



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2019-0062511  
 (43) 공개일자 2019년06월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61K 48/00** (2006.01) **A61K 45/06** (2006.01)  
**C12N 15/113** (2010.01)

(52) CPC특허분류  
**A61K 48/0058** (2013.01)  
**A61K 45/06** (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7012680(분할)  
 (22) 출원일자(국제) 2012년04월27일  
 심사청구일자 2019년05월30일

(62) 원출원 특허 10-2017-7033202  
 원출원일자(국제) 2012년04월27일  
 심사청구일자 2017년12월18일

(85) 번역문제출일자 2019년04월30일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US2012/035694  
 (87) 국제공개번호 WO 2012/149495  
 국제공개일자 2012년11월01일

(30) 우선권주장  
 61/479,817 2011년04월27일 미국(US)  
 61/595,009 2012년02월03일 미국(US)

(71) 출원인  
**아이오니스 파마수티컬즈, 인코포레이티드**  
 미합중국 캘리포니아주 92010 칼스바드 2855 가젤  
 코트

(72) 발명자  
**멀릭, 아담**  
 미국 92010 캘리포니아주 칼스바드 가젤 코트  
 2855  
**크룩, 로잔, 엠.**  
 미국 92010 캘리포니아주 칼스바드 가젤 코트  
 2855  
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인  
**양영준, 김영**

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **아포지방단백질 C I I I (A P O C I I I) 발현의 조정**

**(57) 요약**

본원에서는 동물에서 ApoCIII mRNA와 단백질의 발현을 감소시키기 위한 방법, 화합물, 그리고 조성물이 제시된다. 또한, 본원에서는 동물에서 HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시키고, 그리고 혈장 지질과 혈장 글루코오스를 감소시키기 위한 방법, 화합물, 그리고 조성물이 제시된다. 이런 방법, 화합물, 그리고 조성물은 심혈관 질환 또는 대사 장애, 또는 이의 증상 중에서 하나 또는 그 이상을 치료하거나, 예방하거나, 지연시키거나, 또는 개선하는데 유용하다.

(52) CPC특허분류

*A61K 48/0066* (2013.01)

*C12N 15/113* (2013.01)

*A61K 2121/00* (2013.01)

(72) 발명자

**그라함, 마크, 제이.**

미국 92010 캘리포니아주 칼스바드 가젤 코트 2855

**도비, 케네쓰, 더블유.**

미국 92014 캘리포니아주 델 마 스트라트포드 코트  
#4 703

**벨, 토마스, 에이.**

미국 92010 캘리포니아주 칼스바드 가젤 코트 2855

**리, 리차드**

미국 92010 캘리포니아주 칼스바드 가젤 코트 2855

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

(a) ㉔장염을 앓거나 ㉔장염의 위험에 처해 있는 동물을 선별하고,

(b) ApoCIII를 표적으로 하는 화합물을 상기 동물에 투여하는 것

을 포함하고, 여기서 ㉔장염이 예방되거나, 지연되거나 또는 개선되는 것인, ㉔장염을 예방하거나, 지연시키거나 또는 개선하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **서열 목록**

[0002] 본 출원은 전자 형태의 서열 목록과 함께 제출된다. 서열 목록은 2012년 4월 27일자에 작성되고 BIOL0130WSEQ.TXT로 명명된 8 Kb 크기의 파일로서 제공된다, 서열 목록의 전자 형태에서 정보는 본원에 전체로서 참고문헌으로 편입된다.

[0004] **발명의 분야**

[0005] 본원에서는 동물에서 아포지방단백질 CIII (ApoCIII) mRNA와 단백질의 발현을 감소시키고, 그리고 HDL 또는 HDL 활성을 증가시키기 위한 방법, 화합물, 그리고 조성물이 제시된다. 또한, 본원에서는 동물에서 ApoCIII 관련된 질환 또는 장애를 감소시키기 위한 ApoCIII 저해제에 대한 방법, 화합물, 그리고 조성물이 제시된다.

**배경 기술**

[0006] **배경**

[0007] 지방단백질은 단백질, 인지질과 콜레스테롤의 친양쪽성 코팅에 의해 둘러싸인 아실글리세롤과 콜레스테릴 에스테르의 비-극성 코어로 구성되는 구형, 미셀-유사 입자이다. 지방단백질은 그들의 기능적 및 물리적 성질에 기초하여 5가지 넓은 범주로 분류된다: 카일로마이크론, 초저밀도 지방단백질 (VLDL), 중간 밀도 지방단백질 (IDL), 저밀도 지방단백질 (LDL), 그리고 고밀도 지방단백질 (HDL). 카일로마이크론은 식이 지질을 장에서 조직으로 수송한다. VLDL, IDL과 LDL 모두 트리아실글리세롤과 콜레스테롤을 간에서 조직으로 수송한다. HDL은 내인성 콜레스테롤을 조직에서 간으로 수송한다.

[0008] 지방단백질 입자는 연속적인 대사 과정을 겪고 다양한 성질과 조성을 갖는다. 지방단백질 밀도는 입자 직경의 증가 없이 증가하는데, 그 이유는 그들의 외부 코팅의 밀도가 내부 코어의 밀도보다 적기 때문이다. 지방단백질의 단백질 성분은 아포지방단백질로 알려져 있다. 다양한 인간 지방단백질 중에서 적어도 9가지 아포지방단백질이 유의미한 양으로 분포된다.

[0009] 아포지방단백질 C-III (ApoCIII)는 HDL과 트리글리세리드 (TG)-풍부한 지방단백질의 구성물이다. 상승된 ApoCIII는 파트리글리세리드혈증과 연관된다. 따라서 ApoCIII는 관상 동맥 질환에 대한 위험 인자인 파트리글리세리드혈증에서 일정한 역할을 갖는다 (Davidsson et al., J. Lipid Res. 2005. 46: 1999-2006). ApoCIII는 지방단백질 리파아제의 저해 및 세포-표면 글리코사미노글리칸 매트릭스에 지방단백질 결합의 간섭 둘 모두를 통해, 지방분해를 저해함으로써 트리글리세리드-풍부한 지방단백질의 제거를 늦춘다 (Shachter, *Curr. Opin. Lipidol.*, 2001, 12, 297-304).

[0010] 인간 아포지방단백질 C-III (일명, APOC3, APOC-III, ApoCIII, 그리고 APO C-III)를 인코딩하는 유전자는 1984년에 3 연구 그룹에 의해 클로닝되었다 (Levy-Wilson et al., *DNA*, 1984, 3, 359-364; Protter et al., *DNA*, 1984, 3, 449-456; Sharpe et al., *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12, 3917-3932). 코딩 서열은 3개의 인트론이 중간에 끼어든다 (Protter et al., *DNA*, 1984, 3, 449-456). 인간 ApoCIII 유전자는 아포지방단백질 A-1 유전자의 3' 방향으로 대략 2.6 kb 지점에 위치하고, 그리고 이들 두 유전자는 수렴성으로 전사된다 (Karathanasis,

*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1985**, *82*, 6374-6378). 또한, 현저하게 높은 수준의 혈청 아포지방단백질 C-III를 갖는 환자로부터, Thr74에서 Ala74 돌연변이를 갖는 인간 아포지방단백질 C-III의 변이체가 클로닝되었다. Thr74가 O-당화되기 때문에, Ala74 돌연변이체는 따라서, 탄수화물 모이어티를 결여하는 혈청 ApoCIII의 증가된 수준을 유발하였다 (Maeda *et al.*, *J. Lipid Res.*, **1987**, *28*, 1405-1409). Apo CIII 발현을 조정하는 다른 변이체 또는 다형성이 이후에 확인되었다. 이들 다형성 중에서 일부는 ApoCIII를 상승시켰다. 상승된 ApoCIII 수준은 상승된 트리글리세리드 (TG) 수준과 질환, 예를 들면, 심혈관 질환, 대사 증후군, 비만 및 당뇨병과 연관되었다 (Chan *et al.*, *Int J Clin Pract*, 2008, 62:799-809; Onat *et al.*, *Atherosclerosis*, 2003, 168:81-89; Mendivil *et al.*, *Circulation*, 2011, 124:2065-2072).

[0011] 상기 유전자의 프로모터 영역에서 5개의 다형성이 확인되었다: C (상기 유전자의 위치 -641에서)에서 A, G (상기 유전자의 위치 -630에서)에서 A, T (상기 유전자의 위치 -625에서)에서 결실, C (상기 유전자의 위치 -482에서)에서 T, 그리고 T (상기 유전자의 위치 -455에서)에서 C. 이들 다형성 모두 3' 비번역 영역 내에서 SstI 다형성과 연관 불균형 상태에 있다. SstI 다형성 부위는 S1과 S2 대립유전자를 구별짓고, 그리고 S2 대립유전자는 상승된 혈장 트리글리세리드 수준과 연관된다 (Dammerman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1993**, *90*, 4562-4566). ApoCIII 프로모터는 인슐린에 의해 하향 조절되고, 그리고 이러한 다형성 부위는 인슐린 조절을 파괴한다. 따라서 인슐린 조절의 상실에 기인하는 ApoCIII의 잠재적 과다발현은 S2 대립유전자와 연관된 과트리글리세리드혈증의 발생에 기여 인자일 수 있다 (Li *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **1995**, *96*, 2601-2605). T (상기 유전자의 위치 -455에서)에서 C 다형성은 관상 동맥 질환에 대한 증가된 위험과 연관되었다 (Olivieri *et al.*, *J. Lipid Res.*, 2002, *43*, 1450-1457). 상승된 ApoCIII 및/또는 트리글리세리드 발현과 연관된 인간 ApoCIII 유전자에서 다른 다형성에는 하기가 포함된다: C (위치 1100에서)에서 T, C (위치 3175에서)에서 G, T (위치 3206에서)에서 G, C (위치 3238에서)에서 G 등. (Tilly *et al.*, *J. Lipid Res.*, 2003, *44*:430-436; Waterworth *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, *20*:2663-2669; Petersen *et al.*, *N Engl J Med*, 2010, *362*:1082-1089).

[0012] 인슐린에 더하여, ApoCIII 유전자 발현의 다른 조절자가 확인되었다. 핵 고아 수용체 Rev-erb 알파에 대한 반응 요소는 ApoCIII 프로모터 영역 내에서, 상기 유전자의 위치 -23 내지 -18에 소재하였다. Rev-erb 알파는 ApoCIII 프로모터 활성을 감소시킨다 (Raspe *et al.*, *J. Lipid Res.*, **2002**, *43*, 2172-2179). 상기 유전자의 위치 -86 내지 -74의 ApoCIII 프로모터 영역은 2개의 핵 인자 CIIIB1과 CIIIB2에 의해 인식된다 (Ogami *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 9640-9646). ApoCIII 발현은 또한, 레티노이드 X 수용체를 통해 작용하는 레티노이드에 의해 상향 조절되고, 그리고 레티노이드 X 수용체 준재비에서 변화는 ApoCIII 전사에 영향을 준다 (Vu-Dac *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **1998**, *102*, 625-632). 구체적으로, 단백질 1 (Sp1) 및 간세포 핵 인자-4 (HNF-4)는 HNF-4 결합 부위를 거쳐 아포지방단백질 C-III 프로모터를 전이활성화하는데 상승적으로 작용하는 것으로 밝혀졌다 (Kardassis *et al.*, *Biochemistry*, **2002**, *41*, 1217-1228). HNF-4는 또한, ApoCIII 프로모터를 전이활성화하기 위해 SMAD3-SMAD4와 함께 작용한다 (Kardassis *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 41405-41414).

[0013] 유전자도입과 녹아웃 생쥐는 지방분해에서 ApoCIII의 역할을 더욱 정의하였다. 유전자도입 생쥐에서 ApoCIII 과다발현은 파트리글리세리드혈증 및 VLDL-트리글리세리드의 손상된 제거를 유발한다 (de Silva *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 2324-2335; Ito *et al.*, *Science*, **1990**, *249*, 790-793). ApoCIII 단백질의 완전한 부재를 갖는 녹아웃 생쥐는 야생형 생쥐와 비교하여 유의미하게 감소된 혈장 콜레스테롤과 트리글리세리드 수준을 나타내고, 그리고 식후 파트리글리세리드혈증으로부터 보호되었다 (Maeda *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 23610-23616).

[0014] 총 혈장 ApoCIII 수준은 혈청 트리글리세리드의 주요 결정인자로서 확인되었고, 그리고 역학 연구는 ApoCIII 및 ApoCIII를 한 성분으로 갖는 ApoB 지방단백질이 관상동맥 심장 질환을 독립적으로 예언한다는 것을 증명하였다 (Sacks *et al.*, *Circulation*. 2000. *102*: 1886-1892; Lee *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003. *23*: 853- 858). 연구는 또한, ApoCIII가 내장 비만, 인슐린 저항 및 대사 증후군을 비롯한 파트리글리세리드혈증 상태에서 트리글리세리드-풍부한 지방단백질 및 이의 잔존물의 제거에서 핵심 결정인자라는 것을 증명한다 (Mauger *et al.*, *J. Lipid Res*. 2006. *47*: 1212-1218; Chan *et al.*, *Clin. Chem*. 2002. *278*-283; Ooi *et al.*, *Clin. Sci*. 2008. *114*: 611-624).

[0015] 파트리글리세리드혈증은 심장대사 질환 (Hegele *et al.* 2009, *Hum Mol Genet*, *18*: 4189-4194; Hegele and Pollex 2009, *Mol Cell Biochem*, *326*: 35-43)뿐만 아니라 가장 심각한 형태에서 급성 췌장염의 발생 (Toskes 1990, *Gastroenterol Clin North Am*, *19*: 783-791; Gaudet *et al.* 2010, *Atherosclerosis Supplements*, *11*: 55-60; Catapano *et al.* 2011, *Atherosclerosis*, *217S*: S1-S44; Tremblay *et al.* 2011, *J Clin Lipidol*, *5*:

37-44)의 증가된 위험과 연관된 공통의 임상적 속성이다. 심장대사 질환의 실례에는 당뇨병, 대사 증후군/인슐린 저항, 그리고 유전적 장애, 예를 들면, 가족성 카일로마이크로혈증, 가족성 결합 과지질혈증 및 가족성 과트리글리세리드혈증이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0016] 과트리글리세리드혈증은 트리글리세리드 (TG)-풍부한 지방단백질: VLDL 및 정도가 덜하긴 하지만, 카일로마이크론 (CM)의 증가된 생산 및/또는 감소되거나 지연된 이화의 결과이다. 경계선 높은 TG (150-199 mg/dL)는 일반 개체군에서 통상적으로 발견되고, 그리고 대사 증후군/인슐린 저항 상태의 공통 성분이다. 이것은 혈장 TG 수준이 증가함에 따라서, 근원적 유전 인자가 더욱더 중요한 병인적 역할을 수행한다는 점을 제외하고, 높은 TG (200-499 mg/dL)에 동일하게 적용된다. 매우 높은 TG ( $\geq 500$  mg/dL)는 상승된 CM 수준과도 가장 빈번하게 연관되고, 그리고 급성 췌장염에 대한 증가하는 위험을 동반한다. 췌장염의 위험은 TG가 880 mg/dL ( $>10$  mmol)을 초과하고, 그리고 European Atherosclerosis Society/European Society of Cardiology (EAS/ESC) 2011 가이드라인이 급성 췌장염을 예방하는 조치가 의무적임을 진술할 때, 임상적으로 유의한 것으로 간주된다 (Catapano et al. 2011, *Atherosclerosis*, 217S: S1-S44). EAS/ESC 2011 가이드라인에 따르면, 과트리글리세리드혈증은 췌장염의 모든 사례의 대략 10%의 원인이고, 그리고 췌장염의 발생은 440-880 mg/dL의 TG 수준에서 일어날 수 있다. 상승된 TG 수준이 죽상동맥경화성 CVD에 대한 독립적인 위험 인자임을 증명하는 임상적 연구로부터 증거에 기초하여, National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP 2002, *Circulation*, 106: 3143-421) 및 American Diabetes Association (ADA 2008, *Diabetes Care*, 31: S12-S54.) 둘 모두로부터 가이드라인은 심혈관 위험을 감소시키기 위해 150 mg/dL 이하의 표적 TG 수준을 권고한다.

[0017] ApoCIII-녹아웃 생쥐는 정상적인 장 지질 흡수 및 간 VLDL 트리아실글리세롤 분비를 가졌지만, 혈장으로부터 VLDL 트리아실글리세롤과 VLDL 콜레스테릴 에스테르의 신속한 제거는 관찰된 저지혈증을 설명할 수 있다 (Gerritsen et al., *J. Lipid Res.* 2005. 46: 1466-1473; Jong et al., *J. Lipid Res.* 2001. 42: 1578-1585). ApoCIII을 갖는 VLDL 입자는 과트리글리세리드혈증에서 관상동맥 심장 질환의 높은 위험을 확인하는데 중요한 역할을 하는 것으로 언급되었다 (Campos et al., *J. Lipid Res.* 2001. 42: 1239-1249). 전체 유전자 연관 연구는 Lancaster Amish 사람들에서 자연 발생하는 ApoCIII 삭제 돌연변이가 명백한 유해 효과 없이, 우호적인 지질 프로필 및 명백한 심장보호를 나타낸다는 것을 발견하였다 (Pollin et al., *Science*. 2008. 322: 1702-1705). 이들 돌연변이 보유자는 더욱 낮은 공복과 식후 혈청 트리글리세리드와 LDL-콜레스테롤, 그리고 더욱 높은 수준의 HDL-콜레스테롤을 갖는 것으로 관찰된다.

[0018] HDL 부류의 지방단백질은 가장 밀집하고 가장 작은 크기의 입자의 불균질한 다분산 개체군을 포함한다 (Havel and Kane. In, *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th Edition. McGraw-Hill, New York, 2001:2705-16). HDL은 지질 (콜레스테롤, 트리글리세리드와 인지질) 및 단백질 (아포지방단백질 (apo)과 효소)의 거대분자 복합체이다. HDL의 표면은 주로, 아포지방단백질 A, C와 E를 내포한다. 이들 아포단백질 중에서 일부의 기능은 HDL을 말초 조직에서 간으로 지향시키는 것이다. 혈청 HDL 수준은 근원적인 유전적 원인에 의해 영향을 받을 수 있다 (Weissglas-Volkov and Pajukanta, *J Lipid Res*, 2010, 51:2032-2057).

[0019] 역학 연구는 증가된 수준의 HDL이 심혈관 질환 또는 관상동맥 심장 질환으로부터 보호를 제공한다는 것을 지지하였다 (Gordon et al., *Am. J. Med.* 1977. 62: 707-714). HDL-콜레스테롤의 이들 효과는 트리글리세리드와 LDL-콜레스테롤 농도와는 무관하다. 임상적 실시에서, 낮은 혈장 HDL-콜레스테롤은 혈장 트리글리세리드를 증가시키는 다른 질환, 예를 들면, 내장 비만, 인슐린 저항, 2형 당뇨병 및 신장 질환 (만성 신부전 또는 신장 단백뇨증)과 더욱 통상적으로 연관된다 (Kashyap. *Am. J. Cardiol.* 1998. 82: 42U-48U).

[0020] 현재, ApoCIII의 기능에 영향을 주는 직접적인 치료제는 알려져 있지 않다. 피브레이트 부류의 약물의 저지질혈 효과는 페록시수증 증식인자 활성화된 수용체 (PPAR)가 아포지방단백질 C-III 프로모터로부터 HNF-4의 이동을 매개하고, 아포지방단백질 C-III의 전사 억제를 유도하는 기전을 통해 발생하는 것으로 가정된다 (Hertz et al., *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 13470-13475). 스타틴 부류의 저지질혈 약물 역시 지방단백질 리파아제 mRNA의 증가 및 아포지방단백질 C-III의 혈장 수준의 감소를 유도하는 미지의 기전을 통해 트리글리세리드 수준을 낮춘다 (Schoonjans et al., *FEBS Lett.*, 1999, 452, 160-164). 결과적으로, 아포지방단백질 C-III 기능을 효과적으로 저해할 수 있는 추가의 작용제에 대한 오랜 요구가 여전히 남아있다.

[0021] 안티센스 기술은 일정한 유전자 산물의 발현을 감소시키기 위한 효과적인 수단으로 부상하고 있고, 따라서 ApoCIII의 조절을 위한 다수의 치료적, 진단적, 그리고 연구적 적용에서 독특하게 유용한 것으로 입증될 수 있다.

[0022] 안티센스 화합물에 의해 ApoCIII를 저해하기 위한 조성물과 방법은 US 20040208856 (US Patent 7,598,227), US



20060264395 (US Patent 7,750,141), 그리고 WO 2004/093783에서 앞서 개시되었다. 본 출원에서는 ApoCIII의 안티센스 저해가 HDL 수준의 상승 및 식후 트리글리세리드 수준에서 감소를 유발한다는 예상치 못한 결과가 개시된다. 이러한 결과는 예로써, 하나 또는 그 이상 질환, 예를 들면, 심혈관 질환 (가령, 관상동맥 심장 질환 또는 죽종형성 질환)을 치료하거나, 예방하거나, 지연시키거나, 감소시키거나 또는 개선하는데 유용할 것이다. 가령, 상승된 식후 (비-공복) 트리글리세리드 수준은 심혈관 질환에 대한 유의미한 위험 인자로서 확인되었다 (Bansal *et al.*, *JAMA*, 2007, 298:309-16; Nordestgaard *et al.*, *JAMA*, 2007, 298:299-308). 또한, 본 출원에서, ApoCIII 발현의 저해는 예상치 않게, 증가된 카일로마이크론 제거를 유발하고, 따라서 카일로마이크론 트리글리세리드의 부적절한 제거에 의해 유발된 이상지질혈증성 상태인 카일로마이크론혈증의 예방에서 중요하다 (Chait *et al.*, 1992, *Adv Intern Med*. 1992, 37:249-73). 심각한 형태의 카일로마이크론혈증은 치명적인 질환인 췌장염을 유발할 수 있다. 장 ApoCIII를 저해함으로써, 지방단백질 리파아제의 저해가 감소되고, 그리고 카일로마이크론 트리글리세리드 제거가 증가되고, 따라서 췌장염을 예방할 것이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0023] **발명의 요약**
- [0024] 본원에서는 ApoCIII를 표적으로 하는 화합물을 동물에 투여함으로써 HDL 수준을 증가시키는 방법이 제시된다.
- [0025] 일정한 구체에는 동물에서 심혈관 질환, 장애 또는 이상의 위험을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나, 이의 발생을 지연시키거나 또는 감소시키는 방법을 제시하고, 상기 방법은 ApoCIII를 표적으로 하는 화합물을 동물에 투여하는 것을 포함한다. 동물에 투여된 화합물은 동물에서 HDL 수준을 증가시킴으로써 심혈관 질환, 장애 또는 이상의 위험을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나, 이의 발생을 지연시키거나 또는 감소시킨다.
- [0026] 일정한 구체에는 동물에서 심혈관 질환에 대한 위험을 감소시키기 위한 방법을 제시하고, 상기 방법은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오시드로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물의 치료 효과량을 동물에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오티드는 ApoCIII 핵산에 상보성이다. 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에서 열거된 바와 같다. 일정한 구체예에서, 화합물은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오시드로 구성되고, 그리고 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 적어도 8개의 연속 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 추가의 구체예에서, 동물에 투여된 화합물은 HDL 수준을 증가시킴으로써 심혈관 질환에 대한 위험을 감소시킨다.
- [0027] 일정한 구체에는 동물에서 심혈관 질환의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나 또는 감소시키는 방법을 제시하고, 상기 방법은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오시드로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물의 치료 효과량을 동물에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오티드는 ApoCIII 핵산에 상보성이다. 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에서 열거된 바와 같다. 일정한 구체예에서, 화합물은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오시드로 구성되고, 그리고 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 적어도 8개의 연속 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 추가의 구체예에서, 동물에 투여된 화합물은 동물에서 HDL 수준을 증가시킴으로써, 동물에서 심혈관 질환의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나 또는 감소시킨다.
- [0028] 일정한 구체에는 동물에서 HDL 수준을 증가시키기 위해, ISIS 304801 (서열 번호: 3)로 구성되는 화합물을 동물에 투여함으로써 동물에서 HDL 수준을 증가시키는 방법을 제시한다.
- [0029] 일정한 구체에는 동물에서 HDL 수준을 증가시킴으로써 동물에서 심혈관 질환의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나 또는 감소시키기 위해, ISIS 304801 (서열 번호: 3)로 구성되는 화합물을 동물에 투여함으로써 동물에서 심혈관 질환의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나 또는 감소시키는 방법을 제시한다.
- [0031] 일정한 구체에는 서열 번호: 3 (ISIS 304801)의 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드를 동물에 투여함으로써 동물에서 HDL 수준을 증가시키는 방법을 제시하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오티드는 하기를 포함한다: 10개의 연결된 데옥시뉴클레오시드로 구성되는 겹 분절; 5개의 연결된 뉴클레오시드로 구성되는 5' 날개 분절; 5개의 연결된 뉴클레오시드로 구성되는 3' 날개 분절; 여기서 겹 분절은 5' 날개 분절과 3' 날개 분절에 바로 인접

하게, 그리고 이들 사이에 배치되고, 그리고 각 날개 분절의 각 뉴클레오타이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고, 각 시토신은 5'-메틸시토신이고, 그리고 각 뉴클레오타이드간 연쇄는 포스포로티오에이트 연쇄이고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드 동물에서 HDL 수준을 증가시킨다.

[0032] 일정한 구체에는 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 동물에 투여함으로써 동물에서 심혈관 질환의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나 또는 감소시키는 방법을 제시하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하기를 포함한다: 10개의 연결된 데옥시뉴클레오타이드로 구성되는 갭 분절; 5개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성되는 5' 날개 분절; 5개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성되는 3' 날개 분절; 여기서 갭 분절은 5' 날개 분절과 3' 날개 분절에 바로 인접하게, 그리고 이들 사이에 배치되고, 그리고 각 날개 분절의 각 뉴클레오타이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고, 각 시토신은 5'-메틸시토신이고, 그리고 각 뉴클레오타이드간 연쇄는 포스포로티오에이트 연쇄이고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 동물에서 HDL 수준을 증가시킴으로써 심혈관 질환을 앓는 동물에서 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나 또는 감소시킨다.

[0033] 일정한 구체에는 동물에서 HDL 수준을 증가시키기 위해, 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 동물에 투여함으로써 동물에서 HDL 수준을 증가시키는 방법을 제시하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에서 열거된 바와 같은 ApoCIII 핵산에 상보성이다.

[0035] 일정한 구체에는 동물의 HDL 수준을 증가시킴으로써 동물에서 심혈관 질환의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나 또는 감소시키기 위해, 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 동물에 투여함으로써 동물에서 심혈관 질환의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나 또는 감소시키는 방법을 제시하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에서 열거된 바와 같은 ApoCIII 핵산에 상보성이다.

[0036] 일정한 구체에는 ApoCIII를 표적으로 하는 화합물을 동물에 투여함으로써 CETP 수준을 감소시키는 방법을 제시한다. 일정한 구체예에서, 화합물은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성되고, 그리고 ApoCIII 핵산에 상보성인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일정한 구체예에서, 핵염기 서열은 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 적어도 8개의 연속 핵염기를 포함한다. 일정한 구체예에서, 화합물은 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 핵염기로 구성된다.

[0037] 일정한 구체에는 ApoCIII를 표적으로 하는 화합물을 동물에 투여함으로써 ApoA1, PON1, 지방 제거, 카일로마이 크론 트리글리세리드 제거, 식후 트리글리세리드 제거 또는 HDL을 증가시키는 방법을 제시한다. 일정한 구체예에서, 화합물은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성되고, 그리고 ApoCIII 핵산에 상보성인 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일정한 구체예에서, 핵염기 서열은 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 적어도 8개의 연속 핵염기를 포함한다. 일정한 구체예에서, 화합물은 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 핵염기로 구성된다.

[0038] 일정한 구체에는 췌장염을 예방하거나, 지연시키거나 또는 개선하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 (a) 췌장염을 앓거나 췌장염의 위험에 처해 있는 동물을 선별하고, 그리고 (b) ApoCIII를 표적으로 하는 화합물을 동물에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 췌장염이 예방되거나, 지연되거나 또는 개선된다.

[0039] 일정한 구체에는 췌장염을 예방하거나, 지연시키거나 또는 개선하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 (a) 췌장염을 앓거나 췌장염의 위험에 처해 있는 동물을 선별하고, 그리고 (b) ApoCIII를 표적으로 하는 화합물을 동물에 투여하여, 카일로마이 크론 제거를 증가시키는 것을 포함하고, 여기서 췌장염이 예방되거나, 지연되거나 또는 개선된다.

[0040] 일정한 구체예에서, 동물은 파트리글리세리드혈증을 앓거나 파트리글리세리드혈증의 위험에 처해 있다. 일정한 구체예에서, 파트리글리세리드혈증은 Fredrickson 타입 II, IV 또는 V이다. 일정한 구체예에서, 동물은 파트리글리세리드혈증을 유발하는 유전자 결함을 갖는다. 일정한 구체예에서, 유전자 결함은 이형접합성 LPL 결핍 또는 ApoCIII 다형성이다. 일정한 구체예에서, 동물은 트리글리세리드 수준  $\geq 500$  mg/dL 및 이형접합성 LPL 결핍을 갖는다.

[0041] 일정한 구체예에서, 동물은 100-200 mg/dL, 100-300 mg/dL, 100-400 mg/dL, 100-500 mg/dL, 200-500 mg/dL, 300-500 mg/dL, 400-500 mg/dL, 500-1000 mg/dL, 600-1000 mg/dL, 700-1000 mg/dL, 800-1000 mg/dL, 900-1000

mg/dL, 500-1500 mg/dL, 1000-1500 mg/dL, 100-2000 mg/dL, 150-2000 mg/dL, 200-2000 mg/dL, 300-2000 mg/dL, 400-2000 mg/dL, 500-2000 mg/dL, 600-2000 mg/dL, 700-2000 mg/dL, 800-2000 mg/dL, 900-2000 mg/dL, 1000-2000 mg/dL, 1100-2000 mg/dL, 1200-2000 mg/dL, 1300-2000 mg/dL, 1400-2000 mg/dL, 또는 1500-2000 mg/dL의 트리글리세리드 수준을 갖는다.

- [0042] 일정한 구체예에서, 증가된 카일로마이크론 제거는 식후 트리글리세리드의 제거를 증강시키고 및/또는 식후 트리글리세리드를 감소시킨다.
- [0043] 일정한 구체예는 HDL 수준을 증가시킴으로써 심혈관 질환의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나 또는 감소시키기 위한, ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다.
- [0044] 일정한 구체예는 동물에서 HDL 수준을 증가시키기 위한, ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다.
- [0045] 일정한 구체예는 동물에서 HDL 수준을 증가시키기 위한 약제의 제조에서, ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다.
- [0046] 일정한 구체예는 TG 대 HDL의 비율을 향상시키기 위한 약제의 제조에서, ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다.

**과제의 해결 수단**

- [0047] **발명의 상세한 설명**
- [0048] 상기의 일반적 설명 및 하기의 상세한 설명 둘 모두 단지 예시와 설명에 불과하고, 그리고 청구된 발명을 한정하지 않는 것으로 이해된다. 본원에서, 단수의 이용은 달리 명시되지 않으면, 복수를 포함한다. 본원에서 이용된 바와 같이, "또는"의 이용은 달리 규정되지 않으면, "및/또는"을 의미한다. 더 나아가, 용어 "포함하는"뿐만 아니라 다른 형태, 예를 들면, "포함한다" 및 "포함되는"의 이용은 한정하는 것이 아니다. 또한, "요소" 또는 "성분"과 같은 용어는 달리 특정되지 않으면, 하나의 단위를 포함하는 요소와 성분, 그리고 하나 이상의 아단위를 포함하는 요소와 성분 둘 모두를 포함한다.
- [0049] 본원에서 이용된 섹션 표제는 단지 편성을 목적으로 하고 기술된 요부 (subject matter)를 한정하는 것으로 해석되지 않는다. 특허, 특허 출원, 논문, 서적, 그리고 조약이 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 본 출원에서 언급된 모든 문서, 또는 문서의 일부는 본원에서 논의된 문서의 부분뿐만 아니라 그 전체가 명백히 참고문헌으로 편입된다.
- [0051] **정의**
- [0052] 특정한 정의가 제공되지 않으면, 본원에서 기술된 분석 화학, 합성 유기 화학, 그리고 의약화학과 약화학과 관련하여 이용되는 명명법, 그리고 이들의 절차와 기술은 당분야에 공지되고 통상적으로 이용된다. 화학적 합성, 그리고 화학적 분석을 위해 표준 기술이 이용될 수 있다. 허용되는 경우에, 모든 특허, 출원, 공개된 출원 및 기타 간행물, National Center for Biotechnology Information (NCBI)과 같은 데이터베이스를 통해 입수가 가능한 GENBANK 수탁 번호 및 연관된 서열 정보, 그리고 본원의 개시 전반에서 인용되는 기타 데이터는 본원에서 논의된 문서의 부분뿐만 아니라 그 전체가 참고문헌으로 편입된다.
- [0053] 달리 지정되지 않으면, 하기 용어는 하기 의미를 갖는다:
- [0055] "2'-O-메톡시에틸" (또한, 2'-MOE, 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub> 및 2'-O-(2-메톡시에틸))은 푸로실 고리의 2' 위치의 O-메톡시-에틸 변형을 지칭한다. 2'-O-메톡시에틸 변형된 당은 변형된 당이다.
- [0056] "2'-O-메톡시에틸 뉴클레오타이드"는 2'-O-메톡시에틸 변형된 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0057] "3' 표적 부위"는 특정 안티센스 화합물의 가장 3' 뉴클레오타이드에 상보성인 표적 핵산의 뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0058] "5' 표적 부위"는 특정 안티센스 화합물의 가장 5' 뉴클레오타이드에 상보성인 표적 핵산의 뉴클레오타이드를 지칭한다.



