(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0059413
(43) 공개일자 2025년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/713* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7007619
(22) 출원일자(국제) 2023년09월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년03월07일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/074440
(87) 국제공개번호 WO 2024/052403
국제공개일자 2024년03월14일
(30) 우선권주장
22194224.6 2022년09월06일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124
(72) 발명자
블라이셔 콘라드
스위스 4070 바젤 비에스 그렌짜허스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
푼더 에릭
덴마크 디케이-2970 회르스홀름 프렘티스바이 3 로슈 이노베이션 센터 코펜하겐 에이/에스
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

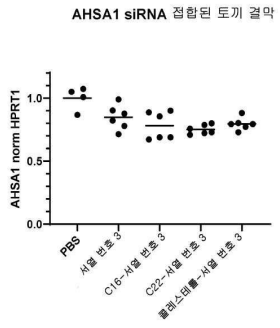
전체 청구항 수 : 총 53 항

(54) 발명의 명칭 **눈에 투여하기 위한 이중 가닥 RNA 분자**

(57) 요 약

본 발명은 눈에 국소 투여하기 위한, 적어도 하나의 접합체 모이어티에 접합된 이중 가닥 RNA 분자 및 이의 약학 조성물에 관한 것이다. 이러한 이중 가닥 RNA 분자는 눈에서 발현되는 표적에 상보적, 예를 들어, 완전히 상보적이며, 눈에서 발현되는 표적의 발현을 억제할 수 있다. 이러한 이중 가닥 RNA 분자는 눈의 병태 및 질병의 치료에 사용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 27/02 (2018.01)
C12N 2310/14 (2013.01)
C12N 2310/315 (2013.01)
C12N 2310/3231 (2013.01)
C12N 2310/3515 (2013.01)
C12N 2310/3525 (2013.01)

(72) 발명자
야콥센 헬레
스위스 디케이-2970 회르스홀름 프렘티스바이 3 로슈 이노베이션 센터 코펜하겐 에이/에스
한센 데니스 율
덴마크 디케이-2970 회르스홀름 프렘티스바이 3 로슈 이노베이션 센터 코펜하겐 에이/에스
켈러 마이클
스위스 4070 바젤 비에스 그렌짜허스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
라르센 인나 아펠도르프
덴마크 디케이-2970 회르스홀름 프렘티스바이 3 로슈 이노베이션 센터 코펜하겐 에이/에스
산토스 페레이라 티아고 프란시스코
스위스 4070 바젤 비에스 그렌짜허스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
빈터 롯테
덴마크 디케이-2970 회르스홀름 프렘티스바이 3 로슈 이노베이션 센터 코펜하겐 에이/에스
보름 예스퍼
덴마크 디케이-2970 회르스홀름 프렘티스바이 3 로슈 이노베이션 센터 코펜하겐 에이/에스
와이스 레나
스위스 4070 바젤 비에스 그렌짜허스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게

명 세 서

청구범위

청구항 1

눈에 국소 투여하기 위한 이중 가닥 리보핵산(RNA) 분자로서, 여기서 이중 가닥 RNA 분자는 표적 서열에 결합할 수 있고, 이중 가닥 RNA 분자는 5' 말단과 3' 말단을 갖는 제1 가닥 및 5' 말단과 3' 말단을 갖는 제2 가닥을 포함하고, 여기서 제1 가닥은 제2 가닥에 상보적이고, 제1 가닥은 표적 서열에 상보적인 적어도 8개 뉴클레오티드 길이의 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서 이중 가닥 RNA 분자는 적어도 하나의 접합체 모이어티에 접합되는, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 이중 가닥 RNA 분자는 siRNA 분자인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 이중 가닥 RNA 분자는 표적의 발현을 억제할 수 있는, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 접합체 모이어티는 지방산 분자 또는 콜레스테롤 분자인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 지방산 분자는 C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25, C26, C27, C28, C29, C30, C31, C32, C33, C34, C35, C36, C37, C38, C39 및 C40으로 구성된 목록에서 선택된, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 6

청구항 4 또는 5에 있어서, 지방산 분자는 C16인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 7

청구항 4 또는 5에 있어서, 지방산 분자는 C22인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 8

청구항 4 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 지방산 분자는 분지형인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 9

청구항 4 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 지방산 분자는 비분지형인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 10

청구항 4 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 지방산 분자는 포화된, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 11

청구항 4 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 지방산 분자는 불포화된, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 지방산 분자는 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 또는 19개 이상의 탄소 이중 결합을 포함하는, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 13

청구항 11 또는 12에 있어서, 지방산 분자는 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 또는 19개 이상의 탄소 삼중 결합을 포함하는, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 14

청구항 11 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 지방산 분자는 다음으로 구성된 목록에서 선택되는, 이중 가닥 RNA 분자: C3:0; C4:0; C4:1; C5:0; C5:1; C6:0; C6:1; C6:2; C7:0; C7:1; C7:2; C8:0; C8:1; C8:2; C8:3; C9:0; C9:1; C9:2; C9:3; C10:0; C10:1; C10:2; C10:3; C10:4; C11:0; C11:1; C11:2; C11:3; C11:4; C12:0; C12:1; C12:2; C12:3; C12:4; C12:5; C13:0; C13:1; C13:2; C13:3; C13:4; C13:5; C14:0; C14:1; C14:2; C14:3; C14:4; C14:5; C14:6; C15:0; C15:1; C15:2; C15:3; C15:4; C15:5; C15:6; C16:0; C16:1; C16:2; C16:3; C16:4; C16:5; C16:6; C16:7; C17:0; C17:1; C17:2; C17:3; C17:4; C17:5; C17:6; C17:7; C18:0; C18:1; C18:2; C18:3; C18:4; C18:5; C18:6; C18:7; C18:8; C19:0; C19:1; C19:2; C19:3; C19:4; C19:5; C19:6; C19:7; C19:8; C20:0; C20:1; C20:2; C20:3; C20:4; C20:5; C20:6; C20:7; C20:8; C20:9; C21:0; C21:1; C21:2; C21:3; C21:4; C21:5; C21:6; C21:7; C21:8; C21:9; C22:0; C22:1; C22:2; C22:3; C22:4; C22:5; C22:6; C22:7; C22:8; C22:9; C22:10; C23:0; C23:1; C23:2; C23:3; C23:4; C23:5; C23:6; C23:7; C23:8; C23:9; C23:10; C24:0; C24:1; C24:2; C24:3; C24:4; C24:5; C24:6; C24:7; C24:8; C24:9; C24:10; C24:11; C25:0; C25:1; C25:2; C25:3; C25:4; C25:5; C25:6; C25:7; C25:8; C25:9; C25:10; C25:11; C26:0; C26:1; C26:2; C26:3; C26:4; C26:5; C26:6; C26:7; C26:8; C26:9; C26:10; C26:11; C26:12; C27:0; C27:1; C27:2; C27:3; C27:4; C27:5; C27:6; C27:7; C27:8; C27:9; C27:10; C27:11; C27:12; C28:0; C28:1; C28:2; C28:3; C28:4; C28:5; C28:6; C28:7; C28:8; C28:9; C28:10; C28:11; C28:12; C28:13; C29:0; C29:1; C29:2; C29:3; C29:4; C29:5; C29:6; C29:7; C29:8; C29:9; C29:10; C29:11; C29:12; C29:13; C30:0; C30:1; C30:2; C30:3; C30:4; C30:5; C30:6; C30:7; C30:8; C30:9; C30:10; C30:11; C30:12; C30:13; C30:14; C31:0; C31:1; C31:2; C31:3; C31:4; C31:5; C31:6; C31:7; C31:8; C31:9; C31:10; C31:11; C31:12; C31:13; C31:14; C32:0; C32:1; C32:2; C32:3; C32:4; C32:5; C32:6; C32:7; C32:8; C32:9; C32:10; C32:11; C32:12; C32:13; C32:14; C32:15; C33:0; C33:1; C33:2; C33:3; C33:4; C33:5; C33:6; C33:7; C33:8; C33:9; C33:10; C33:11; C33:12; C33:13; C33:14; C33:15; C34:0; C34:1; C34:2; C34:3; C34:4; C34:5; C34:6; C34:7; C34:8; C34:9; C34:10; C34:11; C34:12; C34:13; C34:14; C34:15; C34:16; C35:0; C35:1; C35:2; C35:3; C35:4; C35:5; C35:6; C35:7; C35:8; C35:9; C35:10; C35:11; C35:12; C35:13; C35:14; C35:15; C35:16; C36:0; C36:1; C36:2; C36:3; C36:4; C36:5; C36:6; C36:7; C36:8; C36:9; C36:10; C36:11; C36:12; C36:13; C36:14; C36:15; C36:16; C36:17; C37:0; C37:1; C37:2; C37:3; C37:4; C37:5; C37:6; C37:7; C37:8; C37:9; C37:10; C37:11; C37:12; C37:13; C37:14; C37:15; C37:16; C37:17; C38:0; C38:1; C38:2; C38:3; C38:4; C38:5; C38:6; C38:7; C38:8; C38:9; C38:10; C38:11; C38:12; C38:13; C38:14; C38:15; C38:16; C38:17; C38:18; C39:0; C39:1; C39:2; C39:3; C39:4; C39:5; C39:6; C39:7; C39:8; C39:9; C39:10; C39:11; C39:12; C39:13; C39:14; C39:15; C39:16; C39:17; C39:18; C40:0; C40:1; C40:2; C40:3; C40:4; C40:5; C40:6; C40:7; C40:8; C40:9; C40:10; C40:11; C40:12; C40:13; C40:14; C40:15; C40:16; C40:17; C40:18; C40:19

청구항 15

청구항 4에 있어서, 콜레스테롤 분자는 3'-콜레스테릴-TEG CPG, 5'-콜레스테롤-TEG-CE 포스포라미다이트, 5'-콜레스테롤-CE 포스포라미다이트 및 콜레스테릴-TEG-CE 포스포라미다이트로 구성된 군에서 선택되는, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 16

청구항 1-15 중 어느 한 항에 있어서, 접합체 모이어티는 (i) 제1 가닥의 5' 말단 또는 3' 말단에 위치하거나; 또는 (ii) 제2 가닥의 5' 말단 또는 3' 말단에 위치하는, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 17

청구항 1-16 중 어느 한 항에 있어서, 접합체 모이어티는 제1 가닥의 3' 말단에 위치하는, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 18

청구항 1-17 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNA 분자와 접합체 모이어티 사이에 링커가 위치하는, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 19

청구항 1-18 중 어느 한 항에 있어서, 링커는 (i) C6; (ii) TEG; 또는 (iii) 디뉴클레오티드이고, 선택적으로 디뉴클레오티드는 CA인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 20

청구항 1-19 중 어느 한 항에 있어서, 연속 뉴클레오티드 서열은 적어도 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 또는 50개 뉴클레오티드 길이인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 21

청구항 1-20 중 어느 한 항에 있어서, 연속 뉴클레오티드 서열은 적어도 20개 뉴클레오티드 길이인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 연속 뉴클레오티드 서열은 20, 21, 22, 23 또는 24개 뉴클레오티드 길이인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 23

청구항 1-22 중 어느 한 항에 있어서, 제1 가닥은 연속 뉴클레오티드 서열로 구성되는, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 24

청구항 1-23 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNA 분자는 눈 앞쪽에 투여하기 위한 것인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 25

청구항 1-24 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNA 분자는 눈의 결막 또는 눈의 각막에 투여하기 위한 것인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 이중 가닥 RNA 분자는 구 결막, 눈꺼풀 결막, 안구 결막 및/또는 원개 결막에 투여하기 위한 것인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 27

청구항 1-26 중 어느 한 항에 있어서, 연속 뉴클레오티드 서열은 표적 서열에 적어도 75% 상보적인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 연속 뉴클레오티드 서열은 표적 서열에 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100% 상보적인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 29

청구항 1-28 중 어느 한 항에 있어서, 연속 뉴클레오티드 서열은 표적 서열에 대해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개 또는 그 이상의 불일치를 포함하는, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 30

청구항 2-29 중 어느 한 항에 있어서, 표적은 AHA-1인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 31

청구항 30에 있어서, AHA-1 표적은 서열 번호 1 또는 서열 번호 2를 포함하거나 이로 구성되는, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 32

청구항 1-31 중 어느 한 항에 있어서, 연속 뉴클레오티드 서열은 AHA-1 표적 서열에 상보적인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 연속 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 1 또는 서열 번호 2에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 34

청구항 1-33 중 어느 한 항에 있어서, 연속 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 3을 포함하거나 이로 구성되는, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 35

청구항 2-34 중 어느 한 항에 있어서, 표적의 발현은 대조군에 비해 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 95% 또는 100% 억제되는, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 36

청구항 1-35 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNA 분자는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드를 포함하는, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 37

청구항 36에 있어서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드는 2'-O-알킬-RNA; 2'-O-메틸 RNA(2'-OMe); 2'-O-메톡시에틸-RNA(2'-MOE), 2'-알콕시-RNA; 2'-아미노-DNA; 2'-플루오로-RNA; 2'-플루오로-DNA; 아라비노 핵산(ANA); 2'-플루오로-ANA; 잠금 핵산(LNA) 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 독립적으로 선택된 2' 당 변형된 뉴클레오시드인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 2' 당 변형된 뉴클레오시드는 친화도를 향상시키는 2' 당 변형된 뉴클레오시드인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 39

청구항 1-38 중 어느 한 항에 있어서, 연속 뉴클레오티드 서열 상의 뉴클레오시드들 사이에 위치한 하나 이상의 뉴클레오시드 간 링키지가 변형된, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 40

청구항 39에 있어서, 연속 뉴클레오티드 서열 상의 뉴클레오시드들 사이에 위치한 뉴클레오시드 간 링키지의 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%가 변형된, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 41

청구항 39 또는 청구항 40에 있어서, 변형된 뉴클레오시드 간 링키지 중 하나 이상 또는 전부가 포스포로티오에이트 링키지를 포함하는, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 이중 가닥 RNA 분자에 존재하는 모든 뉴클레오시드 간 링키지는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드 간 링키지인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 43

청구항 1-42 중 어느 한 항에 있어서, 이중 가닥 RNA 분자는 약학적으로 허용되는 염의 형태인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 44

청구항 43에 있어서, 염은 나트륨 염 또는 칼륨 염인, 이중 가닥 RNA 분자.

청구항 45

청구항 1-44 중 어느 한 항의 이중 가닥 RNA 분자 및 약학적으로 허용되는 희석제, 용매, 담체, 염 및/또는 보조제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 46

대상체의 질병을 치료 또는 예방하기 위한 방법으로서, 청구항 1-44 중 어느 한 항의 이중 가닥 RNA 분자 또는 청구항 45의 약학 조성물의 치료적 또는 예방적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 47

질병 치료용 약제로 사용하기 위한 청구항 1-44 중 어느 한 항의 이중 가닥 RNA 분자 또는 청구항 45의 약학 조성물.

청구항 48

질병의 치료 또는 예방용 약제를 제조하기 위한, 청구항 1-44 중 어느 한 항의 이중 가닥 RNA 분자 또는 청구항 45의 약학 조성물의 용도.

청구항 49

청구항 46에 따른 방법; 청구항 47에 따른 이중 가닥 RNA 분자 또는 약학 조성물; 또는 청구항 48에 따른 용도에 있어서, 질병은 결막염, 안구 건조증 또는 염증인, 방법, 이중 가닥 RNA 분자 또는 약학 조성물, 또는 용도.

청구항 50

청구항 46에 따른 방법; 청구항 47에 따른 이중 가닥 RNA 분자 또는 약학 조성물; 청구항 48에 따른 용도; 또는 청구항 49에 따른 방법, 이중 가닥 RNA 분자 또는 약학 조성물, 또는 용도에 있어서, 이중 가닥 RNA 분자는 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회 또는 1일 3회 초과로 눈에 투여되고; 선택적으로 이중 가닥 RNA 분자는 양쪽 눈에 투여되는, 방법, 이중 가닥 RNA 분자 또는 약학 조성물, 또는 용도.

청구항 51

청구항 46에 따른 방법; 청구항 47에 따른 이중 가닥 RNA 분자 또는 약학 조성물; 청구항 48에 따른 용도; 또는 청구항 49 또는 청구항 50에 따른 방법, 이중 가닥 RNA 분자 또는 약학 조성물, 또는 용도에 있어서, 이중 가닥 RNA 분자는 1일 미만, 또는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일 또는 7일 초과 동안 투여되고; 선택적으로 이중 가닥 RNA 분자는 양쪽 눈에 투여되는, 방법, 이중 가닥 RNA 분자 또는 약학 조성물, 또는 용도.

청구항 52

청구항 46에 따른 방법; 청구항 47에 따른 이중 가닥 RNA 분자 또는 약학 조성물; 청구항 48에 따른 용도; 또는 청구항 49 또는 청구항 50에 따른 방법, 이중 가닥 RNA 분자 또는 약학 조성물, 또는 용도에 있어서, 이중 가닥 RNA 분자는 (i) 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주 또는 6주 초과, 또는 (ii) 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월 또는 6개월 초과, 또는 (iii) 1년, 2년, 3년, 4년, 5년 또는 5년 초과의 기간 동안 투여되고; 선택적으로

이중 가닥 RNA 분자는 양쪽 눈에 투여되는, 방법, 이중 가닥 RNA 분자 또는 약학 조성물, 또는 용도.

청구항 53

세포 내 표적의 발현을 조절하기 위한 시험관 내 방법으로서, 청구항 1-44 중 어느 한 항의 이중 가닥 RNA 분자 또는 청구항 45의 약학 조성물을 유효량으로 세포에 투여하는 것을 포함하는, 시험관 내 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **발명의 분야**

[0002] 본 발명은 눈에 국소 투여하기 위한, 적어도 하나의 접합체 모이어티에 접합된 이중 가닥 RNA 분자 및 이의 약학 조성물; 및 눈의 병태 및 질병의 치료에 있어서의 이들의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] **배경**

[0004] siRNA 분자와 같은 이중 가닥 RNA 분자는 특히 전사 후 상보적 mRNA에 결합하여 표적 핵산의 발현을 억제함으로써 표적 핵산의 발현을 조절할 수 있으며, 일반적으로 표적 mRNA의 분해 및 이의 번역 손실을 유도한다.

[0005] siRNA 분자는 세포질 내에서 RNA-유도된 침묵 복합체(RISC)를 통해 RNA 의존적 유전자 침묵을 유도할 수 있으며, 상기 세포질에서 이들 분자는 촉매적 RISC 성분인 아르고노트(argonaute)와 상호 작용한다.

[0006] 이중 가닥 RNA 분자는, 이중 가닥 RNA 분자의 안정성을 감소시키거나 이중 가닥 RNA 분자가 표적 부위에 효과적으로 전달되지 못하게 하는 다양한 요인에 의해 조직 부위나 특정 세포로 전달되는 것이 손상되거나 방해 받을 수 있다. 이러한 요인에는 내인성 RNase에 대한 민감성, 짧은 반감기 및 낮은 안정성, 면역계에 의한 인식, 큰 크기와 전하 및 엔도솜 트래핑 등이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

[0007] 전달에 특히 어려움을 보이는 조직 부위 중 하나는 눈인데, 눈은 다양한 병태, 병리 및 질병의 영향을 받을 수 있다. 이중 가닥 RNA 분자를 눈에 전달하면 이중 가닥 RNA 분자가 병리 유발에 관여할 수 있는 눈에서 발현되는 관심 유전자를 표적하여 억제하기 때문에 유익한 치료 효과가 나타날 수 있다.

[0008] 눈에 이중 가닥 RNA 분자를 전달하기 위한 효과적인 메커니즘이 필요하다.

발명의 내용

[0009] **발명의 요약**

[0010] 본 발명은 눈에 국소 투여하기 위한 이중 가닥 RNA 분자를 제공하며, 여기서 이중 가닥 RNA 분자는 표적 서열에 결합할 수 있고, 이중 가닥 RNA 분자는 5' 말단과 3' 말단을 갖는 제1 가닥 및 5' 말단과 3' 말단을 갖는 제2 가닥을 포함하고, 여기서 제1 가닥은 제2 가닥에 상보적이고, 제1 가닥은 표적 서열에 상보적인 적어도 8개 뉴클레오티드 길이의 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서 이중 가닥 RNA 분자는 적어도 하나의 접합체 모이어티에 접합된다.

