(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0129646
(43) 공개일자 2021년10월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01) *C07H 21/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1137 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7024844
(22) 출원일자(국제) 2020년01월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년08월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/014511
(87) 국제공개번호 WO 2020/154343
국제공개일자 2020년07월30일
(30) 우선권주장
62/795,348 2019년01월22일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
코로 바이오, 인크.
미국 02139 메사추세츠주 캠브릿지 스위트 6-401 빌딩 600 원 켄달 스퀘어
(72) 발명자
프랠리, 앤드류, 더블유.
미국 02139 메사추세츠주 캠브릿지 스위트 6-401 빌딩 600 원 켄달 스퀘어 코로 바이오, 인크. 내
로비네트, 스티븐
미국 02139 메사추세츠주 캠브릿지 스위트 6-401 빌딩 600 원 켄달 스퀘어 코로 바이오, 인크. 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 59 항

(54) 발명의 명칭 **RNA-편집 올리고뉴클레오타이드 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 개시내용은, mRNA에서 아데노신의 탈아미노화가 예컨대 이를 필요로 하는 대상체에서 치료 결과를 내는, 장애를 치료하기 위한 유용한 조성물 및 방법을 특징으로 한다.

(52) CPC특허분류
A61K 47/543 (2017.08)
A61K 47/549 (2017.08)
A61K 47/554 (2017.08)
C07H 21/00 (2013.01)
C12Y 305/04004 (2013.01)
C12N 2310/321 (2013.01)
C12N 2310/322 (2013.01)
C12N 2310/3231 (2013.01)
C12N 2310/334 (2013.01)

(72) 발명자
버밍엄, 네싼
미국 02139 메사추세츠주 캠브릿지 스위트 6-401 빌딩 600 원 켄달 스퀘어 코로 바이오, 인크. 내
푸타, 말리카르주나, 레디
미국 02139 메사추세츠주 캠브릿지 스위트 6-401 빌딩 600 원 켄달 스퀘어 코로 바이오, 인크. 내

(30) 우선권주장
62/822,586 2019년03월22일 미국(US)
62/900,017 2019년09월13일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

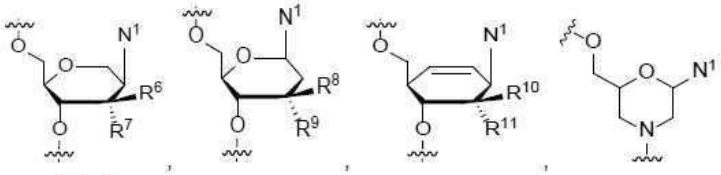
하기 구조를 포함하는 올리고뉴클레오타이드:

$$[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$$

상기 구조 중, A 및 B의 각각은 뉴클레오타이드이고;

m 및 n은, 각각 독립적으로, 1 내지 50의 정수이고;

X^1, X^2 및 X^3은, 각각 독립적으로, 뉴클레오타이드이되, X^1, X^2 및 X^3 중 적어도 하나는 하기 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖고:



화학식 I 화학식 II 화학식 III 화학식 IV

식 중, N^1은 수소 또는 핵염기이고;

R^6은 수소, 하이드록시 또는 할로겐이고;

R^7은 수소, 하이드록시, 할로겐 또는 C_1-C_6 알콕시이고;

R^8은 수소 또는 할로겐이고;

R^9는 수소 또는 하이드록시, 할로겐 또는 C_1-C_6 알콕시이고;

R^{10}은 수소 또는 할로겐이고; 그리고

R^{11}은 수소, 또는 하이드록시, 할로겐 또는 C_1-C_6 알콕시이다.

청구항 2

제1항에 있어서, $[A_m]$ 및/또는 $[B_n]$의 뉴클레오타이드의 적어도 80%는 핵염기, 당 및 인터뉴클레오사이드 링키지(internucleoside linkage)를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 할로겐은 플루오로인, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, C_1-C_6 알콕시는 OCH_3인, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, X^1, X^2 및 X^3 중 적어도 하나는, R^8 및 R^9의 각각이 수소인 화학식 II의 구조를 갖는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 6

제5항에 있어서, X^1은, R^8 및 R^9의 각각이 수소인 화학식 II의 구조를 갖는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, X^2는, R^8 및 R^9의 각각이 수소인 화학식 II의 구조를 갖는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, X^2는 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, X^1이 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^2 및 X^3의 각각은, 독립적으로, 리보뉴클레오타이드, 2'-O-C_1-C_6 알킬-뉴클레오타이드, 2'-아미노-뉴클레오타이드, 아라비노핵산-뉴클레오타이드, 이환식-뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 구속된 에틸-뉴클레오타이드, LNA-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; X^2가 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^1 및 X^3의 각각은, 독립적으로, 리보뉴클레오타이드, 2'-O-C_1-C_6 알킬-뉴클레오타이드, 2'-아미노-뉴클레오타이드, 아라비노핵산-뉴클레오타이드, 이환식-뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 구속된 에틸-뉴클레오타이드, LNA-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; X^3이 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^1 및 X^2의 각각은, 독립적으로, 리보뉴클레오타이드, 2'-O-C_1-C_6 알킬-뉴클레오타이드, 2'-아미노-뉴클레오타이드, 아라비노핵산-뉴클레오타이드, 이환식-뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 구속된 에틸-뉴클레오타이드, LNA-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; X^1 및 X^2이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^3은 리보뉴클레오타이드, 2'-O-C_1-C_6 알킬-뉴클레오타이드, 2'-아미노-뉴클레오타이드, 아라비노핵산-뉴클레오타이드, 이환식-뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 구속된 에틸-뉴클레오타이드, LNA-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; X^1 및 X^3이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^2는 리보뉴클레오타이드, 2'-O-C_1-C_6 알킬-뉴클레오타이드, 2'-아미노-뉴클레오타이드, 아라비노핵산-뉴클레오타이드, 이환식-뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 구속된 에틸-뉴클레오타이드, LNA-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; 그리고 X^2 및 X^3이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^1은 리보뉴클레오타이드, 2'-O-C_1-C_6 알킬-뉴클레오타이드, 2'-아미노-뉴클레오타이드, 아라비노핵산-뉴클레오타이드, 이환식-뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 구속된 에틸-뉴클레오타이드, LNA-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드인, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 10

제9항에 있어서, X^1이 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^2 및 X^3의 각각은, 독립적으로, 리보뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; X^2가 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^1 및 X^3의 각각은, 독립적으로, 리보뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; X^3이 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^1 및 X^2의 각각은, 독립적으로, 리보뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; X^1 및 X^2이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^3은 리보뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드 또는

DNA-뉴클레오타이드이고; X^1 및 X^3이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^2는 리보뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; 그리고 X^2 및 X^3이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^1은 리보뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드인, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 11

제10항에 있어서, X^1이 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^2 및 X^3의 각각은 리보뉴클레오타이드이고; X^2가 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^1 및 X^3의 각각은 리보뉴클레오타이드이고; X^3이 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^1 및 X^2의 각각은 리보뉴클레오타이드이고; X^1 및 X^2이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^3은 리보뉴클레오타이드이고; X^1 및 X^3이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^2는 리보뉴클레오타이드이고; 그리고 X^2 및 X^3이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^1은 리보뉴클레오타이드인, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, X^1은 하이포잔틴 핵염기를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, X^1은 유라실 핵염기를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 14

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, X^1은 사이토신 핵염기를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, X^3은 하이포잔틴 핵염기를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, X^3은 아데닌 핵염기를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, X^2는 사이토신 핵염기를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, X^2는 유라실 핵염기를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 19

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, X^2는 핵염기를 포함하지 않는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, X^2는 2'-O-메틸-뉴클레오타이드가 아닌, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, X^1, X^2, 및 X^3은 2'-O-메틸-뉴클레오타이드가 아닌, 올리고뉴클레오

타이드.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, $[A_m]$은 적어도 하나의 뉴클레아제 내성 뉴클레오타이드를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, $[A_m]$은 적어도 하나의 2'-O-C_1-C_6 알킬-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-아미노-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 아라비노 핵산-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 이환식-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-F-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 구속된 에틸(cEt)-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 LNA-뉴클레오타이드 및/또는 적어도 하나의 DNA-뉴클레오타이드를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 24

제23항에 있어서, $[A_m]$은 적어도 하나의 2'-O-메틸-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-F-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 cEt-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 LNA-뉴클레오타이드 및/또는 적어도 하나의 DNA-뉴클레오타이드를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, $[A_m]$은 적어도 5개의 말단 2'-O-메틸-뉴클레오타이드를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, $[A_m]$은 적어도 하나의 포스포로티오에이트 링키지를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, $[A_m]$은 적어도 4개의 말단 포스포로티오에이트 링키지를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 28

제26항 또는 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 포스포로티오에이트 링키지는 입체순수한, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, $[B_n]$은 적어도 하나의 뉴클레아제 내성 뉴클레오타이드를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, $[B_n]$은 적어도 하나의 2'-O-C_1-C_6 알킬-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-아미노-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 아라비노 핵산-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 이환식-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-F-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 cEt-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 LNA-뉴클레오타이드 및/또는 적어도 하나의 DNA-뉴클레오타이드를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 31

제30항에 있어서, $[B_n]$은 적어도 하나의 2'-O-메틸-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-F-뉴클레오타이드, 적어

도 하나의 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 cEt-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 LNA-뉴클레오타이드 및/또는 적어도 하나의 DNA-뉴클레오타이드를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, $[B_n]$은 적어도 5개의 말단 2'-O-메틸-뉴클레오타이드를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, $[B_n]$은 적어도 하나의 포스포로티오에이트 링키지를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, $[B_n]$은 적어도 4개의 말단 포스포로티오에이트 링키지를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 적어도 하나의 포스포로티오에이트 링키지는 입체순수한, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 조합된 $[A_m]$ 및 $[B_n]$ 중의 뉴클레오타이드의 적어도 20%는 2'-O-메틸-뉴클레오타이드인, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 5'-캡 구조를 더 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 대체 핵염기를 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 5'-말단 뉴클레오타이드는 2'-아미노-뉴클레오타이드인, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 조합된 A 및 B는 18 내지 80개의 뉴클레오타이드로 이루어진, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, m은 5 내지 40인, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, n은 5 to 40인, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 43

제1항에 있어서, m 및 n은, 각각 독립적으로, 5 내지 40의 정수이고; 적어도 X^1, X^2 및 X^3은, R^8 및 R^9가 각각 수소인 상기 화학식 II의 구조를 갖고; 상기 화학식 I의 구조를 갖지 않는 X^1, X^2 및 X^3의 각각은 리보뉴클레오

타이드이고; [A_m] 및 [B_n]은 각각 적어도 5개의 말단 2'-O-메틸-뉴클레오타이드 및 적어도 4개의 말단 포스포로티오에이트 링키지를 포함하고; 그리고 조합된 [A_m] 및 [B_n] 중의 뉴클레오타이드의 적어도 20%는 2'-O-메틸-뉴클레오타이드인, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR)-동원(recruiting) 도메인을 더 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 45

표적화 모이어티에 접합된 제1항 내지 제44항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 접합체.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 표적화 모이어티는 지질, 스테롤, 탄수화물 및/또는 펩타이드인, 접합체.

청구항 47

복합체로서,

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오타이드 또는 제45항 또는 제46항의 접합체; 및

mRNA

를 포함하되, 상기 올리고뉴클레오타이드 또는 접합체와 mRNA는 서로 혼성화되고 상기 복합체는 상기 mRNA의 아데노신에 제1 미스매치를 포함하는, 복합체.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 복합체는 상기 제1 미스매치에 대해서 5'에 있는 4개의 뉴클레오타이드인 제2 미스매치를 포함하는, 복합체.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 상기 복합체는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 미스매치를 포함하는, 복합체.

청구항 50

제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA는 치료 결과를 내기 위하여 탈아미노화될 수 있는 아데노신을 포함하는, 복합체.

청구항 51

제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 mRNA는 대응하는 천연 mRNA에 비해서 구아노신에서 아데노신으로의 돌연변이를 포함하는, 복합체.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 구아노신에서 아데노신으로의 돌연변이는 미스센스 또는 넌센스 돌연변이인, 복합체.

청구항 53

제47항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 미스매치는 상기 mRNA의 개시 코돈 내 아데노신에 있는, 복합체.

청구항 54

제47항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 미스매치는 상기 mRNA의 정지 코돈 내 아데노신에 있는, 복합체.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 정지 코돈은 조발성(premature) 정지 코돈인, 복합체.

청구항 56

제47항 내지 제55항 중 어느 한 항의 복합체를 제조하는 방법으로서, 세포를 제1항 내지 제44항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오타이드 또는 제45항 또는 제46항의 접합체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 57

mRNA에서 아데노신의 탈아미노화 방법으로서, 세포를 제1항 내지 제44항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오타이드 또는 제45항 또는 제46항의 접합체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 58

장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 장애를 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에게 유효량의 제1항 내지 제44항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오타이드 또는 제45항 또는 제46항의 접합체를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 장애는 낭포성 섬유증, 백색증, 알파-1 항트립신 결핍증, 알츠하이머병, 근위축성 축삭 경화증, 천식, 11-지중해빈혈, 카다실 증후군, 샤르코-마리-투스 질환, 만성 폐쇄성 폐질환, 원위 척수성 근위축증, 뒤센/베커 근이영양증, 이영양성 수포성 표피박리증, 수포성 표피박리증, 파브리병, 인자 V 레이든 관련 장애, 가족성 샘종 폴립증, 갈락토스혈증, 고셰병, 포도당-6-인산 탈수소효소 결손증, 혈우병, 유전성 혈색소증, 헌터 증후군, 헌팅틴병, 헐러 증후군(Hurler syndrome), 염증성 장 질환, 유전성 다응고 증후군, 레베르 선천성 흑암시, 레쉬-니한 증후군, 린치 증후군, 마판 증후군, 점액 다당류증, 근이영양증, 근긴장성 이영양증 I 및 II형, 신경섬유종증, 니만-픽병 A, B 및 C형, NY-ESO-1 관련 암, 파킨슨병, 포이츠-제거스 증후군, 페닐케톤뇨증, 폼페병, 원발성 섬모운동이상증, 프로트롬빈 돌연변이 관련 장애, 폐고혈압, 망막색소변성증, 샌드호프병, 중증 연합 면역 결핍 증후증, 겸상 적혈구 빈혈증, 척수성 근위축증, 스타르가르트병(Stargardt's Disease), 테이-삭스병, 어셔 증후군(Usher syndrome), X-연결 면역결핍증, 스터지-웨버 증후군(Sturge-Weber syndrome), 레트 증후군(Rett syndrome), 또는 암인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR)는 이중-가닥 RNA(dsRNA)에 결합하여 탈아미노화를 통해서 아데노신을 이노신으로 전환시키는 효소이다. RNA에서, 이노신은 번역 및 복제를 위해 구아노신과 유사하게 기능한다. 따라서, mRNA에서 아데노신이 이노신으로 전환되면 암호화된 단백질과 그 기능에 변화를 일으킬 수 있는 코돈 변화를 초래할 수 있다. 인간에서 발현되는 ADAR 단백질은 ADAR1, ADAR2, ADAR3의 세 가지가 알려져 있다. ADAR1 및 ADAR2는 신체 전체를 통해서 발현되는 한편 ADAR3은 뇌에서 발현된다. ADAR1 및 ADAR2는 촉매적으로 활성인 반면 ADAR3은 비활성인 것으로 여겨진다.

[0002] 합성 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드는 표적 RNA에서 특정 아데노신을 탈아미노화함으로써 표적 RNA를 편집하기 위해 ADAR 단백질을 활용할 수 있는 것으로 나타났다. 올리고뉴클레오타이드는 탈아미노화될 아데노신과 반대편에 있는 적어도 하나의 미스매치를 제외하고 표적 RNA에 상보적이다. 그러나, 이전에 개시된 방법은 요법으로서의 사용을 허용하는 데 필요한 선택성 및/또는 안정성을 갖는 것으로 나타나지 않았다. 따라서, 치료상 효과적인 방식으로 표적 RNA를 선택적으로 편집하기 위해 ADAR 단백질을 이용할 수 있는 새로운 올리고뉴클레오타이드가 필요하다.

발명의 내용

[0003] 본 발명은 표적 mRNA에서 아데노신을 탈아미노화하는 유용한 조성물 및 방법을 특징으로 하며, 예컨대, 아데노신은 예컨대, 이를 필요로 하는 대상체에서 치료 결과를 내기 위하여 탈아미노화될 수 있다.

[0004] RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR)는 이중-가닥 RNA(dsRNA)의 소정의 구조적 모티프를 인식하고 아데노신을 이노신으로 편집하여, 아미노산 코돈의 레코딩을 유발하여, 암호화된 단백질 및 이의 기능에 대한 변화를

초래할 수 있다. 편집 부위를 둘러싸고 있는 핵산들, 특히 편집 부위의 바로 5'에 있는 핵산과 편집 부위에 대해서 바로 3'에 있는 핵산(이들은 함께 편집 부위와 함께 3문자 배열이라 불림)은 아데노신의 탈아미노화에서 중요한 역할을 한다. 편집 부위에 대해서 5' 위치에서의 U 및 3' 위치에서의 G에 대한 선호도는 과발현된 인간 ADAR2 및 ADAR1에 의해 효율적으로 편집된 효모 RNA의 분석으로부터 밝혀졌다. 이는 문헌[Wang et al., (2018) Biochemistry, 57: 1640-1651, Eifler et al., (2013) Biochemistry, 52: 7857-7869, 및 Eggington et al., (2011) Nat. Commun., 319: 1-9]을 참조한다. 선택된 전사체의 특정 부위에 ADAR을 동원(recruiting)하고 이웃하는 염기에 관계없이 아데노신의 탈아미노화는 질환의 치료에 큰 가능성을 가지고 있다. dsRNA/ADAR 복합체의 편집 부위의 구조 및 모델링 연구를 기초로 하여, 가이드 올리고뉴클레오타이드에 편입될 수 있는 몇 가지 구조적 특징은 그 특성이 ADAR의 동원을 증가시키고 표적 RNA의 편집 효율을 증가시킬 수 있었던 것을 확인해주었다. ADAR 단백질을 동원하고 표적 RNA에서 상이한 주변 염기 조성을 가진 아데노신을 탈아미노화할 수 있는, α-호모-DNA와 같은 화학적 변형을 가진 신규한 올리고뉴클레오타이드가 제시되어 있다. 또한, 구조-활성 관계(SAR) 연구는, 3문자 배열 변형에 더하여 가이드 올리고뉴클레오타이드에서의 전체가 아닌 일부의 뉴클레오사이드 중의 리보스의 2'-O-메틸(2'-OMe) 변형이 효율적인 ADAR 관여 및 편집과 양립 가능함을 밝혀내었다.

[0005] 본 발명의 예시적인 실시형태는 이하에 번호매긴 단락에 기재되어 있다.

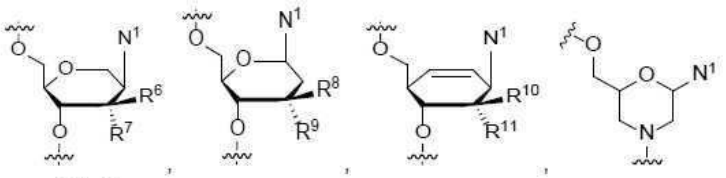
[0006] E1. 하기 구조를 포함하는 올리고뉴클레오타이드:

[0007] $$[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$$

[0008] 여기서 A 및 B의 각각은 뉴클레오타이드이고;

[0009] m 및 n은, 각각 독립적으로, 1 내지 50의 정수이고;

[0010] X^1, X^2 및 X^3은, 각각 독립적으로, 뉴클레오타이드이고, 여기서 X^1, X^2 및 X^3 중 적어도 하나는 하기 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖고:

[0011] 
화학식 I 화학식 II 화학식 III 화학식 IV

[0012] 여기서 N^1은 수소 또는 핵염기이고;

[0013] R^6은 수소, 하이드록시 또는 할로겐이고;

[0014] R^7은 수소, 하이드록시, 할로겐 또는 C_1-C_6 알콕시이고;

[0015] R^8은 수소 또는 할로겐이고;

[0016] R^9는 수소 또는 하이드록시, 할로겐 또는 C_1-C_6 알콕시이고;

[0017] R^{10}은 수소 또는 할로겐이고; 그리고

[0018] R^{11}은 수소, 또는 하이드록시, 할로겐 또는 C_1-C_6 알콕시이다.

[0019] E2. E1의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, $[A_m]$ 및/또는 $[B_n]$의 뉴클레오타이드의 적어도 80%(예컨대, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100%)는 핵염기, 당 및 인터뉴클레오사이드 링키지(internucleoside linkage)를 포함한다.

[0020] E3. E1 또는 E2의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^1은 아데닌 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신 또는 유라실

핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, X^3은 아데닌 핵염기를 포함하고; X^1은 아데닌 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신 또는 유라실 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, X^3은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하거나; X^1은 아데닌 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신 또는 유라실 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, X^3은 유라실 핵염기를 포함하거나; X^1은 아데닌 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신 또는 유라실 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, X^3은 사이토신 핵염기를 포함하거나; X^1은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신 또는 유라실 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, X^3은 아데닌 핵염기를 포함하거나; X^1은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신 또는 유라실 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, X^3은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하거나; X^1은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신 또는 유라실 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, X^3은 유라실 핵염기를 포함하거나; X^1은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신 또는 유라실 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, X^3은 사이토신 핵염기를 포함하거나; X^1은 유라실 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신 또는 유라실 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, X^3은 아데닌 핵염기를 포함하거나; X^1은 유라실 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신 또는 유라실 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, X^3은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하거나; X^1은 유라실 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신 또는 유라실 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, X^3은 유라실 핵염기를 포함하거나; X^1은 유라실 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신 또는 유라실 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, X^3은 사이토신 핵염기를 포함하거나; X^1은 사이토신 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신 또는 유라실 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, X^3은 아데닌 핵염기를 포함하거나; X^1은 사이토신 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신 또는 유라실 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, X^3은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하거나; X^1은 사이토신 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신 또는 유라실 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, X^3은 유라실 핵염기를 포함하거나; 또는 X^1은 사이토신 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신 또는 유라실 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, X^3은 사이토신 핵염기를 포함한다.

[0021] E4. E1 내지 E3 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 할로겐은 플루오로이다.

[0022] E5. E1 내지 E4 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, C_1-C_6 알콕시는 OCH_3이다.

[0023] E6. E1 내지 E5 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^1, X^2 및 X^3 중 적어도 하나는, R^8 및 R^9의 각각이 수소인 화학식 II의 구조를 갖는다.

[0024] E7. E6의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^1은 R^8 및 R^9가 수소인 화학식 II의 구조를 갖는다.

[0025] E8. E6 또는 E7의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^2는 R^8 및 R^9의 각각이 수소인 화학식 II의 구조를 갖는다.

[0026] E9. E1 내지 E5 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^2는 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖는다.

[0027] E10. E1 내지 E9 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^1이 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^2 및 X^3의 각각은, 독립적으로, 리보뉴클레오타이드, 2'-O-C_1-C_6 알킬-뉴클레오타이드, 2'-아미노-뉴클레오타이드, 아라비노핵산-뉴클레오타이드, 이환식-뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 구속된 에틸-뉴클레오타이드, LNA-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; X^2가 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^1 및 X^3의 각각은, 독립적으로, 리보뉴클레오타이드, 2'-O-

C_1-C_6 알킬-뉴클레오타이드, 2'-아미노-뉴클레오타이드, 아라비노핵산-뉴클레오타이드, 이환식-뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 구속된 에틸-뉴클레오타이드, LNA-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; X^3이 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^1 및 X^2의 각각은, 독립적으로, 리보뉴클레오타이드, 2'-O-C_1-C_6 알킬-뉴클레오타이드, 2'-아미노-뉴클레오타이드, 아라비노핵산-뉴클레오타이드, 이환식-뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 구속된 에틸-뉴클레오타이드, LNA-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; X^1 및 X^2이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^3은 리보뉴클레오타이드, 2'-O-C_1-C_6 알킬-뉴클레오타이드, 2'-아미노-뉴클레오타이드, 아라비노핵산-뉴클레오타이드, 이환식-뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 구속된 에틸-뉴클레오타이드, LNA-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; X^1 및 X^3이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^2는 리보뉴클레오타이드, 2'-O-C_1-C_6 알킬-뉴클레오타이드, 2'-아미노-뉴클레오타이드, 아라비노핵산-뉴클레오타이드, 이환식-뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 구속된 에틸-뉴클레오타이드, LNA-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; 그리고 X^2 및 X^3이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^1은 리보뉴클레오타이드, 2'-O-C_1-C_6 알킬-뉴클레오타이드, 2'-아미노-뉴클레오타이드, 아라비노핵산-뉴클레오타이드, 이환식-뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 구속된 에틸-뉴클레오타이드, LNA-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드.

[0028] E11. E10의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^1이 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^2 및 X^3의 각각은, 독립적으로, 리보뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; X^2이 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^1 및 X^3의 각각은, 독립적으로, 리보뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; X^3이 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^1 및 X^2의 각각은, 독립적으로, 리보뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; X^1 및 X^2이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^3은 리보뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; X^1 및 X^3이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^2는 리보뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이고; 그리고 X^2 및 X^3이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^1은 리보뉴클레오타이드, 2'-F-뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드 또는 DNA-뉴클레오타이드이다.

[0029] E12. E11의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^1이 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^2 및 X^3의 각각은 리보뉴클레오타이드이고; X^2가 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^1 및 X^3의 각각은 리보뉴클레오타이드이고; X^3이 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 가질 경우, X^1 및 X^2의 각각은 리보뉴클레오타이드이고; X^1 및 X^2이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^3은 리보뉴클레오타이드이고; X^1 및 X^3이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^2는 리보뉴클레오타이드이고; 그리고 X^2 및 X^3이 각각 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖지 않을 경우, X^1은 리보뉴클레오타이드이다.

[0030] E13. E1 내지 E12 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^1은 하이포잔틴 핵염기를 포함한다.

[0031] E14. E1 내지 E12 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^1은 유라실 핵염기를 포함한다.

[0032] E15. E1 내지 E12 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^1은 사이토신 핵염기를 포함한다.

[0033] E16. E1 내지 E15 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^3은 하이포잔틴 핵염기를 포함한다.

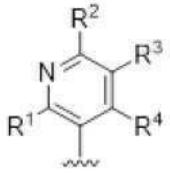
[0034] E17. E1 내지 E15 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^3은 아데닌 핵염기를 포함한다.

[0035] E18. E1 내지 E17 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^2는 사이토신 핵염기를 포함한다.

[0036] E19. E1 내지 E17 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^2는 유라실 핵염기를 포함한다.

[0037] E20. E1 내지 E17 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^2는 핵염기를 포함하지 않는다.

[0038] E21. E1 내지 E17 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^2는 하기 구조를 갖는 핵염기 또는 이의 염을 포함한다:

[0039] 

[0040] 여기서 R^1은 수소, 트라이플루오로메틸, 선택적으로 치환된 아미노, 하이드록실, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알콕시이고;

[0041] R^2는 수소, 선택적으로 치환된 아미노, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬이고; 그리고

[0042] R^3 및 R^4는, 독립적으로, 수소, 할로겐 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬이다.

[0043] E22. E1 내지 E21 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^2는 2'-O-메틸-뉴클레오타이드가 아니다.

[0044] E23. E1 내지 E22 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^1, X^2 및 X^3은 2'-O-메틸-뉴클레오타이드가 아니다.

[0045] E24. E1 내지 E23 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, $[A_m]$은 적어도 하나의 뉴클레아제 내성 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0046] E25. E1 내지 E24 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, $[A_m]$은 적어도 하나의 2'-O-C_1-C_6 알킬-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-아미노-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 아라비노 핵산-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 이환식-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-F-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 구속된 에틸(cEt)-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 LNA-뉴클레오타이드 및/또는 적어도 하나의 DNA-뉴클레오타이드를 포함한다.

[0047] E26. E25의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, $[A_m]$은 적어도 하나의 2'-O-메틸-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-F-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 cEt-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 LNA-뉴클레오타이드 및/또는 적어도 하나의 DNA-뉴클레오타이드를 포함한다.

[0048] E27. E1 내지 E26 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, $[A_m]$은 적어도 5개의 말단 2'-O-메틸-뉴클레오타이드를 포함한다.

[0049] E28. E1 내지 E27 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, $[A_m]$은 적어도 하나의 포스포로티오에이트 링키지를 포함한다.

[0050] E29. E1 내지 E28 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, $[A_m]$은 적어도 4개의 말단 포스포로티오에이트 링키지를 포함한다.

[0051] E30. E28 또는 E29의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 적어도 하나의 포스포로티오에이트 링키지는 입체순수하다.

[0052] E31. E1 내지 E30 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, $[B_n]$은 적어도 하나의 뉴클레아제 내성 뉴클

레오타이드를 포함한다.

[0053] E32. E1 내지 E31 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, $[B_n]$은 적어도 하나의 2'-O-C_1-C_6 알킬-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-아미노-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 아라비노 핵산-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 이환식-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-F-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 cEt-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 LNA-뉴클레오타이드 및/또는 적어도 하나의 DNA-뉴클레오타이드를 포함한다.

[0054] E33. E32의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, $[B_n]$은 적어도 하나의 2'-O-메틸-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-F-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 2'-O-메톡시에틸-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 cEt-뉴클레오타이드, 적어도 하나의 LNA-뉴클레오타이드 및/또는 적어도 하나의 DNA-뉴클레오타이드를 포함한다.

[0055] E34. E1 내지 E33 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, $[B_n]$은 적어도 5개의 말단 2'-O-메틸-뉴클레오타이드를 포함한다.

[0056] E35. E1 내지 E34 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, $[B_n]$은 적어도 하나의 포스포로티오에이트 링키지를 포함한다.

[0057] E36. E1 내지 E35 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, $[B_n]$은 적어도 4개의 말단 포스포로티오에이트 링키지를 포함한다.

[0058] E37. E35 또는 E36의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 적어도 하나의 포스포로티오에이트 링키지는 입체순수하다.

[0059] E38. E1 내지 E37 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 조합된 $[A_m]$과 $[B_n]$의 뉴클레오타이드의 적어도 20%(예컨대, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 100%)는 2'-O-메틸-뉴클레오타이드이다.

[0060] E39. E1 내지 E38 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 5'-캡 구조를 더 포함한다.

[0061] E40. E39의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 5'-캡 구조는 2,2,7-트라이메틸구아노신 캡이다.

[0062] E41. E1 내지 E40 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 대체 핵염기(alternative nucleobase)를 포함한다.

[0063] E42. E41의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 대체 핵염기는 5-메틸사이토신, 5-하이드록시사이토신, 5-메톡시사이토신, N4-메틸사이토신, N3-메틸사이토신, N4-에틸사이토신, 슈도아이소사이토신, 5-플루오로사이토신, 5-브로모사이토신, 5-아이오도사이토신, 5-아미노사이토신, 5-에틴일사이토신, 5-프로핀일사이토신, 피롤로사이토신, 5-아미노메틸사이토신, 5-하이드록시메틸사이토신, 나프티리딘, 5-메톡시유라실, 슈도유라실, 다이하이드로유라실, 2-티오유라실, 4-티오유라실, 2-티오티민, 4-티오티민, 5,6-다이하이드로티민, 5-할로유라실, 5-프로핀일유라실, 5-아미노메틸유라실, 5-하이드록시메틸유라실, 하이포잔틴, 7-데아자구아닌, 8-아자-7-데아자구아닌, 7-아자-2,6-다이아미노퓨린, 티에노구아닌, N1-메틸구아닌, N2-메틸구아닌, 6-티오구아닌, 8-메톡시구아닌, 8-알릴옥시구아닌, 7-아미노메틸-7-데아자구아닌, 7-메틸구아닌, 이미다조피리도피리미딘, 7-데아자아데닌, 3-데아자아데닌, 8-아자-7-데아자아데닌, 8-아자-7-데아자아데닌, N1-메틸아데닌, 2-메틸아데닌, N6-메틸아데닌, 7-메틸아데닌, 8-메틸아데닌, 또는 8-아지도아데닌이다.

[0064] E43. E41의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 대체 핵염기는 2-아미노-퓨린, 2,6-다이아미노-퓨린, 3-데아자-아데닌, 7-데아자-아데닌, 7-메틸-아데닌, 8-아지도-아데닌, 8-메틸-아데닌, 5-하이드록시메틸-사이토신, 5-메틸-사이토신, 피롤로-사이토신, 7-아미노메틸-7-데아자-구아닌, 7-데아자-구아닌, 7-메틸-구아닌, 8-아자-7-데아자-구아닌, 티에노-구아닌, 하이포잔틴, 4-티오-유라실, 5-메톡시-유라실, 다이하이드로-유라실, 또는 슈도유라실이다.

[0065] E44. E41의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 대체 핵염기는 5-메틸-사이토신 또는 2-아미노-퓨린이다.

[0066] E45. E1 내지 E44 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 5'-말단 뉴클레오타이드는 2'-아미노-뉴클레오타이드이다.

[0067] E46. E1 내지 E45 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 조합된 A와 B는 18 내지 80개의 뉴클레오타이드(예컨대, 27 내지 71, 36 내지 62, 45 내지 53, 또는 47 내지 51개의 뉴클레오타이드)로 이루어진다.

[0068] E47. E1 내지 E46 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, m은 5 내지 40(예컨대, 8 내지 36, 12 내지 32, 16 내지 28, 20 내지 24 또는 30 내지 40)이다.

[0069] E48. E1 내지 E47 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, n은 5 내지 40(예컨대, 7 내지 17, 8 내지 36, 12 내지 32, 16 내지 28 또는 20 내지 24)이다.

[0070] E49. E1의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, m 및 n은, 각각 독립적으로, 5 내지 40의 정수이고; 적어도 X^1, X^2 및 X^3은 R^8 및 R^9가 각각 수소인 화학식 II의 구조를 갖고; 화학식 II의 구조를 갖지 않는 X^1, X^2 및 X^3의 각각은 리보뉴클레오타이드이고; $[A_m]$ 및 $[B_n]$은 각각 적어도 5개의 말단 2'-O-메틸-뉴클레오타이드 및 적어도 4개의 말단 포스포로티오에이트 링키지를 포함하고; 그리고 조합된 $[A_m]$ 및 $[B_n]$ 중의 뉴클레오타이드의 적어도 20%는 2'-O-메틸-뉴클레오타이드이다.

[0071] E50. E49의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, X^1은 아데닌 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 아데닌 핵염기를 포함하거나; X^1은 아데닌 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하거나; X^1은 아데닌 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 유라실 또는 티민 핵염기를 포함하거나; X^1은 아데닌 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 사이토신 또는 5-메틸사이토신 핵염기를 포함하거나; X^1은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 아데닌 핵염기를 포함하거나; X^1은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하거나; X^1은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 유라실 또는 티민 핵염기를 포함하거나; X^1은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 사이토신 또는 5-메틸사이토신 핵염기를 포함하거나; X^1은 유라실 또는 티민 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 아데닌 핵염기를 포함하거나; X^1은 유라실 또는 티민 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하거나; X^1은 유라실 또는 티민 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 유라실 또는 티민 핵염기를 포함하거나; X^1은 유라실 또는 티민 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 사이토신 또는 5-메틸사이토신 핵염기를 포함하거나; X^1은 사이토신 또는 5-메틸사이토신 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 아데닌 핵염기를 포함하거나; X^1은 사이토신 또는 5-메틸사이토신 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하거나; X^1은 사이토신 또는 5-메틸사이토신 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민

핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 유라실 또는 티민 핵염기를 포함하거나; 또는 X^1은 사이토신 또는 5-메틸사이토신 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 사이토신 또는 5-메틸사이토신 핵염기를 포함한다.

[0072] E51. E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제 (ADAR)-동원 도메인을 더 포함한다.

[0073] E52. E51의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하나의 ADAR-동원 도메인을 포함한다.

[0074] E53. E52의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, ADAR-동원 도메인은 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 있다.

[0075] E54. E52의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, ADAR-동원 도메인은 상기 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 있다.

[0076] E55. E51의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 제1 ADAR-동원 도메인 및 제2 ADAR-동원 도메인을 포함한다.

[0077] E56. E55의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 제1 ADAR-동원 도메인은 상기 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 있되, 제2 ADAR-동원 도메인은 상기 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 있다.

[0078] E57. E51 내지 E56 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 화학식 V의 구조를 포함한다:

[0079] $$C\text{-}L_1\text{-}D\text{-}L_2\text{-}[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$$

화학식 V

[0080] 식 중,

[0081] $[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$은 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드이고;

[0082] C는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이고;

[0083] L_1은 루프 영역이고; 그리고

[0084] D는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이고;

[0085] L_2는 선택적 링커이고;

[0086] 여기서 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 C 및 D에 의해 형성된 듀플렉스 구조를 포함하되, 듀플렉스 구조는 C의 뉴클레오타이드와 D의 뉴클레오타이드 사이에 적어도 하나의 미스매치를 포함하고, C 또는 D는 적어도 하나의 대체 핵염기를 포함한다.

[0087] E58. E57의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, C 및 D는 적어도 하나의 대체 핵염기를 포함한다.

[0088] E59. E57 또는 E58의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, L_1은 연결된 뉴클레오사이드를 포함한다.

[0089] E60. E59의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, L_1은 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진다.

[0090] E61. E57 내지 E60 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, L_1은 적어도 하나의 대체 핵염기, 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지, 및/또는 적어도 하나의 대체 당 모이어티(alternative sugar moiety)를 포함한다.

[0091] E62. E57 내지 E61 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, C 또는 D는 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지 및/또는 적어도 하나의 대체 당 모이어티를 포함한다.

[0092] E63. E57 내지 E61 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, C 및 D는 각각 독립적으로 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지 및/또는 적어도 하나의 대체 당 모이어티를 포함한다.

[0093] E64. E51 내지 E56 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 화학식 VI의 구조를 포함한다:

$$C\text{-}L_1\text{-}D\text{-}L_2\text{-}[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$$

화학식 VI

[0094]

[0095] 식 중,

[0096] $[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$은 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드이고;

[0097] C는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이고;

[0098] L_1은 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지지 않은 루프 영역이고; 그리고

[0099] D는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이고;

[0100] L_2는 선택적 링커이고,

[0101] 여기서 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 C 및 D에 의해 형성된 듀플렉스 구조를 포함하되, 듀플렉스 구조는 C의 뉴클레오타이드와 D의 뉴클레오타이드 사이에 적어도 하나의 미스매치를 포함한다.

