



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년07월28일
 (11) 등록번호 10-1762734
 (24) 등록일자 2017년07월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12N 15/113 (2010.01) A61K 48/00 (2006.01)
 C07H 21/00 (2006.01)
 - (21) 출원번호 10-2011-7006585
 - (22) 출원일자(국제) 2009년08월25일
 심사청구일자 2014년07월24일
 - (85) 번역문제출일자 2011년03월22일
 - (65) 공개번호 10-2011-0081154
 - (43) 공개일자 2011년07월13일
 - (86) 국제출원번호 PCT/US2009/054973
 - (87) 국제공개번호 WO 2010/042281
 국제공개일자 2010년04월15일
 - (30) 우선권주장
 61/190,121 2008년08월25일 미국(US)
 - (56) 선행기술조사문헌
 US20030144223 A1*
 (뒷면에 계속)
- 전체 청구항 수 : 총 38 항

- (73) 특허권자
 엑스칼리아드 파마슈티컬즈, 인코포레이티드
 미국 10017 뉴욕 뉴욕 이스트 42번 스트리트 235
 아이오니스 파마슈티컬즈, 인코포레이티드
 미합중국 캘리포니아주 92010 칼스바드 2855 가젤
 코트
- (72) 발명자
 단, 니콜라스, 엠.
 미국 캘리포니아 92024 엔시니타스 위스퍼 윈드
 레인 2110
 폴케스, 제이. 고든
 미국 캘리포니아 92024 엔시니타스 브랜드 크레스
 트 3756
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 특허법인아주

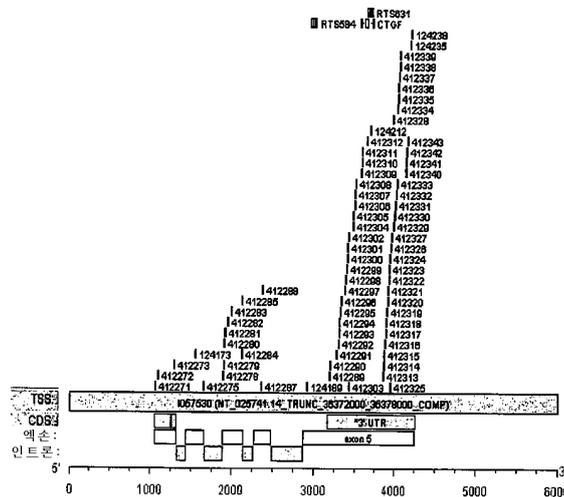
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **결합 조직 성장 인자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 그의 용도**

(57) 요약

본 발명은 결합 조직 성장 인자의 발현을 저해할 수 있는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물과, 이를 포함하는 조성물과, 이러한 화합물을 이용한 과증식 질환과 섬유증의 치료 방법 및 상처 치유에 따른 반흔 감소 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

오도넬, 닐

미국 미주리 63105 세인트 루이스 아파트먼트 19이
린텔 블러버드 4400

베네트, 썬. 프랭크

미국 캘리포니아 92009 칼즈배드 캐신스 스트리트
1347

프라이어, 수잔 엠.

미국 캘리포니아 92122 샌디에고 르널트 스트리트
2946

(56) 선행기술조사문헌

W02003053340 A2

Jpn J Ophthalmol. 2008 Jan-Feb;52(1):8-15

Arthritis Rheum. 2006 Dec;54(12):3859-67

Curr Diab Rep. 2003 Dec;3(6):485-90

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

12개 내지 30개의 결합된 뉴클레오사이드로 구성되고, 적어도 12개의 핵산염기(nucleobase) 서열 부분이 서열 번호 9의 뉴클레오타이드 1388-1423, 1394-1423, 및 1399-1423으로부터 선택되는 영역 내에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적인, 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물로서,

상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는

- (a) 결합된 데옥시뉴클레오사이드로 구성되는 겹 세그먼트;
- (b) 결합된 변형 뉴클레오사이드로 구성되는 5' 윙 세그먼트; 및
- (c) 결합된 변형 뉴클레오사이드로 구성되는 3' 윙 세그먼트를 포함하고,

상기 겹 세그먼트는 5' 윙 세그먼트와 3' 윙 세그먼트 사이에 위치하며, 각 윙 세그먼트 내의 각 변형된 뉴클레오사이드는 변형된 당을 포함하는 것인, 화합물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 적어도 12개의 핵산염기 서열 부분은 상기 영역 1399-1423 내에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적인, 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 적어도 12개의 핵산염기 서열 부분은 상기 영역 1388-1423 내에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적인, 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 적어도 12개의 핵산염기 서열 부분은 상기 영역 1394-1423 내에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적인, 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서, 12개 내지 30개의 결합된 뉴클레오사이드로 구성되고, 적어도 12개의 핵산염기(nucleobase) 서열 부분이 서열 번호 37, 38, 39, 40 및 166에 기재된 핵산염기 서열 중 어느 하나의 서열 내에 존재하는, 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 적어도 12개의 핵산염기 서열 부분은 서열번호 39에 기재된 핵산염기 서열 내에 존재하는, 화합물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 20개의 결합된 뉴클레오사이드로 구성되는 것인 화합물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 14개의 결합된 뉴클레오사이드를 포함하는 것인 화합물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드인 것인 화합물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드인 것인 화합물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 37, 38, 39, 40 및 166에 기재된 서열 중 하나의 일부와 그 길이가 100% 동일한 서열을 갖는 것인 화합물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 39에 기재된 서열 일부와 그 길이가 100% 동일한 서열을 갖는 것인 화합물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오사이드간 결합을 포함하고, 상기 적어도 하나의 변형된 뉴클레오사이드간 결합은 포스포티오에이트 뉴클레오사이드간 결합인, 화합물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 뉴클레오사이드 간 결합은 모두 포스포티오에이트 뉴클레오사이드간 결합인 것인 화합물.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 당은 바이사이클릭 당인 것인 화합물.

청구항 16

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 당 중 적어도 하나는 2'-O-메톡시에틸 당인 것인 화합물.

청구항 17

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 테트라하이드로피란 고리가 푸라노스 고리를 대신하는 적어도 하나의 테트라하이드로피란 변형된 뉴클레오사이드를 포함하는 화합물.

청구항 18

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형된 뉴클레오사이드는 변형된 핵산염기를 포함하고, 상기 변형된 핵산염기는 5-메틸시토신인 것인 화합물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 핵산염기 서열 내의 각 시토신은 5-메틸시토신인 것인 화합물.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는

- (a) 13개의 결합된 데옥시뉴클레오사이드로 구성된 꺾 세그먼트;
- (b) 2개의 결합된 변형 뉴클레오사이드로 구성된 5' 윙 세그먼트; 및
- (c) 5개의 결합된 변형 뉴클레오사이드로 구성된 3' 윙 세그먼트를 포함하고,

상기 꺾 세그먼트는 5' 윙 세그먼트와 3' 윙 세그먼트 사이에 위치하고, 각 윙 세그먼트 내 각 변형된 뉴클레오사이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고, 각 뉴클레오사이드간 결합은 포스포티오에이트 결합인, 화합물.

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 20개의 결합된 뉴클레오타이드로 구성된 것인 화합물.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 핵산염기 서열은 서열 번호 39에 기재된 서열인 것인 화합물.

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 핵산염기 서열은 서열 번호 40에 기재된 서열인 것인 화합물.

청구항 24

제1항에 있어서, 상기 핵산염기 서열은 서열 번호 37에 기재된 서열인 것인 화합물.

청구항 25

제1항에 있어서, 상기 핵산염기 서열은 서열 번호 38에 기재된 서열인 것인 화합물.

청구항 26

제1항에 있어서, 상기 핵산염기 서열은 서열 번호 166에 기재된 서열인 것인 화합물.

청구항 27

서열 번호 39에 기재된 핵산염기 서열을 가지는 20개의 결합된 뉴클레오타이드로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물로서,

상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는

- (a) 13개의 결합된 데옥시뉴클레오타이드로 구성되는 겹 세그먼트;
- (b) 2개의 결합된 변형 뉴클레오타이드로 구성되는 5' 윙 세그먼트; 및
- (c) 5개의 결합된 변형 뉴클레오타이드로 구성되는 3' 윙 세그먼트를 포함하고,

상기 겹 세그먼트는 5' 윙 세그먼트와 3' 윙 세그먼트 사이에 위치하며, 각 윙 세그먼트 내의 각 변형된 뉴클레오타이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고,

각 뉴클레오타이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이며,

각 시토신 핵산염기는 5-메틸시토신인, 화합물.

청구항 28

적어도 12개의 결합된 뉴클레오타이드를 포함하고, 이의 핵산염기 서열이 서열 번호 37, 38, 39, 40 및 166 중 어느 하나에 기재된 핵산염기 서열 내에 존재하는, 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물로서,

상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는

- (a) 결합된 데옥시뉴클레오타이드로 구성되는 겹 세그먼트;
- (b) 결합된 변형 뉴클레오타이드로 구성되는 5' 윙 세그먼트; 및
- (c) 결합된 변형 뉴클레오타이드로 구성되는 3' 윙 세그먼트를 포함하고,

상기 겹 세그먼트는 5' 윙 세그먼트와 3' 윙 세그먼트 사이에 위치하며, 각 윙 세그먼트 내의 각 변형된 뉴클레오타이드는 변형된 당을 포함하는 것인, 화합물.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 핵산염기 서열은 서열 번호 39에 기재된 것인, 화합물.

청구항 30

서열 번호 39의 뉴클레오타이드 서열로 구성되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드로서, 상기 안티센스 올리고뉴

클레오타이드는 5'에서 3' 방향으로, 2 뉴클레오타이드로 구성되는 5' 텀 세그먼트, 13 뉴클레오타이드로 구성되는 겹 세그먼트 및 5 뉴클레오타이드로 구성되는 3' 텀 세그먼트를 가지는 것을 추가적인 특징으로 하되, 상기 5' 및 3' 텀 세그먼트의 각 뉴클레오타이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고, 상기 겹 세그먼트의 각 뉴클레오타이드는 데옥시리보오스 당을 포함하며, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 각 시토신 염기는 5-메틸시토신이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 각 뉴클레오타이드 사이의 뉴클레오타이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합인, 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 31

인체 혹은 개체로부터 분리한 세포 또는 조직에서 결합 조직 성장 인자의 발현을 저해하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 세포 또는 조직을 결합 조직 성장 인자 발현이 저해되는 조건하에 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제30항의 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 32

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제30항의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 과증식성 장애를 지닌 동물을 치료하기 위한 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 과증식성 장애는 암인 조성물.

청구항 34

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제30항의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 섬유증을 가지는 동물을 치료하기 위한 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 섬유증은 비대성 반흔, 켈로이드, 피부 반흔, 간 섬유증, 폐 섬유증, 신장 섬유증, 심장 섬유증 또는 재협착인 조성물.

청구항 36

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제30항의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 오십견 증후군, 힘줄 및 말초신경 손상을 포함하는 관절 섬유증 척수 손상, 관상동맥 바이패스, 자궁내막증, 자궁근종 및 유섬유종을 포함하는 복막 및 복근 유착, 방사상 각막절개 및 각막절제, 망막 재부착 수술, 당뇨병을 포함하는 장치 매개 섬유증, 건 유착, 듀피트렌 구축(Dupuytren contracture) 및 경피증으로부터 선택되는 질환이나 장애를 치료하기 위한 조성물.

청구항 37

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제30항의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 개체의 상처 치유에 기인하는 반흔을 감소시키기 위한 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 상처 치유는 피부 파손, 수술 절개 및 화상으로 구성되는 군으로부터 선택되는 상처에서의 치유인 것인, 조성물.

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 과증식성 질환과 섬유증의 치료와 상처 치유에 따른 반흔 감소에 유용한 신규 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide: ASO)에 관한 것이다.
- [0002] 본 원에서는 특정 특허와 저자, 학술지 인용 및 발행일에 의한 간행물이 인용된다. 이들 특허와 간행물의 기술 내용은 본 발명과 관련되는 기술 분야를 충분히 설명하기 위해 본 원에 참조 문헌으로 편입된다.

배경 기술

- [0003] 안티센스 기술은 특정 유전자 생성물의 발현을 감소하는 데 효과적인 수단으로 부각되어 결합 조직 성장 인자(connective tissue growth factor: CTGF) 발현을 조절하기 위한 다양한 치료, 진단 및 연구 용도에 특히 유용한 것으로 증명되었다(미국 특허 6,965,025 B2, Gaarde 등 참조).
- [0004] 안티센스 화합물은 표적 핵산(예컨대, 표적 mRNA 분자)과 혼성화를 수행할 수 있는 올리고머 화합물이다.
- [0005] CTGF 발현을 조절하고 CTGF 관련 질환 치료하는 안티센스 화합물, 조성물 및 방법은 본 원에 참조 문헌으로 편입되는 상기 미국 특허 제6,965,025 B2호에 개시된다. 그러나, CTGF 발현의 저해와 기능이 향상될 뿐 아니라 기타 이점을 부여할 수 있는 화합물이 여전히 필요하다.
- [0006] 일 실시예에 있어서, 본 발명은 구체적으로 CTGF 발현을 저해하는 변형된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 이들은 예기치 않게도 앞서 기술한 CTGF를 표적하는 ASO보다 매우 강력한 것으로 입증되었다.
- [0007] 결합 조직 성장 인자(CTGF; ctgrogact, 섬유아세포 분비 유도성 단백질, fisp-12, NOV2, 인슐린 유사 성장 인자-결합 단백질-관련 단백질 2, IGFBP-rP2, IGFBP-8, HbGF-0.8, Hcs24, 및 에코제닌(ecogenin)으로도 알려져 있음)는 확인된 최초 구성원의 이름을 따서 지은 CCN(CTGF/CYR61/NOV) 모듈러 단백질류, 결합 조직 성장 인자, 시스테인-리치(CYR61) 및 신아세포종 과발현(nephroblastoma overexpressed: NOV)의 구성원이지만, 이러한 류는 단백질 ELM-1(전이성이 낮은 세포에서 발현), WISP-3(Wnt-1-유도 분비 단백질)과 COP-1(WISP-2)도 포함한다. CCN 단백질은 접착, 이동, 유사분열, 분화, 생존, 혈관형성, 아테롬성 동맥 경화증, 연골 형성, 상처 치유, 종양 형성 및 관다발병 및 경피증 유사 섬유증 등 세포 과정을 조절하는 분비성 세포 외 기질 결합 단백질인 것으로 밝혀져 있다(Lau and Lam, Exp. Cell Res., 1999, 248, 44-57). 결합 조직 성장 인자 단백질은 DNA 합성을 자극하고 섬유아세포의 주화성을 촉진하는 것으로 나타났다(Bradham et al., J. Cell Biol., 1991, 114, 1285-1294).
- [0008] 대부분의 경우, 발현 연구에 하나의 2.4-킬로베이스 CTGF 전사체가 보고되었으나, 교아세포종 세포에 3.5- 및 7-킬로베이스 전사체가 보고되었다. 수정 후 배아형성과 자궁 탈락막화 등 세포 외 기질(extracellular matrix: ECM) 생성과 리모델링을 수반하는 정상적인 분화 과정에서 결합 조직 성장 인자는 섬유아세포에 발현된다. 결합 조직 성장 인자는 흔히 전진성 경화증, 국부성 피부 경화증, 켈로이드, 반흔 조직, 호산성 근막염, 결절성 근막염 및 듀피트렌 구축(Dupuytren's contracture) 등 섬유성 피부 질환에서 과발현된다. 결합 조직 성장 인자 mRNA 또는 단백질 수준은 간, 신장, 폐, 심혈관계, 췌장, 장, 눈 및 잇몸을 포함하는 주요 기관과 조직의 섬유성 병변에서 상승한다. 결합 조직이 상당히 개입되는 특성이 있는 포유류의 이자와 섬유조직 종양에서, 결합 조직 성장 인자는 스트로마 구획(stromal compartment)에서 과발현된다. 많은 경우에 있어, 결합 조직 성장 인자 발현은 섬유발생 전단계 사이토카인 전환 성장 인자-베타(transforming growth factor-beta: TGF-β)와 공간적 이면서 일시적으로 관련된다(Moussad and Brigstock, Mol. Genet. Metab., 2000, 71, 276-292).
- [0009] 결합 조직 성장 인자는 c-myc 유전자에 인접한 사람 염색체 영역 6q23.1과 맵핑되고 이 영역을 수반하는 염색체 이상성은 Wilms 종양 등 사람 종양과 관련된다(Martinierie et al., Oncogene, 1992, 7, 2529-2534).
- [0010] 상당한 섬유 및 혈관 성분을 지니는 종양은 CTGF 발현 증가를 나타냈고 CTGF는 소아 근섬유아세포 종양의 발병 경로와 관련될 수 있다. 조사된 12개의 소아 종양 모두는 관련 맥관 구조의 종양 세포 및/또는 내피 세포에서 CTGF의 보통 내지 강한 발현을 나타낸다(Kasaragod et al., Pediatr. Dev. Pathol., 2001, 4, 37-45).
- [0011] 결합 조직 성장 인자 mRNA는 급성 림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia: ALL) 소아의 악성 사람 백혈병 림프구에 특이적으로 상승조절되고(Vorwerk et al., Br. J. Cancer, 2000, 83, 756-760), mRNA 및 단백질 수준은 투여 의존형 방법으로 Hs578T 사람 유방암 세포의 TGF-베타에 의해 상승조절되며, 이는 CTGF가 TGF-베타

의 중요한 신경내분비 인자이고 결정적인 하위 영향기(downstream effector)임을 나타낸다(Yang et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 1998, 83, 2593-2596).

- [0012] 쥐의 폐 섬유증 모델에서, 결합 조직 성장 인자 mRNA 발현 증가는 알려진 폐 섬유형성제인 블레오마이신에 의해 유도될 뿐 아니라(Lasky et al., Am. J. Physiol., 1998, 275, L365-371), 건강한 비흡연 대조군 개체에 비해서 특발성 폐 섬유증과 폐우육증증 환자의 기관지폐포 세척 세포에서도 마찬가지이다. 이는 결합 조직 성장 인자가 손상에 대한 섬유증식 반응과 관련됨을 말해준다(Allen et al., Am. J. Respir. Cell Moll. Biol., 1999, 21, 693-700). 마찬가지로, 증식성 사구체신염 실험 모델에서, 결합 조직 성장 인자 mRNA 발현은 모세혈관의 및 혈관간 증식 병변과 사구체주위 섬유증 영역에서 매우 증가하였다. 초기 사구체 결합 조직 성장 인자 과발현은 TGF-베타 단백질의 현저한 상승조절과 동시에 일어나며, 결합 조직 성장 인자 발현의 동역학은 이러한 일시적인 신장 손상 모델에서 TGF-베타의 하위(downstream)일 수 있는 사구체 회복 역할을 강력하게 제안한다(Ito et al., J. Am. Soc. Nephrol., 2001, 12, 472-484).
- [0013] 미국 특허 제5,876,730호는 결합 조직 성장 인자(CTGF) 단백질의 카복시 말단 아미노산에 대응하는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 실질적으로 순수하거나 분리된 폴리펩티드로서, 결합 조직 성장 인자의 N-말단 아미노산의 잔부 247 또는 248로 시작하는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드와, 결합 조직 성장 인자 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드 서열과, 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 발현 벡터와, 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포와, 약제학상 허용되는 담체에 치료에 효과적인 양의 결합 조직 성장 인자 폴리펩티드를 포함하는 약제 조성물을 개시 및 특허 청구한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 개괄적으로 개시된다(Brigstock and Harding, 1999).
- [0014] 미국 특허 5,783,187; 5,585,270; 6,232,064; 6,150,101; 6,069,006 및 PCT 공개 WO 00/35936은 결합 조직 성장 인자 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드, 발현 벡터, 발현 벡터로 안정하게 형질변형이나 형질감염되는 숙주 세포; 결합 조직 성장 인자 상위(upstream)에서 분리된 5' 번역되지 않은 조절 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드(여기서, 번역되지 않은 조절 뉴클레오타이드 서열은 전사 및 번역 개시 영역을 포함하고, 서열은 TGF-베타 반응 요소이다); 결합 조직 성장 인자(CTGF) 유전자 상위에서 분리된 비암호화 조절 서열을 포함하는 분리된 핵산 구조체(여기서, 비암호화 조절 서열은 대상 단백질이나 안티센스 RNA를 발현하는 핵산 서열과 사용가능하게 관련되고, 핵산 서열은 비암호화 서열과 이질적이다); ECM 합성, 콜라겐 합성 및/또는 근섬유아세포 분화를 유도할 수 있고 폴리펩티드의 적어도 엑손 2 또는 엑손 3에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하는 결합 조직 성장 인자(CTGF) 폴리펩티드 부분을 개시 및 특허청구한다. 또한, TGF-베타 유도 결합 조직 성장 인자 발현에 영향을 미치는 조성물을 분별하는 방법과, 섬유증 및 아테롬성 동맥 경화증으로 구성되는 군으로부터 선택되는 병리가 예측되는 개체에서 병리적 상태를 진단하는 방법으로서 결합 조직 성장 인자를 포함하는 것으로 예상되는 시료를 취득하여 정상 표준 시료 중 결합 조직 성장 인자 수준에 대한 개체 시료 중 결합 조직 성장 인자 수준의 차를 검출함으로써 개체의 결합 조직 성장 인자와 관련된 세포 증식성 질환을 특징으로 하는 병리를 진단하는 방법이 청구된다. 또한, 질병에 걸린 개체에 결합 조직 성장 인자와 결합하지만, PDGF와는 결합하지 않는 항체 또는 이들의 분획물의 치료에 효과적인 양을 포함하는 조성물을 투여하여 결합 조직 성장 인자 관련세포 증식성 질환을 치료하는 방법이 청구된다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 개괄적으로 개시된다(Grotendorst, 2000; Grotendorst and Bradham, 2001; Grotendorst and Bradham, 2000; Grotendorst and Bradham, 1996; Grotendorst and Bradham, 1998; Grotendorst and Bradham, 2000).
- [0015] PCT 공개 WO 00/27868은 실질적으로 순수한 결합 조직 성장 인자 폴리펩티드 또는 이들의 기능성 단편과, 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드 서열(여기서, T는 U일 수 있음)과, 폴리뉴클레오타이드 서열에 상보적인 핵산 서열, 및 염기수 길이가 적어도 15이고 중간 엄격 조건 내지 고 엄격 조건하에 결합 조직 성장 인자 단백질의 아미노산 서열을 암호화하는 DNA와 혼성화할 수 있는 서열 단편을 개시 및 특허 청구한다. 또한, 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터, 벡터와 안정하게 형질변환되는 숙주 세포, 폴리펩티드와 결합하는 항체, 및 폴리펩티드 제조 방법이 개시된다. 또한, 세포를 세포에서 표적 핵산과 결합하는 폴리뉴클레오타이드와 접촉시키는 세포 내 결합 조직 성장 인자의 발현 저해 방법으로서, 폴리뉴클레오타이드는 세포 내 결합 조직 성장 인자 발현을 저해하고 폴리뉴클레오타이드는 안티센스 폴리뉴클레오타이드인 방법과, 하나 이상의 컨테이너를 수용할 수 있도록 분획된 담체 수단을 포함하는 결합 조직 성장 인자 발현의 검출 키트로서, 적어도 하나의 컨테이너는 결합 조직 성장 인자와 결합하는 적어도 하나의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 키트가 청구된다(Schmidt et al., 2000).
- [0016] PCT 공개 WO 00/13706은 결합 조직 성장 인자 또는 이들의 단편의 발현이나 활성을 조정, 조절 또는 저해하는 항체, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 소분자인 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포

합하는 섬유증의 치료 또는 예방 방법을 개시 및 특허청구한다. 본 방법은 신장 섬유증 관련 신장 질환, 특히, 당뇨병과 고혈압 관련 합병증의 치료와 관련된다(Riser and Denichili, 2000).

- [0017] PCT 공개 WO 01/29217은 NOV1, NOV2(결합 조직 성장 인자) 및 NOV3을 포함하는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 상기 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 미성숙 형태나 변형물을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자뿐만 아니라, 상기 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드와 상기 폴리펩티드의 미성숙 형태나 변형물을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자를 포함하는 핵산 분자와 상기 핵산 분자의 보체를 개시하고 특허 청구한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 전반적으로 기술된다(Prayaga et al., 2001).
- [0018] 비대성 반흔 형성은 특히 심각한 화상의 해결에 있어 중요한 임상 문제이고 영구적인 기능 상실과 외모 손상의 오점을 초래하는 심각한 흉터를 남긴다. 매년, 미국에서는 약 백만 명이 화상 치료를 필요로 한다. 화상 후 비대성 반흔의 발생은 엄청난 규모의 문제를 야기하는 일반적인 결과이다. 이에 따라, 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO) 등 CTGF 저해제는 화상에 따른 비대성 반흔의 심각성을 방지하는 데 매우 효과적이어야 한다. 이러한 활성은 제형화된 ASO를 국소 투여하고 화상 발생 후 성장한 반흔의 심각성을 관찰하여 평가될 수 있다.
- [0019] CTGF는 여러 이유 때문에 비대성 반흔을 조정하는 매력적인 표적일 수 있다. 특히, TGF-β1 또는 TGF-β2는 반흔 형성에 관련이 없는 분화다능 효과를 지니기 때문에, TGF-β1 또는 TGF-β2의 상호인자와 하위 매개체인 CTGF는 반흔을 대상으로 하는 유전자-유도 분자 치료를 위한 TGF-β1 또는 TGF-β2보다 특이적인 표적성을 나타낸다. 또한, CTGF는 항-TGF-β1 또는 TGF-β2 전략에는 무시되는 TGF-β1 또는 TGF-β2과는 무관한 섬유성 표현형 유지 기능을 지닌다. 복수의 기관계와 경피증 등 만성 피부 질환에서 섬유증을 증강하는 CTGF 역할의 이해가 진전됨에도 불구하고, 급성 흉터에서의 CTGF 역할과 상처 치유는 상당히 관찰되었다.
- [0020] 통상적으로, 지금까지 결합 조직 성장 인자의 합성을 효과적으로 저해하는 치료제는 알려진 바 없으며, 결합 조직 성장 인자 기능 조절을 목적으로 하는 연구 전략은 뷰티르산나트륨(NaB), 기능 방지 항체와 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 이용을 수반한다.
- [0021] 식습관 요인은 유방 암종 등 사람 암의 성장과 예방에 중요한 역할을 하는 것으로 믿고 있다. 음식 미세영양소인 NaB은 음식물 전분과 섬유소의 소화의 주요한 최종 생성물이고 많은 생체 외 세포 종류의 세포 분화를 개시하는 강력한 성장 저해제이다. NaB는 포유류의 내피 세포에서 히스톤 데아세틸라제 저해제 일부로서 생물학적 효과를 발휘하고, Hs578T 에스트로겐 비 반응성 사람 유방암 세포에서 아포토시스 세포 사멸을 유도하고, 세포형에 따라 세포 주기 정지와 관련되는 다양한 유전자를 활성화할 수 있다. NaB는 투약 의존 방법으로 결합 조직 성장 인자의 발현을 특이적으로 상승조절하고, 암성 및 비암성 포유류 세포에서 mRNA 및 단백질 증가를 촉진한다(Tsubaki et al., J. Endocrinol., 2001, 169, 97-110).
- [0022] TGF-베타는 형질변형 세포의 특성으로서 연결 한천 내 정상 섬유아세포의 성장을 자극하는 독특한 특성이 있다. 결합 조직 성장 인자는 정착-비의존성 성장 정상 래트 신장(normal rat kidney: NRK) 섬유아세포를 유도할 수 없지만, 결합 조직 성장 인자 합성과 작용은 TGF-베타-유도 정착 비의존에 필요하다. 결합 조직 성장 인자에 대한 항체는 특이적으로 TGF-베타-유도 정착 비의존성 성장을 방지하고, 안티센스 성향으로 결합 조직 성장 인자를 발현하는 구조체로 형질변형된 NRK 섬유아세포는 정착-비의존 성장 분석에서 TGF-베타에 반응하지 않았다(Kothapalli et al., Cell Growth. Differ., 1997, 8, 61-68). 이들 CTGF-안티센스 발현 NRK 세포는 TGF-베타-자극 콜라겐 합성이 결합 조직 성장 인자에 의해 매개되는 것을 입증하는 데 이용되었고, 이는 결합 조직 성장 인자가 항섬유 치료에 유용한 표적일 수 있음을 말해준다(Duncan et al., Faseb J., 1999, 13, 1774-1786).
- [0023] 사람 결합 조직 성장 인자 cDNA의 3'-번역되지 않은 영역(untranslated region: UTR)은 조절 요소에 일치하는 서열을 지닌다. 3'-UTR은 레포터 유전자의 하위 융합될 때, 강력한 시스-작용 저해 요소로 작용하는 것으로 밝혀졌고, 안티센스 3'-UTR은 유사하지만 강력한 효과를 지닌다(Kubota et al., FEBS Lett., 1999, 450, 84-88). 사람과 마우스 결합 조직 성장 인자 3'-UTR를 비교하여 91개 염기의 작은 단편이 보존됨을 확인하였다. 이 영역은 NIH3T3 마우스 섬유아세포를 RT-PCR하여 증폭되고 이의 저해 효과를 분석하기 위해 키메라 융합 구조체를 형성하는 데 이용되었다. 센스 또는 안티센스 성향의 마우스 결합 조직 성장 인자 3'-UTR는 레포터 유전자의 전사에 강력한 저해 효과를 나타내며, 이는 이러한 조절 요소가 성향에 비의존적임을 말해준다(Kondo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, 278, 119-124).
- [0024] 16개의 뉴클레오타이드 길이를 갖고 번역 초기 개시 부위에 표적화된 포스포로티오에이트 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 결합 조직 성장 인자 발현을 저해하고 배양 중 소 대동맥 내피세포의 증식과 이동을 저지하는 데

이용된다(Shimo et al., J. Biochem. (Tokyo), 1998, 124, 130-140). 이러한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 결합 조직 성장 인자가 MCF-7 사람 유방암 세포 내 아포토시스를 유도하는 것과 TGF-베타-유도 아포토시스는 부분적으로 결합 조직 성장 인자에 매개되는 것을 입증하는 데 이용되었다(Hishikawa et al., J. Biol. Chem., 1999, 274, 37461-37466). 동일한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 카스파제3의 TGF-베타-매개 활성화를 저해하여 사람 평활근 세포(HASC) 내 TGF-베타-매개 아포토시스의 유도를 저해하는 것으로 밝혀졌다(Hishikawa et al., Eur. J. Pharmacol., 1999, 385, 287-290). 이러한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 결합 조직 성장 인자 발현을 방지하고 고혈압은 사구체간질 세포에서 결합 조직 성장 인자의 발현을 상승조절하여, ECM 단백질 생성을 촉진하고 아포토시스를 유도함으로써, 사구체간질의 리모델링과 궁극적으로 사구체 경화증에 기여한다(Hishikawa et al., J. Biol. Chem., 2001, 276, 16797-16803).

발명의 내용

[0025] 따라서, 결합 조직 성장 인자 기능을 효과적으로 저해할 수 있는 별도의 제제가 오랫동안 필요하였다.

[0026] 본 발명은 12개 내지 30개의 결합 뉴클레오타이드를 포함하는 변형된 올리고뉴클레오타이드, 바람직하게는 20개 또는 적어도 12개의 결합 뉴클레오타이드를, 보다 바람직하게는 적어도 14개의 결합 뉴클레오타이드를 포함하는, 결합 조직 인자의 발현을 저해할 수 있는 화합물을 제공한다. 본 발명의 안티센스 화합물을 포함하는 약제 조성물과 기타 조성물도 제공된다.

[0027] CTGF 발현 저해에 유효한 양의 이들 화합물을 투여하여 동물, 특히 암과 섬유성 질병 등 과증식성 장애인 CTGF 관련 질병이나 상태가 있는 사람을 치료하는 방법이 제공된다. 또한, CTGF 발현 저해에 유효한 양의 이들 화합물을 투여하여 상처 치유에 기인하는 반흔을 감소시키는 방법도 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0028] **도 1**은 CTGF에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 형성된 CTGF 유전자 서열상 표적 부분이나 영역(주로 엑손을 표적화한 부분)을 나타낸다.

도 2는 CTGF에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 형성된 CTGF mRNA 서열상 표적 부분이나 영역을 나타낸다.

도 3은 CTGF mRNA 서열에서 엑손 서열을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 CTGF 발현 저해 시험의 그래프를 나타낸다.

도 4는 CTGF에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 형성된 CTGF 유전자 서열상 표적 부분이나 영역, 주로 인트론을 표적화한 부분을 나타낸다.

도 5는 CTGF에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 형성된 CTGF mRNA 서열상 표적 부분이나 영역을 나타낸다.

도 6은 CTGF mRNA 서열상 엑손 서열을 표적하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 CTGF 발현 저해 시험 결과의 그래프를 나타낸다.

도 7은 CTGF에 대해 활성이 매우 높은 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 나타내고 미국 특허 제6,965,025 B2호에 개시된 두 개의 기존에 설계된 안티센스 올리고뉴클레오타이드와의 활성(ISIS 124238 및 ISIS 124212)을 비교한다. **도 7a**는 8 엑손을 표적하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 나타내고, **도 7b**는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 바람직한 서열을 제공한다.

도 8은 배양된 인간 제대 정맥 내피세포에서 CTGF 발현을 저해하는 사람 CTGF의 9개의 활성이 높은 선도 안티센스 서열에 대해 얻은 투여 반응의 그래프를 제공한다. 서열 141923은 음성 대조군이고, 서열 124238 및 124212는 두 개의 기존에 설계된 서열이다.

도 9는 25mg/kg 또는 50mg/kg 안티센스 올리고뉴클레오타이드 ISIS 412294(서열 번호 39), ISIS 412295(서열 번호 40), 또는 ISIS 418899(서열 번호 166) 처리 4주 후 마우스 내 혈장 알라닌 아미노기전달효소(ALT)(**도 9a**) 및 아스파르트산 아미노기전달효소(AST)(**도 9b**)의 그래프를 제공한다. 결과는 ISIS 412294(서열 번호: 39) 또는 ISIS 412295(서열 번호: 40) 25mg/kg 또는 50mg/kg이나, ISIS 418899(서열 번호: 166) 25mg/kg를 투여한 마우스의 혈장 ALT과 AST 수준이 식염수(비히클) 대조군의 수준과 유사하지만, ISIS 418899(서열 번호: 166) 50mg/kg를 투여한 마우스는 대조군에서 관찰된 값보다 상당히 증가한 ALT 및 AST 수준을 나타낸다.

도 10은 50mg/kg 412295의 처리군의 체중 증가는 대조군의 체중 증가보다 매우 낮은 것을 보여주는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 처리 4주 후 결과의 그래프를 나타낸다.

도 11은 래트 피부 상처에 CTGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드 3.0, 1.0, 0.3 또는 0.1mg를 피부 내 투여하면 모든 투여량의 경우에 CTGF 및 Col1A2 mRNA 발현이 통계학상 유의적으로 감소함을 나타낸다. 이들 결과는 2'MOE 변형 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용한 CTGF 발현 저해가 피부 내 콜라겐 축적을 감소할 수 있음을 확증한다.

