



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년07월24일

(11) 등록번호 10-1418369

(24) 등록일자 2014년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) **C07H 21/04** (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2007-7025457
 (22) 출원일자(국제) 2007년05월04일
 심사청구일자 2011년04월05일
 (85) 번역문제출일자 2007년11월01일
 (65) 공개번호 10-2008-0009276
 (43) 공개일자 2008년01월28일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2006/004180
 (87) 국제공개번호 WO 2006/117217
 국제공개일자 2006년11월09일
 (30) 우선권주장
 102005020874.6 2005년05월04일 독일(DE)
 (56) 선행기술조사문헌
 Expert Opinion Ther. Targets. Vol. 7, pages
 299-303 (2003)

(73) 특허권자
 녹손 파르마 아게
 독일 베를린, 디-10589, 막스-도른-스트라세.8-10
 (72) 발명자
 바터 악셀
 독일 베를린 디-13467 힐만스트라세 18비
 매쉬 크리스티안
 독일 베를린 디-13509 에른스트 스트라세 27
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 신동인

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 스피에겔머들의 신규 용도

(57) 요약

본 발명은 세포 내 활성 물질로서의 L-핵산에 대한 용도에 관한 것이다.

(72) 발명자

클루스만 스벤

독일 베를린 디-10709 파울스보르너 스트라세 83

퍼쉬케이 웨르너

독일 베를린 디-13359 위에제네르 스트라세 30

울베르그 디르크

독일 베를린 디-10437 술리만 스트라세 17

야로슈 플로리안

독일 베를린 디-13353 키아우슈 스트라세 1

부크너르 클라우스

독일 베를린 디-14197 아스만샤우서 스트라세 3

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

유효성분으로서 서열번호 9 (NOX-A)의 염기 서열을 포함하는 세포내 목표 분자와 결합하는 HMGA-결합 핵산 스피에켈머 및 전달 운반체 (delivery vehicle)를 함유하는, HMGA가 목표 분자임을 특징으로 하는 종양 질병 (tumour disease)을 치료 또는 예방하기 위한 약학조성물.

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

제 37항에 있어서, 상기 스피에켈머는 1개의 PEG 잔기 (PEG residue)를 운반하는 것임을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

제 37항에 있어서, 상기 종양 질병은 전립선 (prostate), 췌장 (pancreas), 갑상선 (thyroid), 경부 (cervix), 위 (stomach), 유방 (breast), 대장/직장 (colon/rectum), 난소 (ovaries)상의 암종(carcinoma); 신경아세포종 (neuroblastomas); 림프종 (lymphomas), 자궁 평활근종 (uterine leiomyomas); 지방종 (lipomas); 자궁내막 폴립증 (endometrial polyps); 폐의 연골상 과오종 (chondroid hamartomas of the lungs); 타액선의 다형 선종 (pleomorphic adenomas of the salivary glands); 혈관종 (haemangiopericytomas); 연골종 종양 (chondromatous tumours); 침습성 맥관근종 (aggressive angiomyxomas); 분산성 신경아교세포종 (diffuse astrocytomas); 파골세포종 (osteoclastomas); 피부암 (skin cancer); 불키프 림프종 (Burkitt's lymphoma); 루이스 폐암 (Lewis lung cancer); 백혈병 (leukaemia); 비소세포성 폐암 (non-small-cell lung cancer); 및

이들의 전이(metastasis) 및 이들의 전이성 형태 (metastasising forms)를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것임을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 142

제 47항에 있어서, 상기 스피에겔머는 서열번호 22(NOX-A-PEG)의 염기 서열을 포함함을 특징으로 하는 약학조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명의 일 양태는 스피에겔머들 (spiegelmers)의 새로운 용도이다. 본 발명의 또 다른 양태는 HMG 단백질들 (HMG proteins)과 결합하는 스피에겔머들에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 분자 약물요법의 진보에 따라 하나의 질병 또는 질병 단계와 관계되고, 이러한 질병 또는 질환 상태를 치료 또는 예방하기 위해서나 또는 이러한 질병으로 수반되는 증상을 적어도 경감시키는 데에 작용하는 목표 분자 (target molecules)를 동정하는 것이 가능해졌다. 상기 목표 분자들은 주로 두 개의 그룹으로 구분가능하다. 첫 번째 그룹은 세포 외부에 존재하는 목표 분자들은 포함하는 것으로 원칙적으로 목표 분자를 함유하는 체액 또는 체강에 이들을 투여함으로써 활성 물질과의 접촉을 유발할 수 있다. 상기의 목표 분자의 첫 번째 그룹은 본원에서 “세포외 목표 분자 (extracellular target molecules)” 라고도 지칭한다. 목표 분자들의 두 번째 그룹은 세포내에 존재하는 목표 분자를 포함하며, 이 세포들은 치료하여야 하는 질병 또는 이러한 질병으로의 진행경향 (predisposition)과 연관된 세포들이다. 덧붙여, 이러한 목표 분자들은 상기 질병 상태의 직접적인 원인 또는 상기 질병으로의 진행경향과 직접적으로 연관될 필요성은 없다. 반면에, 개개 목표 분자들이 만일 상기 활성 분자들이 어떠한 연쇄 반응 (action cascade), 즉 활성 물질에 의해 영향을 받는 진행과정에 관여한다면, 상기 질병의 치료 또는 예방에 적합한 결과를 초래한다. 본원에서 상기의 목표 분자의 두 번째 그룹은 또한 “세포내 목표 분자 (intracellular target molecule)” 라고도 지칭한다.

[0003] 상기 목표 분자, 즉, 세포외 또는 세포내 목표 분자의 특성은 원칙적으로 치료학적 또는 예방적 작용에 필수적인 활성 분자, 일반적으로 약학 활성 분자 및 목표 분자간의 상호반응에 영향을 미치기 위해 시도 가능한 결합 분류군을 결정한다. 사실상 소위 소분자(small molecules), 즉, 전형적으로 1000 달톤 (dalton) 또는 그 미만의 분자량을 갖는 화학 물질에 해당하는 모든 물질들이 사용가능하다. 이러한 분자들은 바람직하기로는 세포외 목표 분자뿐만 아니라 세포내 목표분자와도 직접적으로 상호작용할 수 있다.

[0004] 이런 배경지식에 반하여, 예를 들어 항체들, 더 상세하게는, 단일클론 항체들, 안티센스 분자들 (antisense molecules), siRNA 분자들 (siRNA molecules), 아타머들 (aptamers) 및 스피에겔머들 (spiegelmers) 등의 신규 활성물질 분류군들이 생명공학 산업에 의해 개발되어 왔다. 몇 종의 이러한 분류군들이 아직 임상 시험의 예비단계에 머물고 있음에도 불구하고, 항체 및 안티센스 분자 제품의 경우에는 이미 임상 적용되고 있는 것도 존재한다. 그러나, 이러한 인자들의 새로운 분류군들은 세포에서 세포내 목표 분자들로 인식되는 심각한 문제들도 존재한다. 따라서, 예를 들어, 항체의 세포내 사용은 현재로서는 항상 가능한 것만은 아니며, 최소한 치료 및/ 또는 예방의 목적으로 사용되는 세포내 목표 분자에 대해 직접적으로 작용하는 항체를 환자에게 정기적인 사용을 하는 방법 또는 양상 또는 사용할 정도는 아니다. 또한, 또 다른 분류군의 활성 분자들, 특히 안티센스 분자들 (antisense molecules) 및 siRNA 분자들은 이들의 작용기전이 목표 분자 또는 상기 목표 분자를 코딩하는 유전자를 함유하는 각 세포 내로 도입되어야 함이 감안되어야만 한다. 현재 임상 적용을 위한 현재의 제한 요소, “운반(delivery)” 으로도 지칭되는 활성물질의 목표된 방출은 또한 이러한 분류군 물질들에도 적용된다.

[0005] 아타머들 (aptamers) 및 스피에겔머들 (spiegelmers), 즉, 개개 목표 분자들과 특이적 상호작용을 허용하는 제

한된 삼차원 구조를 갖는 기능성 핵산에 대해서도 동일하게 적용되어야 함도 사실이다. 세포내 목표 분자를 인지하기 위한 압타머들의 용도는 유전자 기술, 보다 구체적으로는 유전자 치료 법을 활용하는 것이다. “인트라머들 (intramers)” 로도 지칭되는 세포내 목표 분자에 대한 압타머들은 유전 공학 기술 수단에 의하여 개개 목표 세포 내로 주입된다. 그러나 이와 같은 접근법은 적어도 유전 치료법에 기초한 치료적 접근으로의 허용상의 어려움으로 인하여 상당한 제한이 뒤따를 수 있다. 특히, 각 압타머 (aptamer)를 세포내로 코딩 (coding)하는 핵산을 세포내 발현하는 과정에 관련되는 인트라머들의 경우에 적용되는 경로는 스피에겔머들, 즉, L-뉴클레오타이드로 구성되는 압타머들을 합성할 수 있는 생체 시스템 (biological system)이 존재하지 않으므로 원칙적으로는 스피에겔머들로 제한된다.

발명의 상세한 설명

- [0006] 따라서, 본 발명의 목적은 세포내 목표 분자들, 즉 세포내에 존재하는 목표 분자들과 특이적으로 상호작용할 수 있는 분자들의 분류군을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명에 따라, 상기 목적은 수반되는 독립항들의 주제(subject-matter)들에 의해 달성될 수 있다. 바람직한 구현예들은 종속항들에 개시되어 있다.
- [0008] 본 발명에 따라, 상기 기본적인 목적은 상기 독립항들의 주제에 의해 달성될 수 있다. 바람직한 구현예들은 종속항들에 개시되어 있다.
- [0009] 본 발명의 첫 번째 양태로서, 상기 목적은 세포내 활성제 (intracellular active agent)로서의 L-핵산의 용도에 의해 달성이 가능하다.
- [0010] 본 발명의 첫 번째 양태의 첫 번째 구현예로서 상기 L-핵산은 스피에겔머이다.
- [0011] 상기 첫 번째 구현예의 또 다른 구현예인, 본 발명의 첫 번째 양태의 두 번째 구현예로서, 상기 L-핵산은 세포내 수용체(intracellular receptor)와 상호작용하는 것이다.
- [0012] 상기 두 번째 구현예의 또 다른 구현예인, 본 발명의 첫 번째 양태의 세 번째 구현예로서, 상기 세포내 수용체는 분자 수용체 (molecular receptors), 효소 (enzymes), 샤프론 분자 (chaperone molecules), 신호성 펩티드 (signal peptides), 세포 내 구조물(intracellular structures) 및 대사 매개물질들 (metabolic intermediates)을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0013] 상기 두 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 첫 번째 양태의 네 번째 구현예로서, 상기 세포내 수용체는 폴리펩티드(polypeptides), 탄수화물 (carbohydrates), 핵산 (nucleic acids), 지질 (lipids) 및 이들의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0014] 상기 두 번째, 세 번째 및 네 번째 구현예의 구현예이기도 한, 본 발명의 첫 번째 양태의 다섯 번째 구현예로서, 상기 L-핵산은 세포내의 세포내 수용체와 상호작용하는 것이다.
- [0015] 상기 두 번째, 세 번째, 네 번째 및 다섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 첫 번째 양태의 여섯 번째 구현예로서, 상기 세포내 수용체는 전사 인자 (transcription factors) 및 AT 후크 (AT hook)와 결

합하는 DNA-결합 단백질(DNA-binding proteins)을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.

- [0016] 본 발명의 여섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 첫 번째 양태의 일곱 번째 구현예로서, 상기 세포내 수용체는 HMG 단백질, 바람직하게는 HMGA1, HMGA1a, HMGA1b 및 HMGA2을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0017] 본 발명의 두 번째 양태에 따라, 상기 목적은
- [0018] 최소 하나 이상의 세포내 수용체를 함유하는 세포를 제공하는 단계;
- [0019] L-핵산을 제공하는 단계; 및
- [0020] 상기 L-핵산을 상기 세포와 함께 배양하는 단계:
- [0021] 를 포함하는, 세포 내 수용체를 결합하는 방법에 의하여 수득된다.
- [0022] 상기 두 번째 양태의 첫 번째 구현예로서, 상기 배양은 상기 L-핵산이 상기 세포내의 상기 세포내 수용체와 결합할 수 있는 조건하에 수행하는 것이다.
- [0023] 상기 첫 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 두 번째 양태의 두 번째 구현예로서, 상기 L-핵산은 스피에겔머인 것이다.
- [0024] 상기 첫 번째 및 두 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 두 번째 양태의 세 번째 구현예로서, 상기 세포를 상기 L-핵산과 배양한 후에, 상기 세포내 수용체와 결합, 특히 세포내 결합(intracellular binding)이 발생되었는지 여부가 결정되는 것이다.
- [0025] 상기 첫 번째, 두 번째 및 세 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 두 번째 양태의 네 번째 구현예로서, 상기 세포내 수용체는 분자 수용체, 대사 매개물질 및 효소를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0026] 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 및 네 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 상기 두 번째 양태의 다섯 번째 구현예로서, 상기 세포내 수용체는 폴리펩티드, 탄수화물, 핵산, 지질 및 이들의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0027] 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째 및 다섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 상기 두 번째 양태의 여섯 번째 구현예로서, 상기 세포내 수용체는 전사 인자 및 AT 후크와 결합하는 DNA-결합 단백질을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0028] 상기 여섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 상기 두 번째 양태의 일곱 번째 구현예로서, 상기 세포내 수용체는 HMG 단백질, 바람직하게는 HMGA1, HMGA1a, HMGA1b 및 HMGA2을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0029] 본 발명의 세 번째 양태에 따라 상기 약제의 목표 분자가 세포내 목표 물질인 것으로서, 질병의 치료 및/또는 예방을 위한 약제를 생산하기 위한 L-핵산의 용도에 의해 달성가능하다.

- [0030] 본 발명의 세 번째 양태의 첫 번째 구현예로서 상기 세포내 수용체는 분자 수용체, 효소, 샤프론 분자, 신호성 펩티드, 세포내 구조물 및 대사 매개물질을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0031] 상기 첫 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 세 번째 양태의 두 번째 구현예로서, 상기 세포내 수용체는 폴리펩티드, 탄수화물, 핵산, 지질 및 이들의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0032] 상기 첫 번째 및 두 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 세 번째 양태의 세 번째 구현예로서, 상기 목표 분자는 전사 인자 및 AT 후크에 결합하는 DNA-결합 단백질을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0033] 상기 세 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 세 번째 양태의 네 번째 구현예로서, 상기 목표 물질은 HMG 단백질, 바람직하게는 HMGA1, HMGA1a, HMGA1b 및 HMGA2을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0034] 상기 세 번째 및 네 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 세 번째 양태의 다섯 번째 구현예로서, 상기 질병은 종양 질병 (tumour disease), 바이러스 감염 (virus infection) 및 동맥경화증 (arteriosclerosis)을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0035] 상기 다섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 세 번째 양태의 여섯 번째 구현예로서, 상기 종양 질병은 간엽 종양 (mesenchymal tumour), 상피성 종양 (epithelial tumours), 양성 종양 (benign tumours), 악성 종양 (malignant tumours) 및 전이성 종양 (metastasising tumours)을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0036] 상기 세 번째, 네 번째, 다섯 번째 및 여섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 세 번째 양태의 일곱 번째 구현예로서, 상기 목표 분자는 HMGA이며, 상기 질병은 전립선 (prostate), 췌장 (pancreas), 갑상선 (thyroid), 경부 (cervix), 위 (stomach), 유방 (breast), 대장/직장 (colon/rectum), 난소 (ovaries)상의 암종(carcinoma); 신경아세포종 (neuroblastomas); 림프종 (lymphomas), 자궁 평활근종 (uterine leiomyomas); 지방종 (lipomas); 자궁내막 폴립증 (endometrial polyps); 폐의 연골상 과오종 (chondroid hamartomas of the lungs); 타액선의 다형 선종 (pleomorphic adenomas of the salivary glands); 혈관종 (haemangiopericytomas); 연골종 종양 (chondromatous tumours); 침습성 맥관근종 (aggressive angiofibromas); 분산성 신경아교세포종 (diffuse astrocytomas); 골골세포종 (osteoclastomas); 피부암 (skin cancer); 불키프 림프종 (Burkitt's lymphoma); 루이스 폐암 (Lewis lung cancer); 백혈병 (leukaemia); 비소 세포성 폐암 (non-small-cell lung cancer); 및 이들의 전이(metastasis) 및/또는 이들의 전이성 형태 (metastasising forms)를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0037] 상기 다섯 번째의 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 세 번째 양태의 여덟 번째 구현예로서, 상기 동맥경화증은 HMGA1, HMGA1a, HMGA1b 및/또는 HMGA2에 의해 매개되는 동맥경화 죽상 플라크 (plaques)의 형성에 자극되거나 유도되는 것이다.
- [0038] 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째, 다섯 번째, 여섯 번째, 일곱 번째 및 여덟 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 세 번째 양태의 아홉 번째 구현예로서 상기 세포내 목표 분자는 세포내에 존재하는 것이다.

- [0039] 본 발명의 네 번째 양태에 따라, 상기 목적은 진단제(diagnostic agent)의 목표 분자가 세포내 목적 물질인 것으로서, 진단 목적을 위한 진단제의 제조를 위한 L-핵산의 용도에 의해 달성 가능하다.
- [0040] 본 발명의 네 번째 양태의 첫 번째 구현예로서 상기 세포내 수용체는 분자 수용체, 효소, 샤프론 분자, 신호성 펩티드, 세포내 구조물 및 대사 매개물질을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0041] 상기 첫 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 네 번째 양태의 두 번째 구현예로서, 상기 세포내 수용체는 폴리펩티드, 탄수화물, 핵산, 지질 및 이들의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0042] 상기 첫 번째 및 두 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 네 번째 양태의 세 번째 구현예로서 상기 목표 분자는 전사 인자 및 AT 후크 에 결합하는 DNA-결합 단백질을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0043]
- [0044] 상기 세 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 네 번째 양태의 네 번째 구현예로서, 상기 목표 분자는 HMG 단백질, 바람직하게는 HMGA1, HMGA1a, HMGA1b 및 HMGA2을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0045] 상기 세 번째 및 네 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 네 번째 양태의 다섯 번째 구현예로서, 상기 질병은 종양 질병 (tumour disease), 바이러스 감염 (virus infection) 및 동맥경화증 (arteriosclerosis)을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0046] 상기 다섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 네 번째 양태의 여섯 번째 구현예로서, 상기 종양 질병은 간엽 종양 (mesenchymal tumour), 상피성 종양 (epithelial tumours), 양성 종양 (benign tumours), 악성 종양 (malignant tumours) 및 전이성 종양 (metastasising tumours)을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0047] 상기 세 번째, 네 번째, 다섯 번째 및 여섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 네 번째 양태의 일곱 번째 구현예로서, 상기 목표 분자는 HMGA이며, 상기 질병은 전립선 (prostate), 췌장 (pancreas), 갑상선 (thyroid), 경부 (cervix), 위 (stomach), 유방 (breast), 대장/직장 (colon/rectum), 난소 (ovaries)상의 암종(carcinoma); 신경아세포종 (neuroblastomas); 림프종 (lymphomas), 자궁 평활근종 (uterine leiomyomas); 지방종 (lipomas); 자궁내막 폴립증 (endometrial polyps); 폐의 연골상 과오종 (chondroid hamartomas of the lungs); 타액선의 다형 선종 (pleomorphic adenomas of the salivary glands); 혈관종 (haemangiopericytomas); 연골종 종양 (chondromatous tumours); 침습성 맥관근종 (aggressive angiomyxomas); 분산성 신경아교세포종 (diffuse astrocytomas); 과골세포종 (osteoclastomas); 피부암 (skin cancer); 불킵트 림프종 (Burkitt's lymphoma); 루이스 폐암 (Lewis lung cancer); 백혈병 (leukaemia); 비소 세포성 폐암 (non-small-cell lung cancer); 및 이들의 전이(metastasis) 및/ 또는 이들의 전이성 형태 (metastasising forms)를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0048] 상기 다섯 번째의 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 네 번째 양태의 여덟 번째 구현예로서, 상기 동맥경화증은 HMGA1, HMGA1a, HMGA1b 및/ 또는 HMGA2에 의해 매개되는 동맥경화 죽상 플라크 (plaques)의 형성에 자극되거나 유도되는 것이다.

- [0049] 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째, 다섯 번째, 여섯 번째, 일곱 번째 및 여덟 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 네 번째 양태의 아홉 번째 구현예로서, 상기 세포내 목표 분자는 세포 내에 존재하는 것이다.
- [0050] 본 발명의 다섯 번째 양태에 따라, 본 발명의 목적은 세포내 목표 분자와 결합하는 L-핵산 및 전달 운반체 (delivery vehicle)를 포함하는 조성물에 의해 수득가능하다.
- [0051] 본 발명의 다섯 번째 양태의 첫 번째 구현예로서, 상기 전달 운반체는 L-핵산의 세포내 전달에 적절한 전달 운반체인 것이다.
- [0052] 상기 첫 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 다섯 번째 양태의 두 번째 구현예로서, 상기 전달 운반체는 운반체 (vehicle), 접합체 (conjugates) 및 물리적 수단 (physical means)을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0053] 상기 두 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 다섯 번째 양태의 세 번째 구현예로서, 상기 전달 운반체는 운반체 (vehicle)이며, 상기 운반체는 리포솜 (liposomes), 나노입자 (nanoparticles), 미세 입자 (microparticles), 시클로덱스트린 (cyclodextrins) 또는 덴드리머 (dendrimers); 또는 폴리펩티드 (polypeptides), 폴리에틸렌이민 (polyethyleneimine) 및/ 또는 양친화성 분자 (amphipatic molecule)로 구성되는 소낭 (vesicle)을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0054] 상기 두 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 다섯 번째 양태의 네 번째 구현예로서, 상기 전달 운반체는 접합체 (conjugate)이고, 상기 접합체는 수용체-매개성 엔도시토시스 (receptor-mediated endocytosis)를 위한 접합체, 융합 펩티드 (fusogenic peptide)와의 접합체, 신호성 핵산과의 접합체, 핵산과의 접합체, 바람직하게는 스피에겔머 또는 지용성 접합체 (lipophilic conjugate)와의 접합체인 것이다.
- [0055] 상기 두 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 다섯 번째 양태의 다섯 번째 구현예로서, 상기 전달 운반체는 물리적 수단 (physical means)이고 상기 수단 (means)은 바람직하게는, 전기천공법 (electroporation), 전리요법 (iontophoresis), 가압법 (pressure), 초음파법 (ultrasound) 및 충격파법 (shock waves)를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0056] 상기 세 번째 구현예의 또 다른 구현예로서, 본 발명의 다섯 번째 양태의 여섯 번째 구현예로서, 상기 전달 운반체는 폴리에틸렌이민 (polyethyleneimine)을 포함하는 것이다.
- [0057] 상기 여섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 다섯 번째 양태의 일곱 번째 구현예로서, 상기 폴리에틸렌이민은 약 25 kDa의 분자량을 가진 가지상 폴리에틸렌이민인 것이다.
- [0058] 상기 여섯 번째 및 일곱 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 다섯 번째 양태의 여덟 번째 구현예로서, 상기 폴리에틸렌이민은 미립구 (micelle) 또는 미립구-유사 구조물 (micelle-like structure)을 형성하는 것이다.
- [0059] 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째, 다섯 번째, 여섯 번째, 일곱 번째 및 여덟 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 다섯 번째 양태의 아홉 번째 구현예로서, 상기 L-핵산은 스피에겔머인 것

이다.

- [0060] 상기 아홉 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 다섯 번째 양태의 열 번째 구현예로서, 상기 스피에겔머는 PEG 잔기 (PEG residue)를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 변형체 (modification)를 운반하는 것이다.
- [0061] 상기 열 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 다섯 번째 양태의 열한 번째 구현예로서, 상기 PEG 잔기는 약 1,000 내지 10,000 Da의 분자량을 갖고 있으며, 바람직하게는 약 1,500 내지 2,500 Da의 분자량, 및 가장 바람직하게는 약 2,000 Da의 분자량을 갖는 것이다.
- [0062] 상기 열 번째 및 열한 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 다섯 번째 양태의 열두 번째 구현예로서, 상기 변형체는 L-핵산의 5 ‘ 말단 또는 3’ 말단에 결합하는 것이다.
- [0063] 상기 아홉 번째, 열 번째, 열한 번째 및 열두 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 다섯 번째 양태의 열세 번째 구현예로서, 상기 조성물 내의 포함되는 L-핵산의 전체 인산기 (phosphate group) 수에 대한 폴리에틸렌이민의 전체 질소기 (nitrogen group)의 비가 약 1 내지 20, 바람직하게는 약 1.5 내지 10, 더욱 바람직하게는 약 2 내지 5, 및 가장 바람직하게는 약 2 내지 3인 것이다.
- [0064] 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째, 다섯 번째, 여섯 번째, 일곱 번째, 여덟 번째, 아홉 번째, 열 번째, 열한 번째, 열두 번째 및 열세 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 다섯 번째 양태의 열네 번째 구현예로서, 상기 조성물은 세포내로 L-핵산을 제공하는 것이다.
- [0065] 본 발명의 여섯 번째 양태에 따라, 상기 목적은 다섯 번째 양태에 따른 조성물 및 약학적으로 허용되는 담체 (pharmaceutically acceptable carrier)를 포함하는 약학 조성물에 의하여 수득가능하다.
- [0066] 본 발명의 상기 첫 번째 양태에 따른 용도의 구현예로서, 상기 L-핵산은 상기 다섯 번째 양태에 따른 조성물인 것이다.
- [0067] 본 발명의 상기 두 번째 양태에 따른 방법의 구현예로서, 상기 L-핵산은 상기 다섯 번째 양태에 따른 조성물인 것이다.
- [0068] 본 발명의 상기 세 번째 양태에 따른 용도의 구현예로서, 상기 L-핵산은 상기 다섯 번째 양태에 따른 조성물인 것이다.
- [0069]
- [0070] 본 발명의 상기 네 번째 양태에 따른 용도의 구현예로서, 상기 L-핵산은 상기 다섯 번째 양태에 따른 조성물인 것이다.
- [0071] 본 발명의 일곱 번째 양태에 따라, 상기 목적은 핵산이 Box A1 및 Box A2 구역 (section)을 포함하고, 상기 Box A1 및 Box A2 구역이 중간 매개 구역 (intermediate section)에 의해 상호 연결되고, 상기 Box A1 및 Box A2 , 상기 Box A1 및 Box A2는 개개 상호 개별적 및 독립적으로 GGGCG, GGGUG 및 GGGAG을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것임을 특징으로 HMGA-결합 핵산에 의하여 달성 가능하다.

- [0072] 상기 일곱 번째 양태의 첫 번째 구현예로서, 상기 중간 매개 구역은 6 개 또는 7 개의 뉴클레오타이드를 포함하고 있는 중간 매개 구역 Z1 (intermediate section Z1) 또는 12 개 내지 25 개의 뉴클레오타이드를 포함하고 있는 중간 매개 구역 Z2 (intermediate section Z2) 중 하나로 구성되는 것이다.
- [0073] 상기 첫 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 두 번째 구현예로서, 상기 핵산은 Box A1 구역의 5' 말단에 첫 번째 구역을, Box A2 구역의 3' 말단에는 두 번째 구역을 포함하고, 바람직하게는 상기 양 구역은 상호 독립적으로 4 개 내지 8 개 뉴클레오타이드를 포함하는 것이다.
- [0074] 상기 두 번째 구현예의 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 세 번째 구현예로서, 양 구역은 최소한 부분적 또는 전체적으로 상호 잡종화되며, 상기 잡종화는 4 개 내지 8 개 이상의 뉴클레오타이드 쌍으로 연장되는 것이다.
- [0075]
- [0076] 상기 두 번째 및 세 번째 구현예의 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 네 번째 구현예로서, 상기 핵산은 Box A1 구역의 5' 말단에 Helix A1 구역, 및 Box A2 구역의 3' 말단에는 Helix A2 구역을 포함하고, 바람직하게는 상기 Helix A1 구역은 4 개 내지 8 개의 뉴클레오타이드를 포함하고, 바람직하게는 상기 Helix A2 구역은 4 개 내지 8 개의 뉴클레오타이드를 포함하고, 바람직하게는, 상기 Helix A1 구역은 상기 Box A1 구역의 5' 말단에 위치한 첫 번째 구역 또는 그 일부를 형성하고, 바람직하게는, 상기 Helix A2 구역은 Box A2 구역의 3' 말단의 두 번째 구역 또는 그 일부를 형성하며, 상기 Helix A1 구역의 길이는 상기 Helix A2 구역의 길이와는 독립적인 것이다.
- [0077] 상기 네 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 다섯 번째 구현예로서, 상기 Helix A1 및 Helix A2 구역은 최소한 부분적 또는 전체적으로 상호 잡종화되고, 상기 잡종화는 4 개 내지 8 개 이상의 뉴클레오타이드 쌍으로 연장되는 것이다.
- [0078] 상기 네 번째 및 다섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 여섯 번째 구현예로서, 상기 Helix B1 구역이 상기 Helix A1 구역의 3' 말단 및 Box A1 구역의 5' 말단의 사이에 위치하고, 상기 Helix B2 구역은 상기 Box A2 구역의 3' 말단 및 상기 Helix A2 구역의 5' 말단의 사이에 위치하며, 바람직하게는, 상기 Helix B1 및 Helix B2 구역의 길이는 개개 독립적 및 개별적으로 4 개 내지 8 개의 뉴클레오타이드 길이를 포함하는 것이다.
- [0079] 상기 여섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 일곱 번째 구현예로서, 상기 Helix B1 또는 Helix B2 구역은 최소한 부분적 또는 전체적으로 상호 잡종화되며, 상기 잡종화는 4 개 내지 8 개 이상의 뉴클레오타이드 쌍으로 연장되는 것이다.
- [0080] 상기 여섯 번째 및 일곱 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 여덟 번째 구현예로서, 0 개 내지 5 개의 뉴클레오타이드가 Helix A1 구역의 3' 말단 및 Helix B1 구역의 5' 말단 사이에 배열되는 것이다.
- [0081] 상기 여덟 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 아홉 번째 구현예로서, 2 개의 뉴클레오타이드가 Helix A1 구역의 3' 말단과 Helix B1 구역의 5' 말단 사이에 배열되는 것이다.

- [0082] 상기 여섯 번째, 일곱 번째, 여덟 번째 및 아홉 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 열 번째 구현예로서, 0 개 내지 6 개의 뉴클레오티드가 Helix B2 구역의 3' 말단 및 Helix A2 구역의 5' 말단 사이에 배열되는 것이다.
- [0083] 상기 열 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 열한 번째 구현예로서, 바람직하게는 이제까지의 상기 아홉 번째 구현예로서, 하나의 뉴클레오티드가 상기 Helix B2 구역의 3' 말단 및 Helix A2 구간의 5' 말단의 사이에 배열되는 것이다.
- [0084] 상기 여섯 번째, 일곱 번째, 여덟 번째, 아홉 번째, 열 번째 및 열한 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 열두 번째 구현예로서, 상기 Helix A1 구역 및 Helix B2 구역의 뉴클레오티드의 합이 10개 내지 12개의 뉴클레오티드이며, 상기 Helix A2 구역 및 Helix B2 구역의 뉴클레오티드의 합이 10 개 내지 12 개의 뉴클레오티드인 것이다.
- [0085] 상기 열두 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 열세 번째 구현예로서, 상기 Helix A1 구역과 Helix A2 구역간의 잡종화 및 상기 Helix B1 구역과 Helix B2 구역간의 잡종화를 인한 잡종화된 뉴클레오티드의 합계가 10개 내지 12개의 뉴클레오티드 쌍인 것이다.
- [0086] 상기 여섯 번째, 일곱 번째, 여덟 번째, 아홉 번째, 열 번째, 열한 번째, 열두 번째 및 열세 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 열네 번째 구현예로서, 상기 핵산은 Helix A1 구역 및 Helix A2 구역을 포함하지 않으며, 상기 Helix B1 구역은 핵산의 5' 말단에 위치하며, 상기 Helix B2 구역은 3' 말단에 위치하며, 바람직하게는, 상기 Helix B1 구역 및 Helix B2 구역의 길이는 개개 독립적 및 개별적으로 4 개 내지 8 개의 뉴클레오티드 길이를 포함하는 것이다.
- [0087] 상기 열네 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 열다섯 번째 구현예로서, 상기 Helix B1 구역 및 Helix B2 구역은 최소한 부분적 또는 전체적으로 상호 잡종화되며, 상기 잡종화는 4 개 내지 8 개 이상의 뉴클레오티드 쌍으로 연장되는 것이다.
- [0088] 상기 네 번째 및 다섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 열여섯 번째 구현예로서, 1 개 내지 5 개의 뉴클레오티드가 Helix A1 구역의 3' 말단 및 Box A1 구역의 5' 말단의 사이에 배열되고, 1개 내지 3개의 뉴클레오티드는 상기 Box A2 구역의 3' 말단 및 Helix A2 구역의 5' 말단 사이에 배열되는 것이다.
- [0089] 상기 여섯 번째, 일곱 번째, 여덟 번째, 아홉 번째, 열 번째, 열한 번째, 열두 번째, 열세 번째, 열네 번째 및 열다섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 열일곱 번째 구현예로서, 2개의 뉴클레오티드가 상기 Helix B1 구역의 3' 말단과 Box A1 구역의 5' 말단의 사이에 배열되며, 1 개 내지 7 개의 뉴클레오티드가 상기 Box A2 구역의 3' 말단과 Helix B2 구역의 5' 말단의 사이에 배열되는 것이다.
- [0090] 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째, 다섯 번째, 여섯 번째, 일곱 번째, 여덟 번째 및 열 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 열여덟 번째 구현예로서, 이제까지의 열두 번째 및 열세 번째 구현예의 여섯 번째, 일곱 번째, 및 여덟 번째 구현예의 구현예이며, 이제까지의 열네 번째 및 열다섯 번째 구현예의 여섯 번째, 일곱 번째, 여덟 번째 및 열 번째의 구현예들이며, 이제까지의 이들은 여섯 번째, 일곱 번째, 여덟 번째, 열 번째, 열두 번째 및 열세 번째 구현예의 또는 열일곱 번째 구현예의 구현예들이며, 이제까지의 여섯 번째, 여덟 번째, 열 번째, 열두 번째, 열세 번째 및 열다섯 번째 구현예의 구현예들이며, 본원에서의 개개 경우에 제한된 범위에서, 상기 중간 매개 구역 Z1 (intermediate section Z1)은 6 개 또는

7 개의 뉴클레오티드를 포함하는 것이다.

[0091] 상기 열여덟 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 열아홉 번째 구현예로서, 상기 중간 매개 구역 Z1 (intermediate section Z1)은 서열 $N_1N_2GN_3N_4N_5$ 을 포함하며, 상기에서

[0092] $N_1=U, C, A$ 또는 G ;

[0093] $N_2=G$ 또는 U ;

[0094] $N_3=U$ 또는 C ;

[0095] $N_4=U$ 또는 A ;

[0096] $N_5=G$ 또는 A ; 및

[0097] $N_8=U$ 또는 부재인 것이다.

[0098] 상기 열아홉 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 스무 번째 구현예로서, 상기 핵산은 Box A1 구역 및 Box A2 구역을 포함하며, 상기 Box A1 구역의 3' 말단이 중간 매개 구역 Z2 (intermediate section Z2)의 5' 말단과 직접적으로 연결되어 있으며, 상기 중간 매개 구역 Z1 (intermediate section Z1)의 3' 말단이 Box A2 구역의 5' 말단과 직접적으로 연결되는 것이다.

[0099] 상기 열여덟 번째, 열아홉 번째 및 스무 번째의 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 스물한 번째 구현예로서, 상기 스무 번째 구현예의 상세한 예로서, 상기 핵산은 Helix B1 구역 및 Helix B2 구역을 포함하는 것이다.

[0100] 상기 스물한 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 스물두 번째 구현예로서, 상기 Helix B1 구역 및 Helix B2 구역은 상호 개개 독립적 및 개별적으로, 바람직하게는 상호 전체적 또는 부분적으로 잡종화된 4 개 내지 8 개의 뉴클레오티드를 포함하는 것이다.

[0101] 상기 스물한 번째 및 스물두 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 스물세 번째 구현예로서, 2 개의 뉴클레오티드 N_6, N_7 가 상기 Helix B1 구역의 3' 말단과 Box A1 구역의 5' 말단의 사이에 5' 에서 3' 의 방향으로 배열되어 있으며, 상기 N_6 은 G, A 또는 U , 및 N_7 은 G 또는 U 인 것이다.

[0102] 상기 스물한 번째, 스물두 번째 및 스물세 번째의 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 스물네 번째 구현예로서, 상기 Box A2 구역의 3' 말단 및 상기 Helix B2 구역의 5' 말단 사이에는 뉴클레오티드가 없거나, 또는 뉴클레오티드 서열 GN_y 은 5' 에서 3' 방향으로 배열되어 있으며, 상기 N_y 은 0 개 내지 6 개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 0 개 또는 6 개의 뉴클레오티드를 포함하는 것이다.

[0103] 상기 열여덟 번째, 열아홉 번째, 스무 번째, 스물한 번째, 스물두 번째, 스물세 번째 및 스물네 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 스물다섯 번째 구현예로서, 상기 핵산은 Helix A1 구역 및 Helix A2 구역을 포함하는 것이다.

[0104] 상기 스물다섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 스물여섯 번째 구현예로서, 상기 Helix A1 구역 및 Helix A2 구역은 개개 상호 개별적 및 독립적으로 4 개 내지 8 개의 뉴클레오

티드를 포함하며, 바람직하게는 상기 Helix A1 구역 및 Helix A2 구역은 전체적 또는 부분적으로 상호 잡종화된 것이다.

[0105] 상기 스물다섯 번째 및 스물여섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 스물일곱 번째 구현예로서, 뉴클레오티드 서열 Nx은 Helix A1 구역의 3' 말단 및 Helix B1 구역의 5' 말단의 사이에 배열하고 있으며, 상기 Nx은 0 개 내지 5 개의 뉴클레오티드를 포함하는 것이다.

[0106] 상기 스물다섯 번째, 스물여섯 번째 및 스물일곱 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 스물여덟 번째 구현예로서, 뉴클레오티드 서열 Nz는 Helix B2 구역의 3' 말단과 Helix A2 구역의 5' 말단의 사이에 배열하고 있으며, 상기 Nz는 0 개 내지 6 개의 뉴클레오티드를 포함하는 것이다.

[0107] 상기 스물한 번째, 스물두 번째, 스물세 번째, 스물네 번째, 스물다섯 번째, 스물여섯 번째, 스물일곱 번째 및 스물여덟 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 스물아홉 번째 구현예로서, 상기 Helix A1 구역 및 Helix A2 구역의 잡종화된 뉴클레오티드 숫자 및 상기 Helix B1 구역 및 Helix B2 구역의 잡종화된 뉴클레오티드의 숫자의 총합계가 10 개 내지 12 개의 뉴클레오티드 쌍인 것이다.

[0108] 상기 스물네 번째, 스물다섯 번째, 스물여섯 번째, 스물일곱 번째, 스물여덟 번째 및 스물아홉 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 열세 번째 구현예로서, 뉴클레오티드 서열 G_{Ny}은 Box A2 구역의 3' 말단과 Helix B2 구역의 5' 말단 사이에 5' 에서 3' 방향으로 배열하고 있으며, 상기 Ny은 0 개 내지 6개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 0개 또는 6개의 뉴클레오티드를 포함하는 것이다.

[0109] 상기 열세 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 서른한 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 하기 구조를 포함하며;

[0110] Helix A1 - N_x - **Helix B1** - N₆N₇ **Box A1** N₁N₂GN₈N₃N₄N₅ **Box A2** G - N_y - **Helix B2** N_z - Helix A2

[0111] 상기에서

[0112] N₁ = U, C, A 또는 G;

[0113] N₂ = G 또는 U;

[0114] N₃ = U 또는 C;

[0115] N₄ = U 또는 A;

[0116] N₅ = G 또는 A;

[0117] N₆ = G, A 또는 U;

[0118] N₇ = G 또는 U;

[0119] N₈ = U 또는 0개의 뉴클레오티드;

[0120] N_x = 0 개 내지 5 개의 뉴클레오티드;

[0121] N_y = 0 개 또는 6 개의 뉴클레오티드; 및

- [0122] $N_z = 0$ 개 내지 6 개의 뉴클레오티드;
- [0123] 상기 Box A1 구역 및 Box A2 구역은 개개 상호간에 개별적 및 독립적으로 GGGCG, GGGUG 및 GGGAG을 포함하는 뉴클레오티드 서열의 그룹으로부터 선택되는 것이며;
- [0124] 상기 Helix A1 및 Helix A2 구역은 개개 상호간에 개별적 및 독립적으로 4개 내지 8개의 뉴클레오티드를 포함하며, 바람직하게 상기 Helix A1 및 Helix A2 구역은 전체적 또는 부분적으로 상호간에 잡종화되는 것, 및;
- [0125] 상기 Helix B1 및 Helix B2 구역은 개개 상호간에 개별적 및 독립적으로 4개 내지 8개의 뉴클레오티드를 포함하며, 바람직하게 상기 Helix B1 및 Helix B2 구역은 전체적 또는 부분적으로 상호간에 잡종화되어 있으며, 상기 잡종화된 구역은 4개 내지 8개의 뉴클레오티드를 포함하고 있으며, 상기 Helix A1 구역과 Helix A2 구역간의 잡종화된 뉴클레오티드의 수 및 상기 Helix B1 구역과 Helix B2 구역간의 잡종화된 뉴클레오티드의 수의 합계는 10개 내지 12개의 뉴클레오티드 쌍이다.
- [0126] 상기 서른 번째 및 서른한 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 서른 두 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 서열 번호(SEQ. ID. No.) 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 서열 번호 7 및 서열 번호 13을 포함하는 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하는 것이다.
- [0127] 상기 스물네 번째, 스물다섯 번째, 스물여섯 번째, 스물일곱 번째, 스물여덟 번째 및 스물아홉 번째의 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 서른세 번째 구현예로서, 상기 Box A2 구역의 3' 말단은 Helix B2 구역의 5' 말단에 직접적으로 연결된 것이다.
- [0128] 상기 서른세 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 서른네 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 하기 구조를 갖는 것이다:
- [0129] Helix A1 - N_x - **Helix B1** - N_6N_7 **Box A1** $N_1N_2GN_8N_3N_4N_5$ **Box A2** **Helix B2** - N_z - Helix A2
- [0130] 상기에서
- [0131] $N_1 = U, C, A$ 또는 G ;
- [0132] $N_2 = G$ 또는 U ;
- [0133] $N_3 = U$ 또는 C ;
- [0134] $N_4 = U$ 또는 A ;
- [0135] $N_5 = G$ 또는 A ;
- [0136] $N_6 = G, A$ 또는 U ;
- [0137] $N_7 = G$ 또는 U ;
- [0138] $N_8 = U$ 또는 0개의 뉴클레오티드;

- [0139] $N_x = 0$ 개 내지 5개의 뉴클레오티드;
- [0140] $N_y = 0$ 개 또는 6개의 뉴클레오티드; 및
- [0141] $N_z = 0$ 개 내지 6개의 뉴클레오티드;
- [0142] 상기 Box A1 구역 및 Box A2 구역은 개개 상호간에 개별적 및 독립적으로 GGGCG, GGGUG 및 GGGAG을 포함하는 뉴클레오티드 서열의 그룹으로부터 선택되는 것이며;
- [0143] 상기 Helix A1 구역 및 Helix A2 구역은 개개 상호간에 개별적 및 독립적으로 4개 내지 8개의 뉴클레오티드를 포함하고 있으며, 바람직하게는 상기 Helix A1 및 Helix A2 구역은 전체적 또는 부분적으로 상호간에 잡종화되어 있으며; 및
- [0144] 상기 Helix B1 및 Helix B2 구역은 개개 상호간에 개별적 및 독립적으로 4개 내지 8개의 뉴클레오티드를 포함하고 있으며, 바람직하게는 상기 Helix B1 및 Helix B2 구역은 전체적 또는 부분적으로 상호간에 잡종화되어 있으며, 상기의 잡종화된 구역은 4개 내지 8개의 뉴클레오티드를 포함하고 있으며, 및 상기 Helix A1 구역과 Helix A2 구역간의 잡종화된 뉴클레오티드 수 및 상기 Helix B1 구역과 Helix B2 구역간의 잡종화된 뉴클레오티드 수의 합계는 10개 내지 12개의 뉴클레오티드 쌍인 것이다.
- [0145] 상기 서른세 번째 및 서른네 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 서른다섯 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 서열번호 3을 포함한 서열을 포함하고 있는 것이다.
- [0146] 상기 서른한 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 서른여섯 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 하기 구조를 포함 한다:
- [0147] **Helix B1** - N_6N_7 **Box A1** $N_1N_2GN_8N_3N_4N_5$ **Box A2**G - N_y - **Helix B2**
- [0148] 상기 서른네 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 서른일곱 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 하기 구조를 포함하는 것이다:
- [0149] **Helix B1** - N_6N_7 **Box A1** $N_1N_2GN_8N_3N_4N_5$ **Box A2** **Helix B2**
- [0150] 상기 서른여섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 서른여덟 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 서열번호 15 및 서열번호 16을 포함한 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하고 있는 것이다.
- [0151] 상기 일곱 번째 양태의 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째, 다섯 번째, 여섯 번째, 일곱 번째, 여덟 번째, 아홉 번째, 열 번째, 열한 번째, 열두 번째, 열세 번째 및 열여섯 번째 또는 열일곱 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 서른아홉 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 12개 내지 25개의 뉴클레오티드를 포함하는 중간 매개 구역 Z_2 (intermediate section Z_2)를 포함하는 것이다.
- [0152] 상기 서른아홉 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 마흔 번째 구현예

로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 중간 매개 구역 Z2 (intermediate section Z2), Helix C1 구역 및 Helix C2 구역을 포함하는 것이다.

