



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

(11) 공개번호 10-2024-0141197  
(43) 공개일자 2024년09월25일

- |   |   |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/><i>C12N 15/113</i> (2010.01) <i>A61K 31/7088</i> (2006.01)<br/><i>A61P 25/28</i> (2006.01) <i>C07H 21/04</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/><i>C12N 15/113</i> (2013.01)<br/><i>A61K 31/7088</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7028814</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2023년02월02일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2024년08월27일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/AU2023/050067</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2023/147630<br/>국제공개일자 2023년08월10일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>2022900200 2022년02월02일 오스트레일리아(AU)</p> | <p>(71) 출원인<br/>페론 인스티튜트 포 뉴로로지컬 앤드 트랜스레이셔널 사이언스 리미티드<br/>오스트레일리아, 웨스턴 오스트레일리아 6009, 네들랜즈, 8 베르둔 스트리트, 큐이아이아이 메이컬 센터, 알알 블록, 그라운드 플로어</p> <p>(72) 발명자<br/>메지니 리타<br/>오스트레일리아, 웨스턴 오스트레일리아 6164, 양게부프, 2 라크스퍼 크로스<br/>아카리 패트릭 안토니<br/>오스트레일리아, 웨스턴 오스트레일리아 6027, 물랄루, 136 뎀피어 애비뉴<br/>플린 로렌 루이스<br/>오스트레일리아, 웨스턴 오스트레일리아 6018, 카리뉴프, 9 락클리프 애비뉴</p> <p>(74) 대리인<br/>특허법인한얼</p> |
|---|---|

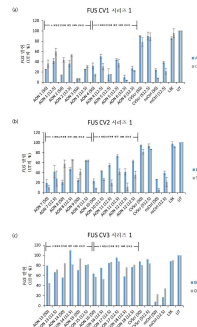
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 **병원성 FUS 변이체와 관련된 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 단백질 FUS 또는 이의 변이체를 코딩하는 FUS 유전자의 선택된 대립유전자의 발현을 감소시키기 위해 사용되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 분야에 관한 것이다. 발명은 또한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 FUS 또는 이의 변이체에 대해 표적화된 AON을 포함하는 치료용 조성물의 투여에 의해 병원성 FUS 유전적 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료하는 약학적 조성물 및 방법을 제공한다.

**대표도**



(52) CPC특허분류

*A61P 25/28* (2018.01)

*C07H 21/04* (2013.01)

*C12N 2310/11* (2013.01)

*C12N 2310/314* (2013.01)

*C12N 2310/315* (2013.01)

*C12N 2310/3233* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

FUS pre-mRNA 또는 mRNA를 코딩하는(encoding) 핵산 분자에 대해 표적화(targeting)되는 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide)로서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는

- a. 서열 번호 1 내지 서열 번호 34 또는 이의 변이체로 이루어진 목록으로부터 선택되거나; 또는
- b. 서열 번호 1 내지 서열 번호 34 또는 이의 변이체가 또한 결합되는 표적 FUS pre-mRNA 또는 mRNA에서의 적어도 1개 이상의 인접한 핵염기(contiguous nucleobase)에 대해 상보성인

핵염기 서열(nucleobase sequence)을 가지며,

여기서 안티센스 올리고뉴클레오티드는 FUS 유전자 또는 이의 FUS 유전자 변이체의 적어도 하나의 대립유전자의 발현을 억제하고,

안티센스 올리고뉴클레오티드는 실질적으로 단리되거나 또는 정제되는, 안티센스 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 대립유전자는 FUS 유전자의 병원성 변이체를 포함하는, 안티센스 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 병원성 변이체는 질환에 대한 대상체(subject)의 감수성(susceptibility) 또는 소인(predisposition)을 증가시키는 유전적 변경(genetic alteration)인, 안티센스 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 질환은 ALS, FTD, ET로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 질환은 ALS 또는 FTD로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 질환은 FUS-ALS 또는 FUS-FTD로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, FUS의 엑손 3, 엑손 4 또는 3'UTR 내에 포함된 전사체의 영역(area)에 결합되는, 안티센스 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 CV (rs741810), CV2 (rs1052352), 또는 CV3 (rs4889537)을 포함하는 전사체의 영역에 결합되는, 안티센스 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 존재하는 정상(normal) mRNA를 충분히 남겨 상당한 양의 단백질을 생산하면서, FUS 또는 이의 FUS 변이체의 pre-mRNA 및/또는 mRNA의 하나의 대립유전자의 발현을 선택적으로 녹다운(knock down)시키는, 안티센스 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, FUS pre-mRNA 및/또는 FUS mRNA의 RNase H 매개 분해(mediated

degradation)를 유도하는, 안티센스 올리고뉴클레오티드.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 티오포스포라미데이트 모르폴리노 올리고머 (TMO) 키메라(chimera)인, 안티센스 올리고뉴클레오티드.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 티오포스포라미데이트 모르폴리노 올리고머 (TMO) 키메라는 TMO 및 포스포로티오에이트 DNA 또는 DNA 서브유닛(subunit)을 포함하는 갭머 디자인(gapmer design)을 갖는, 안티센스 올리고뉴클레오티드.

**청구항 13**

제11항 또는 제12항에 있어서, 펩티드-티오포스포라미데이트 모르폴리노 올리고머 (TMO) 키메라 접합체(chimera conjugate)인, 안티센스 올리고뉴클레오티드.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 1 내지 12로 이루어진 목록으로부터 선택되는, 안티센스 올리고뉴클레오티드.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 서열 번호 2, 4, 5, 8, 또는 11인, 안티센스 올리고뉴클레오티드.

**청구항 16**

FUS pre-mRNA 및 mRNA의 선택된 대립유전자의 선택적 녹다운을 유도하는 방법으로서, 상기 방법은

- a) 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드 중 하나 이상을 제공하는 단계; 및
- b) 올리고머(들)를 표적 핵산 부위(target nucleic acid site)에 결합할 수 있도록 하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 17**

FUS 유전자의 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하는 조성물로서, 상기 조성물은

- a) 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오티드; 및
- b) 하나 이상의 치료적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제를 포함하는 조성물.

**청구항 18**

FUS 유전자의 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하는 약학적 조성물로서, 상기 조성물은

- a) 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오티드; 및
- b) 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물.

**청구항 19**

FUS 유전자의 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하는 방법으로서, 상기 방법은 제18항의 약학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 병원성 변이체는 질환에 대한 대상체의 감수성 또는 소인을 증가시키는 유전적 변경인, 방법.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 질환은 ALS, FTD, 또는 ET로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 질환은 ALS 또는 FTD로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 질환은 FUS-ALS 또는 FUS-FTD로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 24**

바이오마커(biomarker)에 의해 확인된 환자에서 FUS 유전자의 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 방법으로서, 상기 방법은

a) FUS 단백질 병증(proteinopathy)과 관련된 질환과 관련된 바이오마커의 존재에 대해 대상체를 시험하는 단계로서, 여기서 환자는 FUS 억제에 반응할 가능성이 있는 것인 단계; 및

b) 대상체가 바이오마커를 발현하는 것으로 밝혀진 경우, 제18항의 약학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계

를 포함하는 방법.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 질환은 ALS 또는 FTD로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 26**

제24항에 있어서, 바이오마커는 FUS 유전자의 병원성 변이체인, 방법.

**청구항 27**

대상체에서 선택된 FUS 대립유전자의 발현을 감소시키고/시키거나, 대상체에서의 자가 조절(auto regulation)에 의해 야기되는 FUS의 과발현을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 제18항의 약학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 28**

(1) 대상체에서 선택된 FUS 대립유전자의 발현을 감소시키고/시키거나;

(2) 대상체에서의 자가 조절에 의해 야기되는 FUS의 과발현을 감소시키는

방법으로서,

상기 방법은

(a) 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오티드;

(b) 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제

를 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 29**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터(expression vector).

**청구항 30**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 세포.

**청구항 31**

FUS 유전자의 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하는 의약(medicament)의 제조를 위한, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드의 용도.

**청구항 32**

FUS 유전자의 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하기 위한, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드의 용도.

**청구항 33**

제31항 또는 제32항에 있어서, 질환은 ALS 또는 FTD로 이루어진 군으로부터 선택되는, 용도.

**청구항 34**

대상체에서 병원성 FUS 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하는 키트(kit)로서, 여기서 상기 키트는 이의 사용을 위한 설명서와 함께, 적합한 용기에 패키징(packaging)되는, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 키트.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 FUS RNA 결합 단백질 (Fused in Sarcoma로도 알려짐)을 코딩(encoding)하는 FUS 유전자의 발현을 감소시키는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (antisense oligonucleotide; AON)와 관련된다. 발명은 신경퇴행성 질환 (neurodegenerative disease)과 관련된 병원성 변이를 함유하는 FUS의 발현을 감소시키기 위한 AON의 투여에 의해 FUS 전사체의 특정 대립유전자의 발현을 선택적으로 감소시키는 방법을 제공한다.

**배경 기술**

[0002] 배경 기술에 대한 다음의 논의는 단지 본 발명에 대한 이해를 용이하게 하기 위한 것으로 의도된다. 논의는 언급된 자료 중 임의의 것이 출원의 우선일 시점에서의 일반적 범용 지식의 일부이거나 일부이었던 것을 시인하거나 인정하는 것은 아니다.

[0003] FUS

[0004] FUS는 RNA 결합 단백질의 FET 계열에 속하는 흔히 발현되는 526개의 아미노산 단백질을 코딩한다. FUS는 정상적인 생리학적 조건하에서는 주로 핵에 편재되어 있지만, 세포질을 가로질러 핵과 세포질 간의 수송에 있어서 기능한다. FUS는 전사, pre-mRNA 스플라이싱(splicing), RNA 수송 및 번역 조절을 포함하는 다양한 범위의 세포 과정에서 기능한다. FUS는 DNA 이중-가닥 절단 복구 과정에서의 상동 재조합 및 비-상동 말단 연결 둘 모두를 포함하는 DNA 복구 메커니즘에도 관여한다. 추가적으로, FUS는 다양한 유형의 스트레스에 대한 세포 방어를 제공하는 파라스펙클(paraspeckle)의 형성에 있어서 역할을 한다.

[0005] 근위축성 측삭 경화증 (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS)에 이환된 개체의 최대 10%는 적어도 한 명의 다른 이환된 가족 구성원을 가지며, 가족성 ALS (fALS)를 가지는 것으로 정의되며; 이들 사례의 거의 모두는 상염색체 우성 방식으로 유전되는 것으로 밝혀졌다. ALS 사례의 나머지 90 내지 95%는 이전 가족력이 없는 사람에게서 발생하고; 이들 개체는 산발성 ALS (sALS)를 가지는 것으로 언급된다. FUS에서의 병원성 변이는 fALS 사례의 대략 5% 그리고 sALS 사례의 1% 미만에 관여한다.

[0006] 50개 초과 상염색체 우성 FUS 변이체는 현재 ALS 환자에서 확인되었다. 대부분은 미스센스 돌연변이이지만, 드문 경우에 삽입, 결실, 스플라이싱 및 넌센스 돌연변이가 보고되었다. 많은 병원성 변이체는 핵 위치 신호(nuclear localization signal) 내에 밀집되어, 세포질로의 FUS의 재분포를 초래한다. 다른 것들은 글리신 및 아르기닌-풍부 영역, 프리온-유사 도메인 및 3'UTR에서 발생한다. 일부 영역 내의 변이체는 단백질의 단단한 응집체를 형성하는 경향을 증가시키는 것으로 보이며, 이는 FUS 관련 ALS에서 작용하는 다양한 병리 메커니즘을 시사한다.

- [0007] FUS는 엑손 7의 발현을 억제하는 그것 자체의 pre-mRNA에 대한 단백질 결합을 포함하는 하나의 메커니즘으로 자가 조절(autoregulating)된다. 엑손-7 스킵 스플라이스 변이체(exon-7 skipped splice variant)의 프레임시프트는 넌센스 매개 분해(nonsense mediated decay)에 영향을 받은 전사체와 함께 조기 종결 코돈을 야기한다. FUS-ALS (FUS-근위축성 측삭 경화증) 및 FUS-FTD (FUS-전두측두엽 치매(frontotemporal dementia))에서, 세포질에의 FUS 비정상 위치(mislocalisation)로 인해 자가 조절이 손상될 수 있고 이는 과발현을 일으킬 수 있다.
- [0008] 손상된 세포 기능은 또한 스플라이싱 결함, DNA 손상을 야기하고, FUS 자가 조절을 손상시키는 것으로 보고된 병원성 FUS 변이체의 직접적인 결과일 수 있다. 추가적으로, 가능하게는 그것의 프리온-유사 단백질 도메인에 의해 매개되는 FUS-ALS의 질환 확산 메커니즘의 시사가 존재한다.
- [0009] 기능 상실 또는 기능 획득 메커니즘이 FUS-ALS의 질환을 야기하는 정도에 대한 논쟁은 지속되고 있다. FUS 기능 상실 이론은 FUS의 병적인 세포질 재분포가 그것이 핵에서의 그것의 기능을 수행할 수 없게 만든다는 것을 가정한다. 마우스 모델로부터의 증거는 FUS의 상실이 ALS를 일으키는 데 충분하지 않다는 것을 제시하였다. 그러나, 초파리 FUS 녹다운 모델(Drosophila FUS knockdown model)이 사용되고 이에 의해 FUS 동족체 카베자(FUS orthologue Cabeza)의 녹아웃 이후 신경세포 변성 및 운동 결함으로 이어지는 경우에 결과들이 서로 모순되었다.
- [0010] FUS-ALS에서 작동하는 기능 획득 메커니즘에 대한 강력한 증거가 존재한다. 야생형 인간 FUS를 과발현하는 형질 전환 마우스 모델은 운동 신경 변성의 공격적 표현형 및 세포질 FUS 축적의 증거를 보이는 것으로 보고된 바 있다. 독성이 주로 FUS 응집체에 의해 직접적으로 매개되는지, 또는 그것의 재분포 후 세포질에서의 가용성 FUS의 증가로 인해 매개되는지 여부 대해서 논쟁이 있다. 세포질 FUS 분포는 스트레스 과립 역학(stress granule dynamics)도 변화시킨다. 순전히 병리학적이거나보다는 FUS의 응집 경향은 정상적인 세포 기능에 중요하다. 몇몇은 FUS 응집이 가용성 세포질 FUS의 잠재적 독성 증가로부터 세포를 보호하는 보상 메커니즘일 수 있다고 제안하였다.
- [0011] 병원성 FUS 변이체는 조기 발병 및 청소년 ALS와 관련이 있으며, 이는 끊임없이 진행되는 근육 위축 및 약화로 나타나며, 대부분의 경우에 질환 발병 후 3년 미만으로 생존이 제한되는 호흡근에 영향을 미친다. 현재 치료 옵션은 증상 관리와 호흡 지원에 기반을 두고 있으며, 유일하게 승인된 약물은 단지 수개월 동안 생존을 연장시키거나 또는 일부 환자에게 단지 보통의 이점만을 제공한다. 질환 진행을 느리게 하거나 멈추게 하는 효과적인 치료법은 부족하다.
- [0012] FUS 응집, 과발현 또는 세포질 비정상 위치에 의해 야기되는 독성 기능 획득에 대한 강력한 증거로 인해, FUS의 녹다운은 일반적으로 병원성 FUS 돌연변이를 가진 환자를 치료하기 위한 허용 가능한 치료 전략인 것으로 간주된다. 몇몇 환자는 현재 3상 임상 시험 (NCT04768972)이 진행 중인 치료제 (ION363)에 대한 동정적 사용에 기반하여 연구적인(investigational) FUS 표적화 AON(FUS targeted AON)을 투여 받았다. FUS는 여러 DNA 복구 메커니즘에서 핵심적인 역할을 하며, 다른 많은 유전자의 조절과 스플라이싱에 관여하고, 세포 스트레스에 대한 방어에 있어서 역할을 함에 따라, 이것이 이러한 역할들을 수행하지 못하는 것에 기인하여 향후 FUS가 녹다운되어 건강에 위협을 초래할 수 있다는 우려가 존재한다. 이러한 이유로, 환자의 병원성 변이가 나타나는 대립유전자를 표적화할 수 있는 다른 대립유전자에 비해 하나의 FUS 대립유전자를 선택적으로 녹다운시키는 전략이 추구되었다.
- [0013] *대립유전자 선택적 녹다운 전략*
- [0014] FUS-ALS는 우성 질환이며, 이환된 환자의 대부분은 그것의 두 대립유전자 중 하나에만 유해한 변이체를 가지고 있다. 이는 FUS 녹다운에 대한 AON 기반의 대립유전자 특이적 접근법이 이러한 환자를 치료하는 실행 가능한 전략이 되게 한다. FUS는 그것의 단백질 수준에 의해 자가 조절되기 때문에, 정상(normal) mRNA를 충분히 남겨 생리학적으로 건강한 양의 단백질을 생산할 수 있게 하면서, AON을 이용하여 병원성 변이체를 포함하는 pre-mRNA 및 mRNA의 발현을 선택적으로 녹다운시키는 것을 가능하게 할 수 있다.
- [0015] 이러한 대립유전자 선택적 전략은 내인성 효소 RNase H를 이용하는 갭머 기반 AON 설계를 사용한다. RNase H는 DNA/RNA 헤테로듀플렉스에서 RNA 가닥의 절단에 촉매 작용하는 비-서열-특이적 엔도뉴클레아제이다. 갭머는 광범위하게 변형될 수 있고, RNase H 활성과 양립할 필요가 없는 다수의 염기 (윙(wing))에 의해 플랭킹된 RNase H 활성과 양립 가능한 DNA 기반 코어에 이루어진다. 갭머는 대립유전자 간에 변이가 있는 RNA 영역에 대해 직접적으로 표적화될 수 있고, 변이를 이용하여 표적 대립유전자에 대한 선택성을 생성할 수 있다. 표적 대립유전자에 대한 선택성을 증가시킬 수 있는 갭머의 여러 특성은 변형될 수 있고, 그 효과는 일반적으로 실험적으로 결

정될 필요가 있다. 변형은 갭머와 표적 RNA 사이의 불일치의 수, 배치 및 염기 조성, 윈도우(window)(갭(gap)) 또는 링 길이뿐만 아니라 분자 길이 및 화학성질의 변화를 포함할 수 있다.

[0016] FUS-ALS는 비교적 드물며, FUS에서 적어도 50개의 상염색체 우성 ALS-관련 돌연변이가 보고되었다. 많은 수의 병원성 변이체를 고려하면, 각 변이체는 극히 드물며, 이는 각각에 대한 대립유전자 특이적 치료제를 개발하는데 있어서 제약 회사가 자원을 투자하는 것을 경제적으로 실행할 수 없게 만들며, 이러한 이유로 FUS에서 흔한 변이체를 표적화하였다.

[0017] FUS 단백질 병증(FUS proteinopathy)

[0018] 병원성 변이를 포함하는 FUS 대립유전자의 발현을 감소시키는 것은 FUS-ALS 및 FUS-FTLD 또는 환자가 병원성 FUS 돌연변이를 가질 수 있는 기타 신경학적 병태에 포함되는 FUS 단백질 병증과 관련된 질환의 예방 및 치료에 응용되었다. 또한, 병원성 변이를 포함하는 FUS 대립유전자의 발현은 다음의 질환의 예방 및 치료에 응용되는 것이 가능하다: 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 전두측두엽 치매 (FTD) 및 본태성 떨림(essential tremor; ET).

[0019] 이러한 배경의 관점에서 본 발명이 개발되었다. 특히, 본 발명은 병원성 FUS 유전적 변이체와 관련된 질환에서 FUS 단백질 병증을 개선하기 위한 수단을 제공하는 것을 추구한다.

### 발명의 내용

[0020] 발명의 요약

[0021] 본 발명은 FUS를 코딩하는 핵산에 대해 표적화되는 화합물, 특히 AON에 관한 것이다. 본 발명의 실시양태는 FUS pre-mRNA 또는 mRNA에 대해 결합할 수 있는 AON에 관한 것이다.

[0022] 대략적으로, 발명의 제1 양태에 따르면, FUS pre-mRNA 또는 mRNA를 코딩하는 핵산 분자에 대해 표적화되는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 여기서 안티센스 올리고뉴클레오티드는 (a) 서열 번호 1 내지 서열 번호 34 또는 이의 변이체로 이루어진 목록으로부터 선택되거나; 또는 (b) 서열 번호 1 내지 서열 번호 34 또는 이의 변이체가 또한 결합되는 표적 FUS pre-mRNA 또는 mRNA의 적어도 1개 이상의 인접한 핵염기(contiguous nucleobase)에 대해 상보성인 핵염기 서열(nucleobase sequence)을 가지며; 여기서 안티센스 올리고뉴클레오티드는 FUS 유전자 또는 이의 FUS 유전자 변이체의 적어도 하나의 대립유전자의 발현을 억제하며, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 실질적으로 단리되거나 정제된다.

[0023] 하나의 실시양태에서, 대립유전자는 FUS 유전자의 병원성 변이체를 포함한다. 다른 실시양태에서, 병원성 변이체는 질환에 대한 대상체(subject)의 감수성(susceptibility) 또는 소인(predisposition)을 증가시키는 유전적 변경(genetic alteration)이다.

[0024] 다른 실시양태에서, 질환은 다음의 것으로 이루어진 군으로부터 선택된다: ALS, FTD, ET. 바람직하게는, 질환은 다음의 것으로 이루어진 군으로부터 선택된다: ALS 또는 FTD. 바람직하게는, 질환은 다음의 것으로 이루어진 군으로부터 선택된다: FUS-ALS 또는 FUS-FTD.

[0025] 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 FUS의 엑손 3, 엑손 4 또는 3' UTR 내에 포함된 전사체의 영역(area)에 결합된다. 바람직하게는, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 CV (rs741810), CV2 (rs1052352), 또는 CV3 (rs4889537)을 포함하는 전사체의 영역에 결합된다.

