



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월09일  
(11) 등록번호 10-2599712  
(24) 등록일자 2023년11월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/113 (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 15/113 (2013.01)  
C12N 2310/113 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2017-7030397  
(22) 출원일자(국제) 2016년04월21일  
심사청구일자 2021년03월26일  
(85) 번역문제출일자 2017년10월20일  
(65) 공개번호 10-2017-0136542  
(43) 공개일자 2017년12월11일  
(86) 국제출원번호 PCT/GB2016/051117  
(87) 국제공개번호 WO 2016/170349  
국제공개일자 2016년10월27일  
(30) 우선권주장  
62/150,889 2015년04월22일 미국(US)  
(뒷면에 계속)  
(56) 선행기술조사문헌  
W02012175958 A1  
W02011161460 A1  
W02006020768 A1  
W02014078468 A1

(73) 특허권자  
미나 테라퓨틱스 리미티드  
영국 런던 더블유12 0비제트 우드레인 84 트랜슬  
레이션 & 이노베이션 허브  
(72) 발명자  
바그너 안드레아스  
오스트리아 1130 빈 히트창거 카이 199/23  
하빔 로버트  
영국 런던 더블유12 0비제트 우드레인 84 트랜슬  
레이션 & 이노베이션 허브  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
장훈

전체 청구항 수 : 총 22 항

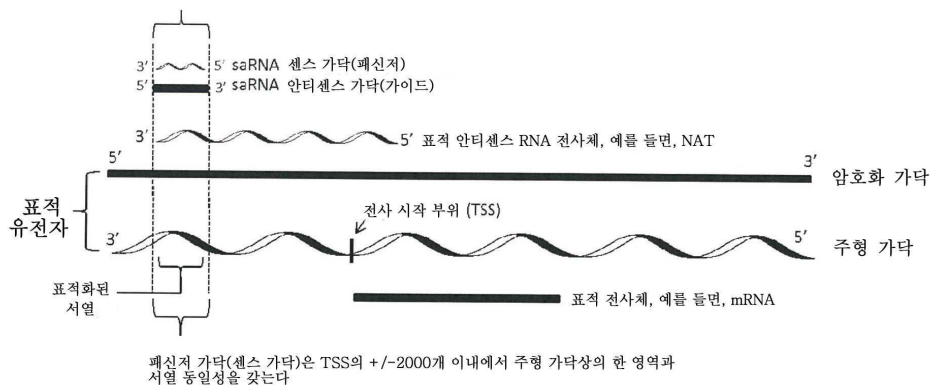
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 C/EBP α 알파 saRNA 조성물 및 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 C/EBP α 전사체를 표적화하는 saRNA 및 상기 saRNA를 포함하는 치료학적 조성물에 관한 것이다. 상기 치료학적 조성물을 사용하는 방법도 또한 제공된다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12N 2310/14 (2013.01)  
 C12N 2310/315 (2013.01)  
 C12N 2310/321 (2013.01)  
 C12N 2310/322 (2013.01)  
 C12N 2310/351 (2013.01)  
 C12N 2310/3521 (2013.01)  
 C12N 2310/3533 (2013.01)  
 C12N 2320/32 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/235,778 2015년10월01일 미국(US)  
 62/308,521 2016년03월15일 미국(US)

(72) 발명자

**후버 한스 이.**

미국 펜실베이니아주 19446 랜스테일 아베이 레인  
 213

**세트롬 폴**

노르웨이 엔오-7023 트론드하임 오스툰베인 5

**스토브네르 엔드레 바켄**

노르웨이 엔오-7013 트론드하임 테글브렌네르베인  
 29

**호스마흐 마르쿠스**

독일 95326 쿨름바흐 에른테백 40

**크람퍼트 모니카**

독일 96047 밤베르크 카푸치너슈트라쎄 13

**보른로커 한스-페터**

독일 95448 베이로이트 알베르트-아인슈타인-링

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

리포솜 내에 캡슐화된 단리된 합성 saRNA를 포함하는, 간세포 암종 (hepatocellular carcinoma: HCC) 치료용 약제학적 조성물로서, 상기 saRNA가 C/EBP  $\alpha$  유전자의 발현을 상향조절하고, 상기 saRNA가 이중 가닥이고 센스 가닥 및 서열번호 109 (CEBPA51) 또는 서열번호 93 (AW51)을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하고, 상기 리포솜이 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (POPC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE), 콜레스테릴-헤미석시네이트 (CHEMS) 및 4-(2-아미노에틸)-모르폴리노-콜레스테릴 헤미석시네이트 (MOCHOL)를 포함하고, 상기 saRNA가 2 mg/mL 내지 5 mg/mL의 농도를 갖는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, POPC:DOPE:CHEMS:MOCHOL의 몰비가 6:24:23:47인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 리포솜의 크기가 50 nm 내지 150 nm인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 리포솜의 크기가 100 nm 내지 120 nm인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 saRNA의 안티센스 가닥 및/또는 센스 가닥이 3' 오버행을 포함하는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 saRNA의 센스 가닥이 적어도 1개의 화학적 변형을 포함하는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 saRNA의 센스 가닥이 적어도 2개의 변형을 포함하는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 8

제6항에 있어서, 상기 변형이 2'-F, 2'-OMe, 역 데옥시리보스, 또는 뉴클레오타이드들 간의 포스포로티오에이트 연결 중 어느 것을 포함하는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 saRNA의 센스 가닥이 서열번호 110 (CEBPA51) 또는 서열번호 94 (AW51)를 포함하는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 상기 saRNA가 서열번호 109의 안티센스 가닥 및 서열번호 110의 센스 가닥을 갖는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 상기 saRNA가 2.5 mg/mL의 농도를 갖는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 7.2 내지 7.8의 pH를 갖는, 약제학적 조성물.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 7.5의 pH를 갖는, 약제학적 조성물.

**청구항 14**

제1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 포스페이트 완충액을 갖는, 약제학적 조성물.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 포스페이트 완충액이 인산수소이나트륨, 이수화물 및 인산이수소칼륨을 포함하는, 약제학적 조성물.

**청구항 16**

제1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 동결보호제를 포함하는, 약제학적 조성물.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 상기 동결보호제가 슈크로스인, 약제학적 조성물.

**청구항 18**

제1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 이온 강도 조정제를 포함하는, 약제학적 조성물.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 상기 이온 강도 조정제가 염화칼륨인, 약제학적 조성물.

