



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년12월11일
 (11) 등록번호 10-1807590
 (24) 등록일자 2017년12월05일

- | | |
|--|--|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/115 (2010.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) C07K 14/54 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/115 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7030327
(22) 출원일자(국제) 2014년03월20일
심사청구일자 2015년10월21일
(85) 번역문제출일자 2015년10월21일
(65) 공개번호 10-2015-0135409
(43) 공개일자 2015년12월02일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2014/057919
(87) 국제공개번호 WO 2014/148638
국제공개일자 2014년09월25일
(30) 우선권주장
JP-P-2013-060817 2013년03월22일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110028552 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌 | (73) 특허권자
고쿠리츠다이가쿠호징 도쿄다이가쿠
일본국 도쿄도 분쿄구 혼고 7-3-1
젠야쿠쿄교가부시키가이샤
일본 도쿄도 분쿄구 오츠카 5초메 6-15
(72) 발명자
이시구로 아키라
일본국 1138654 도쿄도 분쿄구 혼고 7-3-1 고쿠리
츠다이가쿠호징 도쿄다이가쿠 내
나카무라 요시카즈
일본국 1138654 도쿄도 분쿄구 혼고 7-3-1 고쿠리
츠다이가쿠호징 도쿄다이가쿠 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다래 |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 김정태

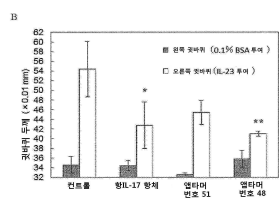
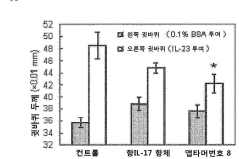
(54) 발명의 명칭 IL-17에 대한 앵타머 및 그 사용

(57) 요약

본 발명은, IL-17에 결합하여 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 앵타머; 해당 앵타머와 기능성 물질(예를 들면, 친화성 물질, 표식용 물질, 효소, 약물송달매체, 또는 약물 등)을 포함하는 복합체; 해당 앵타머, 또는 해당 앵타머와 기능성 물질을 포함하는 복합체를 포함하는 의약, 진단약 및 표식제 등을 제공한다.

대표도 - 도2

마우스 IL-23 유도 전선 모델에 대한 억제효과



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

C07K 14/54 (2013.01)

G01N 33/6869 (2013.01)

C12N 2310/16 (2013.01)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2310/3231 (2013.01)

C12N 2310/3533 (2013.01)

C12N 2320/30 (2013.01)

G01N 2333/54 (2013.01)

(72) 발명자

하루타 가즈히코

일본국 1780062 도쿄도 네리마쿠 오이즈미마치 2초
메 33반 7고 젠야쿠코교가부시키키가이샤 주오켄큐쵸
내

오타키 나츠키

일본국 1780062 도쿄도 네리마쿠 오이즈미마치 2초
메 33반 7고 젠야쿠코교가부시키키가이샤 주오켄큐쵸
내

명세서

청구범위

청구항 1

애타머번호 1~49 및 52~94 중 어느 것인가에 나타내어지는 서열을 포함하는, IL-17에 결합하여 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 애타머.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
염기 길이가 70 이하인 애타머.

청구항 3

제 1 항에 있어서,
인버티드 dT(inverted dT) 또는 폴리에틸렌글리콜로 수식되어 있는 애타머.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 기재한 애타머 및 기능성 물질을 포함하는 복합체.

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 기재한 애타머 또는 상기 애타머와 기능성 물질을 포함하는 복합체를 포함하는, 염증성 질환, 자가면역질환, 암, 알레르기 및 감염증으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 질환의 치료 또는 예방용 의약.

청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 기재한 애타머 또는 상기 애타머와 기능성 물질을 포함하는 복합체를 포함하는, 염증성 질환, 자가면역질환, 암, 알레르기 및 감염증으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 질환의 진단약.

청구항 7

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 기재한 애타머 또는 상기 애타머와 기능성 물질을 포함하는 복합체를 포함하는 검출용 프로브.

청구항 8

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 기재한 애타머 또는 상기 애타머와 기능성 물질을 포함하는 복합체를 포함하는 IL-17 정제용 담체.

청구항 9

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 기재한 애타머 또는 상기 애타머와 기능성 물질을 포함하는 복합체를 이용하는 것을 포함하는 IL-17의 검출방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 기재한 애타머 또는 상기 애타머와 기능성 물질을 포함하는 복합체를 이용하는 것을 포함하는 IL-17의 정제방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인터류킨 17(IL-17)에 대한 앵타머 및 그 이용방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] IL-17(또는 CTLA-8)은 Th17 세포 등에 의해 분비되는 사이토카인으로, 염증성 질환이나 자기면역질환, 감염증과 깊게 관계되어 있다. 인간 IL-17은 N 말단에 시그널펩티드를 포함하는 155 아미노산으로 구성되는 20~30kDa의 당단백질이다. 분자 내에 6개의 시스테인 잔기와 1개소의 N 결합형 당쇄 결합부위를 갖는다. 성숙체는 136 아미노산으로 이루어지고, 통상 다이머(dimer)로 존재한다.

[0003] IL-17 패밀리 단백질로는, IL-17A, B, C, D, E, F의 6 종류의 단백질이 알려져 있다. 일반적으로 IL-17은 IL-17A인 것을 나타낸다. IL-17E는 IL-25로도 불리고 있다. 인간 IL-17과 인간 IL-17B, C, D, E, F의 아미노산

서열의 상동성은 각각 25, 28, 22, 27, 44%이고, IL-17F가 가장 상동성이 높다. 또, 마우스 IL-17과는 63%의 상동성을 갖는다. 수용체로서 IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD, IL-17RE가 알려져 있다. IL-17 및 IL-17F는 호모다имер 또는 헤테로다имер를 형성하고, IL-17RA 및 IL-17RC와 결합한다. IL-17과 IL-17RA의 결합은 Kd 값이 약 10^{-7} 로 약하고, IL-17RC의 관여가 중요할 가능성이 있다.

- [0004] Th17 세포는 IL-17을 생산하는 CD4⁺ T 세포이다. 시험관 내(in vitro)에서 Th17 세포를 IL-23으로 자극하면 IL-17 생산이 유도된다. 한편, Th17 세포의 분화유도에는 TGF-β와 IL-6이 중요한 역할을 하고 있다. TGF-β와 IL-6은 나이브(naive) T 세포에 작용하여, RORγt(전사인자)의 발현을 유도한다. RORγt를 결손시키면 Th17 세포를 분화할 수 없게 되거나, 반대로 RORγt를 강제 발현함으로써 나이브 T 세포를 IL-17 생산세포로 분화시킬 수 있기 때문에, 이 전사인자가 Th17 세포 분화에 중요하다고 생각되고 있다. RORγt의 발현유도에는 IL-6에 의한 STAT3의 활성화가 중요하지만, 반대로 IL-2에 의한 STAT5의 활성화는 발현을 억제한다. IL-2는 조절성 T 세포의 분화에 필요하며, IL-2 결손 마우스는 심각한 자기면역을 발병하지만, 이것은 조절성 T 세포가 감소하는 동시에 Th17 세포의 과잉분화가 일어나기 때문이라고 생각되고 있다. 시험관 내에서 나이브 T 세포를 TGF-β 단독으로 자극하면, Th17이 아닌 조절성 T 세포가 유도된다. Th1 세포가 생산하는 IFN-γ나 Th2 세포가 생산하는 IL-4 등은 Th17 세포 분화에 억제적으로 작용한다.
- [0005] IL-17이 IL-17 수용체에 결합하면, Act-1, TRAF6를 통하여 NF-κB 경로나 MAP 키나제 경로, C/EBP 경로가 활성화되어 염증성 사이토카인이나 케모카인이 유도된다. 예를 들면, IL-17은 대식세포에 작용하여 IL-1, TNF 등의 발현을 유도한다. 이 밖에, 섬유아세포나 내피세포 등의 결합조직계 세포, 상피조직계 세포, 수상세포 전구세포 등의 면역계세포에 작용하여 IL-6이나 IL-1 등 각종 사이토카인이나 수용체의 발현을 유도하는 것이 알려져 있다.
- [0006] IL-17의 생산에는 TNF-α, IL-1β, IL-6 등의 사이토카인이 관여한다. 한편, 이들 사이토카인은 IL-17에 의해 생산이 유도된다. IL-17은 다른 사이토카인과 상승적으로 작용하는 것이 알려져 있다.
- [0007] IL-17은 염증성 질환이나 자기면역질환 등과 깊은 관계가 있는 것을 알 수 있다. 류마티스 관절염, 가령항반변성증, 건선, 전신성 에리테마토데스, 베체트병, 이식거절, 신장염 증후군, 염증성 장질환, 천식, 다발성 경화증, 치주병 등의 환자에서 IL-17의 발현이 상승하고 있는 것이 알려져 있다. 또, IL-17 결손 마우스에서는 류마티스 관절염의 모델인 콜라겐 유도 관절염(CIA), 다발성 경화증의 모델인 실험적 자기면역성 뇌척수염(EAE), DNFB나 TNBC에 의한 접촉형 과민증 반응, 메틸화 BSA에 의한 지연형 과민증 반응, OVA 유도에 의한 기도 과민증 반응 등이 현저하게 억제되는 것이 보고되고 있다.
- [0008] IL-17은 암과도 관계되어 있다. SCID 마우스의 피하에 비소세포 폐암 세포를 이식한 바, IL-17을 고발현시킨 마우스에서는 암 세포의 증식이 촉진되는 것이 보고되고 있다. 또, 자궁경암이나 난소암과도 관계되어 있는 것이 보고되고 있다.
- [0009] IL-17은 감염증과 관계되어 있다. IL-17 수용체 녹아웃 마우스는 폐렴막대균(Klebsiella pneumoniae)감염, 칸디다알비칸(Candida albicans)감염, 톡소플라스마 곤디(Toxoplasma gondii)감염 등에 고감수성이다. IL-17 생산은 리포다당(LPS)이나 보렐리아부르그도르페리(Borrelia burgdorferi)나 폐렴막대균 등의 균체성분에 의해 유도된다. 이들의 성분은 항원 제시세포에 작용하여 IL-23을 유도함으로써, IL-17 생산을 촉진한다고 생각되고 있다. IL-17R 녹아웃 마우스에서는 폐렴막대균 감염 후, 폐감염 국소에 있어서 호중구의 유주(migration)와 기능에 중요한 역할을 하고 있는 CXCL1이나 CXCL2, G-CSF 등의 생산이 저하하고 있으며, 호중구의 유주에 장애가 인정된다.
- [0010] 그런데, 근래, RNA 앵타머의 치료약, 진단약, 시약에의 응용이 주목받고 있으며, 몇 개의 RNA 앵타머가 임상단계 혹은 실용화 단계에 들어가 있다. 2004년 12월에는 세계 최초의 RNA 앵타머 의약인 마큐젠(Macugen)이 가령항반변성증의 치료약으로서 미국에서 승인되었다. RNA 앵타머란 단백질 등의 표적물질에 특이적으로 결합하는 RNA로, SELEX법(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)을 이용하여 제작할 수 있다(특허문헌 1~3 참조). SELEX법이란, 10^{14} 개 정도의 다른 뉴클레오티드 서열을 갖는 RNA의 풀(pool)로부터, 표적물질에 특이적으로 결합하는 RNA를 선별하는 방법이다. 사용되는 RNA는 40 잔기 정도의 랜덤 서열을 프라이머 서열로 끼워 넣은 구조를 하고 있다. 이 RNA 풀을 표적물질과 회합시키고, 필터 등을 이용하여 표적물질에 결합한 RNA만을 회수한다. 회수한 RNA는 RT-PCR로 증폭하고, 이것을 다음 라운드의 주형으로서 이용한다. 이 작업을 10회 정도 반복함으로써 표적물질과 특이적으로 결합하는 RNA 앵타머를 취득할 수 있는 경우가 있다.

[0011] 앵타머 의약은 항체 의약과 마찬가지로 세포외 인자를 표적으로 할 수 있지만, 이미 공표되어 있는 많은 학술 논문 등을 참고로 하면, 몇몇 점에서 항체 의약을 상회할 가능성이 있다. 예를 들면, 앵타머는 항체보다 결합력과 특이성이 높은 경우가 많이 있다. 또, 면역 배제를 받기 어렵고, 항체 특유의 항체 의존성 세포 장애(ADCC)나 보체 의존성 세포장애(CDC) 등에 기인하는 부작용은 일어나지 않는다. 딜리버리의 관점에서는, 앵타머는 항체의 1/10 정도의 크기이므로, 목적인 부위까지 약물을 송달시키는 것은 보다 용이하다. 앵타머는 화학합성에 의해 생산되므로, 각종 수식(修飾, modification)을 용이하게 넣을 수 있어 대량생산에 의한 코스트다운이 가능하다. 한편, 일반적으로 앵타머의 혈중 반감기는 항체보다 짧다. 그러나, 이 점도 독성을 고려한 경우는 장점이 되는 경우가 있다. 이상의 점에서, 같은 분자를 표적으로 한 의약품이어도, 앵타머 의약은 항체 의약에 이길 가능성이 있다.

[0012] 특허문헌 4에는, 상기 SELEX법에 의해 얻어진, IL-17에 결합하여 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 앵타머가 기재되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0013] (특허문헌 0001) 국제공개 제91/19813호
- (특허문헌 0002) 국제공개 제94/08050호
- (특허문헌 0003) 국제공개 제95/07364호
- (특허문헌 0004) 국제공개 제2010/008001호

발명의 내용

해결하려는 과제

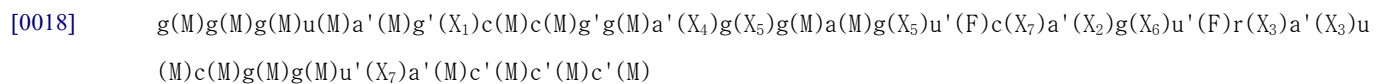
[0014] 본 발명은 IL-17에 대한 앵타머 및 그 이용방법 등을 제공하는 것을 목적으로 한다. 특히, 의약품 용도에 적합한 보다 양질의 앵타머를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명자들은, 상기 과제를 해결하기 위해, 예의 검토한 결과, 종래 공지의 항IL-17 앵타머에 비해 현저하게 높은, IL-17과 IL-17 수용체의 결합저해활성을 갖고 IL-17의 생리활성을 저해할 수 있는, 매우 양질인 항IL-17 앵타머를 제작하는 것에 성공하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0016] 즉, 본 발명은 이하와 같다:

[0017] [1] 하기 식 (Ia)로 표시되는 서열을 포함하는, IL-17에 결합하여 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 앵타머:



[0019] 식 중, a, g, c 및 u는, 각각, 염기가 아데닌, 구아닌, 시토신 및 우라실인 RNA를 나타내고,

[0020] r은, 염기가 아데닌 또는 구아닌인 RNA를 나타내며,

[0021] a', g' 및 c'는, 각각, 염기가 아데닌, 구아닌 및 시토신인 RNA 또는 DNA를 나타내고,

[0022] u'는, 염기가 우라실인 RNA, 염기가 우라실인 DNA 또는 염기가 티민인 DNA를 나타내며,

[0023] 뉴클레오티드에 있어서의 괄호는 그 뉴클레오티드의 수식을 나타내고,

[0024] (M)은, 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 0-메틸기로 치환되어 있는 것을 나타내며,

[0025] (F)는, 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자로 치환되어 있는 것을 나

타내고,

- [0026] (X₁)은, 뉴클레오티드가 비수식(非修飾, non-modified)이거나, 포스포로티오에이트화되어 있거나, 또는 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자로 치환되어 있는 것을 나타내며,
- [0027] (X₂)는, 뉴클레오티드가 비수식이거나, 또는 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자로 치환되어 있는 것을 나타내고,
- [0028] (X₃)은, 뉴클레오티드가 비수식이거나, 또는 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 0-메틸기로 치환되어 있는 것을 나타내며,
- [0029] (X₄)는, 뉴클레오티드가 비수식이거나, 또는 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자 또는 0-메틸기로 치환되어 있는 것을 나타내고,
- [0030] (X₅)는, 뉴클레오티드가 비수식이거나, 포스포로티오에이트화되어 있는 것을 나타내며,
- [0031] (X₆)은, 뉴클레오티드가 비수식이거나, 포스포로티오에이트화되어 있거나, 또는 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 0-메틸기로 치환되어 있는 것을 나타내고,
- [0032] (X₇)은, 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자 또는 0-메틸기로 치환되어 있는 것을 나타낸다;
- [0033] [2] 하기 식 (Ia')로 표시되는 서열을 포함하는 상기 [1]에 기재한 앵타머:
- [0034] g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g(X₅)c(M)c(M)Gg(M)a(X₄)gg(M)a(M)g(X₅)u'(F)c(X₇)a(X₂)g(X₅)u'(F)r(X₃)a(X₃)u(M)c(M)g(M)g(M)u(X₇)a(M)c'(M)c'(M)c'(M)
- [0035] 식 중, a, g, c, u 및 r, a', c' 및 u', 그리고 (M), (F) 및 (X₂)~(X₅) 및 (X₇)은 식 (Ia)와 동의(同義)이며,
- [0036] G는, 염기가 구아닌인 DNA를 나타낸다;
- [0037] [3] 하기 식 (I)로 표시되는 서열을 포함하는 상기 [1]에 기재한 앵타머:
- [0038] g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g'(X₁)c(M)c(M)g'(M)a'(X₂)gg(M)a(M)gu'(F)c(F)a'(X₂)gu'(F)a(X₃)a'(X₃)u(M)c(M)g(M)g(M)u'(F)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)
- [0039] 식 중, a, g, c 및 u, a', g', c' 및 u', 그리고 (M), (F) 및 (X₁)~(X₃)은 식 (Ia)과 동의이다;
- [0040] [4] 하기 식 (Ia'')로 표시되는 서열을 포함하는 상기 [1]에 기재한 앵타머:
- [0041] g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g(X₅)c(M)c(M)Gg(M)a(X₇)g(X₅)g(M)a(M)g(X₅)u'(F)c(X₇)a(F)g(X₆)u'(F)r(X₃)a(X₃)u(M)c(M)g(M)g(M)u(X₇)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)
- [0042] 식 중, a, g, c, u 및 r, a', c' 및 u', 그리고 (M), (F), (X₃) 및 (X₅)~(X₇)은 식 (Ia)과 동의이며, G는, 염기가 구아닌인 DNA를 나타낸다;
- [0043] [5] 식 (Ia'')에 있어서, 3' 말단측의 c'(M)c'(M)c'(M)이 c(M)c(M)c(M)인 상기 [4]에 기재한 앵타머;
- [0044] [6] 식 (Ia), (Ia'), (I) 또는 (Ia'')로 표시되는 서열의 5' 말단에, RNA인 경우에는 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 0-메틸기로 치환되어 있어도 되는, 염기가 구아닌인 뉴클레오티드가 부가되고, 및/또는 3' 말단에 염기가 시토신인 뉴클레오티드가 부가된 상기 [1]~[5] 중 어느 것인가에 기재한 앵타머;
- [0045] [7] 앵타머번호 52~94 중 어느 것인가에 나타내어지는 서열을 포함하는 상기 [1]에 기재한 앵타머;
- [0046] [8] 앵타머번호 3~49 중 어느 것인가에 나타내어지는 서열을 포함하는 상기 [3]에 기재한 앵타머;
- [0047] [9] 염기 길이가 70 이하인 상기 [1]~[8] 중 어느 것인가에 기재한 앵타머;
- [0048] [10] 하기 식 (II)로 표시되는 서열을 포함하는, IL-17에 결합하여 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 앵타머:

