



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0094323
(43) 공개일자 2011년08월23일

(51) Int. Cl.

A61K 31/7105 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7015251

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년12월04일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2011년07월01일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/066741

(87) 국제공개번호 WO 2010/065834

국제공개일자 2010년06월10일

(30) 우선권주장

61/119,779 2008년12월04일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

옵코 옵탈믹스, 엘엘씨

미국 플로리다 33137 마이애미 비스케이 블러바드 4400

(72) 발명자

프로스트 필립

미국 플로리다주 33139 마이애미 비치 스타 아일랜드 21

데즈네카 나다인

미국 펜실베이니아주 19096 윈우드 아파트먼트 비412 노쓰 윈우드 애비뉴 200

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장훈

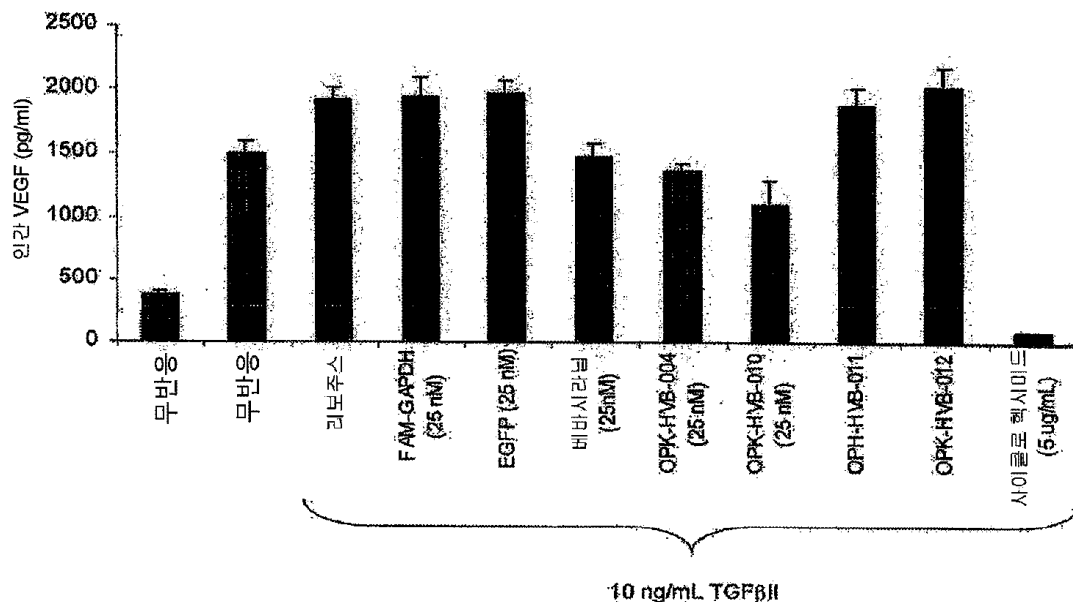
전체 청구항 수 : 총 60 항

(54) 항-혈관신생성 VEGF 이소형의 선택적 억제제를 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 이소형의 발현을 억제하는데 유용한 siRNA 조성물과 상기 VEGF 이소형의 발현을 억제하는데 유용한 방법을 개시한다. 이러한 조성물과 방법은 항-혈관신생성 이소형을 선택적으로 존속 시키면서 혈관신생성 VEGF 이소형을 선택적으로 표적으로 삼을 수 있는 siRNA를 추가로 포함한다. VEGF의 과발 현에 의해 자극을 받는 혈관신생을 포함하는 질환, 예컨대, 당뇨병망막병증, 연령 관련 황반 변성 및 많은 유형의 암은 본원에 개시된 것과 같은 작은 간섭 RNAs를 투여하여 치료될 수 있다.

대표도



(72) 발명자

본드 오토리나 에스.

미국 플로리다주 33160 아벤투라 씨403 노쓰이스트
31스트 코트 18151

삼스 나비드

미국 캘리포니아주 94506 덴빌 도브 크리크 레인
216

(30) 우선권주장

61/171,571 2009년04월22일 미국(US)

61/219,808 2009년06월24일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

제 1 RNA 가닥 및 제 2 RNA 가닥의 이중나선을 포함하는 분리된 siRNA로서, 상기 제 1 RNA 가닥은 인간 VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, VEGF₁₈₃, VEGF₁₄₈, VEGF₁₄₅ 및 이들의 조합물로 구성된 군에서 선택된 혈관 내피 성장 인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 이소형에 대한 약 17개 내지 약 25개의 연속된 뉴클레오티드의 표적 서열과 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하고; 추가로 상기 siRNA는 VEGF_{165b}와 적어도 부분적으로 비상보적 인, 분리된 siRNA(단, 상기 인간 VEGF mRNA는 서열목록번호: 42가 아님을 전제 조건으로 함).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인간 VEGF mRNA가 서열목록번호: 86; 서열목록번호: 87; 서열목록번호: 88; 서열목록번호: 89; 서열목록번호: 90; 서열목록번호: 91; 서열목록번호: 92; 서열목록번호: 93; 서열목록번호: 94; 서열목록번호: 95; 서열목록번호: 96; 서열목록번호: 97; 서열목록번호: 98, 서열목록번호: 99; 서열목록번호: 100; 서열목록번호: 101; 서열목록번호: 102; 서열목록번호: 103; 서열목록번호: 104; 서열목록번호: 105; 서열목록번호: 106; 서열목록번호: 107; 서열목록번호: 108; 서열목록번호: 109; 서열목록번호: 110; 서열목록번호: 111; 서열목록번호: 112; 서열목록번호: 113; 서열목록번호: 114; 서열목록번호: 115; 서열목록번호: 116, 서열목록번호: 117; 및 서열목록번호: 118로 구성된 군에서 선택된 것인, siRNA.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 RNA 이중나선을 형성하는 상기 제 1 및 제 2 RNA 가닥이 단일-가닥 헤어핀에 의해 공유결합적으로 연결되어 있는, siRNA.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 siRNA가 비-뉴클레오티드 물질을 추가로 포함하는, siRNA.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 RNA 가닥이 뉴클레아제 분해에 대해 안정한, siRNA.

청구항 6

제1항에 있어서, 3' 돌출부를 추가로 포함하는, siRNA.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 3' 돌출부가 1개 내지 약 6개의 뉴클레오티드를 포함하는, siRNA.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 3' 돌출부가 약 2개의 뉴클레오티드를 포함하는, siRNA.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 센스 RNA 가닥이 제 1의 3' 돌출부를 포함하고, 상기 안티센스 RNA 가닥이 제 2의 3' 돌출부를 포함하는, siRNA.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2의 3' 돌출부 각각이 1개 내지 약 6개의 뉴클레오티드를 포함하는, siRNA.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 제 1의 3' 돌출부가 디뉴클레오티드를 포함하고, 상기 제 2의 3' 돌출부가 디뉴클레오티드를 포함하는, siRNA.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2의 3' 돌출부를 포함하는 상기 디뉴클레오티드가 디티미딜산(dithymidylic acid)(TT) 또는 디우리딜산(diuridylic acid)(uu)을 포함하는, siRNA.

청구항 13

제6항에 있어서, 상기 3' 돌출부가 뉴클레아제 분해에 안정한, siRNA.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 siRNA가 하나 이상의 평활 말단(blunt end)을 포함하는, siRNA.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 siRNA가 19개의 뉴클레오티드로 구성된 것인, siRNA.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 siRNA가 인간 세포 및 래트 세포로부터의 VEGF의 생산 또는 분비를 억제할 수 있는, siRNA.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 siRNA가 인간 세포, 마우스 세포, 및 래트 세포로부터의 VEGF의 생산 또는 분비를 억제할 수 있는, siRNA.

청구항 18

제 1 RNA 가닥 및 제 2 RNA 가닥의 이중나선을 포함하는 분리된 siRNA로서, 상기 제 1 RNA 가닥은 인간 VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, 및 VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, VEGF₁₈₃, VEGF₁₄₈, VEGF₁₄₅ 및 이들의 조합물로 구성된 군에서 선택된 VEGF 이소형에 대한 약 17개 내지 약 25개의 연속된 뉴클레오티드의 표적 서열과 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하고; 추가로 상기 siRNA는 VEGF_{165b}와 비상보적인, 분리된 siRNA(단, 상기 인간 VEGF mRNA가 서열목록번호: 42가 아님을 전제 조건으로 함).

청구항 19

siRNA 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물로서, 상기 siRNA가 제 1 RNA 가닥 및 제 2 RNA 가닥의 이중나선으로 구성되고, 상기 제 1 RNA 가닥은 인간 VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, 및 VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, VEGF₁₈₃, VEGF₁₄₈, VEGF₁₄₅ 및 이들의 조합물로 구성된 군에서 선택된 VEGF 이소형에 대한 약 17개 내지 약 25개의 연속된 뉴클레오티드의 표적 서열과 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하고; 추가로 상기 siRNA는 VEGF_{165b}와 적어도 부분적으로 비상보적인, 약학 조성물(단, 상기 인간 VEGF mRNA가 서열목록번호: 42가 아님을 전제 조건으로 함).

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 인간 VEGF mRNA가 서열목록번호: 86; 서열목록번호: 87; 서열목록번호: 88; 서열목록번호: 89; 서열목록번호: 90; 서열목록번호: 91; 서열목록번호: 92; 서열목록번호: 93; 서열목록번호: 94; 서열목록번호: 95; 서열목록번호: 96; 서열목록번호: 97; 서열목록번호: 98, 서열목록번호: 99; 서열목록번호: 100; 서열목록번호: 101; 서열목록번호: 102; 서열목록번호: 103; 서열목록번호: 104; 서열목록번호: 105; 서열목록번호: 106; 서열목록번호: 107; 서열목록번호: 108; 서열목록번호: 109; 서열목록번호: 110; 서열목록번호: 111; 서열목록번호: 112; 서열목록번호: 113; 서열목록번호: 114; 서열목록번호: 115; 서열목록번호: 116; 서열목록번호: 117; 및 서열목록번호: 118로 구성된 군에서 선택된 것인, 약학 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 RNA 가닥이 뉴클레아제 분해에 안정한, 약학 조성물.

청구항 22

제19항에 있어서, 적어도 하나의 3' 돌출부를 추가로 포함하는, 약학 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 적어도 하나의 3' 돌출부가 약 2개의 뉴클레오티드를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 적어도 하나의 3' 돌출부가 디티미딜산(TT) 또는 디우리딜산(uu)을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 25

제19항에 있어서, 상기 센스 RNA 가닥이 제 1의 3' 돌출부를 포함하고, 상기 안티센스 RNA 가닥이 제 2의 3' 돌출부를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 26

제19항에 있어서, 상기 siRNA가 적어도 하나의 평활 말단을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 siRNA가 19개의 뉴클레오티드인, siRNA.

청구항 28

제19항에 있어서, 상기 siRNA가 인간 세포 및 래트 세포로부터의 VEGF의 생산 또는 분비를 억제할 수 있는, siRNA.

청구항 29

제19항에 있어서, 상기 siRNA가 인간 세포, 마우스 세포 및 래트 세포로부터의 VEGF의 생산 또는 분비를 억제할 수 있는, siRNA.

청구항 30

siRNA 및 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 유효량의 약학 조성물을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 피험자에서 혈관신생성 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 siRNA가 제 1 RNA 가닥 및 제 2 RNA 가닥의 이중 나선으로 구성되고, 상기 제 1 RNA 가닥이 인간 VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, 및 VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, VEGF₁₈₃, VEGF₁₄₈, VEGF₁₄₅ 및 이들의 조합물로 구성된 군에서 선택된 VEGF 이소형에 대한 약 17개 내지 약 25개의 연속된 뉴클레오티드의 표적 서열과 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하며; 추가로 상기 siRNA는 VEGF_{165b}와 적어도 부분적으로 비상보적인, 피험자에서 혈관신생성 질환을 치료하는 방법(단, 상기 인간 VEGF mRNA가 서열목록번호: 42가 아님을 전제 조건으로 함).

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 혈관신생성 질환이 암과 연관된 종양을 포함하는, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 암이 유방암, 폐암, 두경부암, 뇌암, 복부암, 대장암, 결장직장암, 식도암, 위장암, 신경교종, 간암, 설암, 신경모세포종, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 망막아세포종, 빌름스 종양, 다발성 골수종, 피부암, 림프종, 및 혈액암으로 구성된 군에서 선택된 것인, 방법.

청구항 33

제30항에 있어서, 상기 혈관신생성 질환이 당뇨병망막병증, 연령관련황반변성, 및 염증성 질환으로 구성된 군에서 선택된 것인, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 염증성 질환이 건선 또는 류마티스 관절염인, 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 상기 혈관신생성 질환이 연령관련황반변성인, 방법.

청구항 36

제30항에 있어서, 상기 약학 조성물이 상기 혈관신생성 질환을 치료하기 위한 약제(pharmaceutical agent)와 병용하여 투여되며, 상기 약제가 상기 작은 간섭 리보핵산(short interfering ribonucleic acid, siRNA)과 상이한, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 혈관신생성 질환이 암이고, 상기 약제가 화학요법제를 포함하는, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 화학요법제가 시스플라틴, 카르보플라틴, 사이클로포스파미드, 5-플루오로우라실, 아도리아마이신, 다우노루비신, 및 타목시펜으로 구성된 군에서 선택된 것인, 방법.

청구항 39

제30항에 있어서, 상기 약학 조성물이 상기 혈관신생성 질환을 치료하기 위해 고안된 또 다른 치료 방법과 조합하여 피험자에게 투여되는, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 혈관신생성 질환이 암이고, 상기 약학 조성물이 방사선 요법, 화학요법 또는 외과수술과 조합하여 투여되는, 방법.

청구항 41

siRNA 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 유효량의 약학 조성물을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 siRNA는 제 1 RNA 가닥 및 제 2 RNA 가닥의 이중나선으로 구성되고, 상기 제 1 RNA 가닥은 인간 VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, 및 VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, VEGF₁₈₃, VEGF₁₄₈, VEGF₁₄₅ 및 이들의 조합물로 구성된 군에서 선택된 VEGF 이소형에 대한 약 17개 내지 약 25개의 연속된 뉴클레오티드의 표적 서열과 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하며; 추가로 상기 siRNA는 VEGF_{165b}와 적어도 부분적으로 비상보적인, 인간 혈관 내피 성장 인자(VEGF)의 발현을 억제하는 방법(단, 상기 인간 VEGF mRNA는 서열목록번호: 42가 아님을 전제조건으로 함).

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 유효량이 약 1 nM 내지 약 100 nM의 작은 간섭 리보핵산(siRNA)을 포함하는, 방법.

청구항 43

제41항에 있어서, 상기 약학 조성물이 전달물질(delivery reagent)을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 44

제41항에 있어서, 상기 전달물질이 리포펙틴, 리포펙타민, 쉘펙틴, 다양이온(polycations), 및 리포솜으로 구성된 군에서 선택된 것인, 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 전달물질이 리포솜인, 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 리포솜이 당해 리포솜이 혈관신생 부위의 또는 혈관신생 부위 근처의 세포를 표적으로 삼도록 하는 리간드를 포함하는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 리간드가 종양 세포 또는 혈관 내피 세포 상의 수용체에 결합하는, 방법.

청구항 48

제46항에 있어서, 상기 리간드가 모노클로날 항체를 포함하는, 방법.

청구항 49

제45항에 있어서, 상기 리포솜이 옴소닌작용-저해 모이어티(opsonization-inhibiting moiety)로 변형된 것인, 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 옴소닌작용-저해 모이어티가 PEG, PPG, 또는 이들의 유도체를 포함하는, 방법.

청구항 51

제41항에 있어서, 상기 작은 간섭 리보핵산(siRNA)이 재조합 플라스미드에서 발현되는 것인, 방법.

청구항 52

제41항에 있어서, 상기 작은 간섭 리보핵산(siRNA)이 재조합 바이러스 벡터에서 발현되는 것인, 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 재조합 바이러스 벡터가 아데노바이러스 벡터, 아데노부속바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 헤르페스바이러스 벡터를 포함하는, 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 재조합 바이러스 벡터가 수포성구내염바이러스(vesicular stomatitis virus), 광견병 바이러스, 에볼라바이러스, 또는 모콜라바이러스(Mokola virus)로부터의 표면 단백질로 위화된(pseudotyped), 방법.

청구항 55

제52항에 있어서, 상기 재조합 바이러스 벡터가 아데노부속바이러스 벡터를 포함하는, 방법.

청구항 56

제41항에 있어서, 상기 약학 조성물이 경장(enteral) 투여 경로로 투여되는, 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 경장 투여 경로가 구강, 직장, 및 비강내로 구성된 군에서 선택된 것인, 방법.

청구항 58

제41항에 있어서, 상기 약학 조성물이 비경구 투여 경로에 의해 투여되는, 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 비경구 투여 경로가 혈관내 투여, 조직주위 및 조직내 주사, 피하 주사 또는 침착(deposition), 피하 주입(subcutaneous infusion), 및 신혈관형성 부위에 또는 신혈관형성 부위 근처에 직접 적용으로 구성된 군에서 선택된 것인, 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 혈관내 투여가 정맥내 볼루스 주사, 정맥내 주입, 동맥내 볼루스 주사, 동맥내 주입 및 혈관계내 카테터 설치로 구성된 군에서 선택되는, 방법.

명세서

기술분야

[0001] 관련 특허출원의 상호참조:

[0002] 본 특허출원은 "VEGF의 선택적 억제를 위한 조성물과 방법(Compositions and Methods for Selective Inhibition of VEGF)"이라는 발명의 명칭으로 2008년 12월 4일에 출원된 미국 가특허출원 제61/119,779호, "VEGF의 선택적 억제를 위한 조성물과 방법(Compositions and Methods for Selective Inhibition of VEGF)"이라는 발명의 명칭으로 2009년 4월 22일에 출원된 미국 가특허출원 제61/171,571호, 및 "VEGF의 선택적 억제를 위한 조성물과 방법(Compositions and Methods for Selective Inhibition of VEGF)"이라는 발명의 명칭으로 2009년 6월 24일에 출원된 미국 가특허출원 제61/219,808호에 대하여 우선권을 주장하며, 본원은 상기 특허출원 각각을 전체로 참조문헌으로써 포함한다.

[0003] 정부 지원: 해당사항 없음

[0004] 합동연구협의를 위한 단체: 해당사항 없음

[0005] 콤팩트 디스크로 제출된 자료의 참조에 의한 통합: 해당사항 없음

배경기술

[0006] 1. 발명의 분야: 해당사항 없음

[0007] 2. 관련 기술의 설명: 해당사항 없음

발명의 내용

[0008] 새로운 모세 혈관의 성장 또는 "신혈관형성(neovascularization)"으로 정의되는, 혈관신생(angiogenesis)은 성장과 발달에 근본적 역할을 한다. 성숙한 인간에서, 혈관신생을 개시하는 활성은 모든 조직에 존재하나, 엄격하게 통제된다. 혈관신생의 핵심 조절인자(regulator)는 혈관내피성장인자("VEGF(vascular endothelial growth factor)")인데, 이것은 혈관투과인자("VPF(vascular permeability factor)")로도 지칭된다. 혈관신생은 분비된 VEGF가 Flt-1과 Flk-1/KDR 수용체(VEGF 수용체 1 및 VEGF 수용체 2로도 지칭됨)에 결합할 때 개시되는데, 상기 수용체들은 내피 세포의 표면 상에 발현된다. Flt-1과 Flk-1/KDR은 막관통 단백질 티로신인산화효소이고, VEGF의 결합은 주변 조직에서 최종 신혈관형성을 야기시키는 세포신호전달체계를 작동시킨다.

[0009] 3개의 상이한 주요 VEGF 대체 스플라이싱 형태(즉, 이소형)가 인간에 존재하며(VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, 및 VEGF₁₈₉), 한편 다수의 다른 변이체들도 존재한다(VEGF₂₀₆, VEGF₁₈₃, VEGF₁₄₈, VEGF_{165b} 및 VEGF₁₄₅). 놀랍게도, 상기 이소형들 모두가 항-혈관신생성(pro-angiogenic)인 것은 아니다. 적어도 VEGF_{165b}가 VEGF₁₆₅ 유도 혈관신생의 효과를 상쇄시킬 수 있다는 것은 입증되었다. 이론에 의해 제한됨이 없이, VEGF_{165b}가 분명히 VEGF 수용체 2 신호전달을 막을 수 있는 것으로 보인다. 그에 따라서, VEGF_{165b}의 분비는 병리학적 상태에서 혈관신생을 막거나 지연시킬 수 있을 것이다.

[0010] 비정상적 혈관신생, 또는 신규 혈관의 병적 성장은 수많은 질환(conditions)과 연루되어 있다. 이러한 질환들 중에는 당뇨병망막병증, 건선, 삼출성 또는 "습성" 연령관련황반변성("ARMD(age-related macular degeneration)"), 류마티스 관절염과 기타 염증성 질환, 및 대부분의 암이 있다. 이러한 질환과 연관된 병든 조직 또는 종양은 비정상적으로 높은 수준의 VEGF를 발현시키고, 고도의 혈관형성 또는 혈관투과성을 나타낸다.

[0011] 특히, ARMD는 임상적으로 중요한 혈관신생성 질환이다. 이 질환은 노령 개체에서 한쪽 또는 양쪽 눈의 맥락막 신혈관형성을 특징으로 하고, 산업화된 국가에서 주요한 실명 원인이다.

[0012] RNA 간섭(이하 "RNAi"로 약칭)은 많은 진핵생물 유기체에 걸쳐 보존된 전사후 유전자 조절 방법이다. RNAi는 세포 내에 존재하는 짧은(즉, <30개 뉴클레오타이드) 이중 가닥 RNA("dsRNA") 분자에 의해 유발된다. "작은 간섭 RNA" 또는 "siRNA"로 지칭되는 이러한 짧은 dsRNA 분자는 1개 이내의 뉴클레오타이드 분별력(resolution)으로

siRNA와 서열 상동성을 나타내는 전령 RNAs("mRNAs")의 파괴를 야기시킨다. siRNA와 표적 mRNA는, 이 표적 mRNA를 절단하는, "RNA-유도 침묵 복합체" 또는 "RISC"에 결합하는 것으로 믿어진다. siRNA는 분명히 다중-전환 효소(multiple-turnover enzyme)와 매우 흡사하게 재활용되며, 1개의 siRNA 분자는 대략 1000개의 mRNA 분자의 절단을 유도할 수 있다. 따라서, mRNA의 siRNA-매개 RNAi 분해는 표적 유전자의 발현을 억제하기 위한 현재 가용한 기술보다 더 효과적이다. 그러나, 이러한 방법은 직접적으로 질병의 치료를 위한 치료제로 번역될 수 없다.

[0013] 따라서, 요구되는 것은 항-혈관신생 VEGF 이소형의 분비를 유도 또는 유지시키면서, 포유동물에서 촉매량 또는 아화화학량(sub-stoichiometric amounts)으로 항-혈관신생 VEGF의 발현을 선택적으로 억제시키는 물질이다.

[0014] 본 발명은 VEGF와 이의 이소형으로부터 mRNA의 RNAi-유도 분해를 특이적으로 표적으로 삼고 야기시키는 siRNAs와 관련이 있다. 본 발명의 siRNA 화합물과 조성물은 혈관신생을 억제하는데, 특히 암성 종양, 연령관련황반변성, 및 기타 혈관신생 질환의 치료를 위해 혈관신생을 억제하는데 사용된다.

[0015] 따라서, 본 발명은 인간 VEGF mRNA, 또는 다른 스플라이싱 형태, 이의 돌연변이체 또는 동족체(cognate)를 표적으로 삼는 분리된 siRNA를 제공한다. 예를 들어, 일 구체예에서, siRNA는 항-혈관신생 VEGF_{165b} mRNA를 선택적으로 존속(sparing)시키면서, 항-혈관신생 VEGF mRNA 이소형, 예컨대, VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, VEGF₁₈₃, VEGF₁₄₈, 및/또는 VEGF₁₄₅를 표적으로 삼는다. 특정 구체예에서, siRNA는, RNA 이중나선(duplex)를 형성하는, 센스 RNA 가닥과 안티센스 RNA 가닥을 포함한다. 센스 RNA 가닥은 표적 mRNA내의 약 19개 내지 약 25개의 연속된(contiguous) 뉴클레오티드의 표적 서열과 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0016] 또한 본 발명은 본원에 개시된 siRNA를 발현하는 재조합 플라스미드 및 바이러스 벡터뿐만 아니라, 그러한 siRNA 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명은 표적 mRNA가 분해되도록 하는 유효량의 siRNA를 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 항-혈관신생 VEGF mRNA를 존속시키면서, 인간 항-혈관신생 VEGF mRNA, 또는 다른 스플라이싱 형태, 이의 돌연변이체 또는 동족체의 발현을 억제하는 방법을 추가로 제공한다.

[0018] 본 발명은 항-혈관신생 VEGF mRNA를 존속시키면서, 인간 항-혈관신생 VEGF mRNA, 또는 다른 스플라이싱 형태, 이의 돌연변이체 또는 동족체를 표적으로 삼는 유효량의 siRNA를 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 혈관신생을 억제하는 방법을 추가로 제공한다.

[0019] 본 발명은 항-혈관신생 VEGF mRNA의 효과에는 영향을 미치지 않으면서, 혈관신생 질환과 연관된 혈관신생을 억제되도록, 인간 항-혈관신생 VEGF mRNA 또는 다른 스플라이싱 형태, 이의 돌연변이체 또는 동족체를 표적으로 삼는 유효량의 siRNA를 치료가 필요한 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈관신생 질환을 치료하는 방법을 추가로 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0020] 본 특허의 파일은 1장 이상의 사진 또는 컬러로 작도된 도면을 포함하고 있다. 컬러 도면(들) 또는 사진(들)을 포함한 본 특허의 사본은 신청과 요구되는 요금 납부시 특허상표청으로부터 제공받을 수 있을 것이다.

본 발명의 특성과 이점을 완전하게 이해하기 위해, 하기 상세한 설명은 첨부된 도면과 조합하여 참조되어야 한다:

도 1A 및 1B는 siRNA를 무처리("-")하거나; 비특이적 siRNA("비특이적"); 또는 siRNA 표적 인간 VEGF mRNA("VEGF")를 처리한 산소결핍(hypoxic) 293 및 HeLa 세포에서의 VEGF 농도(단위: pg/ml)에 대한 막대그래프이다. 비-산소결핍 293 및 HeLa 세포에서의 VEGF 농도(단위: pg/ml)가 또한 도시되어 있다. 각각의 막대는 4회 실험의 평균을 나타내고, 오차는 이 평균의 표준편차이다.

도2는 siRNA를 무처리("-")하거나; 비특이적 siRNA("비특이적"); 또는 siRNA 표적 인간 VEGF mRNA("VEGF")를 처리한 산소결핍 NIH 3T3 세포에서의 설치류 VEGF 농도(단위: pg/ml)에 대한 막대그래프이다. 각각의 막대는 6회 실험의 평균을 나타내고, 오차는 이 평균의 표준편차이다.

도 3은 GFP siRNA(어두운 회색 막대) 또는 인간 VEGF siRNA(밝은 회색 막대) 중 어느 하나의 존재하에 인간 VEGF ("AdVEGF")를 발현하는 아데노바이러스를 주입한 마우스(생쥐)로부터의 망막내 인간 VEGF 농도(pg/총 단백질)에 관한 막대그래프이다. 각각의 막대는 5개 눈의 평균을 나타내고, 에러바는 이 평균의 표준오차를 나타낸다.

다.

도 4는 망막하 주입으로 GFP siRNA를 주입한 대조 눈(N=9; "GFP siRNA"), 및 망막하 주입으로 마우스 VEGF siRNA를 주입한 눈(N=7; "마우스 VEGF siRNA")에서 레이저로 유발된 CNV의 평균 면적(단위: mm^2)을 보여주는 막대그래프이다. 에러바는 상기 평균의 표준오차를 나타낸다.

도 5는 본 발명의 재조합 AAV 바이러스 벡터를 제조하는데 사용한 시스-작용(*cis-acting*) 플라스미드인 pAAVsiRNA의 개략도이다. "ITR": AAV 역위 말단 반복부; "U6": U6 RNA 프로모터; "센스": siRNA 센스 코딩 서열; "안티": siRNA 안티센스 코딩 서열; "PolyT": 폴리테미딘 종결 신호.

도 6은 마우스 항-VEGF siRNA("mVEGF1.siRNA") 또는 대조 siRNA("GFP1.siRNA")를 망막하로(A) 또는 유리체강내로(intravitreally)(B) 주입한 마우스 눈의 치료시 레이저 유발된 CNV의 평균 면적(단위: mm^2)에 관한 막대그래프이다. 에러바는 상기 평균의 표준 오차를 나타낸다. (C)는 레이저 유발 후 1일째에 siRNA 없이 인산염 완충 식염수 ("PBS"; CNV 면적을 레이저 유발 후 14일째에 측정함); 레이저 유발 후 14일째에 대조 siRNA("GFP1.siRNA"; CNV 면적을 레이저 유발 후 21일째에 측정함); 또는 레이저 유발 후 14일째에 마우스 항-VEGF siRNA("mVEGF1.siRNA"; CNV 면적을 레이저 유발 후 21일째에 측정함)을 유리체강내로 주입한 마우스 눈에서 레이저 유발된 CNV의 평균 면적(단위: mm^2)에 관한 막대그래프이다. 에러바는 상기 평균의 표준 오차를 나타낸다.

도 7은 인간 항-VEGF siRNA("Cand5") 및 대조 siRNA("GFP1.siRNA")를 망막하로 주입하고, 주입 후 0일(n=2; 사전-siRNA 주입), 6일(n=3), 10일(n=3) 및 14일(n=3) 경과 시, 마우스 눈내의 VEGF 단백질의 비율("%VEGF")에 대한 그래프이다. %VEGF = (Cand5 눈 내의 [VEGF]/GFP1.siRNA 눈 내의 [VEGF]) *100.

도 8은 인간 VEGF siRNAs, 비특이적 siRNA(EGFP siRNA) 또는 siRNA 없이 허위 형질감염체 (mock transfections)로 형질감염시킨 형질감염시킨293 세포 내의 hVEGF 단백질의 수준에 관한 그래프이다.

도 9는 Cand5(베바시라닙(bevasiranib)), hVEGF#1, hVEGF#2, hVEGF#3, hVEGF#4, hVEGF#6 및 hVEGF#7을 사용한 용량 반응 연구에 관한 그래프이다.

