

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C12N 15/11
A61K 9/127
A61K 31/70
C07H 19/073
C07H 19/173
C07H 21/04

(11) 공개번호 특2000-0005561
(43) 공개일자 2000년01월25일

(21) 출원번호	10-1998-0708435
(22) 출원일자	1998년 10월 17일
번역문제출일자	1998년 10월 17일
(86) 국제출원번호	PCT/US1997/06412
(86) 국제출원출원일자	1997년 04월 17일
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 가나 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 가나 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 오스트리아 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국 국내특허 : 아일랜드 알바니아 오스트레일리아 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 쿠바 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드
(30) 우선권주장	60/015,752 1996년04월17일 미국(US)
(71) 출원인	아로빅스 파마슈티칼즈, 인코포레이티드 미국 텍사스주 77381-4223 더 우드랜즈 리써치 포레스트 드라이브 3400웁스 트마리온러벨도이칠란트게엠베하 로제르트, 피셔 키 독일데-65929프랑크푸르트암마인브뤼닝슈트라세50
(72) 발명자	차우드하리 닐랍 미국 콜로라도주 80027 루이스빌 사우쓰 맥카슬린 볼러바드 228 아파트먼트 100 라오 티 수드하카르 미국 텍사스주 77381 더 우드랜즈 루쉬 메도우 플레이스 46 레반카르 가나파티 알 미국 텍사스주 77381 더 우드랜즈 노오쓰 밀트레이스 드라이브 180 코숨 폴 에이 미국 텍사스주 77381 더 우드랜즈 사우쓰 윈드스올 플레이스 27 란도 로버트 에프 미국 텍사스주 77380 더 우드랜즈 도베테일 플레이스 35 파이만 아누쉬 독일 데-65779 켈크하임 차일스하이머슈트라세 46 울만 오이겐 독일 데-61479 글라슈텐 춤 탈블리크 31
(74) 대리인	이병호

심사청구 : 없음

(54) 혈관 내피 성장 인자(VEGF/VPF) 발현의 안티센스 억제제

요약

본 발명은 올리고뉴클레오티드를 사용하여 혈관 내피의 성장 인자를 억제하는 것에 관한 것이다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 서열 특이적인 방식으로 표적 mRNA에 결합하여 암호화된 유전자의 발현을 방해하는 것으로 여겨진다. 올리고뉴클레오티드의 안정성 및 결합 효율성을 증가시키기 위한 화학적 변형이 본원에 기술되어 있다. 이러한 변형은 본 발명에서 고려되는 올리고뉴클레오티드의 안정성 및 효율성

을 증가시킨다. 올리고뉴클레오타이드 조성물은 대식세포의 치료를 위한 생체외 치료법, 또는 주입, 흡입, 국소적 치료 또는 기타의 투여 경로에 의한 생체내 치료법에 사용될 수 있다.

대표도

도1

명세서

관련 출원의 전후-참조

본 출원은 1996년 4월 17일에 출원되어, 계속중인 연속 번호 제60/015,752호의 가특허원을 우선권의 기초로 한다.

연방 정부에 의해 후원되는 연구 또는 개발에 관한 성명

해당 없음.

배경기술

발명의 분야

본 발명은 올리고뉴클레오타이드를 사용한 혈관 내피 성장 인자 발현의 세포성 억제에 관한 것이다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 서열 특이적인 방식으로 표적 mRNA에 결합하여 암호화된 VEGF 유전자의 발현을 방해하는 것으로 여겨진다. 올리고뉴클레오타이드에 대한 화학적 변형은 올리고뉴클레오타이드의 안정성 및 결합 효율성을 증가시키기 위한 것으로 기술되어 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 조성물은 대식세포의 치료를 위한 생체외 치료법 또는 주입, 흡입, 국소적 치료 또는 기타의 투여 경로에 의한 생체내 치료법에 사용될 수 있다.

관련 기술의 설명

혈관 침투성 인자로서 또한 공지된 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 크기가 34 내지 46킬로달톤인 동종이량체의 분비성 당단백질의 패밀리리를 포함한다. 이는 저산소압 및 특정 조절 인자에 반응하는 각종 세포 유형에 의해 분비된다. VEGF의 4가지 이소타입이 공지되어 있다. 이들은 단일 유전자로부터의 선택적인 mRNA 스플라이싱에 의해 생성된다[참조: Keck et al., 1989; Leung et al., 1989; Connolly and Plander, 1989; Tischer et al., 1991].

VEGF는 성장 및 발생 과정 동안의 혈관의 형성(혈관형성, angiogenesis), 및 조직 회복에 필수적이다[참조: Ferrera et al., 1996; Carmeliet et al., 1996; Thomas, 1996; Dvorak et al., 1995 a,b; Folkman, 1995; Ferrera et al., 1992]. 혈관 침투성을 유발하는 상기 인자는 단핵구 및 조골세포에 대해 화학주성을 가지며, 내피 세포에 대해 선택적인 유사분열물질(mitogen)이다. VEGF에 대한 수용체 단백질(사람의 경우 KDR 및 Flt-1)은 막투과(transmembrane) 티로신 키나아제 패밀리에 속한다[참조: Terman et al., 1992; de Vries et al., 1992]. 수용체의 활성화는 혈관 내피 세포를 현저하게 증가된 비율로 증식시켜 신혈관신생(neovascularization)을 일으키는 일련의 반응을 개시한다. VEGF는 혈관형성에 관여하는 기타의 어떤 단백질 인자보다도 내피 세포 증식을 유발하는데 있어서 보다 선택적이다. 불행하게도, 특정 조건하에서는 VEGF의 존재가 건강에 해로운 영향을 끼친다.

VEGF의 비정상적인 고농도는 고도의 혈관신생(vascularization) 또는 혈관 침투성을 특징으로하는 질환과 관련이 있다. 상기 질환의 예로는 당뇨병 망막증, 침습성 암, 건선, 류마티스성 관절염 및 기타 염증 상태가 포함된다[참조: D'Amore, 1994; Dvorak et al., 1995 a,b; Folkman, 1995]. VEGF-매개된 혈관신생을 감소시키기 위해서는 비정상적으로 고농도인 VEGF를 선택적으로 감소시키는 조성물 및 방법이 필요하다. 이들 방법 및 조성물은 혈관신생 및 혈관 침투성을 특징으로하는 질환의 진행을 늦추는데 사용될 수 있다.

VEGF 농도를 감소시키는데 사용되는 한 방법은 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 사용을 포함한다[참조: Wagner, 1994]. 이 기술의 중요 잇점은 억제가 특이적으로 달성될 수 있다는 점이다. 유용한 올리고뉴클레오타이드는 mRNA의 특이적 서열에 결합하여 암호화된 유전자의 발현을 방해한다고 여겨진다. 단백질 발현은 리보솜 기능의 억제, 해독될 수 있는 기질 mRNA의 농도 감소 또는 기타 메카니즘에 의해 감소될 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오타이드는 mRNA 분자의 분해속도를 올리고뉴클레오타이드-매개로 증가시킴으로써 mRNA 농도를 감소시킬 수 있다. 종종 보다 짧은 올리고뉴클레오타이드가 결합하기도 하지만, 일반적으로는 약 15염기의 올리고뉴클레오타이드가 의도된 RNA 표적에 서열 특이적인 결합을 제공하는데 충분하다[참조: Uhlmann and Peyman, 1990]. 그러나, 시험관내 실험에서 단백질의 발현을 감소시키는데는 11 내지 30개의 염기를 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 사용된다[Uhlmann and Peyman, 1990].

안티센스 치료법의 잠재적인 잇점이 질환을 치료함에 있어 실현되기에 앞서 수많은 장애가 극복되어야 한다. 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 거대한(약 3,000 내지 10,000) 친수성 화합물이며, 이는 시토졸 또는 핵에서 이의 표적과 결합하기전 소수성 세포막을 통과하여야 한다[참조: Uhlmann and Peyman, 1990; milligan et al., 1993]. 따라서, VEGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 세포막을 통한 수송을 용이하게 하기 위한 방법이 필요하다. 치료적 올리고뉴클레오타이드는 또한 비독성이어야 하고, 정상적인 세포의 물질 대사를 방해해서는 안된다. 이런 비특이적인 효과를 최소화하기 위해, 이들은 고특이성 및 고친화성을 갖는 이의 동족성 서열에 결합해야 한다.

천연의 포스포디에스테르 골격을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 혈청 및 세포 뉴클레아제에 매우 감수성이 있다. 17개 염기의 랜덤 올리고뉴클레오타이드 서열은 혈청에서 반감기가 3분 미만이다[참조: Bishop et al., 1996]. 이를 신혈관성 질환의 치료제로서 사용할 수 있기 위해서는 안정성이 증가된 올리고뉴클레

오티드가 요구된다. 포스포디에스테르 그룹을 포스포로티오테이트로 치환하면, 올리고뉴클레오타이드의 반감기가 증가된다. 이들은 각종 화학적 환경에서 화학적으로 불활성이고 뉴클레아제에 내성이 있어야 한다. 그러나, 이전에는 이러한 올리고뉴클레오타이드가 선택적인 방식으로 VEGF 발현을 억제시키는 것이 밝혀지지 않았다.

이전에 공지된 포스포로티오테이트 올리고뉴클레오타이드의 한 가지 단점은 VEGF 발현을 감소시키는데 1마이크로몰(μM) 이상의 농도가 필요하다는 것이다[참조: Nomura et al., 1995; Robinson et al., 1996]. 상기 농도에서, 이 올리고뉴클레오타이드는 독성을 가지며[참조: Woolf et al., 1992; Stein and Cheng, 1993; Stein and Kreig, 1994; Wagner, 1994; Fennewald et al., 1996], 관찰된 효과는 아마도 이런 비특이적 독성의 결과일 것이다[참조: Fennewald et al., 1995]. 비독성의 농도로 VEGF 발현을 억제시킴으로써 실제의 안티센스 효과를 나타내는 신규한 올리고뉴클레오타이드 억제제가 요구된다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 종래의 VEGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드보다 이의 표적 mRNA 서열에 대해 보다 높은 결합율 및/또는 증가된 특이성을 갖는 것 같다.

종래의 VEGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 유효성이 제한되는 점에 대해 몇가지 설명이 가능하다. 한 가지 가능성으로는 올리고뉴클레오타이드 결합을 입체적으로 차단시키는 거대분자 구조내에 표적 RNA 서열이 감추어 질 수 있다는 점이다. 예를 들어, RNA 결합 단백질 및 단백질 해독 복합체는 올리고뉴클레오타이드 결합을 차단할 수 있다. 달리, 올리고뉴클레오타이드는 mRNA의 바람직하지 못한 형태에 결합할 수 없다. 또한, 유효한 표적 서열의 위치가 변경될 수 있다. 유효한 표적 서열은 표적 mRNA 전사체상의 어느 곳에도 위치할 수 있으며, 해독 개시 코돈 또는 5' 비해독 영역에 대해 표적화된 올리고뉴클레오타이드가 항상 유효한 것은 아니다[참조: Wagner et al., 1993; Fenster et al., 1994]. 올리고뉴클레오타이드와 다른 분자(예: 단백질) 사이의 비특이적 상호작용은 또한 다양한 생물학적 활성을 이끌어낼 수 있다[참조: Woolf et al., 1992; Stein and Cheng, 1993]. 또한, 올리고뉴클레오타이드 자체가 예상하지 못한 위치에서 DNA와 결합하는 예상치 못한 3차 및 4차 구조를 취할 수도 있다. 이런 비정상적 결합은 목적하지 않는 생물학적 효과를 발생할 수 있는 잠재성을 갖는다[참조: Chaudhary et al., 1995]

또한 효과적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 대한 연구는 다른 난관에 직면하게 되었다. RNA 표적에 대한 올리고뉴클레오타이드의 친화성은 길이와 G-C 함량의 증가에 따라 증가된다. 그러나, 보다 긴 올리고뉴클레오타이드는 비특이적으로 RNA 서열 및 올리고뉴클레오타이드에 결합하는 경향이 있다. 더욱이, G-함량이 높은 올리고뉴클레오타이드는, 안티센스 결합에 필요하다고 여겨지는 올리고뉴클레오타이드의 자유-코일 형태의 양을 감소시키는 G-사중체(quartets)를 형성하는 경향이 있다[참조: Bishop et al., 1996]. 따라서, 길이가 짧고 표적 서열에 대해 고친화성을 가지는 물론, G 함량이 높음에도 불구하고 G-사중체를 형성하지 않는 올리고뉴클레오타이드가 필요하다.

상기에서 주지한 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드는 거대한 친수성 화합물로서, 시도졸 또는 핵내의 표적과 결합하기에 앞서 소수성 세포막을 통과해야 한다[참조: Uhlmann and Peyman, 1990; Milligan et al., 1993]. 그러나, 크기가 크고, 친수성 및 음전하를 갖기 때문에, 올리고뉴클레오타이드는 세포막을 효율적으로 통과하지 못한다. 세포성 흡수 촉진제의 부재하에, 올리고뉴클레오타이드는 처리된 세포의 핵주위 엔도솜 구획에 축적되는 경향이 있다[참조: Fischer et al., 1993; Guy-Caffey et al., 1995]. 이 경우, 원형질막 또는 엔도솜 구획의 막을 통한 올리고뉴클레오타이드의 운반은 이의 내화(internationalization) 속도 및 이의 활성을 제한한다. 따라서, 지질 이중층을 통과하는 올리고뉴클레오타이드의 속도를 향상시키는 신규한 조성물 및 방법이 필요하다.

지질 흡수 촉진제의 한 부류에는 핵산에 결합하는 양전하성 헤드 그룹 및 막 성분과 상호작용한다고 여겨지는 막-상호작용성 테일(tail)이 포함된다. 이들 조성물은 일시적으로 세포막을 파괴시켜 올리고뉴클레오타이드의 세포내 침투를 용이하게 할 수 있는 것으로 추정된다. 불행하게도, 많은 양이온성 지질 제제, 예를 들면 Lipofectin[®], 즉 양이온성 지질 DOTMA 및 융합원성(fusogenic) 지질 디올레오일 포스포티딜에탄올아민(DOPE)(Life Technology, Inc., Gaithersburg)의 1:1 (질량) 리포좀성 혼합물은 핵산의 조성물 양, 표적 세포 유형 및 세포 성장 배지내의 혈청 농도와 같은 인자에 매우 민감하다. 또한 몇몇 제제는 그 자체로도 세포독성이 있다. 이러한 제약으로 인해, 상기 화합물의 대부분이 동물 시스템에서 치료적 용도의 올리고뉴클레오타이드 운반체로서 사용되는 것이 제한된다. 올리고뉴클레오타이드에 적합한 개선된 운반 시스템이 동정되어야 한다.

요약해서, 많은 질환의 진행은 VEGF의 과다 발현에 의해 야기되는 혈관형성 및 혈관 침투성의 증가와 관련이 있다. VEGF 발현을 특이적으로 감소시키는 신규한 조성물 및 방법이 이들 질환의 치료에 유용하다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료는 이의 잠재적인 선택성으로 인해 매력적인 방법이다.

불행하게도, 공지된 많은 VEGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포에 독성이며, 비특이적 효과를 나타내는 농도에서만 작용한다. 또한, 종래의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 화학적 및 생물학적으로 불안정하고, 보다 안정한 것은 표적 서열에 대해 허용될 수 없는 저친화성을 가져서 세포막을 용이하게 침투할 수 없으므로, 이의 생물학적 표적에 도달하는 것이 어렵다. 마지막으로, G-함량이 높은 올리고뉴클레오타이드는 G-사중체를 형성하는 경향이 있다.

따라서, 신규한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 조성물은 비독성이고, 이의 mRNA 표적 서열에 대해 증가된 친화성을 갖을 것이 요구된다. 이들 조성물은 뉴클레아제에 의한 분해에 대한 증가된 내성을 포함하여 개선된 생물학적 안정성을 가져야만 한다. 또한, 유용한 올리고뉴클레오타이드는 이의 서열에 관계없이 회합되지 않아야 한다. 또한 세포막을 통해 올리고뉴클레오타이드의 수송을 용이하게 하는 신규한 조성물 요구된다.

발명의 요약

본 발명은 증가된 혈관형성 및 혈관 침투성과 관련된 질환의 진행을 늦추기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 조성물은 생산 세포에 의한 VEGF 발현을 선택적으로 억제하는데 있어서 종래의 올리고뉴클레오타이드보다 현저하게 뛰어나므로, 이들은 상기와 같은 질환의 치료에 사용된다. 본 발명의 선택성은 VEGF mRNA 분자에 선택적으로 결합하여 VEGF의 발현을 차단시키는 안티센

스 올리고뉴클레오티드에 의해 제공된다.

본 발명은 표적 mRNA 서열에 대한 이의 친화성 및 선택성이 증가되도록 화학적으로 변형된 올리고뉴클레오티드 및 이를 제조하고 사용하는 방법을 제공한다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 개선된 생물학적 안정성 및 표적 서열에 대한 고친화성을 갖는다. 올리고뉴클레오티드는 친수성 및 소수성 환경 모두에서 화학적 및 생물학적 공격에 대해 비교적 불활성이고, 이의 서열에 관계없이 회합에 내성을 갖는다.

본 발명은 효과적이며 비독성인 VEGF 안티센스 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 특히, 본 발명은 세포를 치료하는데 1마이크로몰 이하의 농도로 사용될 경우, VEGF의 세포내 생산을 감소시킬 수 있는 신규한 올리고뉴클레오티드 조성물에 관한 것이다. 상기 농도에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 비독성이며, 세포의 물질 대사를 방해하지 않는다.

또한, 본 발명은 올리고뉴클레오티드가 세포막을 용이하게 침투하여 이의 생물학적 표적에 도달할 수 있도록 하는 조성물 및 방법을 제공한다. 이는 세포성 흡수 촉진제와 함께 안티센스 올리고뉴클레오티드를 제조하고 이용하는 방법을 제공함으로써 성취될 수 있다. 세포성 흡수 촉진제는 비독성이고, VEGF 안티센스 올리고뉴클레오티드에 적합하며, 세포막을 통한 올리고뉴클레오티드의 효율적인 침투를 용이하게 한다.

본 발명의 목적을 위한, 용어 "올리고뉴클레오티드"에는 핵산 중합체 및 핵산 중합체와 유사한 화학적 구조가 포함된다. 상기 구조에 결합된 염기 성분이 이의 표적 서열과의 특이적 결합에 필요한 수소 결합을 유지할 수 있는 한, 해당 리보스 또는 데옥시리보스는 상기 구조로 치환될 수 있다. 유사하게, 올리고뉴클레오티드에는 포스포티오에스테르 결합과 같은 포스포디에스테르 골격의 화학적 동등체가 포함될 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오티드에는 화학적으로 변형된 염기 성분이 포함될 수 있다. 특히, 올리고뉴클레오티드에는 C5-(프로피닐 또는 헥시닐) 우리딘 또는 시티딘 잔기, 6-아자-우리딘 또는 시티딘 잔기 및 5 및 6 아자 변형된 피리미딘이 포함될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

용어 "VEGF"에는 혈관 내피 성장 인자로서 공지된 부류의 모든 단백질이 포함된다. 용어 VEGF에는 mRNA의 선택적인 스플라이싱에 의해 생성되는 것으로 여겨지는 공지된 4개 이상의 사람 이소타입 및 유사한 생물학적 기능을 갖는 특정 동종 단백질이 포함된다. 공지된 단백질에는 VEGF 206, VEGF 185, VEGF 165 및 VEGF 121로서 당해 분야에서 공지된 mRNA 종으로부터 암호화되는 것이 포함된다.

본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 다음과 같이 제조한다:

뉴클레오티드가 약 15 내지 30개, 바람직하게는 약 19개인 서열은 VEGF를 암호화하는 mRNA상에서 확인된다. VEGF mRNA 분자 서열은 당해 분야에 공지되어 있다. 당해 RNA 서열은 VEGF 패밀리 단백질중 임의의 단백질을 암호화하는 임의의 mRNA의 어느 곳에도 있을 수 있다. 보다 바람직한 것은 사람의 VEGF 206, VEGF 185, VEGF 165 및 VEGF 121를 암호화하는 mRNA에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 가장 바람직한 것은 모든 VEGF mRNA상에서 발견되는 서열에 결합하는 올리고뉴클레오티드이다(표 1 참조).

[표 1]

포로티오에이트 결합)을 혼입시킴으로써 개선될 수 있다. 또한, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드에는 여러 또는 모든 피리딘 위치에서 화학적으로 변형된 염기가 포함된다. 이런 변형된 염기에는 C5-프로피닐 피리미딘, 5-헥시닐 피리미딘 또는 6-아자-피리딘 또는 결합된 C5 및 6-아자 피리미딘 유도체가 포함되고, 이는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드를 추가로 안정화시킬 수 있다.

본 발명에서 고려된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에는 표적 서열에 대한 이의 결합 친화성을 개선시킨 변형체가 포함된다. 결합 친화성은 각종 화학적 잔기를 피리미딘 염기로 혼입시킴으로써 개선된다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드에는 여러 또는 모든 피리미딘 위치에서 화학적으로 변형된 염기가 포함된다. 이러한 변형된 염기에는 C5-프로피닐 피리미딘, C5-헥시닐 피리미딘 또는 결합된 C5- 및 6-아자 피리미딘 유도체가 포함된다.

안티센스 올리고뉴클레오타이드는 실제의 mRNA, 또는 VEGF mRNA 상에서 발견되는 서열과 동일한 화학적으로 합성된 RNA 서열에 대한 결합할 수 있다. 이 결합은 다양한 방법으로 입증될 수 있다. 결합을 관찰하는 한 방법은 실시예 III에 기술되어 있다. 상기 방법은 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 동일한 길이의 화학적으로 합성된 RNA 서열과 혼합하는 단계, 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 초기 가열 및 냉각 단계에서 어닐링시키는 단계, 및 가열중에서 260nm에서 혼합물의 흡광도 변화를 관찰하는 단계를 포함한다. 또한, 결합은 다른 방법, 예를 들어 뉴클레아제 보호 실험, 올리고뉴클레오타이드 연장 실험, NMR, 겔 전기영동 또는 당해 분야의 숙련자에게 익히 공지된 기타 기술에 의해 측정될 수 있다.

본 발명의 목적을 위해, "개선된 결합 친화성" 또는 안정성은, 당해 올리고뉴클레오타이드를 이의 표적 RNA 서열을 사용하여 검정할 경우, 변형되지 않은 올리고뉴클레오타이드 보다 높은 용점(T_m)을 갖는 것을 의미한다. 실시예 III에서 기술되는 바와 같은 용점 검정이 이러한 측정에 사용된다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드/mRNA 표적 서열 이본체의 결합 친화성을 증가시킨 화학적 변형체가 본 발명에 의해 사용되는 것으로 고려된다. 일반적으로, 상기 검정에서, T_m 이 45°C 이상인 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 고려된다. 보다 바람직한 것은 T_m 이 50°C 이상인 올리고뉴클레오타이드이다.

본 발명의 특정 올리고뉴클레오타이드에는 이전에 공지된 VEGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 비해 이의 활성이 개선된 화학적 변형체가 포함된다. 개선된 활성이란, 보다 저농도의 올리고뉴클레오타이드가 생체 내에서 VEGF 발현을 억제하는데 필요하다는 것을 의미한다. 본 발명은 상기 변형체의 작용 방식을 한정하고자 하는 것은 아니지만, 증가된 결합 친화성 및 생물학적 안정성이 본 발명에서 고려된 올리고뉴클레오타이드의 활성을 증가시키는데 적어도 부분적으로 책임이 있다고 여겨진다. 후술되는 바와 같은 특이적인 화학적 변형이 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 활성을 증가시키는데 사용된다.

본 발명에서 고려되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 또한 약 1 μ M 미만의 농도에서는 비독성이다. 독성은 실시예 V에서 후술되는 방법에 따라 측정한다.