- [0049] $g(x_1)g(x_1)g(x_1)u(F)ag(S)c(F)c(F)g'(S)g(x_2)aggagu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)ggu(F)ac'(x_3)c'(x_3)c'(x_3)$
- [0050] 식 중, a, g, c 및 u는, 각각, 염기가 아데닌, 구아닌, 시토신 및 우라실인 RNA를 나타내고,
- [0051] g' 및 c'는, 각각, 염기가 구아닌 및 시토신인 RNA 또는 DNA를 나타내며,
- [0052] 뉴클레오티드에 있어서의 괄호는 그 뉴클레오티드의 수식을 나타내고,
- [0053] (F)는, 뉴클레오티드의 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자로 치환되어 있는 것을 나타내며,
- [0054] (S)는, 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 포스포로티오에이트화되어 있는 것을 나타내고,
- [0055] (x_1)은, 뉴클레오티드가 잠금 핵산(Locked Nucleic Acid; LNA) 수식되어 있거나, 또는 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 0-메틸기로 치환되어 있는 것을 나타내며,
- [0056] (x_2)는, 뉴클레오티드가 비수식이거나, 또는 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 0-메틸기로 치환되어 있는 것을 나타내고,
- [0057] (x_3)은, 뉴클레오티드가 비수식이거나, 또는 LNA 수식되어 있는 것을 나타낸다;
- [0058] [11] 앵타머번호 1 또는 2로 표시되는 서열을 포함하는 상기 [10]에 기재한 앵타머;
- [0059] [12] 염기 길이가 70 이하인 상기 [10] 또는 [11]에 기재한 앵타머;
- [0060] [13] 인버티드 dT(inverted dT) 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)로 수식되어 있는 상기 [1]~[12] 중 어느 것인가에 기재한 앵타머;
- [0061] [14] 인버티드 dT 또는 폴리에틸렌글리콜이, 앵타머의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 결합하고 있는 상기 [13]에 기재한 앵타머;
- [0062] [15] [1] 내지 [14] 중 어느 것인가에 기재한 앵타머 및 기능성 물질을 포함하는 복합체;
- [0063] [16] 기능성 물질이, 친화성 물질, 표식용 물질, 효소, 약물송달매체 또는 약물인 [15]에 기재한 복합체;
- [0064] [17] [1] 내지 [14] 중 어느 것인가에 기재한 앵타머 또는 [15] 또는 [16]에 기재한 복합체를 포함하는 의약;
- [0065] [18] [1] 내지 [14] 중 어느 것인가에 기재한 앵타머 또는 [15] 또는 [16]에 기재한 복합체를 포함하는 염증성 질환이나, 자기면역질환, 암, 알레르기, 감염증 등의 질환에 관한 치료 또는 예방에 이용하는 의약;
- [0066] [19] [1] 내지 [14] 중 어느 것인가에 기재한 앵타머 또는 [15] 또는 [16]에 기재한 복합체를 포함하는 진단약;
- [0067] [20] [1] 내지 [14] 중 어느 것인가에 기재한 앵타머 또는 [15] 또는 [16]에 기재한 복합체를 포함하는 검출용 프로브;
- [0068] [21] [1] 내지 [14] 중 어느 것인가에 기재한 앵타머 또는 [15] 또는 [16]에 기재한 복합체를 포함하는 IL-17 정제용 담체;
- [0069] [22] [1] 내지 [14] 중 어느 것인가에 기재한 앵타머 또는 [15] 또는 [16]에 기재한 복합체를 이용하는 것을 특징으로 하는 IL-17의 검출방법;
- [0070] [23] [1] 내지 [14] 중 어느 것인가에 기재한 앵타머 또는 [15] 또는 [16]에 기재한 복합체를 이용하는 것을 특징으로 하는 IL-17의 정제방법.

발명의 효과

[0071] 본 발명의 앵타머 또는 복합체는 염증성 질환이나 자기면역질환, 암, 알레르기, 감염증 등의 질환에 대한 의약, 혹은 진단약, 시약으로서 유용할 수 있다. 또 본 발명의 앵타머 또는 복합체는 IL-17의 정제 및 농축, IL-17의 표식, 그리고 IL-17의 검출 및 정량에 유용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0072] 도 1은 본 발명의 앵타머를 링커를 통하여 PEG 수식하는 경우의 대표적인 5' 말단 수식 PEG화 앵타머의 구조, 그리고 5' 말단 및 3' 말단 수식 PEG화 앵타머의 구조를 나타낸다.

도 2는 PEG 수식된 본 발명의 앵타머에 의한, 마우스 IL-23 유도 건선 모델에 대한 억제효과를 나타내는 도면이다. 황축은 각각, 생리식염수 투여군(네거티브 컨트롤군), 항IL-17 항체 투여군(포지티브 컨트롤군), 및 PEG 수식된 앵타머(A: 앵타머번호 8; B: 앵타머번호 51 및 앵타머번호 48) 투여군을 나타낸다. 종축은 마우스 컷바퀴의 두께를 나타낸다. 도면 중의 각 값은, 평균값±표준오차(n=4 또는 5)를 나타내고, 통계학적 유의차는 일원배치 분산분석법 및 던넛(Dunnett)법을 이용하여 해석했다(*: P<0.05).

도 3은 PEG 수식된 본 발명의 앵타머에 의한, 마우스 글루코스-6-인산 이소메라제 유도 관절염 모델에 대한 관절염 억제효과를 나타내는 도면이다. 도면 중, 흰색 사각은 생리식염수 투여군(컨트롤군)을, 검은색 동그라미는 PEG 수식된 앵타머(앵타머번호 8) 투여군을 나타낸다. 도면 중의 각 값은 평균값±표준오차(n=10)를 나타내고, 통계학적 유의차는 윌콕슨-맨-휘트니(Wilcoxon-Mann-Whitney)법을 이용하여 해석했다(*: P<0.05, **: P<0.01).

도 4는 PEG 수식된 본 발명의 앵타머에 의한, 마우스 콜라겐 유도 관절염 모델에 대한 관절염 억제효과를 나타내는 도면이다. 도면 중, 흰색 사각은 생리식염수 투여군(컨트롤군)을, 검은색 동그라미는 PEG 수식된 본 발명의 앵타머(A: 앵타머번호 8; B: 앵타머번호 64) 투여군을, 검은색 마름모형은 공지 앵타머(앵타머번호 51) 투여군을 나타낸다. 도면 중의 각 값은 평균값±표준오차(n=9 또는 10)를 나타내고, 통계학적 유의차는 윌콕슨-맨-휘트니법을 이용하여 해석했다(*: P<0.05, **: P<0.01).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0073] 제 1 실시형태에 있어서, 본 발명은 하기 식 (Ia)로 표시되는 서열을 포함하는, IL-17에 결합하여 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 앵타머를 제공한다:
- [0074] $g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g'(X_1)c(M)c(M)g'(M)a'(X_4)g(X_5)g(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7)a'(X_2)g(X_6)u'(F)r(X_3)a'(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u'(X_7)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$
- [0075] 식 중, a, g, c 및 u는, 각각, 염기가 아데닌, 구아닌, 시토신 및 우라실인 RNA를 나타내고,
- [0076] r은, 염기가 아데닌 또는 구아닌인 RNA를 나타내며,
- [0077] a', g' 및 c'는, 각각, 염기가 아데닌, 구아닌 및 시토신인 RNA 또는 DNA를 나타내고,
- [0078] u'는, 염기가 우라실인 RNA, 염기가 우라실인 DNA 또는 염기가 티민인 DNA를 나타내며,
- [0079] 뉴클레오티드에 있어서의 괄호는 그 뉴클레오티드의 수식을 나타내고,
- [0080] (M)은, 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 0-메틸기로 치환되어 있는 것을 나타내며,
- [0081] (F)는, 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자로 치환되어 있는 것을 나타내고,
- [0082] (X₁)은, 뉴클레오티드가 비수식이거나, 포스포로티오에이트화되어 있거나, 또는 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자로 치환되어 있는 것을 나타내며,
- [0083] (X₂)는, 뉴클레오티드가 비수식이거나, 또는 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자로 치환되어 있는 것을 나타내고,
- [0084] (X₃)은, 뉴클레오티드가 비수식이거나, 또는 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 0-메틸기로 치환되어 있는 것을 나타내며,
- [0085] (X₄)는, 뉴클레오티드가 비수식이거나, 또는 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자 또는 0-메틸기로 치환되어 있는 것을 나타내고,
- [0086] (X₅)는, 뉴클레오티드가 비수식이거나, 포스포로티오에이트화되어 있는 것을 나타내며,
- [0087] (X₆)는, 뉴클레오티드가 비수식이거나, 포스포로티오에이트화되어 있거나, 또는 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 0-메틸기로 치환되어 있는 것을 나타내고,

- [0088] (X₇)은, 뉴클레오타이드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자 또는 0-메틸기로 치환되어 있는 것을 나타낸다.
- [0089] 또, 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 하기 식 (Ia')로 표시되는 서열을 포함하는, IL-17에 결합하여 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 앵타머를 제공한다:
- [0090] g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g(X₅)c(M)c(M)Gg(M)a(X₄)gg(M)a(M)g(X₅)u'(F)c(X₇)a(X₂)g(X₅)u'(F)r(X₃)a(X₃)u(M)c(M)g(M)g(M)u(X₇)a(M)c'(M)c'(M)c'(M)
- [0091] 식 중, a, g, c, u 및 r, a', c' 및 u', 그리고 (M), (F) 및 (X₂)~(X₅) 및 (X₇)은 식 (Ia)와 동의이며,
- [0092] G는, 염기가 구아닌인 DNA를 나타낸다.
- [0093] 또, 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 하기 식 (I)로 표시되는 서열을 포함하는, IL-17에 결합하여 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 앵타머를 제공한다:
- [0094] g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g'(X₁)c(M)c(M)g'(M)a'(X₂)gg(M)a(M)gu'(F)c(F)a'(X₂)gu'(F)a(X₃)a'(X₃)u(M)c(M)g(M)g(M)u'(F)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)
- [0095] 식 중, a, g, c 및 u, a', g', c' 및 u', 그리고 (M), (F) 및 (X₁)~(X₃)은 식 (Ia)과 동의이다.
- [0096] 또, 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 하기 식 (Ia'')로 표시되는 서열을 포함하는, IL-17에 결합하여 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 앵타머를 제공한다:
- [0097] g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g(X₅)c(M)c(M)Gg(M)a(X₇)g(X₅)g(M)a(M)g(X₅)u'(F)c(X₇)a(F)g(X₆)u'(F)r(X₃)a(X₃)u(M)c(M)g(M)g(M)u(X₇)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)
- [0098] 식 중, a, g, c, u 및 r, a', c' 및 u', 그리고 (M), (F), (X₃) 및 (X₅)~(X₇)은 식 (Ia)과 동의이며,
- [0099] G는, 염기가 구아닌인 DNA를 나타낸다.
- [0100] 또, 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 식 (Ia'')에 있어서, 3' 말단측의 c'(M)c'(M)c'(M)이 c(M)c(M)c(M)인, IL-17에 결합하여 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 앵타머를 제공한다.
- [0101] 앵타머란, 소정의 표적분자에 대한 결합활성을 갖는 핵산분자를 말한다. 앵타머는 소정의 표적분자에 대하여 결합함으로써, 소정의 표적분자의 활성을 저해할 수 있다. 본 발명의 앵타머는 RNA, DNA, 수식 핵산 또는 그들의 혼합물일 수 있다. 본 발명의 앵타머는 또, 직쇄상(直鎖狀) 또는 환상(環狀)의 형태일 수 있다.
- [0102] IL-17이란, Th17 세포 등에 의해 분비되는 사이토카인으로, 예를 들면 Accession code AAH67505나 NP002181로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질이다. IL-17은 IL-17A 또는 CTLA-8로 불리는 경우도 있다. 본 발명에서 나타내는 IL-17은 동물 체내에서 만들어지는 것 외에, 마우스 등의 포유세포, 곤충세포, 대장균 등의 세포를 이용하여 제작할 수 있으며, 또한, 화학합성에 의해서도 만들 수 있다. 배양세포나 화학합성에 의해 제작하는 경우, 용이하게 변이체를 제작할 수 있다. 여기에서 변이체란, 아미노산이 여러 개 치환된 것이나 일부분의 아미노산 서열을 의미하고, 본래 IL-17이 갖고 있는 적어도 하나 이상의 활성을 갖고 있는 단백질 또는 펩티드를 의미한다. 아미노산이 치환되는 경우, 치환 아미노산은 천연의 아미노산이어도 되고, 비천연의 아미노산이어도 된다. 본 발명에서 말하는 IL-17은 이들의 변이체를 포함한다.
- [0103] IL-17 수용체란, IL-17이 결합하는 세포 표면 단백질로, 세포 내의 시그널링을 매개하는 단백질을 의미한다. IL-17 수용체 패밀리로서 IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD, IL-17RE가 알려져 있다. 본 발명에서 말하는 IL-17 수용체란, 천연의 아미노산 서열을 포함하는 단백질이어도 되고, 그 변이체이어도 된다. 여기에서 변이체란, 아미노산이 여러 개 치환된 것이나 일부분의 아미노산 서열을 의미하며, IL-17에 대하여 결합활성을 갖는 단백질 또는 펩티드를 의미한다. 본 발명의 앵타머는 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 것이다.
- [0104] 본 발명의 앵타머가 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는지 여부는 예를 들면, 이하의 시험에 의해 평가할 수 있다.
- [0105] 측정에는 비아코어(BIAcore)사 제조의 BIAcore2000 또는 T100을 이용한다. CM5 센서 칩에 Protein A(21181, PIERCE)를 고정화하고, 그곳에 IL-17 수용체와 IgG의 Fc부분이 융합한 단백질(예를 들면, 재조합 인간 IL-17R-

Fc키메라(177-IR, R&D systems)을 고정화한다. 고정화량은, 약 20(2000의 경우) 또는 약 1200RU로 한다. 분석물(analyte)로서 IL-17(약 100 또는 150nM)과 앵타머(약 50 또는 100nM)를 혼합하여 15분간 유지하고, 이 혼합액을 BIAcore2000에 주입한다. IL-17의 IL-17 수용체에의 결합을 검출한다.

- [0106] 수치가 낮을수록 해당 앵타머는 IL-17과 IL-17 수용체에의 결합을 강하게 저해한다고 판정한다.
- [0107] 바람직한 형태에 따르면, 본 발명의 앵타머는 IL-17에 결합하여 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해함으로써, 임의의 포유동물에서 유래하는 IL-17의 시그널링 활성을 저해할 수 있다. 포유동물로는 예를 들면, 영장류(예, 인간, 원숭이), 설치류(예, 마우스, 래트(rat), 모르모트(guinea pig)), 그리고 애완동물, 가축 및 사육동물(예, 개, 고양이, 말, 소, 염소, 양, 돼지)을 들 수 있다.
- [0108] IL-17 시그널링 활성을 저해한다는 것은, IL-17이 보유하는 임의의 시그널링 활성화에 대한 저해능을 의미한다. 예를 들면, IL-17은 IL-17 수용체에 결합한 후, TRAF6 등을 통하여 NF- κ B 경로나 MAP 키나제 경로를 활성화하는 것이 알려져 있고, 이들 시그널 전달 경로를 통하여 각종 사이토카인이나 케모카인의 생산이 유도된다. 따라서, IL-17 시그널링 저해활성이란, IL-17 시그널 전달 경로의 하류에 존재하는, 이들의 사이토카인이나 케모카인 등의 생산을 저해하는 활성인 것이다. 이들 사이토카인이나 케모카인의 발현은 염증성 세포의 유주나 활성화를 유도하므로, IL-17의 시그널링 저해활성이란 그들의 활성의 저해도 의미한다.
- [0109] 본 발명의 앵타머는, IL-17에 대한 결합성, IL-17과 IL-17 수용체의 결합 저해활성 등을 높이기 위해, 상기 식 (Ia), (Ia'), (I) 및 (Ia'')에 나타내는 바와 같이, 뉴클레오티드의 일부가 수식되어 있다.
- [0110] 본 명세서에 있어서, 뉴클레오티드가 비수식이라는 것은, 리보뉴클레오티드의 리보스의 2' 위치의 히드록실기, 또는 데옥시리보뉴클레오티드의 리보스의 2' 위치의 수소가 다른 원소로 치환되어 있지 않은 것을 말하고, 뉴클레오티드가 수식되어 있다는 것은, 예를 들면, 리보뉴클레오티드의 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자, 또는 0-메틸기로 치환되어 있는 것, 뉴클레오티드가 포스포로티오에이트화되어 있는 것, 혹은 잠금 핵산(LNA) 수식되어 있는 것 등을 의미한다. 「뉴클레오티드가 포스포로티오에이트화되어 있다」란, 인접하는 뉴클레오티드간의 결합 부위에 있는 인산기가 유히화되어 있는, 즉, 포스포디에스테르 결합이 포스포로티오에이트 결합으로 개변(改變)되어 있는 것을 나타내고, LNA 수식되어 있다는 것은, 뉴클레오티드의 리보스의 2' 위치의 산소 원자와 4' 위치의 탄소 원자간이 메틸렌 가교되어 있는 것을 나타낸다.
- [0111] 식 (Ia), (Ia'), (I) 및 (Ia'')에 나타내는 각종의 수식은, 자체 공지의 방법에 의해 실시할 수 있다(예를 들면, Sproat et al., (1991), Nucl. Acid. Res. 19, 733-738; Cotton et al., (1991), Nucl. Acid. Res. 19, 2629-2635; Hobbs et al., (1973), Biochemistry 12, 5138-5145 등 참조).
- [0112] 본 발명은 또, 상기 식 (Ia), (Ia'), (I) 및 (Ia'')로 표시되는 서열의 5' 말단에, RNA의 경우에는 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 0-메틸기로 치환되어 있어도 되는, 염기가 구아닌인 뉴클레오티드가 부가되고, 및/또는 3' 말단에 염기가 시토신인 뉴클레오티드가 부가된 서열을 포함하는, IL-17에 결합하여 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 앵타머도 제공한다.
- [0113] 바람직하게는, 본 발명의 앵타머는, 이하에 나타내는 앵타머번호 3~49, 및 52~94 중 어느 것으로부터 선택되는 서열을 포함하는 앵타머이어서 되고, 혹은, IL-17에 결합하여 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 한, 당해 앵타머의 복수의 연결물이어도 된다.
- [0114] 상기 앵타머의 복수의 연결물에 있어서, 연결은 탠덤(tandem) 결합으로 실시될 수 있다. 또, 연결시에 링커를 이용해도 된다. 링커로는, 뉴클레오티드쇄(예, 1~약 20 뉴클레오티드), 비뉴클레오티드쇄(예, $-(CH_2)_n-$ 링커, $-(CH_2CH_2O)_n-$ 링커, 헥사에틸렌글리콜 링커, TEG 링커, 펩티드를 포함하는 링커, -S-S- 결합을 포함하는 링커, -CONH- 결합을 포함하는 링커, $-OPO_3-$ 결합을 포함하는 링커)를 들 수 있다. 상기 복수의 연결물에 있어서의 복수란, 2 이상이면 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, 2개, 3개 또는 4개일 수 있다.
- [0115] 본 발명의 앵타머의 길이는 특별히 한정되지 않고, 통상, 약 200 뉴클레오티드 이하일 수 있지만, 총 뉴클레오티드 수가 적으면, 화학합성 및 대량생산이 보다 용이하고, 또한 코스트면에서의 메리트도 크다. 또, 화학 수식도 용이하고, 생체 내 안정성도 높다고 생각된다. 따라서, 의약품 용도에의 적용 관점으로 본다면, 본 발명의 앵타머는 70 뉴클레오티드보다 더욱 짧은 염기 길이인 것이 보다 바람직하고, 바람직하게는 약 50 뉴클레오티드 이하이며, 보다 바람직하게는 약 40 뉴클레오티드 이하(예, 40 뉴클레오티드 이하, 39 뉴클레오티드 이하, 38 뉴클레오티드 이하, 37 뉴클레오티드 이하, 36 뉴클레오티드 이하)이고, 가장 바람직하게는 약 35 뉴클레오티드 이하(예, 35 뉴클레오티드 이하, 34 뉴클레오티드 이하, 33 뉴클레오티드 이하)일 수 있다.

