



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0024745
(43) 공개일자 2025년02월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/64 (2017.01) A61K 31/713 (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/6435 (2017.08)
A61K 31/713 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7036275
(22) 출원일자(국제) 2023년04월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년10월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/065812
(87) 국제공개번호 WO 2023/201362
국제공개일자 2023년10월19일
(30) 우선권주장
63/330,797 2022년04월14일 미국(US)

- (71) 출원인
에이알오 바이오테라퓨틱스 컴패니
미국, 펜실베이니아 19106, 필라델피아, 스위트
740, 601 월넛 스트리트
- (72) 발명자
쿨카르니, 스와프닐
미국 펜실베이니아 19106, 필라델피아, 스위트 740,
601 월넛 스트리트
아디스, 러셀
미국 펜실베이니아 19106, 필라델피아, 스위트 740,
601 월넛 스트리트
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
최덕규

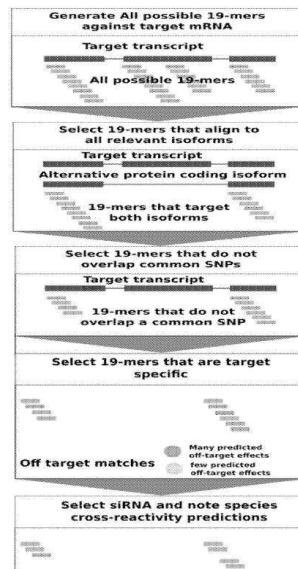
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 FN3 도메인-siRNA 접합체와 효소 대체 요법(FN3 Domain-siRNA Conjugates with Enzyme Replacement Therapy)

(57) 요약

본 개시는 효소 대체 요법 치료제와 함께 사용되는 siRNA 분자 및 이와 접합된 FN3 도메인과 같은 조성물뿐만 아니라 이를 제조하고 사용하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/47 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 3/00 (2018.01)

C12N 15/1137 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/3513 (2013.01)

C12N 2320/31 (2013.01)

C12N 2320/32 (2013.01)

(72) 발명자

나들러, 스티븐

미국 펜실바니아 19106, 필라델피아, 스위트 740,
601 월넛 스트리트

신, 야오

미국 펜실바니아 19106, 필라델피아, 스위트 740,
601 월넛 스트리트

드루지나, 잔나

미국 펜실바니아 19106, 필라델피아, 스위트 740,
601 월넛 스트리트

오'넬, 카린

미국 펜실바니아 19106, 필라델피아, 스위트 740,
601 월넛 스트리트

코라코프스키, 로버트

미국 펜실바니아 19106, 필라델피아, 스위트 740,
601 월넛 스트리트

앤더슨, 스테픈

미국 펜실바니아 19106, 필라델피아, 스위트 740,
601 월넛 스트리트

명세서

청구범위

청구항 1

글리코겐 저장 질환의 치료를 필요로 하는 대상에서 글리코겐 저장 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법이 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA에 연결된 하나 이상의 FN3 도메인을 포함하는 조성물로서, 상기 siRNA가 Gys1을 표적으로 하는 조성물; 및

상기 글리코겐 저장 질환을 치료하는데 사용되는 효소 대체 요법(enzyme replacement therapy, ERT) 치료제; 를 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 글리코겐 저장 질환이 폼페병(GSD2, 포도당분해효소 알파산(glucosidase alpha acid, GAA) 결핍), 코리병 또는 포브스병(GSD3, 글리코겐 탈분지 효소(AGL) 결핍), 앤더슨병(GSD4, 글리코겐 분지 효소(GBE1) 결핍), 맥아들병(GSD5, 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM) 결핍), 타루이병(GSD7, 근육 인산과당분해효소(PFKM) 결핍), 알돌라아제 A 결핍(GSD12, 알돌라아제 A(ALDOA) 결핍), 2형 당뇨병/당뇨병 신병증, 라포라병, 저산소증, 및 성인 폴리글루코산체병으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 ERT가 포도당분해효소 알파산(GAA), 글리코겐 탈분지 효소(AGL), 글리코겐 분지 효소(GBE1), 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM), 근육 인산과당분해효소(PFKM), 알돌라아제 A(ALDOA), 말린, 라포린, 글리코겐 합성효소(GYS2), 포도당-6-인산염분해효소(G6PC/SLC37A4), 가인산분해효소 인산화효소(PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1), 인산글리세르산 이성화효소(PGAM2), 근육 젖산 탈수소효소(LDHA), 포도당 수송체(GLUT2), β -에놀라아제(ENO3), 및 글리코게닌-1(GYG1)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 FN3 도메인이 CD71에 결합하는 FN3 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Gys1을 표적으로 하는 siRNA가 GYS1의 발현을 감소시키는 siRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 Gys1을 표적으로 하는 siRNA가 GYS1의 발현을 감소시키는 siRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 글리코겐 저장 질환이 폼페병이고,

상기 FN3 도메인이 CD71에 결합하는 폴리펩티드이고, 그리고

상기 ERT가 포도당분해효소 알파산(GAA)을 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 글리코겐 저장 질환이 라포라병이고,

상기 FN3 도메인이 CD71에 결합하는 폴리펩티드이고, 그리고

상기 ERT가 말린, 라포린, 또는 이들 둘 다를 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 siRNA가 상기 siRNA의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에 공유 결합된 화학적 링커를 통해 FN3 도메인에 공유 결합되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 siRNA 분자가 OOOO, A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z, AA, BB, CC, DD, EE, FF, GG, HH, II, JJ, KK, LL, MM, NN, OO, PP, QQ, RR, SS, TT, UU, VV, WW, XX, YY, ZZ, AAA, BBB, CCC, DDD, EEE, FFF, GGG, HHH, III, JJJ, KKK, LLL, MMM, NNN, OOO, PPP, QQQ, RRR, SSS, TTT, UUU, VVV, WWW, XXX, YYY, ZZZ, AAAA, BBBB, CCCC, DDDD, EEEE, FFFF, GGGG, HHHH, IIII, JJJJ, KKKK, LLLL, MMMM, NNNN, PPPP에 기재되거나 표 3A, 표 3B, 또는 표 4에 기재된 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는 상기 siRNA 쌍을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 FN3 도메인에 연결된 siRNA가 상기 FN3 도메인의 시스테인 잔기에 접합되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 FN3 도메인의 시스테인이 서열 번호 713에 기초한 아미노산 서열을 포함하는 상기 FN3 도메인의 잔기 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 30, 34, 38, 40, 41, 45, 47, 48, 53, 54, 59, 60, 62, 64, 70, 88, 89, 90, 91, 또는 93에 상응하는 위치에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 시스테인이 서열 번호 713의 아미노산 서열의 잔기 6, 53, 또는 88에 상응하는 위치에 위치하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 FN3 도메인이 서열 번호 509, 708, 및 710으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 FN3 도메인이 서열 번호 273, 288~291, 301~310, 312~572, 592~599, 또는 708~710의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, CD71에 결합하는 상기 FN3 도메인이 서열 번호 273, 288~291, 301~310, 312~572, 592~599, 또는 708~710의 아미노산을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA에 연결된 하나 이상의 FN3 도메인을 포함하는 조성물; 및 글리코겐 저장 질환을 치료하기 위한 효소 대체 요법(ERT) 치료제를 포함하는 것을 특징으로 하는 글리코겐 저장 질환을 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 18

글리코겐 저장 질환을 치료하기 위한 키트로서, 상기 키트가 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA에 연결된 하나 이상의 FN3 도메인을 포함하는 약학 조성물을 포함하는 제1 용기; 및 상기 글리코겐 저장 질환을 치료하기 위한 효소 대체 요법(ERT) 치료제를 포함하는 약학 조성물을 포함하는 제2 용기를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 하나 이상의 FN3 도메인이 CD71에 결합하는 FN3 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 siRNA가 Gys1을 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 21

제18항에 있어서, 상기 하나 이상의 FN3 도메인이 CD71에 결합하는 FN3 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 22

제18항에 있어서, 상기 글리코겐 저장 질환이 폼페병(GSD2, 포도당분해효소 알파산(GAA) 결핍), 코리병 또는 포브스병(GSD3, 글리코겐 탈분지 효소(AGL) 결핍), 앤더슨병(GSD4, 글리코겐 분지 효소(GBE1) 결핍), 맥아들병(GSD5, 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM) 결핍), 타루이병(GSD7, 근육 인산과당분해효소(PFKM) 결핍), 알돌라아제 A 결핍(GSD12, 알돌라아제 A(ALDOA) 결핍), 2형 당뇨병/당뇨병 신병증, 라포라병, 저산소증, 및 성인 폴리글루코산체병으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 23

제18항에 있어서, 상기 ERT가 포도당분해효소 알파산(GAA), 글리코겐 탈분지 효소(AGL), 글리코겐 분지 효소(GBE1), 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM), 근육 인산과당분해효소(PFKM), 알돌라아제 A(ALDOA), 말린, 라포린, 글리코겐 합성효소(GYS2), 포도당-6-인산염분해효소(G6PC/SLC37A4), 가인산분해효소 인산화효소(PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1), 인산글리세르산 이성화효소(PGAM2), 근육 젖산 탈수소효소(LDHA), 포도당 수송체(GLUT2), β -에놀라아제(ENO3), 및 글리코게인-1(GYG1), 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 24

제18항에 있어서, 상기 ERT가 GAA, 말린, 라포린, 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 25

제18항에 있어서, 상기 제1 용기가 Gys1을 표적으로 하는 siRNA에 연결된 CD71을 결합하는 FN3 도메인을 포함하는 약학 조성물을 포함하고 제2 용기가 GAA 효소를 포함하는 약학 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] [001] 본 출원은 2022년 4월 14일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 63/330,797에 대한 우선권을 주장하고, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] [002] 본 구현예는 접합된(conjugated) 피브로넥틴 III형 도메인(fibronectin type III domain, FN3)일 수 있는 siRNA 분자 및 이 분자를 효소 대체 요법(enzyme replacement therapies) 치료제와 병용하여 사용하는 방

법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] [003] 치료용 핵산에는 예를 들어, 소형 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA), 마이크로 RNA(miRNA), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, 플라스미드, 면역 자극 핵산, 안티센스, 안타고미르(antagomir), 안티미르(antimir), 마이크로 RNA 모방체(microRNA mimic), 슈퍼미르(supermir), U1 어댑터 및 앵타머(aptamer)가 포함된다. siRNA나 miRNA의 경우, 이러한 핵산은 RNA 간섭(RNA interference; RNAi)이라는 과정을 통해 특정 단백질의 세포 내 수준을 하향 조절할 수 있다. RNAi의 치료적 적용 범위는 매우 넓는데, siRNA와 miRNA 작제물(construct)은 표적 단백질을 표적으로 하는 어떠한 뉴클레오타이드 서열과도 합성될 수 있기 때문이다. 현재까지 siRNA 작제물은 시험관 내(in vitro)와 생체 내(in vivo) 모델 모두에서 표적 단백질을 특이적으로 하향 조절하는 능력을 보여주었다. 또한, siRNA 작제물은 현재 임상 연구에서 평가되고 있으며 다양한 질환에 대해 승인을 받았다.
- [0006] [004] 그러나 siRNA 작제물이 현재 직면하고 있는 두 가지 문제는 첫째, 혈장 내에서 핵산분해효소(nuclease) 소화에 취약하다는 점, 둘째, 전신적으로 자유 siRNA 또는 miRNA로 투여할 경우 RISC(RNA-induced Silencing Complex, RNA 유도 침묵 복합체)에 결합할 수 있는 세포 내 구획에 접근하는 능력이 제한적이라는 점이다. 양이온성 지질과 콜레스테롤 및 PEG 지질, 탄수화물(예: GalNac 삼량체)과 같은 다른 지질 성분으로 형성된 지질 나노입자와 같은 특정 전달 시스템이 올리고뉴클레오타이드의 세포 흡수를 촉진하는 데 사용되었다. 그러나 이러한 방법들은 간이 아닌 다른 조직에서 siRNA를 의도한 표적에 효율적이고 효과적으로 전달하는 데 성공적이지 못한 것으로 나타났다.
- [0007] [005] siRNA를 의도한 세포 표적에 전달하기 위한 조성물 및 방법에 대한 필요성이 여전히 남아있다. 또한 임상적으로 사용 가능한 최적화된 특성을 지닌 FN3 도메인이 필요하고, 이는 CD71에 특이적으로 결합할 수 있어야 하며, 이러한 분자를 수용체를 통한 CD71 내재화를 통해 세포 내 접근을 가능하게 하는 새로운 치료법에 사용하는 방법이 필요하다. 본 구현예들은 이러한 요구 사항뿐만 아니라 다른 요구 사항도 충족한다.

발명의 내용

- [0008] [006] 일부 구현예에서, 치료를 필요로 하는 대상에게 글리코겐 저장 질환(glycogen storage disease)을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 본 방법은 본원에 제공하는 바와 같이, 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA 분자에 연결된 하나 이상의 FN3 도메인을 포함하는 조성물 및 효소 대체 요법(ERT) 치료제를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0009] [007] 일부 구현예에서, 글리코겐 저장 질환은 폼페병(GSD2, 포도당분해효소 알파산(GAA) 결핍), 코리병 또는 포브스병(GSD3, 글리코겐 탈분지 효소(AGL) 결핍), 앤더슨병(GSD4, 글리코겐 분지 효소(GBE1) 결핍), 맥아들병(GSD5, 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM) 결핍), 타루이병(GSD7, 근육 인산과당분해효소(PFKM) 결핍), 알돌라아제 A 결핍(GSD12, 알돌라아제 A(ALDOA) 결핍), 2형 당뇨병/당뇨병 신병증, 라포라병, 저산소증 및 성인 폴리글루코산체병(polyglucosan body disease)으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0010] [008] 일부 구현예에서, ERT 치료제는 포도당분해효소 알파산(GAA), 글리코겐 탈분지 효소(AGL), 글리코겐 분지 효소(GBE1), 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM), 근육 인산과당분해효소(PFKM), 알돌라아제 A(ALDOA), 말린, 라포르, 글리코겐 합성효소(GYS2), 포도당-6-인산염분해효소(phosphatase)(G6PC/SLC37A4), 가인산분해효소 인산화효소(PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1), 인산글리세르산 이성화효소(PGAM2), 근육 젖산 탈수소효소(LDHA), 포도당 수송체(GLUT2), β -에놀라아제(ENO3) 및 글리코게닌-1(GYG1)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 효소를 포함한다.
- [0011] [009] 일부 구현예에서, CD71 단백질에 결합하는 FN3 도메인에 접합된 siRNA가 제공된다.
- [0012] [0010] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 임의의 FN3 도메인의 아미노산 서열을 포함하는 FN3 도메인이 제공된다. 일부 구현예에서, FN3 도메인은 CD71에 결합한다. 일부 구현예에서, FN3 도메인은 CD71에 특이적으로 결합한다.
- [0013] [0011] 일부 구현예에서, 본 조성물은 유연한 링커(flexible linker)와 같은 링커에 의해 연결된 두 개의 FN3 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 두 개의 FN3 도메인이 서로 다른 표적에 결합한다. 일부 구현예에서, 제1 FN3 도메인은 CD71에 결합한다. 일부 구현예에서, 제2 FN3 도메인은 CD71이 아닌 다른 표적에 결합한다.

- [0014] [0012] 일부 구현예에서, dsRNA 또는 siRNA 분자와 같은 올리고뉴클레오티드가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 본원에 제공된 바와 같은 서열을 갖고, 본원에 제공된 변형이 있거나 없다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 약학 조성물(pharmaceutical composition)과 같은 조성물로 제공된다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 폴리펩티드에 접합된다.
- [0015] [0013] 일부 구현예에서, siRNA 분자에 접합된 하나 이상의 FN3 도메인을 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0016] [0014] 일부 구현예에서, $(X1)_n-(X2)_q-(X3)_y-L-X4$ 의 화학식을 갖는 조성물이 제공되는데, 여기서 X1은 제1 FN3 도메인이고, X2는 제2 FN3 도메인이고, X3은 제3 FN3 도메인 또는 반감기 연장제 분자(half-life extender molecule)이고, L은 링커이고, X4는 올리고뉴클레오티드 분자이고, 여기서 n, q 및 y는 각각 독립적으로 0 또는 1이다.
- [0017] [0015] 일부 구현예에서, $C-(X1)_n-(X2)_q-(X3)_y-L-X4$ 의 화학식을 갖는 조성물이 제공되는데, 여기서 C는 중합체 또는 알부민 결합 도메인(ABD)이고, X1은 제1 FN3 도메인이고, X2는 제2 FN3 도메인이고, X3은 제3 FN3 도메인 또는 반감기 연장제 분자이고, L은 링커이고, X4는 올리고뉴클레오티드 분자이고, 여기서 n, q 및 y는 각각 독립적으로 0 또는 1이다.
- [0018] [0016] 일부 구현예에서, $(X1)_n-(X2)_q-(X3)_y-L-X4-C$ 의 화학식을 갖는 조성물이 제공되는데, 여기서 X1은 제1 FN3 도메인이고, X2는 제2 FN3 도메인이고, X3은 제3 FN3 도메인 또는 반감기 연장제 분자이고, L은 링커이고, X4는 올리고뉴클레오티드 분자이고, C는 중합체 또는 알부민 결합 도메인(ABD)이고, 여기서 n, q 및 y는 각각 독립적으로 0 또는 1이다.
- [0019] [0017] 일부 구현예에서, $X4-L-(X1)_n-(X2)_q-(X3)_y$ 의 화학식을 갖는 조성물이 제공되는데, 여기서 X1은 제1 FN3 도메인이고, X2는 제2 FN3 도메인이고, X3은 제3 FN3 도메인 또는 반감기 연장제 분자이고, L은 링커이고, X4는 올리고뉴클레오티드 분자이고, 여기서 n, q 및 y는 각각 독립적으로 0 또는 1이다.
- [0020] [0018] 일부 구현예에서, $C-X4-L-(X1)_n-(X2)_q-(X3)_y$ 의 화학식을 갖는 조성물이 제공되는데, 여기서 C는 중합체 또는 알부민 결합 도메인(ABD)이고, X1은 제1 FN3 도메인이고, X2는 제2 FN3 도메인이고, X3은 제3 FN3 도메인 또는 반감기 연장제 분자이고, L은 링커이고, X4는 올리고뉴클레오티드 분자이고, 여기서 n, q 및 y는 각각 독립적으로 0 또는 1이다.
- [0021] [0019] 일부 구현예에서, $X4-L-(X1)_n-(X2)_q-(X3)_y-C$ 의 화학식을 갖는 조성물이 제공되는데, 여기서 X1은 제1 FN3 도메인이고, X2는 제2 FN3 도메인이고, X3은 제3 FN3 도메인 또는 반감기 연장제 분자이고, L은 링커이고, X4는 올리고뉴클레오티드 분자이고, C는 중합체 또는 알부민 결합 도메인(ABD)이고, 여기서 n, q 및 y는 각각 독립적으로 0 또는 1이다.
- [0022] [0020] 일부 구현예에서, $C-(X1)_n-(X2)_q[L-X4]-(X3)_y$ 의 화학식을 갖는 조성물이 제공되는데, 여기서 X1은 제1 FN3 도메인이고, X2는 제2 FN3 도메인이고, X3은 제3 FN3 도메인 또는 반감기 연장제 분자이고, L은 링커이고, X4는 올리고뉴클레오티드 분자이고, C는 중합체 또는 알부민 결합 도메인(ABD)이고, 여기서 n, q 및 y는 각각 독립적으로 0 또는 1이다.
- [0023] [0021] 일부 구현예에서, $(X1)_n-(X2)_q[L-X4]-(X3)_y-C$ 의 화학식을 갖는 조성물이 제공되는데, 여기서 X1은 제1 FN3 도메인이고, X2는 제2 FN3 도메인이고, X3은 제3 FN3 도메인 또는 반감기 연장제 분자이고, L은 링커이고, X4는 올리고뉴클레오티드 분자이고, C는 중합체 또는 알부민 결합 도메인(ABD)이고, 여기서 n, q 및 y는 각각 독립적으로 0 또는 1이다.
- [0024] [0022] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물 중 하나 이상을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.
- [0025] [0023] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 조성물 또는 본원에 제공된 바와 같은 병태를 치료하기 위한 약학 조성물 또는 약물의 제조에 있어서의 조성물의 용도가 제공된다.
- [0026] [0024] 일부 구현예에서 골격근(skeletal muscle)에서 GYS1 mRNA 및 단백질을 선택적으로 감소시키고 본원에 제공된 바와 같은 효소를 투여하는 방법이 제공된다. 특정 구현예에서, GYS1 mRNA 및 단백질은 간 및/또는 신장에서 감소하지 않거나 현저하게 감소하지 않는다.
- [0027] [0025] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 FN3 도메인을 암호화하는 단리된(isolated) 폴리뉴클레오티드가 제공

된다.

[0028] [0026] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 제공된다.

[0029] [0027] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0030] [0028] 일부 구현예에서 FN3 도메인을 생산하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 본 방법은 FN3 도메인을 암호화하거나 발현하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 또한 FN3 도메인을 정제하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, FN3 도메인은 CD71에 결합한다.

[0031] [0029] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 분자에 연결된 CD71에 결합하는 FN3 도메인과 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 일부 구현예에서 올리고뉴클레오티드 분자가 있거나 없는 하나 이상의 FN3 도메인을 포함하는 키트(kit)가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0032] [0030] 도 1은 siRNA 스크리닝을 위해 평가하고 고려하는 특성을 나타내는 흐름도이다.

[0031] 도 2는 세포에 siRNA 쌍 HHH를 형질감염(transfection)시킨 후 전사체(transcriptome)의 변화를 식별하는 RNA 서열분석 실험의 그래프이고, 화살표는 GYS1 전사체(transcript)의 상당한 감소를 나타낸다.

[0032] 도 3은 프로테오믹스 어레이에서 6,000개가 넘는 수용체를 사용하여 표적 결합 검정의 결과를 제공하고, 여기서 데이터는 CD71이 FN3 도메인의 독점적 결합 표적임을 보여준다.

[0033] 도 4a는 3가지 다른 FN3 도메인-siRNA 접합체를 사용하여 마우스 비복근(gastrocnemius muscle)에서 GYS1 mRNA를 녹아웃시킨 것을 운반체(vehicle)만을 사용한 경우와 비교하여 보여준다. 도 4b는 3가지 다른 FN3 도메인-siRNA 접합체를 사용하여 마우스 비복근에서 GYS1 단백질을 녹아웃시킨 것을 운반체만을 사용한 경우와 비교하여 보여준다.

[0034] 도 5는 3가지 다른 FN3 도메인-siRNA 접합체를 사용할 때 GYS1이 골격근에 매우 특이적으로 작용하는 것을 보여주는데, 이는 다른 표적(AHA-1)에 대한 siRNA를 사용한 경우와 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] [0035] 본원 및 첨부된 청구항에서 사용된 단수 형태는 내용상 명확히 달리 명시되어 있지 않는 한 복수형을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "세포"에 대한 언급에는 두 개 이상의 세포의 조합 등이 포함된다.

[0034] [0036] “피브로넥틴 III형(FN3) 도메인(Fibronectin type III (FN3) domain)” (FN3 도메인)은 피브로넥틴, 테나신, 세포 내 세포골격 단백질, 시토킨 수용체 및 원핵생물 효소를 포함한 단백질에서 자주 발생하는 도메인을 지칭한다. (Bork and Doolittle, Proc Nat Acad Sci. USA, 1992, 89:8990-8994; Meinke *et al.*, J Bacteriol., 1993, 175:1910-1918; Watanabe *et al.*, J Biol Chem., 1990, 265:15659-15665). 예시적인 FN3 도메인은 인간 테나신 C에 존재하는 15개의 다른 FN3 도메인, 인간 피브로넥틴(FN)에 존재하는 15개의 다른 FN3 도메인, 그리고 예를 들어 미국 특허 제8,278,419호에 기재된 바와 같은 비자연 합성(non-natural synthetic) FN3 도메인이다. 개별 FN3 도메인은 도메인 번호와 단백질 이름으로 지칭된다. 예를 들어, 테나신의 제3 FN3 도메인(TN3), 피브로넥틴의 제10 FN3 도메인(FN10)이 있다. 전반적으로 사용된 "센티린(centyrin)"은 또한 FN3 도메인을 가리킨다. 또한, 본원에 설명된 FN3 도메인은 가변 중쇄(V_H) 및/또는 경쇄(V_L) 구조를 갖지 않으므로 항체가 아니다.

[0035] [0037] 본원에 사용된 "자가면역 질환(autoimmune disease)"은 개인의 면역 반응이 개인 자신의 구성 요소를 대상으로 하여 바람직하지 않고 종종 쇠약해지는 병태를 초래하는 질병 상태 및 상태를 지칭한다. 본원에 사용된 "자가면역 질환은 자가면역 상태, 증후군 등을 더 포함하는 것으로 의도된다. 자가면역 질환에는 애디슨병, 알레르기, 알레르기성 비염, 강직성 척추염, 천식, 죽상경화증, 귀의 자가면역 질환, 눈의 자가면역 질환, 자가면역 위축성 위염, 자가면역 간염, 자가면역 유리성 빈혈, 자가면역 이하선염, 자가면역 포도막염, 복강 질환, 원발성 담관 간경변증, 양성 림프구 항문염, COPD, 대장염, 관상동맥심장질환, 크론병, 당뇨병(1형), 우울증, 당뇨병(1형 및/또는 2형 당뇨병 포함), 부고환염, 사구체신염, 굿파스처 증후군, 그레이브스병, 길랭-바레 증후군, 하시모토병, 용혈성 빈혈, 특발성 혈소판감소성 자반증, 염증성 장질환(IBD), 제조합 약물 제품에 대한 면역 반응(예: 혈우병의 인자 VII), 소아 특발성 관절염, 진신성 홍반 루푸스, 루푸스 신염, 남성 불임, 혼합 결합 조직 질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 종양(oncology), 골관절염, 통증, 원발성 점액수종, 천포창, 악성

빈혈, 다발성 근염, 건선, 건선성 관절염, 반응성 관절염, 류마티스열, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 경화증, 쇼그렌 증후군, 척추관절병, 교감성 안염, T 세포 림프종, T 세포 급성 림프모구 백혈병, 고환 항중심성 T 세포 림프종, 갑상선염, 이식 거부, 궤양성 대장염, 자가면역성 포도막염, 혈관염 등이 있으나 이에 제한되지는 않는다. 자가면역 질환에는 영향을 받는 조직이 1차 표적이 되는 병태, 그리고 어떤 경우에는, 2차 표적이 되는 병태가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 이러한 질환에는 AIDS, 아토피성 알레르기, 기관지 천식, 습진, 나병, 조현병, 유전적 우울증, 조직 및 장기 이식, 만성 피로 증후군, 알츠하이머병, 파킨슨병, 심근경색, 뇌졸중, 자폐증, 간질, 아르투스 현상, 아나필락시스, 알코올 및 약물 중독이 포함되지만 이에 제한되지 않는다.

[0036] [0038] 본원에 사용된 "포획제(capture agent)"는 특정 유형의 세포에 결합하여 해당 세포를 다른 세포로부터 분리할 수 있게 하는 물질을 지칭한다. 예시적인 포획제로는 자기 비드, 강자성 유체, 캡슐화 시약, 특정 세포 유형을 결합하는 분자 등이 있다.

[0037] [0039] 본원에 사용된 "샘플"은 대상으로부터 분리된 유사한 체액, 세포 또는 조직의 집합체와 대상 내에 존재하는 체액, 세포 또는 조직을 의미한다. 예시적인 샘플로는 조직 생검, 세침 흡인 검사, 외과적 절제 조직, 장기 배양(organ cultures), 세포 배양 및 혈액, 혈청 및 장막액, 혈장, 림프, 소변, 타액, 낭포액, 눈물방울, 대변, 가래, 분비 조직 및 장기의 점막 분비물, 질 분비물, 복수액(ascites fluids), 흉막, 심낭, 복막, 복강 및 기타 체강의 체액, 기관 세척으로 수집한 체액, 활액액(synovial fluid), 대상 또는 생물학적 공급원과 접촉한 액체 용액, 예를 들어 세포 또는 장기 조건화 배지 및 세척액 등을 포함한 세포 및 장기 배양 배지 등이 있다.

[0038] [0040] "치환(substituting)" 또는 "치환된(substituted)" 또는 "돌연변이(mutating)" 또는 "돌연변이된(mutated)"은 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열에서 하나 이상의 아미노산 또는 뉴클레오티드를 변경(altering), 결실(deleting), 또는 삽입(inserting)하여 해당 서열의 변이체를 생성하는 것을 지칭한다.

[0039] [0041] "변이체(variant)"는 하나 이상의 변형(예: 치환, 삽입 또는 결실)에 의해 참조 폴리펩티드 또는 참조 폴리뉴클레오티드와 상이한 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

[0040] [0042] "특이적으로 결합하다(specifically binds)" 또는 "특이적 결합(specific binding)"은 FN3 도메인이 약 1×10^{-6} M 이하, 예를 들어 약 1×10^{-7} M 이하, 약 1×10^{-8} M 이하, 약 1×10^{-9} M 이하, 약 1×10^{-10} M 이하, 약 1×10^{-11} M 이하, 약 1×10^{-12} M 이하, 또는 약 1×10^{-13} M 이하의 해리 상수(K_D)로 CD71과 같은 표적에 결합할 수 있는 능력을 지칭한다. 또는 "특이적 결합(specific binding)"은 FN3 도메인이 표준 용액 ELISA 검정에서 음성 대조군보다 적어도 5배 초과 표적(예: CD71)에 결합하는 능력을 의미한다. 특이적 결합(Specific binding)은 또한 본원에 기재되고 도 3에 표시된 프로테옴 어레이를 사용하여 입증될 수 있다. 일부 구현예에서, 음성 대조군(negative control)은 CD71에 결합하지 않는 FN3 도메인이다. 일부 구현예에서, CD71에 특이적으로 결합하는 FN3 도메인은 다른 관련 항원, 예를 들어 다른 종(동족)의 동일한 미리 결정된 항원(예: Macaca Fascicularis(시노몰구스 원숭이, cyno) 또는 Pan troglodytes(침팬지))과 교차 반응성(cross-reactivity)을 가질 수 있다.

[0041] [0043] "라이브러리(Library)"는 변이체들(variants)의 모음을 지칭한다. 라이브러리는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 변이체들로 구성될 수 있다.

[0042] [0044] "안정성(Stability)"은 분자가 생리학적 조건하에서 접힌 상태(folded state)를 유지하여 적어도 하나의 정상적인 기능적 활성(예: CD71과 같은 미리 결정된 항원에 대한 결합)을 유지하는 능력을 지칭한다.

[0043] [0045] "CD71"은 서열 번호 2 또는 5의 아미노산 서열을 갖는 인간 CD71 단백질을 의미한다. 일부 구현예에서, 서열 번호 2는 전체 길이의 인간 CD71 단백질이다. 일부 구현예에서, 서열 번호 5는 인간 CD71의 세포 외 도메인이다.

[0044] [0046] "텐콘(Tencon)"은 서열 번호 1 (LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGAEINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT)에 표시된 컨센서스 서열(consensus sequence)을 갖는 합성 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인을 지칭하고, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 공개 번호 2010/0216708에 기재되어 있다.

[0045] [0047] "암세포" 또는 "종양세포"는 생체 내, 생체 외 및 조직 배양에서 자발적 또는 유도된 표현형 변화를 나타내는 암성(cancerous), 전암성(pre-cancerous) 또는 형질전환된 세포(transformed cell)를 말하고, 반드시 새로운 유전 물질의 흡수를 수반하지는 않는다. 형질전환(transformation)은 형질전환 바이러스에 감염되어 새

로운 계능 핵산이 통합되거나 외인성 핵산이 흡수되어 발생할 수 있지만, 자발적으로 또는 발암 물질에 노출된 후에 발생하여 내인성 유전자가 돌연변이를 일으킬 수도 있다. 형질전환/암(Transformation/cancer)의 예로는 시험관 내, 생체 내, 및 생체 외에서 형태학적 변화, 세포의 불멸화, 비정상적인 성장 제어, 병소 형성, 증식, 악성 종양, 종양 특이적 마커 수준, 침습성, 누드 마우스와 같은 적합한 동물 숙주에서의 종양 성장 또는 억제 등이 있다(Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)).

- [0046] [0048] "수지상 세포"는 적응 면역 체계(adaptive immune system)에서 중요한 역할을 하는 항원 제시 세포(antigen-presenting cell; APC)의 한 유형을 지칭한다. 수지상 세포의 주요 기능은 T 림프구에 항원을 제시하고, 나아가 면역 반응을 직접 또는 간접적으로 조절할 수 있는 시토킨을 분비하는 것이다. 수지상 세포(Dendritic cells)는 비활성 또는 휴면 상태의 순수(naive) T 림프구에서 1차 면역 반응을 유도하는 능력이 있다.
- [0047] [0049] "면역 세포"는 림프구(lymphocytes)(T 세포, B 세포 및 NK 세포), 호중구 또는 단핵구/대식세포로 분류되는 면역계의 세포를 지칭한다. 이들은 모두 백혈구의 유형이다.
- [0048] [0050] 근세포(Myocytes)는 골격근, 평활근, 심장근 세포로 분류되는 다양한 근육 조직을 구성하는 세포이다. 골격근 세포는 다핵이고 횡문근(striated)이다. 평활근 세포는 단핵이고 횡문근이 아니다. 심장근 세포(Cardiac muscle cells)는 단핵이고 횡문근이며 심장에서만 발견된다. 본원에 사용된 "근육 세포(muscle cell)"는 골격근 세포(skeletal muscle cells) 및 평활근 세포(smooth muscle cells)를 의미하고, 심장근 세포(cardiac muscle cells)를 의미하지 않는다. 본원에 사용된 "심장 세포(heart cell)"는 심장근 세포(cardiac muscle cells)만을 의미한다.
- [0049] [0051] "벡터(Vector)"는 기관계 내에서 복제될 수 있거나 그러한 계 간에 이동될 수 있는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 벡터 폴리뉴클레오티드는 일반적으로 복제 기점, 폴리아데닐화 신호, 선택 마커와 같은 요소를 포함하고 있고, 이러한 요소는 기관계에서 이러한 폴리뉴클레오티드의 복제(duplication) 또는 유지를 용이하게 하는 역할을 한다. 이러한 기관계의 예로는 세포, 바이러스, 동물, 식물, 벡터를 복제(duplicate)할 수 있는 생물학적 구성요소를 활용하는 재구성된(reconstituted) 기관계 등이 있다. 벡터를 구성하는 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA 분자이거나 이들의 혼성체일 수 있다.
- [0050] [0052] "발현 벡터(Expression vector)"는 발현 벡터에 존재하는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 폴리펩티드의 번역을 지시하기 위해 기관계 또는 재구성된 기관계에서 활용될 수 있는 벡터를 말한다.
- [0051] [0053] "폴리뉴클레오티드(Polynucleotide)"는 당-인산 골격이나 기타 동등한 공유 화학에 의해 공유 결합된 뉴클레오티드 채로 구성된 합성 분자를 지칭한다. cDNA는 폴리뉴클레오티드의 전형적인 예이다.
- [0052] [0054] "폴리펩티드(Polypeptide)" 또는 "단백질(protein)"은 펩티드 결합으로 연결되어 폴리펩티드를 형성하는 적어도 두 개의 아미노산 잔기를 포함하는 분자를 말한다. 약 50개 미만의 아미노산으로 구성된 작은 폴리펩티드는 "펩티드"라고 불릴 수 있다.
- [0053] [0055] "가(Valent)"는 분자 내 항원에 대한 특정 수의 결합 부위의 존재를 의미한다. 따라서 "1가(monovalent)", "2가(bivalent)", "4가(tetravalent)" 및 "6가(hexavalent)"라는 용어는 분자 내 항원에 대한 특이적 결합 부위가 각각 1개, 2개, 4개 및 6개 존재한다는 것을 나타낸다.
- [0054] [0056] "대상(Subject)"에는 인간이나 비인간 동물이 모두 포함된다. "비인간 동물(Nonhuman animal)"에는 모든 척추동물, 즉 포유류와 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류, 파충류 등의 비포유류가 포함된다. 특별히 언급된 경우를 제외하고 "환자(patient)" 또는 "대상(subject)"이라는 용어는 상호교환적으로 사용된다.
- [0055] [0057] "단리된(Isolated)"이란 분자(합성 폴리뉴클레오티드나 FN3 도메인과 같은 폴리펩티드 등)의 동질 집단이 분자가 생산되는 계의 다른 구성 요소(예: 재조합 세포)와 적어도 한 번의 정제 또는 단리 단계를 거친 단백질로부터 실질적으로 분리(separated) 및/또는 정제된(purified) 것을 의미한다. "단리된 FN3 도메인"은 다른 세포 물질 및/또는 화학 물질이 실질적으로 없는 FN3 도메인을 지칭하고 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 순도와 같이 더 높은 순도로 단리된 FN3 도메인을 포함한다.
- [0056] [0058] "효소 대체 요법(Enzyme replacement therapy)" 또는 "ERT"는 대상에게 하나 이상의 효소를 포함하는 약학 조성물을 투여하는 것을 말한다. 일부 구현예에서, 효소는 대상(subject)에게서 어떤 양태에서 부족하거나

결핍된 효소를 보충하거나 대체하기 위해 투여된다. 일반적으로, 요법(therapy)에 사용되는 효소 또는 효소들은 효소 또는 효소들을 포함하는 약학 조성물을 정맥 주입하여 대상에게 투여된다. 본원에 설명된 바와 같이, 효소 대체 요법 치료제는 FN3 도메인을 포함하는 조성물과 함께 투여될 수 있고, 이 조성물은 올리고뉴클레오타이드(예: siRNA, mRNA, cDNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 등)와 같은 추가 치료제에 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 효소 대체 요법 치료제의 투여는 본원에 제공한 바와 같이 추가 치료제에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물의 투여 전, 투여 중 또는 투여 후에 이루어질 수 있다.

[0057] [0059] 일부 구현예에서 올리고뉴클레오타이드 분자에 연결될 수 있는, FN3 도메인을 포함하는 폴리펩티드와 같은 폴리펩티드를 포함하는 조성물이 제공된다. 올리고뉴클레오타이드 분자는 예를 들어 siRNA 분자, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, mRNA 등일 수 있다.

[0058] [0060] 따라서, 일부 구현예에서 siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있는 이중가닥 RNAi(dsRNA) 작용제이다. dsRNA 작용제는 센스 가닥(운송 가닥)과 안티센스 가닥(안내 가닥)을 포함한다. 일부 구현예에서, dsRNA 작용제의 각 가닥은 길이가 12~40개 뉴클레오타이드일 수 있다. 예를 들어, 각 가닥은 14~40개 뉴클레오타이드 길이, 17~37개 뉴클레오타이드 길이, 25~37개 뉴클레오타이드 길이, 27~30개 뉴클레오타이드 길이, 17~23개 뉴클레오타이드 길이, 17~21개 뉴클레오타이드 길이, 17~19개 뉴클레오타이드 길이, 19~25개 뉴클레오타이드 길이, 19~23개 뉴클레오타이드 길이, 19~21개 뉴클레오타이드 길이, 21~25개 뉴클레오타이드 길이, 또는 21~23개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.

[0059] [0061] 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥은 일반적으로 이중 가닥 dsRNA를 형성한다. dsRNA 작용제의 이중 가닥 영역은 길이가 12~40개의 뉴클레오타이드 쌍일 수 있다. 예를 들어, 이중 가닥 영역은 14~40개 뉴클레오타이드 쌍의 길이, 17~30개 뉴클레오타이드 쌍의 길이, 25~35개 뉴클레오타이드 쌍의 길이, 27~35개 뉴클레오타이드 쌍의 길이, 17~23개 뉴클레오타이드 쌍의 길이, 17~21개 뉴클레오타이드 쌍의 길이, 17~19개 뉴클레오타이드 쌍의 길이, 19~25개 뉴클레오타이드 쌍의 길이, 19~23개 뉴클레오타이드 쌍의 길이, 19~21개 뉴클레오타이드 쌍의 길이, 21~25개 뉴클레오타이드 쌍의 길이 또는 21~23개 뉴클레오타이드 쌍의 길이일 수 있다. 또 다른 예에서, 이중 가닥 영역은 길이가 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27개의 뉴클레오타이드 쌍 중에서 선택된다.

[0060] [0062] 일부 구현예에서, dsRNA는 가닥의 3'-말단, 5'-말단 또는 양쪽 말단에 dsRNA 작용제의 하나 이상의 오버행 영역 및/또는 캡핑기(capping group)를 포함한다. 오버행은 1~10개 뉴클레오타이드 길이, 1~6개 뉴클레오타이드 길이일 수 있고, 예를 들어 2~6개 뉴클레오타이드 길이, 1~5개 뉴클레오타이드 길이, 2~5개 뉴클레오타이드 길이, 1~4개 뉴클레오타이드 길이, 2~4개 뉴클레오타이드 길이, 1~3개 뉴클레오타이드 길이, 2~3개 뉴클레오타이드 길이 또는 1~2개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 오버행은 한 가닥이 다른 가닥보다 길거나 같은 길이의 두 가닥이 엮갈려 있는 결과로 생길 수 있다. 오버행은 표적 mRNA와 불일치를 형성할 수도 있고, 표적이 되는 유전자 서열과 상보적일 수도 있고, 다른 서열일 수도 있다. 제1과 제2 가닥은 예를 들어 추가 염기를 통해 헤어핀 구조를 형성하거나 염기가 아닌 다른 링커를 통해 연결될 수도 있다.

[0061] [0063] 일부 구현예에서, dsRNA 작용제의 오버행 영역의 뉴클레오타이드는 각각 독립적으로 2'-당 변형, 예를 들어 2'-F, 2'-O메틸, 2'-O-(2-메톡시에틸), 2'-O-(2-메톡시에틸), 2'-O-(2-메톡시에틸) 및 이들의 임의의 조합을 포함하되 이에 제한되지 않는 변형되거나 변형되지 않은 뉴클레오타이드일 수 있다. 예를 들어, TT(UU)는 어느 가닥의 어느 쪽 끝에 대해서도 오버행 서열이 될 수 있다. 오버행은 표적 mRNA와 불일치를 형성할 수도 있고, 표적이 되는 유전자 서열과 상보적일 수도 있고, 다른 서열일 수도 있다.

[0062] [0064] dsRNA 작용제의 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 두 가닥 모두의 5' 또는 3' 오버행이 인산화될 수 있다. 일부 구현예에서, 오버행(overhang) 영역은 두 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 메실 포스포라미데이트를 갖는 두 개의 뉴클레오타이드를 포함하는데, 여기서 두 개의 뉴클레오타이드는 동일하거나 상이할 수 있다. 일 구현예에서, 오버행은 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 양 가닥의 3'-말단에 존재한다. 일 구현예에서, 이 3'-오버행은 안티센스 가닥에 존재한다. 일 구현예에서, 이 3'-오버행은 센스 가닥에 존재한다.

[0063] [0065] dsRNA 작용제는 단일 오버행만 포함할 수 있고, 이는 dsRNA의 전반적인 안정성에 영향을 주지 않고 dsRNA의 간섭 활성을 강화할 수 있다. 예를 들어, 단일 가닥 오버행은 센스 가닥의 3' 말단에 위치하거나, 대안적으로 안티센스 가닥의 3' 말단에 위치한다. dsRNA는 또한 안티센스 가닥의 5' 말단(또는 센스 가닥의 3' 말단)에 위치한 둔단(blunt end)을 가질 수도 있고 그 반대의 경우도 있다. 일반적으로 dsRNA의 안티센스 가닥은 3'-말단에 뉴클레오타이드 오버행이 있고 5'-말단은 둔단(blunt)이다. 이론에 얽매이지 않고, 안티센스 가닥의 5'-말단에 있는 비대칭 평활 말단(blunt end)과 안티센스 가닥의 3'-말단 오버행은 RISC에 안내 가닥이 적재되

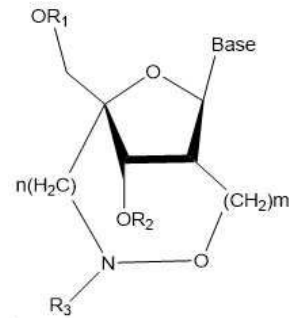
는 데 유리하다. 예를 들어, 단일 오버행은 길이가 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 뉴클레오타이드를 포함한다.

- [0064] [0066] 일부 구현예에서, dsRNA 작용제는 dsRNA 이중 가닥의 양쪽 말단 모두에 두 개의 둔단(blunt ends)을 가질 수도 있다.
- [0065] [0067] 일부 구현예에서, dsRNA 작용제의 센스 가닥과 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오타이드가 변형될 수 있다. 각 뉴클레오타이드는 동일하거나 상이한 변형으로 변형될 수 있고, 이는 비연결 인산 산소 중 하나 또는 둘 다 및/또는 연결 인산 산소 중 하나 이상의 하나 이상의 변형, 리보오스 당의 구성 요소(예: 리보오스 당의 2개 히드록실)의 변형, 인산 부분을 "탈인산(dephospho)" 링커로 대량 대체, 자연적으로 발생하는 염기의 변형 또는 대체, 리보오스-인산 골격의 대체 또는 변형을 포함할 수 있다.
- [0066] [0068] 일부 구현예에서 3' 또는 5' 오버행의 모든 염기 또는 일부가 변형될 수 있다(예: 본원에 설명한 변형). 변형에는 예를 들어 리보오스 당(ribose sugar)의 2' 위치에서 당염기에 공지된 변형을 사용하는 것, 예를 들어 핵염기의 리보당 대신 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드, 2'-데옥시-2'-플루오로(2'-F) 또는 2'-O-메틸을 사용하는 것, 인산기의 변형, 예를 들어 포스포로티오에이트, 포스포로디토에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 메실 포스포라미데이트 변형을 사용하는 것이 포함될 수 있다. 오버행은 표적 서열과 상동(homologous)일 필요는 없다.
- [0067] [0069] 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥의 각 잔기는 LNA, HNA, CeNA, 2'-메톡시에틸, 2'-O-메틸, 2'-O-알릴, 2'-C-알릴, 2'-데옥시 또는 2'-플루오로로 독립적으로 변형된다. 가닥들에는 두 개 이상의 변형이 포함될 수 있다. 일 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥의 각 잔기는 2'-O-메틸 또는 2'-플루오로로 독립적으로 변형된다.
- [0068] [0070] 일부 구현예에서, 일반적으로 적어도 두 개의 서로 다른 변형이 센스 가닥과 안티센스 가닥에 존재한다. 이 두 가지 변형은 2'-데옥시, 2'-O-메틸 또는 2'-플루오로 변형, 비고리(acyclic) 뉴클레오타이드 또는 기타일 수 있다.
- [0069] [0071] 일 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥은 각각 2'-플루오로, 2'-O-메틸 또는 2'-데옥시 중에서 선택된 두 개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0070] [0072] dsRNA 작용제는 또한 적어도 하나의 포스포로티오에이트, 포스포로디토에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트, 메실 포스포라미데이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드 간 연결을 더 포함할 수 있다. 포스포로티오에이트, 포스포로디토에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트, 메실 포스포라미데이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드 간 연결 변형은 센스 가닥 또는 안티센스 가닥, 또는 둘 다의 가닥의 임의의 위치에서 발생할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 간 연결 변형은 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오타이드에서 발생할 수 있다. 각 뉴클레오타이드 간 연결 변형은 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에서 교대로 발생할 수 있다. 또는 센스 가닥 또는 안티센스 가닥은 두 뉴클레오타이드 간 연결 변형을 교대로 포함한다. 센스 가닥의 뉴클레오타이드 간 연결 변형의 교대 패턴은 안티센스 가닥과 동일하거나 상이할 수 있고, 센스 가닥의 뉴클레오타이드 간 연결 변형의 교대 패턴은 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드 간 연결 변형의 교대 패턴에 대해 이동될 수 있다.
- [0071] [0073] 일부 구현예에서, dsRNA 작용제는 오버행 영역에 포스포로티오에이트, 포스포로디토에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트, 메실 포스포라미데이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드 간 연결 변형을 포함한다. 예를 들어, 오버행 영역은 두 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트, 포스포로디토에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트, 메실 포스포라미데이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드 간 연결을 갖는 두 개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 또한, 이중 가닥 영역 내의 말단 쌍을 이룬 뉴클레오타이드와 오버행 뉴클레오타이드를 연결하기 위해 뉴클레오타이드 간 연결 변형이 이루어질 수도 있다. 예를 들어, 적어도 2개, 3개, 4개 또는 모든 오버행 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트, 포스포로디토에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트, 메실 포스포라미데이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드 간 연결을 통해 연결될 수 있고, 임의로 오버행 뉴클레오타이드와 오버행 뉴클레오타이드 옆에 있는 쌍을 이룬 뉴클레오타이드를 연결하는 추가적인 포스포로티오에이트, 포스포로디토에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트, 메실 포스포라미데이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드 간 연결이 있을 수 있다. 예를 들어, 말단의 세 개 뉴클레오타이드 사이에 적어도 두 개의 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 뉴클레오타이드 간 연결이 있을 수 있는데, 이 때 세 개 뉴클레오타이드 중 두 개는 오버행 뉴클레오타이드(overhang nucleotide)고, 제3 뉴클레오타이드는 오버행 뉴클레오타이드 옆에 있는 쌍을 이룬 뉴클레오타이드

티드다. 일부 구현예에서, 이들 말단의 3개 뉴클레오티드는 안티센스 가닥의 3'-말단에 위치할 수 있다.

[0072] [0074] 일부 구현예에서, dsRNA 조성물은 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제7,427,672호에 기재된 바와 같이 변형된 염기 또는 뉴클레오시드 유사체에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 변형된 염기 또는 뉴클레오시드 유사체는 본원에서 설명하는 화학식에서 링커 또는 L로 지칭된다.

[0073] [0075] 일부 구현예에서, 변형된 염기(base) 또는 뉴클레오시드 유사체는 화학식 I 및 이의 염에 표시된 구조를 갖는다.



[0074] (화학식 I)

[0075] 여기서 Base는 임의로 치환기를 갖는 방향족 헤테로고리기(aromatic heterocyclic group) 또는 방향족 탄화수소 고리기(aromatic hydrocarbon ring group)를 나타내고, R₁ 및 R₂는 동일하거나 상이하고 각각 수소 원자, 핵산 합성을 위한 히드록실기의 보호기, 알킬기, 알켄일기, 시클로알킬기, 아릴기, 아랄킬기, 아실기, 술폰일기, 실릴기, 인산기, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 인산기 또는 -P(R₄)R₅를 나타내고, 여기서 R₄ 및 R₅는 동일하거나 상이하고 각각 히드록실기, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 히드록실기, 메르캅토기, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 메르캅토기, 아미노기, 탄소 원자 1~5개를 갖는 알콕시기, 탄소 원자 1~5개를 갖는 알킬티오기, 탄소 원자 1~6개를 갖는 시아노알콕시기 또는 탄소 원자 수가 1~5개인 알킬기로 치환된 아미노기를 나타내고, R₃은 수소 원자, 알킬기, 알켄일기, 시클로알킬기, 아릴기, 아랄킬기, 아실기, 술폰일기 또는 기능성 분자 단위 치환기를 나타내고, m은 0~2의 정수를 나타내고, n은 0~3의 정수를 나타낸다. 일부 구현예에서, m 및 n은 0이다.

[0076] [0076] 일부 구현예에서, 변형된 염기 또는 뉴클레오시드 유사체는 화학식 I 및 이의 염에 표시된 구조를 갖고, 여기서 R₁은 수소 원자, 지방족 아실기, 방향족 아실기, 지방족 또는 방향족 술폰일기, 1~3개의 아릴기로 치환된 메틸기, 저급 알킬, 저급 알콕시, 할로젠 또는 시아노기로 치환된 아릴 고리를 갖는 1~3개의 아릴기로 치환된 메틸기, 또는 실릴기이다.