[0026] 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 정상 mRNA를 충분히 남겨 상당한 양의 단백질을 생산하면서, FUS 또는 이의 FUS 변이체의 pre-mRNA 및/또는 mRNA의 하나의 대립유전자의 발현을 선택적으로 녹다운시킨다.

[0027] 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 FUS pre-mRNA 및/또는 FUS mRNA의 RNase H 매개 분해(mediated degradation)를 유도한다.

[0028] 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 티오포스포라미데이트 모르폴리노 올리고머(thiophosphoramidate morpholino oligomer; TMO) 키메라(chimera)이다.

[0029] 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 TMO 및 포스포리토에이트 DNA 또는 DNA 서브유닛(subunit)을 포함하는 갭머 디자인(gapmer design)을 가진 티오포스포라미데이트 모르폴리노 올리고머(TMO) 키메라이다.

[0030] 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 펩티드-티오포스포라미데이트 모르폴리노 올리고머(TMO)

키메라 접합체(chimera conjugate)이다.

- [0031] 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 다음의 것으로 이루어진 목록으로부터 선택된다: 서열 번호 1 내지 12. 바람직하게는, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 2, 4, 5, 8, 또는 11이다.
- [0032] 발명의 다른 양태에 따르면, FUS pre-mRNA 및 mRNA의 선택된 대립유전자의 선택적 녹다운을 유도하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다: (a) 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드 중 하나 이상을 제공하는 단계; 및 (b) 올리고머(들)를 표적 핵산 부위(target nucleic acid site)에 결합할 수 있도록 하는 단계.
- [0033] 발명의 다른 양태에 따르면, FUS 유전자의 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하는 조성물이 제공되며, 상기 조성물은 다음의 것을 포함한다: (a) 발명의 제1 양태에 따른 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오티드; 및 (b) 하나 이상의 치료적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제.
- [0034] 발명의 다른 양태에 따르면, FUS 유전자의 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하는 약학적 조성물이 제공되며, 상기 조성물은 다음의 것을 포함한다: (a) 발명의 제1 양태의 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오티드; 및 (b) 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제.
- [0035] 발명의 다른 양태에 따르면, FUS 유전자의 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 발명의 약학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0036] 하나의 실시양태에서, 병원성 변이체는 질환에 대한 대상체의 감수성 또는 소인을 증가시키는 유전적 변경이다. 다른 실시양태에서, 질환은 다음의 것으로 이루어진 군으로부터 선택된다: ALS, FTD 또는 ET. 바람직하게는, 질환은 다음의 것으로 이루어진 군으로부터 선택된다: ALS 또는 FTD. 바람직하게는, 질환은 다음의 것으로 이루어진 군으로부터 선택된다: FUS-ALS 또는 FUS-FTD.
- [0037] 발명의 다른 양태에 따르면, 바이오마커(biomarker)에 의해 식별되는 환자에서의 FUS 유전자의 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다: (a) FUS 단백질 병증과 관련된 질환과 관련된 바이오마커의 존재에 대해 대상체를 시험하는 단계로서, 여기서 환자는 FUS 억제에 대해 반응할 가능성이 있는 것인 단계; 및 (b) 대상체가 바이오마커를 발현하는 것으로 밝혀진 경우, 발명의 약학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계. 바람직하게는, 질환은 다음의 것으로 이루어진 군으로부터 선택된다: ALS 또는 FTD. 바람직하게는, 바이오마커는 FUS 유전자의 병원성 변이체이다.
- [0038] 발명의 다른 양태에 따르면, 대상체에서 선택된 FUS 대립유전자의 발현을 감소시키고/시키거나 대상체에서 자가 조절에 의해 야기되는 FUS의 과발현을 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 발명의 약학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0039] 발명의 다른 양태에 따르면, (a) 대상체에서 선택된 FUS 대립유전자의 발현을 감소시키는 단계; 및/또는 (b) 대상체에서 자가 조절에 의해 야기된 FUS의 과발현을 감소시키는 단계의 방법이 제공되며, 상기 방법은 다음의 것을 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다: 발명의 제1 양태에 따른 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오티드; 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제.
- [0040] 발명의 다른 양태에 따르면, 발명의 제1 양태에 따른 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터(expression vector)가 제공된다.
- [0041] 발명의 다른 양태에 따르면, 발명의 제1 양태에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 세포가 제공된다.
- [0042] 발명의 다른 양태에 따르면, FUS 유전자의 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하는 의약(medicament)의 제조를 위한, 발명의 제1 양태에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드의 용도가 제공된다.
- [0043] 발명의 다른 양태에 따르면, FUS 유전자의 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하기 위한, 발명의 제1 양태에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드의 용도가 제공된다. 바람직하게는, 질환은 다음의 것으로 이루어진 군으로부터 선택된다: ALS 또는 FTD.
- [0044] 발명의 다른 양태에 따르면, 대상체에서 병원성 FUS 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하는 키트가 제공되며, 여기서 키트는 이의 사용을 위한 설명서와 함께, 적합한 용기에 패키징된(packaging) 본 발명의 제1 양태에 따른 적어도 하나의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0045] 본 발명의 추가의 특징은 이의 여러 비제한적인 실시양태의 다음의 설명에 보다 전체적으로 기재되어 있다. 이 설명은 본 발명의 예시를 위한 목적으로만 포함된다. 상기 제시된 바와 같은 발명의 광범위한 요약, 개시내용 또는 설명에 대한 제한으로서 이해되지 않아야 한다.

**도면의 간단한 설명**

[0046] 하기 설명은 다음의 첨부된 도면을 참조하여 제공된다.

도 1은 *FUS* CV 표적화 AON (시리즈 1)으로 형질감염된 각각의 CV에서 동형 접합성인 섬유아세포 세포주에서 PCR 및 밀도 측정법을 사용하는 아가로스 겔 전기영동법을 통해 측정된 *FUS* 발현을 나타낸다. 세포를 24시간 동안 L3K를 사용하여 50nM 및 12.5nM로 형질감염시켰다. (a) CV1에 대해 표적화된 AON. (b) CV2에 대해 표적화된 AON. (c) CV3에 대해 표적화된 AON. 오차 막대는 표준 오차 (n=2)이다.

도 2는 드롭렛 디지털 PCR(droplet digital PCR)을 사용하여 측정된 100nM에서 *FUS* CV2 표적화 AON 또는 대조군과 함께 24시간의 인큐베이션 후 CV2 이형 접합성 섬유아세포에서의 원하는 (비-표적) 대립유전자의 백분율을 나타낸다. 추가적인 불일치 거리는 CV로부터 떨어진 염기의 수와 관련되며, 불일치 유형은 AON의 염기 그 다음 표적 RNA의 염기로 작성된다. 오차 막대는 표준 오차 (n≥2)이다.

도 3은 100nM에서 *FUS* CV2 표적화 AON 또는 대조군으로 형질감염시킨 후 24시간 시점에 CV2에 대해 이형 접합성인 섬유아세포에서의 총 *FUS* mRNA 발현을 나타낸다. RT-PCR, 아가로스 겔 전기영동법 및 밀도측정 분석을 통해 측정하였다. 추가적인 불일치 거리는 CV로부터 떨어진 염기의 수와 관련되며, 불일치 유형은 AON의 염기 그 다음 표적 RNA의 염기로 작성된다. 오차 막대는 표준 오차 (n=3)이다.

도 4는 링에서 유일하게 또는 전체적으로 PS 변형이 있는 2'-O메틸 캡머 AON 그리고 TMO 캡머와 함께 CV2 표적화 AON CV2b 및 CV2e로의 형질감염 이후 3일차에 CV2에 대해 이형 접합성인 섬유아세포에서의 원하는 대립유전자 및 총 *FUS* 발현의 백분율을 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0047] **상세한 설명**

[0048] 본 발명은 AON 요법을 사용하여 *FUS* 단백질 병증 (ALS 및 FTD 포함)과 관련된 질환의 증상의 추가 진행을 개선하거나 늦추는 예방적 또는 치료적 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 발명은 *FUS* pre-mRNA 또는 mRNA를 코딩하는 핵산 분자에 대해 표적화된 단리된 또는 정제된 AON을 제공하며, 여기서 AON은 다음과 같은 핵염기 서열을 갖는다: (a) 서열 번호 1로부터 서열 번호 34까지 또는 이의 변이체를 포함하는 목록으로부터 선택되거나, 또는 (b) 서열 번호 1로부터 서열 번호 34까지 또는 이의 변이체가 또한 결합되는 표적 *FUS* pre-mRNA 또는 mRNA에서 적어도 1개 이상의 인접한 핵염기에 대해 상보적인 서열, 그리고 (c) AON은 인간 *FUS* 또는 이의 변이체의 발현을 억제함.

[0049] 편의를 위해, 다음의 섹션은 본원에 사용되는 용어의 다양한 의미를 일반적으로 개략한다. 이러한 논의에 따라, 발명의 조성물, 의약의 용도 및 방법과 관련된 일반적인 양태가 논의되며, 그 다음 발명의 다양한 실시양태의 특성 및 이것이 이용될 수 있는 방식을 보여주는 특정 실시예가 후속된다.

**[0050] 1. 정의**

[0051] 명세서, 실시예 및 첨부된 청구항에서 사용되는 특정 용어 및 문구의 의미가 아래에 제공된다. 기술 분야에서의 용어의 사용과 본원에 제공된 그것의 정의 사이에 명백한 불일치가 있는 경우, 명세서에 제공된 정의가 우선할 것이다.

[0052] 본 기술 분야의 당업자는 본원에 기재된 발명이 구체적으로 기재된 것 이외에도 변형 및 수정이 가능한 것으로 이해할 것이다. 발명은 모든 이러한 변형 및 수정을 포함한다. 발명은 또한 개별적으로 또는 집합적으로 명세서에 언급되거나 표시된 모든 단계, 특징, 제형(formulation) 및 화합물 및 단계 또는 특징 중 어느 2개 이상의 임의의 그리고 모든 조합을 포함한다.

[0053] 본 문헌에 인용된 각각의 문서, 참조문헌, 특허출원 또는 특허는 그 전문이 본원에 참조로 명확하게 편입되며, 이는 그것이 본 문헌의 일부로서 독자가 관독하고 간주하여야 함을 의미한다. 본 문헌에 인용된 이 문서, 참조문헌, 특허출원 또는 특허는 단지 간결성의 이유로 이 텍스트에서 반복되지 않는다. 그러나, 인용된 자료 또는 이 자료에 인용된 포함된 정보 중 어느 것도 일반적 범용 지식인 것으로 이해되지 않아야 한다.

- [0054] 본원에 또는 본원에 참조로 편입된 임의의 문서에 언급된 임의의 제품에 대한 제조사의 설명서, 설명, 제품 사양 및 제품 시트는 본원에 참조로 편입되며, 발명의 실시예에 이용될 수 있다.
- [0055] 본 발명은 본원에 기재된 특정 실시양태 중 어느 하나에 의해 범위가 제한되지 않는다. 이들 실시양태는 단지 예시 목적을 위한 것으로 의도된다. 기능적으로 동등한 제품, 제형 및 방법은 명확하게 본원에 기재된 바와 같이 발명의 범위 내에 있다.
- [0056] 작업 실시예에서의 것, 또는 달리 나타낸 경우 이외에는, 본원에 사용되는 성분의 양 또는 반응 조건을 표현하는 모든 숫자는 모든 경우에 용어 "약"으로 수정되는 것으로 이해되어야 한다. 백분율과 관련하여 사용되는 경우의 용어 "약"은  $\pm 1\%$ 를 의미할 수 있다.
- [0057] 본원에 기재된 발명은 하나 이상의 범위의 값 (예를 들어, 크기, 농도 등)을 포함할 수 있다. 일정 범위의 값은 범위를 정의하는 값, 및 범위의 경계를 정의하는 그 값에 매우 근사한 값과 동일한 또는 실질적으로 동일한 결과를 야기하는 범위에 근사한 값을 비롯하여 범위 내의 모든 값을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, 기술분야의 숙련가는 일정 범위의 한계값보다 더 높거나 낮은 10% 변동이 완전하게 적절할 수 있으며, 발명에 포함되는 것으로 이해될 것이다. 보다 구체적으로, 일정 범위의 한계값보다 더 높거나 낮은 변동은 5%이거나 또는 기술분야에서 일반적으로 인정되는 것 중 더 큰 것일 것이다.
- [0058] 본 출원에서, 단수의 사용은 또한 달리 구체적으로 언급되지 않는 한 복수를 포함한다. 본 출원에서, "또는"의 사용은 달리 언급하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 게다가, 용어 "포함하는(including)"뿐만 아니라 다른 형태, 예컨대 "포함하다" 및 "포함된"의 사용은 제한적인 것이 아니다. 또한, "구성요소" 또는 "성분"과 같은 용어는, 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 하나 이상의 서브유닛을 포함하는 하나의 유닛 및 구성요소 및 성분을 포함하는 구성요소 및 성분 둘 모두를 포괄한다. 또한, 용어 "일부"의 사용은 모이어티의 일부 또는 전체 모이어티를 포함할 수 있다.
- [0059] 본 명세서 전반에서, 맥락에서 달리 요구되지 않는 한, 단어 "포함하다(comprise)" 또는 변형어 예컨대 "포함하다(comprises)" 또는 "포함하는"은 언급된 정수 또는 정수의 그룹을 포함하지만 임의의 다른 정수 또는 정수의 그룹을 배제하지 않는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다.
- [0060] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "투여하다"는 구성물을 방법 또는 경로를 통해 대상체에 배치하는 것과 관련되며, 이는 원하는 효과가 생성되도록 원하는 작용 부위에의 구성물의 적어도 부분적 국재화를 야기한다. 본원에 기재된 화합물 또는 구성물은 비제한적으로 정맥내, 근육내, 피하, 경피, 기도 (에어로졸), 폐, 비강, 직장 및 국소 (협착 및 설하 포함) 투여를 포함하는, 경구 또는 비경구 경로를 포함하는 본 기술분야에 알려진 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다.
- [0061] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "FUS 일반 변이체"는 *FUS* 유전자 또는 *FUS* 단백질에서의 변이체를 지칭한다. 바람직하게는, 변이는 일반적이며, 인간 집단에서 발생된다. 보다 바람직하게는, 변이는 인간 집단에서 자주 발생된다.
- [0062] 본원에 사용되는 선택된 용어에 대한 다른 정의는 발명의 상세한 설명에서 찾을 수 있으며, 전반적으로 적용될 수 있다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 기타 모든 과학 및 기술 용어는 발명이 속한 기술 분야의 당업자에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0063] 발명의 특징은 이제 다음과 같은 비제한적인 설명 및 실시예를 참조하여 논의될 것이다.
- [0064] **2. 실시양태**
- [0065] 본 발명의 실시양태는 일반적으로 개선된 안티센스 화합물, 및 이의 방법 또는 용도에 관한 것이며, 이는 *FUS*의 발현을 억제하기 위해 구체적으로 설계된다. *FUS*의 병원성 변이체는 ALS 및 FTD를 포함하는 *FUS* 단백질 병증과 관련된 질환과 연관된 것으로 나타났다.
- [0066] 이론에 얽매이지 않고, 본 발명은 병원성 *FUS* 변이체에 대해 이형 접합성인 환자에서, 병원성 변이체를 포함하는 *FUS*의 발현을 억제하는 것이 이들 환자의 증상의 진행을 느리게 하고/하거나 이들의 생존을 개선하는 효과를 가질 수 있다는 이해에 기반한다. 이것은 *FUS* 병원성 변이체가 *FUS*의 세포질 비정상 위치, 스플라이싱 결함, DNA 손상을 야기하고, *FUS* 자가 조절을 손상시킬 수 있기 때문이다. 병원성 *FUS* 변이체는 ALS 및 FTD를 포함하는 다수의 신경학적 병태와 관련된다. 따라서, 병원성 변이체를 포함하는 *FUS* 대립유전자의 억제는 ALS 및 FTD를 포함하는 *FUS* 병원성 변이체와 관련된 질환을 앓는 환자의 증상의 진행을 느리게 하고/하거나 이들의 생존을

개선하는 것을 야기한다는 가설이 설정된다.

**A. 안티센스 올리고뉴클레오티드**

이러한 발명은 *FUS* pre-mRNA 및 mRNA를 코딩하는 핵산 분자를 표적화하는 하나 이상의 단리된 또는 정제된 AON을 제공하며, 여기서 AON은 (아래의 표 1 및 2에 제시된 바와 같이) 서열 번호 1로부터 서열 번호 34까지 포함하는 목록으로부터 선택되는 핵염기 서열을 가지며, 여기서 AON은 인간 *FUS* 또는 이의 변이체의 발현을 억제한다. 하나의 예에서, AON은 티오포스포라미데이트 모르폴리노 올리고머 (TMO) 키메라 (깁머): 모르폴리노 3'-티오포스포라미데이트 링 및 3' 말단에 2'-데옥시뉴클레오사이드 염기를 가진 2'-데옥시뉴클레오사이드 3'-티오포스페이트 깁머이다. 다른 예에서, AON은 2' O-메톡시에틸 키메라 (깁머)이다.

바람직하게는, AON은 CV1 (rs741810), CV2 (rs1052352), 및 CV3 (rs4889537)로 이루어진 군으로부터 선택되는 *FUS* 일반 변이체에 대해 표적화된다.

보다 일반적으로, 발명은 *FUS* pre-mRNA 또는 mRNA를 코딩하는 핵산 분자에 대해 표적화되는 단리된 또는 정제된 안티센스 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 여기서 AON은 다음과 같은 핵염기 서열을 갖는다:

- a. 서열 번호 1로부터 서열 번호 34까지 포함하는 목록으로부터 선택되거나, 또는
- b. 서열 번호 1로부터 서열 번호 34까지의 것이 또한 결합되는 표적 *FUS* pre-mRNA 또는 mRNA에서의 적어도 1개 이상의 인접한 핵염기에 대해 상보성인 서열, 및
- c. AON이 인간 *FUS* 또는 이의 변이체의 발현을 억제함.

바람직하게는, AON은 표 1에 제공된 바와 같은 *FUS* 일반 변이체 (*FUS* CV)에 대해 표적화된다.

**표 1**

FUS CV 표적화 AON의 서열

AON 번호	서열 번호	AON 좌표	AON 서열 (5'에서 3'방향)
1	1	FUS H3A(+96+115)	GCCAUATCCTGAAGTGUCCG
2	2	FUS H3A(+100+119)	UCUGGCCATATCCTGAAGUG
3	3	FUS H3A(+103+122)	UGCUCTGGCCATATCCUGAA
4	4	FUS H3A(+96+115)	GCCAUAGCCTGAAGTGUCCG
5	5	FUS H3A(+100+119)	UCUGGCCATAGCCTGAAGUG
6	6	FUS H3A(+103+122)	UGCUCTGGCCATAGCCUGAA
7	7	FUS H4A(+88+107)	GCCAGGGTAGGAGGACUGCU
8	8	FUS H4A(+92+111)	CAUAGCCAGGGTAGGAGGAC
9	9	FUS H4A(+95+114)	GGCCATAGCCAGGGTAGGAG
10	10	FUS H4A(+88+107)	GCCAGGATAGGAGGACUGCU
11	11	FUS H4A(+92+111)	CAUAGCCAGGATAGGAGGAC
12	12	FUS H4A(+95+114)	GGCCATAGCCAGGATAGGAG

[0075]

13	13	FUS 15A(+797+816)	UGACCTCAAGCCCTCUGAGU
14	14	FUS 15A(+801+820)	UCAAUGACCTCAAGCCCUCU
15	15	FUS 15A(+804+823)	AUGUCAATGACCTCAAGCCC
16	16	FUS 15A(+797+816)	UGACCTGAAGCCCTCUGAGU
17	17	FUS 15A(+801+820)	UCAAUGACCTGAAGCCCUCU
18	18	FUS 15A(+804+823)	AUGUCAATGACCTGAAGCCC

[0076]

[0077] 기준점 (0)이 5' 및 3' 스플라이스 부위의 첫 번째 염기에 설정되며; 그러므로 "+"는 엑손 내의 뉴클레오티드 결합과 관련되며, "-"는 인트론 내의 뉴클레오티드 결합을 나타낸다.

[0078] 하나의 예에서, AON은 표 2에 제공된 바와 같은 FUS CV2의 영역에 대해 표적화된다.

**표 2**

FUS CV2 표적화 AON - 시리즈 2의 서열

AON 번호	서열 번호	AON 좌표	AON 서열 (5'에서 3' 방향)
19	19	FUS H4A(+92+111)A1	CAUAGCCAGAGTAGGAGGAC
20	20	FUS H4A(+92+111)A1	CAUAGCCAGTGTAGGAGGAC
21	21	FUS H4A(+92+111)A1	CAUAGCCAAGGTAGGAGGAC
22	22	FUS H4A(+92+111)A1	CAUAGCCATGGTAGGAGGAC
23	23	FUS H4A(+92+111)A1	CAUAGCCAGGGTAAGAGGAC
24	24	FUS H4A(+92+111)A1	CAUAGCCAGGGTATGAGGAC
25	25	FUS H4A(+92+111)A1	CAUAGCGAGGGTAGGAGGAC
26	26	FUS H4A(+92+111)A1	CAUAGCAAGGGTAGGAGGAC
27	27	FUS H4A(+92+111)A2	CAUAGCCAGAATAGGAGGAC
28	28	FUS H4A(+92+111)A2	CAUAGCCAGTATAGGAGGAC
29	29	FUS H4A(+92+111)A2	CAUAGCCAAGATAGGAGGAC
30	30	FUS H4A(+92+111)A2	CAUAGCCATGATAGGAGGAC
31	31	FUS H4A(+92+111)A2	CAUAGCCAGGATAAGAGGAC
32	32	FUS H4A(+92+111)A2	CAUAGCCAGGATATGAGGAC
33	33	FUS H4A(+92+111)A2	CAUAGCGAGGATAGGAGGAC
34	34	FUS H4A(+92+111)A2	CAUAGCAAGGATAGGAGGAC

[0079]

[0080] 기준점 (0)이 5' 및 3' 스플라이스 부위의 첫 번째 염기에 설정되며; 그러므로 "+"는 엑손 내의 뉴클레오티드 결합과 관련되며, "-"는 인트론 내의 뉴클레오티드 결합을 나타낸다.