- [0116] 다른 실시 형태에 있어서, 본 발명은 또, 하기 식 (II)로 표시되는 서열을 포함하는, IL-17에 결합하여 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 앵타머도 제공한다:
- [0117] $g(x_1)g(x_1)g(x_1)u(F)ag(S)c(F)c(F)g'(S)g(x_2)aggagu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)ggu(F)ac'(x_3)c'(x_3)c'(x_3)$
- [0118] 식 중, a, g, c 및 u는, 각각, 염기가 아데닌, 구아닌, 시토신 및 우라실인 RNA를 나타내고,
- [0119] g' 및 c'는, 각각, 염기가 구아닌 및 시토신인 RNA 또는 DNA를 나타내며,
- [0120] 뉴클레오티드에 있어서의 괄호는 그 뉴클레오티드의 수식을 나타내고,
- [0121] (F)는, 뉴클레오티드의 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자로 치환되어 있는 것을 나타내며,
- [0122] (S)는, 뉴클레오티드가 RNA인 경우, 포스포로티오에이트화되어 있는 것을 나타내고,
- [0123] (x₁)은, 뉴클레오티드가 LNA 수식되어 있거나, 또는 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 0-메틸기로 치환되어 있는 것을 나타내며,
- [0124] (x₂)는, 뉴클레오티드가 비수식이거나, 또는 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 0-메틸기로 치환되어 있는 것을 나타내고,
- [0125] (x₃)은, 뉴클레오티드가 비수식이거나, 또는 LNA 수식되어 있는 것을 나타낸다.
- [0126] 상기 식 (II)로 표시되는 서열을 포함하는 앵타머도, 식 (Ia), (Ia'), (I) 및 (Ia'')로 표시되는 서열을 포함하는 앵타머와 마찬가지로, 뉴클레오티드의 일부가 수식되어 있다. 식 (II)에 나타내는 수식은, 상술한 바와 같이, 자체 공지의 방법에 의해 실시할 수 있다.
- [0127] 바람직하게는, 본 발명의 앵타머는, 이하에 나타내는 앵타머번호 1 또는 2의 서열을 포함하는 앵타머이어도 되고, 혹은 IL-17에 결합하여 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 한, 당해 앵타머의 복수의 연결물이어도 된다.
- [0128] 상기 앵타머의 복수의 연결물에 있어서, 연결은 텐덤 결합으로 실시될 수 있다. 또, 연결시에 링커를 이용해도 된다. 링커로는, 뉴클레오티드쇄(예, 1~약 20 뉴클레오티드), 비뉴클레오티드쇄(예, -(CH₂)_n- 링커, -(CH₂CH₂O)_n- 링커, 헥사에틸렌글리콜 링커, TEG 링커, 펩티드를 포함하는 링커, -S-S- 결합을 포함하는 링커, -CONH- 결합을 포함하는 링커, -OPO₃- 결합을 포함하는 링커)를 들 수 있다. 상기 복수의 연결물에 있어서의 복수란, 2 이상이면 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 2개, 3개 또는 4개일 수 있다.
- [0129] 본 발명의 앵타머는 또, IL-17에 대한 결합성, IL-17과 IL-17 수용체의 결합 저해활성, 안정성 등을 높이기 위해, 핵산 염기가 더욱 개변(예, 화학적 치환)된 것이어도 된다. 이러한 개변으로는, 캡핑과 같은 3' 말단 및 5' 말단의 개변이 포함된다.
- [0130] 개변은 또한 폴리에틸렌글리콜, 아미노산, 펩티드, 인버티드 dT, 핵산, 뉴클레오시드, 폴리뉴클레오티드, 미리스토일(Myristoyl), 리토콜릭-오레일(Lithocolic-oleyl), 도코사닐(Docosanyl), 라우로일, 스테아로일, 팔미토일, 오레오일(Oleoyl), 리노레오일(Linoleoyl), 그 외의 지질, 스테로이드, 콜레스테롤, 카페인, 비타민, 색소, 형광물질, 향압제, 독소, 효소, 방사성 물질, 비오틴 등을 말단에 부가함으로써 실시될 수 있다. 이러한 개변에 대해서는 예를 들면, 미국특허 제 5,660,985호, 동 제5,756,703호 참조.
- [0131] 특히, 개변이 PEG의 말단 부가에 의해 실시되는 경우, PEG의 분자량은 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 1000~100000, 보다 바람직하게는 20000~90000이다. PEG는 직쇄상이어도 되고, 2 이상의 쇠(鎖)로 분기한 것(멀티 아암 PEG)이어도 된다. 또, PEG의 말단 부가에 대해서는, 3' 말단 또는 5' 말단의 한쪽 말단에만 부가되어도, 혹은 3' 말단 및 5' 말단의 양단에 부가되어도 된다.
- [0132] 이와 같은 PEG로는 특별히 한정되지 않고, 당업자이면 시판 혹은 공지의 PEG를 적절히 선택하여 이용할 수 있지만(예를 들면, http://www.peg-drug.com/peg_product/branched.html를 참조), 본 발명의 앵타머에 적용하는 PEG의 적합예로서 구체적으로는, 분자량 20000의 CS형 PEG나 GS형 PEG(SUNBRIGHT ME-200GS 니치유사 제조), 분자량 40000의 2분기 GS형 PEG(SUNBRIGHT GL2-400GS2 니치유사 제조), 분자량 40000의 2분기 TS형 PEG(SUNBRIGHT GL2-400TS 니치유사 제조), 분자량 40000의 4분기 TS형 PEG(SUNBRIGHT GL4-400TS 니치유사 제조), 분자량 80000의 2분기 TS형 PEG(SUNBRIGHT GL2-800TS 니치유사 제조), 또는 분자량 80000의 4분기 TS형

PEG(SUNBRIGHT GL4-800TS 니치유사 제조) 등을 들 수 있다.

- [0133] 이 경우, 본 발명의 앵타머는, PEG가 말단에 직접 부가되어 있어도 되지만, 그 말단에 PEG와 결합 가능한 기를 갖는 링커 등이 부가되고, 그것을 통하여 PEG를 본 발명의 앵타머에 부가하는 것이 보다 바람직하다.
- [0134] PEG와 본 발명의 앵타머의 링커로는 특별히 한정되지 않고, 탄소쇄 수(數)나 관능기 등을 결합 부위나 PEG의 종류 등에 따라 적절히 선택할 수 있다. 이와 같은 링커로는 예를 들면 아미노기를 갖는 링커를 들 수 있고, 구체적으로는, 5' 말단에 부가하는 경우는 ssH Linker(SAFC) 또는 DMS(O)MT-AMINO-MODIFIER(GLEN RESEARCH)가, 3' 말단에 부가하는 경우는 TFA Amino C-6 lcaa CPG(ChemGenes) 등이 예시된다. 이 링커를 선택한 경우, PEG에는 예를 들면 N-히드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide)의 활성기를 부가한 다음, 이것을 링커측의 아미노기와 반응시킴으로써, 본 발명의 앵타머와 PEG를 링커를 통하여 결합할 수 있다.
- [0135] 또한 PEG나 링커로는 시판하는 것을 바람직하게 이용할 수 있다. 또, PEG, 링커 및 본 발명의 앵타머의 결합에 관한 반응 조건 등은 당업자이면 적절히 설정하는 것이 가능하다.
- [0136] 본 발명의 앵타머는, 본 명세서 중의 개시 및 당해 기술분야에 있어서의 자체 공지의 방법에 의해 화학합성할 수 있다. 앵타머는, 인산기의 마이너스 전하를 이용한 이온결합, 리보스를 이용한 소수(疏水) 결합 및 수소결합, 핵산 염기를 이용한 수소결합이나 스택킹결합(stacking interaction) 등 다양한 결합 양식에 따라 표적물질과 결합한다. 특히, 구성 뉴클레오티드의 수만큼 존재하는 인산기의 마이너스 전하를 이용한 이온결합은 강하며, 단백질의 표면에 존재하는 리신이나 아르기닌의 플러스 전하와 결합한다. 이 때문에, 표적물질과의 직접적인 결합에 관여하고 있지 않은 핵산 염기는 치환할 수 있다. 특히, 스템(stem)구조의 부분은 이미 염기쌍이 만들어져 있으며, 또, 이중나선구조의 내측을 향하고 있으므로, 핵산 염기는 표적물질과 직접 결합하기 어렵다. 따라서, 염기쌍을 다른 염기쌍으로 치환해도 앵타머의 활성은 감소하지 않는 경우가 많다. 루프구조 등 염기쌍을 만들고 있지 않은 구조에 있어서도 핵산 염기가 표적분자와의 직접적인 결합에 관여하고 있지 않은 경우에, 염기의 치환이 가능하다. 리보스의 2' 위치의 수식에 관해서는, 보기 드물게 리보스의 2' 위치의 관능기가 표적분자와 직접적으로 상호 작용하고 있는 일이 있지만, 대부분의 경우 무관계이며, 다른 수식분자로 치환 가능하다. 이와 같이 앵타머는 표적분자와의 직접적인 결합에 관여하고 있는 관능기를 치환 또는 삭제하지 않는 한, 그 활성을 유지하고 있는 일이 많다. 또, 전체의 입체구조가 크게 변하지 않는 것도 중요하다.
- [0137] 앵타머는 SELEX법 및 그 개량법(예를 들면, Ellington et al., (1990), Nature, 346, 818-822; Tuerk et al., (1990), Science, 249, 505-510)을 이용함으로써 제작할 수 있다. SELEX법에서는 라운드수를 늘리거나, 경합 물질을 사용함으로써, 표적물질에 대해 보다 결합력이 강한 앵타머가 농축되고, 선별되어진다. 따라서, SELEX의 라운드수를 조절하거나, 및/또는 경합 상태를 변화시킴으로써, 결합력이 다른 앵타머, 결합 형태가 다른 앵타머, 결합력이나 결합 형태는 같지만 염기 서열이 다른 앵타머를 얻을 수 있는 경우가 있다. 또, SELEX법에는 PCR에 의한 증폭 과정이 포함되는데, 그 과정에서 망간 이온을 사용하는 등 하여 변이를 넣음으로써, 보다 다양성이 풍부한 SELEX를 실시하는 것이 가능하게 된다.
- [0138] SELEX로 얻어지는 앵타머는 표적물질에 대해 친화성이 높은 핵산이며, 그것은 표적물질의 활성 부위에 결합하는 것을 의미하지 않는다. 따라서, SELEX로 얻어지는 앵타머는 반드시 표적물질의 기능에 작용한다고는 한정되지 않는다. IL-17은 염기성 단백질이며, 핵산이 비특이적으로 결합하기 쉽다고 생각된다. 활성 부위에 결합하지 않는 앵타머는 그 표적물질의 활성에 영향을 미치지 않는다. 실제, 컨트롤로 이용한 RNA는 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하지 않았다.
- [0139] 이와 같이 하여 선택된 활성이 있는 앵타머는, 최적화 SELEX를 실시함으로써 더욱 고성능화하는 것이 가능하다. 최적화 SELEX란, 어느 서열이 정해져 있는 앵타머의 일부를 랜덤 서열로 한 템플릿이나 10~30% 정도의 랜덤 서열을 도프한 템플릿을 제작하고, 재차 SELEX를 실시하는 것이다.
- [0140] SELEX로 얻어지는 앵타머는 70 뉴클레오티드 정도의 길이가 있으며, 이것을 그대로 의약으로 하는 것은 용이하지 않다. 그래서, 시행 착오를 반복하여 용이하게 화학합성을 할 수 있는 50 뉴클레오티드 정도 이하의 길이가 짧게 할 필요가 있다.
- [0141] SELEX로 얻어지는 앵타머는 그 프라이머 설계에 의존하여, 그 후의 최소화 작업의 용이성이 바뀐다. 적절한 프라이머를 설계하지 않으면 SELEX에 의해 활성이 있는 앵타머를 선별할 수 있었다고 해도, 그 후의 개발이 불가능하게 된다. 본 발명에서는 31 뉴클레오티드(앵타머번호 1~4, 6~15, 19~49, 및 52~94)나 33 뉴클레오티드(앵타머번호 5 및 16~18)라도 활성을 유지하고 있는 앵타머를 얻을 수 있다.
- [0142] 앵타머는 화학합성이 가능하므로 개변이 용이하다. 앵타머는 MFOLD 프로그램을 이용하여 2차 구조를 예측하거

나, X선 해석이나 NMR 해석에 의해 입체구조를 예측함으로써, 어느 뉴클레오티드를 치환 또는 결손하는 것이 가능한지, 또, 어디에 새로운 뉴클레오티드를 삽입할 수 있는지를 어느 정도 예측할 수 있다. 예측된 새로운 서열의 앵타머는 용이하게 화학합성 할 수 있으며, 그 앵타머가 활성을 유지하고 있는지 아닌지 기존의 어세이 (assay)계에 의해 확인할 수 있다.

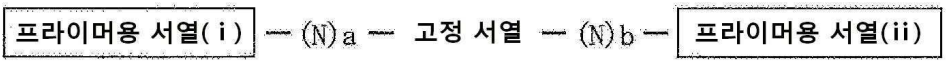
[0143] 언어진 앵타머의 표적물질과의 결합에 중요한 부분이, 상기와 같은 시행착오를 반복함으로써 특정할 수 있었던 경우, 그 서열의 양단에 새로운 서열을 부가해도 대부분의 경우 활성은 변화하지 않는다. 새로운 서열의 길이는 특별히 한정되는 것은 아니다.

[0144] 수식에 관해서도 서열과 마찬가지로 고도로 설계 또는 개변이 가능하다.

[0145] 이상과 같이, 앵타머는 고도로 설계 또는 개변이 가능하다. 본 발명은 또, 소정의 서열(예, 스템 부분, 인터널 루프 부분, 헤어핀 루프 부분 및 단일 가닥 사슬 부분으로부터 선택되는 부분에 대응하는 서열: 이하, 필요에 따라 고정 서열로 생략한다)을 포함하는 앵타머를 고도로 설계 또는 개변 가능한 앵타머의 제조방법을 제공한다.

[0146] 예를 들면, 이와 같은 앵타머의 제조방법은, 하기:

[0147] [표 1]



[0148] [상기에 있어서, (N)_a는 a개의 N으로 이루어지는 뉴클레오티드쇄를 나타내고, (N)_b는 b개의 N으로 이루어지는 뉴클레오티드쇄를 나타내며, N은 각각, 동일 또는 다르고, A, G, C, U 및 T(바람직하게는, A, G, C 및 U)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드이다. a, b는 각각, 동일 또는 다르고, 임의의 수일 수 있지만, 예를 들면 1~약 100, 바람직하게는 1~약 50, 보다 바람직하게는 1~약 30, 보다 더욱 바람직하게는 1~약 20 또는 1~약 10 일 수 있음.]로 표시되는 뉴클레오티드 서열로 이루어지는 단일종의 핵산분자 또는 복수종의 핵산분자(예, a, b의 수 등이 다른 핵산분자의 라이브러리), 및 프라이머용 서열 (i), (ii)에 각각 대응하는 프라이머쌍을 이용하여 고정 서열을 포함하는 앵타머를 제조하는 것을 포함한다.