[0153] 상기 마흔 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 마흔한 번째 구현예로서, 상기 중앙 구역 Nc (central section Nc)는 상기 HMGA-결합 핵산의 상기 Helix C1 구역 및 Helix C2 구역 사이에 배열하는 것이다.

[0154] 상기 마흔 번째 또는 마흔한 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 마흔두 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산의 Helix C1 구역 및 Helix C2 구역의 길이는 동일한 것이다.

[0155] 상기 마흔 번째, 마흔한 번째 및 마흔두 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 마흔세 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산의 Helix C1 구역 및 Helix C2 구역의 길이는 개개 개별적 및 독립적으로 3 개 내지 6 개의 뉴클레오티드인 것이다.

[0156] 상기 마흔 번째, 마흔한 번째, 마흔두 번째 및 마흔세 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 마흔네 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산의 Helix C1 구역 및 Helix C2 구역은 전체적 또는 부분적으로 상호간의 잡종화된 것이다.

[0157] 상기 서른아홉 번째, 마흔 번째, 마흔한 번째, 마흔두 번째, 마흔세 번째 및 마흔네 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 마흔다섯 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산의 중앙 구역 Nc (central section Nc)는 3 개 내지 5 개의 뉴클레오티드를 포함하는 것이다.

[0158] 상기 서른아홉 번째, 마흔 번째, 마흔한 번째, 마흔두 번째, 마흔세 번째, 마흔네 번째 및 마흔다섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 마흔여섯 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 상기 Box A1 구역 및 Box A2 구역을 포함하고 있으며, 상기에서 뉴클레오티드 서열 Nb는 Box A1 구역의 3' 말단 및 Helix C1 구역의 5' 말단 사이에 배열하며 3 개의 뉴클레오티드를 포함하는 것이다.

[0159] 상기 서른아홉 번째, 마흔 번째, 마흔한 번째, 마흔두 번째, 마흔세 번째, 마흔네 번째, 마흔다섯 번째 및 마흔여섯 번째의 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 일곱 번째 양태의 마흔일곱 번째 구현예에서, 상기 HMGA-결합 핵산은 Box A1 구역 및 Box A2 구역을 포함하고 있으며, 상기에서 염기 서열 Nd는 Helix C2 구역의 3' 말단 및 Box A2 구역의 5' 말단에 배열하고 있으며, 2 개 내지 5 개의 뉴클레오티드를 포함하는 것이다.

[0160] 상기 서른아홉 번째, 마흔 번째, 마흔한 번째, 마흔두 번째, 마흔세 번째, 마흔네 번째, 마흔다섯 번째, 마흔여섯 번째 및 마흔일곱 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 마흔여덟 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 상기 Helix A1 구역 및 Helix A2 구역을 포함하는 것이다.

[0161] 상기 마흔여덟 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 마흔아홉 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산의 Helix A1 및 Helix A2 구역들은 개개 상호간 개별적 및 독립적으로 5 개 내지 6 개의 뉴클레오티드를 포함하며, 여기에서 바람직하게 Helix A1 구간 및 Helix A2 구역은 상호간에 전체적 또는 부분적으로 잡종화되어 있는 것이다.

[0162] 상기 마흔여덟 번째 및 마흔아홉 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의

열다섯 번째 구현예로서, 뉴클레오타이드 서열 Na는 HMGA-결합 핵산의 Helix A1 구역의 3' 말단 및 Box A1 구역의 5' 말단의 사이에 배열하고 있으며, 여기에서 Na는 1 개 내지 5 개의 뉴클레오타이드를 포함하는 것이다.

[0163] 상기 마흔여덟 번째, 마흔아홉 번째 및 쉰 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 쉰 번째 구현예로서, 뉴클레오타이드 서열 GNe은 상기 HMGA-결합 핵산의 Box A2 구역의 3' 말단 및 Helix A2 구역의 5' 말단 사이에 5' 에서 3' 의 방향으로 배열하고 있으며, 여기에서 Ne는 1 개 내지 2 개의 뉴클레오타이드를, 바람직하게는 A 또는 UU를 포함하는 것이다.

[0164] 상기 마흔여덟 번째, 마흔아홉 번째, 쉰 번째 및 쉰한 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 쉰 두 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산의 Helix C1 구역 및 Helix C2 구역은 개개 상호간에 개별적 및 독립적으로 5 개 또는 6 개의 뉴클레오타이드의 길이를 가지고 있으며, 여기에서 바람직하게는 Helix C1 및 Helix C2 구역들은 상호간에 전체적 또는 부분적으로 잡종화 되어 있는 것이다.

[0165] 상기 쉰 두 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 쉰 세 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 하기 구조식 (III)을 갖는 것이다:

[0166] Helix A1- Na - Box A1 - Nb - Helix C1 - Nc - Helix C2 - Nd - Box A2 - G - Ne Helix A2 (III)

[0167] 상기에서

[0168] Na = 1개 내지 5개의 뉴클레오타이드;

[0169] Nb = 3개의 뉴클레오타이드;

[0170] Nc = 3개 내지 5개의 뉴클레오타이드;

[0171] Nd = 2개 내지 5개의 뉴클레오타이드; 및

[0172] Ne = 1개 내지 2개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 A 또는 UU이며;

[0173] 상기 Box A1 구역 및 Box A2 구역은 개개 상호간에 개별적 및 독립적으로 GGGCG, GGGUG 및 GGGAG을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이며;

[0174] 상기 Helix A1 및 Helix A2 구역들은 개개 상호간에 개별적 및 독립적으로 5 개 내지 6 개의 뉴클레오타이드를 포함하고 있으며; 및

[0175] 상기 Helix C1 및 Helix C2 구역들은 개개, 바람직하게는 상호 전체적으로 또는 부분적으로 잡종화된, 5 개 또는 6 개의 뉴클레오타이드를 포함하는 것이다.

[0176] 상기 쉰 세 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 쉰 네 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 14, 서열번호 22 및 서열번호 24을 포함하는 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하는 것이다.

[0177] 상기 서른아홉 번째, 마흔 번째, 마흔한 번째, 마흔두 번째, 마흔세 번째 및 마흔네 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 쉰다섯 번째 구현예로서, 상기 핵산은 HMGA-결합 핵산의

Box A1 구역 및 Helix C1 구역을 포함하고 있으며, 상기 뉴클레오티드 A는 상기 Box A1 구역의 3' 말단 및 Helix C1 구역의 5' 말단 사이에 배열된 것이다.

[0178] 상기 원다섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 원여섯 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 Helix C2 구역 및 Box A2 구역을 포함하고 있으며, 여기에서 뉴클레오티드 G는 Helix C2 구역의 3' 말단 및 Box A2 구역의 5' 말단의 사이에 배열된 것이다.

[0179] 상기 원다섯 번째 또는 원여섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 원일곱 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산의 중앙 구역 Nc는 4 개의 뉴클레오티드를 포함하고 있으며, 여기에서 Nc는 바람직하게는 GAUG인 것이다.

[0180] 상기 원다섯 번째, 원여섯 번째 및 원일곱 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 원여덟 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 상기 Helix B1 구역 및 Helix B2 구역을 포함하는 것이다.

[0181] 상기 원여덟 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 원아홉 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산의 Helix B1 및 Helix B2 구역은 개개 상호 개별적 및 독립적으로 5 개의 뉴클레오티드를 포함하며, 여기에서 바람직하게는 Helix B1 구간은 Helix B2 구간과 잡종화된 것이다.

[0182] 상기 원여덟 번째 또는 원아홉 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 예순 번째 구현예로서, 2 개의 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열 Nj는 HMGA-결합 핵산의 Helix B1 구역의 3' 말단과 Box A1 구역의 5' 말단 사이에 배열되어 있으며, 여기에서 Nj는 바람직하게는 AG인 것이다.

[0183] 상기 원여덟 번째, 원아홉 번째 및 예순 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 예순한 번째 구현예로서, 뉴클레오티드 G는 상기 HMGA-결합 핵산의 상기 Box A2 구역의 3' 말단 및 Helix B2 구역의 5' 말단 사이에 배열되어 있는 것이다.

[0184] 상기 원다섯 번째, 원여섯 번째, 원일곱 번째, 원여덟 번째, 원아홉 번째, 예순 번째 및 예순첫 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 예순두 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 Helix A1 및 Helix A2 구역들을 포함하고 있는 것이다.

[0185] 상기 예순두 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 예순세 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산의 상기 Helix A1 및 Helix A2 구역들은 개개 상호간에 개별적 및 독립적으로 6 개의 뉴클레오티드를 포함하며, 바람직하게는 상기 Helix A1 구역 및 Helix A2 구역은 상호 잡종화되어 있는 것이다.

[0186] 상기 예순두 번째 및 예순세 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 예순네 번째 구현예로서, 2 개의 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열 Ni는 상기 Helix A1 구역의 3' 말단 및 Helix B1 구역의 5' 말단의 사이에 배열하고 있으며, 여기에서 Ni는 바람직하게 CA인 것이다.

[0187] 상기 예순두 번째, 예순세 번째 및 예순네 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태에서 예순다섯 번째 구현예로서, 뉴클레오티드 A가 상기 Helix B2 구역의 3' 말단 및 Helix A2 구역의 5' 말단 사이에 배열하는 것이다.

- [0188] 상기 원다섯 번째 내지 예순다섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 예순여섯 번째 구현예로서, 상기 Helix C1 및 Helix C2 구역들은 개개 3 개의 뉴클레오티드를 포함하며, 상기에서 바람직하게는 Helix C1 및 Helix C2 구역들은 개개 상호간에 잡종화되어 있는 것이다.
- [0189] 상기 예순여섯 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본원 발명의 일곱 번째 양태의 예순일곱 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 하기 구조를 갖는 것이다:
- [0190] Helix A1 - Ni - **Helix B1** - Nj - **Box A1** - A - **Helix C1** - Nc - **Helix C2** - G - **Box A2** - G - **Helix B2** - A - Helix A2
- [0191] 상기에서
- [0192] Ni = 2개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 CA;
- [0193] Nj = 2개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 AG;
- [0194] Nc = 4개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 GAUG이며;
- [0195] 상기 Box A1 및 Box A2 구역들은 개개 상호간에 개별적 및 독립적으로 서열 GGGCG, GGGUG 및 GGGAG을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이며;
- [0196] 상기 Helix A1 및 Helix A2 구역들은 개개 개별적 및 독립적으로 바람직하게는, 상호간에 잡종화된 6 개의 뉴클레오티드를 포함하는 것이며;
- [0197] 상기 Helix B1 및 Helix B2 구역들은 개개 개별적 및 독립적으로 5 개의 뉴클레오티드를 포함하고 있으며, 여기에서 바람직하게는, 상기 Helix B1 구역 및 Helix B2 구역은 상호간에 잡종화되어 있으며, 및
- [0198] 상기 Helix C1 및 Helix C2 구역은 개개 개별적 및 독립적으로 3 개의 뉴클레오티드를 포함하며, 여기에서 바람직하게는, 상기 Helix C1 및 Helix C2 구역들은 상호간에 잡종화되어 있는 것이다.
- [0199] 상기 예순일곱 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 예순여덟 번째 구현예로서, 상기 HMGA-결합 핵산은 서열 번호 12를 포함하는 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하는 것이다.
- [0200] 상기 두 번째 내지 예순일곱 번째 구현예의 또 다른 구현예이기도 한, 본 발명의 일곱 번째 양태의 예순아홉 번째 구현예로서, 상기 핵산은 전사 인자, 특히 AT 후크를 포함하는 전사인자와 결합하는 것이다.
- [0201] 본 발명에 따라, 여덟 번째 양태에서의 상기 목적은 AT 후크를 포함하는 전사 인자들과 결합하는 핵산에 의해 달성될 수 있으며, 여기에서 상기 핵산은 상기 일곱 번째 양태에 따른 구조를 갖는 것이다.
- [0202] 상기 여섯 번째 양태에 따른 조성물의 구현예로서, 상기 L-핵산은 상기 일곱 번째 양태에 따른 핵산인 것이다.

- [0203] 상기 첫 번째 양태에 따른 용도의 구현예로서, 상기 L-핵산은 상기 일곱 번째 양태에 따른 핵산인 것이다.
- [0204] 상기 두 번째 양태에 따른 방법의 구현예로서, 상기 L-핵산은 상기 일곱 번째 양태에 따른 핵산인 것이다.
- [0205] 상기 세 번째 양태에 따른 용도의 구현예로서, 상기 L-핵산은 상기 일곱 번째 양태에 따른 핵산인 것이다.
- [0206] 상기 네 번째 양태에 따르는 방법의 구현예로서, 상기 L-핵산은 일곱 번째 양태에 따른 핵산인 것이다.
- [0207] 본 발명에 따라, 아홉 번째 양태에서의 상기 목적은 하기의 단계를 포함하는 HMGA 길항제 (antagonist) 또는 HMGA 효현제 (agonist)를 스크리닝 (screening)하는 방법에 의해 달성가능하다:
- [0208] -후보 HMGA 길항제 (candidate HMGA antagonist) 및/ 또는 후보 HMGA 효현제 (candidate HMGA agonist)를 제공하는 단계;
- [0209] -상기 일곱 번째 양태에 따른 핵산을 제공하는 단계;
- [0210] -HMGA 길항제 및/ 또는 HMGA 효현제 존재하에 신호를 전달하는 시험 시스템 (test system)을 제공하는 단계;
- [0211] -상기 후보 HMGA 길항제가 HMGA 길항제인지 여부 및/ 또는 상기 후보 HMGA 효현제가 HMGA 효현제인지 여부를 결정하는 단계.
- [0212] 본 발명에 따라, 열 번째 양태에서의 상기 목적은 하기 단계를 포함하는 HMGA 길항제 (HMGA antagonist) 또는 HMGA 효현제 (HMGA agonist)를 스크리닝 (screening)하는 방법에 의해 달성 가능하다:
- [0213] -하나의 상 (phase), 바람직하게는 고체상 (solid phase)에 고정화된 HMGA를 제공하는 단계;
- [0214] -상기 일곱 번째 양태에 따른 핵산, 바람직하게는 표지된 일곱 번째 양태에 따른 핵산을 제공하는 단계;
- [0215] -후보 HMGA 길항제 및/또는 후보 HMGA 효현제를 첨가하는 단계; 및
- [0216] -상기 후보 HMGA 길항제가 HMGA 길항제인지 여부 및/또는 상기 후보 HMGA 효현제가 HMGA 효현제인지 여부를 결정하는 단계.
- [0217] 상기 열 번째 양태의 구현예로서, 상기 결정은 핵산이 후보 HMGA 효현제 또는 후보 HMGA 길항제에 의해 치환되는지 여부를 시험함으로써 수행되는 것도 본 발명의 범주 내이다.
- [0218] 본 발명에 따라, 열한 번째 양태에서의 상기 목적은 상기 일곱 번째 양태에 따른 핵산을 포함하는 HMGA 을 탐지하기 위한 키트 (kit)에 의해 달성되는 것이다.
- [0219] 본 발명에 따르면, 열두 번째 양태에서의 상기 목적은 상기 열 번째 양태에 따르는 방법에 의해 수득 가능한 HMGA 길항제에 의해 달성되는 것이다.

[0220] 본 발명에 따르면, 열세 번째 양태에서의 상기 목적은 상기 열 번째 양태에 따르는 방법에 의해 수득 가능한 HMGA 효현제에 의해 달성되는 것이다.

[0221] 본 발명에 따르면, 열네 번째 양태에서의 상기 목적은 상기 일곱 번째 양태에 따르는 핵산 및 HMGA 단 백질을 포함하는 복합체에 의해 달성되는 것이다.

[0222] 본 발명은 선행 기술에서의 자명한 의견내용과는 달리, L-핵산 및 특히, 스피에겔머들을 세포내 목표분자로 정하기에 사용가능하다는 놀라운 결과를 기초로 하고 있다. 상기 세포내 목표 분자는 바람직하게는 세포 내에 존재하는 목표 분자들이다. L-뉴클레오타이드의 구조로 인한 상기 기능성 L-핵산의 고유의 성질, 예를 들어, 이들의 목표 분자들에 대한 상호작용상의 높은 특이성 및 동시에 높은 안정성 및 생체 시스템, 및 특히 동물 및 인체 내에서 이용되었을 때의 독성 또는 면역학적 활성 분해 산물의 부재와 같은 특성은 인트라머 (intramers)의 경우와 같이, 세포성 기전(cellular mechanism)이 L-핵산이 플라스미드 (plasmid) 또는 일반적으로 벡터 (vector)에 의해 코딩되어 따라서 세포 내에서 일어나는 전사과정에 의해 실질적으로 기능성 핵산을 제공하게 하기 위하여 이용될 수 있도록 허용하지 못한다.

[0223] 이러한 불가피한 문제점은 본 발명에 의해 해결된다: 기능성 L-핵산 및 특히, 스피에겔머들은 그들의 활성 및 그들의 목표 분자에 결합할 수 있는 점에서의 그들의 특이성을 유지하면서 세포질 막을 통해 통과할 수 있다. 상기 기능성 L-핵산의 투과성은 스피에겔머상의 고유의 특성이며, 전달 운반체 (delivery vehicles) 또는 전달 기술 (delivery techniques)의 사용에 의해 보다 더 향상될 수 있다. 지금부터 이러한 사항으로 제한되고자 하지 않는 바램으로, 본 발명자들은 기능성 L-핵산은 본질적으로 세포질 막을 극복가능하고 상기 세포질막을 극복하기 위해 이입소체 운반 메커니즘 (endosomal transport mechanism)의 개입과 함께 이들을 생성되는 소낭 구조 (vesicle structure)로부터 방출할 수 있으며, 2차원 또는 3차원 구조를 채택함으로써 그의 목표분자와의 특이적인 상호작용을 허용할 수 있다는 가정하에 시작하였다. 본원에 개시된 기술적 교시 내용으로서, 세포에서 aptamer를 생성시키기 위해 aptamer를 세포내 전사 메커니즘으로 활용하는 개발된 논리는 고의적으로 회피되며, 처음으로 세포에서 기능성 L-핵산 및 특히 스피에겔머를 사용하기 위한 수단이 제공된다.

[0224] 본원에서 바람직한 구현예로 채용되는 바와 같이, 본원에서 정의되는 용어 "기능성 핵산 (Functional nucleic acids)"은 구조적으로 상이한 핵산, 특히 rRNAs와 같은 자연발생적 구조의 핵산 또는 mRNAs와 같은 코딩 핵산 (coding nucleic acids)과는 상이한 것들을 의미한다. 상세하게는 기능성 핵산들은 그들의 2차원 및/또는 3차원 구조에 기인하여 목표 분자와 결합할 수 있다. 특히 바람직한 구현예로서, 상기 목표 분자와의 결합은 잡종화 또는 왓슨-크릭 염기 결합 (Watson-Crick base pairing)에 기초한 염기 결합 또는 호스틴 염기 결합 (Hoogsteen base pairing)에 의해서 발생되지 않는다. 특히 바람직한 기능성 핵산들은 aptamers 및 스피에겔머 (spiegelmers)들이다.

[0225] 바람직한 구현예로서, L-핵산은 전체적으로, 실질적으로 또는 부분적으로 L-핵산으로부터 합성되는 핵산이다. 상세하게는 L-핵산이 전부 L-뉴클레오타이드로 구성되는 것이 바람직하다. 본원에서 정의되는 용어 "실질적으로(Substantially)"는 하나의 구현예와 관련하여 목표 분자와의 상호작용을 담당하는 L-핵산의 부분 또는 상기 목표분자와의 결합을 매개하는 부분이 L-뉴클레오타이드 또는 이들로부터 합성된 것들로 구성되는 것을 의미한다.

[0226] 본원에 개시되는 바와 같이, 기능성 L-핵산은 전체적, 실질적으로 또는 부분적으로 L-뉴클레오타이드로부터 합성된 기능성 핵산이다.

- [0227] L-핵산의 합성은 당업계에 공지되어 있으며 예를 들어, 하기의 문헌들, 놀테 등의 문헌 (Nolte et al., Nat. Biotech, 14, 1116-1119, 1996) 및 클루스만의 문헌 (Klussmann et al., Nat. Biotechnol, 14, 1112-1115, 1996) 등에 개시되어 있다.
- [0228] 압타머 생성의 기본 공정은 하기의 문헌들, 예를 들어, Tuerck et al., Science, 248, 505-510, 1990 또는 Ellington et al. Nature, 346, 818-822, 1990에 개시되어 있으며, 스피에겔머 생성의 기본 공정은 하기의 문헌들, 예를 들어, Nolte et al., Nat. Biotech, 14, 1116-1119, 1996 및 Klussmann et al., Nat. Biotechnol, 14, 1112-1115, 1996에 개시되어 있다. 따라서, 스피에겔머들은 D-뉴클레오티드 대신에 L-뉴클레오티드로 구성되는 압타머들이다. 상기 압타머 및 스피에겔머의 제조와 관련하여, 본원에서 정의되는 용어 "목표 분자 (target molecule)"는 압타머 및 스피에겔머를 생성하기 위한 선택 공정에서 이용되는 분자 또는 압타머 또는 스피에겔머에 의해 최종적으로 결합되는 분자를 의미한다.
- [0229] 바람직한 구현예로서, 세포내 활성제 (intracellularly active agent)는 세포내에 존재 시에 분자와 결합할 수 있는 화학 물질이다. 이 경우에 있어, 만일 세포가 조직 또는 기관으로부터 분리된 상태로 존재하는 세포들이 특히 바람직하나 인체 또는 동물신체에서는 바람직하지 않다. 세포내 활성제가 스피에겔머라면, 세포내 목표 분자와 결합할 수 있다면 세포내 활성제가 바람직하다. 호환적으로, 상기 스피에겔머는 세포상에 존재하는 것과 같은 조건하에서 목표분자와 결합할 수 있다면, 세포내 활성제라고 할 수 있다. 이러한 특성들을 측정하기 위한 시험 방법들은 당업계에 널리 알려져 있으며, 예를 들어 실시예 1에 개시된 바와 같이, 세포내에 존재하는 것 (이온화력 및 용질 조성, pH, 온도)과 같은 완충 조건하에서의 평형 결합측정법(equilibrium binding assays)을 포함한다.
- [0230] 바람직한 구현예로서, 상기 L-핵산, 상세하게는 상기 기능성 L-핵산의 목표분자는 세포내 수용체이다. 본원에 사용되는 바와 같이 세포내 수용체(intracellular receptor)는, 바람직하게는, 상기 기능성 L-핵산과 상호작용하는 화학 물질 또는 화학 구조물 (chemical structure) 또는 이들의 개개 일부이며, 바람직하게는, 상기 기능성 L-핵산이 결합하는 화합물 또는 구조물이며, 여기에서 상기 세포내 수용체, 즉 화합물 또는 화학 구조물 또는 이들의 개개 일부는 세포내에 존재, 예를 들어 바람직하게는 전술한 단락에서 개시된 바와 같이 세포 내에 존재하는 것이다. 덧붙여 말하건대, 본 발명의 범위 내에서 세포내 수용체가 기능성 핵산, 특히, 상기 기능성 L-핵산의 생성과정상에서의 목표분자로 되는 것은 가능하다.
- [0231] 본 발명의 하나의 구현예로서, 본원에서 정의되는 용어 "수용체 (receptor)"는 상기 기능성 핵산의 어떠한 상호작용 파트너 (interaction partner), 바람직하게는 상기 기능성 핵산과 특이적으로 상호작용하는 파트너를 의미하며, 즉, 특정한 공간적인 구조, 전하 분포 (charge distribution), 소수성 분포 (hydrophobicity distribution) 등의 특성을 갖고 상기 기능성 핵산과 상호작용하는 상호작용 파트너를 의미한다. 특히 바람직한 구현예로서, 상기 상호작용 파트너는 상기 기능성 핵산의 창조상에 사용되는 바와 같이, 상기 기능성 핵산의 목표 분자와 대응하는 상호작용 파트너를 의미한다. 이와 관련하여, 수용체가 특정 상호 작용이 상기 기능성 핵산의 창조에 이용되었던 상호작용 파트너 및 목표분자 간의 상기 기능성 핵산의 교차 반응성 (cross reactivity)에 기인함에도 불구하고, 상기 기능성 핵산의 창조에 이용되었던 목표 분자와 상이할 수도 있음은 본 발명의 범주 내이다.
- [0232] 바람직한 구현예로서, 본원에서 정의되는 용어 "세포내 수용체(intracellular receptor)는 세포에 존재, 세포내 존재가능하나 세포내의 자연조건하에서 발생되거나 또는 세포내에서 존재하는 그러한 조건하의 수용체를 의미한다. 이와 관련하여, 조직 또는 기관으로부터 분리된 상태로 존재하는 세포가 특히 바람직하며, 인체 또는 동물신체로부터의 세포는 바람직하지 않다. 본원에 개시되는 바와 같이, 용어 "세포내 수용체"는 그러나, 세포의 존재와 같은 조건하에서 존재하는 수용체를 또한 의미한다.
- [0233] 바람직한 구현예로서, 본원에서 정의되는 용어 "세포 (cell)"는 원핵세포 및 진핵세포를 포함하는 그룹

으로부터 선택된 세포를 의미한다. 바람직하게는, 상기 진핵세포는 곰팡이 세포, 식물 세포, 동물 세포 및 인간 세포를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다. 호환적인 구현예로서, 본원에서 용어 "세포"는 본원에서는 일반적으로 바람직한 구현예로서, 세포질 막 (cytoplasmic membrane)과 대응하고 막을 주변과 분리하는 중 인지질 막 (phospholipids double membrane)에 의해 구분되는 분획 (compartment)을 의미한다. 이와 관련하여, 상기 주변으로부터의 분리는 완전한 분리가 아닌, 세포와 주변간의 에너지 전달 (energy transfer) 및 물질 전달 (mass transfer, 물질 교환)을 허용하는 것이다. 바람직하기로는 상기 물질 전달은 제한적인 것이다. 상기 세포가 세포질 막 또는 세포질 막과 유사한 막에 의해 주변으로부터 분리되는 세포인 경우에는, 상기 물질 전달의 제한은 상기 막의 운반능력 (transport properties)에 의해 정의된다. 하나의 구현예로서, 본원에서 정의되는 용어 "세포"는 본원에서 정의된 바와 같이, 원핵 또는 진핵 세포상의 소낭 및/또는 구성분 (compartments)을 포함하는 것이며, 이들은 변형된 원핵 또는 진핵세포 내에 존재 또는 존재 가능한 것이며, 그와 동시에 예를 들어 하나의 구현예로서, 체액에 존재할 수 있는, 세포질 막에 의해 둘러싸인 진핵 또는 원핵세포의 소낭 또는 일부로 원핵 또는 진핵 세포 외부에 존재할 수 있다. 바람직한 구현예로서, 상기 두 번째 호환적인 구현예에 따른 세포내에서, 원핵 또는 진핵세포에서 발생하는 조건과 실질적으로 상응하는 그러한 세포내의 조건, 특히, 상기 기능성 핵산의 이의 목표물질과의 결합에 영향 미치는 인자와 관련되는 조건도 본 발명의 범주이다.

[0234]

바람직한 구현예로서, 상기 체액 (body fluid)은 혈액 (blood), 소변 (urine), 분비물 (liquor; 해부상의 액, anatomical fluid), 림프액 (lymph fluid), 혈청 (serum), 혈장 (plasma), 질 분비물 (vaginal secretions), 침 (saliva) 및 정액 (sperm)을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다.

[0235]

하나의 구현예로서, 상기 수용체는 세포 내에서 그의 기능에 의해 정의되는 것이다. 결국, 상기 수용체는 분자 수용체 (molecular receptors), 효소 (enzymes), 대사 매개 물질 (metabolic intermediates), 신호성 펩티드 (signal peptides), 샤프론 분자 (chaperone molecules); 및 예를 들어 리보솜 (ribosomes), 미토콘드리아 (mitochondria), 튜블린 (tubulin) 및 액틴 섬유 (actin filaments)와 같은 이입소체입자 (endosomal particles), 라이소좀 (lysosomes)과 같은 세포 골격 요소 (elements of the cytoskeleton)와 같은 세포내 구조물 (intracellular structures); 예를 들어, 소낭 (vesicles), 특히 세포내 소낭 (intracellular vesicles) 같은 기타 세포 내 구조물 (other intracellular structures)을 포함하는 그룹으로부터 선택가능하다. 바람직한 구현예로서, 본원에 개시된 용어 "분자 수용체 (molecular receptor)"는 세포, 조직, 기관 또는 생체 내에서 정보를 수용하고 이를 전달하는 분자를 의미한다. 상기 정보는 분자 수용체와 상호작용하는 분자에 의해 전형적으로 전달된다. 상기 상호작용의 결과로 상기 분자 수용체는 신호를 발생할 수 있다. 그와 같은 신호는 수용체의 활성 및/또는 확증상의 변화에 기초할 수 있거나 본원에서 명시될 수 있다. 상기의 신호 자체는 바람직하게는 화학, 생화학 또는 전기 신호가 될 수 있다. 바람직하게는, 상기 분자 수용체는 연쇄 반응 (reaction cascade)의 부분이며, 더욱 바람직하게는 연쇄 신호 (signal cascade)의 부분이다. 분자 수용체에 의해 전달된 상기 정보는 예를 들어 화합물의 존재 및/또는 그의 농도에 관한 것과 같은 정량적 및/또는 정성적인 정보일 수 있다.

[0236]

바람직한 구현예로서, 본원에서 정의되는 용어 "대사 매개 물질 (metabolic intermediates)"는 세포 내의 대사 활성에 의한 동화작용 (anabolism)뿐만 아니라 이화작용 (catabolism)의 구성요소 (constituents)로서 생성되는 모든 화합물을 의미한다.

[0237]

본 발명의 추가적인 구현예로서, 상기 수용체는 그의 화학적 특성에 의해 정의되는 것이다. 바람직하게는 상기 수용체는 폴리펩티드 (polypeptide), 탄수화물 (carbohydrates), 핵산 (nucleic acids), 지질 (lipids) 및 이들의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 본원에서 정의되는 용어 "폴리펩티드 (polypeptide)"는 바람직하게는 2 개 내지 그 이상의 아미노산을 구성하는 임의의 중합체 (polymer)를 의미한다. 바람직하게는, 상기 구현예의 범위 내에서 D-아미노산도 또한 사용가능함에도 상기 아미노산은 L-아미노산들인 것이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 본원에서 정의되는 용어 "핵산 (nucleic acids)"은 바람직하게는 당염기에 널리 알려진 2개 내지 그 이상의 뉴클레오타이드의 중합체 또는 뉴클레오타이드 구조유사물질 (nucleotide analogues)을 의미하며, 여기에서 상기 뉴클레오타이드는 D-뉴클레오타이드 또는 L-뉴클

레오티드 또는 이들의 조합일 수 있다. 바람직한 조합 (combinations)은 글리코실화된 폴리펩티드 (glycosylated polypeptides) 및 글리코실화된 지질 (glycosylated lipids)을 포함한다.

[0238] 세포내 수용체의 상세한 그룹은 전사 인자 및 AT 후크에 결합하는 DNA-결합 단백질들이다. 전사 인자들의 예는 하기 표 1에 제시되어 있다:

표 1

[0239]

감마(gamma)OBP	14-3-3 엡실론(epsilon)	70-75K 단백질(protein)
(STAT5A)4	14-3-3 제타(zeta)	80-90K 단백질(protein)
120-kDa CRE-결합 단백질 (binding protein)	50-55K protein	AAF
ADA2	53BP1	ABF-1
ADA3	AP-2알파(alpha)B	Bach1t
ADA-NF1	AP-2베타(beta)	Bach2
AFP1	AP-2감마(gamma)	BAF155
AhR	AP-2렙(rep)	BAF47
AhR:Arnt	AP-3 (1)	BAF53a
AIN3	AP-3 (2)	BAF60A
아이올로스(Aiolos)	AP-4	Barh11
AIRE	AP-5	Barh12
AKNA	APC	Barx1
ALF	AR	Barx2
ALL-1	Arnt	Bcl-3
알파(alpha)-CBF	Arnt (774 AA 형태(form))	BCL-6
알파(alpha)-CP2b	ARNT2	베타-카테닌(beta-catenin)
알파(alpha)H0	ASC-2	Bin1
알파(alpha)H2-알파(alpha)H3	ASPP1	BMAL2
ALX3	ASPP2	B-Myb
A1x-4	ATBF1-A	BNC
aMEF-2	ATBF1-B	BP1
AML1	ATF	BP2
AML1a	ATF-1	BR140
AML1b	ATF2	브라키우리(Brachyury)
AML1c	ATF-2:c-Jun	BRCA1
AML1델타(Delta)N	ATF3	BRCA2
AML2	ATF3 델타(delta)ZIP	BRG1
AML3	ATF4	BRIP1
AML3a	ATF5	Brm
AML3b	ATF6	BTEB1
AMY-1L	ATF-a	BTEB2
A-Myb	ATF-아델타(adelata)	BTEB3
ANF	ATOH1	BTEB4
AP-1	ATOF1	B-TF IID
AP-2알파(alpha)A	Bach1	C/EBP알파(alpha)
C/EBP델타(delta)	CIITA	C/EBP베타(beta)
C/EBP엡실론(epsilon)	c-Jun	CtBP2
C/EBP감마(gamma)	c-Jun:JunD	CTCF
CA150	CLIM1	CTF
c-abl	CLIM2	CTF-1
CACCC-결합인자(binding factor)	CLOCK	CTF-2
CAR	c-Myb	CTF-3
CAR:RXR-알파(alpha)	c-Myc	CTF-5
Cart-1	C-Myc 1	CTF-7
CBAF	c-Myc:Max	CUP
CBF (4)	CNBP	CUTL1
		CUTL2

CBF (5)	CoS	Cx
CBP	COUP-TF1	사이클린(cyclin) A
CCAAT-결합인자(binding factor)	COUP-TF2	사이클린(cyclin) T1
	CP1A	사이클린(cyclin) T2
CCF	CP1C	사이클린(cyclin) T2a
CCG1	CP2	사이클린(cyclin) T2b
CCK-1a	CPBP	DAP
CCK-1b	CPE 결합단백질(binding protein)	DAX1
CD28RC	CREB	DB1
Cdc5	CRE-BPa	DBF4
cdk2	c-Rel	DBP
cdk9	c-Rel:RelA	DbpA
Cdx-1	CREM알파(alpha)	DbpAv
CDX2	CREST	DbpB
Cdx-4	CRF	DCoHm
c-Ets-1	Crx	DDB
c-Ets-2	CSA	DDB-1
CFF	CSB	DDB-2
c-Fos	CSBP-1	DEC1
ChCh	CSEN	DEC2
CHOP-10	c-Ski	DEF
Chx10	CtBP1	델타(delta)CREB
델타(delta)FosB	E2F	EIIaE-C베타(beta)
델타(delta)Max	E2F+E4	EivF
DeltaN p63베타(beta)	E2F+p107	EKLF
DeltaN p73알파(alpha)	E2F-1	ELF-1
DeltaN p73베타(beta)	E2F-1:DP-1	ELFR
DeltaN p73감마(gamma)	E2F-1:DP-2	elios
DeltaNp63알파(alpha)	E2F-2	Elk-1
DeltaNp63감마(gamma)	E2F-3a	Emx-1
Dermo-1	E2F-4	Emx-2
DF-1	E2F-4:DP-1	En-1
DF-2	E2F-4:DP-2	En-2
DF-3	E2F-5	ENH-결합단백질(binding protein)
D1x-1	E2F-6	ENKTF-1
D1x-2	E2F-7	EP400
D1x-3	E47	EPAS1
D1x-4 긴 이형(long isoform)	E4BP4	에피카르딘(Epicardin)
D1x-4 짧은 이형(short isoform)	E4F	엡실론(epsilon)F1
D1x-5	E4F1	ER-알파(alpha)
D1x-6	E4TF2	ER-알파(alpha):ER-베타(beta)
DP-1	E7; HPV-16, 유두종 바이러스 형태 (Virus type) 16	ER-베타(beta)
DP-2		ER-베타(beta)1
DPBF	EAR2	ER-베타(beta)2
DRIL1	EBF	ER-베타(beta)3
DSIF	EBP-80	ER-베타(beta)4
DSIF-p14	EC2	ER-베타(beta)5
DSIF-p160	EF1	ERF
DTF	Egr-1	Erg-1
DUX1	Egr-2	Erg-2
DUX2	Egr-3	ERM
DUX3	Egr-4	ERR1
DUX4	EIIaE-A	ERR2
E	EIIaE-B	ERR3
E12	EIIaE-C알파(alpha)	ERR3-1
ERR3-2	FOXBI	FOXO1a
ERR3-3	FOXC1	FOXO1b
ERR알파(alpha)1	FOXC2	FOXO2

ESE-1	FOX D1	FOX O3a
ESE-1a	FOX D2	FOX O3b
ESE-1b	FOX D3	FOX O4
ESE-2	FOX D4	FOX P1
ESE-2a	FOX E1	FOX P2
ESE-2b	FOX E3	FOX P3
ESE-3	FOX F1	FOX P4
ESE-3a	FOX F2	Fra-1
ESE-3b	FOX G1a	Fra-2
ESXR1	FOX G1b	FTF
ETF	FOX G1c	FTS
Ets-1 델타(delta)VII	FOX H1	FXR
Evi-1	FOX I1	FXR:RXR-알파(alpha)
EVX1	FOX J1a	FXR-알파(alpha)
EZF-2	FOX J1b	FXR-베타(beta)1
EZH1	FOX J2긴이형(long isoform)	FXR-베타(beta)2
EZH2	FOX J2짧은이형(short isoform)	G 인자(factor)
F2F	FOX J3	G6 인자(factor)
FAC1 인자(factor) 2	FOX K1	GAAP-1
	FOX K2a	GABP
FBP	FOX K2b	GABP-알파(alpha)
f-EBP	FOX K2c	GABPB
FEV	FOX L1	GABP-베타(beta)1
Fgf3	FOX L2	GABP-베타(beta)2
FKBP59	FOX M1a	GAF
FKHL18	FOX M1b	감마(gamma)CAAT
FKHRL1P2	FOX M1c	감마(gamma)CAC1
FKLF	FOX N1	감마(gamma)CAC2
Fli-1	FOX N2	GATA-1
FosB	FOX N3	GATA-2
GATA-3	HAF	HiNF-A
GATA-4	HAND1	HiNF-B
GATA-5	HAND2	HiNF-C
GATA-6	HB9	HiNF-D
Gbx1	HDAC1	HiNF-D3
Gbx2	HDAC2	HiNF-E
GCF	HDAC3	HiNF-P
GCMa	HDAC4	HIP1
GCN5	HDAC5	HIV-EP2
GCNF-1	h탁스(Daxx)	H1f
GCNF-2	HDBP1	HLTF
GF1	HDBP2	HLTF (Met123)
GKLF	열-유도-인자 (Heat-inducing factor)	HLX
GLI1	HEB	HMBP
GLI2	HEB1-p67	HMG I
GLI3	HEB1-p94	HMG I(Y)
GLIS2	HEF-1B	HMG Y
GMEB-1	HEF-1T	HMGB1
GR	HEF-4C	HMGB2
GR-알파(alpha)	HEN1	HMG I-C
GR-베타(beta)	HEN2	HMX1
GRF-1	HES-1	HNF-1알파(alpha)-A
Gsc	HES-2	HNF-1알파(alpha)-B
Gsc1	Hesx1	HNF-1알파(alpha)-C
GT-IC	Hex	HNF-1베타(beta)-A
GT-IIA	Hey1	HNF-1베타(beta)-B
GT-IIB알파(alpha)	Hey2	HNF-1베타(beta)-C

GT-IIB베타(beta)	HeyL	HNF-3
H1TF1	HFH-1	HNF-3알파(alpha)
H1TF2	HIC-1	HNF-3베타(beta)
H1TF2A	Hic-5	HNF-3감마(gamma)
H4TF-1	HIF-1	HNF-4
H4TF-2	HIF-1알파(alpha)	HNF-4알파(alpha)
HNF-4알파(alpha)1	HOXC11	IB1
HNF-4알파(alpha)2	HOXC12	IBP-1
HNF-4알파(alpha)3	HOXC13	ICER-II
HNF-4알파(alpha)4	HOXC4	ICER-II 감마(gamma)
HNF-4알파(alpha)7	HOXC5	Id1
HNF-4감마(gamma)	HOXC6	Id1H
HNF-6알파(alpha)	HOXC8	Id2
hnRNP K	HOXC9	Id3
HOX11	HOXD10	Id3 / Heir-1
HOXA1	HOXD11	IF1
HOXA10	HOXD12	IFI-16
HOXA10 PL2	HOXD13	IgPE-1
HOXA11	HOXD3	IgPE-2
HOXA13	HOXD4	IgPE-3
HOXA2	HOXD8	Ik-1
HOXA3	HOXD9	I카파(kappa)B
HOXA4	Hp55	I카파(kappa)B-알파(alpha)
HOXA5	Hp65	I카파(kappa)B-베타(beta)
HOXA6	HPX42B	I카파(kappa)BR
HOXA7	HrpF	I1-1 RF
HOXA9A	HSBP1	IL-10E1
HOXA9B	HSF	IL-6 RE-BP
HOXB1	HSF1 긴(long)	I1-6 RF
HOXB13	HSF1 짧은(short)	ING1
HOXB2	HSF2	ING1b
HOXB3	HSF4a	INSAF
HOXB4	HSF4b	IPCS-BF
HOXB5	HSF4c	IPF1
HOXB6	hsp56	IPF1:Pbx
HOXB7	Hsp90	IRF-1
HOXB8	IA-1	IRF-1:C/EBP베타(beta)
HOXB9	iASPP	IRF-2
HOXC10	iASPP-RAI	IRF-3
IRF-4	KR3	Lmo1
IRF-5	KRF-1	Lmo2
IRF-6	KRN	LMO3
IRF-7A	KSR-1	LMX1A
IRF-7B	Ku 자가항원(autoantigen)	LMX1B
IRF-7H	Ku70	L-Myc-1긴 형태(long form)
IRF-8	Ku80	L-Myc-1짧은 형태(short form)
IRF-9	KUP	L-Myc-2
ir1B	LAF-4	LUN-1
IRX-1	LANA; KSHV, Kaposi's	LUN-2
IRX2a	육종-관련 헤피스 바이러스(sarcoma-associated herpes virus)	LXR-알파(alpha)
Irx-3	헤피스 바이러스 (herpes virus 8)	LXR-알파(alpha):RXR-알파(alpha)
Irx-4		LXR-베타(beta)
ISGF-1	LBP-1	LXR-베타(beta):RXR-알파(alpha)
ISGF-3	LBP-1a	Lyl-1
ISGF-3알파(alpha)	LBP-1d	M 인자(factor)
Isl-1알파(alpha)	LBP-32	Mad1
ITF	LBP-9	Maf

ITF-1	LBX1	MafB
ITF-2	LCR-F1	MafF
JRF	LEF-1	MafG
JunB	LEF-1B	MafG:MafG
JunB:Fra-1	LF-A1	MafK
JunB:Fra-2	LHX1	MAML1
JunD	LHX2	MASH-1
JunD:Fra-2	LHX3a	Max
카파(kappa)Y 인자(Factor)	LHX3b	Max1
KBP-1	LHX5	Max2
KER1	LHX6.1a	MAZ
KER-1	LHX6.1b	MAZ i
KLF15	LIT-1	MAZR
KLF7	LITAF	MBF1
Kox1	LKLF	MBF2
MBF3	Miz-1	NERF-2
MBP-1 (1)	MLX	Net
MBP-1 (2)	MM-1	NeuroD1
MBP-2	몬도(Mondo)A	NEUROD-2
MDBP	MOP3	NEUROD-3
MECP-2	MR	NF III-a
MEF-2A	MRF-2	NF III-c
MEF-2B1	Msx-1	NF III-e
MEF-2C	Msx-2	NF-1
MEF-2C/델타(delta)32	MTA1-L1	NF-4FA
MEF-2C/델타(delta)8	MTB-Zf	NF-4FB
MEF-2C/델타(delta)8,32	MTF-1	NF-4FC
MEF-2D00	mtTFA	NF-AB
MEF-2DOB	Mxi1	NF-AT1
MEF-2DAO	Myf-3	NF-AT1
MEF-2DA'0	Myf-4	NF-AT2
MEF-2DAB	Myf-5	NF-AT2-알파(alpha)
MEF-2DA'B	Myf-6	NF-AT2-베타(beta)
메이스(Meis)-1	마이오카딘(Myocardin), 스플라이스 형태 (Splice Form) 1	NF-AT3
메이스(Meis)-2a		NF-AT4
메이스(Meis)-2b	MyoD	NF-AT5
메이스(Meis)-2c	MyoD:E12	Nf 베타(beta)A
메이스(Meis)-2d	MyT1	NF-CLE0a
메이스(Meis)-2e	MZF-1	NF-CLE0b
메이스(Meis)-3	NC1	NF델타(delta)E3A
멜(Mel)-18	NC2	NF델타(delta)E3B
메옥스(Meox)1	NCOR1	NF델타(delta)E3C
메옥스(Meox)1a	NCOR2	NF델타(delta)E4A
메옥스(Meox)2	NCX	NF델타(delta)E4B
MHox (K-2)	NELF	NF델타(delta)E4C
MIF-1	NERF	Nfe
MITF	NERF-1a	NF-E
MIXL1	NERF-1b	NF-E2
NF-E2 p45	NF-Y	NRF
NF-E3	NF-YA	Nrf1
NFE-6	NF-Zc	NRF-1
NF-Gma	NF-Zz	Nrf1:MafG
NF-GMb	NGN3	Nrf1:MafK
NFI/CTF	NHP-1	Nrf2
NFIA	NHP-2	Nrf2:MafG
NFIB	NHP3	Nrf2:MafK
NF-IL-2°	NHP4	NRF-2베타(beta)1
NF-IL-2B	Nkx2-1	NRF-2감마(gamma)1

