

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2025-0017218**(43) 공개일자** 2025년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) **A61K 31/713** (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)

(21) 출원번호 **10-2024-7041678**

(22) 출원일자(국제) **2023년05월24일**
 심사청구일자 **없음**

(85) 번역문제출일자 **2024년12월16일**

(86) 국제출원번호 **PCT/US2023/067384**

(87) 국제공개번호 **WO 2023/230495**
 국제공개일자 **2023년11월30일**

(30) 우선권주장
 63/345,513 2022년05월25일 미국(US)

(71) 출원인
암젠 인크
 미국 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크, 원
 암젠 센터 드라이브

(72) 발명자
허버릭 브래들리 제이.
 미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스,
 메일 스탬프 28-5-에이, 로 디파트먼트-페이턴트 오
 퍼레이션즈, 원 암젠 센터 드라이브

다스 암리타
 미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스,
 로 디파트먼트-페이턴트 오퍼레이션즈 엠에스
 28-5-에이, 원 암젠 센터 드라이브
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 42 항

(54) 발명의 명칭 SCAP 발현을 억제하기 위한 RNAi 작제물 및 이의 사용 방법**(57) 요약**

본 개시내용은 SCAP 유전자의 발현을 감소시키기 위한 RNAi 작제물, 예컨대, siRNA에 관한 것이다. 간 질환, 예컨대, 비알코올성 지방간 질환(NAFLD)을 치료하거나 예방하기 위해 상기 RNAi 작제물을 사용하는 방법이 또한 기재되어 있다.

(52) CPC특허분류

A61P 1/16 (2018.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2310/321 (2013.01)

C12N 2310/322 (2013.01)

(72) 발명자

호만 올리버

미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스,
메일 스타프 28-5-에이, 로 디파트먼트-페이턴트 오
퍼레이션즈, 원 암젠 센터 드라이브

린 다니엘 씨. 에이치.

미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스,
메일 스타프 28-5-에이, 로 디파트먼트-페이턴트 오
퍼레이션즈, 원 암젠 센터 드라이브

명세서

청구범위

청구항 1

센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 RNAi 작제물로서, 상기 안티센스 가닥은 표 1에 열거된 안티센스 서열과는 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접한 뉴클레오티드를 갖는 영역을 포함하고, 상기 RNAi 작제물이 SREBP 절단 활성화 단백질(SREBP Cleavage Activating Protein; SCAP) mRNA의 발현을 억제하는, RNAi 작제물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 센스 가닥은 상기 안티센스 가닥의 서열에 충분히 상보적인 서열을 포함하여 약 15 내지 약 30개 염기쌍 길이의 이중체 영역을 형성하는, RNAi 작제물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 이중체 영역은 약 17 내지 약 24개의 염기쌍 길이인, RNAi 작제물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중체 영역은 약 19 내지 약 21개 염기쌍 길이인, RNAi 작제물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 이중체 영역은 19개의 염기쌍 길이인, RNAi 작제물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥은 각각 약 15 내지 약 30개의 뉴클레오티드 길이인, RNAi 작제물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥은 각각 약 19 내지 약 27개의 뉴클레오티드 길이인, RNAi 작제물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥은 각각 약 21 내지 약 25개의 뉴클레오티드 길이인, RNAi 작제물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥은 각각 약 21 내지 약 23개의 뉴클레오티드 길이인, RNAi 작제물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 평활 말단(blunt end)을 포함하는, RNAi 작제물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 1 내지 4개의 짝지워지지 않은 뉴클레오티드의 적어도 하나의 뉴클레오티드 오버행을 포함하는, RNAi 작제물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 오버행은 2개의 짝지워지지 않은 뉴클레오티드를 갖는, RNAi 작제물.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 센스 가닥의 3' 말단, 상기 안티센스 가닥의 3' 말단, 또는 상기 센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥 둘 다의 3' 말단에 뉴클레오타이드 오버행을 포함하는, RNAi 작제물.

청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 오버행은 5'-UU-3' 디뉴클레오타이드 또는 5'-dTdT-3' 디뉴클레오타이드를 포함하는, RNAi 작제물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는, RNAi 작제물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 2'-변형된 뉴클레오타이드인, RNAi 작제물.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오타이드, 2'-O-알릴 변형된 뉴클레오타이드, 이환식 핵산(BNA), 글리콜 핵산, 역전된 뉴클레오타이드 또는 이들의 조합인, RNAi 작제물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오타이드, 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 또는 이들의 조합인, RNAi 작제물.

청구항 19

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드인, RNAi 작제물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 또는 이들의 조합인, RNAi 작제물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부를 포함하는, RNAi 작제물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 안티센스 가닥의 3' 말단에 2개의 연속적인 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부를 포함하는, RNAi 작제물.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 안티센스 가닥의 3' 말단과 5' 말단 둘 모두에 2개의 연속적인 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부 및 상기 센스 가닥의 5' 말단에 2개의 연속적인 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부를 포함하는, RNAi 작제물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 표 1에 열거된 안티센스 서열로부터 선택된 서열을 포함하는, RNAi 작제물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 가닥은 표 1에 열거된 센스 서열로부터 선택된 서열을 포함하는, RNAi 작제물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 표 1에 열거된 이중체 화합물 중 어느 하나인, RNAi 작제물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 작은 간섭 RNA(siRNA)인, RNAi 작제물.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 대조군 RNAi 작제물과 함께 인큐베이션된 간 세포에서의 SCAP 발현 수준과 비교하여 상기 RNAi 작제물과의 인큐베이션 후 간 세포에서의 SCAP의 발현 수준을 감소시키는, RNAi 작제물.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 간 세포는 Hep3B 또는 HepG2 세포인, RNAi 작제물.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 시험관내 Hep3B 세포에서 5 nM에서 SCAP 발현의 적어도 40%를 억제하는, RNAi 작제물.

청구항 31

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 시험관내 HepG2 세포에서 5 nM에서 SCAP 발현의 적어도 40%를 억제하는, RNAi 작제물.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 약 5 nM 미만의 IC50으로 Hep3B 세포에서 SCAP 발현을 억제하는, RNAi 작제물.

청구항 33

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 약 5 nM 미만의 IC50으로 HepG2 세포에서 SCAP 발현을 억제하는, RNAi 작제물.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 간 세포 표면에 발현된 하나 이상의 단백질에 결합하는 리간드를 더 포함하는, RNAi 작제물.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 RNAi 작제물 및 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 조성물.

청구항 36

SCAP 발현의 감소를 필요로 하는 환자에서 SCAP 발현을 감소시키는 방법으로서, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 RNAi 작제물을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 37

SCAP 발현의 감소를 필요로 하는 환자에서 SCAP 발현을 감소시키는 방법으로서, 제35항의 조성물을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 간세포에서 SCAP의 발현 수준은 상기 RNAi 작제물을 투여받지 않은 환자에서의 SCAP 발현 수준과 비교하여 상기 RNAi 작제물의 투여 후의 환자에서 감소되는, 방법.

청구항 39

제36항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 비알코올성 지방간 질환(NAFLD)을 앓고 있는, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 환자는 비알코올성 지방간염(NASH)을 앓고 있는, 방법.

청구항 41

NAFLD의 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 RNAi 작제물 또는 제35항의 조성물.

청구항 42

NAFLD 치료용 의약의 제조를 위한, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 RNAi 작제물 또는 제35항의 조성물의 용도.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 개시내용은 SREBP 절단 활성화 단백질(SREBP Cleavage Activating Protein; SCAP)의 간 발현을 조절하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 특히, 본 개시내용은 RNA 간섭을 통해 SCAP 발현을 감소시키기 위한 핵산 기반 치료제 및 비알코올성 지방간 질환(nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)과 같은 간 질환을 치료하거나 예방하기 위한 이러한 핵산 기반 치료제의 사용 방법에 관한 것이다.
- [0002] 전자 제출된 자료의 인용에 의한 포함
- [0003] 본 출원과 동시에 제출되고 하기와 같이 식별된 뉴클레오티드/아미노산 서열 목록은 그 전체 내용이 본 명세서에 인용되어 포함된다: 2023년 5월 19일에 작성된, "A-2911-W001-SEC.xml"로 명명된 하나의 550 킬로바이트 XML 문서.
- [0004] 관련 출원에 대한 교차 참조
- [0005] 본 출원은 2022년 5월 25일자로 출원된 미국 가출원 특허 제63/345,513호의 이익을 주장하며, 상기 기초출원은 전문이 본 명세서에 참조에 의해 인용된다.

배경 기술

- [0006] 다양한 간 질환을 포함하여, 비알코올성 지방간 질환(NAFLD)은 세계에서 가장 흔한 만성 간 질환이며, 이의 유병률은 지난 20년 동안 2배가 되었고, 현재 세계 인구의 대략 20%에 영향을 미치는 것으로 추정된다(Sattar et al. (2014) BMJ 349: g4596; Loomba and Sanyal (2013) Nature Reviews Gastroenterology & hepatology 10(11):686-690; Kim and Kim (2017) Clin Gastroenterol Hepatol 15(4):474-485; Petta et al. (2016) Dig Liver Dis 48(3):333-342). NAFLD는 간에서 트리글리세리드의 축적으로 시작하며, 1) 유의한 알코올 소비 이력이 없고, 2) 다른 유형의 간 질환의 진단이 배제된 개체에서 간세포의 5% 초과에서 세포질 지방구(cytoplasmic lipid droplet)의 존재에 의해 정의된다(Zhu et al. (2016) World J Gastroenterol 22(36):8226-33; Rinella (2015) JAMA 313(22):2263-73; Yki-Jarvinen (2016) Diabetologia 59(6):1104-11). 일부 개체에서, 지방증(steatosis)이라 하는 간에서의 이소성 지방 축적은 염증 및 간세포 손상을 촉발하여, 비알코올성 지방간염(NASH; nonalcoholic steatohepatitis)이라고 하는 더 진행된 병기(stage)의 질환을 유발한다(Rinella, 상동). 2015년 현재, 7500만 명 내지 1억 명의 미국인이 NAFLD를 앓고 있는 것으로 예상되며, NASH는 NAFLD 진단의 대략 10% 내지 30%를 차지한다(Rinella, 상동; Younossi et al. (2016) Hepatology 64(5):1577-1586).
- [0007] NAFLD 발병의 주요 원인 중 하나는 간에서 트리글리세리드(TG) 항상성이 상실된다는 것인데, 이는 TG 및 지방산

의 축적을 초래한다. 시간이 지남에 따라 지방독성으로 인해 간세포의 적응 및 재생 반응이 고갈되어, 염증, 선천 면역 체계 활성화 및 지방간염이 발생할 수 있다. 진행성 NASH는 간에서 콜라겐 축적 또는 섬유화를 유발한다. 섬유화 정도가 악화됨에 따라 NASH를 앓는 개인의 10%~29%에서 간이 간경변이 되고 결국 간세포암으로 끝난다.

[0008] 스테롤 반응 요소 결합 단백질(Sterol Response Element Binding Protein, SREBP) 계열은 간내에서 새로운(드노보) 지방 생성 및 TG 축적을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. SREBP는 소포체(endoplasmic reticulum; ER)에서 불활성 전구체로서 합성된다. SREBP 절단 활성화 단백질(SCAP)은 SREBP 계열의 전사 인자에 대해 유일하게 알려진 조절인자이다. 합성 직후, SCAP는 SREBP와 복합체를 형성하고 SREBP를 골지체로 안내한다. 여기서 SREBP는 전사 인자의 활성 아미노 말단을 방출하기 위해 추가로 처리된다. 활성 SREBP는 핵으로 이동하여 SREBP 반응 요소에 결합하여 표적 유전자의 전사 활성화를 유도한다. 따라서 SCAP 기능을 억제하면 활성 SREBP의 처리를 방지하고 간에서 지방생성 및 TG 축적을 줄일 수 있다.

[0009] 현재 NAFLD 증상은 어떠한 약리학적 치료도 승인되지 않았으므로 체중 감소 및 임의의 2차 질병의 치료를 통해 관리된다. 그러므로, 영향을 받은 개체에서 NAFLD를 치료하는 조성물 및 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0010] 본 개시내용은 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 RNAi 작제물을 제공하며, 여기서 RNAi 작제물은 SREBP 절단 활성화 단백질(SCAP) mRNA의 발현을 억제한다. 특정 실시형태에서, RNAi 작제물은 표 1에 열거된 안티센스 서열과는 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접한 뉴클레오티드를 갖는 영역을 포함한다.

[0011] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 RNAi 작제물의 센스 가닥은 안티센스 가닥의 서열에 충분히 상보적인 서열을 포함하여, 약 15 내지 약 30개 염기쌍 길이의 이중체 영역을 형성한다. 이들 및 다른 실시형태에서, 센스 및 안티센스 가닥은 각각 약 15 내지 약 30개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, RNAi 작제물은 적어도 하나의 평활(blunt) 말단을 포함한다. 다른 실시형태에서, RNAi 작제물은 적어도 하나의 뉴클레오티드 오버행을 포함한다. 이러한 뉴클레오티드 오버행은 적어도 1 내지 6개의 짝지워지지 않은 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 센스 가닥의 3' 말단, 안티센스 가닥의 3' 말단, 또는 센스 가닥과 안티센스 가닥 둘 모두의 3' 말단에 위치될 수 있다. 특정 실시형태에서, RNAi 작제물은 센스 가닥의 3' 말단 및 안티센스 가닥의 3' 말단에 2개의 짝지워지지 않은 뉴클레오티드의 오버행을 포함한다. 다른 실시형태에서, RNAi 작제물은 안티센스 가닥의 3' 말단에 2개의 짝지워지지 않은 뉴클레오티드의 오버행 및 센스 가닥의 3' 말단/안티센스 가닥의 5' 말단의 평활 말단을 포함한다.

[0012] 개시내용의 RNAi 작제물은 리보스 고리, 핵염기 또는 포스포디에스테르 골격에 변형을 갖는 뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, RNAi 작제물의 리보스 고리에 대한 변형은 하나 이상의 2'-변형을 포함한다. 이러한 2'-변형은 2'-플루오로 변형된 뉴클레오티드, 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오티드, 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오티드, 2'-O-알릴 변형된 뉴클레오티드, 또는 이환식(bicyclic) 핵산(BNA)을 포함할 수 있다. 리보스 고리에 대한 변형은 또한 글리콜 핵산(GNA)의 혼입을 포함할 수 있는데, 여기서 리보스 고리는 프로필렌 글리콜로 대체된다. 하나의 특정한 실시형태에서, RNAi 작제물은 하나 이상의 2'-플루오로 변형된 뉴클레오티드, 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오티드 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNAi 작제물의 센스 및 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다. 무염기성 뉴클레오티드는, 예를 들어, 센스 가닥의 3' 말단, 5' 말단, 또는 3' 말단과 5' 말단 둘 다에서의 말단 뉴클레오티드로서 본 개시내용의 RNAi 작제물에 혼입될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 무염기성 뉴클레오티드는 반전될 수 있다(예를 들어, 3'-3' 뉴클레오티드간 연결 또는 5'-5' 뉴클레오티드간 연결을 통해 인접한 뉴클레오티드에 연결될 수 있음).

[0013] 일부 실시형태에서, RNAi 작제물은 적어도 하나의 골격 변형, 예컨대, 변형된 뉴클레오티드간 또는 뉴클레오티드간 연결을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 RNAi 작제물은 적어도 하나의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결을 포함한다. 특정 실시형태에서, 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결은 센스 및/또는 안티센스 가닥의 3' 또는 5' 말단에 위치될 수 있다.

[0014] 본 개시내용은 또한 상기 언급된 RNAi 작제물 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 조성물뿐만 아니라, SCAP 발현 감소를 필요로 하는 환자에서 SCAP의 발현을 감소시키는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 상기 언급된 RNAi 작제물 또는 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0015] 본 개시내용은 또한 예컨대, NAFLD 또는 NASH의 치료를 위해서 SCAP의 발현을 감소시키는 데 사용하기 위한

RNAi 작제물을 포함한다. 또한 NAFLD 치료용 의약의 제조를 위한 SCAP 발현을 억제하는 RNAi 작제물의 용도가 제공된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 개시내용은 간 세포에서 SREBP 절단 활성화 단백질(SCAP) 유전자를 표적으로 하고 SCAP의 발현을 감소시키는 RNAi 작제물의 설계 및 생체에 부분적으로 기초한다. SCAP 발현의 억제는, 예를 들어, 단순 지방간(지방증), 비알코올성 지방간염(NASH), 간경변(비가역적, 진행성 간 흉터 형성) 또는 SCAP-매개 고지혈증 또는 고중성지방혈증과 같은 간-관련 질환을 포함하여 SCAP 발현과 연관된 질병을 치료 또는 예방하는 데 유용하다.
- [0017] 본 개시내용은 SCAP를 암호화하는 유전자의 발현을 조절하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 유전자는 세포 또는 대상체, 예컨대, 포유류(예를 들어, 인간) 내에 있을 수 있다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 조성물은 SCAP mRNA를 표적화하고 세포 또는 포유류에서 SCAP 발현을 감소시키는 RNAi 작제물을 포함한다. 이러한 RNAi 작제물은 예를 들어, 단순 지방간(지방증), 비알코올성 지방간 질환(NAFLD), 비알코올성 지방간염(NASH), 간경변(비가역적, 진행성 간 흉터 형성) 또는 SCAP-매개 고지혈증 또는 고중성지방혈증과 같은 다양한 형태의 간-관련 질환을 치료하거나 예방하는 데 유용하다(예를 들어, 문헌[Lee et al., *Experimental & Molecular Medicine*, 52: 724-729 (2020)] 참조).
- [0018] 위에 논의된 바와 같이, SCAP(SREBP 절단-활성화 단백질)는 SREBP를 내소포체의 합성 부위에서 골지체의 절단 부위로 운반하는 스테롤-조절 에스코트 단백질이며, 골지체에서 이들은 세포질 NH₂-말단 전사 인자 도메인을 방출하는 두 가지 프로테아제에 의해 순차적으로 절단된다. 세포 배양 실험에서 SCAP 결핍 돌연변이체 세포는 SREBP 전구체 수준이 낮은 것으로 나타났는데, 이는 이러한 단백질이 SCAP 부재하에서 불안정하기 때문일 것이다. 또한, SCAP-결핍 CHO 세포는 콜레스테롤을 합성할 수 없으며 성장을 위해 외부 콜레스테롤 공급원이 필요하다(Rawson et al., *J Biol Chem.*, 274: 28549-28556(1999)). SCAP는 또한 SCAP의 다형성 막 도메인에 의해 매개되는 콜레스테롤 센서 역할을 한다. 이러한 스테롤-감지 모티프의 점 돌연변이는 SREBP 절단의 스테롤 억제를 방해하고 콜레스테롤의 조절되지 않는 과잉 생산으로 이어진다.
- [0019] 지질 합성의 제어는 간에서 특히 중요한데, 이것은 지질을 그 자체의 용도를 위해서 사용할 뿐만 아니라 지질단백질로서 혈장으로 외수송하기 위해 합성한다. 혈장 지질단백질 콜레스테롤 수준은 스타틴으로의 치료에 의해 낮아진다. 또한, 비만 및 비인슐린 의존성 당뇨병에서 발생할 수 있는 것과 같이 혈장 인슐린이 상승하면 간 지방산 합성이 증가한다. 간에서, 트랜스제닉 마우스에서 SREBP-1a의 가용성 전사-활성화 도메인이 과발현되면 과도한 지방간으로 이어진다. 스테롤-저항성 돌연변이체 SCAP를 과발현하는 트랜스제닉 마우스는 콜레스테롤을 과다 생산하는 간을 발달시켰고 콜레스테롤을 공급받았을 때 정상적인 피드백 억제를 나타내지 못했는데, 이는 SCAP가 간에서 조절 역할을 한다는 것을 시사한다. 간에서 조건부 SCAP 결핍이 있는 마우스는 간에서 콜레스테롤 및 지방산 합성의 기저 속도 감소를 나타내었는데, 이는 주로 다수의 생합성 효소를 암호화하는 mRNA의 감소로 인한 것이다(Matsuda et al., *Genes & Development* 15: 1206-121(2001)). 또한, NASH/NAFLD 환자는 SREBP1c 및 이의 표적 유전자의 발현 및 전사 활성 증가를 나타낸다. 종합하면, 이러한 데이터는 SCAP 및 SREBP가 간 지질 합성에 필요하다는 생체내 증거를 제공한다.
- [0020] RNA 간섭(RNAi)은 외인성 RNA를 세포 내로 도입하여 단백질 발현의 결과적인 감소와 함께 표적화된 단백질을 암호화하는 mRNA의 특이적 분해를 유발하는 프로세스이다. RNAi 기술 및 간 전달 둘 모두의 발전뿐만 아니라, 다른 RNAi-기반 요법을 이용한 증가하는 긍정적 성과는 간에서 지질 합성을 조절하는 유전자, 예컨대, SCAP를 직접 표적화함으로써 NAFLD를 치료적으로 치료하기 위한 강력한 수단으로 RNAi를 시사한다.
- [0021] 본 명세서에 사용되는 용어 "RNAi 작제물"은 세포 내로 도입될 때 RNA 간섭 메커니즘을 통해 표적 유전자(예를 들어, SCAP)의 발현을 하향조절할 수 있는 RNA 분자를 포함하는 제제를 지칭한다. "RNA 간섭"은 핵산 분자가 표적 RNA 분자(예를 들어, 메신저 RNA 또는 mRNA 분자)의 절단 및 분해를 서열-특이적 방식으로, 예를 들어, RNA 유도된 침묵 복합체(RISC) 경로를 통해 유도하는 방법이다. 일부 실시형태에서, RNAi 작제물은 이중체 영역을 형성하도록 혼성화하기 위해 서로에 대해 충분히 상보적인 인접한 뉴클레오티드의 2개의 역평행 가닥을 포함하는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 분자를 포함한다. 이중 가닥 RNAi 작제물은 또한 RNAi "트리거"로 지칭될 수 있다. 용어 "혼성화하다" 또는 "혼성화"는 전형적으로 2개의 폴리뉴클레오티드의 상보적 염기 사이의 수소 결합(예를 들어, 왓슨-크릭(Watson-Crick), 후그스틴(Hoogsteen) 또는 역 후그스틴 수소 결합)을 통한 상보적 폴리뉴클레오티드의 짝지움(pairing)을 지칭한다. 표적 서열(예를 들어, 표적 mRNA)에 실질적으로 상보적인 서열을 갖는 영역을 포함하는 가닥은 "안티센스 가닥"으로 지칭된다. "센스 가닥"은 안티센스 가닥의 영역에 실질적으로 상보

성인 영역을 포함하는 가닥을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 센스 가닥은 표적 서열과 실질적으로 동일한 서열을 갖는 영역을 포함할 수 있다.

[0022] 특정 실시형태에서, 이중 가닥 RNA의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 이중체 영역을 형성하기 위해 혼성화되지만 그렇지 않으면 연결되지 않은 2개의 분리된 분자일 수 있다. 2개의 분리된 가닥으로부터 형성된 이러한 이중 가닥 RNA 분자는 "작은 간섭 RNA" 또는 "짧은 간섭 RNA"(siRNA)로 지칭된다. siRNA는 전형적으로 약 20개 내지 27개의 염기쌍으로 이루어져 있으며 RNAi의 중심인 비(non)코딩 이중 가닥 RNA 분자의 한 부류이다. 그러므로, 일부 실시형태에서, 개시내용의 RNAi 작제물은 siRNA를 포함한다. 다른 실시형태에서, RNAi 작제물은 마이크로 RNA("miRNA" 또는 "성숙 miRNA"라고도 알려짐)일 수 있다. miRNA는 식물, 동물 및 일부 바이러스에 존재하는 작은(대략 18개 내지 24개 뉴클레오타이드 길이) 비코딩 RNA 분자이다. miRNA는 siRNA와 유사하지만 miRNA는 내인성 전구체 헤어핀 mRNA 구조에서 유래한다. miRNA는 표적 mRNA의 상보적 영역에 대한 염기 짝지움 및 RISC 경로를 통한 표적 RNA의 절단을 지시함으로써 유전자 발현을 조절한다.

[0023] 일부 실시형태에서, 개시내용은 SCAP에 관한 RNAi 작제물을 제공한다. 일부 실시형태에서, RNAi 작제물은 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA이며, 안티센스 가닥은 SCAP mRNA 서열에 상보적인 영역을 포함한다. RNAi 안티센스 가닥의 영역은 SCAP mRNA 서열의 임의의 적합한 영역에 상보적일 수 있다. 예를 들어, 안티센스 가닥은 SCAP mRNA 서열의 3' 비번역 영역(UTR) 또는 코딩 영역에 상보적인 영역을 포함할 수 있다.

[0024] 이중 가닥 RNAi 분자는 리보뉴클레오타이드의 리보스 당, 염기 또는 골격 구성요소, 예컨대, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 것에 대한 변형을 포함하여 리보뉴클레오타이드에 대한 화학적 변형을 포함할 수 있다. 이중 가닥 RNA 분자(예를 들어, siRNA, shRNA 등)에 사용된 바와 같은 임의의 이러한 변형은 본 개시내용의 목적 상 용어 "이중 가닥 RNA"에 의해 포괄된다.

[0025] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 제1 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 제2 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 혼성화하여 특정한 조건, 예컨대, 생리학적 조건 하에 이중체 영역을 형성할 수 있다면, 제1 서열은 제2 서열에 "상보적"이다. 다른 이러한 조건은 당업자에게 알려진 중등도 또는 엄격한 혼성화 조건을 포함할 수 있다. 제1 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 임의의 미스매치 없이 하나 또는 두 뉴클레오타이드 서열의 전체 길이에 걸쳐 제2 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드와 염기쌍을 이룬다면, 제1 서열은 제2 서열에 완전히 상보적인(100% 상보적인) 것으로 간주된다. 서열이 표적 서열에 대해 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 상보적인 경우, 서열은 표적 서열에 대해 "실질적으로 상보적"이다. 상보성 백분율은 제2 또는 표적 서열의 상응하는 위치에서 염기에 상보성인 제1 서열의 염기 수를 제1 서열의 총 길이로 나눔으로써 계산될 수 있다. 또한, 2개의 서열이 혼성화될 때 30개 염기쌍 이중체 영역에 걸쳐 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 미스매치가 존재한다면, 서열은 또 다른 서열에 실질적으로 상보적이라고 일컬어질 수 있다. 일반적으로 본 명세서에 정의된 바와 같이, 임의의 뉴클레오타이드 오버행이 존재한다면, 이러한 오버행의 서열은 2개 서열 사이의 상보성 정도를 결정하는 데 있어서 고려되지 않는다. 예를 들어, 혼성화하여 각각의 가닥의 3' 말단에 2-뉴클레오타이드 오버행을 갖는 19개 염기쌍 이중체 영역을 형성하는 21개 뉴클레오타이드 길이의 센스 가닥 및 21개 뉴클레오타이드 길이의 안티센스 가닥은 본 명세서에 사용되는 용어에 따라 완전히 상보적인 것으로 간주될 것이다.

[0026] 일부 실시형태에서, 안티센스 가닥의 영역은 표적 RNA 서열(예를 들어, SCAP mRNA)의 영역에 완전히 상보적인 서열을 포함한다. 이러한 실시형태에서, 센스 가닥은 안티센스 가닥의 서열에 완전히 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 이러한 다른 실시형태에서, 센스 가닥은 센스 및 안티센스 가닥에 의해 형성된 이중체 영역에서 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 미스매치를 갖는 안티센스 가닥의 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 임의의 미스매치는 말단 영역 내에서(예를 들어, 가닥의 5' 및/또는 3' 말단의 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 뉴클레오타이드 내에서) 발생하는 것이 바람직하다. 일 실시형태에서, 센스 및 안티센스 가닥으로부터 형성된 이중체 영역에서 임의의 미스매치는 바람직하게는 안티센스 가닥의 5' 말단의 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 뉴클레오타이드 내에서 발생한다.

[0027] dsRNA의 2개의 실질적으로 상보적인 가닥이 별개의 RNA 분자로 이루어진 경우, 이들 분자는 공유적으로 연결될 필요는 없으나, 공유적으로 연결될 수 있다. 2개 가닥이 이중체 구조를 형성하는 하나의 가닥의 3'-말단과 각각의 다른 가닥의 5'-말단 사이에 중단되지 않은 뉴클레오타이드 사슬 이외의 수단에 의해 공유 연결되는 경우, 연결 구조는 "링크"로 지칭된다. RNA 가닥은 동일하거나 상이한 수의 뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 이중체에서의 염기쌍의 최대 수는 dsRNA의 최대 가닥의 뉴클레오타이드 수에서 이중체에 존재하는 임의의 오버행을 뺀 수이다. 이중체 구조에 더하여, RNAi는 하나 이상의 뉴클레오타이드 오버행을 포함할 수 있다.

[0028] 다른 실시형태에서, 혼성화하여 이중체 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 단일 RNA 분자의 일부일

수 있으며, 즉, 센스 및 안티센스 가닥은 단일 RNA 분자의 자기-상보성 영역의 일부이다. 이러한 경우, 단일 RNA 분자는 이중체 영역(줄기(stem) 영역으로도 지칭됨) 및 루프 영역을 포함한다. 센스 가닥의 3' 말단은 짝지워지지 않은 뉴클레오타이드의 인접 서열에 의해 안티센스 가닥의 5' 말단에 연결되며, 이는 루프 영역을 형성할 것이다. 루프 영역은 전형적으로 안티센스 가닥이 센스 가닥과 염기쌍을 형성하여 이중체 또는 줄기 영역을 형성할 수 있도록 RNA 분자가 그 자체로 접히는 것을 허용하기에 충분한 길이를 갖는다. 루프 영역은 약 3 내지 약 25개, 약 5 내지 약 15개 또는 약 8 내지 약 12개의 짝지워지지 않은 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 본 명세서에 언급된 바와 같이, 적어도 부분적으로 자기-상보성인 영역을 갖는 이러한 RNA 분자는 "짧은 헤어핀 RNA"(shRNA)로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 루프 영역은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 또는 25개의 짝지워지지 않은 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 루프 영역은 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2개 또는 그 이하의 짝지워지지 않은 뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물은 shRNA를 포함한다. 단일한, 적어도 부분적으로 자기-상보성인 RNA 분자의 길이는 약 35개 뉴클레오타이드 내지 약 100개 뉴클레오타이드, 약 45개 뉴클레오타이드 내지 약 85개 뉴클레오타이드, 또는 약 50개 내지 약 60개 뉴클레오타이드일 수 있으며, 각각 본 명세서에 인용된 길이를 갖는 이중체 영역 및 루프 영역을 포함한다.

[0029] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물은 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SCAP 메신저 RNA(mRNA) 서열에 실질적으로 또는 완전히 상보적인 서열을 갖는 영역을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "SCAP mRNA 서열"은 SCAP 단백질 변이체 또는 임의의 종(예를 들어, 마우스, 래트, 비-인간 영장류, 인간)으로부터의 이소형을 포함하는, SCAP 단백질을 암호화하는, 스플라이스 변이체를 포함하는 임의의 메신저 RNA 서열을 지칭한다. SCAP는 또한 SREBF 샤페론으로서 당업계에 알려져 있다.

[0030] SCAP mRNA 서열은 또한 이의 상보적 DNA(cDNA) 서열로서 발현된 전사체 서열을 포함한다. cDNA 서열은 RNA 염기(예를 들어, 구아닌, 아데닌, 우라실 및 시토신)보다는 DNA 염기(예를 들어, 구아닌, 아데닌, 티민 및 시토신)로서 발현된 mRNA 전사물의 서열을 지칭한다. 그러므로, 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물의 안티센스 가닥은 표적 SCAP mRNA 서열 또는 SCAP cDNA 서열에 실질적으로 또는 완전히 상보적인 서열을 갖는 영역을 포함할 수 있다. SCAP mRNA 또는 cDNA 서열은 임의의 SCAP mRNA 또는 cDNA 서열을 포함할 수 있으나 이로 제한되지 않으며, 예컨대, NCBI 참조 서열 NM_001320044.2 또는 NM_012235.4로부터 유래될 수 있다.