본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 처리된 세포에서 VEGF 생성을 감소시킨다. 한 방법은, 세포를 올리고뉴클레오타이드 조성물과 직접 접촉하도록 함으로써, 당해 올리고뉴클레오타이드가 세포내로 내화되어 이의 표적 mRNA 서열에 도달할 수 있도록 세포를 처리하는 것이다. 처리에 선행하여, 올리고뉴클레오타이드를 액체에 용해 또는 현탁시키거나 고체내로 혼입시킨다. 적합한 액체 및 고체 제형은 당해 분야에서 공지된 것으로, 익히 공지된 방법에 의해 선택될 수 있다. 제형화된 올리고뉴클레오타이드를 세포와 직접 접촉하도록 둔다. 다른 방법은, 올리고뉴클레오타이드가 확산, 분산 등의 수단을 통해 이의 표적 세포에 도달할 수 있도록 제형화된 올리고뉴클레오타이드를 위치시키는 것이다. 본 발명은 표적 세포와 직접 접촉하는 올리고뉴클레오타이드 제형을 요구하지는 않는다. 본 발명은 단지 올리고뉴클레오타이드가 표적 세포에 도달하는 것만을 요구한다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 혈류내에 도입될 수 있지만 표적 종양 세포, 관절염 세포 등에 도달하기전 혈액밖으로 확산된다. 달리, 올리고뉴클레오타이드는 피부에 직접 적용되어 세포내로 확산되는 산제로 혼합될 수 있다.

본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리된 세포는 동일한 조건하에서 비처리된 세포에 의해 생성되는 VEGF의 약 90% 이하를 생성한다. 이 영향은 올리고뉴클레오타이드 용액의 농도가 약 1마이크로몰(μ M) 미만일 경우에 관찰된다.

감소된 세포 VEGF 생성을 측정하는 한 방법은 실시예 VI에 기술되어 있다. 그러나, 이들이 실시예 V에 기술된 방법과 같이 감수성이 있을 경우, 다른 방법이 VEGF 생성의 감소를 검출하는데 사용될 수 있다. 처리된 세포에 의해 생성된 VEGF의 퍼센트는 비처리된 세포 및 처리된 세포에 의해 생성되는 VEGF의 양을 측정함으로써 결정된다. 퍼센트는 처리된 세포에 의해 생성된 양을 비처리된 세포에 의해 생성된 양으로 나누고 100을 곱한 것과 같다. 비처리된 세포 및 처리된 세포는 올리고뉴클레오타이드 제형이 존재하거나 존재하지 않는 점을 제외하고는 모든 면에서 거의 동일한 것으로 간주된다. 따라서, 검정에 사용되는 세포는 유형, 세대 수 및 표현형이 동일하고, 동일한 성장 단계에 있다. 세포를 동일한 배지(올리고뉴클레오타이드 제형 자체의 존재 또는 부재로 인한 변화는 제외), 온도 및 대기를 포함한 동일한 조건하에서 성장시킨다. 상기 조건하에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 용액으로서 1 μ M 이하의 농도로 사용되거나 고체 제형으로서 이와 유사한 몰 퍼센트로 사용될 경우, 본 발명에서 고려된 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리된 세포는 비처리된 동일한 세포에 의해 생성되는 VEGF의 약 90% 이하를 생성한다.

바람직한 올리고뉴클레오타이드는 핵산분해에 대한 이의 내성을 증가시키는 특정 화학적 변형체를 포함할 수 있다. 이런 양태에서 고려되는 화학적 변형체는 올리고뉴클레오타이드에서 발견되는 통상의 천연 화합물의 변형체이다. 본 발명에서 고려되는 특정 화학적 성분에는 포스포로티오에이트 결합이 포함된다. 이들은 몇몇 또는 모든 뉴클레오시드 잔기 사이에 위치한다. 가장 바람직한 뉴클레오타이드는 10개의 포스포로티오에이트 결합과 8개의 포스포디에스테르 결합을 포함한다. 뉴클레오타이드 결합 외에, 염기 성분에 대한 화학적 변형은 뉴클레아제 분해에 대한 내성을 증가시킬 수 있다. 보다 특히, C5-프로피닐 또는 헥시닐 그룹 및/또는 6-아자-피리딘 변형을 포함한 피리딘 환에 대한 변형이 고려된다.

뉴클레아제 내성을 측정하는 한 방법은 혈청내의 올리고뉴클레오타이드의 반감기를 측정하는 것이다. 이는 당해 분야에서 익히 공지된 표준 방법에 의해 수행된다. 본 발명의 목적을 위해, 화학적 성분이 없는 경우 보다 있는 경우에 올리고뉴클레오타이드가 보다 긴 혈청내 반감기를 가질 경우, 이 화학적 성분은 안티

센스 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레아제에 의한 분해속도를 감소시킨다. 단지 1개의 포스포디에스테르 결합을 포함하는 비교대상의 혈청내 반감기는 3시간 미만인 반면, 포스포로티오에이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 반감기는 24시간을 훨씬 초과한다.

올리고뉴클레오타이드는 피리딘 환중에 화학적 변형을 포함하는 것으로 여겨진다. 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 C5-프로피닐 피리미딘, C5-헥시닐 피리미딘 및/또는 6-아자 피리미딘을 포함한다. 이러한 변형은 T_m, 생물학적 안정성 및 활성을 증가시킨다. 이들 변형을 포함한 뉴클레오타이드 전구체의 합성은 실시예 1에 기술되어 있다. 이들 및 이외의 보호된 뉴클레오타이드로부터 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 것은 당해 분야에서 익히 공지된 표준 포스포라미디트 화학에 의한 것이다.

본 발명의 특정 양태는 올리고뉴클레오타이드의 활성을 개선시키는 세포성 흡수 촉진 조성물에 관한 것이다. 일반적으로, 이들 조성물은 지질 이중층을 통한 액체의 수송을 촉진시킨다. 몇몇 양태에서, 올리고머는 친유성 분자에 공유결합된다. 콜레스테롤, 지방산 및 기타 친유성 테터(tether)와 같은 친유성 분자는 올리고뉴클레오타이드의 막 결합성 및 침투성을 개선시킨다. 이들 분자는 당해 분야에서 익히 공지된 표준 방법에 의해 올리고뉴클레오타이드에 화학적으로 결합될 수 있다.

다른 양태에서, 양이온성 지질 또는 리포좀성 제제와 같은 흡수 촉진제가 사용될 수 있다. 이들 시제는 이의 다용성(versatility) 때문에 매력적이다. 이들 양태는 올리고뉴클레오타이드 혼합물을 투여하는데 동일한 전달 비히클을 사용할 수 있다는 잇점을 갖는다. 한 양태는 특히 리포좀성 제제 셀펙틴(Cellfectin[®])의 사용을 고려한다. 다른 양태에는 스페르미딘-콜레스테롤(SpdC)를 비롯한 폴리아미노리피드 흡수 촉진제 부류가 포함된다. 후자의 화합물은 혈청의 존재하에서도 특히 충분히 작용할 수 있는 잇점을 갖는다. 세포성 흡수 촉진제와 함께 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제조하는 방법 및 조성물이 실시예 IV, VI 및 VII에 기술되어 있다.

본 발명에서 고려되는 특정 올리고뉴클레오타이드는 염의 형태이다. 염의 형태는 올리고뉴클레오타이드가 양전하(양이온성) 원자 또는 분자와 결합된 형태이다. 적합한 양이온에는 나트륨, 칼륨, 암모니아, 스페르미딘 또는 폴리아미노 지질(예: 스페르미딘-콜레스테롤) 등이 포함되지만 이에 한정되는 않는다.

본 발명에서 고려되는 특정 양태는 리포좀을 포함한다. 적합한 리포좀은 당해 분야에서 익히 공지된 것이다. 본 발명에서 특히 고려되는 특정 리포좀 조성물에는 셀펙틴[®]이 포함된다. 기타 조성물에는 DOPE와 혼합된 스페르미딘-콜레스테롤이 포함된다. 리포좀성 제제는 당해 분야에서 익히 공지된 방법에 의해 제조된다.

본 발명의 특정 양태는, 예를 들어 폴리카프롤락톤 또는 메톡시폴리에틸렌 글리콜과 폴리카프롤락톤의 블렌드와 같은 중합체 방출 장치를 포함하지만 이에 한정되지는 않는 지속적 전달 시스템을 통한 이의 올리고뉴클레오타이드 조성물 전달을 고려한다. 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 지속적 전달 시스템에 혼입시키는 방법 및 조성물은 당해 분야에서 익히 공지된 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 합성에서 천연 염기를 대체시키는데 사용된 본 발명의 대표적인 변형된 염기이다.

도 2는 5-(1-헥시닐 또는 프로피닐)-6-아자-2'-데옥시우리딘 포스포라미디트(도 1 참조)의 제조를 위한 합성식이다

도 3은 배양중인 사람의 정상 각질세포(keratinocytes)에 의한 VEGF 생성에 미치는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 효과이다.

도 4는 각질세포에 의한 VEGF 발현에 있어서 셀펙틴[®]의 유무하에서 투여된 올리고뉴클레오타이드(서열 2)의 효과이다.

도 5는 각질세포에 의한 VEGF 발현에 있어서 셀펙틴[®]의 유무하에서 투여된 올리고뉴클레오타이드(서열 27)의 효과이다.

도 6은 각질세포를 사용한 T30639(서열 2)의 활성에 미치는 상이한 세포성 흡수 촉진제의 효과이다.

도 7은 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 제형에 대한 단기간 세포성 노출 및 VEGF 발현의 장기간 억제를 나타낸다.

도 8은 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 제형에 대한 단기간 세포성 노출 및 VEGF 발현의 장기간 억제를 나타낸다.

도 9는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 제형에 대한 단기간 세포성 노출 및 VEGF 발현의 장기간 억제를 나타낸다.

도 10은 흡수 촉진제의 존재 또는 부재하의 VEGF 발현에 미치는, 말단-변형된 키메라성 VEGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 효과이다.

바람직한 양태의 설명

바람직한 양태는, mRNA 분자를 암호화하는 다중 VEGF에 대한 통상적인 서열에 결합하여 생체내에서 VEGF 발현을 방해하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 몇몇 포스포디에스테르 결합 대신 포스포로티오에이트 결합을 포함하고, 이의 표적 mRNA 서열에 대한 올리고뉴클레오타이드의 친화성을 증가시키는 기타 화학적 변형을 포함한다. 바람직한 조성물에서, 올리고뉴클레오타이드는 세포막을 통과할 수 있는 능력을 개선시키는 세포 흡수 촉진제와 함께 제형화된다.

본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 길이는 약 17 내지 30잔기 범위내 일 수 있다. 바람직한 올리고뉴클레오타이드의 길이는 19 잔기의 뉴클레오타이드이다. 이러한 서열은 VEGF 유전자를 암호화하는 mRNA 분자에 대한 이의 상보성을 기준으로 선택된다. 올리고뉴클레오타이드에 대해 상보적인 mRNA 분자의 영역을 표적 서열이라 부른다. 바람직한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 VEGF 206, VEGF 185, VEGF 165 및 VEGF 121을 포함한 4개의 공지된 각각의 VEGF mRNA에서 발견된 표적 서열에 대해 상보적이다.

올리고뉴클레오타이드는 표적 mRNA에 대한 이의 결합 친화성을 개선시키는 화학적 변형을 포함하는 것이 고려된다. 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 C-5프로피닐 피리미딘, C5-헥시닐 피리미딘 및/또는 6-아자 피리미딘을 포함한다. 바람직한 변형은 올리고뉴클레오타이드가 이의 표적 서열로부터 분리되는 온도를 증가시킨다. 이들 변형체를 포함하는 뉴클레오타이드 전구체의 합성은 실시예 1에 기술되어 있다. 보호된 뉴클레오타이드로부터 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 것은 표준 포스포르아미디트 화학 반응에 의한 것이고, 이는 당해 분야에서 익히 공지된 것이다.

바람직한 올리고뉴클레오타이드는 핵산분해에 대한 이의 내성을 증가시키는 특정 화학적 변형체를 포함한다. 본 발명이 상기 내성에 대한 메카니즘으로 한정되는 것은 아니지만, 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드는 뉴클레아제의 기질 결합강에 올리고뉴클레오타이드가 결합하는 것을 방해함으로써 뉴클레아제 분해에 대해 내성을 갖는 것으로 여겨진다. 바람직한 뉴클레아제 내성 올리고뉴클레오타이드는 적어도 몇몇의 뉴클레오타이드 잔기 사이의 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 가장 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 10개의 포스포로티오에이트 결합과 8개의 포스포디에스테르 결합을 포함한다.

바람직한 조성물에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 제형화되거나, 세포막을 침투할 수 있는 능력을 증가시키는 세포 흡수 촉진제와 혼합된다. 본 발명에서 사용되는 것으로 고려되는 세포 흡수 촉진제에는 디올레오일 포스포티달에탄올아민, 설파틴^R, 스페르미딘-콜레스테롤 등이 포함된다. 보다 바람직한 것은, 스페르미딘-콜레스테롤 및 디올레오일 포스포티달에탄올아민의 질량에 따른 1:1 혼합물이다. 상기 제형을 당해 분야에서 익히 공지된 표준 방법에 따라 올리고뉴클레오타이드 10 나노몰 내지 1 마이크로몰과 혼합한다.

본 발명에서 고려되는 올리고뉴클레오타이드 조성물은 이의 생체내 활성을 기준으로 선택된다. 바람직한 조성물은 1마이크로몰 이하의 올리고뉴클레오타이드 농도를 사용하여도 세포에 대해 실질적으로 세포독성이 없는 것이다. 실시예 1에서 기술된 표준 세포독성 검정은 이를 측정하는데 사용된다. 또한, 본 발명의 조성물은 1 마이크로몰 미만의 농도에서 세포성 VEGF 생성을 감소시킬 수 있는 능력이 입증되어야만 한다.

본 발명은 본 발명을 실시하는데 대한 바람직한 방법을 포함하여, 발견되거나 제안된 특정 양태의 관점에서 기술된다. 본 발명의 내용을 고려할때, 우수한 변형 및 변화가 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 예시된 특정 양태에서 이루어질 수 있다는 것이 당해 분야의 숙련가에게 이해될 수 있을 것이다. 상기 모든 변형은 청구항의 범위내에 포함된다.

실시예

실시예 1

합성 올리고뉴클레오타이드로 혼합시키기 위한 변형된 염기의 제조 방법:

합성 올리고뉴클레오타이드의 결합 친화성 및/또는 특이성을 증가시키는 변형된 염기는 도 1에 나타나있다. 5-(1-헥시닐 또는 프로피닐)-6-아자-2'-데옥시우리딘 포스포르아미디트 염기의 합성 반응식은 도 2에 나타나있다. 이 합성은 6-아자-U를 함유하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제조하기 위한 구조적 단편을 제공한다 유사한 반응식이 6-아자-C를 합성하는데 사용된다. 5-(1-헥시닐)-6-아자-2'-데옥시우리딘 포스포르아미디트의 제조를 위한 상세한 합성 방법이 하기에 기술될 것이다. 유사한 방법으로, 5-프로피닐 유도체가 5-요도 유도체 7로부터 출발하여 제조된다.

3',5'-디-0-p-톨루오일-5-요오도-6-아자-2'-데옥시우리딘(7a)

클로로트리메틸실란(0.5ml)을 1,1,1,3,3,3-헥사메틸디실라잔(HMDS, 80ml)중의 5-요오도-6-아자우리실(5.8g, 33.47mmol) 현탁액에 가하고, 혼합물을 환류하에 6시간 동안 가열한다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고, HMDS를 진공 증발시킨다. 잔사를 고진공하에서 4시간 동안 건조시킨다. 건조된 실릴 유도체를 디클로로메탄(60ml)중에 용해시킨다. 1-클로로-2-데옥시-3,5-디-0-p-톨루오일-b-D-에리트르-펜토푸라노스(6, 16.3g, 42mmol) 및 염화아연(0.46g, 3.35mmol)을 상기 용액에 가하고, 혼합물을 아르곤 대기하에서 24시간 동안 교반한다. 반응 혼합물을 디클로로메탄(250ml)으로 희석시키고, 디클로로메탄 용액을 포화 NaHCO₃ 수용액(100ml)으로 세척한다. 수성 층을 디클로로메탄(4 x 100ml)으로 추출하고, 합한 유기 층을 건조(Na₂SO₄) 및 증발시킨다. 잔사를 실리카 겔 칼럼(4 x 15cm) 크로마토그래피로 정제하여, 생성물을 0 내지 5% 메탄올을 함유한 디클로로메탄중에 용출시킨다. 건조된 아노머성 생성물은 총량이 15g이다. 순수한 b 아노머를 디클로로메탄 및 메탄올(4:1, 200ml)의 혼합물로 연마하여 수득한다. 고체를 여과 및 증발에 의해 수집한다. 상기 연마 과정을 반복한 후 순수한 b 아노머 10.5g을 수득한다(용점 204 내지 205°C).

¹H NMR(DMSO-d₆): δ 2.35, 2.37(2s, 6H, 2CH₃), 2.80(m, 2H, C_{2'}-H 및 C_{2''}-H), 4.43(s, 3H, C_{4'}-H, C₅-H₂), 5.55(br s, 1H, C_{3'}-H), 6.39(t, J=6.0Hz, 1H, C_{1'}-H), 7.28(t, 4H, Tol), 7.85(t, 4H, Tol), 12.42(br, s, 1H, NH).

C₂₄H₂₄N₃O₇에 대한 원소 분석

계산치: C, 48.58; H, 4.08; N, 7.08.

실측치: C, 48.85; H, 3.80; N, 6.92.

3',5'-디-0-p-톨루오일-5-(1-헥시닐)-6-아자-2'-데옥시우리딘(8a)

3',5'-디톨루오일-5-요오도-6-아자-2'-데옥시우리딘(7, 3.84g, 6.50mmol)을 무수 DMF(25ml)와 공동증발시켜서 건조시키고, DMF(30ml)에 용해시킨 후, 아르곤 대기하에서 CuI(0.25g, 1.3mmol) 트리에틸아민(1.82g, 13mmol), 1-헥시닐(2.23g, 19.5mmol) 및 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0.75g, 0.65mmol)을 가한다. 반응 혼합물을 실온에서 18시간 동안 교반하고, 추가로 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐 0.5g을 가한다. 48시간 후, 용매를 증발시키고, 잔사를 톨루엔과 공동증발시킨다. 잔사를 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여, 0 내지 5% 에틸 아세테이트를 함유한 디클로로메탄중에 생성물을 용출시켜서 표제 화합물 0.9g을 수득한다(융점: 198 내지 200°C).

$^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6)$: d 0.87(t, 3H, CH_3), 1.45(m, 4H, 2, CH_2), 2.37, 2.39(2s, 6H, 2CH_3), 2.45(m, 3H, CH_2 및 $\text{C}_2\text{-H}$), 2.84(m, 1H, $\text{C}_2\text{-H}$), 4.45(s, 3H, 1H, $\text{C}_4\text{-H}$, $\text{C}_5\text{-H}_2$), 5.59(br s, 1H, NH), 6.49(t, J=6.3Hz, 1H, $\text{C}_1\text{-H}$), 7.31(dd, 4H, Tol), 7.88(dd, 4H, Tol), 12.40(br s, 1H, NH).

$\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_7$ 에 대한 원소 분석

계산치: C, 65.80; H, 6.07; N, 7.68.

실측치: C, 65.61; H, 5.73; N, 7.29.

6-아자-5-(1-헥시닐)-2'-데옥시우리딘(9a)

3',5'-디-0-p-톨루오일-5-(1-헥시닐)-2'-데옥시우리딘(8a, 0.8g, 1.47mmol), 메탄올(55ml) 및 나트륨 메톡사이드(메탄올중 25% 용액, 1.28mmol)의 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반한다. Dowex 50X8(H^+) 수지를 가하여 반응을 권장시킨다. 수지를 여과시켜 제거하고, 여액을 증발시킨다. 잔사를 0 내지 4% 메탄올을 함유한 디클로로메탄을 용리액으로서 사용하여 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 흡습성이 큰 고체로서 표제 화합물 0.38g(84%)을 수득한다.

$^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6)$: d 0.88(t, 3H, CH_3), 1.47(m, 4H, 2, CH_2), 2.02(m, 1H, $\text{C}_2\text{-H}$), 2.23(m, 1H, $\text{C}_2\text{-H}$), 2.46(m, 2H, CH_2), 3.40(m, 2H, $\text{C}_5\text{-H}_2$), 3.68(m, 1H, $\text{C}_4\text{-H}$), 4.21(br s, 1H, $\text{C}_3\text{-H}$), 4.61(br s, 1H, $\text{C}_3\text{-H}$), 4.61(t, 1H, $\text{C}_5\text{-OH}$), 5.17(d, 1H, $\text{C}_3\text{-OH}$), 6.49(dd, 1H, $\text{C}_1\text{-H}$), 12.27(br s, 1H, NH).

5'-0-(4,4'-디메톡시트리틸)-6-아자-5-(1-헥시닐)-2'-데옥시우리딘(10a)

4,4'-디메톡시트리틸 클로라이드(0.51g, 1.5mmol)를 무수 피리딘(10ml)중 5-(1-헥시닐)-6-아자-2'-데옥시우리딘(0.38g, 1.24mmol) 용액에 가한다. 이를 6시간 동안 교반한 후, 추가로 DMT-Cl 0.5g을 가하고, 반응 혼합물을 밤새 교반한다. 반응 혼합물을 디클로로메탄(100ml)으로 희석하고 유기 용액을 물(20ml)로 세척한다. 수성 층을 디클로로메탄으로 추출하고, 합한 유기 층을 건조(Na_2SO_4) 및 증발시킨다. 잔사를 톨루엔(10ml)과 공동증발시키고, 실리카 겔 칼럼(2 x 10cm)상에서 크로마토그래피로 정제한다. 0 내지 1.5% 메탄올을 함유한 디클로로메탄으로 생성물을 용출시킨다. 수율: 0.45g.

$^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6)$: d 0.85(t, 3H, CH_3), 1.37(m, 4H, 2, CH_2), 2.08(m, 1H, $\text{C}_2\text{-H}$), 2.37(m, 3H, CH_2 및 $\text{C}_2\text{-H}$), 3.06(m, 2H, $\text{C}_5\text{-H}_2$), 3.72(s, 6H, 2 OMe), 3.87(m, 1H, $\text{C}_4\text{-H}$), 4.20(m, 1H, $\text{C}_3\text{-H}$), 5.23(d, 1H, $\text{C}_3\text{-OH}$), 6.35(dd, 1H, $\text{C}_1\text{-H}$), 6.83(m, 4H, DMT), 7.16-7.25(m, 9H, DMT), 12.30(br s, 1H, NH).

5'-0-(4,4'-디메톡시트리틸)-6-아자-5-(1-헥시닐)-2'-데옥시우리딘-3'-0-(2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필포스포르아미디트(11a)

N,N-디이소프로필에틸아민의 존재하에 5'-0-(4,4'-디메톡시트리틸)-6-아자-5-(1-헥시닐)-2'-데옥시우리딘(10a)을 디클로로메탄중의 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필클로로포스포르아미디트와 반응시켜서 익히 공지된 방법에 의해 포스포르아미디트 11a를 수득한다.

실시예 II

올리고뉴클레오타이드 고안 및 합성:

VEGF mRNA의 모든 스플라이싱 변형체에 의해 공유되는 상보적인 mRNA 표적 서열에 결합할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 선택한다. 예시적인 합성적 올리고뉴클레오타이드 서열이 표 1에 나타나있다. mRNA 표적에 대한 이들의 결합 친화성을 개선시키기 위해, 올리고뉴클레오타이드는 도 1에 도시된 바와 같은 C5-프로피닐 또는 C5-헥시닐 그룹을 갖는 피리미딘을 사용하여 합성한다[참조: Wagner et al., 1993]. 6-아자-dU 및 6-아자-dC를 포함한 기타 변형된 염기가 또한 고려된다(도 2). 이러한 변형의 조합이 또한 고려된다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 T3039(서열 2)에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 T30691(서열 27)이 다음의 실험에서 대조군으로서 사용된다. 이는 T30639(서열 2)와 동일한 크기이고, 동일한 골격 및 염기 변형체를 포함한다.