**청구항 20**

제1항에 있어서, 상기 HCC가 진행성 HCC (advanced HCC)인, 약제학적 조성물.

**청구항 21**

제1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물의 용량이 20 내지 160 mg/m<sup>2</sup>인, 약제학적 조성물.

**청구항 22**

제1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 정맥내 주입 (intravenous infusion)에 의해 3주 동안 주 1회로 1일째, 8일째 및 15일째에 투여되는, 약제학적 조성물.

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**



삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 관련 출원에 관한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2015년 4월 22일자로 출원된 미국 가출원 제62/150,889호, 2015년 10월 1일자로 출원된 미국 가출원 제62/235,778호 및 2016년 3월 15일자로 출원된 미국 가출원 제62/308,521호를 우선권으로 주장하며, 이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다.

[0003] 서열목록에 대한 참조

[0004] 본 출원은 전자 포맷의 서열목록과 함께 출원된다. 서열목록의 전자 포맷의 정보는 그 전체가 본원에 참조로 인용된다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 폴리뉴클레오타이드, 특히 saRNA, C/EBP $\alpha$  및 C/EBP $\alpha$  경로를 조절하기 위한 조성물, 및 대사성 장애 및 과증식성 질환의 치료 및 줄기 세포 계통(linage)의 조절과 같은 치료 용도에서 조성물의 사용 방법에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0007] CCAAT/인핸서-결합 단백질  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\alpha$  알파, C/EBP $\alpha$  또는 CEBP $\alpha$ )는 사람 및 래트에 걸쳐 보존되어 있는 류신 지퍼 단백질이다. 이러한 핵 전사 인자는 간 세포, 골수성 단핵구, 지방 세포뿐만 아니라, 기타 유형의 지방 상피 세포에 풍부하다[Lekstrom-Himes et al., *J. Bio. Chem.*, vol. 273, 28545-28548 (1998)]. 이는 N-말단 부분에서의 2개의 전사 활성화 도메인, 및 기타 C/EBP 계열 구성원과의 이합체화를 매개하는 류신 지퍼 영역 및 C-말단 부분에서의 DNA-결합 도메인으로 구성된다. C/EBP 전사 인자의 계열에 대한 결합 부위는 정상 간 세포 기능의 유지 및 손상에 대한 반응에 관여하는 다수의 유전자의 프로모터 영역에 존재한다. C/EBP $\alpha$ 는 면역 및 염증 반응, 발달, 세포 증식, 항-아포토시스 및 수개의 대사성 경로에 연루된 몇몇 간-특이적 유전자의 전사에 대해 다면발현 효과를 가진다[Darlington et al., *Current Opinion of Genetic Development*, vol. 5(5), 565-570 (1995)]. 이것은 간 세포의 분화 상태를 유지하기 위해 필수적이다. 이것은 알부민 전사를 활성화하고, 우레아 생성에 관여된 복수의 오르니틴 회로 효소를 암호화하는 유전자의 발현을 조정하고, 따라서 정상 간 기능에 중요한 역할을 한다.

- [0008] 성체 간에서, C/EBP  $\alpha$ 는 최종적으로 분화한 간 세포에서 기능하는 것으로서 정의되지만, 급속히 증식하는 간암 세포는 C/EBP  $\alpha$ 의 일부분만을 발현한다[Umek et al., *Science*, vol. 251, 288-292 (1991)]. C/EBP  $\alpha$ 는 망막모 세포종의 상향조절 및 Cdk2 및 Cdk4의 억제를 통한 세포 증식의 강력한 억제제인 p21을 상향조절하는 것으로 알려져 있다[Timchenko et al., *Genes & Development*, vol. 10, 804-815 (1996); Wang et al., *Molecular Cell*, vol. 8, 817-828 (2001)]. 간 세포 암종(HCC)에서, C/EBP  $\alpha$ 는 항-증식 특성을 갖는 종양 억제인자로서 작용한다[Iakova et al., *Seminars in Cancer Biology*, vol. 21(1), 28-34 (2011)].
- [0009] 상이한 접근법들이 C/EBP  $\alpha$  mRNA 또는 단백질 조절을 연구하기 위해 수행되고 있다. C/EBP  $\alpha$  단백질이 번역 후 인산화 및 수모화(sumoylation)에 의해 조절된다는 것은 공지되어 있다. 예를 들면, FLT3 티로신 키나제 억제제 및 세포의 신호-조절된 키나제 1 및/또는 2(ERK1/2)는 C/EBP  $\alpha$  단백질의 과립구 분화 잠재력을 증가시키는 C/EBP  $\alpha$ 의 세린-21 인산화를 차단한다[Radomska et al., *Journal of Experimental Medicine*, vol. 203(2), 371-381 (2006); and Ross et al., *Molecular and Cellular Biology*, vol. 24(2), 675-686 (2004)]. 추가로, C/EBP  $\alpha$  번역은 C/EBP  $\alpha$  단백질 이소형의 비율을, 전체 길이 p30 형태에 비해 전체 길이 p42 형태를 선호하도록 변화시켜 과립구 분화를 유도하는 2-시아노-3,12-디옥소올레안-1,9-디엔-28-오산 (CDDO)에 의해 효율적으로 유도될 수 있다[Koschmieder et al., *Blood*, vol. 110(10), 3695-3705 (2007)]. C/EBP  $\alpha$  유전자는 염색체 19q13.1 상에 위치한 인트론이 없는 유전자이다. 대부분의 진핵 세포는 유전자 발현을 조절하기 위한 메카니즘으로서 RNA-상보성을 이용한다. 일례는 이중 가닥의 짧은 간섭 RNA를 사용하여 RNA-유도성 침묵화 복합체(RISC: RNA-induced silencing complex)를 통해 유전자 발현을 녹다운시키는 RNA 간섭(RNAi) 경로이다. 짧은 듀플렉스(duplex) RNA 올리고뉴클레오타이드도 또한 유전자의 프로모터 영역을 표적화하고 이들 유전자의 전사 활성화를 매개하는 능력을 갖는 것으로 밝혀졌고, 이들은 RNA 활성화(RNAa), 안티젠 RNA(agrRNA) 또는 짧은 활성화 RNA(saRNA)로서 언급되었다[Li et al., *PNAS*, vol. 103, 17337-17342 (2006)]. 유전자의 saRNA 유도성 활성화는 마우스, 래트 및 비-사람 영장류를 포함하는 기타 포유동물 중에서 보존되어 있으며, 빠르게 유전자의 내인성 상향조절의 효과를 연구하는 인기있는 방법이 되고 있다. 따라서, saRNA를 이용하는 치료 목적용 C/EBP  $\alpha$ 의 표적화된 조절이 요구된다.