[0031] 안티센스 가닥의 영역은 SCAP mRNA 서열의 적어도 15개의 연속적인 뉴클레오타이드에 실질적으로 상보적이거나 완전히 상보적일 수 있다. 일부 실시형태에서, 안티센스 가닥이 상보성 영역을 포함하는 SCAP mRNA 서열의 표적 영역은 약 15 내지 약 30개의 연속적인 뉴클레오타이드, 약 16 내지 약 28개의 연속적인 뉴클레오타이드, 약 18 내지 약 26개의 연속적인 뉴클레오타이드, 약 17 내지 약 24개의 연속적인 뉴클레오타이드, 약 19 내지 약 25개의 연속적인 뉴클레오타이드, 약 19 내지 약 23개(예를 들어, 19개, 20개, 21개, 22개 또는 23개)의 연속적인 뉴클레오타이드, 또는 약 19 내지 약 21개의 연속적인 뉴클레오타이드의 범위일 수 있다. 특정 실시형태에서, SCAP mRNA 서열에 실질적으로 또는 완전히 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥의 영역은 일부 실시형태에서, 표 1에 열거된 안티센스 서열로부터의 적어도 19개의 인접한 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 센스 및/또는 안티센스 서열은 1, 2, 또는 3개 이하의 뉴클레오타이드 미스매치를 갖는, 표 1에 열거된 서열로부터의 적어도 15개의 연속적인 뉴클레오타이드(예를 들어, 적어도 16개, 17개 또는 18개의 연속적인 뉴클레오타이드)를 포함한다.

[0032] RNAi 작제물의 센스 가닥은 전형적으로 2개의 가닥이 생리학적 조건 하에 혼성화하여 이중체 영역을 형성하도록 안티센스 가닥의 서열에 충분히 상보적인 서열을 포함한다. "이중체 영역"은 2개 폴리뉴클레오타이드 사이에 이중체를 생성하기 위해 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍 형성 또는 다른 수소 결합 상호작용에 의해 서로 염기쌍을 형성하는 2개의 상보적인 또는 실질적으로 상보적인 폴리뉴클레오타이드의 영역을 지칭한다. 예를 들어, RNAi 작제물의 이중체 영역은 다이서(Dicer) 효소 및/또는 (후술하는) RISC 복합체를 관여시킴으로써 RNAi 작제물이 RNA 간섭 경로에 진입하는 것을 가능하게 할 정도로 충분한 길이를 가져야 한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 이중체 영역은 약 15 내지 약 30개 염기쌍 길이이다. 이중체 영역에 대한 이 범위 내의 다른 길이도 또한 적합하며, 예컨대, 약 15 내지 약 28개 염기쌍, 약 15 내지 약 26개 염기쌍, 약 15 내지 약 24개 염기쌍, 약 15 내지 약 22개 염기쌍, 약 17 내지 약 28개 염기쌍, 약 17 내지 약 26개 염기쌍, 약 17 내지 약 24개 염기쌍, 약 17 내지 약 23개 염기쌍, 약 17 내지 약 21개 염기쌍, 약 19 내지 약 25개 염기쌍, 약 19 내지 약 23개 염기쌍, 또는 약 19 내지 약 21개 염기쌍 길이이다. 일 실시형태에서, 이중체 영역은 약 17 내지 약 24개 염기쌍 길이이다. 또 다른 실시형태에서, 이중체 영역은 약 19 내지 약 21개 염기쌍 길이이다. 예를 들어, 이중체 영역은 약 19개 염기쌍 길이일 수 있다.

[0033] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물은 표적 RNA의 절단을 지시하기 위해 표적 RNA 서열, 예를

들어, SCAP 표적 mRNA 서열과 상호작용하는 약 17 내지 약 24개의 뉴클레오타이드의 이중체 영역을 함유한다. 이론에 구애되고자 함 없이, 세포에 도입된 긴 이중 가닥 RNA는 다이스로 알려진 유형 III 엔도뉴클레아제에 의해 siRNA로 분해될 수 있다(문헌[Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485]). 리보뉴클레아제-III-유사 효소인 다이스는 dsRNA를 특징적인 2개의 염기 3' 오버행을 갖는 19 내지 23개 염기쌍의 짧은 간섭 RNA로 처리한다(문헌[Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363]). 그 후에, siRNA는 하나 이상의 헬리카제가 siRNA 이중체를 풀어 상보적인 안티센스 가닥이 표적 인식을 안내할 수 있게 하는 RNA-유도 침묵 복합체(RISC)에 통합된다(문헌[Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309]). 적당한 표적 mRNA에 결합 시, RISC 내의 하나 이상의 엔도뉴클레아제는 표적을 절단하여 침묵을 유도한다(Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15: 188).

[0034] 센스 가닥 및 안티센스 가닥이 2개의 별개의 분자(예를 들어, siRNA RNAi 작제물)인 실시형태의 경우, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 이중체 영역의 길이와 동일한 길이일 필요는 없다. 예를 들어, 하나의 가닥 또는 가닥 둘 모두는 이중체 영역보다 길 수 있고, 이중체 영역을 플랭킹(flaning)하는 하나 이상의 짝지워지지 않은 뉴클레오타이드 또는 미스매치를 갖는다. 그러므로, 일부 실시형태에서, RNAi 작제물은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 오버행을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "뉴클레오타이드 오버행"은 가닥의 말단 단부에서 이중체 영역을 넘어 연장되는 짝지워지지 않은 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드들을 지칭한다. 뉴클레오타이드 오버행은 전형적으로 한 가닥의 3' 말단이 다른 가닥의 5' 말단을 넘어 연장될 때 또는 한 가닥의 5' 말단이 다른 가닥의 3' 말단을 넘어 연장될 때 생성된다. 뉴클레오타이드 오버행의 길이는 일반적으로 1 내지 6개 뉴클레오타이드, 1 내지 5개 뉴클레오타이드, 1 내지 4개 뉴클레오타이드, 1 내지 3개 뉴클레오타이드, 2 내지 6개 뉴클레오타이드, 2 내지 5개 뉴클레오타이드, 또는 2 내지 4개 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 오버행은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 하나의 특정한 실시형태에서, 뉴클레오타이드 오버행은 1 내지 4개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 뉴클레오타이드 돌출부는 2개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 오버행 내의 뉴클레오타이드는 본 명세서에 기재된 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 오버행은 5'-우리딘-우리딘-3'(5'-UU-3') 디뉴클레오타이드를 포함한다. 이러한 실시형태에서, UU 디뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2'-변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 오버행은 5'-데옥시티미딘-데옥시티미딘-3'(5'-dTdT-3') 디뉴클레오타이드를 포함한다.

[0035] 뉴클레오타이드 오버행은 하나의 가닥 또는 가닥 둘 모두의 5' 말단 또는 3' 말단에 있을 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, RNAi 작제물은 안티센스 가닥의 5' 말단 및 3' 말단에 뉴클레오타이드 오버행을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, RNAi 작제물은 센스 가닥의 5' 말단 및 3' 말단에 뉴클레오타이드 오버행을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNAi 작제물은 센스 가닥의 5' 말단 및 안티센스 가닥의 5' 말단에 뉴클레오타이드 오버행을 포함한다. 다른 실시형태에서, RNAi 작제물은 센스 가닥의 3' 말단 및 안티센스 가닥의 3' 말단에 뉴클레오타이드 오버행을 포함한다.

[0036] RNAi 작제물은 이중 가닥 RNA 분자의 한쪽 말단에 단일 뉴클레오타이드 오버행 및 다른쪽 말단에 평할 말단을 포함할 수 있다. "평할 말단"은 센스 가닥 및 안티센스 가닥이 분자의 말단에서 완전히 염기쌍을 형성하고, 이중체 영역을 넘어 연장되는 짝지워지지 않은 뉴클레오타이드가 없음을 의미한다. 일부 실시형태에서, RNAi 작제물은 센스 가닥의 3' 말단에 뉴클레오타이드 오버행을 포함하고, 센스 가닥의 5' 말단 및 안티센스 가닥의 3' 말단에 평할 말단을 포함한다. 다른 실시형태에서, RNAi 작제물은 안티센스 가닥의 3' 말단에 뉴클레오타이드 오버행을 포함하고, 안티센스 가닥의 5' 말단 및 센스 가닥의 3' 말단에 평할 말단을 포함한다. 특정 실시형태에서, RNAi 작제물은 이중 가닥 RNA 분자의 양쪽 말단에 평할 말단을 포함한다. 이러한 실시형태에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 길이가 동일하고, 이중체 영역은 센스 및 안티센스 가닥과 길이가 동일하다(즉, 분자는 전체 길이에 걸쳐 이중 가닥임).

[0037] 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 각각 독립적으로 임의의 적합한 길이, 예컨대, 약 15 내지 약 30개 뉴클레오타이드 길이, 약 18 내지 약 28개 뉴클레오타이드 길이, 약 19 내지 약 27개 뉴클레오타이드 길이, 약 19 내지 약 25개 뉴클레오타이드 길이, 약 19 내지 약 23개 뉴클레오타이드 길이, 약 21 내지 약 25개 뉴클레오타이드 길이, 또는 약 21 내지 약 23개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 특정 실시형태에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 각각 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24 또는 약 25개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 길이가 동일하지만, RNAi 작제물이 2개의 뉴클레오타이드 오버행을 갖도록 가닥보다 짧은 이중체 영역을 형성한다. 예를 들어, 일 실시형태에서, RNAi 작제물은 (i) 각각 21개 뉴클레오타이드 길이인 센스 가닥 및 안티센스 가닥, (ii) 19개 염기쌍 길이인 이중체 영역, 및 (iii) 센스 가닥의 3' 말단과 안티센스 가닥의 3' 말단 둘 모두의 2개의 짝지워지지 않은 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 오버행을 포함한다. 또 다른 실시형

태에서, RNAi 작제물은 (i) 각각 23개 뉴클레오타이드 길이인 센스 가닥 및 안티센스 가닥, (ii) 21개 염기쌍 길이인 이중체 영역, 및 (iii) 센스 가닥의 3' 말단과 안티센스 가닥의 3' 말단 둘 모두의 2개의 짝지워지지 않은 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 오버행을 포함한다. 다른 실시형태에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 동일한 길이를 가지며, 이중 가닥 분자의 어느 한쪽 말단에 뉴클레오타이드 오버행이 없도록 이의 전체 길이에 걸쳐 이중체 영역을 형성한다. 하나의 이러한 실시형태에서, RNAi 작제물은 평할 말단이며, (i) 각각 21개 뉴클레오타이드 길이인 센스 가닥 및 안티센스 가닥, 및 (ii) 21개 염기쌍 길이의 이중체 영역을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, RNAi 작제물은 평할 말단이며, (i) 각각 23개 뉴클레오타이드 길이인 센스 가닥 및 안티센스 가닥, 및 (ii) 23개 염기쌍 길이의 이중체 영역을 포함한다.

[0038] 다른 실시형태에서, 센스 가닥 또는 안티센스 가닥은 다른 가닥보다 길고, 2개 가닥은 RNAi 작제물이 적어도 하나의 뉴클레오타이드 오버행을 포함하도록 짧은 가닥의 길이와 동일한 길이를 갖는 이중체 영역을 형성한다. 예를 들어, 일 실시형태에서, RNAi 작제물은 (i) 19개 뉴클레오타이드 길이인 센스 가닥, (ii) 21개 뉴클레오타이드 길이인 안티센스 가닥, (iii) 19개 염기쌍 길이의 이중체 영역, 및 (iv) 안티센스 가닥의 3' 말단에서 2개의 짝지워지지 않은 뉴클레오타이드의 단일 뉴클레오타이드 오버행을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, RNAi 작제물은 (i) 21개 뉴클레오타이드 길이인 센스 가닥, (ii) 23개 뉴클레오타이드 길이인 안티센스 가닥, (iii) 21개 염기쌍 길이의 이중체 영역, 및 (iv) 안티센스 가닥의 3' 말단에서 2개의 짝지워지지 않은 뉴클레오타이드의 단일 뉴클레오타이드 오버행을 포함한다.

[0039] 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물의 안티센스 가닥은 표 1에 열거된 안티센스 서열 또는 상기 안티센스 서열 중 임의의 것의 뉴클레오타이드 1~18, 2~18, 1~19, 2~19, 1~21 또는 2~21의 서열 중 어느 하나의 서열을 포함할 수 있다. 표 1에 열거된 안티센스 서열 각각은 SCAP mRNA 서열과 2개 뉴클레오타이드 오버행 서열에 상보적인 16~19 개의 연속적인 뉴클레오타이드의 서열을 포함한다. 그러므로, 일부 실시형태에서, 안티센스 가닥은 서열번호 148~294 또는 서열번호 442~588 중 임의의 하나의 뉴클레오타이드 1~18, 2~18, 1~19, 2~19, 1~21 또는 2~21의 서열을 포함한다. 마찬가지로, 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물의 센스 가닥은 표 1에 열거된 센스 서열 또는 상기 센스 서열 중 임의의 것의 뉴클레오타이드 1~18, 2~18, 1~19, 2~19, 1~21 또는 2~21의 서열 중 어느 하나의 서열을 포함할 수 있다. 그러므로, 일부 실시형태에서, 센스 가닥은 서열번호 1~147 또는 서열번호 295~441 중 임의의 하나의 뉴클레오타이드 1~18, 2~18, 1~19, 2~19, 1~21 또는 2~21의 서열을 포함한다.

[0040] 변형된 뉴클레오타이드

[0041] 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물, 예컨대, 표 1에 열거된 것은 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. "변형된 뉴클레오타이드"는 뉴클레오시드, 핵염기, 펜토스 고리 또는 포스페이트기에 하나 이상의 화학적 변형을 갖는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 변형된 뉴클레오타이드는 아데노신 모노포스페이트, 구아노신 모노포스페이트, 우리딘 모노포스페이트 및 시티딘 모노포스페이트를 함유하는 리보뉴클레오타이드, 및 데옥시아데노신 모노포스페이트, 데옥시구아노신 모노포스페이트, 데옥시시티딘 모노포스페이트 및 데옥시시티딘 모노포스페이트를 함유하는 데옥시리보뉴클레오타이드를 포괄하지 않는다. 그러나, RNAi 작제물은 변형된 뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드 및 데옥시리보뉴클레오타이드의 조합을 포함할 수 있다. 변형된 뉴클레오타이드를 이중 가닥 RNA 분자의 하나 또는 양쪽 가닥에 혼입하면, 예를 들어, 뉴클레아제 및 다른 분해 프로세스에 대한 분자의 민감성을 감소시킴으로써 RNA 분자의 생체내 안정성을 향상시킬 수 있다. 표적 유전자의 발현을 감소시키기 위한 RNAi 작제물의 효력은 또한 변형된 뉴클레오타이드의 혼입에 의해 증강될 수 있다.

[0042] 특정 실시형태에서, 변형 뉴클레오타이드는 리보스 당의 변형을 갖는다. 이러한 당 변형은 펜토스 고리의 2' 및/또는 5' 위치에서의 변형뿐만 아니라 이환식 당 변형을 포함할 수 있다. 2'-변형된 뉴클레오타이드는 H 또는 OH 이외의 2' 위치에 치환기를 갖는 펜토스 고리를 갖는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 이러한 2' 변형은 2'-O-알킬(예를 들어, O-C1-C10 또는 O-C1-C10 치환된 알킬), 2'-O-알릴(O-CH₂CH=CH₂), 2'-C-알릴, 2'-플루오로, 2'-O-메틸(OCH), 2'-O-메톡시에틸(O-(CH₂)₂OCH₃), 2'-OCF₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, 2'-O-아미노알킬, 2'-아미노(2예를 들어 NH₂), 2'-O-에틸아민, 및 2'-아지도를 3포함하지만 이로 제한되지 않는다. 펜토스 고리의 5' 위치에서의 변형은 5'-메틸(R 또는 S); 5'-비닐, 및 5'-메톡시를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0043] "이환식 당 변형"은 브릿지가 고리의 두 원자를 연결하여 제2 고리를 형성하여 이환식 당 구조를 생성하는 펜토스 고리의 변형을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 이환식 당 변형은 펜토스 고리의 4' 및 2' 탄소 사이의 브릿지를 포함한다. 이환식 당 변형을 갖는 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오타이드는 본 명세서에서 "이환식 핵산" 또는 "브릿징된 BNA"로 지칭된다. "잠긴 핵산"(locked nucleic acid; LNA)은 리보스 고리가 2'-산소와 4'-탄소를 연결하는 메틸렌 브릿지에 의해서 잠긴 2',4'-이환식 핵산(2',4'-BNA)이다. 예시적인 이환식 당 변형은 α-L-메

틸렌옥시(4'-CH₂-O-2') 이환식 핵산(BNA); α-D-메틸렌옥시(4'-CH₂-O-2') BNA(잠긴 핵산 또는 LNA로도 지칭됨); 에틸렌옥시(4'-(CH₂)₂-O-2') BNA; 아미노옥시(4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA; 옥시아미노(4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA; 메틸(메틸렌옥시)(4'-CH(CH₃)-O-2') BNA(제한된 에틸 또는 cEt로도 지칭됨); 메틸렌-티오(4'-CH₂-S-2') BNA; 메틸렌-아미노(4'-CH₂-N(R)-2') BNA; 메틸 카르보사이클릭(4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA; 프로필렌 카르보사이클릭(4'-(CH₂)₃-2') BNA; 및 메톡시(에틸렌옥시)(4'-CH(CH₂OMe)-O-2')BNA(제한된 MOE 또는 cMOE로도 지칭됨)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물에 혼입될 수 있는 이들 및 다른 당-변형된 뉴클레오타이드는, 예를 들어, 미국 특허 제9,181,551호, 미국 특허 공개 제2016/0122761호 및 문헌[Deleavey and Damha, Chemistry and Biology, 19: 937-954 (2012)]에 기재되어 있다.

[0044] 일부 실시형태에서, RNAi 작제물은 하나 이상의 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오타이드, 2'-O-알릴 변형된 뉴클레오타이드, 이환식 핵산(BNA), 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 실시형태에서, RNAi 작제물은 하나 이상의 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오타이드 또는 이들의 조합을 포함한다. 하나의 특정한 실시형태에서, RNAi 작제물은 하나 이상의 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0045] RNAi 작제물의 센스 및 안티센스 가닥 둘 다는 1개 또는 다수의 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 센스 가닥은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 센스 가닥내 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 안티센스 가닥은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시형태에서, 안티센스 가닥내 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다. 다른 특정 실시형태에서, 센스 가닥내 모든 뉴클레오타이드 및 안티센스 가닥내 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다. 이들 및 다른 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0046] 특정 실시형태에서, 본 발명의 RNAi 작제물의 가닥 중 하나 또는 둘 모두에 혼입된 변형된 뉴클레오타이드는 핵염기(본 명세서에서 "염기"로도 지칭됨)의 변형을 갖는다. "변형된 핵염기" 또는 "변형된 염기"는 천연 퓨린 염기 아데닌(A) 및 구아닌(G) 및 피리미딘 염기 티민(T), 시토신(C), 및 우라실(U) 이외의 염기를 지칭한다. 변형된 핵염기는 합성 및 천연 변형될 수 있고, 유니버설 염기, 5-메틸시토신(5-me-C), 5-하이드록시메틸 시토신, 잔틴(X), 하이포잔틴, 2-아미노아데닌, 6-메틸아데닌, 6-메틸구아닌, 및 아데닌 및 구아닌의 다른 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로필 우라실 및 시토신, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실(슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0047] 일부 실시형태에서, 변형된 염기는 보편적인 염기이다. "유니버설 염기"는 생성되는 이중체 영역의 이중 나선 구조를 변경하지 않고 RNA 및 DNA에서 모든 천연 염기와 염기쌍을 무차별적으로 형성하는 염기 유사체를 지칭한다. 유니버설 염기는 당업자에게 알려져 있으며, 이노신, C-페닐, C-나프틸 및 다른 방향족 유도체, 아졸 카르복사미드, 및 니트로아졸 유도체, 예컨대, 3-니트로피콜, 4-니트로인돌, 5-니트로인돌, 및 6-니트로인돌을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0048] 본 발명의 RNAi 작제물에 포함될 수 있는 다른 적합한 변형된 염기는 문헌[Herdewijn, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., Vol. 10: 297-310, 2000 및 Peacock *et al.*, J. Org. Chem., Vol. 76: 7295-7300, 2011]에 기재된 것들을 포함하며, 이들은 둘 다 그 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다. 당업자는 구아닌, 시토신, 아데닌, 티민, 및 우라실이 이러한 대체 핵염기를 보유하는 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 염기쌍 형성을 실질적으로 변경시키지 않으면서 다른 핵염기, 예컨대, 위에 기재된 변형된 핵염기에 의해 대체될 수 있음을 잘 알고 있다.

[0049] 일부 실시형태에서, RNAi 작제물의 센스 및 안티센스 가닥은 1개 이상의 무염기성 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. "무염기성 뉴클레오타이드" 또는 "무염기성 뉴클레오시드"는 리보스 당의 1' 위치에 핵염기가 결여된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오시드이다. 특정 실시형태에서, 무염기성 뉴클레오타이드는 RNAi 작제물의 센스 및/또는 안티

센스 가닥의 말단으로 혼입된다. 일 실시형태에서, 센스 가닥은 이의 3' 말단, 이의 5' 말단, 또는 이의 3' 및 5' 말단 둘 다에서 말단 뉴클레오타이드로서 무염기성 뉴클레오타이드를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 안티센스 가닥은 이의 3' 말단, 이의 5' 말단, 또는 이의 3' 및 5' 말단 둘 다에서 말단 뉴클레오타이드로서 무염기성 뉴클레오타이드를 포함한다. 무염기성 뉴클레오타이드가 말단 뉴클레오타이드인 이러한 실시형태에서, 이는 반전된 뉴클레오타이드일 수 있다 - 즉, 천연의 3'-5' 뉴클레오타이드간 연결 대신 3'-3' 뉴클레오타이드간 연결(가닥의 3' 말단에 있을 때)을 통해 또는 5'-5' 뉴클레오타이드간 연결(가닥의 5' 말단에 있을 때)을 통해 인접한 뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 또한, 무염기성 뉴클레오타이드는 당 변형, 예컨대, 전술한 임의의 당 변형을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 무염기성 뉴클레오타이드는 2'-변형, 예컨대, 2'-플루오로 변형, 2'-O-메틸 변형, 또는 2'-H (데옥시) 변형을 포함한다. 일 실시형태에서, 무염기성 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형을 포함한다. 다른 실시형태에서, 무염기성 뉴클레오타이드는 2'-H 변형을 포함한다(즉, 데옥시 무염기성 뉴클레오타이드임).

[0050] 일부 실시형태에서, 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥에서 아데노신 뉴클레오타이드 앞의 모든 피리미딘 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다. 예를 들어, 서열 5'-CA-3' 또는 5'-UA-3'이 가닥 중 어느 하나에 나타나는 경우, 시티딘 및 우라실 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드, 바람직하게는 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드이다. 특정 실시형태에서, 센스 가닥 내 모든 피리미딘 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드(예를 들어, 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드)이며, 안티센스 가닥에서 서열 5'-CA-3' 또는 5'-UA-3'의 모든 경우에 5' 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드(예를 들어, 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드)이다. 다른 실시형태에서, 이중체 영역의 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다. 이러한 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 바람직하게는 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드 또는 이들의 조합이다.

[0051] RNAi 작제물이 뉴클레오타이드 오버행을 포함하는 실시형태에서, 오버행의 뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드일 수 있다. 일 실시형태에서, 오버행의 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 예를 들어, 데옥시티미딘이다. 또 다른 실시형태에서, 오버행의 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다. 예를 들어 일부 실시형태에서, 오버행의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 2'-메톡시메틸 변형된 뉴클레오타이드 또는 이들의 조합이다.

[0052] 본 개시내용의 RNAi 작제물은 또한 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "변형된 뉴클레오타이드간 연결부"는 천연 3'에서 5'의 포스포디에스테르 연결부 이외의 뉴클레오타이드간 연결부를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드간 연결은 인-함유 뉴클레오타이드간 연결, 예컨대, 포스포트리에스테르, 아미노알킬 포스포트리에스테르, 알킬포스포네이트(예를 들어, 메틸포스포네이트, 3'-알킬렌 포스포네이트), 포스포네이트, 포스포라미데이트(예를 들어, 3'-아미노포스포라미데이트 및 아미노알킬 포스포라미데이트), 포스포로티오에이트(P=S), 키랄포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 티오노포스포라미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 및 보라노포스포에이트이다. 일 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드간 연결은 2'에서 5'의 포스포디에스테르 연결이다. 다른 실시형태에서, 변형 뉴클레오타이드간 연결은 비-인-함유 뉴클레오타이드간 연결이므로, 변형 뉴클레오타이드간 연결로 지칭될 수 있다. 이러한 비-인-함유 연결은 모르폴리노 연결(뉴클레오타이드의 당 부분으로부터 부분적으로 형성됨); 실록산 연결(-O-Si(H)₂-O-); 설파이드, 설파사이드 및 설피온 연결; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 연결; 알켄 함유 골격; 설파메이트 골격; 메틸렌메틸이미노(-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-) 및 메틸렌히드라지노 연결; 설포네이트 및 설피온 아마이드 연결; 아마이드 연결; 및 N, O, S 및 CH₂ 성분 부분이 혼합된 다른 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드간 연결은 펩티드-기반 연결(예를 들어, 아미노에틸글리신)이어서, 펩티드 핵산 또는 PNA, 예컨대, 미국 특허 제5,539,082호; 제5,714,331호; 및 제5,719,262호에 기재된 것들을 생성한다. 개시된 RNAi 작제물에 사용될 수 있는 다른 적당한 변형된 뉴클레오타이드간 및 뉴클레오타이드간 연결은 미국 특허 제6,693,187호와 제9,181,551호, 미국 특허 공개 제2016/0122761호 및 문헌[Deleavey and Damha(상동)]에 기재되어 있다.

[0053] 특정 실시형태에서, RNAi 작제물은 하나 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부를 포함한다. 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부는 RNAi 작제물의 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 양쪽 가닥에 존재할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 센스 가닥은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부를 포함한다. 다른 실시형태에서, 안티센스 가닥은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개, 또는 그 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 양쪽 가닥은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부를 포함한다. RNAi 작제물은 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 양쪽 가닥의 3'-말단, 5'-말단 또는 3'- 및 5'-말단 양쪽에 하나 이상의 포스포로티

오에이트 뉴클레오타이드간 연결부를 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, RNAi 작제물은 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 양쪽 가닥의 3'-말단에 약 1 내지 약 6개 또는 그 이상의(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6 개 또는 그 이상의) 연속적인 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부를 포함한다. 다른 실시형태에서, RNAi 작제물은 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 양쪽 가닥의 5'-말단에 약 1 내지 약 6개 또는 그 이상의(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 그 이상의) 연속적인 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부를 포함한다. 일 실시형태에서, RNAi 작제물은 센스 가닥의 3' 말단에 단일 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부 및 안티센스 가닥의 3' 말단에 단일 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, RNAi 작제물은 안티센스 가닥의 3' 말단에 2개의 연속적인 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부(즉, 안티센스 가닥의 3' 말단에 있는 제1 및 제2 뉴클레오타이드간 연결부에 있는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부)를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, RNAi 작제물은 안티센스 가닥의 3' 말단과 5' 말단 둘 모두에 2개의 연속적인 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, RNAi 작제물은 안티센스 가닥의 3' 말단과 5' 말단 둘 모두에 2개의 연속적인 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부 및 센스 가닥의 5' 말단에 2개의 연속적인 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, RNAi 작제물은 안티센스 가닥의 3' 말단과 5' 말단 둘 모두에 2개의 연속적인 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부 및 센스 가닥의 3' 말단과 5' 말단 둘 모두에 2개의 연속적인 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부(즉, 안티센스 가닥의 5' 말단과 3' 말단 둘 모두에서의 제1 및 제2 뉴클레오타이드간 연결부에 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부 및 센스 가닥의 5' 말단과 3' 말단 둘 모두에서의 제1 및 제2 뉴클레오타이드간 연결부에 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부)를 포함한다. 하나 또는 두 가닥이 하나 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부를 포함하는 임의의 실시형태에서, 가닥 내의 나머지 뉴클레오타이드간 연결부는 천연 3'에서 5'의 포스포디에스테르 연결부일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 센스 및 안티센스 가닥의 각각의 뉴클레오타이드간 연결부는 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트로부터 선택되며, 적어도 하나의 뉴클레오타이드간 연결부는 포스포로티오에이트이다.

[0054] RNAi 작제물이 뉴클레오타이드 오버행을 포함하는 실시형태에서, 오버행에서의 2개 이상의 짝지워지지 않은 뉴클레오타이드가 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부에 의해 연결될 수 있다. 특정 실시형태에서, 안티센스 가닥 및/또는 센스 가닥의 3' 말단에서 뉴클레오타이드 오버행 내의 모든 짝지워지지 않은 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부에 의해 연결된다. 다른 실시형태에서, 안티센스 가닥 및/또는 센스 가닥의 5' 말단에서 뉴클레오타이드 오버행 내의 모든 짝지워지지 않은 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부에 의해 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 임의의 뉴클레오타이드 오버행에서 모든 짝지워지지 않은 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부에 의해 연결된다.

[0055] 일부 실시형태에서, 개시된 RNAi 작제물의 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 안티센스 및 센스 가닥 둘 모두의 5' 말단은 포스페이트 모이어티를 포함한다. 본 명세서에 사용된 용어 "포스페이트 모이어티"는 비변형된 포스페이트($-O-P(=O)(OH)OH$)뿐만 아니라, 변형된 포스페이트를 포함하는 말단 포스페이트기를 지칭한다. 변형된 포스페이트는 하나 이상의 O 및 OH 기가 H, O, S, N(R) 또는 알킬로 대체된 포스페이트를 포함하며, 여기서 R은 H, 아미노 보호기 또는 치환되지 않은 또는 치환된 알킬이다. 예시적인 포스페이트 모이어티는 5'-모노포스페이트; 5' 디포스페이트; 5'-트리포스페이트; (7-메틸화 또는 비-메틸화된) 5'-구아노신 캡; 5'-아데노신 캡 또는 임의의 다른 변형된 또는 비변형된 뉴클레오타이드 캡 구조; 5'-모노티오포스페이트(포스포로티오에이트); 5'-모노디티오포스페이트(포스포로디티오에이트); 5'-알파-티오텐트리포스페이트; 5'-감마-티오텐트리포스페이트, 5'-포스포라미데이트; 5'-비닐포스페이트; 5'-알킬포스포네이트("알킬"은 메틸, 에틸, 이소프로필, 프로필 등일 수 있음); 및 5'-알킬에테르포스포네이트("알킬에테르"는 메톡시메틸, 에톡시메틸 등일 수 있음)를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0056] 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물에 혼입될 수 있는 변형된 뉴클레오타이드는 본 명세서에 기재된 하나 초과와 화학적 변형을 가질 수 있다. 예를 들어, 변형된 뉴클레오타이드는 리보스 당에 대한 변형은 물론 핵염기에 대한 변형을 가질 수 있다. 예로서, 변형된 뉴클레오타이드는 2' 당 변형(예를 들어, 2'-플루오로 또는 2'-메틸)을 포함할 수 있으며, 변형된 염기(예를 들어, 5-메틸 시토신 또는 슈도우라실)를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드가 폴리뉴클레오타이드에 혼입될 때 변형된 뉴클레오타이드간 또는 뉴클레오타이드간 연결부를 생성하는 5' 포스페이트에 대한 변형과 조합된 당 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 당 변형, 예컨대, 2'-플루오로 변형, 2'-O-메틸 변형 또는 이환식 당 변형뿐만 아니라, 5' 포스포로티오에이트기를 포함할 수 있다. 이에, 일부 실시형태에서, RNAi 작제물의 하나 또는 두 가닥은 2' 변형된 뉴클레오타이드 또는 BNA 및 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부의 조합을 포함한다. 특정 실시형태에서, RNAi 작제물의 센스 및 안티센스 가닥은 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 2'-O-메

틸 변형된 뉴클레오티드, 및 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결부의 조합을 포함한다. 변형된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드간 연결부를 포함하는 예시적인 RNAi 작제물은 표 1 및 표 2에 제시되어 있다.