[0081] 본 발명의 AON 중 어느 하나에 있어서, 본원에 제공된 서열의 우라실 (U)은 티민 (T)으로 대체될 수 있다. 본

발명의 AON 중 어느 하나에서, 본원에 제공된 서열의 티민 (T)은 우라실 (U)로 대체될 수 있다.

- [0082] 발명의 특정 AON은 엑손 3, 4 및 15 내의 인간 *FUS* pre-mRNA 및 mRNA에서 적합한 서열을 보완하도록 설계된다. 바람직한 실시양태에서, 발명의 AON은 인간 *FUS* pre-mRNA 및/또는 mRNA의 엑손 3 또는 4 내의 적합한 서열을 보완하도록 설계된다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 발명의 AON은 *FUS* 일반 변이체 중 하나에 대해 이형 접합성인 환자의 pre-mRNA 및/또는 mRNA의 하나의 대립유전자의 발현을 선택적으로 녹다운시키도록 설계된다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 발명의 AON은 *FUS* pre-mRNA 및/또는 *FUS* mRNA의 RNase H 매개 분해를 유도하도록 설계된다. 가장 바람직하게는, 발명의 AON은 서열 번호 1 내지 서열 번호 34로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0083] 용어 "안티센스 올리고머" 및 "안티센스 화합물" 및 "안티센스 올리고뉴클레오티드" 또는 "AON"은 상호 교환적으로 사용되며, 염기쌍 형성 모이어티가 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍 형성에 의해 핵산 (통상적으로 RNA)에서의 표적 서열에 대해 혼성화되는 것을 가능하게 하여 표적 서열 내에 핵산:올리고머 헤테로듀플렉스를 형성하게 하는 서브유닛 간의 연결에 의해 연결된, 각각 염기쌍 형성 모이어티를 갖는 환형 서브유닛의 선형 서열을 지칭한다. 환형 서브유닛은 리보오스 또는 다른 펜토스 당을 기반으로 하거나, 또는 바람직한 실시양태에서, 모르폴리노기를 기반으로 한다 (아래의 모르폴리노 올리고머의 설명 참조). 올리고머는 표적 서열에 대해 정확하게 또는 거의 서열 상보성을 가질 수 있고; 올리고머의 말단 근처의 서열에서의 변이는 일반적으로 내부의 변이보다 바람직하다. 또한, 기술분야에 알려진 다른 안티센스 체제 중에서도 펩티드 핵산 (PNA), 잠금 핵산 (LNA), 및 2'-O-메틸 올리고뉴클레오티드가 고려된다.
- [0084] 용어 "올리고뉴클레오티드"는 폴리뉴클레오티드 예컨대 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA)을 포함하며, RNA는 DNA 주형 전사에 의해 제조되거나 얻어진다. 발명에 따르면, 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥 그리고 선형 또는 공유적으로 원형으로 닫힌 분자로서 존재할 수 있다.
- [0085] "단리된"은 그것의 천연 상태에서 일반적으로 수반되는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없는 물질을 의미한다. 예를 들어, 본원에 사용되는 바와 같은 "단리된 폴리뉴클레오티드" 또는 "단리된 올리고뉴클레오티드"는 자연 발생된 상태로 그것을 플랭킹하는 서열로부터 정제되거나 제거된 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 케놈에서의 단편에 인접한 서열로부터 제거된 DNA 단편을 지칭할 수 있다. 이것이 세포와 관련된 경우의 용어 "단리하는"은 공급 대상체 (예를 들어, 폴리뉴클레오티드 반복 질환(polynucleotide repeat disease)을 가진 대상체)로부터의 세포 (예를 들어, 섬유아세포, 림프모구)의 정제와 관련된다. mRNA 또는 단백질의 맥락에서, "단리하는"은 예를 들어, 세포와 같은 공급처로부터의 mRNA 또는 단백질의 회수와 관련된다.
- [0086] AON은 이것이 혼성화하는 표적 서열에 대해 "유도되거나" 또는 "이에 대해 표적화되는" 것으로 언급될 수 있다. 특정 실시양태에서, 표적 서열은 폴리아데닐화 부위를 포함하는 영역 및 둘러싸는 영역을 포함한다. 표적 서열은 통상적으로 mRNA의 AUG 개시 코돈을 포함하는 영역, 번역 억제 올리고머(Translation Suppressing Oligomer), 또는 전-처리된 mRNA의 스플라이스 부위, 스플라이스 억제 올리고머 (Splice Suppressing Oligomer; SSO)이다. 스플라이스 부위에 대한 표적 서열은 전-처리된 mRNA에서 정상적인 스플라이스 수용체 접합부의 하류에 그것의 5' 말단 1 내지 약 25개의 염기쌍을 갖는 mRNA 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 표적 서열은 스플라이스 부위를 포함하거나 또는 전체적으로 엑손 코딩 서열에 내에 포함되거나 또는 스플라이스 수용체 또는 공여체 부위에 걸쳐 있는 전-처리된 mRNA의 임의의 영역이다. 올리고머는 보다 일반적으로 그것이 상기 기재된 방식으로 표적의 핵산에 대해 표적화될 때 단백질, 바이러스, 또는 박테리아와 같은 생물학적으로 관련된 표적에 "대해 표적화된다" 것으로 언급된다.
- [0087] 본원에 사용되는 바와 같이, "충분한 길이" 또는 "충분한 서열 상보성"은 표적 *FUS* pre-mRNA 및/또는 *FUS* mRNA에서의 적어도 1개, 보다 통상적으로 1-30개의 인접한 핵염기에 대해 상보성인 AON과 관련된다. 일부 실시양태에서, 충분한 길이의 안티센스는 표적 *FUS* pre-mRNA 및/또는 *FUS* mRNA에 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 인접한 핵염기를 포함한다. 다른 실시양태에서, 충분한 길이의 안티센스는 표적 *FUS* pre-mRNA 및/또는 *FUS* mRNA에 적어도 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개의 인접한 핵염기를 포함한다. 바람직하게는, 충분한 길이의 올리고뉴클레오티드는 길이가 약 10 내지 약 50개의 뉴클레오티드이며, 이는 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 및 40개 또는 그 초과 뉴클레오티드의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 충분한 길이의 올리고뉴클레오티드는 길이가 10 내지 약 30개의 뉴클레오티드이다. 다른 실시양태에서, 충분한 길이의 올리고뉴클레오티드는 길이가 15 내지 약 25개의 뉴클레오티드이다. 또 다른 실시양태에서, 충분한 길이의 올리고뉴클레오티드는 길이가 20 내지 30개, 또는 20 내지 50개의 뉴클레오티드이다. 또 다른 실시양태에서, 충분한 길이의 올리고뉴클레오티드는 길이가 22 내지 28개, 25 내지 28개, 24 내지 29개 또는

25 내지 30개의 뉴클레오티드이다.

- [0088] 특정 실시양태에서, AON은 표적 RNA에 대해 충분한 서열 상보성을 가져 효과적인 방식으로 표적 RNA (예를 들어, FUS pre-mRNA 및/또는 mRNA)의 영역을 블로킹한다. 일부 다른 실시양태에서, 표적 RNA는 표적 pre-mRNA (예를 들어, FUS pre-mRNA 및/또는 mRNA)이며, 발명은 FUS pre-mRNA 및/또는 FUS mRNA의 RNase H 매개 분해를 유도한다.
- [0089] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "상보성인" 또는 "상보성"은 염기쌍 형성 법칙에 의해 관련된 폴리뉴클레오티드 (즉, 뉴클레오티드의 서열)을 참조하여 사용된다. 예를 들어, 서열 5'-A-G-T-3'는 서열 3'-T-C-A-5'에 대해 상보성이다. 상보성은 핵산의 염기의 단지 일부만이 염기쌍 형성 법칙에 따라 일치되는 경우에 "부분적"일 수 있다. 또는 핵산들 간에 "완전한" 또는 "전체적" 상보성이 존재할 수 있다. 핵산 가닥들 간의 상보성 정도는 핵산 가닥들 간의 혼성화의 효율 및 강도에 대해 상당한 영향을 미친다. 이와 같이, 본원에 사용되는 바와 같은 "보체(complement)" 서열은 올리고뉴클레오티드 서열이 표적 RNA 또는 DNA 서열에 대해 어느 정도 상보성을 갖는 것을 의미한다.
- [0090] 발명의 목적을 위해, 뉴클레오티드 서열의 보체는 제시된 뉴클레오티드 서열을 갖는 이중 가닥 DNA 또는 RNA 분자를 형성할 수 있고, 그리고 샤가프의 법칙 (A<T; G<C; A<U)에 따라 뉴클레오티드를 그것의 상보성 뉴클레오티드로 대체하고, 5'에서 3' 방향, 즉, 제시된 뉴클레오티드 서열의 반대 방향으로 관독함으로써 제시된 뉴클레오티드 서열로부터 유래될 수 있는 뉴클레오티드 서열이다. 이는 또한 DNA/RNA의 합성 유사체 (예를 들어, 2' F-ANA 올리고)를 포함한다.
- [0091] 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 상보성의 정도와 관련된다. 올리고뉴클레오티드 서열과 표적 RNA 또는 DNA의 보체 서열 사이에 부분적 상동성 또는 완전한 서열 동일성이 있을 수 있다. 부분적으로 동일한 서열은 표적 RNA 또는 DNA에 대해 적어도 부분적으로 혼성화되어 부분적 헤테로듀플렉스의 형성, 및 표적 RNA 또는 DNA의 부분적 또는 전체적 분해를 야기하는 올리고뉴클레오티드이다. 완전하게 동일한 서열은 표적 RNA 또는 DNA에 대해 완전하게 혼성화되어 완전한 헤테로듀플렉스의 형성, 및 표적 RNA 또는 DNA의 부분적 또는 전체적 분해를 야기하는 올리고뉴클레오티드이다.
- [0092] 특정 실시양태에서, AON은 표적 서열에 대해 100% 상보성일 수 있거나, 또는 예를 들어 올리고뉴클레오티드와 표적 서열 사이에 형성된 헤테로듀플렉스가 세포 뉴클레아제의 작용 및 생체 내에서 일어날 수 있는 다른 방식의 분해를 견딜 수 있도록 충분히 안정하다면, 변이체를 수용하기 위해 불일치를 포함할 수 있다. 그리하여, 특정 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드와 표적 서열 사이에 약 또는 적어도 약 70% 서열 상보성, 예를 들어, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 상보성을 가질 수 있다.
- [0093] 불일치는, 존재하는 경우, 통상적으로 중간부보다는 하이브리드 듀플렉스의 말단 영역을 향하여 불안정성이 더 적어진다. 허용되는 불일치의 수는 듀플렉스 안정성의 잘 이해된 원리에 따라 올리고뉴클레오티드의 길이, 듀플렉스 중의 G:C 염기쌍의 백분율, 및 듀플렉스 중의 불일치(들)의 위치에 좌우될 것이다. 이러한 AON이 표적 서열에 대해 반드시 100% 상보성이지만, 표적 pre-RNA에 결합하는 절단 인자가 조절되도록 표적 서열에 안정적으로 그리고 특이적으로 결합하는 것이 효과적이다.
- [0094] AON과 표적 서열 사이에 형성된 듀플렉스의 안정성은 결합 T<sub>m</sub> 및 세포 효소 절단에 대한 듀플렉스의 민감성의 함수이다. 상보성-서열 RNA에 대한 올리고뉴클레오티드의 T<sub>m</sub>은 종래의 방법, 예컨대 문헌[Hames *et al.*, *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, (1985), 107-108]에 기재된 것 또는 문헌[Miyada C. G. and Wallace R. B., (1987), *Methods Enzymol.* 154, 94-107]에 기재된 것에 의해 측정될 수 있다. 특정 실시양태에서, AON은 체온보다 더 높은, 바람직하게는 약 45°C 또는 50°C 초과의 상보성-서열 RNA에 대한 결합 T<sub>m</sub>을 가질 수 있다. 60-80°C 범위 또는 그 초과의 T<sub>m</sub>이 또한 포함된다.
- [0095] 변이체의 추가적인 예는 서열 번호 X-Y 중 어느 하나의 전체 길이에 걸쳐 약 또는 적어도 약 70% 서열 동일성 또는 상동성, 예를 들어, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성 또는 상동성을 갖는 AON을 포함한다.
- [0096] 바람직한 실시양태에서, 발명의 AON은 인간 FUS pre-mRNA의 엑손 3 및 4 내의 적합한 서열을 보완하여, 전사체의 RNase H 매개 분해를 유도하도록 설계된다.
- [0097] 발명의 특정 AON은 엑손 3, 4 및 15 내의 인간 FUS pre-mRNA 및/또는 mRNA에서 적합한 서열을 보완하도록 설계

된다. 바람직한 실시양태에서, 발명의 AON은 인간 *FUS* pre-mRNA의 엑손 3 및 4 내에 적합한 서열을 보완하도록 설계된다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 발명의 AON은 환자가 *FUS* 일반 변이체에 대해 이형 접합성인 경우에 pre-mRNA 및/또는 mRNA의 하나의 대립유전자의 발현을 선택적으로 녹다운시키도록 설계된다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 발명의 AON은 *FUS* pre-mRNA 및/또는 *FUS* mRNA의 RNase H 매개 분해를 유도하도록 설계된다. 가장 바람직하게는, 발명의 AON은 서열 번호 1 내지 서열 번호 34로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0098] AON은 바람직하게는 표 1 또는 표 2에 제공된 것으로부터 선택된다. 예를 들어, 본 발명에 사용되는 AON은 서열 번호 1 내지 34를 포함하는 목록으로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, AON은 서열 번호 1 내지 12를 포함하는 목록으로부터 선택된다. 보다 바람직하게는, AON은 서열 번호 2, 4, 5, 8 및 11을 포함하는 목록으로부터 선택된다.

[0099] **B. 사용 방법**

[0100] 발명은 *FUS*의 발현을 억제하는 방법을 추가로 제공하며, 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다:

[0101] (a) 본원에 기재된 바와 같은 AON 중 하나 이상을 제공하는 단계, 및

[0102] (b) 올리고머(들)를 표적 핵산 부위에 결합할 수 있도록 하는 단계.

[0103] 보다 구체적으로, AON은 표 1 또는 표 2에 제시된 것으로부터 선택될 수 있다. 서열은 바람직하게는 서열 번호: 서열 번호 1 내지 서열 번호 34 중 어느 하나 이상, 및 이의 조합 또는 각테일로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이는 엄격한 혼성화 조건 하에서의 이러한 서열에 대해 혼성화될 수 있는 서열, 이에 대해 상보성인 서열, 변형된 염기, 변형된 골격(backbone), 및 *FUS* 유전자 전사체에서 RNA 처리 활성을 가지는 또는 조절하는 기능적 절단부 또는 연장부를 포함하는 서열을 포함한다.

[0104] 바람직하게는, 본 발명에 사용되는 AON은 서열 번호 1 내지 12를 포함하는 목록으로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, AON은 서열 번호 2, 4, 5, 8 및 11을 포함하는 목록으로부터 선택된다.

[0105] 하나의 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 사용되는 AON은 *FUS* pre-mRNA 및/또는 mRNA의 RNase H 매개 분해를 유도한다.

[0106] (1) *FUS* 발현을 감소시키도록 설계된 AON (서열 번호 1 내지 34)를 조합한 치료 전략은 병원성 *FUS* 변이체의 영향을 감소시킬 것이다. 하나의 양태에서, 발명은 병원성 *FUS* 변이체와 관련된 질환을 앓는 대상체에서 *FUS* 단백질 병증 또는 질환을 개선하기 위한 수단을 제공하는 것을 추구한다.

[0107] **표적 서열 및 선택적 혼성화**

[0108] 올리고머 및 DNA, cDNA 또는 RNA는 각 분자에서의 충분한 수의 상응하는 위치가 서로 수소 결합될 수 있는 뉴클레오티드가 차지하는 경우에 서로에 대해 상보성이다. 따라서, "특이적으로 혼성화 가능한" 및 "상보성인"은 올리고머 및 DNA, cDNA 또는 RNA 표적들 간에 안정하고 특이적인 결합이 일어나도록 충분한 정도의 상보성 또는 쌍 형성(pairing)을 나타내기 위해 사용되는 용어이다. AON의 서열은 특이적으로 혼성화될 수 있도록 그것의 표적 서열의 것과 100% 상보성일 필요는 없는 것으로 본 기술분야에서 이해된다. AON은 표적 DNA 또는 RNA 분자에 대한 화합물의 결합이 표적 DNA 또는 RNA 생성물의 정상 기능을 방해하는 경우에 특이적으로 혼성화될 수 있으며, 특이적 결합이 요망되는 조건하에서, 즉, 생체내 검정 또는 치유적 치료의 경우에 생리적 조건하에서, 그리고 시험관내 검정의 경우에 검정이 수행되는 조건하에서 비-표적 서열에 대한 AON의 비특이적 결합을 회피하기 위해 충분한 정도의 상보성이 존재한다.

[0109] 선택적 혼성화는 낮은, 중간 또는 높은 엄격성 조건하에서 이루어질 수 있지만, 바람직하게는 높은 엄격성하에 이루어진다. 본 기술분야의 당업자는 혼성화의 엄격성이 염기 조성, 상보적 가닥의 길이 및 혼성화 핵산 간의 뉴클레오티드 염기 불일치의 수 이외에 염 농도, 온도, 또는 유기 용매와 같은 이러한 조건에 영향을 받을 것임을 인지할 것이다. 엄격한 온도 조건은 일반적으로 30°C 초과, 통상적으로 37°C 초과, 바람직하게는 45°C 초과, 바람직하게는 적어도 50°C 그리고 통상적으로 60°C-80°C 또는 그 초과를 포함할 것이다. 엄격한 염 조건은 일반적으로 1000 mM 미만, 통상적으로 500 mM 미만, 바람직하게는 200 mM 미만일 것이다. 그러나, 파라미터의 조합이 임의의 단일 파라미터의 측정보다 훨씬 더 중요하다. 엄격한 혼성화 조건의 예는 65°C 및 0.1 x SSC (1 x SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M 시트르산나트륨 pH 7.0)이다. 따라서, 본 발명의 AON은 표 1 또는 표 2에 제공된 서열에 대해 선택적으로 혼성화되는 올리고머를 포함할 수 있다.

[0110] 주어진 이온 강도 및 pH에서, T<sub>m</sub>은 표적 서열의 50%가 상보성 폴리뉴클레오티드에 대해 혼성화되는 온도이다.

이러한 혼성화는 표적 서열에 대한 AON의 "거의" 또는 "실질적인" 상보성뿐만 아니라 정확한 상보성으로 실시될 수 있다.