NFIX	Nkx2-2	Nrf3
NF-jun	Nkx2-3	Nrf3:MafK
NF-카파(kappa)B	Nkx2-5	NRL
NF-카파(kappa)B유사한(-similar)	Nkx2-8	NRSF
NF-카파(kappa)B1	Nkx3-1	NRSF 형태(Form) 1
NF-카파(kappa)B1 전구체(precursor)	Nkx3-1 v1	NRSF 형태(Form) 2
NF-카파(kappa)B2	Nkx3-1 v2	NTF
NF-카파(kappa)B2 (p49)	Nkx3-1 v3	Nur77
NF-카파(kappa)B2 전구체(precursor)	Nkx3-1 v4	NURR1
NF-카파(kappa)E1	Nkx3-2	OAZ
NF-카파(kappa)E2	Nkx6-1	OC-2
NF-카파(kappa)E3	Nkx6-2	OCA-B
NF-MHCI IA	Nmi	옥타인자(Octa factor)
NF-MHCI IB	N-Myc	옥타머 결합인자(Octamer binding factor)
NF-muE1	N-Oct-2알파(alpha)	Oct-B1
NF-muE2	N-Oct-2베타(beta)	oct-B2
NF-muE3	N-Oct-4	oct-B3
NF-S	NOR1	OLIG2
NF-X	NOR1/MINOR	올리고(Oligo)1
NF-X1	NPA3	Otx1
NF-X2	NPAS1	Otx2
NF-X3	NPAS2	Otx3
NF-Xc	NP-TCII	Pbx1A:HoxD4
OZF	Pax-3	Pbx1a:IPF1
p107	Pax-3A	Pbx1b
p130	Pax-3B	Pbx1B:HoxA5
p160MBP	Pax-4a	Pbx1B:HoxB7
p28 조절기(Modulator)	Pax-5	Pbx1B:HoxB8
p300	Pax-6	Pbx1B:HoxC8
p38erg	Pax-6 / Pd-5a	Pbx1B:HoxD4
p40x; HTLV-I, T-cell 영양성 바이러스 (Lymphotropic virus type I)	Pax-7	Pbx1b:PKNOX1
	Pax-8	Pbx2
	Pax-8a	Pbx2:HoxB8
p45	Pax-8b	Pbx2:Hoxc6
p49erg	Pax-8c	Pbx2:PKNOX1
p50:c-Rel	Pax-8d	Pbx3a
p53	Pax-8e	Pbx3a:Hoxc6
p55	Pax-8f	Pbx3b
p55erg	Pax-9	PC2
p63	Pbx	PC4
p63알파(alpha)	Pbx1	PC5
p63베타(beta)	Pbx1:HoxB1	PCAF
p63델타(delta)	Pbx1:HoxB2	PDEF
p63감마(gamma)	Pbx1:HoxB3	PEA3
p65델타(delta)	Pbx1:HoxB4	PEBP2알파(alpha)
p73	Pbx1:HoxB5	PEBP2베타(beta)
p73알파(alpha)	Pbx1:HoxB6	PGC-1
p73베타(beta)	Pbx1:HoxB8	PITX1
p73델타(delta)	Pbx1:PKNOX1	PITX2
p73엡실론(epsilon)	Pbx1:Tcl3	PITX2A
p73에타(eta)	Pbx1a	PITX2A:Nkx2.5
p73감마(gamma)	Pbx1A:HoxA5	PITX2B
p73카파(kappa)	Pbx1a:Hoxb7	PITX2B:Nkx2.5
p73제타(zeta)	Pbx1a:Hoxb8	PITX2C
Pax-1	Pbx1a:Hoxc6	PITX2C:Nkx2.5
Pax-2	Pbx1A:HoxC8	PU.1
PITX3	POU5F1	

PKNOX1	POU5F1A	PuF
PKNOX2	POU5F1B	Pur 인자(factor)
PLAGL1	POU5F1C	pX; HBV, 감염B바이러스 (Hepatitis B Virus)
PLAGL2	POU6F1	
PLZF	PPAR-알파(alpha)	PXR-1
PML	PPAR-알파(alpha):RXR-알파(alpha)	PXR-1:RXR-알파(alpha)
PML-3		PXR-1:RXR-베타(beta)
Pmx2a	PPAR-베타(beta)	PXR-2
Pmx2b	PPAR-감마(gamma)1	R1
PNR	PPAR-감마(gamma)2	R2
PO-B	PPAR-감마(gamma)3	RAR-알파(alpha)
Pontin52	PPAR-감마(gamma)4	RAR-알파(alpha):RXR-알파(alpha)
POU1F1	PPUR	RAR-알파(alpha):RXR-베타(beta)
POU2F1	PR	RAR-알파(alpha):RXR-감마(gamma)
POU2F2	PR A	
POU2F2 (Oct-2.1)	PR B	RAR-알파(alpha)1
POU2F2B	pRb	RAR-알파(alpha)2
POU2F2C	PRDI-BF1	RAR-베타(beta)
POU2F3	PRDI-BFc	RAR-베타(beta):RXR-알파(alpha)
POU2F3, 이형(Isoform) a	Preb	RAR-베타(beta)2
POU2F3, 이형(Isoform) d1	Prop-1	RAR-감마(gamma)
POU2F3, 이형(Isoform) d2	PROX1	RAR-감마(gamma):RXR-알파(alpha)
POU3F1	PSE1	
POU3F2	P-TEFb	RAR-감마(gamma)1
POU3F2 (N-Oct-5a)	PTF	Rb:E2F-1:DP-1
POU3F2 (N-Oct-5b)	PTF알파(alpha)	RBP60
POU3F3	PTF베타(beta)	RBP-J 카파(kappa)
POU3F4	PTF 델타(delta)	Ref-1
POU4F1(1)	PTF감마(gamma)	RelA
POU4F1(s)	Pu 박스 결합인자 (box binding factor)	RelB
POU4F2	Pu 박스 결합인자 (box binding factor) (BJA-B)	REVERB-알파(alpha)
POU4F3		REVERB-베타(beta)
RFX1	SHOX2b	Smad7
RFX1:RFX2	SHOXa	Smad8
RFX1:RFX3	SHOXb	SMIF
RFX2	SHP	Sna
RFX3	SI11-p110	SnoN
RFX4	SI11-p15	Sox1
RFX5	SI11-p18	Sox10
RFX5:RFXAP:RFXANK	SIM1	Sox11
RFXANK	SIM2	Sox12
RFXAP	SIP1	Sox13
RFX-B-델타(delta)5	Six-1	Sox14
RF-Y	Six-2	Sox17
ROR알파(alpha)1	Six-3	Sox18
ROR알파(alpha)2	Six-4	Sox2
ROR알파(alpha)3	Six-5	Sox20
ROR베타(beta)	Six-6	Sox21
ROR감마(gamma)	SKIP	Sox3
Rox	SLUG	Sox4
RP58	Smad1	Sox5
RPF1	Smad2	Sox7
RPG알파(alpha)	Smad2 (437 아미노산)	Sox8
RREB-1		Sox9
RSRFC4	Smad3	Sp1
RSRFC9	Smad3:Smad4	Sp2
RVF	Smad4	Sp3

RX	Smad4델타(delta)3	Sp4
RXR-알파(alpha)	Smad4델타(delta)4	Spi-B
RXR-베타(beta)	Smad4델타(delta)4-6	SPT16
RXR-감마(gamma)	Smad4델타(delta)4-7	SRC-1
SAP-1a	Smad4델타(delta)5-6	SRC-3
SAP-1b	Smad4델타(delta)6	SRCAP
SF-1	Smad5	SREBP-1a
SHOX2a	Smad6	SREBP-1b
SREBP-1c	TAF(II)100	TBX19
SREBP-2	TAF(II)125	TBX1A
SRE-ZBP	TAF(II)135	TBX1B
SRF	TAF(II)170	TBX2
SRF:SRF	TAF(II)18	TBX20
SRY	TAF(II)20	Tbx22
SSRP1	TAF(II)250	TBX3 (722 아미노산
Staf-50	TAF(II)250델타 (Delta)	(amino acids))
STAT1	TAF(II)28	TBX3 (742 아미노산
STAT1:STAT1	TAF(II)30	(amino acids))
STAT1:STAT3	TAF(II)31	TBX4
STAT1알파(alpha)	TAF(II)55	TBX5 긴 이형 (long isoform)
STAT1베타(beta)	TAF(II)70-알파(alpha)	TBX5 짧은 이형 (short isoform)
STAT2	TAF(II)70-베타(beta)	Tbx5:Nkx2.5
STAT3	TAF(II)70-감마(gamma)	TBX6
STAT3:STAT3	TAF-I	TCF
STAT4	TAF-II	TCF-1
STAT5A	TAF-L	TCF17
STAT5B	Tal-1	TCF-1A
STAT5B:STAT5B	Tal-1베타(beta)	TCF-1B
STAT6	Tal-2	TCF-1C
SXR	TAR 인자(factor)	TCF-1D
SXR:RXR-알파(alpha)	tat; HIV-1, 면역결핍증 바이러스 (Immunodeficiency virus type 1)	TCF-1E
SYT		TCF-1F
T3R-알파(alpha):		TCF-1G
T3R-알파(alpha):RXR-알파(alpha)	Tax; HTLV-I, T세포 림프 영양성 바이러스 타입 (T-cell Lymphotropic virus type I)	TCF-2알파(alpha)
T3R-알파(alpha)1		TCF-3
T3R-알파(alpha)2		TCF-4
T3R-베타(beta)1	T-bet	TCF-4(K)
T3R-베타(beta)2	TBP	TCF-4B
TAF(I)110	Tbr-1	TCF-4E
TAF(I)48	TBR2	TEF
TAF(I)63	TBX18	TEF-1
TEF-2	TFIIH-MO15	TRF (2)
TEF-3	TFIIH-p34	TRRAP
TEF-5	TFIIH-p44	TWIST
TEL1	TFIIH-p62	TxRE BP
Tel-2a	TFIIH-p80	TxREF
Tel-2b	TFIIH-p80:CAK	UBF
Tel-2c	TFIIH-p90	UBP-1
Tel-2d	TFII-I	UEF-1
Tel-2e	TFIIIA	UEF-2
Tel-2f	Tf-LF1	UEF-3
TFE3	Tf-LF2	UEF-4
TFEB	TFP-95	USF1
TFEB-A	TGIF	USF1:USF2
TFEC	TGIF2	USF2
TFIIA	TGT3	USF2b

TFIIA-알파/베타 (alpha/beta) 전구체 (precursor) 주형태 (main form)	TIEG-1 TIF1a	Vav Vax-2
TFIIA-알파/베타 (alpha/beta) 전구체 (precursor) 부형태 (subsidiary form)	TIF1g TIF2	VDR VITF; 우두바이러스 (Vaccinia virus)/, 호모사피엔스(Homo sapiens)
TFIIA-감마(gamma)	TLE1	
TFIIB	TLX	Vpr; HIV-1, 면역결핍증바이러스 (Immunodeficiency virus type 1)
TFIID	TLX3	
TFIIE	TMF	
TFIIE-알파(alpha)	TR2-11	WBSCR14
TFIIE-베타(beta)	TR2-5	WSTF
TFIIF	TR2-9	WT1
TFIIF-알파(alpha)	TR4	WT1 I
TFIIF-베타(beta)	TRAP	WT1 I -KTS
TFIIH	TREB-1	WT1 I-del2
TFIIH*	TREB-2	WT1 -KTS
TFIIH-CAK	TREB-3	WT1-del2
TFIIH-사이클린(cyclin) H	TREF1	XBP-1
TFIIH-MAT1	TREF2	XW, V
YAF2	ZF1	ZNF174
YB-1	ZF2	ZNF-20
YEBP	ZFP-37	ZNF-24
YL-1	ZFX	ZNF33a
YY1	ZFY	ZNF35
ZAC	ZHX1	ZNF43
ZBP89	ZIC2	ZNF44
ZBP99	ZID	ZNF45
ZEB (1124 AA)	ZNF11a	ZNF7
ZEB (1154 AA)	ZNF124	ZNF76
ZER6 p52	ZNF133	ZNF83
ZER6 p71	ZNF143	ZNF85

[0240] 세포내 수용체의 추가적인 그룹은 하기 표 2에 기재되는 세포내 목표 물질들이다.

표 2

[0241]

긴-사슬 지방산 ("long-chain" fatty acid) CoA 리가제 (ligase)	아세틸(Acetyl)-CoA 말레이트-시트레이트 (malate-citrate) 신사제 (synthase)	아밀로이드 전구체 단백질 (Amyloid precursor protein) 안카린 (Ankarin)
주요 기본 단백질 ("major basic" protein)	아세틸글루코사미닐 (Acetylglucosaminyl) 트랜스퍼라제 (transferase)	아르기나제 (Arginase)
혼합된 기능 ("mixed function") 옥시게나제 (oxygenase)	아세틸스퍼민 (Acetylspermine)	아르기노수시네이트 (Argininosuccinate) 신세타제 (synthetase)
11β-하이드록실라제(hydroxylase) (EC 1.14.15.4)	디아세틸라제 (deacetylase)	아르기노수시네이트 라이아제 (Argininosuccinate lyase)
1-아실글라이세롤 (acylglycerol)-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (phosphate acyl transferase)	액틴 (Actin) 아데노신 디아미나제 (Adenosine deaminase)	아스파테이트 (Aspartate) 아미노트랜스퍼라제 (aminotransferase)

2,3-옥시도스쿠알렌 라노스테롤 (oxidosqualene lanosterol) 사이클라제 (cyclase)	아데노실 호모시스테인 (Adenosyl homocysteine) 하이드롤라제 (hydrolase)	아스파테이트 (Aspartate) 트랜스카바모일라제 (transcarbamoylase)
21-스테로이드하이드록실라제 (steroid hydroxylase) (EC1.14.99.10)	아데노실 메티오닌 (Adenosyl methionine) 디카복실라제 (decarboxylase)	ATPase ATP 디포스포하이드롤라제 (diphosphohydrolase)
24,28-스테롤 리덕타제 (sterol reductase)	아데닐레이트 사이클라제 (Adenylate cyclase)	bcl-2 암유전자 단백질 (oncogene protein)
3-하이드록시부티레이트 (hydroxybutyrate) 디하이드로게나제 (dehydrogenase)	아데닐레이트 키나제 (Adenylate kinase)	연결 조직 (Connective tissue)-액티베이팅 펩타이드 (activating peptide)
3-케토티올라제 (ketothiolase)	아데닐로-수시네이트 라이아제 (Adenyllo-succinate lyase)	C5a-비활성 (inactivating) 인자 (factor)
3-β-하이드록시스테로이드 (hydroxysteroid) 디하이드로게나제 (dehydrogenase) (EC5.3.3.1)	아데닐로-수시네이트 신사제 (Adenyllo-succinate synthase)	칼시토닌 (Calcitonin)
	알라닌 아미노트랜스퍼레이스 (Alanine aminotransferase)	칼모듈린 (Calmodulin)
	알도라제 (Aldolase)	칼파인 (Calpain) I
	알도스 리덕타제 (Aldose reductase)	칼레티쿨린 (Calreticulin)
5'-뉴클레오티다제 (nucleotidase)	알카린 포스파타제 (Alkaline phosphatase)	칼바모일 포스페이트 (Carbamoyl phosphate)
8-옥소구아노신 (oxoguanosine)	알코올 디하이드로게나제 (Alcohol dehydrogenase)	신세타제 (synthetase)
디글라이코실라제 (deglycosylase)	아미도포스포리보실 (Amidophosphoribosyl) 아민 트랜스퍼라제 (amine tranferase)	카보네이트 언하이드라제 (carbonate anhydrase)
abl 암유전자 단백질 (oncogene protein)	AMP	카세인 키나제 (Casein kinase)1
아세토락테이트 신사제 (Acetolactate synthase)	포스포디에스테라라제 (phosphodiesterase)	카세인 키나제 (Casein kinase)2
아세틸콜린 에스테라제 (Acetylcholine esterase)	아밀로이드 베타/ A4 단백질 (Amyloid β/A4 protein)	카탈라제 (Catalase)
아세틸-CoA 카복실라제 (Acetyl-CoA carboxylase)	디하이드로우라실 (Dihydrouracil)	글라이세롤 포스페이트 (Glycerol phosphate)
카테콜 (Catechol) 메틸트랜스퍼라제 (methyltransferase)	디하이드로게나제 (dehydrogenase)	아실트랜스퍼라제 (acyltransferase)
카텝신 (Cathepsin)	디옥시게나제(Dioxygenase)	글라이세롤 포스페이트 (Glycerol phosphate)
카텝신 (Cathepsin) B 및 L	도파민 모노옥시게나제 (Dopamine monooxygenase)	디하이드로게나제 (dehydrogenase)
cdc 10	다이너닌 (Dynenin)	글라이시나미드 (Glycinamide) 리보뉴클레오티드 (ribonucleotide)
cdc 13 p60	엘라스타제 (Elastase)	트랜스포밀라제 (transformylase)
cdc 2 p34	엘라스틴 (Elastin)	GTP- 결합 단백질 (GTP-binding protein)
cdc 25 p80	신장인자 (Elongation factor) Tu	헤모글로빈 (Haemoglobin) A
샤페로닌(Chaparonin)	엔도-라모시다제(Endo-rhamosidase)	헤모글로빈 (Haemoglobin) A1
콜레스테롤 에스테라제 (Cholesterol esterase)	이노라제 (Enolase)	헤모글로빈 바르셀로나 (Haemoglobin Barcelona)
콜레스테롤 (Cholesterol) 모노-옥시게나제 (mono-oxygenase)	이노일-ACP-하이드라타제 (Enoyl-ACP-hydratase)	헤모글로빈 바츠 (Haemoglobin Barts)
	이노일-ACP-리덕타제 (Enoyl-ACP-reductase)	헤모글로빈 베스 이스라엘 (Haemoglobin Beth Israel)
사이트레이트 신세타제 (Citrate synthetase)	ets 암유전자 단백질 (oncogene protein)	헤모글로빈 번버리 (Haemoglobin Bunbury)
클라스린 (Clathrin)	페리틴 (Ferritin)	

콜라게나제 (Collagenase)	페레독신 (Ferrodoxin)	헤모글로빈 코친-포트 (Haemoglobin Cochlin-Port)
코르티손 디하이드로게나제 (Cortisone dehydrogenase)	지방산 신세타제 (Fatty acid synthetase)	로얄 (Royal)
crk 암유전자 단백질 (oncogene protein)	fgr 암유전자단백질 (oncogene protein)	헤모글로빈 코우타운 (Haemoglobin Cowtown)
사이클린 (Cyclin) A and B	fps 암유전자 단백질 (oncogene protein)	헤모글로빈 크랜스톤 (Haemoglobin Cranston)
사이클로필린 (Cyclophilin)	프룩토스 비스포스페이트 (Fructose biphosphate)	헤모글로빈 크레테일 (Haemoglobin Creteil)
사이티딘 디아미나제 (Cytidine deaminase)	알도라제 (aldolase)	헤모글로빈 (Haemoglobin) D
사이티딜레이트 디아미나제 (Cytidylate deaminase)	푸마라제 (Fumarase)	헤모글로빈 (Haemoglobin) D
사이토크롬 C 퍼옥시다제 (Cytochrome C peroxidase)	GABA 아미노스랜스퍼라제 (aminotransferase)	로스 엔젤레스 (Los Angeles)
시토크롬 (Cytochrome) P450	갈락토리다제 (Galactosidase)	헤모글로빈 D 펀자브 (Haemoglobin D Punjab)
시토신 (Cytosine)	젤라티나제 (Gelatinase)	헤모글로빈 (Haemoglobin) F
메틸트랜스퍼라제 (methyltransferase)	겔솔린 (Gelsolin)	헤모글로빈 가워 (Haemoglobin Gower)
dbl 암유전자 단백질 (oncogene protein)	글루코포스페이트 아이소머라제 (Glucophosphate isomerase)	헤모글로빈 (Haemoglobin)
디펜신 (Defensin)	글루코실세라마이드 (Glucosylceramide)	헤머스미스 (Hammersmith)
디아실 글라이세롤 (Diacyl glycerol)	갈락토실 트랜스퍼라제 (galactosyl transferase)	헤모글로빈 히로시마 (Haemoglobin Hiroshima)
아실트랜스퍼라제 (acyltransferase)	글루타미나제 (Glutaminase)	헤모글로빈 인디아나폴리스 (Haemoglobin Indianapolis)
디하이드로폴레이트 리덕타제 (Dihydrofolate reductase)	글루타민 포스포리보실 (Glutamine phosphoribosyl)	헤모글로빈 칸사스 (Haemoglobin Kansas)
디하이드로오로타타제 (Dihydroorotatase)	파이로포스페이트 (pyrophosphate)	헤모글로빈 카리야 (Haemoglobin Kariya)
디하이드로오로테이트 (Dihydroorotate)	아미도트랜스퍼라제 (amidotransferase)	헤모글로빈 캄지 (Haemoglobin Kempsey)
디하이드로게나제 (dehydrogenase)		헤모글로빈 케냐 (Haemoglobin Kenya)
헤모글로빈 레포르 (Haemoglobin Lepore)	하이드록시메틸글루타릴- (Hydroxymethylglutaryl-)	마이엘로퍼옥시다제 (Myeloperoxidase)
헤모글로빈 (Haemoglobin) M	CoA-리덕타제 (reductase)	마이오필라멘트 (Myofilament)
헤모글로빈 (Haemoglobin) M	하이드록시메틸글루타릴- (Hydroxymethylglutaryl-)	마이리스토일 트랜스퍼라제 (myristoyl transferase)
하이드 파크 (Hyde Park)	CoA-신세타제 (synthetase)	Na / K ATPase
헤모글로빈 M 르와트 (Haemoglobin M Iwate)	하이드록시스테로이드 (Hydroxysteroid)	N-아세틸글루쿠로니다제 (acetylglucuronidase)
헤모글로빈 M 사스카툰 (Haemoglobin M Saskatoon)	디하이드로게나제 (dehydrogenase)	NAD-3 의존적 스테롤 (dependent sterol)-4-
헤모글로빈 낸시 (Haemoglobin Nancy)	하이포잔틴-구아닌- (Hypoxanthine-guanine-)	카르복실라제 (carboxylase)
헤모글로빈 필리 (Haemoglobin Philly)	포스포리보실 트랜스퍼라제 (phosphoribosyl transferase)	NADase
헤모글로빈 쿵즈 (Haemoglobin Quong Sze)	IMP-디하이드로게나제 (dehydrogenase)	NADPH-의존적 (dependent) 3-

헤모글로빈 롤리 (Haemoglobin Raleigh)	인돌 리아제 (Indole lyase)	옥소스테로이드 리덕타제 (oxosteroid reductase)
헤모글로빈 라니어 (Haemoglobin Ranier)	이노시톨 포스페이트 (Inositol phosphate)	넥신 (Nexin)
헤모글로빈(Haemoglobin) S	포스파타제 (phosphatase)	N-ras 암유전자 단백질 (oncogene protein)
헤모글로빈 실리 (Haemoglobin Sealy)	int-1 암유전자 단백질 (oncogene protein)	뉴클레올러스 단백질 (Nucleolus protein) B23
헤모글로빈 시애틀 (Haemoglobin Seattle)	아이소시트레이트 리아제 (Isocitrate lyase)	뉴클레오시드 디포스페이트 (Nucleoside diphosphate)
헤모글로빈 St. 루이스 (Haemoglobin St. Louis)	키닌-포밍 효소 (Kinin-forming enzyme)	키나제 (kinase)
헤모글로빈 St. 만데 (Haemoglobin St. Mande)	Ki-ras 암유전자 단백질 (oncogene protein)	오미딘 (Ornithine)
헤모글로빈 타이터스빌 (Haemoglobin Titusville)	락테이트 디하이드로게나제 (Lactate dehydrogenase)	아미노트랜스퍼라제 (aminotransferase)
헤모글로빈 토리노 (Haemoglobin Torino)	락토페린 (Lactoferrin)	오미딘 (Ornithine)
헤모글로빈 웨인 (Haemoglobin Wayne)	라미닌 (Laminin)	카바모일트랜스퍼라제 (carbamoyltransferase)
헤모글로빈 요크 (Haemoglobin York)	백혈구 엘라스타제 (Leukocyte elastase)	오미딘 디카복실라제 (Ornithine decarboxylase)
헤모글로빈 취리히 (Haemoglobin Zurich)	리포코르틴 (Lipocortin)	오로테이트 디카복실라제 (Orotate decarboxylase)
Ha-ras 암유전자 단백질 (oncogene protein)	리폭시게나제 (Lipoxygenase)	오로테이트 (Orotate)
헥소키나제 (Hexokinase)	L-myc 암유전자 단백질 (oncogene protein)	포스포리보실 트랜스퍼라제 (phosphoribosyl transferase)
히스타미나제 (Histaminase)	라이소자임 (Lysozyme)	p53
히스티딘 디카복실라제 (Histidine decarboxylase)	말레이트 디하이드로게나제 (Malate dehydrogenase)	펩티딜 아미도글라이코레이트 (Peptidyl amidoglycolate) 리아제 (lyase)
HSP 27	말레이트 신사제 (Malate synthase)	
하이드로피리미딘 (Hydropyrimidine)	말로닐 트랜스아실라제 (Malonyl transacylase)	펩티딜 프로릴 아이소머라제 (Peptidyl prolyl isomerase)
하이드로라제 (hydrolase)	만노시다제 (Mannosidase)	PF4
하이드록실 (Hydroxyacyl)-CoA-	met 암유전자 단백질 (oncogene protein)	페닐알라민 (Phenylalanine)
디하이드로게나제 (dehydrogenase)	메타에모글로빈 (Methaemoglobin)	하이드록실라제 (hydroxylase)
하이드로시메틸글루타릴 (Hydroxymethylglutaryl)	메티오닌 (Methionine)	포스파티데이트 포스파타제 (Phosphatidate phosphatase)
CoA-스플리팅 효소 (splitting enzyme)	아데노실 트랜스퍼라제 (adenosyl transferase)	포스포에놀 피루베이트 (Phosphoenol pyruvate)
	mos 암유전자 단백질 (oncogene protein)	카복시키나제 (carboxykinase)
포스포프рук토키나제 (Phosphofructokinase)	rel 암유전자 단백질 (oncogene protein)	tRNA 신세타제 (synthetase)
포스포글루코키나제 (Phosphoglucokinase)	리보뉴클레오티드 리덕타제 (Ribonucleotide reductase)	트로포마이신 (Tropomyosin)
포스포글루코뮤타제 (Phosphoglucomutase)	리보스 포스페이트-파이로포스페이트 키나제 (Ribose phosphate-pyrophosphate kinase)	트립토판 신사제 (Tryptophan synthase)
포스포글라이세레이트 키나제 (Phosphoglycerate kinase)		튜불린 (Tubulin)
포스포글라이세로뮤타제 (Phosphoglyceromutase)	리친 트로포엘라스틴 (Ricin tropoelastin)	타이로신 키나제 (Tyrosine kinase)
포스포리파제 (Phospholipase) A2	에시드 포스파타제 (acid phosphatase)	유비퀴논 리덕타제 (Ubiquinone reductase)

포스포리파제 (Phospholipase) C	에시드 프로티아제 (acid protease)	UPA
포스포리파제 (Phospholipase) CG1	헤미 머로마이오신 (Heavy meromyosin)	유리딘 모노포스페이트 (Uridine monophosphate)
포스포리파제 (Phospholipase) D	세린/스레오닌 키나제 (serine/threonine kinase)	키나제 (kinase)
포스포리파제 (Phospholipase) S	스펙트린 (Spectrin)	비타민 K 리덕타제 (Vitamin K reductase)
포스포리보무타제 (Phosphoribomutase)	스퍼민 신사제 (Spermine synthase)	wee-1 유전자 생산물 (gene product)
포스포리보실 포스페이트 (Phosphoribosyl phosphate)	스쿠알렌 에폭시다제 (Squalene epoxidase)	젠티딘 디하이드로게나제 (Xanthine dehydrogenase)
트랜스퍼라제 (transferase)	스쿠알렌 모노옥시게나제 (Squalene monooxygenase)	젠티딘 옥시다제 (Xanthine oxidase)
pim 암유전자 단백질 (oncogene protein)	src 암유전자 단백질 (oncogene protein)	자일로실 트랜스퍼라제 (Xylosyl transferase)
플라스미노젠 활성화자 (Plasminogen activator)	스테롤 메틸트랜스퍼라제 (Sterol methyltransferase)	yes 암유전자 단백질 (oncogene protein)
억제자 (inhibitor)	suc 1 p13	α -액틴 (actin)
포린 (Porin)	수시닐-CoA-신사제 (Succinyl-CoA-synthetase)	α -만노시다제 (mannosidase)
pRB 레티노블라스토마 유전자 (retinoblastoma gene)	수퍼옥시다제 디스무타제 (Superoxide dismutase)	α -멜로제닌 (melogenin)
생산물 (product)	타르트레이트 디하이드로게나제 (Tartrate dehydrogenase)	α -튜불린 (tubulin)
pRb 레티나블라스토마 유전자 (retinoblastoma gene)	티오에스터라제 (Thioesterase)	β -액틴 (actin)
생산물(product)	티오레독신 (Thioredoxin)	β -글루루로니다제 (glucuronidase)
프로퍼딘 (Properdin)	트롬보스폰딘 (Thrombospondin)	β -글라이세로포스파테이즈 (glycerophosphatase)
프로스타글란딘 신세아제 (Prostaglandin synthase)	트롬복산 (Thromboxane)-A ₂ -신세타제 (synthetase)	β -케토아실(ketoacyl)-ACP-리덕타제 (reductase)
단백질 키나제 (Protein kinase) C		
퓨린 뉴클레오시드 (Purine nucleoside)	타이미딜레이트 신세타제 (Thymidylate synthetase)	β -케토아실(ketoacyl)-ACP-신세타제(synthetase)
포스포릴라제 (phosphorylase)	트랜스아실라제 (Transacylase)	
파이루베이트 디하이드로게나제 (Pyruvate dehydrogenase)	트리오스 포스페이트 아이소머라제 (Triose phosphate isomerase)	β -스펙트린 (spectrin)
파이루베이트 키나제 (Pyruvate kinase)	트리오스 포스페이트 (Triose phosphate) 디하이드로게나제 (dehydrogenase)	β -트로포마이오신 (tropomyosin)
raf 암유전자 단백질 (oncogene protein)		β -튜불린 (tubulin)

[0242]

특히 더 바람직한 세포 내 수용체의 그룹은 국제특허출원 PCT/EP96/00716호의 실시예에 기재된 바와 같은 HMG 단백질, 더 상세하게는 HMGA 단백질이다. 본원에서 사용되는 용어 "HMGA 단백질 (HMGA proteins)"은 바람직하게는 하기와 같은 전반적인 단백질을 의미한다: HMGA1, HMGA1a, HMGA1b 및 HMGA2.

[0243]

HMGA 단백질은 모듈 구조(module structure) 및 개개가 세 개의 DNA-결합 도메인을 개개 포함하고, 이는 "AT 후크 (AT hooks)"라고 명명되며, 도 2에 DBD 1 내지 DBD3으로 표시되며, 강한 산성 C-말단 영역을 나타낸다. "AT 후크 (AT hooks)" 중 하나와 결합하는 길항제는, HMGA 1 단백질 및 두 개의 접합 변종 (splice variants)인 HMGA1A 및 HMGA1B (도 2 참조)를 인지할 뿐만 아니라, HMGA2와 같은 DNA-결합 분자들과 유사한 교차 반응성을 나타낸다는 것은 당업계에 있어서는 자명

- [0244] 할 것이다. HMG2와는 별도로, 보다 추가적인 단백질들은 또한 " AT 후크 (AT hooks)"와 유사한 서열을 갖고 있고, 개개의 경우에 추가적인 수용체들을 형성한다. 이러한 단백질로는 그 중에서도 특히 하기 표에 개시된 것들이다:
- [0245] 컬럼(column) 1: 단백질데이터은행 접근부호; 컬럼 2: 단백질 명칭
- [0246] Q9UKB0 인간 HMG-단백질-R (Human HMG-Protein-R)
- [0247] Q9UKY1 ZHX1_인간 징크 핑거- 및 호메오박스-단백질 1 (ZHX1_Human zinc Finger-and Homeobox-Protein 1)
- [0248] P55198 AF17_인간 AF-17 단백질 [MLLT6] (AF17_Human AF-17 Proteins [MLLT6])
- [0249] Q59F28 인간 트리토락스 호모로겐 (단편) (Human Trihorax Homologen (Fragment))
- [0250] Q6PJQ2 인간 ZNF406 단백질(단편)(Human ZNF406 Protein (Fragment))
- [0251] Q75PJ9 인간 ZFAT-1 단백질(Human ZFAT-1 Protein)
- [0252] Q75PJ7 인간 ZFAT-3 단백질 (Human ZFAT-3 Protein)
- [0253] Q75PJ6 인간 TR-ZFAT 단백질 (Human TR-ZFAT Protein)
- [0254] Q9ULG1 인간 KIAA1259 단백질 (Human KIAA1259 Protein)
- [0255] Q9NUK2 인간 가설 단백질 FLJ11314 (Human Hypothetical Protein FLJ11314)
- [0256] Q9NTG6 인간 가설 단백질 DKFZp434B0616 (Human Hypothetical Protein DKFZp434B0616)
- [0257] Q8IX01 SFR14_인간 예측 스플라이스 인자 (SFR14_HUMAN Presumed Splice Factor)
- [0258] Q9H5J8 인간 가설 단백질 FLJ23363 (Human Hypothetical Protein FLJ23363)
- [0259] Q6I9Y6 인간 MGC5306 단백질 (Human MGC5306 Protein)
- [0260] Q8IX01-2 Q8IX01의 스플라이스 이형 2 (Splice Isoform 2 of Q8IX01)
- [0261] Q8IX01-3 Q8IX01의 스플라이스 이형 3 (Splice Isoform 3 of Q8IX01)
- [0262] Q8IX01-4 Q8IX01의 스플라이스 이형 4 (Splice Isoform 4 of Q8IX01)
- [0263] Q15291 RBBP5_인간 fp티노블라스토마-결합 단백질 5 (RBBP-5) (RBBP5_HUMAN Retinoblastoma-binding Protein 5 (RBBP-5))
- [0264] P51608 MECP2_인간 메틸-CpG-결합 단백질 2 (MECP2_HUMAN Methyl-CpG-binding Protein 2)
- [0265] Q6IPE2 인간 FLJ12800 단백질 (Human FLJ12800 Protein)
- [0266] Q6QHH9 인간 메틸-CpG-결합 단백질 2, 이형 B (Human Methyl-CpG-binding Protein 2, Isoform B)
- [0267] Q9H8H4 인간 가설 단백질 FLJ13629 (Human Hypothetical Protein FLJ13629)
- [0268] Q7Z384 인간 가설 단백질 DKFZp686A24160 (Human Hypothetical ProteinDKFZp686A24160)
- [0269] O42043 ENK7_인간 HERV-K_1q23.3 프로바이러스 (ENK7_HUMAN HERV-K_1q23.3 Provirus)
- [0270] P61569 ENK16_인간 HERV-K_10p14 프로바이러스 (ENK16_HUMAN HERV-K_10p14 Provirus)
- [0271] Q86VM3 인간 MYB 결합 단백질 1a [MYBBP1A] (Human MYB binding Protein 1a[MYBBP1A])
- [0272] Q9UNW3 인간 코팅 단백질 RIC-2 (Human Coat Protein RIC-2)
- [0273] Q9BWE0 인간 REPIN1 단백질 (가설 단백질 ZNF464) (Human REPIN1 Protein(Hypothetical Protein ZNF464))
- [0274] Q9ULL5 인간 KIAA1205 단백질 (Human KIAA1205 Protein)
- [0275] Q9NZH2 인간 Dhfr Oribeta-결합 단백질 RIP60 (Human Dhfr Oribeta-binding Protein RIP60)
- [0276] Q9NZI3 인간 리넨스 상피세포-포함하는 성장인자 p52 (Human Linens epithelium-containing growth factor

p52)

- [0277] Q9NY27 인간 프로테인포스파테이즈-4의 조절 서브-유닛 2 (Human Regulatory Sub-Unit 2 of Proteinphosphatase-4)
- [0278] Q86U91 인간 HMGA2/RAD51L1 혼합 단백질 (Human HMGA2/RAD51L1 Fusion protein)
- [0279] Q95368 인간 전사 공동자극자 p52 (Human Transcriptional Coactivator p52)
- [0280] Q9P015 인간 HSPC145 (미토콘드리아 리보솜 단백질 L15) (Human HSPC145(Mitochondrial Ribosome protein L15))
- [0281] Q5U071 인간 HMG 단백질 'box 2' (Human HMG Protein 'box 2')
- [0282] Q9H0Y1 인간 가설 단백질 DKFZp564I206 (Human Hypothetical Protein DKFZp564I206)
- [0283] Q6ZP45 인간 가설 단백질 FLJ26517 (Human Hypothetical Protein FLJ26517)
- [0284] P17096-2 P17096의 스플라이스 이형 HMG-Y [HMGA1] (Splice Isoform 1 HMG-Y of P17096)
- [0285] Q9Y6X0 SETBP_인간 SET-결합 단백질 (SEB) [SETBP1] (SETBP_HUMAN SET-binding Protein (SEB) [SETBP1])
- [0286] Q8TEK3 DOT1L_히스톤-리신 N-메틸트랜스퍼라제 (DOT1L_HUMAN Histone-Lysine N-Methyltransferase)
- [0287] Q8TEK3-2 Q8TEK3의 스플라이스 이형 1 [DOT1L] (Splice Isoform 1 from Q8TEK3[DOT1L])
- [0288] Q03164 HRX_인간 징크 핑거-단백질 HRX (ALL-1) (HRX_HUMAN Zinc finger-Protein HRX (ALL-1))
- [0289] Q86YP1 인간 전사 인자 MLL UPN96240 (Human Transcription factor MLLUPN96240)
- [0290] Q86YN9 인간 전사 인자 MLL UPN95022 (Human Transcription factor MLLUPN95022)
- [0291] Q03164-2 Q03164의 스플라이스 이형4P-18B [MLL] (Splice Isoform 4P-18B from Q03164 [MLL])
- [0292] P04920 B3A2_인간 음이온 교환기 단백질 2 (B3A2_HUMAN Anion Exchanger Protein 2)
- [0293] Q59GF1 인간 음이온 교환기-2형 a-변이체 (Human Anion Exchanger-2 type a-variant)
- [0294] Q8TAG3 인간 SLC4A2 단백질 (Human SLC4A2 Protein)
- [0295] Q6P391 인간 PSIP1 단백질 (Human PSIP1 Protein)
- [0296] Q75475 인간 리넨스 상피세포-포함하는 성장 인자 p75 (Human Linens epithelium-containing growth factor p75)
- [0297] Q9UEY6 인간 음이온 교환기-2 형 a [SLC4A2] (Human Anion exchanger-2 type a [SLC4A2])
- [0298] Q9UEY5 인간 음이온 교환기-2 type b2 [SLC4A2] (Human Anion exchanger-2 typeb2 [SLC4A2])
- [0299] Q9UEY4 인간 음이온 교환기-2 type b1 [SLC4A2] (Human Anion exchanger-2 typeb1 [SLC4A2])
- [0300] Q9UER6 인간 전사 공동자극자 p75 (Human Transcriptional coactivator p75)
- [0301] Q00256 인간 DFS70 (Human DFS70)
- [0302] P04920-2 P04920의 스플라이스 이형 B1 [SLC4A2] (Splice Isoform B1 [SLC4A2])
- [0303] Q9BTB1 인간 가설 단백질 MGC10561 (Human Hypothetical Protein MGC10561)
- [0304] Q9UKB0 인간 HMG 단백질-R (Human HMG Protein-R)
- [0305] Q43167 ZBT24_인간 징크 핑거-및 BTB-도메인-포함하는 단백질 (ZBT24_HUMAN Zinc finger- and BTB-domain-containing protein)
- [0306] Q8N455 인간 ZBTB24 단백질 [ZBTB24] (Human ZBTB24 Protein [ZBTB24])
- [0307] Q5TED5 인간 징크 핑거-단백질 450 [ZNF450] (Human Zinc finger-Protein 450 [ZNF450])
- [0308] Q96CK0 인간 징크 핑거-단백질 653 (Human Zinc finger-Protein 653)

[0309]	Q96AS7	인간 징크 핑거-단백질 653 (Human Zinc finger-Protein 653)
[0310]	P51888	PRELP_인간 프로라진 전구체 (PRELP_HUMAN Prolargine Precursor)
[0311]	Q5JPC9	인간 가설 단백질 DKFZp667H216 (Human Hypothetical Protein DKFZp667H216)
[0312]	Q6FHG6	인간 PRELP-단백질 (Human PRELP-Potein)
[0313]	Q6ZR44	인간 가설 단백질 FLJ46672 (Human Hypothetical Protein FLJ46672)
[0314]	Q8NEZ4	MLL3_인간 골수/임파구-백혈병 단백질 3 Homologon (MLL3_HUMANMyeloid/lymphoid-Leukaemia protein 3 Homologon)
[0315]	Q96AC6	KIFC2_인간 키네신-유사 단백질 KIFC2 (KIFC2_HUMAN Kinesine-like Protein KIFC2)
[0316]	Q9COH5	K1688_인간 단백질 KIAA1688 (K1688_HUMAN Protein KIAA1688)
[0317]	P52926	HMGIC_인간 HMG 단백질 I-C (HMGIC_HUMAN HMG Protein I-C)
[0318]	Q9UKV3	ACINU_인간 세포사멸 크로마틴 응축의 수여체 (ACINU_HUMAN Inductor ofapoptotic Chromatin condensation)
[0319]	Q59F82	인간 C21orf2-단백질 변이체 (Human C21orf2-Protein variant)
[0320]	Q5VYT7	인간 OTTHUMP00000021181 (Human OTTHUMP00000021181)
[0321]	Q96M56	인간 가설 단백질 FLJ32810 (Human Hypothetical Protein FLJ32810)
[0322]	Q69YJ6	인간 가설 단백질 DKFZp667N107 (Human Hypothetical Protein KFZp667N107)
[0323]	Q8NEY3	SPAT4_스퍼마토진-관련 단백질 (SPAT4_HUMAN Spermatogene-associated Protein 4)
[0324]	Q12809	KCNH2_인간 포타슘 포텐셜 조절 이온채널 Sub-family (KCNH2_HUMAN Potassium Potential-controlled Ion channel Sub-family)
[0325]	Q8IYY4	인간 DAZ 작용 단백질과 유사한 단백질 1 [DZP1L1] (Human protein similar to the DAZ-interacting protein 1 [DZIP1L])
[0326]	Q6ZN04	인간 가설 단백질 FLJ16544 (Human Hypothetical Protein FLJ16544)
[0327]	Q5SXN7	인간 혈청학적으로 정의된 결장암 항원 3 (Human Serologically defined colon cancer antigen 3)
[0328]	Q8IVG2	인간 KIAA2009 단백질(단편) [RKHD3] (Human KIAA2009 Protein (Fragment) [RKHD3])
[0329]	Q75VX8	인간 KIAA2083 (단편) [KIAA2038] (Human KIAA2038 Protein (Fragment) [KIAA2038])
[0330]	Q12809-2	스플라이스 이형 2 von Q12809 [KCNH2] (Splice Isoform 2 von Q12809 [KCNH2])

[0331] 이런 배경기술에 반하여, 본 발명은 또한 L-핵산, 특히 표 1 내지 표 3에서 언급된 임의의 목표 분자들에 대한 스피에겔머에 관한 것이다.

[0332] 세포내 수용체 및 이의 상호 파트너 사이에서 영향을 줄 수 있는 상호 작용의 세포내에서의 형태와는 달리, L-핵산은 세포내 수용체에 결합시키기 위해 특히 세포 내에서의 세포내 활성 작용체로서 이용된다. 세포내 수용체의 상호작용 파트너의 종류에 따라서, L-핵산의 세포 내 이용은 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물, 또는 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물의 조합물이 서로 영향을 줄 수 있도록 서로 상호작용을 할 수 있도록 한다.

[0333] 본 발명에 따라 핵산, 특히 세포 내 작용체로서의 스피에겔머의 용도 및 세포내 수용체를 결합시키는 방법과 관련하여, 바람직하게는 이들이 시험관 내 (*in vitro*) 적용 및 시험관내 (*in vitro*) 시험 방법과 관련된 것임도 명심해야 할 것이다.

[0334]

본 발명에 따라 질병의 치료 및/ 또는 예방용 약제의 제조 및/ 또는 진단 목적용약제의 제조를 위한 L-핵산, 특히 스피에겔머의 발명에 따른 용도와 관련하여, 상기 목표 분자는 세포내 목표 분자이다. 이와 관련하여, 상기 세포내 목표 분자는 예방, 치료 및 진단하여야 할 질환 또는 질병과 원인적 또는 비원인적인 으로 관련되나, 이 분자가 L-핵산과의 특이적으로 결합하는 어떠한 경우에도 약제의 경우에는 상기 질병은 경감, 예방 또는 치료되며, 진단제인 경우는 상기 질병 또는 이의 예후를 확정 또는 진단할 수 있게 된다. 본원에서 사용되는 "진단(diagnosis)"의 개념은 초기 진단 뿐 만 아니라 후속되는 진단, 특히, 예를 들어 상기질병의 진행 또는 상기 질병의 단계를 결정하거나 추적하기 위한 진단 또는 조사(investigation)도 포함하는 것이다. 상기 목표 분자는 본원에서 개시된 바와 같은 세포내 수용체, 상기 목표 분자는 본원에서 개시된 바와 같이, 세포 내 수용체, 특히 전사인자, 세포 내 목표 분자 또는 HMG 단백질이라는 것도 본 발명의 범주 내이다. 본 발명의 범주 내에서, 만일 상기 목표 분자가 세포 내, 즉, 세포 안에 존재한다면, 상기 질병 및/또는 진단에 영향을 주는 상기 상호작용이 상기 L-핵산, 특히 스피에겔머, 및 상기 목표 분자, 즉, 상기 수용체 간에서의 발생함이 가장 바람직하다. 또한 상기 목표 분자가 세포 외부에 존재하는 경우는 상기 L-핵산, 특히 스피에겔머 및 상기 수용체간의 상기 상호 작용이 세포 외에서 발생하는 것도 본 발명의 범주 내이다.