[0057] **RNAi 작제물의 기능**

[0058] 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물은 바람직하게는 세포, 특히 간 세포에서 SCAP의 발현을 감소시키거나 억제한다. 이에, 일 실시형태에서, 본 개시내용은 세포를 본 명세서에 기재된 임의의 RNAi 작제물과 접촉시킴으로써 세포에서 SCAP 발현을 감소시키는 방법을 제공한다. 세포는 시험관내 또는 생체내에 있을 수 있다. SCAP 발현은 SCAP mRNA, SCAP 단백질 또는 SCAP 발현에 연결된 또 다른 바이오마커의 양 또는 수준을 측정함으로써 평가될 수 있다. 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물로 처리된 세포 또는 동물에서 SCAP 발현의 감소는 RNAi 작제물로 처리되지 않거나 대조군 RNAi 작제물로 처리된 세포 또는 동물에서의 SCAP 발현과 관련하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, SCAP 발현의 감소는 (a) 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물로 처리된 간 세포에서 SCAP mRNA의 양 또는 수준을 측정하고, (b) 대조군 RNAi 작제물(예를 들어, 간 세포에서 발현되지 않는 RNA 분자를 지향하는 RNAi 작제물, 또는 넌센스 또는 스크램블링된 서열을 갖는 RNAi 작제물)로 처리된 또는 작제물이 없는 간 세포내 SCAP mRNA의 양 또는 수준을 측정하고, (c) (a)에서의 처리된 세포로부터 측정된 SCAP mRNA 수준을 (b)에서의 대조군 세포로부터 측정된 SCAP mRNA 수준과 비교함으로써 평가된다. 처리된 세포 및 대조군 세포에서의 SCAP mRNA 수준은 비교 전에 대조군 유전자(예를 들어, 18S 리보솜 RNA)에 대한 RNA 수준으로 정규화될 수 있다. SCAP mRNA 수준은 노던 블롯 분석, 뉴클레아제 보호 검정, 형광 인시추 혼성화(FISH), 역전사 효소(RT)-PCR, 실시간 RT-PCR, 정량적 PCR 등을 포함하는 다양한 방법으로 측정될 수 있다.

[0059] 다른 실시형태에서, SCAP 발현의 감소는 (a) 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물로 처리된 간 세포에서 SCAP 단백질의 양 또는 수준을 측정하고, (b) 대조군 RNAi 작제물(예를 들어, 간 세포에서 발현되지 않는 RNA 분자를 지향하는 RNAi 작제물, 또는 넌센스 또는 스크램블링된 서열을 갖는 RNAi 작제물)로 처리된 또는 작제물이 없는 간 세포내 SCAP 단백질의 양 또는 수준을 측정하고, (c) (a)에서의 처리된 세포로부터 측정된 SCAP 단백질 수준을 (b)에서의 대조군 세포로부터 측정된 SCAP 단백질 수준과 비교함으로써 평가된다. SCAP 단백질 수준은 웨스턴 블롯, 면역검정(예를 들어, ELISA) 및 유세포 측정을 포함하지만 이로 제한되지 않는 당업자에게 알려진 임의의 적합한 방법을 사용하여 측정될 수 있다. SCAP mRNA 또는 단백질을 측정하는 임의의 적합한 방법을 사용하여 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물의 효능을 평가할 수 있다.

[0060] 일부 실시형태에서, SCAP 발현 수준을 평가하는 방법은 SCAP를 본래 발현하는 세포(예를 들어, 간 세포) 또는 SCAP을 발현하도록 조작된 세포에서 시험관 내에서 수행된다. 특정 실시형태에서, 방법은 간 세포에서 시험관내 수행된다. 적합한 간 세포는 1차 간세포(예를 들어, 인간, 비(non)인간 영장류 또는 설치류 간세포), HepAD38 세포, HuH-6 세포, HuH-7 세포, HuH-5-2 세포, BNLCL2 세포, Hep3B 세포 또는 HepG2 세포를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 일 실시형태에서, 간 세포는 Hep3B 세포이다. 또 다른 실시형태에서, 간 세포는 HepG2 세포이다.

[0061] 다른 실시형태에서, SCAP 발현 수준을 평가하는 방법은 생체내에서 수행된다. 예를 들어, RNAi 작제물 및 임의의 대조군 RNAi 작제물은 동물(예를 들어, 설치류 또는 비인간 영장류)에게 투여될 수 있고, SCAP mRNA 또는 단백질 수준은 치료 후 동물로부터 수확된 간 조직에서 평가될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, SCAP 발현과 관련된 바이오마커 또는 기능적 표현형은 처리된 동물에서 평가될 수 있다.

[0062] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 SCAP의 발현은 간 세포에서 본 발명의 RNAi 작제물에 의해 적어도 40%, 적어도 45%, 또는 적어도 50% 만큼 감소된다. 일부 실시형태에서, SCAP의 발현은 간 세포에서 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물에 의해 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80% 또는 적어도 85%만큼 감소된다. 다른 실시형태에서, SCAP의 발현은 간세포에서 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물에 의해 약 90% 또는 그 이상, 예를 들어, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상 감소된다. SCAP 발현의 감소 백분율은 본 명세서에 기재된 임의의 방법 또는 당업계에 알려진 다른 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, RNAi 작제물은 시험관내 Hep3B 세포(야생형 SCAP을 함유함)에서 5 nM에서 SCAP 발현의 적어도 40%를 억제한다. 관련 실시형태에서, RNAi 작제물은 시험관내 Hep3B 세포에서 5 nM에서 SCAP 발현의 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 또는 적어도 75%를 억제한다. 다른 실시형태에서, RNAi 작제물은 시험관내에서 Hep3B 세포에서 5 nM에서 SCAP 발현의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 또는 적어도 98%를 억제한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물은 시험관내 HepG2 세포에서 5 nM에서 SCAP 발현의 적어도 40%를 억제한다. 관련 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물은 시험관내 HepG2 세포에서 5 nM에서 SCAP 발현의 적어도 45%,

적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 또는 적어도 75%를 억제한다. 다른 실시형태에서, RNAi 작제물은 시험관내에서 HepG2 세포에서 5 nM에서 SCAP 발현의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 또는 적어도 98%를 억제한다. 특정 실시형태에서, RNAi 작제물은 시험관내에서 인간 SCAP를 발현하는 CHO 형질감염된 세포에서 5 nM에서 SCAP 발현의 적어도 40%를 억제한다. 관련 실시형태에서, RNAi 작제물은 시험관내에서 인간 SCAP를 발현하는 CHO 형질감염된 세포에서 5 nM에서 SCAP 발현의 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 또는 적어도 75%를 억제한다. 다른 실시형태에서, RNAi 작제물은 시험관내에서 인간 SCAP를 발현하는 CHO 형질감염된 세포에서 5 nM에서 SCAP 발현의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 또는 적어도 98%를 억제한다. SCAP 감소는, 예를 들어, RNA FISH 또는 액적 디지털 PCR을 포함한 다양한 기술을 사용하여 측정할 수 있다(예를 들어, 문헌[Kamitaki et al., *Digital PCR. Methods in Molecular Biology*, 1768: 401-422(2018). doi:10.1007/978-1-4939-7778-9_23] 참조).

[0063] 일부 실시형태에서, IC₅₀ 값은 간 세포에서 SCAP 발현을 억제하기 위한 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물의 효력을 평가하기 위해 계산된다. "IC₅₀ 값"은 생물학적 또는 생화학적 기능의 50% 억제를 달성하는 데 필요한 용량/농도이다. 다른 실시형태에서, RNAi 작제물의 효력은 "AC₅₀" 값을 계산함으로써 평가될 수 있고, 이것은 생물학적 또는 생화학적 기능의 50% 활성화를 달성하는 데 필요한 용량/농도이다. 임의의 물질 또는 길항제에 대한 IC₅₀ 값 또는 AC₅₀ 값은 용량-반응 곡선을 구성하고 임의의 검정에서 발현 수준 또는 기능적 활성에 대한 물질 또는 길항제의 상이한 농도의 효과를 조사함으로써 결정될 수 있다. IC₅₀ 값은 최대 생물학적 반응 또는 자연 발현 수준의 절반을 억제하는 데 필요한 농도를 결정함으로써 주어진 길항제 또는 물질에 대해 계산될 수 있다. 따라서, 임의의 RNAi 작제물에 대한 IC₅₀ 값은 임의의 검정, 예컨대, 면역분석, RNA FISH 분석 또는 액적 디지털 PCR 분석에서 간 세포내 천연 SCAP 발현 수준(예를 들어, 대조군 간 세포내 SCAP 발현 수준)의 절반을 억제하는 데 필요한 RNAi 작제물의 농도를 결정함으로써 계산될 수 있다. 유사하게, AC₅₀ 값은 최대 생물학적 반응 또는 자연 발현 수준의 절반을 활성화하는 데 필요한 농도를 결정함으로써 주어진 물질에 대해 계산될 수 있다. 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물은 약 20 nM 미만(예를 들어, 약 15 nM, 10 nM, 5 nM, 또는 1 nM 미만)의 IC₅₀으로 간 세포(예를 들어, Hep3B 세포)에서 SCAP 발현을 억제할 수 있다. 예를 들어, 개시된 RNAi 작제물은 약 0.001 nM 내지 약 20 nM, 약 0.001 nM 내지 약 10 nM, 약 0.001 nM 내지 약 5 nM, 약 0.001 nM 내지 약 1 nM, 약 0.1 nM 내지 약 10 nM, 약 0.1 nM 내지 약 5 nM, 또는 약 0.1 nM 내지 약 1 nM의 IC₅₀으로 간 세포에서 SCAP 발현을 억제할 수 있다. 특정 실시형태에서, RNAi 작제물은 약 1 nM 내지 약 10 nM(예를 들어, 약 5 nM)의 IC₅₀으로 간 세포(예를 들어, Hep3B 세포)에서 SCAP 발현을 억제한다. 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물은 약 20 nM 미만의 IC₅₀으로 간 세포(예를 들어, HepG2 세포)에서 SCAP 발현을 억제할 수 있다. 예를 들어, RNAi 작제물은 약 0.001 nM 내지 약 20 nM, 약 0.001 nM 내지 약 10 nM, 약 0.001 nM 내지 약 5 nM, 약 0.001 nM 내지 약 1 nM, 약 0.1 nM 내지 약 10 nM, 약 0.1 nM 내지 약 5 nM, 또는 약 0.1 nM 내지 약 1 nM의 IC₅₀으로 간 세포에서 SCAP 발현을 억제할 수 있다. 특정 실시형태에서, RNAi 작제물은 약 1 nM 내지 약 10 nM(예를 들어, 약 5 nM)의 IC₅₀으로 간 세포(예를 들어, HepG2 세포)에서 SCAP 발현을 억제한다. 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물은 약 20 nM 미만의 IC₅₀으로 인간 SCAP를 발현하는 세포(예를 들어, CHO-형질감염된 세포)에서 SCAP 발현을 억제할 수 있다. 예를 들어, RNAi 작제물은 약 0.001 nM 내지 약 20 nM, 약 0.001 nM 내지 약 10 nM, 약 0.001 nM 내지 약 5 nM, 약 0.001 nM 내지 약 1 nM, 약 0.1 nM 내지 약 10 nM, 약 0.1 nM 내지 약 5 nM, 또는 약 0.1 nM 내지 약 1 nM의 IC₅₀으로 SCAP-발현 세포에서 SCAP 발현을 억제한다. 특정 실시형태에서, RNAi 작제물은 약 1 nM 내지 약 10 nM(예를 들어, 약 5 nM)의 IC₅₀으로 SCAP-발현에서 SCAP 발현을 억제한다.

[0064] 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물은 당업계에 알려진 기법, 예를 들어, 통상적인 핵산 고체상 합성과 같은 기법을 사용하여 용이하게 제조될 수 있다. RNAi 작제물의 폴리뉴클레오티드는 표준 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 전구체(예를 들어, 포스포라미다이트)를 사용하여 적합한 핵산 합성기에서 조립될 수 있다. 자동화된 핵산 합성기는 Applied Biosystems(캘리포니아주 포스터시티 소재)로부터의 DNA/RNA 합성기, BioAutomation(텍사스주 어빙 소재)으로부터의 MerMade 합성기, 및 GE Healthcare Life Sciences(펜실베이니아주 피츠버그 소재)로부터의 OligoPilot 합성기를 포함하여, 몇몇 공급업체에서 상업적으로 시판된다.

[0065] 2' 실릴 보호기는 포스포라미다이트 화학을 통해 올리고뉴클레오티드를 합성하기 위해 리보뉴클레오시드의 5' 위치에서 산 불안정한 디메톡시트리틸(DMT)과 함께 사용될 수 있다. 최종 탈보호 조건은 RNA 생성물을 유의하게

분해하지 않는 것으로 알려져 있다. 모든 합성은 임의의 자동 또는 수동 합성기에서 대규모, 중규모, 또는 소규모로 수행될 수 있다. 합성은 또한 다수의 웰 플레이트, 컬럼, 또는 유리 슬라이드에서 수행될 수 있다.

- [0066] 2'-O-실릴기는 플루오라이드 이온에 대한 노출을 통해 제거될 수 있으며, 플루오라이드 이온의 임의의 공급원, 예를 들어, 무기 반대이온과 짝을 이루는 플루오라이드 이온을 함유하는 염, 예를 들어, 세슘 플루오라이드 및 칼륨 플루오라이드 또는 유기 반대이온과 짝을 이루는 플루오라이드 이온을 함유하는 염, 예를 들어, 테트라알킬암모늄 플루오라이드를 포함할 수 있다. 탈보호 반응에서 크라운 에테르 촉매가 무기 플루오라이드와 함께 사용될 수 있다. 예시적인 플루오라이드 이온 공급원은 테트라부틸암모늄 플루오라이드 또는 아미노하이드로플루오라이드(예를 들어, 이극성 비양자성 용매, 예를 들어, 디메틸포름아미드에서 수성 HF를 트리에틸아민과 조합함)를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.
- [0067] 포스파이트 트리에스테르 및 포스포트리에스테르에 사용하기 위한 보호기의 선택은 플루오라이드에 대한 트리에스테르의 안정성을 변경할 수 있다. 포스포트리에스테르 또는 포스파이트트리에스테르의 메틸 보호는 플루오라이드 이온에 대한 연결부를 안정화시키고 공정 수율을 향상시킬 수 있다.
- [0068] 리보뉴클레오시드는 반응성 2' 하이드록실 치환기를 갖기 때문에, 5'-O-디메톡시트리틸 보호기에 직교하는 보호기, 예를 들어, 산으로 처리하기에 안정적인 보호기로 RNA에서 반응성 2' 위치를 보호하는 것이 바람직할 수 있다. 실릴 보호기는 이 기준을 만족시키며, 최종 플루오르화물 탈보호 단계에서 용이하게 제거되어 최소 RNA 분해를 초래할 수 있다.
- [0069] 테트라졸 촉매는 표준 포스포라미다이트 커플링 반응에 사용될 수 있다. 예시적인 촉매는, 예를 들어, 테트라졸, S-에틸-테트라졸, 벤질티오테트라졸 및 p니트로페닐테트라졸을 포함한다.
- [0070] 본 명세서에 기재된 RNAi 작제물을 합성하는 추가의 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 또한, 원하는 화합물을 제공하기 위해 다양한 합성 단계가 교대 서열 또는 순서로 수행될 수 있다. 본 명세서에 기재된 RNAi 작제물을 합성하는 데 유용한 다른 합성 화학 형질전환, (예를 들어, 염기에 존재하는 하이드록실, 아미노, 등을 위한) 보호기 및 보호기 방법론(보호 및 탈보호)은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어, 문헌[R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T. W. Greene and P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2d. Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser and M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); 및 L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995)] 및 이들의 후속판에 기재된 것을 포함한다. RNAi 작제물의 맞춤형 합성은 Dharmacon, Inc.(콜로라도주 라피엣 소재), AxoLabs GmbH(독일 쿨름바흐 소재) 및 Ambion, Inc.(캘리포니아주 포스터시티 소재)를 포함한 몇몇 판매회사에서도 이용 가능하다.
- [0071] 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물은 리간드를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "리간드"는 다른 화합물 또는 분자와 직접 또는 간접적으로 상호작용할 수 있는 임의의 화합물 또는 분자를 지칭한다. 리간드와 또 다른 화합물 또는 분자의 상호작용은 생물학적 반응을 유발할 수 있거나(예를 들어, 신호 전달 캐스케이드를 개시하거나, 수용체 매개된 세포내이입을 유도하거나), 단지 물리적 연관일 수 있다. 리간드는 부착된 이중 가닥 RNA 분자의 하나 이상의 특성, 예컨대, RNA 분자의 약력학적, 약동학적, 결합, 흡수, 세포 분포, 세포 흡수, 전하 및/또는 제거 특성을 변형시킬 수 있다.
- [0072] 리간드는 혈청 단백질(예를 들어, 인간 혈청 알부민, 저밀도 지질단백질, 글로불린), 콜레스테롤 모이어티, 비타민(예를 들어, 바이오틴, 비타민 E, 비타민 B12), 플레이트 모이어티, 스테로이드, 담즙산(예를 들어, 콜린산), 지방산(예를 들어, 팔미트산, 미리스트산), 탄수화물(예를 들어, 텍스트란, 폴루란, 키틴, 키토산, 이눌린, 사이클로덱스트린 또는 히알루론산), 글리코시드, 인지질 또는 항체 또는 이의 결합 단편(예를 들어, 특정 세포 유형, 예컨대, 간 세포에 RNAi 작제물을 표적화하는 전체 항체 또는 결합 단편)을 포함할 수 있다. 리간드의 다른 예는 염료, 삽입제(예를 들어, 아크리딘), 가교제(예를 들어, 소랄렌, 미토마이신 C), 포르피린(예를 들어, TPPC4, 텍사피린, 사피린), 다환식 방향족 탄화수소(예를 들어, 페나진, 디하이드로페나진), 인공 엔도뉴클레아제(예를 들어, EDTA), 친유성 분자(예를 들어, 아다만탄 아세트산, 1-피렌 부티르산, 디하이드로테스토스테론, 1,3-비스O(헥사데실)글리세롤, 제라닐옥시헥실기, 헥사데실글리세롤, 보르네올, 멘톨, 1,3-프로판디올, 헵타데실기, 03-(올레오일)리토콜산, 03-(올레오일)콜렌산, 디메톡시트리틸 또는 페녹사진), 펩티드(예를 들어, 안테나피디아 펩티드, Tat 펩티드, RGD 펩티드), 알킬화제, 중합체(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), PEG-40K), 폴리아미노산 및 폴리아민(예를 들어, 스페르민, 스페르미딘)을 포함한다.
- [0073] 특정 실시형태에서, 리간드는 엔도솜분해 특성을 갖는다. 엔도솜분해 리간드는 엔도솜의 용해 및/또는 RNAi 작

제물 또는 이의 구성요소의 엔도솜에서 세포의 세포질로의 수송을 촉진한다. 엔도솜분해 리간드는 pH 의존적 막 활성 및 융합성을 나타내는 다중 양이온성 펩티드 또는 펩티도미메틱일 수 있다. 일 실시형태에서, 엔도솜분해 리간드는 엔도솜 pH에서 이의 활성 입체형태를 가진다. "활성" 입체형태는 엔도솜분해 리간드가 엔도솜의 용해 및/또는 RNAi 작제물 또는 이의 구성요소의 엔도솜에서 세포의 세포질로의 수송을 촉진하는 입체형태이다. 예시적인 엔도솜분해 리간드는 GALA 펩티드(Subbarao et al., Biochemistry, Vol. 26: 2964-2972, 1987), EALA 펩티드(Vogel et al., J. Am. Chem. Soc., Vol. 118: 1581-1586, 1996), 및 이들의 유도체(Turk et al., Biochem. Biophys. Acta, Vol. 1559: 56-68, 2002)를 포함한다. 일 실시형태에서, 엔도솜분해 구성요소는 pH의 변화에 반응하여 전하의 변화 또는 양성자화를 겪을 화합물(예를 들어, 아미노산)을 함유할 수 있다. 엔도솜분해 구성요소는 선형 또는 분지형일 수 있다.

[0074] 일부 실시형태에서, 리간드는 지질 또는 다른 소수성 분자를 포함한다. 일 실시형태에서, 리간드는 콜레스테롤 모이어티 또는 다른 스테로이드를 포함한다. 콜레스테롤 접합된 올리고뉴클레오타이드는 이들의 비접합된 것보다 더 활성인 것으로 보고되었다(Manoharan, Antisense Nucleic Acid Drug Development, Vol. 12: 103-228, 2002). 콜레스테롤 모이어티 및 핵산 분자와의 접합을 위한 다른 지질을 포함하는 리간드가 또한, 미국 특허 제 7,851,615호; 제7,745,608호; 및 제7,833,992호에 기재되어 있다. 또 다른 실시형태에서, 리간드는 플레이트 모이어티를 포함할 수 있다. 플레이트 모이어티에 접합된 폴리뉴클레오타이드는 수용체-매개 세포내이입 경로를 통해 세포에 의해 흡수될 수 있다. 이러한 플레이트-폴리뉴클레오타이드 접합체는, 예를 들어, 미국 특허 제 8,188,247호에 기재되어 있다.

[0075] SCAP가 간 세포(예를 들어, 간세포)에서 발현되는 것을 고려하면, 특정 실시형태에서, RNAi 작제물을 간 세포에 특이적으로 전달하는 것이 바람직하다. 일부 실시형태에서, RNAi 작제물은 간 세포의 표면에 발현된 단백질에 결합하거나 이와 상호작용하는 리간드를 사용함으로써 간을 특이적으로 표적화할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 리간드는 간세포상에서 발현된 수용체에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체 또는 이의 결합 단편(예를 들어, Fab, scFv))을 포함할 수 있다.

[0076] 특정 실시형태에서, 리간드는 탄수화물을 포함한다. "탄수화물"은 각각의 탄소 원자에 결합된 산소, 질소 또는 황 원자를 갖는 적어도 6개의 탄소 원자(직쇄형, 분지쇄형 또는 환식일 수 있음)를 갖는 하나 이상의 당류 단위로 이루어진 화합물을 지칭한다. 탄수화물은 당(예를 들어, 당류, 이당류, 삼당류, 사당류 및 약 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의 당류 단위를 함유하는 올리고당류) 및 다당류, 예컨대, 전분, 글리코젠, 셀룰로스 및 다당류 검을 포함하지만 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 리간드에 혼입된 탄수화물은 펜토스, 헥소스 또는 헵토스로부터 선택된 당류 및 이러한 당류 단위를 포함하는 이당류 및 삼당류이다. 다른 실시형태에서, 리간드에 혼입된 탄수화물은 아미노 당, 예컨대, 갈락토사민, 글루코사민, N-아세틸갈락토사민 및 N-아세틸글루코사민이다.

[0077] 일부 실시형태에서, 리간드는 헥소스 또는 헥소사민을 포함한다. 헥소스는 글루코스, 갈락토스, 만노스, 푸코스 또는 프룩토스로부터 선택될 수 있다. 헥소사민은 프룩토사민, 갈락토사민, 글루코사민 또는 만노사민으로부터 선택될 수 있다. 특정 실시형태에서, 리간드는 글루코스, 갈락토스, 갈락토사민 또는 글루코사민을 포함한다. 일 실시형태에서, 리간드는 글루코스, 글루코사민 또는 N-아세틸글루코사민을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 리간드는 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸-갈락토사민을 포함한다. 특정 실시형태에서, 리간드는 N-아세틸-갈락토사민을 포함한다. 글루코스, 갈락토스 및 N-아세틸-갈락토사민(GalNAc)을 포함하는 리간드는 화합물을 간 세포로 표적화하는 데 특히 효과적이다(예를 들어, 문헌[D'Souza and Devarajan, J. Control Release, Vol. 203: 126-139, 2015] 참조). 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물에 혼입될 수 있는 GalNAc- 또는 갈락토스-함유 리간드의 예는 미국 특허 제7,491,805호; 제8,106,022호; 및 제8,877,917호; 미국 특허 공개 제2003/0130186호; 및 WIPO 공개 제WO 2013/166155호에 기재되어 있다.

[0078] 특정 실시형태에서, 리간드는 다가 탄수화물 모이어티를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "다가 탄수화물 모이어티"는 다른 분자와 독립적으로 결합하거나 상호작용할 수 있는 2개 이상의 탄수화물 단위를 포함하는 모이어티를 지칭한다. 예를 들어, 다가 탄수화물 모이어티는 2개 이상의 상이한 분자 또는 동일한 분자 상의 2개 이상의 상이한 부위에 결합할 수 있는 탄수화물로 구성된 2개 이상의 결합 도메인을 포함한다. 탄수화물 모이어티의 원자가는 탄수화물 모이어티 내의 개별 결합 도메인의 수를 나타낸다. 예를 들어, 탄수화물 모이어티와 관련하여 용어 "1가", "2가", "3가", 및 "4가"는 각각 1, 2, 3 및 4개의 결합 도메인을 갖는 탄수화물 모이어티를 지칭한다. 다가 탄수화물 모이어티는 다가 락토스 모이어티, 다가 갈락토스 모이어티, 다가 글루코스 모이어티, 다가 N-아세틸-갈락토사민 모이어티, 다가 N-아세틸-글루코사민 모이어티, 다가 만노스 모이어티 또는 다가 푸코스 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 리간드는 다가 갈락토스 모이어티를 포함한다.

다. 다른 실시형태에서, 리간드는 다가 N-아세틸-갈락토사민 모이어티를 포함한다. 이들 및 다른 실시형태에서, 다가 탄수화물 모이어티는 2가, 3가 또는 4가이다. 이러한 실시형태에서, 다가 탄수화물 모이어티는 이안테나형(bi-antennary) 또는 삼안테나형(tri-antennary)일 수 있다. 하나의 특정한 실시형태에서, 다가 N-아세틸-갈락토사민 모이어티는 3가 또는 4가이다. 또 다른 특정 실시형태에서, 다가 갈락토스 모이어티는 3가 또는 4가이다. 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물에 혼입하기 위한 예시적인 GalNAc-함유 리간드는 삼안테나형 GalNAc-함유 리간드("GalNAc3"이라고도 지칭됨)를 포함한다.

[0079] 리간드는 RNAi 작제물의 RNA 분자에 직접 또는 간접적으로 부착되거나 접합될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 리간드는 RNAi 작제물의 센스 또는 안티센스 가닥에 직접 공유적으로 부착된다. 다른 실시형태에서, 리간드는 링커를 통해 RNAi 작제물의 센스 또는 안티센스 가닥에 공유적으로 부착된다. 리간드는 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 센스 가닥 또는 안티센스 가닥)의 핵염기, 당 모이어티 또는 뉴클레오티드간 연결부에 부착될 수 있다. 퓨린 핵염기 또는 이의 유도체에 대한 접합 또는 부착은 내환식 및 외환식 원자를 포함하는 임의의 위치에서 일어날 수 있다. 특정 실시형태에서, 퓨린 핵염기의 2-, 6-, 7- 또는 8-위치는 리간드에 부착된다. 피리미딘 핵염기 또는 이의 유도체에 대한 접합 또는 부착은 또한 임의의 위치에서 일어날 수 있다. 일부 실시형태에서, 피리미딘 핵염기의 2-, 5-, 및 6-위치는 리간드에 부착될 수 있다. 뉴클레오티드의 당 모이어티에 대한 접합 또는 부착은 임의의 탄소 원자에서 일어날 수 있다. 리간드에 부착될 수 있는 당 모이어티의 예시적인 탄소 원자는 2', 3', 및 5' 탄소 원자를 포함한다. 1' 위치는 또한 무염기성 뉴클레오티드와 같은 리간드에 부착될 수 있다. 뉴클레오티드간 연결부는 또한 리간드 부착을 서포트할 수 있다. 인-함유 연결부(예를 들어, 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로아미데이트 등)의 경우, 리간드는 인 원자에 직접 또는 인 원자에 결합된 O, N 또는 S 원자에 부착될 수 있다. 아민- 또는 아미드-함유 뉴클레오시드간 연결부(예를 들어, PNA)의 경우, 리간드는 아민 또는 아미드의 질소 원자 또는 인 접한 탄소 원자에 부착될 수 있다.

[0080] 특정 실시형태에서, 리간드는 센스 또는 안티센스 가닥의 3' 또는 5' 말단에 부착될 수 있다. 특정 실시형태에서, 리간드는 센스 가닥의 5' 말단에 공유적으로 부착된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 리간드는 센스 가닥의 5'-말단 뉴클레오티드에 부착된다. 이러한 특정 실시형태에서, 리간드는 센스 가닥의 5'-말단 뉴클레오티드의 5'-위치에 부착된다. 다른 실시형태에서, 리간드는 센스 가닥의 3' 말단에 공유적으로 부착된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 리간드는 센스 가닥의 3'-말단 뉴클레오티드에 부착된다. 이러한 특정 실시형태에서, 리간드는 센스 가닥의 3'-말단 뉴클레오티드의 3'-위치에 부착된다. 대안적인 실시형태에서, 리간드는 센스 가닥의 3' 말단 근처에, 그러나 하나 이상의 말단 뉴클레오티드 전에(즉 1, 2, 3 또는 4 말단 뉴클레오티드 전에) 부착된다. 일부 실시형태에서, 리간드는 센스 가닥의 3'-말단 뉴클레오티드의 당의 2'-위치에 부착된다.

[0081] 특정 실시형태에서, 리간드는 링커를 통해 센스 또는 안티센스 가닥에 부착된다. "링커"는 리간드를 RNAi 작제물의 폴리뉴클레오티드 구성요소에 공유 결합시키는 원자 또는 원자 그룹이다. 링커는 약 1 내지 약 30개 원자 길이, 약 2 내지 약 28개 원자 길이, 약 3 내지 약 26개 원자 길이, 약 4 내지 약 24개 원자 길이, 약 6 내지 약 20개 원자 길이, 약 7 내지 약 20개 원자 길이, 약 8 내지 약 20개 원자 길이, 약 8 내지 약 18개 원자 길이, 약 10 내지 약 18개 원자 길이, 및 약 12 내지 약 18개 원자 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 이작용성 연결 모이어티를 포함할 수 있으며, 이는 일반적으로 2개의 작용기를 갖는 알킬 모이어티를 포함한다. 작용기 중 하나는 관성 화합물(예를 들어, RNAi 작제물의 센스 또는 안티센스 가닥)에 결합하도록 선택되고, 다른 하나는 본 명세서에 기재된 리간드와 같은 임의의 선택된 기에 본질적으로 결합하도록 선택된다. 특정 실시형태에서, 링커는 사슬 구조 또는 반복 단위의 올리고머, 예컨대, 에틸렌 글리콜 또는 아미노산 단위를 포함한다. 이작용성 연결 모이어티에 전형적으로 사용될 수 있는 작용기의 예는 친핵성 기와 반응하기 위한 친전자체 및 친전자성기와 반응하기 위한 친핵체를 포함하지만 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 이작용성 연결 모이어티는 아미노, 하이드록실, 카르복실산, 티올, 불포화(예를 들어, 이중 또는 삼중 결합) 등을 포함한다.

[0082] RNAi 작제물에서 센스 또는 안티센스 가닥에 리간드를 부착시키는데 사용될 수 있는 링커는 피롤리딘, 8-아미노-3,6-디옥사옥탄산, 숙신이미드 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산 -1-카르복실레이트, 6-아미노헥산 산, 치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 치환된 또는 비치환된 C₂-C₁₀ 알케닐 또는 치환된 또는 비치환된 C₂-C₁₀ 알킬닐을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 링커에 대한 바람직한 치환기는 하이드록실, 아미노, 알콕시, 카르복시, 벤질, 페닐, 니트로, 티올, 티오알콕시, 할로젠, 알킬, 아릴, 알케닐 및 알킬닐을 포함하지만 이로 제한되지는 않는다.

[0083] 특정 실시형태에서, 링커는 절단 가능하다. 절단 가능한 링커는 세포 외부에서 충분히 안정하지만, 표적 세포로

진입 시 절단되어, 링커가 함께 유지하는 두 부분이 해제되는, 링커이다. 일부 실시형태에서, 절단 가능한 링커는 표적 세포에서 또는 대상체의 혈액에서보다 제1 기준 조건(예를 들어, 세포내 조건을 모방하거나 나타내도록 선택될 수 있음) 하에 또는 제2 기준 조건(예를 들어, 혈액 또는 혈청에서 발견된 조건을 모방하거나 나타내도록 선택될 수 있음) 하에, 적어도 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 또는 그 이상 또는 적어도 100배 더 빨리 절단된다.

[0084] 절단 가능한 링커는 절단제, 예를 들어, pH, 산화환원 전위 또는 분해성 분자의 존재에 민감하다. 일반적으로, 절단제는 혈청 또는 혈액보다 세포 내에서 더 우세하거나 더 높은 수준 또는 활성으로 발견된다. 이러한 분해제의 예에는, 특정 기질에 대해 선택되거나, 기질 특이성이 없는 산화환원제, 예를 들어, 산화 또는 환원성 효소 또는 환원에 의해 산화환원 절단성 링커를 분해할 수 있는, 세포에 존재하는 환원제 예컨대, 머캡탄; 에스테라제; 산성 환경, 예를 들어, pH 5 이하를 야기하는 환경을 생성할 수 있는 엔도솜 또는 작용제; 일반적인 산, 펩티다제(기질 특이적일 수 있음) 및 포스파타제로서 작용함으로써 산 절단성 링커를 가수분해 또는 분해할 수 있는 효소가 포함된다.