[0011] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 작은 간섭 RNA(siRNA) 분자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 헤어핀 RNA(shRNA) 분자일 수 있다.

[0012] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 표적의 발현을 억제할 수 있다.

[0013] 이중 가닥 RNA 분자는 적어도 하나의 접합체 모이어티에 접합된다. 일부 실시형태에서 이중 가닥 RNA 분자는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 접합체 모이어티에 접합될 수 있다. 일부 실시형태에서 이중 가닥 RNA 분자는 2개의 접합체 모이어티에 접합될 수 있다. 일부 실시형태에서 이중 가닥 RNA 분자는 3개의 접합체 모이어티에 접합될 수 있다.

[0014] 일부 실시형태에서 접합체 모이어티 또는 접합체 모이어티들은 이중 가닥 RNA 분자에 공유 부착될 수 있다.

[0015] 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 지방산 분자 또는 콜레스테롤 분자이다.

[0016] 2개 이상의 접합체 모이어티가 존재하는 실시형태에서, 접합체 모이어티는 하나 이상의 지방산 분자와 하나 이

상의 콜레스테롤 분자의 조합일 수 있거나, 2개 이상의 지방산 분자의 조합일 수 있거나, 2개 이상의 콜레스테롤 분자의 조합일 수 있다. 2개 이상의 접합체 모이어티가 존재하는 실시형태에서, 각 접합체 모이어티는 독립적으로 선택되므로 이중 가닥 RNA 분자에 부착된 접합체 모이어티들은 동일할 수도 있고 동일하지 않을 수도 있다.

[0017] 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 지방산 분자이다.

[0018] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25, C26, C27, C28, C29, C30, C31, C32, C33, C34, C35, C36, C37, C38, C39 및 C40으로 구성된 목록에서 선택된다.

[0019] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 C16 일 수 있다.

[0020] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 C22 일 수 있다.

[0021] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 분지형이다. 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 비분지형이다.

[0022] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 포화된다. 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 불포화된다.

[0023] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 하나 이상의 이중 결합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 또는 19개 이상의 탄소 이중 결합을 포함한다.

[0024] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 하나 이상의 삼중 결합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 또는 19개 이상의 탄소 삼중 결합을 포함한다.

[0025] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 다음으로 구성된 목록에서 선택된다: C3:0; C4:0; C4:1; C5:0; C5:1; C6:0; C6:1; C6:2; C7:0; C7:1; C7:2; C8:0; C8:1; C8:2; C8:3; C9:0; C9:1; C9:2; C9:3; C10:0; C10:1; C10:2; C10:3; C10:4; C11:0; C11:1; C11:2; C11:3; C11:4; C12:0; C12:1; C12:2; C12:3; C12:4; C12:5; C13:0; C13:1; C13:2; C13:3; C13:4; C13:5; C14:0; C14:1; C14:2; C14:3; C14:4; C14:5; C14:6; C15:0; C15:1; C15:2; C15:3; C15:4; C15:5; C15:6; C16:0; C16:1; C16:2; C16:3; C16:4; C16:5; C16:6; C16:7; C17:0; C17:1; C17:2; C17:3; C17:4; C17:5; C17:6; C17:7; C18:0; C18:1; C18:2; C18:3; C18:4; C18:5; C18:6; C18:7; C18:8; C19:0; C19:1; C19:2; C19:3; C19:4; C19:5; C19:6; C19:7; C19:8; C20:0; C20:1; C20:2; C20:3; C20:4; C20:5; C20:6; C20:7; C20:8; C20:9; C21:0; C21:1; C21:2; C21:3; C21:4; C21:5; C21:6; C21:7; C21:8; C21:9; C22:0; C22:1; C22:2; C22:3; C22:4; C22:5; C22:6; C22:7; C22:8; C22:9; C22:10; C23:0; C23:1; C23:2; C23:3; C23:4; C23:5; C23:6; C23:7; C23:8; C23:9; C23:10; C24:0; C24:1; C24:2; C24:3; C24:4; C24:5; C24:6; C24:7; C24:8; C24:9; C24:10; C24:11; C25:0; C25:1; C25:2; C25:3; C25:4; C25:5; C25:6; C25:7; C25:8; C25:9; C25:10; C25:11; C26:0; C26:1; C26:2; C26:3; C26:4; C26:5; C26:6; C26:7; C26:8; C26:9; C26:10; C26:11; C26:12; C27:0; C27:1; C27:2; C27:3; C27:4; C27:5; C27:6; C27:7; C27:8; C27:9; C27:10; C27:11; C27:12; C28:0; C28:1; C28:2; C28:3; C28:4; C28:5; C28:6; C28:7; C28:8; C28:9; C28:10; C28:11; C28:12; C28:13; C29:0; C29:1; C29:2; C29:3; C29:4; C29:5; C29:6; C29:7; C29:8; C29:9; C29:10; C29:11; C29:12; C29:13; C30:0; C30:1; C30:2; C30:3; C30:4; C30:5; C30:6; C30:7; C30:8; C30:9; C30:10; C30:11; C30:12; C30:13; C30:14; C31:0; C31:1; C31:2; C31:3; C31:4; C31:5; C31:6; C31:7; C31:8; C31:9; C31:10; C31:11; C31:12; C31:13; C31:14; C32:0; C32:1; C32:2; C32:3; C32:4; C32:5; C32:6; C32:7; C32:8; C32:9; C32:10; C32:11; C32:12; C32:13; C32:14; C32:15; C33:0; C33:1; C33:2; C33:3; C33:4; C33:5; C33:6; C33:7; C33:8; C33:9; C33:10; C33:11; C33:12; C33:13; C33:14; C33:15; C34:0; C34:1; C34:2; C34:3; C34:4; C34:5; C34:6; C34:7; C34:8; C34:9; C34:10; C34:11; C34:12; C34:13; C34:14; C34:15; C34:16; C35:0; C35:1; C35:2; C35:3; C35:4; C35:5; C35:6; C35:7; C35:8; C35:9; C35:10; C35:11; C35:12; C35:13; C35:14; C35:15; C35:16; C36:0; C36:1; C36:2; C36:3; C36:4; C36:5; C36:6; C36:7; C36:8; C36:9; C36:10; C36:11; C36:12; C36:13; C36:14; C36:15; C36:16; C36:17; C37:0; C37:1; C37:2; C37:3; C37:4; C37:5; C37:6; C37:7; C37:8; C37:9; C37:10; C37:11; C37:12; C37:13; C37:14; C37:15; C37:16; C37:17; C38:0; C38:1; C38:2; C38:3; C38:4; C38:5; C38:6; C38:7; C38:8; C38:9; C38:10; C38:11; C38:12; C38:13; C38:14; C38:15; C38:16; C38:17; C38:18; C39:0; C39:1; C39:2; C39:3; C39:4;

C39:5; C39:6; C39:7; C39:8; C39:9; C39:10; C39:11; C39:12; C39:13; C39:14; C39:15; C39:16; C39:17; C39:18; C40:0; C40:1; C40:2; C40:3; C40:4; C40:5; C40:6; C40:7; C40:8; C40:9; C40:10; C40:11; C40:12; C40:13; C40:14; C40:15; C40:16; C40:17; C40:18; C40:19.

[0026] 2개 이상의 지방산 분자가 존재하는 실시형태에서, 각 지방산 분자는 독립적으로 선택되므로 이중 가닥 RNA 분자에 부착된 지방산 분자들은 동일할 수도 있고 동일하지 않을 수도 있다.

[0027] 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 콜레스테롤 분자이다.

[0028] 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 분자는 3'-콜레스테릴-TEG CPG, 5'-콜레스테롤-TEG-CE 포스포라미다이트, 5'-콜레스테롤-CE 포스포라미다이트 및 콜레스테릴-TEG-CE 포스포라미다이트로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 2개 이상의 콜레스테롤 모이어티가 존재하는 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 3'-콜레스테릴-TEG CPG, 5'-콜레스테롤-TEG-CE 포스포라미다이트, 5'-콜레스테롤-CE 포스포라미다이트 및 콜레스테릴-TEG-CE 포스포라미다이트로 구성된 군에서 선택된 조합일 수 있다.

[0029] 2개 이상의 콜레스테롤 분자가 존재하는 실시형태에서, 각 콜레스테롤 분자는 독립적으로 선택되므로 이중 가닥 RNA 분자에 부착된 콜레스테롤 분자들은 동일할 수도 있고 동일하지 않을 수도 있다.

[0030] 2개 이상의 접합체 모이어티이 존재하는 실시형태에서, 접합체 모이어티는 C16, C22 또는 콜레스테롤 분자 중에서 선택된 하나 이상의 조합일 수 있다.

[0031] 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 이중 가닥 RNA 분자의 가닥들 중 하나의 5' 말단 또는 3' 말단에 위치할 수 있다. 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 이중 가닥 RNA 분자의 제1 가닥의 3' 말단에 위치할 수 있다. 제1 가닥은 센스 방향일 수 있다(즉, 제1 가닥은 센스 가닥이다). 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 이중 가닥 RNA 분자의 센스 가닥의 3' 말단에 위치할 수 있다.

[0032] 일부 실시형태에서, 링커는 이중 가닥 RNA 분자와 접합체 모이어티 사이에 위치할 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 C6일 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 TEG일 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 디뉴클레오티드이다. 일부 실시형태에서, 디뉴클레오티드는 CA이다(즉, 일부 실시형태에서 링커는 CA 디뉴클레오티드이다).

[0033] 이중 가닥 RNA 분자가 2개 이상의 접합체 모이어티를 포함하는 일부 실시형태에서, 링커는 이중 가닥 RNA 분자와 각각의 접합체 모이어티 사이에 위치할 수 있다. 일부 실시형태에서 링커는 각 접합체 모이어티들 사이에 위치할 수 있다.

[0034] 일부 실시형태에서 링커는 절단가능한 링커 일 수 있다.

[0035] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 적어도 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 또는 50개 뉴클레오티드 길이일 수 있다.

[0036] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 적어도 20개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 20, 21, 22, 23 또는 24개 뉴클레오티드 길이일 수 있다.

[0037] 일부 실시형태에서, 제1 가닥은 연속 뉴클레오티드 서열로 구성될 수 있다.

[0038] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 눈 앞쪽에 투여하기 위한 것일 수 있다.

[0039] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 눈의 결막이나 눈의 각막에 투여되기 위한 것일 수 있다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 구 결막, 눈꺼풀 결막, 안구 결막 및/또는 원개 결막에 투여하기 위한 것일 수 있다.

[0040] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 표적 서열에 적어도 약 75% 상보적일 수 있다. 연속 뉴클레오티드 서열은 표적 서열에 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 완전히(예를 들어, 약 100%) 상보적일 수 있다. 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 표적 서열에 대해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개 또는 그 이상의 불일치를 포함할 수 있다.

[0041] 일부 실시형태에서, 표적은 AHA-1일 수 있다. 일부 실시형태에서, AHA-1 표적은 서열 번호 1 또는 서열 번호 2를 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0042] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 AHA-1 표적 서열에 상보적일 수 있다. 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 1 또는 서열 번호 2에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 일부 실

시형태에서, 연속된 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 3을 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0043] 일부 실시형태에서, 표적의 발현은 대조군에 비해 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 95% 또는 약 100% 만큼 억제될 수 있다. 위에서 언급한 표적의 발현 억제 %는 대조군 대비 감소 %로 이해할 수 있을 것이며, 여기서 용어 "대조군"은 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자에 노출되지 않은 세포에서의 표적 발현을 의미한다.

[0044] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드는 2'-O-알킬-RNA; 2'-O-메틸 RNA(2'-OMe); 2'-O-메톡시에틸-RNA(2'-MOE), 2'-알콕시-RNA; 2'-아미노-DNA; 2'-플루오로-RNA; 2'-플루오로-DNA; 아라비노 핵산(ANA); 2'-플루오로-ANA; 잠금 핵산(LNA) 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 독립적으로 선택된 하나 이상의 2' 당 변형된 뉴클레오시드 일 수 있다. 일부 실시형태에서, 2' 당 변형된 뉴클레오시드는 친화도를 향상시키는 2' 당 변형된 뉴클레오시드이다.

[0045] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오시드들 사이에 위치한 하나 이상의 뉴클레오시드 간 링키지가 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열 상의 뉴클레오시드들 사이에 위치한 뉴클레오시드 간 링키지의 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%가 변형될 수 있다.

[0046] 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오시드 간 링키지 중 하나 이상 또는 전부가 포스포로티오에이트 링키지를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자에 존재하는 모든 뉴클레오시드 간 링키지는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드 간 링키지일 수 있다.

[0047] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 약학적으로 허용되는 염의 형태일 수 있다. 염은 나트륨염 또는 칼륨염일 수 있다.

[0048] 이중 가닥 RNA 분자는 단리된 이중 가닥 RNA 분자이거나 정제된 이중 가닥 RNA 분자일 수 있다. 일부 실시형태에서 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 제작된(인공적으로 만들어진) 이중 가닥 RNA 분자이다.

[0049] 본 발명은 또한 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자 및 약학적으로 허용되는 희석제, 용매, 담체, 염 및/또는 보조제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0050] 본 발명은 또한 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자 또는 본 발명의 약학 조성물의 치료적 또는 예방적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 질병을 치료 또는 예방하기 위한 방법을 제공한다.

[0051] 본 발명은 또한 질병 치료용 약제로 사용하기 위한, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자 또는 본 발명의 약학 조성물을 제공한다.

[0052] 본 발명은 또한 질병의 치료 또는 예방용 약제를 제조하기 위한, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자 또는 본 발명의 약학 조성물의 용도를 제공한다.

[0053] 일부 실시형태에서, 질병은 결막염, 안구 건조증 또는 염증일 수 있다.

[0054] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회 또는 1일 3회 초과로 눈에 투여될 수 있다.

[0055] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 1일 미만 동안 투여되거나, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일 또는 7일 초과 동안 투여될 수 있다.

[0056] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 다음의 기간 동안 투여될 수 있다:

[0057] (i) 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주 또는 6주 초과; 또는

[0058] (ii) 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월 또는 6개월 초과; 또는

[0059] (iii) 1년, 2년, 3년, 4년, 5년 또는 5년 초과.

[0060] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 한쪽 눈 또는 양쪽 눈에 투여될 수 있다.

[0061] 본 발명은 또한 세포 내 표적의 발현을 조절하기 위한 시험관 내 방법을 제공하며, 이 방법은 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자 또는 본 발명의 약학 조성물을 유효량으로 세포에 투여하는 것을 포함한다.

[0062] **서열 목록**

[0063] 본 출원과 함께 제출된 서열 목록은 본 명세서에 참고로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0064] **도면의 간단한 설명**

도 1 - 마지막 투여 후 96시간 후 토끼 눈꺼풀 결막 샘플에서 HPRT로 정규화된 AHSA1 발현. 서열 번호 3의 서열을 포함하는 siRNA 분자의 경우 결막 전체에서 20-25%의 녹다운이 관찰되었으며, C16-, C22- 및 콜레스테롤이 접합된 AHSA1 siRNA의 녹다운이 네이키드 siRNA(즉, 접합되지 않은 siRNA)에 비해 우수했다.

도 2: 마지막 투여 후 96시간 후 토끼 눈꺼풀 결막 샘플에서 AHSA1 siRNA 함량. 서열 번호 3의 서열을 포함하는 siRNA 분자의 경우 결막 내 함량이 증가하는 것으로 관찰되었으며, C16-, C22-, 그리고 특히 콜레스테롤이 접합된 AHA1 siRNA의 함량이 네이키드 siRNA(즉, 접합되지 않은 siRNA)에 비해 우수했다.

도 3. 마지막 투여 후 96시간 후 토끼 구 결막 EYEPRIM 샘플에서 HPRT로 정규화된 AHSA1 발현. 결막 EYEPRIM 샘플에서 69%의 녹다운(C16-접합 서열 번호 3), 65%의 녹다운(C22-접합 서열 번호 3) 및 61%의 녹다운(콜레스테롤-접합 서열 번호 3)이 네이키드(즉, 접합되지 않은 siRNA) siRNA(서열 번호 3(접합 없음))의 4%와 비교되었고, 네이키드 siRNA에 비해 C16-(p=0.02 스튜던트 t-검정)의 경우 유의하게 우수한 녹다운, C22- 및 콜레스테롤-접합 AHSA1 siRNA의 경우 우수한 녹다운을 나타냈다.

도 4. 다양한 지방산 접합 AHA-1 특이적 siRNA(FA-siRNA)의 생물물리학적 분석. 컬럼 3은 25 μM 농도에서 다양한 지방산 접합체가 다양한 올리고머 상태로 존재하는 경향을 보여주며(AUC로 측정한 최종 올리고머 상태); 컬럼 4는 25 μM PBS에 용해했을 때 다양한 FA-siRNA의 단량체 백분율을 보여주며; 컬럼 5는 마우스 혈청 알부민(MSA, ITC로 결정)에 대한 결합 친화도를 보여주며; 컬럼 6은 MSA에 결합된 FA-siRNA 접합체의 수를 보여준다.

도 5. 서열 번호 3의 서열을 포함하는 네이키드 siRNA 분자, 서열 번호 3의 서열을 포함하는 C16-접합 siRNA 분자, 서열 번호 3의 서열을 포함하는 C22-접합 siRNA 분자 및 서열 번호 3의 서열을 포함하는 콜레스테롤-접합 siRNA 분자에 대해 결막 조직 ISH 염색을 관찰하였는데, 네이키드 AHSA1 siRNA에 비해 C16, C22 및 콜레스테롤 AHSA1 siRNA에서 우수한 조직 염색을 나타내는 반면, C16 및 C22 AHAS1 siRNA는 네이키드 및 콜레스테롤 AHAS1 siRNA에 비해 가장 우수한 결과를 보였음을 나타낸다. 또한, 네이키드 AHSA1 siRNA에 대한 염색은 주로 표층 결막에 위치했지만, C16, C22 및 콜레스테롤 AHSA1 siRNA에 대한 염색도 결막 조직의 실질에 위치했다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0065] **발명의 상세한 설명**

[0066] **핵산 분자**

[0067] 본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산 분자" 또는 "치료용 핵산 분자"는 일반적으로 당업자가 이해하는 바와 같이 2개 이상의 공유 연결된 뉴클레오시드(즉, 뉴클레오티드 서열)를 포함하는 분자로 정의된다.

[0068] 본 발명에서 언급된 핵산 분자는 일반적으로 50개 미만의 뉴클레오티드 길이의 치료용 올리고뉴클레오티드이다.

[0069] 본 명세서에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드", "핵산", "핵산 분자" 및 "핵산 서열"은 서로 동의어로 사용된다.

[0070] 핵산 분자는 일반적으로 실험실에서 고체상 화학 합성한 후 정제 및 단리하여 통해 만들어진다. 핵산 분자의 서열을 언급할 때는 공유 연결된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 핵염기 모이어티의 서열이나 순서, 또는 이의 변형을 의미한다. 본 발명의 핵산 분자는 인공적으로 만들어지고, 화학적으로 합성되며, 일반적으로 정제되거나 단리된다. 본 발명의 핵산 분자는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0071] 본 발명의 핵산 분자는 2' 당 변형된 뉴클레오시드와 같은 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 본 발명의 핵산 분자는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 간 링키지, 예를 들어, 하나 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드 간 링키지를 포함할 수 있다.

[0072] **올리고뉴클레오티드**

[0073] 본 명세서에서 사용되는 용어 "올리고뉴클레오티드"는 일반적으로 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이 2개 이

상의 공유 연결된 뉴클레오시드를 포함하는 분자로 정의된다. 이러한 공유 결합된 뉴클레오시드는 핵산 분자 또는 올리고머로도 지칭될 수 있다.