- [0111] 통상적으로, 선택적 혼성화는 적어도 약 14개의 뉴클레오타이드의 구간에 걸쳐 적어도 약 55% 동일성, 바람직하게는 안티센스 올리고머의 뉴클레오타이드와의 적어도 약 65%, 보다 바람직하게는 적어도 약 75%, 가장 바람직하게는 적어도 약 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일성이 있는 경우에 실시될 것이다. 기재된 바와 같이 상동성 비교의 길이는 더 긴 구간에 걸쳐 있을 수 있고, 특정 실시양태에서, 종종 적어도 약 9개의 뉴클레오타이드, 일반적으로 적어도 약 12개 뉴클레오타이드, 보다 일반적으로 적어도 약 20개, 종종 적어도 약 21, 22, 23 또는 24개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 25, 26, 27 또는 28개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 29, 30, 31 또는 32개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 36개 또는 그 초과 뉴클레오타이드의 구간에 걸쳐 있을 것이다.
- [0112] 따라서, 일부 실시양태에서, 발명의 AON 서열은 바람직하게는 본원의 서열 목록에 나타난 서열에 대해 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 86, 87, 88, 89 또는 90% 상동성을 갖는다. 보다 바람직하게는, 적어도 91, 92, 93, 94, 또는 95%, 보다 바람직하게는 적어도 96, 97, 98% 또는 99% 상동성이 존재한다. 일반적으로, 안티센스 올리고머의 길이가 짧을수록, 선택적 혼성화를 얻기 위해 요구되는 상동성은 더 높아진다. 결과적으로, 발명의 AON이 약 30개 미만의 뉴클레오타이드로 이루어지는 경우, 동일성 백분율은 본원의 서열 목록에 제시된 AON과 비교하여 75% 초과, 바람직하게는 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95%, 96, 97, 98% 또는 99% 초과인 것이 바람직하다. 뉴클레오타이드 상동성 비교는 서열 비교 프로그램 예컨대 GCG Wisconsin Bestfit 프로그램 또는 GAP에 의해 실시될 수 있다 (Deveraux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research* 12, 387-395). 이러한 방식으로, 본원에 인용된 것과 유사한 또는 실질적으로 상이한 길이의 서열은 정렬에의 갭의 삽입에 의해 비교될 수 있고, 이러한 갭은 예를 들어 GAP에 의해 사용되는 비교 알고리즘에 의해 결정된다.
- [0113] 본 발명의 AON은 감소된 상동성의 영역, 및 표적 서열과 정확한 상동성의 영역을 가질 수 있다. 올리고머가 그것의 전체 길이에 대해 정확한 상동성을 가질 것이 필요로 되지 않는다. 예를 들어, 올리고머는 표적 서열과 동일한 적어도 4 또는 5개의 염기의 연속적인 구간, 바람직하게는 표적 서열과 동일한 적어도 6 또는 7개의 염기의 연속적인 구간, 보다 바람직하게는 표적 서열과 동일한 적어도 8 또는 9개의 염기를 가질 수 있다. 올리고머는 표적 서열과 동일한 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 26개의 염기의 구간을 가질 수 있다. 올리고머 서열의 나머지 구간은 표적 서열과 간헐적으로 동일할 수 있고; 예를 들어, 나머지 서열은 동일한 염기, 그 다음 동일하지 않은 염기, 그 다음 동일한 염기를 가질 수 있다. 대안적으로 (또는 마찬가지로) 올리고머 서열은 완전한 상동성보다 낮은 구간들이 산재되어 있는 동일한 서열의 여러 구간 (예를 들어 3, 4, 5 또는 6개의 염기)를 가질 수 있다. 이러한 서열 불일치는 바람직하게는 절단 변형 활성의 손실이 없거나 거의 없을 것이다.
- [0114] 생리학적 반응
- [0115] 일 양태에서, 본 발명의 방법은 대상체에서 생리학적 반응을 유도한다. 바람직하게는, 방법은 선택된 *FUS* 대립 유전자의 발현을 감소시킨다.
- [0116] 용어 "조절하다(modulate)" 또는 "조절하다(modulates)"는 임의로 정의된 및/또는 통계적으로 유의미한 양에 의해 하나 이상의 정량화 가능한 파라미터를 "증가시키거나" 또는 "감소시키는" 것을 포함한다. 용어 "증가시키다" 또는 "증가시키는", "향상시키다" 또는 "향상시키는", 또는 "자극시키다" 또는 "자극시키는"은 일반적으로 AON 부재 또는 대조군 화합물에 의해 야기되는 반응에 비해 세포 또는 대상체에서 더 큰 생리학적 반응 (즉, 하위 효과(downstream effect))를 생성하거나 야기하는 일종 또는 AON 또는 조성물의 능력과 관련된다.
- [0117] "향상시키다" 또는 "향상시키는", 또는 "증가시키다" 또는 "증가시키는", 또는 "자극시키다" 또는 "자극시키는"은 일반적으로 안티센스 화합물 부재 또는 대조군 화합물에 의해 야기되는 반응과 비교하여, 세포 또는 대상체에서 더 큰 생리학적 반응 (즉, 하위 효과)를 생성하거나 야기하는 일종 또는 안티센스 화합물 또는 조성물의 능력과 관련된다. "증가된" 또는 "향상된" 양은 통상적으로 "통계적으로 유의미한" 양이며, 안티센스 화합물 부재 (제제의 부재) 또는 대조군 화합물에 의해 생성되는 양의 1.1, 1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 또는 그 초과 배수 (예를 들어, 500, 1000배) (그 사이의 모든 정수 및 소수 점 및 1 초과), 예를 들어, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등 포함)인 증가를 포함할 수 있다.
- [0118] 용어 "감소하는" 또는 "감소하다"는 일반적으로 AON 부재 또는 대조군 화합물에 의해 야기된 반응에 비해 세포 또는 대상체에서 감소된 생리학적 반응 (즉, 하위 효과)를 생성하거나 야기하는 일종 또는 AON 또는 조성물의

능력과 관련된다. 용어 "감소하다" 또는 "억제하다"는 일반적으로 진단 분야에서 통상의 기술에 따라 측정된 바와 같은, 관련된 생리학적 또는 세포 반응, 예컨대, 본원에 기재된 질환 또는 병태의 증상을 "감소시키는" 발명의 하나 이상의 안티센스 화합물의 능력과 관련될 수 있다. 관련된 생리학적 또는 세포 반응 (생체내 또는 시험관내)은 본 기술분야의 당업자에게 명확할 것이며, FUS 관련 병태의 증상 또는 병리의 감소를 포함할 수 있다. 반응에서 "감소하다"는 안티센스 화합물 부재 또는 대조군 조성물에 의해 생성된 반응과 비교하여 통계적으로 유의미할 수 있고, 그 사이의 모든 정수를 포함하여 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 감소를 포함할 수 있다.

[0119] 관련된 생리학적 또는 세포 반응 (생체내 또는 시험관내)은 본 기술분야의 당업자에게 명확할 것이며, FUS 발현의 양의 감소를 포함할 수 있다. "증가된" 또는 "향상된" 양은 통상적으로 통계적으로 유의미한 양이며, AON 부재 (제제의 부재) 또는 대조군 화합물에 의해 생성된 양의 1.1, 1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 또는 그 초과 배수 (예를 들어, 500, 1000배) (그 사이의 모든 정수 및 소수 점 및 1 초과, 예를 들어, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8)인 증가를 포함할 수 있다. 용어 "감소하다" 또는 "억제하다"는 일반적으로 진단 분야에서 통상의 기술에 따라 측정된 바와 같은, 관련된 생리학적 또는 세포 반응, 예컨대, 본원에 기재된 질환 또는 병태의 증상을 "감소시키는" 하나 이상의 AON 또는 조성물의 능력과 관련될 수 있다. 관련된 생리학적 또는 세포 반응 (생체내 또는 시험관내)은 본 기술분야의 당업자에게 명확할 것이며, 예컨대 ALS, FTLD, AD와 같은 FUS 단백질 병증과 관련된 질환의 증상 또는 병리의 감소를 포함할 수 있다. 반응에서 "감소하다"는 AON 부재 또는 대조군 조성물에 의해 생성된 반응과 비교하여 통계적으로 유의미할 수 있고, 그 사이의 모든 정수를 포함하여 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 감소를 포함할 수 있다.

[0120] 변형된 AON

[0121] 일부 실시양태에서, AON은 자연적으로 발생된 핵산 분자의 화학 조성을 가지며, 즉, AON은 변형된 또는 치환된 염기, 당, 또는 서브유닛 간의 연결을 포함하지 않는다.

[0122] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 AON은 자연적으로 발생되지 않은 핵산 분자, 또는 "올리고뉴클레오티드 유사체"이다. 예를 들어, 자연적으로 발생되지 않은 핵산은 하나 이상의 비-천연 염기, 당, 및/또는 서브유닛 간의 연결, 예를 들어, 자연적으로 발생된 핵산 분자에서 발견되는 것과 관련하여 변형되거나 치환된 염기, 당, 및/또는 연결을 포함할 수 있다. 예시적인 변형은 아래에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 자연적으로 발생되지 않은 핵산은 하나 이상의 유형의 변형, 예를 들어, 당 및 염기 변형, 당 및 연결 변형, 염기 및 연결 변형, 또는 염기, 당, 및 연결 변형을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, AON은 비-천연 (예를 들어, 변형된 또는 치환된) 염기를 함유한다. 일부 실시양태에서, AON은 비-천연 (예를 들어, 변형된 또는 치환된) 당을 함유한다. 일부 실시양태에서, AON은 비-천연 (예를 들어, 변형된 또는 치환된) 서브유닛 간의 연결을 함유한다. 일부 실시양태에서, AON은 하나 초과 유형의 변형 또는 치환, 예를 들어, 비-천연 염기 및/또는 비-천연 당, 및/또는 비-천연 서브유닛 간의 연결을 함유한다.

[0123] 따라서, (i) 변형된 골격 구조, 예를 들어, 자연적으로 발생된 올리고- 및 폴리뉴클레오티드에서 발견되는 표준 포스포디에스테르 연결 이외의 골격, 및/또는 (ii) 변형된 당 모이어티, 예를 들어, 리보오스 또는 데옥시리보오스 모이어티 보다는 모르폴리노 모이어티를 갖는 자연적으로 발생되지 않은 AON이 포함된다. 올리고뉴클레오티드 유사체는 표준 폴리뉴클레오티드 염기에 대해 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 수소 결합할 수 있는 염기를 지원하며, 여기서 유사체 골격은 표준 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 단일 가닥 RNA 또는 단일 가닥 DNA)에서 올리고뉴클레오티드 유사체 분자와 염기 사이에 서열-특이적 방식으로 이러한 수소 결합을 허용하는 방식으로 염기를 제공한다. 바람직한 유사체는 실질적으로 하전되지 않은, 인 함유 골격을 갖는 것이다.

[0124] AON을 생성하기 위한 하나의 방식은 2' 하이드록시리보오스 위치의 메틸화이며, 포스포포티오에이트 골격의 혼입은 뉴클레아제 분해에 대해 훨씬 더 내성을 가지는 것을 제외하고 RNA와 피상적으로 유사한 분자를 생성하지만, 발명의 기술분야의 당업자는 발명의 목적으로 사용될 수 있는 적합한 골격의 다른 형태를 인지할 것이다.

[0125] 안티센스 올리고머와의 듀플렉스 형성 과정에서 pre-mRNA/mRNA의 분해를 회피하기 위해, 방법에서 사용되는 AON은 내인성 RNase H에 의한 절단을 최소화하거나 방지하도록 조정될 수 있다. RNase H를 활성화시키지 않는 안티센스 분자는 공지된 기술 (예를 들어, 미국등록특허 제5,149,797호 참조)에 따라 제조될 수 있다. 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 서열일 수 있는 이러한 안티센스 분자는 단순히 이의 하나의 구성원으로서

올리고뉴클레오타이드를 함유하는 듀플렉스 분자에 대한 Rnase H의 결합을 입체적으로 방해 또는 방지하는 임의의 구조적 변형을 함유하며, 이러한 구조적 변형은 듀플렉스 형성을 실질적으로 방해하거나 파괴하지 않는다. 듀플렉스 형성에 포함된 올리고뉴클레오타이드의 부분들은 이에 결합하는 Rnase H에 포함된 부분들과 실질적으로 상이하므로, Rnase H를 활성화시키지 않는 다수의 안티센스 분자가 이용가능하다. 이러한 특성은, 세포내에서 또는 Rnase H를 함유하는 조 추출물로서 메틸화되지 않은 올리고머의 RNA의 처리가 pre-mRNA:AON 듀플렉스의 분해를 초래할 수 있으므로, 매우 바람직하다. 이러한 분해를 우회하거나 유도하지 않게 할 수 있는 임의의 형태의 변형된 AON이 본 방법에 사용될 수 있다. 뉴클레아제 내성은 발명의 AON을 변형시켜 이것이 부분적으로 불포화된 지방족 탄화수소 사슬 및 카복실산기, 에스테르기, 및 알코올기를 포함하는 하나 이상의 극성 또는 하전된기를 포함하도록 함으로써 달성될 수 있다.

[0126] RNA와 듀플렉스된 경우 세포 Rnase H에 의해 절단되지 않는 AON의 예는 2'-O-메틸 유도체이다. 이러한 2'-O-메틸-올리고리보뉴클레오타이드는 세포 환경 및 동물 조직에서 안정하고, RNA와의 임의 듀플렉스는 임의 리보- 또는 데옥시리보-대응물보다 더 높은 T<sub>m</sub> 값을 갖는다. 대안적으로, 발명의 뉴클레아제 내성 AON은 플루오르화된 마지막 3'-말단 뉴클레오타이드 중 적어도 하나를 가질 수 있다. 여전히 대안적으로, 발명의 뉴클레아제 내성 AON은 마지막 3-말단 뉴클레오타이드 염기 중 적어도 2개 사이에 연결된 포스포로티오에이트 결합을 가지고, 바람직하게는 마지막 4개의 3'-말단 뉴클레오타이드 염기 사이에 연결된 포스포로티오에이트 결합을 갖는다.

[0127] 감소된 RNA 절단은 또한 대안적인 올리고뉴클레오타이드 화학을 사용하여 달성될 수 있다 (예를 들어, 미국등록특허 제5,149,797호 참조). 예를 들어, AON은 다음의 것을 포함하는 목록으로부터 선택될 수 있다: 티오포스포라미데이트 모르폴리노 올리고머 (TMO) 키메라, 포스포라미데이트 또는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머 (PMO); PMO-X; PPMO; 펩티드 핵산 (PNA); 잠금 핵산 (LNA) 및 알파-L-LNA, 2' -아미노 LNA, 4'-메틸 LNA 및 4'-O-메틸 LNA를 포함하는 유도체; 에틸렌 가교된 핵산 (ENA) 및 그것의 유도체; 포스포로티오에이트 올리고머; 트리시클로-DNA 올리고머 (tcDNA); 트리시클로포스포로티오에이트 올리고머; 2' O-메틸-변형된 올리고머 (2' -Ome); 2' -O-메톡시 에틸 (2' -MOE); 2' -플루오로, 2' -플루로아라비노(2' -fluroarabino) (FANA); 비잠금 핵산 (UNA); 핵시톨 핵산 (HNA); 시클로핵세닐 핵산 (CeNA); 2' -아미노 (2' -NH<sub>2</sub>); 2' -O-에틸렌아민 또는 혼합물 또는 캡머로서의 상술한 것의 임의의 조합. PMO의 주요 이점은 증가된 안전성 프로파일이다. 임의의 중성 전하는 이들이 감소된 혈소관 활성화 및 면역 활성화로 단백질 상호작용에 대해 덜 민감성이도록 만든다. 이는 또한 뉴클레아제에 의한 분해를 감소시킨다. 이는 또한 5년 초과 동안 DMD 환자에서 안전하게 사용되었다.

[0128] 일 양태에서, 발명의 변형된 AON은 펩티드에 접합될 수 있다. 바람직하게는, AON은 PTMO, 즉, 아마이드, 말레이미드 또는 클릭 화학(click chemistry)을 통해 (바람직하게는 구리가 없는 클릭 화학을 사용하여, 예를 들어, 사이클로옥틴 연결을 통해) 펩티드 모이어티에 화학적으로 접합된 TMO 올리고뉴클레오타이드이고, 적합한 링커, 예컨대, 절단 가능하거나 pH-민감성인 링커를 포함한다. 펩티드 모이어티는 3' 또는 5' 말단을 통해 연결될 수 있다. 가장 바람직하게는, 펩티드 모이어티는 세포를 관통하여 핵에 도달하는 AON의 능력을 개선할 수 있는 펩티드이다. 예를 들어, 펩티드 모이어티는 아르기닌이 풍부한 펩티드, 양이온성 펩티드 및/또는 생물다양성 미생물의 계놈으로부터 유래된 펩티드의 라이브러리로부터 선택된 펩티드일 수 있다 (Hoffman et al., *Sci Rep*, 8, 1, 12538). 펩티드는 비-천연 아미노산 및/또는 화학적으로 변형된 아미노산을 함유할 수 있거나 함유하지 않을 수 있다.

[0129] 세포 투과성 펩티드를 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머에 첨가하여 세포 흡수 및 핵 국제화를 향상시켰다. 상이한 세포 투과성 펩티드는 문헌[Jearawiriyapaisarn et al. (2008), *Mol. Ther.*, 16(9), 1624-1629]에 나타낸 바와 같이, 흡수의 효능 및 표적 조직 특이성에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. 용어 "세포 투과성 펩티드" 및 "CPP"는 상호교환적으로 사용되며, 수송 펩티드, 캐리어 펩티드, 또는 펩티드 형질도입 도메인으로도 명명되는 양이온성 세포 투과성 펩티드를 지칭한다. 본원에 나타낸 바와 같은 펩티드는 주어진 세포 배양 집단의 세포의 100% 내에서 세포 투과성을 유도하는 능력을 가지며, 전신계 투여 시 생체 내에서 다중 조직 내에 거대 분자 전좌(macromolecular translocation)를 허용한다. 펩티드는 또한 조직 또는 기관으로의 국제화된 전달 이후 세포 흡수를 향상시킬 수 있다.

[0130] 전달 효능을 추가로 개선하기 위하여, 상술한 변형된 뉴클레오타이드는 종종 지방산/지질/콜레스테롤/아미노산/탄수화물/다당류/나노입자 등과 함께 당 또는 핵염기 모이어티에 접합된다. 이러한 접합된 뉴클레오타이드 유도체를 또한 사용하여 AON을 작제함으로써 엑손 스킵핑(exon skipping)을 유도할 수 있다. 인간 *FUS* 유전자 전사체의 안티센스 올리고머-유도된 대안적 스플라이싱(alternative splicing)은 포스포로티오에이트 골격 상의 올리고리보뉴클레오타이드, PNA, 2'-Ome 또는 2'-MOE 변형된 염기를 사용할 수 있다. 2'-Ome AON이 양이온성 리포플렉스(lipoplex)로서 전달되는 경우 시험관 내에서 임의의 효율적인 흡수로 인하여 올리고 설계에 사용되지만, 이러한

화합물은 뉴클레아제 분해에 민감하고, 생체 내에서 또는 임상 적용에 이상적인 것으로 고려되지 않는다. 대안적인 화학을 사용하여 본 발명의 AON을 생성하는 경우, 본원에 제공된 서열의 우라실 (U)을 티민 (T)으로 대체할 수 있다.

- [0131] 예를 들어, 이러한 안티센스 분자는 올리고뉴클레오타이드일 수 있고, 여기서 뉴클레오타이드 간의 가교하는 포스페이트 잔기의 적어도 하나, 또는 모두는 변형된 포스페이트, 예컨대, 메틸 포스포네이트, 메틸 포스포로티오에이트, 포스포모르폴리데이트, 포스포로피페라지데이트 및 포스포르 아미데이트(phosphor amidate)이다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 간의 가교하는 포스페이트 잔기의 모든 다른 하나는 기재된 바와 같이 변형될 수 있다. 다른 비-제한적인 예에서, 이러한 안티센스 분자는 뉴클레오타이드의 적어도 하나, 또는 모두가 2' 저급 알킬 모이어티 (예를 들어, Ci-C4, 선형 또는 분지형, 포화된 또는 불포화된 알킬, 예컨대 메틸, 에틸, 에테닐, 프로필, 1-프로페닐, 2-프로페닐, 및 이소프로필)을 함유하는 분자이다. 예를 들어, 뉴클레오타이드의 모든 다른 하나는 기재된 바와 같이 변형될 수 있다.
- [0132] 본 발명에 유용한 AON의 특정 예는 변형된 골격 또는 비-천연 서브유닛 간의 연결을 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0133] 변형된 골격을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 골격 내에 인 원자를 보유하는 것 및 골격 내에 인 원자를 갖지 않는 것을 포함한다. 그것의 뉴클레오사이드 골격 내에 인 원자를 갖지 않는 변형된 올리고뉴클레오타이드도 또한 올리고뉴클레오사이드인 것으로 고려될 수 있다.
- [0134] 다른 안티센스 분자에서, 당 및 뉴클레오사이드 간의 연결 둘 모두, 즉, 뉴클레오타이드 단위의 골격은 새로운 기로 대체된다. 염기 유닛은 적절한 핵산 표적 화합물과의 혼성화를 위해 유지된다. 하나의 이러한 올리고머성 화합물인, 우수한 혼성화 특성을 갖는 것을 나타낸 올리고뉴클레오타이드 모사체가 펩티드 핵산 (PNA)으로 지칭된다. PNA 화합물에서, 올리고뉴클레오타이드의 당-골격은 아미드 함유 골격, 특히 아미노에틸글리신 골격으로 대체된다. 핵-염기는 유지되고, 골격의 아미드 부분의 아자 질소 원자에 대해 직접적으로 또는 간접적으로 결합된다.
- [0135] 변형된 올리고뉴클레오타이드는 또한 하나 이상의 치환된 당 모이어티를 함유할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 또한 핵염기 (종종 본 기술분야에서 단순히 "염기"로 지칭됨) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 변형되거나 치환된 염기를 함유하는 올리고뉴클레오타이드는 핵산 속에서 가장 일반적으로 발견된 하나 이상의 퓨린 또는 피리미딘 염기가 거의 일반적이지 않은 또는 비-천연 염기로 대체된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0136] 퓨린 염기는 이미다졸 고리에 융합된 피리미딘 고리를 포함하고; 아데닌 및 구아닌은 핵산에서 가장 일반적으로 발견되는 2개의 퓨린 핵염기이다. 이들은 N<sub>6</sub>-메틸아데닌, N<sub>2</sub>-메틸구아닌, 하이포잔틴(hypoxanthine), 및 7-메틸구아닌을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 자연적으로 발생된 퓨린으로 치환될 수 있다.
- [0137] 피리미딘 염기는 6원 피리미딘 고리를 포함하고; 시토신, 우라실, 및 티민은 핵산에서 가장 일반적으로 발견되는 피리미딘 염기이다. 이들은 5-메틸시토신 5-하이드록시메틸시토신, 슈도우라실, 및 4-티오우라실을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 자연적으로 발생된 피리미딘으로 치환될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드는 우라실 대신 티민 염기를 함유한다.
- [0138] 다른 변형된 또는 치환된 염기는 2,6-디아미노퓨린, 오르토산, 아그마티딘, 라이시딘, 2-티오피리미딘 (예를 들어 2-티오우라실, 2-티오티민), G-클램프(G-clamp) 및 그것의 유도체, 5-치환된 피리미딘 (예를 들어 5-할로우라실, 5-프로피닐우라실, 5-프로피닐시토신, 5-아미노메틸우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 5-아미노메틸시토신, 5-하이드록시메틸시토신, 슈퍼(Super) T), 7-데아자구아닌, 7-데아자아데닌, 7-아자-2,6-디아미노퓨린, 8-아자-7-데아자구아닌, 8-아자-7-데아자아데닌, 8-아자-7-데아자-2,6-디아미노퓨린, 슈퍼 G, 슈퍼 A, 및 N<sub>4</sub>-에틸시토신, 또는 이의 유도체; N<sub>2</sub>-시클로펜틸구아닌 (cPent-G), N<sub>2</sub>-시클로펜틸-2-아미노퓨린 (cPent-AP), 및 N<sub>2</sub>-프로필-2-아미노퓨린 (Pr-AP), 슈도우라실 또는 이의 유도체; 및 변성된 또는 공통 염기, 예컨대 2,6-디플루오로톨루엔 또는 무 염기(absent base) 예컨대 무염기성 부위 (예를 들어 1-데옥시리보오스, 1,2-디데옥시리보오스, 1-데옥시-2-0-메틸리보오스; 산소 고리가 질소로 대체된 피롤리딘 유도체 (아자리보오스)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 슈퍼 A, 슈퍼 G 및 슈퍼 T의 유도체의 예는 미국등록특허 제6,683, 173호 (Epoch Biosciences)에서 찾을 수 있다. cPent-G, cPent-AP 및 Pr-AP는 siRNA에 혼입된 경우에 번역자극 효과를 감소시키는 것으로 나타났다 (Peacock H. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 9200). 슈도우라실은 우리들 내에서와 같이 규칙적 N-글리코시드보다는 C-글리코시드를 가진, 우라실의 자연적으로 발생하는 이성질체화된 형태이다. 슈도우리딘-함유 합성 mRNA는 우리딘-함유 mPvNA와 비교하여 개선된 안전성 프로파

일을 가질 수 있다 (WO 2009127230 참조).

