

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2018년 6월 21일 (21.06.2018) WIPO | PCT

WO 2018/110980 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 48/00 (2006.01) A61K 9/107 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 9/127 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/014662
- (22) 국제출원일: 2017년 12월 13일 (13.12.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0169681 2016년 12월 13일 (13.12.2016) KR
- (71) 출원인: 주식회사 에이엠사이언스 (AM SCIENCES INC) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145 (고려대학교자연계캠퍼스산학관702-5), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김균환 (KIM, Kyun Hwan); 05834 서울시 송파구 중대로 24, 232동 1501호(문정동, 올림픽훼밀리타운), Seoul (KR). 김두현 (KIM, Doo Hyun); 07052 서울시 동작구 국사봉10길 21, 비01호(상도동, 그린하이츠빌라), Seoul (KR). 박영민 (PARK, Yeong Min); 03356 서울시 은평구 통일로 780, 3동 702호(불광동, 미성아파트), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

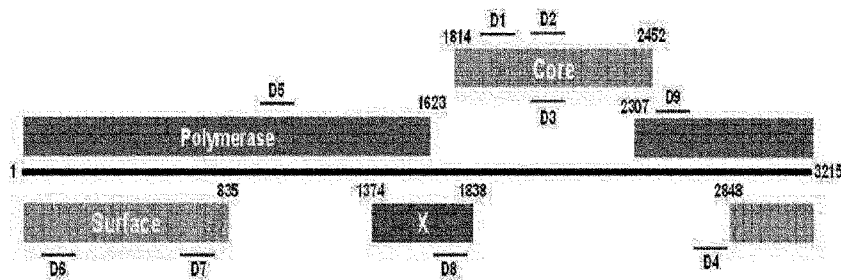
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

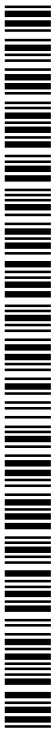
(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING HEPATITIS B

(54) 발명의 명칭: B형 간염 예방 또는 치료용 의약 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating hepatitis B, and a method for screening a hepatitis B treatment agent according to whether an HBV and a guanine-quadruplex (G-quadruplex) of a candidate material are formed, the pharmaceutical composition comprising, as an active ingredient, one or more oligonucleotides selected from the group consisting of: an oligonucleotide expressed by a nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 1, 2, or 6, or a complementary nucleic acid sequence thereof; and an oligonucleotide having at least one chemical modification on said oligonucleotide. The pharmaceutical composition forms an HBV and a guanine-quadruplex and reduces covalently closed circular DNA (cccDNA) of the HBV, and thus can be used to treat or prevent hepatitis B.

(57) 요약서: 본 발명은 SEQ ID NO: 1, 2 또는 6의 핵산 서열 또는 이의 상보적인 핵산서열로 표현되는 올리고뉴클레오타이드; 및 상기 올리고뉴클레오타이드 상에 적어도 하나의 화학적 변형(chemical modification)을 갖는 올리고뉴클레오타이드;로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물 및 HBV와 후보 물질의 구아닌-사중합체(G-quadruplex) 형성 여부에 따른 B형 간염 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다. 상기 의약 조성물은 HBV와 구아닌-사중합체를 형성하고, HBV의 cccDNA(covalently closed circular DNA)를 감소시킴으로써 B형 간염의 치료 또는 예방에 이용될 수 있다.



WO 2018/110980 A1

명세서

발명의 명칭: B형 간염 예방 또는 치료용 의약 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 B형 간염을 예방 또는 치료하기 위한 올리고뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 의약 조성물을 투여함으로써 B형 간염을 치료하는 방법에 대한 것이다.

배경기술

- [2] B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus, 이하 HBV)는 현재 전세계적으로 약 3억 5천만 명 이상이 감염되어 있을 정도로 바이러스 감염 중 인류에 가장 많은 피해를 끼치고 있다. 개체가 HBV에 감염되면 만성간염, 간경화, 간암 등의 간질환이 발생할 수 있고, 심하면 바이러스성 간질환으로 인해 사망에 이르게 된다. HBV는 DNA를 게놈(genome)으로 가지고 있으며, 지금까지 알려진 바이러스 중 가장 작은 게놈을 가진 바이러스 중 하나이다(Ganem and Prince N Engl J Med (2004) 350, 1118-1129).
- [3] 현재 HBV 감염을 억제할 수 있는 백신이 개발되어 신규 감염률이 많이 줄어들고 있으나 저개발 국가에서는 여전히 감염 실태가 심각한 실정이며, 백신 접종 전에 HBV에 감염된 환자들이 많아 사회적으로 많은 문제를 야기하고 있다.
- [4] HBV는 3.2kb의 이중가닥 DNA를 게놈으로 가지고 있는 바이러스로, DNA 주변은 캡시드(capsid) 단백질이 둘러싸고 있고 외피(surface) 단백질이 그 주변을 감싸고 있는 형태로 존재한다. HBV는 간세포에 특화되어 있는 굴성(tropism)이 있고 비세포독성(non-cytotoxic) 상태로 지속적인 감염을 일으키며, 숙주 범위가 매우 좁아서 사람과 침팬지 외의 다른 동물에는 감염되지 않는 특징이 있다(Ganem and Prince N Engl J Med (2004) 350, 1118-1129).
- [5] HBV는 감염 후 캡시드가 해체되고 유전자가 핵 내로 이동하여 숙주의 핵 내에서 이중가닥 바이러스 DNA가 cccDNA(covalently closed circular DNA)로 전환된다. cccDNA는 HBV 전사의 주형(template)으로서 HBV 생활사(life cycle)에 있어서 가장 중요한 역할을 담당하고 있다. 최근 연구에 의하면 cccDNA는 히스톤(histone)에 감겨 있고 이들의 다양한 변형에 의해 조절될 수 있다는 사실이 밝혀졌다(Pollicino et al. Gastroenterology (2006) 130, 823-837). cccDNA는 에피솜(episome) 형태의 꼬마염색체(minichromosome)로써 HBV의 모든 RNA를 만들 뿐만 아니라 현재의 치료제로는 이를 없앨 수 없기 때문에 만성 감염을 일으키는 주요한 원인으로 알려져 있다(Urban et al. J Hepatol (2010) 52, 282-284).
- [6] cccDNA로부터 생성된 바이러스 핵산(viral RNA)은 코어(core), 표면(surface), 중합효소(polymerase) 등을 만들고, 세포질에서 게놈 DNA로 전환이 가능한 pregenomic RNA를 중심으로 이입(encapsidation)이 진행된다. Pregenomic RNA로부터 성공적으로 DNA 전환까지 마친 HBV 비리온(virion)은

출아(budding)된다. 이후 주변 간세포에 감염되거나 재감염이 되어 꾸준히 증식하게 된다(Urban et al. *J Hepatol* (2010) 52, 282-284).

- [7] 현재 사용 중인 모든 B형 간염 치료제는 핵산 유도체로서 pregenomic RNA가 캡시드 안에서 중합효소에 의해 DNA로 전환될 때 바이러스의 신생 DNA 가닥에 끼어들어가 궁극적으로 합성을 종식시키게 된다. 따라서 이 부분을 표적으로 하는 현재의 모든 약제들은 HBV 중합효소의 RT(reverse transcriptase) 도메인 안의 활성부위에 돌연변이가 생기면 약제 내성을 유발하기 때문에 장기 치료 시 대부분 이러한 약제 내성 돌연변이에 의해 완전 치료가 어렵다(Zoulim and Locarnini, *Gastroenterology* (2009) 137, 1593-1608 e1591-1592).
- [8] 현재 FDA의 승인을 받은 만성 B형 감염의 치료제인 핵산 유사체로는 라미부딘(lamivudin), 아데포비어(adefovir), 엔테카비어(entecavir), 텔비부딘(telbivudin), 클레부딘(clevudine) 및 테노포비어(tenofovir)가 있으며, 이들은 모두 중합효소 저해제이기 때문에 만성 감염을 완치할 수는 없다.
- [9] 2014년 Lucifora 등이 IFN- α 와 Lymphotoxin b receptor(LTbR)가 APOBEC3A 또는 3B를 유도하고 이들이 세포사멸 없이 cccDNA 만을 선택적으로 제거할 수 있다고 보고하였으나 사용량이 너무 많아서 실제 적용에는 어려움이 있다(Lucifora et al. *Science*. (2014) Mar 14;343(6176):1221-8).
- [10] 세포 기반 cccDNA 분석 방법을 구축하여 85,000개의 화합물을 분석한 결과, DSS(disubstituted sulfonamides) 2개(CCC-0975, CCC-0346)가 cccDNA를 어느 정도 줄일 수 있음이 발견되었으나 약으로 개발되기에는 아직 효과가 부족하고 작용 기전도 알려지지 않고 있다(Cai et al. *Antimicrob Agents Chemother*. (2012) Aug;56(8):4277-88).
- [11] 따라서, HBV 감염 질환을 치료하기 위해서는 새로운 치료법이 필요하다. 본 발명자들은 HBV의 게놈을 분석하여 구아닌-사중합체를 이룰 수 있는 부분을 발견하고, HBV 유전자의 활성을 조절하고 HBV의 cccDNA를 제거하는 기술을 개발하였다. 구아닌-사중합체(G-quadruplex)는 4개의 구아닌 사이의 결합을 기본으로 하는 4가닥의 DNA 나선이다(Metifiot et al. *Nucleic Acids Res*. 2014 Nov 10;42(20):12352-66. Epub 2014 Oct 20).

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] SEQ ID NO: 1, 2 또는 6의 핵산 서열 또는 이의 상보적인 핵산서열로 표현되는 올리고뉴클레오타이드; 및 상기 올리고뉴클레오타이드 상에 적어도 하나의 화학적 변형(chemical modification)을 갖는 올리고뉴클레오타이드;로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물이 제공된다.
- [13] 또한, 상기 의약 조성물의 유효량을 개체에 투여하는 것을 포함하는 B형 간염의 치료 또는 예방 방법이 제공된다.

- [14] 또한, HBV와 후보 물질을 접촉시키고 구아닌-사중합체의 형성 여부를 확인하는 단계를 포함하는 B형 간염 치료제의 스크리닝 방법이 제공된다.

과제 해결 수단

- [15] SEQ ID NO: 1, 2 또는 6의 핵산 서열 또는 이의 상보적인 핵산서열로 표현되는 올리고뉴클레오타이드 및 상기 올리고뉴클레오타이드 상에 적어도 하나의 화학적 변형(chemical modification)을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 B형 간염 치료 또는 예방용 의약 조성물이 제공된다.
- [16] 일부 구체예에서, 상기 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나 이상의 뉴클레오시드간 링키지(linkage)가 화학적 변형된 것일 수 있다.
- [17] 일부 구체예에서, 상기 뉴클레오시드간 링키지가 화학적 변형된 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 인산기가 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 포스포로디티오에이트(phosphorodithioate), 포스포아미데이트(phosphoramidate) 또는 보라노포스페이트(boranophosphate)로 화학적 변형된 것일 수 있다.
- [18] 일부 구체예에서, 상기 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나 이상의 슈가 모이어티(sugar moiety)가 화학적 변형된 것일 수 있다.
- [19] 일부 구체예에서, 상기 슈가 모이어티는 뉴클레오타이드 내 5 탄당의 2'번 위치의 -H기가 메톡시에틸(MOE), 디메틸아미노옥시에톡시(DMAOE), 디메틸아미노에톡시에틸(DMAEOE), 메틸(Ome), 아미노프로폭시(AP) 또는 플루오르(F)로 치환되어 변형되거나, 상기 슈가 모이어티가 F-ANA로 치환되어 변형된 것일 수 있다.
- [20] 일부 구체예에서, 상기 슈가 모이어티는 LNA(locked nucleic acid) 또는 PNA(peptide nucleic acid) 형태로 화학적 변형된 것일 수 있다.
- [21] 일부 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 3' 또는 5' 말단에 링커를 통해 GalNAc(N-acetylgalactosamine)이 결합되어 있는 형태일 수 있다.
- [22] 일부 구체예에서, 상기 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오시드간 링키지의 화학적 변형 및 슈가 모이어티의 화학적 변형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 2종 이상의 화학적 변형을 갖는 것일 수 있다.
- [23] 일부 구체예에서, 2종 이상의 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는,
- [24] 뉴클레오타이드의 인산기가 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포아미데이트 또는 보라노포스페이트로 화학적 변형되고,
- [25] 추가로 뉴클레오타이드 내 5 탄당의 2'번 위치의 -H기가 메톡시에틸(MOE), 디메틸아미노옥시에톡시(DMAOE), 디메틸아미노에톡시에틸(DMAEOE), 메틸(Ome), 아미노프로폭시(AP) 또는 플루오르(F)로 치환되어 변형되거나, 뉴클레오타이드의 슈가 모이어티가 F-ANA로 치환되어 변형된 것일 수 있다.
- [26] 일부 구체예에서, 2종 이상의 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는,

- [27] 뉴클레오타이드의 인산기가 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포아미데이트 또는 보라노포스페이트로 화학적 변형되고,
- [28] 추가로 슈가 모이어티가 LNA(locked nucleic acid) 또는 PNA(peptide nucleic acid) 형태로 화학적 변형된 것일 수 있다.
- [29] 일부 구체예에서, 2종 이상의 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는,
- [30] 뉴클레오타이드의 인산기가 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포아미데이트 또는 보라노포스페이트로 화학적 변형되고,
- [31] 추가로 3' 또는 5' 말단에 링커를 통해 GalNAc(N-acetylgalactosamine)이 결합되어 있는 형태일 수 있다.
- [32] 일부 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 HBV와 구아닌-사중합체(G-quadruplex)를 형성하는 것일 수 있다.
- [33] 일부 구체예에서, 상기 B형 간염의 치료 또는 예방을 위한 의약 조성물은 HBV의 cccDNA(covalently closed circular DNA)를 줄이는 것일 수 있다.
- [34] 일부 구체예에서, 상기 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [35] 일부 구체예에서, 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 키토산 나노입자, 콜로이드 분산 시스템, 고분자 복합체, 나노캡슐, 나노입자, 미소구체, 비드, 수중유 에멀전, 미셀, 혼합 미셀, 또는 리포솜을 포함하는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [36] 일부 구체예에서, 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 키토산 나노입자이고, 상기 키토산은 50 내지 190 kDa의 분자량을 가지는 것일 수 있다.
- [37] 일부 구체예에서, 상기 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물은 경구 또는 비경구로 개체에 투여되는 것일 수 있다.
- [38] 일부 구체예에서, 상기 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물은 복막내, 정맥내, 경피, 설하, 근육내, 비강내 또는 피하로 개체에 투여되는 것일 수 있다.
- [39] 본 명세서에 기재된 올리고뉴클레오타이드는 B형 간염의 예방 및/또는 치료, 및 치료를 위한 의약 제조에 사용될 수 있다.
- [40]
- [41] SEQ ID NO: 1, 2 또는 6의 핵산서열 또는 이의 상보적인 핵산서열로 표현되는 올리고뉴클레오타이드 및 상기 올리고뉴클레오타이드 상에 적어도 하나의 화학적 변형(chemical modification)을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물의 유효량을 개체에 투여하는 것을 포함하는 B형 간염의 치료 또는 예방 방법이 제공된다.
- [42] 일부 구체예에서, 상기 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나 이상의 뉴클레오시드간 링키지가 화학적 변형된 것일 수 있다.
- [43] 일부 구체예에서, 상기 뉴클레오시드간 링키지가 화학적 변형된 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 인산기가 포스포로티오에이트,

포스포로디티오에이트, 포스포아미데이트 또는 보라노포스페이트로 화학적 변형된 것일 수 있다.

- [44] 일부 구체예에서, 상기 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나 이상의 슈가 모이어티가 화학적 변형된 것일 수 있다.
- [45] 일부 구체예에서, 상기 슈가 모이어티는 뉴클레오타이드 내 5 탄당의 2'번 위치의 -H기가 메톡시에틸(MOE), 디메틸아미노옥시에톡시(DMAOE), 디메틸아미노에톡시에틸(DMAEOE), 메틸(Ome), 아미노프로폭시(AP) 또는 플루오르(F)로 치환되어 변형되거나, 상기 모이어티가 F-ANA로 치환되어 변형된 것일 수 있다.
- [46] 일부 구체예에서, 상기 슈가 모이어티는 LNA(locked nucleic acid) 또는 PNA(peptide nucleic acid) 형태로 화학적 변형된 것일 수 있다.
- [47] 일부 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 3' 또는 5' 말단에 링커를 통해 GalNAc(N-acetylgalactosamine)이 결합되어 있는 형태일 수 있다.
- [48] 일부 구체예에서, 상기 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오시드간 링커지의 화학적 변형 및 슈가 모이어티의 화학적 변형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 2종 이상의 화학적 변형을 갖는 것일 수 있다.
- [49] 일부 구체예에서, 상기 2종 이상의 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는
- [50] 뉴클레오타이드의 인산기가 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포아미데이트 또는 보라노포스페이트로 화학적 변형되고,
- [51] 추가로 뉴클레오타이드 내 5 탄당의 2'번 위치의 -H기가 메톡시에틸(MOE), 디메틸아미노옥시에톡시(DMAOE), 디메틸아미노에톡시에틸(DMAEOE), 메틸(Ome), 아미노프로폭시(AP) 또는 플루오르(F)로 치환되어 변형되거나, 뉴클레오타이드의 슈가 모이어티가 F-ANA로 치환되어 변형된 것일 수 있다.
- [52] 일부 구체예에서, 상기 2종 이상의 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는,
- [53] 뉴클레오타이드의 인산기가 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포아미데이트 또는 보라노포스페이트로 화학적 변형되고,
- [54] 추가로 슈가 모이어티가 LNA(locked nucleic acid) 또는 PNA(peptide nucleic acid) 형태로 화학적 변형된 것일 수 있다.
- [55] 일부 구체예에서, 상기 2종 이상의 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는,
- [56] 뉴클레오타이드의 인산기가 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포아미데이트 또는 보라노포스페이트로 화학적 변형되고,
- [57] 추가로 3' 또는 5' 말단에 링커를 통해 GalNAc(N-acetylgalactosamine)이 결합되어 있는 형태일 수 있다.
- [58] 일부 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 HBV와 구아닌-사중합체(G-quadruplex)를 형성하는 것일 수 있다.

- [59] 일부 구체예에서, 상기 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물은 HBV의 cccDNA(covalently closed circular DNA)를 줄이는 것일 수 있다.
- [60] 일부 구체예에서, 상기 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [61] 일부 구체예에서, 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 키토산 나노입자, 콜로이드 분산 시스템, 고분자 복합체, 나노캡슐, 나노입자, 미소구체, 비드, 수중유 에멀전, 미셀, 혼합 미셀, 또는 리포솜을 포함하는 것일 수 있다.
- [62] 일부 구체예에서, 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 키토산 나노입자이고, 상기 키토산은 50 내지 190 kDa의 분자량을 가지는 것일 수 있다.
- [63] 일부 구체예에서, 상기 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물은 경구 또는 비경구로 개체에 투여되는 것일 수 있다.
- [64] 일부 구체예에서, 상기 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물은 복막내, 정맥내, 경피, 설하, 근육내, 비강내 또는 피하로 개체에 투여되는 것일 수 있다.
- [65]
- [66] 또한, HBV와 후보 물질을 접촉시키고, 상기 HBV와 후보 물질이 구아닌-사중합체(G-quadruplex)를 형성하는지 확인하는 단계를 포함하는 B형 간염 치료제의 스크리닝 방법이 제공된다.
- [67] 일부 구체예에서, HBV와 후보물질이 구아닌-사중합체를 형성하는 경우, B형 간염 치료제로 선정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [68] 일부 구체예에서, 구아닌-사중합체를 확인하는 단계는 EMSA(Electrophoretic mobility shift assay), 원편광 이색성(circular dichroism, CD), 핵자기공명(nuclear magnetic resonance, NMR), 또는 구아닌-사중합체 특이 항체를 이용한 방법을 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [69] 일부 구체예에서, 상기 후보 물질은 구아닌(G)을 4개 이상 포함하는 것일 수 있다.
- [70] 일부 구체예에서, 상기 후보 물질은 HBV의 인핸서 II 부위와 결합하여 구아닌-사중합체를 형성함으로써 HBV의 발현을 저해할 수 있다.

발명의 효과

- [71] SEQ ID NO: 1, 2 또는 6의 핵산 서열 또는 이의 상보적인 핵산서열로 표현되는 올리고뉴클레오타이드 및 상기 올리고뉴클레오타이드 상에 적어도 하나의 화학적 변형(chemical modification)을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물은 HBV(Hepatitis B virus)와 구아닌-사중합체(G-quadruplex)를 형성하여 HBV의 cccDNA(covalently closed circular DNA)를 감소시킴으로써 B형 간염의 치료, 예방 또는 B형 간염 치료제의 스크리닝에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [72] 도 1은 HBV의 게놈 분석을 통한 서열 스크리닝 모식도 및 D1 - D9 HBV DNA 부위를 모식적으로 나타낸 것이다.
- [73] 도 2는 올리고뉴클레오타이드(D1, D2 및 D6)가 단백질 발현 저해[(a) 및 (b)] 및 HBV 복제 저해[(c)] 효과가 있음을 보여준다. (a) 및 (b)는 각각 HBV 1.2 플라스미드의 HBeAg 및 HBsAg 분비량, (c)는 HBV DNA 썬던 블랏 결과이다.
- [74] 도 3은 올리고뉴클레오타이드가 바이럴(viral) mRNAs 전사를 억제시키는 결과를 보여준다. pg/preC RNA는 pregenomic and precore RNA를 의미하고; pre-S/S RNA는 surface RNAs를 의미하며; HBx RNA는 HBx 단백질을 만드는 RNA를 의미한다.
- [75] 도 4는 올리고뉴클레오타이드가 바이럴(viral) 표면 단백질을 저해시키는 것을 보여준다. 베타-액틴은 로딩 대조군이고, L, M, S는 표면단백질의 3가지 종류를 뜻하는 것으로, L은 큰 것, M은 중간 것, S는 작은 것을 의미한다.
- [76] 도 5(a)와 (b)는, 올리고뉴클레오타이드가 HBV 인핸서 활성을 저해함을 보여주는 루시페라아제 리포터 분석 결과이다.
- [77] 도 6 (a) 및 (b)는, 올리고뉴클레오타이드가 HBV 인핸서를 저해함을 보여준다.
- [78] 도 7은 올리고뉴클레오타이드의 EMSA(electrophoretic mobility shift assay) 결과를 나타낸 것이다. 올리고뉴클레오타이드는 HBV 인핸서 I, II 서열과 결합하여 구아닌-사중합체를 형성함을 보여준다.
- [79] 도 8은 올리고뉴클레오타이드의 EMSA(electrophoretic mobility shift assay) 결과를 나타낸 것이다. 상기 올리고뉴클레오타이드가 HBV 인핸서 II 부위와 부분적으로 구아닌-사중합체를 형성함을 보여준다.
- [80] 도 9는 올리고뉴클레오타이드의 EMSA(electrophoretic mobility shift assay) 결과를 나타낸 것이다. 상기 올리고뉴클레오타이드가 자신의 염기서열을 인지하여 구아닌-사중합체 구조를 형성함을 보여준다.
- [81] 도 10은 올리고뉴클레오타이드에 점돌연변이를 일으킨 돌연변이 뉴클레오타이드가 구아닌-사중합체를 형성하는지 알아보기 위한 EMSA 결과이다. 상기 점돌연변이된 올리고뉴클레오타이드의 경우, 구아닌-사중합체를 형성하지 못한다.
- [82] 도 11은 올리고뉴클레오타이드들의 HBV 저해 활성을 루시페라아제 활성 분석을 통해 측정된 결과이다. PS는 포스포로티오에이트 변형된 D2, OMe는 O-methyl 변형된 D2, PNA는 PNA 변형된 D2, PS-OMe는 포스포로티오에이트와 O-메틸 변형된 D2, PS-LNA는 포스포로티오에이트와 LNA 변형된 D2를 나타낸다.
- [83] 도 12(a)는 HepG2-NTCP 세포의 HBV 감염과 바이럴 단백질 분석 과정을 모식적으로 나타낸 것이다. (b) 및 (c)는 변형된 올리고뉴클레오타이드 처리시의 HBV 단백질 발현 분석 결과이다. PS는 포스포로티오에이트 변형된 D2를, PS-OMe는 포스포로티오에이트와 O-메틸 변형된 D2를, PS-LNA는 포스포로티오에이트와 LNA 변형된 D2를 나타낸다. D2의 감염(transfection)(D1, T.F)을 항-HBV 효과의 양성 대조군으로 사용하였다. 변형되지 않은 D2 처리(D2

- Tr)는 음성 대조군으로 사용하였다. LMV는 lamivudine이다.
- [84] 도 13(a)는 PHHs (primary human hepatocytes)의 HBV 감염과 바이럴 단백질 분석 과정을 모식적으로 나타낸 것이다. (b) 및 (c)는 변형된 올리고뉴클레오타이드 처리시의 HBV 단백질 발현 분석결과이다. PS는 포스포로티오에이트 변형된 D2를, PS-OMe는 포스포로티오에이트와 O-메틸 변형된 D2를, PS-LNA는 포스포로티오에이트와 LNA 변형된 D2를 나타낸다. D2의 감염(transfection)(D1, T.F)을 항-HBV 효과의 양성 대조군으로 사용하였다. 변형되지 않은 D2 처리(D2)는 음성 대조군으로 사용하였다.
- [85] 도 14는 변형된 D2의 항-HBV 활성을 보여주는 루시퍼라아제 분석 결과이다. PS는 백본이 PS로 변형된 D2를, PS-Ome(4,4)는 백본은 PS이고 5'과 3'의 양끝에서 각각 4개의 뉴클레오타이드를 O-Methyl로 변형시킨 D2를, PS-Ome(5,5)는 백본은 PS이고 5'과 3'의 양끝에서 각각 5개의 뉴클레오타이드를 O-Methyl로 변형시킨 D2를, PS-Ome(all)은 백본은 PS이고 모든 뉴클레오타이드를 O-Methyl로 변형시킨 D2를, PS-LNA(2,2)는 백본은 PS이고 5'과 3'의 양끝에서 각각 2개의 뉴클레오타이드를 LNA로 변형시킨 D2를, PS-LNA(3,3)는 백본은 PS이고 5'과 3'의 양끝에서 각각 3개의 뉴클레오타이드를 LNA로 변형시킨 D2를, PS-LNA(4,4)는 백본은 PS이고 5'과 3'의 양끝에서 각각 4개의 뉴클레오타이드를 LNA로 변형시킨 D2를, PS-LNA(5,5)는 백본은 PS이고 5'과 3'의 양끝에서 각각 5개의 뉴클레오타이드를 LNA로 변형시킨 D2를, 그리고 PS-LNA(all)은 백본이 PS이고, 모든 뉴클레오타이드를 LNA로 변형시킨 D2를 의미한다.
- [86] 도 15는 58개의 변형된 올리고뉴클레오타이드의 HepG2 세포에서의 HBeAg 저해 활성을 나타낸 것이다.
- [87] 도 16는 58개의 변형된 올리고뉴클레오타이드의 HepG2 세포에서의 HBsAg 저해 활성을 나타낸 것이다.
- [88] 도 17은 58개의 변형된 올리고뉴클레오타이드의 HepG2-NTCP 세포에서의 HBeAg 저해 활성을 나타낸 것이다.
- [89] 도 18은 58개의 변형된 올리고뉴클레오타이드의 HepG2-NTCP 세포에서의 HBsAg 저해 활성을 나타낸 것이다.
- [90] 도 19는 58개의 변형된 올리고뉴클레오타이드의 PHH 세포에서의 HBeAg 저해 활성을 나타낸 것이다.
- [91] 도 20은 58개의 변형된 올리고뉴클레오타이드의 PHH 세포에서의 HBsAg 저해 활성을 나타낸 것이다.
- [92] 도 21은 올리고뉴클레오타이드가 *in vivo* 모델에서 HBV를 저해함을 보여준다. (a)는 *in vivo* 실험 스케줄을 모식적으로 나타낸 것이고, (b) 및 (c)는 각각 바이럴 단백질인 HBeAg 및 HBsAg 측정 결과이다. (b) 및 (c)의 첫번째 막대인 Mock은 control mouse이고 두번째는 HBV와 공백터가 있는 것이고, 세번째는 HBV DNA와 D2가 같이 들어있는 실험군을 의미한다.
- [93] 도 22는 변형된 올리고뉴클레오타이드가 *in vivo* 모델에 정맥 주사하였을 때

HBV를 저해함을 보여준다. (a)는 in vivo 정맥(intravenous, IV) 주사 실험 스케줄을 모식적으로 나타낸 것이고, (b) 및 (c)는 각각 바이럴 단백질인 HBeAg 및 HBsAg 측정 결과이다. (d)는 서던 블랏으로 확인한 결과이고, 각 숫자는 실험한 마우스의 번호를 나타낸다. PS는 백본이 포스포로티오에이트로 변형된 D2, PS-OMe는 백본은 PS이고 모든 뉴클레오타이드를 O-Methyl로 변형시킨 D2를, PS-LNA는 백본은 PS이고 모든 뉴클레오타이드를 LNA로 변형시킨 D2를 의미한다.