[0074] **이중 가닥 RNA 분자**

[0075] 본 명세서에서, "RNA 간섭(RNAi) 분자", "RNAi 분자" 또는 "RNAi"라는 용어는 세포질에서 RNA 유도 침묵 복합체(RISC)를 통해 RNA 의존적 유전자 침묵을 유도할 수 있는 짧고 전형적으로 이중 가닥인 RNA 분자를 지칭하며, 상기 세포질에서 이들은 촉매적 RISC 구성 요소인 아르고노트와 상호 작용한다. RNAi 분자의 한 유형은 siRNA(작은 간섭 RNA)로, 전형적으로 이중 가닥 RNA 분자이며, 전사 후 상보적인 mRNA와 결합하여 일반적으로 mRNA의 분해와 번역 손실을 초래한다. 다시 말해, 본 명세서에서 사용되는 용어 "siRNA 분자"는 표적 핵산에, 특히, 표적 핵산 상의 연속 서열에 결합함으로써 표적 유전자의 발현을 조절할 수 있는 핵산 분자로 정의된다. siRNA 분자는 일반적으로 20-24개 염기쌍 길이이고, 보통 인산화된 5' 말단과 하이드록실화된 3' 말단에 2개의 돌출부 뉴클레오티드를 가진다. 소형 간섭 RNA(siRNA)는 짧은 간섭 RNA 또는 침묵 RNA라고도 알려져 있을 수 있다.

[0076] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 작은 간섭 RNA(siRNA) 분자일 수 있다.

[0077] 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 5' 말단과 3' 말단을 갖는 제1 가닥, 및 5' 말단과 3' 말단을 갖는 제2 가닥을 포함하며, 여기서 제1 가닥은 제2 가닥에 상보적이다.

[0078] 이중 가닥 RNA 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥으로 구성된 것으로 설명할 수 있다.

[0079] 일부 실시형태에서, 제1 가닥은 센스 가닥(즉, 센스 방향)일 수 있고 제2 가닥은 안티센스 가닥(즉, 안티센스 방향)일 수 있다.

[0080] 일부 실시형태에서, 제1 가닥은 안티센스 가닥(즉, 안티센스 방향)일 수 있고 제2 가닥은 센스 가닥(즉, 센스 방향)일 수 있다.

[0081] 또 다른 유형의 RNAi 분자는 헤어핀 구조를 가진 인공 RNA 분자인 소형 헤어핀 RNA(shRNA)로, 발현 시 DICER와 RNA 환원 침묵 복합체(RISC)를 통해 표적 mRNA의 수준을 낮출 수 있다. 작은 헤어핀 RNA(shRNA)는 짧은 헤어핀 RNA라고도 알려져 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 헤어핀 RNA(shRNA) 분자일 수 있다.

[0082] RNAi 분자는 관심 유전자의 RNA 서열을 기초로 설계될 수 있다. 해당 RNAi 분자는 화학적으로 또는 시험관 내 전사를 통해 합성되거나 벡터나 PCR 생성물로부터 발현될 수 있다.

[0083] siRNA와 shRNA 분자는 일반적으로 20 내지 50개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 25 내지 35개 뉴클레오티드 길이)이며, Dicer라는 엔도뉴클레아제와 상호 작용할 수 있는데, Dicer는 dsRNA를 특징적인 2개 염기 3' 돌출부를 갖는 19 내지 23개 염기쌍의 짧은 간섭 RNA(siRNA)로 처리한 다음 RNA 유도 침묵 복합체(RISC)에 통합되는 것으로 알려져 있다. Dicer 기질의 효과적인 확장된 형태는 본 명세서에 참고로 포함된 US 8,349,809 및 US 8,513,207에 기술되어 있다. 적절한 표적 mRNA에 결합하면, RISC 내의 하나 이상의 엔도뉴클레아제가 표적을 절단하여 침묵을 유도한다. RNAi 제제는 변형된 뉴클레오티드 간 링키지 및 높은 친화도 뉴클레오시드, 예를 들어, 2'-4' 이중 고리 리보스 변형된 뉴클레오시드(LNA 및 cET 포함)를 사용하여 화학적으로 변형될 수 있다.

[0084] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 약 8 내지 50개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0085] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 약 12 내지 50개 뉴클레오티드 길이, 예를 들어, 약 15 내지 45개, 약 20 내지 40개, 약 25 내지 35개 길이의 연속 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 구성된다.

[0086] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 약 18 내지 25개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 약 18 내지 30개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 약 18 내지 35개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 약 20 내지 25개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 약 20 내지 30개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 약 20 내지 35개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다. 본 명세서에 제시된 모든 범위에는 범위 종점이 포함된다는 것을 이해해야 한다. 따라서 이중 가닥 RNA 분자가 약 10 내지 30개의 뉴클레오티드를 포함한다고 하면 약 10개 및 약 30개의 뉴클레오티드 길이가 모두 포함된다.

[0087] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 약 50개 이하의 뉴클레오티드, 약 45개 이하의 뉴클레오티드, 약 40

개 이하의 뉴클레오티드, 약 35개 이하의 뉴클레오티드, 약 30개 이하의 뉴클레오티드, 약 25개 이하의 뉴클레오티드, 약 20개 이하의 뉴클레오티드, 또는 약 15개 이하의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 구성된다.

[0088] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 약 10개 이상의 뉴클레오티드, 약 15개 이상의 뉴클레오티드, 약 20개 이상의 뉴클레오티드, 약 25개 이상의 뉴클레오티드, 약 30개 이상의 뉴클레오티드, 약 35개 이상의 뉴클레오티드, 약 40개 이상의 뉴클레오티드, 또는 약 45개 이상의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 구성된다.

[0089] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 적어도 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 또는 50개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0090] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 적어도 약 20개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 이중 가닥 RNA 분자는 20, 21, 22, 23 또는 24개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다.

[0091] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 18개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0092] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 19개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0093] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 20개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0094] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 21개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0095] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 22개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0096] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 23개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0097] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 24개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0098] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 25개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0099] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 26개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0100] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 27개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0101] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 28개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0102] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 29개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0103] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 30개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0104] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 31개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0105] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 32개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0106] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 33개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0107] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 34개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0108] 일부 실시예에서, 이중 가닥 RNA 분자는 35개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0109] 이중 가닥 RNA 분자는 동물, 특히 포유류의 눈에 발현되는 표적 핵산에 결합한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 일반적으로 눈에서 발현되는 표적 핵산 서열의 발현을 억제 및/또는 조절하기 위한 것이다.

[0110] **연속 뉴클레오티드 서열**

[0111] "연속 뉴클레오티드 서열"이란 용어는 표적 핵산에 상보적인 이중 가닥 RNA 분자 영역을 말하며, 이는 올리고뉴클레오티드 모티프 서열일 수도 있고 이를 포함할 수도 있다. 본 명세서에서 이 용어는 "연속 핵염기 서열"이라는 용어와 상호 교환적으로 사용된다.

[0112] 이중 가닥 RNA 분자의 한 가닥은 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 제1 가닥은 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 가닥은 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0113] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자의 가닥은 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 선택적으로 추가 뉴클레오티드, 예를 들어, 작용기(예를 들어, 접합체 기)를 해당 연속 뉴클레오티드 서열에 부착하는 데 사용될 수 있는 뉴클레오티드 링커 영역을 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 링커 영역은 표적 핵산에 상보적일

수도 있고 그렇지 않을 수도 있다.

[0114] 이중 가닥 RNA 분자(또는 이의 가닥들)의 연속 뉴클레오티드 서열은 그 자체의 올리고뉴클레오티드보다 길 수 없고, 이중 가닥 RNA 분자(또는 이의 가닥들)는 연속 뉴클레오티드 서열보다 짧을 수 없는 것으로 이해된다.

[0115] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자의 제1 가닥 또는 제2 가닥의 모든 뉴클레오시드가 연속 뉴클레오티드 서열을 구성할 수 있다.

[0116] 연속 뉴클레오티드 서열이란 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자의 제1 또는 제2 가닥에 있는 뉴클레오티드 서열로서, 표적 핵산, 표적 서열 또는 표적 부위 서열에 상보적이고, 일부 경우에는 완전히 상보적이다.

[0117] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 약 8 내지 50개 뉴클레오티드 길이이다.

[0118] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 약 12 내지 50개 뉴클레오티드 길이, 예를 들어, 약 15 내지 45개, 약 20 내지 40개, 약 25 내지 35개 길이의 연속 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 구성된다.

[0119] 일부 실시예에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 약 18-25개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시예에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 약 18-30개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시예에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 약 18-35개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시예에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 약 20-25개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시예에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 약 20-30개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시예에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 약 20-35개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다. 본 명세서에 제시된 모든 범위에는 범위 종점이 포함된다는 것을 이해해야 한다. 따라서 연속 뉴클레오티드 서열이 약 10 내지 30개의 뉴클레오티드를 포함한다고 하면 약 10개 및 약 30개의 뉴클레오티드 모두가 포함된다.

[0120] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 약 50개 이하의 뉴클레오티드, 약 45개 이하의 뉴클레오티드, 약 40개 이하의 뉴클레오티드, 약 35개 이하의 뉴클레오티드, 약 30개 이하의 뉴클레오티드, 약 25개 이하의 뉴클레오티드, 약 20개 이하의 뉴클레오티드, 또는 약 15개 이하의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0121] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 약 10개 이상의 뉴클레오티드, 약 15개 이상의 뉴클레오티드, 약 20개 이상의 뉴클레오티드, 약 25개 이상의 뉴클레오티드, 약 30개 이상의 뉴클레오티드, 약 35개 이상의 뉴클레오티드, 약 40개 이상의 뉴클레오티드, 또는 약 45개 이상의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0122] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 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 또는 50개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0123] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 적어도 약 20개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 연속 뉴클레오티드 서열은 20, 21, 22, 23 또는 24개 뉴클레오티드 길이일 수 있다.

[0124] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 18개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0125] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 19개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0126] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 20개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0127] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 21개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0128] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 22개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0129] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 23개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0130] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 24개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0131] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 25개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0132] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 26개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0133] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 27개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0134] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 28개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0135] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 29개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0136] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 30개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0137] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 31개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0138] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 32개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0139] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 33개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0140] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 34개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0141] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 35개 뉴클레오티드 길이를 포함하거나 이로 구성된다.

[0142] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 이중 가닥 RNA 분자의 제1 및/또는 제2 가닥과 동일한 길이이다.

[0143] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자의 제1 가닥 또는 제2 가닥은 연속 뉴클레오티드 서열을 구성한다.

[0144] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자의 제1 가닥 또는 제2 가닥은 연속 뉴클레오티드 서열이다.

[0145] **접합체 모이어티**

[0146] 발명자들은 표적 서열에 결합할 수 있는 이중 가닥 RNA 분자가 적어도 하나의 접합체 모이어티에 이중 가닥 RNA 분자를 접합시킴으로써 눈에 효과적으로 투여될 수 있다는 것을 확인했다.

[0147] 실시예에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자를 눈에 투여하면 표적, 특히 눈에서 발현되는 표적의 발현을 억제할 수 있다.

[0148] 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 적어도 하나의 접합체 모이어티에 부착된다. 일부 실시형태에서 이중 가닥 RNA 분자는 2개 이상의 접합체 모이어티에 부착될 수 있다.

[0149] 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티 또는 접합체 모이어티들은 본 발명의 접합체로 지칭될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 적어도 하나의 접합체 모이어티에 공유 부착된다.

[0150] "부착된", "위치된", "연결된" 및 "접합된"이라는 용어는 이중 가닥 RNA 분자와 접합체 모이어티를 참조할 때 상호 교환적으로 사용할 수 있다.

[0151] 본 명세서에서 사용되는 용어 "접합체"는 접합체 모이어티에 연결된, 예를 들어, 공유 연결된 이중 가닥 RNA 분자를 지칭한다. 접합체 모이어티는 이중 가닥 RNA 분자에 직접 연결, 예를 들어, 공유 연결될 수도 있거나, 또는 접합체 모이어티는 링커기를 통해 이중 가닥 RNA 분자에 연결될 수도 있다.

[0152] 올리고뉴클레오티드 접합체와 그 합성에 대해서는 Manoharan이 Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications, S.T. Crooke, ed., Ch. 16, Marcel Dekker, Inc., 2001에서 그리고 Manoharan이 Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 2002, 12, 103에서 종합적으로 검토하여 보고한 바 있다.

[0153] 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 탄수화물, 세포 표면 수용체 리간드, 약물 물질, 호르몬, 친유성 물질, 중합체, 단백질, 펩티드, 독소(예를 들어, 박테리아 독소), 비타민, 바이러스 단백질(예를 들어, 캡시드) 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된다.

[0154] 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 지방산 분자이다. 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티들은 지방산 분자들이다.

[0155] "지방산"은 일반적으로 탄소 원자 사슬로 구성된 분자이며, 일반적으로 사슬의 길이를 따라 탄소 원자에 수소 원자가 결합되어 있다. 즉, 지방산 분자는 탄화수소로 구성되어 있다. 수소 원자는 일반적으로 지방산 분자 사슬의 한쪽 단부(또는 말단)에 존재하고 카르복실기(-COOH)는 일반적으로 사슬의 다른 쪽 단부(또는 말단)에 존재한다. 실제로, 분자를 산(예를 들어, 카르복실산)으로 만드는 것은 카르복실기이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "지방산" 및 "지방산 분자"는 상호 교환가능한 것으로 간주된다.

[0156] "지방산"이라는 용어는 하나의 지방산 분자는 물론, 2개 이상의 지방산 분자의 혼합물, 예를 들어, 2개 이상의 서로 다른 지방산 분자도 포함한다.

[0157] 2개 이상의 지방산 분자가 이중 가닥 RNA 분자에 부착되는 실시형태에서, 각 지방산 분자는 독립적으로 선택되므로 이중 가닥 RNA 분자에 부착된 지방산 분자들은 동일할 수도 있고 동일하지 않을 수도 있다.

[0158] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 지방산이 링커를 통해 연결될 수 있다. 2개 이상의 지방산을 연결하는 링커는 2개 이상의 지방산 분자 각각의 임의의 지점에 부착될 수 있다는 것이 이해할 수 있을 것이다.

[0159] 지방산 분자는 탄소 원자로 구성된 분자일 수 있다. 지방산 분자는 화학식 CX를 가질 수 있는데, 여기서 C는 탄소를 의미하고 X는 지방산 분자에 존재하는 탄소 원자의 총 수(예를 들어, 탄소 사슬 길이)를 나타낸다(예를 들어, "C12"는 탄소 12개의 지방산 분자를 지칭한다).

[0160] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 3-40개의 탄소 원자(예를 들어, C3-C40)를 갖는 분자일 수 있다.

[0161] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 다음으로 구성된 목록에서 선택된다: C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25, C26, C27, C28, C29, C30, C31, C32, C33, C34, C35, C36, C37, C38, C39 및 C40.

[0162] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 12-24개의 탄소 원자(예를 들어, C12-C24)를 갖는 분자일 수 있다.

[0163] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 다음으로 구성된 목록에서 선택된다: C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23 및 C24.

[0164] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 C10이다.

[0165] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 C16이다.

[0166] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 C18이다.

[0167] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 C22이다.

[0168] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 지방산 분자의 염(예를 들어, 지방산 염)일 수 있다.

[0169] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 분지형 또는 비분지형 일 수 있다. 즉, 지방산 분자는 분지형 사슬을 포함할 수도 있고, 비분지형 사슬을 포함할 수도 있다. "비분지형"이란 원자의 선형 사슬, 예를 들어, 수소 원자에 결합된 탄소 원자의 선형 사슬(예를 들어, CH2기)을 지칭하며, 여기서 탄소 원자는 탄소-탄소 결합으로도 연결되어 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다.

[0170] 또한 "분지형"이란 원자들의 비선형 사슬을 지칭하며, 예를 들어, 하나 이상의 탄소 그룹이 수소 원자에 결합된 또 다른 탄소 원자 사슬(예를 들어, CH2기)에 부착되어 분지를 형성하는 경우이며, 여기서 탄소 원자 또한 탄소-탄소 결합으로 연결되어 있음을 이해할 수 있을 것이다. 예를 들어, 분지형 지방산 분자는 탄소 원자 사슬에 결합된 하나 이상의 탄소 그룹(예를 들어, 메틸기)을 포함할 수 있다. 분지를 형성하는 하나 이상의 탄소 그룹은 탄소 사슬의 어느 지점에나 부착될 수 있다(즉, C2 내지 CN-1 위치 중 하나 이상에 부착되고, 여기서 C는 탄소를 의미하고 N은 선형 사슬의 총 탄소 원자 수를 지칭한다).

[0171] 2개 이상의 지방산이 링커로 연결된 경우, 모든 지방산이 분지형일 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 또한 2개 이상의 지방산이 링커로 연결된 경우, 모든 지방산이 비분지형일 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 또한, 2개 이상의 지방산이 링커로 연결되어 있는 경우, 지방산 중 하나 이상이 분지형이고 나머지 하나 이상의 지방산이 비분지형일 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

[0172] 탄소 이중 결합(예를 들어, C=C 결합)을 포함하지 않는 지방산은 포화 지방산으로 지칭될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. "포화"라는 용어는 분자의 각 탄소에 가능한 최대 수의 원자(예를 들어, 수소 원자)가 결합되어 있다는 것을 의미함을 이해할 수 있을 것이다.

[0173] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 포화 지방산일 수 있다. 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 완전히 포화될 수 있다(즉, 탄소 단일 결합은 포함하지만 탄소 이중 결합이나 탄소 삼중 결합은 포함하지 않음). 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 부분적으로 포화될 수 있다(즉, (i) 하나 이상의 탄소 단일 결합, 및 (ii) 하나 이상의 탄소 비단일 결합(즉, 탄소 이중 결합 및/또는 탄소 삼중 결합)의 조합을 포함함).

[0174] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 탄소 이중 결합(예를 들어, C=C 결합)을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 탄소 삼중 결합(예를 들어, C≡C 결합)을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 탄소 이중 결합(예를 들어, C=C 결합)과 탄소 삼중 결합(예를 들어, C≡C 결합)의 조합을 포함할 수 있다. 지방산 분자가 탄소 이중 결합 및/또는 탄소 삼중 결합을 포함하는 경우, 지방산 분자의 나머지 결합은 탄소 단일 결합(예를 들어, C-C 결합)일 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

[0175] 하나 이상의 탄소 이중 결합 및/또는 하나 이상의 탄소 삼중 결합을 포함하는 지방산은 불포화 지방산이라고 지칭될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 하나의 탄소 이중 결합 또는 하나의 탄소 삼중 결합을 포함하는 불포화 지방산은 단일 불포화 지방산으로 지칭될 수 있다. 2개 이상의 비단일 결합(즉, 탄소 이중 결합 및/또는 탄소 삼중 결합)을 포함하는 불포화 지방산은 다중불포화 지방산으로 지칭될 수 있다.

[0176] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 불포화 지방산일 수 있다. 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 단일불포화 지방산일 수 있다. 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 다중불포화 지방산일 수 있다.

[0177] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 완전히 불포화될 수 있다(즉, 탄소 이중 결합 및/또는 탄소 삼중 결합을 포함하지만 탄소 단일 결합은 포함하지 않음). 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 부분적으로 불포화될 수 있다(즉, (i) 하나 이상의 탄소 비단일 결합, 및 (ii) 하나 이상의 탄소 비단일 결합(즉, 탄소 이중 결합 및/또는 탄소 삼중 결합); 및 (ii) 하나 이상의 탄소 단일 결합의 조합을 포함함).

[0178] 2개 이상의 지방산이 링커로 연결된 경우, 모든 지방산이 포화일 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 또한 2개 이상의 지방산이 링커로 연결된 경우, 모든 지방산이 불포화일 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 또한, 2개 이상의 지방산이 링커로 연결되어 있는 경우, 지방산 중 하나 이상이 포화이고 나머지 하나 이상의 지방산이 불포화일 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

[0179] 포화 또는 불포화 지방산 분자는 분지형이거나 비분지형일 수 있음이 이해될 것이다.