도 10은 VEGF의 다양한 이소형과 이들의 엑손 사용빈도에 관한 개략도이다.

도 11은 엑손 7/8 접합부에서 VEGF₁₆₅와 VEGF_{165b}의 상동성을 비교한 도표이다.

도 12는 VEGF₁₆₅ 엑손 7/8 접합부를 표적으로 삼는 다양한 siRNAs에 관한 발현된 VEGF 단백질의 양을 도시한다.

도 13은 VEGF₁₆₅ 엑손 7/8 접합부를 표적으로 삼는 다양한 siRNAs에 대한 인간 VEGF 단백질의 녹다운(knockdown) 비율을 도시한다.

도 14는 VEGF₁₆₅ 엑손 7/8 접합부를 표적으로 삼는 2차 스크리닝된 siRNAs에 대하여 발현된 VEGF 단백질의 양을 도시한다.

도 15는 VEGF₁₆₅ 엑손 7/8 접합부를 표적으로 삼는 2차 스크리닝된 siRNAs에 대한 인간 VEGF 단백질의 녹다운 비율을 도시한다.

도 16은 VEGF₁₆₅ 엑손 7/8 접합부를 표적으로 삼는 다양한 농도의 제 2차 스크리닝된 siRNAs에 대한 인간 VEGF 단백질의 녹다운 비율을 도시한다.

도 17은 VEGF₁₆₅ 엑손 7/8 접합부를 표적으로 삼는 제 2차 스크리닝된 siRNAs에 대한 7일만에 걸친 인간 VEGF 단백질의 녹다운 비율을 도시한다.

도 18은 RT-PCR을 사용하여 GAPDH mRNA 발현에 대한 VEGF₁₆₅ 엑손 7/8 접합부를 표적으로 삼는 siRNA의 효과를 도시한다.

도 19는 RT-PCR을 사용하여 VEGF₁₆₅ mRNA 발현에 대한 VEGF₁₆₅ 엑손 7/8 접합부를 표적으로 삼는 siRNA의 효과를 도시한다.

도 20은 RT-PCR을 사용하여 VEGF₁₈₉ mRNA 발현에 대한 VEGF 엑손 7/8 접합부를 표적으로 삼는 siRNA의 효과를

도시한다.

도 21 은 RT-PCR을 사용하여 VEGF₁₂₁ mRNA 발현에 대한 VEGF 엑손 7/8 접합부를 표적으로 삼는 siRNA의 효과를 도시한다.

도 22 은 RT-PCR을 사용하여 VEGF_{165b} mRNA 발현에 대한 VEGF 엑손 7/8 접합부를 표적으로 삼는 siRNA의 효과를 도시한다. 약 600bp에서 더블 밴딩(double banding)은 인위적이다.

도 23은 선택된 siRNAs로 처리한 후 ARPE19 세포의 사이토카인 프로파일을 도시한다.

도 24 는 ARPE19 세포에 의한 전체 VEGF 단백질 분비에 미치는 siRNAs의 영향을 도시한다.

도 25는 ARPE19 세포에 의한 전체 VEGF 단백질 분비에 미치는 siRNAs의 영향을 도시한다.

도 26은 ARPE19 세포에 의한 전체 VEGF 단백질 분비에 미치는 siRNAs의 영향을 도시한다.

도 27 은 ARPE19 세포에 의한 전체 VEGF 단백질 분비에 미치는 siRNAs의 영향을 도시한다.

도 28은 상이한 온도 조건하에서 시간에 따른 베바시라닙의 안정성을 도시한다.

도 29 는 상이한 온도 조건하에서 시간에 따른 베바시라닙의 안정성을 도시한다.

도 30 은 상이한 온도 조건하에서 시간에 따른 OPK-HVB-004의 안정성을 도시한다.

도 31 은 상이한 온도 조건하에서 시간에 따른 OPK-HVB-009의 안정성을 도시한다.

도 32 는 상이한 온도 조건하에서 시간에 따른 OPK-HVB-0010의 안정성을 도시한다.

도 33은 3' 말단에서 인간, 래트(주) 및 마우스 VEGF 서열 간의 상동성을 도시한다.

도 34는 C6 세포에 의한 래트 VEGF 분비에 미치는 siRNAs의 효과를 도시한다.

도 35 는 NIH3T3 세포에 의한 마우스 VEGF 분비에 미치는 siRNAs의 효과를 도시한다.

도 36은 ARPE19 세포에 의한 VEGF 분비에 미치는 siRNAs의 효과를 도시한다.

도 37 은 ARPE19 세포에 의한 VEGF 분비에 미치는 siRNAs의 효과를 도시한다.

도 38 은 ARPE19 세포에 의한 VEGF 분비에 미치는 siRNAs의 효과를 도시한다.

도 39는 NIH3T3 세포에 의한 마우스 VEGF 분비에 미치는 siRNAs의 효과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명의 조성물과 방법을 기술하기에 앞서, 본 발명은 기술된 특정 과정, 조성물, 또는 방법학으로 제한되지 않는다는 것을 이해하여야 하는데, 그 이유는 이들이 변형될 수 있기 때문이다. 또한 상세한 설명에 사용된 용어는 단지 특정 양태 또는 구체예를 설명하기 위한 목적으로 사용된 것이고, 본 발명의 범위를 제한하려는 의도로 사용된 것은 아니며, 본 발명의 범위는 오직 첨부된 특허청구범위에 의해서만 한정될 것임을 이해하여야 한다. 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계의 통상의 기술자가 공통적으로 이해하고 있는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술한 방법 및 물질과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질을 본 발명의 구체예를 실시하거나 시험하는데 사용할 수 있으나, 이하에서 바람직한 방법, 장치, 및 물질에 대해 설명한다. 본원에서 언급한 모든 간행물은 참조를 위해 전체로 본 명세서에 통합된다. 본원의 어떠한 것도 본 발명이 종래 기술 때문에 이러한 교시를 앞설 자격이 없다는 인정으로써 해석되어서는 안된다.

[0022] 또한 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 사용된, 단수형은 해당 문맥에서 명확하게 달리 기술하지 않는 한 복수의 지칭대상을 포함한다는 것을 주의하여야 한다. 따라서, 예를 들어, "분자"로 지칭된 대상은 하나 이상의 분자 및 당업계의 통상의 기술자에게 알려진 이의 동등물 등을 지칭하고 있는 것이다. 본원에 사용된, 용어 "약"은 사용된 수치의 수치값에서 10%를 더하거나 뺀 수치값을 의미한다. 따라서, 약 50%는 45% 내지 55%의 범위를 의미한다.

[0023] 본원에 사용된, "피험자(subject)"는 인간 또는 인간이 아닌 동물을 의미한다. 특정 구체예에서, 피험자는 인간이다.

[0024] 본원에 사용된, siRNA의 "유효량"은 세포에서 표적 mRNA의 RNAi-매개 분해를 야기시키는데 충분한 양이다. 용

어 "임상적 유효량"은 피험자에게 투여될 때, RNA 침묵에 의해 피험자에서 혈관신생의 진행을 억제시키게 될 양이다.

- [0025] 본원에 사용된, "분리된"은 인간의 개입을 통해 천연 상태에서부터 변형되거나 이동되었음을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물내에 천연적으로 존재하는 siRNA는 "분리된" 것이 아니나, 합성 siRNA, 또는 이의 천연 상태의 공존 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 siRNA는 "분리된" 것이다. 분리된 siRNA는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있거나, 예를 들어, siRNA가 전달된 세포와 같은, 비천연 상태로 존재할 수 있다.
- [0026] 본원에 사용된, "표적 mRNA"는 siRNA 안티센스 가닥에 대한 상보적 센스 서열을 포함하는 mRNA를 의미한다. 이러한 표적 mRNA는, siRNA가 표적 mRNA를 침묵시키거나 달리 표적 mRNA와 RISC 복합체를 형성하는 기능을 발휘하는 한, siRNA 안티센스 가닥과 100% 상동성을 가질 필요는 없다. 본 발명에 따른 방법에 특별히 사용되는 표적 mRNAs는, 예를 들어, 항-혈관신생성 VEGF mRNA 이소형, 예컨대, VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, 및 VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, VEGF₁₈₃, VEGF₁₄₈, 및 VEGF₁₄₅ 및 이들의 조합물을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 표적 mRNA는 항-혈관신생성 VEGF_{165b} mRNA를 포함하지 아니하나, 하나 이상의 다른 VEGF 이소형을 표적으로 삼는다.
- [0027] 본원에 사용된, 용어 "부분적으로 비-상보적인(partially non-complementary)"은 추정컨대, 비표적(non-target) 서열과 약간의 서열 상동성을 나타내지만, 이 비표적 서열에 대한 RNA 침묵이 일어나지 않도록 여전히 충분히 상이한 siRNA 서열을 의미하기 위해 의도적으로 사용된다. 부분적으로 비-상보적인 서열은 비표적 서열과 상동성이 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 2%, 및 1%인 서열을 포함한다. 비표적 서열과 완전히 비-상동적인 서열은 상기 비표적 서열과 비-상보적인 것으로 간주된다.
- [0028] 본원에 사용된, 유전자 또는 mRNA는 인간 VEGF와 "동족체(cognate)"이거나, 또는 인간 VEGF와 상동성이 있는 또 다른 포유동물 종들로부터의 mRNA를 의미한다. 예를 들어, 마우스로부터의 VEGF mRNA 동족체는 서열목록번호: 1로 주어진다.
- [0029] 달리 명시하지 않는 한, 본원의 모든 핵산 서열은 5'에서 3' 방향으로 주어진다. 또한, 핵산 서열 내의 모든 테옥시리보뉴클레오티드는 대문자로 기재하고(예를 들어, 테옥시티미딘은 "T"임, 핵산 서열 내의 리보뉴클레오티드는 소문자로 기재한다(예를 들어, 우리딘은 "U"임)).
- [0030] VEGF와 이의 다양한 이소형을 표적으로 삼는 siRNA를 포함하는 조성물 및 방법을 사용하여 혈관신생, 특히 혈관신생 질환의 치료를 위한 혈관신생을 억제할 수 있다. siRNA는 이러한 mRNAs의 RNAi-매개 분해를 야기시켜, VEGF와 이의 이소형의 단백질 생성물이 생산되지 않거나 감소된 양으로 생산되게 만드는 것으로 믿어진다. Flt-1 또는 Flk-1/KDR 수용체에 결합하는 VEGF는 혈관신생을 개시시키고 이를 유지하는데 필요하기 때문에, VEGF와 이의 이소형을 비롯한 Flt-1 또는 Flk-1/KDR mRNA의 siRNA-매개 분해를 이용하여 혈관신생 과정을 억제시킬 수도 있다.
- [0031] 따라서, 본 발명의 일 양상은 표적 mRNA를 표적으로 삼는, 약 17개 뉴클레오티드 내지 약 29개 뉴클레오티드 길이, 특정 구체예에서, 약 19개 내지 약 25개 뉴클레오티드 길이의 짧은 이중-가닥 RNA를 포함하는 분리된 siRNA를 제공한다. siRNA는 표준 왓슨-크릭 염기쌍 형성 상호작용에 의해 함께 어닐링(annealing)되는(이하 "염기쌍을 이룬(base-paired)") 센스 RNA 가닥 및 상보적인 안티센스 RNA 가닥을 포함한다. 이하에 더 상세하게 설명되어 있으나, 센스 가닥은 표적 mRNA내에 함유된 표적 서열과 동일하거나 극히 상동적인 핵산 서열을 포함한다.
- [0032] siRNA의 센스 및 안티센스 가닥은 2개의 상보적인, 단일 가닥 RNA 분자를 포함할 수 있거나 2개의 상보적인 부분이 염기쌍을 이루고 단일 가닥 "헤어핀" 영역에 의해 공유결합적으로 연결된 단일 분자를 포함할 수 있다. 임의의 이론에 의해 제한되는 것을 원치 아니하면서, 상기 siRNA 분자의 후자 형태의 헤어핀 영역은 각각의 염기쌍을 이룬 2개의 RNA 분자의 siRNA가 형성되도록 "다이서(Dicer)" 단백질(또는 이의 동등체)에 의해 세포내에서 절단되는 것으로 믿어진다.
- [0033] 인간 VEGF의 스플라이싱 변이체가 알려져 있는데, 상기 변이체에는 항-혈관신생성 VEGF mRNA 이소형, 예컨대, VEGF₁₂₁(서열목록번호: 2), VEGF₁₆₅(서열목록번호: 3), VEGF₁₈₉(서열목록번호: 4), VEGF₂₀₆(서열목록번호: 5; GenBank 수탁번호 CS245579), VEGF₁₈₃(GenBank 수탁번호 AJ010438), VEGF₁₄₈(GenBank 수탁번호 AF091352), 및 VEGF₁₄₅(GenBank 수탁번호 CS245578), 뿐만 아니라, 항-혈관신생성 VEGF_{165b} mRNA(GenBank 수탁번호 AF430806)가 포함된다. 인간 VEGF와 이의 이소형, 뿐만 아니라 Flt-1(서열목록번호: 6) 또는 Flk-1/KDR(서열목록번호: 7)

유전자로부터 전사되는 mRNA는 당업계에 잘 알려진 기술을 사용하여 다른 스플라이싱 형태에 대해 추가로 분석될 수 있다. 이러한 기술은 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR), 노던 블랏팅 및 제자리 하이브리드화(*in-situ* hybridization)를 포함한다. mRNA 서열을 분석하는 기술은, 예를 들어, 문헌[Bustin SA (2000), *J. Mol. Endocrinol.* 25: 169-193]에 기술되어 있고, 상기 문헌의 전체 내용은 참조를 위해 본원에 통합된다. 또한 다르게 스플라이싱된 mRNAs를 식별하기 위한 대표적 기술은 아래에 설명되어 있다.

[0034] 예를 들어, 해당 질환 유전자와 관련된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 데이터베이스를 사용하여 다르게 스플라이싱된 mRNA를 식별할 수 있다. 이러한 데이터베이스는 GenBank, Embase, 및 암 유전체 해석 프로젝트(Cancer Genome Anatomy Project, CGAP) 데이터베이스를 포함한다. CGAP 데이터베이스는, 예를 들어, 다양한 유형의 인간 암으로부터의 발현된 서열 태그(expressed sequence tags, ESTs)를 포함하고 있다. VEGF와 이의 이소형으로부터의 mRNA 또는 유전자 서열뿐만 아니라, Flt-1 또는 Flk-1/KDR 유전자를 사용하여 이러한 데이터베이스에 질의함으로써 다르게 스플라이싱된 mRNAs를 나타내는 ESTs가 이러한 유전자에 대해 확인되었는지 여부를 결정할 수 있다.

[0035] 또한 "RNase 보호"라고 명명된 기술을 사용하여 다르게 스플라이싱된 VEGF 및 이의 이소형뿐만 아니라, Flt-1 또는 Flk-1/KDR mRNAs를 식별할 수 있다. RNase 보호는 유전자 서열의 합성 RNA로의 번역을 포함하는데, 상기 합성 RNA는 다른 세포, 예를 들어, 신혈관형성 부위 또는 이 부위 근처에 존재하는 조직으로부터의 세포에서 유래된 RNA와 하이브리드화된다. 이후 하이브리드화된 RNA를 RNA:RNA 하이브리드 미스매치(mismatches)를 인지하는 효소와 함께 인큐베이션한다. 예상한 것 보다 더 작은 단편은 다르게 스플라이싱된 mRNAs의 존재를 나타내는 지표가 된다. 추정된 다르게 스플라이싱된 mRNAs를 당업계의 통상의 기술자에게 잘 알려진 방법으로 클로닝하고 서열분석할 수 있다.

[0036] 또한 RT-PCR을 사용하여 다르게 스플라이싱된 VEGF와 이의 이소형을 비롯한 Flt-1 또는 Flk-1/KDR mRNAs를 식별할 수 있다. RT-PCR에서, 조직 또는 세포로부터의 mRNA는, 당업계의 통상의 기술자에게 널리 알려진 방법을 사용하여, 역전사효소에 의해 cDNA로 전환된다. 이후 cDNA의 코딩 서열은 5' 번역 영역 내에 위치하는 정방향 프라이머, 및 3' 번역 영역 내에 위치하는 역방향 프라이머를 사용하는 PCR을 통해 증폭된다. 일부 구체예에서, cDNA를 엔코딩하는 모든 염기들이 증폭된다. 증폭된 생성물은, 예를 들어, 아가로스 겔 전기영동법에 의해, 예를 들어, 증폭된 생성물의 크기와 정상적으로 스플라이싱된 mRNA의 크기를 비교함으로써, 다른 스플라이싱 형태에 대해 분석될 수 있다. 증폭된 생성물의 크기에 있어서 임의의 변화는 다른 스플라이싱의 지표가 될 수 있다.

[0037] 또한 돌연변이체 VEGF와 이의 이소형을 비롯한 Flt-1 또는 Flk-1/KDR 유전자로부터 생성된 mRNA를 다른 스플라이싱 형태를 식별하기 위한 상기한 기술을 통해 용이하게 식별할 수 있다. 본원에 사용된, "돌연변이체" VEGF와 이의 이소형뿐만 아니라, Flt-1 또는 Flk-1/KDR 유전자 또는 mRNA는 서열상 본원에 제시된 VEGF와 이의 이소형뿐만 아니라, Flt-1 또는 Flk-1/KDR 서열과 상이한 인간 VEGF와 이의 이소형뿐만 아니라, Flt-1 또는 Flk-1/KDR 유전자 또는 mRNA를 포함한다. 따라서, 이들 유전자의 대립유전자 형태, 이들로부터 생성된 mRNA는 본 발명의 목적상 "돌연변이체"로 간주된다.

[0038] 인간 VEGF와 이의 이소형, 뿐만 아니라 Flt-1 또는 Flk-1/KDR mRNA는 이들 각각의 다른 스플라이싱 형태, 동족체 또는 돌연변이체와 함께 공통적으로 표적 서열을 함유할 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 이러한 공통 표적 서열을 포함하는 단일 siRNA는 공통 표적 서열을 함유하는 상이한 RNA 유형에 대한 RNAi-매개 분해를 유도할 수 있다. 예를 들어, 도 10에 도시된 바와 같이, 모든 VEGF 이소형은 엑손 1 내지 5를 공통적으로 지니고 있다. 그러나, VEGF₁₂₁(서열목록번호: 2)에서, 엑손 6 및 7(7a 및 7b)은 결실되어 있다. VEGF₁₆₅(서열목록번호: 3)에서, 엑손 6(6a 및 6b)은 결실되어 있다. VEGF₁₈₉(서열목록번호: 4)에서, 엑손 6b는 결실되어 있다. VEGF₁₈₃에서, 엑손 6a의 일부뿐만 아니라, 완전한 엑손 6b 서열이 결실되어 있다. VEGF₁₄₈는 엑손 6(6a 및 6b) 뿐만 아니라, 엑손 7b 및 엑손 8의 일부의 결실을 지닌다. VEGF₁₄₅에서, 엑손 6b 및 엑손 7(7a 및 7b)은 결실되어 있다. VEGF의 유일한 공지의 항-혈관신생성 이소형인 VEGF_{165b}에는 엑손 6(6a 및 6b)가 결여되어 있으나, 슈도(pseudo)-엑손 9가 추가로 포함되어 있다. 슈도-엑손 9는 정지 코돈의 결실로 초래된 판독틀 이동의 결과인데, 이 판독틀 이동에 따라 3'UTR의 일부가 단백질로서 번역되게 된다. 예를 들어, 전체 내용이 참조를 위해 본원에 통합되는, 문헌[Bates et al., *Can. Res.* 62:4123 (2002)]을 참조바람. VEGF₂₀₆(서열목록번호: 5)은 결실을 수반하지 않는 전장(full length) 서열 VEGF이다. 따라서, 특정 구체예에서, siRNA는 하나 이상의 이소형, 예컨대, VEGF₁₂₁(서열목록번호: 2), VEGF₁₆₅(서열목록번호: 3), 및 VEGF₁₈₉(서열목록번호: 4), VEGF₂₀₆(서열목록번호:

5; GenBank 수탁번호 CS245579), VEGF₁₈₃(GenBank 수탁번호 AJ010438), VEGF₁₄₈(GenBank 수탁번호 AF091352), 및 /또는 VEGF₁₄₅(GenBank 수탁번호 CS245578)를 표적으로 삼지만, 다른 이소형, 예컨대, VEGF_{165b}를 존속시키는데, 그 이유는 siRNA는 다른 이소형 이외의 특정 이소형에 공통적으로 존재하는 엑손을 표적으로 삼기 때문이다.

[0039] 일 구체예에서, 제 1 RNA 가닥 및 제 2 RNA 가닥의 이중나선으로 구성되는 분리된 siRNA가 제공되며, 상기 제 1 RNA 가닥은 인간 VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, VEGF₁₈₃, VEGF₁₄₈, VEGF₁₄₅ 및 이들의 조합물로 구성된 군에서 선택된 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 이소형에 대한 약 19개 내지 약 25개의 연속된 뉴클레오타이드의 표적 서열과 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 추가로 상기 siRNA는 VEGF_{165b}와 적어도 부분적으로 비-상보적이며, 단 상기 인간 VEGF mRNA는 서열목록번호: 42가 아님을 전제조건으로 한다. 추가 구체예는 혈관신생을 억제하기 위해 이러한 siRNA를 사용하는 방법 및 혈관신생을 억제하기 위해 치료학적 유효량의 이러한 siRNA를 포함하는 약학 조성물을 포함한다.

[0040] siRNA는 부분적으로 정제된 RNA, 실질적으로 순수한 RNA, 합성 RNA, 또는 제조합적으로 생성된 RNA뿐만 아니라, 1개 이상의 뉴클레오타이드의 부가, 결실, 치환 및/또는 변형에 의해 천연-생성 RNA와 차이가 있는 변형된 RNA를 포함할 수 있다. siRNA가 뉴클레아제 분해에 대한 내성을 갖도록 만드는 변형을 포함하는, 이러한 변형은 비-뉴클레오타이드 물질의 부가, 예컨대, siRNA의 말단(들) 또는 siRNA의 하나 이상의 내부 뉴클레오타이드에 대한 비-뉴클레오타이드 물질의 부가를 포함할 수 있다.

[0041] 또한 siRNA의 한쪽 또는 양쪽 가닥은 3' 돌출부(overhang)를 포함할 수 있다. 본원에 사용된, "3' 돌출부"는 이중나선 RNA 가닥의 3'-말단으로부터 신장된 적어도 하나의 염기쌍을 이루지 않은 뉴클레오타이드를 지칭한다. 일부 구체예에서, siRNA는 돌출부를 포함하지 않고 평활(blunt) 말단을 지닌다. 일부 구체예에서, siRNA의 양쪽 말단이 평활 말단을 포함한다. 일부 구체예에서, siRNA는 표적 mRNA와 dTdT 돌출부가 연속된 17머(mer)를 포함한다. 일부 구체예에서, siRNA는 상이한 종들로부터의 VEGF의 분비 또는 생성을 억제할 수 있는 siRNA이다. 예를 들어, 일부 구체예에서, siRNA는 인간 세포, 래트 세포, 및/또는 마우스 세포로부터의 VEGF 분비 또는 억제를 억제할 수 있다. 일부 구체예에서, siRNA는 마우스 세포와 인간 세포로부터의 VEGF의 분비 또는 생성을 억제할 수 있지만, 래트 세포로부터의 VEGF의 분비 또는 생성을 억제할 수 없다. 일부 구체예에서, siRNA는 래트 세포와 인간 세포로부터의 VEGF의 분비 또는 생성을 억제할 수 있지만, 마우스 세포로부터의 VEGF의 분비 또는 생성을 억제할 수 없다. 일부 구체예에서, siRNA는 인간 세포, 마우스 세포, 및 래트 세포로부터의 VEGF의 분비 또는 생성을 억제할 수 있다. siRNA의 선택성은 상이한 서열들 간의 상동성에 기반할 수 있다. 예를 들어, 도 33은 인간, 마우스 및 래트 VEGF를 엔코딩하는 말단 코돈(terminal codon) 사이의 상동성을 보여준다. 이러한 차이를 이용하여 하나 이상의 종들로부터의 VEGF의 생성을 선택적으로 억제할 수 있는 siRNAs를 생산할 수 있다.

[0042] 일부 구체예에서, 21개 미만, 예를 들어, 17, 18, 19, 또는 20개의 뉴클레오타이드를 포함하는 siRNAs를 사용하여 임의의 잠재적인 비특이적 생체내(*in vivo*) 반응을 회피할 수 있다. (예를 들어, 문헌[Ambati, Nature, 452, 591-597 (2008년 4월 3일)] 참조바람). 예를 들어, 21개 미만의 뉴클레오타이드를 포함하는 siRNAs를 사용하여 생체내에서 TLR3 반응을 잠재적으로 활성화시키는 것을 회피할 수 있다.

[0043] 따라서, 일 구체예에서, siRNA는 1개 내지 약 6개 뉴클레오타이드(리보뉴클레오타이드 또는 데옥시뉴클레오타이드를 포함함) 길이, 바람직하게는 1개 내지 약 5개 뉴클레오타이드 길이, 더 바람직하게는 1개 내지 약 4개 뉴클레오타이드 길이, 특히 바람직하게는 약 2개 내지 약 4개 뉴클레오타이드 길이의 적어도 하나의 3' 돌출부를 포함한다.

[0044] siRNA 분자의 양쪽 가닥이 3' 돌출부를 포함하는 구체예에서, 돌출부의 길이는 각 가닥의 길이와 동일하거나 상이할 수 있다. 가장 바람직한 구체예에서, 3' 돌출부는 siRNA의 양쪽 가닥에 존재하고, 뉴클레오타이드 2개 길이이다. 예를 들어, siRNA의 각 가닥은 디티미딜산("TT") 또는 디우리딜산("uu")의 3' 돌출부를 포함할 수 있다.

[0045] 본 발명의 siRNA의 안정성을 향상시키기 위해, 3' 돌출부를 분해에 대해 안정화시킬 수도 있다. 일 구체예에서, 돌출부는 퓨린 뉴클레오타이드, 예컨대, 아데노신 또는 구아노신 뉴클레오타이드를 포함시킴으로써 안정화된다. 달리, 변형된 유사체에 의한 피리미딘 뉴클레오타이드의 치환, 예를 들어, 3' 돌출부 내의 우리딘 뉴클레오타이드의 2'-데옥시티미딘으로의 치환이 용인되고, 이러한 치환은 RNAi 분해 효율에 영향을 미치지 아니한다. 특히, 2'-데옥시티미딘 중의 2' 히드록실의 부재는 조직 배양 배지에서 3' 돌출부의 뉴클레아제 내성을 유의하게 향상시킨다.

[0046] 특정 구체예에서, siRNA는 서열 AA(N19)TT 또는 NA(N21)를 포함하는데, 여기서 N은 임의의 뉴클레오타이드이다.

이러한 siRNA는 대략 30-70%의 GC를 포함하고, 바람직하게는 대략 50%의 G/C를 포함한다. 센스 siRNA 가닥의 서열은, 각각, (N19)TT 또는 N21(즉, 위치 3 내지 23)에 해당한다. 후자의 경우, 센스 siRNA의 3' 말단은 TT로 전환된다. 이러한 서열 전환에 관한 원리는 센스 및 안티센스 가닥 3' 돌출부의 서열 조성과 관련하여 대칭되는 이중나선을 생성시키는 것이다. 이후, 안티센스 RNA 가닥이 센스 가닥의 위치 1 내지 21에 대한 상보체로서 합성된다.

[0047] 이러한 구체예에서 23-nt 센스 가닥의 위치 1은 안티센스 가닥에 의해 서열-특이적 방식으로 인식되지 못하기 때문에, 안티센스 가닥의 3'-최말단(most) 뉴클레오티드 잔기는 신중하게 선택될 수 있다. 그러나, (어느 한 구체예에서 23-nt 센스 가닥의 위치 2에 상보적인) 안티센스 가닥의 끝에서 두 번째(penultimate) 뉴클레오티드는 일반적으로 표적 서열에 상보적이다.

[0048] 또 다른 구체예에서, siRNA는 NAR(N17)YNN 서열을 포함하는데, 여기서 R은 퓨린(예를 들어, A 또는 G)이고 Y는 피리미딘(예를 들어, C 또는 U/T)이다. 따라서, 이 구체예의 각각의 21-nt 센스 및 안티센스 RNA 가닥은 일반적으로 퓨린 뉴클레오티드로 시작한다. 이러한 siRNA는, 첫번째로 전사되는 뉴클레오티드가 퓨린인 경우에만 pol III 프로모터의 RNAs의 발현이 효율적인 것으로 믿어지기 때문에, 표적 부위에서의 변화 없이 pol III 발현 벡터로부터 발현될 수 있다.

[0049] 추가 구체예에서, siRNA는 다섯(5) 개 이하의 연속되는 퓨린 또는 피리미딘을 지니는 서열을 포함한다. 추가 구체예에서, siRNA는 동일한 핵산염기(nucleobase)(즉, A, C, G, 또는 U/T)를 지니는 다섯(5) 개 이하의 연속된 뉴클레오티드를 지니는 서열을 포함한다.

[0050] siRNA는 임의의 표적 mRNA 서열("표적 서열") 내의 대략 19-25개의 연속된 뉴클레오티드의 임의의 장쇄(stretch)를 표적으로 삼을 수 있다. siRNA에 대한 표적 서열을 선별하는 기술은, 예를 들어, 2002년 10월 11일에 개정된, 문헌[Tuschl T et al., "The siRNA User Guide"]에 소개되어 있으며, 상기 문헌의 개시내용은 참조를 위해 본원에 인용된다. 상기 문헌["The siRNA User Guide"]은 독일, 괴팅겐 37077, 막스플랑크 생물물리 화학연구소, 아게 105, 세포생화학부, 토마스 투של 박사[Dr. Thomas Tuschl, Department of Cellular Biochemistry, AG 105, Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry, 37077 Göttingen, Germany]에 의해 유전되는 월드 와이드 웹사이트에서 입수가능하며, 막스플랑크연구소의 웹사이트에 접속하여 검색어 "siRNA"를 검색함으로써 찾을 수 있다. 따라서, 본 발명의 siRNA의 센스 가닥은 표적 mRNA의 약 19개 내지 약 25 뉴클레오티드의 임의의 연속된 장쇄에 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0051] 일부 구체예에서, siRNA는 19개 뉴클레오티드이고, 표적 mRNA와 동일한 17개 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예에서, siRNA는 적어도 하나의 평활 말단을 포함하는 19개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구체예에서, 19머의 각 말단은 평활 말단을 지닌다. 일부 구체예에서, 19머는 적어도 하나의 dT 돌출부를 포함한다. 일부 구체예에서, 19머는 2개의 dT 돌출부를 포함한다.