[0085] 절단 가능한 링커는 pH에 민감한 모이어티를 포함할 수 있다. 인간 혈청의 pH는 7.4인 반면, 평균 세포내 pH는 약 7.1-7.3 범위로, 약간 더 낮다. 엔도솜은 5.5-6.0의 범위의 더 산성인 pH를 가지며, 리소솜은 약 5.0의 훨씬 더 산성인 pH를 갖는다. 일부 링커는 바람직한 pH에서 절단되는 절단 가능한 기를 가질 것이며, 이로써 세포 내부의 리간드로부터 또는 세포의 원하는 구획으로 RNA 분자를 방출할 수 있다.

[0086] 링커는 특정 효소에 의해 절단될 수 있는 절단 가능한 기를 포함할 수 있다. 링커에 포함된 절단 가능한 기의 유형은 표적화될 세포에 의존할 수 있다. 예를 들어, 간-표적 리간드는 에스테라지를 포함하는 링커를 통해 RNA 분자에 연결될 수 있다. 간 세포는 에스테라제가 풍부하기 때문에, 링커는 에스테라제가 풍부하지 않은 세포 유형에서보다 간 세포에서 보다 효율적으로 절단될 것이다. 에스테라제가 풍부한 다른 유형의 세포는 폐, 신장, 피질 및 고환의 세포를 포함한다. 펩티드 결합을 함유하는 링커는 간 세포 및 활막세포와 같은 펩티다제가 풍부한 세포를 표적화할 때 사용될 수 있다.

[0087] 일반적으로, 후보 절단 가능한 링커의 적합성은 후보 링커를 절단하는 분해제의 능력(또는 조건)을 테스트함으로써 평가될 수 있다. 또한 혈액에서 또는 다른 비-표적 조직과 접촉할 때 절단에 저항하는 능력에 대해 후보 절단 가능한 링커를 시험하는 것이 바람직할 것이다. 따라서, 제1 조건과 제2 조건 사이의 절단에 대한 상대적 민감성을 결정할 수 있으며, 여기서 첫 번째 조건은 표적 세포에서 절단을 나타내는 것으로 선택되고, 두 번째는 다른 조직 또는 생물학적 유체, 예를 들어, 혈액 또는 혈청에서의 절단을 나타내는 것으로 선택된다. 평가는 무 세포 시스템, 세포, 세포 배양, 기관 또는 조직 배양, 또는 전체 동물에서 수행될 수 있다. 무세포 또는 배양 조건에서 초기 평가를 수행하고 전체 동물에서 추가 평가를 통해 확인하는 것이 유용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 유용한 후보 링커는 혈액 또는 혈청과 비교하여(또는 세포외 조건을 모방하도록 선택된 시험관내 조건 하에서) 세포에서(또는 세포내 조건을 모방하도록 선택된 시험관내 조건 하에서) 적어도 2, 4, 10, 20, 50, 70 또는 100배 더 빨리 절단된다.

[0088] 다른 실시형태에서, 산화환원 절단 가능한 링커가 사용된다. 산화환원 절단 가능한 링커는 환원 또는 산화 시 절단된다. 환원성 절단 가능한 기의 예는 이황화 연결기(-S-S-)이다. 후보 절단 가능한 링커가 적합한 "환원적으로 절단 가능한 링커"인지 또는, 예를 들어, 특정 RNAi 작제물 및 특정 리간드와 함께 사용하기에 적합한지를 결정하기 위해, 본 명세서에 기재된 하나 이상의 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 후보 링커는 디티오프로티톨(DTT) 또는 당업계에 알려진 다른 환원제와의 인큐베이션에 의해 평가될 수 있으며, 이는 세포, 예를 들어, 표적 세포에서 관찰될 절단 속도를 모방한다. 후보 링커는 또한 혈액 또는 혈청 조건을 모방하도록 선택된 조건 하에서 평가될 수 있다. 특정 실시형태에서, 후보 링커는 혈액에서 최대 10%만큼 절단된다. 다른 실시형태에서, 유용한 후보 링커는 혈액과 비교하여 (또는 세포외 조건을 모방하도록 선택된 시험관내 조건 하에서) 세포에서 (또는 세포내 조건을 모방하도록 선택된 시험관내 조건 하에서) 적어도 2, 4, 10, 20, 50, 70 또는 100배 더 빨리 분해된다.

[0089] 또 다른 실시형태에서, 포스페이트-기반 절단 가능한 링커는 포스페이트기를 분해하거나 가수분해하는 제제에 의해 절단된다. 세포에서 포스페이트기를 가수분해하는 제제의 예는 세포에서 포스파타제와 같은 효소이다. 포스페이트-기반 절단 가능한 기의 예는 -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-이고, 식 중, Rk는 수소 또는 C₁-C₁₀ 알킬일 수 있다. 특정 실시형태는 -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-

S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -SP(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, -O-P(S)(H)-S-를 포함한다. 다른 특정 실시형태는 -O-P(O)(OH)-O-이다. 이들 후보 링커는 상기 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0090] 다른 실시형태에서, 링커는 산성 조건 하에서 절단되는 기인 산 절단 가능한 기를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 산 절단 가능한 기는 pH가 약 6.5 이하(예를 들어, 약 6.0, 5.5, 5.0 이하)인 산성 환경에서 또는 일반적인 산으로서 작용할 수 있는 효소와 같은 제제에 의해 절단된다. 세포에서, 엔도솜 및 리소솜과 같은 특정 저 pH 소기관은 산 절단 가능한 기에 대한 절단 환경을 제공할 수 있다. 산 절단 가능한 연결기의 예는 하이드라존, 에스테르 및 아미노산의 에스테르를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 산 절단 가능한 기는 일반 화학식 $-C\equiv N-$, $C(O)O$ 또는 $-OC(O)-$ 를 가질 수 있다. 특정 실시형태는 에스테르(알콕시 기)의 산소에 부착된 탄소 아릴 기, 치환된 알킬기 또는 3차 알킬기, 예컨대, 디메틸, 펜틸 또는 t-부틸인 경우이다. 이들 후보는 상기 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0091] 다른 실시형태에서, 링커는 에스테르-기반 절단 가능한 기를 포함할 수 있으며, 이는 세포에서 효소, 예컨대, 에스테라제 및 아미다제에 의해 절단된다. 에스테르-기반 절단 가능한 기의 예는 알킬렌, 알케닐렌 및 알킬닐렌 기의 에스테르를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 에스테르 절단 가능한 기는 일반 화학식 $-C(O)O-$ 또는 $-OC(O)-$ 를 가진다. 이들 후보 링커는 상기 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0092] 추가 실시형태에서, 링커는 펩티드-기반 절단 가능한 기를 포함할 수 있으며, 이는 세포에서 효소, 예컨대, 펩티다제 및 프로테아제에 의해 절단된다. 펩티드-기반 절단 가능한 기는 아미노산 사이에 형성되어 올리고펩티드(예를 들어, 디펩티드, 트리펩티드 등) 및 폴리펩티드를 생성하는 펩티드 결합이다. 펩티드-기반 절단 가능한 기는 아미드 기($-C(O)NH-$)를 포함하지 않는다. 아미드 기는 임의의 알킬렌, 알케닐렌 또는 알킬닐렌 사이에서 형성될 수 있다. 펩티드 결합은 아미노산 사이에 형성되어 펩티드 및 단백질을 생성하는 특별한 유형의 아미드 결합이다. 펩티드 기반 절단 기는 일반적으로 아미노산 사이에서 형성되어 펩티드 및 단백질을 형성하는 펩티드 결합(즉, 아미드 결합)에 제한되며, 전체 아미드 작용기를 포함하지 않는다. 펩티드-기반 절단 가능한 연결기는 일반 화학식 $-NHCH(R^A)C(O)NHCH(R^B)C(O)-$ 을 가지며, R^A 및 R^B 는 2개의 인접한 아미노산의 측쇄이다. 이들 후보는 상기 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0093] 본 명세서에 기재된 RNAi 작제물에서 센스 또는 안티센스 가닥에 리간드를 부착하기에 적합한 다른 유형의 링커는 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어, 미국 특허 제7,723,509호; 제8,017,762호; 제8,828,956호; 제8,877,917호; 및 제9,181,551호에 기재되어 있는 링커를 포함할 수 있다.

[0094] 특정 실시형태에서, RNAi 작제물의 센스 또는 안티센스 가닥에 공유적으로 부착된 리간드는 GalNAc 모이어티, 예를 들어, 다가 GalNAc 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 다가 GalNAc 모이어티는 3가 GalNAc 모이어티이며, 센스 가닥의 3' 말단에 부착된다. 다른 실시형태에서, 다가 GalNAc 모이어티는 3가 GalNAc 모이어티이며, 센스 가닥의 5' 말단에 부착된다. 또 다른 실시형태에서, 다가 GalNAc 모이어티는 4가 GalNAc 모이어티이며, 센스 가닥의 3' 말단에 부착된다. 또 다른 실시형태에서, 다가 GalNAc 모이어티는 4가 GalNAc 모이어티이며, 센스 가닥의 5' 말단에 부착된다.

[0095] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물은 RNAi 작제물의 세포내 발현을 암호화하고 제어하는 벡터를 투여함으로써 관심 세포 또는 조직으로 전달될 수 있다. "벡터"(본 명세서에서 "발현 벡터"라고도 함)는 세포의 내부로 관심 핵산을 전달하는 데 사용될 수 있는 물질의 조성물이다. 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 관련된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드 및 바이러스를 포함하지만 이로 제한되지 않는 여러 벡터들이 당업계에 알려져 있다. 따라서, 용어 "벡터"는 자율 복제 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 바이러스 벡터의 예는 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 벡터는 살아있는 세포에서 복제될 수 있거나 합성적으로 제조될 수 있다.

[0096] 일반적으로, RNAi 작제물을 발현하기 위한 벡터는 RNAi 작제물을 암호화하는 서열에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 프로모터를 포함할 것이다. 어구 "작동 가능하게 연결된", "작동적으로 연결된" 또는 "전사 제어 하에"는 RNA 폴리머라제에 의한 전사의 개시 및 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 제어하기 위해 프로모터가 폴리뉴클레오티드 서열과 관련하여 정확한 위치 및 배향에 있는 경우를 지칭하는 데 본 명세서에서 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. "프로모터"는 유전자 서열의 특이적 전사를 개시하는 데 필요한 세포의 합성기구 또는 도입된 합성기구에 의해 인식되는 서열을 지칭한다. 적합한 프로모터는 RNA pol I, pol II, HI 또는 U6 RNA pol III, 및 바이러스 프로모터(예를 들어, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 전초기 유전자 프로모터, SV40 초기 프로모터 및 라우스(rous) 육종 바이러스 긴 말단 반복부)를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서,

HI 또는 U6RNA pol III 프로모터가 사용된다. 프로모터는 조직-특이적 또는 유도성 프로모터일 수 있다. 간-특이적 프로모터, 예컨대, 인간 알파-1 안티트립신 유전자, 알부민 유전자, 헤모백신 유전자, 및 간 리파제 유전자로부터의 프로모터 서열이 특히 관심 대상이 된다. 유도성 프로모터는, 예를 들어, 엑디손, 에스트로젠, 프로게스테론, 테트라사이클린 및 이소프로필-PD1-티오갈락토피라노시드(IPTG)에 의해 조절되는 프로모터를 포함한다.

[0097] RNAi 작제물이 siRNA를 포함하는 경우, 2개의 개별 가닥(센스 및 안티센스 가닥)은 단일 벡터 또는 2개의 개별 벡터로부터 발현될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 센스 가닥을 암호화하는 서열은 제1 벡터상의 프로모터에 작동 가능하게 연결되고 안티센스 가닥을 암호화하는 서열은 제2 벡터상의 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 이러한 실시형태에서, 제1 및 제2 벡터는, 예를 들어, 감염 또는 형질감염에 의해 표적 세포 내로 공동 도입되어, 일단 전사된 센스 및 안티센스 가닥이 세포내에서 혼성화되어, siRNA 분자를 형성할 것이다. 또 다른 실시형태에서, 센스 및 안티센스 가닥은 단일 벡터에 위치한 2개의 별개의 프로모터로부터 전사된다. 이러한 실시형태에서, 센스 가닥을 암호화하는 서열은 제1 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있고 안티센스 가닥을 암호화하는 서열은 제2 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 제1 및 제2 프로모터는 단일 벡터에 위치된다. 일 실시형태에서, 벡터는 siRNA 분자를 암호화하는 서열에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터, 및 동일한 서열에 반대 방향으로 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함하여, 제1 프로모터로부터의 서열의 전사는 siRNA 분자의 센스 가닥의 합성을 초래하고, 제2 프로모터로부터의 서열의 전사는 siRNA 분자의 안티센스 가닥의 합성을 초래한다.

[0098] RNAi 작제물이 shRNA를 포함하는 경우, 단일의, 적어도 부분적으로 자기-상보성인 RNA 분자를 암호화하는 서열은 프로모터에 작동 가능하게 연결되어, 단일 전사물을 생성한다. 일부 실시형태에서, shRNA를 암호화하는 서열은 링커 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 연결된 역반복을 포함하여 전사후 shRNA의 줄기 및 루프 구조를 생성한다. 일부 실시형태에서, RNAi 작제물을 암호화하는 벡터는 바이러스 벡터이다. 본 명세서에 기재된 RNAi 작제물을 발현시키기에 적합한 다양한 바이러스 벡터 시스템은 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터, 말로니 뮤린 백혈병 바이러스(maloney murine leukemia virus)), 아데노-관련 바이러스 벡터; 단순포진 바이러스 벡터; SV40 벡터; 폴리오마 바이러스 벡터; 유두종 바이러스 벡터; 피코나비랄 벡터; 및 폭스 바이러스 벡터(예를 들어, 백시니아 바이러스)를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)이다.

[0099] 본 개시내용에 사용하기에 적합한 다양한 벡터, siRNA 또는 shRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 벡터에 삽입하는 방법, 및 벡터를 관심 세포에 전달하는 방법은 당업계에 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Dornburg, Gene Therap., Vol. 2: 301-310, 1995; Eglitis, Biotechniques, Vol. 6: 608-614, 1988; Miller, HumGene Therap., Vol. 1: 5-14, 1990; Anderson, Nature, Vol. 392: 25-30, 1998; Robinson D A et al., Nat. Genet., Vol. 33: 401-406, 2003; Brummelkamp et al., Science, Vol. 296: 550-553, 2002; Brummelkamp et al., Cancer Cell, Vol. 2: 243-247, 2002; Lee et al., Nat Biotechnol, Vol. 20: 500-505, 2002; Miyagishi et al., Nat Biotechnol, Vol. 20: 497-500, 2002; Paddison et al., GenesDev, Vol. 16: 948-958, 2002; Paul et al., Nat Biotechnol, Vol. 20: 505-508, 2002; Sui et al., Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 99: 5515-5520, 2002; 및 Yu et al., Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 99: 6047-6052, 2002] 참조).

[0100] 조성물

[0101] 본 개시내용은 또한 본 명세서에 기재된 RNAi 작제물 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 조성물 및 제형을 제공한다. 이러한 조성물 및 제형은 이를 필요로 하는 대상체에서 SCAP의 발현을 감소시키는 데 유용하다. 임상 적용이 고려되는 경우, 약제학적 조성물 및 제형은 의도한 적용에 적절한 형태로 제조될 수 있다. 일반적으로, 이것은 발열원뿐만 아니라 인간 또는 동물에게 해로울 수 있는 다른 불순물이 본질적으로 없는 조성물의 제조를 수반할 것이다.

[0102] "약학적으로 허용 가능한" 또는 "약리학적으로 허용 가능한"이란 어구는 동물 또는 인간에게 투여될 때 이상 반응, 알러지 반응 또는 기타 부작용을 일으키지 않는 분자 엔티티 및 조성물을 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제"는 약제, 예컨대, 인간에게 투여하기에 적합한 약제를 제형화하는 데 사용하기 위한, 허용 가능한 용매, 완충액, 용액, 분산 매질, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약학적으로 활성인 물질을 위한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제가 본 개시내용의 RNAi 작제물과 불상용성인 경우를 제외하고, 치료적 조성물에서의 이의 사용이 고려된다. 보충 활성 성분은 또한 조성물의 벡터 또는 RNAi

작제물을 불활성화시키지 않는다면 조성물에 혼입될 수 있다.

[0103] 약제학적 조성물의 제형화를 위한 조성물 및 방법은 투여 경로, 치료될 질환 또는 장애의 유형 및 정도 및 투여될 용량을 포함하지만 이로 제한되지 않는 몇몇 기준에 의존한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 의도된 전달 경로에 기반하여 제형화된다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 비경구 전달용으로 제형화된다. 비경구 전달 형태는 정맥내, 동맥내, 피하, 척수강내, 복강내 및 근육내 주사 또는 주입을 포함한다. 일 실시형태에서, 약제학적 조성물은 정맥내 전달용으로 제형화된다. 이러한 실시형태에서, 약제학적 조성물은 지질-기반 전달 비히클을 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 약제학적 조성물은 피하 전달용으로 제형화된다. 이러한 실시형태에서, 약제학적 조성물은 표적화 리간드(예를 들어, 본 명세서에 기재된 GalNAc 함유 리간드)를 포함할 수 있다.

[0104] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 본 명세서에 기재된 유효량의 RNAi 작제물을 포함한다. "유효량"은 유익하거나 바람직한 임상 결과를 생성하기에 충분한 양이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 대상체의 간세포에서 SCAP 발현을 감소시키기에 충분한 양이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 SCAP 발현을 부분적으로만, 예를 들어, 인간 이형접합체에서 야생형 SCAP 대립유전자의 발현에 필적하는 수준으로만 감소시키기에 충분한 양일 수 있다.

[0105] 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물의 유효량은 약 0.01 mg/kg 몸무게 내지 약 100 mg/kg 몸무게, 약 0.05 mg/kg 몸무게 내지 약 75mg/kg 몸무게, 약 0.1 mg/kg 몸무게 내지 약 50 mg/kg 몸무게, 약 1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg 몸무게, 약 2.5 mg/kg of 몸무게 내지 약 20 mg/kg 몸무게, 또는 약 5 mg/kg 몸무게 내지 약 15 mg/kg 몸무게 일 수 있다. 유효량의 RNAi 작제물을 포함하는 약제학적 조성물은 매주, 격주, 매월, 분기 또는 2년마다 투여될 수 있다. 유효량 및 투여 빈도로 간주되는 것의 정확한 결정은 환자의 크기, 연령, 성별, 치료될 장애의 유형(예를 들어, 지방증, NAFLD, NASH, 또는 간경변), 사용된 특정 RNAi 작제물 및 투여 경로를 비롯한 몇몇 요인에 기반할 수 있다. 본 명세서에 개시된 임의의 특정 RNAi 작제물에 대한 유효 투여량 및 생체내 반감기의 추정치는 통상적인 방법 및/또는 적절한 동물 모델에서의 시험을 사용하여 확인될 수 있다.

[0106] 콜로이드 분산 시스템, 에컨대, 거대분자 복합체, 나노캡슐, 마이크로스피어, 비드, 및 수중유 에멀션, 마이셀, 혼합 마이셀 및 리포솜을 포함한 지질-기반 시스템이 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물의 전달 비히클 또는 이러한 작제물을 암호화하는 벡터로 사용될 수 있다. 핵산을 전달하는 데 적합한 시판되는 지방 에멀션은 INTRALIPID®, LIPOSYN®, LIPOSYN® II, LIPOSYN® III, NUTRILIPID, 및 기타 유사한 지질 에멀션을 포함한다. 생체내에서 전달 비히클로서 사용하기에 바람직한 콜로이드 시스템은 리포솜(즉, 인공 막 소포)이다. RNAi 작제물은 양이온성 리포솜과 같은 리포솜 내에 캡슐화될 수 있다. 대안적으로, 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물은 지질, 에컨대, 양이온성 지질에 복합체화될 수 있다. 적합한 지질 및 리포솜은 중성(예를 들어, 디올레오일포스파티딜 에탄올아민(DOPE), 디미리스토일포스파티딜 콜린(DMPC), 및 디팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC)), 디스테아로일포스파티딜 콜린, 음성(예를 들어, 디미리스토일포스파티딜 글리세롤(DMPG)), 및 양이온성(예를 들어, 디올레오일테트라메틸아미노프로필(DOTAP) 및 디올레오일포스파티딜 에탄올아민(DOTMA))을 포함한다. 이러한 콜로이드 분산 시스템의 제조 및 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 예시적인 제형은 또한 예를 들어, 미국 특허 제5,783,565호; 제5,837,533호; 제5,981,505호; 제6,127,170호; 제6,217,900호; 제6,379,965호; 제6,383,512호; 제6,747,014호; 제7,202,227호; 및 WO 03/093449에 개시되어 있다.

[0107] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물은 예를 들어, SPLP, pSPLP, SNALP 또는 다른 핵산-지질 입자를 형성하기 위해 지질 제형으로 완전히 캡슐화된다. 본 명세서에 사용되는 용어 "SNALP"는 SPLP를 포함하는 안정한 핵산-지질 입자를 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 용어 "SPLP"는 지질 소포 내에 캡슐화된 플라스미드 DNA를 포함하는 핵산-지질 입자를 지칭한다. SNALP 및 SPLP는 전형적으로 양이온성 지질, 비 양이온성 지질, 및 입자의 응집을 방지하는 지질(예를 들어, PEG-지질 접합체)을 함유한다. SNALP 및 SPLP는 정맥내 주사 후 연장된 순환 수명을 나타내고 말단 부위(예를 들어, 투여 부위와 물리적으로 분리된 부위)에 축적되기 때문에 전신 적용에 매우 유용하다. SPLP는 PCT 공개 제WO 00/03683호에 개시된 캡슐화된 축합제-핵산 복합체를 포함하는 "pSPLP"를 포함한다. 핵산-지질 입자는 전형적으로 약 50 nm 내지 약 150 nm, 약 60 nm 내지 약 130 nm, 약 70 nm 내지 약 110 nm, 또는 약 70 nm 내지 약 90 nm의 평균 직경을 가지며, 실질적으로 비독성이다. 또한, 핵산-지질 입자에 존재하는 핵산은 바람직하게는 수용액에서 뉴클레아제에 의한 분해에 내성이 있다. 핵산-지질 입자 및 이의 제조 방법은 예를 들어, 미국 특허 제5,976,567호; 제5,981,501호; 제6,534,484호; 제6,586,410호; 및 제6,815,432호; 및 PCT 공개 제WO 96/40964호에 개시되어 있다.

[0108] 주사에 적합한 약제학적 조성물은 예를 들어, 멸균 수용액 또는 분산액 그리고 멸균 주사용 용액 또는 분산액의

즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 일반적으로, 이들 제제는 용이한 주사 가능성이 존재하는 정도로 멸균되고 유동적이다. 제제는 제조 및 저장 조건 하에서 안정하여야 하고, 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용으로부터 보존되어야 한다. 적절한 용매 또는 분산 매질은 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리오(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물 및 식물유를 함유할 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 코팅(예컨대, 레시틴)의 사용에 의해, (분산물의 경우에) 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 및/또는 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등에 의해 초래될 수 있다. 많은 경우, 등장화제(예를 들어, 설탕 또는 염화나트륨)가 조성물에 포함될 수 있다. 주사용 조성물의 장기간 흡수는 흡수 지연제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함함으로써 초래될 수 있다.

[0109] 멸균 주사용 용액은 적절한 양의 RNAi 작제물(단독으로 또는 리간드와 복합된)을 원하는 대로 임의의 다른 성분(예컨대, 전술한 바와 같은 성분)과 함께 용매에 포함시킨 후 여과 멸균하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 염기성 분산 매질 및 원하는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내에 다양한 멸균된 활성 성분을 포함시키는 것에 의해 제조된다. 멸균 주사 가능 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 적합한 제조 방법은 활성 성분(들)에 더하여 임의의 부가적인 요망되는 성분의 분말을 미리 멸균-여과한 이의 용액으로부터 생산하는 진공-건조 및 동결-건조 기법을 포함한다.

[0110] 본 명세서에 제공된 조성물은 중성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 약학적으로-허용 가능한 염은 예를 들어, 무기산(예를 들어, 염산 또는 인산) 또는 유기산(예를 들어, 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등)으로부터 유래된 산 부가 염(유리 아미노기로 형성됨)을 포함한다. 유리 카르복실기로 형성된 염은 또한 무기 염기(예를 들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 수산화 제2철)로부터 또는 유기 염기(예를 들어, 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등)로부터 유래될 수 있다.

[0111] 수용액에서의 비경구 투여를 위해, 예를 들어, 용액은 일반적으로 적절하게 완충되고, 액체 희석제는 먼저 예를 들어 충분한 식염수 또는 글루코스로 등장성이 된다. 이러한 수용액은 예를 들어, 정맥내, 근육내, 피하, 및 복강내 투여에 사용될 수 있다. 당업자에게 알려진 바와 같이 멸균 수성 매질이 바람직하게 사용된다. 예를 들어, 단위 용량을 등장성 NaCl 용액 1 ml에 용해시키고 1000 ml의 피하주사액에 첨가하거나, 제안된 주입 부위에 주사할 수 있다(예를 들어, 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 및 1570-1580] 참조). 인간 투여의 경우, 제제는 FDA 표준에서 요구하는 무균성, 발열성, 일반적인 안전성 및 순도 표준을 충족해야 한다. 본 개시내용의 특정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 멸균 식염수 용액 및 본 명세서에 기재된 RNAi 작제물을 포함하거나 이로 구성된다. 다른 실시형태에서, 약제학적 조성물은 본 명세서에 기재된 RNAi 작제물 및 멸균 수(예를 들어, 주사용수, WFI)를 포함하거나 이로 구성된다. 또 다른 실시형태에서, 약제학적 조성물은 본 명세서에 기재된 RNAi 작제물 및 포스페이스트 완충 식염수(PBS)를 포함하거나 이로 구성된다.

[0112] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 투여용 디바이스와 함께 패키징되거나 그 안에 저장된다. 주사용 제형을 위한 디바이스는 주사 포트, 사전 충전형 시린지, 자동 주사기, 주사 펌프, 체내 주사기 및 주사 펜을 포함하지만 이로 제한되지는 않는다. 에어로졸화 또는 분말 제형을 위한 디바이스는 흡입기, 취입기, 흡입기 등을 포함하지만 이로 제한되지는 않는다. 그러므로, 본 개시내용은 하나 이상의 장애를 치료하거나 예방하기 위한 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물을 포함하는 투여 디바이스를 포함한다.

[0113] SCAP 발현을 억제하는 방법

[0114] 본 개시내용은 또한 세포에서 SCAP 유전자의 발현을 억제하는 방법을 제공한다. 방법은 세포에서 SCAP의 발현을 억제하는 데 효과적인 양으로 세포를 RNAi 작제물, 예를 들어, 이중 가닥 RNAi 작제물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 세포를 RNAi 작제물, 예를 들어, 이중 가닥 RNAi 작제물과 접촉시키는 것은 시험관내 또는 생체내에서 수행될 수 있다. 생체내에서 RNAi 작제물과 세포를 접촉시키는 것은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체 내의 세포 또는 세포 그룹을 RNAi 작제물과 접촉시키는 것을 포함한다. 세포를 접촉시키는 시험관내 및 생체내 방법의 조합도 본 개시내용의 범주 내에 있다.

[0115] 본 개시내용은 SCAP 발현 또는 활성과 관련된 병태, 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법뿐만 아니라 이를 필요로 하는 대상체에서 SCAP의 발현을 감소 또는 억제하는 방법을 제공한다. "SCAP 발현과 관련된 병태, 질환 또는 장애"는 SCAP 발현 수준이 변경되거나 SCAP의 증가된 발현 수준이 병태, 질환 또는 장애의 발병 위험 증가와 관련된 병태, 질환 또는 장애를 지칭한다.

[0116] 세포를 접촉시키는 것은 전술한 바와 같이 직접적이거나 간접적일 수 있다. 더욱이, 세포 접촉은 본 명세서에

기재되거나 당업계에 알려진 임의의 리간드를 포함하는 표적화 리간드를 통해 달성될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 표적화 리간드는 탄수화물 모이어티, 예를 들어, 삼안테나형 GalNAc 리간드(GalNAc3) 또는 RNAi 작제물을 관심 부위로 유도하는 임의의 다른 리간드이다.

[0117] 일 실시형태에서, 세포를 RNAi와 접촉시키는 것은 세포 내로의 흡수 또는 흡인을 촉진하거나 수행함으로써 "RNAi를 세포 내로 도입" 또는 "전달"하는 것을 포함한다. RNAi의 흡수 또는 흡인은 비-보조 확산 또는 활성 세포 프로세스 또는 보조제 또는 보조 디바이스를 통해 발생할 수 있다. 생체내 도입을 위해, 예를 들어, RNAi는 조직 부위에 주사되거나 전신적으로 투여될 수 있다. 세포로의 시험관내 도입은 전기천공 및 리포펙션과 같은 당업계에 알려진 방법을 사용하여 달성될 수 있다. 추가의 접근법이 이하에 설명되고/되거나 당업계에 알려져 있다.

[0118] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "억제하는"은 "감소시키는", "침묵시키는", "하향조절하는", "억제하는" 및 다른 유사한 용어들과 상호교환적으로 사용되며, 임의의 수준의 억제를 포함한다.

[0119] 어구 "SCAP의 발현을 억제하는"은 임의의 SCAP 유전자(예컨대, 예를 들어, 마우스 SCAP 유전자, 래트 SCAP 유전자, 원숭이 SCAP 유전자 또는 인간 SCAP 유전자) 뿐만 아니라 SCAP 유전자의 변이체 또는 돌연변이체의 발현 억제를 지칭하는 것으로 의도된다. 따라서, SCAP 유전자는 유전자 조작된 세포, 세포 그룹, 또는 유기체의 맥락에서 야생형 SCAP 유전자, 돌연변이 SCAP 유전자, 또는 트랜스제닉 SCAP 유전자일 수 있다.

[0120] "SCAP 유전자의 발현을 억제하는"는 SCAP 유전자의 임의의 억제 수준, 예를 들어, SCAP 유전자의 발현의 적어도 부분적 억제를 포함한다. SCAP 유전자의 발현은 SCAP 유전자 발현과 관련된 임의의 변수, 예를 들어, SCAP mRNA 수준 또는 SCAP 단백질 수준의 수준 또는 수준 변화에 기반하여 평가될 수 있다. 이 수준은, 예를 들어, 대상체로부터 유래된 샘플을 포함하여 개별 세포 또는 세포 그룹에서 평가될 수 있다.

[0121] 억제는 대조군 수준과 비교하여 SCAP 발현과 관련된 하나 이상의 변수의 절대적 또는 상대적 수준의 감소에 의해 평가될 수 있다. 대조군 수준은 당 업계에서 이용되는 임의의 유형의 대조군 수준, 예를 들어, 투여-전 기준선 수준 또는 대조군(예컨대, 예를 들어, 완충액 단독 대조군 또는 불활성 제제 대조군)으로 처리되거나 처리되지 않은 유사한 대상체, 세포 또는 샘플로부터 측정된 수준일 수 있다. 일부 실시형태에서, SCAP 유전자의 발현은 적어도 약 5%, 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 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 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% 억제된다.

[0122] SCAP 유전자의 발현의 억제는, SCAP 유전자가 전사되고, (예를 들어, 세포 또는 세포들을 본 명세서에 기재된 RNAi 작제물과 접촉시킴으로써 또는 세포들이 존재하거나 존재했던 대상체에 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물을 투여함으로써) 치료되거나 치료된 제1 세포 또는 세포 그룹(이러한 세포는, 예를 들어, 대상체로부터 유래된 샘플에 존재할 수 있음)에 의해 발현되는 mRNA의 양의 감소에 의해 나타날 수 있으며, 따라서 SCAP 유전자의 발현은 제1 세포 또는 세포 그룹과 실질적으로 동일하지만 그렇게 처리되지 않았거나 그렇지 않은 제2 세포 또는 세포 그룹(대조군 세포(들))과 비교하여 억제된다. 억제는 하기 화학식을 사용하여, 처리된 세포에서의 mRNA 수준을 대조군 세포에서의 mRNA 수준의 백분율로서 표현함으로써 평가될 수 있다:

$$\frac{(\text{대조군 세포에서의 mRNA}) - (\text{처리된 세포에서의 mRNA})}{\text{대조군 세포에서의 mRNA}} \times 100\%$$

[0123]

[0124] 대안적으로, SCAP 유전자의 발현 억제는 SCAP 유전자 발현, 예를 들어, SCAP 단백질 발현 또는 고슴도치(Hedgehog) 경로 단백질 활성화와 기능성으로 연결된 파라미터의 감소의 관점에서 평가될 수 있다. SCAP 유전자 침묵은 SCAP을 발현하는 임의의 세포에서 내인성으로 또는 재조합적으로, 당업계에 알려진 임의의 검정에 의해 결정될 수 있다.