[0077] [0077] 일부 구현예에서, 변형된 염기 또는 뉴클레오시드 유사체는 화학식 I 및 이의 염에 표시된 구조를 갖고, 여기서 R₁은 수소 원자, 아세틸기, 벤조일기, 메탄술폰일기, p-톨루엔술폰일기, 벤질기, p-메톡시벤질기, 트리틸기, 디메톡시트리틸기, 모노메톡시트리틸기 또는 삼차-부틸디페닐실릴기이다.

[0078] [0078] 일부 구현예에서, 변형된 염기 또는 뉴클레오시드 유사체는 화학식 I 및 이의 염에 나타난 바와 같은 구조를 갖고, 여기서 R₂는 수소 원자, 지방족 아실기, 방향족 아실기, 지방족 또는 방향족 술폰일기, 1~3개의 아릴기로 치환된 메틸기, 저급 알킬, 저급 알콕시, 할로젠 또는 시아노기로 치환된 아릴 고리를 갖는 1~3개의 아릴기로 치환된 메틸기, 실릴기, 포스포로아미디티기, 포스포닐기, 인산기 또는 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 인산기이다.

[0079] [0079] 일부 구현예에서, 변형된 염기 또는 뉴클레오시드 유사체는 화학식 I 및 이의 염에 표시된 구조를 갖고, 여기서 R₂는 수소 원자, 아세틸기, 벤조일기, 메탄술폰일기, p-톨루엔술폰일기, 벤질기, p-메톡시벤질기, 삼차-부틸디페닐실릴기, -P(OC₂H₄CN)(N(i-Pr)₂), -P(OCH₃)(N(i-Pr)₂), 포스포닐기 또는 2-클로로페닐 또는 4-클로로페닐포스페이트기이다.

[0080] [0080] 일부 구현예에서, 변형된 염기 또는 뉴클레오시드 유사체는 화학식 I 및 이의 염에 표시된 바와 같은 구조를 갖고, 여기서 R₃은 수소 원자, 페녹시아세틸기, 탄소 원자 수 1~5개의 알킬기, 탄소 원자 수 1~5개의 알켄일기, 탄소 원자 수 6~14개의 아릴기, 1~3개의 아릴기로 치환된 메틸기, 메탄술폰일기 또는 p-톨루엔술폰일기와 같은 하위 지방족 또는 방향족 술폰일기, 아세틸기와 같은 탄소 원자 수 1~5개의 지방족 아실기 또는 벤조일

기와 같은 방향족 아실기이다.

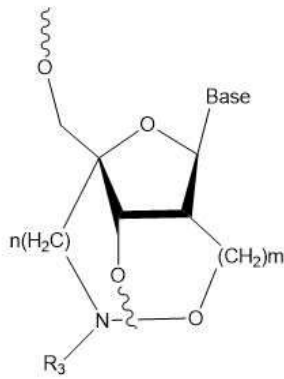
[0081] 일부 구현예에서, 변형된 염기 또는 뉴클레오타이드 유사체는 화학식 I 및 II의 염에 표시된 구조를 갖고, 여기서 R_3 로서의 기능적 분자 단위 치환기(functional molecule unit substituent)는 형광 또는 화학발광 표지 분자, 핵산 절개 활성 기능기(nucleic acid incision activity functional group), 또는 세포 내 또는 핵 전달 신호 펩티드이다.

[0082] 일부 구현예에서, 변형된 염기 또는 뉴클레오타이드 유사체는 화학식 I 및 II의 염에 나타난 바와 같은 구조를 갖고, 여기서 Base는 푸린-9-일기, 2-옥소피리미딘-1-일기, 또는 푸린-9-일기 또는 2-옥소피리미딘-1-일기이고, 이는 다음 α 기에서 선택된 치환기를 갖는다. α 기: 히드록실기, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 히드록실기, 탄소수 1-5의 알콕시기, 메르캅토기, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 메르캅토기, 탄소수 1-5의 알킬티오기, 아미노기, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기, 탄소수 1-5의 알킬기로 치환된 아미노기, 탄소수 1-5의 알킬기 및 할로겐 원자.

[0083] 일부 구현예에서, 변형된 염기 또는 뉴클레오타이드 유사체는 화학식 I 및 II의 염에 표시된 구조를 갖고, 여기서 Base는 6-아미노푸린-9-일(즉, 아데닌일), 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 6-아미노푸린-9-일, 2,6-디아미노푸린-9-일, 2-아미노-6-클로로푸린-9-일, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 2-아미노-6-클로로푸린-9-일, 2-아미노-6-플루오로푸린-9-일, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 2-아미노-6-플루오로푸린-9-일, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 2-아미노-6-브로모푸린-9-일, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 2-아미노-6-브로모푸린-9-일, 2-아미노-6-히드록시푸린-9-일(즉, 구아닌일), 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 2-아미노-6-히드록시푸린-9-일, 6-아미노-2-메톡시푸린-9-일, 6-아미노-2-클로로푸린-9-일, 6-아미노-2-플루오로푸린-9-일, 2,6-디메톡시푸린-9-일, 2,6-디클로로푸린-9-일, 6-메르캅토프린-9-일, 2-옥소-4-아미노-1,2-디히드로피리미딘-1-일(즉, 시토신일), 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 2-옥소-4-아미노-1,2-디히드로피리미딘-1-일, 2-옥소-4-아미노-5-플루오로-1,2-디히드로피리미딘-1-일, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 2-옥소-4-아미노-5-플루오로-1,2-디히드로피리미딘-1-일, 4-아미노-2-옥소-5-클로로-1,2-디히드로피리미딘-1-일, 2-옥소-4-메톡시-1,2-디히드로피리미딘-1-일, 2-옥소-4-메르캅토-1,2-디히드로피리미딘-1-일, 핵산 합성을 위해 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 2-옥소-4-히드록시-1,2-디히드로피리미딘-1-일(즉, 우라실일), 2-옥소-4-히드록시-5-메틸-1,2-디히드로피리미딘-1-일(즉, 티민일), 4-아미노-5-메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리미딘-1-일(즉, 5-메틸시토신일), 또는 핵산 합성을 위해 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 4-아미노-5-메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리미딘-1-일.

[0084] 일부 구현예에서, 변형된 염기 또는 뉴클레오타이드 유사체는 화학식 I 및 II의 염에 표시된 구조를 갖고, 여기서 m 은 0이고, n 은 1이다.

[0085] 일부 구현예에서, 변형된 염기 또는 뉴클레오타이드 유사체는 화학식 II에 표시된 구조를 갖는 뉴클레오타이드 유사체의 하나 이상의 유형의 단위 구조 중 하나 또는 둘 이상을 포함하는 DNA 올리고뉴클레오타이드 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드 유사체이거나, 이의 약리학적으로(pharmacologically) 허용되는 염이고, 단, 올리고뉴클레오타이드 유사체 내의 각각의 뉴클레오타이드 간의 연결 형태가 천연 핵산과 동일한 포스포디에스테르 결합 [$--OP(O_2^-)O--$] 외에 하나 또는 두 개 이상의 포스포티오에이트 결합 [$--OP(O)(S^-)O--$], 포스포디티오에이트 결합 [$--O_2PS_2--$], 포스포네이트 결합 [$--PO(OH)_2--$], 포스포라미데이트 결합 [$--O=P(OH)_2--$] 또는 메실 포스포라미데이트 결합 [$--OP(O)(N)(SO_2)(CH_3)O--$]을 포함할 수 있다. 그리고 이들 구조 중 하나 이상의 유형이 두 개 이상 포함되어 있는 경우, 이들 구조 간의 Base는 동일하거나 상이할 수 있고,



[0086]

[0087]

여기서 Base는 임의로 치환기를 갖는 방향족 헤테로고리기 또는 방향족 탄화수소 고리기를 나타내고, R₃는 수소 원자, 알킬기, 알켄일기, 시클로알킬기, 아릴기, 아랄킬기, 아실기, 술폰일기, 실릴기 또는 기능성 분자 단위 치환기를 나타내고, m은 0~2의 정수를 나타내고, n은 0~3의 정수를 나타낸다. 일부 구현예에서, m 및 n은 0이다.

[0088]

[0086] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염은 화학식 II에 표시된 바와 같은 구조를 갖고, 여기서 R₁은 수소 원자, 지방족 아실기, 방향족 아실기, 지방족 또는 방향족 술폰 일기, 1~3개의 아릴기로 치환된 메틸기, 저급 알킬, 저급 알콕시, 할로젠 또는 시아노기로 치환된 아릴 고리를 갖는 1~3개의 아릴기로 치환된 메틸기, 또는 실릴기이다.

[0089]

[0087] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염은 화학식 II에 표시된 바와 같은 구조를 갖고, 여기서 R₁은 수소 원자, 아세틸기, 벤조일기, 메탄술폰일기, p-톨루엔술폰일기, 벤질기, p-메톡시벤질기, 트리틸기, 디메톡시트리틸기, 모노메톡시트리틸기 또는 삼차-부틸디페닐실릴기이다.

[0090]

[0088] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염은 화학식 II에 표시된 바와 같은 구조를 갖고, 여기서 R₂는 수소 원자, 지방족 아실기, 방향족 아실기, 지방족 또는 방향족 술폰 일기, 1~3개의 아릴기로 치환된 메틸기, 저급 알킬, 저급 알콕시, 할로젠 또는 시아노기로 치환된 아릴 고리를 갖는 1~3개의 아릴기로 치환된 메틸기, 실릴기, 포스포로아미디트기, 포스폰일기, 인산기(phosphate group) 또는 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 인산기이다.

[0091]

[0089] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염은 화학식 II에 표시된 바와 같은 구조를 갖고, 여기서 R₂는 수소 원자, 아세틸기, 벤조일기, 벤질기, p-메톡시벤질기, 메탄술폰 일기, p-톨루엔술폰일기, 삼차-부틸디페닐실릴기, --P(OC₂H₄CN)(N(i-Pr)₂), --P(OCH₃)(N(i-Pr)₂), 포스폰일기, 또는 2-클로로페닐- 또는 4-클로로페닐포스페이트기이다.

[0092]

[0090] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염은 화학식 II에 표시된 바와 같은 구조를 갖고, 여기서 R₃는 수소 원자, 페녹시아세틸기, 탄소 원자 수 1~5개를 갖는 알킬기, 탄소 원자 수 1~5개를 갖는 알켄일기, 탄소 원자 수 6~14개를 갖는 아릴기, 1~3개의 아릴기로 치환된 메틸기, 메탄술폰일기 또는 p-톨루엔술폰일기와 같은 하위 지방족(lower aliphatic) 또는 방향족 술폰일기, 아세틸기와 같은 탄소 원자 수 1~5개를 갖는 지방족 아실기 또는 벤조일기와 같은 방향족 아실기이다.

[0093]

[0091] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염은 화학식 II에 표시된 바와 같은 구조를 갖고, 여기서 R₃으로서의 기능적 분자 단위 치환기는 형광 또는 화학발광 표지 분자, 핵산 절개 활성 기능기, 또는 세포 내 또는 핵 전달 신호 펩티드이다.

[0094]

[0092] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염은 화학식 II에 나타낸 바와 같은 구조를 갖고, 여기서 Base는 푸린-9-일(a purin-9-yl)기, 2-옥소피리미딘-1-일(2-oxopyrimidin-1-yl)기, 또는 푸린-9-일기 또는 2-옥소피리미딘-1-일기이며, 이는 다음 α기에서 선택된 치환기(substituent)를 갖는다. α기: 히드록실기, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 히드록실기, 탄소수 1~5의 알콕시기, 메르캅토(mercapto)기, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 메르캅토기, 탄소수 1~5의 알킬티오기, 아미노기, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기, 탄소수 1~5의 알킬기로 치환된 아미노기, 탄소수 1~5의 알킬

기 및 할로젠 원자.

- [0095] [0093] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염은 화학식 II에 표시된 바와 같은 구조를 갖고, 여기서 Base는 6-아미노푸린-9-일(즉, 아데닌일), 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 6-아미노푸린-9-일, 2,6-디아미노푸린-9-일, 2-아미노-6-클로로푸린-9-일, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 2-아미노-6-클로로푸린-9-일, 2-아미노-6-플루오로푸린-9-일, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 2-아미노-6-플루오로푸린-9-일, 2-아미노-6-브로모푸린-9-일, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 2-아미노-6-브로모푸린-9-일, 2-아미노-6-히드록시푸린-9-일(즉, 구아닌일), 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 2-아미노-6-히드록시푸린-9-일, 6-아미노-2-메톡시푸린-9-일, 6-아미노-2-클로로푸린-9-일, 6-아미노-2-플루오로푸린-9-일, 2,6-디메톡시푸린-9-일, 2,6-디클로로푸린-9-일, 6-메르캅토푸린-9-일, 2-옥소-4-아미노-1,2-디히드로피리미딘-1-일(즉, 시토신일), 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 2-옥소-4-아미노-1,2-디히드로피리미딘-1-일, 2-옥소-4-아미노-5-플루오로-1,2-디히드로피리미딘-1-일, 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 2-옥소-4-아미노-5-플루오로-1,2-디히드로피리미딘-1-일기, 4-아미노-2-옥소-5-클로로-1,2-디히드로피리미딘-1-일, 2-옥소-4-메톡시-1,2-디히드로피리미딘-1-일, 2-옥소-4-메르캅토-1,2-디히드로피리미딘-1-일, 2-옥소-4-히드록시-1,2-디히드로피리미딘-1-일(즉, 우라실일), 2-옥소-4-히드록시-5-메틸-1,2-디히드로피리미딘-1-일(즉, 티민일), 4-아미노-5-메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리미딘-1-일(즉, 5-메틸시토신일), 또는 핵산 합성을 위한 보호기로 보호된 아미노기를 갖는 4-아미노-5-메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리미딘-1-일이다.
- [0096] [0094] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염은 화학식 II에 표시된 구조를 갖고, 여기서 m은 0이고, n은 1이다.
- [0097] [0095] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조성물은 중합체(중합체 모이어티 C)를 더 포함한다. 어떤 경우에는, 중합체는 분지형 또는 비분지형 단량체의 긴 쇄 및/또는 2차원 또는 3차원의 가교된 단량체 네트워크로 구성된 천연 또는 합성 중합체이다. 어떤 경우에는, 중합체에는 다당류, 리그닌, 고무 또는 폴리알킬렌옥사이드(예: 폴리에틸렌 글리콜)가 포함된다. 어떤 경우에는, 적어도 하나의 중합체는 알파-, 오메가-디히드록실폴리에틸렌글리콜, 생분해성 락톤 기반 중합체, 예를 들어 폴리아크릴산, 폴릴락티드산(PLA), 폴리(글리콜산)(PGA), 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리올레핀, 폴리이미드, 폴리스시아노아크릴레이트, 폴리이미드, 폴리에틸렌테레프탈레이트(PET, PETG), 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PETE), 폴리테트라메틸렌 글리콜(PTG) 또는 폴리우레탄, 및 이들의 혼합물을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 본원에 사용된 혼합물은 블록 공중합체를 지칭하는 것뿐만 아니라 동일한 화합물 내에서 상이한 중합체를 사용하는 것을 지칭한다. 어떤 경우에는, 블록 공중합체(block copolymer)는 중합체의 적어도 한 부분이 다른 중합체의 단량체로 구성된 중합체이다. 어떤 경우에는, 중합체는 폴리알킬렌 옥사이드를 포함한다. 어떤 경우에는, 중합체는 PEG를 포함한다. 어떤 경우에는, 중합체가 폴리에틸렌 이미드(PEI) 또는 히드록시에틸 전분(HES)을 포함한다.
- [0098] [0096] 어떤 경우에는, C가 PEG 모이어티(moiety)이다. 어떤 경우에는, PEG 모이어티가 올리고뉴클레오타이드 분자의 5' 말단에 접합되고 결합 모이어티는 올리고뉴클레오타이드 분자의 3' 말단에 접합된다. 어떤 경우에는, PEG 모이어티가 올리고뉴클레오타이드 분자의 3' 말단에 접합되고 결합 모이어티는 올리고뉴클레오타이드 분자의 5' 말단에 접합된다. 어떤 경우에는, PEG 모이어티가 올리고뉴클레오타이드 분자의 내부 부위에 결합된다. 어떤 경우에는, PEG 모이어티, 결합 모이어티 또는 이들의 조합이 올리고뉴클레오타이드 분자의 내부 부위에 접합된다. 어떤 경우에는, 접합(conjugation)이 직접 접합이다. 어떤 경우에는, 접합이 천연 결찰(native ligation)을 통해 이루어진다.
- [0099] [0097] 일부 구현예에서, 폴리알킬렌 옥사이드(예: PEG)는 다분산(polydisperse) 또는 단분산(monodisperse) 화합물이다. 어떤 경우에는, 다분산 물질은 평균 중량(중량 평균) 크기 및 분산도를 특징으로 하는 상이한 분자량의 물질이 분산 분포된 것을 뜻한다. 어떤 경우에는, 단분산 PEG가 한 가지 크기의 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, C는 다분산- 또는 단분산- 폴리알킬렌 옥사이드(예: PEG)이고, 표시된 분자량은 폴리알킬렌 옥사이드(예: PEG) 분자의 분자량의 평균을 나타낸다.
- [0100] [0098] 일부 구현예에서, 폴리알킬렌옥사이드(예: PEG)의 분자량은 약 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1450, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3250, 3350, 3500, 3750, 4000, 4250, 4500, 4600, 4750, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 10,000, 12,000, 20,000, 35,000, 40,000, 50,000, 60,000, 또는 100,000 Da이다.

[0101]

[0099] 일부 구현예에서, C는 폴리알킬렌옥시드(예: PEG)이고, 분자량은 약 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1450, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3250, 3350, 3500, 3750, 4000, 4250, 4500, 4600, 4750, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 10,000, 12,000, 20,000, 35,000, 40,000, 50,000, 60,000, 또는 100,000 Da이다. 일부 구현예에서, C는 PEG이고, 분자량은 약 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1450, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3250, 3350, 3500, 3750, 4000, 4250, 4500, 4600, 4750, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 10,000, 12,000, 20,000, 35,000, 40,000, 50,000, 60,000, 또는 100,000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 200 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 300 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 400 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 500 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 600 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 700 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 800 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 900 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 1000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 1100 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 1200 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 1300 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 1400 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 1450 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 1500 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 1600 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 1700 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 1800 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 1900 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 2000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 2100 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 2200 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 2300 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 2400 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 2500 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 2600 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 2700 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 2800 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 2900 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 3000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 3250 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 3350 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 3500 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 3750 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 4000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 4250 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 4500 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 4600 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 4750 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 5000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 5500 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 6000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 6500 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 7000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 7500 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 8000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 10,000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 12,000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 20,000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 35,000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 40,000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 50,000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 60,000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량이 약 100,00 Da이다.

[0102]

[00100] 일부 구현예에서, 폴리알킬렌 옥시드(예: PEG)는 개별 PEG(discrete PEG)이고, 여기서 개별 PEG는 두 개 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함하는 중합체(중합체) PEG이다. 어떤 경우에는, 개별 PEG(dPEG)가 2~60개, 2~50개, 또는 2~48개의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 42, 48, 50 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 2 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 3 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 4 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 5 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 6 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 7 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 8 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 9 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 10 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 11 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 12 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 13 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 14 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 15 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 16 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 17 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 18 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 19 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다.

어떤 경우에는, dPEG는 약 20 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 22 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 24 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 26 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 28 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 30 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 35 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 40 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 42 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 48 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 50 또는 그 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 순수한(예를 들어, 약 95%, 98%, 99% 또는 99.5%) 출발 물질로부터 단계적으로 단일 분자량 화합물로서 합성된다. 어떤 경우에는, dPEG가 평균 분자량이 아닌 특정 분자량을 갖는다. 어떤 경우에는, 본원에 설명된 dPEG는 Quanta Biodesign, LMD의 dPEG이다.

[0103] [00101] 일부 구현예에서, C는 알부민 결합 도메인이다. 특정 양태에서, 알부민 결합 도메인은 혈청 알부민, 예를 들어 인간 혈청 알부민(HSA)에 특이적으로 결합하여 알부민 결합 도메인이 연관되거나 연결된 도메인 또는 다른 치료제의 반감기를 연장한다. 일부 구현예에서, 인간 혈청 알부민 결합 도메인은 분자의 N-말단에 연결된 개시 메티오닌(Met)을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 혈청 알부민 결합 도메인은 도메인의 C-말단 또는 N-말단에 연결된 시스테인(Cys)을 포함한다. N-말단 Met 및/또는 C-말단 Cys를 첨가하면 다른 분자와의 발현 및/또는 접합이 용이해질 수 있고, 이는 PEG, Fc 영역 등과 같은 다른 반감기 연장 분자가 될 수 있다.

[0104] [00102] 일부 구현예에서, 알부민 결합 도메인은 아래 표 1에 제공된 서열 번호 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118 또는 119의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 알부민 결합 도메인(단백질)이 단리된다. 일부 구현예에서, 알부민 결합 도메인은 서열 번호 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118 또는 119의 아미노산 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 알부민 결합 도메인은 서열 번호 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118 또는 119의 아미노산 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 이때 단백질은 서열 번호 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 또는 119의 위치 10에 해당하는 치환을 갖는다. 일부 구현예에서, 치환은 A10V이다. 일부 구현예에서, 치환은 A10G, A10L, A10I, A10T 또는 A10S이다. 일부 구현예에서, 위치 10에서의 치환은 자연적으로 발생하는 아미노산이다. 일부 구현예에서, 단리된 알부민 결합 도메인은 서열 번호 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118 또는 119의 아미노산 서열과 비교했을 때 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14개의 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 치환은 서열 번호 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118 또는 119의 위치 10에 상응하는 위치에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 제공된 FN3 도메인은 서열 번호 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 또는 119의 잔기 위치 6, 11, 22, 25, 26, 52, 53, 61, 88 또는 위치 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 30, 34, 38, 40, 41, 45, 47, 48, 53, 54, 59, 60, 62, 64, 70, 88, 89, 90, 91, 또는 93에 상응하는 적어도 하나의 잔기 위치에서 또는 C-말단에서 시스테인 잔기를 포함한다. 위치가 일련으로 나열되어 있지만, 각 위치를 개별적으로 선택할 수도 있다. 일부 구현예에서, 시스테인은 위치 6, 53 또는 88에 상응하는 위치에 존재한다. 일부 구현예에서, 알부민 결합 도메인의 추가적인 예는 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제10,925,932호에서 찾아볼 수 있다.

표 1

서열 번호	서열
101	MLPAPKNLVASRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVVHGVKGGASSPPLIARFTT
102	MLPAPKNLVSRVTEASARLSWTAPDAAFDSFNIAIWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVVHGVKGGASSPPLIARFTT

103	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDFAIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT
104	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT
105	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFNIAYAEPIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT
106	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFNIAYWEAGIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT
107	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFNIAYWEPIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT
108	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFNIAYWEPGAGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT
109	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT
110	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT
111	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT
112	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT
113	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT
114	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT
115	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT
116	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT
117	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT
118	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT
119	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVIHGVKGGASSPLIARFTT

[0106] [00103] 일부 구현예에서, dsRNA 작용제는 이중 가닥 내에서 표적과의 불일치(들)를 포함하거나, 이들의 조합을 포함한다. 불일치는 오버행 영역이나 이중 가닥 영역에서 발생할 수 있다. 염기쌍은 분리나 용해를 촉진하는 경향을 기준으로 순위를 매길 수 있다(예: 특정 쌍의 결합이나 해리의 자유 에너지를 기준으로, 가장 간단한 방법은 개별 쌍을 기준으로 쌍을 조사하는 것이지만, 인접 이웃이나 비슷한 분석을 사용할 수도 있다). 해리를 촉진한다는 측면에서, A:U는 G:C보다 선호되고, G:U는 G:C보다 선호되고, I:C는 G:C보다 선호된다(I = 이노신). 불일치, 예를 들어 비정규적(non-canonical) 또는 정규적이지 않은 쌍(본원의 다른 곳에서 설명한 대로)은 정규적(A:T, A:U, G:C) 쌍보다 선호된다. 또한 보편적 염기를 포함하는 쌍은 정규적 쌍보다 선호된다.

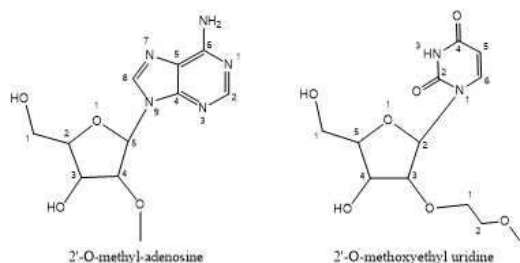
[0107] [00104] 일부 구현예에서, dsRNA 작용제는 센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 5'-말단에 인-함유기를 포함할 수 있다. 5'-말단 인-함유기는 5'-말단 포스페이트(5'-P), 5'-말단 포스포티오에이트(5'-PS), 5'-말단 포스포리디티오에이트(5'-PS2), 5'-말단 비닐포스포네이트(5'-VP), 5'-말단 메틸포스포네이트(MePhos), 5'-말단 메실 포스포라미데이트(5'-MsPA) 또는 5'-데옥시-5'-C-말로닐일 수 있다. 5'-말단 인-함유기가 5'-말단 비닐포스포네이트(5'-VP)인 경우, 5'-VP는 트랜스-비닐포스페이트 또는 시스-비닐포스페이트와 같은 5'-E-VP 이성질체이거나 이들의 혼합물일 수 있다. 이러한 변형의 대표적인 구조는 예를 들어, 미국 특허 제10,233,448호에서 찾아볼 수 있고, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0108] [00105] 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 유사체 또는 합성 뉴클레오타이드 염기는 리보오스 모이어티의 2' 히드록실기에 변형이 있는 핵산을 포함한다. 어떤 경우에는, 변형에 H, OR, R, 할로, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ 또는 CN이 포함되고, 여기서 R은 알킬 모이어티이다. 예시적인 알킬 모이어티는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소-프로필, n-부틸, 이소-부틸, 삼차-부틸, 선형 및 분지형 모두의 C₁-C₁₀ 쇠 길이를 포함하지만 이에 제한되는 않는다. 어떤 경우에는, 알킬 모이어티는 변형을 더 포함한다. 어떤 경우에는, 변형은 아조기, 케토기, 알데히드기, 카르복실기, 니트로기, 니트로소기, 니트릴기, 헤테로고리(예: 이미다졸, 히드라진 또는 히드록실아미노)기, 이소시아네이트 또는 시아네이트기, 또는 황 함유기(예: 술폰, 술폰, 술폰 및 디술폰)를 포함한다. 어떤 경우

에는, 알킬 모이어티가 O, S, N, Se와 같은 추가적인 헤테로 원자를 더 포함하고, 이러한 각각의 헤테로 원자는 위에 설명한 바와 같이 알킬기로 추가로 치환될 수 있다. 어떤 경우에는, 헤테로고리의 탄소가 질소, 산소 또는 황으로 치환된다. 어떤 경우에는, 헤테로고리 치환에는 모르폴리노, 이미다졸 및 피롤리디노가 포함되지만 이에 제한되지 않는다.

[0109]

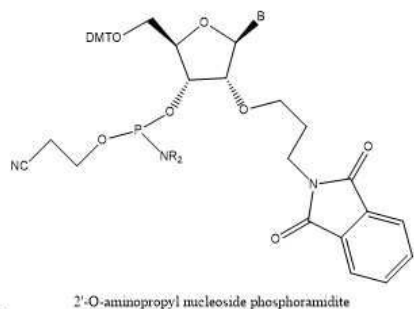
[00106] 어떤 경우에는, 2' 히드록실기의 변형은 2'-O-메틸 변형 또는 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE) 변형이다. 아데노신 분자의 2'-O-메틸 변형과 우리딘의 2'-O-메톡시에틸 변형의 예시적인 화학 구조가 아래에 도시되어 있다.



[0110]

[0111]

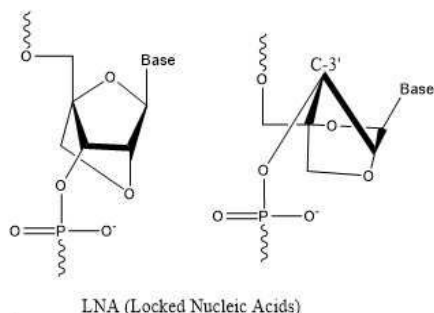
[00107] 어떤 경우에는, 2' 히드록실기의 변형은 프로필 링커를 포함하는 연장된 아민기가 아민기를 2' 산소에 결합하는 2'-O-아미노프로필 변형이다. 어떤 경우에는, 이러한 변형은 당 하나의 아민기로부터 하나의 양전하를 도입함으로써 올리고뉴클레오타이드 분자의 인산 유래 전체 음전하를 중성화하고, 이로써 쌍이온 특성으로 인한 세포 흡수 특성을 향상시킨다. 2'-O-아미노프로필 뉴클레오사이드 포스포라미다이트의 예시적인 화학 구조가 아래에 도시되어 있다.



[0112]

[0113]

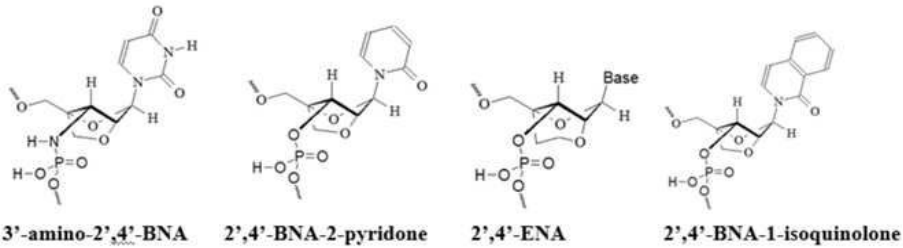
[00108] 어떤 경우에는, 2' 히드록실기에서의 변형은 2' 탄소에 결합된 산소 분자가 메틸렌기를 통해 4' 탄소에 연결되어 2'-C,4'-C-옥시-메틸렌-연결된 이환 리보뉴클레오타이드 단량체를 형성하는 잠금 또는 가교된 리보오스 변형(예: 잠금 핵산 또는 LNA(locked nucleic acid))이다. LNA의 화학 구조에 대한 예시적 표현은 아래와 같다. 왼쪽에 나타난 표현은 LNA 단량체의 화학적 연결성을 강조하고 있다. 오른쪽에 표시된 표현은 LNA 단량체의 푸라노스 고리의 잠긴 3'-엔도(3E) 형태를 강조한다.



[0114]

[0115]

[00109] 어떤 경우에는, 2' 히드록실기의 변형은 에틸렌 핵산(ENA)을 포함하고, 예를 들어 2'-4'-에틸렌-가교 핵산은 당 구조를 C3'-엔도 당 퍼커링 구조(C3'-endo sugar pucker conformation)로 고정(lock)한다. ENA는 LNA도 포함하는 변형 핵산의 가교 핵산 계열에 속한다. ENA와 가교된 핵산의 예시적인 화학 구조는 아래에 그림으로 표시되어 있다.



[0116]

[0117]

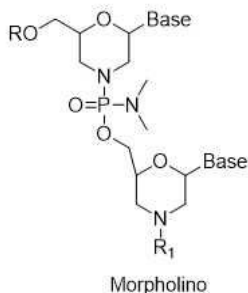
[00110] 일부 구현예에서, 2' 히드록실기의 추가적 변형에는 2'-데옥시, 2'-데옥시-2'-플루오로, 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP), 2'-O-디메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE), 2'-O-디메틸아미노프로필(2'-O-DMAP), 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE) 또는 2'-O-N-메틸아세트아미도(2'-O-NMA)가 포함된다.

[0118]

[00111] 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 유사체는 5-프로피닐우리딘, 5-프로피닐시티딘, 6-메틸아데닌, 6-메틸구아닌, N, N, -디메틸아데닌, 2-프로필아데닌, 2프로필구아닌, 2-아미노아데닌, 1-메틸이노신, 3-메틸우리딘, 5-메틸시티딘, 5-메틸우리딘 및 5 위치에 변형을 갖는 기타 뉴클레오타이드, 5-(2-아미노)프로필우리딘, 5-할로시티딘, 5-할로우리딘, 4-아세틸시티딘, 1-메틸아데노신, 2-메틸아데노신, 3-메틸시티딘, 6-메틸우리딘, 2-메틸구아노신, 7-메틸구아노신, 2, 2-디메틸구아노신, 5-메틸아미노에틸우리딘, 5-메틸옥시우리딘, 7-데아자아데노신이나 6-아조우리딘과 같은 데아자뉴클레오타이드, 6-아조시티딘, 6-아조티미딘, 5-메틸-2-티오우리딘, 2-티오우리딘 및 4-티오우리딘 및 2-티오시티딘과 같은 다른 티오 염기, 디히드로우리딘, 유사우리딘(pseudouridine), 케오신, 아르카에오신, 나프틸 및 치환된 나프틸기, N6-메틸아데노신과 같은 모든 O- 및 N-알킬화된 퓨린(purines) 및 피리미딘(pyrimidines), 5-메틸카르보닐메틸우리딘, 우리딘 5-옥시아세트산, 피리딘-4-온, 피리딘-2-온, 페닐 및 아미노페놀이나 2,4, 6-트리메톡시벤젠과 같은 변형 페닐기, G-클램프 뉴클레오타이드로 작용하는 변형 시토신, 8-치환 아데닌 및 구아닌, 5-치환 우라실 및 티민, 아자피리미딘, 카르복시히드록시알킬 뉴클레오타이드, 카르복시알킬아미노알킬 뉴클레오타이드 및 알킬카르보닐알킬화 뉴클레오타이드를 포함하되 이에 제한되지 않는 변형된 염기를 포함한다. 변형된 뉴클레오타이드에는 당 모이어티에 대해 변형된 뉴클레오타이드뿐만 아니라 리보실이 아닌 당 또는 그 유사체를 갖는 뉴클레오타이드도 포함된다. 예를 들어, 당 모이어티는 어떤 경우에는, 만노스, 아라비노스, 글루코피라노스, 갈락토피라노스, 4'-티오리보오스 및 기타 당, 헤테로고리 또는 카르보고리이거나 이를 기반으로 한다. 뉴클레오타이드라는 용어에는 해당 분야에서 보편적 염기(universal base)로 알려진 것도 포함된다. 예를 들어, 보편적 염기에는 3-니트로피롤, 5-니트로인돌 또는 네볼라린이 포함되지만 이에 제한되지 않는다.

[0119]

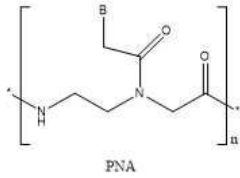
[00112] 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 유사체는 또한 모르폴리노, 펩티드 핵산(PNA), 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드, 티올포스포네이트 뉴클레오타이드, 2'-플루오로 N3-P5'-포스포라미디트, 1', 5'-안히드로핵시톨 핵산(HNA) 또는 이들의 조합을 더 포함한다. 모르폴리노 또는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고(PMO)는 정상적인 당과 인산 구조에서 벗어나 자연 핵산 구조를 모방하는 구조를 가진 합성 분자(synthetic molecules)를 포함한다. 어떤 경우에는, 5원자 리보오스 고리가 탄소 4개, 질소 1개, 산소 1개를 함유하는 6원자 모르폴리노 고리로 치환된다. 어떤 경우에는, 리보오스 단량체가 인산기 대신 인산디아미데이트기에 의해 연결된다. 이런 경우, 골격 변형으로 인해 모든 양전하와 음전하가 제거되어 모르폴리노는 세포 전달제(예: 하전된 올리고뉴클레오타이드)의 도움 없이도 세포막을 통과할 수 있는 중성 분자가 된다.



[0120]

[0121]

[00113] 일부 구현예에서, 펩티드 핵산(PNA)은 당 고리 또는 인산 결합을 포함하지 않고, 염기는 올리고글리신-유사 분자에 의해 부착되고 적절한 간격을 두고 배치되어, 골격 전하가 제거된다.



[0122]

[0123]

[00114] 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형은 임의로 뉴클레오타이드 간 결합에서 발생한다. 어떤 경우에는, 변형된 뉴클레오타이드 간 연결에는 포스포로티오에이트, 메실 포스포라미데이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트, 5'-알킬렌포스포네이트, 5'-메틸포스포네이트, 3'-알킬렌 포스포네이트, 보론트리플루오라이드, 보로노 인산 에스테르 및 3'-5' 연결(linkage) 또는 2'-5' 연결의 셀레노포스페이트, 포스포트리에스테르, 티오노알킬포스포트리에스테르, 수소 포스포네이트 결합, 알킬 포스포네이트, 알킬포스포노티오에이트, 아릴포스포노티오에이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포로디셀레노에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트, 3'-알킬포스포라미데이트, 아미노알킬포스포라미데이트, 티오노포스포라미데이트, 포스포로피페라지데이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포로아닐리데이트, 케톤, 술폰, 술폰아미드, 탄산염, 카르바민산염, 메틸렌히드라조, 메틸렌디메틸히드라조, 포름아세탈, 티오포름아세탈, 옥심, 메틸렌이미노, 메틸렌메틸이미노, 티오아미데이트, 리보아세틸기와 연결, 아미노에틸글리신, 실릴 또는 실록산 연결, 헤테로원자가 있거나 없는 알킬 또는 시클로알킬 연결(예: 포화 또는 불포화 및/또는 치환되거나 및/또는 헤테로원자를 함유하는 1 내지 10개 탄소 원자의), 모르폴리노 구조와의 연결, 아미드, 염기가 골격(backbone)의 아자 질소에 직접 또는 간접적으로 부착된 폴리아미드 및 이들의 조합이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 포스포로티오에이트 안티센스 올리고뉴클레오타이드(PS ASO)는 포스포로티오에이트 결합을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 메실 포스포라미데이트 안티센스 올리고뉴클레오타이드(MsPA ASO)는 메실 포스포라미데이트 연결을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드다.

[0124]

[00115] 어떤 경우에는, 변형이 메틸포스포네이트, 메실 포스포라미데이트 또는 티올포스포네이트 변형과 같은 메틸 또는 티올 변형이다. 어떤 경우에는, 변형된 뉴클레오티드에는 2'-플루오로 N3-P5'-포스포라미디드가 포함되지만 이에 제한되지 않는다.

[0125]

[00116] 어떤 경우에는, 변형된 뉴클레오티드에는 핵시톨 핵산(또는 1', 5'-안히드로핵시톨 핵산(HNA))이 포함되지만 이에 제한되지 않는다.

[0126]

[00117] 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형은 또한 임의로 리보오스 모이어티, 인산 골격 및 뉴클레오시드의 변형 또는 3' 또는 5' 말단의 뉴클레오타이드 유사체의 변형을 포함한다. 예를 들어, 3' 말단은 임의로 3' 양이온기를 포함하거나 3'-3' 연결로 3' 말단의 뉴클레오시드를 반전시킬 수 있다. 또 다른 대안에서, 3'-말단은 임의로 아미노알킬기, 예를 들어 3' C5-아미노알킬 dT와 접합된다. 추가적 대안에서, 3'-말단은 임의로 무염기 부위, 예를 들어 무푸린성 또는 무피리미딘성 부위와 접합된다. 어떤 경우에는, 5'-말단이 아미노알킬기, 예를 들어 5'-0-알킬아미노 치환기와 접합된다. 어떤 경우에는, 5'-말단이 무염기 부위(abasic site), 예를 들어 무푸린성(apurinic) 또는 무피리미딘성(apyrimidinic) 부위와 접합된다.

[0127]

[00118] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 본원에 기재된 하나 이상의 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 본원에 기재된 합성 뉴클레오타이드 유사체 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 25개 또는 그 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 합성 뉴클레오타이드 유사체에는 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE), 2'-O-아미노프로필, 2'-데옥시, 2'-데옥시-2'-플루오로, 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP), 2'-O-디메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE), 2'-O-디메틸아미노프로필(2'-O-DMAP), 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE), 또는 2'-O-N-메틸아세트아미도(2'-O-NMA) 변형, LNA, ENA, PNA, HNA, 모르폴리노, 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드, 티올포스포네이트 뉴클레오타이드, 2'-플루오로 N3-P5'-포스포라미디트 또는 이들의 조합이 포함된다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE), 2'-O-아미노프로필, 2'-데옥시, 2'-데옥시-2'-플루오로, 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP), 2'-O-디메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE), 2'-O-디메틸아미노프로필(2'-O-DMAP), 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE), 또는 2'-O-N-메틸아세트아미도(2'-O-NMA) 변형, LNA, ENA, PNA, HNA, 모르폴리노, 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드, 티올포스포네이트 뉴클레오타이드, 2'-플루오로 N3-P5'-포스포라미디트 또는 이들의 조합 중에서 선택된 합성 뉴클레오타이드 유사체 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 25개 또는 그 이상을 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 25개 또는 그 이상을 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE) 변형 뉴클레오타이드의 1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 25개 또는 그 이상을 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 25개 또는 그 이상의 티올포스포네이트 뉴클레오타이드를 포함한다.

- [0128] [00119] 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 다음 중 하나 이상을 포함한다. 약 5% 내지 약 100%의 변형, 약 10% 내지 약 100%의 변형, 약 20% 내지 약 100%의 변형, 약 30% 내지 약 100%의 변형, 약 40% 내지 약 100%의 변형, 약 50% 내지 약 100%의 변형, 약 60% 내지 약 100%의 변형, 약 70% 내지 약 100%의 변형, 약 80% 내지 약 100%의 변형, 및 약 90% 내지 약 100%의 변형. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자가 100% 변형을 포함한다.
- [0129] [00120] 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 다음 중 하나 이상을 포함한다. 약 10% 내지 약 90%의 변형, 약 20% 내지 약 90%의 변형, 약 30% 내지 약 90%의 변형, 약 40% 내지 약 90%의 변형, 약 50% 내지 약 90%의 변형, 약 60% 내지 약 90%의 변형, 약 70% 내지 약 90%의 변형 및 약 80% 내지 약 100%의 변형.
- [0130] [00121] 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 다음 중 하나 이상을 포함한다. 약 10% 내지 약 80%의 변형, 약 20% 내지 약 80%의 변형, 약 30% 내지 약 80%의 변형, 약 40% 내지 약 80%의 변형, 약 50% 내지 약 80%의 변형, 약 60% 내지 약 80%의 변형 및 약 70% 내지 약 80%의 변형.
- [0131] [00122] 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 다음 중 하나 이상을 포함한다. 약 10% 내지 약 70%의 변형, 약 20% 내지 약 70%의 변형, 약 30% 내지 약 70%의 변형, 약 40% 내지 약 70%의 변형, 약 50% 내지 약 70%의 변형 및 약 60% 내지 약 70%의 변형.
- [0132] [00123] 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 다음 중 하나 이상을 포함한다. 약 10% 내지 약 60%의 변형, 약 20% 내지 약 60%의 변형, 약 30% 내지 약 60%의 변형, 약 40% 내지 약 60%의 변형, 및 약 50% 내지 약 60%의 변형.
- [0133] [00124] 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 다음 중 하나 이상을 포함한다. 약 10% 내지 약 50%의 변형, 약 20% 내지 약 50%의 변형, 약 30% 내지 약 50%의 변형 및 약 40% 내지 약 50%의 변형.
- [0134] [00125] 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 다음 중 하나 이상을 포함한다. 약 10% 내지 약 40%의 변형, 약 20% 내지 약 40%의 변형, 및 약 30% 내지 약 40%의 변형.
- [0135] [00126] 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 다음 중 하나 이상을 포함한다. 약 10% 내지 약 30%의 변형 및 약 20% 내지 약 30%의 변형.
- [0136] [00127] 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 약 10%에서 약 20%의 변형을 포함한다.
- [0137] [00128] 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 약 15% 내지 약 90%, 약 20% 내지 약 80%, 약 30% 내지 약 70%, 또는 약 40% 내지 약 60%의 변형을 포함한다.
- [0138] [00129] 추가의 경우, 올리고뉴클레오타이드 분자는 적어도 약 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 변형을 포함한다.
- [0139] [00130] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 적어도 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 약 36, 약 37, 약 38, 약 39 또는 약 40개의 변형을 포함한다.
- [0140] [00131] 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 적어도 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 약 36, 약 37, 약 38, 약 39 또는 약 40개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0141] [00132] 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 5% 내지 약 100%가 본원에 설명한 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%가 본원에 설명한 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 5%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 10%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 15%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다.

한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 20%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 25%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 30%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 35%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 40%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 45%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 50%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 55%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 60%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 65%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 70%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 75%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 80%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 85%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 90%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 95%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 96%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 97%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 98%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 99%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 100%가 본원에 설명된 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 일부 구현예에서, 합성 뉴클레오타이드 유사체에는 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE), 2'-O-아미노프로필, 2'-데옥시, 2'-데옥시-2'-플루오로, 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP), 2'-O-디메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE), 2'-O-디메틸아미노프로필(2'-O-DMAP), 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE), 또는 2'-O-N-메틸아세트아미도(2'-O-NMA) 변형, LNA, ENA, PNA, HNA, 모르폴리노, 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드, 티올포스포네이트 뉴클레오타이드, 2'-플루오로 N3-P5'-포스포르아미디트 또는 이들의 조합이 포함된다.

[0142]

[illegible]

[illegible]

- [0143] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 두 개의 별도 폴리뉴클레오타이드로부터 조립되는데, 여기서 하나의 폴리뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드 분자의 센스 가닥을 포함하고 제2 폴리뉴클레오타이드는 안티센스 가닥을 포함한다. 다른 구현예에서, 센스 가닥은 링커 분자를 통해 안티센스 가닥에 연결되는데, 어떤 경우에는, 이 링커 분자가 폴리뉴클레오타이드 링커이거나 비뉴클레오타이드 링커이다.

[0144] [00135] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하고, 여기서 센스 가닥의 피리미딘 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸피리미딘 뉴클레오타이드를 포함하고 센스 가닥의 퓨린 뉴클레오타이드는 2'-데옥시 퓨린 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하고, 여기서 센스 가닥에 존재하는 피리미딘 뉴클레오타이드는 2'-데옥시-2'-플루오로 피리미딘 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 센스 가닥에 존재하는 퓨린 뉴클레오타이드는 2'-데옥시 퓨린 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0145] [00136] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하고, 여기서 피리미딘 뉴클레오타이드는 상기 안티센스 가닥에 존재할 때 2'-데옥시-2'-플루오로 피리미딘 뉴클레오타이드이고, 퓨린 뉴클레오타이드는 상기 안티센스 가닥에 존재할 때 2'-O-메틸 퓨린 뉴클레오타이드이다.

[0146] [00137] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하고, 여기서 피리미딘 뉴클레오타이드는 상기 안티센스 가닥에 존재할 때 2'-데옥시-2'-플루오로 피리미딘 뉴클레오타이드이고, 퓨린 뉴클레오타이드는 상기 안티센스 가닥에 존재할 때 2'-데옥시-퓨린 뉴클레오타이드를 포함한다.

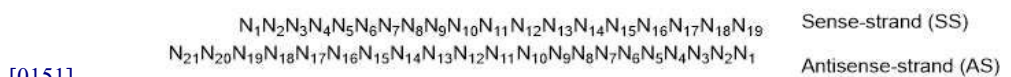
[0147] [00138] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥과 안티센스 가닥 중 적어도 하나는 복수개(예: 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개

이상 등)의 2'-O-메틸 또는 2'-데옥시-2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드를 갖는다. 일부 구현예에서, 복수의 2'-O-메틸 또는 2'-데옥시-2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드 중 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개는 연속된 뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, 연속된 2'-O-메틸 또는 2'-데옥시-2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드는 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 5'-말단에 위치한다. 일부 구현예에서, 연속된 2'-O-메틸 또는 2'-데옥시-2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드는 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 3'-말단에 위치한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자의 센스 가닥은 5' 말단 및/또는 3' 말단, 또는 둘 다에 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개의 연속된 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드를 포함한다. 임의로, 이러한 구현예들에서 올리고뉴클레오타이드 분자의 센스 가닥은 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단에서, 또는 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에서 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개의 연속된 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드의 5' 말단에서 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개의 연속된 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드의 3' 말단에 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개의 2'-데옥시-2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드를 포함한다. 또한 임의로, 이러한 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개의 2'-데옥시-2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드는 연속된 뉴클레오타이드이다.

[0148] [00139] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥과 안티센스 가닥 중 적어도 하나는 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 5'-말단에 위치한 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드를 갖는다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 중 적어도 하나는 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 3'-말단에 위치한 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드를 갖는다. 일부 구현예에서, 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 5'-말단에 위치한 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드는 푸린 뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 5'-말단에 위치한 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드는 피리미딘 뉴클레오타이드이다.

[0149] [00140] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥과 안티센스 가닥 중 하나는 5'-말단에 위치한 적어도 두 개의 연속된 2'-데옥시-2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드를 갖고, 다른 가닥은 5'-말단에 위치한 적어도 두 개의 연속된 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드를 갖는다. 일부 구현예에서, 가닥이 5'-말단에 위치한 적어도 두 개의 연속된 2'-데옥시-2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드를 갖는 경우, 가닥은 또한 적어도 두 개의 연속된 2'-데옥시-2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드의 3'-말단에 적어도 두 개, 적어도 세 개의 연속된 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 중 하나는 5'-말단 및/또는 3'-말단에 2'-데옥시-2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드에 연결된 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개 또는 적어도 7개의 연속적인 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드를 갖는다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 중 하나는 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드와 2'-데옥시-2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드가 번갈아 배열된 최소 4개, 최소 5개의 뉴클레오타이드를 갖는다.

[0150] [00141] 일부 구현예에서, siRNA와 같은 올리고뉴클레오타이드 분자는 화학식 I에 도시된 바와 같은 화학식을 갖는다.



[0152] 여기서 N으로 표현되는 각 뉴클레오타이드는 독립적으로 A, U, C 또는 G이거나, 본원에 제공한 것과 같은 변형된 뉴클레오타이드 염기이다. 센스 가닥과 안티센스 가닥의 N₁ 뉴클레오타이드는 각 가닥의 5' 말단을 나타낸다. 명확하게 말해서, 화학식 I은 센스 가닥과 안티센스 가닥 모두에서 N₁, N₂, N₃ 등을 사용하지만, 뉴클레오타이드 염기는 같을 필요가 없으며 같을 의도도 없다. 화학식 I에 나타난 siRNA는 표적 서열과 보완적일 것이다.

[0153] [00142] 예를 들어, 일부 구현예에서, 센스 가닥은 N₁ 및 N₂에 포스포로티오에이트(PS) 변형 골격을 갖는 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드, N₃, N₇, N₈, N₉, N₁₂ 및 N₁₇에 2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드, 및 N₄, N₅, N₆, N₁₀, N₁₁, N₁₃, N₁₄, N₁₅, N₁₆, N₁₈ 및 N₁₉에 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0154] [00143] 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 N₁에 부착된 비닐포스포네이트 모이어티, N₂에 포스포로티오에이트(PS) 변형 골격을 갖는 2'-플루오로- 변형 뉴클레오타이드, N₃, N₄, N₅, N₆, N₇, N₈, N₉, N₁₀, N₁₁, N₁₂, N₁₃, N₁₅, N₁₆, N₁₇, N₁₈ 및 N₁₉에 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드, N₁₄에 2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드, N₂₀ 및 N₂₁에 포스포로티오에이트(PS) 변형 골격을 갖는 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0155] [00144] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하고, 여기서 센스 가닥은 센스 가닥의 5'-말단, 3'-말단, 또는 5' 및 3'-말단 둘 다에 말단 캡 모이어티를 포함한다. 다른 구현예에

서, 말단 캡 모이어티는 역 디옥시 무염기 모이어티(inverted deoxy abasic moiety)이다.

[0156] [00145] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하고, 여기서 안티센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에 글리세틸 변형을 포함한다.