[0102] E65. E55의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, L_1은 화학식 VII의 구조를 갖는다:

$$F^1\text{-}(G^1)_j\text{-}(H^1)_k\text{-}(G^2)_m\text{-}(I)\text{-}(G^3)_n\text{-}(H^2)_p\text{-}(G^4)_q\text{-}F^2$$

화학식 VII

[0103]

[0104] 식 중, F^1은 루프 영역과 C 사이의 결합이고; F^2는 D와 $[A_m]$ 사이 또는 D와 선택적으로 링커 사이의 결합이고; G^1, G^2, G^3 및 G^4는 각각 독립적으로, 선택적으로 치환된 C_1-C_2 알킬, 선택적으로 치환된 C1-C3 헤테로알킬, O, S 및 NR^N이고; R^N은 수소, 선택적으로 치환된 C_{1-4} 알킬, 선택적으로 치환된 C_{2-4} 알켄일, 선택적으로 치환된 C_{2-4} 알킨일, 선택적으로 치환된 C_{2-6} 헤테로사이클릴, 선택적으로 치환된 C_{6-12} 아릴, 또는 선택적으로 치환된 C_{1-7} 헤테로알킬로부터 선택되고; C^1 및 C^2는, 각각 독립적으로, 카보닐, 티오카보닐, 설포닐 또는 포스포릴로부터 선택되고; j, k, m, n, p 및 q는, 각각 독립적으로, 0 또는 1이고; 그리고 I는 선택적으로 치환된 C_{1-10} 알킬, 선택적으로 치환된 C_{2-10} 알켄일, 선택적으로 치환된 C_{2-10} 알킨일, 선택적으로 치환된 C_{2-6} 헤테로사이클릴, 선택적으로 치환된 C_{6-12} 아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_{10} 폴리에틸렌 글리콜, 또는 선택적으로 치환된 C_{1-10} 헤테로알킬, 또는 $F^1\text{-}(G^1)_j\text{-}(H^1)_k\text{-}(G^2)_m\text{-}(I)\text{-}(G^3)_n\text{-}(H^2)_p\text{-}(G^4)_q\text{-}F^2$를 연결하는 화학 결합이다.

[0105] E66. E64 또는 E65의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, L_1은 탄수화물-함유 연결 모이어티를 포함한다.

[0106] E67. E64 내지 E66 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, C 또는 D는 각각 적어도 하나의 대체 핵염기, 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지, 및/또는 적어도 하나의 대체 당 모이어티를 포함한다.

[0107] E68. E64 내지 E66 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, C 및 D는 각각 독립적으로 적어도 하나의 대체 핵염기, 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지, 및/또는 적어도 하나의 대체 당 모이어티를 포함한다.

[0108] E69. E51 내지 E56 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 화학식 VIII의 구조를 포함한다:

$$C\text{-}L_1\text{-}D\text{-}L_2\text{-}[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$$

화학식 VIII

[0109]

[0110] 식 중,

[0111] $[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$은 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드이고;

[0112] C는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이고;

[0113] L_1은 적어도 하나의 대체 핵염기 또는 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지를 포함하는 루프 영역이고; 그리고

[0114] D는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이고;

[0115] L_2는 선택적 링커이고,

[0116] 여기서 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 C 및 D에 의해 형성된 듀플렉스 구조를 포함하되, 듀플렉스 구조는 C의 뉴클레오타이드와 D의 뉴클레오타이드 사이에 적어도 하나의 미스매치를 포함한다.

[0117] E70. E69의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, L_1은 적어도 하나의 대체 핵염기 및 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지를 포함한다.

[0118] E71. E51 내지 E56 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 화학식 IX의 구조를 포함한다:

[0119] $$C\text{-}L_1\text{-}D\text{-}L_2\text{-}[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$$

화학식 IX

[0120] 식 중,

[0121] $[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$은 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드이고;

[0122] C는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이고;

[0123] L_1은 적어도 하나의 대체 당 모이어티를 포함하는 루프 영역이되, 대체 당 모이어티는 2'-O-C_1-C_6 알킬-당 모이어티, 2'-아미노-당 모이어티, 2'-플루오로-당 모이어티, 2'-O-MOE 당 모이어티, 아라비노 핵산(ANA) 당 모이어티, 데옥시리보스 당 모이어티, 및 이환식 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0124] D는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[0125] L_2는 선택적 링커이고,

[0126] 여기서 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이 사이의 C 및 D에 의해 형성된 듀플렉스 구조를 포함하고, 듀플렉스 구조는 C의 뉴클레오타이드와 D의 뉴클레오타이드 사이에 적어도 하나의 미스매치를 포함한다.

[0127] E72. E71의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 이환식 당 모이어티는 옥시-LNA 당 모이어티, 티오-LNA 당 모이어티, 아미노-LNA 당 모이어티, cEt 당 모이어티, 및 에틸렌-가교된(ENA) 당 모이어티, 및 LNA 당 모이어티로부터 선택된다.

[0128] E73. E71 또는 E72의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, ANA 당 모이어티는 2'-플루오로-ANA 당 모이어티이다.

[0129] E74. E71 내지 E73 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, C 또는 D는 적어도 하나의 대체 핵염기, 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지, 및/또는 적어도 하나의 대체 당 모이어티를 포함한다.

[0130] E75. E71 내지 E73 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, C 및 D는 각각 독립적으로 적어도 하나의 대체 핵염기, 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지, 및/또는 적어도 하나의 대체 당 모이어티를 포함한다.

[0131] E76. E60 내지 E75 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, C는 D의 적어도 5개의 인접한 핵염기에 상보적이다.

[0132] E77. E60 내지 E75 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, C의 핵염기의 적어도 80%(예컨대, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100%)는 D의 핵염기에 상보적이다.

[0133] E78. E57 내지 E77 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, C는 서열번호 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19,

22, 25, 28, 31 및 34 중 어느 하나에 제시된 핵염기 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 핵염기 서열을 포함한다.

[0134] E79. E57 내지 E78 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, D는 서열번호 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32 및 35 중 어느 하나에 제시된 핵염기 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 핵염기 서열을 포함한다.

[0135] E80. E57 내지 E78 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, C-L_1-D는 서열번호 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 및 36 중 어느 하나에 제시된 핵염기 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 핵염기 서열을 포함한다.

[0136] E81. E57 내지 E63, E66, E70, E74 또는 E75 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 적어도 하나의 대체 핵염기는 5-메틸사이토신, 5-하이드록시사이토신, 5-메톡시사이토신, N^4-메틸사이토신, N^3-메틸사이토신, N^4-에틸사이토신, 슈도아이소사이토신, 5-플루오로사이토신, 5-브로모사이토신, 5-아이오도사이토신, 5-아미노사이토신, 5-에틴일사이토신, 5-프로핀일사이토신, 피롤로사이토신, 5-아미노메틸사이토신, 5-하이드록시메틸사이토신, 나프티리딘, 5-메톡시유라실, 슈도유라실, 다이하이드로유라실, 2-티오유라실, 4-티오유라실, 2-티오티민, 4-티오티민, 5,6-다이하이드로티민, 5-할로유라실, 5-프로핀일유라실, 5-아미노메틸유라실, 5-하이드록시메틸유라실, 하이포잔틴, 7-데아자구아닌, 8-아자-7-데아자구아닌, 7-아자-2,6-다이아미노퓨린, 티에노구아닌, N^1-메틸구아닌, N^2-메틸구아닌, 6-티오구아닌, 8-메톡시구아닌, 8-알릴옥시구아닌, 7-아미노메틸-7-데아자구아닌, 7-메틸구아닌, 이미다조피리도피리미딘, 7-데아자아데닌, 3-데아자아데닌, 8-아자-7-데아자아데닌, 8-아자-7-데아자아데닌, N^1-메틸아데닌, 2-메틸아데닌, N^6-메틸아데닌, 7-메틸아데닌, 8-메틸아데닌, 또는 8-아지도아데닌으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0137] E82. E57 내지 E63, E67, E70, E74 또는 E75 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 적어도 하나의 대체 핵염기는 2-아미노-퓨린, 2,6-다이아미노-퓨린, 3-데아자-아데닌, 7-데아자-아데닌, 7-메틸-아데닌, 8-아지도-아데닌, 8-메틸-아데닌, 5-하이드록시메틸-사이토신, 5-메틸-사이토신, 피롤로-사이토신, 7-아미노메틸-7-데아자-구아닌, 7-데아자-구아닌, 7-메틸-구아닌, 8-아자-7-데아자-구아닌, 티에노-구아닌, 하이포잔틴, 4-티오-유라실, 5-메톡시-유라실, 다이하이드로-유라실, 또는 슈도유라실로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0138] E83. E57 내지 E63, E67 내지 E70, E74 또는 E75 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지는 포스포로티오에이트 인터뉴클레오사이드 링키지, 2'-알콕시 인터뉴클레오사이드 링키지, 및 알킬 포스페이트 인터뉴클레오사이드 링키지로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0139] E84. E83의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지는 적어도 하나의 포스포로티오에이트 인터뉴클레오사이드 링키지이다.

[0140] E85. E62, E63, E67 내지 E71, E74 또는 E75 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 적어도 하나의 대체 당 모이어티는 2'-O-알킬-당 모이어티, 2'-O-메틸-당 모이어티, 2'-아미노-당 모이어티, 2'-플루오로-당 모이어티, 2'-O-MOE 당 모이어티, ANA 당 모이어티 데옥시리보스 당 모이어티, 및 이환식 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0141] E86. E85의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 이환식 당 모이어티는 옥시-LNA 당 모이어티, 티오-LNA 당 모이어티, 아미노-LNA 당 모이어티, cEt 당 모이어티, 및 에틸렌-가교된(ENA) 당 모이어티, 및 LNA 당 모이어티로부터 선택된다.

[0142] E87. E83 또는 E85의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, ANA 당 모이어티는 2'-플루오로-ANA 당 모이어티이다.

[0143] E88. E85의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 적어도 하나의 대체 당 모이어티는 2'-O-메틸-당 모이어티, 2'-플루오로-당 모이어티, 또는 2'-O-MOE 당 모이어티이다.

[0144] E89. E57 내지 E87 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 적어도 하나의 미스매치는 쌍을 이룬 A 대 C 미스매치, 쌍을 이룬 G 대 G 미스매치, 또는 쌍을 이룬 C 대 A 미스매치이다.

[0145] E90. E89의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 C의 뉴클레오타이드와 D의 뉴클레오타이드 간의 적어도 2개의 미스매치를 포함한다.

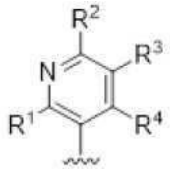
[0146] E91. E90의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 적어도 2개의 미스매치는 적어도 3개의 연결된 뉴클레오사이드만큼

분리되어 있다.

[0147] E92. E91의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 적어도 2개의 미스매치는 3개의 연결된 뉴클레오사이드만큼 분리되어 있다.

[0148] E93. E57 내지 E92 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 적어도 하나의 미스매치는 대체 핵염기를 갖는 뉴클레오사이드를 포함한다.

[0149] E94. E93의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 대체 핵염기는 하기 구조를 갖거나 또는 이의 염이다:

[0150] 

[0151] 여기서 R^1은 수소, 트라이플루오로메틸, 선택적으로 치환된 아미노, 하이드록실, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알콕시이고;

[0152] R^2는 수소, 선택적으로 치환된 아미노, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬이고; 그리고

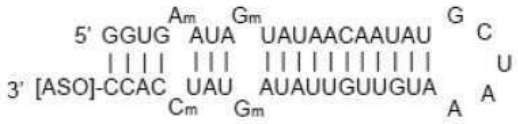
[0153] R^3 및 R^4는, 독립적으로, 수소, 할로겐 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬이다.

[0154] E95. E57 내지 E94 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, C-L_1-D는 ADAR-동원 도메인이다.

[0155] E96. E51 내지 E55 및 E92 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 하나 이상의 ADAR-동원 도메인은 글루타메이트 이온성 수용체 AMPA 소단위 2형(GluR2) ADAR-동원 도메인이다.

[0156] E97. E96의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, GluR2 ADAR-동원 도메인은 서열번호 37의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0157] E98. E97의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 화학식 X의 구조를 포함한다:



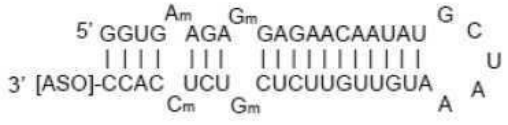
화학식 X

[0158]

[0159] 식 중, [ASO]는 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0160] E99. E96의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, GluR2 ADAR-동원 도메인은 서열번호 38의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0161] E100. E99의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 화학식 XI의 구조를 포함한다:



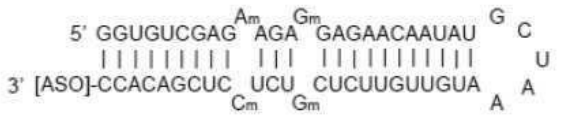
화학식 XI

[0162]

[0163] 식 중, [ASO]는 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0164] E101. E96의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, GluR2 ADAR-동원 도메인은 서열번호 39의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0165] E102. E101의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 화학식 XII의 구조를 포함한다:



화학식 XII

[0166]

[0167] 식 중, [ASO]는 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0168] E103. E96의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, GluR2 ADAR-동원 도메인은 서열번호 40의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

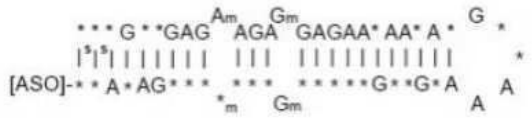
[0169] E104. E51 내지 E56 또는 E95 내지 E103 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 하나 이상의 ADAR-동원 도메인은 적어도 하나의 뉴클레아제-내성 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0170] E105. E104의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 뉴클레아제-내성 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸-뉴클레오타이드이다.

[0171] E106. E51 내지 E56 또는 E95 내지 E104 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 하나 이상의 ADAR-동원 도메인은 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지를 포함한다.

[0172] E107. E106의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 대체 인터뉴클레오사이드 링키지는 포스포로티오에이트 인터뉴클레오사이드 링키지이다.

[0173] E108. E103 내지 E107 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드 하기 화학식 XIII의 구조를 포함한다:



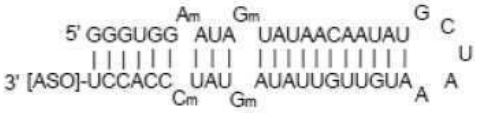
화학식 XIII

[0174]

[0175] 식 중, [ASO]는 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, *는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드이고, s는 포스포로티오에이트 인터뉴클레오사이드 링키지이고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0176] E109. E96의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, GluR2 ADAR-동원 도메인은 서열번호 41의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0177] E110. E109의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 화학식 XIV의 구조를 포함한다:



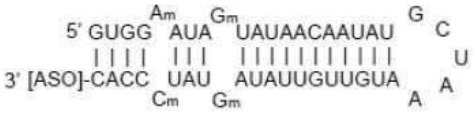
화학식 XIV

[0178]

[0179] 식 중, [ASO]는 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0180] E111. E96의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, GluR2 ADAR-동원 도메인은 서열번호 42의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0181] E112. E111의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 화학식 XV의 구조를 포함한다:



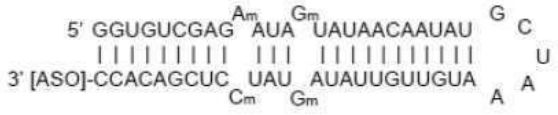
화학식 XV

[0182]

[0183] 식 중, [ASO]는 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0184] E113. E96의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, G1uR2 ADAR-동원 도메인은 서열번호 43의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0185] E114. E113의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 화학식 XVI의 구조를 포함한다:



화학식 XVI

[0186]

[0187] 식 중, [ASO]는 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0188] E115. E96의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, G1uR2 ADAR-동원 도메인은 서열번호 44의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0189] E116. E115의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 화학식 XVII의 구조를 포함한다:



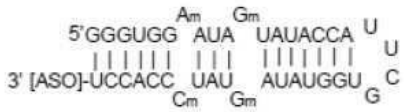
화학식 XVII

[0190]

[0191] 식 중, [ASO]는 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0192] E117. E96의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, G1uR2 ADAR-동원 도메인은 서열번호 45의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0193] E118. E117의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 화학식 XVIII의 구조를 포함한다:



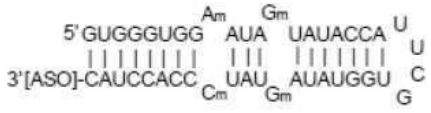
화학식 XVIII

[0194]

[0195] 식 중, [ASO]는 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0196] E119. E96의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, G1uR2 ADAR-동원 도메인은 서열번호 46의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0197] E120. E119의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 화학식 XIX의 구조를 포함한다:



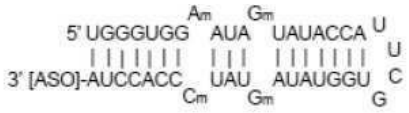
화학식 XIX

[0198]

[0199] 식 중, [ASO]는 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0200] E121. E96의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, G1uR2 ADAR-동원 도메인은 서열번호 47의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0201] E122. E121의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 화학식 XX의 구조를 포함한다:



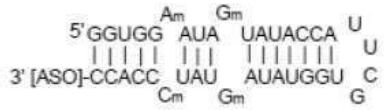
화학식 XX

[0202]

[0203] 식 중, [ASO]는 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0204] E123. E96의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, G1uR2 ADAR-동원 도메인은 서열번호 48의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0205] E124. E123의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 화학식 XXI의 구조를 포함한다:



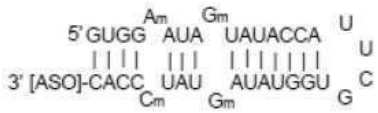
화학식 XXI

[0206]

[0207] 식 중, [ASO]는 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0208] E125. E96의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, G1uR2 ADAR-동원 도메인은 서열번호 49의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0209] E126. E125의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 화학식 XXII의 구조를 포함한다:



화학식 XXII

[0210]

[0211] 식 중, [ASO]는 E1 내지 E50 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0212] E127. E51 내지 E56 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 하나 이상의 ADAR-동원 도메인은 Z-DNA ADAR-동원 도메인이다.

[0213] E128. E51 내지 E56 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 하나 이상의 ADAR-동원 도메인은 MS2 ADAR-동원 도메인이다.

[0214] E129. E128의 올리고뉴클레오타이드에 있어서, MS2 ADAR-동원 도메인은 서열번호 50의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0215] E130. 표적화 모이어티에 접합된 E1 내지 E129 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 접합체.

[0216] E131. E130의 접합체에 있어서, 표적화 모이어티는 지질, 스테롤, 탄수화물 및/또는 펩타이드이다.

[0217] E132. E131의 접합체에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 스테롤에 접합된다.

[0218] E133. E132의 접합체에 있어서, 스테롤은 콜레스테롤이다.

[0219] E134. E131 내지 E133 중 어느 하나의 접합체에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 탄수화물에 접합된다.

[0220] E135. E134의 접합체에 있어서, 탄수화물은 N-아세틸갈락토사민이다.

[0221] E136. E131 내지 E135 중 어느 하나의 접합체에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 펩타이드에 접합된다.

[0222] E137. E136의 접합체에 있어서, 펩타이드는 세포-침투용 펩타이드이다.

[0223] E138. E131 내지 E137 중 어느 하나의 접합체에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 지질에 접합된다.

[0224] E139. E138의 접합체에 있어서, 지질은 리토콜산, 도코사헥사엔산, 또는 도코산산이다.

[0225] E140. 복합체로서,

[0226] E1 내지 E129 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드 또는 E130 내지 E139 중 어느 하나의 접합체; 및

[0227] mRNA

[0228] 를 포함하되, 여기서 올리고뉴클레오타이드 또는 접합체와 mRNA는 서로 혼성화되고, 복합체는 mRNA의 아데노신에 제1 미스매치를 포함한다.

[0229] E141. E140의 복합체에 있어서, 복합체는 제1 미스매치에 대해서 5'에 있는 4개의 뉴클레오타이드인 제2 미스매치를 포함한다.

[0230] E142. E140 또는 E141의 복합체에 있어서, 복합체는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 미스매치를 포함한다.

[0231] E143. E140 내지 E142 중 어느 하나의 복합체에 있어서, mRNA는 치료 결과를 낼 수 있도록 탈아미노화될 수 있는 아데노신을 포함한다.

[0232] E144. E140 내지 E143 중 어느 하나의 복합체에 있어서, mRNA는 대응하는 천연 mRNA에 비해서 구아노신에서 아데노신으로의 돌연변이를 포함한다.

[0233] E145. E144의 복합체에 있어서, 구아노신에서 아데노신으로의 돌연변이는 미스센스 또는 넌센스 돌연변이이다.

[0234] E146. E140 내지 E145 중 어느 하나의 복합체에 있어서, 제1 미스매치는 mRNA의 개시 코돈 내 아데노신에 있다.

[0235] E147. E140 내지 E145 중 어느 하나의 복합체에 있어서, 제1 미스매치는 mRNA의 정지 코돈 내 아데노신에 있다.

[0236] E148. E147의 복합체에 있어서, 정지 코돈은 조발성(premature) 정지 코돈이다.

[0237] E149. E140 내지 E148 중 어느 하나의 복합체를 제조하는 방법에 있어서, 상기 방법은 세포를 E1 내지 E129 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드 또는 E130 내지 E139 중 어느 하나의 접합체와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0238] E150. mRNA에서 아데노신의 탈아미노화 방법으로서, 해당 방법은 세포를 E1 내지 E129 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드 또는 E130 내지 E139 중 어느 하나의 접합체와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0239] E151. 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 장애를 치료하는 방법으로서, 해당 방법은 대상체에게 유효량의 E1 내지 E129 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드 또는 E130 내지 E139 중 어느 하나의 접합체를 투여하는 단계를 포함한다.

[0240] E152. E151의 방법에 있어서, 장애는 낭포성 섬유증, 백색증, 알파-1 항트립신 결핍증, 알츠하이머병, 근위축성 축삭경화증, 천식, 11-지중해빈혈, 카다실 증후군, 샤르코-마리-투스 질환, 만성 폐쇄성 폐질환, 원위 척수성 근위축증, 뒤센/베커 근이영양증, 이영양성 수포성 표피박리증, 수포성 표피박리증, 파브리병, 인자 V 레이든 관련 장애, 가족성 샘종 폴립증, 갈락토스혈증, 고셰병, 포도당-6-인산 탈수소효소 결손증, 혈우병, 유전성 혈색소증, 헌터 증후군, 헌팅턴병, 헐러 증후군(Hurler syndrome), 염증성 장 질환, 유전성 다응고 증후군, 레베르 선천성 흑암시, 레쉬-니한 증후군, 린치 증후군, 마판 증후군, 점액 다당류증, 근이영양증, 근긴장성 이영양증 I 및 II형, 신경섬유종증, 니만-픽병 A, B 및 C형, NY-ESO-1 관련 암, 파킨슨병, 포이츠-제거스 증후군, 폐 닐케톤뇨증, 폼페병, 원발성 섬모운동이상증, 프로트롬빈 돌연변이 관련 장애(예컨대, 프로트롬빈 G20210A 돌연변이), 폐고혈압, 망막색소변성증, 샌드호프병, 중증 연합 면역 결핍 증후증, 겸상 적혈구 빈혈증, 척수성 근위

축증, 스타르가르트병(Stargardt's Disease), 테이-삭스병, 어셔 증후군(Usher syndrome), X-연결 면역결핍증, 스터지-웨버 증후군(Sturge-Weber syndrome), 레트 증후군(Rett syndrome), 또는 암이다.

[0241] E153. E150 내지 E152 중 어느 하나의 방법에 있어서, 해당 방법은 세포에 또는 대상체에게 ADAR 융합 단백질을 투여하는 단계를 더 포함한다.

[0242] E154. E153의 방법에 있어서, ADAR 융합 단백질은세포에 또는 대상체에게 ADAR 융합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 작제물을 이용해서 투여된다.

[0243] E155. E153 또는 E154의 방법에 있어서, ADAR 융합 단백질은 MS2 박테리오파지 코트 단백질에 융합된 ADAR의 데아미나제 도메인을 포함한다.

[0244] E156. E155의 방법에 있어서, ADAR의 데아미나제 도메인은 ADAR1의 데아미나제 도메인이다.

[0245] E157. E155의 방법에 있어서, ADAR의 데아미나제 도메인은 ADAR2의 데아미나제 도메인이다.

[0246] E158. E151 내지 E157 중 어느 하나의 방법에 있어서, 투여는 비경구 투여, 척추강내(intrathecal) 투여, 또는 두개내 투여를 포함한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0247] ***화학 용어***

[0248] 본 명세서에서 사용되는 용어는 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것이며, 한정하려는 의도는 아니다.

[0249] 다음의 화학 정의 중 어느 것인가에 대해서, 원자 기호 뒤에 오는 숫자는 특정 화학 모이어티에 존재하는 해당 원소의 총 원자 수를 나타낸다. 이해되는 바와 같이, 다른 원자, 예컨대, H 원자 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 치환기는 원자의 원자가를 충족시키기 위해 필요에 따라 존재할 수 있다. 예를 들어, 비치환된 C_2 알킬기는 화학식 $-CH_2CH_3$를 갖는다. 본 명세서에 정의된 기와 함께 사용될 때, 탄소 원자의 수에 대한 언급은 아세탈기 및 케탈기 내 2가 탄소를 포함하지만, 아실, 에스터, 카보네이트, 또는 카바메이트기 내 카보닐 탄소는 포함하지 않는다. 헤테로아릴기 내 산소, 질소 또는 황 원자의 수에 대한 언급은 단지 헤테로고리식 고리의 일부를 형성하는 원자들을 포함한다.

[0250] 특정 치환체가 동일한 구조에 여러 번 존재할 수 있는 경우, 치환체의 각 경우는 그 치환체에 대한 가능한 정의 목록으로부터 독립적으로 선택될 수 있다.

[0251] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "알킬"은, 1 내지 20개의 탄소 원자(예컨대, 1 내지 16개의 탄소 원자, 1 내지 10개의 탄소 원자, 1 내지 6개의 탄소 원자, 또는 1 내지 3개의 탄소 원자)의 분지쇄 또는 직쇄 1가 포화 지방족 탄화수소 라디칼을 지칭한다.

[0252] 알킬렌은 2가 알킬기이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "알켄일"은, 단독으로 또는 다른 기와 조합하여, 탄소-탄소 이중 결합을 갖고 2 내지 20개의 탄소 원자(예컨대, 2 내지 16개의 탄소 원자, 2 내지 10개의 탄소 원자, 2 내지 6개의 탄소 원자, 또는 2개의 탄소 원자)를 갖는 직쇄 또는 분지형 탄화수소 잔기를 지칭한다.

[0253] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "할로겐"은, 플루오린(플루오로), 염소(클로로), 브로민(브로모), 또는 요오드(아이오도) 라디칼을 의미한다.

[0254] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "헤테로알킬"은, 구성 탄소 원자의 하나 이상이 질소, 산소 또는 황으로 대체된, 본 명세서에서 정의된 바와 같은 알킬기를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, 헤테로알킬기는 알킬기에 대해서 본 명세서에 기재된 바와 같은 1, 2, 3 또는 4개의 치환기로 더 치환될 수 있다. 헤테로알킬기의 예는, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 알킬-O-(예컨대, 메톡시 및 에톡시)를 지칭하는 "알콕시"이다. 헤테로알킬렌은 2가 헤테로알킬기이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "헤테로알켄일"은, 구성 탄소 원자의 하나 이상이 질소, 산소 또는 황으로 대체된 본 명세서에서 정의된 바와 같은 알켄일기를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, 헤테로알켄일기는 알켄일기에 대해서 본 명세서에 기재된 바와 같은 1, 2, 3 또는 4개의 치환기로 더 치환될 수 있다. 헤테로알켄일기의 예는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 알켄일-O-를 지칭하는 "알켄옥시"이다. 헤테로알켄일렌은 2가 헤테로알켄일기이다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 용어 "헤테로알킨일"은, 구성 탄소 원자의 하나 이상이 질소, 산소 또는 황으로 대체된, 본 명세서에서 정의된 바와 같은 알킨일기를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, 헤테로알킨일기는 알킨일기에 대해서 본 명세서에 기재된 바와 같은 1, 2, 3 또는 4개의 치환

기로 더 치환될 수 있다. 헤테로알킨일기의 예는, 본 명세서에 기재된 바와 같이, 알킨일-O-를 지칭하는 "알킨옥시"이다. 헤테로알킨일렌은 2가 헤테로알킨일기이다.

[0255] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "하이드록시"는 -OH기를 나타낸다.

[0256] 알킬, 헤테로알킬기는 치환 또는 비치환될 수 있다. 치환되는 경우, 달리 특정되지 않는 한, 일반적으로 1 내지 4개의 치환체가 존재할 것이다. 치환체는, 예를 들어: 알킬(예컨대, 비치환된 및 치환된, 여기서 치환체가 본 명세서에 기재된 임의의 기, 예컨대, 아릴, 할로, 하이드록시를 포함함), 아릴(예컨대, 치환된 및 비치환된 페닐), 카보사이클릴(예컨대, 치환된 및 비치환된 사이클로알킬), 할로(예컨대, 플루오로), 하이드록실, 헤테로알킬(예컨대, 치환된 및 비치환된 메톡시, 에톡시, 또는 티오알콕시), 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 아미노(예컨대, NH_2 또는 모노- 또는 다이알킬 아미노), 아지도, 사이아노, 나이트로, 또는 티올. 아릴, 카보사이클릴(예컨대, 사이클로알킬)을 포함하며, 헤테로아릴 및 헤테로사이클릴기는 또한 알킬(아릴알킬(예컨대, 치환된 및 비치환된 벤질)과 같은 비치환된 및 치환된)로 치환될 수 있다.

[0257] 본 발명의 화합물은 하나 이상의 비대칭 탄소 원자를 가질 수 있고, 광학적으로 순수한 거울상이성질체, 거울상이성질체들의 혼합물, 예를 들어, 라세미체, 광학적으로 순수한 부분입체이성질체, 부분입체이성질체들의 혼합물, 부분입체이성질체성 라세미체, 또는 부분입체이성질체성 라세미체의 혼합물의 형태로 존재할 수 있다. 광학적 활성 형태는, 예를 들어, 라세미체의 분해능에 의해, 비대칭 합성 또는 비대칭 크로마토그래피(카이럴 흡수제 또는 용리제에 의한 크로마토그래피)에 의해 얻어질 수 있다. 즉, 개시된 화합물 중 일부는 다양한 입체이성질체성 형태로 존재할 수 있다. 입체이성질체는 단지 이들의 공간적 배열이 상이한 화합물이다. 거울상이성질체는, 거울상이 중첩 가능하지 않은 입체이성질체의 쌍인데, 그 이유는 통상적으로 이들은 카이럴 중심으로서 작용하는 비대칭 치환된 탄소 원자를 함유하기 때문이다. "거울상이성질체"는 서로 거울상이고 중첩 가능하지 않은 분자의 쌍 중 하나를 의미한다. 부분입체이성질체는 거울상으로서 관련되지 않은 입체 이성질체이며, 가장 통상적으로 2개 이상의 비대칭 치환된 탄소 원자를 함유하고 1개 이상의 카이럴 탄소 원자 둘레에 치환체의 입체배치를 나타내기 때문이다. 화합물의 거울상이성질체는, 예를 들어, 하나 이상의 잘 알려진 기술 및 방법, 예를 들어, 카이럴 크로마토그래피 및 이에 기초한 분리 방법을 이용해서 라세미체로부터 거울상이성질체를 분리함으로써 제조될 수 있다. 라세미 혼합물로부터 본 명세서에 기재된 화합물의 거울상이성질체를 분리하기 위한 적절한 기술 및/또는 방법은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. "라세미체" 또는 "라세미 혼합물"은 2가지 거울상이성질체를 함유하는 화합물을 의미하며, 여기서 이러한 혼합물은 광학 활성이 없는 것을 나타내고; 즉, 이들은 편광광의 평면을 회전시키지 않는다. "기하학적 이성질체"는 탄소-탄소 이중 결합에 대한, 사이클로알킬 고리에 대한, 또는 가교된 이환식 계에 대한 관계에서 치환체 원자의 배향이 상이한 이성질체를 의미한다. 탄소-탄소 이중 결합의 각 측면 상의 (H 이외의) 원자는 E(치환체가 탄소-탄소 이중 결합의 25개 반대측면 상에 있음) 또는 Z(치환체가 동일 측면 상에 배향됨) 입체배치에 있을 수 있다. "R", "S", "S*", "R*", "E", "Z", "시스" 및 "트랜스"는 코어 분자에 관한 입체배치를 나타낸다. 개시된 화합물 중 일부는 회전장애이성질체 형태로 존재할 수 있다. 회전장애이성질체는 단일 결합에 대한 회전 장애로 인한 입체 이성질체이며, 여기서 회전에 대한 입체 변형 장벽은 이형태체(conformer)의 단리를 허용할 수 있도록 충분히 높다. 본 발명의 화합물은 이성질체-특이적 합성에 의해 개별적인 이성질체로서 제조될 수 있거나 또는 이성질체 혼합물로부터 분해될 수 있다. 통상의 분해 기술은 광학적 활성 산을 이용해서 이성질체쌍의 각 이성질체의 유리 염기의 염을 형성하는 것(유리 염기의 분별 결정화 및 재생이 후행됨), 광학적 활성 아민을 이용해서 이성질체쌍의 각 이성질체의 산 형태의 염을 형성하는 것(유리 산의 분별 결정화 및 재생이 후행됨), 광학적으로 순수한 산, 아민 또는 알코올을 이용해서 이성질체쌍의 각 이성질체의 에스터 또는 아마이드 35를 형성하는 것(크로마토그래피 분리 및 카이럴 보조제의 제거가 후행됨), 또는 다양한 잘 알려진 크로마토그래피 방법을 이용해서 출발 물질 또는 최종 생성물의 이성질체 혼합물을 분해하는 것을 포함한다. 개시된 화합물의 입체 화학이 구조에 의해 명명되거나 묘사되는 경우, 명명되거나 묘사된 입체이성질체는 다른 입체이성질체에 관하여 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 또는 99.9 중량%이다. 단일 거울상이성질체가 구조에 의해 명명되거나 묘사되는 경우, 명명되거나 묘사된 거울상이성질체는 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 또는 99.9 중량% 광학적으로 순수하다. 단일 부분입체이성질체가 구조에 의해 명명되거나 묘사되는 경우, 명명되거나 묘사된 부분입체이성질체는 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 또는 99.9 중량% 순수하다. 퍼센트 광학 순도는 거울상이성질체의 중량 또는 거울상이성질체의 중량 + 이의 광학적 이성질체의 중량에 대한 거울상이성질체의 중량의 비이다. 중량에 의한 부분입체이성질체 순도는 모든 부분입체이성질체의 중량에 대한 하나의 부분입체이성질체의 중량의 비이다. 개시된 화합물의 입체화학이 구조에 의해 명명되거나 묘사되는 경우, 명명되거나 묘사된 입체이성질체는 다른 입체이성질체에 대해서 몰분율로 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 또는 99.9% 순수하다. 단일 거울상이성질체가 구조에 의해 명명되거나 묘사되

는 경우, 명명되거나 묘사된 거울상이성질체는 몰분율로 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 또는 99.9% 순수하다. 단일 부분입체이성질체가 구조에 의해 명명되거나 묘사되는 경우, 묘사되거나 명명된 부분입체이성질체는 몰분율로 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 또는 99.9% 순수하다. 몰분율에 의한 퍼센트 순도는 거울상이성질체의 몰 또는 거울상이성질체의 몰 + 이의 광학 이성질체의 몰에 대한 거울상이성질체의 몰의 비이다. 마찬가지로, 몰분율에 의한 퍼센트 순도는 부분입체이성질체의 몰 또는 부분입체이성질체의 몰 + 이의 이성질체의 몰에 대한 부분입체이성질체의 몰의 비이다. 개시된 화합물이 입체화학을 나타내는 일 없이 구조에 의해 명명되거나 묘사되고 화합물이 적어도 하나의 카이럴 중심을 갖는 경우, 그 명칭 또는 구조는 대응하는 광학 이성질체가 없는 화합물의 거울상이성질체, 화합물의 라세미 혼합물, 또는 대응하는 광학 이성질체에 대해서 하나의 거울상이성질체가 풍부한 혼합물을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 개시된 화합물이 입체화학을 나타내는 일 없이 구조에 의해 명명되거나 묘사되고 2개 이상의 카이럴 중심을 갖는 경우, 그 명칭 또는 구조는 다른 부분입체이성질체가 없는 부분입체이성질체, 다른 부분입체이성질체 쌍이 없는 다수의 부분입체이성질체, 부분입체이성질체의 혼합물, 부분입체이성질체 쌍의 혼합물, 하나의 부분입체이성질체가 다른 부분입체이성질체(들)에 비해서 풍부한 부분입체이성질체의 혼합물, 또는 하나 이상의 부분입체이성질체가 다른 부분입체이성질체에 비해서 풍부한 부분입체이성질체의 혼합물을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명은 이들 형태 모두를 포괄한다.

[0258] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 방법 및 재료는 본 개시내용에서 사용하기 위해 본 명세서에 기재되어 있고; 당업계에 공지된 다른 적절한 방법 및 재료가 또한 사용될 수 있다. 재료, 방법 및 예는 예시일 뿐이며 제한하려는 의도가 아니다. 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 서열, 데이터베이스 항목 및 기타 참고 문헌은 그들의 전문이 참조에 의해 원용된다. 상충하는 경우 정의를 비롯하여 본 명세서가 우선할 것이다.

[0259] ***정의***

[0260] 편의상 본 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 일부 용어 및 어구의 의미가 아래에 제공된다. 달리 명시되지 않거나 문맥에서 암시되지 않는 한, 다음의 용어 및 어구는 이하에 제공된 의미를 포함한다. 정의는 특정 실시형태를 설명하는 데 도움을 주기 위해 제공되며, 기술의 범위가 청구범위에 의해서만 제한되기 때문에 청구된 기술을 제한하도록 의도되지 않는다. 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 이 기술이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 해당 기술 분야에서의 용어 사용과 본 명세서에서 제공된 정의 사이에 명백한 불일치가 있는 경우, 명세서 내에서 제공된 정의가 우선한다.

[0261] 본 출원에서, 문맥상 달리 명백하지 않는 한, (i) 단수 용어는 "적어도 하나"를 의미하는 것으로 이해될 수 있고; (ii) 용어 "또는"은 "및/또는"을 의미하는 것으로 이해될 수 있고; 그리고 (iii) "포함하는(including)" 및 " 구성하는(comprising)" 이라는 용어는 그 자체로 또는 하나 이상의 추가 구성요소 또는 단계와 함께 제시되든지 간에 항목별 구성요소 또는 단계를 포괄하는 것으로 이해될 수 있다.

[0262] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약" 및 "대략"은 설명되는 값보다 10% 이상 또는 이하인 값을 지칭한다. 예를 들어, 용어 "약 5nM"은 4.5 내지 5.5nM의 범위를 나타낸다.

[0263] 숫자 또는 일련의 숫자 앞에 있는 "적어도"라는 용어는 "적어도"라는 용어에 인접한 숫자와 문맥상 분명한 바와 같이 논리적으로 포함될 수 있는 모든 후속 숫자 또는 정수를 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 핵산 분자 중 뉴클레오타이드의 수는 정수이어야 한다. 예를 들어, "21개의 뉴클레오타이드 핵산 분자 중 18개 이상의 뉴클레오타이드"는 18, 19, 20 또는 21개의 뉴클레오타이드가 표시된 특성을 갖는 것을 의미한다. 일련의 숫자 또는 범위 앞에 적어도가 있는 경우 "적어도"가 시리즈 또는 범위의 각 숫자를 수식할 수 있는 것으로 이해된다.

[0264] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "이하(no more than)" 또는 "미만"은 어구에 인접한 값으로 이해되고, 문맥상 논리적으로 0으로 논리적인 낮은 값 또는 정수로 이해된다. 예를 들어, "5개 이하의 비변형된 뉴클레오타이드"를 갖는 올리고 뉴클레오타이드는 5, 4, 3, 2, 1 또는 0개의 비변형된 뉴클레오타이드를 갖는다. 일련의 숫자 또는 범위 앞에 "이하"가 있는 경우, "이하"는 시리즈 또는 범위의 각 숫자를 수식할 수 있는 것으로 이해된다.