실시예 III

안티센스 올리고뉴클레오타이드-RNA 이중이본체 상호작용의 T_m 분석:

안티센스 올리고뉴클레오타이드 RNA 이본체의 온도(T_m)는 결합 친화성을 산정하는데 사용된다. 온도가 조절되는 세포 홀더가 장착된 다이오드 배열 분광 광도계(Hewlett Packard Model 8452)로 T_m 를 측정한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 2mM 인산나트륨(pH=7.0), 18mM NaCl 및 1mM EDTA로 이루어진 완충액중에서

동일한 크기의 합성 RNA 표적(각각 1 μ M)과 혼합한다. 분광 광도계 셀에서 제조된 용액을 90 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 가열하고 10분에 걸쳐 20 $^{\circ}$ C로 냉각시키고, 10분 동안 평형시켜서 이본쇄가 형성되도록 한다. 이본쇄의 용점(T_m)을 측정하기 위해, 셀을 1 $^{\circ}$ C/분의 속도로 20 $^{\circ}$ C에서 80 $^{\circ}$ C로 서서히 가열하고, 260nm에서 흡광도를 온도의 함수로서 측정한다. 흡광도의 상승은 이본쇄가 일본쇄 올리고머로 용융되거나 분리되는 것을 지시한다. 이본쇄 형의 T_m 은 표준 방법에 의해 기술되는 식을 사용하여 용융 커브 데이터로부터 수득된다[참조: Puglish and Tinoco, 1989]. T_m 데이터는 표 2에 나타나있다. C5-프로핀 변형된 염기 또는 C5-핵시닐-변형된 염기를 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드에 혼합시키면, 비변형된 올리고뉴클레오타이드에 비해 T_m 값이 현저하게 증가된다. 이는 표적 서열에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 친화성이 상당히 개선되었음을 의미한다.

[표 2]

T30807(안티센스 DNA)				
	T30615 (비변형됨)	T30639 (프로피닐)	T30688 (핵시닐)	T306s2 (프로피닐 불일치)
T_m ($^{\circ}$ C)	43	53	49	345
37 $^{\circ}$ C에서의 AG(kcal/mol)	-11.5	-13.4	-11.9	-8.1
Ah(kcal/mol)	-136	-91.6	-79.8	-103
AS(eu)	-402	-252	-219	-306
T30808(안티센스 RNA)				
	T30615	T30639	T30688	T30692
T_m ($^{\circ}$ C)	42	57	53.5	43.5
37 $^{\circ}$ C에서의 AG(kcal/mol)	-11.0	-14.3	-13.5	-11.3
Ah(kcal/mol)	-128	-88.3	-90.7	-119
AS(eu)	-378	-239	-249	-347

실시예 IV

흡수 촉진제의 제조:

세포에 의한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 단독 흡수율은 낮다[참조: Fischer et al., 1993; Guy-Caffey et al., 1995]. 세포내로의 침투를 개선시키기 위해, 시판중인 많은 흡수 촉진제 뿐만 아니라 본 발명에 의해 합성되는 신규한 폴리아미노리피드 제형을 사용한다[참조: Gao et al., 1989; Guy-Caffey et al., 1995].

실시예 V

세포독성 검증:

세포를 96웰 플레이트에 500세포/웰의 밀도로 시딩한다. 플레이팅 1일 후, 세포를 연속적으로 희석시킨 올리고뉴클레오타이드 제형에 노출시킨다(희석액당 4개의 웰). 노출 1일 내지 4일 후, 세포의 생존성에 대한 효과를 비방사능 검정 시스템(Cell Titer 96 Aqueous cell proliferation assay, Promega Corp.)을 사용하여 측정한다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드가 1 μ M 미만의 농도일 때 독성이 관찰되지 않았다.

실시예 VI

올리고뉴클레오타이드의 세포내 시험:

안티센스 올리고뉴클레오타이드, 이의 변형된 비교대상 및 각종 제형의 활성은 정상적인 배양 조건하에서 VEGF를 분비하는 배양된 사람의 각질세포, 1차 세포주를 사용하여 평가한다[참조: Ballaun et al., 1995; Frank et al., 1995]. 세포를 0.5ml KGM 배지(Clonetics)당 50 내지 100,000세포/웰의 밀도로 48-웰 플레이트에 플레이팅한다. 고감도 ELISA-기반 단백질 검정 시스템(R & D 시스템)을 사용하여 세포 상층액중의 VEGF 단백질 수준을 측정한다. 예비 측정은 NHEK 세포가 추천된 배지에서 성장할 때, 0.5ml 배지에 플레이팅된 50,000개의 세포가 15시간 경과시 약 150 내지 200pg의 VEGF를 생성한다는 것을 보여준다(비처리된 대조군 웰의 상층액에서는 약 300 내지 400pg/ml이다). 또한, 세포를 올리고뉴클레오타이드 제형과 15시간 동안 항온처리한다. 4개의 항-VEGF 올리고뉴클레오타이드중 3개가 셀펙틴^R 10 μ g/ml의 존재하에 0.2 μ M에서 활성이 입증되었다. 대조군의 센스 올리고뉴클레오타이드는 어떤 효과도 보이지 않는다(제시안됨). 결과는 표 3에 나타나있다.

안티센스 효과를 평가하기 위해, 흡수 촉진제의 존재 또는 부재하에서 올리고뉴클레오타이드를 세포내로 투여한다. 예비 실험에서, 염기 변형체가 없는 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 1 μ M 미만의 농도에서 효과적이고, 당체의 부재하에서 관찰된 중요 효과는 없었다(데이터는 제시되지 않음). 1 μ M 이상의 농도에서, 올리고뉴클레오타이드는 VEGF 발현을 비특이적으로 억제하는 경향이 있다(데이터는 제시되지 않음). 이러한 비특이적인 효과는 당해 분야에 공지된 것이다[참조: Stein et al., 1993; Wagner, 1994]. 이러한 비특이적 효과를 피하기 위해, 올리고뉴클레오타이드를 흡수 촉진제와 혼합한다. 셀펙틴^R,

테트라팔미틸스페르미딘(T_M -TPS)과 디올레오일 포스포티달에탄올아민(DOPE)의 리포좀성 제제(1:1.5의 질량 비인 T_M -TPS/DOPE, Life Technologies, Inc.)가 보다 효과적이며, 시판중인 기타의 시험된 전달체보다 독성이 적다. 폴리야미노리피드 SpdC(Guy-Caffey et al., 1995; SpdC/DOPE, 1:1의 질량비)의 리포좀성 제제와 함께 제형화된 올리고뉴클레오티드가 보다 더 효과적이다. 전형적인 세포 배양 실험에서, 올리고뉴클레오티드(10nM 내지 1 μ M)를 실온에서 흡수 촉진제 수용액 약 20 μ l 내지 40 μ l에 용해시키고, 약 10분 동안 항온처리한다. 이 용액을 가온된 성장 배지 0.5ml과 혼합하고 세포에 가한다. 세포를 올리고뉴클레오티드의 존재하에서 15시간 동안 배양한다. 배양 후, 상층액을 수집하여 ELISA에 바로 사용하거나, 후에 분석하기 위해 -80 $^{\circ}$ C에 저장한다(동결시키지 않는 상층액 샘플 또는 동결시킨 상층액 샘플 및 해당 시킨 상층액 샘플간의 VEGF 수준은 크게 차이가 나지 않는 것으로 관찰되었다). 도 4에 도시된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오티드 T30639(서열 2)는 셸팩틴^R의 존재하에 보다 활성이지만, 대조군의 '센스' 올리고뉴클레오티드 T30691(서열 27)은 도 5에 도시된 바와 같이 가장 고농도를 사용한 경우를 제외하고는 효과가 거의 없었다.

도 6은 다양한 양이온성 지질 제형 SpdC, 스페르미딘-콜레스테롤(참조: Guy-Caffey et al., 1995); DC-Chol(참조: Gao and Huang, 1991); CS, 콜레이트-스페르미딘; DCS, 데옥시콜레이트-스페르미딘; cF, 셸팩틴^R(Life Technologies, Inc.)과 함께 올리고뉴클레오티드(서열 2) 0.1 μ M 내지 0.2 μ M을 투여한 효과를 보여준다. 각각의 양이온성 지질의 리포좀성 제제는 융합원성 지질 DOPE(1:1 질량비)를 혼합함으로써 제조되고, 사용전까지 동결건조시켜 저장한다. 당해 리포좀을 사용하기전에 5% 맥스트로즈(1mg/ml 이하)에 재현탁시키고, 2주 내에 사용하기 위해 4 $^{\circ}$ C에 저장한다. 상기한 바와 같이 올리고뉴클레오티드를 세포 처리 직전에 양이온 리포좀성 제제와 혼합한다.

도 7 내지 9는 안티센스 올리고뉴클레오티드 T30639(서열 2) 또는 이의 키메라성 포스포디에스터-포스포로티오에이트 형 T30848(서열 6)의 다양한 농도로 세포를 항온처리한 결과를 나타낸 것이다(표 1을 참조하라). 도 7은 0.1 μ M의 올리고뉴클레오티드의 효과를, 표 8은 0.2 μ M의 올리고뉴클레오티드의 효과를, 도 9는 0.4 μ M의 올리고뉴클레오티드의 효과를 나타낸 것이다. 각각의 실험에서, 세포는 SpdC/DOPE와 예비혼합된 안티센스 올리고뉴클레오티드가 보충된 배지에서 4시간 동안 처리된다. 그 다음, 배지를 신선한 비보충된 배지로 대체한다. 그래프 1은 배양물에서 올리고뉴클레오티드 조성물을 세척한 지 16시간 후의 VEGF 생성 억제율을 나타낸 것이고, 그래프 2는 올리고뉴클레오티드를 세척한 지 40시간 후, 그래프 3은 올리고뉴클레오티드를 세척한 지 64후의 VEGF 생성 억제율을 나타낸 것이다. 그 다음 수거된 배지에서 VEGF 수준의 양을 측정한다. 약 3일의 항온처리 기간 말엽에 세포의 형태는 정상이다. VEGF 생성에 미치는 올리고뉴클레오티드의 장기적인 효과는 도 7 내지 9에 나타나있다. 그래프에서, 기호 (Δ)는 0.1 μ M의 T30848(서열 6)이다. 기호 (\square)는 0.1 μ M의 T30639(서열 2)이다.

도 10은 친유성 그룹으로 유도된 올리고뉴클레오티드를 사용한 유사한 실험의 결과를 나타낸 것이다. S96-5296(서열 20)은 C-16 지질 그룹으로 3'-말단이 변형되어 있고, 8개의 포스포디에스테르 결합과 11개의 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. S96-5297(서열 21)은 동일한 골격을 갖고, 말단이 3'-피렌 잔기로 변형되어 있다. 이런 소수성 성분은 셸팩틴^R과 혼합될 경우 올리고뉴클레오티드의 흡수 및 활성을 돕고, 포스포디에스테르 결합은 올리고뉴클레오티드의 활성을 증가시킨다. 기호(\square)는 S96-5296(서열 20)의 경우이고, 기호(\square)는 셸팩틴^R 10 μ g/ml와 S96-5296(서열 20)의 경우이고, 기호(\circ)는 S96-5297(서열 21)의 경우이고, 기호(\bullet)는 셸팩틴^R 10 μ g/ml와 S96-5297(서열 21)의 경우이고, 기호(\square)는 셸팩틴^R 10 μ g/ml와 0.2 μ M T30639의 경우이다.

실시예 VII

안티센스 올리고뉴클레오티드의 항-VEGF 활성:

염기 변형체가 없는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 함유한 포스포로티오에이트는 1 μ M를 초과하는 농도에서 일부 서열-독립적인 비특이적 억제를 제외하고는 VEGF의 세포성 생성에 큰 효과를 나타내지 않는다(데이터 제시되지 않음). 이 결과는 마이크로몰 이하의 낮은 복용량의 단독 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드는 비효과적인 억제제이고, 고농도에서 동일한 올리고뉴클레오티드가 세포의 물질 대사에 비특이적인 효과를 발휘할 수 있다는 것을 보여주는 다른 연구와 일치한다[Stein and Cheng, 1993; Wagner, 1994에 의해 검토됨]. 그러나, C5-프로핀-함유 피리미딘[참조: Wagner et al., 1993]을 함유한 올리고뉴클레오티드를 포함하는 포스포로티오에이트는 세포성 VEGF의 생성을 특이적으로 억제한다. 도 3을 참조하라.

이런 변형된 올리고뉴클레오티드는 비변형된 비교대상보다 용점이 약 15 $^{\circ}$ C 이상 더 높다. 표 2를 참조하라. 이는 변형된 올리고뉴클레오티드가 비변형된 형태보다 높은 친화성으로 표적 세포에 결합한다는 것을 제안한다.

셸팩틴^R에 대한 최적 올리고뉴클레오티드의 비:

올리고뉴클레오티드 양이온성 지질 혼합물의 세포성 흡수는 제형에서 각 성분의 화학적 성질, 농도 및 상대적인 질량비 및 표적 세포의 이물 흡수(endocytic) 성질에 의해 부분적으로 측정된다. 셸팩틴^R을 올리고뉴클레오티드 T30639(서열 2)와 함께 NHEK 세포로 공동투여하여, 올리고뉴클레오티드 내 TMTPT의 비가 1:3(질량비)일 때 최적 활성이 수득된다. 관련 실험에서, 올리고뉴클레오티드 및 양이온성 지질의 비를 유지하면서 올리고뉴클레오티드의 농도를 달리하고, VEGF 발현에 대한 효과를 '센스' 대조 T30691(서열 27)과 비교하여 측정한다. 올리고뉴클레오티드 T30639(서열 2)는 특이적인 항-VEGF 활성을 보이지만, 대조군 올리고뉴클레오티드는 아무런 효과도 갖지 않는다(도 4 및 도 5를 참조하라).

올리고뉴클레오티드 효능에 미치는 스페르미딘-콜레스테롤+DOPE 또는 DC-choI+DOPE(리포좀성 제제; 중량비 1:1) 제형의 효과:

많은 흡수 촉진제가 핵산 치료에 사용된다[참조: Behr, 1994; Guy-Caffey et al., 1995; Lewis et al.,

1995]. 이들 화합물중 하나로 스페르미딘-콜레스테롤 접합체(SpdC)가 있다[참조: Guy-Caffey et al., 1995]. 이들 화합물은 본 발명에서 요구되는 것보다 훨씬 고농도에서 세포에 대해 비독성이고, 최대 1주 동안 치료하는 경우에도 설치류에 대해 비독성이다. 다른 양이온성 지질인 DC-Chol[참조: Gao and Huang, 1991]은 유전자 치료에서의 치료적 용도가 승인되었고, 세포성 시스템에서 비교적 비독성이다. SpdC/DOPE 및 DC-Chol/DOPE(디올레오일 포스포티틸콜린과 SpdC 또는 DC-Chol)의 시험용 리포솜성 제제는 1:0.5, 1:1, 1:1.5 및 1:2의 질량비의 범위중에서 질량비가 1:1일 때 NHEK 세포를 사용한 항-VEGF 검정에서 가장 효과적인 것으로 나타났다. 도 5를 참조하라. 양이온성 시약을 포함하는 조성물은 셀펙틴^R을 포함하는 조성물보다 20 내지 40% 더 활성인 것으로 나타났다(도 6).

올리고뉴클레오타이드 제형에 대한 단기간의 노출은 VEGF 생성에 미치는 장기간의 억제 효과를 관찰하기에 충분하다:

본 발명에 기술된 조성물에 비교적 짧게 노출된 후 VEGF 발현은 감소된다. 예를 들어, 4시간 동안의 항온처리는 올리고뉴클레오타이드에 방해 노출시켰을 때 관찰되는 것보다 높은 항-VEGF 활성을 갖는 것으로 입증되었다. 도 7 내지 9를 참조하라. 놀랍게도, 효과는 실험의 전기간인 3일 이상 동안 지속된다(도 7 내지 9).

다른 시험은 포스포포티오에이트 포스포디에스테르 키메라성 골격과 혼합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 VEGF 발현의 잠재적인 억제제라는 것을 보여준다. 특히, 10개의 포스포포티오에이트와 8개의 포스포디에스테르 결합을 함유하는 T30639(서열 2)의 키메라성 변형체, 지질 말단-변형체 S96-5296(서열 20) 및 S96-5297(서열 21)은 SpdC/DOPE의 존재하에서 뛰어난 활성을 갖는 것으로 입증되었다(도 7). 단지 4시간 동안 항온처리한 후 VEGF 억제는 3일 이상 지속된다(도 7). SpdC의 부재하에서, 키메라성 올리고뉴클레오타이드 골격은 VEGF 발현에 영향을 미치지 않는다. 따라서, 보다 적은 포스포포티오에이트 결합을 갖는 올리고뉴클레오타이드가 개선된 효능을 가지며 비특이적인 효과를 감소시킨다. 흡수는 올리고뉴클레오타이드 효능에 결정적인 것으로 보인다.

실시에 VIII

생체내 VEGF 억제:

A. 특별한 목표

혈관 내피 성장 인자(VEGF)의 증가된 발현은 증식성 당뇨병 망막증, 신생혈관분포성 녹내장 및 기타 많은 실명 질환과 관련된 안구 신혈관신생의 진행과 관계가 있다. 망막성 허혈은 맥관원성 단백질 VEGF의 합성을 증가시키고, 이는 혈관 내피세포의 증식을 유발하여 망막, 시신경 및 홍채에서 비정상적으로 많은 수의 혈관을 형성시킨다. 아직까지, 이런 상태에 대해 허용되는 치료법은 없다. 본 발명의 전반적인 목적은, 사람의 신혈관신생과 관련된 망막성 허혈을 치료할 목적으로 신규하고, 잠재적으로 치료성있는 VEGF 발현의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 억제제를 동정하기 위한 과정을 합리적으로 고안하고 시험하는 것이다. 사람의 세포 배양 시스템에서의 최근 생체외 데이터는, 마이크로몰 이하의 농도 범위에서 VEGF의 세포성 발현을 50% 이상 억제하는 특이적 올리고뉴클레오타이드 제형을 제조할 수 있음을 보여준다. 상기 안전에 대한 본 발명의 목표는 시험관내 발견을 VEGF-관련 신혈관신생의 랫트 모델로 확대하는 것이다. 본 발명의 특별한 목표는 다음과 같다:

1. 랫트의 VEGF mRNA에 대해 지시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 라이브러리를 합성한다. VEGF에는 3개의 주요 스플라이싱 변형체와 1개의 부수적 스플라이싱 변형체가 있다. 10개의 올리고뉴클레오타이드가 RNA의 공통 영역내의 서열에 표적화될 것이다. 이들은 또한 뉴클레아제 내성 골격 및 표적 mRNA에 대한 결합 친화성을 개선시키는 변형된 염기를 포함할 것이다.
2. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 이의 제형의 활성 및 독성을 평가하기 위해 랫트 세포 단층 및 구상체 모델을 설정한다. C6 신경교종 세포주는 VEGF 기능 연구에 널리 사용되어 왔기 때문에 이를 위해 사용할 것이다. 구상체(세포 집합체)는 본원의 올리고뉴클레오타이드가 세포 층을 침투할 수 있는가를 평가하는데 유용할 것이다.
3. 다양한 세포성 흡수 촉진제를 사용하여 올리고뉴클레오타이드의 효능을 평가한다. Aronex에서 개발된 화합물을 시판중인 시약과 비교할 것이다.
4. 안티센스 메카니즘을 지지하는 데이터를 수득하기 위한 개념-입증 검정을 개발한다. 이 시험관내 실험은 단 하나의 VEGF 이소타입이 특이적으로 표적화될 수 있는가를 시험하고, 본원의 올리고뉴클레오타이드가 예상된 방법으로 실제로 작용할 수 있는가에 대한 물음에 해답을 주도록 고안된다. 이는 미래의 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 고안에 도움을 줄 것이다.
5. 가장 유망한 안티센스 화합물을 시험하는데 홍채 신혈관신생의 생체내 랫트 모델을 사용한다. 이들 연구는 하바드의 안토니 아다미스(Anthony Adamis) 박사와 공동으로 실시될 것이다.

제안된 연구의 완성시, 1 내지 2개의 올리고뉴클레오타이드의 생체내 효능에 관한 정량적인 정보를 가질 것으로 기대된다. 복용량, 작용의 잠재적인 메카니즘, 세포내 이용성 및 잠재적인 독성에 관한 몇몇 정보를 또한 알 수 있을 것이다. 임의의 올리고뉴클레오타이드가 혈관신생 및/또는 VEGF 발현을 생체내에서 20%까지 감소시킬 수 있다면, 이는 긍정적인 발전으로 고려될 것이고, 연구의 11단계 동안 동물 모델에서 이에 대한 보다 상세한 연구를 진행시킬 것이다.

올리고뉴클레오타이드를 선택할 경우, 다른 RNA에 대해 비특이적으로 결합 위험이 허용될 수 없을 정도로 높고, G-함량이 높은 서열을 선택하는 경우 바람직하지 않은 G-사중체가 형성되기 때문에 결합에 이용될 수 있는 자유-코일 형의 이용가능성을 감소시킬 것이다[참조: Bishop et al., 1996]. 이 때 본 발명자가 제안하는 대안은 강한 독성없이 매우 효율적으로 결합을 유도할 수 있는 변형체인 C5-프로피닐 피리미딘을 함유한 선택적으로 변형된 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 것이다[참조: Wagner et al., 1993; Fenster et al., 1994]. 최근 본 발명자는 프로피닐 변형체가 특히 유용하게 작용한다는 것을 발견하였

다(예비 결과 참조).

올리고뉴클레오타이드의 뉴클레아제 내성을 개선시키는 방법:

천연의 포스포디에스테르 골격을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 혈청 및 세포성 뉴클레아제에 대해 감수성이 높다. 본 발명자는 랜덤 서열인 17개 염기의 올리고뉴클레오타이드가 혈청에서 3분 미만의 반감기를 갖는 것을 측정하였다[참조: Bishop et al., 1996]. 이에 대한 대안중의 하나는 포스포로티오에이트 골격[참조: Stein et al., 1991], 즉 1일 이상으로 올리고뉴클레오타이드의 혈청내 반감기를 현저하게 증가시키는 변형을 갖는 올리고머를 사용하는 것이다. 포스포로티오에이트 결합을 사용하는 것은 고농도에서 약간의 비특이적 효과를 일으키는 것으로 여겨지지만, 본 출원인은 하기에서 논의되는 바와 같이 매우 저농도에서 작용하는 특별하게 변형된 올리고뉴클레오타이드 합성을 제안함으로써 비특이적 상호작용의 위험을 감소시킬 수 있다. 또다른 골격을 갖는 올리고뉴클레오타이드가 시험되었지만 모두 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드보다 훨씬 큰 비특이적 효과를 갖는다.