[0157] [00146] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하고, 여기서 센스 가닥은 하나 이상, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 메실 포스포라미데이트 뉴클레오타이드 간 연결 및/또는 하나 이상(예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)의 2'-데옥시, 2'-O-메틸, 2'-데옥시-2'-플루오로 및/또는 약 하나 이상(예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)의 보편적 염기 변형 뉴클레오타이드, 및 임의로 센스 가닥의 3'-말단, 5'-말단 또는 3'-말단과 5'-말단 둘 다에 말단 캡 분자를 포함하고, 그리고 여기서 안티센스 가닥이 약 1 내지 약 10개 이상, 구체적으로 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 메실 포스포라미데이트 뉴클레오타이드 간 연결 및/또는 하나 이상(예: 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)의 2'-데옥시, 2'-O-메틸, 2'-데옥시-2'-플루오로 및/또는 하나 이상(예: 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)의 보편적 염기 변형 뉴클레오타이드, 그리고 임의로 안티센스 가닥의 3'-말단, 5'-말단, 또는 3'-말단과 5'-말단 둘 다에 있는 말단 캡 분자를 포함한다. 다른 구현예에서, 센스 및/또는 안티센스 가닥의 하나 이상의, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 피리미딘 뉴클레오타이드가 2'-데옥시, 2'-O-메틸 및/또는 2'-데옥시-2'-플루오로 뉴클레오타이드로써 화학적으로 변형되고, 하나 이상의 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 메실 포스포라미데이트 뉴클레오타이드 간 연결이 있을 수도 있고 없을 수도 있고, 그리고/또는 3'-말단, 5'-말단, 또는 3'-말단과 5'-말단 둘 다에 말단 캡 분자가 동일하거나 상이한 가닥에 존재한다.

[0158] [00147] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하고, 여기서 센스 가닥은 약 1 내지 약 25개, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 메실 포스포라미데이트 뉴클레오타이드 간 연결 및/또는 하나 이상(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)의 2'-데옥시, 2'-O-메틸, 2'-데옥시-2'-플루오로 및/또는 하나 이상(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)의 보편적 염기 변형 뉴클레오타이드 및 임의로 센스 가닥의 3'-말단, 5'-말단 또는 3'-말단과 5'-말단 둘 다에 말단 캡 분자를 포함하고, 그리고 여기서 안티센스 가닥이 약 1 내지 약 25개 이상, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 메실 포스포라미데이트 뉴클레오타이드 간 연결 및/또는 하나 이상(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)의 2'-데옥시, 2'-O-메틸, 2'-데옥시-2'-플루오로 및/또는 하나 이상(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)의 보편적 염기 변형 뉴클레오타이드, 그리고 임의로 안티센스 가닥의 3'-말단, 5'-말단, 또는 3'-말단과 5'-말단 둘 다에 말단 캡 분자를 포함한다. 다른 구현예에서, 하나 이상의, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 센스 및/또는 안티센스 가닥의 피리미딘 뉴클레오타이드가 2'-데옥시, 2'-O-메틸 및/또는 2'-데옥시-2'-플루오로 뉴클레오타이드로 화학적으로 변형되고, 약 1개 내지 약 25개 또는 그 이상, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 메실 포스포라미데이트 뉴클레오타이드 간 연결이 있거나 없이, 및/또는 3'-말단, 5'-말단, 또는 3'-말단과 5'-말단 둘 다에 말단 캡 분자가 동일하거나 상이한 가닥에 존재한다.

[0159] [00148] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는데, 여기서 안티센스 가닥은 하나 이상, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 메실 포스포라미데이트 뉴클레오타이드 간 연결 및/또는 약 하나 이상(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)의 2'-데옥시, 2'-O-메틸, 2'-데옥시-2'-플루오로 및/또는 하나 이상(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)의 보편적 염기 변형 뉴클레오타이드를 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 3'-말단, 5'-말단 또는 3'-말단과 5'-말단 둘 다에, 임의로 센스 가닥의 3'-말단, 5'-말단 또는 3'-말단과 5'-말단 둘 다에 말단 캡 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 약 1 내지 약 10개 또는 그 이상, 구체적으로 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트,

포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 메실 포스포라미데이트 뉴클레오타이드 간 연결 및/또는 하나 이상(예: 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)의 2'-데옥시, 2'-O-메틸, 2'-데옥시-2'-플루오로 및/또는 하나 이상(예: 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)의 보편적 염기 변형 뉴클레오타이드 및 임의로 안티센스 가닥의 3'-말단, 5'-말단 또는 3'- 및 5'-말단 둘 다에 말단 캡 분자를 포함한다. 다른 구현예에서, 하나 이상의, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 센스 및/또는 안티센스 가닥의 피리미딘 뉴클레오타이드가 2'-데옥시, 2'-O-메틸 및/또는 2'-데옥시-2'-플루오로 뉴클레오타이드로 화학적으로 변형되고, 하나 이상의, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 메실 포스포라미데이트 뉴클레오타이드 간 연결이 있거나 없이, 및/또는 3'-말단, 5'-말단 또는 3'-말단 모두에 말단 캡 분자가 동일하거나 상이한 가닥에 존재한다.

[0160] [00149] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는데, 여기서 안티센스 가닥은 약 1 내지 약 25개 또는 그 이상, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 메실 포스포라미데이트 뉴클레오타이드 간 연결 및/또는 하나 이상(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)의 2'-데옥시, 2'-O-메틸, 2'-데옥시-2'-플루오로 및/또는 하나 이상(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)의 보편적 염기 변형 뉴클레오타이드 및 임의로 센스 가닥의 3'-말단, 5'-말단 또는 3'-말단과 5'-말단 둘 다에 있는 말단 캡 분자를 포함하고, 그리고 안티센스 가닥은 약 1개에서 약 25개 또는 그 이상, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 메실 포스포라미데이트 뉴클레오타이드 간 연결 및/또는 하나 이상(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)의 2'-데옥시, 2'-O-메틸, 2'-데옥시-2'-플루오로 및/또는 하나 이상의(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상) 보편적 염기 변형 뉴클레오타이드, 및 임의로 안티센스 가닥의 3'-말단, 5'-말단, 또는 3'-말단과 5'-말단 둘 다에 있는 말단 캡 분자를 포함한다. 다른 구현예에서, 하나 이상의, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 센스 및/또는 안티센스 가닥의 피리미딘 뉴클레오타이드가 2'-데옥시, 2'-O-메틸 및/또는 2'-데옥시-2'-플루오로 뉴클레오타이드로서 화학적으로 변형되고, 약 1 내지 약 5개, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 메실 포스포라미데이트 뉴클레오타이드 간 연결 및/또는 3'-말단, 5'-말단, 또는 3'-말단과 5'-말단 둘 다에 말단 캡 분자가 동일하거나 상이한 가닥에 존재하게 된다.

[0161] [00150] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드 분자는 올리고뉴클레오타이드 분자의 각 가닥에 약 1 내지 약 25개, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 메실 포스포라미데이트 뉴클레오타이드 간 연결을 갖는 화학적으로 변형된 짧은 간접 핵산 분자이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에 인산 골격 변형을 포함한다. 대안적으로 및/또는 추가적으로, 올리고뉴클레오타이드 분자는 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥은 안티센스 가닥의 5' 말단에서 인산 골격 변형을 포함한다. 어떤 경우에는, 인산(포스페이트) 골격 변형이 포스포로티오에이트이다. 어떤 경우에는, 인산 골격 변형이 포스포로디티오에이트이다. 어떤 경우에는, 인산 골격 변형이 포스포네이트이다. 어떤 경우에는, 인산 골격 변형이 포스포라미데이트이다. 어떤 경우에는, 인산 골격 변형이 메실 포스포라미데이트이다. 일부 구현예에서, 센스 또는 안티센스 가닥은 두 개의 포스포로티오에이트 골격을 통해 커플링된 세 개의 연속적인 뉴클레오시드를 갖는다. 일부 구현예에서, 센스 또는 안티센스 가닥은 두 개의 포스포로디티오에이트 골격을 통해 커플링된 세 개의 연속된 뉴클레오시드를 갖는다. 일부 구현예에서, 센스 또는 안티센스 가닥은 두 개의 포스포네이트 골격을 통해 커플링된 세 개의 연속된 뉴클레오시드를 갖는다. 일부 구현예에서, 센스 또는 안티센스 가닥은 두 개의 포스포라미데이트 골격을 통해 커플링된 세 개의 연속된 뉴클레오시드를 갖는다. 일부 구현예에서, 센스 또는 안티센스 가닥은 두 개의 메실 포스포라미데이트 골격을 통해 커플링된 세 개의 연속된 뉴클레오시드를 갖는다.

[0162] [00151] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드 분자는 2'-5' 뉴클레오타이드 간 (internucleotide) 연결을 포함한다. 어떤 경우에는, 2'-5' 뉴클레오타이드 간 연결(들)이 한쪽 또는 양쪽 서열 가닥의 3' 말단, 5' 말단, 또는 3' 말단과 5' 말단 둘 다에 있다. 추가의 경우, 2'-5' 뉴클레오타이드 간 연결(들)은 하나 또는 두 서열 가닥 내의 다양한 다른 위치에 존재하는데, 예를 들어 올리고뉴클레오타이드 분자의 하나 또는 두 가닥 내의 피리미딘 뉴클레오타이드의 모든 뉴클레오타이드 간 연결은 2'-5' 뉴클레오타이드 간 연결을 포함하거나, 또는 올리고뉴클레오타이드 분자의 하나 또는 두 가닥 내의 퓨린 뉴클레오타이드의 모든 뉴클레오타이드

드 간 연결을 포함하여 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상이 2'-5' 뉴클레오타이드 간 연결을 포함한다.

[0163] [00152] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 세포 또는 재구성된 시험관 내 시스템에서 RNAi 활성을 매개하는 단일 가닥 분자이고, 여기서 올리고뉴클레오타이드 분자는 표적 핵산 서열에 대한 상보성을 갖는 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 그리고 여기서 올리고뉴클레오타이드 분자에 존재하는 하나 이상의 피리미딘 뉴클레오타이드가 2'-데옥시-2'-플루오로 피리미딘 뉴클레오타이드이고(예: 모든 피리미딘 뉴클레오타이드가 2'-데옥시-2'-플루오로 피리미딘 뉴클레오타이드이거나 또는 복수의 피리미딘 뉴클레오타이드가 2'-데옥시-2'-플루오로 피리미딘 뉴클레오타이드인 경우), 그리고 여기서 올리고뉴클레오타이드 분자에 존재하는 모든 퓨린 뉴클레오타이드는 2'-데옥시 퓨린 뉴클레오타이드이고(예를 들어, 모든 퓨린 뉴클레오타이드가 2'-데옥시 퓨린 뉴클레오타이드이거나 또는 복수의 퓨린 뉴클레오타이드가 2'-데옥시 퓨린 뉴클레오타이드인 경우), 그리고 말단 캡 변형이 임의로 안티센스 서열의 3'-말단, 5'-말단 또는 3'과 5'-말단 둘 다에 존재하고, 올리고뉴클레오타이드 분자는 임의로 올리고뉴클레오타이드 분자의 3'-말단에 약 1 내지 약 4개(예를 들어, 약 1, 2, 3 또는 4개)의 말단 2'-데옥시뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서 말단 뉴클레오타이드는 또한 하나 이상(예: 1, 2, 3 또는 4)의 포스포로티오에이트 또는 메실 포스포라미데이트 뉴클레오타이드 간 연결을 더 포함하고, 여기서 올리고뉴클레오타이드 분자는 임의로 말단 인산(포스페이트)기, 예를 들어 5'-말단 인산기를 더 포함한다.

[0164] [00153] 어떤 경우에는, 본원에 설명한 하나 이상의 합성 뉴클레오타이드 유사체는 천연 폴리핵산 분자 및 핵산 내부분해효소와 비교했을 때, 예를 들어 RNase H와 같은 리보핵산분해효소, DNase와 같은 데옥시리보핵산분해효소 또는 5'-3' 핵산말단분해효소 및 3'-5' 핵산말단분해효소와 같은 핵산분해효소에 대해 저항성을 나타낸다. 어떤 경우에는, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE), 2'-O-아미노프로필, 2'-데옥시, 2'-데옥시-2'-플루오로, 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP), 2'-O-디메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE), 2'-O-디메틸아미노프로필(2'-O-DMAP), 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE), 또는 2'-O-N-메틸아세트아미도(2'-O-NMA) 변형, LNA, ENA, PNA, HNA, 모르폴리노, 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드, 티올포스포네이트 뉴클레오타이드, 2'-플루오로 N3-P5'-포스포라미디트 또는 이들의 조합을 포함하는 합성 뉴클레오타이드 유사체는 예를 들어 RNase H와 같은 리보핵산분해효소, DNase와 같은 데옥시리보핵산분해효소 또는 5'-3' 핵산말단분해효소 및 3'-5' 핵산말단분해효소와 같은 핵산분해효소에 대해 저항성을 갖는다. 어떤 경우에는, 2'-O-메틸 변형 올리고뉴클레오타이드 분자가 핵산분해효소 저항성을 나타낸다(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성). 어떤 경우에는, 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE) 변형 올리고뉴클레오타이드 분자가 핵산분해효소 저항성(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성)을 나타낸다. 어떤 경우에는, 2'-O-아미노프로필 변형 올리고뉴클레오타이드 분자가 핵산분해효소 저항성을 나타낸다(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성). 어떤 경우에는, 2'-데옥시 변형 올리고뉴클레오타이드 분자가 핵산분해효소 저항성을 나타낸다(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성). 어떤 경우에는, 2'-데옥시-2'-플루오로 변형 올리고뉴클레오타이드 분자가 핵산분해효소 저항성(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성)을 나타낸다. 어떤 경우에는, 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP) 변형 올리고뉴클레오타이드 분자가 핵산분해효소 저항성(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성)을 나타낸다. 어떤 경우에는, 2'-O-디메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE) 변형 올리고뉴클레오타이드 분자가 핵산분해효소 저항성(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성)을 나타낸다. 어떤 경우에는, 2'-O-디메틸아미노프로필(2'-O-DMAP) 변형 올리고뉴클레오타이드 분자가 핵산분해효소 저항성(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성)을 나타낸다. 어떤 경우에는, 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE) 변형 올리고뉴클레오타이드 분자가 핵산분해효소 저항성(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성)을 나타낸다. 어떤 경우에는, 2'-O-N-메틸아세트아미도(2'-O-NMA) 변형 올리고뉴클레오타이드 분자가 핵산분해효소 저항성(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성)을 나타낸다. 어떤 경우에는, LNA 변형 올리고뉴클레오타이드 분자가 핵산분해효소 저항성(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성)을 나타낸다. 어떤 경우에는, ENA 변형 올리고뉴클레오타이드 분자가 핵산분해효소 저항성(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성)을 나타낸다. 어떤 경우에는, HNA 변형 올리고뉴클레오타이드 분자가 핵산분해효소 저항성(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성)을 나타낸다. 어떤 경우에는, 모르폴리노가 핵산분해효소 저항성을 나타낸다(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성). 어떤 경우에는, PNA 변형 올리고뉴클레오타이드 분자가 핵산분해효소에 저항성을 보인다(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성). 어떤 경우에는, 메틸포스포네이트 뉴클

레오티드 변형 올리고뉴클레오티드 분자는 핵산분해효소 저항성(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성)을 나타낸다. 어떤 경우에는, 티올포스포네이트 뉴클레오티드 변형 올리고뉴클레오티드 분자는 핵산분해효소 저항성(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성)을 나타낸다. 어떤 경우에는, 2'-플루오로 N3-P5'-포스포라미디트를 포함하는 올리고뉴클레오티드 분자는 핵산분해효소 저항성(예: RNase H, DNase, 5'-3' 핵산말단분해효소 또는 3'-5' 핵산말단분해효소 저항성)을 나타낸다. 어떤 경우에는, 본원에 설명된 5' 접합체가 5'-3' 외핵산 분해 절단(exonucleolytic cleavage)을 억제한다. 어떤 경우에는, 본원에 설명된 3' 접합체가 3'-5' 외핵산 분해 절단을 억제한다.

[0165]

[00154] 일부 구현예에서, 본원에 설명한 하나 이상의 합성 뉴클레오티드 유사체는 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가한다. 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE), 2'-O-아미노프로필, 2'-데옥시, 2'-데옥시-2'-플루오로, 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP), 2'-O-디메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE), 2'-O-디메틸아미노프로필(2'-O-DMAP), 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE), 또는 2'-O-N-메틸아세트아미도(2'-O-NMA) 변형, LNA, ENA, PNA, HNA, 모르폴리노, 메틸포스포네이트 뉴클레오티드, 티올포스포네이트 뉴클레오티드 또는 2'-플루오로 N3-P5'-포스포라미디트를 포함하는 하나 이상의 합성 뉴클레오티드 유사체는 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가한다. 어떤 경우에는, 2'-O-메틸 변형 올리고뉴클레오티드 분자가 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE) 변형 올리고뉴클레오티드 분자가 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, 2'-O-아미노프로필 변형 올리고뉴클레오티드 분자가 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, 2'-데옥시 변형 올리고뉴클레오티드 분자가 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, 2'-데옥시-2'-플루오로 변형 올리고뉴클레오티드 분자가 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP) 변형 올리고뉴클레오티드 분자가 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, 2'-O-디메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE) 변형 올리고뉴클레오티드 분자가 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, 2'-O-디메틸아미노프로필(2'-O-DMAP) 변형 올리고뉴클레오티드 분자가 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE) 변형 올리고뉴클레오티드 분자가 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, 2'-O-N-메틸아세트아미도(2'-O-NMA) 변형 올리고뉴클레오티드 분자가 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, LNA 변형 올리고뉴클레오티드 분자가 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, ENA 변형 올리고뉴클레오티드 분자가 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, PNA 변형 올리고뉴클레오티드 분자가 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, HNA 변형 올리고뉴클레오티드 분자가 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, 모르폴리노 변형 올리고뉴클레오티드 분자가 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, 메틸포스포네이트 뉴클레오티드로 변형된 올리고뉴클레오티드 분자가 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, 티올포스포네이트 뉴클레오티드 변형의 올리고뉴클레오티드 분자는 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, 2'-플루오로 N3-P5'-포스포라미디트를 포함하는 올리고뉴클레오티드 분자는 동등한 천연 폴리핵산 분자에 비해 mRNA 표적에 대한 결합 친화도가 증가했다. 어떤 경우에는, 증가된 친화도가 더 낮은 Kd, 더 높은 용융 온도(Tm) 또는 이들의 조합으로 표현된다.

[0166]

[00155] 일부 구현예에서, 본원에 설명한 올리고뉴클레오티드 분자는 키랄적으로 순수한(또는 입체적으로 순수한) 폴리핵산 분자(polynucleic acid molecule)이거나, 단일 거울상이성질체를 포함하는 폴리핵산 분자이다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오티드 분자가 L- 뉴클레오티드를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오티드 분자가 D-뉴클레오티드를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오티드 분자 조성은 거울상 이성질체의 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 이하를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오티드 분자 조성은 라세미 혼합물의 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 이하를 포함한다.

[0167]

[00156] 일부 구현예에서, 본원에 설명한 올리고뉴클레오티드 분자는 앵타머 접합 모이어티(aptamer conjugating moiety)를 포함하도록 더 변형된다. 어떤 경우에는, 앵타머 접합 모이어티가 DNA 앵타머 접합 모이어티이다. 어떤 경우에는, 앵타머 접합 모이어티가 알파머(Alphamer)인데, 이는 특정 세포 표면 표적을 인식하

는 앵타머 부분(portion)과 순환 항체에 부착하기 위한 특정 에피토프를 제시하는 부분을 포함한다.

[0168] [00157] 추가적인 구현예에서, 본원에 설명한 올리고뉴클레오타이드 분자는 안정성을 증가시키도록 변형된다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 RNA(예: siRNA)이다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자가 위에서 설명한 하나 이상의 변형으로 변형되어 안정성이 높아진다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 2' 히드록실 위치에서 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE), 2'-O-아미노프로필, 2'-데옥시, 2'-데옥시-2'-플루오로, 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP), 2'-O-디메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE), 2'-O-디메틸아미노프로필(2'-O-DMAP), 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE), 또는 2'-O-N-메틸아세트아미도(2'-O-NMA) 변형 또는 잠금 또는 가교된 리보오스 형태(예: LNA 또는 ENA)에 의해 변형된다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자가 2'-O-메틸 및/또는 2'-O-메톡시에틸 리보오스에 의해 변형된다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 안정성을 높이기 위해 모르폴리노, PNA, HNA, 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드, 티올포스포네이트 뉴클레오타이드 및/또는 2'-플루오로 N3-P5'-포스포라미디트를 포함한다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자가 키랄 순수(chirally pure)(또는 스테레오 순수) 올리고뉴클레오타이드 분자이다. 어떤 경우에는, 키랄 순수(또는 스테레오 순수) 올리고뉴클레오타이드 분자가 안정성을 높이기 위해 변형된다. 전달 안정성을 높이기 위한 RNA의 적절한 변형은 당업자에게 명백할 것이다.

[0169] [00158] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자는 2' 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥의 5' 말단으로부터 위치 3, 7, 8, 9, 12 및 17에 있는 올리고뉴클레오타이드 분자의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형으로 변형되지 않는다. 일부 구현예에서, 센스 가닥의 5' 말단으로부터 위치 3, 7, 8, 9, 12 및 17에 있는 올리고뉴클레오타이드 분자의 뉴클레오타이드는 2' 플루오로 변형으로 변형된다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 5' 말단으로부터 위치 2 및 14에 있는 올리고뉴클레오타이드 분자의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형으로 변형되지 않는다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 5' 말단으로부터 위치 2 및 14에 있는 올리고뉴클레오타이드 분자의 뉴클레오타이드는 2' 플루오로 변형으로 변형된다. 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 중 임의의 것은 5'-포스포로티오에이트(phosphorothioate)기 변형을 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 센스 가닥의 5' 말단으로부터 위치 1 및 2에 있는 올리고뉴클레오타이드 분자의 뉴클레오타이드는 5'-포스포로티오에이트기 변형으로 변형된다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 5' 말단으로부터 위치 1, 2, 20 및 21에 있는 올리고뉴클레오타이드 분자의 뉴클레오타이드는 5'-포스포로티오에이트기 변형으로 변형된다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자의 센스 또는 안티센스 가닥의 5' 말단은 비닐포스포네이트(vinylphosphonate) 변형을 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 5' 말단으로부터 위치 1에 있는 올리고뉴클레오타이드 분자의 뉴클레오타이드는 비닐포스포네이트 변형으로 변형된다.

[0170] [00159] 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 자가 상보적(self-complementary) 센스 및 안티센스 영역을 포함하는 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드 분자이고, 여기서 안티센스 영역은 표적 핵산 분자 또는 그 일부의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 센스 영역은 표적 핵산 서열 또는 그 일부에 상응하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 두 개의 별개의 폴리뉴클레오타이드로부터 조립되는데, 여기서 한 가닥은 센스 가닥이고 다른 가닥은 안티센스 가닥이며, 안티센스 가닥과 센스 가닥은 자가 상보적이다(예를 들어, 각 가닥은 다른 가닥의 뉴클레오타이드 서열과 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 예를 들어, 안티센스 가닥과 센스 가닥이 이중 가닥(duplex) 가닥 또는 두(double) 가닥 구조를 형성하는 경우, 예를 들어 이중 가닥 영역이 약 19, 20, 21, 22, 23개 또는 그 이상의 염기쌍인 경우). 안티센스 가닥은 표적 핵산 분자 또는 그 일부의 뉴클레오타이드 서열과 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 센스 가닥은 표적 핵산 서열 또는 그 일부에 상응하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 대안적으로, 올리고뉴클레오타이드 분자는 단일 올리고뉴클레오타이드로부터 조립되고, 올리고뉴클레오타이드 분자의 자가 상보적 센스 및 안티센스 영역은 핵산 기반 또는 비핵산 기반 링커를 통해 연결된다.

[0171] [00160] 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오타이드 분자는 이중 가닥 구조, 비대칭 이중 구조, 헤어핀 구조 또는 비대칭 헤어핀 구조의 2차 구조를 갖는 폴리뉴클레오타이드로서, 자가 상보적 센스 및 안티센스 영역을 갖고, 여기서 안티센스 영역은 별도의 표적 핵산 분자 또는 그 일부의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 센스 영역은 표적 핵산 서열 또는 그 일부에 상응하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 다른 경우, 올리고뉴클레오타이드 분자는 두 개 이상의 루프 구조와 자가 상보적 센스 및 안티센스 영역을 포함하는 스템(stem)을 갖는 원형 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드(circular single-stranded polynucleotide)이고, 여기서 안티센스 영역은 표적 핵산 분자 또는 그 일부의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 센스 영역은 표적 핵산 서열 또는 그 일부에 상응하는 뉴클레오타이드 서열을 갖고, 여기서 원형 폴리뉴클레오타이드는 RNAi를 매개할 수 있는 활성 올리고뉴클레오타이드 분자를 생성하기 위해 생체 내 또는 시험관 내에서 처리된다. 추가적

인 경우에, 올리고뉴클레오타이드 분자는 또한 표적 핵산 분자 또는 그 일부의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드를 포함하고(예를 들어, 이러한 올리고뉴클레오타이드 분자가 올리고뉴클레오타이드 분자 내에 표적 핵산 서열 또는 그 일부에 상응하는 뉴클레오타이드 서열의 존재를 필요로 하지 않는 경우), 여기서 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드는 추가로 말단 인산기(terminal phosphate group), 예를 들어 5'-인산기(5'-phosphate) 또는 5', 3'-디인산기(diphosphate)를 포함한다.

[0172] [00161] 어떤 경우에는, 비대칭 헤어핀은 안티센스 영역, 뉴클레오타이드나 비뉴클레오타이드를 포함하는 루프 부분, 그리고 센스 영역을 포함하는 선형 올리고뉴클레오타이드 분자로, 센스 영역은 안티센스 영역보다 뉴클레오타이드가 적어 센스 영역이 안티센스 영역과 염기쌍을 이루고 루프와 이중 가닥을 형성할 만큼 충분한 상보적 뉴클레오타이드를 갖는다. 예를 들어, 비대칭 헤어핀 올리고뉴클레오타이드 분자는 세포 또는 시험관 내 시스템에서 RNAi를 매개하기에 충분한 길이(예: 약 19개 내지 약 22개 뉴클레오타이드)를 갖는 안티센스 영역과 약 4개 내지 약 8개 뉴클레오타이드를 포함하는 루프 영역, 그리고 안티센스 영역에 상보적인 약 3개 내지 약 18개 뉴클레오타이드를 갖는 센스 영역을 포함한다. 어떤 경우에는, 비대칭 헤어핀 올리고뉴클레오타이드 분자는 화학적으로 변형된 5'-말단 인산기(phosphate group)를 포함하기도 한다. 추가의 경우, 비대칭 헤어핀 올리고뉴클레오타이드 분자의 루프 부분은 뉴클레오타이드, 비뉴클레오타이드, 링커 분자 또는 접합체 분자를 포함한다.

[0173] [00162] 일부 구현예에서, 비대칭 이중 가닥은 센스 영역과 안티센스 영역을 포함하는 두 개의 별도 가닥을 갖는 올리고뉴클레오타이드 분자이고, 여기서 센스 영역은 안티센스 영역보다 적은 수의 뉴클레오타이드를 포함하고, 센스 영역은 안티센스 영역과 염기쌍을 이루고 이중 가닥을 형성할 만큼 충분한 상보적 뉴클레오타이드를 갖는다. 예를 들어, 비대칭 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 분자는 세포 또는 시험관 내 시스템에서 RNAi를 매개하기에 충분한 길이(예: 약 19개 내지 약 22개 뉴클레오타이드)를 갖는 안티센스 영역과 안티센스 영역에 상보적인 약 3개 내지 약 19개 뉴클레오타이드를 갖는 센스 영역을 포함한다.

[0174] [00163] 어떤 경우에는, 보편적 염기(universal base)는 자연적 DNA/RNA 염기들 각각과 염기쌍을 형성하는 뉴클레오타이드 염기 유사체를 지칭하고, 이들 사이의 구별이 거의 없다. 보편적 염기의 비제한적 예로는 C-페닐, C-나프틸 및 기타 방향족 유도체, 이노신, 아졸 카르복사미드 및 3-니트로피콜, 4-니트로인돌, 5-니트로인돌 및 6-니트로인돌과 같은 니트로아졸 유도체가 포함되고, 이는 당업계에서 알려져 있다.

[0175] [00164] 일부 구현예에서, dsRNA 작용제는 5' 인산화되거나(phosphorylated) 5' 프라임 말단에 인산화 유사체(phosphoryl analog)를 포함한다. 5'-인산 변형(5'-phosphate modifications)에는 RISC를 통한 유전자 침묵(gene silencing)과 호환되는 변형이 포함된다. 적합한 변형은 다음을 포함한다. 5'-모노포스페이트($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$); 5'-디포스페이트($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$); 5'-트리포스페이트($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$); 5'-구아노신 캡(7-메틸화 또는 비메틸화)($7\text{m-G-O-5'-(HO)(O)P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$); 5'-아데노신 캡(Appp) 및 변형 또는 변형되지 않은 임의의 뉴클레오타이드 캡 구조($\text{N}-\text{O-5'-(HO)(O)P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$); 5'-모노티오포스페이트 (포스포로티오에이트; $(\text{HO})_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$); 5'-모노디티오포스페이트 (포스포로디티오에이트; $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$), 5'-포스포로티올레이트 ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5'$); 포스포로디티오에이트 [$-\text{O}_2\text{PS}_2-$]; 포스포네이트 [$-\text{PO}(\text{OH})_2-$]; 포스포라미데이트 [$-\text{O}=\text{P}(\text{OH})_2-$]; 메실 포스포라미데이트 ($\text{CH}_3(\text{SO}_2)(\text{N})\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-5'$); 산소/유황으로 대체된 일인산(모노포스페이트), 이인산(디포스페이트) 및 삼인산(트리포스페이트)의 임의의 추가 조합(예: 5'-알파-티오텐트리포스페이트, 5'-감마-티오텐트리포스페이트 등), 5'-포스포라미데이트($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$, $(\text{HO})(\text{NH}_2)(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$), 5'-알킬포스포네이트($\text{R}=\text{알킬}=\text{메틸}$, 에틸, 이소프로필, 프로필 등, 예: $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'-$, 5'-알켄일포스포네이트(예: 비닐, 치환 비닐), $(\text{OH})_2(\text{O})\text{P}-5'-\text{CH}_2-$), 5'-알킬에테르포스포네이트($\text{R}=\text{알킬에테르}=\text{메톡시메틸}(\text{MeOCH}_2-)$, 에톡시메틸 등, 예: $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'-$). 일부 구현예에서, 해당 변형은 dsRNA 작용제의 안티센스 가닥에 배치될 수 있다.

[0176] [00165] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 분자의 서열은 GYS1의 표적 서열과 적어도 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 99.5% 상보적이다. 일부 구현예에서, GYS1의 표적 서열은 GYS1에서 약 10~50개 염기쌍 길이, 약 15~50개 염기쌍 길이, 15~40개 염기쌍 길이, 15~30개 염기쌍 길이 또는 15~25개 염기쌍 길이의 핵산 서열이고, 여기서 표적 서열의 제1 뉴클레오타이드는 코딩 영역의 GYS1 mRNA 전사체(transcript) 또는 5' 또는 3'-비번역 영역(UTR)의 임의의 뉴클레오타이드에서 시작한다. 예를 들어, 표적 서열의 제1 뉴클레오타이드는 핵산 위치(nal(nucleic acid location), GYS1 mRNA의 전체 길이의 5'-말단에서 시작하는 번호, 예를 들어 5'-말단의 제1 뉴클레오타이드는 nal.1) 1, nal 2, nal 3, nal 4, nal 5, nal 6, nal 7, nal 8, nal 9, nal 10, nal 11, nal 12, nal 13, nal 14, nal 15, nal 15, nal 16, nal 17, 또는 GYS1 mRNA의 코딩

또는 비코딩 영역(5' 또는 3'-비번역 영역)의 임의의 다른 핵산 위치에서 시작하도록 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열의 제1 뉴클레오타이드는 그것이 다음의 위치 내부, 또는 사이에서 시작하도록 선택될 수 있다. nal 10- nal 15, nal 10- nal 20, nal 50- nal 60, nal 55- nal 65, nal 75- nal 85, nal 95- nal 105, nal 135- nal 145, nal 155- nal 165, nal 225- nal 235, nal 265- nal 275, nal 275- nal 245, nal 245- nal 255, nal 285- nal 335, nal 335- nal 345, nal 385- nal 395, nal 515- nal 525, nal 665- nal 675, nal 675- nal 685, nal 695- nal 705, nal 705- nal 715, nal 875- nal 885, nal 885- nal 895, nal 895- nal 905, nal 1035- nal 1045, nal 1045- nal 1055, nal 1125- nal 1135, nal 1135- nal 1145, nal 1145- nal 1155, nal 1155- nal 1165, nal 1125- nal 1135, nal 1155- nal 1165, nal 1225- nal 1235, nal 1235- nal 1245, nal 1275- nal 1245, nal 1245- nal 1255, nal 1265- nal 1275, nal 1125- nal 1135, nal 1155- nal 1165, nal 1225- nal 1235, nal 1235- nal 1245, nal 1275- nal 1245, nal 1245- nal 1255, nal 1265- nal 1275, nal 1275- nal 1285, nal 1335- nal 1345, nal 1345- nal 1355, nal 1525- nal 1535, nal 1535- nal 1545, nal 1605- nal 1615, nal 1615- c.1625, nal 1625- nal 1635, nal 1635- 1735, nal 1735- 1835, nal 1835- 1935, nal. 1836- 1856, nal 1935- 2000, nal 2000 - 2100, nal 2100 - 2200, nal 2200 - 2260, nal 2260 - 2400, nal 2400 - 2500, nal 2500 - 2600, nal 2600 - 2700, nal 2700 - 2800, nal 2800 - 2500, nal 2500 - 2600, nal 2600 - 2700, nal 2700 - 2800, nal 2800 - 2860, 등. 일부 구현예에서, GYS1 mRNA의 서열은 NCBI 참조 서열: NM_002103으로 제공된다.

- [0177] [00166] 일부 구현예에서, dsRNA 작용제의 안티센스 가닥은 표적 RNA와 100% 상보적이어서 그것에 혼성화(hybridize)되고 RNA 간섭을 통해 그 발현을 억제한다. 표적 RNA는 세포에서 발현되는 임의의 RNA일 수 있다. 다른 구현예에서, 세포는 종양 세포, 간 세포, 근육 세포, 면역 세포, 수지상 세포, 심장 세포 또는 중추 신경계의 세포이다. 또 다른 구현예에서, dsRNA 작용제의 안티센스 가닥은 표적 RNA와 적어도 99%, 적어도 98%, 적어도 97%, 적어도 96%, 95%, 적어도 90%, 적어도 85%, 적어도 80%, 적어도 75%, 적어도 70%, 적어도 65%, 적어도 60%, 적어도 55%, 또는 적어도 50% 상보적이다. 일부 구현예에서, 표적 RNA는 GYS1 RNA이다. 일부 구현예에서, siRNA 분자는 GYS1의 발현을 감소시키는 siRNA이다. 일부 구현예에서, siRNA 분자는 GYS의 발현을 감소시키고 본원에 기재한 분석에서 다른 RNA의 발현을 50% 이상 감소시키지 않는 siRNA이고, 본원에 기재한 농도는 200 nm를 넘지 않는다.
- [0178] [00167] siRNA는 관심 있는 모든 유전자나 RNA(예: mRNA) 전사체(transcript)를 표적으로 할 수 있다.
- [0179] [00168] 다른 수정 및 수정 패턴은 예를 들어, 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제10,233,448호에서 찾아볼 수 있다.
- [0180] [00169] 다른 수정 및 수정 패턴은 예를 들어 Anderson et al. (Nucleic Acids Research, 2021, 49(16), 9026-9041)에서 찾을 수 있고 이는 본원에 참조로 포함된다.
- [0181] [00170] 다른 수정 및 수정 패턴은 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 번호 W02021/030778에서 찾을 수 있고, 이는 본원에 참조로 포함된다.
- [0182] [00171] 다른 수정 및 수정 패턴은 예를 들어, 본원에 참조로 포함된 국제 특허 출원 공개 번호 W02021/030763에서 찾을 수 있다.
- [0183] [00172] 일부 구현예에서, siRNA는 FN3 도메인과 같은 단백질에 연결된다. siRNA는 동일한 표적 단백질이나 상이한 표적 단백질에 결합하는 여러 개의 FN3 도메인에 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 센스 가닥에 부착되고, 이는 센스 가닥과 FN3 도메인의 연결을 용이하게 하는 데 사용된다.
- [0184] [00173] 일부 구현예에서, $(X1)_n-(X2)_q-(X3)_y-L-X4$ 의 화학식을 갖는 조성물이 제공되고, 여기서 X1은 제1 FN3 도메인이고, X2는 제2 FN3 도메인이고, X3은 제3 FN3 도메인 또는 반감기 연장제(half-life extender) 분자이고, L은 링커이고, X4는 siRNA 분자와 같은 핵산 분자이지만 이에 제한되지 않으며, 여기서 n, q 및 y는 각각 독립적으로 0 또는 1이다. 일부 구현예에서, X1, X2 및 X3은 상이한 표적 단백질에 결합한다. 일부 구현예에서, y는 0이다. 일부 구현예에서, n은 1이고, q는 0이고, y는 0이다. 일부 구현예에서, n은 1이고, q는 1이고, y는 0이다. 일부 구현예에서, n은 1이고, q는 1이고, y는 1이다. 일부 구현예에서, 제3 FN3 도메인은 X3이 없는 분자에 비해 분자 전체의 반감기를 증가시킨다. 일부 구현예에서, 반감기 연장 모이어티는 알부민에 결합하는 FN3 도메인이다. 이러한 FN3 도메인의 예로는 미국 특허 출원 공개 번호 20170348397 및 미국 특허 번호 9,156,887에 기재된 것들이 포함되나 이에 제한되지 않고, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. FN3 도메인은 예를 들어 공유 결합 상호작용을 통해 다른 하위단위를 통합할 수 있다. 일부 구현예에서, FN3 도메인은 반감기 연장

모이어티(half-life extending moiety)를 더 포함한다. 예시적인 반감기 연장 모이어티로는 알부민, 알부민 변형체, 알부민-결합 단백질 및/또는 도메인, 트랜스페린(transferrin) 및 이의 단편 및 유사체, 그리고 Fc 영역이 있다. 인간 Fc 영역의 아미노산 서열은 잘 알려져 있고, 본원에는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA 및 IgE Fc 영역이 포함된다. 일부 구현예에서, FN3 도메인은 전체 분자의 반감기를 연장하는 분자에 결합하는 제2 FN3 도메인을 통합할 수 있는데, 본원에 설명한 임의의 반감기 연장 모이어티를 포함하되 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 제2 FN3 도메인은 알부민, 알부민 변이체, 알부민 결합 단백질 및/또는 도메인, 그리고 이의 단편 및 유사체에 결합한다.

[0185] [00174] 일부 구현예에서 (X1)-(X2)-L-(X4)의 화학식을 갖는 조성물이 제공되고, 여기서 X1은 제1 FN3 도메인이고, X2는 제2 FN3 도메인이며, L은 링커이고, X4는 핵산 분자이다. 일부 구현예에서, X4는 siRNA 분자이다. 일부 구현예에서, X1은 CD71 중 하나에 결합하는 FN3 도메인이다. 일부 구현예에서, X2는 CD71 중 하나에 결합하는 FN3 도메인이다. 일부 구현예에서, X1 및 X2는 동일한 표적 단백질에 결합하지 않는다. 일부 구현예에서, X1과 X2는 동일한 표적 단백질에 결합하지만, 단백질의 상이한 결합 부위에 결합한다. 일부 구현예에서, X1과 X2는 동일한 표적 단백질에 결합한다. 일부 구현예에서, X1 및 X2는 CD71에 결합하는 FN3 도메인이다. 일부 구현예에서, 조성물은 ASGPR에 결합하는 화합물 또는 단백질을 포함하지 않는다(예를 들어, 그것이 없다).

[0186] [00175] 일부 구현예에서, $-(X1)_n-(X2)_q[L-X4]-(X3)_y$ 의 화학식을 갖는 조성물이 제공되고, 여기서 X1은 제1 FN3 도메인이고, X2는 제2 FN3 도메인이고, X3은 제3 FN3 도메인 또는 반감기 연장제 분자이고, L은 링커이고, X4는 올리고뉴클레오타이드 분자이고, C는 중합체이고, 여기서 n, q 및 y는 각각 독립적으로 0 또는 1이다.

[0187] [00176] 일부 구현예에서, $(X1)_n-(X2)_q[L-X4]-(X3)_y-C$ 의 화학식을 갖는 조성물이 제공되고, 여기서 X1은 제1 FN3 도메인이고, X2는 제2 FN3 도메인이고, X3은 제3 FN3 도메인 또는 반감기 연장제 분자이고, L은 링커이고, X4는 올리고뉴클레오타이드 분자이고, C는 중합체이고, 여기서 n, q 및 y는 각각 독립적으로 0 또는 1이다.

[0188] [00177] 일부 구현예에서, $-(X1)_n-(X2)_q[L-X4]L-(X3)_y$ 의 화학식을 갖는 조성물이 제공되고, 여기서 X1은 제1 FN3 도메인이고, X2는 제2 FN3 도메인이고, X3은 제3 FN3 도메인 또는 반감기 연장제 분자이고, L은 링커이고, X4는 올리고뉴클레오타이드 분자이고, C는 중합체이고, 여기서 n, q 및 y는 각각 독립적으로 0 또는 1이다.

[0189] [00178] 일부 구현예에서 $(X1)_n-(X2)_q[L-X4]L-(X3)_y-C$ 의 화학식을 갖는 조성물이 제공되고, 여기서 X1은 제1 FN3 도메인이고, X2는 제2 FN3 도메인이고, X3은 제3 FN3 도메인 또는 반감기 연장제 분자이고, L은 링커이고, X4는 올리고뉴클레오타이드 분자이고, C는 중합체이고, 여기서 n, q 및 y는 각각 독립적으로 0 또는 1이다.

[0190] [00179] 일부 구현예에서, A₁-B₁의 화학식을 갖는 조성물 또는 복합체가 제공되고, 여기서 A₁은 C-L₁-X_s의 화학식을 갖고 B₁은 X_{AS}-L₂-F₁의 화학식을 갖고, 여기서 C는 PEG와 같은 중합체이고, L₁ 및 L₂는 각각 독립적으로 링커이고, X_s는 이중 가닥 siRNA 분자의 5'에서 3' 올리고뉴클레오타이드 센스 가닥이고, X_{AS}는 이중 가닥 siRNA 분자의 3'에서 5' 올리고뉴클레오타이드 안티센스 가닥이고, F₁은 적어도 하나의 FN3 도메인을 포함하는 폴리펩티드이고, 여기서 X_s 및 X_{AS}는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 분자를 형성하여 조성물/복합체를 형성한다.

[0191] [00180] 일부 구현예에서, C는 분자의 반감기를 연장하는 분자일 수 있다. 이러한 모이어티들의 예는 본원에 설명되어 있다. 일부 구현예에서, C는 엔도포터(Endoporter), INF-7, TAT, 폴리아르기닌, 폴리리신 또는 양성친화성(amphipathic) 펩티드일 수도 있다. 이들 모이어티들은 본원에 제공된 다른 반감기 연장 모이어티를 대신하여 또는 이에 더하여 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, C는 복합체를 세포, 엔도솜 또는 ER로 전달하는 분자일 수 있다. 상기 분자는 아래 표 2에 나열된 펩티드들로부터 선택된다.

표 2

[0192]

서열 번호	명칭	서열
1043	TAT	RKKRRQRRR
1044	Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK
1045	Transportan	GWTLSAGYLLGKINKALAAKAIL
1046	MAP	KLALKLALKALKAAKLA
1047	Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV
1048	KDEL	KDEL
1049	GALA	WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAA

1050	HA2	GDIMGWGWNEIFGAIAGFLGC
1051	Aurine 1.2	GLFDI IKKIAESF
1052	MPG	GALFLGWLGAAGSTMGAPKSKRKV
1053	TP-10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL
1054	EB-1	LIRLWSHLIHIWFQNRRLKWKKK
1055	HA2-Penetratin	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGRQIKIWFQNRMRKWKK
1056	엔도솜 분해	FFKKLAHALHLLALLALHLAHLAKKA
1057	엔도솜 분해	LFEAIEGFIENGWGMIDGWYG
1058	엔도솜 분해	LFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGRKKRRQRRR
1059	엔도솜 분해	IGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ
1060	ER Targeting	MKLAVTLTLVTALSSSSASA
1061	ER 표적화	RLIEDICLPRWGCLWEDDKDEL
1062	ER 표적화	MIRTLTLLSTLVAGALSK
1063	ER 표적화	ILSSLTVTQLRLRHQWIK
1064	ER 표적화	MIRTLTLLSTLVAGALSKDEL

- [0193] [00181] 일부 구현예에서, A_1 - B_1 의 화학식을 갖는 조성물 또는 복합체가 제공되는데, 여기서 A_1 은 X_s 의 화학식을 갖고 B_1 은 X_{AS} - L_2 - F_1 의 화학식을 갖는다.
- [0194] [00182] 일부 구현예에서 A_1 - B_1 의 화학식을 갖는 조성물 또는 복합체가 제공되는데, 여기서 A_1 은 C - L_1 - X_s 의 화학식을 갖고 B_1 은 X_{AS} 의 화학식을 갖는다.
- [0195] [00183] 일부 구현예에서, 센스 가닥은 본원에 제공된 바와 같은 센스 가닥이다.
- [0196] [00184] 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 본원에 제공한 바와 같은 안티센스 가닥이다.
- [0197] [00185] 일부 구현예에서, 센스 및 안티센스 가닥은 GYS1을 표적으로 하는 이중 가닥 siRNA 분자를 형성한다. 일부 구현예에서, 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 길이가 약 21~23개 뉴클레오타이드 염기쌍이다. 특정 구현예에서, C는 선택 사항이다.
- [0198] [00186] 일부 구현예에서 A_1 - B_1 의 화학식을 갖는 조성물 또는 복합체가 제공되고, 여기서 A_1 은 F_1 - L_1 - X_s 의 화학식을 갖고 B_1 은 X_{AS} - L_2 - C 의 화학식을 갖는다.
- [0199] 여기서 F_1 은 적어도 하나의 FN3 도메인을 포함하는 폴리펩티드이고,
- [0200] L_1 및 L_2 는 각각 독립적으로 링커이고,
- [0201] C는 PEG와 같은 중합체이고,
- [0202] X_s 는 이중 가닥 siRNA 분자의 5'에서 3' 올리고뉴클레오타이드 센스 가닥이고,
- [0203] X_{AS} 는 이중 가닥 siRNA 분자의 3'에서 5' 올리고뉴클레오타이드 안티센스 가닥이고, 여기서 X_s 와 X_{AS} 는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 분자를 형성하여 조성물/복합체를 형성한다. 특정 구현예에서 C는 임의적이다.
- [0204] [00187] 일부 구현예에서 A_1 - B_1 의 화학식을 갖는 조성물 또는 복합체가 제공되는데, 여기서 A_1 은 X_s 의 화학식을 갖고 B_1 은 X_{AS} - L_2 - C 의 화학식을 갖는다.
- [0205] [00188] 일부 구현예에서 A_1 - B_1 의 화학식을 갖는 조성물 또는 복합체(complex)가 제공되는데, 여기서 A_1 은 F_1 - L_1 - X_s 의 화학식을 갖고 B_1 은 X_{AS} 의 화학식을 갖는다.
- [0206] [00189] 일부 구현예에서, C는 분지형 또는 비분지형 단량체의 긴쇄 및/또는 2차원 또는 3차원의 가교된 단량체 네트워크로 구성된 천연 또는 합성 중합체이다. 어떤 경우에는, 중합체는 다당류, 리그닌, 고무 또는 폴리알킬렌 산화물을 포함하는데, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜일 수 있다. 어떤 경우에는, 적어도 하나의 중합체는 알파-, 오메가-디히드록실폴리에틸렌글리콜, 생분해성 락톤 기반 중합체, 예를 들어 폴리아크릴산, 폴리락티드산(PLA), 폴리(글리콜산)(PGA), 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리올레핀, 폴리아미드, 폴리아노아크릴레이트, 폴리이미드, 폴리에틸렌테레프탈레이트(PET, PETG), 폴리에틸렌-B-테레프탈레이트(PETE), 폴리테트라메틸렌 글

리콜(PTG) 또는 폴리우레탄 및 이들의 혼합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본원에 사용된 혼합물은 블록 공중합체를 지칭하는 것뿐만 아니라 동일한 화합물 내에서 상이한 중합체를 사용하는 것을 지칭한다. 어떤 경우에는, 블록 공중합체는 중합체의 적어도 한 부분이 또 다른 중합체의 단량체로부터 구성된 중합체이다. 어떤 경우에는, 중합체는 폴리알킬렌 옥시드를 포함한다. 어떤 경우에는, 중합체는 PEG를 포함한다. 어떤 경우에는, 중합체가 폴리에틸렌 이미드(PEI) 또는 히드록시에틸 전분(HES)을 포함한다.

[0207] [00190] 일부 구현예에서, 폴리알킬렌 옥시드(예: PEG)는 다분산 또는 단분산 화합물이다. 어떤 경우에는, 다분산 물질은 평균 중량(중량 평균) 크기 및 분산도를 특징으로 하는 상이한 분자량의 물질을 분산 분포시킨 것을 포함한다. 어떤 경우에는, 단분산 PEG가 한 가지 크기의 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, C는 다분산- 또는 단분산 폴리알킬렌 옥시드(예: PEG)이고, 표시된 분자량은 폴리알킬렌 옥시드, 예를 들어 PEG 분자의 분자량의 평균을 나타낸다.

[0208] [00191] 일부 구현예에서, 폴리알킬렌옥시드(예: PEG)의 분자량은 약 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1450, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3250, 3350, 3500, 3750, 4000, 4250, 4500, 4600, 4750, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 10,000, 12,000, 20,000, 35,000, 40,000, 50,000, 60,000, 또는 100,000 Da이다.

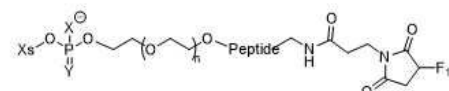
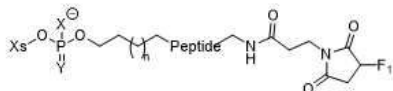
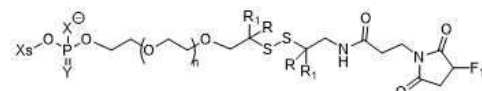
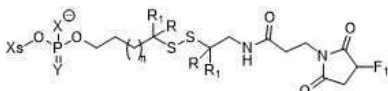
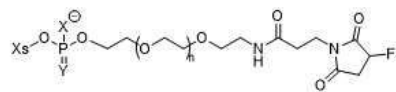
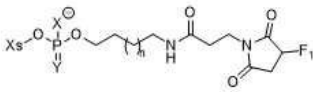
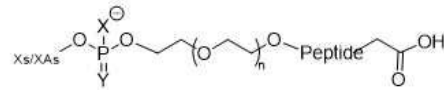
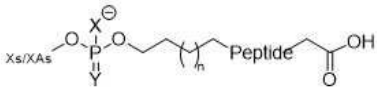
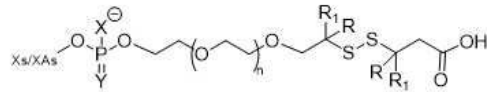
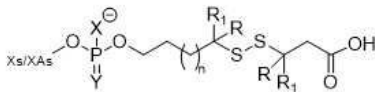
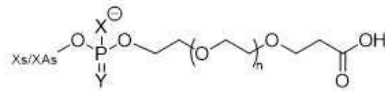
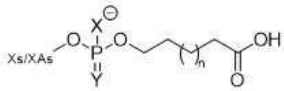
[0209] [00192] 일부 구현예에서, C는 폴리알킬렌 옥시드(예: PEG)이고 분자량은 약 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1450, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3250, 3350, 3500, 3750, 4000, 4250, 4500, 4600, 4750, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 10,000, 12,000, 20,000, 35,000, 40,000, 50,000, 60,000, 또는 100,000 Da이다. 일부 구현예에서, C는 PEG이고 분자량은 약 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1450, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3250, 3350, 3500, 3750, 4000, 4250, 4500, 4600, 4750, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 10,000, 12,000, 20,000, 35,000, 40,000, 50,000, 60,000, 또는 100,000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 200 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 300 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 400 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 500 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 600 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 700 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 800 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 900 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 1000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 1100 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 1200 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 1300 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 1400 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 1450 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 1500 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 1600 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 1700 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 1800 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 1900 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 2000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 2100 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 2200 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 2300 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 2400 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 2500 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 2600 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 2700 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 2800 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 2900 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 3000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 3250 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 3350 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 3500 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 3750 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 4000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 4250 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 4500 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 4600 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 4750 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 5000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 5500 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 6000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 6500 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 7000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 7500 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 8000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 10,000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 12,000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 20,000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 35,000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 40,000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 50,000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 60,000 Da이다. 어떤 경우에는, C의 분자량은 약 100,000 Da이다.

