



## (19) 대한민국특허청(KR)

## (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년12월08일

(11) 등록번호 10-1807323

(24) 등록일자 2017년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) A61K 31/711 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)

(21) 출원번호 10-2012-7001135

(22) 출원일자(국제) 2010년06월24일

심사청구일자 2015년06월18일

(85) 번역문제출일자 2012년01월16일

(65) 공개번호 10-2012-0029474

(43) 공개일자 2012년03월26일

(86) 국제출원번호 PCT/US2010/039824

(87) 국제공개번호 WO 2010/151671

국제공개일자 2010년12월29일

(30) 우선권주장

61/219,911 2009년06월24일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

US20070248590 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문현

(73) 특허권자

큐알엔에이, 임크.

미국, 플로리다 33137, 마이애미, 비스케인 보울  
래바르드 4400

(72) 발명자

콜라드, 조셉

미국, 플로리다 33483, 델레이비치, 브룩스 레인  
1004

크로코바 셔만, 올가

미국, 플로리다 33469, 테퀘스타, 에스아이 헤리티  
지 드라이브 18288

(74) 대리인

강명구, 이경민

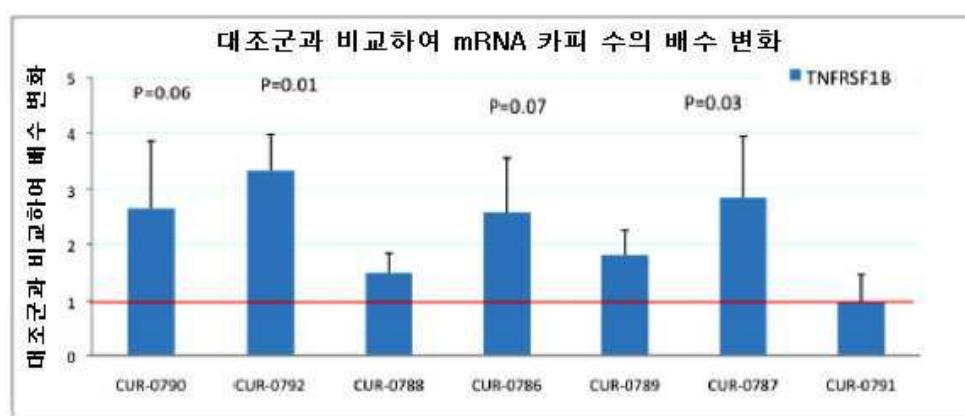
전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 T N F R2에 대한 천연 안티센스 전사체의 억제에 의한 종양 괴사 인자 수용체 2(T N F R2)  
관련된 질환의 치료**(57) 요 약**

본 발명은 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 발현 및/또는 기능을 조절하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 천연 안티센스 폴리뉴클레오티드에 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관계한다. 본 발명은 또한 이러한 안티센스 올리고뉴클레오티드의 확인 및 TNFR2의 발현과 관련된 질환 및 장애의 치료에 이를 사용하는 용도에 관계한다.

대 표 도 - 도1



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열 번호 2 내지 3에 제시된 천연 안티센스 서열에 상보적이며, 상기 천연 안티센스 서열에 특이적으로 혼성화하고 생체내 또는 시험관내에서 환자의 세포 또는 조직내 종양細胞인자 수용체 2 (TNFR2) 폴리뉴클레오티드의 기능 또는 발현 또는 기능 및 발현 모두를 상향 조절하는 10 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스화합물인, 합성 단일 가닥 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 4 내지 10에 제시된 뉴클레오티드 서열로 이루어짐을 특징으로 하는, 합성 단일 가닥 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 12 내지 30개 뉴클레오티드 길이임을 특징으로 하는, 합성 단일 가닥 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 포스포로티오에이트, 알킬포스포네이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포노티오에이트, 포스포르아미데이트, 카르바메이트, 카르보네이트, 포스페이트 트리에스테르, 아세트아미데이트, 카르복시메틸 에스테르, 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 뉴클레오티드간 링키지를 포함하는 최소한 하나의 변형을 추가로 포함함을 특징으로 하는, 합성 단일 가닥 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 최소한 하나의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 링키지를 추가로 포함함을 특징으로 하는, 합성 단일 가닥 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 6

청구항 3에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 링키지의 골격을 추가로 포함함을 특징으로 하는, 합성 단일 가닥 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 7

청구항 3에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 웨티드 핵산, 잠금 핵산 (LNA), 및 이의 조합으로부터 선택된 최소한 하나의 변형된 뉴클레오티드를 추가로 포함함을 특징으로 하는, 합성 단일 가닥 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 8

청구항 3에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 포스포로티오에이트, 알킬포스포네이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포노티오에이트, 포스포르아미데이트, 카르바메이트, 카르보네이트, 포스페이트 트리에스테르, 아세트아미데이트, 카르복시메틸 에스테르, 및 이의 조합에서 선택된 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 복수의 변형을 추가로 포함함을 특징으로 하는, 합성 단일 가닥 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 9

청구항 3에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 웨티드 핵산(PNA), 잠금 핵산 (LNA), 아라비노-핵산(FANA) 및 이의 조합으로부터 선택된 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 복수의 변형을 추가로 포함함을 특징으로 하는, 합성 단일 가닥 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 10

청구항 3에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 2'-0-메톡시에틸 변형된 슈가 모이어티, 2'-메톡시 변형된 슈가 모이어티, 2'-0-알킬 변형된 슈가 모이어티, 바이사이클 슈가 모이어티 및 이의 조합으로부터 선택된 최소한 하나의 변형된 슈가 모이어티를 추가로 포함함을 특징으로 하는, 합성 단일 가닥 올리고뉴클레오티드.

### 청구항 11

청구항 3에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 2'-0-메톡시에틸 변형된 슈가 모이어티, 2'-메톡시 변형된 슈가 모이어티, 2'-0-알킬 변형된 슈가 모이어티, 바이사이클 슈가 모이어티 및 이의 조합으로부터 선택된 변형된 슈가 모이어티를 포함하는 복수의 변형을 추가로 포함함을 특징으로 하는, 합성 단일 가닥 올리고뉴클레오티드.

### 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

삭제

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 출원은 2009년 6월 24일자로 제출된 U.S. 특허 출원 No. 61/219,911의 우선권을 주장하며, 이는 전문이 참 고문헌에 통합된다.

[0002] 본 발명의 구체예들은 TNFR2와 연합된 분자들의 발현 및/또는 기능을 조절하는 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

### 배경 기술

[0003] DNA-RNA 및 RNA-RNA 혼성화는 DNA 복제, 전사, 및 해독을 포함하는 많은 측면의 핵산 기능에 중요하다. 혼성화는 또한 특정 핵산을 탐지하거나 또는 이의 발현을 변경하는 다양한 기술의 중심이다. 안티센스 뉴클레오티드 예를 들면, 표적 RNA에 혼성화되어, 그것에 의해 RNA 접합(splicing), 전사, 해독, 및 복제를 간섭함으로써 유

전자 발현을 봉괴시킨다. 안티센스 DNA는 DNA-RNA 혼성물이 대부분 유형의 세포에 존재하는 활성인 리보뉴클레아제 H에 의한 절단(digestion)에 기질 역할을 하는 추가 특징을 가진다. 안티센스 분자들은 올리고데옥시뉴클레오티드(ODNs)의 경우에서와 같이 세포로 전달될 수 있거나, 또는 RNA 분자들과 같은 내생 유전자로부터 발현될 수 있다. FDA는 최근 안티센스 약물, VITRAVENE™ (사이토메갈로바이러스 레티니티스 (*cytomegalovirus retinitis*) 치료용)을 승인하였는데, 이는 안티센스가 치료 용도를 가진다는 것을 반영한다.

#### [0004] 요약

본 요약은 본 발명의 특징 및 물질을 간략하게 나타내기 위하여 본 발명의 요약으로 제공된다. 청구범위의 범위 또는 의미를 제한하거나 해석하는 것으로 이용되지 않을 것이라는 이해와 함께 요약이 제공된다.

한 구체예에서, 본 발명은 천연 안티센스 전사체의 임의의 부위를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(들)을 이용하여 천연 안티센스 전사체의 작용을 억제시켜 대응하는 센스 유전자를 상향-조절하는 방법을 제공한다. 또한 여기에서 천연 안티센스 전사체의 억제는 siRNA, 리보자임 그리고 소(small) 분자들에 의해 이루어질 수 있는데, 이또한 본 발명의 범위내에 있는 것으로 간주한다.

한 구체예는 생체내 또는 시험관내에서 환자의 세포 또는 조직내 TNFR2 폴리뉴클레오티드의 기능 및/또는 발현을 조절하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 전술한 세포 또는 조직에 길이가 5 내지 30개 뉴클레오티드의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 올리고뉴클레오티드는 서열 번호: 2의 뉴클레오티드 1 내지 413종, 그리고 서열 번호: 3의 1 내지 413종 5 내지 30개 연속적인 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드의 역(reverse) 보체에 최소한 50% 서열 동일성을 가지며, 이러한 접촉에 의해 생체내 또는 시험관내 환자의 세포 또는 조직에서 TNFR2 폴리뉴클레오티드의 기능 및/또는 발현을 조절한다.

또 다른 바람직한 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 TNFR2 폴리뉴클레오티드의 천연 안티센스 서열을 표적으로 하는데, 예를 들면, 서열 번호: 2와 3에서 제시된 뉴클레오티드, 그리고 이에 대한 임의의 변이체들, 대립유전자, 상동체들, 돌연변이들, 유도체들, 단편들 그리고 보체 서열들을 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 예는 서열 번호: 4 내지 10에 제시된다.

또 다른 구체예는 생체내 또는 시험관내에서 환자의 세포 또는 조직내 TNFR2 폴리뉴클레오티드의 기능 및/또는 발현을 조절하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 전술한 세포 또는 조직에 길이가 5 내지 30개 뉴클레오티드의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 올리고뉴클레오티드는 TNFR2 폴리뉴클레오티드의 안티센스의 역 보체에 최소한 50% 서열 동일성을 가지며, 이러한 접촉에 의해 생체내 또는 시험관내 환자의 세포 또는 조직에서 TNFR2 폴리뉴클레오티드의 기능 및/또는 발현을 조절한다.

또 다른 구체예는 생체내 또는 시험관내에서 환자의 세포 또는 조직내 TNFR2 폴리뉴클레오티드의 기능 및/또는 발현을 조절하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 전술한 세포 또는 조직에 길이가 5 내지 30개 뉴클레오티드의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 올리고뉴클레오티드는 TNFR2 안티센스 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드에 최소한 50% 서열 동일성을 가지며, 이러한 접촉에 의해 생체내 또는 시험관내 환자의 세포 또는 조직에서 TNFR2 폴리뉴클레오티드의 기능 및/또는 발현을 조절한다.

바람직한 구체예에서, 조성물은 센스 및/또는 안티센스 TNFR2 폴리뉴클레오티드에 결합하는 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

또 다른 바람직한 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 또는 치환된 뉴클레오티드를 포함한다.

또 다른 바람직한 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 결합(bonds)을 포함한다.

또 다른 구체예에서, 상기 변형된 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 햅티드 핵산, 2'-0-메틸, 플루오로- 또는 탄소, 메틸렌 또는 기타 잡감 핵산 (LNA) 분자들을 포함하는 변형된 염기를 포함한다. 바람직하게는, 상기 변형된 뉴클레오티드는 α-L-LNA을 포함하는 잡감 핵산 분자들이다.

또 다른 바람직한 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 환자의 피하로, 근육내로, 정맥내로 또는 복막내로 투여된다.

또 다른 바람직한 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 약제 조성물내에서 투여된다. 치료 섭생은 환자에게 최소한 한 번 안티센스 화합물을 투여하는 것을 포함하나; 그러나, 이러한 치료는 일정 시간에 걸쳐 다중 투약을 포함하도록 변형될 수 있다. 이 치료는 하나 이상의 다른 유형의 치료법과 결합될 수 있다.

[0017] 또 다른 바람직한 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 리포좀에 포집되거나 또는 운반체 분자 (가령, 콜레스테롤, TAT 팹티드)에 부착될 수 있다.

[0018] 다른 측면들은 아래에서 설명된다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

#### 과제의 해결 수단

### 발명의 효과

#### 도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 Lipofectamine 2000을 이용하여 도입된 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드로 HepG2 세포를 치료 후 대조군과 비교하였을 때, TNFR2 mRNA에서 변화 배수+표준 편차를 보여주는 실시간 PCR 결과 그래프다. 실시간 PCR 결과에서 HepG2 세포들내에 TNRSF1B mRNA 수준은 TNRSF1B 안티센스 Hs.679340 (CUR-0792)에 대해 기획된 올리고중 1개, Hs.639108 (CUR-0787)에 대해 기획된 1개 올리고로 치료후 48시간에 상당히 증가한다는 것을 보여준다. CUR-0790, CUR-0792, CUR-0788, CUR-0786, CUR-0789, CUR-0787 및 CUR-0791로 나타낸 막대는 서열 번호: 4 내지 10로 각 처리된 시료에 대응한다.

#### 서열 목록의 설명

서열 번호: 1: 호모 사피엔스(*Homo sapiens*) 종양 피사 인자 수용체 슈퍼페밀리, 구성원(member) 1B (TNRSF1B), mRNA. (NCBI 수탁번호: NM\_001066);

서열 번호: 2: 천연 TNFR2 안티센스 서열 (Hs.639108);

서열 번호: 3: 천연 TNFR2 안티센스 서열 (Hs.679340);

서열 번호: 4 내지 10: 안티센스 올리고뉴클레오티드.

\*는 포스포티오에이트 결합을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명의 몇 가지 측면들은 설명을 위한 실시예를 참고하여 하기에서 설명된다. 본 발명의 충분한 이해를 제공하기 위하여 다수의 특정 상세한 설명, 관계 및 방법들이 제공됨을 인지해야 한다. 그러나, 당업계 숙련자는 하나 이상의 특정 상세한 내용 없이 또는 기타 방법으로 본 발명을 실시할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 본 발명은 일부 작용이 상이한 순서 및/또는 다른 작용 또는 사건과 동시에 발생될 수 있기 때문에 작용 또는 사건의 순서에 제한되지 않는다. 더욱이, 본 발명에 따른 방법을 실행하기 위하여 모든 설명된 작용 또는 사건이 모두 요구되지는 않는다.

[0021] 여기에서 공개된 모든 유전자, 유전자 이름, 그리고 유전자 산물들은 여기에서 공개된 조성물 및 방법을 적용할 수 있는 특정 종의 상동체에 대응한다. 따라서, 이를 용어는 인간 및 마우스의 유전자 및 유전자 산물들을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 특정 종의 유전자 또는 유전자 산물을 공개할 때, 이러한 공개는 설명을 위함이며, 명시적으로 다른 언급이 없는 한 이를 한정시키는 것으로 해석해서는 안된다. 따라서, 예를 들면, 일부 구체예에서는 포유동물 핵산 및 아미노산 서열에 관련된 여기에서 공개된 유전자는 기타 포유동물, 물고기, 양서류, 과충류 및 조류를 포함하나 이에 한정되지 않는 기타 동물들의 동족(homologous) 및/또는 진화종(orthologous) 유전자 및 유전자 산물들을 포함한다. 바람직한 구체예들에서, 유전자 또는 핵산 서열은 사람이다.

#### 정의

- [0023] 여기에서 사용된 정의는 오로지 특정 구체예들을 설명하기 위함이며, 본 발명을 이에 한정시키고자 함은 아니다. 여기에서 사용된 것과 같이, 단수형은 명시적으로 다른 언급이 없는 한, 복수 개념을 포함한다. 더욱이, 상세한 설명 및/또는 청구범위에 이용된 포함하는("including"), 포함하다("includes"), 가지는("having"), 가지다("has"), ~와 함께("with") 또는 이의 변이체들에 대해서, 이러한 용어들은 포함하는("comprising")과 유사한 방법으로 포함적인 의도이다.
- [0024] 용어 "약(about)" 또는 "대략(approximately)"은 당업계 숙련자가 결정하였을 때 특정 값에 대해 용인가능한 오차 범위내에 있다는 것을 의미하며, 측정 시스템의 한계내에서 그 값이 어떻게 측정되거나 또는 결정되는 지에 따라 부위적으로 달라질 것이다. 예를 들면, "약"은 당업계 실시과정마다 1이내 또는 1이상의 표준 편차를 의미할 수 있다. 대안으로, "약"은 주어진 값의 최대 20%, 바람직하게는 최대 10%, 더 바람직하게는 최대 5%, 그리고 더욱더 바람직하게는 최대 1%의 범위를 의미할 수 있다. 대안으로, 특히 생물학적 시스템 또는 공정에 대해, 이 용어는 값의 10배 범위, 바람직하게는 5-배이내, 그리고 더 바람직하게는 2-배이내를 의미한다. 특정 값이 명세서 및 청구항에 설명된 경우, 다른 언급이 없는 한, 용어 "약"은 특정 값의 수용가능한 오차 범위내에 있는 것을 의미하는 것으로 간주해야만 한다.
- [0025] 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "mRNA"는 표적 유전자의 현재 공지된 mRNA 전사체(들) 그리고 추가로 밝혀질 임의의 추가 전사체를 의미한다.
- [0026] "안티센스 올리고뉴클레오티드" 또는 "안티센스 화합물"은 또다른 RNA 또는 DNA (표적 RNA, DNA)에 결합하는 RNA 또는 DNA 분자를 의미한다. 예를 들면, 단일 RNA 올리고뉴클레오티드라면, RNA-RNA 상호작용 수단에 의해 또다른 RNA 표적에 결합하고, 표적 RNA의 활성을 변경시킨다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 특정 폴리뉴클레오티드의 발현 및/또는 기능의 하향 또는 상향조절할 수 있다. 이 정의는 치료, 진단, 또는 기타 견지로부터 유용한 임의의 외부 RNA 또는 DNA 분자를 포함한다는 것을 의미한다. 이러한 분자들은 예를 들면, 안티센스 RNA 또는 DNA 분자들, 간섭 RNA (RNAi), micro RNA, 유인(decoy) RNA 분자들, siRNA, 효소 RNA, 치료 편집(editing) RNA 그리고 항진 및 길항 RNA, 안티센스 올리고머 화합물, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 외부 가이드 서열 (EGS) 올리고뉴클레오티드, 선택적 접합자(alternate splicers), 프라이머, 프로브, 및 표적 핵산의 최소한 일부위에 혼성되는 기타 올리고머 화합물을 포함한다. 이와 같이, 이들 화합물들은 단일-가닥, 이중-가닥, 부위적으로 단일-가닥, 또는 원형 올리고머 화합물의 형태로 도입될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 내용에서, 용어 "올리고뉴클레오티드"는 리보핵산 (RNA) 또는 데옥시리보핵산 (DNA)의 올리고머 또는 폴리머 또는 이의 모방체를 말한다. 용어 "올리고뉴클레오티드"는 데옥시리보뉴클레오시드, 리보뉴클레오시드, 이의 치환된 그리고 알파-아노머 형태, 웨პ티드 핵산 (PNA), 잠김(locked) 핵산 (LNA), 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 그리고 이와 유사한 것을 포함하는, 천연 및/또는 변형된 모노머 또는 링키지의 선형 또는 고리형 올리고머를 또한 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 모노머-대-모노머 상호작용의 정규적 패턴, 가령, Watson-Crick 유형의 염기 쌍, Hoogsteen 또는 역 Hoogsteen 유형의 염기 쌍형성, 또는 이와 유사한 것에 의해 표적 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0028] 상기 올리고뉴클레오티드는 상이한 부위를 포함하는 키메라("chimeric")일 수 있다. 본 발명의 문맥에서, "키메라" 화합물들은 2개 이상 화학 부위, 예를 들면, DNA 부위(들), RNA 부위(들), PNA 부위(들) 등을 포함하는 올리고뉴클레오티드이다. 각 화학 부위는 최소한 한 개의 모노머 단위, 가령, 올리고뉴클레오티드 화합물의 경우 뉴클레오티드로 구성된다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 최소한 한 부위를 포함하고, 여기서 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 바람직한 성질들을 나타내도록 변형된다. 올리고뉴클레오티드의 바람직한 성질들은 예를 들면, 뉴클레아제 분해에 대한 증가된 저항성, 증가된 세포의 취입(uptake), 및/또는 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화력을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 올리고뉴클레오티드의 상이한 부위는 따라서 상이한 성질들을 가질 수 있다. 본 발명의 키메라 올리고뉴클레오티드는 상기에서 설명된 것과 같이 2개 이상 올리고뉴클레오티드, 변형된 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오시드 및/또는 올리고뉴클레오티드 유사체들의 혼합된 구조로 형성될 수 있다.
- [0029] 상기 올리고뉴클레오티드는 "리지스터(register)"내에서 연결될 수 있는 부위로 구성될 수 있는데, 즉, 모노머가 고유 DNA에서와 같이 연속적으로 연결되거나 또는 스페이스를 통하여 연결될 수 있다. 스페이스는 부위 사이에 공유 "다리"를 구성하고, 바람직한 경우에 약 100개 탄소 원자를 초과하지 않는 길이를 가진다. 스페이스는 상이한 기능성, 예를 들면, 양전하 또는 음전하를 가지며, 특정 핵산 결합 성질들 (인터카레이터(intercalators), 홈 결합자(groove binders), 독소, 형광단(fluorophors) etc.)을 나를 수 있고, 친지성일 수 있으며, 예를 들면, 알파-나선을 유도하는 알라닌을 포함하는 웨პ티드와 같이, 특정 2차 구조를 유도할 수 있는

등의 상이한 기능을 전달할 수 있다.

[0030] 여기에서 사용된 것과 같이, "TNFR2" 및 "종양 피사 인자 수용체 2"는 모든 패밀리 구성요소들, 돌연변이들, 대립유전자, 단편들, 종, 코딩 및 넌코딩 서열들, 센스 및 안티센스 폴리뉴클레오티드 가닥들, 등을 포함한다.

[0031] 여기에서 사용된 것과 같이, '종양 피사 인자 수용체 2', CD120b, p75, p75TNFR, p80 TNF-알파 수용체, TBPII, TNFBR, TNFR1B, TNFR2, TNF-R2, TNF-R75, TNFR80, TNFR-II, TNF-RII, TNF-R-II, 종양 피사 인자 수용체 2, 종양 피사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 1B 및 종양 피사 인자 수용체 유형 II는 본 출원에서 호환 사용된다.

[0032] 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "~에 특이적인 올리고뉴클레오티드" 또는 "~을 표적으로 하는 올리고뉴클레오티드" (i) 표적 유전자의 일부분과 안정적인 복합체를 형성할 수 있는, 또는 (ii) 표적 유전자의 mRNA 전사체의 일부분과 안정적인 듀플렉스를 형성할 수 있는 서열을 가진 올리고뉴클레오티드를 말한다. 복합체와 듀플렉스의 안정성은 이론적 계산 및/또는 시험관 분석에 의해 결정할 수 있다. 혼성화 복합체들 및 듀플렉스의 안정성을 결정하는 예시적인 분석들은 하기 실시예에서 설명한다.

[0033] 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "표적 핵산"은 DNA, 및 이러한 DNA로부터 전사된 RNA (premRNA 및 mRNA를 포함), 그리고 이러한 RNA, 코딩, 넌코딩 서열들, 센스 또는 안티센스 폴리뉴클레오티드로부터 유도된 cDNA를 포함한다. 올리고머 화합물과 이의 표적 핵산의 특이적 혼성화는 이 핵산의 정상적 기능을 간섭한다. 화합물들에 의한 표적 핵산의 기능 조절, 특별히 이에 혼성화되어 기능을 조절하는 것을 일반적으로 "안티센스"라고 한다. 간섭될 DNA의 기능은 예를 들면, 복제 및 전사를 포함한다. 간섭될 RNA의 기능은 모든 중요한 기능, 예를 들면, RNA가 단백질 해독 부위로 전위, RNA로부터 단백질의 해독, 하나 이상의 mRNA 종을 만들기 위한 RNA의 접합, 그리고 RNA에 관여하는 또는 RNA에 의해 실행되는 촉매 활성을 포함하는 기능을 포함한다. 표적 핵산 기능의 이러한 간섭의 전반적인 효과는 인코드된 산물 또는 올리고뉴클레오티드의 발현 조정이다.

[0034] RNA 간섭 "RNAi"는 이들의 "표적" 핵산 서열들에 서열-특이적 상동성을 가지는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 분자들에 의해 중재된다. 본 발명의 특정 구체예들에서, 중개물질은 5-25개의 뉴클레오티드 "작은 간섭" RNA 듀플렉스 (siRNAs)다. siRNAs는 Dicer로 공지된 RNase 효소에 의해 dsRNA의 프로세싱으로부터 유도된다. siRNA 듀플렉스 산물들은 RISC (RNA Induced Silencing Complex)라고 불리는 다중-단백질 siRNA 복합체로 다시 모아게된다. 특정 이론에 결부되는 것을 원하지 않고, 그 다음 RISC는 표적 핵산(적합하게는 mRNA)으로 안내되고, 여기서 siRNA 듀플렉스는 촉매적 방식에서 절단을 중재하기 위하여 서열-특이적 방식으로 상호작용한다. 본 발명에 따라 이용될 수 있는 작은 간섭 RNAs는 숙련자들이 잘 알고 있는 당업계에 공지되어 있는 과정에 따라 합성되고 이용될 수 있다. 본 발명의 방법에 적합하게 이용하기 위한 작은 간섭 RNAs는 약 1 내지 약 50개 뉴클레오티드 (nt)를 포함한다. 비-제한적 구체예들의 실시예에서, siRNAs는 약 5 내지 약 40개 nt, 약 5 내지 약 30 개 nt, 약 10 내지 약 30개 nt, 약 15 내지 약 25개 nt, 또는 약 20-25개 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0035] 적당한 올리고뉴클레오티드의 선택은 핵산 서열들을 자동으로 배열하고, 동일 또는 상동 부위를 표시하는 컴퓨터 프로그램을 이용하여 용이하게 한다. 이러한 프로그램을 이용하여 핵산 서열들은 GenBank와 같은 데이터베이스 조사에 의해 또는 PCR 산물의 서열화에 의해 수득된 핵산 서열들을 비교한다. 다양한 종 범위로부터 핵산 서열들을 비교하면 종간에 적당한 수준의 동일성을 나타내는 핵산 서열들을 선별한다. 서열화되지 않은 유전자의 경우, Southern 블랏을 실행하여 표적 종과 기타 종에서 유전자간에 동일성 수준을 결정한다. 당업계에 공지되어 있는 것과 같이, 다양한 수준의 염격성(stringency)에서 Southern 블랏을 실행함으로써, 동일성의 대략적인 측정이 가능하다. 이러한 과정은 또한 제어해야 할 대상에서 표적 핵산 서열에 높은 수준의 상보성을 나타내며, 기타 종에서 대응 핵산 서열에 대해 더 낮은 수준의 상보성을 나타내는 올리고뉴클레오티드의 선택을 허용한다. 당업계 숙련자는 본 발명에 사용하는 적당한 부위 유전자를 선택함에 있어서 상당한 허용범위가 있다는 것을 인지할 것이다.