[94] 도 23은 변형된 올리고뉴클레오타이드를 나노입자(키토산)로 감싸준 뒤 in vivo 모델에 정맥 주사하였을 때 HBV를 저해함을 보여준다. (a)는 in vivo 정맥(intravenous, IV) 주사 실험 스케줄을 모식적으로 나타낸 것이고, (b) 및 (c)는 각각 바이럴 단백질인 HBeAg 및 HBsAg 측정 결과이며, (d)는 서던 블랏으로 확인한 결과이다.

[95] 도 24는 변형된 올리고뉴클레오타이드가 처음부터 처리되었을 때 HBV 저해함을 보여준다. (a)는 PHH에 HBV를 감염시키는 절차에 대해서 모식화하여 나타낸 것이고, (b) 및 (c)는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 처리하였을 경우 cccDNA를 제거하는 작용이 우수함을 확인한 결과이며, (e) 및 (f)는 realtime PCR로 정량적으로 평가한 결과이다.

[96] 도 25는 변형된 올리고뉴클레오타이드가 재감염 조건에서 처리되었을 때 HBV를 저해함을 보여준다. (a)는 PHH에 HBV를 감염시키는 절차에 대해서 도식화하여 나타낸 것이고, (b) 및 (c)에서는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 농도별로 처리한 결과이며, (d)는 일반 PCR 수행 후 전기영동을 통해 DNA의 양 차이를 확인한 결과이다.

[97] 도 26은 변형된 올리고뉴클레오타이드가 HepG2-NTCP에서 cccDNA를 효율적으로 인식하고 G-quadruplex를 형성하는지 확인한 결과이다. (a)는 NTCP에서 감염되어 생성된 HBV cccDNA와 변형된 올리고뉴클레오타이드를 처리하였을 때, G-quadruplex를 인식하는 BG4 항체에 의해 D2와 cccDNA가 구아닌 중합체를 형성하는 것을 확인하였고, (b)는 BG4에 의한 foci 개수를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[98] SEQ ID NO: 1, 2 또는 6의 핵산 서열 또는 이의 상보적인 핵산서열로 표현되는 올리고뉴클레오타이드 및 상기 올리고뉴클레오타이드 상에 적어도 하나의 화학적 변형(chemical modification)을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물을 제공한다.

[99] 하기 실시예에 따르면, SEQ ID NO: 1, 2 또는 6의 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 HBV 감염 간암 세포주에 처리하고, HBV 마우스 모델에 주입하였을 때, HBV 단백질의 생성이 저해되는 것을 확인하였다. 이를

통해 SEQ ID NO: 1, 2 또는 6의 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드가 HBV에 대한 항바이러스 효과를 가지는 것을 확인하였다. 따라서 SEQ ID NO: 1, 2 또는 6의 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 핵산 서열 또한 HBV에 대한 항바이러스 효과를 가질 수 있다.

[100] 또 다른 구체예에서는, 올리고뉴클레오타이드의 세포 투과를 용이하게 하기 위해 SEQ ID NO: 1, 2 또는 6의 핵산 서열로 표현되는 올리고뉴클레오타이드 상에 적어도 하나의 화학적 변형(chemical modification)을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 합성하고, 이를 HBV 감염 간암 세포주 및 HBV 감염 마우스 모델에 처리하였다. 그 결과, HBV 단백질의 생성이 저해되는 것을 확인하였으며, 이를 통해 상기 적어도 하나의 화학적 변형(chemical modification)을 갖는 올리고뉴클레오타이드가 화학적 변형에도 불구하고 HBV에 대한 우수한 항바이러스 효과를 가지는 것을 확인하였다.

[101] 따라서, SEQ ID NO: 1, 2 또는 6의 핵산 서열 또는 이의 상보적인 핵산서열로 표현되는 올리고뉴클레오타이드; 및 상기 올리고뉴클레오타이드 상에 적어도 하나의 화학적 변형(chemical modification)을 갖는 올리고뉴클레오타이드;로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드는 B형 간염의 치료 또는 예방을 위한 의약의 유효성분으로 사용될 수 있다.

[102] 의약 조성물에서, 상기 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나 이상의 뉴클레오시드간 링키지(linkage)가 화학적 변형된 것이거나, 적어도 하나 이상의 슈가 모이어티(sugar moiety)가 화학적 변형된 것일 수 있다.

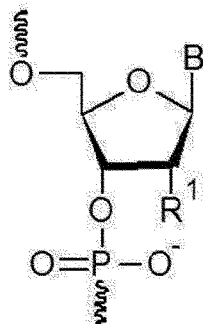
[103] 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)라 함은 이에 제한되는 것은 아니나, 약 5 내지 40개, 예컨대, 10 내지 30개의 뉴클레오타이드로 이루어진 중합체이다.

[104] 뉴클레오타이드(nucleotide)는 염기(base), 5 탄당, 인산기(포스페이트)로 구성된다. 상기 염기는 퓨린(아데닌 또는 구아닌) 또는 피리미딘(시토신, 티민 또는 우라실)일 수 있다. 또한, 5 탄당은 리보오스, 데옥시리보오스, 아라비노스, 자일로스, 릭소스, 알로스, 알토스, 글루코스, 만노스, 굴로스, 이도스, 갈락토스, 탈로스 또는 이들 당의 안정화된 변형 형태일 수 있다.

[105] 예를 들어, 5 탄당이 데옥시리보오스인 경우, 뉴클레오타이드는 하기 화학식 1과 같은 구조로 표현될 수 있다.

[106] [화학식 1]

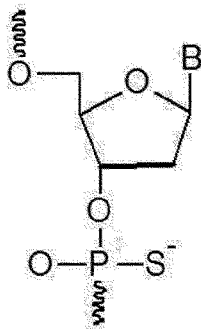
[107]



- [108] 상기 화학식 1에서,
- [109] B는 염기(base)를 나타내고, R¹은 -H이다.
- [110]
- [111] 화학적 변형(chemical modification)에 대해 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 상기 화학적 변형된 올리고뉴클레오타이드는, 자연 올리고뉴클레오타이드와 비교시, 뉴클레오시드간 링키지, 리보오스 단위체 및/또는 자연 뉴클레오시드 염기(아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 등)를 수반하는 다양한 화학적 변형(chemical modification)을 포함할 수 있다. 변형은 올리고뉴클레오타이드의 합성 동안 또는 후에 발생할 수 있다. 합성 동안, 변형된 염기는 내부적으로 또는 그것의 말단에 통합될 수 있다. 합성 후에, 변형은 활성기(아미노 변형자를 통해, 3' 또는 5' 히드록실기를 통해, 또는 포스페이트 기를 통해)를 사용하여 수행될 수 있다. 통상의 기술자는 올리고뉴클레오타이드 변형 방법을 잘 알고 있다.
- [112] 일부 구체예에서, 상기 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나 이상의 뉴클레오시드간 링키지가 화학적 변형된 것일 수 있다.
- [113] 뉴클레오시드간 링키지가 화학적 변형된다는 것은 뉴클레오시드들을 서로 연결시켜주고 있는 포스페이트기 내의 산소가 하나 이상의 다른 치환기로 치환되어 있는 것을 말한다.
- [114] 일부 구체예로, 뉴클레오시드간 링키지에 참여하지 않는 포스페이트기 중의 산소가 황에 의해 대체되어 있는 핵산 분자의 안정화된 당 포스페이트 백본을 "포스포로티오에이트 백본"이라한다. 상기 포스포로티오에이트 외에 뉴클레오티드의 인산기는 포스포로디티오에이트, 포스포아미테이트 또는 보라노포스페이트로도 치환될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포아미테이트 또는 보라노포스페이트 백본은 각각 하기의 화학식 2 내지 5로 나타낸다.

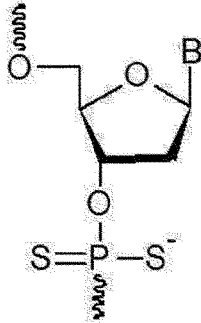
[115] [화학식 2]

[116]



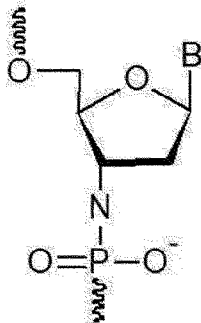
[117] [화학식 3]

[118]



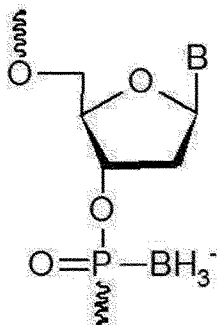
[119] [화학식 4]

[120]



[121] [화학식 5]

[122]



[123] 상기 화학식 2 내지 5에서, B는 염기(base)를 나타낸다.

[124]

[125] 일부 구체예에서, 상기 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나 이상의 슈가 모이어티가 화학적 변형된 것일 수 있다.

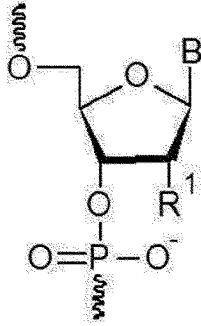
[126] 슈가 모이어티가 화학적 변형되었다는 것은 뉴클레오타이드 내 5 탄당에 화학적 변형이 일어난 것을 말한다.

[127] 슈가 모이어티의 화학적 변형은 예를 들어, 뉴클레오타이드 내 5 탄당의 2' 위치의 -H기가 다른 치환기로 치환되어 있거나, 5 탄당의 기본구조가 변형되어 있는 경우를 포함한다.

[128] 뉴클레오타이드 내 5 탄당의 2' 위치의 -H기가 다른 치환기로 치환되어 있는 슈가 모이어티의 화학적 변형은 하기 화학식 1의 5 탄당의 2' 위치인 R¹이 -H기가 아닌 다른 치환기로 치환되어 있는 것을 의미한다.

[129] [화학식 1]

[130]



[131]

상기 화학식 1에서,

[132]

B는 염기(base)를 나타내고, R¹은 -H이다.

[133]

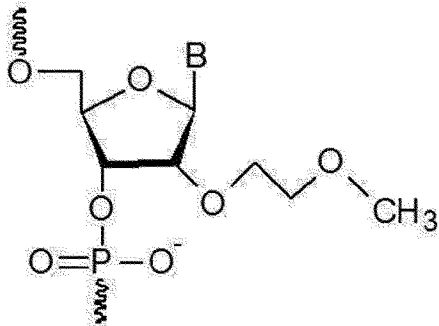
[134]

일부 구체예에서, 상기 슈가 모이어티는 뉴클레오타이드 내 5 탄당의 2' 위치의 -H 기가 이에 제한되는 것은 아니나, 메톡시에톡시([2'-O-CH₂CH₂OCH₃, 2'-O-(2-메톡시에틸); MOE], 화학식 6), 디메틸아미노옥시에톡시([2'-O(CH₂)₂ON(CH₃)₂;DMAOE], 화학식 7), 디메틸아미노에틸옥시에틸([2'-OCH₂CH₂-O-CH₂CH₂-N(CH₃)₂;DMAEOE], 화학식 8), 메톡시([2'-OCH₃; Ome], 화학식 9), 아미노프로폭시([2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂; AP], 화학식 10) 또는 플루오르(2'-F, 화학식 11)로 치환되어 변형되거나, 상기 슈가 모이어티가 F-ANA(2'-F-β-D-arabinofuranosyl, 화학식 12)로 치환되어 변형되는 것일 수 있다.

[135]

[화학식 6]

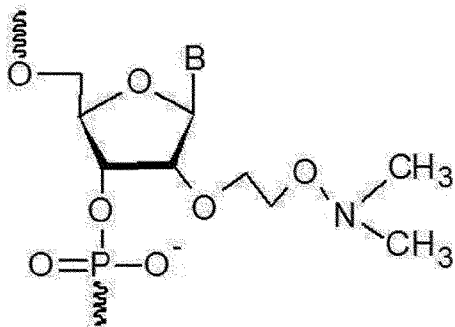
[136]



[137]

[화학식 7]

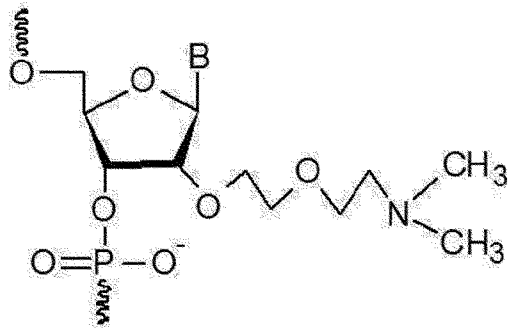
[138]



[139]

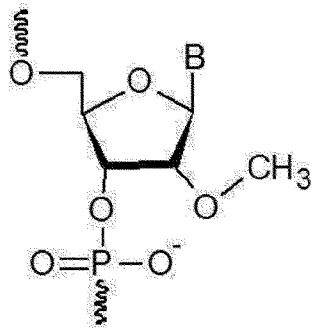
[화학식 8]

[140]



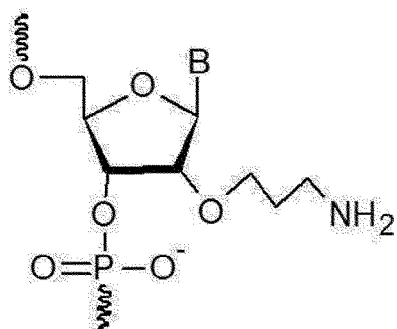
[141] [화학식 9]

[142]



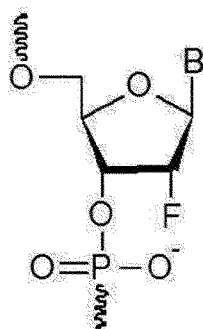
[143] [화학식 10]

[144]



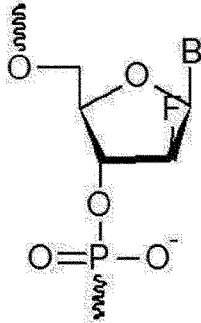
[145] [화학식 11]

[146]



[147] [화학식 12]

[148]



[149] 상기 화학식 6 내지 12에서, B는 염기(base)를 나타낸다.

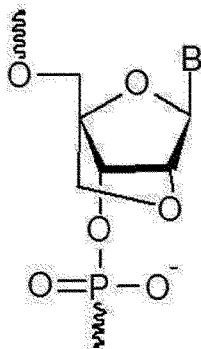
[150]

[151] 일부 구체예에서, 뉴클레오타이드 내 5 탄당의 기본구조가 변형되어 있는 경우는 이에 제한되는 것은 아니나, 뉴클레오타이드 내 5 탄당이 LNA(locked nucleic acid) 또는 PNA(peptide nucleic acid) 형태로 화학적 변형된 것을 포함할 수 있다.

[152] LNA(locked nucleic acid)는 '잠금핵산' 또는 '바이사이클릭 뉴클레오사이드(bicyclic nucleoside)' 이라고도 하며, 뉴클레오타이드 내 5 탄당의 2' 위치와 4' 위치 사이에서의 공유 브릿지를 포함하는 뉴클레오사이드를 포함하는 것을 말한다. LNA는 하기 화학식 13로 표시된다.

[153] [화학식 13]

[154]



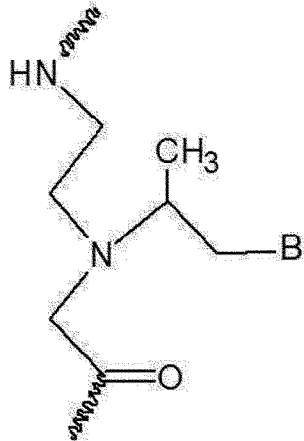
[155] 상기 화학식 13에서, B는 염기(base)를 나타낸다.

[156]

[157] PNA(peptide nucleic acid)는 '펩티드 핵산'이라고도 하며, 뉴클레오타이드의 기본 골격에서 염기(base)는 보유되며, 기본 골격의 아미드(amide-) 부분의 아자(aza-) 질소 원자에 직간접적으로 결합된다. PNA는 하기 화학식 14로 표시될 수 있다.

[158] [화학식 14]

[159]



[160] 상기 화학식 14에서, B는 염기(base)를 나타낸다.

[161]

[162] 일부 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 3' 또는 5' 말단에 링커를 통해 GalNAc(N-acetylgalactosamine)이 결합되어 있는 형태일 수 있다.

[163] 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 GalNAc은 올리고뉴클레오타이드의 말단에 연결된 링커 부분에 필요한 수만큼, 예를 들어, 1개, 2개, 또는 3개를 도입할 수 있다.

[164] GalNAc은 간세포의 아시알로글리코단백질(asialoglycoprotein) 수용체에 결합되기 때문에, 간 표적화 모이어티로서 GalNAc을 올리고뉴클레오타이드의 말단에 결합시켜 간 특이적 전달을 하고자 하는 기술들이 개발되어 있다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 간 특이적 전달이 필요하므로, 이러한 공지의 GalNAc 결합 기술을 활용하여 올리고뉴클레오타이드를 추가적으로 화학적 변형시킬 수 있다.

[165]

[166] 일부 구체예에서, 상기 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오시드간 링크지의 화학적 변형 및 슈가 모이어티의 화학적 변형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 2종 이상의 화학적 변형을 갖는 것일 수 있다.

[167] 상기 슈가 모이어티의 화학적 변형은 동일하거나 상이할 수 있다.

[168] 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드의 하나 이상의 뉴클레오타이드는 슈가 모이어티의 화학적 변형을 포함하고, 화학적 변형을 갖는 뉴클레오시드간 링크지에 의해 결합될 수 있다. 하나의 뉴클레오타이드의 화학적 변형은 동일한 올리고뉴클레오타이드 내에 존재하는 다른 뉴클레오타이드의 화학적 변형과는 무관하다.

[169] 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드의 모든 뉴클레오타이드는 슈가 모이어티의 화학적 변형을 포함할 수 있다.

[170] 일부 구체예에서, 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%가 변형된 것일 수 있다.

- [171]
- [172] 예를 들어, 2종 이상의 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는,
 [173] 뉴클레오타이드의 인산기가 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포아미데이트 또는 보라노포스페이트로 화학적 변형되고,
 [174] 추가로 뉴클레오타이드 내 5 탄당의 2' 위치의 -H기가 메톡시에틸(MOE), 디메틸아미노옥시에톡시(DMAOE), 디메틸아미노에톡시에틸(DMAEOE), 메틸(Ome), 아미노프로폭시(AP) 또는 플루오르(F)로 치환되어 변형되거나, 뉴클레오타이드의 슈가 모이어티가 F-ANA로 치환되어 변형된 것일 수 있다.
- [175] 또 다른 예에서, 2종 이상의 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는,
 [176] 뉴클레오타이드의 인산기가 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포아미데이트 또는 보라노포스페이트로 화학적 변형되고,
 [177] 추가로 슈가 모이어티가 LNA(locked nucleic acid) 또는 PNA(peptide nucleic acid) 형태로 화학적 변형된 것일 수 있다.
- [178] 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단은 1, 2, 3, 4 또는 5개의 인접한 화학적 변형을 포함할 수 있다.
- [179] 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단은 1, 2, 3, 4 또는 5개의 인접한 화학적 변형을 포함할 수 있다.
- [180] 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 5' 말단 및 3' 말단에 1, 2, 3, 4 또는 5개의 인접한 화학적 변형을 포함할 수 있다.
- [181] 예를 들어, 하기 구체예에서 볼 수 있는 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드는 전체 백본이 포스포로티오에이트(PS) 백본으로 변형되고, 올리고뉴클레오타이드의 5'과 3'의 양끝에서 각각 4개의 뉴클레오타이드를 O-Methyl로 변형시킨 PS-OMe(4,4); 또는 올리고뉴클레오타이드의 5'과 3'의 양끝에서 각각 5개의 뉴클레오타이드를 O-Methyl로 변형시킨 PS-OMe(5,5)일 수 있다.
- [182] 또 다른 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드 전체 백본은 포스포로티오에이트(PS)이고, 올리고뉴클레오타이드의 5'과 3'의 양끝에서 각각 2개의 뉴클레오타이드를 LNA로 변형시킨 PS-LNA(2,2); 올리고뉴클레오타이드의 5'과 3'의 양끝에서 각각 3개의 뉴클레오타이드를 LNA로 변형시킨 PS-LNA(3,3); 올리고뉴클레오타이드의 5'과 3'의 양끝에서 각각 4개의 뉴클레오타이드를 LNA로 변형시킨 PS-LNA(4,4); 또는 올리고뉴클레오타이드의 5'과 3'의 양끝에서 각각 5개의 뉴클레오타이드를 LNA로 변형시킨 PS-LNA(5,5)일 수 있다.
- [183] 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 1의 핵산 서열로 표현되는 올리고뉴클레오타이드 또는 이와 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [184] 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 2의 핵산 서열로 표현되는 올리고뉴클레오타이드 또는 이와 상보적인 올리고뉴클레오타이드를

- 포함한다.
- [185] 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 6의 핵산 서열로 표현되는 올리고뉴클레오타이드 또는 이와 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [186] 구체예에서는, 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 SEQ ID NO: 20 내지 57의 핵산 서열로 표현되는 올리고뉴클레오타이드를 이용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [187] 일부 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 HBV와 구아닌-사중합체(G-quadruplex)를 형성할 수 있다.
- [188] Watson-Crick 모델에 기술되어있는 이중나선 DNA는 아데닌(A)는 티민(T)과, 구아닌(G)는 시토신(C)과 수소결합을 통해 쌍을 이룬다. 그러나 Hoogsteen은 구아닌이 풍부한 자리에는 4개의 구아닌이 평면으로 수소 결합하여 하나의 콰르텟(quartet)을 이루고, quatet 3개가 수직으로 층을 이루워진 모양을 이루는데, 이를 구아닌-사중합체(G-quadruplex)로 제안하였다. 일반적으로 구아닌이 많이 위치한 유전자에서 구아닌-사중합체 구조로 나타난다고 보고되었다.
- [189] 일부 구체예로, 상기 올리고뉴클레오타이드는 HBV와 결합하여 구아닌-사중합체를 형성하여 HBV 활성을 저해함을 확인하였다(실시예 3 참고).
- [190] 상기 올리고뉴클레오타이드는 세포, 조직과 같은 개체에서 HBV의 발현을 억제하는데 사용될 수 있다.
- [191] 일부 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 개체에 투여하기 위한 조성물, 즉 의약 조성물을 제제화할 수 있다. 상기 제제는 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 부형제는 활성 약제 성분(예를 들면, 올리고뉴클레오타이드, 치료제 등)을 제외한 물질이다. 부형제는 첨가된 투여량으로는 효과를 나타내지 않는다.
- [192] 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함하는 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물이 제공된다.
- [193] 올리고뉴클레오타이드는 “항바이러스성 올리고뉴클레오타이드” 또는 “항-HBV 올리고뉴클레오타이드”로 기술될 수 있다.
- [194] 일부 구체예에서, 상기 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물은 HBV의 cccDNA(covalently closed circular DNA)를 줄임으로써 HBV 활성을 저해할 수 있다.
- [195] 따라서 "항바이러스성 올리고뉴클레오타이드"를 포함하는 의약 조성물이 제공된다.
- [196] 상기 의약 조성물은 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드들을 포함하고 생체내(in vivo)에서 항바이러스제로써의 사용을 방해하지 않는 다른 물질들을 포함할 수 있다. 이러한 다른 물질들은 제한되지 않으며 희석제, 부형제, 담체 및/또는 다른 항바이러스성 물질들을 포함할 수 있다.
- [197] 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 다양한 의약 조성물로 제제화될 수 있다.

의약 조성물은 의도된 사용에 적합한 형태로 제조될 것이다. 일반적으로, 이는 발열원(pyrogens) 뿐만 아니라 인간 또는 동물에 해로울 수 있는 다른 불순물이 없는 조성물의 제조를 필요로 할 것이다. 예시적인 전달/제제 시스템은 키토산 나노입자, 콜로이드 분산 시스템, 고분자 복합체, 나노캡슐, 나노입자, 미소구체, 비드, 및 수중유 에멀전, 미셀, 혼합 미셀, 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템을 포함한다.

- [198] 일부 구체예에서, 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 키토산 나노입자이고, 상기 키토산은 50 내지 190 kDa의 분자량을 가지는 것일 수 있다.
- [199] 조성물 또는 제제는 본 발명에 기술된 적어도 하나를 포함하는 다수의 치료적 올리고뉴클레오타이드를 사용할 수 있다. 예를 들어, 조성물 또는 제제는 본 발명에 기술된 적어도 1, 2, 또는 3개의 항바이러스성 올리고뉴클레오타이드를 사용할 수 있다.
- [200] 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 다른 치료제와 조합으로 사용될 수 있다. 조합은 또한 세포를 하나 이상의 구별된 조성물 또는 제제와 동시에 접촉시킴으로써 성취될 수 있다. 선택적으로, 조합은 연속적으로 투여될 수 있다.
- [201] 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어, 살균수와 일반적인 식염수를 포함하는, 적절한 희석액과 함께 제제화함으로써, 통상적인 피하 또는 정맥 투여를 위해 제제화된다.
- [202] 의약 조성물 및 제제는 전달 비히클을 안정하게 만들고 표적 세포에 의해 흡수될 수 있도록 적절한 염 및 완충액이 사용될 수 있다. 구체예에서, 의약 조성물은 억제제 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, 리포솜, 나노입자 또는 다른 복합체)를 포함하는 유효량의 전달 비히클이 포함되며, 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 수성 매질에서 용해되거나 또는 분산된다. "약제학적으로 허용 가능한" 또는 "약리학적으로 허용 가능한"은 동물 또는 인간에게 투여된 경우 해롭거나, 알려지이거나, 또는 다른 부반응들을 나타내지 않는 분자 또는 조성물을 말한다.
- [203] 용어 "허용 가능한 담체"는 인간에게 투여하기에 적합한 의약과 같은 의약을 제제화하는 데 사용하기에 적합한 하나 이상의 용매, 완충액, 용액, 분산매, 코팅, 항균성 및 항진균성 물질, 등장성 및 흡수 지연 물질 등을 포함한다. 의약적으로 활성인 물질들을 위한 이러한 매질 및 물질의 사용은 이 기술분야에 잘 알려져 있다. 또한 보조적인 활성 성분들이 조성물에 포함될 수 있다.
- [204] 의약 조성물의 투여 또는 전달은 표적 조직이 그 경로를 통해 이용할 수 있는 한 임의의 경로를 통할 수 있다. 예를 들어, 투여는 국소 또는 피내, 피하, 근육내, 복강내, 동맥내, 관상동맥내, 경막내 또는 정맥내 주사, 또는 표적 조직(예를 들어, 심장 조직) 내로의 직접 주사에 의할 수 있다. 본 발명에 개시된 올리고뉴클레오타이드의 안정성 및/또는 효력은 피하, 피내, 정맥내 및 근육내를 포함하는 편리한 투여 경로를 고려한다. 또한 본 발명에 기술된

올리고뉴클레오타이드를 포함하는 의약 조성물은 카테터 시스템 또는 치료 물질을 심장으로 전달하기 위해 관상 순환을 격리시키는 시스템에 의해 투여될 수 있다. 치료 물질을 심장 및 관상 맥관구조로 전달하기 위한 다양한 카테터 시스템은 이 기술분야에 알려져 있다.