- [0059] "5-메틸시토신"은 5' 위치에 부착된 메틸 군으로 변형된 시토신을 의미한다. 5-메틸시토신은 변형된 핵염기이다.
- [0060] "약"은 값의  $\pm 10\%$  이내를 의미한다. 가령, "마커가 약 50% 증가될 수 있다"라고 규정되면, 이것은 마커가 45% 내지 55% 증가될 수 있다는 것을 암시한다.
- [0061] "활성 제약학적 작용제"는 개체에 투여될 때, 치료적 혜택을 제공하는 제약학적 조성물 내에 물질 또는 물질들을 의미한다. 가령, 일정한 구체예에서, ApoCIII에 표적화된 안티센스 올리고뉴클레오티드가 활성 제약학적 작용제이다.
- [0062] "활성 표적 영역" 또는 "표적 영역"은 하나 또는 그 이상 활성 안티센스 화합물이 표적화되는 영역을 의미한다. "활성 안티센스 화합물"은 표적 핵산 수준 또는 단백질 수준을 감소시키는 안티센스 화합물을 의미한다.
- [0063] "동시 투여된"은 2가지 작용제의 약리학적 효과가 환자에서 동시에 나타나는 임의의 방식으로 이들 두 작용제의 공동-투여를 지칭한다. 동시 투여는 양쪽 작용제가 단일 제약학적 조성물에서, 동일한 제형에서, 또는 동일한 투여 루트에 의해 투여될 것을 요구하지 않는다. 양쪽 작용제의 효과는 동시에 나타날 필요가 없다. 이들 효과는 일정한 기간 동안 단지 중첩되기만 하면 되고 동일한 시간에 결칠 필요가 없다.
- [0064] "투여하는"은 제약학적 작용제를 개체에 제공하는 것을 의미하고, 그리고 여기에는 의료 전문가에 의한 투여 및 자기 투여가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0065] "작용제"는 동물에 투여될 때, 치료적 혜택을 제공할 수 있는 활성 물질을 의미한다. "일차 작용제"는 본 발명의 치료적 화합물을 의미한다. 가령, 일차 작용제는 ApoCIII를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오티드일 수 있다. "이차 작용제"는 본 발명의 두 번째 치료적 화합물(가령, ApoCIII를 표적으로 하는 두 번째 안티센스 올리고뉴클레오티드) 및/또는 비-ApoCIII 치료적 화합물을 의미한다.
- [0066] "개선"은 연관된 질환, 장애 또는 이상의 적어도 하나의 인디케이터, 징후, 또는 증상의 감소를 지칭한다. 인디케이터의 심각도는 당업자에게 공지된 주관적 또는 객관적 적도에 의해 결정될 수 있다.
- [0067] "동물"은 인간, 또는 생쥐, 쥐, 토끼, 개, 고양이, 돼지, 그리고 비-인간 영장류, 예를 들면, 제한 없이 원숭이와 침팬지가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 비-인간 동물을 지칭한다.
- [0068] "안티센스 활성"은 표적 핵산에 안티센스 화합물의 혼성화에 기인한 임의의 검출가능한 또는 측정가능한 활성을 의미한다. 일정한 구체예에서, 안티센스 활성은 표적 핵산 또는 이런 표적 핵산에 의해 인코딩된 단백질의 양 또는 발현에서 감소이다.
- [0069] "안티센스 화합물"은 수소 결합을 통해 표적 핵산에 혼성화를 겪을 수 있는 올리고머 화합물을 의미한다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "안티센스 화합물"은 본원에서 기술된 화합물의 제약학적으로 허용되는 유도체를 포함한다.
- [0070] "안티센스 저해"는 안티센스 화합물의 부재에서 표적 핵산 수준 또는 표적 단백질 수준과 비교하여, 표적 핵산에 상보성인 안티센스 화합물의 존재에서 표적 핵산 수준 또는 표적 단백질 수준의 감소를 의미한다.
- [0071] "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 표적 핵산의 상응하는 영역 또는 분절에 혼성화를 가능하게 하는 핵염기 서열을 갖는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 본원에서 기술된 화합물의 제약학적으로 허용되는 유도체를 포함한다.
- [0072] "ApoCIII"는 ApoCIII를 인코딩하는 임의의 핵산 또는 단백질 서열을 의미한다. 가령, 일정한 구체예에서, ApoCIII는 ApoCIII를 인코딩하는 DNA 서열, ApoCIII를 인코딩하는 DNA (인트론과 엑손을 포함하는 게놈 DNA 포함)로부터 전사된 RNA 서열, ApoCIII를 인코딩하는 mRNA 서열, 또는 ApoCIII를 인코딩하는 펩티드 서열을 포함한다.
- [0073] "ApoCIII mRNA"는 ApoCIII 단백질을 인코딩하는 mRNA를 의미한다.
- [0074] "ApoCIII 단백질"은 ApoCIII를 인코딩하는 임의의 단백질 서열을 의미한다.
- [0075] "죽상동맥경화증"은 큰 크기와 중간 크기 동맥에 영향을 주는 동맥의 경화를 의미하고, 그리고 지방 침착물의 존재로 특징된다. 이들 지방 침착물은 "아테롬" 또는 "플라크"로 불리는데, 이들은 주로 콜레스테롤과 기타 지방, 칼슘 및 흉터 조직으로 구성되고, 그리고 동맥의 내층을 손상시킨다.

- [0076] "이중환상 당"은 2개 비-같은자리 고리 원자의 가교에 의해 변형된 푸로실 고리를 의미한다. 이중환상 당은 변형된 당이다.
- [0077] "이중환상 핵산" 또는 "BNA"는 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드의 푸라노오스 부분이 푸라노오스 고리 상에서 2개 탄소 원자를 연결하는 가교를 포함하고, 따라서 이중환상 고리 시스템을 형성하는 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드를 지칭한다.
- [0078] "캡 구조" 또는 "말단 캡 모이어티"는 안티센스 화합물의 어느 한쪽 말단에서 통합되는 화학적 변형을 의미한다.
- [0079] "심혈관 질환" 또는 "심혈관 장애"는 심장, 혈관, 또는 순환에 관련된 질환의 그룹을 지칭한다. 심혈관 질환의 실례에는 동맥류, 협심증, 부정맥, 죽상동맥경화증, 뇌혈관 질환 (뇌졸중), 관상동맥 심장 질환, 고혈압, 이상지질혈증, 과지질혈증, 과트리글리세리드혈증 및 과콜레스테롤혈증이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0080] "화학적으로 별개의 영역"은 동일한 안티센스 화합물의 다른 영역과 어떤 점에서는 화학적으로 상이한 안티센스 화합물의 영역을 지칭한다. 가령, 2'-O-메톡시에틸 뉴클레오티드를 갖는 영역은 2'-O-메톡시에틸 변형이 없는 뉴클레오티드를 갖는 영역과 화학적으로 별개이다.
- [0081] "키메라 안티센스 화합물"은 적어도 2개의 화학적으로 별개의 영역을 갖는 안티센스 화합물을 의미한다.
- [0082] "콜레스테롤"은 모든 동물 조직의 세포 막에서 관찰되는 스테롤 분자이다. 콜레스테롤은 초저밀도 지방단백질 (VLDL), 중간 밀도 지방단백질 (IDL), 저밀도 지방단백질 (LDL), 그리고 고밀도 지방단백질 (HDL)을 비롯한 지방단백질에 의해 동물의 혈액 혈장에서 수송된다. "혈장 콜레스테롤"은 혈장 또는 혈청 내에 존재하는 모든 지방단백질 (VLDL, IDL, LDL, HDL) 에스테르화된 및/또는 비-에스테르화된 콜레스테롤의 총합을 지칭한다.
- [0083] "콜레스테롤 흡수 저해제"는 식이로부터 획득된 외인성 콜레스테롤의 흡수를 저해하는 작용제를 의미한다.
- [0084] "공동-투여"는 개체에 2개 또는 그 이상의 작용제의 투여를 의미한다. 2개 또는 그 이상의 작용제는 단일 제약학적 조성물 내에 있거나, 또는 별개의 제약학적 조성물 내에 있을 수 있다. 2개 또는 그 이상의 작용제 각각은 동일한 또는 상이한 투여 루트를 통해 투여될 수 있다. 공동-투여는 병렬 또는 순차 투여를 포함한다.
- [0085] "상보성 (complementarity)"은 첫 번째 핵산과 두 번째 핵산의 핵염기 사이에 대합 (pairing)의 능력을 의미한다. 일정한 구체예에서, 첫 번째와 두 번째 핵산 사이에 상보성은 2개 DNA 가닥, 2개 RNA 가닥, 또는 DNA와 RNA 가닥 사이에 상보성일 수 있다. 일정한 구체예에서, 가닥 상에서 일부 핵염기는 다른 가닥 상에서 상보성 수소 결합 염기에 정합 (match)된다. 일정한 구체예에서, 한 가닥 상에서 모든 핵염기가 다른 가닥 상에서 상보성 수소 결합 염기에 정합된다. 일정한 구체예에서, 첫 번째 핵산은 안티센스 화합물이고, 그리고 두 번째 핵산은 표적 핵산이다. 일정한 이런 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 첫 번째 핵산이고, 그리고 표적 핵산은 두 번째 핵산이다.
- [0086] "연속 핵염기"는 서로 바로 인접한 핵염기를 의미한다.
- [0087] "속박된 에틸" 또는 "cEt"는 4'와 2' 탄소 원자 사이에 메틸(메틸렌옥시) (4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2') 가교를 포함하는 푸라노실 당을 갖는 이중환상 뉴클레오시드를 지칭한다.
- [0088] "교차-반응성"은 한 핵산 서열을 표적으로 하는 올리고머 화합물이 상이한 핵산 서열에 혼성화될 수 있다는 것을 의미한다. 가령, 일부 경우에, 인간 ApoCIII를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 뮤린 ApoCIII와 교차-반응할 수 있다. 올리고머 화합물이 지정된 표적 이외의 핵산 서열과 교차-반응하는지의 여부는 화합물이 갖는 비-표적 핵산 서열과의 상보성 정도에 좌우된다. 올리고머 화합물과 비-표적 핵산 사이에 상보성이 높을수록, 올리고머 화합물이 핵산과 교차-반응할 가능성이 더욱 높다.
- [0089] "치료"는 건강을 회복하는 방법 또는 질환에 대한 처방된 치료를 의미한다.
- [0090] "관상동맥 심장 질환 (CHD)"은 종종, 죽상동맥경화증의 결과인, 심장에 혈액과 산소를 공급하는 작은 혈관의 좁아짐을 의미한다.
- [0091] "데옥시리보뉴클레오티드"는 뉴클레오티드의 당 부분의 2' 위치에서 수소를 갖는 뉴클레오티드를 의미한다. 데옥시리보뉴클레오티드는 임의의 다양한 치환기로 변형될 수 있다.
- [0092] "진성 당뇨병" 또는 "당뇨병"은 인슐린의 불충분한 수준 또는 감소된 인슐린 민감성에 기인한 교란된 대사 및 비정상적으로 높은 혈액 당 (과혈당)으로 특징되는 증후군이다. 특징적인 증상은 높은 혈액 글루코오스 수준에

기인한 과도한 소변 생산 (다뇨증), 과도한 갈증 및 증가된 배뇨를 보충하기 위한 증가된 액체 섭취 (조갈증), 눈의 시력에 대한 높은 혈액 글루코오스 효과에 기인한 흐린 시력, 설명되지 않는 체중 감소, 그리고 무기력이다.

- [0093] "당뇨병성 이상지질혈증" 또는 "이상지질혈증을 동반하는 2형 당뇨병"은 2형 당뇨병, 감소된 HDL-C, 상승된 트리글리세리드, 그리고 상승된 작고, 밀집한 LDL 입자로 특징되는 질환을 의미한다.
- [0094] "희석제"는 약리학적 활성이 없지만, 제약학적으로 필요하거나 바람직한, 조성물 내에 성분을 의미한다. 가령, 주사되는 조성물 내에 희석제는 액체, 예를 들면, 식염수 용액일 수 있다.
- [0095] "이상지질혈증"은 지질 및/또는 지방단백질 과다생산 또는 결핍을 비롯하여, 지질 및/또는 지방단백질 대사의 장애를 지칭한다. 이상지질혈증은 지질, 예를 들면, 카일로마이크론, 콜레스테롤과 트리글리세리드뿐만 아니라 지방단백질, 예를 들면, 저밀도 지방단백질 (LDL) 콜레스테롤의 상승에 의해 드러날 수 있다. 이상지질혈증의 실례는 카일로마이크론혈증이다.
- [0096] "투약 단위"는 제약학적 작용제가 제공되는 형태, 예를 들면, 알약, 정제, 또는 당분야에 공지된 기타 투약 단위를 의미한다. 일정한 구체예에서, 투약 단위는 냉동 건조된 안티센스 올리고뉴클레오티드를 내포하는 바이알이다. 일정한 구체예에서, 투약 단위는 재구성된 안티센스 올리고뉴클레오티드를 내포하는 바이알이다.
- [0097] "분량"은 단일 투여에서, 또는 특정된 기간에서 제공되는 특정된 양의 제약학적 작용제를 의미한다. 일정한 구체예에서, 분량은 1개, 2개, 또는 그 이상의 덩어리, 정제, 또는 주사에서 투여될 수 있다. 가령, 피하 투여가 요망되는 일정한 구체예에서, 원하는 분량은 단일 주사에 의해 쉽게 수용되지 않는 부피를 요구하고, 이런 이유로 원하는 분량을 달성하기 위해 2개 또는 그 이상의 주사가 이용될 수 있다. 일정한 구체예에서, 제약학적 작용제는 연장된 기간에 걸쳐 또는 지속적으로 주입에 의해 투여된다. 분량은 시간, 일, 주 또는 월마다 제약학적 작용제의 양으로서 규정될 수 있다. 분량은 또한, mg/kg 또는 g/kg로서 규정될 수 있다.
- [0098] "효과량" 또는 "치료 효과량"은 작용제를 필요로 하는 개체에서 원하는 생리학적 결과를 달성하는데 충분한 활성 제약학적 작용제의 양을 의미한다. 효과량은 치료되는 개체의 건강과 신체 상태, 치료되는 개체의 분류학적 군, 조성물의 제제, 개체의 의학적 상태의 평가, 그리고 다른 관련 인자에 따라, 개체 간에 변할 수 있다.
- [0099] 이상지질혈증의 일차적 (유전적) 원인을 몇몇 하위군 또는 유형으로 분류하기 위해 "Fredrickson" 시스템이 이용된다. 본원에서 개시된 화합물로 치료될 수 있는 이상지질혈증 타입에는 Fredrickson 타입 II, IV와 V가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0100] "Fredrickson 타입 I"은 여러 형태로 존재한다: 타입 1a는 LPL의 결핍 또는 변형된 apoC-II에 기인한 지방단백질 리파아제 결핍이다; 타입 1b는 지방단백질 리파아제 활성자의 결여에 의해 유발된 질환인 가족성 아포단백질 CII 결핍이다; 그리고 타입 1c는 지방단백질 리파아제의 순환 저해제에 기인한 카일로마이크론혈증이다. 타입 I는 통상적으로 아동에서 나타나는 희귀 질환이다. 이것은 복통, 재발성 급성 췌장염, 발진성 피부 황색종증, 그리고 간비종대의 에피소드와 함께, 카일로마이크론에서 심각한 상승 및 극히 상승된 TG 수준 (항상 1000 mg/dL을 훨씬 초과하고, 그리고 드물지 않게 10,000 mg/dL 또는 그 이상까지 상승)으로 특징된다. 환자는 아마도, 그들의 혈장 지방단백질 입자가 동맥 내막으로 들어가기에는 너무 크기 때문에, 죽상동맥경화증이 거의 발생하지 않는다 (Nordestgaard et al., J Lipid Res, 1988, 29:1491-1500; Nordestgaard et al., Arteriosclerosis, 1988, 8:421-428). 타입 I는 통상적으로, LPL 유전자, 또는 상기 유전자의 보조인자 apoC-II의 돌연변이에 의해 유발되고, 병든 개체에서 기능적으로 활성 LPL를 생산하는 능력 없음을 발생시킨다. 환자는 이런 돌연변이에 대한 동형접합성 또는 화합물 이형접합성이다. 유병률은 전체 개체군에서 대략 1,000,000명당 1명이고, 그리고 South Africa와 Eastern Quebec에서, 창시자 효과의 결과로서 훨씬 높다. 환자는 TG-저하 약물에 최소로 반응하거나, 또는 반응하지 않고 (Tremblay et al., J Clin Lipidol, 2011, 5:37-44; Brisson et al., Pharmacogenet Genom, 2010, 20:742-747), 따라서 20 그램/일 또는 그 이하로 식이 지방의 제한이 이러한 희귀 질환의 증상을 관리하는데 이용된다.
- [0101] "Fredrickson 타입 II"는 일차 과지질혈증의 가장 일반적인 형태이다. 이것은 주로, LDL 콜레스테롤 (LDL-C) 이외에 VLDL에서 상승이 있는 지의 여부에 따라, 타입 IIa와 타입 IIb로 더욱 분류된다. 타입 IIa (가족성 과콜레스테롤혈증)는 산발성 (식이 인자에 기인), 다유전자성, 또는 염색체 19 상에서 LDL 수용체 유전자 (개체군의 0.2%) 또는 아포지방단백질 B (apoB) 유전자 (0.2%)에서 돌연변이의 결과로서 진성 가족성이다. 이러한 가족성 형태는 힘줄 황색종, 황색판증 및 조기 심혈관 질환으로 특징된다. 상기 질환의 발생률은 이형접합체의 경우에 약 500명당 1명이고, 그리고 동형접합체의 경우에 1,000,000명당 1명이다. 타입 IIb (일명, 가족성 결합 과지방

단백혈증)는 LDL-C와 VLDL에서 상승에 의해 유발된, 혼합 과지질혈증 (높은 콜레스테롤과 TG 수준)이다. 높은 VLDL 수준은 TG, 아세틸 CoA를 비롯한 기질의 과다생산, 그리고 B-100 합성에서 증가에 기인한다. 이들은 또한, LDL의 감소된 제거에 의해 유발될 수도 있다. 개체군에서 유병률은 약 10%이다.

- [0102] "Fredrickson 타입 III" (일명, 이상베타지방단백혈증)은 잔여 제거 질환, 또는 광범위 베타 질환이다 (Fern *et al.*, *J Clin Pathol*, 2008, 61:1174-118). 이것은 콜레스테롤-풍부한 VLDL ( $\beta$ -VLDL)에 기인한다. 전형적으로, 이러한 질환을 앓는 환자는 카일로마이크론과 VLDL 잔여물 (가령, IDL)의 손상된 제거로 인하여, 상승된 혈장 콜레스테롤과 TG 수준을 갖는다. 손상된 제거는 아포지방단백질 E (apoE)에서 결함에 기인한다. 잔여물 상에 내포된 정상적으로 기능하는 apoE는 LDL 수용체에 결합 및 순환으로부터 제거를 가능하게 할 것이다. 병든 개체에서 잔여물의 축적은 황색종증 및 조기 관상동맥 및/또는 말초 혈관 질환을 유발할 수 있다. 타입 III에 대한 가장 통상적인 원인은 apoE E2/E2 유전형의 존재이다. 이의 유병률은 대략 10,000명당 1명인 것으로 추정된다.
- [0103] "Fredrickson 타입 IV" (일명, 가족성 과트리글리세리드혈증)는 개체의 대략 1%에서 발생하는 상염색체 우성 질환이다. TG 수준이 VLDL의 과도한 간 생산 또는 이형접합성 LPL 결핍의 결과로서 상승되지만, 거의 항상 1000 mg/dL 이하이다. 혈청 콜레스테롤 수준은 통상적으로 정상 범위 내에 있다. 상기 질환은 이질성이고, 그리고 표현형이 환경 인자, 특히 탄수화물과 에탄올 소비에 의해 강한 영향을 받는다.
- [0104] "Fredrickson 타입 V"는 높은 VLDL과 카일로마이크론을 갖는다. 이것은 적어도 20%의 LPL 활성화와 연관된 기능 상실 LPL 유전자 변이체 (즉, Fredrickson 타입 I과 비교하여 부분적인 LPL 결핍)의 보유자로 특징된다. 이들 환자는 카일로마이크론과 VLDL로 인하여, 유백색 혈장 및 심각한 과트리글리세리드혈증을 나타낸다. TG 수준은 항상 1000 mg/dL 이상이고, 그리고 총 콜레스테롤 수준은 항상 상승된다. LDL-C 수준은 통상적으로 낮다. 이것은 또한, 급성 췌장염, 글루코오스 과민증 및 고요산혈증에 대한 증가된 위험과 연관된다. 증상은 일반적으로, 성인기 (> 35세)에 나타나고, 그리고 비록 유병률이 상대적으로 드물긴 하지만, 이것은 동형접합성 또는 화합물 이형접합성 LPL 결함성 환자보다 훨씬 빈번하다.
- [0105] "완전히 상보성" 또는 "100% 상보성"은 첫 번째 핵산의 핵염기 서열의 각 핵염기가 두 번째 핵산의 두 번째 핵염기 서열에서 상보성 핵염기를 갖는다는 것을 의미한다. 일정한 구체예에서, 첫 번째 핵산은 안티센스 화합물이고, 그리고 두 번째 핵산은 표적 핵산이다.
- [0106] "갭머 (gapmer)"는 RNase H 개열을 뒷받침하는 복수의 뉴클레오시드를 갖는 내부 영역이 하나 또는 그 이상 뉴클레오시드를 갖는 외부 영역 사이에 위치되는 키메라 안티센스 화합물을 의미하고, 여기서 내부 영역을 포함하는 뉴클레오시드는 외부 영역을 포함하는 뉴클레오시드 또는 뉴클레오시드들과 화학적으로 별개이다. 내부 영역은 "갭" 또는 "갭 분절"로서 지칭될 수 있고, 그리고 외부 영역은 "날개" 또는 "날개 분절"로서 지칭될 수 있다.
- [0107] "갭-확대된"은 1 내지 6개의 뉴클레오시드를 갖는 5'와 3' 날개 분절 사이에, 그리고 이들에 바로 인접하게 위치하는 12개 또는 그 이상의 연속 2'-데옥시리보뉴클레오시드의 갭 분절을 갖는 키메라 안티센스 화합물을 의미한다.
- [0108] "글루코오스"는 에너지와 염증성 중간물질의 공급원으로서 세포에 의해 이용되는 당당류이다. "혈장 글루코오스"는 혈장 내에 존재하는 글루코오스를 지칭한다.
- [0109] "고밀도 지방단백질-C (HDL-C)"는 고밀도 지방단백질 입자와 연관된 콜레스테롤을 의미한다. 혈청 (또는 혈장)에서 HDL-C의 농도는 mg/dL 또는 nmol/L에서 전형적으로 정량된다. "HDL-C"와 "혈장 HDL-C"는 각각, 혈청과 혈장에서 HDL-C를 의미한다.
- [0110] "HMG-CoA 환원효소 저해제"는 효소 HMG-CoA 환원효소의 저해를 통해 기능하는 작용제, 예를 들면, 아토르바스타틴, 로수바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 프라바스타틴, 그리고 심바스타틴을 의미한다.
- [0111] "혼성화"는 상보성 핵산 분자의 어닐링을 의미한다. 일정한 구체예에서, 상보성 핵산 분자는 안티센스 화합물 및 표적 핵산을 포함한다.
- [0112] "과콜레스테롤혈증"은 Expert Panel Report of the National Cholesterol Educational Program (NCEP) of Detection, Evaluation of Treatment of high cholesterol in adult의 가이드라인에 따라서, 상승된 콜레스테롤 또는 순환 (혈장) 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤과 VLDL-콜레스테롤로 특징되는 질환을 의미한다 (Arch. Int. Med. (1988) 148, 36-39를 참조한다).
- [0113] "과지질혈증" 또는 "고지방혈"은 상승된 혈청 지질 또는 순환 (혈장) 지질로 특징되는 질환이다. 이러한 질환은



지방의 비정상적으로 높은 농도를 나타낸다. 순환 혈액 내에 지질 분획물은 콜레스테롤, 저밀도 지방단백질, 초저밀도 지방단백질, 카일로마이크론 및 트리글리세리드이다. 과지질혈증의 Fredrickson 분류는 전기영동 또는 초원심분리에 의해 측정된, TG와 콜레스테롤-풍부한 지방단백질 입자의 패턴에 기초되고, 그리고 과지질혈증, 예를 들면, 과트리글리세리드혈증의 일차적인 원인을 특징화하는데 통상적으로 이용된다 (Fredrickson and Lee, *Circulation*, 1965, 31:321-327; Fredrickson et al., *New Eng J Med*, 1967, 276 (1): 34-42).

- [0114] "과트리글리세리드혈증"은 상승된 트리글리세리드 수준으로 특징되는 질환을 의미한다. 이의 병인에는 일차적 인자 (즉, 유전적 원인)와 이차적 인자 (기타 근원적 원인, 예를 들면, 당뇨병, 대사 증후군/인슐린 저항, 비만, 신체 비활동, 흡연, 과도한 알코올 및 탄수화물이 매우 많은 식이), 또는 가장 빈번하게는, 양쪽의 조합이 포함된다 (Yuan *et al.* *CMAJ*, 2007, 176:1113-1120).
- [0115] "확인하고" 또는 "대사 또는 심혈관 질환을 앓는 동물을 선별하고"는 대사 질환, 심혈관 질환, 또는 대사 증후군에 걸리기 쉽거나 이것으로 진단된 개체를 확인하거나 선별하는 것; 또는 과콜레스테롤혈증, 과혈당, 과지질혈증, 과트리글리세리드혈증, 고혈압, 증가된 인슐린 저항, 감소된 인슐린 민감성, 정상 초과 체중, 및/또는 정상 초과 체지방 함량 또는 이들의 임의의 조합이 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 대사 질환, 심혈관 질환, 또는 대사 증후군의 임의의 증상을 갖는 개체를 확인하거나 선별하는 것을 의미한다. 이런 확인은 표준 임상적 검사 또는 평가가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 임의의 방법, 예를 들면, 혈청 또는 순환 (혈장) 콜레스테롤의 측정, 혈청 또는 순환 (혈장) 혈액-글루코오스의 측정, 혈청 또는 순환 (혈장) 트리글리세리드의 측정, 혈압의 측정, 체지방 함량의 측정, 체중의 측정 등에 의해 달성될 수 있다.
- [0116] "향상된 심혈관 결과"는 유해한 심혈관 사건의 발생, 또는 이들의 위험에서 감소를 의미한다. 유해한 심혈관 사건의 사례에는 제한 없이, 사망, 재경색, 뇌졸중, 심장성 쇼크, 폐 부종, 심장 마비, 그리고 심파 율동부전이 포함된다.
- [0117] "바로 인접하는"은 바로 인접하는 요소 사이에, 예를 들면, 영역, 분절, 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드 사이에 개재성 요소가 없다는 것을 의미한다.
- [0118] "HDL을 증가시키는" 또는 "HDL을 상승시키는"은 임의의 화합물이 투여되지 않은 동물에서 HDL 수준과 비교하여, 본 발명의 적어도 하나의 화합물의 투여 후 동물에서 HDL의 수준을 증가시키는 것을 의미한다.
- [0119] "개체" 또는 "피험체" 또는 "동물"은 처리 또는 치료를 위해 선별된 인간 또는 비-인간 동물을 의미한다.
- [0120] "유도한다", "저해한다", "강화시킨다", "상승시킨다", "증가시킨다", "감소시킨다", "축소한다" 등은 두 상태 간에 정량적 차이를 나타낸다. 가령, "ApoCIII의 활성 또는 발현을 저해하는데 효과적인 양"은 처리된 시료에서 ApoCIII의 활성 또는 발현의 수준이 처리되지 않은 시료에서 ApoCIII 활성 또는 발현의 수준과 달라진다는 것을 의미한다. 이런 용어는 예로써, 발현의 수준, 그리고 활성의 수준에 적용된다.
- [0121] "발현 또는 활성을 저해하는"은 RNA 또는 단백질의 발현 또는 활성의 감소 또는 차단을 지칭하고, 그리고 발현 또는 활성의 완전한 소멸을 반드시 지시하지는 않는다.
- [0122] "인슐린 저항"은 인슐린의 정상적인 양이 지방, 근육과 간 세포로부터 정상 인슐린 반응을 생산하는데 부적당한 상태로 정의된다. 지방 세포에서 인슐린 저항은 보관된 트리글리세리드의 가수분해를 유발하고, 이것은 혈액 혈장 내에 유리 지방산을 상승시킨다. 근육에서 인슐린 저항은 글루코오스 흡수를 감소시키는 반면, 간에서 인슐린 저항은 글루코오스 보관을 감소시키고, 양쪽 효과는 혈액 글루코오스를 상승시키는 역할을 한다. 인슐린 저항에 기인한 높은 혈장 수준의 인슐린과 글루코오스는 종종, 대사 증후군 및 2형 당뇨병을 유발한다.
- [0123] "인슐린 민감성"은 개체가 글루코오스를 얼마나 효과적으로 가공 처리하는지의 적도이다. 높은 인슐린 민감성을 갖는 개체는 글루코오스를 효과적으로 가공 처리하는 반면, 낮은 인슐린 민감성을 갖는 개체는 글루코오스를 효과적으로 가공 처리하지 못한다.
- [0124] "뉴클레오시드간 연쇄"는 뉴클레오시드 간에 화학적 결합을 지칭한다.
- [0125] "정맥내 투여"는 정맥 내로 투여를 의미한다.
- [0126] "연결된 뉴클레오시드"는 함께 결합되는 인접한 뉴클레오시드를 의미한다.
- [0127] "지질-저하"는 개체에서 하나 또는 그 이상의 지질의 감소를 의미한다. "지질-상승"은 개체에서 지질 (가령, HDL)의 증가를 의미한다. 지질-저하 또는 지질-상승은 시간의 흐름에서 하나 또는 그 이상의 분량으로 발생할 수 있다.



- [0128] "지질-저하 치료" 또는 "지질 저하제"는 개체에서 하나 또는 그 이상의 지질을 감소시키기 위해 개체에 제공된 치료적 섭생을 의미한다. 일정한 구체예에서, 지질-저하 치료는 개체에서 CETP, ApoB, 총 콜레스테롤, LDL-C, VLDL-C, IDL-C, 비-HDL-C, 트리글리세리드, 작은 밀집한 LDL 입자, 그리고 Lp(a) 중에서 하나 또는 그 이상을 감소시키기 위해 제공된다. 지질-저하 치료의 실례에는 스타틴, 피브레이트, MTP 저해제가 포함된다.
- [0129] "지방단백질", 예를 들면, VLDL, LDL과 HDL은 혈청, 혈장과 림프에서 발견되는 단백질의 군을 지칭하고 지질 수송에 중요하다. 각 지방단백질의 화학적 조성은 HDL이 지질과 대비하여 더욱 높은 비율의 단백질을 갖는 반면, VLDL은 지질과 대비하여 더욱 낮은 비율의 단백질을 갖는다는 점에서 상이하다.
- [0130] "저밀도 지방단백질-콜레스테롤 (LDL-C)"은 저밀도 지방단백질 입자에서 운반되는 콜레스테롤을 의미한다. 혈청 (또는 혈장) 내에서 LDL-C의 농도는 전형적으로, mg/dL 또는 nmol/L에서 정량된다. "혈청 LDL-C" 및 "혈장 LDL-C"는 각각, 혈청과 혈장에서 LDL-C를 의미한다.
- [0131] "주요 위험 인자"는 특정 질환 또는 장애에 대한 높은 위험에 기여하는 인자를 지칭한다. 일정한 구체예에서, 관상동맥 심장 질환에 대한 주요 위험 인자에는 제한 없이, 흡연, 고혈압, 저 HDL-C, 관상동맥 심장 질환의 가족력, 연령, 그리고 본원에서 개시된 기타 인자가 포함된다.
- [0132] "대사 장애" 또는 "대사 질환"은 대사 기능에서 변경 또는 교란으로 특징되는 질환을 지칭한다. "대사성" 및 "대사"는 당분야에 공지된 용어이고, 그리고 일반적으로, 생존 생물체 내에서 발생하는 전체 범위의 생물화학적 과정을 포함한다. 대사 장애에는 과혈당, 전당뇨병, 당뇨병 (1형과 2형), 비만, 인슐린 저항, 대사 증후군 및 2형 당뇨병에 기인한 이상지질혈증이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0133] "대사 증후군"은 대사 기원의 지질과 비-지질 심혈관 위험 인자의 클러스터링으로 특징되는 질환을 의미한다. 일정한 구체예에서, 대사 증후군은 하기 인자 중에서 임의의 3가지의 존재에 의해 확인된다: 남성에서 102 cm 이상 또는 여성에서 88 cm 이상의 허리 둘레; 적어도 150 mg/dL의 혈청 트리글리세리드; 남성에서 40 mg/dL 이하 또는 여성에서 50 mg/dL 이하의 HDL-C; 적어도 130/85 mmHg의 혈압; 그리고 적어도 110 mg/dL의 공복 글루코오스. 이들 결정인자는 임상적 실시기준에서 쉽게 측정될 수 있다 (JAMA, 2001, 285: 2486-2497).
- [0134] "미스매치" 또는 "비-상보성 핵염기"는 첫 번째 핵산의 핵염기가 두 번째 또는 표적 핵산의 상응하는 핵염기와 대합할 수 없을 때의 경우를 지칭한다.
- [0135] "혼합 이상지질혈증"은 상승된 콜레스테롤 및 상승된 트리글리세리드로 특징되는 질환을 의미한다.
- [0136] "변형된 뉴클레오시드간 연쇄"는 자연 발생 뉴클레오시드간 결합으로부터 치환 또는 임의의 변화를 지칭한다. 가령, 포스포로티오에이트 연쇄는 변형된 뉴클레오시드간 연쇄이다.
- [0137] "변형된 핵염기"는 아데닌, 시토신, 구아닌, 티미딘, 또는 우라실 이외에 임의의 핵염기를 지칭한다. 가령, 5-메틸시토신은 변형된 핵염기이다. "변형되지 않은 핵염기"는 퓨린 염기 아데닌 (A)와 구아닌 (G), 그리고 피리미딘 염기 티민 (T), 시토신 (C), 그리고 우라실 (U)을 의미한다.
- [0138] "변형된 뉴클레오시드"는 적어도 하나의 변형된 당 모이어티, 및/또는 변형된 핵염기를 갖는 뉴클레오시드를 의미한다.
- [0139] "변형된 뉴클레오티드"는 적어도 하나의 변형된 당 모이어티, 변형된 뉴클레오시드간 연쇄 및/또는 변형된 핵염기를 갖는 뉴클레오티드를 의미한다.
- [0140] "변형된 올리고뉴클레오티드"는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 의미한다.
- [0141] "변형된 당"은 자연 당으로부터 치환 또는 변화를 지칭한다. 가령, 2'-O-메톡시에틸 변형된 당은 변형된 당이다.
- [0142] "모티프"는 안티센스 화합물 내에서 화학적으로 별개의 영역의 패턴을 의미한다.
- [0143] "자연 발생 뉴클레오시드간 연쇄"는 3'에서 5' 포스포디에스테르 연쇄를 의미한다.
- [0144] "자연 당 모이어티"는 DNA (2'-H) 또는 RNA (2'-OH)에서 발견되는 당을 의미한다.
- [0145] "핵산"은 단위체성 뉴클레오티드로 구성되는 분자를 지칭한다. 핵산에는 리보핵산 (RNA), 데옥시리보핵산 (DNA), 단일-가닥 핵산 (ssDNA), 이중-가닥 핵산 (dsDNA), 작은 간섭 리보핵산 (siRNA), 그리고 microRNA

(miRNA)가 포함된다. 핵산은 또한, 단일 분자 내에서 이들 요소의 조합을 포함할 수도 있다.

- [0146] "핵염기"는 다른 핵산의 염기와 대합할 수 있는 헤테로환상 모이어티를 의미한다.
- [0147] "핵염기 상보성"은 다른 핵염기와 염기 대합할 수 있는 핵염기를 지칭한다. 가령, DNA에서, 아데닌 (A)는 티민 (T)에 상보성이다. 가령, RNA에서, 아데닌 (A)는 우라실 (U)에 상보성이다. 일정한 구체예에서, 상보성 핵염기는 표적 핵산의 핵염기와 염기 대합할 수 있는 안티센스 화합물의 핵염기를 지칭한다. 가령, 안티센스 화합물의 일정한 위치에서 핵염기가 표적 핵산의 일정한 위치에서 핵염기와 수소 결합할 수 있으면, 올리고뉴클레오티드와 표적 핵산은 이러한 핵염기쌍에서 상보성인 것으로 간주된다.
- [0148] "핵염기 서열"은 임의의 당, 연쇄, 또는 핵염기 변형과 독립적으로, 연속 핵염기의 순서를 의미한다.
- [0149] "뉴클레오시드"는 당에 연결된 핵염기를 의미한다.
- [0150] "뉴클레오시드 모방체"는 당 또는 당과 염기를 대체하는데 이용되는 구조를 포함하고, 그리고 올리고머 화합물의 하나 또는 그 이상의 위치에서 반드시 연쇄일 필요는 없다; 가령, 모르폴리노, 시클로헥세닐, 시클로헥실, 테트라히드로피라닐, 비시클로 또는 트리시클로 당 모방체, 예를 들면, 비-푸라노오스 당 단위를 갖는 뉴클레오시드 모방체.
- [0151] "뉴클레오티드"는 뉴클레오시드의 당 부분에 공유 연결된 인산염 기를 갖는 뉴클레오시드를 의미한다.
- [0152] "뉴클레오티드 모방체"는 뉴클레오시드 및 하나 또는 그 이상의 위치에서 올리고머 화합물, 예를 들면, 펩티드 핵산 또는 모르폴리노 (-N(H)-C(=O)-O- 또는 기타 비-포스포디에스테르 연쇄에 의해 연결된 모르폴리노)의 연쇄를 대체하는데 이용되는 구조를 포함한다.
- [0153] "올리고머 화합물" 또는 "올리고머"는 핵산 분자의 영역에 혼성화될 수 있는 연결된 단위체성 아단위의 중합체를 의미한다. 일정한 구체예에서, 올리고머 화합물은 올리고뉴클레오시드이다. 일정한 구체예에서, 올리고머 화합물은 올리고뉴클레오티드이다. 일정한 구체예에서, 올리고머 화합물은 안티센스 화합물이다. 일정한 구체예에서, 올리고머 화합물은 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 일정한 구체예에서, 올리고머 화합물은 키메라 올리고뉴클레오티드이다.
- [0154] "올리고뉴클레오티드"는 각각이 서로에 독립적으로, 변형되거나 변형되지 않을 수 있는 연결된 뉴클레오시드의 중합체를 의미한다.
- [0155] "비경구 투여"는 주사 또는 주입을 통한 투여를 의미한다. 비경구 투여에는 피하 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 동맥내 투여, 복강내 투여, 또는 두개내 투여, 예를 들면, 척수강내 또는 뇌실내 투여가 포함된다. 투여는 연속적, 장기적, 단기적 또는 간헐적일 수 있다.
- [0156] "펩티드"는 아마이드 결합에 의해 적어도 2개의 아미노산을 연결함으로써 형성된 분자를 의미한다. 펩티드는 폴리펩티드와 단백질을 지칭한다.
- [0157] "제약학적 작용제"는 개체에 투여될 때, 치료적 혜택을 제공하는 물질을 의미한다. 가령, 일정한 구체예에서, ApoCIII에 표적화된 안티센스 올리고뉴클레오티드는 제약학적 작용제이다.
- [0158] "제약학적 조성물" 또는 "조성물"은 개체에 투여하기에 적합한 물질의 혼합물을 의미한다. 가령, 제약학적 조성물은 하나 또는 그 이상의 활성 작용제 및 제약학적 담체, 예를 들면, 무균 수성 용액을 포함할 수 있다.
- [0159] "제약학적으로 허용되는 담체"는 화합물의 구조를 간섭하지 않는 매체 또는 희석제를 의미한다. 일정한 이런 담체는 제약학적 조성물이 예로써, 개체에 의한 경구 섭취를 위한 정제, 알약, 당의정, 캡슐, 액체, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁액 및 마름모꼴정제로서 조제될 수 있도록 한다. 일정한 이런 담체는 제약학적 조성물이 주사, 주입 또는 국소 투여용으로 조제될 수 있도록 한다. 가령, 제약학적으로 허용되는 담체는 무균 수성 용액일 수 있다.
- [0160] "제약학적으로 허용되는 유도체" 또는 "염"은 본원에서 기술된 화합물의 유도체, 예를 들면, 용매화물, 수화물, 에스테르, 프로드러그, 다형체, 이성질체, 동위원소 표지된 변이체, 제약학적으로 허용되는 염 및 당분야에 공지된 기타 유도체를 포괄한다.
- [0161] "제약학적으로 허용되는 염"은 안티센스 화합물의 생리학적으로 및 제약학적으로 허용되는 염, 다시 말하면, 부모 화합물의 바람직한 생물학적 활성을 유지하고 원치 않는 독성 효과를 거기에 부여하지 않는 염을 의미한다. 용어 "제약학적으로 허용되는 염" 또는 "염"은 무기 또는 유기 산과 염기를 비롯하여, 제약학적으로 허용되는 비-독성 산 또는 염기로부터 제조된 염을 포함한다. 본원에서 기술된 화합물의 "제약학적으로 허용되는 염"은

당분야에 널리 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 제약학적으로 허용되는 염의 검토를 위하여, Stahl and Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)를 참조한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 나트륨 염은 유용하고 인간에 치료적 투여를 위해 널리 인정된다. 따라서 한 구체예에서, 본원에서 기술된 화합물은 나트륨 염의 형태이다.