[0036] "효소 RNA"는 효소 활성(Cech, (1988) *J. American. Med. Assoc.* 260, 3030-3035)을 가진 RNA 분자를 의미한다. 효소 핵산 (리보자임)은 표적 RNA에 우선 결합하여 작용한다. 이러한 결합은 표적 RNA를 절단하도록 작용하는 분자의 효소 부분에 근접하게 있는 효소 핵산의 표적 결합 부분을 통하여 일어난다. 따라서, 효소 핵산은 염기 쌍형성을 통하여 표적 RNA를 먼저 인지하고, 그 다음 이에 결합하고, 그리고 정확한 부위에 일단 결합했다면, 효소적으로 작용하여 표적 RNA를 절단한다.

[0037] "유인(decoy) RNA"는 리간드에 대한 천연 결합 도메인을 모방한 RNA 분자를 의미한다. 따라서, 유인 RNA는 특정 리간드의 결합에 대해 천연 결합 표적과 경쟁한다. 예를 들면, HIV 트랜스-활성화 반응(TAR) RNA의 과다발현

은 "유인"으로 작용하여 HIV tat 단백질에 효과적으로 결합하고, HIV RNA내에 인코드된 TAR 서열에 이의 결합을 방해하는 것으로 나타났다. 이는 특정 실시예를 의미한다. 당업계 숙련자들은 이것은 하나의 예일 뿐이며, 당업계에 일반적으로 공지되어 있는 기술을 이용하여 기타 구체예들을 바로 만들 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0038] 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "모노머"는 전형적으로 소수의 모노머 단위, 약 3-4개부터 약 수백개의 모노머 단위까지 범위의 올리고뉴클레오티드를 만들기 위하여 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 모노머 또는 이의 유사체를 나타낸다. 포스포디에스테르 링키지(linkages)의 유사체들은 하기에서 더 상세하게 설명하는 것과 같이, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포르네이트, 포스포로셀레네이트, 포스포로아미데이트, 그리고 이와 유사한 것을 포함한다.

[0039] 용어 "뉴클레오티드"는 자연적으로 생성되는 뉴클레오티드와 자연적으로 생성되지 않는 뉴클레오티드를 포함한다. 기존에 "자연적으로 생성되지 않는" 것으로 간주된 다양한 뉴클레오티드는 실질적으로 자연에서 볼 수 있다는 것은 당업계 숙련자에게 분명하게 해야만 한다. 따라서, "뉴클레오티드"는 공지의 퓨린 및 피리미딘 이형고리를 포함하는 분자들 뿐만 아니라, 이형고리 유사체 및 이의 호변체(tautomers)를 포함한다. 다른 유형의 뉴클레오티드의 예시적인 예는 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 우라실, 퓨린, 산틴, 디아미노퓨린, 8-옥소- N6-메틸아데닌, 7-데아자산틴, 7-데아자구아닌, N4,N4-에타노시토신, N6,N6-에타노-2,6-디아미노퓨린, 5-메틸시토신, 5-(C3-C6)-알키닐시토신, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 슈도이소시토신, 2-하이드록시-5-메틸-4-트리아졸로피리딘, 이소시토신, 이소구아닌, 이노신 및 Benner *et al.*, U.S. Pat No. 5,432,272에서 설명된 "자연적으로 생성되지 않는" 뉴클레오티드를 포함한다. 용어 "뉴클레오티드"는 이들 예를 모두와 이의 유사체 및 이의 호변체를 모두 포함한다. 특히 흥미로운 뉴클레오티드는 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 우라실을 포함하는 것으로, 이들은 인간에서 치료 및 진단 사용과 관련된 천연 발생 뉴클레오티드로 간주된다. 뉴클레오티드는 Kornberg and Baker, *DNA Replication*, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992)에서 설명하는 것과 같은 천연 2'-데옥시 및 2'-하이드록시 슈가 및 이들의 유사체들을 포함한다.

[0040] 뉴클레오티드와 관련된 "유사체들"은 변형된 염기 모이어티 및/또는 변형된 슈가 모이어티를 가지는 합성 뉴클레오티드를 포함한다. (Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, (1997) *NucI. Acid. Res.*, 25(22), 4429- 4443, TouIm, J.J., (2001) *Nature Biotechnology* 19:17-18; Manoharan M., (1999) *Biochimica et Biophysica Acta* 1489:117-139; Freier S. M., (1997) *Nucleic Acid Research*, 25:4429-4443, Uhlman, E., (2000) *Drug Discovery & Development*, 3: 203-213, Herdewin P., (2000) *Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.*, 10:297-310); 2'-O, 3'-C-linked [3.2.0] bicycloarabinonucleosides (see e.g. N.K Christensen., *et al.*, (1998) *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 5458-5463; Prakash TP, Bhat B. (2007) *Curr Top Med Chem.* 7(7):641-9; Cho EJ, *et al.* (2009) *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2, 241-264). 이러한 유사체들은 결합 성질들 예를 들면, 듀플렉스 또는 트리플렉스 안정성, 특이성, 또는 이와 유사한 것을 강화시키도록 기획된 합성 뉴클레오티드를 포함한다.

[0041] 여기에서 사용된 것과 같이, "혼성화"는 올리고머 화합물들의 실질적인 보체 가닥들이 쌍을 형성하는 것(페어링)을 말한다. 페어링의 한 기전은 올리고머 화합물들의 가닥들의 상보적 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 염기(뉴클레오티드) 사이에 수소 결합을 포함하며, Watson-Crick, Hoogsteen 또는 역전된 Hoogsteen 수소 결합 결합이 될 수 있다. 예를 들면, 아데닌 및 티민은 수소 결합 형성을 통하여 쌍을 이루는 보체 뉴클레오티드다. 혼성화는 다양한 환경하에서 일어날 수 있다.

[0042] 안티센스 화합물은 화합물이 표적 핵산에 결합하여, 표적 핵산의 정상적인 기능을 간섭함으로써 기능 및/또는 활성의 조절이 야기될 때, "특이적으로 결합하고" 그리고 특이적 결합이 바람직한 조건, 가령, 생체내 분석 또는 치료의 경우 생리학적 조건하에, 그리고 시험관 분석의 경우 분석이 실행되는 조건하에서 비-표적 핵산 서열에 안티센스 화합물의 비-특이적 결합을 회피하도록 충분한 보체 수준을 가진다.

[0043] 여기에서 사용된 것과 같이, "엄격한 혼성화 조건" 또는 "엄격한 조건"은 본 발명의 화합물은 이의 표적 서열에 혼성화되지만, 기타 서열들에는 최소한의 수로 혼성화되는 조건을 말한다. 엄격한 조건은 서열-의존적이며, 상이한 환경에서 달라질 것이며, 그리고 본 발명의 문맥에서, 올리고머 화합물들이 표적 서열에 혼성화되는 "엄격한 조건"은 올리고머 화합물들의 성질 및 조성물 그리고 조사될 분석에 의해 결정된다. 일반적으로, 엄격한 혼성화 조건은  $\text{Na}^{++}$  또는  $\text{K}^{++}$ 와 같은 무기 양이온(가령, 낮은 이온 강도)과 낮은 염 농도(<0.15M), 올리고머 화합물:표적 서열 복합체의  $T_m$ 보다 아래의 20°C 내지 25°C보다 더 높은 온도, 그리고 포름아미드, 디메틸포름아미드, 디메틸 술폴시드, 또는 세제 도데실 살레이트 나트륨(SDS)과 같은 변성제의 존재를 포함한다. 예를 들면, 혼성화 비율은 1% 포름아미드의 경우 1.1%로 감소된다. 높은 엄격성 혼성화 조건의 예는 60°C에서, 30분간 0.1

× 염화나트륨-구연산나트륨 완충액(SSC)/0.1% (w/v) SDS이다.

[0044] "상보성"은 여기에서 사용된 것과 같이, 하나 또는 두개의 올리고머 가닥들상에서 2개 뉴클레오티드간에 정확한 페어링 능력을 말한다. 예를 들면, 안티센스 화합물의 특정 위치에 핵염기가 표적 핵산의 특정 위치의 핵염기와 수소결합할 수 있다면, 상기 표적 핵산은 DNA, RNA, 또는 올리고뉴클레오티드 분자이고, 그 다음 올리고뉴클레오티드와 표적 핵산 사이의 위치는 상호적 위치로 간주한다. 올리고머 화합물 및 추가 DNA, RNA, 또는 올리고뉴클레오티드 분자는 각 분자에서 충분한 수의 상보성 위치가 서로 수소 결합할 수 있는 뉴클레오티드에 의해 점유될 때 서로에 대해 상보성이다. 따라서, "특이적으로 혼성화가능한" 그리고 "상보성"은 올리고머 화합물과 표적 핵산 사이에 안정적이고 특이적인 결합이 일어나도록 충분한 수의 뉴클레오티드에 걸쳐 충분한 수준의 정확한 페어링 또는 상보성을 나타낼 때 사용되는 용어들이다.

[0045] 올리고머 화합물의 서열은 특이적으로 혼성화되는 이의 표적 핵산의 서열에 100% 상보성일 필요가 없다는 것을 인지할 것이다. 더욱이, 올리고뉴클레오티드는 사이에 있는 또는 인접 단편(가령, 루프 구조, 미스매취 또는 헤어핀 구조)은 혼성화 과정에 관여하지 않도록 하나 이상의 단편에 걸쳐 혼성화될 수 있다. 본 발명의 올리고머 화합물들은 이들이 표적으로 하는 표적 핵산 서열내에 표적 부위에 대해 최소한 약 70%, 또는 최소한 약 75%, 또는 최소한 약 80%, 또는 최소한 약 85%, 또는 최소한 약 90%, 또는 최소한 약 95%, 또는 최소한 약 99% 서열 상보성을 포함한다. 예를 들면, 안티센스 화합물의 20개 뉴클레오티드중 18개가 표적 부위에 상보성이어서, 이에 따라 특이적으로 혼성화되는 안티센스 화합물은 90% 상보성을 나타낼 것이다. 이러한 예에서, 나머지 비-상보성 뉴클레오티드는 상보성 뉴클레오티드와 덩어리를 형성하거나 또는 간섭하게 될 수 있고, 그리고 서로 또는 상보성 뉴클레오티드에 인접해있을 필요는 없다. 이와 같이, 표적 핵산과 완전한 상보성을 가진 두 개 부위의 측면에 있는 4개의 비-상보성 뉴클레오티드를 가진 길이가 18개의 뉴클레오티드인 안티센스 화합물은 표적 핵산과 전체적으로 77.8% 상보성을 가질 것이며, 따라서, 본 발명의 범위에 속한다. 표적 핵산 부위와 안티센스 화합물의 상보성 비율은 당업계에 공지되어 있는 BLAST 프로그램 (기본적인 국소 배열 연구 도구) 및 PowerBLAST 프로그램을 이용하여 일상적으로 결정할 수 있다. 상동성 비율, 서열 동일성 또는 상보성은 Smith 및 Waterman의 알고리즘(*Adv. Appl. Math.*, (1981) 2, 482-489)을 이용하는 디플트 세팅을 이용하여 예를 들면, Gap 프로그램(*Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.*)에 의해 결정될 수 있다.

[0046] 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "열 용점(T<sub>m</sub>)"은 정의된 이온 강도, pH 및 핵산 농도하에서 표적 서열에 상보적인 올리고뉴클레오티드의 50%가 평형상태에서 표적 서열에 혼성화될 때 온도를 말한다. 전형적으로, 염격성 조건은 염 농도가 pH 7.0 내지 8.3에서 최소한 약 0.01 내지 1.0 M Na 이온 농도(또는 이들의 염)이며, 이 온도는 짧은 올리고뉴클레오티드 (가령, 10 내지 50개 뉴클레오티드)의 경우 최소한 약 30°C이다. 염격한 조건은 포름아미드와 같은 탈안정화제를 첨가하며 얻을 수도 있다.

[0047] 여기에서 사용된 것과 같이, "조정(modulation)"은 유전자의 발현을 증가(자극) 또는 감소 (억제)를 의미한다.

[0048] 폴리뉴클레오티드 서열의 내용에서 이용된 용어 "변이체(variant)"는 야생형 유전자에 관련된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 이 정의에는 예를 들면, "대립유전자(allelic)", "접합(splice)", "종(species)", 또는 "다형성(polymorphic)" 변이체를 포함한다. 접합 변이체는 기준 분자에 대해 상당한 동일성을 가질 수 있지만, mRNA 프로세싱 동안 엑손의 교대 접합으로 인하여 더 많은 또는 더 적은 수의 폴리뉴클레오티드를 가질 수 있다. 대응하는 폴리펩티드는 추가 기능 도메인을 가지거나 또는 도메인이 없을 수 있다. 종 변이체는 종마다 다양한 폴리뉴클레오티드 서열들이다. 본 발명에 특히 유용한 것은 야생형 유전자 산물의 변이체다. 변이체들은 핵산 서열에서 최소한 하나의 돌연변이로 인하여 발생될 수 있고, 그리고 변경된 mRNA 또는 기능 또는 구조가 변경된 또는 변경되지 않은 폴리펩티드를 만들 수 있다. 임의의 주어진 천연 또는 재조합 유전자는 대립유전자가 없거나 하나 또는 많은 대립유전자를 가질 수 있다. 변이체를 발생시키는 공통의 돌연변이적 변화는 뉴클레오티드의 천연 결손, 추가 또는 치환으로 인한 것이다. 이들 유형의 각 변화는 단독으로 일어나거나, 다른 것과 함께 일어날 수 있고, 주어진 서열에서 1회 이상 발생될 수 있다.

[0049] 생성된 폴리펩티드는 서로에 대해 상당한 아미노산 동일성을 일반적으로 가질 것이다. 다형성 변이체는 주어진 종의 개체간에 특정 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열에서 변화이다. 다형성 변이체는 또한 "단일 뉴클레오티드 다형성" (SNPs) 또는 폴리뉴클레오티드 서열이 한 개 염기에 의해 변화되는 단일 염기 돌연변이를 포함할 수 있다. SNPs의 존재는 예를 들면, 민감성 대 저항성의 질병 상태에 대한 성향을 가진 특정 집단을 나타낼 수 있다.

[0050] 유도체 폴리뉴클레오티드는 화학 변형을 받게 된 핵산, 예를 들면, 알킬, 아실, 또는 아미노 기에 의해 치환된

핵산을 포함한다. 유도체들, 가령, 유도체 올리고뉴클레오티드는 변형된 슈가 모이어티 또는 슈가 간 링키지와 같은 천연에서 발생되지 않은 부분들을 포함할 수 있다. 이들중 예로는 당업계에 공지되어 있는 포스포로티오 에이트 및 기타 황을 포함하는 종들이다. 유도체 핵산은 방사능뉴클레오티드, 효소, 형광 물질, 화학적발광 물질, 발색 물질, 기질, 공인자, 억제, 자성 입자, 그리고 이와 유사한 것을 포함하는 표지를 또한 포함할 수 있다.

[0051] "유도체" 폴리펩티드 또는 웨프티드는 예를 들면, 글리코실화, 페길화, 포스포릴화, 황산화, 환원/알킬화, 아실화, 화학 결합, 또는 약한 포르말린 처리에 의해 변형된 것이다. 유도체는 방사능동위원소, 형광, 및 효소 표지를 포함하나 이에 한정되지 않는 직간접적으로 탐지가능한 표지를 포함하도록 또한 변형될 수 있다.

[0052] 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "동물" 또는 "환자"는 예를 들면, 인간, 양, 엘크, 사슴, 물 사슴, 맹크, 포유동물, 원숭이, 말, 소, 돼지, 염소, 개, 고양이, 쥐, 마우스, 새, 닭, 파충류, 물고기, 곤충 그리고 거미류를 포함한다.

[0053] "포유동물"은 전형적으로 건강관리를 받는(가령, 인간 및 길들여진 동물들) 온혈 포유동물을 포함한다. 예로는 고양잇과, 깃과, 말과, 솟과, 그리고 인간, 및 오로지 인간을 포함한다.

[0054] "치료하는(Treating)" 또는 "치료(treatment)"는 포유동물에서 질병 상태의 치료를 포함하고, 그리고 (a) 포유동물에서 질병 상태가 일어나는 것을 막고, 특히 포유동물이 이 질병 상태에 걸리기 쉽지만 아직 걸린 것으로 진단받지 않은 경우; (b) 질병 상태를 억제하는, 가령, 질병의 발생을 억제하는; 및/또는 (c) 질병-상태를 완화시키는, 가령, 바람직한 종점에 도달할 때까지 질병 상태의 퇴보시키는 것을 포함한다. 치료는 또한 질병의 증상을 개선(가령, 통증 또는 불편함을 감소)시키는 것을 포함하며, 여기서 이러한 개선은 질병 상태에 직접적으로 영향을 주거나 주지 않을 수 있다(가령, 원인, 전달, 표현 등).

[0055] 여기에서 사용된 것과 같이, "암"은 백혈병, 림프종, 흑색종, 암종 및 육종을 포함하나 이에 한정되지 않는 포유류에서 발견되는 모든 유형의 암 또는 신형성 또는 악성 종양을 말한다. 암은 자체가 "종양" 이거나 암의 악성 세포들을 포함하는 조직을 말한다. 종양의 예는 육종 및 암종, 예를 들면: 섬유육종, 점액육종, 지방육종(liposarcoma), 연골육종(chondrosarcoma), 골형성(osteogenic) 육종, 척색종(chordoma), 혈관육종, 다중특발성출혈성육종(endothelioma), 스튜어트 - 트래브 신드롬 (lymphangiosarcoma), 림프혈관내피육종(lymphangioendothelioma), 활액육종(synovioma), 중피종(mesothelioma), Ewing 종양, 부드러운 근육결합조직육종(leiomyosarcoma), 횡문근육종(rhabdomyosarcoma), 결장 암종, 퀘장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암, 탐샘 암종, 피지선피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지 암종, 신장 세포 암종, 간종양, 담관 암종, 응모막암종, 고환종, 배 암종, Wilms 종양, 경부암, 고환 종양, 폐 암종, 소(small) 세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 성상세포종, 수질아세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 송과체종(pinealoma), 혈관모세포종, 청각 신경교종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 흑색종, 신경아세포종, 그리고 망막아종을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명에 따른 공개된 조성물에 의해 치료될 수 있는 추가적인 암은 예를 들면, Hodgkin 질환, Non-Hodgkin 림프종, 다발성 골수종, 신경아세포종, 유방암, 난소암, 폐암, 횡문근육종, 일차성 혈소판증가증, 일차성 마크로블린혈증, 소-세포 폐 종양, 일차성 뇌종양, 위암, 결장암, 악성 퀘장 일술린종, 악성 암양종, 비뇨기 방광암, 사전악성 피부 병소, 고환암, 림프종, 갑상선 암, 신경아세포종, 식도 암, 비뇨생식기관 암, 악성 고칼슘혈증, 경부암, 자궁내막암, 부신 피질암, 그리고 전립선 암을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0056] "신경 질환 또는 장애"는 신경계 및/또는 시계의 임의의 질환 또는 장애를 말한다. "신경 질환 또는 장애"는 중추 신경계 (뇌, 뇌간 및 소뇌), 말초 신경계 (뇌신경을 포함), 그리고 자율 신경계 (중추 및 말초 신경계 모두에 위치한 일부)가 관련된 질환 또는 장애를 포함한다. 신경 장애의 예로 두통, 마비 및 혼수, 치매, 발작, 수면 장애, 외상, 감염, 신생물, 신경안과학, 운동 장애, 탈수초화 질환, 척추 장애, 및 말초 신경, 근육 및 신경 근 접합점의 장애를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 중독 및 정신병은 양극 장애 및 정신분열증을 포함하나 이에 한정되지 않으며, 이들 또한 신경 장애의 정의에 포함된다. 다음은 본 발명에 따른 조성물 및 방법을 이용하여 치료될 수 있는 몇 가지 신경 장애, 증상, 신호 및 증후군의 목록이다: 후천성 간질 실어; 급성 파종성 뇌 척수염; 부신백질이영양증; 노인성 황반 변성; 뇌량의 발육부진; 인지불능; Aicardi 증후군; Alexander 질환; Alpers 질환; 교대성 반신마비; 맥관 치매; 근위축성 척색 경화증; 무뇌증; Angelman 증후군; 혈관종(angiomatosis); 산소결핍; 실어증; 운동불능; 거미집모양의 낭종; 거미집모양의 염증(arachnoiditis); Anronl-Chiari 변형; 동정맥 변형; Asperger 증후군; 기능장애 운동실조; 주의력 결핍 과다행동 장애; 자폐증; 자율 장애; 등 통증; Batten 질환; Behcet 질환; Bell 마비; 양성 필수 안검경련; 양성 초점; 근위축증; 양성

두개내 고혈압; Binswanger 질환; 안검경련; Bloch Sulzberger 증후군; 상완 신경 얼기 부상; 뇌 종기; 뇌 손상; 뇌 종양들(교아종 다형포함); 척추 종양; Brown-Sequard 증후군; Canavan 질환; 손목관절 터널 증후군; 작열통; 중앙 통증 증후군; 중심성교뇌수초용해; 두부 장애; 대뇌 동맥류; 대뇌 동맥경화증; 대뇌 위축; 대뇌 거대증; 대뇌 마비; Charcot-Marie-Tooth 질환; 화학요법-유도된 신경병질 및 신경병증 통증; Chiari 변형; 무도병; 만성 염증성 탈수초화 다발신경병질; 만성통증; 만성 국부 통증 증후군; Coffin Lowry 증후군; 지속적인 발육 상태를 포함하는 혼수; 선천적 안면 양측마비; 피질기저 퇴화; 두개 동맥염; 두개골유합증; Creutzfeldt-Jakob 질환; 누적성 외상 장애; Cushing 증후군; 세포 거대 봉입체 질환; 사이토메갈로바이러스 감염; 춤추는 눈-춤추는 발증후군; Dandy-Walker 증후군; Dawson 질환; De Morsier 증후군; Dejerine-Klumke 마비; 치매; 피부근염; 당뇨성 신경병질; 미만성 경화증; 자율신경실조증; 난서증; 난독증; 긴장이상; 조기 유아 간질 뇌증; 빈 Sella 증후군; 뇌염; 뇌류(encephaloceles); 뇌삼차 신경성 혈관종증; 간질; Erb 마비; 본태성 진전증; Fabry's 질환; Fahr's 증후군; 기절; 가족성 강직성 마비; 열병 발작; Fisher 증후군; Friedreich 운동실조; 전두측엽 치매 및 기타 "타우병증"; Gaucher 질환; Gerstmann 증후군; 거대 세포 동맥염; 거대 세포 함유 질환; 구상세포 대뇌피질이영양증; Guillain-Barre 증후군; HTLV-1-관련된 골수증; Hallervorden-Spatz 질환; 두부 손상; 두통; 반측안면 경련증; 유전성 강직성 대마비; 유전성 다발성 신경염증 실조; 이성대상포진; 대상포진; Hirayama 증후군; HIV-관련된 치매 및 신경병질 (또는 AIDS의 신경성 현시); 전전뇌증; Huntington 질환 및 기타 폴리글루타민 반복 질환; 수두무뇌증; 물뇌증; 파콜리졸혈증; 혈중산소감소증; 면역-중재된 뇌척수염; 봉입체 근염; 색조 실조증; 영아 피틴산 축적 질환; 영아 레프슐 질환; 영아 경련; 염증성 근질환; 두개내 낭종; 두개내 고혈압; Joubert 증후군; Keams-Sayre 증후군; Kennedy 질환 Kinsbourne 증후군; Klippel Feil 증후군; Krabbe 질환; Kugelberg-Welander 질환; 쿠루병; Lafora 질환; Lambert-Eaton 근무력 증후군; Landau-Kleffner 증후군; 측면 수질 (Wallenberg) 증후군; 학습 장애; Leigh 질환; Lennox-Gustaut 증후군; Lesch-Nyhan 증후군; 백질이영양증; Lewy 몸통 치매; Lissencephaly; locked-in 증후군; Lou Gehrig 질환 (가령, 운동 신경 질환 또는 근위축성 척색 경화증); 요추간반 질환; Lyme 질환--신경 후유증; Machado-Joseph 질환; 큰뇌증; 거대뇌증; Melkersson-Rosenthal 증후군; Menieres 질환; 뇌막염; Menkes 질환; 이염백질이영양증; 소두증; 편두통; Miller Fisher 증후군; 미니-뇌졸증; 미토콘드리아 근병증; Mobius 증후군; 일지성 근위축증; 운동 신경 질환; Moyamoya 질환; 뮤코다당증; 다발경색 치매; 다병소성 운동 신경병질; 다발성 경화증 및 기타 탈수초화 장애; 체위성 저혈압과 다계통 위축증; p 근육 영양실조; 중증근육무기력증; 말이집탈락성 광범위 경화증; 유아의 근간대성 뇌병증; 근질환; 본태성 근긴장; 기면발작; 신경섬유종증; 신경이완성 악성 증후군; AIDS의 신경성 현시; 낭창의 신경 후유증; 신경근육긴장증; 신경 세로이드 리포푸신증; 신경이동 장애; Niemann-Pick 질환; O'Sullivan-McLeod 증후군; 후두 신경통; 구속성 척추 증후군; Ohtahara 증후군; 올리브교 소뇌 위축증; 안구간대경련-근간대경련; 시신경염; 기립성 저혈압; 과사용 증후군; 이상 감각; 신경퇴행성 질환 또는 장애 (Parkinson 질환, Huntington 질환, Alzheimer 질환, 근위축성 척색 경화증 (ALS), 치매, 다발성 경화증 그리고 신경 세포 사멸과 관련된 기타 질환 및 장애); 선천 이상근육근긴장; 중양연관 질환; 돌발발작; Parry Romberg 증후군; Pelizaeus-Merzbacher 질환; 주기적 마비; 말초 신경병질; 통증있는 신경병질 및 신경병증 통증; 지속적인 성장 상태; 전반적 발달 장애; 빛 재채기 반사; 피탄산 축적 질환; Pick 질환; 신경 압박; 뇌하수체 종양; 다발성근염; 공뇌증; 소아마비 증후군; 대상포진후 신경통; 감염후뇌척수염; 체위성 저혈압; Prader-Willi 증후군; 원발성 척색 경화증; 프리온 질환; 진행성 반얼굴 위축; 진행성 다초점 백색질뇌증; 진행성 경화회백질위축증; 진행성 핵상 마비; 가성뇌종양; Ramsay-Hunt 증후군 (유형 I 및 II); Rasmussen 뇌염; 반사성교감신경이영양증 증후군; Refsum 질환; 반복성 운동 장애; 반복성 스트레스 손상; 하지불안 증후군; 케트로바이러스-연관 골수증; Rett 증후군; Reye 증후군; Saint Vitus 댄스; Sandhoff 질환; Schilder 질환; 뇌갈림증; 중격-시신경 형성장애; 혼들린 아이 증후군; 대상포진; Shy-Drager 증후군; Sjogren 증후군; 수면 무호흡; Soto 증후군; 경련성 마비; 척추 파열; 척추 손상; 척추 종양; 척추 근위축; Stiff-Person 증후군; 발작; Sturge-Weber 증후군; 아급성 경화성 범뇌염; 피질하부 동맥경화성 뇌병; Sydenham 무도병; 실신; 척수공동증; 지연성 운동장애; Tay-Sachs 질환; 일시적 동맥염; 계류 척추 증후군; Thomsen 질환; 흉곽 출구 증후군; Tic Douloureux; Todd 마비; Tourette 증후군; 일파성 허혈 발작; 전염성 해면상뇌증; 횡단성 척추염; 외상성 뇌 손상; 진전; 삼차 신경통; 열대 경직 하반신 마비; 결절성 경화증; 맥관 치매 (다발-경색 치매); 일시적 동맥염을 포함하는 맥관염; Von Hippel-Lindau 질환; Wallenberg 증후군; Werdnig-Hoffman 질환; West 증후군; 편달; Williams 증후군; Wildon 질환; 그리고 Zellweger 증후군을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0057] "염증"은 전신 염증성 이상 및 단핵세포, 백혈구 및/또는 호중구의 이동 및 견인과 국소적으로 관련된 이상을 말한다. 염증의 예는 병원성 유기체(그람-양성 세균, 그람-음성 세포, 바이러스, 곰팡이 그리고 원생동물문 및 기생충과 같은 기생충을 포함)에 의한 감염, 이식 거부 (신장, 간, 폐, 또는 각막과 같은 고형 장기의 거부와