[0335]

세포내 목표 분자에 대한 L-핵산을 이용하여 제조되는 약제의 용도를 표기하는 표기(indication)는 상기 표기를 기반으로 하는 개개 병리기전에 따라 상기 세포내 목표 분자들의 전개가 되는 것임을 당업자를 위해 표기한다. 결국, HMGA 단백질의 경우에 예를 들어 하기 질병들을 수반함은 공지되어 있다: 암종 (그 중에서도, 가슴, 폐, 피부, 갑상선)뿐만 아니라 백혈병 및 림프종 및 육종 (그 중에서도, 횡문근육종, 골육종)과 기타 악성 종양. 또한, HMGA 단백질들은 과오종 (가슴 및 폐), 지방 조직 종양 (지방종), 타액선의 다형성 선종, 자궁 근종, 평활근종, 가슴 섬유 선종, 자궁내막상의 폴립 (polyps of the endometrium) 및 동맥경화성 플라크 (atherosclerotic plaques)를 포함하는 다양한 형태의 중간엽 종양에서 발현된다. HMGA는 흥미로운 치료상의 목표이다. HMGA의 차단은 암을 제어 및 전이성 확산을 방지하기 위한 시점이 적절할 것이다. 본원에서 상세하게 개시된 바와 같이, HMGA 단백질에 대한 L-핵산은 HMGA 단백질의 다수의 바이러스성 유전자의 전사 또는 HMGA의 현저한 발현, 특히 신생내막 (neointimal), 혈관성 평활근 세포 (vascular smooth muscle cells), 대식세포 (macrophages) 및 신생 혈관 (new blood vessels)과 수반되는 동맥경화증에 의하여 영향을 받는 조직상의 HMGA1의 현저한 발현과 관련성이 있어 바이러스성 질환 및 동맥경화증 (arteriosclerosis)의 진단 및/치료를 위해 또한 적합할 수 있다.

[0336]

비록 본 발명자가 놀랍게 발견한 바와 같이 - 핵산, 바람직하게는, L-핵산 및 특히 스피에겔머는 세포질 막과 같은 인지질 이중막에서의 침투가 가능하고, 세포내 수용체와의 특이적 상호 작용의 면에서 세포내에서 기능을 발휘함에도 불구하고, 상기 L-핵산의 침투상의 유효성은 다양한 기술을 이용함으로써 영향을 받고 특히 향상될 수 있다. 이러한 기술들은 화학 물질 또는 분자의 사용뿐만 아니라, 물리적 측정법의 사용도 포함한다. 그 형태에 상관없이, 이러한 기술들은 본원에서 일반적으로 “전달 운반체 (delivery vehicles)”로 지칭된다. 본 발명자들이 압타머도 이러한 특성을 나타내고 상기 스피에겔머도 유사하게 기본적으로 동일한 목적, 적용 및 용도를 위한 조성물과 관련하여 사용가능함을 밝힌 것도 본 발명의 범주 내이다.

[0337]

화학 물질 및 분자들의 이용에 있어서, 추가적인 관점은 상기 핵산이 상기 전달 (delivery)을 위하여 변형이 요구되는 여부이다. 만일 상기 전달 운반체가 리포솜 (liposomes), 폴리펩티드 운반체 (polypeptide vehicles), 사이클로덱스트린 (cyclodextrin), 덴드리머 (dendrimers), 나노입자 (nanoparticles), 극미립자 (microparticles) 및 폴리에틸렌이민과 같은 소포(vesicle)이거나 또는 이를 포함하는 경우에는 전달 운반체를 목적으로 하는 변형은 일반적으로 필요하지 않다. 전달 운반체를 목적으로 한 변형은 만약 상기 전달 운반체가 수용체-매개성 엔도시토시스 (receptor-mediated endocytosis), 융합성 펩티드(fusogenic peptides), 신호성 펩티드 (signal peptides) 또는 소수성 접합체(lipophilic conjugates)을 사용하는 경우에는 보통 필수적이다. 상기한 물리적 기술의 그룹으로는 특히 전기 천공법 (electroporation) 또는 전리용법(iontophoresis)을 포함한다. 세포질막과 같은 인지질 이중막을 통한 추가적인 화합물 전달 기술들은 이미 당업계에 잘 알려져 있으며, 이들은 예를 들어 압타머 및/ 또는 스피에겔머와 같은 기능성 핵산의 전달에 또한 적합할 것이다.

- [0338] 본 발명의 범위 내에서 다양한 양태의 범위 내에서 사용가능한 개별적 전달 운반체는 하기에 좀 더 상세히 기재될 것이다.
- [0339] 리포솜 (Liposomes)은 양이온이 음전하성 핵산과 반응하여 이들의 음이온성 전하를 중화시키는 예를 들어, N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA) 및 N-[1-(2,3-디올레일옥시)]-N,N,N-트리메틸암모늄 설페이트 (DOTAP)와 같은 인공 양이온성 지질(artificial cationic lipids)로 구성되어 있다. 상기 운송과정은 엔도시토시스 (endocytosis)를 통해 발생한다(PNAS, 93:11493-11498, 1996). 그러나, 양이온 리포솜은 특히 고농도에서 독성이 있어 시험관 내 (*in vitro*) 및 생체 내 (*in vivo*)에서의 이용에 제한이 있다 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 197:818, 1993; Biochem Biophys Res Commun, 1372:55-68, 1998.). 반면에, 양친매성 피리디늄 기반 지질인 SAINT-2는 무독성 제형이다 (Nucleic Acids Res, 29:2079-2087, 2001). 또한, pH-민감성 리포솜이 호환 가능하며, 콜레스테릴 헤미석시네이트 (cholesteryl hemisuccinate; CHEMS) 및 디올레일 포스파티딜 에탄올아민 (dioleoyl phosphatidyl ethanolamine; DOPE)와 같은 양친매성 분자들로 구성되된다(J. Pharmacol. Exp. Ther., 297:1129-1136, 2001). 리포솜의 폭넓게 상이한 많은 제형들이 다스 (Dass) 및 토르칠리 (Torchili)의 문헌에서 확인가능하다. (Drug Delivery, 9:169-180, 2002; Nat Rev Drug Disc, 4:145-160, 2005).
- [0340] 이미 세포막에 존재하는 수용체-매개성 엔도시토시스 (RME) 전달 메커니즘이 이용된다. 이러한 목적으로 상기 핵산은 예를 들어, 폴리-L-리신 (poly-L-lysine; PPL) 링커를 매개로 하여 운송 단백질(transporter protein)("운반 단백질(carrier protein)이라고도 함)에 공유 결합으로 결합한다. 상기 운송 단백질의 선택은 세포막의 특정 수용체에 결합할 수 있는 능력 및 엔도시토시스에 의한 세포내에서의 축적에 따라 결정된다. 따라서, 세포-특이적 운송(cell-specific transport)이 실현가능 해진다. 예를 들어, c-myc에 대한 안티센스 포스포로티오에이트 (antisense phosphorothioate)는 M-14 인간 흑색종 세포에 도입될 수 있다 (Anticancer Res, 17:29-35, 1997). 그러나, RME에 의한 효율적인 운송은 리간드에 대한 상기 수용체의 친화성뿐만 아니라 상기 세포들-특히 생체내(*in vivo*)-에 관한 선택되는 수용체의 제한성에 결정된다. 게다가, 선택된 리간드는 전달 운반체의 가능한 독성을 피하기 위하여 비활성이어야만 하거나 치료학적 결과면에서 향상된 효과를 나타내야 한다. 그러므로, *in vivo* 상에서 선택된 수용체의 선택 및 편재된 증식은 성공적인 RME-기반 운송 (RME-based transport)을 위하여 결정적인 요소이다. 게다가, 이입소체 구획 (endosomal compartments)에서의 핵산의 격리가 RME-기반 운송에서 발견되고, 이는 이 방법을 세포내 운송 또는 세포내 방출 또는 전달을 위하여 매우 유망하지 않게 하는 것으로 나타나게 할 수도 있다. 그중 가장 중요한 것은 수용체와 핵산 사이에서의 결합은 서로의 기능이 감추되지 않도록 선택되어야 한다는 점이다 (J Pharmaceutical Science, 92(8): 1559-1573, 2003).
- [0341] 융합 펩티드 (Fusogenic peptide)는 펩티드-올리고뉴클레오타이드 접합체(peptide-oligonucleotide conjugates)로 하여금 세포막과 융합하여 세포에서 운송이 효과가 있도록 하는 데에 사용되어 왔다 (Bioconjug Chem, 9: 466-475, 1998; Bioconjug Chem, 6:43-53, 1995; Nucleic Acids Research, 25:2730-2736, 1997).
- [0342] 핵단백질의 시토졸로부터 핵으로의 선택된 유입은 "핵 정위 신호; nuclear localisation signals; NLS)" 라고 명명되는 짧은 펩티드 서열에 의해 매개된다. 그러므로, 다양한 NLS 펩티드 유도체들은 핵산을 핵 내로 운송하기 위하여 사용가능하다 (Bioconjug Chem, 10:1005-1012, 1999; Bioconjug Chem, 10:598-606, 1999; Bioconjug Chem, 6:101-108, 1995). 덧붙여, 핵산의 세포성 유입을 촉진시킬 수 있는 작용을 갖는 "신호성 유입 펩티드 (signal inport peptides; IP)라고 지칭되는 것이 있고 이는 예를 들어, 카포시 섬유아세포 성장 인자 (Kaposi's fibroblast growth factor; K-FGF)로부터 유래될 수 있다 (Adv Drug Deliv Rev, 44:35-49, 2000).
- [0343] 바이러스성 캡시드 (viral capsids)와 유사한 소포는 폴리펩티드 블록(block)에 의해 형성되고, 이는 세포내 운송을 위한 가능한 전달 운반체로서 제공이 가능하게 한다(Nat. Materials, 3(4): 244-8, 2004).

- [0344] 올리고뉴클레오타이드의 친수성 특성 및 음이온성 포스포디에스테르 골격은 세포내의 침투를 감소시킨다. 따라서, 친지성 접합체는 올리고뉴클레오타이드의 지질단백질과의 결합능을 향상시키는 하나의 방안이다. 가장 널리 시도되어 온 상기 접합체는 콜레스테롤이다 (Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 12:103-128, 2002).
- [0345] 사이클로텍스트린은 중앙에 소수성 공극 및 외부 표면에 다수의 히드록실기를 가는 시클릭 올리고사카라이드이다. 따라서, 사이클로텍스트린은 이미 인간 T-세포주에서의 안티-센스 올리고뉴클레오타이드의 운송에 이용되어 왔으며 (Antisense Res. dev. 5:185-192, 1995), 또한 면역원성 CpG 서열의 세포내 운송, 및 세포내 방출 또는 전달을 위한 생체내 실험상에서 이용되어 왔다. (Biochem Pharmacol, 52:1537-1544, 1996). 사이클로텍스트린의 폭넓게 다양한 제형은 데이비스(Davis) 및 부르스터(Brewster)의 문헌에 제시되어 있다 (Nature Reviews Drug Discovery 3:1023-1035, 2004).
- [0346] 덴드리머 (Dendrimers)는 전형적으로, 폴리아마이드의 반복성 단위로 구성되는 고 가지상 모양 (high branched)의 거대분자이다. 상기 분자는 정전기학적 상호작용에 의해 타 분자와 반응하는, 표면상의 1차 아미노기와 같은 작용기를 운반한다. 따라서 복합 구조이 신속하고 매우 재현성이 강하게 형성되어, 결국 저 독성의 복합체를 형성한다 (Nucleic Acids Research, 28:4225-4231, 2000; Clin Cancer Res, 7:3606-3612, 2001).
- [0347] 시아노아크릴레이트 나노 입자들 (Cyanacrylate nanoparticles)은 1990년대 초반부터 올리고뉴클레오타이드의 방출 또는 전달을 위하여 시험되어 왔다. 올리고뉴클레오타이드의 나노입자와의 상호작용은 다양한 소수성 양이온, 주로 전하를 띤 나노입자의 이온 쌍을 통하여 일어난다. 수많은 친지성 양이온성-올리고뉴클레오타이드 쌍이 시험되어 왔음에도 불구하고, 폴리이소헥실 시아노아크릴레이트 (Polyisohexyl cyanoacrylate, PIHCA), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트 (Polyisobutyl cyanoacrylate, PIBCA) 또는 폴리헥실 시아노아크릴레이트 (Polyhexylcyanoacrylate, PHCA)들이 통상적으로 나노입자의 형성에 사용되어 왔다. (Pharm Res., 1:1370-1378, 1994; PNAS, 91:10460-10464, 1994; Pharm Res, 9:441-449, 1992). 또한, 나노입자들은 이미 생체내 (in vivo)에서 의 용도로 적용되고 있다 (Biochem Biophys Res Commun, 279:401-406, 2000; Pharm Res, 13:38-43, 1996).
- [0348] 극미립자 (microparticles) 또는 소위 "미소구체 (microspheres)"는 전형적으로 폴리 (d,l-락티드-코-글라이콜라이드 [lactide-co-glycolides; P(LA-GA)]와 같은 생분해성 중합체로부터 형성되고, 올리고뉴클레오타이드의 방출을 지연시키는 용도로 이용되어 왔다 (J Pharm Sci, 91:790-799, 2000; J Controlled Release, 69:197-207, 2000; J Drug Target, 5:291-302, 1998).
- [0349] 전기천공법 (electroporation)은 운송 기술의 하나로서, 이는 지질 이중막을 불안정화하기 위해 매우 강한 자기장을 이용하고, 그리하여 세포막을 침투케하여 투여가 가능하도록 상기 물질의 운송에 효과를 나타내도록 하는 하며, 이는 또한 세포내로 이온화된 형태로 존재가능하다 (전리요법). 전기천공법은 생체내 시험뿐만 아니라 생체 외 시험 (ex vivo)에서 올리고뉴클레오타이드의 피부를 통한 운송에 효과를 나타내기 위하여 성공적으로 사용되어 왔다 (Int J Pharm, 184:147-156, 1999; J Drug Target, 5:275-289, 1998; Pharm Res, 15:1596-1602, 1998; Int J Cancer, 85:260-266, 2000; Biochem Biophys Res Commun, 212:286-292, 1995; Blood, 88:731-741, 1996).
- [0350] 세포 내로의 "네이키드 (naked)" 올리고뉴클레오타이드의 수용은 고압을 이용하여 시험관내 시험 및 생체외 시험 (ex vivo)법상에서 향상이 가능하다. 이러한 기술을 사용하기 위한 차단 시스템의 요구는 오직 생체외 시험법 (ex vivo)상에서만 적용가능하다는 것을 의미한다 (PNAS, 96:6411-6416, 1999; Hum Gene Ther, 10:2355-2664, 1999).

- [0351] 또한, 충격파법 (shockwaves) 및 어쿠스틱 고압 파동법 (acoustic high pressure)의 사용은 세포내로의 올리고 뉴클레오티드의 운송에 효과를 나타낸다 (J Mol Med, 79:306-313, 2001; Cancer Res, 58:219-221, 1998). 초음파법(Ultrasound)은 충격파법과 필적하는 어쿠스틱 기술이나, 고주파 (Hz 대신 MHz)를 채용하고 짧은 적용 시간 (초 단위에서 분 단위까지)을 갖고 있어, 유전자 치료 기술에서 이미 지지 역할로서 사용되어 왔다 (Hum Gene Ther, 7:1339-1346, 1996; Invest Radiol, 32:723-727, 1997; Ultrasound Med Bio, 25:1451-1457, 1999).
- [0352] 본 발명의 부가적인 양태로서, 본 발명은 특히 압타머, 바람직하게는 기능성 L-핵산, 가장 바람직하게는 스피에겔머와 같은 기능성 핵산의 운송에 적합한 새로운 전달 운반체 (delivery vehicles)를 제공하는 것이다. 상기 전달 운반체는 폴리에틸렌이민 (polyethyleneimine)을 기초로 한 미립구-유사 (micelle-like) 또는 리포솜-유사 (liposome-like) 구조인 것이다. 하기 개시내용에 의하여 본 발명의 범위가 너무 구체화되지 않는 바램으로서, 본 발명자들은 상기 핵산은 미립구-유사 구조 또는 리포솜-유사 구조 내에 내장되거나 또는 포함되어 존재한다는 가정에서 출발하였다. 폴리에틸렌이민은 원칙상 선형 또는 가지상 폴리에틸렌이민, 특히 바람직하기로는 가지상의 폴리에틸렌이민의 형태로 존재 및 사용되어 왔다. 게다가, 폴리에틸렌이민은 고분자량 또는 저분자량 폴리에틸렌이민의 형태로 존재하거나 또한 사용될 수 있다. 바람직하게는, 고분자량 폴리에틸렌이민은 약 800 kDa의 분자량을 갖는 것이고, 저분자량 폴리에틸렌이민은 약 3 kDa의 분자량을 갖는 것이다. 본 발명의 범위 내에서 폴리에틸렌이민은 25 kDa의 분자량, 더 바람직하게는 25 kDa 분자량의 가지상 폴리에틸렌이민이다.
- [0353] 비록 이것은 효과적인 실행을 위해 필수적이지는 않지만, 그럼에도 불구하고 본 발명에 따른 전달 운반체내라면 전달되어야 할 상기 핵산은 또한 변형체를 운반하는 것이 바람직하다. 이와 관련하여, 상기 변형체로는 PEG 잔기를 포함하는 군으로부터 선택되는 경우가 바람직하다. 나아가, 상기 PEG 잔사는 약 1000 내지 10000 Da의 분자량, 바람직하게는 약 1200 내지 5000 Da, 보다 바람직하게는 약 1500 내지 2500 Da, 가장 바람직하게는 약 2000 Da의 분자량을 갖는 것이다.
- [0354] 본 발명에 따른 조성물을 제조하기 위하여 상기 핵산을 상기 전달 운반체를 혼합하는 경우에, 상기 전달 운반체에 전달되어야 하거나 포장화(packaged)되어야 하는, 상기 폴리에틸렌이민의 질소기의 전체 숫자의 상기 핵산의 전체 인산기 숫자의 비는 약 1 내지 20, 바람직하게는 약 1.5 내지 10, 보다 바람직하게는 2 내지 5, 가장 바람직하게는 2 내지 3으로 조절되는 것이다.
- [0355] 따라서, 본 발명에 따른 전달 운반체는 압타머 및 특히 스피에겔머와 같은 L-핵산과 같은 기능적 핵산을 위해 사용되기 위해, 전하된 입자 또는 시약과의 농축(condensation) 및 포장(packing) 과정 및 전체 복합체의 전하상의 수반되는 변화과정을 통한 핵산의 세포내 운송 메커니즘을 가능하게 한다. 이러한 엔도사이토시스를 통하여 용이하게 흡수되고 세포의 시토졸 내로 통과하게 된다. 이러한 방법상의 단점은 상기 DNA/ RNA의 안정성 및 이입소체 분획(endosomal compartment)으로부터 상기 핵산을 방출한다는 것이다. 세포내 시토졸(cytosol)에서, 리소솜(lysosome)은 프로테아제(protease) 또는 뉴클레아제(nuclease)의 개입 또는 상기 분획(compartment)의 양성자화(protonation)에 기인하여 매우 밀집된 엔도솜(endosome)에서 신속하게 형성된다. 여기에서 뉴클레아제는 상기 핵산을 파괴한다. 그러나, 부자연적인 배위 때문에 뉴클레아제에 안정한 구조를 갖는 스피에겔머에는 적용되지 않는다. 또한, 핵산은 리소솜의 산성 환경에서는 불안정하다. 그러나, 이는 DNA로부터 합성된 핵산은 보다 불안정하고 RNA로부터 합성되는 핵산은 덜 불안정하다. 전체 복합체는 외포작용(exocytosis)에 의하여 다시 세포 외로 운송되고 결국, 매우 소수의 핵산만이 세포 내로 통과한다. 적당한 침입 체계(transfection system)가 극복해야 할 도전 중의 하나는 안정화뿐만 아니라 시토졸 내로 엔도솜으로부터 핵산의 방출이다. 안정성에 관해, RNA 스피에겔머는 효소들에 의해 분해되지 않는 거울상 이성질체 형태이므로 진행 세포에서의 침입을 위한 이상적인 특성을 갖고 있다.
- [0356] 본 발명에 따른 용도에 있어서, L-핵산 및 특히, 본 발명에 따른 조성물에 관련하여, 극히 소수의 분자의

세포내 방출만으로도 원하는 효과를 달성하기에 충분하기에 그 작용기전은 촉매적의 접근법이 아닌 화학량적인 접근법에 근거하므로 이 활성물질 군에 중요하다. 이러한 목적으로, 본 발명은 지금까지 선행기술의 공지기술에서 만족되어야 할 요구사항을 충족시킨다.

- [0357] 본 발명에 따른 상기 침입 시스템 및 전달 운반체는 핵산 및 가지상 폴리에틸렌이민 (PEI)로부터 미립구 (micelle)을 형성시키는데 기초로 한다. 상기한 핵산의 포스포디에스 골격은 상기 PEI의 자유 질소기와 반응하고 가교결합을 통하여 작은 미립구 형성시키고 이는 상기 PEI 때문에 양전하를 갖게 된다. 이러한 미립구는 플라즈마 막의 압축에 의한 세포로부터의 엔도솜으로서 쉽게 흡수된다. 상기 PEI는 엔도솜 내부에서의 다수 클로라이드 이온이 삼투압의 구획 (compartment) 팽창을 야기하여 유입되는 전하를 완충시킨다. 이런 PEI의 효과는 양자 스펀지 효과 (proton sponge effect)로서 정의되며 궁극적으로 엔도솜을 파열시키고 시토플라스마의 방출을 유도한다고 문헌에서 개시된 바 있다(Pharm Res, 22 (3): 373-80, 2005; Eur J Cell Biol 83(3): 97-111, 2004; Gene Ther 9(24): 1700-7, 2002).
- [0358] 본 발명에 따른 조성물이 에어졸(aerosol)로서 적용되는 것도 본 발명의 범위 내이다.
- [0359] 추가적으로 스피에겔머는 세포 내 및 핵내 전달 목적뿐만 아니라 기관-특이적인 전달의 목적으로 신호성 펩티드로 유도체화될 수 있다. 상기 폴리에틸렌이민과의 신호성 펩티드의 직접적인 결합은 기관 또는 세포 내에서의 목표 정위(localisation)를 위해 사용될 수 있다.
- [0360] 본 발명의 또 다른 추가적인 양태는 L-핵산, 특히 스피에겔머, 보다 바람직하게는, HMGA 단백질에 대한 RNA 스피에겔머에 관한 것이다. HMGA 단백질에 대한 본원에서 개시된 상기 스피에겔머는 본 발명의 기본을 형성하는 것과 유사하게, L-핵산 및 특히 스피에겔머는 세포내의 인지질 이중 막 또는 세포질 막을 투과하여 선택되는 부위에 특이적으로 결합하기 위하여 세포내로 세포내 수용체와 결합할 수 있다는 것은 본 발명의 지식 범위내의 특정 실시예에 개시한다.
- [0361] 상기 HMGA 단백질 및 이에 대한 상기 L-핵산에 대하여, 상기 L-핵산의 세포내 용도와 관련하여 본원에서 얻어지는 지견은 본 발명의 본 과제와 관련하여 (그 반대의 경우도 포함) 적용하고 불필요한 반복을 피하기 위해 재차 언급된다.
- [0362] DNA-결합성 인단백질(phosphoproteins)의 HMG (고 운동군; high mobility group) 군 (family)은 모든 포유류 세포에 걸쳐 크로마틴 (chromatin)의 비-히스톤 구성요소 (non-histone component)로서 존재한다 (Grossche et al. 1994). 상기 기본 HMG 단백질은 3개의 서로 상이한 군 (family)으로 구분되는데- HMGB (이전에 HMG-1/-2), HMGN (이전에 HMG-14/-17), 및 HMGA 군 (이전에 HMG-I/Y/C)이다. 개개의 HMG 군은 그 특징적인 기능성 서열 모티프(motif): "HMG 박스 (HMG box)" (HMGB 군), "뉴클레솜성 결합 도메인 (nucleosomal binding domain)" (HMGN 집합체), 및 "AT 후크 (AT hook)" (HMGA 집합체)를 갖고 있다.
- [0363] 현 상태의 지견에 따르면, 상기 HMGA 군은 2개의 유전자, HMGA1 및 HMGA2를 포함한다. HMGA1을 호환적인 스플라이싱 (splicing)을 수행하여 세 개의 상이한 단백질, 즉, HMGA1a [이전에 HMG-I], HMGA1b [이전에 HMG-Y], HMGA1c [이전에 HMG-I/R]로 발현되는 반면에 HMGA2는 하나의 단백질, 즉, HMGA2 (이전에 HMGI-C)로 발현될 수 있다. HMGA1a, HMGA1b 및 HMGA2는 약 100 개의 아미노산 길이의 폴리펩티드이며 모듈 서열 조직(modular sequence organisation)을 갖는다: 이들은 이중-가닥 AT-풍부 DNA (AT-rich DNA)의 좁고 작은 채널과 결합하는 세 개의 강 염기성 영역 ("AT 후크")을 갖는다 (Reeves & Nissen 1990). 다른 한편, C-말단 부위는 다수의 산성 아미노산을 포함한다. 상기 단백질은 용액상에서 혼자인 상태에서는 안정적인 2차 구조를 갖지 않고, DNA 또는 기타 단백질과의 복합체로 존재하는 상태에서는 한정된 구조를 형성한다 (Huth et al 1997). HMGA 단백질은 포유류 세포 핵에서 가장 강하게 변형된 단백질에 속하고 인산화, 아세틸화 및 메틸화되었다 (Reeves & Beckerbauer 2001).

- [0364] 상기 HMGA 단백질은 자체적으로 전사 활성을 갖지는 않으나, 소위 “구조상의 전사 인자(architectonic transcription factors)”라고 불리우며, 단백질-단백질 반응 및 단백질-DNA 반응을 통하여 상기 핵단백질-DNA 전사 복합체(nucleoprotein-DNA)의 형태를 통해 조직화 된다 (Wolffe 1994). 따라서, 이들은 다수의 유전자들의 발현에 있어서 조절적으로 활성화 또는 억제화하는 영향을 나타낸다. 양성 조절 (positive regulation)의 가장 현저한 예로는 HMGA1이 IFN- β 의 조절기능에 대한 관련된다는 것이다 (Thanos & Maniatis, 1992). 따라서, 예를 들어, IFN- β 프로모터의 경우에, HMGA1b는 NF- κ B 및 ATF-2의 결합을 자극하여 DNA 이중 나선을 형성하고 동시에 NF- κ B 및 ATF-2가 서로 상호 및 또한 다른 전사 장치 (transcription machinery)와 함께 상호작용할 수 있도록 상기 DNA 구조를 변형시킨다 (Thanos & Maniatis 1992, Du et al 1993). 동맥경화성 발병과 관련된 전사활성 효과 (transcription-activating effect)는 HMGA1에 의해 유도되는 CD44 유전자 조절이다 (Foster et al 1998). CD44는 세포 표면 당단백질이고 내피 손상 후의 평활근의 이동 및 증식과정과 관련된다 (Jain et al 1996, Cuff et al 2001). CD44의 전사 조절은 CD44 프로모터상에서의 AP-1 결합 부위에 c-Fos 및 c-Jun과의 결합을 유도하고, HMGA1의 결합에 의해 강화된다. 래트 (rat)에서의 시험을 통하여, CD44 과 발현(over-expression)에 기인하여 동맥경화성 부위의 형성에 직접적인 영향을 주는, 평활근의 강화된 회복현상을 확인했다 (Pellacani et al 1999; Foster et al. 1998; 2000).
- [0365] 염색체 밴드 6p21.3에 위치한 HMGA1 유전자 및 12q14-15 영역에 위치한 HMGA2의 발현 측정시험에서 이들이 세포 분화의 과정에서의 주요한 활성을 나타냄을 확인하였다. 결국, 이러한 유전자들의 강한 발현은 태아기 및 미분화세포(Chiappetta et al 1996)뿐만 아니라 성장 촉진 인자 세포에서도 발견 가능하다 (Friedman et al 1993; Johnson et al 1990; Ogram et al 1995; Holth et al 1997). 성인에서 분화된 조직인 HMGA1은 HMGA2가 다른 조직에서 발견되지 않고 HMGA1이 매우 낮은 농도로 발견되는 데 반하여 망막에서만 강하게 발현된다 (Bussemakers et al 1991; Chiappetta et al 1996; Rogalla et al 1996; Zhou et al 1995; Chau et al 2000). 분화된 정상 조직에서의 HMGA 단백질의 재활성화된 발현은 지방세포의 성장 및 분화 (Zhou et al 1995; Anand & Chada 2000; Melillo et al 2001); 혈관 손상 후의 혈관에서의 평활근의 증식 (Chin et al 1999); 항염 반응에서의 면역 반응 (Pellacani et al 1999)뿐만 아니라 세포사멸 (apoptosis) 과정 (Diana et al 2001; Sgarra et al 2003)도 동시에 수반한다. 이와 연관하여, 상기 HMGA1의 양은 상기 세포 증식율에 따라 변화된다 (Johnson et al 1990).
- [0366] 태아 발생 단계 중에, 상기 HMGA1 발현은 HMGA2 가 중간엽 조직에 제한되는데 반하여, 외배엽 (ectodermal), 중배엽 (mesodermal) 또는 내배엽 (endodermal) 기원의 특정 기관에 집중되어 나타난다. 지금까지 HMGA1 녹아웃 (knockout) 마우스(mouse)의 표현형과 관련된다는 정보는 없는데, 이는 이러한 인자의 결핍이 태아 발생과정에 막대한 손상을 주기 때문이다. 다른 한편, HMGA2 녹아웃 마우스는 왜소증(dwarfism) 및 특히 매우 적은 지방 조직 현상을 나타내며 (Zhou et al 1995), 게다가 식이-유도 비만증(diet-induced obesity)에 대한 저항성을 나타낸다 (Anand & Chada 2000).
- [0367] 최종적으로, HMGA2 및 HMGA1b 발현은 정상 쥐의 지방 조직에서 측정할 수 없으나, 극적으로 비만형 및 당뇨병성 마우스의 지방 조직을 증가하였고 (Chada et al. 2004), 이는 지방과다증/ 비만 및 HMGA 발현과의 연관성을 의미한다.
- [0368] HMGA1의 과다 발현은 특히 하기에 영향을 미친다 (Reeves et al 2001):
- [0369] - cdc 25A와 같은 세포 주기 및 성장 조절;
- [0370] - 사이토케라틴 타입 1 (cytokeratin type 1)과 같은 중간 매개성 필라멘트 마커(intermediary filament marker);
- [0371] - TRAR15와 같은 아포토시스 (apoptosis) 조절;
- [0372] - MET와 같은 암유전자 (oncogenes) 및 종양 억제 유전자;

- [0373] - DNase X와 같은 DNA 복구 및 조합용 유전자;
- [0374] - Frizzled-5와 같은 세포 죽음 및 성장 조절;
- [0375] - FGFR1과 같은 수용체;
- [0376] - 콜라겐 타입 1과 같은 세포 유착, 운동성 및 전이 유전자(invasion gene);
- [0377] - FGFR2와 같은 혈관신생형성 조절제;
- [0378] - MMP-16과 같은 전이(invasion) 조절;
- [0379] - RhoC와 같은 Rho 군의 작은 GTPases 및 이들의 조절제;
- [0380] - Cadherin 12와 같은 세포-세포간 상호작용 유전자;
- [0381] - IL-11과 같은 성장 인자 및 사이토카인.

- [0382] 따라서, HMGA1의 비정상적인 조절은 유전자 발현의 일반적 변형을 유발하고 형질 전환 및/ 또는 전이된 표현형을 생성하는데 기여할 수 있다.

- [0383] HMGA 단백질은 중간엽 및 상피 종양에서 개개 상이한 역할을 나타내고, 악성 상피 종양에서, HMGA 발현이 발암과정 후기에 수반되는데 반하여, 양성(benign) 종양자주 중간엽 종양으로 전환되는-은 이미 과형성(hyperplasia) 초기에서 HMGA를 발현한다. 이러한 점은 서로 상이한 배아 기원을 갖는 조직상의 HMGA 단백질이, 또한 하기에 보다 상세하게 실시하는 바와 같이, 상응하는 질병의 진단 및/ 또는 치료면에서 본 발명에 따른 상기 L-핵산의 상응하는 용도를 직접적으로 따르는 것과는 달리 상이한 기능을 수행한다.

- [0384] 다양한 인간 및 동물 신생물(neoplasm)에서의 HMGA1의 발현을 동물 모델에서 조사하였다. HMGA1의 역할은 종양 형성 동물 모델(Leman et al 2003; Ram et al 1993), 뿐만 아니라 종양 진행상태(Bussemakers et al 1991; Nestl et al 2001; Ram et al 1993)에서의 시험으로 입증되었다.

- [0385] HMGA1 유전자의 증가된 발현이 하기의 종양들에서 입증되었다:
- [0386] -전립선(Prostate) (Bussemaker et al 1991; Tamimi et al 1996, Leman et al 2003; Nestl et al 2001)
- [0387] -췌장(Pancreas) (Nestl et al 2001; Abe et al 2000, 2002; Tarne et al 2001)
- [0388] -갑상선(Thyroid) (Chiappetta et al 1998, 1995)
- [0389] -경부(Cervix) (Bandiera et al 1998)
- [0390] -위(Stomach) (Xiang et al 1997)
- [0391] -유방(Breast) (Holth et al 1997; Baldassarre et al 2003; Reeves et al 2001; Nestal et al 2001; Ram et al 1993; Dolde et al 2002)
- [0392] -결장/ 직장(Colon/Rectum) (Fedele et al 1996 Abe et al 1999; Kim et al 1999; Chiappetta et al 2001)
- [0393] -난소(Ovaries) (Masciullo et al 2003)

- [0394] 및 더 나아가,

- [0395] -신경아세포종(Neuroblastoma) (Giannini et al 2000; 1999)뿐만 아니라
- [0396] -임파종(Lymphoma) (Wood et al 2000a; b).

- [0397]
- [0398] 상기 종양의 발병 및 전이 과정에 있어서의 상기 HMGA1 유전자의 증가된 발현 원인 및 그 역할에 대해서는 여전히 명확하지 밝혀지지 않았다. 그러나, 다양한 연구에서 예후 마커 (prognostic marker)로서 개개 종양에 의한 HMGA1 발현의 정도는 이의 전이 잠재능(potential)과 서로 연관 관계가 있고, 악성형질 전환 세포 (malignant transformed cell)의 특징을 나타남을 밝혀지고 있다 (Giancotti et al 1987).
- [0399] 더 나아가, HMGA-1 관련성이 경우에 있어서는, 양성 중간엽 종양-은 염색체 HMGA1 영역 6p21.3.에서의 염색체 변화에 의해 특징되어 진다. 이러한 염색체 이상 (aberration)은 지금까지 그 중에서도 특히 하기의 문헌에 기재되는 것이다:
- [0400] 1 자궁근종 (Uterine leiomyoma) (Mark et al 1988; Ozisik et al 1993)
- [0401] 1 지방종 (Lipoma) (Sreekantaiah et al 1990)
- [0402] 1 자궁내막 폴립증 (Endometrial polyps) (Fletcher et al 1992; Dal Cin et al 1995) 및
- [0403] 1 폐의 연골상 과오종 (chondroid hamartomas of the lungs)(Fletcher et al 1991; Johansson et al 1992, 1993)
- [0404] 성장 및 분화를 조절하는 유전적 기전상의 염색체 이상은 발암의 첫 번째 원인이다. HMGA 단백질의 발현은 다수의 종설 및 논문에서 개시되는 바와 같이 종양 성장과 많은 관련이 있다 (Giancotti et al. 1987, 1989, 1993). 그리하여, 유의적인 HMGA2 발현이 화학적 또는 바이러스성의 유발된 암뿐만 아니라 자발적으로 나타나는 암에서 발견되는 반면에, 상기 단백질은 비-변이성 세포 또는 건강한 조직에서는 발견되지 않았다 (Giancotti et al. 1989). 이와 관련하여 HMGA2의 발현의 합성이 특이적으로 차단된 발암 레트로바이러스로 감염된 세포들의 경우에는, 형질전환을 위한 다양한 표현형 마커들이 나타나지 않았다 (Berlingieri et al. 1995).
- [0405] 정상상태일 뿐만 아니라 병리적 성장 상태에서의 HMGA 단백질의 핵심 역할은 마우스 모델실험에서 연구되어 왔다: HMGA2 녹아웃 마우스들은 정상적인 야생 마우스들보다 정지된 발육, 예를 들어 야생형 마우스보다 약 60% 정도 적은 성장을 나타냈다. 그러나 이러한 왜소증 마우스들은 화학적으로 유도된 피부암에 대한 강한 저항성을 나타내었다.
- [0406] 최근 몇 년 동안에 HMGA2 유전자와 관련된 염색체 영역 12q14-15의 구조적 변이가, 염색체적인 조사법 (cytogenetic investigations)의 도움으로 인간의 중간엽 유래의 양성 종양의 전체에서 발견되었으며, 이들은 인체 내의 가장 큰 무해한 종양이다. 다수의 염색체 이상에도 불구하고 (Schoenmakers et al 1995; Kottickal et al 1998; Klotzbuchel et al 1999), 상기 변이된 형태들은 공통되는 양상, 즉, 이들은 모두 3 개의 DNA-결합 도메인을 갖고 있으나, 그 동시에 산성 C-말단 도메인뿐만 아니라, RNA 수준에서의 3 'UTR의 정보를 잃는양상을 나타낸다.
- [0407] 이와 같은 변화는 이미 하기한 다수의(대부분 양성) 중간엽 HMGA-관련 종양에서 발견되었다:
- [0408] -자궁 평활근종 (Uterine leiomyomas), 여성에게 가장 공통적으로 나타나는 복근 종양 및 미국에서 매년 200,000 이상의 자궁적출 수술이 시행되는 원인임 (Heim et al 1988; Turc-Carel et al 1986; Vanni et al 1988).
- [0409] -지방종 (Lipomas) (Heim et al 1988; Turc-Carel et al 1986; Mandahl et al 1987; Sreekantaiah et al 1991; Belge et al 1992)

- [0410] -자궁내막 폴립증 (Endometrial polyps) (Walter et al 1989; Vanni et al 1993; Dal Cin et al 1995)
- [0411] -폐의 연골상 과오종(Chondroid hamartomas of the lungs) (Fletcher et al 1991, 1995; Dal Cin et al 1995)
- [0412] -타액선의 다형 선종(Pleomorphic adenomas of the salivary glands) (Mark et al 1980, 1986; Bullerdiek et al 1987)
- [0413] -혈관종 (Haemangiopericytomas) (Mandahl et al 1993)
- [0414] -연골종 종양 (Chondromatous tumours) (Mandahl et al 1989; Bridge et al 1992)
- [0415] -유방의 양성 종양(Benign tumours of the breast) (Birdsal et al 1992; Rohen et al 1995; Staats et al 1996)
- [0416] -침습성 맥관근종 (Aggressive angiomyxomas) (Kazmierczak et al 1995)
- [0417] -분산성 신경아교세포종 (Diffuse astrocytomas)
- [0418] -파골세포종 (Osteoclastomas) (Nuguerea et al 1989).

- [0419]

암 환자의 사망 및 치명성 여부의 주된 원인은 신체에서의 최초 종양의 전이성 확산이다. 전이는 많은 단계를 통해서 분산된 종양세포들에 의한 멀리 떨어진 기관의 성공적인 콜론화 (colonisation)은 다수 단계를 통과해야 하므로 간단한 과정이 아니다. 종양 세포들은 최초의 종양으로부터 방출되어, 혈관으로 들어가고 먼 곳까지 침투하게 되며, 상응하는 기관들의 유조직 (parenchyma)에서 마지막으로 증식하게 된다. 단백질분해효소 (protease), 응집 분자 (adhesion molecules), 운동성 인자 (motility factor) 및 혈관 생성 인자 (angiogenic factor)와 같은 단백질을 발현시키는 다수의 유전자들은 이러한 매우 복잡한 전이상 일련 단계 (metastatic cascade)의 다양한 단계와 관련된다.

- [0420]

이러한 유전자중에 어느 유전자들이 전이와 관련하여 가장 결정적인 것인지는 아직 알려진 바가 없다. 그러나, 이 과정을 조절하는 가장 중요한 인자 중의 하나인 HMGA1의 유전자는, 후보물질일 가능성이 크다. HMGA1의 유전자 생성물은 성공적인 전이를 위해서는 매우 중요한 많은 유전자들의 전사에 영향을 준다. 예를 들어, HMGA1 발현이 억제된 경우에 다른 전이-관련 유전자들은 그들 스스로 저수준으로 발현되는 것을 볼 수 있었다 (Battista 1998; Vallone 1997).

- [0421]

그러므로 HMGA1은 중요한 치료상의 목표 분자이다. 그러므로 원칙적으로, HMGA1의 차단은 암의 조절 및 이의 전이 확산(spread)을 예방하기 위해 적당한 인자이다 (Evans 2004; Sgarra 2004). 그러므로 예를 들어, HMGA의 전사물(transcripts)에 대한 안티센스 RNAs를 사용함으로써, 암 세포에서의 세포 증식이 시험관내 실험에서 감소되거나 또는 이러한 세포들이 세포사멸 과정을 거치게 됨을 확인하였다 (Masciullo 2003; Scala 2000; Chau 2003). 동물 모델에서 다양한 체장암의 이중 이식이 유전자 치료법에 의해서 극적으로 감소됨을 볼 수 있었다 (HMGA 전사물에 대한 안티센스 RNAs의 아데노바이러스성 발현(adenoviral expression)) (Trapasso et al 2004).

- [0422]

게다가, HMGA1은 어떠한 환자가 침투성 암 치료법상에서 이익을 볼 수 있는지 여부를 결정하기 위한 예후 진단 표식자 (prognostic diagnostic marker)로 사용될 수 있다. 발현된 HMGA1의 양 및 악성 변이 (malignant transformation)의 정도 사이에는 가까운 상관관계가 있다. 환원하면, 인간 암, 예를 들어 전립선암 (Tamimi 1996; Bussemakers 1991), 직장암 (Abe 1999) 및 신경아세포종 (neuroblastoma)의 다양한 형태에서 낮은 진단율과 연관 지을 수 있다.

- [0423]

HMGA1 단백질은 많은 바이러스들에 의해 사용되었을 뿐만 아니라 바이러스 유전자 또는 보조인자(co-factors)로서의 발현을 위한 숙주세포에 의해 제공된 조절 인자들에 의해, 그 중에서도 하기에 기재된 바이러스에 사용된다:

- [0424] -인간 파포바바이러스 JC (Human papovavirus JC) (Leger et al 1995)
- [0425] -엡스테인-바 바이러스 (Epstein-Barr virus) (Schaefer et al 1997)
- [0426] -헤르비스 단일 바이러스 (Herpes simplex virus) (Panagiotidis 1999 French et al 1996)
- [0427] -HIV-1 바이러스 (HIV-1 virus) (Henderson et al 2000)

[0428] 특히 HMGA 단백질은 숙주 세포에서 다수의 바이러스 유전자의 전사 조절에 관련된다. 이들의 예로는 인간 파포바바이러스 JC (papovavirus JC) 유전자의 초기 및 후기에 발현된 유전자들의 발현 조절 (leger et al. 1995), 바이러스 잠복의 조절을 담당하는 엡스테인-바 바이러스 (Epstein-Barr virus)의 EBNA1(Epstein-Barr virus nuclear antigen 1) 유전자 조절 (Schefer et al. 1997), 미성숙하게 발현된 ICP4 단백질을 코딩하는 허르페스 심플렉스 바이러스-1 (Herpes simplex Virus-1; HSV-1)의 IE-3 유전자(즉각적이고-초기(immediate-early))의 조절 (Panagiotidis et al. 1999), 잠복기동안에 활성을 갖는 HSV-1의 프로모터 2의 조절 (French et al. 1996) 및 인간 HIV-1 바이러스의 LTR (긴 말단 반복성-long terminal repeats-) 프로모터의 조절 (Hendersom et al 2000)을 그 예로 들 수 있다.

[0429] 바이러스 질병의 환경에서의 숙주세포에 의한 HMGA의 필수 조건은 바이러스 유전자 조절로만 제한되는 것은 아니다. HMGA1 또한 침투하는 HIV-1 바이러스, 몰로니 쥐 백혈병 바이러스 (MoMuLv; Moloney murine leukaemia virus), 사르코마 조류 독감 바이러스 (ASV; sarcoma bird flu virus)의 인간 게놈 (genome) 안으로의 바이러스 DNA의 침투에 구조적인 보조 인자 (co-factor)로서 결정적인 역할을 수행하는 것으로 나타났으며, 따라서 항바이러스 치료법에 흥미로운 치료법상의 접근방법으로 나타났다 (Van Maele et al. 2006, Li et al 1998, Hindmarsh et al. 1999). 따라서, HMGA 단백질의 저해제는 바이러스 감염의 치료 및 진단에도 또한 적합하다 (Reeves 및 Beckerbauer 2002).

[0430] 다양한 질병에서의 HMGA 단백질의 진단용 마커로서의 적합성과 연관 관계의 상기 결과로서, L-핵산 및 특히 이러한 단백질에 대한 스피에겔머들은 상기의 질병을 위한 예방, 치료 및 진단을 위해 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 특히 바람직한 스피에겔머들은 본원에 개시되어 있다. 이와 관련하여 비록 실시예 2에 설사된 도메인 접근법(domain approach)의 결과로서, 개개의 스피에겔머들이 특정 HMGA 단백질에 적합하게 개발되었지만, 도 2에 설명되는 설계도로부터 알 수 있는 바와 같이, 상기 스피에겔머들은 다른 HMGA 단백질들과 교차반응을 할 수 있음은 당업자에게 자명함도 인식되어야 한다.