올리고뉴클레오타이드의 세포내 흡수를 개선시키는 방법:

아세포 분포 연구는 형광성 올리고뉴클레오타이드로 처리한 세포가 핵 주위 엔도솜 구획에 축적된다는 것을 보여준다[참조: Guy-Caffey et al., 1995]. 내화 과정의 속도-제한 단계가 원형질막 또는 엔도솜 구획의 막을 통해 올리고뉴클레오타이드를 수송하는 것으로 보인다. 막의 지질 이중층을 통한 올리고뉴클레오타이드의 수송을 촉진시키는 두 가지 잠재적인 방법이 있다. 첫 번째 방법은, 올리고머를 막 결합성 및 침투성을 개선시키는 화합물에 공유적으로 결합시키는 것으로, 예를 들어 콜레스테롤에 결합시키는 것이다[참조: Letsinger et al., 1989]. 본 발명자는 최근 신규한 전매 변형인 친유성 페로센 테터를 동정하였는데(실형 디자인을 참조하라), 이는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 효능을 현저하게 개선시키는 것으로 보인다. 달리, 양이온성 지질 또는 리포솜성 제제와 같은 흡수 촉진제를 사용할 수 있다. 이들 시약은 이의 다용성 때문에 매력적인데, 동일한 전달 비히클을 다양한 올리고뉴클레오타이드와 함께 공동투여할 수 있다. 이들 양이온성 지질의 디자인은 핵산에 결합하는 양전하의 헤드 그룹, 및 융합원성 지질과 상호작용하여/거나 세포막을 탈안정화시키는 것으로 제안된 막 상호작용성 테일을 포함한다. 많은 양이온성 제제(예: 리포펙틴, Lipofectin)의 활성은 조성물 및 핵산의 양, 세포 유형 및 세포 성장 배지에서 혈청의 농도와 같은 인자에 의해 영향을 받는다. 또한, 몇몇 제제는 세포독성이다. 이런 제제는 동물 시스템에서 치료적 올리고뉴클레오타이드에 대한 전달제로서 많은 상기 화합물의 사용을 제한하기 때문에 효과적인 흡수 촉진제가 계속적으로 강하게 요구되고 있다. 본 발명자는 신규한 전달 비히클인 스페르미딘-콜레스테롤(SpdC)를 합성하였는데, 이는 혈청의 존재하에서도 올리고뉴클레오타이드의 세포내 흡수성 및 막 침투성을 개선시킨다[참조: Guy-Caffey et al., 1995]. 이들 화합물을 사용한 제형은 제안된 연구의 일부로서 평가될 것이다.

본 발명의 목적은 질환과 연관된 혈관형성을 감소시키면서 눈의 세포에 의한 VEGF 발현을 억제하는 안티센스 제형을 동정하는 것이다. 이런 연구는 화학적으로 변형된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 마이크로몰 이하의 복용량에서 유효한 억제 활성을 가질 수 있다는 우리의 최근 발견에 의해 고무되었다. 또한 아다미스 박사에게 의한 VEGF-관련된 신혈관신생 동물 모델 개발이 생체내에서 가장 효능있는 화합물 시험을 가능하게 할 것이다.

예비 결과:

요약- 예비적이고, 진행중인 일련의 실험의 목적 세포-기반의 VEGF 발현의 모델에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 활성을 개선시키는 일반적인 원리 및 방법을 발견하고/하거나 시험하는 것이다. 일차적으로, 본 발명의 목표는 다음과 같다:

- VEGF 단백질 수준에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 효과를 측정하기 위한 정량적인 세포-기반의 스크리닝 검정을 개발하고,
- 표적 mRNA에 대한 결합 친화성, 보다 큰 뉴클레아제 내성 및 특이성을 개선시키는 구조적인 변형체를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 합성하며,
- 투여된 올리고뉴클레오타이드의 세포내 내화성 및 막 침투성을 증가시키는 신규한 흡수 촉진제(몇몇은 Aronex에서 개발됨)를 사용하여 제형을 시험하는 것이다.

올리고뉴클레오타이드 디자인:

본 발명자는 본 발명의 화합물 중 하나가 결국 사람에서 시험될 것으로 기대하고 있기 때문에, 이 작업을 사람의 VEGF mRNA에 대해 지시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 개시하였다. 발현의 최대 억제를 달성하기 위해, 본 발명자는 모두 4개의 VEGF mRNA에 의해 공유되는 서열에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 선택하였다(표 3).

[표 3]

사람의 VEGF에 대해 지시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드

안티센스 올리고뉴클레오타이드 (mRNA 서열 57에서의 개시 AUG 코돈)		
T30638	mRNA 서열 87 내지 105	5'-a*g*a*g*C*a*g*C*a*a*g*g*C*g*a*g*g*C*t-3
T30639	mRNA 서열 185 내지 023	5'-g*C*g*C*U*g*a*U*a*g*a*C*a*U*C*a*U*g-3
T30640	mRNA 서열 204 내지 222	5'-C*g*a*U*U*g*g*a*U*g*g*C*a*g*U*a*g*C*t-3
T30641	mRNA 서열 232 내지 250	5'-U*a*C*U*C*C*U*g*g*a*a*g*a*U*g*U*C*C*a-3

전체 포스포로티오에이트(*) 골격은 뉴클레아제 내성을 부여한다.

C-5 프로피닐 피리미딘은 RNA 표적에 대한 결합 친화성을 개선시킨다.

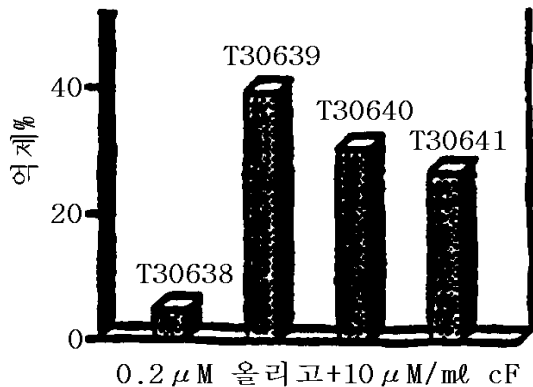
초기의 보고서[참조: Wagner et al., 1993]와 일치하게, 본 출원인은 C5-프로피닐 피리미딘 염기 치환에 의해, 각각의 쇠의 서로에 대한 친화성의 지표인 이분쇄 형의 T_m 이, 비변형된 올리고뉴클레오타이드의 경우 -60°C 에서 80°C 이상으로 증가된다는 것을 발견하였다. 대조군으로서 사용하기 위해, 동일한 크기의 '센스' 올리고뉴클레오타이드 및 변형체 T30691을 합성하였다.

올리고뉴클레오타이드의 세포내 시험:

안티센스 올리고뉴클레오타이드, 이의 변형된 비교상대 및 각종 제형을 VEGF를 분비하는, 배양된 사람의 각질세포, 즉 1차 세포주를 사용하여 평가한다. KGM 배지(Colonetics) 0.5ml이 있는 46웰 플레이트에 50,000세포/웰의 밀도로 세포를 플레이팅한다. 성장 배지로 분비된 VEGF 수준을 효소 결합 면역흡착 검정(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA, R&D 시스템)에 의해 측정한다. 검정은 5 내지 1000pg/ml의 범위 이상에서 선상에 있다. 본 측정은 추천된 배지에서 NHEK 세포 성장시킨 경우, 배지 0.5ml에 플레이팅된 100,000개의 세포가 15시간 동안 약 150pg의 VEGF(비처리된 대조군에서의 상층액중에는 약 300pg/ml이 존재)가 생성된다는 것을 보여준다.

세포-기반의 대부분을 검정은 유전자를 세포내로 전달하는 형질감염제로서 시판중인 양이온성 리포솜 제형(셀펙틴, Cellfectin, Life Technologies)을 사용하여 수행한다. 기타 시판중인 형질감염제는 독성이 있거나 비교적 비효과적인 것으로 밝혀졌다(7회 시험). 셀펙틴의 한가지 독특한 효과는 대조군으로서 세포내로 단독으로 투여될 경우, 이것이 실질적으로 VEGF 생성을 증가시킨다는 것이다. 이 이유는 알려지지 않았다. 보다 최근에, 본 발명인은 스페르미딘-콜레스테롤의 제형을 사용하기 시작하였다[참조: Guy-Caffey et al., 1995].

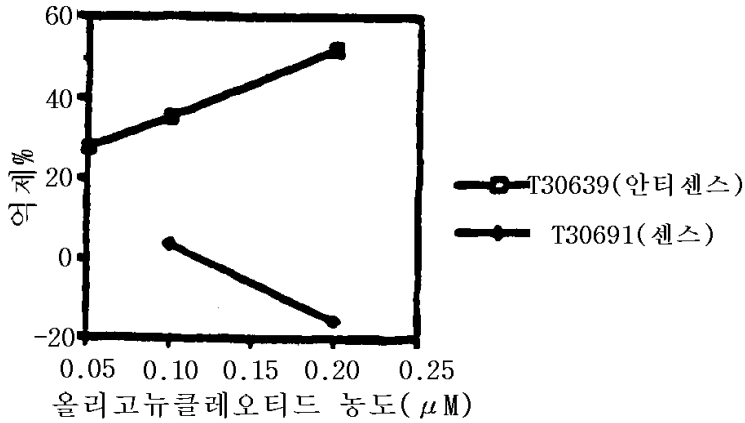
매우 초기의 실험에서, 본 발명인은 C5-프로피닐 변형체가 없는 포스포로티오에이트 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용여도 VEGF 수준에 전혀 영향을 미치지 않는다는 것을 관찰하였다(흡수 촉진제의 존재 또는 부재하의 5M 이하의 세포의 농도). 보다 고수준에서, 비특이적인 억제로 보이는 미비한 효과가 있었다(데이터는 제시되지 않음). 시토신 및 티미딘을 C5-프로핀 함유 피리미딘[참조: Wagner et al., 1993]으로 대 치환할 경우, 생체내에서 측정된 T_m 이 20°C 상승하였고, 이는 올리고뉴클레오타이드가 비변형된 변형체보다 큰 친화성으로 이의 합성 RNA 표적에 결합할 수 있다는 것을 알려준다(데이터는 제시되지 않음). 본 발명자는 흡수 촉진제의 존재 또는 부재하에 이들 올리고뉴클레오타이드의 효과를 시험하였고, 또한 최적의 제형을 동정하고자 올리고뉴클레오타이드에 대한 흡수 촉진제의 다양한 비율을 시험하였다. 본 발명자는 VEGF 수준에서 상이한 효과를 갖는 상이한 올리고뉴클레오타이드를 관찰하였다.



도 3. 4개의 올리고뉴클레오타이드중 3개가 셀펙틴 $10\mu\text{g/ml}$ 의 존재하에 0.2M의 농도 범위에서 활성을 갖는다. 대조군 센스 올리고뉴클레오타이드는 아무런 효과도 없다(제시되지 않음). 따라서, 시험 올리고뉴클레오타이드중 가장 효능있는 T30639가 후속적인 최적화 연구에 사용된다.

최적 올리고뉴클레오타이드 대 흡수 촉진제의 비율:

다음의 실험에서, 본 발명자는 올리고뉴클레오타이드(T30639 안티센스 및 T30691 센스 대조군) 대 cF의 양이온성 지질 성분의 질량비를 1:3으로 유지하면서 VEGF 생성에 대한 효과를 측정하였다. 다시, T30630+cF는 특이적 항-VEGF 활성을 보이는 반면 대조군 올리고뉴클레오타이드는 도 11에서와 같이 아무런 효과도 보이지 않는다.



도 11. VEGF 발현에 미치는 올리고뉴클레오타이드 셀팩틴 (1:3) 제형의 효과

고농도에서, 비특이적인 효과가 있는 것으로 보인다(제시되지 않음). 본 발명자가 결합된 물질로부터 유리 흡수 촉진제를 분리하려는 시도를 하지 않았다는 점을 주시하는 것이 중요하다. 이는 본 발명자가 한 성분에 대한 다른 성분의 상대적인 비를 바꿀 경우, 실제로 일어날 수도 있다.

올리고뉴클레오타이드 크기의 효과:

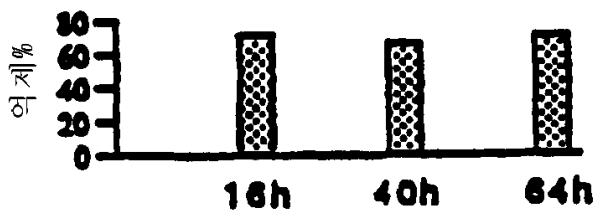
다음의 실험에서, 본 발명자는 특이적인 항-VEGF 활성을 유지하면서 올리고뉴클레오타이드 크기를 감소시키는 것이 실현가능한지 알아볼 것이다. 또한, 보다 짧은 올리고머의 합성이 저렴하다. 그러나, 동일한 NHEK 검정을 사용하여, 본 발명자는 셀팩틴 10μg/ml과 함께 모든 올리고뉴클레오타이드를 투여시, 19개 염기의 올리고뉴클레오타이드가 16 또는 14개 염기의 유도체보다 더효능이 있다는 것을 발견하였다. 셀팩틴 대 올리고뉴클레오타이드의 비를 변화시켜도 상대 활성이 변화되지는 않는다(제시되지 않음).

올리고뉴클레오타이드 효능에 미치는 스페르미딘-콜레스테롤+DOPE 또는 DC-choI+DOPE 제형(리포좀성 제제, 1:1의 중량비)의 효과:

최근, 본 발명자는 장기간 노출시 세포에 다소 독성이 있을 수 있는 셀팩틴에 대한 대안을 연구하기 시작하였다. 흡수 촉진제중 하나인 스페르미딘-콜레스테롤 접합체(SpdC, Guy-Caffey et al., 1995)는 사용된 수준에서 세포에 독성을 보이지 않으며, 최대 1주일 이상 처리한 설치류에서도 독성이 검출되지 않았다. 양이온성 지질 DC-Chol[참조: Gao et al., 1991]은 유전자 치료의 임상적인 시험을 위해 승인되었고, 세포 시스템에서 매우 낮은 수준의 독성을 갖는다. 예비 데이터는 이러한 신규한 지질 제형이 유사한 실험에서 셀팩틴보다 20 내지 40% 더 효능적이라는 것을 알려준다.

올리고뉴클레오타이드 제형에 대한 단기간의 노출은 VEGF 생성에 대한 장기간의 억제 효과를 관찰하기에 충분하다:

상기 모든 실험에 있어서, 본 발명자는 세포를 올리고뉴클레오타이드+흡수 촉진제와 함께 방배 항온처리한다. 그 다음, 올리고뉴클레오타이드에 대한 보다 단기간의 세포 노출에 의해 항-VEGF 활성이 동일한 수준으로 달성될 수 있는지 알아본다. 본 발명자는, 실제로 4시간 후의 세척과 신선한 비보충된 배지로의 교환이 항-VEGF 활성을 감소시키지 않는다는 것을 발견하였다(도 12). 더욱이, 효과는 최대 3일(실험기간) 동안 지속된다.



0.2 μM T30639+10 μg/ml cF의 첨가후 시간(h)

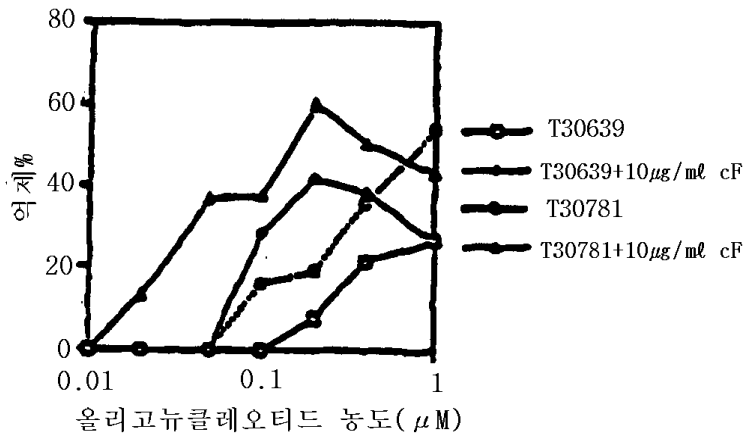
도 12. 올리고뉴클레오타이드+cF를 4시간 동안 처리한 후, 신선한 배지로 대체시킨다. 억제는 약 3일 동안 지속된다. 대조군 센스 올리고뉴클레오타이드에 의해서는 의미있는 억제가 일어나지 않는다(제시되지 않음).

사실, 대조군(올리고뉴클레오타이드 아님)과 관련된 억제 수준은 실제로 이전에 관찰된 것보다 훨씬 크다. 이에 관한 한 이유는, 단일 항온처리 실험에서, VEGF 단백질이 기존 mRNA로부터 계속적으로 합성되어(안티센스 올리고머에 의해 차단되지 않음) 배지에 축적되기 때문일 수 있다. 4시간째 배지를 대체하여, '백그라운드' VEGF의 공급원을 제거한다. 장기간의 안티센스 효과는 약제가 빈번하게 투여되지 않아도 된다는 것을 제안하기 때문에 상기 데이터는 생체내 시험 시스템에서 중요한 함축성을 갖는다. 이런 양상은 제안된 시험관내 및 생체내 검정에서 점검되어야 할 것이다.

페로센-접합된 올리고뉴클레오타이드:

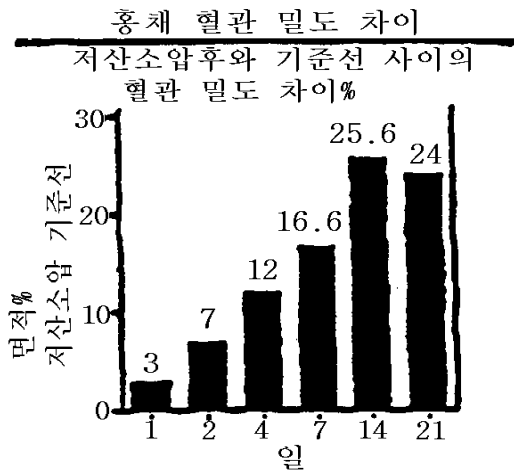
본 발명자는 최근, 흡수 촉진제와 함께 제형화된 메탈로센-변형된 올리고뉴클레오타이드가 사용된 농도의 범위내에서는 거의 독성이 없으면서 가장 효과적인 VEGF 억제제라는 것이 본원의 시험관내 검정에서 밝혀

졌다(도 13). 선택된과 함께 제형화된 올리고뉴클레오티드는 20 μM의 농도에서 특이적인 항-VEGF 활성을 갖는다. 페로센 테터는 올리고뉴클레오티드의 막 회합성을 개선시키도록 고안되었다(D. Mulvey, Aronex, 개인적인 임무). 또한, 본 발명자는 친유성 철 성분이, 아마도 세포의 활성 수송 시스템을 활용함으로써 세포내 표적화 및 올리고뉴클레오티드의 막 투과 이동을 도울 것이라고 추정하였다. 또한, 변형이 본 발명의 범위를 벗어나도록 하는 메카니즘에 대한 연구는 별도의 연구과제이다. 그러나, 페로센-변형된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 고효성을 관찰하였다는 사실은, 상기 방법이 생체내 모델에서 시험용 올리고뉴클레오티드를 시험함으로써 검토되어야만 한다는 것을 제안한다.

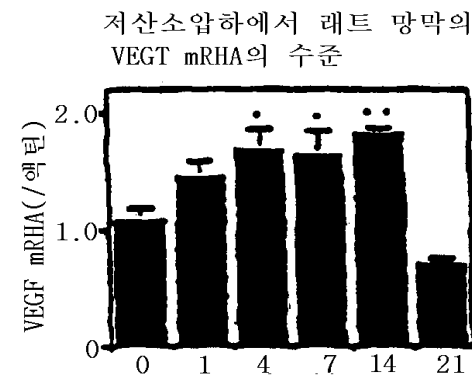


도 13. T0639 안티센스의 페로센-접합된 변형체의 유효한 안티센스 효과

실험 디자인 부분에서 상세히 기술한 바와 같이, 성숙한 랫트의 흉채 신혈관신생 모델은 정량적인 방법으로 안티센스 올리고뉴클레오티드의 활성을 시험하는 수단을 제공한다. 상기 검정에서, 랫트를 1 내지 21일 동안 저산소압 챔버에 두고, 흉채의 신혈관신생 증가를 디지털 영상화에 의해 정량한다. 데이터에 나타난 바와 같이(도 14), 황온처리 기간을 증가시키면 혈관계의 진행 정도가 분명히 나타난다. 이와 동일한 정도는 아니지만 망막의 RNA 수준 또한 증가한다(도 15). 본 발명의 예비 데이터 및 랫트 모델의 유용성에 의해 고무되어, 본 발명자는 혈관형성의 생체내 모델에서 유사한 개념 입증을 얻고자 계획중이다.



도 14



도 15

C. 관련 경험

조사 대표자인 Nilabh Chaudhary 박사는 세포 분자 생물학에 대한 광범위한 경험을 갖고 있다. 그는 1984년 캐나다 런던의 서부 온타리오 대학에서 생화학 박사 학위를 수여받았다. 그 후, 그는 Damon

Runyon-Wlater Winchell 암 기금의 장학금을 수여받아 뉴욕의 록펠러 대학의 Gunter Blobel 박사의 실험실에서 세포 생물학에 대한 박사 후기 연구를 계속하였다. 1986년, 그는 동일한 실험실에서 하바드 휴즈 의학 연구소의 회원으로 임명되었다. 1992년, Chaudhary 박사는 연구 과학자로서 Triplex(최근 Aronex로 개명됨)에 합류하여 핵산 치료제의 세포내 및 핵내 흡수를 개선시키는 기술의 개발에 대한 세포 생물학 프로그램을 개시하였다. 그는 신규한 올리고뉴클레오타이드 변형체 및 흡수 촉진제를 디자인하고, 합성하고, 시험하기 위해 유기 화학팀과 진밀하게 공동협력하였다. Chaudhary 박사는 잠재적인 치료적 올리고뉴클레오타이드의 구조-기능 관계에 관한 과학적 논문을 공동저술하였고, 세포내 내화 및 효능을 향상시키는 방법을 고안해냈다. 그는 세포-기본의 경정 시스템의 디자인, 면역화학적 기술, 단백질의 미세정량, 핵산 정제 및 분자 클로닝 기술, 아세포 분획, 막 단백질 및 지질 분리 및 형광 현미경에 경험이 있다.

Anthony P. Adamis 의학 박사는 본 프로젝트의 공동 협력자이자 고문이다. 그는 하바드 의대에서 안과부문의 조교수이고, 보스턴의 칠드런즈 হাস피탈에서 외과부문의 연구 보조자이다. 1994년, Adamis 박사 및 그의 동료는 처음으로 눈의 VEGF 수준의 증가, 혈관형성 및 실명의 1차적인 요인인 증식성 당뇨병 망막증의 진행간의 중요한 연관이 있다는 것을 입증하였다. 이후 수행된 연구에서 VEGF 발현을 촉진시켜서 눈의 신혈관신생을 일으키는 저산소증의 생리학적인 역할을 확인하였다. 그의 연구 경험에는 환자의 임상적인 연구, 세포-기본의 개념 입증 검정의 질환 디자인의 설치류 모델 개발 및 분자생물학의 이용 및 클로닝 기술이 포함된다. 그는 혈관형성의 분야에서 10편의 논문을 포함하여 20편 이상의 논문을 출간하였다.

D. 실험 디자인 및 방법.

방법의 요약:

본 방법 목적은 혈관형성의 동물 모델에서 항-VEGF 안티센스 화합물의 효능을 입증하는 것이다. 이를 위한 제제에서, 본 발명자는 생체내 시험을 위해 가장 유망한 안티센스 제형으로 이끌어줄 일련의 시험관내 실험을 수행할 것을 계획하였다. 본 발명자는 랫트의 VEGF mRNA에 대해 표적화된 안티센스 올리고뉴클레오타이드(19개 염기)의 10개의 후보 라이브러리 스크리닝을 시작하였다. 올리고뉴클레오타이드는 표적 mRNA 결합 친화성을 개선시키는 C5-프로피닐 피리미딘 및 뉴클레아제 내성을 부여하는 뉴클레오타이드간의 포스포로티오에이트 결합을 포함한다.