이식편대 숙주병(GVHD))을 포함한 골수 이식의 거부를 포함), 또는 국소화된 만성 또는 급성 자가면역 또는 알레르기 반응으로 인한 염증을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 자가면역 질환들은 급성 사구체신염; 류마티즘성 또는 반응성 관절염; 만성 사구체신염; 염증성 장 질환들 가령, Crohn 질환, 궤양성 결장염 그리고 괴사성 전장염; 과립구 주입 관련 증후군; 염증성 피부질환 가령, 접촉성 피부염, 아토피성 피부염, 건선; 전신 홍반성 루프스(SLE), 자가면역 갑상선염, 다발성 경화증, 그리고 일부 형태의 당뇨병 또는 환자의 자기 면역계의 공격에 의해 병인성 조직 파괴를 야기하는 임의의 기타 자가면역상태를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 알레르기 반응은 알레르기 천식, 만성 기관지염, 급성 그리고 지연된 과민성을 포함한다. 전신 염증성 질환 상태는 외상, 화상, 허혈후에 따른 재관류와 관련된 염증 (가령, 폐, 뇌, 내장 또는 말초 맥관에서 심근경색 및 발작을 포함하는 혈전증), 폐혈증, ARDS 또는 다발성 장기부전 증후군을 포함한다. 염증성 세포 모집은 또한 죽상경화성 플라크에서도 발생한다. 염증은 Non-Hodgkin 림프종, Wegener 육아종증, Hashimoto 갑상선염, 간세포 암종, 흉선 위축, 만성 췌장염, 류마티즘성 관절염, 반응성 림프 비후증, 골관절염, 궤양성 결장염, 유두상 암종, Crohn 질환, 궤양성 결장염, 급성 담낭염, 만성 담낭염, 간경변, 만성 타액선염, 복막염, 급성 췌장염, 만성 췌장염, 만성 위염, 자궁선근종, 자궁내막증, 급성 자궁경관염, 만성 자궁경관염, 림프 비후, 다발성 경화증, 특발성 혈소판 감소 자색반병에 후속되는 비대, 일차성 IgA 신증, 전신 홍반성 루프스, 건선, 폐기종, 만성 신우신염, 그리고 만성 방광염을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0058] ‘심혈관 질환 또는 장애’는 허혈을 일으킬 수 있는 또는 폐의 재관류에 의해 질환을 포함한다. 예로는 아데롬성 동맥경화증, 관상 동맥 질환, 육아종성 심근염, 만성 심근염 (비-육아종성), 일차성 비대성 심근증, 말초 동맥 질환 (PAD), 발작, 협심증, 심근 경색, 심장 마비에 의한 심혈관 조직 손상, 심폐 바이패스에 의한 심혈관 조직 손상, 심장 쇼크, 그리고 TNFR2 활성화와 관련된 조직 손상을 포함하는 당업계 숙련자에게 공지된 또는 폐 또는 맥관구조의 부전 또는 조직 손상과 관련된 이상을 포함하나 이에 한정되지 않는다. CVS 질환들은 아데롬성 동맥경화증, 육아종성 심근염, 심근 경색, 판 모양의 폐 질환에 부차적인 심근 섬유증, 경색없이 심근 섬유증, 일차성 비대성 심근증, 그리고 만성 심근염 (비-육아종증)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0059] 산화성 스트레스와 연관된 질환 또는 장애의 예로는 아데롬성동맥경화증, Parkinson 질환, 심부전, 심근경색, Alzheimer 질환, 만성 폐로 증후군, 근위축성 측색 경화증(ALS), 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 다발성 경화증, 간질환 또는 장애, 위장 질환 또는 장애, 당뇨병, 암, 자가면역, 면역 관련된 질환 또는 장애, 신경 질환 또는 장애, 신경퇴행성 질환 또는 장애, 신경 복구 및 마비, 신경내분비 분화, 염증성 질환, 근육 질환 또는 장애, 감염 유기체 관련된 질환 또는 장애, 그리고 이와 유사한 것들을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

#### 폴리뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드 조성물 및 분자들

[0061] 표적: 한 구체예에서, 표적은 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)와 연합된 센스 및/또는 안티센스 네코딩 및/또는 코딩 서열들을 포함하나 이에 한정되지 않는 TNFR2의 핵산 서열들을 포함한다.

[0062] 종양 괴사 인자 (TNF)는 몇 가지 급성 및 만성 질환, 특히 류마티스성 관절염 및 Morbus Crohn과 원인적으로 연관된 두드러진 주로 사전염증(proinflammatory) 매개물질(mediator)이다. 상향조절된 TNF 발현은 대뇌 말라리아, AIDS 치매, Alzheimer 질환, 다발성 경화증 또는 발작과 같은 다양한 신경퇴행성 질환에서 발견되는데, 이러한 질환들에서 TNF의 병인적 역할을 암시한다. 막은 TNF 수용체 (TNFR1 및 TNFR2) 모두를 통하여 TNF 신호 형을 발현하는데, 반면 가용성 TNF -막 형으로부터 단백질분해에 의해 절단된 TNFR1을 통하여 주로 활동한다. 사전 그리고 항-아폽토시스 세포 반응을 유도하는, TNFR1을 포함하는 사멸 도메인으로부터 개시되는 신호 경로가 상세하게 연구되었다. 대조적으로, TNFR2를 통하여 전적으로 개시되는 신호 경로 및 세포 반응에 대한 분자 기전에 대해서는 정보가 적다.

[0063] CD120 (분화 120의 클러스트)은 종양 괴사 인자 수용체 (TNFR)로도 알려져 있다. 이 단백질은 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼페밀리의 구성원이다. 별도 유전자에 의해 각각 인코드되는 수용체의 두 개 변이체가 있다: CD120a - TNFR1 TNFRSF1A 및 CD120b - TNFR2 - TNFRSF1B.

[0064] TNF- $\alpha$ 는 세포에서 독립적으로 작업하지 않고, 두 가지 수용체, TNF 수용체 슈퍼페밀리, 구성원 1A (TNFRSF1A 또는 p55/p60) 및 TNF 수용체 슈퍼페밀리, 구성원 1B (TNFRSF1B/TNFR2, TNFR이라고도 함, p75/p80)에 결합을 통하여 작업한다. TNFRSF1B/TNFR2는 더 큰 수용체이며, 많은 세포 유형에 존재하고, 그리고 자극된 T 및 B 림프구에서 강력하게 발현된다. TNFRSF1B는 TNF- $\alpha$ 가 TNFRSF1A에 결합하는 것을 조절하여, 전사 인자, 핵 인자-kappa B (NF- $\kappa$ B)의 작용을 자극하는데 필요한 TNF- $\alpha$  수준을 조절할 수 있다. TNFRSF1B의 유전자는 염색체 1p36.3-p36.2에 위치하며, 이는 기준에 확인된 IBD 감수성(susceptibility) 좌, IBD7과 일치한다.

- [0065] 종양 괴사 인자 수용체 (TNFR) 패밀리의 구성원들은 램프구 활성화 조절에 다양한 역할을 한다. B 세포 활성화를 위한 중요한 TNFR 패밀리 구성원은 CD40이다. CD40 신호는 B 세포 TNF-알파 분비를 촉진시키고, 그 다음 TNFR2 (CD120b)를 통하여 B 세포 활성화를 강화시키는 신호를 보낸다. 전(pro)-아펩토시스 및 전(pro)-염증성 수용체 TNFR1 (CD120a)의 기능이 많은 연구의 주제이기는 하지만, 세포 활성화에 대한 CD120b의 명확한 기여 및 어떻게 하류 사건들을 자극하는지에 대해서는 잘 모르고 있다. 종양 괴사 인자 수용체 패밀리의 구성원들은 신호발생동안 다양한 세포질 어댑터 단백질 패밀리의 구성원, 종양 괴사 인자 수용체 연합된 인자(TRAFFs)에 결합한다. CD40 및 CD120b는 리간드 자극시 TNF 수용체 연합된 인자 2 (TRAF2)에 결합한다.
- [0066] TNFRSF1B/TNFR2에서 단일 뉴클레오티드 다형(SNPs)은 또한 류마티스성 관절염, 전신 홍반성 루프스, 및 Crohn 질환 (CD)을 포함하는 다수의 자가면역 질환 위험을 조절할 수 있다.
- [0067] 바람직한 구체예들에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 TNFR2 패밀리 구성원과 연합된 질환 또는 장애를 예방하고 또는 치료하는데 이용한다. 안티센스 화합물을 이용하여 수득된 줄기 세포로부터 재생된 세포/조직으로 치료될 수 있는 예시적인 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 매개된 질환 및 장애는 다음을 포함한다: 암, 세포 증식과 관련된 또는 이를 특징으로 하는 질환 또는 이상, TNFRSF1B/TNFR2의 돌연변이 또는 이상 발현 또는 기능 이상과 연합된 질환 또는 장애, 신경 질환 또는 장애, 자가면역 질환 또는 장애, 면역계 관련된 질환 또는 장애, 염증성 장 질환, 다유전적 감수성(polygenic susceptibility)을 가진 만성 염증 상태(가령, Crohn 질환, 궤양성 대장염 등), 과도한 사이토킨 활성과 연관된 질환 또는 이상, 악액질, 간 질환, 신장 질환 (가령, 사구체신염, 급성 신장 이식 거부, 급성 관 괴사 등), 심혈관 질환 또는 장애, 허혈-증개된 동맥신생 및 혈관신생, 산화성-스트레스, 염증, 대뇌 말라리아, 염증 연합된 질환, 장애 또는 상태(가령, 류마티스성 관절염, 건선 및 건선성 관절염, Crohn 질환, 궤양성 대장염, 만성 염증-유도된 결장 상피 변형 등).
- [0068] 바람직한 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 넌코딩 부분을 포함한 TNFR2의 폴리뉴클레오티드에 특이적이나, 이에 국한되지 않는다. TNFR2 표적은 TNFR2의 변이체들; SNP를 포함하는 TNFR2의 돌연변이체들; TNFR2의 넌코딩 서열들; 대립유전자들, 단편들 그리고 이와 유사한 것을 포함한다. 바람직하게는 올리고뉴클레오티드는 안티센스 RNA 분자다.
- [0069] 본 발명의 구체예에 따르면, 표적 핵산 분자는 TNFR2 폴리뉴클레오티드 단독에 국한되지 않고, TNFR2의 동소체, 수용체, 상동체들, 넌-코딩 구역 및 상동체들, 그리고 이와 유사한 것 중 임의의 것까지 확장된다.
- [0070] 또 다른 바람직한 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 변이체들, 대립유전자들, 상동체들, 돌연변이체들, 유도체들, 단편들 및 상보성 서열들을 포함하나 이에 한정되지 않는 TNFR2 표적의 자연적 안티센스 서열(코딩 및 넌-코딩 구역에 자연적 안티센스)을 표적으로 한다. 바람직하게는 올리고뉴클레오티드는 안티센스 RNA 또는 DNA 분자이다.
- [0071] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 올리고머 화합물들은 이 화합물에 있는 하나 이상의 뉴클레오티드 위치에서 상이한 염기가 존재하는 변이체들도 포함한다. 예를 들면, 첫번째 뉴클레오티드가 아데닌이라면, 변이체들은 이 위치에 티미딘, 구아노신, 시티딘 또는 이 위치에 있는 기타 천연 또는 비-천연 뉴클레오티드를 포함하도록 만들어질 수 있다. 안티센스 화합물의 임의의 위치에서 일어날 수 있다. 그 다음 이를 화합물은 표적 핵산의 발현을 억제하는 이들 능력을 측정하기 위하여 여기에서 설명된 방법에 의해 테스트된다.
- [0072] 일부 구체예에서, 안티센스 화합물과 표적 사이에 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 50% 내지 약 60%이다. 일부 구체예에서, 안티센스 화합물과 표적 사이에 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 60% 내지 약 70%이다. 일부 구체예에서, 안티센스 화합물과 표적 사이에 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 70% 내지 약 80%이다. 일부 구체예에서, 안티센스 화합물과 표적 사이에 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 80% 내지 약 90%이다. 일부 구체예에서, 안티센스 화합물과 표적 사이에 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 90%, 약 92%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100%이다.
- [0073] 안티센스 화합물은 화합물이 표적 핵산에 결합하여 표적 핵산의 정상적인 기능을 간섭하여 활성을 잃게 만들 때 특이적으로 하이브리드 가능하며, 그리고 특이적 결합이 바람직한 조건들하에서 안티센스 화합물이 비-표적 핵산 서열에 비-특이적 결합을 피할 수 있도록 충분한 상보성이 있다. 이와 같은 조건은 생체내 분석 또는 치료 요법적 처리의 경우 생리학적 조건, 그리고 분석이 시험관 분석의 경우에 실시되는 조건 등을 포함한다.
- [0074] DNA, RNA, 키메라, 치환된 등의 안티센스 화합물은 표적 DNA 또는 RNA 분자에 화합물이 특이적으로 결합하여 표적 DNA 또는 RNA의 정상적인 기능을 간섭하여, 활성을 잃게 만들 때 특이적으로 하이브리드 가능하며, 그리고 특이적 결합이 바람직한 조건들하에서 안티센스 화합물이 비-표적 핵산 서열에 비-특이적 결합을 피할 수 있도록

충분한 상보성이 있고, 이와 같은 조건은 생체내 분석 또는 치료요법적 처리의 경우 생리학적 조건, 그리고 분석이 시험관 분석의 경우에 실시되는 조건 등을 포함한다.

[0075] 또 다른 바람직한 구체예에서, 예를 들면, PCR, 하이브리드화 등을 이용하여 확인되고, 확장된, 서열 번호: 2 및 3에서 제시된 하나 이상의 서열, 그리고 이와 유사한 것인 안티센스 서열을 포함하나 이에 한정되지 않는 TNFR2의 표적화는 TNFR2의 기능 또는 발현을 조절한다. 한 구체예에서, 기준과 비교하였을 때, 발현 또는 기능은 상향 조절된다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 기준과 비교하였을 때, 발현 또는 기능은 하향 조절된다.

[0076] 또 다른 바람직한 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 PCR, 하이브리드화 등을 이용하여 확인되고, 확장된 안티센스 서열들을 포함하는, 서열 번호: 4 내지 10에서 제시된 핵산 서열들을 포함한다. 이를 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드, 더 짧은 또는 더 긴 단편들, 변형된 결합 그리고 이와 유사한 것을 포함할 수 있다. 변형된 결합 또는 뉴클레오티드간 링키지의 예는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 또는 이와 유사한 것을 포함한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 뉴클레오티드는 인(phosphorus) 유도체이다. 본 발명의 변형된 올리고뉴클레오티드내 슈가 또는 슈가 유사 모이어티에 부착될 수 있는 인 유도체 (또는 변형된 인산염 기)는 일인산염, 이인산염, 삼인산염, 알킬인산염, 알칸인산염, 포스포로티오에이트 그리고 이와 유사한 것이 될 수 있다. 상기 명시된 인산염 유사체의 준비 및 뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드로의 결합은 당분야에 공지되어 있기 때문에, 여기에서 설명할 필요는 없다.

[0077] 안티센스의 특이성 및 감응도는 치료 용도로 당업자에 의해 이용된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 동물 및 사람에게서 질병 상태를 치료하는 치료 모이어티로 이용될 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 인간에게 안전하고 효과적으로 투여되었으며, 여러 임상 시도가 현재 진행중이다. 따라서 올리고뉴클레오티드는 세포, 조직, 동물 특히, 인간의 치료를 위한 치료 섭생에 유용하도록 설정될 수 있는 유용한 치료요법적 형태가 될 수 있다.

[0078] 본 발명의 구체예에서, 올리고머 안티센스 화합물, 특히 올리고뉴클레오티드는 표적 핵산 분자들에 결합하고, 표적 유전자에 의해 인코드된 분자들의 발현 및/또는 기능을 조절한다. 간섭되는 RNA의 기능은 예를 들면, 복제 및 전사를 포함한다. 간섭되는 RNA의 기능은 예를 들면, RNA를 단백질 해독 부위로 전위, RNA로부터 단백질 해독, 하나 이상의 mRNA 종을 만들기 위한 RNA의 접합 및 RNA가 관여하거나 RNA에 의해 실시될 수 있는 촉매 활성과 같은 모든 중요한 기능을 포함한다. 기능은 원하는 기능에 따라 상향-조절되거나 억제될 수 있다.

[0079] 상기 안티센스 화합물들은 안티센스 올리고머 화합물, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 외부 유도 서열 (EGS) 올리고뉴클레오티드, 선택적 스플라이스, 프라이머, 프로브, 및 표적 서열의 최소한 일부에 하이브리드되는 다른 올리고머 화합물을 포함한다. 이와 같이, 이를 화합물들은 단일-가닥, 이중-가닥, 부분적으로 단일-가닥, 또는 원형 올리고머 화합물의 형태로 도입될 수 있다.

[0080] 본 발명의 내용에서 특정 핵산 분자에 안티센스 화합물의 표적화는 다단계 프로세스가 될 수 있다. 이 프로세스는 통상적으로 기능이 조절되는 표적 핵산의 확인으로 시작된다. 이 표적 핵산은 예를 들면, 유전자의 발현이 특정 질환 또는 질병 상태와 연관된 세포 유전자(또는 이 유전자로부터 전사된 mRNA) 또는 감염성 물질의 핵산 분자가 될 수 있다. 본 발명에서 표적 핵산은 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)를 인코드한다.

[0081] 표적화 프로세스는 가령, 발현의 조절과 같은 원하는 효과를 얻기 위하여 안티센스 상호작용을 위하여 표적 핵산 내 최소한 하나의 표적 구역, 단편 또는 부위의 결정을 통상적으로 포함한다. 본 발명의 내용에서, 용어 "구역(region)"은 최소한 한 가지 확인가능한 구조, 기능 또는 성질을 가지는 표적 핵산의 일부로 정의된다. 표적 핵산의 구역내에 단편이 있다. 단편(Segments)은 표적 핵산 내에 구역의 더 작은 또는 하위 부분으로 정의된다. 본 발명에서 사용된 부위(Sites)는 표적 핵산내에 위치로 정의된다.

[0082] 바람직한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 천연 안티센스 서열들에 결합하고, 그리고 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)(서열 번호: 1)의 발현 및/또는 기능을 조절한다. 안티센스 서열들의 예로 서열 번호: 2 내지 10을 포함한다.

[0083] 또 다른 바람직한 구체예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 단편에 결합하고, 그리고 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 발현 및/또는 기능을 조절한다. 상기 단편들은 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 센스 또는 안티센스 폴리뉴클레오티드의 최소한 5개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다.

[0084] 또 다른 바람직한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 천연 안티센스 서열들에 특이적이며, 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 천연 안티센스 서열들에 올리고뉴클레오티드가 결

합하여 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 발현 및/또는 기능이 조절된다.

[0085] 또 다른 바람직한 구체예에서, 올리고뉴클레오티드 화합물은 서열 번호: 4 내지 10에서 제시된 서열들을 포함하는데, 이의 안티센스 서열들은 예를 들면, PCR, 하이브리드화 등을 이용하여 확인되고 연장된다. 이들 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드, 더 짧은 또는 더 긴 단편들, 변형된 결합 그리고 이와 유사한 것을 포함한다. 변형된 결합 또는 뉴클레오티드간 링키지의 예는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 또는 이와 유사한 것을 포함한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 뉴클레오티드는 인 유도체를 포함한다. 본 발명의 변형된 올리고뉴클레오티드내에 슈가 또는 슈가 유사체 모이어티에 부착될 수 있는 인 유도체 (또는 변형된 인산염 기)는 일인산염, 이인산염, 삼인산염, 알킬인산염, 알칸인산염, 포스포로티오에이트 그리고 이와 유사한 것이 될 수 있다. 상기 명시된 인산염 유사체의 준비 및 뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드으로의 결합은 당분야에 공지되어 있기 때문에, 여기에서 설명할 필요는 없다.

[0086] 당분야에 공지된 것과 같이, 해독 개시 코돈은 일반적으로 5'-AUG (전사된 mRNA 분자들에서; 대응하는 DNA 분자에서는 5'-ATG)이기 때문에, 해독 개시 코돈은 "AUG 코돈" "시작 코돈" 또는 "AUG 시작 코돈"으로 지칭되기도 한다. 소수의 유전자는 RNA 서열 5'-GUG, 5'-UUG 또는 5'-CUG을 가지는 해독 개시 코돈을 가지며; 그리고 5'-AUA, 5'-ACG 및 5'-CUG는 생체에서 기능을 하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 각 경우에 시작 아미노산은 일반적으로 메티오닌(진핵세포의 경우) 또는 포르밀메티오닌(원핵생물의 경우)이지만, 용어 "해독 개시 코돈" 및 "시작 코돈"은 많은 코돈 서열들을 포함할 수 있다. 진핵생물 및 원핵생물 유전자는 두 개 이상의 대체 시작 코돈을 가지는데, 이들중 임의의 것이 특정 세포 유형 또는 조직에서, 또는 특정 조건하에서 해독 개시에 선호적으로 이용될 수 있다. 본 발명의 내용에서, "시작 코돈" 및 "해독 개시 코돈"은 코돈의 서열과 무관하게, 종양 괴사 인자 2(TNFR2)를 인코드하는 유전자로부터 전사된 mRNA의 해독을 생체내에서 개시하는데 이용되는 코돈을 지칭한다. 유전자의 해독 종료 코돈 (또는 "중지 코돈")은 다음 세 개 서열중 하나를 가질 수 있다; 5'-UAA, 5'-UAG 및 5'-UGA (대응하는 DNA 서열들은 차례로 각각 5'-TAA, 5'-TAG 및 5'-TGA이다).

[0087] 용어 "시작 코돈 구역" 및 "해독 개시 코돈 구역"은 해독 개시 코돈으로부터 임의의 방향(가령, 5' 또는 3')으로 약 25 내지 약 50 개의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 mRNA 또는 유전자의 일부분을 지칭한다. 유사하게, 용어 "중지 코돈 구역" 및 "해독 종료 코돈 구역"은 해독 종료 코돈으로부터 어느 방향이건(5' 또는 3') 약 25개 내지 약 50개 연속 뉴클레오티드를 포함하는 mRNA 또는 유전자의 일부분을 말한다. 결과적으로, "시작 코돈 구역" (또는 "해독 개시 코돈 구역") 및 "중지 코돈 구역" (또는 "해독 종료 코돈 구역")은 본 발명의 안티센스 화합물에 효과적으로 표적화되는 모든 구역이다.

[0088] 오픈 리딩 프레임(ORF) 또는 해독 개시 코돈과 해독 종료 코돈 사이에 구역을 말하는 것으로 당분야에 공지된 "코딩 구역"은 효과적으로 표적화될 수 있는 구역이다. 본 발명의 내용 범위내에서, 표적화된 구역은 유전자의 오픈 리딩 프레임(ORF)의 해독 개시 또는 종료 코돈을 포함하는 유전자내 구역이다.

[0089] 또 다른 표적 구역은 해독 개시 코돈으로부터 5' 방향으로 mRNA의 일부분을 지칭할 때 당분야에서 공지된 5' 무해독 구역(5'UTR)을 포함하면, 따라서 5' 캡 부위와 mRNA의 해독 개시 코돈 사이에 뉴클레오티드(또는 이 유전자에서 상응하는 뉴클레오티드)도 포함된다. 또 다른 표적 구역은 해독 종료 코돈으로부터 3' 방향으로 mRNA의 일부분을 지칭하는 것으로 당분야에서 공지된 3' 무해독 구역(3'UTR)을 포함하면, 따라서 해독 종료 코돈과 mRNA의 3' 말단 사이에 뉴클레오티드(또는 이 유전자에서 상응하는 뉴클레오티드)도 포함된다. mRNA의 5' 캡 부위는 5'-5' 삼인산염 링키지를 통하여 mRNA의 5'-최말단 잔기에 결합된 N7-메틸화된 구아노신 잔기를 포함한다. mRNA의 5' 캡 구역은 5' 캡 구조 뿐만 아니라 캡 부위에 인접한 첫 50개 뉴클레오티드를 포함하는 것으로 간주된다. 본 발명에 적합한 또 다른 표적 구역은 5' 캡 구역이다.