## 발명의 내용

- [0010] **발명의 요지**
- [0011] 본 발명은 C/EBP  $\alpha$  유전자 발현을 조절하고/하거나 진단 및 예후를 포함한 치료 목적을 위해 기능하는 짧은 활성화 RNA(saRNA) 분자의 디자인, 제제화, 제조, 제형화 및/또는 사용을 위한 조성물, 방법 및 키트를 제공한다.
- [0012] 본 발명의 하나의 양상은 C/EBP  $\alpha$  전사체를 표적화하는 saRNA 및 적어도 하나의 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 억제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 다른 양상은 C/EBP  $\alpha$  전사체를 표적화하는 saRNA와 줄기 세포를 접촉시킴을 포함하는, 줄기 세포 분화 및 다능성(pluripotency)을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 각종 실시형태의 상세내용은 하기 설명으로 제시한다. 본 발명의 기타 특징, 목적 및 이점은 상세한 설명, 도면 및 청구범위로부터 명백해질 것이다.

## 도면의 간단한 설명

- [0014] 전술 및 기타 목적, 특징 및 이점은 첨부된 도면에 예시된 바와 같이, 본 발명의 특정 실시형태의 하기 설명으로부터 명백해질 것이며, 상기 도면에서 동일한 참조 부호는 상이한 도면 전체에서 동일 부분을 의미한다. 도면들은 반드시 일정한 척도는 아니며, 본 발명의 각종 실시형태의 원리를 예시하는데 중점을 둔다.
- 도 1은 간에 미치는 C/EBP  $\alpha$ 의 1차 효과를 나타낸다.
- 도 2은 지방 조직에 미치는 C/EBP  $\alpha$ 의 2차 효과를 나타낸다.
- 도 3은 본 발명의 saRNA의 기능에 관여하는 핵산 모이어티들 간의 관계를 예시하는 도식이다.
- 도 4A 내지 4D는 CEBPA-saRNA에 의한 HCC 세포 패널에서의 CEBPA의 상향조절을 도시한다.
- 도 5A 내지 5D는 CEBPA-saRNA에 의한 HCC 세포 패널에서의 알부민의 상향조절을 도시한다.
- 도 6A는 GAPDH에 대해 정규화된 변형된 saRNA로 형질감염된 DU145 세포에서의 CEBPA mRNA 수준을 도시한다. 도 6B는 DU145 세포에서의 GAPDH mRNA 수준을 도시한다. 도 6C는 형질감염 대조군으로서 Aha1 mRNA 수준을 도시한다.

도 7A 내지 7B는 GAPDH에 대해 정규화된, CEBPA-siRNA 또는 Fluc로 형질감염된 DU145 세포에서의 CEBPA mRNA 수준을 도시한다. 도 7C는 GAPDH에 대해 정규화된, AhA-1-siRNA로 형질감염된 DU145 세포에서의 AhA-1 mRNA 수준을 도시한다.

도 8A 내지 8C는 GAPDH에 대해 정규화된, 3종의 saRNA로 형질감염된 DU145 세포에서의 CEBPA mRNA 수준을 도시한다.

도 9는 발현 수준을 도시하는 도 9A 및 도 9B를 포함한다. 도 9A는 비증식 배지 내 간세포에서의 AhA1, 알부민 및 CEBPA 상대적 발현 수준을 도시한다. 도 9B는 증식 배지 내 간세포에서의 AhA1, 알부민 및 CEBPA 상대적 발현 수준을 도시한다.

도 10A는 CEBPA-51로 형질감염 후 HepG2, Hep3B 및 PLCPRF5 세포에서의 C/EBP- $\alpha$  단백질 수준을 나타내는 대표적 웨스턴 블롯을 도시한다. 도 10B는 CEBPA-51로 형질감염 후 HepG2, Hep3B 및 PLCPRF5 세포에서의 상대적 CEBPA mRNA 발현(\*\*\* p = 0.0002; \*\* p = 0.0012)을 도시한다.

도 11A 내지 11C는 HEP3B, HEPG2 및 PLCPRF5 세포주에서의 AW51의 WST-1의 세포 증식 검정 결과를 도시한다. 도 11D 내지 11F는 HEP3B, HEPG2 및 PLCPRF5 세포에서의 AW51의 술포로다민 B(SRB) 세포 수 검정 결과를 도시한다.

도 12A 내지 12B는 HuH7 세포(도 12A) 및 Panc-1 세포(도 12B)에서 측정된 AW51 표적-이탈(off-target)을 도시한다.

도 13A 내지 13B는 비특이적 대조군(NC-500000), 비변형 AW1-51 서열, 내부 서열 변형을 갖는 AW1-51(CEBPA-AW1-510500), SS상에서 변형된 AW1-51(CEBPA-AW01-510012) 및 AS상에서 변형된 AW1-51(CEBPA-AW01-510013) 또는 두 가닥 모두에서 변형된 AW1-51(CEBPA-AW01-510014)로 형질감염된 세포에서의 CEBPA mRNA 및 알부민 mRNA 수준을 도시한다.

도 14A는 CEBPA51이 1차 인간 간세포에서 CEBPA를 상향조절함을 입증한다. 도 14B는 CEBPA51이 1차 인간 간세포에서 알부민 분비를 증가시킴을 입증한다. 도 14C는 Aha1 수준을 도시한다. Aha1 siRNA는 1차 세포에서 형질감염 효율을 측정하기 위한 양성 대조군으로서 사용하였다. 모든 통계학적 유의성은 신뢰구간에서 비모수 맨 위트니 U 검정(non-parametric Mann Whitney U test)에 따른다.

도 15는 CEBPA51로 형질감염된 배양된 1차 인간 간세포의 배지로부터의 알부민 ELISA 결과를 도시한다.

도 16A 내지 16F는 CEBPA-51로 형질감염된 1차 인간 간세포에서 검출된 (A) 알라닌-글리옥시లే이트 아미노트랜스퍼라제(AGXT); (B) 알부민; (C) 시토크롬 P450 3A4(CYP3A4); (D) 오르니틴 트랜스카바밀라제(OTC); (E) 간세포 핵 인자 4- $\alpha$  (HNF4A) 및 (F) CEBPA 전사체 수준의 상대적 발현을 도시한다.

