



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년01월30일
(11) 등록번호 10-1823702
(24) 등록일자 2018년01월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7088 (2006.01) A61K 31/713 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7016838
(22) 출원일자(국제) 2010년12월15일
심사청구일자 2015년12월11일
- (85) 번역문제출일자 2012년06월28일
(65) 공개번호 10-2012-0103663
(43) 공개일자 2012년09월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/060452
(87) 국제공개번호 WO 2011/084455
국제공개일자 2011년07월14일
- (30) 우선권주장
61/286,924 2009년12월16일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2000026348 A2
WO2000009677 A2
- (73) 특허권자
큐알엔에이, 인크.
미국, 플로리다 33137, 마이애미, 비스케이인 보울
레바르트 4400
- (72) 발명자
콜라드, 조셉
미국, 플로리다 33483, 텔레이 비치, 브룩스 레인
1004
크로코바 셔만, 올라
미국, 플로리다 33469, 테퀘스타, 에스이 헤리티지
드라이브 18288
- (74) 대리인
강명구, 이경민

전체 청구항 수 : 총 7 항

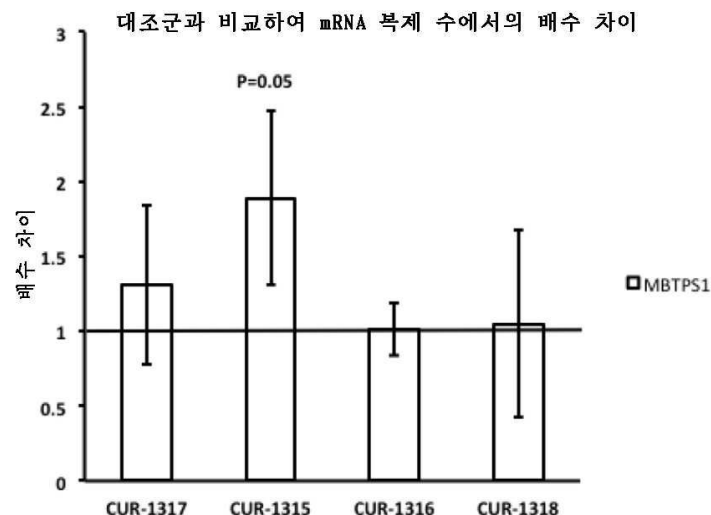
심사관 : 이민정

(54) 발명의 명칭 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1)에 대한 천연 안티센스 전사체의 억제에 의한 MBTPS1 관련 질환의 치료

(57) 요약

본 발명은, 특히 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1)의 천연 안티센스 폴리뉴클레오타이드를 표적화함으로써, 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1)의 발현 및/또는 기능을 조절하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다. 본 발명은 또한 MBTPS1의 발현과 연관된 질환 및 장애를 치료하는데 있어서 이러한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 확인 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

서열 번호:2의 천연 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1) 안티센스 서열에 상보적인 10개 내지 30개 뉴클레오타이드 길이의 합성 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 MBTPS1 유전자의 기능 또는 발현 또는 둘 모두를 상향 조절하는 안티센스 화합물이고, 그리고 상기 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호: 3 내지 4 중에서 한 가지에 제시된 뉴클레오타이드 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 15 내지 30개 뉴클레오타이드 길이인 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 최소한 하나의 변형된 당 모이어티, 최소한 하나의 변형된 뉴클레오타이드간 연결, 최소한 하나의 변형된 뉴클레오타이드, 그리고 이들의 조합에서 선택되는 하나 이상의 변형을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 2'-O-메톡시에틸 변형된 당 모이어티, 2'-메톡시 변형된 당 모이어티, 2'-O-알킬 변형된 당 모이어티, 바이사이클릭 당 모이어티, 그리고 이들의 조합에서 선택되는 최소한 하나의 변형된 당 모이어티를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 6

청구항 3에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트, 2'-O-메톡시에틸 (MOE), 2'-플루오르, 알킬포스포네이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포노티오에이트, 포스포라미데이트, 카바메이트, 카보네이트, 포스페이트 트리에스테르, 아세트아미데이트, 카르복시메틸 에스테르, 그리고 이들의 조합에서 선택되는 최소한 하나의 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 7

청구항 3에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 펩티드 핵산 (PNA), 잠금된 핵산 (LNA), 아라비노-핵산, 그리고 이들의 조합에서 선택되는 최소한 하나의 변형된 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 8

청구항 3에 따른 올리고뉴클레오타이드 및 억제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물에 있어서, 상기 조성물은 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드와 연관된 질환 또는 장애의 예방 또는 치료에서 이용하기 위한 것이고, 여기서 상기 질환 또는 장애는 염증성 장질환, 대사성 질환 또는 장애 또는 지질 대사 질환 또는 장애, 심혈관계 질환 또는 장애, 출혈열, 간 질환 또는 장애, 또는 연골성 뼈 발생 질환 또는 장애로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2009년 12월 16일자로 출원된 미국 특허 가출원 제61/286924호의 우선권을 주장하며, 이는 본 명세서에 전문이 참조로 포함된다.

[0002] 본 발명의 실시형태는 MBTPS1 및 연관된 분자의 발현 및/또는 기능을 조절하는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

배경 기술

[0003] DNA-RNA 및 RNA-RNA 혼성화는 DNA 복제, 전사, 및 번역을 포함하는 많은 측면의 핵산 기능에 중요하다. 혼성화는 또한 특정 핵산을 검출하거나 이의 발현을 변경하는 다양한 기술에 있어서 중심적이다. 안티센스 뉴클레오타이드는, 예를 들어 표적 RNA에 혼성화되고, 그것에 의해 RNA 스플라이싱, 전사, 번역 및 복제를 간섭함으로써

유전자 발현을 붕괴시킨다. 안티센스 DNA는 DNA-RNA 혼성체가 대부분의 세포 유형에 존재하는 활성인 리보뉴클레아제 H에 의한 절단(digestion)의 기질 역할을 하는 추가 특징을 가진다. 안티센스 분자는 올리고데옥시뉴클레오타이드(ODN)의 경우에서와 같이 세포로 전달될 수 있거나, 또는 RNA 분자와 같은 내생 유전자로부터 발현될 수 있다. FDA는 최근 안티센스 약물, VITRAVENE™(사이토메갈로바이러스 레티니티스(cytomegalovirus retinitis) 치료용)을 승인하였는데, 이는 안티센스가 치료적 유용성을 가짐을 반영한다.

발명의 내용

- [0004] 본 요약은 본 발명의 성질 및 물질을 간략하게 나타내도록 본 발명의 요약을 제시하시 위해 제공된다. 청구범위의 범주 또는 의미를 해석하거나 한정하는데 사용되지 않을 것이라는 이해와 함께 제출된다.
- [0005] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 천연 안티센스 전사체의 임의의 영역을 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(들)를 사용함으로써 천연 안티센스 전사체의 작용을 억제하여 상응하는 센스 유전자를 상향 조절하는 방법을 제공한다. 또한 본원에서 천연 안티센스 전사체의 억제가 siRNA, 리보자임 및 소분자에 의해 이루어질 수 있으며, 이는 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 간주됨이 본원에서 고려된다.
- [0006] 하나의 실시형태는 생체 내 또는 시험관 내에서 환자의 세포 또는 조직 내 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드의 기능 및/또는 발현을 조절하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 세포 또는 조직을 길이가 5개 내지 30개 뉴클레오타이드인 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기에서 상기 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 1 내지 1240 중 5개 내지 30개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 역 보체(reverse complement)에 적어도 50% 서열 동일성을 가지고, 상기 접촉에 의하여 생체 내 또는 시험관 내 환자의 세포 또는 조직에서 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드의 기능 및/또는 발현을 조절한다.
- [0007] 또 다른 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 서열번호 2에 제시된 뉴클레오타이드, 및 이에 대한 임의의 변이체, 대립유전자, 상동체, 돌연변이체, 유도체, 단편 및 보체 서열의 천연 안티센스 서열을 표적화한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 예는 서열번호 3 내지 6으로서 제시되어 있다.
- [0008] 또 다른 실시형태는 생체 내 또는 시험관 내에서 환자의 세포 또는 조직 내 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드의 기능 및/또는 발현을 조절하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 세포 또는 조직을 길이가 5개 내지 30개 뉴클레오타이드인 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기에서 상기 올리고뉴클레오타이드는 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드의 안티센스의 역 보체(reverse complement)에 적어도 50% 서열 동일성을 가지고; 상기 접촉에 의하여 생체 내 또는 시험관 내 환자의 세포 또는 조직에서 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드의 기능 및/또는 발현을 조절한다.
- [0009] 또 다른 실시형태는 생체 내 또는 시험관 내에서 환자의 세포 또는 조직 내 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드의 기능 및/또는 발현을 조절하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 세포 또는 조직을 길이가 5개 내지 30개 뉴클레오타이드인 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기에서 상기 올리고뉴클레오타이드는 MBTPS1 안티센스 폴리뉴클레오타이드에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 적어도 50% 서열 동일성을 가지고; 상기 접촉에 의하여 생체 내 또는 시험관 내 환자의 세포 또는 조직에서 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드의 기능 및/또는 발현을 조절한다.
- [0010] 하나의 실시형태에서, 조성물은 센스 및/또는 안티센스 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드에 결합하는 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0011] 또 다른 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 또는 치환된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0012] 또 다른 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 결합을 포함한다.
- [0013] 또 다른 실시형태에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 펩타이드 핵산, 2'-O-메틸, 플루오로- 또는 탄소, 메틸렌 또는 기타 잠금 핵산(locked nucleic acid: LNA) 분자를 포함하는 변형된 염기를 포함한다. 바람직하게, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 α -L-LNA를 포함하는 잠금 핵산 분자이다.
- [0014] 또 다른 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 환자에게 피하로, 근육내로, 정맥내로 또는 복강내로 투여된다.
- [0015] 또 다른 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 약학 조성물로 투여된다. 치료 섭생은 환자에게 적어도 한

변 안티센스 화합물을 투여하는 것을 포함하지만; 이러한 치료는 일정 기간에 걸쳐서 다중 투약을 포함하도록 변형될 수 있다. 상기 치료는 하나 이상의 다른 유형의 치료법과 결합될 수 있다.

[0016] 또 다른 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 리포솜에 포집되거나 또는 담체 분자(예컨대, 콜레스테롤, TAT 펩타이드)에 부착된다.

[0017] 다른 측면들은 하기에서 설명된다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 리포펙타민(Lipofectamine) 2000를 사용하여 도입된 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드로 HepG2 세포의 처리 후 대조군과 비교하였을 때, MBTPS1 mRNA에서 배수 변화 + 표준 편차를 보여주는 실시간 PCR 결과의 그래프이다. 실시간 PCR 결과는 HepG2 세포 내 MBTPS1 mRNA의 수준이 MBTPS1 안티센스 Hs.568369에 대해 고안된 올리고 중 하나로 처리하고 48시간 후에 상당히 증가된다는 것을 보여준다. CUR-1317, CUR-1315, CUR-1316 및 CUR-1318로서 표시된 막대는 각각 서열번호 3 내지 6으로 처리된 샘플에 대응한다.

서열 목록 설명 - 서열번호 1: 호모 사피엔스(Homo sapiens) 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1), mRNA. (NCBI 기탁번호: NM_003791); 서열번호 2: 천연 MBTPS1 안티센스 서열(Hs.568369); 서열번호 3 내지 6: 안티센스 올리고뉴클레오타이드. *는 포스포티오에이트 결합을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명의 몇 가지 측면들은 설명을 위한 실시예 적용을 참고로 하여 하기에서 기술된다. 다수의 구체적인 상세 내용, 관계 및 방법이 본 발명의 완전한 이해를 제공하기 위하여 제시됨을 이해해야 한다. 그러나 당업자는 하나 이상의 구체적인 상세 내용 없이 또는 다른 방법을 이용하여 본 발명이 실시될 수 있음을 용이하게 인지할 것이다. 일부 작용이 상이한 순서 및/또는 다른 작용 또는 사건과 동시에 일어날 수 있으므로, 본 발명은 작용 또는 사건의 순서에 의해 한정되지 않는다. 게다가, 본 발명에 따른 방법을 실행하기 위하여 모든 설명된 작용 또는 사건을 필요로 하지는 않는다.

[0020] 본 명세서에 개시된 모든 유전자, 유전자 명칭, 및 유전자 산물은 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법이 적용될 수 있는 임의의 종의 상동체에 상응하는 것으로 의도된다. 따라서, 이들 용어는 사람 및 마우스의 유전자 및 유전자 산물을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 특정 종으로부터의 유전자 또는 유전자 산물이 개시될 때, 이러한 개시 내용은 단지 예시적인 것으로 의도되며, 개시 내용이 나타난 문맥이 명백하게 지시하지 않는다면 한정으로서 해석되어서는 안 됨이 이해된다. 따라서, 예를 들어 일부 실시형태에서 포유동물 핵산 및 아미노산 서열과 관련된, 본 명세서에 개시된 유전자에 대하여, 이에 한정되지 않지만 다른 포유동물, 어류, 양서류, 파충류 및 조류를 포함하는 다른 동물의 상동성 및/또는 이종상동성(orthologous) 유전자 및 유전자 산물을 포함하는 것으로 의도된다. 실시형태에서, 유전자 또는 핵산 서열은 사람이다.

[0021] 정의

[0022] 본 명세서에 사용된 용어는 단지 특정 실시형태를 기술하기 위함이며, 본 발명을 한정하고자 함이 아니다. 본 명세서에서 사용된 단수형("a", "an" 및 "the")은, 내용이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수형도 포함하는 것으로 의도된다. 게다가, 용어 "포함하는(including)", "포함하다(includes)", "가지는(having)", "가지다(has)", "~를 가진(with)" 또는 이의 변이체가 상세한 설명 및/또는 청구범위에서 사용되는 정도에 대하여, 이러한 용어들은 용어 "포함하는(comprising)"과 유사한 방식으로 포괄적인 것으로 의도된다.

[0023] 용어 "약" 또는 "대략"은 당업자에 의해 결정될 때 특정 값에 대하여 허용가능한 오차 범위 내임을 의미하며, 이는 값이 어떻게 측정 또는 결정되는지, 즉 측정 시스템의 한계에 따라 부분적으로 달라질 것이다. 예를 들어, "약"은 당업계에서 실시마다 1이상의 표준 편차 이내를 의미할 수 있다. 대안적으로, "약"은 주어진 값의 최대 20%, 바람직하게는 최대 10%, 보다 바람직하게는 최대 5%, 보다 더 바람직하게는 최대 1%의 범위를 의미할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 공정에 대하여, 상기 용어는 값의 10배 이내, 바람직하게는 5배 이내, 보다 바람직하게는 2배 이내를 의미할 수 있다. 특정 값이 본 출원 및 청구범위에 기술되는 경우, 달리 언급되어 있지 않는다면 용어 "약"은 특정 값에 대하여 허용가능한 오차 범위 내임을 의미하는 것으로 가정되어야 한다.

[0024] 본 명세서에서 사용된 용어 "mRNA"는 표적 유전자의 현재 알려진 mRNA 전사체(들), 및 밝혀질 수 있는 임의의 추가 전사체를 의미한다.

- [0025] "안티센스 올리고뉴클레오타이드" 또는 "안티센스 화합물"은 또 다른 RNA 또는 DNA(표적 RNA, DNA)에 결합하는 RNA 또는 DNA 분자를 의미한다. 예를 들어, RNA 올리고뉴클레오타이드라면, RNA-RNA 상호작용에 의해 또 다른 RNA 표적에 결합하고, 표적 RNA의 활성을 변경시킨다(Eguchi *et al.*, (1991) *Ann. Rev. Biochem.* 60, 631-652). 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 특정 폴리뉴클레오타이드의 발현 및/또는 기능을 상향 조절 또는 하향 조절할 수 있다. 상기 정의는 치료, 진단, 또는 다른 관점으로부터 유용한 임의의 외부 RNA 또는 DNA 분자를 포함하는 것으로 의미된다. 이러한 분자는, 예를 들어 안티센스 RNA 또는 DNA 분자, 간섭 RNA(RNAi), 마이크로 RNA, 유인(decoy) RNA 분자, siRNA, 효소 RNA, 치료 편집(editing) RNA 및 항진 및 길항 RNA, 안티센스 올리고머 화합물, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 외부 가이드 서열(EGS) 올리고뉴클레오타이드, 교대 스플라이서(alternate splicers), 프라이머, 프로브, 및 표적 핵산의 적어도 일부분과 혼성화하는 다른 올리고머 화합물을 포함한다. 이와 같이, 이들 화합물들은 단일 가닥, 이중 가닥, 부분적 단일 가닥, 또는 원형 올리고머 화합물의 형태로 도입될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 내용에서, 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 리보핵산(RNA) 또는 데옥시리보핵산(DNA)의 올리고머 또는 폴리머 또는 이의 모방체를 말한다. 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 또한 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 이의 치환된 그리고 알파-아노머 형태, 펩타이드 핵산(peptide nucleic acid: PNA), 잠금 핵산(LNA), 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트 등을 포함하는, 천연 및/또는 변형된 단량체 또는 연결의 선형 또는 원형 올리고머를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드는 단량체-대-단량체 상호작용의 규칙적인 패턴, 예를 들어 Watson-Crick 유형의 염기쌍, Hoogsteen 또는 역 Hoogsteen 유형의 염기쌍형성 등에 의해 표적 폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0027] 상기 올리고뉴클레오타이드는 "키메라", 즉 상이한 영역으로 구성될 수 있다. 본 발명의 내용에서, "키메라" 화합물은 2개 이상의 화학적 영역, 예를 들어 DNA 영역(들), RNA 영역(들), PNA 영역(들) 등을 포함하는 올리고뉴클레오타이드이다. 각각의 화학적 영역은 적어도 1개의 단량체 단위, 즉 올리고뉴클레오타이드 화합물의 경우 뉴클레오타이드로 구성된다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 적어도 하나의 영역을 포함하고, 여기에서 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 원하는 특성을 나타내도록 변형된다. 올리고뉴클레오타이드의 원하는 특성은, 예를 들어 뉴클레아제 분해에 대한 증가된 저항성, 증가된 세포의 취입(uptake), 및/또는 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화력을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 따라서 올리고뉴클레오타이드의 상이한 영역은 상이한 특성들을 가질 수 있다. 본 발명의 키메라 올리고뉴클레오타이드는 상기 기술된 바와 같이 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드, 변형된 올리고뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드 및/또는 올리고뉴클레오타이드 유사체의 혼합된 구조로서 형성될 수 있다.
- [0028] 상기 올리고뉴클레오타이드는 "레지스터(register)" 내에서, 즉 단량체가 고유 DNA에서와 같이 연속적으로 연결되거나 또는 스페이서를 통하여 연결되어 있을 때, 연결될 수 있는 영역으로 구성될 수 있다. 스페이서는 영역 사이에서 공유 "가교"를 구성하고, 바람직한 경우에 약 100개 탄소 원자를 초과하지 않는 길이를 가지는 것으로 의도된다. 스페이서는 상이한 기능성, 예를 들어 양전하 또는 음전하를 가지며, 특정 핵산 결합 특성들(인터칼레이터(intercalator), 홈 결합자(groove binder), 독소, 형광단(fluorophor) 등)을 가질 수 있고, 친유성일 수 있으며, 예를 들어 알파-나선을 유도하는 알라닌을 포함하는 펩타이드와 같이, 특정 2차 구조를 유도할 수 있다.
- [0029] 본 명세서에서 사용된 "MBTPS1" 및 "막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1"은 모든 패밀리 구성요소, 돌연변이체, 대립유전자, 단편, 중, 암호 및 비암호 서열, 센스 및 안티센스 폴리뉴클레오타이드 가닥 등을 포함한다.
- [0030] 본 명세서에서 사용된 단어 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1; MBTPS1, KIAA0091, 막 결합 전사 인자 부위-1 프로테아제, MGC138711, MGC138712, PCSK8, S1P, S1P 엔도펩티다제, 부위-1 프로테아제, SKI1, SKI-1, 서브틸리신/켄신-이소자임 1은 본 출원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0031] 본 명세서에서 사용된 용어 "~에 특이적인 올리고뉴클레오타이드" 또는 "~을 표적화하는 올리고뉴클레오타이드"는 (i) 표적화된 유전자의 일부분과 안정적인 복합체를 형성할 수 있는, 또는 (ii) 표적화된 유전자의 mRNA 전사체의 일부분과 안정적인 듀플렉스를 형성할 수 있는 서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드를 말한다. 복합체와 듀플렉스의 안정성은 이론적 계산 및/또는 시험관 내 분석에 의해 결정될 수 있다. 혼성화 복합체 및 듀플렉스의 안정성을 결정하는 예시적인 분석은 하기 실시예에 기술되어 있다.
- [0032] 본 명세서에서 사용된 용어 "표적 핵산"은 DNA, 이러한 DNA로부터 전사된 RNA(프리-mRNA 및 mRNA를 포함함), 그리고 또한 이러한 RNA, 암호, 비암호 서열, 센스 또는 안티센스 폴리뉴클레오타이드로부터 유래한 cDNA를 포함

한다. 올리고머 화합물과 이의 표적 핵산의 특이적 혼성화는 상기 핵산의 정상적 기능을 간섭한다. 구체적으로 표적 핵산과 혼성화하는 화합물에 의한 표적 핵산의 기능 조절은 일반적으로 "안티센스"라고 말한다. 간섭될 DNA의 기능은, 예를 들어 복제 및 전사를 포함한다. 간섭될 RNA의 기능은 모든 중요한 기능, 예를 들어 단백질 번역 부위로 RNA의 전위, RNA로부터 단백질의 번역, 하나 이상의 mRNA 종류를 만들기 위한 RNA의 스플라이싱, 및 RNA에 관여하는 또는 RNA에 의해 용이하게 될 수 있는 촉매 활성을 포함한다. 표적 핵산 기능의 이러한 간섭의 전반적인 효과는 암호화된 산물 또는 올리고뉴클레오타이드의 발현 조절이다.