[0210] [00193] 일부 구현예에서, 폴리알킬렌 옥시드(예: PEG)는 개별 PEG(discrete PEG)이고, 여기서 개별 PEG는 두 개 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함하는 중합체 PEG이다. 어떤 경우에는, 개별 PEG(dPEG)는 2~60개, 2~50개, 또는 2~48개의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 42, 48, 50개 이상의 반복되는 에틸렌 옥시드 단위로 구성된다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 2개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위로 구성된다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 3개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위로 구성된다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 4개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위로 구성된다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 5개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 6개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 7개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 8개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 9개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 10개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 11개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 12개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 13개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 14개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 15개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 16개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 17개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 18개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 19개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 20개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 22개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 24개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 26개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 28개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 30개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 35개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 40개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 42개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 48개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 약 50개 이상의 반복 에틸렌 옥시드 단위를 포함한다. 어떤 경우에는, dPEG가 순수한(예: 약 95%, 98%, 99% 또는 99.5%) 출발 물질로부터 단계적으로 단일 분자량 화합물로 합성된다. 어떤 경우에는, dPEG가 평균 분자량이 아닌 특정 분자량을 갖는다. 어떤 경우에는, 본원에 설명된 dPEG가 Quanta Biodesign, LMD의 dPEG이다.

[0211]

[00194] 일부 구현예에서, L_1 은 중합체 C를 센스 가닥 X_5 에 연결하거나 F1의 폴리펩티드를 센스 가닥 X_5 에 연결하는 데 사용될 수 있는 임의의 링커이다. 일부 구현예에서, L_1 은 다음의 화학식을 갖는다.



[0212]

[0213]

여기서 X_s , X_{As} 및 F_1 은 위에서 정의한 바와 같다.

[0214]

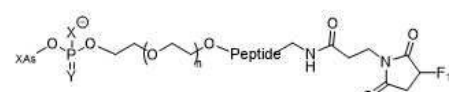
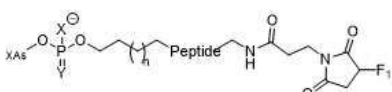
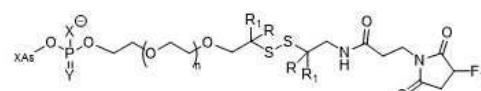
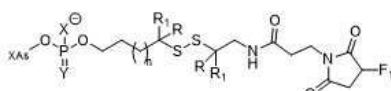
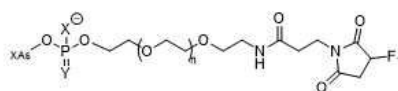
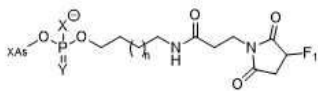
[00195] 일부 구현예에서, $n = 0 \sim 20$ 이다. 일부 구현예에서, R 및 R_1 은 독립적으로 메틸이다. 일부 구현예에서, R 및 R_1 은 독립적으로 존재하거나 둘 다 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, X 및 Y 는 독립적으로 S 이다. 일부 구현예에서, X 및 Y 는 독립적으로 존재하거나 부재한다. 일부 구현예에서, 펩티드는 Val-Cit, Val-Ala 등과 같이 효소적으로 절단 가능한 펩티드이다.

[0215]

[00196] 일부 구현예에서, L_2 는 F_1 의 폴리펩티드를 안티센스 가닥 X_{As} 에 연결하거나 중합체 C 를 안티센스 가닥 X_{As} 에 연결하는 데 사용될 수 있는 임의의 링커이다.

[0216]

[00197] 일부 구현예에서, L_2 는 다음의 복합 구조의 화학식을 갖는다.



[0217]

[0218]

여기서 X_{As} 및 F_1 은 위에서 정의한 바와 같다.

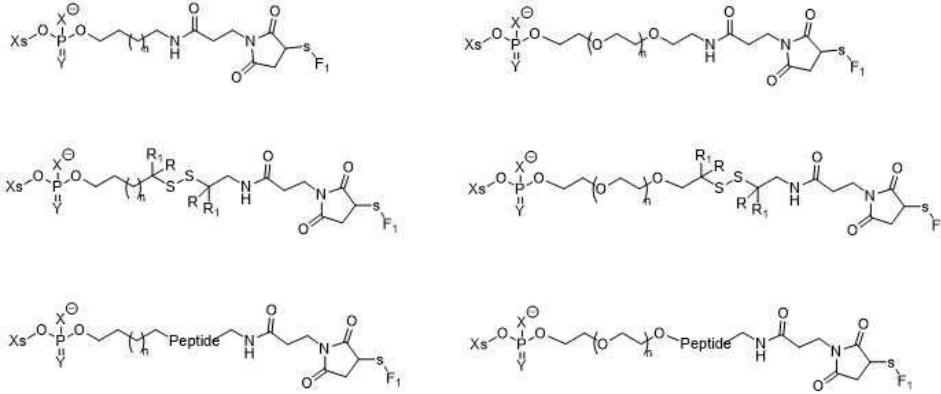
[0219]

[00198] 일부 구현예에서, $n = 0 \sim 20$ 이다. 일부 구현예에서, R 및 R_1 은 독립적으로 메틸이다. 일부 구현예에서,

R 및 R1은 독립적으로 존재하거나 둘 다 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, X 및 Y는 독립적으로 S이다. 일부 구현예에서, X 및 Y는 독립적으로 존재하거나 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, 펩티드는 Val-Cit, Val-Ala 등을 포함하되 이에 제한되지 않는 효소적으로 절단 가능한(cleavable) 펩티드이다.

[0220]

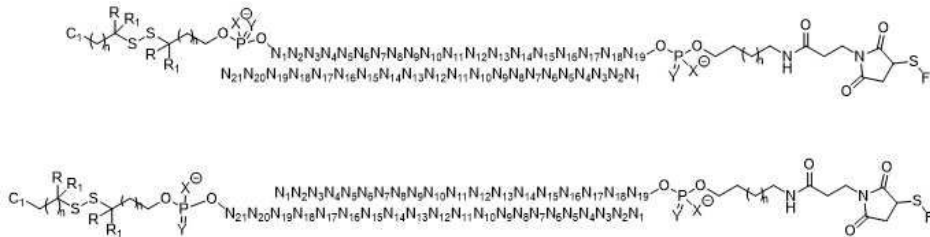
[00199] 일부 구현예에서, 링커는 F1에 존재하는 시스테인 잔기를 통해 F1에 공유 결합되는데, 이는 다음과 같이 도시될 수 있다.



[0221]

[0222]

일부 구현예에서, A1-B1은 다음의 화학식을 갖는다.



[0223]

[0224]

여기서 C는 PEG, 엔도포터, INF-7, TAT, 폴리아르기닌, 폴리로신, 양성친화성 펩티드 또는 본원에 제공한 표 2에 나열된 펩티드와 같은 중합체이고, Xs는 이중 가닥 siRNA 분자의 5'에서 3' 올리고뉴클레오타이드 센스 가닥이고, XAS는 이중 가닥 siRNA 분자의 3'에서 5' 올리고뉴클레오타이드 안티센스 가닥이고, F1은 적어도 하나의 FN3 도메인을 포함하는 폴리펩티드이고, 여기서 Xs 및 XAS는 이중 가닥 siRNA 분자를 형성한다. 센스 및 안티센스 가닥은 "N" 표기법으로 표현되고, 여기서 N으로 표현된 각 뉴클레오타이드는 독립적으로 A, U, C 또는 G이거나 본원에 제공된 것과 같은 변형된 뉴클레오타이드이다. 센스 가닥과 안티센스 가닥의 N1 뉴클레오타이드는 각 가닥의 5' 말단을 나타낸다. 명확하게 말해서, 화학식 I은 센스 가닥과 안티센스 가닥 모두에서 N1, N2, N3 등을 사용하지만, 뉴클레오타이드 염기는 같을 필요가 없으며 같을 의도도 없다. 화학식 I에 나타난 siRNA는 표적 서열과 상보적일 것이다.

[0225]

[00200] 예를 들어, 일부 구현예에서, 센스 가닥은 N1 및 N2에 포스포로티오에이트(PS) 변형 골격을 갖는 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드, N3, N7, N8, N9, N12, 및 N17에 2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드, 및 N4, N5, N6, N10, N11, N13, N14, N15, N16, N18, 및 N19에 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0226]

[00201] 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 N1에 결합된 비닐포스포네이트 모이어티, N2에 포스포로티오에이트(PS) 변형 골격을 갖는 2'-플루오로- 변형 뉴클레오타이드, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N10, N11, N12, N13, N15, N16, N17, N18, 및 N19에 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드, N14에 2'-플루오로- 변형 뉴클레오타이드, N20 및 N21에 포스포로티오에이트(PS) 변형 골격을 갖는 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0237] [00210] 일부 구현예에서, siRNA 분자는 표 3A 또는 3B의 서열 쌍을 포함한다.

[0238] [표 3A]

[0239] siRNA 센스 및 안티센스 서열

siRNA 쌍	서열 번호	센스 가닥 5'-3'	서열 번호	안티센스 가닥 5'-3'
A	10	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mA][mA][T]	11	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
B	12	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mA][T]	13	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
C	14	[fU][*mC][*fC][mG][fC][mA][fG][fC][fC][mU][fG][mG][mA][mU][fG][mA][fU][mU][mA][T]	15	[mU][*fA][*mA][fU][mC][fA][fU][fC][mC][fA][mG][mG][mC][fU][mG][fC][mG][fG][mA][*fU][*mU]
D	16	[mG][*mC][*fG][mA][mC][mU][fG][fC][fC][mU][mG][fU][mA][mG][mC][mA][fA][mC][mA][i dT]	17	[fU][*fG][*mU][mU][mG][mC][mU][mA][mC][mA][mG][mG][mC][fA][mG][mU][mC][mG][mC][*mU][*mU]
E	18	[mU][*mU][*fU][mA][mU][mG][fG][fG][fC][mA][mU][fC][mU][mG][mG][mA][fC][mU][mA][i dT]	19	[fU][*fA][*mG][mU][mC][mC][mA][mG][mA][mU][mG][mC][mC][fC][mA][mU][mA][mA][*mU][*mU]
F	20	[mG][*mC][*fA][mC][mG][mG][fA][fC][fC][mA][mA][fC][mA][mA][mU][mU][fU][mC][mA][i dT]	21	[fU][*fG][*mA][mA][mA][mU][mU][mG][mU][mU][mG][mG][mU][fC][mC][mG][mC][mG][mC][*mU][*mU]
G	22	[mG][*mG][*fA][mC][mC][mA][fA][fC][fA][mA][mU][fU][mU][mC][mA][mA][fC][mG][mA][i dT]	23	[fU][*fC][*mG][mU][mU][mG][mA][mA][mA][mU][mU][mG][mU][fU][mG][mG][mU][mC][mC][*mU][*mU]
H	24	[mA][*mC][*fC][mA][mA][mC][fA][fA][fU][mU][mU][fC][mA][mA][mC][mG][fU][mG][mA][i dT]	25	[fU][*fC][*mA][mC][mG][mU][mU][mG][mA][mA][mA][mU][mU][fG][mU][mU][mG][mG][mU][*mU][*mU]
I	26	[mG][*mC][*fG][mC][mA][mA][fA][fC][fA][mG][mC][fU][mU][mU][mG][mG][fG][mA][mA][i dT]	27	[fU][*fU][*mC][mC][mC][mA][mA][mA][mA][mG][mC][mU][mG][mU][fU][mU][mG][mC][mG][mC][*mU][*mU]

[0240]

J	28	[mA][*mG][*fA][mG][mC][mC][fA][fU][fC][mU][mU][fU][mG][mC][mA][mA][fC][mG][mA][i dT]	29	[fU][*fC][*mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][mU][fG][mG][mC][mU][mC][mU][*mU][*mU]
K	30	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA][i dT]	31	[fU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
L	32	[mA][*mG][*fC][mC][mA][mU][fC][fU][fU][mU][mG][fC][mA][mA][mC][mG][fC][mA][mA][i dT]	33	[fU][*fU][*mG][mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][fA][mU][mG][mG][mC][mU][*mU][*mU]
M	34	[mC][*mC][*fA][mU][mC][mU][fU][fU][fG][mC][mA][fA][mC][mG][mC][mA][fG][mC][mA][i dT]	35	[fU][*fG][*mC][mU][mG][mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][fA][mG][mA][mU][mG][mG][*mU][*mU]
N	36	[mA][*mC][*fG][mC][mA][mG][fC][fG][fG][mC][mA][fG][mU][mC][mU][mU][fU][mC][mA][i dT]	37	[fU][*fG][*mA][mA][mA][mG][mA][mC][mU][mG][mC][mC][mG][fC][mU][mG][mC][mG][mU][*mU][*mU]
O	38	[mU][*mG][*fA][mC][mC][mA][fC][fC][fA][mU][mC][fC][mG][mC][mC][mG][fA][mA][mA][i dT]	39	[fU][*fU][*mU][mC][mG][mG][mC][mG][mG][mA][mU][mG][mG][fU][mG][mG][mU][mC][mA][*mU][*mU]
P	40	[mC][*mG][*fA][mA][mU][mC][fG][fG][fC][mC][mU][fC][mU][mU][mC][mA][fA][mU][mA][i dT]	41	[fU][*fA][*mU][mU][mG][mA][mA][mG][mA][mG][mG][mC][mC][fG][mA][mU][mU][mC][mG][*mU][*mU]
Q	42	[mC][*mU][*fU][mC][mA][mA][fU][fA][fG][mC][mA][fG][mU][mG][mC][mC][mC][fG][mA][mA][i dT]	43	[fU][*fU][*mC][mG][mG][mC][mA][mA][mA][mA][mC][mU][mG][mC][fU][mU][mG][mA][mA][mG][*mU][*mU]

R	44	[mC][*mA][*fG][mU][mA][mU][fC][fU][fC][mC][mA][fC][mC][mA][mA][mU][fC][mU][mA][i dT]	45	[fU][*fA][*mG][mA][mU][mU][mG][mG][mU][mG][mG][mA][mG][fA][mU][mA][mC][mU][mG][*mU][*mU]
S	46	[mC][*mC][*fA][mC][mA][fA][fU][fC][mU][mC][fU][mC][mC][mG][mG][fC][mU][mA][i dT]	47	[fU][*fA][*mG][mC][mC][mG][mA][mA][mA][mG][mA][mU][fU][mG][mG][mU][mG][mG][*mU][*mU]
T	48	[mC][*mA][*fC][mC][mA][mA][fU][fC][fU][mC][mU][fC][mC][mG][mG][mC][fU][mU][mA][i dT]	49	[fU][*fA][*mA][mG][mC][mC][mG][mA][mA][mG][mA][fU][mU][mG][mG][mU][mG][*mU][*mU]
U	50	[mC][*mC][*fC][mC][mU][mC][fA][fG][fC][mU][mA][fA][mC][mG][mG][mU][fA][mU][mA][i dT]	51	[fU][*fA][*mU][mA][mC][mC][mG][mU][mA][mA][mG][mC][mU][fG][mA][mG][mG][mG][*mU][*mU]
V	52	[mC][*mC][*fC][mU][mC][mA][fG][fC][fU][mU][mA][fC][mG][mG][mU][mA][fU][mC][mA][i dT]	53	[fU][*fG][*mA][mU][mA][mC][mC][mG][mU][mA][mA][mG][mC][fU][mG][mA][mG][mG][*mU][*mU]
W	54	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mA][i dT]	55	[fU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mA][mG][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]

[0241]

X	56	[mG][*mG][*fA][mA][mC][mC][fG] [fC][fA][mC][mG][fG][mA][mG][m C][mG][fC][mC][mA][i dT]	57	[fU][*fG][*mG][mC][mG][mC][mU][mC][mC][mG][mU][mG][mC][fG][mG] [mU][mU][mC][mC][*mU][*mU]
Y	58	[mA][*mC][*fG][mG][mA][mG][fC] [fG][fC][mC][mU][fC][mU][mC][m C][mG][fA][mC][mA][i dT]	59	[fU][*fG][*mU][mC][mG][mG][mA][mG][mA][mG][mC][mG][fC][mU] [mC][mC][mG][mU][*mU][*mU]
Z	60	[mA][*mG][*fC][mA][mA][mG][fC] [fG][fC][mA][mA][fC][mU][mC][m U][mG][fU][mG][mA][i dT]	61	[fU][*fC][*mA][mC][mA][mG][mA][mG][mU][mU][mG][mC][mG][fC][mU] [mU][mG][mC][mU][*mU][*mU]
AA	62	[mC][*mA][*fG][mA][mU][mG][fG] [fU][fC][mC][mU][fC][mC][mA][m U][mU][fU][mC][mA][i dT]	63	[fU][*fG][*mA][mA][mU][mG][mG][mA][mG][mG][mA][mC][fC][mA] [mU][mC][mU][mG][*mU][*mU]
BB	64	[mU][*mC][*fU][mA][mG][mA][fU] [fC][fU][mG][mG][fA][mA][mC][m C][mU][fU][mA][mA][i dT]	65	[fU][*fU][*mA][mA][mG][mG][mU][mU][mC][mC][mA][mG][mA][fU][mC] [mU][mA][mG][mA][*mU][*mU]
CC	66	[mC][*mC][*fC][mA][mC][mA][fU] [fU][fU][mA][mC][fC][mU][mC][m G][mA][fG][mG][mA][i dT]	67	[fU][*fC][*mC][mU][mC][mG][mA][mG][mG][mC][mA][mA][mA][fU][mG] [mU][mG][mG][mG][*mU][*mU]
DD	68	[mA][*mC][*fG][mG][mC][mU][fU] [fG][fG][mU][mU][fU][mG][mC][m A][mG][fU][mU][mA][i dT]	69	[fU][*fA][*mA][mC][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mC][mC][mA][fA][mG] [mC][mG][mG][mU][*mU][*mU]
EE	600	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG] [fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][f U][mC][fG][mG][mA][T]	601	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC] [fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
FF	602	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG] [fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][f U][mA][fG][mG][mA][T]	603	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC] [fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
GG	604	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG] [fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][f G][mA][fG][mG][mA][T]	605	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC] [fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
HH	606	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG] [fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][f U][mC][fG][mA][mA][T]	607	[fU][*fU][*fC][fG][fA][fA][fU][fU][fC][fA][fU][fC][fC][fU][fC] [fC][fC][fA][fG][*fU][*fU]
II	608	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG] [fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][f U][mC][fG][mA][mA][T]	609	[mU][*fU][*fC][fG][fA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][fC][fC][fU][fC] [fC][fC][fA][fG][*fU][*mU]
JJ	610	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG] [fG][fA][mU][fG][mA][mA][*fU][i dT]	611	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC] [fC][mC][fA][*mG][*fU][*mU]
KK	612	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][f U][mC][fU][mA][mA][i dT]	613	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC] [fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]

[0242]

LL	614	[fC][*mÅ][*fÅ][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mÅ][f U][mC][fU][mÅ][mG][idT]	615	[mU][*fU][*mÅ][fG][mÅ][fU][fG] [fC][mC][fÅ][mC][mC][mC][fÅ][mC] [fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
MM	616	[fC][*mÅ][*fÅ][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mÅ][f U][mC][fU][mG][mÅ][idT]	617	[mU][*fU][*mÅ][fG][mÅ][fU][fG] [fC][mC][fÅ][mC][mC][mC][fÅ][mC] [fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
NN	618	[fC][*mÅ][*fÅ][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mÅ][f U][mC][fG][mÅ][mÅ][idT]	619	[mU][*fU][*mÅ][fG][mÅ][fU][fG] [fC][mC][fÅ][mC][mC][mC][fÅ][mC] [fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
OO	620	[fC][*mÅ][*fÅ][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mÅ][f U][mÅ][fU][mÅ][mÅ][idT]	621	[mU][*fU][*mÅ][fG][mÅ][fU][fG] [fC][mC][fÅ][mC][mC][mC][fÅ][mC] [fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
PP	622	[fC][*mÅ][*fÅ][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mÅ][f G][mC][fU][mÅ][mÅ][idT]	623	[mU][*fU][*mÅ][fG][mÅ][fU][fG] [fC][mC][fÅ][mC][mC][mC][fÅ][mC] [fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
QQ	624	[fC][*mÅ][*fÅ][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mÅ][f G][mC][fU][mÅ][mG][idT]	625	[mU][*fU][*mÅ][fG][mÅ][fU][fG] [fC][mC][fÅ][mC][mC][mC][fÅ][mC] [fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
RR	626	[mG][*mÅ][*fG][mC][mC][mÅ][fU] [fC][fU][mU][mU][fG][mC][mÅ][m A][mC][fG][mC][mC][mÅ][idT]	627	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG] [mC][mÅ][mÅ][mÅ][mG][mÅ][fU][mG] [mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
SS	628	[mG][*mÅ][*fG][mC][mC][mÅ][fU] [fC][fU][mU][mU][fG][mC][mÅ][m A][mC][fG][mC][mG][idT]	629	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG] [mC][mÅ][mÅ][mÅ][mG][mÅ][fU][mG] [mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
TT	630	[mG][*mÅ][*fG][mC][mC][mÅ][fU] [fC][fU][mU][mU][fG][mC][mÅ][m A][mC][fG][mÅ][mÅ][idT]	631	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG] [mC][mÅ][mÅ][mÅ][mG][mÅ][fU][mG] [mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
UU	632	[mG][*mÅ][*fG][mC][mC][mÅ][fU] [fC][fU][mU][mU][fG][mC][mÅ][m A][mC][fÅ][mC][mÅ][idT]	633	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG] [mC][mÅ][mÅ][mÅ][mG][mÅ][fU][mG] [mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
VV	634	[mG][*mÅ][*fG][mC][mC][mÅ][fU] [fC][fU][mU][mU][fG][mC][mÅ][m A][mÅ][fG][mC][mÅ][idT]	635	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG] [mC][mÅ][mÅ][mÅ][mG][mÅ][fU][mG] [mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
WW	636	[mG][*mÅ][*fG][mC][mC][mÅ][fU] [fC][fU][mU][mU][fG][mC][mÅ][m G][mC][fG][mC][mÅ][idT]	637	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG] [mC][mÅ][mÅ][mÅ][mG][mÅ][fU][mG] [mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
XX	638	[mG][*mÅ][*fG][mC][mC][mÅ][fU] [fC][fU][mU][mU][fG][mC][mÅ][m G][mC][fG][mC][mG][idT]	639	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG] [mC][mÅ][mÅ][mÅ][mG][mÅ][fU][mG] [mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
YY	640	[mU][*mU][*fÅ][mC][mG][mG][fU] [fÅ][fU][mC][mU][fÅ][mC][mÅ][m U][mU][fC][mU][mÅ][idT]	641	[mU][*fÅ][*mG][mÅ][mÅ][mU][mG] [mU][mÅ][mG][mÅ][mU][mÅ][fC][mC] [mG][mU][mÅ][mÅ][*mU][*mU]

ZZ	642	[mU][*mU][*fÅ][mC][mG][mG][fU] [fÅ][fU][mC][mU][fÅ][mC][mÅ][m U][mU][fC][mU][mG][idT]	643	[mU][*fÅ][*mG][mÅ][mÅ][mU][mG] [mU][mÅ][mG][mÅ][mU][mÅ][fC][mC] [mG][mU][mÅ][mÅ][*mU][*mU]
AAA	644	[mU][*mU][*fÅ][mC][mG][mG][fU] [fÅ][fU][mC][mU][fÅ][mC][mÅ][m U][mU][fC][mG][mÅ][idT]	645	[mU][*fÅ][*mG][mÅ][mÅ][mU][mG] [mU][mÅ][mG][mÅ][mU][mÅ][fC][mC] [mG][mU][mÅ][mÅ][*mU][*mU]
BBB	646	[mU][*mU][*fÅ][mC][mG][mG][fU] [fÅ][fU][mC][mU][fÅ][mC][mÅ][m U][mU][fG][mU][mÅ][idT]	647	[mU][*fÅ][*mG][mÅ][mÅ][mU][mG] [mU][mÅ][mG][mÅ][mU][mÅ][fC][mC] [mG][mU][mÅ][mÅ][*mU][*mU]
CCC	648	[mU][*mU][*fÅ][mC][mG][mG][fU] [fÅ][fU][mC][mU][fÅ][mC][mÅ][m U][mG][fC][mU][mÅ][idT]	649	[mU][*fÅ][*mG][mÅ][mÅ][mU][mG] [mU][mÅ][mG][mÅ][mU][mÅ][fC][mC] [mG][mU][mÅ][mÅ][*mU][*mU]
DDD	650	[mU][*mU][*fÅ][mC][mG][mG][fU] [fÅ][fU][mC][mU][fÅ][mC][mÅ][m U][mG][fC][mU][mÅ][idT]	651	[mU][*fÅ][*mG][mÅ][mÅ][mU][mG] [mU][mÅ][mG][mÅ][mU][mÅ][fC][mC] [mG][mU][mÅ][mÅ][*mU][*mU]
EEE	652	[mU][*mU][*fÅ][mC][mG][mG][fU] [fÅ][fU][mC][mU][fÅ][mC][mÅ][m G][mU][fC][mU][mÅ][idT]	653	[mU][*fÅ][*mG][mÅ][mÅ][mU][mG] [mU][mÅ][mG][mÅ][mU][mÅ][fC][mC] [mG][mU][mÅ][mÅ][*mU][*mU]
FFF	654	[mU][*mU][*fÅ][mC][mG][mG][fU] [fÅ][fU][mC][mU][fÅ][mC][mÅ][m G][mU][fC][mU][mG][idT]	655	[mU][*fÅ][*mG][mÅ][mÅ][mU][mG] [mU][mÅ][mG][mÅ][mU][mÅ][fC][mC] [mG][mU][mÅ][mÅ][*mU][*mU]
GGG	656	[fC][*mÅ][*fÅ][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mÅ][f U][mC][fU][mÅ][mG][idT]	657	[mU][*fU][*mÅ][fG][mÅ][fU][fG] [fC][mC][fÅ][mC][mC][mC][fÅ][mC] [fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
HHH	704	[mU][*mU][*fÅ][mC][mG][mG][fU] [fÅ][fU][mC][mU][fÅ][mC][mÅ][m U][mU][fC][mU][mÅ]	705	[mU][*fÅ][*mG][mÅ][mÅ][mU][mG] [mU][mÅ][mG][mÅ][mU][mÅ][fC][mC] [mG][mU][mÅ][mÅ][*mU][*mU]

[00211] 약어 키: (n/N = 모든 뉴클레오타이드) mN = 2'-O-메틸 잔기, fN = 2'-F 잔기, * = 포스포로티오에이트 및 (idT) = 역 Dt, (VP) 2'-O 메틸 비닐 포스포네이트 유리단. 브래킷은 개별 염기를 나타낸다.

[0246] [표 3B]

서열 번호	센스 가닥(5'-3')	서열 번호	안티센스 가닥(5'-3')
801	caggggggcgc gnuuugcaa	861	uuagcaagacc gcaccccguu u
802	ggugcggucuu ugcaauuagg	862	ccuauuugcaa gaccgcaacu u
803	ggugcggucuu gcaauuaggga	863	uccuauuugca agaccgcacu u
804	agccauugccu uuaaaaccgc	864	gcgguuuuaaa ggcguugccuu u
805	augccuuuaa accgcacuuu	865	aagugcggguu uaaaggcauu u
806	uggggaggau gaaucgacc	866	ggucgaaauuc auccucccau u
807	aacgcagugc ucuuugaaag	867	cuucgaaagag cacugcguuu u
808	ggacgaaugg ggcgacaac	868	guugucgccc cauuuguccu u
809	ggcgacugcc ugnuagcaac	869	guugcuacag gcaugcgcuu u
810	cacgcugcug gggcgcuac	870	guagcgcccc agcagcgugu u
811	ugcgucucag ucuuacua	871	uagugaaagac ugagcgcau u
812	ccuuuauacu cuuuuugc	872	cgauuaaaga aguuuaagg u
813	cuuuauugcc ggcgcguau	873	auagcgggccg gcgaauaagu u
814	ucgccggccc cuauugagu	874	aacucauagc gggcgcgau u
815	ggcgcuauaga gnuuccaa	875	uuaggagaacu cauagcggu u
816	ccgcuaugag uuuccaac	876	guuggagaac ucauagcggu u
817	ggcucggcuc aacuaucug	877	cagauauguu agccgagccu u
818	gucggcucua acuaucugc	878	gcagauauguu gagccgagcu u
819	ucggcucacac uaucugcuc	879	gagcagauag uuagcgccgu u
820	ccagcgcgga ccaacaaau	880	aaauuguuugu ccgcgcuggu u
821	agcgcgggacc aacaauuuc	881	gaaauuguuu gnuccgcguu u
822	ucggggaggaa gcuuuuga	882	ucauaaagcu uccuccggu u
823	acgcagcgcg agucuuucc	883	ggaaaaggacug ccgcugcggu u
824	gaccaccauc cggcgaauc	884	gaauucggcg agugugugcu u
825	ccgaaucggc cuuuucaau	885	auugaaagagg ccgaauugcu u
826	aaucggccuc uucaauagc	886	gcuaauagag agggccgaauu u
827	caauagcagu gccgacagg	887	ccugucggca cugcuaauugu u
828	aggaguuugu ccgugcgug	888	cagccacggga caaacuccu u
829	cggcugagug cacgguuau	889	auaacggugc acucagccgu u
830	ugggaaaucc caguauuc	890	gagauacug ggaaucccau u
831	cagaccccuu agcuuacgg	891	ccguaaagcug aggggucugu u
832	ccccucagcu uacgguauc	892	gauaccguaa gcugaggggu u
833	cucagcuauc gguauucac	893	guagauaccg uaaagcuaggu u
834	gcuuacggua ucuaauuc	894	gaauuguaau accguaaagcu u
835	ccggcgggcag cguaucauc	895	gaugauacgc ugccggcggu u
836	agcguaucuu ccagcgga	896	uuccgcugga ugaucgcuu u
837	gcguaucauc cagcggaac	897	guuccgcuggg augauacgc u
838	uaccuaaggcc gguacuaua	898	uauaguaaccg gccuaaggua u
839	cuaggccggg acuaauugu	899	acauauagua ccggccuagu u
840	aggccggua uauugucuu	900	agacauauag uaccggccuu u
841	ggccgguauc auauugucug	901	cagacauaua guaccggccu u
842	ggcgguacua uauugucgc	902	gcagacauau aguaaccggcu u

[0247]

843	cgguaauana ugnucgac	903	gcgcagacau auagnaccgu u
844	gguaauauu gucugcgc	904	cgcgcagaca uauagnaccu u
845	uaauaugucu gcgcgccac	905	guggcgcgca gacauauagn u
846	uaugucugcg cgcacacug	906	cauguggcgc gcagacauu u
847	augucugcg gccacacug	907	ccauguggcg cgcagacauu u
848	ucgcccucg ugnucacgc	908	gucgugacag cgcagcgcgu u
849	cgcgcagcgc uacgaugag	909	cucaucguag cgcucgccgu u
850	caaggaccgg cgcaacauc	910	gaugugcgc cgcucucgu u
851	acauccugc accagagug	911	cacucugug cgcagaguu u
852	cuggcgcagc agcguaacu	912	aguuacguc cucgccaggu u
853	gggcgcagcag cguaacuaa	913	uuagnuacgc uccucgccu u
854	gcgcagcagc uaacuaagu	914	acuuaguuac gcucucgcu u
855	gaagcagcua acuaagucc	915	ggacuuaguu acgucucgu u
856	aguccgccaa acacuccac	916	gugcaguguu ugccgcagcu u
857	ggcgaucacg uccagagcc	917	ggcucugcgc uuagucgccu u
858	ccuaaccug gcuuuuucc	918	ggauuaagcc agguuaggg u
859	ugugaaacca cuaggguu	919	agaaacuaau gguuuacau u
860	accacuaaggu ucuaagucc	920	ggaccuaagaa ccuauguguu u
921	caggcgugcg gucucgcaa	981	uugcaagacc gcaccccggu u
922	ggucgcgucu ugcaauaga	982	ucuaugcaca gaccccgaccu u
923	gugcgugucu gcaauagga	983	uccuaugcga agaccgcacu u
924	agccaugccu uuaaaccga	984	ucgguuuaaa gcaugcgcu u
925	augccuuuaa accgcacua	985	uagucgguu uaaaggcau u
926	ugggaggaug aaucgcaca	986	ugucgaauuc auccuccau u
927	aacgcaguc ucucgaaa	987	uuucgaagag cacugcguu u
928	ggacgaauug ggcgcacaa	988	uuugugccc cauucguc u
929	ggcgaucg ccuagcaca	989	uuugcuaag gcagucgcu u
930	cacgcugcg ggcgcgcaa	990	uuagcgcccc agcagcggu u
931	ugcgucacg ucucacua	991	uagugagac gugagcgcau u
932	ccuuauacu cuuuauca	992	ucgaauaaga aguaauagg u
933	cuuuauccg gcccgcuua	993	uuagcgcccg gcgaauaag u
934	ucgccggcg cuuagagua	994	uacucauag gccgcgcgu u
935	gccgcuauga guucuccaa	995	uuaggagaacu cauagcgcu u
936	ccgcuaugag uuucccaa	996	uuuggagaac ucuaugcggu u
937	ggcucggcuc aacuaucua	997	uagauagug agccgagccu u
938	gcucggcua acuaucua	998	ucagaauagu gacccgagcu u
939	ucggcucac uaucgcu	999	uagcagaug uuagccgcu u
940	ccagcgcgga ccaacaaua	1000	uauguuuggu ccgcgcggu u
941	agcgcggaac aacaauua	1001	uaaauuggu guccgcgcu u
942	ucgggagga gcuuuaua	1002	ucauaaagcu uccuccgcu u
943	acgcagcgcg agucuuca	1003	ugaaagacug ccgcugcggu u

944	gaccaccauc cgcggaaua	1004	uaucggcg aggguguc u
945	ccgaauccgc cucuucaaa	1005	uuugaagagg ccgaauccgu u
946	aaucggccuc uucaauaga	1006	ucuaauagag aggcggauuu u
947	caauagcag gccgacaga	1007	ucugucggca cugcuauuu u
948	aggaguuuu ccgugcua	1008	uagccacgga caaacuccu u
949	cggcugagug cagcguaa	1009	uuaccgugc acucagccgu u
950	ugggaaucgc caguaucua	1010	uagauacug ggaauuccau u
951	cagacccuc agcuuacga	1011	ucguuagcug aggguguc u
952	cccuucagcu uacgguua	1012	uaauccguaa gcugaggggu u
953	cucagcuuac gguauucua	1013	uuagauaccg uagcugag u
954	gcuuacggu ucuaauua	1014	uaauugagau accguagcu u
955	ccggcgcgag cguaucaua	1015	uaugauacgc ugccggcggu u
956	agcguaucan ccagcgga	1016	uuccgucgga ugaucgcu u
957	gcguaucauc cagcgga	1017	uuuccgucg augauacgu u
958	uaccuagcc gguauuaa	1018	uaugauaccg gccuaggu u
959	cuaagccggu acuaauua	1019	ucauaauua ccggccuag u
960	aggccgguac uauauuca	1020	ugacauuag uaccggccu u
961	ggccgguacu auauucua	1021	uagacauua gnaaccgcu u
962	ggcgguacua uauucuga	1022	ucagacauu agnaccgcu u

963	cgguacuaau ugucucgca	1023	ucgcagacau auaguaccgu u
964	gguaacuaau gucucgca	1024	uggcagacau uauaguaccu u
965	cuauauugcu gcgcgccaa	1025	uuggcgcgca gacauauagu u
966	uauugucgcg cggcacaua	1026	uauuggcgcg gcagacaua u
967	augucucgcg gccacauga	1027	ucaugugcg cgagacauu u
968	ucgccucgcg ugucacgaa	1028	uucgugcag cgagcgcau u
969	cggcgagcgc uacgaugaa	1029	uucaucguag cgcucgccgu u
970	caaggaccgg cgcaacaua	1030	uauugucgcg cgguccuugu u
971	acaucucgcg accagagua	1031	uacucugug cagcgauu u
972	cuggcgcagcg agcguaaca	1032	uguuacgcuc cncgccagu u
973	ggcgagcgag cguaacuaa	1033	uuauguacgc uccugcccu u
974	gcgagcgagc uaacuaaga	1034	ucuuaguac gcuccucgu u
975	gagcgagcga acuaaguca	1035	ugacuuagu acgucuccu u
976	aguccgccaa acacuccaa	1036	uugcgaguuu ugccggacu u
977	ggcgaucaag uccagagca	1037	ugcucugcac uugaucgccu u
978	ccuaaccug gcuuauuca	1038	ugaauagcc agguuaggg u
979	ugugaacca cuagguuca	1039	ugaaccuagu gguuuacau u
980	accacnaggu ucuagguca	1040	ugaccnagaa ccuagnggu u
1041	uaggacuucaaccuagacaa	1042	uugcuagguuagauccauu
1043	cugggagggauagauucgaa	1044	uucgaauucauccuccagu u
1045	ggguagacaacuauucua	1046	uagauagauugucacccu u
1047	cugggagggauagauucgaa	1048	uucgaauucauccuccagu u
1049	caagguggguggcacuaa	1050	uuagaugccaccaccuugu u
1051	ucccgagccuggaugauua	1052	uaaucauccagcgucggau u
1055	uuacgguaucuaacuuca	1056	uagaauguaugaccguauu

[0250]

[0251]

[00212] 일부 구현예에서, 위에 설명된 폴리뉴클레오티드에는 siRNA의 안티센스 가닥의 5' 뉴클레오티드로 2'-O 메틸 비닐 포스포네이트 우리딘을 포함하지 않는 폴리뉴클레오티드가 포함된다.

[0252]

[00213] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 본원에 제공된 바와 같다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 이중 가닥을 포함하는 부분에 대해 제1 가닥과 제2 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서 표 3A 또는 3B에 도시된 바와 같은 서열을 포함한다. 일부 구현예에서 표 3A 또는 3B에 도시된 바와 같은 서열을 포함하지만 염기 변형은 없다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 본원에 제공된 바와 같은 siRNA 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, siRNA 쌍은 FN3 도메인에 접합되지 않는다.

[0253]

[00214] 일부 구현예에서, 본원에 설명한 올리고뉴클레오티드 분자는 당업계에 알려진 절차를 사용하여 화학적 합성 및/또는 효소적 결합(ligation) 반응을 사용하여 구성된다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드 분자는 자연적으로 발생하는 뉴클레오티드나 분자의 생물학적 안정성을 높이거나 올리고뉴클레오티드 분자와 표적 핵산 사이에 형성되는 이중 가닥의 물리적 안정성을 높이도록 설계된 다양하게 변형된 뉴클레오티드를 사용하여 화학적으로 합성된다. 또는, 올리고뉴클레오티드 분자는 올리고뉴클레오티드 분자가 안티센스 방향으로 서브클로닝된(subcloned) 발현 벡터를 사용하여 생물학적으로 생산된다(즉, 삽입된 올리고뉴클레오티드 분자로부터 전사된 RNA는 관심 있는 표적 폴리핵산 분자에 대해 안티센스 방향이 될 것이다).

[0254]

[00215] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 분자는 탠덤 합성 방법을 통해 합성되는데, 여기서 두 가닥은 절단 가능한 링커(cleavable linker)에 의해 분리된 단일 연속 올리고뉴클레오티드 단편 또는 가닥으로 합성되고, 이후 이 링커는 절단되어 혼성화되고 이중 가닥의 정제를 허용하는 별도의 단편 또는 가닥을 제공한다.

[0255]

[00216] 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오티드 분자가 두 개의 서로 다른 핵산 가닥이나 단편으로부터 조립되는데, 여기서 한 단편은 분자의 센스 영역을 포함하고 제2 단편은 분자의 안티센스 영역을 포함한다.

[0256]

[00217] 어떤 경우에는, 올리고뉴클레오티드 분자의 뉴클레오티드 간 결합을 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 메실 포스포라미데이트로 화학적으로 변형시키면 연결(linkage)이 안정성을 개선한다. 과도한 변형은 때때로 독성이나 활성 감소를 초래한다. 따라서 핵산 분자를 설계할 때 어떤 경우에는, 이러한 뉴클레오티드 간 결합의 양을 최소화한다. 이런 경우, 이들 연결의 농도가 감소하면 독성은 낮아지고, 효능은 높아지며, 이들 분자의 특이성은 더 높아진다.

[0257]

[00218] 본원에 설명된 바와 같이, 일부 구현예에서, 핵산 분자는 dsRNA의 센스 가닥의 5' 말단에 링커를 포함하도록 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 dsRNA의 안티센스 가닥의 5' 말단에 비닐 포스포네이트 또는 변형된 비닐 포스포네이트를 포함하도록 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 dsRNA의 센스 가닥의 3' 말단에 링커를 포함하도록 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 dsRNA의 안티센스 가닥의 3' 말단에 비닐 포스포네이트를 포함하도록 변형될 수 있다. 링커는 dsRNA를 FN3 도메인에 연결하는 데 사용될 수

있다. 링커는 예를 들어, 자연적으로 존재하거나 본원에 설명된 대로 치환된 FN3 도메인의 시스테인 잔기에 공유 결합될 수 있고, 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제10,196,446호에 설명되어 있다. 이러한 dsRNA의 변형된 가닥의 비제한적 예는 아래 표 4에 설명되어 있다.

표 4

링커 및/또는 비닐 포스포네이트가 포함된 쌍

siRN A 쌍	서 열 번 호	센스 가닥 5' -3'	서 열 번 호	안티센스 가닥 5' -3'	링커
III	70	[mU][*mC][*fU][mC][fG][mU][fG] [mG][fC][mC][fU][mU][fA][mA][f U][mG][fA][mA]-L	71	[VP][*fU][*mU][fC][mA][fU][mU] [fA][mA][fG][mG][fC][mC][fA][m C][fG][mA][fG][mA][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
JJJ	72	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG] [fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][f U][mC][fG][mA][mA]-L	73	[VP][*fU][*mC][mG][mA][mA][mU] [mU][mC][mA][mU][mC][mC][fU][m C][mC][mC][mA][mG][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
KKK	74	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][f U][mC][fU][mA][mA]-L	75	[VP][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG] [fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][m C][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
LLL	76	[mG][*mC][*fG][mC][mG][mG][fA] [fC][fC][mA][mA][fC][mA][mA][m U][mU][fU][mC][mA]-L	77	[VP][*fG][*mA][mA][mA][mU][mU] [mG][mU][mU][mG][mG][mU][fC][m C][mG][mC][mG][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
MMM	78	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU] [fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][m A][mC][fG][mC][mA]-L	79	[VP][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG] [mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][m G][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
NNN	80	[mA][*mG][*fC][mC][mA][mU][fC] [fU][fU][mU][mG][fC][mA][mA][m C][mG][fC][mA][mA]-L	81	[VP][*fU][*mG][mC][mG][mU][mU] [mG][mC][mA][mA][mA][mG][fA][m U][mG][mG][mC][mU][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
OOO	82	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU] [fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][m U][mU][fC][mU][mA]-L	83	[VP][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG] [mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][m C][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
PPP	84	[mC][*mC][*fC][mA][mC][mA][fU] [fU][fU][mA][mC][fC][mU][mC][m G][mA][fG][mG][mA]-L	85	[VP][*fC][*mC][mU][mC][mG][mA] [mG][mG][mU][mA][mA][mA][fU][m G][mU][mG][mG][mG][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
QQQ	86	[mU][*mC][*fU][mC][fG][mU][fG] [mG][fC][mC][fU][mU][fA][mA][f U][mG][mG][mA]-L	87	[VP][*fU][*mU][fC][mA][fU][mU] [fA][mA][fG][mG][fC][mC][fA][m C][fG][mA][fG][mA][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
RRR	658	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][f U][mC][fU][mA][mA][idT]-L	659	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU] [fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][f A][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*m U]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
SSS	660	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][f U][mC][fU][mA][mG][idT]-L	661	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU] [fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][f A][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*m U]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
TTT	662	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][f U][mC][fU][mG][mA][idT]-L	663	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU] [fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][f A][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*m U]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
UUU	664	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][f U][mC][fG][mA][mA][idT]-L	665	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU] [fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][f A][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*m U]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
VVV	666	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][f U][mA][fU][mA][mA][idT]-L	667	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU] [fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][f A][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*m U]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -

WWW	668	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][f G][mC][fU][mA][mA][idT]-L	66 9	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU] [fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][f A][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
XXX	670	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][f G][mC][fU][mA][mG][idT]-L	67 1	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU] [fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][f A][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
YYY	672	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU] [fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][m A][mC][fG][mC][mA][idT]-L	67 3	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU] [mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][f U][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
ZZZ	674	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU] [fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][m A][mC][fG][mC][mG][idT]-L	67 5	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU] [mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][f U][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
AAAA	676	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU] [fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][m A][mC][fG][mA][mA][idT]-L	67 7	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU] [mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][f U][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
BBBB	678	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU] [fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][m A][mC][fA][mC][mA][idT]-L	67 9	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU] [mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][f U][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
CCCC	680	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU] [fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][m A][mA][fG][mC][mA][idT]-L	68 1	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU] [mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][f U][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
DDDD	682	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU] [fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][m G][mC][fG][mC][mA][idT]-L	68 3	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU] [mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][f U][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
EEEE	684	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU] [fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][m G][mC][fG][mC][mG][idT]-L	68 5	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU] [mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][f U][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
FFFF	686	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU] [fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][m U][mU][fC][mU][mA][idT]-L	68 7	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU] [mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][f C][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
GGGG	688	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU] [fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][m U][mU][fC][mU][mG][idT]-L	68 9	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU] [mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][f C][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
HHHH	690	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU] [fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][m U][mU][fC][mG][mA][idT]-L	69 1	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU] [mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][f C][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
IIII	692	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU] [fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][m U][mU][fG][mU][mA][idT]-L	69 3	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU] [mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][f C][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
JJJJ	694	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU] [fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][m U][mG][fC][mU][mA][idT]-L	69 5	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU] [mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][f C][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
KKKK	696	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU] [fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][m U][mG][fC][mU][mA][idT]-L	69 7	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU] [mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][f C][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
LLLL	698	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU] [fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][m G][mU][fC][mU][mA][idT]-L	69 9	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU] [mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][f C][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -

MMMM	700	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU] [fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][m G][mU][fC][mU][mG][idT]-L	70 1	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU] [mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][f C][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
NNNN	702	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][f U][mC][fU][mA][mG][idT]-L	70 3	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU] [fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][f A][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
OOOO	706	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU] [fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][m U][mU][fC][mU][mA]-L	70 7	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU] [mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][f C][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
PPPP	711	[mU][*mG][*fG][mA][mC][mU][fU] [fC][fA][mA][mC][fC][mU][mA][m G][mA][fC][mA][mA]-L	71 2	[VP][mU][*fU][*mG][mU][mC][mU] [mA][mG][mG][mU][mU][mG][mA][f A][mG][mU][mC][mC][mA][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
QQQQ	105 3	[mG][*mG][*fG][mU][mG][mA][fC] [fA][fA][mC][mU][fA][mC][mU][m A][mU][fC][mU][mA]	10 54	[VP][mU][fA][*mG][*mA][mU][mA] [mG][mU][mA][mG][mU][mU][mG][f U][mC][mA][mC][mC][mC][*mU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C (O)(N H)- (CH ₂) 6-
RRRR	105 5	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG] [mG][fA][mU][fG][mA][fA][mU][f U][mC][fG][mA][fA]	10 56	[VP][mU][*fU][*mC][fG][mA][fA] [mU][fU][mC][fA][mU][fC][mC][f U][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C (O)(N H)- (CH ₂) 6-
SSSS	105 7	[fC][*mA][[*fA][mG][fG][mU][f G] [mG][fG][mU][fG][mG][fC][mA][f U][mC][fU][mA][fA]	10 58	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU] [mG][fC][mC][fA][mC][fC][mC][f A][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C (O)(N H)- (CH ₂) 6-
TTTT	105 9	[fU][*mC][*fC][mG][fC][mA][fG] [mC][fC][mU][fG][mG][fA][mU][f G][mA][fU][mU][fA]	10 60	[VP][mU][*fA][*mA][fU][mC][fA] [mU][fC][mC][fA][mG][fG][mC][f U][mG][fC][mG][fG][mA][*fU][*m U]	Ma1- C ₂ H ₄ C (O)(N H)- (CH ₂) 6-
UUUU	70	[mU][*mC][*fU][mC][fG][mU][fG] [mG][fC][mC][fU][mU][fA][mA][f U][mG][fA][mA]-L	10 67	[VP][fU][*mU][*fC][mA][fU][mU] [fA][mA][fG][mG][fC][mC][fA][m C][fG][mA][fG][mA][*mU][*mU]	Ma1- C ₂ H ₄ C (O)(N H)- (CH ₂) 6-
VVVV	72	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG] [fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][f U][mC][fG][mA][mA]-L	10 68	[VP][fU][*mC][*mG][mA][mA][mU] [mU][mC][mA][mU][mC][mC][fU][m C][mC][mC][mA][mG][*mU][*mU]	Ma1- C ₂ H ₄ C (O)(N H)- (CH ₂) 6-
WWWW	74	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG] [fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][f U][mC][fU][mA][mA]-L	10 69	[VP][fU][*mA][*fG][mA][fU][fG] [fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][m C][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Ma1- C ₂ H ₄ C (O)(N H)- (CH ₂) 6-

XXXX	76	[mG][*mC][*fG][mC][mG][mG][fA] [fC][fC][mA][mA][fC][mA][mA][m U][mU][fU][mC][mA]-L	10 70	[VP][fG][*mA][*mA][mA][mU][mU] [mG][mU][mU][mG][mG][mU][fC][m C][mG][mC][mG][mC][*mU][*mU]	Ma1-C ₂ H ₄ C (O)(NH)- (CH ₂) 6 ⁻	
YYYY	78	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU] [fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][m A][mC][fG][mC][mA]-L	10 71	[VP][fG][*mC][*mG][mU][mU][mG] [mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][m G][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Ma1-C ₂ H ₄ C (O)(NH)- (CH ₂) 6 ⁻	
ZZZZ	80	[mA][*mG][*fC][mC][mA][mU][fC] [fU][fU][mU][mG][fC][mA][mA][m C][mG][fC][mA][mA]-L	10 72	[VP][fU][*mG][*mC][mG][mU][mU] [mG][mC][mA][mA][mA][mG][fA][m U][mG][mG][mC][mU][*mU][*mU]	Ma1-C ₂ H ₄ C (O)(NH)- (CH ₂) 6 ⁻	
AAAA A	82	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU] [fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][m U][mU][fC][mU][mA]-L	10 73	[VP][fA][*mG][*mA][mA][mU][mG] [mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][m C][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Ma1-C ₂ H ₄ C (O)(NH)- (CH ₂) 6 ⁻	
BBBB B	84	[mC][*mC][*fC][mA][mC][mA][fU] [fU][fU][mA][mC][fC][mU][mC][m G][mA][fG][mG][mA]-L	10 74	[VP][fC][*mC][*mU][mC][mG][mA] [mG][mG][mU][mA][mA][mA][fU][m G][mU][mG][mG][mG][*mU][*mU]	Ma1-C ₂ H ₄ C (O)(NH)- (CH ₂) 6 ⁻	
CCCC C	86	[mU][*mC][*fU][mC][fG][mU][fG] [mG][fC][mC][fU][mU][fA][mA][f U][mG][mG][mA]-L	10 75	[VP][fU][*mU][*fC][mA][fU][mU] [fA][mA][fG][mG][fC][mC][fA][m C][fG][mA][fG][mA][*mU][*mU]	Ma1-C ₂ H ₄ C (O)(NH)- (CH ₂) 6 ⁻	

[0259] [00219] 일부 구현예에서, 위에 제공된 A 내지 PPPP의 siRNA 쌍은 센스 가닥의 3' 말단에 링커를 포함한다. 일
부 구현예에서, 위에 제공된 A 내지 PPPP의 siRNA 쌍은 센스 가닥의 5' 말단에 비닐 포스포네이트를 포함한다.