[0180] 일부 실시형태에서, 포화 지방산 분자는 분지형 또는 비분지형 일 수 있다.

[0181] 일부 실시형태에서, 불포화 지방산 분자는 분지형 또는 비분지형 일 수 있다. 일부 실시형태에서, 단일불포화 지방산 분자는 분지형 또는 비분지형 일 수 있다. 일부 실시형태에서, 다중불포화 지방산 분자는 분지형 또는 비분지형 일 수 있다.

[0182] 일부 실시형태에서, 분지형 지방산 분자는 완전히 포화이거나, 완전히 불포화이거나, 포화와 불포화가 혼합된 것일 수 있다. 일부 실시형태에서, 비분지형 지방산 분자는 완전히 포화이거나, 완전히 불포화이거나, 포화와 불포화가 혼합된 것일 수 있다.

[0183] 일부 실시형태에서, 지방산 분자 중 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 약 100%는 이중 결합을 포함한다.

[0184] 일부 실시형태에서, 지방산 분자 중 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 약 100%는 삼중 결합을 포함한다.

[0185] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 하나 이상의 이중 결합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 하나 이상의 삼중 결합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 하나 이상의 탄소 이중 결합과 하나 이상의 탄소 삼중 결합의 조합을 포함한다. 지방산 분자가 하나 이상의 탄소 이중 결합 및/또는 탄소 삼중 결합을 포함하는 경우, 지방산 분자의 나머지 결합은 탄소 단일 결합(예를 들어, C-C 결합)일 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

[0186] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 또는 19개 이상의 탄소 이중 결합을 포함한다.

[0187] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 또는 19개 이상의 탄소 삼중 결합을 포함한다.

[0188] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 또는 19개 이상의 탄소 이중 결합과 탄소 삼중 결합의 조합을 포함한다.

[0189] 본 발명에서는 19개 초과의 탄소 이중 결합이 사용될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 본 발명에서는 19개 이상의 탄소 삼중 결합이 사용될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

[0190] 탄소 이중 결합은 시스 배열이거나 트랜스 배열일 수 있다. 탄소 삼중 결합은 시스 배열이거나 트랜스 배열일 수 있다. 시스 배열은 탄소 이중 결합이나 탄소 삼중 결합에 인접한 2개의 작용기(예를 들어, 수소 원자)가 해당 사슬의 같은 쪽에서 튀어나와 있고, 트랜스 배열은 탄소 이중 결합이나 탄소 삼중 결합에 인접한 2개의 작용기(예를 들어, 수소 원자)가 해당 사슬의 *반대쪽*에 있다는 것을 의미함을 이해할 수 있을 것이다.

[0191] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 시스-불포화 지방산 분자일 수 있다.

[0192] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 트랜스-불포화 지방산 분자일 수 있다.

[0193] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 시스-불포화 지방산 성분과 트랜스-불포화 지방산 성분의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 시스와 트랜스 이중 결합의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 시스와 트랜스 삼중 결합의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 시스와 트랜스 이중 결합 및 시스와 트랜스 삼중 결합의 조합을 포함할 수 있다.

[0194] 지방산 분자는 화학식 CX:Y를 가질 수 있는데, 여기서 C는 탄소를 의미하고, 이 때 X는 지방산 분자에 존재하는 총 탄소 원자 수(즉, 탄소 사슬 길이)를 지칭하며, Y는 지방산 분자에 존재하는 총 불포화/비단일 탄소 결합(즉, 탄소 이중 결합 및/또는 탄소 삼중 결합)의 수를 지칭한다(예를 들어, "C16:5"는 총 5개의 불포화/비단일 탄소 결합을 가진 16개 탄소 길이의 지방산 분자를 나타낸다(즉, 5개의 탄소 이중 결합이 존재하거나 5개의 탄소 삼중 결합이 존재하거나 탄소 이중 결합과 탄소 삼중 결합이 결합되어 총 5개의 비단일 결합이 존재할 수 있다)). 즉, 콜론 앞의 숫자 X는 탄소 원자의 수를 지정하고, 콜론 뒤의 숫자 Y는 지방산 분자 내의 총 불포화/비단일 결합(즉, 이중 및/또는 삼중 결합)의 수를 지정한다. X는 임의의 양의 자연수(예를 들어, 1, 2, 3 등)가 될 수 있다. X는 0이나 음수 값일 수 없다. Y는 음수가 아닌 임의의 숫자(예를 들어, 0, 1, 2, 3 등)가 될 수 있다.

[0195] 그러나 주어진 X 숫자(CX:Y에서)에 대해 이중 및/또는 삼중 결합의 최대 숫자 Y는 X/2-1(즉, Y= (X/2)-1)과 같다. 즉, 지방산 분자의 탄소 수가 X개일 때, 이중 결합 및/또는 삼중 결합의 수 Y는 0, 1, 2, 3 등 음이 아닌 임의의 수가 될 수 있으며, 최대 Y=(X/2)-1이 된다. 따라서 지방산 분자가 CX:Y의 화학식을 갖는 일부 실시형태에서 Y는 X/2-1의 최대값(즉, Y=(X/2)-1)과 같을 수 있다. X가 홀수인 경우, 결과값(반수)은 가장 근사한 자연수로 내림해야 한다. 예를 들어, X=7인 경우 (X/2)-1의 결과값은 2.5이며, 이는 2로 내림해야 한다. 즉, X=7인 경우 이중 및/또는 삼중 결합의 최대 수는 Y=2이고, X=9인 경우 이중 및/또는 삼중 결합의 최대 수는 Y=3이다. X가 짝수인 경우, Y의 결과값은 내림할 필요가 없다; 즉, X=8이면 Y=3이고, X=10이면 Y=4이다. 이는 X=8 또는 9(즉, 탄소가 8개 또는 9개인 지방산 분자)의 경우 가능한 이중 및/또는 삼중 결합의 최대 수는 3이며, 주석 C8:Y 또는 C9:Y의 Y 값은 0 내지 3 사이의 임의의 자연수(즉, 0, 1, 2 또는 3)가 될 수 있음을 의미한다. 즉, X=8인 경우 가능한 지방산은 C8:0, C8:1, C8:2 및 C8:3이고, X=9인 경우 가능한 지방산은 C9:0, C9:1, C9:2 및 C9:3이다. 다른 X 값에도 동일하게 적용된다(X는 양의 자연수, 즉, 0도 아니고 음수도 아니다).

[0196] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 다음으로 구성된 목록에서 선택된다: C3:0; C4:0; C4:1; C5:0; C5:1; C6:0; C6:1; C6:2; C7:0; C7:1; C7:2; C8:0; C8:1; C8:2; C8:3; C9:0; C9:1; C9:2; C9:3; C10:0; C10:1; C10:2; C10:3; C10:4; C11:0; C11:1; C11:2; C11:3; C11:4; C12:0; C12:1; C12:2; C12:3; C12:4; C12:5; C13:0; C13:1; C13:2; C13:3; C13:4; C13:5; C14:0; C14:1; C14:2; C14:3; C14:4; C14:5; C14:6; C15:0; C15:1; C15:2; C15:3; C15:4; C15:5; C15:6; C16:0; C16:1; C16:2; C16:3; C16:4; C16:5; C16:6; C16:7; C17:0; C17:1; C17:2; C17:3; C17:4; C17:5; C17:6; C17:7; C18:0; C18:1; C18:2; C18:3; C18:4; C18:5; C18:6; C18:7; C18:8; C19:0; C19:1; C19:2; C19:3; C19:4; C19:5; C19:6; C19:7; C19:8; C20:0; C20:1; C20:2; C20:3; C20:4; C20:5; C20:6; C20:7; C20:8; C20:9; C21:0; C21:1; C21:2; C21:3; C21:4; C21:5; C21:6; C21:7; C21:8; C21:9; C22:0; C22:1; C22:2; C22:3; C22:4; C22:5; C22:6; C22:7; C22:8; C22:9; C22:10; C23:0; C23:1; C23:2; C23:3; C23:4; C23:5; C23:6; C23:7; C23:8; C23:9; C23:10; C24:0; C24:1; C24:2; C24:3; C24:4; C24:5; C24:6; C24:7; C24:8; C24:9; C24:10; C24:11; C25:0; C25:1; C25:2; C25:3; C25:4; C25:5; C25:6; C25:7; C25:8; C25:9; C25:10; C25:11; C26:0; C26:1; C26:2; C26:3; C26:4; C26:5; C26:6; C26:7; C26:8; C26:9; C26:10; C26:11; C26:12; C27:0; C27:1; C27:2; C27:3; C27:4; C27:5; C27:6; C27:7; C27:8; C27:9; C27:10; C27:11; C27:12; C28:0; C28:1; C28:2; C28:3; C28:4; C28:5; C28:6; C28:7; C28:8; C28:9; C28:10; C28:11; C28:12; C28:13; C29:0; C29:1; C29:2; C29:3; C29:4; C29:5; C29:6; C29:7; C29:8; C29:9; C29:10; C29:11; C29:12; C29:13; C30:0; C30:1; C30:2; C30:3; C30:4; C30:5; C30:6; C30:7; C30:8; C30:9; C30:10; C30:11; C30:12; C30:13; C30:14; C31:0; C31:1; C31:2; C31:3; C31:4; C31:5; C31:6; C31:7; C31:8; C31:9; C31:10; C31:11; C31:12; C31:13; C31:14; C32:0; C32:1; C32:2; C32:3; C32:4; C32:5;

C32:6; C32:7; C32:8; C32:9; C32:10; C32:11; C32:12; C32:13; C32:14; C32:15; C33:0; C33:1; C33:2; C33:3; C33:4; C33:5; C33:6; C33:7; C33:8; C33:9; C33:10; C33:11; C33:12; C33:13; C33:14; C33:15; C34:0; C34:1; C34:2; C34:3; C34:4; C34:5; C34:6; C34:7; C34:8; C34:9; C34:10; C34:11; C34:12; C34:13; C34:14; C34:15; C34:16; C35:0; C35:1; C35:2; C35:3; C35:4; C35:5; C35:6; C35:7; C35:8; C35:9; C35:10; C35:11; C35:12; C35:13; C35:14; C35:15; C35:16; C36:0; C36:1; C36:2; C36:3; C36:4; C36:5; C36:6; C36:7; C36:8; C36:9; C36:10; C36:11; C36:12; C36:13; C36:14; C36:15; C36:16; C36:17; C37:0; C37:1; C37:2; C37:3; C37:4; C37:5; C37:6; C37:7; C37:8; C37:9; C37:10; C37:11; C37:12; C37:13; C37:14; C37:15; C37:16; C37:17; C38:0; C38:1; C38:2; C38:3; C38:4; C38:5; C38:6; C38:7; C38:8; C38:9; C38:10; C38:11; C38:12; C38:13; C38:14; C38:15; C38:16; C38:17; C38:18; C39:0; C39:1; C39:2; C39:3; C39:4; C39:5; C39:6; C39:7; C39:8; C39:9; C39:10; C39:11; C39:12; C39:13; C39:14; C39:15; C39:16; C39:17; C39:18; C40:0; C40:1; C40:2; C40:3; C40:4; C40:5; C40:6; C40:7; C40:8; C40:9; C40:10; C40:11; C40:12; C40:13; C40:14; C40:15; C40:16; C40:17; C40:18; C40:19

[0197] 탄소 이중 결합은 지방산 분자 내의 임의의 지점(즉, 인접한 탄소 원자 쌍 사이)에 위치할 수 있다. 탄소 이중 결합은 지방산 분자 내의 임의의 지점(즉, 인접한 탄소 원자들의 다수의 쌍들 사이)에 위치할 수 있다. 탄소 삼중 결합은 지방산 분자 내의 임의의 지점(즉, 인접한 탄소 원자 쌍 사이)에 위치할 수 있다. 탄소 삼중 결합은 지방산 분자 내의 임의의 지점(즉, 인접한 탄소 원자들의 다수의 쌍들 사이)에 위치할 수 있다.

[0198] 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 하나 이상의 변형 및/또는 치환을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 하나 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 지방산 분자는 하나 이상의 당 또는 탄수화물 분자를 포함할 수 있다. 포화지방산, 불포화지방산, 단일불포화지방산 및 다중불포화지방산 분자에 대한 변형 및/또는 대체가 이루어질 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 또한 분지형 및 비분지형 지방산 분자에 대한 변형 및/또는 치환이 이루어질 수 있음도 이해할 수 있을 것이다.

[0199] 도 4에 도시된 바와 같이, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자의 결합 강도는 사용된 지방산 분자/모이어티의 길이에 의해 의도적으로 제어(예를 들어, 조정)될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니지만, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자(즉, 지방산 분자에 접합된 것)의 결합 강도는 도 4에서 C10, C16 및 C22 지방산 접합체로 예시된 바와 같이 지방산의 길이에 비례할 수 있다고 볼 수 있으며, 특히 알부민이 운반체로 사용되는 경우에 그러하다.

[0200] 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티로 사용되는 지방산 분자/모이어티는 발명의 이중 가닥 RNA 분자의 특정한 의도된 용도의 필요에 따라 필요한 결합 강도에 기초하여 선택될 수 있다.

[0201] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 알부민과 조합하여 투여될 수 있다. 알부민은 혈청 알부민, 예를 들어, 마우스 혈청 알부민이나 인간 혈청 알부민일 수 있다.

[0202] 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니지만, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자가 알부민에 결합하는 것은 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자가 세포 내부로 전달될 수 있는 메커니즘 중 하나일 수 있다.

[0203] 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니지만, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자의 결합 강도는 (i) 혈장 내 본 발명의 이중 가닥 RNA의 순환 프로필, (ii) 생물학적 체액(예를 들어, 눈물액)에서 본 발명의 이중 가닥 RNA의 안정성, (iii) 본 발명의 이중 가닥 RNA의 질병 관련 조직으로의 세포 내 흡수에 영향을 주기위해 이용될 수 있다.

[0204] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자의 지방산 분자는 혈장 내에서 본 발명의 이중 가닥 RNA의 순환 프로필에 영향을 주기에 적절한 알부민에 대한 결합 강도를 갖는 지방산 분자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 적합한 결합 강도는 알부민과의 결합에 적합한 결합 강도일 수 있다.

[0205] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자에 접합된 지방산 분자는 생물학적 체액(예를 들어, 눈물액) 내에서 본 발명의 이중 가닥 RNA의 안정성에 영향을 주기에 적절한 알부민에 대한 결합 강도를 갖는 지방산 분자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 적합한 결합 강도는 알부민과의 결합에 적합한 결합 강도일 수 있다.

[0206] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자에 접합된 지방산 분자는 본 발명의 이중 가닥 RNA의 질병 관련 조직으로의 세포내 흡수에 영향을 주기에 적절한 알부민에 대한 결합 강도를 갖는 지방산 분자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 적합한 결합 강도는 알부민과의 결합에 적합한 결합 강도일 수 있다.

[0207] 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 콜레스테롤 분자이다. 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티들은 콜레스테롤 분자들이다. "콜레스테롤 분자"와 "콜레스테롤 모이어티"라는 용어는 상호 교환가능한 것을 이해할 수 있

을 것이다.

[0208] 2개 이상의 콜레스테롤 분자가 이중 가닥 RNA 분자에 부착된 실시형태에서, 각 콜레스테롤 분자는 독립적으로 선택되므로 이중 가닥 RNA 분자에 부착된 콜레스테롤 분자는 동일할 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다.

[0209] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 콜레스테롤 분자가 링커를 통해 연결될 수 있다. 2개 이상의 콜레스테롤 분자를 연결하는 링커는 2개 이상의 콜레스테롤 분자 각각의 임의의 지점에 부착될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

[0210] 일부 실시형태에서 콜레스테롤 모이어티는 다음을 포함하는 그룹에서 선택된다: 3'-콜레스테릴-TEG CPG, 5'-콜레스테롤-TEG-CE 포스포라미다이트, 5'-콜레스테롤-CE 포스포라미다이트 또는 콜레스테릴-TEG-CE 포스포라미다이트(TEG=트리에틸렌글리콜, CPG=제어된 기공 유리 합성 지지체, 또는 CPG 지지체).

[0211] 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 3'-콜레스테릴-TEG CPG이다. 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 3'-콜레스테릴-TEG CPG로부터 유래된다. 예를 들어, 3'-콜레스테릴-TEG CPG는 이중 가닥 RNA 분자의 한 가닥의 3' 말단에 콜레스테롤 모이어티를 도입하는 제제로 사용될 수 있다.

[0212] 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 5'-콜레스테롤-TEG-CE 포스포라미다이트이다. 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 5'-콜레스테롤-TEG-CE 포스포라미다이트로부터 유래된다. 예를 들어, 5'-콜레스테롤-TEG-CE 포스포라미다이트는 이중 가닥 RNA 분자의 한 가닥의 5' 말단에 콜레스테롤 모이어티를 도입하는 제제로 사용될 수 있다.

[0213] 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 5'-콜레스테롤-CE 포스포라미다이트이다. 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 5'-콜레스테롤-CE 포스포라미다이트로부터 유래된다. 예를 들어, 5'-콜레스테롤-CE 포스포라미다이트는 이중 가닥 RNA 분자의 한 가닥의 5' 말단에 콜레스테롤 모이어티를 도입하는 제제로 사용될 수 있다.

[0214] 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 콜레스테릴-TEG-CE 포스포라미다이트이다. 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 콜레스테릴-TEG-CE 포스포라미다이트로부터 유래된다. 예를 들어, 콜레스테릴-TEG-CE 포스포라미다이트는 이중 가닥 RNA 분자의 한 가닥의 말단에 콜레스테롤 모이어티를 도입하는 제제로 사용될 수 있다.

[0215] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자의 가닥은 일반적인 아미다이트 또는 역 아미다이트를 사용하여 합성될 수 있다.

[0216] 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 분자 또는 콜레스테롤 모이어티는 이중 가닥 RNA 분자의 가닥 중 하나의 3' 말단에 역 아미다이트(예를 들어, 뉴클레오시드 포스포라미다이트)를 사용하여 부착된다. 즉, 콜레스테롤은 역 아미다이트를 사용하여 가닥을 구성한 다음 합성의 마지막 단계에서 5' 콜레스테롤 아미다이트를 사용하여 가닥 중 하나의 3' 말단에 부착될 수 있으며, 이를 통해 콜레스테롤이 해당 가닥의 3' 말단에 위치하게 된다.

[0217] 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티(예를 들어, 지방산 분자 또는 콜레스테롤 분자)는 이중 가닥 RNA 분자의 가닥들 중 하나의 5' 말단 또는 3' 말단에 위치된다.

[0218] 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 이중 가닥 RNA 분자의 제1 가닥의 5' 말단에 위치된다. 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 이중 가닥 RNA 분자의 제1 가닥의 3' 말단에 위치된다.

[0219] 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 이중 가닥 RNA 분자의 제2 가닥의 5' 말단에 위치된다. 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 이중 가닥 RNA 분자의 제2 가닥의 3' 말단에 위치된다.

[0220] 이중 가닥 RNA 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥으로 구성된 것으로 설명할 수 있다.

[0221] 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 이중 가닥 RNA 분자의 센스 가닥의 5' 말단에 위치된다. 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 이중 가닥 RNA 분자의 센스 가닥의 3' 말단에 위치된다.

[0222] 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 이중 가닥 RNA 분자의 안티센스 가닥의 5' 말단에 위치된다. 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 이중 가닥 RNA 분자의 안티센스 가닥의 3' 말단에 위치된다.

[0223] 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 어느 한 가닥의 한 쪽 말단 단부에 위치하지 않는다(즉, 접합체 모이어티는 어느 한 가닥의 5' 말단이나 3' 말단에 위치하지 않는다). 예를 들어, 접합체 모이어티는 연속 뉴클레오티드 서열의 중간 또는 중심 영역의 위치에 부착될 수 있다. 여기에서 "중간"과 "중심"이라는 용어는 접합체 모이어티가 해당 가닥의 어느 쪽 말단에도 위치하지 않는다는 것을 나타내기 위한 것이며, 접합체 모이어티가 각 말단으로부터 동일한 거리에 위치한다는 것을 나타내기 위한 것이 아니다.