- [205] 상기 올리고뉴클레오타이드 및 의약 조성물은 키트(kit), 용기(container), 팩(pack) 또는 디스펜서(dispenser)로 포함될 수 있다.
- [206] 일부 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함하는 의약 조성물은 세포, 조직 또는 개체에서 HBV 발현 억제에 유용하다. 또한 조성물 또는 제제는 비경구, 복막내, 정맥내, 경피, 설하, 근육내, 비강내 또는 피하로 투여될 수 있다. 예로써, 유리 염기 또는 약제학적으로 허용가능한 염으로써 콘주게이트(conjugate)의 용액은 물에서 히드록시프로필 셀룰로스(hydroxypropyl cellulose)와 같은 계면활성제와 적절히 혼합하여 제조될 수 있다. 또한 분산액은 글리세롤(glycerol), 액체 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol), 이들의 혼합물 및 오일에서 제조될 수 있다.
- [207] 통상의 저장 및 사용 조건 하에서 이들 제제들은 미생물의 성장을 막기 위해 일반적으로 방부제를 포함한다. 주사 용도 또는 카테터(catheter) 전달에 적합한 약학적 형태는 예를 들어, 살균 수성 용액 또는 분산액 및 살균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 살균 분말을 포함한다. 일반적으로 이들 제제는 살균되며 쉬운 주입성이 존재할 정도로 유동성이다. 제제는 제조 및 보관 조건 하에서 안정해야 하며 세균 및 균류와 같은 미생물의 오염 작용에 대비하여 보관되어야 한다. 적합한 용매 또는 분산매는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌글리콜, 및 액체 폴리에틸렌글리콜 등), 이들의 적절한 혼합물, 및 식물 오일을 포함할 수 있다. 적절한 유동성이 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등의 다양한 항균 및 항진균 물질에 의해 이루어질 수 있다. 많은 경우에서, 등장성 물질, 예를 들어, 당 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 적합할 것이다. 주사 가능한 조성물의 장기 흡수는 흡수지연제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에서 사용하여 이루어질 수 있다.
- [208] 살균 주사 용액은 적절한 양의 콘주게이트를 용매에 원하는 임의의 다른 성분(예를 들어, 상기에서 열거한 것)과 함께 혼합함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 다양한 살균 활성 성분들을 기본적인 분산매와 원하는 다른 성분들, 예를 들어 앞에서 열거한 것들을 포함하는 살균 비히클에 혼합함으로써 제조된다. 살균 주사용액 제조를 위한 살균 분말의 경우, 바람직한 제조방법은 상기 살균-여과된 용액으로부터 어떠한 추가적으로 요구되는 성분들을 더한 활성 성분(들)의 파우더를 생산하는 진공-건조 및 동결-건조 기술을 포함한다.

- [209] 제제에서, 용액들은 되도록 투약 제제에 적합한 방식 및 치료에 효과적인 양으로 투여된다. 제제는 주사 가능한 용액, 약물 방출 캡슐 등과 같은 다양한 투약 형태로 쉽게 투여될 수 있다. 수용액에서 비경구적 투여를 위해서, 예를 들어, 용액은 일반적으로 적절하게 완충되고, 액상 희석액은 먼저 예를 들어 충분한 식염수 또는 글루코스로서 등장성을 만든다. 이러한 수용액은 예를 들어, 정맥내, 근육내, 피하 및 복막내 투여에 사용될 수 있다. 바람직하게는, 특히 본 명세서의 관점에서, 이 기술분야의 통상적인 기술을 가진 자에게 이미 알려진 바대로 살균 수성 매질이 사용된다. 예로써, 단일 복용량은 1ml의 등장성 NaCl 용액에 용해되고 1000ml의 피하주액 유체(hypodermoclysis fluid)에 첨가되거나 또는 예정된 주입 부위에 주사될 수 있다(예를 들어, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, 페이지 1035-1038 및 1570-1580 참조). 치료받는 대상의 질환에 따라 용량의 일부 변화는 필연적으로 생기게 된다. 투여에 대해 책임을 지는 사람은 어떤 일이 있어도 개개의 대상을 위한 적합한 용량을 결정할 것이다. 또한, 인간 투여에 있어, 제형들은 FDA 생물학 기준 사무국에 의해 요구되는 살균성, 발열원성, 일반 안전 및 순도 기준을 만족해야만 한다.
- [210] 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드를 (예를 들어, 본 명세서에 기술된 조성물 또는 제제의 일부로서) 세포로 전달하는 방법, 및 대상에서 질환의 진행을 치료, 경감, 또는 예방하는 방법이 제공된다. 용어 "대상" 또는 "환자"는 인간 및 다른 영장류(예를 들어, 침팬지 및 다른 유인원 및 원숭이 종), 농장 동물(예를 들어, 소, 양, 돼지, 염소 및 말), 가정용 포유류(예를 들어, 개 및 고양이), 실험실 동물(예를 들어, 생쥐, 쥐 및 기니 피그와 같은 설치류) 및 새(예를 들어, 닭, 칠면조 및 가금류와 같은 가정용, 야생용 및 경기용 새, 오리, 거위 등)를 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 척추동물을 의미한다. 일부 실시태양에서, 대상은 포유류이다.
- [211] 일부 구체예에서, 포유류는 인간이다.
- [212] 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드 또는 의약 조성물은 표적 세포(예를 들어, 포유류 세포)와 *in vitro* 또는 *in vivo*로 접촉될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 간 세포일 수 있다.
- [213]
- [214] 또한, B형 간염 바이러스(HBV)와 후보 물질을 접촉시키고, 상기 HBV와 후보 물질이 구아닌-사중합체(G-quadruplex)를 형성하는지 확인하는 단계를 포함하는 B형 간염 치료제의 스크리닝 방법이 제공된다.
- [215] 상기 스크리닝 방법에서 HBV와 후보 물질이 구아닌-사중합체를 형성하는 경우 상기 후보 물질이 B형 간염에 치료 효과가 있다고 판단할 수 있다.
- [216] 구체예에서, HBV와 후보 물질이 구아닌-사중합체를 형성하는지 확인하는 방법은 EMSA(Electrophoretic mobility shift assay), 원편광 이색성(circular dichroism, CD), 핵자기공명(nuclear magnetic resonance, NMR), 또는 구아닌-사중합체 특이 항체를 이용한 방법을 통해 확인할 수 있으나, DNA와

단백질 간의 결합 여부를 확인할 수 있는 방법이라면 특별히 제한되는 것은 아니다.

- [217] 상기 후보 물질은 구아닌(G)을 4개 이상 포함하는 것일 수 있다. 상기 후보 물질이 구아닌을 4개 이상 포함함으로써, 구아닌 4개 결합을 기본으로 하여 4 가닥의 헬릭스가 하나의 구조를 이루는 구아닌-사중합체를 형성할 수 있다.
- [218] 상기 구아닌-사중합체는 HBV의 인핸서 II 부위와 후보 물질이 결합하여 형성되는 것일 수 있다. 상기 인핸서 II는 SEQ ID NO: 19의 핵산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [219] 하기 실시예에서는, SEQ ID NO: 2의 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드가 HBV의 인핸서 II 영역과 물리적으로 결합하여 부분적으로 구아닌-사중합체를 형성하는 것을 확인함으로써, HBV 인핸서 활성을 저해함을 확인하였다.
- [220] 일부 구체예에서, 상기 후보 물질은 SEQ ID NO: 1, 2 또는 6의 핵산 서열 또는 이의 상보적인 핵산 서열로 표현되는 올리고뉴클레오타이드거나, 상기 올리고뉴클레오타이드 상에 적어도 하나의 화학적 변형(chemical modification)을 갖는 올리고뉴클레오타이드거나, 상기 올리고뉴클레오타이드를 모두 포함하는 것일 수 있다.
- [221] 상기 올리고뉴클레오타이드는 앞서 기술한 모든 내용을 그대로 적용시킬 수 있다.
- [222] 일부 구체예에서, 상기 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물을 경구 또는 비경구로 개체에 투여되는 것을 포함하는 B형 간염의 치료 또는 예방 방법이 제공된다.
- [223] 임상적 사용을 위해, 올리고뉴클레오타이드는 원하는 치료 결과를 달성하는데 효과적인 임의의 적합한 투여 경로를 통해 단독으로 투여되거나 의약 조성물로 제형화될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드의 투여 "경로"는 경장, 비경구 및 국소 투여 또는 흡입을 의미할 것이다. 올리고뉴클레오타이드의 경장 투여 경로는 구강, 위장, 창자, 및 직장을 포함한다. 비경구 경로는 정맥내, 복강내, 근육내, 척추강내, 피하, 국소 주입, 질, 국소, 비강, 점막 및 폐 투여를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드의 국소 투여 경로는 표피, 구강 및 귀, 눈 및 코 내로의 올리고뉴클레오타이드의 외부 적용을 나타낸다.
- [224] 용어 "예방"이란, 의약 조성물을 개체에 투여하여, 염증질환 또는 면역질환을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [225] 용어 "치료"란, 의약 조성물을 B형 간염의 발생이 의심되는 개체에 투여하여 간염 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [226] 용어 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [227] 본 발명은 제한적인 것으로 해석되지 않아야 하는 다음 추가예에 의해 추가로 설명된다. 통상의 기술자는, 본 발명의 관점에서, 본 발명의 취지와 범위를

벗어나지 않고 개시된 특정 실시태양에 대한 여러 변화가 가능할 수 있고 동등한 또는 유사한 결과를 얻을 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[228] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[229]

[230] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[231]

[232] 실시예 1: 재료 및 방법

[233] **1-1: 세포배양 및 감염(transfection)**

[234] 인간 간암 세포주(HepG2 및 Huh7 세포)는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 제공 받았다. hNTCP[NM_003049.3]의 NCBI 번호를 갖는 homo sapiens solute carrier family 10(sodium/bile acid cotransporter) 또는 member 1(SLC10A1)을 발현 가능한 플라스미드는 HepG2-hNTCP 세포주를 확립하기 위해 제조자의 지시에 따라 Lipofectamin 2000(Invitrogen)을 이용해 HepG2 세포에 감염(transfection)시켰다. 세포주는 DMEM에서 배양하였다. DMEM에는 10%(v/v)의 FBS(Gibco BRL)를 넣었고 1% 페니실린과 1% 스트렙토마이신을 첨가하여 사용했다. HepG2 및 Huh7 세포를 5% CO₂가 발생하는 인큐베이터에서 37°C 온도로 배양하였다. Primary human hepatocytes(PHHs)는 가톨릭대학교 병원(의정부, 경기도, 한국)의 환자 조직으로부터 IRB 승인을 받아서 분리하여 사용하였다. primary maintenance medium(Gibco BRL, Oregon, USA)에 CM4000(Thermo, Rockford, USA)을 넣고 1% 페니실린과 1% 스트렙토마이신을 첨가하여 PHH를 배양하였다. 감염(Transfection)은 가이드라인에 따라 Lipofectamin 2000을 사용해 80% 정도 세포가 배양되었을 때 수행하였다. 감염 후 15시간이 경과되었을 때, 세포들은 새 배지로 바꾸어주었다. 세포는 감염 후 2~3일차에 수확하였다.

[235]

[236] **1-2. HBV 감염 연구**

[237] 접종 가능한 HBV를 모으기 위해서, 대략 100배로 농축된 HepAD38 cell의 배양 상층액을 6% PEG8000과 함께 침전시켰다. 25% FBS를 포함하는 PBS에 HBV 입자들을 준비했다. 감염성이 있는 HBV stock을 -80°C에서 보관했다. HBV 정량은 점블랏 검정(dot blot assay)을 통해 계산했다. HBV 감염을 위해서, 4% PEG와 2.5% DMSO를 포함하는 PMM과 함께 HepG2-NTCP 세포와 PHH 세포를 사용하였다. 감염 15시간 이후, fresh PMM으로 배지를 교체해주었다. Infection 7일 후에 감염된 세포를 수확하였다.

[238]

[239] **1-3. 써던 블랏(Southern blot)**

[240] 써던 블랏(Southern blot)으로 viral DNA를 검출하였다. 간략하게는, 감염 3일 후에 scrapping으로 세포 펠렛을 수확하였다. 그리고 수확된 세포들을 차가운 HEPES(10mM HEPES pH7.5, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% NP-40) buffer 100ul로 녹인 후, 26% PEG8000 buffer로 용해물에 있는 HBV 코어 캡시드(HBV core capsid)들을 침전시켰다. 이후에 HBV 코어 캡시드를 0.5% SDS buffer(with 250mg Proteinase K)로 37°C에서 3시간 동안 분해시켰다. HBV DNA를 페놀-클로로포름(phenol-chloroform)으로 추출하고 NaOAc와 에탄올(ethanol)로 침전시켰다. 총 DNA를 0.8% 아가로스 겔에서 90V로 3시간 동안 전기영동을 통해 분리시키고 XL nitrocellulose membrane(GE healthcare)로 transfer시켰다. 그 후 HBV DNA를 highly pure randomized HBV probe로 검출하고, Phospho-imager를 사용해 상대적인 HBV DNA 복제 수준을 정량화하였다.

[241]

[242] **1-4. 노던 블랏(Northern blot)**

[243] 노던 블랏(Northern blot)으로 HBV mRNA들을 검출하였다. 간략하게는, 제조사의 프로토콜에 따라 TRIzol reagent(Invitrogen)을 사용해서 Total cell RNA들을 추출했다. 20ul의 total RNA들을 1% 포르말데하이드(formaldehyde) 아가로스 겔에서 120V로 3시간 동안 전기영동을 통해 분리시키고 XL nitrocellulose membrane(GE healthcare)로 16~18시간 동안 transfer시켰다. HBV-specific mRNA들을 검출하기 위해서, membrane을 highly pure randomly primed HBV probe와 함께 혼성화(hybridization)시켰으며, Phospho-imager를 사용해 상대적인 HBV DNA 복제 수준을 정량화하였다.

[244]

[245] **1-5: 웨스턴 블랏(Western blot)**

[246] 감염 2일 후 세포를 수확하여 RIPA buffer [20mM Tris/HCl, 1% NP-40, 0.5% protease inhibitor cocktail(Sigma, St.Luis, MO), 150mM NaCl, 2mM KCl, pH7.4]에 30분간 4°C에서 용해시켰다. 단백질 용해물들은 SDS-PAGE 방법으로 분리하였다. SDS-PAGE 이후 polyacrylamide gel의 단백질을 PVDF membrane으로 옮겼다. 항체(Antibody)는 1:2000의 비율로 사용하였다. 1차 항체(1st antibody)는 anti-actin(Sigma), HBsAg(Abcam) HBcAg(DAKO, USA)를 사용하였다.

[247]

[248] **1-6: 실시간(real-time) PCR을 이용한 rcDNA 및 cccDNA 정량 분석**

[249] HBV rcDNA를 정량하기 위해 HBV가 감염된 PHH에서 QIAamp DNA Mini kit (Qiagen)를 사용하여 전체 cellular DNA를 추출하였다. cccDNA를 증폭하기 전에, DNA를 T5 econuclease(NEB) 처리해 주었다. Real-time PCR은 DNA가 20ng이 포함된 Light Cyclar(roche) 20ul, 0.5umol/L의 정방향, 역방향 프라이머, 0.2umol/L의 3'-fluorescein(FL)가 표지된 프로브, 그리고 0.4umol/L의

5'-Red640(R640)이 표지된 프로브를 사용하였다. cccDNA의 증폭을 위한 정방향과 역방향 프라이머는 각각 5'-CTCCCCGTCTGTGCCTTCT-3' (SEQ ID NO: 10) 및 5'-GCCCCAAAGCCACCCAAG-3'(SEQ ID NO: 11)의 구조이고, 간내의 rcDNA의 증폭은 5'-CTCGTGGTGGACTTCTCTC-3'(SEQ ID NO: 12) 및 5'-CTGCAGGATGAAGAGGAA-3'(SEQ ID NO: 13)을 각각 사용하였다. FRET 혼성화 프로브는 cccDNA의 증폭을 위해 5'-GTTACGGTGGTCTCCATGCAACGT-FL-3'(SEQ ID NO: 14) 5'-R640-AGGTGAAGCGAAGTGCACACGGACC-3'(SEQ ID NO: 15), rcDNA의 증폭을 위해 5'-CACTCACCAACCTCCTGTCCTCCAA-FL-3'(SEQ ID NO: 16) 및 5'-R640 TGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCT-3'(SEQ ID NO: 17)을 각각 사용하였다. HBV DNA의 총량의 증폭은 기술한 바와 같이 수행 하였다: 95°C에 10분 처리한 다음에 95°C 10초, 58°C 10초, 72°C 15초를 45회 반복하였다. cccDNA의 증폭은 다음 기술한 바와 같이 수행하였다: 95°C에 10분 처리한 다음에 95°C 10초, 58°C 5초, 72°C 20초를 45회 반복하였다. 노멀라이징하기 위해 베타-글로빈 유전자를 LightCycler b-Globin control kit(Roche)를 이용하여 증폭시켰다. HBV 모노머(pHBVEcoRI)가 포함된 플라스미드를 단계적 희석한 것을 정량 표준으로 삼았다.

[250]

[251] **1-7:** 루시퍼라아제 리포터(luciferase reporter) 분석

[252] HBV 인핸서 활성을 확인하기 위해 인핸서 루시퍼라아제 리포터 어세이를 실시하였다. 12-well plate에 2×10^5 개의 HepG2 세포주를 준비하고, 0.5ug의 Enhancer-Luc(pEnhI.II, pEnhI.ΔII, pEnhIXp, pXp.EnhII, pNRE.EnhII, pEnhII/cp, pEnhIΔXp-D2, pEnhIXp-D6, pEnhIΔXp-D7, and pEnhIXp-D8: 도 5 및 도 6 참고), 그리고 50nM의 D2를 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 48시간 이후에, 세포를 수확하여 promega lysis buffer에 용해하고, 그 후 enhancer luciferase activity를 Luciferase reagent(Promega, Madison, WI)를 사용하여 측정하였다.

[253] [표1]

명칭	서열번호(SEQ ID NO)	서열(5'-3')
인헨서 I(957-1354)	18	aaattgctgtaaatagac ctattgattg gaaagtatgt caaagaattg tgggtctttt gggttttctgcccctttta cacaatgtgg ctatcctgct ttgatgcctt tatatgcatg tatacaatctaagcaggctt tcactttctc gccaaacttac aaggcctttc tgtgtaaaca atatctgcacctttaccceg ttgcccgga acggtcaggt ctctgccaaag tgtttctga cgcaacccccactggatggg gcttgccat tgccatcgg cgcattcgtg gaacctttgt ggctcctctgccgatccata ccgcggaact cctagcggct tgtttctc gcagccggtc tggagcgaaactatcggga ctgacaactc ttttctct
인헨서 II(1591-1802)	19	cgct tcacctctgc acgtcgcattg gagaccaccgtgaacgcca ccaggtcttg cccaaggtct tacataagag gactcttga ctctcagcaatgtcaacgac cgaccttgag gcatactca aagactgttt gtttaagac tgggaggagttgggggagga gattaggta aaggtctttg tattaggagg ctgtaggcat aaattggt

[254]

[255] **1-8:** 올리고뉴클레오타이드 제작

[256] **1-8-1:** 변형되지 않은 올리고뉴클레오타이드 제작

[257] 도 1은 HBV의 게놈 분석을 통하여 구아닌-사중합체(G-quadruplex) 등 특이 구조를 이루어 항바이러스 효과를 낼 수 있는 서열 스크리닝 모식도를 나타낸 것이다.

[258] 본 발명에 사용한 올리고 화합물 D1 내지 D9는 cosmogenetech(Seoul, Korea) 또는 Bio Basic(Canada)에서 합성하였다. 각각의 자세한 설명은 아래 표 2에 기술하였다.

[259] [표2]

명칭	서열번호(S EQ ID NO)	서열	결합부위
D1	1	AAGCCTCCAAGCTGTGCCT TGGGTGGCT	ε structure (1866-1894); upper stream
D2	2	TGCTGGGGGGAATTGA	core gene (2079-2094)
D3	3	TGCTGGGTGGAATTGA	core gene (2079-2094), D2 mutant
D4	4	ACTAGACACTATTTAA	SPI (2736-2751)
D5	5	CGTTGATGCCTTTGTA	Pol. gene (1049-1064)
D6	6	TTCTAGGGGGAACTAC	(276-291)
D7	7	GATGTGGTATTGGGGG	(745-760)
D8	8	AGGAGTTGGGGGAGGA	(1735-1750)
D9	9	CATAAGGTGGGGAACT	(2466-2481)

[260] D1-D9는 변형되지 않은 올리고뉴클레오타이드이다. 이 중 D2를 PS(Phosphorothioate), OMe(O-Methyl), PNA(Peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), PS-OMe, 그리고 PS-LNA로 변형하여 사용하였다.

[261] PS로 변형된 올리고뉴클레오타이드는 세포 내로 투과가 용이하고 엑소뉴클레아제(exonuclease)에 의한 분해를 막을 수 있다. OMe 변형은 RNA와 유사한 성격을 지니나, 세포 내에서 뉴클레아제(nuclease)와 가수분해에 대하여 안정성이 증가되는 특징이 있다. 또한 2중 구조에서의 Tm이 1-4°C 정도 증가된다. PNA는 인위적으로 만들어진 폴리머로써, DNA 또는 RNA와 유사한 구조를 지니며 골격은 펩타이드 결합에 의해 N-(2-aminoethyl)-glycine이 반복적으로 연결되어 있다. LNA로 변형된 올리고뉴클레오타이드는 2' 산소와 4' 탄소가 연결되어 잠겨있는 구조로, 혼성화 시 Tm이 증가하고 분해로부터 안정적인 특징이 있다. 부분적으로 변형된 D2는 5' 말단과 3' 말단 서열에 부분적으로 변형을 시켰다. 예로, PS-LNA(4,4)는 전체 백분은 PS이고 5'과 3'의 양끝에서 각각 4개의 뉴클레오타이드를 LNA로 변형시킨 것을 의미한다. 이와 같이 부분적으로 변형시켜 제작된 D2로는 PS-OMe(4,4), PS-OMe(5,5), PS-LNA(2,2) PS-LNA(3,3)(SEQ ID NO: 76) PS-LNA(4,4)(SEQ ID NO: 77), PS-LNA(5,5) 등이 있다.

[262]

[263] **1-8-2: 변형된 올리고뉴클레오타이드 제작**

[264] 항바이러스 효과의 최적화를 위해 상기 1-8-1.의 D2를 이용하여 다양한 형태의 올리고뉴클레오타이드를 다음과 같은 명명법을 이용하여 제작하였다: DNA는

대문자 A, G, C, T로 명명하고, RNA는 a, g, c, t로 명명하였다. 뉴클레오타이드 내 5탄당의 2' 위치가 O-methyl로 변형시킨 경우 핵산 앞에 m을 붙이고, LNA로 변형시킨 경우 핵산 앞에 l를 붙였다. DNA 백본(backbone)의 경우 포스포로티오에이트(phosphorothioate, PS)로 되어 있으면 중괄호([])로 표기하였다. 일반 DNA는 중괄호가 없는 형태이다. 상기 명명법에 대해 표 3에 나타내었다.

[265] 상기 명명법 규칙에 따라 총 58개의 올리고뉴클레오타이드를 합성하였으며, 표 4 및 5에 나타내었다. 본 발명에서, 하기 표 4 및 5에 나타난 올리고뉴클레오타이드는 순서대로 SEQ ID NO: 20 내지 SEQ ID NO: 77로 나타내었으며, 하기 표 4 및 5에서 핵산서열에 부여된 번호는 올리고 변형#(Oligo modification#)를 의미한다.

[266] [표3]

2'-ribo		2'-deoxy		2'-O-Methyl		LNA	
Adenosine	a	Adenosine	A	Adenosine	m(A or a)	Adenosine	l(A or a)
Guanosine	g	Guanosine	G	Guanosine	m(G or g)	Guanosine	l(G or g)
Cytidine	c	Cytidine	C	Cytidine	m(C or c)	Cytidine	l(C or c)
Uridine	u	Thymidine	T	Uridine	mu	Uridine	lu
Phosphorothioate	[]			Thymidine	mT	Thymidine	lT

[267] [표4]

1	[mT	mG	mC	mT	mG	IG	IG	mG	mG	mG	mA	mA	mT	mT	mG	mA]
2	[mT	mG	mC	mT	IG	IG	IG	IG	mG	mG	mA	mA	mT	mT	mG	mA]
3	[mT	mG	mC	mT	IG	IG	IG	IG	IG	IG	mA	mA	mT	mT	mG	mA]
4	[mT	mG	mC	IT	IG	IG	IG	IG	IG	IG	IA	mA	mT	mT	mG	mA]
5	[mT	mG	mC	IT	IG	IG	IG	IG	IG	IG	IA	IA	IT	mT	mG	mA]
6	[mT	mG	IC	IT	IG	IG	IG	IG	IG	IG	IA	IA	IT	IT	mG	mA]
7	[IT	IG	mC	mT	mG	mG	mG	mG	mG	mG	mA	mA	IT	IT	IG	IA]
8	[IT	IG	IC	mT	mG	mG	mG	mG	mG	mG	mA	IA	IT	IT	IG	IA]
9	[IT	IG	IC	IT	mG	mG	mG	mG	mG	mG	IA	IA	IT	IT	IG	IA]
10	[IT	IG	IC	IT	IG	mG	mG	mG	mG	IG	IA	IA	IT	IT	IG	IA]
11	[IT	IG	IC	IT	IG	IG	mG	mG	IG	IG	IA	IA	IT	IT	IG	IA]
12	[T	G	C	T	G	G	IG	IG	G	G	A	A	T	T	G	A]
13	[T	G	C	T	G	IG	IG	IG	IG	G	A	A	T	T	G	A]
14	[T	G	C	T	IG	IG	IG	IG	IG	IG	A	A	T	T	G	A]
15	[T	G	C	IT	IG	IG	IG	IG	IG	IG	IA	A	T	T	G	A]
16	[T	G	C	IT	IG	IG	IG	IG	IG	IG	IA	IA	IT	T	G	A]
17	[T	G	IC	IT	IG	IG	IG	IG	IG	IG	IA	IA	IT	IT	G	A]
18	[IT	IG	C	T	G	G	G	G	G	G	A	A	IT	IT	IG	IA]
19	[IT	IG	IC	T	G	G	G	G	G	G	A	IA	IT	IT	IG	IA]
20	[IT	IG	IC	IT	G	G	G	G	G	G	IA	IA	IT	IT	IG	IA]
21	[IT	IG	IC	IT	IG	G	G	G	G	IG	IA	IA	IT	IT	IG	IA]
22	[IT	IG	IC	IT	IG	IG	G	G	IG	IG	IA	IA	IT	IT	IG	IA]
23	[IT	mG	IC	mT	IG	mG	IG	mG	IG	mG	IA	mA	IT	mT	IG	mA]
24	[mT	IG	mC	IT	mG	IG	mG	IG	mG	IG	mA	IA	mT	IT	mG	IA]
25	[IT	G	IC	T	IG	G	IG	G	IG	G	IA	A	IT	T	IG	A]
26	[T	IG	C	IT	G	IG	G	IG	G	IG	A	IA	T	IT	G	IA]
27	[mT	mG	mC	mT	mG	mG	mG	mG	mG	mG	IA	IA	IT	IT	IG	IA]
28	[IT	IG	IC	IT	IG	IG	IG	IG	IG	IG	mA	mA	mT	mT	mG	mA]
29	[T	G	C	T	G	G	G	G	G	G	IA	IA	IT	IT	IG	IA]
30	[IT	IG	IC	IT	IG	IG	IG	IG	IG	IG	A	A	T	T	G	A]

[268] [표5]

31	[mT	mG	mC	mT	mG	mG	mG	mG	mG	mG	A	A	T	T	G	A]
32	[T	G	C	T	G	G	G	G	G	G	mA	mA	mT	mT	mG	mA]
33	[mT	mG	mC	mT	IG	IG	IG	IG	IG	IG	A	A	T	T	G	A]
34	[mT	mG	mC	mT	G	G	G	G	G	G	IA	IA	IT	IT	IG	IA]
35	[T	G	C	T	IG	IG	IG	IG	IG	IG	mA	mA	mT	mT	mG	mA]
36	[T	G	C	T	mG	mG	mG	mG	mG	mG	IA	IA	IT	IT	IG	IA]
37	[IT	IG	IC	IT	mG	mG	mG	mG	mG	mG	A	A	T	T	G	A]
38	[IT	IG	IC	IT	G	G	G	G	G	G	mA	mA	mT	mT	mG	mA]
39	[IT	IG	IC	IT	IG	IG	IG	IG	IG	IG	IA	IA	IT	IT	IG	IA]
40	[T	IG	IC	IT	IG	IG	IG	IG	IG	IG	IA	IA	IT	IT	IG	IA]
41	[mT	mG	mC	mT]	IG	IG	IG	IG	IG	IG	[mA	mA	mT	mT	mG	mA]
42	[IT	IG	IC	IT]	mG	mG	mG	mG	mG	mG	[IA	IA	IT	IT	IG	IA]
43	[T	G	C	T]	IG	IG	IG	IG	IG	IG	[A	A	T	T	G	A]
44	[IT	IG	IC	IT]	G	G	G	G	G	G	[IA	IA	IT	IT	IG	IA]
45	[mT	mG	mC	mT]	IG	IG	IG	IG	IG	IG	[A	A	T	T	G	A]
46	[mT	mG	mC	mT]	G	G	G	G	G	G	[IA	IA	IT	IT	IG	IA]
47	[T	G	C	T]	IG	IG	IG	IG	IG	IG	[mA	mA	mT	mT	mG	mA]
48	[T	G	C	T]	mG	mG	mG	mG	mG	mG	[IA	IA	IT	IT	IG	IA]
49	[IT	IG	IC	IT]	mG	mG	mG	mG	mG	mG	[A	A	T	T	G	A]
50	[IT	IG	IC	IT]	G	G	G	G	G	G	[mA	mA	mT	mT	mG	mA]
51	T	G	C	T	[IG	IG	IG	IG	IG	IG]	A	A	T	T	G	A
52	[mu	mG	mC	mu	IG	IG	IG	IG	IG	IG	mA	mA	mu	mu	mG	mA]
53	[u	G	C	u	G	G	IG	IG	G	G	A	A	u	u	G	A]
54	[lu	mG	IC	mu	IG	mG	IG	mG	IG	mG	IA	mA	lu	mu	IG	IA]
55	[lu	IG	IC	lu	IG	IG	IG	IG	IG	IG	IA	IA	lu	lu	IG	IA]
56	[mu	mG	mC	mu]	IG	IG	IG	IG	IG	IG	[A	A	u	u	G	A]
(3,3)	[IT	IG	IC]	T	G	G	G	G	G	G	A	A	T	[IT	IG	IA]
(4,4)	[IT	IG	IC	IT]	G	G	G	G	G	G	A	A	[IT	IT	IG	IA]

[269]

[270] 1-9: EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

[271] HBV 인핸서 DNA는 30ng을 사용하였고 [32P]-gamma 동위원소를 사용하여 라벨링하였다. D2는 500ng을 G-quadruplex 형성하는데 사용하였다. DNA를 (D2, pEnhIΔXp, pEnhIΔXp-D2, 및 enhancer I.II) 버퍼용액 (10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1M KCl, 1mM DTT, and 10mM MgCl₂)과 섞고 열을 가해 준 후 식혀서 DNA가 접히게 하였다. DNA 혼합물에 반응시킨 후, BG4 antibody(Absolute antibody, United Kingdom)를 첨가해 DNA-protein 결합을 통해 특이적인 G-quadruplex DNA를 확인 하였다. 상온에서 결합 반응 후, DNA-DNA complex는 6% polyacrylamide gel을 이용하여 차가운 온도에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후, 젤은 70°C의 온도에서 30분간 건조시켰다. 결과는 phospho-imager를 사용하여 분석하였다.