- [0162] "포스포로티오에이트 연쇄"는 포스포디에스테르 결합이 비-가교 산소 원자 중에서 하나를 황 원자로 대체함으로써 변형되는 뉴클레오시드 간에 연쇄를 의미한다. 포스포로티오에이트 연쇄는 변형된 뉴클레오시드간 연쇄이다.
- [0163] "부분"은 핵산의 정의된 숫자의 연속 (즉, 연결된) 핵염기를 의미한다. 일정한 구체예에서, 부분은 표적 핵산의 정의된 숫자의 연속 핵염기이다. 일정한 구체예에서, 부분은 안티센스 화합물의 정의된 숫자의 연속 핵염기이다.
- [0164] "예방한다"는 수분 내지 무한의 기간 동안 질환, 장애 또는 이상의 개시 또는 발생을 지연시키거나 앞질러 방해하는 것을 지칭한다. "예방한다"는 또한, 질환, 장애 또는 이상의 발생 위험을 감소시키는 것을 의미한다.
- [0165] "프로드러그"는 내인성 효소 또는 기타 화학물질 또는 조건의 작용에 의해 신체 또는 이의 세포 내에서 활성 형태 (즉, 약물)로 전환되는 비활성 형태로 제조되는 치료적 작용제를 의미한다.
- [0166] "상승시킨다"는 양의 증가를 의미한다. 가령, 혈장 HDL 수준을 상승시키는 것은 혈장 내에서 HDL의 양을 증가시키는 것을 의미한다.
- [0167] "TG 대 HDL의 비율"은 HDL 수준에 비하여 TG 수준을 의미한다. 높은 TG 및/또는 낮은 HDL의 발생은 심혈관 질환 발생률, 결과와 치사율과 연계된다. "TG 대 HDL의 비율을 향상시키고"는 TG를 감소시키고 및/또는 HDL 수준을 상승시키는 것을 의미한다.
- [0168] "감소시킨다"는 크기, 양, 또는 숫자를 더욱 작게 떨어뜨리는 것을 의미한다. 가령, 혈장 트리글리세리드 수준을 감소시키는 것은 혈장 내에서 트리글리세리드의 양을 떨어뜨리는 것을 의미한다.
- [0169] "영역" 또는 "표적 영역"은 적어도 하나의 확인가능 구조, 기능, 또는 특징을 갖는 표적 핵산의 부분으로서 정의된다. 가령, 표적 영역은 3' UTR, 5' UTR, 엑손, 인트론, 엑손/인트론 접합부, 코딩 영역, 번역 개시 영역, 번역 종결 영역, 또는 기타 정의된 핵산 영역을 포괄할 수 있다. ApoCIII에 대한 구조적으로 정의된 영역은 서열 데이터베이스, 예를 들면, NCBI로부터 수탁 번호에 의해 획득될 수 있고, 그리고 이런 정보는 본원에 참고문헌으로 편입된다. 일정한 구체예에서, 표적 영역은 표적 영역 내에 한 표적 분절의 5' 표적 부위에서부터 표적 영역 내에 다른 표적 분절의 3' 표적 부위까지의 서열을 포함한다.
- [0170] "리보뉴클레오티드"는 뉴클레오티드의 당 부분의 2' 위치에서 히드록시를 갖는 뉴클레오티드를 의미한다. 리보뉴클레오티드는 임의의 다양한 치환기로 변형될 수 있다.
- [0171] "이차 작용제" 또는 "이차 치료적 작용제"는 "일차 작용제"와 병용될 수 있는 작용제를 의미한다. 이차 치료적 작용제에는 siRNA 또는 ApoCIII를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 비롯한 안티센스 올리고뉴클레오티드가 포함될 수 있지만 이들에 국한되지 않는다. 이차 작용제에는 또한, 항-ApoCIII 항체, ApoCIII 펩티드 저해제, 콜레스테롤 저해제, 지질 저해제, 글루코오스 저해제 및 소염성 작용제가 포함될 수 있다.
- [0172] "분절"은 핵산 내에서 영역의 더욱 작은 하위-부분으로서 정의된다. 가령, "표적 분절"은 하나 또는 그 이상의 안티센스 화합물이 표적화되는 표적 핵산의 뉴클레오티드 서열을 의미한다. "5' 표적 부위"는 표적 분절의 가장 5' 뉴클레오티드를 지칭한다. "3' 표적 부위"는 표적 분절의 가장 3' 뉴클레오티드를 지칭한다.
- [0173] 본원에서 교시된 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 표적 핵산의 "단축된" 또는 "절두된" 이형은 1개, 2개 또는 그 이상의 뉴클레오시드가 결실된다.
- [0174] "부작용"은 원하는 효과 이외에, 치료에 기인한 생리학적 반응을 의미한다. 일정한 구체예에서, 부작용에는 주사 부위 반응, 간 기능 검사 이상, 신장 기능 이상, 간 독성, 신장 독성, 중추신경계 이상, 근질환, 그리고 불안감이 포함된다. 가령, 혈청 내에서 증가된 아미노전이효소 수준은 간 독성 또는 간 기능 이상을 지시할 수 있다. 가령, 증가된 빌리루빈은 간 독성 또는 간 기능 이상을 지시할 수 있다.
- [0175] "단일-가닥 올리고뉴클레오티드"는 상보성 가닥에 혼성화되지 않은 올리고뉴클레오티드를 의미한다.
- [0176] "특이적으로 혼성화가능한"은 특이적 결합이 요망되는 조건 하에, 다시 말하면, 생체내 검정과 치료적 처리의 경우에 생리학적 조건 하에, 비-표적 핵산에 대한 최소의 효과를 나타내거나 효과를 나타내지 않으면서, 원하는

효과를 유도할 만큼 충분한 정도의 표적 핵산에 대한 상보성을 갖는 안티센스 화합물을 지칭한다.

- [0177] "스타틴"은 HMG-CoA 환원효소의 활성을 저해하는 작용제를 의미한다.
- [0178] "피하 투여"는 피부 바로 아래 투여를 의미한다.
- [0179] "개체"는 처리 또는 치료를 위해 선별되는 인간 또는 비-인간 동물을 의미한다.
- [0180] "심혈관 질환 또는 장애의 증상"은 심혈관 질환 또는 장애로부터 발생하고 이에 수반하여 일어나고 이의 징조로서 역할하는 현상을 의미한다. 가령, 협심증; 흉통; 숨가쁨; 심계항진; 심약; 현기증; 메스꺼움; 발한; 심장빈맥; 서맥; 부정맥; 심방세동; 하지에서 종창; 청색증; 피로; 기절; 얼굴의 무감각; 팔다리의 무감각; 근육의 파행 또는 경련; 복부의 팽창; 또는 열병이 심혈관 질환 또는 장애의 증상이다.
- [0181] "표적으로 하는" 또는 "표적화된"은 표적 핵산에 특이적으로 혼성화되고 원하는 효과를 유도하는 안티센스 화합물의 설계와 선별의 과정을 의미한다.
- [0182] "표적 핵산", "표적 RNA" 및 "표적 RNA 전사체"는 모두, 안티센스 화합물에 의해 표적화될 수 있는 핵산을 지칭한다.
- [0183] "치료적 생활양식 변화"는 지방/지방 조직 질량 및/또는 콜레스테롤을 저하시키기 위해 의도되는 식이와 생활양식 변화를 의미한다. 이런 변화는 심장 질환의 발생 위험을 감소시킬 수 있고, 그리고 총 일일 칼로리, 총 지방, 포화된 지방, 다불포화 지방, 단불포화 지방, 탄수화물, 단백질, 콜레스테롤, 불용성 섬유질의 식이 섭취를 위한 권고뿐만 아니라 신체 활동에 대한 권고를 포함할지도 모른다.
- [0185] "치료한다"는 질환, 장애 또는 이상의 변경 또는 향상을 달성하기 위한 본 발명의 화합물을 투여하는 것을 지칭한다.
- [0186] "트리글리세리드" 또는 "TG"는 3개의 지방산 분자와 결합된 글리세롤로 구성되는 지질 또는 중성 지방을 의미한다.
- [0187] "2형 당뇨병" (일명, "2형 진성 당뇨병", "진성 당뇨병, 2형", "비-인슐린-의존성 당뇨병 (NIDDM)", "비만 관련된 당뇨병", 또는 "성인형 당뇨병")은 인슐린 저항, 상대적 인슐린 결핍, 그리고 과혈당으로 주로 특징되는 대사 장애이다.
- [0188] "변형되지 않은 뉴클레오티드"는 자연 발생 핵염기, 당 모이어티, 그리고 뉴클레오시드간 연쇄로 구성되는 뉴클레오티드를 의미한다. 일정한 구체예에서, 변형되지 않은 뉴클레오티드는 RNA 뉴클레오티드 (즉, β-D-리보뉴클레오티드) 또는 DNA 뉴클레오티드 (즉, β-D-데옥시리보뉴클레오티드)이다.
- [0189] "날개 분절"은 올리고뉴클레오티드에 증강된 저해 활성, 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화성, 또는 생체내 뉴클레아제에 의한 분해에 대한 저항과 같은 성질을 부여하기 위해 변형된 하나 또는 복수의 뉴클레오시드를 의미한다.
- [0191] *일정한 구체예*
- [0192] 일정한 구체예는 ApoCIII를 표적으로 하는 화합물을 동물에 투여하여 ApoCIII 수준을 감소시킴으로써, 동물에서 ApoCIII 수준을 감소시키는 방법을 제시한다. 일정한 구체예에서, ApoCIII 수준은 간 또는 소장에서 감소된다.
- [0193] 일정한 구체예는 화합물을 동물에 투여함으로써, 동물에서 HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시키는 방법을 제시하고, 여기서 상기 화합물은 ApoCIII를 표적으로 하고, HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시킨다.
- [0194] 일정한 구체예는 ApoCIII를 표적으로 하는 화합물을 동물에 투여하는 것을 포함하는, 동물에서 심혈관 질환, 장애, 이상 또는 이의 증상을 예방하거나, 지연시키거나 또는 개선하는 방법을 제시하고, 여기서 동물에 투여된 화합물은 동물에서 HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시킴으로써 동물에서 심혈관 질환, 장애, 이상 또는 증상을 예방하거나, 치료하거나 또는 개선한다.
- [0195] 일정한 구체예는 ApoCIII를 표적으로 하는 화합물을 동물에 투여하는 것을 포함하는, 동물에서 췌장염을 예방하거나, 지연시키거나 또는 개선하는 방법을 제시하고, 여기서 동물에 투여된 화합물은 동물에서 HDL 수준을 증가



시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시킴으로써 동물에서 췌장염을 예방하거나, 치료하거나 또는 개선한다. 일정한 구체예에서, 췌장염은 급성 췌장염이다.

- [0196] 일정한 구체예는 ApoCIII를 표적으로 하는 화합물을 동물에 투여하는 것을 포함하는, 동물에서 심혈관 질환, 장애 또는 이상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나, 이의 발생을 지연시키거나, 또는 이의 위험을 감소시키는 방법을 제시하고, 여기서 상기 화합물은 동물에서 HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시킴으로써 동물에서 심혈관 질환, 장애 또는 이상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나, 이의 발생을 지연시키거나, 또는 이의 위험을 감소시킨다.
- [0197] 일정한 구체예는 ApoCIII를 표적으로 하는 화합물을 동물에 투여함으로써 CETP 수준을 감소시키는 방법을 제시한다.
- [0198] 일정한 구체예는 ApoCIII를 표적으로 하는 화합물을 동물에 투여함으로써 ApoA1, PON1, 지방 제거, 카일로마이 크론 트리글리세리드 제거 및/또는 HDL을 증가시키는 방법을 제시한다. 일정한 구체예는 TG 대 HDL의 비율을 향상시키기 위한 방법을 제시한다.
- [0199] 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산은 GENBANK 수탁 번호 NM\_000040.1 (본원에서 서열 번호: 1로서 편집됨), 그리고 뉴클레오티드 20262640에서부터 20266603까지 절두된 GENBANK 수탁 번호 NT\_033899.8 (본원에서 서열 번호: 2로서 편집됨)에서 열거된 서열 중에서 한 가지이다.
- [0200] 일정한 구체예에서, ApoCIII를 표적으로 하는 화합물은 변형된 올리고뉴클레오티드이다. 추가의 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 적어도 8개의 연속 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는다. 일정한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 100% 상보성을 갖는다.
- [0201] 일정한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 단일-가닥 변형된 올리고뉴클레오티드로 구성된다.
- [0202] 일정한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 12-30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성된다.
- [0203] 일정한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 20개의 연결된 뉴클레오티드로 구성된다.
- [0204] 일정한 구체예에서, 화합물은 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드간 연쇄를 포함한다. 일정한 구체예에서, 뉴클레오티드간 연쇄는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연쇄이다.
- [0205] 일정한 구체예에서, 화합물은 변형된 당을 포함하는 적어도 하나의 뉴클레오티드를 포함한다. 일정한 구체예에서, 적어도 하나의 변형된 당은 이중환상 당이다. 일정한 구체예에서, 적어도 하나의 변형된 당은 2'-O-메톡시에틸을 포함한다.
- [0206] 일정한 구체예에서, 화합물은 변형된 핵염기를 포함하는 적어도 하나의 뉴클레오티드를 포함한다. 일정한 구체예에서, 변형된 핵염기는 5-메틸시토신이다.
- [0207] 일정한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물은 하기를 포함한다: (i) 연결된 데옥시뉴클레오티드로 구성되는 겹 분절; (ii) 연결된 뉴클레오티드로 구성되는 5' 날개 분절; (iii) 연결된 뉴클레오티드로 구성되는 3' 날개 분절, 여기서 겹 분절은 5' 날개 분절과 3' 날개 분절에 바로 인접하게, 그리고 이들 사이에 배치되고, 그리고 각 날개 분절의 각 뉴클레오티드는 변형된 당을 포함한다.
- [0208] 일정한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물은 하기를 포함한다: (i) 8-12개의 연결된 데옥시뉴클레오티드로 구성되는 겹 분절; (ii) 1-5개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되는 5' 날개 분절; (iii) 1-5개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되는 3' 날개 분절, 여기서 겹 분절은 5' 날개 분절과 3' 날개 분절에 바로 인접하게, 그리고 이들 사이에 배치되고, 각 날개 분절의 각 뉴클레오티드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고, 각 시토신은 5'-메틸시토신이고, 그리고 각 뉴클레오티드간 연쇄는 포스포로티오에이트 연쇄이다.
- [0209] 일정한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물은 하기를 포함한다: (i) 10개의 연결된 데옥시뉴클레오티드로 구성되는 겹 분절; (ii) 5개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되는 5' 날개 분절; (iii) 5개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되는 3' 날개 분절, 여기서 겹 분절은 5' 날개 분절과 3' 날개 분절에 바로 인접하게, 그리고 이들 사이에 배치되고, 각 날개 분절의 각 뉴클레오티드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고, 각 시토신은 5'-메틸시토신이고, 그리고 각 뉴클레오티드간 연쇄는 포스포로티오에이트 연쇄이다.
- [0210] 일정한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 핵염기 서열의 적어도 8개의



연속 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는다.

- [0211] 일정한 구체에는 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물의 치료 효과량을 동물에 투여함으로써 동물에서 심혈관 질환의 위험을 감소시키는 방법을 제시하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 ApoCIII 핵산에 상보성이고, 그리고 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시킨다. 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2이다. 일정한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 100% 상보성이다. 추가의 구체예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 핵염기 서열의 적어도 8개의 연속 핵염기를 포함한다.
- [0212] 일정한 구체에는 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성되고 ApoCIII 핵산에 상보성인 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물의 치료 효과량을 동물에 투여하는 것을 포함하는, 동물에서 심혈관 질환의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나 또는 감소시키는 방법을 제시한다. 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2이다. 일정한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 100% 상보성이다. 추가의 구체예에서, 동물에 투여된 화합물은 HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시킴으로써 심혈관 질환의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나 또는 감소시킨다. 추가의 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 적어도 8개의 연속 핵염기를 포함한다.
- [0213] 추가의 구체예에서, 심혈관 질환의 증상에는 협심증; 흉통; 숨가쁨; 심계항진; 심약; 현기증; 메스꺼움; 발한; 심장빈맥; 서맥; 부정맥; 심방세동; 하지에서 종창; 청색증; 피로; 기절; 얼굴의 무감각; 팔다리의 무감각; 근육의 파행 또는 경련; 복부의 팽창; 또는 열병이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0214] 일정한 구체에는 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 핵염기 서열로 구성되는 화합물을 동물에 투여함으로써 동물에서 HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시키는 방법을 제시한다. 추가의 구체예는 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 핵염기 서열로 구성되는 화합물을 동물에 투여하여 동물에서 HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시킴으로써, 동물에서 심혈관 질환의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나 또는 감소시키는 방법을 제시한다.
- [0215] 일정한 구체에는 ISIS 304801의 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 동물에 투여함으로써 동물에서 HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시키는 방법을 제시하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하기를 포함한다: (i) 10개의 연결된 데옥시뉴클레오타이드로 구성되는 겹 분절; (ii) 5개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성되는 5' 날개 분절; (iii) 5개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성되는 3' 날개 분절, 여기서 겹 분절은 5' 날개 분절과 3' 날개 분절에 바로 인접하게, 그리고 이들 사이에 배치되고, 각 날개 분절의 각 뉴클레오타이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고, 각 시토신은 5'-메틸시토신이고, 그리고 각 뉴클레오타이드간 연쇄는 포스포로티오에이트 연쇄이다.
- [0216] 일정한 구체에는 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 동물에 투여함으로써 동물에서 심혈관 질환의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나 또는 감소시키는 방법을 제시하고, 여기서 상기 화합물의 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하기를 포함한다: (i) 10개의 연결된 데옥시뉴클레오타이드로 구성되는 겹 분절; (ii) 5개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성되는 5' 날개 분절; (iii) 5개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성되는 3' 날개 분절, 여기서 겹 분절은 5' 날개 분절과 3' 날개 분절에 바로 인접하게, 그리고 이들 사이에 배치되고, 각 날개 분절의 각 뉴클레오타이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고, 각 시토신은 5'-메틸시토신이고, 그리고 각 뉴클레오타이드간 연쇄는 포스포로티오에이트 연쇄이다.
- [0217] 일정한 구체에는 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 동물에 투여함으로써 동물에서 HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시키는 방법을 제시하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 ApoCIII 핵산에 상보성이다. 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2이다. 일정한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 100% 상보성이다.
- [0218] 일정한 구체에는 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 동물에 투여함으로써 동물에서 심혈관 질환의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나 또는 감소시키는 방법을 제시하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 ApoCIII 핵산에 상보성이고, 그리고 동

물에서 HDL 수준을 증가시킨다. 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2이다. 일정한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 100% 상보성이다.

- [0219] 일정한 구체예는 ApoCIII를 표적으로 하는 화합물을 동물에 투여함으로써 CETP 수준을 감소시키는 방법을 제시한다. 일정한 구체예에서, 화합물은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오티드는 ApoCIII 핵산에 상보성이다. 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2이다. 일정한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 100% 상보성이다. 일정한 구체예에서, 화합물은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되고 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 적어도 8개의 연속 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일정한 구체예에서, 화합물은 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 핵염기로 구성된다.
- [0220] 일정한 구체예는 ApoCIII를 표적으로 하는 화합물을 동물에 투여함으로써 ApoA1, PON1, 지방 제거, 카일로마이 크론 트리글리세리드 제거 및/또는 HDL을 증가시키는 방법을 제시한다. 일정한 구체예에서, 화합물은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오티드는 ApoCIII 핵산에 상보성이다. 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2이다. 일정한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 100% 상보성이다. 일정한 구체예에서, 화합물은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되고 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 적어도 8개의 연속 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일정한 구체예에서, 화합물은 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 핵염기로 구성된다.
- [0221] 일정한 구체예에서, 동물은 인간이다.
- [0223] 일정한 구체예에서, 심혈관 질환은 동맥류, 협심증, 부정맥, 죽상동맥경화증, 뇌혈관 질환, 관상동맥 심장 질환, 고혈압, 이상지질혈증, 과지질혈증, 파트리글리세리드혈증 또는 과콜레스테롤혈증이다. 일정한 구체예에서, 이상지질혈증은 카일로마이 크론혈증이다.
- [0224] 일정한 구체예에서, 동물은 채식염의 위험에 처해 있다. 일정한 구체예에서, 간 및/또는 소장에서 ApoCIII 수준을 감소시키는 것은 채식염을 예방한다. 일정한 구체예에서, HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시키는 것은 채식염을 예방한다.
- [0225] 일정한 구체예에서, 간 및/또는 소장에서 ApoCIII 수준을 감소시키는 것은 식후 트리글리세리드의 제거를 증강시킨다. 일정한 구체예에서, HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시키는 것은 식후 트리글리세리드의 제거를 증강시킨다. 일정한 구체예에서, 간 및/또는 소장에서 ApoCIII 수준을 감소시키는 것은 식후 트리글리세리드를 저하시킨다. 일정한 구체예에서, HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시키는 것은 식후 트리글리세리드를 저하시킨다.
- [0226] 일정한 구체예에서, 간 및/또는 소장에서 ApoCIII 수준을 감소시키는 것은 HDL 대 TG의 비율을 향상시킨다.
- [0227] 일정한 구체예에서, 화합물은 비경구 투여된다. 추가의 구체예에서, 비경구 투여는 피하이다.
- [0228] 일정한 구체예에서, 화합물은 이차 작용제와 공동-투여된다. 일정한 구체예에서, 이차 작용제는 글루코오스-저하제이다. 일정한 구체예에서, 이차 작용제는 LDL, TG 또는 콜레스테롤 저하제이다.
- [0229] 일정한 구체예에서, 화합물 및 이차 작용제는 동시에 또는 순차적으로 투여된다.
- [0230] 일정한 구체예에서, 화합물은 염 형태이다. 추가의 구체예에서, 화합물은 제약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 더욱 포함한다.
- [0231] 일정한 구체예는 동물에서 ApoCIII 수준을 감소시키기 위한 약제의 제조에서 ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다. 일정한 구체예는 동물에서 ApoCIII 수준을 감소시키기 위한, ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다. 일정한 구체예에서, ApoCIII 수준은 간 또는 소장에서 감소된다. 일정한 구체예는 HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시킴으로써 심혈관 질환의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나 또는 감소시키기 위한 약제의 제조에서 ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다.

일정한 구체에는 HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시킴으로써 심혈관 질환의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나 또는 감소시키기 위한, ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다. 일정한 구체에는 동물에서 HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시키기 위한, ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다. 일정한 구체에는 동물에서 HDL 수준을 증가시키고 및/또는 TG 대 HDL의 비율을 향상시키기 위한 약제의 제조에서 ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다. 일정한 구체예에서, 화합물은 ApoCIII 핵산 서열에 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 100% 상보성이다. 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2이다. 일정한 구체예에서, 화합물은 변형된 올리고뉴클레오티드이다. 일정한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 적어도 8개의 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는다. 일정한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 ISIS 304801 (서열 번호: 3)의 핵염기 서열을 갖는다. 일정한 구체예는 채장염을 앓거나 또는 채장염의 위험에 처해 있는 동물을 치료하기 위한 약제의 제조에서 ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다. 일정한 구체예는 채장염을 앓거나 또는 채장염의 위험에 처해 있는 동물을 치료하기 위한, ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다. 일정한 구체예는 간 및/또는 소장에서 ApoCIII 수준을 감소시키기 위한 약제의 제조에서 ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다. 일정한 구체예는 간 및/또는 소장에서 ApoCIII 수준을 감소시키기 위한, ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다. 일정한 구체예는 채장염을 예방하기 위한 약제의 제조에서 ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다. 일정한 구체예는 채장염을 예방하기 위한, ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다.

[0232] 일정한 구체예는 파트리글리세리드혈증을 앓는 동물에서 간 및/또는 소장에서 ApoCIII 수준을 감소시키기 위한 약제의 제조에서 ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다. 일정한 구체예는 파트리글리세리드혈증을 앓는 동물에서 간 및/또는 소장에서 ApoCIII 수준을 감소시키기 위한, ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다. 일정한 구체예는 식후 트리글리세리드의 제거를 증강시키기 위한 약제의 제조에서 ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다. 일정한 구체예는 식후 트리글리세리드의 제거를 증강시키기 위한, ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다. 일정한 구체예는 식후 트리글리세리드를 저하시키기 위한 약제의 제조에서 ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다. 일정한 구체예는 식후 트리글리세리드를 저하시키기 위한, ApoCIII에 표적화된 화합물의 용도를 제시한다.

[0234] *안티센스 화합물*

[0235] 올리고머 화합물에는 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오시드, 올리고뉴클레오티드 유사체, 올리고뉴클레오티드 모방체, 안티센스 화합물, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 그리고 siRNA가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 올리고머 화합물은 표적 핵산에 "안티센스"일 수 있는데, 이것은 수소 결합을 통해 표적 핵산에 혼성화를 겪을 수 있다는 것을 의미한다.

[0236] 일정한 구체예에서, 안티센스 화합물은 5'에서 3' 방향으로 작성될 때, 이것이 표적화되는 표적 핵산의 표적 분절의 역보체를 포함하는 핵염기 서열을 갖는다. 일정한 이런 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 5'에서 3' 방향으로 작성될 때, 이것이 표적화되는 표적 핵산의 표적 분절의 역보체를 포함하는 핵염기 서열을 갖는다.

[0237] 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산에 표적화된 안티센스 화합물은 12 내지 30개의 뉴클레오티드 길이를 갖는다. 다시 말하면, 안티센스 화합물은 12 내지 30개의 연결된 핵염기이다. 다른 구체예에서, 안티센스 화합물은 8 내지 80, 10 내지 80, 12 내지 50, 15 내지 30, 18 내지 24, 19 내지 22, 또는 20개의 연결된 핵염기로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일정한 이런 구체예에서, 안티센스 화합물은 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 80개의 연결된 핵염기, 또는 상기 값 중에서 임의의 2개에 의해 정의된 범위의 길이로 구성되는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 안티센스 화합물은 안티센스 올리고뉴클레오티드이다.

[0238] 일정한 구체예에서, 안티센스 화합물은 단축된 또는 절두된 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 단축된 또는 절두된 변형된 올리고뉴클레오티드는 5' 단부로부터 하나 또는 그 이상의 뉴클레오시드가 결실될 수 있고 (5' 절두), 3' 단부로부터 하나 또는 그 이상의 뉴클레오시드가 결실될 수 있고 (3' 절두), 또는 중심 부분으로부터 하나 또는 그 이상의 뉴클레오시드가 결실될 수 있다. 대안으로, 결실된 뉴클레오시드는 변형된 올리고뉴

클레오티드 전역에 분산될 수 있다, 예를 들면, 안티센스 화합물 내에서 1개의 뉴클레오시드가 5' 단부로부터 결실되고, 그리고 1개의 뉴클레오시드가 3' 단부로부터 결실된다.

[0239] 단일 추가 뉴클레오시드가 길어진 올리고뉴클레오티드 내에 존재할 때, 추가의 뉴클레오시드는 올리고뉴클레오티드의 중심 부분, 5' 또는 3' 단부에 배치될 수 있다. 2개 또는 그 이상의 추가의 뉴클레오시드가 존재할 때, 추가된 뉴클레오시드는 서로에 인접할 수 있다, 예를 들면, 올리고뉴클레오티드 내에서 2개의 뉴클레오시드가 올리고뉴클레오티드의 중심 부분, 5' 단부 (5' 부가), 또는 대안으로, 3' 단부 (3' 부가)에 부가된다. 대안으로, 추가된 뉴클레오시드는 안티센스 화합물 전역에 분산될 수 있다, 예를 들면, 올리고뉴클레오티드 내에서 1개의 뉴클레오시드가 5' 단부에 부가되고, 그리고 1개의 아단위가 3' 단부에 부가된다.

[0240] 활성을 소멸시키지 않으면서, 안티센스 화합물, 예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 길이를 증가 또는 감소시키고 및/또는 미스매치 염기를 도입하는 것이 가능하다. 가령, Woolf 등 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992)에서, 일련의 13-25개 핵염기 길이 안티센스 올리고뉴클레오티드가 난모세포 주사 모델에서 표적 RNA의 개열을 도입하는 능력에 대해 조사되었다. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 단부 인근에서 8 또는 11개 미스매치 염기를 갖는 25개 핵염기 길이 안티센스 올리고뉴클레오티드는 미스매치를 내포하지 않는 안티센스 올리고뉴클레오티드보다 정도가 덜하긴 하지만, 표적 mRNA의 특이적 개열을 주동할 수 있었다. 유사하게, 표적 특이적 개열은 1 또는 3개 미스매치를 갖는 것들을 비롯한 13개 핵염기 안티센스 올리고뉴클레오티드를 이용하여 달성되었다.

[0241] Gautschi 등 (J. Natl. Cancer Inst. 93:463-471, March 2001)은 시험관내와 생체내에서 bcl-2와 bcl-xL 둘 모두의 발현을 감소시키는, bcl-2 mRNA에 100% 상보성을 갖고 bcl-xL mRNA에 3개 미스매치를 갖는 올리고뉴클레오티드의 능력을 증명하였다. 게다가, 이러한 올리고뉴클레오티드는 생체내에서 강력한 항-종양 활성을 보였다.

[0242] Maher과 Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988)은 일련의 탠덤 14개 핵염기 안티센스 올리고뉴클레오티드, 그리고 2개 또는 3개의 탠덤 안티센스 올리고뉴클레오티드의 서열로 구성되는 28과 42개 핵염기 안티센스 올리고뉴클레오티드를, 토끼 망상적혈구 검증에서 인간 DHFR의 번역을 중지시키는 능력에 대해 각각 조사하였다. 3개의 14개 핵염기 안티센스 올리고뉴클레오티드 단독 각각은 28개 또는 42개 핵염기 안티센스 올리고뉴클레오티드보다 수준이 더욱 평범하긴 하지만, 번역을 저해할 수 있었다.

[0244] *안티센스 화합물 모티프*

[0245] 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산에 표적화된 안티센스 화합물은 안티센스 화합물에 증강된 저해 활성, 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화성, 또는 생체내 뉴클레아제에 의한 분해에 내성과 같은 성질을 공여하는 패턴, 또는 모티프로 정렬된 화학적으로 변형된 아단위를 갖는다.

[0246] 키메라 안티센스 화합물은 전형적으로, 뉴클레아제 분해에 증가된 내성, 증가된 세포 흡수, 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화성, 및/또는 증가된 저해 활성을 공여하기 위해 변형된 적어도 하나의 영역을 내포한다. 키메라 안티센스 화합물의 이차 영역은 선택적으로, RNA: DNA 이중나선의 RNA 가닥을 개열하는 세포 엔도뉴클레아제 RNase H에 대한 기질로서 역할할 수 있다.

[0247] 갭머 모티프를 갖는 안티센스 화합물은 키메라 안티센스 화합물로서 간주된다. 갭머에서, RNase H 개열을 뒷받침하는 복수의 뉴클레오티드를 갖는 내부 영역은 내부 영역의 뉴클레오시드와 화학적으로 상이한 복수의 뉴클레오티드를 갖는 외부 영역 사이에 위치된다. 갭머 모티프를 갖는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 경우에, 갭 분절은 일반적으로, 엔도뉴클레아제 개열에 대한 기질로서 역할하는 반면, 날개 분절은 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 일정한 구체예에서, 갭머의 영역은 각각의 상이한 영역을 포함하는 당 모이어티의 유형에 의해 식별된다. 갭머의 영역을 식별하는데 이용되는 당 모이어티의 유형에는 일부 구체예에서,  $\beta$ -D-리보뉴클레오시드,  $\beta$ -D-데옥시리보뉴클레오시드, 2'-변형된 뉴클레오시드 (이런 2'-변형된 뉴클레오시드는 특히, 2'-MOE, 그리고 2'-O-CH<sub>3</sub>을 포함할 수 있다), 그리고 이중환상 당 변형된 뉴클레오시드 (이런 이중환상 당 변형된 뉴클레오시드는 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-2' 가교를 갖는 것들을 포함할 수 있고, 여기서 n=1 또는 n=2)가 포함된다. 바람직하게는, 각각의 상이한 영역은 균일한 당 모이어티를 포함한다. 날개-갭-날개 모티프는 빈번하게, "X-Y-Z"로서 기술되고, 여기서 "X"는 5' 날개 영역의 길이를 나타내고, "Y"는 갭 영역의 길이를 나타내고, 그리고 "Z"는 3' 날개 영역의 길이를 나타낸다. 본원에서 이용된 바와 같이, "X-Y-Z"로서 기술된 갭머는 갭 분절이 5' 날개 분절과 3' 날개 분절의 각각에 바로 인접하게 위치되도록 입체배열을 갖는다. 따라서 개재성 뉴클레오티드가 5' 날개 분절과 갭 분절 사이에, 또는 갭 분절과 3' 날개 분절 사이에 존재하지 않는다. 본원에서 기술된 임의의 안티센스 화합물



은 잭머 모티프를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, X와 Z는 동일하다; 다른 구체예에서, 이들은 상이하다. 바람직한 구체예에서, Y는 8 내지 15개 뉴클레오티드이다. X, Y 또는 Z는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개 또는 그 이상의 뉴클레오티드 중에서 한 가지일 수 있다. 따라서 잭머에는 예로써, 5-10-5, 4-8-4, 4-12-3, 4-12-4, 3-14-3, 2-13-5, 2-16-2, 1-18-1, 3-10-3, 2-10-2, 1-10-1, 2-8-2, 6-8-6, 5-8-5, 1-8-1, 2-6-2, 2-13-2, 1-8-2, 2-8-3, 3-10-2, 1-18-2 또는 2-18-2가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0248] 일정한 구체예에서, "윙머 (wingmer)" 모티프로서 안티센스 화합물은 날개-잭 또는 잭-날개 입체배열, 다시 말하면, 잭머 입체배열에 대해 앞서 기술된 바와 같은 X-Y 또는 Y-Z 입체배열을 갖는다. 따라서 윙머 입체배열에는 예로써, 5-10, 8-4, 4-12, 12-4, 3-14, 16-2, 18-1, 10-3, 2-10, 1-10, 8-2, 2-13 또는 5-13이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0249] 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산에 표적화된 안티센스 화합물은 5-10-5 잭머 모티프를 보유한다.