[0265] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "투여"는 대상체 또는 시스템에 조성물(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 화합물 또는 화합물을 포함하는 제제)의 투여를 지칭한다. 동물 대상체(예를 들어, 인간)에 대한

투여는 본 명세서에 기재된 것과 같은 임의의 적절한 경로에 의한 것일 수 있다.

[0266] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "병용 요법(combination therapy)" 또는 "조합하여 투여되는"은 2가지(또는 그 이상)의 상이한 제제 또는 치료법이 특정 질환 또는 병태에 대해 정의된 치료 요법의 일부로서 대상체에게 투여됨을 의미한다. 치료 요법은 대상체에 대한 개별 제제의 효과가 중첩되도록 각 제제의 투여량 및 투여 주기를 정의한다. 몇몇 실시형태에서, 2가지 이상의 제제의 전달은 동시적 또는 병행적이며 제제는 공동-제형화될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 2종 이상의 제제는 공동-제형화되지 않고 처방된 요법의 일부로서 순차적 방식으로 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 2종 이상의 작용제 또는 치료의 병용 투여는 장애와 관련된 증상의 저감 또는 기타 파라미터가 단독으로 또는 다른 것의 부재하에 전달된 한 가지 제제 또는 치료로 관찰되는 것보다 더 크도록 하는 것이다. 두 가지 처리의 효과는 부분적으로 상가적일 수 있거나 완전히 상가적일 수 있거나 상가적(예컨대, 상승적)보다 클 수 있다. 각각의 치료제의 순차적 또는 실질적으로 동시 투여는 경구 경로, 정맥내 경로, 근육내 경로, 및 점막 조직을 통한 직접 흡수를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 임의의 적절한 경로에 의해 행해질 수 있다. 치료제는 동일한 경로 또는 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 병용의 제1 치료제는 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있는 반면 병용의 제2 치료제는 경구 투여될 수 있다.

[0267] "G", "C", "A", "T" 및 "U"는 각각 일반적으로 구아닌, 사이토신, 아데닌, 티미딘 및 유라실을 염기로서 함유하는 천연-유래 뉴클레오타이드를 지칭한다. 그러나, 용어 "뉴클레오타이드"는 또한 하기에 추가로 상세히 설명되는 바와 같이 대안적(즉, 대체) 뉴클레오타이드 또는 대용 교체 모이어티를 지칭할 수 있음이 이해될 것이다. 당업자라면 구아닌, 사이토신, 아데닌 및 유라실이 이러한 교체 모이어티를 보유하는 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 염기쌍 형성 특성을 실질적으로 변경하지 않고 다른 모이어티로 교체될 수 있음을 잘 알고 있다. 예를 들어, 제한 없이, 이노신을 그의 염기로서 포함하는 뉴클레오타이드는 아데닌, 사이토신 또는 유라실을 함유하는 뉴클레오타이드와 염기쌍을 이룰 수 있다. 따라서, 유라실, 구아닌 또는 아데닌을 함유하는 뉴클레오타이드는, 예를 들어, 이노신을 함유하는 뉴클레오타이드에 의해 본 발명에서 특징화된 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열에서 교체될 수 있다. 또 다른 예에서, 올리고뉴클레오타이드의 어느 곳에서나 아데닌 및 사이토신은 각각 구아닌 및 유라실로 교체되어 표적 mRNA와 G-U 워블(Wobble) 염기 쌍을 형성할 수 있다. 이러한 대체 모이어티를 함유하는 서열은 본 발명에서 특징으로 하는 조성물 및 방법에 적합하다.

[0268] 용어 "핵염기" 및 "염기"는 핵산 혼성화에서 수소 결합을 형성하는 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드에 존재하는 퓨린(예컨대, 아데닌 및 구아닌) 및 피리미딘(예컨대 유라실, 티민 및 사이토신) 모이어티를 포함한다. 본 발명의 맥락에서, 핵염기라는 용어는 또한 천연-유래 핵염기와 다를 수 있지만 핵산 혼성화 동안 기능적인 대체 핵염기를 포함한다. 이러한 맥락에서, "핵염기"는 아데닌, 구아닌, 사이토신, 티미딘, 유라실, 잔틴 및 하이포잔틴과 같은 천연 유래 핵염기뿐만 아니라 대체 핵염기를 모두 의미한다. 이러한 변이체는 예를 들어 문헌 [Hirao et al (2012) Accounts of Chemical Research vol 45, page 2055 및 Bergstrom (2009) Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl. 37 1.4.1]에 기재되어 있다.

[0269] 몇몇 실시형태에서, 핵염기 모이어티는 퓨린 또는 피리미딘을 변형된 퓨린 또는 피리미딘, 예컨대, 치환된 퓨린 또는 치환된 피리미딘, 예컨대, 아이소사이토신, 슈도아이소사이토신, 5-메틸사이토신, 5-티오졸로-사이토신, 5-프로핀일-사이토신, 5-프로핀일-유라실, 5-브로모유라실, 5-티아졸로-유라실, 2-티오-유라실, 슈도유라실, 1-메틸슈도유라실, 5-메톡시유라실, 2'-티오-티민, 하이포잔틴, 다이아미노퓨린, 6-아미노퓨린, 2-아미노퓨린, 2,6-다이아미노퓨린, 및 2-클로로-6-아미노퓨린으로부터 선택된 "대체 핵염기"로 변화시킴으로써 변형된다.

[0270] 핵염기 모이어티는 각각 대응하는 핵염기에 대한 문자 코드, 예컨대 A, T, G, C 또는 U로 표시될 수 있고, 여기서 각 문자는 선택적으로 등가의 기능의 대체 핵염기를 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 예컨대, 갭머(gapmer)의 경우, 5-메틸사이토신 LNA 뉴클레오사이드가 사용될 수 있다.

[0271] "당" 또는 "당 모이어티"는 푸라노스 고리를 갖는 천연 유래 당을 포함한다. 당은 또한 뉴클레오사이드의 푸라노스 고리를 교체할 수 있는 구조로서 정의되는 "대체 당"을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 대체 당은 비-푸라노스(또는 4'-치환된 푸라노스) 고리 또는 고리계 또는 개방계이다. 이러한 구조는 천연 푸라노스 고리, 예컨대, 6-원 고리에 대한 단순한 변화를 포함하거나, 또는 펩타이드 핵산에 사용되는 비-고리계를 가진 경우와 같이 더 복잡할 수 있다. 대체 당은 또한 푸라노스 고리가 예를 들어 몰폴리노 또는 헥시톨 고리계와 같은 또 다른 고리계로 대체된 당 대용물을 포함할 수 있다. 모티프를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 제조에 유용한 당 모이어티는, 제한 없이, β-D-리보스, β-D-2'-데옥시리보스, 치환된 당(예컨대, 2', 5' 및 비스 치환된 당), 4'-S-당(예컨대, 4'-S-리보스, 4'-S-2'-데옥시리보스 및 4'-S-2'-치환된 리보스), 이환식 대체 당(예컨대, 2'-O-CH_2-4' 또는 2'-O-$(CH_2)_2$-4' 가교된 리보스 유래 이환식 당) 및 당 대용물(예컨대, 리보스 고리가 몰폴리노 또

는 헥시톨 고리계로 대체된 경우)을 포함한다. 각 위치에 사용되는 헤테로고리식 염기 및 인터뉴클레오사이드 링키지의 유형은 가변적이며 모티브를 결정하는 요소가 아니다. 대체 당 모이어티를 갖는 대부분의 뉴클레오사이드에서, 헤테로고리식 핵염기는 일반적으로 혼성화를 허용하도록 유지된다.

[0272] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "뉴클레오타이드"는 뉴클레오사이드 및 인터뉴클레오사이드 링키지를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 단량체 단위를 지칭한다. 인터뉴클레오사이드 링키지는 포스페이트 링키지를 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다. 마찬가지로, "연결된 뉴클레오사이드"는 포스페이트 링키지에 의해 연결될 수 있거나 또는 연결되지 않을 수 있다. 많은 "대체 인터뉴클레오사이드 링키지"가 당업계에 알려져 있고, 포스포로티오에이트 및 보로노포스페이트 링키지를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 대체 뉴클레오사이드는 이환식 뉴클레오사이드(BNA)(예컨대, 잠금 뉴클레오사이드(LNA) 및 구속된 에틸(cEt) 뉴클레오사이드), 펩타이드 뉴클레오사이드(PNA), 포스포트라이에스터, 포스포로티오네이트, 포스포라미데이트, 및 본 명세서에 기재된 것들을 비롯하여, 천연 뉴클레오사이드의 포스페이트 골격의 기타 변이체를 포함한다.

[0273] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "대체 뉴클레오타이드"는, 대체 뉴클레오사이드 또는 대체 당, 및 대체 뉴클레오사이드 링키지를 포함할 수 있는 인터뉴클레오사이드 링키지를 갖는 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0274] 용어 "뉴클레오사이드"는 핵염기 및 당 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 단량체 단위를 지칭한다. 뉴클레오사이드는 천연-유래인 것뿐만 아니라, 대체 뉴클레오사이드, 예컨대, 본 명세서에 기재된 것들을 포함할 수 있다. 뉴클레오사이드의 핵염기는 천연-유래 핵염기 또는 대체 핵염기일 수 있다. 마찬가지로, 뉴클레오사이드의 당 모이어티는 천연-유래 당 또는 대체 당일 수 있다.

[0275] 용어 "대체 뉴클레오사이드"는 대체 당 또는 대체 핵염기를 가진 뉴클레오사이드, 예컨대, 본 명세서에 기재된 것들을 지칭한다.

[0276] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "뉴클레아제 내성 뉴클레오타이드"는 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레아제 분해를 제한하는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 뉴클레아제 내성 뉴클레오타이드는 일반적으로 뉴클레아제에 대해서 불량한 기질이 됨으로써 올리고뉴클레오타이드의 안정성을 증가시킨다. 뉴클레아제 내성 뉴클레오타이드, 예컨대, 2'-O-메틸-뉴클레오타이드 및 2'-플루오로-뉴클레오타이드는 당업계에 공지되어 있다.

[0277] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "올리고뉴클레오타이드" 및 "폴리뉴클레오타이드"는, 2개 이상의 공유 연결된 뉴클레오사이드를 포함하는 분자로서 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 같이 정의된다. 이러한 공유 결합된 뉴클레오사이드는 또한 핵산 분자 또는 올리고머를 지칭할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 통상 고상 화학 합성에 이어서 정제에 의해 실험실에서 제조된다. 올리고뉴클레오타이드의 서열을 지칭할 경우, 공유 연결된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드의, 핵염기 모이어티의 서열 및 순서, 또는 이의 변형이 언급된다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 수동 제조될 수 있고, 화학적으로 합성되고, 전형적으로 정제 또는 단리된다. 올리고뉴클레오타이드는 또한 (i) 푸라노스 유도체에 의해 또는 염기 모이어티에 대해서 공유 부착점으로서 사용될 수 있는 임의의 구조, 환식 또는 비환식에 의해 대체되는 하나 이상의 푸라노스 모이어티를 갖는 화합물, (ii) 포스포라미데이트 또는 포스포로티오에이트 링키지의 경우에서처럼 변형되거나, 또는 폼아세탈 또는 리보아세탈 링키지의 경우에서처럼 적합한 연결 모이어티에 의해 완전히 대체된 1개 이상의 포스포다이에스터 링키지를 갖는 화합물, 및/또는 (iii) 염기 모이어티에 대해서 공유 부착점으로서 사용될 수 있는 임의의 구조, 환식 또는 비환식에 의해 대체되는 1개 이상의 연결된 푸라노스-포스포다이에스터 링키지 모이어티를 갖는 화합물을 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 대체 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드(예컨대, 본 명세서에 기재된 것들을 포함함)를 포함할 수 있다. 또한 올리고뉴클레오타이드는 당 모이어티 또는 핵염기를 결여하는 조성물을 포함하지만 여전히 표적 서열과 쌍을 형성할 수 있거나 혼성화될 수 있는 것으로 이해된다.

[0278] "올리고뉴클레오타이드"는 짧은 폴리뉴클레오타이드(예컨대, 100개 이하의 연결된 뉴클레오사이드)를 지칭한다.

[0279] 올리고뉴클레오타이드는 ADAR-매개 경로를 통해서 목적하는 표적 RNA 중의 아데노신의탈아미노화를 허용하는 임의의 길이일 수 있고, 약 10 내지 50개의 염기쌍 길이, 예컨대, 약 15 내지 50개의 염기쌍 길이 또는 약 18 내지 50개의 염기쌍 길이, 예를 들어, 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 또는 50개의 염기쌍 길이, 예컨대, 약 15 내지 30, 15 내지 29, 15 내지 28, 15 내지 27, 15 내지 26, 15 내지 25, 15 내지 24, 15 내지 23, 15 내지 22, 15 내지 21, 15 내지 20, 15 내지 19, 15 내지 18, 15 내지 17, 18 내지 30, 18 내지 29, 18 내지 28, 18 내지 27, 18 내지 26, 18 내지 25, 18 내지 24, 18 내지 23, 18 내지 22, 18

내지 21, 18 내지 20, 19 내지 30, 19 내지 29, 19 내지 28, 19 내지 27, 19 내지 26, 19 내지 25, 19 내지 24, 19 내지 23, 19 내지 22, 19 내지 21, 19 내지 20, 20 내지 30, 20 내지 29, 20 내지 28, 20 내지 27, 20 내지 26, 20 내지 25, 20 내지 24, 20 내지 23, 20 내지 22, 20 내지 21, 21 내지 30, 21 내지 29, 21 내지 28, 21 내지 27, 21 내지 26, 21 내지 25, 21 내지 24, 21 내지 23, 또는 21 내지 22개의 염기쌍 길이의 범위일 수 있다. 위에서 언급된 범위 및 길이의 중간인 범위 및 길이가 본 발명의 일부인 것으로 상정된다.

[0280] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "갭머"는, 하나 이상의 친화도 증대용 대체 뉴클레오사이드(윙 또는 측접부)를 포함하는 영역에 의해 5' 및 3' 측접되는 RNase H 동원 올리고뉴클레오타이드(갭)의 영역을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 다양한 갭머 설계가 본 명세서에 기재되어 있다. 헤드머(headmer) 및 테일머(tailmer)는 윙 중 하나가 누락되는 RNase H를 동원할 수 있는 올리고뉴클레오타이드이고, 즉, 올리고뉴클레오타이드의 단부 중 한쪽만이 친화도 증대용 대체 뉴클레오사이드를 포함한다. 헤드머의 경우, 3' 윙은 누락되고(즉, 5' 윙은 친화도 증대용 대체 뉴클레오사이드를 포함함), 테일머의 경우, 5' 윙은 누락된다(즉, 3' 윙은 친화도 증대용 대체 뉴클레오사이드를 포함함). "혼합된 윙 갭머"는, 윙 영역이 적어도 하나의 대체 뉴클레오사이드, 예컨대, 적어도 하나의 DNA 뉴클레오사이드 또는 적어도 하나의 2' 치환된 대체 뉴클레오사이드, 예를 들어, 2'-O-알킬-RNA, 2'-O-메틸-RNA, 2'-알콕시-RNA, 2'-O-메톡시에틸-RNA(2'-O-MOE), 2'-아미노-DNA, 2'-플루오로-RNA, 2'-F-ANA 뉴클레오사이드(들), 또는 이환식 뉴클레오사이드(예컨대, 잠금 뉴클레오사이드 또는 cEt 뉴클레오사이드)를 포함하는 갭머를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, 혼합된 윙 갭머는 대체 뉴클레오사이드를 포함하는 하나의 윙(예컨대 5' 또는 3')과 2' 치환된 대체 뉴클레오사이드(들)를 포함하는 다른 윙(각각 3' 또는 5')을 갖는다.

[0281] 용어 "링커" 또는 "연결기"는 하나의 관심 화학기 또는 세그먼트를 하나의 공유 결합을 통해서 또 다른 관심 화학기 또는 세그먼트에 연결하는 2개의 원자 사이의 연결부이다. 접합체 모이어티는 올리고뉴클레오타이드에 직접 또는 연결 모이어티(예컨대 링커 또는 테더)를 통해서 부착될 수 있다. 링커는 제3 영역, 예컨대 접합체 모이어티를 올리고뉴클레오타이드(예컨대, 영역 A 또는 C의 말단)에 공유 연결시키는 역할을 한다. 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 접합체 또는 올리고뉴클레오타이드 접합체는 선택적으로 올리고뉴클레오타이드와 접합체 모이어티 사이에 위치된 링커 영역을 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 접합체와 올리고뉴클레오타이드 사이의 링커는 생분해 가능하다. 생절단성 링커를 함유하는 포스포다이에스터는 WO 2014/076195(참조에 의해 본 명세서에 원용됨)에 더욱 상세히 기재되어 있다.

[0282] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "ADAR-동원 도메인"은 본 발명의 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결되어 ADAR 효소에 대해서 동원 및 결합 영역으로서 작용하는 스템-루프 구조를 형성할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 이러한 ADAR-동원 도메인을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 '악시오머(axiomer) AON' 또는 '자가-루핑(self-looping) AON'라 지칭될 수 있다. ADAR-동원 도메인 부분은 세포에 존재하는 내인성 ADAR 효소를 동원하도록 작용할 수 있다. 이러한 ADAR-동원 도메인은 변형된 재조합 ADAR 효소의 존재 또는 접합된 실체를 필요로 하지 않는다. 대안적으로, ADAR-동원 부분은 세포에 또는 대상체에게 ADAR 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 작제물을 통해서 전달된 재조합 ADAR 융합 단백질을 동원하도록 역할할 수 있다. 이러한 ADAR-융합 단백질은 또 다른 단백질에, 예컨대, MS2 박테리오파지 코트 단백질에 융합된 ADAR1의 데아미나제 도메인 또는 ADAR2 효소를 포함할 수 있다. ADAR-동원 도메인은 천연 기질(예컨대, GluR2 수용체 pre-mRNA; 예컨대, GluR2 ADAR-동원 도메인), Z-DNA 구조, 또는 ADAR 융합 단백질의 일부인 또 다른 단백질을 동원하는 것으로 알려진 도메인, 예컨대, ADAR의 dsRNA 결합 영역에 의해 인식될 것으로 알려진 MS2 ADAR-동원 도메인에 기초한 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. ADAR-동원 도메인의 스템-루프 구조는 2개의 별도의 핵산 가닥에 의해 형성된 분자간 스템-루프 구조, 또는 단일 핵산 가닥 내에 형성된 분자내 스템 루프 구조일 수 있다.

[0283] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "Z-DNA"는 DNA 이중 나선 또는 RNA 스템 루프 구조의 좌선성 형태를 지칭한다. 이러한 DNA 또는 dsRNA 나선은 (더 통상적으로 발견되는 B-DNA 형태와 같이 우측과는 반대로) 지그재그 패턴으로 좌측으로 감긴다. Z-DNA는 공지된 고-친화도 ADAR 결합 기질이며 인간 ADAR1 효소에 결합하는 것으로 나타났다.

[0284] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 그리고 달리 지시되지 않는 한, 제2 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드 서열과 관련하여 제1 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드 서열을 설명하기 위하여 사용될 경우 용어 "상보적"은, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드와 소정 조건 하에서 혼성화하여 듀플렉스 구조를 형성하는 제1 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 능력을 지칭한다. 이러한 조건은, 예를

들어, 엄격한 조건일 수 있고, 여기서 엄격한 조건은 12 내지 16시간 동안 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA, 50℃, 또는 70℃에 이어서 세척을 포함할 수 있다(예컨대, 문헌["Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press] 참조). 다른 조건, 예컨대, 유기체 내에서 조우할 수 있는 생리학적으로 관련된 조건이 적용될 수 있다. 당업자라면 혼성화된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드의 궁극적인 적용에 따라서 2개의 서열의 상보성의 시험을 위하여 가장 적절한 조건의 세트를 결정할 수 있을 것이다.

[0285] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "상보적" 서열은, 또한 혼성화하는 능력에 관하여 상기 요건이 충족되는 한, 비-천연 및 대체 뉴클레오타이드로부터 형성된 비-왓슨-크릭 염기쌍 및/또는 염기쌍을 포함할 수 있거나 또는 이로부터 전체적으로 형성될 수 있다. 이러한 비-왓슨-크릭 염기쌍은, G:U 워블 또는 후그스타인(Hoogstein) 염기짝짓기를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 표적 서열과 올리고뉴클레오타이드 사이의 상보적 서열은 제1 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드을 하나 또는 두 뉴클레오타이드 서열의 전체 길이에 대해서 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드에 염기짝짓기한 것을 포함한다. 이러한 서열은 본 명세서에서 서로에 관하여 "완전 상보적"이라고 지칭될 수 있다. 그러나, 제1 서열이 본 명세서에서 제2 서열에 관하여 "실질적으로 상보적"이라고 지칭되는 경우, 2개의 서열이 완전 상보적일 수 있거나, 또는 이들은 최대 30개의 염기쌍의 듀플렉스용의 혼성화 시 하나 이상, 그러나 일반적으로 5, 4, 3 또는 2개 이하의 미스매칭된 염기쌍을 형성할 수 있지만, 이들의 궁극적인 적용, 예컨대, 아데노신의 탈아미노화에 가장 관련된 조건 하에서 혼성화되는 능력을 보유할 수 있다. "실질적으로 상보적"은 또한 관심 mRNA(예컨대, 표적 아데노신을 갖는 mRNA)의 인접한 부분에 실질적으로 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 지칭할 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 서열이 관심 mRNA의 비-중단 부분과 실질적으로 상보성이면 관심 mRNA의 적어도 일부와 상보적이다.

[0286] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "상보적인 영역"은, 내인성 유전자의 발현을 간섭하기 위하여, 유전자, 1차 전사체, 서열(예컨대, 표적 서열; 예컨대, 표적 아데노신을 갖는 표적 서열), 또는 처리된 mRNA의 전부 또는 일부와 실질적으로 상보적인 올리고뉴클레오타이드 상의 영역을 지칭한다. 상보성의 영역이 표적 서열에 완전히 상보적이지 않은 경우, 분자의 내부 또는 말단 영역에 미스매치가 있을 수 있다. 일반적으로, 가장 용인된 미스매치는 말단 영역에, 예컨대, 올리고뉴클레오타이드의 5'- 및/또는 3'-말단의 5, 4, 3 또는 2개의 뉴클레오타이드 내에 있다.

[0287] 어구 "세포를 올리고뉴클레오타이드, 예컨대, 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는"은 임의의 가능한 수단에 의해 세포를 접촉시키는 것을 포함한다. 세포를 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 것은 세포를 올리고뉴클레오타이드와 시험관내에서 접촉시키는 것 또는 세포를 올리고뉴클레오타이드와 생체내에서 접촉시키는 것을 포함한다. 접촉시키는 것은 직접 또는 간접적으로 행해질 수 있다. 따라서, 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 방법을 수행하는 개체에 의해 세포와 물리적 접촉시킬 수 있거나, 또는 대안적으로, 올리고뉴클레오타이드 제제는 후속하여 세포와 접촉하게 하거나 허용할 것인 상황에 놓일 수 있다.

[0288] 세포를 시험관내에서 접촉시키는 것은, 예를 들어, 세포를 올리고뉴클레오타이드와 인큐베이션함으로써 행해질 수 있다. 세포를 생체내에서 접촉시키는 것은, 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드를 세포가 위치되는 조직 내에 또는 근처에 주사함으로써, 또는 올리고뉴클레오타이드 제제를 다른 영역, 예컨대, 혈류 또는 피하 공간에 주사함으로써 수행될 수 있어, 제제는 후속하여 접촉될 세포가 위치되는 조직에 도달할 것이다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 관심 부위, 예컨대, 간에 올리고뉴클레오타이드를 지향시키는 리간드, 예컨대, GalNAc3을 함유할 수 있고/있거나 이에 결합될 수 있다. 접촉시키는 시험관내 방법과 생체내 방법의 조합이 또한 가능하다. 예를 들어, 세포는 또한 올리고뉴클레오타이드와 시험관내에서 접촉될 수 있고, 이어서 대상체 내에 이식될 수 있다.

[0289] 일 실시형태에서, 세포를 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 것은 세포에 섭취(uptake) 또는 흡수(absorption)를 용이하게 하거나 수행함으로써 "세포에 올리고뉴클레오타이드를 전달하는 것" 또는 "도입하는 것"을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드의 흡수 또는 섭취는 비보조 확산 또는 활성 세포 과정을 통해서 또는 보조 제제 또는 디바이스에 의해 일어날 수 있다. 올리고뉴클레오타이드를 세포에 도입하는 것은 시험관내 및/또는 생체내에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 생체내 도입의 경우, 올리고뉴클레오타이드는 조직 부위에 주사될 수 있거나 또는 전신에 투여될 수 있다. 세포에 시험관내 도입은 전기천공 및 리포펙션과 같은 당업계에 공지된 방법을 포함한다. 추가의 접근법은 이하에 기재되고/되거나 당업계에 공지되어 있다.

[0290] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "지질 나노입자" 또는 "LNP"는 약제학적 활성 분자, 예컨대, 핵산 분자, 예

컨대, 올리고뉴클레오타이드를 캡슐화하는 지질층을 포함하는 소포이다. LNP는 안정적인 핵산-지질 입자를 지칭한다. LNP는 전형적으로 양이온성, 이온화 가능한 지질, 비-양이온성 지질, 및 입자의 응집을 방지하는 지질(예컨대, PEG-지질 접합체)을 함유한다. LNP는, 예를 들어, 미국 특허 번호 6,858,225; 6,815,432; 8,158,601; 및 8,058,069에 기재되어 있고, 이들의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0291] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "리포솜"은 적어도 하나의 이중층, 예컨대, 하나의 이중층 또는 복수의 이중층에 배열된 양친매성 지질로 구성된 소포를 지칭한다. 리포솜은 친유성(lipophilic) 재료 및 수성 내부로부터 형성된 막을 갖는 단일막 소포 및 다중막 소포를 포함한다. 수성 부분은 올리고뉴클레오타이드 조성물을 함유한다. 친유성 재료는 수성 내부를 전형적으로 올리고뉴클레오타이드 조성물을 포함하지 않지만 몇몇 예에서는 포함할 수도 있는 수성 외부로부터 단리시킨다. 리포솜은 또한 "입체적으로 안정화된" 리포솜을 포함하며, 이 용어는, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 리포솜에 혼입될 경우, 특수화된 지질을 결여하는 리포솜에 관하여 증대된 순환 수명을 초래하는, 하나 이상의 이러한 특수화된 지질을 포함하는 리포솜을 지칭한다.

[0292] "마이셀"은 분자의 소수성 부분이 모두 안쪽으로 지향되어, 친지성 부분을 둘레의 수성상과 접촉되게 하도록 양친매성 분자가 구형 구조에 배열된 특정 유형의 분자 조립체로서 본 명세서에서 정의된다. 환경이 소수성인 경우 정반대 배열이 존재한다.

[0293] "상보적" 폴리뉴클레오타이드는 표준 왓슨-크릭 상보성 규칙에 따라서 염기짝짓기 가능한 것이다. 구체적으로, 퓨린은 사이토신과 쌍을 이룬 구아닌(G:C) 및 DNA의 경우에 티민과 쌍을 이룬 아데닌(A:T), 또는 RNA의 경우에 유라실과 쌍을 이룬 아데닌(A:U)의 조합을 형성하도록 피리미딘과 염기짝짓기될 것이다. 2개의 폴리뉴클레오타이드는, 각각 서로 실질적으로 상보적인 적어도 하나의 영역을 갖는다는 전제 하에, 이들이 서로 완전히 상보적이지 않더라도 서로 혼성화될 수 있는 것이 이해된다.

[0294] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 본 명세서에 기재된 (예컨대, 세포 또는 대상체에서) 치료적 효과를 초래하는 제제의 "유효량", "치료적 유효량" 및 "충분량"이라는 용어는 인간을 비롯한 대상체에게 투여된 경우, 임상 결과를 비롯한 유익한 또는 바람직한 결과를 내기에 충분한 양을 지칭하고, 그와 같이 "유효량" 또는 이와 동의어는 적용되는 맥락에 따라 좌우된다. 예를 들어, 장애를 치료하는 맥락에서, 이것은 투여 없이 얻어진 반응과 비교해서 치료 반응을 달성하기에 충분한 제제의 양이다. 주어진 제제의 양은 다양한 인자, 예컨대, 주어진 제제, 약제학적 제형, 투여 경로, 질환 또는 장애의 유형, 대상체의 신원(예컨대, 연령, 성별 및/또는 체중) 또는 치료 중인 숙주 등에 따라서 달라질 것이지만, 그럼에도 불구하고 당업자에 의해 관례대로 결정될 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 제제의 "치료적 유효량"은 대조군과 비교해서 대상체에서 유익한 또는 바람직한 결과를 초래하는 양이다. 본 명세서에서 정의된 바와 같은, 제제의 치료적 유효량은 당업계에 공지된 일상적인 방법에 의해 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 투여 요법은 최적의 치료 반응을 제공하도록 조절될 수 있다.

[0295] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "예방적 유효량"은, 장애를 갖거나 장애를 갖는 성향이 있는 대상체에게 투여될 경우, 질환 또는 질환의 하나 이상의 증상을 예방 또는 개선하는데 충분한 올리고뉴클레오타이드의 양을 포함하도록 의도된다. 질환을 개선하는 것은 질환의 경과를 늦추거나 또는 나중에 발병하는 질환의 중증도를 저감시키는 것을 포함한다. "예방적 유효량"은 올리고뉴클레오타이드, 제제가 투여되는 방법, 질환의 위험 정도, 및 치료될 환자의 병력, 연령, 체중, 가족력, 유전자 구성, 존재할 경우, 선행하는 공존하는 치료의 유형 및 기타 개인적 특징에 따라 달라질 수 있다.

[0296] "치료적-유효량" 또는 "예방적 유효량"은 또한 임의의 치료에 적용 가능한 합리적인 유익/유해비에서 일부 목적하는 국소 또는 전신 효과를 내는 올리고뉴클레오타이드의(단일 또는 다회 용량으로 투여되는) 양을 포함한다. 본 발명의 방법에서 사용되는 올리고뉴클레오타이드는 이러한 치료에 적용 가능한 합리적인 유익/유해비를 내기에 충분한 양으로 투여될 수 있다.

[0297] 예방적 유효량은 또한, 예를 들어 인간을 비롯한 대상체에게 투여된 경우, 본 명세서에 기재된 장애의 하나 이상의 발병을 예상된 발병과 비교해서 적어도 120일, 예를 들어, 적어도 6개월, 적어도 12개월, 적어도 2년, 적어도 3년, 적어도 4년, 적어도 5년, 적어도 10년 이상 지연시키기에 충분한 양을 지칭할 수 있다.

[0298] "단백질의 수준을 결정하는 것"이란, 당업계에 공지된 방법에 의해 직접 또는 간접적으로 단백질, 또는 단백질을 암호화하는 mRNA의 검출을 의미한다. "직접 결정하는 것"은 물리적 실체 또는 값을 얻는 과정을 수행하는 것(예컨대, 샘플에 대해 검정 또는 시험을 수행하는 것, 또는 그 용어가 본 명세서에 정의된 것처럼 "샘플을 분석하는 것")을 의미한다. "간접적으로 결정하는 것"은 다른 상대방 또는 공급원(물리적 실체 또는 값을 직접 획득

한 제3자 실험실)으로부터의 물리적 실체 또는 값을 입수하는 것을 지칭한다. 단백질 수준을 측정하는 방법은 일반적으로 웨스턴 블롯팅, 면역블롯팅, 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사선면역검정(RIA), 면역침전, 면역형광, 표면 플라스몬 공명, 화학발광, 형광 편광, 인광, 면역조직화학 분석, 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 비행 시간(MALDI-TOF) 질량 분광분석, 액체 크로마토그래피(LC)-질량 분광분석, 미세세포측정, 현미경, 형광 활성화 세포 분류(FACS) 및 유세포 분석뿐만 아니라, 효소 활성 또는 다른 단백질 상대방과의 상호작용을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 단백질의 특성에 기반한 검정법을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. mRNA 수준을 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0299] 참조 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열에 관하여 "퍼센트(%) 서열 동일성"은, 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위하여, 서열을 정렬하고 필요에 따라 갭을 도입한 후에, 참조 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열 내 핵산 또는 아미노산과 동일한 후보 서열 내 핵산 또는 아미노산의 백분율로서 정의된다. 퍼센트 핵산 또는 아미노산 서열 동일성을 결정할 목적을 위한 정렬은, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, 또는 Megalign 소프트웨어와 같은 공개적으로 입수 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 이용해서 당업자의 능력 이내인 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 당업자라면, 비교 중인 서열의 전장에 비해서 최대 정렬을 달성하는데 필요로 되는 임의의 알고리즘을 포함하는, 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 예를 들어, 퍼센트 서열 동일성 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 BLAST를 이용해서 생성될 수 있다. 예시로서, (대안적으로 주어진 핵산 또는 아미노산 서열 B에 대해서, 이와 함께 또는 이에 대항하여 소정의 퍼센트 서열 동일성을 갖는 주어진 핵산 또는 아미노산 서열 A로 어구화될 수 있는) 주어진 핵산 또는 아미노산 서열 B에 대해서, 이와 함께 또는 이에 대항하여 주어진 핵산 또는 아미노산 서열 A의 퍼센트 서열 동일성은, 다음과 같이 계산된다:

[0300] (분율 X/Y)×100

[0301] 여기서 X는 A 및 B의 그 프로그램의 정렬에서 서열 정렬 프로그램(예컨대, BLAST)에 의해 동일한 매치로서 점수화된 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 수이고, Y는 B에서 핵산의 총 수이다. 핵산 또는 아미노산 서열 A의 길이가 핵산 또는 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, B에 대한 A의 퍼센트 서열 동일성은 A에 대한 B의 퍼센트 서열 동일성과 동등하지 않은 것이 이해될 것이다.

[0302] "수준"이란, 참조와 비교해서, 단백질, 또는 단백질을 암호화하는 mRNA의 수준 또는 활성을 의미한다. 참조는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 임의의 유용한 참조일 수 있다. 단백질의 "감소된 수준" 또는 "증가된 수준"이란, 참조와 비교해서, 단백질 수준의 감소 또는 증가(예컨대, 참조와 비교해서, 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 100%, 약 150%, 약 200%, 약 300%, 약 400%, 약 500%, 이상만큼의 감소 또는 증가; 참조와 비교해서 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 50%, 약 75%, 약 100%, 또는 약 200% 초과의 감소 또는 증가; 약 0.01-배 미만, 약 0.02-배, 약 0.1-배, 약 0.3-배, 약 0.5-배, 약 0.8-배, 이하만큼 감소 또는 증가; 또는 약 1.2-배 초과, 약 1.4-배, 약 1.5-배, 약 1.8-배, 약 2.0-배, 약 3.0-배, 약 3.5-배, 약 4.5-배, 약 5.0-배, 약 10-배, 약 15-배, 약 20-배, 약 30-배, 약 40-배, 약 50-배, 약 100-배, 약 1000-배 이상만큼 증가)를 의미한다. 단백질의 수준은 샘플 내 총 단백질 또는 mRNA에 대해서 질량/vol(예컨대, g/dℓ, mg/mℓ, μg/mℓ, ng/mℓ) 또는 퍼센트로 표현될 수 있다.

[0303] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "약제학적 조성물"은, 약제학적으로 허용 가능한 부형제와 제형화된, 바람직하게는 포유류에서 질환의 치료를 위한 치료 요법의 일부로서 정부 규제 기관의 승인을 받아 제조되거나 판매되는 본 명세서에 기재된 화합물을 함유하는 조성물을 나타낸다. 약제학적 조성물은, 예를 들어, 단위 투여 형태로 경구 투여를 위하여(예컨대, 정제, 캡슐, 당의정, 겔캡, 또는 시럽); 국소 투여를 위하여(예컨대, 크림, 겔, 로션 또는 연고로서); 정맥내 투여를 위하여(예컨대, 입자성 색전이 없는 멸균 용액으로서 그리고 정맥내 용도에 적합한 용매계); 척추강내 주사를 위하여; 뇌실내 주사를 위하여; 뇌실질내 주사를 위하여; 또는 임의의 다른 약제학적으로 허용 가능한 제형으로 제형화될 수 있다.

[0304] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "약제학적으로 허용 가능한 부형제"는, 환자에서 실질적으로 비독성 및 비염증성인 특성을 갖는 본 명세서에 기재된 화합물 이외의 임의의 성분(예를 들어, 활성 화합물을 현탁시키거나 용해시킬 수 있는 비히클)을 지칭한다. 부형제는, 예를 들어, 접착 방지제, 항산화제, 결합제, 코팅제, 압착 보조제, 붕해제, 염료(색소), 연화제, 유화제, 충전제(희석제), 필름 형성제 또는 코팅제, 향료, 방향제, 활택제(유동 향상제), 윤활제, 방부제, 인쇄 잉크, 흡착제, 현탁제 또는 분산제, 감미료 및 수화수를 포함할 수 있다. 예시적인 부형제는 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 탄산칼슘, 인산칼슘(이염기성), 스테아르산칼슘, 크로스카멜로스, 가교결합된 폴리비닐 피롤리돈, 시트르산, 크로스포비돈, 시스테인, 에틸셀룰로스, 젤라틴, 하이드록시프로

필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 락토스, 스테아르산마그네슘, 말티톨, 만니톨, 메티오닌, 메틸셀룰로스, 메틸 파라벤, 미정질 셀룰로스, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 포비돈, 전호화 전분, 프로필 파라벤, 레틴일 팔미테이트, 셀락, 이산화규소, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 시트르산나트륨, 나트륨 전분 글리콜ate, 솔비톨, 전분(옥수수), 스테아르산, 수크로스, 탤크, 이산화티타늄, 비타민 A, 비타민 E, 비타민 C, 및 자일리톨을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0305] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용 가능한 염"은 본 명세서에 기재된 임의의 화합물 중의 화합물의 임의의 약제학적으로 허용 가능한 염을 의미한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염은 건전한 의학적 판단의 범위 내에 있고 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고 합리적인 유익/유해비에 상응하는 것이다. 약제학적으로 허용 가능한 염은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 약제학적으로 허용 가능한 염은 문헌[Berge et al., J. Pharmaceutical Sciences 66:1-19, 1977 및 Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, (Eds. P.H. Stahl and C.G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008]에 기재되어 있다. 염은 본 명세서에 기재된 화합물의 최종 단리 및 정제 동안 동소에서 제조될 수 있거나 유리 염기기를 적합한 유기산과 반응시켜 별도로 제조될 수 있다.

[0306] 본 명세서에 기재된 화합물은 약제학적으로 허용 가능한 염으로서 제조될 수 있도록 이온화 가능한 기를 가질 수 있다. 이들 염은 무기 또는 유기 산을 포함하는 산 부가염일 수 있거나, 염은, 본 명세서에 기재된 화합물의 산성 형태의 경우, 무기 또는 유기 염기로부터 제조될 수 있다. 빈번하게는, 화합물은 약제학적으로 허용 가능한 산 또는 염기의 부가 생성물로서 제조된 약제학적으로 허용 가능한 염으로서 제조되거나 사용된다. 적합한 약제학적으로 허용 가능한 산 및 염기 및 적절한 염의 제조 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 염은 무기 및 유기 산 및 염기를 포함하는 약제학적으로 허용 가능한 비독성 산 및 염기로부터 제조될 수 있다. 대표적인 산 부가염은 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스코르베이트, 아스파테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 바이설페이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포설포네이트, 시트레이트, 사이클로펜탄프로피오네이트, 다이글루코네이트, 도데실설페이트, 에탄설포네이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵토네이트, 헥사노에이트, 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 하이드로아이오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 락토바이오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 설페이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 올레에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼설페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 석시네이트, 설페이트, 타르트레이트, 티오사이아네이트, 톨루엔설포네이트, 운데카노에이트, 및 발레레이트 염을 포함한다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리 토금속 염은 나트륨, 리튬, 칼륨, 칼슘 및 마그네슘뿐만 아니라, 암모늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 다이메틸아민, 트라이메틸아민, 트라이에틸아민 및 에틸아민을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 비독성 암모늄, 4급 암모늄 및 아민 양이온을 포함한다.