- [0139] 특정 변형된 또는 치환된 핵-염기는 발명의 AON의 결합 친화성을 증가시키는데 특히 유용하다. 이는 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 0-6 치환된 퓨린을 포함하며 이는 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함한다. 5-메틸시토신 치환은 핵산 듀플렉스 안정성을 0.6-1.2°C만큼 증가시키는 것을 나타내었으며, 이는 심지어 보다 특히 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 조합된 경우, 현재 바람직한 염기 치환이다.
- [0140] 일부 실시양태에서, 변형된 또는 치환된 핵-염기는 AON의 정제를 촉진시키는데 유용하다. 예를 들어, 특정의 실시양태에서, AON는 3개 이상 (예를 들어, 3, 4, 5, 6개 또는 그 초과)의 연속된 구아닌 염기를 함유할 수 있다. 특정의 AON에서, 3개 이상의 연속된 구아닌 염기의 스트링(string)은 올리고뉴클레오타이드의 응집을 야기하여, 정제를 복잡하게 할 수 있다. 이러한 AON에서, 연속된 구아닌 중 하나 이상은 이노신으로 치환될 수 있다. 3개 이상의 연속된 구아닌 염기의 스트링에서 하나 이상의 구아닌에 대한 이노신의 치환은 AON의 응집을 감소시키고 이에 의해 정제를 용이하게 할 수 있다.
- [0141] 하나의 실시양태에서, AON의 다른 변형은 올리고뉴클레오타이드에 올리고뉴클레오타이드의 활성화, 세포 분포 또는 세포 흡수를 향상시키는 하나 이상의 모이어티 또는 접합체를 화학적으로 연결시키는 것을 포함한다. 이러한 모이어티는 지질 모이어티, 예컨대, 콜레스테롤 모이어티, 콜산, 티오에테르, 예를 들어, 핵실-5-트리틸티올, 티오콜레스테롤, 지방족 사슬, 예를 들어, 도데칸디올 또는 운데실 잔기, 인지질, 예를 들어, 디-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸암모늄 1,2-디-O-헥사데실-rac-26라이세롤-3-H-포스포네이트, 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 또는 아다만탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 또는 옥타데실아민 또는 핵실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0142] 주어진 화합물 내 모든 위치가 균일하게 변형되는 것이 필수적이지는 않으며, 실제로 상술한 변형 중 한개 이상의 것이 단일 화합물 내에 또는 심지어 올리고뉴클레오타이드 내 단일 뉴클레오사이드 내에 혼입될 수 있다. 본 발명은 또한 키메라성 화합물인 AON을 포함한다. 본 발명의 맥락에서 "키메라성" 안티센스 화합물 또는 "키메라"는 안티센스 분자, 특히 올리고뉴클레오타이드이고, 이는 2개 이상의 화학적으로 구별되는 영역을 함유하고, 이들 각각은 적어도 하나의 단량체 단위, 즉, 올리고뉴클레오타이드 화합물의 경우에 뉴클레오타이드를 함유한다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 통상적으로 적어도 하나의 영역을 함유하며 여기서 올리고뉴클레오타이드는 변형됨으로써 뉴클레아제 분해에 대해 증가된 내성, 증가된 세포 흡수, 및 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화성을 위한 추가의 영역을 부여한다.
- [0143] 본 발명에 따라 사용되는 안티센스 분자는 잘 알려진 고체 상 합성 기술을 통해 편리하게 그리고 일상적으로 제조될 수 있다. 이러한 합성을 위한 장치는 예를 들어, Applied Biosystems (캘리포니아주 포스터 시티 소재)를 포함하는 여러 판매업체에 의해 시판되고 있다. 변형된 고체 지지체 상에서 올리고뉴클레오타이드를 합성하기 위한 하나의 방법은 미국등록특허 제4,458,066호에 기재되어 있다.
- [0144] 다른 비제한적인 예에서, 이러한 AON은 뉴클레오타이드의 적어도 하나, 또는 모두가 2' 저급 알킬 모이어티 (예컨대, 예를 들어, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, 선형 또는 분지형, 포화된 또는 불포화된 알킬, 예컨대 메틸, 에틸, 에틸렌, 프로필, 1-프로페닐, 2-프로페닐, 및 이소프로필)을 함유하는 분자이다. 예를 들어, 뉴클레오타이드의 모든 다른 하나는 기재된 바와 같이 변형될 수 있다.
- [0145] 상기 기재된 AON이 본 발명의 AON의 바람직한 형태이며, 본 발명은 다른 올리고머성 안티센스 분자를 포함하며 이는 예컨대 상기 기재된 것과 같은 올리고머 모사체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0146] 변형된 올리고머는 또한 하나 이상의 치환된 당 모이어티를 함유할 수 있다. 올리고머는 또한 핵염기 (종종 본 기술분야에서 단순히 "염기"로 지칭됨) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 특정 핵염기는 발명의 올리고머성 화합물의 결합 친화성을 증가시키는데 특히 유용하다. 이들은 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘, 및 N-2, N-6 및 0-6 치환된 퓨린을 포함하며 이는 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함한다. 5-메틸시토신 치환은 심지어 보다 특히 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 조합된 경우에 핵산 듀플렉스 안정성을 0.6-1.2°C만큼 증가시키는 것을 나타내었다. 하나의 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 적어도 하나의 피리미딘 염기는 5-치환된 피리미딘 염기를 포함하며, 여기서 피리미딘 염기는 시토신, 티민 및 우라실로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나의 실시양태에서, 5-치환된 피리미딘 염기는 5-메틸시토신이다. 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 적어도 하나의 퓨린 염기는 N-2, N-6 치환된 퓨린 염기를 포함한다. 하나의 실시양태에서, N-2, N-6 치환된 퓨린 염기는 2, 6-디아미노퓨린이다.

- [0147] 하나의 실시양태에서, AON은 하나 이상의 5-메틸시토신 치환을 단독으로 또는 다른 변형, 예컨대 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 조합하여 포함한다. 또 다른 실시양태에서, AON은 하나 이상의 2, 6-디아미노퓨린을 단독으로 또는 다른 변형과 조합하여 포함한다.
- [0148] 일부 실시양태에서, AON은 하나 이상의 모이어티, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 모이어티, 또는 접합체, 예컨대 AON의 활성화, 세포 분포, 또는 세포 흡수를 향상시키는 아르기닌-풍부 세포 투과성 펩티드에 화학적으로 연결된다. 하나의 예시적인 실시양태에서, 아르기닌-풍부 폴리펩티드는 안티센스 화합물의 3' 또는 5' 말단에 대해 그것의 N-말단 또는 C-말단 잔기에서 공유적으로 커플링된다. 또한, 예시적인 실시양태에서, 안티센스 화합물은 모르폴리노 서브유닛 및 하나의 서브유닛의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유닛의 5' 엑소사이클릭 탄소(5' exocyclic carbon)에 연결하는 인-함유 서브유닛 간의 연결로 이루어진다.
- [0149] 다른 양태에서, 발명은 상기 기재된 AON, 예를 들어, 서열 번호 1-34의 AON을 혼입시킨 발현 벡터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 발현 벡터는 변형된 레트로바이러스 또는 비-레트로바이러스 벡터, 예컨대 아데노-관련 바이러스 벡터이다.
- [0150] *AON의 활성을 측정하기 위한 검정*
- [0151] AON 및 이의 변이체의 활성은 기술분야의 통상의 기술에 따라 분석될 수 있다. 예를 들어, 조사된 RNA 및 단백질의 이소폼 형태 및 발현 수준은 전사된 핵산 또는 단백질의 이소폼 및/또는 발현을 검출하기 위한 임의의 매우 다양한 잘 알려진 방법에 의해 평가될 수 있다. 이러한 방법의 비-제한적인 예는 RNA의 이소폼의 RT-PCR 그 다음 PCR 생성물의 크기 분리, 핵산 혼성화 방법, 예를 들어, 노던 블롯(Northern blot) 및/또는 핵산 어레이의 사용; 세포 내의 RNA 전사체를 검출하기 위한 형광 인 situ 혼성화(fluorescent in situ hybridization); 핵산 증폭 방법; 단백질의 검출을 위한 면역학적 방법; 단백질 정제 방법; 및 단백질 기능 또는 활성 검정을 포함한다.
- [0152] RNA 발현 수준은 세포, 조직 또는 유기체로부터의 RNA/cDNA (즉, 전사된 폴리뉴클레오티드)를 제조하고, 분석되는 핵산 또는 이의 단편의 보체인 참조 폴리뉴클레오티드로 RNA/cDNA를 혼성화시킴으로써 평가될 수 있다. cDNA는, 선택적으로, 임의의 다양한 중합효소 연쇄 반응 또는 상보성인 폴리뉴클레오티드로의 혼성화 이전의 시험관 내 전사 방법을 사용하여 증폭될 수 있으며; 바람직하게는, 이것은 증폭되지 않는다. 하나 이상의 전사체의 발현은 또한 전사체(들)의 발현의 수준을 평가하기 위해 정량적 PCR을 사용하여 검출될 수 있다.
- [0153] *AON의 제조 방법*
- [0154] 본 발명에 따라 사용되는 AON은 잘 알려진 고체 상 합성 기술을 통해 편리하게 제조될 수 있다. 이러한 합성을 위한 장치는 예를 들어, Applied Biosystems (캘리포니아주 포스터 시티 소재)를 포함하는 여러 판매업체에 의해 시판되고 있다. 변형된 고체 지지체 상에서 올리고머를 합성하기 위한 하나의 방법은 미국등록특허 제 4,458,066호에 기재되어 있다.
- [0155] 본 기술분야에 알려진 이러한 합성을 위한 임의의 다른 수단이 추가적으로 또는 대안적으로 이용될 수 있다. 올리고머 예컨대 포스포로티오에이트 및 알킬화 유도체를 제조하기 위한 유사한 기술을 사용하는 것은 잘 알려져 있다. 하나의 이러한 자동화된 실시양태에서, 디에틸-포스포라미다이트(diethyl-phosphoramidite)는 출발 물질로서 사용되며, 문헌[Beaucage, *et al.*, (1981) *Tetrahedron Letters*, 22:1859-1862]에 기재된 바와 같이 합성될 수 있다.
- [0156] 본 발명의 AON은 시험관 내에서 합성되며 생물학적 기원의 안티센스 조성물, 또는 안티센스 올리고머의 생체내 합성을 유도하도록 설계된 유전 벡터 작제물을 포함하지 않는다. 발명의 분자는 또한 예를 들어, 흡수율, 분포 및/또는 흡수를 지원하기 위한, 리포솜, 수용체 표적화된 분자, 경구, 직장, 국소 또는 다른 제형과 같은 다른 분자, 분자 구조체 또는 화합물의 혼합물과 혼합되거나, 캡슐화되거나, 접합되거나 또는 그렇지 않으면 회합될 수 있다.
- [0157] *벡터*
- [0158] 또한, 본 발명의 올리고머성, FUS-표적화 서열을 발현할 수 있는 벡터 전달 시스템, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 서열 번호 1 내지 34 중 어느 하나 이상을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 발현하는 벡터가 포함된다.
- [0159] "벡터" 또는 "핵산 작제물"은 폴리뉴클레오티드 분자, 바람직하게는 예를 들어, 폴리뉴클레오티드가 삽입되거나 클로닝될 수 있는 플라스미드, 박테리오파지, 효모 또는 바이러스로부터 유래된 DNA 분자를 의미한다. 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 특유의 제한 부위를 함유하고, 표적 세포 또는 조직 또는 이의 후대 세포 또는 조직

을 포함하는 정의된 숙주 세포에서 자가 복제할 수 있거나 또는 정의된 숙주의 게놈과 통합되어 클로닝된 서열이 재생 가능하도록 할 수 있다.

[0160] 따라서, 박터는 자가 복제 박터, 즉, 이의 복제가 염색체 복제와는 무관한 것인 염색체 외 개체(extra-chromosomal entity)로서 존재하는 박터, 예를 들어, 선형 또는 닫힌 원형 플라스미드, 염색체의 성분, 미니-염색체(mini-chromosome), 또는 인공 염색체일 수 있다. 박터는 자가-복제를 보장하기 위한 임의의 수단을 함유할 수 있다. 대안적으로, 박터는 숙주 세포 내로 도입된 경우, 이것이 게놈에 통합되어 이것이 통합된 염색체(들)과 함께 복제되는 것일 수 있다.

[0161] **C. 치료 방법**

[0162] 본 발명의 AON은 또한 예방제 또는 치료제로서 사용될 수 있고, 이는 질환의 치료 목적을 위해 사용될 수 있다. 따라서, 하나의 실시양태에서, 본 발명은 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 또는 부형제와 혼합되는, 치료적 유효량으로 본원에 기재된 바와 같이 FUS의 발현을 감소시키기 위해 FUS pre-mRNA 및 mRNA에서의 선택된 표적에 결합되는 AON을 제공한다.

[0163] 병원성 FUS 변이체는 FUS 세포질 비정상 위치, 스플라이싱 결함, DNA 손상 및 변경된 세포 스트레스 반응을 야기할 수 있다. 이론에 얽매이지 않고, 본 발명의 AON의 투여를 통해 병원성 변이체를 함유하는 FUS mRNA의 발현을 감소시켜 FUS 세포질 응집 및 기타 FUS 관련 병리의 감소를 일으킬 수 있다.

[0164] "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 목적인 치료학적 효과를 생산하기에 효과적인, 단일 용량으로서 또는 일련의 용량의 일부로서, 포유동물 대상체에 투여된 치료적 화합물, 예컨대, 안티센스 올리고머의 양을 지칭한다.

[0165] 따라서, 발명은 FUS 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 약학적, 예방적 또는 치료적 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 다음의 것을 포함한다:

[0166] a) 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 AON, 및

[0167] b) 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제.

[0168] 바람직하게는, FUS 병원성 변이체와 관련된 질환은 ALS 또는 FTD이다.

[0169] 또한, FUS 단백질 병증과 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 방법이 제공되며, 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다: 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 AON 또는 하나 이상의 AON을 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계.

[0170] FUS-ALS 또는 FUS-FTD의 영향을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 방법이 제공되며, 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다: 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 AON 또는 하나 이상의 AON을 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계.

[0171] 발명의 방법은 FUS 단백질 병증과 관련된 질환 및 그것의 증상을 치료하거나, 예방하거나, 또는 이의 진행을 늦추기 위해 추가적인 치료제와 조합되어 투여될 수 있다. 추가적인 치료제는 FUS 단백질 병증과 관련된 질환과 관련된 다른 표적에 유도되는 AON을 포함할 수 있다. 예를 들어, 추가적인 치료제는 SOD1에 유도되는 AON을 포함할 수 있다.

[0172] 추가의 양태에서, 유전적 또는 기타 바이오마커는 발명의 AON을 통한 FUS 억제에 잘 반응할 가능성이 가장 큰 환자를 확인하기 위해 사용될 수 있다. ALS 질환 위험과 관련된 유전적 구조 변이는 ALS 유전자 및 둘러싸인 유전자 영역 내에서 확인되었다. 이들 변이는 본 발명의 방법에 반응할 가능성이 있는 환자를 확인하기 위한 유전적 바이오마커로서 사용될 수 있다. 비-유전적 바이오마커도 또한 본 발명의 방법에 반응할 가능성이 있는 환자를 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0173] 발명은 바이오마커에 의해 확인된 대상체에서 ALS, FTD의 영향을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다:

[0174] a) FUS 억제에 반응할 가능성이 있는 ALS 환자와 관련된 바이오마커의 존재에 대해 대상체를 시험하는 단계; 및

[0175] b) 대상체가 바이오마커를 발현하는 것으로 밝혀진 경우, 하나 이상의 AON 또는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 AON을 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계.

[0176] 또한 FUS 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 정제

된 및 단리된 AON의 용도가 본원에 제공된다.

- [0177] 또한 ALS, FTD의 영향을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 정제된 및 단리된 AON의 용도가 본원에 제공된다.
- [0178] 바람직하게는, 본 발명에 사용되는 AON은 표 1 또는 2에 제공된 AON의 목록으로부터 선택되거나 또는 보다 바람직하게는 서열 번호 1 내지 12로부터 선택된다.
- [0179] 발명은 또한 다음의 것의 조합을 포함하는 치료 방법을 제공한다: (1) *FUS* 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 감소시키기 위해 병원성 변이를 함유하는 *FUS* 대립유전자의 발현을 감소시키도록 설계된 AON (서열 번호 1 내지 34). 하나의 실시양태에서, 발명은 *FUS*-ALS 또는 *FUS*-FTD와 관련된 질환을 앓는 대상체에서 *FUS* 단백질 병증을 개선하기 위한 수단을 제공하는 것을 추구한다.
- [0180] 조성물은 약 1 nM 내지 1000  $\mu$ M의 각각의 발명의 요망되는 안티센스 올리고머(들)을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 조성물은 약 1  $\mu$ M 내지 500  $\mu$ M, 10  $\mu$ M 내지 500  $\mu$ M, 50  $\mu$ M 내지 750  $\mu$ M, 10  $\mu$ M 내지 500  $\mu$ M, 1  $\mu$ M 내지 100  $\mu$ M, 1  $\mu$ M 내지 50  $\mu$ M, 바람직하게는 25  $\mu$ M 내지 100  $\mu$ M의 각각의 발명의 안티센스 올리고머(들)을 포함할 수 있다. 조성물은 또한 바람직하게는 약 1 nM 내지 500 nM, 10 nM 내지 500 nM, 50 nM 내지 750 nM, 10 nM 내지 500 nM, 1 nM 내지 100 nM, 1 nM 내지 50 nM, 가장 바람직하게는 50 nM 내지 100 nM의 각각의 발명의 안티센스 올리고머(들)을 포함할 수 있다.
- [0181] 조성물은 약 1nM, 2nM, 3nM, 4nM, 5nM, 6nM, 7nM, 8nM, 9nM, 10nM, 20nM, 50nM, 75nM, 100nM, 150nM, 200nM, 250nM, 300nM, 350nM, 400nM, 450nM, 500nM, 550nM, 600nM, 650nM, 700nM, 750nM, 800nM, 850nM, 900nM, 950nM 또는 1000nM의 각각의 발명의 요망되는 안티센스 올리고머(들)을 포함할 수 있다.
- [0182] 본 발명은 대상체에 전달하기 위해 적절한 형태로 *FUS* 병원성 변이와 관련된 질환의 증상 또는 병리의 예방적 또는 치료적 치료, 예방 또는 개선에 도움이 되도록 조정된 하나 이상의 AON을 추가로 제공한다.
- [0183] 문구 "약학적으로 허용 가능한"은 생리학적으로 허용되고, 대상체에 투여되었을 때 통상적으로 알레르기 또는 유사한 원하지 않는 반응, 예컨대 복통 등을 일으키지 않는 분자 개체 및 조성물과 관련된다. 용어 "담체"는 이와 함께 화합물이 투여되는 희석제, 아췌반트, 부형제, 또는 비히클을 지칭한다. 이러한 약학적 담체는 멸균 액체, 예컨대, 물 및 오일일 수 있으며 이는 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것, 예컨대, 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름 등을 포함한다. 물 또는 염수 용액 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액은 바람직하게는 특히 주사용 용액을 위한 담체로서 이용된다. 적합한 약학적 담체는 문헌[Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990)]에 기재되어 있다.
- [0184] 하나 이상의 AON을 포함하는 약학적 조성물은 치료 섭생(regimen)의 범위에서 대상체에 투여될 수 있다. 예를 들어, 약학적 조성물은 매시간마다, 1일 3회, 1일 2회, 1일 1회, 2일마다 1회, 3일마다 1회, 1주 1회, 2주마다 1회, 매월 1회, 2개월마다 1회, 6개월마다 1회, 그리고 1년 1회로 투여될 수 있다. 적절한 섭생은 치료되는 병태의 특성에 기반하여 본 기술분야의 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0185] **D. 의약의 제조**
- [0186] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 *FUS* 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 의약의 제조를 위한 *FUS* RNA에서의 선택된 표적에 결합되는 AON의 용도를 제공한다. 따라서, *FUS* 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 의약의 제조를 위한 본원에 기재된 하나 이상의 AON의 용도가 제공된다. 바람직하게는 질환은 ALS 또는 FTD이다.
- [0187] 발명은 *FUS* 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 의약의 제조를 위한, 본원에 기재된 바에 따른 정제된 및 단리된 안티센스 올리고뉴클레오티드의 용도를 제공한다.
- [0188] 발명은 또한 ALS 또는 FTD의 영향을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 의약의 제조를 위한, 본원에 기재된 바에 따른 정제된 및 단리된 안티센스 올리고뉴클레오티드의 용도를 제공한다.
- [0189] 또한, *FUS* 억제에 반응할 가능성이 있는 환자와 관련된 바이오마커를 발현하는 대상체에서 *FUS* 병원성 변이체와 관련된 질환의 영향을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 의약의 제조를 위한 본원에 기재된 하나 이상의 AON의 용도가 제공된다.
- [0190] 바람직하게는, 의약의 제조를 위해 사용되는 AON은 표 1 또는 2에 제공된 AON의 목록으로부터 선택되거나 또는 보다 바람직하게는 서열 번호 1 내지 12로부터 선택된다. 바람직하게는, AON은 서열 번호 2, 4, 5, 8 및

11이다.