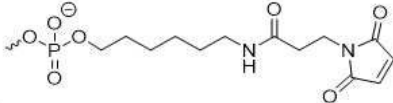
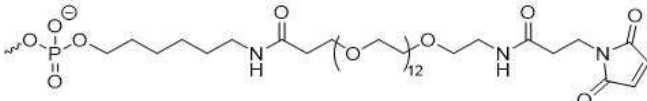
[0260] [00220] 약어 키: (n/N = 모든 뉴클레오타이드) mN = 2'-O-메틸 잔기, fN = 2'-F 잔기, * = 포스포로티오에이
트, (idT) = 역 Dt, (VP) 2'-O 메틸 비닐 포스포네이트 우리딘, BMPS = 프로필 말레이미드

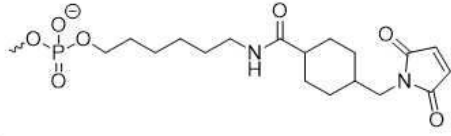
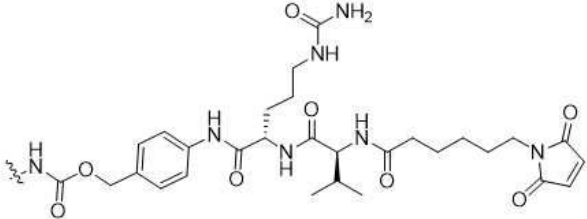
[0261] [00221] 링커(L)의 구조는 아래 표 5와 같다.

표 5

링커(L)의 대표적인 예들

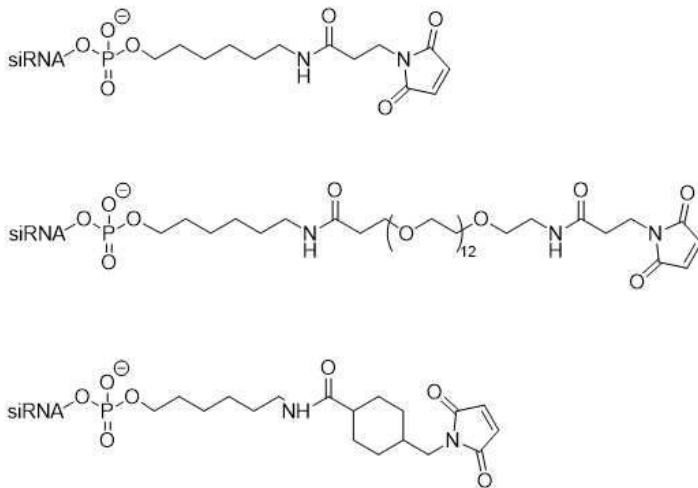
[0262]

링커 구조	링커명
	Ma1-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆
	Ma1-(PEG) ₁₂ (NH)(CH ₂) ₆

	Mal-NH-(CH₂)₆ or 아미노헥실 링커-(CH₂)₆-
	Val-Cit-PABA

[0263] [00222] 클릭 화학, 아미드 커플링, 환원적 아민화, 옥심, 트랜스글루타미나제와 같은 효소 커플링 및 소타지 접합을 통해 형성된 링커 등 다른 링커도 사용할 수 있다. 본원에 제공된 링커는 예시적인 성격을 갖고 있고 다른 방법을 사용하여 만든 다른 링커도 사용할 수 있다.

[0264] [00223] siRNA에 연결될 때, 구조 L-(X4)는 다음 화학식들로 표현될 수 있다.



[0265]

[0266] [00224] 본원에서 특정 siRNA 서열이 특정 변형된 핵염기와 함께 설명되어 있지만, 그러한 변형이 없는 서열도 본원에 제공된다. 즉, 해당 서열은 본원에 제공된 표에 예시된 서열을 아무런 수정 없이 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형되지 않은 siRNA 서열은 여전히 dsRNA의 센스 가닥의 5' 말단에 링커를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 dsRNA의 안티센스 가닥의 5' 말단에 비닐 포스포네이트를 포함하도록 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 dsRNA의 센스 가닥의 3' 말단에 링커를 포함하도록 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 dsRNA의 안티센스 가닥의 3' 말단에 비닐 포스포네이트를 포함하도록 변형될 수 있다. 링커는 본원에 제공한 바와 같을 수 있다.

[0267] [00225] 일부 구현예에서, FN3 단백질은 CD71에 결합하는 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 CD71에 결합하는 FN3 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 서열 번호 273, 288~291, 301~310, 312~572, 592~599 또는 708~710의 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, CD71에 결합하는 폴리펩티드는 서열 번호 301~301, 310, 312~572, 592~599, 또는 708~710의 서열을 포함한다. 폴리펩티드가 결합할 수 있는 CD71 단백질의 서열은 예를 들어, 서열 번호 2 또는 3일 수 있다. 일부 구현예에서, CD71에 결합하는 FN3 도메인은 CD71에 특이적으로 결합한다.

[0268] [00226] 일부 구현예에서, CD71에 결합하는 FN3 도메인은 서열 번호 1의 텐콘(Tencon) 서열 또는 서열 번호 4의 텐콘 서열 (LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAIFTT)을 기반으로 하고, 임의로 잔기 위치 11, 14, 17, 37, 46, 73 또는 86(잔기 번호는 서열 번호 4에 해당)에 치환을 갖는다.

- [0269] [00227] 일부 구현예에서, CD71에 결합하는 단리된 FN3 도메인은 서열 번호 273, 288~291, 301~310, 312~572, 592~599 또는 708~710의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0270] [00228] 일부 구현예에서, 단백질은 서열 번호 273의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 서열 번호 273은 서열 번호 288, 서열 번호 289, 서열 번호 290 및 서열 번호 291의 서열을 기반으로 한 컨센서스 서열(consensus sequence)이다. 서열 번호 273의 서열은
- [0271] MLPAPKKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFX₁IX₂YX₃EX₄X₅X₆X₇GEAIX₈LX₉VPGSERSYDLTGLKPGTEYX₁₀VX₁₁IX₁₂X₁₃VKGGX₁₄X₁₅SX₁₆PLX₁₇A
X₁₈FTT
- [0272] 이다. 여기서 X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 각각 독립적으로 메티오닌 또는 프로린이 아닌 임의의 아미노산이고, X₁은 D, F, Y 또는 H에서 선택되고, X₂는 Y, G, A 또는 V에서 선택되고, X₃은 I, T, L, A 또는 H에서 선택되고, X₄는 S, Y 또는 P에서 선택되고, X₅는 Y, G, Q 또는 R에서 선택되고, X₆은 G 또는 P에서 선택되고, X₇은 A, Y, P, D 또는 S에서 선택되고, X₁₀은 W, N, S 또는 E에서 선택되고, X₁₁은 L, Y 또는 G에서 선택되고, X₁₂는 D, Q, H 또는 V에서 선택되고, X₁₃은 G 또는 S에서 선택되고, X₁₄는 R, G, F, L 또는 D에서 선택되고, X₁₅는 W, S, P 또는 L에서 선택되고, X₁₆은 T, V, M 또는 S에서 선택된다.
- [0273] [00229] 일부 구현예에서, X₁은 D, F, Y 또는 H에서 선택되고, X₂는 G, A 또는 V에서 선택되고, X₃은 T, L, A 또는 H에서 선택되고, X₄는 Y 또는 P에서 선택되고, X₅는 G, Q 또는 R에서 선택되고, X₆은 G 또는 P에서 선택되고, X₇은 Y, P, D 또는 S에서 선택되고, X₁₀은 W, N, S 또는 E에서 선택되고, X₁₁은 L, Y 또는 G에서 선택되고, X₁₂는 Q, H 또는 V에서 선택되고, X₁₃은 G 또는 S에서 선택되고, X₁₄는 G, F, L 또는 D에서 선택되고, X₁₅는 S, P 또는 L에서 선택되고, X₁₆은 V, M 또는 S에서 선택된다.
- [0274] [00230] 일부 구현예에서, X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄, X₁₅, 및 X₁₆은 서열 번호 288의 서열에 표시된 바와 같다. 일부 구현예에서, X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄, X₁₅, 및 X₁₆은 서열 번호 289의 서열에 표시된 바와 같다. 일부 구현예에서, X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄, X₁₅, 및 X₁₆은 서열 번호 290의 서열에 표시된 바와 같다. 일부 구현예에서, X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄, X₁₅, 및 X₁₆은 서열 번호 291의 서열에 표시된 바와 같다.
- [0275] [00231] 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 페닐알라닌, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 또는 발린이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 페닐알라닌, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 또는 발린이 아니다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 알라닌이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 아르기닌이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 아스파라긴이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 아스파르트산이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 시스테인이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 글루타민이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 글루탐산이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 글리신이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 히스티딘이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 이소류신이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 류신이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 리신이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 페닐알라닌이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 세린이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 트레오닌이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 트립토판이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 티로신이다. 일부 구현예에서, X₈, X₉, X₁₇, 및 X₁₈은 독립적으로 발린이다.

- [0276] [00232] 일부 구현예에서, 서열은 서열 번호 288의 서열에서 표시된 바와 같이 제시되는데, 단 X_8 , X_9 , X_{17} , 및 X_{18} 의 위치에 대응하는 위치는 위에 제시된 바와 같은 것이 아닌 다른 아미노산 잔기일 수 있다. 단, 일부 구현예에서, X_8 은 V가 아니고, X_9 는 T가 아니고, X_{17} 은 S가 아니고, X_{18} 은 I가 아니다.
- [0277] [00233] 일부 구현예에서, 서열은 서열 번호 289의 서열에서 표시된 바와 같이 제시되는데, 단 X_8 , X_9 , X_{17} , 및 X_{18} 의 위치에 대응하는 위치는 위에 제시된 바와 같은 것이 아닌 다른 아미노산 잔기일 수 있다. 단, 일부 구현예에서, X_8 은 V가 아니고, X_9 는 T가 아니고, X_{17} 은 S가 아니고, X_{18} 은 I가 아니다.
- [0278] [00234] 일부 구현예에서, 서열은 서열 번호 290의 서열에서 표시된 바와 같이 제시되는데, 단 X_8 , X_9 , X_{17} , 및 X_{18} 의 위치에 대응하는 위치는 위에 제시된 바와 같은 것이 아닌 다른 아미노산 잔기일 수 있다. 단, 일부 구현예에서, X_8 은 V가 아니고, X_9 는 T가 아니고, X_{17} 은 S가 아니고, X_{18} 은 I가 아니다.
- [0279] [00235] 일부 구현예에서, 서열은 서열 번호 291의 서열에서 표시된 바와 같이 제시되는데, 단 X_8 , X_9 , X_{17} , 및 X_{18} 의 위치에 대응하는 위치는 위에 제시된 바와 같은 것이 아닌 다른 아미노산 잔기일 수 있다. 단, 일부 구현예에서, X_8 은 V가 아니고, X_9 는 T가 아니고, X_{17} 은 S가 아니고, X_{18} 은 I가 아니다. 일부 구현예에서, 서열 번호 273의 서열과 적어도 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 단백질이다. 일부 구현예에서, 단백질은 서열 번호 273의 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 일부 구현예에서, 단백질은 서열 번호 273의 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 일부 구현예에서, 단백질은 서열 번호 273의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다.
- [0280] [00236] 동일성 백분율(Percent identity)은 NCBI 웹사이트에서 제공되는 BlastP를 사용하여 두 서열을 정렬하는 기본 매개변수를 사용하여 결정할 수 있다.
- [0281] [00237] 일부 구현예에서, 인간 CD71 단백질(서열 번호 2 또는 5)에 결합하거나 특이적으로 결합하는 피브로넥틴 유형 III(FN3) 도메인이 제공된다. 본원에 제공된 바와 같이, FN3 도메인은 CD71 단백질에 결합될 수 있다. 명시적으로 언급되지는 않았더라도 해당 도메인은 또한 CD71 단백질에 특이적으로 결합할 수 있다. 따라서 예를 들어 CD71에 결합하는 FN3 도메인은 CD71에 특이적으로 결합하는 FN3 도메인 단백질도 포함한다. 예를 들어, 이러한 분자는 치료 및 진단 응용 분야와 영상화에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 FN3 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적 핵산, 벡터, 숙주 세포, 및 이들을 제조하고 사용하는 방법이 제공된다.
- [0282] [00238] 일부 구현예에서, CD71에 결합하거나 특이적으로 결합하는 단리된 FN3 도메인이 제공된다.
- [0283] [00239] 일부 구현예에서, FN3 도메인은 링커에 의해 연결된 두 개의 FN3 도메인을 포함한다. 링커는 유연한 링커일 수 있다. 링커는 본원에 설명된 것과 같은 짧은 펩티드 서열일 수 있다. 예를 들어, 링커는 G/S 링커 등일 수 있다.
- [0284] [00240] 일부 구현예에서, FN3 도메인은 본원에 제공한 것과 같은 링커에 의해 연결된 두 개의 FN3 도메인을 포함한다. 예시적인 링커는 다음을 포함하되 이에 제한되지 않는다: $(GS)_2$, (서열 번호 720), $(GGGS)_2$ (서열 번호 721), $(GGGS)_{1-5}$ (서열 번호 722), $(AP)_{1-20}$; $(AP)_2$ (서열 번호 723), $(AP)_5$ (서열 번호 724), $(AP)_{10}$ (서열 번호 725), $(AP)_{20}$ (서열 번호 726), $A(EAAAK)_5AAA$ (서열 번호 727), 또는 $(EAAAK)_{1-5}$ (서열 번호 728). 일부 구현예에서, 링커는 다음의 아미노산 서열을 포함하거나 이 아미노산 서열이다. EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK(서열 번호 729); GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG(서열 번호 730); APAPAPAPAP(서열 번호 731); 또는 EAAAK(서열 번호 732).
- [0285] [00241] 일부 구현예에서, FN3 도메인은 표면 플라즈몬 공명 또는 Kinexa 방법을 통해 결정된 바와 같이 약 1×10^{-7} M 미만, 예를 들어 약 1×10^{-8} M 미만, 약 1×10^{-9} M 미만, 약 1×10^{-10} M 미만, 약 1×10^{-11} M 미만, 약 1×10^{-12} M 미만, 또는 약 1×10^{-13} M 미만의 해리 상수(K_D)로 CD71과 결합할 수 있다. 이는 당업자가 실시할 수 있다. 특정 FN3 도메인-항원 상호작용의 측정된 친화도는 상이한 조건(예: 삼투압, pH)에서 측정하는 경

우 달라질 수 있다. 따라서, 친화도 및 기타 항원 결합 매개변수(예: K_D , K_{on} , K_{off})의 측정은 단백질 스캐폴드 및 항원의 표준화된 용액과, 본원에 기재된 완충액과 같은 표준화된 완충액을 사용하여 이루어진다.

- [0286] [00242] 일부 구현예에서, FN3 도메인은 표준 용액 ELISA 검정에서 음성 대조군에 대해 얻은 신호보다 적어도 5배 더 높게 CD71에 결합할 수 있다.
- [0287] [00243] 일부 구현예에서, CD71에 결합하거나 특이적으로 결합하는 FN3 도메인은 분자의 N-말단에 결합된 개시 메티오닌(Met)을 포함한다. 일부 구현예에서, CD71에 결합하거나 특이적으로 결합하는 FN3 도메인은 FN3 도메인의 C-말단에 연결된 시스테인(Cys)을 포함한다. N-말단 Met 및/또는 C-말단 Cys를 첨가하면 분자의 반감기를 늘리고 다른 기능을 제공하기 위해 발현 및/또는 접합을 용이하게 할 수 있다.
- [0288] [00244] FN3 도메인은 또한 미국 특허 제10,196,446호에 기재되어 있는 것과 같은 시스테인 치환을 포함할 수 있고, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 간략하게, 일부 구현예에서, 본원에 제공된 폴리펩티드는 본원에 제시된 바와 같이 미국 특허 제10,196,446호의 서열 번호 1 또는 서열 번호 4에 기초한 FN3 도메인의 잔기 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 30, 34, 38, 40, 41, 45, 47, 48, 53, 54, 59, 60, 62, 64, 70, 88, 89, 90, 91, 및 93으로 이루어진 군에서 선택된 위치와 관련 FN3 도메인의 동등한 위치에서 적어도 하나의 시스테인 치환을 포함할 수 있다.
- [0289] [00245] 미국 특허 제10,196,446호의 서열 번호 1의 아미노산 서열은 다음과 같다.
- [0290] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTPDAAFDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT(본원에서 할당, 서열 번호 713)
- [0291] [00246] 일부 구현예에서, 치환은 잔기 6에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 8에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 10에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 11에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 14에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 15에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 16에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 20에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 30에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 34에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 38에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 40에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 41에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 45에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 47에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 48에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 53에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 54에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 59에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 60에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 62에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 64에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 70에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 88에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 89에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 90에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 91에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 잔기 93에서 이루어진다.
- [0292] [00247] 도메인이나 단백질 내 위치에서의 시스테인 치환은 기존 아미노산 잔기를 시스테인 잔기로 대체하는 것을 말한다. 일부 구현예에서 치환 대신 시스테인이 위에 나열된 위치에 인접한 서열에 삽입된다. 시스테인 변형의 다른 예는 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 출원 공개 제20170362301호에서 찾을 수 있다. 서열 정렬은 NCBI 웹사이트 등에서 기본 매개변수를 사용하여 BlastP를 사용하여 수행할 수 있다.
- [0293] [00248] 일부 구현예에서, 시스테인 잔기가 도메인 또는 단백질의 임의의 위치에 삽입된다.
- [0294] [00249] 일부 구현예에서, CD71에 결합하는 FN3 도메인이 세포 내로 내재화된다. 일부 구현예에서, FN3 도메인의 내재화는 검출 가능한 라벨이나 치료제를 세포 내로 전달하는 것을 용이하게 할 수 있다. 일부 구현예에서, FN3 도메인의 내재화는 세포 내로 세포독성제의 전달을 용이하게 할 수 있다. 세포독성제는 치료제로 작용할 수 있다. 일부 구현예에서, FN3 도메인의 내재화는 본원에 개시된 모든 검출 가능한 라벨, 치료제 및/또는 세포독성제의 세포 내로의 전달을 용이하게 할 수 있다. 일부 구현예에서, FN3 도메인의 내재화는 올리고뉴클레오타이드의 세포 내로의 전달을 용이하게 할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 종양 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 간 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 근육 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 면역 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 수지상 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 중추 신경계의 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 심장 세포이다.
- [0295] [00250] 일부 구현예에서, CD71에 결합하는 단리된 FN3 도메인은 서열 번호 273, 288~291, 301~310, 312~572,

592~599, 또는 708~710의 아미노산 서열을 포함한다.

[0296]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[00297] 일부 구현예에서, CD71에 결합하는 단리된 FN3 도메인은 분자의 N-말단에 결합된 개시 메티오닌(Met)을 포함한다. 일부 구현예에서, CD71에 결합하는 단리된 FN3 도메인은 서열 번호 273, 288~291, 301~310,

312~572, 592~599, 또는 708~710의 아미노산 서열 중 하나와 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 동일성 백분율은 NCBI 웹사이트에서 제공되는 BlastP를 사용하여 두 서열을 정렬하기 위한 기본 매개변수를 사용하여 결정할 수 있다. CD71에 결합하는 FN3 도메인의 서열은 예를 들어 아래 표 6에서 찾을 수 있다.

표 6

CD71 결합 FN3 도메인 서열

서열 번호	CD71에 결합하는 FN3 도메인의 아미노산 서열
301	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPITYIEAVVLGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVGI SGVKGGHNSMPLSAIFTT
302	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFMINYSELFWMGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVRIGVKGGKGSWPLHAHFTT
303	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIIEYAETRWYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPIDGVKGGIASKPLSAIFTT
304	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAESTT
305	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWYIWGVKGGKPSFPLRAGFTT
306	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPITYMETFSRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVRPIGGVKGGSSSCPLSAIFTT
307	MLPAPKNLVVSDVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
310	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIAYIETATRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPPIGVKGGNTSSPLSAIFTT
312	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFIPYAEPSPTEGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLHGVKGGHLSDDLPLSAISTT
313	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIAYPEDGFRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVPIIGVKGGGSGPLSAIFTT
314	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIYYENVVWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWEVIGVKGGQCSRPLSAIFTT
315	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTECPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
316	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIAYREFRPSGEAIVLTVPGSERSYDLTVETGYRNEVVICGVKGGPWSGPLSAIFTT
317	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPILYTECVYRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYHVPITGVKGGGGSWPLSAIFTT
318	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIMYHEIYYVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVPIEGVKGGGTSGPLSAIFTT
319	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAITYTEAALCGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVPIINGVKGGGTSGPLSAIFTT
320	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFIDYSEYWWGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVLIIGVKGGYRSGPLSAIFTT
321	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFIRYNEFIVAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVPVIAGVKGGGASWPLSAIVTT
322	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWYLELQFAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVPIITGVKGGIISFPLSAIFTT
323	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIYWEHWYGDGEAIVLTVPGSERSYDLTGPKPGTEYVRVIRSGVKGGFESGPLSAIFTT
324	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFMIRYQEGTRWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYIVMIAGVKGGQISLPLSAIFTT
325	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIWYLEKSYQGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPVIGVKGGGRDSCPLSAIFTT
326	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
327	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFRISYAETVRQGEAIVLTVPGSERSYDLTVETGYRNWVMILGVKGGPGLPLSAIFTT
328	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVVRAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
329	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIEYWEAVGFGAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVGIYGVKGGYLSAPLSAIFTT
330	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFIHYVEQQLIGEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVPIITGVKGGACSWPLSAIFTT
331	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTIEYSEHPIDGEAIPLVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVRVIRHGVKGGWFSHPLWAFFTT
332	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYGVTIAGVKGGWRKPLNAESTT
333	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIAYVESYWYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVPIYGVKGGDGSGLPLSAIFTT
334	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYITYVELNLAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVPIIGVKGGSLSQPLSAIFTT
335	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPISYIESIADGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVAIVGVKGGPFSWLSAIVTT
336	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVTVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVPIAGVKGGGPSAPLSAIFTT
337	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTTPDAAFDSFPIYYWEVTITGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVDIPGVKGGGAASPLSAIFTT
338	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIYLEHTVRSEAIVLTVPGSERSYDLTDLKPGTEYCVPIIDGVKGGRLSRPLSAIFTT
339	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIPYTEPPDGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYLVITILGVKGGSMVPLSAIFTT
340	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTIDYWENRCPGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYCVWISGVKGGYSSWPLSAIFTT
341	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGHLSDDLPLSAIVTT
342	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIPYAETSPSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLHGVKGGDYSEPLSAIFTT
343	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFMIVVYETRFGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVPIIDGVKGGGRSSPLSAIFTT
344	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFIPYAEPSPTEGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLHGVKGGHLSDDLPLSAIVTT
345	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
346	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFIIPYAETVRPDGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLHGVKGGKLSLPLSAIFTT
347	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFIVYLEMMVTGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVPVILGVKGGTRSVPLSAIFTT
348	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIYYEYGLEYYSYSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVGIVGVKGGSLSGPLSAISTT
349	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIYAEPRPDGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLHGVKGGDWSLPLSAIFTT
350	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTIHYREFQLSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVPVIEGVKGGGPSRPLSAIFTT

351	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTPVPGSECSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
352	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFEIDYDELAIFYGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYGVRIIPGVKGGMPSLPLSAIFTT
353	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
354	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIYAGEHIVIGEIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYMPVIAIGVKGKGPISLPLSAIFTT
355	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIPYAEPSPTEGEIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAIFTT
356	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFISGYVELVLLGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVLIPGVKGGSLSRPLSAIFTT
357	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIPYAELSRNGEIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVLIHGVKGGCLSDPLSAIFTT
358	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFHIYELSRHGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWIMFGVKGGGSKPLSAIFTT
359	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFVYNEVHWIGEIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVGIVGVKGGHWSKPLSAIFTT
360	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFEIDYDELAIFYGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYGVRIIPGVKGGMPSLPLSAIFTT
361	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFQIVYSELWIKGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYQVPIPGVKGGGRNSFPLSAIFTT
362	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIRYTETRSIGEIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYCVPIGGVKGGDSSWPLSAISTT
363	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFCISYERMGRGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYMVYIFGVKGGHLSPLSAIFTT
364	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIYAEPINPGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGGRNSDPLSAIFTT
365	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIYAEPDPDGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAIFTT
366	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTIDYDEPRSPGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYRVFIWIKGGDTSFPLSAIFTT
367	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTILYAEQAQGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYPIITGVKGGTRSGPLSAISTT
368	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFIIPYAEVRPDGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAISTT
369	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFHIAYEETATSGEAIYLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYGVIEGVKGGARSPLVADFTT
370	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGDLNPLSAIFTT
371	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPISYLELSLYGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVGIAGVKGGVSRPLSAIFTT
372	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTIGYREWYWGGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVPISGVKGGDLSPPLSAIFTT
373	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
374	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFISITYLEWNLGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYMTIPGVKGGMSSYPLSAIFTT
375	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTISYGEALIGEAIYLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYVYHIEGVKGGSWSQLAAFTT
376	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTIEYYENIGIGEIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVPIGVKGGPYSHPLSAIFTT
377	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIYAEPDPDGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAIFTT
378	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIGYEHKRFGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVDIIEGVKGGVLSWPLFAEFTT
379	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFVIEYTERFWSGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVPIIDGVKGGQCSPLSAIFTT
380	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIDYEEEGVIGEAIYLVHPGSERSYDLTGLKPGTEYVVKIHGVKGGHPSHPLVAVFTT
381	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYVELRHLGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
382	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIPYAETSPSGEIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGDYSSPLSAIFTT
383	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIYAEPDPDGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAISTT
384	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFISILYLELTPKGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
385	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFIIEYFEPPIIGEIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVNIYGVKGGYLSHPLSAIFTT
386	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTPVPGSECSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
387	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIEYTEFLYSGEIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYGVPIINGVKGGFVSPPLSAIVTT
388	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIKYREVLRCGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYTPITGVKGGFGSSPLSAIFTT
389	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIEYEGVIGQGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVAIWGVKGGKWSVPLSAIFTT
390	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
391	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFQIHYWETQGFGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVLIIPGVKGGPSSPLSAIFTT
392	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIPYAEPSPTEGEIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAIFTT
393	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIEYEPVPAGEAIYLDVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVTIYGVKGGYSHPLFASFTT
394	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
395	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
396	MSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIAYLEVFEYGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYQVPIEGVKGGAMSLPLSAIFTT
397	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFHIWYEEETIGEAIYLVHPGSERSYDLTGLKPGTEYEVHITGVKGGPYSRPLFANFTT
398	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIAYDEWPEFGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPDTEYIVEIYGVKGGWFSWPLSAIFTT
399	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIPYAEPSPTEGEIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSVIFTT
400	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIWEYEVMLGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVPIPGVKGGHSSPPLSAIFTT
401	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFHILYEELFLVGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVPISGVKGGPVSRPLSAIFTT
402	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
403	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFHIYVHEPRPSGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVGIVSVKGGDLSPVLAFFTT
404	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIYAEPDPDGEAISLLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLVAVFTT
405	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIYAEPDPDGEAIFLVPVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLHANFTT
406	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIYAEPDPDGEAIFLLDVPVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLVASFSTT
407	MSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIYAEPDPDGEAISLVVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAISTT
408	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIYGVKGGFPMSPLSAIFTT

409	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFHI SYEEDYTFGEAIYLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYRVVIGGVKGGWFSEPLLAFTT
410	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEAIYLVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSYPLDASFTT
411	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEAIDLVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMLDPLEAYFTT
412	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAILLLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLSAIFTT
413	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAINLQVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLVAFTT
414	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEAISLQVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSPLFAVFTT
415	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIELHVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLFTT
416	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAQLVVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLSAIFTT
417	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAITLDVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLSAIFTT
418	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIVLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLVASFTT
419	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAINLDVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLVAEFTT
420	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIVLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLVAIFTT
421	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEAIALWVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMLSAIFTT
422	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAII LVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLSAHFTT
423	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEAQLWVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSHPLGAVFTT
424	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAQLHVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLASFTT
425	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIALHVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLVAFTT
426	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEAIVLVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSIPLHANFTT
427	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIFLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLSAIFTT
428	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIVLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLIASFTT
429	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAINLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLDASFTT
430	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IEYFEWTLNGEAI VLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVQIYGVKGGCLSRPLSAIFTT
431	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIVLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLIAHFTT
432	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IPYAEPSPTGEAIVLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLSAHFTT
433	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIYLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLDAFTT
434	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIGLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLSAIFTT
435	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAQLAVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLHAFTT
436	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEAIVLVHVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSIPLIAIFTT
437	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIVLDVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLVAEFTT
438	MLPTPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAQLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLHASFTT
439	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEAQLGVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSHPLNANFTT
440	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEAIVLVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMLSAIFTT
441	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIFLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLIAFTT
442	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEAIGLVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSHPLKAQFTT
443	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAILLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLVAHFTT
444	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIGLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLGAFTT
445	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAILLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLTAIFTT
446	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIVLVHVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLSAIFTT
447	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIVLEVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLDAHFTT
448	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIALHVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLRAVFTT
449	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAQLWVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLSAIFTT
450	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSRTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIVLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLSAIFTT
451	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEAQLWVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSRPLQAHFTT
452	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAITLDVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLYAFTT
453	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIALHVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLSAIFTT
454	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIGLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLIAHFTT
455	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIVLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLHARFTT
456	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIFLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLAAVFTT
457	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIVLVHVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLSAISTT
458	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAII LVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLSAVFTT
459	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIVLVKVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLVAHFTT
460	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIVLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLLAYFTT
461	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAII LVHVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLEAKFTT
462	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIKLEVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLAIFTT
463	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEAIYLEVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSPLKAAFTT
464	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIVLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLVAIFTT
465	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIVLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLAAWFTT
466	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFY IAYAEPRPDGEAIFLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHGVKGGLLSSPLNAFTT

467	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAII LGVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLHAYSTT
468	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA ILLDVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLSAIFTT
469	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA ILLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLSAVFTT
470	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IHLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLLAHFTT
471	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IQLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLDAYFTT
472	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPMLASFTT
473	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFHIYVHEPRP SGEA IHLQVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPYPLSAFFTT
474	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEA IQLVWPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPMLSAIFTT
475	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFRI SYCETFYHGEA IVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLIAKFTT
476	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IWLKVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLQANFTT
477	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IWLKVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLQANFTT
478	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IQLQVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLSAIVTT
479	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLSAFFTT
480	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IALLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLVAQFTT
481	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IILHVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLEAKFTT
482	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IDLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLHALFTT
483	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA ILLDVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLSAIFTT
484	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIDLAVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLSFTT
485	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IYLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLRAKFTT
486	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IQLGVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLSAIFTT
487	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAISLLVPD SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPMLKFTT
488	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IGLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLDASFTT
489	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IQLTVPG SERSYDLTGPKPGTEYVWLIQGVKGGSSVPLVAYFTT
490	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA ISLDVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLEASFTT
491	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAII LAVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPPLVASFTT
492	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFDIGYTEYGGYGEA IYLSVP GSERSYDLTGLKPGTEYVWLIQGVKGGSSVPLSAIFTT
493	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA ISLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLIANFTT
494	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IALLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLSAIVTT
495	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IILDVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLSSIFTT
496	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IVLWVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLRASFTT
497	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IKLDVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLVAFFTT
498	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IILEVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLVAYFTT
499	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IHLWVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLHADFTT
500	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IWLEVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLVADFTT
501	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA ISLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLLAHFTT
502	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFDIGYTEYGGYGEA IILHVP GSERSYDLTGLKPGTEYVWLIQGVKGGSSVPLSAIFTT
503	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIVLLVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPVLAFFTT
504	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEA ILLWVP GSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPQFTT
505	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEA ILLGVP GSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPMLHPLVALFTT
506	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IGLDVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLSAIFTT
507	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IHLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLAAYFTT
508	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIVLAVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPYPLVAAFTT
509	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA ILLQVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLTAIFTT
510	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEA INLQVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPFLSAVFTT
511	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IQLHVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLVAIFTT
512	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IWLAVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLHAQFTT
513	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA ILLGVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLFTT
514	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IGLQVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLCAEFTT
515	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IVLWVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLIAEFTT
516	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA ISLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSP PKFTT
517	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IILEVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLRAVFTT
518	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IHLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLSAIFTT
519	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA ISLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLEAIFTT
520	MLPAPKNPVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEP RP DGEA IHLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLKRLSPVVTITI TMAVCRKPVAENLSQTL
521	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIFLDVP GSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPLTAFFTT
522	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIVLDVP GSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPHPLAAFTT
523	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEA IGLAVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPVLOANFTT

524	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLVAEFTT
525	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLQVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLSASF TT
526	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGLHVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLTASF TT
527	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLSAIF TT
528	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLAASF TT
529	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IQLLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLVAHF TT
530	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IWL LVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLVAF TT
531	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEA IHLVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVT IQGVKGFP SDPLDAV FT T
532	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEA IYLDVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVT IQGVKGFP STFT T
533	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IQLFVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLKAY FT T
534	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IVLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLSAIF TT
535	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEA IQLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVT IQGVKGFP SPLSAD FT T
536	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA ILLQVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLDAE FT T
537	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IVLAVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLYASF TT
538	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTTDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IRLQVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLGFT T
539	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IQLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLYAIF TT
540	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA ISLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLHAK FT T
541	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEA IHLVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVT IQGVKGFP SIPLFASF TT
542	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IQLLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLYAAF TT
543	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEA IHLAVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVT IQGVKGFP SVPLAAV FT T
544	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA ISLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLGAHF TT
545	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IALWVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLVASF TT
546	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IQLHVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLYAF FT T
547	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA ILLHVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLRAS FT T
548	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IWLGVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLHAT FT T
549	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA ILEVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLHAN FT T
550	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA ILLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLYAK FT T
551	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEA IGLWVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVT IQGVKGFP SDPLQAV FT T
552	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IVLHVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLDAF FT T
553	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IILHVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLDAY FT T
554	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA ILLAVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLSAK FT T
555	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IGYLEPQPPGEA ILLFVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVT IQGVKGFP STPLSASF TT
556	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IQLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLHAY FT T
557	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IQLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLRAY FT T
558	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA ILLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLVAF FT T
559	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IQLVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLLAV FT T
560	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IHLRVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVT IQGVKGFP SMPLSAIF TT
561	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA ILLQVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLIAK FT T
562	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IVLHVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLQAI FT T
563	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IALVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLAAN FT T
564	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA INLSVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLDAY FT T
565	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA ILEVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLTASF TT
566	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IRLQVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLGASF TT
567	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IGLWVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLVAY FT T
568	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IYLEVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLFT T
569	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEA IYLDVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVL IHG VKGGLSSPLDAY FT T
570	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI EYCETKMGCEA IVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYRVP I PGVKGGTASLPLSAIF TT
571	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IYYIESYPAGEA IVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWV IDGVKGRWSTPLSAIF TT
572	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFF IYYIESYPAGEA IVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYVWV IDGVKGRWSTPLSAIF TT
592	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI VYHEPRPDGEA IVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYEVV ILGVKGGVHSYPLSAIFTTAPAPAP APAPLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI VYHEPRPDGEA IVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVV ILGVKGGVHSYPLSAIFTT
593	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI VYHEPRPDGEA IVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYEVV ILGVKGGVHSYPLSAIFTTGGGSG GGGSGGGGSGGSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI VYHEPRPDGEA IVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVV ILGVKGGVHSYPL LSAIFTT
594	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI VYHEPRPDGEA IVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYEVV ILGVKGGVHSYPLSAIFTTAAAKE AAAKEAAAKEAAAKLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI VYHEPRPDGEA IVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVV ILGVKGGVHSYPL LSAIFTT
595	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI VYHEPRPDGEA IVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYEVV ILGVKGGVHSYPLSAIFTTAAAKL PAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI VYHEPRPDGEA IVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVV ILGVKGGVHSYPLSAIFTT

596	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIEYFEYVGYGEAIVLTPVPGSCRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIEYFEYVGYGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTT
597	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIEYFEYVGYGEAIVLTPVPGSCRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGSGGGSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIEYFEYVGYGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTT
598	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIEYFEYVGYGEAIVLTPVPGSCRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTTEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIEYFEYVGYGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTT
599	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIEYFEYVGYGEAIVLTPVPGSCRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTTEAAAKLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIEYFEYVGYGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTT
708	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIVYHEPRPDGEAIVLTPVPGSCRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
709	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIVYHEPRPDGEAIVLTPVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
710	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIVLTPVPGSCRSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSIPLFASFTT

[0299] [00253] 본원에 제공된 바와 같이, 일부 구현예에서, CD71에 결합하는 FN3 도메인은 서열 번호 2(인간 성숙 CD71) 또는 서열 번호 5(인간 성숙 CD71 세포 외 도메인)에 결합하고, 각각의 서열은 아래 표 7에 제공된다.

표 7

서열 번호	서열
2	MTKEYQDLQHLDNEESDHHQLRKGPPLPQLRLCSGPRLLLLSLGLLLLLVVVCVIGSQNSQLQEELRGLRETFSNFTASTEAVKGLSTQGGNVGRKMKLSLESQLEKQKDLSEDHSSLLHVKQFVSDLRSLSCQMAALQNGSERTCCPVNWVEHERSCYWFSSRGKAWADADNYCRLEDAHLVVVTSWEEQKFVQHHIGPVNTWMGLHDQNGPWKWDGTDYETGFKNWRPEQDDWYGHGLGGGEDCAHFTDDGRWNDDVCQRPYRWVCETELDKASQEPPLL
5	QNSQLQEELRGLRETFSNFTASTEAVKGLSTQGGNVGRKMKLSLESQLEKQKDLSEDHSSLLHVKQFVSDLRSLSCQMAALQNGSERTCCPVNWVEHERSCYWFSSRGKAWADADNYCRLEDAHLVVVTSWEEQKFVQHHIGPVNTWMGLHDQNGPWKWDGTDYETGFKNWRPEQDDWYGHGLGGGEDCAHFTDDGRWNDDVCQRPYRWVCETELDKASQEPPLL

[0301] [00254] 일부 구현예에서, FN3 도메인은 링커에 의해 연결된 두 개의 FN3 도메인을 포함한다. 링커는 유연한 링커일 수 있다. 링커는 본원에 기재된 것과 같은 짧은 펩티드 서열일 수 있다. 예를 들어, 링커는 G/S 또는 G/A 링커 등일 수 있다. 본원에 제공된 바와 같이, 링커는 예를 들어 (GS)₂, (서열 번호 720), (GGGS)₂(서열 번호 721), (GGGS)₅(서열 번호 722), (AP)₂₋₂₀, (AP)₂(서열 번호 723), (AP)₅(서열 번호 724), (AP)₁₀(서열 번호 725), (AP)₂₀(서열 번호 726) 및 A(EAAAK)₅AAA(서열 번호 727) 또는 (EAAAK)₁₋₅(서열 번호 728)일 수 있다. 이는 비제한적인 예이고 다른 링커도 사용할 수 있다. GGGGS 또는 GGGGA 반복의 수는 또한 1, 2, 3, 4 또는 5일 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 하나 이상의 GGGGS 반복 및 하나 이상의 GGGGA 반복을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK(서열 번호 729); GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS(서열 번호 730); APAPAPAPAP(서열 번호 731); 또는 EAAAK(서열 번호 732)를 포함한다.

[0302] [00255] 일부 구현예에서, 링커에 의해 연결된 두 개의 FN3 도메인을 포함하는 FN3 도메인은 서열 번호 592의 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 링커에 의해 연결된 두 개의 FN3 도메인을 포함하는 FN3 도메인은 서열 번호 593의 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 링커에 의해 연결된 두 개의 FN3 도메인을 포함하는 FN3 도메인은 서열 번호 594의 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 링커에 의해 연결된 두 개의 FN3 도메인을 포함하는 FN3 도메인은 서열 번호 595의 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 링커에 의해 연결된 두 개의 FN3 도메인을 포함하는 FN3 도메인은 서열 번호 596의 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 링커에 의해 연결된 두 개의 FN3 도메인을 포함하는 FN3 도메인은 서열 번호 597의 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 링커에 의해 연결된 두 개의 FN3 도메인을 포함하는 FN3 도메인은 서열 번호 598의 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 링커에 의해 연결된 두 개의 FN3 도메인을 포함하는 FN3 도메인은 서열 번호 599의 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 링커에 의해 연결된 두 개의 FN3 도메인을 포함하는 FN3 도메인은 서열 번호 592~599 중 하나의 아미노산 서열을 갖는다.

[0303] [00256] 일부 구현예에서, FN3 도메인은 당업자가 실시하는 표면 플라즈몬 공명 또는 Kinexa 방법에 의해 결정되는 바와 같이, 약 1×10^{-7} M 미만, 예를 들어 약 1×10^{-8} M 미만, 약 1×10^{-9} M 미만, 약 1×10^{-10} M 미만, 약 1×10^{-11} M 미만, 약 1×10^{-12} M 미만, 또는 약 1×10^{-13} M 미만의 해리 상수(K_D)로 CD71에 결합할 수 있다. 특정 FN3 도메인 항원 상호 작용의 측정된 친화도는 상이한 조건(예: 삼투압, pH)에서 측정하는 경우 달라질 수

있다. 따라서, 친화도 및 기타 항원 결합 매개변수(예: K_D , K_{on} , K_{off})의 측정은 단백질 골격 및 항원의 표준화된 용액과, 본원에 기재된 완충액과 같은 표준화된 완충액을 사용하여 이루어진다.

[0304] [00257] 일부 구현예에서, FN3 도메인은 표준 용액 ELISA 검정에서 음성 대조군에 대해 얻은 신호보다 적어도 5 배 더 높은 수준으로 표적 단백질에 결합할 수 있다.

[0305] [00258] 일부 구현예에서, 표적 단백질에 결합하거나 특이적으로 결합하는 FN3 도메인은 분자의 N-말단에 연결된 개시 메티오닌(methionine, Met)을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 단백질에 결합하거나 특이적으로 결합하는 FN3 도메인은 FN3 도메인의 C-말단에 연결된 시스테인(cysteine, Cys)을 포함한다. N-말단 Met 및/또는 C-말단 Cys를 추가하면 반감기 연장 분자의 발현 및/또는 접합이 용이해질 수 있다.

[0306] [00259] FN3 도메인은 또한 미국 특허 제10,196,446호에 기재된 것과 같은 시스테인 치환을 함유할 수 있고, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 간단히 말해서, 일부 구현예에서, FN3 도메인을 포함하는 폴리펩티드는 시스테인으로 치환된 잔기를 갖는 FN3 도메인을 가질 수 있고, 이는 시스테인 조작된 피브로넥틴 III형 [fibronectin type III, FN3] 도메인이라고 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, FN3 도메인은 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제10,196,446호의 서열 번호 1(LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGGEAINLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGRHNPLSAEFTT; 서열 번호 713)을 기반으로 하는 FN3 도메인의 잔기 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 30, 34, 38, 40, 41, 45, 47, 48, 53, 54, 59, 60, 62, 64, 70, 88, 89, 90, 91, 및 93으로 이루어진 군에서 선택된 위치와 관련 FN3 도메인의 동등한 위치에서 적어도 하나의 시스테인 치환을 포함한다. 도메인 또는 단백질의 위치에서의 시스테인 치환은 기존 아미노산 잔기를 시스테인 잔기로 대체하는 것을 포함한다. 시스테인 변형의 다른 예는 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제20170362301호에서 찾을 수 있고, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 서열의 정렬은 예를 들어 NCBI 웹사이트에서 기본 매개변수를 사용하여 BlastP를 사용하여 수행할 수 있다.

[0307] 일부 구현예에서, 표적 단백질에 결합하는 FN3 도메인은 세포 내로 내재화된다. 일부 구현예에서, FN3 도메인의 내재화는 검출 가능한 라벨 또는 치료제를 세포 내로 전달하는 것을 용이하게 할 수 있다. 일부 구현예에서, FN3 도메인의 내재화는 세포 내로 세포독성제를 전달하는 것을 용이하게 할 수 있다. 세포독성제는 치료제로 작용할 수 있다. 일부 구현예에서, FN3 도메인의 내재화는 본원에 개시된 임의의 검출 가능한 라벨, 치료제, 및/또는 세포독성제를 세포 내로 전달하는 것을 용이하게 할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 종양 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 간 세포, 폐 세포, 근육 세포, 면역 세포, 수지상 세포, CNS 세포, 또는 심장 세포이다. 일부 구현예에서, 치료제는 본원에 제공된 siRNA 분자이다. 검출 가능한 라벨에 접합된 CD71을 결합하는 FN3 도메인은 생체 내 또는 시험관 내에서 종양 조직과 같은 샘플에서 CD71의 발현을 평가하는 데 사용될 수 있다. 검출 가능한 라벨에 접합된 CD71을 결합하는 FN3 도메인은 생체 내 또는 시험관 내에서 샘플 혈액, 면역 세포, 근육 세포, 또는 수지상 세포에서 CD71의 발현을 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0308] [00260] 본원에 제공된 바와 같이, siRNA 분자에 연결된 상이한 FN3 도메인은 또한 상이한 표적에 결합하는 또 다른 FN3 도메인에 접합되거나 연결될 수 있다. 이를 통해 분자는 다중 특이적(예: 이중 특이적, 삼중 특이적 등)이 될 수 있으므로 첫 번째 표적과 또 다른, 예를 들어 표적에 결합한다. 일부 구현예에서, 첫 번째 FN3 결합 도메인은 종양 세포(종양 항원)에 의해 발현되는 항원에 결합하는 또 다른 FN3 도메인에 연결된다.

[0309] [00261] 일부 구현예에서, FN3 도메인은 링커에 의해 서로 연결되어 2가 FN3 도메인을 형성할 수 있다. 링커는 유연한 링커일 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 G/S 링커이다. 일부 구현예에서, 링커는 1, 2, 3, 또는 4개의 G/S 반복을 갖는다. G/S 반복 단위는 네 개의 글리신 다음에 세린이 오는 것, 예를 들어 GGGGS이다. 링커의 다른 예가 본원에 제공되고 또한 사용될 수 있다.

[0310] [00262] 일부 구현예에서, 링커는 (GS)₂, (서열 번호 720), (GGGS)₂(서열 번호 721), (GGGS)₅(서열 번호 722), (AP)₂₋₂₀, (AP)₂(서열 번호 723), (AP)₅(서열 번호 724), (AP)₁₀(서열 번호 725), (AP)₂₀(서열 번호 726) 및 A(EAAAK)₅AAA(서열 번호 727) 또는 (EAAAK)₁₋₅(서열 번호 728)의 폴리펩티드이다. 이는 비제한적인 예이고 다른 링커도 사용될 수 있다. GGGGS 또는 GGGGA 반복의 수는 또한 1, 2, 3, 4, 또는 5일 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 하나 이상의 GGGGS 반복 및 하나 이상의 GGGGA 반복을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 하나 이상의 GGGGS 반복 및 하나 이상의 EAAAK 반복을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 하나 이상의 GGGGS 반복 및 하나 이상의 'AP' 반복을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK(서열 번호 729); GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS(서열 번호 730); APAPAPAPAP(서열 번호 731); 또는 EAAAK(서열 번호 732)를 포함한다.

- [0311] [00263] 어떠한 특별한 이론에도 얽매이지 않고, 일부 구현예에서, 핵산 분자에 연결된 FN3 도메인은 하나 이상의 FN3 도메인의 결합 파트너를 발현하는 세포(예: 종양 세포)에 치료제를 표적 전달하는 데 사용될 수 있고, 그 안에 핵산 분자를 세포 내 축적시킬 수 있다. 이를 통해 siRNA 분자는 세포 기계와 적절히 상호 작용하여 표적 유전자의 발현을 억제하고, 효능을 개선하며, 또한 일부 구현예에서는 동일한 siRNA 분자의 비표적 투여로 인해 발생할 수 있는 독성을 피할 수 있다.
- [0312] [00264] 본원에 기재된 특정 표적 단백질에 결합하는 FN3 도메인은 예를 들어, 원자가를 증가시켜 표적 분자 결합의 친화도를 높이거나 두 개 이상의 상이한 표적 분자와 동시에 결합하는 이중 또는 다중 특이적 골격을 생성하기 위한 수단으로서 단량체, 이량체 또는 다량체로서 생성될 수 있다. 이량체 및 다량체는 예를 들어, 아미노산 링커, 예를 들어 폴리글리신, 글리신 및 세린, 또는 알라닌 및 프롤린을 함유하는 링커를 포함시켜 단일 특이적, 이중 또는 다중 특이적 단백질 골격을 연결하여 생성될 수 있다. 예시적인 링커는 (GS)₂, (서열 번호 720), (GGGS)₂(서열 번호 721), (GGGS)₅(서열 번호 722), (AP)₂₋₂₀, (AP)₂(서열 번호 723), (AP)₅(서열 번호 724), (AP)₁₀(서열 번호 725), (AP)₂₀(서열 번호 726) 및 A(EAAAK)₅AAA(서열 번호 727) 또는 (EAAAK)₁₋₅(서열 번호 728)를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 다음의 아미노산 서열을 포함하거나 다음의 아미노산 서열이다. EAAAKEAAKEAAKEAAK(서열 번호 729); GGGSGGGSGGGSGGGSGGG(서열 번호 730); APAPAPAPAP(서열 번호 731); 또는 EAAAK(서열 번호 732).
- [0313] [00265] 이량체와 다량체는 N에서 C 방향으로 서로 연결될 수 있다. 폴리펩티드를 새로운 연결된 융합 폴리펩티드로 연결하기 위해 자연적으로 발생하는 것과 합성된 펩티드 링커를 사용하는 것은 문헌에서 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Hallewell *et al.* (J Biol Chem., 1989, 264:5260-5268); Alfthan *et al.* (Protein Eng., 1995, 8:725-731); Robinson & Sauer (Biochemistry, 1996, 35:109-116)]; 및 미국 특허 제5,856,456호를 참조한다. 이 문단에 설명된 링커는 본원과 위에 제공된 공식에 제공된 도메인을 연결하는 데에도 사용될 수 있다.
- [0314] [00266] **반감기 연장 모이어티**
- [0315] [00267] FN3 도메인은 또한 일부 구현예에서 예를 들어 공유 결합 상호 작용을 통해 다른 소단위를 통합할 수 있다. 일부 구현예에서, 반감기 연장 모이어티를 더 포함하는 FN3 도메인. 예시적인 반감기 연장 모이어티는 알부민, 알부민 변이체, 알부민 결합 단백질 및/또는 도메인, 트랜스페린 및 이의 단편 및 유사체, 및 Fc 영역이다. 인간 Fc 영역의 아미노산 서열은 잘 알려져 있고, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA 및 IgE Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, FN3 도메인은 알부민, 알부민 변이체, 알부민 결합 단백질 및/또는 도메인, 및 이의 단편 및 유사체에 결합하여 전체 분자의 반감기를 연장한다.
- [0316] [00268] 일부 구현예에서, 알부민 결합 도메인은 서열 번호 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 또는 119의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 알부민 결합 도메인(단백질)은 단리된다. 일부 구현예에서, 알부민 결합 도메인은 서열 번호 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 또는 119의 아미노산 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 알부민 결합 도메인은 단백질이 서열 번호 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 또는 119의 위치 10에 해당하는 치환을 갖는 경우 서열 번호 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 또는 119의 아미노산 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 901%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 치환은 A10V이다. 일부 구현예에서, 치환은 A10G, A10L, A10I, A10T, 또는 A10S이다. 일부 구현예에서, 위치 10에서의 치환은 자연적으로 발생하는 임의의 아미노산이다. 일부 구현예에서, 단리된 알부민 결합 도메인은 서열 번호 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 또는 119의 아미노산 서열과 비교했을 때 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14개의 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 치환은 서열 번호 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 또는 119의 위치 10에 해당하는 위치에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 제공된 FN3 도메인은 서열 번호 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 또는 119의 잔기 위치 6, 11, 22, 25, 26, 52, 53, 61, 88 또는 위치 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 30, 34, 38, 40, 41, 45, 47, 48, 53, 54, 59, 60, 62, 64, 70, 88, 89, 90, 91, 또는 93에 해당하는 적어도 하나의 잔기 위치 또는 C-말단에 시스테인 잔기를 포함한다. 위치가 일련으로 나열되어 있지만, 각 위치를 또한 개별적으로 선택

할 수 있다. 일부 구현예에서, 시스테인은 위치 6, 53, 또는 88에 해당하는 위치에 있다. 일부 구현예에서, 알부민 결합 도메인의 추가 예는 미국 특허 제10,925,932호에서 찾을 수 있고, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0317] [00269] 항체 불변 영역의 전체 또는 일부는 FN3 도메인에 부착되어 항체와 같은 특성, 특히 C1q 결합, 보체 의존 세포독성[complement dependent cytotoxicity, CDC], Fc 수용체 결합, 항체 의존 세포 매개 세포독성[antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC], 식세포작용, 세포 표면 수용체(예: B 세포 수용체[B cell receptor]; BCR)의 하향 조절과 같은 Fc 효과기 기능과 같은 Fc 영역과 연관된 특성을 부여할 수 있고, 이러한 활동을 담당하는 Fc의 잔기를 변형하여 추가로 변형될 수 있다(검토를 위해; 문헌[Strohl, Curr Opin Biotechnol. 20, 685-691, 2009]을 참조한다). [00270] 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 분자, 예컨대 PEG5000 또는 PEG20,000, 지방산 및 다양한 쇠 길이의 지방산 에스테르, 예를 들어 라우레이트, 미리스테이트, 스테아레이트, 아라키데이트, 베헤네이트, 올레이트, 아라키도네이트, 옥탄디오산, 테트라데칸디오산, 옥타데칸디오산, 도코산 디오산 등, 폴리리신, 옥탄, 탄수화물(텍스트란, 셀룰로오스, 올리고당 또는 다당류)과 같은 추가 모이어티를 원하는 특성을 위해 FN3 도메인에 통합할 수 있다. 이러한 모이어티는 단백질 골격 코딩 서열과 직접 융합될 수 있고 표준 클로닝 및 발현 기술로 생성될 수 있다. 또는, 잘 알려진 화학적 결합 방법을 사용하여 모이어티를 본원에 개시된 재조합적으로 생성된 분자에 부착할 수 있다.