[0250] 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산에 표적화된 안티센스 화합물은 잭-넓어진 모티프를 갖는다.

[0252] 표적 핵산, 표적 영역 및 뉴클레오티드 서열

[0253] ApoCIII를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에는 제한 없이, 하기가 포함된다: GENBANK 수탁 번호 NM\_000040.1 (본원에 서열 번호: 1로서 편집됨), 그리고 뉴클레오티드 20262640에서부터 20266603까지 절두된 GENBANK 수탁 번호 NT\_033899.8 (본원에 서열 번호: 2로서 편집됨).

[0254] 본원에 내포된 실시예에서 각 서열 번호에서 열거된 서열은 당 모이어티, 뉴클레오시드간 연쇄, 또는 핵염기에 임의의 변형과 독립적인 것으로 이해된다. 따라서 서열 번호로 정의된 안티센스 화합물은 독립적으로, 당 모이어티, 뉴클레오시드간 연쇄, 또는 핵염기에 하나 또는 그 이상의 변형을 포함할 수 있다. Isis 번호 (Isis No) 로 기술된 안티센스 화합물은 핵염기 서열과 모티프의 조합을 표시한다.

[0255] 일정한 구체예에서, 표적 영역은 표적 핵산의 구조적으로 정의된 영역이다. 가령, 표적 영역은 3' UTR, 5' UTR, 엑손, 인트론, 엑손/인트론 접합부, 코딩 영역, 번역 개시 영역, 번역 종결 영역, 또는 기타 정의된 핵산 영역을 포괄할 수 있다. ApoCIII에 대한 구조적으로 정의된 영역은 서열 데이터베이스, 예를 들면, NCBI로부터 수탁 번호에 의해 획득될 수 있고, 그리고 이런 정보는 본원에 참고문헌으로 편집된다. 일정한 구체예에서, 표적 영역은 표적 영역 내에 한 표적 분절의 5' 표적 부위에서부터 표적 영역 내에 다른 표적 분절의 3' 표적 부위까지의 서열을 포괄할 수 있다.

[0256] 일정한 구체예에서, "표적 분절"은 핵산 내에서 표적 영역의 더욱 작은 하위-부분이다. 가령, 표적 분절은 하나 또는 그 이상의 안티센스 화합물이 표적화되는 표적 핵산의 뉴클레오티드의 서열일 수 있다. "5' 표적 부위"는 표적 분절의 가장 5' 뉴클레오티드를 지칭한다. "3' 표적 부위"는 표적 분절의 가장 3' 뉴클레오티드를 지칭한다.

[0257] 표적 영역은 하나 또는 그 이상의 표적 분절을 내포할 수 있다. 표적 영역 내에 복수 표적 분절은 겹칠 수 있다. 대안으로, 이들은 비-겹칠 수 있다. 일정한 구체예에서, 표적 영역 내에서 표적 분절은 약 300개 이하의 뉴클레오티드에 의해 분리된다. 일정한 구체예에서, 표적 영역 내에서 표적 분절은 표적 핵산 상에서 약 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 또는 10개 뉴클레오티드, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 또는 10개 뉴클레오티드 이하, 약 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 또는 10개 뉴클레오티드 이하, 또는 전술한 값 중에서 임의의 2개에 의해 정의된 범위인 숫자의 뉴클레오티드에 의해 분리된다. 일정한 구체예에서, 표적 영역 내에서 표적 분절은 표적 핵산 상에서 5개 뉴클레오티드 이하, 또는 약 5개 뉴클레오티드 이하에 의해 분리된다. 일정한 구체예에서, 표적 분절은 연속된다. 본원에서 열거된 5' 표적 부위 또는 3' 표적 부위 중에서 한 가지인 출발 핵산을 갖는 범위에 의해 정의된 표적 영역이 예기된다.

[0258] 표적화는 원하는 효과가 발생하도록, 안티센스 화합물이 혼성화되는 적어도 하나의 표적 분절의 결정을 포함한다. 일정한 구체예에서, 원하는 효과는 mRNA 표적 핵산 수준에서 감소이다. 일정한 구체예에서, 원하는 효과는 표적 핵산에 의해 인코딩된 단백질 또는 표적 핵산과 연관된 표현형적 변화의 수준의 감소이다.

[0259] 적절한 표적 분절은 5' UTR, 코딩 영역, 3' UTR, 인트론, 엑손, 또는 엑손/인트론 접합부 내에서 발견될 수 있다. 출발 코돈 또는 종결 코돈을 내포하는 표적 분절 역시 적절한 표적 분절이다. 적절한 표적 분절은 일정한



구조적으로 정의된 영역, 예를 들면, 출발 코돈 또는 종결 코돈을 특정적으로 배제할 수도 있다.

- [0260] 적절한 표적 분절의 결정은 표적 핵산의 서열과 게놈 전역에서 다른 서열의 비교를 포함할 수 있다. 가령, BLAST 알고리즘이 상이한 핵산 사이에 유사성의 영역을 확인하는데 이용될 수 있다. 이러한 비교는 선별된 표적 핵산 이외의 서열 (즉, 비-표적 또는 오프-표적 서열)에 비-특이적 방식으로 혼성화될 수 있는 안티센스 화합물 서열의 선별을 예방할 수 있다.
- [0261] 활성 표적 영역 내에 안티센스 화합물의 활성에서 변화 (가령, 표적 핵산 수준의 감소 퍼센트에 의해 정의됨)가 있을 수 있다. 일정한 구체예에서, ApoCIII mRNA 수준에서 감소는 ApoCIII 발현의 저해를 지시한다. ApoCIII 단백질의 수준에서 감소는 표적 mRNA 발현의 저해를 지시할 수 있다. 게다가, 표현형적 변화는 ApoCIII 발현의 저해를 지시할 수 있다. 가령, HDL 수준에서 증가, LDL 수준에서 감소, 또는 트리글리세리드 수준에서 감소는 ApoCIII 발현의 저해에 대해 검정될 수 있는 표현형적 변화에 속한다. 다른 표현형적 징후, 예를 들면, 심혈관 질환과 연관된 증상, 예를 들면, 협심증; 흉통; 숨가쁨; 심계항진; 심약; 현기증; 메스꺼움; 발한; 심장빈맥; 서맥; 부정맥; 심방세동; 하지에서 종창; 청색증; 피로; 기절; 얼굴의 무감각; 팔다리의 무감각; 근육의 파행 또는 경련; 복부의 팽창; 또는 열병 역시 평가될 수 있다.
- [0263] 혼성화
- [0264] 일부 구체예에서, 혼성화는 본원에서 개시된 안티센스 화합물 및 ApoCIII 핵산 사이에 발생한다. 혼성화의 가장 일반적인 기전은 핵산 분자의 상보성 핵염기 간에 수소 결합 (가령, 왓슨-크릭, 후구스틴 또는 역후구스틴 수소 결합)을 수반한다.
- [0265] 혼성화는 변하는 조건 하에서 발생할 수 있다. 엄격한 조건은 서열-의존성이고, 그리고 혼성화되는 핵산 분자의 성격과 조성에 의해 결정된다.
- [0266] 서열이 표적 핵산에 특이적으로 혼성화될 수 있는지의 여부를 결정하는 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다 (Sambrooke and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., 2001). 일정한 구체예에서, 본원에서 제시된 안티센스 화합물은 ApoCIII 핵산과 특이적으로 혼성화될 수 있다.
- [0268] 상보성
- [0269] 안티센스 화합물 및 표적 핵산은 원하는 효과 (가령, 표적 핵산, 예를 들면, ApoCIII 핵산의 안티센스 저해)가 발생하도록, 안티센스 화합물의 충분한 숫자의 핵염기가 표적 핵산의 상응하는 핵염기와 수소 결합할 때, 서로에 상보성이다.
- [0270] 안티센스 화합물은 개재성 또는 인접한 분절 (가령, 루프 구조, 미스매치 또는 헤어핀 구조)가 혼성화 사건에 관련되지 않도록, ApoCIII 핵산의 하나 또는 그 이상의 분절 위에서 혼성화될 수 있다.
- [0271] 일정한 구체예에서, 본원에서 제시된 안티센스 화합물, 또는 이의 특정된 부분은 ApoCIII 핵산, 표적 영역, 표적 분절, 또는 이의 특정된 부분에 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 상보성이거나, 또는 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 상보성이다. 안티센스 화합물과 표적 핵산의 퍼센트 상보성은 일과적인 방법을 이용하여 결정될 수 있다.
- [0272] 가령, 안티센스 화합물의 20개 핵염기 중에서 18개가 표적 영역에 상보성이고, 따라서 특이적으로 혼성화되는 안티센스 화합물은 90 퍼센트 상보성을 나타낼 것이다. 이러한 실례에서, 잔여 비-상보성 핵염기는 상보성 핵염기와 균집되거나 산재되고, 그리고 서로에 또는 상보성 핵염기에 인접할 필요가 없다. 따라서 표적 핵산과 완전한 상보성의 2개 영역이 측면에서 접하는 4개 비-상보성 핵염기를 갖는 18개 핵염기 길이인 안티센스 화합물은 표적 핵산과 77.8% 전체 상보성을 갖고, 따라서 본 발명의 범위 내에 속할 것이다. 안티센스 화합물과 표적 핵산의 영역의 퍼센트 상보성은 당분야에 공지된 BLAST 프로그램 (basic local alignment search tools)과 PowerBLAST 프로그램을 이용하여 일과적으로 결정될 수 있다 (Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, *Genome Res.*, 1997, 7, 649-656). 퍼센트 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 예로써, Smith와 Waterman의 알고리즘 (*Adv. Appl. Math.*, 1981, 2, 482-489)을 이용하는, 디폴트 설정을 이용한 깎 프로그램 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group,

University Research Park, Madison Wis.)에 의해 결정될 수 있다.

- [0273] 일정한 구체예에서, 본원에서 제시된 안티센스 화합물, 또는 이의 특정된 부분은 표적 핵산, 또는 이의 특정된 부분에 완전히 상보성 (즉, 100% 상보성)이다. 가령, 안티센스 화합물은 ApoCIII 핵산, 또는 이의 표적 영역, 또는 표적 분절 또는 표적 서열에 완전히 상보성일 수 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, "완전히 상보성"은 안티센스 화합물의 각 핵염기가 표적 핵산의 상응하는 핵염기와 정확한 염기 대합을 할 수 있다는 것을 의미한다. 가령, 20개 핵염기 안티센스 화합물은 안티센스 화합물에 완전히 상보성인 표적 핵산의 상응하는 20개 핵염기 부분이 있기만 하면, 400개 핵염기 길이인 표적 서열에 완전히 상보성이다. 완전히 상보성은 또한, 일차 및/또는 이차 핵산의 특정된 부분에 관련하여 이용될 수도 있다. 가령, 30개 핵염기 안티센스 화합물의 20개 핵염기 부분은 400개 핵염기 길이인 표적 서열에 "완전히 상보성"일 수 있다. 30개 핵염기 올리고뉴클레오티드 중에서 20개 핵염기 부분은 표적 서열이 상응하는 20개 핵염기 부분을 가지면 표적 서열에 완전히 상보성이고, 여기서 각 핵염기는 안티센스 화합물의 20개 핵염기 부분에 상보성이다. 동시에, 전체 30개 핵염기 안티센스 화합물은 안티센스 화합물의 나머지 10개 핵염기 역시 표적 서열에 상보성인 지의 여부에 따라, 표적 서열에 완전히 상보성이거나 그렇지 않을 수 있다.
- [0274] 비-상보성 핵염기(들)의 위치는 안티센스 화합물의 5' 단부 또는 3' 단부에 있을 수 있다. 대안으로, 비-상보성 핵염기(들)는 안티센스 화합물의 내부 위치에 있을 수 있다. 2개 또는 그 이상의 비-상보성 핵염기가 존재할 때, 이들은 연속적(즉, 연결된) 또는 비-연속적일 수 있다. 한 구체예에서, 비-상보성 핵염기는 꺾머 안티센스 올리고뉴클레오티드의 날개 분절 내에 배치된다.
- [0275] 일정한 구체예에서, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 핵염기 길이, 또는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개까지의 핵염기 길이를 갖는 안티센스 화합물은 표적 핵산, 예를 들면, ApoCIII 핵산, 또는 이의 특정된 부분에 비하여 단지 4개, 단지 3개, 단지 2개, 또는 단지 1개의 비-상보성 핵염기(들)를 포함한다.
- [0276] 일정한 구체예에서, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 핵염기 길이, 또는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개까지의 핵염기 길이를 갖는 안티센스 화합물은 표적 핵산, 예를 들면, ApoCIII 핵산, 또는 이의 특정된 부분에 비하여 단지 6개, 단지 5개, 단지 4개, 단지 3개, 단지 2개, 또는 단지 1개의 비-상보성 핵염기(들)를 포함한다.
- [0277] 본원에서 제시된 안티센스 화합물은 또한, 표적 핵산의 부분에 상보성인 것들을 포함한다. 본원에서 이용된 바와 같이, "부분"은 표적 핵산의 영역 또는 분절 내에서 정의된 숫자의 연속(즉, 연결된) 핵염기를 지칭한다. "부분"은 또한, 안티센스 화합물의 정의된 숫자의 연속 핵염기를 지칭할 수 있다. 일정한 구체예에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 적어도 8개 핵염기 부분에 상보성이다. 일정한 구체예에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 적어도 10개 핵염기 부분에 상보성이다. 일정한 구체예에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 적어도 12개 핵염기 부분에 상보성이다. 일정한 구체예에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 적어도 15개 핵염기 부분에 상보성이다. 또한, 표적 분절의 적어도 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개, 또는 그 이상, 또는 이들 값 중에서 임의의 2개에 의해 정의된 범위의 핵염기 부분에 상보성인 안티센스 화합물이 예기된다.
- [0279] 동일성
- [0280] 본원에서 제시된 안티센스 화합물은 또한, 특정 뉴클레오티드 서열, 서열 번호, 또는 특정 Isis 번호로 대표되는 화합물의 서열, 또는 이의 부분에 정의된 퍼센트 동일성을 가질 수도 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, 안티센스 화합물은 동일한 핵염기 대합 능력을 가지면, 본원에서 개시된 서열에 동일하다. 가령, 개시된 DNA 서열에서 티미딘 대신에 우라실을 내포하는 RNA는 DNA 서열에 동일한 것으로 간주되는데, 그 이유는 우라실과 티미딘 둘 모두 아데닌과 쌍을 이루기 때문이다. 본원에서 기술된 안티센스 화합물의 단축되고 길어진 이형뿐만 아니라 본원에서 제시된 안티센스 화합물에 비하여 비-동일한 염기를 갖는 화합물 역시 예기된다. 비-동일한 염기는 서로에 인접하거나 또는 안티센스 화합물 전역에 분산된다. 안티센스 화합물의 퍼센트 동일성은 비교되는 서열에 비하여, 동일한 염기 대합을 갖는 염기의 숫자에 따라 계산된다.
- [0281] 일정한 구체예에서, 안티센스 화합물, 또는 이들의 부분은 본원에서 개시된 안티센스 화합물 또는 서열 번호, 또는 이들의 부분 중에서 하나 또는 그 이상에 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일하다.

- [0283] 변형
- [0284] 뉴클레오시드는 염기-당 조합이다. 뉴클레오시드의 핵염기 (일명, 염기) 부분은 통상적으로, 헤테로환상 염기 모이어티이다. 뉴클레오티드는 뉴클레오시드의 당 부분에 공유 연결된 인산염 기를 더욱 포함하는 뉴클레오시드이다. 펜토포라노실 당을 포함하는 뉴클레오시드의 경우에, 인산염 기는 상기 당의 2', 3' 또는 5' 히드록실 모이어티에 연결될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 선형 중합성 올리고뉴클레오티드를 형성하는, 인접한 뉴클레오시드의 서로 간에 공유 연쇄를 통해 형성된다. 올리고뉴클레오티드 구조 내에서, 인산염 기는 통상적으로, 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오시드간 연쇄를 형성하는 것으로 지칭된다.
- [0285] 안티센스 화합물의 변형은 뉴클레오시드간 연쇄, 당 모이어티, 또는 핵염기에 치환 또는 변화를 포괄한다. 변형된 안티센스 화합물은 종종, 예를 들면, 증강된 세포 흡수, 핵산 표적에 대한 증강된 친화성, 뉴클레아제의 존재에서 증가된 안정성, 또는 증가된 저해 활성과 같은 바람직한 성질로 인하여, 고유 형태보다 선호된다.
- [0286] 표적 핵산에 대한 단축된 또는 절두된 안티센스 올리고뉴클레오티드의 결합 친화성을 증가시키기 위해, 화학적으로 변형된 뉴클레오시드 역시 이용될 수 있다. 결과적으로, 이런 화학적으로 변형된 뉴클레오시드를 갖는 더욱 짧은 안티센스 화합물로 필적하는 결과가 종종 획득될 수 있다.
- [0288] 변형된 뉴클레오시드간 연쇄
- [0289] RNA와 DNA의 자연 발생 뉴클레오시드간 연쇄는 3'에서 5' 포스포디에스테르 연쇄이다. 하나 또는 그 이상의 변형된, 다시 말하면, 비-자연 발생, 뉴클레오시드간 연쇄를 갖는 안티센스 화합물은 종종, 예로써 증강된 세포 흡수, 표적 핵산에 대한 증강된 친화성, 그리고 뉴클레아제의 존재에서 증가된 안정성과 같은 바람직한 성질로 인하여, 자연 발생 뉴클레오시드간 연쇄를 갖는 안티센스 화합물에 비하여 선별된다.
- [0290] 변형된 뉴클레오시드간 연쇄를 갖는 올리고뉴클레오티드는 인 원자를 유지하는 뉴클레오시드간 연쇄뿐만 아니라 인 원자를 갖지 않는 뉴클레오시드간 연쇄를 포함한다. 대표적인 인 내포 뉴클레오시드간 연쇄에는 포스포디에스테르, 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, 포스포라미데이트, 그리고 포스포로티오에이트가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 인-내포 연쇄 및 비-인-내포 연쇄의 제조 방법은 널리 알려져 있다.
- [0291] 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산에 표적화된 안티센스 화합물은 하나 또는 그 이상의 변형된 뉴클레오시드간 연쇄를 포함한다. 일정한 구체예에서, 변형된 뉴클레오시드간 연쇄는 포스포로티오에이트 연쇄이다. 일정한 구체예에서, 안티센스 화합물의 각 뉴클레오시드간 연쇄는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연쇄이다.
- [0293] 변형된 당 모이어티
- [0294] 본 발명의 안티센스 화합물은 하나 또는 그 이상의 뉴클레오시드를 선택적으로 내포할 수 있는데, 여기서 당 기가 변형된다. 이런 당 변형된 뉴클레오시드는 증강된 뉴클레아제 안정성, 증가된 결합 친화성, 또는 일부 다른 유익한 생물학적 성질을 안티센스 화합물에 부여할 수 있다. 일정한 구체예에서, 뉴클레오시드는 화학적으로 변형된 리보푸라노오스 고리 모이어티를 포함한다. 화학적으로 변형된 리보푸라노오스 고리의 실례에는 제한 없이, 치환기의 부가 (5'와 2' 치환기 포함, 이중환상 핵산 (BNA)을 형성하는 비-같은자리 고리 원자의 가교, 리보실 고리 산소 원자의 S, N(R), 또는 C(R<sub>1</sub>)(R<sub>2</sub>)로의 대체 (R, R<sub>1</sub>과 R<sub>2</sub>는 각각 독립적으로 H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬 또는 보호 기이다), 그리고 이들의 조합이 포함된다. 화학적으로 변형된 당의 실례에는 2'-F-5'-메틸 치환된 뉴클레오시드 (다른 개시된 5',2'-비스 치환된 뉴클레오시드에 대해, 8/21/08에 공개된 PCT International Application WO 2008/101157를 참조한다) 또는 2'-위치에서 추가의 치환으로 리보실 고리 산소 원자의 S로의 대체 (2005년 6월 16일자 공개된 U.S. Patent Application US2005-0130923을 참조한다) 또는 대안으로, BNA의 5'-치환 (11/22/07에 공개된 PCT International Application WO 2007/134181을 참조하고, 여기서 LNA는 예로써, 5'-메틸 또는 5'-비닐 기로 치환된다)이 포함된다.
- [0295] 변형된 당 모이어티를 갖는 뉴클레오시드의 실례에는 제한 없이, 5'-비닐, 5'-메틸 (R 또는 S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH<sub>3</sub>, 2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F 및 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> 치환기를 포함하는 뉴클레오시드가 포함된다. 2' 위치에서 치환기는 또한, 알릴, 아미노, 아지도, 티오, O-알릴, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬, OCF<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>F, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), 그리고 O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>1</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>)에서 선택될 수 있고, 여기서 각

R<sub>1</sub>, R<sub>m</sub>과 R<sub>n</sub>은 독립적으로, H 또는 치환되거나 치환되지 않은 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬이다.

[0296] 본원에서 이용된 바와 같이, "이중환상 뉴클레오시드"는 이중환상 당 모이어티를 포함하는 변형된 뉴클레오시드를 지칭한다. 이중환상 뉴클레오시드의 실례에는 제한 없이, 4'와 2' 리보실 고리 원자 사이에 가교를 포함하는 뉴클레오시드가 포함된다. 일정한 구체예에서, 본원에서 제시된 안티센스 화합물은 4'에서 2' 가교를 포함하는 하나 또는 그 이상의 이중환상 뉴클레오시드를 포함한다. 이런 4'에서 2' 가교된 이중환상 뉴클레오시드의 실례에는 하기 화학식 중에서 한 가지가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다: 4'-(CH<sub>2</sub>)-O-2' (LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (ENA); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'와 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2' (및 이들의 유사체, 2008년 7월 15일자에 허여된 U.S. Patent 7,399,845를 참조한다); 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)-O-2' (및 이의 유사체, 2009년 1월 8일자 공개된 International Application WO/2009/006478을 참조한다); 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2' (및 이의 유사체, 2008년 12월 11일자 공개된 International Application WO/2008/150729를 참조한다); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2' (2004년 9월 2일자 공개된 U.S. Patent Application US2004-0171570을 참조한다); 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', 여기서 R은 H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬, 또는 보호 기이다 (2008년 9월 23일자 허여된 U.S. Patent 7,427,672를 참조한다); 4'-CH<sub>2</sub>-C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (Chattopadhyaya et al., *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134를 참조한다); 그리고 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2' (및 이의 유사체, 2008년 12월 8일자 공개된 International Application WO 2008/154401을 참조한다).

[0297] 이중환상 뉴클레오시드에 관련된 추가의 보고서는 또한, 공개된 문헌에서 찾아볼 수 있다 (예로써, Singh et al., *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129(26) 8362-8379; Elayadi et al., *Curr. Opinion Invest. Drugs*, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., *Chem. Biol.*, 2001, 8, 1-7; 그리고 Orum et al., *Curr. Opinion Mol. Ther.*, 2001, 3, 239-243; U.S. Patent Nos. 6,268,490; 6,525,191; 6,670,461; 6,770,748; 6,794,499; 7,034,133; 7,053,207; 7,399,845; 7,547,684; 그리고 7,696,345; U.S. Patent Publication No. US2008-0039618; US2009-0012281; U.S. Patent Serial Nos. 60/989,574; 61/026,995; 61/026,998; 61/056,564; 61/086,231; 61/097,787; 그리고 61/099,844; Published PCT International applications WO 1994/014226; WO 2004/106356; WO 2005/021570; WO 2007/134181; WO 2008/150729; WO 2008/154401; 그리고 WO 2009/006478을 참조한다). 전술한 이중환상 뉴클레오시드는 각각, 예로써 α-L-리보푸라노오스와 β-D-리보푸라노오스를 포함하는 하나 또는 그 이상의 입체화학적 당 입체배열을 갖도록 제조될 수 있다 (1999년 3월 25일자에 WO 99/14226으로서 공개된 PCT international application PCT/DK98/00393을 참조한다).

[0298] 일정한 구체예에서, BNA 뉴클레오시드의 이중환상 당 모이어티에는 펜토푸라노실 당 모이어티의 4'와 2' 위치 사이에 적어도 하나의 가교를 갖는 화합물이 포함되지만 이들에 국한되지 않고, 여기서 이런 가교는 독립적으로,  $-\text{C}(\text{R}_a)(\text{R}_b)_n-$ ,  $-\text{C}(\text{R}_a)=\text{C}(\text{R}_b)-$ ,  $-\text{C}(\text{R}_a)=\text{N}-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{NR}_a)-$ ,  $-\text{C}(=\text{S})-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{Si}(\text{R}_a)_2-$ ,  $-\text{S}(=\text{O})_x-$ , 그리고  $-\text{N}(\text{R}_a)-$ 에서 독립적으로 선택되는 1개 또는 2개 내지 4개의 연결된 기를 포함하고;

[0299] 여기서:

[0300] x는 0, 1, 또는 2이고;

[0301] n은 1, 2, 3, 또는 4이고;

[0302] 각 R<sub>a</sub>와 R<sub>b</sub>는 독립적으로, H, 보호 기, 히드록실, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬, 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알케닐, 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알케닐, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알키닐, 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알키닐, C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> 아릴, 치환된 C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> 아릴, 헤테로환 라디칼, 치환된 헤테로환 라디칼, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub> 지환상 라디칼, 치환된 C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub> 지환상 라디칼, 할로젠, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, COOJ<sub>1</sub>, 아실 (C(=O)-H), 치환된 아실, CN, 술폰일 (S(=O)<sub>2</sub>-J<sub>1</sub>), 또는 술폰실 (S(=O)-J<sub>1</sub>)이고; 그리고

[0303] 각 J<sub>1</sub>과 J<sub>2</sub>는 독립적으로, H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬, 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알케닐, 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알케닐, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알키닐, 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알키닐, C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> 아릴, 치환된 C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> 아릴, 아실 (C(=O)-H), 치환된 아실, 헤테로환 라디칼, 치

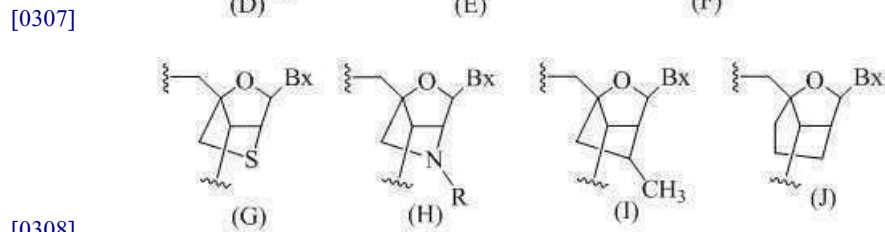
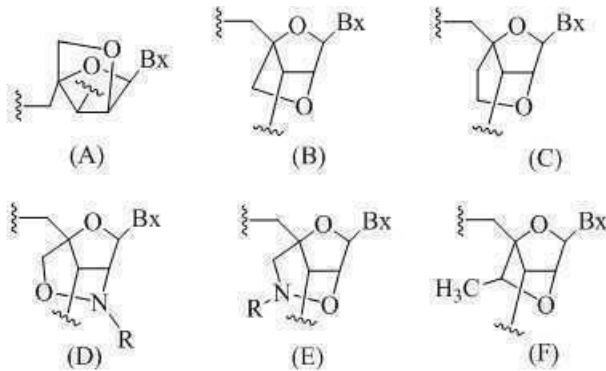


환된 헤테로환 라디칼, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 아미노알킬, 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 아미노알킬 또는 보호 기이다.

[0304] 일정한 구체예에서, 이중환상 당 모이어티의 가교는  $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ ,  $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$ ,  $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$  또는  $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$ 이다. 일정한 구체예에서, 가교는 4'-CH<sub>2</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2', 4'-CH<sub>2</sub>-O-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2', 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2' 및 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2'-이고, 여기서 각 R은 독립적으로, H, 보호 기 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬이다.

[0305] 일정한 구체예에서, 이중환상 뉴클레오시드는 이성질성 입체배열에 의해 더욱 정의된다. 가령, 4'-2' 메틸렌-옥시 가교를 포함하는 뉴클레오시드는 α-L 입체배열 또는 β-D 입체배열일 수 있다. 이전에, α-L-메틸렌옥시 (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA가 안티센스 활성을 보이는 안티센스 올리고뉴클레오티드 내로 함유되었다 (Frieden *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 2003, 21, 6365-6372).

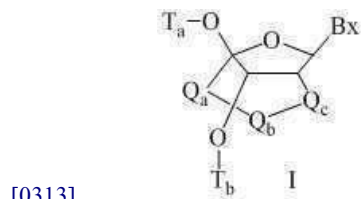
[0306] 일정한 구체예에서, 이중환상 뉴클레오시드에는 (A) α-L-메틸렌옥시 (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA, (B) β-D-메틸렌옥시 (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA, (C) 에틸렌옥시 (4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2') BNA, (D) 아미노옥시 (4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2') BNA, (E) 옥시아미노 (4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2') BNA, 그리고 (F) 메틸(메틸렌옥시) (4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2') BNA, (G) 메틸렌-티오 (4'-CH<sub>2</sub>-S-2') BNA, (H) 메틸렌-아미노 (4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-2') BNA, (I) 메틸 탄소환상 (4'-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-2') BNA, 그리고 하기에 묘사된 바와 같은 (J) 프로필렌 탄소환상 (4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2') BNA가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다:



[0310] 여기서 Bx는 염기 모이어티이고, 그리고 R은 독립적으로 H, 보호 기 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬이다.

[0311] 일정한 구체예에서, 화학식 I을 갖는 이중환상 뉴클레오시드가 제시된다:

[0312] [화학식 I]



[0315] 여기서:

[0316] Bx는 헤테로환상 염기 모이어티이고;

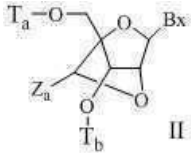
[0317]  $-Q_a-Q_b-Q_c-$ 는  $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}_c)-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_c)-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{R}_c)-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}_c)-\text{O}-$  또는  $-\text{N}(\text{R}_c)-\text{O}-\text{CH}_2-$ 이고;

[0318]  $\text{R}_c$ 는  $\text{C}_1-\text{C}_{12}$  알킬 또는 아미노 보호 기이고; 그리고

[0319]  $\text{T}_a$ 와  $\text{T}_b$ 는 각각, 독립적으로 H, 히드록실 보호 기, 접합체 기, 반응성 인 기, 인 모이어티 또는 지지 매체에 공유 부착이다.

[0320] 일정한 구체예에서, 화학식 II를 갖는 이중환상 뉴클레오시드가 제시된다:

[0321] [화학식 II]



[0322]

[0324] 여기서:

[0325]  $\text{Bx}$ 는 헤테로환상 염기 모이어티이고;

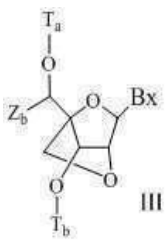
[0326]  $\text{T}_a$ 와  $\text{T}_b$ 는 각각, 독립적으로 H, 히드록실 보호 기, 접합체 기, 반응성 인 기, 인 모이어티 또는 지지 매체에 공유 부착이고;

[0327]  $\text{Z}_a$ 는  $\text{C}_1-\text{C}_6$  알킬,  $\text{C}_2-\text{C}_6$  알케닐,  $\text{C}_2-\text{C}_6$  알키닐, 치환된  $\text{C}_1-\text{C}_6$  알킬, 치환된  $\text{C}_2-\text{C}_6$  알케닐, 치환된  $\text{C}_2-\text{C}_6$  알키닐, 아실, 치환된 아실, 치환된 아미드, 티올 또는 치환된 티오이다.

[0329] 한 구체예에서, 치환된 기는 각각, 독립적으로, 할로겐, 옥소, 히드록실,  $\text{OJ}_c$ ,  $\text{NJ}_c\text{J}_d$ ,  $\text{SJ}_c$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{OC}(=\text{X})\text{J}_c$ , 그리고  $\text{NJ}_c\text{C}(=\text{X})\text{NJ}_c\text{J}_d$ 에서 독립적으로 선택되는 치환기로 단일 또는 다중 치환되고, 여기서 각  $\text{J}_c$ ,  $\text{J}_d$ 와  $\text{J}_e$ 는 독립적으로, H,  $\text{C}_1-\text{C}_6$  알킬, 또는 치환된  $\text{C}_1-\text{C}_6$  알킬이고, 그리고  $\text{X}$ 는 O 또는  $\text{NJ}_c$ 이다.

[0330] 일정한 구체예에서, 화학식 III을 갖는 이중환상 뉴클레오시드가 제시된다:

[0331] [화학식 III]



[0332]

[0334] 여기서:

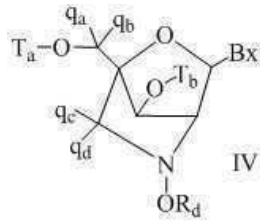
[0335]  $\text{Bx}$ 는 헤테로환상 염기 모이어티이고;

[0336]  $\text{T}_a$ 와  $\text{T}_b$ 는 각각, 독립적으로 H, 히드록실 보호 기, 접합체 기, 반응성 인 기, 인 모이어티 또는 지지 매체에 공유 부착이고;

[0337]  $\text{Z}_b$ 는  $\text{C}_1-\text{C}_6$  알킬,  $\text{C}_2-\text{C}_6$  알케닐,  $\text{C}_2-\text{C}_6$  알키닐, 치환된  $\text{C}_1-\text{C}_6$  알킬, 치환된  $\text{C}_2-\text{C}_6$  알케닐, 치환된  $\text{C}_2-\text{C}_6$  알키닐 또는 치환된 아실 ( $\text{C}(=\text{O})-$ )이다.

[0338] 일정한 구체예에서, 화학식 IV를 갖는 이중환상 뉴클레오시드가 제시된다:

[0339] [화학식 IV]



[0340]

[0342] 여기서:

[0343] Bx는 헤테로환상 염기 모이어티이고;

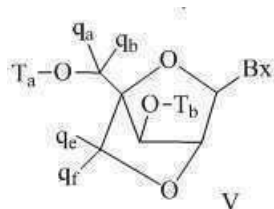
[0344] Ta와 Tb는 각각, 독립적으로 H, 히드록실 보호 기, 접합체 기, 반응성 인 기, 인 모이어티 또는 지지 매체에 공유 부착이고;

[0346] Rd는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알케닐, 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알케닐, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알키닐 또는 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알키닐 이고;

[0347] 각 qa, qb, qc와 qd는 독립적으로, H, 할로젠, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알케닐, 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알케닐, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알키닐 또는 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알키닐, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알콕실, 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알콕실, 아실, 치환된 아실, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 아미노알킬 또는 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 아미노알킬이다.

[0348] 일정한 구체예에서, 화학식 V를 갖는 이중환상 뉴클레오시드가 제시된다:

[0349] [화학식 V]



[0350]

[0352] 여기서:

[0353] Bx는 헤테로환상 염기 모이어티이고;

[0354] Ta와 Tb는 각각, 독립적으로 H, 히드록실 보호 기, 접합체 기, 반응성 인 기, 인 모이어티 또는 지지 매체에 공유 부착이고;

[0355] qa, qb, qc와 qf는 각각, 독립적으로, 수소, 할로젠, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬, 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알케닐, 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알케닐, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알키닐, 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알키닐, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알콕시, 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알콕시, OJ<sub>j</sub>, SJ<sub>j</sub>, SOJ<sub>j</sub>, SO<sub>2</sub>J<sub>j</sub>, NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N<sub>3</sub>, CN, C(=O)OJ<sub>j</sub>, C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, C(=O)J<sub>j</sub>, O-C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N(H)C(=NH)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N(H)C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub> 또는 N(H)C(=S)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>이고;

[0356] 또는 qc와 qf는 서로 합쳐 =C(qg)(qh)이고;

[0357] qg와 qh는 각각, 독립적으로, H, 할로젠, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬 또는 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬이다.

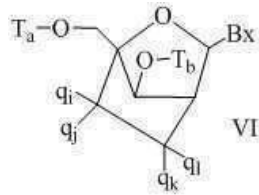
[0358] 메틸렌옥시 (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA 단위체 아데닌, 시토신, 구아닌, 5-메틸-시토신, 티민과 우라실의 합성과 제조뿐만 아니라 이들의 올리고머화, 그리고 핵산 인식 성질이 기술되었다 (Koshkin *et al.*, *Tetrahedron*, 1998, 54,

3607-3630). BNA 및 이들의 제조는 또한, WO 98/39352와 WO 99/14226에서 기술된다.