[0033] RNA 간섭 "RNAi"는 이중 가닥 RNA(dsRNA)의 "표적" 핵산 서열에 서열-특이적 상동성을 가지는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 분자에 의해 매개된다(Caplen, N. J., *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:9742-9747). 본 발명의 특정 실시형태에서, 매개자는 5~25개의 뉴클레오타이드 "짧은 간섭" RNA 듀플렉스(siRNA)이다. siRNA는 Dicer로서 알려진 RNase 효소에 의해 dsRNA의 가공으로부터 유래한다(Bernstein, E., *et al.* (2001) *Nature* 409:363-366). siRNA 듀플렉스 산물은 RISC(RNA Induced Silencing Complex)라고 불리는 다중-단백질 siRNA 복합체로 모인다. 이론에 구속되는 것을 원하지 않지만, 그 다음에 RISC는 표적 핵산(적합하게는 mRNA)으로 안내되고, 여기에서 siRNA 듀플렉스는 서열 특이적 방식으로 상호작용하여 촉매적 방식으로 절단을 매개하는 것으로 여겨진다(Bernstein, E., *et al.* (2001) *Nature* 409:363-366; Boutla, A., *et al.* (2001) *Curr. Biol.* 11:1776-1780). 본 발명에 따라 사용될 수 있는 짧은 간섭 RNA는 당업계에 잘 알려져 있고 당업자에게 잘 알려져 있을 절차에 따라서 합성되고 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에서 적합하게 사용하기 위한 짧은 간섭 RNA는 약 1개 내지 약 50개 뉴클레오타이드(nt)를 포함한다. 비제한적 실시형태의 예에서, siRNA는 약 5개 내지 약 40개 nt, 약 5개 내지 약 30개 nt, 약 10개 내지 약 30개 nt, 약 15개 내지 약 25개 nt, 또는 약 20개 내지 25개 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0034] 적절한 올리고뉴클레오타이드의 선택은 자동적으로 핵산 서열을 정렬하고, 동일성 또는 상동성인 영역을 나타내는 컴퓨터 프로그램을 사용하여 용이하게 된다. 이러한 프로그램을 사용하여, 예를 들어 GenBank와 같은 데이터 베이스를 검색함으로써 또는 PCR 산물을 서열화함으로써 획득한 핵산 서열을 비교한다. 다양한 종으로부터의 핵산 서열의 비교는 종간의 적절한 정도의 동일성을 나타내는 핵산 서열의 선택을 가능하게 한다. 서열화되지 않은 유전자의 경우, 서던 블롯을 실행하여 표적 종과 다른 종 사이에서 동일성 정도의 측정을 가능하게 한다. 당업계에 잘 알려져 있는 바와 같이, 다양한 정도의 엄격성(stringency)에서 서던 블롯을 실행함으로써, 동일성의 대략적인 측정 결과를 획득하는 것이 가능하다. 이러한 절차는 제어될 대상에서는 표적 핵산 서열에 대하여 높은 정도의 상보성을 나타내고 다른 종에서는 상응하는 핵산 서열에 대하여 더 낮은 정도의 상보성을 나타내는 올리고뉴클레오타이드의 선택을 가능하게 한다. 당업자는 본 발명에서 사용하기 위한 유전자의 적절한 영역을 선택함에 있어 상당한 허용 범위가 있음을 인식할 것이다.

[0035] "효소 RNA"는 효소 활성이 있는 RNA 분자를 의미한다(Cech, (1988) *J. American. Med. Assoc.* 260, 3030-3035). 효소 핵산(리보자임)은 우선 표적 RNA에 결합함으로써 작용한다. 이러한 결합은 표적 RNA를 절단하도록 작용하는 분자의 효소 부분에 근접하게 있는 효소적 핵산의 표적 결합 부분을 통하여 일어난다. 따라서, 효소적 핵산은 염기쌍형성을 통하여 표적 RNA를 먼저 인지하고, 그 다음 이에 결합하며, 그리고 일단 정확한 부위에 결합하면 효소적으로 작용하여 표적 RNA를 절단한다.

[0036] "유인(decoy) RNA"는 리간드에 대한 천연 결합 도메인을 모방한 RNA 분자를 의미한다. 따라서, 유인 RNA는 특이적 리간드의 결합에 대하여 천연 결합 표적과 경쟁한다. 예를 들어, HIV 트랜스-활성화 반응(TAR) RNA의 과다발현은 "유인"으로 작용하여 HIV tat 단백질에 효과적으로 결합하고, 이에 의하여 HIV RNA 내에 암호화된 TAR 서열에의 리간드의 결합을 방해하는 것으로 나타났다(Sullenger *et al.* (1990) *Cell*, 63, 601- 608). 이는 특정 실시예인 것으로 의미된다. 당업자는 이것이 단지 하나의 예일 뿐이며, 다른 실시형태는 당업계에 일반적으로 알려져 있는 기술을 사용하여 용이하게 생성될 수 있음을 인지할 것이다.

[0037] 본 명세서에서 사용된 용어 "단량체"는 전형적으로 크기가 소수의 단량체 단위, 예컨대 약 3개~4개 내지 약 수백개의 단량체 단위의 범위인 올리고뉴클레오타이드를 형성하기 위하여 포스포다이에스터 결합에 의해 연결된 단량체 또는 이의 유사체를 나타낸다. 포스포다이에스터 연결의 유사체는 하기에 보다 완전히 기술된 바와 같이, 포스포로티오에이트, 포스포로다이티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포라미데이트 등을 포함한다.

[0038] 용어 "뉴클레오타이드"는 자연적으로 생성되는 뉴클레오타이드뿐만 아니라 비자연적으로 생성되는 뉴클레오타이드를 포함한다. 이전에 "비자연적으로 생성되는" 것으로 간주된 다양한 뉴클레오타이드가 이후에 자연에서 발견됨이 당업자에게 명백해야 한다. 따라서, "뉴클레오타이드"는 공지된 퓨린 및 피리미딘 헤테로사이클을 포함하

는 분자, 및 이의 헤테로사이클 유사체 및 호변이성질체를 포함한다. 다른 유형의 뉴클레오타이드의 예시적인 예는 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 유라실, 퓨린, 잔틴, 다이아미노퓨린, 8-옥소-N6-메틸아데닌, 7-테아자잔틴, 7-테아자구아닌, N4,N4-에타노시토신, N6,N6-에타노-2,6-다이아미노퓨린, 5-메틸시토신, 5-(C3-C6)-알킬닐 시토신, 5-플루오로유라실, 5-브로모유라실, 슈도이소시토신, 2-하이드록시-5-메틸-4-트리아졸로피리딘, 이소시토신, 이소구아닌, 이노신 및 미국 특허 제5,432,272호(Benner *et al.*)에 기술된 "비자연적으로 생성되는" 뉴클레오타이드를 포함하는 분자이다. 용어 "뉴클레오타이드"는 이들 예 및 이의 유사체와 호변이성질체를 모두 포함하는 것으로 의도된다. 특히 흥미로운 뉴클레오타이드는 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 및 유라실을 포함하는 것이며, 이들은 사람에서 치료 및 진단 적용과 관련된 자연적으로 생성되는 뉴클레오타이드로 간주된다. 뉴클레오타이드는 예컨대 문헌 [Kornberg and Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992)]에 기술된 바와 같은 천연 2'-데옥시 및 2'-하이드록실 당 및 이의 유사체를 포함한다.

[0039] 뉴클레오타이드와 관련된 "유사체"는 변형된 염기 모이어티 및/또는 변형된 당 모이어티를 가지는 합성 뉴클레오타이드(예컨대, 문헌 [Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, (1997) *Nucl. Acid. Res.*, 25(22), 4429- 4443, Toulme, J.J., (2001) *Nature Biotechnology* 19:17-18; Manoharan M., (1999) *Biochemica 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]에 일반적으로 기술된 것을 참조함); 2'-O, 3'-C-연결된 [3.2.0] 비사이클로아라비노뉴클레오타이드(예컨대, 문헌 [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]를 참조함)를 포함한다. 이러한 유사체들은 결합 특성, 예컨대 듀플렉스 또는 트리플렉스 안정성, 특이성 등을 향상시키도록 고안된 합성 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0040] 본 명세서에서 사용된 "혼성화"는 올리고머 화합물들의 실질적인 보체 가닥들의 쌍형성을 의미한다. 쌍형성의 한가지 기전은 올리고머 화합물 가닥의 상보적 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 염기들(뉴클레오타이드들) 사이에 수소 결합을 포함하며, 이는 Watson-Crick, Hoogsteen 또는 역전된 Hoogsteen 수소 결합일 수 있다. 예를 들어, 아데닌 및 티민은 수소 결합의 형성을 통하여 쌍을 이루는 보체 뉴클레오타이드이다. 혼성화는 다양한 환경 하에서 일어날 수 있다.

[0041] 안티센스 화합물은 표적 핵산에 대한 화합물의 결합이 표적 핵산의 정상적인 기능을 간섭하여 기능 및/또는 활성의 조절을 야기할 때 "특이적으로 혼성화가능"하고, 특이적 결합을 원하는 조건 하에서, 즉 생체 내 분석 또는 치료적 처치의 경우 생리학적 조건 하에서, 그리고 시험관 내 분석의 경우 분석이 실행되는 조건 하에서 비-표적 핵산 서열에 안티센스 화합물의 비-특이적 결합을 피하기에 충분한 정도의 상보성이 있다.

[0042] 본 명세서에서 사용된 어구 "엄격한 혼성화 조건" 또는 "엄격한 조건"은, 본 발명의 화합물은 이의 표적 서열에 혼성화할 것이지만, 다른 서열에는 최소한의 수로 혼성화할 것인 조건을 말한다. 엄격한 조건은 서열-의존적이고, 상이한 환경에서 상이할 것이며, 그리고 본 발명의 내용에서 올리고머 화합물이 표적 서열에 혼성화하는 "엄격한 조건"은 올리고머 화합물들의 성질과 조성물, 및 조사될 분석에 의해 결정된다. 일반적으로, 엄격한 혼성화 조건은 Na⁺ 또는 K⁺와 같은 무기 양이온(즉, 낮은 이온 강도)과 염의 낮은 농도(<0.1M), 올리고머 화합물:표적 서열 복합체의 T_m 미만의 20°C ~ 25°C보다 더 높은 온도, 및 포름아미드, 다이메틸포름아미드, 다이메틸 설펍시드, 또는 세제 소듐 도데실 설펍레이트(SDS)와 같은 변성제의 존재를 포함한다. 예를 들어, 혼성화 비율은 각 1% 포름아미드에 대하여 1.1% 감소한다. 높은 엄격성 혼성화 조건의 예는 60°C에서, 30분간 0.1× 염화나트륨-시트르산나트륨 완충액(SSC)/0.1%(w/v) SDS이다.

[0043] 본 명세서에서 사용된 "상보성"은 1개 또는 2개의 올리고머 가닥 상에서 2개 뉴클레오타이드 사이의 정확한 쌍형성을 위한 능력을 말한다. 예를 들어, 안티센스 화합물의 특정 위치에서 핵염기가 표적 핵산의 특정 위치에서 핵염기와 수소 결합할 수 있다면, 상기 표적 핵산은 DNA, RNA, 또는 올리고뉴클레오타이드 분자이고, 그 다음 올리고뉴클레오타이드와 표적 핵산 사이의 수소 결합 위치는 상보적 위치인 것으로 간주된다. 올리고머 화합물 및 추가 DNA, RNA, 또는 올리고뉴클레오타이드 분자는 각 분자에서 충분한 수의 상보적 위치가 서로 수소 결합할 수 있는 뉴클레오타이드에 의해 점유될 때 서로에 대해 상보적이다. 따라서, "특이적으로 혼성화가능" 및 "상보적"은 올리고머 화합물과 표적 핵산 사이에 안정적이고 특이적인 결합이 일어나도록 충분한 수의 뉴클레오타이드에 걸쳐 충분한 정도의 정확한 쌍형성 또는 상보성을 나타낼 때 사용되는 용어이다.

[0044] 올리고머 화합물의 서열은 특이적으로 혼성화가능한 표적 핵산의 서열에 100% 상보성일 필요가 없다는 것이 이

해된다. 더욱이, 올리고뉴클레오타이드는 개재하는 또는 인접한 분절이 혼성화 사건(예컨대, 루프 구조, 미스매치 또는 헤어핀 구조)에 관여하지 않도록 하나 이상의 분절에 걸쳐 혼성화할 수 있다. 본 발명의 올리고머 화합물은 표적화 되는 표적 핵산 서열 내에 표적 영역에 대해 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99% 서열 상보성을 포함한다. 예를 들어, 안티센스 화합물의 20개 뉴클레오타이드 중 18개가 표적 영역에 상보적이고 따라서 특이적으로 혼성화할 것인 안티센스 화합물은 90% 상보성을 나타낼 것이다. 이러한 예에서, 나머지 비상보성 뉴클레오타이드는 상보적 뉴클레오타이드와 덩어리를 형성하거나 또는 상보적 뉴클레오타이드가 점재될(interspersed) 수 있고, 그리고 서로 또는 상보적 뉴클레오타이드와 인접할 필요는 없다. 이와 같이, 표적 핵산과 완전한 상보성을 가진 두 개 영역이 측면에 위치한 4개의 비상보적 뉴클레오타이드를 가진 길이 18개의 뉴클레오타이드인 안티센스 화합물은 표적 핵산과 전체적으로 77.8% 상보성을 가질 것이며, 따라서 본 발명의 범주에 속할 것이다. 표적 핵산의 영역과 안티센스 화합물의 상보성 비율은 당업계에 알려진 BLAST 프로그램(기본적인 국소배열 검색 도구) 및 PowerBLAST 프로그램을 사용하여 통상적으로 결정될 수 있다(Altschul *et al.*, (1990) *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410; Zhang and Madden, (1997) *Genome Res.*, 7, 649-656). 상동성 비율, 서열 동일성 또는 상보성은 예를 들어 디폴트 세팅을 사용하여, Smith 및 Waterman의 알고리즘(*Adv. Appl. Math.*, (1981) 2, 482-489)을 사용하는 Gap 프로그램(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)에 의해 결정될 수 있다.

[0045] 본 명세서에서 사용된 용어 "열 융점(Tm)"은 정의된 이온 강도, pH 및 핵산 농도 하에서 표적 서열에 상보적인 올리고뉴클레오타이드의 50%가 평형상태에서 표적 서열에 혼성화할 때의 온도를 말한다. 전형적으로, 엄격성 조건은 염 농도가 pH 7.0 내지 8.3에서 적어도 약 0.01 내지 1.0M Na 이온 농도(또는 다른 염)이며, 온도가 짧은 올리고뉴클레오타이드(예컨대, 10개 내지 50개 뉴클레오타이드)에 대하여 적어도 약 30℃인 조건일 것이다. 엄격한 조건은 또한 포름아미드와 같은 탈안정화제를 첨가하여 얻을 수도 있다.

[0046] 본 명세서에서 사용된 "조정(modulation)"은 유전자의 발현에 있어서 증가(자극) 또는 감소(억제)를 의미한다.

[0047] 폴리뉴클레오타이드 서열의 내용에서 사용된 용어 "변이체(variant)"는 야생형 유전자와 관계가 있는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 또한 이 정의는, 예를 들어 "대립유전자(allelic)", "스플라이스(splice)", "종(species)", 또는 "다형성(polymorphic)" 변이체를 포함할 수 있다. 스플라이스 변이체는 참조 분자에 대해 상당한 동일성을 가질 수 있지만, 일반적으로 mRNA 가공 동안 엑손의 교대 스플라이싱으로 인하여 더 많은 또는 더 적은 수의 폴리뉴클레오타이드를 가질 것이다. 상응하는 폴리펩타이드는 추가적인 기능 도메인을 가질 수 있거나 또는 도메인이 없을 수 있다. 종 변이체는 종마다 다양한 폴리뉴클레오타이드 서열이다. 본 발명에 특히 유용한 것은 야생형 유전자 산물의 변이체다. 변이체는 핵산 서열에서 적어도 하나의 돌연변이로 인하여 생길 수 있고, 변경된 mRNA 또는 기능 또는 구조가 변경될 수 있거나 또는 변경되지 않을 수 있는 폴리펩타이드를 만들 수 있다. 임의의 주어진 천연 또는 재조합 유전자는 대립유전자가 없거나 하나 또는 많은 대립유전자를 가질 수 있다. 변이체를 발생시키는 공통의 돌연변이적 변화는 일반적으로 뉴클레오타이드의 자연적 결손, 추가 또는 치환으로 인한 것이다. 이들 유형의 각 변화는 단독으로 일어나거나, 다른 것과 조합하여 일어날 수 있고, 주어진 서열에서 1회 이상 발생할 수 있다.

[0048] 생성된 폴리펩타이드는 일반적으로 서로에 대해 상당한 아미노산 동일성을 가질 것이다. 다형성 변이체는 주어진 종의 개체 간에 특정 유전자의 폴리뉴클레오타이드 서열에서의 변화이다. 다형성 변이체는 또한 "단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)" 또는 폴리뉴클레오타이드 서열이 한 개 염기로 다른 단일 염기 돌연변이를 포함할 수 있다. SNP의 존재는 예를 들어 민감성 대 저항성인 질환 상태에 대한 성향을 가진 특정 집단을 나타낼 수 있다.

[0049] 유도체 폴리뉴클레오타이드는 화학적 변형, 예를 들어 알킬, 아실, 또는 아미노 기에 의해 수소의 치환이 일어나는 핵산을 포함한다. 유도체, 예컨대 유도체 올리고뉴클레오타이드는 변형된 당 모이어티 또는 당 간(inter-sugar)의 연결과 같은 비자연적으로 생성되는 부분을 포함할 수 있다. 이들 중 예로는 당업계에 알려져 있는 포스포로티오에이트 및 기타 황을 포함하는 종들이다. 유도체 핵산은 또한 방사능뉴클레오타이드, 효소, 형광성 제제, 화학발광제, 발색제, 기질, 보조인자, 억제자, 자성 입자 등을 포함한 표지를 포함할 수 있다.

[0050] "유도체" 폴리펩타이드 또는 펩타이드는 예를 들어 글리코실화, 폐길화, 인산화, 황산화, 환원/알킬화, 아실화, 화학적 커플링, 또는 약한 포르말린 처리에 의해 변형된 것이다. 또한 유도체는 이에 한정되지는 않지만 방사능 동위원소, 형광 및 효소 표지를 포함하는 검출가능한 표지를 직접적으로 또는 간접적으로 포함하도록 변형될 수 있다.

[0051] 본 명세서에서 사용되는 용어 "동물" 또는 "환자"는 예를 들어 사람, 양, 엘크, 사슴, 물사슴, 밍크, 포유동물,

원숭이, 말, 소, 돼지, 염소, 개, 고양이, 래트, 마우스, 조류, 닭, 파충류, 어류, 곤충 및 거미류를 포함하는 것으로 의미된다.

[0052] "포유동물"은 전형적으로 건강 관리를 받는 온혈 포유동물(예컨대, 사람 및 가축)을 포함한다. 예로는 고양이과, 개과, 말과, 소과 및 인간뿐만 아니라 오로지 사람을 포함한다.

[0053] "치료하는" 또는 "치료"는 포유동물에서 질환 상태의 치료를 포함하고, (a) 포유동물에서 질환 상태가 일어나는 것을 막고, 특히 포유동물이 질환 상태에 걸리기 쉽지만 아직 걸린 것으로 진단받지 않은 경우; (b) 질환 상태를 억제하는 것, 예컨대 질환의 진행을 막는 것; 및/또는 (c) 질환 상태를 완화시키는 것, 예컨대 원하는 종점에 도달할 때까지 질환 상태를 퇴보시키는 것을 포함한다. 치료는 또한 질환 증상의 개선(예컨대, 통증 또는 불편함을 감소)을 포함하며, 여기에서 이러한 개선은 질환에 직접적으로 영향(예컨대, 원인, 전염, 발현 등)을 줄 수 있거나 주지 않을 수 있다.

[0054] 폴리뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드 조성물 및 분자

[0055] 표적: 하나의 실시형태에서, 표적은 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1)과 연관된 센스 및/또는 안티센스 비암호화 및/또는 암호화 서열을 포함하나 이에 한정되지 않는, MBTPS1의 핵산 서열을 포함한다.

[0056] 또한 MBTPS1 또는 서브틸리신/켁신 이소자임 1(SKI-1)로서도 널리 알려진, 사람 부위-1-프로테아제(S1P)는 막 결합 서브틸리신-관련 세린 프로테아제이며, 이는 9가지 포유동물 전단백질(proprotein) 전환효소의 군에 속한다. 이들 프로테아제 중에서, S1P는 비염기성 아미노산 뒤의 바람직한 절단을 나타냄으로써 특유의 기질 특이성을 보인다. S1P는 막, 세포 및 혈액의 콜레스테롤 함량을 조절하는 단백질 분해 경로에서 중요한 역할을 한다. S1P는, 콜레스테롤 및 지질 대사에 관여하는 다양한 유전자의 발현을 조절하는 2가지 전사 인자인 스테롤 조절 요소 결합 단백질(SREBP) 1 및 2에 대한 전구체의 단백질 분해 활성을 매개하는 골지 프로테아제이다.

[0057] 안티센스 화합물을 사용하여 얻은 줄기 세포로부터 재생된 세포/조직으로 치료될 수 있는, 예시적인 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1) 매개된 질환 또는 장애는 다음을 포함한다: ER 스트레스 반응, 염증성 장질환(예컨대, 대장염), 대사성 질환 또는 장애, 지질 대사 질환 또는 장애(예컨대, 비만, 당뇨, 고콜레스테롤혈증, 이상지질혈증), 스테롤 조절 요소 결합 단백질(SREBP)의 손상된 기능과 연관된 질환 또는 장애, 심혈관계 질환 또는 장애, 출혈열(예컨대, 크립-콩고 출혈열 등), 간질환 또는 장애, 연골성 뼈 발생 질환 또는 장애(예컨대, 연골이형성증, 연골세포 아파토시스, 파괴된 콜라겐 네트워크(disorganized collagen network)).

[0058] 하나의 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는, 한정되지 않지만 비암호화 영역을 포함하는 MBTPS1의 폴리뉴클레오타이드에 특이적이다. MBTPS1 표적은 MBTPS1의 변이체; SNP를 포함한 MBTPS1의 돌연변이체; MBTPS1의 비암호화 서열; 대립유전자, 단편 등을 포함한다. 바람직하게 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 RNA 분자이다.

[0059] 본 발명의 실시형태에 따라서, 표적 핵산 분자는 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드 단독에 한정되지 않으며, MBTPS1의 이소형태, 수용체, 상동체, 비암호화 영역 등 중 임의의 것으로 확장된다.

[0060] 하나의 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이에 한정되지 않지만, MBTPS1에 대한 변이체, 대립유전자, 상동체, 돌연변이체, 유도체, 단편 및 상보적 서열을 포함하여, MBTPS1 표적의 천연 안티센스 서열(암호화 영역 및 비암호화 영역에 대한 천연 안티센스)을 표적으로 한다. 바람직하게 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 RNA 또는 DNA 분자이다.

[0061] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 올리고머 화합물은 또한 상이한 염기가 상기 화합물 내 하나 이상의 뉴클레오타이드 위치에 존재하는 변이체를 포함한다. 예를 들어, 제1 뉴클레오타이드가 아데닌이라면, 이 위치에서 티미딘, 구아노신, 시티딘 또는 다른 천연 또는 비천연 뉴클레오타이드를 포함하는 변이체가 생성될 수 있다. 이는 안티센스 화합물의 임의의 위치에서 일어날 수 있다. 그 다음 이들 화합물은 본 명세서에 기술된 방법을 사용하여 테스트되어 표적 핵산의 발현을 억제하는 능력을 결정한다.