[0307] "참조"란, 단백질 또는 mRNA 수준 또는 활성을 비교하는 데 사용되는 임의의 유용한 참조를 의미한다. 참조는 비교 목적으로 사용되는 임의의 샘플, 표준, 표준 곡선 또는 수준이 될 수 있다. 참조는 일반 참조 샘플 또는 참조 표준 또는 수준일 수 있다. "참조 샘플"은, 예를 들어, 대조군, 예컨대, "정상 대조군"과 같은 미리 결정된 음성 대조군 값 또는 동일한 대상체로부터 채취한 이전 샘플; 정상 세포 또는 정상 조직과 같은 정상적인 건강한 대상체로부터의 샘플; 질환이 없는 대상체의 샘플(예컨대, 세포 또는 조직); 질환으로 진단되었지만 아직 본 명세서에 기재된 화합물로 치료되지 않은 대상체로부터의 샘플; 본 명세서에 기재된 화합물로 치료받은 대상체로부터의 샘플; 또는 알려진 정상 농도의 정제된 단백질(예컨대, 본 명세서에 기재된 임의의 것)의 샘플일 수 있다. "참조 표준 또는 수준"이란 참조 샘플에서 파생된 값 또는 숫자를 의미한다. "정상 대조군 값"은 비-질환 상태를 나타내는 미리 결정된 값, 예컨대, 건강한 대조군 대상체에서 예상되는 값이다. 전형적으로, 정상 제어 값은 범위("X와 Y 사이"), 높은 임계값("X보다 높지 않음") 또는 낮은 임계값("X보다 낮지 않음")으로 표현된다. 특정 바이오마커에 대한 정상 대조군 값 내의 측정된 값을 갖는 대상체는 전형적으로 그 바이오마커에 대한 "정상 한계 이내"로 지칭된다. 정상적인 참조 표준 또는 수준은 질환 또는 장애가 없는 정상 대상체; 본 명세서에 기재된 화합물로 치료된 대상체에서 파생된 값 또는 숫자일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 참조 샘플, 표준 또는 수준은 다음의 기준, 즉, 연령, 체중, 성별, 병기 및 전반적인 건강 중 적어도 하나에 의해 샘플 대상체 샘플과 매칭된다. 정상 참조 범위 내에서, 정제된 단백질, 예컨대, 본 명세서에 기재된 임의의 것의 수준의 표준 곡선이 또한 참조로서 사용될 수 있다.

[0308] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체"는, 예컨대, 실험, 진단, 예방 및/또는 치료 목적을 위해 본

발명에 따른 조성물이 투여될 수 있는 임의의 유기체를 지칭한다. 전형적인 대상체는 임의의 동물(예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 인간이 아닌 영장류 및 인간과 같은 포유동물)을 포함한다. 대상체는 치료를 구할 수 있거나, 필요로 할 수 있거나, 치료를 요구할 수 있거나, 치료를 받을 수 있거나, 미래에 치료를 받을 수 있거나, 또는 특정 질환 또는 병태에 대해서 숙련된 전문가의 보살핌을 받고 있는 인간 또는 동물일 수 있다.

[0309] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료된" 또는 "치료하는"은, 치료적 처치 및 예방적 또는 방지적 조치 둘 다를 의미하며, 여기서 목적은 바람직하지 않은 생리학적 병태, 장애 또는 질환을 예방하거나 늦추는 것(경감), 또는 유익하거나 원하는 임상 결과를 얻을 수 있다. 유익하거나 원하는 임상 결과는 증상 완화; 병태, 장애 또는 질환의 정도 감소; 병태, 장애 또는 질환의 안정화된(즉, 악화되지 않은) 상태; 병태, 장애 또는 질환 진행의 발병 지연 또는 둔화; 검출 가능 여부에 관계없이 병태, 장애 또는 질환 상태 또는 관해(부분적이든 전체적이든)의 개선; 환자가 반드시 식별할 수 있는 것은 아니지만 적어도 하나의 측정 가능한 물리적 파라미터의 개선; 또는 병태, 장애 또는 질환의 향상 또는 개선을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 치료는 과도한 수준의 부작용 없이 임상적으로 유의한 반응을 이끌어내는 것을 포함한다. 치료는 치료를 받지 않는 경우 예상 생존 기간과 비교하여 생존 기간이 연장되는 것도 포함한다.

[0310] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "변이체" 및 "유도체"는 호환 가능하게 사용되며, 본 명세서에 기재된 화합물, 펩타이드, 단백질 또는 기타 물질의 천연-유래, 합성 및 반합성 유사체를 지칭한다. 본 명세서에 기재된 화합물, 펩타이드, 단백질 또는 기타 물질의 변이체 또는 유도체는 원래 물질의 생물학적 활성을 유지하거나 개선할 수 있다.

[0311] 본 발명의 하나 이상의 실시형태의 세부사항은 아래의 설명에서 설명된다. 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점은 상세한 설명 및 청구범위로부터 명백할 것이다.

[0312] **상세한 설명**

[0313] 본 발명자들은 변형된 올리고뉴클레오타이드가 mRNA에서 표적 아데노신을 탈아미노화하는데 이용될 수 있음을 발견하였다. 따라서, 본 발명은, 예컨대, 이를 필요로 하는 대상체에서 치료 결과를 생성하기 위해 탈아미노화될 수 있는 mRNA, 예컨대, 아데노신 상의 표적 아데노신을 탈아미노화하기 위한 유용한 조성물 및 방법을 특징으로 한다.

[0314] **I. 장애**

[0315] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 바와 같이 포유동물, 바람직하게는 인간 세포에서 표적 RNA 서열을 변화시키는 방법에 사용하기 위한 본 발명의 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 유사하게, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같이 포유동물, 바람직하게는 인간 세포에서 표적 RNA 서열을 변화시키기 위한 약제의 제조에서의 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 작제물의 용도를 제공한다.

[0316] 본 발명은 또한 세포에서 표적 RNA 서열에 존재하는 적어도 하나의 특이적 표적 아데노신의 탈아미노화 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 상기 세포에 본 명세서에 기재된 올리고뉴클레오타이드를 제공하는 단계; 올리고뉴클레오타이드의 세포에 의한 흡수를 허용하는 단계; 표적 RNA 서열에 대한 올리고뉴클레오타이드의 어닐링을 허용하는 단계; 야생형 효소에서 발견되는 바와 같은 천연 dsRNA 결합 도메인을 포함하는 포유동물 ADAR 효소가 표적 RNA 서열에서 상기 표적 아데노신을 이노신으로 탈아미노화하도록 하는 단계; 및 선택적으로 RNA 서열에서의 이노신의 존재를 식별하는 단계를 포함한다.

[0317] 그러므로, 본 발명은 또한 서로 인접하는 2개의 아데노신이 ADAR과 같은 RNA 편집 효소에 의해 공동-탈아미노화되는 올리고뉴클레오타이드 및 방법에 관한 것이다. 이 특별한 경우, UAA 정지 코돈은 UII Trp-암호화 코돈으로 변환된다. 표적 코돈 내의 표적 아데노신의 탈아미노화로 인한 변형의 다른 예는 이하의 표 1 및 표 2에 제공된다.

표 1

표적 코돈	표적 코돈에 의해 암호화된 아미노산	변형된 코돈	변형된 코돈에 의해 암호화된 아미노산
AAA	Lys	IAA	Glu
		AIA	Arg
		IIA	Gly
		AII	Arg
		IAI	Glu
		III	Gly
AAC	Asn	IAC	Asp
		AIC	Ser
		IIC	Gly
AAG	Lys	IAG	Glu
		AIG	Arg
		IIG	Gly
AAU	Arg	IAU	Asp
		AIU	Ser
		IIU	Gly
ACA	Thr	ICA	Ala
		ICI	Ala
ACC	Thr	ICC	Ala
ACG	Thr	ICG	Ala
ACU	Thr	ICU	Ala
AGA	Arg	IGA	Gly
		IGI	Gly
AGC	Ser	IGC	Gly

[0318]

AGG	Arg	IGG	Gly
AGU	Ser	IGU	Gly
AUA	Ile	IUA	Asp
		AUI	Met
		IUI	Val
AUC	Ile	IUC	Val
AUG	Met	IUG	Val
AUU	Ile	IUU	Val
CAA	Gln	CIA	Arg
		CII	Arg
CAC	His	CIC	Arg
CAG	Gln	CIG	Arg
CAU	His	CIU	Arg
GAA	Glu	GIA	Gly
		GII	Gly
GAC	Asp	GIC	Gly
GAG	Glu	GIG	Gly
GAU	Asp	GIU	Gly
UAA	Stop	UII	Trp
UGA	Stop	UGI	Trp
UAC	Tyr	UIC	Cys
UAG	Stop	UIG	Trp
UAU	Tyr	UIU	Cys

[0319]

표 2

3문자 배열 염기 조성 및 얻어지는 편집된 3문자 배열

표적 코돈	변형된 코돈
AAA	AIA
AAC	AIC
AAG	AIG
AAU	AIU
CAA	CIA
CAC	CIC
CAG	CIG
CAU	CIU
GAA	GIA
GAC	GIC
GAG	GIG
GAU	GIU
UAA	UIA
UAC	UIC
UAG	UIG
UAU	UIU

[0320]

[0321] 아데노신의 이노신으로의 탈아미노화는 표적 위치에서 더 이상 돌연변이된 A를 겪지 않는 단백질이 되게 할 수 있기 때문에, 이노신으로의 탈아미노화의 식별은, 기능적 판독, 예를 들어, 기능성 단백질이 존재하는지의 여부에 대한 평가 또는 심지어 아데노신의 존재로 인해 초래된 질환이 (부분적으로) 역전되었다는 평가일 수 있다. 본 명세서에 언급된 질환의 각각에 대한 기능적 평가는 일반적으로 당업자에게 공지된 방법에 따를 것이다. 표적 아데노신의 존재가 비정상적 스플라이싱을 야기할 때, 판독은 비정상적 스플라이싱이 여전히 일어나고 있는지 여부, 또는 덜 일어나는지에 대한 평가일 수 있다. 다른 한편으로, 표적 아데노신의 탈아미노화가 스플라이스 부위를 도입하고자 원할 때, 필요한 유형의 스플라이싱이 실제로 일어나고 있는지 여부를 검증하기 위해 유사한 접근법이 사용될 수 있다. 표적 아데노신의 탈아미노화 후 이노신의 존재를 확인하는 매우 적합한 방식은 물론 당업자에게 잘 알려진 방법을 사용하는 RT-PCR 및 시퀀싱이다.

[0322] 일반적으로, 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 작제물을 사용하여 역전될 수 있는 임의의 표적 RNA에서의 돌연변이는 G-에서-A로의 돌연변이이고, 올리고뉴클레오타이드 작제물은 그에 따라 설계될 수 있다. 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 작제물을 사용하여 표적화될 수 있는 돌연변이는 또한 아데노신 데아미나제를 동원하는 경우에 C에서 A, U에서 A(DNA 수준에서 T에서 A)를 포함한다. 후자의 상황에서 RNA 편집이 반드시 돌연변이를 야생형으로 되돌릴 필요는 없지만, 편집된 뉴클레오타이드는 원래의 돌연변이에 비해서 개선될 수 있다. 예를 들어, 프레임 정지 코돈에서 발생하는 - 번역 시에 절단된 단백질을 생성하는 - 돌연변이는 그 위치에서 원래의 아미노산이 아닐 수 있는 아미노산을 암호화하는 코돈으로 변화될 수 있지만, 절단된 단백질보다 적어도 일부 기능성, 적어도 더 기능성을 가진 (전장) 단백질을 생성할 수 있다.

[0323] 본 발명은 유전 질환, 예컨대, 낭포성 섬유증, 백색증, 알파-1-안티트립신(A1AT) 결핍증, 알츠하이머병, 근위축성 축삭경화증, 천식, 11-지중해빈혈, 카다실 증후군, 샤르코-마리-투스 질환, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 원위척수성 근위축증(DSMA), 뒤센/베커 근이영양증, 이영양성 수포성 표피박리증, 수포성 표피박리증, 파브리병, 인자 V 레이든 관련 장애, 가족성 샘종 폴립증, 갈락토스혈증, 고셰병, 포도당-6-인산 탈수소효소 결손증, 혈우병, 유전성 혈색소증, 헌터 증후군, 헌팅턴병, 헐러 증후군, 염증성 장 질환(IBD), 유전성 다응고 증후군, 레베르 선천성 흑암시, 레쉬-니한 증후군, 린치 증후군, 마판 증후군, 점액 다당류증, 근이영양증, 근긴장성 이영양증 I 및 II형, 신경섬유종증, 니만-픽병 A, B 및 C형, NY-ESO-1 관련 암, 파킨슨병, 포이츠-제거스 증후군,

페닐케톤뇨증, 폼페병, 원발성 섬모운동이상증, 프로트롬빈 돌연변이 관련 장애(예컨대, 프로트롬빈 G20210A 돌연변이), 폐고혈압, 망막색소변성증, 샌드호프병, 중증 연합 면역 결핍 증후증(SCID), 겸상 적혈구 빈혈증, 척수성 근위축증, 스타르가르트병, 테이-삭스병, 어셔 증후군, X-연결 면역결핍증, 스터지-웨버 증후군, 레트 증후군, 및 다양한 형태의 암(예컨대, BRCA1 및 2 연결된 유방암 및 난소암)을 치료하는데 특히 적합하다.

[0324] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 아데노신 돌연변이를 탈아미노화하여 단백질 활성을 증가시킬 수 있다.

[0325] 소정의 실시형태에서, 치료는 유전자의 돌연변이로 진단되었지만 아직 질환 증상을 갖지 않는 대상체(예컨대, 유아, 예컨대, 1개월 내지 12개월인 대상체 또는 2세 미만의 대상체)에 대해 수행된다. 다른 실시형태에서, 치료는 적어도 하나의 증상을 가진 개체에 대해서 수행된다.

[0326] 치료는 유아기에서 시작해서 성인기까지의 모든 연령의 대상체에서 수행될 수 있다. 대상체는, 예를 들어, 출생시, 6개월, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 또는 18세에 치료를 시작할 수 있다.

[0327] 소정의 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 시험관내 및/또는 생체내에서 단백질 활성을 증가(예컨대, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%. 700%, 800%, 900%, 1000% 이상만큼 증가, 또는 1.2-배 초과, 1.4-배, 1.5-배, 1.8-배, 2.0-배, 3.0-배, 3.5-배, 4.5-배, 5.0-배, 10-배, 15-배, 20-배, 30-배, 40-배, 50-배, 100-배, 1000-배 이상만큼 증가)시킨다.

[0328] 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 뇌에서 단백질 활성을 증가(예컨대, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% 이상만큼 증가, 또는 1.2-배 초과, 1.4-배, 1.5-배, 1.8-배, 2.0-배, 3.0-배, 3.5-배, 4.5-배, 5.0-배, 10-배, 15-배, 20-배, 30-배, 40-배, 50-배, 100-배, 1000-배 이상만큼 증가)시킨다.

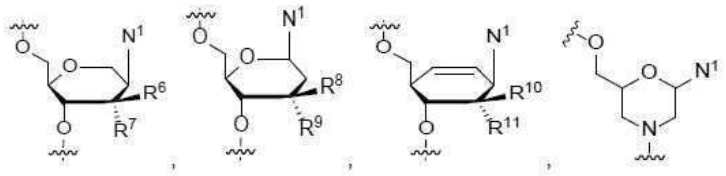
[0329] **II. 올리고뉴클레오타이드 제제**

[0330] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 표적 mRNA 상의 선택된 아데노신을 탈아미노화하기 위해 ADAR 효소를 동원할 수 있는 적어도 하나의 미스매치를 제외하고 표적 mRNA에 상보적이다. 몇몇 실시형태에서, 단지 1개의 아데노신은 탈아미노화된다. 몇몇 실시형태에서, 1, 2 또는 3개의 아데노신은 탈아미노화된다. 올리고뉴클레오타이드는, 표적 아데노신과 반대편, 예컨대, X^2에서 미스매치를 포함한다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 안정성을 증가 및/또는 탈아미노화 효율을 증가시키기 위한 변형(예컨대, 대체 뉴클레오타이드)을 더 포함할 수 있다.

[0331] A. 대체 올리고뉴클레오타이드

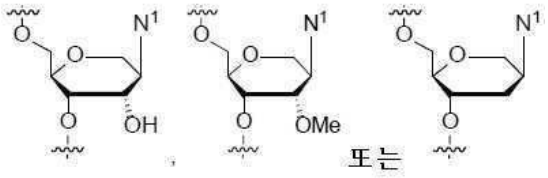
[0332] 일 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 하나 이상의 뉴클레오타이드는 천연-유래이고, 예컨대, 당업계에 공지되고 본 명세서에 기재된 화학적 변형 및/또는 접합을 포함하지 않는다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 하나 이상의 뉴클레오타이드는, 안정성 또는 다른 유익한 특징을 향상시키기 위하여 화학적으로 변형된다(예컨대, 대체 뉴클레오타이드). 이론에 얽매이지 않고, 소정의 변형은 뉴클레아제 내성 및/또는 혈청 안정성을 증가시킬 수 있거나 또는 면역원성을 감소시킬 수 있는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA(예컨대, 아데닌, 티미딘, 구아노신, 사이티딘, 유리딘, 또는 이노신)에서 천연 유래인 것으로 밝혀진 소정의 뉴클레오타이드를 함유할 수 있거나 또는 뉴클레오타이드의 하나 이상의 성분에 하나 이상의 화학적 변형(예컨대, 핵염기, 당 또는 포스포-링커 모이어티)을 갖는 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 천연-유래 포스포다이에스터 결합을 통해서 서로 연결될 수 있거나, 또는 포스포로티오에이트, 3'-메틸렌포스포네이트, 5'-메틸렌포스포네이트, 3'-포스포아미데이트, 2'-5' 포스포다이에스터, 구아니디늄, S-메틸티오유레아, 또는 펩타이드 결합을 통해서 공유 연결되도록 변형될 수 있다.

[0333] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 하나 이상의 뉴클레오타이드는 하기 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 구조를 갖는다:

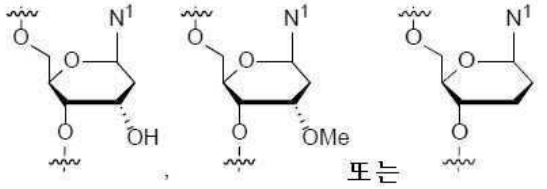
[0334] 

화학식 I, 화학식 II, 화학식 III, 화학식 IV.

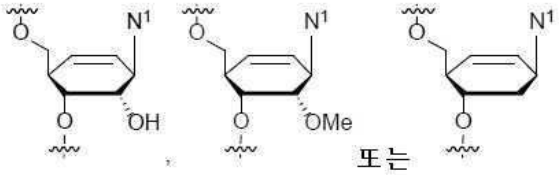
[0335] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 하나 이상의 뉴클레오타이드는 화학식 I 중 어느 하나의 구조를 갖고, 예컨대, 하기 구조를 갖는다:

[0336] 

[0337] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 하나 이상의 뉴클레오타이드는 화학식 II 중 어느 하나의 구조를 갖고, 예컨대, 하기 구조를 갖는다:

[0338] 

[0339] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 하나 이상의 뉴클레오타이드는 화학식 III 중 어느 하나의 구조를 갖고, 예컨대, 하기 구조를 갖는다:

[0340] 

[0341] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 하나 이상의 뉴클레오타이드는 화학식 IV 중 어느 하나의 구조를 갖는다.

[0342] 본 발명의 소정의 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드의 실질적으로 전부는 대체 뉴클레오타이드이다. 본 발명의 다른 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드의 전부는 대체 뉴클레오타이드이다. "뉴클레오타이드의 실질적으로 전부가 대체 뉴클레오타이드인" 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 전부는 아니지만 대체로 변형되고 단지 5, 4, 3, 2 또는 1개의 천연-유래 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 단지 5, 4, 3, 2 또는 1개의 대체 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0343] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 하기 구조를 포함한다:

[0344] $$[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$$

[0345] 여기서, A 및 B의 각각은 뉴클레오타이드이고; m 및 n은, 각각 독립적으로, 5 내지 40의 정수이고; X^1, X^2 또는 X^3 중 적어도 하나는, R^8 및 R^9가 각각 수소인 화학식 II의 구조를 갖고, 화학식 II의 구조를 갖지 않는 X^1, X^2 및 X^3의 각각은 리보뉴클레오타이드이고; $[A_m]$ 및 $[B_n]$은 각각 적어도 5개의 말단 2'-O-메틸-뉴클레오타이드 및 적어도 4개의 말단 포스포로티오에이트 링키지를 포함하고; 조합된 $[A_m]$ 및 $[B_n]$ 중의 뉴클레오타이드의 적어도 20%는 2'-O-메틸-뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시형태에서, X^1은 아데닌 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 아데닌 핵염기를 포함하거나; X^1은 아데닌 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하거나; X^1은 아데닌 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 유라실 또는 티민 핵염기를 포함하거나; X^1은 아데닌 핵염기를 포함하고, X^2는 사이

토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 사이토신 또는 5-메틸사이토신 핵염기를 포함하거나; X^1은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 아데닌 핵염기를 포함하거나; X^1은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하거나; X^1은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 유라실 또는 티민 핵염기를 포함하거나; X^1은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 사이토신 또는 5-메틸사이토신 핵염기를 포함하거나; X^1은 유라실 또는 티민 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 아데닌 핵염기를 포함하거나; X^1은 유라실 또는 티민 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하거나; X^1은 유라실 또는 티민 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 유라실 또는 티민 핵염기를 포함하거나; X^1은 유라실 또는 티민 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 사이토신 또는 5-메틸사이토신 핵염기를 포함하거나; X^1은 사이토신 또는 5-메틸사이토신 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 아데닌 핵염기를 포함하거나; X^1은 사이토신 또는 5-메틸사이토신 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 구아닌 또는 하이포잔틴 핵염기를 포함하거나; X^1은 사이토신 또는 5-메틸사이토신 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 유라실 또는 티민 핵염기를 포함하거나; 또는 X^1은 사이토신 또는 5-메틸사이토신 핵염기를 포함하고, X^2는 사이토신, 5-메틸사이토신, 유라실, 또는 티민 핵염기를 포함하거나 또는 핵염기를 포함하지 않고, 그리고 X^3은 사이토신 또는 5-메틸사이토신 핵염기를 포함한다.

[0346] 본 발명의 예시적인 올리고뉴클레오타이드는 하기 표 3에 표시되어 있다. 표 3에서, A, C, G 및 U는 리보뉴클레오사이드이고; mA, mC, mG 및 mU는 2'-O-메틸 리보뉴클레오사이드를 나타내고; hC는 β-D-호모DNA-사이티딘을 나타내고; 그리고 별표는 포스포로티오에이트 링키지를 나타낸다(나머지 링키지는 포스포다이에스터 링키지이다).

표 3

본 발명의 예시적인 올리고뉴클레오타이드

5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**CCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	서열번호 51
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**hCCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3''	서열번호 52
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**ChCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3''	서열번호 53
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**CCA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	서열번호 54
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**hCCA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3''	서열번호 55
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**ChCA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3''	서열번호 56

[0347]

[0348] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 ADAR 효소에 대해서 동원 도메인(예컨대, ADAR-동원 도메인)으로서 작용하는 스템-루프 구조를 포함한다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 '악시오머 AON' 또는 '자가-루핑 AON'이라 지칭될 수 있다. 동원 부분은 표적 서열을 표적화 부분과 혼성화하는 것에 의해 dsRNA에 대해서 세포에 존재하는 천연 ADAR 효소를 동원하는데 작용한다. 동원 부분은 천연 기질(예컨대, 글루타메이트 이온성 수용체 AMPA 소단위 2형(GluR2) 수용체; 예컨대, GluR2 ADAR-동원 도메인) 또는 ADAR 효소의 dsRNA 결합 영역(예컨대, Z-DNA ADAR-동원 도메인)에 의해 인식될 것으로 알려진 Z-DNA 구조를 모방하는 스템-루프 구조일 수 있다. GluR2 및 Z-DNA ADAR-동원 도메인이 ADAR에 대한 높은 친화도 결합 파트너이므로, 접합된 실체 또는 변형된 재조합 ADAR 효소의 존재에 대한 필요는 없다. 스템-루프 구조는 2개의 개별의 핵산 가닥에 의해 형성된 분자간 스템-루프 구조 또는 단일 핵산 가닥 내에 형성된 분자내 스템 루프 구조일 수 있다. 동원 부분의 스템-루프 구조는 WO 2016/097212, US 2018/0208924, 문헌[Merkle et al. Nature Biotechnology, 37: 133-8 (2019), Katrekar et al. Nature Methods, 16(3): 239-42 (2019), Fukuda et al. Scientific Reports, 7: 41478 (2017)]에 기재된 스템 루프 구조일 수 있고, ADAR 동원 부분의 스템-루프 구조는 참조에 의해 본 명세서에 원용된다. 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 ADAR-동원 도메인(예컨대, 1 또는 2 ADAR-동원 도메인)을 포함한다.

[0349] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 화학식 V, VI, VIII 또는 IX 중 어느 하나의 구조를 갖는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 화학식 XXIII의 구조를 갖는 ADAR-동원 도메인을 포함하는 것을 포함한다:

C-L_1-D

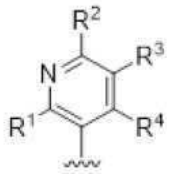
[0350] **화학식 XXIII**

[0351] 식 중, C는 약 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이(예컨대, 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이)의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이고, L_1은 루프 영역이고, D는 약 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이(예컨대, 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이)의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이다.

[0352] 몇몇 실시형태에서, C는 2개의 가닥이 혼성화되고 적합한 조건 하에 듀플렉스를 형성하도록 D에 상보적인 영역을 포함한다. 일반적으로, 듀플렉스 구조는 5 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이, 예컨대, 5 내지 49, 5 내지 45, 5 내지 40, 5 내지 35, 5 내지 30, 5 내지 25, 5 내지 20, 5 내지 15, 5 내지 10, 5 내지 6, 8 내지 50, 8 내지 45, 8 내지 40, 8 내지 35, 8 내지 30, 8 내지 25, 8 내지 20, 8 내지 15, 8 내지 10, 15 내지 50, 15 내지 45, 15 내지 40, 15 내지 35, 15 내지 30, 15 내지 25, 15 내지 20, 15 내지 16, 20 내지 50, 20 내지 45, 20 내지 40, 20 내지 35, 20 내지 30, 20 내지 25, 25 내지 50, 25 내지 45, 25 내지 40, 25 내지 35, 또는 25 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드 길이이다. 위에서 언급된 범위 및 길이에 대해서 중간인 범위 및 길이는 또한 본 발명의 일부인 것으로 상정된다. 몇몇 실시형태에서, C는 D의 적어도 5개의 인접한 핵염기(예컨대, 5, 10, 15, 20, 25, 30개 이상의 인접 핵염기)에 상보적이고, 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이(예컨대, 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 또는

50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이)의 듀플렉스 구조를 형성한다.

[0353] 몇몇 실시형태에서, 듀플렉스 구조는 C의 뉴클레오타이드와 D의 뉴클레오타이드 사이에 적어도 하나의 미스매치(예컨대, 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5개의 미스매치)를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 미스매치는 쌍을 이룬 A 대 C 미스매치이다. 몇몇 실시형태에서, A 대 C 미스매치의 A 뉴클레오사이드는 C 가닥 상에 있고 A 대 C 미스매치의 C 뉴클레오사이드는 D 가닥 상에 있다. 몇몇 실시형태에서, A 대 C 미스매치의 A 뉴클레오사이드는 D 가닥 상에 있고 A 대 C 미스매치의 C 뉴클레오사이드는 C 가닥 상에 있다. 다른 실시형태에서, 미스매치는 쌍을 이룬 G-대-G 미스매치이다. 또 다른 실시형태에서, 미스매치는 쌍을 이룬 C 대 A 미스매치이다. 몇몇 실시형태에서, C 대 A 미스매치의 C 뉴클레오사이드는 C 가닥 상에 있고 C 대 A 미스매치의 A 뉴클레오사이드는 D 가닥 상에 있다. 몇몇 실시형태에서, C 대 A 미스매치의 C 뉴클레오사이드는 D 가닥 상에 있고 C 대 A 미스매치의 A 뉴클레오사이드는 C 가닥 상에 있다. 몇몇 실시형태에서, 미스매치는 쌍을 이룬 I 대 I 미스매치이다. 몇몇 실시형태에서, 미스매치는 쌍을 이룬 I 대 G 미스매치이다. 몇몇 실시형태에서, I 대 G 미스매치의 I 뉴클레오사이드는 C 가닥 상에 있고, I 대 G 미스매치의 G 뉴클레오사이드는 D 가닥 상에 있다. 몇몇 실시형태에서, I 대 G 미스매치의 I 뉴클레오사이드는 D 가닥 상에 있고, I 대 G 미스매치의 G 뉴클레오사이드는 C 가닥 상에 있다. 몇몇 실시형태에서, 미스매치는 쌍을 이룬 G 대 I 미스매치이다. 몇몇 실시형태에서, G 대 I 미스매치의 G 뉴클레오사이드는 C 가닥 상에 있고 G 대 I 미스매치의 I 뉴클레오사이드는 D 가닥 상에 있다. 몇몇 실시형태에서, G 대 I 미스매치의 G 뉴클레오사이드는 D 가닥 상에 있고 G 대 I 미스매치의 I 뉴클레오사이드는 C 가닥 상에 있다. 몇몇 실시형태에서, 미스매치는 대체 핵염기를 갖는 뉴클레오사이드를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 대체 핵염기는 하기 구조 또는 이의 염을 갖는다:

[0354] 

[0355] 여기서 R^1은 수소, 트라이플루오로메틸, 선택적으로 치환된 아미노, 하이드록실, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알콕시이고;

[0356] R^2는 수소, 선택적으로 치환된 아미노, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬이고; 그리고

[0357] R^3 및 R^4는, 독립적으로, 수소, 할로겐 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬이다. 몇몇 실시형태에서, R^1은 수소 결합 공여기(예컨대, 하이드록실기, 아미노기)이다. 몇몇 실시형태에서, R^1은 수소 결합 수용기(예컨대, 알콕시기)이다.

[0358] 몇몇 실시형태에서, 듀플렉스 구조는 2개의 미스매치를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 미스매치는 적어도 3개의 연결된 뉴클레오사이드 떨어져 있다. 예를 들어, 미스매치가 "3개의 뉴클레오타이드"만큼 이격되어 있는 경우, 올리고뉴클레오타이드는 구조 M_1-N_1-N_2-N_3-M_2를 포함하며, 여기서 M_1은 제1 미스매치이고, N_1, N_2 및 N_3은 쌍을 이룬 핵염기이고, M_2는 제2 미스매치이다. 몇몇 실시형태에서, M_1은 쌍을 이룬 A 대 C 미스매치이고 M_2는 쌍을 이룬 G-대-G 미스매치이다.

[0359] 몇몇 실시형태에서, 루프 영역, L_1은 연결된 뉴클레오사이드를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, L_1은 적어도 하나의 대체 핵염기, 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지, 및/또는 적어도 하나의 대체 당 모이어티를 포함한다.

[0360] 다른 실시형태에서, 루프 영역은 하기 화학식 VII의 구조를 갖는다:

[0361] $$F^1\text{-}(G^1)_j\text{-}(H^1)_k\text{-}(G^2)_m\text{-}(I)\text{-}(G^3)_n\text{-}(H^2)_p\text{-}(G^4)_q\text{-}F^2$$

화학식 VII

[0362] 식 중, F^1은 루프 영역과 C 사이의 결합이고; F^2는 D와 뉴클레오타이드 사이 또는 D와 선택적으로 링커 사이의 결합이고; G^1, G^2, G^3 및 G^4는, 각각 독립적으로, 선택적으로 치환된 C1-C2 알킬, 선택적으로 치환된 C1-C3 헤테

로알킬, O, S 및 NR^N으로부터 선택되고; R^N은 수소, 선택적으로 치환된 C_{1-4} 알킬, 선택적으로 치환된 C_{2-4} 알켄일, 선택적으로 치환된 C_{2-4} 알킨일, 선택적으로 치환된 C_{2-6} 헤테로사이클릴, 선택적으로 치환된 C_{6-12} 아릴, 또는 선택적으로 치환된 C_{1-7} 헤테로알킬이고; C^1 및 C^2는, 각각 독립적으로, 카보닐, 티오카보닐, 설포닐 또는 포스포릴로부터 선택되고; j, k, m, n, p 및 q는, 각각 독립적으로, 0 또는 1이고; 그리고 I는 선택적으로 치환된 C_{1-10} 알킬, 선택적으로 치환된 C_{2-10} 알켄일, 선택적으로 치환된 C_{2-10} 알킨일, 선택적으로 치환된 C_{2-6} 헤테로사이클릴, 선택적으로 치환된 C_{6-12} 아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_{10} 폴리에틸렌 글리콜, 또는 선택적으로 치환된 C_{1-10} 헤테로알킬, 또는 F^1-$(G^1)_j$-$(H^1)_k$-$(G^2)_m$-(I)-$(G^3)_n$-$(H^2)_p$-$(G^4)_q$-F^2를 연결하는 화학 결합이다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 선택적이다.

[0363] 몇몇 실시형태에서, 루프 영역, L_1은 탄수화물-함유 연결 모이어티를 포함한다.

[0364] 일 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드의 하나 이상은, 천연-유래이고, 예컨대, 화학적 변형 및/또는 당업계에 공지되고 본 명세서에 기재된 접합을 포함하지 않는다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 하나 이상의 뉴클레오타이드는 안정성 또는 다른 유익한 특징(예컨대, 대체 뉴클레오타이드)을 향상시키기 위하여 화학적으로 변형된다. 이론에 얽매이지 않고, 소정의 변형은 뉴클레아제 내성 및/또는 혈청 안정성을 증가시킬 수 있거나, 또는 면역원성을 감소시킬 수 있는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA(예컨대, 아데닌, 티미딘, 구아노신, 사이티딘, 유리딘, 또는 이노신)에서 천연 유래인 것으로 밝혀진 소정의 뉴클레오타이드를 함유할 수 있거나 또는 뉴클레오타이드의 하나 이상의 성분에 하나 이상의 화학적 변형(예컨대, 핵염기, 당 또는 포스포-링커 모이어티)을 갖는 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 천연-유래 포스포다이에스터 결합을 통해서 서로 연결될 수 있거나, 또는 포스포로티오에이트, 3'-메틸렌포스포네이트, 5'-메틸렌포스포네이트, 3'-포스포아미데이트, 2'-5' 포스포다이에스터, 구아니디늄, S-메틸티오유레아, 또는 펩타이드 결합을 통해서 공유 연결되도록 변형될 수 있다.

[0365] 몇몇 실시형태에서, C는 적어도 하나의 대체 핵염기, 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지, 및/또는 적어도 하나의 대체 당 모이어티를 포함한다. 다른 실시형태에서, D는 적어도 하나의 대체 핵염기, 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지, 및/또는 적어도 하나의 대체 당 모이어티를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, C와 D 둘 다는 각각 적어도 하나의 대체 핵염기, 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지, 및/또는 적어도 하나의 대체 당 모이어티를 포함한다.

[0366] 본 발명의 소정의 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드의 실질적으로 전부는 대체 뉴클레오타이드이다. 본 발명의 다른 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드의 전부는 대체 뉴클레오타이드이다. "뉴클레오타이드의 실질적으로 전부가 대체 뉴클레오타이드인" 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 전부는 아니지만 대체로 변형되고 단지 5, 4, 3, 2 또는 1개의 천연-유래 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 단지 5, 4, 3, 2 또는 1개의 대체 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0367] 일 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 화학식 XXIII의 구조를 갖는 ADAR-동원 도메인을 포함하되, 여기서 C는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이고, L_1은 루프 영역이고, D는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시형태에서, C는 D의 적어도 5개의 인접한 핵염기에 상보적이고, 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 C 및 D에 의해 형성된 듀플렉스 구조를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 듀플렉스 구조는 적어도 하나의 미스매치를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, C 또는 D는 적어도 하나의 대체 핵염기를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, C 및 D는 각각 적어도 하나의 대체 핵염기를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, C 및/또는 D는, 독립적으로, 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지 및/또는 적어도 하나의 대체 당 모이어티를 더 포함한다. 몇몇 실시형태에서, L_1은 연결된 뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시형태에서, L_1은 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진다. 몇몇 실시형태에서, L_1은 적어도 하나의 대체 핵염기, 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지, 및/또는 적어도 하나의 대체 당 모이어티를 포함한다.

[0368] 다른 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 화학식 XXIII의 구조를 갖는 ADAR-동원 도메인을 포함하

고, C는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이고, L_1은 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지지 않은 루프 영역이고, D는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시형태에서, C는 D의 적어도 5개의 인접한 핵염기에 상보적이고, 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 C 및 D에 의해 형성된 듀플렉스 구조를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 듀플렉스 구조는 적어도 하나의 미스매치를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, L_1은 본 명세서에 기재된 바와 같은 화학식 VII의 구조를 갖는다. 몇몇 실시형태에서, L_1은 탄수화물-함유 연결 모이어티를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, C 및/또는 D는, 독립적으로, 적어도 하나의 대체 핵염기, 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지, 및/또는 적어도 하나의 대체 당 모이어티를 포함한다.

[0369] 다른 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 화학식 XXIII의 구조를 갖는 ADAR-동원 도메인을 포함하되, C는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이고, L_1은 적어도 하나의 대체 핵염기 또는 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지를 포함하는 루프 영역이고, D는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시형태에서, C는 D의 적어도 5개의 인접한 핵염기와 상보적이고, 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 C 및 D에 의해 형성된 듀플렉스 구조를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 듀플렉스 구조는 적어도 하나의 미스매치를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, L_1은 적어도 하나의 대체 핵염기 및 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지를 포함한다.

[0370] 다른 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 화학식 XXIII의 구조를 갖는 ADAR-동원 도메인을 포함하되, 여기서 C는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이고, L_1은 2'-O-메틸 당 모이어티가 아닌 적어도 하나의 대체 당 모이어티를 포함하는 루프 영역이고(예컨대, 대체 당 모이어티는 2'-O-C_1-C_6 알킬-당 모이어티, 2'-아미노-당 모이어티, 2'-플루오로-당 모이어티, 2'-O-MOE 당 모이어티, LNA 당 모이어티, 아라비노 핵산(ANA) 당 모이어티, 2'-플루오로-ANA 당 모이어티, 데옥시리보스 당 모이어티, 및 이환식 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택되고), D는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시형태에서, C는 D의 적어도 5개의 인접한 핵염기와 상보적이고, 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 50개의 연결된 뉴클레오사이드 길이의 C 및 D에 의해 형성된 듀플렉스 구조를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 듀플렉스 구조는 적어도 하나의 미스매치를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, C 및/또는 D는, 독립적으로, 적어도 하나의 대체 핵염기, 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지, 및/또는 적어도 하나의 대체 당 모이어티를 포함한다.