[0431] 게다가, 본 발명에 따른 핵산이 세포내 수용체 (intracellular receptor)로서 HMGA 단백질에 결합하는 일군의 스피에겔머류를 결정하는 다수의 구조적 모티프 (motif)를 포함한다는 것은 당업자에 의해 잘 알려져 있다. 상기의 다양한 모티프는 실시예 1에 더 상세하게 설명되어 있다.

[0432] 바람직한 하나의 구현예로서, 본 발명에 따른 핵산은 또한 본원에 구체적으로 개시된 서열들과 실질적으로 상동적인 (homologous) 핵산도 포함한다. 이와 관련하여, 용어 “실질적으로 상동적인 (substantially homologous)”은 바람직하게는, 상기의 상동성이 적어도 75% 이상, 바람직하게는 85%, 더 바람직하게는 90%, 가장 바람직하게는 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상이라는 것을 의미하는 것으로 해석되어야 한다.

[0433] 발명에 따른 용어 “핵산 (nucleic acids)” 또는 본 발명에 따른 핵산들은 더 나아가, 또한 본원에 개시된 바와 같은 핵산 서열들을 포함하는 핵산 또는 이들의 일부분, 바람직하게는 상기 핵산들 또는 이들의 일부분이 HMGA 단백질들과의 결합에 관련되는 범위정도를 구성하는 핵산들도 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 그러한 핵산은 예를 들어, 단축법 (shortening) 또는 절단법 (truncation)에 의하여, 본원 개시된 핵산으로부터 유래될 수 있다. 단축은 본원에 개시된 바와 같이, 핵산의 한 쪽 또는 양쪽 말단 둘 중 어느 한쪽과 관련성을

갖을 수 있다. 상기 단축은 또한 뉴클레오타이드의 내부 서열, 즉, 뉴클레오타이드의 5 ‘ 말단 및 3’ 말단 사이에 있는 뉴클레오타이드와 또한 관련될 수 있다. 게다가, “단축 (shortening)”이라는 용어는 본원에 개시된 핵산들의 서열로부터 하나의 개별적인 뉴클레오타이드만큼이나 적은 수를 제거하는 것으로 해석되어야 할 것이다. 상기 단축은 본 발명에 따른 핵산(들)의 한 영역 이상과 연관될 수 있으며, 이러한 개개 영역에서의 접합은 한개의 뉴클레오타이드 길이만큼이나 작을 수도 있을 것이다.

[0434] 게다가, 본 발명에 따른 핵산은 D-핵산 또는 L-핵산 중 하나가 될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 핵산은 L-핵산이다. 부가적으로, 상기 핵산의 하나 이상의 부분들은 D-핵산 형태로 존재하거나, 상기 핵산의 하나 이상의 부분이 L-핵산 형태로 존재하는 것은 가능할 것이다. 상기 핵산의 “부분 (part)”이라는 용어는 한 개의 뉴클레오타이드만큼 적은 것으로 해석되어 진다. 이러한 핵산은 일반적으로 본원에서 D-핵산 또는 L-핵산으로 지칭한다. 따라서, 바람직한 구현예로서 본 발명에 따른 상기 핵산은 L-뉴클레오타이드로 구성되고 최소한 하나 이상의 D-뉴클레오타이드를 포함한다. 그러한 D-뉴클레오타이드는 바람직하게는, 본 발명에 따른 핵산을 정의하는 영역 또는 영역들과 상이한 부분에 고정됨이 바람직하고 또한 상기 핵산의 기타 부분과의 상호 작용에 관련된 이들의 부분에 고정됨이 바람직하다. 그러한 D-뉴클레오타이드는 본 발명에 따른 상기 개개 부분의 말단 또는 개개의 핵산에 고정됨이 바람직하다. 바람직한 구현예로서, 그러한 D-뉴클레오타이드들은 바람직하게는, PEG 및 HES와 같은 변형체들이 본 발명에 따른 핵산에 결합하게 하는 공간자 (spacer) 또는 연결자 (linker)로서 작용할 수 있다.

[0435]

[0436] 본 발명의 범위 내에서, 하나의 구현예로서, 본 발명에 따른 핵산은 또한 긴 핵산 (longer nucleic acid)이 몇 개의 부분, 적어도 본 발명에 따른 핵산이 되는 하나의 부분 이상 또는 그 일부를 포함할 수 있는 긴 핵산을 포함한다는 것이다. 이러한 긴 핵산의 기타 부분 또는 부분들은 D-핵산 또는 L-핵산 중 하나가 될 수 있다. 본 발명, 본 발명에 따른 핵산을 위해 개시된 바와 같은 목적 및 용도와 연관되어서는 임의의 조합도 사용될 수 있다. 이러한 긴 핵산의 기타 부분 또는 다른 부분들은 결합 기능 (binding function), 및 특히, HMGA 단백질에 결합하는 것과는 상이한 기능을 갖을 수 있다. 이러한 가능한 기능은 예를 들어, 고정화 (immobilisation), 교차 결합 (cross-linking), 검출 (detection), 증폭 (amplification), 변형 (modification) 또는 분자량 증가 (increasing the molecular weight)를 목적으로 다른 분자들과의 상호 작용을 가능케 한다.

[0437] 이와 관련하여 특히 본원에서 사용된 L-핵산은 L-뉴클레오타이드로 구성된 핵산이며, 바람직하게는 전체적 (completely)으로 L-뉴클레오타이드로 구성되는 것이다.

[0438] 결국, 특히 본원에서 사용된 D-핵산은 D-뉴클레오타이드로 구성된 핵산이며, 바람직하게는 전체적으로 L-뉴클레오타이드로 구성되는 것이다.

[0439] 본 발명에 따른 상기 핵산이 D-뉴클레오타이드, L-뉴클레오타이드 또는 이들의 조합, 예를 들어, 최소 하나 이상의 L-뉴클레오타이드 및 최소 하나 이상의 D-뉴클레오타이드로 구성되는 무작위 조합 또는 한정된 서열과 같은 조합으로 구성되는 여부와 상관없이, 상기 핵산은 하나 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드 (deoxyribonucleotides), 리보뉴클레오타이드 (ribonucleotides) 및 이들의 조합으로 구성될 수가 있다.

[0440] 본 발명의 추가적인 양태로서, 본 발명은 본 발명에 따른 하나 이상의 상기 핵산 및 기타 다른 하나 이상의 핵산으로 구성되는 약학 조성물을 제공하며, 상기 기타 다른 핵산은 바람직하게는, HMGA 단백질 이외의 목표 분자들과 결합 가능하거나 본 발명의 상기 핵산의 기능과는 다른 기능을 발휘하는 것이다.

[0441] L-핵산과 같은 본 발명에 따른 핵산의 구성은 몇몇의 이유로 장점을 갖는다. L-핵산은 자연계에서 핵산의 거울상 이성질체 (enantiomers)이다. 그러나 D-핵산은 수용액, 특히 뉴클레아제 (nucleases)의 광범위한 존

재로 인해, 생물학적 시스템 (biological system) 및 생물학 시료에서 매우 안정하다. 자연 발생적 뉴클레아제, 특히, 동물세포 유래의 뉴클레아제는 L-핵산을 분해할 수 없다. 결과적으로, 인체 및 동물 체내를 포함하는 상기한 생물학적 시스템에서 L-핵산의 생물학적 반감기는 유의적으로 증가된다. L-핵산의 분해성 (degradability) 결핍으로 인해, 뉴클레아제에 의한 분해산물이 없으며, 결국 이러한 분해 산물에 따른 부작용도 발견되지 않는다. 사실상, 이러한 본 발명의 양태는 L-핵산과 질병 및/또는 장애의 치료에 사용되는 다른 모든 화합물을 구별시키고 HMGA의 존재 또는 그의 임시적 관련성도 포함하는 것이다. 상기 왓슨-크릭 (Watson-Crick)의 염기쌍과는 상이한 메카니즘을 통해 목표 분자에 특이적으로 결합하는 L-핵산 또는 부분적으로 또는 전체적으로 L-핵산으로 구성된 압타머, 특히 상기 목표분자에 결합하는 압타머의 결합과 관련된 압타머의 일부분을 “스피에겔머 (spiegelmer)”라고 정의한다.

[0442]

또한, 본 발명에 따른 핵산이 D-핵산, L-핵산 또는 D-L-핵산으로 존재하는지 여부에 상관없이 및 DNA 또는 RNA인지 여부에 상관없이 단일 가닥 또는 이중 가닥 핵산의 형태로 존재해야 함도 또한 본 발명의 범위 내이다. 전형적으로, 본 발명에 따른 핵산은 단일 가닥 핵산은, 기본 서열로 인해 한정된 2차원 구조를 포함하고 또한 3차원 구조도 형성할 수는 단일 가닥 핵산이다. 그러나 본 발명에 따른 핵산은 또한 서로 상보적이거나 서로 부분적으로 상보적인 두 개의 가닥이 서로 잡종화된다는 의미에서 이중 가닥일 수도 있다. 이는 상기 핵산에 안정성을 부여해주며, 이는 만일 상기 핵산이 상기 L-형 대신에 자연발생적인 D-형으로 존재한다면 특히 중요하게 된다.

[0443]

본 발명에 따른 핵산은 변형될 수 있다. 이러한 변형은 상기 핵산의 개별적인 뉴클레오티드를 포함할 수 있으며 당업계에 잘 알려져 있다. 이러한 변형의 예들은 하기 문헌들에 특히 잘 개시되어 있다: Venkatesan N. et al. *Curr. Med. Chem.* Oct; 10(19), pp.1973-91, 2003; Kusser, W. *J. Biotechnol.*, 74, pp.27-38, 2000; Aurup, H. et al. *Nucleic. Acids. Res.*, 22, pp.20-4, 1994; Cummins, L.L. et al, *Nucleic Acids Res*, 23, pp.2019-24, 1995; Eaton, B.E. et al. *Chem Biol*, 2, pp.633-8, 1995; Green, L.S. et al., *Chem Biol.*, 2, pp.683-95, 1995; Kawasaki, A.M. et al., *J Med Chem*, 36, pp.831-41, 1993; Lesnik. E. A. et al., *Biochemistry*, 32, pp.7832-8, 1993; Miller, L.E. et al., *J Physiol*, 469, pp.213-43, 1993. 이러한 변형은 예를 들어, 상기 핵산을 구성하는 개별적인 뉴클레오티드의 2' 위치에서의 수소 원자, 불소 원자 또는 메톡시기 또는 아민기가 될 수 있다. 게다가 본 발명에 따른 상기 핵산은 적어도 하나 이상의 LNA 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 하나의 구현예로서, 본 발명에 따른 핵산은 LNA 뉴클레오티드, 바람직하게는 완전한 LNA 뉴클레오티드로 구성되는 것이다.

[0444]

하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 핵산은 다중-부분 핵산 (multi-part nucleic acid)이 될 수 있다. 본원에서 사용된 다중-부분 핵산 (multi-part nucleic acid)은 적어도 두 개 이상의 핵산 가닥들로 구성된 핵산이다. 상기 두 개 이상의 핵산 가닥은 표적 분자에 대한 리간드 (ligand)로 작용하는 기능 부위 (functional unit)를 형성한다. 적어도 상기 두 개 이상의 핵산 가닥들은 두 개의 가닥들 생산하기 위한 상기 핵산의 분할 단계 또는 본 발명의 전체 핵산, 즉, 본 발명의 핵산 중 첫 번째 부분에 상응하는 하나의 핵산 및 본 발명의 전체 핵산 중 두 번째 부분에 상응하는 또 다른 하나의 핵산으로부터의 합성 방법에 의해 유래된 것일 수 있다. 실시예를 통한 본원에서 개시되는 상기한 2개 이상의 가닥을 갖는 다중-부분 핵산을 생산하기 위하여 합성법뿐만 아니라 분할법도 사용될 수 있음도 인식되어야 한다. 환언하면, 바람직하게는, 상기 2개 이상의 핵산 가닥들은, 비록 상보성이 다양한 핵산 부분들 사이에 어느 정도로 존재할 수 있다 하더라도 서로에 대해 상보적이고 서로 잡종화하는 두 개의 가닥과는 상이한 것이다.

[0445]

본 발명자들은 본 발명에 따른 핵산이 매우 좋은 분해도 (K_D value) 또는 해리도 (dissociation value)를 가지며, 이로 인해 매우 좋은 결합상수 (binding constant)를 갖고 있음을 확립하였다. 상기의 결합 상수를 측정하는 하나의 방법은 실시예 1에 기재된 바와 같이 “평형 결합 어세이법 (equilibrium binding assay)”을 사용하는 것이다.

[0446] 본 발명에 따른 상기 핵산의 분해도 (K_D value)는 바람직하게 $1\mu\text{M}$ 이하이다. 약 $1\mu\text{M}$ 의 분해도 (K_D value)는 목표 분자에 대한 핵산의 비특이적 결합 (non-specific binding) 특성이어야 한다. 당업계에 종사하는 당업자에 의해 잘 인식되는 바와 같이, 예를 들어, 본 발명에 따른 핵산과 같은 화합물군의 분해도는 일정한 범위 내에서 다양하다. 상기에서 언급한 약 $1\mu\text{M}$ 의 분해도 (K_D value)는 분해도 (K_D value)의 바람직한 상한치에 해당한다. 상기 목표 분자에 결합하는 핵산의 분해도 (K_D value)에 대한 바람직한 하한치는 약 피코몰 단위 (picomolar) 또는 그 이하일 수 있다. HMGA에 결합하는 개별적인 핵산의 분해도 (K_D value)가 바람직하게는 상기 범위 내에 존재하는 것은 본 발명의 범위 내이다. 바람직한 범위는 이 범위 내의 첫 번째 숫자 및 이 범위 내의 두 번째 숫자를 선택함으로써 선택될 수 있다. 바람직한 상위값은 $0.25\mu\text{M}$, $0.1\mu\text{M}$ 이며, 바람직한 하위값은 100 nM , 10 nM , 1 nM 또는 0.05 nM 이다.

[0447] 본 발명에 따른 상기 핵산은 실시예 2에 기재된 바와 같이, 바람직하게는 해리 상수 ($K_D < 20\text{ nM}$)를 갖는 37°C 의 용액에서 HMGA1b와 결합하는 것이다.

[0448] 본 발명에 따른 상기 핵산은 상기 핵산이 여전히 상기 목표 분자에 결합할 수 있다면, 임의의 길이일 수 있다. 본 발명에 따른 핵산의 특정 길이가 바람직함은 선행 기술에 의해 잘 알려져 있다. 전형적으로, 상기 길이는 15 개 및 120 개 뉴클레오타이드 사이이다. 15개 및 120 개 사이의 임의의 모든 수가 본 발명에 따른 핵산의 길이로 바람직하다는 것도 또한 당업자에 의해 알려져 있다. 본 발명에 따른 핵산의 길이로 바람직한 범위는 약 20 내지 100 개 뉴클레오타이드, 약 20 내지 80개 뉴클레오타이드, 약 20 내지 60개 뉴클레오타이드, 약 20 내지 50개 뉴클레오타이드 및 약 30 내지 50개 뉴클레오타이드이다.

[0449] 하나의 구현예로서, 본 발명에 따른 핵산은 변형된 형태로 존재하는 것이다. 특히 바람직한 변형의 형태는 PEG화 반응 (PEGylation)이다. 이 경우에, 본 발명에 따른 상기 핵산의 변형은 PEG (polyethylene glycol) 또는 다른 기와의 커플링 (coupling)반응을 포함한다.

[0450] 본 발명에 따른 상기 핵산의 높은 안전성 때문에, 특히 상기 핵산이 L-핵산으로 존재하는 구현예의 경우에, 이와 같은 치료가 요구되는 환자에게 본 발명에 따른 핵산을 직접 투여하는 것은 가능하다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 상기 핵산은 국소적 또는 전신적 적용을 위한 생리학적 용액 (physiological solution) 형태로 제조되는 것이다.

[0451] 본 발명에 개시된 질병의 치료, 예방 및 진단을 위한 본 발명에 따른 상기 핵산의 직접적 사용과는 별도로, 상기 핵산은 약학 조성물로서 개별적으로 또는 기타 성분과 조합하는 형태로 존재 또는 사용 가능하다. 따라서, 본 발명에 따른 약학 조성물은 본 발명에 따른 한 개 이상의 핵산 및 바람직하게는 약물학적으로 허용 가능한 결합제 (binder)를 포함한다. 이러한 결합제는 임의의 공지 결합제 또는 당분야에서 잘 알려진 결합제일 수 있다. 특히 이와 같은 결합제는 본 발명에 개시된 바와 같은, 약제의 제조와 관련하여 개시된 바와 같은 임의의 결합제이다. 본 발명의 추가적인 구현예로서, 상기 약학 조성물은 추가적인 약학적 활성제(active agent)를 포함한다. 본 발명에 개시된 약제가 본 발명에 개시된 약학조성물을 구성하는 것은 본 발명의 범위 내이다.

[0452] 바람직하게는, 상기 약학 조성물은 정맥 투여용으로 구도되었다. 그러나, 이러한 약학조성물이 근육 내 (intramuscularly), 복강 내 (intraperitoneally) 또는 피하 내 (subcutaneously)로 투여되는 것도 또한 본 발명의 범위 내이다. 기타 다른 투여경로는 경구(orally) 또는 비강 (intranasally)로서, 이와 관련된 투여 방법의 바람직한 형태로는 가장 적은 침입성과 동시에 약학 조성물 및 약학 활성제의 효능을 유지시키는 것이 바람직하다.

- [0453] 본 발명에 핵산은 바람직하게는 본 발명에 따른 약학 조성물과 관련하여 약학적으로 허용되는 용매에 용해되는 것과 같이 포함되는 것이다. 이러한 용매로는 특히 물, 생리 식염수, PBS 또는 포도당 용액을 포함하는 군으로부터 선택되는 것이며, 특히 상세하게는 5% 포도당 용매이다. 이러한 담체(carrier)로는 예를 들어, 물, 완충액(buffer), PBS, 포도당 용액, 특히 5% 포도당 용액(iso-osmotic), 전분, 당(sugars), 젤라틴(gelatin) 또는 기타 임의의 허용 가능한 담체 물질일 수도 있다. 이러한 담체들은 일반적으로 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0454] 다양한 구현예로서, 본 발명에 따른 하나 이상의 상기 핵산을 포함하는 상기 약학 조성물은 본원에 개시된 바와 같이, 이에 제한하고자 함은 아니나, 접합체(conjugate)로서 상기 핵산을 포함하는 것도 본 발명의 범위 내이다.
- [0455] 본 발명의 추가적인 구현예로서, 상기 약제(medicament)는 추가적인 약학 활성제를 포함하는 것이다. 이와 같은 추가적인 약학 활성제로는 예를 들어, 단백질 분해 저해제(protease inhibitor), 증식 저해제(proliferation inhibitor) 및 신생혈관생성 저해제(angiogenesis inhibitor) 및/또는 세포분열 억제 효과(cytostatic effect)를 갖는 성분들을 들 수 있다. 호환적으로 또는 추가적으로, 이러한 추가적인 약학적 활성제는 본 발명에 따른 추가적인 핵산이다. 호환적으로, 상기 약제는 HMGA와 상이한 목표 분자와 결합하거나 또는 본 발명에 따른 핵산과 상이한 기능을 갖는 하나 이상의 핵산을 포함한다.
- [0456] 본 발명에 따른 약학 조성물은 본원에 개시된 개개 질병(diseases) 또는 장애(disorder)의 치료(treatment), 진단(diagnosis) 및/또는 예방(prevention)을 위해 사용될 수 있다.
- [0457] 본 발명의 추가적인 양태로서, 본 발명은 약학적 유효량의 본 발명에 따른 하나 이상의 상기 핵산을 이러한 치료가 요구되는 생물 유기체(living organism)에 투여함을 포함하는 상기 생물 유기체를 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 하나의 구현예로서, 상기 생물 유기체는 하나의 질병으로 고통받거나, 또는 본원에서 개시된 임의의 질병, 상세하게는 약제 제조를 위한 본 발명에 따른 하나 이상의 핵산의 사용과 관련하여 개시된 질병으로 인해 고통 받을 위험이 있는 것이다.
- [0458] 비록 본 발명에 따른 핵산의 사용은 이미 다양한 질병(disease) 및 상태(state)에서 HMGA 단백질에 대해 상술한 바에 따라 따름에도 불구하고, 이러한 양태는 상술할 목적으로 하기에 더 깊이 논의될 것이다.
- [0459]
- [0460] HMGA 단백질 및 그의 유전자들은 특히 신생물적 질병(neoplastic disease)의 진단 및 예후와 점증적으로 연관되고 잠재한 생물학적 표식자(biomarker)로서 제안되었다. 건강한 조직의 경우, 만약 적어도 탐지 가능하다면, HMGA1a/b 단백질의 발현 수준은 매우 낮은 수준인 것이다. 상승된 HMGA1a/b 단백질 발현현상은 매우 다양한 암 종류의 다수 종양 및 암 전이물의 표현형의 특징으로 나타난다 (Sarhadi et al. 2006, Balcerzak et al. 2005, Briese et al 2006, Chang et al. 2005, Peters et al. 2005, Sato et al. 2005, Chiappetta et al. 2004, Li et al. 2004, Chuma et al, 2004, Donato et al. 2004, Czyz et al. 2004, Kettunen et al. 2004, Lee et al. 2004, Chen et al. 2004, Abe et al. 2003, Blacerczak et al. 2003, Flohr et al. 2003, Masciullo et al. 2003, Nam et al. 2003, Pierantoni et al. 20003). 높은 HMGA 단백질 발현은 낮은 진단율 및 암전이에 대한 형성과 유의적으로 상관관계를 갖는다. 생검(biopsy)시 상기 HMGA1a/b 발현 수준의 탐지 및 이의 조직학적 특징은 신생물적 질병, 특히 전술한 질병 및 병적 상태(conditions)의 초기 탐지(detection), 진단(prognosis) 및 동정(identification)을 하기 위한 진단적 접근법(diagnostic approach)이다.
- [0461]
- [0462] 게다가, HMGA1 단백질 및 동맥경화 죽상 플라크(arteriosclerotic plaques) 사이의 상호 관계는 문헌에 기재되어 있다 (Schlueter et al. 2005). HMGA1은 상기 플라크 형성을 위한 주요 목표 분자 중 하나인 CD44를 조절한다. 이와 관련하여, 주변조직에 비교하여, 신내막(neo-intimal), 혈관평활근 세포(vascular smooth

muscle cell), 대식세포 (macrophage) 및 신생혈관 (new blood vessel)과 같이 영향을 받은 영역들은 높은 HMGA1 발현을 나타낸다. 따라서, HMGA1은 플라크 형성의 매개자 중 하나로, 진단목적의 목표 분자로 밝혀 졌다.

[0463]

[0464] 본원에 개시된 상기 L-핵산, 특히 HMGA1a/b와 결합하는 상기 스피에겔머 (spiegelmer)는 당업자에게 알려진 방법 범위 내에서, 유사한 방법으로 항체로 사용가능하다. 현재까지 HMGA1에 대한 특이적(분화 중의)인 인척 항체들 (affine antibodies)은 매우 소수 만이 동정되었으며 상업적으로 구입가능하다. 이는 HMGA1의 비-존재성 2 차원 구조 때문인 것으로 밝혀 졌으며, 이는 항체 생산에서 MHC 복합체에 적합하지 않은 목표이다.

[0465]

[0466] 이러한 배경지식 반하여, 그러나 놀랍게도, 웨스턴 블롯 실험 (western blot procedure)에서 비오티ن화된 (biotinylated) HMGA1a/b-결합 스피에겔머 5 '-bio-NOX-A50은 암 세포주의 개별적인 밴드(bands)로서 HMGA1a/b를 인지함을 밝혀 냈다. 더 나아가, 실시예 2에 기재된 바와 같이, 재조합적으로 발현된 HMGA1b 단백질이 검출될 수 있다. 상기한 비오티ن화된 스피에겔머의 탐지는 예를 들어, HRP (horseradish peroxidase) 효소에 의하여 접합된 항-비오티인 항체 (anti-biotin antibody)에 의해서 수행되는 것이다.

[0467]

[0468] HMGA1a/b의 생체 내 (in vivo) 진단은 추가적인 접근법이며, 본 발명에 따른 핵산이 사용될 수 있다. 종양과 암 전이는 종종 괴사성 종양 세포(necrotic tumor cells)에 침투되어 주변 조직에 HMGA1a/b를 방출한다. 상기 세포의 HMGA1a/b의 검출은 건강한 조직에 침투된 종양 및 암 전이를 진단하기 위한 하나의 접근법이다.

[0469]

[0470] 바람직하게는 본원에서 사용되는 바와 같이, 본원의 진단 도구 (diagnostic tool) 또는 진단제 (diagnostic agent) 또는 진단 수단(diagnostic means)은 다양한 장애 및 질병과 관련하여 본원에 개시된 바와 같이, 직접적으로 또는 간접적으로 HMGA 단백질, 바람직하게는 HMGA1a/b를 검출할 수 있다. 상기 진단 도구는 본원에 개시된 임의의 질병 및 병적 상태를 탐지 및/또는 조사하기에 적합하다. 이러한 탐지는 본 발명에 따른 핵산의 HMGA1a/b에 대한 결합에 의해서 가능하다. 이러한 결합은 직접적으로 또는 간접적으로 탐지가능하다. 상기에 상응하는 방법 및 수단은 당업계에 종사하는 당업자에게 알려져 있다. 본 발명에 따른 핵산은 특히, 표지될 수 있으며, 이 표지는 본 발명에 따른 핵산, 바람직하게는 HMGA 단백질 및 바람직하게는 HMGA1a/b에 결합하거나 결합가능한 상기 핵산의 탐지를 가능케 한다. 이러한 표지는 바람직하게는, 방사성(radioactive), 효소적(enzymatic) 및 형광성(fluorescence) 표지(labeling)를 포함하는 그룹으로부터 선택된 것이다. 원칙적으로, 항체를 얻기 위해 개발된 모든 공지의 시험법을 본 발명에 따른 핵산, 목표 분자 - 결합 핵산 (target molecule-binding nucleic acid)으로 대체되는 목표 분자-결합 항체 (target molecule-binding antibody)에 적용 가능하다. 비표지 목표 분자 - 결합 항체(unlabelled target molecule-binding antibody)를 이용한 항체 시험에서, 상기 탐지는 바람직하게는, 방사성, 효소적 또는 형광성 표지로 변형 및 항체 Fc 단편에서 상기 목표 분자-결합 항체에 결합하는 2차 항체에 의해 수행된다. 핵산, 바람직하게는 본 발명에 따른 핵산의 경우에, 상기 핵산은 바람직하게는, 비오티인 (biotin), CY-3 및 CY-5를 구성하는 그룹으로부터 선택되는 상기 표지와 같은 표지로 변형되며, 이러한 표지는 예를 들어, 항 비오티인 (anti-biotin) 항체, 항-CY-3 (anti-CY-3) 항체 또는 항-CY-5 (anti-CY-5) 항체와 같은 표지에 대한 항체에 의해 탐지되고, 또는 상기 표지가 비오티인인 경우에, 상기 표지는 자연적으로 비오티인과 결합하는 스트렙타비딘 (streptoavidin) 또는 아비딘 (avidin)에 의해 검출된다. 이와 같은 항체, 즉, 스트렙타비딘 또는 아비딘은 바람직하게는 예를 들어 2차 항체와 유사하게, 방사성, 효소적 또는 형광성 표지와 같은 상응하는 표지로 교대로 변형된다.

[0471]

[0472] 추가적인 구현예로서, 본 발명에 따른 상기 핵산은 분자 비콘 (molecular beacon)인 2차 검출 시약에 의해 검출 또는 분석된다. 상기한 분자 비콘의 기술은 당업계에 종사하는 당업자에게 알려져 있다. 요약하면, 이러한 분자 비콘은 검출되어 검출되어야 할 핵산 탐지 일부와 혼성화되는 핵산 탐침의 역 보체 (reverse complement)인 핵산 탐침 (probe)이다. 상기 핵산 탐침과 결합 후에, 상기 분자 비콘의 형광 군들은 서로 분리되며, 이는 형광 신호상의 변화, 바람직하게는 강도(intensity)상의 변화로 이어진다. 상기 변화는 존재하는 핵산 탐침의 양과 연관된다.

[0473]

[0474]

본 발명에 따르는 상기 핵산은 본원에서 개시되는 다양한 양태의 범위 내에서 의 L-핵산으로서 적절하게 이용될 수 있음도 본 발명의 범위 내이다.

[0475]

[0476]

본 발명에 따른 핵산은 더 나아가 약학적 활성 물질을 설계하기(약물 설계 ;drug design) 위한 출발 물질 (starting material)로서 사용될 수 있다. 원칙적으로 이 문제에 관해 두 가지 가능한 접근 방법이 있다. 하나의 접근방법은 화합물의 스크리닝 라이브러리 (screening library)법으로서, 상기 화합물의 라이브러리는 바람직하게는, 저분자 화합물 (저분자 또는 소분자)이다. 이러한 라이브러리는 당업계에 종사하는 당업자에게 알려져 있다. 상기 스크리닝법의 하나의 구현예로는 고속 처리 스크리닝법 (high throughput screening)이다. 바람직하게는 상기 고속 처리 스크리닝법은 신속하고 효율적이며, 목표 분자 기반 시험법 (target molecule-based assay)에서 활성 물질의 시험-착오 평가법 (trial-and-error evaluation)으로서 수행되는 것이다.

[0477]

[0478]

선택적으로, 본 발명에 따른 상기 핵산은 이론적 활성 물질 설계 (rational design of active substances)를 위해 사용될 수 있다. 바람직하게는 상기 이론적 활성 물질 설계는 약학적 활성 후보 물질을 설계하는 것이다. 통상적으로 X선 구조 분석법 (X-ray structure analysis) 또는 핵자기공명분광법 (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)과 같은 방법으로 측정되는 목표 분자의 3차원 구조로부터 시작하여, 컴퓨터 프로그램은 다수의 상이한 화합물 구조를 포함하는 데이터 बैं크(data bank)를 통한 조사에 이용된다. 상기 선택은 컴퓨터에 의해 수행된다. 상기 선별된 화합물들은 추가적으로 시험실에서 시험된다.

[0479]

[0480]

상기 이론적 활성물질 설계는 본 발명에 따른 임의의 핵산을 그 설계의 시작점으로 채용할 수 있으며, 구조, 특히, 본 발명에 따른 핵산 구조와 유사하거나 HMG 단백질과의 결합을 매개하는 본 발명에 따른 핵산 구조 부분과 동일한 3차원 구조를 포함한다. 어떠한 경우라도, 이러한 구조는 또한 본 발명에 따른 상기 핵산에 대해 동일하거나 또는 적어도 유사한 결합 방식을 발휘한다. 상기 이론적 활성 물질 설계의 추가적인 단계 또는 상호 호환적인 단계로서, HMG 단백질과 결합하는 상기 핵산의 상기 부분의 바람직한 3차원 구조는 화학적 치환기, 바람직하게는 뉴클레오타이드 및 핵산들과는 상이한 화학적 치환기에 의해서 모방되는 것이다. 상기 모방 (imitation), 또는 모조 (mimicry)라 불리는 방법으로, 상기 활성 물질의 이론적 설계법을 위한 출발물질로 사용되어 온 상기 핵산 또는 핵산들과는 상이한 화합물을 설계할 수 있을 것이다. 이러한 화합물 또는 활성 물질은 바람직하게는 소 분자 또는 펩티드 (peptide)이다.

[0481]

[0482]

당업계에 종사하는 당업자에게 잘 알려진 경쟁적 시험법 (competitive tests)을 이용한 화합물의 스크리닝 라이브러리법인 경우에, 적합한 HMG 유사체들 (analogues), HMG 효현제들 (agonists) 및 HMG 길항제들 (antagonists)이 발견 될 수 있다. 이러한 경쟁적 어세이법은 하기와 같이 설계될 수 있다. 본 발명에 따른 상기 핵산, 바람직하게는 스피에겔머, 즉, 상기 목표 분자에 결합하는 L-핵산은 바람직하게 고체상 (solid phase)에 결합되는 것이다. HMG 유사체를 확인하기 위하여, 표지된 HMG 단백질은 상기 경쟁적 어세이법에 첨가된다. 선택적으로, 상기 HMG 단백질은 고체상에 결합할 수 있으며, 본 발명에 따르는 핵산은 표지가가능하다. 잠재적 (potential) 유사체 또는 잠재적 효현제 또는 길항제는 상기 스피에겔머에 결합하는 상기 HMG 분자와 경쟁할 것이고, 이러한 경쟁은 상기 상응하는 표지로부터 수신되는 신호의 감소를 초래할 것이다. 효현제 또는 길항제에 대한 상기 스크리닝법은 당업계에 종사하는 당업자에게 잘 알려진 세포 배양실험 시험법 (cell culture test)의 사용을 포함할 수 있다.

[0483]

[0484]

본 발명의 추가적인 양태로서, 본 발명에 따른 상기 핵산은 HMG 단백질에 대한 특징적 결합방식 때문에 목표 (목표 분자) 평가용으로 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 상기 핵산은 HMG 단백질의 기능을 실험하기 위해 생체 외 (ex vivo) 조직 모델에 사용될 수 있다. 원칙적으로, HMG 효현제/ 길항제가 시험될 수 있는 생체 외 (ex vivo)모델이 존재한다.

[0485]

[0486] 본 발명에 따른 키트 (kit)는 본 발명에 따른 하나 이상의 상기 핵산을 포함할 수 있다. 추가적으로, 상기 키트는 적어도 하나 이상의 양성 또는 음성 대조군을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 상기 핵산이 스크리닝되거나 결합, 바람직하게는 액상 형태에서 결합되는 HMG 단백질은 양성 대조군으로 이용될 수 있다. 음성대조군으로, 특히 생물리화학적 특성이 HMG 단백질과 유사하게 작용하지만 본 발명에 따른 핵산에 의해 인지되지 않는 펩티드 또는 HMG 단백질과 상이한 서열을 갖지만 동일한 아미노산 조성을 갖는 펩티드가 사용될 수 있다.

[0487]

[0488] 더 나아가, 상기 키트는 하나 이상의 완충액을 포함할 수 있다. 상기의 다양한 구성 요소가 건조형(dry), 동결건조 형(lyophilised) 또는 액체상에서 용해된 형태로 상기 키트 내에 존재할 수 있다. 상기 키트는 하나 이상의 충전 용기(container)를 포함하며, 이 충전 용기는 바람직하게는 상기 키트의 하나 이상의 구성 요소를 교대로 포함가능하다. 바람직하게는, 상기 용기는 상기 키트의 하나 이상의 구성 요소를 이용하여 일회 실시(single execution)하기 위해 필요한 반응 배치(reaction batch)를 포함하는 것이다.

[0489]

[0490] 상반되는 의도로 실시하지 않는다면, 본원에 개시된 서열은 5' - 3' 방향으로 제시되는 것으로 인지되어야 할 것이다. 더 나아가 용어 “두 단편이 서로 잡종화 한다(the two sections hybridise with one another)”는 본원에서 상기 단편은 보편적인 염기쌍 법칙에 기초하여 시험관 내(in vitro)에서 잡종화 할 수 있거나, 상기 단편은 잡종화하거나 사용 조건하에서 잡종화 할 수 있지만, 반드시 서로 잡종화하지 않거나 사용 조건하에서 잡종화된 형태로 존재하는 것을 의미하고자 함으로 해석되어야 한다.

[0491]

[0492] 다양한 서열 번호, 본원에 개시된 상기 핵산 및 본원에서 사용된 목표 분자 HMGA1a/b의 화학 구조, 상기 실제 서열 및 상기 내부 참조물질은 하기 표에 요약되어 있다.

[0493] 표 3

서열 번호	내부 참조물질	RNA/펩티드	서열
1	132-C3, NOX-h	1-RNA (스피에겔머)	GCUGCUGCAAAUUGACGGGGCGUGGUUGGGGCGGGUCGAUUGCAGC
2	132-B3, NOX-f (48nt)	1-RNA (스피에겔머)	GCUGAAUGAGGAUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGACCGUUCAGC
3	132-C4	1-RNA (스피에겔머)	GCUGCACAAGGAGAGGGGCGCGGUUGGGGAGGCUCUAAGCGCUGCAGC
4	132-E2	1-RNA (스피에겔머)	GCUGGCGCUAUAGGACAGGGGUGCGGUUGGGGCGGUCCGUGUCAGC
5	132-A2	1-RNA (스피에겔머)	GCUGGAUAGAACGCAGGGGUGCGGUUUGGGGUGGGCGUGAUUGCAGC
6	132-H1, NOX-I	1-RNA (스피에겔머)	GCUGCCGUAAAGAGGGGUGAGGUUGGGGAGGCUUACGGUUCAGC
7	132-F1	1-RNA (스피에겔머)	GCUGCAUGCCGCGAUCAGGGGAGCGGUUGGGGCGGGAUCCGGCUCAGC
8	132-G2, NOX-g	1-RNA (스피에겔머)	GCUGCGAGGGAGGUAGCGGCUCUGCGCCGUGACGUGGGUGGAUGCAGC
9	122-A1, NOX-A	1-RNA (스피에겔머)	GGCUGAUACGUGGGUGGAUAUGGGGAGUCCAUGUGGGUGGUUUCAGCC
10	122-C1, NOX-B	1-RNA (스피에겔머)	GGCUGAUACGUGGGUGAAUAUGGGGAGUCCAUGUGGGUGGUUUCAGCC
11	122-B2	1-RNA (스피에겔머)	GGCUGAUACGUGGGAGGAAAGGUGUAACUACCUGUGGGAGGUUUCAGCC
12	122-E2, NOX-C	1-RNA (스피에겔머)	GGCUGGCACUCGCAGGGGUGAAGUGAUGAUUGGGGUGGGCGAGACCAGCC

13	122-G2, NOX-E	l-RNA (스피에겔머)	GGCUGCCGAGUGGUUGGGUGGUGUAAGGGAGGUGGAAUCCGCGGGCAGCC
14	122-B4, NOX-D	l-RNA (스피에겔머)	GGCUGUUCGUGGGAGGAAGGCUCUUGGAUAGAGUCGUGGGUGGUUCAGCC
15	132-B3 32nt, NOX-f 32nt	l-RNA (스피에겔머)	GGAUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGACC
16	132-B3 33nt, NOX-f 33nt	l-RNA (스피에겔머)	GGAUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGAUCC
17	HMG1a/b 목표분자 도 메인, 비오틴화-- D-HMG1a/b- 21mer	d-펩티드	비오틴-EPSEVPTPKRPRGRPKGSKNK
18	HMG1a (인 간)	l-펩티드	(M)SESSSKSSQPLASKQEKDGTETKRGRGRPRKQPPVSPGTALVGSQKEPSEVPTPKRPRGR PK GSKNKGAATRKTTPGRKPRGRPKKLEKEEEEGISQESSEEEQ
19	HMG1b (인 간)	l-펩티드	(M)SESSSKSSQPLASKQEKDGTETKRGRGRPRKQPPKEPSEVPTPKRPRGRPKGSKNKGA AK TRKTTPGRKPRGRPKK-LEKEEEEGISQESSEEEQ
20	HMG2 인간	l-펩티드	(M)SARGEGAGQPSTSAQGQPAAPQKRGGRPRKQQQEPTGEPSPKRPRGRPKGSKNKSP SKAAQKKAETGEKRPRGRPRKWPQQVQKPAQEETEETSSQESAEED
21 50	bio-dsDNA (AT후크)	d-DNA	5'biotin-TCGAAAAAGCAAAAAAAAAAAAAAAAACTGGC) 및 5'CCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTGCTTTTT
22	NOX-A- 3'PEG, NOX-A- 3'PEG2000, NOX-A-2kDa PEG, NOX-A PEG	l-RNA	GGCUGAUACGUGGGUGGAUAUGGGGAGUCCAUGUGGGUGGUUCAGCC-2kDa-PEG
23	INVERSE- 3'PEG INV 3'PEG	l-RNA	CCGACUUUGGUGGGUGUACCUUGACGGGGUUAUAGGUGGGUGCAUAGUCGG-2kDa-PEG
24	5'비오틴- NOX-A	l-RNA	비오틴-GGCUGAUACGUGGGUGGAUAUGGGGAGUCCAUGUGGGUGGUUCAGCC
25	5'비오틴- NOX-A inverse	l-RNA	비오틴-CCGACUUUGGUGGGUGUACCUUGACGGGGUUAUAGGUGGGUGCAUAGUCGG
26	INVERSE	l-RNA	CCGACUUUGGUGGGUGUACCUUGACGGGGUUAUAGGUGGGUGCAUAGUCGG
27	POC-3'-PEG	l-RNA	UAAGGAAACUCGGUCUGAUGCGGUAGCGCUGUGCAGAGCU-2kDa-PEG
28	포획용 프 로브 NOX-A	l-RNA	CCCATATCCACCCACGTATCAGCCTTTTTTT-NH2
29	검출용 프로브 NOX- A	l-RNA	비오틴-TTTTTTTGGCTGAAACCCACCATGG
30	포획용 프로브 POC	l-RNA	NH2(C7)-TTTTTTTTAGCTCTGCACAGCGCT
31	검출용 프로브 POC	l-RNA	CCGCATCAGACCGAGTTTCTTATTTTTTTT-비오틴
32	HMG_fwd1 프 라이머	d-DNA	TCGACACCATGGGTGAGTC
33	HMG_rev1 프 라이머	d-DNA	GTCTAGAAAGCTTCCCAACTG

34	132-C3, NOX-h	d-RNA (압타머)	GCUGCUGCAAAUUGACGGGGGCGUGGUUGGGGCGGGUCGAUUGCAGC
35	132-B3, NOX-f (48nt)	d-RNA (압타머)	GCUGAAUAGGAUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGACCGUUCAGC
36	132-C4	d-RNA (압타머)	GCUGCGCAAGGAGAGGGGCGCGGUUGGGGAGGCUCUAAGCGCUGCAGC
37	132-E2	d-RNA (압타머)	GCUGGCGCUAUAGGACAGGGGUGCGGUUGGGGCGGUCCGCUGUCAGC
38	132-A2	d-RNA (압타머)	GCUGGAUAGAACGCAGGGGUGCGGUUUGGGGUGGGCGUGAUUAGCAGC
39	132-H1, NOX-i	d-RNA (압타머)	GCUGCCGUAAAGAGGGGUGAGGUUGGGGAGGCUUACGGUUUCAGC
40	132-F1	d-RNA (압타머)	GCUGCAUGCCGCGAUCAGGGGAGCGGUUGGGGCGGGAUCCGGCUCAGC
41	132-G2, NOX-g	d-RNA (압타머)	GCUGCGAGGGAGGUAGCGGCUCUGCGCCGUGACGUGGGUGGAUCAGC
42	122-A1, NOX-A	d-RNA (압타머)	GGCUGAUACGUGGGUGGAUAUGGGGCAGUCCAUGUGGGUGGUUUCAGCC
43	122-C1, NOX-B	d-RNA (압타머)	GGCUGAUACGUGGGUGAAUAUGGGGCAGUCCAUGUGGGUGGUUUCAGCC
44	122-B2	d-RNA (압타머)	GGCUGAUACGUGGGAGGAAAGGUGUAACUACCUGUGGGAGGUUUCAGCC
45	122-E2, NOX-C	d-RNA (압타머)	GGCUGGCACUCGCAGGGGUGAAGUGAUGAUUGGGGUGGGCGAGACCAGCC
46	122-G2, NOX-E	d-RNA (압타머)	GGCUGCCGAGUGGUUGGGUGGUGUAAGGGAGGUGGAAUCCGCGGGCAGCC
47	122-B4, NOX-D	d-RNA (압타머)	GGCUGUUCGUGGGAGGAAGGCUCUUGGAUAGAGUCGUGGGUGGUUCAGCC
48	132-B3 32nt, NOX-f 32nt	d-RNA (압타머)	GGAUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGACC
49	132-B3 33nt, NOX-f 33nt	d-RNA (압타머)	GGAUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGAUCC

[0494] 만약 본 발명에 따른 상기 핵산의 개별적 부분에 대한 서열이 명시적으로 제시되지 않는다면, 이들은 본원에 개시된 기술적 교시에 따라 자유로이 선택가능하며, 즉, 상기 개개 목표 분자에 필수적인 결합 방식을 발휘하고 또는 특정 구조, 특히, 본원에 개시된 2차원 구조를 형성할 수 있도록 자유롭게 선택 될 수 있음도 본 발명의 범위 내이다.

[0495]

[0496] 더 나아가, RNA 서열로 확인된 서열의 경우에, T는 U 대신에 제시되었고, T는 U를 의미하게 된다는 것은 본 발명의 바람직한 구현예의 범위 내이다.

[0497]

[0498] 본 발명은 하기에 추가적인 도면, 구현예 및 장점을 기재하고 있는 하기의 도면 및 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명된다.

실시예

실시예 1: HMGA1a/b-결합 스피에겔머 (HMGA1a/b-binding spiegelmers)

1.1 HMGA1a/b-결합서열

HMGA1a/b-결합 RNA 스피에겔머는 D-21AS-HMGA1a/b에 대한 시험관내 선택법(*in vitro* selection) 및 뒤따른 단축 단계 (shortening step)들에 의해 제조된다. 21AS-HMGA1a/b 도메인(domain)에 결합하는 상기 제조된 압타머 (aptamers)는 도면 1A에 나타냈다.

1.1.1 순위(Ranking) 및 압타머의 수준

서로 다른 클론들을 (도면 1A 참조) 일반적인 포스포라미다이트 합성 법(phosphoramidite synthesis)을 통해 압타머 (D-RNA)로서 준비하였으며, 키나싱법 (kinasing)에 의해 5' 말단을 방사성으로 표지하였다 (하기 참조). 그 후 상기 클론들을 이들의 친화도 및 활성도를 측정하기 위하여 D-bio-21aaHMGA1a/b의 두가지 농도에서 평형 결합어세이법 (equilibrium binding assay)에 의하여 분석하였다.