[0224] 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 연속 뉴클레오티드 서열의 임의의 위치에 위치된다. 일부 실시형태에서, 접합체 모이어티는 이중 가닥 RNA 분자의 임의의 위치에 위치된다.

[0225] **링커**

[0226] 링키지, 링커 또는 스페이서는 하나의 관심 화학기 또는 세그먼트를 하나 이상의 공유 결합을 통해 또 다른 관심 화학기 또는 세그먼트에 연결하는 두 원자 사이의 연결이다. 접합체 모이어티는 직접적으로 또는 연결 모이어티(예를 들어, 링커 또는 스페이서)를 통해 이중 가닥 RNA 분자에 부착 될 수 있다. 링커는 접합체 모이어티를 이중 가닥 RNA 분자 또는 이의 연속 뉴클레오티드 서열에 공유 연결시키는 역할을 한다.

[0227] 본 명세서에서 사용되는 용어 "링커" 및 "스페이서"는 서로 교환가능하다.

[0228] 본 발명의 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 이중 가닥 RNA 분자와 접합체 모이어티 사이에 위치한 링커(또한 "링커 영역"이라고도 명명됨)를 포함할 수 있다. 링커는 표적 핵산과 접합체 모이어티에 상보적인 이중 가닥 RNA 분자 가닥의 연속 뉴클레오티드 서열에 부착될 수 있다.

[0229] 일부 실시형태에서, 링커는 C6이다.

[0230] 일부 실시형태에서, 링커는 TEG이다.

[0231] 일부 실시형태에서, 링커는 디뉴클레오티드이다. 일부 실시형태에서, 링커는 CA 디뉴클레오티드이다.

[0232] 일부 실시형태에서, 링커는 생분해성 링커이다. 생분해성 링커는 일반적으로 만나게 되는 또는 포유동물 신체 내부에서 만나게 되는 조건과 유사한 조건하에서 절단가능한 생리학적으로 불안정한 결합을 포함하거나 이러한 결합으로 구성된다. 생리학적으로 불안정한 링커가 화학적 변형(예를 들어, 절단)을 거치게 되는 조건에는 포유동물 세포에서 발견되거나 만나게 되는 것과 유사한 화학적 조건, 예를 들어, pH, 온도, 산화 또는 환원 조건 또는 물질, 염 농도가 포함된다. 포유동물 세포내 조건은 또한 단백질분해 효소 또는 가수분해 효소 또는 뉴클레아제와 같은 포유동물 세포에 정상적으로 존재하는 효소 활성의 존재를 포함한다. 일부 실시형태에서, 생분해성 링커는 S1 뉴클레아제 절단에 민감하다. 일부 실시형태에서, 뉴클레아제 민감성 링커는 1 내지 5개의 뉴클레오시드, 예를 들어, 적어도 2개의 연속적인 포스포디에스테르 링키지를 포함하는 DNA 뉴클레오시드를 포함한다. 생분해성 링커를 함유하는 포스포디에스테르는 WO 2014/076195에 보다 상세히 설명되어 있다.

[0233] 일부 실시형태에서, 링커는 생분해성 링커가 아니다. 반드시 생분해성인 것은 아니지만 주로 접합체 모이어티를 올리고뉴클레오티드에 공유 연결하는 역할을 하는 링커가 공지되어 있다. 이들 링커는 에틸렌 글리콜, 아미노산 단위 또는 아미노 알킬기와 같은 반복 단위의 사슬 구조나 올리고머, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서 링커는 예를 들어, C6 내지 C12 아미노 알킬기를 비롯한 C2-C36 아미노 알킬기와 같은 아미노 알킬이다.

[0234] **추가 5' 및/또는 3' 뉴클레오시드**

[0235] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자의 한 가닥 또는 두 가닥 모두 추가 5' 및/또는 3' 뉴클레오시드를 추가로 포함할 수 있다. 즉, 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 연속 뉴클레오티드 서열 외에도 5' 및/또는 3' 뉴클레오시드를 포함할 수 있다.

[0236] 추가 5' 및/또는 3' 뉴클레오시드는 표적 핵산에 상보적, 예를 들어, 완전히 상보적일 수 있거나 상보적이지 않을 수 있다.

[0237] 추가 5' 및/또는 3' 뉴클레오시드의 추가는 연속 뉴클레오티드 서열을 접합체 모이어티 또는 또 다른 작용기에 연결하기 위한 목적으로 사용될 수 있다. 이것이 연속 뉴클레오티드 서열을 접합체 모이어티에 연결하기 위해 사용되는 경우, 이는 생분해성 링커로 기능할 수 있다. 대안적으로, 이는 엑소뉴클레아제 보호를 제공하거나 합성 또는 제조의 용이성을 위해 사용될 수 있다.

[0238] 추가 5' 및/또는 3' 뉴클레오시드는 표적 핵산에 상보적이거나 비-상보적일 수 있는 1, 2, 3, 4, 5개 또는 5개 초과의 추가 뉴클레오티드를 독립적으로 포함하거나 이들로 구성될 수 있다.

[0239] 추가 5' 및/또는 3' 뉴클레오시드는 뉴클레아제에 민감한 생분해성 링커로 작용할 수 있다(링커의 정의 참조). 일부 실시형태에서 추가 5' 및/또는 3' 말단 뉴클레오티드는 포스포디에스테르 링키지로 연결되며, DNA 또는 RNA이다. 이렇게 사용하기에 적합한 뉴클레오티드 기반 생분해성 링커는 WO2014/076195에 개시되어 있으며, 이는 예로서 포스포디에스테르 연결된 DNA 디뉴클레오티드를 포함한다. 폴리-올리고뉴클레오티드 구조체에서 생분

해성 링커의 사용은 WO2015/113922에 개시되어 있으며, 여기서 이들은 단일 올리고뉴클레오티드 내에서 다수의 안티센스 구조체들을 연결하는데 사용된다.

[0240] 일부 실시형태에서, 추가 5' 및/또는 3' 뉴클레오시드와 연속 뉴클레오시드 서열 사이에 위치한 뉴클레오시드 간 링키지는 포스포디에스테르 링키지이다.

[0241] **눈에 대한 투여**

[0242] 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 눈에 국소적으로 투여된다(예를 들어, 안과적 투여).

[0243] 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 눈의 어느 부분에나 투여될 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0244] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 눈 앞쪽에 투여하기 위한 것이다.

[0245] 결막과 각막은 둘 다 눈의 구성 요소이다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 결막에 투여하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 각막에 투여하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 결막을 표적한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 각막을 표적한다.

[0246] 결막은 구 결막, 눈꺼풀 결막, 안구 결막 및 원개 결막을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 구 결막에 투여하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 눈꺼풀 결막에 투여하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 안구 결막에 투여하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 원개 결막에 투여하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 구 결막, 눈꺼풀 결막, 안구 결막 및 원개 결막 중 하나 이상에 투여하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 구 결막을 표적한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 눈꺼풀 결막을 표적한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 안구 결막을 표적한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 원개 결막을 표적한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 구 결막, 눈꺼풀 결막, 안구 결막 및 원개 결막 중 하나 이상을 표적한다.

[0247] 일부 실시형태에서 이중 가닥 RNA 분자는 각막 및 결막에 투여하기 위한 것일 수 있다. 일부 실시형태에서 이중 가닥 RNA 분자는 각막 및 결막을 표적할 수 있다.

[0248] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 알부민과 조합하여 투여될 수 있다. 알부민은 혈청 알부민, 예를 들어, 마우스 혈청 알부민이나 인간 혈청 알부민일 수 있다.

[0249] **표적 서열에 대한 상보성**

[0250] 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자의 연속 뉴클레오티드 서열은 표적 핵산 서열, 예를 들어, 표적 mRNA의 핵산 서열에 상보적일 수 있다.

[0251] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 표적 핵산 서열에 완전히, 예를 들어, 약 100% 상보적일 수 있다.

[0252] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 표적 핵산 서열에 부분적으로 상보적, 예를 들어, 표적 핵산 서열에 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99% 상보적일 수 있다.

[0253] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개 또는 그 이상의 불일치를 포함할 수 있는데, 여기서 불일치란 그 표적과 염기쌍을 형성하지 않는 연속 뉴클레오티드 서열 내의 뉴클레오티드이다.

[0254] 표적 핵산 서열은 눈에서 발현되거나 눈에 존재하는 mRNA 서열과 같은 표적 핵산 서열일 수 있다.

[0255] 일부 실시형태에서, 표적은 눈에 존재하는 임의의 표적일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 핵산 서열은 눈에서 발현되거나 눈에 존재하는 임의의 핵산 서열일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 핵산 서열은 눈에서 발현되거나 눈에 존재하는 임의의 mRNA 서열일 수 있다. 본 명세서에서 언급된 눈은 눈의 모든 부분을 포함함을 이해할 수 있을 것이다. 또한, 본 명세서에서 언급된 눈은 눈의 모든 부분, 즉, 눈의 앞쪽이나 눈의 모든 부분을 포함한(그러나 이에 제한되지 않음) 눈의 임의의 부분의 조합을 포함함을 이해할 수 있을 것이다.

[0256] 일부 실시형태에서, 표적은 눈의 병리, 눈 질병 또는 눈 병태와 관련된 임의의 표적일 수 있다. 일부 실시형태

에서, 표적은 하나 이상의 눈의 병리, 눈 질병 또는 눈 병태와 관련된 임의의 표적일 수 있다.

[0257] 일부 실시형태에서, 표적 핵산 서열은 눈의 병리, 눈 질병 또는 눈 병태와 관련된 임의의 핵산 서열일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 핵산 서열은 하나 이상의 눈의 병리, 눈 질병 또는 눈 병태와 관련된 임의의 핵산 서열일 수 있다.

[0258] 일부 실시형태에서, 표적 핵산 서열은 눈의 병리, 눈 질병 또는 눈 병태와 관련된 임의의 mRNA 서열일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 핵산 서열은 하나 이상의 눈의 병리, 눈 질병 또는 눈 병태와 관련된 임의의 mRNA 서열일 수 있다.

[0259] 눈의 병리, 눈 질병 또는 눈 병태와 관련된 표적(또는 표적 핵산 서열 또는 표적 mRNA 서열)에는 눈의 병리, 눈 질병 또는 눈 병태를 유발하거나, 눈의 병리, 눈 질병 또는 눈 병태에 기여하거나, 눈의 병리, 눈 질병 또는 눈 병태의 마커인 표적(또는 표적 핵산 서열 또는 표적 mRNA 서열)이 포함되지만 이에 제한되지는 않음을 이해할 수 있을 것이다.

[0260] 본 발명에서 사용될 수 있는 구체적인 표적의 예로는 AHA-1이 있다. AHA-1이 표적의 비제한적 예임을 이해할 수 있을 것이다. 또한, 본 발명에는 다수의 다른 표적들이 포함됨을 이해할 수 있을 것이다.

[0261] AHA1(또는 AHA-1), 특히, AHA1 유전자는 p38; AHSA1; hAha1; C14orf3로도 알려져 있다. 본 발명의 맥락에서 "AHA1", "p38", "AHSA1", "hAha1" 및 C14orf3는 상호 교환가능한 용어임을 이해할 수 있을 것이다.

[0262] 일부 실시형태에서, 표적은 AHA-1 핵산 서열이다.

[0263] AHA-1 표적 핵산 서열은 서열 번호 1 또는 서열 번호 2를 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0264] 서열 번호 1 (인간 AHA1 표적 서열: 위치 488-507, NCBI 참조 서열: NM_012111.3):

[0265] 5'-AATCTCGTGGCCTTAATGAAA-3'

[0266] 서열 번호 2 (토끼 AHA1 표적 서열: 위치 548-567, NCBI 참조 서열: XM_002719625.3):

[0267] 5'-AATCTCGTGGCCTTAATGAAG-3

[0268] 서열 번호 1과 비교했을 때 서열 번호 2에는 "워블" 염기쌍 불일치가 존재한다는 것을 알 수 있다(즉, 서열 번호 1과 서열 번호 2의 마지막 뉴클레오티드 위치의 A 내지 G가 다르다). 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니지만, 이러한 불일치는 이중 가닥 RNA의 활성에 영향을 미치지 않아야 하는데, 왜냐하면 A나 G가 (예를 들어, 워블 염기 페어링에 의해) 이중 가닥 RNA 분자 가닥의 연속 뉴클레오티드 서열에 있는 상보적 U와 여전히 혼성화될 수 있기 때문이다. 워블 염기쌍 불일치가 존재하는 경우, 이 불일치는 이중 가닥 RNA 분자의 활성에 영향을 미치지 않아야 함을 이해할 수 있을 것이다.

[0269] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 AHA-1 표적 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0270] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 1에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0271] 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 2에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0272] 일부 실시형태에서, 연속된 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 3을 포함하거나 이로 구성된다.

[0273] 서열 번호 3 (AHA-1 siRNA 안티센스 가닥):

[0274] 5'-UUUCAUUAAGGCCACGAGAUU-3'

[0275] 일부 실시형태에서, AHA-1은 구 결막 및/또는 눈꺼풀 결막에서 발현될 수 있다. 일부 실시형태에서, AHA-1의 발현 감소가 구 결막 및/또는 눈꺼풀 결막에서 관찰될 수 있다.

[0276] **표적의 억제**

[0277] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 표적의 발현을 억제할 수 있다. 즉, 이중 가닥 RNA 분자는 표적의 발현 수준을 감소시킬 수 있다.

[0278] 표적은 표적 핵산 서열(예를 들어, 표적 mRNA 서열) 또는 표적 단백질일 수 있다.

[0279] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 표적의 발현을 대조군 대비 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 억제할 수 있을 수 있다.

[0280] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 표적 mRNA의 발현을 대조군 대비 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 억제할 수 있을 수 있다.

[0281] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 표적 단백질의 발현을 대조군 대비 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 억제할 수 있을 수 있다.

[0282] 위에서 언급한 표적의 발현 억제 %는 대조군 대비 감소 %로 이해할 수 있을 것이며, 여기서 용어 "대조군"은 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자에 노출되지 않은 세포에서의 표적 발현을 의미한다.

[0283] 일부 실시형태에서, 대조군은 모의 형질감염, 예를 들어, PBS로 세포를 처리하는 것일 수 있다. 여기서, 표적의 발현 감소는 표적 mRNA 수준의 감소 및/또는 표적 단백질 수준의 감소를 포함한다.

[0284] **뉴클레오티드 및 뉴클레오시드**

[0285] 뉴클레오티드와 뉴클레오시드는 올리고뉴클레오티드와 폴리뉴클레오티드의 구성 요소이며, 본 발명의 목적상 자연적으로 발생하는 뉴클레오티드와 뉴클레오시드, 그리고 비자연적으로 발생하는 뉴클레오티드와 뉴클레오시드를 모두 포함한다. 자연에서 DNA 및 RNA와 같은 뉴클레오티드는 리보스 당 모이어티, 핵염기 모이어티 및 하나 이상의 포스페이트기(뉴클레오시드에는 없음)를 포함한다. 뉴클레오시드와 뉴클레오티드는 상호교환적으로 "단위" 또는 "단량체"로도 지칭될 수 있다.

[0286] **변형된 이중 가닥 RNA 분자**

[0287] 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 변형된 이중 가닥 RNA 분자일 수 있다.

[0288] 용어 "변형된 이중 가닥 RNA 분자"는 하나 이상의 당 변형된 뉴클레오시드 및/또는 변형된 뉴클레오시드 간 링키지를 포함하는 이중 가닥 RNA 분자를 포괄한다.

[0289] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자 또는 이의 연속 뉴클레오티드 서열은 염기 페어링에서 표시된 뉴클레오티드로 기능하는 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있는데, 예를 들어, 메틸 시토신 대신 5-메틸 시토신이 사용될 수 있다. 이노신은 범용 염기로 사용될 수 있다.

[0290] 연속 핵염기 서열(모티프 서열)은 예를 들어 뉴클레아제 내성 및/또는 표적 핵산에 대한 결합 친화도를 증가시키기 위해 변형될 수 있는 것으로 이해된다.

[0291] 변형된 뉴클레오시드(예를 들어, 높은 친화도의 변형된 뉴클레오시드)가 올리고뉴클레오티드 서열에 통합되는 패턴을 일반적으로 올리고뉴클레오티드 설계라고 한다.

[0292] 일부 실시형태에서, 고 친화도의 변형된 뉴클레오시드가 사용될 수 있다.

[0293] 한 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오시드, 예를 들어, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25, 적어도 26, 적어도 27, 적어도 28, 적어도 29, 적어도 30, 적어도 31, 적어도 32, 적어도 33, 적어도 34, 적어도 35, 적어도 36, 적어도 37, 적어도 38, 적어도 39, 적어도 40, 적어도 41, 적어도 42, 적어도 43, 적어도 44, 적어도 45, 적어도 46, 적어도 47, 적어도 48, 적어도 49 또는 적어도 50개의 변형된 뉴클레오시드를 포함한다.

[0294] 적합한 변형이 본 명세서에 설명되어 있다.

[0295] **변형된 뉴클레오시드 간 링키지**

[0296] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 간 링키지를 포함할 수 있다.

[0297] 용어 "변형된 뉴클레오시드 간 링키지"는 일반적으로 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이 2개의 뉴클레오시드를 함께 공유 커플링시키는 포스포디에스테르 (PO) 링키지 이외의 링키지로서 정의된다. 그러므로 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 간 링키지, 예를 들어, 하나 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드 간 링키지를 포함할 수 있다.

[0298] 일부 실시형태에서 이중 가닥 RNA 분자 또는 이의 연속 뉴클레오티드 서열 내의 뉴클레오시드 간 링키지의 적어도 50%가 변형되는데, 예를 들어, 이중 가닥 RNA 분자 또는 이의 연속 뉴클레오티드 서열 내의 뉴클레오시드 간 링키지의 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 이상이 변형된다. 일부 실시형태에서 이중 가닥 RNA 분자, 또는 이의 연속 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오시드 간 링키지 모두가 변형된다.

[0299] 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오시드 간 링키지 중 하나 이상 또는 전부가 포스포로티오에이트 링키지를 포함한다.

[0300] 일부 실시형태에서 이중 가닥 RNA 분자 또는 이의 연속 뉴클레오티드 서열 내의 뉴클레오시드 간 링키지의 적어도 50%는 포스포로티오에이트인데, 예를 들어, 이중 가닥 RNA 분자 또는 이의 연속 뉴클레오티드 서열 내의 뉴클레오시드 간 링키지의 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 이상이 포스포로티오에이트이다. 일부 실시형태에서 이중 가닥 RNA 분자, 또는 이의 연속 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오시드 간 링키지 모두가 포스포로티오에이트이다.

[0301] 추가 실시형태에서 이중 가닥 RNA 분자는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드 간 링키지를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 연속 뉴클레오티드 서열 내부의 적어도 75%, 예를 들어, 모두가 포스포로티오에이트 또는 보라노포스페이트 뉴클레오시드 간 링키지이다.

[0302] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자의 연속 뉴클레오티드 서열의 모든 뉴클레오시드 간 링키지가 포스포로티오에이트 일 수 있거나, 이중 가닥 RNA 분자의 모든 뉴클레오시드 간 링키지가 포스포로티오에이트 링키지일 수 있다.

[0303] **변형된 뉴클레오시드**

[0304] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드를 포함할 수 있다.

[0305] 본 명세서에서 사용되는 용어 "변형된 뉴클레오시드" 또는 "뉴클레오시드 변형"은 당 모이어티 또는 (핵)염기 모이어티의 하나 이상의 변형을 도입함으로써 균등한 DNA 또는 RNA 뉴클레오시드와 비교하여 변형된 뉴클레오시드를 지칭한다.