도 17은 CEBPA-51의 두번째 형질감염 후 24시간째에 시노몰구스(CYNOM-K1) 섬유아세포에서의 CEBPA mRNA 발현을 도시한다.

도 18A 내지 18C는 래트 혈장, 인간 혈장 및 시노몰구스 원숭이 혈장에서의 CEBPA-51의 안정성을 도시한다.

도 19A 내지 19C는 래트 혈장, 인간 혈장 및 시노몰구스 원숭이 혈장에서의 MTL-CEBPA의 안정성을 도시한다.

도 20A는 1.5 mg/kg CEBPA51의 IV 투여 후 래트 혈장 중의 CEBPA51 및 대사산물/불순물의 평균 농도를 도시한다.

도 20B는 1.5 mg/kg CEBPA51의 IV 투여 후 래트 혈장 중의 온전한 CEBPA51의 평균 농도를 도시한다. 투여 후 0.5시간째에 온전한 CEBPA51의 농도는 검출 한계치 미만이다.

도 21A는 2.175 mg/kg MTL-CEBPA의 IV 투여 후 래트 혈장 중의 CEBPA51의 평균 농도를 도시한다. 온전한 모 화합물과 CEBPA51의 대사산물의 비교는 혈장 중에서 MTL-CEBPA의 높은 안정성을 나타낸다.

도 21B는 2.175 mg/kg MTL-CEBPA의 IV 투여 후 래트 혈장 중의 온전한 CEBPA51의 평균 농도를 도시한다. 투여 후 48시간째에 CEBPA51은 여전히 혈장에서 발견된다.

도 22a 내지 22k는 MTL-CEBPA의 상이한 용량의 투여 후 CCL4-처리된 래트에서의 체중, ALT 수준, AST 수준, ALP 수준, GGT 수준, 빌리루빈 수준, 총 단백질 수준, 알부민 수준, 프로트롬빈 시간, 암모니아 수준 및 하이드록시프로틴 수준 변화를 도시한다.

도 23은 건강한 간 및 CCL4와 대조군으로 처리된 간, CCL4와 0.3 mg/kg MTL-CEBPA으로 처리된 간 및 CCL4와 3.0 mg/kg MTL-CEBPA으로 처리된 간의 육안 병리상태이다.

도 24a 내지 24c는 나이브(naive) 래트, CCL4과 대조군으로 처리된 래트 및 래트 CCL4와 MTL-CEBPA로 처리된 래트에 대한 H&E 염색, 메이슨 트릭롬(Mason Trichrome) 염색 및 시리우스 레드 염색을 포함하는 조직학 염색을 도시한다. 도 23a는 샴(sham) 대조군이다. 도 23b는 NOV340/siFluc 처리를 받은 CCL4-처리된 래트(음성 대조군)이다. 도 23c는 MTL-CEBPA 처리를 받은 CCL4-처리된 래트이다.

도 25a 내지 25h는 ALT, AST, ALP, GGT, 빌리루빈과 같은 간 기능 파라미터 및 총 단백질, 알부민 및 암모니아와 같은 기타 파라미터에 미치는 TAA 주사의 효과를 도시한다.

도 26은 CEBPA-saRNA로 처리된 당뇨병 래트의 혈청 및 신체적 파라미터를 도시한다. 도 26A: 트리글리세라이드 수준. 도 26B: 총 콜레스테롤 수준. 도 26C: 간 콜레스테롤 수준. 도 26D: HDL-c 수준. 도 26E: LDL-c 수준. 도 26F: HDL-c/LDL-c 비. 도 26G: AST 수준. 도 26H: ALT 수준. 도 26I: TG/HDL-c 비. 도 26J: 공복 글루코스 수준. 도 26K: 인슐린 수준. 도 26L: 체중 변화. 도 26M: 간 중량 변화. 도 26N: 간 중량/체중 비.

도 27a 내지 27b는 MCD-유도된 NASH 연구에서의 체중 및 음식소비 변화를 도시한다. 도 27c 내지 27h는 상기 연구에서의 ALT, AST, ALP, 빌리루빈, 알부민 및 간 TG 수준 변화를 도시하였다.

도 28은 간 조직에서의 CEBPA 및 알부민 mRNA 발현을 도시한다. 발현 값은 처리전 대조군(DEN-유도성 HCC)에 상대적이다. NOV340/siFLUC에 대한  $**p < 0.01$ .

도 29A 내지 29I는 MTL-CEBPA-처리된 DEN-래트에서의 신체적 및 혈청 파라미터를 도시한다. 평균  $\pm$  SEM으로서 제시된 값; MTL-CEBPA에 대해 제시된 p-값:  $\#p < 0.1$ , NOV340/siFLUC에 대한  $*p < 0.05$ ; 처리전 대조군에 대한  $\$p < 0.05$ .

도 30A는 아르곤노트(Argonaute) 단백질과 CEBPA51의 바이오티닐화된 가닥의 공동-면역침전 결과를 도시한다.

도 30B는 CEBPA-saRNA로 형질감염된, 야생형 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 및 Ago2 녹아웃 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 세포 둘 다에서의 CEBPA 수준을 도시한다.

도 30C는 CEBPA-saRNA로 형질감염된, 야생형 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 및 Ago2 녹아웃 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 세포 둘 다에서의 p21 수준을 도시한다.

도 31은 MTL-CEBPA 생산 과정의 개관이다.

도 32A 및 도 32B는 CEBPA-51 및 대조군 올리고뉴클레오타이드로 형질감염된 후 huPBMC에서의 TNF- $\alpha$  및 IFN- $\alpha$  분비를 도시한다.

도 33은 용량 증량 흐름도이다.

도 34는 API 용액의 2가지 상이한 pH에 대해 분사 완충액 중의 API 농도와 대비한 리포솜 내로의 CEBPA-51의 캡슐화 효율을 도시한다.

도 35는 분사 완충액 중의 API 농도에 대한 리포솜으로의 CEBPA-51의 캡슐화 효율을 도시한다.

도 36은 8주째 또는 11주째에서의 MTL-CEBPA 처리 후 암모니아 수준을 도시한다.

도 37A 및 도 37B는 8주째 또는 11주째에서의 MTL-CEBPA 처리 후의 복수(腹水) 스코어를 도시한다.

도 38A 및 도 38B는 8주째 또는 11주째에서의 MTL-CEBPA 처리 후의 생존 그래프를 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 치료 목적을 위한 C/EBP $\alpha$  유전자 발현 및/또는 기능을 조절하기 위한 조성물, 방법 및 키트를 제공한다. 이들 조성물, 방법 및 키트는 C/EBP $\alpha$  전사체를 표적화하는 핵산 작제물을 포함한다.