**E. 약학적 조성물**

하나의 형태의 발명에서 약학적으로 허용 가능한 희석제, 보존제, 가용화제, 에멀전화제, 아췌반트, 및/또는 담체와 함께 발명의 하나 이상의 AON의 치료적 유효량을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 이러한 조성물은 다양한 완충제 성분 (예를 들어, Tris-HCl, 아세테이트, 포스페이트), pH 및 이온 강도의 희석제 및 첨가제 예컨대 세제 및 가용화제 (예를 들어, Tween 80, 폴리소르베이트 80), 산화방지제 (예를 들어, 아스코르브산, 메타중아황산나트륨), 보존제 (예를 들어, 티메르솔(Thimersol), 벤질 알코올) 및 증량 물질(bulking substance) (예를 들어, 락토오스, 만니톨)을 포함한다. 물질은 중합체성 화합물, 예컨대, 폴리락트산, 폴리글리콜산 등의 미립자 제제 내에 혼입되거나 또는 리포솜 내에 혼입될 수 있다. 히알루론산이 또한 사용될 수 있다. 이러한 조성물은 본 단백질 및 유도체의 물리적 상태, 안정성, 생체내 방출 속도, 및 생체내 제거율에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 본원에 참조로 편입된 문헌[Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) 페이지 1435-1712]을 참조한다. 조성물은 액체 형태로 제조될 수 있거나, 또는 건조된 분말, 예컨대 동결건조된 형태일 수 있다.

본 발명에 따라 제공된 약학적 조성물은 기술분야에 알려진 임의의 수단에 의해 투여될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 바람직하게는, 투여를 위한 약학적 조성물은 주사에 의해, 경구로, 국소적으로 또는 폐 또는 비강 경로로 투여된다. AON은 보다 바람직하게는 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내 또는 피하의 투여 경로에 의해 전달된다. 적절한 경로는 치료 중인 대상체의 상태에 적절하게, 본 기술분야의 당업자에 의해 결정될 수 있다. 혈관 또는 혈관의 순환, 혈액 또는 림프 시스템, 및 뇌척수액은 일부 비-제한된 부위이며 여기서 AON이 도입될 수 있다. 직접적인 CNS 전달이 이용할 수 있으며, 예로서, 뇌실내(intracerebro-ventricular) 또는 척추강내 투여가 투여 경로로서 사용될 수 있다.

국소 투여용 제형은 개시내용의 올리고머가 국소 전달제, 예컨대, 지질, 리포솜, 지방산, 지방산 에스테르, 스테로이드, 킬레이트제 및 계면활성제와 혼합된 것을 포함한다. 지질 및 리포솜은 중성 (예컨대, 디올레오일포스파티딜 DOPE 에탄올아민, 디미리스토일포스파티딜 콜린 DMPC, 디스테아로일포스파티딜 콜린) 음성 (예를 들어, 디미리스토일포스파티딜 글리세롤 DMPG) 및 양이온성 (예를 들어, 디올레오일테트라메틸아미노프로필 DOTAP 및 디올레오일포스파티딜 에탄올아민 DOTMA)를 포함한다. 국소 또는 다른 투여의 경우, 개시내용의 올리고머는 리포솜 내로 캡슐화될 수 있거나 또는 특히 양이온성 리포솜에 대해 복합체를 형성할 수 있다. 대안적으로, 올리고머는 지질, 특히 양이온성 지질에 복합체화될 수 있다. 지방산 및 에스테르, 이의 약학적으로 허용되는 염, 및 이의 용도는 미국등록특허 제6,287,860호 및/또는 1999년 5월 20일에 출원된 미국특허출원 일련번호 제 09/315,298호에 추가로 기재되어 있다.

특정 실시양태에서, 개시내용의 AON은 경피 방법에 의해 전달될 수 있다 (예를 들어, AON의 에멀전으로의 혼입에 의해, 이러한 AON은 리포솜 내로 임의로 패키징됨). 이러한 경피 및 에멀전/리포솜-매개 전달 방법은 예를 들어, 미국등록특허 제6,965,025호와 같이 본 기술분야에서 AON의 전달에 대해 기재되어 있다.

본원에 기재된 AON은 또한 이식 가능한 장치를 통해 전달될 수 있다. 이러한 장치의 설계는 예를 들어 미국등록특허 제6,969,400호에서와 같이 기재된 합성 임플란트 설계를 사용하는 본 기술분야에 인지된 공정이다.

경구 투여용 조성물 및 제형은 분말 또는 과립, 마이크로입자, 나노입자, 물 또는 비-수성 매질 중의 현탁액 또는 용액, 캡슐, 겔 캡슐, 사체(sachet), 정제 또는 미니정제(minitabket)를 포함한다. 증점제, 풍미제, 희석제, 에멀전화제, 분산 보조제 또는 결합제가 요구될 수 있다. 경구 제형은 개시내용의 올리고머가 하나 이상의 투과성 향상제, 계면활성제 및 킬레이트제와 함께 투여되는 것이다. 계면활성제는 지방산 및/또는 이의 에스테르 또는 염, 담즙산 및/또는 이의 염을 포함한다. 담즙산/염 및 지방산 및 이의 용도는 미국등록특허 제6,287,860호에 추가로 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 투과성 향상제의 조합, 예를 들어, 담즙산/염과 조합된 지방산/염을 제공한다. 예시적인 조합은 라우르산, 카프르산 및 UDCA의 나트륨 염이다. 추가의 투과성 향상제는 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-20-세틸 에테르를 포함한다. 개시내용의 올리고머는 경구적으로, 분무 건조된 입자를 포함하는 과립 형태로 전달될 수 있거나, 또는 복합체화되어 마이크로 또는 나노입자를 형성할 수 있다. 올리고머 복합체화제(oligomer complexing agent) 및 이의 용도는 미국등록특허 제 6,287,860호에 추가로 기재되어 있다. 올리고머 및 이의 제제에 대한 경구 제형은 미국등록특허 제6,887,906호, 1999년 5월 20일에 출원된 제09/315,298호 및/또는 제US20030027780호에 상세하게 기재되어 있다.

비경구, 수막내 또는 심실내 투여를 위한 조성물 및 제형은 완충제, 희석제 및 다른 적합한 부가제, 예컨대, 비

제한적으로, 투과성 향상제, 담체 화합물 및 다른 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 또한 함유할 수 있는 멸균 수용액을 포함할 수 있다.

- [0199] 치료적으로 유용한 양의 AON의 전달은 이전에 공개된 방법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, AON의 세포간 전달은 AON 및 유효량의 블록 공중합체의 혼합물을 포함하는 조성물을 통해 이루어질 수 있다. 이러한 방법의 예는 미국특허출원 US20040248833에 기재되어 있다. 핵으로의 AON의 다른 전달 방법은 문헌[Mann CJ *et al.* (2001) *Proc, Natl. Acad. Science*, 98(1) 42-47], 및 문헌[Gebiski *et al.* (2003) *Human Molecular Genetics*, 12(15): 1801-1811]에 기재되어 있다. 내이카드 DNA로서의 발현 벡터 또는 지질 담체에 복합체화된 발현 벡터의 방식으로 핵산 분자를 세포에 혼입시키기 위한 방법은 US 6,806,084에 기재되어 있다.
- [0200] 특정 실시양태에서, 발명의 AON 및 이를 포함하는 치료용 조성물은 경피 방법에 의해 전달될 수 있다 (예를 들어, 에멀전에 AON을 혼입시키는 것에 의한, 이러한 AON은 리포솜에 임의로 패키징됨). 이러한 경피 및 에멀전/리포솜-매개 전달 방법은 예를 들어, 미국등록특허 제6,965,025호에 기재된 것과 같이 기술분야에서의 AON 전달에 대해 기재되어 있다.
- [0201] AON을 콜로이드성 분산 시스템으로 전달하는 것이 바람직할 수 있다. 콜로이드성 분산 시스템은 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구체, 비드, 및 지질-기반 시스템을 포함하며 이는 수중유 에멀전, 미셀(micelle), 혼합된 미셀, 및 리포솜 또는 리포솜 제형을 포함한다. 이러한 콜로이드성 분산 시스템은 치료용 약학적 조성물의 제조에 사용될 수 있다.
- [0202] 리포솜은 인공 막 소낭(artificial membrane vesicle)이며, 이는 시험관 내 및 생체 내에서 전달 비히클로서 유용하다. 이러한 제형은 순 양이온성, 음이온성, 또는 중성 전하 특성을 가질 수 있고, 시험관내, 생체내 및 생체의 전달 방법을 위한 유용한 특성을 갖는다. 큰 단일라멜라 소낭(unilamellar vesicle)은 큰 거대분자를 함유하는 상당한 비율의 수성 완충제를 캡슐화시킬 수 있다는 것을 나타내었다. RNA 및 DNA는 수성 내부 내에 캡슐화되어 생물학적으로 활성인 형태로 세포에 전달될 수 있다 (Fraley, *et al.*, 1981, *Trends Biochem. Sci.*, 6, 77).
- [0203] 리포솜이 효율적인 유전자 전달 비히클이 되도록 하기 위해서는, 다음의 특성이 존재하여야 한다: (1) 이의 생물학적 활성을 손상시키지 않으면서 고효율로의 관심 대상의 AON의 캡슐화; (2) 비-표적 세포와 비교하여 표적 세포에 대한 우선적이고 실질적인 결합; (3) 소낭의 수성 성분을 고효율로 표적 세포 세포질로의 전달; 및 (4) 유전 정보의 정밀하고 효과적인 발현 (Mannino, *et al.*, 1988 *Biotechniques*, 6, 682). 리포솜의 조성물은 보통 스테로이드, 특히 콜레스테롤과 일반적으로 조합된, 인지질, 특히, 높은 상-전이-온도 인지질(phase-transition temperature phospholipid)의 조합이다. 다른 인지질 또는 다른 지질이 또한 사용될 수 있다. 리포솜의 물리적 특성은 pH, 이온 강도, 및 2가 양이온의 존재에 좌우된다. 양이온성 리포솜은 음전하로 하전된 DNA 분자와 상호작용하여 안정한 복합체를 형성하는 것으로 여겨지는 양전하로 하전된 리포솜이다. pH-민감성 또는 음전하로 하전된 리포솜은 이것과의 복합체보다는 DNA를 가두는 것으로 여겨진다. 양이온성 및 비양이온성 리포솜 둘 모두는 DNA를 세포로 전달하기 위해 사용되고 있다.
- [0204] 리포솜은 또한 "입체적으로 안정한" 리포솜을 포함하고, 본원에 사용된 바와 같은, 이러한 용어는 리포솜 내로 혼입된 경우, 이러한 특화된 지질을 결여한 리포솜에 비해 향상된 순환 수명(circulation lifetime)을 야기하는 하나 이상의 특화된 지질을 포함하는 리포솜을 지칭한다. 입체적으로 안정한 리포솜의 예는 리포솜의 소낭-형성 지질 부위의 일부가 하나 이상의 당지질을 포함하거나 하나 이상의 친수성 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티로 유도체화된 것이다. 리포솜 및 이의 용도는 US 6,287,860에 추가로 기재되어 있다.
- [0205] AON은 본 기술분야에 인지된 기술 (예를 들어, 형질감염, 전기천공(electroporation), 융합, 리포솜, 콜로이드성 중합체 입자 및 바이러스 및 비-바이러스 벡터뿐만 아니라 본 기술분야에 알려진 다른 수단)을 사용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 선택된 전달 방법은 적어도 치료될 세포 및 세포의 위치에 좌우될 것이며, 숙련자에게 명백할 것이다. 예로서, 국제화는 리포솜을 유도하기 위한 표면 상의 특정 마커를 가진 리포솜, 표적 세포를 함유하는 조직으로의 직접 주사, 특이적인 수용체-매개된 흡수 등에 의해 달성될 수 있다.
- [0206] 본 기술분야에 알려진 바와 같이, AON은 예를 들어, 리포솜-매개 흡수, 지질 접합체, 폴리라이신-매개 흡수, 나노입자-매개 흡수, 및 수용체-매개 세포내이입(receptor-mediated endocytosis), 뿐만 아니라, 비-식균작용성 전달 방식(non-endocytic modes of delivery), 예컨대, 미세주사, 투과화 (예를 들어, 스트랩토라이신-0 투과화, 음이온성 펩티드 투과화), 전기천공, 및 본 기술분야에 알려진 다양한 비-침입성의 비-세포내이입 전달 방법을 포함하는 방법을 사용하여 전달될 수 있다 (문헌[Dokka and Rojanasakul, *Advanced Drug Delivery*

Reviews 44, 35-49]을 참조하며, 이는 그 전문이 참조로 편입됨).

- [0207] AON은 또한 다른 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제와 조합되어 약학적 조성물을 생성할 수 있다. 적합한 담체 및 희석제는 등장성 식염수 용액, 예를 들어, 인산염-완충 식염수를 포함한다. 조성물은 비경구, 근육내, 정맥내, 피하, 안내, 경구, 또는 경피 투여용으로 제형화될 수 있다.
- [0208] 숙련된 전문의는 최적의 투여 경로 및 임의의 특수한 동물 및 상태에 대한 임의의 투여량을 용이하게 결정할 수 있을 것이므로, 기재된 투여 경로는 단지 안내인 것으로 의도된다.
- [0209] 시험관내 그리고 생체내 둘 모두에서의 세포로 새로운 기능성 유전자 물질을 혼입시키기 위한 여러 방법론이 시도되었다 (Friedmann (1989) *Science*, 244, 1275-1280). 이들 방법론은 변형된 레트로바이러스로의 발현될 유전자의 통합 (상기 문헌[Friedmann (1989)]; Rosenberg (1991) *Cancer Research* 51(18), suppl.: 5074S-5079S); 비-레트로바이러스 벡터로의 통합 (Rosenfeld, et al. (1992) *Cell*, 68, 143-155; Rosenfeld, et al. (1991) *Science*, 252, 431-434); 또는 리포솜을 통한 이중 프로모터-인핸서 성분에 연결되는 전이유전자의 전달 (상기 문헌[Friedmann (1989)]; Brigham, et al. (1989) *Am. J. Med. Sci.*, 298, 278-281; Nabel, et al. (1990) *Science*, 249, 1285-1288; Hazinski, et al. (1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.*, 4:206-209; 및 Wang and Huang (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84, 7851-7855); 리간드-특이적 양이온-기반 수송 시스템에의 커플링 (Wu and Wu (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 14621-14624) 또는 나이키드 DNA, 발현 벡터의 사용 (상기 문헌[Nabel et al. (1990)]); Wolff et al. (1990) *Science*, 247, 1465-1468)을 포함한다. 조직으로의 전이유전자의 직접 주입은 단지 국제화된 발현만을 생성한다 (상기 문헌[Rosenfeld (1992)]); 상기 문헌 [Rosenfeld et al. (1991)]; 상기 문헌[Brigham et al. (1989)]; 상기 문헌[Nabel (1990)]; 및 상기 문헌 [Hazinski et al. (1991)]. Brigham 등의 그룹의 문헌([(1989) *Am. J. Med. Sci.* 298, 278-281 및 *Clinical Research* (1991) 39 (초록)])은 DNA 리포솜 복합체의 정맥내 또는 기관내 투여 후 마우스의 폐의 생체내 형질감염만을 보고하였다. 인간 유전자 요법 절차의 리뷰 논문의 예는 다음과 같다: Anderson, (1992) *Science* 256, 808-813; Barreau et al. (2008), *Curr Gene Ther.*, 8(5), 313-23; Mueller et al. (2008). *Clin Rev Allergy Immunol.*, 35(3), 164-78; Li et al. (2006) *Gene Ther.*, 13(18), 1313-9; Simoes et al. (2005) *Expert Opin Drug Deliv.*, 2(2), 237-54.
- [0210] 발명의 AON은 임의의 약학적으로 허용 가능한 염, 에스테르, 또는 이러한 에스테르의 염, 또는 인간을 포함하는 동물에게 투여시, 생물학적으로 활성인 대사산물 또는 이의 잔기를 (직접적으로 또는 간접적으로) 제공할 수 있는 임의의 다른 화합물을 포괄한다. 따라서, 일례로서, 개시내용은 또한 발명의 화합물의 전구약물 및 약학적으로 허용 가능한 염, 이러한 전구-약물의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 다른 생물학적 균등물(bioequivalent)에 관한 것이다.
- [0211] 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 발명의 화합물의 생리학적으로 및 약학적으로 허용 가능한 염: 즉, 모 화합물의 요망되는 생물학적 활성을 보유하며 이에 대해 바람직하지 않은 독성 효과를 부여하지 않는 염을 지칭한다. 올리고머의 경우, 약학적으로 허용 가능한 염의 바람직한 예는 (a) 양이온, 예컨대, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 마그네슘, 칼슘, 폴리아민, 예컨대, 스페르민 및 스페르미딘 등과 함께 형성된 염; (b) 무기산, 예를 들어, 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 질산 등과 함께 형성된 산 부가염; (c) 유기산, 예컨대, 예를 들어 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 석신산, 말레산, 푸마르산, 글루콘산, 시트르산, 말산, 아스코르브산, 벤조산, 탄닌산, 팔미트산, 알긴산, 폴리글루탐산, 나프탈렌설포산, 메탄설포산, p-톨루엔설포산, 나프탈렌디설포산, 폴리갈락투론산 등과 함께 형성된 염; 및 (d) 원소 음이온, 예컨대, 염소, 브롬, 및 요오드로부터 형성된 염을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 약학적 조성물은 국소 또는 전신 치료가 요망되는지의 여부 및 치료될 부위에 따라 여러 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 국소 (안내 및 점막, 뿐만 아니라 직장 전달 포함), 예를 들어, 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 취입 (예를 들어, 네블라이저(nebulizer) 사용, 기관내, 비강내, 상피 및 경피 포함)에 의한 폐, 경구 또는 비경구에 의한 것일 수 있다. 비경구 투여는 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 주사 또는 주입; 또는 두개내, 예를 들어, 척추강내 또는 뇌실내를 포함한다. 적어도 하나의 2'-O-메톡시에틸 변형을 가진 올리고머는 경구 투여에 특히 유용한 것으로 여겨진다. 바람직하게는, AON은 피하 또는 정맥내 경로를 통해 전달된다.
- [0212] 편리하게는 단위 투여 형태로 제공될 수 있는, 본 발명의 약학적 제형은 약제 산업에 잘 알려진 종래의 기술에 따라 제조될 수 있다. 이러한 기술은 활성 성분을 약학적 담체(들) 또는 부형제(들)과 회합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 활성 성분을 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 둘 모두와 균일하게 그리고 긴밀하게 회합시키고 이후, 필요한 경우, 생성물을 성형하여 제조된다.

[0213] 다음의 실시예는 개시내용의 나머지를 제한하는 것이 아닌 단지 예시적인 것으로 해석되어야 한다. 이러한 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적을 위해서만 포함된다. 이는 발명의 광범위한 요약, 개시내용 또는 설명을 상기 제시된 바와 같이 제한하는 것으로 이해되지 않아야 한다. 추가의 설명없이, 본 기술분야의 당업자는 상기 설명을 사용하여 본 발명을 이의 최대한 범위로 이용할 수 있는 것으로 여겨진다. 상기 그리고 다음의 실시예에서, 모든 온도는 섭씨도로 수정되지 않고 제시내며; 달리 나타내지 않는 한, 모든 부 및 퍼센트는 중량 기준이다.

[0214] 실시예

[0215] 실시예

[0216] 실시예 1 - 실험 전략

[0217] 배경

[0218] *FUS* 유전자에서의 일반 변이체 (CV)의 선별은 집단에서 자주 일어나는 것이 선택되게 하는 전략을 이용하였다. 각각의 CV에 대해, AON은 각 대립유전자에 대한 선택성을 최대화하도록 최적화될 수 있다. CV 표적화 대립유전자 특이적 AON 요법에 대해 적합하도록, 환자는 선택된 CV 중 하나에 대해 이형 접합성일 필요가 있을 것이다. *FUS*에서 확인된 병원성 변이체를 가진 환자의 DNA는 *FUS* 유전자 중의 선택된 CV에서의 그것의 유전자형을 결정하기 위해 시퀀싱될 수 있다. 긴 판독 시퀀싱이나 다른 방법을 활용하여 이형 접합성 CV에 비하여 그것의 병원성 변이가 속하는 대립유전자를 결정할 수 있다. 적합한 CV 표적화 AON은 이후 병원성 변이체를 함유하는 대립유전자를 선택적으로 녹다운시킬 것인 환자에 대해 선택될 수 있다. 이는 단지 소수의 AON 중 하나가 대부분의 *FUS*-ALS 또는 *FUS*-FTD 환자를 치료하는 데 적용될 수 있음을 의미한다. CV 중 하나에 대해 이형 접합성이 아닌 것에는 두 대립유전자를 동등하게 녹다운시키는 대안적인 *FUS* 표적화 AON 치료법이 제공될 수 있다.

[0219] *FUS* 일반 변이체 분석

[0220] 가장 일반적인 유형의 변이체는 단일 뉴클레오티드 다형성 (single nucleotide polymorphism; SNP)이며 이는 게놈에 단일 염기 변화가 존재한다. 인트론보다는 *FUS* 엑손 내에 위치하는 CV가 스크리닝을 위해 사용된 세포주에서 보다 용이하게 분석되도록 선택되었다 (이는 병원성 *FUS* 변이체를 함유하지 않음).