도 12는 토끼에 50mg/ml(총 투여량: 5mg) 피부 내 투여한 후 적어도 14일 이내에 TGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 상당량이 존재함을 보여주는 그래프를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 일 실시예에 있어서, 본 발명은 12개 내지 30개의 결합된 뉴클레오사이드로 구성되고, 적어도 12개의 핵산염기(nucleobase) 서열 부분이 서열 번호 9의 뉴클레오타이드 718-751, 1388-1423, 1457-1689, 2040-2069, 2120-2147, 2728-2797, 2267-2301, 553-611, 1394-1423, 1469-1508, 1559-1605, 1659-1689, 2100-2129 및 1399-1423로부터 선택되는 영역 내에 존재하는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 제공한다.
- [0030] 다른 실시예에 있어서, 본 발명은 12개 내지 30개의 결합된 뉴클레오사이드를 구성되고, 적어도 12개의 핵산염기 서열 부분이 서열 번호 10의 뉴클레오타이드 2540-2559, 2568-2587, 2623-2647 및 2623-2642로부터 선택되는 영역 내에 존재하는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 제공한다.
- [0031] 일 실시예에 있어서, 본 발명은 12개 내지 30개의 결합된 뉴클레오사이드를 포함하고 적어도 12개의 핵산염기 서열 부분이 서열 번호 28, 30, 39, 40, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 56, 78, 125 및 166에 기재된 핵산염기 서열 내에 존재하는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 상기 화합물은 20개 또는 적어도 12개의 결합된 뉴클레오사이드를 포함하고, 보다 바람직하게는 적어도 14개의 결합된 뉴클레오사이드를 포함하고, 서열 번호 28, 30, 39, 40, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 56, 78, 125 및 166에 기재된 핵산 서열 내에 존재한다.
- [0033] 이들 서열의 선택은 **도 1 내지 7**에 제시한 결과와 인간 제대 정맥 내피세포(HuVEC)에서의 투약 반응 연구 결과(**도 8**)를 확인하여 결정된다. 실험과 데이터 세부 사항은 후술하는 실시예 항목 중 **실시예 8**에 제시된다.
- [0034] **도 1 내지 6**에 제시한 표적 서열은 인트론 및 엑손 표적 서열을 포함한다. A 표적 영역은 구조적으로 정의한 핵산 영역이다. 예를 들어, 표적 영역은 3' UTR, 5' UTR, 엑손, 인트론, 코딩 영역, 번역 개시 영역, 번역 종료 영역, 또는 기타 정의된 핵산 영역을 포함할 수 있다. 표적화는 소기의 효과를 얻을 수 있도록 안티센스 화합물과 혼성화되는 적어도 하나의 표적 부분을 결정하는 것을 포함한다. 본 실시예에 있어서, 소기의 효과는 mRNA 표적 핵산량 감소이다.
- [0035] 서열 번호 15(isis 124238) 등 이전에 설계된 서열보다 현저하게 활성이 높은 복수의 서열이 엑손과 인트론 서열에서 확인된다. 다양한 새로운 인트론(서열 번호 125)과 엑손(서열 번호 28, 30, 40, 45, 52, 50 및 78) 올리고뉴클레오타이드는 다른 서열보다 활성이 현저하게 높은 것으로 나타났다.
- [0036] 서열 번호 39 및 40은 활성에 대한 본래의 ASO 선별(screen)에서 매우 효과적인 CTGF 발현 저해제인 것으로 나타났다(본 원에 나타난 데이터). 이러한 CTGF mRNA 영역이 ASO와 표적화되는 "열점"을 나타내는지 더 조사하기 위해, 서열 번호 39 및 40에 표적화되는 서열의 상위 서열과 혼성화하도록 설계되는 또 다른 ASO 서열(서열 번호 166)이 설계된다. 이러한 ASO(서열 번호 166)는 매우 강력한 CTGF mRNA 발현 저해제로도 알려졌으며, 이는 이러한 CTGF mRNA 영역은 ASO 저해제와 표적화하는 데 유리한 영역임을 입증한다.
- [0037] 특정 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 활성 올리고뉴클레오타이드에 의해 표적화되는 표적 부위 1396에서 1424에 이르는 CTGF 영역의 일부와 상보적이다. 이는 Isis 418899, 412295 및 412294(각각, 서열 번호 166, 40 및 39)로 표적화되는 서열 영역이다.
- [0038] 본 발명은 적어도 12개, 바람직하게는 적어도 14개의 결합된 뉴클레오사이드를 포함하고 이의 핵산염기 서열이 서열 번호 28, 30, 39, 40, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 56, 78, 125 및 166에 기재된 핵산염기 서열 중 하나의 일부인 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물도 제공한다.
- [0039] 본 원에 개시한 안티센스 화합물은 12개 내지 30개, 12개 내지 20개, 바람직하게는 14개 내지 20개 결합된 뉴클

레오사이드를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

- [0040] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥이거나 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0041] 본 발명은 핵산 분자의 결합 조직 성장 인자 암호화 기능을 조정하여, 궁극적으로 생성되는 결합 조직 성장 인자의 조절하는 데 올리고머 화합물, 특히, 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용한다. 이는 결합 조직 성장 인자를 암호화하는 하나 이상의 핵산과 특이적으로 혼성화하는 안티센스 화합물을 제공함으로써 달성된다. 본원에서 사용하는 "표적 핵산"과 "결합 조직 성장 인자를 암호화하는 핵산"라는 용어는 결합 조직 성장 인자를 암호화하는 DNA와, 이러한 DNA로부터 전사되는 RNA(pre-mRNA 및 mRNA 포함)와 이러한 RNA로부터 유래하는 cDNA도 포함한다. 올리고머 화합물과 이의 표적 핵산과의 특이적 혼성화는 핵산의 일반적인 기능을 저해한다. 일반적으로, 이러한 표적 핵산과 특이적으로 혼성화되는 화합물에 의한 표적 핵산의 기능 조절을 "안티센스"(antisense)라고 한다. 저해되는 DNA 기능은 복제와 전사를 포함한다. 저해되는 RNA 기능은 단백질 번역 부위의 RNA 전좌, RNA로부터 단백질의 번역, 하나 이상의 mRNA 중을 얻는 RNA의 스플라이싱, 및 RNA와 연관되거나 이에 의해 촉진될 수 있는 촉매 활성 등 모든 생체 기능을 포함한다. 이러한 표적 핵산 기능 저해의 전반적인 효과는 결합 조직 성장 인자 발현 조절이다. 본 발명에 따르면, "조절"(modulation)은 유전자 발현의 상승(자극)이나 하강(저해)을 의미한다. 본 발명에 따르면, 저해는 바람직한 유전자 발현 조절 형태이고, mRNA는 바람직한 표적이다.
- [0042] 표적 핵산, 표적 영역 및 뉴클레오타이드 서열
- [0043] 안티센스되는 특정 핵산을 표적하는 것이 바람직하다. 본 발명에 따르면, 특정 핵산에 대한 안티센스 화합물의 "표적화"는 다단계 과정이다.
- [0044] 본원에 포함되는 실시예에서 각 서열 번호로 나열된 서열은 독립적으로 당 부분, 뉴클레오타이드간 결합 또는 핵산염기의 임의의 변형과는 무관하다. 이와 같이, 서열 번호로 정의되는 안티센스 화합물은 독립적으로 당 부분, 뉴클레오타이드간 결합 또는 핵산염기에 대한 하나 이상의 변형된 부분을 포함할 수 있다.
- [0045] Isis 번호(Isis No)로 나타내는 안티센스 화합물은 핵산염기 서열과 모티브(motif)의 조합을 나타낸다.
- [0046] 일 실시예에 있어서, 표적 영역은 구조적으로 정의되는 핵산 영역이다. 예를 들어, 표적 영역은 3' UTR, 5' UTR, 엑손, 인트론, 코딩 영역, 번역 개시 영역, 번역 종료 영역, 또는 기타 정의된 핵산 영역을 포함할 수 있다. 구조적으로 정의된 핵산 영역은 NCBI 등 서열 데이터베이스의 등록 번호로 얻을 수 있고, 이러한 정보는 참조 문헌으로 본원에 편입된다. 다른 실시예에 있어서, 표적 영역은 표적 영역의 일 표적 부분의 5' 표적 부위에서 표적 영역의 다른 표적 부분의 3' 표적 부위의 서열을 포함할 수 있다.
- [0047] 혼성화는 소기의 효과를 얻을 수 있도록 안티센스 화합물이 혼성화되는 적어도 하나의 표적 부분을 결정하는 것을 포함한다. 특정 실시예에 있어서, 소기의 효과는 표적 핵산 수치 감소이다. 다른 실시예에 있어서, 소기의 효과는 표적 핵산에 의해 암호화되는 단백질량 감소나 표적 핵산과 관련된 표현형 변화이다.
- [0048] 표적 영역은 하나 이상의 표적 부분을 포함할 수 있다. 표적 영역 내의 복수의 표적 부분은 중첩될 수 있다. 이와는 달리, 이들은 중첩되지 않을 수도 있다. 일 실시예에 있어서, 표적 영역 내 표적 부분은 약 300 이하의 뉴클레오타이드로 분리된다. 다른 실시예에 있어서, 표적 영역 내 표적 부분은 표적 핵산 상 약 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 또는 10 이하의 뉴클레오타이드로 분리된다. 다른 실시예에 있어서, 표적 영역 내 표적 부분은 표적 핵산상 약 5 이하의 뉴클레오타이드로 분리된다. 다른 실시예에 있어서, 표적 부분은 인접한다.
- [0049] 적절한 표적 부분은 5' UTR, 코딩 영역, 3' UTR, 인트론 또는 엑손 내에 나타날 수 있다. 개시 코돈이나 정지 코돈을 포함하는 표적 부분도 역시 적절한 표적 부분이다. 적절한 표적 부분은 개시 코돈이나 정지 코돈 등 특정 구조상 정의된 영역을 특이적으로 배제할 수 있다.
- [0050] 적합한 표적 부분의 결정은 게놈 전반에 걸쳐 표적 핵산 서열과 다른 서열을 비교하는 것을 포함한다. 예를 들면, BLAST 알고리즘을 이용하여 상이한 핵산에서 유사 영역을 확인한다. 이러한 비교를 통해 비특이적인 방법으로 선택된 표적 핵산과는 다른 서열(즉, 비-표적 또는 오프-표적 서열)과 혼성화될 수 있는 안티센스 화합물 서열이 선택되는 것을 방지한다.
- [0051] 활성 표적 영역 내 안티센스 화합물의 활성(예컨대, 표적 핵산량 백분율 감소로 정의됨)이 변할 수 있다. 일 실시예에 있어서, CTGF mRNA 농도 감소는 CTGF 발현 저해를 나타낸다. CTGF 단백질 농도 감소도 표적 mRNA 발

현 저해를 나타낸다. 또한, 표현형 변화는 CTGF 발현 저해를 나타낸다. 예를 들면, CTGF량 증가는 CTGF 발현 저해를 나타낸다.

[0052] 상세하게는, 표적 과정은 대개 그 기능이 조절되는 핵산 서열의 동정으로 시작된다. 이는 예를 들어 그 발현이 특정 질환이나 장애 상태, 또는 감염원의 핵산 분자와 관련되는 세포 유전자(또는 유전자로부터 전사된 mRNA)일 수 있다. 본 발명에서, 표적은 결합 조직 성장 인자를 암호화하는 핵산 분자이다. 표적 과정은 단백질 발현의 검출이나 조절 등 소기의 효과를 얻을 수 있는 안티센스 상호 작용을 위해 유전자 내부 부위를 결정하는 것을 포함한다. 본 발명의 맥락 범위에서, 바람직한 유전자 내부 부위는 유전자의 오픈 리딩 프레임(open reading frame: ORF)의 번역 개시 또는 종결 코돈을 포함하는 영역이다. 당업예에 공지되어 있는 바와 같이, 번역 개시 코돈은 전형적으로 5'-AUG(전사된 mRNA 분자일 경우; 대응 DNA 분자에서는 5'-ATG)이므로, 번역 개시 코돈은 "AUG 코돈", "개시 코돈" 또는 "AUG 개시 코돈"이라고도 한다. 많은 유전자는 RNA 서열 5'-GUG, 5'-UUG 또는 5'-CUG를 갖는 번역 개시 코돈을 지니고, 5'-AUA, 5'-ACG 및 5'-CUG는 생체 내 작용하는 것으로 나타났다. 따라서, 각 경우에 개시 아미노산은 전형적으로 메티오닌(진핵생물) 또는 포르밀메티오닌(원핵생물)이나, "번역 개시 코돈" 및 "개시 코돈"은 많은 코돈 서열을 포함한다. 진핵생물과 원핵생물 유전자는 둘 이상의 다른 개시 코돈을 가질 수 있고, 이들 중 어느 하나는 특정 세포형이나 조직 또는 특정한 일련의 상태에서 번역 개시에 우선적으로 이용될 수 있음이 당업예에 알려져 있다. 본 발명에 따르면, "개시 코돈"과 "번역 개시 코돈"은 이러한 코돈의 서열과는 상관없이 결합 조직 성장 인자를 암호화하는 유전자로부터 전사되는 mRNA 분자의 번역을 개시하는 데 생체 내 이용되는 코돈이나 코돈들을 말한다.

[0053] 유전자의 번역 종료 코돈(또는 "정지 코돈")은 세 종류의 서열(즉, 5'-UAA, 5'-UAG 및 5'-UGA)(대응 DNA 서열은 각각 5'-TAA, 5'-TAG 및 5'-TGA) 중 하나를 가질 수 있음이 당업예에 공지되어 있다. "개시 코돈 영역"과 "번역 개시 코돈 영역"은 약 25개 내지 50개의 인접하는 뉴클레오타이드를 번역 개시 코돈에서 임의의 방향(예컨대, 5' 또는 3')으로 포함하는 mRNA나 유전자의 일부를 말한다. 마찬가지로, "정지 코돈 영역"과 "번역 종료 코돈 영역"은 약 25개 내지 50개의 인접하는 뉴클레오타이드를 번역 종료 코돈에서 임의의 방향(예컨대, 5' 또는 3')으로 포함하는 mRNA나 유전자의 부분을 말한다.

[0054] 번역 개시 코돈과 번역 종료 코돈 간 영역을 말하는 것으로 당업예에 알려져 있는 오픈 리딩 프레임(ORF)이나 "코딩 영역"도 효과적으로 표적화될 수 있는 영역이다. 다른 표적 영역은 mRNA의 5' 캡 부위와 번역 종료 코돈 사이의 뉴클레오타이드나 유전자상 대응 뉴클레오타이드를 포함하며, 번역 개시 코돈에서 5' 방향으로 배치되는 mRNA의 일부로서 당업예에 공지되어 있는 5' 미번역 영역(5'UTR)과 mRNA의 번역 종료 코돈과 5' 캡 부위 사이의 뉴클레오타이드나 유전자상 대응 뉴클레오타이드를 포함하며, 번역 개시 코돈에서 3' 방향으로 배치되는 mRNA의 일부로서 당업예에 공지되어 있는 3' 미번역 영역(3'UTR)을 포함한다. mRNA의 5'캡은 5'-5' 삼인산 결합을 통해 mRNA의 5'대부분의 잔부와 결합하는 N7-메틸화 구아노신 잔부를 포함한다. mRNA의 5'캡 영역은 5'캡 구조 자체와 캡에 인접하는 50개의 뉴클레오타이드를 포함하는 것으로 여겨진다. 5' 캡 영역도 바람직한 표적 영역일 수 있다.

[0055] 진핵생물의 mRNA 전사체가 직접 번역되지 않더라도, 번역되기 전에 전사체로부터 절단되는 "인트론"으로 알려진 하나 이상의 영역을 포함한다. 나머지(번역되는) 영역은 "엑손"이고, 함께 스플라이싱되어 연속 mRNA 서열을 형성한다. mRNA 스플라이스 부위, 즉, 인트론-엑손 접합부는 바람직한 표적 영역일 수도 있고, 비정상적인 스플라이싱이 질병의 원인이 되는 상태나, 특정 mRNA 스플라이스 생성물의 과생성이 질환의 원인이 되는 상태에 특히 유용하다. 재배열이나 탈락에 의한 비이상적인 융합 접합도 바람직한 표적이다. 인트론은 DNA 또는 전구체 mRNA(pre-mRNA) 등에 표적화되는 안티센스 화합물의 효과적이고 바람직한 표적 영역인 것으로도 밝혀져 있다.

[0056] DNA의 동일한 유전자 영역에서 대체 RNA 전사체가 생성될 수 있음도 당업예에 공지되어 있다. 이들 대체 전사체는 일반적으로 "변종"(variants)으로 알려져 있다. 보다 상세하게는, "전구체 mRNA 변종"(pre-mRNA variants)은 이들의 개시 또는 정지 위치에서 동일한 유전자의 DNA로부터 생성되는 다른 전사체와 상이한 동일한 유전자의 DNA에서 생성되는 전사체이고 인트론 영역과 엑손 영역을 포함한다.

[0057] 스플라이싱 중에 하나 이상의 엑손 또는 인트론 영역이나 이들의 부분이 잘단될 때, pre-mRNA 변종은 보다 작은 "mRNA 변종"을 생성한다. 이에 따라, mRNA 변종은 가공된 pre-mRNA 변종이 되고, 각 독특한 pre-mRNA 변종은 스플라이싱 결과로서 독특한 mRNA 변종을 형성한다. 이들 mRNA 변종은 "대체 스플라이스 변종"(alternative splice variants)로도 알려져 있다. pre-mRNA 변종이 스플라이싱되지 않으면, pre-mRNA 변종은 mRNA 변종과 유사하다.

[0058] 전사를 개시하거나 정지하는 대체 신호를 이용하여 변종을 형성할 수 있고, pre-mRNA와 mRNA는 하나 이상의 개

시 코돈이나 정지 코돈을 포함할 수 있음은 당업예에 공지되어 있다. 대체 개시 코돈을 이용하는 pre-mRNA나 mRNA에서 유래하는 변종은 그 pre-mRNA나 mRNA의 "대체 개시 변종"(alternative start variants)으로 알려져 있다. 대체 정지 코돈을 이용하는 이러한 전사체는 그 pre-mRNA나 mRNA의 "대체 정지 변종"(alternative stop variants)라고 알려져 있다. 대체 정지 변종의 특정 형태는 형성된 복수개의 전사체는 전사 기구(machinery)에 의해 "폴리에이 정지 신호"(polyA stop signals) 중 하나를 대체 선택함으로써 이루어져 독특한 폴리에이 부위에서 종결되는 전사체를 형성하는 "폴리에이 변종"(polyA variant)이다.

- [0059] 안티센스 화합물은 연구 시약과 진단에 통상적으로 이용된다. 예를 들면, 매우 특이한 유전자 발현을 저해할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 특정 유전자의 기능을 확인하기 위해 통상적인 지식을 가진 자들에 의해 종종 이용된다. 안티센스 화합물은 예컨대 다양한 생물학적 경로의 기능을 구별하는 데 이용되기도 한다. 이에 따라, 안티센스 조절은 연구 용도로 이용되어 왔다.
- [0060] 키트와 진단 용도로서, 본 발명의 안티센스 화합물은 단독이나 다른 안티센스 화합물이나 치료제와 함께 세포와 조직 내부에 발현되는 유전자의 일부나 전체의 발현 패턴을 확인하는 시차 및/또는 조합 분석 도구로 이용될 수 있다.
- [0061] 하나 이상의 안티센스 화합물을 처리한 세포나 조직 내부의 발현 패턴은 안티센스 화합물을 처리하지 않은 대조군 세포나 조직과 비교되고, 생성된 패턴은 조사된 유전자의 질병 관련성, 신호 경로, 세포 국소화, 발현 정도, 크기, 구조 또는 기능 등과 관련되므로 유전자 발현량 차이를 분석한다. 이들 분석은 발현 패턴에 영향을 미치는 다른 화합물의 존재하에 또는 부존재하에 자극되거나 자극되지 않은 세포에서 수행된다.
- [0062] 당업예에 공지된 유전자 발현 분석 방법의 예로는 DNA 배열 또는 미시 배열(Brazma and Vilo, FEBS Lett., 2000, 480, 17-24; Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16), 유전자 발현 연속 분석법(SAGE)(Madden, et al., Drug Discov. Today, 2000, 5, 415-425), 분해된 cDNA의 제한 효소 증폭(READS)(Prashar and Weissman, Methods Enzymol., 1999, 303, 258-72), 전체 유전자 발현 분석(TOGA)(Sutcliffe, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 1976-81), 단백질 배열과 단백질체학(Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Jungblut, et al., Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10), 발현 서열 표지(EST) 시퀀싱(Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson, et al., J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), 가감 RNA 지문분석(SuRF)(Fuchs, et al., Anal. Biochem., 2000, 286, 91-98; Larson, et al., Cytometry, 2000, 41, 203-208), 가감 클로닝(subtractive cloning), 차등 디스플레이(differential display, DD)(Jurecic and Belmont, Curr. Opin. Microbiol., 2000, 3, 316- 21), 비교 유전체 혼성화법(Carulli, et al., J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31, 286-96), 형광 제자리 혼성화법(FISH)(Going and Gusterson, Eur. J. Cancer, 1999, 35, 1895-904) 및 (To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3, 235-41)에서 검토된 질량 분석법을 들 수 있다.
- [0063] 안티센스 화합물
- [0064] 본 발명에 따르면, "올리고뉴클레오타이드"는 리보핵산(RNA) 또는 데옥시리보핵산(DNA) 또는 이들의 유사체의 저중합체나 중합체를 말한다. 올리고뉴클레오타이드는 자연 발생 핵산염기, 당 및 뉴클레오사이드(골격)간 공유 결합으로 구성되는 올리고뉴클레오타이드뿐만 아니라, 유사하게 작용하는 비자연 발생부를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 이러한 변형 또는 치환 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레아제 존재 하에, 세포 흡수 증진, 핵산 표적 친화성 증진 및 안정성 증가 등 바람직한 특성 때문에 원래의 형태보다 바람직하다.
- [0065] 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 안티센스 화합물의 바람직한 형태지만, 본 발명은 올리고뉴클레오타이드 모사체를 포함하는 올리고머 안티센스 화합물도 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0066] 안티센스 화합물은 수소 결합에 의해 표적 핵산과 혼성화할 수 있는 올리고머 화합물을 의미한다. 안티센스 화합물은 표적 핵산과 혼성화하여 그의 발현을 조절하는 올리고뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오사이드, 올리고뉴클레오타이드 유사체, 올리고뉴클레오타이드 모사체, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, RNAi, 리보자임, 외부 가이드 서열(EGS) 올리고뉴클레오타이드(올리고자임) 및 기타 올리고뉴클레오타이드를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 특정 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 5'에서 3' 방향으로 기재되어 있으면, 표적화되는 표적 핵산의 표적 부분의 역 상보를 포함하는 핵산염기 서열을 갖는다. 이들 실시예에 있어서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 5'에서 3' 방향으로 기재되어 있으면, 표적화되는 표적 핵산의 표적 부분의 역 상보를 포함하는 핵산염기 서열을 갖는다.

- [0068] 특정 실시예에 있어서, 핵산에 표적화되는 안티센스 화합물의 길이는 12개 내지 30개 서브유닛이다. 달리 말해, 안티센스 화합물은 12개 내지 30개 서브유닛이 결합되어 구성된다. 다른 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 8개 내지 80개, 12개 내지 50개, 15개 내지 30개, 18개 내지 24개, 19개 내지 22개 또는 20개길이의 결합 서브유닛이다. 이러한 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 그 길이가 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 또는 80인 결합 서브유닛이거나, 상기 값 중에 두 개의 값으로 정의되는 범위의 결합 서브유닛이다. 일부 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고 결합 서브유닛은 뉴클레오타이드이다.
- [0069] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 있어서, 상기 화합물은 20 또는 14개 이상의 결합된 뉴클레오사이드를 포함하고 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 28, 30, 39, 40, 45, 52, 56, 78, 125 및 166에 기재된 서열 중 하나와 100% 동일한 서열이다. 바람직한 일 실시예에 있어서, 흥미로운 선도 화합물은 서열 번호 39(ISIS 412294)로 나타난 서열을 갖는다.
- [0070] 특정 실시예에 있어서, 핵산에 표적화된 단축되거나 절단된 안티센스 화합물은 5' 말단(5' 절단부)에서 탈락한 하나의 서브유닛을, 아니면 3' 말단(3' 절단부)에서 탈락한 하나의 서브유닛을 갖는다. 핵산에 표적화된 단축되거나 절단된 안티센스 화합물은 안티센스 화합물의 5' 말단에서 탈락한 두 개의 서브유닛을, 아니면 안티센스 화합물의 3' 말단에서 탈락한 두 개의 서브유닛을 갖는다. 아니면, 탈락된 뉴클레오타이드는 5' 말단에서 탈락한 하나의 뉴클레오사이드와 3' 말단에서 탈락한 하나의 뉴클레오사이드를 갖는 안티센스 화합물 등 안티센스 화합물 전반에 걸쳐 분포한다.
- [0071] 연장된 안티센스 화합물에 하나의 서브유닛이 더 포함되는 경우, 부가되는 서브유닛은 안티센스 화합물의 5' 또는 3' 말단에 위치할 수 있다. 연장된 안티센스 화합물에 두 개의 서브유닛이 더 포함되는 경우, 부가되는 서브유닛은 예를 들면, 안티센스 화합물의 5' 말단(5' 부가)에 추가된 두 개의 서브유닛을, 아니면 3' 말단(3' 부가)에 추가된 두 개의 서브유닛을 갖는 안티센스 화합물에서 서로 인접할 수 있다. 아니면, 부가된 서브유닛은 안티센스 화합물 예컨대, 5' 말단에 부가된 하나의 서브유닛과 3' 말단에 부가된 하나의 서브유닛을 갖는 안티센스 화합물 전반에 걸쳐 분포할 수 있다.
- [0072] 안티센스 올리고뉴클레오타이드 등 안티센스 화합물의 길이를 늘리거나 줄일 수 있고/있거나 활성을 제거하지 않고 미스매치(mismatch) 염기를 도입할 수 있다. 예를 들어, Woolf 등은 난모세포 주입 모델에서 13 내지 25개의 핵산염기의 길이를 갖는 일련의 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 표적 RNA의 절단을 도입할 수 있는 지 시험하였다(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992). 안티센스 올리고뉴클레오타이드 말단 주변에 8 내지 11개의 미스매치 염기를 포함하는 25개 길이의 핵산염기를 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 미스매치를 포함하지 않는 안티센스 올리고뉴클레오타이드보다 낮은 정도지만 표적 mRNA의 특이적 절단을 초래한다. 마찬가지로, 표적 특이 절단은 1 내지 3개의 미스매치를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 13개의 핵산염기 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 달성되었다.
- [0073] Gautschi 등은 bcl-2 mRNA에 100% 상보적이고 bcl-xL mRNA에 대해 3개의 미스매치를 갖는 올리고뉴클레오타이드가 bcl-2와 bcl-xL의 생체 외 및 생체 내 발현을 감소할 수 있음을 증명하였다(J. Natl. Cancer Inst. 93:463-471, March 2001).
- [0074] Maher와 Dolnick는 토끼 망상적혈구 분석에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 둘 또는 세 개의 서열로 구성되는 일련의 텐덤(tandem) 14개의 핵산염기 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 28개 및 42개 핵산염기 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 사람 DHFR 번역 저해성을 시험하였다(Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988).
- [0075] 세 개의 14개의 핵산염기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 각각은 번역을 저해하지만 28개 또는 42개 핵산염기 안티센스 올리고뉴클레오타이드보다 낮은 정도에 불과하다.
- [0076] Bhanot 등(PCT/US2007/068401)은 화학적으로 변형된 친화성이 높은 8 내지 16개의 단량체를 포함하는 화합물을 포함하는 단 길이 안티센스 화합물을 제공하였다. 이들 단 길이의 안티센스 화합물은 효능 증가와 치료 지수 증진과 함께 치료 세포, 조직 및 동물 내 표적 핵산 및/또는 단백질을 줄이는 데 유용한 것으로 나타났다. 단 길이 안티센스 화합물은 상술한 안티센스 화합물보다 더 낮은 용량으로도 효과적이므로 독성과 치료 비용 감소가 가능하다. 또한, 상기 단 길이 안티센스 화합물은 경구 복용 가능성이 매우 높다.
- [0077] 혼성화(Hybridization)

- [0078] 하나 이상의 표적 부위가 확인되면, 표적과 충분히 상보적인 올리고뉴클레오타이드가 선택되어, 다시 말해, 충분히 만족스럽고, 충분히 특이적으로 혼성화되어, 소기의 효과를 얻는다.
- [0079] 본 발명에 따르면, "혼성화"는 상보적 뉴클레오사이드나 뉴클레오타이드 염기 간 왓슨-크릭(Watson-Crick), 후그스틴(Hoogsteen) 또는 역 후그스틴(Hoogsteen) 수소 결합할 수 있는 수소 결합을 의미한다. 예를 들면, 아데닌과 티민은 수소 결합을 형성하여 쌍을 이루는 상보적인 핵산염기이다.
- [0080] 일부 실시예에 있어서, 혼성화는 본 원에 개시된 안티센스 화합물과 핵산 사이에서 일어난다. 혼성화의 가장 통상적인 메카니즘은 핵산 분자의 상보적 핵산염기 간 수소 결합을 수반한다.
- [0081] 혼성화는 다양한 조건에서 발생할 수 있다. 가혹한 조건은 서열에 의존하고, 혼성화되는 핵산 분자의 성질과 조성에 따라 결정된다.
- [0082] 서열이 표적 핵산과 특이적으로 혼성화할 수 있는지 확인하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일 실시예에 있어서, 본 원에서 제공되는 안티센스 화합물은 핵산과 특이적으로 혼성화될 수 있다.
- [0083] 상보성(Complementarity)
- [0084] 본 원에서 사용되는 "상보적"이라는 용어는 두 뉴클레오타이드 간 정교하게 쌍을 이룰 수 있는 특성을 말한다. 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드의 특정 위치에 있는 뉴클레오타이드가 DNA 또는 RNA 분자의 동일한 위치에 있는 뉴클레오타이드와 수소 결합할 수 있다면, 올리고뉴클레오타이드와 DNA 또는 RNA는 그 위치에서 서로 상보적인 것으로 본다. 올리고뉴클레오타이드와 DNA 또는 RNA는 각 분자의 충분히 많은 대응 위치들이 수소 결합할 수 있는 뉴클레오타이드로 채워지면 서로 상보적이다.
- [0085] 따라서, "특이적으로 혼성화할 수 있는"(specifically hybridizable)과 "상보적"은 올리고뉴클레오타이드와 DNA 또는 RNA 표적 사이에서 안정한 특이 결합이 발생할 수 있게 하는 상보성 또는 정교한 쌍 형성의 충분한 정도를 나타내는 데 이용되는 용어이다. 당업계에서 안티센스 화합물의 서열은 특이적으로 혼성화되는 표적 핵산의 서열과 100% 상보적일 필요는 없는 것으로 인지되어 있다. 안티센스 화합물은 화합물의 표적 DNA 또는 RNA 분자와의 결합이 표적 DNA 또는 RNA의 정상적인 기능을 저해하여 유용성의 손실을 초래할 때 특이적으로 혼성화되고, 특이 결합이 바람직한 조건에서, 즉, 생체 내 분석이나 치료 처치의 경우 생리적 조건하에, 생체 외 분석의 경우에 분석, 분석 수행 조건하에, 안티센스 화합물의 비-표적 서열과의 비특이 결합을 방지하는 데 충분한 정도의 상보성이 있다.
- [0086] 표적과 혼성화하여 표적 발현을 저해하는 본 발명의 안티센스와 기타 화합물은 실험을 통해 동정하고, 이들 화합물의 서열은 본 발명의 바람직한 실시예로서 후술하는 바와 같이 동정한다. 바람직한 서열과 상보적인 표적 부위는 이제부터 "활성부위"(active site)라 칭하므로, 바람직한 표적 부위이다. 따라서, 본 발명의 다른 실시예는 이들 활성 부위와 혼성화하는 화합물을 포함한다.
- [0087] 소기의 효과를 얻을 수 있도록 안티센스 화합물의 충분히 많은 핵산염기가 표적 핵산의 대응 핵산염기와 수소 결합할 수 있으면, 안티센스 화합물과 표적 핵산은 서로 상보적이다(예컨대, CTGF 핵산 등 표적 핵산의 안티센스 저해).
- [0088] 안티센스 화합물이 표적 핵산과 특이적으로 혼성화할 수 있으면, 안티센스 화합물과 CTGF 핵산 간 비상보적인 핵산염기는 용인될 수 있다. 게다가, 안티센스 화합물은 개재 또는 인접 부분이 혼성화에 관여하지 않도록 하나 이상의 CTGF 핵산 부분과 혼성화할 수 있다(예컨대, 루프 구조, 미스매치 또는 헤어핀 구조).
- [0089] 일부 실시예에 있어서, 본 원에 제공된 안티센스 화합물은 CTGF 핵산과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 상보적이다. 안티센스 화합물의 표적 핵산과의 상보성 퍼센트는 통상적인 방법으로 결정될 수 있다.
- [0090] 예를 들면, 안티센스 화합물의 20개의 핵산염기 중에서 18개가 표적 영역과 상보적인 안티센스 화합물은 특이적으로 혼성화할 수 있고, 90 퍼센트의 상보성을 지닌다. 이 예에서, 남은 비상보적인 핵산염기는 상보적 핵산염기와 균을 이루거나 그 내부에 배치되고, 서로 또는 상보적 핵산염기와 인접할 필요가 없다. 이에 따라, 표적 핵산과 완전히 상보적인 두 영역의 양 측면에 배치되는 네 개의 (4) 비상보적 핵산염기를 갖는 18개의 핵산염기 길이의 안티센스 화합물은 표적 핵산과 77.8% 전체 상보성을 가지므로, 본 발명의 범주에 포함된다. 표적 핵산 영역과의 안티센스 화합물의 상보성 퍼센트는 당업계에 알려진 BLAST 프로그램(기본 국부 정렬 검색 도구)과 PowerBLAST 프로그램을 이용하여 통상적으로 결정될 수 있다(Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, 계놈 Res., 1997, 7, 649-656). 상동성 퍼센트, 서열 동일성 또는 상보성은 스미스와

워터맨의 알고리즘(Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)을 이용한 기본 설정을 이용하는 Gap 프로그램 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.) 등에 의해 결정될 수 있다.