키나싱법에 의한 방사성 표지:

물질	[최종]
RNA	5 μ M
T4 포워드 (forward) 반응 버퍼 (Invitrogen)	1x
T4 폴리뉴클레오티드 카이네이즈 (Invitrogen)	10 U/ 10 μ l _{Reaction batch}
[γ - ³² P]-ATP	1 μ l/10 μ l _{Reaction batch}

반응은 37°C에서 한 시간 동안 진행되며, 열을 가하여 (65°C에서 10분간) 정지시켰다. 표지된 올리고뉴클레오티드로부터의 방사성 뉴클레오티드의 분리는 분석적 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동법 (PAGE)에 의해 수행된다 (하기 참조). "크러시 및 소크 (crush-and-soak)" 겔 용출 (elution)은 암모늄 아세테이트 (ammonium acetate) 및 에탄올에 의한 침전법으로 수행되었다 (하기 참조). 정제된 RNA의 양은 펠렛 (pellet) (침전 이후)의 방사능 수치를 컷-아웃-스트립 (cut-out strip)의 방사능을 대조하여 측정되었다.

폴리아크릴아마이드 (Polyacrylamide) 겔 전기영동 (PAGE)

올리고뉴클레오티드의 예비적 정제를 위해서, PAGE를 변성시키기 위해 1/2 내지 2배 부피로 농축된 시료 완충액을 반응 용액에 첨가했다. 추가적으로 필요에 의해 대용량 표준액 (large-scale standards)을 준비하였으며, (각 250 pmole) 시료 완충액에 첨가했다. 상기 배치 (batches)를 95°C에서 5 분간 변성시킨 후 얼음에 냉각시켰다. 예비적 변성용으로 7% 또는 10% PAA 겔 (200 $\times$ 200 $\times$ 1.5 mm)을 40-50 W에서 최대 전압 600 V를 가하여 예열 (약 1 시간)하였다. 1xTBE으로 겔을 행군 후에 시료들을 플롯(plot)하였다. 분리 (50 W에서 50분간)를 마친 후에, 겔을 투명 필름에 의해 보호된 형광 박층 (fluorescing thin-layer) 크로마토그래피 플레이트 (염료 60F₂₅₄)에 배치하였다. 밴드가 "UV 광 (254 nm)" 으로 그림자 ("UV shadowing") 형태로 형상화되었고 이를 메스로 잘라낸다. 그리고, 암모늄 아세테이트를 포함하는 "크러시 및 소크 (crush-and soak)" 겔 용리법(gel elution)을 수행했다.

"크러시 및 소크 (crush-and-soak)" 겔 용리법 (elution)

- [0543] PAA겔로부터 올리고뉴클레오타이드를 용리시키기 위하여, 잘려진 PAA 겔 스트립을 세분한 후에, 500 μ l의 암모늄 아세테이트 (2 M)를 피펫 팁 (pipet tip)이나 스파툴라 (spatula)를 이용하여 첨가했다. "크러시 및 소크 (crush-and soak)" 용리법은 온도조정 교반장치 (thermoshaker)(1000 rpm)에서 68℃, 2 x 1.5 시간동안 수행했다. 상층액을 겔 잔류물로부터 책상 원심분리기 (16,100 x g)에서 "Ultrafree-MC" 소형 컬럼 (Millipore/Amicon, Schwalbach, Germany)에 의해 유리시킨다. 상기의 방법으로 용리된 RNA는 에탄올에 의한 침전법으로 탈염시켰다.
- [0544]
- [0545] **에탄올 침전(Ethanol precipitation)**
- [0546] 에탄올 침전을 하기 위해서, 1 내지 2 μ l의 글리코젠 (glycogen)을 침전 보조제 (precipitation auxiliary)로 사용했다. 2.5배의 순수 에탄올을 첨가 및 교반 (vortexing)한 후에, 올리고뉴클레오타이드를 30분간 -80℃에서 침전시킨 후, 4℃에서 16,100 x g로 원심 분리하여 분리하였다. 펠렛은 70% 에탄올로 1회 세척하고 4℃, 16,100 x g로 5분간 원심분리하였다.
- [0547]
- [0548] **평형 결합 어세이법 (Equilibrium binding assay)에서 결합 등온선 (binding isotherms) 기록**
- [0549] 5' 방사성 표지된 개개의 압타머 2 pmole을 Bachem (Weil am Rhein, Germany)사에서 제조되는, 비오틴화된-D-HMGA1a/b-21mer(EPSEVPTPKRPRGRPKGSKNK[서열번호 17]; 도면2 참조)과 결합시켰다. 1 내지 3000 nM (또는 300 nM 및 30 nM 또는 100 nM 및 10 nM 펩티드의 두 지점 측정) 농도 범위의 용액을 선택용 완충액 (selection buffer) (10 mM Tris HCl pH 7.4, 5 mM KCl, 0.8 mM MgCl₂, 0.1% Tween)에서 37℃에 1시간동안 배양하였다. 비오틴화된 D-HMGA1a/b-21mer가 없는 용액을 배경 대조군 (background)으로서 제공되었다. 펩티드와 복합체들을 이후에 10 μ l 스트렙타바딘 울트라링크 (streptavidin UltraLink) 겔에서 37℃에 30분 이내에 고정시켰다. 현탁액의 방사능을 측정하였다. 상층액을 제거하였다. 그리고 매트릭스 (matrix)을 100 μ l 선택용 완충액으로 한 차례 세척하고, 이 선택용 완충액으로 침전시켰다. 복합체에서 비오틴화된-D-HMGA1a/b-21mer와 같이 존재하는 압타머 단편의 방사능을 각펩티드 농도에서 측정하였다. 활성종 (active species)의 해리상수 (dissociation constants) 및 활성 종들의 분포를 도식적 플로팅 (plotting) 및 피트 법 (fit)으로 측정하였다 (GraFit, Version 4.0.10, Erithacus Software).
- [0550]
- [0551] **결과**
- [0552] 압타머 (D-RNA)로 합성된 모든 클론들을 위해, 8-22 nM의 HMGA1a/b (비오틴화된-D-HMGA1a/b-21mer)의 21개 아미노산 길이의 D 단편의 결합을 위한 해리 상수를 평형 결합 어세이법에 의해 측정하였다 (도면 1A).
- [0553]
- [0554] **1.1.2 실시예 132-B3의 단축(Shortening in Example 132-B3)**
- [0555]
- [0556] 선택된 모든 후보자 (candidates)들을 헬릭스/스텝 모티프 (helix/stem motif)에 의해서 5' 말단 및 3' 말단에 안정화되는, 반복적으로 발생하는 서열 모티프 GGGCG 또는 GGGUG 또는 GGGAG를 나타냈다 (도면 3).
- [0557]
- [0558] 유망한 구조 분석 및 주커(Zuker)의 방법 (Nucleic Acids Res. 2003 Jul 1; 31 (13): 3406-15)에 따른 상기 RNA 압타머의 침전 시험결과로 예정된(predetermined) 스텝/헬릭스 (stem/helix) 구조가 일부 경우 (132-C3, 132-B3, 132-C4, 132-E2, 132-A2, 132-H1, 132-F1, 122-G2, 122-E2, 도면 1A 참조)에서는 길어 졌음을 나타내었다. 이 스텝/ 헬릭스 (stem/ helix) 구조는 이러한 후보 물질들의 추가적인 단축의 기초를 형성하였다. 이러한 후보 물질들의 추가적인 단축은 침전 분석법 (precipitation analysis) 및 뒤따른 HMGA1a/b 단편에의 결합과 관련된 합성 D-RNA의 결실 분석법(deletion analysis)에 의해 최소 결합 모티프(minimal binding motif)를 동정 및 안정화시킴으로써 수행하였다. 이러한 결합 특성들은 평형 결합 어세이법(equilibrium binding assay)에 의해 측정되었다. 도면 3은 후보물질인 NOX-f (132-B3)에서의 예로서, 상기 안정화 스텝 구조 (stabilising stem structure)에 근거하여 상기 압타머의 단축된 예를 나타내며, 이는 후보 물질인, 132-C3,

132-B3, 132-C4, 132-E2, 132-A2, 132-H1, 132-F1, 122-G2, 122-E2에서 길어진 형태로 발견될 수 있다 (도면 1A 참조). 6개 뉴클레오티드 길이의 스템 (stem) (NOX-f 32nt)로부터 32개 뉴클레오티드 길이의 압타머 변이체 (variant)로의 단축(shortening)은 상기 21aa HMGA1a/b 단편에 대한 결합 특성상에 아무런 손실을 초래하지 않았다 (도면 3 및 4 참조). 5' 위치 스템 (stem)의 세 번째 위치에서의 아데노신 (adenosine)의 인공적인 삽입 (artificial insertion)은 비루프화 (looped-out) 영역이 없는 7개 뉴클레오티드 길이의 스템 (stem)의 이론적인 형성을 초래하고 3' 영역 (NOX-f 33nt, 도면 3 및 4)에서 상기 스템을 완성하도록 제공한다. HMGA1a/b의 21개 아미노산 길이 도메인에 대한 평형 결합 에세이법에서의 결합 특성 (친화도 및 활성)의 측정은 이러한 변화들에 영향을 받지 않았다.

[0559]

[0560] 반면에, 서열 132-G2, 122-A1, 122-C1, 122-B2 및 122-B4은 반복적으로 일어나는 서열 모티프 (GGGCG 또는 GGGUG 또는 GGGAG)의 5' 말단 및 3' 말단에 현저하게 단축된 스템 구조를 갖는다. 스템 구조의 단축은 결합 손실을 초래하였다. 단축반복적인 서열 모티프 (GGGCG 또는 GGGUG 또는 GGGAG)사이의 이러한 서열들 위한, 보다 긴 상기 중심 영역 (central region)의 가능한 단축은 수행하지 않았다.

[0561]

[0562] 본원에 개시된 상기 HMGA-결합 핵산의 상기 압타머 서열번호는 하기와 같다:

[0563]	서열번호	내부참조	RNA/펩티드
[0564]	34	132-C3, NOX-h	D-RNA(압타머, aptamer)
[0565]	35	132-B3, NOX-f(48nt)	D-RNA(압타머, aptamer)
[0566]	36	132-C4	D-RNA(압타머, aptamer)
[0567]	37	132-E2	D-RNA(압타머, aptamer)
[0568]	38	132-A2	D-RNA(압타머, aptamer)
[0569]	39	132-H1, NOX-i	D-RNA(압타머, aptamer)
[0570]	40	132-F1	D-RNA(압타머, aptamer)
[0571]	41	132-G2, NOX-g	D-RNA(압타머, aptamer)
[0572]	42	122-A1, NOX-A	D-RNA(압타머, aptamer)
[0573]	43	122-C1, NOX-B	D-RNA(압타머, aptamer)
[0574]	44	122-B2	D-RNA(압타머, aptamer)
[0575]	45	122-E2, NOX-C	D-RNA(압타머, aptamer)
[0576]	46	122-G2, NOX-E	D-RNA(압타머, aptamer)
[0577]	47	122-B4, NOX-D	D-RNA(압타머, aptamer)



[0578] 48 132-B332nt, NOX-f32nt D-RNA(압타머, aptamer)

[0579] 49 132-B3 33nt, NOX-f 33nt D-RNA (압타머, aptamer)

[0580]

[0581] 본원에서 이미 개시되고 당업계에 종사하는 당업자에게 널리 알려진 바와 같이, 압타머, 즉 D-펩티드에 대해 형성된 D-핵산의 L-뉴클레오티드로 구성되는 이성질체 (enatiomer)는 D-펩티드의 거울상 이성질체, 즉, 자연 발생적 L-펩티드와 결합한다. 본원에서 “스피에겔머”로 또한 지칭되는 이 L-핵산 및 원칙적으로 압타머와 같은 결합 특성을 나타낸다.

[0582]

[0583] 1.2 HMGA/b-결합 스피에겔머의 특성들

[0584]

[0585] 1.2.1 반복적인 서열 요소: BOX A1 및 BOX A2

[0586] 서열 GGGCG 또는 GGGUG 또는 GGGAG의 반복적인 서열 요소는 HMGA1a/b에 결합하는 모든 스피에겔머의 특성이다. 이 서열 요소들은 HMGA1a/b-결합 스피에겔머에서 두번 나타난다 (도면 1A 및 1B). 스피에겔머의 5' 말단에 가까이 위치한 서열 요소를 본원에서 “Box A1”로 정의한다. 반면에, 스피에겔머의 3' 말단에 가까이 위치한 서열 요소는 본 발명에서 “Box A2”로 정의된다. Box A1 및 Box A2 및 이들의 상호 간 배열 (mutual arrangement)은 아마도 HMGA1a/b-결합 스피에겔머의 결정적인 특성을 나타낼 것이다.

[0587]

[0588] 1.2.2 Box A1 및 Box A2 사이의 서열 구간(sequence section)

[0589]

[0590] Box A1 및 Box A2 사이에도 6개 내지 7개의 핵산 또는 12개 내지 22개의 뉴클레오티드 길이의 서열 구간이 있다 (도면 1A 및 1B). 이 서열 구간은 그들의 길이면에서만 상이한 것이 아니기에, 개별적으로 논의된다.

[0591]

[0592] 사례 1: 서열 구간은 6개 내지 7개의 뉴클레오티드를 구성한다.

[0593]

[0594] 만일 Box A1 및 Box A2 사이의 서열 구간이 6개의 뉴클레오티드 길이를 가진다면, 상기의 서열 구간은 서열 UGGUUG, UGGCUG, CGGUUG, AGGUUG 또는 GUGUAA를 나타낸다. 서열 CGGUUG 내로의 한 개의 뉴클레오티드 (우라실, uracil) 삽입으로 인한 서열 CGGUUG는 스피에겔머의 결합 특성에 부정적 또는 긍정적인 영향을 어느 것도 초래하지 않는다.

[0595]

[0596] 사례 2: 서열 구간은 12개 내지 22개의 뉴클레오티드를 구성한다.

[0597]

[0598] 만일 BOX A1 및 BOX A2 사이에 위치한 서열 구간이 12 개 내지 22 개의 뉴클레오티드 길이를 가진다면, 상기의 서열 구간은 동일 길이의 두개의 서열 영역을 포함하며, 이들은 상호간에 잡종화가 가능하다 (HelixC). 이 경우에 상기 잡종화는 각 경우의 3 개 내지 6 개의 뉴클레오티드의 영향을 받는다. Helix C를 생성하는 상기 뉴클레오티드 사이에 3개 내지 5개의 짝지지 않은 뉴클레오티드가 존재한다. Helix C의 5' 말단 및 Box A1의 3' 말

단의 사이에 존재하는 짝짓지 않은 (unpaired) 1 개 내지 3 개의 뉴클레오티드가 존재한다. 1 개 내지 5 개의 뉴클레오티드는 Helix C의 3' 말단과 BOX A2의 5' 말단 사이에 짝짓지 않은 상태로 존재할 수 있다.

[0599]

[0600]

1.2.3 스피에겔머 (spiegelmer)의 5' 말단 및 3' 말단의 나선형 구조 (helical structure)

[0601]

모든 HMGA1a/b-결합 스피에겔머는 상호 잡종화할 수 있는 서열 구간(Helix A1 및 Helix A2, 도면 1A 및 1B)에 의해 5' 말단 및 3' 말단으로 특징지을 수 있다. 각 경우에서 서로 간에 잡종화하는 뉴클레오티드의 수는 4 개 내지 8개로 다양하다. 이와 관련하여, 아마도 이러한 이중 가닥 부분은 BOX A1의 5' 말단 및 BOX A2의 3' 말단에 연장될 수 있다. 이 경우가 아니라면, BOX A1 및 BOX A2가 추가적으로 서로 잡종화하는 뉴클레오티드 (Helix B1과 Helix B2)에 의해 플랭크화 (flank)가 될 수 있다. 이는 개개의 경우에 4개 내지 8개의 뉴클레오티드의 영역으로 전개될 수 있다 (도면 1A 및 1B).

[0602]

[0603]

본 출원에 기초한 발명의 범위 내에서, 다양한 부류(classes)의 핵산 및 특히, 목표 분자에 결합하는 L-핵산이 동정되었다. 본원에서 "사례(case)"라고도 정의되는 이러한 부류(classes)에 대한 하기 설명 및 개시 내용은 본 발명의 필수적인 구성요소에 해당한다. 각 분류에서 그들의 주요 구조 및 분류를 위한 예시적인 L-핵산은 지금부터 상기 L-핵산의 개개 생략용어(Abbreviation)를 통하여 본 발명에서 구체적으로 특정화될 것이다.

[0604]

[0605]

사례 1: 132-C3, 132-B3, 132-C4, 132-E2, 132-A2, 132-H1, 132-F1, 122-G2, 132-B3 32nt, 132-B3 33nt

[0606]

[0607]

Helix A1-N_X-HelixB1-N₆N₇Box A1N₁N₂GN₈N₃N₄N₅BOX A2 G-N_Y-

[0608]

Helix B2-N_Z-Helix A2 (사례1A)

[0609]

[0610]

또는

[0611]

[0612]

Helix A1-N_X-HelixB1-N₆N₇Box A1 N₁N₂GN₈N₃N₄N₅BOX A2 HelixB2-N_Z-

[0613]

Helix A2 (사례 1B)

[0614]

[0615]

N₁=U, C, A, G;

[0616]

N₂=G, U;

[0617]

N₃=U, C;

[0618]

N₄=U, A;

[0619]

N₅=G, A;

[0620]

N₆=G, A, U;

[0621]

N₇=G, U;

[0622]

N₈=U 또는 0개의 뉴클레오티드;

[0623]

N_X=0 개 내지 5개의 뉴클레오티드;

[0624]

N_Y = 0 또는 6개의 뉴클레오티드;

- [0625] $N_z = 0$ 개 내지 6개의 뉴클레오티드;
- [0626]
- [0627] Box A1 = Box A2 = GGGCG 또는 GGGUG 또는 GGGAG;
- [0628]
- [0629] Helix A1 및 Helix A2 = 각 경우에, 상호 전체적 또는 부분적으로 잡종화하는 4개 내지 8개의 뉴클레오티드로 구성되고, Helix A1 및 Helix A2 및 **Helix B1** 및 **Helix B2**의 각 경우에서의 상호 잡종화하는 뉴클레오티드의 총합은 10개 내지 12개의 뉴클레오티드이다;
- [0630]
- [0631] **Helix B1** 및 **Helix B2** = 각 경우에, 상호 잡종화하는 4개 내지 8개의 뉴클레오티드로 구성되고, Helix A1 및 Helix A2 및 **Helix B1** 및 **Helix B2**의 각 경우에서의 상호 잡종화하는 뉴클레오티드의 총합은 10개 내지 12개의 뉴클레오티드이다.
- [0632]
- [0633] 상기 분자들은 또한 5' 말단 및 3' 말단의 단축 이후에 활성화 된다. 상기 Helix A1 및 Helix A2뿐만 아니라 N_6N_7 및 GN_y 를 제거한 이후에, 상기 단축된 분자들은 결합 특성을 유지한다. 이는 단축된 변이체 (variant) 132-B3 32nt (NOX-f 32nt) 및 132-B3 33nt (NOX-f 33nt) (도면 3 및 4 참조)이라는 것이 증명되었다.
- [0634]
- [0635] **사례 2A: 132-G2, 122-A1, 122-C1, 122-B2, 122-B4**
- [0636]
- [0637] Helix A1- N_a - **Box A1** - N_b -Helix C1- N_c -Helix C2- N_d -**Box A2**-G- N_e -Helix A2
- [0638]
- [0639] $N_a=1$ 개 내지 5개의 뉴클레오티드
- [0640] $N_b=3$ 개의 뉴클레오티드
- [0641] $N_c=3$ 개 내지 5개까지의 뉴클레오티드
- [0642] $N_d=2$ 개 내지 5개의 뉴클레오티드
- [0643] $N_e=1$ 개 내지 2개의 뉴클레오티드, 바람직하게는, A 또는 UU
- [0644]
- [0645] Box A1 = Box A2 = GGGCG 또는 GGGUG 또는 GGGAG
- [0646] Helix A1 및 Helix A2 = 각 경우에서 상호간에 전체적 또는 부분적으로 잡종화하는 5개 내지 6개의 뉴클레오티드,
- [0647]
- [0648] Helix C1 및 Helix C2 = 각 경우에서, 상호간에 잡종화하는, 5개 내지 6개의 뉴클레오티드
- [0649]
- [0650] **사례 2B: 122-E2**
- [0651]
- [0652] Helix A1- N_i -**Helix B1**- N_j -Box A1-A-Helix C1- N_c -Helix C2-G-Box A2-G-**Helix B2**-A-Helix A2
- [0653]

- [0654] $N_i=2$ 개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 CA
- [0655] $N_j=2$ 개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 AG
- [0656] $N_c=4$ 개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 GAUG
- [0657]
- [0658] Box A1 = BoxA2 = GGGCG 또는 GGGUG 또는 GGGAG
- [0659] Helix A1 및 Helix A2 = 각 경우에서 상호간에 잡종화하는, 6개의 뉴클레오티드,
- [0660] **Helix B1 및 Helix B2** = 각 경우에서 상호간에 잡종화하는 5개의 뉴클레오티드,
- [0661] Helix C1 및 Helix C2 = 각 경우에서 서로간에 잡종화하는 3개의 뉴클레오티드
- [0662]
- [0663] **실시예 2: 도메인 접근 (Domain Approach)**
- [0664]
- [0665] 2.1 상기 경쟁적 어세이법 (competitive assay)에서의 HMGA1a/b 스피에겔머 및 재조합 (recombinant) HMGA1b의 상호작용의 측정
- [0666]
- [0667] 실시/방법
- [0668] **His6- 표지된 HMGA1b의 클로닝 (Cloning)**
- [0669] HMGA1b를 암호화하는 서열을 가진 BD-FreedomTM ORF클론 GH00552L1.0 (고이동성그룹 (high mobility group); AT 후크 1)는 BioCat Heidelberg에서 구입하였다. 상기 서열은 C-말단의 융합을 허용하기 위해 상기 정지 코돈 (stop codon)이 루신 (leucine)을 암호화하는 코돈 (codon)으로 전환되도록 이미 변환되었다. 상기 클론의 서열은 일반적으로 RefSeq 데이터 뱅크 (databank)에 저장된 번호(No.NM002131)와 상응하는 것이다. HMGA1b를 암호화하는 상기 서열은 프라이머(primer) HMG_fwd1 (TCGACACCATGGGTGAGTC, 서열번호 34) 및 HMG_rev1 (GTCTAGAAAGCTTCCCAACTG, 서열번호 35)로 표준 PCR 방법을 이용하여 증폭시켰다. 이와 관련하여, ATG 이후의 염기는 Nco I 경계면 (interface)을 도입하기 위해 A에서 G로 전환시켰다. 상기 PCR산물은 제조자의 지시서 (instruction)에 따라, 상기 제한 효소 Nco I 및 HindIII (모두 NEB, Fankfurt am Main 구입, Germany)로 잘랐고, 아가로스 겔로 정제하였다. 상기 벡터 pH02d (Fasshauer et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:28036-28041)도 또한 유사하게 Nco I 및 HindIII로 잘랐으며, 아가로스 겔 (agarose gel)로 정제하였다. 상기 벡터 pH02d는 T7-프로모터 (Fasshauer et al., 1997, JBC 272:28036)의 조절 하에, C말단에 6개의 히스티딘 잔기 (His6-tag) 서열로 융합된 단백질의 발현을 나타냈다. 상기 제조자의 지시 (MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Germany)에 따라, 상기의 정제되고 잘려진 PCR산물을 준비된 벡터에 T4 리가제 (ligase)로 15℃에서 하룻동안 결합된다. DH5 박테리아 균주 (strain)는 결합된 산물과 함께 형질 전환된다. 획득된 콜로니들 (colonies)로부터 얻은 플라스미드 (plasmid)의 정확도는 시퀀싱 (sequencing)을 통해 확인하였다. pH02d/HMGA1b에 의해 암호화된 상기 융합 단백질 HMGA1b-His6은 자연적인 HMGA1b 단백질과 비교하였을 때, 2번 위치의 세린 (serine) (S) 대신에 글리신 (glycine) (G)을 갖으며, C-말단의 글루타민 (G) 이후에 루신 (L) (상기 참조)을 갖고 또한 여섯 개의 히스티딘 (H)이 결합하는 추가의 5 개의 아미노산 (G S L N S)이 뒤따른다 (상기 벡터에 의해 암호화되는).
- [0670]
- [0671] **HMGA1b-His6의 발현 및 정제**
- [0672] 융합 단백질 (fusion protein) 발현을 위해, 균주 박테리아 균주 BL21가 플라스미드 pH02d/HMGA1b와 함께 형질 전환되었다. 상기 융합 단백질 (fusion protein)의 발현은 아이소프로필티오-베타-D-갈락토시드 (isopropylthio-β-D-galactoside; IPTG)에 의해 유도되었다. 4시간 후에 상기 박테리아는 15분간 $10,000 \times g$ 에서 원심분리하고, 침전물은 -20℃에서 추후 사용 전까지 보관하였다.

[0673]

[0674]

융합 단백질의 추출 (extraction)을 위해, 25 ml의 추출 완충액 (extraction buffer: Na_2PO_4 완충액내에 1% n-옥틸- β ,D-티오글루코피라노시드 (n-octyl- β ,D-thioglucopyranoside; OTG), pH8.0, 250 mM NaCl, 10 mM 이미다졸(imidazole) 및 미니프로테아제(Mini-protease) 저해제 정제(Roche, Mannheim, Germany) (5시간/50ml) 함유)을 500 ml 배양액으로부터 냉동 박테리아 침전물 (pellet)에 첨가하고, 5 μl 벤조네이즈 (benzonase) (1 등급; MERCK, Darmstadt, Germany)를 첨가 후, 파이펫팅 (pipetting)으로 균질화하여 실온에서 5분간 배양하였다. 이후 $10,000 \times g$ (RT)에서 15분간 원심분리하였다. 상층액은 흡이 있는(fluted) 필터로 여과하고, 세척용 완충액 (wash buffer) (50 mM Na_2PO_4 완충액, pH 8.0, 250 mM NaCl, 10 mM 이미다졸, 모두 MERCK, Darmstadt사 구입, Germany)로 평형화시킨 HIS-SELECT 컬럼 (HIS-SELECT Cartridge, Sigma, Deisenhofen, Germany)에 첨가하였다. 세척용 완충액 (wash buffer) 10 내지 15 ml로 컬럼을 세척 후에 상기 융합 단백질을 용리 완충액 (elution buffer) (세척 완충액 내에 250 mM 이미다졸 (imidazole) 함유)로 0.5 내지 1 ml 크기의 분획 (fraction)으로 용리시켰다. 단백질-함유 분획은 겔 전기영동 (문헌 (Sch& Jagow, 1987, Anal. Biochem. 166: 368-379)에 따른 16% 폴리아크릴아미드 겔)법을 이용하여 그 순도를 확인하였다. 상기 융합 단백질을 포함하는 분획들을 정제하였고, 필요에 따라, 적절한 완충액으로 투석한 후, 다시 한 번 순도측정을 위해 단백질 정량을 수행하였다. 정제된 융합 단백질은 나누어 -20°C 에서 보관하였다.

[0675]

[0676]

HMGA1a/b 스피에겔머 및 HMGA1b-His 6의 상호작용의 측정

[0677]

[0678]

96-웰 포맷 (well format)에 기초한 실험법으로 HMGA1b에 대한 상기 HMGA1a/b 스피에겔머의 친화성 (affinity)을 보다 세밀한 분석을 위해 사용하였다. 이 시험에서, HMGA1b-His6에 대한 상기 HMGA1a/b 스피에겔머 (spiegelmer)의 결합은 HMGA1a/b을 위한 결합 부위를 함유하고 있는 DNA 올리고뉴클레오티드 (oligonucleotide)와의 상호작용을 저해한다. 상기 DNA 올리고뉴클레오티드 (dsDNA AT 후크) (Fashena et al., 1992)를 비오틴 (biotin)분자로 한 가닥에 표지하고, 이로 인하여 스트렙타비딘 (streptavidin)으로 코팅된 플레이트 (plate)에 결합될 수 있다. DNA에 결합된 HMGA1b-His6의 탐지는, 형광성 기질 (fluorogenic substrate)을 전환하는 니켈 (Nickel) (Nickel-HRP)로 변형시킨 HRP (horseradish peroxidase) 존재하에 의해 수행하였다. 이 어세이법에서, 상기 스피에겔머는 자연적 결합 파트너로부터 재조합 HMGA1b을 치환시킨다. 스피에겔머/rHMGA1b/dsDNA AT 후크의 화학양론적 비율이 1:1:1이므로, HMGA1b에 대한 스피에겔머의 친화성에 관한 직접적인 예측이 가능하다. 상기 실험에 관한 원리는 도면 5에 상술되어 있다.

[0679]

[0680]

이 실험을 수행하기 위해서는 다양한 농도의 스피에겔머 및 총 부피 100 μl 내에 HMGA1b-His6 (0.36 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 약 30 nM)를 실온에서 10분간 테이퍼드 플로어 플레이트 (tapered floor plate)에 교반하며 배양한다. 배양 용액은 또한 하기를 함유하고 있다: 25 mM Tris/HCl, pH 7.0 (Ambion, Austin, TX, USA), 140 mM KCl (Ambion, Austin, TX, USA), 12 mM NaCl (Ambion, Austin, TX, USA), 0.8 mM MgCl_2 (Ambion, Austin, TX, USA), 0.25 mg/ml BSA (Roche, Mannheim, Germany), 1 mM DTT (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), 18 내지 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poly (dGdC) (Sigma, Deisenhofen, Germany), 0.05% Tween 20 (Roche, Mannheim, Germany). 2 μl 비오틴화된 DNA 올리고뉴클레오티드 dsDNA AT hook (5' 비오틴 -TCGAAAAAAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGGC (34nt) 및 5' GCCAGTTTTTTTTTTTTTTTGTCTTTTT (31nt)의 동일한 양의 혼합물); 75 μM 이 함유된 150 mM의 NaCl (Ambion, Austin, TX, USA)가 첨가되고 실온에서 10분간 더 교반하면서 배양한다. 상기 배치 (batch)들을 그런 후 스트렙타비딘 (streptavidin) (ReactiBind from Pierce, Bonn, Germany)로 코팅된 검정 96-웰 플레이트로 옮긴 후, 실온에서 천천히 교반하면서 30분간 동안 배양한다. 이어서 플레이트의 이 웰들을 매번 200 μl TBSTCM (20 mM Tris/ HCL, pH 7.6 (Ambion, Austin, TX, USA); 137 mM NaCl (Ambion, Austin, TX, USA), 1 mM MgCl_2 (Ambion, Austin, TX, USA), 1 mM CaCl_2 (Sigma, Deisenhofen, Germany), 0.05% Tween20 (Roche, Mannheim, Germany))으로 3회 세척했다. 희석된 니켈-HRP 용액 50 μl 를 각 웰 (ExpressDetector니켈-HRP (Medac, Hamburg, Germany), TBSTCM내 10 mg/ml BSA (Roche, Mannheim, Germany) 1: 1000 용액)에 첨가후에 실온에서 천천히 교반하면서 1 시간 동안 배양한다. 그런 후에 상기 웰들은 매번 200 μl TBSTCM으로 다시 세 번 세척한다. 이후에 100 μl 의 형광 HRP 기질 (QuantaBlue, Pierce, Bonn, Germany)을 각 웰에 첨가하고 상기 형광치를

15분 후 (여기과장(ex): 340/ 방출과장(em): 405 nm)에서 측정하였다.

[0681] 결과

[0682] 스피에겔머 NOX-A (50nt), NOX-f (33nt) 및 NOX-f (48nt)가 비오틴화된 DNA-올리고뉴클레오타이드에 대한 상기 HMGA1b-His6의 결합에 대하여 농도 의존적으로 경쟁함을 알 수 있다 (도면 6). 스피에겔머 NOX-A의 IC₅₀는 약 15 nM으로 측정되었다.

[0683] 상기 활성 스피에겔머와는 대조적으로, NOX-A 대한 역 서열을 갖는 대조 스피에겔머는 0.5 μM까지의 농도에서 DNA 올리고뉴클레오타이드에 대한 HMGA1b-His6의 결합에 아무런 영향이 미치지 않았으며, 오직 1 μM의 농도 이상에서만 HMGA1b-His6와의 비-특이적 상호작용이 일어남을 보여준다 (도면 7).

[0684] 2.2 웨스턴 블롯 (western blot)에서의 HMGA1b 검출을 위한 스피에겔머의 사용

[0685] 실행/ 방법

[0686] 재조합적으로 발현된 HMGA1b는 16% PAA-tricin 겔에서 겔 전기영동법에 의해 분리되었으며, 니트로셀룰로즈 막 (nitrocellulose membrane)상의 전기 블랏팅 (electroblotting) 방법을 수행하였다. 상기 막은 5% 전지 우유 (skim milk) 및 1× TBST (20 mM Tris/ HCl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween)내의 비특이적 스피에겔머 100 nM로 1 시간 동안 차단하고 10분씩 3 차례 1× TBST로 세척하였다. 상기 재조합 HMGA1b의 검출을 5' 말단의 비오틴화된 스피에겔머 NOX-A에 의해 수행하였다 (5' bioNOX-A). 5' bioNOX-A는 개개 1 mM의 칼슘 및 마그네슘 ((TBST+Ca/Mg) 및 100 nM 비-특이적 스피에겔머으로 1× TBST상에서 희석하고, 1.5시간 동안 배양하였다. 그런 후 상기 블랏(blot)을 1× TBST+Ca/Mg로 10분 동안 3 차례 세척하고, 상기 결합된 비오틴화된 스피에겔머를 항-비오틴 항체 (anti-biotin antibody)와 함께 TBST+Ca/Mg에서 45분간 배양하였다. 그런 후에, 상기 블랏을 10분 간 5 차례 1× TBST+Ca/Mg로 세척하고, LumiGLO 검출 반응용액 방법 (Cell Signaling Technology)에 의해 HRP (horseradish peroxidase)와 결합되는 이차 항체를 검출했다.

[0687] 결과

[0688] 상기 재조합적으로 발현된 HMGA1b에 대한 5' 말단형 비오틴화된 스피에겔머의 결합은 상기 한 공정에 의해 설명 된다. 항체에 기초한 검출과 유사하게, 5 μg의 HMGA1b를 블랏 멤브레인 (blot membrane)으로 이동 후에 3 nM bioNOX-A으로 검출하였다. NOX-A의 역 스피에겔머(inverse spiegelmer)는 NOX-A의 상기 특이적 결합을 확인하는 HMGA1b를 인식할 수 없다.

[0689] 실시예 3: PEI-Spiegelmer 제형 (formulation)

[0690] 3.1 스피에겔머의 폴리에틸렌이민-매개성 침입 원리

[0691] 상기 목표분자 HMGA1a/b는 시토솔에서 발현되며 이의 자연적인 결합 파트너인 세포 핵 내 이중가닥 DNA에 대한 전사인자로서 발견된다. 상기 HMGA1a/b-중재된 세포성 반응 (HMGA1a/b-mediated cellular response)은 시토솔에서 HMGA1a/b에 대한 스피에겔머의 결합 및 세포 핵 내의 상기 DNA에 대한 AT hook의 HMGA1/b 결합의 경쟁에 의해 대항된다. 상기 원형질막의 음전하로 인해, DNA 및 RNA분자는 세포 내로부터의 수동수송 (passive transport)에 의해 쉽게 흡수되지 않는다. 핵산에 의한 세포 내 수송 (intracellular transport)에 대한 접근법 중 하나는, 전하성 입자 또는 시약에 의한 농축법 (condensation) 또는 패킹법 (packing)으로 전체 복합체에 전하를 띄게 하는 것이다. 상기 복합체는 내포 작용 (endocytosis)을 통해 쉽게 흡수되며 그리하여 세포내 시토솔을 통과한다. 이 방법의 단점들은 상기 DNA/RNA의 안정성 및 이입소체 구획 (endosomal compartment)으로부터의 핵산 방출이다. 세포의 시토솔 내에서, 리소좀 (lysosome)이 프로테아제 (protease) 또는 뉴클리아제

(nuclease)의 유입 및 상기 구획의 양자화(protonation)에 의하여 수축된 엔도솜(endosome)으로부터 신속하게 형성된다. 뉴클리아제는 여기에서 상기 핵산을 흡수하고 추가적으로 상기 핵산은 산성 조건에서 불안정하다. 상기 전체 복합체는 골기체에서의 외포 작용(exocytosis) 및 분해 작용(decomposition)으로 신속하게 세포 밖으로 다시 수송되며, 결국 소량의 핵산만이 세포를 통과할 수 있다. 따라서 적절한 침투 시스템(transfection system)의 전제조건 중 하나는, 안정화(stabilisation) 및 엔도솜에서 시토졸 내로의 핵산의 방출이다. 안정성 면에 있어서, RNA 스피에겔머는 효소에 의해 분해되지 않는 비자연성 이성질체이므로 진핵 세포에서의 침투면에 있어서 이상적인 특성을 갖는다.

[0692] 상기 선택된 침투 시스템은 가지상 PEI (polyethyleneimine)로 핵산에서 미립구를 형성함을 기초로 한다. 상기 핵산의 인산기 골격은 상기 PEI의 자유 (free) 질소 위치에서 상호작용하며, 교차성 가지화 (cross-branching)에 의한 작은 미립구를 형성함으로써, 상기 PEI에 의하여 양전하를 갖게 된다. 이와 관련하여, 분자량 3 내지 800 kDa을 갖는 PEI가 사용된다. 상기 PEI가 작을수록, 생성되는 미립구들이 작아진다. 25 kDa의 교차성-가지화된 PEI (Sigma Aldrich Cat. No. 40; 872-7)의 사용은 상기 핵산 첨가로 비록 통상적으로는 폴리플렉스 (polyplexes)의 크기가 100 nm 내지 200 nm임에도 불구하고, 100 nm 내지 500 nm 크기를 갖는 폴리플렉스를 유도한다. 원칙적으로, 질소기/인산기 (N/P)의 비율이 2:1 내지 5:1인 것이 사용되나, 경우에 따라 20:1까지도 사용가능하다. 미립구 내의 핵산의 패키징은 상기 복합체의 N/P 비율이 3이고 제타 (zeta) 전위가 ~(+) 21 mV로 변화시킨다. 상기 복합체의 양성 제타 (zeta) 전위의 증가로 인하여 배양 세포에 독성을 야기함은 공지되어 있다. 그러나 이러한 미립구들은 원형질막 패키징에 의해 엔도솜으로서 세포에 쉽게 흡수된다. 상기 PEI는 상기 엔도솜 내부의 다수 염소 이온들이 삼투압때문에 구획 (compartment)을 부풀리게 됨에 따라 유입되는 양성자들을 완충한다. PEI의 이러한 효과는 양성자 스펀지 효과(proton sponge effect)라고 문헌 (Sonawane et al., JBC, 2003, Vol.278; No.45(7) pp.44826-44831)에 개시되며, 궁극적으로 이는 엔도솜의 파열 및 시토졸 내로의 스피에겔머 방출을 초래한다.

[0693] 상기 핵산-PEI 복합체는 강한 양전하에 기인하여 혈장 단백질과 상호작용 및 응집작용을 하고 또한 상기한 세포 독성을 나타내는 경향을 나타낸다. 따라서, 래트 (rat)에 피하 및 정맥 내 주사한 후에, 고용량의 핵산-PEI 미립구는 급격한 폐에서의 축적을 초래하고 결과적으로 색전증 (embolism)/경색 (infarcts)을 초래한다고 문헌에서 개시되어 왔다. 이 문제점에 대한 해결책은 상기 핵산을 2 kDa PEG (polyethylene glycol)로 핵산을 유도체화 (derivatise) 시키는 것이다. 이러한 잔기들은 상기 미립구를 방패처럼 둘러싸므로써, 혈장 단백질에 결합하는 것을 방지한다 (Ogris et al., Gene Therapy, 1999, 6 (595-605). 게다가, 상기 제타 (zeta) 전위는 +/-0 mV로 감소하고, 이는 양성자 스펀지 효과에 관하여 상기 PEI의 완충 수용력을 유지하는 동시에 더 낮은 세포 독성에 초래한다.

[0694] 3.2 PEG2000을 이용한 스피에겔머의 합성

[0695] 주요 후보 물질인 NOX-A 및 NOX-F을 3' 말단에 아미노기로 압타머 및 스피에겔머 (spiegelmer)로서 합성하였고, 이후 아미노 라디칼 (radical)을 통해서 PEG화 반응 (PEGylation)을 시켰다. 평형 결합 어세이법 (equilibrium binding assay)를 통해, PEG화 반응 (PEGylation)은 HMG1a/b 단편에 대한 상기 압타머의 결합 특성에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 게다가 재조합 전장 HMG1a/b (recombinant full-length HMG1a/b)에 의한 경쟁적 어세이법 (competition assay)을 통해, 재조합 전장 HMG1a/b에 대한 상기 스피에겔머의 결합은 3'-말단 PEG화 반응 (PEGylation)과는 비의존적인 것으로 나타났다.

[0696] 3.3 스피에겔머의 패키징

[0697] 멸균된, PEG화 반응 (PEGylation)된 스피에겔머의 패키징 (packing)은 PBS에서, 상기 PEI의 절대 질소기 분획 (absolute nitrogen fraction)의 상기 리보핵산 (ribonucleic acid) 골격의 비가 2.5:1 (N/P 2.5)인 비율로, 25 kDa의 교차성-가지화된 PEI (ALDRICH, 제품번호: 40,872-7)를 첨가함으로써 수행되었다. 상기 멸균되고 오토 클레이브 처리된 PEI 용액은 200 mM 유리형 질소기 농도를 갖으며, 1 M 염산으로 pH 7.4로 조정되었다. 상기의 멸균 여과된 스피에겔머는 Ca/Mg 함유한 1× PBS에 700 μM의 농도까지 만들어졌으며, 이후 상기 멸균 여과된 PEI를 첨가 후에 실온에서 30 내지 60분 동안 배양하였다. 이상적으로, 복합체 생성은 고농도의 스피에겔머가

무작위적으로 거대 응집물(large aggregates)을 생성하므로 가장 가능한 적은 양으로 조정하여 첨가된 스피에겔머 농도에서 발생한다. 스피에겔머 미립구의 생성을 염색 배제법 (dye exclusion assay)으로 측정하였다. 이를 위하여, 스피에겔머는 미립구 내의 패킹 전후의 염색법에 의해 측정되었다. 염색시약으로 리보그린 (RiboGreen)을 사용하였으며, 엘라이자 리더 (ELISA reader)로 형광치를 측정하였다. 개개 경우에, 1 μM 스피에겔머를 100 μl 의 1xPBS에 첨가하고, PEI의 증가된 양을 첨가하였다. 100 μl 의 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 리보그린 (RiboGreen)을 형광에 적합한 96-웰 마이크로티트리 플레이트 (well microtitre plate)에 첨가하였고, 실온에서 30분간 미립구 반응 용액을 배양한 후에, 상기 마이크로티트리 플레이트에 10 μl 를 피펫팅(pipetting) 하여 첨가하였다. N/P 비율(2)로부터 시작하여, 90% 이상의 스피에겔머가 미립구로 존재하였다 (도면 10). 이와 관련하여, PEI 단독으로는 염색 형광에는 아무런 영향을 미치지 않았다.

[0698] 3.4 스피에겔머 미립구의 안정성

[0699] 도면 11에 특정되어 있는 조건 하에서, 1 μM 스피에겔머를 보관하였다. 스피에겔머 미립구의 안정성은 상기 3.3단락에 개시된 바와 같이, 염색 배제법 (dye exclusion assay)에 의해 측정하였다. 미립구들에 관한 안정성 연구를 통해 상이한 온도뿐만 아니라 상이한 배지 조건하에서도 미립구들의 보관은 스피에겔머 미립구들에 영향을 미치지 않는 것으로 알 수 있었다. 리보자임 (ribozyme)의 특성의 아무런 소실이 없는 조건하에서의 상기 리보자임/ PEI 복합체의 동결건조법은 문헌에 기재되어 있다 (Brus-C al., J. Control Release, 5004, Feb, 20, 95(1), 199-31).

[0700] 3.5 스피에겔머 미립구의 수용

[0701] 스피에겔머 미립구들의 세포내 흡수는 HS578T 세포의 세포 배양 시스템에서 확립되었다. HS578T 세포 (1×10^4)를 멸균된 20 mm 크기 커버글라스에 30 내지 40%의 집합비 (confluence)가 될 때까지 배양하였다. 5' -표지된 스피에겔머 NOX-A-3' -PEG를 미립구 내에서 N/P 비율 (2.5: 1)로 패킹하였고, 세포에 1 μM 의 농도로 첨가되었으며, 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 스피에겔머의 수동적 흡수 (passive uptake)의 조절을 위해, 1 μM 의 순수 형광 표시된 (pure fluorescence-labelled) 스피에겔머를 개개 세포와 함께 배양하였다. 상기의 세포들을 1 ml PBS로 3번 세척하고, 3% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)로 30분 동안 고정시켰다. 상기 조제물 (preparations)을 다시 1 ml PBS로 3번 세척하고 세포 핵 내의 염색질을 염색하기 위해, DAPI 용액 (10 ml 1x PBS에 1 μl 스톡(stock))으로 10 내지 20초 동안 추가 배양하였고, 한 번 더 세척 한 후에 마운팅 용액 (mounting solution)으로 덮었다. 이러한 방법으로 준비된 조제물을 형광 현미경으로 분석하였다 (방출 파장 488 nm/흡수 파장 514 내지 522 nm).

[0702] 스피에겔머 미립구들은 "누드화된 (naked)", 비패킹 (unpacked)된 스피에겔머들과 비교하였을 때보다 더 높은 침투 비율 (Transfection rate)을 나타냄을 확인할 수 있었다 (도면 12).

[0703] 이와 관련하여 상기 침투 효율은 모든 세포에서 95% 이상이었으며, 세포의 형태에도 영향을 미치지 않았다. 5' -FITC-연결된 스피에겔머는 주로 시토솔(cytosol)에서 발견되며 원형질 막과 함께 연합한다. 상기의 포인트형 분포(point-like distribution)는 구획의 세포 함유물(inclusion)을 나타내며, 확산 형태(diffusion pattern)는 방출된 스피에겔머를 나타낸다. 약한 스피에겔머의 신호만이 세포 핵 내에서 검출가능하다.