세포내 시험을 위해, 본 발명자는 풍부한 양의 VEGF mRNA 및 단백질을 생산함으로써 저산소압에 반응하는 랫트의 C6(신경교종) 세포의 사용을 계획하였다. 96-웰 포맷으로 수행된 검정을 각종 안티센스 또는 대조군 올리고뉴클레오타이드 제제의 활성을 스크리닝하는데 사용한다. 세포외 배지에 분비된 VEGF의 수준에 대한 시간 경과에 따른 이의 효과는 ELISA에 의해 모니터링된다. 세포내 흡수를 개선시키기 위해, 올리고뉴클레오타이드는 신규한 흡수 촉진제와 함께 공동투여된다. 상이한 비율의 핵산 및 지질을 사용하여 시험한다. 또한, 두 개의 "최고" 안티센스 서열을 선택하여 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 세포내 이입에 공헌할 수 있는 3'-친유성 페로센 테타인 변형체에 접합시킨다. 또한, 두 개의 최상 올리고뉴클레오타이드(또는 이의 제형)의 VEGF mRNA 수준에 대한 효과를 노던 블롯팅으로 측정하고, (적절한 대조의 효과와 비교한다.)

안티센스 메카니즘에 대한 증거를 제공하려는 노력으로, 일련의 개별적인 시험관내 실험을 계획한다. C6 세포를, VEGF 이소타입-특이적, 즉 1종 또는 2종의 VEGF mRNA를 표적화하도록 특별히 디자인된 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리한다(랫트에서 3개의 주요물, 1개의 부수물). RNA 보호 검정을 각종 VEGF mRNA의 상대적인 수준을 측정하는데 사용한다. 원칙적으로는 안티센스 효과가 실제로 서열-특이적일 경우, 표적화된 이소타입의 발현은 단지 하향 조절된다. 상이한 서열의 올리고뉴클레오타이드는 비효과적일 것이다.

가장 효과적인 안티센스 화합물의 세포내 독성은 두 개의 상이한 세포주에서 검정되고, 올리고뉴클레오타이드가 세포 층을 침투할 수 있는가를 측정하기 위해 디자인된 C6 세포 구상체 모델에서 두 가지 이상의 독성 제형을 시험한다. 구상체중의 연속적인 세포 층내의 VEGF mRNA 수준은 원위치(in situ) 하이브리드화에 의해 측정된다. 또한, 흡수 촉진제 및 테타의 유용성을 이 모델에서 확인한다. 가장 효과적인 항-VEGF 올리고뉴클레오타이드의 항-혈관형성 활성은 랫트 눈의 홍채 신혈관신생 모델을 사용하여 평가한다. 알비노 랫트를 저산소 챔버에 두고(2주 이하), 홍채에서의 혈관신생을 간접적인 정량 디지털 영상화 공정 에 의해 모니터링한다. 상기 모델에서 증가된 혈관신생은 저산소압하 1 내지 2일 후에 감지될 수 있다. 랫트의 한쪽 눈에 시험 올리고뉴클레오타이드(또는 제형)를 직접 도입하고, 다른 쪽 눈은 대조군으로서 비처리시킨다. 최대 1주일 노출시킨 후, 혈관 성장에 미친 모든 효과를 정량화한다. (가능하다면 유리체의) VEGF 단백질 수준 및 망막내의 mRNA 수준의 변화를 ELISA 및 노던 블롯팅으로 각각 확인한다. 특정 부작용이 관찰될 것이다. 초기의 결과에 따라, 다중복용량 실험을 시도한다. 대조군 올리고뉴클레오타이드의 효과를 또한 확인한다. 독성이 가장 적고, 가장 효과적인 제형(신혈관신생을 20%미만으로 억제)을 상기 연구의 제 II 단계의 일부로서 광범위한 일련의 동물 시험에서 시험한다.

안티센스 및 대조군 올리고뉴클레오타이드의 선택:

VEGF 발현의 최대 차단을 달성하기 위해, 랫트의 모든 VEGF 이소타입의 10개의 공통 영역에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성한다[참조: Conn et al., 1990]. 명백한 헤어핀 모티프 또는 G-풍부한 스트레치가 아닌, 실질적으로 랜덤하게 선택된 10개의 올리고뉴클레오타이드를 스크리닝의 제1 과정에서 시험하기 위해 합성한다. 5개는 랫트에 특이적이고, 나머지 5개의 서열은 사람의 mRNA에 결합하도록 선택한다. 가장 최근의 증거는 안티센스 표적화에 대해 예측가능하고 선호되는 위치는 없는 것으로 제안하고 있지만 진화적으로 보존된 부위가 좋은 안티센스 표적인지 나쁜 안티센스 표적인지는 분명치 않다. 모든 합성적 올리고뉴클레오타이드는 C5-프로피닐 피리미딘(표적에 대한 결합 친화성을 개선) 및 포스포로티오에이트 결합(뉴클레아제 내성)을 포함한다[참조: Wagner et al., 1993; Fenster et al., 1994]. 본 발명자는 이미 대조군으로서 사용된 몇몇 관계없는 올리고뉴클레오타이드를 가지고 있지만, 필요할 경우, 안티센스 서열과 동일한 크기와 염기 조성을 갖는 대조군 올리고뉴클레오타이드를 합성할 것이다. 올리고뉴클레오타이드는 Aronex의 올리고뉴클레오타이드 합성 그룹에 의해 합성되고, 정제되고(HPLC에 의해 95%이상) 특성지워질 것이다.

작용 메카니즘의 연구를 위한 올리고뉴클레오티드:

안티센스 작용 메카니즘을 지지하는 데이터를 수득하기 위해, 20-량체의 이소타입-특이적인 올리고뉴클레오티드를 몇 개(약 4개, 효능에 따른다) 제조한다. VEGF-165 mRNA에서만 발견되는 서열에 대해 지시되는 올리고뉴클레오티드는 VEGF-120 mRNA에는 결합하지 않는다. 유사하게, VEGF-120의 스플라이싱 접합부(즉, 엑손당 10염기)에 상보적인 20개 염기의 올리고뉴클레오티드는 VEGF-165에 잘 결합할 수 없다. 대조군으로서 사용하기 위해, 역서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 합성한다. VEGF 발현에 미치는 이들 올리고뉴클레오티드의 효과는 각종 mRNA의 상대적인 수준을 비교함으로써 측정한다. 각각의 mRNA의 상대적인 수준을 정량하는데 RNase 보호 검정을 사용한다(Ambion, Austin, TX). 이를 수행하기 위한 프로브(약 150 내지 250염기 범위의 길이)를 랫트의 mRNA 서열-특이적 프라이머 및 RT-PCR 기술(Perkin Elmer)을 사용하여 이미 제조하였다.

세포 배양:

랫트의 신경교종으로부터 유도된 C6 신경교 세포에서 생물학적 스크리닝을 수행한다. 상기 세포주에서 우세한 VEGF 세포주는 VEGF-165(아미노산) 및 VEGF-120(각각 46%)인 반면 VEGF-188은 단지 약 8%를 차지한다.[참조: Bacic et al., 1995]. 상기 세포주는 VEGF 구조 및 기능을 조사하는데 널리 사용된다. 저산소압에 의한 자극으로 VEGF 합성을 유발하기 위해, 세포를 수소 또는 팔라듐 촉매를 갖는 저산소압 챔버(GasPak Plus anaerobic culture chamber, BBL Microbiology System)에 두어 모든 산소를 제거한다[참조: Stein et al., 1995]. 전형적인 항온처리 시간은 6 내지 18시간이다. 달리는, 배양물은 헴(heme)-의존적인 저산소압 반응 시스템을 방해하고 VEGF mRNA의 잔사를 유발시키는 저산소압 반응 인자를 활성화하는 100 내지 300 μ M의 영화코발트에 노출시킨다.

생체외에서 안티센스 올리고뉴클레오티드의 활성 평가:

단층으로 성장한 C6 세포를 5% 소 태아 혈청 및 항생제를 포함한 돌베코의 배지에서 유지시킨다. 항-VEGF 올리고뉴클레오티드의 예비 시험을 위해, 세포를 96웰 디쉬에 10,000 또는 20,000세포/웰의 밀도로 플레이트팅한다. 회수한지 1일 후, 세포를 (25m²의 배지중에서) 올리고뉴클레오티드로 처리한다. 두 가지 유형의 배지인 일정한 혈청-함유 C6 배지 또는, 혈청 성분에서 의한 방해로 감소시킴으로써 형질전환 효능을 증가시키는데 종종 사용되는 감소된 혈청 배지인 Optimem(Life Technologies사)가 사용된다. 저산소압 챔버에서의 다양한 항온처리 기간 후, 상층액을 ELISA에 의한 추가의 분석을 위해 신선한 플레이트에 옮긴다. 원칙적으로는, 신규한 제형을 시험할 경우, 특별한 변화 또는 독성의 분명한 징후를 찾기 위해 현미경을 통해 세포의 형태를 조사하여야 한다.

RNA 분석을 위해, 다수의 세포(T75 플라스크중의 2×10^6 내지 10^7 세포)를 선택된 수의 제형으로 처리한다. 올리고뉴클레오티드 처리(및 저산소압 등에 노출) 후, 상층액을 ELISA용으로 다시 저장하고, RNA를 분리하여 하기 기술된 방법을 사용하여 분석한다.

VEGF ELISA 검정:

설치류 시스템용으로 시판중인 키트가 없기 때문에, 랫트의 VEGF와 반응하는 것으로 공지된 항체(Research Diagnostics의 RD1-1020 또는 RD1-4060, 및 R&d 시스템의 다른 것들)를 사용하여 시스템을 고안하였다. VEGF에 대한 다른 항-혈청이 또한 유용하기 때문에 최상의 조합을 선택할 수 있다. ELISA 시약(효소-결합된 2차 항체, 기질)은 Pierce로부터 구입한다.

RNA 추출, 노던 블롯, RNase 보호 검정 및 하이브리드화 프로브:

VEGF mRNA 크기는 주로 긴 비해독된 영역 때문에 3.8 내지 4킬로베이스의 범위이다. RNA 분석을 위해, 총 RNA를 RNA졸(RNAzol) 방법(Tel-Test, Inc., Friendswood, TX)으로 처리되거나 비처리된 세포로부터 분리한다. 프로브로 사용하기 위해, C6 RNA 및 VEGF-특이적 프라이머에 이어서 이소타입-특이적 프라이머를 사용하여 공통의 영역에 상응하는 VEGF-특이적 단편 및 이소타입-특이적 프로브를 역전사효소 연쇄 반응(RT-PCR 키트, Perkin Elmer)의 조합으로 이미 생산하였다. 이들 프로브를 PCR II 플라즈미드 클로닝 벡터(Invitron)내로 클로닝하고, 서열은 서열분석(Sequenase, USB)에 의해 확인한다. PCR II 벡터는 RNase 보호 검정(AmbionM Austin, TX)에서 사용하기 위한 방사능표지된 RNA 프로브를 RNA 폴리머라제 의존적 생산을 가능하게 한다. β -액틴 프로브는 RNA 수준을 표준화하는데 사용된다. 노던 블롯을 위해 RNA(20 μ g 이하)를 포름알데히드 겔에서 분획화하고, 나일론으로 옮기고, 표준 공정에 따라 RNA 수준을 표준화하는 β -액틴을 갖는 방사능표지된 프로브로 탐지한다. 모든 RNase 검정에서, 포스포이미징(Fuji Phosphor imager)을 방사능의 상대적인 수준을 정량화하는데 사용한다.

안티센스 작용 메카니즘을 지지하는 실험:

이 연구에서 안티센스 올리고뉴클레오티드는 VEGF mRNA를 암호화하는 mRNA 서열에 상보적이다. 그러나, 생물학적 시스템에서 이의 억제 효과가 안티센스 작용 메카니즘을 필수적으로 입증하는 것은 아니다. 사실상, 설치류 분석은 많은 올리고뉴클레오티드가 특히 1 μ M 이상의 농도에서 세포의 물질 대사를 비특이적으로 방해할 수 있다는 것을 지적한다[Stein and Cheng 1993에서 검토됨]. 안티센스 메카니즘을 입증하는 것이 언뜻 보기엔 어렵고, 환경적인 증거가 없었더라면 실제로 나타나지 않는다. 현재의 실험은 간접적이지만 가능성있는 안티센스 메카니즘의 증거를 수득하도록 디자인된 것이다. 간단히, 본 발명자는 랫트의 세포-기본 검정에 사용되어 단일 VEGF 변형체의 발현을 선택적으로 억제하는 "이소타입-특이적" 안티센스 올리고뉴클레오티드를 합성하였다. 랫트 C6 세포(신경교종 기원)은 VEGF 이소타입의 3가지 주요 유형을 생산한다. RNase 보호 검정은 C6 세포주에서, 약 45%의 VEGF가 120개의 아미노산 변형체이고, 약 45%가 165개의 아미노산 변형체이며 나머지는 188개의 아미노산 변형체이라는 것을 보여준다[참조: Bacic et al., 1995]. 세포를 하나 이상의 이소타입에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리한 후, 저산소압 또는 저산소압을 모사한 영화코발트 200 μ M를 가함으로써 mRNA 전사를 촉진시킨다. 9시간 동안 노출시킨 후, VEGF mRNA의 세포내 수준을 RNase 보호 검정(Ambion, Austin, TX)으로 모니터한다. RT-PCR 기술에 의해 이미 생성된, 매우 중요한 이소타입-특이적 프로브(약 100 내지 200 염기 길이)가 각종 VEGF mRNA 수준을 정량하는데 사용되고, 수준은 β -액틴에 대해 표준화시킨다. 안티센스 메카니즘이

작동되고 단일의 이소타입-특이적 올리고뉴클레오티드가 사용되는 경우, 단지 한 종의 VEGF 발현이 다른 것에 비해 상대적으로 감소될 것이다. 반면, 모든 VEGF의 공통 영역에 상보적인 올리고뉴클레오티드는 모든 VEGF의 발현을 감소시킬 것이다.

페로센-접합된 올리고뉴클레오티드의 합성:

몇 차례의 선별 후, 가장 적은 부작용을 갖는 가장 활성적인 올리고뉴클레오티드를, 올리고뉴클레오티드의 흡수 및 특이적 활성을 추가로 증가시킬 페로센 테터의 3 말단을 통해 결합시킨다(예비 결과를 참고하라: T30781(+페로센) 대 T30639(비변형됨)). 효과가 있을 경우, 상기 올리고뉴클레오티드의 활성을 동일한 테터를 함유한 랜덤 서열 대조군의 활성과 비교한다. 페로센 부분은 올리고뉴클레오티드가 세포의 활성 수송 또는 침투 시스템(철?)을 활용할 수 있게 하지만, 메카니즘은 아직 연구되지 않았다.

흡수 촉진제의 용도:

대부분의 경우에서, 세포내로의 이입을 용이하게 하기 위해, 올리고뉴클레오티드는 양이온성 지질 시약의 존재하에 세포로 투여된다. 유전자 전달을 위한 형질감염제로서 개발된 많은 양이온성 지질은 현재 시판 중이지만, 셀펙틴(Life Technologies사)만이 본원의 검정에 지속적으로 효과적인 것으로 밝혀졌다(7번의 주요 지질을 시험). 셀펙틴은 폴리아미노리피드 테트라팔미틸-스페르미딘 및 포스포리피드 디올레오일 포스포티딜 에탄올아민(DOPE)의 1:1.5(중량/중량)의 리포좀성 혼합물이다. 다른 지질로는 Leaf Huang[참조: Gao and Huang, 1991]에 의해 개발되고, 유전자 치료를 위한 임상학적 실험용으로 승인된 DC-choi을 사용하여 수행한다(Regene Therapeutics, The woodlands, TX). 또한, 본 발명자는 혈청의 존재하에서 관련 의미있는 독성이 없이, 올리고뉴클레오티드의 세포내 흡수를 현저하게 증가시키는 일련의 신규한 폴리아미노리피드 흡수 촉진제를 디자인하고 합성하였다. 이들 중 가장 효과적인 것은 SpdC(스페르미딘-콜레스테롤)이다. 마우스의 정맥내로 이를 주입할 경우, SpdC는 많은 조직으로의 올리고뉴클레오티드 전달을 향상시키고, 1주일 동안 100/mg/kg/1일의 농도로 마우스에 주입할 경우, 독성이 관찰되지 않았다(데이터는 제시되지 않음). 본 발명자는 SpdC/DOPE 및 DC-choi/DOPE(디올레오일 포스포티딜콜린을 갖는 SpdC 또는 DC-choi)의 리포좀성 제제를 1:0.5, 1:1, 1:1.5 및 1:2의 질량비로 제조하였다. NHEK 세포에서의 초기 항-VEGF 검정에서 가장 효과적으로 작용하는 비율은 각각의 양이온성 지질의 경우 1:1이다. 본 발명자는 C6 세포주, C6 구상체 및 최종적으로는 눈의 모델에서 항-VEGF 올리고뉴클레오티드의 활성을 향상시키는 이들 약제의 유용성을 조사할 계획이다.

이들 흡수 방법 수행에 의한 정확한 메카니즘은 여전히 논쟁적이다. 양이온성 지질과 핵산과의 혼합은 세포로 효과적으로 이입되는 미세침전물을 거의 항상 생성한다. 일관성을 유지하고 기본이 되는 원리를 발견하기 위해, 쿨터(Coulter) 입자 사이징 장치를 사용하여 입자의 크기를 모니터한다.

생체내에서의 주입용 제형:

본원에서 용어 제형은 약물을 전달하는 다중성분 혼합물의 사용 메시지를 전달하기 위해 본 제안에서 관대하게 사용된다. 그러나, 생체내 시험 단계에 가까워지면서, 눈에 주입하기 위한 안과용 제형, 특히 흡수 촉진제를 포함하는 제형 고안에 신중을 기하였다. 고려될 다른 매개 변수로는 안티센스의 양 및 농도, 염도, 입자 크기, pH 및 비히클이 있다. Joe Wyse 박사가 최적의 제형을 선택하고 제조하는데 도움을 주었다.

세포독성 검정:

세포를 96웰 플레이트에 500세포/웰의 밀도로 시딩한다. 플레이팅한지 1일 후, 세포를 연속적으로 희석된 올리고뉴클레오티드 제형에 노출시킨다(희석액당 4웰). 노출 1 내지 4일 후, 세포 생존 효과를 비방사능 검정 시스템(Cell Titer 96 Aqueous cell proliferation assay, Promega Corp.)을 사용하여 모니터한다. 가장 잠재적인 올리고뉴클레오티드에 대해, 상기 검정을 개별적인 3개의 세포주(C6, NHEK 및 섬유아세포 포함)에서 수행한다.

구상체에서 안티센스 활성 평가:

단층(4.5g/글루코오스/l, DMEM, 5% FCS+항생제)에서 정상적으로 성장한 C6 세포를 약 0.4 내지 0.8mm의 세포 구상체 또는 응집체로 성장하도록 유도한다. 이는 지질 또는 다른 것과 함께 제형화된 본원의 안티센스 올리고뉴클레오티드가 세포 구상체 층을 통과하면서 여전히 생물학적 활성을 가질 수 있는지를 알려줄 것이다. Stein 등에 의해 기술된 구상체를 제조하기 위한 방법이 사용된다. 세포를 컨플루언스(confluence) 배양물로부터 비접착성 세균학적 디쉬로 옮기고 48시간 동안 성장시킨다. 출현한 스페로블라스트를 스피너 플라스크로 옮기고, 추가로 10일 동안(80rpm) 성장시키고, 구상체를 10ml의 피펫을 통해 침전시켜 일정 크기로 분류한다. 추가로 6주 더 성장시키고, 매일 배지를 교환한다. 플라스크를 매일 95% 공기+5% CO₂로 씻어내어 적절한 산소화 및 pH를 확보한다.

VEGF 합성을 유발시키도록 1일 이상 저산소압에 노출시킨 구상체를 안티센스 제형 또는 적절한 대조군으로 처리하고, 구상체 단편에서의 VEGF mRNA 수준을 원위치 하이브리드화에 의해 측정한다. 이를 위해, 구상체를 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, 동결시키고 10 μ m 두께의 조각으로 절단하여 상기한 바와 같이 생성된 VEGF에 대해 ³⁵S-표지된 DNA 또는 RNA 프로브를 사용하는 원위치 하이브리드화를 위해 제조한다.

제조된 단편은 헤마톡실린 및 코신 염료로 역염색시킨다. 방사능사진법[참조: Guy-Caffey et al.]을 수행하고 며칠 후, 얇은 조각을 명암의 조도에 의해 측정(사진화)한다.

VEGF RNA 분포는 안티센스 올리고뉴클레오티드에 의해 달성되는 억제 정도를 나타낸다. 이상적으로, 모든 층은 낮은 수준의 VEGF mRNA를 나타낼 것이다. 가장 가능성있는 것은, 약물이 세포 층을 침투하지 못하거나, 세포 중심이 보다 저산소압화되고 보다 많은 VEGF를 생산하기 때문에 표면 층이 보다 적은 VEGF를 갖게 되는 것이다. 전달이 표면 층에서만 이루어진다면, 신규한 전달 방법을 고안해내는 것을 시도할 것이다.

생체내에서 VEGF 안티센스 올리고뉴클레오티드의 항-혈관형성 활성 평가:

VEGF-관련된 홍채 신혈관신생의 성숙한 설치류 모델;

성숙한 랫트는 저산소압 대기중에서 홍채에 새로운 혈관 성장을 촉진시킨다. 신혈관신생은 망막에서 VEGF mRNA 수준이 상향조절되는 시간과 상호관련이 있다. 망막의 연속적인 사건은, 허혈성 망막 VEGF가 홍채의 신혈관신생 발달의 원인으로 공지된 홍채홍색증의 원인이 모델 및 사람의 홍채 신혈관신생에서 나타나는데 것과 유사하게 재현한다. 이는 혈관형성을 감소시킬 수 있는 안티센스 화합물의 활성을 시험하기 위해 상기 모델을 사용하려는 의도이다. 아다미스 실험실에서 수행될 동물 실험은 동물 조작 및 수술, 사진 촬영술, 컴퓨터 정량 및 VEGF mRNA의 노던 분석을 포함한다.

성숙한 350 내지 400그램의 킹스턴 콜로니 알비노 스프라그-다울리 랫트(Kingston colony albino Sprague-Dawley, 암컷)를 1 내지 21일 동안 저산소압 챔버(1% 산소)에 방치시킨다. 생체현미경적 진단 및 표준화된 스릿 카메라 사진 촬영술을 항온처리 기간 전 및 후에 수행한다. 진행된 홍채 혈관 확장 및 안구의 징후뿐만 아니라 증가된 혈관 밀도가 저산소압 대기중에서 발달되었다. 홍채 혈관은 이런 알비노 동물에서 확실하게 시각화된다. 홍채의 표준화된 사진은 컴퓨터 프로그램(NIH image, 1.54D 소프트웨어)내로 스캐닝되고, 신혈관신생 영역은 픽셀 분석을 통해 마스킹 방법에서 정량한다. 홍채 혈관신생은 14일에 걸쳐 진행되는 증가를 보여준다. 증식 세포 핵 항원(PCNA) 및 인자 VIII 면역학적 염색은, 혈관형성을 나타내는 증가된 혈관신생을 제공하는, 2일째 시작된 내피 세포 증식을 확인시켜준다. 노던 블롯팅용으로 제조되는 분리된 망막은 저산소압하의 동물이 망막에서 안정된 상태의 VEGF mRNA 수준을 증가시킨다는 것을 입증한다. 요약하면, 성숙한 랫트는 저산소압 대기 상태에서 홍채에 새로운 혈관 성장을 촉진시킨다. 이것이 상기 모델을 후보 항-VEGF 제형의 효과를 시험하는데 사용하려는 의도이다.

신혈관신생에서 저산소압의 차단 효과를 측정하는 실험:

상기 랫트 모델은 저산소압에 대한 연속적인 노출용으로만 사용된다. 이 모델은 예를 들어 약물의 반복적인 투여를 위해 저산소압이 차단될 경우 보다 유용한 것으로 입증될 수 있기 때문에, 1일을 기준으로 단기간 동안 저산소압으로부터 이동된 동물에 대해 홍채 신혈관신생도를 특성화한다. 상기 방법으로 처리된 신생아 랫트는 일정한 산소중의 동물과 비교시 보다 큰 신혈관신생 반응을 갖기 때문에 이런 제거가 신혈관신생을 상승시키는 것으로 추측할 수 있다[참조: Reynaud and Dorey, 1994]. 저산소압의 망막을 재산소화시키는 것은 망막의 VEGF mRNA 단백질을 증가시키는 것으로 공지된 반응성 산소 중간체를 생성한다[참조: Kuroki et al., 1995].