- [0091] 다른 실시예에 있어서, 본 원에서 제공되는 안티센스 화합물은 표적 핵산에 완전히 상보적(즉, 100% 상보적)이다. 예를 들면, 안티센스 화합물은 CTGF 핵산이나, 표적 영역이나, 표적 부분이나, 이들의 표적 서열에 완전히 상보적이다. 본 원에 사용되는 "완전히 상보적"(fully complementary)이란 말은 안티센스 화합물의 각 핵산염기가 표적 핵산의 대응 핵산염기와 정교한 염기 쌍을 이룰 수 있음을 말한다.
- [0092] 비상보성 핵산염기의 위치는 안티센스 화합물의 5' 말단이나 3' 말단이다. 아니면, 비상보성 핵산염기나 핵산염기들은 안티센스 화합물의 내부에 위치할 수 있다. 둘 이상의 비상보성 핵산 염기가 존재하는 경우, 이들은 인접(즉, 결합)하거나 인접하지 않을 수 있다. 일 실시예에 있어서, 비상보성 핵산염기는 갭머(gapmer) 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 텅 부분에 위치한다.
- [0093] 일 실시예에 있어서, 20개 이하의 핵산염기 길이를 갖는 안티센스 화합물은 CTGF 핵산 등 표적 핵산보다 넷, 셋, 둘 또는 하나 적은 비상보성 핵산염기(들)을 포함한다.
- [0094] 다른 실시예에 있어서, 30개 이하의 핵산염기 길이를 갖는 안티센스 화합물은 CTGF 핵산 등 표적 핵산보다 여섯, 다섯, 넷, 셋, 둘 또는 하나 적은 비상보성 핵산염기(들)을 포함한다.
- [0095] 본 원에서 제공되는 안티센스 화합물은 표적 핵산 부분에 상보적인 것들을 포함할 수도 있다. 여기서 사용한 "부분"(portion)은 표적 핵산의 영역이나 부분 내에 인접(즉, 결합)하는 소정의 핵산염기 수를 말한다. "부분"은 안티센스 화합물의 인접하는 핵산염기의 일정 수를 말하기도 한다. 일 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 표적 부분의 적어도 8개의 핵산염기 부분과 상보적이다. 다른 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 표적 부분의 적어도 12개의 핵산염기 부분과 상보적이다. 다른 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 표적 부분의 적어도 15개의 핵산염기 부분과 상보적이다. 표적 부분의 적어도 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 그 이상이나 이들 값들 중에서 두 개의 값으로 정의되는 범위의 핵산염기 부분에 상보적인 안티센스 화합물도 고려된다.
- [0096] 동일성(Identity)
- [0097] 본 원에서 제공되는 안티센스 화합물은 특정 뉴클레오타이드 서열, 서열 번호, 또는 특정 Isis 번호로 나타내는 화합물에 대하여 정의되는 동일성 퍼센트도 지닌다. 여기서 사용되는 안티센스 화합물은 동일한 핵산염기 쌍을 형성할 수 있으면 본 원에 개시된 서열과 일치한다. 예를 들어, 개시된 DNA 서열에서 티미딘 대신에 우라실을 포함하는 RNA는 우라실과 티미딘이 아데닌과 쌍을 이루기 때문에 DNA 서열과 일치하는 것으로 생각할 수 있다. 감축 및 연장된 안티센스 화합물 형태와 본 원에서 제공되는 안티센스 화합물과 동일하지 않는 염기를 갖는 화합물도 고려된다. 비동일성 염기는 서로 인접하거나 안티센스 화합물 전반에 걸쳐 분포할 수 있다. 안티센스 화합물의 동일성 퍼센트는 비교되는 서열과 일치하는 염기 쌍을 갖는 염기의 수에 따라 계산된다.
- [0098] 일 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 본 원에 개시되는 안티센스 화합물 또는 서열 번호, 이들의 부분 중 하나 이상과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일하다.
- [0099] 변형(Modifications)
- [0100] 본 발명의 특정 실시예에 있어서, 안티센스 화합물의 변형은 뉴클레오사이드간 결합, 당 부분, 또는 핵산염기의 치환이나 변화를 포함한다.
- [0101] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 화합물은 변형된 뉴클레오사이드간 결합, 변형된 당, 및 변형된 핵산염기로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 변형을 포함한다.
- [0102] 다양한 변형된 뉴클레오사이드간 결합을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용하더라도, 통상적으로 바람직한 변형된 뉴클레오사이드간 결합은 하나 이상의 뉴클레오타이드간 포스포티오에이트 결합이나, 모든 뉴클레오사이드간 결합은 포스포티오에이트 뉴클레오사이드간 결합이다. 일반적으로, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나, 전형적으로는 하나 이상의 변형된 당을 포함하고 당은 바이사이클릭(bicyclic) 당인 것도 바람직하다. 다양한 변형된 당이 이용될 수 있으나, 현재로서 2'-O-메톡시에틸 당을 이용하는 것이 바람직하다.
- [0103] 또한, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 적어도 하나, 전형적으로 하나 이상 포함된 핵산염기는 5-메틸시토신 등 변형 뉴클레오타이드일 것이다.

- [0104] 뉴클레오사이드는 염기와 당의 조합이다. 뉴클레오사이드의 핵산염기(염기로도 알려져 있음) 부분은 일반적으로 이중환 염기 부분이다. 뉴클레오타이드는 뉴클레오사이드의 당 부분과 공유 결합하는 인산기를 더 포함한다. 펜토푸라노실 당을 포함하는 뉴클레오타이드에 있어서, 인산기는 당의 2', 3' 또는 5' 하이드록시부와 결합한다. 올리고뉴클레오타이드는 서로 인접하는 뉴클레오타이드의 공유 결합을 통해 형성되어, 선형 중합체 올리고뉴클레오타이드를 형성한다. 통상적으로 올리고뉴클레오타이드 구조 내에 인산기는 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오사이드 간 결합을 형성한다고 한다.
- [0105] 안티센스 화합물의 변형은 뉴클레오사이드간 결합, 당 부분, 또는 핵산염기의 치환이나 변형을 포함한다. 변형된 안티센스 화합물은 세포 흡수 증가, 표적 핵산 친화성 증진, 뉴클레아제 존재 하 안정성 증가, 또는 저해성 증가 등 바람직한 특성때문에 원래 형태보다 바람직하다.
- [0106] 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드는 그 표적 핵산에 대한 단축되거나 절단된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 결합 친화성을 높이는 데 이용될 수도 있다. 따라서, 이러한 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 단 길이의 안티센스 화합물로 대조 결과를 얻을 수도 있다.
- [0107] 변형된 뉴클레오타이드간 결합
- [0108] RNA와 DNA의 자연발생적 뉴클레오사이드간 결합은 3' 내지 5' 포스포다이에스터 결합이다. 하나 이상의 변형된 (즉, 비자연발생) 뉴클레오사이드간 결합을 포함하는 안티센스 화합물은 예를 들면, 세포 흡수 증진, 표적 핵산 친화성 증진, 뉴클레아제 존재 하 안정성 증가 등 바람직한 특성에 의해 자연발생적 뉴클레오사이드간 결합을 포함하는 안티센스 화합물보다 자주 선택된다.
- [0109] 올리고뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오사이드간 결합을 포함하는 인산 원자를 보유하는 뉴클레오사이드간 결합뿐만 아니라 인산 원자를 포함하지 않는 뉴클레오사이드간 결합을 포함한다. 대표적인 인 함유 뉴클레오사이드간 결합은 포스포다이에스터, 포스포트라이에스터, 메틸포스포네이트, 포스포아미데이트, 및 포스포로티오에이트를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 인 함유 결합과 인 비함유 결합의 제조 방법이 주지되어 있다.
- [0110] 일 실시예에 있어서, CTGF 핵산에 표적화된 안티센스 화합물은 하나 이상의 변형된 뉴클레오사이드간 결합을 포함한다. 일부 실시예에 있어서, 변형된 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이다. 다른 실시예에 있어서, 안티센스 화합물의 각 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 결합이다.
- [0111] 당업예에 공지되어 있는 바와 같이, 뉴클레오사이드는 염기와 당의 조합이다. 뉴클레오사이드의 염기 부분은 일반적으로 이중환 염기이다. 이러한 이중환 염기의 가장 일반적인 두 종류는 퓨린과 피리미딘이다. 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 당 부분과 공유 결합하는 인산기를 더 포함한다. 펜토푸라노실 당을 포함하는 뉴클레오타이드에 있어서, 인산기는 결합 당의 2', 3' 또는 5' 하이드록시기와 결합할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 형성에 있어, 인산기는 서로 인접하는 뉴클레오타이드와 공유 결합하여 선형 중합체 화합물을 형성한다. 차례로, 선형 중합체 구조의 각 말단도 결합하여 원형 구조를 형성하지만, 개방형 선형 구조가 일반적으로 바람직하다. 올리고뉴클레오타이드 구조에서, 인산기는 통상적으로 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오사이드간 골격을 형성한다고 한다. RNA와 DNA의 일반적인 결합과 골격은 3' 내지 5' 포스포다이에스터 결합이다.
- [0112] 본 발명에서 이용될 수 있는 바람직한 안티센스 화합물의 특정 예로는 변형된 골격이나 비자연적 뉴클레오사이드간 결합을 포함하는 올리고뉴클레오타이드이다. 본 명세서에서 정의한 바와 같이, 변형된 골격을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 골격에 인 원자를 함유하는 올리고뉴클레오타이드와 골격에 인 원자를 포함하지 않는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 구체적으로 설명하기 위해, 당업예에서 원용되는 바와 같이, 뉴클레오사이드 간 골격에 인 원자를 포함하지 않는 변형된 올리고뉴클레오타이드도 올리고뉴클레오타이드인 것으로 여겨진다.
- [0113] 바람직한 변형된 올리고뉴클레오타이드 골격은 예를 들면, 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로다이에티오에이트, 포스포트라이에스터, 아미노알킬포스포트라이에스터, 3'-알킬렌 포스포네이트, 5'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함하는 메틸 및 기타 알킬 포스포네이트, 포스포네이트, 이들의 정상적인 3'-5' 결합, 2'-5' 결합 유사체를 갖는 3'-아미노 포스포아미데이트 및 아미노알킬포스포아미데이트, 티오노 포스포아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트라이에스터, 세레노포스페이트 및 보라노포스페이트를 포함하는 포스포아미데이트 및 하나 이상의 뉴클레오타이드간 결합이 3'-3', 5'-5' 또는 2'-2' 결합인 반대의 극성을 갖는 화합물을 들 수 있다. 반대 극성을 갖는 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 3'-대부분의 뉴클레오타이드간 결합에서 단일 3'-3' 결합, 즉 염기 소실 부분일 수 있는 하나의 역전된 뉴클레오사이드 잔부 (핵산염기가 누락되고, 그 대신 하이드록시기를 지님)를 포함한다. 다양한 염, 염 혼합물 유리산 형태도 포함된다.

- [0114] 인 함유 결합의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허의 예로 미국 특허 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697 및 5,625,050을 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 이들 중 일부는 본 출원인의 권리이고 본 원에 참조 문헌으로 편입된다.
- [0115] 이에 인 원자를 포함하지 않는 바람직한 변형된 올리고뉴클레오타이드 골격은 단사슬 알킬이나 사이클로알킬 뉴클레오사이드간 결합, 혼합 이중원자와 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오사이드간 결합이나, 하나 이상의 단사슬 이중원자 또는 이중환 뉴클레오사이드간 결합에 의해 형성되는 골격이다. 이들은 모폴린 결합(뉴클레오사이드의 당 부분으로부터 일부 형성)을 갖는 골격; 실록산 골격; 설파이드, 설파사이드 및 설피온 골격; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 리보아세틸 골격; 알켄 함유 골격; 설파메이트 골격; 메틸렌이미노 및 메틸렌히드라지노 골격; 설포네이트 및 설피온아미드 골격; 아미드 골격; N, O, S 및 CH₂ 혼합 성분 요소를 갖는 골격을 포함한다.
- [0116] 상기 올리고뉴클레오타이드의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허의 예로 미국 특허 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269 및 5,677,439를 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 이들 중 일부는 본 출원인의 권리이고 본 원에 참조 문헌으로 편입된다.
- [0117] 기타 바람직한 올리고뉴클레오타이드 모사체에 있어서, 당과 뉴클레오사이드간 결합(즉, 뉴클레오타이드 단위의 골격)은 새로운 기로 치환된다. 염기 단위는 적절한 핵산 표적 화합물과 혼성화하도록 유지된다. 우수한 혼성화 특성을 갖는 것으로 밝혀진 이러한 올리고머 화합물, 올리고뉴클레오타이드 모사체는 펩티드 핵산(PNA)으로 나타난다. PNA 화합물에서, 올리고뉴클레오타이드의 당 골격은 아미드를 포함하는 골격(특히, 아미노에틸글리신 골격)으로 치환된다. 핵산염기는 유지되어 골격의 아미드 부분의 아자 질소 원자와 직접 또는 간접 결합한다. PNA 화합물의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허 화합물의 예로는 미국 특허 5,539,082; 5,714,331; 및 5,719,262를 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 이들 각각은 참조 문헌으로 본 원에 편입된다. 또한, PNA 화합물의 교시는 Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500에 제시된다.
- [0118] 본 발명의 가장 바람직한 실시예는 포스포로티오에이트 골격을 갖는 올리고뉴클레오타이드와 이중원자 골격을 갖는 올리고뉴클레오타이드이며, 특히, 상기 참조 문헌의 미국 특허 제 5,489,677 -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-[메틸렌(메틸이미노)이나 MMI 골격으로 공지됨], -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃), -N(CH₃)-CH₂- 및 -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂-[원래 포스포다이에스터 골격은 -O-P-O-CH₂-]과 상기 참조 문헌의 미국 특허 5,602,240의 아미드 골격을 들 수 있다. 또한, 상기 참조 문헌 미국 특허 5,034,506의 모폴린 골격 구조를 갖는 올리고뉴클레오타이드도 바람직하다.
- [0119] 변형된 당 부분
- [0120] 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 치환된 당 부분을 포함할 수도 있다. 예를 들면, 후라노실 당 고리는 참조 문헌으로 그 전문이 본 원에 편입되는 미국 특허 7,399,845(Seth 등)에 개시된 치환기로의 치환, 바이사이클릭 핵산 "BNA"을 형성하는 가교(bridging)와 S 또는 N(R) 등 이중원자에 의한 4'-O 치환 등 다양한 방법으로 변형될 수 있다. BNA의 다른 예는 참조 문헌으로 그 전문이 본 원에 편입되는 국제 특허 출원 제 WO 2007/146511호에 개시된다.
- [0121] 본 발명의 안티센스 화합물은 선택적으로 변형된 당 부분을 갖는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 당 변형은 안티센스 화합물에 뉴클레아제 안정성, 결합 친화성이나 기타 유리한 생물학적 특성을 부여한다. 뉴클레오사이드의 후라노실 당 고리는 치환기의 부가(특히, 2' 위치); 바이사이클릭 핵산(BNA)을 형성하는 두 개의 다른 자리 고리 원자의 가교; 및 4'-위치의 고리 산소에 -S-, -N(R)- 또는 -C(R1)(R2) 등의 원자나 기의 치환을 포함하는 다양한 방법으로 변형될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 변형된 당은 치환 당, 특히, 2'-F, 2'-OCH₂(2'-OMe) 또는 2'-O(CH₂)₂-OCH₃(2'-O-메톡시에틸 또는 2'-MOE) 치환기를 갖는 2'-치환 당; 및 4'-(CH₂)_n-O-2'(n=1 또는 n=2) 가교를 갖는 바이사이클릭 변형 당(BNA)을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

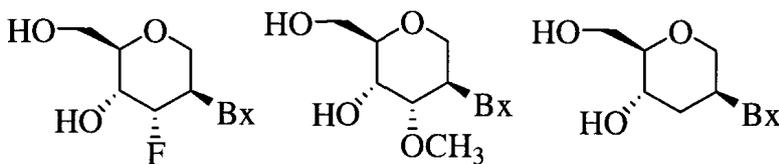
변형된 당의 제조 방법은 당업계에 주지되어 있다.

- [0122] 특정 실시예에 있어서, 2'-변형된 뉴클레오사이드는 바이사이클릭 당 부분을 갖는다. 특정 실시예에 있어서, 바이사이클릭 당 부분은 알파 위치의 D 당이다. 특정 실시예에 있어서, 바이사이클릭 당 부분은 베타 위치의 D 당이다. 특정 실시예에 있어서, 바이사이클릭 당 부분은 알파 위치의 L 당이다. 특정 실시예에 있어서, 바이사이클릭 당 부분은 베타 위치의 L 당이다.
- [0123] 특정 실시예에 있어서, 바이사이클릭 당 부분은 2'과 4'-탄소 원자 사이의 가교 기를 포함한다. 특정 실시예에 있어서, 가교 기는 1 내지 8 결합 바이라디칼 기를 포함한다. 특정 실시예에 있어서, 바이사이클릭 당 부분은 1 내지 4 결합 바이라디칼(biradical) 기를 포함한다. 특정 실시예에 있어서, 바이사이클릭 당 부분은 2 또는 3 결합 바이라디칼 기를 포함한다. 특정 실시예에 있어서, 바이사이클릭 당 부분은 2 결합 바이라디칼 기를 포함한다. 특정 실시예에 있어서, 결합 바이라디칼 기는 -O-, -S-, -N(R1)-, -C(R1)(R2)-, C(R1)=C(R1)-, -C(R1)=N-, -C(=NR1)-, -Si(R1)(R2)-, -S(=O)₂-, -S(=O)-, -C(=O)- 및 -C(=S)-로부터 선택된다(여기서, R1와 R2는 각각 독립적으로 H, 하이드록시, C1-C12 알킬, 치환된 C1-C12 알킬, C2-C12 알케닐, 치환된 C2-C12 알케닐, C2-C12 알키닐, 치환된 C2-C12 알키닐, C5-C20 아릴, 치환된 C5-C20 아릴, 이중환 라디칼, 치환된 이중환 라디칼, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, C5-C7 지환 라디칼, 치환된 C5-C7 지환 라디칼, 할로젠, 치환된 옥시(-O-), 아미노, 치환된 아미노, 아지도, 카복시, 치환된 카복시, 아실, 치환된 아실, CN, 티올, 치환된 티올, 설포닐(S(=O)₂-H), 치환된 설포닐, 설포시(S(=O)-H) 또는 치환된 설포시이고; 각 치환기는 독립적으로 할로젠, C1-C12 알킬, 치환된 C1-C12 알킬, C2-C12 알케닐, 치환된 C2-C12 알케닐, C2-C12 알키닐, 치환된 C2-C12 알키닐, 아미노, 치환된 아미노, 아실, 치환된 아실, C1-C12 아미노알킬, C1-C12 아미노알콕시, 치환된 C1-C12 아미노알킬, 치환된 C1-C12 아미노알콕시 또는 보호기이다).
- [0124] 일부 실시예에 있어서, 바이사이클릭 당 부분은 2' 및 4' 탄소 원자 사이에서 -O-(CH₂)_p-, -O-CH₂-, -O-CH₂CH₂-, -O-CH(알킬)-, -NH-(CH₂)_p-, -N(알킬)-(CH₂)_p-, -O-CH(알킬)-, -(CH(알킬))-(CH₂)_p-, -NH-O-(CH₂)_p-, -N(알킬)-O-(CH₂)_p-, 또는 -O-N(알킬)-(CH₂)_p-로부터 선택되는 바이라디칼 기와 가교된다(여기서, p는 1, 2, 3, 4 또는 5 이고, 각 알킬기는 치환될 수도 있다). 특정 실시예에 있어서, p는 1, 2 또는 3이다.
- [0125] 일 양태에서, 각 가교는 독립적으로 [C(R1)(R2)]_n-, -[C(R1)(R2)]_n-O-, -C(R1R2)-N(R1)-O- 또는 C(R1R2)-O-N(R1)-이다. 다른 양태에서, 각 가교는 독립적으로, 4'-(CH₂)₃-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-O-N(R1)-2' 및 4'-CH₂-N(R1)-O-2'-이다(여기서, 각 R1은 독립적으로 H, 보호기 또는 C1-C12 알킬이다).
- [0126] 변형된 당 부분을 포함하는 뉴클레오타이드에서 핵산염기 부분은 (자연, 변형 또는 이들의 화합물) 적절한 핵산 표적과 혼성화하도록 유지된다.
- [0127] 일 실시예에 있어서, 핵산에 표적화된 안티센스 화합물은 변형된 당 부분을 갖는 하나 이상의 뉴클레오타이드이다. 바람직한 실시예에 있어서, 변형된 당 부분은 2'-MOE이다. 다른 실시예에 있어서, 2'-MOE 변형 뉴클레오타이드는 갭머 모티프(gapmer motif)에 배열된다.
- [0128] 통상적으로 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 2' 위치에서 OH; F; O-, S-, 또는 N-알킬; O-, S- 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알키닐; 또는 O-알킬-O-알킬 중 하나를 포함한다(여기서, 알킬, 알케닐 및 알키닐은 치환되거나 치환되지 않은 C₁ 내지 C₁₀ 알킬 또는 C₂ 내지 C₁₀ 알케닐 및 알키닐이다). O[(CH₂)_nO]_n, CH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, 및 O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂가 특히 바람직하다(여기서, n과 m은 1 내지 약 10이다). 기타 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 2' 위치에 C₁ 내지 C₁₀ 저급 알킬, 치환 저급 알킬, 알케닐, 알키닐, 알카릴, 아랄킬, O-알카릴 또는 O-아랄킬, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알카릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환 실릴, RNA 분할기, 리포터기, 인터칼레이터, 올리고뉴클레오타이드의 약물동력 향상기, 또는 올리고뉴클레오타이드의 약력학 특성 향상기와 기타 유사한 특성을 갖는 치환기 중 하나를 포함한다. 바람직한 변형은 2'-메톡시에톡시(2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로도 알려져 있는 2'-O-CH₂CH₂ OCH₃)(Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504), 즉, 알콕시알콕시기를 포함한다. 보다 바람직한 변형은 2'-다이메틸아미노옥시에톡시(즉, 2'-DMAOE로도 알려져 있는 (CH₂)₂ON(CH₃)₂기), 및 2'-다이메틸아미노에톡시에톡시(2'-O-다이메틸아미노에톡시에틸 또는 2'-DMAEOE로도 알려져 있음, 즉, 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂)이다. 보다 바람직한 변형은 2'-하이드록시기

가 당 고리의 3' 또는 4' 탄소 원자와 결합하여 바이사이클릭 당 부분을 형성하는 바이사이클릭 핵산(잠금 핵산(LNA)이라고도 함)을 포함한다. 결합은 α-L-메틸렌옥시(4'-CH₂-O-2') BNA, β-D-메틸렌옥시(4'-CH₂-O-2') BNA 및 에틸렌옥시(4'-(CH₂)₂-O-2') BNA를 포함하는 산소 원자와 4' 탄소 원자를 가교하는 메틸렌(--CH₂--)_n기(여기서, n은 1 또는 2이다)가 바람직하다. 바이사이클릭 변형 당은 (6'S)-6' 메틸 BNA, 아미노옥시(4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA, 옥시아미노(4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA(여기서, R는 독립적으로 H, 보호기, 또는 C1-C12 알킬이다)를 포함한다. LNA도 열 친화성이 높은 상보적 DNA, RNA 또는 LNA과 함께 듀플렉스를 형성한다. 원편광 이색성(circular dichroism: CD) 스펙트럼은 완전히 변형된 LNA(특히, LNA: RNA)를 포함하는 듀플렉스가 A형 RNA:RNA 듀플렉스와 구조가 유사함을 나타낸다. LNA:DNA 듀플렉스의 핵자기공명(NMR) 실험을 통해 LNA 단량체의 3'-엔도 배치를 확인하였다. 이중 가닥 DNA의 인지는 LNA에 의한 가닥 침입을 나타내는 것도 증명되었다. 미스매치 서열 연구에 따르면 LNA는 대응하는 비변형 대조군 가닥에 비해 일반적으로 선택성이 향상되는 왓슨-크릭 염기쌍 형성을 따르는 것으로 나타났다.

[0129] LNA는 2'-하이드록시기가 당 고리의 4' 탄소 원자와 결합하여 2'-C,4'-C-옥시메틸렌 결합을 형성함으로써, 바이사이클릭 당 부분을 이룬다. 결합은 2' 산소 원자와 4' 탄소 원자를 가교하는 메틸렌(-CH₂-)_n기(여기서, n은 1 또는 2이다)일 수 있다(Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456). LNA와 LNA 유사체는 상보적인 DNA 및 RNA(Tm=+3 내지 +10°C)와 매우 높은 듀플렉스 열 안정성, 3'-외부핵산 분해 안정성과 우수한 용해성을 나타낸다. 기타 바람직한 가교기는 2'-데옥시-2'-CH₂OCH₂-4' 가교를 포함한다. LNA와 이들의 제조는 국제 특허 공개 WO 98/39352 및 WO 99/14226에 개시된다.

[0130] 기타 바람직한 변형은 2'-메톡시(2'-O-CH₃), 2'-아미노프로폭시(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-알릴(2'-CH₂-CH=CH₂), 2'-O-알릴(2'-O-CH₂-CH=CH₂) 및 2'-플루오로(2'-F)를 포함한다. 2'-변형은 아라비노(상부) 위치나 리보(하부) 위치일 수 있다. 바람직한 2'-아라비노 변형은 2'-F이다. 올리고뉴클레오타이드의 다른 위치(특히, 3' 말단 뉴클레오타이드의 당의 3' 위치 또는 2'-5' 결합 올리고뉴클레오타이드 및 5' 말단 뉴클레오타이드의 5' 위치)도 유사하게 변형될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 펜토피라노실 당 대신 사이클로뷰틸 부분 등 당 모사체나 치환체(surrogates)(경우에 따라 DNA 유사체라고도 함)를 갖는다. 이러한 변형된 당 구조의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허의 예로는 미국 특허 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; 및 5,700,920을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니며, 이들 중 일부 특허는 본 출원인의 권리이고, 참조 문헌으로 그 전문이 본 원에 편입된다. 특정 실시예에 있어서, 하기 화학식 중 하나를 갖는 모폴리노 고리, 사이클로핵세닐 고리, 사이클로핵실 고리 또는 테트라하이드로피라닐 고리 등 치환된 환계로 리보실 고리를 치환하여 뉴클레오타이드는 변형된다.

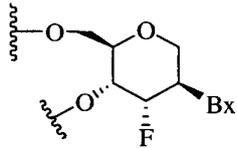


[0131]

[0132] 안티센스 화합물의 도입되는 뉴클레오타이드를 변형하는 데 이용될 수 있는 기타 다양한 이환 및 삼환 당 치환 고리 계가 당업계에 공지되어 있다(예를 들면, Leumann, Christian J., 검토 논문 참조). 이러한 고리 계는 다양한 치환과정을 통해 활성이 증진된다.

[0133] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 화합물은 테트라하이드로피라닐 고리가 피라노스 고리를 대체하는 적어도 하나의 테트라하이드로피라닐 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다.

[0134] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 적어도 하나의 테트라하이드로피라닐 변형된 뉴클레오사이드 각각은 하기 구조를 갖는다.



[0135]

[0136]

[0137]

[0138]

[0139]

[0140]

[0141]

[0142]

[0143]

상기 식에서, Bx은 선택적으로 보호된 이중환 염기기이다.

변형된 핵산염기

올리고뉴클레오타이드는 핵산염기(당업예에서 간단히 "염기"라고도 함) 변형 또는 치환도 포함한다. 핵산염기 변형 또는 치환은 구조적으로 구별되는 형태이지만, 자연발생적이나 합성 변형되지 않은 핵산염기와 기능적으로 서로 교환될 수 있다. 원래의 핵산염기와 변형된 핵산염기는 수소 결합에 참여할 수 있다. 이러한 핵산 염기 변형은 안티센스 화합물에 뉴클레아제 안정성, 결합 친화성 또는 기타 유리한 생물학적 특성을 부여한다. 변형된 핵산염기는 5-메틸시토신(5-me-C) 등 합성 및 자연 핵산염기를 포함한다. 5-메틸시토신 치환 등 특정한 핵산염기 치환은 표적 핵산에 대한 안티센스 화합물의 결합 친화성을 증진하는 데 특히 유용하다. 예를 들면, 5-메틸시토신 치환은 0.6-1.2°C까지 핵산 듀플렉스 안정성을 높이는 것으로 밝혀졌다(Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278).

기타 변형되지 않은 핵산염기는 5-하이드록시메틸 시토신, 크산틴, 하이포크산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌과 구아닌의 6-메틸 및 기타 알킬 유도체, 아데닌과 구아닌의 2-프로필 및 기타 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐(-C≡C-CH₃) 우라실 및 시토신 및 피리미딘 염기의 타 알킬 유도체, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실(유사 우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록시 및 기타 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로(특히 5-브로모), 5-트라이플루오로메틸 및 기타 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2-아미노-아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌을 포함한다.

이중환 염기기는 퓨린이나 피리미딘 염기가 다른 이중 고리로 치환되는 7-데아자-아데닌, 7-데아자구아노신, 2-아미노피리딘 및 2-피리돈 등의 이중환 염기기도 포함할 수 있다. 안티센스 화합물의 결합 친화성을 높이는 데 특히 유용한 핵산염기는 5-치환 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신 등을 포함한 N-2, N-6 및 O-6 치환 퓨린을 포함한다.

일 실시예에 있어서, CTGF 핵산에 표적화된 안티센스 화합물은 하나 이상의 변형된 핵산염기를 포함한다. 다른 실시예에 있어서, CTGF 핵산에 표적화된 겹이 넓은 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 핵산염기를 포함한다. 일부 실시예에 있어서, 변형된 핵산염기는 5-메틸시토신이다. 다른 실시예에 있어서, 이러한 시토신은 5-메틸시토신이다.

본 원에서 사용되는 "변형되지 않은"이나 "자연" 핵산염기는 퓨린 염기 아데닌(A) 및 구아닌(G), 및 피리미딘 염기 티민(T), 시토신(C) 및 우라실(U)을 포함한다.

변형된 핵산염기는 5-메틸시토신(5-me-C), 5-하이드록시메틸 시토신, 크산틴, 하이포크산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌과 구아닌의 6-메틸 및 기타 알킬 유도체, 아데닌과 구아닌의 2-프로필 및 기타 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐(-CsC-CH₃) 우라실 및 시토신피리미딘 염기의 기타 알킬 유도체, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실(유사 우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록시 및 기타 8-치환 아데닌 및 구아닌, 5-할로(특히 5-브로모), 5-트라이플루오로메틸 및 기타 5-치환 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2-아미노-아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌 등의 기타 합성 및 자연 핵산염기를 포함한다. 또한, 변형된 핵산염기는 폐녹사진 사이티딘(1H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조옥사진-2(3H)-온), 페노티아진 사이티딘(1H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조티아진-2(3H)-온) 등 삼환 피리미딘, 9-(2-아미노에톡시)-H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조옥사진-2(3H)-온, 카바졸 사이티딘(2H-피리미도[4,5-b]인돌-2-온), 피리도인돌 사이티딘(H-피리도[3',2':4,5]피롤로[2,3-d]피리미딘-2-온)와 같은 치환 폐녹사진 사이티딘 등의 G-클래프를 포함한다. 변형된 핵산염기는 7-데아자-아데닌, 7-데아자구아노신, 2-아미노피리딘 및 2-피리돈 등 퓨린이나 피리미딘 염기가 다른 이중고리로 치환되어 있는 핵산염기도 포함한다. 또한, 핵산염기는 미국 특허 제3,687,808호, 문헌[The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-

859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613], 및 문헌[Sanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B. ed., CRC Press, 1993]에 게시되어 있는 핵산염기를 포함한다.

[0144] 이들 핵산염기 중 일부는 본 발명의 올리고머 화합물의 결합 친화성을 증진하는 데 특히 유용하다. 이들은 5-치환 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함하는 N-2, N-6 및 O-6 치환 퓨린을 포함한다. 5-메틸시토신 치환은 0.6-1.20°C까지 핵산 듀플렉스 안정성을 높이는 것으로 나타났고(Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 조합되는 경우 현재 특히 바람직한 염기 치환이다.

[0145] 상술한 변형된 핵산염기와 기타 변형된 핵산염기의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허의 예로는 상술한 미국 특허 3,687,808과, 특허 중 일부는 본 출원인의 권리이고 본 원에 참조 문헌으로 편입되는 미국 특허 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096; 및 5,681,941과, 특허 중 일부는 본 출원인의 권리이고 본 원에 참조 문헌으로 편입되는 미국 특허 제 5,750,692를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0146] 안티센스 화합물 모티프

[0147] 본 발명의 실시예에 있어서, 화합물은 (a) 결합된 테옥시뉴클레오타이드(바람직하게는, 13개의 결합된 변형 테옥시뉴클레오타이드)로 구성되는 갭 세그먼트; (b) 결합된 변형 뉴클레오타이드(바람직하게는 2개의 결합된 변형 뉴클레오타이드)로 구성되는 5' 윙 세그먼트; 및 (c) 결합된 변형 뉴클레오타이드(바람직하게는 5개의 결합된 뉴클레오타이드)로 구성되는 5' 윙 세그먼트로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 갭 세그먼트는 5' 윙 세그먼트와 3' 윙 세그먼트 사이에 위치하고, 각 윙 세그먼트 내 변형된 뉴클레오타이드는 변형당을 포함하고(바람직하게는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고), 각 뉴클레오타이드간 결합은 포스포티오에이트 결합이다. 이러한 안티센스 화합물 내 변형된 뉴클레오타이드의 패턴을 "모티프"(motif)라 한다. 이러한 모티프는 저해 활성을 증진하고, 표적 핵산에 대한 결합 친화성을 높이거나, 생체 내 뉴클레아제 내분해성을 높인다.

[0148] 키메라 안티센스 화합물은 전형적으로 뉴클레아제 내분해성 증가, 세포 흡수 증가, 표적 핵산에 대한 결합 친화성 증가 및/또는 저해 활성 증가를 부여하도록 변형된 적어도 하나의 영역을 함유한다. 키메라 안티센스 화합물의 제2 영역은 임의로 RNA:DNA 듀플렉스의 RNA 가닥을 절단하는 세포 엔도뉴클레아제 RNaseH에 대한 기질로서 제공될 수 있다.