[0371] 몇몇 실시형태에서, C는 서열번호 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 및 34 중 어느 하나에 제시된 핵염기 서열과 적어도 50% 서열 동일성(예컨대, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵염기 서열을 포함하고, D는 C의 핵염기 서열에 상보적인 핵염기 서열을 포함하며, 여기서 서열은 본 명세서에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 미스매치를 포함한다. 다른 실시형태에서, D는 서열번호 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32 및 35 중 어느 하나에 제시된 핵염기 서열과 적어도 50% 서열 동일성(예컨대, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵염기 서열을 포함하고, C는 C의 핵염기 서열에 상보적인 핵염기 서열을 포함하며, 여기서 서열은 본 명세서에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 미스매치를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, C-L_1-D는 서열번호 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 및 36 중 어느 하나에 제시된 핵염기 서열과 적어도 50% 서열 동일성(예컨대, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵염기 서열을 포함하고, 여기서 서열은 본 명세서에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 미스매치를 포함한다.

[0372] 서열번호 1 내지 36의 핵염기 서열은 이하에 제공된다:

표 4

[0373]

GGUGAAUAGUAUAACAAUAU	서열번호 1
AUGUUGUUAUAGUAUCCACC	서열번호 2
GGUGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCACC	서열번호 3
GGUGAAGAGGAGAACAAUAU	서열번호 4
AUGUUGUUCUCGUCUCCACC	서열번호 5
GGUGAAGAGGAGAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUCUCGUCUCCACC	서열번호 6
GGUGUCGAGAAGAGGAGAACAAUAU	서열번호 7
AUGUUGUUCUCGUCUCCUCGACACC	서열번호 8
GGUGUCGAGAAGAGGAGAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUCUCGUCUCCUCGACACC	서열번호 9
GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAU	서열번호 10
AUGUUGUUAUAGUAUCCCACCU	서열번호 11
GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCACCU	서열번호 12
GUGGAAUAGUAUAACAAUAU	서열번호 13
AUGUUGUUAUAGUAUCCCAC	서열번호 14
GUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCAC	서열번호 15
GGUGUCGAGAAUAGUAUAACAAUAU	서열번호 16
AUGUUGUUAUAGUAUCCUCGACACC	서열번호 17
GGUGUCGAGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCUCGACACC	서열번호 18
GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAU	서열번호 19
AUGUUGUUAUAGUAUCCCACCU	서열번호 20
GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCACCU	서열번호 21
GGGUGGAAUAGUAUACCA	서열번호 22
UGGUAUAGUAUCCCACCU	서열번호 23
GGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCU	서열번호 24
GUGGGUGGAAUAGUAUACCA	서열번호 25
UGGUAUAGUAUCCCACCUAC	서열번호 26

[0374]

GUGGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCUAC	서열번호 27
UGGGUGGAAUAGUAUACCA	서열번호 28
UGGUAUAGUAUCCCACCUA	서열번호 29
UGGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCUA	서열번호 30
GGUGGAAUAGUAUACCA	서열번호 31
UGGUAUAGUAUCCCACC	서열번호 32
GGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACC	서열번호 33
GUGGAAUAGUAUACCA	서열번호 34
UGGUAUAGUAUCCCAC	서열번호 35
GUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCAC	서열번호 36

[0375] 서열번호 1 내지 36의 서열이 비변형된 및/또는 비-접합된 서열로서 기재되지만, 본 발명의 올리고뉴클레오타이

드의 RNA는 대체 뉴클레오사이드인 서열번호 1 내지 36에 제시되고/되거나 이하에 상세히 기재된 바와 같이 접합된 서열 중 어느 하나를 포함할 수 있는 것이 이해될 것이다.

[0376] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 5' 캡 구조를 더 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 5' 캡 구조는 2,2,7-트라이메틸구아노신 캡이다.

[0377] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어, Biosearch, Applied Biosystems, Inc.로부터 상업적으로 입수 가능한 것과 같은 자동화 DNA 합성기의 사용에 의해, 예컨대, 이하에 더욱 논의된 바와 같은 표준 당업계에 공지된 방법에 의해 합성될 수 있다.

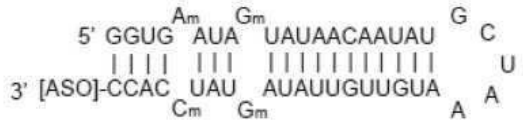
[0378] 올리고뉴클레오타이드 화합물은, 용액상 또는 고체상 유기 합성 또는 둘 다를 사용하여 제조될 수 있다. 유기 합성은 비천연 또는 대체 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 용이하게 제조될 수 있다는 이점을 제공한다. 단일-가닥 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 용액상 또는 고체상 유기 합성 또는 둘 다를 사용하여 제조될 수 있다.

[0379] 또한, 본 명세서에서 확인된 임의의 서열에 대해서, 더 길거나 더 짧은 서열을 생성하기 위해 연결된 뉴클레오사이드를 체계적으로 추가하거나 제거함으로써 추가의 최적화가 달성될 수 있는 것으로 상정된다. 추가로, 이러한 최적화된 서열은, 분자를 더욱 최적화시키기 위하여(예컨대, 혈청 안정성 또는 순한 반감기를 증가시키고, 열 안정성을 증가시키고, 막관통 전달을 증대시키고, 특정 위치 또는 세포 유형에 표적화시키고, 그리고/또는 RNA 편집 효소(예컨대, ADAR)와의 상호작용을 증가시키기 위하여) 당업계에 공지되고/되거나 본 명세서에서 논의된 바와 같은 대체 뉴클레오사이드, 대체 당 모이어티, 및/또는 대체 인터뉴클레오사이드 링키지를 비롯하여, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 공지된 바와 같은 대체 뉴클레오사이드, 대체 당 모이어티, 및/또는 대체 인터뉴클레오사이드 링키지의 도입에 의해 조절될 수 있다.

[0380] 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 하나의 ADAR-동원 도메인을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, ADAR-동원 도메인은 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 있다. 몇몇 실시형태에서, ADAR-동원 도메인은 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 있다. 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 제1 ADAR-동원 도메인 및 제2 ADAR-동원 도메인을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 제1 ADAR-동원 도메인은 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 있되, 제2 ADAR-동원 도메인은 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 있다. 몇몇 실시형태에서, 하나 이상의 ADAR-동원 도메인은 GluR2 ADAR-동원 도메인이다. 몇몇 실시형태에서, GluR2 ADAR-동원 도메인은, 이하에 나타낸 바와 같이 5'에서 3' 방향으로, 서열번호 37의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:

[0381] GGUGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCACC(서열번호 37)

[0382] 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이하에 나타낸 바와 같은 화학식 X의 구조를 포함한다:



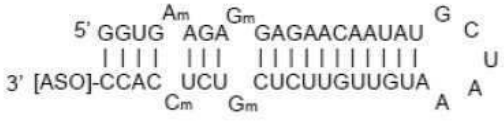
화학식 X

[0383]

[0384] 식 중, [ASO]는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 어느 것인가를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, GluR2 ADAR-동원 도메인은 이하에 나타낸 바와 같이 5'에서 3' 방향으로 서열번호 38의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:

[0385] GGUGAAGAGGAGAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUCUCGUCUCCACC(서열번호 38)

[0386] 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이하에 나타낸 바와 같은 하기 화학식 XI의 구조를 포함한다:



화학식 XI

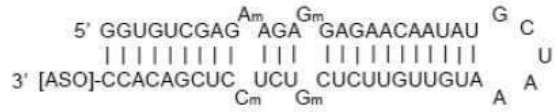
[0387]

[0388] 식 중, [ASO]는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 어느 것인가를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, GluR2 ADAR-동원 도메인은, 이하에 나타낸 바와 같이 5'에서 3' 방향으로, 서열

번호 39의 뉴클레오타이드를 갖는다:

[0389] GGUGUCGAGAAGAGGAGAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUCUCGUCUCCUCGACACC(서열번호 39)

[0390] 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이하에 나타낸 바와 같은 화학식 XII의 구조를 포함한다:



화학식 XII

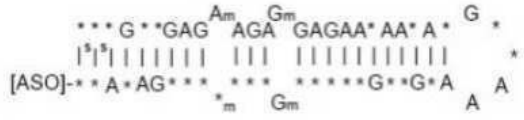
[0391]

[0392] 식 중, [ASO]는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 어느 것인가를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0393] 몇몇 실시형태에서, GluR2 ADAR-동원 도메인은, 이하에 나타낸 바와 같이 5'에서 3' 방향으로, 서열번호 40의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:

[0394] *s*s*G**GAGAAGAGGAGAA*AA*A*G**AAA*G**G*****G*******GA*A**(서열번호 40)

[0395] 식 중, *는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드이고, s는 2개의 연결된 뉴클레오타이드 사이의 포스포로티오에이트 인터뉴클레오사이드 링키지이다. 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이하에 나타낸 바와 같은 화학식 XIII의 구조를 포함한다:



화학식 XIII

[0396]

[0397] 식 중, [ASO]는 청구항 제1항 내지 제38항, 또는 청구항 제45항 내지 제49항 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, *는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드이고, s는 포스포로티오에이트 인터뉴클레오사이드 링키지이고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, ADAR-동원 도메인은 적어도 하나의 뉴클레아제-내성 뉴클레오타이드(예컨대, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드)를 더 포함한다. 몇몇 실시형태에서, ADAR-동원 도메인은 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지(예컨대, 포스포로티오에이트 인터뉴클레오사이드 링키지)를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, GluR2 ADAR-동원 도메인은, 이하에 나타낸 바와 같이 5'에서 3' 방향으로, 서열번호 41의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:

[0398] GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCACCU(서열번호 41)

[0399] 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이하에 나타낸 바와 같은 하기 화학식 XIV의 구조를 포함한다:



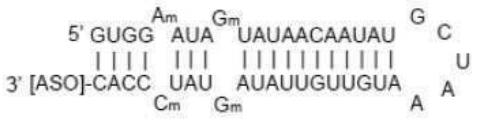
화학식 XIV

[0400]

[0401] 식 중, [ASO]는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 어느 것인가를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, GluR2 ADAR-동원 도메인은, 이하에 나타낸 바와 같이 5'에서 3' 방향으로, 서열번호 42의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:

[0402] GUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCAC(서열번호 42)

[0403] 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이하에 나타낸 바와 같은 화학식 XV의 구조를 포함한다:



화학식 XV

[0404]

[0405] 식 중, [ASO]는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 어느 것인가를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, GluR2 ADAR-동원 도메인은, 이하에 나타낸 바와 같이 5'에서 3' 방향으로, 서열번호 43의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:

[0406] GGUGUCGAGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCUCGACACC(서열번호 43)

[0407] 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이하에 나타낸 바와 같은 화학식 XVI의 구조를 포함한다:



화학식 XVI

[0408]

[0409] 식 중, [ASO]는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 어느 것인가를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, GluR2 ADAR-동원 도메인은, 이하에 나타낸 바와 같이 5'에서 3' 방향으로, 서열번호 44의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:

[0410] GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCACCU(서열번호 44)

[0411] 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이하에 나타낸 바와 같이 화학식 XVII의 구조를 포함한다:



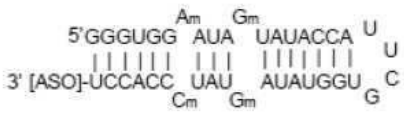
화학식 XVII

[0412]

[0413] 식 중, [ASO]는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 어느 것인가를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, GluR2 ADAR-동원 도메인은, 이하에 나타낸 바와 같이 5'에서 3' 방향으로, 서열번호 45의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:

[0414] GGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCU(서열번호 45)

[0415] 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이하에 나타낸 바와 같이 화학식 XVIII의 구조를 포함한다:



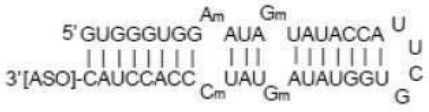
화학식 XVIII

[0416]

[0417] 식 중, [ASO]는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 어느 것인가를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, GluR2 ADAR-동원 도메인은, 이하에 나타낸 바와 같이 5'에서 3' 방향으로, 서열번호 46의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:

[0418] GUGGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCUAC(서열번호 46)

[0419] 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는, 이하에 나타낸 바와 같은 화학식 XIX의 구조를 포함한다:



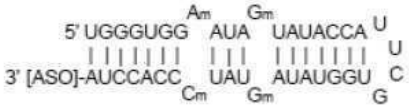
화학식 XIX

[0420]

[0421] 식 중, [ASO]는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 어느 것인가를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, GluR2 ADAR-동원 도메인은, 이하에 나타낸 바와 같이 5'에서 3' 방향으로, 서열번호 47의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:

[0422] UGGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCUA(서열번호 47)

[0423] 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이하에 나타낸 바와 같은 화학식 XX의 구조를 포함한다:



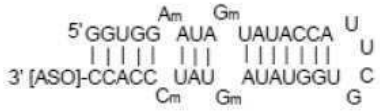
화학식 XX

[0424]

[0425] 식 중, [ASO]는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 어느 것인가를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, GluR2 ADAR-동원 도메인은, 이하에 나타낸 바와 같이 5'에서 3' 방향으로, 서열번호 48의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:

[0426] GGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACC(서열번호 48)

[0427] 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이하에 나타낸 바와 같은 화학식 XXI의 구조를 포함한다:



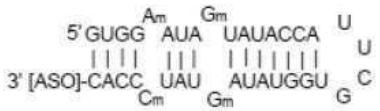
화학식 XXI

[0428]

[0429] 식 중, [ASO]는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 어느 것인가를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, GluR2 ADAR-동원 도메인은, 이하에 나타낸 바와 같이 5'에서 3' 방향으로 서열번호 49의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:

[0430] GUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCAC(서열번호 49)

[0431] 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이하에 나타낸 바와 같은 화학식 XXII의 구조를 포함한다:



화학식 XXII

[0432]

[0433] 식 중, [ASO]는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 중 어느 것인가를 포함하고, m은 미스매칭된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0434] 몇몇 실시형태에서, ADAR-동원 도메인은 Z-DNA ADAR-동원 도메인이다. 몇몇 실시형태에서, ADAR-동원 도메인은 MS2 ADAR-동원 도메인이다. 몇몇 실시형태에서, MS2 박테리오파지 스템-루프 구조는 ADAR-동원 도메인(예컨대, MS2 ADAR-동원 도메인)으로서 사용될 수 있다. MS2 스템-루프는 MS2 박테리오파지 코트 단백질에 결합되는 것으로 알려져 있고, ADAR의 데아미나제 도메인(예컨대 ADAR 융합 단백질)에 융합된 경우 표적-특이적 탈아미노화에 이용될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, MS2 ADAR-동원 도메인은 이하에 나타낸 바와 같이 5'에서 3' 방향으로 서열번호 50의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:

[0435] ACATGAGGATCACCCATGT(서열번호 50)

[0436] 몇몇 실시형태에서, ADAR 융합 단백질은 ADAR 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 작제물을 이용해서 세포 또는 대상체에게 투여된다. 몇몇 실시형태에서, ADAR 융합 단백질은 MS2 박테리오파지 코트 단백질에 융합된 ADAR의 데아미나제 도메인을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, ADAR의 데아미나제 도메인은 ADAR1의 데아미나제 도메인이다. 몇몇 실시형태에서, ADAR의 데아미나제 도메인은 ADAR2의 데아미나제 도메인이다. ADAR 융합 단백질은 문헌[Katrekar et al. Nature Methods, 16(3): 239-42 (2019)]에 기재된 융합 단백질일 수 있고, 여기서의 ADAR 융합 단백질은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0437] 본 발명에서 특성화된 핵산은, 예컨대, 문헌["Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S. L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., USA](참조에 의해 본 명세서에 원용됨)에 기재된 것들과 같이 당업계에 충분히 확립된 방법에 의해 합성 및/또는 변형될 수 있다. 대체 뉴클레오타이드 및 뉴클레오사이드는, 예를 들어, 말단 변형, 예컨대, 5'-말단 변형(포스포릴화, 접합, 반전된 링키지) 또는 3'-말단 변형(접합, DNA 뉴클레오타이드, 반전된 링키지 등); 염기 변형, 예컨대, 안정화 염기, 탈안정화 염기 또는 파트너의 확장된 레퍼토리와 염기짝짓기하는 염기로의 교체, 염기(무염기 뉴클레오타이드), 또는 접합된 염기의 제거; 당 변형(예컨대, 2'-위치 또는 4'-위치에서) 또는 당의 교체; 및/또는 포스포다이에스터 링키지의 변형 또는 교체를 포함하는 골격 변형을 비롯한 변형을 가진 것을 포함한다. 핵염기는 또한 핵염기가 당 모이어티의 C1 위치로부터 상이한 위치(예컨대 C2, C3, C4, 또는 C5)로 이동된 아이소뉴클레오사이드일 수 있다. 본 명세서에 기재된 실시형태에서 유용한 올리고뉴클레오타이드 화합물의 특정 예는 변형된 골격을 함유하거나 또는 천연 인터뉴클레오사이드 링키지를 함유하지 않는 대체 뉴클레오사이드를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 변형된 골격을 가진 뉴클레오타이드 및 뉴클레오사이드는, 특히 골격에 인 원자를 갖지 않는 것을 포함한다. 본 명세서의 목적을 위하여 그리고 때때로 당업계에서 언급되는 바와 같이, 인터뉴클레오사이드 골격에서 인 원자를 갖지 않는 대체 RNA는 또한 올리고뉴클레오사이드인 것으로 간주될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 인터뉴클레오사이드 골격에 인 원자를 가질 것이다.

[0438] 대체 인터뉴클레오사이드 링키지는, 예를 들어, 포스포로티오에이트, 카이럴 포스포로티오에이트, 포스포로다이티오에이트, 포스포트라이에스터, 아미노알킬포스포트라이에스터, 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 예컨대, 3'-알킬렌 포스포네이트 및 카이럴 포스포네이트, 포스피네이트, 포스포라미데이트, 예컨대, 3'-아미노 포스포라미데이트 및 아미노알킬포스포라미데이트, 티오노포스포라미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트라이에스터, 및 정상의 3'-5' 링키지를 가진 보로노포스페이트, 이들의 2'-5'-연결된 유사체, 및 뉴클레오사이드 단위의 인접한 쌍이 3'-5'에서 5'-3'으로 또는 2'-5'에서 5'-2'로 연결된 역극성을 가진 것을 포함한다. 다양한 염, 혼합된 염, 및 유리산 형태가 또한 포함된다.

[0439] 상기 인-함유 링키지의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 미국 특허 번호 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,195; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,316; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,625,050; 6,028,188; 6,124,445; 6,160,109; 6,169,170; 6,172,209; 6,239,265; 6,277,603; 6,326,199; 6,346,614; 6,444,423; 6,531,590; 6,534,639; 6,608,035; 6,683,167; 6,858,715; 6,867,294; 6,878,805; 7,015,315; 7,041,816; 7,273,933; 7,321,029; 및 미국 특허 RE39464를 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며, 이들 각각의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0440] 인 원자를 내부에 포함하지 않는 대체 인터뉴클레오사이드 링키지는 짧은 사슬 알킬 또는 사이클로알킬 인터뉴클레오사이드 링키지, 혼합된 헤테로원자 및 알킬 또는 사이클로알킬 인터뉴클레오사이드 링키지, 또는 하나 이상의 짧은 사슬 헤테로원자 또는 헤테로고리식 인터뉴클레오사이드 링키지에 의해 형성된 골격을 갖는다. 이들은 몰폴리노 링키지(뉴클레오사이드의 당 부분으로부터 부분적으로 형성됨)를 갖는 것; 실록산 골격; 설파이드, 설폭사이드 및 설폰 골격; 폼아세틸 및 티오폼아세틸 골격; 메틸렌 폼아세틸 및 티오폼아세틸 골격; 알켄 함유 골격; 설파메이트 골격; 메틸렌이미노 및 메틸렌하이드라지노 골격; 설포네이트 및 설폰아마이드 골격; 아마이드 골격; 및 혼합된 N, O, S 및 CH_2 성분 부분을 갖는 기타의 것들을 포함한다.

[0441] 상기 올리고뉴클레오사이드의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는, 미국 특허 번호 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,64,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 및 5,677,439를 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며, 이들 각각의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0442] 다른 실시형태에서, 적합한 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 단위의 당과 인터뉴클레오사이드 링키지 둘

다, 즉, 골격이 대체된 것들을 포함한다. 염기 단위는 적절한 핵산 표적 화합물과의 혼성화를 위하여 유지된다. 우수한 혼성화 특성을 갖는 것으로 제시된 모방체인 하나의 이러한 올리고머 화합물은 펩타이드 핵산(PNA)이라 지칭된다. PNA 화합물에서, 뉴클레오사이드의 당은 아마이드 함유 골격, 특히 아미노에틸글리신 골격으로 대체된다. 핵염기는 보유되고, 골격의 아마이드 부분의 아자 질소 원자에 직접적으로 또는 간접적으로 결합된다. PNA 화합물의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는, 미국 특허 번호 5,539,082; 5,714,331; 및 5,719,262를 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며, 이들 각각의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드에 사용하기에 적합한 추가의 PNA 화합물은, 예를 들어, 문헌[Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500]에 기재되어 있다.

[0443] 본 발명에서 특성화된 몇몇 실시형태는 포스포로티오에이트 골격을 가진 올리고뉴클레오타이드 및 헤테로원자 골격을 가진 올리고뉴클레오타이드, 특히 상기 미국 특허 번호 5,489,677의 $-CH_2-NH-CH_2-$, $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ [메틸렌 (메틸이미노) 또는 MMI 골격으로 공지됨], $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$, $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ 및 $-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$[여기서 천연 포스포다이에스터 골격은 $-O-P-O-CH_2-$로서 표시됨] 및 위에서 인용된 미국 특허 번호 5,602,240의 아마이드 골격을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명에서 특성화된 올리고뉴클레오타이드는 위에서 언급된 미국 특허 번호 5,034,506의 몰폴리노 골격 구조를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 올리고뉴클레오타이드는 포스포로다이아미데이트 몰폴리노 올리고머(PMO)를 포함하는데, 여기서 데옥시리보스 모이어티는 몰폴린 고리로 대체되고, 하전된 포스포다이에스터 소단위간 링키지는 문헌[Summerton, et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1997, 7:63-70]에 기재된 바와 같이, 비하전 포스포로다이아미데이트 링키지에 의해 대체된다.

[0444] 대체 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드는 또한 하나 이상의 치환된 당 모이어티를 함유할 수 있다. 본 명세서에서 특징화된 올리고뉴클레오타이드, 예컨대, 올리고뉴클레오타이드는, 2'-위치에서 하기: OH; F; O-, S-, 또는 N-알킬; O-, S-, 또는 N-알켄일; O-, S- 또는 N-알킨일; 또는 O-알킬-O-알킬 중 하나를 포함할 수 있고, 여기서 알킬, 알켄일 및 알킨일은 치환된 또는 비치환된 C_1 내지 C_{10} 알킬 또는 C_2 내지 C_{10} 알켄일 및 알킨일일 수 있다. 예시적인 적합한 변형은 $-O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $-O(CH_2)_nOCH_3$, $-O(CH_2)_n-NH_2$, $-O(CH_2)_nCH_3$, $-O(CH_2)_n-ONH_2$ 및 $-O(CH_2)_n-ON[(CH_2)_nCH_3]_2$를 포함하며, 여기서 n 및 m은 1 내지 약 10이다. 다른 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 2' 위치에서 하기 중 하나를 포함한다: C_1 내지 C_{10} 저급 알킬, 치환된 저급 알킬, 알크아릴, 아르알킬, O-알크아릴 또는 O-아르알킬, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알크아릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실릴, RNA 절단기, 리포터 기, 인터칼레이터, 올리고뉴클레오타이드의 약동학적 특성을 개선하기 위한 기, 또는 올리고뉴클레오타이드의 약역학적 특성을 개선하기 위한 기, 및 유사한 특성을 가진 기타 치환체. 몇몇 실시형태에서, 변형은 2'-메톡시에톡시(2'-O-$CH_2CH_2OCH_3$, 또한 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-O-MOE로도 알려짐)(Martin et al., Helv. Chin. Acta, 1995, 78:486-504), 즉, 알콕시-알콕시기를 포함한다. 2'-O-MOE 뉴클레오사이드는, 비변형된 올리고뉴클레오타이드에 비해서, 올리고뉴클레오타이드에 증가된 뉴클레아제 내성, 개선된 약동학 특성, 저감된 비-특이적 단백질 결합, 저감된 독성, 저감된 면역자극 특성 및 증대된 표적 친화도를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 몇 가지 유익한 특성을 부여한다.

[0445] 또 다른 예시적인 대체물은 2'-다이메틸아미노옥시에톡시, 즉, 하기에 본 명세서에서의 예에 기재된 바와 같은 2'-DMAOE로도 공지된 $-O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$기, 및 2'-다이메틸아미노에톡시에톡시(또한 2'-O-다이메틸아미노에톡시에틸 또는 2'-DMAEOE로도 당업계에 공지됨), 즉, 2'-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-$N(CH_3)_2$를 함유한다. 추가의 예시적인 대체물은 5'-Me-2'-F 뉴클레오타이드, 5'-Me-2'-OMe 뉴클레오타이드, 5'-Me-2'-데옥시뉴클레오타이드(이들 3가지 패밀리에서 R 및 S 이성질체 둘 다); 2'-알콕시알킬; 및 2'-NMA(N-메틸아세트아마이드)를 포함한다.

[0446] 기타 대체물은 2'-메톡시(2'-OCH_3), 2'-아미노프로폭시(2'-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$) 및 2'-플루오로(2'-F)를 포함한다. 유사한 변형은 또한 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드 상의 다른 위치, 특히 3' 말단 뉴클레오타이드 상의 또는 2'-5' 연결된 올리고뉴클레오타이드 내의 당의 3' 위치 및 5' 말단 뉴클레오타이드의 5' 위치에서 이루어질 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 또한 펜토푸라노실 당 대신에 사이클로부틸 모이어티와 같은 당 모방체를 가질 수 있다. 이러한 변형된 당 구조의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 미국 특허 번호 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873;

5,670,633; 및 5,700,920를 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며, 이들 일부는 본 출원과 공통으로 소유된다. 상기 문헌의 각각의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0447] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 또한 핵염기(종종 단순히 당업계에서 "염기"로 지칭됨) 대체물(예컨대, 변형 또는 치환)을 포함할 수 있다. 비변형된 또는 천연 핵염기는 퓨린 염기인 아데닌(A) 및 구아닌(G), 및 피리미딘 염기인 티민(T), 사이토신(C) 및 유라실(U)을 포함한다. 대체 핵염기는 다른 합성 및 천연 핵염기, 예컨대, 5-메틸사이토신, 5-하이드록시메틸사이토신, 5-폼일사이토신, 5-카복시사이토신, 피롤로사이토신, 다이데옥시사이토신, 유라실, 5-메톡시유라실, 5-하이드록시데옥시유라실, 다이하이드로유라실, 4-티오유라실, 슈도유라실, 1-메틸-슈도유라실, 데옥시유라실, 5-하이드록시부틴일-2'-데옥시유라실, 잔틴, 하이포잔틴, 7-데아자-잔틴, 티에노구아닌, 8-아자-7-데아자구아닌, 7-메틸구아닌, 7-데아자구아닌, 6-아미노메틸-7-데아자구아닌, 8-아미노구아닌, 2,2,7-트라이메틸구아닌, 8-메틸아데닌, 8-아지도아데닌, 7-메틸아데닌, 7-데아자아데닌, 3-데아자아데닌, 2,6-다이아미노퓨린, 2-아미노퓨린, 7-데아자-8-아자-아데닌, 8-아미노-아데닌, 티민, 다이데옥시티민, 5-나이트로인돌, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 기타 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 기타 알킬 유도체, 2-티오유라실, 2-티오티민 및 2-티오사이토신, 5-할로유라실 및 사이토신, 5-프로핀일 유라실 및 사이토신, 6-아조 유라실, 사이토신 및 티민, 4-티오유라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 기타 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트라이플루오로메틸 및 기타 5-치환된 유라실 및 사이토신, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 및 3-데아자구아닌을 포함한다. 추가의 핵염기는 미국 특허 번호 3,687,808에 개시된 것, 문헌[Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008]에서의 변형된 뉴클레오사이드에 개시된 것; 문헌[The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990]에 개시된 것들, 문헌[Englisch et al., (1991) Angewandte Chemie, International Edition, 30:613]에 개시된 것들, 및 문헌[Sanghvi, Y S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993]에 개시된 것들을 포함한다. 이들 핵염기의 일부는 본 발명에서 특성화된 올리고머 화합물의 결합 친화도를 증가시키는데 특히 유용하다. 이들은 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘, 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린, 예컨대, 2-아미노프로필아데닌, 5-프로핀일유라실 및 5-프로핀일사이토신을 포함한다. 5-메틸사이토신 치환은 0.6 내지 1.2℃만큼 핵산 듀플렉스 안정성을 증가시키는 것으로 나타났고(Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278), 더욱 특히 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 조합된 경우에도 예시적인 염기 치환이다.

[0448] 위에서 언급된 대체 핵염기뿐만 아니라 다른 대체 핵염기의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 위에서 언급된 미국 특허 번호 3,687,808, 4,845,205; 5,130,30; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; 5,750,692; 6,015,886; 6,147,200; 6,166,197; 6,222,025; 6,235,887; 6,380,368; 6,528,640; 6,639,062; 6,617,438; 7,045,610; 7,427,672; 및 7,495,088을 포함하지만, 이들로 제한되지 않고, 이들 각각의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0449] 다른 실시형태에서, 뉴클레오타이드 내 당 모이어티는, 선택적으로 2'-O-메틸, 2'-O-MOE, 2'-F, 2'-아미노, 2'-O-프로필, 2'-아미노프로필, 또는 2'-OH 변형을 갖는 리보스 분자일 수 있다.

[0450] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 1개 이상의 이환식 당 모이어티를 포함할 수 있다. "이환식 당"은 2개의 원자의 가교에 의해 변형된 푸라노실 고리이다. "이환식 뉴클레오사이드"("BNA")는, 당 고리의 2개의 탄소 원자를 연결하는 브리지를 포함하는 당 모이어티를 갖는 뉴클레오사이드이고, 이에 의해서 이환식 고리계를 형성한다. 소정의 실시형태에서, 브리지는 당 고리의 4'-탄소와 2'-탄소를 연결한다. 따라서, 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 제제는 하나 이상의 잠금 뉴클레오사이드를 포함할 수 있다. 잠금 뉴클레오사이드는 변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오사이드이고, 여기서 리보스 모이어티는 2' 탄소와 4' 탄소를 연결하는 여분의 가교를 포함한다. 즉, 잠금 뉴클레오사이드는 4'-CH_2-O-2' 가교를 포함하는 이환식 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오타이드이다. 이 구조는 3'-엔도 구조 입체형태에서 리보스를 효과적으로 "잠근다". 올리고뉴클레오타이드에 잠금 뉴클레오사이드의 첨가는 혈청에서 올리고뉴클레오타이드 안정성을 증가시키고 비표적 효과를 저감시키는 것으로 나타났다(Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193). 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 사용하기 위한 이환식 뉴클레오사이드의 예는 제한 없이 4' 리보실 고리 원자와 2' 리보실 고리 원자 사이에 가교를 포함하는 뉴클레오사이드를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 제제는 4'에서 2' 가교를 포함하는 하나 이상의 이환식 뉴클레오사이드를 포함한다. 이러한 4'에서 2' 가교된

이환식 뉴클레오사이드의 예는, 4'-(CH_2)-O-2' (LNA); 4'-(CH_2)-S-2'; 4'-(CH_2)$_2$-O-2'(ENA); 4'-CH(CH_3)-O-2'("구속된 에틸" 또는 "cEt"로도 지칭됨) 및 4'-CH(CH_2OCH_3)-O-2'(및 이의 유사체; 예컨대, 미국 특허 번호 7,399,845 참조); 4'-C(CH_3)(CH_3)-O-2'(및 이의 유사체; 예컨대, 미국 특허 번호 8,278,283 참조); 4'-CH_2-N(OCH_3)-2'(및 이의 유사체; 예컨대, 미국 특허 번호 8,278,425 참조); 4'-CH_2-O-N(CH_3)$_2$-2'(예컨대, 미국 특허 공개 번호 2004/0171570); 4'-CH_2-N(R)-O-2'(여기서 R은 H, C_1-C_{12} 알킬 또는 보호기(예컨대, 미국 특허 번호 7,427,672 참조); 4'-CH_2-C(H)(CH_3)-2'(예컨대, 문헌[Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134] 참조); 및 4'-CH_2-C(=CH_2)-2'(및 이의 유사체; 예컨대, 미국 특허 번호 8,278,426 참조)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 이들 문헌의 각각의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0451] 잠금 핵산 뉴클레오타이드의 제조를 교시하는 추가의 대표적인 미국 특허 및 미국 특허 공개는 하기를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: 미국 특허 번호 6,268,490; 6,525,191; 6,670,461; 6,770,748; 6,794,499; 6,998,484; 7,053,207; 7,034,133; 7,084,125; 7,399,845; 7,427,672; 7,569,686; 7,741,457; 8,022,193; 8,030,467; 8,278,425; 8,278,426; 8,278,283; US 2008/0039618; 및 US 2009/0012281, 이들 각각의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0452] 예를 들어 α-L-리보푸라노스 및 β-D-리보푸라노스를 포함하는 하나 이상의 입체화학 당 입체배치를 가진 상기 이환식 뉴클레오사이드의 어느 것도 제조될 수 있다(WO 99/14226 참조).

[0453] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 또한 하나 이상의 구속된 에틸 뉴클레오타이드를 포함하도록 변형될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "구속된 에틸 뉴클레오타이드" 또는 "cEt"는 4'-CH(CH3)-O-2' 가교를 포함하는 이환식 당 모이어티를 포함하는 잠금 핵산이다. 일 실시형태에서, 구속된 에틸 뉴클레오타이드는 본 명세서에서 "S-cEt"로 기재된 S 형태이다.

[0454] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 또한 하나 이상의 "형태 제한된 뉴클레오타이드"("CRN")을 포함할 수 있다. CRN은 리보스의 C2'와 C4' 또는 리보스의 C3 및 --C5' 탄소를 연결하는 링커를 가진 뉴클레오타이드 유사체이다. CRN은 안정적인 형태에 리보스 고리를 잠그고, mRNA에 혼성화 친화도를 증가시킨다. 링커는 안정성 및 친화도를 위한 최적의 위치에서 산소를 배치하여 더 적은 리보스 고리 퍼커링(puckering)을 초래하기에 충분한 길이이다.

[0455] 위에서 논의된 CRN의 일부의 제조를 교시하는 대표적인 공보는 미국 특허 공개 번호 2013/0190383; 및 PCT 공개 WO 2013/036868을 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며, 이들 각각의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0456] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 UNA(비잠금 핵산) 뉴클레오타이드인 하나 이상의 단량체를 포함한다. UNA는 당의 결합 중 어느 것인가가 제거되어 비잠금 "당" 잔기를 형성하는 비잠금 비환식 핵산이다. 일례에서, UNA는 또한 C1'-C4' 사이의 결합(즉, C1' 탄소와 C4' 탄소 사이의 공유 탄소-산소-탄소 결합)이 제거된 단량체를 포함한다. 또 다른 예에서, 당의 C2'-C3' 결합(즉, C2' 탄소와 C3' 탄소 사이의 공유 탄소-탄소 결합)이 제거되어 있었다(참조에 의해 본 명세서에 편입된 문헌[Nuc. Acids Symp. Series, 52, 133-134 (2008) 및 Fluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039] 참조).

[0457] UNA의 제조를 교시하는 대표적인 미국 공보는 미국 특허 번호 8,314,227; 및 미국 특허 공개 번호 2013/0096289; 2013/0011922; 및 2011/0313020를 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며, 이들 각각의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0458] 리보스 분자는 또한 사이클로프로판 고리로 변형되어 트라이사이클로데옥시핵산(트라이사이클로 DNA)을 생성할 수 있다. 리보스 모이어티는 다른 당, 예컨대, 1,5-안하이드로헥시톨, 트레오스 대신에 치환되어 트레오스 뉴클레오사이드(TNA)를 생성하거나, 또는 아라비노스 대신에 치환되어 아라비노 뉴클레오사이드를 생성할 수 있다. 리보스 분자는 또한 비-당(non-sugar), 예컨대, 사이클로헥센으로 대체되어 사이클로헥센 뉴클레오사이드를 생성할 수 있거나 또는 글리콜로 대체되어 글리콜 뉴클레오사이드를 생성할 수 있다.

[0459] 리보스 분자는 또한 비-당, 예컨대, 사이클로헥센으로 대체되어 사이클로헥센 핵산(CeNA)을 생성할 수 있거나 또는 글리콜로 대체되어 글리콜 핵산(GNA)을 생성할 수 있다. 뉴클레오타이드 분자의 말단에 대한 잠재적 안정화 변형은 N-(아세틸아미노카프로일)-4-하이드록시프롤리놀(Hyp-C6-NHAc), N-(카프로일-4-하이드록시프롤리놀(Hyp-C6), N-(아세틸-4-하이드록시프롤리놀(Hyp-NHAc), 티미딘-2'-O-데옥시티미딘(에터), N-(아미노카프로일)-

4-하이드록시프롤리놀(Hyp-C6-아미노), 2-도코사노일-유리딘-3''-포스페이트, 역전된 염기 dT(idT) 및 기타를 포함할 수 있다. 이 변형의 개시내용은 PCT 공보 번호 2011/005861에서 찾을 수 있다.

[0460] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 다른 대체 화학은 5' 포스페이트 또는 5' 포스페이트 모방체, 예컨대, 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단 포스페이트 또는 포스페이트 모방체를 포함한다. 적합한 포스페이트 모방체는, 예를 들어 미국 특허 공개 번호 2012/0157511에 개시되어 있고, 이의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0461] 본 발명의 예시적인 올리고뉴클레오타이드는 당-변형된 뉴클레오사이드를 포함하고 또한 DNA 또는 RNA 뉴클레오사이드를 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 당-변형된 뉴클레오사이드 및 DNA 뉴클레오사이드를 포함한다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드에의 대체 뉴클레오사이드의 혼입은 표적 핵산에 대한 올리고뉴클레오타이드의 친화도를 증대시킬 수 있다. 그 경우에, 대체 뉴클레오사이드는 친화도 증대 대체 뉴클레오타이드라 지칭될 수 있다.

[0462] 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 대체 뉴클레오사이드, 예컨대, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15 또는 적어도 16개의 대체 뉴클레오사이드를 포함한다. 다른 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 1 내지 10개의 대체 뉴클레오사이드, 예컨대, 2 내지 9개의 대체 뉴클레오사이드, 예컨대, 3 내지 8개의 대체 뉴클레오사이드, 예컨대, 4 내지 7개의 대체 뉴클레오사이드, 예컨대, 6 또는 7개의 대체 뉴클레오사이드를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 이들 3가지 유형의 대체물(대체 당 모이어티, 대체 핵염기, 및 대체 인터뉴클레오사이드 링키지) 또는 이들의 조합물로부터 독립적으로 선택된 대체물을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는 대체 당 모이어티, 예컨대, 2' 당 대체 뉴클레오사이드를 포함하는 하나 이상의 뉴클레오사이드를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는, 2'-O-알킬-RNA, 2'-O-메틸-RNA, 2'-알콕시-RNA, 2'-O-메톡시에틸-RNA, 2'-아미노-DNA, 2'-플루오로-DNA, ANA, 2'-플루오로-ANA 및 BNA(예컨대, LNA) 뉴클레오사이드로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 2' 당 대체 뉴클레오사이드를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 하나 이상의 대체 뉴클레오사이드는 BNA이다.