[272]

[273] 1-10: 마우스에 유체역학적 주입(hydrodynamic injection)을 이용한 실험

[274] 6주령의 쥐(BALB/C)에 plasmid DNA(HBV 1.2 25ug, D2 25ug 및 b-gal 5ug)를 hydrodynamic injection 방법을 이용해 전달하였다. 쥐 몸무게의 10%에 해당하는

부피를 PBS로 준비하였고, 마우스 꼬리 정맥에 주사하였다. 변형된 D2(50ug)들도 마우스 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. DNA를 포함한 PBS는 주사기를 이용해 4-6초간 빠른 속도를 통해 정맥에 주사하였다. 모든 동물실험은 건국대학교 Animal Care Committee에 의해 승인 받았다.

[275]

[276] **1-11: 세포에 구아닌-사중합체를 현미경으로 분석하는 방법**

[277] 6웰 플레이트에 커버 글라스를 바닥에 깔아두고 세포를 배양하였다. 상기 세포에 HBV를 감염시키고 변형된 D2 500nM를 처리하였다. 아세톤으로 세포를 고정시킨 후 PBS로 3번 세척하였다. 3% BSA를 포함한 PBS를 사용해 blocking을 진행하였다. PBS로 3번 세척 후 BG4 (absolute antibody, Ab00174-1.1) 항체를 1:300 비율로 섞어서 cold room에 오버나잇으로 반응시켰다. PBS로 3번 세척 후 mouse alexa 568을 이용해 1시간동안 6웰 플레이트에 커버 글라스를 바닥에 깔아두고 세포를 배양하였다. 상기 세포에 HBV를 감염시키고 변형된 D2 500nM를 처리하였다. 아세톤으로 세포를 고정시킨 후 PBS로 3번 세척하였다. 3% BSA를 포함한 PBS를 사용해 blocking을 진행하였다. PBS로 3번 세척한 후 BG4 (absolute antibody, Ab00174-1.1) 항체를 1:300 비율로 섞어서 cold room에 오버나잇으로 반응시켰다. PBS로 3번 세척한 후 mouse alexa 568을 이용해 1시간동안 반응시켰다. PBS로 3번 세척한 후 DAPI를 30분간 사용해 핵을 염색시켰다. PBS로 3번 세척한 후 커버 글라스를 유리 슬라이드에 마운팅 시킨 후 건조시켰다.

[278]

[279] **1-12: 키토산 나노입자를 이용한 In vivo 실험**

[280] 6주령의 쥐(BALB/C)에 plasmid DNA(HBV 1.2 25ug and b-gal 5ug)를 hydrodynamic injection 방법을 이용해 전달하였다. 쥐 몸무게의 10%에 해당하는 부피를 PBS로 준비하였고, 마우스 꼬리 정맥에 주사하였다. DNA를 포함한 PBS는 주사기를 이용해 4-6초간 빠른 속도를 통해 정맥에 주사하였다. 다음날 키토산 나노입자 D2 8ug도 마우스 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 키토산 나노입자는 낮은 세포독성과 면역원성뿐 아니라 효율적인 생체적합성 분자로 siRNA와 같은 올리고뉴클레오타이드를 효율적으로 전달할 수 있는 특징이 있다(Targeted Gene Silencing Using RGD-Labeled Chitosan Nanoparticles, Hee Dong Han, Clin Cancer Res. 2010).

[281]

상기의 실험을 위해 사용된 키토산 나노입자는 키토산(MW 50-190KDa)과 D2의 이온적인 겔화(gelation)를 기반으로 제조하였다. TPP(0.25% w/v)와 D2(1 µg/µL)를 1%(w/v) 키토산 솔루션에 첨가하였다. 실온에서 연속적인 반응이 일어났으며, 인큐베이션 반응이 끝난 후 4°C에서 40분간 13,000RPM으로 원심분리하여 펠렛을 수득하였다. 수득된 펠렛은 DW로 3번에 걸쳐 세척하였고 사용하기까지 4°C에서 보관하였다. 모든 동물실험은 건국대학교 Animal Care Committee에 의해 승인 받았다.

[282]

[283] 실시예 2: 항바이러스 효과 확인

[284] **2-1: 항바이러스 효과를 나타내는 올리고뉴클레오타이드 확인**

[285] D1 내지 D9의 올리고뉴클레오타이드를 HBV와 같이 간암 세포주에 감염시킨 후, 항바이러스 효과를 바이러스의 단백질(HBsAg 및 HBeAg) 생성 저해 및 복제 저해로 판단하였다.

[286] 구체적으로, HBV 1.2 플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드(D1 내지 D9, 각각 서열번호 1 내지 9)는 HepG2에 감염시켰다. 감염시킨 후 3일 동안 세포와 상등액을 배양하였다. HBV 단백질 발현을 결정하기 위해, 분비된 HBeAg 및 HBsAg를 측정하였다. 배양 배지의 HBeAg 및 HBsAg는 HBeAg 및 HBsAg ELSIA 키트(Wantai Pharm Inc., Beijing, China)를 사용하여 분석하였다. HBV DNA는 써던 블랏으로 측정하였다.

[287] 그 결과, 도 2에 나타난 것과 같이 D1, D2 및 D6가 항바이러스 효과를 보였다.

[288]

[289] **2-2: HBV RNA 발현 저해**

[290] 상기 실시예 2-1에서 확인하였듯이, D2 올리고뉴클레오타이드의 항바이러스 효능이 D1, D2 및 D6 올리고뉴클레오타이드 중에서 가장 우수한 D2 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 HBV RNA 발현 저해 실험을 수행하였다. 구체적으로, D2 올리고뉴클레오타이드에 의해 어떤 단계의 HBV 라이프 사이클이 저해되는지 확인하기 위해, Huh7 세포들에 HBV 1.2 mer를 감염시킨 후 HBV mRNA 레벨을 노던 블랏으로 분석하였다.

[291] 그 결과, 도 3에 나타난 것과 같이 D2 올리고뉴클레오타이드는 용량 의존적 방법으로 HBV RNAs를 억제시키는 것을 확인하였다. 따라서 D2 올리고뉴클레오타이드가 HBV RNA 발현 또한 저해함을 확인함으로써 D2 올리고뉴클레오타이드가 바이러스의 RNA 전사단계에 작용하여 저해함을 확인하였다.

[292]

[293] **2-3: HBV 단백질 발현 저해 확인**

[294] D2 올리고뉴클레오타이드의 HBV 단백질 발현을 저해하는지 확인하기 위해, Huh7 세포들에 HBV 1.2mer와 D2 올리고뉴클레오타이드를 감염시킨 후에 웨스턴 블랏 분석으로 표면 단백질 발현 레벨을 측정하였다.

[295] 그 결과, 도 4에 나타난 것과 같이 D2 올리고뉴클레오타이드가 HBV의 단백질 중 하나인 표면 단백질들의 발현을 농도 의존적으로 저해하는 것을 확인하였다.

[296]

[297] **2-4: HBV의 인핸서/프로모터(enhancer/promoter) 활성 저해**

[298] D2 올리고뉴클레오타이드가 HBV mRNA 레벨을 어떻게 감소시키는지 알아보기 위해, HBV 인핸서를 이용하여 루시퍼라아제 리포터 분석을 수행하였다.

- [299] 그 결과, 도 5(a) 및 (b)에 나타난 것과 같이 D2 올리고뉴클레오타이드 감염에 의해 HBV 인핸서 I, II 활성은 약 80%가 저해됨을 확인하였다. 이러한 사실을 통해 D2 올리고뉴클레오타이드는 인핸서 I 및 II 활성을 모두 억제함을 확인하였다. 그러나 인핸서 I(EnhI), pEnhIΔXp의 상위 부위에서는 효과가 나타나지 않았다. D2 올리고뉴클레오타이드 감염에 의해 HBV 인핸서 II(EnhII)는 약 48% 저해되는 것을 확인하였다. 이러한 사실을 통해 HBV 인핸서 II의 1742 G 풍부 부위(1742부터 1747까지의 영역)가 D2 올리고뉴클레오타이드에 의한 인핸서 활성 억제에 중요한 것임을 확인하였다.
- [300] 결과적으로 도 5의 결과를 통해, D2 올리고뉴클레오타이드가 인핸서 I과 II의 활성을 줄임으로써 전사단계에서 항바이러스 효과를 낸다는 사실을 확인하였다.
- [301]
- [302] D2 올리고뉴클레오타이드가 어떻게 HBV 인핸서 활성을 감소시키는지 알아보기 위해, 앞서 언급한 리포터 플라스미드를 제작한 후에 리포터 활성을 측정하였다. 도 6(a)와 같이, 표 2의 D2, D6, D7 및 D8-염기 G가 풍부한 HBV 모티프가 리포터 플라스미드 프로모터 영역에 도입되었다.
- [303] 그 결과, 도 6(b)에 나타난 것과 같이, pEnhIΔXp 루시퍼라아제 클론은 아무 효과가 없었으나, D2 또는 D6 모티프를 포함한 pEnhIΔXp 루시퍼라아제 클론은 루시퍼라아제 활성을 강하게 저해하는 것을 확인하였다.
- [304] 따라서 D2 올리고뉴클레오타이드가 인핸서 I(EnhI) 앞부분인 pEnhIΔXp reporter에는 전혀 작용을 하지 못하지만, 여기에 자신과 동일한 염기서열을 넣어서 만들면 강력하게 저해 효과를 발휘하는 것을 확인하였고, D2 올리고뉴클레오타이드와 유사한 염기서열을 가진 D6 올리고뉴클레오타이드를 넣은 리포터도 저해하는 것을 확인하였다. 이는 D2 올리고뉴클레오타이드가 자신의 염기서열을 인지하여 저해 작용함을 나타내는 결과이다.
- [305]
- [306] **실시예3: G-quadruplex 구조 형성**
- [307] **3-1: D2 올리고뉴클레오타이드가 HBV 인핸서 I, II 부위를 인지하여 구아닌-사중합체(G-quadruplex) 형성**
- [308] D2 올리고뉴클레오타이드가 인핸서 I, II 서열과 구아닌-사중합체를 형성하는지 확인하기 위해, D2 올리고뉴클레오타이드 및 P32-표지 HBV 인핸서 서열을 이용하여, in vitro EMSA(electrophoretic mobility shift assay)를 수행하였다(도 7(a)).
- [309] 그 결과, EMSA를 통해 D2 올리고뉴클레오타이드가 인핸서 I, II 서열과 부분적으로 구아닌-사중합체를 형성함을 확인하였다. 도 7(b)에 나타난 것과 같이, 구아닌-사중합체의 형성은 구아닌-사중합체 특이적 BG4 항체를 사용하여 밴드 수퍼 시프트를 통해 확인하였다. 이는 포스포이미징(phosphorimaging)으로 겔을 시각화한 결과이다. 즉 도 7을 통해,

D2 올리고뉴클레오타이드가 HBV 인핸서 부위와 물리적으로 결합하여 구아닌-사중합체를 형성함으로써 HBV 인핸서 활성을 저해함을 확인하였다.

[310]

[311] **3-2: D2** 올리고뉴클레오타이드가 HBV 인핸서 II 영역과 구아닌-사중합체 형성

[312] D2 올리고뉴클레오타이드가 인핸서 II 영역과 구아닌-사중합체를 형성하는지 확인하기 위해, D2 및 HBV를 이용하여 *in vitro* EMSA를 수행하였다.

[313] 그 결과, EMSA를 통해 D2 올리고뉴클레오타이드가 인핸서 II 서열과 부분적으로 구아닌-사중합체를 형성함을 확인하였다. 구아닌-사중합체의 형성은 구아닌-사중합체 특이적 BG4 항체를 사용하여 밴드 수퍼 시프트를 통해 확인하였다. 도 8을 통해, D2 올리고뉴클레오타이드가 HBV 인핸서 II 영역을 통해서 구아닌-사중합체 구조를 형성함을 확인하였다.

[314]

[315] **3-3: D2** 올리고뉴클레오타이드가 자신의 염기서열을 가진 부위와 완전한 G-quadruplex 구조 형성

[316] D2 올리고뉴클레오타이드가 자신의 서열을 통해 HBV 게놈과 완전한 구아닌-사중합체를 형성하는지 확인하기 위해, *in vitro* EMSA를 수행하였다.

[317] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 EMSA를 통해 D2 올리고뉴클레오타이드가 자신의 서열을 통해 HBV 게놈과 완전한 구아닌-사중합체를 형성함을 확인하였다. 구아닌-사중합체의 형성은 구아닌-사중합체 특이적 BG4 항체를 사용하여 밴드 수퍼 시프트를 통해 확인하였고, 겔은 포스포이미징으로 시각화하였다.

[318] 도 9에 의하면 D2 올리고뉴클레오타이드가 인핸서 I 부위(EnhI Δ Xp)와는 결합하지 않지만, 여기에 자신의 염기서열을 넣은 것(EnhI Δ Xp-D2)과는 완전한 구아닌-사중합체 구조를 형성하였다. 이는 D2 올리고뉴클레오타이드가 자신의 염기서열을 인지하여 구아닌-사중합체 구조를 형성하고 이것이 바이러스의 저해와 관련 있음을 의미한다.

[319]

[320] **3-4: D2** 올리고뉴클레오타이드의 염기서열에서 점돌연변이를 도입한 D3 올리고뉴클레오타이드는 구아닌-사중합체 구조를 형성하지 못함

[321] 도 10에 나타난 바와 같이, *In vitro* EMSA를 통해 D2 올리고뉴클레오타이드의 염기서열에서 점돌연변이를 도입한 D3 올리고뉴클레오타이드는 구아닌-사중합체 구조를 형성하지 못함을 확인하였다. 구체적으로, D2 올리고뉴클레오타이드 서열의 중간 부위의 보전적인 GGGGGG를 GGGTGG로 점 돌연변이시킨 D3 올리고뉴클레오타이드는, HBV 게놈과 구아닌-사중합체를 형성하지 못했다. 이 결과를 통해, D2 올리고뉴클레오타이드의 G-풍부 부위가 구아닌-사중합체 형성에 매우 중요함을 알 수 있다.

[322] 또한 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, D3 올리고뉴클레오타이드는 전혀 바이러스 저해작용을 나타내지 못하는데, 도 10에 나타난 EMSA 결과인 D3

올리고뉴클레오타이드의 구아닌-사중합체 구조 미형성 결과와 함께 보면, 구아닌-사중합체 구조의 형성이 항바이러스 작용의 필요 조건임을 알 수 있다.

[323]

[324] 실시예 4: HBV 활성 저해

[325] **4-1: 변형된 D2** 올리고뉴클레오타이드가 세포를 투과하여 HBV 인핸서 활성을 저해함

[326] HBV 인핸서 I.II 플라스미드를 HepG2 세포들로 감염시켰다. 감염 전에, 다수의 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드(PS, OPMe, PNA, LNA PS-OMe, PS-LNA)를 HepG2 세포(500nM 최종 농도)로 전처리하였다. 그 다음날, 세포들을 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드 500nM을 포함하는 새로운 배지(DMEM)로 바꾸어주었다. 감염 후 24시간 동안 세포를 배양하였고, Steady Glo-Luciferase system을 이용하여 루시페라아제 활성을 분석하였다.

[327] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 PS 변형에 따라 세포 투과와 HBV 저해 활성이 우수함을 확인하였다. 상기 결과에 따르면, PS(phosphorothioate) 또는 LNA(locked nucleic acids)로 올리고뉴클레오타이드의 백본 골격을 변형시키는 것은 올리고뉴클레오타이드의 투과성을 향상시키고, 결과적으로 그 올리고뉴클레오타이드의 항바이러스 효과를 증가시킨다.

[328]

[329] **4-2: 변형된 D2** 올리고뉴클레오타이드가 HBV 감염 모델에서 HBV를 저해함

[330] HBV 감염 모델에서도 D2 올리고뉴클레오타이드가 저해 효과를 나타내는지 보기 위해 HBV 감염이 가능한 세포주인 HepG2-NTCP 세포주에 HBV를 감염시킨 후, PS로 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드(PS, PS-OMe, PS-LNA)를 처리하여 진행하였다. 구체적으로, 도 12(a)의 HepG2-NTCP 세포의 HBV 감염과 바이럴 단백질 분석 과정을 모식도에 나타난 것과 같이 실험과정은 다음과 같다: HepG2-NTCP 세포는, 2% DMSO와 4% PEG8000를 함유한 PMM(PHH maintain media, Gibco)에서 16~20시간 동안 배양된 2000 HBV genome equivalent per cell(Geq/cell)로 감염시켰다. 그 다음, 세포는 PBS 500ul로 세 번 세척하고, PMM(2% DMSO)에 유지시켰으며, 감염 후 7일 동안 배양시켰다. HBV 단백질 발현을 분석하기 위해, 분비된 HBeAg 및 HBsAg를 측정하였다. 배양 배지 내의 HBeAg 및 HBsAg는 HBeAg 및 HBsAg ELISA 키트(Wantai Pharm Inc, Beijing, China)를 이용하여 분석하였다. D2 올리고뉴클레오타이드의 감염(transfection)(D1, T.F)를 항-HBV 효과의 양성 대조군으로 사용하였다. 변형되지 않은 D2 올리고뉴클레오타이드 처리(D2 Tr)은 음성 대조군으로 사용하였다. LMV는 lamivudine이다.

[331] HBV 단백질 발현 분석결과, 도 12(b) 및(c)에 나타난 바와 같이 PS로 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드(PS, PS-OMe, PS-LNA)가 HBV 감염이 가능한 세포주인 HepG2-NTCP에서도 HBV를 저해함을 확인하여, 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드를 처리하였을 때 항바이러스 효과를 확인하였다.

[332]

[333] **4-3: 변형된 D2** 올리고뉴클레오타이드가 PHH (primary human hepatocyte)에서 HBV를 저해함

[334] PS로 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드가 PHH(primary human hepatocyte)에서 HBV를 저해함을 확인하기 위해, 간 수술 후 남은 사람의 간 조직으로부터 PHH를 분리 후 여기에 HBV를 감염시킨 후 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드의 항바이러스 효과를 조사하였다. 구체적으로, 도 13(a)의 PHHs의 HBV 감염과 바이럴 단백질 분석 과정을 모식도에 나타난 것과 같이 실험과정은 다음과 같다: PHHs는 2% DMSO 와 4% PEG8000를 함유한 PMM (PHH maintain media, Gibco)에서 16~20시간 동안 배양된 5000 HBV genome equivalent per cell(Geq/cell)로 감염시켰다. 그 다음, 세포는 PBS 500ul로 세 번 세척하고, PMM(2% DMSO)에 유지시켰으며, 감염 후 7일 동안 배양시켰다. HBV 단백질 발현을 분석하기 위해, 분비된 HBeAg 및 HBsAg를 측정하였다. 배양 배지 내의 HBeAg 및 HBsAg는 HBeAg 및 HBsAg ELISA 키트(Wantai Pharm Inc, Beijing, China)를 이용하여 분석하였다. 변형되지 않은 D2는 음성 대조군으로 사용하였다. LMV는 lamivudine이다.

[335] HBV 단백질 발현 분석 결과, 도 13에 나타난 바와 같이 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드는 항바이러스 효과가 우수하였고, 특히 PS-LNA로 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드가 90% 이상 바이러스를 저해하는 결과를 보임으로써 가장 강력한 저해 효과를 나타내었다. 이러한 결과를 통해, 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드를 인간 세포에 처리하였을 때도 항바이러스 효과가 나타남을 확인하였다.

[336]

[337] **4-4: D2** 올리고뉴클레오타이드의 분석

[338] 가장 최적의 효과를 나타내는 변형 형태를 찾기 위해 D2 올리고뉴클레오타이드의 말단을 3개씩 (3,3), 4개씩 (4,4), 또는 5개씩 (5,5)을 변형하였다. 분석을 위해, HBV 인핸서 LII 구조체를 HepG2 세포로 감염시켰다. 감염 전에, 다수의 변형된 D2(PS, PS-Ome(4,4), PS-Ome(5,5), PS-Ome(all), PS-LNA(2,2), PS-LNA(3,3), PS-LNA(4,4), PS-LNA(5,5), PS-LNA(all))를 HepG2 세포(500nM 최종 농도)로 전처리하였다. 그 다음 날, 세포들을 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드 500nM을 포함하는 새로운 배지(DMEM)로 바꾸어주었다. 감염 2일 후에, luciferase assay system(Promega; madison, WI)을 이용하여 프로토콜에 따라 HBV 인핸서 루시퍼라아제 활성을 분석하였다.

[339] 그 결과 도 14에 나타난 것과 같이, 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드들은 우수한 항바이러스 효과를 나타내었다. 그 중, 5' 말단과 3' 말단이 모두 4개의 LNA로 변형된 PS-LNA(4,4)가 가장 강력한 항바이러스 효과를 보여주었다.

[340]

[341] **4-5: HepG2** 세포에서 변형된 올리고뉴클레오타이드의 항바이러스 효과 확인

- [342] 1-8-2에서 제작한 올리고뉴클레오타이드를 HepG2 세포에 HBV와 함께 삽입하였다. 58개의 올리고뉴클레오타이드는 50nM의 농도로 사용하였고, HBV 1ug과 함께 2ml의 media에 넣어서 감염시켰다. 그 다음날, media를 새로운 배지(DMEM)으로 바꾸어 준 후, 72시간동안 세포를 배양하였다. 이후 배양 배지 내의 HBeAg 및 HBsAg를 HBeAg 및 HBsAg ELISA 키트(Wantai Pharm Inc., Beijing, China)를 이용하여 분석하였다. HBeAg에 대한 결과를 도 15에, HBsAg에 대한 결과를 도 16에 나타내었다.
- [343] 그 결과, 도 15에 나타난 것과 같이, 다수의 올리고뉴클레오타이드가 HBeAg를 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 HepG2 세포의 HBeAg을 효과적으로 줄인 물질은 9, 17, 18, 20, 21, 34, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 50, 51, 54, 55, (3,3), (4,4)로 나타났다.
- [344] 또한, 도 16에서는 다수의 올리고뉴클레오타이드가 HBsAg를 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 HepG2 세포의 HBsAg을 효과적으로 줄인 물질은 9, 10, 18, 20, 21, 24, 28, 34, 37, 40, 41, 44, 48, (3,3)로 나타났다.
- [345]
- [346] **4-6: HepG2-NTCP 세포에서의 변형된 올리고뉴클레오타이드 효과 확인**
- [347] 1-8-2에서 제작한 올리고뉴클레오타이드의 HBV 감염 모델에서의 효과를 확인하기 위해, 감염이 가능한 HepG2-NTCP 세포를 이용하였다. 구체적으로, HBV를 2% DMSO와 4% PEG8000를 함유한 PMM(PHH maintain media, Gibco)에서 16~20시간동안 배양된 2000 HBV genome equivalent per cell(Geq/cell)로 감염시켰다. 그 다음, 세포는 PBS 500ul로 세 번 세척하고, PMM(2% DMSO)에 유지시킨 후, 7일동안 배양하였다. 감염 후 3일 뒤부터 58개의 변형된 올리고뉴클레오타이드를 매일 처리하였다. 이때 처리 농도는 500nM이다. 감염 후 7일차가 되었을 때 분비된 HBeAg 및 HBsAg를 측정하여 HBV 단백질 발현을 분석하였다. 배양 배지 내 HBeAg 및 HBsAg는 HBeAg 및 HBsAg ELISA 키트를 이용하여 분석하였다. HBeAg에 대한 결과를 도 17에, HBsAg에 대한 결과를 도 18에 나타내었다.
- [348] 그 결과, 도 17에서 보는 것과 같이, 다수의 올리고뉴클레오타이드가 HBeAg을 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 HepG2-NTCP 세포의 HBeAg를 효과적으로 줄인 물질은 8, 17, 18, 19, 20, 21, 27, 40, 44, 47, 55, (3,3), (4,4)로 나타났다. 또한, 도 18에서와 같이, HBsAg 역시 다수 올리고뉴클레오타이드에 의해 저해되는 것을 확인할 수 있었다. HepG2-NTCP 세포의 HBsAg를 효과적으로 줄인 물질은 7, 8, 9, 18, 19, 20, 40, 42, 44, 45, (3,3), (4,4)로 나타났다.
- [349]
- [350] **4-7: PHH(Primary human hepatocyte) 세포에서의 변형된 올리고뉴클레오타이드 효과 확인**
- [351] 1-8-2에서 제작한 올리고뉴클레오타이드가 PHH(Primary human hepatocyte)에서도 HBV를 저해할 수 있는지 확인하기 위해, 간 수술 후 남은 간

조직으로부터 PHH를 분리하여 HBV를 감염시키고, 58개의 변형된 올리고뉴클레오타이드의 항바이러스 효과를 확인하였다. 구체적으로, PHHs의 HBV 감염과 바이럴 단백질 분석 과정은 다음과 같다: HBV를 2% DMSO와 4% PEG8000를 함유한 PMM(PHH maintain media, Gibco)에서 16~20시간동안 배양된 2000 HBV genome equivalent per cell(Geq/cell)로 감염시켰다. 그 다음 HepG2-NTCP 세포와 마찬가지로 PHHs는 PBS 500ul로 세 번 세척하고, PMM(2% DMSO)에 유지시킨 후 11일 동안 배양하였다. 감염 후 5일 뒤부터 58개의 변형된 올리고뉴클레오타이드를 매일 처리하였고, 이때 처리농도는 500nM으로 하였다. 감염 후 11일차가 되었을 때, HBV 단백질 발현을 분석하기 위해 배양 배지 내 HBeAg 및 HBsAg를 측정하였다. HBeAg에 대한 결과를 도 19에, HBsAg에 대한 결과를 도 20에 나타내었다.