[0221] *FUS*에서의 일반 변이체를 1000개 게놈 프로젝트로부터의 데이터를 사용하여 분석하였다. 3개의 CV가 *FUS* 유전자의 엑손 영역에 존재하였다. 엑손 3에서의 동의 변이체 (CV1), 엑손 4에서의 동의 변이체 (CV2) 및 엑손 15의 3' 비번역 영역에서의 SNP (CV3). rs 넘버, 뉴클레오티드, 소수 대립유전자 빈도 및 각 변이체에 대해 이형 접합성인 데이터세트에서의 사람의 비율은 표 3에서 알 수 있다.

**표 3**

1000개 게놈 프로젝트 데이터세트로부터의 일반 *FUS* 엑손 변이체에 대해 이형 접합성인 집단의 특성 및 비율.

MAF는 1000개 게놈 데이터세트에서의 소수 대립유전자 빈도이다.  
MAF (최대)는 1000개 게놈 3 단계, ESP 및 gnomAD를 포함하는 임의의 집단에 보고된 가장 높은 소수 대립유전자 빈도이다.

	RS #	Loc	Var	유형	MAF (모두)	MAF 최대	Het % (모두)
CV1	rs741810	엑손 3	C/A	syn	0.28	0.49	32.8
CV2	rs1052352	엑손 4	C/T	syn	0.47	0.49	41.6
CV3	rs4889537	3'UTR	G/C	SNP	0.28	0.49	33.2

[0222]

[0223] 1000개 게놈 데이터세트에서의 개체 각각에 대한 유전자형을 SPSS를 사용하여 분석하여 선택된 *FUS* CV 중 하나 또는 둘에서 이형 접합성인 각 집단의 사람의 비율을 결정하였다. 모든 집단은 CV1 또는 CV3보다 CV2에 대해 이형 접합성인 사람의 비율이 더 높았다. 유럽, 미국, 아시아 집단에서는 차이가 작았지만, 그러나 아프리카 집단

에서는 CV1 및 CV3가 소수 대립유전자 빈도가 훨씬 더 작기 때문이 큰 차이가 존재하였다. 모든 3개의 변이체는 모두 서로 연관 불균형 (linkage disequilibrium; LD)으로 존재하지만, CV1과 CV3는 CV2보다 LD가 더 높았다. 이는 단독으로 표적화하는 것과 비교하여 CV1 및 CV3 둘 모두를 표적화하기 위한 집단의 추가적인 커버리지 (coverage)와 관련하여 이점이 거의 없다는 것을 의미한다. CV2뿐만 아니라 CV1 또는 CV3를 표적화하여 적어도 하나의 변이체에 대해 이형 접합성인 집단의 비율을 최대 10.6%만큼 증가시켰다 (표 4).

**표 4**

적어도 하나의 *FUS* CV에 대해 이형 접합성인 집단의 백분율 및 2개의 일반 변이체를 조합하는 것에 의한 추가적인 집단 커버리지 (1000개 게놈 3 단계로부터의 데이터).

							추가적인 커버리지		
	CV1	CV2	CV3	CV 1+3	CV 2+1	CV 2+3	1+3	2+1	2+3
모두	32.8	41.6	33.2	33.3	46.5	46.9	0.5	4.9	5.3
유럽	42.9	45.9	42.7	42.9	56.5	56.5	0	10.6	10.6
미국	45.8	49.9	45.8	45.8	57.9	57.9	0	8	8
아시아	41.1	41.4	41.6	41.6	42.9	43.1	0.5	1.5	1.7
아프리카	5.3	34.2	6.7	6.8	38.8	39.5	1.5	4.6	5.3

[0224]

[0225]

**실시예 2 - 시리즈 1 캡머의 설계**

[0226]

하나의 대립유전자에 대한 완전한 상보성 및 다른 대립유전자에 대한 단일 불일치를 갖는 3개의 *FUS* CV 각각을 표적화하기 위해 제1 라운드 of 캡머를 설계하였다. 캡머는 포스포로티오에이트 골격을 가진 2'-O-메틸 변형 RNA 염기의 어느 하나의 면에 5개의 염기의 윙에 의해 플랭킹된 10 염기 DNA 코어로 구성되었다. 조상형(ancestral) 대립유전자에 대해 완전하게 상보성인 3개 그리고 소수 대립유전자에 대해 완전하게 상보성인 3개인 6개의 AON을 각 CV에 대해 설계하였다. 3개의 캡머는 5' 말단으로부터의 코어의 2, 6 또는 9 위치에서 CV가 DNA 코어 내에 위치한 위치에 있어서 차이가 있었다. AON 좌표 및 서열은 표 5에서 알 수 있다. 스크램블 대조군 캡머 (서열 번호 35: ACCUUATCCAATAGCGCCUC)뿐만 아니라 대립유전자 선택성에 대한 대조군 (표 6)으로서 역할을 하는 엑손 3의 다른 부위에 대해 표적화된 캡머를 사용하였다. AON 명명법은 문헌[Mann, C.J., et al., *Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy*. The Journal of Gene Medicine, 2002. 4(6): p. 644-654]에 기재된 것에 기반하였으며, 이에서 종, 유전자, 엑손 번호, 수용체 또는 공여체 표적화 및 어닐링 좌표(annealing coordinate)가 기재되어 있으며, 여기서 "-"는 본원에 기재된 바와 같이 인트론 위치를 나타내고 "+"는 스플라이스 부위로부터의 엑손 위치를 특정한다. AON은 TriLink Biotechnologies, Inc (미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재) 또는 ChemGenes Corporation (미국 매사추세츠주 윌밍턴 소재)로부터 주문되었다.

표 5

FUS CV 표적화 AON 의 서열 및 특성.

AON 번호	서열 번호	명칭	표적 대립유전자	AON 좌표	AON 서열 (5'에서 3' 방향)
1	1	CV1a	A	FUS H3A(+96+115)	GCCAUATCCTGAAGTGUCCG
2	2	CV1b	A	FUS H3A(+100+119)	UCUGGCCATATCCTGAAGUG
3	3	CV1c	A	FUS H3A(+103+122)	UGCUCTGGCCATATCCUGAA
4	4	CV1d	C	FUS H3A(+96+115)	GCCAUAGCCTGAAGTGUCCG
5	5	CV1e	C	FUS H3A(+100+119)	UCUGGCCATAGCCTGAAGUG
6	6	CV1f	C	FUS H3A(+103+122)	UGCUCTGGCCATAGCCUGAA
7	7	CV2a	C	FUS H4A(+88+107)	GCCAGGGTAGGAGGACUGCU
8	8	CV2b	C	FUS H4A(+92+111)	CAUAGCCAGGGTAGGAGGAC
9	9	CV2c	C	FUS H4A(+95+114)	GGCCATAGCCAGGGTAGGAG
10	10	Cv2d	T	FUS H4A(+88+107)	GCCAGGATAGGAGGACUGCU
11	11	CV2e	T	FUS H4A(+92+111)	CAUAGCCAGGATAGGAGGAC
12	12	CV2f	T	FUS H4A(+95+114)	GGCCATAGCCAGGATAGGAG
13	13	CV3a	G	FUS 15A(+797+816)	UGACCTCAAGCCCTCUGAGU
14	14	CV3b	G	FUS 15A(+801+820)	UCAAUGACCTCAAGCCUCU
15	15	CV3c	G	FUS 15A(+804+823)	AUGUCAATGACCTCAAGCCC
16	16	CV3d	C	FUS 15A(+797+816)	UGACCTGAAGCCCTCUGAGU
17	17	CV3e	C	FUS 15A(+801+820)	UCAAUGACCTGAAGCCUCU
18	18	CV3f	C	FUS 15A(+804+823)	AUGUCAATGACCTGAAGCCC

[0227]

표 6

대조군 서열

AON 번호	서열 번호	명칭	표적 대립유전자	AON 좌표	AON 서열 (5'에서 3' 방향)
35	35	CVscr	스크램블 대조군	N/A	ACCUUATCCAATAGCGCCUC
36	36	nsCtrl	둘다	FUS H3A(+62+81)	CCACUGTAACTCTGUGUCC

[0228]

[0229] 물질 및 방법

[0230] 스크리닝을 위한 세포주 선택

[0231] 여러 인간 섬유아세포 세포주를 3개의 FUS CV에서 그것의 유전자형을 결정하기 위해 생어 시퀀싱(sanger sequencing)을 사용하여 시퀀싱하였다. CV에서 그것의 유전자형이 상이한 3개의 세포주를 스크리닝에 사용하기 위해 선택하였다. FUS CV에서 각각의 세포주의 유전자형은 표 7에서 알 수 있다. 각각의 세포주를 일정 범위의 농도로 FUS CV 표적화 캡머를 사용하여 형질감염시키고, 형질감염 후 24시간 시점에 RNA를 수집하였다. FUS RNA 수준을 아가로스 겔 전기영동법을 사용하여 시각화되는 RT-PCR을 사용하여 측정하였고, 하우스키핑 유전자로서 TBP를 사용하는 밀도측정 분석을 통해 정량화하였다.

**표 7**

CV 표적화 캡머를 스크리닝하기 위해 사용된 인간 섬유아세포 세포주의 FUS CV에서의 유전자형.

세포주	CV1	CV2	CV3
Hom 1	C/C	T/T	G/G
Hom 2	A/A	C/C	C/C
Het	C/A	C/T	G/C

[0232]

[0233]

**섬유아세포의 형질감염**

[0234]

정상 인간 피부 섬유아세포를 확립된 기술에 따라 증식시켰고, 15,000개의 세포를 10% FBS DMEM 중의 24 웰 플레이트에 시딩하고 형질감염 전 24시간 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. 모든 AON을 제조업체의 프로토콜에 따라 리포펙타민 3000(Lipofectamine 3000) (형질감염 부피의 ml당 3 µl)을 사용하여 형질감염시켰고, AON 형질감염된 세포를 24시간 동안 인큐베이션시켰다.

[0235]

**전사체 분석**

[0236]

제조업체의 설명서에 따라 DNase 처리를 포함하는 MagMAX-96 Total RNA Isolation 키트 (Life Technologies)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 제조업체의 설명서에 따라 Platinum Taq 증합효소 (Life Technologies)와 함께 1 단계 Superscript III RT-PCR 키트를 사용하여 RT-PCR를 수행하였다. 30분 동안 55°C, 2분 동안 94°C, 그 다음 30초 동안 94°C의 22회 사이클, 30초 동안 58°C 그리고 1분 동안 68°C의 온도 프로파일을 사용하여 생성물을 FUS 엑손 1 내지 6 (서열 번호 37 Fwd: GTACTCAGCGGTGTTGGAAC, 서열 번호 38: Rev: CCACTACTCATGGAGGATTG)에 걸쳐 증폭시켰다. 적용 가능한 경우, 다음의 프라이머 (서열 번호 39: Fwd: AGCGCAAGGGTTTCTGGTTT, Rev: 서열 번호 40: GGAGTCATGGGGGAGGGATA)를 사용하여 엑손 2 내지 3에 걸쳐 증폭된 관련 없는 하우스키핑 대조군 유전자 (TBP)의 전사체 수준에 대해 결과를 정규화시켰다.

[0237]

PCR 생성물을 트리스-아세테이트-EDTA(Tris-Acetate-EDTA) 완충액 중의 2% 아가로스 겔에서 분획하였고, 겔 도큐멘테이션 시스템(gel documentation system) (Vilber Lourmat, 독일 에베르하르트젤 소재) 상에서 이미지를 캡처하였다. 밀도 측정 분석은 Image J를 사용하여 수행되었다. 전사체 녹다운의 백분율은 하우스키핑 유전자에 대한 정규화와 처리된 또는 처리되지 않은 대조군 샘플에 대한 비교에 의해 결정되었다.

[0238]

**실시예 3 - 시리즈 1 CV1 표적화 캡머 결과의 스크리닝**

[0239]

섬유아세포 세포주 (Hom 1 및 Hom 2)를 50nM 및 12.5nM 농도로 CV1 (서열 번호 1 내지 6)에 대해 표적화된 AON 또는 스크램블 대조군 (CVscr) (서열 번호 35) 및 각 대립유전자에서 동일한 엑손 3의 영역에 대해 표적화된 선택성 대조군 (nsCtrl) (서열 번호 36)을 포함하는 대조군 서열로 처리하였고, 2개의 독립적인 실험에서 24시간 후 수집하였다. FUS CV1에 대해 표적화된 캡머로 처리된 두 세포주는 FUS mRNA의 감소된 발현을 나타내었다. A 대립유전자 (서열 번호 1 내지 3)에 대해 100% 상보성을 갖는 모든 캡머는 동형 접합성 C인 세포주에서보다 CV 위치에서 동형 접합성 A인 세포주에서 FUS의 더 큰 녹다운을 유도하였다. 마찬가지로 C 대립유전자 (서열 번호 4 내지 6)에 대해 100% 상보성을 갖는 모든 캡머는 동형 접합성 A 세포주에서 보다 동형 접합성 C 세포주에서 더 큰 FUS 녹다운을 유도하였다 (도 1a). 용량 반응은 12.5nM보다 50nM에서 처리되었을 때 FUS 발현이 더 적은 모든 CV 표적화 캡머에 대해 볼 수 있었다. 특히, 선택성에 대한 대조군 (nsCtrl) (서열 번호 36)으로서 역할을 하기 위해 SNP가 없는 FUS 전사체의 부위에 대해 표적화된 대조군 캡머는 두 실험에서 동형 접합성 A 세포주보다 동형 접합성 C 세포주에서 더 큰 녹다운을 야기하였다. 이는 동형 접합성 A 세포주 (Hom 2)의 감소된 형질감염 효율 또는 관련된 세포 처리 중 어느 하나의 속도 또는 효율에 있어서 세포주들 간의 차이를 보일 수 있었다.

[0240]

CV1b (서열 번호 2)는 A 대립유전자에 대해 가장 큰 선택성을 나타내었고 이는 50nM에서 두 동형 접합성 세포주에서 FUS 발현 간의 가장 큰 차이를 생성하였고, 동형 접합성 A 세포주는 처리되지 않은 대조군 세포에서 보이는 수준의 14%를, 동형 접합성 C 세포주는 44%를 발현하였다. CV1a (서열 번호 1)은 또한 A 대립유전자에 대해 일부 선택성을 나타내었다. CV1c (서열 번호 3) 처리된 세포는 두 세포주에서 유사한 수준의 FUS를 발현하였

다.

[0241] C 대립유전자에 대해 표적화된 AON은 대립유전자 간의 차별성이 낮은 것을 나타내었고, AON CV1e (서열 번호 5) 및 CV1f (서열 번호 6)은 두 세포주에서 유사한 정도로 *FUS*를 녹다운시켰다. CV1d (서열 번호 4)는 50nM에서 동형 접합성 A 세포주에서 처리되지 않은 대조군 수준의 32%로 그리고 동형 접합성 C 세포주에서 14%로 세포주들 간의 *FUS* 발현의 가장 큰 차이를 나타내었다. 이는 그러나 임의의 진정한 선택성을 나타내는 것이 아닐 수 있고, 이는 nsCtrl (서열 번호 36) 처리된 세포에서의 *FUS* 수준이 처리되지 않은 대조군 수준의 24% 및 8%로 측정되었기 때문이다.

[0242] **실시예 4 - 시리즈 1 CV2 표적화 캡머의 스크리닝**

[0243] 섬유아세포 세포주 (Hom 1 및 Hom 2)를 50nM 및 12.5nM 농도로 CV2 (서열 번호 7 내지 12)에 대해 표적화된 AON 또는 대조군 서열 (서열 번호 35 및 36)으로 처리하였고, 2개의 독립적인 실험에서 24시간 후 수집하였다. *FUS* 발현을 분석하였고, 이는 도 2b에서 알 수 있다. 용량 반응은 12.5nM보다 50nM로 처리되었을 때 *FUS* 발현이 더 적은 모든 CV2 표적화 캡머에 대해 볼 수 있었다. C 대립유전자 (서열 번호 7 내지 9)에 대해 100% 상보성을 갖는 캡머의 경우, CV2b (서열 번호 8)은 두 실험에서 동형 접합성 세포주들 사이에서 *FUS* 발현 수준의 가장 큰 차이를 나타내었고, 동형 접합성 C 세포주에서 50nM에서 대조군 수준의 21%로 그리고 동형 접합성 T 세포주에서 단지 58%로 *FUS*가 감소되었다. CV2c (서열 번호 9)는 또한 동형 접합성 C 세포주에서 더 큰 녹다운과 함께 C 대립유전자에 대한 일부 선택성을 나타내었다. 반면 CV2a (서열 번호 7)로 처리된 세포는 동형 접합성 T 세포주에서 약간 더 큰 *FUS* 녹다운을 일으켰다. 이는 T 대립유전자에 대한 어느 정도의 선택성이 있었다는 것을 나타내는 것은 아니며, 그러나 마찬가지로, 결과를 해석할 때 고려할 필요가 있는 두 세포주 사이에서 nsCtrl 처리된 세포의 *FUS* 녹다운 수준의 차이가 있었다. T 대립유전자에 대해 표적화된 캡머 중에서 CV2e (서열 번호 5)는 동형 접합성 세포주 사이에서 발현의 가장 큰 차이를 나타내었다. 차이는 CV2d (서열 번호 10) 및 CV2f (서열 번호 12)의 경우 단지 약간 더 낮았다.

[0244] **실시예 5 - 시리즈 1 CV3 표적화 캡머의 스크리닝**

[0245] 섬유아세포 세포주 (Hom 1 및 Hom 2)를 50nM 및 12.5nM 농도로 CV3 (서열 번호 13 내지 18)에 대해 표적화된 AON 또는 대조군 서열 (서열 번호 35 및 36)로 처리하였고, 2개의 독립적인 실험에서 24시간 후 수집하였다. CV3에 대해 표적화된 캡머는 CV1 및 CV2 표적화 A0에 대해 보여지는 것과 동일한 정도로 *FUS* 발현을 감소시키지 못하였고, 일부는 스크램블 대조군으로 처리된 세포에서 보여지는 것보다 더 큰 녹다운을 나타내지 못하였다. 발현은 엑손 3 (nsCtrl) (서열 번호 36)에 대해 표적화된 대조군 올리고의 경우 이전 실험과 실질적으로 그리고 유사한 수준으로 녹다운되었고, 이는 이것이 저조한 형질감염 효율에 기인한 것이 아니라는 것을 나타낸다. nsCtrl 올리고 (서열 번호 36)를 제외하고 대부분의 처리에 걸쳐 보여진 명확한 용량 반응은 없었다. 게다가, CV1 및 CV2에 대해 보여지는 바와 같이 형질감염된 캡머에 대해 100% 상보성인 동형 접합성 세포주에서 발현 수준이 더 낮아지는 경향이 없었다.

[0246] **실시예 6 - 추가적인 불일치를 갖는 CV2 시리즈 2 캡머의 설계**

[0247] 제2 시리즈의 캡머를 CV2를 표적화하기 위해 설계하였다. 제1 시리즈의 캡머로부터의 데이터는 중앙에 위치한 불일치가 대립유전자 간의 선택성을 개선한다는 것을 나타내었다. CV2b (서열 번호 8)은 C 대립유전자를 표적화하기 위해, CV2e (서열 번호 11)는 T 대립유전자를 표적화하기 위해 선택되었고, 제2 시리즈의 캡머는 추가적인 불일치가 추가된 이들 서열에 대해 설계되었다. 이들 2개의 AON은 5' 말단으로부터 10 중 6 위치에서 분자의 DNA 겹 중심에 위치한 단일 염기 변화를 제외하고는 동일하다.

[0248] **추가적인 불일치의 첨가**

[0249] 불일치된 염기쌍은 왓슨 크릭 염기쌍 형성 법칙을 따르지 않는 것이다 (구아닌-시토신 및 아데닌-티민). 불일치는 이것이 비-상보적인 피리미딘/퓨린 염기에 의해 형성된 경우의 형질도입으로서 정의된다. 퓨린/퓨린 또는 피리미딘/피리미딘 쌍에 의해 형성된 것은 염기전환형(transversion)이다 (Modrich, P., *DNA MISMATCH CORRECTION*. Annual Review of Biochemistry, 1987. **56**(1): p. 435-466). 불일치는 특히 퓨린 염기전환의 경우에 핵산 듀플렉스의 구조 및 안정성에 큰 변화를 일으킬 수 있다 (Rossetti, G., et al., *The structural impact of DNA mismatches*. Nucleic Acids Research, 2015. **43**(8): p. 4309-4321). DNA는 일반적으로 왓슨 및 크릭이 기술한 염기쌍 형성 모델에서의 수소 결합에 의해 함께 유지되는 이중 가닥 듀플렉스로 존재하며, 이것이 가장 안정한 구조이지만, 변동이 일어난다. DNA 불리딩(DNA breathing)은 듀플렉스의 용융점 미만의 구조적 또는 열적 변동으로 인해 핵산 염기쌍의 일시적 개방(transient opening)과 관련된다. 이는 더 낮은 안정성을

갖는 일시적 구조의 형성을 초래한다. 이는 DNA 듀플렉스의 내부 내에 위치한 DNA 코딩 주형에의 중합 효소 및 다른 DNA 조절 단백질 접근을 허용하는 중요한 메커니즘이다 (Phelps, C., et al., *Single-molecule FRET and linear dichroism studies of DNA breathing and helicase binding at replication fork junctions*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. **110**(43): p. 17320-17325). NMR 분광법 및 분자 동역학 시뮬레이션을 사용하여 표준 염기쌍 및 각각의 DNA 불일치에 대한 구조적 변화 및 블리딩 빈도를 특성화하였다. 표준 염기쌍의 블리딩 경향은 비교적 낮아 C/G의 경우 <0.2% 그리고 A/T의 경우 <3%로 측정되었다. 이는 C/C와 같이 일부가 대략 1%의 낮은 블리딩 경향을 갖는 불일치 염기쌍에 대해 크게 변화될 수 있다. 대조적으로 G/G 및 A/A는 블리딩 경향이 >40%이고 다른 불일치는 그 사이의 어느 부분에 있다 (문헌 [Rossetti et al.] 참조).