[0463] 몇몇 실시형태에서, 적어도 1개의 대체 뉴클레오사이드는 BNA(예컨대, LNA)이고, 예컨대, 적어도 2, 예컨대, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 또는 적어도 8개의 대체 뉴클레오사이드는 BNA이다. 더욱 추가의 실시형태에서, 모든 대체 뉴클레오사이드는 BNA이다.

[0464] 추가의 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 대체 인터뉴클레오사이드 링키지를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 인접한 뉴클레오타이드 서열 내의 인터뉴클레오사이드 링키지는 포스포로티오에이트 또는 보로노포스페이트 인터뉴클레오사이드 링키지이다. 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드의 인접 서열에서의 인터뉴클레오타이드 링키지의 전부는 포스포로티오에이트 링키지이다. 몇몇 실시형태에서, 포스포로티오에이트 링키지는 입체화학적으로 순수한 포스포로티오에이트 링키지이다. 몇몇 실시형태에서, 포스포로티오에이트 링키지는 Sp 포스포로티오에이트 링키지이다. 다른 실시형태에서, 포스포로티오에이트 링키지는 Rp 포스포로티오에이트 링키지이다.

[0465] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 2'-O-MOE-RNA인 적어도 하나의 대체 뉴클레오사이드, 예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 2'-O-MOE-RNA 뉴클레오사이드 단위를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 2'-O-MOE-RNA 뉴클레오사이드 단위는 포스포로티오에이트 링키지에 의해 연결된다. 몇몇 실시형태에서, 상기 대체 뉴클레오사이드 중 적어도 하나는 2'-플루오로 DNA, 예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 2'-플루오로-DNA 뉴클레오사이드 단위이다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 BNA 단위 및 적어도 하나의 2' 치환된 대체 뉴클레오사이드를 포함한다. 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 2' 당 변형된 뉴클레오사이드와 DNA 단위를 둘 다 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 인접한 뉴클레오타이드 영역은 갭머 올리고뉴클레오타이드이다.

[0466] B. 리간드에 접합된 올리고뉴클레오타이드

[0467] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드의 활성, 세포 분배 또는 세포 흡수를 증대시키는 하나 이상의 리간드, 모이어티, 또는 접합체에 화학적으로 연결될 수 있다. 이러한 모이어티는 지질 모이어티, 예컨대, 콜레스테롤 모이어티(Letsinger et al., (1989) Proc. Natl. Acid. Sci. USA, 86: 6553-6556), 콜산(Manoharan et al., (1994) Biorg. Med. Chem. Let., 4:1053-1060), 티오에터, 예컨대, 베릴-S-트라이틸티올(Manoharan et al., (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci., 660:306-309; Manoharan et al., (1993) Biorg. Med.

Chem. Let., 3:2765-2770), 티오콜레스테롤(Oberhauser et al., (1992) Nucl. Acids Res., 20:533-538), 지방족 사슬, 예컨대, 도데칸다이올 또는 운데실 잔기(Saison-Behmoaras et al., (1991) EMBO J, 10:1111-1118; Kabanov et al., (1990) FEBS Lett., 259:327-330; Svinarchuk et al., (1993) Biochimie, 75:49-54), 인지질, 예컨대, 다이-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트라이에틸-암모늄 1,2-다이-O-헥사데실-rac-글리세로-3-포스포네이트(Manoharan et al., (1995) Tetrahedron Lett., 36:3651-3654; Shea et al., (1990) Nucl. Acids Res., 18:3777-3783), 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬(Manoharan et al., (1995) Nucleosides & Nucleotides, 14:969-973), 또는 아다만탄 아세트산(Manoharan et al., (1995) Tetrahedron Lett., 36:3651-3654), 팔미틸 모이어티(Mishra et al., (1995) Biochim. Biophys. Acta, 1264:229-237), 또는 옥타데실아민 또는 헥실아미노-카보닐옥시콜레스테롤 모이어티(Crooke et al., (1996) J. Pharmacol. Exp. Ther., 277:923-937)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0468] 일 실시형태에서, 리간드는 혼입되는 올리고뉴클레오타이드의 분포, 표적화 또는 수명을 변경시킨다. 몇몇 실시형태에서, 리간드는, 예컨대, 이러한 리간드가 없는 종에 비해서, 신체의 선택된 표적, 예컨대, 분자, 세포 또는 세포 유형, 구획, 예컨대, 세포 또는 유기 구획, 조직, 기관 또는 영역에 대한 증대된 친화도를 제공한다.

[0469] 리간드는 천연 유래 기질, 예컨대, 단백질(예컨대, 인간 혈청 알부민(HSA), 저밀도 지질단백질(LDL), 또는 글로불린); 탄수화물(예컨대, 덱스트란, 풀루란, 키틴, 키토산, 인슐린, 사이클로덱스트린, N-아세틸글루코사민, N-아세틸갈락토사민, 또는 하이알루론산); 또는 지질을 포함할 수 있다. 리간드는 또한 재조합 또는 합성 분자, 예컨대, 합성 중합체, 예컨대, 합성 폴리아미노산일 수 있다. 폴리아미노산의 예는 폴리아미노산, 예컨대, 폴리라이신(PLL), 폴리 L-아스파르트산, 폴리 L-글루탐산, 스타이렌-말레산 무수물 공중합체, 폴리(L-락타이드-코-글리콜ied) 공중합체, 다이비닐 에터-말레산 무수물 공중합체, N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아마이드 공중합체(HMPA), 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리비닐 알코올(PVA), 폴리우레탄, 폴리(2-에틸아크릴산), N-아이소프로필아크릴아마이드 중합체, 또는 폴리포스파진을 포함한다. 폴리아민의 예는 폴리에틸렌이민, 폴리라이신(PLL), 스퍼민, 스퍼미딘, 폴리아민, 슈도펩타이드-폴리아민, 펩티도미메틱(peptidomimetic) 폴리아민, 덴드리머 폴리아민, 아르기닌, 아미딘, 프로타민, 양이온성 지질, 양이온성 포르피린, 폴리아민의 4차 염, 또는 알파 나선형 펩타이드를 포함한다.

[0470] 리간드는 또한 표적화기, 예컨대, 세포 또는 조직 표적화제, 예컨대, 렉틴, 당단백질, 지질 또는 단백질, 예컨대, 신장 세포와 같은 특정 세포 유형에 결합하는 항체를 포함할 수 있다. 표적화기는 티로트로핀, 멜라노트로핀, 렉틴, 당단백질, 계면활성제 단백질 A, 뮤신 탄수화물, 다가 락토스, 다가 갈락토스, N-아세틸-갈락토사민, N-아세틸-글루코사민 다가 만노스, 다가 푸코스, 글리코실화 폴리아미노산, 다가 갈락토스, 트랜스페린, 비스포스포네이트, 폴리글루타메이트, 폴리아스파테이트, 지질, 콜레스테롤, 스테로이드, 담즙산, 폴레이트, 비타민 B12, 비타민 A, 바이오틴, 또는 RGD 펩타이드 또는 RGD 펩타이드 모방체일 수 있다.

[0471] 리간드의 다른 예는 염료, 끼어들기 약물(intercalating agent)(예컨대 아크리딘), 가교결합제(예컨대, 소랄렌(psoralen), 미토마이신 C), 포르피린류(TPPC4, 텍사피린(texaphyrin), 사피린(Sapphyrin)), 다환식 방향족 탄화수소(예컨대, 페나진, 다이하이드로페나진), 인공 엔도뉴클레아제(예컨대 EDTA), 친유성 분자, 예컨대, 콜레스테롤, 콜산, 아다만탄 아세트산, 1-피렌 부티르산, 다이하이드로테스토스테론, 1,3-비스-O(헥사데실)글리세롤, 게라닐옥시헥실기, 헥사데실글리세롤, 보레올, 멘톨, 1,3-프로판다이올, 헵타데실기, 팔미트산, 미리스트산, O3-(올레일)리토콜산, O3-(올레일)콜렌산, 다이메톡시트라이틸, 또는 페녹사진) 및 펩타이드 접합체(예컨대, 안테나페디아 펩타이드, Tat 펩타이드), 알킬화제, 포스페이트, 아미노, 머캅토, PEG(예컨대, PEG-40K), MPEG, $[MPEG]_2$, 폴리아미노, 알킬, 치환된 알킬, 방사성 표지된 마커, 효소, 합텐(예컨대 바이오틴), 이동/흡수 촉진제(transport/absorption facilitator)(예컨대, 아스피린, 비타민 E, 엽산), 합성 리보뉴클레아제(예컨대, 이미다졸, 비스이미다졸, 히스타민, 이미다졸 클러스터, 아크리딘-이미다졸 접합체, 테트라아자거대고리의 Eu3+ 복합체), 다이나이트로페닐, HRP, 또는 AP를 포함한다.

[0472] 리간드는 단백질, 예컨대, 당단백질, 또는 펩타이드, 예컨대, 공동-리간드에 대한 특이적 친화도를 갖는 분자, 또는 항체, 예컨대, 간 세포와 같은 특정 세포 유형에 결합하는 항체일 수 있다. 리간드는 또한 호르몬 및 호르몬 수용체를 포함할 수 있다. 이들은 또한 비-펩타이드 종, 예컨대, 지질, 렉틴, 탄수화물, 비타민, 보조인자, 다가 락토스, 다가 갈락토스, N-아세틸-갈락토사민, N-아세틸-글루코사민 다가 만노스, 또는 다가 푸코스를 포함할 수 있다.

[0473] 리간드는, 예를 들어, 세포의 사이토카인을 파괴함으로써, 예컨대, 세포의 미세소관, 미세섬유 및/또는 중간 필라멘트를 파괴함으로써 올리고뉴클레오타이드 제제의 세포 내로의 흡수를 증가시킬 수 있는 물질, 예컨대, 약물

일 수 있다. 이러한 약물은, 예를 들어, 탁손, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 사이토칼라신, 노코다졸, 자스플라키놀라이드, 라트룬쿨린 A, 팔로이딘, 스윈홀라이드 A, 인다노신 또는 미오세르빈일 수 있다.

[0474] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드에 부착된 리간드는 약동학적 조절제(PK 조절제)로서 작용한다. PK 조절제는 친지질체, 담즙산, 스테로이드, 인지질 유사체, 퀩타이드, 단백질 결합제, PEG, 비타민 등을 포함한다. 예시적인 PK 조절제는 콜레스테롤, 지방산, 콜산, 리토콜산, 다이알킬글리세라이드, 다이아실글리세라이드, 인지질, 스핑고지질, 나프록센, 이부프로펜, 비타민 E, 비오틴 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 다수의 포스포로티오에이트 링키지를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 또한 혈청 단백질에 결합하는 것으로 알려져 있으므로, 짧은 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어, 골격에 다수의 포스포로티오에이트 링키지를 포함하는, 약 5개의 염기, 10개의 염기, 15개의 염기 또는 20개의 염기의 올리고뉴클레오타이드는 또한 리간드(예: PK 조절 리간드)로서 본 발명에 적용할 수 있다. 또한, 혈청 성분(예를 들어, 혈청 단백질)에 결합하는 압타머는 또한 본 명세서에 기재된 실시형태에서 PK 조절 리간드로서 사용하기에 적합하다.

[0475] 리간드-접합된 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 연결 분자가 올리고뉴클레오타이드에 부착되는 것으로부터 유래된 것과 같은 펜던트 반응성 작용기를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 사용에 의해 합성될 수 있다(하기 기재됨). 이 반응성 올리고뉴클레오타이드는 상업적으로 입수 가능한 리간드, 다양한 보호기 중 임의의 것을 보유하여 합성된 리간드, 또는 이에 부착된 연결 모이어티를 갖는 리간드와 직접 반응할 수 있다.

[0476] 본 발명의 접합체에 사용되는 올리고뉴클레오타이드는 공지된 고체상 합성 기술을 통해 편리하게 그리고 관례대로 제조될 수 있다. 이러한 합성을 위한 장비는, 예를 들어, Applied Biosystems(캘리포니아주 포스터 시티 소재)를 비롯한 여러 공급업체에서 판매되고 있다. 당업계에 공지된 이러한 합성을 위한 임의의 다른 수단이 추가로 또는 대안적으로 사용될 수 있다. 다른 올리고뉴클레오타이드, 예컨대, 포스포로티오에이트 및 알킬화 유도체를 제조하는 유사한 기술을 사용하는 것이 또한 공지되어 있다.

[0477] 본 발명의 리간드-접합된 올리고뉴클레오타이드, 예컨대, 본 발명의 리간드-분자 보유 서열-특이적 연결된 뉴클레오사이드에서, 올리고뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오사이드는 표준 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드 전구체, 또는 연결 모이어티를 이미 보유하는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드 접합체 전구체, 리간드 분자를 이미 보유하는 리간드-뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드-접합체 전구체, 또는 비-뉴클레오사이드 리간드-보유 빌딩 블록을 이용해서 적합한 DNA 합성기 상에 조립될 수 있다.

[0478] 연결 모이어티를 이미 보유하는 뉴클레오타이드-접합체 전구체를 사용할 경우, 서열-특이적 연결된 뉴클레오사이드의 합성이 전형적으로 완결되고, 모든 리간드 분자는 이어서 연결 모이어티와 반응하여 리간드-접합된 올리고뉴클레오타이드를 형성한다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 또는 연결된 뉴클레오사이드는 올리고뉴클레오타이드 합성에서 통상적으로 사용되고 상업적으로 입수 가능한 표준 포스포라미다이트 및 비-표준 포스포라미다이트에 부가해서 리간드-뉴클레오사이드 접합체로부터 유도된 포스포라미다이트를 이용해서 자동화 합성기에 의해 합성된다.

[0479] *i. 지질 접합체*

[0480] 일 실시형태에서, 리간드 또는 접합체는 지질 또는 지질-기반 분자이다. 이러한 지질 또는 지질-기반 분자는 바람직하게는 혈청 단백질, 예컨대, 인간 혈청 알부민(HSA)에 결합한다. HSA 결합 리간드는 표적 조직, 예컨대, 신체의 비-신장 표적 조직에 대한 접합체의 분포를 허용한다. 예를 들어, 표적 조직은, 간의 실질 세포를 비롯하여, 간일 수 있다. HSA에 결합할 수 있는 기타 분자는 또한 리간드로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 네프록신 또는 아스피린이 사용될 수 있다. 지질 또는 지질-기반 리간드는 (a) 접합체의 분해에 대한 내성을 증가시킬 수 있고, (b) 표적 세포 또는 세포막에의 표적화 또는 이송을 증가시킬 수 있고, 그리고/또는 (c) 혈청 단백질, 예컨대, HSA에 대한 결합을 조절하는데 사용될 수 있다.

[0481] 지질-기반 리간드는, 표적 조직에 대한 접합체의 결합을 저해, 예컨대, 제어하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, HSA를 더욱 강력하게 결합하는 지질 또는 지질-기반 리간드는 신장에 표적화할 가능성이 적고 따라서 신체로부터 제거될 가능성이 적을 것이다. HSA를 덜 강력하게 결합하는 지질 또는 지질-기반 리간드는 접합체를 신장에 표적화하는데 사용될 수 있다.

[0482] 또 다른 양상에서, 리간드는 표적 세포, 예컨대, 증식 세포에 의해 흡수되는 모이어티, 예컨대, 비타민이다. 예시적인 비타민은 비타민 A, E 및 K를 포함한다.

[0483] *ii. 세포 투과제*

[0484] 또 다른 양상에서, 리간드는 세포-투과제, 바람직하게는 나선형 세포-투과제이다. 바람직하게는, 해당 제제는 양친매성이다. 예시적인 제제는 tat 또는 안테나페디아와 같은 펩타이드이다. 제제가 펩타이드인 경우, 펩티딜 모방체, 인버토머(invertomer), 비-펩타이드 또는 슈도-펩타이드 링키지, 및 D-아미노산의 사용을 포함하여 변형될 수 있다. 나선형 제제는 바람직하게는 친유성 및 소수성 상을 갖는 알파-나선형 제제이다.

[0485] 리간드는 펩타이드 또는 펩티도미메틱일 수 있다. 펩티도미메틱(올리고펩티도미메틱이라고도 지칭됨)은 천연 펩타이드와 유사한 정의된 3차원 구조로 접힐 수 있는 분자이다. 올리고뉴클레오타이드 제제에의 펩타이드 및 펩티도모방체의 부착은, 예컨대, 세포 인식 및 흡수를 증대시킴으로써 올리고뉴클레오타이드의 약동학적 분포에 영향을 미칠 수 있다. 펩타이드 또는 펩티도미메틱 모이어티는 약 5 내지 50개의 아미노산 길이, 예컨대, 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개의 아미노산 길이일 수 있다.

[0486] 펩타이드 또는 펩티도미메틱는, 예를 들어, 세포 투과 펩타이드, 양이온성 펩타이드, 양친매성 펩타이드 또는 소수성 펩타이드(예컨대, 주로 Tyr, Trp 또는 Phe로 이루어짐)일 수 있다. 펩타이드 모이어티는 덴드리머 펩타이드, 구속된 펩타이드 또는 가교결합된 펩타이드일 수 있다. 또 다른 대안에서, 펩타이드 모이어티는 소수성 막 전좌 서열(MTS)을 포함할 수 있다. 예시적인 소수성 MTS-함유 펩타이드는 아미노산 서열 AAVALLPAVLLALLAP(서열번호 57)를 갖는 RFGF이다. 소수성 MTS를 함유하는 RFGF 유사체(예컨대, 아미노산 서열 AALLPVLLAAP(서열번호 58))는 또한 표적화 모이어티일 수 있다. 펩타이드 모이어티는 세포막을 가로질러 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드 및 단백질을 포함하는 커다란 극성 분자를 운반할 수 있는 "전달" 펩타이드일 수 있다. 예를 들어, HIV Tat 단백질(GRKKRRQRRRPPQ; 서열번호 59) 및 드로소필라 안테나페디아(Drosophila Antennapedia) 단백질(RQIKIWFQNRRMKWKK; 서열번호 60)로부터의 서열은 전달 펩타이드로서 기능할 수 있는 것으로 판명되었다. 펩타이드 또는 펩티도미메틱은 DNA, 예컨대, 파지-디스플레이 라이브러리, 또는 원-비드-원-화합물(one-bead-one-compound: OBOC) 조합 라이브러리로부터 식별된 펩타이드의 랜덤 서열에 의해 암호화된다(Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). 세포 표적화 목적을 위하여 혼입된 단량체 단위를 통해서 올리고뉴클레오타이드 제제에 테더링된 펩타이드 또는 펩티도미메틱의 예는 아르기닌-글리신-아스파르트산(RGD)-펩타이드, 또는 RGD 모방체이다. 펩타이드 모이어티는 약 5개의 아미노산 내지 약 40개의 아미노산의 길이의 범위일 수 있다. 펩타이드 모이어티는 예컨대 안정성을 증가시키거나 또는 입체배좌 특성을 유도하기 위한 구조 변형을 가질 수 있다. 이하에 기재된 구조 변형의 어느 것도 활용될 수 있다.

[0487] 본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 위한 RGD 펩타이드는 선형 또는 환형일 수 있고, 특정 조직(들)에의 표적화를 용이하게 하기 위하여 변형, 예컨대, 글리코실화 또는 메틸화될 수 있다. RGD-함유 펩타이드 및 펩티도모방체는 D-아미노산뿐만 아니라, 합성 RGD 모방체를 포함할 수 있다. RGD에 부가해서, 인테그린 리간드를 표적화하는 다른 모이어티를 사용할 수 있다. 이 리간드의 몇몇 접합체는 PECAM-1 또는 VEGF를 표적화한다.

[0488] 세포 투과 펩타이드는 세포, 예컨대, 미생물 세포, 예컨대, 박테리아 또는 진균 세포, 또는 포유류 세포, 예컨대, 인간 세포를 투과할 수 있다. 미생물 세포-투과 펩타이드는, 예를 들어, α-나선형 선형 펩타이드(예컨대, LL-37 또는 Ceropin P1), 다이설파이드 결합-함유 펩타이드(예컨대, α-디펜신, β-디펜신, 또는 박테네신), 또는 단지 1 또는 2개의 우성 아미노산(예컨대, PR-39 또는 인돌리시딘)을 함유하는 펩타이드일 수 있다. 세포 투과 펩타이드는 또한 핵 국재화 신호(nuclear localization signal: NLS)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 세포 투과 펩타이드는 이분(bipartite) 양친매성 펩타이드, 예컨대, HIV-1 gp41의 융합 펩타이드 도메인으로부터 유래된 MPG, 및 SV40 거대 T 항원의 NLS일 수 있다(Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

[0489] *iii. 탄수화물 접합체*

[0490] 본 발명의 조성물 및 방법의 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 탄수화물을 더 포함한다. 탄수화물 접합된 올리고뉴클레오타이드는, 본 명세서에 기재된 바와 같은, 생체내 치료적 용도에 적합한 조성물뿐만 아니라 핵산의 생체내 전달을 위하여 유리하다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "탄수화물"은 각 탄소 원자에 결합된 산소, 질소 또는 황 원자와 함께 적어도 6개의 탄소 원자를 갖는 1개 이상의 단당류 단위(선형, 분지형 또는 환형일 수 있음)로 이루어진 탄수화물 자체인 화합물; 또는 각 탄소 원자에 결합된 산소, 질소 또는 황 원자와 함께 1개 이상의 단당류 단위(선형, 분지형 또는 환형일 수 있음)로 이루어진 탄수화물 모이어티를 그 일부로서 갖는 화합물을 지칭한다. 대표적인 탄수화물은 당류(약 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의 단당류 단위를 함유하는 단-, 이-, 삼- 및 올리고당), 및 다당류, 예컨대, 전분, 글리코겐, 셀룰로스 및 다당류 검을 포함한다. 특정 단당류는 C5 이상(예컨대, C5, C6, C7, 또는 C8)의 당을 포함하고; 이- 및 삼당류는 2 또는 3개의 단당류 단위(예컨대, C5, C6, C7 또는 C8)를 갖는 당을 포함한다.

[0491] 일 실시형태에서, 본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 위한 탄수화물 접합체는 단당류이다.

[0492] 몇몇 실시형태에서, 탄수화물 접합체는 위에서 기재된 바와 같은 1개 이상의 추가의 리간드, 예컨대, 제한 없이, PK 조절제 및/또는 세포 투과 펩타이드를 더 포함한다.

[0493] 본 발명에서 사용하는데 적합한 추가의 탄수화물 접합체(및 링커)는 PCT 공개 번호 WO 2014/179620 및 WO 2014/179627에 기재된 것들을 포함하고, 이들 각각의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0494] *iv. 링커*

[0495] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 접합체 또는 리간드는 절단 가능할 수 있거나 절단 가능하지 않을 수 있는 다양한 링커로 올리고뉴클레오타이드에 부착될 수 있다.

[0496] 링커는 전형적으로 직접 결합 또는 원자, 예컨대, 산소 또는 황, NR^8, C(O), C(O)NH, SO, SO_2, SO_2NH 또는 원자의 사슬과 같은 단위, 예컨대, 제한 없이, 치환된 또는 비치환된 알킬, 치환된 또는 비치환된 알켄일, 치환된 또는 비치환된 알킨일, 아릴알킬, 아릴알켄일, 아릴알킨일, 헤테로아릴알킬, 헤테로아릴알켄일, 헤테로아릴알킨일, 헤테로사이클릴알킬, 헤테로사이클릴알켄일, 헤테로사이클릴알킨일, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 알킬아릴알킬, 알킬아릴알켄일, 알킬아릴알킨일, 알켄일아릴알킬, 알켄일아릴알켄일, 알켄일아릴알킨일, 알킨일아릴알킬, 알킨일아릴알켄일, 알킨일아릴알킨일, 알킬헤테로아릴알킬, 알킬헤테로아릴알켄일, 알킬헤테로아릴알킨일, 알켄일헤테로아릴알킬, 알켄일헤테로아릴알켄일, 알켄일헤테로아릴알킨일, 알킨일헤테로아릴알킬, 알킨일헤테로아릴알켄일, 알킨일헤테로아릴알킨일, 알킬헤테로사이클릴알킬, 알킬헤테로사이클릴알켄일, 알킬헤테로사이클릴알킨일, 알켄일헤테로사이클릴알킬, 알켄일헤테로사이클릴알켄일, 알켄일헤테로사이클릴알킨일, 알킨일헤테로사이클릴알킬, 알킨일헤테로사이클릴알켄일, 알킨일헤테로사이클릴알킨일, 알킬아릴, 알켄일아릴, 알킨일아릴, 알킬헤테로아릴, 알켄일헤테로아릴, 알킨일헤테로아릴을 포함하되, 여기서 하나 이상의 메틸렌이 O, S, S(O), SO_2, $N(R^8)$, C(O), 치환된 또는 비치환된 아릴, 치환된 또는 비치환된 헤테로아릴, 치환된 또는 비치환된 헤테로고리에 의해 중단 또는 종결될 수 있고; R^8은 수소, 아실, 지방족 또는 치환된 지방족이다. 일 실시형태에서, 링커는 약 1 내지 24 원자, 2 내지 24, 3 내지 24, 4 내지 24, 5 내지 24, 6 내지 24, 6 내지 18, 7 내지 18, 8 내지 18 원자, 7 내지 17, 8 내지 17, 6 내지 16, 7 내지 17, 또는 8 내지 16개의 원자이다.

[0497] 절단성 연결기는 세포 밖에서 충분히 안정적이지만, 표적 세포에의 진입 시 절단되어 링커가 함께 유지되고 있는 2 부분을 방출하는 것이다. 바람직한 실시형태에서, 절단성 연결기는 표적 세포에서 또는 대상체의 혈액에서보다 (예컨대, 세포내 조건을 모방하거나 나타내도록 선택될 수 있는) 제1 참조 조건 하에, 또는 (예컨대, 혈액 또는 혈청에서 발견되는 조건을 모방하거나 나타내도록 선택될 수 있는) 제2 참조 조건 하에 적어도 약 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 이상, 또는 적어도 약 100배 더 빠르게 절단된다.

[0498] 절단성 연결기는 절단 제제, 예컨대, pH, 산화환원 전위, 또는 분해성 분자의 존재에 민감하다. 일반적으로, 절단 제제는 혈청 또는 혈액에서보다 세포 내부에서 더 높은 수준 또는 활성에서 발견되거나 더 일반적이다. 이러한 분해 제제의 예는, 특정 기질에 대해 선택적이거나 또는 기질 특이성이 없는 산화환원제, 예컨대, 환원에 의해 산화환원 절단성 연결기를 분해시킬 수 있는, 세포에 존재하는 산화 또는 환원 효소 또는 환원제, 예컨대, 머캅탄; 에스테라제; 산성 환경을 만들 수 있는 엔도솜 또는 제제, 예컨대, 5 이하의 pH를 초래하는 것; 일반적 산으로서 작용함으로써 산 절단성 연결기를 가수분해 또는 분해될 수 있는 효소, (기질 특이적일 수 있는) 펩티다제 및 포스파타제를 포함한다.

[0499] 절단성 링키지 기, 예컨대, 다이설파이드 결합은 pH에 민감할 수 있다. 인간 혈청의 pH는 7.4인 반면, 평균 세포내 pH는 약 7.1 내지 7.3의 범위로 다소 낮다. 엔도솜은 5.5 내지 6.0의 범위의 더욱 산성 pH를 갖고, 라이소좀은 5.0 부근에서 더욱 산성 pH를 갖는다. 몇몇 링커는, 바람직한 pH에서 절단됨으로써, 리간드로부터 세포 내부로, 또는 세포의 목적하는 구획에 양이온성 지질을 방출하는 절단성 연결기를 가질 것이다.

[0500] 링커는 특정 효소에 의해 절단 가능한 절단성 연결기를 포함할 수 있다. 링커에 혼입된 절단성 연결기의 유형은 표적화될 세포에 좌우될 수 있다. 예를 들어, 간-표적화 리간드는 에스터기를 포함하는 링커를 통해서 양이온성 지질에 연결될 수 있다. 간 세포는 에스테라제에서 풍부하고, 따라서 링커는 에스테라제-풍부하지 않은 세포 유형에서보다 간 세포에서 더욱 효율적으로 절단될 것이다. 에스테라제에서 풍부한 기타 세포-유형은 폐, 신장 피질 및 고환의 세포를 포함한다.

[0501] 펩타이드 결합을 함유하는 링커는 펩티다제가 풍부한 세포 유형, 예컨대, 간 세포 및 윤활막세포를 표적화할 때 사용될 수 있다.

[0502] 일반적으로, 후보 절단성 연결기의 적합성은 후보 연결기를 절단하는 분해제(또는 조건)의 능력을 시험함으로써 평가될 수 있다. 또한 혈액 중에서 또는 다른 비-표적 조직과 접촉될 때 절단에 저항하는 능력에 대해서 또한 후보 절단성 연결기를 시험하는 것이 바람직할 것이다. 따라서, 제1 조건과 제2 조건 사이의 절단에 대한 상대적 민감성을 결정할 수 있고, 여기서 제1 조건은 표적 세포에서의 절단을 나타내도록 선택되고, 제2 조건은 다른 조직 또는 생물학적 유체, 예컨대, 혈액 또는 혈청에서 절단을 나타내도록 선택된다. 평가는 무세포계(cell free system)에서, 세포에서, 세포 배양액에서, 기관 또는 조직 배양액에서, 또는 전체 동물에서 수행될 수 있다. 무세포 또는 배양 조건에서 초기 평가를 하고 전체 동물에서 추가의 평가를 확인하는 것이 유용할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 유용한 후보 화합물은 혈액 또는 혈청에 비해서(또는 세포외 조건을 모방하도록 선택된 시험관내 조건 하에서) 세포에서(또는 세포내 조건을 모방하도록 선택된 시험관내 조건 하에서) 적어도 약 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 약 100배 더 빠르게 분해된다.

[0503] *a. 산화환원 절단성 연결기*

[0504] 일 실시형태에서, 절단성 연결기는 환원 또는 산화 시 절단되는 산화환원 절단성 연결기이다. 환원적 절단성 연결기의 예는 다이설파이드 연결기(--S--S--)이다. 후보 절단성 연결기가 적합한 "환원적 절단성 연결기"이거나 또는 예를 들어 특정 올리고뉴클레오타이드 모이어티 및 특정 표적화제와 함께 사용하기에 적합한지를 결정하기 위하여, 본 명세서에 기재된 방법을 찾아볼 수 있다. 예를 들어, 후보는 세포, 예컨대, 표적 세포에서 관찰되는 분해율을 모방하는, 당업계에서 공지된 시약을 이용해서 다이티오트레이톨(DTT), 또는 기타 환원제와의 인큐베이션에 의해 평가될 수 있다. 후보는 또한 혈액 또는 혈청 조건을 모방하도록 선택되는 조건 하에 평가될 수 있다. 일 실시형태에서, 후보 화합물은 혈액 중 최대 약 10%만큼 절단된다. 다른 실시형태에서, 유용한 후보 화합물은 혈액에 비해서(또는 세포외 조건을 모방하도록 선택된 시험관내 조건 하에서) 적어도 약 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 약 100배 더 빠르게 분해된다. 후보 화합물의 절단율은 세포내 배지를 모방하도록 선택된 조건 하에서 그리고 세포외 배지를 모방하도록 선택된 조건과 비교해서 표준 효소 동력학 검정을 이용해서 결정될 수 있다.

[0505] *b. 포스페이트-기반 절단성 연결기*

[0506] 다른 실시형태에서, 절단성 링커는 포스페이트-기반 절단성 연결기를 포함한다. 포스페이트-기반 절단성 연결기는 포스페이트기를 분해 또는 가수분해시키는 제제에 의해 절단된다. 세포 내 포스페이트기를 절단하는 제제의 예는 세포 내 포스파타제와 같은 효소이다. 포스페이트-기반 연결기의 예는 -O-P(O)(OR^k)-O-, -O-P(S)(OR^k)-O-, -O-P(S)(SR^k)-O-, -S-P(O)(OR^k)-O-, -O-P(O)(OR^k)-S-, -S-P(O)(OR^k)-S-, -O-P(S)(OR^k)-S-, -S-P(S)(OR^k)-O-, -O-P(O)(R^k)-O-, -O-P(S)(R^k)-O-, -S-P(O)(R^k)-O-, -S-P(S)(R^k)-O-, -S-P(O)(R^k)-S-, -O-P(S)(R^k)-S-이다. 이들 후보는 위에서 기재된 것들과 유사한 방법을 이용해서 평가될 수 있다.

[0507] *c. 산 절단성 연결기*

[0508] 다른 실시형태에서, 절단성 링커는 산 절단성 연결기를 포함한다. 산 절단성 연결기는 산성 조건 하에 절단되는 연결기이다. 바람직한 실시형태에서, 산 절단성 연결기는 약 6.5 이하(예컨대, 약 6.0, 5.75, 5.5, 5.25, 5.0 이하)의 pH를 가진 산성 환경에서, 또는 일반적인 산으로서 작용할 수 있는 효소와 같은 제제에 의해 절단된다. 세포에서, 특정 낮은 pH 소기관(organelle), 예컨대, 엔도솜 및 라이소좀은 산 절단성 연결기를 위한 절단 환경을 제공할 수 있다. 산 절단성 연결기의 예는 하이드라존, 에스터, 및 아미노산의 에스터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 산 절단성 기는 일반식 -C=NN--, C(O)O, 또는 --OC(O)를 가질 수 있다. 바람직한 실시형태는 에스터의 산소에 부착된 탄소(알콕시기)가 아릴기, 치환된 알킬기, 또는 3차 알킬기, 예컨대, 다이메틸 펜틸 또는 t-부틸인 경우이다. 이들 후보는 위에서 기재된 것들과 유사한 방법을 이용해서 평가될 수 있다.

[0509] *d. 에스터-기반 연결기*

[0510] 다른 실시형태에서, 절단성 링커는 에스터-기반 절단성 연결기를 포함한다. 에스터-기반 절단성 연결기는 세포내 에스테라제 및 아미다제와 같은 효소에 의해 절단된다. 에스터-기반 절단성 연결기의 예는 알킬렌, 알켄일렌 및 알킨일렌기의 에스터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 에스터 절단성 연결기는 일반식 --C(O)O--, 또는 --OC(O)--를 갖는다. 이들 후보는 위에서 기재된 것들과 유사한 방법을 이용해서 평가될 수 있다.

[0511] *e. 펩타이드-기반 절단기*

[0512] 또 다른 실시형태에서, 절단성 링커는 펩타이드-기반 절단성 연결기를 포함한다. 펩타이드-기반 절단성 연결기는 세포 내 펩티다제 및 프로테아제와 같은 효소에 의해 절단된다. 펩타이드-기반 절단성 연결기는 올리고펩타이드(예컨대, 다이펩타이드, 트라이펩타이드 등) 및 폴리펩타이드를 수득하기 위하여 아미노산 사이에 형성된 펩타이드 결합이다. 펩타이드-기반 절단성 기는 아마이드기(--C(O)NH--)를 포함하지 않는다. 아마이드기는 임의의 알킬렌, 알켄일렌, 또는 알킨일렌 사이에 형성될 수 있다. 펩타이드 결합은 펩타이드 및 단백질을 수득하기 위하여 아미노산 사이에 형성된 특별한 유형의 아마이드 결합이다. 펩타이드-기반 절단기는 일반적으로 펩타이드 및 단백질을 수득하기 위한 아미노산 사이에 형성된 펩타이드 결합(즉, 아마이드 결합)으로 제한되고 전체 아마이드 작용기를 포함하지 않는다. 펩타이드-기반 절단성 연결기는 일반식 --NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)--를 갖고, 여기서 RA 및 RB는 2개의 인접한 아미노산의 R기이다. 이들 후보는 위에서 기재된 것들과 유사한 방법을 이용해서 평가될 수 있다.

[0513] 일 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 링커를 통해서 탄수화물에 접합된다. 링커는 2가 및 3차 분지된 링커기를 포함한다. 본 발명의 조성물 및 방법의 링커와 접합된 예시적인 올리고뉴클레오타이드 탄수화물은, PCT 공보 번호 2018/195165의 화학식 24 내지 35에 기재된 것들을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0514] 올리고뉴클레오타이드 접합체의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는, 미국 특허 번호 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717, 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241, 5,391,723; 5,416,203, 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 및 5,688,941; 6,294,664; 6,320,017; 6,576,752; 6,783,931; 6,900,297; 7,037,646; 8,106,022를 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며, 이들 각각의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0515] 소정의 경우에, 올리고뉴클레오타이드 중의 뉴클레오타이드는 비-리간드기로 변형될 수 있다. 다수의 비-리간드 분자는 올리고뉴클레오타이드의 활성, 세포 분포 또는 세포 흡수를 증대시키기 위하여 올리고뉴클레오타이드에 접합되었고, 이러한 접합을 수행하기 위한 절차는 과학 문헌에서 입수 가능하다. 이러한 비-리간드 모이어티에는 지질 모이어티, 예컨대, 콜레스테롤(Kubo, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm, 2007, 365(1):54-61; Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553), 콜산(Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053), 티오에터, 예컨대, 헥실-S-트라이틸티올(Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3:2765), 티오콜레스테롤(Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533), 지방족 사슬, 예컨대, 도데칸다이올 또는 운데실 잔기(Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10:111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49), 인지질, 예컨대, 다이-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트라이에틸암모늄 1,2-다이-O-헥사데실-rac-글리세로-3-H-포스포네이트(Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777), 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬(Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969), 또는 아다만탄 아세트산(Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651), 팔미틸 모이어티(Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229), 또는 옥타데실아민 또는 헥실아미노-카보닐-옥시콜레스테롤 모이어티(Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923)가 포함된다. 이러한 올리고뉴클레오타이드 접합체의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 위에서 열거되어 있다. 전형적인 접합 프로토콜은 서열의 하나 이상의 위치에서 올리고뉴클레오타이드 보유 아미노링커의 합성을 포함한다. 이어서, 아미노기는 적절한 커플링 또는 활성화 시약을 이용해서 접합되는 분자와 반응한다. 접합 반응은 고체 지지체에 여전히 결합되거나 용액상에서 올리고뉴클레오타이드의 절단 후 올리고뉴클레오타이드로 수행될 수 있다. HPLC에 의한 올리고뉴클레오타이드 접합체의 정제는 전형적으로 순수한 접합체를 제공한다.

[0516] **III. 약제학적 용도**

[0517] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 아데노신의 탈아미노화를 통해서 치료될 수 있는 임의의 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 구아노신에서 아데노신으로의 돌연변이, 조발성 정지 코돈의 도입 또는 바람직하지 않은 단백질의 발현에 의해 초래되는 임의의 장애. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는, 대

상체에게 투여될 경우, 구아노신에서 아데노신으로의 돌연변이의 보정을 초래할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 목적하는 단백질이 발현되도록 조발성 정지 코돈의 턴 오프를 초래할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 바람직하지 않은 단백질의 발현의 저해를 초래할 수 있다.

[0518] 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드를 이용하는 특히 관심 있는 편집용 표적 아데노신은, 공동-번역 또는 번역후 변형, 예컨대, 글리코실화, 하이드록실화, 미리스토일화 및 (단백질을 성숙시키고/시키거나 세포내 라우팅의 일부로서) 프로테아제에 의한 단백질 분해를 위하여, 핵심 기능, 또는 특징, 예컨대, 촉매 부위, 다른 단백질용의 결합 부위, 기질에 의한 결합, 국재화 도메인을 정의하는 아미노산 잔기용의 코돈의 일부인 것들이다.