[0306] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자의 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드는 변형된 당 모이어티를 포함할 수 있다. 변형된 뉴클레오시드라는 용어는 본 명세서에서 "뉴클레오시드 유사체" 또는 변형된 "단위" 또는 변형된 "단량체"라는 용어와 상호교환적으로 사용될 수도 있다. 본 명세서에서는 변형되지 않은 DNA 또는 RNA 당 모이어티를 갖는 뉴클레오시드를 DNA 또는 RNA 뉴클레오시드라고 한다. DNA 또는 RNA 뉴클레오시드의 염기 영역에 변형이 있는 뉴클레오시드는 이것이 만약 왓슨 크릭 염기 페어링을 허용한다면 여전히 일반적으로 DNA 또는 RNA라고 불린다. 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자에 사용될 수 있는 대표적인 변형된 뉴클레오시드에는 LNA, 2'-O-MOE, 2'oMe 및 모르폴리노 뉴클레오시드 유사체가 포함된다.

[0307] **핵염기**

[0308] 용어 핵염기는, 핵산 혼성화에서 수소 결합을 형성하는, 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드에 존재하는 퓨린 (예를 들어, 아데닌 및 구아닌) 및 피리미딘 (예를 들어, 우라실, 티민 및 시토신) 모이어티를 포함한다.

[0309] 본 발명의 내용에서 용어 핵염기는 또한 자연 발생 핵염기와 다를 수 있지만 핵산 혼성화 동안 기능하는 변형된 핵염기를 포함한다. 이러한 내용에서 "핵염기"는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티미딘, 우라실, 잔틴 및 하이포잔틴과 같은 자연 발생 핵염기뿐만 아니라 비 자연 발생 변이체를 모두 지칭한다. 이러한 변이체들은 예를 들어, Hirao *외*, 2012, Accounts of Chemical Research, 45, 2055-2065 및 Bergstrom, 2009, Curr. Protoc. Nucleic

Acid Chem., 37, 1.4.1-1.4.32에 기재되어 있다.

[0310] 일부 실시형태에서 핵염기 모이어티는 퓨린 또는 피리미딘을 변형된 퓨린 또는 피리미딘, 예를 들어, 치환된 퓨린 또는 치환된 피리미딘, 예를 들어, 이소시토신, 슈도이소시토신, 5-메틸 시토신, 5-티오졸로-시토신, 5-프로핀일-시토신, 5-프로핀일-우라실, 5-브로모우라실 5-티아졸로-우라실, 2-티오-우라실, 2'티오-티민, 이노신, 디아미노퓨린, 6-아미노퓨린, 2-아미노퓨린, 2,6-디아미노퓨린 및 2-클로로-6-아미노퓨린으로부터 선택된 핵염기로 변화시킴으로써 변형된다.

[0311] 핵염기 모이어티는 각각의 상응하는 핵염기에 대한 문자 코드, 예를 들어, A, T, G, C 또는 U로 표시 될 수 있으며, 여기서 각 문자는 선택적으로 동등한 기능의 변형된 핵염기를 포함 할 수 있다. 예를 들면, 예시된 올리고뉴클레오티드에서, 핵염기 모이어티는 A, T, G, C 및 5-메틸 시토신에서 선택된다. 선택적으로, LNA 갭머의 경우 5-메틸 시토신 LNA 뉴클레오시드를 사용할 수 있다. 5-메틸 시토신은 "E"로 표시될 수 있다.

[0312] **고 친화도 변형 뉴클레오시드**

[0313] 고 친화도 변형 뉴클레오시드는, 예를 들어, 용융 온도 (T^m)로 측정시, 올리고뉴클레오티드에 통합 될 때 해당 올리고뉴클레오티드의 그 상보적 표적에 대한 친화도를 향상시키는 변형된 뉴클레오시드이다. 본 발명의 고 친화도 변형 뉴클레오시드는 용융 온도를 바람직하게는 변형 뉴클레오시드 당 +0.5 내지 +12°C, 더욱 바람직하게는 +1.5 내지 +10°C 그리고 가장 바람직하게는 +3 내지 +8°C 증가시킨다. 다수의 고 친화도 변형 뉴클레오시드가 해당 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 많은 2' 치환된 뉴클레오시드 및 잠금 핵산 (LNA)을 포함한다(예를 들어, Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 및 Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3 (2), 203-213 참고).

[0314] **당 변형**

[0315] 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 변형된 당 모이어티, 즉 DNA 및 RNA에서 발견되는 리보스 당 모이어티와 비교할 때 당 모이어티의 변형을 갖는 하나 이상의 뉴클레오시드를 포함 할 수 있다.

[0316] 주로 친화도 및/또는 뉴클레아제 내성과 같은 올리고뉴클레오티드의 특정한 특성을 개선하기 위한 목적으로 리보스 당 모이어티가 변형된 수많은 뉴클레오시드가 만들어졌다.

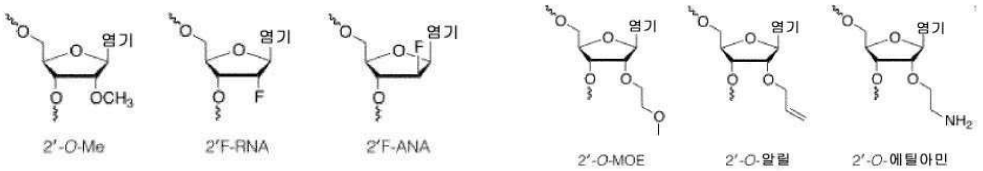
[0317] 이러한 변형에는, 리보스 고리 구조가, 예를 들어, 헥소스 고리 (HNA), 또는, 일반적으로 리보스 고리 (LNA)의 C2와 C4 탄소 사이에 바이라디칼 가교를 갖는 바이사이클릭 고리, 또는 일반적으로 C2와 C3 탄소 사이에 결합이 없는 연결되지 않은 리보스 고리 (예를 들어, UNA)로의 대체에 의해 변형되는 경우가 포함된다. 다른 당 변형된 뉴클레오시드는, 예를 들어, 바이사이클로헥소스 핵산(WO 2011/017521) 또는 트리사이클릭 핵산(WO 2013/154798)을 포함한다. 변형된 뉴클레오시드는 또한, 예를 들어, 펩티드 핵산(PNA) 또는 모르폴리노 핵산의 경우에 당 모이어티가 비-당 모이어티로 교체된 뉴클레오시드를 포함한다.

[0318] 당 변형은 또한 리보스 고리의 치환기를 수소 이외의 기로 변경하거나 DNA 및 RNA 뉴클레오시드에서 자연적으로 발견되는 2'-OH 기로 변경하여 이루어진 변형을 포함한다. 예를 들어, 치환기는 2', 3', 4' 또는 5' 위치에 도입 될 수 있다.

[0319] **2' 당 변형된 뉴클레오시드**

[0320] 2' 당 변형된 뉴클레오시드는 2' 위치에 H 또는 -OH 이외의 치환기를 갖는 뉴클레오시드 (2' 치환된 뉴클레오시드) 또는 리보스 고리의 2' 탄소와 제 2 탄소 사이에 가교를 형성할 수 있는 2' 연결된 바이라디칼을 포함하는 뉴클레오시드, 예를 들어, LNA (2'-4' 바이라디칼 가교된) 뉴클레오시드이다.

[0321] 실제로, 2' 당 치환된 뉴클레오시드를 개발하는데 많은 노력을 해왔으며, 많은 2' 치환된 뉴클레오시드는 올리고뉴클레오티드에 통합 될 때 유익한 특성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 2' 변형된 당은 올리고뉴클레오티드에 대한 향상된 결합 친화도 및/또는 증가된 뉴클레아제 내성을 제공 할 수 있다. 2' 치환된 변형 뉴클레오시드의 예는 2'-O-알킬-RNA(2'oMe), 2'-알콕시-RNA, 2'-O-메톡시에틸-RNA (MOE), 2'-아미노-DNA, 2'-플루오로-RNA, 및 2'-F-ANA 뉴클레오시드이다. 추가 예로서, 예를 들어, Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 and Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 203-213, 및 Deleavey and Damha, Chemistry and Biology 2012, 19, 937을 참고한다. 아래에 일부 2' 치환된 변형된 뉴클레오시드를 예시한다.



[0322]

[0323] 본 발명과 관련하여 2' 치환된 당 변형된 뉴클레오시드는 LNA와 같은 2' 가교 뉴클레오시드를 포함하지 않는다.

[0324] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 2' 당 변형된 뉴클레오시드와 같은 하나 이상의 당 변형된 뉴클레오시드를 포함한다.

[0325] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 당 변형된 뉴클레오시드를 포함한다.

[0326] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 2'-O-알킬-RNA, 2'-O-메틸-RNA(2'oMe), 2'-O-메톡시에틸-RNA(2'MOE), 2'-알콕시-RNA, 2'-아미노-DNA, 2'-플루로-RNA 2'-플루오로-DNA, 아라비노 핵산(ANA), 2'-플루오로-ANA and LNA 뉴클레오시드로 구성된 군에서 독립적으로 선택된 하나 이상의 2' 당 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오시드 중 하나 이상이 LNA일 수 있다.

[0327] 일부 실시형태에서, 2' 당 변형된 뉴클레오시드는 친화도를 향상시키는 2' 당 변형된 뉴클레오시드일 수 있다.

[0328] **잠금 핵산 뉴클레오시드(LNA 뉴클레오시드)**

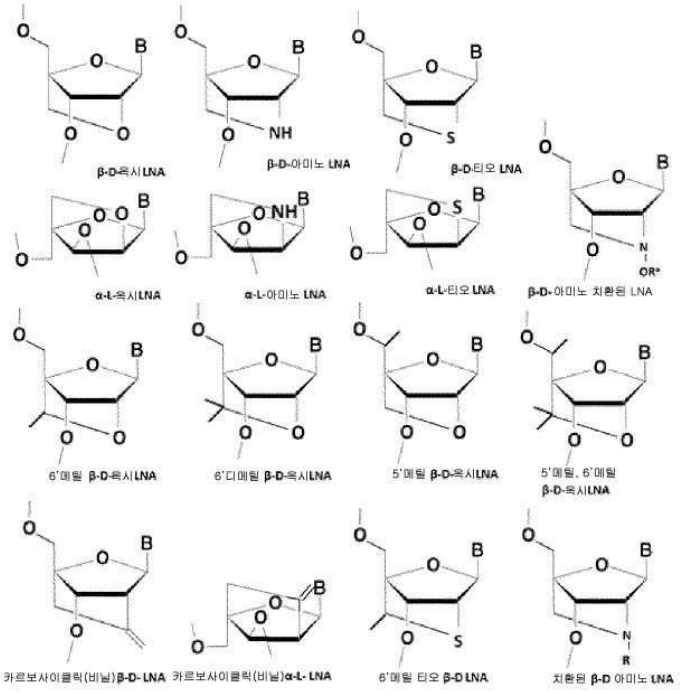
[0329] "LNA 뉴클레오시드"는 상기 뉴클레오시드의 리보스 당 고리의 C2'과 C4'를 연결하는 바이라디칼 ("2'- 4' 가교"로도 지칭됨)을 포함하는 2'-변형된 뉴클레오시드로서, 리보스 고리의 입체형태를 제한 또는 잠금한다.

[0330] 이러한 뉴클레오시드는 문헌에서 가교 핵산 또는 바이사이클릭 핵산 (BNA)으로도 명명된다. 리보스 입체형태의 잠금은 LNA가 상보적 RNA 또는 DNA 분자에 대한 올리고뉴클레오티드에 통합 될 때 향상된 혼성화 (이중 가닥 안정화) 친화도와 연관된다. 이는 관례적으로 올리고뉴클레오티드/보체 이중 가닥의 용융 온도를 측정하여 결정될 수 있다.

[0331] 비 제한적인 예시적 LNA 뉴클레오시드가 WO 99/014226, WO 00/66604, WO 98/039352, WO 2004/046160, WO 00/047599, WO 2007/134181, WO 2010/077578, WO 2010/036698, WO 2007/090071, WO 2009/006478, WO 2011/156202, WO 2008/154401, WO 2009/067647, WO 2008/150729, Morita 외, Bioorganic & Med.Chem. Lett. 12, 73-76, Seth 외, J. Org. Chem. 2010, Vol 75(5) pp. 1569-81, 및 Mitsuoka 외, Nucleic Acids Research 2009, 37(4), 1225-1238, 및 Wan and Seth, J. Medical Chemistry 2016, 59, 9645-9667에 개시되어 있다.

[0332] 추가적으로 비 제한적인 예시적 LNA 뉴클레오시드가 도식 1에 개시되어 있다.

[0333] **도식 1:**



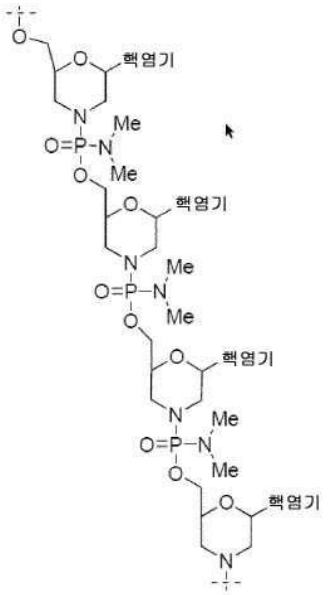
[0334]

[0335] 특정 LNA 뉴클레오시드는 베타-D-옥시-LNA, 6'-메틸-베타-D-옥시 LNA, 예를 들어, (S)-6'-메틸-베타-D-옥시-LNA (ScET) 및 ENA이다.

[0336] 특히 유리한 LNA는 베타-D-옥시-LNA이다.

[0337] **모르폴리노 올리고뉴클레오티드**

[0338] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 모르폴리노 뉴클레오시드를 포함하거나 이로 구성된다(즉, 모르폴리노 올리고머이고, 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO)이다). 스플라이스 조절 모르폴리노 올리고뉴클레오티드는 임상적 사용이 승인되었다-예를 들어, DMD의 프레임 시프트 돌연변이를 표적으로 하는 30nt 모르폴리노 올리고뉴클레오티드인 에테플러센은 듀센 근이영양증을 치료하는 데 사용된다. 모르폴리노 올리고뉴클레오티드는 리보스가 아닌 6원 모르폴리노 고리, 예를 들어, 다음과 같은 4개의 연속 모르폴리노 뉴클레오티드의 도시에서 보는 바와 같이 포스포로디아미데이트 기를 통해 연결된 메틸렌모르폴린 고리에 부착된 뉴클레아제를 가지고 있다.



[0339]

[0340] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는, 예를 들어, 8 - 50개 모르폴리노 뉴클레오티드 길이 일 수 있다.

[0341] **상보성**

[0342] 용어 "상보성"은 뉴클레오시드/뉴클레오티드의 왓슨-크릭 염기-페어링 능력을 설명한다. 왓슨-크릭 염기쌍은 구아닌(G)-시토신(C) 및 아데닌(A)-티민(T)/우라실(U)이다.

[0343] 올리고뉴클레오티드는 변형된 핵염기를 가진 뉴클레오시드를 포함할 수 있다, 예를 들면, 5-메틸 시토신은 종종 시토신 대신 사용되며, 이와 같이 이러한 상보성이라는 용어는 비-변형된 핵염기와 변형된 핵염기 사이의 왓슨 크릭 염기-쌍을 포함하는 것임을 이해할 수 있을 것이다(예를 들면 Hirao *외,* 2012, Accounts of Chemical Research, 45, 2055 및 Bergstrom, 2009, Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem., 37, 1.4.1 참고).

[0344] 본 명세서에서 사용된 용어 "상보성 %"는, 핵산 분자(예를 들어, 올리고뉴클레오티드) 내 연속 뉴클레오티드 서열 중, 이러한 연속 뉴클레오티드 서열 전반에 걸쳐, 참조 서열 (예를 들어, 표적 서열 또는 서열 모티프)에 상보적인, 뉴클레오티드의 비율 (퍼센트)를 지칭한다. 그러므로 상보성 백분율은 (표적 서열 5'-3' 및 3'-5'의 올리고뉴클레오티드 서열과 함께 정렬될 때) 2개 서열들 사이에 (왓슨 크릭 염기 쌍을 형성함) 상보적인 정렬된 핵염기들의 수를 계수하고, 이 수를 올리고뉴클레오티드의 총 뉴클레오티드 수로 나누고 100을 곱하여 계산된다. 이러한 비교에서 정렬되지 않는 (염기쌍을 형성하는) 핵염기/뉴클레오티드를 불일치라 명명한다. 연속 뉴클레오티드 서열의 상보성 % 계산에서 삽입 및 결실은 허용되지 않는다.

[0345] 상보성을 결정할 때 핵염기의 화학적 변형은 왓슨 크릭 염기쌍을 형성하는 핵염기의 기능적 능력이 유지되는 한 무시됨을 이해할 수 있을 것이다(예를 들어, 5'-메틸 시토신은 동일성 % 계산에 있어서 시토신과 동일한 것으로 간주된다).

[0346] **동일성**

[0347] 본 명세서에서 사용된 용어 "% 동일성"은 핵산 분자 (예를 들어, siRNA 분자) 내 연속 뉴클레오티드 서열 중, 연속 뉴클레오티드 서열 전반에 걸쳐 참조 서열 (예를 들어, 서열 모티프)에 동일한 뉴클레오티드의 비율(퍼센트로 표현)을 지칭한다.

[0348] 그러므로 동일성 백분율은 2개 서열들 (본 발명의 화합물의 연속 뉴클레오티드 서열과 참조 서열) 사이에 동일한(일치) 정렬된 핵염기의 수를 계수하고, 이 수를 올리고뉴클레오티드 내 총 뉴클레오티드의 수로 나누고 100을 곱하여 계산된다. 그러므로, 동일성 백분율 = (일치 x 100)/정렬된 영역 (예를 들어, 연속 뉴클레오티드 서열)의 길이. 연속 뉴클레오티드 서열의 동일성 백분율 계산에서 삽입 및 결실은 허용되지 않는다. 동일성을 결정할 때 핵염기의 화학적 변형은 왓슨 크릭 염기쌍을 형성하는 핵염기의 기능적 능력이 유지되는 한 무시됨을 이해할 수 있을 것이다 (예를 들어, 5-메틸 시토신은 % 동일성 계산을 위해 시토신과 동일한 것으로 간주된다).

[0349] 따라서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자 내에서 표적 서열에 상보적인 연속 뉴클레오티드 서열은 또한 상기 상보적인 서열과 일정 백분율의 동일성을 공유하는, 동일성과 상보성 사이의 관계가 존재하는 것으로 이해되어야 한다.

[0350] **혼성화**

[0351] 본 명세서에서 사용된 용어 "혼성화" 또는 "혼성화하다"는 2개의 핵산 가닥(예를 들어, 올리고뉴클레오티드 및 표적 핵산)이 반대 가닥의 염기 쌍들 사이에 수소 결합을 형성하여 이중 가닥을 형성하는 것으로 이해되어야 한다. 두 핵산 가닥 사이의 결합 친화도는 혼성화의 강도이다. 이것은 종종 올리고뉴클레오티드의 절반이 표적 핵산과 이중 가닥을 형성하는 온도로 정의되는 용융 온도(T_m)로 설명된다. 생리적 조건에서 T_m은 친화도에 엄격하게 비례하지 않는다 (Mergny and Lacroix, 2003, Oligonucleotides 13:515-537). 표준 상태 깁스 자유 에너지 ΔG° 는 결합 친화도의 보다 정확한 표현이며 $\Delta G^\circ = -RT\ln(K_d)$에 의한 반응의 해리 상수 ($K_d$)와 관련되며, 여기서 R은 기체 상수이고 T는 절대 온도이다. 그러므로, 올리고뉴클레오티드와 표적 핵산 사이 반응의 매우 낮은 ΔG° 는 올리고뉴클레오티드와 표적 핵산 사이의 강한 혼성화를 반영한다. ΔG° 는 수용액 농도가 1M이고, pH가 7이고, 온도가 37 ℃인 반응과 관련된 에너지이다. 표적 핵산에 대한 올리고뉴클레오티드의 혼성화는 자발적인 반응이며 자발적인 반응의 경우 ΔG° 는 0보다 작다. ΔG° 는, 예를 들면, Hansen 외, 1965, *Chem. Comm.* 36-38 및 Holdgate 외, 2005, *Drug Discov Today*에 기재된 등온 적정 열량계 (ITC) 방법을 사용하여 실험적으로 측정될 수 있다. 통상의 기술자는 ΔG° 측정에 시판 장비들을 이용가능함을 알고 있을 것이다. ΔG° 는

Sugimoto 외의, 1995, *Biochemistry* 34:11211-11216 및 McTigue 외, 2004, *Biochemistry* 43:5388-5405에 기재된 적절히 유도된 열역학적 매개변수들을 사용하여 SantaLucia, 1998, *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 1460-1465에 기재된 가장 근접한 이웃 모델을 사용하여 수치적으로 추정될 수도 있다.