[0052] 일반적으로, 표적 mRNA 상의 표적 서열은 표적 mRNA에 대응하는 당해 cDNA 서열로부터 선택될 수 있는데, 바람직하게는, 개시 코돈으로부터 하류로(즉, 3' 방향으로) 50 내지 100개 뉴클레오티드(nt)에서 시작한다. 그러나, 표적 서열은 5' 또는 3' 비번역 영역 내에, 또는 개시 코돈 근처의 영역 내에 위치할 수 있다(예를 들어, 하기 표 1의 서열목록번호 73과 74의 표적 서열(이 표적 서열은 VEGF₁₂₁ cDNA의 5'-말단의 100개 뉴클레오티드(nt) 이내에 존재함)을 참조바람).

[0053] 본 발명의 추가 구체예에서, 표적 mRNA 서열은 다섯(5) 개 이하의 연속된 퓨린 또는 피리미딘을 포함한다. 예를 들어, VEGF₁₂₁ cDNA 서열 내의 적합한 표적 서열은 아래와 같다:

[0054] TCATCACGAAGTGGTGAAG (서열목록번호: 8)

[0055] 따라서, 이 서열을 표적으로 삼고, 각 가닥 상에 3' uu 돌출부(돌출부는 진한글씨체로 표기되어 있음)를 지니는 siRNA는 아래와 같다:

[0056] 5'-ucaucacgaaguggugaaguu-3' (서열목록번호: 9)

[0057] 3'-uuaguagugcuuccaccacuuc-5' (서열목록번호: 10)

[0058] 이와 동일한 서열을 표적으로 삼지만, 각 가닥 상에 3' TT 돌출부(돌출부는 진한글씨체로 표기되어 있음)를 지니는 siRNA는 아래와 같다:

[0059] 5'-ucaucacgaaguggugaagTT-3' (서열목록번호: 11)

[0060] 3'-TTaguagugcuucaccacuuc-5' (서열목록번호: 12)

[0061] siRNA가 유래될 수 있는 다른 VEGF₁₂₁ 표적 서열은 표 1에 제시되어 있다. 표 1에 나열된 모든 VEGF₁₂₁ 표적 서열은 인간 VEGF의 모든 다른 스플라이싱 형태에 공통적인 VEGF₁₂₁의 다른 스플라이싱 형태의 해당 부분 이내에 존재하는 것으로 이해된다. 따라서, 표 1의 VEGF₁₂₁ 표적 서열은 또한 VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ 및 VEGF₂₀₆ mRNA를 표적으로 삼을 수 있다. 또한 특정 VEGF 이소형을 표적으로 삼는 표적 서열은 용이하게 식별될 수 있다. 예를 들어, VEGF₁₆₅ mRNA를 표적으로 삼지만 VEGF₁₂₁ mRNA를 표적으로 삼지 않는 표적 서열은 AACGTACTTGAGATGTGACA(서열목록번호: 13)이다. 역으로, 항-혈관신생성 VEGF mRNA 이소형, 예컨대, VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, VEGF₁₈₃, VEGF₁₄₈, 및 VEGF₁₄₅ 및 이들의 조합물을 표적으로 삼지만, 항-혈관신생성 VEGF_{165b} mRNA를 표적으로 삼지 않는 표적 서열은 표 2에 제시된 서열을 포함하며, 단 VEGF mRNA는 서열목록번호: 42가 아님을 전제조건으로 한다. 특정 구체예에서, 상기 인간 VEGF mRNA는 서열목록번호: 86; 서열목록번호: 87; 서열목록번호: 88; 서열목록번호: 89; 서열목록번호: 90; 서열목록번호: 91; 서열목록번호: 92; 서열목록번호: 93; 서열목록번호: 94; 서열목록번호: 95; 서열목록번호: 96; 서열목록번호: 97; 서열목록번호: 98; 서열목록번호: 99; 서열목록번호: 100; 서열목록번호: 101; 서열목록번호: 102; 서열목록번호: 103; 서열목록번호: 104; 서열목록번호: 105; 서열목록번호: 106; 서열목록번호: 107; 서열목록번호: 108; 서열목록번호: 109; 서열목록번호: 110; 서열목록번호: 111; 서열목록번호: 112; 서열목록번호: 113; 서열목록번호: 114; 서열목록번호: 115; 서열목록번호: 116; 서열목록번호: 117; 및 서열목록번호: 118로 구성된 군에서 선택된다. 특정 구체예에서, 상기 인간 VEGF mRNA는 서열목록번호: 88 및 서열목록번호: 94 중에서 선택된다.

[0062] 항-혈관신생성 이소형을 존속시키면서, VEGF의 혈관신생성 이소형을 선택적으로 표적으로 삼음으로써, siRNA 치료의 항-혈관신생성 효과를 향상시키는 것이 가능하다. 도 11에 도시된 바와 같이, 엑손 7과 9 사이의 영역은 혈관신생성 서열과 항-혈관신생성 서열 사이에서 차이가 있다. 다양한 구체예에 따라서, siRNA이 혈관신생성 이소형과 적어도 부분적으로 상보적이나, 항-혈관신생성 이소형과 적어도 부분적으로 또는 완전히 비-상보적인 이 영역을 선택적으로 표적으로 삼는 것이 가능하다. 결과적으로, 특정 구체예에서, siRNA는 항-혈관신생성 이소형, VEGF_{165b}의 발현을 억제하지 않을 것인데, 단 VEGF mRNA가 서열목록번호: 42가 아님을 전제조건으로 한다. 특정 구체예에서, 상기 인간 VEGF mRNA는 서열목록번호: 86; 서열목록번호: 87; 서열목록번호: 88; 서열목록번호: 89; 서열목록번호: 90; 서열목록번호: 91; 서열목록번호: 92; 서열목록번호: 93; 서열목록번호: 94; 서열목록번호: 95; 서열목록번호: 96; 서열목록번호: 97; 서열목록번호: 98; 서열목록번호: 99; 서열목록번호: 100; 서열목록번호: 101; 서열목록번호: 102; 서열목록번호: 103; 서열목록번호: 104; 서열목록번호: 105; 서열목록번호: 106; 서열목록번호: 107; 서열목록번호: 108; 서열목록번호: 109; 서열목록번호: 110; 서열목록번호: 111; 서열목록번호: 112; 서열목록번호: 113; 서열목록번호: 114; 서열목록번호: 115; 서열목록번호: 116; 서열목록번호: 117; 및 서열목록번호: 118로 구성된 군에서 선택된다. 특정 구체예에서, 상기 인간 VEGF mRNA는 서열목록번호: 88 및 서열목록번호: 94 중에서 선택된다.

[0063] 인간 Flk-1/KDR에 관한 인간 Flt-1의 대표적인 표적 서열은 이의 전체로 참조를 위해 본원에 통합되는 2003년 7월 18일에 출원된 PCT/US2003/0022444에 소개되어 있다.

표 1

VEGF 표적 서열

| 표적 서열 | 서열 목록 번호 | 표적 서열 | 서열 목록 번호 |
|----------------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
| 동축체 VEGF mRNA 서열 | 1 | GATAGAGCAAGACAAGAAA | 26 |
| 스플라이싱 변이체 VEGF ₁₂₁ 서열 | 2 | GACAAGAAAATCCCTGTGG | 27 |
| 스플라이싱 변이체 VEGF ₁₆₅ 서열 | 3 | GAAAATCCCTGTGGGCCTT | 28 |
| 스플라이싱 변이체 VEGF ₁₈₉ 서열 | 4 | AATCCCTGTGGGCCTTGCT | 29 |
| 스플라이싱 변이체 VEGF ₂₀₆ 서열 | 5 | TCCCTGTGGGCCTTGCTCA | 30 |
| TCATCACGAAGTGGTGAAG | 8 | GCATTGTTTTGTACAAGAT | 31 |
| ucaucacgaaguggugaaguu | 9 | GATCCGCAGACGTGTAAAT | 32 |
| uuaguagugcuuccaccacuuc | 10 | ATGTTCTTGCAAAAACACA | 33 |
| ucaucacgaaguggugaagTT | 11 | TGTTCTTGCAAAAACACAG | 34 |
| TTaguagugcuuccaccacuuc | 12 | AAACACAGACTCGCGTTGC | 35 |
| AACGTACTTGACAGATGTGACA | 13 | AACACAGACTCGCGTTGCA | 36 |
| GTTCATGGATGTCTATCAG | 14 | ACACAGACTCGCGTTGCAA | 37 |
| TCGAGACCCTGGTGGACAT | 15 | CACAGACTCGCGTTGCAAG | 38 |
| TGACGAGGGCCTGGAGTGT | 16 | GGCGAGGCAGCTTGAGTTA | 39 |
| TGACGAGGGCCTGGAGTGT | 17 | ACGAACGTACTTGACAGATG | 40 |
| CATCACCATGCAGATTATG | 18 | CGAACGTACTTGACAGATGT | 41 |
| ACCTCACCAAGGCCAGCAC | 19 | CGTACTTGACAGATGTGACA | 42 |
| GGCCAGCACATAGGAGAGA | 20 | GTGGTCCCAGGCTGCACCC | 43 |
| CAAATGTGAATGCAGACCA | 21 | GGAGGAGGGCAGAATCATC | 44 |
| ATGTGAATGCAGACCAAAG | 22 | GTGGTGAAGTTCATGGATG | 45 |
| TGCAGACCAAGAAAAGATA | 23 | AATCATCACGAAGTGGTGAAG | 46 |
| AGAAAGATAGAGCAAGACA | 24 | AAGTTCATGGATGTCTATCAG | 47 |
| GAAAGATAGAGCAAGACAA | 25 | AATCGAGACCCTGGTGGACAT | 48 |
| AATGACGAGGGCCTGGAGTGT | 49 | AATGTTCTTGCAAAAACACAGAC | 65 |
| AACATCACCATGCAGATTATG | 50 | AAAAACACAGACTCGCGTTGCAA | 66 |
| AAACCTCACCAAGGCCAGCAC | 51 | AAAAACACAGACTCGCGTTGCAAG | 67 |
| AAGGCCAGCACATAGGAGAGA | 52 | AAACACAGACTCGCGTTGCAAGG | 68 |
| AACAAATGTGAATGCAGACCA | 53 | AACACAGACTCGCGTTGCAAGGC | 69 |
| AAATGTGAATGCAGACCAAAG | 54 | AAGGCGAGGCAGCTTGAGTTAAA | 70 |
| AATGCAGACCAAGAAAAGATA | 55 | AAACGAACGTACTTGACAGATGTG | 71 |

[0064]

| | | | |
|-------------------------|----|--------------------------|----|
| AAAGAAAGATAGAGCAAGACA | 56 | AACGAACGTACTTGACAGATGTGA | 72 |
| AAGAAAGATAGAGCAAGACAA | 57 | AAGTGGTCCCAGGCTGCACCCAT | 73 |
| AAGATAGAGCAAGACAAGAAAAT | 58 | AAGGAGGAGGGCAGAATCATCAC | 74 |
| AAGACAAGAAAATCCCTGTGGGC | 59 | AAGTGGTGAAGTTCATGGATGTC | 75 |
| AAGAAAATCCCTGTGGGCCTTGC | 60 | AAAATCCCTGTGGGCCTTGCTCA | 76 |
| AATCCCTGTGGGCCTTGCTCAGA | 61 | accucaccaaggccagcacTT | 77 |
| AAGCATTTGTTTGTACAAGATCC | 62 | gugcuggccuugggagguTT | 78 |
| AAGATCCGCAGACGTGTAAATGT | 63 | GGCTACGTCCAGCGCACC | 79 |
| AAATGTTCTTGCAAAAACACAGA | 64 | AAACCUCACCAAGGCCAGCAC | 80 |

[0065]

표 2

VEGF_{165b}를 선택적으로 배제한 VEGF 표적 서열

| siRNA 명칭 | 표적 서열 (5'-3') |
|---------------|-----------------------------------|
| OPK-HVB-001 | AACGTACTTGAGATGTGA (서열목록번호: 86) |
| OPK-HVB-002 | ACGTACTTGAGATGTGAC (서열목록번호: 87) |
| OPK-HVB-003 | CGTACTTGAGATGTGACA (서열목록번호: 42) |
| OPK-HVB-004 | GTACTTGAGATGTGACAA (서열목록번호: 88) |
| OPK-HVB-005 | TACTTGAGATGTGACAAG (서열목록번호: 89) |
| OPK-HVB-006 | ACTTGAGATGTGACAAGC (서열목록번호: 90) |
| OPK-HVB-007 | CTTGAGATGTGACAAGCC (서열목록번호: 91) |
| OPK-HVB-008 | TTGAGATGTGACAAGCCG (서열목록번호: 92) |
| OPK-HVB-009 | TGAGATGTGACAAGCCGA (서열목록번호: 93) |
| OPK-HVB-010 | GCAGATGTGACAAGCCGAG (서열목록번호: 94) |
| OPK-HVB-011 | CAGATGTGACAAGCCGAGG (서열목록번호: 95) |
| OPK-HVB-012 | AGATGTGACAAGCCGAGGC (서열목록번호: 96) |
| OPK-HVB-013 | GATGTGACAAGCCGAGGCG (서열목록번호: 97) |
| OPK-HVB-014 | ATGTGACAAGCCGAGGCGG (서열목록번호: 98) |
| OPK-HVB-004be | GTACTTGAGATGTGACAA (서열목록번호: 99) |
| OPK-HVB-009be | TGAGATGTGACAAGCCGA (서열목록번호: 100) |
| OPK-HVB-010be | GCAGATGTGACAAGCCGAG (서열목록번호: 101) |
| OPK-HVB-012be | AGATGTGACAAGCCGAGGC (서열목록번호: 102) |
| OPK-HVB-001a | AACGTACTTGAGATGT (서열목록번호: 103) |
| OPK-HVB-002a | ACGTACTTGAGATGTG (서열목록번호: 104) |
| OPK-HVB-003a | CGTACTTGAGATGTGA (서열목록번호: 105) |
| OPK-HVB-004a | GTACTTGAGATGTGAC (서열목록번호: 106) |
| OPK-HVB-005a | TACTTGAGATGTGACA (서열목록번호: 107) |

[0066]

| | |
|--------------|---------------------------------|
| OPK-HVB-006a | ACTTGAGATGTGACAA (서열목록번호: 108) |
| OPK-HVB-007a | CTTGAGATGTGACAAG (서열목록번호: 109) |
| OPK-HVB-008a | TTGAGATGTGACAAGC (서열목록번호: 110) |
| OPK-HVB-009a | TGAGATGTGACAAGCC (서열목록번호: 111) |
| OPK-HVB-010a | GCAGATGTGACAAGCCG (서열목록번호: 112) |
| OPK-HVB-011a | CAGATGTGACAAGCCGA (서열목록번호: 113) |
| OPK-HVB-012a | AGATGTGACAAGCCGAG (서열목록번호: 114) |
| OPK-HVB-013a | GATGTGACAAGCCGAGG (서열목록번호: 115) |
| OPK-HVB-014a | ATGTGACAAGCCGAGGC (서열목록번호: 116) |
| OPK-HVB-015a | TGTGACAAGCCGAGGCG (서열목록번호: 117) |
| OPK-HVB-016a | GTGACAAGCCGAGGCGG (서열목록번호: 118) |

[0067]

[0068]

"OPK-HVB-XXXbe"라는 명칭을 갖는 서열은 유사한 21개의 19머 평할 말단 대응부인 서열을 지칭한다. "OPVHVB-XXXa"라는 명칭을 갖는 서열은, dTdT 돌출부를 지니는 17 bp 뉴클레오타이드 서열인, 19머를 지칭한다. 또한 VEGF_{165b}를 잔존시키면서 VEGF를 표적으로 삼지만 본원에 특이적으로 예시되지 않는 다른 서열이 유사한 특성을

지니도록 제조될 수 있다.

- [0069] siRNA는 당업계의 통상의 기술자에게 알려진 많은 방법을 사용하여 획득될 수 있다. 예를 들어, siRNA는 화학적으로 합성되거나 당업계에 공지된 방법, 예컨대, 전체 교시 내용이 참조를 위해 본원에 통합되는, 투של 등 (Tuschl et al.)의 미국 특허 출원 제2002/0086356호에 소개된 드로소필라(*Drosophila*) 시험관내(*in vitro*) 시스템을 사용하여 재조합적으로 생성된다.
- [0070] 특정 구체예에서, siRNA는 적절히 보호된 리보뉴클레오시드 포스포르아미디트와 관용적인 DNA/RNA 합성기를 사용하여 화학적으로 합성된다. siRNA는 2개의 별개의, 상보적인 RNA 분자로써, 또는 2개의 상보적인 영역을 지니는 단일 RNA 분자로써 합성될 수 있다. 합성 RNA 분자 또는 합성 시약의 상업적 공급업체는 Proligo(Hamburg, Germany), Dharmacon Research(Lafayette, CO, USA), Pierce Chemical(part of Perbio Science, Rockford, IL, USA), Glen Research(Sterling, VA, USA), ChemGenes(Ashland, MA, USA) 및 Cruachem(Glasgow, UK)을 포함한다.
- [0071] 달리, siRNA는 또한 임의의 적합한 프로모터를 사용하여 재조합 원형 또는 선형 DNA 플라스미드로부터 발현시킬 수 있다. 플라스미드로부터 siRNA를 발현시키기 위한 적합한 프로모터는, 예를 들어, U6 또는 H1 RNA pol III 프로모터 서열 및 사이토메갈로바이러스 프로모터를 포함한다. 다른 적합한 프로모터를 선택하는 것은 당업계의 기술상식에 속한다. 본 발명의 재조합 플라스미드는 또한 특정 조직 또는 특정 세포내 환경에서의 siRNA의 발현을 위한 유도성(inducible) 또는 조절성(regulatable) 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0072] 재조합 플라스미드에서 발현된 siRNA는 표준 기술에 의해 배양된 세포 발현 시스템으로부터 분리되거나, 생체내 신혈관형성 영역에서 또는 신혈관형성 영역 근처에서 세포내적으로 발현될 수 있다. siRNA를 생체내에서 세포로 전달하기 위한 재조합 플라스미드의 사용은 아래에서 더 상세히 논의된다.
- [0073] siRNA는 2개의 별개의, 상보적인 RNA 분자로써, 또는 2개의 상보적인 영역을 지니는 단일 RNA 분자로써 재조합 플라스미드로부터 발현될 수 있다.
- [0074] siRNA를 발현시키기 위한 적합한 플라스미드의 선택, siRNA를 발현시키기 위한 핵산 서열을 플라스미드 내로 삽입하는 방법, 및 관심있는 세포로 재조합 플라스미드를 전달하는 방법은 당업계의 기술 상식에 속한다. 예를 들어, 전체 개시 내용이 참조를 위해 본원에 통합되는, 하기 문헌을 참조바람: Tuschl, T. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20: 446-448; Brummelkamp TR et al. (2002), *Science* 296: 550-553; Miyagishi M et al. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20: 497-500; Paddison PJ et al. (2002), *Genes Dev.* 16: 948-958; Lee NS et al. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20: 500-505; 및 Paul CP et al. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20: 505-508.
- [0075] siRNA를 발현시키기 위한 핵산 서열을 포함하는 플라스미드는 하기 실시예 7에 기술되어 있다. pAAVsiRNA로 불리는, 그러한 플라스미드는 인간 U6 RNA 프로모터의 조절하의 폴리 T 종결 서열과 작동가능하게 연결된 센스 RNA 가닥 코딩 서열, 및 인간 U6 RNA 프로모터의 조절하에 폴리 T 종결 서열과 작동가능하게 연결된 안티센스 RNA 가닥을 포함한다. 플라스미드 pAAVsiRNA는 siRNA를 발현시키기 위한 동일한 핵산 서열을 포함하는 재조합 아데노-부속 바이러스 벡터를 생산하는데 궁극적으로 사용하기 위한 것이다.
- [0076] 본원에 사용된, "폴리 T 종결 서열과 작동가능하게 연결된"은 센스 또는 안티센스 가닥을 엔코딩하는 핵산 서열이 5' 방향으로 폴리 T 종결 신호와 인접해 있다는 것을 의미한다. 플라스미드로부터 센스 또는 안티센스 서열의 전사가 진행되는 동안, 폴리 T 종결 신호는 전사를 종결시키는 역할을 한다.
- [0077] 본원에 사용된, 프로모터의 "조절 하에"는 센스 또는 안티센스 가닥을 엔코딩하는 핵산 서열이 프로모터의 3'에 위치하여, 프로모터가 센스 또는 안티센스 코딩 서열의 전사를 개시시킬 수 있다는 것을 의미한다.
- [0078] siRNA는 또한 생체내 신혈관형성 영역에서 또는 이 영역 근처에서 세포내적으로 재조합 바이러스 벡터로부터 발현될 수 있다. 본 발명의 재조합 바이러스 벡터는 siRNA를 엔코딩하는 서열과 siRNA 서열을 발현시키기 위한 임의의 적합한 프로모터를 포함한다. 적합한 프로모터는, 예를 들어, U6 또는 H1 RNA pol III 프로모터 서열 및 사이토메갈로바이러스 프로모터를 포함한다. 다른 적합한 프로모터의 선택은 당업계의 기술상식에 속한다. 본 발명의 재조합 바이러스 벡터는 또한 특정 조직 또는 특정 세포내 환경 내에서 siRNA의 발현을 위한 유도성 또는 조절성 프로모터를 포함할 수 있다. siRNA를 생체내에서 세포로 전달하기 위한 재조합 바이러스 벡터의 사용은 아래에서 더 상세하게 논의된다.
- [0079] siRNA는 2개의 별개의, 상보적인 RNA 분자로써, 또는 2개의 상보적인 영역을 지니는 단일 RNA 분자로써 재조합 바이러스 벡터로부터 발현될 수 있다.

- [0080] 발현될 siRNA 분자(들)에 대한 코딩 서열을 수용할 수 있는 임의의 바이러스 벡터, 예를 들어, 아데노바이러스 (AV); 아데노-부속 바이러스 (AAV); 레트로바이러스(예를 들어, 렌티바이러스(LV), 램도바이러스, 뮤린 백혈병 바이러스); 헤르페스 바이러스 등에서 유래된 벡터 등이 사용될 수 있다. 바이러스 벡터의 향성(tropism)은 다른 바이러스로부터의 외피 단백질 또는 다른 표면 항원으로 벡터를 위화(pseudotyping)시킴으로써 변형될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 AAV 벡터는 수포성구내염바이러스(vesicular stomatitis virus, VSV), 광견병, 에볼라, 모콜라(Mokola) 등으로부터의 표면 단백질로 위화될 수 있다.
- [0081] 본 발명에 사용하기에 적합한 재조합 바이러스 벡터의 선택, siRNA를 발현시키기 위한 핵산 서열의 벡터로의 삽입 방법, 및 바이러스 벡터를 관심 있는 세포로 전달하는 방법은 당업계의 기술상식에 속한다. 예를 들어, 전체 개시 내용이 참조를 위해 본원에 통합되는 하기 문헌을 참조바람: Dornburg R (1995), *Gene Therap.* 2: 301-310; Eglitis MA (1988), *Biotechniques* 6: 608-614; Miller AD (1990), *Hum Gene Therap.* 1: 5-14; 및 Anderson WF (1998), *Nature* 392: 25-30.
- [0082] 바람직한 바이러스 벡터는 AV와 AAV에서 유래된 벡터이다. 특히 바람직한 구체예에서, siRNA는, 예를 들어, U6 또는 H1 RNA 프로모터 또는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터를 포함하는 재조합 AAV 벡터로부터 2개의 별개의, 상보적인 단일 가닥 RNA 분자로 발현된다.
- [0083] SiRNA를 발현시키는데 적합한 AV 벡터, 재조합 AV 벡터를 구성하는 방법, 및 상기 벡터를 표적 세포로 전달하는 방법은 문헌[Xia H et al. (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010]에 소개되어 있다.
- [0084] SiRNA를 발현시키는데 적합한 AAV 벡터, 재조합 AAV 벡터를 구성하는 방법, 및 상기 벡터를 표적 세포로 전달하는 방법은, 전체 개시 내용이 참조를 위해 본원에 통합되는, 하기 문헌에 소개되어 있다: Samulski R et al. (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher KJ et al. (1996), *J. Virol.*, 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; 미국 특허 제5,252,479호; 미국 특허 제5,139,941호; 국제 특허 출원 공개 공보 WO 94/13788호; 및 국제 특허 출원 공개 공보 WO 93/24641호. 본 발명의 재조합 AAV 벡터를 생성시키기 위한 대표적인 방법은 하기 실시예 7에 기술되어 있다.
- [0085] 표적 mRNA 의 RNAi-매개 분해를 야기시키는 당해 표적 서열을 함유하는 siRNA의 활성은 세포내의 RNA 또는 단백질 수준을 측정하기 위한 표준 기술을 사용하여 평가할 수 있다. 예를 들어, siRNA는 배양된 세포로 전달될 수 있고, 표적 mRNA의 수준은 노던 블랏 또는 도트 블랏팅 기술에 의해, 또는 정량 RT-PCR에 의해 측정될 수 있다. 달리, 배양된 세포 내의 VEGF와 이의 이소형뿐만 아니라, Flt-1 또는 Flk-1/KDR 수용체 단백질의 수준은 ELISA 또는 웨스턴 블랏에 의해 측정될 수 있다. 표적 mRNA 또는 단백질 수준에 대한 본 발명의 siRNA의 영향을 측정하기 위한 적합한 세포 배양 시스템은 하기 실시예 1에 기술되어 있다.
- [0086] 또한 당해 표적 서열을 함유하는 siRNA에 의한 표적 mRNA의 RNAi-매개 분해가 신혈관형성의 동물 모델, 예컨대, ROP 또는 CNV 마우스 모델로 평가될 수 있다. 예를 들어, ROP 또는 CNV 마우스에서 신혈관형성 영역은 siRNA의 투여 전후에 측정될 수 있고, 일부 구체예에서, 비처리된 동물과 비교된다. siRNA 의 투여시 이러한 모델에서 신혈관형성 영역의 감소는, 일부 구체예에서, 표적 mRNA의 하향-조절(down-regulation)을 나타내는 지표이다(하기 실시예 6 참조).
- [0087] 위에서 논의한 바와 같이, siRNA VEGF와 이의 이소형뿐만 아니라, Flt-1 또는 Flk-1/KDR mRNA, 또는 이의 다른 스플라이싱 형태, 돌연변이체 또는 동족체, 바람직하게는 VEGF, 더 바람직하게는 인간 VEGF를 표적으로 삼고 이의 RNAi-매개 분해를 야기시킬 수 있다. 본 발명의 siRNA에 의한 표적 mRNA의 분해는 VEGF와 이의 이소형뿐만 아니라, Flt-1 또는 Flk-1/KDR 유전자로부터의 기능적 유전자 생성물의 생성을 감소시킨다. 따라서, 본 발명의 또 다른 구체예는 표적 mRNA가 분해되도록, 피험자에게 유효량의 siRNA를 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 VEGF와 이의 이소형, 예컨대, VEGF₁₂₁(서열목록번호: 2), VEGF₁₆₅(서열목록번호: 3), VEGF₁₈₉(서열목록번호: 4), VEGF₂₀₆(서열목록번호: 5; GenBank 수탁번호 CS245579), VEGF₁₈₃(GenBank 수탁번호 AJ010438), VEGF₁₄₈(GenBank 수탁번호 AF091352), 및/또는 VEGF₁₄₅(GenBank 수탁번호 CS245578)뿐만 아니라, Flt-1 또는 Flk-1/KDR의 발현을 억제시키는 방법을 제공한다. VEGF와 이의 이소형뿐만 아니라, Flt-1과 Flk-1/KDR 유전자의 생성물이 혈관신생을 개시시키고 유지하는데 필요하기 때문에, 본 발명의 또 다른 본 발명의 siRNA에 의한 표적 mRNA의 RNAi-매개 분해에 의해 피험자에서 혈관신생을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0088] 표적 mRNA의 RNAi-매개 분해는 상기한 것과 같은 mRNA 또는 단백질을 분리 및 정량하기 위한 표준 기술을 사용하여, 피험자의 세포내 표적 mRNA 또는 단백질 수준을 측정함으로써 검출될 수 있다.