[0090] 일부 진핵 mRNA 전사체는 바로 해독되며, 많은 것들은 "인트론"이라고 공지된 하나 이상의 구역을 포함하는데, 이는 해독되기 전에 전사체로부터 잘려나간다. 나머지(그리고 따라서 해독된) 구역들은 "엑손"으로 알려져 있으며, 함께 접목되어, 연속 mRNA를 형성한다. 한 구체예에서, 접목 부위 가령, 인트론-엑손 접합 또는 엑손-인트론 접합 부위를 표적화하는 것은 질병에 이상 접합이 연관되거나 또는 특정 접합 산물의 과다 생산이 질병과 연관되는 상황에서 특히 유용하다. 재배열 또는 결손으로 인한 이상 융합 접합은 표적 부위의 또 다른 구체예다. 상이한 유전자 소스로부터 두 개(또는 그 이상)의 mRNA의 접합 프로세스를 통하여 생산된 mRNA 전사체는 "융합 전사체"로 공지되어 있다. 인트론은 예를 들면, DNA 또는 pre-mRNA를 표적으로 하는 안티센스 화합물을 이용하면 효과적으로 표적화될 수 있다.

[0091] 또 다른 바람직한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 표적 폴리뉴클레오티드의 코딩 및/또는 넌-코딩 구역에 결합하여, 표적 분자의 발현 및/또는 기능을 조절한다.

- [0092] 또 다른 바람직한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 천연 안티센스 폴리뉴클레오티드에 결합하여, 표적 분자의 발현 및/또는 기능을 조절한다.
- [0093] 또 다른 바람직한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 센스 폴리뉴클레오티드에 결합하여, 표적 분자의 발현 및/또는 기능을 조절한다.
- [0094] 대체(alternative) RNA 전사체는 DNA의 동일한 계놈 구역으로부터 만들어질 수 있다. 이와 같은 대체 전사체들은 일반적으로 "변이체들"로 알려져 있다. 좀더 특이적으로, "pre-mRNA 변이체들"은 동일한 계놈 DNA로부터 생산되지만, 동일한 계놈 DNA로부터 만들어진 다른 전사체와 이들의 시작 또는 중지 위치에서 상이하며, 인트론 및 엑손 서열을 모두 포함하고 있는 전사체다.
- [0095] 접합 동안 하나 이상의 엑손 또는 인트론 구역 또는 이의 일부분을 잘라낼 때, pre-mRNA 변이체들은 더 작은 "mRNA 변이체들"을 만든다. 결과적으로, mRNA 변이체들은 pre-mRNA 변이체들로 프로세스되고, 각 독특한 pre-mRNA 변이체들은 접합의 결과로 독특한 mRNA 변이체를 항상 만들어낸다. 이와 같은 mRNA 변이체들은 또한 "대체 접합 변이체들"로 공지되어 있다. pre-mRNA 변이체의 접합이 발생되지 않는다면, pre-mRNA 변이체는 mRNA 변이체와 동일하게 된다.
- [0096] 변이체들은 전사의 시작 또는 중지에 대한 대체 신호를 이용하여 만들어질 수 있다. Pre-mRNAs 및 mRNAs는 하나 이상의 시작 코돈 또는 중지 코돈을 보유할 수 있다. 대체 시작 코돈을 이용하는 pre-mRNA 또는 mRNA으로부터 기인된 변이체들은 pre-mRNA 또는 mRNA의 "대체 시작 변이체들"로 공지되어 있다. 대체 중지 코돈을 이용하는 이들 전사체들은 pre-mRNA 또는 mRNA의 "대체 중지 변이체들"로 공지되어 있다. 대체 중지 변이체중 한 가지 특정 유형은 "polyA 변이체"이며, 만들어진 다중 전사체들은 전사 기전에 의해 "polyA 중지 신호" 중 하나의 대체 선택하고, 따라서, 독특한 polyA 부위에서 종료된 전사체를 만들도록 생성된 것이다. 본 발명의 내용 범위에서, 여기에서 설명된 변이체들의 유형이 표적 핵산의 구체예이기도 하다.
- [0097] 안티센스 화합물이 하이브리드되는 표적 핵산 상의 위치는 활성 안티센스 화합물이 표적으로 하는 표적 구역의 최소한 5개 길이의 뉴클레오티드 부분으로 정의된다.
- [0098] 특정 예시적인 표적 단편들의 특이적 서열이 여기에서 제시되어 있지만, 당업자는 이들은 본 발명의 범위내에서 특정 구체예를 설명하고, 묘사하기 위함이라는 것을 인지할 것이다. 추가적인 표적 단편들은 본 내용을 근거하여 당업자들이 용이하게 인지할 수 있다.
- [0099] 설명된 바람직한 표적 단편으로부터 선택된 최소한 5개 길이의 연속 뉴클레오티드 스트레치를 포함하는 길이가 5-100개 뉴클레오티드 표적 단편들은 표적화에 적합한 것으로 간주된다.
- [0100] 표적 단편은 설명된 바람직한 표적 단편의 5'-말단으로부터 최소한 5개 연속 뉴클레오티드(나머지 뉴클레오티드는 표적 단편의 5' 말단의 바로 상류에서 시작하고, DNA 또는 RNA가 약 5 내지 약 100개 뉴클레오티드를 포함할 때 까지 연속되는 동일한 DNA 또는 RNA의 연속 스트레치다)를 포함하는 DNA 또는 RNA 서열들을 포함할 수 있다. 유사하게, 바람직한 표적 단편은 바람직한 표적 단편의 3'-말단으로부터 최소한 5개 연속 뉴클레오티드(나머지 뉴클레오티드는 표적 단편의 3' 말단의 바로 하류에서 시작하고, DNA 또는 RNA가 약 5 내지 약 100개 뉴클레오티드를 포함할 때 까지 연속되는 동일한 DNA 또는 RNA의 연속 스트레치다)를 포함하는 DNA 또는 RNA 서열들을 포함할 수 있다. 표적 단편을 갖춘 기술 분야에 당업자는 과도한 실험없이 추가적으로 바람직한 표적 단편을 확인할 수 있을 것이다.
- [0101] 하나 이상의 표적 구역, 단편 또는 부위가 확인되었다면, 표적에 충분한 상보성을 가진, 가령, 충분히 잘 하이브리드되고, 원하는 효과를 제공하기 위하여 충분한 특이성을 가진 안티센스 화합물이 선택된다.
- [0102] 본 발명의 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 특정 표적의 안티센스 가닥에 결합한다. 올리고뉴클레오티드는 길이가 최소한 5개 길이의 뉴클레오티드이며, 그리고 표적 뉴클레오티드의 전체 길이를 수용하도록 합성하기 위하여, 서열들을 중첩되는 각 올리고뉴클레오티드 표적이 되도록 합성될 수 있다. 표적은 또한 코딩 뿐만 아니라 네-코딩 구역을 포함한다.
- [0103] 한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드에 의해 특정 핵산을 표적하는 것이 바람직하다. 특정 핵산에 안티센스 화합물의 표적화는 다단계 프로세스다. 프로세스는 기능이 조절되는 핵산 서열의 확인으로 통상적으로 시작된다. 이는 예를 들면, 유전자의 발현이 특정 질환 또는 질환 상태와 연관되는 세포 유전자(또는 이 유전자로부터 전사된 mRNA), 또는 네코딩 RNA(ncRNA)와 같은 네코딩 폴리뉴클레오티드가 될 수 있다.
- [0104] RNAs는 (1) 메신저 RNAs (mRNAs), 이는 단백질로 해독되며, 및 (2) 단백질-네코딩 RNAs (ncRNAs)로 분류될 수

있다. ncRNAs는 마이크로RNAs, 안티센스 전사체 및 고밀도의 중지 코돈을 포함하며, 임의의 광범위한 “오픈리딩 프레임”이 부족한 다른 전사 단위 (TU)를 포함한다. 많은 ncRNAs는 단백질-코딩 좌의 3' 무해독 구역 (3'UTRs)에서 개시 부위로부터 시작되는 것으로 보인다. ncRNAs는 아주 드물고, FANTOM 협회에 의해 서열화된 ncRNA의 최소한 절반은 폴리아데닐화되지 않는 것으로 간주된다. 대부분의 조사자들은 분명한 이유로 프로세스되고, 세포질로 배출된 폴리아데닐화된 mRNA에 초점을 맞추고 있다. 최근, 폴리아데닐화안된 핵 RNA 세트는 매우 크고, 이와 같은 전사체중 많은 것들은 소위 인터진(intergenic) 구역에서 생성된다. ncRNAs가 유전자 발현을 조절할 수 있는 기전은 표적 전사체와의 염기쌍에 의한 것이다. 염기쌍에 의해 기능을 하는 RNA는 (1) 동일한 유전적 위치에서, 그러나 이들이 작용하는 RNA에 반대 가닥상에서 인코드되어, 이를 표적에 대해 완벽한 상보성을 나타내는 *cis*-인코드된 RNAs, 및 (2) 이들이 작용하는 RNA와는 별개의 염색체 위치에서 인코드되며, 표적과 완벽한 염기쌍을 일반적으로 나타내지 않는 *trans*-인코드된 RNAs로 분류될 수 있다.

[0105]

이론에 구애되지 않고, 여기에서 설명되는 안티센스 올리고뉴클레오티드에 의한 안티센스 폴리뉴클레오티드의 혼란은 상응하는 센스 메신저 RNA의 발현을 변경시킬 수 있다. 그러나, 이와 같은 조절은 부조화적 (discordant)(안티센스 녹다운은 메신저 RNA 상승을 초래한다) 또는 조화적(concordant)(안티센스 녹다운은 수반되는 메신저 RNA 감소를 초래한다)이다. 이와 같은 경우에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 안티센스 전사체의 중첩 또는 중첩되지 않는 부위로 표적화되어, 표적의 녹다운 또는 제거를 초래할 수 있다. 코딩 뿐만 아니라 넌-코딩 안티센스는 동일한 방식으로 표적화될 수 있으며, 그리고 어느 쪽이든 조화 또는 비조화 방식으로 상응하는 센스 전사체를 조절할 수 있다. 표적에 대항하여 이용되는 새로운 올리고뉴클레오티드를 확인하는데 사용되는 전략은 안티센스 올리고뉴클레오티드에 의한 안티센스 RNA 전사체의 녹다운 또는 원하는 표적을 조절하는 임의의 다른 수단에 기초될 수 있다.

[0106]

전략 1: 부조화적인 조절의 경우, 안티센스 전사체의 녹다운은 통상적(센스) 유전자의 발현을 상승시킨다. 후자 유전자가 공지의 또는 가상 약물 표적에 인코드한다면, 이의 안티센스 반대편의 녹다운은 수용체 항진 또는 효소 자극물질의 작용을 의식적으로 모방할 수 있다.

[0107]

전략 2: 조화적 조절의 경우, 안티센스 및 센스 전사체 모두 동시에 녹다운 시킬 수 있어, 통상의(센스) 유전자 발현의 상승적 감소를 얻을 수 있다. 예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 녹다운을 얻는데 이용된다면, 이 전략은 센스 전사체를 표적으로 하는 하나의 안티센스 올리고뉴클레오티드, 그리고 상응하는 안티센스 전사를 표적으로 하는 또 다른 안티센스 올리고뉴클레오티드, 또는 중첩 센스 및 안티센스를 동시에 표적으로 하는 단일 대칭적 안티센스 올리고뉴클레오티드에 적용할 수 있다.

[0108]

본 발명에 따르면, 안티센스 화합물들은 안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임, 외부 유도 서열 (EGS) 올리고뉴클레오티드, siRNA 화합물, 단일 또는 이중-가닥 RNA 간섭 (RNAi) 화합물, 가령 siRNA 화합물, 그리고 표적 핵산의 최소한 일부분에 하이브리드하여, 이의 기능을 조절하는 기타 올리고머 화합물들을 포함한다. 이와 같이, 안티센스 화합물들은 DNA, RNA, DNA-like, RNA-like, 또는 이의 혼합물이 될 수 있거나, 또는 하나 이상의 상기 것들의 모방체가 될 수 있다. 이들 화합물은 단일-가닥, 이중-가닥, 원형 또는 헤어핀 올리고머 화합물이 될 수 있으며, 그리고, 내부에 또는 말단이 중배(bulges), 미스매치 또는 루프와 같은 구조적 요소를 포함할 수 있다. 안티센스 화합물은 선형으로 준비될 수 있지만, 결합되거나 원형 및/또는 분지형으로 준비될 수 있다. 안티센스 화합물은 두 가닥이 하이브리드되어 전체적으로 또는 부분적으로 이중-가닥 화합물을 형성하거나 또는 하이브리드화를 허용하고, 전체적으로 또는 부분적으로 이중-가닥 화합물의 형성을 위하여 충분히 자가-상보성을 가진 단일 가닥과 같은 구조체를 포함할 수 있다. 상기 두 개 가닥이 서로 자유 3' 또는 5' 말단을 남기고 내부적으로 연결되거나 또는 연속적인 헤어핀 구조 또는 루프를 형성하도록 연결될 수 있다. 헤어핀 구조는 단일 가닥 특징으로 된 연장부를 만드는 5' 또는 3' 말단 상에 오버행(overhang)을 포함할 수 있다. 이러한 이중 가닥의 화합물은 선택적으로 양단에 오버행을 포함할 수 있다. 추가 변형은 말단, 선택된 뉴클레오티드 위치, 슈가 위치중 하나에 부착된, 또는 뉴클레오티드간 링키지 중 하나에 부착된 콘쥬게이트 군을 포함할 수 있다. 대안으로, 두 개 가닥은 비-핵산 모이어티 또는 링커 군을 통하여 링크될 수 있다. 한 개 가닥으로부터 형성된 경우, dsRNAs는 듀플렉스를 형성하기 위하여 자체에 둘로 접히는 자가-상보성 헤어핀 유형 분자의 형태를 취할 수 있다. 따라서, dsRNAs는 완전히 또는 부분적으로 이중 가닥이 될 수 있다. 유전자 발현의 특이적 조절은 유전자전이 세포계에서 dsRNA 헤어핀의 안정적 발현에 의해 이루어질 수 있지만, 그러나, 일부 구체예에서, 유전자 발현 또는 기능은 상향 조절된다. 두 개 가닥으로부터 형성될 때, 또는 듀플렉스를 형성하기 위하여 자체에 둘로 접히는 자가-상보성 헤어핀 유형 분자의 형태를 취하는 단일 가닥의 경우, 두 개 가닥(또는 단일 가닥의 듀플렉스 형성 구역)은 Watson-Crick 방식으로 염기쌍을 이루는 상보성 RNA 가닥이다.

[0109]

일단 시스템내로 도입되면, 본 발명의 화합물들은 표적 핵산의 절단 또는 다른 변형을 얻기 위하여 하나 이상의

효소 또는 구조적 단백질의 작용을 유도하거나 또는 점유-기반 기전(occupancy-based mechanisms)을 통하여 작용할 수 있다. 일반적으로, 핵산(올리고뉴클레오티드를 포함)은 "DNA-like" (가령, 하나 이상의 2'-데옥시 슈가를 가지고, 그리고 U 염기 대신 일반적으로 T를 가짐) 또는 "RNA-like" (가령, 하나 이상의 2'-하이드록시 또는 2'-변형된 슈가를 가지고, 그리고 T 염기 대신 U 염기를 일반적으로 가짐)으로 설명될 수 있다. 핵산 헬릭스는 한 가지 이상의 구조 유형을 채택할 수 있지만, 가장 흔하게는 A- 및 B-형이 된다. 일반적으로, B-형-유사 구조를 가지는 올리고뉴클레오티드는 "DNA-like"이며, 그리고 A-형-유사 구조를 가지는 올리고뉴클레오티드는 "RNA-like"이다. 일부(키메라) 구체예에서, 안티센스 화합물은 A- 및 B-형 구역을 포함한다.

[0110] 또 다른 바람직한 구체예에서, 바람직한 올리고뉴클레오티드 또는 안티센스 화합물은 최소한 하나의 안티센스 RNA, 안티센스 DNA, 키메라 안티센스 올리고뉴클레오티드, 변형된 링키지를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 간섭 RNA (RNAi), 짧은 간섭 RNA (siRNA); 마이크로, 간섭 RNA (miRNA); 작은, 일시적, RNA (stRNA); 또는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA); 작은 RNA-유도된 유전자 활성(RNAa); 작은 활성화 RNAs (saRNAs), 또는 이의 조합을 포함한다.

[0111] dsRNA는 또한 "작은 RNA-유도된 유전자 활성화" 또는 RNAa 기전인 유전자 발현을 활성화시킬 수 있다. dsRNAs 표적화 유전자 프로모터는 관련 유전자의 강력한 전사 활성화를 유도한다. RNAa는 "작은 활성화 RNA(saRNA)"로 불리는 합성 dsRNA를 이용하여 인간 세포에서 설명되었다. 현재까지 다른 유기체들에서 RNAa가 보존되는지는 밝혀지지 않았다.

[0112] 작은 이중-가닥 RNA (dsRNA), 가령, 작은 간섭 RNA (siRNA) 및 마이크로RNA (miRNA)는 RNA 간섭(RNAi)로 알려진 진화론적으로 보존된 기전의 촉발자로 밝혀졌다. RNAi는 크로마틴의 리모델링을 통하여 유전자 침묵을 일관되게 유도하여, 전사 억제, 상보성 mRNA 분해 또는 단백질 해독을 차단시킨다. 그러나, 실시예 부분에서 상세하게 설명된 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 폴리뉴클레오티드 및 이의 인코드된 산물들의 발현 및/또는 기능을 증가시키는 것으로 보인다. dsRNAs는 작은 활성화된 RNAs (saRNA)로 작용할 수 있다. 이론에 구애되지 않고, 유전자 프로모터에서 서열들을 표적화함으로써, saRNAs는 dsRNA-유도된 전사 활성화 (RNAa)로 불리는 현상에서 표적 유전자 발현을 유도할 수 있다.

[0113] 추가 구체예에서, 여기에서 확인된 "바람직한 표적 단편"은 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 폴리뉴클레오티드의 발현을 조절하는 추가 화합물을 스크리닝하는데 이용될 수 있다. "조절물질(modulators)"은 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)을 인코드하는 핵산 분자의 발현을 감소 또는 증가시키는 화합물이며, 바람직한 표적 단편에 상보성인 최소한 5개-뉴클레오티드 부분을 포함한다. 상기 스크리닝 방법은 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 센스 또는 안티센스 폴리뉴클레오티드를 인코드하는 핵산 분자의 바람직한 표적 단편을 하나 이상의 후보 조절물질과 접촉시키고, 그리고 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2 폴리뉴클레오티드(가령, 서열 번호: 4-10)를 인코드하는 핵산 분자의 발현을 감소 또는 증가시키는 하나 이상의 후보 조절물질을 선택하는 단계로 구성된다. 상기 후보 조절물질 또는 조절물질들이 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 폴리뉴클레오티드를 인코드하는 핵산 분자의 발현을 조절(가령, 감소 또는 증가)시킬 수 있는 것으로 일단 확인되면, 그 다음 조절물질은 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 폴리뉴클레오티드의 기능의 추가 연구, 또는 본 발명에 따른 연구, 진단 또는 치료 물질로 이용될 수 있다.

[0114] 상기 천연 안티센스 서열의 표적화는 바람직하게는 표적 유전자의 기능을 조절한다. 예를 들면, TNFR2 유전자 (수탁번호 NM\_001066). 바람직한 구체예에서, 상기 표적은 TNFR2 유전자의 안티센스 폴리뉴클레오티드다. 바람직한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)(가령, 수탁번호 NM\_001066)의 센스 및/또는 천연 안티센스 서열들, 변이체들, 대립유전자들, 이소폼, 상동체들, 돌연변이체들, 유도체들, 단편들 및 이들의 상보성 서열들을 표적으로 삼는다. 바람직하게는, 상기 올리고뉴클레오티드는 안티센스 분자이며, 그리고 상기 표적은 안티센스 및/또는 센스 TNFR2 폴리뉴클레오티드의 코딩 및 넌코딩 구역을 포함한다.

[0115] 본 발명의 바람직한 표적 단편은 본 발명의 각 상보성 안티센스 화합물과 복합되어 안정화된 이중-가닥 (duplexed) 올리고뉴클레오티드를 형성할 수도 있다.

[0116] 이와 같은 이중 가닥의 올리고뉴클레오티드 모이어티는 당분야에서 표적 발현을 조절하고, 해독을 조절하고 뿐만 아니라 안티센스 기전을 통하여 RNA 프로세싱을 조절하는 것으로 알려져 있다. 더욱이, 이중-가닥 모이어티는 화학적 변형을 받을 수도 있다. 예를 들면, 이와 같은 이중-가닥 모이어티는 표적에 대한 듀플렉스의 안티센스 가닥의 고유한 하이브리드화에 의해 표적을 저해하여, 표적의 효소적 분해를 촉발시키는 것으로 알려져 있다.

- [0117] 바람직한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)(가령, 수탁번호 NM\_001066), 변이체들, 대립유전자들, 이소폼, 상동체들, 돌연변이체들, 유도체들, 단편들 및 이의 상보성 서열들을 표적한다. 바람직하게는 올리고뉴클레오티드는 안티센스 분자다.
- [0118] 본 발명의 구체예에 따르면, 표적 핵산 분자는 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)에만 국한되지 않으며, 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 분자들의 이소폼, 수용체, 상동체들 그리고 이와 유사한 것까지 확장된다.
- [0119] 또 다른 바람직한 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 TNFR2 폴리뉴클레오티드의 천연 안티센스 서열, 예를 들면, 폴리뉴클레오티드(서열 번호: 2 및 3) 및 이의 임의의 변이체들, 대립유전자들, 상동체들, 돌연변이체들, 유도체들, 단편들 및 상보성 서열들을 표적한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 예는 서열 번호: 4-10에서 제시된다.
- [0120] 한 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 예를 들면, 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 폴리뉴클레오티드와 연합된 넌코딩 센스 및/또는 안티센스 서열들을 포함하나 이에 한정되지 않는 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 안티센스의 핵산 서열에 상보성이거나 또는 이에 결합하고, 그리고 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 분자들의 발현 및/또는 기능을 조절한다.
- [0121] 또 다른 바람직한 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 TNFR2 천연 안티센스의 핵산 서열(서열 번호: 2 및 3에 제시됨)에 상보성이거나 또는 이에 결합하고, 그리고 TNFR2 분자들의 발현 및/또는 기능을 조절한다.
- [0122] 바람직한 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호: 4 내지 10의 최소한 5개의 연속 뉴클레오티드 서열들을 포함하고, 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 분자들의 발현 및/또는 기능을 조절한다.
- [0123] 상기 폴리뉴클레오티드 표적은 TNFR2의 패밀리 멤버, TNFR2의 변이체들; SNP를 포함하는 TNFR2의 돌연변이체들; TNFR2의 넌코딩 서열들; TNFR2의 대립유전자들; 종 변이체들, 단편들 그리고 이와 유사한 것을 포함하는 TNFR2를 포함한다. 바람직하게는 상기 올리고뉴클레오티드는 안티센스 분자다.
- [0124] 또 다른 바람직한 구체예에서, 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)를 표적화하는 상기 올리고뉴클레오티드는 안티센스 RNA, 간섭 RNA (RNAi), 짧은 간섭 RNA (siRNA); 마이크로 간섭 RNA (miRNA); 작은, 일시적 RNA (stRNA); 또는 짧은, 헤어핀 RNA (shRNA); 작은 RNA-유도된 유전자 활성화 (RNAa); 또는, 작은 활성화 RNA (saRNA)를 포함한다.
- [0125] 또 다른 바람직한 구체예에서, 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 폴리뉴클레오티드(가령, 서열 번호: 2 및 3)의 표적화는 이를 표적의 발현 또는 기능을 조절한다. 한 구체예에서, 발현 또는 기능은 기준과 비교하였을 때 상향-조절된다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 발현 또는 기능은 기준과 비교하였을 때 하향-조절된다.
- [0126] 또 다른 바람직한 구체예에서, 안티센스 화합물은 서열 번호: 4-10에서 제시된 것과 같은 서열들을 포함한다. 이를 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드, 더 짧은 또는 더 긴 단편들, 변형된 결합 그리고 이와 유사한 것을 포함할 수 있다.
- [0127] 또 다른 바람직한 구체예에서, 서열 번호: 4 내지 10은 하나 이상의 LNA 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0128] 바람직한 표적 핵산의 조절은 당분야에 공지된 몇 가지 방식으로 실행될 수 있다. 예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA 등. 효소적 핵산 분자들(가령, 리보자임)은 뉴클레오티드 염기 서열-특이적 방식으로 다른 별도의 핵산 분자들을 반복적으로 절단하는 능력을 포함하여 하나 이상의 다양한 반응을 촉매할 수 있는 핵산 분자들이다. 이러한 효소적 핵산 분자들은 예를 들면, 임의의 RNA 전사체를 실질적으로 표적화시키는데 이용될 수 있다.
- [0129] 이들의 서열-특이성 때문에, *trans*-절단 효소적 핵산 분자들은 인간 질환에 대한 치료 물질로써 가능성을 보여 준다(Usman & McSwiggen, (1995) *Ann. Rep. Med. Chem.* 30, 285-294; Christoffersen and Marr, (1995) *J. Med. Chem.* 38, 2023-2037). 효소적 핵산 분자들은 세포성 RNA의 배경내에 특이적 RNA 표적을 절단하도록 고안될 수 있다. 이러한 절단 이벤트는 mRNA 비-기능성을 제공하여, 이 RNA로부터 단백질 발현을 폐기시킨다. 이러한 방식에서, 질환 상태와 연관된 단백질의 합성이 선택적으로 억제될 수 있다.
- [0130] 일반적으로, RNA 절단 활성을 가진 효소적 핵산은 먼저 표적 RNA에 결합함으로써 작용한다. 이와 같은 결합은 표적 RNA를 절단하기 위하여 작용하는 분자의 효소적 부분에 근접하게 유지된 효소적 핵산의 표적 결합 부분을 통하여 일어난다. 따라서, 효소적 핵산은 우선 표적 RNA를 인지하고, 그 다음 상보성 염기 쌍을 통하여 표적 RNA에 결합하고, 그리고 정확한 부위에 일단 결합되면, 효소적으로 작용하여 표적 RNA를 절단한다. 이러한

표적 RNA의 전략적 절단으로 인코드된 단백질의 합성을 지시하는 능력을 파괴시킬 것이다. 효소적 핵산은 이의 RNA 표적에 결합하여 이를 절단시킨 후, RNA로부터 방출되어 또 다른 표적을 찾고, 새로운 표적에 반복적으로 결합하고, 이를 절단할 수 있다.