[0149] 갭머 모티프를 가지는 안티센스 화합물이 키메라 안티센스 화합물로 간주된다. 갭머에서, RNaseH 절단을 지원하는 다수의 뉴클레오타이드를 가지는 내부 영역은 내부 영역의 뉴클레오타이드와 화학적으로 상이한 다수의 뉴클레오타이드를 가지는 외부 영역 사이에 위치한다. 갭머 모티프를 가지는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 경우, 갭 세그먼트는 표적 핵산의 분할을 지원하는 반면, 윙 세그먼트는 안정성, 친화성 및 엑소뉴클레아제 내성을 향상시키기 위한 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 바람직한 실시예에 있어서, 갭머 영역은 각각 상이한 영역을 포함하는 타입의 당 부분으로 구분된다. 갭머 영역을 구분하기 위해 사용되는 타입의 당 부분은 일부 실시예에 있어서, β-D-리보뉴클레오타이드, β-D-데옥시리보뉴클레오타이드, 2'-변형된 뉴클레오타이드(여기에서 2'-변형된 뉴클레오타이드는 특히 2'-MOE 및 2'-O-CH₃일 수 있다) 및 바이사이클릭 당 변형된 뉴클레오타이드(이러한 바이사이클릭 당 변형된 뉴클레오타이드는 4'-(CH₂)_n-O-2' 브릿지(여기에서, n은 1 또는 2임)를 가지는 것을 포함할 수 있다)를 포함할 수 있다. 바람직하게, 상이한 각 영역은 균일한 당 부분을 포함한다. 윙-갭-윙 모티프는 종종 "X-Y-Z"(여기에서, "X"는 5' 윙 세그먼트의 길이를 나타내고, "Y"는 갭 세그먼트의 길이를 나타내며, "Z"는 3' 윙 세그먼트의 길이를 나타냄)로 나타내어진다. 본 원에 기재된 임의의 안티센스 화합물은 갭머 모티프를 가질 수 있다. 일부 실시예에 있어서, X 및 Z는 동일하고, 다른 실시예에 있어서 이들은 상이하다. 바람직한 실시예에 있어서, Y는 8 내지 15 뉴클레오타이드이다. X, Y 또는 Z는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 또는 그 이상의 뉴클레오타이드의 임의의 것일 수 있다. 요컨대, 본 발명의 갭머는 예를 들어, 2-13-5, 5-10-5, 4-8-4, 4-12-3, 4-12-4, 3-14-3, 2-16-2, 1-18-1, 3-10-3, 2-10-2, 1-10-1 또는 2-8-2를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0150] 일부 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 윙-갭 또는 갭-윙 구조, 즉, 갭머 구조에 대해 상술된 바와 같은 X-Y 또는 Y-Z 구조의 "윙머"(wingmer) 모티프를 가진다. 요컨대 본 발명의 윙머 구조는 예를 들어, 5-10, 8-4, 4-

12, 12-4, 3-14, 16-2, 18-1, 10-3, 2-10, 1-10 또는 8-2를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

- [0151] 일부 실시예에 있어서, 핵산에 표적화된 안티센스 화합물은 5-10-5 겹머 모티프를 지닌다.
- [0152] 일부 실시예에 있어서, 핵산에 표적화된 안티센스 화합물은 겹머 넓은 모티프를 지닌다. 다른 실시예에 있어서, 핵산에 표적화된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 겹머 넓은 모티프를 지닌다.
- [0153] 일부 실시예에 있어서, 핵산에 표적화된 겹머 넓은 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 3개의 화학적으로 변형된 뉴클레오사이드의 윙 세그먼트 사이에 위치한 14개의 2'-데옥시리보뉴클레오타이드의 겹머 세그먼트를 가진다. 일부 실시예에 있어서, 화학적 변형은 2'-당 변형을 포함한다. 또 다른 실시예에 있어서, 화학적 변형은 2'-MOE 당 변형을 포함한다.
- [0154] 겹머 모티프를 지니는 안티센스 화합물은 적어도 하나의 단량체 단위(즉, 올리고뉴클레오타이드 화합물인 경우 뉴클레오타이드)로 이루어지는 둘 이상의 화학적으로 다른 영역을 포함하는 "키메라"(chimeric) 안티센스 화합물이나 "키메라"(chimeras)인 것으로 본다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 뉴클레아제 내분비성 증가, 세포 흡수 증가, 표적 핵산에 대한 결합 친화성 증가, 및/또는 저해 활성 증가를 부여하도록 변형된 적어도 하나의 영역을 갖는다. 임의의 화합물의 전 영역이 균일하게 변형되어야 하는 것은 아니며, 사실상 상술한 변형 중 하나 이상이 하나의 화합물이나 올리고뉴클레오타이드 내부의 하나의 뉴클레오타이드에 도입될 수 있다.
- [0155] 다른 올리고뉴클레오타이드 영역은 RNA:DNA나 RNA:RNA 하이브리드를 절단할 수 있는 효소 기질로서 작용할 수도 있다. 일 예로서, RNase H는 RNA:DNA 듀플렉스의 RNA 가닥을 절단하는 세포 엔도뉴클레아제이다. 따라서, RNase H의 활성화는 RNA 표적의 절단을 초래하여, 올리고뉴클레오타이드의 유전자 발현 저해 효능을 크게 향상할 수 있다. 이에 따라, 키메라 올리고뉴클레오타이드를 이용하면, 동일한 표적 영역을 혼성화하는 포스포로티오에이트 데옥시올리고뉴클레오타이드에 비해 짧은 올리고뉴클레오타이드를 얻게 되는 대조적인 결과를 얻을 수 있다. RNA 표적의 절단은 겹머 전기영동에 의해 통상적으로 검출할 수 있고, 필요에 따라 당업계에 공지된 관련 핵산 혼성화 방법을 이용할 수도 있다.
- [0156] 본 발명의 키메라 안티센스 화합물은 상술한 바와 같이 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드, 변형된 올리고뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오사이드 및/또는 올리고뉴클레오타이드 모사체의 복합 구조로 형성될 수 있다. 당업계에서는 이러한 화합물을 하이브리드나 겹머라고도 한다. 이러한 하이브리드 구조 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허의 예로는 미국 특허 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; 및 5,700,922를 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 이들 중 일부는 본 출원인의 권리이고 본 원에 참조 문헌으로 편입된다.
- [0157] 겹머 모티프를 가지는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 경우, 겹머 세그먼트는 표적 핵산의 절단을 지원하는 반면, 윙 세그먼트는 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 바람직한 실시예에 있어서, 겹머 영역은 각각 상이한 영역을 포함하는 타입의 당 부분으로 구분된다. 겹머 영역을 구분하기 위해 사용되는 타입의 당 부분은 β-D-리보뉴클레오사이드, β-D-데옥시리보뉴클레오사이드, 2'-변형된 뉴클레오사이드(여기에서 2'-변형된 뉴클레오사이드는 2'-MOE를 포함할 수 있다) 및 바이사이클릭 당이 변형된 뉴클레오사이드를 포함할 수 있다.
- [0158] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 변형은 올리고뉴클레오타이드와 올리고뉴클레오타이드의 활성, 세포 분포 또는 세포 흡수를 증가하는 하나 이상의 기 또는 컨주게이트의 화학 결합을 수반한다. 본 발명의 화합물은 제1 또는 제2 하이드록시기 등 관능기와 공유 결합한 컨주게이트기를 포함할 수 있다. 본 발명의 컨주게이트기는 인터칼레이터, 레포터 분자, 폴리아민, 폴리아미드, 폴리에틸렌 글라이콜, 폴리메터, 올리고머의 약력학 특성을 증가하는 기, 올리고머의 약물동력 특성을 증가하는 기를 포함한다. 전형적인 컨주게이트기는 콜레스테롤, 지질, 인지질, 바이오틴, 페나진, 엽산, 페난트리딘, 안트라퀴논, 아크리딘, 플루오레세인, 로다민, 쿠마린 및 염료를 포함한다. 본 발명에 따르면, 약력 특성을 증가하는 기는 올리고머 흡수를 증진하고, 올리고머 내분해성을 높이고/높이거나 RNA와 서열-특이 혼성화를 증가한다. 본 발명에 따르면, 약물동력성을 증가하는 기는 올리고머 흡수, 분배, 대사 또는 분비를 증진하는 기를 포함한다. 대표적인 컨주게이트기는 그 전문이 참조 문헌으로 본 원에 편입되는 1992년 10월 23일에 출원된 국제 특허 출원 PCT/US92/09196에 개시된다. 컨주게이트기는 콜레스테롤 부분 등 지질 기(Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), 콜린산(Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1994, 4, 1053-1060), 티오에터, 예컨대, 핵실-S-트리틸티올(Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770), 티오펀올(Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), 지

방죽 사슬, 예컨대, 도데칸다이올 또는 운데실 잔기(Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), 인지질, 예컨대, 다이-핵사데실-락-글라이세롤 또는 트라이에틸-암모늄 1,2-다이-O-핵사데실-락-글리세로-3-H-포스포네이트(Manoharan et al., tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글라이콜 사슬(Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), 또는 아다만탄 아세트산(Manoharan et al., tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), 팔미틸기(Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), 또는 옥타데실아민이나 핵실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤기(Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937)를 포함한다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 아스피린, 와파린, 페닐부타존, 아이부프로펜, 수프로펜, 펜부펜, 케프로펜, (S)-(+)-피라노프로펜, 카프로펜, 단실사르코신, 2,3,5-타리아이오도벤조산, 플루페남산, 폴린산, 벤조티아디아자이드, 클로로티아자이드, 디아제핀, 인도메티신, 바르비투레이트, 세팔로스포린, 설과 약물, 당뇨병 약물, 항균제 또는 항생제 등 활성 약물 물질과 컨주게이트될 수도 있다. 올리고뉴클레오타이드-약물 컨주게이트와 이들의 제조는 본 원에 참조 문헌으로 그 전문이 편입되는 미국 특허 출원 제 09/334,130호(1999년 5월 15일 출원)에 개시된다.

[0159] 이러한 올리고뉴클레오타이드 컨주게이트 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허의 예로는 미국 특허 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717, 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241, 5,391,723; 5,416,203, 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 및 5,688,941을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 이들 중 일부는 본 출원인의 권리이고 본 원에 참조 문헌으로 편입된다.

[0160] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 화합물은 20개의 결합된 뉴클레오사이드로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0161] 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 화합물은 서열 번호 39, 40, 45, 52 및 166에 나타난 서열인 핵산염기 서열을 포함한다.

[0162] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 조성물은 결합된 뉴클레오사이드를 포함하고 핵산염기 서열이 서열 번호 28, 30, 39, 40, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 56, 78, 125 및 166로 나타내는 서열인 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 이들의 염과, 약제학상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함한다. 약제학상 허용되는 염의 예는 본 기술 분야의 당업자에게 자명하다.

[0163] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 CTGF 서열상 뉴클레오타이드 범위에서 상보적이다. 특정 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 서열 번호 9의 뉴클레오타이드 718-751, 1388-1423, 1457-1689, 2040-2069, 2120-2147, 또는 2267-2301 범위에서 상보적이다. 특정 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 서열 번호 10의 2728-2797 뉴클레오타이드 범위에서 상보적이다. 이들 범위에 표적화된 화합물은 적어도 50%의 저해성을 나타내었다(즉, 서열 번호: 15, 29, 31, 42, 46-49, 53, 72, 81, 82, 152-154, 164 및 165). 표 1에 제시한 특정 표적 부위는 적어도 50% 저해성을 입증하였다(즉, 서열 번호: 12, 20, 33, 34, 76, 107, 129, 132, 134, 136, 및 146). 특정 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 상보적 서열 번호 9의 뉴클레오타이드 553-611, 1394-1423, 1469-1508, 1559-1605, 1659-1689 또는 2100-2129 범위에서 상보적이고, 서열 번호 10의 2623-2647 뉴클레오타이드 범위에서 상보적이다. 여기서 표적으로 하는 화합물은 적어도 60% 저해성을 나타낸다(즉, 서열 번호: 27, 28, 38, 39, 40, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 54, 55, 56, 77, 78, 79, 138 및 139). 표 1에 나열되어 있는 특정 추가 표적 부위는 적어도 60% 저해성도 나타낸다(즉, 서열 번호: 24, 30, 61, 63, 67, 69, 73, 86, 125, 128, 및 161). 특정 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 뉴클레오타이드 1399-1423 범위에서 상보적이다. 본 원에서 표적화된 화합물은 적어도 70% 저해성을 나타낸다(즉, 서열 번호: 39 및 40). 표 1에 기재된 표적 부위는 적어도 70% 저해성도 나타낸다(즉, 서열 번호: 28, 30, 44, 45, 51, 56, 78, 128, 및 138). 표 1에 기재된 하나의 표적 부위는 적어도 80% 저해성도 나타낸다(즉, 서열 번호: 44). 특정 실시예에 있어서, 50 nm 농도의 안티센스 화합물이 HuVec 세포로 전달되면, 저해 퍼센트를 얻게 된다. 더 상세한 정보가 필요하면, 후술하는 실시예 8을 참조할 수 있다.

- [0164] 조성물의 실시예에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥이나 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이다. 본 발명의 다른 실시예는 20개의 결합된 뉴클레오사이드로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 본 발명의 다른 실시예는 결합 성장 인자의 발현을 저해할 수 있는 조건에서 대상 화합물을 세포나 조직에 접촉시키는 단계를 포함하는 세포나 조직에서 결합 조직 성장 인자의 발현을 저해하는 방법을 제공한다.
- [0165] 조성물 및 약제 조성물의 제제화 방법
- [0166] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약제 조성물 또는 제형을 제조하기 위해 약제학상 허용되는 활성 또는 불활성 물질과 혼합될 수 있다. 약제 조성물의 제형의 조성 및 방법은 투여 경로, 질환 정도 또는 투여 용량 등 다양한 기준에 의존하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0167] 핵산에 표적화된 안티센스 화합물은 안티센스 화합물을 적합한 약제학상 허용되는 희석제 또는 담체와 혼합함으로써 약제 조성물에 사용될 수 있다. 약제학상 허용되는 희석제는 포스페이트-완충 염수(PBS)를 포함한다. PBS는 비경구적으로 전달되는 조성물에 사용하기에 적합한 희석제이다. 따라서, 본원에 기재된 방법에 사용된 일 실시예는 핵산에 표적화된 안티센스 화합물 및 약제학상 허용되는 희석제를 포함하는 약제 조성물이다. 일 실시예에 있어서, 약제학상 허용되는 희석제는 PBS이다. 다른 실시예에 있어서, 약제학상 허용되는 희석제는 약학적 수준의 염수나 약학적 수준의 PBS이다. 다른 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0168] 안티센스 화합물을 포함하는 약제 조성물은 인간을 포함한 동물에 투여시(직접 또는 간접적으로) 생물학적으로 활성인 대사물 또는 그의 잔사를 제공할 수 있는 임의의 약제학상 허용되는 염, 에스터 또는 이러한 에스터의 염 또는 임의의 다른 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 안티센스 화합물의 약제학상 허용되는 염, 프로드럭, 이러한 프로드럭의 약제학상 허용되는 염 및 다른 생물학적 등가물과 관련한 개시가 도출된다. 약제학상 허용되는 적합한 염은 나트륨염 및 칼륨염을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0169] 프로드럭은 체내에서 내인성 뉴클레아제에 의해 절단되어 활성 안티센스 화합물을 형성하는, 안티센스 화합물의 한쪽 말단 또는 양 말단에 도입된 추가의 뉴클레오사이드를 포함할 수 있다.
- [0170] 특히, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 프로드럭 형은 WO 93/24510(Gosselin 등, 1993. 12. 9 공개) 또는 WO 94/26764 및 미국 특허 5,770,713(Imbach 등)에 개시된 방법에 따라 SATE[(S-아세틸-2-티오에틸)포스페이트] 유도체로서 제조된다.
- [0171] "약제학상 허용되는 염"(pharmaceutically acceptable salt)은 본 발명의 화합물의 생리학상 및 약제학상 허용되는 염을 말한다. 다시 말해, 모 화합물의 원하는 생물학적 활성을 보유하고, 이에 독물학적 효과를 미치지 않는 염을 말한다.
- [0172] 약제학상 허용되는 염기 부가염은 알칼리금속과 알칼리토금속이나 유기 아민 등 금속이나 아민으로 형성된다. 양이온으로 사용되는 금속의 예로는 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등을 들 수 있다. 적합한 아민의 예로는 N,N'-다이벤질에틸렌디아민, 클로로프로카인, 콜린, 다이에탄올아민, 다이사이클로헥실아민, 에틸렌디아민, N-메틸글루카민 및 프로카인을 들 수 있다(예를 들면, Berge et al., "Pharmaceutical salt," J. of Pharma Sci., 1977, 66, 1-19 참조). 산 화합물의 염기 부가염은 유리산 형태와 충분한 양의 바람직한 염기를 접촉시켜 종래의 방법으로 염을 형성하여 제조된다. 유리산 형태는 종래의 방법으로 염 형태와 산을 접촉하고 유리산을 분리하여 재생성될 수 있다. 유리산 형태는 별개의 염 형태와 극성 용매에서의 용해성 등 물리적 특징이 다소 상이하지만, 염은 본 발명의 목적을 위한 별개의 자유산과 동일하다. 본원에서 사용된 "약제학상 부가염"(pharmaceutical addition salt)은 본 발명의 조성물의 성분 중 하나의 산 형태의 약제학상 허용되는 염을 포함한다. 이들은 아민의 유기산염 또는 무기산염을 포함한다. 바람직한 산성염은 염산염, 아세트산염, 살리실산염, 질산염 및 인산염을 포함한다. 기타 적합한 약제학상 허용되는 염이 당업계에 알려져 공지되어 있으며, 그 예로는 염화수소산, 브롬화수소산, 황산 또는 인산 등 무기산으로 형성된 염기성염과; 유기 카복시산, 설펡산, 설포산 또는 포스포산 또는 N-치환 설펡산(예: 아세트산, 프로피온산, 글라이콜산, 숙신산, 말레산, 하이드록시말레산, 메틸말레산, 푸말산, 말산, 타르타르산, 락트산, 옥살산, 글루콘산, 글루카르산, 글루쿠론산, 시트르산, 벤조산, 신남산, 만델산, 살리실산, 4-아미노살리실산, 2-페녹시벤조산, 2-아세톡시벤조산, 엠본산, 니코틴산 또는 아이소니코틴산)으로 형성된 염기성염; 및 천연 단백질의 합성과 관련되는 20 알파-아미노산 등 아미노산(예: 글루탐산 또는 아스파르트산)으로 형성된 염기성염과, 페닐아세트산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 에탄-1,2-다이설폰산, 벤젠설폰산, 4-메틸벤젠설폰산, 나프탈렌-2-설폰산, 나프탈렌-1,5-다

이설펜산, 2-또는 3-포스포글리세라이트, 글루코스-6-포스페이트, N-사이클로헥실술폰산(시클라메이트의 형성과 함께), 또는 아스코르브산 등 기타 산 유기 화합물로 형성된 염기성염 등 다양한 무기산과 유기산의 염기성염을 들 수 있다. 화합물의 약제학상 허용되는 염은 약제학상 허용되는 양이온으로 제조될 수도 있다. 적합한 약제학상 허용되는 양이온은 당업계에 주지되어 있으며, 알칼리, 알칼리토류, 암모늄 및 4차 암모늄 양이온을 포함한다. 탄산염 또는 수소 탄산염도 가능하다.

[0173] 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 약제학상 허용되는 염의 바람직한 예로는 (a) 스페르민 및 스페르미딘 등 나트륨, 칼륨, 암모늄, 마그네슘, 칼슘, 폴리아민 양이온으로 형성된 염; (b) 염화수소산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 질산 등 무기산으로 형성된 산 부가염; (c) 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 숙신산, 말레산, 푸말산, 글루콘산, 시트르산, 말산, 아스코르브산, 벤조산, 탄닌산, 팔미트산, 알긴산, 폴리글루탐산, 나프탈렌설펜산, 메탄설펜산, p-톨루엔설펜산, 나프탈렌다이설펜산, 폴리갈락투론산 등 유기산으로 형성된 염; 및 (d) 염소, 브롬 및 요오드 등 음이온 원소로 형성된 염을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0174] 본 발명의 실시예에 있어서, 약제학상 허용되는 담체 또는 희석제는 약리 활성이 부족한 조성물의 성분이지만, 용매, 현탁제 또는 사람이나 사람 외 동물에 하나 이상의 핵산을 운반하는 약물학상 비활성 비히클로서 약물학상 필요하거나 바람직하다. 약물학상 담체는 본 기술 분야의 당업자에게 자명하다.

[0175] 담체

[0176] 본 발명의 조성물은 제형에 담체 화합물을 도입하기도 한다. 본 원에 사용된 "담체 화합물"(carrier compound) 이나 "담체"(carrier)는 불활성(즉, 그 자체는 생물학적 활성을 지니지 않음)이지만, 생물학적으로 활성인 핵산을 분해하거나 순환계로부터 이의 제거를 촉진하여 생물학적 활성을 지니는 핵산의 생체이용률을 감소시키는 생체 내 과정에 의한 핵산으로 간주되는 핵산이나 이들의 유사체를 말한다. 핵산과 담체 화합물의 공동 투여(전형적으로, 담체 화합물이 과잉 투여)는 간, 신장 또는 간, 신장 또는 기타 특이순환(extracirculatory) 저장소에서 회복되는 핵산량의 상당한 감소를 초래할 수 있고, 이는 공동 리셉터에 대한 담체 화합물과 핵산 간 경쟁에 따른 것으로 예측된다. 예를 들면, 폴리이노신산, 텍스트란 설펜이트, 폴리시티딘산 또는 4-아세트아미드-4' 아이소티오시아노-스틸벤-2,2'-다이설펜산과 함께 투여되는 경우, 간 조직 내 포스포포티오에이트 올리고뉴클레오타이드의 부분적인 회복이 감소할 수 있다(Miyao et al., Antisense Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., Antisense & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

[0177] 부형제

[0178] 담체 화합물과는 대조적으로, "약제학상 담체"(pharmaceutical carrier) 또는 "부형제"(excipient)는 동물에 하나 이상의 핵산을 운반하는 약제학상 허용되는 용매, 현탁제 또는 기타 약물학상 비활성 비히클이다. 부형제는 액체나 고체일 수 있고, 핵산과 임의의 약제 조성물의 다른 성분과 조합하는 경우 원하는 부피와 컨시스턴시(consistency)를 부여할 수 있도록 계획한 투여 방법으로 선택된다. 전형적인 약물학상 담체의 예로는 결합제(예컨대, 예비젤라틴화된 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스 등); 필러(예컨대, 락토오스 및 기타 당, 미세결정 셀룰로스, 펙틴, 젤라틴, 황산 칼슘, 에틸 셀룰로스, 폴리아크릴레이트 또는 인산 수소 칼슘 등); 유탈제(예컨대, 스테아르산 마그네슘, 탈크, 실리카, 콜로이드 실리콘 다이옥사이드, 스테아르산, 스테아르산 금속염, 수소치환 식물성 오일, 옥수수 전분, 폴리에틸렌 글라이콜, 벤조산 나트륨, 아세트산 나트륨 등); 붕괴제(예컨대, 전분, 글라이콜산 나트륨 전분 글라이콜 등); 및 습윤제(예컨대, 황산 나트륨 라우릴 등)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0179] 핵산과 유해하게 반응하지 않는 비경구 투여에 적합한 약제학상 허용되는 유기 또는 무기 부형제는 본 발명의 조성물을 제형화하는 데 이용될 수도 있다. 적합한 약제학상 허용되는 담체의 예로는 물, 염 용액, 알콜, 폴리 에틸렌 글라이콜, 젤라틴, 락토오스, 아밀로즈, 스테아르산 마그네슘, 탈크, 규산, 다양한 파라핀, 하이드록시 메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0180] 핵산의 국소 투여용 제형은 알콜 등 통상적인 용매 중 살균 및 비살균 수용액 또는 액상이나 고상 오일 베이스 중 핵산용액을 포함할 수 있다. 용액은 완충액, 희석제 및 기타 적합한 첨가제를 함유한다. 핵산과 불리하게 반응하지 않는 비경구에 적합한 약제학상 허용되는 유기 또는 무기 부형제가 이용될 수 있다.

[0181] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 조성물은 단일 가닥이나 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하고 20개의 결합된 뉴클레오사이드로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0182] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 세포나 조직을 결합 조직 성장 인자 발현을 저해하는 조건하에 상기 화합물 중 하나와 접촉시키는 과정을 포함하는 세포 또는 조직에 결합 조직 성장 인자의 발현을 저해하는 방법을 수반

한다.

- [0183] 본 발명의 실시예에 있어서, 결합 조직 성장 인자의 발현을 저해하는 데 유효한 양의 상기 화합물을 동물에 투여함으로써, 동물을 치료하는 것을 포함하는 결합 조직 성장 인자의 발현과 관련되는 질병이나 병태를 갖는 동물의 치료 방법을 수반한다.
- [0184] 본 발명의 방법에 실행하는 데 있어, 동물은 사람뿐만 아니라 사람 외 동물을 포함하며, 바람직하게는 사람이다.
- [0185] 본 발명은 본 발명의 안티센스 화합물을 포함하는 약제 조성물과 제형도 포함한다. 본 발명의 약제 조성물은 국소나 전신 처리가 바람직한 것인지의 여부와 치료 부위에 따라 다양한 방법으로 투여될 수 있다. 투여는 국소 ((안막과 질 및 직장 전달 등 점막 포함), 폐(예컨대, 뉴블라이저 등을 이용한 분말이나 에어로졸의 흡입이나 서플레이션), 기관내, 비강내, 상피내 및 경피내} 경구 또는 비경구 일 수 있다. 비경구 투여는 정맥내, 동맥내, 피하내, 복강내 또는 근육내 주사 또는 주입; 또는 두개내(예컨대, 척추강내 또는 심실내) 투여를 포함한다. 적어도 하나의 2'-O-메톡시에틸로 변형된 올리고뉴클레오타이드 경구 투여에 특히 유용한 것으로 여겨진다.
- [0186] 국소 투여용 약제 조성물과 제형은 경피내 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 점액, 좌약, 스프레이, 액상 및 분말을 포함한다. 종래의 약제 담체, 수용성, 분말성 또는 오일성 염기, 증점제 등이 필요하거나 바람직하다. 코팅 콘돔, 글러브 등도 이용될 수 있다. 바람직한 제형은 지질, 리포솜, 지방산, 지방산 에스터, 스테로이드, 킬레이트제 및 계면활성제 등 국소 운반제와 혼합된 제형을 포함한다.
- [0187] 바람직한 지질과 리포솜은 중성(예컨대, 다이올레오일 포스파티딜 DOPE 에탄올아민, 다이미리스토일포스파티딜 콜린 DMPC, 다이스테아롤포스파티딜 콜린), 음이온성(예컨대, 다이미리스토일포스파티딜 글라이세롤 DMPG) 및 양이온성(예컨대, 다이올레오일테트라메틸아미노프로필 DOTAP 및 다이올레오일 포스파티딜 에탄올아민 DOTMA)을 포함한다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 리포솜에 캡슐화되거나, 이와외 (특히, 양이온 리포솜) 착물을 형성할 수 있다. 아니면, 올리고뉴클레오타이드는 지질(특히, 양이온성 지질)과 착물을 형성할 수도 있다. 바람직한 지방산과 에스터는 아라티돈산, 올레산, 예이코산산, 라우르산, 카프릴산, 카프르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 다이카프레이트, 트라이카프레이트, 모노올레인, 다이라우린, 글라이세롤 1-모노카프레이트, 1-도데실아자사이클로헥탄-2-온, 아실카르니틴, 아실콜린, 또는 C₁₋₁₀ 알킬 에스터(예컨대, 아이소프로필미리스테이트 IPM), 모노글라이세라이드, 다이글라이세라이드 또는 이들의 약제학상 허용되는 염을 포함한다. 국소 제형은 본 원에 참조문헌으로 그 전문이 편입되는 미국 특허 출원 제 09/315,298(1999, 5. 20 출원)호에 상세하게 기술되어 있다.
- [0188] 경구 투여용 조성물과 제형은 분말이나 과립, 마이크로입자, 나노입자, 물이나 비수용성 매체 중 서스펜션이나 용액, 캡슐, 젤 캡슐, 사체(sachet), 정제나 미니정제를 포함한다. 증점제, 향료, 희석제, 유화제, 분산보조제 또는 바인더가 바람직할 수 있다. 바람직한 경구 제형은 본 발명의 올리고뉴클레오타이드와 하나 이상의 침투촉진제, 계면활성제 및 킬레이트제와 함께 투여되는 제형이다. 바람직한 계면활성제는 지방산 및/또는 이들의 에스터 또는 염, 담즙산 및/또는 이들의 염 이다. 바람직한 담즙산/염은 케노데옥시콜린산(CDCA) 및 우르소데옥시케노데옥시콜린산(UDCA), 콜린산, 다이하이드로콜린산, 데옥시콜린산, 글루콜린산, 글라이콜린산, 글리코데옥시콜린산, 타우로콜린산, 타우로데옥시콜린산, 나트륨 타우로-24, 25-다이하이드로-후시테이트, 소듐 글리코다이하이드로후시테이트를 포함한다. 바람직한 지방산은 아라티돈산, 운데칸산, 올레산, 라우르산, 카프릴산, 카프르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 다이카프레이트, 트라이카프레이트, 모노올레인, 다이라우린, 글라이세롤 1-모노카프레이트, 1-도데실아자사이클로헥탄-2-온, 아실카르니틴, 아실콜린, 또는 모노글라이세라이드, 다이글라이세라이드 또는 이들의 약제학상 허용되는 염(예컨대, 나트륨)을 포함한다. 또한, 침투촉진제와의 혼합물, 예를 들면, 담즙산/염과 지방산/염의 혼합물이 바람직하다. 특히 바람직한 혼합물은 라우르산, 카프르산 및 UDCA의 나트륨염이다. 또한, 침투촉진제는 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에터, 폴리옥시에틸렌-20-세틸 에터를 포함한다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 분무 건조 입자를 포함하는 과립 형태로 경구 투여되거나, 착물을 형성하여 마이크로입자 또는 나노입자를 형성한다. 올리고뉴클레오타이드 착화제는 폴리아미노산; 폴리이미드; 폴리아크릴레이트; 폴리알킬아크릴레이트, 폴리옥세탄, 폴리알킬시아노아크릴레이트; 양이온 젤라틴, 알부민, 전분, 아크릴레이트, 폴리에틸렌글라이콜(PEG) 및 전분; 폴리알킬시아노아크릴레이트; DEAE-유도체 폴리이미드, 폴루란(pollulan), 셀룰로스 및 전분을 포함한다. 특히 바람직한 착화제는 키토산, N-트라이메틸키토산, 폴리-L-리신, 폴리히스티딘, 폴리오르니틴, 폴리스페르민, 프로타민, 폴리비닐피리딘, 폴리티오다이에틸아미노메틸-에틸렌 P(TDAE), 폴리아미노스티렌(예컨대, p-아미노), 폴리(메틸시아노아크릴레이트),

폴리(에틸시아노아크릴레이트), 폴리(뷰틸시아노아크릴레이트), 폴리(아이소뷰틸시아노아크릴레이트), 폴리(아이소-헥실시아노아크릴레이트), DEAE-메타크릴레이트, DEAE-헥실아크릴레이트, DEAE-아크릴아미드, DEAE-알부민 및 DEAE-텍스트란, 폴리메틸아크릴레이트, 폴리헥실아크릴레이트, 폴리(D,L-락트산), 폴리(DL-락트-코-글라이콜산(PLGA), 알긴산, 및 폴리에틸렌-글라이콜(PEG)을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드 경구 제형과 이들의 제조는 참조 문헌으로서 본 원에 그 전문이 편입되는 미국 출원 제08/886,829호(1997년 7월 1일 출원), 제 09/108,673호(1998년 7월 1일 출원), 제09/256,515호(1999년 2월 23일 출원), 제 09/082,624호(1998년 5월 21일 출원) 및 제 09/315,298(1999년 5월 20일 출원)에 상세히 기술되어 있다.

[0189] 비경구, 척추강내 또는 심실내 투여용 조성물과 제형은 완충액, 희석제 및 기타 적합한 첨가제(침투촉진제, 담체 화합물 및 기타 약제학상 허용되는 담체 또는 부형제 등 포함하지만, 이에 제한되지 않음)를 함유하는 멸균 수용액을 포함한다.

[0190] 본 발명의 약제 조성물은 용액, 에멀전 및 리포솜 함유 제형을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 조성물은 프리폼 액체, 자가유화성 고체 및 자가유화성 반고체 성분으로 형성되지만, 이들 성분에 제한되지는 않는다.

[0191] 종래에 단위 복용 형태로 제시되는 본 발명의 약제 제형은약품 산업에 주지되어 있는 종래의 방법에 따라 제조될 수 있다. 이러한 방법은 유효 성분과 약제 담체(들) 또는 부형제(들)를 조합하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 유효 성분을 액상 담체, 미세분쇄된 고상 담체 또는 이들 모두와 균일하게 직접 혼합하거나, 필요에 따라, 그 후 생성물을 성형하여 제조된다.

[0192] 본 발명의 조성물은 정제, 캡슐, 젤 캡슐, 액상 시럽, 연성 젤, 좌약 및 관장제 등 투약 형태로 제형화되며, 이들 형태에 제한되지는 않는다. 본 발명의 조성물은 수성, 비수성 또는 이들의 혼합 매체 서스펜션으로 제형화될 수도 있다. 수성 서스펜션은 나트륨 카복시메틸-셀룰로스, 소르비톨 및/또는 텍스트란 등 서스펜션의 점성을 증진하는 물질을 더 함유할 수도 있다. 서스펜션은 안정화제를 포함할 수도 있다.

[0193] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 약제 조성물은 제형화되어 포말로서 이용될 수 있다. 약제 포말은 에멀전, 마이크로에멀전, 크림, 젤리 및 리포솜 등 제형을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 제형은 기본적으로 특성이 유사하면서, 최종 생성물의 성분과 농도(consistency)는 다르다. 이러한 조성물과 제형의 제조는 약물 제형 분야의 당업자에게 일반적으로 공지되어 있고, 본 발명의 조성물의 제형에 적용될 수 있다.

[0194] 에멀전

[0195] 본 발명의 조성물은 제조되어 에멀전으로 제형화된다. 에멀전은 전형적으로 직경이 0.1 um 이상인 비말 형태로 서로 분산되어 있는 액상 이질계이다(Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). 에멀전은 직접 혼합되어 서로 분산되는 두 개의 섞이지 않는 액상으로 구성되는 2상 계일 수도 있다. 일반적으로, 에멀전은 유중수(w/o) 또는 수중유(o/w) 중 하나일 수 있다. 수상이 거대한 유상의 미세 비말로 미세분리되어 분산될 때, 얻는 조성물을 유중수(w/o) 에멀전이라 한다. 이와는 달리, 유상이 미세 비말로서 거대한 유상으로 미세분리되어 분산될 때, 얻게 되는 조성물을 수중유(o/w) 에멀전이라 한다. 에멀전은 분산상뿐만 아니라 기타 성분과 수상, 유상의 용액이나 별개의 상 그 자체로 포함될 수 있는 활성 약물을 함유할 수도 있다. 유화제, 안정화제, 염료, 및 향산화제 등 약제 부형제도 필요에 따라 에멀전에 포함될 수도 있다. 약제 에멀전은 유중수중유(o/w/o) 및 수중유중수(w/o/w) 에멀전의 경우에 둘 이상의 상을 포함하는 다중 에멀전일 수도 있다. 이러한 복합 제형은 단순 2원 에멀전이 지니지 않는 특정 이점이 있다. o/w 에멀전의 각 유상 비말이 작은 물 비말을 둘러싸는 다중 에멀전은 w/o/w 에멀전을 구성한다. 마찬가지로, 유상에 안정화된 물 소구체에 에워싸인 유상 비말계는 연속하여 o/w/o 에멀전을 제공한다.

[0196] 에멀전은 열역학적 안정성이 낮거나 없는 특성이 있다. 종종, 에멀전의 분산상 또는 비연속상은 외부상이나 연속상으로 원활하게 분산되어 유화제나 제형의 점도를 수단으로 이러한 형태로 유지된다. 에멀전형 연고 베이스와 크림인 경우에 에멀전 상 중 어느 하나는 반고체나 고체일 수 있다. 에멀전을 안정화하는 다른 방법은 에멀전 상으로 도입될 수 있는 유화제의 사용을 수반한다. 유화제는 크게 합성 계면활성제, 자연발생 유화제, 흡수 베이스, 및 미세분산 고체의 네 종류로 분류된다(Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger

and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199).

- [0197] 표면활성제로도 알려져 있는 합성 계면활성제는 에멀전 제형에 널리 이용할 수 있는 것으로 밝혀져 문헌에서 검토되었다(Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 285; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). 계면활성제는 전형적으로 양친매성이고 친수성부와 소수성부를 포함한다. 계면활성제의 친수성부와 소수성부의 비율은 친수-친유 발란스(HLB)라고 하고, 제형의 제조에 있어 계면활성제를 분류하고 선택하기에 중요한 도구이다. 계면활성제는 친수성부의 성질에 따라 비이온성, 이온성, 양이온성 및 양쪽성의 상이한 종류로 구분될 수 있다(Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 285).
- [0198] 에멀전 제형에 이용되는 자연발생적 유화제는 라놀린, 밀랍, 인지질, 레시틴 및 아카시아를 포함한다. 흡수 베이스는 물을 흡수하여 w/o 에멀전을 형성할 수 있는 친수성을 지니지만, 무수 라놀린과 친수성 광유 등 이들의 반고체 컨시스턴시(consistency)를 유지한다. 미세분리 고체는 특히 계면활성제와 함께 좋은 유화제로서 점성제제로서 이용되어 왔다. 이들은 중금속 수산화물 등 극성 무기 고체, 벤토나이트, 애터펄자이트, 핵토라이트, 카올린, 몬모틸로나이트, 콜로이드성 알루미늄 실리케이트 및 콜로이드성 마그네슘 알루미늄 실리케이트 등 비팽창성 클레이, 색소 및 탄소 또는 글라이세롤 트라이스테아레이트 등 비극성 고체를 포함한다.
- [0199] 매우 다양한 비유화성 물질은 유화 제형에 포함되기도 하고 에멀전의 특성에 기여한다. 이들은 지방, 오일, 왁스, 지방 알콜, 지방 에스터, 습윤제, 친수성 콜로이드, 보존제 및 항산화제(Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 335; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199)를 포함한다.
- [0200] 친수성 콜로이드 또는 하이드로콜로이드는 다당류 등 자연 유래 검 및 합성 중합체(예를 들면, 아카시아, 한천, 알긴산, 카라기닌, 구아검, 카라야 검, 및 트래거캔스 고무), 셀룰로스 유도체(예를 들면, 카복시메틸셀룰로스 및 카복시프로필셀룰로스), 및 합성 중합체(예를 들면, 카보머, 셀룰로스 에터, 및 카복시비닐 중합체)를 포함한다. 이들은 물에서 분산되거나 팽창되어 분산상 비말 주위에 강한 계면 막을 형성하고 외부 상의 점성을 증가함으로써 에멀전을 안정화하는 콜로이드 용액을 형성한다.
- [0201] 에멀전은 미생물의 성장을 쉽게 지지할 수 있는 탄수화물, 단백질, 스테롤 및 인지질 등 다양한 성분을 함유하기도 하기 때문에, 이들 제형은 보존제를 포함하기도 한다. 에멀전에 포함되는 통상적으로 이용되는 보존제는 메틸파라벤, 프로필파라벤, 4차 암모늄염, 벤즈알코니움 클로라이드, p-하이드록시벤조산의 에스터 및 붕산을 포함한다. 통상적으로 항산화제도 유화 제형에 포함되어 제형의 저하를 방지한다. 사용된 항산화제는 토코페롤, 알킬 갈산, 뷰틸화 하이드록시안니솔, 뷰틸화 하이드록시톨루엔 등 자유 라디칼 제거제(scavenger) 또는 아스코르브산 및 메타중아황산나트륨 등 감소제, 및 시트르산, 타르타르산 및 레시틴 등 항산화 상승제를 포함한다.
- [0202] 피부, 경구 및 비경구 경로를 통한 에멀전 제형의 적용은 문헌(Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199)에서 검토되었다. 경구 투여 에멀전 제형은 제형의 용이성, 흡수 및 생체이용성 측면에서의 효능 덕분에 널리 이용되고 있다(Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 245; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199). 미네랄 오일계 완하제, 유용성 비타민 및 고지방 영양 제제는 o/w 에멀전로서 통상적으로 경구 투여되는 물질에 속한다.
- [0203] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 올리고뉴클레오타이드와 핵산의 조성물은 마이크로에멀전으로 제형화된다. 마이크로에멀전은 단일 광학적 등방성이고 열역학적으로 안정한 용액인 수계, 유계 및 양친매제로 정의될 수 있다(Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 245). 전형적으로, 마이크로에멀전은 우선 수성 계면활성제 용액에 오일을 분산한 후, 제4 성분(일반적으로, 중-사슬 길이의 알콜) 충분한 양을 첨가하여 투명계를 형성함으로써 제조된다. 따라서, 마이크로에멀전은 표면활성 분자의 계면 막에 의해 안정화되는 두 개의 섞이지 않는 액체의 열역학적으로 안정하고, 등방적으로 투명한 분산액으로서도 기술된다(Leung and Shah, in: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). 마이크로에멀전은 통상적으로 오일, 물, 계면활성제, 공-계면활성제 및 전해질을 포함하는 셋 내지 다섯

성분을 혼합하여 제조된다. 마이크로에멀전이 유중수(w/o) 또는 수중유(o/w) 형인지의 여부는 사용된 오일과 계면활성제의 특성과 계면활성제 분자의 극성 헤드와 탄화수소 테일의 구조와 기하학적 패킹에 따른다(Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

[0204] 상평형 그림을 이용한 현상학적 접근은 본 기술 분야의 당업자에게 폭넓게 연구되어 마이크로에멀전의 제형화 방법에 대한 광대한 지식을 제공하였다(Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 245; 블릭, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 335). 종래 에멀전에 비해, 마이크로에멀전은 자발적으로 형성되는 열역학적으로 안정한 비말의 제형에서 비수용성 약물을 용해할 수 있는 이점을 부여한다.