[0016] C/EBP $\alpha$  단백질은 대사 과정 및 세포 증식의 중요한 조절인자로서 알려져 있다. C/EBP $\alpha$  유전자의 조절은 치료 목적을 위한 큰 잠재력을 가진다. 본 발명은 C/EBP $\alpha$  전사체를 표적화하는 핵산 작제물을 제공함으로써 이러한 요구를 다루며, 여기서, 상기 핵산 작제물은 변형되거나 변형되지 않은 단일 또는 이중 가닥 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다.



- [0017] 본원에서 사용되는 C/EBP  $\alpha$  유전자는 암호화 가닥 및 주형 가닥을 포함하는 이중 가닥의 DNA이다. 이는 또한 본 출원에서 표적 유전자로서 언급될 수도 있다.
- [0018] 용어 "C/EBP  $\alpha$  전사체", "C/EBP  $\alpha$  표적 전사체" 또는 "표적 전사체"는 맥락상 C/EBP  $\alpha$  단백질을 암호화하는 C/EBP  $\alpha$  mRNA일 수 있다. C/EBP  $\alpha$  mRNA는 C/EBP  $\alpha$  유전자의 주형 가닥으로부터 전사되고 미토콘드리아 내에 존재할 수 있다.
- [0019] C/EBP  $\alpha$  유전자의 암호화 가닥으로부터 전사된 C/EBP  $\alpha$  유전자의 안티센스 RNA는 이하 표적 안티센스 RNA 전사체로 지칭된다. 표적 안티센스 RNA 전사체는 긴 비암호화 안티센스 RNA 전사체일 수 있다.
- [0020] 용어 "소형 활성화 RNA", "짧은 활성화 RNA" 또는 "saRNA"는 본 발명의 맥락에서 특정한 유전자의 발현을 상향 조절하거나 이에 대한 양성 효과를 갖는 단일 가닥 또는 이중 가닥의 RNA를 의미한다. saRNA는 14 내지 30개 뉴클레오타이드의 단일 가닥일 수 있다. saRNA는 또한 각각의 가닥이 14 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함하는 이중 가닥일 수 있다. 상기 유전자는 saRNA의 표적 유전자로 지칭된다. C/EBP  $\alpha$  유전자의 발현을 상향조절하는 saRNA는 "C/EBP  $\alpha$ -saRNA"로 지칭되고, C/EBP  $\alpha$  유전자는 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 표적 유전자이다.
- [0021] 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$  표적 안티센스 RNA 전사체를 표적화하는 C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 C/EBP  $\alpha$  유전자 발현 및/또는 기능을 상향조절한다.
- [0022] 용어 "표적화하다" 또는 "표적화하는"은 맥락상 C/EBP  $\alpha$  유전자에 효과를 미치는 것을 의미한다. 효과는 직접적 또는 간접적일 수 있다. 직접적 효과는 C/EBP  $\alpha$  표적 안티센스 RNA 전사체와의 완전한 또는 부분적 하이브리드화에 의해 일어날 수 있다. 간접적 효과는 업스트림 또는 다운스트림일 수 있다.
- [0023] C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 생물학적 과정 또는 활성화에 미치는 다운스트림 효과를 가질 수 있다. 이러한 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 두번째의 비-표적 전사체에 (상향조절하거나 하향조절하는) 효과가 있을 수 있다.
- [0024] 용어 "유전자 발현"은 맥락상 C/EBP  $\alpha$  유전자로부터 C/EBP  $\alpha$  mRNA를 생성하는 전사 단계 또는 C/EBP  $\alpha$  mRNA로부터 C/EBP  $\alpha$  단백질을 생성하는 번역 단계를 포함할 수 있다. C/EBP  $\alpha$  mRNA의 증가와 C/EBP  $\alpha$  단백질의 증가는 둘 다 C/EBP  $\alpha$  유전자 발현의 증가 또는 양성 효과를 가리킨다.
- [0025] 유전자의 "상향조절" 또는 "활성화"란, 본 발명의 saRNA의 부재하에 관찰 것에 비하여 유전자의 발현 수준 또는 유전자에 의해 암호화되는 폴리펩타이드(들)의 수준 또는 이의 활성화 또는 유전자의 주형 가닥으로부터 전사되는 RNA 전사체(들)의 수준이 증가됨을 의미한다. 본 발명의 saRNA는 표적 유전자의 발현에 직접적 또는 간접적 상향조절 효과가 있을 수 있다.
- [0026] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 증식 세포에서 효능을 나타낼 수 있다. 본원에서 세포와 관련하여 사용될 경우, "증식하는"은 빠르게 성장하고/하거나 재생하는 세포를 의미한다.
- [0027] **I. 본 발명의 조성물**
- [0028] 본 발명의 하나의 측면은 C/EBP  $\alpha$  유전자를 상향조절하는 saRNA 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 이러한 saRNA는 이하에서 "C/EBP  $\alpha$ -saRNA" 또는 "본 발명의 saRNA"로서 언급되고, 본 출원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0029] **saRNA 디자인**
- [0030] C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 C/EBP  $\alpha$  전사체를 표적화한다. 하나의 실시형태에서, 이것은 C/EBP  $\alpha$  유전자의 표적 안티센스 RNA 전사체에 대해 상보적인 것으로 디자인되며, 이것은 표적 안티센스 RNA 전사체를 하향조절함으로써 C/EBP  $\alpha$  유전자 발현 및/또는 기능에 효과를 미칠 수 있다.
- [0031] 용어 "에 대해 상보적인"은 맥락상 엄격한 조건 하에 표적 안티센스 RNA 전사체와 하이브리드화할 수 있는 것을 의미한다.
- [0032] 본 발명의 맥락상 핵산 서열을 설명하기 위해 사용될 때의 용어 "센스"는, 서열이 유전자의 암호화 가닥 상의 서열과 동일성을 갖는 것을 의미한다. 본 발명의 맥락상 핵산 서열을 설명하기 위해 사용될 때의 용어 "안티센스"는, 서열이 유전자의 암호화 가닥 상의 서열과 상보적인 것을 의미한다.
- [0033] DNA의 티미딘이 RNA에서는 우리딘으로 치환되어 있고 이러한 차이가 "안티센스" 또는 "상보성"의 이해를 바꾸지 않는다는 것이 이해될 것이다.