[0250] 일부 경우에, DNA/RNA 헤테로듀플렉스에서의 단일 불일치는 RNase H에 의한 절단의 수배 감소를 초래할 수 있다 (Giles, R.V., et al., *Single base discrimination for ribonuclease H-dependent antisense effects within intact human leukaemia cells*. Nucleic Acids Research, 1995. **23**(6): p. 954-961). RNase H에 의한 절단의 단일 불일치 구별은 SNP의 특성 및 둘러싸인 뉴클레오티드에 매우 의존적이다. 특정 대립유전자를 표적화하도록 설계된 갭머에 추가적인 불일치를 추가하면 일부 경우에는 두 대립유전자 사이의 차이가 증가할 수 있다. 다른 경우에 이는 일어나지 않으며, 반대 효과가 심지어 나타날 수 있다 (Magner, D., et al., *Influence of mismatched and bulged nucleotides on SNP-preferential RNase H cleavage of RNA-antisense gapmer heteroduplexes*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 12532). 다른 불일치의 위치와 관련된 DNA 범위 내의 불일치의 위치는 또한 RNase H 활성에 영향을 미칠 수 있다.

[0251] 각각의 FUS 대립유전자 (서열 번호 19 내지 34)를 표적화하기 위해 8개의 새로운 AON이 설계되었으며, CV2는 동일한 위치에 유지되고 추가적인 불일치를 추가하였다. 불일치는 다양한 위치 (CV2와 떨어진 1, 2, 3 또는 4개의 염기들)에 그리고 (높거나 작게) 허용될 것인 블리딩의 양에 기반하여 불일치에 대해 선택된 상이한 뉴클레오티드와 함께 첨가되었다. AON 서열 및 특성은 표 8에서 알 수 있다.

**표 8**

**FUS CV2 표적화 AON - 시리즈 2의 서열 및 특성.**

AON 번호	서열 번호	명칭	표적 대립유전자	AON 좌표	AON 서열 (5'에서 3' 방향)	MM 으로부터의 거리	MM	불일치 유형
19	19	CV2b1	C	FUS H4A(+92+111)A1	CAUAGCCAGAGTAGGAGGAC	1 개의 염기	A/C	형질도입
20	20	CV2b2	C	FUS H4A(+92+111)A1	CAUAGCCAGTGTAGGAGGAC	1 개의 염기	T/C	피리미딘 염기전환
21	21	CV2b3	C	FUS H4A(+92+111)A1	CAUAGCCAAGGTAGGAGGAC	2 개의 염기	A/C	형질도입
22	22	CV2b4	C	FUS H4A(+92+111)A1	CAUAGCCATGGTAGGAGGAC	2 개의 염기	T/C	피리미딘 염기전환
23	23	CV2b5	C	FUS H4A(+92+111)A1	CAUAGCCAGGGTAAGAGGAC	3 개의 염기	A/C	형질도입
24	24	CV2b6	C	FUS H4A(+92+111)A1	CAUAGCCAGGGTATGAGGAC	3 개의 염기	T/C	피리미딘 염기전환
25	25	CV2b7	C	FUS H4A(+92+111)A1	CAUAGCCAGGGTAGGAGGAC	4 개의 염기	G/G	퓨린 염기전환
26	26	CV2b8	C	FUS H4A(+92+111)A1	CAUAGCCAGGGTAGGAGGAC	4 개의 염기	G/A	퓨린 염기전환
27	27	CV2e1	T	FUS H4A(+92+111)A2	CAUAGCCAGAATAGGAGGAC	1 개의 염기	A/C	형질도입
28	28	CV2e2	T	FUS H4A(+92+111)A2	CAUAGCCAGTATAGGAGGAC	1 개의 염기	T/C	피리미딘 염기전환
29	29	CV2e3	T	FUS H4A(+92+111)A2	CAUAGCCAAGATAGGAGGAC	2 개의 염기	A/C	형질도입
30	30	CV2e4	T	FUS H4A(+92+111)A2	CAUAGCCATGATAGGAGGAC	2 개의 염기	T/C	피리미딘 염기전환
31	31	CV2e5	T	FUS H4A(+92+111)A2	CAUAGCCAGGATAAGAGGAC	3 개의 염기	A/C	형질도입
32	32	CV2e6	T	FUS H4A(+92+111)A2	CAUAGCCAGGATATGAGGAC	3 개의 염기	T/C	피리미딘 염기전환
33	33	CV2e7	T	FUS H4A(+92+111)A2	CAUAGCCAGGATAGGAGGAC	4 개의 염기	G/G	퓨린 염기전환
34	34	CV2e8	T	FUS H4A(+92+111)A2	CAUAGCCAGGATAGGAGGAC	4 개의 염기	G/A	퓨린 염기전환

[0252]

[0253] **실시예 7 - 시리즈 2 CV2 표적화 캡머의 스크리닝**

[0254] CV2에서 이형 접합성인 인간 섬유아세포 세포주를 스크리닝을 위해 사용하였다. AON의 하위 집합을 사용하여 가장 큰 선택성을 제공하는 농도와 시점은 100nM 농도에서 형질감염 후 24시간 시점인 것으로 결정되었다. 처리된 세포에 존재하는 각 대립유전자의 비율을 이 농도와 시점에서 복수의 실험에서 드롭렛 디지털 PCR을 사용하여 정량화하였다. 드롭렛 디지털 PCR 분석을 BioRad QX200 시스템 및 One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes를 사용하여 실시하였다. 50분 동안 50°C, 10분 동안 95°C 그 다음 30초 동안 95°C의 40회 사이클 그리고 1분 동안 55°C 마지막으로 10분 동안 98°C의 온도 프로파일로 엑손 4에서의 정방향 프라이머와 엑손 4/5 접합부와 교차하는 역방향 프라이머 (서열 번호 41: Fwd: CTATGGAAGCTCAGTCAACTCC, 서열 번호 42: Rev: GAACTGCTACCGTAACTTCC)를 사용하여 프라이머로 *FUS*를 증폭시켰다. CV2에서 T를 함유하는 전사체의 정량화는 Hex 형광단 및 Iowa Black 켄처를 가진 프로브 (프로브 1(Probe 1): CCTCCT+AT+C+CTGGCT)를 사용하여 감지되었다. CV2에서 C를 함유하는 전사체의 정량화는 FAM 형광단 및 Iowa Black 켄처를 가진 프로브 (프로브 2: CTCCT+AC+C+CTGGCTA)를 사용하여 감지되었다. 프로브를 Integrated DNA Technologies로부터 구입하였다. 각 프로브에 대한 다른 대립유전자로부터 신호가 없다는 것을 보장하기 위해 *FUS* CV2에서 각 대립유전자에 대해 동형 접합성인 세포주로부터의 RNA와 함께 대조군을 실시하였다.

[0255] 24시간 동안 AON CV2b (서열 번호 8)로 처리된 세포 (C 대립유전자에 대해 100% 상보성 그리고 T 대립유전자에 대한 1개 불일치)에서, *FUS* 전사체의 72%가 CV에서 T를 함유하는 대립유전자의 것이었다 (도 2). CV2b1 및 CV2b2 (서열 번호 19 및 20)로 처리된 세포에 존재하는 T 대립유전자의 비율은 73.3 및 73.7%로 단지 약간만 더 높았다. 추가적인 불일치를 가진 A0의 일부 (CV2b3, CV2b7 및 CV2b8) (서열 번호 21, 25, 26)는 전사체의 66.7, 63.5 및 63.1%로 측정된 T 대립유전자를 가진 서열 번호 8로 처리된 세포와 비교하여 대립유전자 선택적 녹다운의 상당한 감소를 초래하였다.

[0256] AON CV2e (서열 번호 11)로 처리된 세포 (T 대립유전자에 대해 100% 상보성 그리고 C 대립유전자에 대한 1개 불일치)에서, *FUS* 전사체의 81.1%는 C 대립유전자의 것이었다 (도 2). 추가적인 불일치 모두는 CV2e8 (서열 번호 34)를 사용한 경우 66.1%로부터 CV2e5 (서열 번호 31)의 경우 72.5%에 이르기까지의 범위로 C 대립유전자 전사체의 비율의 감소를 일으켰다.

[0257] 총 *FUS* 발현은 아가로스 겔 전기영동법과 후속되는 밀도 측정 분석과 함께 RT-PCR을 사용하여 100nM에서 24시간 인큐베이션 후 정량화되었다 (도 3). 그것의 표적 대립유전자에 대한 완전한 상보성 및 비-표적 대립유전자로부터의 단지 1개의 불일치를 갖는 AON의 경우, (서열 번호 8 및 11) 총 *FUS* 수준은 대조군 처리된 세포 (존재하는 AON이 없는 형질감염 시약으로 처리됨)에서 보여지는 수준의 31% 및 23%이었다. 추가적인 불일치가 추가되는 경우, 총 *FUS* 수준은 대조군 수준의 71%로부터 130%에 이르는 범위이었다. *FUS*가 그것의 단백질 수준에 의해 자가 조절되기 때문에, AON 매개 녹다운에 대한 반응의 상향 조절이 있을 수 있다.

[0258] **실시예 8 - CV2 표적화 AON 화학물질 비교**

[0259] CV2 표적화 AON CV2b 및 CV2e를 전반적으로 PS 변형이 있는 2' O-메틸 캡머 및 티오포스포라미데이트 모르폴리노 올리고머 (TMO) 키메라 (캡머): 5 염기 모르폴리노 3'-티오포스포라미데이트 링, 3' 말단에 2'-데옥시뉴클레오사이드 염기를 가진 10 염기 2'-데옥시뉴클레오사이드 3'-티오포스페이트 캡머로 합성하였고, CV2에 대해 이형 접합성인 인간 섬유아세포 세포주에서 3개의 실험에서 시험하였다. 세포를 25 nM과 10 nM 농도의 리포펙타민 3000을 사용하여 형질감염시켰다. 세포를 형질감염 후 3일차에 수집하였고, *FUS* 전사체를 ddPCR 및 RT-PCR 및 아가로스 겔 전기영동법에 의해 분석하였다. 25nM에서 T 대립유전자의 발현을 감소시키도록 표적화되는 CV2e (TMO 캡머)로 형질감염된 세포에서, 3일 이후의 전사체의 86%는 C 대립유전자의 것이었다 (도 4a). 25nM에서 C 대립유전자의 발현을 감소시키도록 표적화된 CV2b (TMO 캡머)로 형질감염된 세포에서, 3일 이후의 전사체의 78%는 T 대립유전자의 것이었다 (도 4b). 원하는 대립유전자의 전사체의 비율은 세포가 2'-O-메틸 캡머 AON으로 형질감염되었을 때 상당히 더 낮았다. 25nM에서 AON CV2e로의 3일 처리 이후의 총 *FUS* 발현은 대조군 수준의 62%이었고 (도 4c), 이는 C 대립유전자의 전체 발현은 L3K 처리된 대조군 세포에서의 수준과 비교하여 약간 증가되었고, 한편 T 대립유전자의 발현은 대조군의 수준의 대략 17%로 감소되었음을 나타내었다 (도 4d). 10nM에서 AON CV2b로의 3일 처리 이후의 총 *FUS* 발현은 대조군 수준의 61%이었고 (도 4c), 이는 T 대립유전자의 전체 발현은 L3K 처리된 대조군 세포의 93%로 단지 약간 감소되었고, 한편 C 대립유전자의 발현은 대조군의 수준의 대략 29%로 감소되었음을 나타내었다 (도 4d).

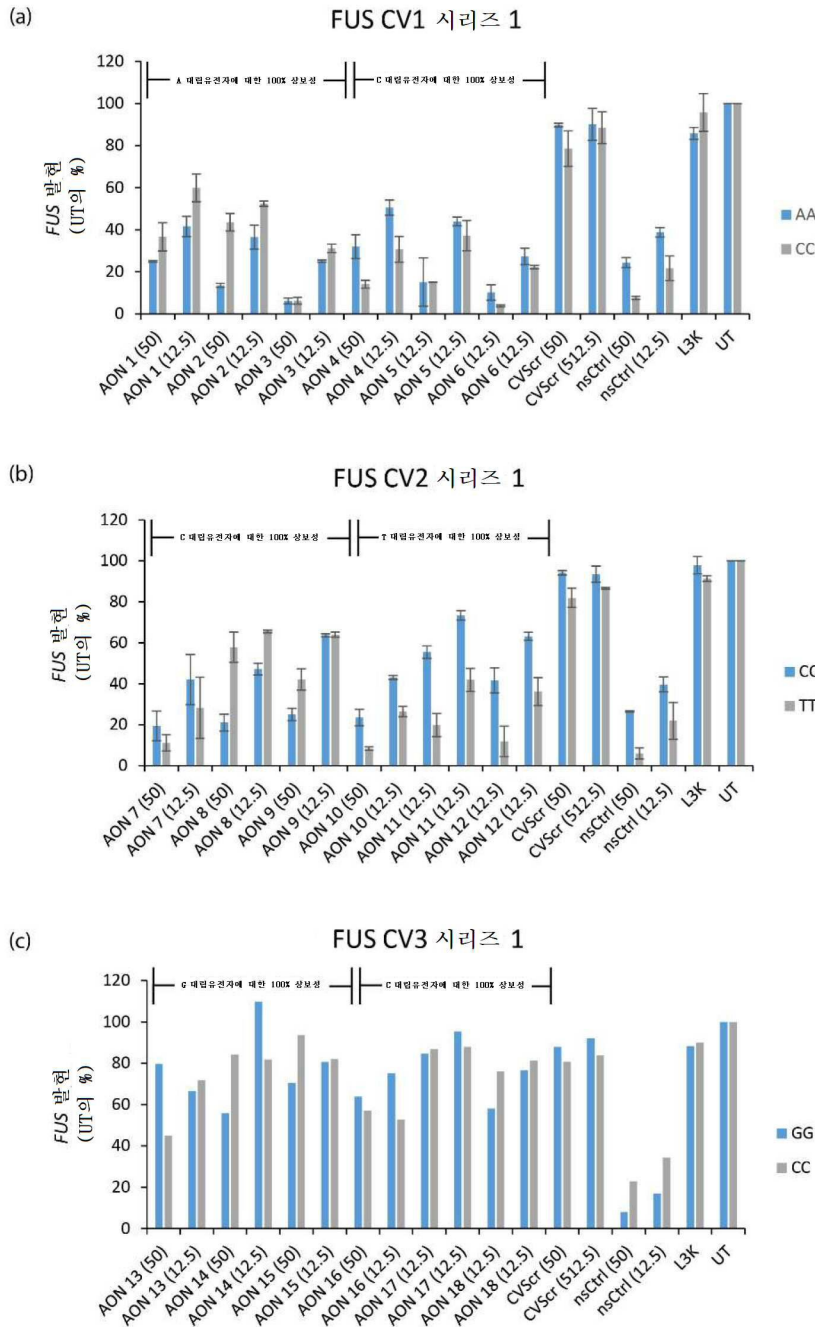
[0260] **서열 목록**

[0261]

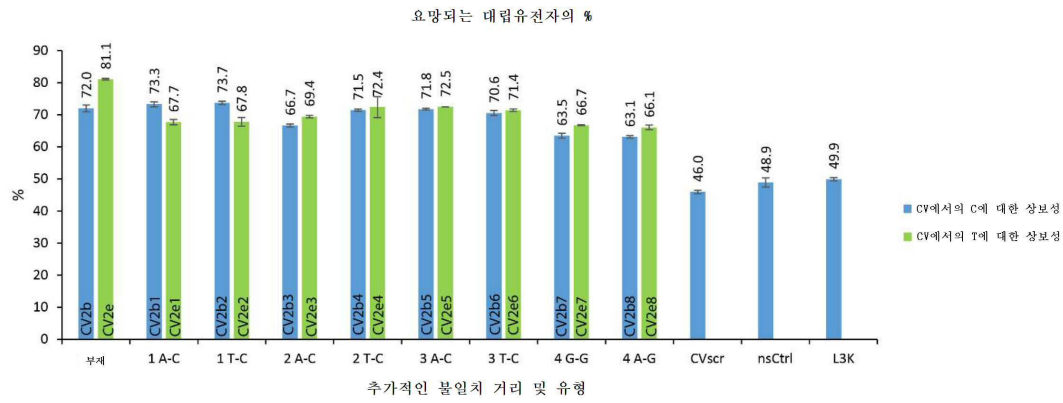
WIPO의 서열 목록 소프트웨어의 한계로 인해 출원인은 (본 발명의 많은 서열과 같은) 우라실 염기와 티민 염기 둘 모두를 포함하는 서열을 입력할 수 없으므로, 서열의 모든 우라실 염기는 서열 목록 작성과 WIPO의 서열 목록 소프트웨어로의 입력을 가능하게 하기 위해 티민 염기로 변환되었고, 분자 유형은 "DNA"로 분류되었다. 그러나, 본 명세서의 본문의 서열과 서열 목록 파일에 열거된 서열 사이에 정보에 차이가 있는 경우, 본 명세서의 본문이 서열 및 발명에 관한 정보에 대한 주요 참조 자료이다.

도면

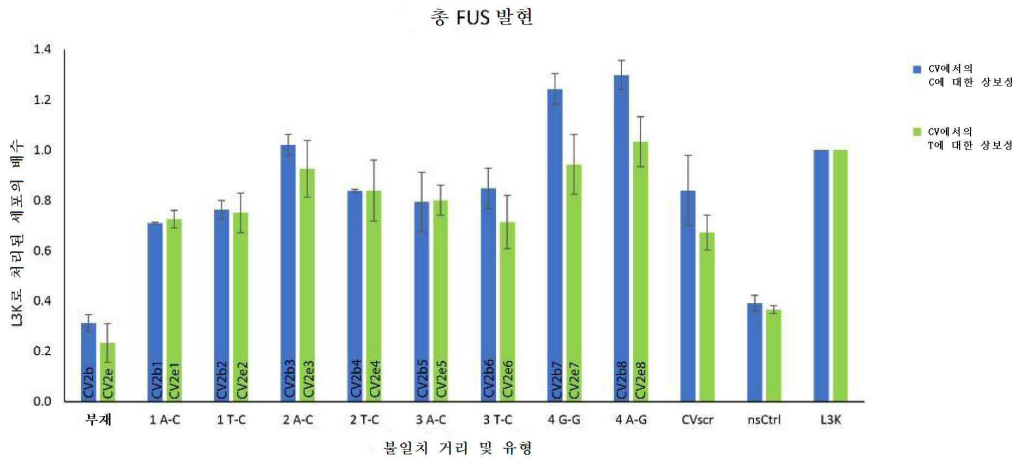
도면1



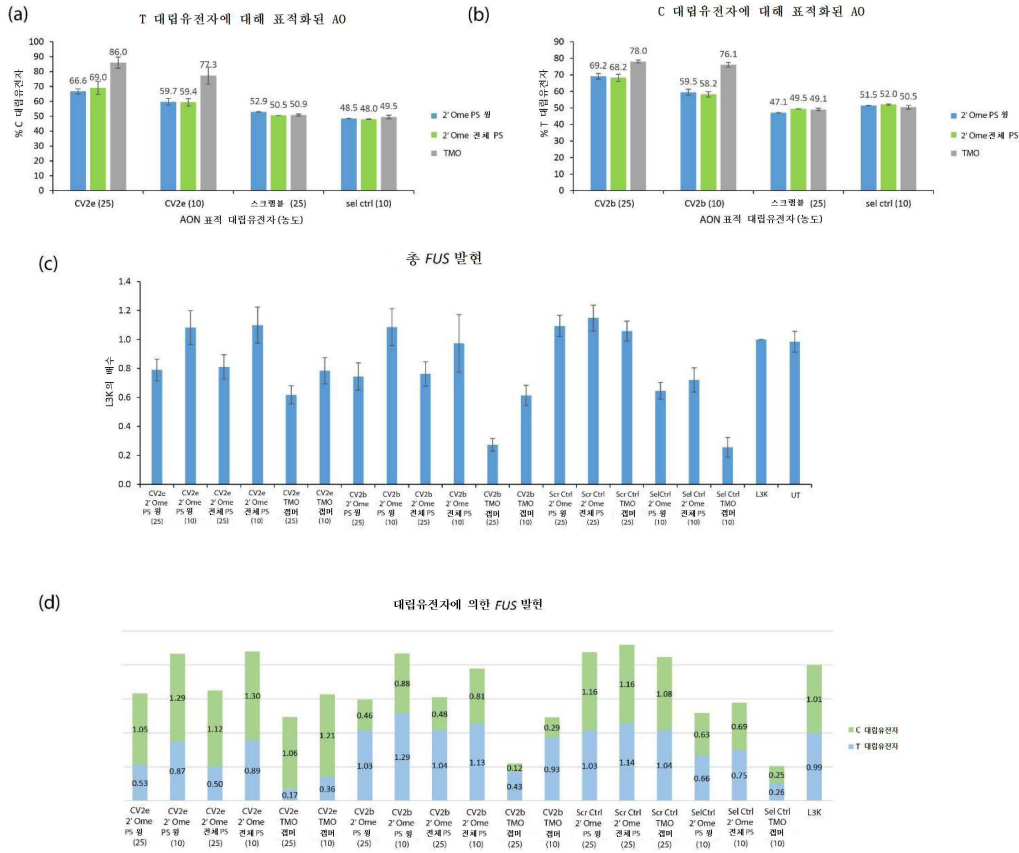
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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