- [0089] 혈관신생의 억제제는 피험자에서 병원성 또는 비병원성 혈관신생의 진행을 직접적으로 측정함으로써; 예를 들어, siRNA로 치료하기 전과 후에 신혈관형성 영역의 크기를 관찰함으로써, 평가될 수 있다. 신혈관형성 영역의 크기가 동일하게 유지되거나 감소되면, 혈관신생의 억제를 나타내는 지표가 된다. 피험자에서 신혈관형성 영역의 크기를 관찰 및 측정하기 위한 기술은 당업계의 기술상식에 속하며; 예를 들어, 맥락막 신혈관형성 영역은, 예를 들어, 플루오레세인 혈관조영법(fluorescein angiography)에 의해 관찰될 수 있다.
- [0090] 또한 혈관신생의 억제제는 혈관신생과 연관된 병원성 질환에서의 변화 또는 회복(reversal)에 대한 관찰을 통해 추론될 수 있다. 예를 들어, ARMD에서, 시력 상실의 지연, 정지 또는 회복은 맥락막에서 혈관신생의 억제에 대한 지표이다. 종양의 경우, 종양 성장의 지연, 정지 또는 회복, 또는 종양 전이의 지연 또는 정지는 종양 부위에서 또는 종양 부위 근처에서 혈관신생의 억제에 대한 지표이다. 또한 비병원성 혈관신생의 억제제가 siRNA의 투여시 지방 손실 또는 콜레스테롤 수준에서의 감소로부터 추론될 수 있다.
- [0091] siRNA가 아화화학량으로 표적 mRNA를 분해(그에 따라 혈관신생을 억제)할 수 있다는 것은 이해된다. 임의의 이론에 국한됨을 바라지 않으면서, siRNA는 촉매적 방식으로 표적 mRNA의 분해를 야기시키는 것으로 믿어진다. 따라서, 표준 항-혈관신생성 요법과 비교할 때, 유의하게 더 적은 siRNA가 치료 효과를 발휘하도록 신혈관형성 부위에 또는 이 부위 근처에 전달될 필요가 있다.
- [0092] 당업계의 통상의 기술자는 피험자의 체격과 체중; 신혈관형성 또는 질병 침투의 정도; 피험자의 연령, 건강 및 성별; 투여 경로; 및 투여가 국부적인지 전신적인지 여부와 같은 인자들을 고려함으로써, 해당 피험자에게 투여될 siRNA의 유효량을 용이하게 결정할 수 있다. 일반적으로, siRNA의 유효량은 약 1 나노몰농도(nM) 내지 약 100 nM, 바람직하게는 약 2 nM 내지 약 50 nM, 더 바람직하게는 약 2.5 nM 내지 약 10 nM의 신혈관형성 부위에서 또는 신혈관형성 부위 근처에서 세포내 농도를 포함한다. 더 많거나 더 적은 양의 siRNA가 투여될 수 있음은 이해된다.
- [0093] 본 발명의 방법을 사용하여 비병원성인 혈관신생, 즉 피험자에서 정상 과정으로부터 야기되는 혈관신생을 억제할 수 있다. 비병원성 혈관신생의 일례는 자궁내막 신혈관형성, 및 지방 조직 또는 콜레스테롤의 생성에 관여하는 과정을 포함한다. 따라서, 본 발명은, 예를 들어, 체중을 조절하기 위한 목적 또는 지방 손실을 촉진하기 위한 목적, 콜레스테롤 수준을 감소시키기 위한 목적, 또는 낙태약으로 사용하기 위한 목적으로, 비병원성 혈관신생을 억제하기 위한 방법을 제공한다.
- [0094] 본 발명은 또한 혈관신생성 질환, 즉 병원성이 부적절하거나 통제되지 않은 혈관신생과 연관된 질환과 관련된 혈관신생을 억제할 수 있다. 예를 들어, 대부분의 암성 고형 종양은 종양 부위에서 그리고 종양 부위 주위에서 혈관신생을 유도시킴으로써 혼자 힘으로 적합한 혈액 공급을 생성시킨다. 이러한 종양-유도 혈관신생은 종종 종양 성장에 요구되고, 또한 전이성 세포가 혈류로 진입되도록 한다.
- [0095] 다른 혈관신생성 질환은 당뇨병망막병증, 연령관련황반변성(ARMD), 건선, 류마티스 관절염 및 기타 염증성 질환을 포함한다. 이러한 질병은 신혈관형성 영역에서 새롭게 형성된 혈관에 의한 정상 조직의 파괴로 특징지어진다. 예를 들어, ARMD에서, 맥락막은 모세관에 의해 침습되고 파괴된다. ARMD에서 맥락막의 혈관신생-파괴 파괴는 최종적으로 부분적 또는 완전한 맹증(blindness)을 야기시킨다.
- [0096] 바람직하게는, siRNA는 암; 예를 들어, 유방암, 폐암, 두경부암, 뇌암, 복부암, 대장암, 결장직장암, 식도암, 위장암, 신경교종, 간암, 설암, 신경모세포종, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 망막아세포종, 빌름스 종양, 다발성 골수종; 피부암(예를 들어, 흑색종), 림프종 및 혈액암과 연관된 고형 종양의 성장 또는 전이를 억제시키는데 사용된다.
- [0097] 더 바람직하게는, siRNA는 연령관련황반변성에서 맥락막의 신혈관형성을 억제시키는데 사용된다.
- [0098] 혈관신생성 질환을 치료하기 위해, siRNA는 본 발명의 siRNA와 상이한 약제와 조합하여 피험자에게 투여될 수 있다. 달리, siRNA는 혈관신생성 질환을 치료하기 위해 설계된 또 다른 치료 방법과 조합하여 피험자에게 투여될 수 있다. 예를 들어, siRNA 암을 치료하거나 종양 전이를 예방하기 위해 현재 사용되고 있는 치료 방법(예를 들어, 방사선 요법, 화학요법, 및 외과수술)과 조합하여 투여될 수 있다. 종양을 치료하기 위해, siRNA는 바람직하게는 방사선 요법과 조합하여, 또는 화학요법제, 예컨대, 시스플라틴, 카르보플라틴, 사이클로포스파미드, 5-플루오로우라실, 아드리아마이신, 다우노루비신 또는 타목시펜과 조합하여 피험자에게 투여된다.
- [0099] 본 발명의 방법에서, 본 발명의 siRNA는 전달물질과 함께, 나출형(naked) siRNA로써, 또는 siRNA를 발현시키는

제조합 플라스미드 또는 바이러스 벡터로써 피험자에게 투여될 수 있다.

- [0100] 본 발명의 siRNA와 함께 투여하기 위한 적합한 전달물질은, 이로만 국한되는 것은 아니지만, Mirus Transit TKO 친유성 시약; 리포펙틴; 리포펙타민; 켈펙틴; 또는 다양이온(예를 들어, 폴리리신), 또는 리포솜을 포함한다. 일부 구체예에서, 전달물질은 리보주스(Novagen), siRNA 형질감염 시약인데, 아민과 지질 기반 시약을 포함한다. 바람직한 전달물질은 리포솜이다. 일부 구체예에서, siRNA는 리포솜성 전달물질 없이 전달된다.
- [0101] 리포솜은 특정 조직, 예컨대, 망막 또는 종양 조직으로의 siRNA의 전달을 보조할 수 있고, 또한 siRNA의 혈중 반감기를 증가시킬 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적합한 리포솜은 표준 소포-형성 지질로부터 형성되는데, 상기 소포 형성 지질은 일반적으로 중성 또는 음으로 하전된 인지질과 스테롤, 예컨대, 콜레스테롤을 포함한다. 지질은 일반적으로 바람직한 리포솜 크기와 혈류 중에서 리포솜의 반감기와 같은 인자들을 고려하여 선택된다. 리포솜을 제조하기 위한 다양한 방법, 예를 들어, 전체 개시 내용이 참조를 위해 본원에 통합되는 하기 문헌에 소개된 방법이 공지되어 있다: Szoka et al. (1980), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467; 및 미국 특허 제 4,235,871호, 제4,501,728호, 제4,837,028호, 및 제5,019,369호.
- [0102] 바람직하게는, 본 발명의 siRNA를 캡슐화하는(encapsulating) 리포솜은 이 리포솜이 혈관신생 부위에서 또는 이 부위 근처에서 특정 세포 또는 조직을 표적으로 삼도록 할 수 있는 리간드 분자를 포함한다. 종양 항원 또는 내피 세포 표면 항원에 결합하는 모노클로날 항체와 같은, 종양 또는 혈관 내피 세포에 널리 퍼져있는 수용체에 결합하는 리간드가 바람직하다.
- [0103] 특히 바람직하게는, 본 발명의 siRNA를 캡슐화하는 리포솜은, 예를 들어, 구조물의 표면에 결합된 옹소닌작용-저해 모이어티(opsonization-inhibiting moieties)를 지님으로써, 단핵성 대식세포 및 세망내피계(reticuloendothelial systems)에 의한 제거를 회피하도록 변형된다. 일 구체예에서, 본 발명의 리포솜은 옹소닌작용-저해 모이어티와 리간드 둘 모두를 포함할 수 있다.
- [0104] 본 발명의 리포솜을 제조하는데 사용하기 위한 옹소닌작용-저해 모이어티는 전형적으로 리포솜 막에 결합된 거대 친수성 중합체다. 본원에 사용된, 옹소닌작용-저해 모이어티는, 예를 들어, 지용성 앵커(lipid-soluble anchor)의 막 그 자체내로의 삽입에 의해, 또는 막 지질의 작용기들에 직접적으로 결합함으로써, 화학적으로 또는 물리적으로 막에 결합된 경우, 리포솜 막에 "결합"된다. 이러한 옹소닌작용-저해 친수성 중합체는, 예를 들어, 전체 개시 내용이 참조를 위해 본원에 통합되는, 미국 특허 제4,920,016호에 소개된 것과 같이, 대식구-단핵구 시스템("MMS(macrophage-monocyte system)")과 세망내피계("RES(reticuloendothelial system)")에 의한 리포솜의 섭취를 유의하게 감소시키는 보호 표면층을 형성한다. 따라서, 옹소닌작용-저해 모이어티로 변형된 리포솜은 순환에서 비변형된 리포솜보다 훨씬 더 오랫동안 존속한다. 이러한 이유로, 이러한 리포솜은 때때로 "스텔스(stealth)" 리포솜으로 불리운다.
- [0105] 스텔스 리포솜은 다공성 또는 "유출성(leaky)" 미세혈관계에 의해 지탱되는 조직내에 축적되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 이러한 미세혈관계 결합, 예를 들어, 고형 종양에 의해 특징지어지는 표적 조직은, 이러한 리포솜을 효율적으로 축적시킬 것이다; 하기 문헌 참조바람: Gabizon, et al. (1988), *P.N.A.S., USA*, 18: 6949-53. 또한, RES에 의한 감소된 섭취는 간과 비장내 유의한 축적을 막음으로써 스텔스 리포솜의 독성을 저하시킨다. 따라서, 옹소닌작용-저해 모이어티로 변형된 본 발명의 리포솜은 종양 세포에 본 발명의 siRNA를 전달시킬 수 있다.
- [0106] 리포솜을 변형시키는데 적합한 옹소닌작용-저해 모이어티는 바람직하게는 약 500 내지 약 40,000 달톤, 더 바람직하게는 약 2,000 내지 약 20,000 달톤의 수-평균 분자량을 지니는 수-용해성 중합체다. 이러한 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 폴리프로필렌 글리콜(PPG) 유도체; 예를 들어, 메톡시 PEG 또는 PPG, 및 PEG 또는 PPG 스테아레이트; 합성 중합체, 예컨대, 폴리아크릴아미드 또는 폴리 N-비닐 피롤리돈; 선형, 분지형, 또는 덴드리머 폴리아미도아민; 폴리아크릴산; 폴리알코올, 예를 들어, 카르복시기 또는 아미노기가 화학적으로 연결된, 폴리비닐알코올 및 폴리자일리톨뿐만 아니라 강글리오시드, 예컨대, 강글리오시드 GM₁을 포함한다. PEG, 메톡시 PEG, 또는 메톡시 PPG, 또는 이의 유도체의 공중합체가 또한 적합하다. 또한, 옹소닌작용-저해 중합체는 폴리아미노산, 폴리스카라이드, 폴리아미도아민, 폴리에틸렌아민, 또는 폴리뉴클레오티드 중 어느 하나와 PEG의 블록 공중합체일 수 있다. 옹소닌작용-저해 중합체는 또한 아미노산 또는 카르복실산, 예를 들어, 갈락투론산, 글루쿠론산, 만누론산, 히알루론산, 펙트산, 뉴라민산, 알긴산, 캐라지난; 아미노화된 폴리스카라이드 또는 올리고사카라이드(선형 또는 분지형)를 함유하는 천연 폴리스카라이드; 또는 카르복실화된 폴리스카라이드 또는 올리고사카라이드, 예를 들어, 카본산의 유도체와의 반응으로 결과적으로 생성되는 카르복실기의 연결을 지니는

카르복실화된 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드일 수 있다.

- [0107] 바람직하게는, 읍소닌작용-저해 모이어티는 PEG, PPG, 또는 이의 유도체이다. PEG 또는 PEG-유도체로 변형된 리포솜은 때때로 "페길화된(PEGylated) 리포솜"으로 불리운다.
- [0108] 읍소닌작용 저해 모이어티는 다수의 잘 알려진 기술들 중 임의의 기술에 의해 리포솜 막에 결합될 수 있다. 예를 들어, PEG의 N-히드록시숙신이미드 에스테르는 포스포타일-에탄올아민 지질-용해성 앵커에 결합될 수 있고, 그런 다음 막에 결합될 수 있다. 유사하게, 텍스트란 중합체는 60 °C에서 $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ 와 용매 혼합물, 예컨대, 30: 12 비율의 테트라히드로푸란과 물을 사용하여 환원성 아미노화를 통해 스테아릴아민 지질-용해성 앵커로 유도체화될 수 있다.
- [0109] siRNA를 발현시키는 재조합 플라스미드는 위에 논의되어 있다. 이러한 재조합 플라스미드는 또한 직접적으로 투여되거나, Mirus Transit LT1 친유성 시약; 리포펙틴; 리포펙타민; 쉘펙틴; 다양이온(예를 들어, 폴리리신) 또는 리포솜을 포함하는, 적합한 전달물질과 함께 투여될 수 있다. siRNA를 발현시키는 재조합 바이러스 벡터는 또한 위에 논의되어 있으며, 피험자내의 신혈관형성 영역으로 이러한 벡터를 전달하기 위한 방법은 당업계의 기술상식에 속한다.
- [0110] siRNA는 신혈관형성 영역 또는 신혈관형성 영역 근처에 존재하는 조직의 세포로 siRNA를 전달하는데 적합한 임의의 수단으로 피험자에게 투여될 수 있다. 예를 들어, siRNA는 유전자 총에 의해, 전기천공법에 의해, 또는 기타 적합한 비경구 또는 경장(enteral) 투여 경로로 투여될 수 있다.
- [0111] 적합한 경장 투여 경로는 구강, 직장, 또는 비강내 전달을 포함한다.
- [0112] 적합한 비경구 투여 경로는 혈관내 투여(예를 들어, 정맥내 볼루스 주사(intravenous bolus injection), 정맥내 주입(intravenous infusion), 동맥내 볼루스 주사, 동맥내 주입 및 혈관계로의 카테터 설치); 조직주위 및 조직내 투여(예를 들어, 종양주위(peritumoral) 및 종양내 주사, 망막내 주사 또는 망막하 주사); 피하 주사 또는 피하 주입(예컨대, 삼투압 펌프에 의한 피하 주입)을 포함하는 침착(deposition); 신혈관형성 부위 또는 신혈관형성 부위 근처의 영역으로의 직접(예를 들어, 국소) 적용, 예를 들어, 카테터 또는 기타 설치 기구(예를 들어, 각막 펠렛 또는 좌제(suppository), 점안제(eye-dropper), 또는 다공성, 비다공성, 또는 젤라틴성 물질을 포함하는 임플란트); 및 흡기를 포함한다. 적합한 설치 기구는, 전체 개시 내용이 참조를 위해 본원에 통합되는, 미국 특허 제 5,902,598호 및 제6,375,972호에 기재된 안구내 임플란트, 및 미국 특허 제6,331,313호에 기재된 생분해성 안구내 임플란트를 포함한다. 그러한 안구내 임플란트는 Control Delivery Systems, Inc.(Watertown, MA) 및 Oculex Pharmaceuticals, Inc.(Sunnyvale, CA)로부터 구입가능하다.
- [0113] 바람직한 구체예에서, siRNA의 주사 또는 주입은 신혈관형성 부위 또는 이 부위 근처에 주어진다. 더 바람직하게는, siRNA는 눈에 국소적으로, 예를 들어, 아래쪽 눈꺼풀 또는 결막 쿨데삭(cul-de-sac)에 액체 또는 겔 형태로 투여되는데, 이것은 당업계의 기술상식에 속한다(예를 들어, 전체 개시 내용이 참조를 위해 본원에 통합되는, 문헌[Acheampong AA et al, 2002, *Drug Metabol. and Disposition* 30: 421-429]을 참조바람).
- [0114] 전형적으로, siRNA는 약 5 마이크로리터 내지 약 75 마이크로리터, 예를 들어, 약 7 마이크로리터 내지 약 50 마이크로리터, 바람직하게는 약 10 마이크로리터 내지 약 30 마이크로리터의 양으로 눈에 국소적으로 투여된다. 75 마이크로리터를 초과하는 부피의 siRNA의 눈 국소 점적주입은 결과적으로 흘림과 유출을 통해 눈으로부터 siRNA의 소실을 야기시킬 수 있음이 이해된다. 따라서, 가능한 적은 부피로 고농도의 siRNA(예를 들어, 100-1000 nM)를 투여하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0115] 특히 바람직한 비경구 투여 경로는 안구내(intraocular) 투여이다. 본 발명의 siRNA의 안구내 투여는, 당해 투여 경로가 siRNA를 눈으로 들어가도록 하는 한, 눈에 대한 주사 또는 직접(예를 들어, 국소) 투여에 의해 이루어질 수 있다. 상기한 눈으로의 국소 투여 경로 이외에, 적합한 안구내 투여 경로는 망막내, 망막하, 태눈낭하(subtenon), 안구주위(periorbital) 및 안구후방(retro-orbital), 각막통과(transcorneal) 및 공막통과(transscleral) 투여를 포함한다. 이러한 안구내 투여 경로는 당업계의 기술상식에 속한다; 예를 들어, 전체 개시내용이 참조를 위해 본원에 통합되는, 하기 문헌을 참조바람: Acheampong AA et al, 2002 (전제서); 및 Bennett et al. (1996), *Hum. Gene Ther.* 7: 1763-1769 및 Ambati J et al., 2002, *Progress in Retinal and Eye Res.* 21: 145-151. 또 다른 바람직한 구체예에서, siRNA는 유리체내(intravitreal) 주사에 의해 투여된다.
- [0116] siRNA는 1회 용량 또는 수회 용량으로 투여될 수 있다. siRNA의 투여가 주입에 의해 이루어지는 경우, 주입은

1회 자연 용량일 수있거나 수회 주입에 의해 전달될 수 있다. 조직으로 제제의 직접 주사는 바람직한 신혈관형성 부위 또는 이 부위 근처에 이루어진다. 신혈관형성 부위 또는 이 부위 근처에 존재하는 조직으로의 제제의 수회 주입이 특히 바람직하다.

[0117] 또한 당업계의 통상의 기술자는 해당 피험자에게 siRNA를 투여하기 위한 적합한 투여량 섭생(regimen)을 용이하게 결정할 수 있다. 예를 들어, siRNA는 피험자에게 한번, 예컨대, 신혈관형성 부위 또는 이 부위 근처에 1회 주사 또는 침착에 의해, 투여될 수 있다. 달리, siRNA는 피험자에게 1일 또는 1주 단위로 수회 투여될 수 있다. 예를 들어, siRNA는 약 3주 내지 약 28주의 기간 동안, 달리 약 7주 내지 약 10주 동안 1주 단위로 1번 피험자에게 투여될 수 있다. 특정 투여량 섭생에서, siRNA는 7주 동안 1주에 한번 신혈관형성 부위 또는 이 부위 근처에 (예를 들어, 유리체강내로) 주사된다. 만성적인 신혈관형성 질환, 예컨대, 삼출성 ARMD 또는 당뇨병 망막병증을 앓고 있는 피험자의 경우 기한을 정하지 않은 시간 동안 siRNAs의 주기적 투여가 요구될 수 있음이 이해된다.

[0118] 투여량 섭생이 수회 투여를 포함하는 경우, 피험자에게 투여된 유효량의 siRNA는 전체 투여량 섭생에 걸쳐 투여되는 siRNA의 총량을 포함할 수 있는 것으로 이해된다.

[0119] siRNA는 바람직하게는, 당업계에 공지된 기술에 따라, 피험자에게 투여하기 전에 약학 조성물로 제형화된다. 본 발명의 약학 조성물은 적어도 멸균되고 피로젠이 없는 것을 특징으로 한다. 본원에 사용된, "약제 제형"은 인간용 및 수의용 제형을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물을 제조하기 위한 방법은, 예를 들어, 전체 개시내용이 참조를 위해 본원에 통합되는 문헌[Remington's Pharmaceutical Science, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985)]에 소개된 바와 같이, 당업계의 기술 상식에 속한다.

[0120] 일 구체예에서, 약제 제형은 생리학적으로 허용되는 담체 매질과 혼합된, siRNA(예를 들어, 중량 기준 0.1 내지 90%), 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염을 포함한다. 바람직한 생리학적으로 허용되는 담체 매질은 물, 완충수, 염류 용액(예를 들어, 정상 염류 용액 또는 평형 염류 용액, 예컨대, 행크(Hank) 또는 얼(Earle) 평형 염 용액), 0.4% 염분, 0.3% 글리신, 히알루론산 등이다.

[0121] 약학 조성물은 또한 약제학적 부형제 및/또는 첨가제를 포함할 수 있다. 적합한 약제학적 부형제는 안정화제, 항산화제, 삼투압 조절제, 완충제, 및 pH 조절제를 포함한다. 적합한 첨가제는 생리학적 생체적합성 완충제(예를 들어, 트로메타민 히드로클로라이드), 킬레이트제(chelants)(예를 들어, DTPA 또는 DTPA-비스아미드) 또는 칼슘 킬레이트 복합체(예를 들어, 칼슘 DTPA, CaNaDTPA-비스아미드로서)의 첨가, 또는, 임의로, 칼슘 또는 나트륨 염(예를 들어, 칼슘 클로라이드, 칼슘 아스코베이트, 칼슘 글루코네이트 또는 칼슘 락테이트)의 첨가를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 액체 형태로의 사용을 위해 패키징될 수 있거나, 동결건조될 수 있다.

[0122] 눈에 대한 국소 투여의 경우, 관용적인 안구내 전달물질이 사용될 수 있다. 예를 들어, 국소 안구내 전달을 위한 본 발명의 약학 조성물은 상기한 것과 같은 염류 용액, 각막 투과 향상제, 불용성 입자, 석유 또는 기타 겔-기반 연고, 점안시 점도 증가를 겪는 중합체, 또는 점막점착성(mucoadhesive) 중합체를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 안구내 전달물질은 각막 투과를 증가시키거나, 점성 효과를 통해 또는 각막 상피를 덮고 있는 뮤신층과의 물리화학적 상호작용을 구축함으로써 siRNA의 전안부(preocular) 체류를 연장시킨다.

[0123] 국소 안구내 전달을 위한 적합한 불용성 입자는, 전체 개시 내용이 참조를 위해 본원에 통합되는, 벨(Bell) 등의 미국 특허 제6,355,271호에 소개된 칼슘 포스페이트 입자를 포함한다. 눈 안으로 점적주입시 점도 증가를 겪는 적합한 중합체는 폴리에틸렌폴리옥시프로필렌 블록 공중합체, 예컨대, 폴록사머(poloxamer) 407(예를 들어, 25%의 농도에서), 셀룰로오스 아세토프탈레이트(예를 들어, 30%의 농도에서), 또는 저-아세틸 겔란 검, 예컨대, Gelrite®

(델라웨어, 윌밍턴 소재, CP Kelco로부터 구입가능함)를 포함한다. 적합한 점막점착성 중합체는 다수의 친수성 작용기, 예컨대, 카르복실, 히드록실, 아미드 및/또는 설페이트 기를 지니는 하이드로콜로이드(hydrocolloids); 예를 들어, 히드록시프로필셀룰로오스, 폴리아크릴산, 고분자량 폴리에틸렌 글리콜(예를 들어, >200,000 수평균 분자량), 텍스트란, 히알루론산, 폴리갈락투론산, 및 자일로칸(xylocan)을 포함한다. 적합한 각막 투과 향상제는 사이클로텍스트린, 벤잘코니움 클로라이드, 폴리옥시에틸렌 글리콜 라우릴 에테르(예를 들어, Brij®

35), 폴리옥시에틸렌 글리콜 스테아릴 에테르(예를 들어, Brij®

78), 폴리옥시에틸렌 글리콜 올레일 에테르(예를 들어, Brij®

98), 에틸렌 디아민 테트라아세트산(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), 디지토닌, 나트륨 타우로콜레이트, 사포닌 및 폴리옥시에틸화된 피마자유, 예컨대, Cremaphor EL을 포함한다.

[0124] 고체 조성물의 경우, 관용적인 무독성 고체 담체가 사용될 수 있고; 일례로, 약제학적 등급의 만니톨, 락토오스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 탈컴(talcum), 셀룰로오스, 글루코오스, 수크로오스, 마그네슘 카보네이트 등이 있다.

[0125] 예를 들어, 구강 투여용 고체 약학 조성물은 위에 나열된 담체 및 부형제들 중 임의의 것을 하나 이상의 siRNA의 10- 95%, 바람직하게는 25%-75%로 포함할 수 있다. 에어로졸 (흡입) 투여용 약학 조성물은 상기한 리포솜내에 캡슐화된 하나 이상의 siRNA의 0.01-20 중량%, 바람직하게는 1-10 중량%, 및 추진제를 포함할 수 있다. 또한 담체는 필요에 따라 포함될 수 있고; 예를 들어, 비강내 전달을 위해 레시틴이 포함될 수 있다.

[0126] 본 발명은 지금부터 하기한 비제한적 실시예들로 예시될 것이다.

[0127] 실시예 1 - siRNA 형질감염 및 시험관내 저산소 유도

[0128] siRNA 설계 - 인간 VEGF mRNA의 5' 말단으로부터 329번째 뉴클레오티드(nt)에 위치한 19개 뉴클레오티드(nt) 서열을 표적 서열로 선택하였다: AAACCTCACCAGGCCAGCAC(서열목록번호: 51). 임의의 다른 유전자로부터의 mRNA 내에 비함유되어 있음을 명확하게 하기 위해, 이 표적 서열을 NCBI에서 제공하는 BLAST 검색 엔진에 적용해 보았다. BLAST 알고리즘의 용도는, 전체 개시 내용이 참조를 위해 본원에 통합되는 하기 문헌들에 소개되어 있다: Altschul et al. (1990), *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 및 Altschul et al. (1997), *Nucleic acids Res.* 25: 3389-3402. 상기 표적 서열을 함유한 다른 mRNA는 발견되지 않았으며, 상기 서열(Dharmacon Research, Inc., Lafayette, CO)을 표적으로 삼도록 siRNA 이중 나선을 합성하였다.

[0129] siRNA 이중나선은 아래의 센스 및 안티센스 가닥을 지녔다.

[0130] 센스:

[0131] 5'-accucaccaaggccagcacTT-3' (서열목록번호: 77).

[0132] 안티센스:

[0133] 5'-gugcuggccuuggugagguTT-3' (서열목록번호: 78).

[0134] 함께, siRNA 센스와 안티센스 가닥은 각각의 가닥 상에 TT 3' 돌출부(진한 글씨체로 표기됨)를 지니는 19개 뉴클레오티드(nt) 이중-가닥 siRNA를 형성하였다. 이 siRNA를 "후보체(Candidate) 5" 또는 "Cand5"로 명명하였다. 인간 VEGF mRNA를 표적으로 삼는 다른 siRNA를 설계하고 Cand5 (베바시라닙)에 대하여 기술한 것과 같이 시험하였다.

[0135] 녹색 형광 단백질(GFP) mRNA 중의 하기 서열을 표적으로 삼는 siRNA를 비특이적 대조군으로 사용하였다: GGCTACGTCCAGCGCACC(서열목록번호: 79). 상기 siRNA를 Dharmacon (Lafayette, CO) 사로부터 구입하였다.

[0136] siRNA 형질감염 및 시험관내 저산소 유도 - 인간 세포주(293; HeLa 및 ARPE19)를 형질감염 1일 전에 250 마이크로리터의 완전 DMEM 배지 중의 24-웰 플레이트에 개별적으로 파종하여, 상기 세포는 형질감염 시점에 ~50% 혼합하였다. 세포를 2.5 nM Cand5 siRNA로 형질감염시켰고, 대조군으로써 siRNA로 형질감염시키지 않거나 2.5 nM 비특이적 siRNA(GFP를 표적으로 삼음)로 형질감염시켰다. 제조업자(Mirus)가 권고한 대로, "Transit TKO 형질감염" 시약을 사용하여 모든 세포주에서 형질감염을 실행하였다.

[0137] 형질감염 24시간 경과후, 각 웰에서 130 마이크로몰의 최종 농도로 데페록사민 메실레이트(deferoxamine mesylate)를 첨가하여 세포에서 저산소상태를 유도하였다. 형질감염 후 24시간 경과시, 세포 배양 배지를 모든 웰에서 제거하고, 전체 개시 내용이 참조를 위해 본원에 통합되는, 제조업자로부터 입수가 가능한 Quantikine 인간 VEGF ELISA 프로토콜에 기재된 바와 같이, 배양 배지에서 인간 VEGF ELISA(R&D systems, Minneapolis, MN)를 실행하였다.

[0138] 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, Cand5 siRNA에 의해 유도된 RNAi 분해는 저산소상태의 293 및 HeLa 세포에 의해 생산된 VEGF의 농도를 유의하게 감소시킨다. siRNA를 처리하지 않았거나 비특이적 siRNA 대조군으로 처리한 저산소상태 세포에 의해 생산된 VEGF의 양은 본질적으로 차이가 없었다. 또한 유사한 결과가 동일한 조건에서 처리한 인간 ARPE19 세포에서도 관찰되었다. 따라서, VEGF를 표적으로 삼는 siRNA로의 RNA 간섭은 시험관내에서 배양된 인간 세포에서 VEGF의 병원성 상향-조절을 붕괴시킨다.