[352] 그 결과, 도 19에서 보는 것과 같이, 다수의 올리고뉴클레오타이드가 HBeAg을 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 PHH 세포의 HBeAg를 효과적으로 줄인 물질은 7, 8, 18, 19, 20, 52, (3,3), (4,4)로 나타났다. 또한, 도 20에서와 같이, HBsAg 역시 다수 올리고뉴클레오타이드에 의해 저해되는 것을 확인할 수 있었다. PHH 세포의 HBsAg를 효과적으로 줄인 물질은 6, 7, 8, 15, 16, 18, 19, 42, (3,3), (4,4)로 나타났다.

[353]

[354] HBV 단백질 발현 분석 결과, 각각의 결과에 나타난 것과 같이, 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드의 항바이러스 효과가 우수하였으며, 특히 다양한 형태의 gap mer 중 PS-LNA로 부분 변형된 D2가 가장 강력한 저해 효과를 보이는 것을 확인하였다. 특히 (3,3) 또는 (4,4)와 같이 G가 연속적으로 있는 부분이 변형되지 않은 경우에 HBeAg 및 HBsAg 저해 효과가 우수하였다. 이는 올리고뉴클레오타이드 합성에 필요한 단가를 낮출 수 있으며, 부분 또는 완전히 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드를 인간 세포에 처리하였을 때 항바이러스 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

[355]

[356] 실시예 5: in vivo 모델

[357] **5-1: D2** 올리고뉴클레오타이드가 마우스 in vivo 모델에서 HBV를 저해함

[358] D2 올리고뉴클레오타이드가 in vivo에서도 작용하는지를 보기 위해서 HBV 마우스 모델을 사용하여 실험하였다. 실험은 도 21(a)에 따라 수행하였다. 6주령 수컷 마우스들을 각 그룹으로 이용하였다. PBS를 대조군으로 주사하였다(Mock). hydrodynamic injection 방법으로 주사된(HI) DNA는 다음과 같다: 25ug HBV 1.2mer, 25ug의 공벡터(empty vector) 또는 D2 올리고뉴클레오타이드, 그리고 5ug의 b-gal. b-gal은 주사 대조군으로 사용하였다. 마우스들을 희생시켜서 혈액 샘플을 얻었다. 마우스 혈청은 PBS로 희석시켰다(HBeAg의 경우 1:50 및 HBsAg의 경우 1:2000). 바이럴 단백질(HBeAg 및 HBsAg)은 ELISA 키트로 측정하였다.

- [359] 그 결과 도 21(b) 및 (c)에 나타난 것과 같이, D2 올리고뉴클레오타이드를 주사한 마우스에서 강력한 항바이러스 효과를 나타내었다. 또한 도 21(d)에 나타난 것과 같이, 썬던 블랏을 이용하여 D2 올리고뉴클레오타이드를 주사한 마우스에서 HBV DNA가 매우 크게 줄어들어있음을 확인하였다.
- [360]
- [361] **5-2: 변형된 D2** 올리고뉴클레오타이드를 마우스 in vivo 모델에 정맥주사하였을 때 HBV를 저해함
- [362] 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드를 주사하였을 때 in vivo에서도 작용하는지를 알아보기 위해 HBV 마우스 모델을 사용하여 실험하였다. in vivo 실험은 도 22(a)에 따라 수행하였다. 6주령 수컷 마우스들을 각 그룹으로 이용하였다. HBV만 주사한 것을 대조군으로 하였다. 25ug의 HBV 1.2mer 및 5ug의 b-gal 플라스미드가 hydrodynamic injection 방법으로 주사되었다. 그 다음 50ug의 변형된 DNA(PS, PS-OMe 및 PS-LNA)를 3일 동안 정맥주사하였다. 주사 4일 후 마우스들을 희생시켜서 혈액 샘플을 얻었다. b-gal은 주사 대조군으로 사용하였다. 마우스 혈청은 PBS로 희석시켰다(HBeAg의 경우 1:50 및 HBsAg의 경우 1:2000). 바이럴 단백질(HBeAg 및 HBsAg)은 ELISA 키트로 측정하였다.
- [363] 그 결과 도 22(b) 및(c)에 나타난 것과 같이, 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드를 주사한 마우스에서 항바이러스 효과를 나타내었다. 도 22(d)에 나타난 것과 같이, 썬던 블랏으로 확인하였을 때 HBV DNA 수준에서도 항바이러스 효과가 나타내었다. 이는 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드를 주사하였을 때 마우스의 간에 전달되어 바이러스 저해작용을 나타냄을 확인한 결과이다.
- [364]
- [365] **5-3: 나노입자(키토산)으로 D2** 올리고뉴클레오타이드를 감싸준 후 마우스 in vivo 모델에 정맥주사하였을 때 HBV를 저해함
- [366] 나노입자(키토산)로 D2 올리고뉴클레오타이드를 감싸준 후 주사하였을 때 in vivo에서도 작용하는지를 알아보기 위해 HBV 마우스 모델을 사용하여 실험하였다. 나노입자를 이용해 D2 올리고뉴클레오타이드를 감싸주게 되면 효율적으로 간에 전달된다. 도 23(a)에 따라 in vivo 실험을 수행하였다. 6주령 수컷 마우스들을 각 그룹으로 이용하였다. 25ug의 HBV 1.2mer 및 5ug의 b-gal 플라스미드가 hydrodynamic injection 방법으로 주사되었다. 그 다음 8ug의 나노입자 D2를 HBV에 감염시킨 뒤 1회 정맥주사하였다. 주사 4일 후 마우스들을 희생시켜서 혈액 샘플을 얻었다. b-gal은 주사 대조군으로 사용하였다. 마우스 혈청은 PBS로 희석시켰다(HBeAg의 경우 1:50 및 HBsAg의 경우 1:2000). 바이럴 단백질(HBeAg 및 HBsAg)은 ELISA 키트로 측정하였다.
- [367]
- [368] 그 결과 도 23(b) 및 (c)에 나타난 것과 같이, 나노입자 D2를 주사한 마우스에서 항바이러스 효과를 나타내었다. 이때 첫번째 막대는 mock, 두번째 막대는 HBV, 세번째 막대는 HBV와 키토산 나노입자 D2, 네번째 막대는 HBV와 키토산

나노입자 D4를 의미한다. 키토산 나노입자 D4는 HBV를 전혀 저해하지 못하는 음성 대조군으로 사용하였다. 도 23(d)에 나타난 것과 같이, 썬던 블랏으로 확인하였을 때 HBV DNA 수준에서도 항바이러스 효과가 나타났다. 이는 키토산 나노입자 D2를 주사하였을 때 마우스의 간에 전달되어 매우 강력하게 바이러스 활성을 저해한 것임을 확인하였다.

[369]

[370] 실시예 6: PHH(primary human hepatocyte)에서의 HBV cccDNA 저해

[371] **6-1: 변형된 D2가 처음부터 처리되어 HBV를 저해함**[372] D2 올리고뉴클레오타이드가 PHH에서 HBV cccDNA를 제거하는지를 보기 위해서 PHH에 HBV를 감염시켜 실험하였다. 본 실험은 HBV 감염 후 다음날부터 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드를 처리하였고, 이 방법은 도 24(a)는 PHH에 HBV를 감염시키는 절차에 대하여 모식화하였다. 이때, IFN- α 는 양성 대조군으로 사용하였고, 변형되지 않은 일반 D2 올리고뉴클레오타이드를 처리하였을 경우는 HBV를 전혀 저해하지 못하므로 음성 대조군으로 사용하였다. 도 24(d)와 (E)는 real time PCR을 이용하여 정량적으로 수행하였다.

[373]

그 결과, 도 24(b)와 (c)에서는 PS-LNA(3,3), PS-LNA(4,4), PS-LNA(all)로 부분 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드를 처리하였을 경우 HBeAg과 HBsAg이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 도 24(d)에서 나타나듯이 HBV rcDNA가 PS-LNA(3,3), PS-LNA(4,4), PS-LNA(all)로 부분 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드에서 효율적으로 감소함을 나타내었다. 중요한 결과로 HBV를 궁극적으로 치료하기 위해서는 cccDNA를 제거해야 하는데, 도 24(e)에서 나타난 것과 같이 HBV cccDNA가 PS-LNA(3,3), PS-LNA(4,4), PS-LNA(all)로 부분 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드가 처리되었을 때 감소됨을 알 수 있었다.

[374]

[375] **6-2: 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드가 cccDNA가 충분히 생성된 경우도 HBV를 저해함**[376] HBV 감염 후 5일동안 충분한 재감염 조건에서도 D2 올리고뉴클레오타이드가 PHH에서 HBV cccDNA를 제거하는지를 보기 위해서 실험을 수행하였다. 본 실험은 HBV 감염 후 5일 후부터 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드(PS-LNA(all) 0.5 μ M, PS-LNA(all) 1 μ M)를 처리하였고, 이 방법은 도 25(a)는 PHH에 HBV를 감염시키는 절차에 대하여 모식화하였다. 이때 IFN- α 는 HBeAg, HBsAg, rcDNA, cccDNA를 감소시키는 양성 대조군으로 사용하였고, 변형되지 않은 일반 D2 올리고뉴클레오타이드를 처리하였을 경우는 HBV를 전혀 저해하지 못하므로 음성 대조군으로 사용하였다.

[377]

그 결과, 도 25(b)와 (c)에서는 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드를 농도 별로 처리하였을 경우 HBeAg과 HBsAg이 감소하는 것을 알 수 있었다. 도 25(d)는 일반 PCR을 수행 후 DNA 전기영동으로 HBV DNA 및 cccDNA의 양 차이를 확인하였다. 또한 도 25(d)에서 나타나듯이 HBV rcDNA와 cccDNA가 부분

변형된 D2 올리고뉴클레오타이드에서 농도 의존적으로 감소함을 나타내었다.

[378]

[379] 실시예 7: HepG2-NTCP에서 D2 올리고뉴클레오타이드와 HBV cccDNA가 형성하는 G-quadruplex 확인

[380] PS-LNA로 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드가 HepG2-NTCP에서 HBV cccDNA를 효율적으로 인식하고 G-quadruplex를 형성하는지를 알아보기 위해서, NTCP에 HBV를 감염시키고 D2 올리고뉴클레오타이드를 처리하여 현미경을 이용해 보았다. 본 실험은 HBV 감염 후 5일차부터 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드를 처리하였고, 7일차에 세포를 고정시켰다. 이후 BG4 antibody를 이용해 G-quadruplex를 볼 수 있도록 red signal이 나오도록 슬라이드 글라스를 제작하였다.

[381] 그 결과 도 26(a)는 NTCP에서 감염되어 생성된 HBV cccDNA와 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드를 처리하였을 때, G-quadruplex를 인식하는 BG4 항체에 의해 D2 올리고뉴클레오타이드와 cccDNA가 구아닌-사중합체를 형성하는 것을 확인하였다. 또한 HBeAg level이 HBV에서는 정상적으로 발현하고, 변형된 D2를 처리하였을 경우 감소하는 결과를 확인함으로써 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드에 의한 항바이러스 효과도 같이 검정할 수 있었다. 도 26(b)에 정리된 그래프 및 도 26(a)의 하단에 정리한 BG4에 의한 foci 개수를 보았을 때 Mock의 경우는 일반적인 세포의 조건에서 약 5개의 endogenous한 형태의 구아닌-사중합체 signal이 확인되었다. 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드만 처리하였을 경우 약 6개의 signal이 확인되었다. HBV만 감염된 경우 약 7개의 signal이 확인되었다. 무엇보다도, HBV와 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드를 처리하였을 때 약 16개의 signal이 확인되었다. 이 결과는 HBV cccDNA가 변형된 D2 올리고뉴클레오타이드에 의해 구아닌-사중합체를 형성함을 나타내는 결과이다.

청구범위

- [청구항 1] SEQ ID NO: 1, 2 또는 6의 핵산 서열 또는 이의 상보적인 핵산 서열로 표현되는 올리고뉴클레오타이드; 및 상기 올리고뉴클레오타이드 상에 적어도 하나의 화학적 변형(chemical modification)을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나 이상의 뉴클레오시드간 링키지가 화학적 변형된 것인 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 뉴클레오시드간 링키지가 화학적 변형된 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 인산기가 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포아미데이트 또는 보라노포스페이트로 화학적 변형된 것인 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나 이상의 슈가 모이어티가 화학적 변형된 것인 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 슈가 모이어티는 뉴클레오타이드 내 5 탄당의 2'번 위치의 -H가 메톡시에틸(MOE), 디메틸아미노옥시에톡시(DMAOE), 디메틸아미노에톡시에틸(DMAEOE), 메틸(Ome), 아미노프로폭시(AP) 또는 플루오르(F)로 치환되어 변형되거나, 상기 슈가 모이어티가 F-ANA로 치환되어 변형된 것인 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 슈가 모이어티는 LNA(locked nucleic acid) 또는 PNA(peptide nucleic acid) 형태로 화학적 변형된 것인 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 3' 또는 5' 말단에 링커를 통해 GalNAc(N-acetylgalactosamine)이 결합되어 있는 형태인 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오시드간

링키지의 화학적 변형 및 슈가 모이어티의 화학적 변형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 2종 이상의 화학적 변형을 갖는 것인 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물.

[청구항 9] 제8항에 있어서,
2종 이상의 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 인산기가 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포아미데이트 또는 보라노포스페이트로 화학적 변형되고,
추가로 뉴클레오타이드 내 5 탄당의 2'번 위치의 -H기가 메톡시에틸(MOE), 디메틸아미노옥시에톡시(DMAOE), 디메틸아미노에톡시에틸(DMAEOE), 메틸(Ome), 아미노프로폭시(AP) 또는 플루오르(F)로 치환되어 변형되거나, 뉴클레오타이드의 슈가 모이어티가 F-ANA로 치환되어 변형된 것인 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물.

[청구항 10] 제8항에 있어서,
2종 이상의 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 인산기가 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포아미데이트 또는 보라노포스페이트로 화학적 변형되고,
추가로 슈가 모이어티가 LNA(locked nucleic acid) 또는 PNA(peptide nucleic acid) 형태로 화학적 변형된 것인 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물.

[청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 올리고뉴클레오타이드는 HBV와 구아닌-사중합체(G-quadruplex)를 형성하는 것인 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물.

[청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물은 HBV의 cccDNA(covalently closed circular DNA)를 줄이는 것인 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물.

[청구항 13] 제1항에 있어서,
상기 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물.

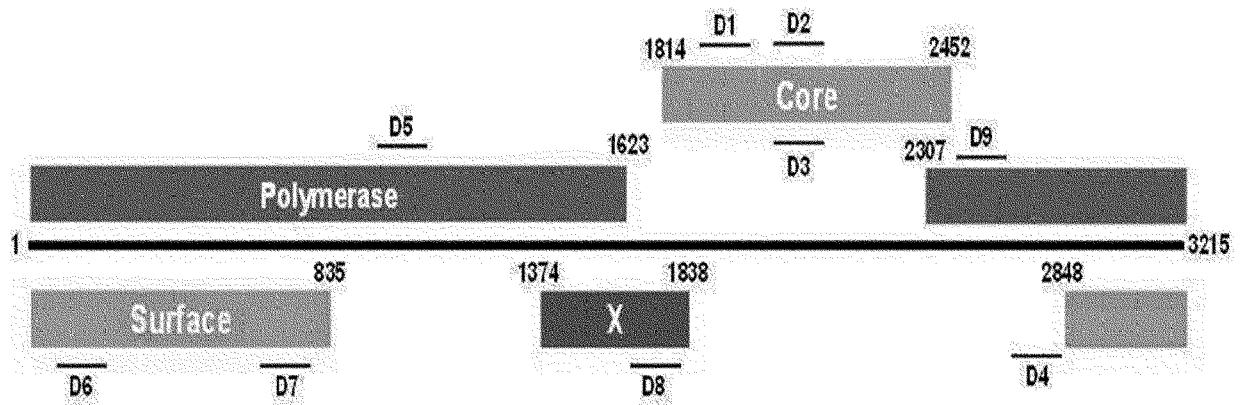
[청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 키토산 나노입자, 콜로이드 분산 시스템, 고분자 복합체, 나노캡슐, 나노입자, 미소구체, 비드, 수중유에멀전, 미셀, 혼합 미셀, 또는 리포솜을 포함하는 것인 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물.

- [청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 키토산 나노입자이고,
상기 키토산은 50 내지 190 kDa의 분자량을 가지는 것인 B형 간염의 치료
또는 예방용 의약 조성물.
- [청구항 16] 제1항에 있어서,
상기 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물은 경구 또는 비경구로
개체에 투여되는 것인 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물.
- [청구항 17] 제1항에 있어서,
상기 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물은 복막내, 정맥내, 경피,
설하, 근육내, 비강내 또는 피하로 개체에 투여되는 것인 B형 간염의 치료
또는 예방용 의약 조성물.
- [청구항 18] SEQ ID NO: 1, 2 또는 6의 핵산 서열 또는 이의 상보적인 핵산서열로
표현되는 올리고뉴클레오타이드; 및 상기 올리고뉴클레오타이드 상에
적어도 하나의 화학적 변형(chemical modification)을 갖는
올리고뉴클레오타이드;로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의
올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 B형 간염의 치료 또는
예방용 의약 조성물의 유효량을 개체에 투여하는 것을 포함하는 B형
간염의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나 이상의
뉴클레오시드간 링크지가 화학적 변형된 것인 B형 간염의 치료 또는
예방 방법.
- [청구항 20] 제19항에 있어서,
상기 뉴클레오시드간 링크지가 화학적 변형된 올리고뉴클레오타이드는
뉴클레오타이드의 인산기가 포스포로티오에이트,
포스포로디티오에이트, 포스포아미데이트 또는 보라노포스페이트로
화학적 변형된 것인 B형 간염의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 21] 제18항에 있어서,
상기 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나 이상의
슈가 모이어티가 화학적 변형된 것인 B형 간염의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 22] 제21항에 있어서,
상기 슈가 모이어티는 뉴클레오타이드 내 5 탄당의 2'번 위치의 -H기가
메톡시에틸(MOE), 디메틸아미노옥시에톡시(DMAOE),
디메틸아미노에톡시에틸(DMAEOE), 메틸(Ome), 아미노프로폭시(AP)
또는 플루오르(F)로 치환되어 변형되거나,
상기 슈가 모이어티가 F-ANA로 치환되어 변형된 것인 B형 간염의 치료
또는 예방 방법.
- [청구항 23] 제21항에 있어서,

- 상기 슈가 모이어티는 LNA(locked nucleic acid) 또는 PNA(peptide nucleic acid) 형태로 화학적 변형된 것인 B형 간염의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 24] 제18항에 있어서,
상기 올리고뉴클레오타이드는 3' 또는 5' 말단에 링커를 통해 GalNAc(N-acetylgalactosamine)이 결합되어 있는 형태인 B형 간염의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 25] 제18항에 있어서,
상기 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오시드간 링커지의 화학적 변형 및 슈가 모이어티의 화학적 변형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 2종 이상의 화학적 변형을 갖는 것인 B형 간염의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 26] 제25항에 있어서,
2종 이상의 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 인산기가 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포아미데이트 또는 보라노포스페이트로 화학적 변형되고,
추가로 뉴클레오타이드 내 5 탄당의 2'번 위치의 -H기가 메톡시에틸(MOE), 디메틸아미노옥시에톡시(DMAOE), 디메틸아미노에톡시에틸(DMAEOE), 메틸(Ome), 아미노프로폭시(AP) 또는 플루오르(F)로 치환되어 변형되거나, 뉴클레오타이드의 슈가 모이어티가 F-ANA로 치환되어 변형된 것인 B형 간염의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 27] 제25항에 있어서,
2종 이상의 화학적 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 인산기가 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포아미데이트 또는 보라노포스페이트로 화학적 변형되고,
추가로 슈가 모이어티가 LNA(locked nucleic acid) 또는 PNA(peptide nucleic acid) 형태로 화학적 변형된 것인 B형 간염의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 28] 제18항에 있어서,
상기 올리고뉴클레오타이드는 HBV와 구아닌-사중합체(G-quadruplex)를 형성하는 것인 HBV의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 29] 제18항에 있어서,
상기 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물은 HBV의 cccDNA(covalently closed circular DNA)를 줄이는 것인 B형 간염의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 30] 제18항에 있어서,
상기 B형 간염의 치료 또는 예방용 의약 조성물은 약제학적으로

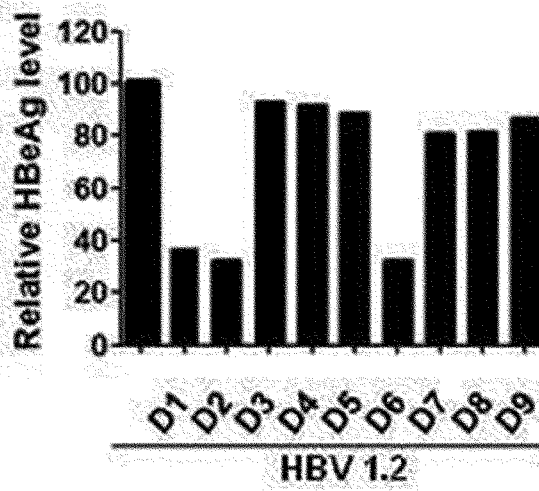
- 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인 B형 간염의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 31] 제30항에 있어서,
상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 키토산 나노입자, 콜로이드 분산 시스템, 고분자 복합체, 나노캡슐, 나노입자, 미소구체, 비드, 수중유에멀전, 미셀, 혼합 미셀, 또는 리포솜을 포함하는 것인 B형 간염의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 32] 제31항에 있어서,
상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 키토산 나노입자이고,
상기 키토산은 50 내지 190 kDa의 분자량을 가지는 것인 B형 간염의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 33] 제18항에 있어서,
상기 B형 간염 치료 또는 예방용 의약 조성물은 경구 또는 비경구로 개체에 투여되는 것인 B형 간염의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 34] 제18항에 있어서,
상기 B형 간염 치료 또는 예방용 의약 조성물은 복막내, 정맥내, 경피, 설하, 근육내, 비강내 또는 피하로 개체에 투여되는 것인 B형 간염의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 35] B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus, HBV)와 후보 물질을 접촉시키고,
상기 HBV와 후보 물질이 구아닌-사중합체(G-quadruplex)를 형성하는지 확인하는 단계를 포함하는, B형 간염 치료제의 스크리닝 방법.
- [청구항 36] 제35항에 있어서,
HBV와 후보 물질이 구아닌-사중합체를 형성하는 경우 B형 간염 치료제로 선정하는 단계를 추가로 포함하는 B형 간염 치료제의 스크리닝 방법.
- [청구항 37] 제35항에 있어서,
구아닌-사중합체를 형성하는지 확인하는 단계는 EMSA(Electrophoretic mobility shift assay), 원편광 이색성(circular dichroism, CD), 핵자기공명(nuclear magnetic resonance, NMR), 및 구아닌-사중합체 특이 항체를 이용한 방법으로 이루어진 군에서 선택된 방법에 의해 확인하는 것인 B형 간염 치료제의 스크리닝 방법.
- [청구항 38] 제35항에 있어서,
후보 물질은 구아닌(G)을 4개 이상 포함하는 것인 B형 간염 치료제의 스크리닝 방법.
- [청구항 39] 제35항에 있어서,
구아닌-사중합체는 HBV의 SEQ ID NO: 19의 핵산 서열을 갖는 인핸서 II(enhancer II) 부위와 후보 물질이 결합하여 형성되는 것인 B형 간염 치료제의 스크리닝 방법.

[도1]

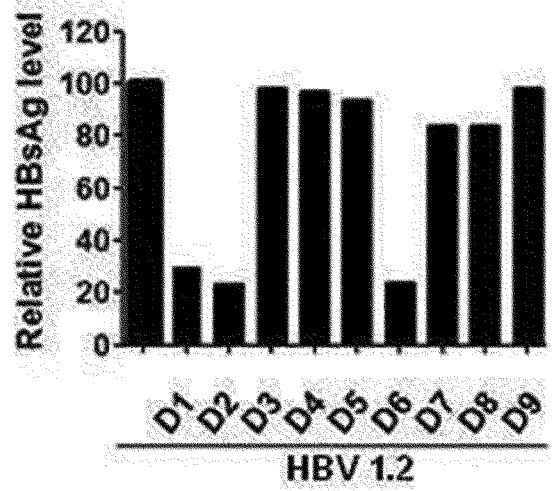


[도2]

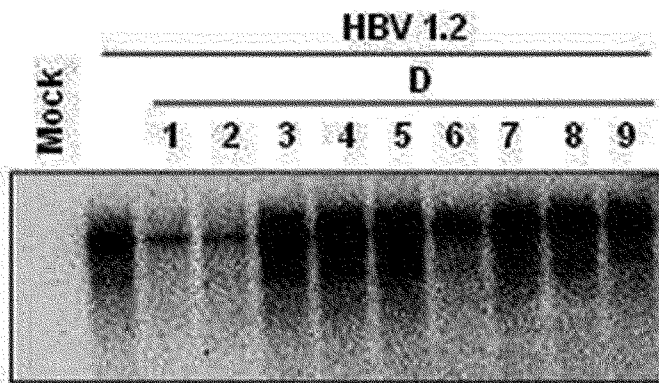
(a)



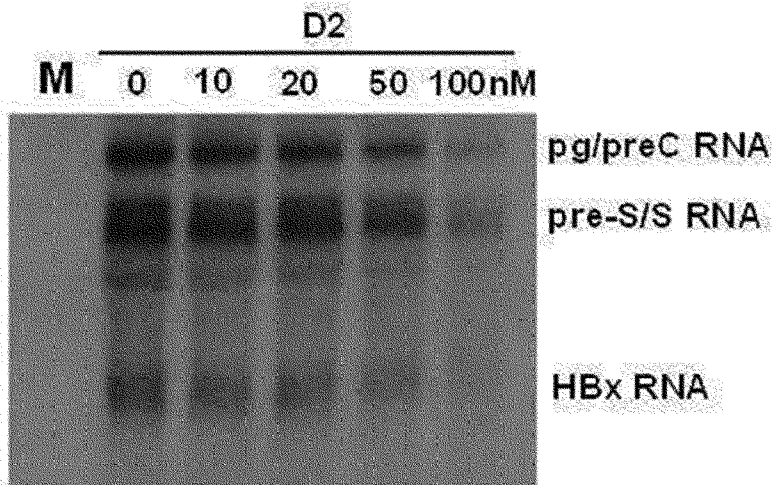
(b)



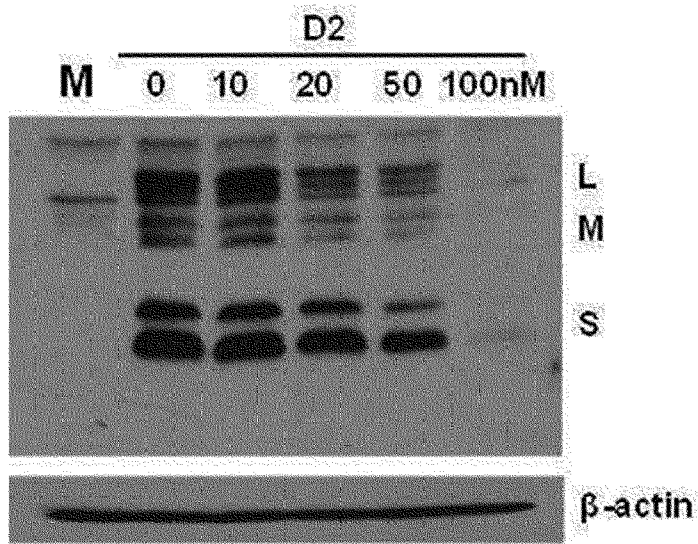
(c)