[0062] 일부 실시형태에서, 안티센스 화합물과 표적 사이의 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 50% 내지 약 60%이다. 일부 실시형태에서, 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 60% 내지 약 70%이다. 일부 실시형태에서, 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 70% 내지 약 80%이다. 일부 실시형태에서, 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 80% 내지 약 90%이다. 일부 실시형태에서, 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.

[0063] 안티센스 화합물은, 표적 핵산에 대한 화합물의 결합이 표적 핵산의 정상적인 기능을 간섭하여 활성의 손실을

야기할 때 특이적으로 혼성화가 가능하고, 특이적 결합을 원하는 조건 하에서 비-표적 핵산 서열에 안티센스 화합물의 비-특이적 결합을 피하기 위해 충분한 정도의 상보성이 있다. 이러한 조건은 즉 생체 내 분석 또는 치료적 처치의 경우 생리학적 조건, 그리고 시험관 내 분석의 경우 분석이 실행되는 조건을 포함한다.

[0064] DNA, RNA, 키메라, 치환된 등의 안티센스 화합물은, 표적 DNA 또는 RNA 분자에의 화합물의 결합이 표적 DNA 또는 RNA의 정상적인 기능을 간섭하여 유용성의 손실을 야기할 때 특이적으로 혼성화가 가능하고, 특이적 결합을 원하는 조건 하에서, 즉 생체 내 분석 또는 치료적 처치의 경우 생리학적 조건 하에, 그리고 시험관 내 분석의 경우 분석이 실행되는 조건 하에서 비-표적 핵산 서열에 안티센스 화합물의 비-특이적 결합을 피하기 위해 충분한 정도의 상보성이 있다.

[0065] 하나의 실시형태에서, 한정되지 않지만 예를 들어 PCR, 혼성화 등을 사용하여 확인되고 확장된 안티센스 서열, 서열번호 2에 제시된 하나 이상의 서열 등을 포함하는 MBTPS1의 표적화는 MBTPS1의 발현 또는 기능을 조절한다. 하나의 실시형태에서, 발현 또는 기능은 대조군과 비교하여 상향 조절된다. 하나의 실시형태에서, 발현 또는 기능은 대조군과 비교하여 하향 조절된다.

[0066] 하나의 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어 PCR, 혼성화 등을 사용하여 확인되고 확장된 안티센스 서열을 포함하는, 서열번호 3 내지 6에 제시된 핵산 서열을 포함한다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드, 더 짧거나 더 긴 단편, 변형된 결합 등을 포함할 수 있다. 변형된 결합 또는 뉴클레오타이드간 연결의 예는 포스포로티오에이트, 포스포로다이트오에이트 등을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 뉴클레오타이드는 인(phosphorus) 유도체를 포함한다. 본 발명의 변형된 올리고뉴클레오타이드 내 당 또는 당 유사체 모이어티에 부착될 수 있는 인 유도체(또는 변형된 포스페이트 기)는 모노포스페이트, 다이포스페이트, 트라이포스페이트, 알킬포스페이트, 알칸포스페이트, 포스포로티오에이트 등일 수 있다. 상기 명시된 포스페이트 유사체의 제조 및 뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드 내로의 포함, 그 자체는 또한 알려져 있으며, 여기에서 기술할 필요는 없다.

[0067] 안티센스의 특이성 및 민감성은 또한 치료적 용도를 위하여 당업자에 의해 이용된다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 동물 및 인간에서 질환 상태의 치료에서의 치료적 모이어티로서 이용되어 왔다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 사람에게 안전하고 효과적으로 투여되어 왔으며, 다수의 임상 시험이 현재 진행 중이다. 따라서 올리고뉴클레오타이드는 세포, 조직, 동물, 특히 사람의 치료를 위한 치료 섭생에서 유용하도록 구성될 수 있는 유용한 치료적 양상일 수 있음이 수립되어 있다.

[0068] 본 발명의 실시형태에서, 올리고머 안티센스 화합물, 특히 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산 분자에 결합하고 표적 유전자에 의해 암호화되는 분자의 발현 및/또는 기능을 조절한다. 간섭되는 DNA의 기능은, 예를 들어 복제 및 전사를 포함한다. 간섭될 RNA의 기능은 모든 중요한 기능, 예를 들어 단백질 번역 부위로 RNA의 전위, RNA로부터 단백질의 번역, 하나 이상의 mRNA 종류를 만들기 위한 RNA의 스플라이싱, 및 RNA에 관여하는 또는 RNA에 의해 용이하게 될 수 있는 촉매 활성을 포함한다. 상기 기능은 원하는 기능에 따라서 상향 조절되거나 억제될 수 있다.

[0069] 상기 안티센스 화합물은 안티센스 올리고머 화합물, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 외부 가이드 서열(EGS) 올리고뉴클레오타이드, 교대 스플라이서, 프라이머, 프로브, 및 표적 핵산의 적어도 일부분과 혼성화하는 다른 올리고머 화합물을 포함한다. 이와 같이, 이들 화합물은 단일 가닥, 이중 가닥, 부분적 단일 가닥, 또는 원형 올리고머 화합물의 형태로 도입될 수 있다.

[0070] 본 발명의 내용에서 특정 핵산 분자에 대하여 안티센스 화합물을 표적화하는 것은 다단계 공정일 수 있다. 상기 공정은 보통 기능이 조절되어야 하는 표적 핵산의 확인으로 시작된다. 이러한 표적 핵산은, 예를 들어 발현이 특정 장애 또는 질환 상태와 연관된 세포 유전자(또는 상기 유전자로부터 전사된 mRNA), 또는 감염원으로부터의 핵산 분자일 수 있다. 본 발명에서, 표적 핵산은 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1)을 암호화한다.

[0071] 또한 표적화 공정은 보통, 안티센스 상호작용이 일어나 원하는 효과, 예컨대 발현의 조절이 생기도록 표적 핵산 내 적어도 하나의 표적 영역, 분절, 또는 위치의 결정을 포함한다. 본 발명의 내용에서, 용어 "영역"은 적어도 하나의 확인가능한 구조, 기능 또는 특징을 가지는 표적 핵산의 일부분으로서 정의된다. 표적 핵산의 영역 내에 분절이 있다. "분절"은 표적 핵산 내 영역의 더 작은 또는 하위 부분으로서 정의된다. 본 발명에서 사용된 "위치"는 표적 핵산 내의 위치로서 정의된다.

[0072] 하나의 실시형태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1)의 천연 안티센스 서열에 결합하고, MBTPS1(서열번호 1)의 발현 및/또는 기능을 조절한다. 안티센스 서열의 예는 서열번호

호 2 내지 6을 포함한다.

- [0073] 하나의 실시형태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1) 폴리뉴클레오타이드의 하나 이상의 분절에 결합하고 MBTPS1의 발현 및/또는 기능을 조절한다. 상기 분절은 MBTPS1 센스 또는 안티센스 폴리뉴클레오타이드의 적어도 5개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0074] 하나의 실시형태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 MBTPS1의 천연 안티센스 서열에 특이적이며, 여기에서 MBTPS1의 천연 안티센스 서열에의 올리고뉴클레오타이드의 결합은 MBTPS1의 발현 및/또는 기능을 조절한다.
- [0075] 하나의 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드 화합물은 서열 번호: 3 내지 6에 제시된 서열, 예를 들어 PCR, 혼성화 등을 사용하여 확인되고 확장된 안티센스 서열을 포함한다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드, 더 짧은 또는 더 긴 단편, 변형된 결합 등을 포함할 수 있다. 변형된 결합 또는 뉴클레오타이드간 연결의 예로는 포스포로티오에이트, 포스포로다이트오에이트 등을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 뉴클레오타이드는 인 유도체를 포함한다. 본 발명의 변형된 올리고뉴클레오타이드 내 당 또는 당 유사체 모이어티에 부착될 수 있는 인 유도체(또는 변형된 포스페이트 기)는 모노포스페이트, 다이포스페이트, 트라이포스페이트, 알킬포스페이트, 알칸포스페이트, 포스포로티오에이트 등일 수 있다. 상기 명시된 포스페이트 유사체의 제조 및 뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드 내로의 포함, 그 자체는 또한 알려져 있으며, 여기에서 기술할 필요는 없다.
- [0076] 당업계에 알려진 바와 같이, 번역 개시 코돈은 전형적으로 5'-AUG(전사된 mRNA 분자에서; 상응하는 DNA 분자에서는 5'-ATG)이므로, 번역 개시 코돈은 또한 "AUG 코돈", "시작 코돈" 또는 "AUG 시작 코돈"으로 불린다. 소수의 유전자는 RNA 서열 5'-GUG, 5'-UUG 또는 5'-CUG를 가지는 번역 개시 코돈을 가지며; 그리고 5'-AUA, 5'-ACG 및 5'-CUG는 생체 내에서 기능을 하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 각 경우에 시작 아미노산은 전형적으로 메티오닌(진핵세포의 경우) 또는 포밀메티오닌(원핵생물의 경우)이지만, 용어 "번역 개시 코돈" 및 "시작 코돈"은 많은 코돈 서열들을 포함할 수 있다. 진핵생물 및 원핵생물 유전자는 두 개 이상의 대안적인 시작 코돈을 가질 수 있는데, 이들 중 임의의 하나는 특정 세포 유형 또는 조직에서, 또는 조건의 특정 세트 하에서 번역 개시에 우선적으로 이용될 수 있다. 본 발명의 내용에서, "시작 코돈" 및 "번역 개시 코돈"은 코돈의 서열(들)과 무관하게, 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1)을 암호화하는 유전자로부터 전사된 mRNA의 번역을 생체 내에서 개시하는데 사용되는 코돈 또는 코돈들을 말한다. 유전자의 번역 종료 코돈(또는 "정지 코돈")은 다음 3가지 서열 중 하나를 가질 수 있다: 즉, 5'-UAA, 5'-UAG 및 5'-UGA(상응하는 DNA 서열은 각각 5'-TAA, 5'-TAG 및 5'-TGA임).
- [0077] 용어 "시작 코돈 영역" 및 "번역 개시 코돈 영역"은 번역 개시 코돈으로부터 임의의 방향(즉, 5' 또는 3')으로 약 25개 내지 약 50개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하는 mRNA 또는 유전자의 일부분을 말한다. 유사하게, 용어 "정지 코돈 영역" 및 "번역 종료 코돈 영역"은 번역 종료 코돈으로부터 임의의 방향(즉, 5' 또는 3')으로 약 25개 내지 약 50개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하는 mRNA 또는 유전자의 일부분을 말한다. 결과적으로, "시작 코돈 영역" (또는 "번역 개시 코돈 영역") 및 "정지 코돈 영역" (또는 "번역 종료 코돈 영역")은 본 발명의 안티센스 화합물에 효과적으로 표적화될 수 있는 모든 영역이다.
- [0078] 오픈 리딩 프레임(ORF) 또는 번역 개시 코돈과 번역 종료 코돈 사이의 영역 구역을 말하는 것으로 당업계에 알려진 "코딩 영역"은 또한 효과적으로 표적화될 수 있는 영역이다. 본 발명의 내용 내에서, 표적화된 영역은 유전자의 오픈 리딩 프레임(ORF)의 번역 개시 또는 종료 코돈을 포함하는 유전자내 영역이다.
- [0079] 또 다른 표적 영역은 번역 개시 코돈으로부터 5' 방향으로 mRNA의 일부분을 말하는 것으로 당업계에 알려진 5' 비번역 영역(5'UTR)을 포함하고, 따라서 5' 캡 위치와 mRNA의 번역 개시 코돈 사이의 뉴클레오타이드(또는 유전자에서 상응하는 뉴클레오타이드)를 포함한다. 또 다른 표적 영역은 번역 종료 코돈으로부터 3' 방향으로 mRNA의 일부분을 말하는 것으로 당업계에 알려진 3' 비번역 영역(3'UTR)을 포함하고, 따라서 번역 종료 코돈과 mRNA의 3' 말단 사이의 뉴클레오타이드(또는 유전자에서 상응하는 뉴클레오타이드)를 포함한다. mRNA의 5' 캡 부위는 5'-5' 트라이포스페이트 연결을 통하여 mRNA의 5'-최말단 잔기에 결합된 N7-메틸화된 구아노신 잔기를 포함한다. mRNA의 5' 캡 영역은 5' 캡 구조 자체뿐만 아니라 캡 부위에 인접한 처음 50개 뉴클레오타이드를 포함하는 것으로 간주된다. 본 발명을 위한 또 다른 표적 영역은 5' 캡 영역이다.
- [0080] 일부 진핵 mRNA 전사체는 직접 번역되지만, 많은 진핵 mRNA는 "인트론"이라고 알려진 하나 이상의 영역을 포함하는데, 이는 번역되기 전에 전사체로부터 잘려진다. 나머지(그리고 따라서 번역된) 영역은 "엑손"으로 알려져 있으며, 함께 스플라이싱되어 연속적인 mRNA 서열을 형성한다. 하나의 실시형태에서, 스플라이스 부위, 즉 인

트론-엑손 접합 또는 엑손-인트론 접합 부위를 표적화하는 것은 이상 스플라이싱이 질환과 관련되거나 또는 특정 스플라이스 산물의 과다 생성이 질환과 관련된 상황에서 특히 유용하다. 재배열 또는 결손으로 인한 이상 융합 접합은 표적 부위의 또 다른 실시형태이다. 상이한 유전자 공급원으로부터 두 개(또는 그 이상)의 mRNA의 스플라이싱 공정을 통하여 생성된 mRNA 전사체는 "융합 전사체"로 알려져 있다. 인트론은 예를 들어 DNA 또는 프리-mRNA로 표적화되는 안티센스 화합물을 사용하여 효과적으로 표적화될 수 있다.

- [0081] 하나의 실시형태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 표적 폴리뉴클레오타이드의 암호화 및/또는 비암호화 영역에 결합하고, 표적 분자의 발현 및/또는 기능을 조절한다.
- [0082] 하나의 실시형태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 천연 안티센스 폴리뉴클레오타이드에 결합하고, 표적 분자의 발현 및/또는 기능을 조절한다.
- [0083] 하나의 실시형태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 센스 폴리뉴클레오타이드에 결합하고, 표적 분자의 발현 및/또는 기능을 조절한다.
- [0084] 대안적인 RNA 전사체는 DNA의 동일한 게놈 영역으로부터 생성될 수 있다. 이들 대안적인 전사체는 일반적으로 "변이체"로 알려져 있다. 보다 구체적으로, "프리-mRNA 변이체"는 시작 또는 정지 위치에서 동일한 게놈 DNA로부터 생성된 다른 전사체와 상이하고, 인트론과 엑손 서열을 모두 포함하는 동일한 게놈 DNA로부터 생성되는 전사체이다.
- [0085] 스플라이싱 동안 하나 이상의 엑손 또는 인트론 영역, 또는 이의 일부분을 잘라낼 때, 프리-mRNA 변이체는 더 작은 "mRNA 변이체"를 생성한다. 결과적으로, mRNA 변이체는 프리-mRNA 변이체로 가공되고, 각각의 특유한 프리-mRNA 변이체는 항상 스플라이싱의 결과로서 특유의 mRNA 변이체를 생성하여야 한다. 이러한 mRNA 변이체는 또한 "대안적인 스플라이스 변이체"로서 알려져 있다. 프리-mRNA 변이체의 스플라이싱이 일어나지 않으면, 프리-mRNA 변이체는 mRNA 변이체와 동일하다.
- [0086] 변이체는 전사를 시작 또는 정지하는 대안적인 신호의 사용을 통하여 생성될 수 있다. 프리-mRNA 및 mRNA는 하나 초과와 시작 코돈 또는 정지 코돈을 가질 수 있다. 대안적인 시작 코돈을 사용하는 프리-mRNA 또는 mRNA로부터 기인한 변이체는 프리-mRNA 또는 mRNA의 "대안적인 시작 변이체"로 알려져 있다. 대안적인 정지 코돈을 사용하는 프리-mRNA 또는 mRNA로부터 기인한 변이체는 프리-mRNA 또는 mRNA의 "대안적인 정지 변이체"로 알려져 있다. 대안적인 정지 변이체의 한 가지 특정 유형은, 생성된 다양한 전사체는 전사 기구에 의한 "polyA 정지 신호" 중 하나의 대안적인 선택으로 생성되고, 이에 의하여 특유의 polyA 부위에서 종료하는 전사체를 생성하는 "polyA 변이체"이다. 본 발명의 내용 내에서, 본 명세서에 기술된 변이체의 유형은 또한 표적 핵산의 실시형태이다.
- [0087] 안티센스 화합물이 혼성화하는 표적 핵산 상의 위치는 활성 안티센스 화합물이 표적화되는 표적 영역의 적어도 5개 길이의 뉴클레오타이드 일부분으로 정의된다.
- [0088] 특정 예시적인 표적 분절의 특이적 서열이 본 명세서에 제시되어 있지만, 당업자는 상기 분절이 본 발명의 범주 내에서 특정 실시형태를 설명하고 기술하는데 도움이 되는 것을 인지할 것이다. 추가적인 표적 분절은 본 개시 내용을 고려하여 당업자에 의해 용이하게 확인될 수 있다.
- [0089] 설명된 바람직한 표적 분절 내로부터 선택된 적어도 5개의 연속적인 뉴클레오타이드의 스트레치를 포함한 길이가 5~100개 뉴클레오타이드인 표적 분절은 또한 표적화에 적합한 것으로 간주된다.
- [0090] 표적 분절은 설명된 바람직한 표적 분절 중 하나의 5'-말단으로부터 최소한 5개 연속적인 뉴클레오타이드(나머지 뉴클레오타이드는 표적 분절의 5'-말단의 바로 상류에서 시작하고, DNA 또는 RNA가 약 5개 내지 약 100개 뉴클레오타이드를 포함할 때까지 연속되는 동일한 DNA 또는 RNA의 연속 스트레치이다)를 포함하는 DNA 또는 RNA 서열을 포함할 수 있다. 유사하게, 바람직한 표적 분절은 설명된 바람직한 표적 분절 중 하나의 3'-말단으로부터 최소한 5개 연속적인 뉴클레오타이드(나머지 뉴클레오타이드는 표적 분절의 3'-말단의 바로 하류에서 시작하고, DNA 또는 RNA가 약 5개 내지 약 100개 뉴클레오타이드를 포함할 때까지 연속되는 동일한 DNA 또는 RNA의 연속 스트레치이다)를 포함하는 DNA 또는 RNA 서열로 나타내어진다. 본 명세서에 설명된 표적 분절을 갖춘 당업자는 과도한 실험없이 추가적으로 바람직한 표적 분절을 확인할 수 있을 것이다.
- [0091] 일단 하나 이상의 표적 영역, 분절 또는 위치가 확인되었다면, 표적에 충분히 상보적인, 즉 충분히 잘 혼성화하고 충분한 특이성을 가지는 안티센스 화합물이 원하는 효과를 제공하도록 선택된다.
- [0092] 본 발명의 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 특정 표적의 안티센스 가닥에 결합한다. 올리고뉴클레오타이

드는 길이가 적어도 5개의 뉴클레오타이드이며, 표적 폴리뉴클레오타이드의 전체 길이를 포함하게 합성되도록, 서열들을 중첩하는 각각의 올리고뉴클레오타이드 표적이 합성될 수 있다. 표적은 또한 암호화 영역뿐만 아니라 비암호화 영역을 포함한다.

[0093] 하나의 실시형태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의해 특정 핵산을 표적화하는 것이 바람직하다. 특정 핵산에 안티센스 화합물을 표적화하는 것은 다단계 공정이다. 상기 공정은 보통 기능이 조절되는 핵산 서열의 확인으로 시작된다. 이는 예를 들어 유전자의 발현이 특정 장애 또는 질환 상태와 연관된 세포 유전자(또는 상기 유전자로부터 전사된 mRNA), 또는 예를 들어 비암호화 RNA(ncRNA)와 같은 비암호화 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

[0094] RNA는 (1) 단백질로 번역되는 메신저 RNA(mRNA), 및 (2) 단백질-비암호화 RNA(ncRNA)로 분류될 수 있다. ncRNA는 마이크로RNA, 안티센스 전사체 및 고밀도의 정지 코돈을 포함하며, 임의의 광범위한 “오픈 리딩 프레임”이 부족한 다른 전사 단위(TU)를 포함한다. 많은 ncRNA는 단백질-암호화 좌의 3' 비번역 영역(3'UTRs)에서 개시 위치로부터 시작하는 것으로 보인다. ncRNA는 아주 드물고, FANTOM 컨소시엄에 의해 서열화된 ncRNA의 적어도 절반은 폴리아데닐화되지 않는 것으로 보인다. 대부분의 조사자는 분명한 이유로 가공되고, 세포질로 배출된 폴리아데닐화된 mRNA에 초점을 맞추고 있다. 최근, 비폴리아데닐화된 핵 RNA 세트는 매우 크고, 많은 이러한 전사체는 소위 유전자간(intergenic) 영역에서 생성된다. ncRNA가 유전자 발현을 조절할 수 있는 기전은 표적 전사체와의 염기쌍형성에 의한 것이다. 염기쌍형성에 의해 기능하는 RNA는 (1) 동일한 유전적 위치에서, 그러나 이들이 작용하는 RNA에 대한 반대 가닥상에서 암호화되어, 이들 표적에 대해 완벽한 상보성을 나타내는 cis-암호화된 RNA, 및 (2) 이들이 작용하는 RNA와는 별개의 염색체 위치에서 암호화되며, 일반적으로 표적과 완벽한 염기쌍형성을 나타내지 않는 trans-암호화된 RNA로 분류될 수 있다.

[0095] 이론에 구속되는 것을 원하지 않지만, 본 명세서에서 기술되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 안티센스 폴리뉴클레오타이드의 혼란은 상응하는 센스 메신저 RNA의 발현을 변경시킬 수 있다. 그러나, 이러한 조절은 부조화적(discordant)(안티센스 녹다운은 메신저 RNA의 상승을 가져옴) 또는 조화적(concordant)(안티센스 녹다운은 수반되는 메신저 RNA의 감소를 가져옴)이다. 이러한 경우에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 전사체의 중첩 또는 비중첩 부분으로 표적화되어, 표적의 녹다운 또는 격리를 초래할 수 있다. 암호화 안티센스 뿐만 아니라 비암호화 안티센스는 동일한 방식으로 표적화될 수 있으며, 어느 하나의 카테고리는 조화적 또는 비조화적 방식으로 상응하는 센스 전사체를 조절할 수 있다. 표적에 대한 사용을 위한 새로운 올리고뉴클레오타이드를 확인하는데 이용되는 전략은 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 안티센스 RNA 전사체의 녹다운 또는 원하는 표적을 조절하는 임의의 다른 수단에 기반할 수 있다.