[0318] [00271] 예를 들어, PEG 모이어티는 분자의 C-말단에 시스테인 잔기를 통합하거나, 분자의 결합 면에서 멀어지는 잔기 위치에 시스테인을 조작하고, 그리고 잘 알려진 방법을 사용하여 시스테인에 PEG기를 결합시킴으로써 FN3 도메인 t에 첨가될 수 있다.

[0319] [00272] 추가 모이어티를 통합한 FN3 도메인은 여러 잘 알려진 검정을 통해 기능성을 비교할 수 있다. 예를 들어, Fc 도메인 및/또는 Fc 도메인 변이체의 통합으로 인한 변형된 특성은 Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII 또는 FcRn 수용체와 같은 수용체의 가용성 형태를 사용하거나, 예를 들어 ADCC 또는 CDC를 측정하는 잘 알려진 세포 기반 검정을 사용하거나, 생체 내 모델에서 본원에 개시된 분자의 약동학적 특성을 평가하여 Fc 수용체 결합 검정에서 검정할 수 있다.

[0320] [00273] 본원에 제공된 조성물은 FN3 단백질과 핵산 분자를 제조하고 이를 연결하여 제조할 수 있다. 단백질을 핵산 분자에 연결하는 기술은 알려져 있고, 어떤 방법이든 사용할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 핵산 분자는 본원에 제공된 링커와 같은 링커로 변형되고, 그런 다음 단백질은 링커를 포함하는 핵산 분자와 혼합되어 조성물을 형성한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, FN3 도메인은 티올-말레이미드 화학을 사용하여 시스테인 siRNA에 접합된다. 일부 구현예에서 시스테인을 함유하는 FN3 도메인은 예를 들어 인산 완충 식염수(또는 임의의 다른 적절한 완충액)에서 환원제(예: 트리스(2-카르복시에틸) 포스핀[tris(2-carboxyethyl) phosphine, TCEP])로 환원되어 유리 티올을 생성할 수 있다. 그런 다음, 일부 구현예에서, 유리 티올을 함유하는 FN3 도메인은 말레이미드 연결된 변형 siRNA 이중가닥과 혼합되고 연결된 복합체를 형성하는 조건에서 배양되었다. 일부 구현예에서, 혼합물은 실온에서 0~5시간 또는 약 1, 2, 3, 4 또는 5시간 동안 배양된다. 예를 들어, 반응은 N-에틸 말레이미드로 급냉될 수 있다. 일부 구현예에서, 접합체는 친화 크로마토그래피 및 이온 교환을 사용하여 정제될 수 있다. 다른 방법도 사용될 수 있고, 이는 단순히 하나의 비제한적인 구현예이다.

[0321] [00274] FN3 단백질을 만드는 방법은 알려져 있고, 단백질을 생산하기 위해 어떤 방법이든 사용될 수 있다. 예는 본원에 참조로 포함된 참조문헌에 제공된다.

[0322] [00275] 일부 구현예에서, CD71에 특이적으로 결합하는 FN3 도메인은 서열 번호 301~301, 310, 312~519, 521~572, 592~599, 또는 708~710의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 히스티딘 태그(histidine tag, His-태그)는 정제를 용이하게 하기 위해 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 첨부되었다. 일부 구현예에서, 히스티딘 태그(His-태그)는 여섯 개의 히스티딘 잔기를 포함한다. 추가 구현예에서, His-태그는 적어도 하나의 글리신 잔기 또는 약 2 내지 약 4개의 글리신 잔기에 의해 FN3 도메인에 연결된다. 따라서, FN3 도메인을 정제하고 폴리펩티드에서 His-태그를 절단한 후, 하나 이상의 글리신이 N-말단 또는 C-말단에 남을 수 있다. 일부 구현예에서, His-태그가 N-말단에서 제거되면 모든 글리신이 제거된다. 일부 구현예에서, His-태그가 C-말단에서 제거되면 하나 이상의 글리신이 유지된다.

[0323] [00276] 일부 구현예에서, CD71에 특이적으로 결합하는 FN3 도메인은 서열 번호 301~301, 310, 312~519, 521~572, 592~599, 또는 708~710의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 N-말단 메티오닌은 FN3 도메인의 정제 후 유지된다.

[0324] [00277] **키트**

- [0325] [00278] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조성물을 포함하는 키트가 제공된다.
- [0326] [00279] 키트는 치료적 용도 및 진단 키트로 사용될 수 있다.
- [0327] [00280] 일부 구현예에서, 키트는 핵산 분자에 접합된 FN3 도메인을 포함한다.
- [0328] [00281] 일부 구현예에서, 글리코겐 저장 질환을 치료하기 위한 키트가 제공된다. 일부 구현예에서, 키트는 글리코겐 저장 질환을 치료하기 위한 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA에 연결된 하나 이상의 FN3 도메인을 포함하는 약학 조성물을 포함하는 제1 용기; 및 효소 대체 요법 치료제[ERT]를 포함하는 약학 조성물을 포함하는 제2 용기를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 FN3 도메인은 CD71에 결합하는 FN3 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, siRNA는 Gys1을 표적으로 한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 FN3 도메인은 CD71에 결합하는 FN3 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 글리코겐 저장 질환은 폼페병(GSD2, 포도당분해효소 알파산(GAA) 결핍), 코리병 또는 포브스병(GSD3, 글리코겐 탈분지 효소(AGL) 결핍), 앤더슨병(GSD4, 글리코겐 분지 효소(GBE1) 결핍), 맥아들병(GSD5, 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM) 결핍), 타루이병(GSD7, 근육 인산과당분해효소(PFKM) 결핍), 알돌라아제 A 결핍(GSD12, 알돌라아제 A(ALDOA) 결핍), 2형 당뇨병/당뇨병 신병증, 라포라병, 저산소증, 및 성인 폴리글루코산체병으로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, ERT는 포도당분해효소 알파산(GAA), 글리코겐 탈분지 효소(AGL), 글리코겐 분지 효소(GBE1), 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM), 근육 인산과당분해효소(PFKM), 알돌라아제 A(ALDOA), 말린, 라포린, 글리코겐 합성효소(GYS2), 포도당-6-인산염 분해효소(G6PC/SLC37A4), 가인분해효소 인산화효소(PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1), 인산글리세르산 이성화효소(PGAM2), 근육 젖산 탈수소효소(LDHA), 포도당 수송체(GLUT2), β 에놀라아제(ENO3), 및 글리코게닌-1(GYG1), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 GAA, 말린, 라포린, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 용기는 Gys1을 표적으로 하는 siRNA에 연결된 CD71에 결합하는 FN3 도메인을 포함하는 약학 조성물을 포함하고, 제2 용기는 GAA 효소를 포함하는 약학 조성물을 포함한다.
- [0329] [00282] **접합체 FN3 도메인의 용도**
- [0330] [00283] 본원에 제공된 조성물은 세포, 조직, 장기, 체액, 또는 일반적으로 숙주에서 인간 질환 또는 특정 병리의 증상을 진단, 모니터링, 조절, 치료, 완화, 발병 예방, 또는 감소시키는 데 사용될 수 있다.
- [0331] [00284] 일부 구현예에서, 골격근에서 GYS1 mRNA 및 단백질을 선택적으로 감소시키는 방법. 특정 구현예에서, GYS1 mRNA 및 단백질은 간 및/또는 신장에서 감소되지 않는다.
- [0332] [00285] 일부 구현예에서, GYS1 mRNA 및 단백질의 감소는 본원에 제공된 접합체의 투여 후 약 1주일, 약 2주일, 약 3주일, 약 4주일, 약 5주일 또는 5주일 이상 동안 지속된다.
- [0333] [00286] 일부 구현예에서, FN3 도메인은 근육 질환 치료를 위해 CD71 양성 조직(예: 골격근, 평활근)으로의 전달을 용이하게 할 수 있다.
- [0334] [00287] 일부 구현예에서, FN3 도메인은 면역 질환 치료를 위해 활성화된 림프구, 수지상 세포, 또는 기타 면역 세포로의 전달을 용이하게 할 수 있다.
- [0335] [00288] 일부 구현예에서, CD71에 결합하는 폴리펩티드는 면역 세포로 향한다. 일부 구현예에서, CD71에 결합하는 폴리펩티드는 수지상 세포로 향한다. 일부 구현예에서, 자가면역 질환의 치료를 필요로 하는 대상에서 자가면역 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 대상에게 CD71에 결합하는 폴리펩티드 또는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 CD71에 결합하는 FN3 도메인이다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 서열 번호 301~301, 310, 312~519, 521~572, 592~599, 또는 708~710과 같은 서열, 또는 치료제에 연결되거나 접합된 본원에 제공된 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 하시모토 자가면역 갑상선염, 쉐리악병, 1형 당뇨병, 백반증, 류마티스열, 악성 빈혈/위축성 위염, 원형 탈모증, 및 면역 혈소판 감소성 자반으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0336] [00289] 일부 구현예에서, 폼페병(GSD2, 산성 알파-포도당분해효소(GAA) 결핍)이 있는 대상을 치료하는 방법이 제공되고, 방법은 본원에 제공된 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 CD71에 결합하는 폴리펩티드 또는 약학 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 CD71에 결합하는 FN3 도메인이다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 서열 번호 301~301, 310, 312~519, 521~572, 592~599, 또는 708~710과 같은 서열을 포함하거나, 치료제에 연결되거나 접합된 본원에 제공된 폴리펩티드를 포함한다.
- [0337] [00290] 일부 구현예에서, 글리코겐 저장 질환의 치료를 필요로 하는 대상의 글리코겐 저장 질환을 치료하는 방

법으로서, 본원에 제공된 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 글리코겐 저장 질환은 코리병 또는 포브스병(GSD3, 글리코겐 탈분지 효소(AGL) 결핍), 맥아들병(GSD5, 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM) 결핍), 2형 당뇨병/당뇨병 신병증, 알돌라아제 A 결핍증 GSD12, 라포라병, 저산소증, 앤더슨 병(GSD4, 글리코겐 탈분지 효소(GBE1) 결핍), 타투이병(GSD7, 근육 인산과당분해효소(PFKM) 결핍), 및 성인 폴리글루코산체병으로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 글리코겐 저장 질환은 글리코겐 합성효소(GYS2) 결핍(GSD0), 포도당-6-인산염분해효소(G6PC/SLC37A4) 결핍(GSD1, 폰 기르케병), 허스병(GSD6, 간 글리코겐 가인산분해효소(PYGL) 또는 근육 인산글리세르산 이성화효소(PGAM2) 결핍), 가인산분해효소 인산화효소(PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1) 결핍(GSD9), 인산글리세르산 이성화효소(PGAM2) 결핍(GSD10), 근육 젖산 탈수소효소(LDHA) 결핍(GSD11), 파코니-비켈 증후군(GSD 11, 포도당 수송체(GLUT2) 결핍, 알돌라아제 A 결핍(GSD 12), β 에놀라아제(ENO3) 결핍(GSD13), 및 글리코게닌-1(GYG1) 결핍(GSD15)으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0338] [00291] 일부 구현예에서, 암을 치료하기 위한 약학 조성물 또는 의학의 제조에서 본원에 제공된 바와 같은 조성물 또는 그 중 임의의 것의 용도가 제공된다. 일부 구현예에서, 암은 급성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군, 위암, 투명 세포 신세포 암종, 유방의 투명 세포 암종, 자궁내막의 투명 세포 암종, 난소의 투명 세포 암종, 자궁의 투명 세포 암종, 간세포 암종, 췌장암, 전립선암, 연부 조직 암, 유인 육종, 및 비소세포 폐암으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0339] [00292] 일부 구현예에서, CD71 세포는 CNS 질환, 염증/면역 질환, 예컨대 MS 및 뇌의 감염성 질환에 관여하는 세포이다. 일부 구현예에서, CD71에 결합하는 폴리펩티드는 중추 신경계로 향한다. 일부 구현예에서, 신경학적 병태 및/또는 뇌 종양의 치료를 필요로 하는 대상에서 이를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 대상에게 CD71에 결합하는 폴리펩티드 또는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 CD71에 결합하는 FN3 도메인이다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 서열 번호 301~301, 310, 312~519, 521~572, 592~599, 또는 708~710과 같은 서열, 또는 치료제에 연결되거나 접합된 본원에 제공된 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 뇌 종양은 비악성, 양성 및 악성 뇌 종양으로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 신경학적 병태는 알츠하이머병, 근위축성 측색 경화증, 파킨슨병, 라포라병, 폼페병, 성인 폴리글루코산체병, 뇌졸중, 척수 손상, 운동 실조, 벨 마비, 뇌동맥류, 간질, 발작, 길랭-바레 증후군, 다발성 경화증, 근위축증, 신경피부 증후군, 편두통, 뇌염, 패혈증, 및 중증 근무력증으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0340] [00293] 일부 구현예에서, 암이 있는 대상을 치료하는 방법이 제공되고, 이 방법은 본원에 제공된 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 CD71에 결합하는 폴리펩티드 또는 약학 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 CD71에 결합하는 FN3 도메인이다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 서열 번호 301~301, 310, 312~519, 521~572, 592~599 또는 708~710과 같은 서열, 또는 치료제에 연결되거나 접합된 본원에 제공된 폴리펩티드를 포함한다.

[0341] [00294] 일부 구현예에서, 대상은 고형 종양을 갖는다.

[0342] [00295] 일부 구현예에서, 고형 종양은 흑색종이다.

[0343] [00296] 일부 구현예에서, 고형 종양은 폐암이다. 일부 구현예에서, 고형 종양은 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC)이다. 일부 구현예에서, 고형 종양은 편평세포 비소세포 폐암(squamous non-small cell lung cancer, NSCLC)이다. 일부 구현예에서, 고형 종양은 비편평세포 NSCLC이다. 일부 구현예에서, 고형 종양은 폐 선암종이다.

[0344] [00297] 일부 구현예에서, 고형 종양은 신세포 암종(renal cell carcinoma, RCC)이다.

[0345] [00298] 일부 구현예에서, 고형 종양은 중피종이다.

[0346] [00299] 일부 구현예에서, 고형 종양은 비인두 암종(nasopharyngeal carcinoma, NPC)이다.

[0347] [00300] 일부 구현예에서, 고형 종양은 결장직장암이다.

[0348] [00301] 일부 구현예에서, 고형 종양은 전립선암이다. 일부 구현예에서, 고형 종양은 거세 저항성 전립선암이다.

[0349] [00302] 일부 구현예에서, 고형 종양은 위암이다.

[0350] [00303] 일부 구현예에서, 고형 종양은 난소암이다.

[0351] [00304] 일부 구현예에서, 고형 종양은 위암이다.

- [0352] [00305] 일부 구현예에서, 고형 종양은 간암이다.
- [0353] [00306] 일부 구현예에서, 고형 종양은 췌장암이다.
- [0354] [00307] 일부 구현예에서, 고형 종양은 갑상선암이다.
- [0355] [00308] 일부 구현예에서, 고형 종양은 두경부의 편평 세포 암종이다.
- [0356] [00309] 일부 구현예에서, 고형 종양은 식도 또는 위장관 암종이다.
- [0357] [00310] 일부 구현예에서, 고형 종양은 유방암이다.
- [0358] [00311] 일부 구현예에서, 고형 종양은 나팔관 암이다.
- [0359] [00312] 일부 구현예에서, 고형 종양은 뇌암이다.
- [0360] [00313] 일부 구현예에서, 고형 종양은 요도암이다.
- [0361] [00314] 일부 구현예에서, 고형 종양은 비뇨생식기 암이다.
- [0362] [00315] 일부 구현예에서, 고형 종양은 자궁 내막증이다.
- [0363] [00316] 일부 구현예에서, 고형 종양은 자궁 경부암이다.
- [0364] [00317] 일부 구현예에서, 고형 종양은 암의 전이성 병변이다.
- [0365] [00318] 일부 구현예에서, 대상은 혈액학적 악성 종양을 갖는다.
- [0366] [00319] 일부 구현예에서, 혈액학적 악성 종양은 림프종, 골수종 또는 백혈병이다. 일부 구현예에서, 혈액학적 악성 종양은 B 세포 림프종이다. 일부 구현예에서, 혈액학적 악성 종양은 버킷 림프종이다. 일부 구현예에서, 혈액학적 악성 종양은 호지킨 림프종이다. 일부 구현예에서, 혈액학적 악성 종양은 비호지킨 림프종이다.
- [0367] [00320] 일부 구현예에서, 혈액학적 악성 종양은 골수이형성 증후군이다.
- [0368] [00321] 일부 구현예에서, 혈액학적 악성 종양은 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia, AML)이다. 일부 구현예에서, 혈액학적 악성 종양은 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML)이다. 일부 구현예에서, 혈액학적 악성 종양은 만성 골수 단핵구 백혈병(chronic myelomonocytic leukemia, CMML)이다.
- [0369] [00322] 일부 구현예에서, 혈액학적 악성 종양은 다발성 골수종(multiple myeloma, MM)이다.
- [0370] [00323] 일부 구현예에서, 혈액학적 악성 종양은 형질세포종이다.
- [0371] [00324] 일부 구현예에서, 암은 연부 조직 암이다. 일부 구현예에서, 연부 조직 암은 유잉 육종이다.
- [0372] [00325] 일부 구현예에서, 암의 치료를 필요로 하는 대상에서 암을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 대상에게 본원에 제공된 임의의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물의 용도는 암을 치료하기 위한 약학 조성물 또는 의약의 제조에서 제공된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 암을 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0373] [00326] 일부 구현예에서, 폼페병(GSD2, 산성 알파-포도당분해효소(GAA) 결핍)의 치료를 필요로 하는 대상에서 이를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 본원에 제공된 임의의 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물의 용도는 폼페병(GSD2, 산성 알파-포도당분해효소(GAA) 결핍)을 치료하기 위한 약학 조성물 또는 의약의 제조에 제공된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 폼페병(GSD2, 산성 알파-포도당분해효소(GAA) 결핍)을 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0374] [00327] 일부 구현예에서, 글리코겐 저장 질환의 치료를 필요로 하는 대상에서 글리코겐 저장 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 본원에 제공된 임의의 조성물을 대상에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물의 용도는 글리코겐 저장 질환을 치료하기 위한 약학 조성물 또는 의약의 제조에 제공된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 글리코겐 저장 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0375] [00328] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 글리코겐 저장 질환의 치료를 필요로 하는 대상에서 글리코겐 저장 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 글리코겐 저장 질환은 코리병 또는 포브스병(GSD3, 글리코겐 탈분지 효소(AGL) 결핍), 맥아들병(GSD5, 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM) 결핍), 2형 당뇨병/당뇨병 신병증, 알둘라아제 A 결핍증 GSD12, 라포라병, 저산소증, 앤더슨병(GSD4, 글

리코겐 탈분지 효소(GBE1) 결핍), 타루이병(GSD7, 근육 인산과당분해효소(PFKM) 결핍), 및 성인 폴리글루코산체 병으로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 글리코겐 저장 질환은 글리코겐 합성효소(GYS2) 결핍 (GSD0), 포도당-6-인산염분해효소(G6PC/SLC37A4) 결핍(GSD1, 폰 기르케병), 허스병(GSD6, 간 글리코겐 가인산 분해효소(PYGL) 또는 근육 인산글리세르산 이성화효소(PGAM2) 결핍), 가인산분해효소 인산화효소 (PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1) 결핍(GSD9), 인산글리세르산 이성화효소(PGAM2) 결핍(GSD10), 근육 젖산 탈수소효소 (LDHA) 결핍(GSD11), 파코니-비켈 증후군(GSD 11, 포도당 수송체(GLUT2) 결핍, 알돌라아제 A 결핍(GSD 12), β 에놀라아제(ENO3) 결핍(GSD13), 및 글리코게닌-1(GYG1) 결핍(GSD15)으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0376] [00329] 일부 구현예에서, CD71에 결합하는 폴리펩티드는 중추 신경계로 향한다. 일부 구현예에서, 신경학적 병 태 및/또는 뇌 종양의 치료를 필요로 하는 대상에서 이를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 대상에게 CD71에 결합하는 폴리펩티드 또는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 CD71에 결합하는 FN3 도메인이다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 서열 번호 301~301, 310, 312~519, 521~572, 592~599, 또는 708~710과 같은 서열, 또는 치료제에 연결되거나 접합된 본원에 제공된 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 뇌 종양은 비악성, 양성, 및 악성 뇌 종양으로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 신경학적 병태는 알츠하이머병, 근위축성 측색 경화증, 파킨슨병, 라포라병, 폼페 병, 성인 폴리글루코산체병, 뇌졸중, 척수 손상, 운동 실조, 벨 마비, 뇌동맥류, 간질, 발작, 길랭-바레 증후군, 다발성 경화증, 근위축증, 신경피부 증후군, 편두통, 뇌염, 패혈증, 및 중증 근무력증으로 이루어진 군 에서 선택된다. 일부 구현예에서, 대상에서 신경학적 병태 및/또는 뇌 종양을 치료하는 방법으로서, 이 방법은 CD71에 결합하는 FN3 도메인을 대상에게 투여하는 단계를 포함하고, FN3 도메인은 치료제(예: 세포독성제, siRNA, ASO 등과 같은 올리고뉴클레오티드, 또 다른 표적에 결합하는 FN3 도메인 등)에 접합된다.

[0377] [00330] 일부 구현예에서, 폼페병의 치료를 필요로 하는 대상에서 폼페병을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 CD71에 결합하는 폴리펩티드 또는 약학 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 CD71에 결합하는 FN3 도메인이다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 서열 번호 301~301, 310, 312~519, 521~572, 592~599, 또는 708~710과 같은 서열, 또는 치료제에 연결되거나 접합된 본원 에 제공된 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상에서 폼페병을 치료하는 방법으로서, 이 방법은 CD71 에 결합하는 FN3 도메인을 대상에게 투여하는 단계를 포함하고, FN3 도메인은 치료제(예: 세포독성제, siRNA, ASO 등과 같은 올리고뉴클레오티드, 또 다른 표적에 결합하는 FN3 도메인 등)에 접합된다.

[0378] [00331] 일부 구현예에서, CD71에 결합하는 폴리펩티드는 면역 세포로 향한다. 일부 구현예에서, CD71에 결합하 는 폴리펩티드는 수지상 세포로 향한다. 일부 구현예에서, 자가면역 질환의 치료를 필요로 하는 대상에서 자가 면역 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 대상에게 CD71에 결합하는 폴리펩티드 또 는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 CD71에 결합하는 FN3 도메인이다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 서열 번호 301~301, 310, 312~519, 521~572, 592~599, 또는 708~710과 같은 서 열, 또는 치료제에 연결되거나 접합된 본원에 제공된 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 자가면역 질환 은 류마티스 관절염, 하시모토 자가면역 갑상선염, 쉐리악병, 1형 당뇨병, 백반증, 류마티스열, 악성 빈혈/위축 성 위염, 원형 탈모증, 및 면역 혈소판 감소성 자반으로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 대상에서 자가면역 질환을 치료하는 방법으로서, 이 방법은 CD71에 결합하는 FN3 도메인을 대상에게 투여하는 단계를 포 함하고, FN3 도메인은 치료제(예: 세포독성제, siRNA, ASO 등과 같은 올리고뉴클레오티드, 또 다른 표적에 결합 하는 FN3 도메인 등)에 접합된다.

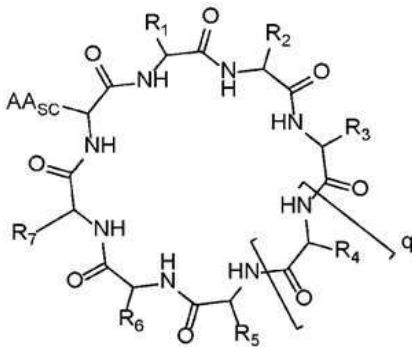
[0379] [00332] 일부 구현예에서, 세포에서 표적 유전자의 발현을 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 본원에 제공된 바와 같은 조성물 또는 약학 조성물을 세포에 전달하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에 서, 세포는 생체 외이다. 일부 구현예에서, 세포는 생체 내이다. 일부 구현예에서, 표적 유전자는 GYS1이다. 그 러나, 표적 유전자는 본원에 제공된 증거가 siRNA 분자가 FN3 도메인에 접합될 때 효율적으로 전달될 수 있음을 보여주기 때문에 임의의 표적 유전자일 수 있다. 일부 구현예에서, GYS1을 표적으로 하는 siRNA는 FN3 도메인에 연결된다. 일부 구현예에서, FN3 폴리펩티드(도메인)는 CD71에 결합하는 것이다. 일부 구현예에서, FN3 폴리펩 티드는 본원에 제공된 바와 같거나 PCT 출원 제PCT/US20/55509호, 미국 출원 제17/070,337호, PCT 출원 제 PCT/US20/55470호, 또는 미국 출원 제17/070,020호에 제공된 바와 같고, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, siRNA는 FN3 도메인에 접합되지 않는다.

[0380] [00333] 일부 구현예에서, 세포에서 표적 유전자의 발현을 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 본원에 제공된 바와 같은 조성물 또는 약학 조성물을 세포에 전달하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에 서, 세포는 생체 외이다. 일부 구현예에서, 세포는 생체 내이다. 일부 구현예에서, 표적 유전자의 발현을 감소

시키는 방법은 표적 유전자의 발현에서 약 99%, 90~99%, 50~90%, 또는 10~50%의 감소를 초래한다.

- [00381] [00334] 일부 구현예에서, GYS1의 발현을 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 감소된 발현은 GYS1 mRNA의 발현(양)이다. 일부 구현예에서, GYS1의 발현을 감소시키는 방법은 GYS1의 발현에서 약 99%, 90~99%, 50~90%, 또는 10~50%의 감소를 초래한다. 일부 구현예에서, 감소된 발현은 GYS1 단백질의 발현(양)이다. 일부 구현예에서, 감소된 단백질은 글리코젠이다. 일부 구현예에서, 글리코젠의 감소는 근육 세포에서 발생한다. 일부 구현예에서, 글리코젠의 감소는 심장 세포에서 발생한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 GYS1을 표적으로 하는 본원에 제공된 바와 같은 siRNA 분자를 세포에 전달하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, siRNA는 FN3 도메인에 접합된다. 일부 구현예에서, FN3 도메인은 CD71에 결합하는 FN3 도메인이다. 일부 구현예에서, FN3 도메인은 본원에 제공된 바와 같다. 일부 구현예에서, FN3 도메인은 CD71에 결합하는 두 개의 FN3 도메인의 이량체이다. 일부 구현예에서, FN3 도메인은 동일하다. 일부 구현예에서, 두 개의 FN3 도메인은 상이하고, 즉, CD71의 상이한 영역 또는 아미노산 잔기, 즉 상이한 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 본원에 제공된 것과 같은 GYS1 siRNA 분자를 대상(환자)에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상에게 투여된 GYS1 siRNA는 FN3 도메인에 접합되거나 연결된다. 일부 구현예에서, FN3 도메인은 CD71에 결합하는 FN3 도메인이다. 일부 구현예에서, FN3 도메인은 본원에 제공된 바와 같다. 일부 구현예에서, FN3 도메인은 CD71에 결합하는 두 개의 FN3 도메인의 이량체이다. 일부 구현예에서, FN3 도메인은 동일하다. 일부 구현예에서, 두 개의 FN3 도메인은 상이하고, 즉, CD71의 상이한 영역 또는 아미노산 잔기, 즉 상이한 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, CD71 결합 도메인은 본원에 제공된 바와 같은 폴리펩티드이다.

- [00382] [00335] 일부 구현예에서, siRNA는 화학식 III의 고리형 펩티드 또는 이의 양성자화된 형태에 접합되고,



[00383]

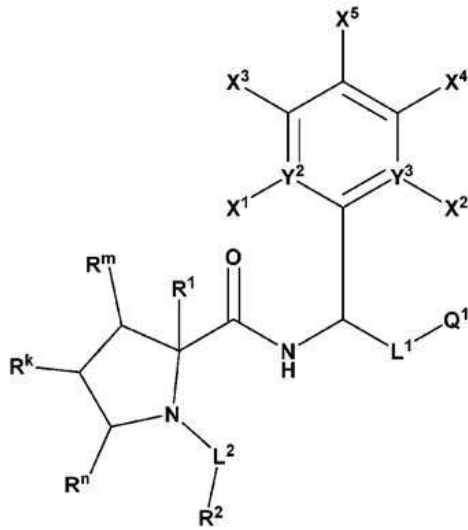
[00384] (화학식 III)

- [00385] 여기서 R_1 , R_2 , 및 R_3 이 각각 독립적으로 H 또는 아미노산의 방향족 또는 헤테로방향족 측쇄이고, R_1 , R_2 , 및 R_3 중 적어도 하나가 아미노산의 방향족 또는 헤테로방향족 측쇄이고, R_4 , R_5 , R_6 , R_7 이 독립적으로 H 또는 아미노산 측쇄이고, R_4 , R_5 , R_6 , R_7 중 적어도 하나가 3-구아니디노-2-아미노프로피온산, 4-구아니디노-2-아미노부탄산, 아르기닌, 호모아르기닌, N-메틸아르기닌, N,N-디메틸아르기닌, 2,3-디아미노프로피온산, 2,4-디아미노부탄산, 리신, N-메틸리신, N,N-디메틸리신, N-에틸리신, N,N-트리메틸리신, 4-구아니디노페닐알라닌, 시트룰린, N,N-디메틸리신, b-호모아르기닌, 3-(1-피페리딘일)알라닌의 측쇄이고, Aasc가 아미노산 측쇄이고, 그리고 q가 1, 2, 3 또는 4이고, 여기서 화학식 III의 고리형 펩티드가 그 전체가 본원에 참조로 포함된 국제 특허 공개 제W02022/213118호에 개시된 바와 같이 FfΦRrRrE가 아니다. 'FfΦRrRrE'는 'F'가 L-Phe이고, 'f'가 D-Phe이고, 'Φ'가 L-2-나프틸알라닌이고, 'R'이 L-아르기닌이고, 'r'이 D-아르기닌인 구조를 지칭한다. 'FfΦRrRrE'는 또한 그 전체가 본원에 참조로 포함된 Soudah et al. ("AntimiR-155 Cyclic Peptide-PNA Conjugate: Synthesis, Cellular Uptake, and Biological Activity", ACS Omega, 2019, 4(9):13954-13961)에도 기재되어 있다.

- [00386] [00336] 일부 구현예에서, 대상에서 세포에 siRNA 분자를 전달하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 본원에 제공된 바와 같은 조성물을 포함하는 약학 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 CD71 양성 세포이다. 단백질과 관련하여 용어 "양성 세포"는 단백질을 발현하는 세포를 지칭한다. 일부 구현예에서, 단백질은 세포 표면에서 발현된다. 일부 구현예에서, 세포는 종양 세포, 간 세포, 면역 세포, 수지상 세포, 심장 세포, 근육 세포, CNS 세포, 또는 혈액 뇌 장벽 내부의 세포이다. 일부 구현예에서, siRNA는 세포에서 표적 유전자의 발현을 하향 조절한다. 일부 구현예에서, 표적 유전자는 GYS1이다.

[0387]

[00337] 일부 구현예에서, 본원에 화학식 IV의 화합물 또는 이의 입체 이성질체 또는 호변 이성질체, 또는 전술한 것의 임의의 것의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물이 제공되고,



[0388]

[0389]

(화학식 IV)

[0390]

여기서 Y^2 및 Y^3 이 각각 C이거나, Y^2 및 Y^3 중 하나가 N이고 Y^2 및 Y^3 중 다른 하나가 C이고, X^1 및 X^2 가 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, 또는 C_{1-6} 알콕시이고, X^3 및 X^4 가 각각 독립적으로 H, 할로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 또는 5-20원 헤테로아릴이고, 여기서 X^3 및 X^4 의 C_{1-6} 알킬이 임의로 하나 이상의 할로로 치환되고, X^5 가 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 또는 C_{3-10} 시클로알킬이고, (1) L^1 이 존재하지 않고, 그리고 Q^1 이 (i) 내지 (iv), (i) 페닐, 여기서 Q^1 의 페닐이 하나 이상의 할로, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알켄일, $-NH_2$, $-NH-C(O)-(C_{1-6}알킬)$, $-NH-C(O)-(3-15원 헤테로시클릴)$, $C_{3-10}시클로알킬$, 또는 5-20원 헤테로아릴로 치환되고, 여기서 C_{1-6} 알킬이 하나 이상의 할로, $-NH-C(O)-NH(C_{1-6}알킬)$, $-NH-C(O)-C_{1-6}알킬$, 또는 $-NH-C(O)-C_{1-6}알콕시$ 로 임의로 치환되고, $C_{3-10}시클로알킬$ 이 하나 이상의 할로 또는 C_{1-6} 알킬로 임의로 치환되고, 그리고 5-20원 헤테로아릴이 하나 이상의 C_{1-6} 알킬로 임의로 치환됨, (ii) 3-15원 헤테로시클릴, 여기서 Q^1 의 3-15원 헤테로시클릴이 하나 이상의 옥소, 또는 C_{1-6} 알킬로 임의로 치환됨, (iii) 5-20원 헤테로아릴, 여기서 Q^1 의 5-20원 헤테로아릴이 하나 이상의 할로, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{1-6} 알콕시, $-NH_2$, 또는 $C_{3-10}시클로알킬$ 로 임의로 치환됨, 여기서 C_{1-6} 알킬이 하나 이상의 할로로 임의로 치환되고, $C_{3-10}시클로알킬$ 이 하나 이상의 할로 또는 C_{1-6} 알킬로 임의로 치환됨, 및 (iv) $C_{3-10}시클로알킬$ 에서 선택되거나, (2) L^1 이 $-CH_2-$ 이고, 그리고 Q^1 이 $C_{3-10}시클로알킬$ 이고, L^2 가 $-C(O)-$ 또는 $-S(O)_2-$ 이고, R^1 이 H 또는 C_{1-6} 알킬이고, R^k 가 H, 할로, $-OH$, $-NH_2$, 또는 $-NH-C(O)C_{1-6}알킬$ 이고, R^m 이 H, $-OH$, 또는 C_{1-6} 알킬이고, R^n 이 H, C_{1-6} 알킬, 또는 $C_{3-10}시클로알킬$ 이거나 R^n 이 부착된 탄소 원자와 함께 C_{3-5} 시클로알킬을 형성하고, 또는 R^k 가 R^m 또는 R^n 과 함께, 그리고 이들이 부착된 원자와 함께 시클로프로필을 형성하고, 그리고 R^2 가 (i) 내지 (vii), (i) C_{1-6} 알킬, 여기서 R^2 의 C_{1-6} 알킬이 하나 이상의 R^a 로 임의로 치환되고, 여기서 R^a 가 (a) $-OH$, (b) 시아노, (c) C_{2-6} 알킨일, (d) C_{6-20} 아릴, 여기서 R^a 의 C_{6-20} 아릴이 하나 이상의 할로, 시아노, C_{1-6} 알콕시, 또는 $-NH-C(O)-C_{1-6}알킬$ 로 임의로 치환됨, (e) 3-15원 헤테로시클릴, 여기서 R^a 의 3-15원 헤테로시클릴이 하나 이상의 R^c 로 임의로 치환되고, 여기서 R^c 가 할로, 옥소, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(O)-C_{1-6}알킬$, 또는 $-C(O)-C_{1-6}알콕시$ 이고, 여기서 R^c 의 C_{1-6} 알킬이 하나 이상의 할로 또는 C_{2-6} 알킨일로 임의로 치환되고, 그리고 R^c 의 $-C(O)-C_{1-6}알콕시$ 가 하나

이상의 할로로 임의로 치환됨, (f) $-N(R^c)(R^d)$, 여기서 $-N(R^c)(R^d)$ 의 R^c 및 R^d 가 서로 독립적으로 H, C1-6알킬, $-C(O)-C_{1-6}$ 알킬, $-C(O)-C_{1-6}$ 알콕시, $-C(O)-NH_2$, $-C(O)-NH(C_{1-6}$ 알킬), $-C(O)-N(C_{1-6}$ 알킬)₂, $-C(O)-(3-15$ 원 헤테로시클릴), $-CH_2-C(O)-NH_2$, 3-15원 헤테로시클릴, 또는 5-20원 헤테로아릴이고, 여기서 R^c 또는 R^d 의 C_{1-6} 알킬이 하나 이상의 $-C(O)-NH_2$ 로 임의로 치환되고, R^c 또는 R^d 의 $-C(O)-C_{1-6}$ 알킬이 하나 이상의 할로로 임의로 치환되고, R^c 또는 R^d 의 3-15원 헤테로시클릴 및 5-20원 헤테로아릴이 독립적으로 하나 이상의 C1-6알킬로 임의로 치환되고, R^c 또는 R^d 의 $-C(O)-(3-15$ 원 헤테로시클릴)이 하나 이상의 할로, $-C(O)-C_{1-6}$ 알콕시, 또는 C1-6알킬로 임의로 치환되고, 여기서 C1-6알킬이 하나 이상의 할로, C1-6알콕시, 또는 C3-10시클로알킬로 임의로 치환되고, 그리고 R^c 또는 R^d 의 $-C(O)-N(C_{1-6}$ 알킬)₂의 C_{1-6} 알킬이 서로 독립적으로 하나 이상의 할로 또는 C6-20아릴로 임의로 치환됨, (g) $-O-R^e$, 여기서 R^e 가 C_{1-6} 알킬, C₆₋₂₀아릴, $-C(O)-(3-15$ 원 헤테로시클릴), $-C(O)-N(C_{1-6}$ 알킬)₂, 또는 5-20원 헤테로아릴이고, 여기서 R^e 의 C1-6알킬이 하나 이상의 C1-6알콕시로 임의로 치환되고, 여기서 C1-6알콕시가 하나 이상의 C2-6알킬일로 임의로 치환되고, R^e 의 C₆₋₂₀아릴이 하나 이상의 C_{1-6} 알킬로 임의로 치환되고, 그리고 R^e 의 $-C(O)-(3-15$ 원 헤테로시클릴)이 하나 이상의 C1-6알킬, C1-6알콕시, 또는 $-C(O)-C_{1-6}$ 알콕시로 임의로 치환되고, 여기서 C1-6알킬이 하나 이상의 할로, C_{1-6} 알콕시, 또는 C₃₋₁₀시클로알킬로 임의로 치환됨, (h) $-C(O)-R^f$, 여기서 R^f 가 $-NH_2$, $-OH$, 또는 3-15원 헤테로시클릴임, 또는 (i) $-S(O)_2-R^f$, 여기서 R^f 가 C_{1-6} 알킬 또는 3-15원 헤테로시클릴임이고, 단 R^2 가 비치환 메틸인 경우, (1) Q^1 이 5-20원 헤테로아릴이고, 여기서 Q^1 의 5-20원 헤테로아릴이 하나 이상의 할로, C1-6알킬, C2-6알켄일, C1-6알콕시, $-NH_2$, C₃₋₁₀시클로알킬, 또는 $-OH$ 로 임의로 치환되고, 여기서 Q^1 이 비치환 피리딜이 아니거나, (2) Q^1 이 페닐이고, 여기서 Q^1 의 페닐이 (i) 적어도 하나의 C₃₋₆알킬로 서, 하나 이상의 할로로 임의로 치환된 적어도 하나의 C₃₋₆알킬, (ii) 적어도 하나의 C₃₋₁₀시클로알킬로서, 하나 이상의 할로 또는 C_{1-6} 알킬로 임의로 치환된 적어도 하나의 C₃₋₁₀시클로알킬, 또는 (iii) 적어도 하나의 5-20원 헤테로아릴로서, 하나 이상의 C1-6알킬로 임의로 치환된 적어도 하나의 5-20원 헤테로아릴로 치환됨, (ii) C₃₋₁₀시클로알킬, 여기서 R^2 의 C₃₋₁₀시클로알킬이 하나 이상의 R^q 로 임의로 치환되고, 여기서 R^q 가 5-20원 헤테로아릴 또는 C6-20아릴이고, 여기서 R^q 의 C6-20아릴이 하나 이상의 C1-6알콕시로 임의로 치환됨, (iii) 3-15원 헤테로시클릴, 여기서 R^2 의 3-15원 헤테로시클릴이 하나 이상의 할로, 옥소, C_{1-6} 알킬, $-C(O)-C_{1-6}$ 알킬, 또는 5-20원 헤테로아릴로 임의로 치환됨, (iv) 5-20원 헤테로아릴 또는 $-(C_{1-4}$ 알킬)(5-20원 헤테로아릴), 여기서 C_{1-4} 알킬이 하나 이상의 $-OH$, 할로, $-NH_2$, $-NH(C_{1-6}$ 알킬), $-N(C_{1-6}$ 알킬)₂로 임의로 치환되고, 여기서 5-20원 헤테로아릴이 하나 이상의 R^s 로 임의로 치환되고, 여기서 R^s 가 할로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-NH_2$, $-NH(C_{1-6}$ 알킬), $-N(C_{1-6}$ 알킬)₂, $-NH-C(O)-C_{1-6}$ 알킬, C6-20아릴, C3-10시클로알킬, 3-15원 헤테로시클릴, 5-20원 헤테로아릴, 또는 $-C(O)-C_{1-6}$ 알콕시이고, 여기서 R^s 의 C_{1-6} 알킬이 하나 이상의 할로, C_{1-6} 알콕시, $-NH_2$, $-NH(C_{1-6}$ 알킬), $-N(C_{1-6}$ 알킬)₂, $-NH-C(O)-C_{1-6}$ 알킬, 또는 $-NH-C(O)-C_{1-6}$ 알콕시로 임의로 치환되고, R^s 의 3-15원 헤테로시클릴이 하나 이상의 할로 또는 $-C(O)-C_{1-6}$ 알콕시로 임의로 치환됨, (v) $-N(R^g)(R^h)$, 여기서 R^g 및 R^h 가 독립적으로 H 또는 C_{1-6} 알킬임, (vi) $-C(O)-R^j$, 여기서 R^j 가 C₃₋₁₀시클로알킬, $-NH(C_{1-6}$ 알킬), $-N(C_{1-6}$ 알킬)₂, 또는 $-NH(5-20$ 원 헤테로아릴)임, 및 (vii) C₆₋₂₀아릴, 여기서 R^2 의 C₆₋₂₀아릴이 하나 이상의 5-20원 헤테로아릴 또는 $-O-R^p$ 로 임의로 치환되고, 여기서 R^p 가 3-15원 헤테로시클릴이고, 여기서 R^p 의 3-15원 헤테로시클릴이 하나 이상의 $-C(O)-C_{1-6}$ 알킬로 임의로 치환됨에서 선택되고, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된 국제 특허 공개 제W02022/198196호에 기재되어 있다.

[0391]

[00338] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물은 세포, 조직, 장기, 체액, 또는 일반적으로 숙주에서 인간 질환 또는 특정 병리의 증상을 진단, 모니터링, 조절, 치료, 완화, 예방 또는 감소시키는 데 사용될 수 있고, 또

한 혈액 뇌 장벽을 통과할 수 있는 특성을 나타낸다. 혈액 뇌 장벽(blood-brain barrier, BBB)은 대부분의 거대 분자(예: DNA, RNA, 및 폴리펩티드)와 많은 소분자가 뇌로 들어가는 것을 방지한다. BBB는 주로 매우 제한적인 밀착 접합을 갖는 특수 내피 세포로 구성되어 있으므로 혈액에서 중추 신경계로의 작고 큰 물질의 통과는 BBB에 의해 제어된다. 이 구조는 많은 치료제가 바람직한 효율로 BBB를 통과할 수 없기 때문에 신경 질환 및 장애(예: 뇌암)가 있는 환자의 치료 및 관리를 어렵게 만든다. BBB의 교란을 수반하는 추가 병태에는 다음이 포함된다. 뇌졸중, 당뇨병, 발작, 고혈압성 뇌병증, 후천성 면역 결핍 증후군, 외상성 뇌 손상, 다발성 경화증, 라포라병, 폼페병, 성인 폴리글루코산체병, 파킨슨병(Parkinson's disease, PD) 및 알츠하이머병. 이 능력은 예를 들어 다음을 포함한 뇌암을 치료하는 데 특히 유용하다. 성상세포종, 수모세포종, 신경교종, 뇌실막세포종, 생식세포종(송과종), 다형성 교모세포종, 희소돌기교세포종, 신경초종, 망막모세포종, 및 선천성 종양; 또는 척수암, 예를 들어 신경섬유종, 수막종, 신경교종 및 육종. 이는 폼페병 및/또는 글리코겐 저장 질환을 치료하는 데 더욱 유용하다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 조성물은 예를 들어 혈액 뇌 장벽을 통과하여 치료제 또는 세포독성제를 전달하는 데 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 조성물은 예를 들어 근육으로 치료제 또는 세포독성제를 전달하는 데 사용될 수 있다.

[0392] [00339] 일부 구현예에서, 글리코겐 저장 질환의 치료를 필요로 하는 대상의 글리코겐 저장 질환을 치료하는 방법으로서, 본원에 제공된 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 글리코겐 저장 질환은 코리병 또는 포브스병(GSD3, 글리코겐 탈분지 효소(AGL) 결핍), 맥아들병(GSD5, 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM) 결핍), 2형 당뇨병/당뇨병 신병증, 알돌라아제 A 결핍 GSD12, 라포라병, 저산소증, 앤더슨병(GSD4, 글리코겐 탈분지 효소(GBE1) 결핍), 타루이병(GSD7, 근육 인산과당분해효소(PFKM) 결핍), 및 성인 폴리글루코산체병으로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 글리코겐 저장 질환은 글리코겐 합성효소(GYS2) 결핍(GSD0), 포도당-6-인산염분해효소(G6PC/SLC37A4) 결핍(GSD1, 폰 기르케병), 허스병(GSD6, 간 글리코겐 가인산분해효소(PYGL) 또는 근육 인산글리세르산 이성화효소(PGAM2) 결핍), 가인산분해효소 인산화효소(PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1) 결핍(GSD9), 인산글리세르산 이성화효소(PGAM2) 결핍(GSD10), 근육 젖산 탈수소효소(LDHA) 결핍(GSD11), 파코니-비켈 증후군(GSD 11, 포도당 수송체(GLUT2) 결핍, 알돌라아제 A 결핍(GSD 12), β 에놀라아제(ENO3) 결핍(GSD13), 및 글리코게닌-1(GYG1) 결핍(GSD15)으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0393] [00340] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물 또는 약학 조성물은 근위축증, DMD 등과 같은 근육 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0394] [00341] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물 또는 약학 조성물은 단독으로 또는 다른 치료제와 함께, 즉 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 다른 또는 추가 치료제는 다른 항종양제 또는 치료제이다. 종양의 상이한 유형 및 단계는 암 치료에 유용한 다양한 보조 화합물의 사용을 요구할 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 조성물은 탁솔, 티로신 인산화효소 억제제, 루코보린, 플루오로우라실, 이리노테칸, 인산염분해효소 억제제, MEK 억제제 등과 같은 다양한 화학 요법제와 함께 사용될 수 있다. 조성물은 또한 항-PD-1 또는 항-CTLA-4 등과 같이 종양에 대한 면역 반응을 조절하는 약물과 함께 사용될 수 있다. 추가 치료는 면역계를 조절하는 작용제, 예컨대 PD-1 또는 PD-L1을 표적으로 하는 항체일 수 있다.

[0395] [00342] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물 또는 약학 조성물은 효소 대체 요법 치료제(enzyme replacement therapy, ERT)와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, ERT는 글리코겐 저장 질환을 치료하도록 설계된 ERT이다. 일부 구현예에서, 글리코겐 저장 질환은 폼페병(GSD2, 포도당분해효소 알파산(GAA) 결핍), 코리병 또는 포브스병(GSD3, 글리코겐 탈분지 효소(AGL) 결핍), 앤더슨병(GSD4, 글리코겐 분지 효소(GBE1) 결핍), 맥아들병(GSD5, 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM) 결핍), 타루이병(GSD7, 근육 인산과당분해효소(PFKM) 결핍), 알돌라아제 A 결핍(GSD 12, 알돌라아제 A(ALDOA) 결핍), 2형 당뇨병/당뇨병 신병증, 라포라병, 저산소증, 및 성인 폴리글루코산체병으로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 글리코겐 저장 질환은 글리코겐 합성효소(GYS2) 결핍(GSD0), 포도당-6-인산염분해효소(G6PC/SLC37A4) 결핍(GSD1, 폰 기르케병), 허스병(GSD6, 간 글리코겐 가인산분해효소(PYGL) 또는 근육 인산글리세르산 이성화효소(PGAM2) 결핍), 가인산분해효소 인산화효소(PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1) 결핍(GSD9), 인산글리세르산 이성화효소(PGAM2) 결핍(GSD10), 근육 젖산 탈수소효소(LDHA) 결핍(GSD11), 파코니-비켈 증후군(GSD 11, 포도당 수송체(GLUT2) 결핍, 알돌라아제 A 결핍(GSD 12), β 에놀라아제(ENO3) 결핍(GSD13), 및 글리코게닌-1(GYG1) 결핍(GSD15)으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0396] [00343] 따라서, 일부 구현예에서, ERT는 포도당분해효소 알파산(GAA), 글리코겐 탈분지 효소(AGL), 글리코겐 분지 효소(BGE1), 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM), 근육 인산과당분해효소(PFKM), 알돌라아제 A, 말린, 라포린, 글리코겐 합성효소(GYS2), 포도당-6-인산염분해효소(G6PC/SLC37A4), 가인산분해효소 인산화효소

(PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1), 인산글리세르산 이성화효소(PGAM2), 근육 젖산 탈수소효소(LDHA), 포도당 수송체 (GLUT2), β 에놀라아제 (ENO3), 글리코게닌-1(GYG1), 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 효소 또는 유전자 대체 산물의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 포도당분해효소 알파산(GAA)을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 글리코겐 탈분지 효소(AGL)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 글리코겐 분지 효소(BGE1)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 근육 인산과당분해효소(PFKM)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 알돌라아제 A(ALDOA)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 말린을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 라포린을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 글리코겐 합성효소(GYS2)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 포도당-6-인산 염분해효소(G6PC/SLC37A4)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 가인산분해효소 인산화효소 (PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 인산글리세르산 이성화효소 (PGAM2)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 근육 젖산 탈수소효소(LDHA)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 포도당 수송체 (GLUT2)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 β 에놀라아제 (ENO3)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ERT는 글리코게닌-1(GYG1)을 투여하는 것을 포함한다.