[0150] 본 발명은 또, 본 발명의 앵타머 및 그것에 결합한 기능성 물질을 포함하는 복합체를 제공한다. 본 발명의 복합체에 있어서의 앵타머와 기능성 물질간의 결합은 공유결합, 또는 비공유결합일 수 있다. 본 발명의 복합체는 본 발명의 앵타머와 1 이상(예, 2 또는 3개)의 동종 또는 이종의 기능성 물질이 결합한 것일 수 있다. 기능성 물질은 본 발명의 앵타머에 어떤 기능을 새롭게 부가하는 것, 혹은 본 발명의 앵타머가 유지할 수 있는 어떤 특성을 변화(예, 향상)시킬 수 있는 것인 한 특별히 한정되지 않는다. 기능성 물질로는, 예를 들면, 단백질, 펩티드, 아미노산, 지질, 당질, 단당, 폴리뉴클레오티드, 뉴클레오티드를 들 수 있다. 기능성 물질로는 또, 예를 들면, 친화성 물질(예, 비오틴, 스트렙트아비딘, 표적 상보 서열에 대하여 친화성을 갖는 폴리뉴클레오티드, 항체, 글루타티온세파로오스, 히스티딘), 표식용 물질(예, 형광물질, 발광물질, 방사성 동위체), 효소(예, 겨자무 퍼옥시다아제, 알칼리포스파타제), 약물송달매체(예, 리포솜, 마이크로스피어, 펩티드, 폴리에틸렌글리콜류), 약물(예, 칼리케어마이신(calicheamycin)이나 듀오카르마이신 등 미사일요법에 사용되고 있는 것, 시클로포스파미드, 멜파란, 이포스파미드 또는 트로포스파미드 등의 질소머스타드 유사체, 티오테파 등의 에틸렌이민류, 카르무스틴 등의 니트로소 요소, 테모졸로미드 또는 다카르바진 등의 알킬화제, 메토티렉세이트 또는 랄티트렉시드(raltitrexed) 등의 염산유사대사길항제, 티오구아닌, 클라드리빈 또는 플루다라빈 등의 퓨린 유사체, 플루오로우라실, 테가푸르 또는 젤시타빈 등의 피리미딘 유사체, 빈블라스틴, 빈크리스틴 또는 비노렐빈 등의 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid) 및 그 유사체, 에토포시드, 탁산(taxans), 도세탁셀 또는 파클리탁셀 등의 포도필로톡신 유도체, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신 및 미톡산트론 등의 안트라사이클린류 및 유사체, 블레오마이신(bleomycin) 및 미토마이신 등의 다른 세포독성 항생물질, 시스플라틴, 카르보플라틴 및 옥살리플라틴 등의 백금 화합물, 펜토스타틴, 밀테포신, 에스트라무스틴, 토포테칸, 이리노테칸 및 비카루타미드), 독소(예, 리신 독소, 리어독소(liatoxin) 및 베로독소)를 들 수 있다. 이들의 기능성 분자는 최종적으로 제거되는 경우가 있다. 또한, 트롬빈이나 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP), 팩터X 등의 효소가 인식하여 절단할 수 있는 펩티드, 뉴클레아제나 제한 효소를 절단할 수 있는 폴리뉴클레오티드이어도 된다.

[0151] 본 발명의 앵타머 또는 복합체는 예를 들면, 의약 또는 진단약, 검사약, 시약으로서 사용될 수 있다. 특히, 염증성 질환 및 자기면역질환 등의 의약 또는 진단약, 검사약, 시약으로서 유용하다.

- [0152] 여기에서 염증성 질환 및 자기면역질환 등으로는 다발성 경화증(MS), 전신성 에리테마토데스(SLE), 강직성 척추염(AS), 쇼그렌 증후군, 다발성 근염(PM), 피부 근염(DM), 류머티스 관절염(RA), 변형성 관절염(OA), 염증성 장질환(크론병 등), 전신성 경화증(PSS), 강피증, 결절성 동맥 주위염(PN), 갑상선 질환(바제도병, 하시모토병 등), 길랑 바레 증후군, 원발성 담즙성 간경변(PBC), 돌발성 혈소판 감소성 자반병, 자기면역 용혈성 빈혈, 중증근무력증(MG), 근위축성 측색경화증(ALS) I형 당뇨병, 심상성 건선, 농포성 건선, 천식, 호중구 기능 이상, 호산구성 폐렴, 특발성 폐섬유증, 과민성 폐렴, 암(예, 식도암, 갑상선암, 방광암, 대장암, 위암, 췌장암, 흉부암, 간암, 폐암, 비소세포 폐암, 유방암, 신경아세포종, 교모세포종, 자궁암, 자궁경부암, 난소암, 윌름즈 종양, 전립선암, 골육종), 이식 질환(예, 거절반응, 이식편대숙주병), 알레르기(예, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 음식 과민증, 두드러기, 과민성 폐장염), ANCA관련 질환, 뒤시엔느 근위축증(Duchenne muscular dystrophy), 폐기종, 폐수종, 폐결핵, 과민성 폐장염, 폐포 단백증, 폐렴프관 근종증(pulmonary lymphangiomyomatosis; LAM), 기흉, 흉막염, 수술후 유착, 자궁 내막증, 성인성 치주염, 기관지염, 만성 폐색성 폐질환(COPD), 감염증, 가령항반변성증, 망막증, 녹내장, 백내장, 포도막염, 베체트병, 간염, 간경변, 간부전, 신경색, 신장염, 신부전, 방광염, 뇌경색, 뇌출혈, 두개내출혈, 지주막하 출혈, 고혈압성 뇌질환, 뇌색전증, 일과성 뇌허혈 발작, 골수염, 화농성 관절염, 골다공증, 추간판 헤르니아, 통풍 등을 들 수 있다.
- [0153] 또 본 발명의 앵타머 또는 복합체는 약물송달체, 생체 내 이미징(in vivo imaging)용 프로브, IL-17의 혈중농도 측정용 프로브, 조직 염색용 프로브, ELISA용 프로브, IL-17의 분리 정제용 리간드로서도 사용될 수 있다.
- [0154] IL-17은 섬유아세포, 내피세포, 상피세포, 연골세포, 골아세포, 수상세포 전구세포, 골수유래간질세포, T 세포, 대식세포, 호중구 등의 각종 세포에 작용하는 것이 알려져 있다. IL-17은 이들의 세포에 작용함으로써 각종 사이토카인, 케모카인, 수용체, 접착분자, 효소 등의 생산 및 발현을 유도한다. 구체적으로는 CXCL1(KC 또는 Gro α), CXCL2(MIP2 또는 Gro β), CXCL5(LIX), CXCL6(GCP-2), CXCL8(IL-8), CXCL9(MIG), CXCL10(IP10), CXCL11(I-TAC), CCL2(MCP-1), CCL5(RANTES), CCL7(MCP-3), CCL11(Eotaxin), CXCL12(SDF-1), CCL20(MIP3 α), IL-1, IL-6, IL-19, TNF, CSF2(GM-CSF), CSF3(G-CSF), ICAM-1, VCAM-1, PTGS2(COX2), NOS2(iNOS), LCN2(24p3), DEFB4(BD2), S100A7(Psoriasin), S100A8(Calgranulin A), S100A9(Calgranulin B), MUC5AC, MUC5B, EREG, SOCS3, TNFSF11(RANKL), MMP1, MMP3, MMP9, MMP13, TIMP1, ADAMTS4, PGE2, SCF, CD80, CD86, MHC 등을 들 수 있다. 따라서, 본 발명의 앵타머 또는 복합체는, 이들의 세포 및 사이토카인, 케모카인 등에 관계한 질환의 의약 또는 진단약, 검사약, 시약으로서 사용될 수 있다.
- [0155] IL-17은 IL-17 수용체에 결합함으로써 Act1이나 TRAF6를 활성화하고, NF- κ B 경로나 MAP 키나제 경로, C/EBP 경로 등을 활성화한다. 따라서, 본 발명의 앵타머 또는 복합체는 이들의 시그널 전달 경로의 활성화에 관계한 질환의 의약 또는 진단약, 검사약, 시약으로서 사용될 수 있다.
- [0156] 본 발명의 앵타머 또는 복합체는, 염증성 질환 및 자기면역질환 등(예, 다발성 경화증(MS), 전신성 에리테마토데스(SLE), 강직성 척추염(AS), 쇼그렌 증후군, 다발성 근염(PM), 피부 근염(DM), 류머티스 관절염(RA), 변형성 관절염(OA), 염증성 장질환(크론병 등), 전신성 경화증(PSS), 강피증, 결절성 동맥 주위염(PN), 갑상선 질환(바제도병, 하시모토병 등), 길랑 바레 증후군, 원발성 담즙성 간경변(PBC), 돌발성 혈소판 감소성 자반병, 자기면역 용혈성 빈혈, 중증근무력증(MG), 근위축성 측색경화증(ALS), I형 당뇨병, 심상성 건선, 농포성 건선, 천식, 호중구 기능 이상, 호산구성 폐렴, 특발성 폐섬유증, 과민성 폐렴), 암(예, 식도암, 갑상선암, 방광암, 대장암, 위암, 췌장암, 흉부암, 간암, 폐암, 비소세포 폐암, 유방암, 신경아세포종, 교모세포종, 자궁암, 자궁경부암, 난소암, 윌름즈 종양, 전립선암, 골육종), 이식 질환(예, 거절반응, 이식편대숙주병), 알레르기(예, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 음식 과민증, 두드러기, 과민성 폐장염), ANCA관련 질환, 뒤시엔느 근위축증, 폐기종, 폐수종, 폐결핵, 과민성 폐장염, 폐포 단백증, 폐렴프관 근종증(LAM), 기흉, 흉막염, 수술후 유착, 자궁 내막증, 성인성 치주염, 기관지염, 만성 폐색성 폐질환(COPD), 감염증, 가령항반변성증, 망막증, 녹내장, 백내장, 포도막염, 베체트병, 간염, 간경변, 간부전, 신경색, 신장염, 신부전, 방광염, 뇌경색, 뇌출혈, 두개내출혈, 지주막하 출혈, 고혈압성 뇌질환, 뇌색전증, 일과성 뇌허혈 발작, 골수염, 화농성 관절염, 골다공증, 추간판 헤르니아, 통풍의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [0157] 본 발명의 의약은 의약상 허용되는 담체가 배합된 것일 수 있다. 의약상 허용되는 담체로는, 예를 들면, 자당, 전분, 만니트, 솔비트, 유당, 글루코스, 셀룰로오스, 탈크, 인산칼슘, 탄산칼슘 등의 부형제, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 히드록실 프로필셀룰로오스, 폴리프로필피롤리돈, 젤라틴, 아라비아고무, 폴리에틸렌글리콜, 자당, 전분 등의 결합제, 전분, 카복시메틸셀룰로오스, 히드록실프로필전분, 나트륨-글리콜-전분, 탄산수소나트륨, 인산칼슘, 구연산 칼슘 등의 붕괴제, 스테아린산마그네슘, 에어로실, 탈크, 라우릴황산나트륨 등의 활제, 구연산, 멘톨, 글리시리진·암모늄염(glycyrrhizin-ammonium salt), 글리신, 오렌지가루 등의 방향제, 안식향산나트륨,

아황산수소나트륨, 메틸파라벤, 프로필파라벤 등의 보존제, 구연산, 구연산 나트륨, 초산 등의 안정제, 메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 스테아린산알루미늄 등의 현탁제, 계면활성제 등의 분산제, 물, 생리식염수, 오렌지 주스 등의 희석제, 카카오지(脂), 폴리에틸렌글리콜, 백등유 등의 베이스 왁스 등을 들 수 있지만, 그들에 한정되는 것은 아니다.

[0158] 경구투여에 적합한 제제는, 물, 생리식염수, 오렌지 주스와 같은 희석액에 유효량의 리간드를 용해시킨 액제, 유효량의 리간드를 고체나 과립으로서 포함하고 있는 캡슐제, 사세(sachet)제 또는 정제, 적당한 분산매 중에 유효량의 유효성분을 현탁시킨 현탁액제, 유효량의 유효성분을 용해시킨 용액을 적당한 분산매 중에 분산시켜 유효시킨 유제 등이다.

[0159] 또, 본 발명의 의약은 필요에 따라, 맛의 마스킹, 장용성(腸溶性) 혹은 지속성 등의 목적을 위해 자체 공지의 방법으로 코팅할 수 있다. 코팅에 이용되는 코팅제로는 예를 들면, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 폴리옥시에틸렌글리콜, 트윈(Tween) 80, 플루로닉(Pluronic) F68, 셀룰로오스아세테이트프탈레이트, 히드록시프로필메틸셀룰로오스프탈레이트, 히드록시메틸셀룰로오스아세테이트숙시네이트, 유드라지트(Eudragit)(롬사 제조, 독일, 메타아크릴산·아크릴산 공중합체) 및 색소(예, 벵갈라(ferric oxide red), 이산화티탄 등) 등이 이용된다. 당해 의약은, 속방성 제제, 서방성 제제 중 어느 것이어도 된다. 서방의 기재로는, 예를 들면, 리포솜, 아텔로콜라겐, 젤라틴, 히드록시아파타이트, PLGA 등을 들 수 있다.

[0160] 비경구적인 투여(예를 들면, 정맥내 투여, 피하투여, 근육내 투여, 국소투여, 복강내 투여, 경비투여, 경폐투여 등)에 적합한 제제로는, 수성 및 비수성의 등장(等張)인 무균의 주사액제가 있고, 이것에는 항산화제, 완충액, 계균제, 등장화제 등이 포함되어 있어도 된다. 또, 수성 및 비수성의 무균의 현탁액제를 들 수 있으며, 이것에는 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정화제, 방부제 등이 포함되어 있어도 된다. 당해 제제는, 애플이나 바이알과 같이 단위 투여량 혹은 복수 회 투여량씩 용기에 봉입할 수 있다. 또, 유효성분 및 의약상 허용되는 담체를 동결건조하고, 사용 직전에 적당한 무균 용매에 용해 또는 현탁하면 되는 상태로 보존할 수도 있다. 또한 주사액제 이외에도, 흡입제, 연고제도 가능하다. 흡입제의 경우, 동결건조 상태의 유효성분을 미세화하고 적당한 흡입 디바이스를 이용하여 흡입 투여 또는 네블라이저를 이용하여 흡입하는 등의 방법이 포함되어도 된다. 흡입제에는, 추가로 필요에 따라 종래부터 사용되고 있는 계면활성제, 기름, 조미료, 시클로 텍스트린 또는 그 유도체 등을 적절히 배합할 수 있다.

[0161] 여기에서 계면활성제로는, 예를 들면 올레인산, 레시틴, 디에틸렌글리콜디올레에이트, 테트라히드로플루프릴올레에이트, 에틸올레에이트, 이소프로필미리스테이트, 글리세릴트리올레에이트, 글리세릴모노라우레이트, 글리세릴모노올레에이트, 글리세릴모노스테아레이트, 글리세릴모노리시노에이트, 세틸알코올, 스테아릴 알코올, 폴리에틸렌글리콜 400, 세틸피리디늄클로라이드, 소르비탄트리올레에이트(상품명 스팬(Span) 85), 소르비탄모노올레에이트(상품명 스팬 80), 소르비탄모노라우레이트(상품명 스팬 20), 폴리옥시에틸렌 경화 피마자유(상품명 HCO-60), 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄모노라우레이트(상품명 트윈 20), 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄모노올레에이트(상품명 트윈 80), 천연자원 유래의 레시틴(상품명 에피클론(EPICLON)), 올레일폴리옥시에틸렌(2) 에테르(상품명 브리지(Brij) 92), 스테아릴폴리옥시에틸렌(2) 에테르(상품명 브리지 72), 라우릴폴리옥시에틸렌(4) 에테르(상품명 브리지 30), 올레일폴리옥시에틸렌(2) 에테르(상품명 게나폴(Genapol) 0-020), 옥시에틸렌과 옥시프로필렌의 블록 공중합체(상품명 신페로닉(Synperonic) 등을 들 수 있다. 기름으로는, 예를 들면 옥수수유, 올리브유, 면실유, 해바라기유 등을 들 수 있다. 또, 연고제의 경우, 적당한 의약상 허용되는 기재(황색 바셀린, 백색 바셀린, 파라핀, 플라스틱베이스, 실리콘, 백색 연고, 밀랍, 돈유, 식물유, 친수 연고, 친수 바셀린, 정제 라놀린, 가수 라놀린, 흡수 연고, 친수 플라스틱베이스, 마크로골 연고 등)을 이용하고, 유효성분과 혼합하여 제제화하여 사용한다.

[0162] 흡입제는 상법에 따라 제조할 수 있다. 즉, 상기 본 발명의 앵타머 또는 복합체를 분말 또는 액상으로 하고, 흡입 분사제 및/또는 담체 중에 배합하여, 적당한 흡입 용기에 충전함으로써 제조할 수 있다. 또 상기 본 발명의 앵타머 또는 복합체가 분말인 경우는 통상의 기계적 분말 흡입기를, 액상인 경우는 네블라이저 등의 흡입기를 각각 사용할 수도 있다. 여기에서 분사제로는 종래 공지인 것을 널리 사용할 수 있고, 클로로플루오로카본-11, 클로로플루오로카본-12, 클로로플루오로카본-21, 클로로플루오로카본-22, 클로로플루오로카본-113, 클로로플루오로카본-114, 클로로플루오로카본-123, 클로로플루오로카본-142c, 클로로플루오로카본-134a, 클로로플루오로카본-227, 클로로플루오로카본-C318, 1,1,1,2-테트라플루오로에탄 등의 클로로플루오로카본계 화합물, 프로판, 이소부탄, n-부탄 등의 탄화수소류, 디에틸에테르 등의 에테르류, 질소가스, 탄산가스 등의 압축가스

등을 예시할 수 있다.