[0096] 전략 1: 부조화적 조절의 경우, 안티센스 전사체의 녹다운은 통상적인 (센스) 유전자의 발현을 상승시킨다. 후자 유전자가 공지의 또는 가상 약물 표적에 대하여 암호화한다면, 이의 안티센스 반대편의 녹다운은 수용체 항진 또는 효소 자극물질의 작용을 의식적으로 모방할 수 있다.

[0097] 전략 2: 조화적 조절의 경우, 안티센스 및 센스 전사체 모두 동시에 녹다운시킬 수 있어, 통상적인 (센스) 유전자 발현의 상승적 감소를 얻을 수 있다. 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 녹다운을 얻는데 사용된다면, 이러한 전략을 사용하여 센스 전사체를 표적화하는 하나의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 그리고 상응하는 안티센스 전사체에 대한 또 다른 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 또는 중첩 센스 및 안티센스 중첩체를 동시에 표적화하는 단일의 강력하게 대칭적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 적용할 수 있다.

[0098] 본 발명에 따르면, 안티센스 화합물은 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, 외부 가이드 서열(EGS) 올리고뉴클레오타이드, siRNA 화합물, 단일-가닥 또는 이중-가닥 RNA 간섭(RNAi) 화합물, 예를 들어 siRNA 화합물, 및 표적 핵산의 적어도 일부분에 혼성화하고 표적 핵산의 기능을 조절하는 기타 올리고머 화합물을 포함한다. 이와 같이, 안티센스 화합물은 DNA, RNA, DNA-유사, RNA-유사, 또는 이의 혼합물일 수 있거나, 또는 이들 중 하나 이상의 모방체일 수 있다. 이들 화합물은 단일-가닥, 이중-가닥, 원형 또는 헤어핀 올리고머 화합물일 수 있으며, 그리고, 내부에 또는 말단이 벌지(bulge), 미스매치 또는 루프와 같은 구조적 요소를 포함할 수 있다. 안티센스 화합물은 통상적으로 선형으로 제조될 수 있지만, 원형 및/또는 분지형으로 결합되거나 또는 제조될 수 있다. 안티센스 화합물은, 예를 들어 전체적 또는 부분적 이중-가닥 화합물 또는 전체적 또는 부분적 이중-가닥 화합물의 형성 및 혼성화를 허용하기에 충분한 자가 상보성을 가지는 단일 가닥 화합물을 형성하기 위해 혼성화된 2개 가닥과 같은 구조체를 포함할 수 있다. 상기 2개 가닥은 자유 3' 또는 5' 말단을 남기고 내부적으로 연결될 수 있거나 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 화합

물은 선택적으로 양단에 오버행을 포함할 수 있다. 추가 변형은 말단, 선택된 뉴클레오타이드 위치, 당 위치 중 하나에 부착된, 또는 뉴클레오타이드간 연결 중 하나에 부착된 컨주게이트 기를 포함할 수 있다. 대안적으로, 2개 가닥은 비핵산 모이어티 또는 링커 기를 통하여 연결될 수 있다. 1개 가닥으로부터만 형성된 경우, dsRNA는 듀플렉스를 형성하기 위하여 자체에 둘로 접히는 자가-상보적 헤어핀 유형 분자의 형태를 취할 수 있다. 따라서, dsRNA는 완전히 또는 부분적으로 이중 가닥일 수 있다. 유전자 발현의 특이적 조절은 유전자이식 세포주에서 dsRNA 헤어핀의 안정적 발현에 의해 이루어질 수 있지만, 그러나 일부 실시형태에서, 유전자 발현 또는 기능은 상향 조절된다. 2개 가닥으로부터 형성될 때, 또는 듀플렉스를 형성하기 위하여 자체에 둘로 접히는 자가-상보적 헤어핀 유형 분자의 형태를 취하는 단일 가닥의 경우, 2개 가닥(또는 단일 가닥의 듀플렉스 형성 영역)은 Watson-Crick 방식으로 염기쌍을 이루는 상보적 RNA 가닥이다.

[0099] 일단 시스템 내로 도입되면, 본 발명의 화합물은 표적 핵산의 절단 또는 다른 변형을 이루기 위하여 하나 이상의 효소 또는 구조적 단백질의 작용을 유도하거나 또는 점유-기반 기전(occupancy-based mechanisms)을 통하여 작용할 수 있다. 일반적으로, 핵산(올리고뉴클레오타이드를 포함)은 "DNA-유사"(즉, 하나 이상의 2'-데옥시 당을 가지고, 그리고 일반적으로 U 염기 대신 T를 가짐) 또는 "RNA-유사"(즉, 하나 이상의 2'-하이드록시 또는 2'-변형된 당을 가지고, 그리고 일반적으로 T 염기 대신 U를 가짐)로 설명될 수 있다. 핵산 나선은 한 가지 초과 구조 유형, 가장 일반적으로는 A-형 및 B-형을 채택할 수 있다. 일반적으로, B-형-유사 구조를 가지는 올리고뉴클레오타이드는 "DNA-유사"이며, A-형-유사 구조를 가지는 올리고뉴클레오타이드는 "RNA-유사"이다. 일부(키메라) 실시형태에서, 안티센스 화합물은 A-형 및 B-형 영역을 모두 포함할 수 있다.

[0100] 하나의 실시형태에서, 바람직한 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 화합물은 안티센스 RNA, 안티센스 DNA, 키메라 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 변형된 연결을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 간섭 RNA(RNAi), 짧은 간섭 RNA(siRNA); 마이크로 간섭 RNA(miRNA); 소형 일시적 RNA(stRNA); 또는 짧은 헤어핀 RNA(shRNA); 작은 RNA-유도된 유전자 활성화(RNAa); 작은 활성화 RNA(saRNA), 또는 이의 조합 중 적어도 하나를 포함한다.

[0101] dsRNA는 또한 "작은 RNA-유도된 유전자 활성화" 또는 RNAa로 불리는 기전인 유전자 발현을 활성화시킬 수 있다. dsRNA 표적화 유전자 프로모터는 연관된 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.

[0102] 작은 이중-가닥 RNA(dsRNA), 예를 들어 짧은 간섭 RNA(siRNA) 및 마이크로RNA(miRNA)는 RNA 간섭(RNAi)으로 알려진 진화적으로 보존된 기전의 촉발자인 것으로 밝혀졌다. RNAi는 리모델링 크로마틴을 통하여 유전자 침묵을 일관되게 유도하여, 전사를 억제하고, 상보적 mRNA를 분해하거나 또는 단백질 번역을 차단한다. 그러나, 하기 실시예 부분에서 상세하게 기술된 경우에서, 올리고뉴클레오타이드는 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1) 폴리뉴클레오타이드 및 이의 암호화된 산물의 발현 및/또는 기능을 증가시키는 것으로 보인다. dsRNA는 또한 작은 활성화된 RNA(saRNA)로서 작용할 수 있다. 이론에 구속되는 것을 원하지 않지만, 유전자 프로모터에서 서열들을 표적화함으로써, saRNA는 dsRNA-유도된 전사 활성화(RNAa)로 불리는 현상에서 표적 유전자 발현을 유도할 수 있다.

[0103] 추가 실시형태에서, 본 명세서에서 확인된 "바람직한 표적 분절"은 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1) 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하는 추가적인 화합물에 대하여 스크리닝하는데 이용될 수 있다. "조절인자(modulator)"는 MBTPS1을 암호화하는 핵산 분자의 발현을 감소 또는 증가시키며, 바람직한 표적 분절에 상보적인 적어도 5개-뉴클레오타이드 부분을 포함하는 화합물이다. 상기 스크리닝 방법은 MBTPS1의 센스 또는 천연 안티센스 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 핵산 분자의 바람직한 표적 분절을 하나 이상의 후보 조절인자와 접촉시키는 단계, 및 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 서열번호 3 내지 6을 암호화하는 핵산 분자의 발현을 감소 또는 증가시키는 하나 이상의 후보 조절인자를 선택하는 단계를 포함한다. 일단 상기 후보 조절인자 또는 조절인자들이 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 핵산 분자의 발현을 조절(예컨대 감소 또는 증가)할 수 있는 것으로 나타나면, 그 다음 상기 조절인자는 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드의 기능의 추가적인 조사 연구에서, 또는 본 발명에 따른 연구, 진단, 또는 치료 제제로서의 용도로 이용될 수 있다.

[0104] 상기 천연 안티센스 서열의 표적화는 바람직하게 표적 유전자의 기능을 조절한다. 예를 들어, MBTPS1 유전자(기탁번호 NM_003791). 하나의 실시형태에서, 표적은 MBTPS1 유전자의 안티센스 폴리뉴클레오타이드이다. 하나의 실시형태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드(예컨대, 기탁번호 NM_003791)의 센스 및/또는 천연 안티센스 서열, 이에 대한 변이체, 대립유전자, 이소형태, 상동체, 돌연변이체, 유도체, 단편

및 상보적인 서열을 표적화한다. 바람직하게 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 분자이며, 상기 표적은 안티센스 및/또는 센스 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드의 암호화 영역 및 비암호화 영역을 포함한다.

- [0105] 본 발명의 바람직한 표적 분절은 본 발명의 각각의 상보적 안티센스 화합물과 조합되어 안정화된 이중-가닥(듀플렉스화) 올리고뉴클레오타이드를 형성할 수도 있다.
- [0106] 이러한 이중 가닥의 올리고뉴클레오타이드 모이어티는 당업계에서 표적 발현을 조절하고, 번역 및 안티센스 기전을 통한 RNA 가공을 조절하는 것으로 나타났다. 게다가, 이중-가닥 모이어티는 화학적 변형을 거칠 수 있다. 예를 들어, 이와 같은 이중-가닥 모이어티는 표적에 대한 듀플렉스의 안티센스 가닥의 고유한 혼성화에 의해 표적을 저해하여, 표적의 효소적 분해를 촉발시키는 것으로 나타났다.
- [0107] 하나의 실시형태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1) 폴리뉴클레오타이드(예컨대, 기탁번호 NM_003791), 이에 대한 변이체, 대립유전자, 이소형태, 상동체, 돌연변이체, 유도체, 단편 및 상보적 서열을 표적화한다. 바람직하게 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 분자다.
- [0108] 본 발명의 실시형태에 따르면, 표적 핵산 분자는 MBTPS1에만 한정되지 않으며, MBTPS1 분자의 이소형태, 수용체, 상동체 등 중 임의의 것으로 확장된다.
- [0109] 하나의 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드의 천연 안티센스 서열, 예를 들어 서열번호 2에 제시된 폴리뉴클레오타이드 및 이에 대한 임의의 변이체, 대립유전자, 상동체, 돌연변이체, 유도체, 단편 및 상보적 서열을 표적화한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 예는 서열번호 3 내지 6에 제시되어 있다.
- [0110] 하나의 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는, 이에 한정되지 않지만 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드와 연관된 비암호화 센스 및/또는 안티센스 서열을 포함한, MBTPS1 안티센스의 핵산 서열과 상보적이거나 또는 MBTPS1 안티센스의 핵산 서열에 결합하고, MBTPS1 분자의 발현 및/또는 기능을 조절한다.
- [0111] 하나의 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 2에 제시된 MBTPS1 천연 안티센스의 핵산 서열과 상보적이거나 또는 상기 MBTPS1 천연 안티센스의 핵산 서열에 결합하고, MBTPS1 분자의 발현 및/또는 기능을 조절한다.
- [0112] 하나의 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 3 내지 6의 적어도 5개의 연속적인 뉴클레오타이드의 서열을 포함하고 MBTPS1 분자의 발현 및/또는 기능을 조절한다.
- [0113] 상기 폴리뉴클레오타이드 표적은 MBTPS1의 패밀리 구성요소를 포함한 MBTPS1, MBTPS1의 변이체; SNP를 포함한 MBTPS1의 돌연변이체; MBTPS1의 비암호화 서열; MBTPS1의 대립유전자; 중 변이체, 단편 등을 포함한다. 바람직하게 상기 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 분자이다.
- [0114] 하나의 실시형태에서, MBTPS1를 표적화하는 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 RNA, 간섭 RNA(RNAi), 짧은 간섭 RNA(siRNA); 마이크로 간섭 RNA(miRNA); 소형 일시적 RNA(stRNA); 또는 짧은 헤어핀 RNA(shRNA); 작은 RNA-유도된 유전자 활성화(RNAa); 또는, 작은 활성화 RNA(saRNA)를 포함한다.
- [0115] 하나의 실시형태에서, 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1) 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 서열번호 2의 표적화는 이들 표적의 발현 또는 기능을 조절한다. 하나의 실시형태에서, 발현 또는 기능은 대조군과 비교하여 상향 조절된다. 하나의 실시형태에서, 발현 또는 기능은 대조군과 비교하여 하향 조절된다.
- [0116] 하나의 실시형태에서, 안티센스 화합물은 서열번호 3 내지 6에 제시된 서열을 포함한다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드, 더 짧은 또는 더 긴 단편, 변형된 결합 등을 포함할 수 있다.
- [0117] 하나의 실시형태에서, 서열번호 3 내지 6은 하나 이상의 LNA 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0118] 원하는 표적 핵산의 조절은 당업계에 공지된 여러 가지 방식으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA 등. 효소적 핵산 분자(예컨대, 리보자임)는, 뉴클레오타이드 염기 서열-특이적 방식으로 다른 별도의 핵산 분자를 반복적으로 절단하는 능력을 포함하여 하나 이상의 다양한 반응을 촉매할 수 있는 핵산 분자이다. 이러한 효소적 핵산 분자는 예를 들어 임의의 RNA 전사체를 실질적으로 표적화하는데 사용될 수 있다.
- [0119] 이들의 서열-특이성 때문에, trans-절단 효소적 핵산 분자는 사람 질환에 대한 치료제로서 가능성을 보여준다 (Usman & McSwiggen, (1995) Ann. Rep. Med. Chem. 30, 285-294; Christoffersen and Marr, (1995) J. Med.

Chem. 38, 2023-2037). 효소적 핵산 분자는 세포성 RNA의 배경 내에 특이적 RNA 표적을 절단하도록 고안될 수 있다. 이러한 절단 사건은 mRNA 비-기능성을 제공하며, 이 RNA로부터 단백질 발현을 폐기시킨다. 이러한 방식으로, 질환 상태와 연관된 단백질의 합성이 선택적으로 억제될 수 있다.

- [0120] 일반적으로, RNA 절단 활성이 있는 효소적 핵산은 먼저 표적 RNA에 결합함으로써 작용한다. 이러한 결합은 표적 RNA를 절단하도록 작용하는 분자의 효소적 부분에 근접하게 있는 효소적 핵산의 표적 결합 부분을 통하여 일어난다. 따라서, 효소적 핵산은 상보적 염기쌍형성을 통하여 표적 RNA를 먼저 인지하고, 그 다음 이에 결합하며, 그리고 일단 정확한 부위에 결합되면, 효소적으로 작용하여 표적 RNA를 절단한다. 이러한 표적 RNA의 전략적 절단은 암호화된 단백질의 합성을 지시하는 능력을 파괴할 것이다. 효소적 핵산은 이의 RNA 표적에 결합하여 이를 절단시킨 후, RNA로부터 방출되어 또 다른 표적을 찾고, 새로운 표적에 반복적으로 결합하며, 이를 절단할 수 있다.
- [0121] 시험관 내 선택(발달) 선택(Orgel, (1979) Proc. R. Soc. London, B 205, 435)과 같은 여러 가지 접근법이 사용되어 절단 및 포스포다이에스터 연결 및 아마이드 연결의 결합과 같은 다양한 반응을 촉매할 수 있는 새로운 핵산 촉매를 개발하였다.
- [0122] 촉매 활성에 최적인 리보자임의 개발은 유전자 발현을 조절하기 위한 목적으로 RNA-절단 리보자임을 이용하는 임의의 전략에 상당히 기여할 것이다. 해머헤드 리보자임은, 예를 들어 Mg^{2+} 보조인자의 포화농도(10mM) 존재시 약 1분-1의 촉매속도(kcat)로 기능을 한다. 인위적인 "RNA 리가아제" 리보자임은 약 100분-1의 속도로 상응하는 자가-변형 반응을 촉매하는 것으로 나타났다. 추가적으로, DNA로 구성된 기질 결합 팔(arm)을 가지고 있는 특정 변형된 해머헤드 리보자임은 100분-1에 근접한 다중 턴-오버 속도로 RNA 절단을 촉매한다. 최종적으로, 특정 뉴클레오타이드 유사체를 가진 해머헤드의 촉매 코어 내에 특이적 잔기의 대체는 촉매 속도에서 10배만큼의 개선을 보이는 변형된 리보자임을 제공한다. 이러한 결과는 리보자임이 대부분의 천연 자가-절단 리보자임에 의해 시험관 내에서 보여주는 것보다 상당히 큰 촉매 속도로 화학적 변형을 촉진시킬 수 있음을 입증한다. 그 다음 특정 자가-절단 리보자임의 구조를 최적화시켜 최대 촉매 활성을 제공할 수 있거나, 또는 전체적으로 RNA 포스포다이에스터 절단에 대해 상당히 더 빠른 속도를 보여주는 새로운 RNA 모티프를 만들 수 있는 것이 가능하다.
- [0123] "해머헤드" 모델을 적용한 RNA 촉매에 의한 RNA 기질의 분자내 절단은 1987년에 처음 알려졌다(Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600). 상기 RNA 촉매가 회수되었고, 다중 RNA 분자들과 반응되었는데, 이는 상기 RNA 촉매가 진정한 촉매임을 입증한다.
- [0124] "해머머리" 모티프를 기반으로 고안된 촉매적 RNA를 사용하여 표적 서열들과 필수적인 염기쌍형성을 유지하기 위하여 촉매 RNA 내에 적절한 염기 변화를 만들으로써 특이적 표적 서열을 절단하였다. 이것은 특이적 표적 서열을 절단하기 위하여 촉매 RNA의 사용을 가능하게 하며, 그리고 "해머헤드" 모델에 따라 고안된 촉매 RNA는 생체 내에서 특이적 기질 RNA를 절단할 수 있음이 가능함을 나타낸다.
- [0125] RNA 간섭(RNAi)은 포유동물 및 포유동물 세포에서 유전자 발현을 조절하는 강력한 도구가 되었다. 이러한 접근법은 발현 플라스미드 또는 바이러스 및 siRNA로 가공되는 작은 헤어핀 RNA에 대한 암호 서열을 사용하여 RNA 자체로서 또는 DNA로서 짧은 간섭 RNA(siRNA)의 운반을 필요로 한다. 이 시스템은 프리-siRNA를 세포질로 효과적으로 운반할 수 있는데, 세포질에서 이들 RNA는 활성적이며, 유전자 발현을 위하여 조절된 그리고 조직 특이적인 프로모터의 사용을 허용한다.
- [0126] 하나의 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 화합물은 리보핵산(RNA) 및/또는 데옥시리보핵산(DNA)의 올리고머 또는 폴리머, 또는 이의 모방체, 키메라, 유사체 또는 상동체를 포함한다. 이 용어는 자연적으로 생성된 뉴클레오타이드, 당 및 공유적 뉴클레오타이드간 (기본골격) 연결로 구성된 올리고뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 유사하게 기능을 하는 비자연적으로 생성되는 부분들을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 이와 같은 변형된 또는 치환된 올리고뉴클레오타이드는 종종 예를 들어 강화된 세포의 취입, 표적 핵산에 대해 향상된 친화력 그리고 뉴클레아제 존재시 증가된 안정성과 같은 바람직한 특성들 때문에 고유 형태를 능가하는 것이 종종 요구된다.
- [0127] 본 발명에 따르면, 올리고뉴클레오타이드 또는 "안티센스 화합물"은 안티센스 올리고뉴클레오타이드(즉, RNA, DNA, 이의 모방체, 키메라, 유사체 또는 상동체), 리보자임, 외부 가이드 서열(EGS) 올리고뉴클레오타이드, siRNA 화합물, 단일-가닥 또는 이중-가닥 RNA 간섭(RNAi) 화합물 예를 들어 siRNA 화합물, saRNA, aRNA, 및 표적 핵산의 적어도 일부분과 혼성화하고 표적 핵산의 기능을 조절하는 기타 올리고머 화합물을 포함한다. 이와 같이, 올리고뉴클레오타이드 또는 "안티센스 화합물"은 DNA, RNA, DNA-유사, RNA-유사, 또는 이의 혼합물들일

수 있거나, 또는 이들 중 하나 이상의 모방체일 수 있다. 이들 화합물들은 단일-가닥, 이중-가닥, 원형 또는 헤어핀 올리고머 화합물일 수 있으며, 그리고 내부 또는 말단 벌지(bulge), 미스매치 또는 루프와 같은 구조적 요소를 포함할 수 있다. 안티센스 화합물은 통상적으로 선형으로 제조될 수 있지만, 원형 및/또는 분지형이 되도록 결합되거나 또는 다르게 제조될 수 있다. 안티센스 화합물은, 예를 들어 전체적 또는 부분적 이중-가닥 화합물 또는 전체적 또는 부분적 이중-가닥 화합물의 형성 및 혼성화를 허용하기에 충분한 자가 상보성이 있는 단일 가닥을 형성하기 위해 혼성화된 2개 가닥과 같은 구조체를 포함할 수 있다. 상기 2개 가닥은 자유 3' 또는 5' 말단을 남기고 내부적으로 연결될 수 있거나 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 뉴클레오타이드 위치, 당 위치 중 하나에 부착된, 또는 뉴클레오타이드간 연결 중 하나에 부착된 컨쥬게이트 군을 포함할 수 있다. 대안적으로, 2개 가닥은 비핵산 모이어티 또는 링커 기를 통하여 연결될 수 있다. 1개 가닥으로부터만 형성된 경우, dsRNA는 듀플렉스를 형성하기 위하여 자체에 둘로 접히는 자가-상보적 헤어핀 유형 분자의 형태를 취할 수 있다. 따라서, dsRNA는 완전히 또는 부분적으로 이중 가닥일 수 있다. 유전자 발현의 특이적 조절은 유전자인식 세포주에서 dsRNA 헤어핀의 안정적 발현에 의해 이루어질 수 있다. 2개 가닥으로부터 형성될 때, 또는 듀플렉스를 형성하기 위하여 자체에 둘로 접히는 자가-상보적 헤어핀 유형 분자의 형태를 취하는 단일 가닥의 경우, 2개 가닥(또는 단일 가닥의 듀플렉스 형성 영역)은 Watson-Crick 방식으로 염기쌍을 이루는 상보적 RNA 가닥이다.