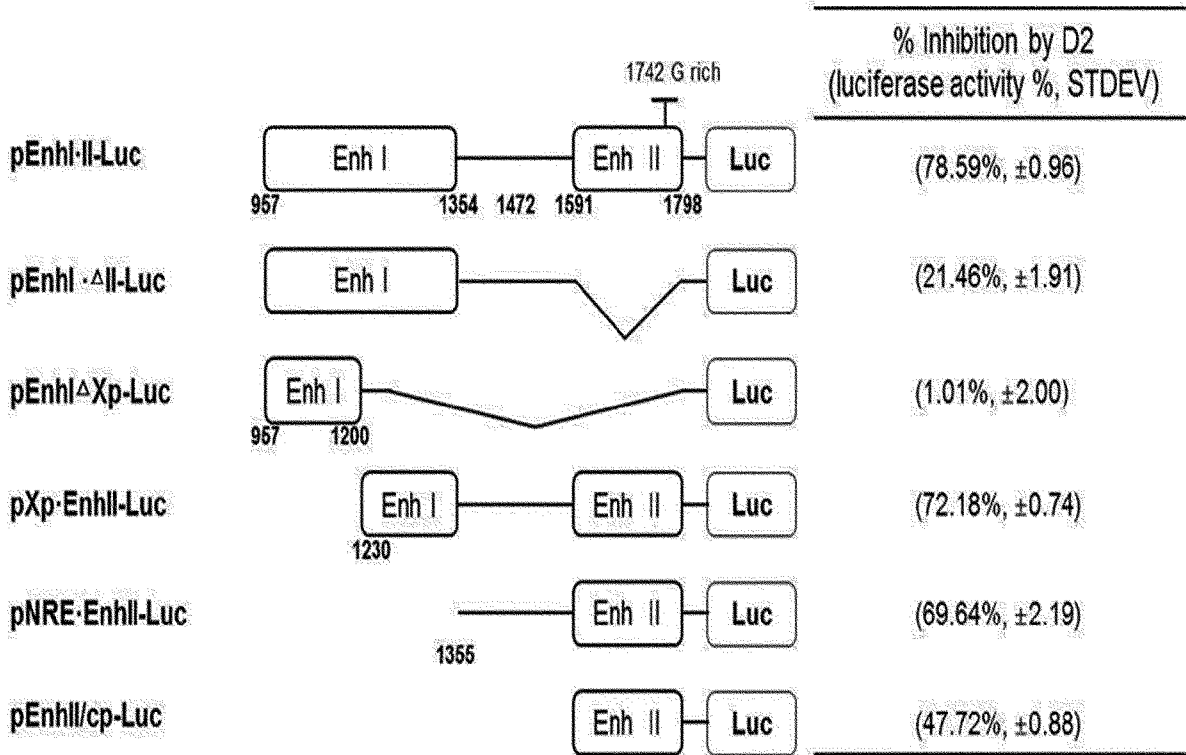
[도3]



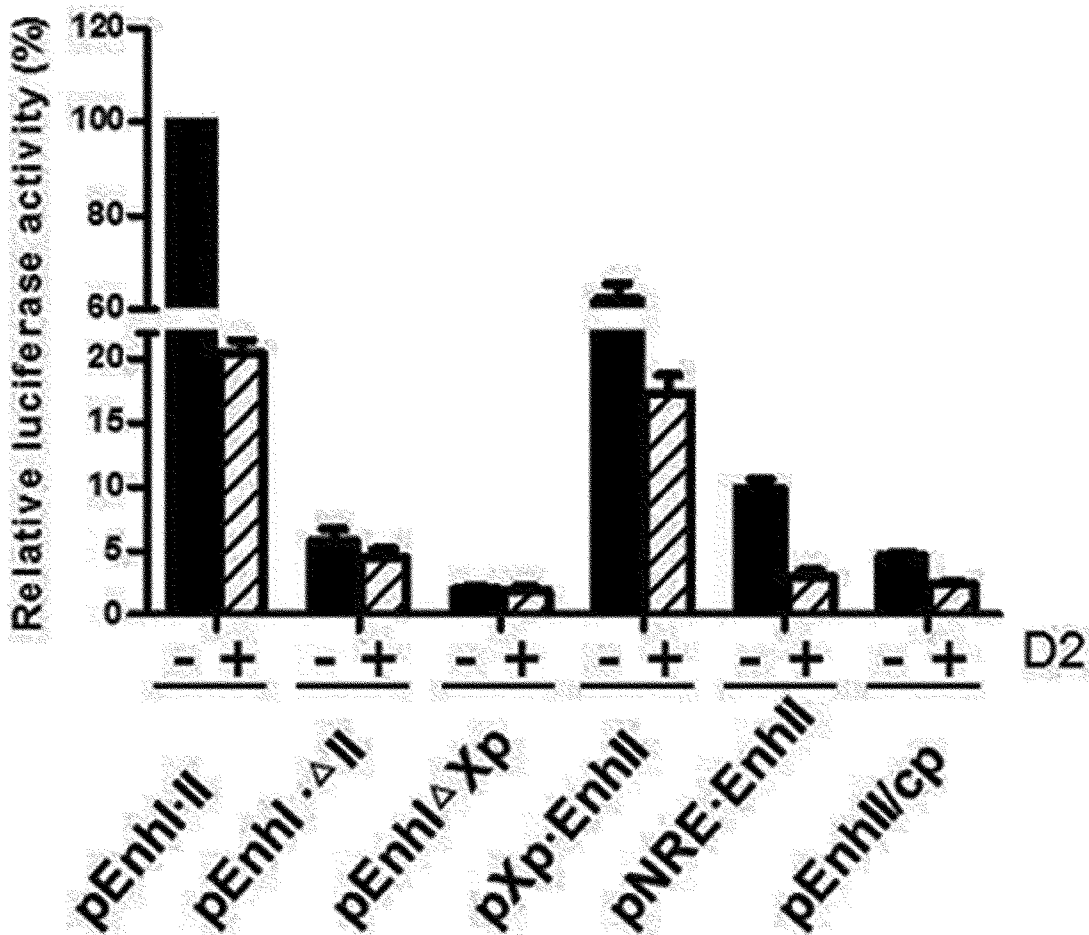
[도4]



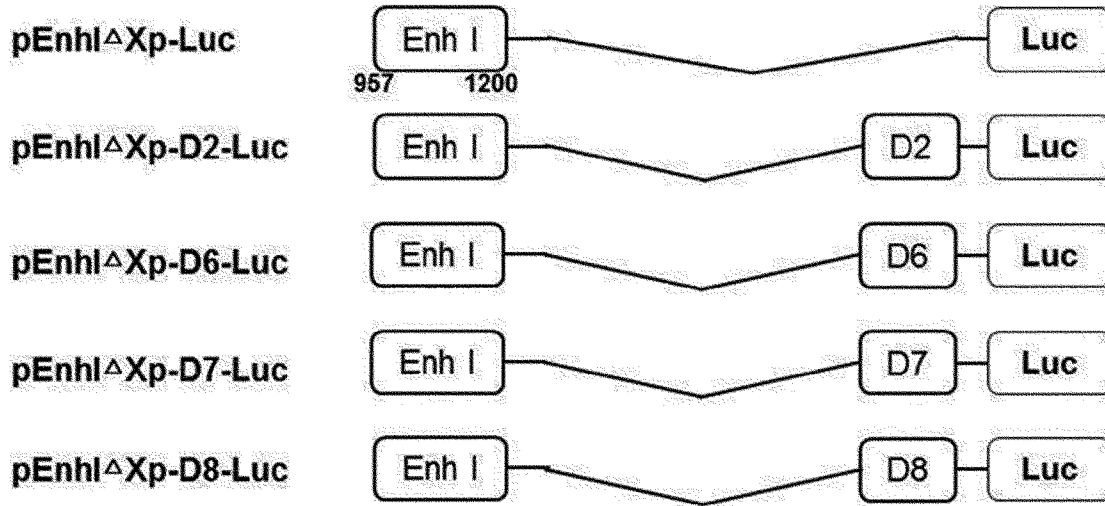
[도5a]



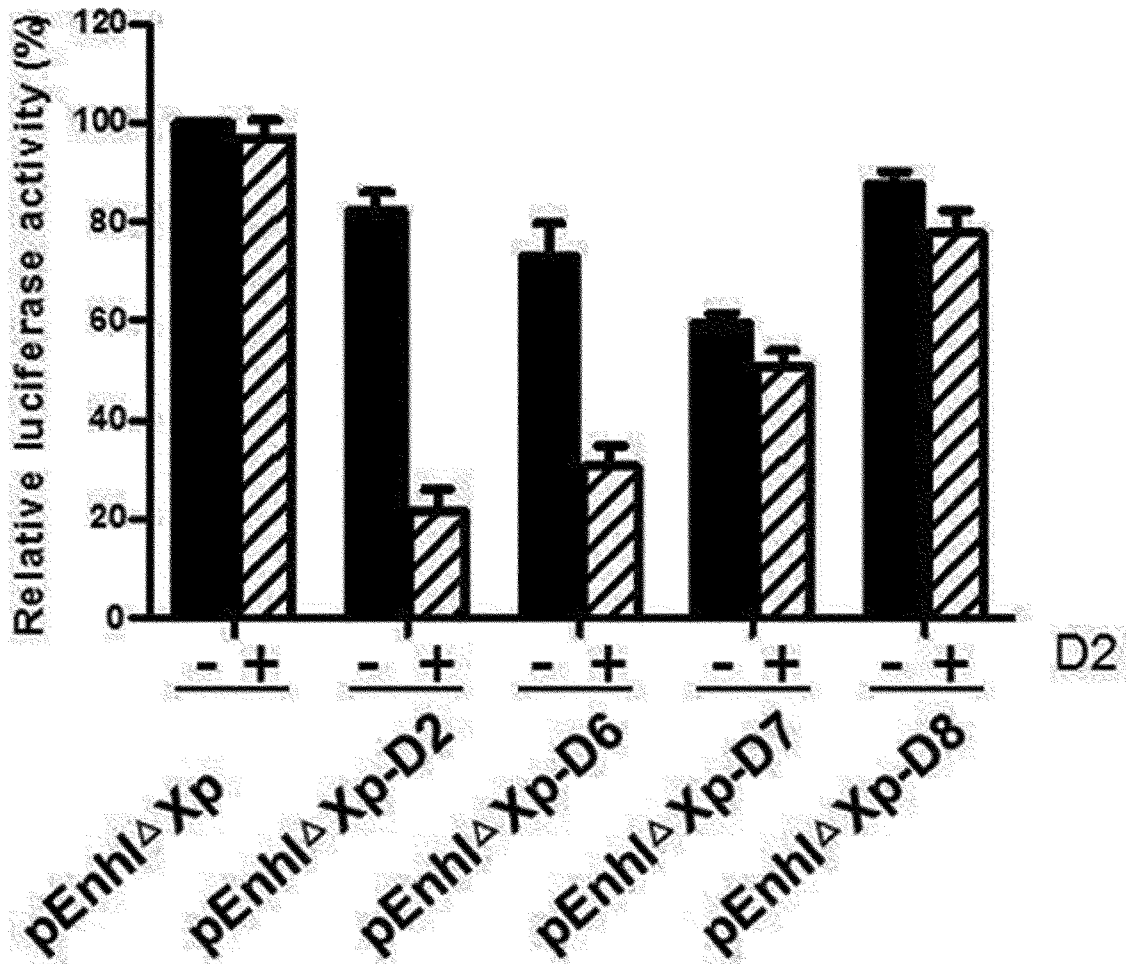
[도5b]



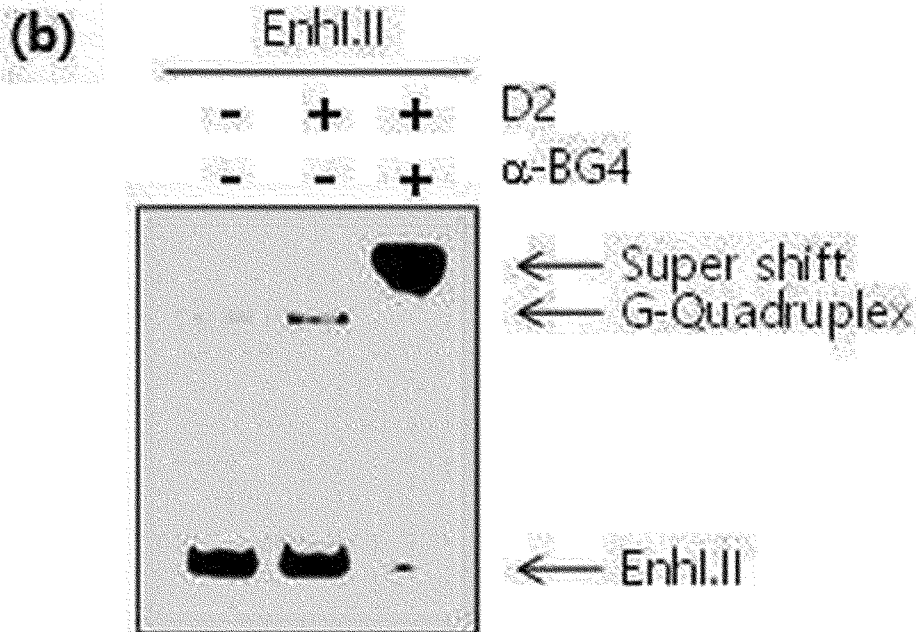
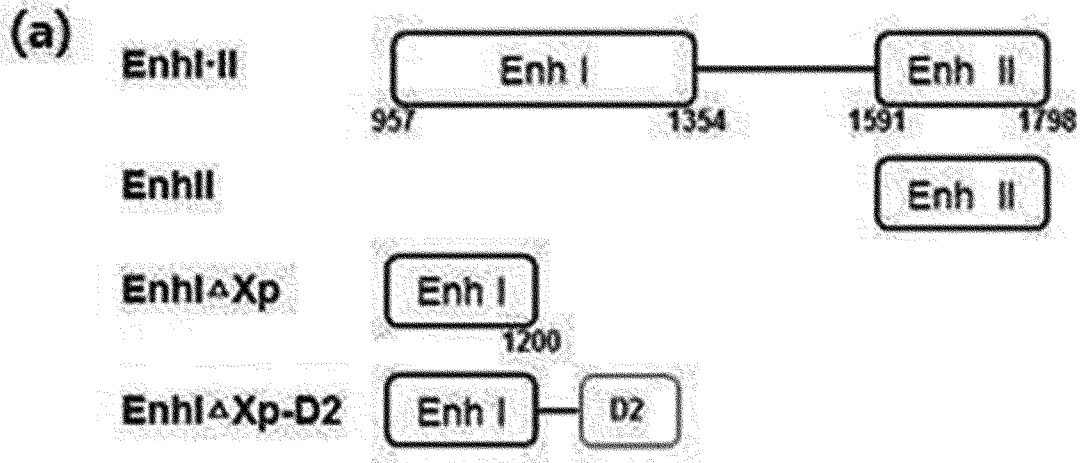
[도6a]



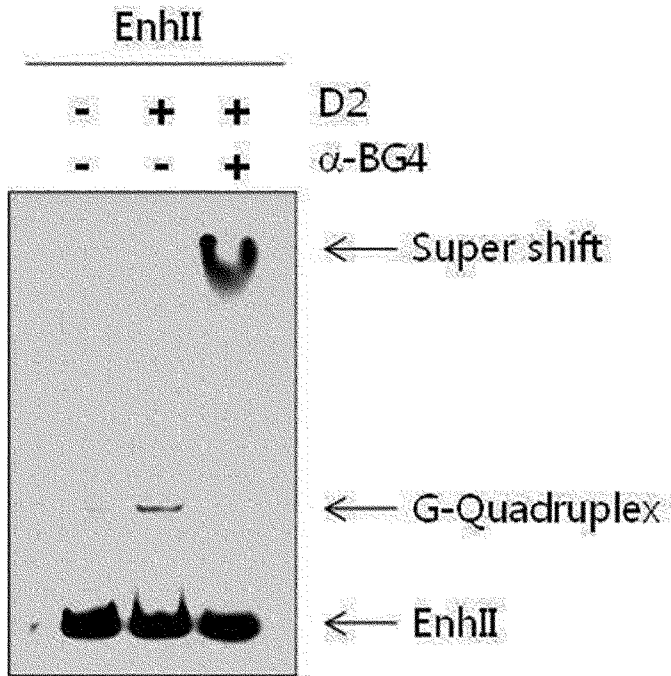
[도6b]



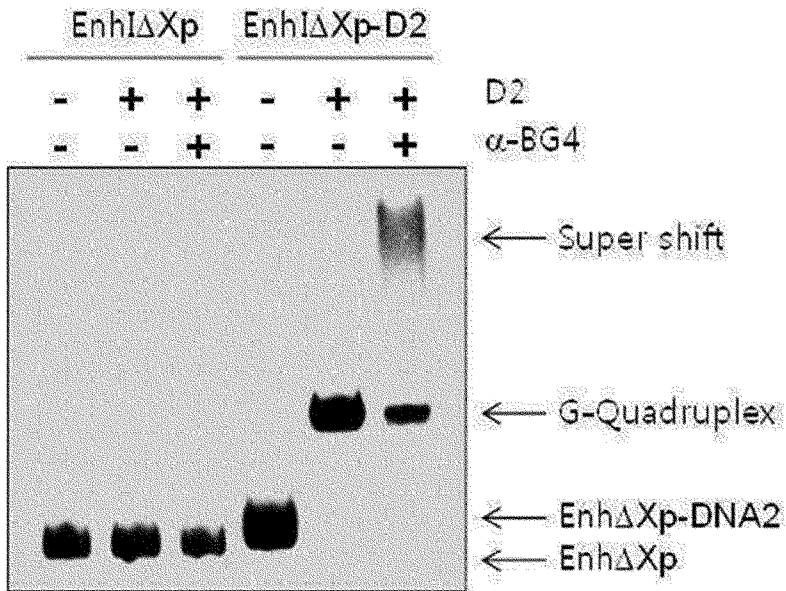
[도7]



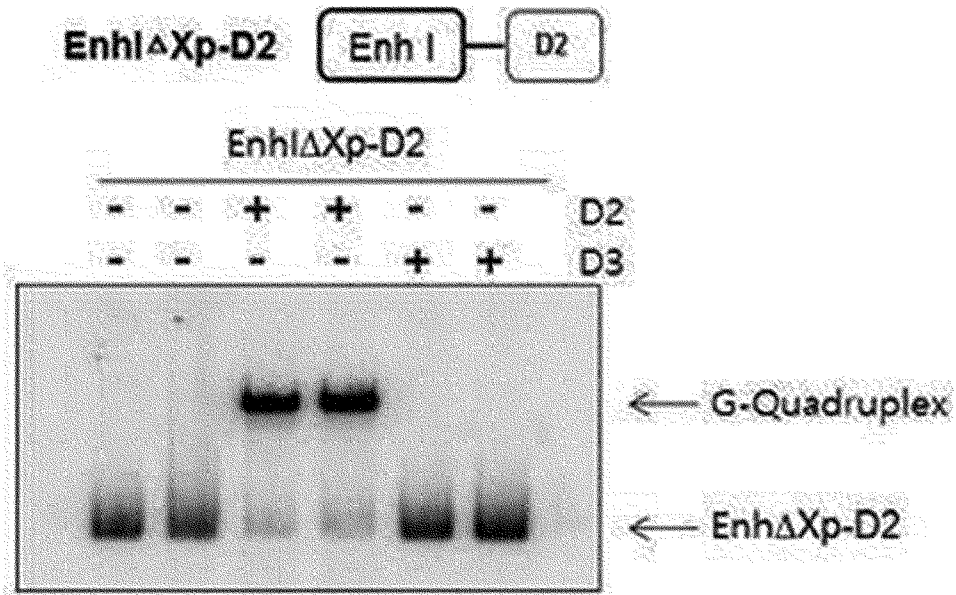
[도8]



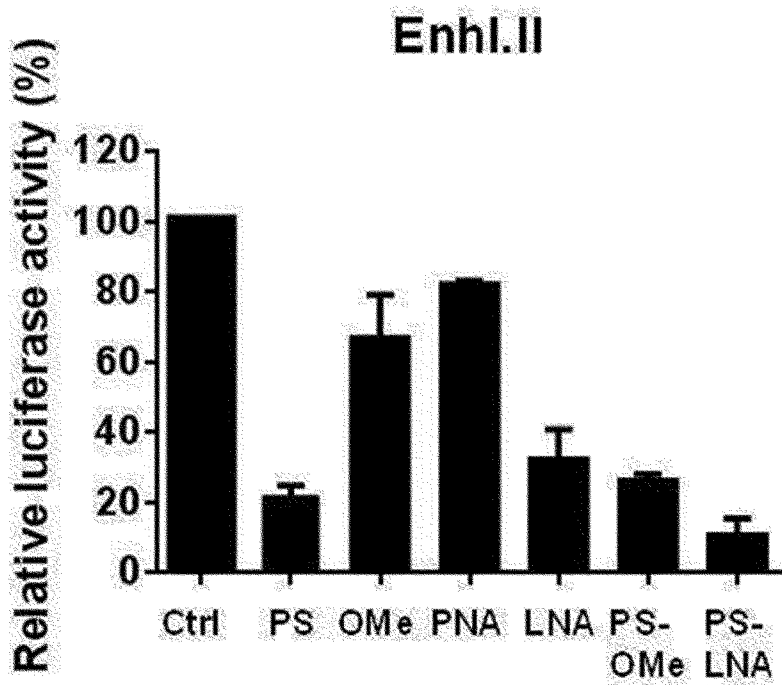
[도9]



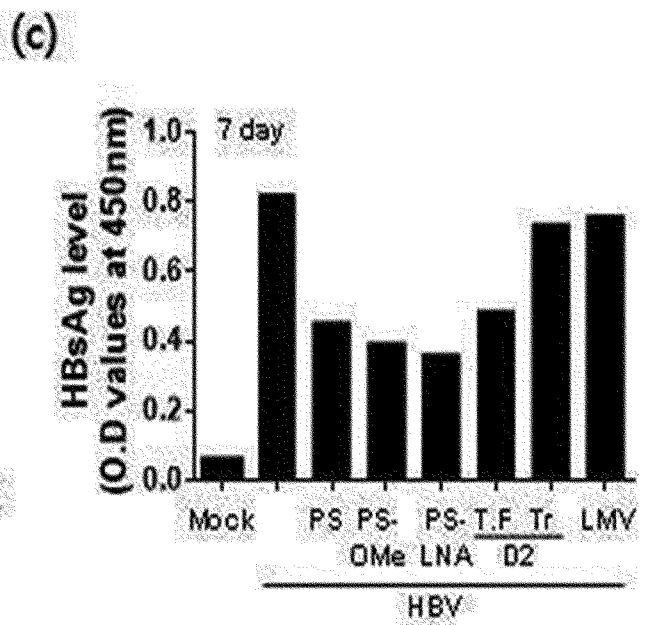
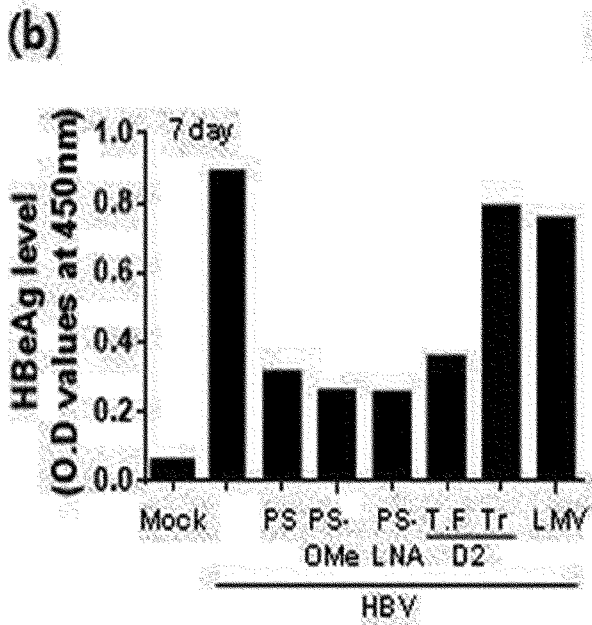
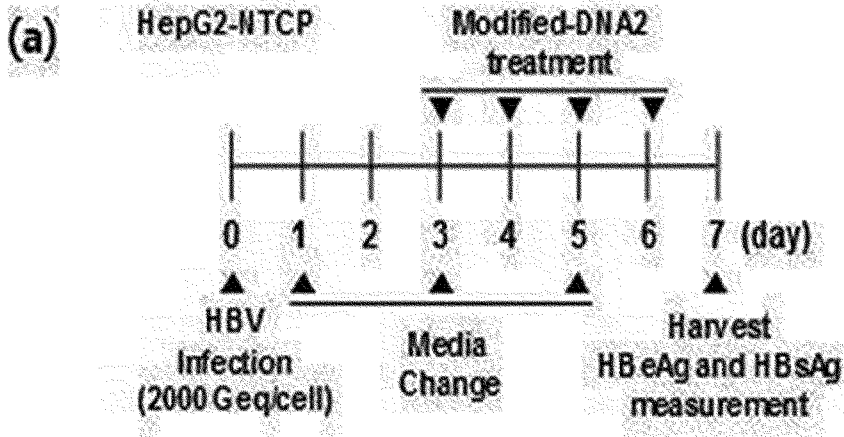
[도10]



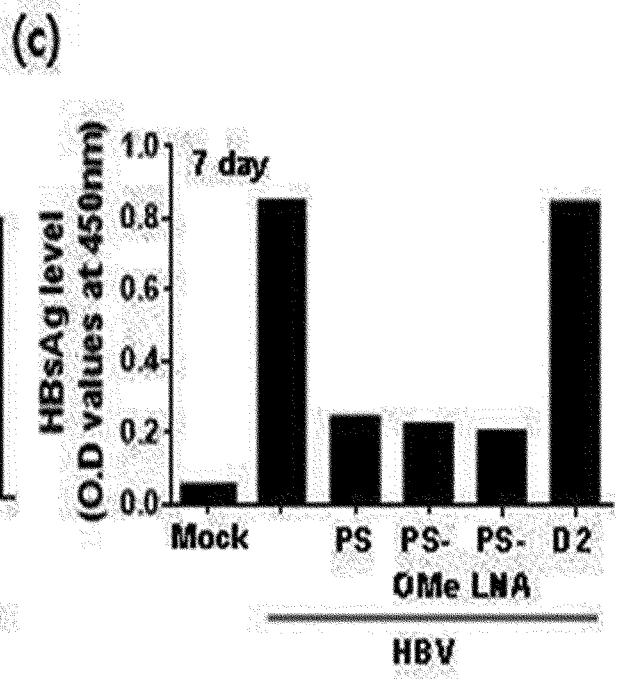
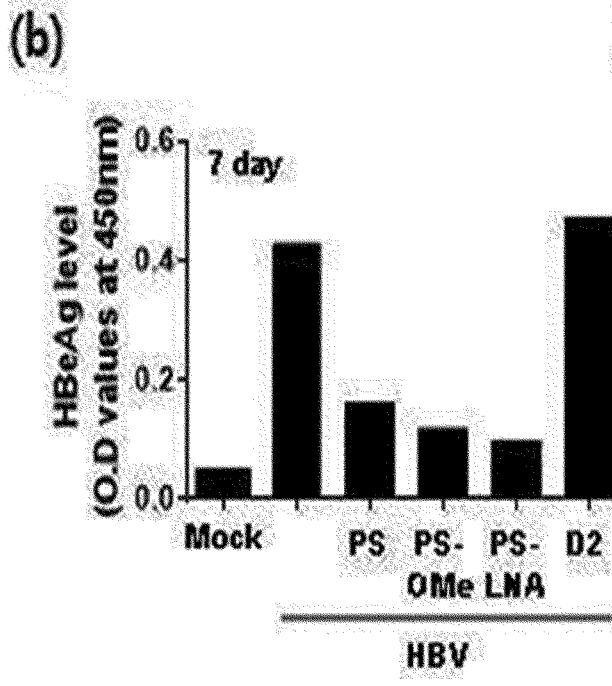
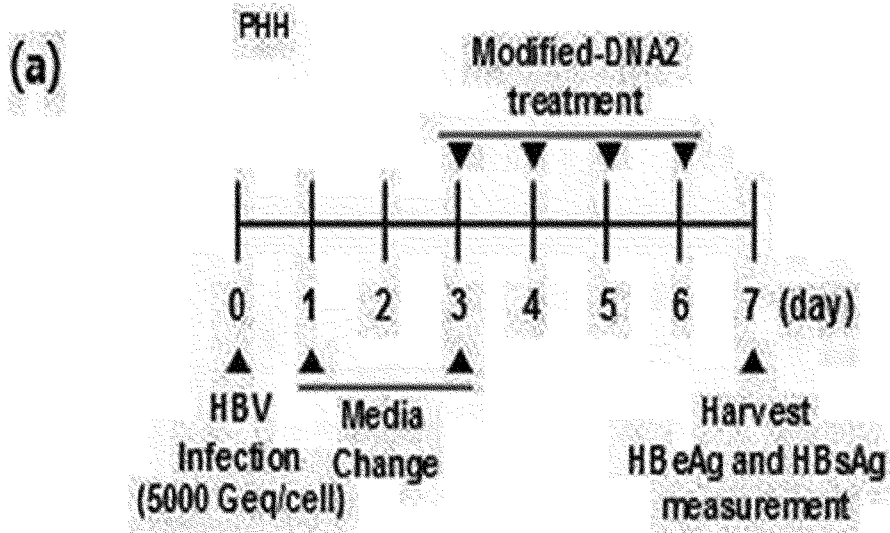
[도11]