- [0163] 본 발명의 의약의 투여량은, 유효성분의 종류·활성, 병의 중증도(重篤度), 투여 대상이 되는 동물종, 투여 대상의 약물 수용성, 체중, 연령 등에 따라 다르지만, 통상, 성인 1일당 유효성분량으로서 약 0.0001~약 100mg/kg, 예를 들면 약 0.0001~약 10mg/kg, 바람직하게는 약 0.005~약 1mg/kg 일 수 있다.
- [0164] 본 발명은 또, 본 발명의 앵타머 또는 복합체가 고정화된 고상(固相) 담체를 제공한다. 고상 담체로는, 예를 들면, 기관, 수지, 플레이트(예, 멀티 웰 플레이트), 필터, 카트리지, 컬럼, 다공질체를 들 수 있다. 기관은, DNA 칩이나 단백질 칩 등에 사용되고 있는 것 동일 수 있고, 예를 들면, 니켈-PTFE(폴리테트라플루오로에틸렌) 기관이나 유리 기관, 아파타이트 기관, 실리콘 기관, 알루미늄 기관 등이 고, 이들 기관에 폴리머 등의 코팅을 실시한 것을 들 수 있다. 수지로는, 예를 들면, 아가로오스 입자, 실리카 입자, 아크릴아미드와 N,N'-메틸렌비스아크릴아미드의 공중합체, 폴리스티렌 가교 디비닐벤젠 입자, 텍스트란을 에피클로로히드린으로 가교한 입자, 셀룰로오스 파이버, 알틸텍스트란과 N,N'-메틸렌비스아크릴아미드의 가교 폴리머, 단분산계 합성 폴리머, 단분산계 친수성 폴리머, 세파로오스, 토요펠 등을 들 수 있으며, 또, 이들의 수지에 각종 관능기를 결합시킨 수지도 포함된다. 본 발명의 고상 담체는, 예를 들면, IL-17의 정제, 및 IL-17의 검출, 정량에 유용할 수 있다.
- [0165] 본 발명의 앵타머 또는 복합체는, 자체 공지의 방법에 의해 고상 담체에 고정할 수 있다. 예를 들면, 친화성 물질(예, 상술한 것)이나 소정의 관능기를 본 발명의 앵타머 또는 복합체에 도입하고, 이어서 당해 친화성 물질이나 소정의 관능기를 이용하여 고상 담체에 고정화하는 방법을 들 수 있다. 본 발명은 또, 이와 같은 방법을 제공한다. 소정의 관능기는 커플링 반응에 제공하는 것이 가능한 관능기일 수 있고, 예를 들면, 아미노기, 티올기, 히드록실기, 카르복실기를 들 수 있다. 본 발명은 또, 이와 같은 관능기가 도입된 앵타머를 제공한다.
- [0166] 본 발명은 또, IL-17의 정제 및 농축방법을 제공한다. 특히 본 발명은 IL-17을 다른 패밀리 단백질로부터 분리하는 것이 가능하다.
- [0167] 따라서, 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 (a) 본 발명의 앵타머 또는 복합체를 IL-17을 포함하는 샘플과 접촉시켜, 샘플 중의 IL-17과 해당 앵타머 또는 복합체를 결합시키는 공정, 및 (b) 해당 앵타머 또는 복합체에 결합한 IL-17을 샘플로부터 분리하는 공정을 포함하는, IL-17의 정제방법을 제공한다.
- [0168] 본 발명의 정제 및 농축방법은, 본 발명의 고상 담체에 IL-17을 흡착시키고, 흡착한 IL-17을 용출액에 의해 용출시키는 것을 포함할 수 있다. 본 발명의 고상 담체에의 IL-17의 흡착은 자체 공지의 방법에 의해 실시할 수 있다. 예를 들면, IL-17을 함유하는 시료(예, 세균 또는 세포의 배양물 또는 배양상청, 혈액)를 본 발명의 고상 담체 또는 그 함유물에 도입한다. IL-17의 용출은 중성용액 등의 용출액을 이용해 실시할 수 있다. 중성용출액은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면 pH 약 6~약 9, 바람직하게는 약 6.5~ 약 8.5, 보다 바람직하게는 약 7~약 8 일 수 있다. 중성용액은 또, 예를 들면, 칼륨염(예, KCl), 나트륨염(예, NaCl), 마그네슘염(예, MgCl₂), 계면활성제(예, 트윈 20, 트리톤(Triton), NP 40), 글리세린을 포함하는 것일 수 있다. 본 발명의 정제 및 농축방법은 또한 IL-17의 흡착 후, 세정액을 이용하여 고상 담체를 세정하는 것을 포함할 수 있다. 세정액으로는 예를 들면, 요소, 킬레이트제(예, EDTA), 트리스(Tris), 산, 알칼리, 전이RNA(Transfer RNA), DNA, 트윈 20 등의 표면활성제, NaCl 등의 염을 포함하는 것 등을 들 수 있다. 본 발명의 정제 및 농축방법은 또한 고상 담체를 가열 처리하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 공정에 의해, 고상 담체의 재생, 멸균이 가능하다.
- [0169] 본 발명의 앵타머 또는 복합체는, 검출용 프로브, 특히 IL-17의 검출용 프로브로서 이용할 수 있다. 앵타머의 표식방법으로는 특별히 한정되지 않고, 자체 공지의 방법이 적용 가능하다. 이와 같은 방법으로는, 예를 들면 방사성 동위 원소에 의한 표식, 형광 색소나 형광 단백질에 의한 표식 등을 들 수 있다.
- [0170] 본 발명은 또, IL-17의 검출 및 정량방법을 제공한다. 특히 본 발명은 IL-17을 다른 패밀리 단백질과 구별하여 검출 및 정량할 수 있다. 본 발명의 검출 및 정량방법은 본 발명의 앵타머를 이용하여(예, 본 발명의 복합체 및 고상 담체의 사용에 의해) IL-17을 측정하는 것을 포함할 수 있다.
- [0171] 따라서, 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은, (a) 본 발명의 앵타머 또는 복합체를 시험 샘플과 접촉시켜, 시험 샘플 중의 IL-17과 해당 앵타머 또는 복합체를 결합시키는 공정, 및 (b) 해당 앵타머 또는 복합체와 결합한 IL-17을 검출하는 공정을 포함하는, IL-17의 검출방법을 제공한다.
- [0172] IL-17의 검출 및 정량방법은 항체 대신에 본 발명의 앵타머를 이용하는 것 이외에는, 면역학적 방법과 마찬가지로

의 방법에 의해 실시될 수 있다. 따라서, 항체 대신에 본 발명의 앵타머를 이용함으로써, 효소면역측정법(EIA)(예, 직접 경합 ELISA, 간접 경합 ELISA, 샌드위치 ELISA), 방사면역측정법(RIA), 형광면역측정법(FIA), 웨스턴블롯법(예, 웨스턴블롯법에 있어서의 2차 항체 대신으로서의 사용), 면역조직화학적 염색법, 셀 소팅(cell sorting)법 등의 방법과 마찬가지로의 방법에 의해 검출 및 정량을 실시할 수 있다. 이와 같은 방법은, 예를 들면, 생체 또는 생물학적 샘플에 있어서의 IL-17량의 측정이나 IL-17이 관련되는 질환의 진단에 유용할 뿐만 아니라, 항체 대신에 본 발명의 앵타머를 이용함으로써, 인간이나 인간 이외의 동물 유래의 생체 샘플을 이용하여, 혹은 생체 이외의 샘플을 이용하여, IL-17을 검출 또는 정량하는 과학적 목적이나, 실험·연구 목적 등 질환 진단 목적 이외에도 유용할 수 있다.

[0173] 본 명세서 중에서 예로 들어진 특허 및 특허 출원 명세서를 포함하는 모든 간행물에 기재된 내용은, 본 명세서에서의 인용에 의해, 그 전부가 명시된 것과 같은 정도로 본 명세서에 편입되는 것이다.

[0174] 이하에 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명은 하기 실시예 등에 하등 제약되는 것은 아니다.

[0175] **실시예**

[0176] 실시예 1-1: IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 앵타머의 제작 1

[0177] 이하에 기재한 앵타머번호 1~49로 표시되는 앵타머는 자동 합성장치를 이용하여, 포스포로아미디트법에 의해 이하와 같이 합성했다. 고상 합성장치에 있어서, 3' 말단을 수지에 담지시킨 뉴클레오티드를 출발원료로 하고, 합성용 컬럼에 장착 후, 탈보호 용액, 활성화 용액 및 3' 말단에 인접하는 뉴클레오티드의 β-시아노에틸포스포로아미디트, 산화용액 또는 S화 시약, 미반응 뉴클레오티드의 캡핑용액 순으로 반응용액을 합성용 컬럼에 통과시키고, 뉴클레오티드간에 포스포디에스테르 또는 포스포로티오에이트 결합을 형성시켰다. 이하 마찬가지로 하여, 3'→5' 방향으로 1 염기씩 연장 합성했다. 그 후, 고상 담체로부터의 잘라냄을 실시하고, 염기 부분의 보호기 및 인산 부분의 보호기를 이탈시켰다. 그 후, 카트리지 정제에 의해 소정의 앵타머를 얻었다(예를 들면 특개 2011-50381을 참조).

[0178] 이하, 얻어진 앵타머의 각각의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 또한 a, g, c, u는 각각, 염기가 아데닌, 구아닌, 시토신 및 우라실인 RNA를 나타내고, A, G, C, T는 각각, 염기가 아데닌, 구아닌, 시토신 및 티민인 DNA를 나타내며, mc는 염기가 메틸시토신인 RNA를 나타낸다. 뉴클레오티드에 있어서의 괄호는 그 뉴클레오티드의 수식을 나타내고, (M)은 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 O-메틸기로 치환되어 있는 것을, (F)는, 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자로 치환되어 있는 것을 나타낸다. (S)는 뉴클레오티드가 포스포로티오에이트화되어 있는 것을 나타내고, (L)은 LNA 수식되어 있는 것을 나타낸다. 예를 들면, c(F)는, 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자로 치환된 시티딘을 나타내며, a(M)은 리보스의 2' 위치가 O-메틸기로 치환된 아데노신을 나타내고, g(M)은 리보스의 2' 위치가 O-메틸기로 치환된 구아노신을 나타낸다(이하, 마찬가지로 기재한다).

[0179] 또 각 서열의 선두는 5' 말단이며, 종단이 3' 말단이다.

[0180] 앵타머번호 1(서열번호 1):

[0181] g(L)g(L)g(L)u(F)ag(S)c(F)c(F)g(S)gaggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)amc(L)mc(L)mc(L)

[0182] 앵타머번호 2:

[0183] g(M)g(M)g(M)u(F)ag(S)c(F)c(F)Gg(M)aggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)aCCC

[0184] 앵타머번호 3:

[0185] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)gc(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)ACCC

[0186] 앵타머번호 4:

[0187] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

[0188] 앵타머번호 5(서열 번호 2):

[0189] g(M)g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)ACCCC

[0190] 앵타머번호 6:

- [0191] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)ACCC
- [0192] 앵타머번호 7:
- [0193] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)aa(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0194] 앵타머번호 8:
- [0195] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTaa(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0196] 앵타머번호 9:
- [0197] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0198] 앵타머번호 10:
- [0199] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)u(F)ACCC
- [0200] 앵타머번호 11:
- [0201] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0202] 앵타머번호 12:
- [0203] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0204] 앵타머번호 13:
- [0205] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0206] 앵타머번호 14:
- [0207] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(F)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0208] 앵타머번호 15:
- [0209] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(F)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0210] 앵타머번호 16:
- [0211] g(M)g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCCC
- [0212] 앵타머번호 17:
- [0213] g(M)g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCCC
- [0214] 앵타머번호 18:
- [0215] g(M)g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTaa(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCCC
- [0216] 앵타머번호 19:
- [0217] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0218] 앵타머번호 20:
- [0219] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0220] 앵타머번호 21:
- [0221] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- [0222] 앵타머번호 22:
- [0223] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- [0224] 앵타머번호 23:
- [0225] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)TAc(M)c(M)c(M)
- [0226] 앵타머번호 24:

- [0227] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)c(M)g(M)g(M)TAc(M)c(M)c(M)c(M)
- [0228] 애플타머번호 25:
- [0229] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)Au(M)c(M)c(M)g(M)g(M)TAc(M)c(M)c(M)c(M)
- [0230] 애플타머번호 26:
- [0231] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)c(M)
- [0232] 애플타머번호 27:
- [0233] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)Au(M)c(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)c(M)
- [0234] 애플타머번호 28:
- [0235] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)c(M)
- [0236] 애플타머번호 29:
- [0237] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)a(M)u(M)c(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)c(M)
- [0238] 애플타머번호 30:
- [0239] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)Au(M)c(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)c(M)
- [0240] 애플타머번호 31:
- [0241] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)c(M)g(M)g(M)TAc(M)c(M)c(M)c(M)
- [0242] 애플타머번호 32:
- [0243] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)a(M)u(M)c(M)c(M)g(M)g(M)TACCC
- [0244] 애플타머번호 33:
- [0245] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)Au(M)c(M)c(M)g(M)g(M)TACCC
- [0246] 애플타머번호 34:
- [0247] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)AgTa(M)a(M)u(M)c(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)c(M)
- [0248] 애플타머번호 35:
- [0249] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)AgTa(M)Au(M)c(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)c(M)
- [0250] 애플타머번호 36:
- [0251] g(M)g(M)g(M)u(M)AGc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)Au(M)c(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)c(M)
- [0252] 애플타머번호 37:
- [0253] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaAu(M)c(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)c(M)
- [0254] 애플타머번호 38:
- [0255] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)au(M)c(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)c(M)
- [0256] 애플타머번호 39:
- [0257] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)AgTaa(M)u(M)c(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)c(M)
- [0258] 애플타머번호 40:
- [0259] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)AgTa(M)au(M)c(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)c(M)
- [0260] 애플타머번호 41:
- [0261] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)c(M)
- [0262] 애플타머번호 42:

- [0263] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)agg(M)a(M)gTc(F)agTaAu(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- [0264] 앵타머번호 43:
- [0265] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)au(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- [0266] 앵타머번호 44:
- [0267] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)agg(M)a(M)gTc(F)AgTa(M)au(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- [0268] 앵타머번호 45:
- [0269] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)agg(M)a(M)gTc(F)agTaaU(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0270] 앵타머번호 46:
- [0271] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaaU(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0272] 앵타머번호 47:
- [0273] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTaaU(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0274] 앵타머번호 48:
- [0275] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)agg(M)a(M)gTc(F)agTaaU(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0276] 앵타머번호 49:
- [0277] g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaaU(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0278] 앵타머번호 1~49로 표시되는 앵타머가 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는지 여부를 표면 플라즈몬 공명 법에 의해 평가했다.
- [0279] 측정에는 비아코어사 제조의 2000을 이용했다. CM5 센서 칩에 Protein A(21181, PIERCE)를 고정화하고, 그곳에 IgG의 Fc부분을 융합한 제조업 인간 IL-17R-Fc키메라(177-IR, R&D systems)를 약 20RU로 고정화했다. 분석물로서 IL-17(100 또는 150nM)과 앵타머번호 1~49로 표시되는 앵타머(50 또는 100nM)를 혼합하여 15분간 유지한 것을 흘렸다.
- [0280] IL-17과 IL-17 수용체의 결합능의 결과를 아래 표 2에 나타낸다. 표 2에서는 본 발명의 앵타머에 의한 IL-17과 IL-17 수용체의 결합능에의 영향을 IL-17과 IL-17 수용체의 결합량을 100으로 한 경우의 상대값으로서 나타냈다. 또, 선행기술문헌인 국제공개 제 2010/008001호에 기재한 IL-17 앵타머를 제작하고, 본 발명 앵타머와의 비교를 위해 사용했다. 제작한 앵타머의 서열은 이하와 같다.
- [0281] 앵타머번호 50(서열 번호 3):
- [0282] ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aaU(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F).
- [0283] 표 2에 나타내는 수치는, 그 수치가 낮을수록 앵타머가 IL-17과 강하게 결합하는 것을 나타내고 있고, 즉, 당해 앵타머에 의한 IL-17과 IL-17 수용체의 결합 저해활성이 높은 것을 나타내고 있다.

[0284] [표 2-1]

IL-17과 IL-17 수용체의 결합활성

	IL-17과 IL-17 수용체의 결합능(%)
IL-17	100
애타머번호 50	37.12
애타머번호 1	28.63
애타머번호 2	32.02
애타머번호 3	25.26
애타머번호 4	26.78
애타머번호 5	32.31
애타머번호 6	25.31
애타머번호 7	18.37
애타머번호 8	15.35
애타머번호 9	8.94
애타머번호 10	25.23
애타머번호 11	16.75
애타머번호 12	24.38
애타머번호 13	13.75
애타머번호 14	16.50
애타머번호 15	14.22
애타머번호 16	27.95
애타머번호 17	4.21
애타머번호 18	13.62
애타머번호 19	8.46
애타머번호 20	18.53
애타머번호 21	22.75
애타머번호 22	11.58
애타머번호 23	13.44
애타머번호 24	15.23
애타머번호 25	11.73
애타머번호 26	13.60
애타머번호 27	13.35
애타머번호 28	13.24
애타머번호 29	13.30
애타머번호 30	14.08
애타머번호 31	16.18
애타머번호 32	13.16
애타머번호 33	15.95
애타머번호 34	19.52
애타머번호 35	14.96
애타머번호 36	18.59
애타머번호 37	15.53
애타머번호 38	15.09
애타머번호 39	14.76
애타머번호 40	15.49
애타머번호 41	13.19

[0285]

[0286] [표 2-2]

IL-17과 IL-17 수용체의 결합활성 (계속)

	IL-17과 IL-17 수용체의 결합능(%)
애타머번호 42	12.99
애타머번호 43	15.24
애타머번호 44	17.88
애타머번호 45	19.21
애타머번호 46	20.03
애타머번호 47	17.65
애타머번호 48	19.24
애타머번호 49	19.04

[0287]

[0288] 측정 결과, 새롭게 개변 수식한 애타머는 종래 공지의 애타머(애타머번호 50)와 비교하여 모두 결합 저해활성이 상승했다. 높은 저해활성을 갖는 애타머에서는 약 8배나 결합 저해활성이 상승했다.

[0289] 이상으로부터, 본 발명의 애타머는 종래 공지의 애타머와 비교하여 IL-17과 IL-17 수용체의 결합에 대하여 높은 저해활성을 갖는 것이 나타났다.

[0290] 실시예 1-2: IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는 애타머의 제작 2

[0291] 이하에 기재한 애타머번호 52~94로 표시되는 애타머는 자동 합성장치를 이용하여, 실시예 1-1과 동일한 방법에 의해 합성했다.

[0292] 이하, 얻어진 애타머 각각의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 또한 a, g, c, u는 각각, 염기가 아데닌, 구아닌, 시토신 및 우라실인 RNA를 나타내고, A, G, C, U, T는 각각, 염기가 아데닌, 구아닌, 시토신, 우라실 및 티민인 DNA를 나타내며, mc는 염기가 메틸시토신인 RNA를 나타낸다. 뉴클레오티드에 있어서의 괄호는 그 뉴클레오티드의 수식을 나타내고, (M)은 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 0-메틸기로 치환되어 있는 것을, (F)는, 뉴클레오티드가 RNA인 경우에, 그 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자로 치환되어 있는 것을 나타낸다. (S)는 뉴클레오티드가 포스포포티오에이트화되어 있는 것을 나타내고, (L)은 LNA 수식되어 있는 것을 나타낸다. 예를 들면, c(F)는 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 불소 원자로 치환된 시티딘을 나타내고, a(M)은 리보스의 2' 위치가 0-메틸기로 치환된 아데노신을 나타내며, g(M)은 리보스의 2' 위치가 0-메틸기로 치환된 구아노신을 나타낸다(이하, 마찬가지로 기재한다).

[0293] 또 각 서열의 선두는 5' 말단이며, 종단이 3' 말단이다.