[0397] [00344] 일부 구현예에서, 글리코겐 저장 질환의 치료를 필요로 하는 대상에서 글리코겐 저장 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 대상에게 본원에 제공된 임의의 조성물과 ERT 치료제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물과 ERT 치료제의 용도는 글리코겐 저장 질환을 치료하기 위한 약학 조성물 또는 의약의 제조에 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물은 FN3 도메인을 포함하는 조성물이고, 이는 올리고뉴클레오티드(예: siRNA, 안티센스, mRNA, miRNA, cDNA 등)와 같은 추가 치료제에 연결될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 조성물은 ERT 치료제 투여 전에 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 ERT 치료제 투여 중에 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 ERT 치료제 투여 후에 대상에게 투여된다.

[0398] [00345] 일부 구현예에서, 폼페병의 치료를 필요로 하는 대상에서 폼페병을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 본원에 제공된 임의의 조성물과 포도당분해효소 알파산(GAA)을 포함하는 ERT 치료제를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물과 포도당분해효소 알파산(GAA)을 포함하는 ERT 치료제의 용도는 폼페병을 치료하기 위한 약학 조성물 또는 의약의 제조에 제공된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 올리고뉴클레오티드(예: siRNA, 안티센스, mRNA, miRNA, cDNA 등)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 추가 치료제에 연결될 수 있는 FN3 도메인을 포함하는 조성물이다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여하기 전에 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여하는 동안 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여한 후에 대상에게 투여된다.

[0399] [00346] 일부 구현예에서, 코리병 또는 포브스병(GSD3)의 치료를 필요로 하는 대상에서 코리병 또는 포브스병을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 본원에 제공된 임의의 조성물과 글리코겐 탈분지 효소 (AGL)를 포함하는 ERT 치료제를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물과 글리코겐 탈분지 효소(AGL)를 포함하는 ERT 치료제의 용도는 코리병 또는 포브스병(GSD3)을 치료하기 위한 약학 조성물 또는 의약의 제조에 제공된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 올리고뉴클레오티드(예: siRNA, 안티센스, mRNA, miRNA, cDNA 등)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 추가 치료제에 연결될 수 있는 FN3 도메인을 포함하는 조성물이다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여하기 전에 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여하는 동안 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 ERT 치료제 투여 후에 대상에게 투여된다.

[0400] [00347] 일부 구현예에서, 앤더슨병(GSD4)의 치료를 필요로 하는 대상에서 앤더슨병을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 대상에게 본원에 제공된 임의의 조성물과 글리코겐 분지 효소(BGE1)를 포함하는 ERT 치료제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물과 글리코겐 분지 효소 (BGE1)를 포함하는 ERT 치료제의 용도는 앤더슨병(GSD4)을 치료하기 위한 약학 조성물 또는 의약의 제조에 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물은 올리고뉴클레오티드(예: siRNA, 안티센스, mRNA, miRNA, cDNA 등)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 추가 치료제에 연결될 수 있는 FN3 도메인을 포함하는 조성물이다. 일부 구현예에서, 조성물은 ERT 치료제 투여 전에 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 ERT 치료제 투여 중에 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 ERT 치료제 투여 후 대상에게 투여된다.

[0401] [00348] 일부 구현예에서, 맥아들병(GSD5)의 치료를 필요로 하는 대상에서 맥아들병을 치료하는 방법이 제공된다.

다. 일부 구현예에서, 이 방법은 대상에게 본원에 제공된 임의의 조성물과 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM)를 포함하는 ERT 치료제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물과 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM)를 포함하는 ERT 치료제의 용도는 맥아들병(GSD5)을 치료하기 위한 약학 조성물 또는 의약의 제조에 제공된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 올리고뉴클레오티드(예: siRNA, 안티센스, mRNA, miRNA, cDNA 등)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 추가 치료제에 연결될 수 있는 FN3 도메인을 포함하는 조성물이다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여하기 전에 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여하는 동안 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여한 후에 대상에게 투여된다.

[0402] [00349] 일부 구현예에서, 타루이병(GSD7)의 치료를 필요로 하는 대상에서 타루이병을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 본원에 제공된 임의의 조성물과 근육 인산과당분해효소(PFKM)를 포함하는 ERT 치료제를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물과 근육 인산과당분해효소(PFKM)를 포함하는 ERT 치료제의 용도는 타루이병(GSD7)을 치료하기 위한 약학 조성물 또는 의약의 제조에 제공된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 올리고뉴클레오티드(예: siRNA, 안티센스, mRNA, miRNA, cDNA 등)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 추가 치료제에 연결될 수 있는 FN3 도메인을 포함하는 조성물이다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여하기 전에 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여하는 동안 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여한 후에 대상에게 투여된다.

[0403] [00350] 일부 구현예에서, 알돌라아제 A 결핍(GSD12)의 치료를 필요로 하는 대상에서 알돌라아제 A 결핍을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 본원에 제공된 임의의 조성물과 알돌라아제 A(ALDOA)를 포함하는 ERT 치료제를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물과 알돌라아제 A(ALDOA)를 포함하는 ERT 치료제의 용도는 알돌라아제 A 결핍(GSD12)을 치료하기 위한 약학 조성물 또는 의약의 제조에 제공된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 올리고뉴클레오티드(예: siRNA, 안티센스, mRNA, miRNA, cDNA 등)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 추가 치료제에 연결될 수 있는 FN3 도메인을 포함하는 조성물이다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여하기 전에 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여하는 동안 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여한 후에 대상에게 투여된다.

[0404] [00351] 일부 구현예에서, 라포라병의 치료를 필요로 하는 대상에서 라포라병을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 본원에 제공된 임의의 조성물과 말린, 라포린 또는 이들 둘 다를 포함하는 ERT 치료제를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물과 말린, 라포린 또는 이들 둘 다를 포함하는 ERT 치료제의 용도는 라포라병을 치료하기 위한 약학 조성물 또는 의약의 제조에 제공된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 올리고뉴클레오티드(예: siRNA, 안티센스, mRNA, miRNA, cDNA 등)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 추가 치료제에 연결될 수 있는 FN3 도메인을 포함하는 조성물이다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여하기 전에 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여하는 동안 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여한 후에 대상에게 투여된다.

[0405] [00352] 일부 구현예에서, 성인 폴리글루코산체병의 치료를 필요로 하는 대상에서 성인 폴리글루코산체병을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 본원에 제공된 임의의 조성물과 글리코겐 분지 효소(BGE1)를 포함하는 ERT 치료제를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물과 글리코겐 분지 효소(BGE1)를 포함하는 ERT 치료제의 용도는 성인 폴리글루코산체병을 치료하기 위한 약학 조성물 또는 의약의 제조에 제공된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 FN3 도메인을 포함하는 조성물이다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여하기 전에 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여하는 동안 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 ERT 치료제를 투여한 후에 대상에게 투여된다.

[0406] [00353] “치료하다” 또는 “치료”는 치료적 치료 및 예방적 조치를 지칭하고, 그 목적은 암의 발병 또는 확산과 같은 바람직하지 않은 생리적 변화 또는 장애를 예방하거나 늦추는(완화하는) 것이다. 일부 구현예에서, 유익하거나 바람직한 임상 결과에는 증상 완화, 질환의 정도 감소, 질환의 안정화(즉, 악화되지 않음), 질환 진행 지연 또는 늦춤, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 검출 가능하든 검출 불가능하든(부분적이든 전면적이든) 완화가 포함되지만 이에 제한되지 않는다. “치료”는 또한 치료를 받지 않을 경우 예상 생존율에 비해 생존 기간을 연장하는 것을 의미할 수 있다. 치료를 필요로 하는 사람에는 이미 병태 또는 질환이 있는 사람뿐만 아니라

병태 또는 장애가 있을 가능성이 있는 사람 또는 병태 또는 장애를 예방해야 하는 사람이 포함된다.

- [0407] [00354] "치료 유효량"은 원하는 치료 결과를 달성하기 위해 필요한 용량 및 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 본원에 제공된 조성물의 치료 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별, 및 체중과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 효과적인 양의 예시적인 지표는 환자의 웰빙 개선, 종양 크기의 감소 또는 축소, 종양의 성장 정지 또는 둔화, 및/또는 신체의 다른 위치로의 암세포 전이 부재이다.
- [0408] [00355] **투여/약학 조성물**
- [0409] [00356] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조성물의 약학 조성물 및 약학적으로 허용되는 담체가 제공된다. 치료적 사용을 위해, 조성물은 약학적으로 허용되는 담체에 유효 성분으로서 도메인 또는 분자의 유효량을 함유하는 약학 조성물로 제조될 수 있다. "담체"는 활성 화합물이 투여되는 희석제, 보조제, 부형제, 또는 운반체를 지칭한다. 이러한 운반체는 물과 기름과 같은 액체일 수 있고, 여기에는 땅콩 기름, 대두 기름, 팜유, 참기름 등과 같은 석유, 동물성, 식물성 또는 합성 기원의 것들이 포함된다. 예를 들어, 0.4% 식염수와 0.3% 글리신을 사용할 수 있다. 이러한 용액은 멸균되어 있고 일반적으로 입자가 없다. 이들은 기존의 잘 알려진 멸균 기술(예: 여과)로 멸균할 수 있다. 조성물은 pH 조절제 및 완충제, 안정화제, 증점제, 윤활제 및 착색제 등과 같은 생리적 조건에 근접하도록 필요에 따라 약학적으로 허용되는 보조 물질을 함유할 수 있다. 본원에 개시된 분자의 이러한 약학 제형 내 농도는 중량 기준으로 약 0.5% 미만에서 보통은 적어도 약 1% 내지 많게는 15 또는 20%까지 매우 다양할 수 있고, 선택된 특정 투여 방식에 따라 필요한 용량, 유체 용량, 점도 등을 기준으로 주로 선택될 것이다. 예를 들어, 인간 혈청 알부민과 같은 다른 인간 단백질을 포함하는 적합한 운반체 및 제형은 예를 들어 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092]에 설명되어 있다. 특히 958~989쪽을 참조한다.
- [0410] [00357] 본원에 개시된 조성물의 치료적 사용을 위한 투여 방식은 숙주에게 작용제를 전달하는 임의의 적합한 경로일 수 있고, 예컨대 비경구 투여, 예를 들어 피 내, 근육 내, 복강 내, 정맥 내 또는 피하, 폐; 점막 투여(경구, 비강 내, 질 내, 직장), 정제, 캡슐, 용액, 분말, 겔, 입자 형태의 제형을 사용하고, 주사기, 이식 장치, 삼투 펌프, 카트리지, 마이크로 펌프에 담아 투여하거나, 또는 당업자가 인식하는 기타 수단(이는 당업계에 잘 알려져 있음)을 사용할 수 있다. 부위별 투여는 예를 들어 관절 내, 기관지 내, 복강 내, 낭 내, 연골 내, 강 내, 체강 내, 소뇌 내, 뇌실 내, 결장 내, 자궁경부 내, 위 내, 간 내, 심장 내, 골 내, 골반 내, 심장막 내, 복강 내, 흉막 내, 전립선 내, 폐 내, 직장 내, 신장 내, 망막 내, 척추 내, 활막 내, 흉강 내, 자궁 내, 혈관 내, 방광 내, 병변 내, 질, 직장, 협측, 설하, 비강 내, 또는 경피 전달을 통해 달성될 수 있다.
- [0411] [00358] 약학 조성물은 본원에 설명된 대로 약학 조성물을 포함하는 용기를 포함하는 키트로 제공될 수 있다. 예를 들어, 단일 또는 다중 투여를 위한 주사 용액 형태 또는 주사 전에 재구성되는 멸균 분말 형태로 약학 조성물을 제공할 수 있다. 또는, 이러한 키트는 약학 조성물을 투여하기 위한 건조 분말 분산기, 액체 에어로졸 생성기, 또는 분무기를 포함할 수 있다. 이러한 키트는 약학 조성물의 적응증 및 사용에 대한 서면 정보를 더 포함할 수 있다.
- [0412] [00359] 또한, 다음의 구현예도 제공된다.
- [0413] [00360] 1. 글리코겐 저장 질환의 치료를 필요로 하는 대상에서 글리코겐 저장 질환을 치료하는 방법으로서, 이 방법이
- [0414] 본원에 제공된 바와 같이 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA 분자(또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 다른 올리고뉴클레오타이드 또는 본원에 달리 제공된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드)에 연결된 하나 이상의 FN3 도메인을 포함하는 조성물, 및
- [0415] 효소 대체 요법(enzyme replacement therapy, ERT) 치료제
- [0416] 를 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0417] [00361] 2. 구현예 1에 있어서, 글리코겐 저장 질환이 폼페병(GSD2, 포도당분해효소 알파산(GAA) 결핍), 코리병 또는 포브스병(GSD3, 글리코겐 탈분지 효소(AGL) 결핍), 앤더슨병(GSD4, 글리코겐 분지 효소(GBE1) 결핍), 맥아 들병(GSD5, 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM) 결핍), 타루이병(GSD7, 근육 인산과당분해효소(PFKM) 결핍), 알돌라아제 A 결핍(GSD 12, 알돌라아제 A(ALDOA) 결핍), 2형 당뇨병/당뇨병 신병증, 라포라병, 저산소증, 및 성인 폴리글루코산체병으로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

- [0418] [00362] 3. 구현에 1 또는 2에 있어서, ERT가 포도당분해효소 알파산(GAA), 글리코겐 탈분지 효소(AGL), 글리코겐 분지 효소(BGE1), 근육 글리코겐 가인산분해효소(PYGM), 근육 인산과당분해효소(PFKM), 알돌라아제 A, 말린, 라포린, 글리코겐 합성효소(GYS2), 포도당-6-인산염분해효소(G6PC/SLC37A4), 가인산분해효소 인산화효소(PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1), 인산글리세르산 이성화효소(PGAM2), 근육 젖산 탈수소효소(LDHA), 포도당 수송체(GLUT2), β 에놀라아제(ENO3), 및 글리코게닌-1(GYG1)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 효소를 포함하는 방법.
- [0419] [00363] 4. 구현에 1~3 중 어느 하나에 있어서, siRNA에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물이 ERT 치료제 투여 전에 대상에게 투여되는 방법.
- [0420] [00364] 5. 구현에 1~3 중 어느 하나에 있어서, siRNA에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물이 ERT 치료제 투여 중에 대상에게 투여되는 방법.
- [0421] [00365] 6. 구현에 1~3 중 어느 하나에 있어서, siRNA에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물이 ERT 치료제 투여 후에 대상에게 투여되는 방법.
- [0422] [00366] 7. 폼페병의 치료를 필요로 하는 대상에서 폼페병을 치료하는 방법으로서, 이 방법이
- [0423] 본원에 제공된 바와 같이 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA(또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 다른 올리고뉴클레오타이드 또는 본원에 달리 제공된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드)에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물, 및
- [0424] 포도당분해효소 알파산(GAA)을 포함하는 ERT 치료제를
- [0425] 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0426] [00367] 8. 코리병(포브스병이라고도 함)의 치료를 필요로 하는 대상에서 이를 치료하는 방법으로서, 이 방법이
- [0427] 본원에 제공된 바와 같이 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA(또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 다른 올리고뉴클레오타이드 또는 본원에 달리 제공된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드)에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물, 및
- [0428] 글리코겐 탈분지 효소(AGL)를 포함하는 ERT 치료제
- [0429] 를 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0430] [00368] 9. 앤더슨병(GSD4)의 치료를 필요로 하는 대상에서 이를 치료하는 방법으로서, 이 방법이
- [0431] 본원에 제공된 바와 같이 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA(또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 다른 올리고뉴클레오타이드 또는 본원에 달리 제공된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드)에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물, 및
- [0432] 글리코겐 분지 효소(BGE1)를 포함하는 ERT 치료제
- [0433] 를 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0434] [00369] 10. 맥아들병(GSD5)의 치료를 필요로 하는 대상에서 이를 치료하는 방법으로서, 이 방법이
- [0435] 본원에 제공된 바와 같이 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA(또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 다른 올리고뉴클레오타이드 또는 본원에 달리 제공된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드)에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물, 및
- [0436] 글리코겐 가인산분해효소(PYGM)를 포함하는 ERT 치료제
- [0437] 를 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0438] [00370] 11. 타루이병(GSD7)의 치료를 필요로 하는 대상에서 이를 치료하는 방법으로서, 이 방법이
- [0439] 본원에 제공된 바와 같이 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA(또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 다른 올리고뉴클레오타이드 또는 본원에 달리 제공된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드)에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물, 및
- [0440] 근육 인산과당분해효소(PFKM)를 포함하는 ERT 치료제

- [0441] 를 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0442] [00371] 12. 알돌라아제 A 결핍(GSD12)의 치료를 필요로 하는 대상에서 이를 치료하는 방법으로서, 이 방법이
- [0443] 본원에 제공된 바와 같이 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA(또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 다른 올리고뉴클레오타이드 또는 본원에 달리 제공된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드)에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물, 및
- [0444] 알돌라아제 A(ALDOA)를 포함하는 ERT 치료제
- [0445] 를 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0446] [00372] 13. 라포라병의 치료를 필요로 하는 대상에서 이를 치료하는 방법으로서, 이 방법이
- [0447] 본원에 제공된 바와 같이 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA(또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 다른 올리고뉴클레오타이드 또는 본원에 달리 제공된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드)에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물, 및
- [0448] 말린, 라포린 또는 이들 둘 다를 포함하는 ERT 치료제
- [0449] 를 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0450] [00373] 14. 성인 폴리글루코산체병의 치료를 필요로 하는 대상에서 이를 치료하는 방법으로서, 이 방법이
- [0451] 본원에 제공된 바와 같이 센스 가닥과 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA(또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 다른 올리고뉴클레오타이드 또는 본원에 달리 제공된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드)에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물, 및
- [0452] 글리코젠 분지 효소(BGE1)를 포함하는 ERT 치료제
- [0453] 를 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0454] [00374] 15. 구현에 7~14 중 어느 하나에 있어서, 방법이 적어도 하나의 추가 ERT 치료제를 더 포함하는 방법.
- [0455] [00375] 16. 구현에 7~15 중 어느 하나에 있어서, siRNA에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물이 ERT 치료제 투여 전에 대상에게 투여되는 방법.
- [0456] [00376] 17. 구현에 7~15 중 어느 하나에 있어서, siRNA에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물이 ERT 치료제 투여 중에 대상에게 투여되는 방법.
- [0457] [00377] 18. 구현에 7~15 중 어느 하나에 있어서, siRNA에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물이 ERT 치료제 투여 후에 대상에게 투여되는 방법.
- [0458] [00378] 19. 구현에 1~18 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 FN3 도메인이 CD71에 결합하는 FN3 도메인을 포함하는 방법.
- [0459] [00379] 20. 구현에 1~19 중 어느 하나에 있어서, siRNA(또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 다른 올리고뉴클레오타이드 또는 본원에 달리 제공된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드) 분자가 GYS1의 발현을 감소시키는 siRNA인 방법.
- [0460] [00380] 21. 구현에 1~20 중 어느 하나에 있어서, siRNA가 어떠한 변형 핵염기도 함유하지 않는 방법.
- [0461] [00381] 22. 구현에 1~21 중 어느 하나에 있어서, siRNA가 siRNA의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에 공유 결합된 링커를 더 포함하는 방법.
- [0462] [00382] 23. 구현에 22에 있어서, 링커가 센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 5' 말단 또는 3' 말단에 결합되는 방법.
- [0463] [00383] 24. 구현에 1~23 중 어느 하나에 있어서, siRNA가 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에 비닐 포스포네이트 변형을 더 포함하는 방법.
- [0464] [00384] 25. 구현에 24에 있어서, 비닐 포스포네이트 변형이 센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 5' 말단 또는 3' 말단에 결합되는 방법.
- [0465] [00385] 26. 구현에 1~25 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥이 서열 번호 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24,

26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 600, 602, 604, 606, 608, 610, 612, 614, 616, 618, 620, 622, 624, 626, 628, 630, 632, 634, 636, 638, 640, 642, 644, 646, 648, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 662, 664, 666, 668, 670, 672, 674, 676, 678, 680, 682, 684, 686, 688, 690, 692, 694, 696, 698, 700, 702, 704, 706, 801~860, 921~980의 서열, 또는 표 3A, 표 3B, 또는 표 4에 기재된 서열을 포함하는 방법.

[0466] [00386] 27. 구현예 1~26 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥이 서열 번호 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 601, 603, 605, 607, 609, 611, 613, 615, 617, 619, 621, 623, 625, 627, 629, 631, 633, 635, 637, 639, 641, 643, 645, 647, 649, 651, 653, 655, 657, 659, 661, 663, 665, 667, 669, 671, 673, 675, 677, 679, 681, 683, 685, 687, 689, 690, 691, 693, 695, 697, 699, 701, 703, 705, 707, 861~920, 981~1042의 서열, 또는 표 3A, 표 3B, 또는 표 4에 기재된 서열을 포함하는 방법.

[0467] [00387] 28. 위의 구현예 중 어느 하나에 있어서, siRNA 분자가 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z, AA, BB, CC, DD, EE, FF, GG, HH, II, JJ, KK, LL, MM, NN, OO, PP, QQ, RR, SS, TT, UU, VV, WW, XX, YY, ZZ, AAA, BBB, CCC, DDD, EEE, FFF, GGG, HHH, III, JJJ, KKK, LLL, MMM, NNN, OOO, PPP, QQQ, RRR, SSS, TTT, UUU, VVV, WWW, XXX, YYY, ZZZ, AAAA, BBBB, CCCC, DDDD, EEEE, FFFF, GGGG, HHHH, IIII, JJJJ, KKKK, LLLL, MMMM, NNNN, OOOO, PPPP의 siRNA 쌍, 또는 표 3A, 표 3B, 또는 표 4에 기재된 siRNA 쌍을 포함하는 방법.

[0468] [00388] 29. 위의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥이 19개의 뉴클레오타이드를 포함하는 방법.

[0469] [00389] 30. 위의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥이 21개의 뉴클레오타이드를 포함하는 방법.

[0470] [00390] 31. 구현예 1~30 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 표 4에 제공된 siRNA 쌍과 표 5에 기재된 링커 및/또는 비닐 포스포네이트 변형을 포함하는 방법.

[0471] [00391] 32. 위의 구현예 중 어느 하나에 있어서, siRNA 분자가 화학식 I에 도시된 바와 같은 화학식을 갖고

[0472]
$$\begin{array}{ll} \text{N}_1\text{N}_2\text{N}_3\text{N}_4\text{N}_5\text{N}_6\text{N}_7\text{N}_8\text{N}_9\text{N}_{10}\text{N}_{11}\text{N}_{12}\text{N}_{13}\text{N}_{14}\text{N}_{15}\text{N}_{16}\text{N}_{17}\text{N}_{18}\text{N}_{19} & \text{Sense-strand (SS)} \\ \text{N}_{21}\text{N}_{20}\text{N}_{19}\text{N}_{18}\text{N}_{17}\text{N}_{16}\text{N}_{15}\text{N}_{14}\text{N}_{13}\text{N}_{12}\text{N}_{11}\text{N}_{10}\text{N}_9\text{N}_8\text{N}_7\text{N}_6\text{N}_5\text{N}_4\text{N}_3\text{N}_2\text{N}_1 & \text{Antisense-strand (AS)} \end{array},$$

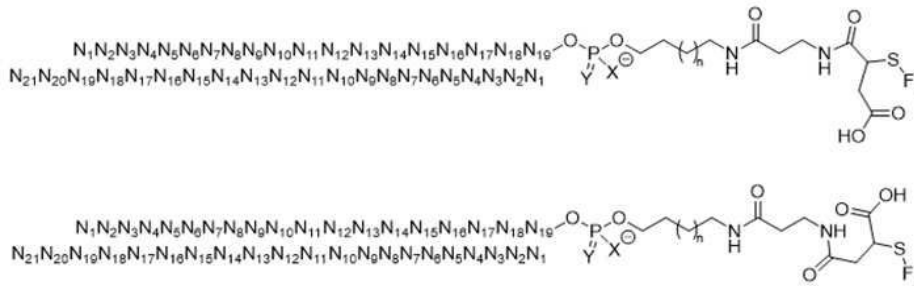
[0473] N으로 표현된 각 뉴클레오타이드가 독립적으로 A, U, C, 또는 G이거나 본원에 제공된 것과 같은 변형 뉴클레오타이드 염기인 방법.

[0474] [00392] 33. 구현예 32에 있어서, 센스 가닥이 N₁ 및 N₂에 포스포로티오에이트(phosphorothioate, S) 변형 골격을 갖는 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드, N₃, N₇, N₈, N₉, N₁₂, 및 N₁₇에 2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드, 및 N₄, N₅, N₆, N₁₀, N₁₁, N₁₃, N₁₄, N₁₅, N₁₆, N₁₈, 및 N₁₉에 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드를 포함하는 방법.

[0475] [00393] 34. 구현예 32에 있어서, 안티센스 가닥이 N₁에 결합된 비닐포스포네이트 모이어티, N₂에 포스포로티오에이트(PS) 변형 골격을 갖는 2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드, N₃, N₄, N₅, N₆, N₇, N₈, N₉, N₁₀, N₁₁, N₁₂, N₁₃, N₁₅, N₁₆, N₁₇, N₁₈, 및 N₁₉에 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드, N₁₄에 2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드, 및 N₂₀ 및 N₂₁에 포스포로티오에이트(PS) 변형 골격을 갖는 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드를 포함하는 방법.

[0476] [00394] 35. 위의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 비닐포스포네이트 모이어티가 안티센스 가닥의 N₁에 결합되는 방법.

[0477] [00395] 36. 위의 구현예 중 어느 하나에 있어서, siRNA 분자가 화학식 I에 도시된 바와 같은 화학식을 갖고



[0478]

[0479]

여기서 F_1 이 적어도 하나의 FN3 도메인을 포함하는 폴리펩티드이고 링커 L_1 에 접합되고, L_1 이 X_5 에 연결되고, 여기서 X_5 가 이중 가닥 siRNA 분자의 5'에서 3' 올리고뉴클레오타이드 센스 가닥이고 X_{A5} 가 이중 가닥 siRNA 분자의 3'에서 5' 올리고뉴클레오타이드 안티센스 가닥이고, 여기서 X_5 와 X_{A5} 가 이중 가닥 siRNA 분자를 형성하는 방법.

[0480]

[00396] 37. 구현예 36에 있어서, F_1 이 $(X_1)_n-(X_2)_q-(X_3)_y$ 의 화학식을 갖는 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 X_1 이 제1 FN3 도메인이고, X_2 가 제2 FN3 도메인이고, X_3 이 제3 FN3 도메인 또는 반감기 연장제 분자이고, 여기서 n , q , 및 y 가 각각 독립적으로 0 또는 1이고, 단 n , q , 및 y 중 적어도 하나가 1인 방법.

[0481]

[00397] 38. 위의 구현예 중 어느 하나에 있어서, FN3 도메인이 FN3 도메인의 시스테인을 통해 siRNA 분자에 접합되는 방법.

[0482]

[00398] 39. 구현예 38에 있어서, 시스테인이 본원에 기재된 위치에 있는 방법.

[0483]

[00399] 40. 구현예 38 또는 39에 있어서, FN3 도메인의 시스테인이 서열 번호 713에 기초한 아미노산 서열을 포함하는 FN3 도메인의 잔기 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 30, 34, 38, 40, 41, 45, 47, 48, 53, 54, 59, 60, 62, 64, 70, 88, 89, 90, 91, 또는 93에 상응하는 위치에 있는 방법.

[0484]

[00400] 41. 구현예 40에 있어서, 시스테인이 잔기 6, 53, 또는 88에 해당하는 위치에 위치하는 방법.

[0485]

[00401] 42. 위의 구현예 중 어느 하나에 있어서, FN3 도메인이 서열 번호 509, 708, 및 710으로 이루어진 군에서 선택된 서열을 갖는 방법.

[0486]

[00402] 43. 위의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 FN3 도메인이 펩티드 링커에 의해 연결된 적어도 두 개의 FN3 도메인을 포함하는 방법.

[0487]

[00403] 44. 위의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 제1 FN3 도메인과 제2 FN3 도메인을 포함하는 방법.

[0488]

[00404] 45. 구현예 44에 있어서, 제1 FN3 도메인과 제2 FN3 도메인이 상이한 단백질에 결합하는 방법.

[0489]

[00405] 46. 구현예 44에 있어서, 제1 FN3 도메인과 제2 FN3 도메인이 동일한 단백질에 결합하는 조성물.

[0490]

[00406] 47. 구현예 44~46 중 어느 하나에 있어서, 제1 FN3 도메인이 CD71에 결합하는 방법.

[0491]

[00407] 48. 구현예 44~46 중 어느 하나에 있어서, 제2 FN3 도메인이 CD71에 결합하지 않는 상이한 표적에 결합하는 방법.

[0492]

[00408] 49. 위의 구현예 중 어느 하나에 있어서, FN3 도메인이 서열 번호 273, 288~291, 301~310, 312~572, 592~599, 또는 708~710의 서열과 적어도 87% 동일하거나 동일한 서열을 포함하는 방법.

[0493]

[00409] 50. 구현예 43~49 중 어느 하나에 있어서, 방법이 제3 FN3 도메인을 더 포함하는 방법.

[0494]

[00410] 51. 구현예 50에 있어서, 제3 FN3 도메인이 CD71 또는 알부민에 결합하는 FN3 도메인인 방법.

[0495]

[00411] 52. 구현예 51에 있어서, CD71에 결합하는 FN3 도메인이 본원에 제공된 아미노산 서열을 갖고, 여기에는 서열 번호 273, 288~291, 301~310, 312~572, 592~599, 또는 708~710, 또는 이의 결합 단편이 포함되지만 이에 제한되지 않는 방법.

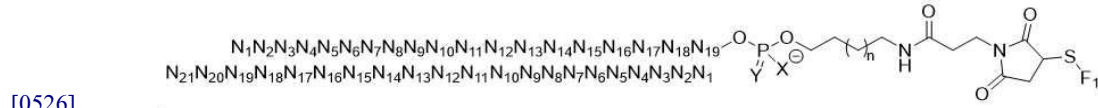
[0496]

[00412] 53. 구현예 51에 있어서, 알부민에 결합하는 FN3이 본원에 제공된 아미노산 서열을 갖고, 여기에는 서열 번호 101~119, 또는 이의 결합 단편이 포함되지만 이에 제한되지 않는 방법.

- [0497] [00413] 54. 구현예 1에 있어서, siRNA에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물이 $(X_1)_n-(X_2)_q-(X_3)_y-L-X_4$, $C-(X_1)_n-(X_2)_q-L-X_4-(X_3)_y$, $(X_1)_n-(X_2)_q-L-X_4-(X_3)_y-C$, $C-(X_1)_n-(X_2)_q-L-X_4-L-(X_3)_y$, 또는 $(X_1)_n-(X_2)_q-L-X_4-L-(X_3)_y-C$ 에서 선택된 화학식을 갖고,
- [0498] 여기서
- [0499] X_1 이 제1 FN3 도메인이고,
- [0500] X_2 가 제2 FN3 도메인이고,
- [0501] X_3 이 제3 FN3 도메인 또는 반감기 연장제 분자이고,
- [0502] L 이 링커이고,
- [0503] X_4 가 핵산 분자(예: siRNA의 가닥 또는 가닥들)이고, 그리고
- [0504] C 가 PEG, 알부민 결합 단백질과 같은 중합체이고, 그리고
- [0505] 여기서 n , q , 및 y 가 각각 독립적으로 0 또는 1인 방법.
- [0506] [00414] 55. 구현예 54에 있어서, X_1 , X_2 , 및 X_3 이 동일하거나 상이한 표적 단백질에 결합하는 방법.
- [0507] [00415] 56. 구현예 54 또는 55에 있어서, y 가 0인 방법.
- [0508] [00416] 57. 구현예 54 또는 55에 있어서, n 이 1이고, q 가 0이고, 그리고 y 가 0인 방법.
- [0509] [00417] 58. 구현예 54 또는 55에 있어서, n 이 1이고, q 가 1이고, 그리고 y 가 0인 방법.
- [0510] [00418] 59. 구현예 54 또는 55에 있어서, n 이 1이고, q 가 1이고, 그리고 y 가 1인 방법.
- [0511] [00419] 60. 구현예 54~59 중 어느 하나에 있어서, 제3 FN3 도메인이 X_3 이 없는 분자에 비해 분자 전체의 반감기를 증가시키는 방법.
- [0512] [00420] 61. 구현예 54에 있어서, 제3 FN3 도메인이 알부민에 결합하는 FN3 도메인인 방법.
- [0513] [00421] 62. 구현예 54~61 중 어느 하나에 있어서, 링커가 본원에 제공된 링커인 방법.
- [0514] [00422] 63. 구현예 54~62 중 어느 하나에 있어서, FN3 도메인이 펩티드 링커에 의해 연결된 방법.
- [0515] [00423] 64. 구현예 63에 있어서, 펩티드 링커가 $(GS)_2$ (서열 번호 720), $(GGGS)_2$ (서열 번호 721), $(GGGGS)_5$ (서열 번호 722), $(AP)_{2-20}$, $(AP)_2$ (서열 번호 723), $(AP)_5$ (서열 번호 724), $(AP)_{10}$ (서열 번호 725), $(AP)_{20}$ (서열 번호 726) 및 $A(EAAAK)_5AAA$ (서열 번호 727) 또는 $(EAAAK)_{1-5}$ (서열 번호 728), 또는 이들의 임의의 조합인 방법.
- [0516] [00424] 65. 구현예 54~64 중 어느 하나에 있어서, 제1, 제2, 또는 제3 FN3 도메인이 본원에 제공된 아미노산 서열을 갖는 방법.
- [0517] [00425] 66. 구현예 54~65 중 어느 하나에 있어서, X_4 가 siRNA 분자인 방법.
- [0518] [00426] 67. 구현예 66에 있어서, siRNA 분자가 본원에 제공된 siRNA 분자인 방법.
- [0519] [00427] 68. 구현예 66에 있어서, siRNA 분자가 GYS1의 발현을 감소시키는 siRNA인 방법.
- [0520] [00428] 69. 구현예 66에 있어서, siRNA 분자가 GYS1의 발현을 특이적으로 감소시키는 siRNA인 방법.
- [0521] [00429] 70. 구현예 66에 있어서, siRNA 분자가 GYS1의 발현을 감소시키고 다른 RNA의 발현을 크게 감소시키지 않는 siRNA인 방법.
- [0522] [00430] 71. 구현예 66에 있어서, siRNA 분자가 본원에 기재된 바와 같이 200 nm 이하의 농도에서 본원에 기재된 검정에서 GYS1의 발현을 감소시키고 다른 RNA의 발현을 50% 초과 감소시키지 않는 siRNA인 방법.
- [0523] [00431] 72. 구현예 66에 있어서, siRNA 분자가 GYS1의 발현을 감소시키고 GYS1 단백질의 농도를 감소시키는 siRNA인 방법.

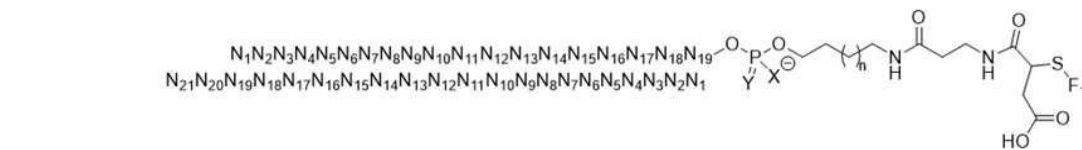
[0524] [00432] 73. 구현예 66에 있어서, siRNA 분자가 GYS1의 발현을 감소시키고 근육 세포에서 글리코겐의 농도를 감소시키는 siRNA인 방법.

[0525] [00433] 74. 구현예 54~73 중 어느 하나에 있어서, siRNA가 다음 화학식에서 제공되는 siRNA 쌍인 방법.



[0527] [00434] 75. 구현예 74에 있어서, 안티센스 가닥의 N₁이 비닐 포스포네이트 변형을 포함하는 방법.

[0528] [00435] 76. 구현예 74에 있어서, 말레이미드가 가수분해되어 다음 화합물의 혼합물, 또는 각 화합물 중 하나 또는 둘 다, 또는 화합물 중 하나만을 형성하는 방법.



[0530] [00436] 77. 구현예 54~76 중 어느 하나에 있어서, siRNA가 본원에 제공된 siRNA 쌍이거나 표 3A, 표 3B, 또는 표 4에 제공된 대로 이루어진 군에서 선택된 siRNA 쌍인 방법.

[0531] [00437] 78. 구현예 1에 있어서, siRNA에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물이 A₁-B₁의 화학식을 갖고, 여기서 A₁이 (C)_n-(L₁)_t-X_s의 화학식을 갖고 B₁이 X_{AS}-(L₂)_q-(F₁)_y의 화학식을 갖고, 여기서

[0532] C가 PEG, 알부민 결합 단백질과 같은 중합체이고,

[0533] L₁ 및 L₂가 각각 독립적으로 링커이고,

[0534] X_S가 이중 가닥 siRNA 분자의 5'에서 3' 올리고뉴클레오타이드 센스 가닥이고,

[0535] X_{AS}가 이중 가닥 siRNA 분자의 3'에서 5' 올리고뉴클레오타이드 안티센스 가닥이고,

[0536] F₁이 적어도 하나의 FN3 도메인을 포함하는 폴리펩티드이고,

[0537] 여기서 n, t, q, 및 y가 각각 독립적으로 0 또는 1이고,

[0538] 여기서 X_S 및 X_{AS}가 조성물/복합체를 형성하기 위해 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 분자를 형성하는 방법.

[0539] [00438] 79. 구현예 1에 있어서, siRNA에 연결된 FN3 도메인을 포함하는 조성물이 A₁-B₁의 화학식을 갖고, 여기서 A₁이 (F₁)_n-(L₁)_t-X_s의 화학식을 갖고 B₁이 X_{AS}-(L₂)_q-(C)_y의 화학식을 갖고, 여기서

[0540] C가 PEG, 알부민 결합 단백질과 같은 중합체이고,

[0541] L₁ 및 L₂가 각각 독립적으로 링커이고,

[0542] X_S가 이중 가닥 siRNA 분자의 5'에서 3' 올리고뉴클레오타이드 센스 가닥이고,

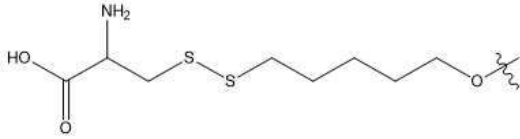
[0543] X_{AS}가 이중 가닥 siRNA 분자의 3'에서 5' 올리고뉴클레오타이드 안티센스 가닥이고,

[0544] F₁이 적어도 하나의 FN3 도메인을 포함하는 폴리펩티드이고,

[0545] 여기서 n, t, q, 및 y가 각각 독립적으로 0 또는 1이고,

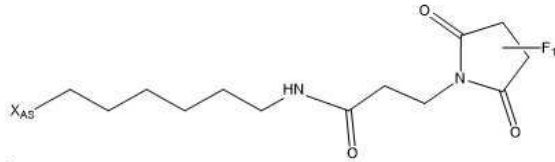
[0546] 여기서 X_S 및 X_{AS} 가 조성물/복합체를 형성하기 위해 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 분자를 형성하는 방법.

[0547] [00439] 80. 구현예 78 또는 79에 있어서, L_1 이 다음 화학식을 갖는 방법.



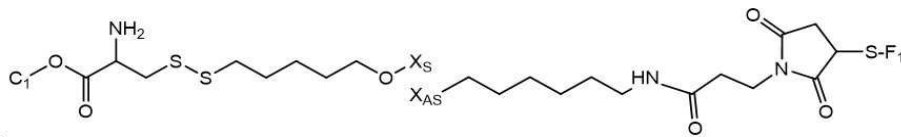
[0548]

[0549] [00440] 81. 구현예 78 또는 79에 있어서, L_2 가 다음 화학식을 갖는 방법.



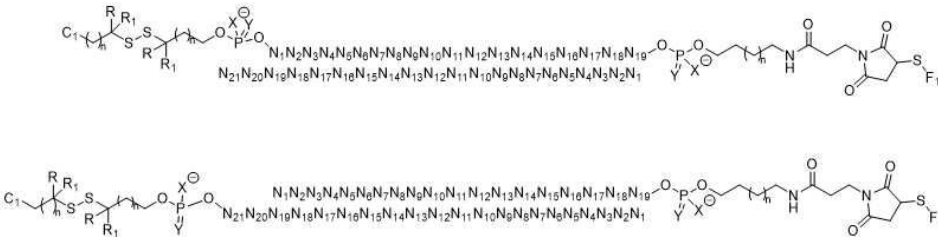
[0550]

[0551] [00441] 82. 구현예 78 또는 79에 있어서, A_1-B_1 이 다음 화학식을 갖는 방법.



[0552]

[0553] [00442] 83. 구현예 78 또는 79에 있어서, A_1-B_1 이 다음 화학식을 갖는 방법.



[0554]

[0555] [00443] 84. 구현예 78 또는 79에 있어서, F_1 이 $(X_1)_n-(X_2)_q-(X_3)_y$ 의 화학식을 갖는 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 X_1 이 제1 FN3 도메인이고, X_2 가 제2 FN3 도메인이고, X_3 이 제3 FN3 도메인 또는 반감기 연장제 분자이고, 여기서 n , q , 및 y 가 각각 독립적으로 0 또는 1이고, 단 n , q , 및 y 중 적어도 하나가 1인 방법.

[0556] [00444] 85. 구현예 78 또는 79에 있어서, X_1 이 CD71 FN3 결합 도메인인 방법.

[0557] [00445] 86. 구현예 78 또는 79에 있어서, X_2 가 CD71 FN3 결합 도메인인 방법.

[0558] [00446] 87. 구현예 78 또는 79에 있어서, X_3 이 인간 혈청 알부민에 결합하는 FN3 도메인인 방법.

[0559] [00447] 88. 구현예 78 또는 79에 있어서, X_3 이 단백질의 반감기를 연장하는 효과기 기능이 없는 Fc 도메인인 방법.

[0560] [00448] 89. 구현예 78~88 중 어느 하나에 있어서, X_5 가 서열 번호 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 600, 602, 604, 606, 608, 610, 612, 614, 616, 618, 620, 622, 624, 626, 628, 630, 632, 634, 636, 638, 640, 642, 644, 646, 648, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 662, 664, 666, 668, 670, 672, 674, 676, 678, 680, 682, 684, 686, 688, 690, 692, 694, 696, 698, 700, 702, 704, 706, 801~860, 921~980 의 서열, 또는 표 3A, 표 3B, 또는 표 4에 기재된 서열을 포함하는 방법.

[0561] [00449] 90. 구현예 78~88 중 어느 하나에 있어서, X_{AS} 가 서열 번호 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29,

31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 601, 603, 605, 607, 609, 611, 613, 615, 617, 619, 621, 623, 625, 627, 629, 631, 633, 635, 637, 639, 641, 643, 645, 647, 649, 651, 653, 655, 657, 659, 661, 663, 665, 667, 669, 671, 673, 675, 677, 679, 681, 683, 685, 687, 689, 690, 691, 693, 695, 697, 699, 701, 703, 705, 707, 861~920, 981~1042의 서열, 또는 표 3A, 표 3B, 또는 표 4에 기재된 서열을 포함하는 방법.

[0562] [00450] 91. 구현예 78~88 중 어느 하나에 있어서, X_s 및 X_{As} 가 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z, AA, BB, CC, DD, EE, FF, GG, HH, II, JJ, KK, LL, MM, NN, OO, PP, QQ, RR, SS, TT, UU, VV, WW, XX, YY, ZZ, AAA, BBB, CCC, DDD, EEE, FFF, GGG, HHH, III, JJJ, KKK, LLL, MMM, NNN, OOO, PPP, QQQ, RRR, SSS, TTT, UUU, VVV, WWW, XXX, YYY, ZZZ, AAAA, BBBB, CCCC, DDDD, EEEE, FFFF, GGGG, HHHH, IIII, JJJJ, KKKK, LLLL, MMMM, NNNN, OOOO, PPPP로 이루어진 군에서 선택된 siRNA 쌍, 또는 표 3A, 표 3B, 또는 표 4에 기재된 siRNA 쌍을 형성하는 방법.

[0563] [00451] 92. 구현예 78~88 중 어느 하나에 있어서, F_1 이 서열 번호 273, 288~291, 301~310, 312~572, 592~599, 또는 708~710의 서열과 적어도 87% 동일하거나 동일한 서열을 포함하는 방법.

[0564] [00452] 93. 구현예 78~88 중 어느 하나에 있어서, F_1 이 알부민에 결합하는 폴리펩티드를 포함하는 방법.

[0565] 실시예

[0566] [00453] 다음 실시예는 본원에 개시된 구현예를 설명하는 것이다. 이러한 실시예는 단지 설명을 목적으로 제공되고 구현예는 이러한 실시예에 제한되는 것으로 해석되어서는 안 되며, 오히려 본원에 제공된 교시의 결과로 증거가 되는 임의의 그리고 모든 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 당업자는 본질적으로 유사한 결과를 내기 위해 변경되거나 수정될 수 있는 다양한 비중요 매개변수를 쉽게 인식할 것이다.

[0567] [00454] **실시예 1: GYS1 siRNA 서열 ID 및 특성 분석**

[0568] [00455] siRNA 인실리코 스크리닝: 인실리코 siRNA 스크리닝은 인간 GYS1 mRNA에 상보적인 인간 siRNA를 식별하기 위해 수행하였다(도 1 참조). 모든 가능한 19-머 안티센스 서열은 인간 GYS1 siRNA 서열(NM_001161587)에서 생성하였고 각 19-머는 다른 인간 GYS1 동형체뿐만 아니라 잠재적인 교차 반응성 마우스, 래트, 및 시노몰구스 원숭이에 대한 활성을 평가하였다. 인간 siRNA 표적 부위는 dbSNP(b155 v2)를 사용하여 일반적인 인간 SNP(MAF > 1%)에 대해 평가하였다. 일반적인 대립유전자를 표적으로 하는 서열은 폐기하였다. 다음으로, siRNA 비표적 유전자는 모든 관련 모델 생물체에서 센스 및 안티센스 가닥에 대해 평가하였다. 이 선택은 200개의 잠재적 후보를 산출하였고, 이는 시험관 내 녹다운 스크린을 통해 추가로 정의하였다. 리드 siRNA 후보는 표 3A 및 3B에 있다. 시스템인 조작된 센티린에 접합하기 위한 GYS1 siRNA 링커는 표 5에 설명된 대로 준비하였다.

[0569] [00456] HEK293T 세포는 10 nM ABXO-HHH(siRNA 쌍 HHH)로 24시간 동안 미처리 대조군 세포(처리군당 6회 반복)와 함께 리포펙션하였다. mRNA는 세포에서 폴리A로 선택하였고 Illumina HiSeq 플랫폼에서 평균 3천만 회 초과 판독 깊이로 가닥이 없는 2 x 150 bp 쌍 말단 서열 분석을 거쳤다.

[0570] [00457] 도 2 ABXO-HHH 대 미처리 세포의 DESeq2 결과를 도시하는 Volcano 플롯. X축은 모든 유전자에 대한 유전자 발현(ABXO-HHH를 미처리로 나눈 값)의 $\log_2$ 배수 변화를 나타낸다. Y축은 음의 $\log_{10}$ 변환된 조정된 P 값을 도시한다. 색상이 있는 점은 BLAST를 통해 검출된 ABXO-HHH에 상당한 상보성을 갖는 유전자를 나타낸다.

[0571] [00458] RNA-seq 라이브러리 품질은 FastQC를 사용하여 검사하였다. 라이브러리는 Kallisto를 사용하여 GrCh38 인간 전사체에 유사 정렬하였다. 평균 90% 초과 판독이 전사체에 정렬되어 뛰어난 판독 정렬을 달성하였다. 그런 다음 ABXO-HHH로 처리한 세포와 리포펙타민만 처리한 세포를 비교하여 DESeq2를 사용하여 차등 발현을 평가하였다.

[0572] [00459] DESeq 결과는 GYS1 표적의 실질적이고 유의미한 녹다운을 보여주었다. ABXO-HHH로 처리한 샘플에서 GYS1 발현은 미처리 샘플의 31%로 하향 조절되었다(도 2). GYS1은 ABXO-HHH 처리하에 차등적으로 발현된(differentially expressed, DE) 모든 유전자에 대해 가장 많이 하향 조절된 단백질 코딩 유전자였다. GYS1은 또한 가장 낮은 p-값을 갖는 DE 유전자였고, 조정된 p-값은 $1e-87.7$ 로 두 번째로 낮은 조정된 p-값보다 30배 초과 작았다.

[0573] [00460] 잠재적 비표적 효과에 대한 인실리코 예측은 BLAST를 사용하여 수행하였다. ABXO-HHH 센스 및 안티센스 서열은 GRCh38 전사체에서 구축된 내부 BLAST 데이터베이스에 대해 BLAST 정렬되었다. BLAST에서 확인한 모든

잠재적 비표적 효과 중에서, RAP2C만이 ABXO-HHH가 존재하는 경우 상당히 하향 조절되었고(도 2) $\log_2 f -1$ 미만의 배수 변화의 DE 임계값을 넘지 못하였다.