[0704] 3.6 스피에겔머의 방출

[0705] 상기의 H578T 세포의 시토솔 및 핵 주변 공간에서의 스피에겔머의 포인트형 분포는 예를 들어 엔도솜과 같은 세포의 구획 내에서의 축적을 나타낸다. 이러한 구획으로부터의 스피에겔머의 방출을 확인하기 위하여, 개개의 거대 확대 세포들의 분포 형태를 분석하였다 (도면 13). 추가적으로, 스피에겔머의 포인트형 위치 측정에 대하여, 시토솔 및 원형질 막에서의 스피에겔머의 이입소체상의 방출을 나타내는 확산 분포 형태가 관측되었다. 이 형태는 "누드화된" 스피에겔머의 경우에는 발견되지 않았다.

[0706] 실시예 4: 생체 내 시험 (*in vivo*)에서의 생리활성

[0707] 4.1 PEI를 제외한 증식실험

[0708] MCF-7 세포의 증식에 대한 효과

[0709] 세포 분화에서 HMGA1a/b의 잠재적인 역할을 증식 어세이법(proliferation assay)으로 조사하였다. 먼저 "누드화된" 핵산으로서, 상기 세포 배양액에 고농도로 모든 스피에겔머를 첨가하였으며, 상기 세포의 성장이 시간에 따라 뒤따랐다. 유방암 세포주 MCF-7을 모델로 사용하였는데, 이 세포들에서는 HMGA1a/b가 보다 적게 (길항하는) 발현하는 것으로 밝혀 졌고 이런 세포들에서의 증식에서 HMGA1a/b의 역할에 대해서는 이미 기존 문헌에 개시되어 있다. 리브 (Reeves-R) 등은 (Reeves-R et al., Molecular and Cellular Biology, Jan 2001, p.575-594) MCF-7 세포에서 HMGA1a/b의 과다발현이 증가된 증식을 초래하고, 발현된 안티센스 구조물(anti-sense-construct)에 의한 HMGA1a/b의 저해는 MCF-7 세포 증식을 억제한다.

[0710] 실행/ 방법

[0711] MCF-7 세포 (ATCC) (0.5×10^4)를 평편하고 투명한 96-웰-플레이트 (Costar)에 분주하며, 10% FCS (foetal calf serum)이 함유된 100 μ l RPMI 1640 배지에서 16 내지 24시간 배양한다. 세포들을 이후 PBS로 세척하였으며, 멸균 여과된 스피에겔머가 직접 첨가된 표준 세포 배양 배지로 48시간 더 배양하였다. 이 후에 레사주린 (resazurin) (PBS 내에 0.44 mM) 10 μ l을 개개의 배양용액에 첨가하고, 37°C에서 2시간 동안 추가 배양했다. 세포 대사에 의한 레사주린의 변환 (transformation)은 세포의 숫자와 직접적인 연관성이 있다. 색깔의 변화를 형광 검출계 (Fluostar Optima multidetection plate reading device)을 통해 측정하였다 (BMG) (방출파장 544nm, 여기파장 590nm). 개개 수치는 실험별로 세 번 측정되었으며, 처리하지 않은 대조군의 값으로 표준화하였다.

[0712] 결과

[0713] NOX-A는 이틀 후에, 농도 의존적인 양상으로 MCF-7세포 (n=12)의 증식을 억제하였다 (도면 14). 처리하지 않은 대조군의 증식 최대 증식 억제율 수치(약 30%)에 대하여 처리군의 증식 최대 증식 억제율은 40 μ M을 나타냈다. 40 μ M까지의 농도에서도, 역 대조 스피에겔머의 비특이적 효과는 발견되지 않았다.

[0714] 4.2 PEI와의 증식 실험

[0715] H-1299 세포 증식에 대한 스피에겔머 미립구의 효과

[0716] 실행/ 방법

[0717] NCI-H-1299 (폐암 세포 ATCC) (1×10^4)를 평편하고 투명한 24-웰-플레이트 Costar)에 분주하여, 10% FCS (foetal calf serum)이 함유된 100 μ l의 RPMI 1640 배지에서 16 내지 24시간 배양한다. 세포들은 이후 PBS로 두번 세척하였으며, 1% FCS 및 스피에겔머 미립구들이 함유된 세포 배양 배지에 추가 3일간 배양하였다. 멸균된, PEG화 반응 (PEGylation)된 스피에겔머의 패키징은 미리 PBS에서 PEI의 절대 질소기 분획 (absolute nitrogen fraction)의 상기 리보핵산 (ribonucleic acid) 골격의 비가 2.5:1 (N/P 2.5)인 비율로, 25 kDa의 교차-가치화된 PEI (ALDRICH, 제품번호: 40,872-7)를 첨가하여 수행하였다. 상기 멸균된 스피에겔머를 30 μ M의 농도로 사용하였으며 PEI 첨가 이후에 실온에서 30 내지 60분을 배양하였다. 그리고 상기 스피에겔머 미립구들을 1% FCS를 함유한 세포 배양 배지 1 μ M로 희석하였으며, 세척된 세포들에 직접적으로 첨가하여 37°C에서 3일

간 배양하였다.

[0718] 이후에 100 μ l 레사주린 용액을 개개의 배치에 첨가하고 37℃에서 2시간동안 추가 배양하였다. 세포 대사에 의한 레사주린의 변환은 세포의 숫자와 직접적인 연관성이 있다. 반응용액으로부터 100 μ l를 96-웰 플레이트에 옮긴 후, 색깔의 변화를 형광 검출기 (Fluostar Optima multidetection plate reading device)를 통해 측정하였다 (BMG) (방출파장 544nm, 여기파장 590nm). 개개의 수치는 실험별로 세 번 측정되었으며, 처리하지 않은 대조군의 값으로 표준화하였다.

[0719] 결과

[0720] 스피에겔머 1 μ M을 갖는 PEI (N/P 2.5)의 사용은 처음에는 세포 증식에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 세포 배양 배지에서 FKS의 양을 1% 이하로 낮춤으로서, 스피에겔머 미립자들의 침투는 이전의 10% FKS으로는 발견되지 않은, H-1299 세포의 증식에 영향을 미침을 알 수 있었다 (도면 15). 아마도 FKS는 상기 미세 효과가 관찰되지 않는 범위로 증식을 자극하는 것 같다. MCF-7 세포에서의 FKS 농도의 감소는 3일의 시험 기간에 거쳐 세포들의 죽음을 초래하였다.

[0721] 4.3 종양 표식자 cdc25a의 억제 (PEI와)

[0722] 잠재적 종양 유전자 cdc25a의 예에서의, 세포 주기 인자의 HMGA1a/b-매개성 조절에 대한 효과

[0723] 리브스 (Reeves0 등은 (Molecular and Cellular Biology, Jan 2001, p.575-594) MCF-7 세포의 HMGA1a/b를 과발현시킨 cDNA 시험법 (cDNA array)을 통하여, HMGA1a/b가 다수의 유전자 발현을 유도하는 것을 나타내었다. 이와 동시에, 세포 주기 인자 및 성장 인자, 예를 들어 잠재적 종양 유전자 (세포 분획 주기 25a 포스파테아제; cell division 25a phosphatase)로 동정되고 세포 주기의 G1 주기에서 S주기로 이동할 때의 조절하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 cdc25a는 100가지의 인자에 의해 과발현된다. 이와 같은 조절 점 (control points)상의 활성은 세포주기 진행의 저해 이후에, DNA 수리 (repair)와 관련된 유전자들의 전사 또는, 만일 상기 DNA 손상이 회복 불가능한 경우에는, 세포 사멸을 유도하는 결과를 초래한다. 세포 배양 시험 시스템에서 H-1299 세포는 이러한 목적으로, 증가된 HMGA1a/b의 발현 현상을 이미 나타내었으므로 선택되었다.

[0724] 실험/ 방법

[0725] H-1299 세포 1×10^4 를 평편하며, 투명한 24-웰-플레이트 (Costar)에 분주하며, 10% FCS (foetal calf serum)이 함유된 100 μ l의 RPMI 1640 배지에서 16 내지 24시간 배양한다. 세포들은 이후 PBS로 두 번 세척하였으며, 1% FCS 및 스피에겔머 미립자들이 함유된 세포 배양 배지로 추가 3일간 배양하였다. 멸균된, PEG화 반응된 (PEGylation) 스피에겔머의 패킹 (packing)은 미리 PBS에서 PEI의 절대 질소기 분획 (absolute nitrogen fraction)의 상기 리보핵산(ribonucleic acid) 골격의 비가 2.5:1(N/P 2.5)인 비율로, 25 kDa의 교차-가치화된 PEI (Sigma)를 첨가함으로써 수행되었다. 멸균된 스피에겔머는 30 μ M의 농도로 사용하였고 PEI의 첨가 이후에는 실온에서 30 내지 60분을 배양하였다. 스피에겔머 미립구에 1% FCS를 포함한 세포 배양 배지를 사용하여 여러 농도로 희석하고, 37℃에서 3일 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 2번 세척하고 세포 스크래퍼 (cell scraper)로 수확한다. 세포의 mRNA는 기구 (Roti-Quick-Kits; Roth, Cat, NO. 979.1)로 분리하고 전체 RNA의 0.2 내지 1 μ g을 cdc25a 및 GAPDH의 PCR 위한 주형 (template)으로 사용하였다.

[0726] GAPDH의 증폭을 위한 프라이머 (primer)는 하기와 같다: 전진 프라이머 (forward primer: 5'-ACATGTTCCAATATGATTC-3') 및 역전사 프라이머 (reverse primer: 5'-TGGACTCCACGACTACTCAG-3')이며, 풀림 (annealing) 온도는 51℃; 또한 cdc25a를 증폭하기 위한 프라이머는 하기와 같다: 전진 프라이머 (forward primer: 5'-GAGGAGTCTCACCTGGAAGTACA-3') 및 역전사 프라이머 (reverse primer: 5'-GCCATTCAAACAGATGCCATAA-3')이며, 풀림 (annealing) 온도는 59℃이다. PCR 조건은 하기와 같다: 0.2 내지 0.75 μ M 프라이머, 1.5 mM MgCl₂ 및 0.2 mM dNTPs. PCR 사이클 2주기마다 5 μ l은 PicoGreen에 의해 정량하였으

며, 대조군으로 GAPDH와 관련하여 평가되었다: 이를 위해, 개개 조사된 시료의 첫 번째 단계에서, 참고 유전자 (reference gene)의 "교차 포인트 (crossing point)"값 (CP)이라고 지칭되는 수치를 조사된 유전자의 CP 수치에서 제하였다 (dCP=CP 목표 유전자 - CP 참고유전자).

[0727] CP는 지속적으로 한정된 형광 값을 도달하기 위해 필요한 PCR 사이클의 횟수로 정의된다. 모든 반응 용기에서의 CP에서 동일 양의 새로 합성된 DNA를 발견할 수 있다. 이 표준화 (standardisation) 이후에, 실험상 처리된 시료(experimentally treated samples)의 dCP 수치로부터 대조군 (이 경우에는 GAPDH)의 dCP 수치를 제하였다: 소위 "델타-델타 CT (delta-delta CT)"라고 정의되는 계산 모델에 이르게 된다. 상기 참조 유전자로 정상화되고, 표준화 시료 (standard sample)로 일컬어지는, 처리군 (treatment) 및 대조군 (control)간의 상대적인 발현율 차이 (relative expression difference)는 (비율; ratio) 하기 수학적 2^{-ddCP} 로부터 계산된다.

수학적 1

$$dCP = CP (cdc25a) - CP (GAPDH)$$

$$ddCP = dCP (\text{처리군: 스피에겔머 NOX-A}) - dCP (\text{대조군: PBS 또는 NOX-A 역수})$$

$$(\text{inverse})$$

$$\text{비율(ratio)} = 2^{-ddCP}$$

[0728]

[0729] 결과

[0730] cdc25a 및 HMGA1a/b는 RT-PCR을 통해 H-1299 및 MCF-7 세포에서 검출되었다.

[0731] MCF-7 세포는 HMGA1a/b 및 cdc25a의 낮은 발현을 나타낸 반면에, H-1299 세포에서는 HMGA1a/b 및 cdc25a들이 다량 발현되었다. 이들 동안의 HMGA1a/b-결합스피에겔머로 침투된 H-1299 세포는 cdc25a의 mRNA 발현이 뚜렷하게 농도 의존적인 감소를 초래했다 (도면 16 a 및 도면 17).

[0732] 4 μ M 농도까지, 대조 스피에겔머는 상기 GAPDH 또는 상기 cdc25a의 mRNA의 발현, 둘 중 어느 것에도 비-특이적인 효과를 나타내지 않았다. 이로부터, 상기 잠재적인 종양 유전자 cdc25a의 HMGA1a/b-유도 과발현은 스피에겔머로 저해될 수 있다는 결론을 내릴 수 있었다.

[0733] **실시예 5. 유효성 연구 (Effectiveness Study): 이종 이식 모델 (xenograft model)**

[0734] 생체 내 시험 (*in vivo*)에서의 종양 성장에 대한 스피에겔머의 효과

[0735] HMGA1a/b-결합 스피에겔머는 생체 내 시험에서 종양의 성장을 억제한다는 가설을 시험하기 위해서, 이종 이식 모델로서 강하게 HMGA1a/b-을 발현하는 췌장암 세포 (HMGA1a/b-expressing pancreatic carcinoma cell; PSN-1)를 개발하였다. 이 모델을 기초로 하여, 치료적 실험은 N/P (2.5)에서 2 mg/ kg NOX-A 스피에겔머 미립구로 수행하였다 (실시예 3, 단락 3.3 참조).

[0736] 실행/ 방법

[0737] 수컷 누드화된 쥐 (NMRI: nu/nu) (n=8)들은 개개의 경우에 10^7 PSN-1세포(ECACC)를 양쪽에 피하 주입한 뒤에 22 일 동안 종양 성장을 관찰하였다. 쥐들은 평균 25 내지 27 kg의 몸무게를 가졌으며, 6 내지 8주령이었다. 상기한 바대로, N/P (2.5)인 PEI를 첨가함으로써, INV-3'PEG에서 활성 스피에겔머 NOX-A-3' PEG 및 역 대조군 스피에겔머를 미립구 내에 패키징시켰다. 상기 스피에겔머 미립구 현탁액 100 μ l (3.46 nmole/ 동물 또는 2mg/ kg에

상응하는)를 개개의 경우에 쥐의 종양 근처 피하에 매일 주입하였다. 종양 크기 및 몸무게는 일주일에 3번 측정하였다. 동물들을 22째 되는 날에 희생하였고, 혈장, 간, 신장 및 종양에서의 NOX-A의 분포를 정량화하였다.

[0738] 이 목적을 위하여, 상기 조직들을 잡종화 버퍼 (hybridisation buffer: 0.5 x SSC, pH 7.0; 0.5% (w/v) SCSarcosinate)로 균질화하고 4000× g에서 10분 동안 원심분리하였다. 수득한 상층액을 이후에 사용할 때까지 -20℃에서 보관한다.

[0739] 상기 조직 균질화물 (tissue homogenate) 및 혈장 시료에 존재하는 스피에겔머의 양을 잡종화 어세이법 (hybridisation assay)을 통해 측정하였다 (Drolet et al., (2000) Pharm.Res. 17:1503). 상기 잡종화 어세이법은 하기 원리에 근거한다: 검출될 스피에겔머 (L-RNA 분자)는 고정화된 L-DNA 올리고뉴클레오티드 프로브 (probe) (= 포획용 프로브 (capture probe) NOX-A; 이 경우에는: HMGA1a/b-NOX-A의 5' 말단과 상보적인 5'-CCCATATCCACCCACGTATCAGCCTTTT-TT-NH₂-3')에 잡종화되며, 비오틴화 검출용 L-DNA 프로브 (검출용 프로브 (detector probe) NOX-A; 이 경우에는: HMGA1a/b-NOX-A의 3' 말단과 상보적인 5'-비오틴-TTTTTTTTGGCTGAAACCCACCATGG-3')에 의해 검출된다. 이 목적을 위해, 스트렙타비딘 알칼리화 포스파타제 접합체 (streptavidin alkaline phosphatase conjugate)를 추가적 단계에서, 상기 복합체(complex)와 결합시킨다. 화학 발광 기질 (chemilluminescence substrate)을 첨가한 후에, 빛이 생성되며 루미노미터 (luminometer)로 측정한다.

[0740] 올리고뉴클레오티드 프로브의 고정화 (Immobilisation): 100 μl의 포획용 프로브 (결합용 완충액 (coupling buffer)으로 녹인 0.75 pmole/ml: 500 mM Na₂HPO₄, pH 8.5, 0.5 mM EDTA)를 DNA-BIND 플레이트 (Corning Costar)의 각 웰에 넣어 (각 플레이트에서의 기능저하), 4℃에서 하루동안 배양한다. 상기 프로브는 이후에 200 μl의 결합용 완충액으로 3번 세척하고, 200 μl의 차단용 완충액 (blocking buffer; 결합용 완충액에 0.5% (w/v) BSA)을 개개 웰에 넣어 37℃에서 1 시간동안 배양한다. 200 μl 결합용 완충액 및 3× 200 μl 잡종화 완충액 (hybridisation buffer)로 세척을 한 후에, 상기 플레이트를 검출용으로 사용가능하다.

[0741] 잡종화 및 검출법: 10 μl의 EDTA 혈장 또는 조직 균질화물(tissue homogenate)을 검출용 완충액 (detection buffer; 2 pmole/μl의 검출 프로브를 잡종화 완충액에 넣은 완충액) 90 μl와 혼합하고 원심분리하였다. 추가의 정제를 필수적으로 수행하였다. 그리고, 상기 배치들을 95℃에서 10분간 변성시켰고(denatured), 적당하게 준비된 상기 DNA-BIND 웰에 옮겼으며(상기 참조), 약 40℃에서 45분 동안 배양하였다. 다음에 하기 세척 단계를 수행하였다: 2× 200 μl 잡종화 완충액 및 3× 200 μl의 1× TBS/Tween 20 (20 mM Tris-Cl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20). 1 μl 스트렙타비딘 알칼리화 포스파타제 접합체 (Promega)는 5ml TBS/Tween 20로 희석하였다. 100 μl의 희석된 접합체 (conjugate)는 개개의 웰에 넣어준 뒤에 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 그리고 하기 세척단계를 수행하였다: 2× 200 μl TBS/Tween 20 및 2× 200 μl의 1x어세이용 완충액 (Assay buffer; 20 mM Tris-Cl pH 9.8, 1 mM MaCl₂). 100 μl의 CSPD "즉시-사용-기질 (Ready-To-Use Substrate)" (Applied Biosystem)을 넣어준 뒤, 실온에서 30분 동안 배양하고, 화학 발광(chemiluminescence)을 장치 (Fluostar Optima multidetection plate reading device) (BMG)을 통해 측정하였다.

[0742] 결과

[0743] 예비 실험에서, 종양 이식 후에 H-1299 세포는 PSN-1보다 성장이 뚜렷하게 감소하는 것을 알 수 있었으며, 개별적 동물개체에서 비교하였을 때, 종양의 성장이 동질하지 않았으며, 그러므로 시료 연구를 위한 이중 이식 모델로는 적합하지 않은 것으로 나타났다. PSN-1 세포는 22일 안에 공격적인 (aggressive) 종양 성장을 나타냈다. 2 mg/ kg 투여량의 NOX-A 미립구는 PBS 대조군과 비교하여 PSN-1 종양의 성장을 뚜렷하게 감소하는 것을 나타내었다 (도면 18). 동물의 무게는 스피에겔머 미립구의 처리에 의해 영향을 받지 않았다. 대조군 스피에겔머는 종양 성장 저해의 어떠한 특이성도 나타내지 않았으며, 유사하게, 동물의 무게에도 아무런 효과를 미치지 않았다. 10일째부터 NOX-A 3'PEG를 투여한 처치군의 종양 크기상의 차이가 처리하지 않은 비처리군(PBS 대조군)과 비교할 시에, 확연하게 또는 매우 확연하게 그 차이가 나타났다. 22 일 이후의 종말 포인트 분석(end point

analysis)에서 종양 성장이 확연하게 감소된 것을 알 수 있었다 (PBS와 비교시, $p=0.0098$ 및 역 대조군 스피에겔머와 비교시, $p=0.022$) (도면 19). 22일 후에 PBS 투여한 쥐는 평균 종양 성장 (2.5 cm^3)의 크기를 나타냈으며, 대조군 스피에겔머 투여한 동물에서는 평균 종양 성장 (2.6 cm^3)의 크기를 나타냈으며, NOX-A 투여한 동물에서는 평균 종양 성장 (1.2 cm^3)의 크기를 나타냈다 (박스 및 휘스커 분석법; box-and-whisker analysis). 이는 50% 이상의 종양 성장의 저해효과와 상응한다.

[0744] NOX-A의 조직 분포의 분석결과는 종양에서 고농도로 나타났다 (도면 20).

[0745] **실시예 6: 패킹된(packed) 및 비-패킹된(unpacked) 스피에겔머의 생체 내 시험 (*in vivo*) 조직 분포의 비교**

[0746] 스피에겔머 미립구의 효과적인 혼입 (incorporation)을 검사하기 위해서, 비 기능성 스피에겔머 (Proof of Concept=POC)를 PEG 2kDa로 3' 말단에 PEG화 반응 (PEGylation)을 수행했으며, 미립구 내의 질소기/인산기 비율 (N/P) 2.5로 패킹시켰다 (실시예 3, 단락 3.3 참조). 실시예 5에 개시된 유사한 방법으로, 본 접근법은 미립구 내에 패킹된 스피에겔머뿐만 아니라 유리된, 비패킹된 스피에겔머를 위해서도 채택되었다.

[0747] 실행/ 방법

[0748] 수컷 누드화된 쥐 (NMRI: nu/nu) ($n=8$)들은 개개의 경우에 10^7 PSN-1 세포 (ECACC)를 피하에 주입한 뒤에 25 일 동안 종양 성장을 관찰하였다. 쥐들은 평균 25 내지 27 kg의 몸무게를 가졌으며, 6 내지 8주령이었다. 상기에 개시한 바와 같이, 비-기능성 (non-functional) 스피에겔머 POC-3' PEG를 N/P 비율(2.5)로 PEI를 첨가함으로써, 미립구 내에서 패킹시켰다. 미립구에 패킹되지 않은 스피에겔머 POC-3'PEG를 PEI에 의해 매개되지 않은 혼입을 위한 대조군으로 제공되었다. 100 μl 의 스피에겔머-미립구 현탁액 또는 스피에겔머 용액 (1500 nmole/kg 및 2000 nmole/kg에 상응하는)을 매일 종양 주변 피하에 주입하였다. 종양 크기 및 몸무게는 일주일에 3번 측정하였다. 마지막 투여 후 24 및 96 시간후에, 각 그룹으로부터 2마리 동물이 희생되었으며, 혈장, 뇌, 심장, 폐, 간, 신장, 쓸개 및 종양에서의 POC-3'PEG (패킹된/비패킹된)의 분포를 정량화하였다.

[0749] 이 목적을 위해, 상기 조직은 잡종화 완충액 ($0.5 \times \text{SSC}$ pH 7.0: 0.5% (w/v) SDSarcosinate)으로 균질화되었으며, $4000 \times g$ 에서 10분동안 원심분리하였다. 결과물의 상층액은 사용하기까지 -20°C 에 보관한다.

[0750] 균질화된 조직 및 혈장 시료에 존재하는 스피에겔머의 양은 잡종화 어세이법을 통해 측정되었다 (Drolet et al., (2000) Pharm.Res. 17:1503). 잡종화 어세이법은 하기의 원리에 근거한다: 검출될 스피에겔머 (L-RNA 분자)는 고정화된 L-DNA 올리고뉴클레오타이드 프로브 (probe) (=포획용 프로브 POC; 여기서는 POC의 3' 말단과 상보적인 5'-2NH₂ (C7)-TTTTTTTAGCTCTGCACAGCGCT-3')에 잡종화되며, 비오틴화 검출용 L-DNA 프로브 (=검출용 프로브 POC; POC의 5' 말단과 상보적인 5'-CCGCTACAGACCGACTTCCTTATTTTTTTT-비오틴-3')에 의해 검출된다. 이를 위해, 스트렙타비딘 알칼리화 포스파타제 접합체 (streptavidin alkaline phosphatase conjugate)를 추가 단계에서 상기 복합체에 결합시킨다. 화학 발광 기질을 첨가한 후에 빛이 생성되며 루미노미터 (luminometer)로 측정한다

[0751] 올리고뉴클레오타이드 프로브의 고정화: 100 μl 의 POC 포획용 프로브 (결합용 완충액으로 녹인 0.75 pmole/ ml: 500 mM Na₂HPO₄, pH 8.5, 0.5 mM EDTA)를 DNA-BIND 플레이트 (Corning Costar)의 각 웰에 넣어 (각 플레이트에서의 기능저하), 4°C 에서 하루동안 배양한다. 상기 프로브는 이후 200 μl 의 결합용 완충액으로 3번 세척하고, 200 μl 의 차단용 버퍼 (결합용 완충액에 0.5% (w/v) BSA)를 개개의 웰에 넣어 37°C 에서 1 시간동안 배양한다. 그 후에 200 μl 결합용 완충액 및 $3 \times 200 \mu\text{l}$ 잡종화 완충액으로 세척을 한 뒤, 플레이트를 검출용으로 사용 가능하다.

- [0752] 잡종화 및 검출법: 10 μ l의 EDTA 혈장 또는 조직 균질화물을 검출용 완충액 (2 pmole/ μ l의 POC 검출 프로브를 잡종화 완충액에 넣은 완충액) 90 μ l와 혼합하여 원심분리한다. 추가 정제과정을 필수적으로 수행하였다. 그 후에 배치들을 95℃에서 10분간 변성시켰고, 적당하게 준비된 상기의 DNA-BIND 웰에 옮겼으며, 약 40℃에서 45 분 동안 배양하였다. 하기의 세척 단계는 그 다음 실행한다: 2× 200 μ l 잡종화 완충액 및 3× 200 μ l의 1× TBS/Tween 20 (20 mM Tris-Cl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20). 1 μ l 스트렙타비딘 알카리화 포스 파타제 접합체 (Promega)는 5ml TBS/Tween 20로 희석하였다. 100 μ l 희석된 접합체를 개개의 웰에 넣어준 뒤 1 시간 동안 실온에서 배양하였다. 이하의 세척단계는 그 다음 수행한다: 2× 200 μ l TBS/Tween 20 및 2× 200 μ l 의 1x 어세이용 완충액 (20 mM Tris-Cl pH 9.8, 1 mM MgCl_2). 100 μ l의 CSPD "즉시-사용-기질(Ready-To-Use Substrate)" (Applied Biosystem)을 넣어준 뒤, 실온에서 30분 동안 배양하고, 화학 발광을 장치 (Fluostar Optima multidetection plate reading device) (BMG)을 통해 측정하였다.
- [0753] 결과
- [0754] 미립구에 패킹되는 비 기능성 스피에겔머 POC-3'PEG의 무게 분포의 분석결과는 24 시간 후에, 패킹되지 않은 스피에겔머와 비교시 (0.840 $\pm$ 0.255 pmole/ mg)에 종양 조직에서 현저하게 높은 농도를 나타내었다 (24.925 $\pm$ 13.301 pmole/ mg) (도면 21A). 추가적인 3일 (96 시간)후에는 패킹된 스피에겔머의 농도가 절반 (11.325 $\pm$ 4.050 pmole/ mg)으로 줄어든 반면에, 극히 미량의 비패킹된 스피에겔머만이 검출되었다 (0.120 $\pm$ 0.057 pmole/ mg).
- [0755] 24시간 후에, 패킹되지 않은 스피에겔머의 혈장 수준 (2.950 $\pm$ 0.438 pmole/ ml)은 PEI-패킹된 스피에겔머 (1.930 $\pm$ 2.729 pmole/ ml)의 혈장 수준에 필적하였다. 96 시간 후에는, 비패킹된 스피에겔머와 비교시에 패킹된 스피에겔머의 양이 약 4배로 높은, 현저한 차이를 확인할 수 있었다.
- [0756] 두 가지 제형 (formulation) 모두가, 24시간 후에 신장에서 소량 축적된 반면에, 비패킹된 스피에겔머만이 간 및 비장에서 소량 축적되었다. 96시간 후에는, 두 가지 제형 모두에서 극히 미량의 스피에겔머만이 간 및 신장에서 검출되었다. 다른 한편, 패킹되지 않은 스피에겔머에 비교시에 패킹된 스피에겔머는 비장 및 췌장에서는 (그러나 높은 표준 편차를 갖고) 소량 증가된 수치로 나타났다.
- [0757] 요약하면, PEI의 유무에 따른 스피에겔머의 무게 분포를(마지막 투여 24 및 96 시간 후) 비교하면, 스피에겔머 미립구들은 패킹되지 않은 물질에 필적하는, 혈장 및 종양에서 현저하게 연장된 체류 시간 (residence time)을 나타냈으며 (도면 21B), 결국 세포내 목표 분자에 대한 스피에겔머의 용도는 아주 유망한 접근법임을 나타낸다.
- [0758] 하기의 문헌들은 본원에서 참고문헌으로서 참고로 인용되는 것이다.
- [0759] Abe et al. J Gastroenterol. 2003 38, 1144-9
- [0760] Abe N et al (1999). Cancer Res 59:1169-1174
- [0761] Abe N et al (2000). Cancer Res 60:3117-3122
- [0762] Abe N et al (2002). Pancreas 25:198-204
- [0763] Anand A & Chada K (2000). Nat Genet 24
- [0764] Balcerzak et al, Postepy Biochem, 2005; 51(3):261-9
- [0765] Balcerzak et al Pathol Res Pract 2003; 199, 641-6
- [0766] Baldassarre G et al (2003). Mol Cell Biol 23:2225-2238
- [0767] Bandiera S et al (1998). Cancer Res 58:426-431

- [0768] Battista S et al (1998) Oncogene 17:377-385
- [0769] Belge G et al (1992). Cell Biol Int Rep 16
- [0770] Berlingieri MT et al. (1995). Mol Cell Biol 15:1545-1553
- [0771] Birdsall SH et al (1992). Cancer Gen Cytogen 60:74-77
- [0772] Bridge JA et al (1992). Cancer Detect Prevent 16:215-219
- [0773] Briesse et al. Int. J Gynevol Pathol 2006 Jan, 65-9
- [0774] Bullerdiek J et al (1987). Cytogenet Cell Genet 45
- [0775] Bussemakers MJG et al (1991). Cancer Res 51
- [0776] Chada K et al (2004). US Patent 6,756,355
- [0777] Chang et al. Dig Dis Sci, 2005 Oct, 1764-70
- [0778] Chau KY et al (2000). J Neurosci 20
- [0779] Chau KY et al (2003). Mol Med 9
- [0780] Chen et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004 Jan, 30-3
- [0781] Chiappetta et al. Clin Cancer Res. 2004 Nov, 7634-44
- [0782] Chiappetta G et al (1995). Oncogene 10:1307-1314
- [0783] Chiappetta G et al (1996). Oncogene 13:2439-2446
- [0784] Chiappetta G et al (1998). Cancer Res 58:4193-4198
- [0785] Chiappetta G et al (2001). Int J Cancer 91:147-151
- [0786] Chin MT et al (1999). J Mol Cell Cardiol 31
- [0787] Chuma et al, Keio J Med 2004 Jun, 90-7
- [0788] Cuff CA et al (2001). J Clin Invest 108
- [0789] Czyz et al. Langenbecks Arch Surg 2004, Jun, 193-7
- [0790] Dal Cin P et al (1993). Genes Chromosomes Cancer 8:131-133
- [0791] Dal Cin P et al (1995). Cancer Res 55:1565-1568
- [0792] Diana F et al (2001). J Biol Chem 276
- [0793] Dolde CE et al (2002). Breast Cancer Res Treat 71
- [0794] Donato et al. Oncol Rep 2004 Jun, 1209-13
- [0795] Du W et al (1993). Cell 74
- [0796] Evans A et al (2004). J Surg Oncol 88
- [0797] Fedele M et al (1996). Cancer Res 56:1896-1901
- [0798] Fletcher AJ et al (1991). Am J Pathol 138:1199-1207
- [0799] Fletcher AJ et al (1992). Cancer Res 52
- [0800] Fletcher AJ et al (1995). Genes Chromosomes Cancer 12:220-223
- [0801] Flohr et al. Histol Histopathol 2003 Oct, 999-1004
- [0802] Foster LC et al (1998). J Biol Chem 273
- [0803] Foster LC et al (2000). FASEB J 14

- [0804] French et al. Mol Cell Biol 1996, 5393-9
- [0805] Friedman M et al (1993). Nucleic Acids Res 21:4259-4267
- [0806] Giacchetti V et al (1987). EMBO J 6:1981-1987
- [0807] Giacchetti V et al (1989). Exp Cell Res 184:538-545
- [0808] Giacchetti V et al. (1993). Eur J Biochem 213:825-832
- [0809] Giannini G et al (1999). Cancer Res 59:2484-2492
- [0810] Giannini G et al (2000). Br J Cancer 83:1503-1509
- [0811] Grosschedl R et al (1994). Trends Genet 10
- [0812] Heim S et al (1988). Cancer Genet Cytogenet 32:13-17
- [0813] Henderson et al J Virol 2000, 10523-34
- [0814] Hindmarsh et al. J. Virol 1999, 2994-3003
- [0815] Holth LT et al (1997). DNA Cell Biol 16:1299-1309
- [0816] Huth JR et al (1997). Nat Struct Biol 4:657-665
- [0817] Jain M et al (1996). J Clin Invest 97
- [0818] Johansson M et al (1992). Cancer Genet Cytogenet 60
- [0819] Johansson M et al (1993). Br J Cancer 67
- [0820] Johnson KR et al (1990). Exp Cell Res 187:69-76
- [0821] Kazmierczak B et al (1995). Cancer Res 55
- [0822] Kettunen et al. Cancer Genet Cytogenet 2004 Mar, 98-106
- [0823] Kim DH et al (1999). Int J Cancer 84
- [0824] KlotzbM et al (1999). Am J Pathol 155:1535-1542
- [0825] Kottickal LV et al (1998). Biochem Biophys Res Commun 24252-456
- [0826] Lee et al. Int J Oncol 2004, Apr, 847-51
- [0827] Leger et al. Mol Cell Biol 1995, 3738-47
- [0828] Leman ES et al (2003). J Cell Biochem 88
- [0829] Li et al J. Virol 1998, 2125-31
- [0830] Li et al, Am J Dermatopathol 2004 Aug, 267-72
- [0831] Mandahl N et al (1987). Int J Cancer 39:685-688
- [0832] Mandahl N et al (1989). Cancer 65
- [0833] Mandahl N et al (1993). Cancer 713009-3013
- [0834] Mark J & Dahlenfors R (1986). Anticancer Res 6:299-308
- [0835] Mark J et al (1980). Cancer Genet Cytogenet 2
- [0836] Mark J et al (1988). Anticancer Res 8:621-626
- [0837] Masciullo et al Carcinogenesis 2003 Jul, 1191-8
- [0838] Masciullo V et al (2003). Carcinogenesis 24:1191-1198
- [0839] Melillo RM et al (2001). Mol Cell Biol 21:2485-2495

- [0840] Nam et al Histopathology 2003 May, 466-71
- [0841] Nestl A et al (2001). Cancer Res 61:1569-1577
- [0842] Noguera R et al (1989). Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 415:377-382
- [0843] Ogram SA et al (1997). J Biol Chem 270:14235-14242
- [0844] Ozisik YY et al (1993). Cancer Genet Cytogenet 79
- [0845] Panagiotidis et al Virology 1999, 64-74
- [0846] Pellacani A et al (1999). J Biol Chem 274:1525-1532
- [0847] Peters et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005, Jul 17, 17-23
- [0848] Pierantoni et al. Biochem J 2003 May, 145-50
- [0849] Ram TG et al (1993). Cancer Res 53
- [0850] Reeves R & Beckerbauer K (2002). Progr Cell Cycle Res 5:279-286
- [0851] Reeves R & Beckerbauer L (2001). Biochim Biophys Acta 1519:13-29
- [0852] Reeves R & Nissen MS (1990). J Biol Chem 265:8573-8582
- [0853] Reeves R et al (2001). Mol Cell Biol 21:575-594
- [0854] Rogalla P et al (1996). Am J Pathol 149:775-779
- [0855] Rohen C et al (1995). Cancer Genet Cytogenet 84:82-84
- [0856] Sarhadi et al. J Pathol Mar 6 2006, Epub ahead of print
- [0857] Sato et al. Pathol Res Pract, 2005; 201, 333-9
- [0858] Scala S et al (2000). Proc Natl Acad Sci USA 97
- [0859] Schaefer et al. Mol Cell Biol. 1997, 873-86
- [0860] Schlueter et al. Pathol Res Pract, 2005; 201, 101-7
- [0861] Schoenmakers EFPM et al. (1995). Nat Genet 10:436-444
- [0862] Sgarra R et al (2003). Biochemistry 42
- [0863] Sgarra R et al (2004). FEBS Lett 574
- [0864] Sreekantaiah C et al (1990). Cancer Genet Cytogenet 45
- [0865] Sreekantaiah C et al (1991). Cancer Res 5
- [0866] Staats B et al (1996). Breast Cancer Res Treat 38
- [0867] Tamimi Y et al (1996). Br J Cancer 74
- [0868] Tapasso F et al (2004). Cancer Gene Ther 11
- [0869] Tarbe N et al (2001). Anticancer Res 21:3221-3228
- [0870] Thanos D & Maniatis T (1992). Cell 71:777-789
- [0871] Turc-Carel C et al (1986). Cancer Genet Cytogenet 23
- [0872] Vallone D et al (1997). EMBO J 16:5310-5321
- [0873] Van Maele et al. , Trends Biochem Sci 2006, 98-105
- [0874] Vanni R et al (1988). Cancer Genet Cytogenet 32:33-34
- [0875] Vanni R et al (1993). Cancer Genet Cytogenet 68:32-33

- [0876] Walter TA et al (1989). Cancer Genet Cytogenet 41
- [0877] Wolffe AP (1994). Science 264:1100-1101
- [0878] Wood LJ et al (2000a). Cancer Res 60:4256-4261
- [0879] Wood LJ et al (2000b). Mol Cell Biol 20
- [0880] Xiang YY et al (1997). Int J Cancer 74
- [0881] Zhou X et al (1995). Nature 376

[0882] 전술한 상세한 설명란, 청구항 및 도면들에 개시된 특징들은 이들의 다양한 구현예로서 본 발명의 수행을 위하여 개별적뿐만 아니라 임의의 어떠한 조합된 형태 면에서도 필수적일 수가 있다.

산업상 이용 가능성

[0883] 본 발명은 기능성 L-핵산 및 특히, 스피에겔머들은 그들의 활성 및 그들의 목표 분자에 결합할 수 있는 점에서 그들의 특이성을 유지하면서 세포질 막을 통해 통과할 수 있다. 상기 기능성 L-핵산의 투과성은 스피에겔머 상의 고유의 특성이며, 전달 운반체 (delivery vehicles) 또는 전달 기술 (delivery techniques)의 사용에 의해 보다 더 향상될 수 있다. 지금부터 이러한 사항으로 제한되고자 하지 않는 바램으로, 본 발명자들은 기능성 L-핵산은 본질적으로 세포질 막을 극복가능하고 상기 세포질막을 극복하기 위해 이입소체 운반 메커니즘 (endosomal transport mechanism)의 개입과 함께 이들을 생성되는 소낭 구조 (vesicle structure)로부터 방출할 수 있으며, 2차원 또는 3차원 구조를 채택함으로써 그의 목표분자와의 특이적인 상호작용을 허용할 수 있다는 가정하에 시작하였다. 본원에 개시된 기술적 교시 내용으로서, 세포에서 압타머 (aptamer)를 생성시키기 위해 압타머를 세포내 전사 메커니즘으로 활용하는 개발된 논리는 고의적으로 회피되며, 처음으로 세포에서 기능성 L-핵산 및 특히 스피에겔머를 사용하기 위한 수단이 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0499] 도면 1A. 상기 21AS-HMGA1a/b 도메인(domain)을 결합하는 D-21AS-HMGA1a/b에 대한 시험관 내 선택법에 의해 생산된 압타머를 나타낸 도이고;
- [0500] 도면 1B. 상기 21AS-HMGA1a/b 도메인에 결합하는 D-21AS-HMGA1a/b에 대한 시험관 내 선택법에 의해 생산된 상기 압타머의 동정되고, 반복적으로 발생하는 서열부분에 대한 그림을 나타낸 도이고;
- [0501] 도면 2 HMGA1a/b와 HMGA2의 서열 비교를 나타낸 도이고;
- [0502] 도면 3. HMGA1a/b-결합 압타머 NOX-f의 단축(shortening)을 나타낸 도이고;
- [0503] 도면 4. 단축된 HMGA1a/b-결합 압타머 NOX-f의 결합 특성을 나타낸 도이고;
- [0504] 도면 5. 상기 다중 웰 플레이트 방법 (multi-well plate assay)으로 상기 이중 나선 자연적 (natural) 목표 DNA와 HMGA의 결합을 측정하기 위한 경쟁적 어세이법 (competition assay)을 나타낸 도이고; 상기 스피에겔머 (spiegelmer)의 결합은 비오틴화된 dsDNA (AT 후크 모티프 (AT hook motif))에 대해 상기 재조합 HMGA1b의 결합과 경쟁한다. 상기 결합된 HMGA1b의 검출은 기질(substrate)이 형광 신호로 전환되는 니켈 (nickel) HRP를 통한 상기 His-Tag법을 통하여 수행된다;
- [0505] 도면 6. 상기 경쟁적 다중 웰 플레이트 방법으로 스피에겔머 NOX-A와 스피에겔머 NOX-f의 비교를 나타낸 도이고 (48nt; 33nt); 상기 플레이트 방법에서, 스피에겔머 NOX-A뿐만 아니라 스피에겔머 NOX-f 및 그의 단축된 변종 스피에겔머 NOX-f33은 재조합 HMGA1b의 자연 발생적 결합 파트너로의 결합을 낮은 나노몰 범위 내에서 저해한다;
- [0506] 도면 7. 상기 경쟁적 다중 웰 플레이트 방법으로 2kDa-PEG-결합된 스피에겔머NOX-A 뿐만 아니라 비-기능적 대조 스피에겔머의 활성을 나타낸다; PEG화된 (PEGylated) 스피에겔머 NOX-A는 15 nM의 IC50로 dsDNA의 AT 후크 모티프와 재조합 HMGA1b와의 결합과 경쟁한다; NOX-A의 역 대조 (inverse control) 스피에겔머가 높은 스피에겔머 농도에서 HMGA1b와 비-특이적인 상호작용을 함을 나타낸 도이고;

- [0507] 도면 8. 웨스턴 블롯 (western blot)을 나타낸 도이고; 비오틴화된 스피에겔머에 의해 고정화된 HMGA1b의 검출; 제조합 HMGA1b는 20kDa의 거대 단백질과 똑같은 전기영동 자장 영역으로 이동하며 저 농도 (3nM)에서 상기 비오틴화 스피에겔머 (여기서 NOX-A의 예와 함께)에 의해 인지될 수 있다; 역 대조 스피에겔머는 HMGGA1b를 인지할 수 없다;
- [0508] 도면 9. 상기 경쟁적 다중 웰 플레이트 방법으로 유리형 (free) 및 PEG화 스피에겔머 NOX-A의 활성을 나타낸 도이고;
- [0509] 도면 10. 상기 “리보그린 배제 어세이 법 (RiboGreen exclusion assay)” 에서 미립구 (micelles) 내에서 PEG화된 스피에겔머의 패킹 (packing)을 조사한 결과를 나타낸 도이고;
- [0510] 도면 11. 상기 “리보그린 배제 어세이 법 (RiboGreen exclusion assay)” 으로 PEI 스피에겔머 미립구의 안정성을 나타낸 도이고;
- [0511] 도면 12. 예를 들어, 스피에겔머 NOX-A-3'PEG2kDa와 함께 존재시의 특히 “누드화된 (naked)” 스피에겔머과 미립구 내에 패킹된 스피에겔머 간의 침입(transfection) 정도를 상호 비교하여 PEI 미립구 (PEI micelles) 안에 패킹된 스피에겔머의 효율적인 흡수 (uptake)를 나타낸 도이고; 스피에겔머 미립구로 침입되었던 세포는 오직 순수한 (pure) 스피에겔머만으로 배양되었던 세포와 비교하여 한층 낮은 카메라 민감도에서 상기 감염세포의 시토솔 내 (cytosol)에서 더 강한 형광을 나타냈다 (모든 침입 방법의 효율성은 >95%임);
- [0512] 도면 13. 이입소체 구획으로부터의 스피에겔머의 방출을 나타낸 도이고; 스피에겔머 미립구는 순수 스피에겔머와 비교하여 유의적으로 높은 형광을 나타냈다; 스피에겔머 미립구는 핵 주위의 (perinuclear), 포인트 형 (point-like) 및 세포질 분포 양상 (cytoplasmic distribution pattern)을 나타냈다; 상기 포인트 형 분포는 이입소체 구획에 정위됨 (localisation)을 나타낸다; 시토솔 내 및 원형질 막상에서의 상기 확산 분포는 이입소체로부터 방출된 스피에겔머를 의미한다;
- [0513] 도면 14. “누드화된 (naked)” 스피에겔머를 이용한 증식 어세이법(proliferation assay)이고; 세포 배양 배지 안에서 2일 후의 높은 스피에겔머 농도에서의 MCF-7 세포의 농도 의존적인 증식 억제를 나타낸 도이고 (레자주린 (reazurin)에 의한 정량화);
- [0514] 도면 15. PEI 패킹된 NOX-A-2kDa PEG로 처리된 후의 H1299 세포 (“비-소세포성 폐암 (non-small cell lung cancer))의 증식을 나타낸 도이고; PEI-스피에겔머 미립구 (N/P 2.5)에 적용되는 바와 같이, 1 μ M 스피에겔머 농도에서의 H1299 세포의 증식 억제; NOX-A는 상기 대조 스피에겔머와 비교하여 약한 증식 억제 효과를 나타냈다;
- [0515] 도면 16. 정량적 RT-PCR의해 검출되는 상기 HMGA1a/b 유도 cdc25a 유전자 발현 의 억제효과를 나타낸 도이고; RT-PCR 방법을 통해 1 μ M NOX-A 스피에겔머 미립구 (N/P 2.5)에 의한 H-1299에서의 cdc25a mRNA 발현의 특이적 억제를 측정한다;
- [0516] 도면 17. 스피에겔머 (spiegelmer) NOX-A에 의한 cdc25a mRNA 발현의 농도 의존적 저해 효과 (dose-dependent inhibition)를 나타낸 도이고; RT-PCR을 이용한 H1299 세포에서의 cdc25a mRNA발현의 농도 의존적 억제의 정량; NOX-A 스피에겔머 미립구 (N/P 2.5)은 250 nM부터 cdc25a mRNA 발현의 특이적인 억제를 나타냈다; 농도 (> 4 μ M)에서의, 대조 스피에겔머의 비특이적 효과가 발견되었을 뿐만 아니라, 농도(> 10 μ M)에서는 PEI (polyethyleneimine)로 인하여 독성효과를 나타냈다 (자료는 미제시됨);
- [0517] 도면 18. 이종 이식 모델 (xenograft model)의 누드 마우스 (naked mice)에서의 스피에겔머 NOX-A에 의한 종양 성장의 억제효과를 나타낸 도이고; 스피에겔머 미립구 (N/P 2.5)의 PSN-1 세포로의 피하주입 후의 (2mg/ kg) 종양 성장의 억제효과; 스피에겔머 NOX-A는 종양 성장에서 매우 현저한 감소를 나타낸다;
- [0518] 도면 19. 이종 이식 실험 자료의 통계학적 분석결과를 나타낸 도이고; 스피에겔머 미립구 (N/P 2.5)를 PSN-1 세포에 피하주입한 후의 (2mg/ kg) 종양 성장의 억제; 종점 분석 (end point analysis)과 박스-위스커 플롯법 (box-and-whisker plot)의 표시. NOX-A는 매우 현저한 종양성장 억제 효과(PBS에 대조하여 p=0.0098 및 역 대조군 스피에겔머에 대조하여 p=0.022)를 나타낸다;
- [0519] 도면 20. 이종 이식 실험에서 스피에겔머 NOX-A의 조직 분포를 나타낸 도이고; 혈장 및 조직에서 스피에겔머 NOX-A 분포의 정량적 분석; 고농도 스피에겔머 NOX-A는 기타 조직 및 혈장과 비교시 종양 조직에서 검출될 수 있다.