[0128] 일단 시스템 내로 도입되면, 본 발명의 화합물은 표적 핵산의 절단 또는 다른 변형을 이루기 위하여 하나 이상의 효소 또는 구조적 단백질의 작용을 유도하거나 또는 점유-기반 기전(occupancy-based mechanisms)을 통하여 작용할 수 있다. 일반적으로, 핵산(올리고뉴클레오타이드를 포함)은 "DNA-유사"(즉, 하나 이상의 2'-데옥시 당을 가지고, 그리고 일반적으로 U 염기 대신 T를 가짐) 또는 "RNA-유사"(즉, 하나 이상의 2'-하이드록시 또는 2'-변형된 당을 가지고, 그리고 일반적으로 T 염기 대신 U를 가짐)로 설명될 수 있다. 핵산 나선은 한 가지 초과 구조 유형, 가장 일반적으로는 A-형 및 B-형을 채택할 수 있다. 일반적으로, B-형-유사 구조를 가지는 올리고뉴클레오타이드는 "DNA-유사"이며, A-형-유사 구조를 가지는 올리고뉴클레오타이드는 "RNA-유사"이다. 일부 (키메라) 실시형태에서, 안티센스 화합물은 A-형 및 B-형 영역을 모두 포함할 수 있다.

[0129] 본 발명에 따른 안티센스 화합물은 길이가 약 5개 내지 약 80개의 뉴클레오타이드(즉, 약 5개 내지 약 80개의 연결된 뉴클레오사이드)의 안티센스 부분을 포함할 수 있다. 이는 안티센스 가닥 또는 안티센스 화합물의 일부분의 길이를 말한다. 다시 말하면, 본 발명의 단일-가닥 안티센스 화합물은 약 5개 내지 약 80개의 뉴클레오타이드를 포함하며, 본 발명의 이중-가닥 안티센스 화합물(예를 들어, dsRNA)은 길이가 5개 내지 약 80개의 뉴클레오타이드로 된 센스 및 안티센스 가닥 또는 일부분을 포함한다. 이는 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 80개의 뉴클레오타이드 또는 이 범위 내 임의의 범위의 안티센스 부분을 포함한다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0130] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 안티센스 화합물은 길이가 10개 내지 50개의 뉴클레오타이드의 안티센스 부분을 가진다. 이는 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, 또는 50개의 뉴클레오타이드, 또는 이 범위 내 임의의 범위의 안티센스 부분을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 구체화한다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 길이가 15개의 뉴클레오타이드이다.

[0131] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 안티센스 또는 올리고뉴클레오타이드 화합물은 길이가 12개 또는 13개 내지 30개 뉴클레오타이드의 안티센스 부분을 가진다. 이는 길이가 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개의 뉴클레오타이드, 또는 이 범위 내 임의의 범위의 안티센스 부분을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 구체화한다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0132] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 올리고머 화합물은 또한 상이한 염기가 화합물 내 하나 이상의 뉴클레오타이드 위치에 존재하는 변이체를 포함한다. 예를 들어, 제1 뉴클레오타이드가 아데노신이면, 이 위치에서 티미딘, 구아노신 또는 시티딘을 포함하는 변이체가 생성될 수 있다. 이는 안티센스 또는 dsRNA 화합물의 임의의 위치에서

일어날 수 있다. 그 다음 이들 화합물은 본 명세서에 기술된 방법을 사용하여 테스트되어 표적 핵산의 발현을 억제하는 능력을 결정한다.

- [0133] 일부 실시형태에서, 안티센스 화합물과 표적 사이의 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 40% 내지 약 60%이다. 일부 실시형태에서, 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 60% 내지 약 70%이다. 일부 실시형태에서, 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 70% 내지 약 80%이다. 일부 실시형태에서, 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 약 80% 내지 약 90%이다. 일부 실시형태에서, 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.
- [0134] 하나의 실시형태에서, 예를 들어 서열번호 2 내지 6에 제시된 핵산 분자와 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 치환 또는 변형을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 뉴클레오타이드는 잠금 핵산(LNA)으로 치환된다.
- [0135] 하나의 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 MBTPS1 및 서열번호 1 및 2에 제시된 서열과 연관된 암호화 및/또는 비암호화 서열의 핵산 분자 센스 및/또는 안티센스의 하나 이상의 영역을 표적화한다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 또한 서열번호 1 및 2의 중첩 영역에 대하여 표적화된다.
- [0136] 본 발명의 특정 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 키메라 올리고뉴클레오타이드이다. 본 발명의 내용에서 "키메라 올리고뉴클레오타이드" 또는 "키메라"는 2개 이상의 화학적으로 별개의 영역을 포함하고, 각각 적어도 하나의 뉴클레오타이드로 구성되는 올리고뉴클레오타이드이다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 하나 이상의 유익한 특성(예를 들어, 증가된 뉴클레아제 저항성, 세포 내로의 증가된 취입, 표적에 대한 증가된 결합 친화력)을 부여하는 변형된 뉴클레오타이드의 적어도 하나의 영역과 RNA:DNA 또는 RNA:RNA 혼성체를 절단할 수 있는 효소에 대한 기질인 영역을 포함한다. 예로써, RNase H는 RNA:DNA 듀플렉스의 RNA 가닥을 절단하는 세포성 엔도뉴클레아제이다. 따라서, RNase H의 활성화는 RNA 표적을 절단하게 되고, 이에 의하여 유전자 발현의 안티센스 조절의 효율을 상당히 향상시킨다. 결과적으로, 동일한 표적 영역으로 혼성화하는 포스포로티오에이트 테옥시올리고뉴클레오타이드와 비교하여, 키메라 올리고뉴클레오타이드가 사용될 때, 더 짧은 올리고뉴클레오타이드로 유사한 결과가 얻어질 수 있다. RNA 표적의 절단은 통상적으로 겔 전기영동에 의해, 필요하다면 당업계에 공지된 핵산 혼성화 기술과 연관된 기술에 의해 통상적으로 탐지될 수 있다. 하나의 구체예에서, 키메라 올리고뉴클레오타이드는 표적 결합 친화력을 증가시키도록 변형된 적어도 하나의 영역, 및 일반적으로 RNase H에 대하여 기질로서 작용하는 영역을 포함한다. 이의 표적(이 경우, ras를 암호화하는 핵산)에 대한 올리고뉴클레오타이드의 친화력은 올리고뉴클레오타이드/표적 쌍의 Tm을 측정함으로써 통상적으로 결정되는데, 이것은 올리고뉴클레오타이드와 표적이 분리되는 온도이며; 해리는 분광광도계에 의해 검출된다. Tm이 더 높을수록 표적에 대한 올리고뉴클레오타이드의 친화력은 더 커진다.
- [0137] 본 발명의 키메라 안티센스 화합물은 상기에서 기술된 바와 같이 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드, 변형된 올리고뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드 및/또는 올리고뉴클레오타이드 모방체의 복합 구조로서 형성될 수 있다. 이러한 화합물은 또한 당업계에서 혼성체(hybrid) 또는 갭머(gapmer)로 불린다. 이러한 혼성체 구조의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 이에 한정되지는 않지만, 미국 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 5,700,922호를 포함하며, 이의 각각은 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0138] 하나의 실시형태에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드의 영역은 당의 2' 위치에서 변형된 적어도 하나의 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 2'-O-알킬, 2'-O-알킬-O-알킬 또는 2'-플루오로-변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 하나의 실시형태에서, RNA 변형은 피리미딘의 리보오스, 염기가 소실된 잔기(abasic residue) 또는 RNA의 3' 말단에서 역전된 염기상에 2'-플루오로, 2'-아미노 및 2' O-메틸 변형을 포함한다. 이러한 변형은 올리고뉴클레오타이드에 통상적으로 포함되며, 그리고 이들 올리고뉴클레오타이드는 주어진 표적에 대해 2'-데옥시올리고뉴클레오타이드보다 더 높은 Tm(즉, 더 높은 표적 결합 친화력)을 가지는 것으로 나타났다. 이러한 증가된 친화력의 효과는 유전자 발현의 RNAi 올리고뉴클레오타이드 억제를 상당히 향상시키는 것이다. RNase H는 RNA:DNA 듀플렉스의 RNA 가닥을 절단하는 세포성 엔도뉴클레아제이며; 따라서, 이 효소의 활성화로 RNA 표적을 절단시키고, 그리고 따라서 RNAi 억제의 효과를 크게 향상시킬 수 있다. RNA 표적의 절단은 통상적으로 겔 전기영동에 의해 입증될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 키메라 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레아제 저항성을 향상시키기 위하여 변형된다. 세포는 핵산을 분해시킬 수 있는 다양한 엑소-뉴클레아제 및 엔도-뉴클레아제를 포함한다. 다수의 뉴클레오타이드 및 뉴클레오사이드 변형은 변형이 포함된 올리고뉴클레오타이드를 고유한 올리고데옥시뉴클레오타이드보다 뉴클레아제 절단에 더 저항성이 되도록 만드는 것으로 나타났다. 뉴클레아제 저항성은 올리고뉴

클레오타이드를 세포 추출물 또는 분리된 뉴클레아제 용액과 함께 항온처리하고, 보통 겔 전기영동에 의해 시간이 경과한 후에 남아있는 고유 올리고뉴클레오타이드의 수준을 측정함으로써 통상적으로 측정된다. 뉴클레아제 저항성을 향상시키도록 변형된 올리고뉴클레오타이드는 변형되지 않은 올리고뉴클레오타이드보다 더 긴 시간 동안 고유한 상태로 존재한다. 다양한 올리고뉴클레오타이드 변형은 뉴클레아제 저항성을 향상시키거나 부여한다는 것이 입증되었다. 현재 적어도 하나의 포스포로티오에이트 변형을 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 더 바람직하다. 일부 경우에, 표적 결합 친화력을 향상시킨 올리고뉴클레오타이드 변형은 또한 독립적으로 뉴클레아제 저항성을 향상시킬 수 있다.

[0139] 본 발명에서 구상된 일부 바람직한 올리고뉴클레오타이드의 특정 예는 변형된 기본골격, 예를 들어 포스포로티오에이트, 포스포트라이에스터, 메틸 포스포네이트, 짧은 사슬 알킬 또는 사이클로알킬 당간(intersugar) 연결 또는 짧은 사슬 헤테로원자 또는 헤테로사이클릭 당간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 가장 바람직한 것은 포스포로티오에이트 기본골격을 가지는 올리고뉴클레오타이드 및 헤테로원자 기본골격을 가지는 올리고뉴클레오타이드, 특히 $\text{CH}_2\text{--NH--O--CH}_2$, $\text{CH}_2\text{--N(CH}_3\text{)--O--CH}_2$ (메틸렌(메틸이미노) 또는 MMI 기본골격으로 알려짐), $\text{CH}_2\text{--O--N(CH}_3\text{)--CH}_2$, $\text{CH}_2\text{--N(CH}_3\text{)--N(CH}_3\text{)--CH}_2$ 및 $\text{O--N(CH}_3\text{)--CH}_2\text{--CH}_2$ 기본골격을 가지는 올리고뉴클레오타이드이며, 여기에서 고유 포스포다이에스터 기본골격은 O--P--O--CH_2 로 나타내어진다. 문헌 [De Mesmaeker et al. (1995) Acc. Chem. Res. 28:366-374]에서 개시된 아마이드 기본골격이 또한 바람직하다. 또한 몰폴리노 기본골격을 가지는 올리고뉴클레오타이드가 바람직하다(Summerton and Weller, U.S. Pat. No. 5,034,506). 다른 실시형태에서, 펩타이드 핵산(PNA) 기본골격과 같은, 올리고뉴클레오타이드의 포스포다이에스터 기본골격은 폴리아미드 기본골격으로 대체되고, 뉴클레오타이드는 폴리아미드 기본골격의 아자 질소 원자에 직접적으로 또는 간접적으로 결합된다. 올리고뉴클레오타이드는 또한 하나 이상의 치환된 당 모이어티를 포함할 수 있다. 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 2' 위치에서 다음 중 하나를 포함한다: OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃, OCH₃, O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_n NH₂ 또는 O(CH₂)_n CH₃(여기에서 n은 1 내지 약 10임); C1 내지 C10 저급 알킬, 알콕시알콕시, 치환된 저급 알킬, 알카릴 또는 아랄킬; C1; Br; CN; CF₃; OCF₃; O--, S--, 또는 N-알킬; O--, S--, 또는 N-알케닐; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; 헤테로사이클로알킬; 헤테로사이클로알카릴; 아미노알킬아미노; 폴리알킬아미노; 치환된 시릴; RNA 절단기; 리포터기; 인터칼레이터; 올리고뉴클레오타이드의 약동학 특성을 개선시키는 기; 또는 올리고뉴클레오타이드 및 유사한 특성을 가지는 다른 치환기의 약동학 특성을 개선시키는 기. 바람직한 변형은 2'-메톡시에톡시[2'-O-CH₂ CH₂ OCH₃, 또한 2'-O-(2-메톡시에틸)로 알려짐]를 포함한다. 다른 바람직한 변형은 2'-메톡시(2'-O-CH₃), 2'-프로폭시(2'-OCH₂ CH₂CH₃) 및 2'-플루오로(2'-F)를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드 상의 다른 위치, 특히 3' 말단 뉴클레오타이드 상 당의 3' 위치와 5' 말단 뉴클레오타이드의 5' 위치에서 유사한 변형이 이루어질 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 또한 펜토푸라노실기 대신 사이클로부틸과 같은 당 모방체를 가질 수 있다.

[0140] 올리고뉴클레오타이드는 또한 추가적으로 또는 대안적으로, 핵염기(당업계에서 종종 간단하게 "염기"로 불림) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 "비변형된" 또는 "천연" 뉴클레오타이드는 아데닌(A), 구아닌(G), 티민(T), 시토신(C) 및 유라실(U)을 포함한다. 변형된 뉴클레오타이드는 천연 핵산에 드물게 또는 일시적으로만 발견되는 뉴클레오타이드, 예컨대 하이포잔틴, 6-메틸아데닌, 5-Me 피리미딘, 특히 5-메틸시토신(또한 5-메틸-2' 데옥시시토신이라고 불리고, 당업계에서 종종 5-Me-C라고 불림), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC 및 겐토마이오실 HMC, 뿐만 아니라 합성 뉴클레오타이드, 예컨대 2-아미노아데닌, 2-(메틸이미노)아데닌, 2-(이미다졸릴알킬)아데닌, 2-(아미노알킬아미노)아데닌 또는 다른 헤테로치환된 알킬아데닌, 2-티오유라실, 2-티오티민, 5-브로모유라실, 5-하이드록시메틸유라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N₆(6-아미노헥실)아데닌 및 2,6-아디아미노퓨린을 포함한다. 당업계에 알려진 "범용(universal)" 염기, 예컨대 이노신이 포함될 수 있다. 5-Me-C 치환은 0.6~1.2°C로 핵산 듀플렉스 안정성을 증가시키는 것으로 보여졌고, 현재 바람직한 염기 치환이다.

[0141] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 변형은 올리고뉴클레오타이드의 활성 또는 세포성 취입을 향상시키는 하나 이상의 모이어티 또는 컨쥬게이트를 올리고뉴클레오타이드에 화학적으로 연결시키는 것을 포함한다. 이러한 부분은 이에 한정되는 것은 아니지만, 지질 부분 예를 들어 콜레스테롤 부분, 콜레스테릴 부분, 지방족 사슬, 예컨대 도데칸다이올 또는 운데실 잔기, 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 또는 아다만탄 아세트산을 포함한다. 친유성 부분을 포함하는 올리고뉴클레오타이드, 및 이러한 올리고뉴클레오타이드를 제조하는 방법이 당업계에, 예를 들어 미국 특허 제5,138,045호, 제5,218,105호 및 제5,459,255호에 알려져 있다.

[0142] 주어진 올리고뉴클레오타이드에서 모든 위치가 균일하게 변형될 필요는 없으며, 사실 전술한 변형 중 하나 초과가 단일 올리고뉴클레오타이드에 또는 심지어 올리고뉴클레오타이드 내 단일 뉴클레오사이드내에 포함될 수 있

다. 본 발명은 또한 상기 정의된 바와 같은 키메라 올리고뉴클로타이드인 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0143] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 핵산 분자는, 이에 한정되지는 않지만 염기가 소실된(abasic) 뉴클레오타이드, 폴리에터, 폴리아민, 폴리아미드, 펩타이드, 탄수화물, 지질 또는 폴리하이드로카본 화합물을 포함하는 다른 모이어티와 컨주게이션된다. 이들 분자는 당, 염기 또는 포스페이트 기의 몇몇 위치에서 핵산 분자를 포함하는 임의의 뉴클레오타이드 중 하나 이상에 연결될 수 있음을 당업자는 인지할 것이다.

[0144] 본 발명에 따라서 사용된 올리고뉴클레오타이드는 잘 알려진 고상 합성 기술을 통하여 편리하게 그리고 통상적으로 만들어질 수 있다. 이러한 합성을 위한 장비는 Applied Biosystems를 포함하여 여러 회사에 의해 판매된다. 이러한 합성을 위한 임의의 다른 수단을 또한 이용할 수 있으며, 올리고뉴클레오타이드의 실질적인 합성은 당업자의 능력 범위 내에 있다. 또한 포스포로티오에이트 및 알킬화된 유도체와 같은 다른 올리고뉴클레오타이드를 제조하는 유사한 기술을 사용하는 것이 또한 잘 알려져 있다. 형광 표지된, 비오틴닐화된 또는 다른 변형된 올리고뉴클레오타이드 예를 들어 콜레스테롤-변형된 올리고뉴클레오타이드를 합성하기 위하여 유사한 기술 및 상업적으로 이용가능한 변형된 아미디트 및 제어된 기공을 갖는 유리(CPG) 산물 예를 들어 비오틴, 플루오레세인, 아크리딘 또는 소랄렌-변형된 아미디트 및/또는 CPG(미국 버지니아주 스틸링 소재의 Glen Research로부터 입수가능함)를 사용하는 것이 잘 알려져 있다.

[0145] 본 발명에 따르면, 효능, 특이성 및 작용 기간을 향상시키기 위하여 LNA 단량체의 사용과 같은 변형의 사용은 MOE, ANA, FANA, PS 등과 같은 현재 화합물질로 구성된 올리고뉴클레오타이드의 투여 경로를 넓힌다. 이는 현재 올리고뉴클레오타이드에서 일부 단량체를 LNA 단량체로 치환시킴으로써 이루어질 수 있다. LNA 변형된 올리고뉴클레오타이드는 부모 화합물과 유사한 크기를 가질 수 있거나, 또는 더 큰, 또는 바람직하게는 더 작은 크기일 수 있다. 이러한 LNA-변형된 올리고뉴클레오타이드는 약 70% 미만, 보다 바람직하게는 약 60% 미만, 가장 바람직하게는 약 50% 미만의 LNA 단량체를 포함하며, 이들 크기는 약 5개 내지 25개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 약 12개 내지 20개의 뉴클레오타이드이다.

[0146] 바람직한 변형된 올리고뉴클레오타이드 기본골격은 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로다이트오에이트, 포스포트라이에스터, 아미노알킬포스포트라이에스터, 메틸 및 3'알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함하는 기타 알킬 포스포네이트, 포스포네이트, 3'-아미노 포스포아미데이트 및 아미노알킬포스포라미데이트를 포함하는 포스포라미데이트, 티오노포스포라미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트라이에스터, 및 정상적인 3'-5' 연결을 가지는 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결된 유사체, 그리고 역전된 극성을 가진 것들(여기에서, 뉴클레오사이드 단위의 인접한 쌍은 3'-5'에서 5'-3'로 또는 2'-5'에서 5'-2'로 연결됨)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 또한 다양한 염, 혼합된 염 및 유리 산 형태도 포함된다.

[0147] 상기 인 함유 연결의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 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 제5,625,050호를 포함하나 이에 한정되지 않으며, 이들 각각은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0148] 인 원자를 포함하지 않는 바람직한 변형된 올리고뉴클레오타이드 기본골격은 짧은 사슬 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오사이드간 연결, 혼합된 헤테로원자 및 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오사이드간 연결, 또는 하나 이상의 짧은 사슬 헤테로원자 또는 헤테로사이클릭 뉴클레오사이드간 연결에 의해 형성된 기본 골격을 가진다. 이들은 몰폴리노 연결(부분적으로 뉴클레오사이드의 당 부분으로부터 형성된); 실로옥산 기본골격; 설파이드, 설폭시드 및 설폰 기본골격; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 기본골격; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 기본골격; 알켄 함유 기본골격; 설파메이트 기본골격; 메틸렌이미노 및 메틸렌하이드라지노 기본골격; 설포네이트 및 설포아미드 기본골격; 아미드 기본골격; 및 혼합된 N, O, S 및 CH₂ 성분 부분을 가지는 것들을 포함한다.

[0149] 상기 올리고뉴클레오사이드의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 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 제5,677,439호를 포함하나 이에 한정되지 않으며, 이들 각각은 본 명세서에 참조로 포함된다.