- [0034] 표적 안티센스 RNA 전사체는 표적 유전자의 전사 시작 부위(TSS)에 상응하는 위치의 최대 100, 80, 60, 40, 20 또는 10 kb까지의 업스트림과 표적 유전자의 전사 정지 부위에 상응하는 위치의 최대 100, 80, 60, 40, 20 또는 10 kb까지의 다운스트림 사이에 있는 암호화 가닥상의 유전자좌로부터 전사될 수 있다.
- [0035] 하나의 실시형태에서, 표적 안티센스 RNA 전사체는 표적 유전자의 전사 시작 부위의 +/- 1 kb 이내에 위치한 암호화 가닥상의 유전자좌로부터 전사된다.
- [0036] 다른 실시형태에서, 표적 안티센스 RNA 전사체는 표적 유전자의 전사 시작 부위의 +/- 500, +/- 250 또는 +/- 100 이내에 위치한 암호화 가닥상의 유전자좌로부터 전사된다.
- [0037] 다른 실시형태에서, 표적 안티센스 RNA 전사체는 표적 유전자의 전사 시작 부위의 +/- 2000 뉴클레오타이드에 위치한 암호화 가닥상의 유전자좌로부터 전사된다.
- [0038] 다른 실시형태에서, 암호화 가닥상의 유전자좌는 표적 유전자의 전사 시작 부위에 상응하는 위치로부터 1000개 이하의 뉴클레오타이드 업스트림 또는 다운스트림에 있다.
- [0039] 다른 실시형태에서, 암호화 가닥상의 유전자좌는 표적 유전자의 전사 시작 부위에 상응하는 위치로부터 500개 이하의 뉴클레오타이드 업스트림 또는 다운스트림에 있다.
- [0040] 본원에서 사용되는 "전사 시작 부위"(TSS)는 전사 시작 위치에 상응하거나 전사 시작 위치를 표시하는 유전자의 주형 가닥상의 뉴클레오타이드를 의미한다. TSS는 유전자의 주형 가닥상의 프로모터 영역 내에 위치할 수 있다.
- [0041] 본원에서 사용되는 "전사 정지 부위"는 표적 전사체의 적어도 하나의 중지 코돈을 암호화하는 영역, 표적 전사체의 3'UTR 전에 있는 서열을 암호화하는 영역, RNA 폴리머라제가 유전자를 방출하는 영역, 스플라이스 부위 또는 스플라이스 부위 전의 부위를 암호화하는 영역 및 표적 전사체의 전사가 종결되는 주형 가닥상의 영역과 같으나 이에 제한되지 않는 적어도 하나의 특징을 갖는, 유전자의 주형 가닥상의 하나 이상의 뉴클레오타이드일 수 있는 영역을 의미한다.
- [0042] 어구 "특정 유전자좌로부터 전사되는"은 본 발명의 표적 안티센스 RNA 전사체의 맥락에서 표적 안티센스 RNA 전사체의 전사가 특정 유전자좌에서 시작됨을 의미한다.
- [0043] 표적 안티센스 RNA 전사체는 표적 유전자의 게놈 서열의 암호화 가닥에 대해 상보적이고, 본원에서 "게놈 서열"에 대한 모든 언급은 "게놈 서열의 암호화 가닥"에 대한 약칭이다.
- [0044] 유전자의 "암호화 가닥"은, mRNA에서 T가 U로 대체된다는 점을 제외하고는, mRNA가 생산한 것과 동일한 서열을 갖는다. 따라서, 유전자의 "주형 가닥"은 mRNA가 생산한 것에 대해 상보적이고 역평행이다.
- [0045] 따라서, 표적 안티센스 RNA 전사체는 표적 유전자의 전사 시작 부위의 100, 80, 60, 40, 20 또는 10 kb 업스트림과 표적 유전자의 전사 정지 부위의 100, 80, 60, 40, 20 또는 10 kb 다운스트림 사이에 위치한 게놈 서열에 대해 상보적인 서열을 포함할 수 있다.
- [0046] 하나의 실시형태에서, 표적 안티센스 RNA 전사체는 표적 유전자의 전사 시작 부위의 1 kb 업스트림과 표적 유전자의 전사 정지 부위의 1 kb 다운스트림 사이에 위치한 게놈 서열에 대해 상보적인 서열을 포함한다.
- [0047] 다른 실시형태에서, 표적 안티센스 RNA 전사체는 표적 유전자의 전사 시작 부위의 500, 250 또는 100개 뉴클레오타이드 업스트림에 위치하고 표적 유전자의 전사 정지 부위의 500, 250 또는 100개 뉴클레오타이드 다운스트림에서 종결되는 게놈 서열에 상보적인 서열을 포함한다.
- [0048] 표적 안티센스 RNA 전사체는 CEBPA 유전자의 암호화 영역을 포함하는 게놈 서열에 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 표적 안티센스 RNA 전사체는 주형 가닥상의 표적 유전자의 프로모터 영역과 정렬되는 게놈 서열에 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 유전자는 복수의 프로모터 영역을 가질 수 있으며, 이 경우에 표적 안티센스 RNA 전사체는 1개, 2개 또는 그 이상의 프로모터 영역과 정렬될 수 있다. 주석이 달린 유전자좌(annotated gene loci)의 온라인 데이터베이스는 유전자의 프로모터 영역을 동정하는데 사용될 수 있다. 용어 "정렬되다" 및 "정렬"은 한쌍의 뉴클레오타이드 서열의 맥락에서 사용될 경우에 이 한 쌍의 뉴클레오타이드 서열이 서로 상보적이거나 서로 서열 동일성을 가짐을 의미한다.
- [0049] 표적 안티센스 RNA 전사체와 표적 유전자의 프로모터 영역 사이의 정렬 영역은 부분적일 수 있으며, 길이가 단일 뉴클레오타이드 만큼 짧을 수 있지만, 이것은 적어도 15개 또는 적어도 20개의 뉴클레오타이드 길이 또는 적어도 25개 뉴클레오타이드 길이 또는 적어도 30개, 35개, 40개, 45개 또는 50개 뉴클레오타이드 길이 또는 적어

도 55개, 60개, 65개, 70개 또는 75개 뉴클레오타이드 길이 또는 적어도 100개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 하기 특정 배열 각각은 용어 "정렬"의 범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.