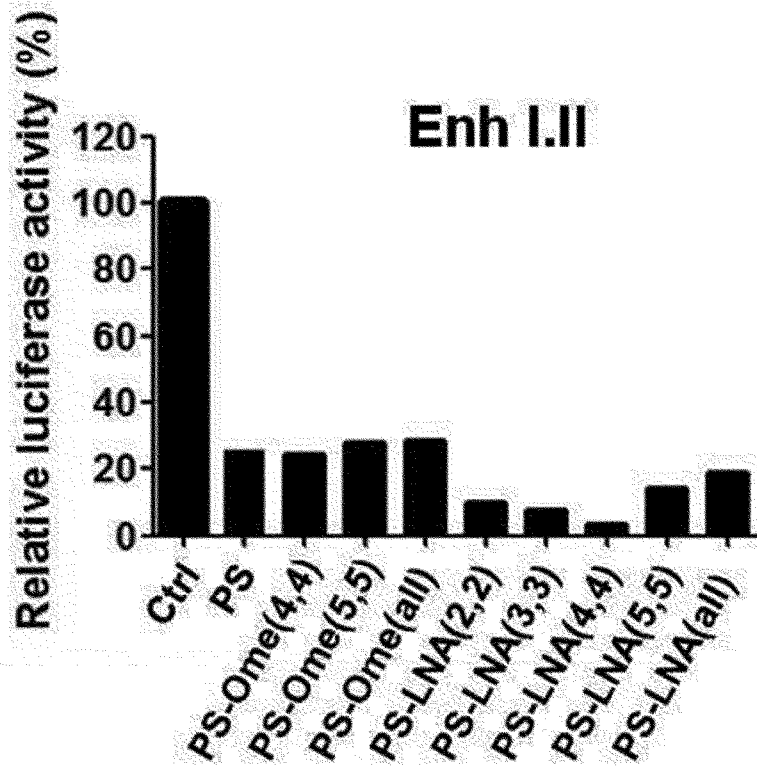
[도 12]



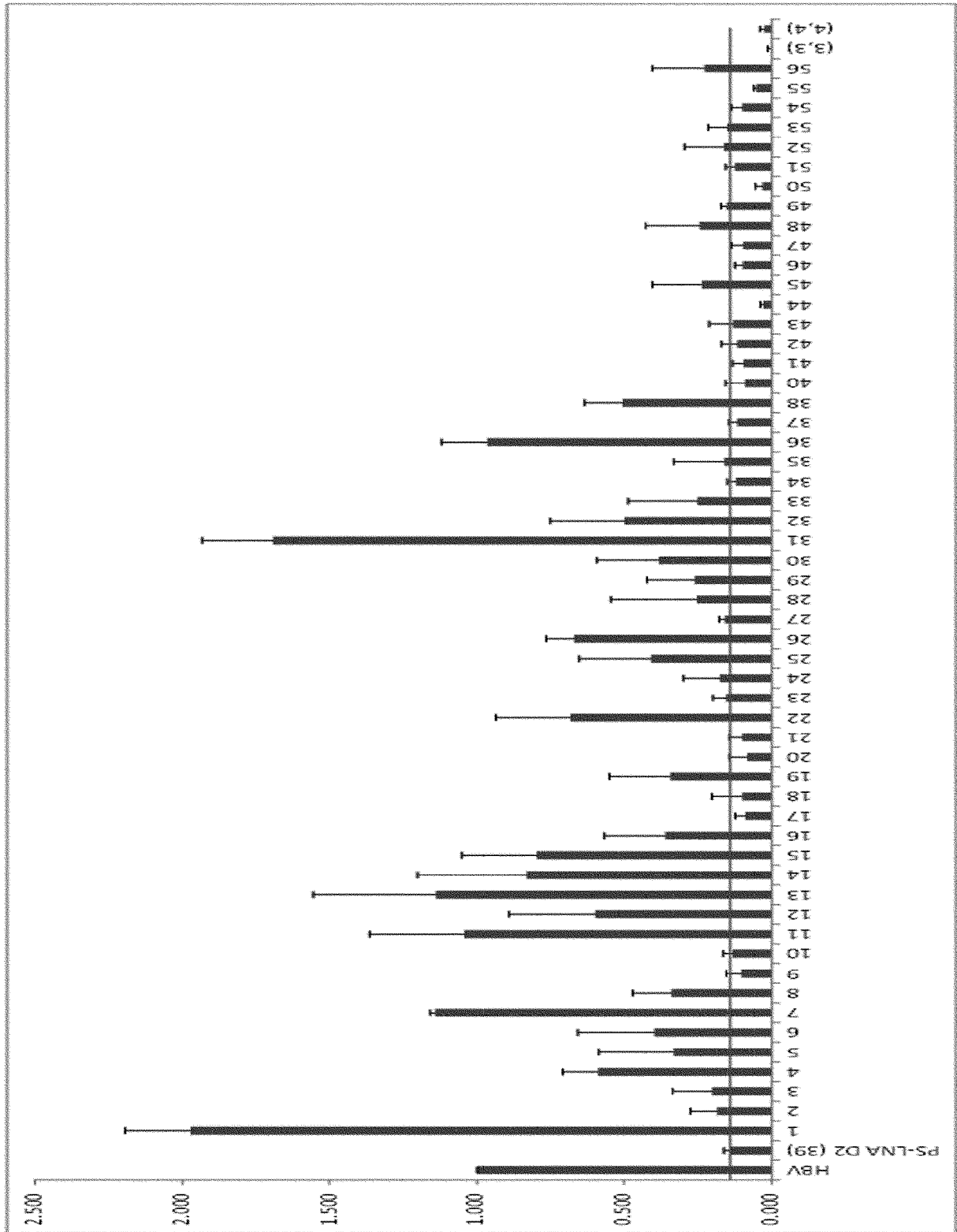
[도 13]



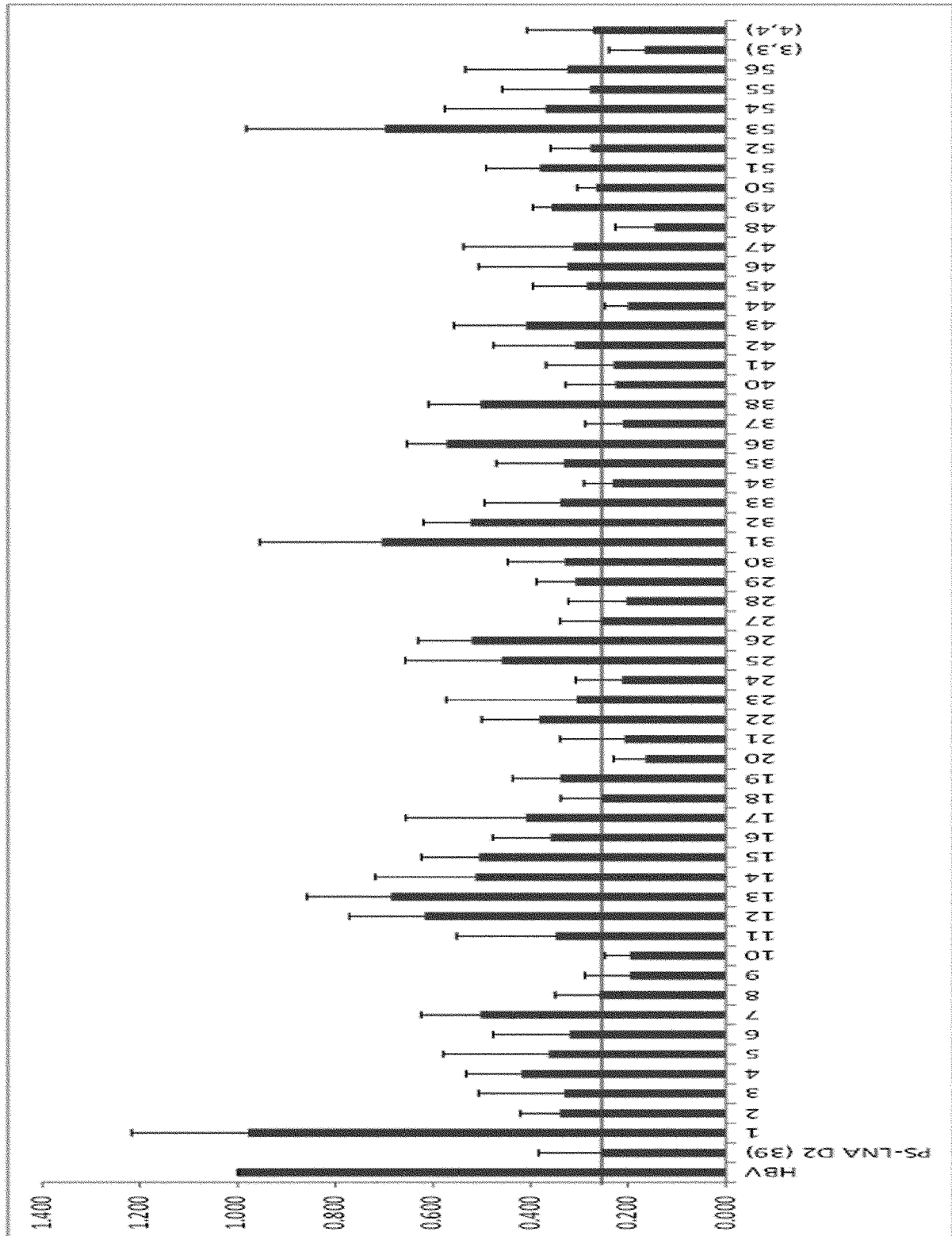
[도14]



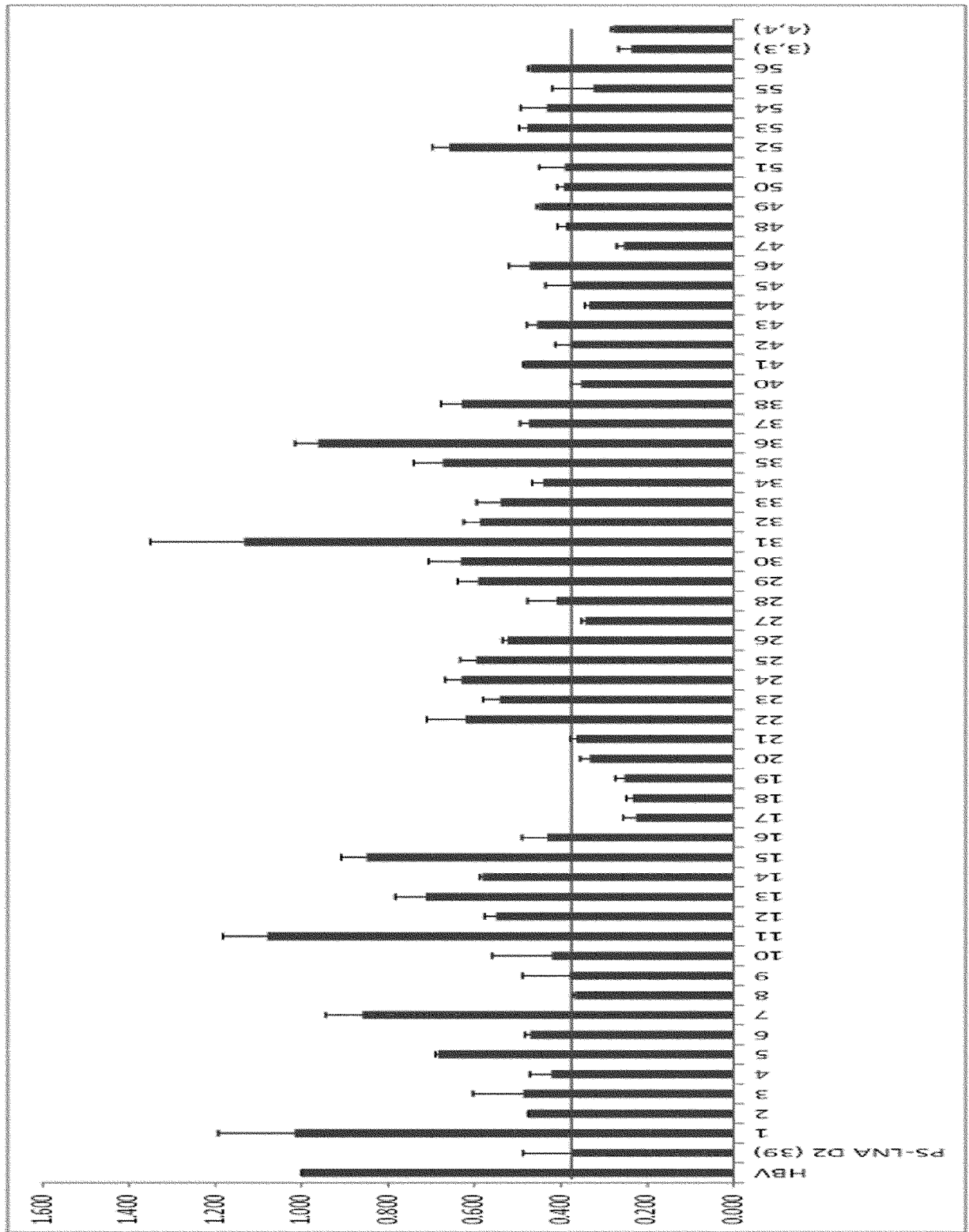
[도 15]



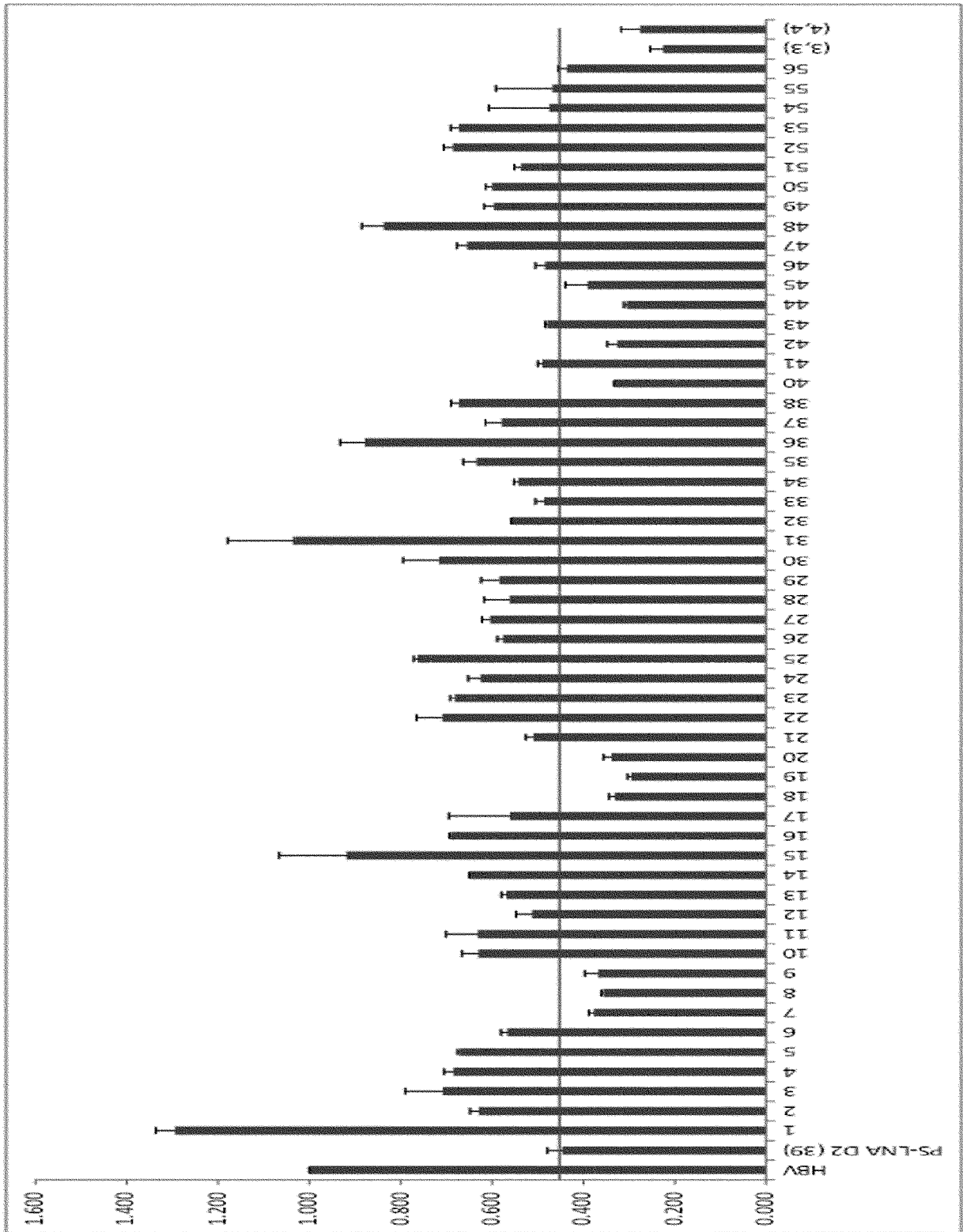
[도16]



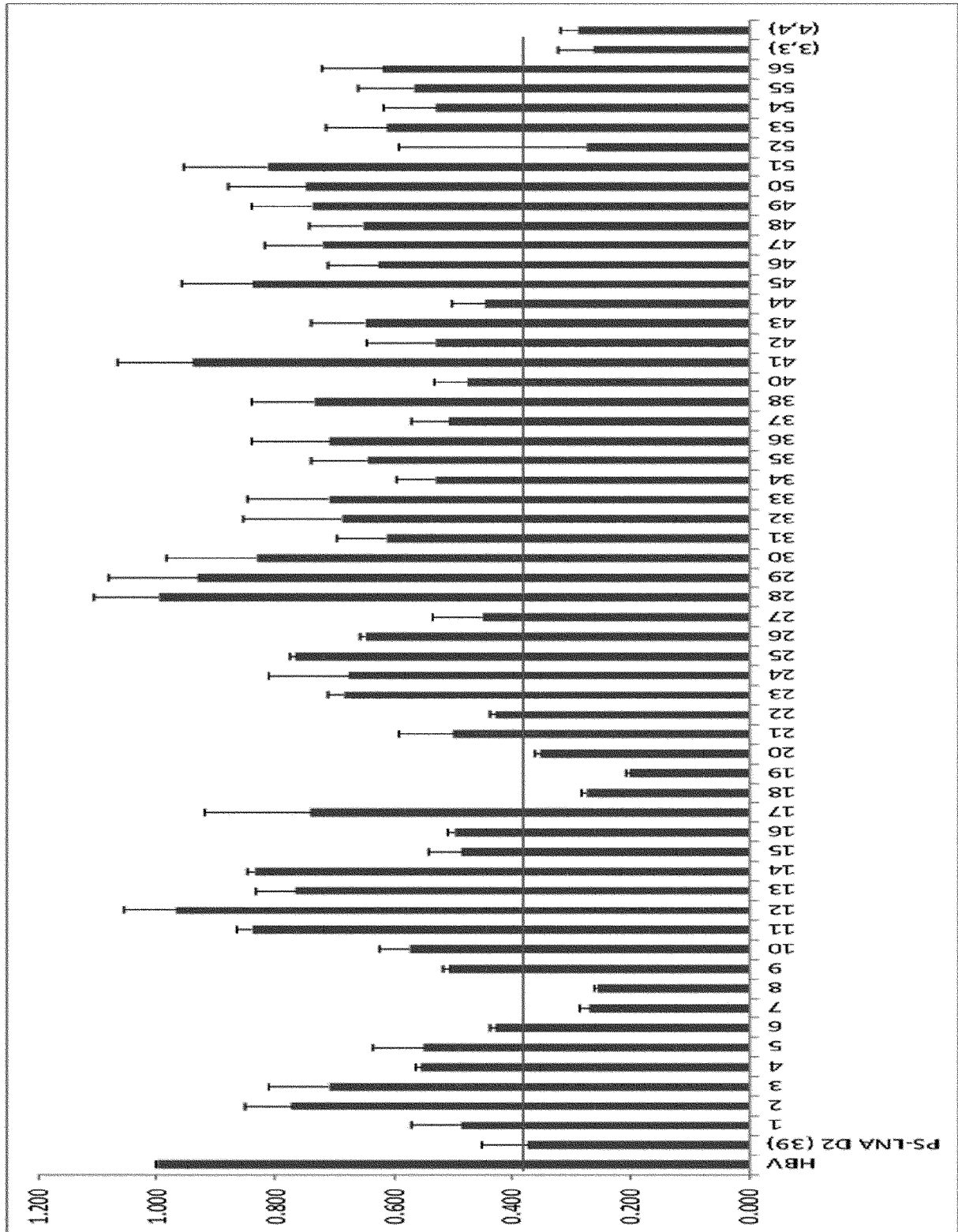
[도17]



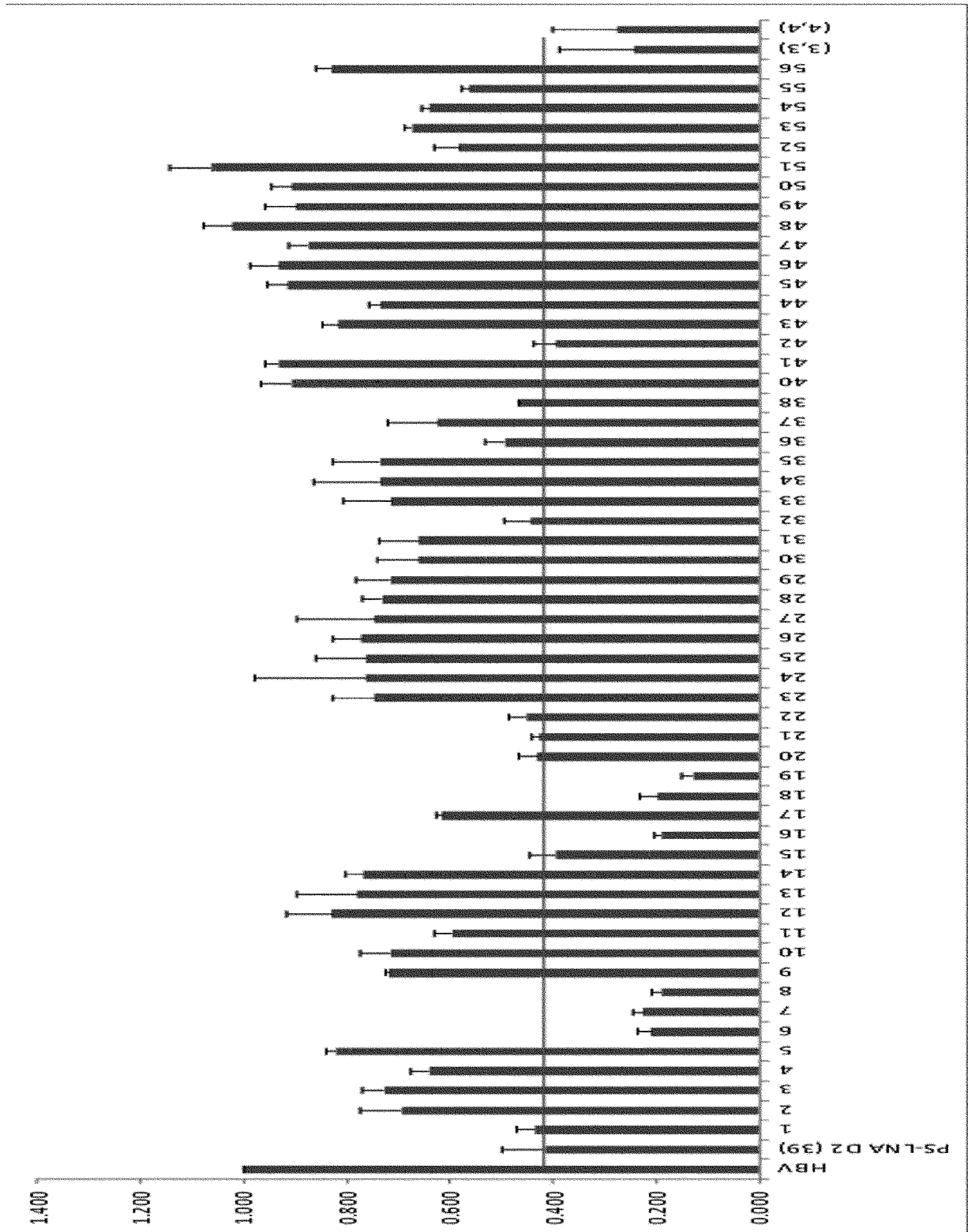
[도18]



[도19]

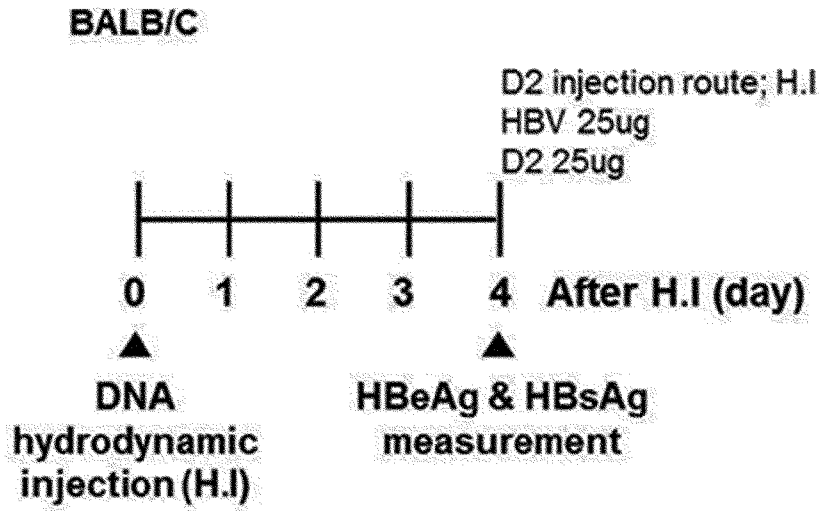


[도20]

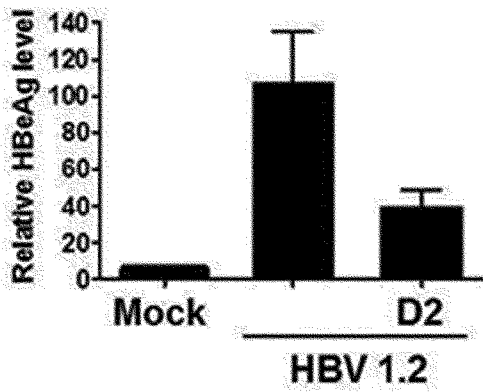


[도21]

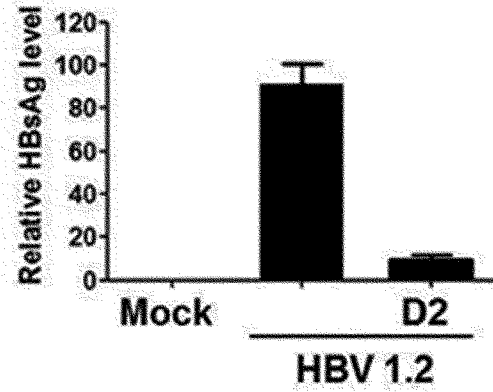
(a)



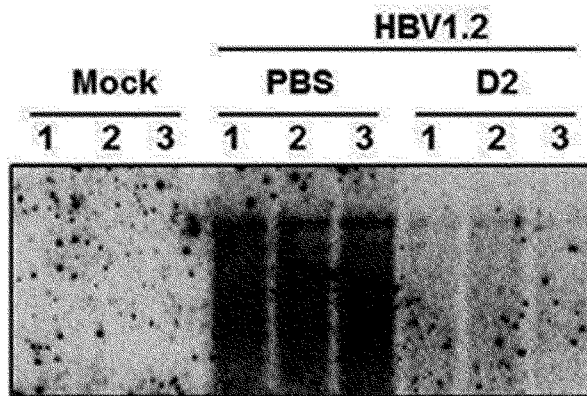
(b)