[0125] PNPLA3 단백질의 발현 저해는 세포 또는 세포 그룹에 의해 발현되는 PNPLA3 단백질의 수준(예를 들어, 대상체로부터 획득된 샘플에서 발현된 단백질의 수준)의 감소에 의해 나타날 수 있다. 전술한 바와 같이, mRNA 억제의 평가를 위해, 처리된 세포 또는 세포 그룹에서 단백질 발현 수준의 억제는 대조군 세포 또는 세포 그룹에서 단백질 수준의 백분율로 유사하게 표현될 수 있다.

- [0126] SCAP 유전자의 발현 억제를 평가하기 위해 사용될 수 있는 대조군 세포 또는 세포 그룹은 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물과 아직 접촉되지 않은 세포 또는 세포 그룹을 포함한다. 예를 들어, 대조군 세포 또는 세포 그룹은 RNAi 작제물로 대상체를 치료하기 전에 개별 대상체(예를 들어, 인간 또는 동물 대상체)로부터 유래될 수 있다.
- [0127] 세포 또는 세포 그룹에 의해 발현되는 SCAP mRNA의 수준, 또는 순환 SCAP mRNA의 수준은 mRNA 발현을 평가하기 위해 당 업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 샘플에서 SCAP의 발현 수준은 전사된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 일부, 예를 들어, SCAP 유전자의 mRNA를 검출함으로써 결정된다. 이와 관련하여, 예를 들어, RNA는, 예를 들어, 산 페놀/구아니딘 이소티오시아네이트 추출(RNAzol B; Biogenesis), RNeasy RNA 제조 키트(Qiagen) 또는 PAXgene(PreAnalytix, 스위스 소재)을 포함하는 RNA 추출 기법을 사용하여 세포로부터 추출될 수 있다. 리보핵산 혼성화를 이용하는 전형적인 검정 포맷은 핵 런-온 검정, RT-PCR, RNase 보호 검정(Melton et al., Nuc. Acids Res., 12:7035), 노던 블롯팅, 인시추 혼성화 및 마이크로어레이 분석을 포함한다. 순환 SCAP mRNA는 WO 2012/177906에 기재된 방법을 사용하여 검출될 수 있다.
- [0128] 일 실시형태에서, SCAP의 발현 수준은 핵산 프로브를 사용하여 결정된다. 본 명세서에 사용되는 용어 "프로브"는 특정 SCAP 서열에 선택적으로 결합할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 프로브는 당업자에 의해 합성되거나 적절한 생물학적 제조로부터 유래될 수 있다. 프로브는 표지되도록 특별히 설계될 수 있다. 프로브로서 이용될 수 있는 분자의 예는 RNA, DNA, 단백질, 항체 및 유기 분자를 포함하지만 이로 제한되지는 않는다.
- [0129] 단리된 mRNA는 서던 또는 노던 분석, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 분석 및 프로브 어레이를 포함하지만 이로 제한되지 않는 혼성화 또는 증폭 검정에 사용될 수 있다. mRNA 수준의 결정을 위한 하나의 방법은 단리된 mRNA를 SCAP mRNA에 혼성화할 수 있는 핵산 분자(프로브)와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, mRNA는 고체 표면에 고정되고, 예를 들어, 단리된 mRNA를 아가로스 겔상에서 전개시키고 mRNA를 겔에서 니트로셀룰로스와 같은 막으로 전달함으로써 프로브와 접촉된다. 대안적인 실시형태에서, 프로브(들)는 고체 표면 상에 고정되고 mRNA는, 예를 들어, Affymetrix 유전자 칩 어레이에서 프로브(들)와 접촉된다. 당업자는 SCAP mRNA의 수준을 결정하는 데 사용하기 위해 알려진 mRNA 검출 방법을 용이하게 적용할 수 있다.
- [0130] 샘플내 SCAP의 발현 수준을 결정하기 위한 대안적인 방법은 예를 들어, RT-PCR(예를 들어, 미국 특허 제 4,683,202호 참조), 리가제 연쇄 반응(Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189-193), 자가 지속 서열 복제(Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878), 전사 증폭 시스템(Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177), Q-베타 레플리카제(Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6: 1197), 롤링 서클 복제(문헌[Lizardi et al., 상동]; 및 미국 특허 제5,854,033호) 또는 임의의 기타 핵산 증폭 방법에 의한 샘플내, 예를 들어, mRNA의 핵산 증폭 및/또는 역전사효소(cDNA를 제조하기 위한) 프로세스 및 이에 뒤이은 당업자에게 잘 알려진 기법을 사용한 증폭된 분자의 검출을 포함한다. 이러한 검출 방식은 그러한 분자가 매우 적은 수로 존재하는 경우 핵산 분자의 검출에 특히 유용하다. 개시내용의 일부 양태에서, SCAP의 발현 수준은 정량적 형광성 RT-PCR(즉, TAQMAN계 System)에 의해 결정될 수 있다. SCAP mRNA의 발현 수준은 막 블롯(예컨대, 노던, 서던, 도트 등과 같은 혼성화 분석에 사용됨), 또는 마이크로웰, 샘플 튜브, 겔, 비드 또는 섬유(또는 결합된 핵산을 포함하는 임의의 고체 지지체)를 사용하여 모니터링될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,445,934호; 제5,677,195호; 제5,770,722호; 제5,744,305호; 및 제5,874,219호 참조). SCAP 발현 수준의 결정은 또한 용액 중의 핵산 프로브를 사용하는 것을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, mRNA 발현의 수준은 분지형 DNA(bDNA) 검정 또는 실시간 PCR(qPCR)을 사용하여 평가된다.
- [0131] SCAP 단백질 발현의 수준은 단백질 수준의 측정을 위해 당 업계에 알려진 임의의 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어, 전기영동, 모세관 전기영동, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 박층 크로마토그래피(TLC), 과산화 크로마토그래피, 유체 또는 겔 프리시피틴(precipitin) 반응, 흡수 분광법, 비색 검정, 분광 검정, 유세포 측정, 면역확산(단일 또는 이중), 면역전기영동, 웨스턴 블롯팅, 방사면역측정법(RIA), 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA), 면역형광 검정, 전기화학발광 검정 등을 포함한다.
- [0132] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법의 효능은 SCAP-관련 질환의 증상, 예컨대, 위장 통증, 호흡 곤란, 고혈압 또는 사지, 얼굴, 후두, 상기도, 복부, 몸통 및 생식기의 부종의 감소를 검출하거나 모니터링함으로써 모니터링될 수 있다. 이들 증상은 관련 기술 분야에 알려진 임의의 방법을 사용하여 시험관내 또는 생체내에서 평가될 수 있다.
- [0133] 일부 실시형태에서, RNAi 작제물 또한 RNAi 작제물을 포함하는 조성물이 대상체에게 투여되어, RNAi 작제물이 대상체내 특정 부위로 전달되도록 한다. SCAP의 발현 억제는 대상체 내의 특정 부위로부터의 유체 또는 조직으로부터 유래된 샘플에서 SCAP mRNA 또는 SCAP 단백질의 수준 또는 수준 변화 측정을 사용하여 평가될 수 있다.

일부 실시형태에서, RNAi 작제물은 간, 맥락막 신경총, 망막 및 췌장과 같은 부위로 전달될 수 있다. 상기 부위는 또한 상기 언급된 부위 중 어느 하나로부터의 세포의 서브섹션 또는 서브그룹일 수 있다. 부위는 또한 특정 유형의 수용체를 발현하는 세포를 포함할 수 있다.

[0134] SCAP-관련 질환의 치료 또는 예방 방법

[0135] 본 발명은 GPAM-관련 질환, 장애 및/또는 병태를 갖는 대상체, 또는 GPAM-관련 질환, 장애 및/또는 병태가 발생하기 쉬운 대상체에게, RNAi 작제물, RNAi 작제물을 포함하는 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물), 또는 본원에 기재된 RNAi 작제물을 포함하는 벡터를 투여하는 단계를 포함하는 치료 및 예방 방법을 제공한다. SCAP-관련 질환의 비제한적인 예는, 예를 들어, 지방간(지방증), 비알코올성 지방간염(NASH), 간경변, 간에서의 지방 축적, 간 염증, 간세포 괴사, 간 섬유증, 비만, 비알코올성 지방간 질환(NAFD), 고중성지방혈증 및 고지혈증을 포함한다. 일 실시형태에서, SCAP-관련 질환은 NAFD이다. 또 다른 실시형태에서, SCAP-관련 질환은 NASH이다. 또 다른 실시형태에서, SCAP-관련 질환은 지방간(지방증)이다. 또 다른 실시형태에서, SCAP-관련 질환은 인슐린 저항성이다.

[0136] 특정 실시형태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 임의의 RNAi 작제물을 SCAP 발현의 감소를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 환자의 SCAP의 발현을 감소시키는 방법을 제공한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "환자"는 인간을 포함하는 포유류를 지칭하고, 용어 "대상체"와 상호교환적으로 사용될 수 있다. 환자의 간세포에서 SCAP의 발현 수준은 바람직하게는 RNAi 작제물을 투여받지 않은 환자에서의 SCAP 발현 수준과 비교하여 RNAi 작제물의 투여 후 감소된다.

[0137] 본 명세서에 개시된 방법은 SCAP-관련 질환을 갖는 대상체, 예를 들어, SCAP 유전자 발현 및/또는 SCAP 단백질 생산의 감소로부터 이익을 얻을 수 있는 대상체를 치료하는 데 유용하다. 일 양태에서, 본 개시내용은 비알코올성 지방간 질환(NAFD)을 갖는 대상체에서 SCAP 유전자 발현의 수준을 감소시키는 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 NAFD를 갖는 대상체에서 SCAP 단백질의 수준을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0138] 본 명세서에 개시된 치료 방법(및 용도)은 치료적 유효량의, SCAP 유전자를 표적으로 하는 개시된 RNAi 작제물, RNAi 작제물을 포함하는 약제학적 조성물, 또는 RNAi 작제물을 포함하는 벡터를 대상체, 예를 들어, 인간에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0139] 일 양태에서, 본 개시내용은 NAFD를 갖는 대상체에서 적어도 하나의 증상, 예를 들어, 증가된 고섬도치 신호전달 경로의 존재, 피로, 허약, 체중 감소, 식욕 부진, 구역질, 복통, 거미-혈관, 피부 및 눈의 황변(황달), 가려움증, 체액 축적 및 다리 붓기(부종), 복부 팽만(복수) 및 정신적 혼란을 예방하는 방법을 제공한다. 방법은 예방적 유효량의 RNAi 작제물, 예를 들어, siRNA, RNAi 작제물을 포함하는 약제학적 조성물, 또는 RNAi 작제물을 암호화하는 벡터를 대상체에게 투여하여, SCAP 유전자 발현의 감소로부터 이익을 얻을 수 있는 장애를 갖는 대상체의 적어도 하나의 증상을 예방하는 단계를 포함한다. "예방적 유효량"은 원하는 예방적 결과(예를 들어, 질환 발병 방지)를 달성하는 데 필요한 투여량 및 그러한 기간으로 효과적인 양을 지칭한다.

[0140] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 대상체, 예를 들어, SCAP 유전자 발현의 감소 및/또는 억제로부터 이익을 얻을 수 있는 대상체를 치료하기 위한 치료적 유효량의 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물의 용도를 제공한다. 추가 양태에서, 본 개시내용은 대상체, 예를 들어, SCAP 유전자 발현 및/또는 SCAP 단백질 생산의 감소 및/또는 억제로부터 이익을 얻는 대상체, 예컨대, SCAP 유전자 발현 감소로부터 이익을 얻는 장애, 예를 들어, SCAP-관련 질환을 갖는 대상체를 치료하기 위한 의학의 제조에서 SCAP 유전자를 표적화하는 RNAi 작제물, 예를 들어, siRNA, 또는 SCAP 유전자를 표적화하는 RNAi 작제물을 포함하는 약제학적 조성물의 용도를 제공한다.

[0141] 본 개시내용은 SCAP 유전자 발현 및/또는 SCAP 단백질 생산의 감소 및/또는 억제로부터 이익을 얻는 장애를 앓고 있는 대상체의 적어도 하나의 증상을 예방하기 위한 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물, 예를 들어, siRNA의 용도를 제공한다. 예를 들어, 본 개시내용은 NAFD의 치료에서 본 명세서에 기재된 RNAi 작제물, 이를 포함하는 조성물, 및 이를 포함하는 벡터의 용도를 제공한다.

[0142] 추가 양태에서, 본 개시내용은 SCAP 유전자 발현 및/또는 SCAP 단백질 생산의 감소 및/또는 억제로부터 이익을 얻는 장애, 예컨대, SCAP-관련 질환을 앓고 있는 대상체의 적어도 하나의 증상을 예방하기 위한 의학의 제조에 있어서 개시된 RNAi 작제물, 이를 포함하는 조성물, 또는 이를 포함하는 벡터의 용도를 제공한다.

[0143] 일 실시형태에서, SCAP을 표적화하는 RNAi 작제물은 SCAP-관련 질환, 예를 들어, 비알코올성 지방간 질환(NAFD)을 갖는 대상체에게 투여되어, RNA 작제물이 대상체에게 투여될 경우 예를 들어, 대상체의 세포, 조직, 혈액 또는 다른 조직 또는 체액에서 SCAP 유전자의 발현이 적어도 약 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%,

18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 약 99% 이상 감소된다.

[0144] 본 명세서에 개시된 방법 및 용도는 본 명세서에 기재된 조성물을 투여하는 단계를 포함하여, 표적 SCAP 유전자의 발현이 임의의 적합한 시간 동안, 예컨대, 약 1, 2, 3, 4 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76 또는 약 80시간 동안 감소된다. 일 실시형태에서, 표적 SCAP 유전자의 발현은 연장된 지속기간동안, 예를 들어, 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7일 이상, 예를 들어, 약 1주일, 2주일, 3주일 또는 약 4주일 이상 감소된다.

[0145] 본 명세서에 개시된 방법 및 용도에 따른 RNAi 작제물의 투여는 SCAP-관련 질환, 예를 들어, NAFLD를 갖는 환자의 상기 질환 또는 장애의 중증도, 징후, 증상 및 마커를 감소시킬 수 있다. 이와 관련하여 "감소"는 이러한 수준의 통계적으로 유의한 감소를 의미한다. 감소는, 예를 들어, 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 약 100%일 수 있다. 예를 들어 질환 진행, 질환 완화, 증상 중증도, 통증 감소, 삶의 질, 치료 효과를 유지하기 위해 필요한 약제의 용량, 질환 마커의 수준 또는 치료 또는 예방 대상의 특정 질환에 적합한 임의의 다른 측정 가능한 파라미터를 측정함으로써 질환 치료 또는 예방의 효능을 평가할 수 있다. 이러한 파라미터 중 임의의 하나 또는 파라미터의 임의의 조합을 측정함으로써 치료 또는 예방의 효능을 모니터링하는 것은 당업자의 능력 내에 있다. 예를 들어, NAFLD의 치료 효능은, 예를 들어, NAFLD 증상, 간 지방 수준, 또는 다운스트림 유전자의 발현의 주기적 모니터링에 의해 평가될 수 있다. 초기 판독 값과 이후 판독 값의 비교는 의사에게 치료가 효과적인지 지표를 제공한다. SCAP을 표적화하는 RNAi 또는 이의 약제학적 조성물의 투여와 관련하여, SCAP-관련 질환에 대한 "유효한"은 임상적으로 적절한 방식의 투여가, 적어도 통계적으로 유의한 환자 분율에 유의한 효과, 예컨대, 증상 개선, 치료, 질환 감소, 수명 연장, 삶의 질 개선, 또는 일반적으로 NAFLD 및/또는 SCAP-관련 질환 및 관련 원인의 치료에 친숙한 의사에 의해 긍정적인 것으로 인식되는 다른 효과를 가져온다는 것을 나타낸다.

[0146] 치료 또는 예방 효과는 질환 상태의 하나 이상의 파라미터에서 통계적으로 유의한 개선이 있거나, 그렇지 않으면 예상되는 증상을 악화시키거나 발전시키지 못하는 경우에 명백하다. 예로서, 질환의 측정 가능한 파라미터에서 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 30%, 40%, 50% 이상의 유리한 변화는 효과적인 치료를 나타낼 수 있다. 주어진 RNAi 작제물 또는 그 작제물의 제형에 대한 효능은 또한 당업계에 알려진 주어진 질환에 대한 실험 동물 모델을 사용하여 판단될 수 있다. 실험 동물 모델을 사용하는 경우, 마커 또는 증상의 통계적으로 유의한 감소가 관찰될 때 치료 효능이 입증된다.

[0147] 대상체에게는 임의의 치료적 유효량의 RNAi 작제물이 투여될 수 있다. RNAi 작제물의 치료적 유효량의 예시적인 범위는 약 0.01 mg/kg 몸무게 내지 약 100 mg/kg 몸무게, 약 0.05 mg/kg 몸무게 내지 약 75mg/kg 몸무게, 약 0.1 mg/kg 몸무게 내지 약 50 mg/kg 몸무게, 약 1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg 몸무게 또는 약 2.5 mg/kg 몸무게 내지 약 20 mg/kg 몸무게를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 인용된 범위의 중간 값 및 범위도 본 개시내용에 포함된다.

[0148] RNAi 작제물 또는 이를 포함하는 조성물의 투여는, 예를 들어, 환자의 세포, 조직, 혈액, 소변 또는 다른 구획에서의 SCAP 단백질 수준의 존재를 적어도 약 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%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 약 99% 이상 감소시킬 수 있다.

[0149] 전체 용량의 RNAi를 투여하기 전에, 환자는 5% 주입과 같은 더 적은 용량을 투여받을 수 있고, 알레르기 반응과 같은 유해 효과에 대해 모니터링될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 환자는 증가된 사이토카인(예를 들어, TNF-알파 또는 INF-알파) 수준과 같은 원하지 않는 면역자극 효과에 대해 모니터링될 수 있다.

[0150] SCAP 발현에 대한 억제 효과로 인해, 본 개시내용에 따른 조성물 또는 이로부터 제조된 약제학적 조성물은 SCAP-관련 질환(예를 들어, NAFLD)을 앓고 있는 환자의 삶의 질을 향상시킬 수 있다.

- [0151] 본 명세서에 개시된 RNAi는 "네이키드(naked)" 형태로 투여될 수 있으며, 변형된 또는 비변형된 RNAi 작제물은 "유리 RNAi"로서 수성 또는 적합한 완충 용매에 직접 현탁된다. 유리 RNAi는 약제학적 조성물의 부재하에 투여된다. 유리 RNAi는 적합한 완충 용액에 존재할 수 있다. 완충 용액은 아세테이트, 시트레이트, 프롤라민, 카르보네이트 또는 포스페이트 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 완충 용액은 포스페이트 완충 식염수(PBS)이다. RNAi를 함유하는 완충 용액의 pH 및 삼투질 농도는 대상체에게 투여하기에 적합하도록 조정될 수 있다.
- [0152] 대안적으로, 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물은 리포솜 제형과 같은 약제학적 조성물로서 투여될 수 있다.
- [0153] SCAP 유전자 발현의 감소 및/또는 억제로부터 이익을 얻을 수 있는 대상체는 본 명세서에 기재된 바와 같은 또는 당업계에 달리 알려진 비알코올성 지방간 질환(NAFLD) 및/또는 또 다른 SCAP-관련 질환 또는 장애를 갖는 대상체이다.
- [0154] 개시내용은 다른 약제학적 및/또는 다른 치료적 방법들, 예를 들어, 알려진 약제학적 및/또는 알려진 치료적 방법들, 예컨대, 예를 들어, 상기 장애를 치료하기 위해 현재 사용되는 방법들과 조합하여, SCAP 유전자 발현의 감소 및/또는 억제로부터 이익을 얻는 대상체, 예를 들어, SCAP-관련 질환을 갖는 대상체를 치료하기 위한 방법 및 RNAi 작제물 또는 이의 약제학적 조성물의 용도를 추가로 제공한다.
- [0155] 예를 들어, 특정 실시형태에서, SCAP 유전자를 표적화하는 RNAi 작제물은 예를 들어, SCAP-관련 질환을 치료하는 데 유용한 작용제와 조합하여 투여된다. 예를 들어, SCAP 발현 감소로부터 이익을 얻는 대상체, 예를 들어, SCAP-관련 질환을 갖는 대상체를 치료하는 데 적합한 추가의 치료제 및 치료 방법은 SCAP 유전자의 다른 부분을 표적화하는 RNAi 작제물, SCAP-관련 질환을 치료하기 위한 치료제, 및/또는 절차 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0156] 특정 실시형태에서, SCAP 유전자의 일부를 표적화하는 제1 RNAi 작제물은 SCAP 유전자의 다른 부분을 표적화하는 제2 RNAi 작제물과 조합하여 투여된다. 예를 들어, 제1 RNAi 작제물은 이중 가닥 영역을 형성하는 제1 센스 가닥 및 제1 안티센스 가닥을 포함할 수 있으며, 제1 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드 및 제1 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이며, 제1 센스 가닥은 3'-말단에 부착된 리간드에 접합되며, 리간드는 2가 또는 3가 분지된 링커를 통해 부착된 하나 이상의 GalNAc 유도체이며; 제2 RNAi 작제물은 이중 가닥 영역을 형성하는 제2 센스 가닥 및 제2 안티센스 가닥을 포함할 수 있으며, 제2 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드 및 제2 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이며, 제2 센스 가닥은 3'-말단에 부착된 리간드에 접합되며, 리간드는 2가 또는 3가 분지된 링커를 통해 부착된 하나 이상의 GalNAc 유도체이다. 일 실시형태에서, 제1 및 제2 센스 가닥의 모든 뉴클레오타이드 및/또는 제1 및 제2 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오타이드는 변형을 포함한다. 변형된 뉴클레오타이드는 본 명세서에 기재된 변형된 뉴클레오타이드 중 임의의 하나 또는 조합일 수 있다.
- [0157] 다른 실시형태에서, SCAP 유전자를 표적화하는 제1 RNAi 작제물은 SCAP 유전자와 상이한 유전자를 표적화하는 제2 RNAi 작제물과 조합하여 투여된다. 예를 들어, SCAP 유전자를 표적화하는 RNAi 작제물은 파타틴 유사 포스포리파제 도메인 함유 3(patatin like phospholipase domain containing 3; PNPLA3) 유전자를 표적화하는 RNAi 작제물과 조합하여 투여될 수 있다. I148M 돌연변이체 PNPLA3 단백질은 비알코올성 지방간염(NASH) 치료에 대한 강력한 인간 유전적 검증을 갖는 치료 표적이다. PNPLA3 I148M 발현은 과도한 간 지방 축적으로 이어지고 비알코올성 지방간 질환(NAFLD) 관련 표현형을 유발하며 발병률, 진행 및 심각도가 증가한다. SCAP 유전자를 표적화하는 제1 RNAi 작제물 및 상이한 유전자, 예를 들어, PNPLA3 유전자를 표적화하는 제2 RNAi 작제물은 동일한 약제학적 조성물의 일부로서 투여될 수 있다. 대안적으로, SCAP 유전자를 표적화하는 제1 RNAi 작제물 및 상이한 유전자, 예를 들어, PNPLA3 유전자를 표적화하는 제2 RNAi 작제물은 상이한 약제학적 조성물의 일부로서 투여될 수 있다.
- [0158] RNAi 작제물 및 추가적인 치료제 및/또는 치료는 동시에 및/또는 동일한 조합으로, 예를 들어, 비경구로 투여될 수 있으며, 또는 추가적인 치료제는 별개의 조성물의 일부로서 또는 별개의 시간에 및/또는 당업계에 알려져 있거나 본 명세서에 기재된 또 다른 방법에 의해 투여될 수 있다.
- [0159] 본 개시내용은 또한 세포에서 SCAP 발현(유전자 또는 단백질 발현)을 감소 및/또는 억제하기 위해 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물 및/또는 RNAi 작제물을 함유하는 조성물을 사용하는 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 세포에서 SCAP 유전자 발현을 감소 및/또는 억제하기 위한 의약의 제조를 위한 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물 및/또는 RNAi 작제물을 포함하는 조성물의 용도가 제공된다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 세포에서 SCAP

단백질 생산을 감소 및/또는 억제하는 데 사용하기 위한 RNAi 작제물 및/또는 본 명세서에 기재된 RNAi 작제물을 포함하는 조성물을 제공한다. 또 다른 양태에서, 세포에서 SCAP 단백질 생산을 감소 및/또는 억제하기 위한 의약의 제조를 위한 본 명세서에 개시된 RNAi 작제물 및/또는 RNAi 작제물을 포함하는 조성물의 용도가 제공된다. 방법 및 용도는 세포를 RNAi 작제물, 예를 들어, 본 명세서에 개시된 siRNA와 접촉시키고, SCAP 유전자의 mRNA 전사물의 분해를 수득하기에 충분한 시간 동안 세포를 유지시켜 SCAP 유전자의 발현을 억제하거나 세포내 SCAP 단백질 생산을 억제하는 것을 포함한다. 유전자 발현의 감소는 mRNA 또는 단백질 수준을 결정하기 위해 당 업계에 알려져 있거나 본 명세서에 기재된 임의의 방법에 의해 평가될 수 있다.

[0160] 본 명세서에 개시된 방법 및 용도에서, 세포는 시험관내 또는 생체내에서 접촉될 수 있으며, 즉 세포는 대상체 외부(예를 들어, 세포 배양) 또는 대상체 내에 있을 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법을 사용하여 치료하기에 적합한 세포는 SCAP 유전자를 발현하는 임의의 세포, 예를 들어, NAFLD를 갖는 대상체의 세포 또는 SCAP 유전자 또는 SCAP 유전자의 일부를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 세포일 수 있다. 개시된 방법에 사용하기에 적합한 세포는, 예를 들어, 포유동물 세포, 예를 들어, 영장류 세포(예컨대, 인간 세포 또는 비인간 영장류 세포, 예를 들어, 원숭이 세포 또는 침팬지 세포), 비-영장류 세포(예컨대, 소 세포, 돼지 세포, 낙타 세포, 라마 세포, 말 세포, 염소 세포, 토끼 세포, 양 세포, 햄스터, 기니피그 세포, 고양이 세포, 개 세포, 래트 세포, 마우스 세포, 사자 세포, 호랑이 세포, 곰 세포, 또는 버팔로 세포), 조류 세포(예를 들어, 오리 세포 또는 거위 세포) 또는 고래 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 세포는 인간 세포이다.

[0161] SCAP 유전자 발현은 세포에서 적어도 약 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%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 약 100% 억제될 수 있다.

[0162] SCAP 단백질 생산은 세포에서 적어도 약 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%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 약 100% 억제될 수 있다.

[0163] 본 명세서에 개시된 생체내 방법 및 용도는 대상체에게 RNAi 작제물을 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함할 수 있으며, RNAi 작제물은 대상체의 SCAP 유전자의 RNA 전사체의 적어도 일부에 대해 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 치료될 유기체가 인간인 경우, 조성물은 두개내(예를 들어, 뇌실내, 뇌실질내 및 경막내), 근육내, 경피, 기도(에어로졸), 코, 직장 및 국소(협측 및 설하 포함) 투여를 포함하는, 피하, 정맥내, 경구, 복강내 또는 비경구 경로를 포함하지만 이로 제한되지 않는 당업계에 알려진 임의의 수단에 의해 투여될 수 있다. 특정 실시형태에서, 조성물은 피하 또는 정맥내 주입 또는 주사에 의해 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 조성물은 피하 주사에 의해 투여된다.

[0164] 일부 실시형태에서, 투여는 데포 주사를 통해 이루어진다. 데포 주사는 장기간에 걸쳐 일정한 방식으로 RNAi 작제물을 방출할 수 있다. 따라서, 데포 주사는 원하는 효과, 예를 들어, SCAP의 원하는 억제 또는 치료적 또는 예방 효과를 얻기 위해 필요한 투여 빈도를 감소시킬 수 있다. 데포 주사는 또한 보다 일정한 혈청 농도를 제공할 수 있다. 데포 주사는 피하 주사 또는 근육내 주사를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 데포 주사는 피하 주사이다.

[0165] 일부 실시형태에서, 투여는 펌프를 통해 이루어진다. 펌프는 외부 펌프 또는 외과적으로 이식된 펌프일 수 있다. 특정 실시형태에서, 펌프는 피하 이식된 삼투 펌프이다. 다른 실시형태에서, 펌프는 주입 펌프이다. 정맥내, 피하, 동맥 또는 경막외 주입에 주입 펌프가 사용될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 주입 펌프는 피하 주입 펌프이다. 다른 실시형태에서, 펌프는 RNAi 작제물을 대상체에게 전달하는 외과적으로 이식된 펌프이다.

[0166] 투여 방식은 국소 또는 전신 치료가 바람직한지 여부 및 치료될 영역에 기반하여 선택될 수 있다. 투여 경로 및 투여 부위는 표적화를 향상시키기 위해 선택될 수 있다.

[0167] 방법 및 용도는 포유류의 세포에서 SCAP 유전자를 표적화하는 RNAi 작제물, 예를 들어, siRNA를 포함하는 조성

물을 포유류, 예를 들어, 인간에게 투여하고, SCAP 유전자의 mRNA 전사물의 분해를 수득하기에 충분한 시간 동안 포유류를 유지시켜, 포유류에서 SCAP 유전자의 발현을 억제하는 것을 포함한다. 유전자 발현 및/또는 단백질 발현의 감소는 당업계에 알려져 있거나 본 명세서에 기재된 임의의 방법에 의해 RNAi 작제물이 투여된 대상으로부터 얻은 샘플에서 평가될 수 있다. 일 실시형태에서, 조직 샘플은 SCAP 유전자 및/또는 단백질 발현의 감소를 모니터링하기 위한 조직 물질로서 기능한다. 또 다른 실시형태에서, 혈액 샘플은 SCAP 유전자 및/또는 단백질 발현의 감소를 모니터링하기 위한 조직 물질로서 기능한다.

[0168] 일부 실시형태에서, RNAi 작제물 투여 후 생체내 표적 mRNA(예를 들어, SCAP mRNA)의 RISC 매개 절단의 검증은 당업계에 알려진 프로토콜의 5'-RACE 또는 변형을 수행함으로써 평가될 수 있다(Lasham A et al., (2010) Nucleic Acid Res., 38 (3) p-e19; 및 Zimmermann et al. (2006) Nature 441: 111-4).

[0169] 본 명세서에 개시된 모든 리보핵산 서열은 서열에서 우라실 염기를 티민 염기로 치환함으로써 테옥시리보핵산 서열로 전환될 수 있는 것으로 이해된다. 마찬가지로, 본 명세서에 개시된 모든 테옥시리보핵산 서열은 서열 내의 티민 염기를 우라실 염기로 치환함으로써 리보핵산 서열로 전환될 수 있다. 테옥시리보핵산 서열, 리보핵산 서열, 및 본 명세서에 개시된 모든 서열의 테옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드의 혼합물을 함유하는 서열이 본 개시내용에 포함된다.

[0170] 추가로, 본 명세서에 개시된 임의의 핵산 서열은 화학적 변형의 임의의 조합으로 변형될 수 있다. 당업자는 변형된 폴리뉴클레오타이드를 기재하기 위한 "RNA" 또는 "DNA"와 같은 명칭이 특정 경우 임의적이라는 것을 쉽게 이해할 것이다. 예를 들어, 리보스 당 위에 2'-OH 치환기를 갖는 뉴클레오타이드 및 티민 염기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 변형된 당(DNA의 천연 2'-H에 대해 2'-OH)을 갖는 DNA 분자로서 또는 변형된 염기(RNA의 천연 우라실을 위한 티민(메틸화된 우라실))를 갖는 RNA 분자로서 기재될 수 있다.