[0359] 메틸렌옥시 (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA와 2'-티오-BNA의 유사체 역시 제조되었다 (Kumar *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222). 올리고데옥시리보뉴클레오티드 이중나선을 핵산 중합효소에 대한 기질로서 포함하는 잠금된 뉴클레오시드 유사체의 제조 역시 기술되었다 (Wengel *et al.*, WO 99/14226). 게다가, 신규한 입체 형태적으로 제한된 높은-친화성 올리고뉴클레오티드 유사체인 2'-아미노-BNA의 합성이 당분야에서 기술되었다 (Singh *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039). 이에 더하여, 2'-아미노-와 2'-메틸아미노-BNA가 제조되고, 그리고 상보성 RNA와 DNA 가닥을 갖는 이들의 이중나선의 열적 안정성이 이전에 보고되었다.

[0360] 일정한 구체예에서, 화학식 VI를 갖는 이중환상 뉴클레오시드가 제시된다:

[0361] [화학식 VI]



[0362]

[0364] 여기서:

[0365] Bx는 헤테로환상 염기 모이어티이고;

[0366] Ta와 Tb는 각각, 독립적으로 H, 히드록실 보호 기, 접합체 기, 반응성 인 기, 인 모이어티 또는 지지 매체에 공유 부착이고;

[0367] qi, qj, qk와 qi은 각각, 독립적으로, H, 할로겐, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬, 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알케닐, 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알케닐, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알키닐, 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 알키닐, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알콕실, 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알콕실, OJ<sub>j</sub>, SJ<sub>j</sub>, SOJ<sub>j</sub>, SO<sub>2</sub>J<sub>j</sub>, NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N<sub>3</sub>, CN, C(=O)OJ<sub>j</sub>, C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, C(=O)J<sub>j</sub>, O-C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N(H)C(=NH)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N(H)C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub> 또는 N(H)C(=S)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>이고; 그리고

[0368] qi와 qj 또는 qi과 qk는 서로 합쳐 =C(q<sub>g</sub>)(q<sub>h</sub>)이고, 여기서 q<sub>g</sub>와 q<sub>h</sub>는 각각, 독립적으로, H, 할로겐, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬 또는 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬이다.

[0369] 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2' 가교 및 알케닐 유사체 가교 4'-CH=CH-CH<sub>2</sub>-2'를 갖는 탄소환상 이중환상 뉴클레오시드가 기술되었다 (Freier *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4429-4443 및 Albaek *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731-7740). 탄소환상 이중환상 뉴클레오시드의 합성과 제조뿐만 아니라 이들의 올리고머화와 생물화학적 연구결과 역시 기술되었다 (Srivastava *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129(26), 8362-8379).

[0370] 본원에서 이용된 바와 같이, "4'-2' 이중환상 뉴클레오시드" 또는 "4'에서 2' 이중환상 뉴클레오시드"는 푸라노오스 고리의 2개 탄소 원자, 다시 말하면, 푸라노오스 고리의 2' 탄소 원자와 4' 탄소 원자를 연결하는 가교를 포함하는 푸라노오스 고리를 포함하는 이중환상 뉴클레오시드를 지칭한다.

[0371] 본원에서 이용된 바와 같이, "단일환상 뉴클레오시드"는 이중환상 당 모이어티가 아닌 변형된 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오시드를 지칭한다. 일정한 구체예에서, 뉴클레오시드의 당 모이어티, 또는 당 모이어티 유사체는 임의의 위치에서 변형되거나 치환될 수 있다.

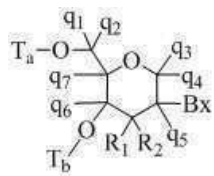
[0372] 본원에서 이용된 바와 같이, "2'-변형된 당"은 2' 위치에서 변형된 푸라노실 당을 의미한다. 일정한 구체예에서, 이런 변형은 제한 없이, 치환된 알콕시와 치환되지 않은 알콕시, 치환된 티오알킬과 치환되지 않은 티오알킬, 치환된 아미노 알킬과 치환되지 않은 아미노 알킬, 치환된 알킬과 치환되지 않은 알킬, 치환된 알릴과 치환되지 않은 알릴, 그리고 치환된 알키닐과 치환되지 않은 알키닐을 비롯하여, 할로겐 화합물에서 선택되는 치환기를 포함한다. 일정한 구체예에서, 2' 변형은 O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>F, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>C(=O)N(H)CH<sub>3</sub>, 그리고 O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 치환기에서 선



택되고, 여기서  $n$ 과  $m$ 은 1 내지 약 10이다. 다른 2'- 치환기는 또한, 하기에서 선택될 수 있다:  $C_1$ - $C_{12}$  알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 알키닐, 알크아릴, 아르알킬, 0-알크아릴 또는 0-아르알킬, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, F, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, 헤테로시클로알킬, 헤테로시클로알크아릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실릴, RNA 개열 기, 리포터 기, 삼입제, 안티센스 화합물의 약동학적 성질을 향상시키기 위한 기, 또는 약역학적 성질을 향상시키기 위한 기, 그리고 유사한 성질을 갖는 기타 치환기. 일정한 구체예에서, 변형된 뉴클레오시드는 2'-MOE 측쇄를 포함한다 (Baker *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 11944-12000). 이런 2'-MOE 치환은 변형되지 않은 뉴클레오시드 및 기타 변형된 뉴클레오시드, 예를 들면, 2'-O-메틸, O-프로필, 그리고 O-아미노프로필에 비하여 향상된 결합 친화성을 갖는 것으로 기술되었다. 2'-MOE 치환기를 갖는 올리고뉴클레오티드 역시 생체내 이용을 위한 유망한 특질을 갖는, 유전자 발현의 안티센스 저해제인 것으로 밝혀졌다 (Martin, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504; Altmann *et al.*, *Chimia*, 1996, 50, 168-176; Altmann *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, 24, 630-637; 그리고 Altmann *et al.*, *Nucleosides Nucleotides*, 1997, 16, 917-926).

[0373] 본원에서 이용된 바와 같이, "변형된 테트라히드로피란 뉴클레오시드" 또는 "변형된 THP 뉴클레오시드"는 정상적인 뉴클레오시드에서 펜토프라노실 잔기에 대해 치환된 6-원 테트라히드로피란 "당" (당 대용물)을 갖는 뉴클레오시드를 의미한다. 변형된 THP 뉴클레오시드에는 당분야에서 핵시톨 핵산 (HNA), 아니톨 핵산 (ANA), 마니톨 핵산 (MNA)으로 지칭되는 것들 (Leumann, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, 10, 841-854를 참조한다), 플루오르 HNA (F-HNA), 또는 화학식 VII를 갖는 화합물이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다:

[0374] [화학식 VII]



VII

[0375]

[0377] 여기서 화학식 VII의 상기 적어도 하나의 테트라히드로피란 뉴클레오시드 유사체 각각에 독립적으로:

[0378] Bx는 헤테로환상 염기 모이어티이고;

[0379] Ta와 Tb는 각각, 독립적으로, 테트라히드로피란 뉴클레오시드 유사체를 안티센스 화합물에 연결하는 뉴클레오시드간 연결 기이거나, 또는 Ta와 Tb 중에서 하나는 테트라히드로피란 뉴클레오시드 유사체를 안티센스 화합물에 연결하는 뉴클레오시드간 연결 기이고, Ta와 Tb 중에서 다른 하나는 H, 히드록실 보호 기, 연결된 접합체 기 또는 5' 또는 3'-말단 기이고;

[0380] q1, q2, q3, q4, q5, q6과 q7은 각각 독립적으로, H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알케닐, 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알케닐, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알키닐 또는 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알키닐이고; 그리고 R1과 R2는 각각, 수소, 히드록실, 할로젠, 치환되거나 치환되지 않은 알콕시, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> 및 CN에서 선택되고, 여기서 X는 O, S 또는 NJ<sub>1</sub>이고, 그리고 각 J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>와 J<sub>3</sub>은 독립적으로, H 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬이다.

[0381] 일정한 구체예에서, 화학식 VII의 변형된 THP 뉴클레오시드가 제시되는데, 여기서 q1, q2, q3, q4, q5, q6과 q7은 각각 H이다. 일정한 구체예에서, q1, q2, q3, q4, q5, q6과 q7 중에서 적어도 하나는 H가 아니다. 일정한 구체예에서, q1, q2, q3, q4, q5, q6과 q7 중에서 적어도 하나는 메틸이다. 일정한 구체예에서, 화학식 VII의 THP 뉴클레오시드가 제시되는데, 여기서 R1과 R2 중에서 하나는 플루오르이다. 일정한 구체예에서, R1은 플루오르이고 R2는 H이고; R1은 메톡시이고 R2는 H이고, 그리고 R1은 메톡시에톡시이고 R2는 H이다.

[0382] 본원에서 이용된 바와 같이, "2'-변형된" 또는 "2'-치환된"은 2' 위치에서 H 또는 OH 이외의 치환기를 포함하는 당을 포함하는 뉴클레오시드를 지칭한다. 2'-변형된 뉴클레오시드에는 하기가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다: 당 고리의 2개 탄소 원자를 연결하는 가교가 2' 탄소 및 당 고리의 다른 탄소를 연결하는 이중환상 뉴클레

오시드; 그리고 비-가교 2' 치환기, 예를 들면, 알릴, 아미노, 아지도, 티오, 0-알릴, 0-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬, -OCF<sub>3</sub>, 0-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, 0-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), 또는 0-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>)을 갖는 뉴클레오시드, 여기서 각 R<sub>m</sub>과 R<sub>n</sub>은 독립적으로, H 또는 치환되거나 치환되지 않은 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬이다. 2'-변형된 뉴클레오시드는 예로써, 당의 다른 위치에서 및/또는 핵염기에서 다른 변형을 더욱 포함할 수 있다.

[0383] 본원에서 이용된 바와 같이, "2'-F"는 2' 위치에서 플루오르 기를 포함하는 당을 포함하는 뉴클레오시드를 지칭한다.

[0384] 본원에서 이용된 바와 같이, "2'-OMe" 또는 "2'-OCH<sub>3</sub>" 또는 "2'-O-메틸"은 각각, 당 고리의 2' 위치에서 -OCH<sub>3</sub> 기를 포함하는 당을 포함하는 뉴클레오시드를 지칭한다.

[0385] 본원에서 이용된 바와 같이, "MOE" 또는 "2'-MOE" 또는 "2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>" 또는 "2'-O-메톡시에틸"은 각각, 당 고리의 2' 위치에서 -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> 기를 포함하는 당을 포함하는 뉴클레오시드를 지칭한다.

[0386] 본원에서 이용된 바와 같이, "올리고뉴클레오티드"는 복수의 연결된 뉴클레오시드를 포함하는 화합물을 지칭한다. 일정한 구체예에서, 복수의 뉴클레오시드 중에서 하나 또는 그 이상이 변형된다. 일정한 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 하나 또는 그 이상의 리보뉴클레오시드 (RNA) 및/또는 데옥시리보뉴클레오시드 (DNA)를 포함한다.

[0387] 안티센스 화합물 내로 함입을 위한 뉴클레오시드를 변형하는데 이용될 수 있는 많은 다른 비시클로와 트리시클로 당 대응물 고리 시스템 역시 당분야에 공지되어 있다 (예로써 검토 논평을 참조한다: Leumann, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, 10, 841-854). 이런 고리 시스템은 활성을 증강시키기 위해 다양한 추가의 치환을 겪을 수 있다.

[0388] 변형된 당의 제조를 위한 방법은 당업자에게 널리 알려져 있다.

[0389] 변형된 당 모이어티를 갖는 뉴클레오티드에서, 핵염기 모이어티 (중성, 변형된 또는 이들의 조합)는 적절한 핵산 표적과의 혼성화를 위해 유지된다.

[0390] 일정한 구체예에서, 안티센스 화합물은 변형된 당 모이어티를 갖는 하나 또는 그 이상의 뉴클레오시드를 포함한다. 일정한 구체예에서, 변형된 당 모이어티는 2'-MOE이다. 일정한 구체예에서, 2'-MOE 변형된 뉴클레오시드는 캡머 모티프에서 배열된다. 일정한 구체예에서, 변형된 당 모이어티는 (4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2') 가교 기를 갖는 이중환상 뉴클레오시드이다. 일정한 구체예에서, (4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2') 변형된 뉴클레오시드는 캡머 모티프의 날개 전역에 배열된다. 일정한 구체예에서, 변형된 당 모이어티는 cEt이다. 일정한 구체예에서, cEt 변형된 뉴클레오티드는 캡머 모티프의 날개 전역에 배열된다.

[0392] 변형된 핵염기

[0393] 핵염기 (또는 염기) 변형 또는 치환은 자연 발생 또는 합성 변형되지 않은 핵염기와 구조적으로 식별가능하지만, 기능적으로 교환가능하다. 자연과 변형된 핵염기 둘 모두 수소 결합에 참여할 수 있다. 이런 핵염기 변형은 안티센스 화합물에 뉴클레아제 안정성, 결합 친화성 또는 일부 다른 유익한 생물학적 성질을 부여할 수 있다. 변형된 핵염기에는 합성과 자연 핵염기, 예를 들면, 가령 5-메틸시토신 (5-me-C)이 포함된다. 5-메틸시토신 치환을 비롯한 일정한 핵염기 치환은 표적 핵산에 대한 안티센스 화합물의 결합 친화성을 증가시키는데 특히 유용하다. 가령, 5-메틸시토신 치환은 핵산 이중나선 안정성을 0.6-1.2°C 증가시키는 것으로 밝혀졌다 (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278).

[0394] 추가의 변형된 핵염기에는 5-히드록시메틸 시토신, 크산틴, 히포크산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌과 구아닌의 6-메틸과 기타 알킬 유도체, 아데닌과 구아닌의 2-프로필과 기타 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민과 2-티오시토신, 5-할로우라실과 시토신, 피리미딘 염기의 5-프로피닐 (-C≡C-CH<sub>3</sub>) 우라실과 시토신 및 기타 알킬 유도체, 6-아조 우라실, 시토신과 티민, 5-우라실 (슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-히드록실 및 기타 8-치환된 아데닌과 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오르메틸 및 기타 5-치환된 우라실과 시토신, 7-메틸구아닌과 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2-아미노-아데닌, 8-아자구아닌과 8-아자아데닌, 7-테아자구아닌과 7-테아자아데닌, 그리고 3-테아자구아닌과 3-테아자아데닌이 포함된다.

- [0395] 헤테로환상 염기 모이어티에는 퓨린 또는 피리미딘 염기가 다른 헤테로환, 예를 들면, 7-데아자-아데닌, 7-데아자구아노신, 2-아미노피리딘 및 2-피리돈으로 대체되는 것들이 포함될 수 있다. 안티센스 화합물의 결합 친화성을 증가시키는데 특히 유용한 핵염기에는 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실과 5-프로피닐시토신을 비롯하여, 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘, 그리고 N-2, N-6과 O-6 치환된 퓨린이 포함된다.
- [0396] 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산에 표적화된 안티센스 화합물은 하나 또는 그 이상의 변형된 핵염기를 포함한다. 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산에 표적화된 갭-넓어진 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 또는 그 이상의 변형된 핵염기를 포함한다. 일정한 구체예에서, 변형된 핵염기는 5-메틸시토신이다. 일정한 구체예에서, 각 시토신은 5-메틸시토신이다.
- [0398] *제약학적 조성물을 조제하기 위한 조성물과 방법*
- [0399] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 제약학적 조성물 또는 제제의 제조를 위해 제약학적으로 허용되는 활성 또는 비활성 물질과 혼합될 수 있다. 제약학적 조성물의 조제를 위한 조성물과 방법은 투여 루트, 질환의 정도, 또는 투여되는 분량이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 다수의 기준에 의존한다.
- [0400] ApoCIII 핵산에 표적화된 안티센스 화합물은 안티센스 화합물을 적절한 제약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체와 합동함으로써 제약학적 조성물에서 이용될 수 있다.
- [0401] 일정한 구체예에서, "제약학적 담체" 또는 "부형제"는 하나 또는 그 이상의 핵산을 동물에 전달하기 위한 제약학적으로 허용되는 용매, 현탁제 또는 임의의 다른 약리학적으로 비활성 운반체이다. 부형제는 액체 또는 고체일 수 있고, 그리고 소정의 제약학적 조성물의 핵산 및 기타 성분과 합동될 때, 원하는 부피, 경도 등을 제공하기 위해 예정된 투여 방식을 염두에 두고 선택될 수 있다. 전형적인 제약학적 담체에는 결합제 (가령, 전호화옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 등); 충전제 (가령, 락토오스와 기타 당, 미세결정성 셀룰로오스, 펙틴, 젤라틴, 칼슘 황산염, 에틸 셀룰로오스, 폴리아크릴산염 또는 칼슘 수소 인산염 등); 윤활제 (가령, 마그네슘 스테아르산염, 활석, 규소, 콜로이드 이산화실리콘, 스테아르산, 금속성 스테아르산염, 수소화된 야채 오일, 옥수수 전분, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 벤조산염, 나트륨 아세트산염 등); 붕해제 (가령, 전분, 나트륨 전분 글리콜산염 등); 그리고 습윤제 (가령, 나트륨 라우릴 황산염 등)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0402] 핵산과 유해하게 반응하지 않고, 비경구 또는 비-비경구 투여에 적합한 제약학적으로 허용되는 유기 또는 무기 부형제 역시 본 발명의 조성물을 조제하는데 이용될 수 있다. 적절한 제약학적으로 허용되는 담체에는 물, 염 용액, 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 젤라틴, 락토오스, 아밀로오스, 마그네슘 스테아르산염, 활석, 규산, 점성 파라핀, 히드록시메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0403] 제약학적으로 허용되는 희석제에는 인산염-완충된 식염수 (PBS)가 포함된다. PBS는 비경구 전달되는 조성물에서 이용하기 적합한 희석제이다. 따라서 한 구체예에서, ApoCIII 핵산에 표적화된 안티센스 화합물 및 제약학적으로 허용되는 희석제를 포함하는 제약학적 조성물이 본원에서 기술된 방법에 이용된다. 일정한 구체예에서, 제약학적으로 허용되는 희석제는 PBS이다. 일정한 구체예에서, 안티센스 화합물은 안티센스 올리고뉴클레오티드이다.
- [0404] 안티센스 화합물을 포함하는 제약학적 조성물은 임의의 제약학적으로 허용되는 염, 에스테르, 또는 이런 에스테르의 염, 또는 인간을 비롯한 동물에 투여 시에, 생물학적 활성 대사물질 또는 이의 잔류물을 (직접적으로 또는 간접적으로) 제공할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 포괄한다. 따라서 예로써, 본 발명은 또한, 안티센스 화합물의 제약학적으로 허용되는 염, 프로드러그, 이런 프로드러그의 제약학적으로 허용되는 염, 그리고 기타 생물학적 등가물에 관계한다. 적절한 제약학적으로 허용되는 염에는 나트륨과 칼륨 염이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0405] 프로드러그는 신체 내에서 내인성 뉴클레아제에 의해 개열되어 활성 안티센스 화합물을 형성하는 안티센스 화합물의 한쪽 또는 양쪽 단부에서 추가의 뉴클레오시드의 함입을 포함할 수 있다.
- [0406]
- [0407] *접합된 안티센스 화합물*
- [0408] 안티센스 화합물은 결과의 안티센스 올리고뉴클레오티드의 활성, 세포 분포 또는 세포 흡수를 증강시키는 하나

또는 그 이상의 모이어티 또는 접합체에 공유 연결될 수 있다. 전형적인 접합체 기에는 폴레스테롤 모이어티 및 지질 모이어티가 포함된다. 추가의 접합체 기에는 탄수화물, 인지질, 비오틴, 페나진, 폴산염, 페난트리딘, 안트라퀴논, 아크리딘, 플루오레세인, 로다민, 쿠마린, 그리고 염료가 포함된다.

- [0409] 안티센스 화합물은 또한, 예로써 뉴클레아제 안정성과 같은 성질을 증강시키기 위해 일반적으로, 안티센스 화합물의 한쪽 또는 양쪽 말단에 부착되는 하나 또는 그 이상의 안정화 기를 갖도록 변형될 수 있다. 안정화 기 내에 캡 구조가 포함된다. 이들 말단 변형은 안티센스 화합물을 엑소뉴클레아제 분해로부터 보호하고, 그리고 세포 내에서 전달 및/또는 국부화를 보조할 수 있다. 캡은 5'-말단 (5'-캡)에서, 또는 3'-말단 (3'-캡)에서, 또는 양쪽 말단에서 존재할 수 있다. 캡 구조는 당분야에 널리 공지되어 있고, 여기에는 예로써, 역 데옥시 염기소실된 캡이 포함된다. 뉴클레아제 안정성을 부여하기 위해 안티센스 화합물의 한쪽 또는 양쪽 단부를 캡핑하는데 이용될 수 있는 추가의 3'와 5'-안정화 기에는 2003년 1월 16일자 공개된 WO 03/004602에서 개시된 것들이 포함된다.
- [0411] 세포 배양 및 안티센스 화합물 처리
- [0412] ApoCIII 핵산 또는 단백질의 수준, 활성 또는 발현에 대한 안티센스 화합물의 효과는 다양한 세포 유형에서 시험관내에서 조사될 수 있다. 이런 분석에 이용되는 세포 유형은 상업적 공급업체 (가령, American Type Culture Collection, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD)로부터 입수가 가능하고, 그리고 세포는 상업적으로 구입가능한 시약 (가령, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)을 이용하여 공급업체의 사용설명서에 따라 배양된다. 예시적인 세포 유형에는 HepG2 세포, Hep3B 세포, Huh7 (간세포 암종) 세포, 일차 간세포, A549 세포, GM04281 섬유아세포 및 LLC-MK2 세포가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0414] 안티센스 올리고뉴클레오티드의 시험관내 검사
- [0415] 안티센스 올리고뉴클레오티드로 세포의 처리를 위한 방법이 본원에서 기술되고, 이들은 다른 안티센스 화합물로 처리를 위해 적절하게 변형될 수 있다.
- [0416] 일반적으로, 세포는 이들 세포가 배양 동안 대략 60-80% 합류 (confluence)에 도달할 때, 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리된다.
- [0417] 안티센스 올리고뉴클레오티드를 배양된 세포 내로 도입하는데 통상적으로 이용되는 시약에는 양이온성 지질형 질감염 시약 LIPOFECTIN® (Invitrogen, Carlsbad, CA)이 포함된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 원하는 최종 농도 및 전형적으로, 100 nM 안티센스 올리고뉴클레오티드마다 2 내지 12 ug/mL 범위에서 변하는 LIPOFECTIN® 농도를 달성하기 위해 OPTI-MEM® 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 LIPOFECTIN®과 혼합된다.
- [0418] 안티센스 올리고뉴클레오티드를 배양된 세포 내로 도입하는데 이용되는 다른 시약에는 LIPOFECTAMINE 2000® (Invitrogen, Carlsbad, CA)이 포함된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 원하는 농도 및 전형적으로, 100 nM 안티센스 올리고뉴클레오티드마다 2 내지 12 ug/mL 범위에서 변하는 LIPOFECTAMINE® 농도를 달성하기 위해 OPTI-MEM® 1 환원된 혈청 배지 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 LIPOFECTAMINE 2000®과 혼합된다.
- [0419] 안티센스 올리고뉴클레오티드를 배양된 세포 내로 도입하는데 이용되는 다른 시약에는 Cytofectin® (Invitrogen, Carlsbad, CA)이 포함된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 원하는 농도 및 전형적으로, 100 nM 안티센스 올리고뉴클레오티드마다 2 내지 12 ug/mL 범위에서 변하는 Cytofectin® 농도를 달성하기 위해 OPTI-MEM® 1 환원된 혈청 배지 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 Cytofectin®과 혼합된다.
- [0420] 안티센스 올리고뉴클레오티드를 배양된 세포 내로 도입하는데 이용되는 다른 시약에는 Oligofectamine™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)이 포함된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 100 nM당 대략 0.2 내지 0.8 µL의 Oligofectamine™ 대 올리고뉴클레오티드 비율에서 올리고뉴클레오티드의 원하는 농도를 달성하기 위해 Opti-MEM™-1 환원된 혈청 배지 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)에서



Oligofectamine™과 혼합된다.

- [0421] 안티센스 올리고뉴클레오티드를 배양된 세포 내로 도입하는데 이용되는 다른 시약에는 FuGENE 6 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN)이 포함된다. 안티센스 올리고머 화합물은 100 nM당 1 내지 4 μL의 FuGENE 6의 FuGENE 6 대 올리고머 화합물 비율에서 올리고뉴클레오티드의 원하는 농도를 달성하기 위해 1 mL의 혈청-없는 RPMI에서 FuGENE 6과 혼합되었다.
- [0422] 안티센스 올리고뉴클레오티드를 배양된 세포 내로 도입하는데 이용되는 다른 기술에는 전기천공이 포함된다 (Sambrooke and Russell in *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001*).
- [0423] 세포는 일과적인 방법에 의해 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리된다. 세포는 전형적으로, 안티센스 올리고뉴클레오티드 처리 후 16-24 시간 시점에 수확되고, 이 시점에서 표적 핵산의 RNA 또는 단백질 수준은 당분야에 공지되고 본원에서 기술된 방법에 의해 측정된다 (Sambrooke and Russell in *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001*). 일반적으로, 처리가 복수 반복으로 수행될 때, 데이터는 반복 처리의 평균으로서 표시된다.
- [0424] 이용된 안티센스 올리고뉴클레오티드의 농도는 세포주마다 변한다. 특정 세포주에 대한 최적 안티센스 올리고뉴클레오티드 농도를 결정하는 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다 (Sambrooke and Russell in *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001*). 안티센스 올리고뉴클레오티드는 LIPOFECTAMINE2000® (Invitrogen, Carlsbad, CA), Lipofectin® (Invitrogen, Carlsbad, CA) 또는 Cytofectin™ (Genlantis, San Diego, CA)으로 형질감염될 때, 전형적으로 1 nM 내지 300 nM 범위의 농도에서 이용된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 전기천공을 이용하여 형질감염될 때, 625 내지 20,000 nM 범위의 더욱 높은 농도에서 이용된다.
- [0426] *RNA 단리*
- [0427] RNA 분석은 전체 세포 RNA 또는 폴리(A)+ mRNA에서 수행될 수 있다. RNA 단리의 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다 (Sambrooke and Russell in *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001*). RNA는 당분야에 널리 공지된 방법을 이용하여, 예를 들면, 제조업체의 권장된 프로토콜에 따라 TRIZOL® 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 준비된다.
- [0429] *표적 수준 또는 발현의 저해의 분석*
- [0430] ApoCIII 핵산의 수준 또는 발현의 저해는 당분야에 공지된 다양한 방식으로 검정될 수 있다 (Sambrooke and Russell in *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001*). 가령, 표적 핵산 수준은 예로써, 노던 블롯 분석, 경쟁적 중합효소 연쇄 반응 (PCR), 또는 정량적 실시간 PCR에 의해 정량될 수 있다. RNA 분석은 전체 세포 RNA 또는 폴리(A)+ mRNA에서 수행될 수 있다. RNA 단리의 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다. 노던 블롯 분석 역시 당분야에서 일과적이다. 정량적 실시간 PCR은 제조업체의 사용설명서에 따라, PE-Applied Biosystems, Foster City, CA로부터 상업적으로 구입가능한 ABI PRISM® 7600, 7700, 또는 7900 서열 Detection System을 이용하여 편의하게 달성될 수 있다.
- [0432] *표적 RNA 수준의 정량적 실시간 PCR 분석*
- [0433] 표적 RNA 수준의 정량은 제조업체의 사용설명서에 따라, ABI PRISM® 7600, 7700, 또는 7900 Sequence Detection System (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용한 정량적 실시간 PCR에 의해 달성될 수 있다. 정량적 실시간 PCR의 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다.
- [0434] 실시간 PCR에 앞서, 단리된 RNA는 역전사효소 (RT) 반응에 종속되고, 여기에서 상보성 DNA (cDNA)가 생산되고, 이것은 이후, 실시간 PCR 증폭을 위한 기질로서 이용된다. RT와 실시간 PCR 반응은 동일한 시료 웰에서 순차적으로 수행되었다. RT와 실시간 PCR 시약은 Invitrogen (Carlsbad, CA)로부터 구입된다. RT와 실시간-PCR 반응

은 당업자에게 널리 공지된 방법에 의해 수행된다.

- [0435] 실시간 PCR에 의해 획득된 유전자 (또는 RNA) 표적 양은 발현이 일정한 유전자, 예를 들면, 시클로필린 A의 발현 수준을 이용하여, 또는 RIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA)으로 전체 RNA를 정량함으로써 정규화될 수 있다. 시클로필린 A 발현은 표적과 동시에, 복합적으로, 또는 개별적으로 가동됨으로써, 실시간 PCR에 의해 정량된다. 전체 RNA는 RIBOGREEN® RNA 정량 시약 (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA)을 이용하여 정량된다. RIBOGREEN®에 의한 RNA 정량의 방법은 Jones, L.J., et al, (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374)에서 교시된다. RIBOGREEN® 형광을 측정하기 위해 CYTOFLUOR® 4000 기구 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)가 이용된다.
- [0436] 프로브와 프라이머는 ApoCIII 핵산에 혼성화되도록 설계된다. 실시간 PCR 프로브와 프라이머를 설계하기 위한 방법은 당분야에 공지되어 있고, 그리고 PRIMER EXPRESS® Software (Applied Biosystems, Foster City, CA)와 같은 소프트웨어의 이용을 포함할 수 있다.
- [0437] RT, 실시간 PCR에 의해 획득된 유전자 표적 양은 발현이 일정한 유전자, GAPDH 또는 시클로필린 A의 발현 수준을 이용하여, 또는 RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)으로 전체 RNA를 정량함으로써 정규화될 수 있다. GAPDH 또는 시클로필린 A 발현은 표적과 동시에, 복합적으로, 또는 개별적으로 가동됨으로써, RT, 실시간 PCR에 의해 정량될 수 있다. 전체 RNA는 RiboGreen™ RNA 정량 시약 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)을 이용하여 정량되었다.
- [0439] 단백질 수준의 분석
- [0440] ApoCIII 핵산의 안티센스 저해는 ApoCIII 단백질 수준을 측정함으로써 평가될 수 있다. ApoCIII의 단백질 수준은 당분야에 널리 공지된 다양한 방법, 예를 들면, 면역침전, 웨스턴 블롯 분석 (면역블롯팅), 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA), 정량적 단백질 검정, 단백질 활성 검정 (가령, 카스파아제 활성 검정), 면역조직화학, 면역세포화학 또는 형광-활성화 세포 분류 (FACS) (Sambrooke and Russell in Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001)에서 평가되거나 정량될 수 있다. 표적 지향된 항체는 다양한 공급원, 예를 들면, 항체의 MSRS 카탈로그 (Aerie Corporation, Birmingham, MI)로부터 확인되고 획득되거나, 또는 당분야에 널리 공지된 전통적인 단일클론 또는 다중클론 항체 생산 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간과 생쥐 ApoCIII의 검출에 유용한 항체는 상업적으로 구입가능하다.
- [0442] 안티센스 화합물의 생체내 검사
- [0443] 안티센스 화합물, 예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 ApoCIII의 발현을 저해하고 표현형적 변화를 발생시키는 그들의 능력을 평가하기 위해 동물에서 조사된다. 검사는 정상적인 동물, 또는 실험 질환 모델에서 수행될 수 있다. 동물에 투여를 위하여, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 제약학적으로 허용되는 희석제, 예를 들면, 인산염-완충된 식염수에서 조제된다. 투여는 투여의 비경구 루트를 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 용량과 투약 빈도의 계산은 투여 루트 및 동물 체중과 같은 인자에 좌우된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드로 치료 기간 이후에, RNA가 조직으로부터 단리되고, 그리고 ApoCIII 핵산 발현에서 변화가 측정된다. ApoCIII 단백질 수준에서 변화 역시 측정된다.
- [0445] 일정한 징후
- [0446] 일정한 구체예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 하나 또는 그 이상의 제약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 개체를 치료하기 위한 방법이 본원에서 제시된다. 일정한 구체예에서, 개체는 심혈관 질환 또는 대사 장애를 앓는다.
- [0447] 일정한 구체예에서, 심혈관 질환은 동맥류, 협심증, 부정맥, 죽상동맥경화증, 뇌혈관 질환, 관상동맥 심장 질환, 고혈압, 이상지질혈증, 과지질혈증, 과트리글리세리드혈증, 과콜레스테롤혈증, 뇌졸중 등이다. 일정한 구체예에서, 이상지질혈증은 카일로마이크론혈증이다.
- [0448] 하기 실시예에서 제시된 바와 같이, 본원에서 기술된 바와 같은 ApoCIII에 표적화된 화합물은 심혈관 질환의 생

리학적 마커 또는 표현형을 조정하는 것으로 밝혀졌다. 일정한 실험에서, 화합물은 치료되지 않은 동물과 비교하여, HDL 수준을 증가시키고, 그리고 LDL과 트리글리세리드 수준을 감소시켰다. 일정한 구체예에서, HDL 수준에서 증가 및 LDL과 트리글리세리드 수준에서 감소는 화합물에 의한 ApoCIII의 저해와 연관하였다.

- [0449] 일정한 구체예에서, 심혈관 질환의 생리학적 마커는 정량될 수 있다. 가령, HDL 수준은 예로써, 표준 지질 검사에 의해 측정되고 정량될 수 있다. 이런 마커의 경우에, 일정한 구체예에서, 마커는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 99%, 또는 이들 값 중에서 임의의 2개에 의해 정의된 범위에 의해 증가될 수 있다.
- [0450] 또한, 치료를 필요로 하는 병든 개체에서 심혈관 질환과 연관된 증상을 예방하거나, 치료하거나 또는 개선하기 위한 방법이 본원에서 제시된다. 일정한 구체예에서, 심혈관 질환과 연관된 증상의 발생률을 감소시키기 위한 방법이 제시된다. 일정한 구체예에서, 심혈관 질환과 연관된 증상의 심각도를 감소시키기 위한 방법이 제시된다. 이런 구체예에서, 이들 방법은 ApoCIII 핵산에 표적화된 화합물의 치료 효과량을 병든 개체에 투여하는 것을 포함한다.
- [0451] 심혈관 질환은 다양한 신체 증상으로 특징된다. 심혈관 질환과 연관되는 것으로 당업자에게 알려진 임의의 증상이 앞서 기술된 방법에서 진술된 바와 같이 예방되거나, 치료되거나, 개선되거나 또는 달리 조정될 수 있다. 일정한 구체예에서, 증상은 제한 없이, 협심증, 흉통, 숨가쁨, 심계항진, 심약, 현기증, 메스꺼움, 발한, 심장빈맥, 서맥, 부정맥, 심방세동, 하지에서 종창, 청색증, 피로, 기절, 얼굴의 무감각, 팔다리의 무감각, 근육의 파행 또는 경련, 복부의 팽창 또는 열병 중에서 한 가지일 수 있다.
- [0452] 일정한 구체예에서, 증상은 협심증이다. 일정한 구체예에서, 증상은 흉통이다. 일정한 구체예에서, 증상은 숨가쁨이다. 일정한 구체예에서, 증상은 심계항진이다. 일정한 구체예에서, 증상은 심약이다. 일정한 구체예에서, 증상은 현기증이다. 일정한 구체예에서, 증상은 메스꺼움이다. 일정한 구체예에서, 증상은 발한이다. 일정한 구체예에서, 증상은 심장빈맥이다. 일정한 구체예에서, 증상은 서맥이다. 일정한 구체예에서, 증상은 부정맥이다. 일정한 구체예에서, 증상은 심방세동이다. 일정한 구체예에서, 증상은 하지에서 종창이다. 일정한 구체예에서, 증상은 청색증이다. 일정한 구체예에서, 증상은 피로이다. 일정한 구체예에서, 증상은 기절이다. 일정한 구체예에서, 증상은 얼굴의 무감각이다. 일정한 구체예에서, 증상은 팔다리의 무감각이다. 일정한 구체예에서, 증상은 근육의 파행 또는 경련이다. 일정한 구체예에서, 증상은 복부의 팽창이다. 일정한 구체예에서, 증상은 손상된 단기 열병이다.
- [0453] 일정한 구체예에서, 대사 장애에는 과혈당, 전당뇨병, 당뇨병 (I형과 II형), 비만, 인슐린 저항, 대사 증후군 및 당뇨병성 이상지질혈증이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0454] 일정한 구체예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 ApoCIII에 표적화된 화합물은 대사 장애의 생리학적 마커 또는 표현형을 조정한다. 일정한 구체예에서, 대사 장애의 생리학적 마커는 정량될 수 있다. 가령, 글루코오스 수준 또는 인슐린 저항은 당분야에 공지된 표준 검사에 의해 측정되고 정량될 수 있다. 이런 마커의 경우에, 일정한 구체예에서, 마커는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 99%, 또는 이들 값 중에서 임의의 2개에 의해 정의된 범위에 의해 감소될 수 있다. 다른 실례에서, 인슐린 민감성 또는 HDL 수준은 당분야에 공지된 표준 검사에 의해 측정되고 정량될 수 있다. 이런 마커의 경우에, 일정한 구체예에서, 마커는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 99%, 또는 이들 값 중에서 임의의 2개에 의해 정의된 범위에 의해 증가될 수 있다.
- [0455] 또한, 병든 개체에서 대사 장애와 연관된 증상을 예방하거나, 치료하거나 또는 개선하기 위한 방법이 본원에서 제시된다. 일정한 구체예에서, 대사 장애와 연관된 증상의 발생률을 감소시키기 위한 방법이 제시된다. 일정한 구체예에서, 대사 장애와 연관된 증상의 심각도를 감소시키기 위한 방법이 제시된다. 이런 구체예에서, 이들 방법은 ApoCIII 핵산에 표적화된 화합물의 치료 효과량을 병든 개체에 투여하는 것을 포함한다.
- [0456] 대사 장애는 다양한 신체 증상으로 특징된다. 대사 장애와 연관되는 것으로 당업자에게 알려진 임의의 증상이 앞서 기술된 방법에서 진술된 바와 같이 예방되거나, 치료되거나, 개선되거나 또는 달리 조정될 수 있다. 일정한 구체예에서, 증상은 제한 없이, 과도한 소변 생산 (다뇨증), 과도한 갈증과 증가된 액체 섭취 (조갈증), 흐린 시력, 설명되지 않는 체중 감소 및 무기력 중에서 한 가지일 수 있다.
- [0457] 일정한 구체예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 하나 또는 그 이상의 제약학적 조성물의 치료 효과량을 투여하는 것을 포함하는, 개체를 치료하는 방법이 제시된다. 일정한 구체예에서, 개체는 심혈관 질환을 앓는다. 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산에 표적화된 안티센스 화합물의 치료 효과량의 투여는 안티센스 화합물의 투여에

대한 개체의 반응을 결정하기 위해, 심혈관 질환, 당뇨병 또는 ApoCIII의 발현과 연관된 기타 질환 과정의 ApoCIII 수준 또는 마커의 모니터링을 동반한다. 안티센스 화합물의 투여에 대한 개체의 반응은 치료적 개입의 양과 지속 기간을 결정하기 위해 의사에 의해 이용된다.