[0131] 이와 같은 시험관 선별(발달)의 몇 가지 전략(Orgei, (1979) *Proc. R. Soc. London, B* 205, 435)이 이용되어, 절단, 및 포스포디에스테르 링키지와 아미드 링키지의 결찰과 같은 다양한 반응을 촉매할 수 있는 새로운 핵산 촉매를 개발하였다

[0132] 촉매 활성을 조절할 수 있는 리보자임의 개발은 유전자 발현을 조절하기 위한 목적으로 RNA-절단 리보자임을 이용하는 임의의 전략에 상당히 기여할 수 있다. 해머 머리모양의 리보자임은 예를 들면,  $Mg^{2+}$  공인자의 포화 농도 존재(10mM)하에 약  $1\text{min}^{-1}$ 의 촉매속도( $k_{cat}$ )로 기능을 한다. 인위적인 "RNA 리가아제" 리보자임은 약  $100\text{ min}^{-1}$ 의 속도로 상응하는 자가-변형 반응을 촉매하는 것으로 나타났다. 또한, DNA로 구성된 기질 결합 팔(arm)을 가지고 있는 특정 변형된 해머머리 리보자임은  $100\text{ min}^{-1}$ 에 근접한 다중 턴-오버 속도로 RNA 절단을 촉매한다. 최종적으로, 특정 뉴클레오티드 유사체를 가진 해머머리의 촉매 코어내에 특이적 잔기의 대체는 촉매 속도에서 약 10배 개선 변형된 리보자임을 제공한다. 이와 같은 발견은 리보자임이 대부분의 자가-절단 리보자임에 의해 시험관에서 보여주는 것보다 상당히 큰 촉매 속도로 화학적 변형을 촉진시킬 것이라는 것을 설명한다. 그 다음 특정 자가-절단 리보자임의 구조를 최적화시켜 최대 촉매 활성을 제공하거나, 또는 전체적으로 RNA 포스포디에스테르 절단에 대해 상당히 더 빠른 속도를 보여주는 새로운 RNA 모티프를 만드는 것이 가능하다.

[0133] "해머머리" 모델을 적용시킨 RNA 촉매에 의해 RNA 기질의 분자내 절단은 1987년 처음 나타났다(Uhlenbeck, O. C. (1987) *Nature*, 328: 596-600). 상기 RNA 촉매가 회수되었고, 다중 RNA 분자들과 반응되었는데, 이는 진정한 촉매임을 설명하는 것이다.

[0134] "해머머리" 모티프에 기초하여 고안된 촉매적 RNA를 이용하여 표적 서열들과 필수적인 염기쌍을 유지하도록 하기 위하여 촉매 RNA내에 적절한 염기 변화를 만들었으며 특이적 표적 서열들을 절단하였다. 이것은 특이적 표적 서열들을 절단하기 위하여 촉매 RNA의 사용을 허락하며, 그리고 "해머머리" 모델에 따라 고안된 촉매 RNA는 생체에서 특이적 기질 RNA를 절단하는 것이 가능하다는 것을 나타낸다.

[0135] RNA 간섭 (RNAi)은 포유류 및 포유류 세포에서 유전자 발현을 조절하는 강력한 도구가 되었다. 이와 같은 방식은 발현 플라스미드 또는 바이러스 및 siRNA로 프로세스되는 작은 헤어핀 RNA에 대한 코딩 서열을 이용하여 RNA 자체로 또는 DNA로 작은 간섭 RNA(siRNA) 운반을 요구한다. 이 시스템은 pre-siRNA를 세포질로 효과적으로 운반 할 수 있는데, 세포질에서 이를 RNA는 활성이 있으며, 유전자 발현을 위하여 조절된 그리고 조직 특이적인 프로모터의 사용을 허용한다.

[0136] 바람직한 구체예에서, 올리고뉴클레오티드 또는 안티센스 화합물은 리보핵산 (RNA) 및/또는 데옥시리보핵산 (DNA)의 올리고머 또는 폴리머, 또는 이의 모방체, 키메라, 유사체 또는 동사체를 포함한다. 이 용어는 자연적으로 생성된 뉴클레오티드, 슈가들 및 공유적 뉴클레오티드간 (기본골격) 링키지로 구성된 올리고뉴클레오티드뿐만 아니라, 유사하게 기능을 하는 비-자연적으로 생성되는 부분들을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 이와 같은 변형된 또는 치환된 올리고뉴클레오티드는 예를 들면, 강화된 세포성 취입, 표적 핵산에 대해 강화된 친화력 그리고 뉴클레아제 존재시 증가된 안정성과 같은 바람직한 성질들 때문에 고유 형태를 능가하는 것이 종종 바람직하다.

[0137] 본 발명에 따르면, 올리고뉴클레오티드 또는 "안티센스 화합물"은 안티센스 올리고뉴클레오티드 (가령 RNA, DNA, 이의 모방체, 키메라, 유사체 또는 동사체), 리보자임, 외부 유도 서열 (EGS) 올리고뉴클레오티드, siRNA 화합물, 단일- 또는 이중-가닥 RNA 간섭 (RNAi) 화합물 가령, siRNA 화합물, saRNA, aRNA, 및 표적 핵산의 최소한 일부분에 하이브리드되어 이의 기능을 조절하는 기타 올리고머 화합물을 포함한다. 이와 같이, 올리고뉴클레오티드 또는 "안티센스 화합물"은 DNA, RNA, DNA-like, RNA-like, 또는 이의 혼합물들일 수 있고, 또는 하나 이상의 이들의 모방체가 될 수도 있다. 이들 화합물들은 단일-가닥, 이중-가닥, 원형 또는 헤어핀 올리고머 화합물이 될 수 있으며, 그리고 내부 또는 말단 중배(bulges), 미스메치 또는 루프와 같은 구조적 요소들을 포함할 수 있다. 안티센스 화합물들은 일반적으로 선형으로 준비되지만, 원형 및/또는 가지형이 되기 위해 결합하거나 다른 방식으로 준비될 수 있다. 안티센스 화합물은 예를 들면, 두 개 가닥이 하이브리드되어 완전하게 또는 부분적으로 이중-가닥 화합물을 형성하거나 또는 하이브리드화 및 완전하게 또는 부분적으로 이중-가닥 화합물의 형성을 허용하기 위하여 충분한 자가-상보성을 가진 단일 가닥과 같은 구조체를 포함할 수 있다. 두 가

닥은 내부적으로 연결되어 자유 3' 또는 5' 말단을 남겨놓거나 또는 연속 헤어핀 구조 또는 루프를 형성하기 위해 연결될 수 있다. 헤어핀 구조는 5' 또는 3' 말단에 단일 가닥의 연장부를 만드는 오버행을 포함할 수 있다. 이중 가닥의 화합물들은 선택적으로 양단에 오버행을 포함할 수 있다. 추가 변형은 말단, 선택된 뉴클레오티드 위치, 슈가 위치중 하나에 부착된, 또는 뉴클레오티드간 링키지 중 하나에 부착된 콘쥬게이트 군을 포함할 수 있다. 대안으로, 두 개 가닥은 비-핵산 모이어티 또는 링커 군을 통하여 링크될 수 있다. 한 개 가닥으로부터만 형성된 경우, dsRNA는 듀플렉스를 형성하기 위하여 자체에 둘로 접히는 자가-상보성 헤어핀 유형 분자의 형태를 취할 수 있다. 따라서, dsRNAs는 완전히 또는 부분적으로 이중 가닥이 될 수 있다. 유전자 발현의 특이적 조절은 유전자전이 세포계에서 dsRNA 헤어핀의 안정적 발현에 의해 이루어질 수 있다. 두 개 가닥으로부터 형성될 때, 또는 듀플렉스를 형성하기 위하여 자체에 둘로 접히는 자가-상보성 헤어핀 유형 분자의 형태를 취하는 단일 가닥의 경우, 두 개 가닥(또는 단일 가닥의 듀플렉스 형성 구역)은 Watson-Crick 방식으로 염기쌍을 이루는 상보성 RNA 가닥이다.

[0138] 일단 시스템내로 도입되면, 본 발명의 화합물들은 표적 핵산의 절단 또는 다른 변형을 얻기 위하여 하나 이상의 효소 또는 구조적 단백질의 작용을 유도할 수 도 있고, 또는 점유-기반 기전(occupancy-based mechanisms)을 통하여 작용할 수도 있다. 일반적으로, 핵산 (올리고뉴클레오티드를 포함)은 "DNA-like" (가령, 하나 이상의 2'-데옥시 슈가를 가지고, 그리고 U 염기 대신 일반적으로 T를 가짐) 또는 "RNA-like" (가령, 하나 이상의 2'-하이드록시 또는 2'-변형된 슈가를 가지고, 그리고 T 염기 대신 U 염기를 일반적으로 가짐)으로 설명될 수 있다. 핵산 헬릭스는 한 가지 이상의 구조 유형을 선택할 수 있지만, 가장 흔하게는 A- 및 B-형이 된다. 일반적으로, B-형-유사 구조를 가지는 올리고뉴클레오티드는 "DNA-like"이며, 그리고 A-형-유사 구조를 가지는 올리고뉴클레오티드는 "RNA-like"이다. 일부(키메라) 구체예에서, 안티센스 화합물은 A- 및 B-형 구역을 포함한다.

[0139] 본 발명에 따른 안티센스 화합물은 길이가 약 5 내지 약 80 뉴클레오티드 (가령, 약 5 내지 약 80개의 링크된 뉴클레오사이드)의 안티센스 부분을 포함할 수 있다. 이는 안티센스 가닥 또는 안티센스 화합물의 일부분의 길이를 말한다. 확인하면, 본 발명의 단일-가닥 안티센스 화합물은 약 5 내지 약 80 뉴클레오티드를 포함하며, 그리고 본 발명의 이중-가닥 안티센스 화합물(예를 들면, dsRNA)은 길이가 5개 내지 약 80개 뉴클레오티드로 된 센스 및 안티센스 가닥 또는 일부분을 포함한다. 이것은 길이가 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 40개, 41개, 42개, 43개, 44개, 45개, 46개, 47개, 48개, 49개, 50개, 51개, 52개, 53개, 54개, 55개, 56개, 57개, 58개, 59개, 60개, 61개, 62개, 63개, 64개, 65개, 66개, 67개, 68개, 69개, 70개, 71개, 72개, 73개, 74개, 75개, 76개, 77개, 78개, 79개, 또는 80개 뉴클레오티드 또는 이 범위내 임의의 수의 안티센스 부분을 포함한다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0140] 한 구체예에서, 본 발명의 안티센스 화합물은 길이가 10개 내지 50개 뉴클레오티드의 안티센스 부분을 가진다. 이것은 길이가 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 40개, 41개, 42개, 43개, 44개, 45개, 46개, 47개, 48개, 49개, 50개, 51개, 52개, 53개, 54개, 55개, 56개, 57개, 58개, 59개, 60개, 61개, 62개, 63개, 64개, 65개, 66개, 67개, 68개, 69개, 70개, 71개, 72개, 73개, 74개, 75개, 76개, 77개, 78개, 79개, 또는 80개 뉴클레오티드다.

[0141] 한 구체예에서, 본 발명의 안티센스 화합물은 길이가 12개 또는 13개 내지 30개 뉴클레오티드의 안티센스 부분을 가진다. 이것은 길이가 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 또는 30개 뉴클레오티드 또는 이 범위내 임의의 수의 안티센스 부분으로 구체화된다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 일부 구체예들에서, 올리고뉴클레오티드는 길이가 15개의 뉴클레오티드다.

[0142] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 올리고머 화합물은 화합물내에 하나 이상의 뉴클레오티드 위치에 상이한 염기가 존재하는 변이체를 포함한다. 예를 들면, 첫번째 뉴클레오티드가 아데노신이라면, 변이체들은 이 위치에 티미딘, 구아노신 또는 시티딘을 포함하도록 만들어질 수 있다. 안티센스 또는 dsRNA 화합물의 임의의 위치에서 일어날 수 있다. 이들 화합물은 표적 핵산의 발현을 억제하는 이들 능력을 측정하기 위하여 여기에서 설명된 방법에 의해 테스트된다.

[0143] 일부 구체예에서, 안티센스 화합물과 표적 사이에 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 40% 내지 약 60%이다. 일부 구체예에서, 안티센스 화합물과 표적 사이에 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 60% 내지 약 70%이다. 일부 구체예에서, 안티센스 화합물과 표적 사이에 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 70% 내지 약 80%이다. 일부 구체예에서, 안티센스 화합물과 표적 사이에 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 80% 내지 약 90%이다.

일부 구체예에서, 안티센스 화합물과 표적 사이에 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 90%, 약 92%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100%이다.

[0144] 또 다른 바람직한 구체예에서, 서열 번호:3 내지 10에 제시된 핵산 문자들과 같은 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 치환 또는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 뉴클레오티드는 잠금 핵산 (LNA)으로 치환된다.

[0145] 또 다른 바람직한 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 TNFR2 및 서열 번호: 1 내지 3의 서열과 연관된 코딩 및/또는 넌코딩 서열들의 핵산 문자들 센스 및/또는 안티센스의 하나 이상의 구역을 표적한다. 상기 올리고뉴클레오티드는 서열 번호: 1 내지 3의 중첩 구역을 또한 표적한다.

[0146] 본 발명의 특정 바람직한 올리고뉴클레오티드는 키메라 올리고뉴클레오티드다. 본 발명의 내용에서 "키메라 올리고뉴클레오티드" 또는 "키메라"는 두개 이상의 화학적으로 별개의 구역을 포함하며, 각 구역은 최소 한 개의 뉴클레오티드로 구성되는, 올리고뉴클레오티드다. 이와 같은 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 하나 이상의 유익한 성질(예를 들면, 증가된 뉴클레아제 저항성, 세포내로의 증가된 취입, 표적에 대한 증가된 결합 친화력)을 부여하는 변형된 뉴클레오티드의 최소 한 구역과 RNA:DNA 또는 RNA:RNA 하이브리드를 절단할 수 있는 기질이 되는 구역을 포함한다. 예를 들면, RNase H는 RNA:DNA 듀플렉스의 RNA 가닥을 절단하는 세포성 엔도뉴클레아제다. 따라서, RNase H의 활성화는 RNA 표적의 절단을 초래하여, 유전자 발현의 안티센스 조절의 효과를 상당히 강화시킨다. 결과적으로, 동일한 표적 구역에 하이브리드되는 포스포로티오에이트 데옥시올리고뉴클레오티드와 비교하였을 때, 키메라 올리고뉴클레오티드가 사용되면, 더 짧은 올리고뉴클레오티드로 필적할 수 있는 결과를 종종 얻을 수 있다. RNA 표적의 절단은 젤 전기영동 및 필요하다면, 당분야에 공지된 핵산 하이브리드 기술과 연합하여 일반적으로 탐지될 수 있다. 바람직한 한 구체예에서, 키메라 올리고뉴클레오티드는 표적 결합 친화력을 증가시키도록 변형된 최소한 한 구역과, RNase H에 대한 기질로 작용하는 한 구역을 포함한다. 올리고뉴클레오티드가 이의 표적에 대한 친화력(이 경우, *ras*를 인코드하는 핵산)은 올리고뉴클레오티드/표적 쌍의  $T_m$ 을 측정함으로써 일반적으로 결정되는데, 이것은 올리고뉴클레오티드와 표적이 분리되는 온도이며; 해리는 분광광도계에 의해 탐지된다.  $T_m$ 이 높을수록 표적에 대한 올리고뉴클레오티드의 친화력은 커진다.

[0147] 본 발명의 키메라 안티센스 화합물은 상기에서 설명된 것과 같이 두개 이상의 올리고뉴클레오티드, 변형된 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오시드 및/또는 올리고뉴클레오티드 모방체의 혼성 구조로 형성될 수 있다. 이와 같은 화합물을 당분야에서 하이브리드(hybrids) 또는 캠퍼(gampers)라고 한다. 이와 같은 하이브리드 구조의 제조에 대해 교시하는 대표적인 미국 특허는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: US 특허 제5,013,830호; 제5,149,797호; 제5,220,007호; 제5,256,775호; 제5,366,878호; 제5,403,711호; 제5,491,133호; 제5,565,350호; 제5,623,065호; 제5,652,355호; 제5,652,356호; 및 제5,700,922호, 이를 각각은 참고문헌에 통합된다.

[0148] 또 다른 바람직한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드의 구역은 슈가의 2'위치에서 변형된 최소한 뉴클레오티드를 포함하는데, 가장 바람직하게는 2'-0알킬, 2'-0-알킬-0-알킬 또는 2'-플루오르-변형된 뉴클레오티드이다. 다른 바람직한 구체예에서, RNA 변형은 피리미딘의 리보즈, 염기가 소실된 잔기(abasic residues) 또는 RNA의 3' 밀단에서 역전된 염기상에 2'-플루오르, 2'-아미노 및 2'-0-메틸 변형을 포함한다. 이와 같은 변형은 올리고뉴클레오티드에 통상적으로 통합되며, 그리고 이를 올리고뉴클레오티드는 주어진 표적에 대해 2'-데옥시올리고뉴클레오티드보다 더 높은  $T_m$ (가령, 더 높은 표적 결합 친화력)을 가지는 것을 보여주었다. 증가된 친화력의 효과는 유전자 발현의 RNAi 올리고뉴클레오티드 억제를 상당히 강화시키는 것이다. RNase H는 RNA:DNA 듀플렉스의 RNA 가닥을 절단하는 세포성 엔도뉴클레아제이며; 따라서, 이 효소의 활성화로 RNA 표적이 절단되며, 그리고 RNAi 억제의 효과는 상당히 강화될 것이다. RNA 표적의 절단은 젤 전기영동에 의해 통상적으로 설명될 수 있다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 키메라 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레아제 저항성을 강화시키기 위하여 변형된다. 세포는 핵산을 분해시킬 수 있는 다양한 액소- 및 엔도-뉴클레아제를 포함한다. 다수의 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드 변형은 고유한 올리고데옥시뉴클레오티드 보다 뉴클레아제 절단에 더 저항성을 가지고도록 올리고뉴클레오티드가 통합된 것들이다. 뉴클레아제 저항성은 올리고뉴클레오티드를 세포 추출물 또는 분리된 뉴클레아제 용액과 항온처리하고, 통상적으로 젤 전기영동에 의해 시간이 경과한 후에 남아있는 고유 올리고뉴클레오티드의 수준을 측정함으로써 결정된다. 뉴클레아제 저항성을 강화시키도록 변형된 올리고뉴클레오티드는 변형안된 올리고뉴클레오티드보다 더 긴 시간 동안 고유한 상태로 존재한다. 다양한 올리고뉴클레오티드 변형이 뉴클레아제 저항성을 강화시키거나 부여한다는 것이 설명되었다. 최소한 하나의 포스포로티오에이트 변형을 포함하는 올리고뉴클레오티드가 더 바람직하다. 일부 경우, 표적 결합 친화력이 강화된 올리고뉴클레오티드 변형은 독립적으로 뉴클레아제 저항성을 강화시킨다.

[0149]

본 발명에서 구상된 일부 바람직한 올리고뉴클레오티드의 특정 예는 변형된 기본골격을 포함하는 것들, 예를 들면, 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 짧은 쇄 알킬 또는 사이클로알킬 인터슈가 링키지 또는 짧은 쇄 이형원자 또는 이형사이를 인터슈가 링키지를 포함한다. 가장 바람직한 것은 포스포로티오에이트 기본골격을 가진 올리고뉴클레오티드 및 이형원자 기본골격을 가진 올리고뉴클레오티드, 특히,  $\text{CH}_2-\text{NH}-\text{O}-\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2$  [메틸렌(메틸이미노) 또는 MMI 기본골격으로 공지됨],  $\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2$  및  $\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2$  기본골격을 가지며, 이때 고유 포스포디에스테르 기본골격은  $\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}$ 로 나타낸다). *De Mesmaeker et al. (1995) Acc. Chem. Res. 28:366-374*에서 설명된 아미드 기본골격 또한 바람직하다. 몰포리노 기본골격 구조를 가진 올리고뉴클레오티드 또한 바람직하다(*Summerton and Weller, U.S. 특허 제5,034,506호*). 다른 바람직한 구체예에서, 펩티드 핵산 (PNA) 기본골격과 같은 올리고뉴클레오티드의 포스포디에스테르 기본골격은 폴리아미드 기본골격과 대체되며, 뉴클레오티드는 폴리아미드 기본골격의 아자 질소 원자에 직간접적으로 결합된다. 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 치환된 슈가 모이어티를 또한 포함할 수 있다. 바람직한 올리고뉴클레오티드는 2' 위치에 다음중 하나를 포함한다: OH, SH,  $\text{SCH}_3$ , F, OCN,  $\text{OCH}_3\text{OCH}_3$ ,  $\text{OCH}_3\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$  또는  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$  이때, n은 1 내지 약 10이다; C<sub>1</sub> 내지 C<sub>10</sub> 저가알킬, 알콕시알콕시, 치환된 저가 알킬, 알카릴 또는 아랄킬; Cl; Br; CN; CF<sub>3</sub>; OCF<sub>3</sub>; O--; S--, 또는 N-알킬; O--, S--, 또는 N-알케닐; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>; N<sub>3</sub>; NH<sub>2</sub>; 헤테로사이클로알킬; 헤테로사이클로알카릴; 아미노알킬아미노; 폴리알킬아미노; 치환된 실일; RNA 절단기; 리포터기; 삽입기(intercalator); 올리고뉴클레오티드의 약리역학적 성질을 개선시키는 기; 또는 올리고뉴클레오티드 및 유사한 성질을 가진 다른 치환기의 약리역학적 성질을 개선시키는 기. 바람직한 변형은 2'-메톡시에톡시[2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, 2'-O-(2-메톡시에틸)로 공지되기도 함]을 포함한다. 다른 바람직한 변형은 2'-메톡시 (2'-O--CH<sub>3</sub>), 2'-프로폭시 (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 및 2'-플루오르 (2'-F)를 포함한다. 올리고뉴클레오티드상의 다른 위치에 유사한 변형이 있을 수 있는데, 특히, 3' 말단 뉴클레오티드과 5' 말단 뉴클레오티드의 5'위치의 슈가의 3' 위치에 있을 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 또한 웬토퓨라노실기 대신 사이클로부틸과 같은 슈가 모방체를 가질 수 있다.

[0150]

올리고뉴클레오티드는 또한 추가적으로 또는 대안으로, 뉴클레오티드 (당분야에서 흔히 간단히 “염기”라고 부른다) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 여기에서 사용된 것과 같이, “변형안된” 또는 “천연” 뉴클레오티드는 아데닌 (A), 구아닌 (G), 티민 (T), 시토신 (C) 및 우라실 (U)을 포함한다. 변형된 뉴클레오티드는 천연 핵산에 드물게 또는 일시적으로 발견되는 뉴클레오티드, 가령, 하이포산틴, 6-메틸아데닌, 5-Me 피리미딘, 특히 5-메틸 시토신 (5-메틸-2'데옥시시토신이라고 하기도 하고, 당분야에서 5-Me-C 라고 지칭하기도 함), 5-하이드록시메틸시토신 (HMC), 글리코실 HMC 및 젠토바이오실 HMC, 뿐만 아니라 합성 뉴클레오티드, 가령, 2-아미노아데닌, 2-(메틸아미노)아데닌, 2-(이미다졸일알킬)아데닌, 2-(아미노알킬아미노)아데닌 또는 다른 헤테로치환된 알킬아데닌, 2-티오우라실, 2-티오타민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N<sup>6</sup>(6-아미노헥실)아데닌 및 2,6-디아미노퓨린을 포함한다. 당분야에 공지된 “범용(universal)” 염기, 가령, 이노신이 포함될 수 있다. 5-Me-C 치환은 0.6-1.2°C로 핵산 듀플렉스 안정성을 증가시키는 것으로 확인되었고, 그리고 현재 가장 바람직한 염기 치환이다.

[0151]

본 발명의 올리고뉴클레오티드의 또 다른 변형은 올리고뉴클레오티드의 활성 또는 세포성 취입을 강화시키는 올리고뉴클레오티드 하나 이상의 모이어티 또는 콘쥬게이트에 화학적으로 연결된 것을 포함한다. 이러한 모이어티는 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 지방족 쇄, 가령, 도데칸디올 또는 운데실 잔기, 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 쇄, 또는 아다만탄 아세트산을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 친지성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오티드 및 이와 같은 올리고뉴클레오티드를 준비하는 방법들은 당분야에 공지되어 있다. 예를 들면, U.S. 특허 제5,138,045호, 제5,218,105호 및 제5,459,255호.

[0152]

주어진 올리고뉴클레오티드의 모든 위치들이 균일하게 변형될 필요는 없으며, 그리고 전술한 변형중 하나 이상이 단일 올리고뉴클레오티드에 통합되거나 또는 올리고뉴클레오티드내 단일 뉴클레오티드에만 통합될 수 있다. 본 발명은 여기에서 정의된 키메라 올리고뉴클레오티드가 되는 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0153]

또 다른 구체예에서, 본 발명의 핵산 분자는 염기가 소실된(abasic) 뉴클레오티드, 폴리에테르, 폴리아민, 폴리아미드, 펩티드, 탄수화물, 지질 또는 폴리하이드로카본 화합물을 포함하나 이에 한정되지 않는 또 다른 모이어티와 콘쥬게이트된다. 이를 분자들은 슈가, 염기 또는 인산염 기의 몇 군데 위치에서 핵산 분자를 포함하는 임의의 하나 이상의 뉴클레오티드에 링크될 수 있다는 것을 당업자는 인지할 것이다.