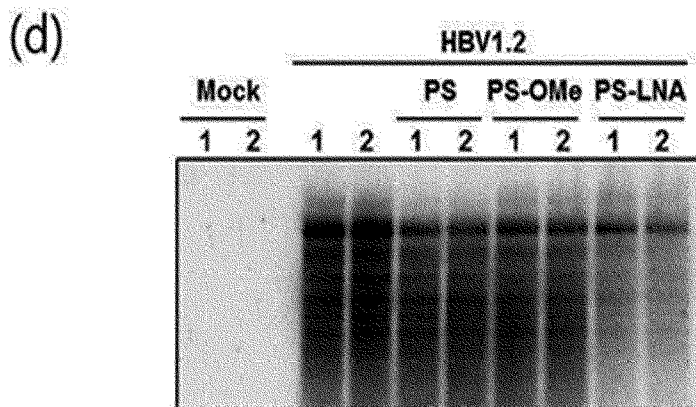
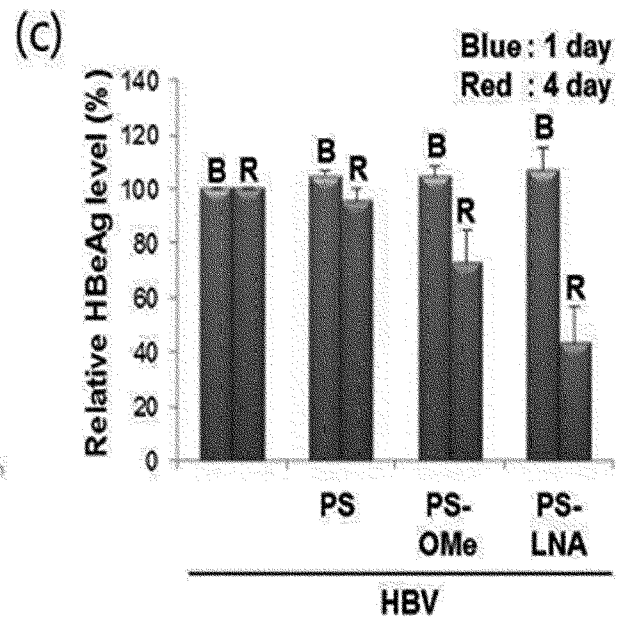
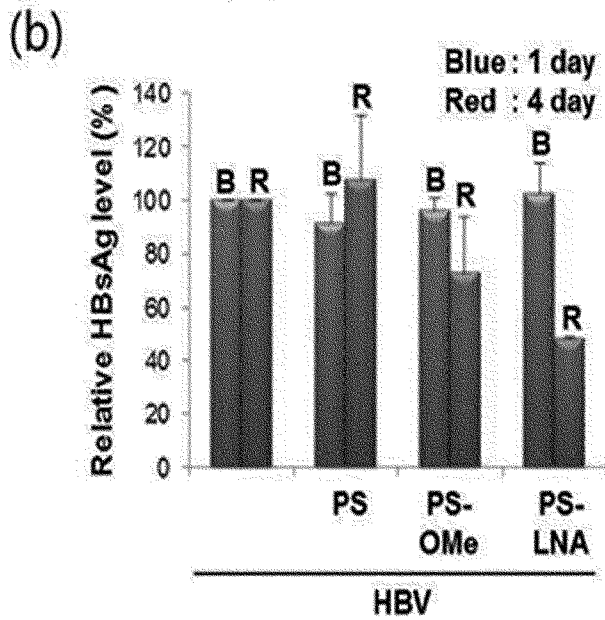
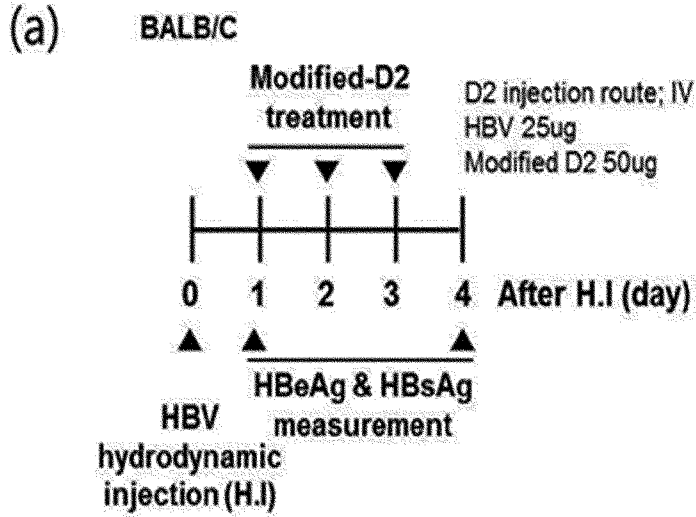
(c)



(d)

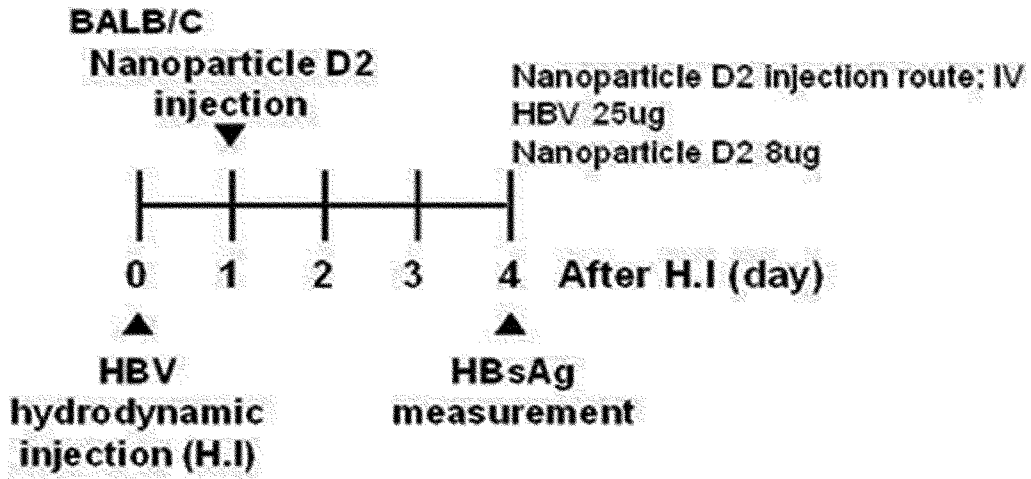


[도22]

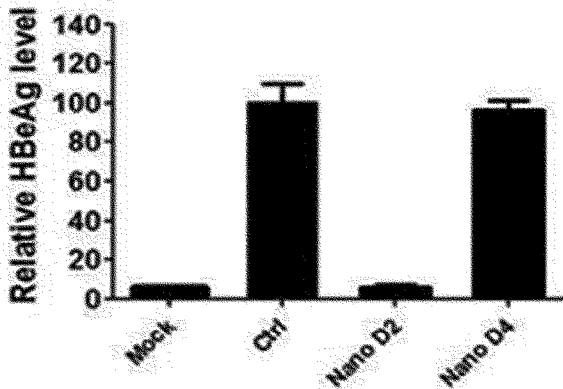


[도23]

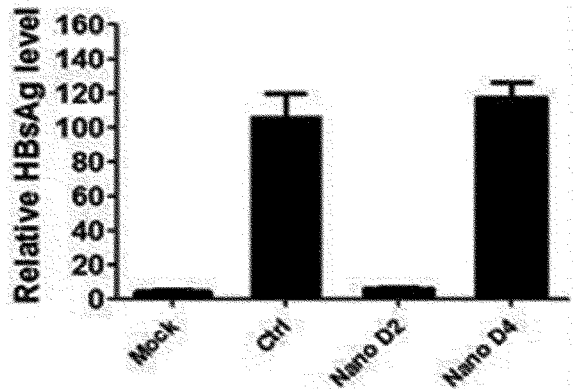
(a)



(b)



(c)

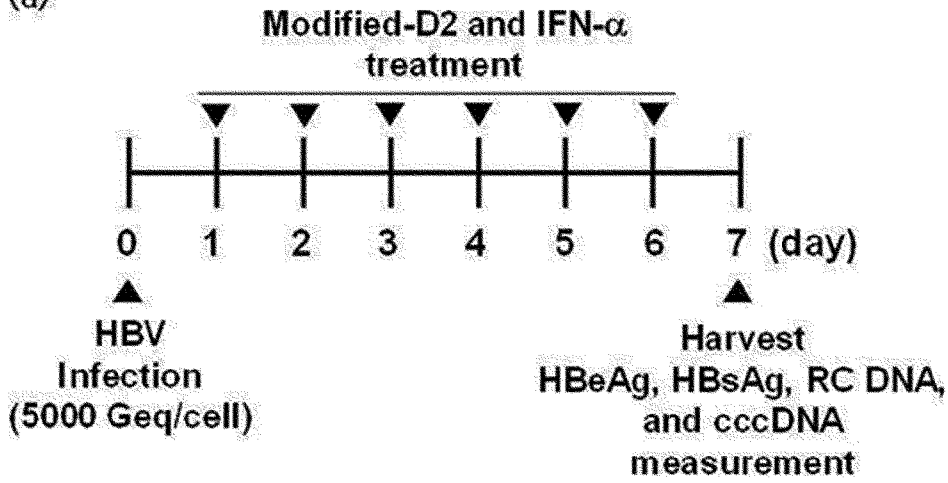


(d)

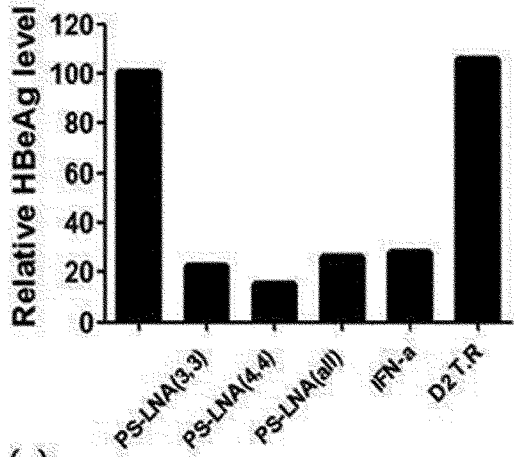


[도24]

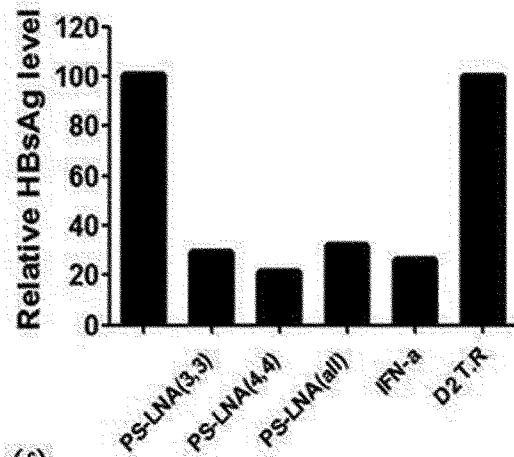
(a)



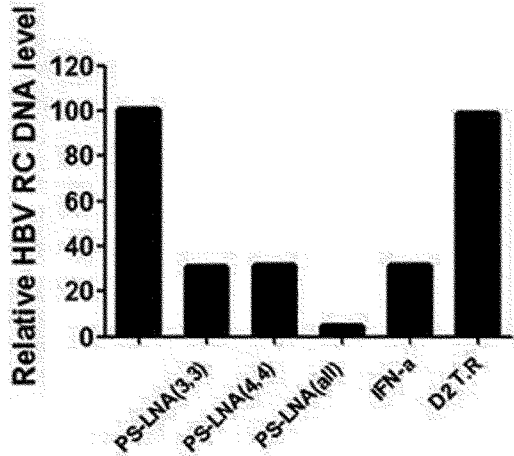
(b)



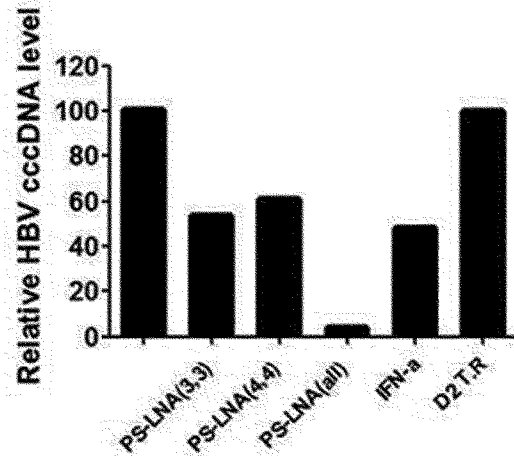
(c)



(e)

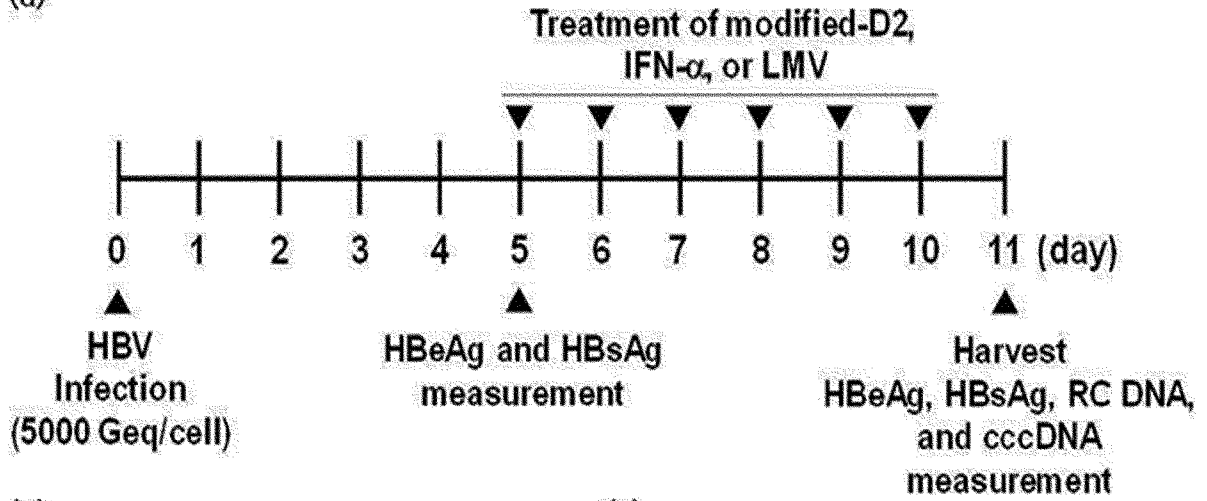


(f)

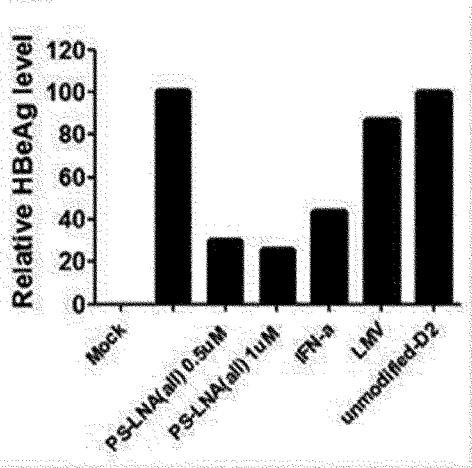


[도25]

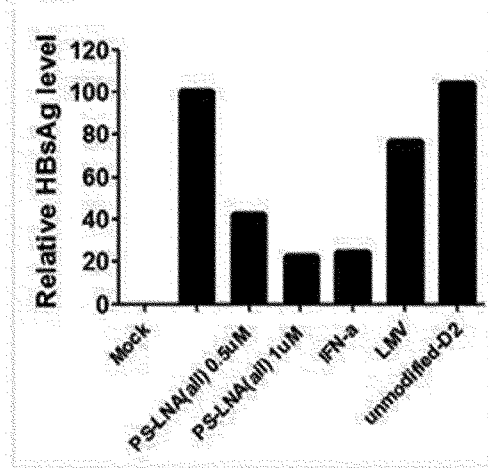
(a)



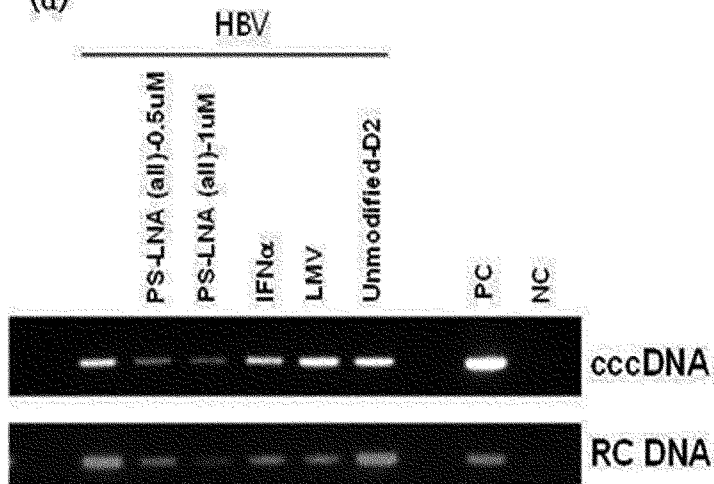
(b)



(c)

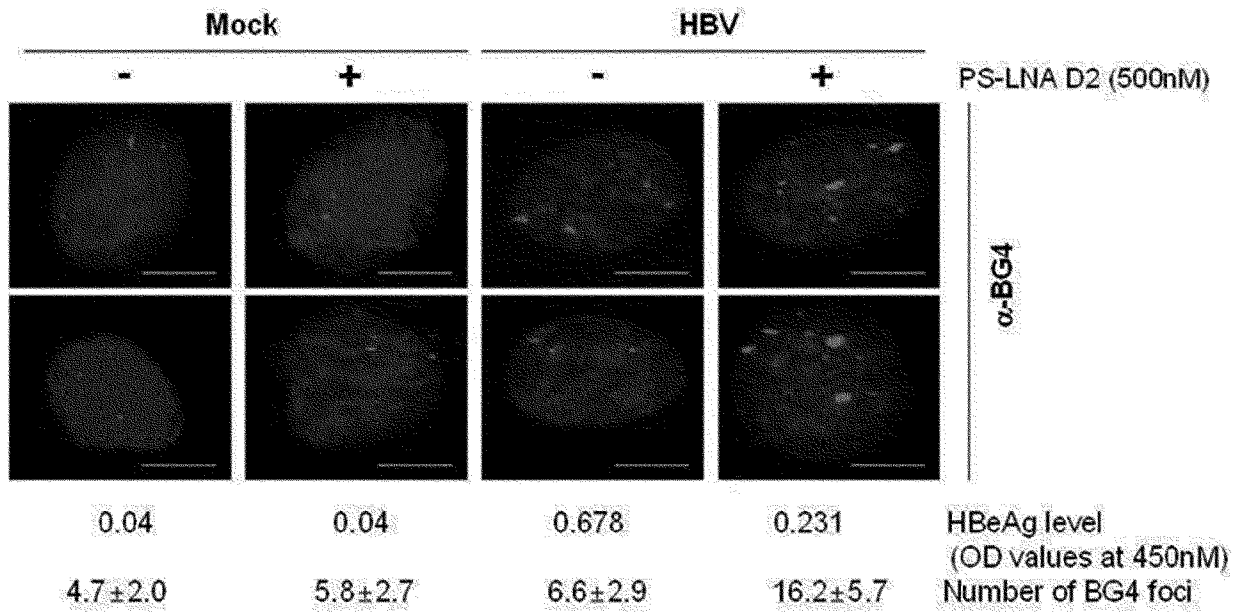


(d)

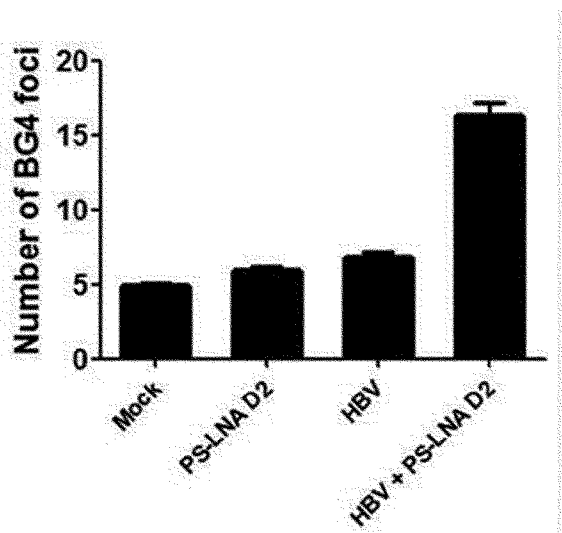


[도26]

(a)



(b)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/014662

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i, A61K 9/51(2006.01)i, A61K 9/107(2006.01)i, A61K 9/127(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 48/00; A61K 31/404; C12Q 1/25; G01N 21/64; G01N 33/15; A61K 38/12; C12N 15/113; A61K 9/51; A61K 9/107; A61K 9/127

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: hepatitis B, chemical modification, HBV, guanine-quadruplex, G-quadruplex, cccDNA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2015-0022911 A (DREXEL UNIVERSITY et al.) 04 March 2015 See abstract; paragraph [0004]; claims 1-3.	1-17,35-39
A	US 2013-0288380 A1 (PANASONIC CORPORATION) 31 October 2013 See abstract; claim 1.	1-17,35-39
A	HARRIS, L. M. et al., "G-quadruplexes in Pathogens: a Common Route to Virulence Control?", PLOS Pathogens, 05 February 2015, vol. 11, no. 2, document no. e1004562, pages 1-15 See abstract.	1-17,35-39
A	NCBI, GenBank accession no. KY003230.1 (26 November 2016) See the entire document.	1-17,35-39
A	METIFIOT, M. et al., "G-quadruplexes in Viruses: Function and Potential Therapeutic Applications", Nucleic Acids Research, 2014, vol. 42, no. 20, pages 12352-12366 See abstract.	1-17,35-39
A	KR 10-2014-0130514 A (BIOGENERA S.P.A.) 10 November 2014 See abstract; claims 1 and 6-11.	1-17,35-39



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 MARCH 2018 (19.03.2018)

Date of mailing of the international search report

19 MARCH 2018 (19.03.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/014662

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **18-34**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 18-34 pertain to a method for treatment of an entity including the human body, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/014662

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2011-0127086 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 24 November 2011 See abstract; claims 6, 7 and 12-15.	1-17,35-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/014662

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0022911 A	04/03/2015	AU 2013-267209 A1	18/12/2014
		AU 2013-267209 B2	02/02/2017
		AU 2017-202675 A1	11/05/2017
		CA 2874828 A1	05/12/2013
		CN 104507488 A	08/04/2015
		EP 2854832 A2	08/04/2015
		HK 1208823 A1	18/03/2016
		IL 235912 A	29/01/2015
		JP 2015-518055 A	25/06/2015
		PH 12014502659 A1	21/01/2015
		SG 11201407970 A	30/12/2014
		US 2015-0265672 A1	24/09/2015
		US 2017-0296619 A1	19/10/2017
		US 9623071 B2	18/04/2017
		WO 2013-181584 A2	05/12/2013
		WO 2013-181584 A3	13/02/2014
		US 2013-0288380 A1	31/10/2013
CN 103403158 B	28/01/2015		
JP 5216943 B1	08/03/2013		
US 8691589 B2	08/04/2014		
WO 2013-021536 A1	14/02/2013		
KR 10-2014-0130514 A	10/11/2014	AR 090129 A1	22/10/2014
		AU 2013-223694 A1	25/09/2014
		CA 2864060 A1	29/08/2013
		CN 104169421 A	26/11/2014
		EP 2817407 A2	31/12/2014
		EP 2817407 B1	06/09/2017
		HK 1201878 A1	11/09/2015
		IN 1493MUN2014 A	17/04/2015
		IT M120120275 A1	25/08/2013
		JP 2015-513398 A	14/05/2015
		MA 35935 B1	01/12/2014
		RU 2014138198 A	10/04/2016
		SG 10201606946 A	28/10/2016
		SG 11201404852 A	30/10/2014
		TN 2014000327 A1	21/12/2015
		US 2016-0040166 A1	11/02/2016
		WO 2013-124807 A2	29/08/2013
WO 2013-124807 A3	27/12/2013		
KR 10-2011-0127086 A	24/11/2011	WO 2011-145885 A2	24/11/2011
		WO 2011-145885 A3	03/05/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
A61K 48/00(2006.01)i, A61K 9/51(2006.01)i, A61K 9/107(2006.01)i, A61K 9/127(2006.01)i

B. 조사된 분야
 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
 A61K 48/00; A61K 31/404; C12Q 1/25; G01N 21/64; G01N 33/15; A61K 38/12; C12N 15/113; A61K 9/51; A61K 9/107; A61K 9/127

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
 eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: B형 간염, 화학적 변형, HBV, 구아니-사중합체, G-quadruplex, cccDNA

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2015-0022911 A (드렉셀유니버시티 등) 2015.03.04 요약; 단락 [0004]; 청구항 1-3 참조.	1-17, 35-39
A	US 2013-0288380 A1 (PANASONIC CORPORATION) 2013.10.31 요약; 청구항 1 참조.	1-17, 35-39
A	HARRIS, L. M. 등, 'G-quadruplexes in pathogens: a common route to virulence control?', PLOS Pathogens, 2015.02.05, 11권, 2호, 문헌번호 e1004562, 페이지 1-15 초록 참조.	1-17, 35-39
A	NCBI, GenBank accession no. KY003230.1 (2016.11.26) 전체 문헌 참조.	1-17, 35-39
A	METIFIOT, M. 등, 'G-quadruplexes in viruses: function and potential therapeutic applications', Nucleic Acids Research, 2014, 42권, 20호, 페이지 12352-12366 초록 참조.	1-17, 35-39
A	KR 10-2014-0130514 A (바이오제네라 에스.피.에이.) 2014.11.10 요약; 청구항 1 및 6-11 참조.	1-17, 35-39

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2018년 03월 19일 (19.03.2018)	국제조사보고서 발송일 2018년 03월 19일 (19.03.2018)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 장기정 전화번호 +82-42-481-8364
---	------------------------------------

C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2011-0127086 A (연세대학교 산학협력단) 2011.11.24 요약: 청구항 6, 7 및 12-15 참조.	1-17, 35-39

제2기제란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. 청구항: 18-34
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉, 청구항 18-34는 인간을 포함하는 개체에 대한 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(i v)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기제란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0022911 A	2015/03/04	AU 2013-267209 A1	2014/12/18
		AU 2013-267209 B2	2017/02/02
		AU 2017-202675 A1	2017/05/11
		CA 2874828 A1	2013/12/05
		CN 104507488 A	2015/04/08
		EP 2854832 A2	2015/04/08
		HK 1208823 A1	2016/03/18
		IL 235912 A	2015/01/29
		JP 2015-518055 A	2015/06/25
		PH 12014502659 A1	2015/01/21
		SG 11201407970 A	2014/12/30
		US 2015-0265672 A1	2015/09/24
		US 2017-0296619 A1	2017/10/19
		US 9623071 B2	2017/04/18
		WO 2013-181584 A2	2013/12/05
		WO 2013-181584 A3	2014/02/13
		US 2013-0288380 A1	2013/10/31
CN 103403158 B	2015/01/28		
JP 5216943 B1	2013/03/08		
US 8691589 B2	2014/04/08		
WO 2013-021536 A1	2013/02/14		
KR 10-2014-0130514 A	2014/11/10	AR 090129 A1	2014/10/22
		AU 2013-223694 A1	2014/09/25
		CA 2864060 A1	2013/08/29
		CN 104169421 A	2014/11/26
		EP 2817407 A2	2014/12/31
		EP 2817407 B1	2017/09/06
		HK 1201878 A1	2015/09/11
		IN 1493MUN2014 A	2015/04/17
		IT MI20120275 A1	2013/08/25
		JP 2015-513398 A	2015/05/14
		MA 35935 B1	2014/12/01
		RU 2014138198 A	2016/04/10
		SG 10201606946 A	2016/10/28
		SG 11201404852 A	2014/10/30
		TN 2014000327 A1	2015/12/21
		US 2016-0040166 A1	2016/02/11
		WO 2013-124807 A2	2013/08/29
		WO 2013-124807 A3	2013/12/27
		KR 10-2011-0127086 A	2011/11/24
WO 2011-145885 A3	2012/05/03		