[0171] 따라서, 서열 목록에 기재된 것들을 포함하지만 이로 제한되지 않는 본 명세서에 제공된 핵산 서열은 변형된 핵염기를 갖는 이러한 핵산을 포함하지만 이로 제한되지 않는 천연 또는 변형된 RNA 및/또는 DNA의 임의의 조합을 함유하는 핵산을 포함하는 것으로 의도된다. 추가의 예로서 비제한적으로, 서열 "ATCGATCG"를 갖는 폴리뉴클레오타이드는 변형 또는 비변형이든 간에, RNA 염기를 포함하는 상기 화합물, 예컨대, 서열 "AUCGAUCG"을 갖는 화합물 및 일부 DNA 염기 및 일부 RNA 염기 예컨대, "AUCGATCG"를 갖는 화합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 상기 서열을 갖는 임의의 폴리뉴클레오타이드 및 다른 변형된 염기, 예컨대, "ATmeCGAUCG"를 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하며, 여기서 meC는 5-위치에 메틸 기를 포함하는 시토신 염기를 나타낸다.

[0172] 수행된 실험 및 달성된 결과를 포함하는 하기 실시예는 단지 예시적 목적을 위해 제공되며 첨부되는 청구범위의 범주를 제한하는 것으로 간주되어서는 안 된다.

[0173] 실시예

[0174] 본 명세서에 기재된 모든 동물 실험은 Amgen의 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)에 의해 승인되었고, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Edition(National Research Council (U.S.)), Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research (U.S.), 및 National Academies Press (U.S.) (2011) Guide for the care and use of laboratory animals. 8th Ed., National Academies Press, Washington, D.C.에 따라 관리되었다. 12시간의 조명과 12시간의 암흑 주기(0600-1800 시간)로, 22±2℃에서 에어컨이 있는 방에 마우스를 단독 수용하였다. 달리 지시하지 않는 한 동물들은 정기적인 차우 식이(Envigo, 2920X 또는 달리 언급된 식이) 및 자동 급수 시스템을 통한 물(역삼투-정제됨)에 자유롭게 접근할 수 있었다. 종료 후, 심부 마취하에 심장 천자에 의해 혈액을 수집한 다음, 실험동물 관리평가 인증협회(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC) 가이드라인에 따라, 2차 물리적 방법으로 안락사시켰다.

[0175] **실시예 1: 변형된 SCAP siRNA 분자의 선택, 설계 및 합성**

[0176] SREBP 절단 활성화 단백질(SCAP)을 표적화하는 치료적 siRNA 분자에 대한 최적의 서열의 확인 및 선택은 인간 SCAP 전사체의 생물정보학 분석을 사용하여 확인하였다. siRNA 트리거는 센스(패신저) 및 안티센스(가이드) 가닥으로 구성된 화학적으로 변형된 siRNA 이중체로서 준비하였다. 두 가닥 모두 18~23개 뉴클레오타이드 길이이고 2개 염기쌍 3' 오버행이 있다. siRNA는 각각의 뉴클레오타이드의 리보스의 천연 2'-OH가 2'-OMe 또는 2'-F 기로 치환되고 두 가닥의 각각의 말단의 2개의 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결부가 엑소뉴클레아제에 의한 분해를 줄이기 위해 포스포로티오에이트로 치환되도록 변형되었다. 생성된 변형되지 않은 안티센스 및 센스

siRNA 서열과 변형된 안티센스 및 센스 siRNA 서열은 표 1에 제시되어 있다.

[0177]

표 1 및 본 출원의 다른 부분의 뉴클레오타이드 서열은 하기 표기법에 따라 열거된다: A, U, G, 및 C = 상응하는 리보뉴클레오타이드; dT = 데옥시티미딘; dA = 데옥시아데노신; dC = 데옥시시티딘; dG = 데옥시구아노신; invAb = 역전된 무염기성; invDT = 역전된 데옥시티미딘; invDA = 역전된 데옥시아데노신; invDC = 역전된 데옥시시티딘; invDG = 역전된 데옥시구아노신; a, u, g, 및 c = 상응하는 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드; Af, Uf, Gf, 및 Cf = 상응하는 2'-데옥시-2'-플루오로("2'-플루오로") 리보뉴클레오타이드; Ab = 무염기성; invAb = 역전된 무염기성; MeO-I = 2' 메톡시 이노신; GNA = 글리콜 핵산; sGNA = 3' 포스포로티오에이트가 있는 글리콜 핵산; LNA = 잠긴 핵산. 서열에서 "s"의 삽입은 2개의 인접한 뉴클레오타이드가 포스포로티오디에스테르기에 의해 연결됨(예를 들어, 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결부)을 나타낸다. 달리 지시되지 않는 한, 다른 모든 뉴클레오타이드는 3'-5' 포스포디에스테르기에 의해 연결된다.

표 1

SCAP에 관한 변형되지 않은 siRNA 및 변형된 siRNA 서열

이종체 번호	센스 (5'-3') 변형됨	서열번호 (센스-변형됨)	센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (센스-변형되지 않음)	안타센스 (5'-3') 변형됨	서열번호 (안타센스-변형됨)	안타센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (안타센스-변형되지 않음)
1	ggaccuGfuGfGfAfAfuacacscs[invAb]	1	ggaccuGfuGfGfAfAfuacacscs	295	usGfsgugaAfuaccAfcAfguccsusu	148	ugguGaaauuccacagucccuu	442
2	ggaccuGfuGfGfAfAfuacacscs[invAb]	2	ggaccuGfuGfGfAfAfuacacscs	296	usGfsgUfgAfAfuaccAfcAfguccsusu	149	ugguGaaauuccacagucccuu	443
3	ggacCfuGfUfGfGfauuacacscs[invAb]	3	ggaccuGfuGfGfAfAfuacacscs	297	usGfsgugaAfuaccAfcAfguccsusu	150	ugguGaaauuccacagucccuu	444
4	ggacCfuGfUfGfGfauuacacscs[invAb]	4	ggaccuGfuGfGfAfAfuacacscs	298	usGfsgugaAfuaccAfcAfguccsusu	151	ugguGaaauuccacagucccuu	445
5	ggaccuGfuGfGfAfAfuacacscs[invAb]	5	ggaccuGfuGfGfAfAfuacacscs	299	usGfsgugaAfuaccAfcAfguccsusu	152	ugguGaaauuccacagucccuu	446
6	ggaccuGfuGfGfAfAfuacacscs[invAb]	6	ggaccuGfuGfGfAfAfuacacscs	300	usGfsgugaAfuaccAfcAfguccsusu	153	ugguGaaauuccacagucccuu	447
7	gcgagaUfuUfCfCfCfcuacscs[invAb]	7	gcgagaUfuUfCfCfCfcuacscs	301	asGfsguagGfggaaAfuUfucgcsusu	154	agguuaggggaanaucuccuu	448
8	gcgagaUfuUfCfCfCfcuacscs[invAb]	8	gcgagaUfuUfCfCfCfcuacscs	302	asGfsgUfaGfGfggaaAfaUfucgcsusu	155	agguuaggggaanaucuccuu	449
9	gcgagaUfuUfCfCfCfcuacscs[invAb]	9	gcgagaUfuUfCfCfCfcuacscs	303	asGfsguagGfggaaAfaUfucgcsusu	156	agguuaggggaanaucuccuu	450
10	gcgagaUfuUfCfCfCfcuacscs[invAb]	10	gcgagaUfuUfCfCfCfcuacscs	304	asGfsguaggggaaAfaUfucgcsusu	157	agguuaggggaanaucuccuu	451
11	gcgagaUfuUfCfCfCfcuacscs[invAb]	11	gcgagaUfuUfCfCfCfcuacscs	305	asGfsguagGfggaaAfaUfucgcsusu	158	agguuaggggaanaucuccuu	452
12	gcgagaUfuUfCfCfCfcuacscs[invAb]	12	gcgagaUfuUfCfCfCfcuacscs	306	asGfsguagGfggaaAfaUfucgcsusu	159	agguuaggggaanaucuccuu	453

[0178]

이종체 번호	센스 (5'-3') 변형됨	서열번호 (센스-변형됨)	센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (센스-변형되지 않음)	안타센스 (5'-3') 변형됨	서열번호 (안타센스-변형됨)	안타센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (안타센스-변형되지 않음)
13	ccugucCfuUfUfGfAfcauucsgs[invAb]	13	ccuguccauugaauucg	307	asCfsgaanGfucaaUfgGfacaaggsusu	160	acgaauugucaaugacagguu	454
14	ccugucCfuUfUfGfAfcauucsgs[invAb]	14	ccuguccauugaauucg	308	asCfsgAfaUfGfucaaUfgGfacaaggsusu	161	acgaauugucaaugacagguu	455
15	ccugUfcCfaUfUfGfAcauucsgs[invAb]	15	ccuguccauugaauucg	309	asCfsgaanGfucaangGfaCfaggsusu	162	acgaauugucaaugacagguu	456
16	ccugUfcCfaUfUfGfAcauucsgs[invAb]	16	ccuguccauugaauucg	310	asCfsgaanGfucaaUfgGfaCfaggsusu	163	acgaauugucaaugacagguu	457
17	ccugucCfuUfUfGfAfcauucsgs[invAb]	17	ccuguccauugaauucg	311	asCfsgaanGfucaaUfgGfacaaggsusu	164	acgaauugucaaugacagguu	458
18	ccugucCfuUfUfGfAfcauucsgs[invAb]	18	ccuguccauugaauucg	312	asCfsgaanGfucaaUfgGfacaaggsusu	165	acgaauugucaaugacagguu	459
19	guccauUfgAfCfAfUfUfgccsgs[invAb]	19	guccauugacauucg	313	asCfsggagAfauguCfaAfuagacgsusu	166	acggcgaaugucaauggacuu	460
20	guccauUfgAfCfAfUfUfgccsgs[invAb]	20	guccauugacauucg	314	asCfsggagAfauguCfaAfuagacgsusu	167	acggcgaaugucaauggacuu	461
21	guccauUfgAfCfAfUfUfgccsgs[invAb]	21	guccauugacauucg	315	asCfsggagAfauguCfaAfuagacgsusu	168	acggcgaaugucaauggacuu	462
22	guccauUfgAfCfAfUfUfgccsgs[invAb]	22	guccauugacauucg	316	asCfsggagAfauguCfaAfuagacgsusu	169	acggcgaaugucaauggacuu	463
23	guccauUfgAfCfAfUfUfgccsgs[invAb]	23	guccauugacauucg	317	asCfsggagAfauguCfaAfuagacgsusu	170	acggcgaaugucaauggacuu	464
24	guccauUfgAfCfAfUfUfgccsgs[invAb]	24	guccauugacauucg	318	asCfsggagAfauguCfaAfuagacgsusu	171	acggcgaaugucaauggacuu	465
25	guccauUfgAfCfAfUfUfgccsgs[invAb]	25	guccauugacauucg	319	asCfsggagAfauguCfaAfuagacgsusu	172	acggcgaaugucaauggacuu	466

[0179]

이종체 번호	센스 (5'-3') 변형 필	서열번호 (센스- 변형 필)	센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (센스- 변형되지 않음)	안티센스 (5'-3') 변형 필	서열번호 (안티센스- 변형 필)	안티센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (안티센스- 변형되지 않음)
26	ggaaagAfgCfCfGfAfigua ucsus[invAb]	26	ggaaagagccga gnaucua	320	asAfigAfuAfcfucgg CfuCfuaucsusua	173	agaaactucgg cucuaucua	467
27	ggaaAfgAfgCfCfGfAfigua uc[invAb]	27	ggaaagagccga gnaucua	321	asAfigaauacucggCfuC fuUfucsusua	174	agaaactucgg cucuaucua	468
28	ggaaagAfgCfCfGfAfigua ucuas[invAb]	28	ggaaagagccga gnaucua	322	asAfigaauCfucggCfu Cfuaucsusua	175	agaaactucgg cucuaucua	469
29	ggaaagAfgCfCfGfAfigua ucus[invAb]	29	ggaaagagccga gnaucua	323	asAfigaauCfucggCfu Cfuaucsc	176	agaaactucgg cucuaucua	470
30	ggaaAfgAfgCfCfGfAfigua ucus[invAb]	30	ggaaagagccga gnaucua	324	asAfigaauCfucggcuC fuUfucsusua	177	agaaactucgg cucuaucua	471
31	aaagagCfCfGfAfgUfuauc ucsc[invAb]	31	aaagagccga gnaucua	325	asGfaagaUfuaucGfg Cfuaucsusua	178	agaaactuc gcuucua	472
32	ggaaagagCfCfGfAfgUfua ucuas[invAb]	32	ggaaagagccga gnaucua	326	asGfaagaUfuaucGfg Cfuaucsusua	179	agaaactuc gcuucua	473
33	ggaaagAfgCfCfGfAfigua ucuas[invAb]	33	ggaaagagccga gnaucua	327	asGfaagaUfuaucggC fuCfuaucsusua	180	agaaactuc gcuucua	474
34	ggaaagagCfCfGfAfgUfua ucuas[invAb]	34	ggaaagagccga gnaucua	328	asGfaagaUfuaucGfg Cfuaucsc	181	agaaactuc gcuucua	475
35	ggaaagAfgCfCfGfAfiguauc ucus[invAb]	35	ggaaagagccga gnaucua	329	asGfaagaauacucGfgC fuCfuaucsusua	182	agaaactuc gcuucua	476
36	aaagagCfCfGfAfgUfuauc ucuas[invAb]	36	aaagagccga gnaucua	330	asGfaagaUfuaucGfg Cfuaucsc	183	agaaactuc gcuucua	477
37	gcggcgAfgAfuUfUfucc ccus[invAb]	37	gcggcgagaauc uucccu	331	usAfgggcgAfaaaucCfu Cfucggcusua	184	uaagggaau cucggcuu	478
38	gcggcgAfuUfUfUfUfUfccc uascs[invAb]	38	gcggcgagaauc ccuac	332	asGfaaggGfgaaaAfu Cfucggcusua	185	agaaagggaau cucggcuu	479

이종체 번호	센스 (5'-3') 변형 필	서열번호 (센스- 변형 필)	센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (센스- 변형되지 않음)	안티센스 (5'-3') 변형 필	서열번호 (안티센스- 변형 필)	안티센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (안티센스- 변형되지 않음)
39	aaagaaUfcUfCfGfGfgcc ucscs[invAb]	39	aaagaaucucgg gcuuc	333	asGfaaggCfcccgaGfa Ufuaucsusua	186	agaaaggccga gaaucua	480
40	cgggcccUfuCfUfAfcfuauc casus[invAb]	40	cgggcccuaucua aacua	334	asAfgagguUfgaagAfa Gfgcccgusua	187	aaaggguuag aaaggccuu	481
41	cugcagUfuUfAfgGfAfggg acscs[invAb]	41	cugcaguuaga gggaac	335	asGfggcccCfuaucAfa Cfuaucsusua	188	agggcccua aacugcaguu	482
42	acggggAfcCfUfGfUfuauc agss[invAb]	42	acggggacug uacaga	336	asUfcuguaUfuaucGfu Cfcccgsusua	189	auucguaacag gucccguu	483
43	cgggcuAfaCfGfGfUfucc cus[invAb]	43	cgggcuacgg uuccuu	337	asAfgaggAfaaccUfu Gfgccgsusua	190	aaagggaaccg uuagaccuu	484
44	uguaucGfaCfUfGfGfag ccscs[invAb]	44	uguaucgacug cagccc	338	asCfaggcuGfcccagUfc Afgaacusua	191	acggcugccag uacuaucua	485
45	cccugCfaGfUfUfUfaga gsgs[invAb]	45	cccugcaguu aggaag	339	usCfcccucUfuaucUfg Cfaggcgusua	192	ucccuaaacu gcaggguu	486
46	uguaucAfuGfAfcAfuuc gcscs[invAb]	46	uguaucagaca uucccc	340	asGfggcuAfuugucAfa Ufgaacusua	193	agggcgauguc aaugacua	487
47	ggcuggCfaCfCfGfUfugu cusgs[invAb]	47	ggcuggcacgu ugucug	341	asCfagagAfaaccUfg Cfagccusua	194	acagacacag gcccaguu	488
48	ggcucaAfcGfGfUfUfccc ucscs[invAb]	48	ggcucaacgg cccuug	342	usCfaaggGfuaacGfu Ufgaacusua	195	ucaaagggaac guuagccuu	489
49	gcuaacCfGfUfUfUfUfUfccc ugss[invAb]	49	gcuaacgguc ccuuga	343	asUfcaagGfuaacCfG Ufuaucsusua	196	aucaagggaac guuagccuu	490
50	caacggUfuCfCfCfUfuga ucsus[invAb]	50	caacgguuccu ugauuu	344	asAfaaacAfggggAfa Cfugugusua	197	aaaaacaggga accguuua	491
51	acgguuCfCfUfUfUfUfUfccc ucsus[invAb]	51	acgguuccuug auuacu	345	asAfgaaauUfcaagGfg Afaaccusua	198	aaaaaucaagg gaaccguu	492
52	guagggaUfgUfAfcUfUfgac ugsgs[invAb]	52	guagggaugacu gacugg	346	asCfagcuCfuaucCfa Ufcccacsusua	199	accagucaguc aucccacuu	493

이종체 번호	센스 (5'-3') 변형됨	서열번호 (센스- 변형됨)	센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (센스- 변형되지 않음)	안티센스 (5'-3') 변형됨	서열번호 (안티센스- 변형됨)	안티센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (안티센스- 변형되지 않음)
53	cugaaaCfuCfCfCfCfuug ccsas[invAb]	53	cugaaacucuccu ugeca	347	asUfnggaAfngggAf Ufuucagusu	200	anngcaagggg agruucagru	494
54	ganccuGfaCEAfUfCfaa gsgsg[invAb]	54	ganccugacac auuggg	348	usCfscacAfngaugUf Afngacusu	201	ucccaaugaug ucaggaucuu	495
55	ugguccAfcGfUfGfCfacu ucas[invAb]	55	ugguccacgugc acumca	349	usUfnggaUfgcacGfu Gfgaccasusu	202	uuagaugcac guggaacuu	496
56	guggaCfuUfGfAfCfge aasas[invAb]	56	guggaacugac cgcaaa	350	asUfauugGfgucaGfa Gfuccasusu	203	auuugcgugca gagucacuu	497
57	ggaggaGfaUfGfGfugu cgcs[invAb]	57	ggaggaugaug ugucgc	351	asGfngacAfcaaaUf Ufucuasusu	204	agcgacacaa cuucucu	498
58	agugauUfCfCfUfGfca casas[invAb]	58	agugauucug gcacaa	352	asUfauugCfnggGfa Afaccuasusu	205	auugcgagg gaacacuu	499
59	ggagauUfGfUfGfUfge ugsa[invAb]	59	ggagauugugu cgcuca	353	asUfngacGfacacCfa Afucuasusu	206	auccggacac aaucucu	500
60	ucgcuGfGfCfUfCfAfuc ccsc[invAb]	60	ucgcuagcuca uccccc	354	asGfngggAfngagCfu Cfnggagusu	207	agggggagag cuacgcu	501
61	uguccGfGfCfAfUfuc aascs[invAb]	61	uguccgggcu uccaac	355	asGfauugAfngacCf Gfgacacusu	208	aguuagaaug ccgggacuu	502
62	ggagauCfuUfCfUfCfu ucas[invAb]	62	ggagauucugu cuuugc	356	asGfcaaaGfngacAf Afucuasusu	209	agcaagagaca gaucucu	503
63	gagauAAfCfUfGfGfgg ccsus[invAb]	63	gagauaacug ggccuu	357	asAfnggcCfngagGfu Ufucuasusu	210	aaagcccccag uuucucu	504
64	acaccaUfCfGfGfUfngc agcs[invAb]	64	acaccaucag gcagc	358	asGfngacAfngcuGfa Ufnguasusu	211	agcgcaacgu gauguguu	505
65	cggcuCfuUfCfAfCfCu agau[invAb]	65	cggcuacuc ccuagu	359	asAfngcuGfgugaAf Ufngccgusu	212	aacuaagguga agaaagcu	506
66	cauugaCfCfAfGfAfCfau ggsus[invAb]	66	cauugaccagac auugu	360	asAfccauGfgucGfg Ufcaugusu	213	aacauugcu ggucaaugu	507

이종체 번호	센스 (5'-3') 변형됨	서열번호 (센스- 변형됨)	센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (센스- 변형되지 않음)	안티센스 (5'-3') 변형됨	서열번호 (안티센스- 변형됨)	안티센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (안티센스- 변형되지 않음)
67	aggagaUfUGfUfGfuc cusgs[invAb]	67	aggagauug ucgcu	361	usCfngacAfaccAf Ufucuasusu	214	ucagcgacaca auucucu	508
68	ccgcuUfCfCfUfCfuc gsgsg[invAb]	68	ccgcuucac uucggg	362	asCfngcaAfngggGfa Afngcgusu	215	accgaaggg gaagcgcu	509
69	auugaGfGfGfUfGfng ugcs[invAb]	69	auugaagg cugugc	363	asGfscacGfaccCf Ufcauasusu	216	agcacagaccc cucauuu	510
70	ccugguCfGfUfGfCfa ucas[invAb]	70	ccugguacgu gcacuca	364	usUfnggaUfgcacGfu Gfgaccgusu	217	uuagaugcac guggaccaugu	511
71	ccugguCfCfAfGfUfgea ucas[invAb]	71	ccugguacgu gcacuca	365	usUfnggaUfgcacGfu Afngcagusu	218	uuagaugcac guggaccaugu	512
72	ugguccAfcGfUfGfCfacu ucas[invAb]	72	ugguccacgugc acumca	366	usUfnggaUfgcacGfu Gfgaccgsg	219	uuagaugcac guggaccagg	513
73	ccugguCfGfUfGfCfa ucas[invAb]	73	ccugguacgu gcacuca	367	usUfnggaUfgcacGfu Gfgaccgsg	220	uuagaugcac guggaccagg	514
74	ccugguCfCfAfGfngacu ucas[invAb]	74	ccugguacgu gcacuca	368	usUfnggaugcacGfuG fgAfngcagusu	221	uuagaugcac guggaccaugu	515
75	ggagauUfGfUfGfUfge ugas[invAb]	75	ggagauuggu cgcuca	369	asUfscAfCfGfcaacC faAfucuasusu	222	aucaagcacac aaucucu	516
76	acaccaUfCfGfGfUfngc agcs[invAb]	76	acaccaucag gcagc	370	asGfscUfGfCfAfngG faUfnguasusu	223	agcucaacgu gauguguu	517
77	ggagAfuUfGfGfUfngc ugas[invAb]	77	ggagauuggu cgcuca	371	asUfscagGfcaaccaAf uCfucuasusu	224	aucaagcacac aaucucu	518
78	acacCfuUfCfAfCfnguc agcs[invAb]	78	acaccaucag gcagc	372	asGfngcAfngcuGfa Ufnguasusu	225	agcucaacgu gauguguu	519
79	ggagAfuUfGfGfngucg as[invAb]	79	ggagauuggu cgcuca	373	asUfscagcacacCfaAf uCfucuasusu	226	aucaagcacac aaucucu	520

이종제 번호	센스 (5'-3') 변형필	서열번호 (센스- 변형필)	센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (센스- 변형되지 않음)	안티센스 (5'-3') 변형필	서열번호 (안티센스- 변형필)	안티센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (안티센스- 변형되지 않음)
80	acacCfaUfcAfcgungage s[invAb]	80	acaccauacggu gcagc	374	asGfscugcaacguGfaU fgGfugusuu	227	agcuugcaacgu gauugguuuu	521
81	ggagauUfgGfUGfUfge ugas[invAb]	81	ggagauugguu cgcuga	375	asUfscageGfacacCfa Afuuucsc	228	auucagcgacac aauucucc	522
82	acaccaUfcAfcGfUfuge ages[invAb]	82	acaccauacggu gcagc	376	asGfscugeAfaagguGfa Ufgguuguu	229	agcuugcaacgu gauugguuu	523
83	ggagauUfgGfUGfUfge ugauus[invAb]	83	ggagauugguu cgcugauu	377	asUfscageGfacacCfa Afuuucsuu	230	auucagcgacac aauucuccu	524
84	acaccaUfcAfcGfUfuge agcuus[invAb]	84	acaccauacggu gcagcuu	378	asGfscugeAfaagguGfa Ufgguuguuu	231	agcuugcaacgu gauugguuuu	525
85	ucgcuGAfcCfUfCEAfucc cces[invAb]	85	ucgcuagagcuca uucccc	379	asGfsgGfgGfAfuagag CfuCfaagcasuu	232	aggggggagag cucagcgauu	526
86	ucgcUfgAfcGfUfcaucc cces[invAb]	86	ucgcuagagcuca uucccc	380	asGfsggggAfuagagcuC faGfcgcasuu	233	aggggggagag cucagcgauu	527
87	ucgcUfgAfcGfUfcaucccc s[invAb]	87	ucgcuagagcuca uucccc	381	asGfsggggagagCfuC faGfcgcasuu	234	aggggggagag cucagcgauu	528
88	ucgcuGAfcCfUfCEAfucc cccuus[invAb]	88	ucgcuagagcuca uuccccuu	382	asGfsggggAfuagagCfu Cfaagcasuu	235	aggggggagag cucagcgauu	529
89	ucgcuGAfcCfUfCEAfucc cces[invAb]	89	ucgcuagagcuca uucccc	383	asGfsggggAfuagagCfu Cfaagcasuu	236	aggggggagag cucagcgau	530
90	ggcucaAfcGfUGfUfccc uusgs[invAb]	90	ggcucaacggguu cccuug	384	usCfisaAfcGfGfaaccG fuUfgagccuuu	237	ucaagggaacc guuagccuu	531
91	ggcuCfaAfcGfGfUfccc uusgs[invAb]	91	ggcucaacggguu cccuug	385	usCfisaaggGfaaccguU fgAfcgcsuu	238	ucaagggaacc guuagccuu	532
92	ggcuCfaAfcGfUfUfccc uusgs[invAb]	92	ggcucaacggguu cccuug	386	usCfisaagggaaccGfuU fgAfcgcsuu	239	ucaagggaacc guuagccuu	533
93	ggcucaAfcGfUGfUfccc ungaus[invAb]	93	ggcucaacggguu cccuugau	387	usCfisaaggGfaaccGfu Ufgagccuuu	240	ucaagggaacc guuagccuu	534

이종제 번호	센스 (5'-3') 변형필	서열번호 (센스- 변형필)	센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (센스- 변형되지 않음)	안티센스 (5'-3') 변형필	서열번호 (안티센스- 변형필)	안티센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (안티센스- 변형되지 않음)
94	ggcucaAfcGfUGfUfccc uusgs[invAb]	94	ggcucaacggguu cccuug	388	usCfisaaggGfaaccGfu Ufgagccuu	241	ucaagggaacc guuagccuu	535
95	ggcgagAfuUfUfUfCfc cuuacs[invAb]	95	ggcgagagauu uucccuac	389	asGfuuaggGfgaaaAfu Cfucgccgsuu	242	aguaaggga auucgccgcu u	536
96	ggcucaaCfGfUfUfCfc cuugas[invAb]	96	ggcucaacgggu uuccuuga	390	asUfscaggGfgaacCfu Ufuggccgsuu	243	aucaagggaacc guuagccguu	537
97	ggcgagAfuUfUfUfUfCfc cuuacs[invAb]	97	ggcgagagauu uucccuac	391	asGfuuaggGfgaaaauC fuCfugccgsuu	244	aguaaggga auucgccgcu u	538
98	ggcucaAfaCfGfUfUfCfc cuugas[invAb]	98	ggcucaacgggu uuccuuga	392	asUfscaggGfgaacCfu fuGfagccgsuu	245	aucaagggaacc guuagccguu	539
99	ggcgagAfuUfUfUfUfCfc uacs[invAb]	99	ggcgagagauu uucccuac	393	asGfuuagggaauAfuC fuCfugccgsuu	246	aguaaggga auucgccgcu u	540
100	ggcucaAfaCfGfUfUfCfc cuugas[invAb]	100	ggcucaacgggu uuccuuga	394	asUfscagggaaccCfuU fuGfagccgsuu	247	aucaagggaacc guuagccguu	541
101	ggcgagAfuUfUfUfCfc uacuuus[invAb]	101	ggcgagauuuc ccuacuu	395	asGfuuaggGfgaaaAfu Cfucgccgsc	248	aguaaggga auucgccgc	542
102	ggcucaaCfGfUfUfCfcu ugauus[invAb]	102	ggcucaacgggu ccuugauu	396	asUfscaggGfgaacCfu Ufuggccgscg	249	aucaagggaacc guuagccg	543
103	ggcgagAfuUfUfUfCfc ccuacs[invAb]	103	ggcgagagauu uucccuac	397	asGfuuaggGfgaaaAfu Cfucgccgsc	250	aguaaggga auucgccgc	544
104	ggcucaaCfGfUfUfCfc cuugas[invAb]	104	ggcucaacgggu uuccuuga	398	asUfscaggGfgaacCfu Ufuggccgscg	251	aucaagggaacc guuagccg	545
105	agaaganaUfcUfCfGfGfg ccuacs[invAb]	105	agaaganauc ggcccuuc	399	asGfisaaggCfcccgaGfa Ufuuuuuuuu	252	agaaggccgga gaaauuuuu	546

이종체 번호	센스 (5'-3') 변형됨	서열번호 (센스- 변형됨)	센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (센스- 변형되지 않음)	안티센스 (5'-3') 변형됨	서열번호 (안티센스- 변형됨)	안티센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (안티센스- 변형되지 않음)
106	agaagaaUfcUfCfGfGfg ccuucs[inv.Ab]	106	agaagaaUfcUfCfGfGfg ccuucs[inv.Ab]	400	asGfsaaggCfccgaGfa Ufauucususuu	253	agaaggcccgga gaauucucuuu u	547
107	agaagaUfaUfCfUfCfGfg ccuucs[inv.Ab]	107	agaagaaUfcUfCfGfGfg ccuucs[inv.Ab]	401	asGfsaaggCfccgagaU faUfcuucususuu	254	agaaggcccgga gaauucucuuu u	548
108	agaagaUfaUfUfGfgGfg ccuucs[inv.Ab]	108	agaagaaUfcUfCfGfGfg ccuucs[inv.Ab]	402	asGfsaaggcccggaGfaU faUfcuucususuu	255	agaaggcccgga gaauucucuuu u	549
109	agaagaUfcUfCfGfGfgGfg ccuucs[inv.Ab]	109	agaagaaUfcUfCfGfGfg ccuucs[inv.Ab]	403	asGfsaaggCfccgaGfa Ufauucususuu	256	agaaggcccgga gaauucucuuu u	550
110	ccuggnccAfcGfUfGfCfa cuucas[inv.Ab]	110	ccuggnccAfcGfUfGfCfa cuucas[inv.Ab]	404	usUfsgaagUfgcacGf GfAfcaggsusu	257	uugaagugcac guggaccagg u	551
111	gcggcgagAfuUfUfUfCfc ccuacs[inv.Ab]	111	gcggcgagAfuUfUfUfCfc ccuacs[inv.Ab]	405	asGfsuaggGfgaaaaC fuCfGccgcsusu	258	aguaaggga auucgccc u	552
112	cggcucacCfGfUfUfCfc cuucas[inv.Ab]	112	cggcucacCfGfUfUfCfc cuucas[inv.Ab]	406	asUfscagGfgaacGf fuGfagccgsusu	259	aucaagggaac gugagccg u	553
113	agaagaaUfcUfCfGfGfg ccuucs[inv.Ab]	113	agaagaaUfcUfCfGfGfg ccuucs[inv.Ab]	407	asGfsaaggCfccgagaU faUfcuucususuu	260	agaaggcccgga gaauucucuuu u	554
114	ccuggnccAfcGfUfGfCfa cuucas[inv.Ab]	114	ccuggnccAfcGfUfGfCfa cuucas[inv.Ab]	408	usUfsgaagUfgcacGf GfAfcaggsusu	261	uugaagugcac guggaccagg u	555
115	gcggcgagAfuUfUfUfCfc ccuacs[inv.Ab]	115	gcggcgagAfuUfUfUfCfc ccuacs[inv.Ab]	409	asGfsuaggGfgaaaAfu CfuCfGccgsusu	262	aguaaggga auucgccc u	556