- [0154] 본 발명에 이용된 올리고뉴클레오티드는 잘 알려진 고형상 합성 기술을 통하여 통상적으로 그리고 일상적으로 만들어질 수 있다. 이와 같은 합성을 위한 장비는 Applied Biosystems을 포함하는 몇 군데 업자들이 판매한다. 이와 같은 합성을 위한 임의의 기타 수단들이 이용될 수 있으며; 올리고뉴클레오티드의 실질적인 합성은 본 발명의 분야에 속지된 자의 능력 범위내에 있다. 포스포로티오에이트 및 알킬화된 유도체들과 같은 다른 올리고뉴클레오티드를 준비하기 위한 유사한 기술을 이용하는 것 또한 공지되어 있다. 형광 라벨된, 바이오티닐화된 또는 콜레스테롤-변형된 올리고뉴클레오티드와 같은 기타 변형된 올리고뉴클레오티드를 합성하기 위하여 유사한 기술 및 시판되는 변형된 아미디트(amidites) 및 조절된 포어 글라스(CPG) 산물들, 가령, 바이오틴, 플로오레신, 아크리딘 또는 솔라렌(psoralen)-변형된 아미디트 및/또는 CPG (Glen Research, Sterling VA)으로부터 시판되는 것 이용(을 이용하는 것 또한 공지되어 있다.
- [0155] 본 발명에 따르면, 효과, 특이성 및 작용 기간을 강화시키기 위하여 LNA 모노머와 같은 변형을 이용하면, MOE, ANA, FANA, PS 등과 같은 현재 화학물질로 구성된 올리고뉴클레오티드의 투여 경로를 확장시킨다. 현재 올리고뉴클레오티드에서 일부 모노머를 LNA 모노머로 치환시키면 이루어질 수 있다. LNA 변형된 올리고뉴클레오티드는 부모 화합물과 유사한 크기를 가질 수 있고, 또는 더 큰, 또는 바람직하게는 더 작은 크기를 가질 수 있다. 이와 같은 LNA-변형된 올리고뉴클레오티드는 약 70% 미만의, 더욱 바람직하게는 약 60% 미만의, 가장 바람직하게는 약 50% 미만의 LNA 모노머를 포함하며, 이들 크기는 약 5개 내지 25개 뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 약 12개 내지 20 개 뉴클레오티드 사이가 된다.
- [0156] 바람직한 변형된 올리고뉴클레오티드 기본골격은 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 메틸 및 3'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함하는 기타 알킬 포스포네이트, 포스피네이트, 3'-아미노 포스포르아미데이트 및 아미노알킬포스포르아미데이트를 포함하는 포스포르아미데이트, 티오노포스포르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 및 정상적인 3'-5' 링키지를 가진 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 링크된 유사체들, 그리고 역전된 극성을 가진 것들(이때, 뉴클레오시드 단위의 인접된 쌍은 3'-5'에서 5'-3'로 또는 2'-5'에서 5'-2'로 링크된)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 다양한 염, 혼합된 염 및 자유 산 형태도 포함된다.
- [0157] 상기 인-함유 링키지의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: US 특허 제3,687,808호; 제4,469,863호; 제4,476,301호; 제5,023,243호; 제5,177,196호; 제5,188,897호; 제5,264,423호; 제5,276,019호; 제5,278,302호; 제5,286,717호; 제5,321,131호; 제5,399,676호; 제5,405,939호; 제5,453,496호; 제5,455,233호; 제5,466,677호; 제5,476,925호; 제5,519,126호; 제5,536,821호; 제5,541,306호; 제5,550,111호; 제5,563,253호; 제5,571,799호; 제5,587,361호; 및 제5,625,050호, 이들 각각은 참고문헌에 통합된다.
- [0158] 인 원자를 포함하지 않는 바람직한 변형된 올리고뉴클레오티드 기본골격은 짧은 쇠 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오시드간 링키지, 혼합된 이형원자 및 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오시드간 링키지, 또는 하나 이상의 짧은 쇠 이형원자 또는 이형사이클 뉴클레오시드간 링키지에 의해 형성된 기본 골격을 가진다. 이들은 몰포리노 링키지 (뉴클레오시드의 슈가 부분으로부터 일부 형성됨); 실로옥산 기본골격; 설파이드, 술포옥시드 및 술폰 기본골격; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 기본골격; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 기본골격; 알켄 함유 기본골격; 술플레이트 기본골격; 메틸렌이미노 및 메틸렌하이드라지노 기본골격; 술포네이트 및 술폰아미드 기본골격; 아미드 기본골격; 그리고 N, O, S 및 CH<sub>2</sub> 성분 부분이 혼합된 것을 가지는 것들을 포함한다.
- [0159] 상기 올리고뉴클레오시드의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: 미국 특허 제5,034,506호; 제5,166,315호; 제5,185,444호; 제5,214,134호; 제5,216,141호; 제5,235,033호; 제5,264,562호; 제5,264,564호; 제5,405,938호; 제5,434,257호; 제5,466,677호; 제5,470,967호; 제5,489,677호; 제5,541,307호; 제5,561,225호; 제5,596,086호; 제5,602,240호; 제5,610,289호; 제5,602,240호; 제5,608,046호; 제5,610,289호; 제5,618,704호; 제5,623,070호; 제5,663,312호; 제5,633,360호; 제5,677,437호; 및 제5,677,439호, 이들 각각은 참고문헌에 통합된다.
- [0160] 기타 바람직한 올리고뉴클레오티드 모방체에 있어서, 슈가 및 뉴클레오티드간 링키지는 모두, 가령, 뉴클레오티드 단위의 기본 골격은 신규한 군으로 대체된다. 염기 단위는 적합한 핵산 표적 화합물과의 하이브리드화를 위해 유지된다. 올리고머 화합물중 하나인, 우수한 하이브리드화 성질을 가진 것으로 확인된 올리고뉴클레오티드 모방체를 웹티드 핵산 (PNA)이라 지칭한다. PNA 화합물에서, 올리고뉴클레오티드의 슈가-기본 골격은 아미드 함유 기본골격, 특히 아미도에틸글리신 기본골격으로 치환된다. 핵염기는 보유되며, 기본 골격의 아미드 부분의 아자 질소 원자에 직간접적으로 결합된다. PNA 화합물의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 US 특허 제

5,539,082호; 제5,714,331호; 및 제5,719,262호를 포함하나 이에 한정되지 않으며, 이를 각각은 참고문헌에 통합된다. PNA 화합물의 추가 교시는 Nielsen et al., (1991) *Science*, 254, 1497-1500에서 볼 수 있다.

[0161] 본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에서, 포스포로티오에이트 기본골격을 가진 올리고뉴클레오티드, 이형원자 기본골격, 특히,  $\text{CH}_2-\text{NH}-\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ (메틸렌(메틸이미노) 또는 MMI 기본골격으로 공지됨),  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$  및  $-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 를 가진 올리고뉴클레오시드가 되며, 이때, 고유 포스포디에스테르 기본골격은 상기 언급된 US 특허 제5,489,677호의  $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$ 를 나타내고, 그리고 상기 언급된 US 특허 제5,602,240호의 아미드 기본 골격이다. 또한, 상기 언급된 US 특허 제5,034,506호의 몰포리노 기본골격 구조를 가진 올리고뉴클레오티드가 바람직하다.

[0162] 변형된 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 치환된 슈가 모이어티를 포함할 수 있다. 바람직한 올리고뉴클레오티드는 2' 위치에 다음중 하나를 포함한다: OH; F; O-, S-, 또는 N-알킬; O-, S-, 또는 N-알케닐; O-, S-또는 N-알키닐; 또는 O 알킬-O-알킬, 이때, 알킬, 알케닐 및 알키닐은 치환된 또는 치환안된 C 내지 CO 알킬 또는 C<sub>2</sub> 내지 CO 알케닐 및 알키닐이다. 특히 바람직한 것은  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{O}_m\text{CH}_3$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_n$ ,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ , 및  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3)_2$ 이며, 이때 n과 m은 1 내지 약 10이 될 수 있다. 다른 바람직한 올리고뉴클레오티드는 2' 위치에 다음중 하나를 포함한다: C 내지 CO, (저가 알킬, 치환된 저가 알킬, 알카릴, 아랄킬, O-알카릴 또는 O-아랄킬, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알카릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실일, RNA 절단기; 리포터기; 삽입기(intercalator); 올리고뉴클레오티드의 약리역학적 성질을 개선시키는 기; 또는 올리고뉴클레오티드 및 유사한 성질을 가진 다른 치환기의 약리역학적 성질을 개선시키는 기. 바람직한 변형은 알콕시알콕시기인 2'-메톡시에톡시[2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로 공지되기도 함]을 포함한다. 추가 바람직한 변형은 2'-디메틸아미노옥시에톡시, 가령,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$  기, (하기 실시예에서 설명되는 것과 같이 2'-DMAOE로 공지되기도 함) 그리고 2'-디메틸아미노에톡시에톡시 (당분야에서 2'-O-디메틸아미노에톡시에틸 또는 2'-DMAEOE), 가령, 2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>을 포함한다.

[0163] 다른 바람직한 변형은 2'-메톡시(2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-아미노프로포시(2'-O CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) 및 2'-플루오르 (2'-F)을 포함한다. 올리고뉴클레오티드의 다른 위치, 특히 3' 말단 뉴클레오티드에서 3' 위치의 슈가 또는 2'-5' 링크된 올리고뉴클레오티드에서, 그리고 5' 말단 뉴클레오티드의 5' 위치에 유사한 변형이 만들어질 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 또한 펜토퓨라노실 슈가 대신 사이클로부틸 모이어티와 같은 슈가 모방체를 가질 수 있다. 이와 같은 변형된 슈가 구조의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: US 특허 제4,981,957호; 제5,118,800호; 제5,319,080호; 제5,359,044호; 제5,393,878호; 제5,446,137호; 제5,466,786호; 제5,514,785호; 제5,519,134호; 제5,567,811호; 제5,576,427호; 제5,591,722호; 제5,597,909호; 제5,610,300호; 제5,627,053호; 제5,639,873호; 제5,646,265호; 제5,658,873호; 제5,670,633호; 및 제5,700,920호, 이를 각각은 참고문헌에 통합된다.

[0164] 올리고뉴클레오티드는 또한 핵염기 (당분야에서 흔히 간단히 “염기”라고 부른다) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 여기에서 사용된 것과 같이, “변형안된” 또는 “천연” 뉴클레오티드는 아데닌 (A), 구아닌 (G), 티민 (T), 시토신 (C) 및 우라실 (U)을 포함한다. 변형된 뉴클레오티드는 5-메틸시토신 (5-me-C), 5-하이드록시메틸시토신, 산틴, 하이포산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌과 구아닌의 6-메틸 및 다른 알킬 유도체들, 아데닌과 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체들, 2-티오우라실, 2-티오타민 및 2-티오시토신, 5- 할로우라실 및 시토신, 5-프로파닐 우라실 및 시토신, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실 (슈도-우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로 특히 5-브로모, 5-트리플루오르메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸무아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌 그리고 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌과 같은 다른 합성 및 천연 뉴클레오티드를 포함한다.

[0165] 또한, 뉴클레오티드는 미국 특허 No. 3,687,808호, 'The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering', pages 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, those disclosed by Englisch et al., 'Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, page 613, 및 Sanghvi, Y.S., Chapter 15, 'Antisense Research and Applications', pages 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993에 설명된 것들을 포함한다. 이와 같은 뉴클레오티드의 일부는 본 발명의 올리고머 화합물의 결합

친화력을 증가시키는데 특히 유용하다. 이들은 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함하는 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린을 포함한다. 5-메틸시토신 치환은 핵산 듀플렉스 안정도를 0.6-1.2°C 증가시킨 것으로 나타났고(Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds, 'Antisense Research and Applications', CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) 그리고 2'-0메톡시에틸 슈가 변형과 복합하였을 때 특히 바람직한 염기 치환이다.

[0166] 상기 변형된 뉴클레오티드 및 기타 변형된 뉴클레오티드의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: US 특허 제3,687,808호, 제4,845,205호; 제5,130,302호; 제5,134,066호; 제5,175,273호; 제5,367,066호; 제5,432,272호; 제5,457,187호; 제5,459,255호; 제5,484,908호; 제5,502,177호; 제5,525,711호; 제5,552,540호; 제5,587,469호; 제5,596,091호; 제5,614,617호; 제5,750,692호, 및 제5,681,941호, 이들 각각은 참고문헌에 통합된다.

[0167] 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 기타 변형은 올리고뉴클레오티드 하나 이상의 모이어티 또는 콘쥬게이트에 화학적으로 연결되는 것을 포함하는데, 이는 활성, 세포 분포 또는 올리고뉴클레오티드의 세포 취입을 강화시킨다.

[0168] 이와 같은 모이어티는 콜레스테롤 모이어티, 담즙산, 티오에테르, 가령, 헥실-S-트리릴티올, 티오콜레스테롤, 지방족 쇄 가령, 도데칸디올 또는 운데실 잔기, 인지질 가령, 디-헥사데실--rac-글리세롤 또는 트리에틸암모늄 1,2-디-0-헥사데실-rac-글리세로-3-Η-포스포네이트, 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 쇄, 또는 아다만탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 또는 옥타데실아민 또는 헥실아미노-카르보닐-t 옥시콜레스테롤 모이어티와 같은 지질 모이어티를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0169] 이와 같은 올리고뉴클레오티드 모이어티의 제법을 교시하는 대표적인 미국 특허는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: US 특허 제4,828,979호; 제4,948,882호; 제5,218,105호; 제5,525,465호; 제5,541,313호; 제5,545,730호; 제5,552,538호; 제5,578,717호, 제5,580,731호; 제5,580,731호; 제5,591,584호; 제5,109,124호; 제5,118,802호; 제5,138,045호; 제5,414,077호; 제5,486,603호; 제5,512,439호; 제5,578,718호; 제5,608,046호; 제4,587,044호; 제4,605,735호; 제4,667,025호; 제4,762,779호; 제4,789,737호; 제4,824,941호; 제4,835,263호; 제4,876,335호; 제4,904,582호; 제4,958,013호; 제5,082,830호; 제5,112,963호; 제5,214,136호; 제5,082,830호; 제5,112,963호; 제5,214,136호; 제5,245,022호; 제5,254,469호; 제5,258,506호; 제5,262,536호; 제5,272,250호; 제5,292,873호; 제5,317,098호; 제5,371,241호; 제5,391,723호; 제5,416,203호; 제5,451,463호; 제5,510,475호; 제5,512,667호; 제5,514,785호; 제5,565,552호; 제5,567,810호; 제5,574,142호; 제5,585,481호; 제5,587,371호; 제5,595,726호; 제5,597,696호; 제5,599,923호; 제5,599,928호 및 제5,688,941호, 이들 각각은 참고문헌에 통합된다.

[0170] 약물 발견: 본 발명의 화합물은 약물 발견 및 표적 유효화 분야에 적용시킬 수 있다. 본 발명은 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 폴리뉴클레오티드와 질병 상태, 표현형 또는 조건 사이에 존재하는 상관 관계를 설명하기 위하여 약물 발견 노력에서 여기에서 확인된 화합물의 이용 및 바람직한 표적 단편의 이용을 포함한다. 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 폴리뉴클레오티드를 탐지 또는 조절하는 것을 포함하는 이들 방법은 시료, 조직, 세포 또는 유기체를 본 발명의 화합물과 접촉시키고, 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 폴리뉴클레오티드의 핵산 또는 단백질 수준을 측정하거나 및/또는 처치후 일정 시간에서 관련된 표현형 또는 화학적 엔드포인트를 측정하고, 그리고 선택적으로 처리안된 샘플의 측정된 값과 본 발명의 추가 화합물로 처리된 화합물의 값을 비교하는 것을 포함한다. 이들 방법은 표적 유효화 프로세스를 위하여 미지의 유전자 기능을 결정하기 위하여, 또는 특정 질환, 상태 또는 표현형의 치료 또는 예방을 위한 표적으로 특정 유전자 산물의 유효성을 결정하기 위한 다른 실험과 나란히 또는 복합하여 실행될 수 있다.

[0171] 유전자 발현의 상향 조절 또는 억제의 평가:

[0172] 외인성 핵산을 숙주 세포 또는 유기체로의 전달은 세포 또는 유기체내 핵산이 존재하는 것을 직접적으로 탐지함으로써 평가될 수 있다. 이와 같은 탐지는 당분야에 공지된 몇 가지 방법에 의해 실현될 수 있다. 예를 들면, 외인성 핵산의 존재는 서든 블랏 또는 핵산과 연합된 뉴클레오티드 서열을 특이적으로 증폭시키는 프라이머를 이용한 폴리메라제 쇄 반응(PCR)에 의해 탐지될 수 있다. 외인성 핵산의 발현은 유전자 발현 분석을 포함하는 통상적인 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 예를 들면, 외인성 핵산으로부터 생성된 mRNA는 노던 블랏 또는 역전사 PCR (RT-PCR)을 이용하여 탐지되고 정량화될 수 있다.

[0173]

외인성 핵산으로부터의 RNA 발현 또한 효소적 활성 또는 리포터 또는 리포터 단백질 활성을 측정함으로써 탐지될 수 있다. 예를 들면, 외인성 핵산이 효과물질 RNA를 생산하고 있다는 것을 나타내는 것과 같이 표적 핵산 발현의 증가 또는 감소에 의해 안티센스 조절 활성을 간접적으로 측정할 수 있다. 서열 보존에 근거하여, 프라이머를 고안하고, 이를 표적 유전자의 코딩 구역을 증폭시키는데 이용할 수 있다. 우선, 각 유전자의 가장 많이 발현된 코딩 구역을 이용하여 모델 기준 유전자를 구축할 수 있는데, 이때 임의의 코딩 또는 넌코딩 구역이 이용될 수 있다. 리포터 코딩 구역과 이의 폴리(A) 신호 사이에 각 코딩 구역을 삽입시켜 각 기준 유전자를 어셈블리한다. 이와 같은 플라스미드는 유전자의 상류 부분에 리포터 유전자를 가지고, 그리고 3' 넌-코딩 구역에 잠재적인 RNAi 표적을 가지는 mRNA를 만든다. 리포터 유전자를 조절함으로써 개별 안티센스 올리고뉴클레오티드의 효과를 분석할 수 있다. 본 발명의 방법에 유용한 리포터 유전자는 아세토하이드록시산 합성효소 (AHAS), 알칼리 포스파타제(AP), 베타 갈락토시다제(LacZ), 베타 글루코로니다제(GUS), 클로람페니콜 아세틸전이효소 (CAT), 녹색 형광 단백질 (GFP), 적색 형광 단백질 (RFP), 황색 형광 단백질 (YFP), 청록색 형광 단백질 (CFP), 양고추냉이 과산화효소 (HRP), 루시페라제(Luc), 노팔린 합성효소 (NOS), 옥토파인 합성효소 (OCS), 그리고 이들의 유도체들을 포함한다. 암피실린, 블레오마이신, 클로람페니콜, 젠타마이신, 하이그로마이신, 카나마이신, 린코마이신, 메토트렉세이트, 포스피노트리친, 퓨로마이신 및 테트라사이클린에 저항성을 부여하는 다중 선택성 마커가 이용된다. 리포터 유전자의 조절을 결정하는 방법은 당분야에 공지되어 있으며, 이들 방법은 형광 측정법(가령, 형광 분광학, 형광 활성화된 세포 분류(FACS), 형광 현미경), 항생제 저항성 측정을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0174]

TNFR2 단백질 및 mRNA 발현은 당업계에 공지되어 있는 방법들 및 본 명세서 곳곳에서 설명된 방법들을 이용하여 분석할 수 있다. 예를 들면, ELISA와 같은 면역분석을 이용하여 단백질 수준을 결정할 수 있다. ELISAs를 위한 TNFR2 항체는 R&D Systems (Minneapolis, MN)으로부터 상업적으로 입수 가능하다.

[0175]

구체예들에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 이용하여 처리되는 시료(가령 생체내 또는 시험관내 세포 또는 조직들)내의 TNFR2 발현 (가령, mRNA 또는 단백질)은 대조군 시료에서의 TNFR2 발현과 비교하여 평가한다. 예를 들면, 단백질 또는 핵산의 발현은 당업계에 공지되어 있는 방법들을 이용하여 가짜로 처리된 또는 처리안된 시료내에서의 발현과 비교할 수 있다. 대안으로, 원하는 정보에 근거하여 대조군 안티센스 올리고뉴클레오티드 (가령, 변경된 또는 상이한 서열을 가지는 올리고뉴클레오티드)로 처리된 시료와 비교할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 처리된 시료 대 처리안된 시료내에서 TNFR2 단백질 또는 핵산의 발현의 차이는 처리된 시료 대 처리안된 시료내 상이한 핵산(연구자가 적합하다고 간주하는 임의 표준, 가령, 유지관리(housekeeping) 유전자를 포함)의 발현 차이로 비교할 수 있다.

[0176]

관찰된 차이는 대조군과의 비교를 위하여 비율 또는 분획형태로 원한다면 표현할 수 있다. 구체예들에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리된 시료내의 TNFR2 mRNA 또는 단백질의 수준은 대조군 핵산으로 처리된 또는 처리안된 시료와 비교하여 약 1.25배 내지 약 10배 이상 증가 또는 감소된다. 구체예들에서, TNFR2 mRNA 또는 단백질의 수준은 최소한 약 1.25-배, 최소한 약 1.3-배, 최소한 약 1.4-배, 최소한 약 1.5-배, 최소한 약 1.6-배, 최소한 약 1.7-배, 최소한 약 1.8-배, 최소한 약 2-배, 최소한 약 2.5-배, 최소한 약 3-배, 최소한 약 3.5-배, 최소한 약 4-배, 최소한 약 4.5-배, 최소한 약 5-배, 최소한 약 5.5-배, 최소한 약 6-배, 최소한 약 6.5-배, 최소한 약 7-배, 최소한 약 7.5-배, 최소한 약 8-배, 최소한 약 8.5-배, 최소한 약 9-배, 최소한 약 9.5-배, 또는 최소한 약 10-배 또는 그 이상 증가 또는 감소된다.

[0177]

### 키트, 연구 시약, 진단제 및 치료제

[0178]

본 발명의 화합물을 진단, 치료 및 예방용으로 이용하거나 연구 시약 및 키트 성분으로 이용할 수 있다. 더욱이, 당업자들은 정교한 특이성으로 유전자 발현을 저해시킬 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 이용하여 특정 유전자의 기능을 밝히거나 또는 생물학적 경로의 다양한 구성부의 기능들을 구별한다.

[0179]

키트, 진단 그리고 다양한 생물학적 시스템에 사용하기 위하여, 본 발명의 화합물은 단독으로 또는 다른 화합물 또는 치료제와 복합하여, 세포 및 조직에서 발현되는 유전자의 일부 또는 전체 보체의 발현 패턴을 밝히기 위한 차등적 및/또는 복합적 분석에 도구로 유용하다.

[0180]

여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "생물학적 시스템" 또는 "시스템"은 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 유전자의 산물들을 발현시키는, 또는 이를 발현시키도록 능력을 갖춘 임의의 유기체, 세포, 세포 배양물 또는 조직으로 정의된다. 시스템에는 인간, 유전자전이 동물, 세포, 세포 배양물, 조직, 이형이식편, 이식물 및 이의 조합을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

- [0181] 비-제한적 실시예로써, 하나 이상의 안티센스 화합물로 처리된 세포 또는 조직에서의 발현 패턴은 안티센스 화합물로 처리안된 기준 세포 또는 조직과 비교되며, 그리고 생성된 패턴은 검사되는 유전자의 질병 연관성, 신호 경로, 세포 국소화, 발현 수준, 크기, 구조 또는 기능에 관련되기 때문에 차등적인 유전자 발현 수준에 대해 분석된다. 자극된 또는 자극되지 않은 세포, 그리고 발현 패턴에 영향을 주는 다른 화합물들의 존부하에 이와 같은 분석들이 실행될 수 있다.
- [0182] 당분야에 공지된 유전자 발현 분석 방법의 예로는 DNA 어레이 또는 마이크로어레이, SAGE (유전자 발현의 일련의 분석), READS (절단된 cDNAs의 제한 효소 증폭), TOGA (총 유전자 발현 분석), 단백질 어레이 및 단백체학 (proteomics), 발현된 서열 tag (EST) 서열화, 차감성 RNA 평거프린팅 (SuRF), 차감성 클로닝, 차등적 디스플레이(DD), 비교성 게놈 하이브리드화, FISH (형광 원위치 하이브리드화) 기술 및 대량 분광학 방법을 포함한다.
- [0183] 본 발명의 화합물은 이들 화합물이 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)를 인코드하는 핵산에 하이브리드하기 때문에 연구 및 진단에 유용하다. 예를 들면, 효과적인 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 조절물질로써 여기에서 설명되는 조건 및 효과를 가지고 하이브리드되는 올리고뉴클레오티드는 유전자 증폭 또는 탐지에 유리한 조건하에 효과적인 프라이머 또는 프로브다. 이들 프라이머 및 프로브는 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)를 인코드하는 핵산 분자들의 특이적 탐지를 요구하는 방법 및 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 탐지 또는 추가 연구에 유용한 이들 핵산 분자들의 증폭에 유용하다. 당분야에 공지된 방법에 의해 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히, 본 발명의 프라이머 및 프로브와 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)를 인코드하는 핵산의 하이브리드를 탐지할 수 있다. 이와 같은 수단은 올리고뉴클레오티드에 효소의 콘쥬게이션, 올리고뉴클레오티드의 병사능라벨링 또는 임의의 다른 적합한 탐지 수단을 포함할 수 있다. 샘플에서 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 수준을 탐지하기 위한 탐지 수단을 이용한 키트를 준비할 수 있다.
- [0184] 치료요법적 용도로 당업자는 안티센스의 특이성 및 감응성을 이용한다. 인간을 포함하는 동물의 질병 상태를 치료하는데 치료요법적 모이어티로 안티센스 화합물을 이용하였다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 약물은 인간에게 안전하고 효과적으로 투여되었으며, 그리고 다수의 임상 시험이 현재 진행중이다. 따라서, 안티센스 화합물은 세포, 조직 및 동물, 특히 인간의 치료 섭생에 유용하도록 설정되는 유용한 치료 양식이 될 수 있다.
- [0185] 치료용으로, 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 발현을 조절하여 치료될 수 있는 질환 또는 장애에 민감한 동물, 특히 인간을 본 발명에 따른 안티센스 화합물을 투여함으로써 치료한다. 예를 들면, 한 가지 비-제한적인 구체예에서, 이 방법은 치료를 요하는 동물에게 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 조절물질의 치료요법적 효과량을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 조절물질은 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 단백질의 활성을 효과적으로 조절하거나 또는 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 단백질의 발현을 효과적으로 조절한다. 한 구체예에서, 동물에서 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 활성 또는 발현은 기준과 비교하여 약 10% 억제된다. 바람직하게는, 동물에서 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 활성 또는 발현은 약 30% 억제된다. 더욱 바람직하게는, 동물에서 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 활성 또는 발현은 약 50% 또는 그 이상으로 억제된다. 따라서, 기준과 비교하였을 때, 이 올리고머 화합물은 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) mRNA의 발현을 최소한 10%, 최소한 50%, 최소한 25%, 최소한 30%, 최소한 40%, 최소한 50%, 최소한 60%, 최소한 70%, 최소한 75%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 98%, 최소한 99%, 또는 100% 조절한다.
- [0186] 한 구체예에서, 동물에서 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 활성 또는 발현은 기준과 비교하였을 때 약 10% 증가된다. 바람직하게는, 동물에서 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 활성 또는 발현은 기준과 비교하였을 때 약 30% 증가된다. 더욱 바람직하게는, 동물에서 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 활성 또는 발현은 기준과 비교하였을 때 약 50% 또는 그 이상 증가된다. 따라서, 올리고머 화합물은 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) mRNA의 발현을 기준과 비교하였을 때, 최소한 10%, 최소한 50%, 최소한 25%, 최소한 30%, 최소한 40%, 최소한 50%, 최소한 60%, 최소한 70%, 최소한 75%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 98%, 최소한 99%, 또는 100% 조절한다.
- [0187] 예를 들면, 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 발현 감소는 혈청, 혈액, 지방 조직, 간 또는 임의의 기타 체액, 동물의 조직 또는 장기에서 문헌에서 설명되고, 그리고 당업계에 공지되어 있는 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 바람직하게는, 분석될 체액, 조직 또는 기관에 포함된 세포는 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 웹티드를 인코드하는 핵산 분자 및/또는 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 단백질 자체를 포함한다.
- [0188] 본 발명의 화합물들은 적절한 약리학적으로 허용가능한 희석제 또는 캐리어에 효과량의 화합물을 첨가하여 약제

조성물로 이용될 수 있다. 본 발명의 화합물의 용도 및 방법은 예방학적으로 유용하다.