- [0139] 위에 개관된 실험을 마우스-특이적 VEGF siRNA(하기 실시예 6 참조)를 사용하여 마우스 NIH 3T3 세포에서 반복하였고, 전체 개시 내용이 참조를 위해 본원에 통합되는, 제조업자로부터 입수가 가능한 Quantikine 마우스 VEGF ELISA 프로토콜에 기재된 것과 같은 마우스 VEGF ELISA(R&D systems, Minneapolis, MN)로 VEGF 생성을 정량하였다. 인간 세포주에 대하여 도 1에 보고된 것과 유사한 결과를 얻었다.
- [0140] **실시예 2 - 배양된 인간 세포에서 VEGF 생성에 대한 siRNA 농도 증가에 따른 영향**
- [0141] 실시예 1에 개관된 실험을 10 nM 내지 50 nM 농도 범위의 siRNA를 사용하여 인간 293, HeLa 및 ARPE19 세포에 대해 반복하였다. VEGF 생성을 하향-조절시키는 Cand5 siRNA의 활성은 대략 최대 13 nM siRNA까지 완만하게 증가하였으나, 고원 효과(plateau effect)가 상기 농도를 초과하여 관찰되었다. 이러한 결과는 mRNA의 siRNA-매개 RNAi 분해의 촉매적 특성을 부각시키는데, 상기 고원 효과는 siRNA를 형질감염시키지 않은 몇몇 세포로부터의 VEGF 생성을 반영하는 것으로 보이기 때문이다. siRNA를 형질감염시킨 대부분의 세포의 경우, 약 13 nM를 초과하는 siRNA 농도에서 표적 mRNA의 siRNA-유도 분해는 상기 저산소상태에 의해 유도된 VEGF mRNA의 증가된 생성을 능가한다.
- [0142] **실시예 3 - siRNA 표적화의 특이성**
- [0143] NIH 3T3 마우스 섬유아세포를 표준 조건하에서 24-웰 플레이트에서 성장시켜, 상기 세포가 형질감염 1일 전에 ~50% 혼잡하게 만들었다. 인간 VEGF siRNA Cand5를 실시예 1에서와 같이 NIH 3T3 마우스 섬유아세포에 형질감염시켰다. 이후 저산소상태를 상기 형질감염된 세포에서 유도시키고, 무린 VEGF 농도를 실시예 1에서와 같이 ELISA로 측정하였다.
- [0144] 인간 VEGF siRNA Cand5에 의해 표적화되는 서열은 무린 VEGF mRNA와 1개 뉴클레오티드 기준으로 다르다. 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 인간 VEGF siRNA는 저산소상태후 마우스 VEGF를 상향-조절시키는 마우스 세포의 능력에 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 siRNA 유도 RNAi 분해가 1개 이내의 뉴클레오티드 분별로 서열-특이적임을 제시한다.
- [0145] **실시예 4 - 무린 망막 색소 내피 세포로의 siRNA의 생체내 전달**
- [0146] VEGF 연령관련황반변성(ARMD)을 지니는 인간 피험자의 망막 색소 상피(retinal pigment epithelial, RPE) 세포에서 상향조절된다. 기능성 siRNA가 생체내에서 RPE 세포로 전달될 수 있는지를 밝혀내기 위해, GFP를 재조합 아데노바이러스로 마우스 망막에서 발현시키고, GFP 발현을 siRNA로 침묵시켰다. 본 실험을 다음과 같이 수행하였다.
- [0147] 5마리의 성체 C57/Black6 마우스(Jackson Labs, Bar Harbor, ME) 각각의 한쪽 눈에 베네트 등의 문헌[Bennett et al. (1996), 전계서]에 기재된 대로 CMV 프로모터에 의해 유도되는 eGFP를 함유하는 $\sim 1 \times 10^8$ 개의 아데노바이러스 입자 및 Transit TKO 시약(Mirus)과 접합된 eGFP를 표적으로 삼는 20 피코몰의 siRNA를 함유하는 혼합물을 망막하로 주사하였다.
- [0148] 양성 대조군으로써, 반대쪽(contralateral) 눈에 CMV 프로모터에 의해 유도되는 eGFP를 함유하는 $\sim 1 \times 10^8$ 개의 아데노바이러스 입자 및 Transit TKO 시약(Mirus)과 접합된 인간 VEGF를 표적으로 삼는 20 피코몰의 siRNA를 함유하는 혼합물을 주사하였다. GFP의 발현을 주사후 48시간 및 60 시간 경과시, 안저 검안경검사(fundus ophthalmoscopy)로 검출하였다. 동물을 주사후 48시간 또는 60시간 경과시 절명시켰다. 눈을 적출하고 4% 파라포름알데히드에서 고정시키고, 플랫 마운트(flat mounts)로 제조하거나 형광 현미경용 10마이크론의 동결절편(cryosections)으로 가공하였다.
- [0149] 5마리 마우스 중 4마리에서 GFP mRNA를 표적으로 삼는 siRNA를 투여한 눈에서 검안경검사로 GFP 형광을 검출할 수 없었으며, 반면 비특이적 대조 siRNA를 투여한 반대쪽 눈에서 GFP 형광이 검출가능하였다. 형광 현미경으로 분석한 대표적인 플랫 마운트는, 비특이적 대조 siRNA를 투여한 눈과 비교할 때, GFP siRNA를 투여한 눈에서 GFP 형광의 결여를 나타내었다. 또 다른 망막의 동결절편은 재조합 아데노바이러스가 RPE 세포를 효율적으로 표적으로 삼고, 상기 아데노바이러스가 GFP mRNA를 표적으로 삼는 siRNA를 동반하는 경우, GFP 도입유전자(transgene)의 발현이 중단됨을 보여주었다.
- [0150] GFP mRNA를 표적으로 삼는 siRNA를 투여한 눈에는 형광 현미경에 의해 검출가능한 일부 GFP 형광이 존재한 반면, 비특이적 siRNA를 투여한 대조군과 비교하여 형광은 현저하게 억제된다. 이러한 데이터는 기능적 siRNA가 생체내에서 RPE 세포로 전달될 수 있다는 것을 입증한다.

[0151] **실시예 5 - 무린 망막에서 인간 VEGF의 생체내 발현 및 siRNA-유도 RNAi 분해**

[0152] VEGF를 표적으로 삼는 siRNA가 생체내에서 기능을 발휘한다는 것을 입증하기 위해, 외생성(exogenous) 인간 VEGF 발현 카세트, 실시예 4에서와 같이, 망막하 주사에 의해 아데노바이러스를 통해 마우스 RPE 세포로 전달하였다. 한쪽 눈에 Cand5 siRNA를 투여하고, 반대쪽 눈에 GFP mRNA를 표적으로 삼는 siRNA를 투여하였다. 동물을 주사 후 60시간 경과시 절명시키고, 투여한 눈을 적출하고, 적출후 액체 N₂ 에서 즉시 동결시켰다. 이후 눈을 용해 완충액에서 균질화시키고, 총 단백질을 표준Bradford 단백질 검정(Roche, Germany)을 사용하여 측정하였다. 샘플을 실시예 1에 기재한 것과 같이 ELISA로 인간 VEGF에 대해 검정하기 전에 총 단백질에 대해 평균화하였다.

[0153] VEGF의 발현은 동물 마다 다소 차이가 있을 수 있다. VEGF 수준의 변동성은 실시예 4의 GFP 실험에서 관찰된 변동성과 밀접한 관련이 있고, 이 변동성은 주사와 주사간의 약간의 오차, 및 각 동물에서 표적 유전자를 전달시키는 아데노바이러스의 차별화된 활성에서 기인할 수 있다. 그러나, 비특이적 대조 siRNA를 투여한 눈과 비교할 때, VEGF siRNA를 투여한 각각의 눈에서 VEGF 발현의 유의한 약화가 존재하였다(도 4). 이러한 데이터는 Cand5 siRNA가 생체내 무린 RPE 세포에서 인간 VEGF의 발현을 침묵시키는데 강력하고 효과적이었음을 제시한다.

[0154] **실시예 6 - 마우스 CNV 모델에서 맥락막의 신혈관형성의 억제**

[0155] ARMD에서 맥락막의 신혈관형성은 RPE 세포에서 VEGF의 상향조절에 기인한 것이라는 증거가 있다. 이러한 인간의 병적 상태는 망막 상의 한 지점에 화상을 입히는 레이저 ("레이저 광-응고(laser photo-coagulation)" 또는 "레이저 유도(laser induction)")를 사용함으로써 마우스에서 모델화될 수 있다. 치유 과정이 진행되는 동안, VEGF는 화상입은 영역의 RPE 세포에서 상향조절되며, 이는 맥락막의 재혈관형성(re-vascularization)을 야기시키는 것으로 믿어진다. 이 모델은 마우스 맥락막 신혈관형성("CNV") 모델로 불리운다.

[0156] 마우스 CNV 모델의 구조를 위해, 실시예 1로부터의 인간 "Cand5" siRNA에서 한 개의 뉴클레오티드 변형을 포함하는 마우스 siRNA를 설계하였다. 마우스 siRNA는 서열 AAACCUCACCAAAGCCAGCAC(서열목록번호: 80)에서 마우스 VEGF mRNA를 특이적으로 표적으로 삼았다. 마우스 VEGF를 표적으로 삼는 다른 siRNA를 또한 설계하고 시험하였다. 또한 실시예 1에서 비특이적 대조군으로써 사용한 GFP siRNA를 여기서 비특이적 대조군으로써 사용하였다.

[0157] 레이저 유도 후 24시간 경과시, 11마리의 성체 C57/Black6 마우스(Jackson Labs, Bar Harbor, ME) 각각의 한쪽 눈에, 실시예 4에서와 같이, CMV 프로모터에 의해 유도되는 LacZ를 포함하는 ~1x10⁸개의 아데노바이러스 입자 및 Transit TKO 시약(Mirus)과 접합된 마우스 VEGF를 표적으로 삼는 20 피코몰의 siRNA를 포함하는 혼합물을 망막하로 주사하였다. 대조군으로써, 반대쪽 눈에 CMV 프로모터에 의해 유도되는 LacZ를 포함하는 ~1x10⁸개의 아데노바이러스 입자 및 Transit TKO 시약(Mirus)과 접합된 GFP를 표적으로 삼는 20 피코몰의 siRNA를 포함하는 혼합물을 투여하였다.

[0158] 레이저 처치 후 14일 경과시, 마우스에 플루오레세인을 관류시키고, 화상 지점 주위에서 신혈관형성 영역을 측정하였다. 반대쪽 눈에서 화상 지점의 영역을 대조군으로써 사용하였다. 마우스 VEGF를 표적으로 삼는 siRNA를 투여한 동물에서 화상 지점 주위의 신혈관형성 부위는, 평균적으로, 대조군 영역의 1/4이었다. 이러한 데이터는 ARMD의 치료를 위한 VEGF-지향(directed) siRNA("항-VEGF siRNA"로도 불리움)의 용도를 지지한다.

[0159] **실시예 7 - siRNA의 발현을 위한 아데노-부속 바이러스 벡터의 제조**

[0160] siRNA를 전달하기 위한 제조합 AAV 벡터를 제조하기 위한 "시스-작용(cis-acting)" 플라스미드를, 본질적으로 사물스키 등의 문헌[Samulski R et al. (1987), 전제서]에 기재된 것과 같이, PCR 기반 서브클로닝에 의해 제조하였다. 시스-작용 플라스미드를 "pAAVsiRNA"로 명명하였다.

[0161] psub201의 rep 및 cap 유전자를 이 순서로 다음 서열로 대체하였다: 인간 U6 RNA 프로모터의 조절하의 폴리 T 종결 서열과 작동가능하게 연결된 19개 뉴클레오티드(nt)의 센스 RNA 가닥 코딩 서열, 및 인간 U6 RNA 프로모터의 조절하의 폴리 T 종결 서열과 작동가능하게 연결된 19개 뉴클레오티드(nt)의 안티센스 RNA 가닥 코딩 서열. pAAVsiRNA의 개략도는 도 5에 제시되어 있다.

[0162] 제조합 AAV siRNA 벡터를, 피셔 등의 문헌[Fisher KJ et al. (1996), 전제서]에 기재된 바와 같이, E1-결실 아데노바이러스를 미리 감염시킨 인간 293 세포내로 pAAVsiRNA를 형질감염시킴으로써 획득하였다. AAV rep 및 cap 기능을 사물스키 등의 문헌[Samulski R et al. (1989), 전제서]에 기재된 바와 같이 트랜스-작용(trans-

acting) 플라스미드 pAAV/Ad를 통해 제공하였다. 재조합 AAV siRNA 벡터의 생산 로트의 역가를, 피셔 등의 문헌 [Fisher KJ et al. (1996), 전제서]에 기재된 바와 같이, ml 당 계놈 복제물의 수로 측정하였다.

[0163] **실시예 8 - VEGF-지향 siRNA는 실험 맥락막의 신혈관형성을 억제한다**

[0164] 마우스에서 실험 레이저 유발된 맥락막의 신혈관형성(CNV)을 억제하는 무린 VEGF-지향 siRNA 의 활성을 아래와 같이 시험하였다.

[0165] 성체 암컷 C57BL/6 마우스의 망막을 810 nm 다이오드 레이저(75 um, 140 mw, 0.10 초) (OcuLight Six; IRIS Medical, Mountain View, CA)를 사용하여 레이저 광응결시켰다. 3개의 레이저 스폿을 각각의 마우스의 양쪽 눈에 적용하였다. 레이저 광응결 후 36시간 경과시, 마우스 VEGF를 표적으로 삼는 siRNA ("mVEGF1.siRNA")를 각각의 마우스의 한쪽 눈에 망막하로 또는 유리체강내로 전달하였다. 망막하 주사의 경우, siRNA를 Transit TKO 형질감염 시약(Mirus)과 접합시키고, 재조합 아데노바이러스(rAdenovirus)와 혼합하였다. 유리체강내 주사의 경우, siRNA를 형질감염 시약 및 재조합 아데노바이러스의 부재하에 전달하였다. 대조군으로써, 각각의 마우스의 반대쪽 눈에, 마우스 VEGF와 상동성이 없는, GFP를 표적으로 삼는 siRNA("GFP1.siRNA")를 지니는 동일한 제형을 망막하 주입 또는 유리체강내 주입으로 투여하였다.

[0166] 레이저 처리 후 14일 경과시, 모든 동물에 고분자량 FITC-텍스트란을 관류시키고, 맥락막 플랫 마운트를 상기한 바와 같이 제조하고, 상기 플랫 마운트를 사진촬영하고, 마스크를 착용한 상태에서 현미경으로 분석하였다. 각각의 플랫 마운트 내의 CNV 영역을 Openlab 소프트웨어(Improvision, Boston, MA)로 측정하였다. mVEGF1.siRNA를 처리한 눈에서 평균적 CNV 영역은 망막하(도 6A; $P < 0.003$) 및 유리체강내(도 6B; $P < 0.04$) 전달 둘 모두에 대하여 GFP1.siRNA-처리 눈으로부터의 평균적 CNV 영역보다 유의하게 더 적었다.

[0167] 제 2 실험에서, 성체 암컷 C57BL/6 마우스의 망막을 상기한 것과 같이 레이저 광응결시키고, 동물을 대조군과 시험군으로 나누었다. 레이저 광응결 후 1일 경과시, 인산염 완충 염수를 대조군 동물들의 유리체강내로 전달하고, 이 동물들에 레이저 처리 후 14일 경과시 텍스트란-플루오레세인을 관류시켰다. 이후 맥락막 플랫 마운트를 제조하고, 각각의 플랫 마운트에서 CNV 영역을 상기한 것과 같이 측정하였다.

[0168] 레이저 광응결 후 14일 경과시, mVEGF1.siRNA를 시험군의 각각의 마우스의 한쪽 눈에 유리체강내 주사를 통해 전달하였다. 반대쪽 눈에 대조군으로써 GFP1.siRNA를 주사하였다. 레이저 처리 후 21일 경과시, 고분자량 텍스트란-플루오레세인을 시험군 동물에 관류시켰다. 이후 맥락막 플랫 마운트를 제조하고, 각각의 플랫 마운트에서 CNV 영역을 상기한 것과 같이 측정하였다.

[0169] 이러한 후자의 실험에서, 항-VEGF siRNA를, CNV 성장전 투여와 반대로, CNV 성장 진행중에 투여하였고, 그에 따라 이 실험은 습성 AMD를 나타내는 인간 피험자의 상태를 더 대변한다. 도 6으로부터 알 수 있는 바와 같이, mVEGF1.siRNA-처리 눈에서 평균 CNV 영역은 GFP1.siRNA-처리 눈에서 측정된 평균 CNV 영역 보다 유의하게 더 적었다(도 6C; $P < 0.05$). 21일째 mVEGF1.siRNA-처리 눈 및 14일째 대조군("PBS") 눈의 평균 CNV 영역은 유의한 차이가 없었다(도 6C; $P = 0.469$).

[0170] 이러한 실험의 결과는 연령관련황반변성이 항-VEGF siRNA로 치료될 수 있음을 제시한다.

[0171] **실시예 9 - 무린 RPE 세포에서 항-VEGF siRNA로 유도된 인간 VEGF의 생체내 RNA 간섭**

[0172] 시간에 따른 생체내 VEGF의 RNAi를 유도시키는 Cand5 siRNA의 활성을 아래와 같이 평가하였다.

[0173] 아데노-부속 바이러스 벡터로부터 인간 VEGF를 발현시키는, AAV.CMV.VEGF를 A. 아우리치오 박사(A. Auricchio)가 아낌없이 제공해주었다. AAV.CMV.VEGF를 5마리 C57BL/6 마우스의 눈에 망막하 및 양쪽으로 주사하였다. AAV.CMV.VEGF의 주사 후 28일 경과시, Cand5 siRNA를 유리체강내 주사를 통해 한쪽 눈에 전달하고 대조군 GFP1.siRNA를 유리체강내 주사를 통해 각 동물의 반대쪽 눈에 전달하였다.

[0174] 0일(siRNA 주사 전), 및 siRNA 주사 후 6일, 10일 및 14일 경과시, 마우스를 절명시키고, 눈을 적출후 액체 질소에 즉시 동결시켰다. 이후 눈을 용해 완충액(Roche, Basel, 스위스)에서 균질화시키고, 총 단백질을 상기 실시예 5에서와 같이, 브래드포드 검정을 이용하여 측정하였다. 마우스 2마리를 시점 0일에 사용하였고($n=2$), 마우스 3마리를 각각 시점 6일, 10일 및 14일에 사용하였다($n=3$). 샘플을 총 단백질에 대해 정량화시키고 난 다음 제조업자의 권장사항(R&D systems, Minneapolis, Minnesota)에 따라, ELISA로 인간 VEGF에 관해 분석하였다. 각각의 마우스의 VEGF 비율(%VEGF)을 Cand5를 주사한 눈에서의 VEGF 농도("[VEGF]")를 GFP1.siRNA를 주사한 눈에서의 [VEGF]로 나누고, 100을 곱함으로써 계산하였다.

[0175] 도 7로부터 알 수 있는 바와 같이, Cand5의 1회 주사는, 주사 후 적어도 14일 내내 지속되는 대략 35%의 VEGF 생성의 감소와 더불어, siRNA 주사 후 6일까지 대략 70%의 VEGF 수준의 RNAi-매개 감소를 유도하였다. 이러한 결과는 인간 VEGF에 대해 유도된 siRNA 가 연장된 시간 동안 생체내에서 인간 VEGF 의 RNAi를 유도할 수 있다는 것을 제시한다.

[0176] **실시예 10 - 항-VEGF siRNA로의 원숭이에서 VEGF의 생체내 RNA 간섭**

[0177] 본 연구의 목적은 CNV의 유도 후 수컷 사이노몰거스 원숭이에게 1회 유리체강내 주사로 투여한 경우 Cand5의 안정성과 효능을 결정하는 것이다. Cand5를 하기 용량 수준으로 무경험 수컷 사이노몰거스 원숭이에게 부형제 대조물로 투여하였다: 0 mg/눈(대조군), 0.07 mg/눈, 0.18 mg/ 눈, 0.35 mg/ 눈 및 0.70 mg/ 눈.

[0178] CNV를 각 동물의 양쪽 눈의 황반(maculae)에 레이저 치료로 유도하였고, Cand5의 용량을 레이저 치료 후 단시간에 주입하였다. 동물을 임상 징후, 체중 및 안구 상태에서의 변화에 관해 평가하였다(광범위 안과 검사, 망막 전도검사, 및 안압측정법). 플루오레세인 혈관조영검사를 실시하고, 혈액 샘플을 모았다. 연구 종료시(44일), 모든 동물을 안락사시키고, 전신 부검(complete gross necropsy)을 실행하였다. 선별된 조직을 모으고 조직병리학 평가를 위해 보존시켰다.

[0179] 황반을 레이저로 손상시킨 후 및 CNV의 연이은 발달 진행 중 원숭이의 양쪽 눈에 최대 0.70 mg/눈의 용량을 1회 유리체강내 주사로 투여하였을 때, Cand5의 전신적 또는 국소적 부작용은 검출되지 않았다.

[0180] **실시예 11 - 인간 배아 신장 293 세포에서 항-VEGF siRNA로의 VEGF의 시험관내 RNA 간섭**

[0181] 인간 배아 신장 293 세포(ATCC(Manassas, VA)에서 획득함)를 10% 우태아 혈청(FBS; JRH Biosciences(Lenexa, KS)로부터 입수함) 및, 세포 배양물 성장 오염체의 예방을 위해 사용되는, 항생제-항진균제(antibiotic-antimycotic reagent)(Gibco(Carlsbad, CA)로부터 입수함)와 함께 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Cellgro(Herndon, VA)로부터 입수함)에서 배양하였다.

[0182] siRNAs를 통합 DNA 기술(Coralville, IA)을 통해 합성하였다. siRNA 표적 서열은 하기 표 2에 제시되어 있다. 음성 대조군으로써 향상된 녹색 형광 단백질 (EGFP) 의 유전자를 표적으로 삼는 또 다른 siRNA를 본 연구에 사용하였다.

[0183] [표 2]

| 명칭 | GC 함량 | 뉴클레오티드 개시 부위 | 표적 서열 5'-3' |
|----------|-------|-----------------|------------------------------------|
| hVEGF#1 | 58% | 92 | aaggaggaggcagaatc (서열목록번호: 81) |
| hVEGF#2 | 42% | 124 | aagttcatggtgtctatcag (서열목록번호: 47) |
| hVEGF#3 | 58% | 162 | aatcgagaccctgttgacat (서열목록번호: 48) |
| hVEGF#4 | 42% | 301 | aacatcacatgcagattatg (서열목록번호: 50) |
| hVEGF#5 | 58% | 338 | aaggccagcacataggagaga (서열목록번호: 52) |
| hVEGF#6 | 42% | 380 | aatgtgaatgcagaccaaga (서열목록번호: 82) |
| hVEGF#7 | 37% | 396 | aaagaaagatagagcaagaca (서열목록번호: 56) |
| hVEGF#8 | 32% | 450 | aaagcattgtttgtacaaga (서열목록번호: 83) |
| hVEGF#9 | 42% | 467 | aagatccgcagacgtgtaaat (서열목록번호: 84) |
| hVEGF#10 | 53% | 498 | aaacacacactcgcgttgcaa (서열목록번호: 85) |
| Cand5 | 63% | 328 | aaacctaccaaggccagcac (서열목록번호: 51) |

[0184]

[0185] **시험관내 siRNA 형질감염 및 저산소상태 유도.** 인간 293 세포를 24웰 플레이트에 담아 37°C, 5% CO₂에서 밤새 배양하였다. 다음 날, 세포가 약 50%-70% 혼잡하게 되었을 때, 형질감염을 실행하였다. 세포를 인간 VEGF에 대해 유도되는 siRNAs로 형질감염시켰다. siRNAs를 CaPi 시약과 혼합하고 20 μ L의 250 mM CaCl₂ 용액에 첨가하였다. siRNA/CaCl₂ 혼합물을 볼텍싱으로 혼합하면서 20 μ L의 2X 헝크 평형 염 용액(Hanks Balanced Salt Solution, HBS)에 적가하였다. siRNA/CaCl₂/HBS 복합체를 각 웰 중의 배지에 직접 첨가하였다(300 μ L/웰). 37°C에서 4시간 인큐베이션한 후, 배지를 옮기고, 세포를 10% DMSO-함유 무혈청 배지(300 μ L/웰, 실온에서 1-2

분)와 함께 추가로 인큐베이션하였다. 이후 이 배지를 옮기고, 세포에 다시 성장 배지(500 μ L/웰)를 공급하였다. 음성 대조군에 siRNA가 결합된 형질감염 시약과 비특이적 siRNA(EGFP1 siRNA)를 포함하였다. 스크리닝 실험의 경우, siRNAs를 25nM의 농도로 사용하였다. 용량 반응 실험의 경우, siRNAs를 1 nM, 5nM 및 25nM의 농도로 사용하였다. 저산소상태를 형질감염을 실행한 후 4시간 경과시 데스페리옥사민(desferrioxamin)을 130 μ M의 최종 농도에서 유도하였다. 데스페리옥사민은 저산소 상태를 모방하는데, 그 이유는 헴-Fe²⁺ 상호작용을 억제함으로써 포유동물 세포에서 정상적인 산소-감지 경로를 붕괴시키는 것으로 제안되기 때문이다.

[0186] **VEGF 단백질 정량.** 형질감염 후 대략 48시간 경과시, 상청액을 모든 웰에서 따라 내고, Quantikine 인간 VEGF ELISA 프로토콜에 기재된 대로 인간 VEGF ELISA(R & D systems, Minneapolis, MN)를 293 세포에 대해 실시하였다. VEGF-특이적 항체를 각 웰에 첨가하였고, 이것은 플레이트에 결합된 VEGF의 양에 비례하여 색 발달을 초래하였다. ELISA 결과를 450 nm에서 AD340 플레이트 판독기(Beckman Coulter) 상에서 판독하였다.

[0187] **결과.** 인간 VEGF siRNAs는 293 세포에서 인간 VEGF 단백질의 저산소상태-유도된 상황-조절을 억제시킨다. 인간 VEGF는 저산소상태의 데스페리옥사민-매개 유도에 의해 상향조절되었다. OD 450nm의 판독치는 세포 샘플 내의 인간 VEGF 단백질 수준을 반영하였다. hVEGF 단백질 수준의 저산소상태-유도된 수준은 모든 인간 VEGF siRNAs로 형질감염된 세포에서 유의하게 감소되었다(도 8). hVEGF 수준에 대한 영향은 비특이적 siRNA(EGFP siRNA)로의 형질감염 또는 siRNA 없이 허위 형질감염에서는 관찰되지 않았다. 용량 반응 연구를 Cand5, hVEGF#1, hVEGF#2, hVEGF#3, hVEGF#4, hVEGF#6 및 hVEGF#7에 대해 실시하였다(도 9).

[0188] 실시예 12 - VEGF 이소형의 시험관내 RNA 간섭

[0189] VEGF_{165b}은 내생성 항-혈관신생성 VEGF 이소형으로써 확인되었다. 특정 VEGF 이소형, 예컨대 VEGF₁₆₅를 선택적으로 억제시키나, VEGF_{165b}를 존속시키도록 siRNA를 설계하였다.

[0190] **방법:** ARPE19 세포를 24웰 플레이트(웰 당 50,000개 세포)에 파종하였다. 파종 후 18 내지 24시간 경과시, 세포는 50-75% 혼합하게 되었고, 이것을 형질감염에 사용하였다. 14개의 인간 VEGF-A 특이적 siRNAs를 설계하고 시험하였다. 제조업자의 프로토콜에 따라 리보주스(Ribojuice™) siRNA 형질감염 시약(Novagen)을 사용하여 siRNAs(25 nM)로 세포를 형질감염시켰다. 구체적으로, 세포의 1개 웰에 대하여, 40.5 μ L의 무혈청 OPTI-MEM에 에펜도르프 튜브로 파이펫팅하고 난 다음 2 μ L의 리보주스를 OPTI-MEM에 첨가하였다. 용액을 유순한 볼텍싱으로 혼합하고 튜브 바닥에 내용물이 모이도록 잠시 원심분리하고 5분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. siRNA(1 μ M 원액(stock)의 7.5 μ L)를 리보주스/배지 혼합물에 첨가하고 부드럽게 혼합하고 튜브 바닥에 내용물이 모이도록 잠시 원심분리하였다. 혼합물을 15분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 진행중에, 배지를 세포에서 따라 내고, 250 μ L의 신선한 완전 ARPE19 성장 배지(DMEM/F12; 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신)로 교체하였다. 15 분 인큐베이션후, siRNA/리보주스/배지 혼합물(50 μ L)을 세포에 적가하였다. 300 μ L 부피 중의 siRNA의 최종 농도는 25 nM이었다. 세포를 24시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 유지하였다. 추가 실험에서, 웰 3개에 담긴 세포를 각각의 siRNA 로 형질감염시켜 반응을 스케일업하였다. 형질감염시킨 후 24시간 경과시, 형질감염 혼합물을 따라 내고, 세포를 500 μ Ls의 무혈청 DMEM/F12, 10 ng/mL 인간 재조합 TGF β II를 함유하는 DMEM/F12 또는 10ng/mL TGF β II와 5 μ g/mL 사이클로헥시미드(cycloheximide)를 함유하는 DMEM/F12로 처리하였다. 세포를 추가 24시간 동안 37°C, 5% CO₂에 복귀시켰다. 이후, 배지를 세포에서 따라 내고, ELISA (Quantikine 인간 VEGF ELISA 키트(R&D Systems))를 통해 단백질 발현에 대해 분석하였다. 배지를 세포로부터 따라 내고, 에펜도르프 튜브에 모으고, ELISA를 통해 VEGF 단백질에 관해 즉시 분석하거나, -80°C에 저장하고 나중에 VEGF 단백질에 대해 분석하였다.

[0191] 이러한 결과에 기초하여, 선별된 숫자의 siRNA 후보체들에 대해 추가의 형질감염 스크린을 실행하였다. 세포를 모으고, RNA를 추출하고, 준-정량(semi-quantitative) RT-PCR로 VEGF₁₆₅, VEGF_{165b}, VEGF₁₂₁ 및 VEGF₁₈₉에 대한 siRNAs의 억제 효과를 측정하였다. GAPDH 하우스키핑 유전자 발현을 대조군으로 사용하였다. 구체적으로, 웰로부터 배지를 따라 낸 후, 200 μ Ls의 RNAqueous Kit (Ambion)로부터의 용해/결합 용액을 각각의 웰에 첨가하였다. RNA를 분광광도법을 통해 정량하였다(OD 260 nm). 용해된 세포를 모으고, RNA를 제조업자의 프로토콜에 따라 추출하였다. RNA를 제조업자의 프로토콜에 따라 SuperScript™ III 역 전사효소(Invitrogen)를 사용하여 역전사시켰다. PCR 을 이용하여 GAPDH, VEGF₁₆₅, VEGF_{165b}, VEGF₁₂₁ 및 VEGF₁₈₉에 대한 cDNA를 분석하였다. PCR 에 사용된 프라이머는 하기 표 3에 제시되어 있다.