[0294] 애타머번호 52:

[0295] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

[0296] 애타머번호 53:

[0297] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)g(S)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

[0298] 애타머번호 54:

[0299] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gUc(F)a(F)gUa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

[0300] 애타머번호 55:

[0301] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTgau(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

[0302] 애타머번호 56:

[0303] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(S)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

[0304] 애타머번호 57:

- [0305] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(M)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0306] 애플타머번호 58:
- [0307] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)g(S)g(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(M)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CC
C
- [0308] 애플타머번호 59:
- [0309] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(M)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)
(M)c(M)
- [0310] 애플타머번호 60:
- [0311] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(M)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c
(M)c(M)c(M)
- [0312] 애플타머번호 61:
- [0313] g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(M)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- [0314] 애플타머번호 62:
- [0315] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)
c(M)
- [0316] 애플타머번호 63:
- [0317] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(S)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c
(M)c(M)c(M)
- [0318] 애플타머번호 64:
- [0319] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c
(M)c(M)c(M)
- [0320] 애플타머번호 65:
- [0321] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)
c(M)
- [0322] 애플타머번호 66:
- [0323] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(S)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c
(M)c(M)c(M)
- [0324] 애플타머번호 67:
- [0325] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c
(M)c(M)c(M)
- [0326] 애플타머번호 68:
- [0327] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)
Ac(M)c(M)c(M)
- [0328] 애플타머번호 69:
- [0329] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c
(M)c(M)c(M)
- [0330] 애플타머번호 70:
- [0331] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)
a(M)c(M)c(M)c(M)

- [0332] 애플타머번호 71:
- [0333] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(M)a(F)g(S)u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0334] 애플타머번호 72:
- [0335] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0336] 애플타머번호 73:
- [0337] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0338] 애플타머번호 74:
- [0339] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)gc(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0340] 애플타머번호 75:
- [0341] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)gc(M)c(M)gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0342] 애플타머번호 76:
- [0343] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)gc(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)Ac(M)c(M)c(M)
- [0344] 애플타머번호 77:
- [0345] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)gc(M)c(M)gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)Ac(M)c(M)c(M)
- [0346] 애플타머번호 78:
- [0347] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)gc(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0348] 애플타머번호 79:
- [0349] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)gc(M)c(M)gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)
- [0350] 애플타머번호 80:
- [0351] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)Ac(M)c(M)c(M)
- [0352] 애플타머번호 81:
- [0353] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0354] 애플타머번호 82:
- [0355] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(S)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0356] 애플타머번호 83:
- [0357] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(M)a(F)g(S)u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)

- [0358] 앵타머번호 84:
- [0359] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0360] 앵타머번호 85:
- [0361] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0362] 앵타머번호 86:
- [0363] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Tg(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0364] 앵타머번호 87:
- [0365] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Tga(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0366] 앵타머번호 88:
- [0367] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(M)a(F)g(S)u(F)ga(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0368] 앵타머번호 89:
- [0369] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Taa(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0370] 앵타머번호 90:
- [0371] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Ta(M)au(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0372] 앵타머번호 91:
- [0373] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Taa(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0374] 앵타머번호 92:
- [0375] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)aa(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0376] 앵타머번호 93:
- [0377] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)a(M)au(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0378] 앵타머번호 94:
- [0379] g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)aa(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)
- [0380] 합성한 앵타머가 IL-17과 IL-17 수용체의 결합을 저해하는지 여부를, 표면 플라즈몬 공명법에 의해 평가했다.
- [0381] 측정에는 GE헬스케어 바이오 사이언스 주식회사 제조의 BiacoreT100을 이용했다. CM5 센서 칩에 Protein A(21181, PIERCE)를 고정화하고, 그것에 IgG의 Fc부분을 융합한 재조합 인간 IL-17R-Fc키메라(177-IR, R&D systems)를 약 750RU로 고정화했다. 분석물로서 IL-17(150nM)과 표 3에 나타내는 각 앵타머(12.5 또는 50nM)를 혼합하여 15분간 유지한 것을 흘렸다.
- [0382] IL-17과 IL-17 수용체의 결합능의 결과를 하기 표 3에 나타낸다. 표 3에서는 본 발명의 앵타머에 의한 IL-17과 IL-17 수용체의 결합능에의 영향을 IL-17과 IL-17 수용체의 결합량을 100으로 한 경우의 상대값으로서 나타냈다. 또한 본 발명의 앵타머와 비교하기 위해, 종래 공지 IL-17에 대한 앵타머(앵타머번호 50)를 사용

했다.

[0383] 표 3에 나타내는 수치는, 그 수치가 낮을수록 앵타머가 IL-17과 강하게 결합하는 것을 나타내고 있고, 즉, 당해 앵타머에 의한 IL-17과 IL-17 수용체의 결합 저해활성이 높은 것을 나타내고 있다.

[0384] [표 3]

IL-17과 IL-17 수용체의 결합활성

	IL-17과 IL-17 수용체의 결합능(%)
IL-17	100
앵타머번호 50	37.12
앵타머번호 52	27.55
앵타머번호 53	22.65
앵타머번호 54	25.15
앵타머번호 55	18.99
앵타머번호 56	26.96
앵타머번호 58	33.72
앵타머번호 59	36.54
앵타머번호 60	31.88
앵타머번호 62	25.92
앵타머번호 63	27.10
앵타머번호 64	29.32
앵타머번호 65	20.29
앵타머번호 66	28.71
앵타머번호 68	37.00
앵타머번호 69	18.44
앵타머번호 70	34.97
앵타머번호 72	26.12
앵타머번호 73	31.96
앵타머번호 75	21.57
앵타머번호 76	24.12
앵타머번호 77	23.95
앵타머번호 78	23.28
앵타머번호 79	28.23
앵타머번호 80	25.26
앵타머번호 81	34.26
앵타머번호 82	5.28
앵타머번호 83	33.53
앵타머번호 84	27.74
앵타머번호 85	27.80
앵타머번호 86	35.71
앵타머번호 87	32.40
앵타머번호 89	35.10
앵타머번호 90	41.23
앵타머번호 91	35.10
앵타머번호 92	31.63
앵타머번호 93	30.62
앵타머번호 94	29.32

[0385]

[0386] 측정 결과, 새롭게 개변 수식한 앵타머는 종래 공지 앵타머(앵타머번호 50)와 비교하여 모두 결합 저해활성이 상승했다. 높은 저해활성을 갖는 앵타머에서는 약 7배나 결합 저해활성이 상승했다.

[0387] 이상으로부터, 본 발명의 앵타머는 종래 공지 앵타머와 비교하여, IL-17과 IL-17 수용체의 결합에 대하여 높은 저해활성을 갖는 것이 나타났다.

[0388] 실시예 2-1: 마우스 섬유아세포주 NIH3T3 세포를 이용한 본 발명의 앵타머의 저해작용 1

[0389] 마우스 섬유아세포주 NIH3T3 세포는 IL-17과 TNF α 의 세포 자극으로, 세포 바깥으로 IL-6을 방출한다. 이 성질

을 이용하여 IL-17 저해작용을 갖는 앵타머의 선별을 실시했다.

[0390] 우선, 인간 IL-17과 실시예 1-1에서 제작한 앵타머를 37℃로 30분간 프리 인큐베이트한 후, 마우스 TNF α (2ng/mL)와 함께 NIH3T3 세포(ATCC, CRL1658)에 첨가했다. 이어서, 24시간 인큐베이트 후, 배양상청을 회수하고, BD Cytometric Bead Array(BD 바이오 사이언스사)에 의해 IL-6 생산량을 측정했다. IL-6 생산량으로부터 각 앵타머의 IL-17 저해작용을 확인했다. 50% 저해 농도(IC₅₀값)를 하기 표 4 및 5에 나타낸다. 또한 본 발명의 앵타머와 비교하기 위해, 종래 공지 IL-17에 대한 앵타머(앵타머번호 50)를 사용했다.

[0391] [표 4]

마우스 NIH3T3 세포주에 있어서의 각종 앵타머의 IL-17 저해작용

	IC ₅₀ (nM)
앵타머번호 50	7.36
앵타머번호 1	1.17
앵타머번호 2	0.68
앵타머번호 3	2.08
앵타머번호 4	2.78
앵타머번호 5	0.13
앵타머번호 6	0.77
앵타머번호 7	0.30
앵타머번호 8	0.49
앵타머번호 9	0.64
앵타머번호 10	0.63
앵타머번호 11	0.34
앵타머번호 12	0.52
앵타머번호 13	0.40
앵타머번호 14	0.50
앵타머번호 15	0.63
앵타머번호 16	0.25
앵타머번호 17	0.30
앵타머번호 18	0.15
앵타머번호 19	2.78
앵타머번호 20	0.37
앵타머번호 21	0.39
앵타머번호 22	1.66
앵타머번호 23	1.34
앵타머번호 24	1.77
앵타머번호 25	1.64

[0392]

[0393] [표 5]

마우스 NIH3T3 세포주에 있어서의 각종 앵타머의 IL-17 저해작용 (계속)

	IC ₅₀ (nM)
앵타머번호 26	0.78
앵타머번호 27	2.45
앵타머번호 28	2.11
앵타머번호 29	2.53
앵타머번호 30	1.49
앵타머번호 31	0.30
앵타머번호 32	4.62
앵타머번호 33	4.31
앵타머번호 34	2.41
앵타머번호 35	2.47
앵타머번호 37	1.64
앵타머번호 38	0.31
앵타머번호 39	3.91
앵타머번호 40	3.75
앵타머번호 41	0.40
앵타머번호 42	0.51
앵타머번호 43	0.49
앵타머번호 44	1.83
앵타머번호 45	0.76
앵타머번호 46	1.13
앵타머번호 47	0.59
앵타머번호 48	0.30
앵타머번호 49	0.65

[0394]

[0395]

측정 결과, 새롭게 개변 수식한 앵타머는 종래 공지 앵타머(앵타머번호 50)와 비교하여 2배에서 50배 정도 활성이 상승했다.

[0396]

이상으로부터, 본 발명의 앵타머는 종래 공지 앵타머와 비교하여, IL-17의 생리 활성을 매우 강하게 저해하는 것이 나타났다.

[0397]

실시예 2-2: 마우스 섬유아세포주 NIH3T3 세포를 이용한 본 발명의 앵타머의 저해작용 2

[0398]

인간 IL-17과 실시예 1-2로 제작한 앵타머를 37℃로 30분간 프리 인큐베이트한 후, 마우스 TNF α(2ng/mL)와 함께 NIH3T3 세포(ATCC, CRL1658)에 첨가했다. 이어서, 24시간 인큐베이트 후, 배양상청을 회수하고, 이하에 기재한 ELISA법에 따라 IL-6 생산량을 측정했다. IL-6 생산량으로부터 각 앵타머의 IL-17 저해작용을 확인했다. 50% 저해 농도(IC₅₀값)를 하기 표 6에 나타낸다. 또한 본 발명의 앵타머와 비교하기 위해, 종래 공지 앵타머 17에 대한 앵타머(앵타머번호 50)를 사용했다.

[0399]

앵타머의 IL-17 저해작용을 검증하는 ELISA법: ELISA용 마이크로티터 플레이트(microtiter plate)를, PBS로 희석한 래트 항마우스 IL-6 항체(BD 바이오 사이언스사, 2μg/mL; 100 μL/웰)를 이용하여 피막하고, 4℃로 하룻밤 인큐베이트했다. 다음날, 마이크로티터 플레이트를 PBS/0.05% 트윈 20으로 3회 세정한 후에, PBS/1% BSA(200 μL/웰)를 이용하여 실온으로 2시간 블로킹했다. 이어서, 플레이트를 PBS/0.05% 트윈 20으로 3회 세정했다. PBS/1% BSA/0.05% 트윈 20을 이용하여 단계 희석한 리컴비넌트 마우스(recombinant mouse) IL-6(BD 바이오 사이언스사; 100 μL/웰) 및 배양상청(100 μL/웰)을 플레이트에 첨가했다. 실온으로 2시간 인큐베이션한 후, 플레이트를 PBS/0.05% 트윈 20으로 3회 세정했다. 이어서, 플레이트에 비오틴 컨주게이트 래트 항마우스(biotin conjugated rat anti-mouse) IL-6 항체(BD 바이오 사이언스사)를 최종 희석 1/500, 100 μL/웰로 첨가하고, 실온에서 1시간 반응시켰다. PBS/0.05% 트윈 20으로 3회 세정 후, 알칼리 포스파타아제 컨주게이트 스트렙트아비딘을 최종 희석 1/1000, 100 μL/웰로 첨가했다. 실온으로 30분 후, 플레이트를 다시 PBS/0.05% 트윈 20으로 4회 세정하고, 기질(1-Step PNPP; Thermo Fisher Scientific Inc; 100 μL/웰)을 첨가했다. 15분 후에 수산화나트륨 수용액(2N: 50 μL/웰)을 첨가하여 반응을 정지하고, 플레이트를 마이크로티터 리더(Bio-Rad)로 405nm의

필터를 이용하여 관독했다.

[0400] [표 6]

마우스 NIH3T3 세포주에 있어서의 각종 앵타머의 IL-17 저해작용

	IC ₅₀ (nM)
앵타머번호 50	8.63
앵타머번호 52	1.11
앵타머번호 53	1.67
앵타머번호 55	0.11
앵타머번호 56	0.52
앵타머번호 57	2.36
앵타머번호 59	1.19
앵타머번호 60	2.35
앵타머번호 61	3.41
앵타머번호 62	0.69
앵타머번호 63	0.81
앵타머번호 64	4.64
앵타머번호 65	0.67
앵타머번호 66	1.21
앵타머번호 67	5.95
앵타머번호 68	2.40
앵타머번호 69	1.73
앵타머번호 70	3.28
앵타머번호 71	5.54
앵타머번호 72	2.24
앵타머번호 73	3.46
앵타머번호 74	1.06
앵타머번호 75	1.33
앵타머번호 76	1.70
앵타머번호 77	4.66
앵타머번호 78	1.36
앵타머번호 79	2.25
앵타머번호 80	1.52
앵타머번호 81	2.26
앵타머번호 82	0.48
앵타머번호 84	1.04
앵타머번호 85	0.96
앵타머번호 86	5.16
앵타머번호 87	3.23
앵타머번호 88	2.88
앵타머번호 89	6.21
앵타머번호 90	1.08
앵타머번호 91	3.86
앵타머번호 92	2.60
앵타머번호 93	0.22
앵타머번호 94	0.29

[0401]

[0402]

측정 결과, 새롭게 개변 수식한 앵타머는 종래 공지 앵타머(앵타머번호 50)와 비교하여 모두 활성이 상승했다. 높은 저해활성을 갖는 앵타머에서는 80배 정도 활성이 상승했다.

[0403]

이상으로부터, 본 발명의 앵타머는 종래 공지 앵타머와 비교하여 IL-17의 생리 활성을 매우 강하게 저해하는 것이 나타났다.

[0404]

실시예 3: 결합 조직 유래 세포에 대한 본 발명의 앵타머의 IL-17 저해작용

[0405]

정상 인간 피부 섬유아세포(NHDF)는 IL-17에 의한 세포 자극으로 세포 바깥으로 IL-6을 방출한다. 그래서, 결합 조직 유래 세포의 예로서 NHDF를 이용하여 Arthritis Rheum. 63, 455-466(2011)에 기재한 방법에 따라 각 앵타머의 IL-17 저해작용을 확인했다.

[0406] 우선, 48 웰 마이크로 플레이트에 NHDF(론자 재팬 주식회사)를 과중하고, 24시간 인큐베이트했다. 이어서, 인간 IL-17(1 또는 2ng/mL)과, 후술의 실시예 5에 기재한 방법에 의해 PEG 수식된 앵타머(5 또는 10ng/mL)를 37℃로 60분간 프리 인큐베이트한 후, NHDF에 첨가했다. 또한 24시간 인큐베이트 후, 배양상청을 회수하고, 효소면역정량(ELISA)법(Endogen Human IL-6 ELISA Kit: Thermo scientific)에 의해 IL-6 생산량을 측정했다. IL-6 생산량으로부터 IL-17 저해능을 산출한 결과를, 종래 공지 IL-17에 대한 앵타머(앵타머번호 50)에 의한 IL-17 저해능을 1로 한 경우의 상대비로서 표 7에 나타낸다.

[0407] [표 7]

정상 인간 피부 섬유아세포에 있어서의 각종 앵타머의 IL-17 저해작용

	IL-17 저해능
앵타머번호 50	1. 0 0
앵타머번호 1	1. 1 9
앵타머번호 3	1. 1 3
앵타머번호 4	1. 2 1
앵타머번호 5	1. 1 7
앵타머번호 7	1. 3 7
앵타머번호 8	1. 3 8
앵타머번호 9	1. 3 3
앵타머번호 10	1. 3 0
앵타머번호 11	1. 3 7
앵타머번호 12	1. 3 6
앵타머번호 13	1. 3 2
앵타머번호 14	1. 1 2
앵타머번호 16	1. 3 2
앵타머번호 17	1. 3 4
앵타머번호 18	1. 3 4
앵타머번호 19	1. 2 8
앵타머번호 20	1. 3 3
앵타머번호 21	1. 7 3
앵타머번호 22	1. 6 6
앵타머번호 23	1. 8 2
앵타머번호 24	1. 7 0
앵타머번호 25	1. 6 2
앵타머번호 26	1. 6 7
앵타머번호 27	1. 7 8
앵타머번호 28	1. 7 8
앵타머번호 29	1. 3 9
앵타머번호 30	1. 4 6
앵타머번호 31	1. 8 0
앵타머번호 32	1. 2 5
앵타머번호 33	1. 3 0
앵타머번호 34	1. 1 4
앵타머번호 37	1. 8 7
앵타머번호 38	1. 8 4
앵타머번호 39	1. 2 9
앵타머번호 40	1. 3 4
앵타머번호 41	1. 5 3
앵타머번호 42	1. 5 7
앵타머번호 43	1. 4 0
앵타머번호 45	1. 7 9
앵타머번호 46	1. 8 8
앵타머번호 47	1. 9 1
앵타머번호 48	1. 7 8
앵타머번호 49	1. 7 2

[0408]

[0409] 측정 결과, 새롭게 개변 수식한 앵타머는 종래 공지 IL-17에 대한 앵타머(앵타머번호 50)와 비교하여 IL-17 저해능이 상승했다.

[0410] 이상으로부터, 본 발명의 앵타머는 종래 공지 IL-17에 대한 앵타머와 비교하여 결합 조직 유래 세포에 대하여 IL-17의 생리활성을 매우 강하게 저해하는 것이 나타났다.

[0411] 실시예 4: 상피조직 유래 세포에 대한 본 발명의 앵타머의 IL-17 저해작용

[0412] 정상 인간 표피 각화 세포(NHEK)는 IL-17과 TNF α 의 세포 자극으로, 세포 바깥으로 IL-6, IL-8, CCL20을, 또, 정상 인간 신장근위요세관 상피세포(HRPTEC)는 IL-17의 세포 자극으로 IL-6, IL-8, MCP-1을 방출한다. 그래서, 상피조직의 예로서 NHEK 및 HRPTEC를 이용하여 본 발명의 앵타머의 IL-17 저해작용을 확인했다.