[0205] 마이크로에멀전의 제조에 이용되는 계면활성제의 예로는 이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, Brij 96, 폴리옥시에틸렌 올레일 에터, 폴리글라이세롤 지방산 에스터, 테트라글라이세롤 모노라우레이트(ML310), 테트라글라이세롤 모노올레이트(MO310), 헥사글라이세롤 모노올레이트(PO310), 헥사글라이세롤 펜타올레이트(PO500), 데카글라이세롤 모노카프레이트(MCA750), 데카글라이세롤 모노올레이트(MO750), 데카글라이세롤 세퀴올레이트(SO750), 데카글라이세롤 데카올레이트(DA0750), 또는 공-계면활성제와의 혼합물을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 대개 에탄올, 1-프로판올, 및 1-부탄올 등 단사슬 알콜인 공-계면활성제는 계면활성제 막에 침투하여 계면활성제 분자 중에 형성된 간극에 의해 무질서 막을 형성함으로써 계면 유동성을 높이는 역할을 한다. 그러나, 마이크로에멀전은 공-계면활성제와 알콜 프리 자가 유화성 마이크로에멀전 계를 이용하지 않고도 제조될 수 있음이 당업계에 공지되어 있다. 수상은 전형적으로 물, 약물 수용액, 글라이세롤, PEG300, PEG400, 폴리글라이세롤, 프로필렌 글라이콜 및 에틸렌 글라이콜유도체를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 수상은 전형적으로 Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, 지방산 에스터, 중사슬(C8-C12) 모노, 다이 및 트라이-글라이세라이드, 폴리옥시에틸화 글라이세롤 지방산 에스터, 지방 알콜, 폴리글라이콜화 글라이세라이드, 포화 폴리글라이콜화 C8-C10 글라이세라이드, 식물성 오일 및 실리콘 오일 등일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0206] 마이크로에멀전은 약물 가용성과 약물의 흡수 증진의 측면에 있어 특히 유리하다. 지질계 마이크로에멀전(o/w 및 w/o)은 펩티드를 이용한 약물의 경구 생체이용성을 증진하도록 제안되었다(Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). 마이크로에멀전은 약물 가용성 증진, 효소 가수분해로부터 약물의 보호, 계면활성제 유도 막 유동성과 침투성 변화에 의한 약물 침투 향상가능성, 제조 용이성, 고상 복용형태 경구 투여의 용이성, 임상 효능 증진 및 독성 감소의 이점이 있다(Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143). 마이크로에멀전은 실온에서 이들의 성분이 함께 접촉하면 자발적으로 형성되기도 한다. 이는 열 불안정성 약물, 펩티드 또는 올리고뉴클레오타이드를 제형화하는 경우에 특히 유리하다. 마이크로에멀전은 미용 및 약물 용도로 활성 성분의 경피 내 투여에 효과적이었다. 이는 본 발명의 마이크로에멀전 조성물과 제형은 위장관으로부터 올리고뉴클레오타이드와 핵산의 전신 흡수 증가를 촉진할 뿐만 아니라, 위장관, 질, 구강 및 기타 투여 영역 내부에서의 올리고뉴클레오타이드와 핵산의 국소 세포 흡수도 증진할 것으로 예상된다.

[0207] 본 발명의 마이크로에멀전은 소르비탄 모노스테아레이트(Grill 3), Labrasol 등 부가 성분과 첨가제와, 제형의 특성을 향상하고 본 발명의 올리고뉴클레오타이드와 핵산의 흡수를 증진하는 침투촉진제를 포함할 수도 있다. 본 발명의 마이크로에멀전에 이용되는 침투촉진제는 계면활성제, 지방산, 담즙산염, 킬레이트제, 및 비킬레이트성 비-계면활성제의 광범위한 다섯 카테고리 중 하나에 포함되는 것으로 분류된다(Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92). 각 종류는 앞서 논의하였다.

[0208] 리포솜

[0209] 약물 제형으로 연구 및 이용되어 온 마이크로에멀전 뿐만 아니라 다양한 유기 계면활성제 구조가 있다. 이들은 단층, 미셀, 이중층 및 소포를 포함한다. 리포솜 등 소포는 약물 전달성 측면에서 그들이 제공하는 특이성과 활성 주기에 의해 많은 흥미를 끌고 있다. 본 발명에서 사용한 "리포솜"은 구형 이중층 또는 이중층들에 배열된 양친매성 지질로 구성되는 소포를 의미한다.

[0210] 리포솜은 친유성 물질과 수성 내부로 형성되는 막을 갖는 단일라멜라 또는 다중라멜라 소포이다. 수상은 전달되는 조성물을 함유한다. 양이온 리포솜은 세포벽에 융합될 수 있는 이점이 있다. 비양이온 리포솜은 세포벽과 효과적으로 융합되지 못하더라도 생체 내 마크로파지에 의해 흡수된다.

- [0211] 원래의 포유류 피부를 클로스하기 위해, 적합한 경피내 그라디언트의 영향하에 지질 소포를 직경이 50 nm 이하 인 일련의 미세 기공에 통과시킨다. 따라서, 변형가능성이 높고 소포미세 기공을 통과할 수 있는 리포솜을 이용하는 것이 바람직하다.
- [0212] 리포솜은 천연 인지질에서 얻은 리포솜은 생체적합하고 생체분해가능하고, 리포솜은 광범위한 수용성 및 지용성 약물을 도입할 수 있고, 리포솜은 대사작용과 분해로부터 내부 컴파트먼트(compartment)에서 캡슐화된 약물을 보호할 수 있는 다른 이점이 있다(Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 245). 리포솜 제형 제조에 있어 중요하게 고려해야 할 것은 리포솜의 지질 표면 전하, 소포 크기 및 수성 부피이다.
- [0213] 리포솜은 작용 부위에 유효 성분을 운반 및 전달하는 데 유용하다. 리포솜이 조직에 적용되는 경우, 리포솜막은 생물의 막과 구조가 유사하므로, 리포솜은 세포막과 병합되기 시작한다. 리포솜과 세포의 병합이 진행됨에 따라, 리포솜 성분은 활성제가 작용하는 세포로 공동화된다.
- [0214] 리포솜 제형은 다양한 약물의 전달 모드로서 광범위한 조사에 중심이 되어 왔다. 국소 투여에 있어 리포솜이 다른 제형보다 많은 이점이 있음이 점차 입증되고 있다. 이러한 이점으로서 투여 약물의 높은 전신 흡수와 관련되는 부작용 감소와 원하는 표적 내 투여 약물의 축적 증가와 매우 다양한 친수성과 소수성 약물의 피부로의 투여 가능성을 들 수 있다.
- [0215] 분자량이 높은 DNA를 포함하는 약물을 피부에 전달할 수 있는 리포솜의 기능이 상세하게 보고되었다. 진통제, 항체, 호르몬 및 고분자량 DNA를 포함하는 화합물은 피부에 투여되었다. 다수의 적용은 상 표피의 표적화를 초래한다.
- [0216] 리포솜은 크게 두 종류로 나뉜다. 양이온 리포솜은 음전하 DNA 분자와 상호 작용하여 안정한 복합체를 형성하는 양전하 리포솜이다. 양전하 DNA/리포솜 복합체는 음전하의 세포면과 결합하고 엔도솜에 내포된다. 엔도솜의 산성 pH에 의해 리포솜이 포획되어 이들의 성분을 세포질로 방출한다(Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).
- [0217] pH에 민감하거나 음전하를 갖는 리포솜은 그와의 복합체를 형성하기보다 DNA를 포획한다. DNA와 지질은 유사한 전하를 지니므로, 복합체 형성보다는 반발력이 생성된다. 그럼에도 불구하고, 이들 리포솜의 수상 내에 포획된다. pH에 민감한 리포솜은 배양 중 세포 단층에 티미딘 키나아제 유전자를 전달하는 데 이용되어 왔다. 외인성 유전자의 발현은 표적 세포에서 검출되었다(Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).
- [0218] 리포솜 조성물의 주요 형태는 자연 유래 포스파티딜콜린이 아니라 인지질을 포함한다. 중성 리포솜 조성물은 예컨대 다이미리스토일 포스파티딜콜린(DMPC) 또는 다이팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC)으로 형성될 수 있다. 음이온 리포솜 조성물은 일반적으로 다이미리스토일 포스파티딜글라이세롤로 형성되는 것에 반해, 양이온 융합성(fusogenic) 리포솜은 주로 다이올레오일 포스파티딜에탄올아민(DOPE)으로 형성된다. 다른 형태의 리포솜 조성물은 대두 PC 및 계란 PC 등 포스파티딜콜린(PC)으로 형성된다. 다른 형태는 인지질 및/또는 포스파티딜콜린 및/또는 콜레스테롤의 혼합물로 형성된다.
- [0219] 몇 연구에서 리포솜 약물 제형의 피부로의 국소 전달이 평가되었다. 인터페론을 함유하는 리포솜을 기니 돼지 피부에 적용하면 피부 포진이 감소하고, 다른 수단(예컨대, 용액이나 에멀전)에 의한 인터페론의 전달이 비효율적이다(Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405-410). 또한, 다른 연구에서는 수계를 이용한 인터페론의 투여에 대한 리포솜 제형의 일부로서 투여한 인터페론의 효능을 시험하고, 리포솜 제형은 수계 투여가 우월하다는 결론을 얻었다(du Plessis et al., *Antiviral Research*, 1992, 18, 259-265).
- [0220] 비이온성 리포솜계(특히, 비이온성 계면활성제와 콜레스테롤을 포함하는 리포솜계)의 피부로의 약물 전달 유용성을 확인하기 위해 조사되었다. Novasome™ I(글라이세롤 다이라우레이트/콜레스테롤/폴리옥시에틸렌-10-스테아릴 에터)과 Novasome™ II(글라이세롤 다이스테아레이트/콜레스테롤/폴리옥시에틸렌-10-스테아릴 에터)를 포함하는 비이온성 리포솜 제형을 이용하여 마우스 피부의 진피로 사이클로스포린-A를 전달하였다. 그 결과로서, 이러한 비이온성 리포솜계는 상이한 피부층에 사이클로스포린-A의 부착을 촉진하는 데 효과적인 것으로 나타났다(Hu et al. *S .T. P. Pharma. Sci.*, 1994, 4, 6, 466).
- [0221] 리포솜은 지질 리포솜에 도입되면 특이 지질이 부족한 리포솜에 비해 순환 주기를 높이는 하나 이상의 특이 지질을 포함하는 리포솜을 말하는 "입체구조가 안정한"(sterically stabilized) 리포솜도 포함한다.

- [0222] 입체구조가 안정한 리포솜의 예로는 리포솜의 소포형성 지질부 일부가 (A) 모노시알로갱글리오사이드(G_{MI}) 등 하나 이상의 글라이콜지질을 포함하거나 (B) 폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 부분 등 하나 이상의 친수성 중합체로 유도되는 것을 들 수 있다. 특정 이론에 국한되지 않으나, 당업예에서는 적어도 갱글리오사이드, 스펅고미엘린, 또는 PEG-유도 지질을 함유하는 입체구조가 안정한 리포솜에 있어서, 이들 입체구조가 안정한 리포솜 순환 반감기 증진은 세망내피계(RES) 세포로의 흡수의 감소에 의한 것이라 여겨진다(Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).
- [0223] 당업예에 하나 이상의 글라이콜지질을 포함하는 다양한 리포솜이 공지되어 있다. Papahadjopoulos 등(Ann. N. Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64)은 모노시알로갱글리오사이드 G_{MI} , 갈락토세레브로사이드 설페이트 및 포스파티딜이노시톨의 리포솜이 혈액반감기를 향상할 수 있음을 보고하였다. 이러한 발견은 Gabizon 등(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949)에 의해 충분히 설명되었다. 미국 특허 4,837,028 및 WO 88/04924(모두 Allen 등)은 (1) 스펅고미엘린과 (2) 갱글리오사이드 G_{MI} 또는 갈락토세레브로사이드 설페이트 에스터를 포함하는 리포솜을 개시한다. 미국 특허 5,543,152(Webb 등)는 스펅고미엘린을 포함하는 리포솜을 개시한다. 1,2-sn-다이미리스토일포스파티딜콜린을 포함하는 리포솜이 WO 97/13499(Lim 등)에 개시된다.
- [0224] 하나 이상의 친수성 중합체로 유도체화된 지질을 포함하는 많은 리포솜과 이들의 제조 방법은 당업예에 공지되어 있다. Sunamoto 등(Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778)은 PEG 기를 함유하는 비이온 세정제, 2C₁₂ 15G 를 포함하는 리포솜을 개시한다. Ilium 등(FEBS Lett., 1984, 167, 79)은 폴리스티렌 입자와 중합성 글라이콜의 친수성 코팅은 혈액반감기를 크게 향상시키는 것이라고 언급하였다. 폴리알킬렌 글라이콜(예컨대, PEG)에 카복시기의 부착에 의한 합성 인지질 변형은 Sears(미국 특허 4,426,330 및 4,534,899)에 의해 설명되었다. Klivanov 등(FEBS Lett., 1990, 268, 235)은 PEG이나 PEG 스테아레이트로 유도체화된 포스파티딜에탄올-아민(PE)을 포함하는 리포솜은 혈액 순환 반감기를 크게 높이는 것을 입증하는 실험을 기술하였다. Blume 등(Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91)은 이러한 관찰을 다이스테아로일포스파티딜에탄올아민(DSPE)과 PEG의 혼합물로 형성되는 다른 PEG-유도체화 인지질(예컨대, DSPE-PEG)로 확장하였다. 외표면에 공유 결합 PEG기를 지니는 리포솜은 유럽 특허 제 EP 0 445 131 B1호 및 WO 90/04384(Fisher)에 개시된다. PEG로 유도된 PE 1-20 몰 퍼센트를 함유하는 리포솜 조성물과 이들의 이용 방법은 Woodle 등(미국 특허 5,013,556 및 5,356,633) 및 Martin 등(미국 특허 5,213,804 및 유럽 특허 EP 0 496 813 B1)에 의해 설명되었다. 기타 많은 지질-중합체 컨쥬게이트를 포함하는 리포솜이 WO 91/0554 및 미국 특허 5,225,212(모두 Martin 등)와 WO 94/20073(Zalipsky 등)에 개시된다. PEG-변형 세라마이드 지질을 포함하는 리포솜은 WO 96/10391(Choi 등)에 개시된다. 미국 특허 5,540,935(Miyazaki 등) 및 5,556,948(Tagawa 등)은 표면이 관능기로 유도체화될 수 있는 PEG-함유 리포솜을 개시한다.
- [0225] 일정수의 핵산을 포함하는 리포솜은 당업예에 알려져 있다. WO 96/40062(Thierry 등)는 리포솜에 분자량이 높은 핵산을 캡슐화하는 방법을 개시한다. 미국 특허 5,264,221(Tagawa 등)은 단백질-결합 리포솜을 개시하고 이러한 리포솜의 성분이 안티센스 RNA를 포함한다고 주장하였다. 미국 특허 5,665,710(Rahman 등)은 리포솜에 올리고데옥시뉴클레오타이드를 캡슐화하는 방법을 개시한다. WO 97/04787(Love 등)은 raf 유전자에 표적화된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 리포솜을 개시한다.
- [0226] 트랜스퍼솜은 리포솜의 다른 형태이고 효과적인 약물 전달 비히클인 변형가능성이 높은 지질 응집체이다. 트랜스퍼솜은 변형성이 매우 높아 비말보다 작은 기공을 쉽게 통과할 수 있는 지질 비말로 설명될 수 있다. 트랜스퍼솜은 자가-최적화(피부에 기공 형태로 적응), 흔히 부서지지 않고 이들의 표적에 접근하는 자가-보수성 및 자가 적재성을 지니는 이들이 사용되는 환경에 적합하다. 트랜스퍼솜을 제조하는 데 기준 리포솜 조성물에 표면 모서리-활성제(대개, 계면활성제)를 첨가할 수 있다. 트랜스퍼솜은 피부에 혈청 알부민을 전달하는 데 이용된다. 혈청 알부민의 트랜스퍼솜-매개 전달은 혈청 알부민을 함유하는 용액의 피하내 주사로서 효과적인 것으로 나타났다.
- [0227] 계면활성제는 에멀전(마이크로에멀전 포함) 등 제형과 리포솜에 널리 적용된다. 천연 및 합성 계면활성제 등 다양한 종류의 계면활성제의 특성을 분류하고 등급을 정하는 가장 통상적인 방법은 친수-친유 발란스(HLB)를 이용하는 것이다. 친수성기("헤드"(head)로도 알려짐)의 특성은 제형에 이용되는 상이한 계면활성제를 분류하는 가장 유용한 수단을 제공한다(Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, p. 285).
- [0228] 계면활성제 분자가 이온화되지 않으면, 비이온성 계면활성제로 분류된다. 비이온성 계면활성제는 약품과 미용

제품에 널리 적용되고 광범위한 pH에서 이용될 수 있다. 일반적으로, 이들의 HLB 값은 이들의 구조에 따라 2 내지 약 18이다. 비이온성 계면활성제는 에틸렌 글라이콜 에스터, 프로필렌 글라이콜 에스터, 글라이세롤 에스터, 폴리글라이세롤 에스터, 소르비탄 에스터, 슈크로스 에스터, 및 에톡시화 에스터 등 비이온성 에스터를 포함한다. 지방 알콜 에톡시레이트, 프로폭시화 알콜, 및 에톡시화/프로폭시화 블록 중합체 등 비이온성 알칸올아미드와 에터도 이 종류에 포함된다. 폴리옥시에틸렌 계면활성제는 비이온성 계면활성제의 가장 일반적인 종류이다.

- [0229] 계면활성제 분자 담체가 물에 용해되거나 분산되어 음전하를 갖게 되면, 계면활성제는 음이온 계면활성제로 분류된다. 음이온 계면활성제는 비누 등 카복시레이트, 아실 락틸레이트, 아미노산의 아실 아마이드, 알킬 설페이트 및 에톡시화 알킬 설페이트 등 황산의 에스터, 알킬 벤젠 설포네이트, 아실 아세티오네이트, 아실 타우레이트 및 설포석시네이트 등 설포네이트, 및 포스페이트를 포함한다. 음이온 계면활성제의 가장 중요한 요소는 알킬 설페이트와 비누이다.
- [0230] 계면활성제 분자 담체가 물에 용해되거나 분산되어 양전하를 갖게 되면, 계면활성제는 양이온 계면활성제로 분류된다. 양이온 계면활성제는 4차 암모늄염과 에톡시화 아민을 포함한다. 4차 암모늄염은 이 종류에서 가장 많이 이용되는 요소이다.
- [0231] 계면활성제 분자가 양전하나 음전하를 운반할 수 있으면, 계면활성제는 양친매성 계면활성제로 분류된다. 양친매성 계면활성제는 아크릴산 유도체, 치환 알킬아미드, N-알킬베타인 및 인지질을 포함한다.
- [0232] 약물 제형, 제형 및 에멀전에 계면활성제를 이용하는 것이 검토되었다 (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, p. 285).
- [0233] 침투촉진제
- [0234] 일 실시예에 있어서, 본 발명은 동물의 피부에 핵산(특히, 올리고뉴클레오타이드)을 효과적으로 전달하는 다양한 침투촉진제를 이용한다. 대부분의 약물은 이온 및 비이온 형태의 용액으로 존재한다. 그러나, 대개 지용성 또는 친유성 약물은 세포막을 쉽게 투과한다. 투과되는 세포막을 침투 촉진제로 처리하면, 비친유성 약물은 세포막을 투과하는 것이 밝혀졌다. 침투촉진제는 세포막으로의 비친유성 약물의 확산을 촉진할 뿐 아니라, 친유성 약물의 투과성을 향상하기도 한다.
- [0235] 침투촉진제는 크게 다섯 개의 범주(즉, 계면활성제, 지방산, 담즙산염, 킬레이트제, 및 비킬레이트성 비계면활성제) 중 하나에 속하는 것으로 분류될 수 있다(Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). 상기한 범주의 각 침투촉진제를 보다 상세하게 후술할 것이다.
- [0236] 계면활성제: 본 발명과 관련하여, 계면활성제(또는 "표면활성제")는 수용액에 용해되면, 용액의 표면장력이나 수용액과 다른 액체 간 계면 장력을 줄이고 그 결과로서 점막을 통한 올리고뉴클레오타이드의 흡수를 향상시키는 화학제이다.
- [0237] 담즙산염과 지방산뿐만 아니라, 이들 침투촉진제는 예를 들면, 나트륨 라우릴 설페이트, 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에터 및 폴리옥시에틸렌-20-세틸 에터(Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92); 및 FC-43 등 퍼플루오로케미칼 에멀전을 포함한다(Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).
- [0238] 지방산: 침투촉진제로 작용하는 다양한 지방산과 이들의 유도체는 예를 들면, 올레산, 라우르산, 카프르산(n-데카논산), 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 다이카프레이트, 트라이카프레이트, 모노올레인(1-모노올레오일-락-글라이세롤), 다이라우린, 카프릴산, 아라티돈산, 글라이세롤 1-모노카프레이트, 1-도데실아자사이클로헥탄-2-온, 아실카르니틴, 아실콜린, 이들의 C₁₋₁₀ 알킬 에스터(예컨대, 메틸, 아이소프로필 및 t-부틸), 및 이들의 모노- 및 다이-글라이세라이드(즉, 올레이트, 라우레이트, 카프레이트, 미리스테이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 리놀레이트 등)를 포함한다(Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651- 654).
- [0239] 담즙산염: 담즙의 생리적인 역할은 지질과 지용성 비타민의 분산과 흡수의 촉진을 포함한다(Brunton, Chapter 38 in: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). 다양한 천연 담즙산염 및 이들의 합성 유도체는 침투촉진제 역할을 한다. 따라서, "담즙산염"은 담즙의 자연발생 성분뿐만 아니라 이들의 합성 유도체도 포함한다. 본 발명의 담즙산염은, 예를 들면, 콜린산(또는 이의 약제학상 허용되는 나트륨염, 나트륨 콜레이트), 다이하이드로콜린산

(나트륨 다이하이드로콜레이트), 데옥시콜린산(나트륨 데옥시콜레이트), 글루콜린산(나트륨 글루콜레이트), 글라이콜린산(나트륨 글라이콜레이트), 글리코데옥시콜린산(나트륨 글리코데옥시콜레이트), 타우로콜린산(나트륨 타우로콜레이트), 타우로데옥시콜린산(나트륨 타우로데옥시-콜레이트), 케노데옥시콜린산(나트륨 케노데옥시콜레이트), 우르소데옥시콜린산(UDCA), 나트륨 타우로-24,25-다이하이드로-후시데이트(STDHF), 나트륨 글리코다이하이드로후시데이트 및 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에터(POE)(Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita et al., J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583)를 포함한다.

[0240] 킬레이트제: 본 발명과 관련하여 사용되는 킬레이트제는 용액에서 착물을 형성하여 용액에서 금속 이온을 제거하여, 그 결과로서 점막을 통한 올리고뉴클레오타이드의 흡수를 향상하는 화합물로 정의될 수 있다. 본 발명에서 침투촉진제로서의 용도에 있어서, 대부분의 특성화된 DNA 뉴클레아제는 촉매 작용에 이가 금속 이온을 필요로 하므로 킬레이트제에 의해 저해되므로 킬레이트제는 DNase 저해제 역할도 하는 이점이 있다(Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339). 본 발명의 킬레이트제는 다이소듐 에틸렌다이아민테트라아세테이트(EDTA), 시트르산, 살리실레이트(예컨대, 나트륨 살리실레이트, 5-메톡시살리실레이트 및 호모바닐레이트), 콜라겐의 N-아실 유도체, 베타-다이케톤의 라우레이트-9 및 N-아미노 아실 유도체(에나민)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다(Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51).

[0241] 비킬레이트성 비-계면활성제: 본 원에 사용된 비킬레이트성 비-계면활성제 침투 촉진 화합물은 킬레이트제나 계면활성제로서 상당한 활성을 나타내지만, 소화 점막을 통한 올리고뉴클레오타이드의 흡수를 향상하는 화합물로 정의될 수 있다(Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33). 이러한 종류의 침투촉진제의 예로는 불포화 환형 우레아, 1-알킬- 및 1-알케닐아자사이클로-알카논 유도체(Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92); 및 다이클로로페낙 소듐, 인도메타신 및 페닐부타존(Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626) 등 비스테로이드성 항염제를 포함한다.

[0242] 본 발명의 약물과 기타 조성물에 세포 수준으로 올리고뉴클레오타이드의 흡수를 증진하는 약제가 첨가될 수도 있다. 예를 들면, 리포펙틴 등 양이온 지질(Junichi 등, 미국 특허 5,705,188), 양이온 글라이세롤 유도체, 및 폴리리신 등 폴리양이온 분자(Lollo 등, PCT 출원 WO 97/30731)도 올리고뉴클레오타이드의 세포 흡수를 증진하는 것으로 알려져 있다.

[0243] 핵산, 에틸렌 글라이콜 및 프로필렌 글라이콜 등 글라이콜, 2-피롤 등 피롤, 아존, 및 리모넨 및 멘톤 등 테르펜 등 투여된 핵산의 침투를 향상하는 다른 약제도 이용될 수 있다.

[0244] 기타 성분

[0245] 본 발명의 조성물은 약제 조성물에서 통상적으로 나타나는 부형제 성분을 이들의 분야에 설립되어 있는 복용량으로 더 포함할 수도 있다. 따라서, 예를 들면, 조성물은 항소양제, 수렴제, 국소 마취제 또는 항염제 등 부가적인 상보성 약물활성 물질을 포함하거나, 염료, 향료, 보존제, 향산화제, 불투명화제, 증점제 및 안정화제 등 본 발명의 조성물의 다양한 복용 형태를 물리적으로 제형화하는 데 유용한 부가 물질을 포함할 수 있다. 그러나, 이들 물질이 첨가될 때, 본 발명의 조성물의 성분의 생물학적 활성을 방해하지 않아야 한다. 제형은 안정화되고 필요에 따라 제형의 핵산(들)과 불리하게 작용하지 않는 윤활제, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유회제, 삼투압에 영향을 미치는 염, 완충액, 색제, 향료 및/또는 방향제 등 보조제와 혼합될 수 있다.

[0246] 수성 서스펜션은 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 소르비톨 및/또는 덱스트란 등 서스펜션의 점성을 증진하는 물질을 포함할 수도 있다. 서스펜션은 안정화제를 포함할 수도 있다.

[0247] 본 발명의 특정 실시예는 (a) 하나 이상의 안티센스 화합물 및 (b) 비-안티센스 메카니즘에 의해 작용하는 하나 이상의 화학치료제를 포함하는 약제 조성물을 제공한다. 이러한 화학치료제의 예로는 다우노르비신, 다우노르마이신, 닥티노마이신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 예소루비신, 블레오마이신, 마포스포아미드, 이포르스아미드, 시토신 아라비노사이드, 비스-클로로에틸니트로수레아, 부솔판, 미토마이신 C, 악티노마이신 D, 미스라마이신, 프레드닌손, 하이드록시프로게스테론, 테스토스테론, 타모시펜, 다카르바진, 프로카르바진, 핵사메틸

멜라민, 펜타메틸멜라민, 미토산트론, 암사크린, 클로라부실, 메틸사이클로헥실니트로수레아, 질소 머스타드, 멜파란, 사이클로포스포미드, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-아자사이티딘, 하이드록시우레아, 테옥시코포르마이신, 4-하이드록시페록시사이클로포스포르-아미드, 5-플루오로우라실(5-FU), 5-플루오로데옥시유리딘(5-FUdR), 메토트렉사트(MTX), 콜히친, 탁솔, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드(VP-16), 트라이메트렉사이트, 이리노테칸, 토포테칸, 젠시타빈, 테니포사이드, 시스플라틴 및 다이에틸stil베스트롤(DES)을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다(개괄적으로, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th Ed. 1987, pp. 1206-1228, Berkow et al., eds., Rahway, N.J 참조). 이러한 화학치료제를 본 발명의 화합물과 함께 이용하는 경우, 이들은 개별적으로 (예컨대, 5-FU 및 올리고뉴클레오타이드), 차례로 (예컨대, 일정 기간 5-FU 및 올리고뉴클레오타이드 이용 후, MTX 및 올리고뉴클레오타이드), 또는 하나 이상의 다른 화학치료제 (예컨대, 5-FU, MTX 및 올리고뉴클레오타이드, 또는 5-FU, 방사선치료 및 올리고뉴클레오타이드)와 병용하여 이용된다. 항염제와 (비스테로이드 항염제 및 코르티코스테로이드를 포함하지만 이에 제한되지 않음) 항바이러스제(리비비린, 비다라빈, 아사이클로비르 및 간시클로비르를 포함하지만 이에 제한되지 않음)도 본 발명의 조성물에 혼합될 수도 있다(The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th Ed., Berkow et al., eds., 1987, Rahway, N. J., pages 2499-2506 및 46-49, 각각을 개괄적으로 참조). 다른 비-안티센스 화학치료제도 본 발명의 범주에 포함된다. 둘 이상의 조합 화합물은 동시에 또는 차례로 이용된다. 다른 관련 실시예에 있어서, 본 발명의 조성물은 제1 핵산에 표적화된 하나 이상의 안티센스 화합물(특히, 올리고뉴클레오타이드) 및 제2 핵산에 표적화된 하나 이상의 부가 안티센스 화합물을 포함한다. 안티센스 화합물의 많은 예들이 당업계에 공지되어 있다. 둘 이상의 조합 화합물은 동시에 또는 차례로 이용될 수 있다.

[0248] 본 발명에 따라 사용된 안티센스 화합물은 주지되어 있는 고상 합성 방법을 통해 간편하고 통상적으로 제조된다. 이러한 합성 장치는 Applied Biosystems(Foster City, Calif.) 등 많은 회사에서 판매하고 있다. 당업계에 공지되어 있는 다른 합성 수단은 부가적으로나 대체하여 이용될 수 있다. 포스포로티오에이트와 알킬화 유도체 등 올리고뉴클레오타이드의 유사한 제조 방법을 이용하는 것이 알려져 있다.

[0249] 본 발명의 안티센스 화합물은 생체 외 합성되고 안티센스 분자의 생체 내 합성을 유도하도록 설계된 생물학적 기원이나 유전 벡터의 안티센스 조성물을 포함하지 않는다. 본 발명의 화합물은 리포솜, 리셉터 표적 분자, 경구, 직장, 국소 또는 다른 제형 등 흡수, 분포 및/또는 흡착에 기여하는 다른 분자, 분자 구조 또는 혼합 화합물과 혼합, 캡슐, 컨쥬게이트되거나 다른 방법으로 결합할 수도 있다. 이러한 흡수, 분포 및/또는 흡착 촉진 제형의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허 는 본 원에 참조문헌으로 편입되는 5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,521,291; 5,543,158; 5,547,932; 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330; 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854; 5,469,854; 5,512,295; 5,527,528; 5,534,259; 5,543,152; 5,556,948; 5,580,575; 및 5,595,756을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0250] 특이 지침

[0251] 안티센스의 특이성과 민감성은 치료 용도로서 본 기술 분야의 당업자에 의해 이용된다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 동물과 사람의 질환 상태의 치료에 치료제로 이용되어 왔다. 리보자임을 포함한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 약물은 사람에게 안전하고 효과적으로 투여되어 왔고, 현재 다양한 임상 시도가 진행 중이다. 올리고뉴클레오타이드는 세포, 조직 및 동물(특히 사람)을 치료하는 치료 방법에 유용한 것으로 여겨지는 치료 양상에 유용할 수 있는 것으로 확립되었다.

[0252] 본 발명의 실시예에 있어서, CTGF 발현과 관련되는 질환이나 상태를 치료하는 방법으로서, 상기 질환은 유방암, 전립선암, 신장암, 이자암, 두경부암, 위암, 및 다발성 골수암 등을 포함하는 과증식성 질환인 방법을 제공한다 (Pickles M and Leask A, J Cell Commun Signal. 2007 Sep; 1 (2) : 85-90. Epub 2007 Jul 17; Mullis T. C, Tang X., Chong K. T., J Clin Pathol. 2008 May; 61 (5) : 606-10 ; Liu L. Y., et al. World J Gastroenterol. 2008 Apr 7 ; 14 (13) : 2110-4; Chintalapudi M. R., et al., Carcinogenesis. 2008 Apr;29 (4) : 696- 703. Epub 2008 Jan 22; Munemasa S., et al . Br J Haematol. 2007 Oct;139 (1) :41-50; Shimo T., et al . J Bone Miner Res. 2006 Jul; 21 (7) :1045-59; and Yang F., et al . Cancer Res. 2005 Oct 1;65(19):8887-95.).

[0253] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 방법은 질환이나 상태의 치료하는 것을 포함하고, 질환이나 장애는 섬유증이다. 본 발명의 방법에 따른 일 실시예에 있어서, 섬유증은 비대성 반흔, 켈로이드, 피부 흉터, 간 섬유증, 폐 섬유증, 신장 섬유증, 심장 섬유증 또는 재협착이다.