랫트를 1, 3, 5, 7, 14 및 21일 동안(시점당 n=3, 총 18) 저산소압 챔버(10% 산소)에 방치한다. 이를 1일마다 1시간 동안 이동시켜 정상적인 실제 산소(21%)에 노출시킨다. 항온처리 기간 끝에, 표준화된 홍채 사진촬영을 실시한다. 동물을 희생시키고, 눈의 앞쪽반을 PCNA 염색용 및 광현미경용으로 제조한다. 망막을 분리하고 ³²P-표지된 558bp의 VEGF cDNA 랜덤 프라이머-표지된 프로브를 사용한 노던 블롯팅용으로 제조한다.

망막의 VEGF mRNA 상향조절은 21일 간의 기간에 걸친 홍채 신혈관신생의 사진적 및 면역조직화학적 증거와 상호관련이 있다. 혈관분포 영역을 표준화된 사진법으로부터 정량화하고, 비차단된 저산소압에서 방치된 동물과 비교한다. 상기 실험으로부터, 저산소압 효과를 손상시키지 않으면서 동물이 저산소압 챔버로부터 제거되고 투약되는 최대 횟수를 추정할 수 있다.

생체내에서 안티센스 효과의 평가:

0일째, 기본 사진을 촬영한다. VEGF 안티센스 화합물을 유리체내로 단독으로 수여받기 위해 동물의 한쪽 눈을 임의로 마취한다. 다른 쪽 눈은 비처리된 채로 남겨둔다. 용량은 생체내 연구에 따라 처리되지만 20 μ l 또는 이 이하로 투여된다. 먼저 상기와 같은 검정에서, 제형당 6마리의 동물을 처리한다(4개의 제형: 올리고만; 올리고+테터; 흡수 촉진제와 함께 올리고 및 흡수 촉진제와 함께 올리고+테터). 이의 목적은 이들 화합물이 어떤 즉각적인 효과를 갖는지를 확인하는 것이다. 만일 혈관생성이 주목할만큼 감소할 경우, 많은 동물이 사용될 것이다. 하기의 표는 얼마나 많은 동물이 필요한지에 대한 통계적인 근거를 요약한 것으로, 처리당 약 20마리의 랫트가 사용되는 것으로 기대된다.

요구되는 랫트의 수: 상기 모델에서 90%의 랫트가 신혈관신생을 발달시킨다.

의미있는 수준은 0.05 ($\alpha=0.05$)이고 능력의 수준은 0.8 ($1-\beta=0.80$)로서 추정되고, 처리 그룹당 눈의 수는 혈관형성 차단제의 다양한 효과에 대해 측정될 수 있다.

[표 4]

대조군 그룹	처리 그룹	요구되는 눈의 수
90	40	38
90	50	24
90	60	17
90	70	12

이런 실험에 대한 신혈관신생의 억제 처리된 눈에 대한 대조군 눈의 혈관신생 영역이 20% 감소되는 것으로 정의된다. 추정되는 특정 시약의 효과가 높을 경우, 처리된 그룹에서 홍채 신혈관신생을 발달시키는 눈의 비율은 낮을 것이고, 통계적인 의미를 부여하는데 요구되는 눈의 수는 극적으로 감소할 것이다.

7일째, 동물을 사진촬영하고 희생시킨다. 망막을 수거하고 노던 블롯팅용(각각)으로 제조한다. VEGF의 안정한 수준의 mRNA는 포스포리미지저(Molecular Dynamics)를 사용하여 285 리보솜성 RNA 시그널에 대해 표준화한 후에 정량화한다. 홍채 혈관 분포를 정량화하고, 처리된 눈 및 대조군 눈을 비교한다.

F. 척추 동물 조작 방법:

모든 동물 방법은, 연구를 위한 동물의 용도에 있어서 시각 및 안과학에서의 연구 협회에 의해 발표된 지침서 및 매사추세츠 안과 및 이과 동물 보호 협의회에 의해 발표된 지침서에 따라 칠드런스 হাস피탈(하바드 메디칼 스쿨)에서 수행한다. 총 120마리의 알비노 암컷 킹스톤 콜로니 스프라그-다울리 랫트를 사용한다. 이들을 마취시키고, 30게이지 니들을 사용하여 올리고뉴클레오티드 20 μ l 또는 대조 제형 20 μ l을 유리체내로 투여한다. 상기 주입후 겐타마이신 설페이트를 적용시킨다. 동물을 10% 산소 대기중에 3주 이하 동안 유지시킨다. 마지막으로 처리한 후, 이들을 CO₂ 흡입으로 희생시킨다. 모든 동물은 OPRR 지침서와 일치한다.

1. 인용된 문헌

- Adamis, A.P., et al., 1994, Arch. Ophthalmol. 118:445-450**
Adamis, A.P., et al., 1993, Biochem. Biophys. Res. Comm., 193:631-638
Adamis, A.P., et al., 1996, Arch. Ophthal. 114:66-71
Bacic et al., 1995 Pharm. News 2:V, (abst)
Bishop et al., 1996, 3. Biol. Chem.271:5698-5703.
Conn, (3. et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2628-2632
D'Amore, P.A., 1994, Investigative Ophthal. Vis. Sci. 35:3974-3979
deYries, C., et al., 1992, Science 255:989-991.
Fenster, S.D., et al., 1994, Biochemistry 33:8391-8398
Ferrera, N., et al., 1992., Endocrine Reviews 13:18-31
Guy-Caffey et al., 1995, J.Biol.Chem. 270:31391-31396
Gao, X., and Huang, L.1991, Biochem. Biophys. Res. Comm. 179:280-285

Miller, J. et al., 1994. Am. J. Pathol. 145: 574-584.
Milligan, J.F. et al., 1993, J.Med.Chem. 36:1923-1937.
Plate, K.H., et al., 1992, Nature 359:845-848
Shima, D.T., et al., 1995, Molecular Med. 2:64-75
Shweiki et al., 1992, Nature 362: 841-844
Stein, C.A. et al., 1991, Pharmac. Ther. 52:365-384
Stein, C.A and Cheng, Y.C., 1993, Science 261:1004-1012
Terman et al., 1992, Biochem. Biophys. Res. Comm. 187:1579-1586
Uhlmann, F., and Peyman, A., 1990, Chem. Rev.90:543
Wagner, R.W. et al., 1993, 260:1510-1513
Wagner, R.W., 1994, Nature 372:333-335.

인용된 참조 문헌

하기에 기술되어 세부적인 보충 공정을 제공하는 다음의 참조 문헌은 특히 본원에서 참고로서 인용된다.

- Ballam, C., Weninger, W., Uthman, A., Weich, H., Tschachler, E. (1995) *J. Invest. Ital. Dermatol.* 104, 7-10.**
- Behr, J. (1994) *Ital. Bioconjugate Chem.* 5, 382-389**
- Bishop, J. S., Guy-Caffey, J. K., Ojwang, J. O., Smith, S. R., Hogan, M. E., Cossum, P. A., Rando, R. F., Chaudhary, N. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 5698-5703**
- Carmeliet, P., Ferreriera, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A. (1996) *Nature* 380, 435-439**
- Chaudhary, N., Bishop, J. S., Jayaraman, K., Guy-Caffey, J. K., in *Delivery Strategies For Antisense Oligonucleotide Therapeutics*, S. Akhtar, Ed. (CRC Press, Boca Raton, 1995) pp. 39-60:**
- Connolly, D. T., Plander, J. V. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 20017-20024**
- D'Amore, P. A. (1994) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 3974-3978**
- de Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrera, N., Williams, L. T. (1992) *Science* 255, 989-991**

- Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M., Dvorak, A. M. (1995a) *Am. J. Pathol.* 146, 1029-1039
- Dvorak, H. F., Detmar, M., Claffey, K. P., Nagy, J. A., van der Water, L., Senger, D. R. (1995b) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107, 233-235
- Fenster, S. D., Wagner, R. W., Froehler, B. C., Chin, D. J. (1994) *Biochemistry* 33, 8391-8398
- Ferrera, N., Houck, K., Jakeman, L., Leung, D. W. (1992) *Endocr. Rev.* 13, 18-32
- Ferrera, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J., Moore, M. W. (1996) *Nature* 380, 439-442
- Fisher, T. L., Terhorst, T., Cao, X., Wagner, R. W. (1993) *Nuc. Acids Res.* 21, 3857
- Folkman, J. (1995) *Nat. Med.* 1, 27-31
- Frank, S., Hubner, G., Breier, G., Longaker, M. T., Greenhalgh, D. G., Werner, S. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 12607-12613
- Gao, X., Huang, L. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 280-285
- Gao, X., Huang, L. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 280-285
- Guy-Caffey, J. K., Bodepudi, V., Bishop, J. S., Jayaraman, K., Chaudhary, N. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 31391-31396
- Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., Connolly, D. T. (1989) *Science* 246, 1309-1312
- Ledley, F. (1994) *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 626-636
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., Ferrera, N. (1989) *Science* 246, 1306-1309
- Lewis, J. G., Lin, K.-Y., Kothavale, A., Flanagan, W. M., Matteucci, M. D., DePrince, R. B., Mook, J., R.A., Hendren, R. W., Wagner, R. W. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3176-3181
- Milligan, J. F., Matteucci, M. D., Martin, J. C. (1993) *J. Med. Chem.* 36, 1923-1937
- Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Hayashi, Y., Yamashima, T., Yamashita, J., Yamamoto, H. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 28316-28324
- Puglisi, J. D., Tinoco, J. I. (1989) *Methods Enzymol.* 180, 304-325
- Robinson, G. S., Pierce, E. A., Rook, S. L., Foley, E., Webb, R., Smith, L. E. H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4851-4856
- Stein, C. A., Cheng, Y.-C. (1993) *Science* 261, 1004-1012
- Stein, C. A., Kreig, A. M. (1994) *Antisense Res. Dev.* 4, 67-69

- Terman, B. I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D., Bohlen, P. (1992) *Biochem. Biophys. res. Commun.* 187, 1579-1586**
- Thomas, K. A. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 603-606**
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C., Abraham, J. A. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 11947-11954**
- Uhlmann, E., Peyman, A. (1990) *Chemical Reviews* 90, 543-584**
- Wagner, R. W., Matteucci, M. D., Lewis, J. G., Gutierrez, A. J., Moulds, C., Froehler, B. C. (1993) *Science* 260, 1510-1513**
- Wagner, R. W. (1994) *Nature* 372, 333-335**
- Winternitz, C. I., Jackson, J. K., Oktaba, A. M., Burt, H. M. (1996) *Pharm. Res.* 13, 368-375**
- Wolf, T. M., Melton, D. A., Jennings, C. G. B. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7305-7309**

서열 목록

(1) 일반적 정보:

(i) 출원인: 차우드하리 닐람

라오 티 수드하카르

레반카르 가나파티 알

코숨 폴 에이

란도 로버트 에프

파이만 아누쉬

올만 오이겐

(ii) 발명의 명칭: 혈관 내피 성장 인자 발현의 억제제

(iii) 서열수: 21

(iv) 서신 주소:

(A) 수신인: 콘레이, 로즈 & 타이온, 피 씨

(B) 거리: 슈트 1850 트라비스 600

(C) 시: 하우스톤

(D) 주: 텍사스

(E) 국가: 미국

(F) 우편번호: 77002-2912

(v) 컴퓨터 판독형:

(A) 매체 유형: 플로피 디스켓

(B) 컴퓨터: IBM PC 호환성

(C) 운영 시스템: 윈도우 95

(D) 소프트웨어: 마이크로소프트 워드 7.0a

(vi) 현 출원 데이터:

(A) 출원 번호:

(B) 출원일:

(C) 분류:

(vii) 전 출원 데이터:

(A) 출원 번호:

(B) 출원일:

(viii) 변호사/대리인 정보:

- (A) 성명: 맥다니엘 씨 스트븐
 (B) 등록 번호: 33,962
 (C) 참조문헌/사건 번호: 1472-07200
 (ix) 전자통신 정보:
 (A) 전화: 713/238-8010
 (B) 팩시밀리: 713/238-8008
 (2) 서열 1에 대한 정보:
 (i) 서열 특징
 (A) 길이: 19개 염기 쌍
 (B) 유형: 합성 핵산
 (C) 소재: 일본소재
 (D) 형태: 선형
 (E) 안티-센스: Y
 (iv) 안티-센스: 유
 (ix) 양상
 (A) 명칭/키: misc 양상
 (B) 위치: 1-19
 (C) 기타 정보: /주의= "각각의 잔기사이의 포스포로티오에이트 결합"

서열 1**GCGCTGATAG ACATCCATG****19**

- (2) 서열 2에 대한 정보:
 (i) 서열 특징
 (A) 길이: 19개 염기 쌍
 (B) 유형: 핵산
 (C) 소재: 일본소재
 (D) 형태: 선형
 (iv) 안티-센스: 유
 (ix) 양상
 (A) 명칭/키: misc 양상
 (B) 위치: 1-19
 (C) 기타 정보: /주의= "각각의 잔기사이의 포스포로티오에이트 결합, C5-프로피닐 피리미딘"

서열 2**GCGCUGAUAG ACAUCCAUG****19**

- (2) 서열 3에 대한 정보:
 (i) 서열 특징
 (A) 길이: 19개 염기 쌍
 (B) 유형: 핵산
 (C) 소재: 일본소재
 (D) 형태: 선형
 (iv) 안티-센스: 유

(ix) 양상

(A) 명칭/키: misc 양상

(B) 위치: 1-19

(C) 기타 정보: /주의= "각각의 잔기사이의 포스포로티오에이트 결합, C5-프로피닐 피리미딘"

서열 3

CGAUUGGAUG GCAGUAGCCT

19

(2) 서열 4에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 소재: 일본소재

(D) 형태: 선형

(iv) 안티-센스: 유

(ix) 양상

(A) 명칭/키: misc 양상

(B) 위치: 1-19

(C) 기타 정보: /주의= "각각의 잔기사이의 포스포로티오에이트 결합, C5-프로피닐 피리미딘"

서열 4

(2) 서열 4에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 소재: 일본소재

(D) 형태: 선형

(iv) 안티-센스: 유

(ix) 양상

(A) 명칭/키: misc 양상

(B) 위치: 1-19

(C) 기타 정보: /주의= "각각의 잔기사이의 포스포로티오에이트 결합, C5-프로피닐 피리미딘"

서열 4

UACUCCUGGA AGAUGUCCA

19

(2) 서열 5에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 소재: 일본소재

(D) 형태: 선형

(iv) 안티-센스: 유

(ix) 양상

(A) 명칭/키: misc 양상

(B) 위치: 6-7; 9-10; 10-11; 13-14

(C) 기타 정보: /주의= "지정된 잔기사이의 포스포로티오에이트 결합"

서열 5

GCGCUGAUAG ACAUCCAUG

19.

(2) 서열 6에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 색: 일본색

(D) 형태: 선형

(iv) 안티-센스: 유

(ix) 양상

(A) 명칭/키: misc 양상

(B) 위치: 3-4; 5-6; 6-7; 9-10; 10-11; 13-14

(C) 기타 정보: /주의= "지정된 잔기사이를 제외한 포스포로티오에이트 결합"

서열 6

GCGCUGAUAG ACAUCCAUG

19

(2) 서열 7에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 색: 일본색

(D) 형태: 선형

(iv) 안티-센스: 유

(ix) 양상

(A) 명칭/키: misc 양상

(B) 위치: 6-7; 10-11

(C) 기타 정보: /주의= "지정된 잔기사이를 제외한 포스포로티오에이트 결합"

서열 7

GCGCUGAUAG ACAUCCAUG

19

(2) 서열 8에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 색: 일본색

(D) 형태: 선형

(iv) 안티-센스: 유

(ix) 양상

- (A) 명칭/키: misc 양상
- (B) 위치: 1-19
- (C) 기타 정보: /주의= "모든 잔기사이의 포스포로티오에이트 결합, C5-프로피닐 피리미딘"

서열 8**GAAGAUGUCC ACCAGGGUC 19**

(2) 서열 9에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(iv) 안티-센스: 유

(ix) 양상

(A) 명칭/키: misc 양상

(B) 위치: 1-19

(C) 기타 정보: /주의= "지정된 잔기사이의 포스포로티오에이트 결합, C5-프로피닐 피리미딘"

서열 9**AGGAAGCUCA UCUCUCCUA 19**

(2) 서열 10에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(iv) 안티-센스: 유

(ix) 양상

(A) 명칭/키: misc 양상

(B) 위치: 1-19

(C) 기타 정보: /주의= "포스포로티오에이트 결합, C5-프로피닐 피리미딘"

서열 10**UACACGUCUG CGGAUCUUG 19**

(2) 서열 11에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

- (iv) 안티-센스: 유
- (ix) 양상
- (A) 명칭/키: misc 양상
- (B) 위치: 1-19
- (C) 기타 정보: /주의= "포스포로티오에이트 결합, C5-프로피닐 피리미딘"

서열 11

UAACUCAAGC UGCCUCGCC **19**

- (2) 서열 12에 대한 정보:
 - (i) 서열 특징
 - (A) 길이: 19개 염기 쌍
 - (B) 유형: 핵산
 - (C) 소재: 일본산
 - (D) 형태: 선형
 - (iv) 안티-센스: 유
 - (ix) 양상
 - (A) 명칭/키: misc 양상
 - (B) 위치: 1-19
 - (C) 기타 정보: /주의= "포스포로티오에이트 결합, C5-프로피닐 피리미딘"

서열 12

CCAUGAACUU CACCACUUC **19**

- (2) 서열 13에 대한 정보:
 - (i) 서열 특징
 - (A) 길이: 19개 염기 쌍
 - (B) 유형: 핵산
 - (C) 소재: 일본산
 - (D) 형태: 선형
 - (iv) 안티-센스: 유
 - (ix) 양상
 - (A) 명칭/키: misc 양상
 - (B) 위치: 1-19
 - (C) 기타 정보: /주의= "포스포로티오에이트 결합, C5-프로피닐 피리미딘"

서열 13

GACAUCCAUG AACUUCACC **19**

- (2) 서열 14에 대한 정보:
 - (i) 서열 특징
 - (A) 길이: 19개 염기 쌍
 - (B) 유형: 핵산

- (C) 쇠: 일본쇠
- (D) 형태: 선형
- (iv) 안티-센스: 유
- (ix) 양상
- (A) 명칭/키: misc 양상
- (B) 위치: 1-19
- (C) 기타 정보: /주의= "포스포로티오에이트 결합, C5-프로피닐 피리미딘"

서열 14

GGCUGGCAGU AGCUGCGCU 19

- (2) 서열 15에 대한 정보:
 - (i) 서열 특징
 - (A) 길이: 19개 염기 쌍
 - (B) 유형: 핵산
 - (C) 쇠: 일본쇠
 - (D) 형태: 선형
 - (iv) 안티-센스: 유
 - (ix) 양상
 - (A) 명칭/키: misc 양상
 - (B) 위치: 1-19
 - (C) 기타 정보: /주의= "포스포로티오에이트 결합, C5-프로피닐 피리미딘"

서열 15

GGAUGGCAGU AGCUGCGCU 19

- (2) 서열 16에 대한 정보:
 - (i) 서열 특징
 - (A) 길이: 19개 염기 쌍
 - (B) 유형: 핵산
 - (C) 쇠: 일본쇠
 - (D) 형태: 선형
 - (iv) 안티-센스: 유
 - (ix) 양상
 - (A) 명칭/키: misc 양상
 - (B) 위치: 1-19
 - (C) 기타 정보: /주의= "포스포로티오에이트 결합, C5-프로피닐 C 잔기"

서열 16

GCGCTGATAG ACATCCATG 19

- (2) 서열 17에 대한 정보:
 - (i) 서열 특징
 - (A) 길이: 19개 염기 쌍

- (B) 유형: 핵산
- (C) 쇠: 일본쇠
- (D) 형태: 선형
- (iv) 안티-센스: 유
- (ix) 양상
- (A) 명칭/키: misc 양상
- (B) 위치: 1-19
- (C) 기타 정보: /주의= "포스포로티오에이트 결합, C5-프로피닐 U 잔기"

서열 17

GCGCUGAUAG ACAUCCAUG **19**

- (2) 서열 18에 대한 정보:
 - (i) 서열 특징
 - (A) 길이: 19개 염기 쌍
 - (B) 유형: 핵산
 - (C) 쇠: 일본쇠
 - (D) 형태: 선형
 - (iv) 안티-센스: 유
 - (ix) 양상
 - (A) 명칭/키: misc 양상
 - (B) 위치: 1-19
 - (C) 기타 정보: /주의= "포스포로티오에이트 결합, 잔기 8, 12, 14 및 15에서의 C5-프로피닐 피리미딘"

서열 18

GCGCTGAUAG ACAUCCATG **19**

- (2) 서열 19에 대한 정보:
 - (i) 서열 특징
 - (A) 길이: 19개 염기 쌍
 - (B) 유형: 핵산
 - (C) 쇠: 일본쇠
 - (D) 형태: 선형
 - (iv) 안티-센스: 유
 - (ix) 양상
 - (A) 명칭/키: misc 양상
 - (B) 위치: 1-19
 - (C) 기타 정보: /주의= "포스포로티오에이트 결합, 잔기 2, 5, 8, 12, 15 및 18에서 의 C5-프로피닐 피리미딘"

서열 19

GCGCUGAUAG ACATCCAUG **19**

- (2) 서열 20에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 색: 일본색

(D) 형태: 선형

(iv) 안티-센스: 유

(ix) 양상

(A) 명칭/키: misc 양상

(B) 위치: 1-19

(C) 기타 정보: /주의= "포스포로티오에이트 결합, C5-프로피닐 피리미딘, 지질 테테르에 결합된 3' 말단"

서열 20

GCGCUGAUAG ACAUCCAUG

19

(2) 서열 21에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 색: 일본색

(D) 형태: 선형

(iv) 안티-센스: 유

(ix) 양상

(A) 명칭/키: misc 양상

(B) 위치: 1-19

(C) 기타 정보: /주의= "잔기 1-5, 8-9, 12-13, 14-15 및 16-19를 제외한 포스포로티오에이트 결합; 3'-말단 피렌; C5-프로 피닐닐 피리미딘"

서열 21

GCGCUGAUAG ACAUCCAUG

19

(2) 서열 22에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 색: 일본색

(D) 형태: 선형

(iv) 안티-센스: 유

(ix) 양상

(A) 명칭/키: misc 양상

(B) 위치: 1-19

(C) 기타 정보: /주의= "포스포로티오에이트 결합; C5-핵시닐 피리미딘"

서열 22**GCGCUGAUG ACAUCCAUG****19**

(2) 서열 23에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 색: 일본색

(D) 형태: 선형

(iv) 안티-센스: 유

(ix) 양상

(A) 명칭/키: misc 양상

(B) 위치: 1-19

(C) 기타 정보: /주의= "포스포로티오에이트 결합, C5-프로피닐 피리미딘"

서열 23**GCGCUGACAG ACAUCCAUG****19**

(2) 서열 24에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 색: 일본색

(D) 형태: 선형

(iv) 안티-센스: 무

서열 24**CATGGATGTC TATCAGCGC****19**

(2) 서열 25에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 색: 일본색

(D) 형태: 선형

(iv) 안티-센스: 무

서열 25**CATGGATGTC TATCAGCGC****19**

(2) 서열 26에 대한 정보:

(i) 서열 특징

- (A) 길이: 19개 염기 쌍
- (B) 유형: 핵산
- (C) 소재: 일본소재
- (D) 형태: 선형
- (iv) 안티-센스: 유
- (ix) 양상
- (A) 명칭/키: misc 양상
- (B) 위치: 1-19
- (C) 기타 정보: /주위= "포스포티오에이트 결합, C5-프로피오닐 C 잔기"

서열 26

AGAGCAGCAA GCGAGGCT

19

2) 서열 27에 대한 정보:

- (i) 서열 특징
- (A) 길이: 19개 염기 쌍
- (B) 유형: 핵산
- (C) 소재: 일본소재
- (D) 형태: 선형
- (iv) 안티-센스: 유
- (ix) 양상
- (A) 명칭/키: misc 양상
- (B) 위치: 1-19
- (C) 기타 정보: /주위= "포스포티오에이트 결합, C5-프로피오닐 C 잔기"

서열 27

CAUGGAUGUC UAUCAGCGC

19

(57) 청구의 범위

청구항 1

약 1 μ M 미만의 농도로 처리한 세포내에서 세포성 VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor) 생성을 감소시켜, 비처리된 세포에 의해 생성되는 VEGF의 약 90% 이하로 VEGF를 생성시키는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 2

제1항에 있어서, VEGF를 암호화하는 mRNA상에서 발견되는 RNA 서열에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 3

제1항에 있어서, VEGF를 암호화하는 20이상의 mRNA상에서 발견되는 RNA 서열에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 4

제1항에 있어서, VEGF 206 mRNA상에서 발견되는 RNA 서열에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 5

제1항에 있어서, VEGF 185 mRNA상에서 발견되는 RNA 서열에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 6

제1항에 있어서, VEGF 165 mRNA상에서 발견되는 RNA 서열에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 7

제1항에 있어서, VEGF 121 mRNA상에서 발견되는 RNA 서열에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 8

제1항에 있어서, 뉴클레아제에 의한 분해 속도를 감소시키는 화학적 성분을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 9

제1항에 있어서, 포스포로티오에이트 그룹 및 포스포디에스테르 그룹을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 10

제1항에 있어서, 뉴클레아제에 의한 분해에 대해 내성을 갖는 화학적 성분을 통하여 연결된 한 쌍의 인접 잔기를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 11

제8항에 있어서, 뉴클레아제에 의한 분해 속도를 감소시키는 화학적 성분이 포스포로티오에이트 그룹인 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 12

제8항에 있어서, 각각의 잔기가 포스포로티오에이트 그룹을 통하여 연결된 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 13

제1항에 있어서, C5-프로피닐 우리딘, C5-프로피닐 시티딘, C5-헥시닐 우리딘, C5-헥시닐 시티딘, 6-아자-우리딘, 및 6-아자-시티딘으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 뉴클레오티드 잔기를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 14

제1항에 있어서, 포스포로티오에이트 그룹, 및 C5-프로피닐 우리딘, C5-프로피닐 시티딘, C5-헥시닐 우리딘, C5-헥시닐 시티딘, 6-아자-우리딘 및 6-아자-시티딘으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 뉴클레오티드 잔기를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 15

제1항에 있어서, C5-프로피닐 우리딘 잔기를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 16

제1항에 있어서, C5-프로피닐 우리딘 잔기 및 포스포로티오에이트 그룹을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 17

제1항에 있어서, C5-프로피닐 시티딘 잔기를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 18

제1항에 있어서, C5-프로피닐 시티딘 잔기 및 포스포로티오에이트 그룹을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 19

제1항에 있어서, C5-헥시닐 우리딘 잔기 및 포스포로티오에이트 그룹을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 20

제1항에 있어서, C5-헥시닐 시티딘 잔기를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 21

제1항에 있어서, C5-헥시닐 시티딘 잔기 및 포스포로티오에이트 그룹을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 22

제1항에 있어서, 6-아자-데옥시 우리딘 잔기를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 23

제1항에 있어서, 6-아자-데옥시 우리딘 잔기 및 포스포로티오에이트 그룹을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 24

제1항에 있어서, 6-아자-데옥시 시티딘 잔기를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 25

제1항에 있어서, 6-아자-데옥시 시티딘 잔기 및 포스포로티오에이트 그룹을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 26

약 $1\mu\text{M}$ 미만의 농도로 처리한 세포내에서 세포성 VEGF 생성을 감소시켜, 비처리된 세포에 의해 생성되는 VEGF의 약 90% 이하로 VEGF를 생성시키는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 및 추가로 세포성 흡수 촉진제를 포함하는 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 세포성 흡수 촉진제가 친유성 성분인 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 친유성 성분이 콜레스테롤인 조성물.

청구항 29

제1항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 추가로 양이온에 대한 이온 결합을 포함하여 염을 형성하는 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 양이온이 양이온성 지질인 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 양이온성 지질이 폴리아미노리피드인 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 폴리아미노리피드가 스페르미딘-콜레스테롤인 조성물.

청구항 33

제26항에 있어서, 세포성 흡수 촉진제가 리포솜을 포함하는 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 리포솜이 Cellfectin^R을 포함하는 조성물.

청구항 35

제33항에 있어서, 리포솜이 DOPE(dioleoyl phosphatidylethanolamine)와 혼합된 스페르미딘-콜레스테롤을 포함하는 조성물.

청구항 36

VEGF mRNA에 결합하고; 포스포로티오에이트 그룹, 및 C5-프로피닐 우리딘, C5-프로피닐 시티딘, C5-헥시닐 우리딘, C5-헥시닐 시티딘, 6-아자-데옥시 우리딘 및 6-아자-데옥시 시티딘으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 뉴클레오티드 잔기를 포함하며; 이중쇄 융점 온도가 화학적으로 변형된 피리미딘 잔기가 없는 동일한 안티센스 올리고뉴클레오티드의 융점보다 약 5°C 이상 높고; 약 $1\mu\text{M}$ 미만의 농도로 처리한 세포내에서 세포성 VEGF 생성을 감소시켜, 비처리된 세포에 의해 생성되는 VEGF의 약 90% 이하로 VEGF를 생성시키는, 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 37

i) VEGF mRNA에 결합하고; 포스포로티오에이트 그룹, 및 C5-프로피닐 우리딘, C5-프로피닐 시티딘, C5-헥시닐 우리딘, C5-헥시닐 시티딘, 6-아자-데옥시 우리딘 및 6-아자-데옥시 시티딘으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 뉴클레오티드 잔기를 포함하며; 이중쇄 융점 온도가 화학적으로 변형된 피리미딘 잔기가 없는 동일한 안티센스 올리고뉴클레오티드의 융점보다 약 5°C 이상 높고; 약 $1\mu\text{M}$ 미만의 농도로 처리한 세포내에서 세포성 VEGF 생성을 감소시켜, 비처리된 세포에 의해 생성되는 VEGF의 약 90% 이하로 VEGF를 생성시키는, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 및 ii) 추가로 서방성 중합체 화합물을 포함하는 조성물.

청구항 38

C5-프로피닐 우리딘, C5-프로피닐 시티딘, C5-헥시닐 우리딘, C5-헥시닐 시티딘, 6-아자-데옥시 우리딘 및 6-아자-데옥시 시티딘으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 뉴클레오티드 잔기를 포함하며; 포스포로티오에이트 결합을 포함하며; VEGF를 암호화하는 mRNA에 결합함으로써, 이분쇄 융점 온도를 약 5°C 이상 증가시킨 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 39

약 1 μ M 미만 농도의 제1항의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 세포에 접촉시키는 단계를 포함하여, 비처리된 세포에 의해 생성되는 VEGF의 약 90% 이하로 세포성 VEGF 생성을 감소시키는 방법.

청구항 40

서열 2 내지 22로 이루어진 그룹중에서 선택된 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 41

서열 2의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물.

청구항 42

서열 3의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물.

청구항 43

서열 4의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물.

청구항 44

서열 6의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물.

청구항 45

서열 10의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물.

청구항 46

서열 20의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물.

청구항 47

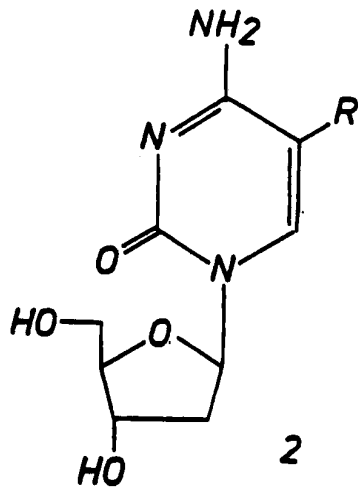
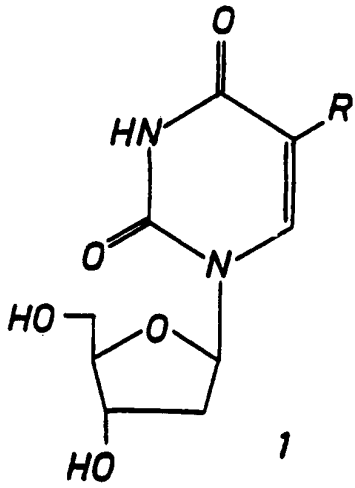
서열 21의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물.

청구항 48

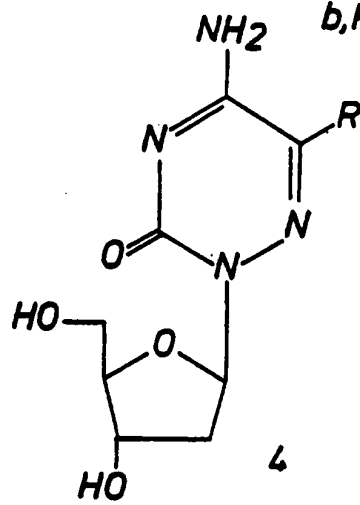
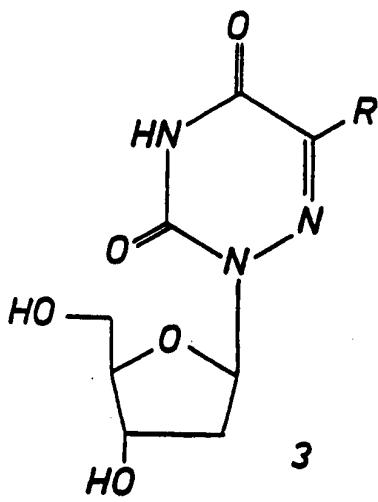
서열 22의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물.