### [0189] 콘쥬게이트(Conjugates)

본 발명의 올리고뉴클레오티드의 또 다른 변형은 올리고뉴클레오티드의 활성, 세포 분포 또는 세포 취입을 강화시키는 하나 이상의 모이어티 또는 콘쥬게이트에 올리고뉴클레오티드를 화학적으로 연결시키는 것을 포함한다. 이와 같은 모이어티 또는 콘쥬게이트는 1차 또는 2차 하이드록시기와 같은 기능기에 공유적으로 결합된 콘쥬게이트기를 포함한다. 본 발명의 콘쥬게이트기는 삽입자, 리포터 분자들, 폴리아민, 폴리아미드, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에테르, 올리고머의 약력학 성질을 강화시키는 기, 그리고 올리고머의 약동학 성질을 강화시키는 기를 포함한다. 일반적인 콘쥬게이트기는 콜레스테롤, 지질, 인지질, 바이오틴, 페나진, 폴레이트, 페탄트리딘, 안트라퀴논, 아크리딘, 플루오레세인, 로다민, 쿠마린 및 염료를 포함한다. 본 발명의 내용에서 올리고머의 약력학 성질을 강화시키는 기는 취입을 개선시키고, 분해에 저항성을 강화시키고, 및/또는 표적 핵산과 서열 특이적 하이브리드를 강화시키는 기들을 포함한다. 본 발명의 내용에서 올리고머의 약동학 성질을 강화시키는 기는 본 발명의 화합물의 취입, 분포, 대사 또는 배출을 개선시키는 기들을 포함한다. 대표적인 콘쥬게이트 기는 국제 특허 출원 PCT/US92/09196 (1992년 10월 23일 출원) 및 U.S. 특허 제6,287,860호에서 설명되며, 참고문헌에 통합된다. 콘쥬게이트 모이어티는 콜레스테롤 모이어티, 콜린산, 티오에테르, 가령, 헥실-5-트리틸티올, 티오콜레스테롤, 지방족 쇄, 가령, 도데칸디올 또는 운데실 잔기, 인지질 가령, 디-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸암모늄 1,2-디-0-헥사데실-rac-글리세로-3-H포스포네이트, 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 쇄 또는 아다만탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 또는 옥타데실아민 또는 헥실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티와 같은 지질 모이어티를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 활성 약물 물질, 예를 들면, 아스피린, 와르파린, 페닐부타존, 이부프로펜, 수프로펜, 웬부펜, 케토프로펜, (S)-(+)-프라노프로펜, 카르프로펜, 단실사르코신, 2,3,5-트리요호드벤조산, 플루페나민산, 폴린산, 벤조티아디아지드, 클로로티아지드, 디아제핀, 인도메티신, 바르비투레이트, 세팔로스포린, 술파 약물, 당뇨병치료제, 항균제 또는 항생제에 콘쥬게이트될 수도 있다.

이와 같은 올리고뉴클레오티드 콘쥬게이트의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 U.S. 특허 제4,828,979호; 제4,948,882호; 제5,218,105호; 제5,525,465호; 제5,541,313호; 제5,545,730호; 제5,552,538호; 제5,578,717호; 제5,580,731호; 제5,580,731호; 제5,591,584호; 제5,109,124호; 제5,118,802호; 제5,138,045호; 제5,414,077호; 제5,486,603호; 제5,512,439호; 제5,578,718호; 제5,608,046호; 제4,587,044호; 제4,605,735호; 제4,667,025호; 제4,762,779호; 제4,789,737호; 제4,824,941호; 제4,835,263호; 제4,876,335호; 제4,904,582호; 제4,958,013호; 제5,082,830호; 제5,112,963호; 제5,214,136호; 제5,082,830호; 제5,112,963호; 제5,214,136호; 제5,245,022호; 제5,254,469호; 제5,258,506호; 제5,262,536호; 제5,272,250호; 제5,292,873호; 제5,317,098호; 제5,371,241호; 제5,391,723호; 제5,416,203호; 제5,451,463호; 제5,510,475호; 제5,512,667호; 제5,514,785호; 제5,565,552호; 제5,567,810호; 제5,574,142호; 제5,585,481호; 제5,587,371호; 제5,595,726호; 제5,597,696호; 제5,599,923호; 제5,599,928호 및 제5,688,941호을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

### [0192] 제제(Formulations)

본 발명의 화합물은 다른 분자들, 화합물의 분자 구조 또는 혼합물, 예를 들면, 리포좀, 수용체-표적화된 분자들, 흡수(uptake), 분포 및/또는 흡수를 지원하는 경구, 직장, 국소 또는 기타 제제와 혼합, 포침, 콘쥬게이트 또는 연합될 수 있다. 취입, 분포 및/또는 흡수-지원 제제를 만드는 방법을 교시하는 대표적인 미국 특허는 다음과을 포함하나 이에 한정되지 않는다: U.S. 특허 제5,108,921호; 제5,354,844호; 제5,416,016호; 제5,459,127호; 제5,521,291호; 제5,543,165호; 제5,547,932호; 제5,583,020호; 제5,591,721호; 제4,426,330호; 제4,534,899호; 제5,013,556호; 제5,108,921호; 제5,213,804호; 제5,227,170호; 제5,264,221호; 제5,356,633호; 제5,395,619호; 제5,416,016호; 제5,417,978호; 제5,462,854호; 제5,469,854호; 제5,512,295호; 제5,527,528호; 제5,534,259호; 제5,543,152호; 제5,556,948호; 5,580,575호; 및 5,595,756호, 이를 각각은 참고문헌에 통합된다.

[0194] 비록 안티센스 올리고뉴클레오티드는 표적 발현 및/또는 기능을 조절하기 위하여 벡터로 투여할 필요는 없지만, 본 발명의 구체예는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 발현을 위한 발현 벡터 구조체에 관계하는데, 이 벡터 구조

체는 프로모터, 하이브리드 프로모터 유전자 서열들을 포함하며, 그리고 강력한 구성 프로모터 활성 프로모터 활성 또는 원하는 경우 유도될 수 있는 프로모터 활성을 보유한다.

[0195] 구체예에서, 본 발명은 적절한 핵산 운반 시스템과 함께 전술한 안티센스 올리고뉴클레오티드중 최소한 하나를 투여하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 이 시스템은 폴리뉴클레오티드에 작용가능하도록 링크된 비-바이러스 벡터를 포함한다. 이와 같은 비-바이러스 벡터의 예는 올리고뉴클레오티드 만을 포함하거나(가령 서열 번호: 4 내지 10 중 임의의 하나 이상) 또는 적합한 단백질, 폴리사카라이드 또는 지질 제제와 복합된 것을 포함한다.

[0196] 추가로 적합한 핵산 운반 시스템은 바이러스 벡터를 포함하는데, 일반적으로 아데노바이러스, 아데노바이러스-연합된 바이러스(AAV), 헤파-의존성 아데노바이러스, 레트로바이러스 또는 Japan-리포좀 (HVJ) 복합체의 헤마글루티닌 바이러스중 최소한 하나로부터 서열을 포함한다. 바람직하게는, 바이러스 벡터는 폴리뉴클레오티드에 작용가능하도록 링크된 강력한 진핵 프로모터 가령, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터를 포함한다.

[0197] 추가적으로 바람직한 벡터는 바이러스 벡터, 융합 단백질 및 화학적 콘쥬게이트를 포함한다. 레트로바이러스 벡터는 Moloney 뮤린 백혈병 바이러스 및 HIV-계 바이러스를 포함한다. 한 가지 바람직한 HIV-계 바이러스 벡터는 최소한 두 개 벡터를 포함하는데, *gag* 및 *pol* 유전자는 HIV 계娄의 것이며, *env* 유전자는 또 다른 바이러스에서 유래된 것이다. DNA 바이러스 벡터가 바람직하다. 이들 벡터들은 오르소폭스(orthopox) 또는 아비폭스(avipox) 벡터와 같은 폭스 벡터, 허피스바이러스 벡터 예를 들면, 허피스 심플렉스 I 바이러스(HSV) 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 아데노-연합된 바이러스 벡터를 포함한다.

[0198] 본 발명의 안티센스 화합물은 임의의 약리학적으로 수용가능한 염, 에스테르 또는 이와 같은 에스테르의 염, 또는 인간을 포함하는 동물에게 투여할 때 생물학적 활성 대사를질 또는 이의 잔기를 제공(직간접적으로)할 수 있는 임의의 다른 화합물을 포함한다.

[0199] 용어 "약제학적으로 허용가능한 염"은 본 발명의 화합물의 생리학적 그리고 약제학적으로 허용가능한 염을 지칭하는데, 가령, 부모 화합물의 바람직한 생물학적 활성을 보유하지만, 화합물에 바람직하지 못한 독성 효과를 부여하지 않는 염을 말한다. 올리고뉴클레오티드의 경우, 약제학적으로 허용가능한 염의 바람직한 예시 및 이의 용도는 U.S. 특허 제6,287,860호에서 추가 설명되고 있으며, 이는 참고문헌에 통합된다.

[0200] 본 발명은 본 발명의 안티센스 화합물을 포함하는 약제 조성물 및 제제를 또한 포함한다. 본 발명의 약제 조성물은 국소 또는 전신 치료가 바람직한지 그리고 치료될 부위에 따라 여러 방법으로 투여될 수 있다. 투여는 국소(눈, 질 및 직장 운반을 포함하는 점막 포함), 네뷸리라이즈를 포함하여 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 들여마시는 것을 통하여 폐; 기관내(intratracheal), 비강, 상피 또는 경피), 구강 또는 장관외가 될 수 있다. 장관외(Parenteral) 투여는 정맥, 동맥내, 피하, 복막 또는 근육 주사 또는 주입; 또는 두개내(intracranial), 가령, 수막강내 또는 뇌실내 투여를 포함한다.

[0201] 중추 신경계내 조직을 치료하기 위하여, 뇌척수액으로 주입 또는 주사를 통하여 투여할 수 있다. 안티센스 RNA의 뇌척수액으로의 투여는 가령, 전문이 참고문헌에 통합되어 있는 U.S. Pat. App. Pub. No. 2007/0117772, "Methods for slowing familial ALS disease progression,"에서 설명하고 있다.

[0202] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 중추신경계의 세포로 투여하고자 할 때, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드가 혈액-뇌 장벽의 통과를 촉진시킬 수 있는 하나 이상의 물질과 함께 투여할 수 있다. 가령, 내후각뇌피질 또는 해마로 주사할 수 있다. 근육 조직내 운동 뉴우런으로 아데노바이러스 벡터를 투여하여 신경영양성 인자들의 운반은 가령, 전문이 참고문헌에 통합되어 있는 U.S. Pat. 제6,632,427호, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons,"에서 설명하고 있다. 뇌, 가령, 선조체(striatum), 시상(thalamus), 해마(hippocampus) 또는 흑질(substantia nigra)과 같은 뇌로 직접적으로 벡터의 운반은 당엽계에 공지되어 있으며, 그리고 가령, 전문이 참고문헌에 통합되어 있는 U.S. Pat. 제6,756,523호, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain"에서 설명하고 있다. 주사를 통하여 신속하게 투여할 수 있거나 또는 시간을 두고 서서히 주입 또는 자연 방출 제제의 투여를 통하여 이루어질 수 있다.

[0203] 본 안티센스 올리고뉴클레오티드는 또한 바람직한 약제 또는 약리학적 성질들을 제공하는 물질에 연결 또는 콘쥬게이트될 수 있다. 예를 들면, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 혈액-뇌 장벽의 침투를 촉진하는 또는 이를 통과하는 것으로 당엽계에 공지되어 있는 임의의 물질, 가령, 트랜스페린 수용체에 대한 항체에 결합시키고, 정맥 주사를 통하여 투여할 수 있다. 상기 안티센스 화합물은 안티센스 화합물을 더 효과적으로 만들거나 및/또는 혈액-뇌 장벽을 통한 안티센스 화합물의 운반을 증가시키는 바이러스 벡터에 연결시킬 수 있다. 삼투성 혈액

-뇌 장벽 파괴는 메소 에리트리톨(meso erythritol), 크실리톨, D(+) 갈락토즈, D(+) 락토즈, D(+) 크실로오즈, 둘시톨, myo-이노시톨, L(-) 푸락토즈, D(-) 만니톨, D(+) 포도당, D(+) 아라비노즈, D(-) 아라비노즈, 셀로비오즈, D(+) 말토오즈, D(+) 라파노즈, L(+) 람노즈, D(+) 멜리비오즈, D(-) 리비오즈, 아도니톨, D(+) 아라비톨, L(-) 아라비톨, D(+) 퓨코스, L(-) 퓨코스, D(-) 릭소스, L(+) 릭소스, 및 L(-) 릭소스을 포함하나 이에 한정되지 않는 슈가의 주입, 또는 글루타민, 리신, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민산, 글리신, 히스티딘, 루이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 티로신, 발린, 및 타우린을 포함하나 이에 한정되지 않는 아미노산을 주입하여 실행할 수 있다. 혈액-뇌 장벽 침투를 강화시키는 방법 및 재료들은 가령, 전문이 참고문헌에 통합되어 있는 U. S. 특허 제4,866,042호, "Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier," 제6,294,520호, "Material for passage through the blood-brain barrier," 그리고 제6,936,589호, "Parenteral delivery systems,"에서 설명하고 있다.

[0204]

본 안티센스 화합물들은 기타 분자들, 분자 구조 또는 화합물의 혼합물과 혼합, 포집, 콘쥬게이트 또는 연합될 수 있는데, 예를 들면, 취입, 분포 및/또는 흡수를 지원하기 위하여 리포좀, 수용체-표적화된 분자, 경구, 직장, 국소 또는 기타 제형이 될 수 있다. 예를 들면, 올리고뉴클레오티드 취입을 용이하게 하기 위하여 제형 내에 양이온 지질을 포함시킬 수 있다. 취입을 용이하게 하는 것으로 나타난 이러한 조성물중 하나가 LIPOFECTIN (GIBCO-BRL, Bethesda, MD)이다.

[0205]

최소한 하나의 2'-0-메톡시에틸 변형을 가진 올리고뉴클레오티드는 경구 투여용으로 특히 유용한다. 국소 투여를 위한 약제 조성물 및 제제는 경피 패취, 연고, 로션, 크림, 젤, 드롭, 좌약, 스프레이, 액상 및 분말을 포함한다. 통상적인 약리학적으로 캐리어, 수용성, 분말 또는 오일 베이스, 농후제 그리고 이와 유사한 것이 필수적이거나 바람직할 수 있다. 피복된 콘돔, 장갑 그리고 이와 유사한 것이 유용할 수 있다.

[0206]

본 발명의 약제 제제는 통상적으로 단위 약형으로 제공될 수 있는데, 이는 약학 산업분야에 공지된 기술에 따라 제조될 수 있다. 이와 같은 기술은 활성 성분들을 약학적 캐리어 또는 부형제와 연합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제제는 활성 성분들을 액상 캐리어 또는 미세하게 분할된 캐리어 또는 이들 모두와 연합되도록 하고, 그 다음 필요에 따라 산물의 모양을 만들어 제조할 수 있다.

[0207]

본 발명의 조성물은 정제, 캡슐, 젤 캡슐, 액체 시럽, 연질 젤, 좌약 및 관장제를 포함하나 이에 한정되지 않는 많은 가능한 약형으로 제조될 수 있다. 본 발명의 조성물은 액상, 비-액상 또는 혼합형 매질에 혼탁액으로 조제될 수 있다. 수용성 혼탁액은 카르복시메틸셀룰로오즈, 솔비톨 및/또는 텍스트란을 포함하는 혼탁액의 점성을 증가시키는 물질을 더 포함할 수 있다. 혼탁액은 안정화제를 포함할 수 있다.

[0208]

본 발명의 약제 조성물은 용액, 에멀젼, 리포좀-함유 제제를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 약제 조성물 및 제제는 하나 이상의 침투 강화제, 캐리어, 부형제 또는 기타 활성 또는 비활성 성분을 포함할 수 있다.

[0209]

에멀젼은 일반적으로 액체에  $0.1\mu\text{m}$ 를 초과하는 방울의 형태로 분산된 또 다른 액체로 구성된 이종(heterogeneous) 시스템이다. 에멀젼은 분산된 상에 추가하여 추가 성분, 그리고 수용성 상, 오일상의 용액으로 존재하는 또는 별도 상 자체로 존재하는 활성 성분을 포함할 수 있다. 본 발명의 구체예로 마이크로에멀젼이 포함된다. 에멀젼 및 이의 용도는 당분야에 공지되어 있으며, U.S. 특허 제6,287,860호에서 추가 설명된다.

[0210]

본 발명의 제제는 리포좀 제제를 포함한다. 본 발명에 이용된 것과 같이, 용어 "리포좀"은 구형 이중층 또는 이중층에 배열된 양쪽성 지질로 구성된 소포를 말한다. 리포좀은 단층라벨라 또는 다층라벨라로 친지성 물질로 형성된 막과 운반될 조성물을 포함하는 수용성 내부를 가진다. 양이온성 리포좀은 안정한 복합체를 형성하기 위하여 음전하를 띤 DNA 분자들과 상호작용하는 것으로 보이는 양전하를 띤 리포좀이다. pH-민감성 또는 음전하를 띤 리포좀은 복합체를 형성하기 보다는 DNA를 포집하는 것으로 본다. 양이온성 및 비-양이온성 리포좀은 세포로 DNA를 운반하는데 이용된다.

[0211]

리포좀은 또한 "공간적으로 안정화된" 리포좀을 포함하는데, 여기에서 사용된 이 용어는 하나 이상의 특화된 지질을 포함하는 리포좀을 말한다. 리포좀에 통합되었을 때, 이와 같은 특화된 지질은 이와 같은 특화된 지질이 없는 리포좀과 비교하였을 때 순환 반감기가 강화된 리포좀을 만든다. 공간적으로 안정화된 리포좀의 예는 리포좀의 소포-형성된 지질 부분이 하나 이상의 글리코리페드를 포함하거나 또는 하나 이상의 친지성 폴리머, 가령, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티로 유도화된 것들이다. 리포좀 및 이의 용도는 U.S. 특허 제6,287,860호에서 설명되고 있다.

- [0212] 본 발명의 제약 제제 및 조성물은 계면활성제 또한 포함할 수 있다. 약물, 제제 및 에멀젼에서 계면활성제의 이용은 당분야에 잘 공지되어 있다. 계면활성제 및 이의 용도는 U.S. 특허 제6,287,860호에서 추가 설명되고 있으며, 이는 참고문헌에 통합된다.
- [0213] 한 구체예에서, 본 발명은 핵산, 특히 올리고뉴클레오티드의 효과적인 운반을 위하여 다양한 침투 강화제를 이용한다. 세포 막을 가로질러 비-친지성 약물의 융합을 지원하는 것에 추가하여, 침투 강화제는 또한 친지성 약물의 침투성을 강화시킨다. 침투 강화제는 계면활성제, 지방산, 담즙산, 킬레이트제 그리고 비-킬레이트 비-계면활성제로 된 5가지 넓은 범주중 하나에 속하는 것으로 분류될 수 있다. 침투 강화제 및 이의 용도는 U.S. 특허 제6,287,860호에서 추가 설명되고 있으며, 이는 참고문헌에 통합된다.
- [0214] 당업자는 제제는 투여 경로와 같은 이들의 의도된 용도에 따라 통상적으로 기획된다는 것을 인지할 것이다.
- [0215] 본 발명의 올리고뉴클레오티드와 국소 운반제가 혼합된 국소 투여용 바람직한 제제가 포함되는데, 국소 운반제는 지질, 리포좀, 지방산, 지방산 에스테르, 스테로이드, 킬레이트제 및 계면활성제등이 된다. 바람직한 지질 및 리포좀은 중성(가령, 디올레일-포스파티딜 DOPE 에탄올아민, 디미리스토일포스파티딜 콜린 DMPC, 디스테아로일포스파티딜 콜린), 음성(가령, 디미리스토일포스파티딜 글리세롤 DMPG) 및 양이온(가령, 디올레일테트라메틸아미노프로필 DOTAP 및 디올레일-포스파티딜 에탄올아민 DOTMA)을 포함한다.
- [0216] 국소 또는 기타 투여용으로, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 리포좀내에 포집되거나 양이온 리포좀에 복합체를 형성할 수 있다. 대안으로, 올리고뉴클레오티드는 지질, 특히, 양이온 지질에 복합될 수 있다. 바람직한 지방산 및 에스테르, 이의 약제학적으로 허용가능한 염 그리고 이들의 용도는 U.S. 특허 제6,287,860호에서 추가 설명되어 있다.
- [0217] 경구 투여용 조성물 및 제제는 분말 또는 과립, 미립자, 나노입자, 물 또는 비-수용성 매질에서의 혼탁액 또는 용액, 캡슐, 젤 캡슐, 사 сет, 태블릿 또는 미니테블릿을 포함한다. 농후제, 향료, 희석제, 에멀젼화제, 분산 보조제 또는 결합제가 바람직할 수 있다. 바람직한 경구 제제는 본 발명의 올리고뉴클레오티드와 하나 이상의 침투 강화제, 계면활성제 및 킬레이터와 함께 투여되는 것들이다. 바람직한 계면활성제는 지방산 및/또는 이의 에스테르 또는 염, 담즙산 및/또는 이의 염을 포함한다. 바람직한 담즙산/염 그리고 지방산 및 이의 용도들은 U.S. 특허 제 6,287,860호에서 추가 설명되고 있으며, 이는 참고문헌에 통합된다. 침투 강화제, 예를 들면, 지방산/염과 담즙산/염의 복합 또한 바람직하다. 특히 바람직한 조합은 라우르산, 카프리산 및 UDCA의 나트륨염이다. 추가 침투 강화제는 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-20-세틸 에테르를 포함한다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 분무된 건조 과립을 포함하는 과립형으로 경구로 운반될 수 있고, 또는 미립자 또는 나노입자를 형성하기 위하여 복합될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 복합제 및 이의 용도는 U.S. 특허 제 6,287,860호에 추가 설명되어 있으며, 이는 참고문헌에 통합된다.
- [0218] 장관외, 기관내 또는 심실내 투여를 위한 조성물 및 제제는 완충액, 희석액 및 침투 강화제, 캐리어 화합물 및 기타 약제학적으로 허용가능한 캐리어 또는 부형제를 포함하나 이에 한정되지 않는 기타 적합한 침가제를 포함하는 멀균 수용액을 포함할 수 있다.
- [0219] 본 발명의 특정 구체예는 하나 이상의 올리고머 화합물 및 비-안티센스 기전에 의해 기능을 하는 하나 이상의 다른 치료제를 포함하는 약제 조성물을 제공한다. 이와같은 화학요법제의 예로는 다우노루비신, 다우노마이신, 닥티노마이신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 에소루비신, 블래오마이신, 마포스파미드, 이포스파미드, 시토신 아라비노시드, 비스클로로에틸-니트로조우레아, 부술판, 미토마이신 C, 악티노마이신 D, 미트라마이신, 프레드니손, 하이드록시프로게스테론, 테스토스테론, 탐옥시펜, 다카르바진, 프로카르바진, 헥사메틸멜라민, 펜타메틸멜라민, 미토산트론, 암사크린, 클로람부칠, 메틸사이클로헥실니트로조우레아, 질소 무스타드, 멜파란, 사이클로포스파미드, 6-멀캅토퓨린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-아자시티딘, 하이드록시우레아, 데옥시코포르미신, 4-하이드록시페옥시사이클로-포스포라미드, 5-플루오르우라실 (5-FU), 5-플루오르데옥시우리딘(5-FdR), 메토트렉세이트(MTX), 콜치신, 탁솔, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드(VP-16), 트리메트레세이트, 이리노테칸, 포토테칸, 켙시타빈, 테니포시드, 시스플라틴 및 디에틸스틸베스트롤(DES)과 같은 암 화학치료 약물을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 화합물과 함께 이용되면, 이와 같은 화학요법제는 개별적으로 (가령, 5-FU 및 올리고뉴클레오티드), 연속적으로(가령, 일정 시간동안 5-FU 및 올리고뉴클레오티드, 그 다음 MTX 및 올리고뉴클레오티드), 또는 하나 이상의 다른 화학요법제(가령, 5-FU, MTX 및 올리고뉴클레오티드, 또는 5-FU, 방사능요법 및 올리고뉴클레오티드)와 병용하여 이용될 수 있다. 비-스테로이드성 소염제를 포함하나 이에 한정되지 않는 소염제 약물 그리고 코르티코스테로이드, 항바이러스 약물(리비비린, 비다라빈, 아시클로비르 및 강시클로비르를 포함하나 이에 한정되지 않는)이 본 발명의 조성물에 복합될 수 있다. 안티센스 화합물

및 다른 비-안티센스 약물의 복합 또한 본 발명의 범위안에 있다. 두 개 이상의 복합 화합물이 함께 또는 연속적으로 이용될 수 있다.