- [0254] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 방법은 상기 질환이나 상태를 치료하는 것을 포함하고, 질환이나 장애는 관절 섬유증(오십견 증후군, 힘줄 및 말초신경 손상 등), 척수 손상, 관상동맥 바이패스, 복막 및 복근 유착(자궁내막증, 자궁근종 및 유섬유증), 방사상 각막절개 및 각막절제, 망막 재부착 수술, 장치 매개 섬유증(예를 들면, 당뇨병), 건 유착, 듀피트렌 구축 또는 경피증이다.
- [0255] 본 발명의 다른 실시예는 결합 조직 성장 인자(CTGF) 발현을 저해하는 데 유효한 양의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 화합물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하여 개체의 상처 치유에 기인하는 반흔을 감소시키는 것을 포함하는 피부 상처 치유에 기인하는 비대성 반흔을 감소시키는 방법도 제공한다. 개체는 사람이나 사람 외 동물을 포함할 수 있다.
- [0256] 치료 조성물의 제형화와 그 이후 이들의 투여는 본 기술 분야 범주에 있는 것으로 여겨진다. 투여는 수일 내지 수달 간 치료를 지속하는 동안이나 치료가 효과적이거나 질환 상태의 저하를 얻을 수 있을 때까지 치료되는 질환 상태의 심각도와 반응성에 따라 달라진다. 최적의 투여 스케줄은 환자의 신체에 약물 축적 측정으로부터 계산될 수 있다. 당업자는 최적 복용량, 복용 방법 및 반복률을 쉽게 알 수 있다. 최적 복용량은 각 올리고뉴클레오타이드의 상대적인 효능에 따라 변할 수 있고 생체 외 및 생체 내 동물 모델에 효과적인 것으로 알려진 EC_{50s}에 의거하여 일반적으로 예측될 수 있다. 일반적으로, 투여량은 체중 kg 당 0.01 μ g 내지 100g이고 매일, 매주 또는 매달 또는 심지어 2년 내지 20년마다 일 회 이상 투여될 수 있다. 본 기술 분야의 당업자는 체액이나 조직 내 약물의 체류 시간과 농도에 따라 복용 반복률을 용이하게 예측할 수 있다.
- [0257] 성공적인 치료 후, 환자는 질환 상태의 재발을 방지하는 유지 요법을 수행하는 것이 바람직하고, 올리고뉴클레오타이드는 0.01 μ g 내지 100g(체중 1 kg당) 범위의 일정 용량으로 매일 일 회 이상 내지 20년마다 한번 투여된다.
- [0258] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 방법은 피부 상처 치유에 기인하는 비대성 반흔을 감소시키는 것을 더 포함하며, 상처 치유는 피부 파손, 수술 절개 및 화상으로 구성되는 군으로부터 선택되는 상처의 치유이다.
- [0259] 특정 실시예에 있어서, 본 발명은 하나 이상의 본 발명의 약제 조성물을 투여하는 것을 포함하는 개체 치료 방법을 제공한다. 특정 실시예에 있어서, 개체는 상기 질환 중 하나를 지닌다. 특정 실시예에 있어서, 개체는 상기 질환 중 하나의 위험이 있다. 특정 실시예에 있어서, 개체는 치료가 필요한 것으로 확인되었다. 특정 실시예에 있어서, 본 발명은 개체 내 CTGF 발현을 예비적으로 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0260] 특정 실시예는 CTGF 핵산에 표적화된 안티센스 화합물의 치료에 유효한 양을 이를 필요로 하는 개체에 투여하여 개체를 치료하는 것을 포함한다.
- [0261] 일 실시예에 있어서, 안티센스 화합물의 투여에 대한 개체의 반응을 확인할 수 있도록 개체 혈청 내 CTGF 양을 관찰하여 CTGF 핵산에 표적화된 안티센스 화합물의 치료에 유효한 양을 투여한다. 안티센스 화합물 투여에 대한 개체의 반응을 이용하여 전문의는 치료량과 치료기간을 결정한다.
- [0262] 일 실시예에 있어서, CTGF 핵산에 표적화된 안티센스 화합물의 투여는 적어도 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 99%, 또는 이들 값 중 임의의 두 개의 값으로 정의된 범위의 CTGF 발현 감소를 초래한다. 일 실시예에 있어서, CTGF 핵산에 표적화된 안티센스 화합물의 투여는 표준 시험에 의해 측정된 CTGF 값 등의 변화를 초래하지만, CTGF에 제한되는 것은 아니다. 일부 실시예에 있어서, CTGF 안티센스 화합물을 투여하면 적어도 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 99%, 또는 이들 값 중 임의의 두 개의 값으로 정의된 범위로 증가한다. 일부 실시예에 있어서, CTGF 안티센스 화합물을 투여하면 적어도 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 99%, 또는 이들 값 중 임의의 두 개의 값으로 정의된 범위로 감소한다.
- [0263] 특정 실시예에 있어서, CTGF로 표적화된 안티센스 화합물을 포함하는 약제 조성물은 상기 질환 중 하나에 걸렸거나 걸리기 쉬운 환자를 치료하는 약물의 제조에 이용된다.
- [0264] 특정 병합 치료
- [0265] 특정 실시예에 있어서, 하나 이상의 본 발명의 약제 조성물은 하나 이상의 다른 약제와 함께 투여된다. 특정 실시예에 있어서, 이러한 하나 이상의 다른 약제는 하나 이상의 본 발명의 약제 조성물로서 동일한 질환이나 병태를 치료하도록 설계된다. 특정 실시예에 있어서, 이러한 하나 이상의 다른 약제는 하나 이상의 본 발명의 약제 조성물로서 상이한 질환이나 병태를 치료하도록 설계된다. 특정 실시예에 있어서, 이러한 하나 이상의 다른 약제는 하나 이상의 본 발명의 약제 조성물의 바람직하지 않은 효과를 치료하도록 설계된다. 특정 실시예에 있어

서, 하나 이상의 본 발명의 약제 조성물은 다른 치료제의 바람직하지 않은 효과를 치료하는 다른 약제와 함께 투여된다. 특정 실시예에 있어서, 하나 이상의 본 발명의 약제 조성물과 하나 이상의 다른 약제는 동시에 투여된다. 특정 실시예에 있어서, 하나 이상의 본 발명의 약제 조성물과 하나 이상의 다른 약제는 상이한 시점에 투여된다. 특정 실시예에 있어서, 하나 이상의 본 발명의 약제 조성물과 하나 이상의 다른 약제는 하나의 제형으로 함께 제조된다. 특정 실시예에 있어서, 하나 이상의 본 발명의 약제 조성물과 하나 이상의 다른 약제는 별도로 제조된다.

[0266] 특정 실시예에 있어서, 본 발명의 약제 조성물과 함께 투여되는 약제는 제2 치료제를 포함한다. 특정 실시예에 있어서, 본 발명의 약제 조성물과 함께 투여될 수 있는 약제는 제2 치료제를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 실시예에 있어서, 제2 치료제는 본 발명의 약제 조성물을 투여하기 전에 투여된다. 특정 실시예에 있어서, 제2 치료제는 본 발명의 약제 조성물을 투여한 후에 투여된다. 특정 실시예에 있어서, 제2 치료제는 본 발명의 약제 조성물과 동시에 투여된다. 특정 실시예에 있어서, 함께 투여된 제2 치료제의 용량은 제2 치료제를 단독 투여하는 경우에 투여되는 용량과 동일하다. 특정 실시예에 있어서, 함께 투여된 제2 치료제의 용량은 제2 치료제를 단독 투여하는 경우에 투여되는 용량보다 낮다. 특정 실시예에 있어서, 함께 투여된 제2 치료제의 용량은 제2 치료제를 단독 투여하는 경우에 투여되는 용량보다 높다.

[0267] 특정 실시예에 있어서, 제2 화합물의 공동 투여는 제1 화합물의 치료 효과를 증진하여, 화합물의 공동 투여는 제1 화합물만을 투여할 때의 효과보다 우수한 치료 효과, 즉 시너지 효과를 초래한다. 다른 실시예에 있어서, 공동 투여는 단독 투여시 화합물의 효과보다 높은 치료 효과를 나타낸다. 다른 실시예에 있어서, 공동 투여는 단독 투여시 화합물의 효과보다 훨씬 높은 치료 효과를 나타낸다. 일부 실시예에 있어서, 제1 화합물은 안티센스 화합물이다. 일부 실시예에 있어서, 제2 화합물은 안티센스 화합물이다.

[0268] 본 발명은 후술하는 실험의 상세한 설명에서 기술된다. 본 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위한 목적으로 제시되었을 뿐 그 후 기술되는 특허 청구 범위에 제시한 발명을 제한하는 것은 아니다.

[0269] **실시예**

[0270] **실시예 1: 세포 배양 및 안티센스 화합물 처리**

[0271] CTGF 핵산의 수준, 활성 또는 발현에 미치는 안티센스 화합물의 효과를 다양한 세포 타입에서 시험관내로 시험할 수 있다. 이러한 분석에 사용되는 세포 타입은 상업적 제조자로부터 입수할 수 있으며(예: ATCC(American Type Culture Collection), Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD), 세포는 상업적으로 이용가능한 시약(예: Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)을 사용하여 공급자 지시에 따라 배양된다. 예시적인 세포 타입은 HepG2 세포, HepB3 세포 및 초대 간세포를 포함한다.

[0272] **실시예 2: 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 시험관내 시험**

[0273] 다른 안티센스 화합물로 처리하기 위해 적절히 변형될 수 있는, 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 세포를 처리하는 방법이 본원에 기재된다.

[0274] 일반적으로, 세포는 배양중에 약 60 내지 80%의 컨플루언시(confluency)가 되면 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리된다.

[0275] 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 배양 세포에 도입하기 위해 일반적으로 사용되는 한가지 시약은 양이온성 지질 형질감염 시약인 LIPOFECTIN[®](Invitrogen, Carlsbad, CA)이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는, 전형적으로 100 nM 안티센스 올리고뉴클레오타이드당 2 내지 12 ug/ml 범위인 LIPOFECTIN[®] 농도 및 목적하는 최종 농도의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이루기 위해 OPTI-MEM[®] 1(Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 리포펙틴과 혼합된다.

[0276] 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 배양 세포에 도입하기 위해 사용되는 다른 시약은 LIPOFECTAMINE[®](Invitrogen, Carlsbad, CA)이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 100 nM 안티센스 올리고뉴클레오타이드당 2 내지 12 ug/ml 범위인 LIPOFECTAMINE[®] 농도 및 목적하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 농도를 이루기 위해, OPTIMEM[®] 1 혈청 감소 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 LIPOFECTAMINE[®] 과 혼합된다.

[0277] 세포는 일상적인 방법에 의해 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리된다. 세포는 전형적으로 안티센스 올리고

뉴클레오타이드 처리 16 내지 24시간 후에 수거되며, 이때 표적 핵산의 RNA 또는 단백질 수준이 당업계에 공지된 방법 및 본원에 기재된 방법으로 측정된다. 일반적으로, 처리가 여러 번 반복 수행되는 경우, 데이터는 반복처리 평균으로 제시된다.

[0278] 사용된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 농도는 세포주마다 다르다. 특정 세포주를 위하여 최적의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 농도를 결정하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 LIPOFECTIN[®]로 형질감염되는 경우, 전형적으로 1 nM 내지 300 nM 범위의 농도로 사용된다.

[0279] **실시예 3: RNA 분리**

[0280] RNA 분석이 총 세포 RNA 또는 폴리(A)+mRNA에 대해 수행될 수 있다. RNA 분리 방법은 당업계에 주지되었다. RNA는 당업계에 주지된 방법에 의해, 예를 들면, TRIZOL[®] 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 제조업자의 추천 프로토콜에 따라 제조된다.

[0281] **실시예 4: 표적 수준 또는 발현 저해 분석**

[0282] CTGF 핵산의 수준 또는 발현 저해는 당업계에 공지된 각종 방법으로 어세이될 수 있다. 예를 들어, 표적 핵산 수준은 노던 블롯 분석, 경쟁적 역 전사 증합효소 연쇄 반응(RT-PCR) 또는 정량적 실시간 RT-PCR에 의해 정량화될 수 있다. RNA 분석은 총 세포 RNA 또는 폴리(A)+mRNA에 대해 수행될 수 있다. RNA 분리 방법은 당업계에 주지되었다. 노던 블롯 분석 또한 당업계에 전형적인 분석이다. 실시간 RT-PCR은 PE-Applied Biosystems(Foster City, CA)로부터 구입할 수 있는 상업적으로 이용가능한 ABI PRISM[®] 7600, 7700 또는 7900 서열 검출 시스템을 사용하여 제조업자의 지시에 따라 편리하게 수행될 수 있다.

[0283] **실시예 5: 표적 RNA 수준의 정량적 실시간 RT-PCR 분석**

[0284] 표적 RNA 수준의 정량화는 ABI PRISM[®] 7600, 7700 또는 7900 서열 검출 시스템(PE-Applied Biosystems, Foster City, CA)을 사용하여 제조업자의 지시에 따라 정량적 실시간 RT-PCR에 의해 수행될 수 있다. 실시간 RT-PCR 방법은 당업계에 주지되었다.

[0285] 실시간 PCR 전에, 분리된 RNA를 역전사(RT) 반응에 적용하고, 이후 실시간 PCR 증폭 기질로 사용되는 상보적 DNA(cDNA)를 생성하였다. RT 및 실시간 PCR 반응은 동일 샘플 웰에서 차례로 수행된다. RT 및 실시간 PCR 시약은 Invitrogen(Carlsbad, CA)으로부터 구입한 것이다. RT 및 실시간-PCR 반응은 당업자들에게 주지된 방법으로 수행된다.

[0286] 사이클로필린 A와 같이, 발현이 일정한 유전자의 발현 수준을 이용하거나, RIBOGREEN[®](Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA)을 사용해 총 RNA를 정량화함으로써, 실시간 RT-PCR로 수득한 유전자(또는 RNA) 표적 정량물들을 정규화한다. 사이클로필린 A 발현은 실시간 RT-PCR에 의해, 표적과 동시에 복합적으로 실시하거나, 별도로 실시함으로써 정량화된다. 총 RNA는 RIBOGREEN[®] RNA 정량화 시약(Invetrogen, Inc. Eugene, OR)을 사용하여 정량화된다. RIBOGREEN[®]에 의한 RNA 정량화 방법은 존스 엘.제이.(Jones, L.J.) 등에 의해 문헌[Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374]에 교시되었다. CYTOFLUOR[®] 4000 장비(PE Applied Biosystems)가 RIBOGREEN 형광 측정에 이용된다.

[0287] CTGF 핵산을 혼성화하도록 프로브 및 프라이머가 설계된다. 실시간 RT-PCR 프로브 및 프라이머 설계 방법은 당업계에 주지되었으며, PRIMER EXPRESS[®] 소프트웨어(Applied Biosystems, Foster City, CA)와 같은 소프트웨어의 이용을 포함할 수 있다.

[0288] **실시예 6: 단백질 수준 분석**

[0289] CTGF 핵산의 안티센스 저해는 CTGF 단백질 수준을 측정함으로써 평가할 수 있다. CTGF의 단백질 수준은 면역침전, 웨스턴 블롯 분석(면역블롯팅), 효소 면역 측정법(ELISA), 정량적 단백질 어세이, 단백질 활성 어세이(예를 들어, 캐스파제 활성 어세이), 면역조직화학, 면역세포화학 또는 형광-활성화 세포 분류(FACS)와 같이 당업계에 주지되어 있는 다양한 방식으로 평가 또는 정량화될 수 있다. 표적에 대한 항체는 MSRS 항체 카탈로그(Aerie Corporation, Birmingham, MI)와 같은 각종 출처로부터 확인 및 입수할 수 있거나, 당업계에 주지되어 있는 통상적인 단일클론 또는 다중클론 항체 발생 방법을 통해 제조할 수 있다. 인간 및 마우스 CTGF 검출에 유용한 항

체는 상업적으로 입수할 수 있다.

[0290]

실시예 7: 안티센스 화합물의 생체내 시험

[0291]

안티센스 화합물(예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드)은 CTGF의 발현 저해능 및 표현형 변화 생성능을 평가하고자 동물에서 시험된다. 시험은 정상적인 동물 또는 실험용 질환 모델에서 수행될 수 있다. 동물 투여를 위해, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 포스페이트-완충 염수와 같은 약제학적 허용되는 희석제 중에 제제화된다. 투여는 복막내, 정맥내 및 피하와 같은 비경구 투여 경로를 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 용량 및 투여 빈도는 당업자들의 능력내에 있으며, 투여 경로 및 동물 체중과 같은 인자에 따른다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 처리 기간 후, RNA를 간 조직으로부터 분리하여 CTGF 핵산 발현에 대한 변화를 측정한다. CTGF 단백질 수준의 변화는 실시예 6에서 상술한 방법을 이용하여 측정된다.

[0292]

실시예 8: 선도 사람 결합 조직 성장 인자(CTGF) 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보의 선택

[0293]

도입

[0294]

본 발명에 따라, 공개된 서열(서열 번호 9로 본 원에 원용된 GenBank 등록 번호 NM_001901.2, 및 서열 번호 10으로 본 원에 원용된 GenBank 등록 번호 NT_025741.14)을 이용하여 사람 결합 조직 성장 인자 RNA의 상이한 영역을 표적화하도록 일련의 올리고뉴클레오타이드를 설계하였다.

[0295]

본 연구에서는 이용가능한 서열 공간과 CTGF의 엑손과 인트론 영역을 표적하는 변형된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 분석한다. 표적당 약 150개 새로운 서열을 합성하고, 세포 배양에서 CTGF에 대한 활성을 평가하였다. 올리고뉴클레오타이드는 표 1에 나타난다. 표 1의 모든 화합물은, 양측(5' 및 3' 방향)에 5개의 뉴클레오타이드 "윙"이 배치되는 10개의 2'-데옥시뉴클레오타이드로 구성되거나, 양측(5' 및 3' 방향)에 각각 2개와 5개의 뉴클레오타이드 "윙"이 배치되는 13개의 2'-데옥시뉴클레오타이드로 구성된 중앙 "갭" 영역으로 이루어지는 20개 길이의 뉴클레오타이드 키메라 올리고뉴클레오타이드("갭머")이다. 윙은 2'-메톡시에틸(2'-MOE) 뉴클레오타이드로 구성된다. 뉴클레오사이드간(골격) 결합은 전체 올리고뉴클레오타이드에서 포스포로티오에이트(P=S)이다. 모든 시스테인 잔부는 5-메틸사이티딘이다. 본 원의 다른 실시예에 기술된 정량적인 실시간 PCR를 통해 화합물이 사람 결합 조직 성장 인자 mRNA 수준에 미치는 영향을 분석하였다. 데이터는 두 실험의 평균이다. 존재하는 경우, "N.D."는 "데이터 없음"을 나타낸다.

표 1

2'-MOE 윙과 데옥시 갭을 갖는 키메라 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드에 의한 사람 결합 조직 성장 인자 mRNA 수준의 저해

ISIS #	영역	표적 서열 번호	표적 영역	서열	저해 %	서열 번호
124173	CDS	9	380	CCAGCTGCTTGGCGCAGACG	35	11
124189	CDS	9	1003	GCCAGAAAGCTCAACTTGA	57	12
124212	3'-UTR	9	1783	CCACAAGCTGTCCAGTCTAA	47	13
124235	3'-UTR	9	2267	GGTCACACTCTCAACAAATA	47	14
124238	3'-UTR	9	2282	AAACATGTAACPTTTGGTCA	53	15
412271	5'-UTR	9	4	GCGAAGAGTTGTGTGTGAG	0	16
412272	5'-UTR	9	38	AGGCTGGAGTCCGCACTGGCT	46	17
412273	CDS	9	228	ACGAAGGCGACGCGGACGGG	35	18
412274	CDS	9	265	GCCGACGGCCGGCCGGCTGC	40	19
412275	CDS	9	475	GGTGCACACGCCGATCTTGC	52	20
412276	CDS	9	483	TCTTTGGCGGTGCACACGCC	0	21
412277	CDS	9	489	GCACCATCTTTGGCGGTGCA	0	22

[0296]

ISIS #	영역	표적 서열 번호	표적 영역	서열	저해 %	서열 번호
412278	CDS	9	496	GCAGGGAGCACCATCTTTGG	16	23
412279	CDS	9	501	AAGATGCAGGGAGCACCATC	63	24
412280	CDS	9	507	CCACCGAAGATGCAGGGAGC	0	25
412281	CDS	9	512	CCGTACCACCCGAAGATGCAG	47	26
412282	CDS	9	553	GTACTTCCAGCTGCTCTGGA	68	27
412283	CDS	9	592	GGCATGCAGCCACCAGCC	72	28
412284	CDS	9	718	AGGCCCAACCACGGTTTGGT	59	29
412285	CDS	9	723	AGGCCAGGCCAACACGGT	79	30
412286	CDS	9	732	TAAGCCGGAGGGCAGGCC	55	31
412287	CDS	9	829	CCACAGGTCTTGGAAACAGG	30	32
412288	CDS	9	839	AGATGCCCATCCCACAGGTC	55	33
412289	3'-UTR	9	1273	CCAGTCTAATGAGTTAATGT	56	34
412290	3'-UTR	9	1281	TTCAAGTTCAGTCTAATGA	10	35
412291	3'-UTR	9	1361	TTTTCCCCAGTAGAAAA	38	36
412292	3'-UTR	9	1388	CACAAATTTTGAATTTGGT	50	37
412293	3'-UTR	9	1394	ACATGGCACAAATGTTTGA	67	38
412294	3'-UTR	9	1399	GTTTGACATGGCACAAATGT	73	39
412295	3'-UTR	9	1404	TATTTGTTTGCATGGCAC	74	40
412296	3'-UTR	9	1412	TGATAGACTATTTGTTGAC	35	41
412297	3'-UTR	9	1457	GTTCCACTGTCAAGTCTTAA	55	42
412298	3'-UTR	9	1469	TGTAATAATGATTTCCACT	69	43
412299	3'-UTR	9	1482	CATTCGGTGTCTGTACTA	86	44
412300	3'-UTR	9	1489	TAAATACATTTCTGGTGTG	76	45
412301	3'-UTR	9	1495	ACACCTTAATATACATTTCTG	54	46
412302	3'-UTR	9	1502	TAAAGCCACACCTTAAATATA	54	47
412303	3'-UTR	9	1520	GTACCCCTCCCACTGCTCCTA	53	48
412304	3'-UTR	9	1554	AAGATGCTATCTGATGATAC	52	49
412305	3'-UTR	9	1559	CGTATAAGATGCTATCTGAT	69	50
412306	3'-UTR	9	1577	AATAGCAGGCATATTAATCTCG	74	51
412307	3'-UTR	9	1586	TACACTTCAAAATAGCAGGCA	69	52
412308	3'-UTR	9	1591	TCAATTCACCTTCAAAATAGC	50	53
412309	3'-UTR	9	1659	GGAGAATGCACATCCTAGCT	66	54
412310	3'-UTR	9	1665	ATGGCTGGAGAATGCACATC	60	55
412311	3'-UTR	9	1670	TCTTGATGGCTGGAGAATGC	71	56
412312	3'-UTR	9	1729	GAATCAGAATGTGAGGCTG	37	57
412313	3'-UTR	9	1946	CATTTGAAATATCAAAGCATT	0	58
412314	3'-UTR	9	1952	GGCTAACATGAAATATCAA	25	59
412315	3'-UTR	9	1958	AATTGAGGCTAACATTTGAAA	1	60
412316	3'-UTR	9	1965	GTTCAGAAATTGAGGCTAAC	65	61
412317	3'-UTR	9	1971	TATGGTGTTCAGAAATTGAG	13	62
412318	3'-UTR	9	1976	CTACCTATGGTGTTCAGAAA	61	63
412319	3'-UTR	9	1982	TACATTTACCTATGGTGT	38	64
412320	3'-UTR	9	1991	GACAAGCTTTACATTTCTACC	24	65
412321	3'-UTR	9	1996	GATCAGACAAGCTTTACATT	37	66
412322	3'-UTR	9	2007	ATGCTTTGAAACGATCAGACA	64	67
412323	3'-UTR	9	2012	ATTTCAATGCTTTGAAACGATC	44	68
412324	3'-UTR	9	2018	GTATCCATTTCAATGCTTTGA	60	69
412325	3'-UTR	9	2026	CCATATAAGTATCCATTTCA	48	70
412326	3'-UTR	9	2032	GAATTTCCATATAAGTATCC	28	71
412327	3'-UTR	9	2040	TCTGAGCAGAATTTCCATAT	58	72
412328	3'-UTR	9	2050	TGTCATTTCTATCTGAGCAGA	61	73
412329	3'-UTR	9	2060	TTTGACGGACTGTCAATTTCTA	47	74
412330	3'-UTR	9	2070	AACAATCTGTTTTCAGCGGAC	48	75
412331	3'-UTR	9	2088	TGATGCCCTCCCTTTGCAAA	53	76
412332	3'-UTR	9	2100	TGCCAAGGACACTGATGCC	68	77
412333	3'-UTR	9	2105	CAGCTTGCCAAGGACACTGA	75	78
412334	3'-UTR	9	2110	GAAATCAGCTTCCCAAGGAC	60	79
412335	3'-UTR	9	2115	ACCTAGAARTCAGCCTGCCA	46	80
412336	3'-UTR	9	2120	TTCTTACC TAGAATCAGCC	51	81
412337	3'-UTR	9	2128	TACCACATTTCTTACCTAGA	59	82
412338	3'-UTR	9	2134	TGAGGCTACCACATTTCTTA	0	83

[0297]

ISIS #	영역	표적 서열번호	표적 영역	서열	저해 %	서열번호
412339	3'-UTR	9	2140	TAAAAGTGGAGGCTACCCAT	48	84
412340	3'-UTR	9	2213	CAATGCTTCCAGGTGAAAA	49	85
412341	3'-UTR	9	2219	TAGAAACAAATGCTTCCAGG	66	86
412342	3'-UTR	9	2230	TCATATCAAAGTAGAAACAA	12	87
412343	3'-UTR	9	2242	TCCGAAAAACAGTCATATCA	24	88
412368	Intron 1	10	1308	ACC CGGCTGCAGAGGGCGAG	0	89
412369	Intron 1	10	1313	CGCTTACCCGGCTGCAGAGG	0	90
412370	Intron 1	10	1410	GACAAGGCGGTCAGCGGCGC	0	91
412371	Intron 2	10	1730	AGTCCGAGCGGTTCTTTT	0	92
412372	Intron 2	10	1735	AACTCAGTCCGAGCGGTTTC	19	93
412373	Intron 2	10	1740	AAAGAAACTCAGTCCGAGCG	10	94
412374	Intron 2	10	1745	TGGAGAAAGAAACTCAGTCC	45	95
412375	Intron 2	10	1750	GCAGCTGGAGAAAGAAACTC	14	96
412376	Intron 2	10	1755	TGGCAGCAGCTGGAGAAAGA	46	97
412377	Intron 2	10	1887	AGGGAGCACCATCTTTGGCT	20	98
412378	Intron 3	10	2125	TCACCCGCGAGGGCAGGCC	33	99
412379	Intron 3	10	2137	GGAGACTCGACTCACCCGC	0	100
412380	Intron 3	10	2142	TTAGAGGAAGACTCGACTCA	0	101
412381	Intron 3	10	2150	ACCTGACTTAGAGGAAGAC	47	102
412382	Intron 3	10	2155	TCACGACCTGACTTAGAGG	31	103
412383	Intron 3	10	2160	GAGAAFCACGACCCCTGACTT	2	104
412384	Intron 3	10	2165	TGGGAGAGAATCACGCCCT	31	105
412385	Intron 3	10	2170	CTCCCTGGGAGAGAATCAGG	0	106
412386	Intron 3	10	2191	GGTCGGCAGCAGTTAGGACTC	53	107
412387	Intron 3	10	2196	CGTTCGGTCCGACAGTTAG	30	108
412388	Intron 3	10	2216	CCTGGATAAGGTATTTCCCC	0	109
412389	Intron 3	10	2235	ACAAACACCATGTAAAACGC	11	110
412390	Intron 3	10	2241	GAGCACACAAACACCATGTA	0	111
412391	Intron 3	10	2251	TGCAGAGCAGAGCACAA	0	112
412392	Intron 3	10	2256	TAAGCTGCGAGAGCAGACCA	2	113
412393	Intron 3	10	2261	GTCCGTAAGCTCCGAGACCA	23	114
412394	Intron 3	10	2266	TTCCAGTCCGTTAAGCTCCGA	15	115
412395	Intron 4	10	2472	ACAATGACCTTAAGTCTCTC	0	116
412396	Intron 4	10	2477	GCAGAACATGTACCTTAATG	0	117
412397	Intron 4	10	2482	TAGGAGCAGAACATGTACCT	9	118
412398	Intron 4	10	2487	GTAAATAGGAGCAGAACATG	19	119
412399	Intron 4	10	2496	TGAAAAATAGTTAATAGGAG	0	120
412400	Intron 4	10	2511	CCACTGTTTTTCCGTGAAA	10	121
412401	Intron 4	10	2525	AAGTTGGTCCATCCACTG	28	122
412402	Intron 4	10	2530	GCCCTAAGTTGGTCCCTATC	20	123
412403	Intron 4	10	2535	CAAGAGCCCTAAGTTGGGTC	0	124
412404	Intron 4	10	2540	CGTGGCAGAGCCCTAAGTT	64	125
412405	Intron 4	10	2558	CGGCTTTACTAACAGCG	6	126
412406	Intron 4	10	2563	GATAACGGGCTTACTTAAC	33	127
412407	Intron 4	10	2568	TTGGAGATAACGGGCTTATA	73	128
412408	Intron 4	10	2573	TAGTTTGGAGATAACGGGC	51	129
412409	Intron 4	10	2578	TTAGATAGTTTGGAGATAA	24	130
412410	Intron 4	10	2584	CAATGGTTAGATAGTTTGG	36	131
412411	Intron 4	10	2589	CAGCTCAATGGTTAGATAGT	53	132
412412	Intron 4	10	2594	CAAAACAGCTCAATGGTTAG	34	133
412413	Intron 4	10	2599	TCCAGCAAAACAGCTCAATG	59	134
412414	Intron 4	10	2604	CTCATCCAGCAAAACAGCT	42	135
412415	Intron 4	10	2609	AAGCTCTCATTCAGCAAAA	57	136
412416	Intron 4	10	2614	TACCAAGCTCTCATTCAG	44	137
412417	Intron 4	10	2623	GGTTGCTATTACACAAGCTC	72	138
412418	Intron 4	10	2628	CTGTTGGTTGCTATTACACA	61	139
412419	Intron 4	10	2633	GAAACTGGTGGTTGCTATT	29	140
412420	Intron 4	10	2638	TAGTGAAAACCTGGTGGTTG	5	141
412421	Intron 4	10	2663	TTAACTAACCCCTGGGGAAGA	15	142
412422	Intron 4	10	2672	TGTCCTGAATTAACCTAACCC	4	143
412423	Intron 4	10	2677	TGGAATGCTTGAATTAACCT	0	144

[0298]

ISIS #	영역	표적 서열번호	표적 영역	서열	저해 %	서열번호
412424	Intron 4	10	2691	GCCAGAGCCCTCTTGGAAAT	36	145
412425	Intron 4	10	2698	AAAAATAGCCAGAGCCCTCTC	59	146
412426	Intron 4	10	2703	TGTCCAAAAATAGCCAGAGC	28	147
412427	Intron 4	10	2708	TGCTATGTCCAAAAATAGCC	15	148
412428	Intron 4	10	2713	TCATTTGCTATGTCCAAAAA	28	149
412429	Intron 4	10	2718	GAGTCTCATTTGCTATGTCC	20	150
412430	Intron 4	10	2723	AGTTTGAAGTCTCATTTGCTA	30	151
412431	Intron 4	10	2728	GAGGAAGTTTGAAGTCTCAT	55	152
412432	Intron 4	10	2763	CTTCGTGTTGCTGACTCTCTG	55	153
412433	Intron 4	10	2778	CCTCTGTGTTTGTAGTCTTCT	56	154
412434	Intron 4	10	2788	TTTCTTCAACCCCTGTTGTT	15	155
412435	Intron 4	10	2796	GGAGTGGCTTCTTCAACCC	43	156
412436	Intron 4	10	2849	AGGAAGACAGGGAAGAGAG	20	157
412437	Intron 4	10	2854	TTCTAAGGAGACAGGGAA	0	158
412438	Intron 4	10	2859	TGCCCTTCAAGGAGACAA	31	159
412439	Intron 2	10	1791	GGATGCGAGTTGGGATCTGG	0	160
412440	CDS	9	380	CCAGTCTTGGCGCAGACG	64	161
412441	CDS	9	1003	GCCAGAAAGCTCAAACTTGA	37	162
412442	3'-UTR	9	1783	CCACAAGCTGTCCAGTCTAA	32	163
412443	3'-UTR	9	2267	GGTCACACTCTCAACAATA	59	164
412444	3'-UTR	9	2282	AAACATGTAACCTTTGGTCA	55	165
418899	3'-UTR	9	1391	TGACATGGCACAATGTTTTG	ND*	166

[0299]

*ND - 실험으로 정해지는 것은 아니지만 다른 분석에서 활성이 높다.