[0458] 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산에 표적화된 안티센스 화합물의 투여는 ApoCIII 발현을 적어도 약 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 99%, 또는 이들 값 중에서 임의의 2개에 의해 정의된 범위에서 감소시킨다. 일정한 구체예에서, ApoCIII 발현은  $\leq 50$  mg/L,  $\leq 60$  mg/L,  $\leq 70$  mg/L,  $\leq 80$  mg/L,  $\leq 90$  mg/L,  $\leq 100$  mg/L,  $\leq 110$  mg/L,  $\leq 120$  mg/L,  $\leq 130$  mg/L,  $\leq 140$  mg/L,  $\leq 150$  mg/L,  $\leq 160$  mg/L,  $\leq 170$  mg/L,  $\leq 180$  mg/L,  $\leq 190$  mg/L 또는  $\leq 200$  mg/L로 감소된다.

[0459] 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산에 표적화된 안티센스 화합물의 투여는 HDL 수준을 적어도 약 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 99%, 또는 이들 값 중에서 임의의 2개에 의해 정의된 범위에서 증가시킨다.

[0460] 일정한 구체예에서, ApoCIII 핵산에 표적화된 안티센스 화합물의 투여는 TG (식후 또는 공복) 수준을 적어도 약 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%, 또는 이들 값 중에서 임의의 2개에 의해 정의된 범위에서 감소시킨다. 일정한 구체예에서, TG (식후 또는 공복)는  $\leq 100$  mg/dL,  $\leq 110$  mg/dL,  $\leq 120$  mg/dL,  $\leq 130$  mg/dL,  $\leq 140$  mg/dL,  $\leq 150$  mg/dL,  $\leq 160$  mg/dL,  $\leq 170$  mg/dL,  $\leq 180$  mg/dL,  $\leq 190$  mg/dL,  $\leq 200$  mg/dL,  $\leq 210$  mg/dL,  $\leq 220$  mg/dL,  $\leq 230$  mg/dL,  $\leq 240$  mg/dL,  $\leq 250$  mg/dL,  $\leq 260$  mg/dL,  $\leq 270$  mg/dL,  $\leq 280$  mg/dL,  $\leq 290$  mg/dL,  $\leq 300$  mg/dL,  $\leq 350$  mg/dL,  $\leq 400$  mg/dL,  $\leq 450$  mg/dL,  $\leq 500$  mg/dL,  $\leq 550$  mg/dL,  $\leq 600$  mg/dL,  $\leq 650$  mg/dL,  $\leq 700$  mg/dL,  $\leq 750$  mg/dL,  $\leq 800$  mg/dL,  $\leq 850$  mg/dL,  $\leq 900$  mg/dL,  $\leq 950$  mg/dL,  $\leq 1000$  mg/dL,  $\leq 1100$  mg/dL,  $\leq 1200$  mg/dL,  $\leq 1300$  mg/dL,  $\leq 1400$  mg/dL,  $\leq 1500$  mg/dL,  $\leq 1600$  mg/dL,  $\leq 1700$  mg/dL,  $\leq 1800$  mg/dL 또는  $\leq 1900$  mg/dL로 감소된다.

[0461] 일정한 구체예에서, ApoCIII에 표적화된 안티센스 화합물을 포함하는 제약학적 조성물은 심혈관 질환을 앓거나 심혈관 질환에 민감한 환자를 치료하기 위한 약제의 제조에 이용된다.

[0463] 투여

[0464] 본 발명의 화합물 또는 제약학적 조성물은 국부 또는 전신 치료가 요망되는 지의 여부 및 치료되는 부위에 따라 다양한 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 경구 또는 비경구일 수 있다.

[0465] 일정한 구체예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 화합물과 조성물은 비경구 투여된다. 비경구 투여에는 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 주사 또는 주입이 포함된다.

[0466] 일정한 구체예에서, 비경구 투여는 주입에 의한다. 주입은 장기적 또는 연속적 또는 단기적 또는 간헐적일 수 있다. 일정한 구체예에서, 주입된 제약학적 작용제는 펌프로 전달된다. 일정한 구체예에서, 주입은 정맥내이다.

[0467] 일정한 구체예에서, 비경구 투여는 주사에 의한다. 주사는 주사기 또는 펌프로 전달될 수 있다. 일정한 구체예에서, 주사는 일시 주사이다. 일정한 구체예에서, 주사는 조직 또는 장기에 직접적으로 투여된다. 일정한 구체예에서, 비경구 투여는 피하이다.

[0468] 일정한 구체예에서, 비경구 투여를 위한 제제에는 완충제, 희석제 및 기타 적절한 첨가제, 예를 들면, 제한 없이, 침투 증강제, 담체 화합물 및 기타 제약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 또한 내포할 수 있는 무균 수성 용액이 포함될 수 있다.

[0469] 일정한 구체예에서, 본 발명의 화합물 또는 조성물의 경구 투여를 위한 제제에는 제약학적 담체, 부형제, 분말 또는 과립, 미세미립자, 나노미립자, 물 또는 비-수성 매체에서 현탁액 또는 용액, 캡슐, 겔 캡슐, 향낭, 정제 또는 미니정제가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 농후제, 폼미제, 희석제, 유화제, 분산 보조제 또는 접합제가 바람직할 수 있다. 일정한 구체예에서, 경구 제제는 본 발명의 화합물이 하나 또는 그 이상의 침투 증강제, 계면활성제 및 킬레이터와 함께 투여되는 것들이다.

[0471] 투약



- [0472] 일정한 구체예에서, 제약학적 조성물은 투약 섭생 (가령, 분량, 투약 빈도, 그리고 지속 기간)에 따라 투여되는 데, 여기서 투약 섭생은 원하는 효과를 달성하도록 선택될 수 있다. 원하는 효과는 예로써, ApoCIII의 감소, 또는 ApoCIII와 연관된 질환 또는 장애의 예방, 감소, 개선 또는 이의 진행의 늦춤일 수 있다.
- [0473] 일정한 구체예에서, 투약 섭생의 변수는 개체에서 제약학적 조성물의 원하는 농도가 산출되도록 조정된다. 투약 섭생에 관하여 이용된 "제약학적 조성물의 농도"는 제약학적 조성물의 화합물, 올리고뉴클레오티드, 또는 활성 성분을 지칭할 수 있다. 가령, 일정한 구체예에서, 분량 및 투약 빈도는 원하는 효과를 달성할 만큼 충분한 양으로 제약학적 조성물의 조직 농도 또는 혈장 농도를 제공하도록 조정된다.
- [0474] 투약은 치료되는 질환 상태의 심각도와 반응성에 좌우되는데, 치료의 경과에 수일 내지 수개월 동안 지속되거나, 또는 치료가 실패되거나 질환 상태의 감소가 달성될 때까지 지속된다. 투약은 또한, 약물 효능과 대사에 좌우된다. 일정한 구체예에서, 용량은 체중 kg당 0.01 $\mu$ g 내지 100mg이거나, 또는 투약마다 0.001mg - 1000mg의 범위 내에 있고, 그리고 하루, 주, 월 또는 연 1회 또는 그 이상, 또는 심지어, 2 내지 20년마다 1회 제공될 수 있다. 성공적인 치료 이후에, 질환 상태의 재발을 예방하기 위한 유지 요법 (maintenance therapy)을 환자가 받도록 하는 것이 바람직한데, 여기서 올리고뉴클레오티드는 체중 kg당 0.01 $\mu$ g 내지 100mg 범위에서, 하루 1회 또는 그 이상 내지 20년마다 1회, 또는 투약마다 0.001mg 내지 1000mg 범위에서 유지 분량으로 투여된다.
- [0476] 일정한 복합 요법
- [0477] 일정한 구체예에서, 본원에서 기술된 화합물을 포함하는 일차 작용제는 하나 또는 그 이상의 이차 작용제와 공동-투여된다. 일정한 구체예에서, 이런 이차 작용제는 본원에서 기술된 일차 작용제와 동일한 질환, 장애 또는 이상을 치료하도록 설계된다. 일정한 구체예에서, 이런 이차 작용제는 본원에서 기술된 일차 작용제와 상이한 질환, 장애 또는 이상을 치료하도록 설계된다. 일정한 구체예에서, 일차 작용제는 이차 작용제의 원치 않는 부작용을 치료하도록 설계된다. 일정한 구체예에서, 이차 작용제는 일차 작용제의 원치 않는 효과를 치료하기 위해 일차 작용제와 공동-투여된다. 일정한 구체예에서, 이런 이차 작용제는 본원에서 기술된 하나 또는 그 이상의 제약학적 조성물의 원치 않는 부작용을 치료하도록 설계된다. 일정한 구체예에서, 이차 작용제는 복합 효과를 발생시키기 위해 일차 작용제와 공동-투여된다. 일정한 구체예에서, 이차 작용제는 상승 효과를 발생시키기 위해 일차 작용제와 공동-투여된다. 일정한 구체예에서, 일차와 이차 작용제의 공동-투여는 이들 작용제가 독립적 요법으로서 투여되면 치료적 또는 예방적 효과를 달성하기 위해 요구되는 용량보다 적은 용량의 이용을 가능하게 한다.
- [0478] 일정한 구체예에서, 본원에서 기술된 하나 또는 그 이상의 조성물 및 하나 또는 그 이상의 다른 제약학적 작용제는 동시에 투여된다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 조성물 및 하나 또는 그 이상의 다른 제약학적 작용제는 상이한 시점에 투여된다. 일정한 구체예에서, 본원에서 기술된 하나 또는 그 이상의 조성물 및 하나 또는 그 이상의 다른 제약학적 작용제는 단일 제제에서 함께 제조된다. 일정한 구체예에서, 본원에서 기술된 하나 또는 그 이상의 조성물 및 하나 또는 그 이상의 다른 제약학적 작용제는 별개로 제조된다.
- [0479] 일정한 구체예에서, 이차 작용제에는 ApoCIII 저하제, 콜레스테롤 저하제, 비-HDL 지질 저하 (가령, LDL) 작용제, HDL 증가제, 어유, 니아신, 피브레이트, 스타틴, DCCR (디아족시드의 염), 글루코오스-저하제 및/또는 항-당뇨병제가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 일정한 구체예에서, 일차 작용제는 최대 내용량의 이차 작용제와 공동으로 투여된다. 일정한 구체예에서, 일차 작용제는 최대 내용량의 이차 작용제에 반응하지 않는 개체에 투여된다.
- [0480] ApoCIII 저하제의 실례에는 일차 작용제와 상이한 ApoCIII 안티센스 올리고뉴클레오티드, 니아신 또는 Apo B 안티센스 올리고뉴클레오티드가 포함된다.
- [0481] 글루코오스-저하제 및/또는 항-당뇨병제의 실례에는 치료적 생활양식 변화, PPAR 효현제, 디펩티딜 펩티다아제 (IV) 저해제, GLP-1 유사체, 인슐린 또는 인슐린 유사체, 인슐린 분비촉진제, SGLT2 저해제, 인간 아밀린 유사체, 비구아니드, 알파-글루코시다아제 저해제, 메트포르민, 술폰닐우레아, 로시글리타존, 메글리티니드, 티아졸리디네디온, 알파-글루코시다아제 저해제 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 술폰닐우레아는 아세토헥사미드, 클로르프로파미드, 톨부타미드, 톨라자미드, 글리메피리드, 글리피지드, 글리부리드, 또는 글리클라지드일 수 있다. 메글리티니드는 나테글리니드 또는 레파글리니드일 수 있다. 티아졸리디네디온은 피오글리타존 또는 로시글리타존일 수 있다. 알파-글루코시다아제는 아카르보스 또는 미글리톨일 수 있다.

- [0482] 콜레스테롤 또는 지질 저하 치료에는 치료적 생활양식 변화, 스타틴, 담즙산 격리제, 니코틴산 및 피브레이트가 포함될 수 있지만 이들에 국한되지 않는다. 스타틴은 아토르바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴 및 심바스타틴 등일 수 있다. 담즙산 격리제는 콜레세벨람, 콜레스티라민, 콜레스티폴 등일 수 있다. 피브레이트는 겐피브로질, 페노피브레이트, 클로피브레이트 등일 수 있다.
- [0483] HDL 증가제에는 콜레스테릴 에스테르 전달 단백질 (CETP) 저해 약물 (가령, Torcetrapib), 폐록시슘 증식 활성화된 수용체 효현제, Apo-A1, 피오글리타존 등이 포함된다.
- [0485] 일정한 치료 개체군
- [0486] 높은 TG 수준을 갖는 일정한 개체는 심혈관과 대사 질환의 유의미한 위험에 처해있다. 높은 TG (가령, 파트리글리세리드혈증)를 갖는 많은 개체에서, 현재의 치료법은 이들의 TG 수준을 안전한 수준으로 감소시킬 수 없다. ApoCIII는 TG 대사에서 중요한 역할을 수행하고 심혈관 질환에 대한 독립적 위험 인자이다. 본원에서 제시된 바와 같이, ApoCIII 저해는 TG 수준을 유의미하게 감소시키고, 이것은 심혈관 또는 대사 질환, 또는 이의 위험을 개선할 수 있다.
- [0487] 경계선 높은 TG 수준 (150-199 mg/dL)은 일반 개체군에서 흔히 발견되고 대사 증후군/인슐린 저항 상태의 공통의 성분이다.  $\geq 200$  mg/dL의 높은 혈장 TG 수준은 심혈관 질환의 증가된 위험과 연관된 통상의 임상적 속성이다 (Hegele et al., *Hum Mol Genet* 2009, 18:4189-4194; Hegele and Pollex, *Mol Cell Biochem*, 2009, 326:35-43). 매우 높은 TG 수준 ( $\geq 500$  및  $\leq 2000$  mg/dL)은 상승된 카일로마이크론 수준과도 가장 자주 연관되고, 그리고 급성 췌장염에 대한 증가하는 위험을 동반한다.
- [0488] 일정한 구체예에서, 본원에서 개시된 화합물, 조성물과 방법은 100-200 mg/dL, 100-300 mg/dL, 100-400 mg/dL, 100-500 mg/dL, 200-500 mg/dL, 300-500 mg/dL, 400-500 mg/dL, 500-1000 mg/dL, 600-1000 mg/dL, 700-1000 mg/dL, 800-1000 mg/dL, 900-1000 mg/dL, 500-1500 mg/dL, 1000-1500 mg/dL, 100-2000 mg/dL, 150-2000 mg/dL, 200-2000 mg/dL, 300-2000 mg/dL, 400-2000 mg/dL, 500-2000 mg/dL, 600-2000 mg/dL, 700-2000 mg/dL, 800-2000 mg/dL, 900-2000 mg/dL, 1000-2000 mg/dL, 1100-2000 mg/dL, 1200-2000 mg/dL, 1300-2000 mg/dL, 1400-2000 mg/dL, 또는 1500-2000 mg/dL의 TG 수준을 갖는 개체를 치료하는데 이용된다. 일정한 구체예에서, 본원에서 개시된 화합물로 치료는  $\geq 100$  mg/dL,  $\geq 110$  mg/dL,  $\geq 120$  mg/dL,  $\geq 130$  mg/dL,  $\geq 140$  mg/dL,  $\geq 150$  mg/dL,  $\geq 160$  mg/dL,  $\geq 170$  mg/dL,  $\geq 180$  mg/dL,  $\geq 190$  mg/dL,  $\geq 200$  mg/dL,  $\geq 300$  mg/dL,  $\geq 400$  mg/dL,  $\geq 500$  mg/dL,  $\geq 600$  mg/dL,  $\geq 700$  mg/dL,  $\geq 800$  mg/dL,  $\geq 900$  mg/dL,  $\geq 1000$  mg/dL,  $\geq 1100$  mg/dL,  $\geq 1200$  mg/dL,  $\geq 1300$  mg/dL,  $\geq 1400$  mg/dL,  $\geq 1500$  mg/dL,  $\geq 1600$  mg/dL,  $\geq 1700$  mg/dL,  $\geq 1800$  mg/dL,  $\geq 1900$  mg/dL,  $\geq 2000$  mg/dL,  $\geq 2100$  mg/dL,  $\geq 2200$  mg/dL,  $\geq 2300$  mg/dL,  $\geq 2400$  mg/dL 또는  $\geq 2500$  mg/dL의 TG 수준을 갖는 개체에 처방된다.
- [0490] 일부 유형의 파트리글리세리드혈증은 Fredrickson 분류 시스템 또는 Tremblay (Tremblay et al., *J Clin Lipidol*, 2011, 5:37-44)에 의해 기술된 분류 시스템에 의해 특징될 수 있다. 일정한 구체예에서, 본원에서 기술된 화합물, 조성물과 방법은 Fredrickson 타입 II, IV 또는 V 파트리글리세리드혈증을 앓거나, 또는 이에 대한 위험에 처해 있는 개체를 치료하는데 유용하다.
- [0491] Fredrickson 타입 IIb (일명, 가족성 결합 과지방단백혈증)은 LDL-C와 VLDL의 상승에 의해 유발된 혼합 과지방혈증 (높은 콜레스테롤과 TG 수준)이다. 높은 VLDL 수준은 TG, 아세틸 CoA를 비롯한 기질의 과다생산, 그리고 B-100 합성의 증가에 기인한다. 이들은 또한, LDL의 감소된 제거에 의해 유발될 수도 있다. 개체군에서 유병률은 약 10%이다.
- [0492] Fredrickson 타입 IV (일명, 가족형 파트리글리세리드혈증)은 개체군의 대략 1%에서 발생하는 상염색체 우성 질환이다. TG 수준은 VLDL의 과도한 간 생산 또는 이형접합성 LPL 결핍의 결과로서 상승되지만, 거의 항상 1000 mg/dL 이하이다. 혈청 콜레스테롤 수준은 통상적으로, 정상 범위 내에 있다. 상기 질환은 이질성이고, 그리고 표현형이 환경 인자, 특히 탄수화물과 에탄올 소비에 의해 강한 영향을 받는다. 일정한 구체예에서, 본원에서 기술된 화합물, 조성물과 방법은 TG 수준  $\geq 200$  mg/dL 및 이형접합성 LPL 결핍 또는 VLDL 과다생산을 갖는 개체를 치료하는데 유용하다. 일정한 구체예에서, 본원에서 기술된 화합물, 조성물과 방법은 TG 수준  $\geq 500$  mg/dL 및 이형접합성 LPL 결핍 또는 VLDL 과다생산을 갖는 개체를 치료하는데 유용하다.

[0493] Fredrickson 타입 V는 높은 VLDL과 카일로마이크론을 갖는다. 이것은 적어도 20%의 LPL 활성과 연관된 기능 상실 LPL 유전자 변이체 (즉, 부분적인 LPL 결핍)의 보유자로 특징된다. 이들 개체는 카일로마이크론과 VLDL로 인하여, 유백색 혈장 및 심각한 파트리글리세리드혈증을 나타낸다. TG 수준은 항상 1000 mg/dL 이상이고, 그리고 총 콜레스테롤 수준은 항상 상승된다. LDL-C 수준은 통상적으로 낮다. 이것은 또한, 급성 췌장염, 글루코오스 과민증 및 고요산혈증에 대한 증가된 위험과 연관된다. 증상은 일반적으로, 성인기 (> 35세)에 나타나고, 그리고 비록 유병률이 상대적으로 드물긴 하지만, 이것은 동형접합성 또는 화합물 이형접합성 LPL 결함성 개체보다 훨씬 빈번하다. 일정한 구체예에서, 본원에서 기술된 화합물, 조성물과 방법은  $\geq 1000$  mg/dL TG를 갖는 개체를 치료하는데 유용하다. 일정한 구체예에서, 본원에서 기술된 화합물, 조성물과 방법은 개체에서 높은 TG 수준과 연관된 췌장염을 앓거나, 또는 이의 위험에 처해 있는 개체를 치료하는데 유용하다. 일정한 구체예에서, 본원에서 기술된 화합물, 조성물과 방법은 개체에서 높은 TG 수준과 연관된 심혈관 또는 대사 질환을 앓거나, 또는 이의 위험에 처해 있는 개체를 치료하는데 유용하다. 일정한 구체예에서, 심혈관 질환은 동맥류, 협심증, 부정맥, 죽상동맥경화증, 뇌혈관 질환, 관상동맥 심장 질환, 고혈압, 이상지질혈증, 과지질혈증, 파트리글리세리드혈증, 과콜레스테롤혈증, 뇌졸중 등이다. 일정한 구체예에서, 이상지질혈증은 카일로마이크론혈증이다. 일정한 구체예에서, 대사 질환 또는 장애에는 과혈당, 전당뇨병, 당뇨병 (I형과 II형), 비만, 인슐린 저항, 대사 증후군 및 당뇨병성 이상지질혈증이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0494] 일정한 구체예에서, 본원에서 개시된 화합물로 치료는 ApoCIII 수준 및/또는 트리글리세리드 수준을 증가시키는 유전자 결함을 갖는 인간 동물에 처방된다. 일정한 구체예에서, 유전자 결함은 ApoCIII 발현을 증가시키는 대립 유전자 변이체 또는 다형성이다. 일정한 구체예에서, 다형성은 T (위치 74에서)에서 A, C (위치 -641에서)에서 A, G (위치 -630에서)에서 A, T (위치 -625에서)에서 결실, C (위치 -482에서)에서 T, T (위치 -455에서)에서 C, C (위치 1100에서)에서 T, C (위치 3175에서)에서 G, T (위치 3206에서)에서 G, C (위치 3238에서)에서 G, 그리고 기타 등등이다. 일정한 구체예에서, 유전자 결함은 이형접합성 LPL 결핍이다.

[0495] 일정한 구체예에서, 본원에서 개시된 화합물로 치료는 상승된 ApoCIII 수준을 갖는 인간 동물에 처방된다. 일정한 구체예에서, 상승된 ApoCIII 수준은  $\geq 50$  mg/L,  $\geq 60$  mg/L,  $\geq 70$  mg/L,  $\geq 80$  mg/L,  $\geq 90$  mg/L,  $\geq 100$  mg/L,  $\geq 110$  mg/L,  $\geq 120$  mg/L,  $\geq 130$  mg/L,  $\geq 140$  mg/L,  $\geq 150$  mg/L,  $\geq 160$  mg/L,  $\geq 170$  mg/L,  $\geq 180$  mg/L,  $\geq 190$  mg/L,  $\geq 200$  mg/L,  $\geq 300$  mg/L,  $\geq 400$  mg/L 또는  $\geq 500$  mg/L이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0496] 실시예

[0498] 무제한적 개시 및 참고문헌에 의한 편집

[0499] 본원에서 기술된 일정한 화합물, 조성물과 방법이 일정한 구체예에 따라서 구체적으로 기술되지만, 하기 실시예는 본원에서 기술된 화합물을 단지 예시하고 이를 한정하는 것으로 의도되지 않는다. 본 출원에서 언급된 각 참고문헌은 본원에 전체로서 참고문헌으로 편집된다.

[0501] 실시예 1: huApoCIII 유전자도입 생쥐에서 인간 ApoCIII의 생체내 안티센스 저해의 효과

[0502] 본 연구에서 이용된 인간 ApoCIII 도입유전자를 갖는 유전자도입 생쥐는 huApoCIII 유전자도입 F1 하이브리드 (Jackson Laboratories, CA)와 C57BL/6 생쥐의 후손이었다. 서열 번호: 1 (GENBANK 수탁 번호 NM\_000040.1) 상에서 508의 출발 부위, 서열 번호: 2 (뉴클레오티드 20263040에서부터 20266203까지 절두된 GENBANK 수탁 번호 NT\_033899.8) 상에서 3139의 출발 부위, 서열 5'- AGCTTCTGTCCAGCTTTAT-3' (서열 번호: 3) 및 5-10-5 MOE 갭머 모티프를 갖는 ISIS 304801 (US Patent 7,598,227에서 이전에 개시됨)이 본 검정에 이용되었다. 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2의 다른 영역을 표적으로 하는, 5-10-5 MOE 갭머 모티프를 갖는 다른 ISIS 안티센스 올리고뉴클레오티드, '화합물 X' 역시 본 검정에 포함되었다. 설치류 ApoCIII 서열 (GenBank 수탁 번호 NM\_023114.3; 서열 번호: 5)을 표적으로 하는, 5-10-5 MOE 갭머 모티프를 갖는 다른 ISIS 안티센스 올리고뉴클레오티드, '화합물 Y' 역시 본 검정에 포함되었다.

[0504] 치료

[0505] 인간 ApoCIII 유전자도입 생쥐는 12-시간 명/암 주기에서 유지되고 Teklad lab 사료가 무제한으로 공급되었다. 동물은 실험의 시작에 앞서 연구 시설에서 적어도 7일 동안 순치되었다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASOs)는 PBS에서 제조되고 0.2 마이크론 필터를 통해 여과함으로써 멸균되었다. 올리고뉴클레오티드는 주사를 위해 0.9% PBS에서 용해되었다.

[0506] 수컷과 암컷 생쥐는 별개로 검정되었다. 수컷 생쥐는 각각 5마리 생쥐로 구성되는 3개 치료 군으로 분할되었다. 이와 같은 2개 군은 37.5 mg/kg의 분량에서 2주 동안 주2회, ISIS 304801 또는 화합물 X가 피하 주사되었다. 한 생쥐 군은 2주 동안 주2회, PBS가 피하 주사되었다. 암컷 생쥐는 각각 4-5마리 생쥐로 구성되는 4개 치료 군으로 분할되었다. 이와 같은 3개 군은 37.5 mg/kg의 분량에서 2주 동안 주2회, ISIS 304801, 화합물 X 또는 Y가 피하 주사되었다. 한 생쥐 군은 2주 동안 주2회, PBS가 피하 주사되었다. 치료 이전뿐만 아니라 최종 투약 후, 혈액이 각 생쥐로부터 채혈되고 혈장 시료가 분석되었다. 최종 투약 후 2일 시점에, 이들 생쥐는 안락사되고, 장기가 수확되고, 그리고 분석이 수행되었다.

[0508] 콜레스테롤과 트리글리세리드 수준

[0509] 혈장 트리글리세리드와 콜레스테롤은 Bligh와 Dyer의 방법 (Bligh, E.G. and Dyer, W.J. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917, 1959)에 의해 추출되고, 그리고 상업적으로 구입가능한 트리글리세리드 키트 (DCL 트리글리세리드 시약; Diagnostic Chemicals Ltd.)로 측정되었다.

[0510] 수컷과 암컷에서 트리글리세리드 분석의 결과는 표 1과 2에서 제공되고, 그리고 mg/dL로 표시된다. 관찰된 바와 같이, 모든 치료 군에서 트리글리세리드 수준은 대조 군에서 트리글리세리드 수준과 비교하여 유의하게 저하되었다.

[0511] 콜레스테롤의 상이한 분획물 (HDL, LDL과 VLDL)을 측정하기 위하여, 암컷 군으로부터 혈장 시료는 HPLC에 의해 분석되고 표 3에 제공된다. 관찰된 바와 같이, ApoCIII의 안티센스 저해는 VLDL을 유의하게 감소시키고, 또한 HDL의 수준을 유의하게 증가시켰다. HDL에서 증가 및 VLDL 수준에서 감소는 ApoCIII의 안티센스 저해의 유의한 심혈관 효과이고, 그리고 이상지질혈증성 질환을 앓거나, 또는 이의 위험에 처해 있는 동물에 유익할 수 있다.

**표 1**

[0512] 암컷 유전자도입 생쥐에서 트리글리세리드 수준 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료의 효과

	0 주	2 주	변화 %
PBS	2144	2533	+21
화합물 X	2385	677	-72
화합물 Y	2632	1644	-37
ISIS 304801	2390	542	-75

**표 2**

[0513] 수컷 유전자도입 생쥐에서 트리글리세리드 수준 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료의 효과

	0 주	2 주	변화 %
PBS	6191	7073	+14
ISIS 304801	6588	780	-88
화합물 X	5464	861	-84

**표 3**

[0514] 암컷 유전자도입 생쥐에서 혈장 콜레스테롤 분율 (총 콜레스테롤 %)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료의 효과

	VLDL (%)	LDL (%)	HDL (%)
PBS	77 ± 2.6	4 ± 1.0	19 ± 1.9
ISIS 304801	41 ± 0.6	7 ± 0.3	52 ± 0.5

화합물 X	46 ± 5.1	7 ± 1.0	48 ± 5.8
-------	----------	---------	----------

- [0515] 실시예 2: huApoCIII 유전자도입 생쥐에서 인간 ApoCIII의 용량-의존성 안티센스 저해
- [0516] ISIS 304801 및 화합물 X는 인간 ApoCIII 유전자도입 생쥐를 이용한 용량-의존성 연구에서 더욱 연구되었다.
- [0518] 치료
- [0519] 인간 ApoCIII 유전자도입 생쥐는 12-시간 명/암 주기에서 유지되고 Teklad lab 사료가 무제한으로 공급되었다. 동물은 실험의 시작에 앞서 연구 시설에서 적어도 7일 동안 순치되었다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASOs)는 PBS에서 제조되고 0.2 마이크론 필터를 통해 여과함으로써 멸균되었다. 올리고뉴클레오티드는 주사를 위해 0.9% PBS에서 용해되었다.
- [0520] 암컷 생쥐는 각각 3마리 생쥐로 구성되는 9개 치료 군으로 분할되었다. 이와 같은 8개 군은 1.5 mg/kg/주, 5 mg/kg/주, 15 mg/kg/주, 또는 50 mg/kg/주의 분량에서 2주 동안 ISIS 304801 또는 화합물 X가 피하 주사되었다. 한 생쥐 군은 2주 동안 PBS가 피하 주사되었다. 치료 이전뿐만 아니라 최종 투약 후, 혈액이 각 생쥐로부터 채혈되고 혈장 시료가 분석되었다. 최종 투약 후 2일 시점에, 이들 생쥐는 안락사되고, 장기가 수확되고, 그리고 분석이 수행되었다.
- [0522] 콜레스테롤과 트리글리세리드 수준
- [0523] 혈장 트리글리세리드와 콜레스테롤은 Bligh와 Dyer의 방법 (Bligh, E.G. and Dyer, W.J. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917, 1959)에 의해 추출되고, 그리고 상업적으로 구입가능한 트리글리세리드 키트 (DCL 트리글리세리드 시약; Diagnostic Chemicals Ltd.)로 측정되었다.
- [0524] 생쥐에서 콜레스테롤과 트리글리세리드 분석의 결과는 표 4와 5에 제공되고, 그리고 mg/dL로 표시된다. 관찰된 바와 같이, 더욱 높은 분량의 ISIS 304801로 치료된 생쥐에서 HDL 수준은 유의미하게 상승되었는데, 이것은 이들 올리고뉴클레오티드에 의한 ApoCIII의 저해의 유의한 효과를 지시하였다. 높은 분량 치료 군에서 LDL과 트리글리세리드 수준은 대조 군에서 LDL과 트리글리세리드 수준과 비교하여 저하되었다. HDL에서 증가 및 LDL과 TG 수준에서 감소는 ApoCIII의 안티센스 저해의 유의한 심혈관 효과이고, 그리고 이상지질혈증성 질환을 앓거나, 또는 이의 위험에 처해 있는 동물에 유익할 수 있다.
- [0525] <표 4>
- [0526] 유전자도입 생쥐에서 콜레스테롤과 트리글리세리드 수준 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료의 효과



	분량 (mg/kg/주)	총 콜레스테롤	트리글리세리드
PBS	-	124	1017
ISIS 304801	50.0	105	417
	15.0	116	593
	5.0	101	871
	1.5	125	1092
화합물 X	50.0	90	496
	15.0	127	1168
	5.0	166	1506
	1.5	168	1518

[0527]

[0529]

<표 5>

[0530]

유전자도입 생쥐에서 HDL와 LDL 콜레스테롤 수준 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료의 효과

	분량 (mg/kg/주)	HDL	LDL
PBS	-	40 ± 8	42 ± 8
ISIS 304801	50.0	62 ± 19	28 ± 7
	15.0	60 ± 9	34 ± 7
	5.0	44 ± 3	30 ± 13
	1.5	39 ± 2	40 ± 2
화합물 X	50.0	46 ± 10	25 ± 3
	15.0	37 ± 7	40 ± 2
	5.0	40 ± 10	47 ± 5
	1.5	45 ± 7	44 ± 6

[0531]

[0533]

실시예 3: CETP 유전자도입 LDL 수용체 비존재 생쥐에서 ApoCIII의 안티센스 저해의 효과

[0534]

화합물 Y는 고지혈 생쥐에서 혈장 지질과 지방단백질 대사에 대한 생쥐 ApoCIII 안티센스 저해제의 효과를 조사하기 위해 인간 CETP 유전자도입 LDLr<sup>-/-</sup> 생쥐 모델에서 더욱 연구되었다.

[0536]

치료

[0537] 인간 CETP 유전자도입 LDLr<sup>-/-</sup> 유전자도입 생쥐는 12-시간 명/암 주기에서 유지되고 서양식 사료 (지방으로부터 42% 칼로리, 0.2% 콜레스테롤)가 무제한으로 공급되었다. 동물은 실험의 시작에 앞서 연구 시설에서 10일 동안 이러한 사료에 순치되었다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASOs)는 PBS에서 제조되고 0.2 마이크론 필터를 통해 여과함으로써 멸균되었다. 올리고뉴클레오티드는 주사를 위해 0.9% PBS에서 용해되었다.

[0538] 8주령 수컷 생쥐는 3개 치료 군으로 분할되었다. 6마리 생쥐의 이와 같은 한 군은 12.5 mg/kg/주의 분량에서 4주 동안 화합물 Y가 피하 주사 되었다. 4마리 생쥐의 한 군은 12.5 mg/kg/주의 분량에서 4주 동안 대조 올리고뉴클레오티드 ISIS 141923 (서열 번호: 4)이 피하 주사 되었다. 5마리 생쥐의 한 군은 4주 동안 PBS가 피하 주사 되었다. 혈장 시료는 투약의 시작에 앞서, 그리고 치료의 2주와 4주 시점에 채취되었다.