이종체 번호	센스 (5'-3') 변형됨	서열번호 (센스- 변형됨)	센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (센스- 변형되지 않음)	안티센스 (5'-3') 변형됨	서열번호 (안티센스- 변형됨)	안티센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (안티센스- 변형되지 않음)
116	cggcucacCfGfUfUfCfc cuucas[inv.Ab]	116	cggcucacCfGfUfUfCfc cuucas[inv.Ab]	410	asUfscagGfgaacCf UfuGfagccgsusu	263	aucaagggaac gugagccg u	557
117	agaagaaUfcUfCfGfGfg ccuucs[inv.Ab]	117	agaagaaUfcUfCfGfGfg ccuucs[inv.Ab]	411	asGfsaaggCfccgaGfa UfaUfcuucususuu	264	agaaggcccgga gaauucucuuu u	558
118	ccuggnccAfcGfUfGfCfa cuucas[inv.Ab]	118	ccuggnccAfcGfUfGfCfa cuucas[inv.Ab]	412	usUfsgaagGfUfgcacGf GfAfcaggsusu	265	uugaagugcac guggaccagg u	559
119	gcggcgagAfuUfUfUfCfc ccuacs[inv.Ab]	119	gcggcgagAfuUfUfUfCfc ccuacs[inv.Ab]	413	asGfsuaggGfgaaaaC fuCfGccgcsusu	266	aguaaggga auucgccc u	560
120	cggcucacCfGfUfUfCfc cuucas[inv.Ab]	120	cggcucacCfGfUfUfCfc cuucas[inv.Ab]	414	asUfscagGfgaacGf UfuGfagccgsusu	267	aucaagggaac gugagccg u	561
121	agaagaUfaUfUfCfGfg ccuucs[inv.Ab]	121	agaagaaUfcUfCfGfGfg ccuucs[inv.Ab]	415	asGfsaaggCfccgagaU faUfcuucususuu	268	agaaggcccgga gaauucucuuu u	562
122	ggagaaUfgGfUfGfUfGfg cuucas[inv.Ab]	122	ggagaaUfgGfUfGfUfGfg cuucas[inv.Ab]	416	asUfscagGfgaacCf UfuGfagccgsusu	269	aucaagggaac gugagccg u	563
123	uugcugAfcCfUfCfAface cccs[inv.Ab]	123	uugcugAfcCfUfCfAface cccs[inv.Ab]	417	asGfsgggAfuagcuC faGfcggsusu	270	agggggagag cucagcgauu	564
124	acaccaUfcAfcRGfUfGc ages[inv.Ab]	124	acaccaUfcAfcRGfUfGc ages[inv.Ab]	418	asGfscagAfcagugaU fgGfuggsusu	271	agcugcaacg gaugaguuu	565
125	ggcucacAfcGfGfUfUfCfc cuucas[inv.Ab]	125	ggcucacAfcGfGfUfUfCfc cuucas[inv.Ab]	419	usCfsgaaggGfgaacGf UfuGfagccgsusu	272	ucaaagggaac gugagccg u	566
126	ggagaaUfgGfUfGfUfGfg cuucas[inv.Ab]	126	ggagaaUfgGfUfGfUfGfg cuucas[inv.Ab]	420	asUfscagGfgaacCf AfuCfucgsusu	273	aucaagggaac gugagccg u	567
127	ggagAfuUfgGfugcug as[inv.Ab]	127	ggagAfuUfgGfugcug as[inv.Ab]	421	asUfscagRGfagacca AfuCfucgsusu	274	aucaagggaac gugagccg u	568

이중체 번호	센스 (5'-3') 변형됨	서열번호 (센스- 변형됨)	센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (센스- 변형되지 않음)	안티센스 (5'-3') 변형됨	서열번호 (안티센스- 변형됨)	안티센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (안티센스- 변형되지 않음)
128	ucgcugAfgCfUfCfAfucc cccs[invAb]	128	ucgcugagcucua uccccc	422	asGfsggggAfuagagCfu CfaGfcgaasuu	275	aggggggaagga cacagcgcauu	569
129	ucgcUfgAfgCfuaucucccc sf[invAb]	129	ucgcugagcucua uccccc	423	asGfsgggGfAfuagagcu CfaGfcgaasuu	276	aggggggaagga cacagcgcauu	570
130	acaccaUfcAfCfGfUfugc agcs[invAb]	130	acaccaucacguu gcagcc	424	asGfscugcAfuagcuGfa UfgGfugusuu	277	agcugcaacgu gauguguuuu	571
131	acacCfaUfcAfCguugcagc sf[invAb]	131	acaccaucacguu gcagcc	425	asGfscugCfAfuagcuGfa UfgGfugusuu	278	agcugcaacgu gauguguuuu	572
132	ggcuccAfcGfGfUfucc uugs[invAb]	132	ggcuccaagcguu cccuug	426	usCfisaaggGfuaaccGfu UfgAfcccsuu	279	ucaagggaacc guuagaccuu	573
133	ggcucCfaAfcGfugucccuu gs[invAb]	133	ggcuccaagcguu cccuug	427	usCfisaaggGfuaaccgu UfgAfcccsuu	280	ucaagggaacc guuagaccuu	574
134	ucgcugAfgCfUfCfAfucc cccs[invAb]	134	ucgcugagcucua uccccc	428	asGfsgGfgGfAfuagag CfuCfagcsaa	281	aggggggaagga cacagcgca	575
135	ucgcugAfgCfUfCfAfucc cccs[invAb]	135	ucgcugagcucua uccccc	429	asGfsgGfgGfAfuagagc uCfuGfcgaasuu	282	aggggggaagga cacagcgcauu	576
136	uggcuCfcAfCfGfUfgaau ucaaus[invAb]	136	uggcuccacgugc acumcauu	430	usUfisaaggUfagcagcuG fgAfcccsag	283	uugaagugcac guugaccagg	577
137	uggcuccAfcGfUfGfCfacu ucaaus[invAb]	137	uggcuccacgugc acumcauu	431	usUfisaaggUfagcagcuG fgAfcccsag	284	uugaagugcac guugaccagg	578
138	uggcuccAfcGfUfGfCfacu ucaaus[invAb]	138	uggcuccacgugc acumcauu	432	usUfisaaggUfagcagcuG fgAfcccsag	285	uugaagugcac guugaccagg	579
139	ggagauUfgGfUfGfUfucc ugauus[invAb]	139	ggagauuugcguu cgcuaguu	433	asUfiscagcGfuaaccaAf uCfuaccsuu	286	aucaagcgacac aauuuccuu	580
140	ggagauUfgGfUfGfUfucc ugauus[invAb]	140	ggagauuugcguu cgcuaguu	434	asUfiscagcGfuaaccaAf AfuCfuaccsuu	287	aucaagcgacac aauuuccuu	581
141	ggagAfuUfGfGfUfugcgc ugauus[invAb]	141	ggagauuugcguu cgcuaguu	435	asUfiscagcGfuaaccaAf uCfuaccsuu	288	aucaagcgacac aauuuccuu	582

이중체 번호	센스 (5'-3') 변형됨	서열번호 (센스- 변형됨)	센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (센스- 변형되지 않음)	안티센스 (5'-3') 변형됨	서열번호 (안티센스- 변형됨)	안티센스 (5'-3') 변형되지 않음	서열번호 (안티센스- 변형되지 않음)
142	acaccaUfcAfCfGfUfugc agcuus[invAb]	142	acaccaucacguu gcagcuu	436	asGfscugcAfuagcuGfa UfgGfugusuu	289	agcugcaacgu gauguguuuu	583
143	acaccaUfcAfCfGfUfugc agcuus[invAb]	143	acaccaucacguu gcagcuu	437	asGfscugcAfuagcuGfa UfgGfugusuu	290	agcugcaacgu gauguguuuu	584
144	ggcucCfaAfcGfGfUfucc uugaus[invAb]	144	ggcuccaagcguu cccuugau	438	usCfisaaggGfuaaccguU fgAfcccsuu	291	ucaagggaacc guuagaccuu	585
145	ggcucCfaAfcGfGfUfucc uugs[invAb]	145	ggcuccaagcguu cccuug	439	usCfisaaggGfuaaccguU fgAfcccsuu	292	ucaagggaacc guuagaccuu	586
146	cggcucAfaCfGfGfUfucc cuugas[invAb]	146	cggcuccaagcguu ucccuuga	440	asUfiscagGfgaaccgU fuGfagccscg	293	aucaaggaacc guuagaccuu	587
147	cggcucAfaCfGfGfUfucc cuugas[invAb]	147	cggcuccaagcguu ucccuuga	441	asUfiscagGfgaaccCf UfuGfagccscg	294	aucaaggaacc guuagaccuu	588

실시예 2: RNA FISH 검정에서 선택된 SCAP siRNA 분자의 효능

실시예 1에서 합성된 siRNA 분자를 리보핵산 분자를 표적화하는 형광 인식추 혼성화 검정(RNA FISH)으로 스크리닝하여 IC₅₀ 및 최대 활성 값을 결정하였다.

RNA FISH 검정을 수행하여 시험 siRNA에 의한 SCAP mRNA 억감을 측정하였다. Hep3B 세포(ATCC에서 구매)를 10% 우태아 혈청(FBS, Sigma) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(P-S, Corning)이 보충된 최소 필수 배지(MEM, Corning)에서 배양하였다. siRNA 형질감염을 하기와 같이 수행하였다: 1 μL의 시험 siRNAs 및 4 μL의 일반 MEM을 BioMek FX(Beckman Coulter)에 의해 PDL-코팅된 CellCarrier-384 Ultra 검정 플레이트(PerkinElmer)에 첨가하였다. 일반 MEM(5 μL EMEM 중의 0.035 μL의 RNAiMAX)에 사전-희석된, 5 μL의 리포펙타민 RNAiMAX(Thermo Fisher Scientific)을 Multidrop Combi 시약 분주기(Thermo Fisher Scientific)에 의해 검정 플레이트에 분주하였다. 실온(RT)에서 siRNA/RNAiMAX 혼합물을 20분 동안 인큐베이션한 후, 10% FBS 및 1% P-S가 보충된 MEM 중의 30 μL의 Hep3B 세포(웰당 2000개 세포)를 Multidrop Combi 시약 분주기를 사용하여 형질감염 복합체에 첨가하고, 검정 플레이트를 RT에서 20분 동안 유지시킨 후 인큐베이터로 이동시켰다. 세포를 37 °C 및 5% CO₂에서 72시간 동안 인큐베이션하였다.

제조사 프로토콜에 따라서 Affymetrix QuantiGene® View RNA HC 스크리닝 검정 키트(QVP0011), Affymetrix View HC Signal Amplification Kit 3-plex(QVP0213) 및 Affymetrix 유전자 특이적 프로브(SCAP Human 0.33 mL View RNA Type 6(650 라벨) VA6-20279-01 및 PPIB Human 0.44 mL View RNA Type 1(488 라벨) VA1-10148-01)을 사용하여 RNA FISH 검정을 수행하였다.

플레이트를 먼저 순차적인 100%, 70% 및 50% 에탄올 세척으로 재수화시켰다. 이어서, 세포를 PBS로 세척한 후,

키트 지침에 따라 투과화 및 프로테아제-소화시켰다. 표적 작업 프로브 세트는 제조사의 프로토콜에 따라 제조하고, 웰에 첨가하고 40℃에서 3시간 동안 배양하였다. 위킹 프로브 세트, 위킹 프리앰프, 위킹 앰프 및 위킹 LP와의 순차적 혼성화를 위해 제조업체의 프로토콜을 따랐다. 마지막으로, 핵 카운터스테인을 적용하였다 (Hoechst 33342 및 세포 마스크 블루; Molecular Probes). 플레이트를 실온에서 30분 동안 인큐베이션하고, PBS로 세척하고, 80 µl의 PBS로 오버레이한 후, 플레이트를 이미징을 위해 밀봉하였다.

[0195] Hoechst 33342용 UV 채널 및 세포 마스크 블루, 타입1 프로브용 488 채널, 및 타입6 프로브에 대한 647 채널을 사용하여 Opera Phenix High Content Screening System(PerkinElmer)에서 모든 플레이트를 영상화하였다.

[0196] 콜럼버스 소프트웨어를 사용하여 RNA FISH 데이터를 분석하고, Genedata를 사용하여 영상을 생성하였다. 영상을 분석하여 세포당 평균 스팟 카운트를 얻었다. 스팟 카운트는 높은(포스페이트 완충 식염수 함유, Corning) 및 낮은(표적 프로브 생략) 대조군 웰을 사용하여 정규화되었다. 총 siRNA 농도에 대한 정규화된 값을 플롯팅하고 데이터를 Genedata Screener(Genedata)의 4-파라미터 시그모이드 모델에 맞추어 IC50 및 최대 활성을 얻었다.

[0197] 검정 결과는 표 2에 제시되어 있다. SCAP 활성은 대조군에 대한 턴다운의 백분율로서 표현된다. 음수 값은 SCAP 수준의 감소를 나타낸다. 몇몇 siRNA 트리거의 추가 시험을 수행하였고, 이의 결과가 표 2의 마지막 열에 제시되어 있다.

표 2

변형된 SCAP siRNA를 사용한 RNA FISH 검정

어중제 번호	센스 (5'-3')	서열번호 (센스)	안티센스 (5'-3')	서열번호 (안티센스)	RNA FISH IC50 IP [nM]	RNA FISH 최대 활성 (%)	RNA FISH 추가 시험 평균 활성 (%)
1	ggaccuGfuGfGfAfAfuaacscs[invAb]	1	usGfsgugaAfuaaccAfAfagguccsusu	148	3.24	-73.7	
2	ggaccuGfuGfGfAfAfuaacscs[invAb]	2	usGfsgUfgAfAfuaaccAfAfagguccsusu	149	1.04	-82.7	
3	ggacCfuGfuGfGfGfaauacacs[invAb]	3	usGfsgugaAfuaaccAfAfagguccsusu	150	1.23	-80.6	
4	ggacCfuGfuGfGfaauacacs[invAb]	4	usGfsgugaauaccAfAfAfagguccsusu	151	1.18	-78.5	
5	ggaccuGfuGfGfAfAfuaacacs[invAb]	5	usGfsgugaAfuaaccAfAfagguccsusu	152	--	-34.6	-64.0
6	ggaccuGfuGfGfAfAfuaacacs[invAb]	6	usGfsgugaAfuaaccAfAfagguccsc	153	6.63	-65.7	-54.9
7	gcgagaUfuUfUfCfCfcuacscs[invAb]	7	asGfsguagGfaggaaAfAfUfcuagcsusu	154	0.916	-68.8	-70.9
8	gcgagaUfuUfUfCfCfcuacscs[invAb]	8	asGfsgUfaGfGfaggaaAfAfUfcuagcsusu	155	1.13	-81.7	
9	gcgaGfaUfuUfUfUfCfcuacscs[invAb]	9	asGfsguagGfaggaaAfAfUfcuagcsusu	156	1.82	-85.0	
10	gcgaGfaUfuUfUfUfCfcuacscs[invAb]	10	asGfsguaggggaaAfAfUfcuagcsusu	157	1.89	-73.0	
11	gcgagaUfuUfUfCfCfcuacscs[invAb]	11	asGfsguagGfaggaaAfAfUfcuagcsusu	158	3.52	-63.9	-57.6
12	gcgagaUfuUfUfCfCfcuacscs[invAb]	12	asGfsguagGfaggaaAfAfUfcuagcsusu	159	7.67	-69.7	-64.8
13	ccugucCfaUfUfGfAfAfaucsgs[invAb]	13	asCfsgaauGfuaaaUfgGfagaggsusu	160	3.76	-69.2	-63.3
14	ccugucCfaUfUfGfAfAfaucsgs[invAb]	14	asCfsgAfAfUfGfuaaaUfgGfagaggsusu	161	1.44	-82.4	
15	ccugUfcCfaUfUfGfAfaucsgs[invAb]	15	asCfsgaauGfuaaaUfgGfagaggsusu	162	0.62	-88.5	
16	ccugUfcCfaUfGfAfaucsgs[invAb]	16	asCfsgaauGfuaaaUfgGfagaggsusu	163	6.04	-55.4	-40.3
17	ccugucCfaUfUfGfAfAfaucsgs[invAb]	17	asCfsgaauGfuaaaUfgGfagaggsusu	164	1.65	-77.8	
18	ccugucCfaUfUfGfAfAfaucsgs[invAb]	18	asCfsgaauGfuaaaUfgGfagagsg	165	16.10	-68.3	-61.0
19	guccauUfgAfCfAfUfUfCfcgsgs[invAb]	19	asCfsggcgAfauuGfAfAfagagcsusu	166	1.61	-78.5	

[0198]

이종제 번호	센스 (5'-3')	서열번호 (센스)	안티센스 (5'-3')	서열번호 (안티센스)	RNA FISH IC50 IP [nM]	RNA FISH 최대 활성 (%)	RNA FISH 추가 시험 평균 활성 (%)
20	cuguccauUfgAfcfAfUfucgcgcs[invAb]	20	asCfsggcgAfauguaCfaAfuaggacagsusu	167	1.17	-86.61	
21	cuguccAfuUFGfAfCfaucgcgcs[invAb]	21	asCfsggcgAfauguaAfuGfgacagsusu	168	1.83	-88.59	
22	cuguccauUfgAfcfAfUfucgcgcs[invAb]	22	asCfsggcgAfauguaCfaAfuaggacagsusu	169	1.67	-82.83	
23	cuguccAfuUfgAfcfAfUfucgcgcs[invAb]	23	asCfsggcgAfauguaCfaAfuGfgacagsusu	170	3.35	-81.06	
24	guccauUfgAfcfAfUfucgcgcs[invAb]	24	asCfsggcgAfauguaCfaAfuaggacagsusu	171	2.75	-81.36	
25	ggaaagAfgCfcfGfAfguacscs[invAb]	25	asAfsaagaCfucggCfuCfuucscsusu	172	1.44	-84.3	
26	ggaaagAfgCfcfGfAfguacscs[invAb]	26	asAfsaagaCfucggCfuCfuucscsusu	173	1.4	-73.61	
27	ggaaAfgAfgCfcgaguacscs[invAb]	27	asAfsaagaCfucggCfuCfuucscsusu	174	2.7	-83.17	
28	ggaaagAfgCfcfGfAfguacscs[invAb]	28	asAfsaagaCfucggCfuCfuucscsusu	175	1.05	-76.92	
29	ggaaagAfgCfcfGfAfguacscs[invAb]	29	asAfsaagaCfucggCfuCfuucscsusu	176	3.02	-79.38	
30	ggaaAfgAfgCfcfGfAfguacscs[invAb]	30	asAfsaagaCfucggCfuCfuucscsusu	177	1.82	-88.68	
31	aaagagCfcGfAfgUfauucscs[invAb]	31	asGfsaagaUfacucGfgCfucucscsusu	178	1.37	-90	
32	ggaaagAfgCfcfGfAfguacscs[invAb]	32	asGfsaagaUfacucGfgCfucucscsusu	179	2.18	-79.50	
33	ggaaagAfgCfcfGfAfguacscs[invAb]	33	asGfsaagaUfacucGfgCfucucscsusu	180	0.486	-80.75	
34	ggaaagAfgCfcfGfAfguacscs[invAb]	34	asGfsaagaUfacucGfgCfucucscsusu	181	3.03	-83.15	
35	ggaaagAfgCfcfGfAfguacscs[invAb]	35	asGfsaagaUfacucGfgCfucucscsusu	182	3.01	-91.24	
36	aaagagCfcGfAfgUfauucscs[invAb]	36	asGfsaagaUfacucGfgCfucucscsusu	183	2.91	-82.11	
37	gcggcgAfgAfuUfUfucscs[invAb]	37	usAfgggcgAfaaaCfuCfucscsusu	184	2.69	-61.2	-63.6
38	gcggcgAfuUfUfUfucscs[invAb]	38	asGfsaaggGfgaaAfuCfucscsusu	185	1.50	-79.1	
39	aaagaaUfcUfGfGfucscs[invAb]	39	asGfsaaggCfcgaGfuUfauucscsusu	186	2.50	-73.0	
40	cgggcgUfcUfUfUfucscs[invAb]	40	asAfsuagUfguagAfaGfgcscsusu	187	3.28	-73.1	
41	cugcgUfuUfUfGfAfggacscs[invAb]	41	asGfsuagCfucuaAfaCfucgacscsusu	188	1.76	-78.3	

이종제 번호	센스 (5'-3')	서열번호 (센스)	안티센스 (5'-3')	서열번호 (안티센스)	RNA FISH IC50 IP [nM]	RNA FISH 최대 활성 (%)	RNA FISH 추가 시험 평균 활성 (%)
42	acggggAfcCfUfGfUfucacscs[invAb]	42	asUfscugUfAfcagGfuCfcccscsusu	189	1.45	-84.3	
43	cgggcgAfcCfGfGfUfucscs[invAb]	43	asAfsaaggAfaagUfuGfgacscsusu	190	14.90	-63.7	-32.2
44	uguaaGfaCfUfGfGfucscs[invAb]	44	asCfsggcgUfocagUfcAfguacscsusu	191	3.59	-53.2	-41.7
45	cccccgCfaGfUfUfagagcgcs[invAb]	45	usCfscacUfaaacUfgCfagcgcsusu	192	12.20	-50.0	-49.1
46	uguccaUfuGfAfcfAfuucscs[invAb]	46	asGfscgcaAfuuguaAfaUfgacscsusu	193	0.55	-87.4	
47	ggcuggCfaCfCfGfUfugucscs[invAb]	47	asCfsagacAfaagUfgCfagcscsusu	194	3.20	-48.1	-8.4
48	ggcucaAfcGfGfUfUfucscs[invAb]	48	usCfsaaggGfaacGfuUfgagcscsusu	195	3.10	-79.8	
49	gcucaaCfGfGfUfUfucscs[invAb]	49	asUfscagGfgaacCfUfugacscsusu	196	2.20	-92.1	
50	caacggUfuCfCfCfUfugucscs[invAb]	50	asAfsaagCfagggAfaCfugucscsusu	197	0.97	-79.4	
51	acgguuCfcCfUfUfGfauucscs[invAb]	51	asAfsaagaUfcaagGfgAfaagcscsusu	198	0.67	-89.9	
52	gugggaUfgUfAfcfUfagucscs[invAb]	52	asCfscagCfagaaCfaUfocscsusu	199	5.38	-59.6	-39.1
53	cugaaaCfuCfCfCfUfucscs[invAb]	53	asUfsgcaAfgggAfgUfucscsusu	200	—	-20.0	-7.6
54	gaucuuGfaCfAfuUfUfagcgcs[invAb]	54	usCfscacUfgangUfcAfgaucscsusu	201	2.77	-66.2	-32.8
55	ugguccAfcGfUfGfCfucscs[invAb]	55	usUfsgaagUfgacGfuGfgacscsusu	202	1.70	-78.7	
56	guggaUfcUfGfAfcfGfucscs[invAb]	56	asUfsgagGfgucaGfaGfucscsusu	203	5.67	-47.1	-23.4
57	ggaggGfaUfUfGfGfugcgcs[invAb]	57	asGfscgacAfcacUfcUfucscsusu	204	0.91	-80.6	
58	aguuuUfcCfCfUfGfGfucscs[invAb]	58	asUfsgagCfagGfaAfaucscsusu	205	2.22	-57.4	-45.6
59	ggaguuUfgGfUfGfUfucscs[invAb]	59	asUfscagGfagacCfaAfuucscsusu	206	3.50	-84.1	
60	ucgcuAfgCfUfCfAfuucscs[invAb]	60	asGfsgggAfgagCfuCfagcscsusu	207	3.30	-75.0	
61	uguccGfgGfCfAfuUfucscs[invAb]	61	asGfsgagAfaagCfcGfgacscsusu	208	5.09	-51.0	-32.3
62	ggaguuCfuGfUfCfUfucscs[invAb]	62	asGfscacGfagacAfgAfaucscsusu	209	0.31	-91.4	
63	gagguaAfcCfUfGfGfggscs[invAb]	63	asAfsagccCfcagGfuUfucscsusu	210	2.24	-62.1	-48.2

이중체 번호	센스 (5'-3')	서열번호 (센스)	안티센스 (5'-3')	서열번호 (안티센스)	RNA FISH IC50 IP [nM]	RNA FISH 최대 활성 (%)	RNA FISH 추가 시험 평균 활성 (%)
64	acaccaUfcAfcGfUfugcags[invAb]	64	asGfscugcAfacguGfaUfgugususu	211	3.50	-86.7	
65	cggcuacCfuUfcAfcfcuagsus[invAb]	65	asAfcuagGfgugaAfgUfagccgsusu	212	17.80	-55.9	-37.4
66	cauugaCfcAfcGfAfcfcuagsus[invAb]	66	asAfcuagGfgucuGfgUfcaangusu	213	3.28	-54.7	-42.2
67	aggagaUfuGfGfUfGfcugcgs[invAb]	67	usCfsagcGfaccAfaUfuccususu	214	0.79	-71.5	
68	cgcguUfcCfcGfUfCfucggsgs[invAb]	68	asCfscgaAfgaggGfaAfgcgggsusu	215	—	-40.5	-31.4
69	auugaaGfgGfGfUfGfcugcgs[invAb]	69	asGfscacaGfaccCfcUfcaaususu	216	2.73	-71.0	
70	ccugguccAfcGfUfGfCfacuacs[invAb]	70	usUfsgaagUfgcacGfuGfgaccagsusu	217	3.51	-77.78	
71	ccugguCfcAfcGfUfGfcacucacs[invAb]	71	usUfsgaagUfgcacguGfgAfcaggsusu	218	1.83	-76.44	
72	ugguaccAfcGfUfGfGfCfacuacs[invAb]	72	usUfsgaagUfgcacGfuGfgaccagsg	219	7.48	-83.25	
73	ccugguccAfcGfUfGfCfacuacs[invAb]	73	usUfsgaagUfgcacGfuGfgaccagsg	220	5.25	-80.05	
74	ccugguCfcAfcGfGfcacucacs[invAb]	74	usUfsgaagugcacGfaGfgAfcaggsusu	221	5.77	-81.11	
75	ggagauUfgGfUfGfUfGfcugcs[invAb]	75	asUfscAfgCfGfacacCfaAfcuccsusu	222	2.9	-81.52	
76	acaccaUfcAfcGfUfugcags[invAb]	76	asGfscUfgCfAfacguGfaUfgugususu	223	3.93	-90.02	
77	ggagAfuUfGfUfGfcugcs[invAb]	77	asUfscageGfacaccaAfuCfuccsusu	224	500	-8.18	-64.7
78	acacCfaUfCfAfcGfugcags[invAb]	78	asGfscugcAfacgugaUfgGfugususu	225	4.2	-86.99	
79	ggagAfuUfGfGfcugcgs[invAb]	79	asUfscagcgacacCfaAfuCfuccsusu	226	6.53	-83.09	
80	acacCfaUfCfAfcugcags[invAb]	80	asGfscugcagcuGfaUfgGfugususu	227	7	-87.92	
81	ggagauUfgGfUfGfUfGfcugcs[invAb]	81	asUfscageGfacacCfaAfcuccsc	228	12.1	-71.94	
82	acaccaUfcAfcGfUfugcags[invAb]	82	asGfscugcAfacguGfaUfgugcsusu	229	16.6	-76.00	
83	ggagauUfgGfUfGfUfGfcugcs[invAb]	83	asUfscageGfacacCfaAfcuccsusu	230	6.5	-85.33	
84	acaccaUfcAfcGfUfugcags[invAb]	84	asGfscugcAfacguGfaUfgugususu	231	7.52	-78.50	
85	ucgcugAfgCfUfCfAfuuccscs[invAb]	85	asGfsgGfgGfAfcagCfuCfagcgasusu	232	3.65	-76.02	

이중체 번호	센스 (5'-3')	서열번호 (센스)	안티센스 (5'-3')	서열번호 (안티센스)	RNA FISH IC50 IP [nM]	RNA FISH 최대 활성 (%)	RNA FISH 추가 시험 평균 활성 (%)
86	ucgcUfgAfgCfUfcauccccs[invAb]	86	asGfsggggAfcagcuCfaGfcgasusu	233	4.87	-78.97	
87	ucgcUfgAfgCfUfcauccccs[invAb]	87	asGfsggggagagCfuCfaGfcgasusu	234	17.4	-64.39	-44.7
88	ucgcugAfgCfUfCfAfuuccccs[invAb]	88	asGfsggggAfcagCfuCfagcgasusu	235	14.8	-63.94	-55.5
89	ucgcugAfgCfUfCfAfuuccccs[invAb]	89	asGfsggggAfcagCfuCfagcgsga	236	12.5	-66.64	-57.4
90	ggcucaAfcGfGfUfUfuccuugs[invAb]	90	usCfuaAfgGfGfaccGfuUfgagccusu	237	4.7	-85.50	
91	ggcuCfaAfcGfGfUfUfuccuugs[invAb]	91	usCfuaaggGfaaccGfuUfgagccusu	238	7.08	-86.03	
92	ggcuCfaAfcGfUfUfuccuugs[invAb]	92	usCfuaagggaaccGfuUfgagccusu	239	9.84	-79.22	
93	ggcucaAfcGfGfUfUfuccuugs[invAb]	93	usCfuaaggGfaaccGfuUfgagccusu	240	22.6	-80.97	
94	ggcucaAfcGfGfUfUfuccuugs[invAb]	94	usCfuaaggGfaaccGfuUfgagcsc	241	20.5	-63.66	-55.4
95	gcggcgagAfuUfUfUfCfuccuacs[invAb]	95	asGfuaaggGfuaaAfuCfucgcgcsusu	242	3.88	-82.42	
96	cggcucaacCfGfUfUfCfuccuacs[invAb]	96	asUfscagGfuaacCfGfUfagccgsusu	243	4.55	-85.51	
97	gcggcgAfgAfuUfUfUfuccuacs[invAb]	97	asGfuaaggGfuaaAfuCfucgcgsusu	244	3.09	-80.60	
98	cggcucaAfcGfGfUfUfuccuugs[invAb]	98	asUfscagGfuaaccGfuGfagccgsusu	245	3.29	-92.30	
99	gcggcgAfgAfuUfUfuccuacs[invAb]	99	asGfuaaggGfuaaAfuCfucgcgsusu	246	9.43	-79.94	
100	cggcucaAfcGfGfUfUfuccuugs[invAb]	100	asUfscagGfuaacCfGfUfagccgsusu	247	4.23	-89.56	
101	gcggcgAfuUfUfUfCfuccuacs[invAb]	101	asGfuaaggGfuaaAfuCfucgcgsc	248	17.9	-78.53	
102	gcucaacCfGfUfUfCfuccuacs[invAb]	102	asUfscagGfuaacCfGfUfagccsg	249	5.36	-88.46	
103	gcggcgagAfuUfUfUfCfuccuacs[invAb]	103	asGfuaaggGfuaaAfuCfucgcgsc	250	6.13	-78.57	
104	cggcucaacCfGfUfUfCfuccuacs[invAb]	104	asUfscagGfuaacCfGfUfagccsg	251	3.3	-90.52	
105	agaagauUfUfCfGfGfuccuacs[invAb]	105	asGfuaaggCfccaGfaUfauccususu	252	7.32	-71.83	
106	agaagauUfUfCfGfGfuccuacs[invAb]	106	asGfuaaggCfccaGfaUfauccususu	253	5.56	-70.77	
107	agaagaUfaUfCfUfCfGfuccuacs[invAb]	107	asGfuaaggCfccaGfaUfauccususu	254	35.6	-45.72	-25.7

[0203]