[0413] 우선, 96 웰 마이크로 플레이트에 NHEK(구라보사(KURABO INDUSTRIES LTD.)) 또는 HRPTEC(구라보사)를 파종하고, 24시간 인큐베이트했다. 다음으로, 인간 IL-17(100ng/mL)과, 실시예 1-1에서 제작한 앵타머를 37°C로 30분간 프리 인큐베이트한 후, 인간 TNF α (10ng/mL)와 함께 NHEK에 첨가했다. 또, 마찬가지로 인간 IL-17(100ng/mL)과 실시예 1-1에서 제작한 앵타머를 37°C로 30분간 프리 인큐베이트한 후, HRPTEC에 첨가했다. 또한 24시간 및 48시간 배양한 후에 배양상청을 회수하고, CCL20 및 IL-6, IL-8, MCP-1을 ELISA(Quantikine Human CCL20/MIP-3 ELISA, R&D systems) 혹은 BD Cytmetric Bead Array로 측정했다.

[0414] 이하에 NHEK에 있어서의 각종 앵타머의 IL-17 저해작용을 나타낸다. 또한 본 발명의 앵타머와의 비교를 위해, 종래 공지 IL-17에 대한 앵타머(앵타머번호 50)를 사용했다.

[0415] [표 8]

IL-6 생산 억제율

앵타머 첨가량	IL-6 생산 억제율 (%)	
	300 nM	30 nM
앵타머번호 50	13.9	0.0
앵타머번호 8	—	24.9
앵타머번호 28	—	14.4
앵타머번호 41	—	29.8
앵타머번호 45	—	24.1
앵타머번호 47	—	20.0
앵타머번호 48	—	33.4

— : 실시하지 않음

[0416]

[0417] [표 9]

IL-8 생산 억제율

앵타머 첨가량	IL-8 생산 억제율 (%)	
	300 nM	30 nM
앵타머번호 50	45.6	0.0
앵타머번호 8	—	58.0
앵타머번호 28	—	22.3
앵타머번호 37	—	18.9
앵타머번호 38	—	25.8
앵타머번호 41	—	47.2
앵타머번호 45	—	55.0
앵타머번호 47	—	50.8
앵타머번호 48	—	49.5

— : 실시하지 않음

[0418]

[0419] [표 10]

CCL20 생산 억제율

애타머 첨가량	CCL20 생산 억제율 (%)	
	300 nM	30 nM
애타머번호 50	1.0	0.0
애타머번호 8	—	35.2
애타머번호 28	—	28.7
애타머번호 37	—	12.1
애타머번호 38	—	12.4
애타머번호 41	—	79.4
애타머번호 45	—	28.9
애타머번호 47	—	34.1
애타머번호 48	—	71.2

— : 실시하지 않음

[0420]

[0421] 이하에 HRPTEC에 있어서의 각종 애타머의 IL-17 저해작용을 나타낸다. 또한 본 발명의 애타머와의 비교를 위해, 종래 공지의 IL-17에 대한 애타머(애타머번호 50)를 사용했다.

[0422] [표 11]

IL-6 생산 억제율

애타머 첨가량	IL-6 생산 억제율 (%)	
	300 nM	30 nM
애타머번호 50	47.4	17.5
애타머번호 8	—	53.5
애타머번호 25	—	33.1
애타머번호 28	—	42.8
애타머번호 37	—	30.7
애타머번호 38	—	42.7
애타머번호 41	—	58.9
애타머번호 45	—	48.2
애타머번호 47	—	47.1
애타머번호 48	—	53.8

— : 실시하지 않음

[0423]

[0424] [표 12]

IL-8 생산 억제율

애타머 첨가량	IL-8 생산 억제율 (%)	
	300 nM	30 nM
애타머번호 50	63.6	40.3
애타머번호 8	—	73.1
애타머번호 25	—	56.5
애타머번호 28	—	60.8
애타머번호 37	—	55.4
애타머번호 38	—	64.3
애타머번호 41	—	79.7
애타머번호 45	—	70.6
애타머번호 47	—	71.7
애타머번호 48	—	72.7

— : 실시하지 않음

[0425]

[0426] [표 13]

MCP1 생산 억제율

애타머 첨가량	MCP1 생산 억제율 (%)	
	300 nM	30 nM
애타머번호 50	67.9	36.5
애타머번호 8	—	69.6
애타머번호 25	—	53.2
애타머번호 28	—	62.7
애타머번호 37	—	56.9
애타머번호 38	—	64.8
애타머번호 41	—	74.1
애타머번호 45	—	63.8
애타머번호 47	—	69.8
애타머번호 48	—	70.6

— : 실시하지 않음

[0427]

[0428] 측정 결과, 새롭게 개변 수식한 애타머는 종래 공지 애타머(애타머번호 50)보다 IL-17로 유도되는 사이토카인(IL-6, IL-8)이나 케모카인(CCL20, MCP1)의 생산을 강하게 억제했다.

[0429] 이상으로부터, 본 발명의 애타머는 종래 공지 애타머와 비교하여 상피조직의 세포에 대하여 IL-17의 생리 활성을 매우 강하게 저해하는 것이 나타났다.

[0430] 실시예 5: 혈청 중 안정성 시험 I

[0431] 각 애타머의 인간 혈청 중에 있어서의 안정성을 시험관 내에 의해 평가했다.

[0432] 실시예 1-1에서 제작한 애타머의 5' 말단에 링커(ssH amino linker 또는 C6 amino linker)를 통하여 분자량이 40 또는 80kDa의 PEG(SUNBRIGHT GL2-400GS2 니혼유시사 제조, SUNBRIGHT GL2-400TS 니혼 유시사 제조, SUNBRIGHT GL2-800GS2 니혼 유시사 제조, SUNBRIGHT GL4-800GS2 니혼 유시사 제조 또는 Y-NHS-40K: Y-shape Jenkem사 제조)를 부가하고, 3' 말단에 idT(인버티드 dT)를 부가한 애타머의 개변 수식체를 각각 제작했다(제작 방법에 대해서는, 예를 들면, 특허 제 3626503호 참조).

[0433] 인간 혈청(36 μ L)에, 실시예 1-1에서 제작한 앵타머 또는 상기 PEG 수식된 앵타머(100 μ M 2 μ L)를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C로 정지(靜置)하면서, 0시간, 24시간, 48시간, 96시간 경과시에 각각 4.5 μ L씩 샘플링하여 -80 $^{\circ}$ C로 보존했다. 그 후, 해동한 각 샘플에 프로테아제K(6mg/mL)를 0.5 μ L씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C로 10분간 정지한 후, 추가로 반응 정지액(8M 요소, 10mM EDTA: 에틸렌디아민4초산, 0.05% BPB: 브로모페놀 블루)를 25.5 μ L 첨가한 후, 95 $^{\circ}$ C로 10분간 열처리를 실시했다. 계속해서, 각 샘플을 8M 요소 존재하에서 아크릴아미드 겔 전기영동을 실시함으로써, 샘플 중에 함유되는 앵타머의 분리를 실시했다. 이어서, 겔을 SYBR Green II(다카라 바이오사)로 30분간 염색한 후, Storm840 Phosphorimager(GE 헬스케어 재팬사)를 이용하여 RNA의 형광을 검출했다. 얻어진 상에 의해, 잔존 앵타머에 해당하는 밴드를 정량하고, 반감기를 산출함으로써 각 검체의 안정성을 평가했다. 각 검체의 반감기를 하기 표 14에 나타낸다. 표 14에서는, 상기 종래 공지의 IL-17에 대한 앵타머(앵타머번호 50)에 대하여, 국제공개 제 2010/008001호에 기재한 다른 IL-17 앵타머를 제작하고, 본 발명의 앵타머와의 비교를 위해 사용했다. 제작한 앵타머의 서열은 이하와 같다.

[0434] 앵타머번호 51(서열 번호 4):

[0435] GGGGu(F)agc(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)aCCCC).

[0436] [표 14]

인간 혈청 중에 있어서의 앵타머의 반감기

	PEG 있음 시간(hr)	PEG 없음 시간(hr)
앵타머번호 50	9.78	8.22
앵타머번호 51	9.59	6.17
앵타머번호 8	57.28	30.14
앵타머번호 25	19.92	14.91
앵타머번호 28	25.30	16.86
앵타머번호 37	22.50	13.03
앵타머번호 38	23.74	11.73
앵타머번호 41	38.72	17.33
앵타머번호 45	52.12	20.09
앵타머번호 47	37.27	26.87
앵타머번호 48	30.27	26.06

[0437]

[0438] 측정 결과, 새롭게 개변 수식한 앵타머는 종래 공지의 앵타머(앵타머번호 50 및 51)와 비교하여 모두 혈청 중의 반감기가 약 2~5배 연장되었다. 또한, PEG 수식시킴에 따른 반감기의 연장은 새롭게 개변 수식한 앵타머쪽이 현저했다.

[0439] 이상으로부터, 본 발명의 앵타머는 종래 공지의 앵타머와 비교하여 혈청 중의 안정성이 의미 있게 향상되었다.

[0440] 실시예 6: 혈청 중 안정성 시험 II

[0441] 마우스 혈청, 인간 혈청 혹은 인산 완충액(33 μ L)에, 실시예 1-1 및 1-2에서 제작한 앵타머(100 μ M 2.5 μ L)를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C로 정지하며, 24시간 경과시에 4 μ L를 샘플링하여 반응 정지액(8M 요소, 10mM EDTA: 에틸렌디아민4초산, 0.05% BPB: 브로모페놀 블루) 24 μ L에 첨가했다. -70 $^{\circ}$ C로 보존한 후, 각 샘플을 8M 요소 존재 하에서 아크릴아미드 겔 전기영동을 실시함으로써, 샘플 중에 함유되는 앵타머의 분리를 실시했다. 이어서, 겔을 SYBR Green II(다카라 바이오사)로 30분간 염색한 후, MOLECULAR IMAGER FX (BIO-RAD사)를 이용하여 RNA의 형광을 검출했다. 얻어진 상에 의해, 잔존 앵타머에 해당하는 밴드를 후지필름사 제조 Science Lab 2005 Multi Gauge Ver3.0을 이용하여 정량하고, 인산 완충액으로 얻어진 결과를 100%로 하여 각 검체의 혈청 중에서의 잔존량을 측정했다.

[0442]

[표 15]

	마우스 혈청 중 잔존량(%) 24시간 후
애타머번호 50	7.3
애타머번호 51	5.5
애타머번호 8	17.1
애타머번호 48	17.3
애타머번호 56	17.0
애타머번호 57	14.6
애타머번호 58	28.4
애타머번호 59	59.4
애타머번호 60	43.4
애타머번호 61	22.3
애타머번호 62	81.5
애타머번호 63	49.5
애타머번호 64	94.7
애타머번호 65	48.6
애타머번호 66	49.1
애타머번호 67	87.0
애타머번호 68	63.9
애타머번호 69	76.8
애타머번호 70	89.0
애타머번호 71	83.7
애타머번호 72	32.3
애타머번호 73	65.3
애타머번호 74	33.9
애타머번호 75	44.4
애타머번호 76	66.6
애타머번호 77	50.8
애타머번호 78	36.6
애타머번호 79	26.8
애타머번호 80	66.2
애타머번호 81	86.8
애타머번호 82	67.7
애타머번호 83	76.9
애타머번호 84	82.9
애타머번호 85	86.1
애타머번호 86	79.9
애타머번호 87	81.1
애타머번호 88	84.2
애타머번호 89	92.4
애타머번호 90	95.4
애타머번호 91	78.6
애타머번호 92	79.9
애타머번호 93	66.8
애타머번호 94	64.4

[0443]

[0444] [표 16]

	인간 혈청 중 잔존량(%) 24시간 후
애타머번호 50	24.9
애타머번호 51	29.0
애타머번호 8	76.6
애타머번호 48	57.7
애타머번호 56	48.4
애타머번호 58	37.2
애타머번호 59	57.1
애타머번호 60	48.4
애타머번호 61	52.1
애타머번호 62	59.6
애타머번호 63	57.8
애타머번호 64	90.4
애타머번호 65	68.2
애타머번호 66	57.9
애타머번호 67	107.9
애타머번호 68	90.1
애타머번호 69	36.1
애타머번호 71	79.7
애타머번호 73	91.4
애타머번호 76	31.7
애타머번호 80	52.7
애타머번호 81	98.9
애타머번호 82	51.1
애타머번호 83	81.3
애타머번호 84	89.1
애타머번호 85	80.8
애타머번호 86	94.8
애타머번호 87	98.5
애타머번호 88	73.3
애타머번호 89	99.0
애타머번호 90	106.8
애타머번호 91	94.8
애타머번호 92	92.9
애타머번호 93	90.6
애타머번호 94	101.1

[0445]

[0446] 측정 결과, 새롭게 개변 수식한 애타머는 종래 공지 애타머(애타머번호 50 및 51)와 비교하여 모두 24시간 후의 혈청 중의 잔존량은 증가했다. 가장 안정성이 높은 애타머에서는 약 15배, 24시간 후의 혈청 중의 잔존량이 증가했다.

[0447] 이상으로부터, 본 발명의 애타머는 종래 공지 애타머와 비교하여 혈청 중의 안정성이 의미있게 향상되었다.

[0448] 실시예 7: 마우스 약물 동태 시험

[0449] 애타머를 1mg/mL로 생리식염수에 용해하고, 수컷 C57BL/6 마우스(8주령, 찰스·리버사)에 1mg/kg로 정맥 내 투여했다. 5, 15, 30분 후, 1, 2, 4, 6, 8, 24시간 후, 혹은 추가로 48, 72, 96시간 후에 각각 혈액을 채취했다. 혈장으로 분리하고 -70°C로 보존한 후, Judith M. Healy 등(Pharmaceutical Research, December 2004, Volume 21, Issue 12, pp 2234-2246)의 방법에 따라, ELOSA법(하이브리다이제이션법(hybridization method))을 이용하여 본 발명의 애타머에 대해 혈장 중의 잔존 핵산 농도를 측정했다.

[0450] [표 17]

마우스 혈중 반감기

	$t_{1/2}$ (h r)
애타머번호 50	1. 7 9
애타머번호 51	0. 8 5
애타머번호 8	6. 3 8
애타머번호 48	4. 2 9
애타머번호 9	3. 5 0
애타머번호 57	3. 1 2
애타머번호 58	4. 2 4
애타머번호 64	9. 2 6

[0451]

[0452] 측정 결과, 새롭게 개변 수식한 애타머는 종래 공지의 애타머(애타머번호 50 및 51)와 비교하여 반감기가 모두 2~5배 정도 증가했다.

[0453] 이상으로부터, 본 발명의 애타머는 종래 공지의 애타머와 비교하여 혈중에 있어서의 안정성이 의미있게 향상되었다.

[0454] 실시예 8: 마우스 공기낭 염증 모델에 있어서의 본 발명의 애타머의 IL-17 저해작용

[0455] 개변 수식한 애타머가 IL-17의 생리 활성을 생체 내에서도 저해할 수 있는지, Biochemical Pharmacology 77, 878-887 (2009)을 참고로 마우스 공기낭 염증 모델로 확인했다.

[0456] 마우스 공기낭 염증 모델에는 수컷 C57BL/6J(7주령, 찰스·리버사) 마우스를 이용했다(n=4 또는 5). 우선 등 부분의 면도를 실시하고, 그 다음날 및 4일 후에 등 부분 피하에 공기를 2.5mL 주입했다. 2회째의 공기 주입으로부터 3일 후에, 실시예 5에 기재한 방법에 의해 PEG 수식된 본 발명의 애타머를 복강 내 투여하고, 1시간 후에 IL-17(0.5mg)을 포함하는 2% 카르보메틸셀룰로오스 수용액을 공기낭 내에 주입하고 IL-6 생산을 유도했다. IL-17을 주입하고 나서 24시간 후에 공기낭 내의 삼출액을 회수하고, 삼출액 중의 IL-6량을 ELISA로 측정했다. IL-6 생산 억제율(%)을 산출한 결과를 하기 표 18 및 19에 나타낸다. 또한 표 18 및 19에서는 본 발명의 애타머와의 비교를 위해, 종래 공지의 IL-17에 대한 애타머(애타머번호 50 및 51)를 사용했다.

[0457] [표 18]

각종 애타머 10mg/kg 투여시의 IL-6 생산 억제작용

10mg/kg 투여	IL-6 생산 억제율 (%)
애타머번호 50	50. 2 0
애타머번호 51	42. 8 6
애타머번호 8	88. 1 6

[0458]

[0459] [표 19]

각종 앵타머 1mg/kg 투여시의 IL-6 생산 저해작용

1 m g / k g 투여	I L - 6 생산 억제율 (%)
앵타머번호 50	17.48
앵타머번호 51	22.74
앵타머번호 8	70.05
앵타머번호 9	42.77
앵타머번호 16	49.20
앵타머번호 21	36.20
앵타머번호 22	40.98
앵타머번호 23	47.33
앵타머번호 24	32.45
앵타머번호 25	41.94
앵타머번호 26	56.05
앵타머번호 27	52.97
앵타머번호 28	33.29
앵타머번호 37	36.68
앵타머번호 38	45.28
앵타머번호 45	81.74
앵타머번호 46	72.84
앵타머번호 47	63.03
앵타머번호 48	67.50
앵타머번호 49	32.21

[0460]

[0461]

측정 결과, 새롭게 개변 수식한 앵타머는 동일 농도 투여에서의 종래 공지 앵타머(앵타머번호 50 및 51)와 비교하여, 모두 약 2배에서 5배에 걸쳐 IL-6 생산 억제율이 향상하고 있는 것이 확인되었다. 또한, 종래 공지 앵타머(앵타머번호 50 및 51)의 투여 농도를 10배로 해도, 개변 수식한 앵타머의 IL-6 생산 억제율쪽이 모두 상회하고 있어, 본 발명의 앵타머의 IL-17 저해활성이 생체 내에서도 현저하게 상승하고 있는 것이 확인되었다.

[0462]

실시예 9-1: 마우스 IL-23 유도 건선 모델에 대한 염증 억제효과 1

[0463]

Heather L. Rizzo 등의 방법(J Immunol. 186, 1495-1502(2011))에 따라, 본 발명의 앵타머의 IL-23 유도 건선 모델에 대한 억제작용을 조사했다.

[0464]

즉, 수컷 C57BL/6 마우스(7주령, 찰스·리버사)의 왼쪽 컷바퀴에 0.1% 소혈청알부민을 포함하는 PBS(20 μL)만을, 오른쪽 컷바퀴에는 마우스 IL-23(eBioscience사, 1 μg/20 μL)을 각각 1일 1회, 4일간 연일 피내 투여했다. 그 후, 실시예 5에 기재한 방법에 의해 PEG 수식된 본 발명의 앵타머(앵타머번호 8)(5mg/kg)를 1일 1회, 연일 복강내 투여했다. 또한 포지티브 컨트롤로서, 항IL-17 항체(eBioscience사, 100 μg/head)를 1일 1회, 1일 간격으로 복강내 투여하고, 네거티브 컨트롤로서 생리식염수를 10mL/kg로 1일 1회, 연일 복강내 투여했다. 마우스 IL-23의 최종 투여로부터 24시간 후에 다이얼 두께 측정기(Dial Thickness Gauge)(G-1A, PEACOCK사)로 양 컷바퀴의 두께를 측정하고, 본 발명의 앵타머의 건선양 피부염에 대한 약효를 평가했다.