[0519] 유전 질환의 숙주는 G-대-A 돌연변이에 의해 초래되고, 이는 돌연변이된 표적 아데노신에서의 아데노신 탈아미노화는 야생형에 대한 돌연변이를 역전시킬 것이기 때문에 본 발명의 올리고뉴클레오타이드에 의해 치료될 가능한 질환이다. 그러나, 유익한 효과를 얻기 위하여 야형으로의 전환이 항상 필요한 것은 아니다. 표적에서 A에서 G로의 변형은 또한 야생형 뉴클레오타이드가 G 이외의 것인 경우 유익할 수 있다. 소정의 상황에서, 이것은 그 경우에 예측될 수 있고, 다른 상황에서 이것은 약간의 시험을 요구할 수도 있다. 소정의 상황에서, 표적 RNA에서의 A에서 야생형이 G가 아닌 G로의 변형은 (상이한 아미노산으로 번역되지 않고) 침묵할 수 있거나, 또는 다르게는 비결과적일 수 있거나(예를 들어 아미노산이 치환되지만 단백질 구조 및 기능을 파괴시키지 않는 보존적 치환을 구성하거나), 또는 아미노산이 변화를 위한 소정의 강인성을 갖는 기능적 도메인의 일부이다. 본 발명에 따른 편집에 의해 야기된 A에서 G로의 전이가 비-암호화 RNA 또는 RNA의 비-암호화 부분에 있는 경우, 그 결과는 또한 원래의 돌연변이보다 중요하지 않거나 덜 심각할 수 있다. 당업자라면 본 발명의 적용 가능성이 매우 광범위하고 심지어 질환의 예방 또는 치료로 제한되지 않는다는 것을 이해할 것이다. 본 발명은 또한 이러한 변형이 예를 들어 세포 또는 비-인간 동물 모델에서 질환 상태를 유도할 경우에도 또는 특히 그러한 경우에 그 효과를 연구하기 위하여 전사체를 변형시키는데 사용될 수 있다.

[0520] 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드로 예방 및/또는 치료될 수 있는 유전 질환의 예는 표적 RNA에서 하나 이상의 아데노신의 변형이 (잠재적으로) 유리한 변화를 가져올 임의의 질환이다.

[0521] 본 발명은 돌연변이를 교정하는 것으로 제한되지 않는데, 그 대신에 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드를 적용함으로써 야생형 서열을 돌연변이된 서열로 변화시키는 것이 유용할 수 있다. 야생형 아데노신을 변형시키는 것이 유리할 수 있는 일례는, 예를 들어 엑손의 스플라이싱에 필요한 분지 부위가 되는 아데노신을 변형시킴으로써 엑손의 스킵이 일어나는 것이다. 또 다른 예는 아데노신이 단백질 결합을 정의하거나 또는 이러한 결합을 위한 인식 서열의 일부이거나 또는 RNA의 안정성을 규정하는 2차 구조에 관여하는 경우이다. 따라서, 위에서 언급된 바와 같이, 본 발명은 기존의 돌연변이보다 덜 유해한 새로운 돌연변이를 도입하기 위하여 질환에 대한 연구 툴을 제공하는데 사용될 수 있다.

[0522] 본 명세서에 개시된 올리고뉴클레오타이드를 이용하는 아데노신의 탈아미노화는 임의의 수준의 아데노신 탈아미노화, 예컨대, 표적 서열 내에서 적어도 1개의 탈아미노화된 아데노신(예컨대, 표적 서열에서 적어도, 1, 2, 3개 이상의 탈아미노화된 아데노신)을 포함한다.

[0523] 아데노신 탈아미노화는 대조군 수준과 비교하여 표적 서열 내의 아데노신의 절대적 또는 상대적 수준의 감소에 의해 평가될 수 있다. 대조군 수준은 당업계에서 활용되는 임의의 유형의 대조군 수준, 예컨대, 투약전 기준선 수준, 또는 대조군(예컨대, 완충제 단독 대조군 또는 비활성화제 대조군)으로 처리된 또는 처리되지 않은 유사한 대상체, 세포 또는 샘플로부터 결정된 수준일 수 있다.

[0524] ADAR의 효소 활성이 아데노신을 이노신으로 전환시키기 때문에, 아데노신 탈아미노화는 대안적으로 대조군 수준에 비해서 표적 서열 내 절대적 또는 상대적 수준의 이노신의 증가에 의해 평가될 수 있다. 마찬가지로, 대조군 수준은 당업계에서 활용되는 임의의 유형의 대조군 수준, 예컨대, 투약전 기준선 수준, 또는 대조군(예컨대, 완충제 단독 대조군 또는 비활성화제 대조군)으로 처리된 또는 처리되지 않은 유사한 대상체, 세포 또는 샘플로부터 결정된 수준일 수 있다.

[0525] 표적 서열 내의 아데노신 및/또는 이노신의 수준은 폴리뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오타이드 조성을 결정하기 위하여 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용해서 평가될 수 있다. 예를 들어, 표적 서열 내의 아데노신 또는 이노신의 상대 또는 절대 수준은 생어(Sanger) 시퀀싱 방법, 상업적으로 입수 가능한 플랫폼(예컨대, Illumina, Qiagen, Pacific Biosciences, Thermo Fisher, Roche, and Oxford Nanopore Technologies) 상에 제공된 것들과 같은 차세대 시퀀싱(NGS; 예컨대, 파이로시퀀싱, 가역적 종결자 화학에 의한 시퀀싱, 결찰에 의한 시퀀싱 및

실시간 시퀀싱)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 핵산 시퀀싱 기술을 이용해서 평가될 수 있다. NGS에 대한 표적 서열의 클론 증폭은 Applied Biosystems, Roche, Stratagene, Cepheid, Eppendorf, 또는 Bio-Rad Laboratories로부터의 상업적으로 입수 가능한 플랫폼 상에서의 실시간 중합효소 연쇄 반응(qPCR로도 공지됨)을 이용해서 수행될 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 에멀션 PCR 방법은 Bio-Rad Laboratories에 의한 Droplet Digital PCR과 같은 상업적으로 입수 가능한 플랫폼을 이용하는 표적 서열의 증폭에 사용될 수 있다.

[0526] 소정의 실시형태에서, 대용 마커는 표적 서열 내 아데노신 탈아미노화를 검출하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 허용 가능한 진단 및 모니터링 기준에 의해 입증된 바와 같은, 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드를 이용한 G에서 A로의 돌연변이를 포함하는 유전 장애를 갖는 대상체의 유효한 치료는 임상적으로 관련된 아데노신 탈아미노화를 입증하는 것으로 이해될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 방법은, 예컨대, 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드에 의한 대상체의 치료 후에 임상적으로 관련된 성과에 의해 입증되는 바와 같이, 임상적으로 관련된 아데노신 탈아미노화를 포함한다.

[0527] 관심 유전자에서의 아데노신 탈아미노화는 제1 세포 또는 세포군과 실질적으로 동일하지만 처리되지 않은 또는 처리되지 않았던 제2 세포 또는 세포군(올리고뉴클레오타이드로 처리되지 않거나 또는 관심 유전자에 표적화된 올리고뉴클레오타이드로 처리되지 않은 대조군 세포(들))에 비해서, 관심 유전자의 발현이 증가 또는 감소되도록, (예컨대, 세포 또는 세포들을 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드와 접촉시킴으로써, 또는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드를 세포가 존재하는 또는 존재했던 대상체에게 투여함으로써) 관심 유전자가 전사되고 처리된 또는 처리되었던 제1 세포 또는 세포군(이러한 세포는 예를 들어 대상체로부터 유래된 샘플에 존재할 수 있음)에 의해 발현된 mRNA의 수준의 증가 또는 감소에 의해 나타날 수 있다. 관심 유전자의 mRNA의 수준의 증가 또는 감소의 정도는 다음으로 환산되어 표현될 수 있다:

[0528] $$\frac{(\text{대조군 세포내 mRNA}) - (\text{처리된 세포 내 mRNA})}{(\text{대조군 세포 내 mRNA})} \times 100\%$$

[0529] 다른 실시형태에서, 유전자의 수준의 변화는, 관심 유전자의 발현에 기능적으로 연결된 파라미터의 감소, 예컨대, 관심 유전자의 단백질 발현 또는 단백질의 하류의 신호전달로 환산해서 평가될 수 있다. 관심 유전자의 수준의 변화는, 발현 작제물로부터 내인성 또는 이종성인 관심 유전자를 발현하는 임의의 세포에서, 그리고 당업계에 공지된 임의의 검정법에 의해 결정될 수 있다.

[0530] 관심 유전자의 발현 수준의 변화는 세포 또는 세포군에 의해 발현된 관심 유전자에 의해 생산된 단백질의 수준(예컨대, 대상체로부터 유래된 샘플에서 발현된 단백질의 수준)의 증가 또는 감소에 의해 나타날 수 있다. 위에서 설명된 바와 같이, mRNA 억제의 평가를 위하여, 처리된 세포 또는 세포군에서의 단백질 발현 수준의 변화는 유사하게 대조군 세포 또는 세포군에서의 단백질 수준의 백분율로 표현될 수 있다.

[0531] 3 관심 유전자의 발현의 변화를 평가하는데 사용될 수 있는 대조군 세포 또는 세포군은 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드와 아직 접촉되지 않은 세포 또는 세포군을 포함한다. 예를 들어, 대조군 세포 또는 세포군은 올리고뉴클레오타이드로 대상체를 치료하기 전에 개별적인 대상체(예컨대, 인간 또는 동물 대상체)로부터 유래될 수 있다.

[0532] 세포 또는 세포군에 의해 발현되는 관심 유전자의 mRNA의 수준은 mRNA 발현을 평가하기 위하여 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용해서 결정될 수 있다. 일 실시형태에서, 샘플에서의 관심 유전자의 발현 수준은 전사된 폴리뉴클레오타이드, 또는 이의 일부, 예컨대, 관심 유전자의 mRNA를 검출함으로써 결정된다. RNA는, 예를 들어, 산 페놀/구아니딘 아이소티오사이아네이트 추출(RNAzol B; Biogenesis), RNEASY™ RNA 제조 키트(Qiagen) 또는 PAXgene(PreAnalytix, 스위스 소재)을 이용하는 것을 비롯한 RNA 추출 기술을 이용해서 세포로부터 추출될 수 있다. 리보핵산 혼성화를 이용하는 전형적인 검정 포맷은 핵 실행 검정(nuclear run-on assay), RT-PCR, RNase 보호 검정, 노던 블롯팅(northern blotting), 인시추 혼성화, 및 마이크로어레이 분석을 포함한다. 관심 유전자의 순환 mRNA는 PCT 공개 공보 WO2012/177906(전체 내용이 참조에 의해 본 명세서에 원용됨)에 기재된 방법을 이용해서 검출될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 관심 유전자의 발현 수준은 핵산 프로브를 이용해서 결정된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "프로브"는, 특정 서열에, 예컨대, mRNA 또는 폴리펩타이드에 선택적으로 결합 가능한 임의의 분자를 지칭한다. 프로브는 당업자에 의해 합성되거나, 또는 적절한 생물학적 제제로부터 유래될 수 있다. 프로브는 표지되도록 특별히 설계될 수 있다. 프로브로서 이용될 수 있는 분자의 예는 RNA, DNA, 단백질, 항체 및 유기 분자를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0533] 단리된 mRNA는 서던(Southern) 또는 노던 분석, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 분석, 및 프로브 어레이를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 혼성화 또는 증폭 검정에 사용될 수 있다. mRNA 수준을 결정하는 하나의 방법은, 단리된 mRNA를 관심 유전자의 mRNA에 혼성화될 수 있는 핵산 분자(프로브)와 접촉시키는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, mRNA는, 예를 들어, 아가로스 겔 상에 단리된 mRNA를 가동시키고 mRNA를 겔로부터 막, 예컨대 나이트로셀룰로스로 전사함으로써, 고체 표면 상에 고정화되고 프로브와 접촉된다. 대안적인 실시형태에서, 프로브(들)는 고체 표면에 고정화되고 mRNA는, 예를 들어, AFFYMETRIX 유전자 칩 어레이에서 프로브(들)와 접촉된다. 당업자라면 관심 유전자의 mRNA 수준을 결정하는 데 사용하기 위해 공지된 mRNA 검출 방법을 쉽게 개조할 수 있다.

[0534] 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 결정하기 위한 대안적인 방법은, 예컨대, RT-PCR(Mullis, 1987, 미국 특허 번호 4,683,202에 제시된 실험 실시형태), 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-Beta 레플리카제(Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197), 롤링 서클 복제(Lizardi et al., 미국 특허 번호 5,854,033) 또는 임의의 다른 핵산 증폭 방법에 의해 예를 들어 샘플에서 mRNA의 (cDNA를 제조하기 위한) 핵산 증폭 및/또는 역방향 전사효소의 과정에 이어서, 증폭된 분자를 당업자에게 공지된 기술을 이용해서 검출하는 것을 포함한다. 이러한 검출 방식은, 이러한 분자가 매우 낮은 수로 존재할 경우 핵산 분자의 검출에 특히 유용하다. 본 발명의 특정 양상에서, 관심 유전자의 발현 수준은 정량적 형광 RT-PCR(즉, TAQMAN™ System) 또는 DUAL-GLO® 루시페라제 검정에 의해 결정된다.

[0535] 관심 유전자의 mRNA의 발현 수준은 멤브레인 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 사용해서 모니터링될 수 있다. 미국 특허 번호 5,770,722; 5,874,219; 5,744,305; 5,677,195; 및5,445,934를 참조하며, 이들은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다. 유전자 발현 수준의 결정은 또한 용액 중에서 핵산 프로브를 이용하는 것을 포함할 수 있다.

[0536] 몇몇 실시형태에서, mRNA 발현 수준은 분지형 DNA(bDNA) 검정 또는 실시간 PCR(qPCR)을 이용해서 평가된다. 이 PCR 방법의 사용은 본 명세서에 제시된 실시예에서 기재되고 예시되어 있다. 이러한 방법은 또한 관심 유전자의 핵산의 검출에 사용될 수 있다.

[0537] 관심 유전자의 발현에 의해 생산된 단백질의 수준은 단백질 수준의 측정을 위한 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용해서 결정될 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어, 전기영동, 모세관 전기영동, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 박층 크로마토그래피(TLC), 과확산 크로마토그래피, 유체 또는 겔 침전 반응, 흡수 분광법, 비색 검정, 분광광도 검정, 유세포 분석, 면역확산(단일 또는 이중), 면역전기영동, 웨스턴 블롯팅, 방사선면역검정(RIA), 효소결합 면역흡착 검정(ELISA), 면역형광 검정, 전기화학발광 검정 등을 포함한다. 이러한 검정은 또한 관심 유전자에 의해 생산된 단백질의 존재 또는 복제를 나타내는 단백질의 검출에 사용될 수 있다. 추가로, 상기 검정은 단백질 기능의 회복 또는 변화를 초래함으로써 대상체의 치료 효과 및 유익을 제공하고, 대상체의 장애를 치료하고 그리고/또는 대상체에서 장애의 증상을 저감시키는 관심 mRNA 서열의 변화를 보고하는데 사용될 수 있다.

[0538] 본 발명의 방법의 몇몇 실시형태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드가 대상체 내의 특정 부위로 전달되도록 대상체에게 투여된다. 관심 유전자의 발현의 변화는 대상체 내의 특정 부위로부터 유래된 샘플에서 관심 유전자에 의해 생산된 mRNA 또는 단백질의 수준 또는 수준의 변화의 측정을 이용해서 평가될 수 있다.

[0539] 다른 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 (a) 관심 유전자의 표적 서열 내의 아데노신의 수의 감소, (b) 장애의 발병의 지연, (c) 대상체의 생존 증가, (d) 대상체의 무진행 생존 증가, (e) 단백질 기능의 회복 또는 변화 및 (f) 증상의 저감 중 하나(또는 그 이상, 예컨대, 2 이상, 3 이상, 4 이상)를 초래하는데 효과적인 양으로 그리고 시간 동안 투여된다.

[0540] G에서 A로의 돌연변이와 연관된 장애를 치료하는 것은 또한 비치료 집단에 비해서 치료된 대상체의 집단의 사망률의 감소를 초래할 수 있다. 예를 들어, 사망률은 2% 초과(예컨대, 5%, 10% 또는 25% 초과)만큼 감소된다. 치료된 대상체의 집단의 사망률의 감소는 임의의 재현 가능한 수단에 의해, 예를 들어, 집단에 대해 화합물 또는 본 명세서 기재된 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염으로 치료의 개시 후 단위 시간당 질병-관련 사망의 평

균 수를 계산함으로써 측정될 수 있다. 집단의 사망률의 감소는 또한, 예를 들어, 집단에 대해 화합물 또는 본 명세서 기재된 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염으로 1차 치료를 완료한 후에 단위 시간당 질환-관련 사망의 평균수를 계산함으로써 측정될 수 있다.

[0541] *A. 올리고뉴클레오타이드의 전달*

[0542] 세포, 예컨대, 대상체, 예컨대, 인간 대상체(예컨대, 이를 필요로 하는 대상체, 예컨대, 장애를 가진 대상체) 내 세포에의 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 전달은 다수의 상이한 방식으로 달성될 수 있다. 예를 들어, 전달은 세포를 본 발명의 올리고뉴클레오타이드와 시험관내 또는 생체내에서 접촉시킴으로써 수행될 수 있다. 생체내 전달은 또한 대상체에게 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 조성물을 투여함으로써 직접 수행될 수 있다. 대안적으로, 생체내 전달은 올리고뉴클레오타이드의 발현을 암호화하고 유도하는 하나 이상의 벡터를 투여함으로써 간접적으로 수행될 수 있다. 세포를 접촉하는 시험관내 방법과 생체내 방법의 조합도 가능하다. 세포를 접촉하는 것은 위에서 논의된 바와 같이 직접적 또는 간접적일 수 있다. 또한, 세포를 접촉시키는 것은 본 명세서에 기재된 또는 당업계에 공지된 임의의 리간드를 포함하는, 표적화 리간드를 통해서 달성될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 표적화 간드는 관심 부위로 올리고뉴클레오타이드를 유도하는 탄수화물 모이어티, 예컨대, $GalNAc_3$ 리간드, 또는 임의의 다른 리간드이다. 세포는 중추신경계의 것들, 또는 근육 세포를 포함할 수 있다. 이들의 대안은 추가로 이하에 논의된다.

[0543] 세포를 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 것은 시험관내에서 또는 생체내에서 수행될 수 있고, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드와 함께 사용하기 위하여 개조될 수 있다(예컨대, 문헌[Akhtar S. and Julian R L., (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144] 및 WO94/02595 참조, 이들은 이들의 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용됨). 생체내 전달을 위하여, 올리고뉴클레오타이드 분자를 전달하기 위하여 고려되는 인자는, 예를 들어, 전달된 분자의 생물학적 안정성, 비특이적 효과의 방지 및 표적 조직 내 전달된 분자의 축적을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드의 비특이적 효과는, 국소 투여에 의해, 예를 들어, 조직에 직접 주사 또는 이식에 의해, 또는 제제를 국소 투여함으로써 최소화될 수 있다. 치료 부위에의 국소 투여는 제제의 국소 농도를 최대화하고, 다르게는 제제에 의해 손상될 수 있거나 제제를 분해시킬 수 있는 전신 조직에 약제의 노출을 제한하고, 투여될 올리고뉴클레오타이드 분자의 더 낮은 용량을 허용한다.

[0544] 질환의 치료를 위하여 전신으로 올리고뉴클레오타이드를 투여하기 위하여, 올리고뉴클레오타이드는 대체 핵염기, 대체 당 모이어티, 및/또는 대체 인터뉴클레오사이드 링키지를 포함할 수 있거나, 또는 대안적으로 약물 전달 시스템을 이용해서 전달될 수 있고; 두 방법은 생체내에서 엔도-뉴클레아제 및 엑소-뉴클레아제에 의한 올리고뉴클레오타이드의 신속한 분해를 방지하도록 작용한다. 올리고뉴클레오타이드 또는 약제학적 담체의 변형은 또한 올리고뉴클레오타이드 조성물의 표적 조직에의 표적화를 허용하고 바람직하지 않은 비표적 효과를 회피할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 분자는 세포 흡수를 증대시키고 분해를 방지하기 위하여 콜레스테롤과 같은 친유성 기에 대한 화학적 접합에 의해 변형될 수 있다. 대안적인 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 약물 전달 시스템, 예컨대, 나노입자, 지질 나노입자, 폴리플렉스 나노입자, 리포플렉스 나노입자, 덴드리머, 중합체, 리포솜, 또는 양이온성 전달 시스템을 이용해서 전달될 수 있다. 양으로 하전된 양이온성 전달 시스템은 (음으로 하전된) 올리고뉴클레오타이드 분자의 결합을 용이하게 하고 음으로 하전된 세포막에서의 상호작용을 증대시켜, 세포에 의한 올리고뉴클레오타이드의 효율적인 흡수를 허용한다. 양이온성 지질, 덴드리머 또는 중합체는 올리고뉴클레오타이드에 결합될 수 있거나, 또는 올리고뉴클레오타이드를 피복하는 소포 또는 마이셀을 형성하도록 유도될 수 있다. 소포 또는 마이셀의 형성은, 전신으로 투여될 경우, 올리고뉴클레오타이드의 분해를 더욱 방지한다. 일반적으로, 당업계에 공지된 임의의 핵산의 전달 방법은 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 전달에 적응 가능할 수 있다. 양이온성 올리고뉴클레오타이드 복합체를 제조하고 투여하는 방법은 충분히 당업자의 능력 이내이다(예컨대, 문헌[Sorensen, D R., et al. (2003) J. Mol. Biol 327:761-766; Verma, U N. et al., (2003) Clin. Cancer Res. 9:1291-1300; Arnold, A S et al., (2007) J. Hypertens. 25:197-205] 참조, 이들은 이들의 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용됨). 올리고뉴클레오타이드의 전신 전달에 유용한 약물 전달 시스템의 몇몇 비제한적인 예는 DOTAP(Sorensen, D R., et al (2003), 상기 참조; Verma, U N. et al., (2003), 상기 참조), Oligofectamine, "고체 핵산 지질 입자"(Zimmermann, T S. et al., (2006) Nature 441:111-114), 카디오리핀(Chien, P Y. et al., (2005) Cancer Gene Ther. 12:321-328; Pal, A. et al., (2005) Int J. Oncol. 26:1087-1091), 폴리에틸렌이민(Bonnet M E. et al., (2008) Pharm. Res. Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) J. Biomed. Biotechnol. 71659), Arg-Gly-Asp(RGD) 펩타이드(Liu, S. (2006) Mol. Pharm. 3:472-487), 및 폴리아미도아민(Tomalia, D A. et al., (2007) Biochem. Soc. Trans. 35:61-67; Yoo, H. et al., (1999) Pharm. Res. 16:1799-1804)을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 올리고뉴클레

오타이드는 전신 투여를 위하여 사이클로덱스트린과 복합체를 형성한다. 올리고뉴클레오타이드 및 사이클로덱스트린의 투여 방법 및 약제학적 조성물은 미국 특허 번호 7,427,605에서 찾을 수 있고, 이 문헌은 이의 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용된다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 폴리플렉스 또는 리포플렉스 나노입자에 의해 전달된다. 올리고뉴클레오타이드 및 폴리플렉스 나노입자, 및 리포플렉스 나노입자의 투여 방법 및 약제학적 조성물은 미국 특허 출원 번호 2017/0121454; 2016/0369269; 2016/0279256; 2016/0251478; 2016/0230189; 2015/0335764; 2015/0307554; 2015/0174549; 2014/0342003; 2014/0135376; 및 2013/0317086에서 찾을 수 있고, 이들은 이들의 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0545] *i. 막 분자 조립체 전달 방법*

[0546] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 또한 당업계에 공지된 중합체성, 생분해성 마이크로입자 또는 마이크로캡슐 전달 디바이스를 비롯하여 다양한 막 분자 조립체 전달 방법을 이용해서 전달될 수 있다. 예를 들어, 콜로이드 분산 시스템은 본 명세서에 기재된 올리고뉴클레오타이드 제제의 표적화된 전달을 위하여 사용될 수 있다. 콜로이드 분산 시스템은 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구체, 비드, 및 수중유 에멀션을 비롯한 지질-기반 시스템, 마이셀, 혼합 마이셀, 및 리포솜을 포함한다. 리포솜은 시험관내 및 생체내에서 전달 운반체로서 유용한 인공막 소포이다. 크기 범위가 0.2 내지 4.0㎛인 커다란 단일막 소포(LUV)는 커다란 거대분자를 함유하는 수성 완충제의 상당한 부분을 캡슐화할 수 있는 것으로 나타났다. 리포솜은 활성 성분을 작용 부위로 이송 및 전달하는데 유용하다. 리포솜 막은 생물학적 막과 구조적으로 유사하기 때문에, 리포솜이 조직에 적용될 경우, 리포솜 이중층이 세포막의 이중층과 융합된다. 리포솜과 세포의 병합이 진행됨에 따라서, 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 내부 수성 내용물이 세포에 전달되어, 올리고뉴클레오타이드가 표적 RNA에 특이적으로 결합될 수 있고 RNase H-매개 유전자 침묵을 매개할 수 있다. 몇몇 경우에, 리포솜은 또한 예컨대 올리고뉴클레오타이드를 특정 세포 유형으로 유도하기 위하여 특이적으로 표적화된다. 리포솜의 조성물은 통상 스테로이드, 특히 콜레스테롤와 조합되는 통상 인지질의 조합물이다. 기타 인지질 또는 기타 지질이 또한 사용될 수 있다. 리포솜의 물리적 특징은 pH, 이온 강도 및 2가 양이온의 존재에 따라 좌우된다.

[0547] 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 리포솜은 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 일례에서, 리포솜의 지질 성분은 마이셀이 지질 성분과 함께 형성되도록 세제에 용해된다. 예를 들어, 지질 성분은 양친매성 양이온성 지질 또는 지질 접합체일 수 있다. 세제는 높은 임계 마이셀 농도를 가질 수 있고 비이온성일 수 있다. 예시적인 세제는 콜레이트, CHAPS, 옥틸글루코사이드, 데옥시콜레이트 및 라우로일 사르코신을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드 제제는 이어서 지질 성분을 포함하는 마이셀에 첨가된다. 지질 상의 양이온 기는 올리고뉴클레오타이드와 상호작용하여 올리고뉴클레오타이드 둘레에 축합되어 리포솜을 형성한다. 축합 후에, 세제는, 예컨대, 투석에 의해 제거되어 올리고뉴클레오타이드의 리포솜 제제를 수득한다.

[0548] 필요한 경우, 축합을 보조하는 담체 화합물이 축합 반응 동안 예컨대 조절된 첨가에 의해 첨가될 수 있다. 예를 들어, 담체 화합물은 핵산 이외의 중합체(예컨대, 스퍼민 또는 스퍼미딘)일 수 있다. pH는 또한 축합에 유리하도록 조정될 수 있다.

[0549] 전달 운반체의 구조 성분으로서 폴리뉴클레오타이드/양이온성 지질 복합체를 내포하는 안정적인 폴리뉴클레오타이드 전달 운반체를 제조하는 방법은, 예컨대, WO 96/37194에 더욱 기재되어 있으며, 이의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다. 리포솜 형성은 또한 문헌[Feigner, P. L. et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8:7413-7417; 미국 특허 번호 4,897,355; 미국 특허 번호 5,171,678; Bangham et al., (1965) M. Mol. Biol. 23:238; Olson et al., (1979) Biochim. Biophys. Acta 557:9; Szoka et al., (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4194; Mayhew et al., (1984) Biochim. Biophys. Acta 775:169; Kim et al., (1983) Biochim. Biophys. Acta 728:339; 및 Fukunaga et al., (1984) Endocrinol. 115:757]에 기재된 예시적인 방법의 하나 이상의 양상을 포함할 수 있다. 전달 운반체로서 사용하기에 적절한 크기의 지질 응집체를 제조하기 위한 통상 사용되는 기술은 초음파 및 동결-해동 압출을 포함한다(예컨대, 문헌[Mayer et al., (1986) Biochim. Biophys. Acta 858:161] 참조). 일관되게 작고(50 내지 200㎚) 비교적 균일한 응집체가 요망되는 경우 미세유동화가 사용될 수 있다(Mayhew et al., (1984) Biochim. Biophys. Acta 775:169). 이들 방법은 올리고뉴클레오타이드 제제를 리포솜에 패키징하는데 용이하게 적응된다.

[0550] 리포솜은 크게 두 부류로 나뉜다. 양이온성 리포솜은 안정적인 복합체를 형성하기 위하여 음으로 하전된 핵산 분자와 상호작용하는 양으로 하전된 리포솜이다. 양으로 하전된 핵산/리포솜 복합체는 음으로 하전된 세포 표면에 결합하고 엔도솜에 내재화된다. 엔도솜 내의 산성 pH로 인해, 리포솜은 파열되어, 그의 내용물을 세포의 세포질로 방출한다(Wang et al. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun., 147:980-985).

[0551] pH-민감하거나 또는 음으로 하전된 리포좀은, 핵산과 복합되기보다는 핵산을 포획한다. 핵산과 지질은 둘 다 유사하게 하전되므로, 복합체 형성보다는 반발이 일어난다. 그럼에도 불구하고, 일부 핵산은 이러한 리포솜의 수성 내부에 포획된다. pH 민감성 리포솜은 티미딘 키나제 유전자를 암호화하는 핵산을 배양물의 세포 단층으로 전달하는데 사용되었다. 외인성 유전자의 발현은 표적 세포에서 검출되었다(Zhou et al. (1992) Journal of Controlled Release, 19:269-274).

[0552] 한 가지 주된 유형의 리포솜 조성물은 천연 유래 포스파티딜콜린 이외의 인지질을 포함한다. 예를 들어, 중성 리포솜 조성물은, 다이미리스토일 포스파티딜콜린(DMPC) 또는 다이팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC)으로부터 형성될 수 있다. 음이온성 리포솜 조성물은 일반적으로 다이미리스토일 포스파티딜글리세롤로부터 형성되는 한편, 음이온성 융해성 리포솜은 주로 다이올레오일 포스파티딜에탄올아민(DOPE)로부터 형성된다. 다른 유형의 리포솜 조성물은 포스파티딜콜린(PC), 예를 들어, 대두 PC, 및 계란 PC로부터 형성된다. 다른 유형은 인지질 및/또는 포스파티딜콜린 및/또는 콜레스테롤의 혼합물로부터 형성된다.

[0553] 리포솜을 시험관내 및 생체내에서 세포에 도입하는 다른 방법의 예는 미국 특허 번호 5,283,185; 미국 특허 번호 5,171,678; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; 문헌[Feigner, (1994) J. Biol. Chem. 269:2550; Nabel, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307; Nabel, (1992) Human Gene Ther. 3:649; Gershon, (1993) Biochem. 32:7143; 및 Strauss, (1992) EMBO J. 11:417]을 포함한다.

[0554] 비이온성 리포솜 시스템, 특히 비이온성 계면활성제와 콜레스테롤을 포함하는 시스템은 또한 피부에 약물의 전달에서의 그의 유용성을 결정하기 위하여 검토된 바 있다. NOVASOME™ I(글리세릴 다이라우레이트/콜레스테롤/폴리옥시에틸렌-10-스테아릴 에터) 및 NOVASOME™ II(글리세릴 다이스테아레이트/콜레스테롤/폴리옥시에틸렌-10-스테아릴 에터)를 포함하는 비이온성 리포솜 제형은 사이클로스포린-A를 마우스의 피부의 진피에 전달하는데 사용되었다. 그 결과는 이러한 비이온성 리포솜 시스템이 사이클로스포린 A를 피부의 다른 층에 침착시키는 것을 용이하게 함에 있어서 효과적인 것을 나타내었다(Hu et al., (1994) S.T.P.Pharma. Sci., 4(6):466).

[0555] 리포솜은 또한 당해 특수한 지질을 결여하는 리포솜에 비해서 증대된 순환 수명을 초래하는 하나 이상의 특수한 지질을 포함하는 입체적으로 안정화된 리포솜일 수 있다. 입체적으로 안정화된 리포솜의 예는 (A) 리포솜의 소포-형성 지질의 일부가 모노시알로강글리오사이드 G_{M1}과 같은 하나 이상의 당지질을 포함하거나, 또는 (B) 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티와 같은 하나 이상의 친수성 중합체와 유도체화되는 것들이다. 임의의 특정 이론에 의해 구속되길 원치 않지만, 당업계에서는, 적어도 강글리오사이드, 스핑고미엘린, 또는 PEG-유도체화 지질을 함유하는 입체적으로 안정화된 리포솜에 대해서, 이러한 입체적으로 안정화된 리포솜의 증대된 순환 수명은 세망내피계(RES)의 세포로의 저감된 흡수로부터 유래되는 것으로 여기고 있다(Allen et al., (1987) FEBS Letters, 223:42; Wu et al., (1993) Cancer Research, 53:3765).

[0556] 하나 이상의 당지질을 포함하는 다양한 리포솜은 당업계에 공지되어 있다. Papahadjopoulos 등(Ann. N.Y. Acad. Sci., (1987), 507:64)은 리포솜의 혈액 반감기를 개선하는 모노시알로강글리오사이드 G^{M1}, 갈락토세레브로사이드 설페이트 및 포스파티딜이노시톨의 능력을 보고하였다. 이들 지견은 Gabizon 등(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (1988), 85:6949)에 의해 상세히 설명되어 있었다. 미국 특허 번호 4,837,028 및 WO 88/04924(둘 다 발명자 Allen 등)는, (1) 스핑고미엘린 및 (2) 강글리오사이드 G_{M1} 또는 갈락토세레브로사이드 설페이트 에스터를 포함하는 리포솜을 개시한다. 미국 특허 번호 5,543,152(Webb et al.)는 스핑고미엘린을 포함하는 리포솜을 개시한다. 1,2-sn-다이미리스토일포스파티딜콜린을 포함하는 리포솜은 WO 97/13499(Lim et al)에 개시되어 있다.

[0557] 일 실시형태에서, 양이온성 리포솜이 사용된다. 양이온성 리포솜은 세포막에 융합될 수 있는 이점을 지닌다. 비이온성 리포솜은, 혈장막과 효과적으로 융합될 수 없지만, 생체내에서 대식세포에 의해 취해져서, 올리고뉴클레오타이드를 대식세포에 전달하는데 사용될 수 있다.

[0558] 리포솜의 추가의 이점은 하기를 포함한다: 천연 인지질로부터 얻어진 리포솜은 생체적합성 및 생분해성이고; 리포솜은 광범위한 범위의 수용성 및 지용성 약물을 혼입할 수 있고; 리포솜은 대사 및 분해로부터 내부 구획에서의 캡슐화된 올리고뉴클레오타이드를 보호할 수 있다(Rosoff, in "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245). 리포솜 제형의 제조에서의 중요한 고려사항은 지질 표면 전하, 소포 크기 및 리포솜의 수성 부피이다.

[0559] 양으로 하전된 합성 양이온성 지질인 N-[1-(2,3-다이올레일옥시)프로필]-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드

(DOTMA)는, 핵산과 자발적으로 상호 작용하여 지질-핵산 복합체를 형성해서, 조직 배양 세포의 세포막의 음으로 하전된 지질과 융합하여 올리고뉴클레오타이드의 전달을 초래할 수 있는 작은 리포솜을 형성하는데 사용될 수 있다(예컨대, DOTMA의 설명 및 이의 DNA와의 용도에 대해서 문헌[Feigner, P. L. et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8:7413-7417], 및 미국 특허 번호 4,897,355 참조).

[0560] DOTMA 유사체인 1,2-비스(올레일옥시)-3-(트라이메틸암모니아)프로판(DOTAP)은 DNA-복합 소포를 형성하기 위하여 인지질과 조합하여 사용될 수 있다. LIPOFECTIN™(Bethesda Research Laboratories, 메릴랜드주 게이더스버그 소재)은, 음으로 하전된 폴리뉴클레오타이드와 자발적으로 상호작용하여 복합체를 형성하는 양으로 하전된 DOTMA 리포솜을 포함하는 살아 있는 조직 배양 세포에 고도의 음이온성 핵산의 전달을 위한 효과적인 제제이다. 양으로 하전된 리포솜이 충분히 사용되면 생성된 복합체의 순 전하도 양이다. 이러한 방식으로 제조된 양으로 하전된 복합체는 음으로 하전된 세포 표면에 자발적으로 부착되어서, 원형질막과 융합되어 기능적 핵산을 예를 들어 조직 배양 세포에 효율적으로 전달한다. 또 다른 상업적으로 입수 가능한 양이온성 지질인 1,2-비스(올레일옥시)-3,3-(트라이메틸암모니아)프로판("DOTAP")(Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.)은 올레오일 모이어티가 테터보다는 오히려 에스터에 의해 연결된다는 점에서 DOTMA와는 상이하다.

[0561] 기타 보고된 양이온성 지질 화합물은, 예를 들어, 2가지 유형 중 한 가지 지질에 접합된 카복시스퍼민을 포함하는 다양한 모이어티에 저합된 것들을 포함하고, 5-카복시스퍼밀글리신 다이옥타올레일아마이드("DOGS")(TRANSFECTAM™, Promega, 위스콘신주 매디슨 소재) 및 다이팔미토일포스파티딜에탄올아민 5-카복시스퍼밀-아마이드("DPPES")(예컨대, 미국 특허 번호 5,171,678 참조)와 같은 화합물을 포함한다.

[0562] 또 다른 양이온성 지질 접합체는 DOPE와 조합하여 리포솜으로 제형화된 콜레스테롤("DC-Chol")에 의한 지질의 유도체화를 포함한다(문헌[Gao, X. and Huang, L., (1991) Biochim. Biophys. Res. Commun. 179:280] 참조). 폴리라이신을 DOPE에 접합시킴으로써 제조된 리포폴리라이신은 혈청의 존재 하에 형질감염에 효과적인 것으로 보고되어 있다(Zhou, X. et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 1065:8). 소정의 세포주의 경우에, 접합된 양이온성 지질을 함유하는 이러한 리포솜은 DOTMA-함유 조성물보다 낮은 독성을 나타내고 더 효율적인 형질감염을 제공하는 것으로 일컬어진다. 기타 상업적으로 입수 가능한 양이온성 지질 제품은 DMRIE 및 DMRIE-HP(Vical, 캘리포니아주 라호이아) 및 Lipofectamine(DOSPA)(Life Technology, Inc., 메릴랜드주 게이더스버그 소재)을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드의 전달에 적합한 기타 양이온성 지질은 WO 98/39359 및 WO 96/37194에 기재되어 있다.

[0563] 리포솜 제형은 특히 국소 투여에 적합하고, 리포솜은 다른 제형에 비해서 몇 가지 이점을 제공한다. 이러한 이점은 투여된 약물의 높은 전신 흡수와 관련된 부작용의 감소, 목적하는 표적에서 투여된 약물의 축적 증가 및 올리고뉴클레오타이드를 피부에 투여하는 능력을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 리포솜은 올리고뉴클레오타이드를 표피 세포에 전달하고 또한 진피 조직에의, 예컨대, 피부에의 올리고뉴클레오타이드의 침투를 증대시키기 위하여 사용된다. 예를 들어, 리포솜은 국소 적용될 수 있다. 리포솜으로서 제형화된 약물의 피부에의 국소 전달은 문서화되어 있었다(예컨대, 문헌[Weiner et al., (1992) Journal of Drug Targeting, vol. 2,405-410 및 du Plessis et al., (1992) Antiviral Research, 18:259-265; Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., (1998) Biotechniques 6:682-690; Itani, T. et al., (1987) Gene 56:267-276; Nicolau, C. et al. (1987) Meth. Enzymol. 149:157-176; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. (1983) Meth. Enzymol. 101:512-527; Wang, C. Y. and Huang, L., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7851-7855] 참조).