- [0050] a) 표적 안티센스 RNA 전사체 및 표적 유전자의 프로모터 영역은 길이가 동일하고 이들은 정렬한다(즉, 이들은 전체 길이에 걸쳐 정렬된다).
- [0051] b) 표적 안티센스 RNA 전사체는 표적 유전자의 프로모터 영역보다 더 짧고, 이의 전체 길이에 걸쳐 표적 유전자의 프로모터 영역과 정렬한다(즉, 이것은 표적 유전자의 프로모터 영역 내의 서열에 대해 전체 길이에 걸쳐 정렬된다).
- [0052] c) 표적 안티센스 RNA 전사체는 표적 유전자의 프로모터 영역보다 더 길고, 표적 유전자의 프로모터 영역은 상기 전사체체에 의해 완전히 정렬된다(즉, 표적 유전자의 프로모터 영역은 표적 안티센스 RNA 전사체 내의 서열에 대해 전체 길이에 걸쳐 정렬된다).
- [0053] d) 표적 안티센스 RNA 전사체 및 표적 유전자의 프로모터 영역은 길이가 동일하거나 상이하고, 정렬 영역은 표적 안티센스 RNA 전사체의 길이와 표적 유전자의 프로모터 영역의 길이 둘 다보다 더 짧다.
- [0054] "정렬하다" 및 "정렬"의 상기 정의는 상세한 설명 전체에 걸쳐 다른 중첩, 예를 들면, 정렬된 서열의 설명에 준용된다. 명백히, 표적 안티센스 RNA 전사체가 프로모터 영역 이외의 표적 유전자의 영역과 정렬하는 것으로 기재된다면, 표적 안티센스 RNA 전사체의 서열은 표적 유전자의 프로모터 영역이 아니라 언급된 그 영역 내의 서열과 정렬된다.
- [0055] 하나의 실시형태에서, 표적 안티센스 RNA 전사체는 길이가 적어도 1 kb 또는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10, 예를 들면, 20, 25, 30, 35 또는 40 kb이다.
- [0056] 하나의 실시형태에서, 표적 안티센스 RNA 전사체는 표적 유전자의 암호화 가닥 상의 서열에 대해 이의 전체 길이를 따라 적어도 75% 또는 적어도 85% 또는 적어도 90% 또는 적어도 95% 상보적인 서열을 포함한다.
- [0057] 본 발명은 표적 안티센스 RNA 전사체를 표적화하는 saRNA를 제공하고, 이러한 표적 안티센스 RNA 전사체를 효과적이고 특이적으로 하향조절할 수 있다. 이것은 표적 안티센스 RNA 전사체 내의 한 영역에 대해 고도의 상보성을 갖는 saRNA에 의해 달성될 수 있다. 상기 saRNA는 표적화될 표적 안티센스 RNA 전사체 내의 영역과 5개 이하 또는 4 또는 3개 이하 또는 2개 이하 또는 1개 이하 또는 0개의 불일치(mismatch)를 가질 것이다.
- [0058] 도 3에 대하여, 표적 안티센스 RNA 전사체가 표적 유전자의 주형 가닥의 한 영역과 동일성을 갖기 때문에, 표적 안티센스 RNA 전사체는 표적 유전자의 주형 가닥 내의 영역에 대해 부분적으로 동일하여, 유전자의 주형 가닥 또는 표적 안티센스 RNA 전사체가 참조될 수 있다. saRNA가 표적 안티센스 RNA 전사체에 하이브리드화하거나 결합하는 위치(및 따라서 주형 가닥상의 동일한 위치)는 "표적화된 서열" 또는 "표적 부위"로서 언급된다.
- [0059] saRNA(단일 가닥이든지 이중 가닥이든지)의 안티센스 가닥은 표적화된 서열의 역 상보체와 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100% 동일할 수 있다. 따라서, saRNA의 안티센스 가닥의 역 상보체는 표적화된 서열과 높은 서열 동일성 정도를 갖는다. 표적화된 서열은 saRNA 및/또는 saRNA의 역 상보체 동일한 길이, 즉 동일한 수의 뉴클레오타이드를 가질 수 있다.
- [0060] 일부 실시형태에서, 표적화된 서열은 적어도 14개 내지 30개 미만의 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0061] 일부 실시형태에서, 표적화된 서열은 19, 20, 21, 22 또는 23개의 뉴클레오타이드를 갖는다.
- [0062] 일부 실시형태에서, 표적화된 서열의 위치는 주형 가닥의 프로모터 부위 내에 위치된다.
- [0063] 일부 실시형태에서, 표적화된 서열은 주형 가닥의 TSS(전사 시작 부위) 코어 내에 위치한다. 본원에서 사용되는 "TSS 코어" 또는 "TSS 코어 서열"은 TSS(전사 시작 부위)의 2000개 뉴클레오타이드 업스트림과 2000개 다운스트림 사이의 영역을 의미한다. 따라서, TSS 코어는 4001개 뉴클레오타이드를 포함하며, TSS는 TSS 코어 서열의 5' 말단으로부터 2001번 위치에 위치한다. CEBPA TSS 코어 서열은 하기 표에 제시된다.

CEBPA mRNA 참조 번호	CEBPA 단백질 참조번호	CEBPA TSS 코어 개념 위치	CEBPA TSS 코어 서열번호
NM_001285829	NP_001272758	chr19:33302564	서열번호 77
NM_001287424	NP_001274353	마이너스 가닥	
NM_001287435	NP_001274364		
NM_004364	NP_004355		

[0064]

[0065]

일부 실시형태에서, 표적화된 서열은 TSS의 1000개 뉴클레오타이드 업스트림과 1000개 뉴클레오타이드 다운스트림 사이에 위치한다.

[0066]

일부 실시형태에서, 표적화된 서열은 TSS의 500개 뉴클레오타이드 업스트림 과 500개 뉴클레오타이드 다운스트림 사이에 위치한다.

[0067]

일부 실시형태에서, 표적화된 서열은 TSS의 250개 뉴클레오타이드 업스트림과 250개 뉴클레오타이드 다운스트림 사이에 위치한다.

[0068]

일부 실시형태에서, 표적화된 서열은 TSS의 100개 뉴클레오타이드 업스트림과 100개 뉴클레오타이드 다운스트림 사이에 위치한다.

[0069]

일부 실시형태에서, 표적화된 서열은 TSS 코어 내의 TSS의 업스트림에 위치한다. 표적화된 서열은 TSS의 2000개 미만, 1000개 미만, 500개 미만, 250개 미만 또는 100개 미만의 뉴클레오타이드 업스트림일 수 있다.