[0220] 다른 관련된 구체예에서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 안티센스 화합물, 특히 제1핵산을 표적으로 하는 올리고뉴클레오티드 그리고 제 2 핵산 표적을 표적으로 하는 하나 이상의 추가 안티센스 화합물을 포함한다. 예를 들면, 제1 표적은 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)의 특정 안티센스 서열이 되며, 그리고 제 2 표적은 또 다른 뉴클레오티드 서열의 구역이 될 수 있다. 대안으로, 본 발명의 조성물은 동일한 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 핵산 표적의 상이한 구역을 표적으로 하는 두 개이상의 안티센스 화합물을 포함할 수 있다. 다양한 안티센스 화합물의 예들이 여기에서 설명되며, 기타 화합물들은 당분야에 공지된 적합한 화합물들 중에서 선택될 수 있다. 두 개 이상의 복합 화합물이 함께 또는 연속적으로 이용될 수 있다.

#### **약액주입(Dosing):**

[0222] 치료 조성물의 제제 및 이의 후속적인 투여(약액주입)은 당분야의 기술에 속한다. 약액주입은 수 일 내지 수개월 지속되는 치료 과정, 또는 치료 효과 또는 질병 상태의 감소가 수득되는 날까지의 치료 과정과 함께 치료될 질병 상태의 중증도, 반응성에 따라 달라진다.

[0223] 최적의 약액주입 일정은 환자의 신체에 약물 축적 측량으로부터 계산될 수 있다. 당업자는 최적의 주입량, 방법 및 반복률을 용이하게 결정할 수 있다. 최적의 약량은 개별 올리고뉴클레오티드의 상대적 효능에 따라 다양해질 수 있으며, 그리고 일반적으로 시험관 및 생체내 동물 모델에서 효과가 발견되는 EC<sub>50</sub>에 근거하여 예측된다. 일반적으로, 투약량은 체중 kg당 0.01 $\mu$ g 내지 100 g이 되며, 매일, 주단위, 월단위 또는 년단위로 한번 또는 2년마다 내지 20년마다 한번씩 제공될 수 있다. 당업자는 측정된 잔류 시간 및 체액 또는 조직에서 약물의 농도에 근거하여 약액주입에 대한 반복률을 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 성공적인 처치후, 질병 상태의 재발을 방지하기 위하여 환자가 유지요법을 받도록 하는 것이 바람직하며, 이때 올리고뉴클레오티드는 체중 kg당 0.01  $\mu$ g 내지 100 g 범위의 유지 약량으로, 하루에 1회 이상 내지 매 20년마다 1회로 투여된다.

[0224] 구체예들에서, 환자는 최소한 약 1mg/kg(체중), 최소한 약 2mg/kg, 최소한 약 3mg/kg, 최소한 약 4mg/kg, 최소한 약 5mg/kg, 최소한 약 6mg/kg, 최소한 약 7mg/kg, 최소한 약 8mg/kg, 최소한 약 9mg/kg, 최소한 약 10mg/kg, 최소한 약 15mg/kg, 최소한 약 20mg/kg, 최소한 약 25mg/kg, 최소한 약 30mg/kg, 최소한 약 35mg/kg, 최소한 약 40mg/kg, 최소한 약 45mg/kg, 최소한 약 50mg/kg, 최소한 약 60mg/kg, 최소한 약 70mg/kg, 최소한 약 80mg/kg, 최소한 약 90mg/kg, 또는 최소한 약 100 mg/kg의 약물을 투여량으로 치료된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 특정 주사 투여량은 가령, 전문이 참고문헌에 통합되어 있는 U.S. 특허 제7,563,884호, “Antisense modulation of PTP1B expression”에서 설명하고 있다.

[0225] 본 발명의 다양한 구체예들이 상기에서 설명되었는데, 이는 예를 든 것이며, 이에 한정되지 않음을 인지해야 한다. 본 발명의 범위 또는 사상을 벗어나지 않고, 본 발명의 내용에 따라 설명된 구체예에 대해 여러 변화가 만들어질 수 있다. 따라서, 본 발명의 범위는 상기 설명된 임의의 구체예에 한정되어서는 안된다.

[0226] 여기에서 언급된 모든 문헌들은 참고문헌에 통합된다. 본 출원에서 언급된 모든 공고 및 특히 문헌은 각 공개 또는 특히 문헌이 개별적으로 언급된 것과 같은 수준으로 모든 목적을 위하여 참고문헌에 통합된다. 본 서류에 다양한 참고문헌에서, 출원인은 이들을 본 발명의 “선행 기술”로 인정하지 않는다. 본 발명의 조성물 및 방법의 구체예는 다음의 실시예에서 설명된다.

#### **실시예**

[0228] 다음의 비-제한적 실시예는 본 발명의 선택된 구체예들을 설명하는 것이다. 나타낸 성분들에서 비율의 변화 및 대체 성분은 당업자에 자명하며, 본 발명의 구체예의 범위내에 있다.

#### **실시예 1:**

[0230] 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2)에 대한 핵산 분자 안티센스 및/또는 종양 괴사 인자 수용체 2 (TNFR2) 폴리뉴클레오티드의 센스 가닥에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오티드의 기획

[0231] 상기에서 명시된 것과 같이, 용어 “특이적인 올리고뉴클레오티드” 또는 “올리고뉴클레오티드 표적”은 (i) 표적 유전자의 부분과 안정적인 복합체를 형성할 수 있는, 또는 (ii) 표적 유전자의 mRNA 전사체의 일부분과 안정적

인 듀플렉스를 형성할 수 있는 서열을 가진 올리고뉴클레오티드를 말한다.

[0232] 적절한 올리고뉴클레오티드의 선택은 핵산 서열들을 자동으로 배열하고, 동일 또는 동사체 구역을 표시하는 컴퓨터 프로그램을 이용하여 실시한다. 이와 같은 프로그램을 이용하여 GenBank와 같은 데이터베이스를 조사하거나 또는 PCR 산물들을 서열화하여 수득된 핵산 서열들을 비교한다. 특정 종 범위로부터 핵산 서열을 비교하면, 종간에 적절한 동일성 수준을 나타내는 핵산을 선택할 수 있다. 유전자가 서열화안된 경우, 서든 블랏을 실시하여 표적 종과 다른 종의 유전자 사이에 동일성 수준을 결정한다. 다양한 염격성 수준에서 서든 블랏을 실시함으로써, 당분야에 공지된 바와 같이, 적절한 동일성 수준을 얻을 수 있다. 이 과정에 의해 조절되어야 할 개체에서 표적 핵산 서열에 대해서는 높은 수준의 상보성을 나타내고, 그리고 다른 종의 대응하는 핵산 서열들에 대해서는 낮은 수준의 상보성을 나타내는 올리고뉴클레오티드의 선택이 허용된다. 당업자는 본 발명에 사용하기 위한 유전자의 적절한 구역을 선택하는 것에 상당한 허용범위가 있다는 것을 인지할 것이다.

[0233] 안티센스 화합물은 표적 핵산에 화합물이 결합하여, 표적 핵산의 정상적인 기능을 간섭하여 기능 및/또는 활성이 조절되어 “특이적으로 하이브리드가능하며”, 그리고 특이적 결합이 바람직한 조건들, 가령, 생체 분석 또는 치료요법적 처치의 경우 생리학적 조건, 또는 분석이 시험관 분석으로 실행되는 경우의 조건하에서 비-표적 핵산 서열에 안티센스 화합물의 비-특이적 결합을 회피할 수 있도록 충분한 수준의 상보성이 있다.

[0234] 여기에서 설명된 올리고뉴클레오티드의 하이브리드화 성질은 당분야에 공지된 하나 이상의 시험관 분석에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 여기에서 설명된 올리고뉴클레오티드의 성질은 용융 곡선 분석(Melting curve assay)을 이용하여 표적 천연 안티센스와 잠재적인 약물 분자들 사이에 결합 강도를 측정함으로써 수득될 수 있다.

[0235] 표적 천연 안티센스와 잠재적인 약물 분자(Molecule) 사이에 결합 강도는 예를 들면, 용융 곡선 분석과 같은 분자간 상호작용의 강도를 측정하는 확립된 방법중 임의의 것을 이용하여 예측될 수 있다.

[0236] 용융 곡선 분석은 천연 안티센스/분자 복합체에서 이중 가닥으로부터 단일 가닥 형태로 신속하게 전이가 일어나는 온도를 결정한다. 이 온도는 두 개 분자 사이에 상호작용 강도의 신뢰성있는 척도로 광범위하게 인정된다.

[0237] 용융 곡선 분석은 실제 천연 안티센스 RNA 분자 또는 분자의 결합 부위에 상응하는 합성 DNA 또는 RNA 뉴클레오티드의 cDNA 복사체를 이용하여 실시된다. 이 분석을 실행하기 위하여 모든 필수 시약을 포함하는 다중 키트를 이용한다(가령 *Applied Biosystems Inc. MeltDoctor kit*). 이들 키트들은 이중 가닥 DNA (dsDNA) 결합 염료(가령, ABI HRM 염료, SYBR Green, SYTO, 등) 중 하나를 포함하는 적절한 완충액을 포함한다. dsDNA 염료의 성질은 이들이 자유형에서는 형광을 방출하지 않지만, dsDNA에 결합되면 상당한 형광성이라는 것이다.

[0238] 이 분석을 실행하기 위하여, cDNA 또는 대응하는 올리고뉴클레오티드를 특정 제조업자의 프로토콜에 명시된 농도에서 분자와 혼합시킨다. 혼합물을 95°C로 가열시켜, 모든 미리-형성된 dsDNA 복합체를 해리시키고, 그 다음 실온으로 서서히 냉각시키거나 또는 키트 제조업자가 정한 다른 낮은 온도로 냉각시켜, DNA 분자들이 어닐(anneal)되도록 한다. 새로 형성된 복합체를 다시 95°C 가열시키고, 반응에 의해 생성된 형광물질의 양에 대한 데이터를 동시에 수집한다. 형광 강도는 반응에 존재하는 dsDNA의 양에 역비례한다. 키트에 사용 가능한 실시간 PCR 장비(가령 ABI's StepOne Plus 실시간 PCR 시스템 또는 LightTyper instrument, Roche Diagnostics, Lewes, UK)를 이용하여 데이터를 수거할 수 있다.

[0239] 적합한 소프트웨어(예를 들면, LightTyper (Roche) 또는 SDS Dissociation Curve, ABI)를 이용하여 온도(x축)에 대해 온도에 따른 형광물질의 네가티브 유도체를 플롯팅하여(y축상에 -d(Fluorescence)/dT) 용융 피크를 만든다. dsDNA 복합체에서 단일 가닥 분자들로의 신속한 전이 온도를 확인하기 위하여 데이터를 분석한다. 이 온도를 Tm 이라고 하며, 두 분자간의 상호작용 강도에 직접적으로 비례한다. 일반적으로, Tm은 40°C를 넘을 것이다.

#### 실시예 2: TNFR2 폴리뉴클레오티드의 조절

[0241] HepG2 세포를 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리

[0242] ATCC (cat# HB-8065)의 HepG2 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 성장 배지(MEM/EBSS (Hyclone cat #SH30024, 또는 Mediatech cat # MT-10-010-CV) +10% FBS (Mediatech cat# MT35-011-CV)+페니실린/스트렙토마이신(Mediatech cat# MT30-002-CI)에서 성장시켰다. 실험 하루전, 세포는  $1.5 \times 10^5 / \text{ml}$ 의 농도로 6개 웰 플레이트에 재도말시키고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 항온처리하였다. 실험 당일, 6개 웰 플레이트에 있는 배지는 새로운 성장배지로 대체하

였다. 모든 안티센스 올리고뉴클레오티드를 20  $\mu\text{M}$ 의 농도가 되도록 희석시켰다. 이 용액 2 $\mu\text{l}$ 를 400 $\mu\text{l}$ 의 Opti-MEM 배지 (Gibco cat#31985-070) 및 4 $\mu\text{l}$ 의 리포펙타민 2000 (Invitrogen cat# 11668019)와 실온에서 20분간 항온처리하고, HepG2 세포가 있는 6개 웰 플레이트의 각 웰에 제공하였다. 올리고뉴클레오티드 용액 대신 물 2 $\mu\text{l}$ 를 포함하는 유사 혼합물을 허위-처리된 기준으로 이용하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 3-18시간 동안 항온처리후, 배지를 새로운 성장 배지로 교환하였다. 안티센스 올리고뉴클레오티드를 추가시킨 후 48시간 후, 배지를 제거하였고, SV Total RNA Isolation System(Promega (cat # Z3105)) 또는 RNeasy Total RNA Isolation Kit(Qiagen (cat# 74181))를 이용하여 제조업자의 지시에 따라 세포로부터 RNA를 추출하였다. 600ng의 RNA를 Verso cDNA 키트 (Thermo Scientific (cat#AB1453B)) 또는 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(cat# 4368813)을 이용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 실시된 역전사 반응에 첨가하였다. 이와 같은 역전사 반응에서 cDNA를 이용하여 ABI Taqman Gene Expression Mix (cat#4369510) 및 ABI에서 기획한 프라이머/프로브(Applied Biosystems Taqman Gene Expression Assay: Hs00961755\_m1 Appliend Biosystems Inc., Foster City CA에서 제공)을 이용하여 실시간 PCR에 의해 유전자 발현을 모니터하였다. 다음과 같은 PCR 주기가 이용되었다: 50°C 2분, 95°C 10분, Mx4000 thermal cycler (Stratagene)를 이용하여 [95°C 15초, 60°C 1분]을 40회.

[0243] 처리된 샘플과 허위로 처리된 샘플간에 18S-표준화된 dCt 값에서 차이에 근거하여 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리후 유전자 발현에서 폴드 변화가 계산되었다.

#### 결과:

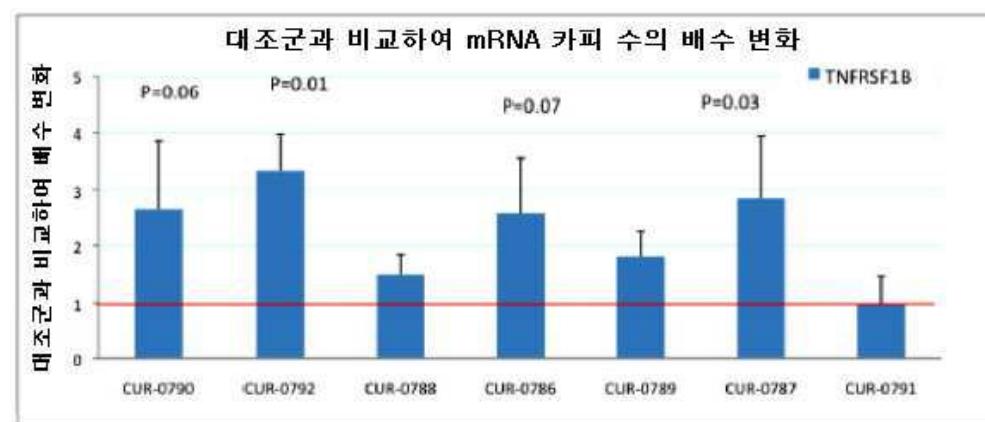
[0245] 실시간 PCR 결과에서, TNRSF1B 안티센스 Hs.679340 (CUR-0792)에 대해 기획된 올리고중 1개, Hs.639108 (CUR-0787)에 대해 기획된 한 개의 올리고로 처리한 후 48시간 시점에서 HepG2 세포에서 TNRSF1B mRNA 수준은 상당히 증가한다(도 1).

[0246] 본 발명은 하나 이상의 실행에 대해 설명되고 묘사되었지만, 본 명세서 및 첨부된 도면을 이해하면 당업자는 동등한 변형 및 변화가 있을 수 있다는 것을 인지할 것이다. 또한, 본 발명의 특정 성질들은 몇 가지 실행 중 하나에 대해 설명되었지만, 이와 같은 성질이 다른 하나 이상의 성질과 복합될 수 있으며, 이는 임의의 주어진 또는 특정 부분에 바람직 할 수 있다.

[0247] 내용의 요약은 기술 내용을 신속하게 확인할 수 있도록 도와줄 것이다. 이는 다음의 청구범위의 범위 또는 영역을 이해하거나 범위를 한정하는데 이용되어서는 안될 것이다.

#### 도면

##### 도면1



#### 서열 목록

##### SEQUENCE LISTING

<110> CuRNA, Inc.

<120> TREATMENT OF TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR 2 (TNFR2) RELATED DISEASES BY INHIBITION OF NATURAL ANTISENSE TRANSCRIPT TO TNFR2

<130> TNFR2

<150> 61/219,911

<151> 2009-06-24

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3682

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<300><308> NM\_001066.2

<309> 2010-06-06

<313> (1)..(3682)

<400> 1

gcgagcgcag cggagcctgg agagaaggcg ctgggctgcg agggcgcgag ggcgcgaggg	60
---	----

cagggggcaa ccggaccccg cccgcaccca tggcgcccgt cgccgtctgg gccgcgctgg	120
---	-----

ccgtcggact ggagctctgg gctcgccgc acgccttgcc cgcccaggtg gcatttacac	180
--	-----

cctacgcccc ggagcccggg agcacatgcc ggctcagaga atactatgac cagacagctc	240
---	-----

agatgtgctg cagcaaatgc tcgcccggcc aacatgcaaa agtcttctgt accaagacct	300
---	-----

cggaacaccgt gtgtgactcc tgtgaggaca gcacatacac ccagctctgg aactgggttc	360
--	-----

ccgagtgctt gagctgtggc tcccgctgtta gctctgacca ggtggaaact caagcctgca	420
--	-----

ctcggaaca gaaccgcata tgcacctgca ggcccggtg gtactgcgcg ctgagcaagc	480
---	-----

aggaggggtg ccggctgtgc ggcgcgtgc gcaagtgcgc cccggcttc ggcgtggcca	540
---	-----

gaccaggaac taaaacatca gacgtggtgt gcaagccctg tgcccccggg acgttctcca	600
---	-----

acacgacttc atccacggat atttgcaggc cccaccagat ctgtaacgtg gtggccatcc	660
---	-----

ctggaaatgc aagcatggat gcagtctgca cgtccacgtc cccacccgg agtatggccc	720
--	-----

cagggcagt acacttaccc cagccagtgt ccacacgtc ccaacacacg cagccaaactc	780
--	-----

cagaacccag cactgctcca agcacctct tcctgctccc aatggccccc agccccccag	840
--	-----

ctgaaggag cactggcgac ttgcgtcttc cagttggact gattgtgggt gtgacagect	900
--	-----

tgggtctact aataatagga gtggtaact gtgtcatcat gaccagggtg aaaaagaagc	960
--	-----

ccttgtgcct gcagagagaa gccaagggtgc ctcacttgcc tgccgataag gcccgggta	1020
cacagggccc cgagcagcag cacctgctga tcacagcgcc gagctccagc agcagctccc	1080
tggagagctc ggccagtgcg ttggacagaa gggcgccac tcggaaccag ccacaggcac	1140
caggcgtgga gcccagtggg gccggggagg cccggccag caccggagc tcagatttt	1200
cccctgtgg ccatggacc caggtcaatg tcacctgcat cgtaacgtc tgttagcagct	1260
ctgaccacag ctacagtgc tcctccaaag ccagctccac aatgggagac acagattcca	1320
gcccctcgga gtccccgaag gacgagcagg tcccctctc caaggagggaa tgtgccttc	1380
ggtcacagct ggagacgcca gagaccctgc tggggagcac cgaagagaag cccctgcccc	1440
ttggagtgcc tgaatgtggg atgaagccca gttaaaccagg ccggtgtgg ctgtgtcgta	1500
gccaagggtgg gctgagccct ggcaggatga ccctgcgaag gggccctggt cttccaggc	1560
ccccaccact aggactctga ggctctttct gggccaagtt cctctagtgc cttccacage	1620
cgcagcctcc ctctgacctg caggccaaga gcagaggcag cgagttgtgg aaagcctctg	1680
ctgcacatggc gtgtccctct cggaaaggctg gctggccatg gacgttcggg gcatgctggg	1740
gcaagtccct gactctctgt gacctgcccc gcccagctgc acctgccagc ctggctctg	1800
gagcccttgg gttttttgtt tgtttgtt tttgttttt tgtttctccc cctgggctct	1860
gccccagctc tggctccag aaaaccccaag catcctttc tgcaaggggg ctttctggag	1920
aggagggatg ctgcctgagt cacccatgaa gacaggacag tgcttcagcc tgaggctgag	1980
actgcgggat ggtcttggg ctctgtgcag ggaggagggtg gcagccctgt agggAACGGG	2040
gtccttcaag ttagctcagg aggcttggaa agcatcacct caggccaggt gcagtggctc	2100
acgcctatga tcccagact ttgggaggct gaggcgggtg gatcacctga ggtaggagt	2160
tcgagaccag cctggccaac atggtaaaac cccatctcta ctaaaaatac agaaattagc	2220
cgggcgtgg tgcgggcacc tatagtccca gctactcaga agcctgaggc tggaaatcg	2280
tttgaaccccg ggaagcggag gttgcaggga gccgagatca cgccactgca ctccagccgt	2340
ggcgcacagag cgagagtctg tctcaaaga aaaaaaaaaaag caccgcctcc aaatgccaac	2400
ttgtcccttt gtaccatgtt gtgaaagtca gatgccaga gggcccaggc aggccaccat	2460
attcagtgtt gtggcctggg caagataacg cacttctaac tagaaatctg ccaatttttt	2520
aaaaaaagtaa gtaccactca gccaacaag ccaacgacaa agccaaactc tgccagccac	2580
atccaacccc ccacactgcca tttgcacccct ccgccttac tccgggtgtc ctgcagcccc	2640
gcccctcctt cttgtgtc ctaggccaca ccatctcctt tcagggatt tcaggaacta	2700
gagatgactg agtctcgta gcatctctc tactctacc tcagcctaga ccctccct	2760
cccccagagg ggtgggttcc tttccccac tccccaccc caattcctgg gccccaaacg	2820

ggctgccctg ccacttttgt acatggccag tgtgatccca agtgcagtc ttgtgtctgc 2880  
 gtctgttgtg cgtgtcgtag gtgtgtgtg ccaaggctcg taagttgaat ggcctgcctt 2940  
 gaagccactg aagctggat tcctccccat tagagtcagc ctccccctc ccagggccag 3000

ggccctgcag agggaaacc agtgtagcct tgcccgatt ctgggaggaa gcaggttgag 3060  
 gggctctgg aaaggctcg tctcaggagc atggggataa aggagaaggc atgaaattgt 3120  
 ctagcagacg agggcaggg tgataaattt tgataaattt ccactggact tgagcttggc 3180  
 agctgaacta ttggagggtg ggagagccca gccattacca tggagacaag aagggtttc 3240  
 caccctggaa tcaagatgtc agactggctg gctgcagtga cgtgcacctg tactcaggag 3300  
 gctgagggga ggtactgg agcccaggag tttgaggctg cagcgagcta tgatcgcgcc 3360  
 actacactcc accctgagca acagagttag accctgtctc ttaaagaaaa aaaaagttag 3420

actgctggga ctggccaggt ttctgccac attggacca catgaggaca tcatggagcg 3480  
 cacctgcccc ctggggaca gtcctggag aacctcaggc ttcctggca tcacaggca 3540  
 gagccggaa gcgatgaatt tggagactt gtggggcctt gttccctt tggtgtgt 3600  
 ttgatccaa gacaatgaaa gttgcactg tatgctggac ggcattcctg cttatcaata 3660  
 aacctgtttt tttaaaaaa aa 3682

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 413

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

gggagcccca ggtggcacag aaggaggctg agtcctattc ctgggctgg gacccagta 60

gagccgagta ctgaggagcc tcattcaaaa cacaggatcc cagggccggg cgccagtggt 120  
 cacacctgtta atcccagcac ttggggaggc cgaggtggtc accgaatcac gaggtcagg 180  
 gattgagacc atcctggcta acaagggtaa accccgtctc tactaaaaat aaaaaaaaaatt 240  
 agctggcga gctgggggt gcctgttagtc ccagctactt gggaggctga ggcaggagaa 300  
 tgggtgtgaac cggggaggcg gagcttgcag tgagccaaga ttgtgccact gcactccagc 360  
 ctggcgcaca aagcaagact ctttctcaag aaaaaaaaaa aaaaaaacat gtc 413

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 413

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

ttttttttt tttttttgg gcaaagacta agagttata attggagcgc actcattcat	60
tcattcattc aacagtgtgt agggcccctg atctttcca ggcactggcc caggccctcc	120
catagggagt tcicaggatg gagtgagggg cactigtgag acctccacc gaggaggctg	180
ggggctatga tgccccagac agaaatggcc acgtcagctc ctgtggcag ttggggacag	240
gttagAACAG gtgtggcagg caggggtggc atgagtgcag gcaagaggca gggcgcagt	300
gagctgggaa gcagctgggg gtgagtgagc tggaggaggg ctgcgtggcagggctgcag	360
ccatcagtcc ccacctggag gcggcccaa gggagcctgg ccctggctg gtg	413

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Antisense oligonucleotide

&lt;400&gt; 4

gttcacacca ttctcctgcc t	21
-------------------------	----

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Antisense oligonucleotide

&lt;400&gt; 5

agcctgcttc tgtgccacct	20
-----------------------	----

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Antisense oligonucleotide

&lt;400&gt; 6

ctcctcagta ctcggctct	19
----------------------	----

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 7

acaccattct cctgcctca

19

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 8

tgcctgccac acctgttcct

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 9

ctccatcctg agaactccct

20

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 10

gccacacctg ttccctacctg t

21