[0465]

생리식염수를 투여한 네거티브 컨트롤군과 비교하여 PEG 수식된 본 발명의 앵타머(앵타머번호 8) 투여군의 컷바퀴 두께는 의미 있게 감소하고 있었다(도 2A). 포지티브 컨트롤로서 사용한 항IL-17 항체 투여군에서는 금회 이용한 투여량으로는 현저한 효과를 확인할 수 없었다. 또한 도면 중의 각 값은 평균값±표준오차(n=4 또는 5)를 나타내고, 통계학적 유의차는 일원배치 분산분석법 및 던넛법을 이용하여 해석했다(*: P<0.05).

[0466]

이상의 결과는, IL-17에 대한 본 발명의 앵타머가 건선을 비롯한 면역성 피부 질환의 치료약으로서 이용할 수 있는 것을 강하게 시사한다.

[0467]

실시예 9-2: 마우스 IL-23 유도 건선 모델에 대한 염증 억제효과 2

[0468]

Heather L. Rizzo 등의 방법(J Immunol. 186, 1495-1502(2011))에 따라, 본 발명의 앵타머의 IL-23 유도 건선

모델에 대한 억제작용을 조사했다.

- [0469] 즉, 수컷 C57BL/6 마우스(7주령, 찰스·리버사)의 왼쪽 귓바퀴에 0.1% 소혈청알부민을 포함하는 PBS(20 μ L)를, 오른쪽 귓바퀴에는 마우스 IL-23(eBioscience사, 1 μ g/20 μ L)을 각각 1일 1회, 4일간 연일 피내 투여했다. 그 후, 실시예 5에 기재한 방법에 의해 PEG 수식된 본 발명의 앵타머(앵타머번호 48)(10mg/kg) 및 마찬가지로 PEG 수식된 종래 공지의 앵타머(앵타머번호 51)(10mg/kg)를 1일 1회, 피내 투여하는 전날부터 5일간 연일 복강내 투여했다. 또한 포지티브 컨트롤로서 항IL-17 항체(eBioscience사, 100 μ g/head)를 1일 1회, 피내 투여하는 당일부터 1일 간격으로 복강내 투여하고, 네거티브 컨트롤로서 생리식염수를 10mL/kg로 1일 1회, 피내 투여하는 전날부터 5일간 연일 복강내 투여했다. 마우스 IL-23의 최종 투여로부터 24시간 후에 다이얼 두께 측정기(G-1A, PEACOCK사)로 양 귓바퀴의 두께를 측정하고, 본 발명의 앵타머의 건선양 피부염에 대한 약효를 평가했다.
- [0470] 생리식염수를 투여한 네거티브 컨트롤군과 비교하여 PEG 수식된 본 발명의 앵타머(앵타머번호 48) 투여군 및 항 IL-17 항체 투여군의 귓바퀴 두께는 의미 있게 감소하고 있었지만, PEG 수식된 종래 공지의 앵타머(앵타머번호 51) 투여군의 귓바퀴 두께에 의미 있는 차이는 보이지 않았다(도 2B). 또한 도면 중의 각 값은 평균값 \pm 표준오차(n=5)를 나타내고, 통계학적 유의차는 일원배치 분산분석법 및 던넛법을 이용하여 해석했다(*: P<0.05, **: P<0.01).
- [0471] 이상의 결과는, IL-17에 대한 본 발명의 앵타머가 건선을 비롯한 면역성 피부 질환의 치료약으로서 이용할 수 있는 것을 강하게 시사한다.
- [0472] 실시예 10: 마우스 글루코스-6-인산 이소메라제 유도 관절염 모델에 대한 염증 억제효과
- [0473] A Ishiguro 등의 방법(Arthritis Rheum. 63, 455-466(2011))에 따라, 본 발명의 앵타머의 글루코스-6-인산 이소메라제(GPI) 유도 관절염 모델에 대한 억제작용을 조사했다.
- [0474] 즉, 수컷 DBA/1 마우스(8주령, 찰스·리버사)의 미근부(尾根部)에 완전 애주번트(Difco)로 유향한 마우스 GPI(300 μ g/head)를 피내 투여하는 동시에, 실시예 5에 기재한 방법에 의해 PEG 수식된 본 발명의 앵타머(앵타머번호 8)(5mg/kg)의 투여를 개시했다. 앵타머는 1일 1회, 격일로 복강내에 투여되었다. 또한 컨트롤로서 생리식염수를 10mL/kg로 1일 1회, 격일로 복강내에 투여했다. 또, 매일 동물을 관찰하여 각 다리의 염증 정도를 0(무증상)에서 2(다리 전체의 발적과 최대 종창)까지의 3단계로 스코어화하고, 본 발명의 앵타머의 관절염에 대한 약효를 평가했다.
- [0475] 생리식염수를 투여한 컨트롤군과 비교하여 PEG 수식된 본 발명의 앵타머(앵타머번호 8) 투여군의 관절염 스코어는 의미 있게 감소하고 있었다(면역 후 11일째 및 12일째, 도 3). 또한 도면 중의 각 값은 평균값 \pm 표준오차(n=10)를 나타내고, 통계학적 유의차는 윌콕슨-맨-휘트니법을 이용하여 해석했다(*: P<0.05, **: P<0.01).
- [0476] 이상의 결과는, IL-17에 대한 본 발명의 앵타머가 류마티스 관절염을 비롯한 자기면역성 관절염의 치료약으로서 이용할 수 있는 것을 강하게 시사한다.
- [0477] 실시예 11-1: 마우스 콜라겐 유도 관절염 모델에 대한 염증 억제효과 1
- [0478] S Toyama 등의 방법(Arthritis Res Ther 12, R92(2010))에 따라, 본 발명의 앵타머의 콜라겐 유도 관절염 모델에 대한 억제작용을 조사했다.
- [0479] 즉, 수컷 DBA/1 마우스(8주령, 찰스·리버사)의 미근부에 완전 애주번트(Chondrex사)로 유향한 소II형 콜라겐(200 μ g/head, 콜라겐 기술 연수회)을 피내 투여했다(실험 제 1 일째). 실험 제 22 일째에 불완전 애주번트로 유향한 소II형 콜라겐으로 추가 면역하는 동시에, 실시예 5에 기재한 방법에 의해 PEG 수식한 본 발명의 앵타머(앵타머번호 8)(5mg/kg)를 1일 1회, 16일간 연일 복강내 투여했다. 또한 컨트롤로서 생리식염수를 10mL/kg로 1일 1회, 연일 복강내 투여했다. 매일 동물을 관찰하여 각 다리의 염증 정도를 0(무증상)에서 4(다리 전체의 발적과 최대 종창)까지의 5단계로 스코어화하고, 본 발명의 앵타머의 관절염에 대한 약효를 평가했다.
- [0480] 생리식염수를 투여한 컨트롤군과 비교하여 PEG 수식된 본 발명의 앵타머(앵타머번호 8) 투여군의 관절염 스코어는 의미 있게 감소하고 있었다(도 4A). 또한 도면 중의 각 값은 평균값 \pm 표준오차(n=9 또는 10)를 나타낸다. 통계학적 유의차는 윌콕슨-맨-휘트니법을 이용하여 해석했다(*: P<0.05, **: P<0.01).
- [0481] 실시예 11-2: 마우스 콜라겐 유도 관절염 모델에 대한 염증 억제효과 2
- [0482] 실시예 11-1과 마찬가지로의 방법에 의해, 본 발명의 앵타머의 콜라겐 유도 관절염 모델에 대한 억제작용을 조사

했지만, 본 발명의 앵타머로는 실시예 5에 기재한 방법에 의해 PEG 수식한 본 발명의 앵타머(앵타머번호 64)(5mg/kg) 및 마찬가지로 방법으로 PEG 수식한 종래 공지의 앵타머(앵타머번호 51)(5mg/kg)를 사용하고, 컨트롤에 대해서는 생리식염수를 10mL/kg로 1일 1회, 16일간 연일 복강내 투여했다.

[0483] 생리식염수를 투여한 컨트롤군과 비교하여 PEG 수식된 본 발명의 앵타머(앵타머번호 64) 투여군의 관절염 스코어는 의미 있게 감소하고 있었지만, PEG 수식한 종래 공지의 앵타머(앵타머번호 51) 투여군의 관절염 스코어에 의미 있는 차이는 볼 수 없었다(도 4B). 또한 도면 중의 각 값은 평균값±표준오차(n=9)를 나타낸다. 통계학적 유의차는 윌콕슨-맨-휘트니법을 이용하여 해석했다(*: P<0.05, **: P<0.01).

[0484] 관절염 동물 모델로서 범용되고 있는 GPI 유도 관절염 모델(실시예 10) 및 콜라겐 유도 관절염 모델(실시예 11-1 및 11-2) 모두에서 본 발명의 앵타머의 유효성이 실증되었기 때문에, IL-17에 대한 본 발명의 앵타머가 류마티스 관절염을 비롯한 자기면역성 관절염의 치료약으로서 이용할 수 있는 것이 또한 증명되었다. 특히, 본 발명의 앵타머는 종래 공지의 앵타머보다 강한 활성을 나타내는 것이 명확해졌다.

산업상 이용가능성

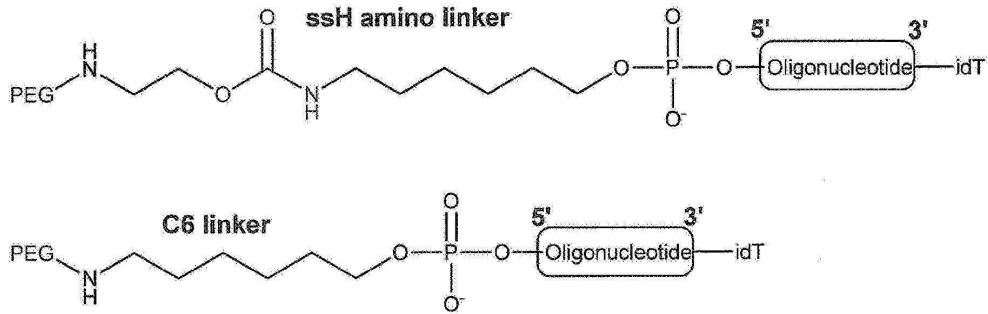
[0485] 본 발명의 앵타머 또는 복합체는, 염증성 질환이나 자기면역질환, 암, 알레르기, 감염증 등의 질환에 대한 의약, 혹은 진단약, 시약으로서 유용할 수 있다. 본 발명의 앵타머 또는 복합체는 또, IL-17의 정제 및 농축, IL-17의 표식, 그리고 IL-17의 검출 및 정량에 유용할 수 있다.

[0486] 본 출원은 일본에서 출원된 특원 2013-060817(출원일: 2013년 3월 22일)을 기초로 하고 있으며, 그 내용은 본 명세서에 모두 포함되는 것이다.

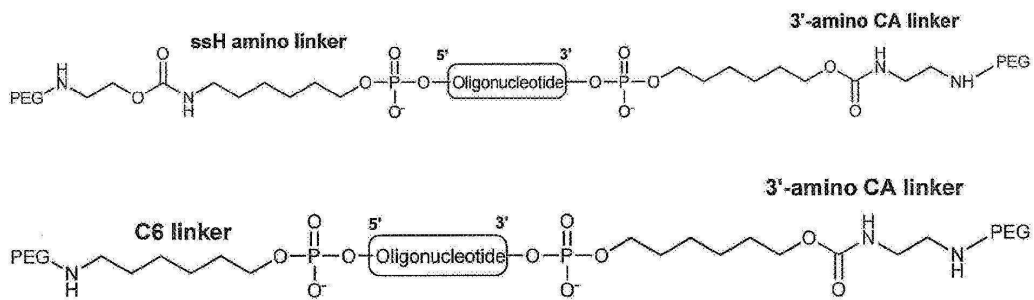
도면

도면1

대표적 5' PEG체의 구조(2종류의 링커)



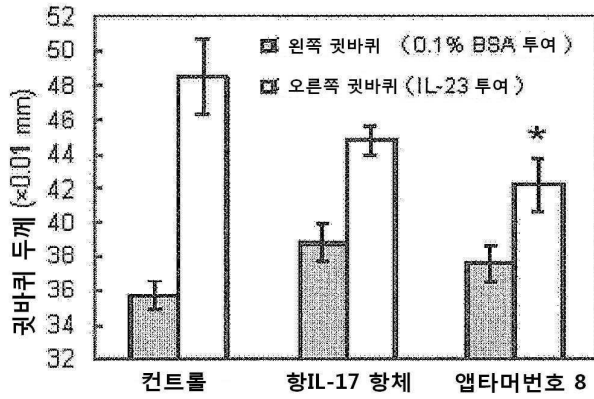
대표적 5', 3' 양 PEG체의 구조



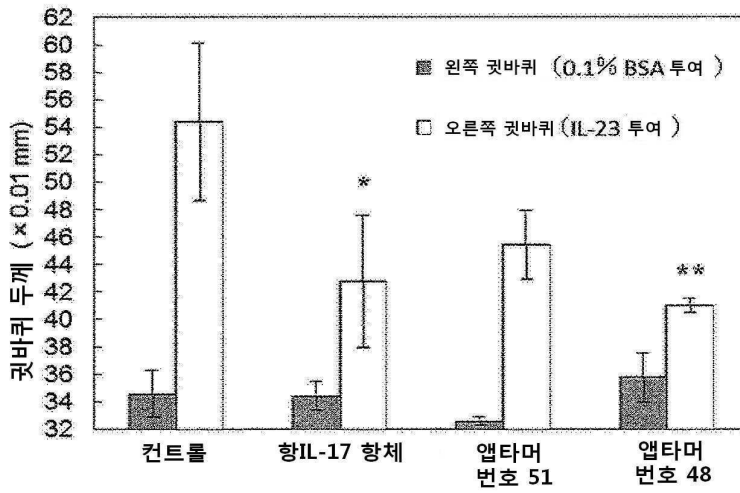
도면2

마우스 IL-23 유도 건선 모델에 대한 억제효과

A

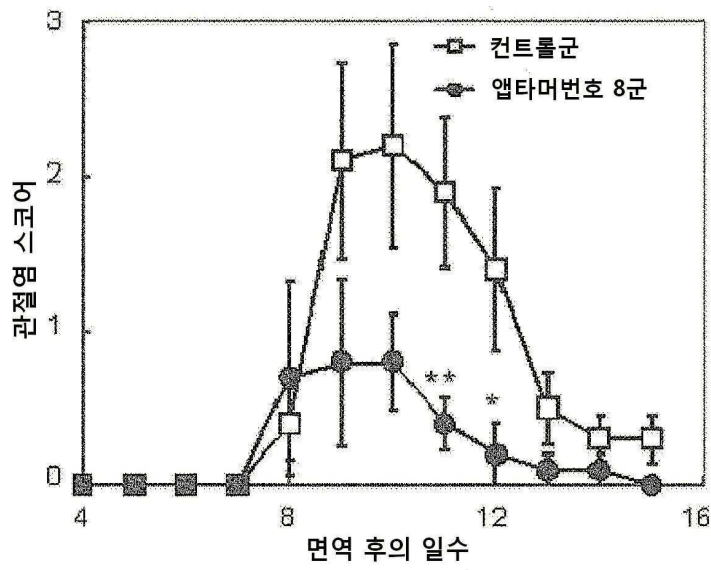


B



도면3

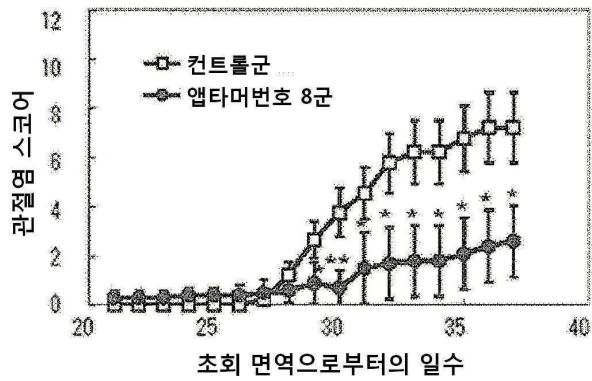
마우스 글루코스-6-인산 이소메라제 유도 관절염 모델에 대한 관절염 억제효과



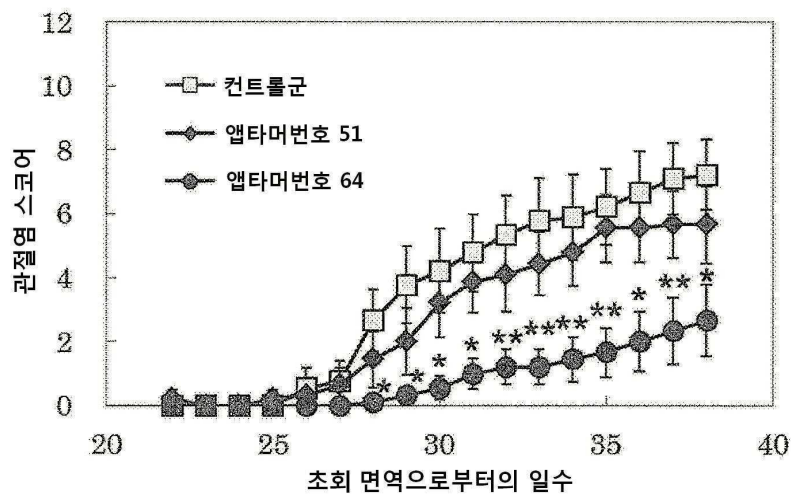
도면4

마우스 콜라겐 유도 관절염 모델에 대한 관절염 발증 억제효과

A



B



서열목록

- <110> THE UNIVERSITY OF TOKYO
ZENYAKU KOGYO KABUSHIKIKAI SHA
- <120> Aptamer against interleukin-17 and use thereof
- <130> 092157
- <150> JP 2013-060817
- <151> 2013-03-22
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 31
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Aptamer against interleukin-17	
<400> 1	
ggguagccgg aggagucagu raucguacc c	31
<210> 2	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Aptamer against interleukin-17	
<400> 2	
ggguagccg gaggagtcag taaucguac ccc	33
<210> 3	
<211> 33	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Aptamer against interleukin-17	
<400> 3	
ggucuagccg gaggagucag uaaucguag acc	33
<210> 4	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Aptamer against interleukin-17	
<400> 4	
ggguagccg gaggagucag uaaucguac ccc	33