- [0574] [00461] 이러한 데이터를 함께 살펴보면 ABXO-HHH가 인간 전사체에서 비교적 높은 농도에서도 매우 특이적인 siRNA임을 알 수 있다.
- [0575] [00462] 올리고뉴클레오타이드 합성, 탈보호 및 어닐링 프로토콜:
- [0576] [00463] 올리고뉴클레오타이드 합성은 Mermade 12 합성기에서 아세토니트릴에 0.1 M 농도의 포스포라미디트를 사용하여 500 Å 제어 기공 유리(controlled pore glass, CPG)에서 표준 포스포라미디트 화학을 사용하여 수행하였다. THF/피리딘/물(0.02 M)의 1:2는 산화제였고 0.6 M ETT(5-에틸티오테트라졸)는 활성화제로 사용하였다. 피리딘에 0.09 M의 N,N-디메틸-N' 티옥소-3H-1,2,4-디티아졸-5-일)메탄이미다미드(N,N-dimethyl-N' , DDTT)는 포스포로티오에이트(PS) 결합을 도입하기 위한 황화 시약으로 사용하였다. 디클로로메탄에 3%(v/v) 디클로로아세트산을 디블로킹 용액으로 사용하였다. 말레이미드가 없는 모든 단일 가닥은 완충액 A로 pH 8.5의 20 mM 인산염과 완충액 B로 pH 8.5의 20 mM 인산염 및 1 M 브롬화 나트륨을 사용하여 이온 교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography, IEX)로 정제하였다. 정제 후 올리고뉴클레오타이드 분획을 모아, 농축하고, 그리고 염을 제거하였다. 염을 제거한 샘플은 동결 건조하여 건조시키고 -20 °C에서 보관하였다.
- [0577] [00464] 안티센스 가닥의 탈보호
- [0578] [00465] 합성 후, 지지체를 아세토니트릴(acetonitrile, ACN)로 세척하고 진공하의 컬럼에서 건조시킨 후 단단히 밀봉할 수 있는 1 mL 스크류 캡으로 옮겨 65 °C에서 5시간 동안 수성 암모니아에 5% 디에틸아민 용액과 함께 흔들었다. 조 올리고의 절단 및 탈보호는 액체 크로마토그래피-질량 분석법(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)으로 확인한 후 IEX-HPLC로 정제하였다.
- [0579] [00466] 말레이미드 함유 올리고뉴클레오타이드의 합성 및 탈보호
- [0580] [00467] 말레이미드 함유 올리고는 3' 아미노-변형된 CPG 고체 지지체 또는 5' 아미노 개질제 포스포라미디트를 사용하여 제조하였다. 지지체는 단단히 밀봉할 수 있는 1 mL 바이알로 옮겨 실온에서 2시간 동안 또는 65 °C에서 10분 동안 50/50 v/v 40% 수성 메틸 아민 및 수성 암모니아(AMA)와 함께 배양하여 절단하고 탈보호할 수 있다. 단일 가닥은 IEX 크로마토그래피로 정제하고 말레이미드를 첨가하기 전에 안티센스와 동일한 조건에서 염을 제거하였다.
- [0581] [00468] pH 7.1의 0.05 M 인산 완충액에서 아민-변형된 센스 가닥 대략 20 mg/mL을 제조하고, 여기에 ACN에 용해된 말레이미드 N-히드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS) 에스테르 10당량을 첨가하였다. NHS 에스테르 용액을 수용성 올리고뉴클레오타이드 용액에 첨가하고 실온에서 3시간 동안 흔들었다. 이제 말레이미드 접합된 올리고뉴클레오타이드는 역상 크로마토그래피(완충액 B에 80% 아세토니트릴을 첨가한 20 mM 트리에틸 암모늄 아세테이트)로 정제하여 이온 교환 완충액 조건에서 말레이미드 가수분해를 방지하였다.
- [0582] [00469] 정제 후, 올리고뉴클레오타이드 분획을 모아, 농축하고, 그리고 염을 제거하였다.
- [0583] [00470] 말레이미드의 가수분해를 방지하기 위해, 각 탈염 단일 가닥의 등몰량을 사용하여 동결 건조를 통해 센스 및 안티센스 가닥의 이중화를 수행하였다.
- [0584] [00471] siRNA에 대한 센티린 접합, 접합체 정제 및 분석:
- [0585] [00472] 센티린은 말레이미드를 통한 시스테인 특이적 화학을 통해 siRNA에 접합되었다.
- [0586] [00473] PBS에서 50~200 μM의 시스테인 함유 센티린을 실온에서 10 mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(tris(2-carboxyethyl) phosphine, TCEP)으로 환원시켜(30분) 유리 티올을 생성하였다. 그런 다음 유리 티올 함유 센티린을 물 비율 약 1.5:1 센티린:siRNA로 즉시 물에서 말레이미드 함유 siRNA 이중 가닥과 혼합하였다. RT 또는 37 °C에서 2시간 동안 배양한 후, 반응을 N-에틸 말레이미드(반응 혼합물에서 1 mM 최종 NEM 농도)로 급냉하였다. 접합체는 두 단계로 정제하였다. 1단계는 고정화된 금속 친화도 크로마토그래피(태그된 단백질의 경우) 또는 소수성 상호 작용 크로마토그래피(태그 없는 단백질의 경우)로, 미반응 siRNA 링커를 제거한다. 2단계-Capto-DEAE로, 미반응 센티린을 제거한다. 접합체를 함유하는 분획을 모아, 투석을 사용하여 탈염하여 HBS로 교환하고, 그리고 필요한 경우 농축하였다.
- [0587] [00474] 센티린-siRNA 접합체의 분석적 특성 분석:

[0588] [00475] 센티린-siRNA 접합체는 여러 분석 기술을 조합하여 특성 분석하였다. SDS-PAGE를 사용하여 접합체의 양과 유리 단백질의 양을 비교하였다. SDS-PAGE의 경우, 4~20% Mini-PROTEAN®TGX Stain-Free™ 단백질 겔(BioRad)을 SDS 완충액에서 100 V에서 1시간 동안 실행하였다. 겔은 자외선 아래에서 시각화하였다. 분석용 SEC(Superdex-75 5/150 GL 컬럼-GE)를 사용하여 센티린-siRNA 접합체의 순도와 응집 상태를 분석하였다. 액체 크로마토그래피/질량 분석법(Liquid chromatography/mass spectrometry, LCMS)을 사용하여 접합체의 동일성과 순도를 확인하였다. 샘플은 Waters Acuity UPLC/Xevo G2-XS TOF 질량 분석기 시스템을 사용하여 분석하였다. 이 기기는 음성 전기 분무 이온화 모드에서 작동하고 m/z 200에서 3000까지 스캔하였다. 접합체는 안티센스와 센스-센티린의 두 단편으로 보였다.

[0589] [00476] siRNA에 대한 센티린 접합, 접합체 정제 및 분석: 센티린은 말레이미드를 통한 시스테인 특이적 화학을 통해 siRNA에 접합되었다. 50~200 μ M의 PBS에 시스테인 함유 센티린을 실온에서 10 mM 트리스(2-카복시에틸)포스핀(tris(2-carboxyethyl) phosphine, TCEP)으로 환원시켜(30분) 유리 티올을 생성하였다. 그런 다음 유리 티올 함유 센티린을 물 비율 약 1.5:1 센티린:siRNA로 즉시 물에서 말레이미드 함유 siRNA 이중 가닥과 혼합하였다. RT 또는 37 °C에서 2시간 동안 배양한 후, 반응을 N-에틸 말레이미드(반응 혼합물에서 1 mM 최종 NEM 농도)로 급냉하였다. 접합체는 두 단계로 정제하였다. 1단계는 고정화된 금속 친화도 크로마토그래피(태그된 단백질의 경우) 또는 소수성 상호 작용 크로마토그래피(태그 없는 단백질의 경우)로, 미반응 siRNA 링커를 제거한다. 2단계-Capto-DEAE로, 미반응 센티린을 제거한다. 접합체를 함유하는 분획을 모아, 투석을 사용하여 탈염하여 HBS로 교환하고, 그리고 필요한 경우 농축하였다.

[0590] [00477] 도 6: 태그된 단백질에 대한 IMAC 크로마토그래피. IMAC의 경우, Cytiva의 Histrap HP 컬럼(1 ml, 5 ml)을 사용하였다. Histrap 완충액 A(결합 완충액)는 1형 H2O에 50 mM 트리스 pH 7.4, 500 mM NaCl 및 10 mM 이미다졸, Histrap 완충액 B(용출 완충액): 1형 H2O에 50 mM 트리스 pH 7.4, 500 mM NaCl 및 250 mM 이미다졸이었다. 반응 샘플은 샘플 루프 또는 샘플 펌프를 통해 컬럼에 직접 주사하였다. 샘플 적용 후, 컬럼을 완충액 A의 5~10 CV로 세척한다. 용출은 일반적으로 단계적 기울기(0~100%)로 시작한다. UV 관독값이 50 mAU 이상일 때 분획 수집기와 피크 단편화를 사용하여 분획을 수집하였다.

[0591] [00478] 도 7: 태그 없는 단백질의 HIC(과잉 siRNA 제거). HIC의 경우, Cytiva의 HiTrap Butyl HP 컬럼(1 ml, 5 ml)을 사용하였다. HIC 완충액 A(결합 완충액)는 1형 H2O에 2 M 황산 암모늄, 25 mM 인산 나트륨 pH 7.0인 반면, HIC 완충액 B(용출 완충액): 1형 H2O에 25 mM 인산 나트륨 pH 7.0이었다. 결합 반응 샘플은 완충액 A와 1:1 비율로 희석한다. 위에서 준비한 샘플은 샘플 루프 또는 샘플 펌프를 통해 컬럼에 주사하였다. 샘플 적용 후, 컬럼을 5 CV의 완충액 A로 세척한다. 용출은 일반적으로 0.0 %B로 시작한 다음 아래 표 8과 같이 기울기를 적용한다. UV 관독값이 50 mAU 이상일 때 분획 수집기와 피크 단편화를 사용하여 분획을 수집한다.

표 8

[0592]

	유형	%B	길이(CV)
1	선형	30 내지 90	3.00
2	선형	35.0	10.00
3	선형	100.0	10.00
4	선형	100.0	5.00

[0593] [00479] 링 개방-역 마이클 반응을 통한 화물 손실을 방지하기 위해, 말레이미드 링 가수분해를 수행한다. 히스 트랩(태그된 단백질) 또는 HIC(태그 없는 단백질)에서 모은 분획을 25 mM TRIS pH 8.9 완충액에 투석한다. 이 완충액에서 반응을 37도 C의 진탕 배양기에 72시간 동안 넣는다. LC-MS로 반응 완료를 모니터링한다.

[0594] [00480] 도 8: 이온 교환 크로마토그래피(Ion-exchange chromatography, IEX)-태그된 단백질과 태그 없는 단백질(과도한 미반응 센티린 제거). IEX 크로마토그래피의 경우, Cytiva의 HiTrap Capto DEAE 컬럼(1 ml, 5 ml)을 사용하였다. Capto DEAE 완충액 A(결합 완충액)는 1형 H2O에 25 mM Tris pH 8.8인 반면, 사용된 Capto DEAE 완충액 B(용출 완충액)는 1형 H2O에 25 mM Tris pH 8.8, 1 M NaCl이었다.

[0595] [00481] 링 개방 후 샘플은 샘플 루프 또는 샘플 펌프를 통해 컬럼에 직접 주사하였다. 샘플을 적용한 후, 컬럼을 5~10 CV의 완충액 A로 세척한다. 용출은 일반적으로 0.0 %B로 시작한 다음 아래 표 9와 같이 기울기를 적용한다.

[0596] [00482] 미반응 단백질은 일반적으로 첫 번째 피크인 유동 흐름에서 용출되고 두 번째 피크는 일반적으로 순수한 접합체이다. 모든 분획을 수집하여 모은다. 폴의 농도는 수율 계산을 위해 Nanodrop을 사용하여 A260을 측정하여 결정한다.

표 9

[0597]

1	선형	20	5
2	선형	100	15
3	선형	100	5

[0598] [00483] 도 9: 센티린-올리고뉴클레오타이드 접합체의 분석적 SEC의 예. 센티린-siRNA 접합체는 분석 기술의 조합으로 특성 분석하였다. 분석적 SEC는 센티린-siRNA 접합체의 순도와 응집 상태를 분석하는 데 사용하였다. Waters H-class UPLC와 Waters ACQUITY UPLC 단백질 BEH SEC 컬럼, 125 Å, 1.7 µX mm를 일상적인 SEC 분석에 사용하였다. 일반적으로, 2-5 µl 샘플은 자동 샘플러를 사용하여 주사하였고, 유속은 0.25 ml/min이었고 사용된 이동상은 1 X PBS 또는 100 mM, pH 7.2 인산 완충액이었다.

[0599] [00484] 도 10: 접합체의 SDS PAGE 겔의 예. SDS-PAGE는 접합체와 유리 단백질의 양을 비교하는 데 사용하였다. SDS-PAGE 겔을 수행하기 위해, Invitrogen Mini Gel 탱크, PowerEase™Touch 600W 전원 공급 장치와 115 VAC를 사용하였다. Invitrogen - NuPAGE™4-12% Bis-Tris 단백질 겔, 1.0 mm를 20 × NuPAGE®MES SDS Running Buffer 및 SeeBlue™사전 염색 단백질 표준과 함께 사용하였다. 초순수로 약 0.5 mg/mL로 정규화된 샘플. 비환원 겔의 경우, 정규화된 샘플 10 µL를 2 x Laemmli 샘플 완충액 10 µL와 1:1 비율로 혼합한다. 환원 겔의 경우, 2 x Laemmli 샘플 완충액을 β과 95:1 비율로 혼합한 다음, 샘플 10 µL와 1:1 비율로 혼합한다. 생성된 샘플 혼합물을 95 °C에서 5분간 끓인 다음 Thermocycler에서 식혔다. 15 µL의 샘플과 Protein Ladder를 적절한 웰에 적재하고 전압을 200 V로 설정하고 실행 시간을 약 30분으로 설정하였다. 겔 실행이 완료되면, Coomassie blue 또는 SYBR Green 또는 메틸렌 블루로 시각화하였다. 가장 왼쪽 선이 Protein Ladder이고, 다음은 센티린 자체이고, 마지막은 센티린-siRNA 접합체이다.

[0600] [00485] 후보 siRNA 서열은 다양한 농도에서 인간 세포(H358)에 형질감염되었다. RNA는 형질감염 24시간 후에 수확하였고 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 통해 GYS1 수준을 분석하였다. 18S 리보솜 RNA는 RT-PCR 내인성 대조군 유전자로 사용하였다. 녹다운 수준은 미처리 세포와 비교하였다. EC50 값은 Graphpad Prism 소프트웨어를 사용하여 계산하였고 Emax 값은 관찰된 GYS1 mRNA의 최대 녹다운 백분율을 나타낸다(표 10).

표 10

[0601]

siRNA	참조	EC50(pM)	Emax(%)
A	ABX08	3.841	70
B	ABX09	10.02	70.2
C	ABX012	12.62	71.5
D	ABX0110	21.73	87.9
E	ABX0113	23.74	82.1
F	ABX0114	6.716	75.5
G	ABX0115	4.5	75.2
H	ABX0116	0.7542	69.4
I	ABX0117	20.87	93.8
J	ABX0122	8.93	65.6
K	ABX0123	4.049	75.5
L	ABX0124	2.642	70.5
M	ABX0125	0.8761	53.3
N	ABX0128	2.549	76.3
O	ABX0129	0.4961	64.3
P	ABX0139	0.6143	70.6
Q	ABX0142	23.19	80.3
R	ABX0150	58.88	96.1
S	ABX0151	1.502	75.6
T	ABX0152	24.76	91.1

U	ABX0155	5.893	60.2
V	ABX0156	0.6893	57.6
W	ABX0160	0.787	80.1
X	ABX0168	8.662	75.7
Y	ABX0171	38.82	69.2
Z	ABX0191	54.2	75.4
AA	ABX0197	19.8	77.1
BB	ABX0201	7.1	75.6
CC	ABX0203	5.7	74.9
DD	ABX0205	9.8	80.4

[0602] 다른 siRNA도 전술한 바와 같이 시험하였고, 해당 EC50은 표 11에 나와 있다.

표 11

siRNA 쌍	EC50(pM)
EE	1.8
FF	6
GG	5.9
HH	15.1
II	8.2
JJ	25.2
KK	
LL	1.35
MM	3.74
NN	5.66
OO	5.56
PP	6.34
QQ	11.76
RR	2.85
SS	3.35
TT	5.67
UU	0.4
VV	3.72
WW	3.15
XX	2.57
YY	1.64
ZZ	1.56
AAA	ND
BBB	4.87
CCC	2.65
DDD	2.66
EEE	1.21
FFF	1.31
GGG	NA

[0604] [00486] 후보 siRNA 서열의 선택성은 다양한 농도에서 siRNA를 인간 세포(HEK-293)로 형질감염시켜 평가하였다. 세포 생존율은 CellTiterGlo를 사용하여 형질감염 후 72시간 후에 평가하였다. Emax 값은 시험된 가장 높은 siRNA 농도(10 nM)에서 세포 생존율의 최대 감소 백분율로 보고한다(표 12).

표 12

siRNA 쌍	참조	(10 nM에서) Emax, %
A	ABX08	5.52
B	ABX09	-0.3
C	ABX012	31.67
D	ABX0110	25.68

E	ABX0113	22.83
F	ABX0114	-1.1
G	ABX0115	30.85
H	ABX0116	29.27
I	ABX0117	35.19
J	ABX0122	28.25
K	ABX0123	17.21
L	ABX0124	24.09
M	ABX0125	71.45
N	ABX0128	42.41
O	ABX0129	58.02
P	ABX0139	34.44
Q	ABX0142	8.94
R	ABX0150	16.06
S	ABX0151	60.95
T	ABX0152	42.84
U	ABX0155	54.4
V	ABX0156	34.1
W	ABX0160	-4.59
X	ABX0168	51.66
Y	ABX0171	4.79
Z	ABX0191	46.41
AA	ABX0197	25.01
BB	ABX0201	46.92
CC	ABX0203	15.18
DD	ABX0205	60.13

[0606] [00487] 실시예 2: CD71에 결합하는 피브로넥틴 III형(fibronectin type III, FN3) 도메인 선택

[0607] [00488] CD71에 결합하고 CD71에 대한 트랜스페린 결합을 억제하지 않는 FN3 도메인을 식별하기 위한 패닝 및 생화학적 스크리닝 방법. CD71에 특이적으로 결합하고 CD71에 대한 트랜스페린 결합을 억제하지 않는 FN3 도메인을 스크리닝하기 위해, 스트랩타비딘으로 코팅한 Maxisorp 플레이트(Nunc 카탈로그 436110)를 Starting Block T20(Pierce)에서 1시간 동안 차단한 다음, 비오틴화된 CD71(패닝에서와 동일한 항원 사용) 또는 음성 대조군(관련 없는 Fc 융합 재조합 단백질 및 인간 혈청 알부민)과 함께 트랜스페린 존재하에 또는 CD71 트랜스페린 결합 부위에 결합하는 FN3 단백질로 1시간 동안 코팅한다. 트랜스페린의 농도는 최대 35 μ M이다. 어떤 특별한 이론에 얽매이지 않고, CD71 트랜스페린 결합 부위에 결합하는 트랜스페린이나 FN3 단백질을 포함시키면 FN3 도메인이 CD71에 대한 트랜스페린 결합과 경쟁하거나 억제하지 않는 도메인으로 선택된다. 플레이트를 TBST로 행군 다음 희석된 용해물을 플레이트에 1시간 동안 적용한다. 추가 행군 후, 웰을 HRP-결합 항-V5 태그 항체(Abcam, ab1325)로 1시간 동안 처리한 다음 POD(Roche, 11582950001)로 검정한다. 스트랩타비딘 대조군보다 적어도 10배 높은 ELISA 신호를 갖는 FN3 도메인 용해물의 DNA를 서열 분석하여 스크리닝에서 단리된 FN3 도메인 서열을 얻는다.

[0608] [00489] 실시예 3: CD71에 결합하고 트랜스페린과 경쟁하지 않는 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인 선택

[0609] [00490] 트랜스페린과 경쟁하지 않거나 최소한으로 경쟁하는 CD71 결합 FN3 도메인을 식별하기 위해 편향된 CIS-디스플레이 전략을 설계하였다. 간단히 말해, 인간 CD71의 ECD에서 5라운드 패닝 후 회수된 출력을 사용한다(실시예 3). 최종 용출 단계 전에 트랜스페린과 동일한 부위에 결합된 센티린을 용출하기 위해 인간 홀로 트랜스페린으로 세척 단계를 추가하거나 2) 단클론 항체 OKT9로 FN3 도메인 결합체를 용출하여 실시예 3에 설명된 대로 추가 라운드의 오프올 선택을 수행하였다. 트랜스페린 세척 전략과 OKT9 용출 전략에서 회수된 FN3 도메인을 PCR 증폭하여 이전에 설명된 대로 pET 벡터에 클로닝하였다. huCD71에 특이적으로 결합한 228개의 FN3 도메인은 huCD71 ECD에 결합하는 것을 ELISA로 확인하였다. 고유한 결합체의 하위 집합은 SEC로 분석하고, MMAF에 접합하고, 그리고 SKBR-3 세포 +/- 홀로 인간 트랜스페린에서 세포 생존력 검정을 통해 내재화를 평가하였다. 폴리펩티드는 수용체에 의해 내재화되는 것으로 밝혀졌다.

[0610] [00491] 막 프로테옴 어레이(membrane proteome array, MPA) 검정은 서열 번호 509의 서열을 포함하는 폴리펩티드와 서열 번호 509를 포함하는 폴리펩티드를 siRNA 쌍에 연결하고, 링커 번호가 siRNA 쌍 0000에 기재된 서

열 및 링커를 포함하는 siRNA 쌍에 인간 막 단백질 라이브러리에 대한 특이성을 프로파일링하기 위해 수행하였다. MPA 라이브러리에는 GPCR, 이온 채널 및 수송체를 포함하여 모든 단일 통과, 다중 통과 및 GPI 고정 단백질의 94%를 포함하여 6,000개 초과인 인간 막 단백질이 함유되어 있고, 각 막 단백질은 조류 QT6 세포 배지에서 고유하게 발현된다. 유세포 분석은 고정되지 않은 세포에서 개별적으로 발현되는 막 단백질에 대한 리간드(FN3 도메인) 결합을 직접 검출하는 데 사용된다.

[0611] [00492] 서열 번호 509를 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호 509의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 siRNA 쌍 0000에 기재된 서열 및 링커를 포함하는 링커 번호로 siRNA 쌍에 연결하여 MPA에 대해 각각 최적의 신호/배경 잡음 비율인 1.25 ug/ml, 1.25 ug/ml 및 0.31 ug/ml의 농도에서 스크리닝하였다. 스크리닝에서 식별된 막 단백질 표적은 리간드 연속 희석과 식별된 표적을 개별적으로 형질전환한 세포를 사용하는 검증 절차를 거쳐 추적하였다. 스크리닝을 통해 폴리펩티드가 CD71에 결합하는 데 특이적이었고 폴리펩티드에 접합된 siRNA를 추가해도 특이성이 변하지 않는다는 것을 확인하였다.

[0612] [00493] 실시예 4: CD71 FN3 도메인-올리고뉴클레오타이드 접합체를 사용한 근육 세포에서 mRNA의 녹다운

[0613] [00494] muCD71 결합 FN3 도메인은 FN3 도메인에 고유하게 조작된 시스테인을 통해 말레이미드 화학을 사용하여 siRNA 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide, ASO)에 접합된다. 시스테인 치환은 본원에 제공된 것과 같은 것일 수 있고, 또한 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 출원 공개 제20150104808호에 제공된 것과 같은 것일 수 있다. siRNA 또는 ASO는 표준 화학적 변형으로 변형되고 시험관 내에서 표적 mRNA의 녹다운을 가능하게 하는 것을 확인한다. FN3 도메인-올리고뉴클레오타이드 접합체는 올리고뉴클레오타이드 페이로드당 최대 10 mg/kg의 용량으로 마우스에 정맥 주사로 투여한다. 투여 후 다양한 시점에서, 마우스를 희생시키고, 골격근, 심장근 및 기타 다양한 조직은 회수하여 필요할 때까지 RNeasyTM(Sigma Aldrich)에 보관한다. 표적 유전자 녹다운은 표준 qPCR $\Delta\Delta C_T$ 방법과 표적 유전자 및 대조군 유전자에 대한 특정 프라이머를 사용하여 평가한다. 표적 유전자는 근육에서 녹다운된 것으로 밝혀졌고 이러한 녹다운은 siRNA 또는 ASO를 CD71 FN3 결합 도메인에 접합하여 향상된다.

[0614] [00495] 시험된 FN3-siRNA 접합체는 아래 표 13에 설명된 바와 같다.

표 13

[0615]

접합체	CD71 FN3 도메인(센티린)	GYS1 siRNA 쌍
ABXC-1	서열 번호 572	RRRR
ABXC-2	서열 번호 572	SSSS
ABXC-3	서열 번호 572	TTTT
ABX1005	서열 번호 572	비-GYS1 표적/대조군
ABXC-27	서열 번호 572	A
ABXC-28	서열 번호 572	QQQQ
ABXC-29	서열 번호 572	PPPP

[0616] [00496] 도 4a는 운반체만 투여한 경우와 비교하여 세 가지 상이한 FN3 도메인-siRNA 접합체를 사용하여 마우스 비복근에서 GYS1 mRNA의 녹다운을 도시한다. 효능 시험을 위해, 수컷 GAA^{-/-} 마우스(4~5주령)를 Jackson Laboratories에서 구입하였다. 모든 동물은 IACUC 프로토콜에 따라 처리하였다. 다섯 마리의 동물에게 5.4 mg/kg의 세 가지 상이한 FN3 도메인-siRNA 접합체(3 mpk Gys1siRNA) 또는 운반체를 단일 꼬리 정맥 정맥 내 볼루스 주사하였다. 단일 투여 4주 후에, 마우스를 안락사시키고 비복근을 RNeasy에 수집하고, 4 °C에서 밤새 보관하며 -80 °C에서 동결하였다. Qiagen의 RNeasy 섬유 조직 키트를 사용하여 비복근에서 총 RNA를 분리하였다. 표적 Gys1과 내인성 대조군(Pgk1, Ubc, Hprt1 및 Aha1)의 발현 수준은 실시간 정량 PCR을 사용하여 분석하였다. 데이터는 운반체만 투여한 대조군 동물에 정규화하여 $\Delta\Delta C_T$ 방법을 사용하여 분석하였다. FN3 도메인-siRNA 접합체 처리군에서 Gys1 mRNA의 녹다운 백분율은 남은 Gys1 mRNA 수준의 백분율을 100으로 빼서 측정하였다. 통계적 유의성은 GraphPad Prism 소프트웨어에서 Dunnett의 다중 비교 검사를 사용한 일원 분산 분석(One-way ANOVA)을 사용하여 계산하였다. 통계적 유의성은 별표 ***p < 0.001로 도면에 표시한다.

[0617] [00497] 도 4b는 운반체만 투여한 경우와 비교하여 세 가지 상이한 FN3 도메인-siRNA 접합체를 사용하여 마우스 비복근에서 GYS1 단백질의 녹다운을 도시한다. 비복근에서 Gys1 단백질 정량은 RIPA 완충액에서 비복근을 균질화하여 수행하였다. 비복근의 단백질 농도는 Bradford 검정을 사용하여 측정하였다. Gys1 수준은 12~230 kDa Jess 분리 모듈(SM-W004)에 대한 제조업체의 표준 방법을 사용하여 정량화하였다. 단백질은 Protein Simple의

독점적인 광활성화 포획 화학을 사용하여 모세관에 고정하여 분리하였다. 항-Gys1 1차 항체는 1:100 희석으로 사용하였다. 화학 발광 계시는 과산화물/루미놀-S를 사용하여 확립하였다. 모세관의 화학 발광의 디지털 이미지는 높이(화학 발광 강도), 면적, 및 신호/잡음 비율을 자동으로 측정하는 Compass' Simple Western 소프트웨어를 사용하여 캡처하였다. 각 실행에 내부 시스템이 포함되었다. FN3 도메인-siRNA 접합체 처리군의 피크 면적 값은 운반체 처리 조직에 대해 정규화하였고, 처리군에서 Gys1 단백질의 녹다운 백분율은 남은 Gys1 단백질 수준의 백분율을 100으로 빼서 측정하였다. 통계적 유의성은 GraphPad Prism 소프트웨어에서 Dunnett의 다중 비교 검사를 사용한 일원 분산 분석(One-way ANOVA)을 사용하여 계산하였다. 통계적 유의성은 별표 ***p < 0.001로 도면에 표시한다.

[0618] [00498] 도 5는 GYS1 녹다운이 상이한 표적(AHA-1)에 대한 siRNA와 비교하여 세 가지 상이한 FN3 도메인-siRNA 접합체를 사용하여 골격근에 대해 매우 특이적임을 도시한다. 수컷 GAA^{-/-} 마우스(8~9주령)는 Jackson Laboratories에서 구입하였다. 모든 동물은 IACUC 프로토콜에 따라 처리하였다. 세 마리의 동물에게 세 가지 상이한 FN3 도메인-siRNA 접합체(10 mpk Gys1siRNA) 17.9 mg/kg, 한 가지 FN3 도메인-siRNA 접합체(10 mpk Aha1 siRNA) 17.9 mg/kg 또는 운반체를 단일 꼬리 정맥 정맥 내 볼루스 주사하였다. 단일 투여 2주 후에, 마우스를 안락사시켰다. 비복근, 대퇴사두근, 횡격막, 심장, 간, 및 신장 조직을 RNAlater에 수집하여, 4 °C에서 밤새 보관하고 그리고 -80 °C에서 동결시켰다. Qiagen의 RNeasy 섬유 조직 키트를 사용하여 조직에서 총 RNA를 단리하였다. 표적 Gys1/Aha1과 내인성 대조군(Pgk1)의 발현 수준은 실시간 정량 PCR을 사용하여 분석하였다. 데이터는 운반체만 투여한 대조군 동물로 정규화하는 $\Delta \Delta C_t$ 방법을 사용하여 분석하였다.

[0619] [00499] **실시예 5: ABX-HHH 처리 및 미처리 세포를 비교하는 RNA-seq 실험.**

[0620] [00500] mRNA 서열 분석은 HEK293T 세포를 10 nM ABXO-HHH로 24시간 동안 리포펙션한 후 polyA⁺ 선택 mRNA에서 수행하였다. 처리당 6회 반복하여 3천만 초과의 평균 깊이 관독으로 서열 분석하였다. 라이브러리는 Kallisto를 사용하여 90% 초과 매핑 비율로 GRCh38 전사체에 유사 정렬되었다. 이 화산 플롯의 값은 ABXO-HHH 처리 RNA-seq 라이브러리와 미처리 세포를 비교하기 위해 DESeq2를 사용하여 생성되었다. 도 2의 플롯에 있는 각 점은 유전자에서 측정된 발현 변화를 나타낸다. X축은 모든 유전자에 대한 유전자 발현의 $\log_2$ 배수 변화(ABXO-HHH를 미처리로 나눈 값)를 나타낸다. Y축은 음의 $\log_{10}$ 변환된 조정된 P 값을 도시한다. 검은색 화살표는 플롯에서 GYS1을 가리킨다.

[0621] [00501] **실시예 6: CD71 FN3 도메인 siRNA 접합체의 결합 특이성.**

[0622] [00502] 막 프로테옴 어레이(MPA) 검정을 수행하여 인간 막 단백질 라이브러리에 대한 CD71 FN3 도메인 및 CD71 FN3 도메인 siRNA 접합체의 특이성을 프로파일링하였다(도 3). MPA에는 6,000개가 넘는 인간 막 단백질이 함유되어 있고, GPCR, 이온 채널 및 수송체를 포함하여 모든 단일 통과, 다중 통과 및 GPI 고정 단백질의 94%를 차지하며, 각 막 단백질은 조류 QT6 세포 배경에서 고유하게 발현된다. 유세포 분석은 고정되지 않은 세포에서 개별적으로 발현되는 막 단백질에 대한 FN3 도메인 결합을 직접 검출하는 데 사용하였다.

[0623] [00503] FN3 도메인 및 FN3 도메인-siRNA 접합체는 각각 1.25 ug/ml 또는 0.31 ug/ml의 최적 신호/배경 잡음 비율을 갖는 농도에서 MPA에 대해 스크리닝하였다. 스크리닝에서 식별된 막 단백질 표적은 식별된 표적을 고유하게 발현하는 세포에서 리간드 연속 희석을 사용하여 검증하였다.

[0624] [00504] **실시예 7: 효소 대체 요법(ERT) 치료제와 공동 투여되는 CD71에 결합하는 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인을 포함하는 조성물을 사용한 글리코겐 저장 질환 치료**

[0625] [00505] 폼페병이 있는 대상에게 GYS1을 표적으로 하는 siRNA에 연결된 CD71 결합 FN3 도메인과 효소 포도당분해효소 알파산(GAA)을 포함하는 조성물을 공동 투여한다. 효소 대체 요법 치료제만을 받는 대상과 비교했을 때, GYS1을 표적으로 하는 siRNA에 연결된 CD71 결합 FN3 도메인과 포도당분해효소 알파산 ERT를 모두 받는 대상은 ERT로 GAA만을 투여한 경우에 비해 반응이 더 향상되고 증상이 더 많이 감소한다.

[0626] [00506] **실시예 8: 효소 대체 요법(ERT) 치료제와 공동 투여되는 CD71에 결합하는 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인을 포함하는 조성물을 사용한 글리코겐 저장 질환 치료**

[0627] [00507] 코리병이 있는 대상에게 글리코겐 탈분지 효소(AGL)와 함께 GYS1을 표적으로 하는 siRNA에 연결된 CD71 결합 FN3 도메인을 포함하는 조성물을 공동 투여한다. 효소 대체 요법 치료제만을 받는 대상과 비교했을 때, GYS1을 표적으로 하는 siRNA에 연결된 CD71 결합 FN3 도메인과 글리코겐 탈분지 효소 ERT를 모두 받는 대상은 AGL ERT 치료제 투여에 비해 반응이 더 향상되고 증상이 더 많이 감소한다.

[0628] [00508] 실시예 9: CD71에 결합하는 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인을 포함하는 조성물을 효소 대체 요법(ERT) 치료제와 공동 투여하는 약력학적 효과를 평가하기 위한 반복 투여 시험

[0629] [00509] 반복 투여 시험은 CD71 결합 FN3 도메인을 단일 요법 또는 효소 대체 요법 치료제와 병용하여 사용하는 약력학적 효과를 평가하기 위해 수행하였다.

[0630] [00510] 실험 조건: ABXC-29는 설치류 CD71 결합 센티린(서열 번호 572)으로 구성되고, 이는 설치류 특이적 GYS1 siRNA ABXO-371(서열 번호 711의 센스 가닥 및 서열 번호 712의 안티센스 가닥)에 화학적으로 접합된다. ABXC-29는 인간 CD71에 결합하는 폴리펩티드를 포함하는 거대 분자의 대용물로 마우스에서 사용하였고, 이는 인간 CD71 결합 센티린(서열 번호 509)으로 구성되며, 이는 인간 특이적 GYS1 siRNA(서열 번호 706의 센스 가닥 및 서열 번호 707의 안티센스 가닥)에 화학적으로 접합된다. 제조합 인간 산성 알파-포도당분해효소(rhGAA)는 GAA 매개 또는 GAA 연관 질환을 치료하기 위한 효소 대체 요법 치료제에 사용된다. 이 시험은 스무(20) 마리의 수컷 GAA $-/-$ 마우스(B6;129-Gaa^{tm1Rabn}; J 균주, 스톡 번호 004154; 6^{ne}; Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)와 다섯(5) 마리의 야생형 마우스(C57BL/6J, 스톡 번호 000664; Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)에서 수행하였다. 야생형 마우스 다섯 마리와 GAA $-/-$ 마우스 다섯 마리는 운반체(HBS)로만 치료하였다. GAA $-/-$ 마우스 다섯 마리는 단일 요법으로 ABXC-29의 반복 정맥 투여로 치료하였다. GAA $-/-$ 마우스 다섯 마리는 단일 요법으로 rhGAA의 반복 투여로 치료하였다. GAA $-/-$ 마우스 다섯 마리는 rhGAA와 함께 ABXC-29로 병용 요법으로 치료하였다.

[0631] [00511] 치료 후 근육 세포 및 심장 세포에서의 글리코겐 합성효소 1 mRNA 발현: 결과는 아래 표 14에 나타나 있고, GAA $-/-$ 마우스에서 운반체의 백분율로 표현한다. 3 mg/kg의 ABXC-29를 반복 투여한 지 2주 후, Gys1 mRNA 발현은 횡격막에서 83%, 대퇴사두근에서 81%, 그리고 비복근과 심장 모두에서 84% 감소하였다. rhGAA를 단독 요법으로 투여한 경우, Gys1 mRNA 발현에 대한 효과는 관찰되지 않았다. ABXC-29와 rhGAA를 병용 요법으로 투여한 경우, Gys1 mRNA 발현은 횡격막에서 79%, 비복근에서 84%, 그리고 대퇴사두근에서 83% 감소하여, rhGAA 투여가 근육 세포에서 ABXC-29의 활성화에 영향을 미치지 않았음을 나타낸다. 반면, 심장 세포에서, ABXC-29와 rhGAA를 공동 투여한 결과 Gys1 mRNA 발현이 22% 감소하였는데, 이는 심장 세포에서 ABXC-29의 활성화에 미치는 영향이 적다는 것을 제시하고, 이는 임상적으로 관련이 있을 수 있다.

표 14

[0632]

	비복근 Gys1 mRNA 감소율	대퇴사두근 Gys1 mRNA 감소율	심장 Gys1 mRNA 감소율	횡격막 Gys1 mRNA 감소율
ABXC-29(10mg/kg)	84%	81%	76%	NA
ABXC-29(3mg/kg)	84%	81%	84%	83%
rhGAA	NS	NS	NS	NS
ABXC-29(3mg/kg) + rhGAA	84%	83%	22%	79%

[0633] NS = 유의하지 않음(not significant); NA = 사용할 수 없음(not available)

[0634] [00512] 치료 후 근육 세포의 글리코겐 수준: 결과는 아래 표 15에 나와 있고, μ g 글리코겐/mg 조직으로 표현한다. 단일 요법으로 ABXC-29 3 mg/kg을 반복 투여한 결과 글리코겐 수준이 비복근에서 23% 그리고 대퇴사두근에서 67% 감소하였다. 단일 요법으로 rhGAA를 투여한 결과 글리코겐이 비복근에서 33% 그리고 대퇴사두근에서 35% 감소하였다. ABXC-29(3 mg/kg)와 rhGAA를 병용 요법으로 투여한 결과 글리코겐이 비복근에서 48% 그리고 대퇴사두근에서 42% 감소하였다. 이러한 결과는 두 가지 치료제의 상승 효과를 보여준다. 아래에 설명된 대로, 두 가지 치료제의 조합은 ABXC-29의 10 mg/kg 용량의 단일 요법 용량과 유사한 반응을 생성하였고 ABXC-29의 3 mg/kg 용량의 단일 요법 용량의 반응보다 높았고 rhGAA 단일 요법 용량보다 높았다. 이러한 결과는 예측할 수 없었다.

표 15

[0635]

	비복근 글리코겐 수준 감소율	대퇴사두근 글리코겐 수준 감소율
ABXC-29(10 mg/kg)	53%	67%
ABXC-29(3 mg/kg)	23%	27%
rhGAA	33%	35%

ABXC-29(3 mg/kg) + rhGAA	48%	42%
--------------------------	-----	-----

[0636] [00513] 일반 방법

[0637] [00514] 분자 생물학의 표준 방법은 문헌[Sambrook, Fritsch and Maniatis (1982 & 1989 2nd Edition, 2001 3rd Edition) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning, 3rd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA)]에 설명되어 있다. 표준 방법은 문헌[Ausbel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology, Vols.1-4*, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY]에도 나와 있고, 이는 박테리아 세포에서의 클로닝과 DNA 돌연변이 (Vol. 1), 포유류 세포와 효모에서의 클로닝(Vol. 2), 당접합체와 단백질 발현(Vol. 3), 및 생물정보학(Vol. 4)에 대해 설명한다.

[0638] [00515] 면역침전, 크로마토그래피, 전기영동, 원심분리, 및 결정화를 포함한 단백질 정제 방법이 설명되어 있다(문헌[Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science, Vol. 1*, John Wiley and Sons, Inc., New York]). 화학 분석, 화학 변형, 번역 후 변형, 융합 단백질의 생산, 단백질의 당화가 설명되어 있다(예를 들어, 문헌[Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science, Vol. 2*, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 3*, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391] 참조). 다클론 및 단클론 항체의 생산, 정제, 및 단편화가 설명되어 있다(문헌[Coligan, et al. (2001) *Current Protocols in Immunology, Vol. 1*, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, *supra*]). 리간드/수용체 상호 작용을 특성 분석하기 위한 표준 기술을 사용할 수 있다(예를 들어, 문헌[Coligan, et al. (2001) *Current Protocols in Immunology, Vol. 4*, John Wiley, Inc., New York] 참조).

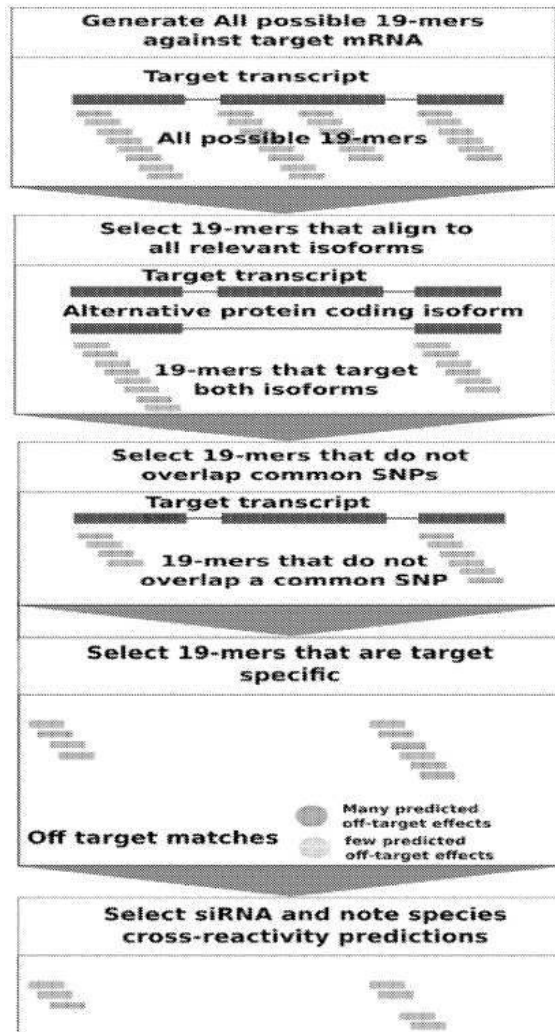
[0639] [00516] 본원에 인용된 모든 참조는 각 개별 간행물, 데이터베이스 항목(예: 유전자은행 서열 또는 GeneID 항목), 특허 출원, 또는 특허가 참조로 포함되도록 구체적이고 개별적으로 표시된 것처럼 동일한 범위로 참조로 포함된다. 이 참조에 의한 포함 진술은 37 C.F.R. §에 따라 출원인이 의도한 대로, 37 C.F.R. §에 따라 명확하게 식별되는 각각의 및 모든 개별 간행물, 데이터베이스 항목(예: 유전자은행 서열 또는 GeneID 항목), 특허 출원, 또는 특허와 관련되고, 이러한 인용이 참조에 의한 포함에 대한 전용 진술과 바로 인접하지 않더라도 마찬가지이다. 명세서에 참조에 의한 포함에 대한 전용 진술이 포함되어 있는 경우, 이러한 일반적인 참조에 의한 포함에 대한 진술을 어떤 식으로든 약화시키지 않는다. 본원에 참조문헌을 인용하는 것은 참조문헌이 관련 선행 기술임을 인정하는 것이 아니고, 이러한 간행물이나 문서의 내용이나 날짜에 대한 인정을 구성하지도 않는다.

[0640] [00517] 본 구현예는 본원에 설명된 특정 구현예에 의해 범위가 제한되지 않는다. 실제로, 본원에 설명된 것 외에도 구현예의 다양한 변형은 전술한 설명에서 당업자에게 명백해질 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구항의 범위 내에 포함되도록 의도된다.

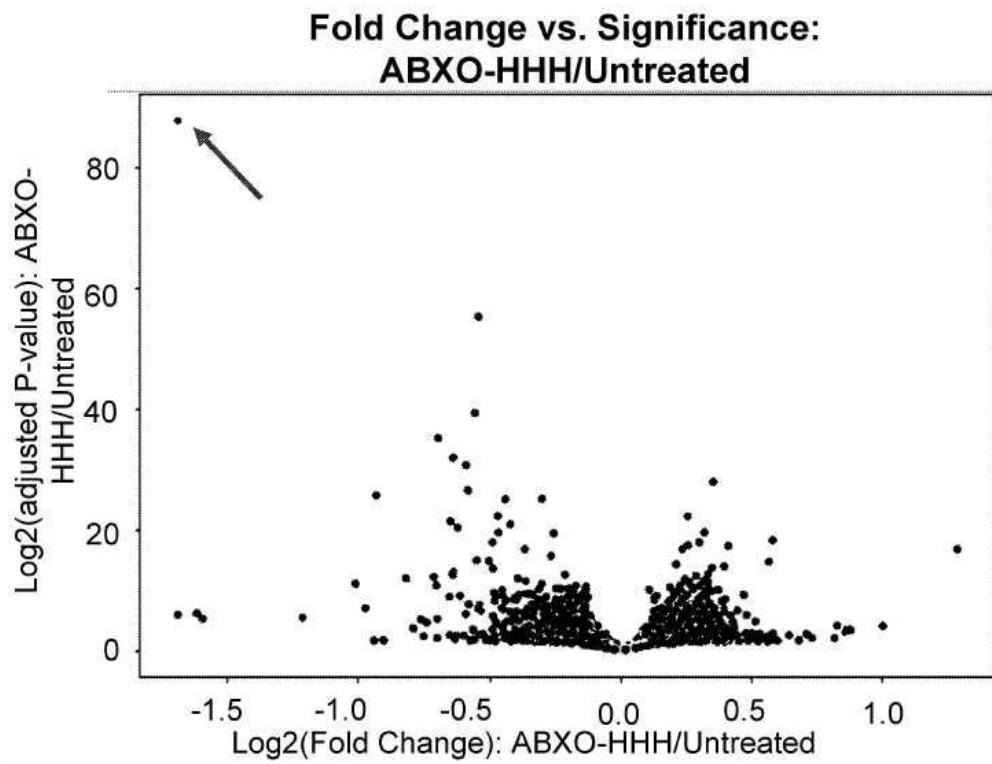
[0641] [00518] 전술한 서면 명세서는 당업자가 구현예를 실시하는데 충분하다고 간주된다. 본원에 도시되고 설명된 것 외에도 구현예의 다양한 변형은 전술한 설명에서 당업자에게 명백해질 것이고 첨부된 청구항의 범위 내에 포함된다.

도면

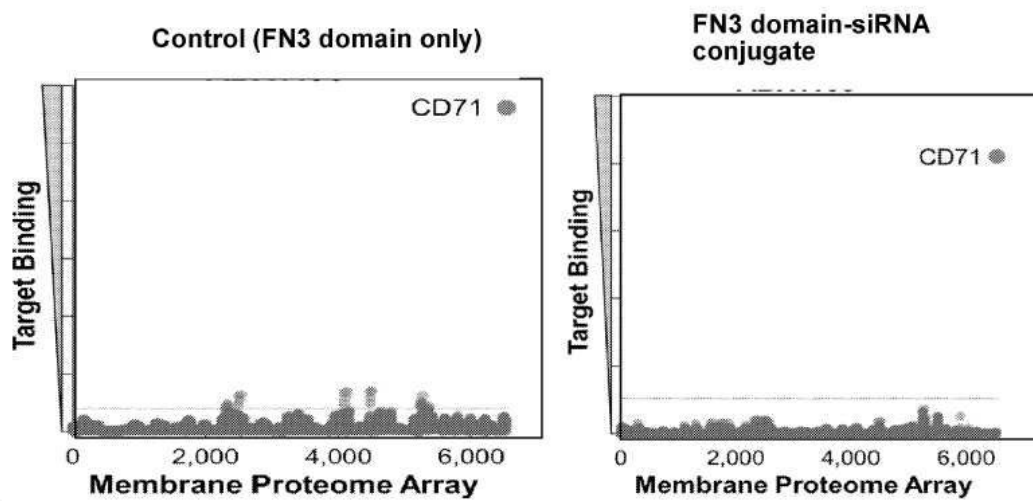
도면1



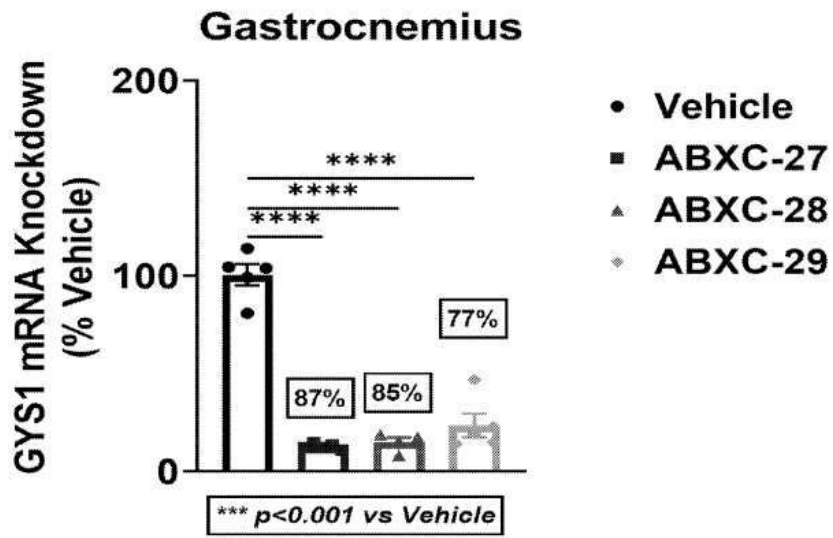
도면2



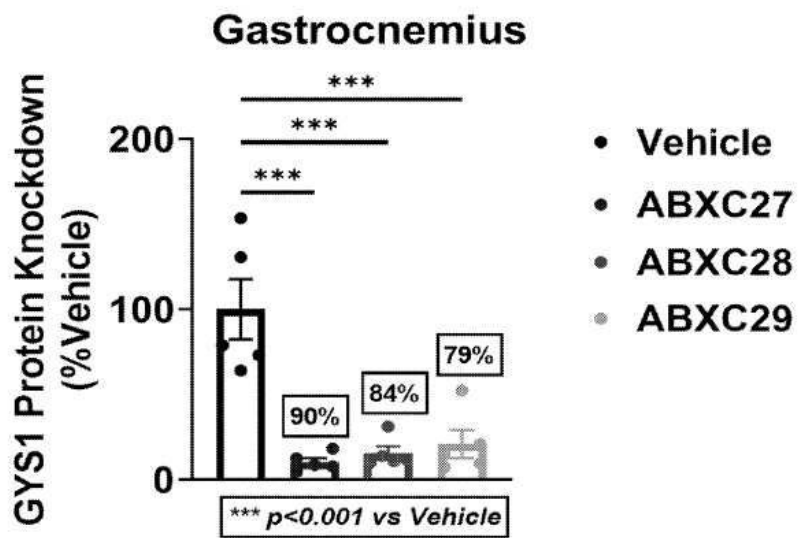
도면3



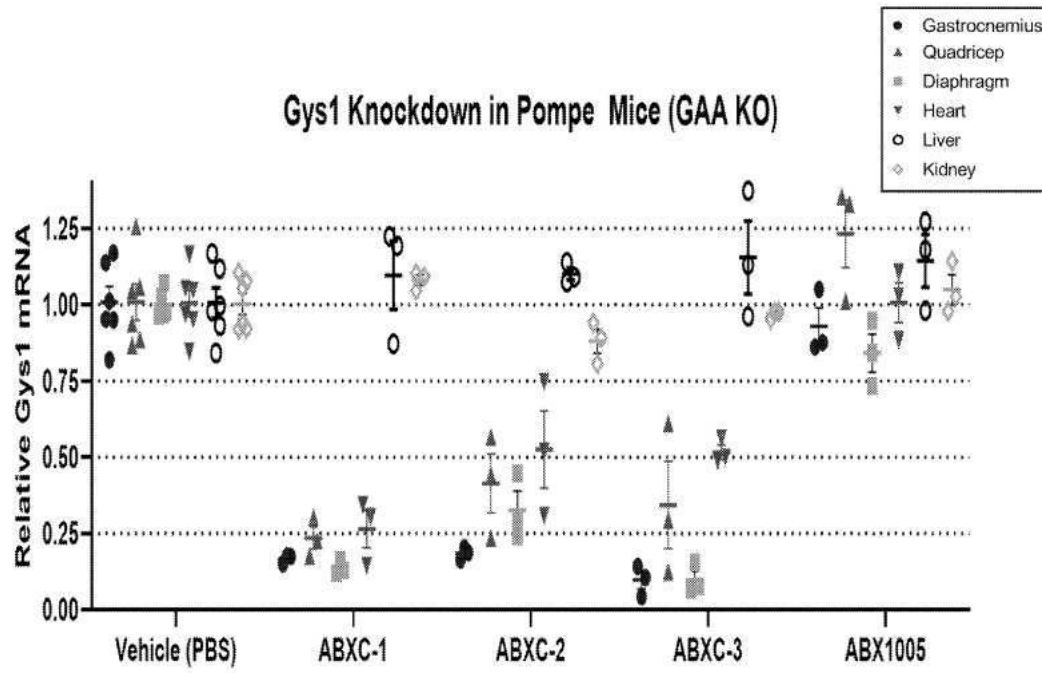
도면4a



도면4b



도면5



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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