[0540] 콜레스테롤과 트리글리세리드 수준

[0541] 혈장 트리글리세리드와 콜레스테롤은 Bligh와 Dyer의 방법 (Bligh, E.G. and Dyer, W.J. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917, 1959)에 의해 추출되고, 그리고 상업적으로 구입가능한 트리글리세리드 키트 (DCL 트리글리세리드 시약; Diagnostic Chemicals Ltd.)로 측정되었다.

[0542] 이들 생쥐에서 콜레스테롤과 트리글리세리드 분석의 결과는 표 6 내지 7에서 제공되고, 그리고 mg/dL로 표시된다. 치료 군에서 콜레스테롤과 트리글리세리드 수준은 대조 군에서 콜레스테롤과 트리글리세리드 수준과 비교하여 유의미하게 저하되었다. 콜레스테롤과 TG 수준에서 감소는 ApoCIII의 안티센스 저해의 유의한 심혈관 효과이고, 그리고 이상지질혈증성 질환을 앓거나, 또는 이의 위험에 처해 있는 동물에 유익할 수 있다.

**표 6**

[0543] 유전자도입 생쥐에서 콜레스테롤 수준 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료의 효과

주	PBS	화합물 Y
0	1851	1747
2	2035	878
4	2359	686

**표 7**

[0544] 유전자도입 생쥐에서 트리글리세리드 수준 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료의 효과

주	PBS	화합물 Y
0	297	451
2	420	150
4	496	86

[0545] CETP 단백질 수준과 활성의 저해

[0546] 혈장 CETP 단백질 수준은 상업적 ELISA 키트 (ALPCO, Cat# 47-CETHU-E01)를 이용하여 측정되었다. CETP 단백질 활성은 형광 검정 키트 (Roar Biomedical, Inc. Cat# RB-CETP)를 이용하여 측정되었다. 표 8에서 제공된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오티드로 치료는 CETP 단백질 발현과 활성을 감소시켰다. CETP (콜레스테릴 에스테르 전달 단백질)는 고밀도 지방단백질 (HDL) 및 apoB-내포 지방단백질, 예를 들면, 초저밀도 지방단백질 (VLDL), LDL과 카일로마이크론 사이에 트리글리세리드와 콜레스테롤 에스테르의 교환을 촉진한다. CETP에서 감소는 증가된 HDL 수준 및 감소된 LDL 수준과 연관된다 (Barter P.J. et al. Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol. 23: 160-167, 2003). 이런 이유로, CETP 단백질 수준과 활성의 저해는 ApoCIII의 안티센스 저해의 유의한 심혈관 효과이고, 그리고 이상지질혈증성 질환을 앓거나, 또는 이의 위험에 처해 있는 동물에 유익할 수 있다. 대조 올리고뉴클레오티드는 예상된 바와 같이, CETP에 대한 유의미한 효과를 갖지 않았다.

**표 8**

[0547] 유전자도입 생쥐에서 CETP 단백질의 저해 퍼센트

	수준	활성
화합물 Y	24	24
ISIS 141923	0	3

[0548] apoA1 단백질 수준과 파라옥사나아제-1 (PON1) 활성의 증가

[0549] 혈장 ApoA1 단백질 수준은 ELISA에 의해 측정되었다. PON1 단백질 활성은 EnzChek® Paroxanase 형광 검정 키트 (Invitrogen, Cat# E33702)를 이용하여 측정되었다. 표 9와 10에서 제공된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오티드로 치료는 ApoA1 단백질 발현을 증강시키고 PON1 단백질 활성을 증가시켰다. ApoA1과 PON1은 혈장 내에서 HDL의 주요 단백질 성분이다 (Aviram, M and Rosenblat, M. Curr. Opin. Lipidol. 16: 393-399, 2005). 이런 이유로, 이들 두 단백질 성분의 단백질 수준과 활성의 증가는 ApoCIII의 안티센스 저해의 유의한 심혈관 효과이고, 그리고 이상지질혈증성 질환을 앓거나, 또는 이의 위험에 처해 있는 동물에 유의할 수 있다. 대조 올리고뉴클레오티드는 예상된 바와 같이, 어느 단백질에도 효과를 갖지 않았다.

**표 9**

[0550] 유전자도입 생쥐에서 APOA1 단백질 수준의 증가 퍼센트

	mg/dL
PBS	65
화합물 Y	211
ISIS 141923	106

**표 10**

[0551] 유전자도입 생쥐에서 PON1 단백질 활성의 증가 퍼센트

분	PBS	화합물 Y	ISIS 141923
15	0.2	0.5	0.2
30	0.8	1.1	0.8
60	2.3	3.5	2.3
120	4.9	7.5	4.8
180	7.7	11.6	7.6

[0552] 실시예 4: CETP 유전자도입 LDL 수용체 비존재 생쥐에서 HDL 콜레스테롤 제거에 대한 ApoCIII의 안티센스 저해의 효과

[0553] 화합물 Y는 고지혈 생쥐에서 HDL 콜레스테롤 제거와 대사에 대한 ApoCIII 안티센스 저해제의 효과를 조사하기 위해 인간 CETP 유전자도입 LDLr<sup>-/-</sup> 생쥐 모델에서 더욱 연구되었다.

[0555] 치료

[0556] 인간 CETP 유전자도입 LDLr<sup>-/-</sup> 생쥐는 12-시간 명/암 주기에서 유지되고 서양식 사료 (지방으로부터 42% 칼로리, 0.2% 콜레스테롤)가 무제한으로 공급되었다. 동물은 실험의 시작에 앞서 연구 시설에서 10일 동안 이러한 사료에 순치되었다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASOs)는 PBS에서 제조되고 0.2 마이크론 필터를 통해 여과함으로써 멸균되었다. 올리고뉴클레오티드는 주사를 위해 0.9% PBS에서 용해되었다.

[0557] 8주령 수컷 생쥐는 3개 치료 군으로 분할되었다. 6마리 생쥐의 한 군은 15 mg/kg/주의 분량에서 6주 동안 화합물 Y가 피하 주사 되었다. 4마리 생쥐의 한 군은 15 mg/kg/주의 분량에서 6주 동안 대조 올리고뉴클레오티드 ISIS 141923이 피하 주사 되었다. 5마리 생쥐의 한 군은 6주 동안 PBS가 피하 주사 되었다.

[0559] 콜레스테롤과 트리글리세리드 수준

[0560] 혈장 트리글리세리드와 콜레스테롤은 Bligh와 Dyer의 방법 (Bligh, E.G. and Dyer, W.J. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917, 1959)에 의해 추출되고, 그리고 상업적으로 구입가능한 트리글리세리드 키트 (DCL 트리글리세리드 시약; Diagnostic Chemicals Ltd.)로 측정되었다.

[0561] 이들 생쥐에서 콜레스테롤과 트리글리세리드 분석의 결과는 표 11에 제공되고, 그리고 mg/dL로 표시된다. 치료군에서 콜레스테롤과 트리글리세리드 수준은 대조군에서 콜레스테롤과 트리글리세리드 수준과 비교하여 유의미하게 저하되었다. 콜레스테롤과 TG 수준에서 감소는 ApoCIII의 안티센스 저해의 유익한 심혈관 효과이고, 그리고 이상지질혈증성 질환을 앓거나, 또는 이의 위험에 처해 있는 동물에 유익할 수 있다.

**표 11**

[0562] 유전자도입 생쥐에서 콜레스테롤과 트리글리세리드 수준 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료의 효과

	총 콜레스테롤	트리글리세리드
PBS	2188	641
화합물 Y	1402	170

[0563] HDL 제거

[0564] 모드 군으로부터 생쥐는 꼬리 정맥을 통해,  $1 \times 10^6$  dpm의  $^3\text{H}$ -콜레스테릴 에테르 ( $^3\text{H}$ -Ceth)-표지된 HDL이 주사되었다. 방사성표지된 콜레스테릴 에테르는 콜레스테롤과 구조적으로 유사하지만, 이를 흡수하는 조직 내에 트랩될 것이다. 이런 이유로, 혈장으로부터 방사성표지된 콜레스테릴 에테르의 제거 및 간에서 이의 축적은 역 콜레스테롤 수송에 대한 효과를 평가하는데 이용될 수 있다. 혈장 시료는 주사후 5분, 1.5시간, 3시간, 6시간 및 24시간 시점에 수집되고, 그리고 방사성은 액체 섬광 계수기를 이용하여 계수되었다. 24시간 시점에, 이들 생쥐는 희생되고 간이 수확되었다. 간 시료는 2:1 클로로포름/메탄올에서 추출되고, 그리고 추출물은 질소 가스 하에 블로우 다운되고, 섬광 카테일에서 용해되고, 동일한 액체 섬광 계수기를 이용하여 계수되었다.

[0565] 표 12에서 제공된 바와 같이, 방사성라벨에서 감소는 혈장으로부터 HDL-Ceth의 제거와 연관된다. 이들 결과는 화합물 Y로 치료가 혈장으로부터 HDL 콜레스테롤 제거의 증강된 비율을 유발한다는 것을 지시한다. 이것은 표 13에서 제공된 바와 같이, 화합물 Y-치료된 생쥐의 간에서 방사성표지된 콜레스테릴 에테르의 더욱 큰 축적과 연관되었다. 이런 이유로, 상기 데이터는 이들 유전자도입 생쥐에서 ApoCIII의 저해가 역 콜레스테롤 수송을 향상시키고, 따라서 심혈관 질환을 앓는 환자, 예를 들면, 이상지질혈증성 질환을 앓는 환자에 대한 유익한 효과를 가질 것이라는 것을 지시한다.

**표 12**

[0566] 유전자도입 생쥐에서 혈장 HDL 콜레스테롤 (0시간에서 계수의 %)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료의 효과

	1.5시간	3시간	6시간	24시간
PBS	87	79	64	38
ISIS 141923	84	82	69	39
화합물 Y	78	71	57	25

**표 13**

[0567] 유전자도입 생쥐에서 방사성표지된 Ceth의 간 섭취에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료의 효과

	증가 % (dpm/g 간 조직)
ISIS 141923	0
화합물 Y	14

[0568] 실시예 5: C57BL/6 생쥐에서 인간 ApoCIII의 안티센스 저해의 효과의 ApoCIII 녹아웃 생쥐 모델과의 비교

[0569] ApoCIII 녹아웃 생쥐는 Jackson Laboratories (재고 번호 002057)로부터 구입되고 ApoCIII 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료된 C57BL/6 생쥐와 비교되었다. 설치류 ApoCIII 서열 (GenBank 수탁 번호 NM\_023114.3; 서열 번호: 5)을 표적으로 하는, 5-10-5 MOE 갭머 모티프를 갖는 화합물 Z가 본 연구에 이용되었다.

[0571] 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료

[0572] C57BL/6 생쥐는 12-시간 명/암 주기에서 유지되고 1주 동안 높은 지방 사료 (Harland Teklad lab 사료 #8813 7)가 공급되었다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASOs)는 PBS에서 제조되고 0.2 마이크론 필터를 통해 여과함으로써 멸균되었다. 올리고뉴클레오티드는 주사를 위해 0.9% PBS에서 용해되었다. 이들 생쥐는 총 혈장 콜레스테롤과 트리글리세리드 수준에 기초하여, 각각 6-8마리 생쥐의 군으로 무작위화되었다. C57BL/6 생쥐의 3개 군은 3.1 mg/kg, 6.3 mg/kg, 또는 12.5 mg/kg의 분량에서 6주의 기간 동안 주1회, 화합물 Z가 복강내 주사되었다. C57BL/6 생쥐의 한 군은 6주의 기간 동안 주1회, PBS가 복강내 주사되었다. PBS 군은 올리고뉴클레오티드-치료된 군 및 ApoCIII 녹아웃 생쥐가 비교되는 대조로서 역할하였다.

[0573] 최종 투약 후 2일 시점에, 이들 생쥐는 희생되고 장기가 수확되었다. 정상적인 무린 사료가 공급된 유사한 생쥐 군 역시 시험되었다.

[0575] 간 트리글리세리드

[0576] 간 트리글리세리드는 Olympus 임상 분석기 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)로 측정되었다. 데이터는 표 14에 제공되고, 그리고 ApoCIII 안티센스 올리고뉴클레오티드로 치료된 생쥐가 ApoCIII 녹아웃 생쥐와 상이한 표현형을 갖는다는 것을 예증한다. 높은 분량 ApoCIII 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료된 생쥐는 PBS 대조에서와 유사한 간 트리글리세리드 수준을 가졌다. ApoCIII 녹아웃 생쥐에서 간 트리글리세리드 수준은 ApoCIII 안티센스 올리고뉴클레오티드로 치료된 C57BL/6 생쥐 또는 PBS 대조에서보다 훨씬 높았다. 이런 이유로, ApoCIII의 안티센스 저해는 ApoCIII 녹아웃 생쥐 모델과 비교하여, 간 지방증의 위험을 저하시키는 유익한 효과를 가졌다.

[0577] <표 14>

[0578] 간 트리글리세리드 수준 (mg/g 간 조직)

	분량 (mg/kg)	고-지방 사료 공급
PBS	-	33
화합물 Z	3.1	44
	6.3	47
	12.5	33
ApoCIII KO	-	60

[0579]

[0581] 실시예 6: C57BL/6 생쥐에서 ApoCIII의 생체내 안티센스 저해의 효과

[0582] 혈장 지질 수준과 지방 제거에 대한 ApoCIII의 안티센스 저해의 효과가 평가되었다.



[0584] 치료

[0585] 수컷 C57/BL6 생쥐는 12-시간 명/암 주기에서 유지되고 서양식 사료 (Harland Tekland 88137)가 무제한으로 공급되었다. 동물은 실험의 시작에 앞서 연구 시설에서 적어도 7일 동안 순치되었다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASOs)는 PBS에서 제조되고 0.2 마이크론 필터를 통해 여과함으로써 멸균되었다. 올리고뉴클레오티드는 주사를 위해 0.9% PBS에서 용해되었다.

[0586] 각각 7-8마리 생쥐의 군은 12.5 mg/kg/주의 분량에서 6주 동안 화합물 Z가 복강내 주사되었다. 다른 생쥐 군은 12.5 mg/kg/주의 분량에서 6주 동안 대조 올리고뉴클레오티드 ISIS 141923이 복강내 주사되었다. 세 번째 생쥐 군은 6주 동안 PBS가 복강내 주사되었다. 최종 투약 후 2일 시점에, 이들 생쥐는 4시간 동안 금식되고, 희생되고, 그리고 혈장과 조직이 수집되었다.

[0588] ApoCIII mRNA의 저해

[0589] 전체 RNA는 간과 소장으로부터 추출되고, 그리고 ApoCIII mRNA는 ApoCIII 프라이머 프로브 세트를 이용한 RT-PCR에 의해 정량되고 시클로필린에 정규화되었다. 결과는 표 15에 제공되고 PBS 대조와 비교하여 ApoCIII mRNA의 저해 퍼센트로서 표시된다. ISIS 141923은 예상된 바와 같이, ApoCIII mRNA 수준에서 감소를 유발하지 않았다. 상기 데이터는 간과 소장에서, PBS 대조와 비교하여 화합물 Z에 의한 ApoCIII mRNA의 유의미한 저해를 예측하였다.

[0590] 장 ApoCIII 발현의 저해는 카일로마이크론 트리글리세리드의 부적절한 제거에 의해 유발된 이상지질혈증성 상태인 카일로마이크론혈증 (Chait et al., 1992, Adv Intern Med. 1992, 37:249-73)의 예방에서 중요할 수 있다. 심각한 형태의 카일로마이크론혈증은 치명적인 질환인 췌장염을 유발할 수 있다. 장 ApoCIII를 저해함으로써, 지방단백질 리파아제의 저해가 감소되고, 그리고 카일로마이크론 트리글리세리드 제거가 증강되어, 췌장염을 예방할 것이다. 이에 더하여, 장 ApoCIII의 저해는 식후 트리글리세리드의 제거를 증강시켜, 관상동맥 심장 질환에 대한 공지된 위험 인자인 식후 TG를 저하시킬 것이다.

표 15

[0591] PBS 대조에 비하여 ApoCIII mRNA의 저해 퍼센트

	저해 %
간	74
소장	13

[0592] 콜레스테롤과 트리글리세리드 수준

[0593] 혈장 콜레스테롤은 Bligh와 Dyer의 방법 (Bligh, E.G. and Dyer, W.J. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917, 1959)에 의해 추출되고 Olympus 임상 분석기 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)로 측정되었다. HDL과 비-HDL 콜레스테롤은 HPLC에 의해 개별적으로 측정되었다. 트리글리세리드 수준은 상업적으로 구입가능한 트리글리세리드 키트 (DCL 트리글리세리드 시약; Diagnostic Chemicals Ltd., Charlottetown, Canada)의 이용으로 측정되었다. 결과는 표 16에 제공되고 mg/dL로 표시된다. 화합물 Z로 치료는 PBS 대조와 비교하여, 총 콜레스테롤, 비-HDL 콜레스테롤과 혈장 트리글리세리드 수준의 유의미한 감소를 유발하였다. 총 콜레스테롤, 비-HDL 콜레스테롤과 TG 수준에서 감소는 ApoCIII의 안티센스 저해의 유의한 심혈관 효과이고, 그리고 이상지질혈증성 질환을 앓거나, 또는 이의 위험에 처해 있는 동물에 유익할 수 있다.

표 16

[0594] C56BL/6 생쥐에서 혈장 콜레스테롤과 트리글리세리드 수준 (mg/dL)

처리	분량 (mg/kg/주)	총 콜레스테롤	HDL 콜레스테롤	LDL 콜레스테롤	VLDL 콜레스테롤	트리글리세리드
PBS	-	93	70	20	2.9	84
ISIS 141923	12.5	97	78	19	2.1	82
화합물 Z	12.5	95	75	17	3.1	70

[0595] 지방 제거

[0596] 혈장 시료는 주사후 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 그리고 4시간 시점에 수집되고, 그리고 혈장 총 지질 함량이 Olympus 임상 분석기 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)로 측정되었다. 표 17에서 제공된 바와 같이, 혈장에서 지질 수준은 혈장으로부터 지질 제거의 역 인디케이터였다. 이들 결과는 화합물 Z로 치료가 혈장으로부터 지방 제거의 증강된 비율을 유발한다는 것을 지시한다.

[0597] 이런 이유로, 상기 데이터는 이들 유전자도입 생쥐에서 ApoCIII의 저해가 역 콜레스테롤 수송을 향상시키고, 그리고 심혈관 질환을 앓는 환자에 대한 유익한 효과를 가질 것이라는 것을 지시한다.

**표 17**

[0598] C57BL/6 생쥐에서 혈장 지질 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료의 효과

	0시간	0.5시간	1시간	2시간	3시간	4시간	곡선 아래 면적
PBS	86	80	64	122	118	90	23631
ISIS 141923	115	142	124	236	225	150	43677
화합물 Z	66	55	96	156	151	101	28371

[0599] 실시예 7: C57BL/6 생쥐에서 ApoCIII의 생체내 안티센스 저해의 효과

[0600] ApoCIII 발현 수준과 지방 제거에 대한 ApoCIII의 안티센스 저해의 효과가 평가되었다.

[0601] 치료

[0602] 수컷 C57/BL6 생쥐는 12-시간 명/암 주기에서 유지되고 서양식 사료 (Harland Tekland 88137)가 무제한으로 공급되었다. 동물은 실험의 시작에 앞서 연구 시설에서 적어도 7일 동안 순치되었다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASOs)는 PBS에서 제조되고 0.2 마이크론 필터를 통해 여과함으로써 멸균되었다. 올리고뉴클레오티드는 주사를 위해 0.9% PBS에서 용해되었다.

[0603] 각각 5마리 생쥐의 군은 12.5 mg/kg/주의 분량에서 6주 동안, ApoCIII 표적화 안티센스 올리고뉴클레오티드, 화합물 Z가 복강내 주사되었다. 다른 생쥐 군은 12.5 mg/kg/주의 분량에서 6주 동안 대조 올리고뉴클레오티드 ISIS 141923이 복강내 주사되었다. 최종 투약 후 2일 시점에, 이들 생쥐는 하룻밤 동안 금식되고, 그리고 200 µL의 올리브 오일의 볼러스가 경구 위관영양에 의해 투여되었다. 볼러스 이후에, 혈장 트리글리세리드 수준은 4시간 동안 규칙적인 간격에서 측정되었다. 이들 생쥐는 희생되고, 그리고 혈장과 조직이 수집되었다.

[0605] ApoCIII mRNA의 저해

[0606] 전체 RNA는 간과 소장으로부터 추출되고, 그리고 ApoCIII mRNA는 ApoCIII 프라이머 프로브 세트를 이용한 RT-PCR에 의해 정량되고 시클로필린에 정규화되었다. 결과는 표 18에 제공되고, 올리고뉴클레오티드 대조와 비교하여 ApoCIII mRNA의 저해 퍼센트로서 표시된다. 상기 데이터는 간과 소장에서, 올리고뉴클레오티드 대조와 비교하여 화합물 Z에 의한 ApoCIII mRNA의 유의미한 저해를 예증하였다.

[0607] 본원의 다른 곳에서 언급된 바와 같이, 장 ApoCIII 발현의 저해는 카일로마이크론 트리글리세리드의 부적절한 제거에 의해 유발된 이상지질혈증성 상태인 카일로마이크론혈증 (Chait et al., 1992, Adv Intern Med. 1992, 37:249-73)의 예방에서 중요할 수 있다. 심각한 형태의 카일로마이크론혈증은 치명적인 질환인 췌장염을 유발할 수 있다. 장 ApoCIII를 저해함으로써, 지방단백질 리파아제의 저해가 감소되고, 그리고 카일로마이크론 트리글리세리드 제거가 증강되어, 췌장염을 예방할 것이다. 이에 더하여, 장 ApoCIII의 저해는 식후 트리글리세리드의 제거를 증강시켜, 관상동맥 심장 질환에 대한 공지된 위험 인자인 식후 TG를 저하시킬 것이다.

[0608] <표 18>

[0609] 대조 올리고뉴클레오티드 치료된 C57/BL/6 생쥐에 비하여 ApoCIII mRNA의 저해 퍼센트

생쥐의 계통		저해 %
C57BL/6	간	74
	소장	60

[0610]

[0612] 지방 제거

[0613] 혈장 시료는 주사후 0분, 30분, 60분, 120분, 180분, 그리고 240분 시점에 수집되고, 그리고 혈장 트리글리세리드 농도는 Olympus 임상 분석기 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)로 측정되었다. 획득된 결과는 화합물 Z로 치료가 혈장으로부터 트리글리세리드 제거의 증강된 비율을 유발한다는 것을 지시한다.

[0614] 본 연구는 지방 볼러스 임상 연구와 비교될 수 있는데, 여기서 높은 apo-CIII 수준을 나타내는 환자는 증가된 식후 TG 농도를 보였다 (Petersen K.F. et al., N Engl J Med 2010; 362: 1082-1089).

[0615] <표 19>

[0616] C57BL/6 생쥐에서 식후 혈장 TG (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료의 효과

생쥐의 계통		0분	30분	60분	120분	180분	240분
C57BL/6	ISIS 141923	115	142	124	236	225	150
	화합물 Z	66	55	96	156	151	101

[0617]

[0619] 실시예 8: C57BL/6 생쥐에서 ApoCIII의 생체내 안티센스 저해의 효과

[0620] 지방 제거에 대한 ApoCIII의 안티센스 저해의 효과가 평가되었다.

[0621] 치료

[0622] 수컷 C57/BL6 생쥐는 12-시간 명/암 주기에서 유지되고 서양식 사료 (Harland Tekland 88137)가 무제한으로 공급되었다. 동물은 실험의 시작에 앞서 연구 시설에서 적어도 7일 동안 순치되었다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASOs)는 PBS에서 제조되고 0.2 마이크론 필터를 통해 여과함으로써 멸균되었다. 올리고뉴클레오티드는 주사를 위해 0.9% PBS에서 용해되었다.

[0623] 각각 6마리 생쥐의 군은 12.5 mg/kg/주, 6.3 mg/kg/주 또는 3.1 mg/kg/주의 분량에서 6주 동안 ApoCIII 표적화 안티센스 올리고뉴클레오티드, 화합물 Y 또는 화합물 Z가 복강내 주사되었다. 다른 생쥐 군은 12.5 mg/kg/주의 분량에서 6주 동안 대조 올리고뉴클레오티드 ISIS 141923이 복강내 주사되었다. 다른 생쥐 군은 6주 동안 PBS가 복강내 주사되었다. 최종 투약 후 2일 시점에, 이들 생쥐는 하룻밤 동안 금식되고, 그리고 200 µL의 올리브 오일의 볼러스가 경구 위관영양에 의해 투여되었다. 볼러스 이후에, 혈장 트리글리세리드 수준이 4시간 동안 규칙적인 간격에서 측정되었다.

[0624] 지방 제거

[0625] 혈장 시료는 주사후 0분, 30분, 60분, 120분, 180분, 그리고 240분 시점에 수집되고, 그리고 혈장 트리글리세리드 농도는 Olympus 임상 분석기 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)로 측정되었다. 획득된 결과는 화합물 Y와 화합물 Z로 치료가 혈장으로부터 지방 제거의 증강된 비율을 유발한다는 것을 지시한다. N.d.는 데이터 세트가 계산되지 않았음을 표시한다.

[0626] 본 연구는 지방 볼러스 임상 연구와 비교될 수 있는데, 여기서 높은 apo-CIII 수준을 나타내는 환자는 증가된 식후 TG 농도를 보였다 (Petersen K.F. et al., N Engl J Med 2010; 362: 1082-1089).

[0627] <표 20>

[0628] C57BL/6 생쥐에서 식후 혈장 TG (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료의 효과

	분량 (mg/kg/주)	0분	30분	60분	120분	180분	240분
PBS	-	79	104	118	126	113	116
ISIS 141923	12.5	75	100	116	150	138	133
화합물 Y	12.5	79	74	103	117	120	96
	6.3	64	70	81	94	120	112
	3.1	91	85	106	139	164	133
화합물 Z	12.5	73	65	84	118	94	76
	6.3	70	73	89	117	120	89
	3.1	86	98	143	137	152	128

[0629]

[0631] 실시예 9: 파트리글리세리드혈증의 원숭이 모델에서 인간 ApoCIII를 표적으로 하는 ISIS 안티센스 올리고뉴클레오티드의 효과

[0632] 높은 프리토오스 사료에 유지된 붉은털 원숭이는 ISIS 304801로 치료되었다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 효과와 내약성뿐만 아니라 약리학적 효과가 평가되었다.

[0633] 치료

[0634] 이들 원숭이는 2-4세이고 체중이 2 내지 5 kg이었다. 이들 원숭이는 각각 5마리의 무작위로 배정된 수컷 붉은털 원숭이의 6개 군에 배정되었다. 약 60g의 사료 (Certified Primate Diet #5048, PMI Nutrition International, Inc.)가 군 1-4에서 각 원숭이에 하루 2회 제공되었다. 적절한 프리토오스 보충물 (즉, 대략 15% Kool Aid® 혼합물)이 16주 동안, 안티센스 올리고뉴클레오티드 투약에 앞서 아침에 제공되었다. 충분한 트리글리세리드 수준 상승을 입증하기 위하여, 혈청 화학에 대한 혈액 시료가 투약 1-2주 전에 모든 동물로부터 수집되었다.

[0635] 이들 원숭이 군은 적절한 크기의 스테인리스강 투약 바늘과 주사기를 이용하여, 원숭이의 등에서 4 부위 중에서의 한 곳에 ISIS 올리고뉴클레오티드 또는 PBS가 피하 주사되었다; 각 부위는 시계 방향으로 투약마다 이용되었다. 일부 군은 부하 분량 (loading dose)으로 첫 주 동안 주 3회 (1일자, 3일자, 그리고 5일자) 투약되고, 그리고 차후에, 주 2-12 동안 5 mg/kg, 10 mg/kg, 또는 20 mg/kg의 ISIS 304801이 주 2회 투약되었다. 각각 5마리 붉은털 원숭이의 2개 대조 군은 첫 주 동안 주 3회 (1일자, 3일자, 그리고 5일자), 그리고 차후에, 주 2-12 동안 주 2회, PBS가 피하 주사되었다. 투약 차트는 표 21에 제공된다. 군 1-4의 원숭이는 86일자에 희생되었다.

[0636] 추가의 높은 지방 공격이 휘핑크림 밀크셰이크의 형태로, 군 5와 6의 원숭이에 투여되었다. 밀크셰이크는 체표면의 m<sup>2</sup>당 782 칼로리로 구성되도록 표준화되는데, 칼로리의 77.6%가 지방으로부터, 19.2%가 탄수화물로부터, 그리고 3.1%가 단백질로부터 발생되었다. 군 5와 6의 원숭이는 하룻밤 동안 금식되고, 그리고 밀크셰이크가 84일자에 위관을 통해, 1회 투여되었다. 혈액은 트리글리세리드 회유를 평가하기 위해, 지방 부하의 섭취 직전에 (시간 = 0시), 그리고 섭취 후 1, 2, 3, 4와 6시간 시점에 채취되었다. 이들 원숭이는 지방 공격 후 6시간 동안 휴식기를 갖고 만약 그렇지 않으면 공복 상태로 있었다. 이러한 군의 원숭이는 87일자에 희생되었다.

**표 21**

높은 프럭토오스 사료에서 붉은털 원숭이의 군

[0637]

군	검사 물품	주 분량 (mg/kg/주)	성별	동물의 수
독성학 군				
1	PBS	0	수컷	5
2	ISIS 304801	10	수컷	5
3	ISIS 304801	20	수컷	5
4	ISIS 304801	40	수컷	5
높은 지방 공격 검사 군				
5	PBS	0	수컷	5
6	ISIS 304801	40	수컷	5

[0638] 간 표적 감소

[0639] RNA 분석

[0640] 대략 150 mg의 간이 희생 시점에서, ApoCIII mRNA 분석을 위해 군 1-4로부터 수집되었다. 간은 2개의 조각으로 분할되고, 그리고 1% 베타-메르캅토에탄올을 갖는 RLT 완충액을 내포하는 2개 튜브에서 담겼다. 이들 조직은 균질화되고, 그리고 ApoCIII 발현이 RT-PCR 분석에 의해 정량되었다. 표 22에 도시된 바와 같이, ISIS 304801로 치료는 PBS 대조와 비교하여, ApoCIII mRNA의 유의미한 감소를 유발하였다.

**표 22**

[0641] PBS 대조에 비하여 붉은털 원숭이 간에서 ApoCIII mRNA의 저해 퍼센트

군	분량 (mg/kg/주)	저해 %
2	10	68
3	20	78
4	40	83

[0642] 단백질 분석

[0643] 대략 1.5 mL의 혈액이 군 1-4에서 모든 연구 동물로부터 수집되고, K<sub>2</sub>-EDTA를 내포하는 튜브 내에 배치되고, 이 후 혈장 분리를 위해 원심분리되었다. ApoCIII 단백질 수준은 상업적으로 구입가능한 혼탁도측정 검정 (Kamiya Biomedical Co., Seattle, WA)을 이용하여 임상 분석기에서 정량되었다. 표 23에서 도시된 바와 같이, ISIS 304801로 치료는 PBS 대조와 비교하여, ApoCIII 단백질 수준의 유의미한 감소를 유발하였다. ApoCIII 단백질 수준 감소의 동역학 역시 분석되고 표 24에 제공된다.

**표 23**

[0644] PBS 대조에 비하여 붉은털 원숭이에서 ApoCIII 혈장 단백질 수준의 저해 퍼센트

군	분량 (mg/kg/주)	저해 %
2	10	74
3	20	72
4	40	89

**표 24**



[0645] 상이한 일자에서, PBS 대조에 비하여 붉은털 원숭이에서 ApoCIII 혈장 단백질 수준 (mg/dL)

군	분량 (mg/kg/주)	-7일	16일	30일	86일
1	-	4.0	5.5	3.8	5.7
2	10	4.8	3.2	0.2	1.5
3	20	4.5	3.8	0.9	1.6
4	40	5.2	2.9	0.0	0.6

[0646] 지방단백질 입자 분석

[0647] 혈장 ApoCIII 억제제의 동력학을 확립하기 위해, 혈장 시료가 투약의 개시 7일전뿐만 아니라 투약 기간의 16일자, 30일자와 86일자에 수집되었다. 시료는 NMR 지방단백질 입자 분석 (Liposcience, Raleigh, NC)에 종속되었다. 치료 군 (군 2-4) 간에 ApoCIII 저하에서 유의미한 차이가 없었기 때문에, 상기 분석은 군 2 (10 mg/kg/주를 받는 치료 군)에만 적용된다. 데이터는 표 25와 26에 제공된다.

[0648] 기준선으로부터 통계학적으로 유의미한 평균 변화는 30일자에 상기 치료 군의 총 혈장 트리글리세리드 (TG)에서 및 VLDL과 카일로마이크론 TG에서 관찰되었다. 동시에, 대조 원숭이가 동일한 파라미터에서 평균 증가를 나타냈다. 이들 프럭토오스-공급 원숭이에서 ISIS 304801로 지속된 치료는 HDL 콜레스테롤 입자 수에서 대략 8  $\mu$  mol/L의 시간-의존성 증가를 유발하고 (표 27), 그리고 이들 연구에서 LDL 콜레스테롤의 상승이 발생하지 않았다 (표 28). PBS 대조 군에 비하여, 12주 치료 기간에 걸쳐서 LDL 콜레스테롤 입자 양에서 유의미한 변화가 없었다.

[0649] 희생의 시점에서, 간은 Bligh와 Dyer 추출 방법 (Bligh EG and Dyer WJ. Can J Biochem Physiol 1959; 37: 911-917)을 이용하여 추출되고, 그리고 Wako 비색 TG 검정을 이용하여 정량되었다. ApoCIII의 안티센스 저해는 PBS 대조 군에 비하여, 어떤 치료 군에서도 간 TG 축적을 증가시키지 않았다 (표 29).

**표 25**

[0650] 상이한 일자에서, 붉은털 원숭이에서 기준선 혈장 TG (mg/dL)로부터 변화

	분량 (mg/kg/주)	-7일	16일	30일	86일
PBS	-	0	18	23	27
ISIS 304801	10	0	-22	-32	-27

**표 26**

[0651] 상이한 일자에서, 붉은털 원숭이에서 기준선 VLDL과 카일로마이크론 TG (mg/dL)로부터 변화

	분량 (mg/kg/주)	-7일	16일	30일	86일
PBS	-	0	17	22	28
ISIS 304801	10	0	-22	-31	-26

**표 27**

[0652] 상이한 일자에서, 붉은털 원숭이에서 기준선 HDL 콜레스테롤 입자 ( $\mu$ mol/L)로부터 변화

	분량 (mg/kg/주)	-7일	16일	30일	86일
PBS	-	0.3	-5.6	-3.5	-8.1
ISIS 304801	10	0.0	0.5	9.7	8.0

**표 28**

[0653] 상이한 일자에서, 붉은털 원숭이에서 총 LDL 콜레스테롤 입자 (nmol/L)

	분량 (mg/kg/주)	-7일	16일	30일	86일
PBS	-	982	928	1005	1184
ISIS 304801	10	1007	938	781	910

**표 29**

[0654] HTG 붉은털 원숭이에서 12주후 PBS 대조와 ISIS 304801 코호트에서 간 트리글리세리드 함량

간 TG (ug/mg)	평균
PBS	9
10mg/kg/주	16
20mg/kg/주	18
40mg/kg/주	6

[0655] 식후 혈장 TG 제거

[0656] 10주에서, 10 mg/kg/주 군 (군 2)으로부터 원숭이에서 식후 혈장 TG 수준이 이들 원숭이에 식사를 제공한 후, 0 시간, 1시간, 2시간, 3시간, 그리고 4시간 시점에 측정되었다. 표 30과 31에 도시된 바와 같이, 식후 혈장 TG 제거는 10 mg/kg/주 군의 원숭이에서 곡선 아래 식후 TG 면적 (AUC)에서 38% 감소에 의해 증명된 바와 같이, 유의미하게 증가되었다.