[0520] 도면 21. 이중 이식 실험에서 미립구 내에 패킹된 스피에겔머 및 패킹되지 않은 스피에겔머의 최종 주입 후 24 시간과 96 시간 경과 후의 조직 분포효과를 나타낸 도이고; 혈장 및 조직에서 비-기능적 스피에겔머 분포의 정량적 분석; 24 시간과 96 시간 후에, 미립구 속에 패킹된 스피에겔머의 경우, 다른 조직과 혈장에 대조하여 종양 조직에서 현저하게 농도가 증가한 스피에겔머를 감지할 수 있다.

[0521] 도면 22. 이중 이식 시험에서 마지막으로 주입한 후 24 시간과 96 시간 경과 후의 혈장과 종양에서 미립구 내에 패킹된 스피에겔머 및 패킹되지 않은 스피에겔머의 분포를 나타낸 도이고; 혈장과 종양에서 비-기능적인 스피에겔머 분포의 정량적 분석; 24시간과 96시간 후, 미립구 내에 패킹된 스피에겔머의 경우에 패킹되지 않은 스피에겔머와 대조하여 종양 조직에서 현저하게 농도가 증가한 스피에겔머를 감지할 수 있다.

도면

도면 1A

Name	Alias	Sequence	Case	H	K _D	A
132-C3	NOX-h	GCUGCUGCAAAUUGACGGGGCGUGGUUGGGGCGGUCGAUUGCAGC	1A	12	12nM	78
132-B3	NOX-f	GCUGAAUGAGGAUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGACCGUUCAGC	1A	5	9nM	92
132-C4		GCUGCUGCAAGGAGAGGGGCGCGGUUGGGGAGGCUCUAAGCGCUGCAGC	1A	1	14nM	78
132-E2		GCUGGGCGUAUAGGACAGGGGUGCGGUUGGGGCGGUCCGCUGUCAGC	1B	1	14nM	79
132-A2		GCUGGAUAGAACGCAGGGGUGCGGUUUGGGGUGGGCGUGAUUAGCAGC	1A	1	13nM	82
132-H1	NOX-i	GCUGCCGUAAAGAGGGGUGAGGUUGGGGAGGCUUUACGGGUUCAGC	1A	1	8nM	77
132-F1		GCUGCAUGCCGCGAUACGGGAGCGGUUGGGGCGGGAUCCGGCUCAGC	1A	1	22nM	63
132-G2	NOX-g	GCUGCGAGGGAGGUAAGCGGCUUCUGGCGCGUACGU GGGUGGAUGCAGC	2A	1	12nM	64
122-A1	NOX-A	GGCUGAUACGU GGGUGGAUAUGGGGCGAUUCCAUUG GGGUGGUUUCAGCC	2A	10	18nM	94
122-C1		GGCUGAUACGU GGGUGAAUAUGGGGCGAUUCCAUUG GGGUGGUUUCAGCC	2A	1	16nM	87
122-B2	NOX-B	GGCUGAUACGU GGGAGGAAAGGUUAACUACCUUG GGGAGGUUUCAGCC	2A	3	22nM	92
122-E2	NOX-C	GGCUGGCACUCCAGGGGUGAAGUGAUGAUUG GGGUGGGCGAGACCAGCC	2B	1	12nM	85
122-G2	NOX-E	GGCUGCCGAGUGGUUGGGUGGUGUAA GGGAGGUGGAUCCGCGGGCAGCC	1°	1	11nM	85
122-B4	NOX-D	GGCUGUUCGU GGGAGGAAAGGCUCUUGGAUAGAGUCGU GGGUGGUUUCAGCC	2A	1	15nM	85

Helix A1/A2 (5'+3' terminal of the total sequence)

H = Frequency of the sequence

Box A1 and Box A2 (Binding motif)

K_D = Dissociation constant determined

Helix B1/B2 (5' + 3' terminal of Box A)

in the equilibrium binding assay

Helix C1/C2 (between the Box A1 and Box A2)

A = Activity [%]

도면 1A

도면1B

	Name	Alias	Helix A1	Helix B1	Box A1	Helix C1	Helix C2	Box A2	Helix B2	Helix A2
Case 1A										
	132-C3	NOX-h	X	X	X	-	-	X	X	X
	132-C4		X	X	X	-	-	X	X	X
	132-A2		X	X	X	-	-	X	X	X
	132-H1	NOX-i	X	X	X	-	-	X	X	X
	132-F1		X	X	X	-	-	X	X	X
	122-G2	NOX-E	X	X	X	-	-	X	X	X
	132-B3	NOX-f	X	X	X	-	-	X	X	X
Case 1A shortened										
	132-B3 32nt	NOX-f 32nt	-	X	X	-	-	X	X	-
	132-B3 32nt	NOX-f 33nt	-	X	X	-	-	X	X	-
Case 1B										
	132-E2		X	X	X	-	-	X	X	X
Case 2A										
	132-G2	NOX-g	X	-	X	X	X	X	-	X
	122-A1	NOX-A	X	-	X	X	X	X	-	X
	122-C1		X	-	X	X	X	X	-	X
	122-B2	NOX-B	X	-	X	X	X	X	-	X
	122-B4	NOX-D	X	-	X	X	X	X	-	X
Case 2B										
	122-E2	NOX-C	X	X	X	X	X	X	X	X

도면 1B

도면2

DED1
 HMGAla human (Seq. ID 18): (M)SESSSKSQPLASKQEKDGT---EKKRGRPRKPPVSPGTALUGSQKEPSEUPTPKRPRGRPKGSKNK (66)
 HMGAlb human (Seq. ID 19): (M)SESSSKSQPLASKQEKDGT---EKKRGRPRKPP-----KEPSEUPTPKRPRGRPKGSKNK (55)
 HMGA2 human (Seq. ID 20): (M)SARGEAGQPSTSAQGQPAAPAPQKEGRPRKQQ-----EPTGEPSPKPRGRPKGSKNK (57)

DED2
 HMGAla human (Seq. ID 18): GAAKT--RKTTPGKPRGRPKK----LEK----EEEEGISQESSEEDQ 106
 HMGAlb human (Seq. ID 19): GAAKT--RKTTPGKPRGRPKK----LEK----EEEEGISQESSEEDQ 95
 HMGA2 human (Seq. ID 20): SPSKAAQKKAEATGEKPRGRPRKTPQQVQKKPAQEETEETSSQESAEED 108

DED1-3:DNA-binding domain 1-3 ("AT hooks")

HMGAla/b Target molecule domain (Seq. ID 17): EPSEVPTPKRPRGRPKGSKNK

도면2 : HMGAla/b와 HMGA2의 서열 비교

도면3

Name	Alias	Sequence	L	K_d	A
132-B3	NOX-f	GCUGAAUGAGGAUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGACCGUUCAGC	48	9 nM	92
132-B3	NOX-f	GGAUUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGACC	32	21 nM	90
132-B3	NOX-f	GGAUUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGAUCC	33	14 nM	90

Helix A1/A2 (5'+3' terminal of the total sequence)

Box A1 and Box A2 (Binding motif)

Helix B1/2 (5' + 3' terminal of Box A1/2)

L = Length [Number of nucleotides]

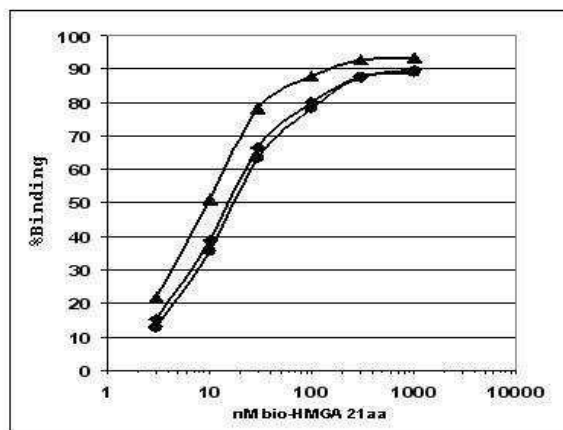
K_d = Dissociation constant determined in the equilibrium binding assay

A = Activity [%]

도면 3

도면4

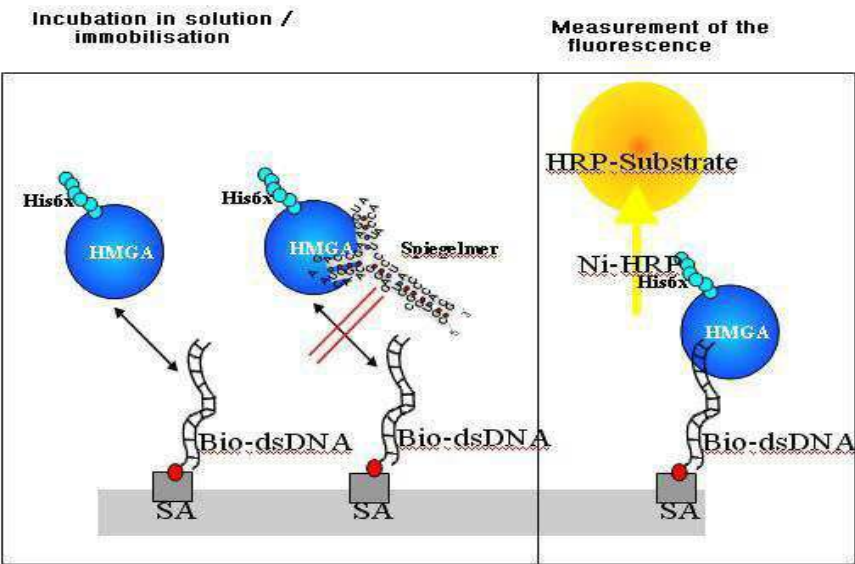
NOX-f 48nt GCUGAAUGAGGAUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGACCGUUCAGC
 NOX-f 32nt GGAUUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGACC
 NOX-f 33nt GGAUUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGAUCC



▲ NOX-f 48nt: 9 nM
 ● NOX-f 32nt: 21 nM
 ◆ NOX-f 33nt: 14 nM

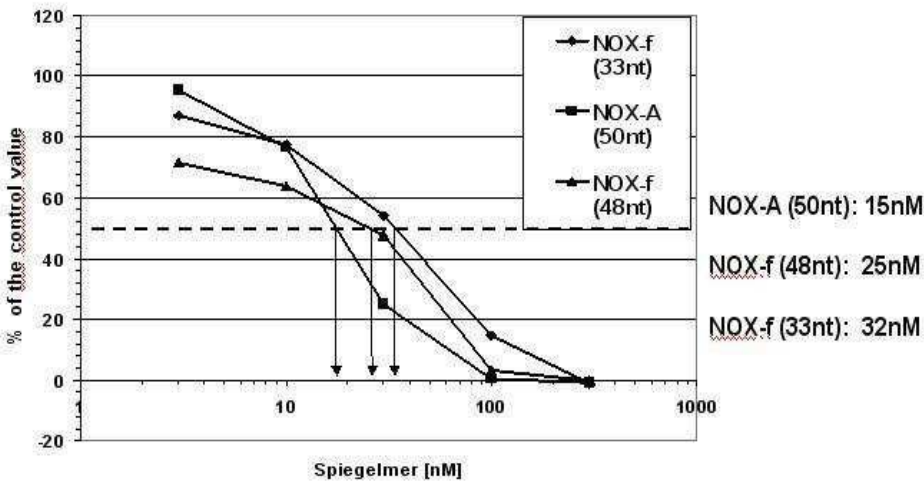
도면 4 : 단축된 HMGA1a/b-결합 애타머 NOX-f의 결합 특성

도면5



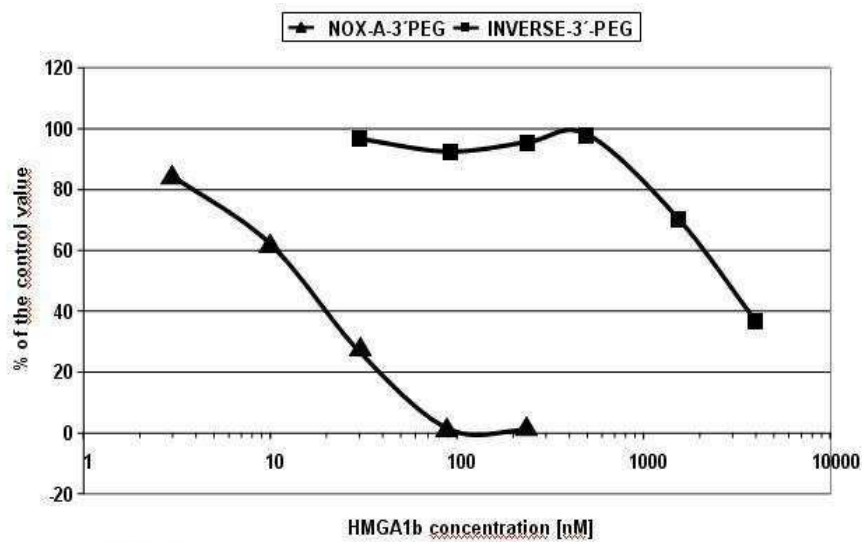
도면 5 : 다중 웰 플레이트 방법으로 이중 나선 자연적 목표 DNA와 HMG-A의 결합을 측정하기 위한 경쟁적 어세이법

도면6



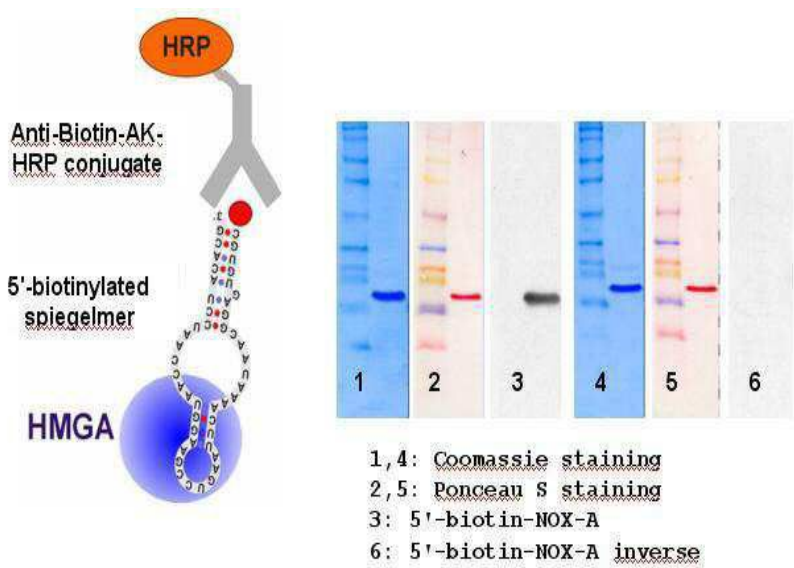
도면 6 : 경쟁적 다중 웰 플레이트 방법에서의 NOX-A 및 NOX-F (48nt ; 33nt)의 비교

도면7



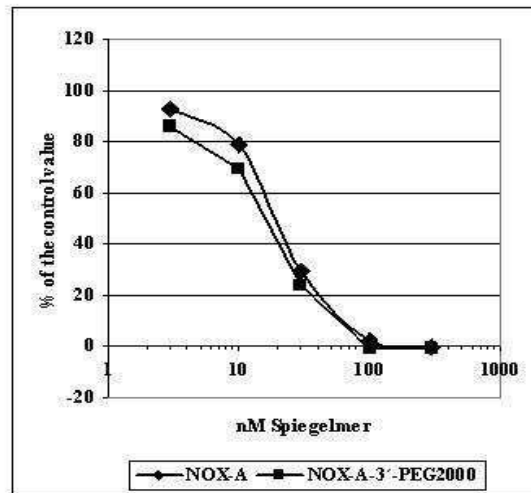
도면 7 : 경쟁적 다중 웰 플레이트 방법으로 2kDa-PEG-결합된 스피에겔머 NOX-A 뿐만 아니라 비-기능적 대조 스피에겔머의 활성

도면8



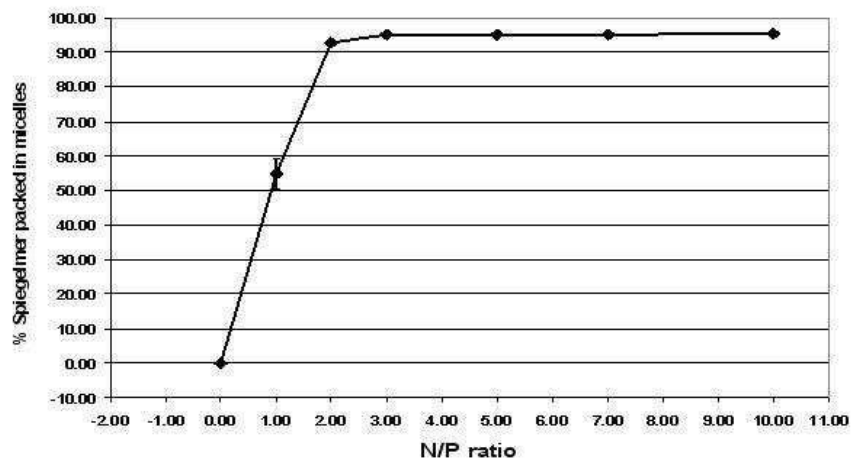
도면 8 : 웨스턴 블롯 ; 비오티ن화된 스피에겔머에 의해 고정화된 HMGA1b의 검출

도면9



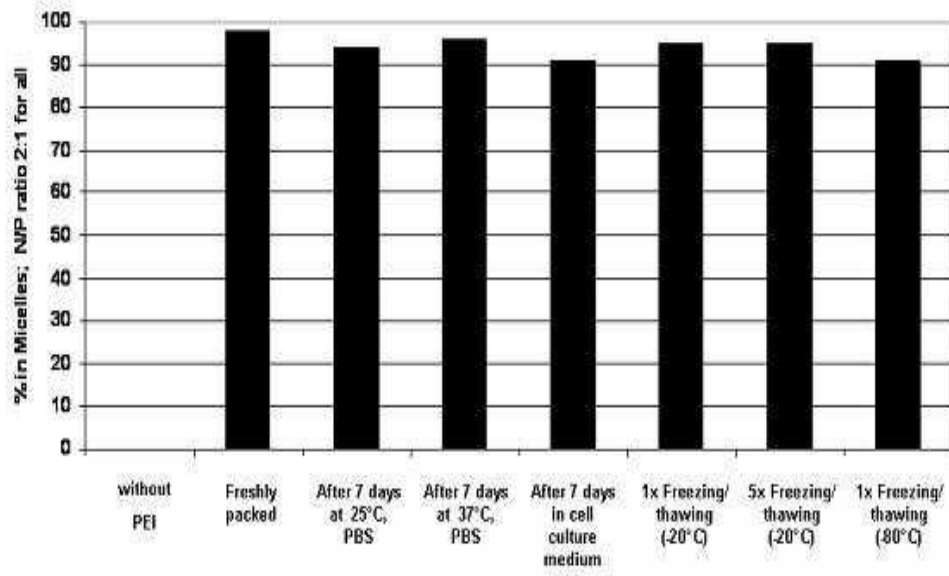
도면 9 : 경쟁적 다중 웰 플레이트 방법으로 유리형 (free) 및 PEG화 스피겔머 NOX-A의 활성

도면10



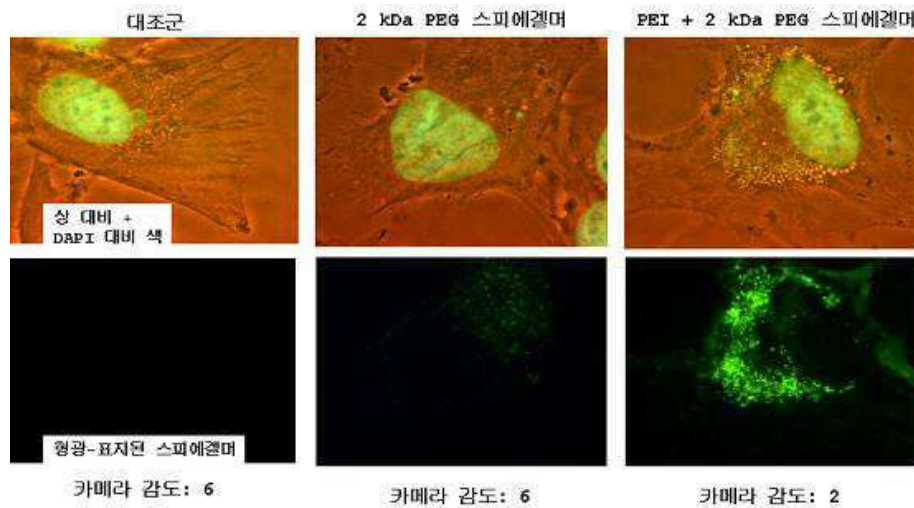
도면10 : "리보그린 배제 에세이 법"에서 미립구(micelles)내에서 PEG화된 스피겔머의 패킹(packing) 조사

도면11



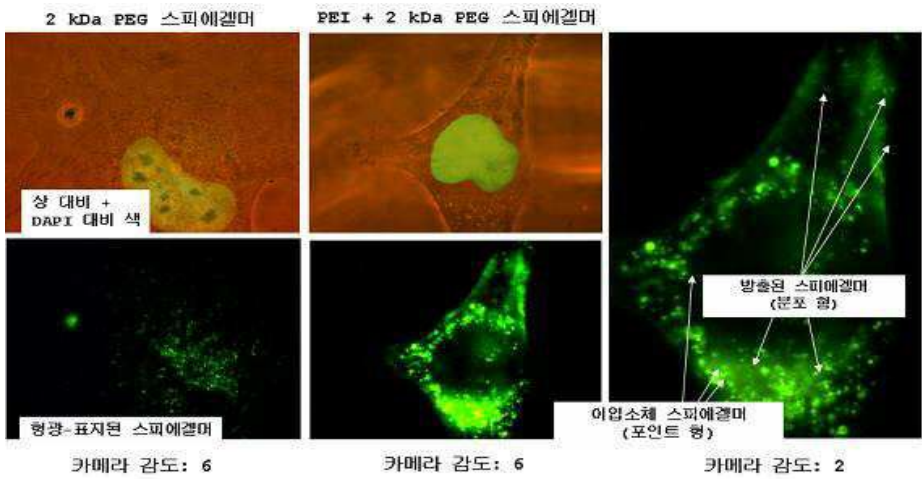
도면 11: "리보그린 배제 어세이법"으로 PEI 스피에겔머 미립구의 안전성

도면12



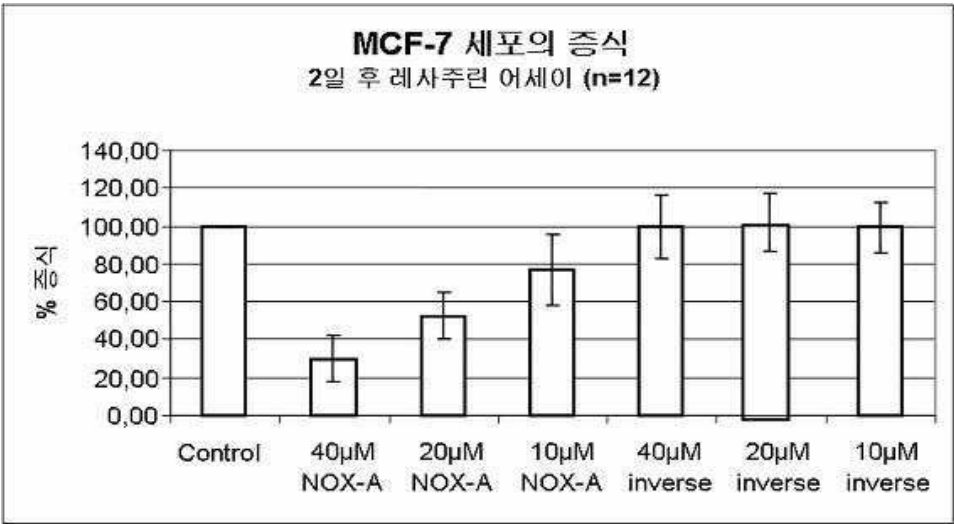
도면 12: PEI 미립구 내에 패키징된 스피에겔머의 효율적인 흡수

도면13



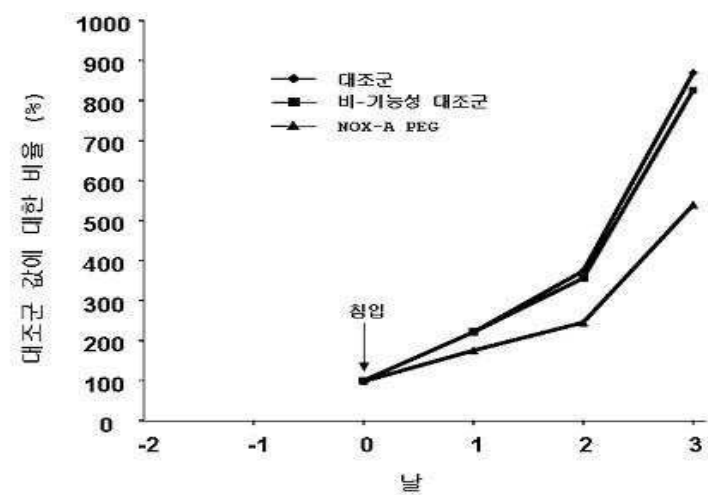
도면 13: 이입소체 구조로부터의 스피에겔머의 방출

도면14



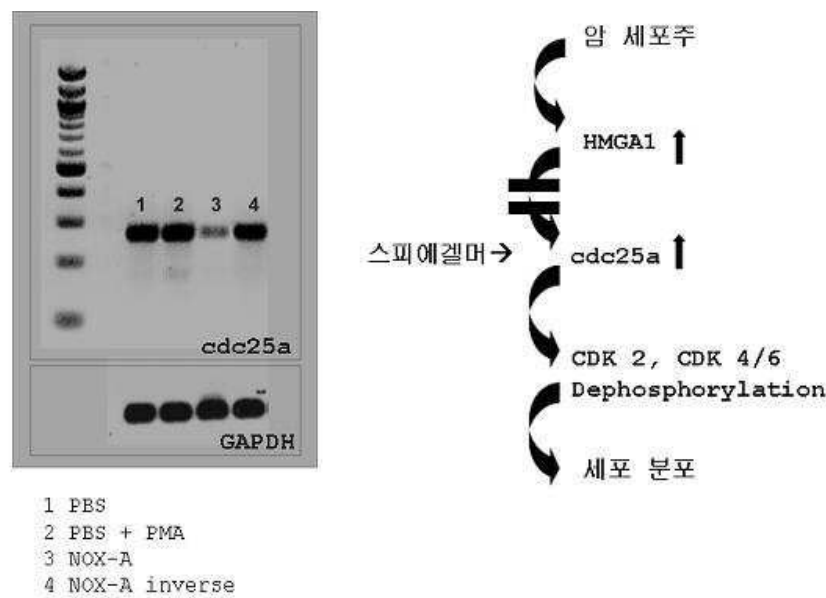
도면 14: “누드화된 ” 스피에겔머를 이용한 증식 어세이 법

도면15



도면 15: PEI 패킹된 NOX-A-2kDa PEG로 처리된 후의 H1299 세포 (“비-소세포성 폐암”)

도면16



도면 16: 정량적 RT-PCR 의해 검출되는 HMGA 유도 cdc25a 유전자 발현의 억제효과

도면17

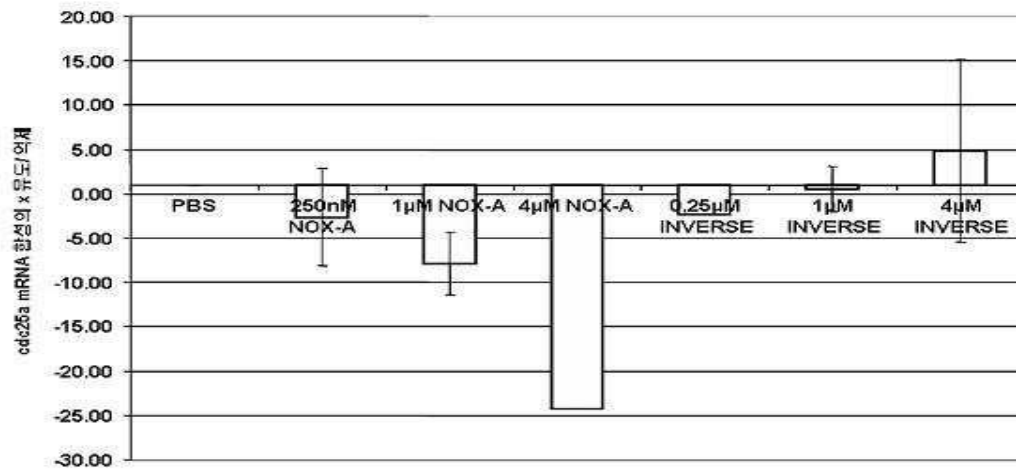
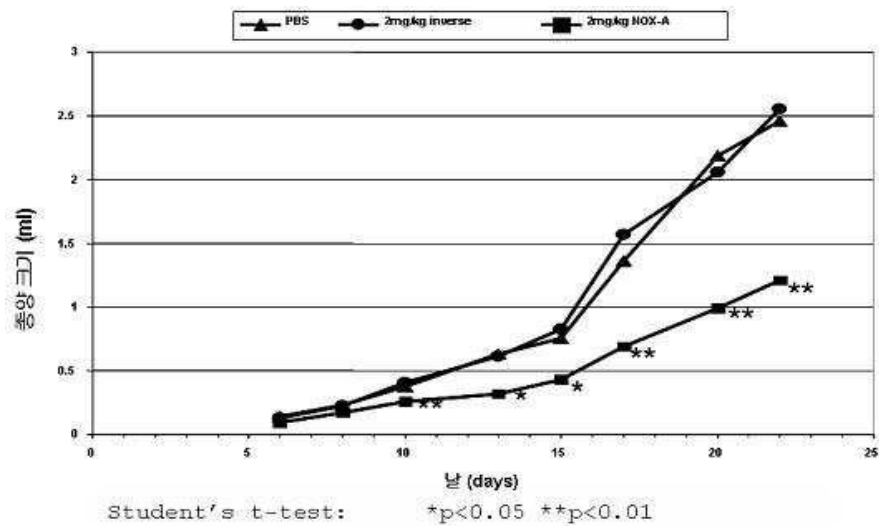


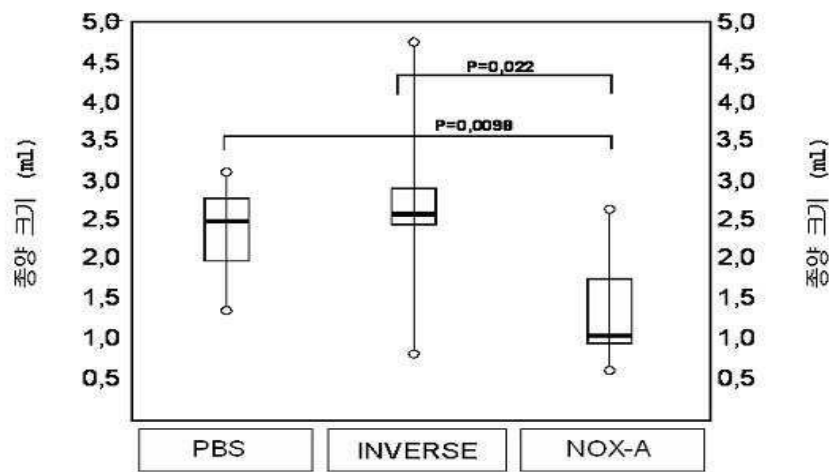
Fig.17: 스피에겔머 NOX-A에 의한 *cdc25a* mRNA 발현의 농도 의존적 효과

도면18



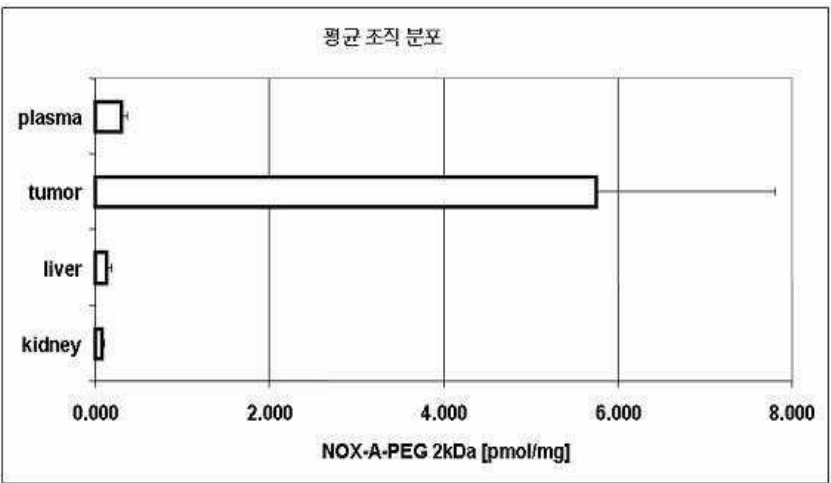
도면 18: 이종 이식 모델 (xenograft model)의 누드 마우스에서의 스피에겔머 NOX-A에 의한 종양 성장의 억제효과

도면19



도면 19: 이종 이식 실험 자료의 통계학적 분석결과

도면20



도면 20: 이종 이식 실험에서 스피에겔머 NOX-A의 조직 분포

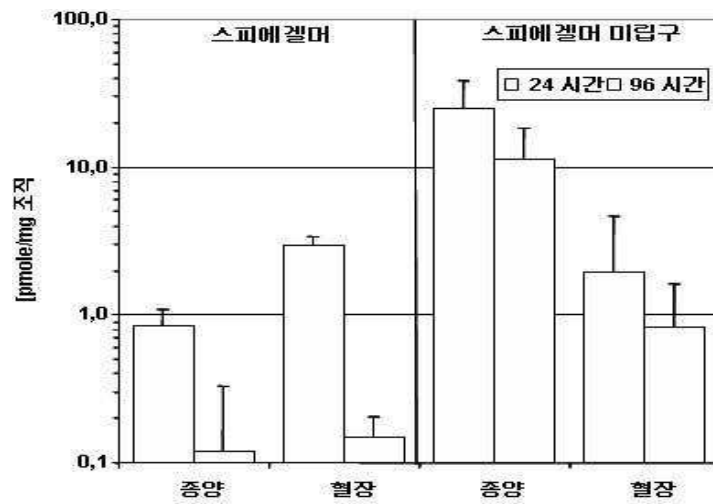
도면21

패킹된 스피에겔머 및 패킹되지 않은 스피에겔머의 최종 주입 후 24 시간과 96시간 경과 후의 조직 분포효과

	최종 주입 후 24 시간		최종 주입 후 96시간	
	스피에겔머 [pmole/mg 조직]	스피에겔머 미립구 [pmole/mg 조직]	스피에겔머 [pmole/mg 조직]	스피에겔머 미립구 [pmole/mg 조직]
혈장	2,950 ± 0,438	1,930 ± 2,729	0,150 ± 0,212	0,830 ± 0,778
뇌	0,000 ± 0,000	0,030 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
심장	0,055 ± 0,078	0,050 ± 0,000	0,040 ± 0,057	0,040 ± 0,057
폐	0,010 ± 0,014	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
간	0,310 ± 0,014	0,025 ± 0,035	0,070 ± 0,042	0,070 ± 0,000
신장	0,595 ± 0,092	0,310 ± 0,212	0,105 ± 0,035	0,160 ± 0,085
췌장	0,120 ± 0,057	0,070 ± 0,099	0,000 ± 0,000	0,560 ± 0,792
췌장	0,070 ± 0,057	0,040 ± 0,000	0,000 ± 0,000	2,700 ± 2,531
종양	0,840 ± 0,255	24,925 ± 13,301	0,120 ± 0,057	11,325 ± 7,050

도면 21

도면22



서 열 목 록

<110> NOXXON Pharma AG

<120> Novel use of spiegelmers

<130> DIFI/PA0717/SJ

<150> DE 10 2005 020 874.6
<151> 2005-05-04

<160> 50

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
<211> 47
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 1
gcugcugcaa auugacgggg gcgugguugg ggcgggucga uugcagc 47

<210> 2
<211> 48
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 2
gcugaaugag gaucgcaggg gcguggcugg ggugggcgac cguucagc 48

<210> 3
<211> 48
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 3

gcugcgcaag gagaggggcg cgguggggga ggcucuaagc gcugcagc 48

<210> 4
<211> 47
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 4
gcuggcgcuu uaggacaggg gugcggguugg ggcgguccgc ugucagc 47

<210> 5
<211> 48
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 5
gcuggauaga acgcaggggu gcgguuuggg gugggcguga uaucagc 48

<210> 6
<211> 46
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 6
gcugccguua agagggguga gguuggggag gcuuuacggu uucagc 46

<210> 7
<211> 48
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 7
gcugcaugcc gcgaucaggg gagcggguugg ggcgggaucc ggcucagc 48

<210> 8
<211> 48
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 8
gcugcgaggg agguagcggc ucugcgccgu gacgugggug gaugcagc 48

<210> 9
<211> 50
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 9
ggcugauacg uggguggaua uggggcaguu ccaugugggu gguuucagcc 50

<210> 10
<211> 50
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 10

ggcugauacg ugggugaaua uggggcaguu ccaugugggu gguuucagcc 50

<210> 11
 <211> 49
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 11
 ggcugauacg ugggaggaaa gguguaacua ccugugggag guuucagcc 49

<210> 12
 <211> 50
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 12
 ggcuggcacu cgcaggggug aagugaugau uggggugggc gagaccagcc 50

<210> 13
 <211> 50
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 13
 ggcugccgag ugguugggug guguaaggga gguggaauc gcgggcagcc 50

<210> 14
 <211> 50
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 14

ggcuguucgu gggaggaagg cucuuggaua gagucguggg ugguucagcc

50

<210> 15

<211> 32

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 15

ggaucgcagg ggcguggcug gggugggcga cc

32

<210> 16

<211> 33

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 16

ggaucgcagg ggcguggcug gggugggcga ucc

33

<210> 17

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 17

Glu Pro Ser Glu Val Pro Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys

1 5 10 15

Gly Ser Lys Asn Lys
20

<210> 18
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Ser Glu Ser Ser Ser Lys Ser Ser Gln Pro Leu Ala Ser Lys Gln Glu
1 5 10 15

Lys Asp Gly Thr Glu Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys Gln Pro
20 25 30

Pro Val Ser Pro Gly Thr Ala Leu Val Gly Ser Gln Lys Glu Pro Ser
35 40 45

Glu Val Pro Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys
50 55 60

Asn Lys Gly Ala Ala Lys Thr Arg Lys Thr Thr Thr Thr Pro Gly Arg
65 70 75 80

Lys Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys Leu Glu Lys Glu Glu Glu Glu Gly
85 90 95

Ile Ser Gln Glu Ser Ser Glu Glu Glu Gln
100 105

<210> 19
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Ser Glu Ser Ser Ser Lys Ser Ser Gln Pro Leu Ala Ser Lys Gln Glu
1 5 10 15

Lys Asp Gly Thr Glu Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys Gln Pro

Pro Lys Glu Pro Ser Glu Val Pro Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg

35 40 45

Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Gly Ala Ala Lys Thr Arg Lys Thr Thr
50 55 60

Thr Thr Pro Gly Arg Lys Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys Leu Glu Lys
65 70 75 80

Glu Glu Glu Glu Gly Ile Ser Gln Glu Ser Ser Glu Glu Glu Gln
85 90 95

$\langle 210 \rangle$	20
$\langle 211 \rangle$	108
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	Homo sapiens

<400> 20
Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg
20 25 30

Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro Arg
35 40 45

Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala Gln
50 55 60

Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Arg
65 70 75 80

Lys Trp Pro Gln Gln Val Val Gln Lys Lys Pro Ala Gln Glu Glu Thr
85 90 95

Glu Glu Thr Ser Ser Gln Glu Ser Ala Glu Glu Asp
100 105

$\langle 210 \rangle$	21
$\langle 211 \rangle$	34

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 21
tcgaaaaaag caaaaaaaaa aaaaaaaaaac tggc 34

<210> 22
<211> 50
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 22
ggcugauacg uggguggaua uggggcaguu ccaugugggu gguuucagcc 50

<210> 23
<211> 50
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 23
ccgacuuugg uggguguacc uugacggggu auaggugggu gcuaugucgg 50

<210> 24
<211> 50
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 24
ggcugauacg uggguggaua uggggcaguu ccaugugggu gguuucagcc 50

<210> 25
<211> 50
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 25
ccgacuuugg uggguguacc uugacggggu auaggugggu gcuaugucgg 50

<210> 26
<211> 50
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 26
ccgacuuugg uggguguacc uugacggggu auaggugggu gcuaugucgg 50

<210> 27
<211> 40
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 27
uaaggaaacu cggucugaug cgguagcgcu gugcagagcu 40

<210> 28
<211> 32
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 28

cccatacca cccacgtatc agcctttttt tt

32

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 29

tttttttttg ctgaaaccac ccacatgg

28

<210> 30

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 30

ttttttttta gctctgcaca gcgct

25

<210> 31

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 31

ccgcacacaga ccgagtttcc ttattttttt t 31

<210> 32
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 32
 tcgacacat ggtgagtc 19

<210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 33
 gtctagaaag cttcccaact g 21

<210> 34
 <211> 47
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 34
 gcugcugcaa auugacgggg gcgugguugg ggcgggucga uugcagc 47

<210> 35
 <211> 48
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 35
gcugaaugag gaucgcaggg gcguggcugg ggugggcgac cguucagc 48

<210> 36
<211> 48
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 36
gcugcgcaag gagaggggcg cgguugggga ggcucuaagc gcugcagc 48

<210> 37
<211> 47
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 37
gcuggcgcuu uaggacaggg gugcgguugg ggcgguccgc ugucagc 47

<210> 38
<211> 48
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 38

gcuggauaga acgcaggggu gcgguuuggg gugggcguga uaucgagc 48

<210> 39
 <211> 46
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 39
 gcugccguaa agagggguga gguuggggag gcuuuacggu uucagc 46

<210> 40
 <211> 48
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 40
 gcugcaugcc gcgaucaggg gagcgguugg ggcgggaucc ggcucagc 48

<210> 41
 <211> 48
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 41
 gcugcgaggg agguagcggc ucugcgccgu gacgugggug gaugcagc 48

<210> 42
 <211> 50
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>		
<223>	synthetic	
<400>	42	
	ggcugauacg uggguggaua uggggcaguu ccaugugggu gguuucagcc	50
<210>	43	
<211>	50	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	synthetic	
<400>	43	
	ggcugauacg ugggugaaua uggggcaguu ccaugugggu gguuucagcc	50
<210>	44	
<211>	49	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	synthetic	
<400>	44	
	ggcugauacg ugggaggaaa gguguaacua ccugugggag guuucagcc	49
<210>	45	
<211>	50	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	synthetic	
<400>	45	

ggcuggcacu cgcaggggug aagugaugau ugaggugggc gagaccagcc 50

<210> 46
 <211> 50
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 46
 ggcugccgag ugguugggug guguaaggga gguggaaucc gcgggcagcc 50

<210> 47
 <211> 50
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 47
 ggcuguucgu gggaggaagg cucuuggaua gagucguggg ugguucagcc 50

<210> 48
 <211> 32
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 48
 ggaucgcagg ggcguggcug gggugggcga cc 32

<210> 49
 <211> 33
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 49
ggaucgcagg ggcguggcug gggugggcga ucc 33

<210> 50
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 50
gccagttttt tttttttttt tttgcttttt t 31