표 3

| 프라이머 명칭 | 설명 | 서열 5'-3' |
|------------|--|----------------------|
| P121 | VEGF121 역방향 프라이머 | GGCTTGTCACATTTTCTTG |
| P165 | VEGF165 역방향 프라이머 | CCCACAGGGATTTTCTTGTC |
| P189 | VEGF189 역방향 프라이머 | CTTCCCTTTCCTCGAACTG |
| hVEGF-E | VEGF121, VEGF165 및 VEGF 189에 대한 정방향 프라이머 | GCTACTGCCATCCAATCGAG |
| P165bR | VEGF165b에 대한 역방향 프라이머 | GTCTTTCCTGGTGAGAGATC |
| hVEGF-A | VEGF165b에 대한 정방향 프라이머 | CTGTCTTGGGTGCATTGGAG |
| GAPDH-B | GAPDH 역방향 프라이머 | GAGGCAGGGATGATGTTCTG |
| GAPDH-A | GAPDH 정방향 프라이머 | CATGGCAAATTCATGGCAC |

[0192]

[0193]

PCR 분석을 위해, 3 μ L cDNA를 1 μ L의 각각의 적절한 정방향 프라이머(10 μ M)와 역방향 프라이머(10 μ M) 프라이머, 및 45 mL의 Platinum PCR Supermix(Invitrogen)와 조합하여, 각각의 프라이머의 최종 농도가 200 nM이 되도록 만들었다. cDNA를 하기 PCR 조건에 따라서 써모사이클러(thermocycler)에서 증폭시켰다:

[0194]

단계 1: 94°C에서 2분

[0195]

단계 2: 94°C에서 15초

[0196]

단계 3: 55°C에서 30초

[0197]

단계 4: 72°C에서 30초

[0198]

단계 5: GAPDH, VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁ 및 VEGF₁₈₉의 경우 단계 2 내지 4를 30회 반복 또는 VEGF_{165b}의 경우 35회 반복

[0199]

단계 6: 72°C에서 10분

[0200]

단계 7: 4°C

[0201]

이후 PCR 생성물을 1X TAE 완충액 중에서 제조한 2% 아가로스 겔 상에 현시되게 하였다.

[0202]

결과: ARPE19 세포에서 TGF β II로 유도된 VEGF 생성을 동반하는 ARPE19 세포의 처리와 ELISA 결과는 몇몇 siRNA 후보체들이 ARPE19 세포 에서 TGF β II-유도 VEGF 생성을 억제시켰음을 입증하였다. RT-PCR은 2개의 후보체들이 VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁ 및 VEGF₁₈₉의 생성을 억제시켰으나, VEGF_{165b}는 존속시켰다는 것을 확실히 보여주었다. 도 12(pg/mL hVEGF) 및 13(녹다운 hVEGF %)에 도시되어 있는 바와 같이, VEGF siRNA 후보체들(표 2)을 ELISA를 통해 시험한 것과 같이 ARPE19 세포에 의한 VEGF 단백질 생성을 억제시키는 활성에 관해 스크리닝하였다. 세포를 10 ng/mL TGF β II 로 처리하여 VEGF 생성을 상향조절시켰다. ELISA로 총 VEGF 단백질을 측정하였고, 이것은 임의의 특정 스플라이싱 변이체에 대해 선별적이지 않았다. 몇몇 후보체들(OPK-HVB-004, OPK-HVB-010, 및 OPK-HVB-011)은 억제 효과를 나타내었고, 추가 연구는 이를 보증하였다. 도 14(pg/mL hVEGF)와 15 (녹다운 hVEGF %)에 도시된 바와 같이, 도 12와 13에서와 동일한 방법을 사용한 VEGF 생성에 대한 2차 스크리닝은 OPK-HVB-004와 OPK-HVB-010이 VEGF 단백질 생성을 억제시켰음을 입증하였고, 추가 조사는 이것을 보증하였다.

[0203]

도 16, 24 및 27은 다양한 농도에서 몇몇 후보체들(OPK-HVB-004, OPK-HVB-010, 및 OPK-HVB-012)의 인간 VEGF

녹다운에 관한 용량 반응 효능을 입증한다.

- [0204] 도 17은 몇몇 후보체들(OPK-HVB-004, OPK-HVB-010, 및 OPK-HVB-012)의 1주(7일)에 걸쳐 인간 VEGF의 하향조절을 입증한다.
- [0205] 대조군으로써, GAPDH RT-PCR을 도 18에 도시된 것과 같이 다양하게 처리된 세포에 대해 실시하였다. 존재하는 RNA의 실제 양을 정량하지 않았으나, 절차는 참조 대조군 레인 3과 비교할 때 준-정량적이다. 구체적으로, RNA 생성의 하향조절은 밴드가 더 흐려진 것으로 보이는 경우를 보여준다. 이 실험에서, 레인 2-11은 10 ng/mL의 TGF β II로 처리되어 VEGF의 생성을 상향조절하였다. FAM-GAPDH siRNA는 GAPDH 메시지(레인 4)를 하향조절시켰고, 반면 다른 처리는 GAPDH mRNA에 영향을 미치지 않았으며, 그에 따라 처리된 세포에서 총 RNA 생성에 변동성은 존재하지 않는다는 것이 확증된다.
- [0206] 또한 VEGF₁₆₅ 이소형 RT-PCR을 도 19에 도시한 것과 같이 처리된 세포에서 실시하였다. 레인 2-11의 샘플을 10 ng/mL의 TGF β II로 처리하여 VEGF의 생성을 상향조절시켰다. 모든 VEGF 이소형을 하향조절시키는 것으로 알려진, 베바시라닙 25 nM(레인 6), OPK-HVB-004 25 nM(레인 7) 및 OPK-HVB-010 25 nM(레인 8)는, 레인 3의 대조군보다 더 가벼운 밴드에 의해 입증된 것과 같이, TGF β II(레인 2)로의 유도 후 VEGF₁₆₅ mRNA의 생성을 하향조절시켰다.
- [0207] VEGF₁₈₉ 이소형 RT-PCR을 또한 도 20에 도시한 것과 같이 실시하였다. 레인 2-11의 샘플을 10 ng/mL의 TGF β II로 처리하여 VEGF의 생성을 상향조절시켰다.
- [0208] 25 nM 베바시라닙(레인 6), 25 nM OPK-HVB-004(레인 7) 및 25 nM OPK-HVB-010(레인 8)은, 레인 3의 대조군보다 더 가벼운 밴드에 의해 입증된 것과 같이, TGF β II(레인 2)로의 유도 후 VEGF₁₈₉ mRNA의 생성을 하향조절시켰다.
- [0209] 이후 VEGF₁₂₁ 이소형 RT-PCR을 도 21에 도시한 것과 같이 실시하였다. 레인 2-11의 샘플을 10 ng/mL의 TGF β II로 처리하여 VEGF의 생성을 상향조절시켰다.
- [0210] VEGF₁₂₁ mRNA는 레인 3의 대조군보다 더 가벼운 밴드에 의해 입증된 것과 같이 레인 6(25 nM 베바시라닙)에서 하향조절되었다.
- [0211] 마지막으로, VEGF_{165b} 이소형 RT-PCR을 도 22에 도시한 것과 같이 실시하였다.
- [0212] 레인 2-11의 샘플을 10 ng/mL의 TGF β II로 처리하여 VEGF의 생성을 상향조절시켰다. 초기 문제으로써, > 600bp 더블 밴딩(double banding)은 인위적인 것으로 결정되었다. 그러나, VEGF_{165b} mRNA는 레인 3의 대조군보다 더 희미한 밴드에 의해 드러난 것과 같이 베바시라닙(레인 6)에 의해 하향조절된다. 대조적으로, OPK-HVB-004(레인 7) 및 OPK-HVB-010(레인 8)에 대한 밴드는 레인 3의 대조군에 비해 더 희미하게 나타났다. 따라서, 이러한 siRNA 구성체는 VEGF_{165b} 발현을 유지시키면서, 또한 다양한 다른 VEGF 이소형을 억제시킬 수 있었다. 따라서, VEGF_{165b}를 잔존시키는 siRNAs가 합성될 수 있고 이것은 모든 VEGF-A 이소형을 녹다운시키는 siRNAs보다 더 효과적일 수 있다. VEGF_{165b}를 잔존시키는 siRNAs는 안구내 신혈관형성의 치료를 위한 유력한 치료 후보체일 수 있다.
- [0213] **실시예 13 - siRNAs 처리 후 사이토카인 프로파일**
- [0214] dsRNA 유사체인, 폴리이노시닉-폴리사이티딜산(polyinosinic-polycytidylic acid) 나트륨 염[Poly (I:C)]을 처리한 후 ARPE19 세포의 사이토카인 분비 프로파일을 측정하였다. siRNAs가 Poly(I:C)와 유사하게 행동하는지 여부 및 이 siRNAs가 세포에 의한 동일한 사이토카인의 생산을 초래하는지 여부를 결정하기 위한 추가 시험을 수행하였다.
- [0215] **방법.** ARPE19 세포를 24 웰 플레이트(웰 당 50,000개 세포)에 파종하였다. 24시간 경과 후, 배지를 따라내고, 세포를 Poly(I:C); 0-1000 mg/mL(Sigma, St. Louis, MO) 또는 무혈청 DMEM/F12(1:1) (Invitrogen, Carlsbad, CA) 중에서 제조된, 폴리데옥시이노시닉-데옥시사이티딜산 나트륨 염[Poly(dI:dC); 50mU/mL-800 mU/mL](Sigma)으로 처리하였다. 처리 후 48시간 경과시, 배지를 세포로부터 모으고, 제조업자의 프로토콜에 따라 ELISA(IFN- γ , IL-8, IL-6, TNF α , ICAM, IL-12 및 MCP-1에 대한 Quantikine®

면역검정(R&D Systems, Minneapolis, MN); IFN- α 및 IFN- β 에 대한 Verikine[®]

ELISA 키트(PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ))를 통해 IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-8, IL-6, TNF α , ICAM, IL-12 및 MCP-1에 대해 분석하였다.

[0216] ARPE19 세포를 베바시라닙, OPK-HVB-004, OPK-HVB-009, OPK-HVB-010 및 OPK-HVB-012(Dharmacon/Thermo Scientific, Chicago, IL)으로 형질감염시켰다. 세포를 24웰 플레이트(웰 당 40,000개 세포)에 파종하였다. 24시간 후, 세포를 제조업자의 프로토콜에 따라 리보주스(Ribojuce[™]) 형질감염 시약(Novagen/EMD, San Diego, CA)을 사용하여 25nM의 siRNA로 형질감염시켰다. 형질감염 후 24시간 경과시, 세포를 10 ng/mL의 인간 재조합 TGF β II(R&D Systems)로 처리하였다. 형질감염 후 48시간(즉, TGF β II 처리 후 24시간) 경과시, 배지를 모으고, 사이토카인 수준을 상기한 것과 같이 분석하였다. 추가적으로, 배지를 ELISA(R&D Systems)를 통해 hVEGF에 대해 분석하였다. 결과는 도 23에 제시되어 있다.

[0217] 결론. 앞의 결과에 기초하여, (i) ARPE19 세포가 Poly(I:C), dsRNA 유사체에 반응하여 몇몇 염증성 사이토카인을 생산하나, 3종의 주 조절자인, IFN- α , IFN- β 또는 IFN- γ 를 생산하지 못하고; (ii) ARPE19 세포가 siRNAs와 같은 dsRNAs의 염증성 활성(inflammatory potential) 및 특이적 효과를 연구하는데 사용될 수 있으며; (iii) OPK-HVB-009와 OPK-HVB-010는 ARPE19 세포가 시험된 임의의 사이토카인을 분비하지 못하였으며, 이는 이들이 낮은 염증 활성을 지닐 수 있다는 것을 시사한다는 것을 제시한다.

[0218] **실시예 14: 용량 반응 곡선은 siRNAs의 특이성을 나타낸다.**

[0219] 용량 반응 곡선을 도 26과 27에 도시된 것과 같이, 다양한 siRNAs, 21-머를 사용하여 얻었다. 용량 반응이 특정 siRNAs로 드러났는데, 이는 사용된 siRNAs에 대한 특이적 반응을 나타내는 지표이다. 용량 반응 곡선을 또한 도 25와 26에 도시되어 있는 것과 같이 OPK-HVB-009에 대해 얻었다. 세포를 실시예 12와 13에 기재되어 있는 것과 같이 처리하고 형질감염시켰다. 세포를 24 웰 플레이트에 파종하였다(40,000개 세포/웰). 또한, 상이한 농도를 사용하였고, 그리하여, OPTI-MEM, 리보주스, 및 siRNA의 부피를, 50 ml 형질감염 혼합물을 제조할 때, 그에 따라 조정하였다.

[0220] **실시예 15: siRNAs의 안정성**

[0221] ARPE19 세포를 도 28, 29, 30, 31, 및 32에 도시되어 있는 것과 같이 다양한 조건하에서 보관하였던 siRNAs로 형질감염시켰다. 세포를 실시예 12와 13에 기재된 것과 같이 형질감염시켰다. siRNA 분자가 도 28, 29, 30, 31, 및 32에 제시된 것과 같은 다양한 조건하에서 안정하였음이 확인되었다. 예를 들어, 7.5 mM siRNA를 3개의 튜브로 분취하고, 각 튜브를 최대 8주 동안 상이한 온도(37 $^{\circ}$ C, 실온, 4 $^{\circ}$ C)에서 보관하였다. 각 튜브의 분취액을 사전결정된 시점(24시간, 48시간 및 이후 주단위로) 수집하였다. 수집시, 분취액을 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 각 분취액을 ARPE19 세포에서의 효능에 대해 연이어 시험하여, siRNAs의 안정성이 상이한 환경 조건하에서 유지되는지 여부에 대해 알아 보았다. siRNAs를 실시예 12에 기재된 방법을 이용하여 ARPE19 세포로 형질감염시켰는데, 40,000개의 세포를 각 웰 당 파종하였다.

[0222] **실시예 16: VEGF의 중간 하향 조절.**

[0223] C6 세포를 24 웰 플레이트(P12, 웰 당 40,000개 세포)에 파종하였다. 파종 후 18 내지 24시간 경과시, 세포는 50-70% 혼합하게 되었고, 이것을 형질감염에 사용하였다. 세포를 제조업자의 프로토콜에 따라 리보주스(Ribojuce[™]) siRNA 형질감염 시약(Novagen)을 사용하여 OPK-HVB-004, OPK-HVB-009, OPK-HVB-010 및 OPK-HVB-012로 형질감염시켰다. 요약하면, 1개의 웰에, 무혈청 OPTI-MEM (40.5 μ L-47 μ L)을 엔펜도르프 튜브에서 파이펍팅하고, 이후 2 μ L의 리보주스를 OPTI-MEM(Gibco)에 첨가하였다. 용액을 부드럽게 볼텍싱하여 혼합하고, 잠시 원심분리시켜 튜브의 바닥에 내용물이 모이게 하고, 5분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. siRNA(100nM 또는 1 mM원액의 0.3 μ L-7.5 μ L)을 리보주스/배지 혼합물에 첨가하고, 부드럽게 혼합하고, 잠시 원심분리하여 튜브의 바닥에 내용물이 모이게 하였다. 혼합물을 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션을 진행하는 동안, 배지를 세포에서 따라 내고, 250 μ L의 신선한 C6 성장 배지(F-12 케인(Kaighn) 배지, 2.5% 우태아 혈청; 15% 말 혈청, 1% 페니실린/스트렙토마이신)로 교체하였다. 인큐베이션 15분 후, siRNA/리보주스/배지 혼합물(50 μ L)을 세포에 적가하였다. 플레이트를 잠시 흔들어 복합체가 확실히 웰 전체에 균등하게 분포되도록 하였다. 300 μ L 부피 중의 siRNA의 최종 농도는 250pM, 500pM, 1nM, 5nM 또는 25nM이다. 세포를 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 유지하였다. 각각의 siRNA가 각 농도에서 3회 시험되도록 모든 부피를 스케일업하였다. 형질감염 후 24시간 경과시, 형질감염 혼합물을 따라 내고, 세포를 500 μ LS의 신선한 C6 성장 배지 또는 10 ng/mL

인간 재조합 TGF β II 를 보충한 신선한 C6 성장 배지로 처리하였다. 세포를 추가 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ 로 복귀시켰다. 이후, 배지를 세포로부터 제거하고, ELISA(Quantikine 래트 VEGF ELISA 키트, R&D Systems)를 통해 단백질 발현에 대해 분석하였다.

[0224] NIH3T3 세포를 24 웰 플레이트(P2-P6, 웰 당 40,000개 세포)에 파종하였다. 파종 후 18 내지 24시간 경과시, 세포는 50-70% 혼합하게 되었고, 이것을 형질감염에 사용하였다. 세포를 제조업자의 프로토콜에 따라 리포펙타민(Lipofectamine™) 시약 2000(Invitrogen)을 사용하여 siRNAs로 형질감염시켰다. 요약하면, 단일 웰에 대해, siRNA(1 μ M 또는 7.5 μ M)를 에펜드르프 튜브에서 50 μ L OPTI-MEM으로 희석하고, 부드럽게 혼합하고, 볼텍싱하였다. 제 2 에펜드르프 튜브에서, 1 μ L의 리포펙타민 2000을 49 μ L의 OPTI-MEM와 혼합하였다. 혼합물을 부드럽게 섞어 주고, 볼텍싱하고, 5분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 5분 후, 희석된 siRNA(50 μ L 부피)를 희석된 리포펙타민 2000(50 μ L)에 첨가하였다. 내용물을 부드럽게 섞어 주고, 20분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 20분간 인큐베이션을 진행하는 동안, 배지를 세포로부터 제거하고, 500 μ Ls의 신선한 NIH3T3 성장 배지(DMEM, 10% 우태아 혈청)로 교체하였다. 20분 후, siRNA-리포펙타민 2000 복합체(100 μ L)를 세포에 적가하였다. 플레이트를 부드럽게 흔들어 주어 복합체가 확실히 웰 전체에 균일하게 분포되도록 하였다. 이후, 세포를 24시간 동안 37℃, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 500 μ L 부피 중의 siRNA의 최종 농도는 1nM, 5nM 또는 25nM이었다. 형질감염 후 24시간 경과시, 형질감염 혼합물을 따라내고, 세포를 500 μ L의 신선한 DMEM 또는 10 ng/mL의 인간 재조합 TGF β II를 보충한 신선한 DMEM으로 처리하였다. 세포를 추가 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ 로 복귀시켰다. 이후, 배지를 세포로부터 제거하고, ELISA(Quantikine 마우스 VEGF ELISA 키트, R&D Systems)를 통해 단백질 발현에 대해 분석하였다.

[0225] 실험 결과는 도 34, 35 및 39에 제시되어 있다. OPK-HVB-004 및 OPK-HVB-009는 도 34에 제시된 것과 같이 C6 세포에 의한 VEGF 분비를 억제시킬 수 있었다. 유사한 실험을 마우스 세포(NIH3T3)에서 수행하였고, OPK-HVB-004, OPK-HVB-009, 및 OPK-HVB-010은 도 35 및 39에서 마우스 VEGF의 분비를 억제시킬 수 있었다.

[0226] 실시예 17: 상이한 siRNAs의 비교

[0227] 돌출부를 포함하는 21머 siRNAs를 19머 평활-말단 대응체(counterpart)와 비교하였다. ARPE19 세포를 실시예 12, 13, 및 14에 기재된 것과 같이 상이한 siRNAs로 형질감염시키고, VEGF 생성을 측정하였다. 평활-말단 대응체는 도 36에 도시된 것과 같이 21머와 동일하게 유효하게 ARPE19 세포에서 VEGF 생성을 녹다운시키는 것으로 확인되었다.

[0228] 실시예 18: 17bp 및 돌출부를 포함하는 19머의 스크리닝은 VEGF 생성을 억제할 수 있다.

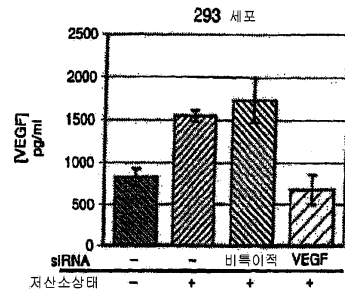
[0229] 17머 및 dTdT 돌출부를 포함하는 siRNAs를 실시예 12, 13, 및 14에 기재된 것과 같이 ARPE19 세포에 형질감염시켰다. 몇몇 siRNAs는 도 37에 도시된 것과 같이 VEGF 생성을 억제시키는 것으로 확인되었다.

[0230] 실시예 19: siRNAs의 용량 반응

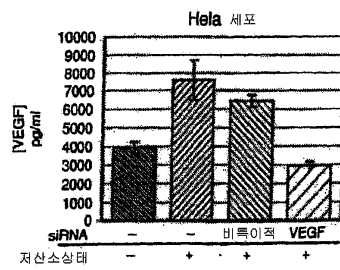
[0231] 평활 말단을 포함하는 19머또는 돌출부를 포함하는 19머(17bp + dTdT 돌출부)를 도 38에 도시한 것과 같이 다양한 용량으로 ARPE19 세포에 형질감염시켰다. 실시예 12, 13 및 16에 기재한 것과 같이 VEGF 분비를 측정함으로써 용량 반응 곡선을 얻었다. 확인된 용량 siRNAs에 대한 반응이 siRNA에 특이적이고, 비특이적 siRNA 반응에 의해 생성되지 않는다는 것을 제시한다. 결과는 도 38에서 확인할 수 있다. NIH3T3 세포에서 시험한 평활 말단 siRNAs는 특이적 용량 반응을 나타내었다. (도 39 참조바람).

도면

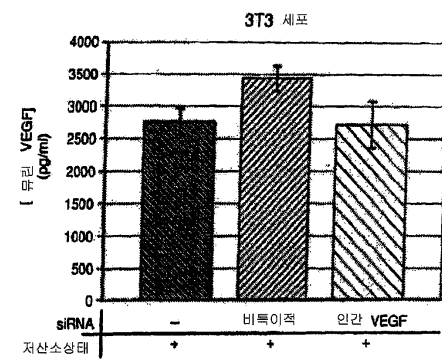
도면1a



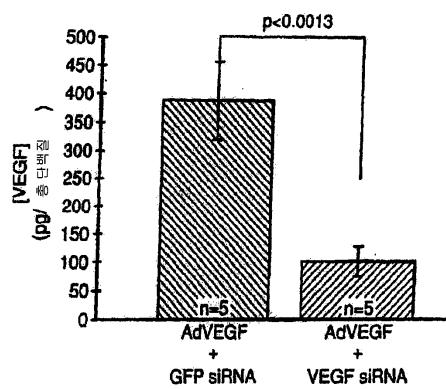
도면1b



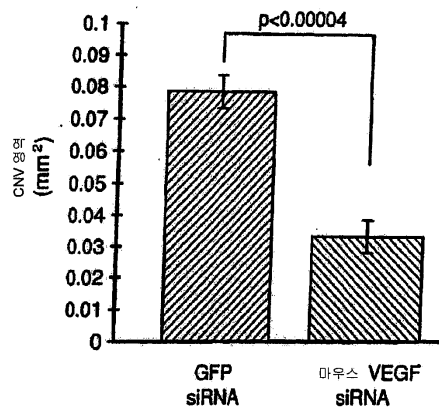
도면2



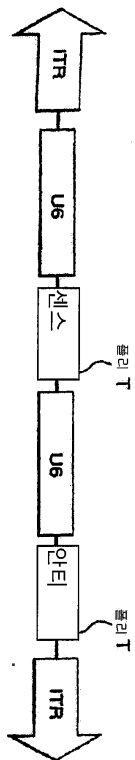
도면3



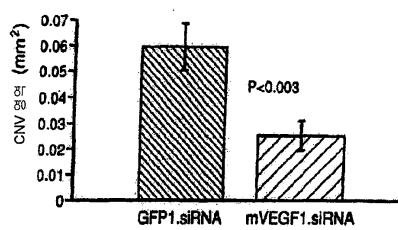
도면4



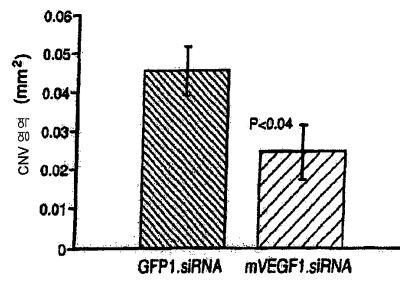
도면5



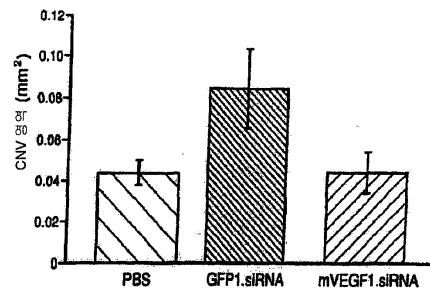
도면6a



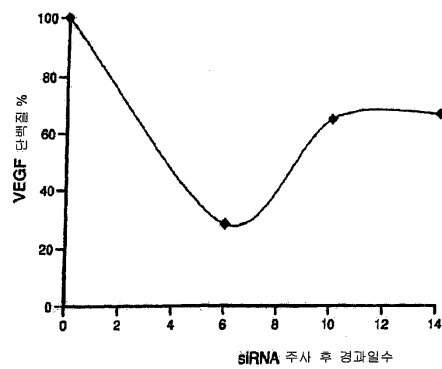
도면6b



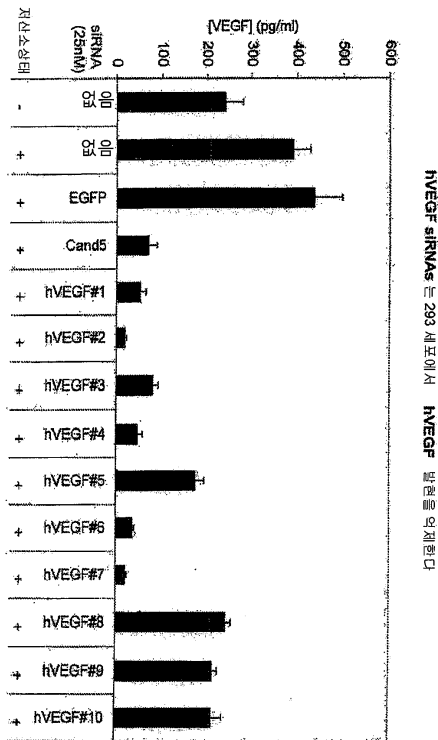
도면6c



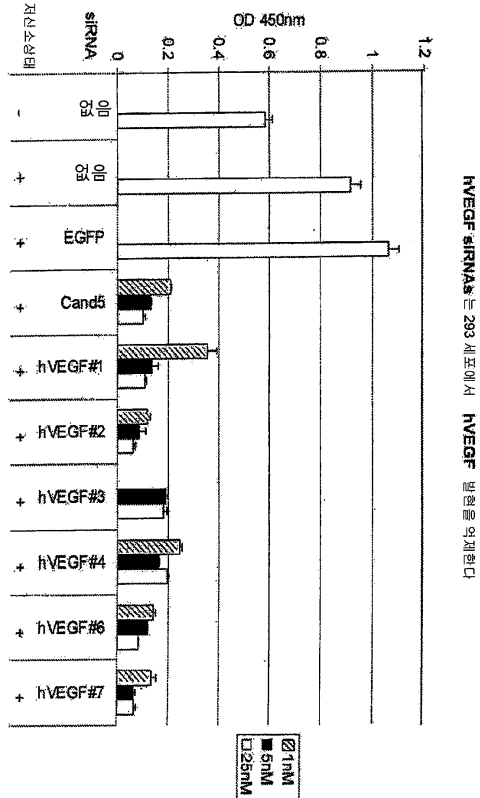
도면7



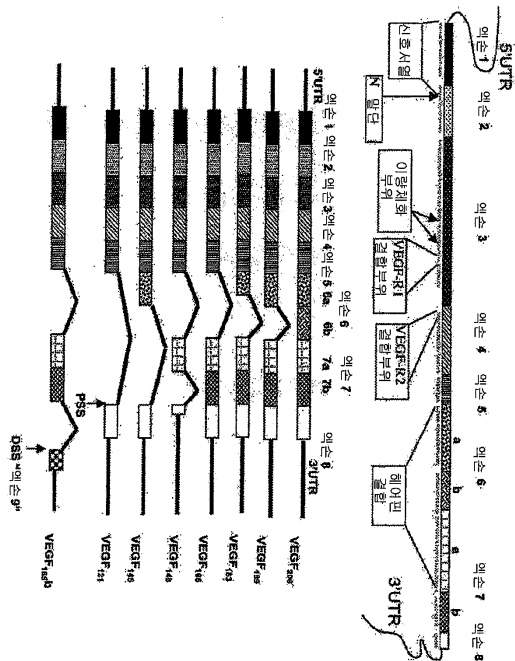
도면8



도면9



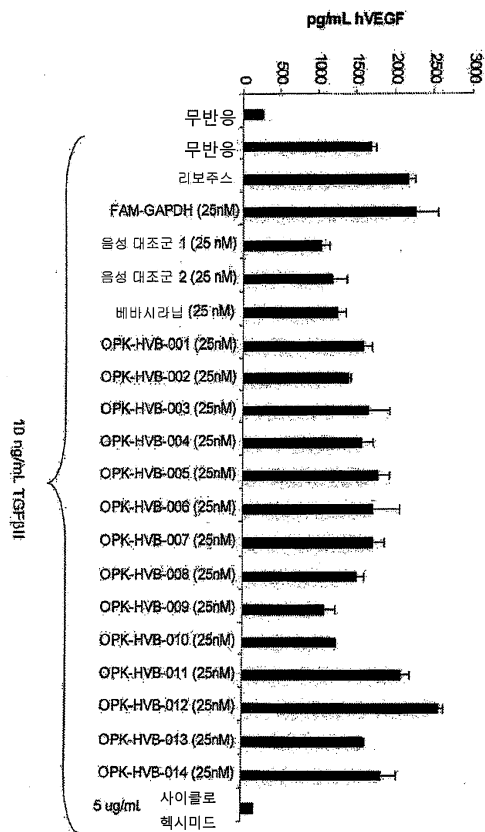
도면10



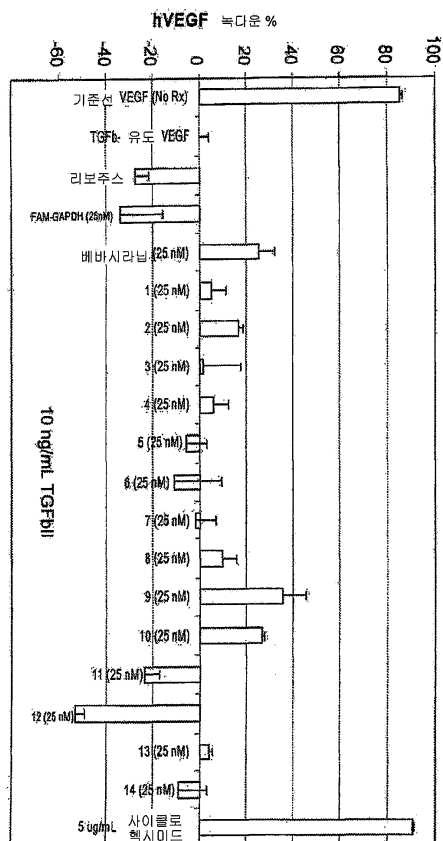
도면11

| nt | 518 | 엑손 7/8 경계 |
|-----------|---|--------------------|
| VBGF 15E | Aagtcgacgagcgacgtcttgagctctaaacgaaacgtactctgcagatgctgaacagcgagcgctgctgac | |
| VBGF 165B | Aagtcgacgagcgacgtcttgagctctaaacgaaacgtactctgacgag | |
| VBGF 165 | gacgcgagcgacgagacgagacgacgcgcctcagcggtcttcgcggaaacacagatctctctaacacggaaac | |
| VBGF 165B | | ctctctcaccacggaaac |
| VBGF 165 | gactcgtctacacgaaacgagtcgactcgaatcagaaacacac | |
| VBGF 165B | gactcgtctacacgaaacgagtcgactcgaatcagaaacacac | |