이종제 번호	셀스 (5'-3')	서열번호 (셀스)	안티셀스 (5'-3')	서열번호 (안티셀스)	RNA FISH IC50 IP [nM]	RNA FISH 최대 활성 (%)	RNA FISH 추가 시험 평균 활성 (%)
108	agaagaUfaUfcUfcgggcccucacs[invAb]	108	asGfsaaaggcccggaGfaUfaUfuccacucusu	255	500	-21.94	-11.6
109	aagauuaUfcUfcRGfgccucucacs[invAb]	109	asGfsaaaggCfccegaGfaUfaUcucacucu	256	8.22	-72.74	
110	cggguccAfcGfuRfGcfacucacs[invAb]	110	usUfsgaagUfgcacgnGfgAfccaggcsusu	257	6.21	-74.11	
111	ggcgcgagAfaUfUfUfcfccucacs[invAb]	111	asGfsuaaggGfgaaaauCfuCfgeccgsusu	258	5.7	-77.61	
112	cggcucaaCfGfGUfUfcfccungas[invAb]	112	asUfscaggGfgaacgUfuGhgagccgsusu	259	3.81	-92.67	
113	agaagauaUfcUfcRGfgccucacs[invAb]	113	asGfsaaaggCfccegaGfaUfuccucucu	260	38.8	-55.21	-29.1
114	ccugguccAfcGfuRfGcfacucacs[invAb]	114	usUfsgaagUfgcacGfuGfgAfccaggcsusu	261	5.26	-74.45	
115	ggcgcgagAfaUfUfUfcfccucacs[invAb]	115	asGfsuaaggGfgaaaAfaCfuCfgeccgsusu	262	5.58	-82.96	
116	cggcucaacCfGfGUfUfcfccungas[invAb]	116	asUfscaggGfgaacCfGuUfGhgagccgsusu	263	3.43	-84.24	
117	agaagauaUfcUfcRGfgccucacs[invAb]	117	asGfsaaaggCfccegaGfaUfaUfuccucusu	264	28.7	-56.99	-21.7
118	ccugguCfcAfcGfgacacucacs[invAb]	118	usUfsgaaGfUfgcacgnGfgAfccaggcsusu	265	3.3	-75.82	
119	ggcgcgAgfAfaUfUfuccucacs[invAb]	119	asGfsuaagGfGfgaaaauCfuCfgeccgsusu	266	4.89	-82.00	
120	cggcucaAfaCfGfGfuuccucugas[invAb]	120	asUfscacGfGfgaacgUfuGhgagccgsusu	267	2.6	-94.24	
121	agaagauaUfaUfcUfcgggcccucacs[invAb]	121	asGfsaaagGRfccegaGfaUfuccucucusu	268	24.3	-61.77	-42.7
122	ggagauUfgGfURGfUfcgccugas[invAb]	122	asUfscageGfacaccaAfuCficucusu	269	10.9	-82.25	
123	ucggcuAfgCfuUfcFAfucccccc[invAb]	123	asGfsggggAfufagaccGfaGfgagasusu	270	8.51	-69.15	-69.4
124	acacaaUfcACfGfUfHgagcas[invAb]	124	asGfscugcAfagaggaUfgGfhggsusu	271	5.34	-80.19	
125	ggcucaAfcGfGUfUfcfccungas[invAb]	125	usCfsaaaggGfiaccgUfuGhgagccusu	272	6.52	-81.92	
126	ggagauUfgGfUfGfUfcgccugas[invAb]	126	asUfscageGfacacCfaAfuCficucusu	273	9.62	-86.67	
127	ggagAfaUfGfGfhgagccugcas[invAb]	127	asUfiscagCRGfacaccaAfuCficucusu	274	8.3	-83.21	
128	ucggcuAfgCfuUfcFAfucccccc[invAb]	128	asGfsggggAfufagCCfuCfaGfgagasusu	275	7.23	-71.83	
129	uceUfGfAgfCficuacccccc[invAb]	129	asGfsgggGfadugacuCfaGfgagasusu	276	5.58	-72.60	

이종제 번호	센스 (5'-3')	서열번호 (센스)	안티센스 (5'-3')	서열번호 (안티센스)	RNA FISH IC50 IP [nM]	RNA FISH 폐대 활성 (%)	RNA FISH 추가 시험 평균 활성 (%)
130	acaccaUfcAfcRGfUfugcages[invAb]	130	asGfscugcAfacguGfaUfgGfugususu	277	500	-83.34	
131	acacCfaUfcAfcgucagcgs[invAb]	131	asGfscugcCfafacgugaUfgGfugususu	278	9.05	-85.16	
132	ggcucaAfcGRGfUfUfccuugs[invAb]	132	usCfsaagGfaaccGfuUfgAfgecsusu	279	4.92	-86.26	
133	ggcuCfaAfcRGfuguccuugs[invAb]	133	usCfsaagGfGfaaccguUfgAfgecsusu	280	4.45	-87.64	
134	ucgugcAfgcCfUfcCfaflucccacs[invAb]	134	asGfsgGfgGfAfugagcGfaCfagcsaga	281	24.6	-56.17	-64.7
135	ucgucgAfcCfUfcCfaflucccacs[invAb]	135	asGfsgGfgGfAfugagcCfaGfagcsusu	282	7.15	-74.41	
136	ugguUfcAfcRGfugcagcauas[invAb]	136	usUfsgaagUfgcacGfGfAfccasgsg	283	3.71	-79.80	
137	ugguccAfcGfUfRGfcaucauas[invAb]	137	usUfsgaagUfgcacguGfGfAfccasgsg	284	5.24	-78.85	
138	ugguccAfcGfUfRGfcaucauas[invAb]	138	usUfsgaagUfgcacGfuGfAfccasgsg	285	7.83	-81.55	
139	ggagauUfgGfUfGfUfgcuganus[invAb]	139	asUfscagcGfacaccaAfuCfuccsusu	286	8.21	-77.02	
140	ggagauUfgGfUfGfUfgcuganus[invAb]	140	asUfscagcGfacacCfaAfuCfuccsusu	287	8.24	-83.79	
141	ggagAfuUfGfGfUfgcugcuganus[invAb]	141	asUfscagcGfacaccaAfuCfuccsusu	288	10.6	-83.56	
142	acaccaUfcAfcRGfUfugcagcuus[invAb]	142	asGfscugcAfacguGfaUfgGfugususu	289	18	-76.24	
143	acaccaUfcAfcRGfUfugcagcuus[invAb]	143	asGfscugcAfacgugaUfgGfugususu	290	18.4	-76.34	
144	ggcuCfaAfcRGfUfugcugcuganus[invAb]	144	usCfsaagGfaaccguUfgAfgecsusu	291	11.2	-80.59	
145	ggcuCfaAfcRGfUfugcugcuganus[invAb]	145	usCfsaagGfaaccguUfgAfgecsusu	292	17.8	-64.03	-68.1
146	cggcucAfaCfGfGfUfuccuugas[invAb]	146	asUfscagGfgaacCfUfgGfagcsag	293	5.28	-91.97	
147	cggcucAfaCfGfGfUfuccuugas[invAb]	147	asUfscagGfgaacCfUfgGfagcsag	294	500	-28.59	-90.2

실시예 3: 마우스 모델에서 선택된 SCAP siRNA 분자의 효능 스크리닝

7 내지 8주령이고 체중이 20 그램을 초과하는 수컷 Balbc 마우스를 Charles River Laboratories (Charles River Laboratories, Inc, 미국 매사추세츠주 소재)에서 입수하였다. 강력한 간 발현을 위해서 마우스에게 AAV8 바이러스 벡터를 투여하였다. 각각의 동물에게 200 μ l의 세포 배양 등급 PBS에 재구성된 1×10^{12} 개의 바이러스 입자를 투여하였다. AAV 벡터는 루시페라제 유전자-기반 리포터 작제물을 암호화하였다. Xenolight Rediject D-Luciferin 기질(Perkin Elmer)을 10분 동안 복강내 투여한 후, 루시페린/루시페라제 반응에서 생성된 광 신호를 측정함으로써 루시페라제 활성을 분석하였다. 이러한 광 신호를 플럭스로 표시하였다. Perkin Elmer의 IVIS Lumina S5 Spectrum 전임상 생체내 영상화 기기를 사용하여 수행하였다. 간에 작고 동일한 관심 영역(region of interest; ROI)을 배치함으로써 BLI 영상 분석을 수행하고, Living Image Software 4.7.2를 사용하여 분석하였다.

SCAP siRNA 활성을 모니터링하기 위해서, 루시페라제 리포터 유전자의 3'UTR 영역은 siRNA가 결합하여 루시페라제 리포터 유전자의 분해를 시작할 수 있는 특정 SCAP mRNA 서열을 포함하였다. AAV 투여 2주 후, 마우스를 기준 루시페라제 활성에 대해 영상화하였다. 그런 다음 동물을 기준 영상 강도에 따라 무작위 배치하고 siRNA당 5마리씩 그룹화하였다. 다음 날, 마우스에게 센스 가닥의 5' 말단에서 삼안테나형 GalNAc(GalNAc3)에 접합된 SCAP siRNA를 체중 1kg당 3 mg(mpk)로 피하 주사하였다. siRNA 투여 4주 후에, BLI 영상화를 수행하여 루시페라제 활성을 모니터링하였다. 제4주에 siRNA 효력은 표 3에 침묵% 데이터로 표시되어 있으며, 이것은 각각의 siRNA 그룹에 대한 제4주(Wk4) 플럭스:기준 플럭스의 비율을 PBS 그룹에 정규화하여 계산하였다. 총 158개의 트

리거를 시험하였고, 이들 중 몇몇은 상이한 화학적 변형을 포함하였다.

Д 3

SCAP siRNA의 생체내 효력

이종체 번호	셀스 (5'-3')	서열 번호 (셀스)	안티셀스 (5'-3')	서열 번호 (안티셀스)	BLI 용량	BLI wk4 침묵%
1	ggaccuGfuGfGfAfAfinuacacs[invAb]	1	usGfsuguaAfnuccAfcAfgguccusu	148	3mpk	-80.34
2	ggaccuGfuGfGfAfAfinuacacs[invAb]	2	usGfsUfgAfAfinuccAfcAfgguccusu	149	3mpk	-15.88
3	ggacCfuGfUGfGfaauucacs[invAb]	3	usGfsuguaAfnuccAcAfgGfuccusu	150	3mpk	-53.3
4	ggacCfuGfuGfgaauucacs[invAb]	4	usGfsuguaauccAfcAfgGfuccusu	151	3mpk	-42.49
5	ggaccuGfuGfGfAfAfinuacacs[invAb]	5	usGfsuguaAfnuccAfcAfgguccusu	152	3mpk	-63.11
6	ggaccuGfuGfGfAfAfinuacacs[invAb]	6	usGfsuguaAfnuccAfcAfgguccsc	153	3mpk	-3.65
7	gcgagaUfuUfUfCfcfcenacs[invAb]	7	asGfsguagGfggaaAfaUfcuagcsusu	154	3mpk	-86.33
8	gcgagaUfuUfUfCfcfcenacs[invAb]	8	asGfsUfgUfaGfGfggaaAfaUfcuagcsusu	155	3mpk	-79.59
9	gcgaGfaUfuUfUfccccuacs[invAb]	9	asGfsguagGfggaaaaUfcUfcgcsusu	156	3mpk	-72.82
10	gcgaGfaUfuUfucccuacs[invAb]	10	asGfsguaggggaaAfaUfcUfcgcsusu	157	3mpk	-84.66
11	gcgagaUfuUfUfCfcfcuacs[invAb]	11	asGfsguagGfggaaAfaUfcuagcsc	158	3mpk	-47.38
12	gcgagaUfuUfUfCfcfcuacuu[invAb]	12	asGfsguagGfggaaAfaUfcuagcsusu	159	3mpk	-81.46
13	ccugucCfaUfuUGfAfaauucs[invAb]	13	asCfsgaauGfhucaaUfgGfacaggssusu	160	3mpk	-65.41
14	ccugucCfaUfuUGfAfaauucs[invAb]	14	asCfsGafAuUfgfhucaaUfgGfacaggssusu	161	3mpk	-77.07
15	ccugUfcCfaUfuUfgaacuugs[invAb]	15	asCfsgaauGfhucaaugGfaCfaaggssusu	162	3mpk	-79.08
16	ccugUfcCfaUfugaacuugs[invAb]	16	asCfsgaauGfhucaaUfgGfacaggssusu	163	3mpk	-73.33
17	ccugucCfaUfuUGfAfaauucgu[invAb]	17	asCfsgaauGfhucaaUfgGfacaggssusu	164	3mpk	-83.3
18	ccugucCfaUfuUGfAfaauucgs[invAb]	18	asCfsgaauGfhucaaUfgGfacaggsg	165	3mpk	-27.8
19	guccauUfgAfCfaUfufcgccgs[invAb]	19	asCfsggcgAfanguCfaAfngggacsusu	166	3mpk	-71.1
20	cuguccauUfgAfCfaUfufcgcs[invAb]	20	asCfsggcgAfanguCfaAfngggacagsusu	167	3mpk	-57.77
21	cuguccAfuUfgGfAfcfaucgccgs[invAb]	21	asCfsggcgAfanguCaAfuGfgacagsusu	168	3mpk	-64.67

[0208]

이종체 번호	셀스 (5'-3')	서열 번호 (셀스)	안티셀스 (5'-3')	서열 번호 (안티셀스)	BLI 용량	BLI wk4 참류%
22	cuguccauUfgAfCfAfUfucgccgs[invAb]	22	asCfsgggcgAfanguCfaAfuggacsasg	169	3mpk	-73.61
23	cuguccAfUfUfgAfcauucgccgs[invAb]	23	asCfsgggcgaaugCfaAfUfGfgacagsusu	170	3mpk	-56.27
24	guccauUfgAfCfAfUfucgccgs[invAb]	24	asCfsgggcgAfanguCfaAfuggacsasg	171	3mpk	-79.22
25	ggaaagAfgCfCfGfAfguancus[invAb]	25	asAfgganaCfucggCfuCfuuccesusu	172	3mpk	-76.7
26	ggaaagAfgCfCfGfAfguancus[invAb]	26	asAfgAfUfAfCfucggCfuCfuuccesusu	173	3mpk	-86.88
27	ggaaAfgAfGfCfGfaguanucus[invAb]	27	asAfgganacucggCfuCfuUfuccesusu	174	3mpk	-64.51
28	ggaaagAfgCfCfGfAfguancus[invAb]	28	asAfgganaCfucggCfuCfuuccesusu	175	3mpk	-88.89
29	ggaaagAfgCfCfGfAfguancus[invAb]	29	asAfggaaCfucggCfuCfuuccesc	176	3mpk	-44.87
30	ggaaAfgAfGfCfCfaguanucus[invAb]	30	asAfgganaCfucggCfuCfuuccesusu	177	3mpk	-69.31
31	aaagagCfCfGfAfGfUfauucuss[invAb]	31	asGfsaagaUfacncGfgCfucuuussusu	178	3mpk	-78
32	ggaaagagCfCfGfAfGfUfauucuss[invAb]	32	asGfsaagaUfacucGfgCfucuuuccususu	179	3mpk	-67.98
33	ggaaagAfgCfCfGfAfguancus[invAb]	33	asGfsaagaUfacucggCfuCfuuccesusu	180	3mpk	-86.86
34	ggaaagagCfCfGfAfGfUfauucuss[invAb]	34	asGfsaagaUfacucGfgCfucuuuccesc	181	3mpk	-66.29
35	ggaaagAfgCfCfGfaguanucus[invAb]	35	asGfsaagaauucGfgCfuCfuuccesusu	182	3mpk	-66.65
36	aaagagCfCfGfAfGfUfauucuss[invAb]	36	asGfsaagaUfacucGfgCfucuuuccesc	183	3mpk	-74.06
37	ggggcgAfgAfUfUfUfUfucccsus[invAb]	37	usAfgggggAfaauCfuCfsgcgcsusu	184	3mpk	-14.96
38	ggcgagAfUfUfUfUfUfUfucccsus[invAb]	38	asGfsuaggGfganaAfUfucggcsusu	185	3mpk	-88.43
39	aagauUfUfCfGfGfGfGfuccuss[invAb]	39	asGfsaaggCfcogaAfUfauucussusu	186	3mpk	-77.32
40	cggcgUfuCfUfAfCfaaccasus[invAb]	40	asAfsuuggUfguagAfaGfgccgsusu	187	3mpk	0
41	cugcgUfuUfAfGfAfGfggacscs[invAb]	41	asGfsguuccfCfucuaAfaCfugcagsusu	188	3mpk	-54.07
42	acggggAfcCfUfGfUfuaacagsas[invAb]	42	asUfscuguAfacagGfuCfcccgsusu	189	3mpk	0
43	cggcgUfaCfGfGfUfucccsus[invAb]	43	asAfsaggUfaocgUfuGfagccgsusu	190	3mpk	-66.71
44	uguaucGfaCfUfUfGfGfagcs[invAb]	44	asCfsgggUfGfcagUfAfAfguacassusu	191	3mpk	-45.12
45	cccccGfGfUfUfUfUfagagcs[invAb]	45	usCfscuccUfaacUfGfCfagggcsusu	192	3mpk	0

[0209]

이종체 번호	센스 (5'-3')	서열 번호 (센스)	안티센스 (5'-3')	서열 번호 (안티센스)	BLI 용량	BLI wk4 침묵%
46	uguccaUfuGfAfCfAfucgcscs[invAb]	46	asGfsgcgaAfugucAfaUfggacassu	193	3mpk	-69.36
47	ggcuggCfaCfCGfUfugucuss[invAb]	47	asCfsagacAfacggUfgCfagccsusu	194	--	--
48	ggcucaAfcGfGfUfUfccuuss[invAb]	48	nsCfsaaggGfaaccGfuUfgagccsusu	195	3mpk	-87.62
49	gcuccaCfGfUfUfCfCucgss[invAb]	49	asUfscaggGfgaacCfUfugagcsusu	196	3mpk	-86.43
50	caacggUfuCfCfCfUfugauus[invAb]	50	asAfsaauCfagggAfaCfCgungssu	197	3mpk	-60.78
51	acgguuCfCfUfUfGfaucuss[invAb]	51	asAfsaaaUfcaagGfgAfaccgussu	198	3mpk	-74.51
52	gggggaUfgUfAfCfUfugacuss[invAb]	52	asCfscaguCfaguaCfaUfccaccusu	199	3mpk	-20.77
53	cugaaaCfuCfCfCfCfucgss[invAb]	53	asUfsggcaAfgggGfgUfucagssu	200	--	--
54	gaucuuGfaCfAfUfCfauugss[invAb]	54	usCfscacUfgangUfcAfggaucssu	201	--	--
55	ugguccAfcGfUfGfCfacuuss[invAb]	55	usUfsgaagUfgcacGfuGfgaccassu	202	3mpk	-73.63
56	gggacUfcUfGfAfCfCgaass[invAb]	56	asUfscagCfagcaGfaGfuaccassu	203	--	--
57	ggaggaGfaUfUfGfGfugucss[invAb]	57	asGfscgacAfcacaaUfcUfccuussu	204	3mpk	-34.27
58	aguguuUfcCfCfUfGfCgacass[invAb]	58	asUfscagCfagGfaAfaccassu	205	--	--
59	ggagauUfgGfUfGfUfCgucss[invAb]	59	asUfscagCfagacCfaAfucucssu	206	3mpk	-76.45
60	ucgcuAfgCfUfCfAfucuccss[invAb]	60	asGfsgggAfugagCfuCfagcassu	207	3mpk	-45.22
61	uguccGfgGfGfUfCfCgacss[invAb]	61	asGfscuagAfaugCfcGfggacassu	208	--	--
62	ggaguuCfuGfUfCfUfCgucss[invAb]	62	asGfscacGfagacAfgAfaccuussu	209	3mpk	-48.69
63	ggagaaAfcCfUfGfGfGgucss[invAb]	63	asAfsagccCfagGfuUfaccuussu	210	--	--
64	acaccaUfcAfcGfUfGfCgucss[invAb]	64	asGfscugCfagcuGfaUfggucssu	211	--	--
65	cggucaCfuUfCfAfCfCgucss[invAb]	65	asAfsuagGfgngaAfgUfgcucssu	212	--	--
66	caugaCfcAfcGfUfCfCgucss[invAb]	66	asAfsccagGfgcuGfgUfcaucssu	213	--	--
67	aggagaUfuGfGfUfGfCgucss[invAb]	67	usCfsagcgAfcaccAfaUfcucssu	214	3mpk	-73.73
68	ccgcuUfcCfCfUfCfCgucss[invAb]	68	asCfscgaAfgagGfaAfgcggssu	215	--	--
69	auugaaGfgGfGfUfGfCgucss[invAb]	69	asGfscacGfaccCfcUfcaucssu	216	--	--

이종체 번호	센스 (5'-3')	서열 번호 (센스)	안티센스 (5'-3')	서열 번호 (안티센스)	BLI 용량	BLI wk4 침묵%
70	ccuguccAfcGfUfGfCfacuuss[invAb]	70	usUfsgaagUfgcacGfuGfgaccgssu	217	3mpk	-59.29
71	ccugguCfcAfcGfUfGfCacuuss[invAb]	71	usUfsgaagUfgcacGfuGfgaccgssu	218	3mpk	-83.99
72	ugguccAfcGfUfGfCfacuuss[invAb]	72	usUfsgaagUfgcacGfuGfgaccgssu	219	3mpk	-70.67
73	ccuguccAfcGfUfGfCfacuuss[invAb]	73	usUfsgaagUfgcacGfuGfgaccgssu	220	3mpk	-63.01
74	ccuguuCfcAfcGfUfGfCacuuss[invAb]	74	usUfsgaagGcacGfuGfgAfcaccgssu	221	3mpk	-49.48
75	ggagauUfgGfUfGfUfCgucss[invAb]	75	asUfscAfgCfGfaccCfaAfucucssu	222	3mpk	-67.13
76	acaccaUfcAfcGfUfGfCgucss[invAb]	76	asGfscUfgCfAfcagGfaUfggucssu	223	--	--
77	ggagAfuUfGfGfUfGfCgucss[invAb]	77	asUfscagCfagaccaAfuCfuucssu	224	3mpk	-64.32
78	acacCfaUfCfAfCfGfUfGfCgucss[invAb]	78	asGfscugCfagcuGfaUfggucssu	225	--	--
79	ggagAfuUfGfGfUfGfCgucss[invAb]	79	asUfscagCgacacCfaAfuCfuucssu	226	3mpk	-69.66
80	acacCfaUfCfAfCfGfUfGfCgucss[invAb]	80	asGfscugCgacagGfaUfggucssu	227	--	--
81	ggagauUfgGfUfGfUfCgucss[invAb]	81	asUfscagCfagacCfaAfucucssu	228	3mpk	-70.56
82	acaccaUfcAfcGfUfGfCgucss[invAb]	82	asGfscugCfagcuGfaUfggucssu	229	--	--
83	ggagauUfgGfUfGfUfCgucss[invAb]	83	asUfscagCfagacCfaAfucucssu	230	3mpk	-85.28
84	acaccaUfcAfcGfUfGfCgucss[invAb]	84	asGfscugCfagcuGfaUfggucssu	231	--	--
85	ucgcuAfgCfUfCfAfucuccss[invAb]	85	asGfsgGfgGfAfgagCfuCfagcassu	232	3mpk	-81.14
86	ucgcuAfgCfUfCfAfucuccss[invAb]	86	asGfsgggGfagagCfuCfagcassu	233	3mpk	-74.05
87	ucgcuAfgCfUfCfAfucuccss[invAb]	87	asGfsgggGfagagCfuCfagcassu	234	3mpk	-66.76
88	ucgcuAfgCfUfCfAfucuccss[invAb]	88	asGfsgggGfagagCfuCfagcassu	235	3mpk	-73.73
89	ucgcuAfgCfUfCfAfucuccss[invAb]	89	asGfsgggGfagagCfuCfagcassu	236	3mpk	-74.58
90	ggcucaAfcGfUfUfCfCgucss[invAb]	90	usCfsaAfgGfGfaccGfuUfgagccssu	237	3mpk	-68.23
91	ggcuCfaAfcGfGfGfUfCgucss[invAb]	91	usCfsaaggGfaaccGfuUfgagccssu	238	3mpk	-94.43
92	ggcuCfaAfcGfGfGfUfCgucss[invAb]	92	usCfsaaggGfaaccGfuUfgagccssu	239	3mpk	-89.89
93	ggcucaAfcGfGfUfUfCfCgucss[invAb]	93	usCfsaaggGfaaccGfuUfgagccssu	240	3mpk	-94.81

이종체 번호	센스 (5'-3')	서열 번호 (센스)	안티센스 (5'-3')	서열 번호 (안티센스)	BLI 용량	BLI wk4 침묵%
94	ggcucaAfcGfGfUfUfccuung[invAb]	94	usCfsaaggGfaaccGfuUfgagcsc	241	3mpk	-91.36
95	gcggcgagAfuUfUfUfCfccuacs[invAb]	95	asGfsuaggGfgaaaAfuCfucgccgsusu	242	--	--
96	cggcucaaCfGfUfUfCfccuugas[invAb]	96	asUfscaggGfgaacCfGfUfgagccgsusu	243	3mpk	-87.69
97	gcggcgAfgAfuUfUfUfUfccuacs[invAb]	97	asGfsuaggGfgaaaCfuCfugccgsusu	244	--	--
98	cggcucAfaCfGfGfUfUfccuugas[invAb]	98	asUfscaggGfgaacGfuUfgagccgsusu	245	3mpk	-94.03
99	gcggcgAfgAfuUfUfUfccuacs[invAb]	99	asGfsuaggGfgaaaAfuCfuCfugccgsusu	246	--	--
100	cggcucAfaCfGfGfUfUfccuugas[invAb]	100	asUfscaggGfgaacCfGfUfgagccgsusu	247	3mpk	-67.91
101	ggcgagAfuUfUfUfCfccuacs[invAb]	101	asGfsuaggGfgaaaAfuCfugccsgsc	248	--	--
102	gcucaaCfGfUfUfCfccuugaus[invAb]	102	asUfscaggGfgaacCfGfUfgagccsg	249	3mpk	-70.86
103	gcggcgagAfuUfUfUfCfccuacs[invAb]	103	asGfsuaggGfgaaaAfuCfugccsgsc	250	--	--
104	cggcucaaCfGfUfUfCfccuugas[invAb]	104	asUfscaggGfgaacCfGfUfgagccsg	251	3mpk	-92.8
105	agaaganaUfUfCfGfGfGfccuacs[invAb]	105	asGfsaaggCfcccgaGfaUfancususu	252	--	--
106	agaaganaUfUfCfGfGfGfccuacs[invAb]	106	asGfsaaggCfcccgaGfaUfancususu	253	--	--
107	agaagaUfaUfCfUfCfGfGfccuacs[invAb]	107	asGfsaaggCfcccgaGfaUfancususu	254	--	--
108	agaagaUfaUfCfUfGfGfccuacs[invAb]	108	asGfsaaggCfcccgaGfaUfancususu	255	--	--
109	aagauUfUfCfGfGfGfccuacs[invAb]	109	asGfsaaggCfcccgaGfaUfancususu	256	--	--
110	ccuguccAfcGfUfGfCfaccuacs[invAb]	110	usUfsgaagUfgcacGfuAfcaggsusu	257	--	--
111	gcggcgagAfuUfUfUfCfccuacs[invAb]	111	asGfsuaggGfgaaaCfuCfugccgsusu	258	--	--
112	cggcucaaCfGfUfUfCfccuugas[invAb]	112	asUfscaggGfgaacCfGfUfgagccgsusu	259	--	--
113	agaaganaUfUfCfGfGfGfccuacs[invAb]	113	asGfsaaggCfcccgaGfaUfancususu	260	--	--
114	ccuguccAfcGfUfGfCfaccuacs[invAb]	114	usUfsgaagUfgcacGfuGfgAfcaggsusu	261	--	--
115	gcggcgagAfuUfUfUfCfccuacs[invAb]	115	asGfsuaggGfgaaaAfuCfuCfugccgsusu	262	--	--
116	cggcucaaCfGfUfUfCfccuugas[invAb]	116	asUfscaggGfgaacCfGfUfgagccgsusu	263	--	--

이종체 번호	센스 (5'-3')	서열 번호 (센스)	안티센스 (5'-3')	서열 번호 (안티센스)	BLI 용량	BLI wk4 침묵%
117	agaaganaUfUfCfGfGfGfccuacs[invAb]	117	asGfsaaggCfcccgaGfaUfancususu	264	--	--
118	ccuguccAfcGfUfGfCfaccuacs[invAb]	118	usUfsgaagUfgcacGfuAfcaggsusu	265	--	--
119	gcggcgAfgAfuUfUfUfccuacs[invAb]	119	asGfsuaggGfgaaaCfuCfugccgsusu	266	--	--
120	cggcucAfaCfGfGfUfUfccuugas[invAb]	120	asUfscaggGfgaacCfGfUfgagccgsusu	267	--	--
121	agaagaUfaUfCfUfCfGfGfccuacs[invAb]	121	asGfsaaggCfcccgaGfaUfancususu	268	--	--
122	ggagauUfgGfUfGfUfGfGfccuacs[invAb]	122	asUfscaggGfgaacCfuCfugccgsusu	269	--	--
123	ucgcugAfgCfUfCfUfUfccuacs[invAb]	123	asGfsgggGfUfgagcuCfaGfcgasusu	270	--	--
124	acaccaUfCfUfCfUfUfgcagcs[invAb]	124	asGfscugCfUfgagcuUfgGfugususu	271	--	--
125	ggcucaAfcGfGfUfUfccuungs[invAb]	125	usCfsaaggGfaaccGfuUfgAfgccsusu	272	--	--
126	ggagauUfgGfUfGfUfGfGfccuacs[invAb]	126	asUfscaggGfgaacCfuCfugccgsusu	273	--	--
127	ggagAfuUfgGfUfGfUfGfGfccuacs[invAb]	127	asUfscaggGfgaacCfuCfugccgsusu	274	--	--
128	ucgcugAfgCfUfCfUfUfccuacs[invAb]	128	asGfsgggGfUfgagcuCfaGfcgasusu	275	--	--
129	ucgcUfgAfgCfUfUfccuacs[invAb]	129	asGfsgggGfUfgagcuCfaGfcgasusu	276	--	--
130	acaccaUfCfUfCfUfUfgcagcs[invAb]	130	asGfscugCfUfgagcuUfgGfugususu	277	--	--
131	acacCfaUfCfUfGfGfccuacs[invAb]	131	asGfscugCfUfgagcuUfgGfugususu	278	--	--
132	ggcucaAfcGfGfUfUfccuungs[invAb]	132	usCfsaaggGfaaccGfuUfgAfgccsusu	279	--	--
133	ggcuCfaAfcGfUfUfccuungs[invAb]	133	usCfsaaggGfaaccGfuUfgAfgccsusu	280	--	--
134	ucgcugAfgCfUfCfUfUfccuacs[invAb]	134	asGfsgGfGfUfgagcuCfaGfcgasusu	281	--	--
135	ucgcugAfgCfUfCfUfUfccuacs[invAb]	135	asGfsgGfGfUfgagcuCfaGfcgasusu	282	--	--
136	ugguCfCfUfGfUfGfGfccuacs[invAb]	136	usUfsgaagUfgcacGfuAfcaggsusu	283	--	--
137	ugguccAfcGfUfGfCfUfUfccuacs[invAb]	137	usUfsgaagUfgcacGfuAfcaggsusu	284	--	--
138	ugguccAfcGfUfGfCfUfUfccuacs[invAb]	138	usUfsgaagUfgcacGfuAfcaggsusu	285	--	--
139	ggagauUfgGfUfGfUfGfGfccuacs[invAb]	139	asUfscaggGfgaacCfuCfugccgsusu	286	--	--

이종체 번호	센스 (5'-3')	서열 번호 (센스)	안티센스 (5'-3')	서열 번호 (안티센스)	BLI 용량	BLI wk4 침묵%
140	ggagauUfgGfUfGfUfGfGfccuacs[invAb]	140	asUfscaggGfgaacCfuCfugccgsusu	287	--	--
141	ggagAfuUfgGfUfGfUfGfGfccuacs[invAb]	141	asUfscaggGfgaacCfuCfugccgsusu	288	--	--
142	acaccaUfCfUfCfUfUfgcagcs[invAb]	142	asGfscugCfUfgagcuUfgGfugususu	289	--	--
143	acaccaUfCfUfCfUfUfgcagcs[invAb]	143	asGfscugCfUfgagcuUfgGfugususu	290	--	--
144	ggcuCfaAfcGfGfUfUfccuungs[invAb]	144	usCfsaaggGfaaccGfuUfgAfgccsusu	291	--	--
145	ggcuCfaAfcGfGfUfUfccuungs[invAb]	145	usCfsaaggGfaaccGfuUfgAfgccsusu	292	--	--
146	cggcucAfaCfGfGfUfUfccuugas[invAb]	146	asUfscaggGfgaacCfuCfugccgsusu	293	--	--
147	cggcucAfaCfGfGfUfUfccuugas[invAb]	147	asUfscaggGfgaacCfuCfugccgsusu	294	--	--

본 명세서에서 언급된 모든 공보, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 공보, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고

개별적으로 참고로 포함된 것으로 표시되는 것과 동일한 정도로 본 명세서에 참고로 포함된다. 그러나 본 명세서에서 참고문헌의 인용은 그러한 참고문헌이 본 발명의 선행 기술이라는 인정으로 해석되어서는 안된다. 참고로 포함된 참고문헌에서 제공된 임의의 정의 또는 용어가 본 명세서에 제공된 용어 및 고찰과 상이한 경우, 본 용어 및 정의가 좌우한다.

[0216]

전술한 명세서는 당업자가 본 발명을 실시할 수 있게 하기에 충분한 것으로 간주된다. 전술한 상세한 설명 및 실시예는 본 발명의 특정한 바람직한 실시형태를 상술하고 있고, 본 발명자들에 의해 고려되는 최상의 방식을 기재하고 있다. 그러나, 전술한 내용이 텍스트로 상세하게 표현되었더라도, 본 발명은 많은 방식으로 실시될 수 있으며 본 발명은 첨부된 청구범위 및 이의 임의의 등가물에 따라 해석되어야 한다는 것이 이해될 것이다.

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.