[0564] 비이온성 리포솜 시스템, 특히 비이온성 계면활성제와 콜레스테롤을 포함하는 시스템은 또한 피부에 약물의 전달에서의 그의 유용성을 결정하기 위하여 검토된 바 있다. Novasome I(글리세릴 다이라우레이트/콜레스테롤/폴리옥시에틸렌-10-스테아릴 에터) 및 Novasome II(글리세릴 다이스테아레이트/콜레스테롤/폴리옥시에틸렌-10-스테아릴 에터)를 포함하는 비이온성 리포솜 제형은 마우스의 피부의 진피에 약물을 전달하는데 사용되었다. 올리고뉴클레오타이드를 가진 이러한 제형은 피부과 장애를 치료하는데 유용하다.

[0565] 리포솜의 표적화는 또한 예를 들어 기관-특이성, 세포-특이성, 및 소기관-특이성에 기초하여 가능하고, 당업계에 공지되어 있다. 리포솜 표적화된 전달 시스템의 경우에, 지질 기는 리포솜 이중층과 안정적인 회합으로 표적화 리간드를 유지하기 위하여 리포솜의 지질 이중층에 혼입될 수 있다. 다양한 연결기는 표적화 리간드에 지질 사슬을 접합시키는데 사용될 수 있다. 추가의 방법은, 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 20060058255에 기재되어 있고, 여기서 연결기는 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0566] 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 리포솜은 고도로 변형 가능하게 만들어질 수 있다. 이러한 변형 가능성은 리포솜이 리포솜의 평균 반경보다 작은 기공을 투과 가능하게 할 수 있다. 예를 들어, 트랜스퍼좀(transfersome)

은 또 다른 유형의 리포솜이고, 약물 전달 운반체용의 매력적인 후보인 고도로 변형 가능한 지질 응집체이다. 트랜스퍼좀은 액적보다 작은 기공을 용이하게 투과할 수 있도록 고도로 변형 가능한 지질 액적으로 기재될 수 있다. 트랜스퍼좀은 표면 에지 활성제, 통상 계면활성제를 표준 리포솜 조성물에 첨가함으로써 만들어질 수 있다. 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 트랜스퍼좀은, 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드를 피부의 각질형성세포에 전달하기 위하여 감염에 의해 피하에 전달될 수 있다. 무손상 포유류 피부를 횡단하기 위하여, 지질 운반체는 적합한 경피 구비의 영향 하에 일련의 세공을 통과해야만 하고, 이러한 세공의 각각은 직경이 50㎚ 미만이다. 또한, 지질 특성으로 인해, 이들 트랜스퍼좀은 (예컨대, 피부에서 기공의 형상에 적응할 수 있는) 자가-최적화, 자가-수선일 수 있고, 단편화 및 종종 자체-부하 없이 빈번하게 그들의 표적에 도달할 수 있다. 트랜스퍼좀은 혈청 알부민을 피부에 전달하는데 사용되어 왔다. 혈청 알부민의 트랜스퍼좀-매개 전달은 혈청 알부민을 함유하는 용액의 피하 주사와 같이 유효한 것으로 나타났다.

[0567] 본 발명에 순응하는 다른 제형은 미국 가출원 일련 번호 61/018,616(출원일: 2008년 1월 2일); 61/018,611(출원일: 2008년 1월 2일); 61/039,748(출원일: 2008년 3월 26일); 61/047,087(출원일: 2008년 4월 22일) 및 61/051,528(출원일: 2008년 5월 8일)에 기재되어 있다. PCT 출원 번호 PCT/US2007/080331(출원일: 2007년 10월 3일)은 또한 본 발명에 순응하는 제형을 기재하고 있다.

[0568] 계면활성제는 제형, 예컨대, 에멀션(마이크로에멀션 포함) 및 리포솜에서 넓은 응용을 발견하고 있다. 천연 및 합성 둘 다의 많은 상이한 유형의 계면활성제의 특성을 분류하고 순위화하는 가장 통상적인 방식은, 친수성/친유성 밸런스(hydrophile/lipophile balance: HLB)의 사용에 의한 것이다. 친수성 기("헤드"라고도 알려짐)의 속성은 제형에 사용되는 상이한 계면활성제를 범주화하는 가장 유용한 수단을 제공한다(Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

[0569] 계면활성제 분자가 이온화되지 않은 경우, 이것은 비이온성 계면활성제로서 분류된다. 비이온성 계면활성제는 약제학적 및 화장품 제품에서 넓은 응용을 발견하고, 광범위한 pH값에 걸쳐서 이용 가능하다. 일반적으로, 이들의 HLB 값은 그들의 구조에 따라서 2 내지 약 18의 범위이다. 비이온성 계면활성제는 비이온성 에스터, 예컨대, 에틸렌 글리콜 에스터, 프로필렌 글리콜 에스터, 글리세릴 에스터, 폴리글리세릴 에스터, 솔비탄 에스터, 수크로스 에스터, 및 에톡실화 에스터를 포함한다. 비이온성 알칸올아마이드 및 에터, 예컨대, 지방 알코올 에톡실레이트, 프로폭실화 알코올, 및 에톡실화/프로폭실화 블록 중합체는 또한 이 부류에 포함된다. 폴리옥시에틸렌 계면활성제는 비이온성 계면활성제 부류의 가장 인기있는 구성원이다.

[0570] 계면활성제 분자가 물에 용해 또는 분산된 경우 음전하를 보유한다면, 그 계면활성제는 음이온성으로 분류된다. 음이온 계면활성제는 카복실레이트, 예컨대, 비누, 아실 락틸레이트, 아미노산의 아실 아마이드, 황산의 에스터, 예컨대, 알킬 설페이트 및 에톡실화 알킬 설페이트, 설포네이트, 예컨대, 알킬 벤젠 설포네이트, 아실 이세티오네이트, 아실 타우레이트 및 설포석시네이트, 및 포스페이트를 포함한다. 음이온 계면활성제 부류의 가장 중요한 구성원은 알킬 설페이트 및 비누이다.

[0571] 계면활성제 분자가 물에 용해 또는 분산된 경우 양전하를 보유한다면, 그 계면활성제는 양이온성으로 분류된다. 양이온 계면활성제는 4차 암모늄 염 및 에톡실화 아민을 포함한다. 4차 암모늄 염은 이 부류의 가장 잘 사용되는 구성원이다.

[0572] 계면활성제 분자가 양전하 또는 음전하를 운반하는 능력을 갖는다면, 계면활성제는 양쪽성으로 분류된다. 양쪽성 계면활성제는 아크릴산 유도체, 치환된 알킬아마이드, N-알킬베타인, 및 포스파타이드를 포함한다.

[0573] 약물 제품, 제형에서 그리고 에멀션에서 계면활성제의 사용이 검토된 바 있다(Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

[0574] 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 올리고뉴클레오타이드는 또한 마이셀 제형으로서 제공될 수 있다. 마이셀은 분자의 모든 소수성 부분이 안쪽으로 향하도록 양친매성 분자가 구형 구조로 배열되어, 친수성 부분이 주변 수상과 접촉하도록 하는 분자 조립체의 특정 유형이다. 환경이 소수성인 경우 정반대 배열이 존재한다.

[0575] *ii. 지질 나노입자-기반 전달 방법*

[0576] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 지질 제형, 예컨대, 지질 나노입자(LNP), 또는 기타 핵산-지질 입자에 완전히 캡슐화될 수 있다. LNP는, 정맥내(i.v.) 주사 후 연장된 순환 수명을 나타내고 원위 부위(예컨대, 투여 부위로부터 물리적으로 분리된 부위)에서 축적되기 때문에 전신 적용에 매우 유용하다. LNP는 PCT 공보 번호 00/03683에 제시된 바와 같은 캡슐화된 축합제-핵산 복합체를 포함하는 "pSPLP"를 포함한다. 본 발명의 입자는 전형적으로 평균 직경이 약 50㎚ 내지 약 150㎚, 더 전형적으로 약 60㎚ 내지 약 130㎚, 더 전형적으로 약 70㎚

내지 약 110nm, 가장 전형적으로 약 70nm 내지 약 90nm이고, 실질적으로 비독성이다. 또한, 핵산은, 본 발명의 핵산-지질 입자에 존재할 경우, 뉴클레아제에 의한 분해에 대해서 수용액에서 내성이 있다. 핵산-지질 입자 및 이의 제조 방법은, 예컨대, 미국 특허 번호 5,976,567; 5,981,501; 6,534,484; 6,586,410; 6,815,432; 미국 특허 공개 번호 2010/0324120 및 PCT 공보 번호 96/40964에 개시되어 있다.

[0577] 일 실시형태에서, 지질 대 약물비(질량/질량비)(예컨대, 지질 대 올리고뉴클레오타이드비)는 약 1:1 내지 약 50:1, 약 1:1 내지 약 25:1, 약 3:1 내지 약 15:1, 약 4:1 내지 약 10:1, 약 5:1 내지 약 9:1, 또는 약 6:1 내지 약 9:1의 범위일 것이다. 위에서 인용된 범위에 대한 중간 범위도 본 발명의 일부인 것으로 상정된다.

[0578] 양이온성 지질의 비제한적인 예는 N,N-다이올레일-N,N-다이메틸암모늄 클로라이드(DODAC), N,N-다이스테아릴-N,N-다이메틸암모늄 브로마이드(DDAB), N--(I-(2,3-다이올레일옥시)프로필)-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드(DOTAP), N--(I-(2,3-다이올레일옥시)프로필)-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), N,N-다이메틸-2,3-다이올레일옥시)프로필아민(DODMA), 1,2-다이리놀레일옥시-N,N-다이메틸아미노프로판(DLinDMA), 1,2-다이리놀레닐옥시-N,N-다이메틸아미노프로판(DLenDMA), 1,2-다이리놀레일카바모일옥시-3-다이메틸아미노프로판(DLin-C-DAP), 1,2-다이리놀레일옥시-3-(다이메틸아미노)아세톡시프로판(DLin-DAC), 1,2-다이리놀레일옥시-3-몰폴리노프로판(DLin-MA), 1,2-다이리놀레오일-3-다이메틸아미노프로판(DLinDAP), 1,2-다이리놀레일티오-3-다이메틸아미노프로판(DLin-S-DMA), 1-리놀레오일-2-리놀레일옥시-3-다이메틸아미노프로판(DLin-2-DMAP), 1,2-다이리놀레일옥시-3-트라이메틸아미노프로판 클로라이드 염(DLin-TMA.Cl), 1,2-다이리놀레오일-3-트라이메틸아미노프로판 클로라이드 염(DLin-TAP.Cl), 1,2-다이리놀레일옥시-3-(N-메틸피페라지노)프로판(DLin-MPZ), 또는 3-(N,N-다이리놀레일아미노)-1,2-프로판다이올(DLinAP), 3-(N,N-다이올레일아미노)-1,2-프로판다이올(DOAP), 1,2-다이리놀레일옥소-3-(2-N,N-다이메틸아미노)에톡시프로판(DLin-EG-DMA), 1,2-다이리놀레닐옥시-N,N-다이메틸아미노프로판(DLinDMA), 2,2-다이리놀레일-4-다이메틸아미노메틸-[1,3]-다이옥솔란(DLin-K-DMA) 또는 이들의 유사체, (3aR,5s,6aS)-N,N-다이메틸-2,2-다이((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이에니에테트라하이드로--3aH-사이클로펜타[d][1,3]다이옥솔-5-아민(ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트라이아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일4-(다이메틸아미노)부타노에이트(MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(비스(2-하이드록시도데실)아미노)에틸)(2-하이드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일에틸아잔다이일다이도데칸-2-올(Tech G1), 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 양이온성 지질은, 예를 들어, 입자에 존재하는 총 지질의 약 20 mol% to 약 50 mol% 또는 약 40 mol%를 포함할 수 있다.

[0579] 이온화/비-양이온성 지질은 음이온성 지질 또는 중성 지질일 수 있고, 이는 다이스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 다이올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 다이팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 다이올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG), 다이팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 다이올레오일-포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 팔미토일올레오일포스파티딜에탄올아민(POPE), 다이올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복실레이트(DOPE-mal), 다이팔미토일 포스파티딜 에탄올아민(DPPE), 다이미리스토일포스포에탄올아민(DMPE), 다이스테아로일-포스파티딜-에탄올아민(DSPE), 16-O-모노메틸 PE, 16-O-다이메틸 PE, 18-1-트랜스 PE, 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민(SOPE), 콜레스테롤, 또는 이들의 혼합물을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 비-양이온성 지질은, 예를 들어, 콜레스테롤이 포함된다면, 입자에 존재하는 총 지질의 약 5 mol% 내지 약 90 mol%, 약 10 mol%, 또는 약 58 mol%일 수 있다.

[0580] 입자의 응집을 저해하는 접합된 지질은, 예를 들어, 제한 없이, PEG-다이아실글리세롤(DAG), PEG-다이알킬옥시프로필(DAA), PEG-인지질, PEG-세라마이드(Cer), 또는 이들의 혼합물을 포함하는 폴리에틸렌글리콜(PEG)-지질일 수 있다. PEG-DAA 접합체는, 예를 들어, PEG-다이라우릴옥시프로필(C_{12}), PEG-다이미리스틸옥시프로필(C_{14}), PEG-다이팔미틸옥시프로필(C_{16}) 또는 PEG-다이스테아릴옥시프로필(C_{18})일 수 있다. 입자의 응집을 방지하는 접합된 지질은, 예를 들어, 입자에 존재하는 총 지질의 0 mol% 내지 약 20 mol% 또는 약 2 mol%일 수 있다.

[0581] 몇몇 실시형태에서, 핵산-지질 입자는, 콜레스테롤을, 예컨대, 입자에 존재하는 총 지질의 약 10 mol% 내지 약 60 mol% 또는 약 50 mol%로 더 포함한다.

[0582] *B. 병용 요법*

[0583] 본 발명의 방법은 단독으로 또는 추가의 치료제, 예컨대, 장애와 연관된 동일한 장에 또는 증상을 치료하는 다른 제제와 조합하여, 또는 장애에 대한 다른 유형의 요법과 조합하여 사용될 수 있다. 병용 치료에서, 1종 이상의 치료용 화합물의 투여량은 단독으로 투여될 경우 표준 투여량으로부터 저감될 수 있다. 예를 들어, 용량은 약물 조합 및 순열로부터 실험적으로 결정될 수 있거나, 또는 등효과선 분석(isobolographic analysis)에 의해 저감될 수 있다(예컨대, 문헌[Black et al., Neurology 65:S3-S6 (2005)]). 이 경우에, 조합될 경우 화합물의

투여량은 치료 효과를 제공해야 한다.

[0584] 몇몇 실시형태에서, 제2 치료제는 화학요법제(예컨대, 장애의 치료에 유용한 세포독성제 또는 기타 화학적 화합물)이다.

[0585] 제2 제제는 비-약물 치료인 치료제일 수 있다. 예를 들어, 제2 치료제는 물리적 요법이다.

[0586] 본 명세서에 기재된 임의의 조합 실시형태에서, 제1 및 제2 치료제는 어느 순서로든 동시에 또는 순차적으로 투여된다. 제1 치료제는 제2 치료제 전 또는 후 즉시, 최대 1시간, 최대 2시간, 최대 3시간, 최대 4시간, 최대 5시간, 최대 6시간, 최대 7시간, 최대, 8시간, 최대 9시간, 최대 10시간, 최대 11시간, 최대 12시간, 최대 13시간, 14시간, 최대시간 16, 최대 17시간, 최대 18시간, 최대 19시간 최대 20시간, 최대 21시간, 최대 22시간, 최대 23시간 최대 24시간 또는 최대 1 내지 7, 1 내지 14, 1 내지 21 또는 1 내지 30일에 투여될 수 있다.

[0587] **IV. 약제학적 조성물**

[0588] 본 명세서에 기재된 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 생체내 투여에 적합한 생물학적으로 양립 가능한 형태로 인간 대상체에게 투여용으로 약제학적 조성물로 제형화된다.

[0589] 본 명세서에 기재된 화합물은 유리 염기의 형태로, 염, 용매화물의 형태로 그리고 전구약물로서 사용될 수 있다. 모든 형태는 본 명세서에 기재된 방법 내이다. 본 발명의 방법에 따르면, 기재된 화합물 또는 이의 염, 용매화물 또는 전구약물은 선택된 투여 경로에 따라서 다양한 형태로 환자에게 투여될 수 있는데, 이는 당업자에 의해 이해될 것이다. 본 명세서에 기재된 화합물은, 예를 들어, 경구, 비경구, 척수강내, 뇌실내, 뇌실질내, 협측, 설하, 비강, 직장, 패치, 펌프, 종양내, 또는 경피 투여에 의해, 이에 따라 제형화된 약제학적 조성물이 투여될 수 있다. 비경구 투여는 정맥내, 복강내, 피하, 근육내, 경상피, 비강, 폐내, 척추강내, 뇌실내, 뇌실질내, 직장 및 국소 투여 방식을 포함한다. 비경구 투여는 선택된 기간에 걸쳐서 연속 주입에 의해 이루어질 수 있다.

[0590] 본 명세서에 기재된 화합물은, 예를 들어, 불활성 희석제 또는 동화 가능한 식용 담체와 함께 경구 투여될 수 있거나, 경질 또는 연질 쉘 젤라틴 캡슐에 포함될 수 있거나, 정제로 압축될 수 있거나, 다이어트 식품으로 직접 혼입될 수 있다. 경구 치료 투여를 위해, 본 명세서에 기재된 화합물은 부형제와 혼입될 수 있고 섭취가능한 정제, 구강 정제, 트로키제, 캡슐제, 엘릭시르, 현탁액, 시럽 및 웨이퍼의 형태로 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 화합물은 또한 비경구적으로 투여될 수 있다. 본 명세서에 기재된 화합물의 용액은 히드록시프로필셀룰로스와 같은 계면활성제와 적절하게 혼합된 물에서 제조될 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, DMSO 및 알코올이 있거나 없는 이들의 혼합물과 그리고 오일에서 제조될 수 있다. 일반적인 보관 및 사용 조건 하에서, 이러한 제제는 미생물의 성장을 방지하기 위해 방부제를 함유할 수 있다. 적합한 제형의 선택 및 제조를 위한 통상의 절차 및 성분은, 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (2012, 22nd ed.) 및 The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 41 NF 36), 2018년에 간행]에 기재되어 있다. 주사용으로 적합한 약제학적 형태는 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 주사액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에 형태는 멸균 상태이어야 하고 주사기를 통해 용이하게 투여될 수 있을 정도로 유체이어야 한다. 비강 투여용 조성물은 에어로졸, 점적제, 겔 및 분말로서 편리하게 제형화될 수 있다. 에어로졸 제형은 전형적으로 생리학적으로 허용 가능한 수성 또는 비수성 용매에 활성 물질의 용액 또는 미세 현탁액을 포함하며, 통상적으로 분무화 디바이스와 함께 사용하기 위하여 카트리지 또는 리필 형태를 취할 수 있는 밀봉된 용기에 멸균 형태로 단일 또는 다회 용량으로 제공된다. 대안적으로, 밀봉된 용기는 단일 투여량 비강 흡입기 또는 사용 후 폐기용으로 의도된 계량 밸브가 장착된 에어로졸 분배기와 같은 단일 분배 디바이스일 수 있다. 투여 형태가 에어로졸 디스펜서를 포함하는 경우, 압축 공기와 같은 압축 가스 또는 플루오로클로로탄화수소와 같은 유기 추진제일 수 있는 추진제를 함유할 것이다. 에어로졸 투여 형태는 또한 펌프 분무기의 형태를 취할 수 있다. 협측 또는 설하 투여에 적합한 조성물은 정제, 로젠지 및 패스틸(pastille)을 포함하며, 여기서 활성 성분은 당, 아카시아, 트래거캔스, 젤라틴 및 글리세린과 같은 담체와 함께 제형화된다. 직장 투여용 조성물은 편리하게는 코코아 버터와 같은 통상적인 좌약 기제를 함유하는 좌제의 형태이다. 본 명세서에 기재된 화합물은 종양내, 예를 들어, 종양내 주사로서 투여될 수 있다. 종양내 주사는 종양 맥관 구조에 직접 주사하는 것이며, 특별히 분리된 고형의 접근 가능한 종양에 대해 상정된다. 국소, 국부 또는 전신 투여가 또한 적절할 수 있다. 본 명세서에 기재된 화합물은 유리하게는 종양에 주사액 또는 다회 주사액을 투여함으로써, 예를 들어, 대략 1㎝ 간격으로 이격될 수 있다. 수술적 개입의 경우에, 본 발명은 예를 들어 수술 불가능한 종양이 절제 대상이 되도록 하기 위해 수술 전에 사용될 수 있다. 연속 투여는 또한 예를 들어 카테터를 종양 또는 종양 맥관 구조에 이식함으로써 적용될 수 있다.

[0591] 본 명세서에 기재된 화합물은, 본 명세서에 언급된 바와 같이, 단독으로 또는 약제학적으로 허용 가능한 담체와 조합하여 동물, 예컨대, 인간에게 투여될 수 있고, 그 비율은 화합물의 용해도 및 화학적 속성, 선택된 투여 경로, 및 표준 약제학적 관행에 의해 결정된다.

[0592] **V. 투여량**

[0593] 본 명세서에 기재된 조성물(예컨대, 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 조성물)의 투여량은, 많은 인자, 예컨대, 화합물의 약역학적 특성; 수용자의 연령, 건강 및 체중; 증상의 속성 및 정도; 치료 빈도 및 존재할 경우 동시 치료의 유형; 및 치료될 동물에서의 화합물의 청소율에 따라서 변할 수 있다. 당업자라면 상기 인자에 기초하여 적절한 투여량을 결정할 수 있다. 본 명세서에 기재된 조성물은 임상 반응에 따라서, 필요에 따라, 조절될 수 있는 적합한 투여량으로 초기에 투여될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 조성물(예컨대, 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 조성물)의 투여량은 예방적 또는 치료적 유효량이다.

[0594] **VI. 키트**

[0595] 본 발명은 또한 (a) 본 명세서에 기재된 세포 또는 대상체에서 mRNA 내 아데노신의 탈아미노화를 초래하는 올리고뉴클레오타이드 제제를 포함하는 약제학적 조성물 및 (b) 본 명세서에 기재된 임의의 방법을 수행하기 위한 설명서를 가진 패키지 삽입물을 포함하는 키트를 특징으로 한다. 몇몇 실시형태에서, 키트는 (a) 본 명세서에 기재된 세포 또는 대상체에서 mRNA 내 아데노신의 탈아미노화를 초래하는 올리고뉴클레오타이드 제제를 포함하는 약제학적 조성물, (b) 추가의 치료제, 및 (c) 본 명세서에 기재된 임의의 방법을 수행하기 위한 설명서를 가진 패키지 삽입물을 포함한다.

[0596] **실시예**

[0597] **일반적인 방법**

[0598] 모든 가이드 올리고뉴클레오타이드는 표준 β-사이아노에틸포스포라미다이트 화학을 이용해서 자동화 RNA/DNA 합성기 및 제어된 기공 유리(controlled pore glass: CPG)와 같은 범용 고체 지지체 상에서 화학적으로 합성되었다. N-보호된 β-호모-DNA의 포스포라미다이트는 보고된 절차를 이용해서 합성되었다. 문헌[Matheus Froeyen et al., (2001) Chem. Eur. J., 7: 5183-5794, Herdewijn, (2010) Chem. Biodivers., 7: 1-59, Jabgunde et al., (2019) Tetrahedron, 75: 1107-1114]을 참조한다. 기타 5'-O-DMT-3'-포스포라미다이트 RNA, 2'-O-메틸-RNA 및 DNA 단량체, 즉, A, C, G, U 및 T는 화학적 공급원으로부터 구입하였다. 모든 올리고뉴클레오타이드는 200 nmol 규모에서 BioSpring GmbH(독일 프랑크푸르트 소재)에 의해 합성되었다. 합성 후, 올리고뉴클레오타이드를 고체 지지체로부터 절단하고, 탈보호시키고, 표준 프로토콜을 이용해서 HPLC 시스템에 의해 정제하였다. 올리고뉴클레오타이드를 탈염시키고, 투석하고, 동결건조시켰다. 이러한 동결건조된 올리고의 순도는 분석적 역상 HPLC에 의해 결정된 바 95% 이상이었다. 올리고뉴클레오타이드의 서열 무결성은 ESI-MS에 의해 결정되었다.

[0599] BamHI 및 XbaI 제한 부위(Quintara Bio, 캘리포니아 버클리 소재)를 이용해서 CMV 프로모터의 제어 하에 인간 ADAR2 서열(NM_001112.4)을 pcDNA3.1 플라스미드에 클로닝시키고 올바른 삽입물을 서열 검증하였다. 이제부터 이 플라스미드는 ADAR2/pcDNA3.1로 지칭될 것이다. 편집 실험을 위하여, 10㎝ 접시당 25㎕의 Lipofectamine 3000 및 24㎕의 P3000(Life Technologies)을 이용해서 2㎍의 ADAR2/pcDNA3.1 플라스미드를 5×10^6 HEK293T 세포(ATCC)에 형질주입하였다. 4시간 후에, 배양 배지를 신선한 가온된 배지(DMEM High Glucose; Life Technologies)로 보충하였다. 형질주입 후 12 내지 16시간에, 형질주입된 HEK293T 세포를 각 웰 내 최종 농도가 100nM이 되도록 가이드 올리고뉴클레오타이드로 형질주입시켰다. 모든 형질주입은 제조사의 지시에 따라서 96-웰 포맷으로 Lipofectamine 3000(0.4 ㎖/웰당)으로 수행되었다. 두 번째 형질주입 후 12 내지 16시간에, 세포를 빙랭 PBS로 한번 세척하고, 제조사의 지시에 따라서 KingFisher Flex Purification(Life Technologies)에 적합화된 Dyna Beads mRNA Direct Kit(Life Technologies)를 이용해서 총 mRNA 단리를 수행하였다. 샘플을 용리 전에 TURBO DNase(Life Technologies)로 처리하였다. 얻어진 단리된 mRNA는 제조사의 지시에 따라서 SuperScript IV Vilo(Life Technologies)를 이용해서 cDNA 합성을 위하여 사용하였다. 유전자 특정 프라이머를 이용해서 1㎕의 cDNA를 PCR용 주형(Platinum II Hot-Start PCR Master Mix; Life Technologies)으로서 사용해서 Sanger 시퀀싱용 앰플리콘(표 5)을 생성하였다. Sanger 시퀀싱은 Quintara Biosciences(캘리포니아 버클리 소재)에 의해 수행하였다. 아데노신 대 구아노신 편집 수율은 아데노신 및 구아노신의 피크 높이를 측정하고 구아노신 피크 높이를 조합된 아데노신과 구아노신의 총 피크 높이 측정치로 나눔으로써 정량하였다.

표 5

RT-PCR에 사용되는 프라이머

명칭	서열 (5' 에서 3'로)	서열번호
RAB7A 부위 1 정방향	ACAGTATCCATTTATTATGTAATGCTTCTTAG	61
RAB7A 부위 1 역방향	TGAAAGGAGCGCCTTCTAGAAC	62

[0600]

[0601] **실시예 1: 인간 RAB7A 3'-UTR 표적(UAG)를 표적으로 하는 신규한 뉴클레오타이드 변형을 갖는 가이드 올리고뉴클레오타이드의 설계**

[0602] **인간 RAB7A(3'-UTR)를 표적으로 하는 가이드 올리고뉴클레오타이드:**

[0603] 5'-CAGAGUGUUACUCAGAAUUGGGAAAUCCAGCUAGCGGCAGUAUUCUGUACAGUAGACACAAGAAUUAUGUACGCCUUUUAUCAAAGAC-3' 서열번호 63
3'-CCCUUUAGGUCGACCGCCGUCAUAAGACAUGUCAUCUGUGUUCUUAAUAC-5' (gRNA) 서열번호 64

[0604] 이하의 표 6에는 UAG 3문자 배열을 가진 인간 RAB7A를 표적화하는 예시적인 변형된 가이드 올리고뉴클레오타이드가 표시되어 있다. 표 6에서, A, C, G 및 U는 리보뉴클레오사이드이고; 중앙의 3문자 배열에 밑줄쳐 있고 볼드체로 되어 있으며; mA, mC, mG 및 mU는 2'-O-메틸 리보뉴클레오사이드이고; hC는 β-D-호모DNA-사이티딘(화학식 II, R^8 = 수소, R^9 = 수소 및 N^1 = 사이토신)을 나타내고; 그리고 별표는 포스포로티오에이트 링키지를 나타낸다(나머지 링키지는 포스포다이에스터 링키지이다).

표 6

인간 RAB7A 3'-UTR 표적(UAG)을 표적화하는 가이드 올리고뉴클레오타이드

서열번호	20% 2'-O-메틸 변형(5' 에서 3'로)을 가진 서열	편집 (%)	SD
51	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**CCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	22.35	7.42
52	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**hCCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3"	17.55	9.60
53	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**ChCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3"	25.74	4.73
	50% 2'-O-메틸 변형(5' 에서 3'로)을 가진 서열		
54	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmG AAUmAmCUGCmCmG**CCA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	17.17	5.26
55	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**hCCA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3"	9.19	0.79
56	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**ChCA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3"	26.76	9.83

[0605]

[0606] **기타 실시형태**

[0607] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 마치 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 그 전

문이 참조에 의해 원용되는 것으로 구체적이고 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용된다. 본 출원에서의 용어가 본 명세서에 참조에 의해 원용된 문서에서 다르게 정의된 것으로 밝혀진 경우, 본 명세서에 제공된 정의는 용어에 대한 정의로 작용하는 것이다.

[0608] 본 발명은 그 특정 실시형태와 관련하여 설명되었지만, 본 발명은 추가의 변형이 가능하며 본 출원은 일반적으로 본 발명의 원리를 따르고 본 발명의 속하는 기술 내에서 공지된 또는 관례적인 관행 내에 있고 앞에서 제시된 필수 특징부에 적용될 수 있고 청구범위의 범주 내에 따르는 본 개시내용으로부터의 그러한 이탈을 포함하는 본 발명의 임의의 변형, 사용 또는 개조를 포함하도록 의도된 것으로 이해된다.

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> KORRO BIO, INC.

<120> RNA-EDITING OLIGONUCLEOTIDES AND USES THEREOF

<130> WO2020/154343

<140> PCT/US2020/014511

<141> 2020-01-22

<150> US 62/900,017

<151> 2019-09-13

<150> US 62/822,586

<151> 2019-03-22

<150> US 62/795,348

<151> 2019-01-22

<160> 64

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 1

ggugaauagu auaacaauau 20

<210> 2

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

auguuguuau aguauccacc 20

<210> 3

<211> 45

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

ggugaauagu auaacaauau gcuaaauguu guuauaguau ccacc 45

<210> 4

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

ggugaagagg agaacaauau 20

<210> 5

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 5

auguuguucu cgucuccacc 20

<210> 6

<211> 45

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 6

ggugaagagg agaacaauau gcuaaauguu guucucgucu ccacc 45

<210> 7

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 7

ggugucgaga agaggagaac aauau 25

<210> 8

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 8

auguuguucu cgucuccucg acacc 25

<210> 9

<211> 55

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 9

ggugucgaga agaggagaac aauaugcuaa auguuguucu cgucuccucg acacc 55

<210> 10

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 10

ggguggaaua guauaacaau au 22

<210> 11

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 11

auguuguuau aguaucccac cu 22

<210> 12

<211> 49

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 12

ggguggaaua guauaacaau augcuaaaug uuguuauagu aucccaccu 49

<210> 13

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 13

guggaauagu auaacaauau 20

<210> 14

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 14

auguuguuau aguaucccac 20

<210> 15

<211> 45

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 15

guggaauagu auaacaauau gcuaaauguu guuauaguau cccac 45

<210> 16

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 16

ggugucgaga auaguauaac aauau 25

<210> 17

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 17

auguuguuau aguauccucg acacc 25

<210> 18

<211> 55

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 18

ggugucgaga auaguauaac aauaugcuaa auguuguuau aguauccucg acacc 55

<210> 19

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 19

ggguggaaua guauaacaau au 22

<210> 20

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 20

auguuguuau aguaucccac cu 22

<210> 21

<211> 49

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 21

ggguggaaua guauaacaau augcuaaaug uuguuauagu aucccaccu 49

<210> 22

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 22

ggguggaaua guauacca 18

<210> 23

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 23

ugguauagua ucccaccu 18

<210> 24

<211> 40

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 24

ggguggaaua guauaccauu cgugguauag uaucccaccu 40

<210> 25

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 25

guggguggaa uaguauacca 20

<210> 26

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 26

ugguauagua ucccaccuac 20

<210> 27

<211> 44

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 27

guggguggaa uaguauacca uucgugguau aguaucccac cuac 44

<210> 28

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 28

uggguggaau aguauacca 19

<210> 29

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 29

ugguauagua ucccaccua 19

<210> 30

<211> 42

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 30

uggguggaau aguauaccau ucgugguaua guaucccacc ua 42

<210> 31

<211> 17

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 31

gguggaauag uauacca 17

<210> 32

<211> 17

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 32

ugguauagua ucccacc 17

<210> 33

<211> 38

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 33

gguggaauag uauaccauuc gugguauagu aucccacc 38

<210> 34

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 34

guggaauagu auacca 16

<210> 35

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 35

ugguauagua ucccac 16

<210> 36

<211> 36

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 36

guggaauagu auaccauucg ugguauagua ucccac 36

<210> 37

<211> 45

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 37

ggugaauagu auaacaauau gcuaaauguu guuauaguau ccacc 45

<210> 38

<211> 45

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 38

ggugaagagg agaacaauau gcuaaauguu guucucgucu ccacc 45

<210> 39

<211> 55

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 39

ggugucgaga agaggagaac aauaugcuaa auguuguucu cgucuccucg acacc 55

<210> 40

<211> 55

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> n is a 2'-O-methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> n is a 2'-O-methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> n is a 2'-O-methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> n is a 2'-O-methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> n is a 2'-O-methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (27)..(28)

<223> n is a 2'-O-methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> n is a 2'-O-methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(35)

<223> n is a 2'-O-methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(41)

<223> n is a 2'-O-methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(49)

<223> n is a 2'-O-methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (52)..(52)

<223> n is a 2'-O-methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (54)..(55)

<223> n is a 2'-O-methyl nucleotide

<400> 40

nnngnngaga agaggagaan aanangnnaa angnngnnnn ngnnnnnnng anann 55

<210> 41

<211> 49

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 41

ggguggaaua guauaacaau augcuaaaug uuguuauagu aucccaccu 49

<210> 42

<211> 45

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 42

guggaauagu auaacaauau gcuaaauguu guuauaguau cccac 45

<210> 43

<211> 55

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 43

ggugucgaga auaguauaac aauaugcuaa auguuguuau aguauccucg acacc 55

<210> 44

<211> 49

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 44

ggguggaaua guauaacaau augcuaaaug uuguuauagu aucccaccu 49

<210> 45

<211> 40

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 45

ggguggaaua guauaccauu cgugguauag uaucccaccu 40

<210> 46

<211> 44

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 46

guggguggaa uaguauacca uucgugguau aguaucccac cuac 44

<210> 47

<211> 42

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 47

uggguggaau aguauaccau ucgugguaua guaucccacc ua 42

<210> 48

<211> 38

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 48

gguggaauag uauaccauuc gugguauagu aucccacc 38

<210> 49

<211> 36

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 49

guggaauagu auaccauucg ugguauagua ucccac 36

<210> 50

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 50

acatgaggat cacccatgt 19

<210> 51

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (46)..(47)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (48)..(50)

<223> 2'-O-methylcytidine

<400> 51

cauaauucuu gugucuacug uacagaauac ugccgccagc uggauuuccc 50

<210> 52

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (36)..(36)

<223> Beta-D-homoDNA-cytidine

<220><221> modified_base

<222> (46)..(47)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (48)..(50)

<223> 2'-O-methylcytidine

<400> 52

cauaauucuu gugucuacug uacagaauac ugccgccagc uggauuuccc 50

<210> 53

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (37)..(37)

<223> Beta-D-homoDNA-cytidine

<220><221> modified_base

<222

> (46)..(47)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (48)..(50)

<223> 2'-O-methylcytidine

<400> 53

cauaauucuu gugucuacug uacagaauac ugccgccagc uggauuuccc 50

<210> 54

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base
<222> (4)..(5)
<223> 2'-O-methyladenosine
<220><221> modified_base
<222> (9)..(10)
<223> 2'-O-methyluridine
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-O-methyluridine
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-methylcytidine
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-methyluridine
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-O-methylguanosine
<220><221> modified_base
<222> (24)..(24)
<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base
<222> (25)..(25)
<223> 2'-O-methylguanosine
<220><221> modified_base
<222> (29)..(29)
<223> 2'-O-methyladenosine
<220><221> modified_base
<222> (30)..(30)
<223> 2'-O-methylcytidine
<220><221> modified_base
<222> (34)..(34)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (35)..(35)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (39)..(39)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (40)..(40)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (43)..(43)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (44)..(44)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (46)..(47)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (48)..(50)

<223> 2'-O-methylcytidine

<400> 54

cauaauucuu gugucuacug uacagaauac ugccgccagc uggauuuccc 50

<210> 55

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (9)..(10)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (24)..(24)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (25)..(25)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (29)..(29)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (30)..(30)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (34)..(34)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (35)..(35)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (36)..(36)

<223> Beta-D-homoDNA-cytidine

<220><221> modified_base

<222> (39)..(39)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (40)..(40)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (43)..(43)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (44)..(44)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (46)..(47)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (48)..(50)

<223> 2'-O-methylcytidine

<400> 55

cauaauucuu gugucuacug uacagaauac ugccgccagc uggauuuccc 50

<210> 56

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223

> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (9)..(10)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222

> (24)..(24)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (25)..(25)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (29)..(29)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (30)..(30)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (34)..(34)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (35)..(35)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (37)..(37)

<223> Beta-D-homoDNA-cytidine

<220><221> modified_base

<222> (39)..(39)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (40)..(40)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (43)..(43)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (44)..(44)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (46)..(47)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (48)..(50)

<223> 2'-O-methylcytidine

<400> 56

cauaauucuu gugucuacug uacagaauac ugccgccagc uggauuuccc 50

<210> 57

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro

1 5 10 15

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 58

Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro

1 5 10

<210> 59

<211> 13

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 59

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln

1 5 10

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> Drosophila Antennapedia

<400> 60

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 61

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 61

acagtatcca tttattatgt aatgcttctt ag 32

<210> 62

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 62

tgaaaggagc gccttctaga ac 22

<210> 63

<211> 88

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 63

cagaguguua cucagaauug ggaaauccag cuagcggcag uauucuguac aguagacaca 60

agaauuaugu acgccuuuua ucaaagac 88

<210> 64

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 64

cauaauucuu gugucuacug uacagaauac ugccgccagc uggauuuccc 50