- [0150] 다른 바람직한 올리고뉴클레오타이드 모방체에 있어서, 뉴클레오타이드 단위의 당 및 뉴클레오타이드간 연결 모두, 즉 기본 골격은 신규한 기로 대체된다. 염기 단위는 적당한 핵산 표적 화합물과의 혼성화를 위해 유지된다. 이러한 한 가지 올리고머 화합물, 즉 우수한 혼성화 특성을 가진 것으로 나타난 올리고뉴클레오타이드 모방체는 펩타이드 핵산(PNA)이라고 불린다. PNA 화합물에서, 올리고뉴클레오타이드의 당-기본골격은 아마이드 함유 기본골격, 특히 아마도에틸글리신 기본골격으로 대체된다. 핵염기를 가지며, 기본골격의 아마이드 부분의 아자 질소 원자에 직접적으로 또는 간접적으로 결합된다. PNA 화합물의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 미국 특허 제 5,539,082호; 제5,714,331호; 및 제5,719,262호를 포함하나 이에 한정되지 않으며, 이들 각각은 본 명세서에 참조로 포함된다. PNA 화합물의 추가적인 교시는 문헌 [Nielsen, et al. (1991) Science 254, 1497-1500]에서 찾아볼 수 있다.
- [0151] 본 발명의 하나의 실시형태에서, 포스포로티오에이트 기본골격을 가지는 올리고뉴클레오타이드, 헤테로원자 기본골격, 특히 $-CH_2-NH-O-CH_2-$, $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ (메틸렌(메틸이미노) 또는 MMI 기본골격으로 알려짐), $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$, $-CH_2N(CH_3)-N(CH_3)CH_2-$ 및 $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ 를 가지는 올리고뉴클레오타이드가 있으며, 여기에서 고유 포스포다이에스터 기본골격은 상기 언급된 미국 특허 제5,489,677호의 $-O-P-O-CH_2-$ 로서 나타내어지고, 상기 언급된 미국 특허 제5,602,240호의 아마이드 기본골격이다. 또한 상기 언급된 미국 특허 제 5,034,506호의 몰폴리노 기본골격 구조를 가지는 올리고뉴클레오타이드가 바람직하다.
- [0152] 변형된 올리고뉴클레오타이드는 또한 하나 이상의 치환된 당 모이어티를 포함할 수 있다. 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 2' 위치에 OH; F; O-, S-, 또는 N-알킬; O-, S-, 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알킬닐; 또는 O 알킬-O-알킬 중 하나를 포함하며, 여기에서 알킬, 알케닐 및 알킬닐은 치환된 또는 비치환된 C 내지 CO 알킬 또는 C2 내지 CO 알케닐 및 알킬닐이다. 특히 바람직한 것은 O $(CH_2)_n$ OmCH₃, O $(CH_2)_n$, OCH₃, O $(CH_2)_n$ NH₂, O $(CH_2)_n$ CH₃, O $(CH_2)_n$ NH₂, 및 O $(CH_2)_n$ ON $(CH_2)_m$ CH₃2이며, 여기에서 n과 m은 1 내지 약 10일 수 있다. 다른 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 2' 위치에 다음 중 하나를 포함한다: C 내지 CO, (저급 알킬, 치환된 저급 알킬, 알카릴, 아랄킬, O-알카릴 또는 O-아랄킬, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알카릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실릴, RNA 절단기, 리포터기, 인터칼레이터, 올리고뉴클레오타이드의 약동학 특성을 개선시키는 기, 또는 올리고뉴클레오타이드 및 유사한 특성을 가지는 다른 치환기의 약동학 특성을 개선시키는 기. 바람직한 변형은 2'-메톡시에톡시 (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, 또한 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로 알려짐), 즉 알콕시알콕시기를 포함한다. 추가적인 바람직한 변형은 2'-다이메틸아미노옥시에톡시, 즉 O $(CH_2)_2$ ON $(CH_3)_2$ 기(본 명세서에서 하기 실시예에 기술된 바와 같이, 2'-DMAOE로 알려짐), 및 2'-다이메틸아미노에톡시에톡시(또한 당업계에서 2'-O-다이메틸아미노에톡시에틸 또는 2'-DMAEOE), 즉 2'-O-CH₂-O-CH₂-N $(CH_2)_2$ 를 포함한다.
- [0153] 다른 바람직한 변형은 2'-메톡시(2'-OCH₃), 2'-아미노프로폭시(2'-O-CH₂CH₂CH₂NH₂) 및 2'-플루오로(2'-F)를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드의 다른 위치, 특히 3' 말단 뉴클레오타이드에서 당의 3' 위치 또는 2'-5' 링크된 올리고뉴클레오타이드에서, 그리고 5' 말단 뉴클레오타이드의 5' 위치에 유사한 변형이 이루어질 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 또한 펜토피라노실 당 대신 사이클로부틸 모이어티와 같은 당 모방체를 가질 수 있다. 이와 같은 변형된 당 구조의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 미국 특허 제4,981,957호; 제5,118,800호; 제 5,319,080호; 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 제5,700,920호를 포함하지만, 이에 한정되지 않으며, 이들 각각은 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0154] 올리고뉴클레오타이드는 또한 핵염기(흔히 당업계에서는 간단히 "염기"라고 부름) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "비변형" 또는 "천연" 뉴클레오타이드는 퓨린 염기인 아데닌(A)과 구아닌(G), 및 피리미딘 염기인 티민(T), 시토신(C)과 유라실(U)을 포함한다. 변형된 뉴클레오타이드는 다른 합성 및 천연 뉴클레오타이드, 예를 들어 5-메틸시토신(5-me-C), 5-하이드록시메틸 시토신, 잔틴, 하이포잔틴, 2-아미노아데닌, 아데닌과 구아닌의 6-메틸 및 다른 알킬 유도체, 아데닌과 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오유라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로유라실 및 시토신, 5-프로피닐 유라실 및 시토신, 6-아조유라실, 시토신 및 티민, 5-유라실(슈도-유라실), 4-티오유라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 유라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌 그리고 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌을 포함한다.
- [0155] 또한, 뉴클레오타이드는 미국 특허 제3,687,808호에 개시된 것, 문헌[The Concise Encyclopedia of Polymer

Science And Engineering', pages 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990]에 개시된 것, 문헌[Englisch et al., 'Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, page 613]에 개시된 것, 및 문헌[Sanghvi, Y.S., Chapter 15, 'Antisense Research and Applications', pages 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993]에 개시된 것을 포함한다. 이러한 뉴클레오타이드의 일부는 본 발명의 올리고머 화합물의 결합 친화력을 증가시키는데 특히 유용하다. 이들은 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐유라실 및 5-프로피닐시토신을 포함하여, 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 증가시키는 것으로 나타났고(Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds, 'Antisense Research and Applications', CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278), 훨씬 더 구체적으로는 2'-O메톡시에틸 당 변형과 조합될 때 현재 바람직한 염기 치환이다.

[0156] 상기 변형된 뉴클레오타이드 및 기타 변형된 뉴클레오타이드의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 미국 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 제5,681,941호를 포함하지만, 이에 한정되지 않으며, 이들 각각은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0157] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 변형은 올리고뉴클레오타이드 하나 이상의 모이어티 또는 컨쥬게이트에 화학적으로 연결되는 것을 포함하는데, 이는 올리고뉴클레오타이드의 활성, 세포 분포 또는 세포 취입을 강화시킨다.

[0158] 이러한 모이어티는 지질 모이어티, 예를 들어 콜레스테롤 모이어티, 콜산, 티오에터, 예컨대 헥실-S-트리틸티올, 티오콜레스테롤, 지방족 사슬, 예컨대 도데칸다이올 또는 운데실 잔기, 인지질, 예컨대 다이-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸암모늄 1,2-다이-O-헥사데실-rac-글리세로-3-H-포스포네이트, 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 또는 아다만탄아세트산, 팔미틸 모이어티, 또는 옥타데실아민 또는 헥실아미노-카보닐-t 옥시콜레스테롤 모이어티를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0159] 이러한 올리고뉴클레오타이드 컨쥬게이트의 제법을 교시하는 대표적인 미국 특허는 미국 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 제5,688,941호를 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 이들 각각은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0160] **약물 발견:** 본 발명의 화합물은 또한 약물 발견 및 표적 유효화 분야에 적용될 수 있다. 본 발명은 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1) 폴리뉴클레오타이드와 질병 상태, 표현형 또는 조건 사이에 존재하는 상관 관계를 설명하기 위하여 약물 발견 노력에서 본 명세서에서 확인된 화합물의 이용 및 바람직한 표적 분절의 이용을 포함한다. 이들 방법은 샘플, 조직, 세포 또는 유기체를 본 발명의 화합물과 접촉시키는 단계, 처리 후 일정 시간에서 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드의 핵산 또는 단백질 수준 및/또는 관련 표현형 또는 화학적 종점을 측정하는 단계, 및 선택적으로 측정된 값을 비처리된 샘플 또는 본 발명의 추가 화합물로 처리된 샘플과 비교하는 단계를 포함하는, MBTPS1을 검출 또는 조절하는 것을 포함한다. 이들 방법은 또한 표적 유효화 공정을 위하여 미지의 유전자 기능을 결정하기 위하여, 또는 특정 질환, 상태 또는 표현형의 치료 또는 예방을 위한 표적으로서 특정 유전자 산물의 유효성을 결정하기 위한 다른 실험과 조합하여 또는 동시에 실행될 수 있다.

[0161] **유전자 발현의 상향 조절 또는 억제 평가:**

[0162] 숙주 세포 또는 유기체로 외인성 핵산의 전달은 세포 또는 유기체 내 핵산의 존재를 직접적으로 검출함으로써 평가될 수 있다. 이러한 검출은 당업계에 잘 알려진 몇 가지 방법에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 외인성 핵산의 존재는 서든 블릿 또는 핵산과 연관된 뉴클레오타이드 서열을 특이적으로 증폭시키는 프라이머를 사용한 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 검출될 수 있다. 외인성 핵산의 발현은 또한 유전자 발현 분석을 포함하는 통

상적인 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 외인성 핵산으로부터 생성된 mRNA는 노던 블롯 또는 역전사 PCR(RT-PCR)을 사용하여 검출되고 정량화될 수 있다.

[0163] 외인성 핵산으로부터 RNA의 발현은 또한 효소적 활성 또는 리포터 단백질 활성을 측정함으로써 검출될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 조절 활성은 외인성 핵산이 효과기(effector) RNA를 생성하고 있다는 표시로서 핵산 발현에서의 감소 또는 증가로 간접적으로 측정될 수 있다. 서열 보존을 기반으로 하여, 프라이머는 표적 유전자의 암호화 영역을 증폭시키기 위하여 고안되고, 사용될 수 있다. 임의의 암호화 또는 비암호화 영역이 사용될 수 있지만, 처음에 각각의 유전자로부터 가장 많이 발현된 암호화 영역이 모델 제어 유전자를 구축하는데 사용될 수 있다. 리포터 코딩 구역과 이의 폴리(A) 신호 사이에 각각의 암호화 영역을 삽입함으로써 각각의 제어 유전자는 회합된다. 이러한 플라스미드는 제어 유전자의 상류에 리포터 유전자 및 3' 비암호 영역에 잠재적인 RNAi 표적을 가지는 mRNA를 생성할 것이다. 개별적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 효과는 리포터 유전자의 조절에 의해 분석될 것이다. 본 발명의 방법에 유용한 리포터 유전자는 아세트하이드록시산 합성효소(AHAS), 알칼리 포스파타제(AP), 베타 갈락토시다제(LacZ), 베타 글루코코니다제(GUS), 클로람페니콜 아세틸전이효소(CAT), 녹색 형광 단백질(GFP), 적색 형광 단백질(RFP), 황색 형광 단백질(YFP), 청록색 형광 단백질(CFP), 호스레디시페록시다제(HRP), 루시페라제(Luc), 노팔린 합성효소(NOS), 옥토판인 합성효소(OCs), 및 이의 유도체를 포함한다. 암피실린, 블레오마이신, 클로람페니콜, 젠타마이신, 하이그로마이신, 카나마이신, 린코마이신, 메토크세이트, 포스포노트리킨, 퓨로마이신 및 테트라사이클린에 저항성을 부여하는 다중 선택성 마커가 이용가능하다. 리포터 유전자의 조절을 결정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 이들 방법은 형광 측정법(예컨대, 형광 분광학, 형광 활성화 세포 분류(FACS), 형광 현미경), 항생제 저항성 측정을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0164] MBTPS1 단백질 및 mRNA 발현은 당업자에게 알려진 방법 및 본원 다른 곳에 기술된 방법을 사용하여 분석될 수 있다. 예를 들어, ELISA와 같은 면역분석법이 단백질 수준을 측정하는데 사용될 수 있다. MBTPS1 ELISA 분석 키트는 예컨대 R&D Systems(미국 미네소타주 미니애폴리스 소재)로부터 상업적으로 이용가능하다.

[0165] 실시형태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 처리된 샘플(예컨대, 생체 내 또는 시험관 내 세포 또는 조직)에서 MBTPS1 발현(예컨대, mRNA 또는 단백질)은 대조군 샘플에서 MBTPS1 발현과 비교하여 평가된다. 예를 들어, 단백질 또는 핵산의 발현은 당업자에게 알려진 방법을 사용하여 가짜로 처리된 또는 비처리된 샘플 내에서의 발현과 비교될 수 있다. 대안적으로, 원하는 정보에 따라서 대조 안티센스 올리고뉴클레오타이드(예컨대, 변형된 또는 상이한 서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드)로 처리된 샘플과의 비교가 이루어질 수 있다. 다른 실시형태에서, 처리된 샘플 대 비처리된 샘플 내 MBTPS1 단백질 또는 핵산의 발현에서의 차이는 처리된 샘플 대 비처리된 샘플 내 (연구자에 의해 적절하다고 여겨지는 임의의 표준물질, 예컨대 하우스키핑 유전자를 포함하여) 상이한 핵산의 발현에서의 차이와 비교될 수 있다.

[0166] 관찰된 차이는 대조군과의 비교에서의 사용을 위하여, 예컨대 비율 또는 분획의 형태로 원하는 대로 표현될 수 있다. 실시형태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리된 샘플 내 MBTPS1 mRNA 또는 단백질의 수준은 비처리된 샘플 또는 대조군 핵산으로 처리된 샘플과 비교하여 약 1.25배 내지 약 10배 이상으로 증가 또는 감소된다. 실시형태에서, MBTPS1 mRNA 또는 단백질의 수준은 적어도 약 1.25배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 3.5배, 적어도 약 4배, 적어도 약 4.5배, 적어도 약 5배, 적어도 약 5.5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 6.5배, 적어도 약 7배, 적어도 약 7.5배, 적어도 약 8배, 적어도 약 8.5배, 적어도 약 9배, 적어도 약 9.5배, 또는 적어도 약 10배 또는 그 이상으로 증가 또는 감소된다.

[0167] *키트, 연구 시약, 진단제 및 치료제*

[0168] 본 발명의 화합물은 진단, 치료 및 예방용으로, 또는 연구 시약 및 키트 성분으로서 이용될 수 있다. 더욱이, 정교한 특이성으로 유전자 발현을 억제할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 종종 당업자에 의해 특정 유전자의 기능을 설명하거나 또는 생물학적 경로의 다양한 구성원의 기능을 구별하는데 사용된다.

[0169] 키트 및 진단에서의 사용 및 다양한 생물학적 시스템에서의 사용에 있어서, 단독으로 또는 다른 화합물 또는 치료제와 조합하여 본 발명의 화합물은 세포 및 조직 내에서 발현되는 유전자의 일부 또는 전체 보체의 발현 패턴을 밝히는데 차등 분석 및/또는 조합 분석에서의 도구로서 유용하다.

[0170] 본 명세서에서 사용된 용어 "생물학적 시스템" 또는 "시스템"은 막 결합 전사 인자 켈티다제, 부위 1(MBTPS1) 유전자의 산물을 발현하거나 또는 이를 발현하는 능력을 갖춘 임의의 유기체, 세포, 세포 배양물 또는 조직으로 정의된다. 이들은 인간, 형질전환동물, 세포, 세포 배양물, 조직, 이종이식편, 이식체 및 이의 조합을 포함하지

만 이에 한정되지 않는다.

- [0171] 하나의 비제한적 예로서, 하나 이상의 안티센스 화합물로 처리된 세포 또는 조직 내의 발현 패턴은 안티센스 화합물로 처리되지 않은 대조군 세포 또는 조직과 비교되며, 생성된 패턴은, 예를 들어 검사되는 유전자의 질환 연관성, 신호전달 경로, 세포 국소화, 발현 수준, 크기, 구조 또는 기능과 관련되므로 차등적인 유전자 발현 수준에 대해 분석된다. 이러한 분석은 자극된 또는 자극되지 않은 세포에서, 그리고 발현 패턴에 영향을 주는 다른 화합물의 존재 또는 부재시 실행될 수 있다.
- [0172] 당업계에 알려진 유전자 발현 분석 방법의 예는 DNA 어레이 또는 마이크로어레이, SAGE(유전자 발현의 일련의 분석), READS(절단된 cDNA의 제한 효소 증폭), TOGA(총 유전자 발현 분석), 단백질 어레이 및 프로테오믹스, 발현된 서열 tag(EST) 서열화, 차감성 RNA 핑거프린팅(SuRF), 차감성 클로닝, 차등 디스플레이(DD), 비교 유전체 혼성화, FISH(형광 현상 혼성화) 기술 및 질량 분석법을 포함한다.
- [0173] 본 발명의 화합물은 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1)을 암호화하는 핵산에 혼성화하기 때문에, 이들 화합물은 연구 및 진단에 유용하다. 예를 들어, 효과적인 MBTPS1 조절인자인 것으로서 본 명세서에 기술된 바와 같은 효율을 가지고 본 명세서에 기술된 바와 같은 조건 하에서 혼성화하는 올리고뉴클레오타이드는 유전자 증폭 또는 검출에 유리한 조건 하에서 각각 효과적인 프라이머 또는 프로브이다. 이러한 프라이머 및 프로브는 MBTPS1을 암호화하는 핵산 분자의 특이적 검출을 필요로 하는 방법 및 MBTPS1의 추가 연구에서의 검출 또는 사용을 위한 상기 핵산 분자의 증폭에 유용하다. MBTPS1을 암호화하는 핵산을 가진 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 특히 프라이머 및 프로브의 혼성화는 당업계에 알려진 수단에 의해 검출될 수 있다. 이러한 수단은 올리고뉴클레오타이드와 효소의 컨주게이션, 올리고뉴클레오타이드의 방사능표지, 또는 임의의 다른 적합한 검출 수단을 포함할 수 있다. 또한 샘플에서 MBTPS1의 수준을 검출하기 위하여 이러한 검출 수단을 사용하는 키트가 제조될 수 있다.
- [0174] 안티센스의 특이성 및 민감성은 또한 치료적 용도를 위하여 당업자에 의해 이용된다. 안티센스 화합물은 사람을 포함한 동물에서 질환 상태의 치료에서의 치료적 모이머티로서 이용되어 왔다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 약물은 사람에게 안전하고 효과적으로 투여되어 왔으며, 다수의 임상 시험이 현재 진행중이다. 따라서 안티센스 화합물은 세포, 조직, 동물, 특히 사람의 치료를 위한 치료 섭생에서 유용하도록 구성될 수 있는 유용한 치료적 양상일 수 있음이 수립되어 있다.
- [0175] 치료용으로, MBTPS1 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절함으로써 치료될 수 있는 질환 또는 장애를 가진 것으로 의심되는 동물, 바람직하게는 사람은 본 발명에 따른 안티센스 화합물을 투여함으로써 치료된다. 예를 들어, 하나의 비제한적인 실시형태에서, 상기 방법은 치료의 필요가 있는 동물에게 MBTPS1 조절인자의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 MBTPS1 조절인자는 MBTPS1의 활성을 효과적으로 조절하거나 MBTPS1 단백질의 발현을 조절한다. 하나의 실시형태에서, 동물에서 MBTPS1의 활성 또는 발현은 대조군과 비교하여 약 10% 억제된다. 바람직하게, 동물에서 MBTPS1의 활성 또는 발현은 약 30% 억제된다. 보다 바람직하게, 동물에서 MBTPS1의 활성 또는 발현은 50% 이상 억제된다. 따라서, 올리고머 화합물은 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1) mRNA의 발현을 대조군과 비교하여 적어도 10%, 적어도 50%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 조절한다.
- [0176] 하나의 실시형태에서, 동물에서 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1)의 활성 또는 발현은 대조군과 비교하여 약 10% 증가된다. 바람직하게, 동물에서 MBTPS1의 활성 또는 발현은 약 30% 증가된다. 보다 바람직하게, 동물에서 MBTPS1의 활성 또는 발현은 50% 이상 증가된다. 따라서, 올리고머 화합물은 MBTPS1 mRNA의 발현을 대조군과 비교하여 적어도 10%, 적어도 50%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 조절한다.
- [0177] 예를 들어, 동물에서 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1)의 발현의 감소는 동물의 혈청, 혈액, 지방 조직, 간 또는 임의의 다른 체액, 조직 또는 기관에서 측정될 수 있다. 바람직하게, 분석될 상기 체액, 조직 또는 기관에 포함된 세포는 MBTPS1 펩티다제를 암호화하는 핵산 분자 및/또는 MBTPS1 단백질 자체를 포함한다.
- [0178] 본 발명의 화합물은 적합한 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체에 화합물의 유효량을 첨가함으로써 약학 조성물에 이용될 수 있다. 본 발명의 화합물의 용도 및 방법은 또한 예방적으로 유용할 수 있다.
- [0179] 컨주게이트

- [0180] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 변형은 올리고뉴클레오타이드의 활성, 세포 분포 또는 세포 취입을 향상시키는 하나 이상의 모이어티 또는 컨주게이트에 올리고뉴클레오타이드를 화학적으로 연결시키는 것을 포함한다. 이러한 모이어티 또는 컨주게이트는 1차 또는 2차 하이드록실기와 같은 기능기에 공유적으로 결합된 컨주게이트 기를 포함할 수 있다. 본 발명의 컨주게이트 기는 인터칼레이터, 리포터 분자, 폴리아민, 폴리아미드, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에터, 올리고머의 약리학 특성을 향상시키는 기, 및 올리고머의 약동학 특성을 향상시키는 기를 포함한다. 전형적인 컨주게이트 기는 콜레스테롤, 지질, 인지질, 비오틴, 페나진, 플레이트, 페탄트리딘, 안트라퀴논, 아크리딘, 플루오레세인, 로다민, 쿠마린 및 염료를 포함한다. 본 발명의 내용에서 올리고머의 약리학 특성을 향상시키는 기는 취입을 개선시키고, 분해에 저항성을 향상시키고/향상시키거나 표적 핵산과의 서열-특이적 혼성화를 강화시키는 기를 포함한다. 본 발명의 내용에서 약동학 특성을 향상시키는 기는 본 발명의 화합물의 취입, 분포, 대사 또는 배출을 개선시키는 기를 포함한다. 대표적인 컨주게이트 기는 1992년 10월 23일 출원된 국제 특허 출원 PCT/US92/09196호 및 미국 특허 제6,287,860호에 개시되며, 이들은 본 명세서에 참조로 포함된다. 컨주게이트 모이어티는 지질 모이어티, 예를 들어 콜레스테롤 모이어티, 콜린산, 티오에터, 예컨대 핵실-5-트리틸티올, 티오펀테스테롤, 지방족 사슬, 예컨대 도데칸다이올 또는 운데실 잔기, 인지질, 예컨대 다이-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸암모늄 1,2-다이-O-헥사데실-rac-글리세로-3-H포스포네이트, 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 또는 아다만탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 또는 옥타데실아민 또는 핵실아미노-카보닐-옥시콜레스테롤 모이어티를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 또한 활성 약물 물질, 예를 들어 아스피린, 와파린, 페닐부타존, 이부프로펜, 수프로펜, 펜부펜, 케토프로펜, (S)-(+)-프라노프로펜, 카프로펜, 단실사코신, 2,3,5-트라이아이오도벤조산, 플루페남산, 폴린산, 벤조티아디아아자이드, 클로로티아자이드, 다이아제파인, 인도메티신, 바비튜레이트, 세팔로스포린, 설파제, 당뇨병 치료약, 항균제 또는 항생제에 컨주게이트될 수 있다.
- [0181] 이러한 올리고뉴클레오타이드 컨주게이트의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 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; 제5,587,044호; 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 제5,688,941호를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0182] 제형
- [0183] 본 발명의 화합물은 다른 분자, 화합물의 분자 구조 또는 혼합물, 예를 들어, 리포솜, 수용체-표적화된 분자, 취입, 분포 및/또는 흡수를 지원하는 경구, 직장, 국소 또는 기타 제형과 혼합, 포집, 컨주게이트 또는 결합될 수 있다. 이러한 취입, 분포 및/또는 흡수-지원 제형의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 미국 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; 제5,580,575호; 및 제5,595,756호를 포함하지만, 이에 한정되지 않으며, 이들 각각은 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0184] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 표적 발현 및/또는 기능을 조절하기 위하여 벡터로 투여될 필요는 없지만, 본 발명의 실시형태는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 발현을 위한 발현 벡터 구조체와 관련되며, 이 벡터 구조체는 프로모터, 혼성체 프로모터 유전자 서열들을 포함하고, 강력한 구성 프로모터 활성 또는 원하는 경우 유도될 수 있는 프로모터 활성을 가진다.
- [0185] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 실시는 적합한 핵산 전달 시스템과 함께 전술한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 하나를 투여하는 것을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 이 시스템은 폴리뉴클레오타이드에 실시가능하게 연결된 비바이러스 벡터를 포함한다. 이러한 비바이러스 벡터의 예는 올리고뉴클레오타이드 만(예컨대,

서열번호: 3 내지 6 중 임의의 하나 이상) 또는 적합한 단백질, 다당류 또는 지질 제형과 조합하여 포함한다.