[0352] 일부 실시형태에서 혼성화 정도 또는 강도는 표준 상태 깁스 자유 에너지 ΔG° 에 의해 측정된다. 상기 올리고뉴클레오티드는 -10 kcal 범위 미만, 예를 들어, -15 kcal 미만, 예를 들어, -20 kcal 미만, 그리고 예를 들어, -25 kcal 미만의 추정 ΔG° 값으로 표적 핵산에 혼성화할 수 있다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오티드는 -10 내지 -60 kcal, 예를 들어, -12 내지 -40, 예를 들어, -15 내지 -30 kcal 또는 -16 내지 -27 kcal, 예를 들어, -18 내지 -25 kcal의 추정 ΔG ° 값으로 표적 핵산에 혼성화한다.

[0353] **염**

[0354] 본 명세서에서 사용되는 "염"이라는 용어는 일반적으로 공지된 의미, 즉, 음이온과 양이온의 이온 집합체라는 의미에 따른다.

[0355] 본 발명은 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다. 즉, 본 발명은 약학적으로 허용되는 염의 형태로 존재하는 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자를 제공한다.

[0356] 일부 실시형태에서 약학적으로 허용되는 염은 나트륨염 또는 칼륨염 일 수 있다.

[0357] 본 발명은 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자의 약학적으로 허용되는 나트륨염을 제공한다.

[0358] 본 발명은 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자의 약학적으로 허용되는 칼륨염을 제공한다.

[0359] **이중 가닥 RNA 분자의 전달**

[0360] 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 지질 기반 전달 비히클에 캡슐화되거나, 덴드리머에 공유 연결되거나 캡슐화되거나, 또는 앱타머에 접합될 수 있다.

[0361] 이는 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자를 표적 세포에 전달하고/하거나 이중 가닥 RNA 분자의 약동학을 개선하기 위한 것일 수 있다.

[0362] 지질 기반 전달 비히클의 예로는 수중유 에멀전, 미셀, 리포솜 및 지질 나노입자가 있다.

[0363] 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자가 적어도 하나의 접합체 모이어티에 접합되므로, 이중 가닥 RNA 분자의 캡슐화는 이중 가닥 RNA 분자가 적어도 하나의 접합체 모이어티에 접합되는 것 이외에도, 접합체 모이어티 단독에 대한 접합에 비해 추가적인 장점을 제공할 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

[0364] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 알부민과 조합하여 투여될 수 있다. 알부민은 혈청 알부민, 예를 들어, 마우스 혈청 알부민이나 인간 혈청 알부민일 수 있다. 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니지만, 알부민은 운반체로 기능할 수 있고/하거나 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자의 관련 조직 또는 세포로의 흡수를을 촉진하거나 향상시킬 수 있다.

[0365] **약학 조성물**

[0366] 본 발명은 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자 및 약학적으로 허용되는 희석제, 용매, 담체, 염 및/또는 보조제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0367] 본 발명은 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자 및 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 예를 들어, 이러한 염은 금속 양이온, 예를 들어, 나트륨염 또는 칼륨염을 포함할 수 있다.

[0368] 본 발명은 본 발명의 약학 조성물을 제공하며, 여기서 약학 조성물은 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자 및 수성 희석제 또는 용매를 포함한다.

[0369] 본 발명은 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자의 용액, 예를 들어, 포스페이트 완충 식염수 용액을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 포스페이트 완충 식염수와 같은 용액은 멸균 용액이다.

[0370] 본 발명의 약학 조성물은 눈에 국소적으로 투여될 수 있다(예를 들어, 안과적 투여). 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 눈의 어느 부분에나 투여될 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0371] 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 눈 앞쪽에 투여하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 결막에 투여하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 각막에 투여하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서,

약학 조성물은 구 결막에 투여하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 눈꺼풀 결막에 투여하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 안구 결막에 투여하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 원개 결막에 투여하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 구 결막, 눈꺼풀 결막, 안구 결막 및 원개 결막 중 하나 이상에 투여하기 위한 것이다.

[0372] 일부 실시형태에서, 본 발명의 약학 조성물은 알부민을 포함할 수 있다. 알부민은 혈청 알부민, 예를 들어, 마우스 혈청 알부민이나 인간 혈청 알부민일 수 있다.

[0373] **제조 방법**

[0374] 또 다른 양상에서, 본 발명은 뉴클레오티드 단위를 반응시켜 올리고뉴클레오티드에 포함된 공유 결합된 연속 뉴클레오티드 단위를 형성하는 단계를 포함하는 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자의 제조 방법을 제공한다. 이러한 방법은 포스포르아미다이트 화학을 사용할 수 있다(예를 들면 Caruthers 외, 1987, Methods in Enzymology vol. 154, 페이지 287-313 참조). 추가 실시형태에서, 이러한 방법은 접합체 모이어티와 상기 연속 뉴클레오티드 서열을 반응시켜 접합체 모이어티를 이중 가닥 RNA 분자에 부착(예를 들어, 공유 부착)하는 단계를 추가로 포함한다. 추가 양상에서 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자를 약학적으로 허용되는 희석제, 용매, 담체, 염 및/또는 보조제와 혼합하는 단계를 포함하는, 본 발명의 조성물의 제조 방법이 제공된다.

[0375] **치료**

[0376] 본 명세서에서 사용된 용어 '치료'는 기존 질병 (예를 들어, 본 명세서에서 언급되는 질병 또는 장애)의 치료 또는 질병의 방지, 즉, 예방을 모두 지칭한다. 따라서, 본 명세서에 언급된 치료는 일부 실시형태에서 예방적일 수 있는 것으로 인정 될 것이다.

[0377] 본 발명은 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자 또는 약학 조성물의 치료적 또는 예방적 유효량을 질병에 걸린 또는 이에 걸리기 쉬운 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질병의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0378] 본 발명은 질병의 치료를 위한 약제로서 사용하기 위한 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자를 제공한다.

[0379] 본 발명은 요법에서 사용하기 위한 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자를 제공한다.

[0380] 본 발명은 질병의 치료 또는 예방를 위한 약제의 제조를 위한 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자를 제공한다.

[0381] 본 발명은 약제로 사용하기 위한 본 발명의 약학 조성물을 제공한다.

[0382] 본 발명은 요법에서 사용하기 위한 본 발명의 약학 조성물을 제공한다.

[0383] 본 발명은 질병의 치료 또는 예방를 위한 약제를 제조하기 위한 본 발명의 약학 조성물을 제공한다.

[0384] 질병은 눈과 관련된 질병일 수 있다. 질병은 눈에 영향을 미치는 질병일 수 있다.

[0385] 질병은 눈의 감염(또는 이와 관련된 것)일 수 있다. 질병은 일종의 눈의 (또는 눈과 관련된) 일종의 염증일 수 있다.

[0386] 일부 실시형태에서, 질병은 결막염, 안구 건조증 또는 눈의 염증일 수 있다.

[0387] 일부 실시형태에서, 치료 대상체는 동물, 바람직하게는 마우스, 래트, 햄스터, 원숭이와 같은 포유류, 또는 바람직하게는 인간이다. 일부 실시형태들에서, 대상체는 인간이다.

[0388] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자 또는 약학 조성물은 또 다른 치료제와의 조합 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0389] **투여 전략**

[0390] 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자 또는 본 발명의 약학 조성물은 대상체에게 단 한 번 투여될 수도 있고, 수 시간, 수 일, 수 주, 수 개월 또는 수 년에 걸쳐 투여될 수도 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다.

[0391] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자 또는 약학 조성물의 투여는 만성 투여일 수 있다.

[0392] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자 또는 약학 조성물은 한쪽 눈에만 투여된다.

[0393] 일부 실시형태에서, 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자 또는 약학 조성물은 양쪽 눈 모두에 투여된다. 양쪽 눈에 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0394] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 눈에 (또는 각 눈에) 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회 또는 1일 3회 초과로 투여된다. 예를 들어, 이중 가닥 RNA 분자는 눈에 (또는 각 눈에) 1일 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10회 이상 투여될 수 있다.

[0395] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 눈에 (또는 각 눈에) 1시간마다, 2시간마다, 3시간마다, 4시간마다, 5시간마다, 6시간마다, 7시간마다, 8시간마다, 9시간마다, 10시간마다, 11시간마다 또는 12시간마다 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 눈에 (또는 각 눈에) 4시간마다 투여될 수 있다.

[0396] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 눈에 (또는 각 눈에) 1일 미만 동안, 또는 1일, 연속 2일, 연속 3일, 연속 4일, 연속 5일, 연속 6일, 연속 7일, 연속 8일, 연속 9일, 연속 10일 또는 연속 10일 초과 동안 투여된다. 예를 들어, 이중 가닥 RNA 분자는 눈에 (또는 각 눈에) 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, 30, 31일 또는 31일 초과 동안 투여될 수 있다.

[0397] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 눈에 (또는 각 눈에) 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주 또는 6주 초과의 기간 동안 투여된다. 예를 들어, 이중 가닥 RNA 분자는 눈에 (또는 각 눈에) 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52주 또는 52주 초과 동안 투여될 수 있다.

[0398] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 눈에 (또는 각 눈에) 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월또는 6개월 초과의 기간 동안 투여된다. 예를 들어, 이중 가닥 RNA 분자는 눈에 (또는 각 눈에) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개월 또는 12개월 초과 동안 투여될 수 있다.

[0399] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 RNA 분자는 눈에 (또는 각 눈에) 1년, 2년, 3년, 4년, 5년 또는 5년 초과의 기간 동안 투여된다. 예를 들어, 이중 가닥 RNA 분자는 눈에 (또는 각 눈에) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25년 또는 25년 초과 동안 투여될 수 있다.

[0400] **발현의 조절 방법**

[0401] 본 발명은 세포 내 표적의 발현을 조절하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자 또는 본 발명의 약학 조성물을 유효량으로 상기 세포에 투여하는 것을 포함한다.

[0402] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 시험관내 방법이다.

[0403] 일부 실시형태에서 상기 방법은 생체 내 방법이다.

[0404] 일부 실시형태에서, 상기 세포는 동물 세포, 바람직하게는 마우스 세포, 래트 세포, 햄스터 세포 또는 원숭이 세포와 같은 포유류 세포, 또는 바람직하게는 인간 세포이다.

[0405] 일부 실시형태에서, 상기 세포는 포유류 세포이다.

[0406] 일부 실시형태에서, 상기 세포는 인간 세포이다.

[0407] 일부 실시형태에서, 상기 세포는 눈의 세포이다. 일부 실시형태에서, 상기 세포는 인간 눈의 세포이다.

[0408] 일부 실시형태에서, 상기 세포는 샘플링 의료 장치를 통해 수집될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 세포는 눈의 안구 표면의 결막 세포 집합체에서 유래될 수 있다.

[0409] **응용**

[0410] 본 발명의 이중 가닥 RNA 분자는 예를 들어, 진단, 치료 및 예방을 위한 연구 시약으로 사용될 수 있다.

[0411] 연구에서 이러한 이중 가닥 RNA 분자는 실험 동물의 눈에서 발현되는 표적의 발현을 억제하는 데 사용될 수 있으며, 이를 통해 표적의 기능 분석이나 치료적 개입을 위한 표적으로서의 유용성 평가를 용이하게 할 수 있다.

[0412] 본 발명은 본 명세서에 개시된 예시적인 방법 및 재료에 의해 제한되지 않으며, 본 명세서에 설명된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시예를 실시하거나 테스트하는 데 사용될 수 있다. 수치 범위는 해당 범위를 정의하는 숫자를 포함한다. 달리 표시되지 않는 한 임의의 핵산 서열은 5'에서 3' 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 기재된다. 아미노산 서열은 각각 아미노에서 카르복시 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 기재된다.

[0413] 본 명세서에서 논의된 간행물은 본 출원의 출원일 이전의 공개내용에 대해서만 제공된다. 본원의 어떠한 내용

도 이러한 간행물이 본 명세서에 첨부된 청구범위에 대한 선행 기술을 구성함을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0414] 본 발명은 이제 실시예를 통하여 더 자세히 설명될 것이며, 이는 해당 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 실시하는 것을 돕기 위한 것이며, 어떤 식으로든 본 발명의 범위를 제한하려는 의도는 아니다.

[0415] **실시예**

[0416] **실시예 1:**

[0417] 뉴질랜드 흰 토끼에게 서열 번호 3의 서열을 포함하는 네이키드 또는 C16-, C22- 또는 콜레스테롤-접합된 siRNA 분자를 PBS에서 제형화한 25 μg/μL 용액 20 μl(투여 당 500 μg)를 5일 동안 투약 사이에 4시간 간격을 두고 1일 3회 좌우 양쪽 눈에 국소 투여했다. 마지막 투약 후 4일차에 토끼를 희생시키고 각 눈에서 눈꺼풀 결막 샘플을 채취(식염수 n=4, siRNA 치료군 n=6)하여 디지털 드롭렛 PCR을 통해 AHSA1 mRNA 녹다운을 분석했다.

[0418] 결막 조직은 금속 비드를 첨가한 후 500 μL MagnaPure 조직 용해 완충액(Roche LifeScience)에서 TissueLyser II(Qiagen)를 사용하여 균질화하였고, 제조업체의 지침(Roche LifeScience)에 따라 MagNA Pure 96 시스템을 사용하여 350 μL Lysis 완충액에서 mRNA를 추출한 다음 RNAse가 없는 50 μL 물에서 추출했다. cDNA 합성은 RT-qPCR용 IScript Advanced cDNA 합성 키트(Bio-Rad)를 사용하여 4 μL 입력 RNA로 수행하였고, 제조업체의 프로토콜에 따라 프로브용 ddPCR 수퍼믹스(dUTP 없음)(Bio-Rad)를 사용하여 디지털 드롭렛 PCR의 투입량으로 2 μL가 사용되었다.

[0419] 다음의 TaqMan 유전자 발현 분석이 사용되었다:

[0420] AHSA1 (FAM): Oc06762465_g1 (카탈로그 번호: 4351372, TaqMan Thermofisher Scientific) 및 HPRT1 (VIC): Oc03399461_m1 (카탈로그 번호: 4331182, TaqMan Thermofisher Scientific)

[0421] AHSA1 mRNA 농도는 QuantaSoft 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 하우스키핑 유전자 HPRT를 기준으로 정량화하고 PBS로 처리한 토끼(값을 1로 설정)에 대해 정규화했다.

[0422] 도 1에 그 결과를 도시한다. 서열 번호 3의 서열을 포함하는 네이키드 siRNA 분자, 서열 번호 3의 서열을 포함하는 C16-접합된 siRNA 분자, 서열 번호 3의 서열을 포함하는 C22-접합된 siRNA 분자 및 서열 번호 3의 서열을 포함하는 콜레스테롤-접합된 siRNA 분자의 경우 결막 전체에서 20-25%의 녹다운이 관찰되었으며, 이는 네이키드 AHSA1 siRNA에 비해 C16, C22 및 콜레스테롤 AHSA1 siRNA의 녹다운이 우수함을 나타낸다.

[0423] **실시예 2:**

[0424] 뉴질랜드 흰 토끼에게 서열 번호 3의 서열을 포함하는 네이키드 또는 C16-, C22- 또는 콜레스테롤-접합된 siRNA 분자를 PBS에 녹인 25 μg/μL 용액 20 μl(투여 당 500 μg)를 5일 동안 4시간 간격을 두고 1일 3회 눈에 국소 투여했다. 마지막 투여 후 4일차에 토끼를 희생시켜 눈꺼풀 결막 샘플을 채취(식염수 n=4, siRNA 치료군 n=6)하고 hELISA를 이용하여 AHSA1 siRNA 함량을 분석했다.

[0425] 결막 조직(~5 mg)을 금속 비드를 첨가한 후 500 μL MagnaPure 조직 용해 완충액(Roche LifeScience)에서 TissueLyser II(Qiagen)를 사용하여 균질화했다. siRNA 함량은 비오틴화된 캡처 프로브 및 안티센스 siRNA 가닥에 결합하는 디곡시게닌-접합된 검출 프로브를 사용하여 hELISA를 통해 결정했다. 생성된 용해물을 희석하여 96웰 플레이트에서 SSCT 완충액(5x 식염수 시트르산나트륨 완충액[0.05% Tween 20[Sigma-Aldrich, 번호 P9416] 함유 SSC 완충액 20x 농축액, Sigma-Aldrich, 번호 6639])에서 35 nM 비오틴화 캡처 프로브 및 30 nM 디곡시게닌-커플링된 검출 프로브와 함께 실온에서 30분 동안 인큐베이션되었다. 조립된 복합체를 스트렙타비딘으로 코팅한 ELISA 플레이트(Nunc 436014)에서 1시간 동안 캡처하고, 2 x SSCT 완충액으로 3단계 세척한 후, 각 웰을 항-디곡시게닌-알칼리성 인산가수분해효소(AP)-Fab 단편(Roche, no. 11093274910)과 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 3단계의 추가 세척 후 BluePhos 기질(Kirkegaard & Perry Labs [KPL], no. 50-88-00)을 플레이트에 첨가하고, 20분 후 615 nm에서 분광 광도계로 발색을 측정했다. 올리고 함량 분석을 위해 각 샘플의 여러 희석액(50배, 100배, 200배, 400배, 800배 및 1,600배)을 측정했다. 각 조직 무게로 다시 계산하고 다양한 희석액에서 유효한 값들(즉, 표준 곡선의 선형 범위 내의 판독값)의 평균을 내어 결막 조직 무게당 약물 농도를 nmol/g 단위로 생성한다.

[0426] 결과를 도 2에 나타낸다. 서열 번호 3의 서열을 포함하는 네이키드 siRNA 분자, 서열 번호 3의 서열을 포함하는 C16-접합된 siRNA 분자, 서열 번호 3의 서열을 포함하는 C22-접합된 siRNA 분자 및 서열 번호 3의 서열을 포함

하는 콜레스테롤-접합된 siRNA 분자의 경우 결막에서 증가된 함량이 관찰되었으며, 이는 네이키드 siRNA에 비해 C16, C22 그리고 특히 콜레스테롤 접합된 AHA1 siRNA의 함량이 우수함을 나타낸다.

[0427] **실시예 3:**

[0428] 뉴질랜드 흰 토끼에게 서열 번호 3의 서열을 포함하는 네이키드 또는 C16-, C22- 또는 콜레스테롤-접합된 siRNA 분자를 PBS에 녹인 25 μg/μL 용액 20 μl(투여 당 500 μg)를 5일 동안 4시간 간격을 두고 1일 3회 눈에 국소 투여했다. 마지막 투여 후 4일차에 EYEPRIM(OPIA technologies) 샘플을 구 결막에서 채취했다(식염수 n=4, siRNA 치료군 n=6). 동물을 안락사시킨 후, 구 결막을 노출시키고 EYEPRIM 멤브레인을 하구 결막에 대고 3초간 눌렀다. 그런 다음 EYEPRIM으로부터 멤브레인을 제거했다. 이때 멤브레인이 떨어지거나 날아가지 않도록 배출할 때 포셉트로 멤브레인을 잡았다. 멤브레인을 2 mL 에펜도르프 튜브에 스냅 냉동했다.