- [0300] 표 1에 나타난 바와 같이, 서열 번호 11-15, 17-20, 24, 26-34, 36-57, 59, 61, 63-82, 84-86, 88, 95, 97, 99, 102, 103, 105, 107, 108, 122, 125, 127-140, 145, 146, 149, 151-154, 156, 159, 161-165는 본 분석에서 사람 결합 조직 성장 인자 발현의 적어도 24% 저해성을 나타내므로 바람직하다. 바람직한 서열이 상보적인 표적 부위는 본 원에서 "활성 부위"(active sites)라 하므로 본 발명의 화합물에 의해 표적화되는 바람직한 부위이다.
- [0301] 안티센스 화합물은 CTGF 서열 중 뉴클레오타이드 범위, 즉, 서열 번호 9의 뉴클레오타이드 718-751, 1388-1423, 1457-1689, 2040-2069, 2120-2147, 또는 2267-2301 범위에서 상보적이다. 특정 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 서열 번호 10의 뉴클레오타이드 2728-2797 범위에서 상보적이다. 이들 범위에서 표적화된 화합물은 적어도 50% 저해성을 나타낸다(즉, 서열 번호: 15, 29, 31, 42, 46-49, 53, 72, 81, 82, 152-154, 164, 및 165). 표 1에 나타난 특정 표적 부위는 적어도 50% 저해성도 나타낸다(즉, 서열 번호: 12, 20, 33, 34, 76, 107, 129, 132, 134, 136, 및 146).
- [0302] 특정 실시예에 있어서, 안티센스 화합물은 뉴클레오타이드 553-611, 1394-1423, 1469-1508, 1559-1605, 1659-1689 또는 2100-2129 범위에서 상보적이다. 여기에서 표적화된 화합물은 적어도 60% 저해성을 나타낸다(즉, 서열 번호: 27, 38, 43, 50, 52, 54, 55, 77, 79, 및 86). 표 1에 나타난 특정 표적 부위는 적어도 60% 저해성도 나타낸다(즉, 서열 번호: 24, 61, 63, 67, 69, 73, 125, 139 및 161).
- [0303] 안티센스 화합물은 뉴클레오타이드 1399-1423 범위에서도 상보적이다. 여기에서 표적화된 화합물은 적어도 70% 저해성을 나타낸다(즉, 서열 번호 39 및 40). 표 1에 나타난 특정 표적 부위는 적어도 70% 저해성도 나타낸다(즉, 서열 번호 28, 30, 45, 51, 56, 78, 128 및 138). 표 1에 나타난 일 표적 부위는 적어도 80% 저해성도 나타낸다(즉, 서열 번호 44). 특정 실시예에 있어서, 저해 퍼센트는 안티센스 화합물이 50 nm 농도로 HuVec 세포에 전달될 때 얻는다.
- [0304] 역사적으로(historical) ASO 선도(lead) 서열인 서열 번호 15(ISIS 124238)보다 매우 활성이 높은 복수의 선도 서열이 엑손 및 인트론 서열에서 확인되었다.
- [0305] 활성이 높은 서열(서열 번호: 28, 30, 39, 40, 45, 52, 56, 78, 125)에서의 복용 반응 연구가 고려되었다(도 8 참조). 서열 번호 13 및 15(ISIS 124212 및 124238)는 이전에 지정된 올리고뉴클레오타이드이고 서열 번호 167(ISIS 141923, 서열 CCTCCCTGA AGGTCCTCC)는 음성 대조군이다.
- [0306] **재료 및 방법**
- [0307] 올리고뉴클레오타이드는 리포펙틴 매개 형질감염을 이용한 인간 제대 정맥 내피세포(HuVEC)에서 스크리닝되고 50 nM 농도로 확인되었다. Low Serum Growth Supplement(Cascade Biologies)로 보충된 배지(Medium 200)에 유지된 HuVEC 세포(Cascade Biologies, Portland, OR)를 96-웰 플레이트에 웰당 5,000 세포수로 플레이팅하고 5% CO₂ 존재 하에 밤새 372°C에서 배양하였다. 다음날, 배지를 흡입하고 올리고-리포펙타민 2000(Invitrogen) 혼합물(Opti-MEM I 배지 1ml당 리포펙타민 2000 3mg)을 함유하는 미리 가열한 Opti-MEM I(Invitrogen)로 대체하였다. 4시간 후, 형질감염 혼합물은 Low Serum Growth Supplement를 보충한 새로운 배지 200으로 교체하고, 5% CO₂ 조건 하에 372°C에서 배양하였다. 16-24시간 후, 약 80% 컨플루언스(confluence)에서, 세포를 포스페이트 완충 염수(PBS)로 세척하고 Qiagen RNeasy Kit를 이용하여 RNA 정제를 위해 용해하였다. 정량 실시간 폴리머라제 사슬 반응(RT-PCR)(후술되는 프라이머/프로브 세트)에 의해 CTGF 메시지를 측정하였고, 그 결과는 총 RNA로 정규화하였다.
- [0308] **통계 분석**
- [0309] 각 시료는 2회 분석하고 세로 막대는 두 측정값 간의 차이를 나타낸다.
- [0310] **결과 및 논의**
- [0311] 표적당 약 150개의 새로운 서열을 합성하고 세포 배양중 CTGF에 대한 활성을 평가하였다. 새로운 CTGF 올리고뉴클레오타이드(서열 번호: 28, 30, 39, 40, 45, 52, 56, 78, 125, 및 166)는 사람 CTGF mRNA 발현에 대한 저해성이 우수하다. 확인된 활성이 높은 올리고뉴클레오타이드는 도 7에 나타낸다.
- [0312] 많은 새로운 인트론(도 4, 5 및 6) 및 엑손(도 1, 2 및 3) 올리고뉴클레오타이드는 놀랍게도 시간상 이전에 확인된 ISIS 124238을 포함한 화합물보다 활성이 상당히 높다.
- [0313] 엑손을 표적으로 하는 안티센스의 효능은 일반적으로 인트론을 표적으로 하는 안티센스보다 높다(도 7a). 이들

엑손 뉴클레오타이드 서열 리스트는 도 7b에 나타낸다.

[0314] 상술한 방법을 이용하여 HuVEC 세포에서의 복용 반응 실험으로 활성이 가장 높은 순으로 10개의 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 확인되다.

[0315] **실시예 9: 결합 조직 성장 인자 단백질 수준의 웨스턴 블롯 분석**

[0316] 표준 방법을 이용하여 웨스턴 블롯 분석(면역블롯 분석)을 수행한다. 올리고뉴클레오타이드 처리 16-20시간 후 세포를 수거하고 PBS로 1회 세척하고, Laemmli 버퍼(100 μ l/well)로 현탁하고, 5분간 가열하고 16% SDS-PAGE 겔에 로딩한다. 겔을 150V에서 1.5시간 처리하고, 웨스턴 블롯 막으로 이송한다. 1차 항체 중에 대하여 방사표지나 형광표지한 2차 항체와 함께 결합 조직 성장 인자가 겨냥하는 적절한 1차 항체를 이용한다. PHOSPHORIMAGER™(Molecular Dynamics, Sunnyvale Calif.)를 이용하여 밴드를 시각화한다.

[0317] **실시예 10: CTGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드 실험 마우스 독성 연구**

[0318] **연구 목적**

[0319] 본 실험 독성 연구의 목적은 정상 수컷 BALB/c 마우스 내 잠재적인 독성에 있어서 사람 CTGF를 표적으로 하는 세 종류의 올리고뉴클레오타이드를 평가하는 것이다. 실험한 올리고뉴클레오타이드는 ISIS 서열 412294(서열 번호: 39), 412295(서열 번호: 40) 및 418899(서열 번호: 166)이었다.

[0320] **방법**

[0321] 본 연구 전반에 걸쳐 약 25 그램 체중의 수컷 BALB/c 마우스(약 8주령)에 정상적인 실험 음식 식사를 공급하였다. 마우스에 25 또는 50mg/kg 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 4주간 주당 2회 피하(SQ) 주입하였다(n=6). 하기 최종 값을 측정하였다.

- [0322] - 주당 체중
- [0323] - 4주간 혈액 혈장 화학반응
- [0324] - 부검의 기관 중량 및 체중
- [0325] - 간과 신장의 H&E 염색

[0326] **결과**

[0327] 25mg/kg 또는 50mg/kg 안티센스 올리고뉴클레오타이드 ISIS 412294(서열 번호: 39), ISIS 412295(서열 번호: 40) 또는 ISIS 418899(서열 번호: 166)을 투여한 4주 후 결과는 염수-처리 마우스 대조군과 상당히 다른 결과를 나타내었다. 이는 다음과 같다.

- [0328] 1) ISIS 412294(서열 번호: 39) 또는 ISIS 412295(서열 번호: 40) 25mg/kg 또는 50mg/kg나, ISIS 418899(서열 번호: 166) 25mg/kg 처리 4주 후, 혈장 알라닌 아미노기전달효소(ALT) 및 아스파르트산 아미노기전달효소(AST) 수준은 식염수(비히클) 대조군과 유사하였지만, ISIS 418899(서열 번호: 166) 50mg/kg를 투여한 마우스는 대조군에서 관찰되는 ALT/AST양보다 상당히 증가하였다(도 9a 및 9b 참조). 이는 이전의 연구나 세포 계 분석에서 예측하지 못한 의외의 결과였다.
- [0329] 2) 50mg/kg 412295 처리군에 대한 체중 증가는 대조군의 체중 증가보다 상당히 낮다(도 10 참조).

[0330] **결론**

[0331] 서열 번호 39(ISIS 412294)는 서열 번호 40(ISIS 412295) 및 서열 번호 166(ISIS 418899)만큼 바람직하지 않은 독성학적 특징을 많이 나타내지 않았다. 이 결과는 전체적으로 예상되지 않았고, 이들 올리고뉴클레오타이드 서열의 세포 배양에 의해 예상되지 않았다.

[0332] **실시예 11: 래트 CTGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드(서열 번호 163)가 손상 래트의 콜라겐 및 CTGF mRNA 발현에 미치는 영향**

[0333] 래트 동물 반환 모델에서 목적하는 CTGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열 번호 163(ISIS 412442)를 이용하여 CTGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 CTGF와 Col1A2(반흔의 생체지표)의 발현을 감소시킬 수 있는지를 조사하였다. 이러한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 39(ISIS 412294)와 동일한 화학 구조를 갖지만, 서열은 래트 CTGF mRNA 서열에 100% 상보적인 것으로 약간 변형되었다.

- [0334] **외상**
- [0335] 4개의 총 길이가 0.8 센티미터인 생검 펀치를 10주령 털이 없는 래트의 등(연구 첫날)에 척추 중심선의 각 측에 두 개 도입하였다. 상처는 개방되어 있지만 멸균 패색 봉대로 드레싱하였다.
- [0336] **안티센스 올리고뉴클레오타이드 투여**
- [0337] 동물의 우측상 두 생검 부위는 CTGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드 생검 후 1일, 5일, 9일 및 13일에 3.0, 1.0, 0.3 또는 0.1mg 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 피부 내 처리하였다. 동물의 좌측 생검 부위는 포스페이 트 완충 염수(PBS)로 피부 내 처리하였다. 동물은 생검 15일 후 희생되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드나 PBS의 총 부피 200 μ l를 펀칭한 생검 부위에 전달하였다. 이 200 μ l 부피는 상처의 좌측, 우측, 상측 및 하측에서 0.25cm 내지 0.5cm인 상처 주변부에 주입되는 4개의 50 μ l 분액으로 분리된다.
- [0338] **시료 수거/희생**
- [0339] 희생일에 동물은 안락사하고 0.5cm 생검 펀치로 상처 중심부에서 피부 샘플을 얻었고, 표준 공정을 이용하여 이들 시료에서 mRNA를 추출하였다. 래트 CTGF 및 Col1A2의 RT-PCR mRNA 분석은 데이터 분석용 표준 곡선 방법과 하우스킵핑/정규화 유전자로서 RiboGreen을 이용하여 수행되었다.
- [0340] **결과**
- [0341] 래트를 모든 투여량으로 처리하면 CTGF와 Col1A2 mRNA 발현이 통계적으로 유의하게 감소한다(도 11 참조). 이들 결과는 2'MOE 변형 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용한 CTGF 발현 저해는 피부 내 콜라겐의 축적을 감소시켜 피부 반흔 형성의 심각성을 낮추는 것을 명백하게 입증한다.
- [0342] **실시예 12: 토끼의 CTGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 일회 투여 피부 내 약물동력 연구**
- [0343] **연구 목적**
- [0344] 토끼 약물동력학적 연구의 목적은 일회 피부 내 주입 후 상이한 시점에서 토끼 피부 내 CTGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드(서열 번호: 39, ISIS 412294)의 농도를 측정하는 것이다.
- [0345] **연구 설계**
- [0346] 연구일에, 모든 동물에 CTGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열 번호 39 100 μ l를 50mg/ml 농도로(총 용량: 5 mg) 일 회 주입하였다. 토끼의 등에 거의 평행인 척추 중심 측에 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 투여하였다. 시험 물질이 동물 신체의 하부를 향해 주입되도록 바늘을 주입하였다. 1일, 3일, 7일 또는 14일에 토끼를 안락 사하고 하나는 초기 주입 부위 중심부이고, 다른 하나는 수직 방향으로 0.5cm 아래 거리를 두고 있는, 두 개의 총 두께가 1.0cm인 펀치 생검을 얻었다. 시료는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 약물량 분석 전에 냉동 분리하 고 -80 $^{\circ}$ C에 저장하였다. 결과는 상기한 시기에 양 생검에서 얻은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 평균량을 나타 낸다.
- [0347] **결과 및 결론**
- [0348] 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 상당량은 피부 내 투여 후 적어도 14일에는 나타난다(도 12 참조). 약물 치료 농도는 조직 그람 당 1 내지 100 μ g이다. 이들 결과는 처음에는 피부 내 이러한 화학 구조를 갖는 2'MOE 안티센 스 올리고뉴클레오타이드의 체류 시간이 연장됨을 나타내고, 이러한 결과는 피부 내 이러한 화합물의 치료 효능 을 확증한다.
- [0349] **실시예 13: 게놈 검색**
- [0350] 서열 번호 39 뉴클레오타이드 서열과 전체나 부분 상동성이나 상보성을 갖는 서열에 대한 사람 게놈 데이터베이스 검색을 수행하여 "오프-표적" 독성으로 변형될 수 있는 원치 않는 안티센스 효과를 유도하는 서열 번호 39의 효능을 분석하였다.
- [0351] 공개되어 있는 사람 DNA 서열 데이터베이스의 종합 검색을 수행하여 원치않는 안티센스나 기타 저해성이 표적 CTGF(결합 조직 성장 인자)와 사람 유전자 생성물의 발현에 발휘되어 "오프-표적" 효과를 유도할 수 있도록 서 열 번호 39를 포함하는 서열이 사람 유전자의 알려진 배열과 상당한 상동성이 있는지를 평가하였다. 검색은 20 개 뉴클레오타이드 범위의 상동 서열의 선별(즉, 서열 번호 39, 총 길이: 12개의 뉴클레오타이드 이하)을 수반 하였다.

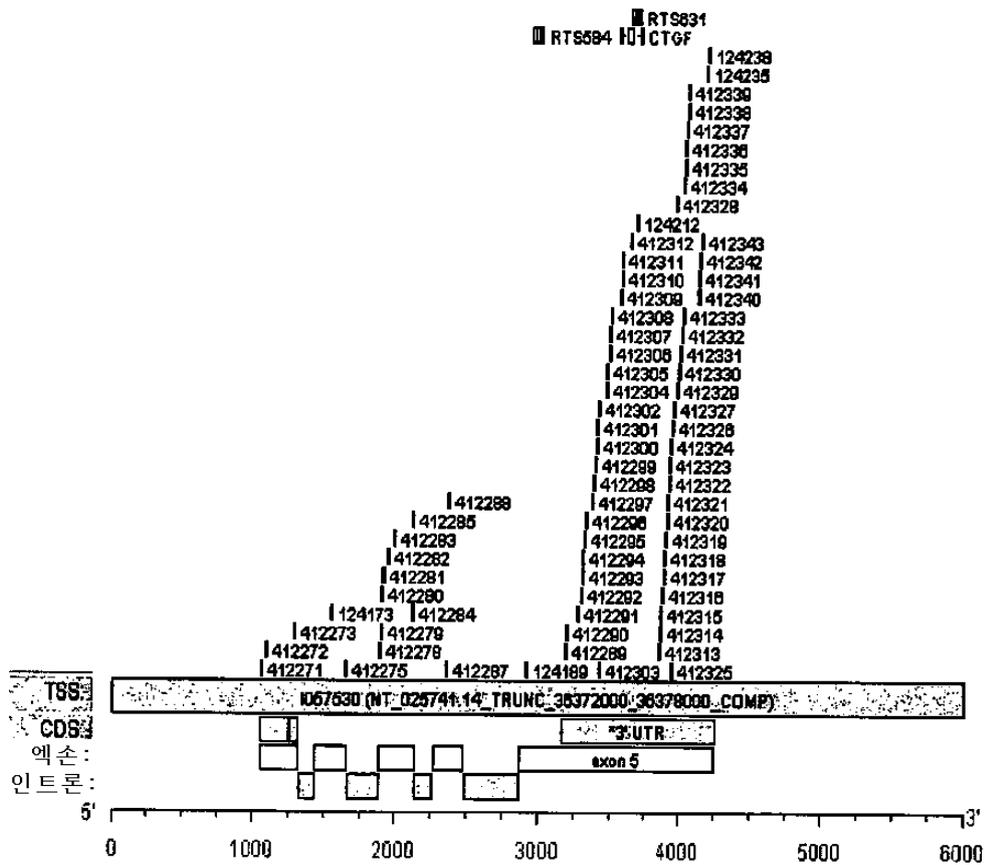
- [0352] 서열 번호 39와 상동성이 있는 20, 19 또는 18 염기를 갖는 사람 게놈에서 오프-표적 부위는 검출되지 않았다. 18, 19 또는 20 염기를 갖는 오프-표적 부위가 전혀 존재하지 않는 것은 이에 따른 오프-표적 활성화 가능성이 최소임을 나타낸다. 서열 번호 39와 상동성이 있는 세 개의 17-염기가 동정되었다. 이들 중 하나는 LRFN2 유전자의 인트론 내에 있다. 서열 번호 39의 작용 부위인 세포질에 mRNA가 도착하기 전에, 인트론은 전형적으로 전사체로부터 스플라이싱된다. 이 때문에, 서열 번호 39는 LRFN2 발현에 영향을 미치는 것으로 예측되지 않는다. 두 개의 다른 17-염기 상동체는 유전자 내부 스페이스 영역에 존재한다. 유전자 내 스페이스는 일반적으로 번역되는 것이 아니라 핵 컴파트먼트(compartment)에서 서열 번호 39의 작용 부위와는 별도로 이중 가닥 DNA로서 존재한다. 따라서, 이와 관련된 17-염기 상동체는 없다.
- [0353] 16-염기, 15-염기 및 14-염기 상동체 중, 단 하나만이 알고 있거나 의심되는 전사체(즉, 간 활성인 지질 생합성 트랜스퍼라제를 암호화하는 FRMD5)에 배치되었다. 그러나, mRNA 센스 전사체와 상동관계인 14-염기 서열 번호 39는 안티센스 활성화에 도움이 되지 않는다(즉, 혼성화는 서열 번호 39 서열의 일부가 mRNA 전사체 서열에 상동적이지 않고 상보적일 때만 가능할 수 있다). 따라서, 서열 번호 39는 이러한 전사체에 영향을 미치지 않을 것이다. 모든 다른 16-염기 내지 14-염기 상동체는 중첩된 전사체, 예측된 전사체 또는 발현된 서열 표지가 없는 인트론 또는 유전자 내 스페이스에 대응되었다. 13-염기 상동체는 없었다. 의도한 표적을 갖는 20개 염기 올리고뉴클레오타이드 결합(서열 번호 39)의 결합에 비해, 단지 12개 이하의 뉴클레오타이드 상동체에 따른 전사체는 열역학상 불리한 표적이다. 따라서, 12개 이하의 염기 상동체는 오프-표적 안티센스 활성화의 상당한 가능성을 제시하지 않는다.
- [0354] 따라서, 사람 게놈 데이터베이스 검색은 서열 번호 39가 최소한의 오프-표적 효과 가능성을 갖는 의도한 표적에 대한 높은 특이성을 지니는 것을 입증하였다.
- [0355] **실시예 14: CTGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 안전성과 내성을 평가하는 일회 투여 피부 내 임상 연구(서열 번호: 39)**
- [0356] **연구 목적**
- [0357] 일회 약물 투여의 안전성과 내성을 평가하는 1상 연구 프로토콜의 하나로서 6명의 환자에게 사람 CTGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열 번호 39(Isis 번호 412294)를 피부 내 투여하였다(총 용량: 80mg).
- [0358] **결과**
- [0359] 홍반, 염증, 가려움 및 경결 등 국소 주입 부위 반응 외 부작용은 보고되지 않았다. 나열한 부작용은 "최소한의" 심각도로 개체의 약 50%인 것으로 보고되었다. 혈청 화학, 혈액학, 소변 검사, ECG, 생명 징후, 물리적 실험, 및 보체 활성화 변화는 나타나지 않았다.
- [0360] **결론**
- [0361] CTGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 치료 범위 내 복용량의 투여는 사람에게 효과적이며 이는 피부 반흔 치료 화합물의 안정성을 입증한다.
- [0362] **실시예 15: 피부 내 투여 후 사람 피부 내 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열 번호 39의 약물량**
- [0363] 초기 임상 연구에서는 환자 집단의 피부 약물량을 측정하였고, 5명의 환자는 각각 40mg 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)(각 4mg 동일하게 10회 복용)를 투여하였다. 피부 생검은 첫날 ASO 단일 투여 후 21일에 자극된 외상 부위에서 얻었다(복용 위치 기준으로 피부에 선을 그림). 편치 생검은 조직 시료의 4mm 원기둥형 코어로 이루어졌다. 모세관 전기이동과 형광 표지한 서열-특이 프로브를 이용하여 ASO량을 확인하였는바, 이는 조직 그램 당 84.2 μ g/g이었다. ASO 약물의 계획된 치료 농도는 조직 그램당 1 내지 100 μ g인 것으로 예측되었다.
- [0364] 이러한 결과는 처음에는 피부 내 투여 후 이러한 화학 구조를 갖는 2'MOE 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 피부에서의 체류 시간이 연장됨을 나타내고, 이러한 결과는 피부에서의 이러한 화합물의 치료 가능성을 명확하게 나타낸다.
- [0365] **실시예 16: 선택적 복강 형성 수술을 받은 개체의 반흔 심각성 감소에 있어 서열 번호 39의 2상 무작위 이중 블라인드 개체 내 제어 임상 효능 및 안정성 연구**
- [0366] 본 연구는 CTGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열 번호 39(즉, 약물 제품)의 효능과 안정성을 평가하는 무작위 이중 블라인드 개체 내 제어 연구이다. 약물 제품은 선택적 복강 형성수술을 받은 개체의 피부 주입을 통한

복강 절개의 양측 인접부에 투여되었다.

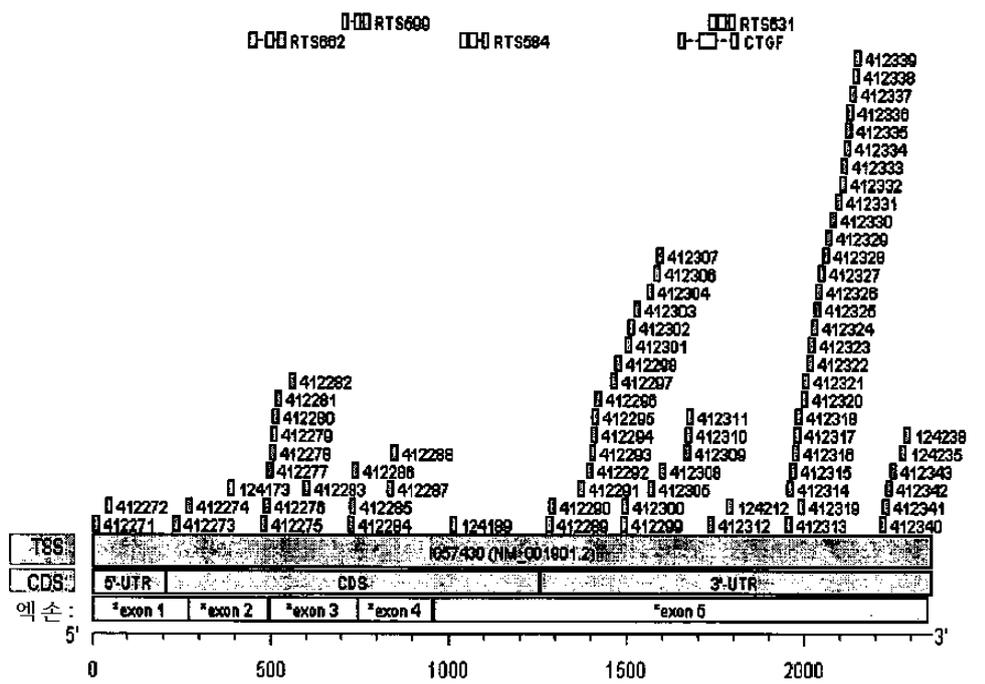
- [0367] 음모 바로 옆 중심선 측에 복강 절개부는 외상 절개부를 밀폐한 후 약물이나 위약 처리하였다.
- [0368] 연구 기간은 약 24주이다. 개체는 첫날에 복강 형성 수술을 받은 후 10주간 약제품과 위약을 복용하였다. 상처 관찰과 평가는 4주 내지 12주에 걸쳐 모두 수행하였고 24주에 다시 수행하였다.
- [0369] 각 매치된 쌍의 절개부를 평가하여 효능을 확인하였다.
- [0370] 하기 절개 상처의 심각성을 평가하는 두 가지 방법을 이용하여 복강 형성 수술 후 12주와 24주에 효능을 평가하였다.
- [0371] - 시각 통증 척도(VAS)를 이용한 블라인드 사진의 전문의 집단 평가
- [0372] - 조사자 반흔 평가 척도 개체 반흔 평가 척도
- [0373] 서열 번호 39는 이들 기준에 의해 효력이 있다.
- [0374] **실시예 17: 전 유방 축소나 유방 고정 수술에 의한 내측 반흔의 선택적 성형수술을 받은 개체의 피부 반흔 감소에 있어 서열 번호 39의 2상 무작위 이중 블라인드 개체 내 제어 임상 효능 및 안정성 연구**
- [0375] 본 연구는 CTGF 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열 번호 39(즉, 약제품)의 효능과 안정성을 평가하는 무작위 이중 블라인드 개체 내 제어 연구이다. 약제품은 피부 내 주입을 통해 성형수술한 유방 축소 반흔의 내부에 투여되었다. 성형수술된 유방 상처/반흔의 내부의 측부는 수술 절개부를 밀폐한 후 약제품이나 위약 처리하였다.
- [0376] 본 연구에 40명의 개체가 참여하였다. 연구 기간은 약 24주이다. 개체는 첫 날 반흔 성형 수술을 받은 후 10주간 약제품과 위약을 투여하였다. 반흔 관찰과 평가는 4주 내지 12주에 걸쳐 모두 수행하였고 24주에 다시 수행하였다.
- [0377] 각 매치된 쌍의 절개부를 평가하여 효능을 확인하였다. 하기 절개 상처의 심각도를 평가하는 두 가지 방법을 이용하여 복강 형성 수술 후 12주와 24주에 효능을 평가하였다.
- [0378] - 시각 통증 척도(VAS)를 이용한 블라인드 사진의 전문의 집단 평가
- [0379] - 조사자 반흔 평가 척도 개체 반흔 평가 척도
- [0380] 서열 번호 39는 이들 기준에 의해 효력이 있다.

도면

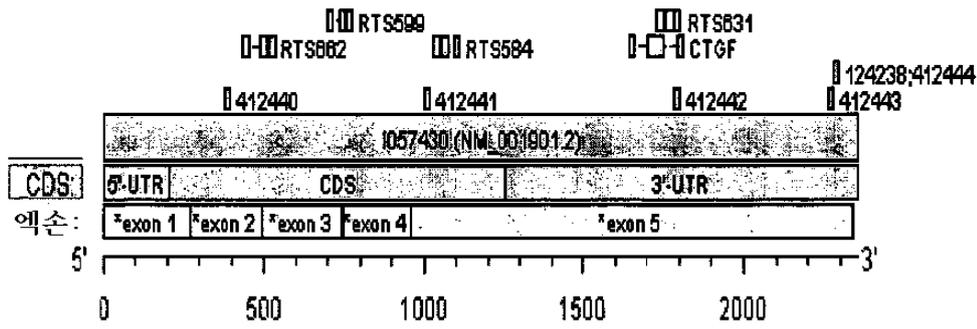
도면1



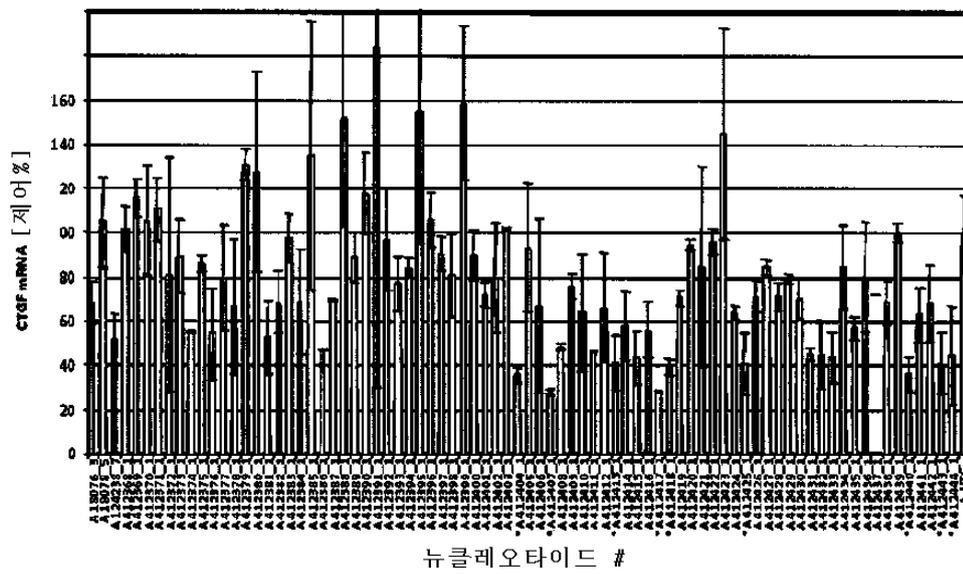
도면2



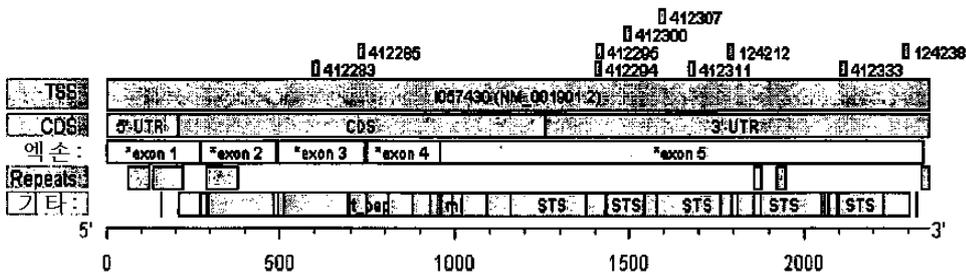
도면5



도면6



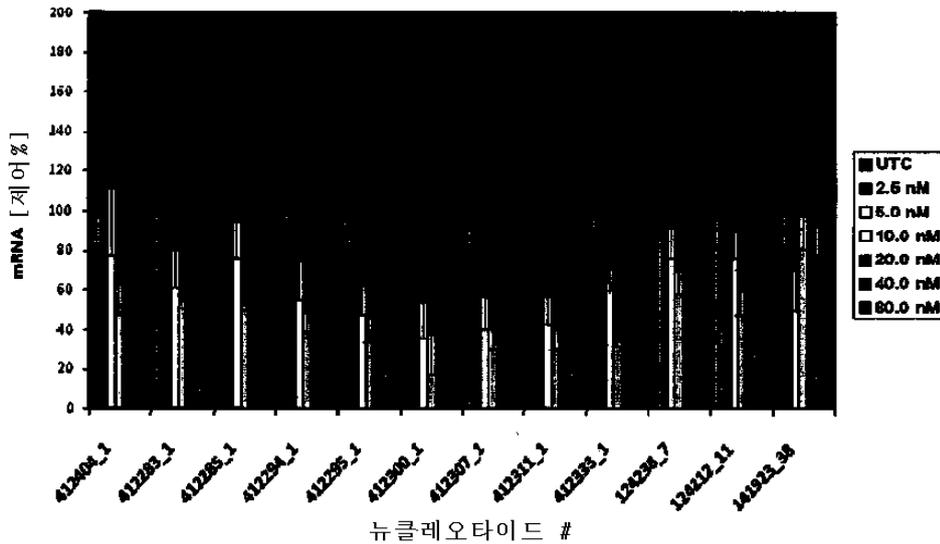
도면7a



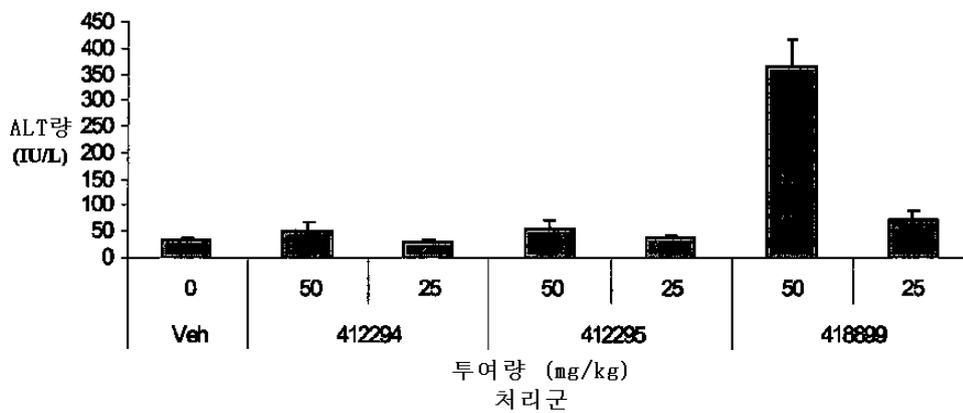
도면7b

올리고뉴클레오타이드 #	서열
412404	CGTGGCAAGAGCCCTAAGTT (INTRON)
412283	GGGCATGCAGCCCACCGCCC (EXON 3)
412285	AGGGCAGGCCCAACCACGGT (EXON 3)
412294	GTTTGACATGGCACAATGTT (EXON 5)
412295	TATTGTTTTGACATGGCACA (EXON 5)
412300	TAATATACATTCTGGTGCTG (EXON 5)
412307	TACACTTCAAATAGCAGGCA (EXON 5)
412311	TCTTGATGGCTGGAGAATGC (EXON 5)
412333	CAGCCTGCCAAGGACACTGA (EXON 5)
124238	AAACATGTAACTTTTGGTCA (Old leads)
124212	CCACAAGCTGTCCAGTCTAA (Old leads)

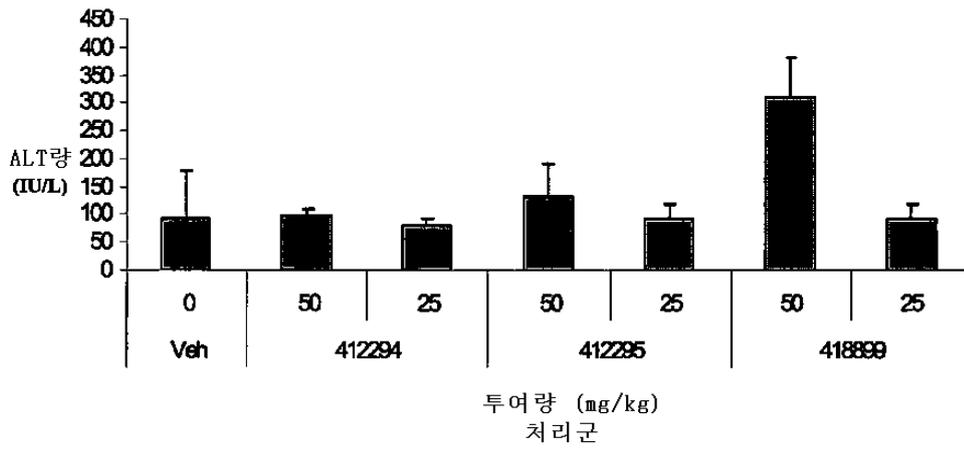
도면8



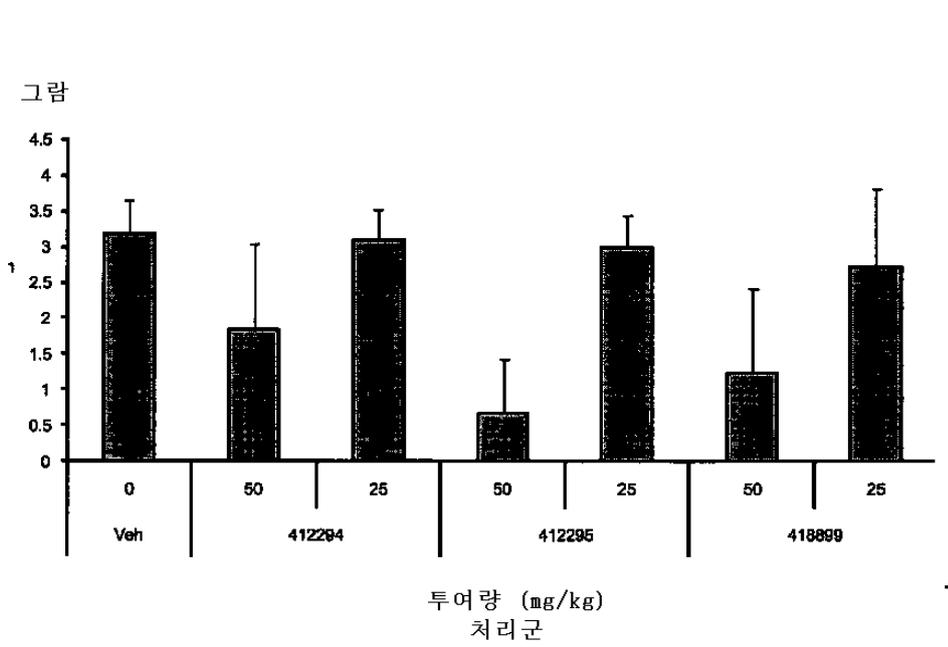
도면9a



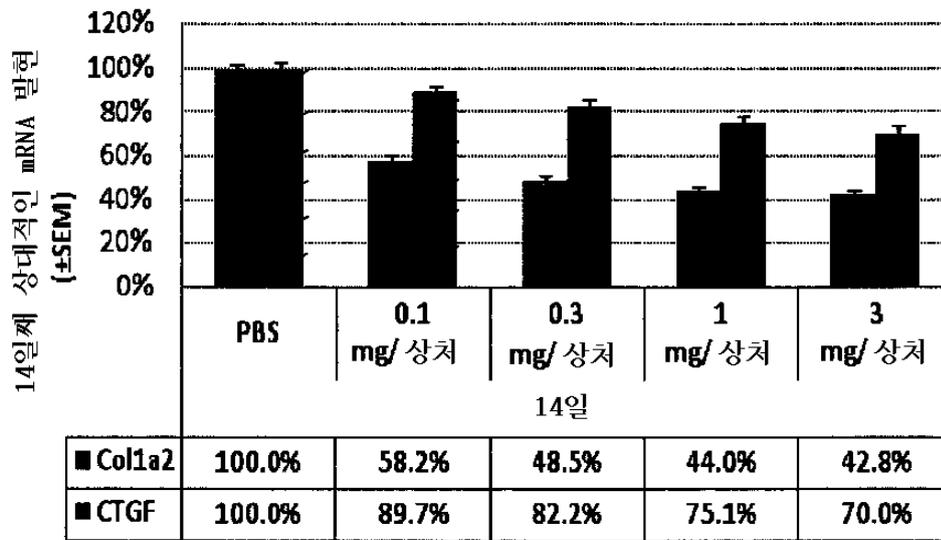
도면9b



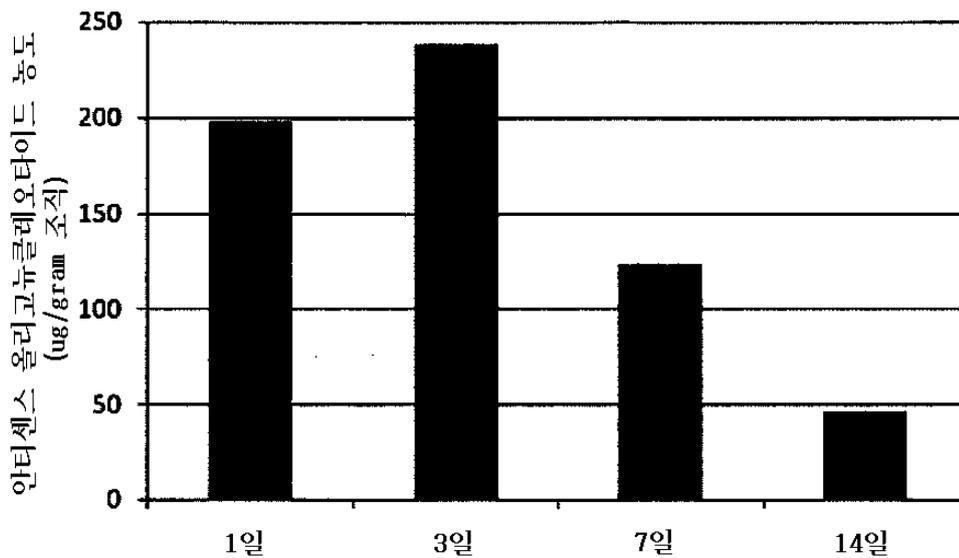
도면10



도면11



도면12



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> EXCALIARD PHARMACEUTICALS, INC.