- [0186] 추가적으로 적합한 핵산 운반 시스템은 바이러스 벡터, 전형적으로는 아데노바이러스, 아데노바이러스연관 바이러스(AAV), 헬퍼-의존성 아데노바이러스, 레트로바이러스, 또는 Japan-리포좀(HVJ)의 헤마글루티닌 바이러스 복합체 중 적어도 하나로부터의 서열을 포함한다. 바람직하게, 바이러스 벡터는 폴리뉴클레오타이드에 실시가능하게 연결된 강력한 진핵 프로모터, 예컨대 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터를 포함한다.
- [0187] 추가적으로 바람직한 벡터는 바이러스 벡터, 융합 단백질 및 화학적 컨쥬게이트를 포함한다. 레트로바이러스 벡터는 모로니 뮤린 백혈병 바이러스 및 HIV-계 바이러스를 포함한다. 하나의 바람직한 HIV-계 바이러스 벡터는 적어도 2개 벡터를 포함하는데, 여기에서 gag 및 pol 유전자는 HIV 게놈에서 유래한 것이고, env 유전자는 또 다른 바이러스에서 유래한 것이다. DNA 바이러스 벡터가 바람직하다. 이들 벡터는 오르토폭스(orthopox) 또는 아비포스(avipox) 벡터와 같은 포스 벡터, 1형 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 벡터와 같은 헤르페스바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터를 포함한다.
- [0188] 본 발명의 안티센스 화합물은 임의의 약제학적으로 허용가능한 염, 에스터 또는 이러한 에스터의 염, 또는 사람을 포함한 동물에게 투여시 생물학적 활성 대사물질 또는 이의 잔기를 (직접적으로 또는 간접적으로) 제공할 수 있는 임의의 다른 화합물을 포함한다.
- [0189] 용어 "약제학적으로 허용가능한 염"은 본 발명의 화합물의 생리학적 및 약제학적으로 허용가능한 염, 즉 부모 화합물의 원하는 생물학적 활성을 유지하지만 염에 원하지 않는 독성 효과를 부여하지 않은 염을 말한다. 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염의 바람직한 예 및 이의 용도는 미국 특허 제6,287,860호에서 추가로 기술되어 있으며, 이는 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0190] 본 발명은 또한 본 발명의 안티센스 화합물을 포함하는 약학 조성물 및 제형을 포함한다. 본 발명의 약학 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), 네블라이저를 포함하여 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 주입을 통하여 폐; 기관내(intratracheal), 비강, 상피 또는 경피), 구강 또는 비경구일 수 있다. 비경구 투여는 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 주사 또는 주입; 또는 두개내(intracranial), 예컨대 척추강내 또는 뇌실내 투여를 포함한다.
- [0191] 중추 신경계내 조직을 치료하기 위하여, 투여는 예컨대 뇌척수액으로 주사 또는 주입에 의하여 이루어질 수 있다. 안티센스 RNA의 뇌척수액으로의 투여는, 예컨대 본 명세서에 전문이 참조로 포함된 미국 특허출원 공개 제 2007/011772호(발명의 명칭: "Methods for slowing familial ALS disease progression")에 기술되어 있다.
- [0192] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 중추신경계의 세포로 투여하고자 할 때, 투여는 혈액-뇌 장벽을 통한 대상 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 투과를 촉진시킬 수 있는 하나 이상의 제제와 함께 이루어질 수 있다. 주사는 예컨대 내비피질 또는 해마로 이루어질 수 있다. 근육 조직내 운동 뉴런으로 아데노바이러스 벡터의 투여에 의한 신경영양 인자의 전달은 예컨대 본 명세서에 참조로 포함된 미국 특허 제6,632,427호(발명의 명칭: "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons")에 기술되어 있다. 뇌 예컨대 선조체, 시상, 해마 또는 흑질의 직접적인 벡터의 전달은 당업계에 공지되어 있고, 예컨대 본 명세서에 참조로 포함된 미국 특허 제6,756,523호(발명의 명칭: "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain")에 기술되어 있다. 투여는 주사로써 신속하게 이루어질 수 있거나 또는 시간을 두고 느린 주입으로써 또는 지효성 제형의 투여로써 이루어질 수 있다.
- [0193] 대상 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 또한 바람직한 약제학적 또는 약리학 특성을 제공하는 제제와 연결되거나 컨쥬게이트될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 혈액-뇌 장벽을 통한 침투 또는 수송을 촉진하는 것으로 다업계에 공지된 임의의 물질, 예컨대 트랜스페린 수용체에 대한 항체에 커플링시키고, 정맥 주사에 의해 투여될 수 있다. 안티센스 화합물은 안티센스 화합물을 더 효과적으로 만들고/만들거나 혈액-뇌 장벽을 통한 안티센스 화합물의 수송을 증가시키는 바이러스 벡터와 연결될 수 있다. 삼투성 혈액-뇌 장벽 파괴는 또한 메소 에리트리톨(meso erythritol), 자일리톨, D(+) 갈락토스, D(+) 락토스, D(+) 자일로스, 덤시톨, myo-이노시톨, L(-) 푸룩토스, D(-) 만니톨, D(+) 글루코스, D(+) 아라비노스, D(-)아라비노스, 셀로비오즈, D(+) 말토오스, D(+) 라피노스, L(+) 랍노스, D(+) 멜리비오스, D(-) 리보스, 아도니톨, D(+) 아라비톨, L(-) 아라비톨, D(+) 푸코스, L(-) 푸코스, D(-) 릭소스, L(+) 릭소스, 및 L(-) 릭소스를 포함하지만 이에 한정되지 않는 당, 또는 글루타민, 리신, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민산, 글리신, 히스티딘, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 티로신, 발린 및 타우린을 포함하나 이에 한

정되지 않는 아미노산의 주입에 의해 수행될 수 있다. 혈액-뇌 장벽 침투를 향상시키는 방법 및 재료는 예컨대 미국 특허 제4,866,042호(발명의 명칭: "Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier"), 제6,294,520호(발명의 명칭: "Material for passage through the blood-brain barrier"), 및 제6,936,589호(발명의 명칭: "Parenteral delivery systems")에 예시되어 있으며, 이들 모두 본 명세서에 전문이 참조로 포함된다.

[0194] 대상 안티센스 화합물은 다른 분자, 화합물의 분자 구조 또는 혼합물, 예를 들어 리포솜, 수용체-표적화된 분자, 취입, 분포 및/또는 흡수를 지원하는 경구, 직장, 국소 또는 기타 제형과 혼합, 포집, 컨지게이트 또는 결합될 수 있다. 예를 들어, 양이온 지질이 올리고뉴클레오타이드 취입을 용이하게 하기 위하여 제형 내에 포함될 수 있다. 취입을 용이하게 하는 것으로 나타난 이러한 조성물 중 하나가 LIPOFECTIN(GIBCO-BRL(미국 메릴랜드주 베테스다 소재)로부터 입수가가능함)이다.

[0195] 적어도 하나의 2'-O-메톡시에틸 변형을 가진 올리고뉴클레오타이드는 경구 투여에 특히 유용한 것으로 여겨진다. 국소 투여를 위한 약학 조성물 및 제형은 경피 패취, 연고, 로션, 크림, 젤, 점적약, 좌약, 스프레이, 액상 및 분말을 포함할 수 있다. 통상적인 약제학적 담체, 수용성, 분말 또는 오일 베이스, 점증제 등은 필수적이거나 바람직할 수 있다. 코팅된 콘돔, 장갑 등이 또한 유용할 수 있다.

[0196] 통상적으로 단위 용량 형태로 제공될 수 있는 본 발명의 약학 제형은 약학 산업분야에 잘 알려진 통상적인 기술에 따라 제조될 수 있다. 이러한 기술은 활성 성분을 약학 담체(들) 또는 부형제(들)와 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 활성 성분을 액상 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 이들 둘다와 균일하고 친밀하게 결합되도록 하고, 그 다음 필요하다면 산물을 성형함으로써 제조된다.

[0197] 본 발명의 조성물은 다수의 가능한 투약 형태 정제, 예를 들어 이에 한정되지 않지만 정제, 캡슐, 젤 캡슐, 액체 시럽, 연질 젤, 좌약 및 관장제 중 임의의 것으로 제형화될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 액상, 비-액상 또는 혼합형 매질에 현탁액으로서 제형화될 수 있다. 수용성 현탁액은 카복시메틸셀룰로오스, 솔비톨 및/또는 텍스트란을 포함하는 현탁액의 점성을 증가시키는 물질을 추가로 포함할 수 있다. 현탁액은 또한 안정화제를 포함할 수 있다.

[0198] 본 발명의 약학 조성물은 용액, 에멀전, 폼 및 리포솜-함유 제형을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 약학 조성물 및 제형은 하나 이상의 침투 강화제, 담체, 부형제 또는 기타 활성 또는 비활성 성분을 포함할 수 있다.

[0199] 에멀전은 전형적으로 액체에 보통 직경이 0.1 μ m를 초과하는 방울의 형태로 분산된 또 다른 액체로 구성된 이중(heterogeneous) 시스템이다. 에멀전은 분산된 상에 더하여 추가적인 성분, 및 수성 상, 유성 상에 또는 분리된 상으로서 그 자체에 용액으로서 존재할 수 있는 활성 약물을 포함할 수 있다. 마이크로에멀전이 본 발명의 실시 형태로서 포함된다. 에멀전 및 이의 용도는 당업계에 잘 알려져 있으며, 미국 특허 제6,287,860호에 추가로 기술되어 있다.

[0200] 본 발명의 제형은 리포솜 제형을 포함한다. 본 발명에 사용된 용어 "리포솜"은 구형 이중층 또는 이중층들에 배열된 양쪽성 지질로 구성된 소포를 말한다. 리포솜은 친유성 물질로 형성된 막 및 전달될 조성물을 포함하는 수용성 내부를 가지는 단층(unilamellar) 또는 다중층(multilamellar) 소포체이다. 양이온성 리포솜은 안정적인 복합체를 형성하기 위하여 음으로 하전된 DNA 분자와 상호작용하는 것으로 여겨지는 양으로 하전된 리포솜이다. pH-민감성 또는 음으로 하전된 리포솜은 DNA와 복합체를 형성하기 보다는 DNA를 포집하는 것으로 여겨진다. 양이온성 및 비양이온성 리포솜 모두 DNA를 세포로 운반하는데 사용되어 왔다.

[0201] 리포솜은 또한 "입체적으로 안정화된" 리포솜을 포함하며, 본 명세서에서 사용된 용어는 하나 이상의 특화된 지질을 포함하는 리포솜을 말한다. 리포솜에 포함될 때, 이러한 특화된 지질은 이러한 특화된 지질이 없는 리포솜과 비교하여 순환 있을 때 순환 수명이 향상된 리포솜을 만든다. 입체적으로 안정화된 리포솜의 예는 리포솜의 소포체-형성 지질 일부분의 부분이 하나 이상의 당지질을 포함하거나 또는 하나 이상의 친수성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티로 유도체화된 것이다. 리포솜 및 이의 용도는 미국 특허 제6,287,860호에 추가로 기술되어 있다.

[0202] 본 발명의 약학 제형 및 조성물은 또한 계면활성제를 포함할 수 있다. 약물 제형, 제형 및 에멀전에서 계면활성제의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 계면활성제 및 이의 용도는 미국 특허 제6,287,860호에 추가로 기술되어 있으며, 이는 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0203] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 다양한 침투 강화제를 이용하여 핵산, 특히 올리고뉴클레오타이드의 효율적인

전달을 달성한다. 세포 막을 통한 비친유성 약물의 확산을 돕는 것에 더하여, 침투 강화제는 또한 친유성 약물의 침투성을 향상시킨다. 침투 강화제는 5가지 광범위한 카테고리, 즉 계면활성제, 지방산, 담즙산, 킬레이트제, 및 비킬레이트 계면활성제 중 하나에 속하는 것으로 분류될 수 있다. 침투 강화제 및 이의 용도는 미국 특허 제6,287,860호에 추가로 기술되어 있으며, 이는 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0204] 당업자는 제형의 의도된 용도, 즉 투여 경로에 따라 통상적으로 고안된다는 것을 인지할 것이다.

[0205] 국소 투여용의 바람직한 제형은 본 발명의 올리고뉴클레오타이드가 국소 전달제, 예를 들어 지질, 리포솜, 지방산, 지방산 에스터, 스테로이드, 킬레이트제 및 계면활성제와 혼합된 것을 포함한다. 바람직한 지질 및 리포솜은 중성(예컨대, 다이올레오일-포스파티딜 DOPE) 에탄올아민, 다이미리스토일포스파티딜 콜린 DMPC, 다이스테아로일포스파티딜 콜린), 음성(예컨대, 다이미리스토일포스파티딜 글리세롤 DMPG) 및 양이온(예컨대, 다이올레일 테트라메틸아미노프로필 DOTAP 및 다이올레일-포스파티딜 에탄올아민 DOTMA)을 포함한다.

[0206] 국소 또는 기타 투여용으로, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 리포솜 내에 포집되거나 리포솜과, 특히 양이온 리포솜과 복합체를 형성할 수 있다. 대안적으로, 올리고뉴클레오타이드는 지질, 특히 양이온 지질과 착화될 수 있다. 바람직한 지방산 및 에스터, 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 이의 용도는 미국 특허 제6,287,860호에 추가로 기술되어 있다.

[0207] 경구 투여용 조성물 및 제형은 분말 또는 과립, 미립자, 나노입자, 물 또는 비-수용성 매질에서의 현탁액 또는 용액, 캡슐, 겔 캡슐, 사세, 정제 또는 미니정제(minitab)를 포함한다. 점층제, 착향료, 희석제, 에멀전화제, 분산 보조제 또는 결합제가 바람직할 수 있다. 바람직한 경구용 제형은 본 발명의 올리고뉴클레오타이드가 하나 이상의 침투 강화제, 계면활성제 및 킬레이터와 함께 투여되는 것이다. 바람직한 계면활성제는 지방산 및/또는 이의 에스터 또는 염, 담즙산 및/또는 이의 염을 포함한다. 바람직한 담즙산/염 그리고 지방산 및 이의 용도는 미국 특허 제6,287,860호에 추가로 기술되어 있으며, 이는 본 명세서에 참조로 포함된다. 또한 침투 강화제, 예를 들어, 담즙산/염과 조합하여 지방산/염의 조합이 바람직하다. 특히 바람직한 조합은 라우르산, 카프릭산 및 UDCA의 나트륨염이다. 추가 침투 강화제는 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에터, 폴리옥시에틸렌-20-세틸 에터를포함한다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 분무된 건조 과립을 포함하는 과립형으로 경구로 운반될 수 있고, 또는 착화되어 미립자 또는 나노입자를 형성할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 착화제 및 이의 용도는 미국 특허 제6,287,860호에 추가로 기술되어 있으며, 이는 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0208] 비경구, 기관내 또는 뇌실내 투여용 조성물 및 제형은 또한 완충제, 희석제 및 기타 적합한 첨가제, 예를 들어 이에 한정되지 않지만 침투 강화제, 담체 화합물 및 기타 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있는 멸균 수용액을 포함할 수 있다.

[0209] 본 발명의 특정 실시형태는 하나 이상의 올리고머 화합물 및 비-안티센스 기전에 의해 기능하는 하나 이상의 다른 화학치료제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 이러한 화학요법제의 예는 암 치료요법제, 예를 들어 다우노루비신, 다우노마이신, 닥티노마이신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 에소루비신, 블레오마이신, 마포스파미드, 이포스파미드, 시토신 아라비노시드, 비스클로로에틸-니트로스유레아, 부술판, 미토마이신 C, 악티노마이신 D, 미트라마이신, 프레드니손, 하이드록시프로게스테론, 테스토스테론, 타목시펜, 다카바진, 프로카바진, 핵사메틸멜라민, 펜타메틸멜라민, 미톡산트론, 암사크린, 클로람부실, 메틸사이클로헥실니트로스유레아, 질소 무스타드, 멜파란, 사이클로포스파미드, 6-멜캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-아자시티딘, 하이드록시유레아, 테옥시코포마이신, 4-하이드록시페록시사이클로-포스포라미드, 5-플루오로유라실(5-FU), 5-플루오로데옥시유리딘(5-FUdR), 메토티렉세이트(MTX), 콜히친, 탁솔, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드(VP-16), 트리메트렉세이트, 이리노테칸, 포토테칸, 젠타타빈, 테니포시드, 시스플라틴 및 다이에틸stil베스트롤(DES)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 화합물과 함께 사용될 때, 이러한 화학요법제는 개별적으로(예컨대, 5-FU 및 올리고뉴클레오타이드), 연속적으로(예컨대, 일정 시간 동안 5-FU 및 올리고뉴클레오타이드, 그 다음 MTX 및 올리고뉴클레오타이드), 또는 하나 이상의 다른 이러한 화학요법제(예컨대, 5-FU, MTX 및 올리고뉴클레오타이드, 또는 5-FU, 방사능요법 및 올리고뉴클레오타이드)와 조합하여 사용될 수 있다. 이에 한정되지 않지만 비스테로이드성 항염제 및 코르티코스테로이드를 포함하는 항염증제, 이에 한정되지 않지만 리비비린, 비다라빈, 아사이클로비르 및 겐사이클로비르를 포함하는 항바이러스 약물이 또한 본 발명의 조성물에 조합될 수 있다. 안티센스 화합물 및 다른 비-안티센스 약물의 조합은 또한 본 발명의 범주 내에 있다. 2개 이상의 조합된 화합물은 함께 또는 연속적으로 사용될 수 있다.

[0210] 또 다른 관련된 구체예에서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 안티센스 화합물, 특히 제1 핵산을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드 및 제 2 핵산 표적을 표적으로 하는 하나 이상의 추가적인 안티센스 화합물을 포함할 수

있다. 예를 들어, 제1 표적은 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1)의 특정 안티센스 서열일 수 있으며, 제2 표적은 또 다른 뉴클레오타이드 서열로부터의 영역일 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 조성물은 동일한 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1) 핵산 표적의 상이한 영역을 표적으로 하는 2개 이상의 안티센스 화합물을 포함할 수 있다. 안티센스 화합물의 다수의 예가 본 명세서에 설명되며, 기타 화합물은 당업계에 알려진 적합한 화합물 중에서 선택될 수 있다. 2개 이상의 조합된 화합물은 함께 또는 연속적으로 사용될 수 있다.

[0211] 투약(Dosing):

[0212] 치료 조성물의 제형 및 이의 후속적인 투여(투약)은 당업자의 기술 범위 내인 것으로 여겨진다. 투약은 수 일 내지 수 개월 지속되는 치료가 진행됨에 따라, 또는 치료가 이루어지고 질환 상태의 감소가 이루어질 때까지, 치료될 질환 상태의 중증도 및 반응성에 따라 다르다. 최적의 투약 스케줄은 환자의 신체 내 약물 축적의 측정으로부터 계산될 수 있다. 당업자는 최적의 투약량, 투약 방법 및 반복률을 용이하게 결정할 수 있다. 최적의 투약량은 개별적인 올리고뉴클레오타이드의 상대적 효능에 따라 다양할 수 있으며, 일반적으로 시험관 내 및 생체 내 동물 모델에서 효과적인 것으로 발견된 EC50을 기반으로 하여 추정된다. 일반적으로, 투약량은 체중 kg당 0.01 μ g 내지 100g이며, 매일, 매주, 매월 또는 매년 1번 이상, 또는 심지어 매 2년 내지 20년에 1번씩 제공될 수 있다. 당업자는 체액 또는 조직 내 약물의 측정된 체류 시간 및 농도를 기반으로 하여 투약에 대한 반복률을 용이하게 추정할 수 있다. 성공적인 처치 후, 질병 상태의 재발을 방지하기 위하여 환자가 유지요법을 받도록 하는 것이 바람직할 수 있으며, 여기에서 올리고뉴클레오타이드는 체중 kg 당 0.01 μ g 내지 100g의 범위로 매일 1번 이상 내지 매 20년에 1번 범위의 유지량으로 투여된다.

[0213] 하나의 실시형태에서, 환자는 적어도 약 1mg/체중 kg, 적어도 약 2mg/체중 kg, 적어도 약 3mg/체중 kg, 적어도 약 4mg/체중 kg, 적어도 약 5mg/체중 kg, 적어도 약 6mg/체중 kg, 적어도 약 7mg/체중 kg, 적어도 약 8mg/체중 kg, 적어도 약 9mg/체중 kg, 적어도 약 10mg/체중 kg, 적어도 약 15mg/체중 kg, 적어도 약 20mg/체중 kg, 적어도 약 25mg/체중 kg, 적어도 약 30mg/체중 kg, 적어도 약 35mg/체중 kg, 적어도 약 40mg/체중 kg, 적어도 약 45mg/체중 kg, 적어도 약 50mg/체중 kg, 적어도 약 60mg/체중 kg, 적어도 약 70mg/체중 kg, 적어도 약 80mg/체중 kg, 적어도 약 90mg/체중 kg, 또는 적어도 약 100mg/체중 kg의 약물 투약량으로 치료된다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 특정 주사 투약량은, 예컨대 미국 특허 제7,563,884호(발명의 명칭: "Antisense modulation of PTP1B expression")에 기술되어 있으며, 이는 본 명세서에 전문이 참조로 포함된다.

[0214] 본 발명의 다양한 실시형태가 상기에 기술되었지만, 이는 단지 예로서 제시된 것이고 이에 한정되지 않음을 이해해야 한다. 본 발명의 사상 또는 범주를 벗어나지 않고 본 명세서의 개시 내용에 따라 개시된 실시형태에 대한 다수의 변화가 이루어질 수 있다. 따라서, 본 발명의 범위 및 범주는 상기 기술된 임의의 실시형태에 의해 한정되어서는 안된다.

[0215] 본 명세서에 언급된 모든 문헌은 본 명세서에 참조로 포함된다. 본 출원에 인용된 모든 간행물 및 특허 문헌은 각각의 개별적인 간행물 또는 특허 문헌이 개별적으로 나타난 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위하여 참조로 포함된다. 본 서류에서 다양한 참조문헌의 인용에 의해 출원인은 임의의 특정 참조문헌이 본 발명에 대한 "선행 기술"인 것으로 인정하지 않는다. 본 조성물 및 방법의 실시형태는 하기 실시예에서 설명된다.