[0429] EYEPRIM 샘플은 금속 비드를 첨가한 후 500 μL MagnaPure 조직 용해 완충액(Roche LifeScience)에서 TissueLyser II(Qiagen)를 사용하여 균질화하였고, 제조업체의 지침(Roche LifeScience)에 따라 MagNA Pure 96 시스템을 사용하여 350 μL Lysis 완충액에서 mRNA를 추출한 다음 RNAse가 없는 50 μL 물에서 추출했다. cDNA 합성은 RT-qPCR용 IScript Advanced cDNA 합성 키트(Bio-Rad)를 사용하여 4 μL 입력 RNA로 수행하였고, 제조업체의 프로토콜에 따라 프로브용 ddPCR 수퍼믹스(dUTP 없음)(Bio-Rad)를 사용하여 디지털 드롭렛 PCR의 투입량으로 2 μL가 사용되었다.

[0430] 다음의 TaqMan 유전자 발현 분석이 사용되었다:

[0431] AHSA1 (FAM): Oc06762465_g1 (카탈로그 번호: 4351372, TaqMan Thermofisher Scientific) 및 HPRT1 (VIC): Oc03399461_m1 (카탈로그 번호: 4331182, TaqMan Thermofisher Scientific).

[0432] AHSA1 mRNA 농도는 QuantaSoft 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 하우스키핑 유전자 HPRT를 기준으로 정량화하고 PBS로 처리한 토끼(PBS를 1로 설정)에 대해 정규화했다.

[0433] 결과를 도 3에 나타낸다. 결막 EYEPRIM 샘플에서 69%의 녹다운(C16-접합 서열 번호 3), 65%의 녹다운(C22-접합 서열 번호 3) 및 61%의 녹다운(콜레스테롤-접합 서열 번호 3)이 네이키드 siRNA(서열 번호 3)의 54%와 비교되었고, 네이키드 siRNA에 비해 C16-(p=0.02 스튜던트 t-검정)의 경우 유의하게 우수한 녹다운, C22 및 콜레스테롤-접합 AHSA1 siRNA의 경우 우수한 녹다운을 나타냈다.

[0434] **실시예 4**

[0435] *등온 적정 열량측정법(ITC)*

[0436] 실험은 표적 단백질이 주사기에 존재하고 세포에 놓인 FA-siRNA 샘플에 주입되는 분석 설정에서 자동 PEAQ ITC(Malvern Panalytical, Malvern, 영국)에서 수행되었다. 주사기 내의 마우스 혈청 알부민 농도(MSA, 카탈로그 번호 A3139-100 mg, 기본적으로 지방산 무함유)(25-450 μM)와 세포 내의 FA-siRNA 농도(3-60 μM)는 측정된 화학양론 및 결합 친화도를 기반으로 투석으로부터 여과 및 탈기된 완충액을 사용하여 조절되었다. ITC 분석은 다음의 실험 매개변수를 사용하여 25 ℃에서 수행되었다: 교반기 속도: 750 rpm, 간격: 150초, 주입 시간: 3초, 기준 전력 10 μcal/s. 초기 지연 시간은 60초로, 필터 주기는 5초로 설정되었으며, 각각 적정 부피 2.0 및 3.0으로 13회 또는 19회 주입을 수행하여, 분석된 상호작용에 대한 엔탈피 데이터를 수집했다. 희석열을 보정하기 위한 대조 적정이 수행되었다(완충액에서 FA-siRNA로, MSA에서 완충액으로, 완충액에서 완충액으로). MSA를 DPBS(카탈로그 번호 14190-094, Gibco/Thermo Fisher Scientific, Basel, 스위스)에 용해한 후 ITC 분석 전에 Slide-A-Lyzer Dialysis 카세트 20K MWCO(카탈로그 번호 66003, Thermo ScientificTM, Waltham, MA)를 사용한 DPBS를 사용하여 추가로 투석했다. FA-siRNA 분말을 DPBS에 용해시켰다. 투석된 단백질과 FA-siRNA 농도는 각각 280 및 260 nm에서 UV 분광법을 사용하여 (Beer-Lambert 법칙 방정식에 따라) 결정되었다. FA-siRNA 적정 중 생성된 반응열에서 오프셋 및 MSA 희석열을 빼었다. 기준선은 수동으로 조정했고(필요한 경우) 교정된 반응열은 MicroCal PEAQ ITC 분석 소프트웨어 버전 1.3(Malvern instrument, Malvern, 영국)의 단일 부위 결합 모델을 사용하여 적합되었다. FA-siRNA ITC 연구에 앞서 와파린(DPBS + 2% DMSO(v/v))에 대한 MSA 적정의 ITC 제어 실험이 수행되었다.

[0437] *분석 초원심분리(AUC)*

[0438] 샘플은 테스트 농도(1-75 μM)에 따라 흡광도 검출(260-295 nm 범위)이 가능한 분석용 초원심분리기 XLI 및 Optima-AUC(Beckman Coulter, CA)에서 침전 속도(SV) 및/또는 침전 평형(SE) 실험을 통해 분석되었다. 개별 샘플을 DPBS(카탈로그 번호 14190-094, Gibco/Thermo Fisher Scientific, Basel, 스위스)에 용해한 후 DPB로 희

석했다. AUC-SV 실험은 3 및 12 mm Ti 센터피스(Nanolytics Instruments, Potsdam, 독일)와 An-60 Ti 로터(Beckman Coulter, CA)를 사용하여 60,000rpm, 20 ℃에서 진행되었다. SE 실험은 다중 속도 모드(FA Bis C16 및 FA C24 접합체의 경우 각각 10, 15, 및 20 krpm 또는 7, 10, 및 14 krpm의 로터 속도)에서 수행되었고, FA-siRNA 접합체 농도는 6 및 25 μM으로 설정되었다. SE 분석에는 3 mm Ti 센터피스(Nanolytics Instruments, Potsdam, 독일)와 An-60 Ti 로터(Beckman Coulter, CA)가 사용되었다. 완충액 밀도와 점도는 밀도계와 점도계(각각 DMA 5000 M과 AMVn, Anton Paar, Aarau, 스위스)를 사용하여 실험적으로 결정되었다. FA-siRNA 접합체와 MSA의 상호 작용은 흡광도(290-305 nm) 및/또는 형광 검출 시스템(Aviv Biomedical, NJ)을 사용한 형광 검출을 통해 SV 모드에서 분석되었다.

[0439] *결과*

[0440] 도 4는 다양한 지방산 접합된 AHA-1 특이적 siRNA(FA-siRNA)에 대한 생물물리학적 분석을 제공하는 결과를 보여준다. 컬럼 3: 25 μM 농도에서 다양한 지방산 접합체가 다양한 올리고머 상태로 존재하는 경향(AUC로 측정한 최종 올리고머 상태); 컬럼 4: 25 μM PBS에 용해했을 때 다양한 FA-siRNA의 단량체 백분율; 컬럼 5: 마우스 혈청 알부민(MSA, ITC로 결정)에 대한 결합 친화도를 보여주며; 컬럼 6은 MSA에 결합된 FA-siRNA 접합체의 수.

[0441] 그 결과 (i) 지방산이 접합된 siRNA 분자의 결합 강도는 지방산의 길이에 따라 조정/변경될 수 있고; (ii) 이중 결합의 도입(예를 들어, 스테아르산 대 올레산)이 지방산과 알부민의 결합에 영향을 미치지 않으며; (iii) 알부민 결합은 지방산 접합된 siRNA 분자의 운반체로 활용될 수 있고 필요에 따라 결합 강도를 조절할 수 있음을 입증하였다.

[0442] **실시예 5:**

[0443] 뉴질랜드 흰 토끼에게 서열 번호 3의 서열을 포함하는 네이키드 또는 C16-, C22- 또는 콜레스테롤-접합된 siRNA 분자를 PBS에서 제형화한 25 μg/μL 용액 20 μl(투여 당 500 μg)를 5일 동안 투약 사이에 4시간 간격을 두고 1일 3회 좌우 양쪽 눈에 국소 투여했다. 마지막 투여 후 3일차에 토끼를 희생시키고 각 눈에서 상하 눈꺼풀 결막 샘플을 채취(n=2의 눈)하고 조직 절편(n=3-8)을 현장 교잡법(ISH)을 사용하여 결막 조직에서 siRNA 분자 분포에 대해 분석하였다.

[0444] 결막 조직을 절개하여 10% NBF에서 하룻밤 고정한 후 표준 탈수 과정을 거쳐 다음 날 파라핀에 포매시켰다. 횡단 결막 조직 절편(5 μm)은 Ventana Discovery ULTRA 자동 염색기(Roche Diagnostics)를 사용하여 염색되었다. 베이킹(60 ℃에서 20분), 파라핀 제거(69 ℃에서 24분) 및 ISH 프로테아제 3회 처리(1방울, 32분)를 위한 자동화 프로토콜들이 설계되었다. 슬라이드에 DISC 억제제(1방울, 12분)를 처리하고 반응 완충액(1회)으로 세척했다. 서열 번호 3을 표적으로 하는 DIG 표지된 프로브를 최종 농도가 0.25 nM이 되도록 miRCURY LNA miRNA ISH 완충액(1x RNase가 없는 물)에 희석하여 수동으로 슬라이드에 도포했다. 슬라이드들을 90 ℃에서 8분 동안 변성시킨 후 65℃에서 16분 동안 혼성화시켰다. 그런 다음 슬라이드를 0.1x SSC(5x 54 ℃에서 4분 동안)로 세척했다. DIG 분자는 항-DIG-HRP(1방울, 4 ℃, 가열 없음)를 사용한 다음, DISC AMP TSA BF와 DISC AMP H2O2 BF(각각 1방울, 4분간 가열 없이) 및 DISC 항-BF HRP(각각 1방울, 4분간 가열 없이)를 도포하여 검출했다. HRP는 DAB(갈색) 검출 키트를 이용해 검출되었다. 슬라이드는 EcoMount 배지에 장착하기 전에 헤마톡실린 II로 (가열 없이 4분간) 대조 염색한 다음 청색화 시약으로 (가열 없이 4분간) 처리했다. Olympus VS120 슬라이드 스캐너를 사용하여 20배 확대율로 슬라이드를 스캔하여 결과를 시각화했다. 양성 염색의 정량화는 Halo, Indica Labs(V3.6.4134.166)를 사용하여 수행되었다.

[0445] 다음 시약들이 사용되었다: ISH-프로테아제 3(05273331001), Disc. 억제제(07017944001), 항-DIG HRP(07256299001), Disc. 항-BF HRP(07529422001)), DISC AMP TSA BF(07529422001), 헤마톡실린 II(05277965001), 청색화 시약(05266769001), SSC 용액(10x)(05353947001), 반응 완충 농축액(10X)(05353955001), DISC. ChromoMap DAB RUO(05266645001)는 모두 Roche Diagnostics에서 구입했다. miRCURY LNA miRNA ISH 완충액(#1108512)과 서열 번호 3을 표적하는 DIG 표지 프로브(Custom miRCURY LNA /5DiGN/CGTGGCCTTAATGAA/3DiG_N/)는 Qiagen에서 구입했다.

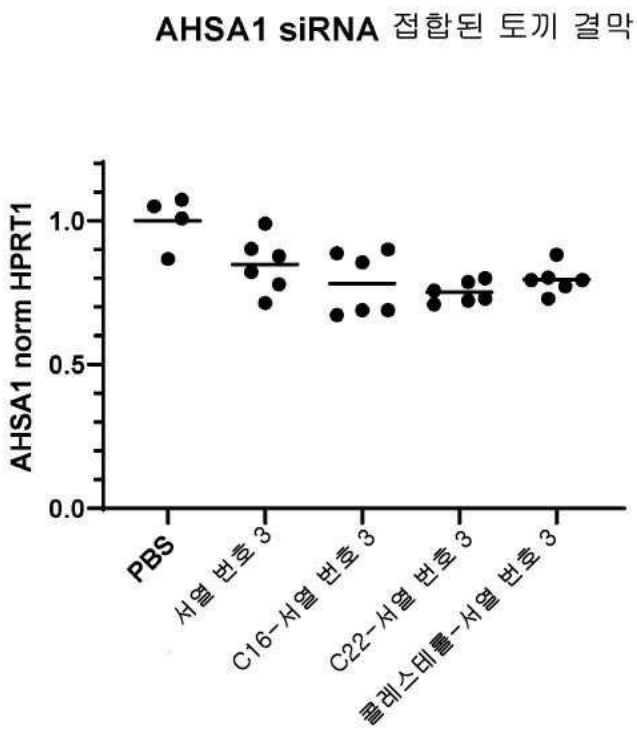
[0446] 결과를 도 5에 나타낸다. 서열 번호 3의 서열을 포함하는 네이키드 siRNA 분자, 서열 번호 3의 서열을 포함하는 C16-접합 siRNA 분자, 서열 번호 3의 서열을 포함하는 C22-접합 siRNA 분자 및 서열 번호 3의 서열을 포함하는 콜레스테롤-접합 siRNA 분자에 대해 0.3-0.4%의 결막 조직 ISH 염색이 관찰되었는데, 네이키드 AHSA1 siRNA에 비해 C16, C22 및 콜레스테롤 AHSA1 siRNA에서 우수한 조직 염색을 나타내는 반면, C16 및 C22 AHAS1 siRNA는 네이키드 및 콜레스테롤 AHAS1 siRNA에 비해 가장 우수한 결과를 보였음을 나타낸다. 또한, 네이키드 AHSA1

siRNA에 대한 염색은 주로 표층 결막에 위치했지만, C16, C22 및 콜레스테롤 AHSA1 siRNA에 대한 염색도 결막 조직의 실질에 위치했다.

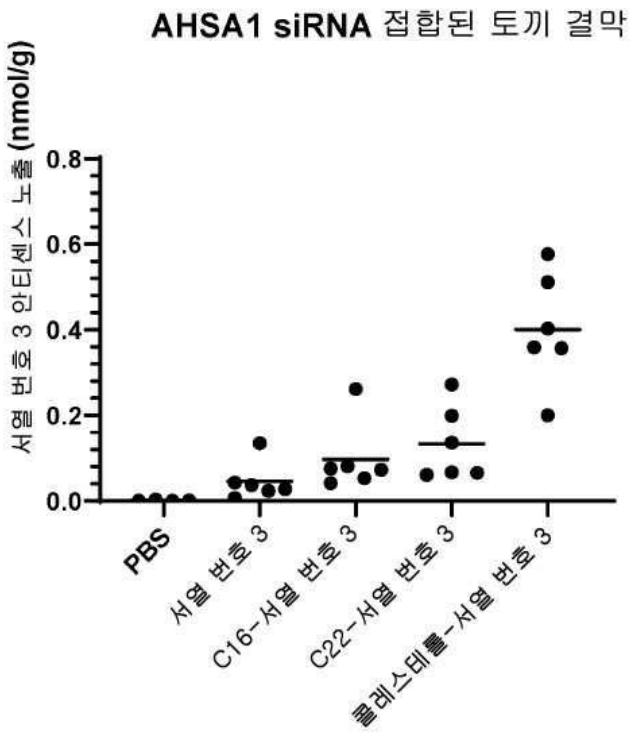
[0447] 상기 명세서에 언급된 모든 간행물은 본 명세서에 참고로 포함되어 있다. 본 발명의 기술된 방법 및 시스템에 대한 다양한 수정 및 변형은 본 발명의 범위 및 사상에서 벗어나지 않고도 해당 기술 분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 본 발명을 특정한 바람직한 실시예와 관련하여 기술하였지만, 청구범위에 기재된 본 발명이 부당하게 이러한 특정 실시예에 제한되어서는 안된다는 것을 이해해야 한다. 실제로, 분자 생물학 또는 관련 분야의 통상의 기술자에게 자명한 본 발명을 수행하기 위한 기술된 방식의 다양한 변형은 하기 청구범위의 범주에 속하는 것으로 한다.

도면

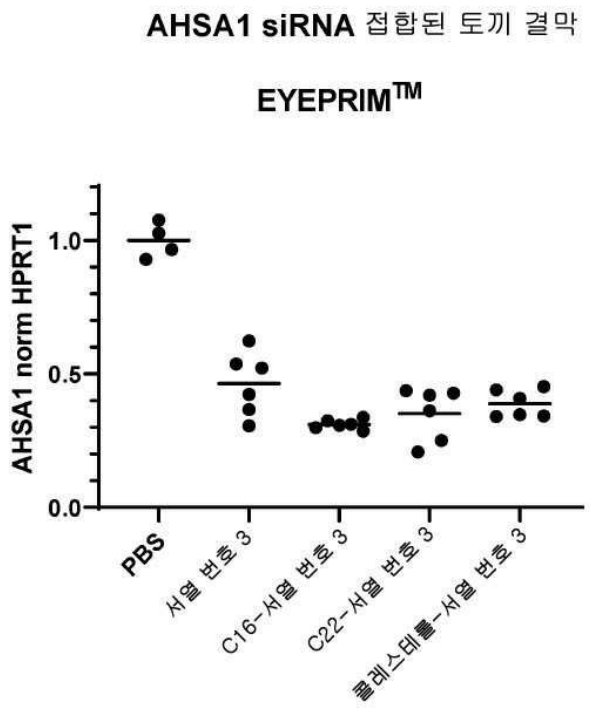
도면1



도면2


AHSA1 siRNA 접합된 토끼 결막
서열 번호 3 안티센스 노출 (nmol/g)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
PBS
서열 번호 3
C16-서열 번호 3
C22-서열 번호 3
콜레스테롤-서열 번호 3

도면3

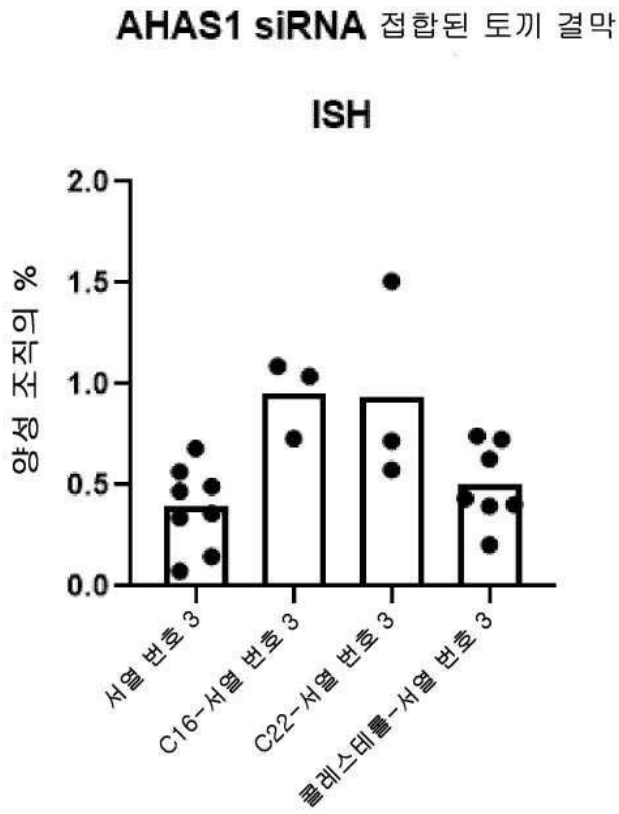

AHSA1 siRNA 접합된 토끼 결막
EYEPRIM™
AHSA1 norm HPRT1
1.0
0.5
0.0
PBS
서열 번호 3
C16-서열 번호 3
C22-서열 번호 3
콜레스테롤-서열 번호 3

도면4

화합물 번호	siRNA 접합체	최종 올리고머 5상태 (AUC)*	@25μM [단량체%](AUC)*	MSA 결합 친화도 (μM) (ITC)**	화학양론 (ITC)**	관찰결과/비고
126604	네이키드(C0)	1량체	100	>500	해당 없음	MSA에 결합하지 않음 또는 매우 약하게 결합
153870	C10 (데칸산)	1량체	100	≈356	≈4	MSA에 약하게 결합
126802	C16 (스테아르산)	2량체	87	6.9	4.1	MSA에 결합
153871	C18+ (올레산)	1량체	100	7.0	4.6 - 4.1	MSA에 결합
126804	C22 (도코산산)	2량체	42	≈4	>4	MSA에 결합
126801	콜레스테롤	3량체	29	0.5-1.5	3-4	MSA에 결합

*AUC: 분석용 초고속원심분리
** 등온 적정 열량측정법
+ 올레산: 시스-9-옥타데센산

도면5



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.