도면

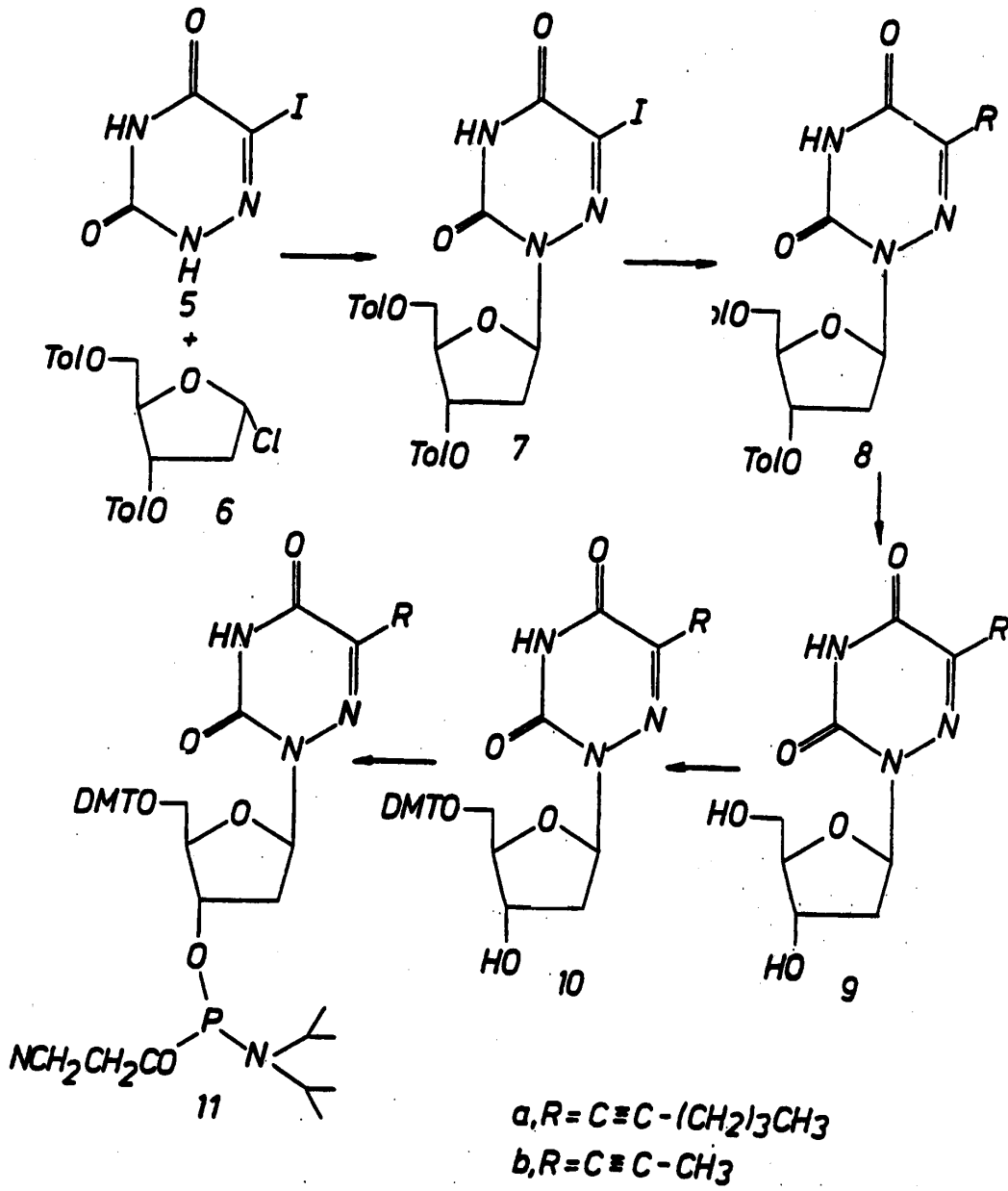
도면1



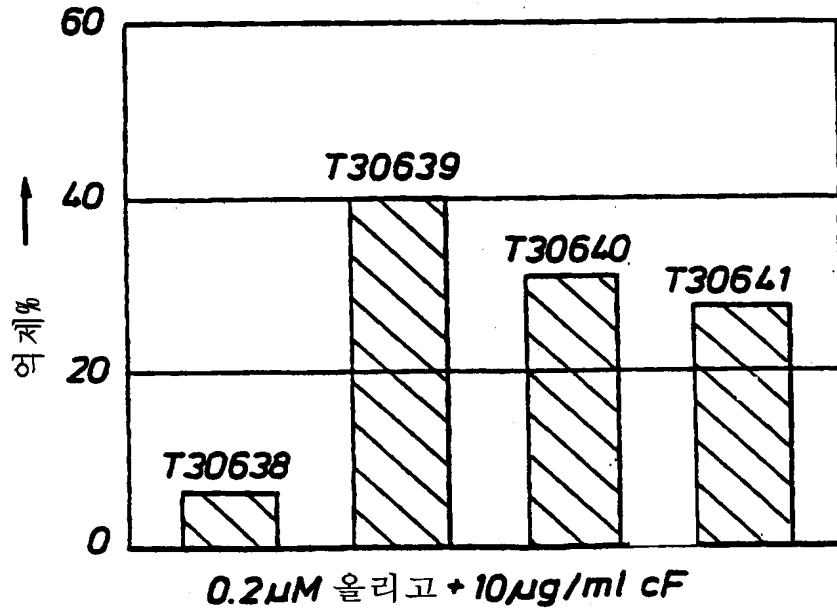
a, R=C≡C-(CH₂)₃CH₃
 b, R=C≡C-CH₃



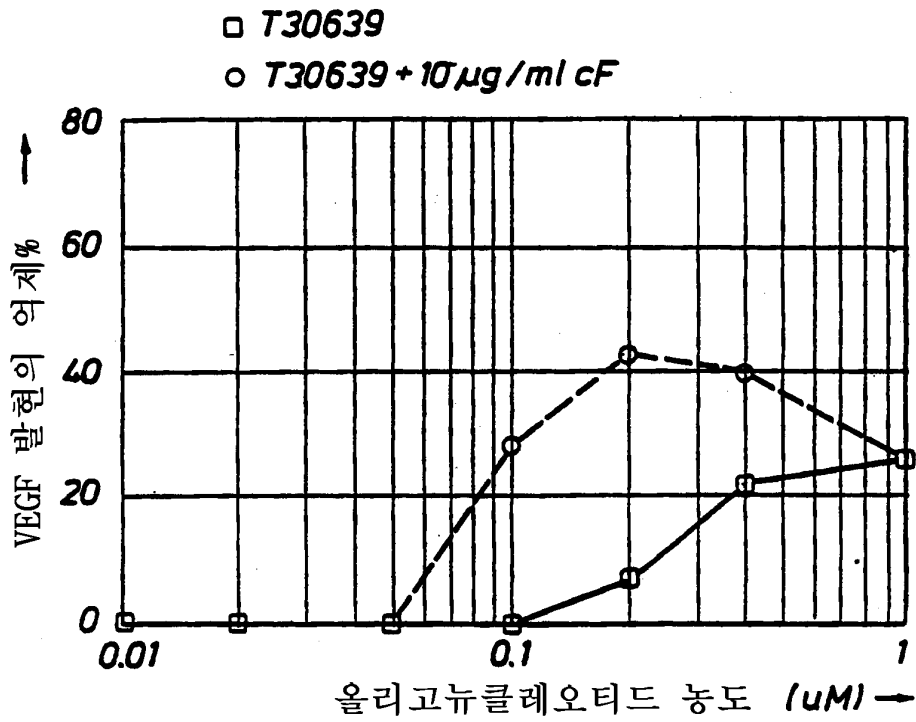
도면2



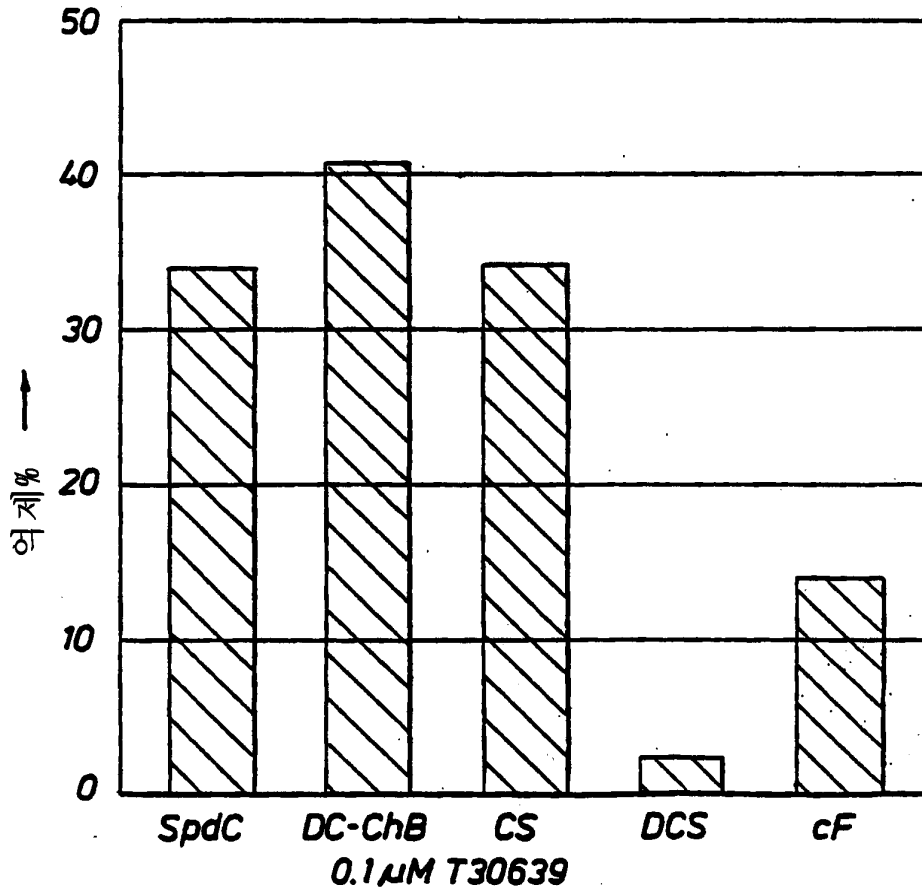
도면3



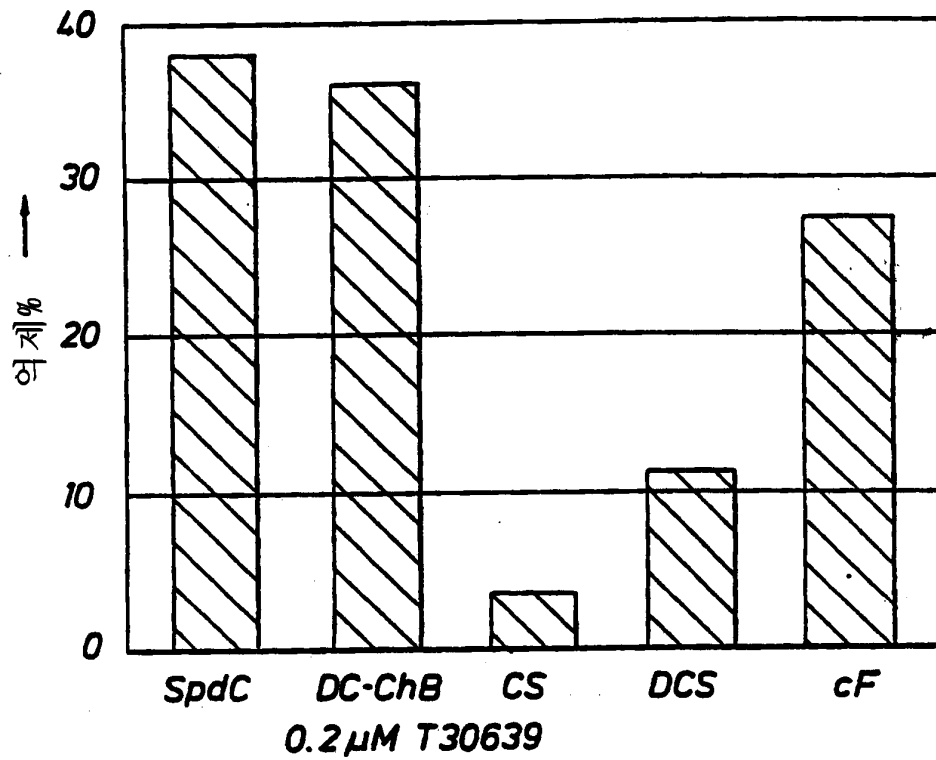
도면4



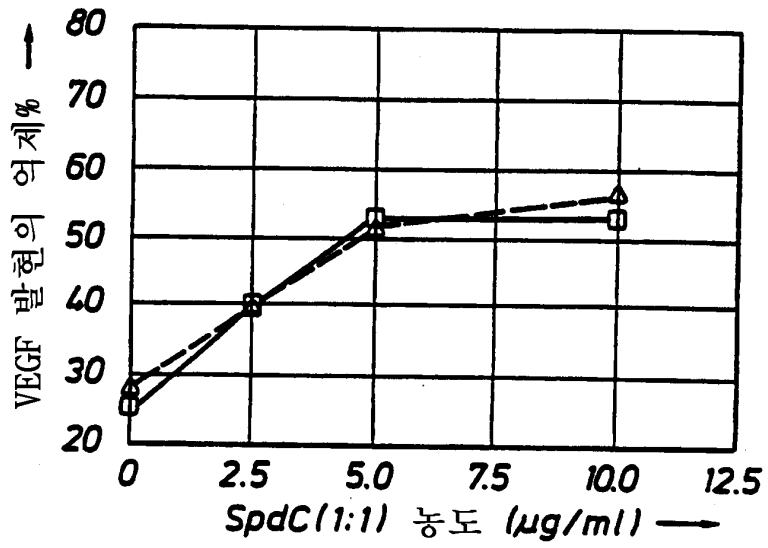
도면5



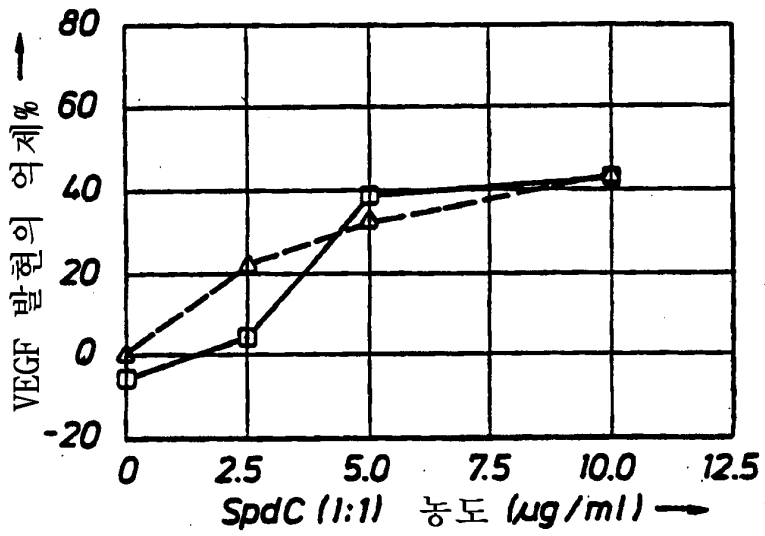
도면6



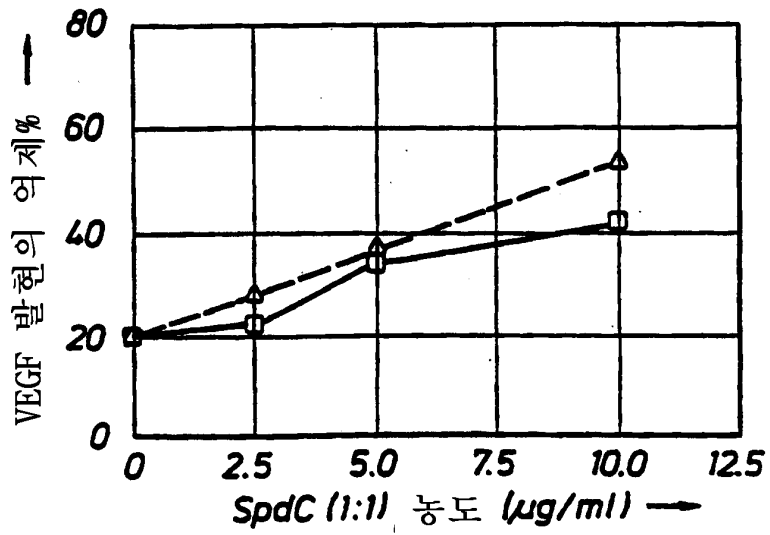
도면7A



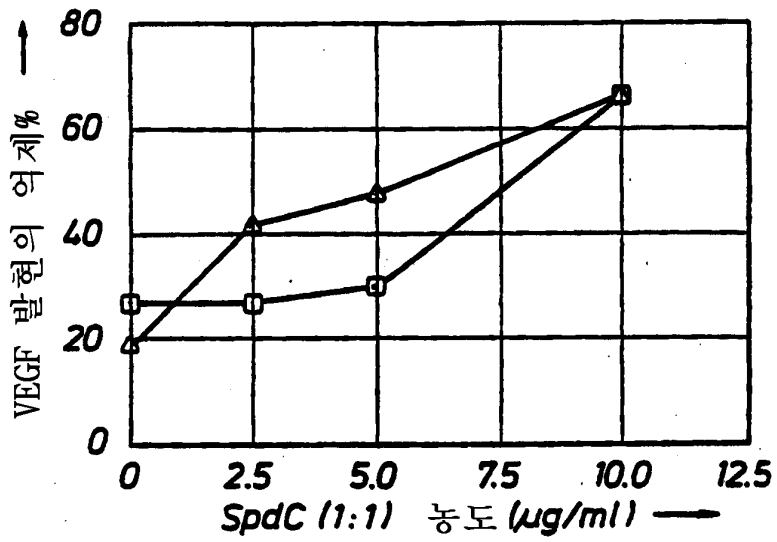
도면7B



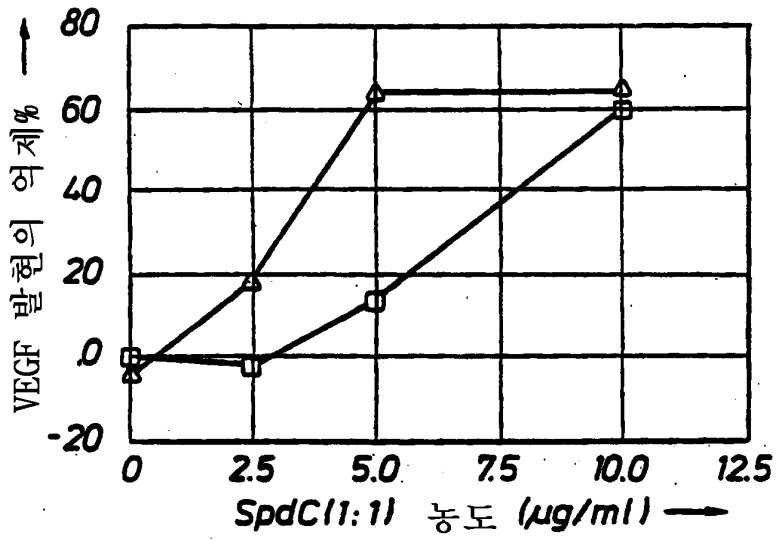
도면7C



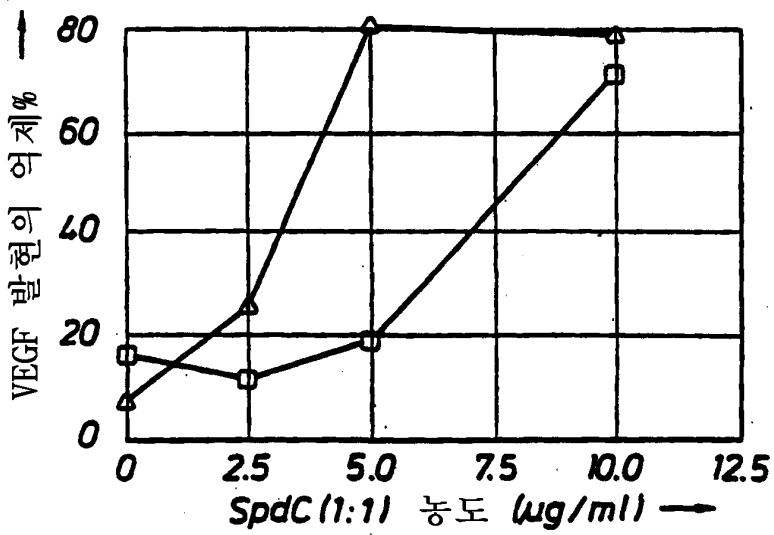
도면8A



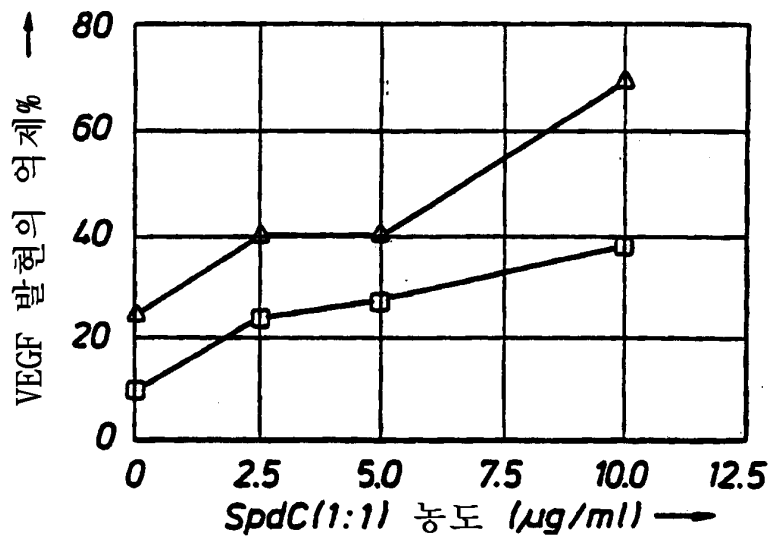
도면88



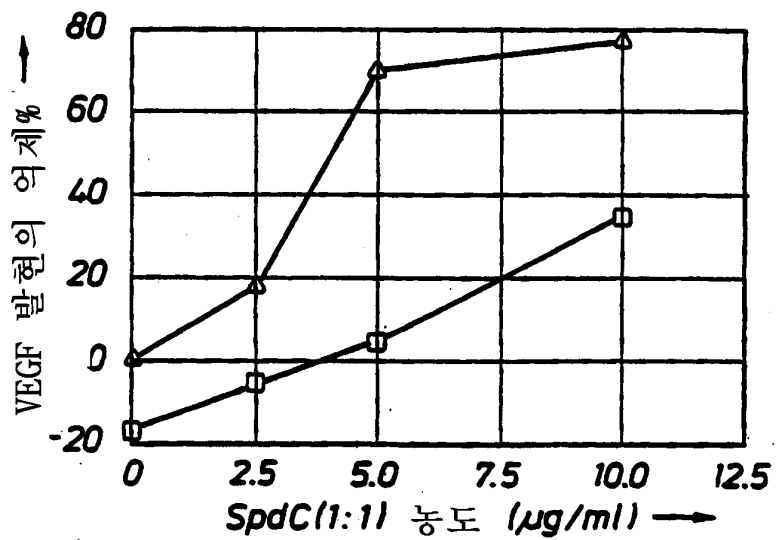
도면8C



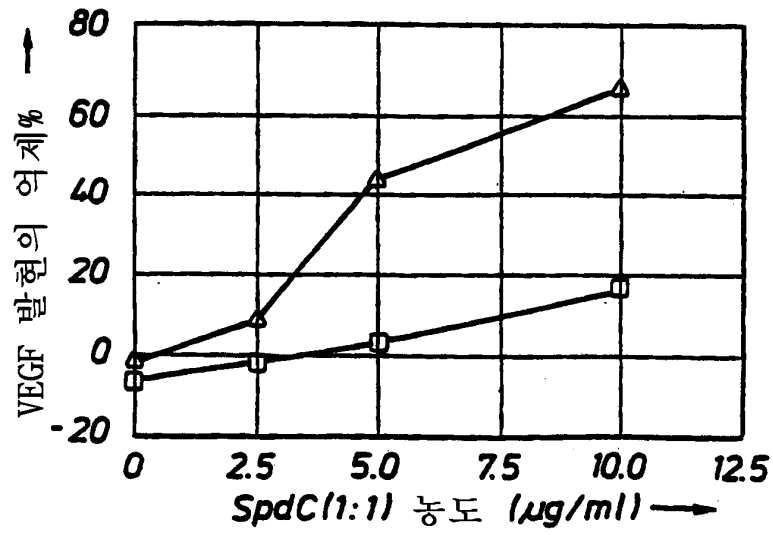
도면9A



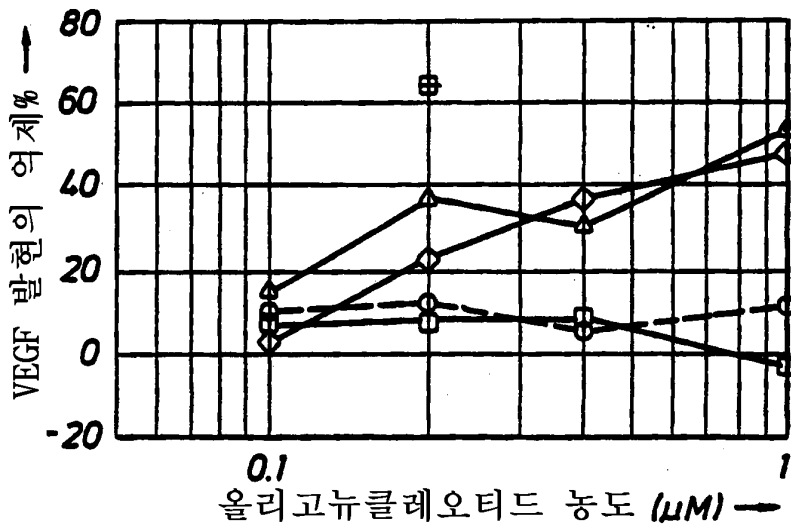
도면9B



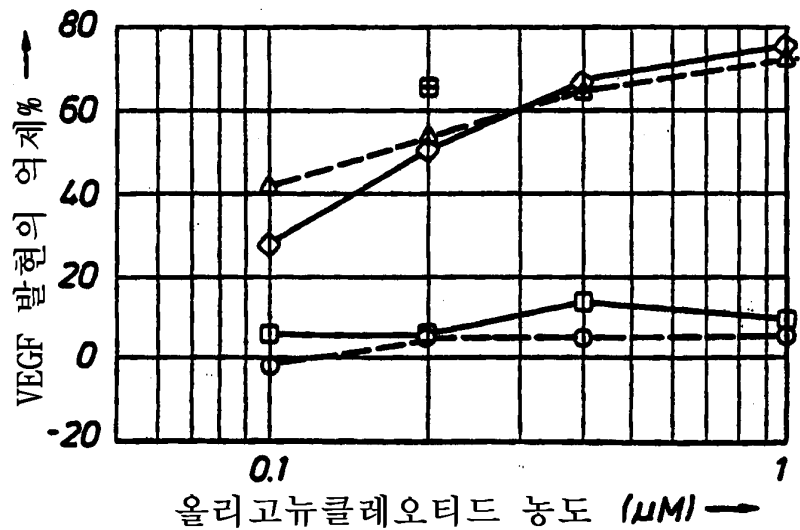
도면9C



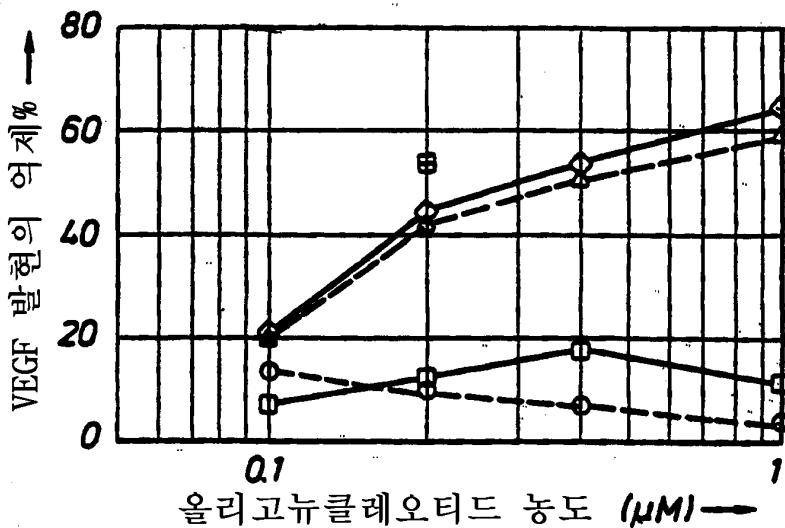
도면10A



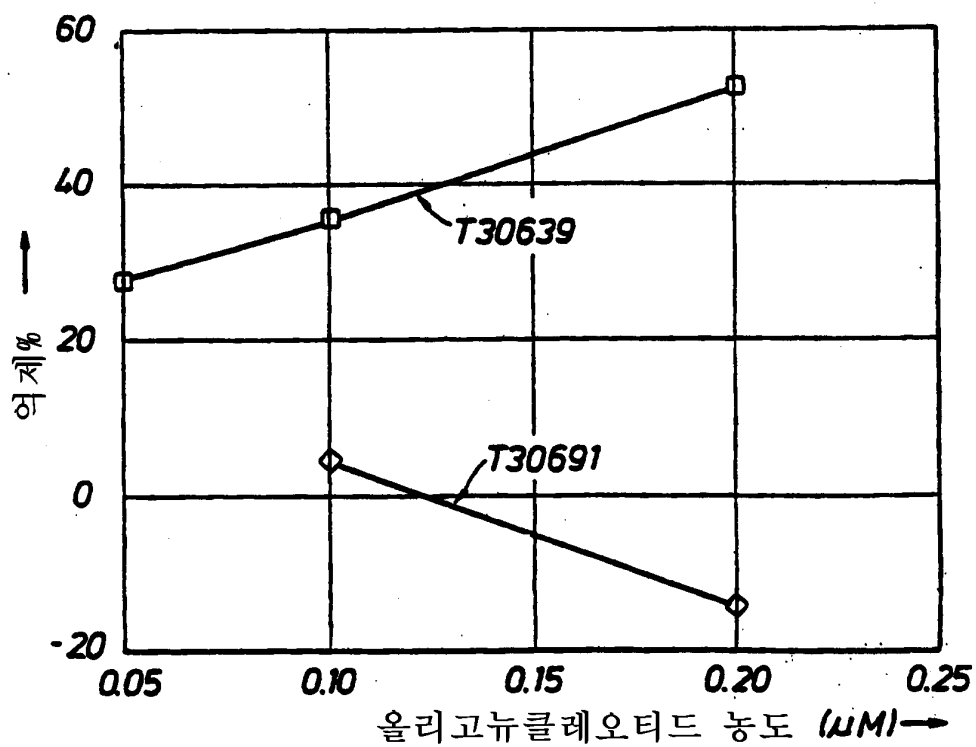
도면 10B



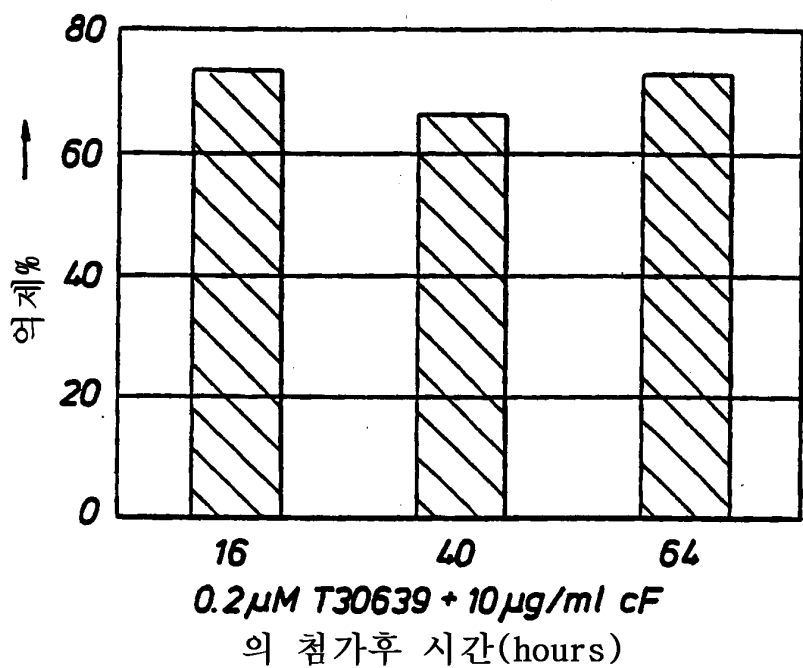
도면 10C



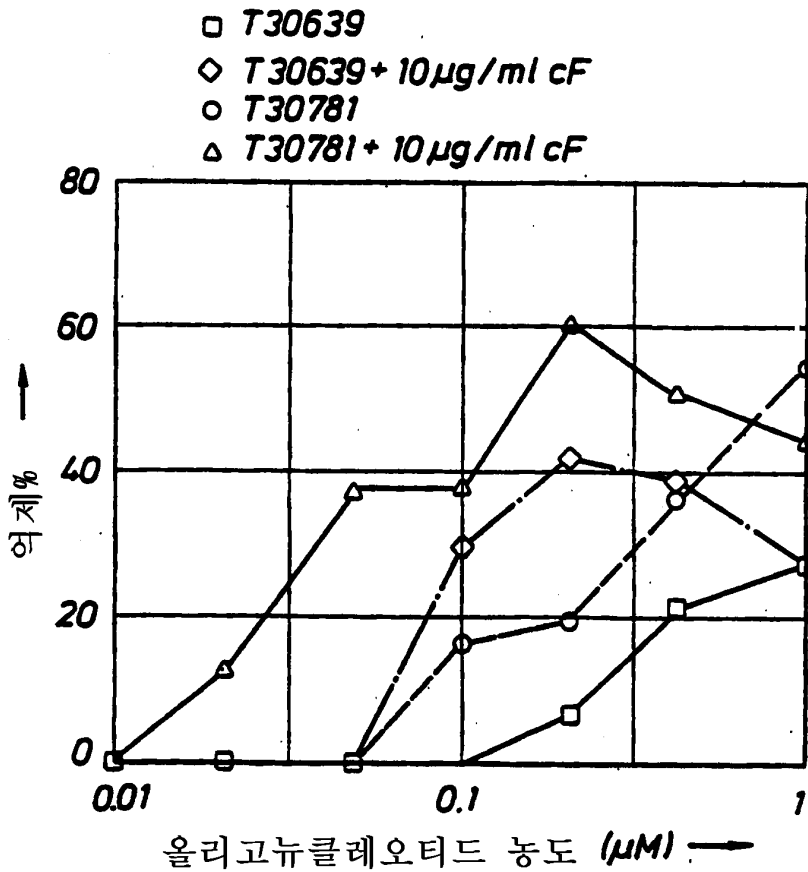
도면11



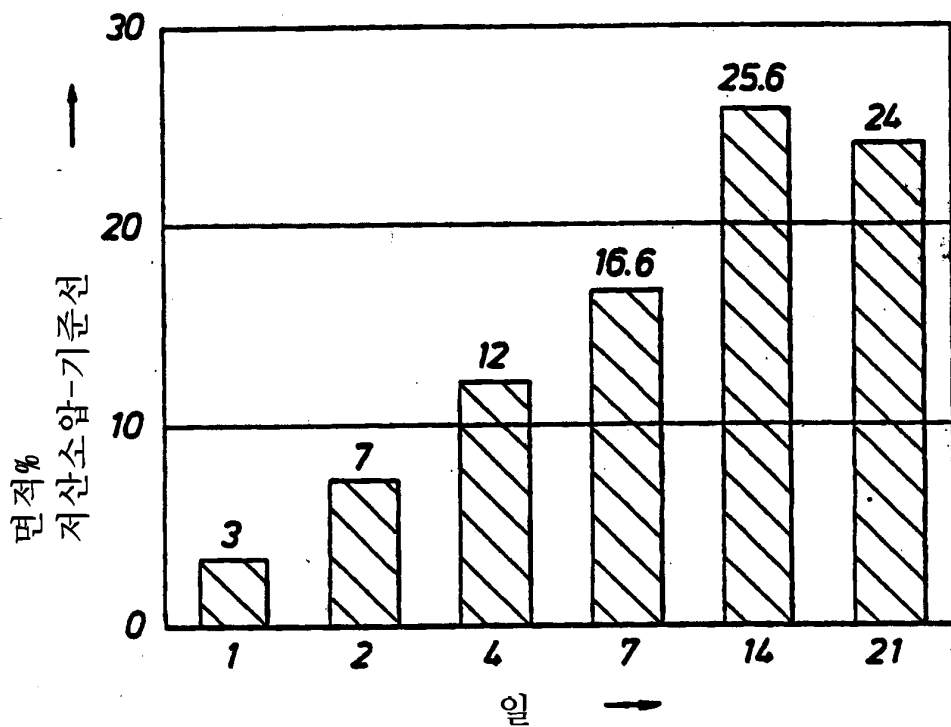
도면12



도면13



도면14



도면 15