[0216] 실시예

[0217] 하기 비제한적인 실시예는 본 발명의 선택된 실시형태를 설명하는 데 도움이 된다. 나타난 성분에서 비율의 변화 및 요소의 대체는 당업자에게 명백할 것이며 본 발명의 실시형태의 범주 내임이 인식될 것이다.

[0218] 실시예 1: 막 결합 전사 인자 펩티다제, 부위 1(MBTPS1)에 대한 핵산 분자 안티센스 및/또는 MBTPS1 폴리뉴클레오타이드의 센스 가닥에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 고안

[0219] 상기 나타난 바와 같이 용어 "~에 특이적인 올리고뉴클레오타이드" 또는 "올리고뉴클레오타이드 표적"은 (i) 표적화된 유전자의 일부분과 안정적인 복합체를 형성할 수 있는, 또는 (ii) 표적화된 유전자의 mRNA 전사체의 일부분과 안정적인 듀플렉스를 형성할 수 있는 서열을 가진 올리고뉴클레오타이드를 말한다.

[0220] 적절한 올리고뉴클레오타이드의 선택은 핵산 서열을 자동으로 배열하고, 동일 또는 상동성의 영역을 나타내는 컴퓨터 프로그램을 사용함으로써 용이하게 된다. 이러한 프로그램은 예를 들어 GenBank와 같은 데이터베이스를 검색함으로써 또는 PCR 산물을 서열화함으로써 수득한 핵산 서열을 비교하는데 사용한다. 다양한 종으로부터의 핵산서열의 비교는 종 간 적절한 정도의 동일성을 나타내는 핵산 서열을 선택하게 한다. 서열화되지 않은 유전자의 경우에, 서던 블롯을 실행하여 표적 종과 다른 종의 유전자간 동일성 정도를 결정할 수 있게 한다. 당업계에 잘 알려진 바와 같이 다양한 엄격성 정도에서 서던 블롯을 실행함으로써, 동일성의 대략의 측정값을 얻을 수

있다. 이러한 절차는 제어될 개체에서 핵산 서열을 표적화하는 높은 정도의 상보성 및 다른 종에서 상응하는 핵산 서열에 낮은 정도의 상보성을 나타내는 올리고뉴클레오타이드를 선택하게 한다. 당업자는 본 발명에서의 사용을 위한 유전자의 적절한 영역을 선택함에 있어 상당한 허용 범위가 있음을 인지할 것이다.

- [0221] 안티센스 화합물은 표적 핵산에 대한 화합물의 결합이 표적 핵산의 정상적인 기능을 간섭하여 기능 및/또는 활성의 조절을 야기할 때 "특이적으로 혼성화가능"하고, 특이적 결합이 요구되는 조건 하, 즉 생체 내 분석 또는 치료적 처리의 경우에서 생리학적 조건 하, 그리고 시험관 내 분석의 경우에서 분석이 실행되는 조건 하에서 비 표적 핵산 서열에 안티센스 화합물의 비특이적 결합을 회피하기에 충분한 정도의 상보성이 있다.
- [0222] 본 명세서에 기술된 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 특성은 당업계에 알려진 바와 같이 하나 이상의 시험관 내 분석에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기술된 올리고뉴클레오타이드의 특성은 용융 곡선 분석(melting curve assay)을 사용하여 표적 천연 안티센스와 잠재적인 약물 분자들 사이에서 결합 강도의 측정에 의해 얻어질 수 있다.
- [0223] 표적 천연 안티센스와 잠재적인 약물 분자(Molecule) 사이에서 결합 강도는 분자간 상호작용의 강도를 측정하는 확립된 방법 중 임의의 것, 예를 들어 용융 곡선 분석을 사용하여 평가될 수 있다.
- [0224] 용융 곡선 분석은 천연 안티센스/분자 복합체에 대하여 이중 가닥에서 단일 가닥 구조로의 빠른 전이가 일어나는 온도를 결정한다. 이 온도는 2개 분자 사이에서 상호작용의 신뢰할 수 있는 척도로서 광범위하게 인정된다.
- [0225] 용융 곡선 분석은 실제 천연 안티센스 RNA 분자 또는 분자의 결합 부위에 상응하는 합성 DNA 또는 RNA 뉴클레오타이드의 cDNA 복사체를 사용하여 실행될 수 있다. 이러한 분석을 실행하기 위하여 모든 필수 시약을 포함하는 다중 키트가 입수가능하다(예컨대, Applied Biosystems Inc. MeltDoctor kit). 이러한 키트는 이중 가닥 DNA(dsDNA) 결합 염료(예를 들어 ABI HRM 염료, SYBR Green, SYTO 등) 중 하나를 포함하는 적합한 완충액을 포함한다. dsDNA 염료의 특성은 상기 염료가 유리 형태로 형광을 거의 방출하지 않지만, dsDNA에 결합할 때에는 상당히 형광성이라는 것이다.
- [0226] 상기 분석을 실행하기 위하여, cDNA 또는 상응하는 올리고뉴클레오타이드는 특정 제조자의 프로토콜에 의해 한 정된 농도로 분자와 혼합된다. 혼합물을 95℃로 가열하여 모든 미리 형성된 dsDNA 복합체를 해리시키고, 그 다음 실온 또는 키트 제조자에 의해 한정된 다른 더 낮은 온도로 냉각하여 DNA 분자가 어닐링되게 한다. 그 다음 동시에 반응에 의해 생성된 형광물질의 양에 대한 데이터를 동시에 계속 수집하면서, 새로 형성된 복합체를 서서히 95℃로 가열한다. 형광 강도는 반응에 존재하는 dsDNA의 양에 역비례한다. 상기 키트와 양립가능한 실시간 PCR 장비(예컨대, ABI's StepOne Plus Real Time PCR System 또는 LightTyper 장비, 영국 루이스 소재 Roche Diagnostics)를 사용하여 데이터를 수집할 수 있다.
- [0227] 적절한 소프트웨어(예를 들어, LightTyper(Roche) 또는 SDS Dissociation Curve, ABI)를 사용하여 온도(x-축)에 대하여 온도에 대한 형광물질의 음성 유도체(y-축 상에 $-d(\text{형광물질})/dT$)를 플롯팅함으로써 용융 피크가 구성된다. 상기 데이터를 분석하여 dsDNA 복합체로부터 단일 가닥 분자로의 빠른 전이의 온도를 확인한다. 이 온도는 T_m 이라고 하며, 두 분자 사이에서 상호작용의 강도에 직접적으로 비례한다. 전형적으로, T_m 은 40℃를 초과할 것이다.
- [0228] 실시예 2: MBTPS1 폴리뉴클레오타이드의 조절
- [0229] HEPG2 세포를 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리
- [0230] ATCC (cat# HB-8065)의 HepG2 세포를 37℃, 5% CO₂에서 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 당일, 6개 웰 플레이트에 있는 배지는 신선한 성장 배지로 바꾸었다. 모든 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 20 μM의 농도로 희석하였다. 이 용액 2 μl를 400 μl의 Opti-MEM 배지(Gibco cat#31985-070) 및 4 μl의 리포펙타민(Lipofectamine) 2000(Invitrogen cat# 11668019)와 실온에서 20분간 항온처리하고, HEPG2 세포가 있는 6개 웰 플레이트의 각 웰에 적용하였다. 올리고뉴클레오타이드 용액 대신 물 2 μl를 포함하는 유사 혼합물을 가짜-처리된 대조군으로 사용하였다. 37℃, 5% CO₂에서 3~18시간 동안 항온처리 후, 배지를 신선한 성장 배지로 바꾸었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 첨가하고 48시간 후, 배지를 제거하였고, SV Total RNA Isolation System(Promega, cat # Z3105) 또는 RNeasy Total RNA Isolation 키트(Qiagen, cat# 74181)를 사용하여 제조자의 지시에 따라 세포로부터 RNA를 추출하였다. Verso cDNA 키트(Thermo Scientific, cat#AB1453B) 또는 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(cat# 4368813)를 사

용하여 제조자의 프로토콜에 기술된 바와 같이 실행된 역전사 반응에 600ng의 RNA를 첨가하였다. 이러한 역전사 반응으로부터의 cDNA를 사용하여 ABI Taqman Gene Expression Mix(cat#4369510) 및 ABI에 의해 고안된 프라이머/프로브(Applied Biosystems Taqman Gene Expression Assay: Hs00921626_m1, 미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재 Applied Biosystems Inc. 제공)를 사용하여 실시간 PCR에 의해 유전자 발현을 모니터링하였다. 하기와 같은 PCR 주기가 사용되었다: 50℃에서 2분, 95℃에서 10분, Mx4000 열순환기(Stratagene)를 사용하여 (95℃에서 15초, 60℃에서 1분)을 40회. 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리한 후에 유전자 발현에서의 배수 변화를 처리된 샘플과 가짜-형질감염된 샘플 사이에서 18S-정규화된 dCt 값에서의 차이를 기반으로 하여 계산하였다.

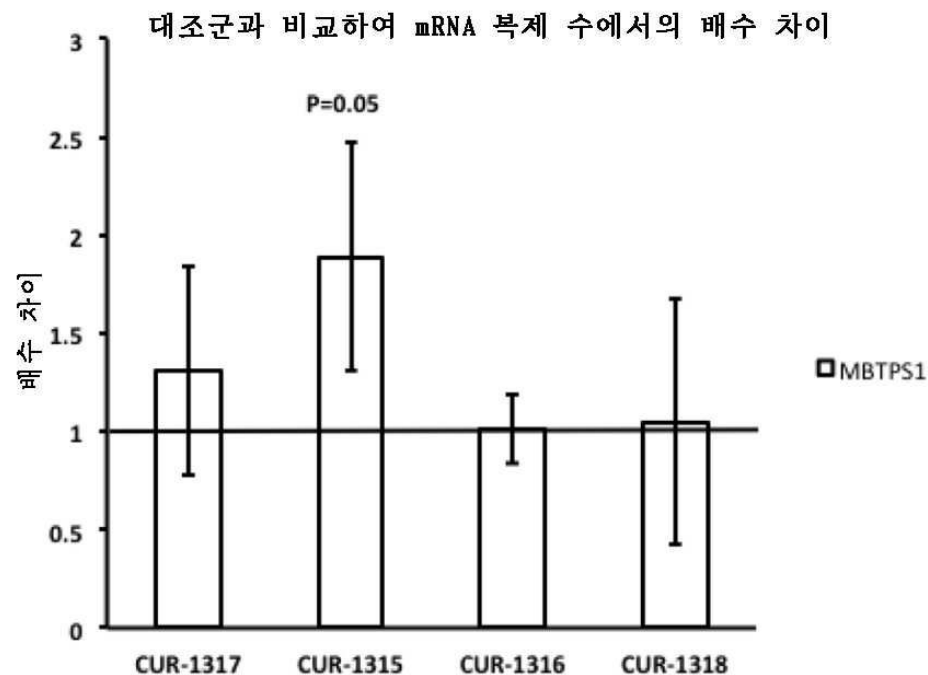
[0231] **결과:** 실시간 PCR 결과는, MBTPS1 안티센스 Hs.568369에 대하여 고안된 올리고 중 하나로 처리하고 48시간 후 HepG2 세포에서 MBTPS1 mRNA의 수준이 상당히 증가된다는 것을 보여준다.

[0232] 본 발명은 하나 이상의 실행에 대하여 설명되고 기술되었지만, 본 명세서 및 첨부된 도면의 해석 및 이해시 당업자에 의해 동등한 변형 및 변형이 일어날 것이다. 추가적으로, 본 발명의 특정한 특징은 단지 몇몇 실행 중 하나에 대하여 개시되었지만, 이러한 특징은 임의의 주어진 또는 특정 적용에 대하여 요구되거나 유리할 수 있는 다른 실행의 하나 이상의 다른 특징과 조합될 수 있다.

[0233] 본 개시 내용의 요약은 독자가 기술 개시 내용의 성질을 빠르게 확인할 수 있게 할 것이다. 이는 하기 청구범위의 범위 또는 의미를 해석하거나 한정하는데 사용되지 않을 것이라는 이해와 함께 제출된다.

도면

도면1



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> OPKO CuRNA, LLC

<120> TREATMENT OF MEMBRANE BOUND TRANSCRIPTION FACTOR PEPTIDASE, SITE

1 (MBTPS1) RELATED DISEASES BY INHIBITION OF NATURAL ANTISENSE

TRANSCRIPT TO MBTPS1

<130> MBTPS1

<150> US61/286924

<151> 2009-12-16

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4354

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<300><308> NM_003791

<309> 2010-09-21

<313> (1)..(4354)

<400> 1

gacagacagg gcacgctggg tcggcggagc tgaggctccc agctgtgggc ctgctggcc 60

cggtcgccca gtctcgcgag agttgggagt aaacagcccc gaatggagtg cccaggcgtg 120

ttcgccgagg aggcgccgtt atccccggcc cgccggccct gagtccccgg cggcgagat 180

tggctcacag tggttgattg atcaaccca ttggacgttg gttctgtggt acaaattggag 240

tacaggactc agtcgtcacg gcctgagtga gagaagcctt attccaaga tggagaagaa 300

gcggagaaag aaatgaaagc ctctcttcag gctgaaccac aaaaggccat gggatttaac 360

ttttatttat gttgggcaag actgtaagat ggctgattag taatgttgca gcttttagct 420

gaaacaaaaa ttcactttta atcaagaaga aaaaagtgtg atttgaatat atgcaatttt 480

atgatcatat tcgcttgatg ccatgaagct tgcaacatc tggctgcttc tgctcgtggt 540

tttgctctgt gggaagaaac atctgggcga cagactggaa aagaaatctt ttgaaaaggc 600

cccatgccct ggctgttccc acctgacttt gaaggtggaa ttctcatcaa cagttgtgga 660

atatgaatat attgtggctt tcaatggata ctttacagcc aaagctagaa attcatttat 720

ttcaagtgcc ctgaagagca gtgaagtaga caattggaga attatacctc gaaacaatcc 780

atccagtgcac taccctagtg attttgaggt gattcagata aaagaaaaac agaaagcggg 840

gctgctaaca ctgaagatc atccaaacat caaacgggtc acgccccaac gaaaagtctt 900

tcgttccctc aagtatgctg aatctgacct cacagtacct tgcaatgaaa cccggtggag 960

ccagaagtgg caatcatcac gtccccctgcg aagagccagc ctctccctgg gctctggctt 1020

ctggcatgct acgggaaggc attcgagcag acggctgctg agagccatcc cgcgccagg 1080

tgcccagaca ctgcaggcag atgtgctctg gcagatggga tatacagggtg ctaatgtaag	1140
agttgctgtt ttgacactg ggctgagcga gaagcatccc cacttcaaaa atgtgaagga	1200
gagaaccaac tggaccaacg agcgaacgct ggacgatggg ttgggccatg gcacattcgt	1260
ggcagggtgtg atagccagca tgagggagtg ccaaggattt gctccagatg cagaacttca	1320
cattttcagg gtctttacca ataatcagggt atcttacaca tcttggtttt tggacgcctt	1380
caactatgcc attttaaga agatcgacgt gttaaacctc agcatcggcg gcccgactt	1440
catggatcat ccgtttgttg acaagggtgtg ggaattaaca gctaacaatg taatcatggt	1500
ttctgctatt ggcaatgacg gacctcttta tggcactctg aataaccctg ctgatcaaat	1560
ggatgtgatt ggagtaggcg gcattgactt tgaagataac atcgcccgtt tttcttcaag	1620
gggaatgact acctgggagc taccaggagg ctacggtcgc atgaaacctg acattgtcac	1680
ctatggtgct ggcgtgcggg gttctggcgt gaaagggggg tgccggggcc tctcaggggac	1740
cagtgttgct tctccagtgg ttgcagggtgc tgtcaccttg ttagtgagca cagtccagaa	1800
gcgtgagctg gtgaatcccg ccagtatgaa gcaggccctg atcgcgtcag cccggaggct	1860
ccccggggtc aacatgtttg agcaaggcca cggcaagctc gatctgctca gagcctatca	1920
gaccccaac agctacaagc cacaggcaag tttagagccc agctacatag atctgactga	1980
gtgtccctac atgtggccct actgtctcca gcccatctac tatggaggaa tgccgacagt	2040
tgtaaatgtc accatctca acggcatggg agtcacagga agaattgtag ataagcctga	2100
ctggcagccc tatttgccac agaacggaga caacattgaa gttgccttct cctactctc	2160
ggtcttatgg ccttggtcgg gctacctggc catctccatt tctgtgacca agaaagcggc	2220
ttcctgggaa ggcatgtctc agggccatgt catgatcact gtggcttccc cagcagagac	2280
agagtcaaaa aatggtgcag aacagacttc aacagtaaag ctccccatta aggtgaagat	2340
aattcctact cccccgcaa gcaagagagt tctctgggat cagtaccaca acctcgccta	2400
tccacctggc tatttccca gggataattt aaggatgaag aatgaccctt tagactggaa	2460
tggatgacac atccacacca atttcaggga tatgtaccag catctgagaa gcatgggcta	2520
ctttgtagag gtctcggggg ccccttcac gtgttttgat gccagtcagt atggcacttt	2580
gctgatggtg gacagtgagg aggagtactt ccctgaagag atcgccaagc tccggaggga	2640
cgtggacaac ggcctctcgc tcgtcatctt cagtgactgg tacaacactt ctgttatgag	2700
aaaagtgaag ttttatgatg aaaacacaag gcagtgggtg atgccggata ccggaggagc	2760
taacatccca gctctgaatg agctgctgtc tgtgtggaac atggggttca gcgatggcct	2820
gtatgaaggg gagttcaccc tggccaacca tgacatgtat tatgcgtcag ggtgcagcat	2880
cgcaagttt ccagaagatg gcgtcgtgat aacacagact ttcaaggacc aaggattgga	2940

ggtttttaag caggaaacag cagttgttga aaacgtcccc attttgggac tttatcagat 3000

tccagctgag ggtggaggcc ggattgtact gtatggggac tccaattgct tggatgacag 3060

tcaccgacag aaggactgct tttggcttct ggatgccctc ctccagtaca catcgtatgg 3120

ggtgacaccg cctagcctca gtcactctgg gaaccgccag cgccctccca gtggagcagg 3180

ctcagtcact ccagagagga tggaaagaaa ccatcttcat cgggtactcca aggttctgga 3240

ggcccatittg ggagacccaa aacctcggcc tctaccagcc tgtccacgct tgtcttgggc 3300

caagccacag cctttaaacg agacggcgcc cagtaacctt tggaacatc agaagctact 3360

ctccattgac ctggacaagg tgggtgttacc caactttcga tcgaatcgcc ctcaagtgag 3420

gcccttgtcc ccaggagaga gcggcgccctg ggacattcct ggagggatca tgcctggccg 3480

ctacaaccag gaggtgggcc agaccattcc tgtctttgcc ttcttgggag ccatggtggt 3540

cctggcccttc tttgtggtac aaatcaacaa ggccaagagc aggccgaagc ggaggaagcc 3600

caggggtgaag cgcccgagc tcatgcagca ggttcacccg ccaaagacc cttcggtgtg 3660

accggcagcc tggctgaccg tgagggccag agagagcctt cacggacggc gctggtgggt 3720

gagccgagct gtggtggcgg ctggtttaaa agggatccag tttccagctg caggtttgtt 3780

agagtctgtt ctacatgggc ctgccctcct gtgatgggca gaggtcctg gtacatcgag 3840

aagattcctg tggatcccg caggaggac ttagtggtc tgccgccagt gagacttccc 3900

gccggcagct gtgcgcacca aagactcggg agaactggaa aggctgtctg ggtcttctg 3960

actgcagggg aaggatgtac tttccaaaca atgatacaa ccctgaccaa gctaaaagac 4020

gcttgttaaa ggctattttc tatatttatt gttgggaaaa gtcactttaa agacttgtgc 4080

tatttgaag caaagctatt tttttgtca gtggaatgca gtttttttac tattccatca 4140

tgaggaacaa catagattcc atgatctttt taatgacagt acagactgag atttgaagga 4200

aacatgcaca aatctgtaaa acatagacct tcgctttatt tttgtaagta tcacctgcca 4260

ccatgttttg taatttgagg tcttgatttc accattgtcg gtgaagaaaa ttttcaataa 4320

atatgtatta cccgtctgaa gcttaaaaaa aaaa 4354

<210> 2

<211> 1240

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

tgccaggcgg cgagaacgcg ctgggggaac ccttgggtccg ctctgcgctg cgctctagga 60

tccccgaaaa ggagcacggg cgcgaaagcg gccaggctgg gccaggatct agaaagactg 120

cctggcgag gctccctgcc cccgcgggcc tgctgtcatg gactcgtgga gagctcgctt 180
cccgcgcga cccttcctgc aggggtccac gtccaggcac cggcggctcg gacacccac 240

ccccggccgg gcacctgccc tgggtgcccc ttaaccggg cggtagctcg ttaagatggc 300
gaagtgtccg gtccggaaca cgcgaaaccc caaatccgc ctgcccagacc tctgacccc 360
cggcccccac ggacgacaga ctgggcctcc cgacgcgag cgcgctgccg ggacaccggg 420
tgctgcgaa acggcaggac cctttgtaac gccacgtgtc ttgtctttc ttgacaaaac 480
cagaataaat gcgtcaact ggcctgaaaa aggtctgccc gcctaataaa aaaaaaaaaa 540
cgggcgcgtc ggctcctagc agcatcccc cccagggggc cccaagcgtt taggcggtaa 600
cccccggttt ttgtttgtt acaaaaccga gggtccccct tataagggcg agggtcgcga 660

cattcacata cagccccggc cggctacctt gggttcgcg tcgcccctgt tccaccagag 720
cgcgcccctg tgtgatactt ggggcgagac aacaaacacg tgtgattaca ggactctggg 780
ggggcgaaca cctcacctc gcttgagaat aacgggaata ccccccttc acgttatctc 840
ctacgggggg gggggggggc ggcgaaaaac aattacgtct gtcggtggga caccgcgcac 900
atgtacaga cctggagagc gggaaggtaa tattgtctaa aataaagccg cgcccttag 960
cggcgcgcg acgaacatat gtcatacacc aatgtccctt gtctcacaca cccggaacac 1020
gacagcaaag gcggggggcg tccaaacagg atcgaggcca cgcgctctgc ttaacgaggc 1080

actcgtggc gctgcacct ccttcgacgc tgagaatcta tttcgtgcgc gtcacctgt 1140
gaacaagccg actagggagg atatgtccc ggccaacacc cgcggtcatc ctctccgcgc 1200
gcacagtgcg cgcgcgcgt cctcggagtg ccccgctaata 1240

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide
<400> 3
gaccggacac ttgccatct 20
<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 4
gcagtcctttc tagatcctgg c 21
<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide
<400> 5
ctccacgagt ccatgacagc a 21
<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligonucleotide
<400> 6
gcgccaggca gtctttctag a 21