[0657] 식후 TG 제거는 또한, 12주 시점에서, 군 5와 6 (지방 공격 후 PBS 대조 및 40 mg/kg/주 군)에서 평가되었다. 데이터는 표 32에 제공되고, 그리고 대조와 비교하여, 상기 군의 원숭이에서 곡선 아래 식후 TG 면적 (AUC)의 유의미한 증가를 역시 지시한다.

**표 30**

[0658] 붉은털 원숭이에서 혈장 TG (mg/dL)

	분량 (mg/kg/주)	0시간	1시간	2시간	3시간	4시간
PBS	-	167	169	146	147	131
ISIS 304801	10	105	87	95	102	80

**표 31**

[0659] 붉은털 원숭이에서 곡선 아래 식후 TG 면적 (AUC)

	AUC
PBS	610
ISIS 304801	376

**표 32**

[0660] 지방 공격 후, 붉은털 원숭이에서 곡선 아래 식후 TG 면적 (AUC)

	AUC
PBS	613
ISIS 304801	405

- [0661] 10 mg/kg/주 군에서 원숭이는 10주 시점에서, PBS 군보다 낮은 공복 혈장 TG 수준을 가졌다. 비-인간 영장류에서 결과는 ApoCIII의 안티센스 저해가 이상지질혈증성 개체에서 혈장 TG와 VLDL을 감소시키기 위한 매력적인 치료 전략을 대표하고, 그리고 치료가 LDL-C에 대한 유해한 효과 없이, HDL-C 수준을 동시에 증가시킬 수 있다는 것을 예증한다.
- [0662] **실시예 10: ISIS 304801 임상 I기 시험**
- [0663] 이중-맹검, 단일과 복수 상승적 분량 (SAD와 MAD) 1기 연구에서, 18세 내지 55세의 건강한 개체가 ISIS 304801 또는 위약 (통상의 식염수)을 복용하도록 3:1 비율로 무작위 배정되었다.
- [0664] SAD 개체는 연구 센터에서 50, 100, 200, 또는 400 mg (n=4/코호트)의 단일 피하 (SC) 주사가 투여되었다. 이들 개체는 혈액 시료추출 및 임상적 평가를 위해, 4일자와 8일자 ( $\pm 24$  시간 윈도우)에 외래환자 방문의 목적으로 연구 센터에 복귀하였다. 이들 개체는 그들이 전화 인터뷰에 의해 평가되는 15일자까지 추적되었다.
- [0665] MAD 개체는 연구 센터에서 50, 100, 200, 그리고 400 mg의 복수 SC 주사가 투여되었다. 이들 개체는 첫 주에 3회 투약 (1일자, 3일자와 5일자)의 부하 섭생, 그 이후에 3주 동안 주 1회 투약 (8일자, 15일자와 22일자)을 받았다. 이들 개체는 연구 약물의 최종 투약 후 8주 동안 추적되었다. 이들 개체는 안정성과 임상적 실험실 평가를 위해, 그리고 PK 분석을 위한 혈액 시료추출을 위해, 29일자, 36일자와 50일자 ( $\pm 24$  시간 윈도우)에 외래환자 방문의 목적으로 연구 센터에 복귀하였다. 이들 개체는 그들이 전화 인터뷰에 의해 평가되는 78일자 ( $\pm 7$ 일 윈도우)까지 추적되었다.
- [0666] 이들 MAD 개체는 -1일자 내지 6일자, 그리고 22일자 내지 23일자에 연구 센터에 머물렀는데, 여기서 이들은 표 33에 도시된 규정식을 제공받았다. 이들 개체는 5일자, 8일자, 15일자, 22일자, 23일자, 29일자, 36일자, 43일자와 50일자 ( $\pm 24$  시간 윈도우)에서 평가를 위한 혈액 시료를 채취하기에 앞서, 적어도 12시간 동안 금식되었다.

표 33

연구 중심 환자식

연구 일자	인분	식품 설명
-1 일 [입원]	525 ml.	• 쇠고기 & 혼합 야채, 브로콜리, 콩나물, 그린 & 레드 케피카 들어간 태국식 국수
	375 ml. 300 ml.	• 신선한 과일 샐러드 • 오렌지 주스
1 일	1	• 피자 케이크
	250 ml.	• 2% 우유
	1	• 비터 크로와상
	2	• 스크램블된 에그
	250 ml.	• 시럽에 담긴 조각 복숭아
	300 ml.	• 오렌지 주스
	75 g. 1.5 컵 1-pkg. 조금 온 사이드	• Kaiser 빵을 위해 구운 닭 가슴살 [샌드위치] • 양송이 크림 수프 • 크래키 • 샐러드 • 콩디말
	355 ml.	• 진지 예일
	75 g. 250 ml. 375 ml. 온 사이드 온 사이드 300 ml.	• 구운 쇠고기 • 으갠 감자 • 혼합 야채 • 그레이비 • 마늘 빵 • 사과 주스
	1	• 당근 머핀
250 ml.	• 2% 우유	
2 일	3 온 사이드	• 팬케이크 • 시럽
	1	• 마나나
	300 ml.	• 오렌지 주스
	9" 온 사이드 컵 1-pkg. 355 ml.	• 메스키트 치킨, 치킨, 베이컨, 체다치즈, 토마토, 붉은 양파, & 호밀빵 위에 상추 • 란치 드레싱 • 브로콜리 & 치즈 수프 • 크래키 • 진지 예일
	375 g. 150 g. 1-pkg. 300 ml.	• 쇠고기 볶음 & 혼합 야채, 브로콜리, 당근, 셀러리, & 알파 • 흰 밀 • 건포도 • 사과 주스
	250 ml. 300 ml.	• 신선한 과일 샐러드 • 딸기향 주스
3 일	Med. 300 ml.	• 구운 호밀 베이글 위에 치즈 & 야채 오믈렛 • 포도 주스

[0667]

	9"	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 치즈 빵 위에 에버딘 앵거스 스테이크, 모차렐라, 체다치즈, 볶은 양파 &amp; 버섯</li> <li>• 허니 버번 머스타드, 제스티 그릴 소스</li> <li>• 국수를 넣은 닭고기 수프</li> <li>• 크래커</li> <li>• 진저 예일</li> </ul>
	400 g. 1.5 컵 1-pkg. 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100g 닭 가슴살, 야채, 조리된 혼합, 풀러풀라워, 달걀, 레드 &amp; 그린 페퍼, 그린 민스</li> <li>• 풍미된 쌀</li> <li>• 포도</li> <li>• 사과 주스</li> </ul>
	1 250 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 건포도 오트밀 쿠키</li> <li>• 2% 우유</li> </ul>
4 일	1 250 ml. 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 치즈 크로와상</li> <li>• 시럽에 담긴 조리 볶은아</li> <li>• 오렌지 주스</li> </ul>
	2 온 사이드 컵 1-pkg. 355 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 지린, 베이컨, 체다치즈, 토마토 &amp; 배추상추가 들어간 플랫폼레드 제비</li> <li>• 버터우유 랜치 드레싱</li> <li>• 브로콜리 &amp; 치즈 수프</li> <li>• 크래커</li> <li>• 진저 예일</li> </ul>
	425 g. 325 g. 1 250 ml. 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 부드러운 곱창 선 쇠고기, 달걀, 양파, &amp; 감자가 들어간 쇠고기 스프,</li> <li>• 배추상추, 파스타, &amp; 드레싱이 들어간 태국식 샐러드</li> <li>• 이탈리아식 빵</li> <li>• 시럽에 담긴 조리 볶은아</li> <li>• 사과 주스</li> </ul>
	1 250 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 블루베리 머핀</li> <li>• 2% 우유</li> </ul>
5 일	375 ml. Med. 250 ml. 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 연플레이크</li> <li>• 바나나</li> <li>• 2% 우유</li> <li>• 사과 주스</li> </ul>
	6 조각 250 ml. 250 ml. 355 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 닭 날개</li> <li>• 볶음밥</li> <li>• 혼합 조리된 야채, 그린 민스, 달걀, &amp; 햇빛에 말린 토마토소스가 들어간 레드 페퍼</li> <li>• 7-업</li> </ul>
	6" 피자 조금 355 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 펠리 스타일 페퍼로니 &amp; 100% 피자 모차렐라의 페퍼로니 리브스 피자 칼베기</li> <li>• 샐러드</li> <li>• 진저 예일</li> </ul>
	1 250 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 아몬드 크로와상</li> <li>• 2% 우유</li> </ul>
6 일 [퇴원]	45 g. 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 크림 치즈가 말린 베이글</li> <li>• 오렌지 주스</li> </ul>
22 일	450 g. 2 조각 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 블랙퍼스트 오믈렛 시금치 &amp; 캐타 치즈</li> <li>• 노릇노릇하게 구운 토스트</li> <li>• 오렌지 주스</li> </ul>

[0668]

	9"	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 치즈 빵 위에 제스티 그릴 스테이크 프라이드 스테이트, 모차렐라, 체다치즈, 버섯, 볶은 양파</li> <li>• 허니 버번 머스타드, 제스티 그릴 소스</li> <li>• 브로콜리 &amp; 치즈 수프</li> <li>• 크래커</li> <li>• 진저 예일</li> </ul>
	400 g. 1.5 컵 조금 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 야채가 들어간 구운 허브 닭 가슴살</li> <li>• 풍미된 쌀</li> <li>• 신선한 과일 샐러드</li> <li>• 사과 주스</li> </ul>
	1 250 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 건포도 오트밀 쿠키</li> <li>• 2% 우유</li> </ul>
23 일 [퇴원]	45 g. 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 버터 크로와상</li> <li>• 오렌지 주스</li> </ul>

[0669]

[0671]

결과

[0672]

전반적으로, ISIS 304801은 우수한 안전성 프로필을 나타내고, 그리고 트랜스아미나아제 효소의 임상적으로 의미 있는 상승 및 유의미한 부작용 없이 모든 개체에서 충분히 내약성이었다.



[0673] MAD 코호트의 기준선 특징은 표 34에 도시된다. MAD 개체는 표 35-36에서 기준선으로부터 변화 백분율로서 표시된, 총 apoC-III과 TG 수준에서 용량-의존성 지속적 감소를 보였다.

**표 34**

[0674] MAD 코호트의 기준선 특징

	위약 (n=4)	50 mg (n=3)	100 mg (n=3)	200 mg (n=3)	400 mg (n=3)
성별 (M:F)	3:1	3:0	3:0	3:0	3:0
연령 (년)	43.0	40.0	40.0	43.0	40.0
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.7	24.0	27.3	28.0	27.5
지질 & 지방단백질, mg/dL					
Apo CIII	6.3	10.4	9.5	11.6	8.7
트리글리세리드	97	124	94	195	89
총 콜레스테롤	195	157	196	185	181
HDL-C	45	42	46	43	62
비-HDL-C	136	118	150	149	126
LDL-C	112	93	131	95	102

[0675] 프로토콜 이전 개체군. 제공된 값은 중간값이다.

**표 35**

[0677] 혈청 ApoCIII에서 용량-의존성 지속성 감소: 기준선으로부터 ApoCIII에서 중간 변화 %

연구 일자	위약	50 mg	100 mg	200 mg	400 mg
5일	38.6	33.4	-4.5	-10.8	-42.6
8일	31.9	17.8	-5.2	-36.0	-78.6
15일	0.0	-22.1	-24.0	-54.1	-79.8
22일	11.7	-20.9	-21.0	-61.7	-86.4
23일	15.8	-15.6	-11.9	-58.7	-79.0
29일	-11.0	-19.7	-17.3	-70.5	-77.5
36일	1.9	-26.6	-32.1	-57.3	-69.5
50일	16.4	21.9	-3.9	-63.0	-78.6

**표 36**

[0678] 트리글리세리드에서 용량-의존성 감소: 기준선으로부터 트리글리세리드에서 중간 변화 %

연구 일자	위약	50 mg	100 mg	200 mg	400 mg
5일	78.5	50.0	15.9	-15.6	-7.7
8일	34.9	17.7	-24.5	-31.8	-38.5
15일	21.2	-27.4	-12.8	-50.8	-46.2
22일	12.2	-18.3	-9.8	-25.1	-53.8
23일	51.8	-4.0	1.1	-41.0	-44.2
29일	28.5	-19.5	-25.0	-43.1	-43.8
36일	15.4	-33.1	-34.8	-17.9	-36.5
50일	33.1	48.8	-23.9	-48.2	-48.1

[0679] 50, 100, 200과 400 mg 다중-분량 군에서 기준선 값으로부터 중간 변화 퍼센트는 최종 투약 후 1주 (29일) 시점에 각각, 총 apoC-III의 20, 17, 71, 그리고 78% 감소 및 TG의 20, 25, 43, 그리고 44% 감소를 보였다. 감소는 더욱 높은 분량 군에서 최종 투약 후 적어도 4주 동안 지속되었다. TG 수준은 위약 군의 경우에 5일자와 23일자에 스파이킹하고, 연구 센터에서 개체의 하룻밤 채류와 일치하였다. 연구 센터에 의해 제공된 규정식은 연구 센터에서 하룻밤 동안 채류하는 개체에서 TG 수준의 급상승을 유발한 것으로 생각된다. ISIS 304801은 TG 스파

이크를 용량-의존성 방식으로 감소시켰다. 어떤 의미로는, 본원에서 도시된 결과는 TG에 대한 ISIS 304801에 의한 식후 효과 (비록 TG 수준이 12시간 금식 후 평가되긴 하지만)를 지시하는데, 그 이유는 TG의 식이 유도된 급상승이 ISIS 304801에 의해 용량-의존성 방식으로 감소되었기 때문이다.

[0680] LDL-C 값은 변하지 않고 (데이터 제시되지 않음), 반면 HDL-C 값은 표 37에서 도시된 바와 같이 치료-의존성 방식으로 증가하는 경향이 있었다.

**표 37**

HDL-C에 대한 유해한 효과 없음

[0681]

연구 일자	위약	50 mg	100 mg	200 mg	400 mg
5일	-5.9	7.7	-3.1	-3.2	-16.1
8일	2.1	2.4	0.0	-11.1	-2.9
15일	-2.8	4.8	10.9	4.7	-9.7
22일	-0.6	4.8	8.7	11.6	-2.0
23일	0.7	7.1	12.5	19.4	-1.6
29일	2.1	19.0	0.0	13.9	8.0
36일	0.0	23.8	8.8	13.9	1.6
50일	-4.8	16.7	5.9	25.0	14.5

[0682] **실시예 11: ISIS 304801 임상 II기 시험**

[0683] VLDL 수준과 연관된 공복 apoC-III에 대한 ISIS 304801 대 위약의 용량/반응 약역학적 효과를 평가하기 위한 무작위, 이중-맹검, 위약-대조, 용량 반응 연구가 계획된다. 평가를 위한 추가의 종점에는 하기가 포함된다: 공복 총 apoC-III, TG, apoC-II (전체 및 VLDL과 연관된), 아포지방단백질 B-100 (apoB-100), 아포지방단백질 A-1 (apoA-1), 아포지방단백질 A-2 (apoA-2), 아포지방단백질 E (apoE), 총 콜레스테롤 (TC), 저밀도 지방단백질-콜레스테롤 (LDL-C), LDL-TG, VLDL-C, VLDL-TG, 비-고밀도 지방단백질-콜레스테롤 (비-HDL-C), 비-HDL-TG, HDL-C, HDL-TG, 카일로마이론-C (CM-C), CM-TG, 유리 지방산 (FFA), 그리고 글리세롤 수준에 대한 ISIS 304801 대 위약의 약역학적 효과; 연구 중인 환자의 부분집합에서 식후 지질, 아포지방단백질과 지방단백질 특징과 동역학, 그리고 글루코코스 수준, 그리고 환자의 다른 부분집합 (이들은 식후 평가를 받는 환자와 동일한 환자가 아닐 것이다)에서 평가된 더욱 광범위한 PK; 그리고, ISIS 304801의 안전성, 내약성과 PK.

[0684] 각 환자의 경우에, 참여 기간은 총 32주의 연구 참여를 위해, ≤5-주 스크리닝 기간 (이것은 4-주 엄격한 규정식 통제 런-인 자격 기간을 포함한다), 1-주 연구 자격/기준선 평가 기간, 13-주 치료 기간, 그리고 13주의 치료 후 평가 기간으로 구성된다. 동반하는 약물과 부작용 (AEs)은 연구의 모든 기간 내내 기록될 것이다.

[0685] 환자는 적어도 18세이고, 그리고 스크리닝에서 공복 TG ≥500mg/dL 및 4-주의 엄격한 규정식 통제 런-인 후 공복 TG ≥300mg/dL과 ≤2000mg/dL을 가질 것이다.

[0686] 72명의 환자가 본 연구에 계획된다. 코호트당 18명의 ISIS 304801 (활성물)과 6명의 위약 환자로, 분량 코호트 (100, 200, 300 mg)마다 24명의 환자가 계획될 것이다. 유자격 환자는 비-광범위 PK/식후 군 (군 1) 또는 광범위 PK/식후 군 (군 2)으로 동등하게 (1:1) 등록될 것이다.

[0687] 군 2에서 환자는 광범위 PK 군 (군 2a) 또는 식후 평가 군 (군 2b)으로 동등하게 (1:1) 무작위화될 것이다. 군 2a 환자는 활성물 또는 위약을 복용하도록 3개 분량 코호트 (100, 200, 300 mg) 중에서 하나에 동등하게 (1:1:1), 그리고 각 분량 코호트 내에서, 5:1로 무작위화될 것이다. 군 2b 환자는 활성물 또는 위약을 복용하도록 2개 분량 코호트 (200, 300 mg) 중에서 하나에 동등하게 (1:1), 그리고 각 분량 코호트 내에서, 2:1로 무작위화될 것이다. 군 1 환자는 분량 코호트 (100, 200, 300 mg)에 1:1:1 및 치료 (활성물, 위약)에 3:1의 전체 연구 무작위화를 달성하는 방식으로, 분량 코호트와 치료에 무작위화될 것이다.

[0688] 환자는 연구 참여의 지속 기간 동안 엄격하게 통제된 규정식 (스크리닝 절차가 수행된 후)에 놓일 것이다. 통제된 규정식에서 28일 후, 환자는 기준선 측정을 받고, 그리고 연구의 치료 단계에 등록의 자격여부에 대해 심사될 것이다. 규정식 런-인 이후에 등록 기준을 충족하는 환자는 비-광범위 PK/식후 군 (군 1) 또는 광범위 PK/식후 군 (군 2)으로 동등하게 (1:1) 등록되고 그들의 군 배정 내에서 무작위화될 것이다.

- [0690] 연구 약물과 치료
- [0691] 2-mL 마개달린 유리 바이알에 내포된 ISIS 304801 (200 mg/mL, 1.0 mL)의 용액이 제공될 것이다.
- [0692] 본 연구를 위한 위약은 0.9% 무균 식염수일 것이다. ISIS 304801 용액과 위약은 자각한 약사 (또는 유자격 대리인)에 의해 제조될 것이다. 바이알은 단지 1회용이다. 약물의 정체를 알지 못하는 숙련된 전문가가 연구 약물을 투여할 것이다. 연구 약물은 각 투약 일에, 복부, 넓적다리, 또는 상완의 외부 부위에 SC 주사로서 투여될 것이다. 100과 200 mg의 분량은 단일 SC 주사로서 투여될 것이다. 300 mg의 분량은 2개의 동등 부피 불연속 SC 주사로서 투여될 것이다.
- [0693] 환자는 13주 동안 주 1회 (1일자, 8일자, 15일자, 22일자, 29일자, 36일자, 43일자, 50일자, 57일자, 64일자, 71일자, 78일자, 그리고 85일자), SC 주사에 의해 투여되는 연구 약물의 13회 분량을 받게 될 것이다.
- [0694] 환자는 1일자 ± 0일, 그리고 ± 1일 이내에 8일자, 15일자, 22일자, 29일자, 36일자, 43일자, 50일자, 57일자, 64일자, 71일자, 78일자와 85일자에 치료 방문을 완결할 것이다. 광범위 PK 군에서 환자 역시 24시간 채혈을 위해, 각각 1일자와 85일자에 관하여 2일자와 86일자 ± 0일에 병원을 방문할 것이다. 환자는 예정된 방문 일자의 ± 1일 이내에 92일자와 99일자, ± 3일 이내에 127일자, 그리고 ± 5일 이내에 176일자에 추가 방문을 완결할 것이다. 식후 평가 군에서 환자 역시 24시간 채혈을 위해, ± 2일 이내에 103일자, 그리고 103일자 방문 익일에 병원을 방문할 것이다.
- [0695] 약역학적 측정을 위한 채혈을 포함하는 각 방문 (8일자, 15일자, 29일자, 43일자, 57일자, 71일자, 그리고 85일자)에 앞서, 환자는 그들의 방문 전날 밤에 저녁 식사를 위한 표준화된 미리 조리된 식사가 제공되고 (환자마다 및 시점마다, 지방 섭취의 동등한 질체를 담보하기 위해), 그 이후 공복 상태로 있게 될 것이다. 알코올 소비는 그들의 병원 방문에 앞서 48시간 동안 허용되지 않을 것이다.
- [0696] 혈액은 8일자, 15일자, 29일자, 43일자, 57일자, 71일자, 그리고 85일자 (연구 약물 투여에 앞서)에 VLDL apoC-III 및 기타 약역학적 마커의 측정을 위해 수집될 것이다.
- [0697] 식후 평가 군에서 환자는 식후 평가에 앞서 2일 동안, 표준화된 미리 조리된 식사 (점심과 저녁 식사 (제공됨), 그리고 아침 식사와 스낵에 대한 지시)를 소비할 것이다. 각 식후 평가 일에, 채혈 이후에, 환자는 표준화된 유동식을 소비할 것이고, 이것은 안정된 방사성동위원소 트레이서에서 일일 칼로리 필요량의 약 1/3을 제공하고, 그 이후에 일련의 혈액 시료추출이 수행될 것이다. 환자는 유동식을 소비한 후 9시간 시점에 표준화된 미리 조리된 식사를 받게 될 것이고, 그 이후 익일에 24시간 채혈 때까지 금식할 것이다.
- [0698] 저점 시료 수집에 더하여, 광범위 PK 평가 군에서 환자는 연구 약물의 최초 투약 (1-2일자)과 최종 투약 (85-86일자) 후 24시간 동안 일련의 혈액 시료추출을 받을 것이다.
- [0700] 치료후 평가 기간
- [0701] 환자는 연구 일자 176까지 추적될 것이다. 이러한 기간 동안, 환자는 안전성과 임상적 실험실 평가 (채혈), 규정식 카운슬링과 모니터링, 동반하는 약제 유용성 기록, 그리고 AE 사건 수집을 위해, 연구 일자 92, 99, 127, 그리고 176 (식후 평가 군에서 환자의 경우에 연구 일자 103)에 외래환자 병원 방문을 위해 연구 센터로 복귀할 것이다.
- [0702] PK와 PD 분석을 위한 혈액 시료는 치료후 평가 기간 내내 주기적으로 수집될 것이다. 혈청 화학, 검뇨, 응고, 보체, 혈액학, 면역 기능, 갑상선 기능, 그리고 완전 지질 패널의 실험실 측정이 연구 내내 다양한 시점에서 수행될 것이다.
- [0703] 식후 평가는 하기에 기술된 바와 같은 환자의 부분집합에서 수행될 것이다.
- [0705] 식후 식사, 시료추출 일정, 그리고 평가
- [0706] 지방단백질 대사에 대한 식후 평가는 유동식 내로 초음파처리된 표지된 트레이서, 3H-팔미트산염 (300 μCi, Perkin Elmer Inc., Woodbridge, ON, Canada)으로 보충된 방사성표지된 식사를 이용하여 수행될 것이다. 팔미트산염은 임의의 음식물의 공통 성분인 지방산이다. 3H-팔미트산염 트레이서는 X-선에 상응하는 약한 방사선을 방출한다. 식이 팔미트산염은 장의 장세포에서 형성될 때 카일로마이크론 내로 함입되기 때문에, 순환으로부터

새로-형성된 카일로마이크론의 출현과 제거를 모니터링하는 것을 가능하게 한다. 카일로마이크론 출현과 제거의 식후 동역학을 연구하기 위해 적용되는 방법은 널리 확립되어 있다 (Mittendorfer et al. 2003, Diabetes, 52: 1641-1648; Bickerton et al. 2007; Normand-Lauziere et al. 2010, PLoS. One, 5: e10956).

- [0707] 소량 (300  $\mu$ Ci)의 방사성표지된 지방산 (3H-팔미트산염)을 내포하는 유동식 (밀크셰이크와 유사)이 제공될 것이다. 유동식은 일일 칼로리 필요량의 약 1/3을 제공할 것이다. 식사 섭취 후 1시간에서부터 9시간 이전까지, [U-13C]-K 팔미트산염 (100 ml 25% 인간 혈청 알부민에서 0.01  $\mu$ mol/kg/분; Cambridge Isotopes Laboratories Inc., Andover, MA)의 일정한 주입, 그리고 [1,1,2,3,3-2H]-글리세롤 (Cambridge Isotopes Laboratories Inc.)의 기록된 (1.6  $\mu$ mol/kg) 연속 (0.05  $\mu$ mol/kg/분) 주입은 기존 문헌 (Normand-Lauziere et al. 2010, PLoS. One, 5: e10956)에서 기술된 바와 같이 투여될 것이다. 혈장 팔미트산염과 글리세롤 출현율은 각각, 90ml/kg과 230ml/kg의 분포 용적 (volume of distribution)을 가정하는 Steele의 비-정상 상태 방정식을 이용하여 계산될 것이다 (Gastaldelli et al. 1999, J Appl. Physiol, 87: 1813-1822).
- [0708] 혈액 시료는 하기 표에서 언급된 바와 같은 치료 단계 전후에 여러 일자에서 방사성표지된 식사의 섭취 전후에 여러 간격에서 채취될 것이다. 표준화된 식사가 9시간 채혈 후 참여자에게 제공될 것이다. 혈액은 시험관내 트리아실글리세롤 지방분해를 예방하기 위한 Na2 EDTA와 Orlistat (30  $\mu$ g/ml, Roche, Mississauga, Canada)를 내포하는 튜브에서 수집되고, 그리고 별개의 시료는 혈장 글루코오스 결정을 위해 NaF 튜브에서 수집될 것이다.
- [0709] 하기가 각 시점에서 측정될 것이다:
- [0710] · 3H-트레이서에 대한 혈장과 CM 분율 수준
  - [0711] · 혈장 [U-13C]-K 팔미트산염과 [1,1,2,3,3-2H]-글리세롤 출현율
  - [0712] · TG, TC, 그리고 apoB에 대한 혈장과 CM 분율 수준
  - [0713] · apo CIII, apo CII, 그리고 apo E에 대한 혈장과 VLDL 분율 수준
  - [0714] · 글루코오스에 대한 혈장 수준
- [0716] 혈장 시료는 또한, 약물 결합 단백질의 프로파일링, 생물분석법 검증 목적, 안정성과 대사산물 평가, 또는 ISIS 304801과 혈장 성분의 다른 작용의 평가에 이용될 수도 있다.

## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.

Adam Mullick

Rosanne M. Crooke

Mark J. Graham

Kenneth W. Dobie

Thomas A. Bell III

Richard Lee

<120> MODULATION OF APOLIPOPROTEIN CIII

(APOCIII) EXPRESSION

<130> BIOL0130W0

<150> 61/479,817

<151> 2011-04-27

<150> 61/595,009

<151> 2012-02-03

<160> 5

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 533

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

tgctcagttc atccctagag gcagctgctc caggaacaga ggtgccatgc agccccgggt 60

actccttggt gttgccctcc tggcgtcctt ggctctgcc cgagcttcag aggccgagga 120

tgctccctt ctgagctca tgcagggtta catgaagcac gccaccaaga ccgccaagga 180

tgcactgagc agcgtgcagg agtcccaggt ggcccagcag gccaggggct gggtagaccg 240

tggcttcagt tccctgaaag actactggag caccgttaag gacaagtctc ctgagttctg 300

ggatttggac cctgaggcca gaccaacttc agccgtggct gcctgagacc tcaatacccc 360

aagtccacct gcctatccat cctgcgagct ccttgggtcc tgcaatctcc agggctgccc 420

ctgtaggttg cttaaaaggg acagtattct cagtgtcttc ctacccacc tcatgctctg 480

ccccctcca ggcattgctg cctcccaata aagctggaca agaagctgct atg 533

<210> 2

<211> 3964

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ctactccagg ctgtgttcag ggcttggggc tggtagggg aggggcctga aattccagtg 60

tgaaaggctg agatgggccc gaggccctg gcctatgtcc aagccattc cctctcacc 120

agcctctccc tggggagcca gtcagctagg aaggaatgag ggctccccag gcccacccc 180

agttctctgag ctcatctggg ctgcagggtt ggccggacag cagcgtggac tcagtctct 240

agggatttcc caactctccc gccccttgc tgcatttga caccctgcct caggccctca 300

tctccactgg tcagcaggtg acctttgccc agcgcctgg gtcctcagtg cctgctgccc 360

tggagatgat ataaaacagg tcagaacct cctgcctgct tgctcagttc atccctagag 420

gcagctgctc caggtaatgc cctctgggga ggggaaagag gaggggagga ggatgaagag 480

gggcaagagg agctccctgc ccagcccagc cagcaagcct ggagaagcac ttgctagagc 540

taaggaagcc tcggagctgg acgggtgccc cccaccctc atcataacct gaagaacatg 600



gaggccggg aggggtgtca cttgccaaa gctacacagg gggtagggct ggaagtggct 660  
 ccaagtgcag gttccccct cattcttcag gcttagggct ggaggaagcc ttagacagcc 720  
 cagtctacc ccagacaggg aaactgaggc ctggagaggg ccagaaatca cccaaagaca 780  
 cacacgatgt tggctggact ggacggagat cagtccagac cgcaggtgcc ttgatgttca 840  
 gctctggtagg tttctgtctc cateccacc acctcccttt gggcctcgat cctcgcgcc 900  
  
 tcaccagtcc ccttctgag agcccgtatt agcagggagc cggcccctac tcttctggc 960  
 agaccagct aaggttctac cttaggggcc acgccactc cccagggagg ggtccagagg 1020  
 catggggacc tgggtgccc ctcacaggac acttcttgc aggaacagag gtgcatgca 1080  
 gccccgggta ctcttgttg ttgcccctct ggcgctctg gcctctgcc gtaagcactt 1140  
 ggtgggactg ggctgggggc agggtaggag caacttgggg atcccagtcc caatgggtgg 1200  
 tcaagcagga gccacggct cgtccagagg ccgatccacc ccaactcagcc ctgctctttc 1260  
 ctccagagct tcagaggccg aggatgcctc ccttctcagc ttcatgcagg gttacatgaa 1320  
 gcacgccacc aagaccgcca aggatgcact gagcagcgtg caggagtccc aggtggccca 1380  
  
 gcagccagc tacaccgct ggcctccctc cccatccccc ctgccagctg cctccatcc 1440  
 caccgcccc tgcctgggtg agatccaac aatggaatgg aggtgctcca gcctccctg 1500  
 ggctgtgccc tcttcagct cctcttctc cacagggcct ttgtcaggt gctgaggag 1560  
 agatgacaga gttgagactg cattctccc aggtccctcc ttttccccg gagcagctct 1620  
 agggcgtgcc gtttagccc tcatttccat tttctttcc tttcctttc tttcttttc 1680  
 tattctttc tttcttctt tttcttttc tttcttctt tttcttttc tttcttctt 1740  
 tttctttc cttctttct tctctttct tttctcttt cttctttct tctctttct 1800  
 tctctttct tttctttc cttttcttt cttctctct cttctttct cttctttct 1860  
  
 cttctttt ttttttaat ggagtctccc tctgtcact aggetggagt gcagtgggtc 1920  
 catctcggct cactgcaacc tccgtctccc gggttcaacc cattctctg cctcagctc 1980  
 ccaagtact gggattacag gcacgcgcca ccacaccag ctaattttg tatttttagc 2040  
 agagatgggg tttcaccatg ttggccaggt tggctttgaa ttcctgacct caggggatec 2100  
 tctgctcgc gcctccaaa gtgctgggat tacaggcatg agccactgcg cctggcccca 2160  
 tttctttt ctgaaggtct ggctagagca gtggtctca gcccttttgg caccagggac 2220  
 cagttttgtg gtggacaatt tttccatggg ccagcgggga tggttttggg atgaagctgt 2280  
 tccacctcag atcatcagc attagattct cataaggagc cctccaccta gatccctggc 2340  
  
 atgtgcagtt cacaataggg ttcacactcc tatgagaatg taaggccact tgatctgaca 2400  
 ggaggcggag ctcagcggg attgtcact caccaccac tcaactctgt ctgtgcagc 2460

cggtcctaa cagtccatgg accagtacct atctatgact tgggggttgg ggaccctgg 2520  
 gctaggggtt tgccttggga ggccccacct gacccaattc aagccctga gtgcttctgc 2580  
 tttgttctaa gacctggggc cagtgtgagc agaagtgtgt ccttcctctc ccatcctgcc 2640  
 cctgcccac agiactctcc tctcccctac tccttctcc acctcacct gactggcatt 2700  
 agctggcata gcagagggtt tcataaacat tcttagtccc cagaaccggc tttgggtag 2760  
 gtgttatttt ctcaatttgc agatgagaaa attgaggctc agagcgatta ggtgacctgc 2820

cccagatcac acaactaatc aatcctcaa tgactttcca aatgagaggc tgctcctc 2880  
 tgtectacce tgctcagagc caccaggttg tgcaactcca ggcggtgctg tttgcacaga 2940  
 aaacaatgac agccttgacc tttcacatct cccaccctg tcacttttg cctcaggccc 3000  
 aggggcataa acatctgagg tgacctggag atggcagggt ttgacttgtg ctggggttcc 3060  
 tgcaaggata tctcttctcc cagggtggca gctgtggggg attcctgcct gaggtctcag 3120  
 ggctgtcgtc cagtgaagtt gagagggttg tgggtcctg actggtgtcg tccagtgggg 3180  
 acatgggtgt gggcccattg gttgcctaca gaggagtct catgccctgc tctgttctt 3240  
 cccctgactg atttaggggc tgggtgaccg atggcttcag ttcctgaaa gactactgga 3300

gcaccgttaa ggacaagttc tctgagttct gggatttga cctgaggtc agaccaactt 3360  
 cagccgtgge tgctgagac ctcaataacc caagtccacc tgctatcca tctgcgagc 3420  
 tccttgggtc ctgcaatctc cagggtgcc cctgtaggtt gcttaaaagg gacagtattc 3480  
 tcagtctct cctacccac ctcatgctg gccccctcc aggcattgctg gcctcccaat 3540  
 aaagctggac aagaagctgc tatgagtggg ccgtcgcaag tgtgcatct gtgtctgggc 3600  
 atgggaaagg gccgaggtg ttctgtgggt gggcactgga cagactccag gtcaggcagg 3660  
 catggaggcc agcgtctat ccaccttctg gtagctgggc agtctctggg cctcagttc 3720  
 ttcactctta aggtaggaat caccctcctg acctgcctt ccttgacagc tttgtcgga 3780

aggtcaaaca ggacaataag tttgtgata ctttgataaa ctgttaggtg ctgcacaaca 3840  
 tgacttgagt gtgtgcccc tgccagccac tatgcctggc acttaagttg tcatcagagt 3900  
 tgagactgtg tigtgttact caaaactgtg gagctgacct cccctatcca ggccccctag 3960  
 ccct 3964

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 3  
agcttcttgt ccagctttat 20

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213>  
> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic oligonucleotide  
<400> 4  
ccttcctga aggttcctcc 20

<210> 5  
<211> 524  
<212> DNA  
<213> Mus musculus  
<400> 5  
ctgctcagtt ttatccctag aagcagctag ctactccagg tacgtaggtg ccatgcagcc 60  
ccggacgctc ctactgtgg ccctcttggc tctcctggca tctgcccagag ctgaagaggt 120  
agagggatcc ttgctgctgg gctctgtaca gggctacatg gaacaagcct ccaagacggt 180  
ccaggatgcg ctaagtagcg tgcaggagtc cgatatagct gtggiggcca ggggctggat 240  
ggacaatcac ttcagatccc tgaaaggcta ctggagcaag tttactgaca agttcaccgg 300

cttctgggat tetaaccctg aggaccaacc aactccagct attgagtcgt gagacttctg 360  
tgttgcagat gtgctgttc ctccatctg ctgccccct ccaggcctgc caggtggccc 420  
ctgaaggttg ctttaagggg aaagtatggt ctcatgtctt caccctccc tagatctcac 480  
ctaaacatgc tgcctaat aaagctggat aagaagctgc tggt 524