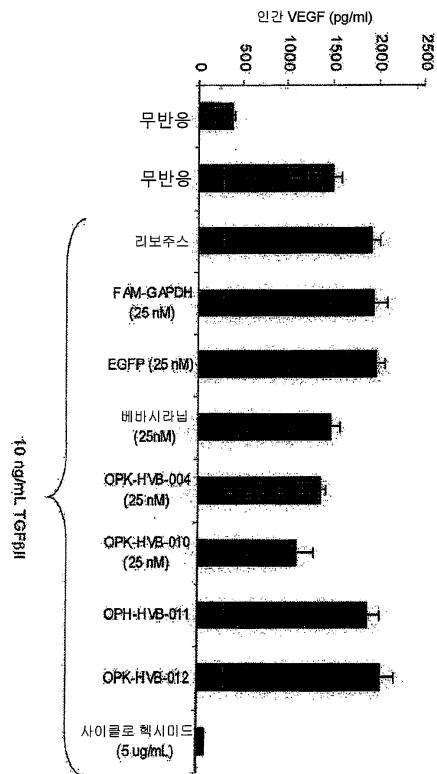
도면12



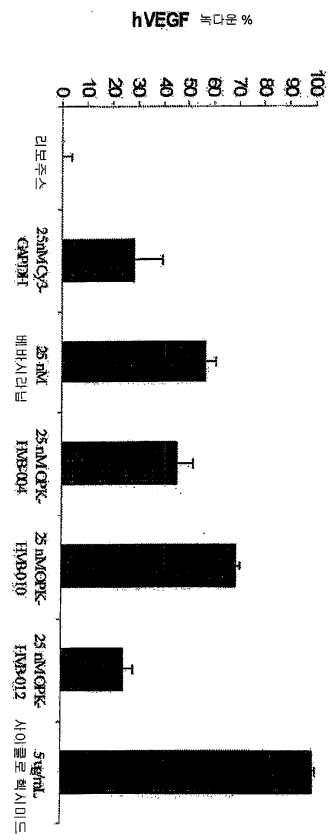
도면13



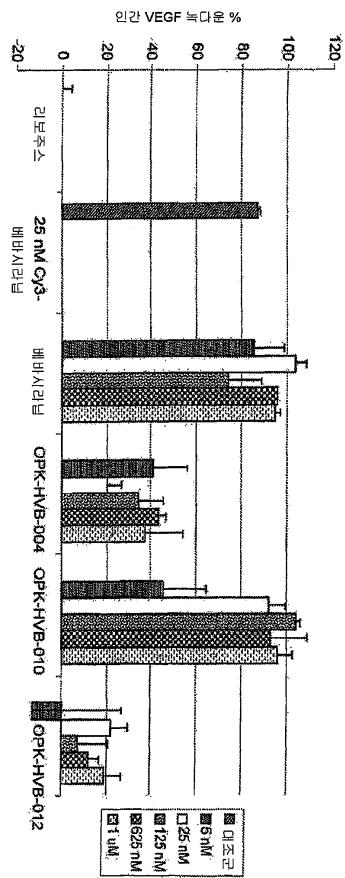
도면14



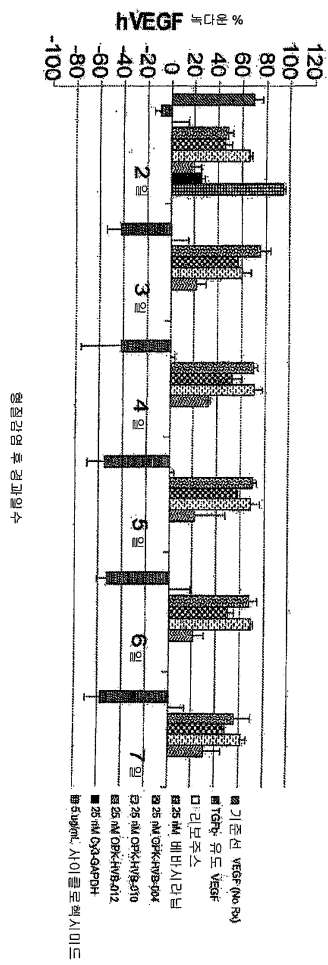
도면15



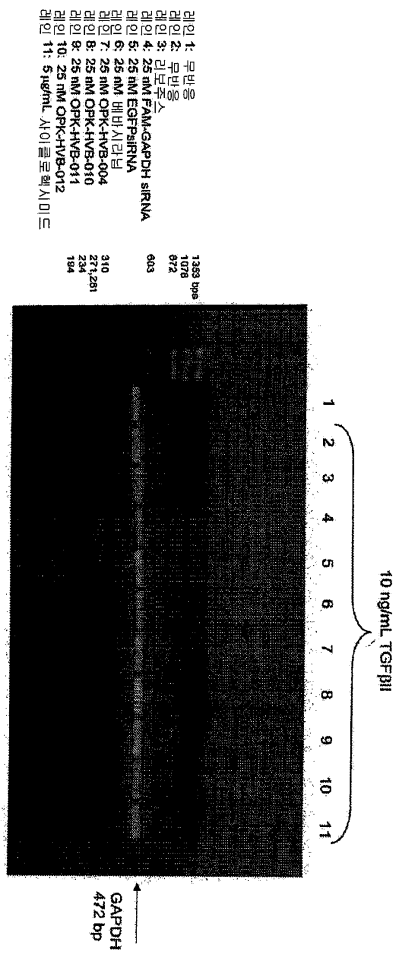
도면16



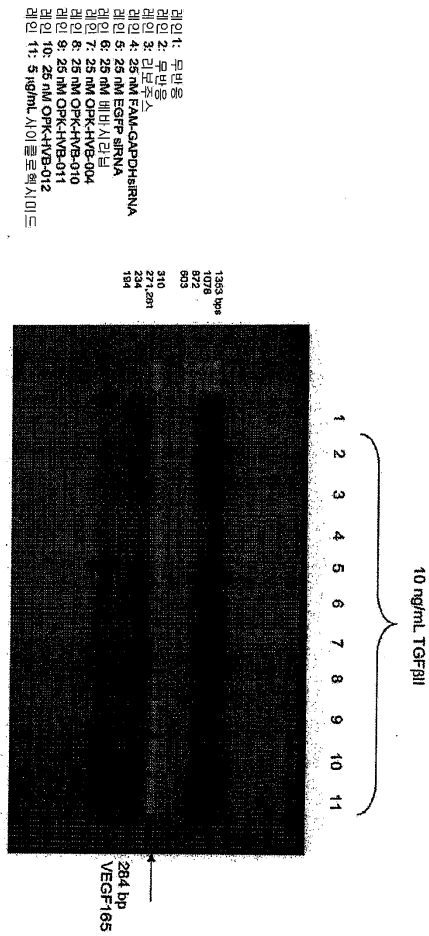
도면17



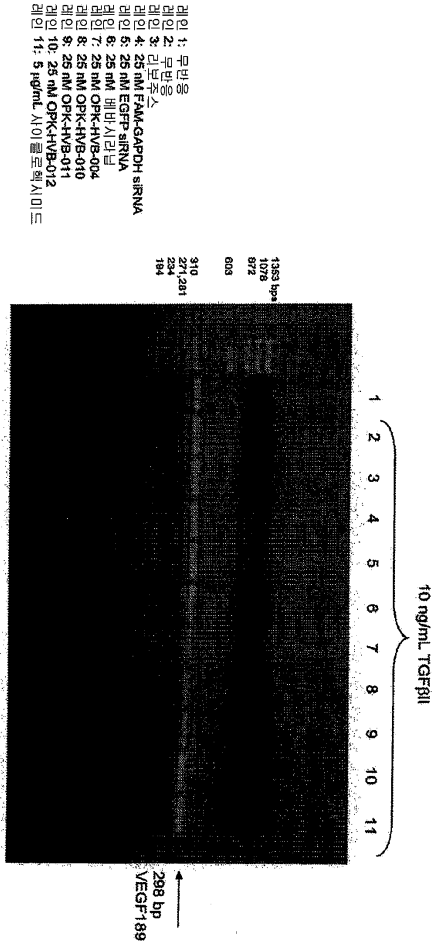
도면18



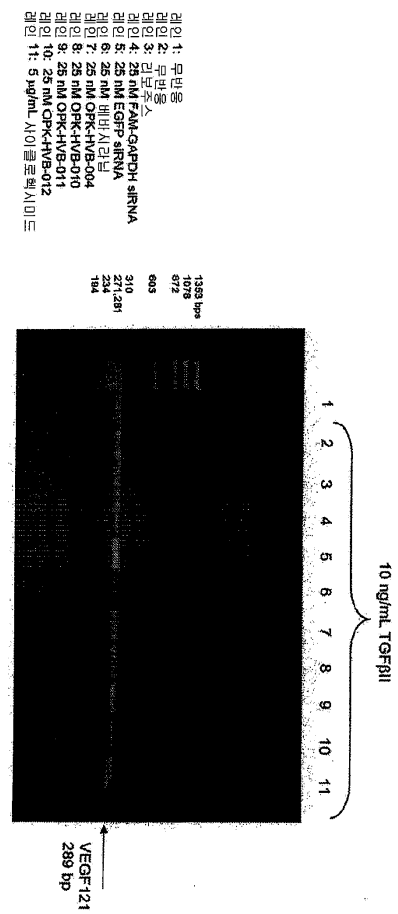
도면19



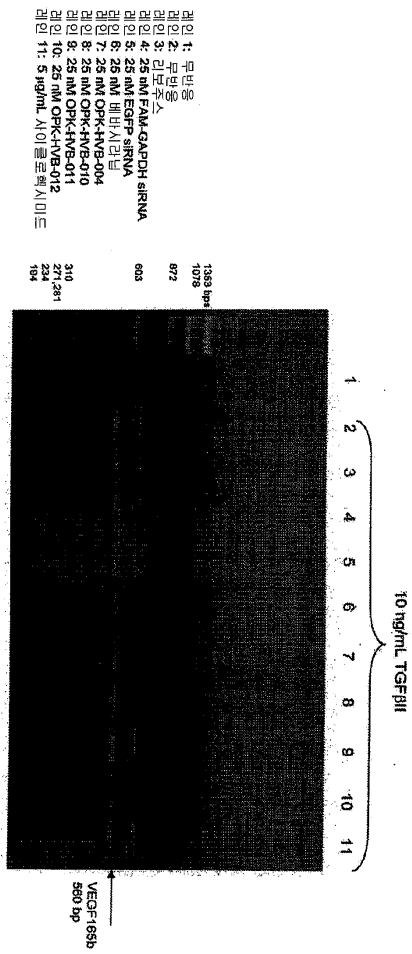
도면20



도면21



도면22

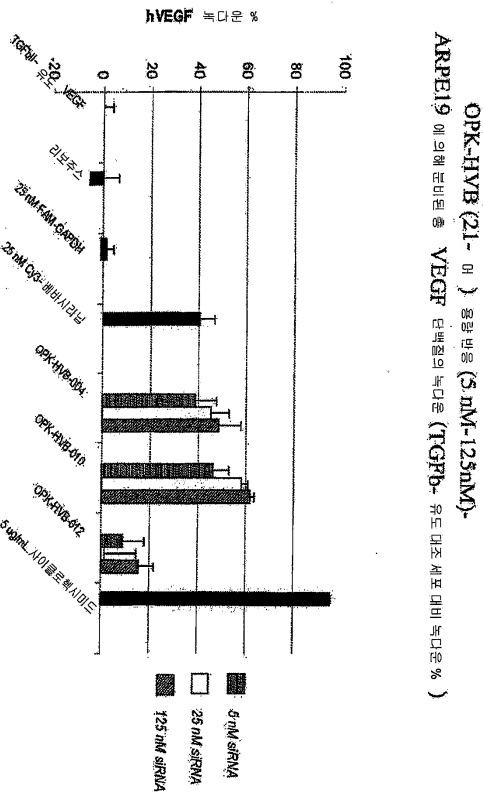


도면23

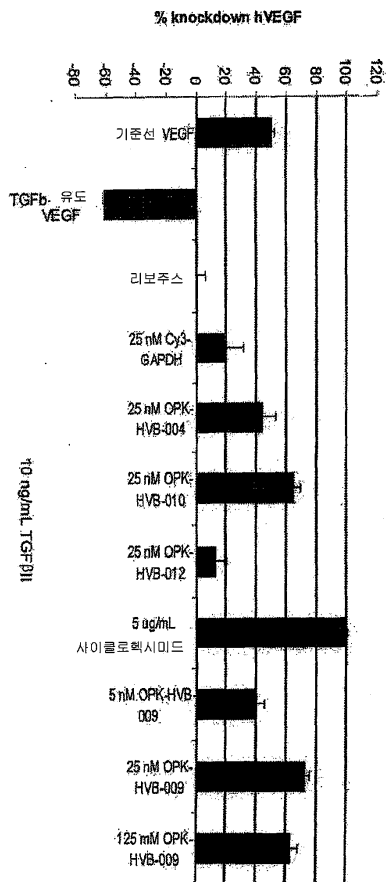
sirnas로 처리 후 ARPE19 세포의 사이토카인 프로파일

| 사이토카인 | Poly I:C | 베바시루브 | OPK-HVB-004 | OPK-HVB-010 | OPK-HVB-009 | OPK-HVB-012 |
|-------|----------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| IFN-α | - | - | - | - | - | - |
| IFN-β | - | - | - | - | - | - |
| IFN-γ | - | - | - | - | - | - |
| IL-8 | + | - | + | - | - | + |
| IL-6 | + | + | + | - | - | + |
| TNFα | + | - | - | - | - | - |
| ICAM | + | - | - | - | - | - |
| IL-12 | - | - | - | - | - | - |
| MCP-1 | + | - | + | - | - | + |

도면24

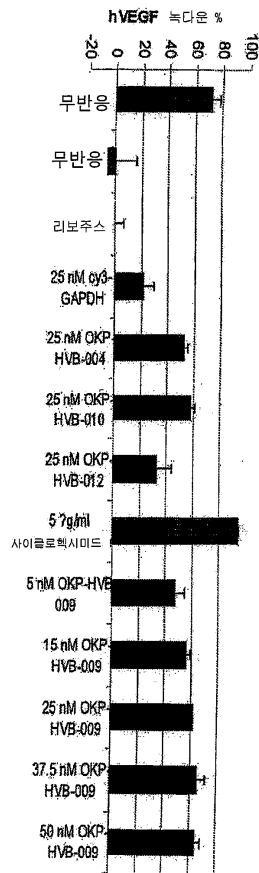


도면25



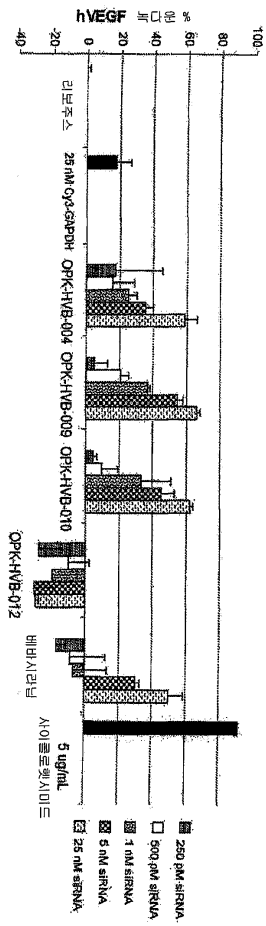
OPK-HVB-009 용량 반응 (5 nM-125 nM)
ARPE 19에 의해 분비된 총 VEGF 단백질의 knockdown(리보주스를 처리한 미조로 대비 knockdown %)

도면26

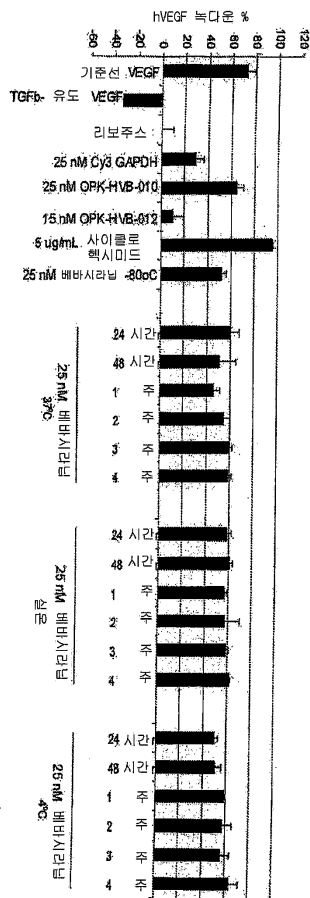


OPK-HVB-009 농량 반응 (5 nM-50nM)
ARPE 19에 의해 분비된 총 VEGF 단백질의 hVEGF 발현(리보주스를 처리한 대조군 대비 발현 %)

도면27

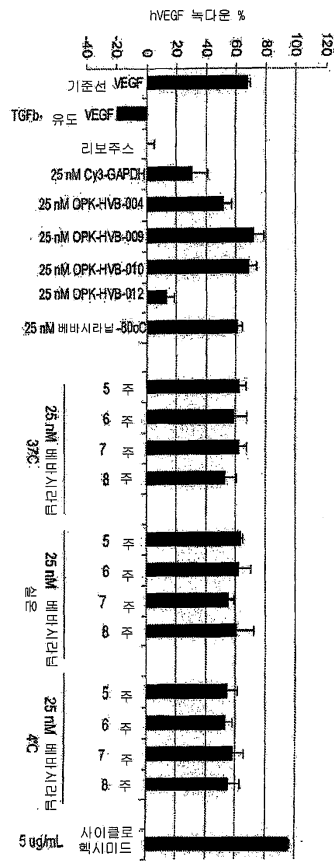


도면28



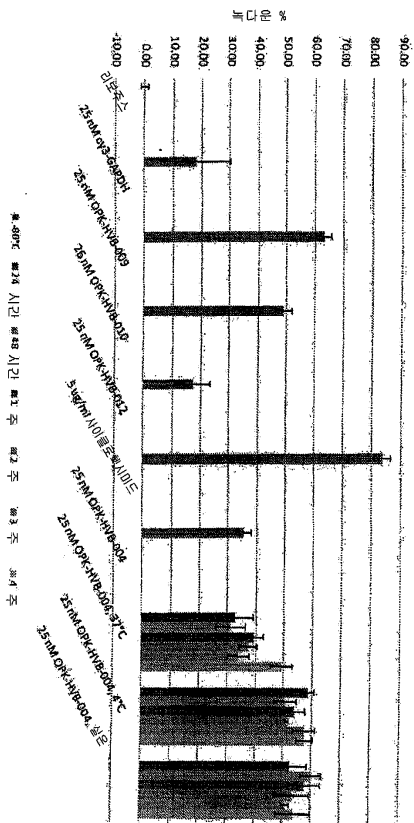
ARPE 19 세포에 의해 분비된 hVEGF의 농도 (%)
상이한 온도 조건 하에서 베바시라닌 (25nM)의 안정성 연구 (4주)

도면29



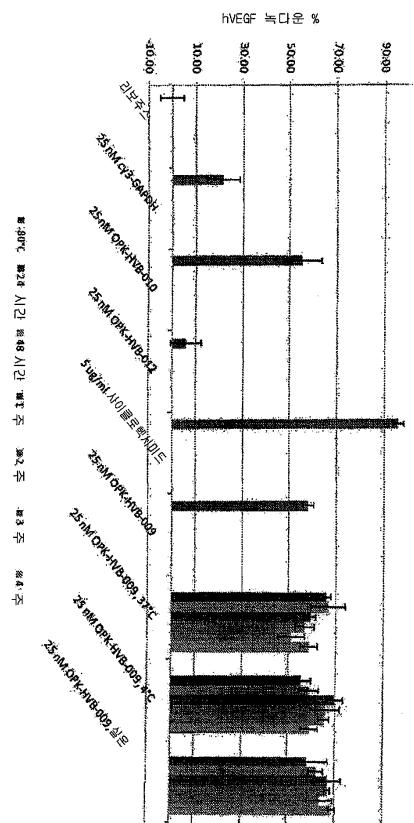
ARPE 19 세포에 의해 분비된 hVEGF의 발현량
상이한 온도 조건에서 베바시라닌(25nM)의 안정성 연구(5-8주)

도면30



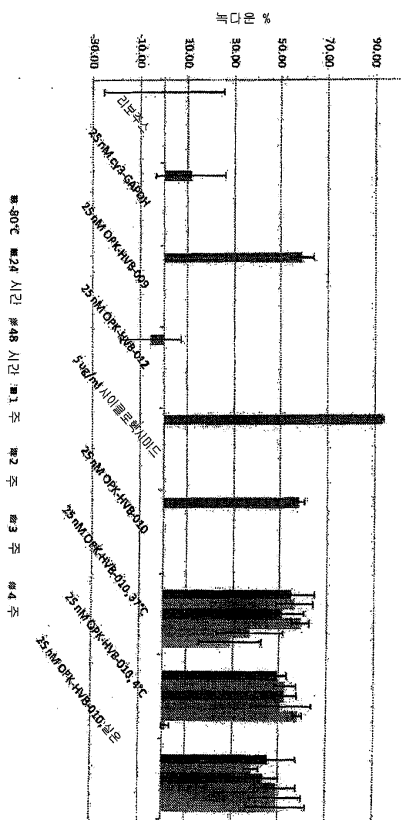
ARPE 19 세포에 의해 분비된 hVEGF의 농도 (%)
상이한 온도 조건하에서 OPK-HVB-004(25nM)의 안정성 연구 (24시간, 4주)

도면31



ARPE 19 세포에 의해 분비된 hVEGF의 농도 (%)
상이한 온도 조건하에서 OPK-HVB-009(25nM)의 안정성 연구 (24시간, 4주)

도면32



도면33

인간, 마우스 및 래트 VEGF를 암호화하는 발현 코드의 상동성

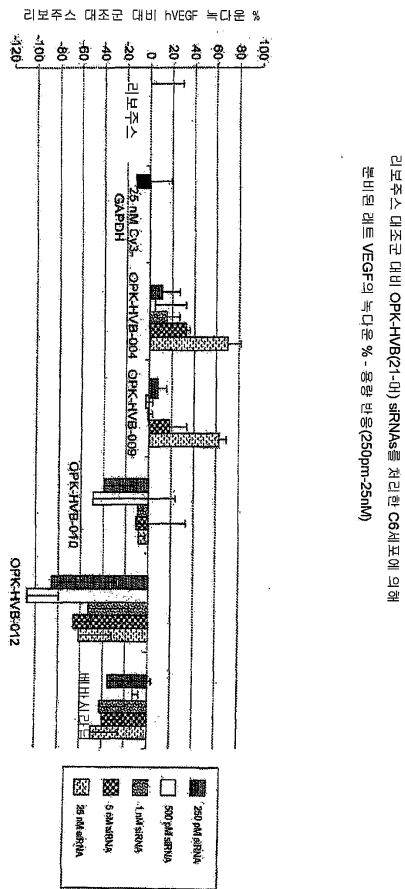
| | |
|-----|--|
| 인간 | gaaagctacatc gacaga tgg gac aag cca aag cgg tga c d k p r |
| 래트 | gaagctacatc gacaga tgg gac aag cca aag cgg tga c d k p r |
| 마우스 | gaagctacatc gacaga tgg gac aag cca aag cgg tga c d k p r |

시퀀스

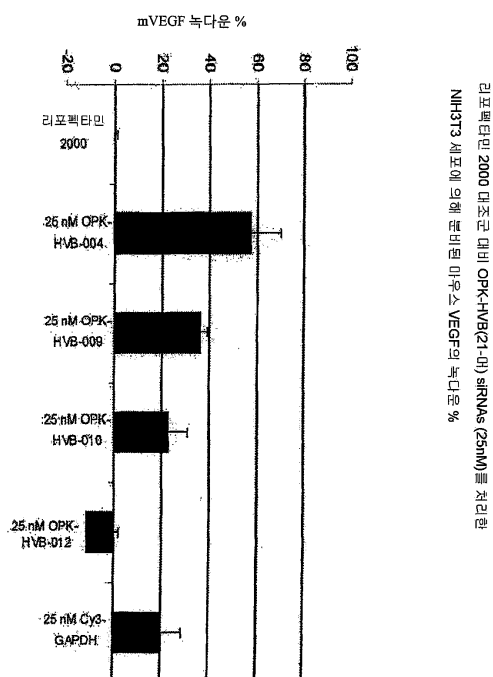
| | |
|-------------|---------------------|
| OPK-HVB-004 | GTACTTCGNSATGTACAA |
| OPK-HVB-009 | TGCAGATATTCACAGCCAA |
| OPK-HVB-010 | GCAAGATATTCACAGCCAA |
| OPK-HVB-012 | AGATATTCACAGCCAGGC |

표적 시퀀스

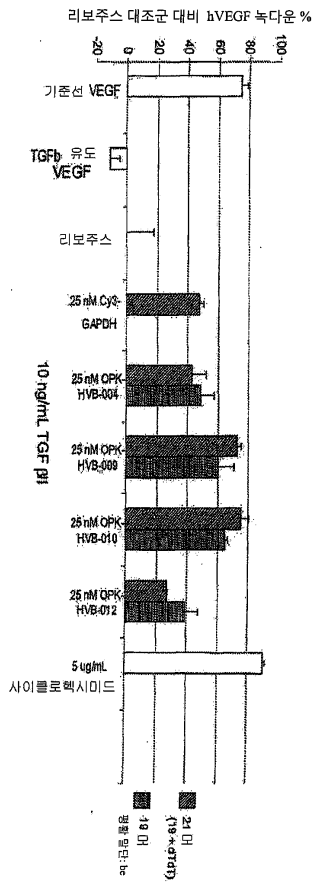
도면34



도면35

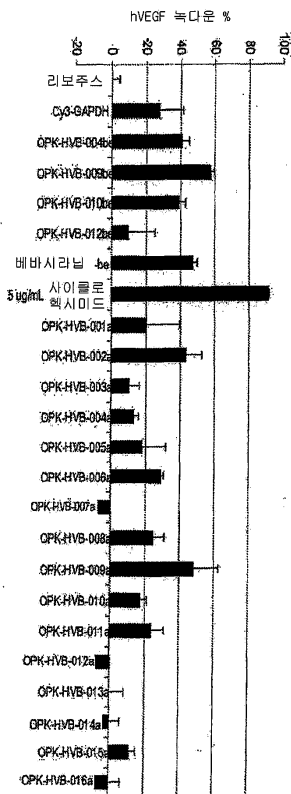


도면36



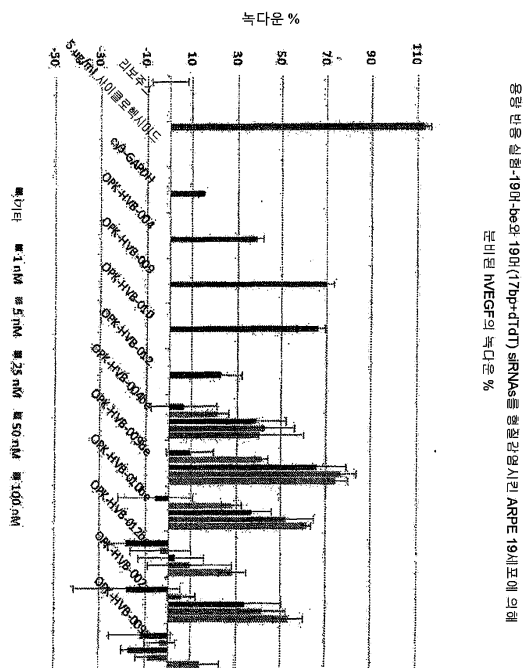
ARPE 19 세포에서 hVEGF knockdown %에 대한 OPK-HVB siRNAs의 효과-
21-미(19+DTT) 대 19-미(영양물만) 대응부

도면37

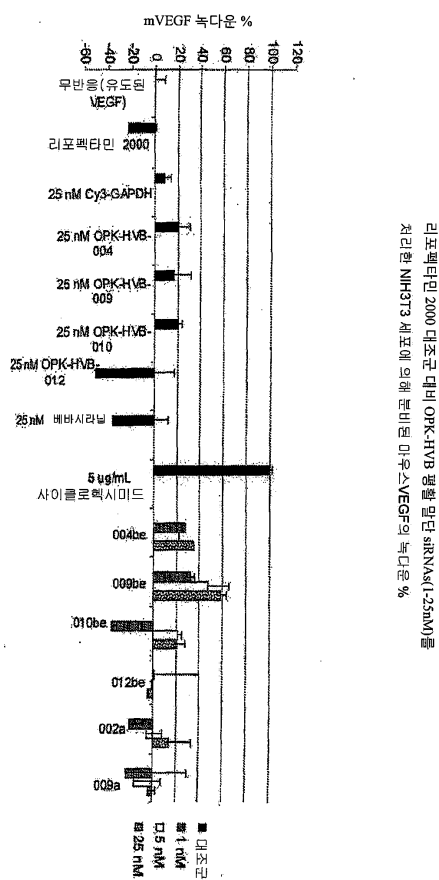


예비 siRNA 스크린 : ARPE 19 에서 총 VEGF 단백질의 knockdown에 대한 OPK-HVB(19-미; 17bp+DTT) siRNAs (25nm)의 효과(리보주스 처리 대조군 대비 knockdown %)

도면38



도면39



서 열 목 록

<110> Opko Ophthalmics, LLC

<120> Compositions and methods for selective inhibition of pro-angiogenic
VEGF isoforms