ISIS PHARMACEUTICALS, INC.

<120> ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES DIRECTED AGAINST CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR AND USES THEREOF

<130> EPP11143KR

<150> US61/190,121

<151> 2008-08-25

<160> 167

<170> PatentIn version 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Positive control oligonucleotide directed to human H-ras

<400> 1

tccgtcatcg ctctcaggg 20

<210> 2

<211> 2075

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> exon

<222> (130)..(1180)

<400> 2

cccgccgac agccccgaga cgacagcccg gcgcgtcccg gtccccacct cggaccaccg 60

ccagcgctcc aggccccgcg ctccccgtc gccgccaccg cgcctccgc tccgcccga 120

gtgccaacc atg acc gcc gcc agt atg ggc ccc gtc cgc gtc gcc ttc gtg 171

Met Thr Ala Ala Ser Met Gly Pro Val Arg Val Ala Phe Val

1 5 10

gtc ctc ctc gcc ctc tgc agc cgg ccg gcc gtc ggc cag aac tgc agc 219

Val Leu Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Ala Val Gly Gln Asn Cys Ser

15 20 25 30

ggg ccg tgc cgg tgc ccg gac gag ccg gcg ccg cgc tgc ccg gcg ggc 267

Gly Pro Cys Arg Cys Pro Asp Glu Pro Ala Pro Arg Cys Pro Ala Gly

35 40 45

gtg agc ctc gtg ctg gac ggc tgc ggc tgc tgc cgc gtc tgc gcc aag 315

Val Ser Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys

50 55 60

cag ctg ggc gag ctg tgc acc gag cgc gac ccc tgc gac ccg cac aag 363

Gln Leu Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys

65 70 75

ggc ctc ttc tgt gac ttc ggc tcc ccg gcc aac cgc aag atc ggc gtg 411
 Gly Leu Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val
 80 85 90

tgc acc gcc aaa gat ggt gct ccc tgc atc ttc ggt ggt acg gtg tac 459
 Cys Thr Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Ile Phe Gly Gly Thr Val Tyr
 95 100 105 110

cgc agc gga gag tcc ttc cag agc agc tgc aag tac cag tgc acg tgc 507
 Arg Ser Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys
 115 120 125

ctg gac ggg gcg gtg ggc tgc atg ccc ctg tgc agc atg gac gtt cgt 555

Leu Asp Gly Ala Val Gly Cys Met Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg
 130 135 140

ctg ccc agc cct gac tgc ccc ttc ccg agg agg gtc aag ctg ccc ggg 603
 Leu Pro Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly
 145 150 155

aaa tgc tgc gag gag tgg gtg tgt gac gag ccc aag gac caa acc gtg 651
 Lys Cys Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Gln Thr Val
 160 165 170

gtt ggg cct gcc ctc gcg gct tac cga ctg gaa gac acg ttt ggc cca 699
 Val Gly Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro
 175 180 185 190

gac cca act atg att aga gcc aac tgc ctg gtc cag acc aca gag tgg 747
 Asp Pro Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp
 195 200 205

agc gcc tgt tcc aag acc tgt ggg atg ggc atc tcc acc cgg gtt acc 795
 Ser Ala Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr
 210 215 220

aat gac aac gcc tcc tgc agg cta gag aag cag agc cgc ctg tgc atg 843
 Asn Asp Asn Ala Ser Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met
 225 230 235

gtc agg cct tgc gaa gct gac ctg gaa gag aac att aag aag ggc aaa 891

Val Arg Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys
 240 245 250

aag tgc atc cgt act ccc aaa atc tcc aag cct atc aag ttt gag ctt 939

Lys Cys Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro Ile Lys Phe Glu Leu
 255 260 265 270

tct ggc tgc acc agc atg aag aca tac cga gct aaa ttc tgt gga gta 987

Ser Gly Cys Thr Ser Met Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val
 275 280 285

tgt acc gac ggc cga tgc tgc acc ccc cac aga acc acc acc ctg ccg 1035

Cys Thr Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro
 290 295 300

gtg gag ttc aag tgc cct gac ggc gag gtc atg aag aag aac atg atg 1083

Val Glu Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met Lys Lys Asn Met Met
 305 310 315

ttc atc aag acc tgt gcc tgc cat tac aac tgt ccc gga gac aat gac 1131

Phe Ile Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp
 320 325 330

atc ttt gaa tgc ctg tac tac agg aag atg tac gga gac atg gca tga a 1180

Ile Phe Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala
 335 340 345

gccagagagt gagagacatt aactcattag actggaactt gaactgattc acatctcatt 1240

tttccgtaaa aatgatttca gtagcacaag ttattttaaatt ctgtttttct aactggggga 1300

aaagattccc acccaattca aaacattgtg ccatgtcaaa caaatagtct atcttcccca 1360

gacactgggt tgaagaatgt taagacttga cagtggaact acattagtac acagcaccag 1420

aatgtatatt aaggtgtggc tttaggagca gtgggagggt accggcccgg ttagtatcat 1480

cagatcgact cttatacgag taatatgcct gctatttgaa gtgtaattga gaaggaaaat 1540

tttagcgtgc tcaactgacct gcctgtagcc ccagtgacag ctaggatgtg cattctccag 1600

ccatcaagag actgagtcaa gttgttcctt aagtcagaac agcagactca gctctgacat 1660

tctgattcga atgacactgt tcaggaatcg gaatcctgtc gattagactg gacagcttgt 1720
 ggcaagtga tttgcctgta acaagccaga ttttttaaaa tttatattgt aatattgtg 1780
 tgtgtgtgtg tgtgtgtata tataatata tatgtacagt tatctaagtt aatttaaagt 1840
 tgtttgtgcc tttttatfff tgtttttaat gctttgatat ttcaatgtta gcctcaattt 1900
 ctgaacacca taggtagaat gtaaagcttg tctgacggtt caaagcatga aatggatact 1960
 tatatggaaa ttctgctcag atagaatgac agtccgtcaa aacagattgt ttgcaaaggg 2020
 gaggcacag tgccttgcca ggctgatttc taggtaggaa atgtggtagc tcacg 2075

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward PCR primer directed to human connective tissue growth factor (CTGF)

<400> 3

acaagggcct ctctctgac tt 22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse PCR primer directed to human connective tissue growth factor (CTGF)

<400> 4

ggtacaccgt accaccgaag at 22

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR probe directed to human connective tissue growth factor (CTGF)

<400> 5

tgtgcaccgc caaagatggt gct 23

<210> 6

<211> 19

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward PCR primer directed to human GAPDH
 <400> 6
 gaaggtgaag gtcggagtc 19
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><
 223> Reverse PCR primer directed to human GAPDH
 <400> 7
 gaagatggtg atgggatttc 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR probe directed to human GAPDH
 <400> 8
 caagcttccc gttctcagcc 20
 <210> 9
 <211> 2358
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> exon
 <222> (207)..(1256)
 <400> 9
 aaactcacac aacaactctt ccccgctgag aggagacagc cagtgcgact ccaccctcca 60

 gctcgacggc agccgccccg gccgacagcc ccgagacgac agcccggcgc gtccccgtcc 120
 ccacctccga ccaccgccag cgctccaggc cccgccgctc cccgctcgcc gccaccgcgc 180
 cctccgctcc gcccgagtg ccaacc atg acc gcc gcc agt atg ggc ccc gtc 233

 Met Thr Ala Ala Ser Met Gly Pro Val
 1 5
 cgc gtc gcc ttc gtg gtc ctc ctc gcc ctc tgc agc cgg ccg gcc gtc 281

aag gac caa acc gtg gtt ggg cct gcc ctc gcg gct tac cga ctg gaa	761
Lys Asp Gln Thr Val Val Gly Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu	
170 175 180 185	
gac acg ttt ggc cca gac cca act atg att aga gcc aac tgc ctg gtc	809
Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val	
190 195 200	
cag acc aca gag tgg agc gcc tgt tcc aag acc tgt ggg atg ggc atc	857
Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile	
205 210 215	
tcc acc cgg gtt acc aat gac aac gcc tcc tgc agg cta gag aag cag	905
Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp Asn Ala Ser Cys Arg Leu Glu Lys Gln	
220 225 230	
agc cgc ctg tgc atg gtc agg cct tgc gaa gct gac ctg gaa gag aac	953
Ser Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn	
235 240 245	
att aag aag ggc aaa aag tgc atc cgt act ccc aaa atc tcc aag cct	1001
Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro	
250 255 260 265	
atc aag ttt gag ctt tct ggc tgc acc agc atg aag aca tac cga gct	1049
Ile Lys Phe Glu Leu Ser Gly Cys Thr Ser Met Lys Thr Tyr Arg Ala	
270 275 280	
aaa ttc tgt gga gta tgt acc gac ggc cga tgc tgc acc ccc cac aga	1097
Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg	
285 290 295	
acc acc acc ctg ccg gtg gag ttc aag tgc cct gac ggc gag gtc atg	1145
Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met	
300 305 310	
aag aag aac atg atg ttc atc aag acc tgt gcc tgc cat tac aac tgt	1193
Lys Lys Asn Met Met Phe Ile Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys	
315 320 325	
ccc gga gac aat gac atc ttt gaa tcg ctg tac tac agg aag atg tac	1241

Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr
 330 335 340 345
 gga gac atg gca tga agccagagag tgagagacat taactcatta gactggaact 1296
 Gly Asp Met Ala

tgaactgatt cacatctcat ttttcgtaa aaatgatttc agtagcaciaa gttatttaaa 1356
 tctgtttttc taactggggg aaaagattcc cacccaattc aaaacattgt gccatgtcaa 1416
 acaaatagtc tatcaacccc agacactggg ttgagaatg ttaagacttg acagtggaac 1476
 tacattagta cacagcacca gaatgtatat taagggtgtg ctttaggagc agtgggaggg 1536
 taccagcaga aaggttagta tcatcagata gcattctata cgagtaatat gcctgctatt 1596
 tgaagtgtaa ttgagaagga aaattttagc gtgctcactg acctgcctgt agccccagtg 1656

acagctagga tgtgcattct ccagccatca agagactgag tcaagttggt ccttaagtca 1716
 gaacagcaga ctcagctctg acattctgat tcgaatgaca ctgttcagga atcggaatcc 1776
 tgtcgattag actggacagc ttgtggcaag tgaatttgcc tgtaacaagc cagatttttt 1836
 aaaatttata ttgtaaata tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tatatatata tatatgtaca 1896
 gttatctaag ttaatttaaa gttgtttgtg cttttttatt tttgttttta atgctttgat 1956
 atttcaatgt tagcctcaat ttctgaacac cataggtaga atgtaaagct tgtctgateg 2016
 ttcaaagcat gaaatggata cttatatgga aattctgctc agatagaatg acagtccgtc 2076

aaaacagatt gtttgcaaag gggaggcatc agtgtccttg gcaggctgat ttctaggtag 2136
 gaaatgtggt agcctcactt ttaatgaaca aatggccttt attaaaaact gactgactct 2196
 atatagctga tcagtttttt cacctggaag cttttgttc tactttgata tgactgtttt 2256
 tcggacagtt tatttgttga gactgtgacc aaaagttaca tgtttgcacc tttctagttg 2316
 aaaataaagt gtatattttt tctataaaaa aaaaaaaaaa aa 2358

<210> 10
 <211> 6001
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

tatattattc actgtcaatc ttagtttata tccagataca acagggtaca ctgctcttgt 60

aatggaatca gacttcttat ttttaacaaga caaaccaaat ccaatccaca tttgaagatt 120
 ataggtttta atataagaaa atgcactcat ttctcaaga ccctagtgaa gctgtgttta 180

aatgctccta ggigaacccc ctttgcaccc cagtgttccc accctgacac ccagagcccc 240
tacctaccca acacagaatc atttgctctg atagaacaat ggatcccttt ttctggaaac 300
attgatggcc actcctccct tgtccttgcc tatataaaac tectacatat attaagagaa 360
aactaagcaa gagttttgga aatctgcccc aggagactgc atcctgagtc acacgcgtct 420
ttgttctctt tcttgtccca aaaccgttac ctcaagtgac aaatgatcaa atctcaata 480

tagaattcag ggttttacag gtaggcatct tgaggatttc aaatggttaa aagcaactca 540
ctccttttct actcttttga gagtttcaag agcctatagc ctctaaaacg caaatcattg 600
ctaagggttg ggggggagaa accttttcca attttttagg aattcctgct gtttgccctc 660
tcagctacct acttccataa aaggatgtat gtcagtggac agaacagggc aaacttattc 720
gaaaaagaaa taagaaataa ttgccagtgt gtttataaat gatatgaatc aggagtgggtg 780
cgaagaggat agggaaaaaa aaattctatt tgggtgctgga aatactgcgc tttttttttt 840
cctttttttt tttttctgtg agctggagtg tgccagcttt ttcagacgga ggaatgctga 900

gigtcaaggg gtcaggatca atccggtgtg agttgatgag gcaggaaggt ggggaggaat 960
gcgaggaatg tcctgttttg tgtaggactc cattcagctc attggcgagc cgcggccgcc 1020
cggagcgtat aaaagcctcg ggccgccccg cccaaactca cacaacaact cttccccgct 1080
gagaggagac agccagtgcg actccacct ccagctcgac ggcagccgcc ccggccgaca 1140
gccccgagac gacagccccg cgcgtccccg tccccactc cgaccaccgc cagcgtcca 1200
ggccccgccg ctccccgctc gcccccaccg cgcctccgc tccgccgca gtccaacca 1260
tgaccgccgc cagtatgggc cccgtccgcg tcgcttcgt ggtcctctc gcctctgca 1320

gccgggtaag cgccgggagc ccccgtgcg gccggcggct gccagggagg gactcggggc 1380
cggccgggga gggcgtgccc gccgaccgag cgcctgac gcctgtcc tcctgcage 1440
cggccgtcgg ccagaactgc agcgggcegt gccggtgccc ggacgagccg gcgccgct 1500
gccccgggg cgtagcctc gtgctggacg gctgcggtg ctgccgcgtc tgcccaagc 1560
agctgggca gctgtgacc gagcgcgacc catgcaacc gcacaagggc ctattctgtc 1620
acttcggctc cccggccaac cgcaagatcg gctgtgac cggttaagacc cgcagcccc 1680
accgctaggt gtccggccgc ctctccctc acgcccacc gcccgctgga aaaagaacc 1740

gctcggactg agttttttc tccagctgct gccagcccgc cccctgcage ccagatccca 1800
actcgcaccc ctgacgctct ggatgtgaga gtgcccctaat gcctgacctc tgcaccccc 1860
accctctct tccttctc ttctccagcc aaagatgggt ctcctgcat cttcgtggt 1920
acggtgtacc gcagcggaga gtccttccag agcagctgca agtaccagt cactgctctg 1980
gacggggcgg tgggctgcat gccctgtgc agcatggacg ttcgtctgcc cagccctgac 2040

tgccccttcc cgaggagggt caagctgccc gggaaatgct gcgaggagtg ggtgtgtgac 2100
 gagcccaagg accaaaccgt ggttgggcct gcctcgcgg gtgagtcgag tcttcctcta 2160

 agtcagggtc gtgattctct cccagggagg gagtccctaac tgtgccgacc gaacggggga 2220
 aataccttat ccaggcgttt tacatggtgt ttgtgtgctc tgctctcgca gcttaccgac 2280
 tggaaagacac gtttggccca gacccaacta tgattagagc caactgcctg gtccagacca 2340
 cagagtggag cgctgttcc aagacctgtg ggatgggcat ctcacccgg gttaccaatg 2400
 acaacgcctc ctgcaggcta gagaagcaga gccgcctgtg catggtcagg ccttgcaag 2460
 ctgacctgga agagaacatt aaggtacatg ttctgctcct attaactatt tttcacagga 2520
 aaaacagtgg ataggacca acttagggct cttgccacgc ttgtagtat aagcccgtta 2580

 tctccaaaac tatctaacca ttgagctgtt ttgctggaat gagagcttgt gtaatagcaa 2640
 ccaccagttt tccactacga aatcttccac agggtttagtt aattcaagac attccaagag 2700
 aggctctggc tatttttggc catagcaaat gagactcaaa cttctcccc tcaaaatata 2760
 aacagaagtc agacaacaga agactaaaac acagagggtt gaagaaagcc actcctcttg 2820
 tagagtgcgt gattttttt tttctctct cttttccctt gtcttctta gaagggcaaa 2880
 aagtgcacc gtactcccaa aatctccaag cctatcaagt ttgagctttc tggtgcacc 2940
 agcatgaaga cataccgagc taaattctgt ggagtatgta ccgacggccg atgctgcacc 3000

 ccccacagaa ccaccacct gccggtggag ttcaagtgcc ctgacggcga ggtcatgaag 3060
 aagaacatga tgttcatcaa gacctgtgcc tgccattaca actgtcccgg agacaatgac 3120
 atctttgaat cgetgtacta caggaagatg tacggagaca tggcatgaag ccagagagtg 3180
 agagacatta acicattaga ctggaacttg aactgattca catctcattt tccgtaaaa 3240
 atgatttcag tagcacaagt tatttaaatc tgttttcta actgggggaa aagattccca 3300
 cccaattcaa aacattgtgc catgtcaaac aaatagtcta tcaaccccag aactggttt 3360
 gaagaatggt aagacttgac agtgaacta cattagtaca cagcaccaga atgtatatta 3420

 aggtgtggct ttaggagcag tgggagggtta ccagcagaaa ggttagtatc atcagatagc 3480
 atcttatacg agiaatatgc ctgctatttg aagtgttaatt gagaaggaaa attttagcgt 3540
 gctcactgac ctgcctgtag cccagtgac agctaggatg tgcatctcc agccatcaag 3600
 agactgagtc aagtgttcc ttaagtcaga acagcagact cagctctgac attctgattc 3660
 gaatgacact gttcaggaat cggaatcctg tcgattagac tggacagctt gtggcaagtg 3720
 aatttgctg taacaagcca gattttttaa aatttatatt gtaaatttg tgtgtgtgtg 3780

tgtgtgtgta tatatatata tatgtacagt tatctaagtt aatttaaagt tgtttgtgcc 3840

 tttttatfff tgttttfaat gctttgatat ttcaatgtta gcctcaatff ctgaacacca 3900
 taggtagaat gtaaagcttg tctgatcgtt caaagcatga aatggatact tatatggaaa 3960
 ttctgctcag atagaatgac agtccgtcaa aacagattgt ttgcaaaggg gaggcatcag 4020
 tgtccttggc aggctgattt ctaggttagga aatgtggtag cctcactfff aatgaacaaa 4080
 tggcctffat taaaaactga gtgactctat atagctgac agttttttca cctggaagca 4140
 tttgtttcta cttgatatg actgtttttc ggacagtffa tttgttgaga gtgtgaccaa 4200
 aagttacatg tttgacctt tctagttgaa aataaagtgt atatfttttc tataaagggc 4260

 ttggttattc atttatcctt ctaaacattt ctgagttttc ttgagcataa ataggaagtt 4320
 cttattaate ataagataat tcaccaataa ttttctaaat atctttaatt attctataca 4380
 ttaataaatt gattattcca tagaattfff atgtaaacad acttcacact gaatcaagta 4440
 tcacagactt gcaggcatac acaccacatt gactatacag ccattftttt tgttatcttc 4500
 acagaactff atagacactt taaattcaat tctctctaga ttacttcagt ctccattaac 4560
 cctgttgtat tacacttggc ccttttggca tttgtacctc tctggccgtt ataggttagt 4620
 ttccaacctt tcacatcaca aactagtcta tgtgccttgc acgtggaaaa tgtttacatt 4680

 ttttaaaaat tttatgctct aggtctgttt ctgaacttca ttaccttact gttaaatctg 4740
 aaaattatga aatgaaatcc tcatttfaat ggagctatft cataagtctt gttttgtata 4800
 attccgtfff tggttgccat gataaccaat gacaaacaga tggcataaat agaaaagga 4860
 ggatgagcaa atcttccatt cattaacatt aatagaaatt tgttttgaaa gtaattcctc 4920
 catttgccca agtctttagc tttatcagac ttccagatta atgcatccta cttaccaag 4980
 tggtttatac atgagaaaa ggaattgttc aagaagcctc atgtggaaac aatattgtac 5040
 ctaccagggt aggtttttac taaagagtga accaaagtga atggtaaaca aaagcaatac 5100

 accaaaggca actagaatct tctccacatg aggatagctg aggattctag gggaaaaaaa 5160
 aattgcagac agactaactt ttcccaaggt aattagcaac gttgtagtgc caatgtcatt 5220
 tggacagaca aaaatacacc tgaaaataaa gactagctct acaacaact gtccacacca 5280
 caaaccaaag ggaaaacttc ccgtgttcag aatgtgaaaa tttatggtca aaactctggg 5340
 ctttaaggat acaccacat ctgtatatag cagtgtgcc aggagcagca ccccactcc 5400
 ccaaataaat gcgcatgtac acatacacat aggcacacac acagagtaca ctgtagttc 5460
 acacttctt tctgtcaatt aattcctaac tgcaaagatg aagggccatg catgataaac 5520

gagactgact actgaattag agcatttctgg aaatatagaa gcagcaggaa aagcatagat 5580
 ttcacatttt ccaaataccc acattaaaga aaaaaaaaaag agtcactaga ttgcaaaaca 5640
 aaaatcccac aggcaatggt tctacaaaaa ttagatggca atgcacactt tcacccccca 5700
 aatatcggag gtaggggggtg ccaaatcatc aaccaccgta agatctgcac cgtgtcagca 5760
 catgtgtgag aaaagcagag aaacaacaag gtatctgatg cttctgagaa cagcagagct 5820
 ctcaaacagc cagcaggtag tcaactagata tatagaagge caggetgaca gcagctgttg 5880
 aatctagtag gggtttgcc tagcactcca acaaagctta caagccaggg ctgcctccca 5940

ggagaagatc ctcatactcc tggaagtgga atctaaattg agcaggtcac cagacagatg 6000
 t 6001

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)

<400> 11

ccagctgctt ggcgcagacg 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)

<400> 12

gccagaaagc tcaaacttga 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)

<400> 13

ccacaagctg tccagtctaa 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 14

ggtcacactc tcaacaaata 20

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 15

aaacatgtaa cttttggtca 20

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 16

gggaagagtt gttgtgtgag 20

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 17

agggtggagt cgactggct 20

<210> 18

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 18
 acgaaggcga cgcgacggg 20
 <210> 19
 <211> 20

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 19
 gccgacggcc ggccggctgc 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 20
 ggtgcacacg ccgatcttgc 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 21
 tctttggcgg tgcacacgcc 20
 <210> 22
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 22
 gcacatcctt tggcgggtgca 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 23
 gcagggagca ccatctttgg 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 24
 aagatgcagg gagcaccatc 20
 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 25
 ccaccgaaga tgcagggagc 20
 <210> 26
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 26

ccgtaccacc gaagatgcag 20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 27

gtacttgag ctgctctgga 20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 28

gggcatgcag cccaccgccc 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 29

aggccaacc acggtttggt 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 30
 agggcaggcc caaccacggt 20
 <210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 31
 taagccgcga gggcaggccc 20
 <210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 32
 cccacaggtc ttggaacagg 20
 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 33
 agatgcccat cccacaggtc 20
 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor

acatggcaca atgttttgaa 20

 <210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 39
 gtttgacatg gcacaatgtt 20
 <210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 40
 tatttgtttg acatggcaca 20
 <210> 41
 <211> 20

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 41
 tgatagacta tttgtttgac 20
 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 42
 gttccactgt caagtcttaa 20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 43

tgtactaatg tagttccact 20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 44

cattctggtg ctgtgtacta 20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor

(CTGF)

<400> 45

taatatacat tctggtgctg 20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 46

acaccttaat atacattctg 20

<210> 47

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 47

taaagccaca ccttaatata 20

<210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 48

gtaccctccc actgctccta 20

<210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 49

aagatgctat ctgatgatac 20

<210> 50
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 50

cgtataagat gctatctgat 20

<210> 51
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 51
 aatagcaggc atattactcg 20
 <210> 52
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 52
 tacacttcaa atagcaggca 20
 <210> 53
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 53
 tcaattacac ttcaaatagc 20
 <210> 54
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 54
 ggagaatgca catcctagct 20
 <210> 55
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 55

atggctggag aatgcacatc 20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 56

tcttgatggc tggagaatgc 20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 57

gaatcagaat gtcagagctg 20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 58

cattgaaata tcaaagcatt 20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 59
 ggctaacatt gaaatatcaa 20
 <210> 60
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 60
 aattgaggct aacattgaaa 20
 <210> 61
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 61
 gttcagaaat tgaggctaac 20
 <210> 62
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 62
 tatggtgttc agaaattgag 20
 <210> 63
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor

(CTGF)

<400> 63
ctacctatgg tgttcagaaa 20

<210> 64
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 64
tacattctac ctatggtgtt 20

<210> 65
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 65
gacaagcttt acattctacc 20

<210> 66
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 66
gatcagacaa gctttacatt 20

<210> 67
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 67
atgctttgaa cgatcagaca 20
<210> 68
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)
<400> 68
atttcatgct ttgaacgatc 20
<210> 69
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)
<400> 69

glatccattt catgctttga 20
<210> 70
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)
<400> 70
ccatataagt atccatttca 20
<210> 71
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)
<400> 71

gaatttccat ataagtatcc 20

<210> 72
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 72
 tctgagcaga atttccatat 20
 <210> 73
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 73
 tgtcattcta tctgagcaga 20
 <210> 74
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 74
 tttgacggac tgtcattcta 20
 <210> 75
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 75
 aacaatctgt tttgacggac 20

<210> 76
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)

<400> 76
 tgatgcctcc cctttgcaaa 20

<210> 77
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)

<400> 77
 tgccaaggac actgatgcct 20

<210> 78
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)

<400> 78
 cagcctgccca aggacactga 20

<210> 79
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)

<400> 79
 gaaatcagcc tgccaaggac 20

<210> 80

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 80

 acctagaaat cagcctgcca 20
 <210> 81
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 81
 ttccctaccta gaaatcagcc 20
 <210> 82
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 82
 taccacattt cctacctaga 20

 <210> 83
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 83
 tgaggetacc acatttccta 20
 <210> 84
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 84
 taaaagtgag gctaccacat 20
 <210> 85
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 85
 caaatgcttc cagtgaaaa 20
 <210> 86
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 86
 tagaaacaaa tgcttcagg 20
 <210> 87
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 87
 tcatatcaaa gtagaaacaa 20
 <210> 88
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 88

tccgaaaaac agtcataatca 20

<210> 89

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 89

acccggctgc agagggcgag 20

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 90

cgcttaccgg gctgcagagg 20

<210> 91

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 91

gacagggcgg tcagcggcgc 20

<210> 92

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 92
 agtccgagcg gtttcttttt 20
 <210> 93
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 93
 aactcagtcc gagcggtttc 20
 <210> 94
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 94
 aaagaaactc agtccgagcg 20
 <210> 95
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 95
 tggagaaaga aactcagtcc 20
 <210> 96
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor

(CTGF)

<400> 96
gcagctggag aaagaaactc 20

<210> 97
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor

(CTGF)

<400> 97
tggcagcagc tggagaaaga 20

<210> 98
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor

(CTGF)

<400> 98
agggagcacc atctttgct 20

<210> 99
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor

(CTGF)

<400> 99
tcaccgcga gggcaggccc 20

<210> 100
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor

(CTGF)

<400> 100
 ggaagactcg actcaccgc 20
 <210> 101
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 101
 ttagaggaag actcgactca 20
 <210> 102
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400>
 > 102
 accctgactt agaggaagac 20
 <210> 103
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 103
 tcacgaccct gacttagagg 20
 <210> 104
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 104

gagaatcacg accctgactt 20

<210> 105
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 105
 tgggagagaa tcacgacct 20
 <210> 106
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 106
 ctccctggga gagaatcacg 20
 <210> 107
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 107
 ggtcggcaca gttaggactc 20
 <210> 108
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 108
 cgttcgtcg gcacagttag 20

<210> 109
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)

<400> 109
 cctggataag gtatttcccc 20

<210> 110
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)

<400> 110
 acaaacacca tgtaaacgc 20

<210> 111
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)

<400> 111
 gagcacacaa acaccatgta 20

<210> 112
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)

<400> 112
 tgcgagagca gagcacacaa 20

<210> 113

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400>
 > 113
 taagctgca gagcagagca 20
 <210> 114
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 114
 gtcgtaagc tgcgagagca 20
 <210> 115
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 115
 ttccagtgg taagctgca 20

 <210> 116
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 116
 acatgtacct taatgttctc 20
 <210> 117
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 117
 gcagaacatg taccttaatg 20
 <210> 118
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 118
 taggagcaga acatgtacct 20
 <210> 119
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 119
 gttaatagga gcagaacatg 20
 <210> 120
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 120
 tgaaaaatag ttaataggag 20
 <210> 121
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 121

ccactgtttt tcctgtgaaa 20

<210> 122

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 122

aagttgggtc ctatccactg 20

<210> 123

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 123

gccctaagtt gggcctatc 20

<210> 124

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400>

> 124

caagagccct aagttgggtc 20

<210> 125

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 125
 cgtggcaaga gcctaagtt 20
 <210> 126
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 126
 cgggcttata ctaacaagcg 20
 <210> 127
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 127
 gataacgggc ttataactaac 20
 <210> 128
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 128
 ttggagataa cgggcttata 20
 <210> 129
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor

(CTGF)

<400> 129
tagttttgga gataacgggc 20

<210> 130
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor

(CTGF)

<400> 130
ttagatagtt ttggagataa 20

<210> 131
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor

(CTGF)

<400> 131
caatggtag atagttttgg 20

<210> 132
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor

(CTGF)

<400> 132
cagctcaatg gtagatagt 20

<210> 133
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor

(CTGF)

<400> 133
 caaaacagct caatggtag 20

<210> 134
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)

<400> 134
 tccagcaaaa cagctcaatg 20

<210> 135
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)

<400>
 > 135

ctcattccag caaaacagct 20

<210> 136
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)

<400> 136
 aagctctcat tccagcaaaa 20

<210> 137
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)

<400> 137

tacacaagct ctcattccag 20

<210> 138
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 138
 ggttgctatt acacaagctc 20
 <210> 139
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 139
 ctggtggttg ctattacaca 20
 <210> 140
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 140
 gaaaactggt ggttgctatt 20
 <210> 141
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 141
 tagtgaaaa ctggtggttg 20

<210> 142

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 142

ttaactaacc ctgtggaaga 20

<210> 143

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 143

tgtcttgaat taactaaccc 20

<210> 144

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor

(CTGF)

<400> 144

tggaatgtct tgaattaact 20

<210> 145

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 145

gccagagcct ctcttggaaat 20

<210> 146

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400>
 > 146
 aaaaatagcc agagcctctc 20
 <210> 147
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 147
 tgtccaaaa tagccagagc 20
 <210> 148
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 148
 tgctatgtcc aaaaatagcc 20

 <210> 149
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 149
 tcatttgcta tgtccaaaa 20
 <210> 150
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 150
 gagtctcatt tgctatgtcc 20
 <210> 151
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 151
 agtttgagtc tcatttgcta 20
 <210> 152
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 152
 gaggaagttt gagtctcatt 20
 <210> 153
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 153
 cttctgttgt ctgacttctg 20
 <210> 154
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 154

cctctgtggt ttagtcttct 20

<210> 155

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 155

tttcttcaac cctctgtggt 20

<210> 156

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 156

ggagtggctt tcttcaacc 20

<210> 157

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400>

> 157

aggaagacaa gggaaaagag 20

<210> 158

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 158
 ttctaaggaa gacaaggaa 20
 <210> 159
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 159
 tgcccttcta aggaagaca 20
 <210> 160
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 160
 ggatgcgagt tgggatctgg 20
 <210> 161
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
 (CTGF)
 <400> 161
 ccagctgctt ggcgcagacg 20
 <210> 162
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor

(CTGF)

<400> 162
gccagaaagc tcaaacttga 20

<210> 163
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 163
ccacaagctg tccagtctaa 20

<210> 164
<211> 20
<212> DNA
<213>
> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 164
ggtcacactc tcaacaaata 20

<210> 165
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 165
aaacatgtaa cttttggtca 20

<210> 166
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 166

tgacatggca caatgtttg

20

<210> 167

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense directed to human connective tissue growth factor
(CTGF)

<400> 167

ccttcctga aggttcctcc

20