<130> 129402.02101

<150> US 61/119,779

<151> 2008-12-04

<150> US 61/171,571

<151> 2009-04-22

<150> US 61/219,808

<151> 2009-06-24

<160> 126

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 2250

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

tgagccaggc tggcaggaag gagcctccct cagggtttcg ggaaccagac ctctcaccgg 60

aaagaccgat taaccatgtc accaccacgc catcatcgtc accgttgaca gaacagtcct 120

taatccagaa agcctgacat gaaggaagag gagactcttc gaggagcact ttgggtccgg 180

agggcgagac tccggcagac gcattcccgg gcaggtgacc aagcacggtc cctcgtggga 240

ctggattcgc cattttctta tatctgctgc taaatcgcca agcccgaag attagggttg 300

tttctgggat tctgtagac acaccaccc acatacacac atatatatat attatatata 360

taaataaata tatatgtttt atatataaaa tatatatata ttcctttttt taaattaaact 420

ctgctaattgt tattggtgtc ttactggat atgtttgact gctgtggact tgtgttggga 480

ggaggatgtc ctactcgga tgccgacatg ggagacaatg ggatgaaagg cttcagtgtg 540

gtctgagaga ggccgaagtc cttttgcctg ccggggagca agcaaggcca gggcacgggg 600

gcacattggc tcaattccag aaacacgaca aaccatttc tggccctgag tcaagaggac 660

agagagacag atgatgacac agaaagagat aaagatgccg gttccaacca gaagtttggg 720

gagcctcagg acatggcatg ctttgtggat ccccatgata gtctacaaaa gcaccccgcc 780

cctctgggca ctgcctggaa gaatcgggag cctggccagc cttcagctcg ctctccact 840

tctgaggggc ctaggaggcc tcccacaggt gtcccggcaa gagaagacac ggtggtggaa 900

gaagaggcct ggtaatggcc cctctctctg ggacccttc gtctctctct taccacact 960

cctgggtaca gccaggagg accttgtgtg atcagacat tgaaccact aattctgtcc 1020
ccaggagact tggctctgtg tgtgagtggc ttacccttcc tcattctccc ttccaaggc 1080
acagagcaat ggggcaggac ccgcaagccc ctcacggagg cagagaaaag agaaagtgtt 1140
ttatatacgg tacttattta atagcccttt ttaattagaa attaaaacag ttaatttaat 1200
taaagagtag ggTTTTTTC agtattcttg gttaatatTT aatttcaact atttatgaga 1260
tgtatctctc gctctctctt atttgtactt atgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 1320
gtgtgtgtgt gtatgaaatc tgtgtttcca atctctctct cccagatcgg tgacagtcac 1380

tagcttgtcc tgagaagata tttatttttg ctaacactca gctctgcctt ccttgtccc 1440
caccacacat tcctttgaaa taaggtttca atatacatTT acatactata tatatatTTg 1500
gcaacttgtg ttgtatata aatatatata tatatatatg tttatgtata tatgtgattc 1560
tgataaaata gacattgcta ttctgttttt tatatgtaaa aacaaaacaa gaaaaataga 1620
gaattctaca tactaaatct ctctcctttt ttaattttaa tatttgttat catttattta 1680
ttggtgctac tgtttatccg taataattgt gggggaaaaa gatattaaca tcacgtcttt 1740
gtctctagag cagttttccg agatatccg tagtacatat ttatttttaa acagcaacaa 1800

agaaatacag atatatctta aaaaaaagc attttgtatt aaagaattga attctgatct 1860
caaagctctc cctggctctt ccttctctcc tgggcctcc tgtctcgtt tccctcctcc 1920
tttggggtag atagtttttg tcttaggttt gagaagcagt cctggagta gaatatgggg 1980
tgaccatcc attcctgggc ggaggggaga tggctccttt gccagggtc ctcacactac 2040
gtggtactct gttccttgtc agacaaggat gggggcatgt ctccaggtgc taactggaga 2100
tcggagagag ctgttggctg cagctggcca ggatttgggc atgccgggga catgggaggc 2160
tgtgagccca gcatgcagtt tacttctggg tgctaaatgg aagagtcag taaaaagagt 2220

cttgcccatg ggattccatt ccgctttgtg 2250

<210> 2

<211> 444

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgaactttc tgetgtcttg ggtgcattgg agccttgcct tgetgtctta cctccacat 60
gccaaagtgtt cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg 120
gtgaagtcca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctggtggac 180
atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgccctg 240

| | |
|---|-----|
| atgcatgctg ggggctgctg caatgacgag ggcctggagt gtgtgccac tgaggagtc | 300 |
| aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctaccaag gccagcacat aggagagatg | 360 |
| agcttcctac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa | 420 |
| aaatgtgaca agccgaggcg gtga | 444 |
| <210> 3 | |
| <211> 576 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 3 | |
| atgaactttc tgctgtcttg ggtgcattgg agccttgcct tgctgtctta cctccacat | 60 |
| gccaagtggc cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg | 120 |
| gtgaagtcca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctggtggac | 180 |
| atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgccctg | 240 |
| atgcatgctg ggggctgctg caatgacgag ggcctggagt gtgtgccac tgaggagtc | 300 |
| aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctaccaag gccagcacat aggagagatg | 360 |
| agcttcctac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa | 420 |
| aatccctgtg ggccttgcct agagcggaga aagcatttgt ttgtacaaga tccgcagacg | 480 |
| tgtaaatgtt cctgcaaaaa cacagactcg cgttgcaagg cgaggcagct tgagttaac | 540 |
| gaacgtactt gcagatgtga caagccgagg cgtga | 576 |
| <210> 4 | |
| <211> 648 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 4 | |
| atgaactttc tgctgtcttg ggtgcattgg agccttgcct tgctgtctta cctccacat | 60 |
| gccaagtggc cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg | 120 |
| gtgaagtcca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctggtggac | 180 |
| atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgccctg | 240 |
| atgcatgctg ggggctgctg caatgacgag ggcctggagt gtgtgccac tgaggagtc | 300 |
| aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctaccaag gccagcacat aggagagatg | 360 |
| agcttcctac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa | 420 |

aaaaaatcag ttcgaggaag gggaaagggg caaaaacgaa agcgcaagaa atcccgttat 480
 aagtccttga gcgttccttg tgggccttgc tcagagcgga gaaagcattt gtttgtacaa 540
 gatccgcaga cgtgtaaatg ttctgcaaa aacacagact cgcgttgcaa ggcgaggcag 600
 cttagagttaa acgaacgtac ttgcagatgt gacaagccga ggcggtga 648
 <210> 5
 <211> 670
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 gccttgctgc tctacctcca ccatgccaag tgggccagg ctgcacccat ggcagaagga 60

 ggagggcaga atcatcacga agtgggtgaag ttcattgatg tctatcagcg cagctactgc 120
 catccaatcg agaccctggt ggacatcttc caggagtacc ctgatgagat cgagtacatc 180
 ttcaagccat cctgtgtgcc cctgatgcga tgcgggggct gctgcaatga cgagggcctg 240
 gagtgtgtgc ccaatgagga gtccaacatc accatgcaga ttatgcggat caaacctcac 300
 caaggccagc acataggaga gatgagcttc ctacagcaca acaaatgtga atgcagacca 360
 aagaaggata gagcaagaca agaaaaaaaa tcagttcgag gaaagggaaa ggggcaaaaa 420
 cgaaagcgca agaaatcccc gtataagtcc tggagcgttt acgttggtgc ccgtgctgt 480

 ctaatgccct ggagcctccc tggcccccatt cctgtgggc ctgtctcaga gcggagaaag 540
 catttgtttg tacaagatcc gcagacgtgt aaatgttctt gcaaaaacac agactcgcgt 600
 tgcaaggcga ggcagcttga gttaaacgaa cgtacttgca gatgtgacaa gccgaggcgg 660
 tgatgaatga 670
 <210> 6
 <211> 1137
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 atgtcattg tccagactgg ggtcagatca gcaaacaaag ggcctctgat ggtgattgtt 60
 gaatatgtga aatatgaaa tctatccaac tacctcaaga gcaaatatga cttatTTTT 120

 ctcgacaagg atgtggcatc acacatggag cgtaaagaaag aaaaaatgga gccaggcctg 180
 gaacaaggca agaaacaaa actagatagc atcaccagca gcgagagctt tgggagctcc 240
 aagtttcagg aagataaaaa tctgagtgat gttgaggaag aggaggattc tgatggtttc 300
 taccaggagc ccatcactat ggaagatctg atttcttaca gttttcaagt ggccagaggc 360

| | |
|--|------|
| atgaagtttc tgcittccag aaagtgcatt cattgggacc tggcagcaag aaacattctt | 420 |
| ttatctgaga acaatgtggt gaagatttgt gattttggcc ttgccagga tatttacaag | 480 |
| aacgccgatt atgtgagaaa aggaggtggg tctccatacc caggagtgc aatggatgag | 540 |
| | |
| cacttctgca gtigccitgag ggaaggcatg aggatgagag ctgctgagta ctccactcct | 600 |
| gaaatctatc agatcatgct ggactgcagg cacaaagacc caaaagaaag gccaagattt | 660 |
| gcagaacttg tgaaaaaact agaaaatagt gggtttacat actcaactcc tgccttctct | 720 |
| gaggacttct tcaaggaagg tatttcagct cccaagtta gttcaggaag ctctgatgat | 780 |
| gtcagatacg taaatgcttt caagtcatg agcctggaaa gaatcaaac ctttgaagaa | 840 |
| cttttgccaa atgccacctc catgtttgat gactaccagg gggacagcag cgctctgctg | 900 |
| gcctctccca tgctgaagcg cttcaccagg actgacagca aaccaaggc ctgctcaag | 960 |
| | |
| attgacttga gactaactag caaaagtaag aagtcggggc tttctgatgt cagcaggccc | 1020 |
| agtttctgcc attccaacag tgggcacatc agcaaaggca agggcaggtt cacctacgac | 1080 |
| aacgccgagc tggaaggaa gacggcgtgc tgctccccgc ccctctggga gttgtag | 1137 |
| <210> 7 | |
| <211> 5830 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 7 | |
| actgagtccc gggacccccg gagagcggtc agtgtgtggt cgctgcgttt cctctgcctg | 60 |
| cgccgggcat cacttgcgcg ccgcagaaag tccgtctggc agcctggata tcctctccta | 120 |
| ccggcacccg cagacgcccc tgcagccgcc ggtcggcgcc cgggctccct agccctgtgc | 180 |
| | |
| gtcgaactgt cctgcgtgc ggggtgccgc gatttccacc tccgcgcctc cttctctaga | 240 |
| caggcgctgg gagaagaac cggctccga gttctgggca tttcgcccgg ctcgaggcgc | 300 |
| aggatgcaga gcaaggtgct gctggccgct gccctgtggc tctgcgtgga gacccgggcc | 360 |
| gcctctgtgg gtttgcctag tgtttctctt gatctgcca ggctcagcat acaaaaagac | 420 |
| atacttaca ttaaggctaa tacaactctt caaattactt gcaggggaca gagggacttg | 480 |
| gactggcttt ggccaataa tcagagtggc agtgagcaaa ggggtggaggt gactgagtgc | 540 |
| agcgtggcc tcttctgtaa gacactcaca attccaaaag tgatcggaat tgacactgga | 600 |
| | |
| gcctacaagt gtttctaccg ggaaactgac ttggcctcgg tcatttatgt ctatgttcaa | 660 |
| gattacagat ctccatttat tgcttctgtt agtgaccaac atggagtcgt gtacattact | 720 |
| gagaacaaaa acaaaactgt ggtgattcca tgtctcgggt ccatttcaa tctcaactg | 780 |

| | |
|--|------|
| tcactttgtg caagataccc agaaaagaga ttgtttcctg atggtaacag aatttcctgg | 840 |
| gacagcaaga agggcctttac tattcccagc tacatgatca gctatgctgg catggctctc | 900 |
| tgtgaagcaa aaattaatga tgaaagttac cagtctatta tgtacatagt tgtcgttgta | 960 |
| gggtatagga tttatgatgt ggttctgagt ccgtctcatg gaattgaact atctgttgga | 1020 |
| | |
| gaaaagcttg tcttaaatg tacagcaaga actgaactaa atgtggggat tgacttcaac | 1080 |
| tggaataacc cttcttcgaa gcatcagcat aagaaacttg taaaccgaga cctaaaaacc | 1140 |
| cagtctggga gtgagatgaa gaaatTTTT agcaccttaa ctatagatgg tgtaaccggg | 1200 |
| agtgaccaag gattgtacac ctgtgcagca tccagtgggc tgatgaccaa gaagaacagc | 1260 |
| acatttgta ggggtccatga aaaacTTTT gttgcttttg gaagtggcat ggaatctctg | 1320 |
| gtggaagcca cgggtggggga gcgtgtcaga atccctgcga agtaccttgg ttaccacccc | 1380 |
| ccagaaataa aatggtataa aaatggaata cccttgagt ccaatcacac aattaaagcg | 1440 |
| | |
| gggcagtgtac tgacgattat ggaagtgagt gaaagagaca caggaaatta cactgtcatc | 1500 |
| cttaccaatc ccatttcaaa ggagaagcag agccatgtgg tctctctggt tgtgtatgtc | 1560 |
| ccacccaga ttggtgagaa atctctaata tctctgttgg attctacca gtacggcacc | 1620 |
| actcaaacgc tgacatgtac ggtctatgcc attcctcccc cgcatcacat ccactggtat | 1680 |
| tggcagttgg aggaagagtg cgccaacgag ccagccaag ctgtctcagt gacaaacca | 1740 |
| tacccttgtg aagaatggag aagtgtggag gacttcagg gaggaataa aattgaagtt | 1800 |
| aataaaaatc aatttgctct aattgaagga aaaaacaaaa ctgtaagtac cttgtttatc | 1860 |
| | |
| caagcggcaa atgtgtcagc ttgtacaaa tgtgaagcgg tcaacaaagt cgggagagga | 1920 |
| gagagggtga tctccttcca cgtgaccagg ggtcctgaaa ttactttgca acctgacatg | 1980 |
| cagcccactg agcaggagag cgtgtctttg ttgtgcactg cagacagatc tacgtttgag | 2040 |
| aacctcacat ggtacaagct tggccacag cctctgcaa tccatgtggg agagttgccc | 2100 |
| acacctgttt gcaagaactt ggatactctt tggaaattga atgccacat gttctctaat | 2160 |
| agcacaatg acattttgat catggagctt aagaatgcat ccttcagga ccaaggagac | 2220 |
| tatgtctgcc ttgctcaaga caggaagacc aagaaaagac attgcgtggt caggcagctc | 2280 |
| | |
| acagtccatg agcgtgtggc acccacgatc acaggaaacc tggagaatca gacgacaagt | 2340 |
| attggggaaa gcatcgaagt ctcatgcacg gcatctggga atccccctcc acagatcatg | 2400 |
| tggtttaaag ataatgagac cttttagaa gactcaggca ttgtattgaa ggatgggaac | 2460 |
| cggaacctca ctatccgag agtgaggaag gaggacgaag gcctctacac ctgccaggca | 2520 |
| tgcagtgttc ttggctgtgc aaaagtggag gcatttttca taatagaagg tgcccaggaa | 2580 |
| aagacgaact tggaaatcat tattctagta ggcacggcgg tgattgccat gttcttctgg | 2640 |

| | |
|--|------|
| ctacttcttg tcatcatcct acggaccgtt aagcgggcca atggaggga actgaagaca | 2700 |
| ggctacttgt ccatcgatcat ggatccagat gaactcccat tggatgaaca ttgtgaacga | 2760 |
| ctgccttatg atgccagcaa atgggaattc cccagagacc ggctgaagct aggtaagcct | 2820 |
| cttgccgtg gtgcctttgg ccaagtgatt gaagcagatg cctttggaat tgacaagaca | 2880 |
| gcaacttgca ggacagtagc agtcaaatg ttgaaagaag gagcaacaca cagttagcat | 2940 |
| cgagctctca tgtctgaact caagatcctc attcatattg gtcaccatct caatgtggtc | 3000 |
| aaccttctag gtgcctgtac caagccagga gggccactca tggatgattgt ggaattctgc | 3060 |
| aaatttggaa acctgtccac ttacctgagg agcaagagaa atgaatttgt cccctacaag | 3120 |
| accaaagggg cagattccg tcaaggaaa gactacgttg gagcaatccc tgtggatctg | 3180 |
| aaacggcgt tggacagcat caccagtagc cagagctcag ccagctctgg atttgtggag | 3240 |
| gagaagtccc tcaagtatgt agaagaagag gaagctcctg aagatctgta taaggacttc | 3300 |
| ctgaccttgg agcatctcat ctgttacagc ttccaagtgg ctaaggcat ggagtcttg | 3360 |
| gcatcgcaa agtgtatcca caggacctg gcggcacgaa atatcctctt atcggagaag | 3420 |
| aacgtggtta aaatctgtga ctttggcttg gccgggata ttataaaga tccagattat | 3480 |
| gtcagaaaag gagatgctcg cctccctttg aaatggatgg cccagaaac aatttttgac | 3540 |
| agagtgtaca caatccagag tgacgtctgg tcttttgggtg ttttctgtg ggaaatattt | 3600 |
| tccttaggtg ctctccata tcctggggta aagattgatg aagaattttg taggcgattg | 3660 |
| aaagaaggaa ctagaatgag ggccccgat tatactacac cagaaatgta ccagaccatg | 3720 |
| ctggactgct ggcacgggga gcccagtcag agaccacgt ttccagagtt ggtggaacat | 3780 |
| ttgggaaatc tcttgaagc taatgtcag caggatggca aagactacat tgttcttccg | 3840 |
| atatcagaga ctttagcat ggaagaggat tctggactct ctctgcctac ctcacctgtt | 3900 |
| tcctgtatgg aggaggagga agtatgtgac cccaaattcc attatgacaa cacagcagga | 3960 |
| atcagtcagt atctgcagaa cagtaagcga aagagccggc ctgtgagtgt aaaaacattt | 4020 |
| gaagatatcc cgttagaaga accagaagta aaagtaatcc cagatgacaa ccagacggac | 4080 |
| agtggatagg ttcttgctc agaagagctg aaaactttgg aagacagaac caaattatct | 4140 |
| ccatcttttg gtggaatgg gcccagcaaa agcaggaggt ctgtggcatc tgaaggctca | 4200 |
| aaccagacaa gcggctacca gtccggatat cactccgatg acacagacac caccgtgtac | 4260 |
| tccagttagg aagcagaact tttaaagctg atagagattg gagtgcaaac cggtagcaca | 4320 |
| gcccagattc tccagctga ctcggggacc aactgagct ctctctctgt ttaaaaggaa | 4380 |

gcattccacac cccaactccc ggacatcaca tgagaggtct gctcagattt tgaagtgttg 4440

ttctttccac cagcaggaag tagccgcatt tgattttcat ttcgacaaca gaaaaaggac 4500

ctcggactgc agggagccag tcttctaggc atatcctgga agaggcttgt gaccaagaa 4560

tgtgtctgtg tcttctccca gtgttgacct gatcctcttt tttcattcat ttaaaaagca 4620

ttatcatgcc cctgctgcgg gtctcacat gggttttagaa caaagagctt caagcaatgg 4680

ccccatcctc aaagaagtag cagtacctgg ggagctgaca cttctgtaaa actagaagat 4740

aaaccaggca acgtaagtgt tcgagggtgt gaagatggga aggatttgca gggctgagtc 4800

tatccaagag gctttgttta ggacgtgggt cccaagccaa gccttaagtg tggaattcgg 4860

attgatagaa aggaagacta acgttacctt gctttggaga gtactggagc ctgcaaatgc 4920

attgtgtttg ctctgggtga ggtgggcatt gggctctgtt tgaaatgtaa agggttcaga 4980

cggggtttct ggttttagaa ggttgcgtgt tcttcagatt gggctaaagt agagtctgtt 5040

gtgtgttttc tgactcctaa tgagagtcc ttcagaccg ttagctgtct ccttgccaag 5100

ccccaggaag aaaatgatgc agctctggct ccttgtctcc caggctgac ctttattcag 5160

aataccacaa agaaaggaca ttcagctcaa ggctccctgc cgtgtgaag agttctgact 5220

gcacaaacca gcttctggtt tcttctggaa tgaataccct catactgtc ctgatgtgat 5280

atgtctgaga ctgaatgcgg gaggttcaat gtgaagctgt gtgtggtgtc aaagtttcag 5340

gaaggatttt acccttttgt tcttccccct gtccccaacc cactctcacc ccgcaacca 5400

tcagtatttt agttatttgg cctctactcc agtaaacctg attgggtttg ttcactctct 5460

gaatgattat tagccagact tcaaaattat tttatagccc aaattataac atctattgta 5520

ttatttagac ttttaacata tagagctatt tctactgatt tttgcccttg tctgtcctt 5580

tttttcaaaa aagaaaatgt gttttttgtt tggtagcata gtgtgaaatg ctgggaacaa 5640

tgactataag acatgctatg gcacatatat ttatagtctg tttatgtaga aacaaatgta 5700

atatattaaa gccttatata taatgaactt tgtactattc acattttgta tcagtattat 5760

gtagcataac aaaggctcata atgctttcag caattgatgt cattttatta aagaacattg 5820

aaaaacttga 5830

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

tcatcacgaa gtggtgaag 19

<210> 9

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <
 400> 9
 ucaucacgaa guggugaagu u 21
 <210> 10
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 uuaguagugc uucaccacuu c 21
 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA/RNA hybrid
 <400> 11
 ucaucacgaa guggugaagt t 21
 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA/RNA hybrid
 <400> 12
 ttaguagugc uucaccacuu c 21
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 aacgtacttg cagatgtgac a 21
 <210> 14
 <211> 19

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 gtatcatggat gtctatcag 19
 <210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 tcgagaccct ggtggacat 19

 <210> 16
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 tgacgagggc ctggagtgt 19
 <210> 17
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 tgacgagggc ctggagtgt 19
 <210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 catcaccatg cagattatg 19
 <210> 19
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

| | |
|----------------------|----|
| acctcaccaa ggccagcac | 19 |
| <210> 20 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 20 | |
| ggccagcaca taggagaga | 19 |
| <210> 21 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 21 | |
| caaatgtgaa tgcagacca | 19 |
| <210> 22 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 22 | |
| atgtgaatgc agaccaaag | 19 |
| <210> 23 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 23 | |
| tgcagaccaa agaaagata | 19 |
| <210> 24 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 24 | |
| agaaagatag agcaagaca | 19 |
| <210> 25 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |

<213> Homo sapiens
 <400> 25
 gaaagataga gcaagacaa 19
 <210> 26
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 26

 gatagagcaa gacaagaaa 19
 <210> 27
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 gacaagaaaa tcctgtgg 19
 <210> 28
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 gaaaatccct gtgggcctt 19
 <210> 29
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 aatccctgtg ggccttgct 19

 <210> 30
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 tcctgtggg ccttgctca 19

<210> 31
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 gcatttggtt gtacaagat 19
 <210> 32
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 gatccgcaga cgtgtaaat 19
 <210> 33
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 33

 atgttcctgc aaaaacaca 19
 <210> 34
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 tgttcctgca aaaacacag 19
 <210> 35
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 aaacacagac tcgcgttgc 19
 <210> 36
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

| | |
|----------------------|----|
| <400> 36 | |
| aacacagact cgcttgca | 19 |
| <210> 37 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 37 | |
| acacagactc gcgttgcaa | 19 |
| <210> 38 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 38 | |
| cacagactcg cgttgcaag | 19 |
| <210> 39 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 39 | |
| ggcgaggcag cttgagtta | 19 |
| <210> 40 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 40 | |
| acgaacgtac ttgcagatg | 19 |
| <210> 41 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 41 | |
| cgaacgtact tgcagatgt | 19 |
| <210> 42 | |

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 42
 cgtacttgca gatgtgaca 19
 <210> 43
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 gtggtcccag gctgcaccc 19

 <210> 44
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 44
 ggaggagggc agaatcatc 19
 <210> 45
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 45
 gtggtgaagt tcatggatg 19
 <210> 46
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 aatcatcacg aagtggtgaa g 21
 <210> 47
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 47

aagttcatgg atgtctatca g

21

<210> 48

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

aatcgagacc ctggtggaca t

21

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

aatgacgagg gcctggagtg t

21

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

aacatcacca tgcagattat g

21

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

aaacctcacc aaggccagca c

21

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

aaggccagca cataggagag a

21

<210> 53

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 53
 aacaaatgtg aatgcagacc a 21
 <210> 54
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 54

 aaatgtgaat gcagaccaa g 21
 <210> 55
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 55
 aatgcagacc aaagaaagat a 21
 <210> 56
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 56
 aaagaaagat agagcaagac a 21
 <210> 57
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 57
 aagaaagata gagcaagaca a 21

 <210> 58
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 58
aagatagagc aagacaagaa aat 23
<210> 59
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 59
aagacaagaa aatccctgtg ggc 23
<210> 60
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 60
aagaaaatcc ctgtgggcct tgc 23
<210> 61
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 61

aatccctgtg ggccttgetc aga 23
<210> 62
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 62
aagcatttgt ttgtacaaga tcc 23
<210> 63
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 63
aagatccgca gacgtgtaaa tgt 23
<210> 64
<211> 23

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 64
 aaatgttcct gcaaaaacac aga 23

 <210> 65
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 65
 aatgttcctg caaaaacaca gac 23

 <210> 66
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 66
 aaaaacacag actcgcgttg caa 23

 <210> 67
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 67
 aaaacacaga ctgcggttg aag 23

 <210> 68
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 68

 aaacacagac tcgcggttgca agg 23

 <210> 69
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 69

aacacagact cgcgttgcaa ggc 23

<210> 70

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 70

aaggcgaggc agcttgagtt aaa 23

<210> 71

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 71

aaacgaacgt acttcagat gtg 23

<210> 72

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 72

aacgaacgta cttgcagatg tga 23

<210> 73

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 73

aagtgtccc aggctgcacc cat 23

<210> 74

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 74

aaggaggagg gcagaatcat cac 23

<210> 75

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 75

aagtggtgaa gttcatggat gtc

23

<210> 76

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 76

aaaatccctg tgggccttgc tca

23

<210> 77

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA/RNA hybrid

<400> 77

accucaccaa ggccagcact t

21

<210> 78

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA/RNA hybrid

<400> 78

gugcuggccu uggugaggut t

21

<210> 79

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 79

ggctacgtcc agcgacc

18

<210> 80

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 80
aaaccucacc aaagccagca c 21
<210> 81
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 81
aaggaggagg gcagaatcat c 21
<210> 82
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 82
aatgtgaatg cagaccaaag a 21
<210> 83
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 83
aaagcatttg tttgtacaag a 21
<210> 84
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 84
aagatccgca gacgtgtaaa t 21
<210> 85
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 85
aaacacacac tcgcgttgca a 21
<210> 86

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 86
 aacgtacttg cagatgtga 19
 <210> 87
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 87
 acgtacttgc agatgtgac 19
 <210> 88
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 88
 gtacttgcag atgtgacaa 19

 <210> 89
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 89
 tacttgcaga tgtgacaag 19
 <210> 90
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 90
 acttgcagat gtgacaagc 19
 <210> 91
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 91

| | |
|----------------------|----|
| cttgcagatg tgacaagcc | 19 |
| <210> 92 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 92 | |
| ttgcagatgt gacaagccg | 19 |
| <210> 93 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 93 | |
| tgcagatgtg acaagccga | 19 |
| <210> 94 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 94 | |
| gcagatgtga caagccgag | 19 |
| <210> 95 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 95 | |
| cagatgtgac aagccgagg | 19 |
| <210> 96 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 96 | |
| agatgtgaca agccgaggc | 19 |
| <210> 97 | |
| <211> 19 | |

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 97
 gatgtgacaa gccgaggcgc 19
 <210> 98
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 98
 atgtgacaag ccgaggcgg 19
 <210> 99
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 99

 gtacttgcag atgtgacaa 19
 <210> 100
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 100
 tgcagatgtg acaagccga 19
 <210> 101
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 101
 gcagatgtga caagccgag 19
 <210> 102
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 102

| | |
|----------------------|----|
| agatgtgaca agccgaggc | 19 |
| <210> 103 | |
| <211> 17 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 103 | |
| aacgtacttg cagatgt | 17 |
| <210> 104 | |
| <211> 17 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 104 | |
| acgtacttgc agatgtg | 17 |
| <210> 105 | |
| <211> 17 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 105 | |
| cgtacttgca gatgtga | 17 |
| <210> 106 | |
| <211> 17 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> | |
| > 106 | |
| gtacttgcag atgtgac | 17 |
| <210> 107 | |
| <211> 17 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 107 | |
| tacttgcaga tgtgaca | 17 |
| <210> 108 | |
| <211> 17 | |

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 108
 acttgcagat gtgacaa 17
 <210> 109
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 109
 cttgcagatg tgacaag 17

 <210> 110
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 110
 ttgcagatgt gacaagc 17
 <210> 111
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 111
 tgcagatgtg acaagcc 17
 <210> 112
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 112
 gcagatgtga caagccg 17
 <210> 113
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400>
 > 113

| | |
|--------------------|----|
| cagatgtgac aagccga | 17 |
| <210> 114 | |
| <211> 17 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 114 | |
| agatgtgaca agccgag | 17 |
| <210> 115 | |
| <211> 17 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 115 | |
| gatgtgacaa gccgagg | 17 |
| <210> 116 | |
| <211> 17 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 116 | |
| atgtgacaag ccgaggc | 17 |
| <210> 117 | |
| <211> 17 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 117 | |
| tgtgacaagc cgaggcg | 17 |
| <210> 118 | |
| <211> 17 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 118 | |
| gtgacaagcc gaggcgg | 17 |
| <210> 119 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |

<213> Homo sapiens
 <400> 119
 ggcttgtcac atttttcttg 20
 <210> 120
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400>
 > 120
 cccacagggga ttttcttgtc 20
 <210> 121
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 121
 ctttcccttt cctcgaactg 20
 <210> 122
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 122
 gctactgccca tccaatcgag 20
 <210> 123
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 123
 gtctttcctg gtgagagatc 20

 <210> 124
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 124
 ctgtcttggg tgcattggag 20

| | | |
|-------|-----------------------|----|
| <210> | 125 | |
| <211> | 20 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Homo sapiens | |
| <400> | 125 | |
| | gaggcaggga tgatgttctg | 20 |
| <210> | 126 | |
| <211> | 20 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Homo sapiens | |
| <400> | 126 | |
| | catggcaaat tccatggcac | 20 |