[0070]

일부 실시형태에서, 표적화된 서열은 TSS 코어 내의 TSS의 다운스트림에 위치한다. 표적화된 서열은 TSS의 2000개 미만, 1000개 미만, 500개 미만, 250개 미만 또는 100개 미만의 뉴클레오타이드 다운스트림일 수 있다.

[0071]

일부 실시형태에서, 표적화된 서열은 TSS 코어 주변의 +/-50개 뉴클레오타이드에 위치한다. 일부 실시형태에서, 표적화된 서열은 TSS 코어의 TSS와 실질적으로 중첩된다. 일부 실시형태에서, 표적화된 서열 중첩부는 TSS 코어의 TSS에서 시작하거나 종결된다. 일부 실시형태에서, 표적화된 서열은 업스트림 또는 다운스트림 방향으로 TSS 코어의 TSS와 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 19개 뉴클레오타이드만큼 중첩된다.

[0072]

주형 가닥상의 표적화된 서열의 위치는 표적화된 서열의 5' 말단의 위치에 의해 한정된다. 표적화된 서열의 5' 말단은 TSS 코어의 임의의 위치에 있을 수 있고, 표적화된 서열은 TSS 코어의 1번 위치 내지 4001번 위로부터 선택된 임의의 위치에서 시작할 수 있다. 본원에서 참조를 위해, 표적화된 서열의 가장 5' 말단이 TSS 코어의 1번 위치부터 2000번 위치까지일 경우, 표적화된 서열은 TSS의 업스트림으로서 간주되며, 표적화된 서열의 가장 5' 말단이 TSS 코어의 2002번 위치부터 4001번 위치까지일 경우, 표적화된 서열은 TSS의 다운스트림으로서 간주된다. 표적화된 서열의 가장 5' 말단이 2001번 뉴클레오타이드에 있을 경우, 표적화된 서열은 TSS 코어의 서열인 것으로 간주되며 TSS의 업스트림도 다운스트림도 아닌 것으로 간주된다.

[0073]

추가 참조를 위해, 예를 들면, 표적화된 서열의 5' 말단이 TSS 코어의 1600번 위치에 있을 경우, 즉 TSS의 1600번째 뉴클레오타이드일 경우, 표적화된 서열은 TSS 코어의 1600번 위치에서 시작하고 TSS의 업스트림인 것으로 간주된다.

[0074]

하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 듀플렉스를 형성하는 2개의 가닥을 가질 수 있는데, 이때 하나의 가닥은 가이드 가닥이다. saRNA 듀플렉스는 또한 이중 가닥의 saRNA로서도 지칭된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 이중 가닥 saRNA 또는 saRNA 듀플렉스는 가닥 간 하이브리드화가 듀플렉스 구조의 영역을 형성할 수 있는 1개 이상 및 바람직하게는 2개의 가닥을 포함하는 saRNA이다. 이중 가닥 saRNA의 2개 가닥은 안티센스 가닥 또는 가이드 가닥 및 센스 가닥 또는 패신저 가닥으로서 언급된다.

[0075]

saRNA 듀플렉스의 안티센스 가닥은 안티센스 가닥 saRNA 또는 안티센스 saRNA와 상호교환 가능하게 사용되며, 표적 안티센스 RNA 전사체 내의 한 영역과 높은 상동성 정도를 갖는다. 안티센스 가닥은 표적 안티센스 RNA 전사체 또는 표적화된 서열 내의 영역과 5개 미만 또는 4개 또는 3개 미만 또는 2개 미만 또는 1개 미만의 불일치를 가질 수 있거나 불일치를 갖지 않을 수 있다. 따라서, 안티센스 가닥은 주형 가닥상의 표적화된 서열과 높은 상보성 정도를 갖는다. saRNA 듀플렉스의 센스 가닥은 센스 가닥 saRNA 또는 센스 saRNA와 상호교환 가능하게 사용되며, 주형 가닥상의 표적화된 서열과 높은 서열 동일성 정도를 갖는다. 일부 실시형태에서, 표적화된 서열



은 주형 가닥의 프로모터 부위 내에 위치한다. 일부 실시형태에서, 표적화된 서열은 주형 가닥의 TSS 코어 내에 위치한다.

- [0076] 표적화된 서열에 상대적인, saRNA 듀플렉스의 안티센스 가닥 및/또는 센스 가닥의 위치는 TSS 코어 서열을 참조함으로써 정의된다. 예를 들면, 표적화된 서열이 TSS의 다운스트림일 경우, 안티센스 saRNA 및 센스 saRNA는 TSS의 다운스트림에서 시작한다. 다른 예에서, 표적화된 서열이 TSS 코어의 200번 위치에서 시작할 경우, 안티센스 saRNA 및 센스 saRNA는 TSS의 업스트림에서 시작한다.
- [0077] saRNA, 표적 유전자, 표적 유전자의 암호화 가닥, 표적 유전자의 주형 가닥, 표적 안티센스 RNA 전사체, 표적 전사체, 표적화된 서열/표적 부위 및 TSS 간의 관계는 도 3에 도시되어 있다.
- [0078] "가닥"은 본 발명의 맥락에서 비천연 발생 또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드의 연속적 서열을 의미한다. 2개 이상의 가닥은 별개의 분자일 수 있거나 각각 별개의 분자의 일부분을 형성할 수 있거나, 예를 들면 폴리에틸렌글리콜 링커와 같은 링커에 의해 공유 연결될 수 있다. saRNA의 적어도 하나의 가닥은 표적 안티센스 RNA에 상보적인 영역을 포함할 수 있다. 이러한 가닥은 saRNA 듀플렉스의 안티센스 또는 가이드 가닥으로 지칭된다. saRNA의 안티센스 가닥에 상보적인 영역을 포함하는 saRNA의 제2 가닥은 센스 또는 패신저 가닥으로 지칭된다.
- [0079] saRNA 듀플렉스는 듀플렉스 영역을 포함하여 헤어핀 구조를 형성하는 적어도 부분적으로 자가-상보적인 단일 분자로부터 형성될 수도 있다. 이러한 경우에, 용어 "가닥"은 saRNA의 또 다른 내부 영역에 상보적인 saRNA의 영역들 중 하나를 의미한다. saRNA의 가이드 가닥은 표적 안티센스 RNA 전사체 내의 서열과 5개 미만, 또는 4개 또는 3개 미만 또는 2개 미만 또는 1개 미만의 불일치를 가질 것이다.
- [0080] 일부 실시형태에서, saRNA의 패신저 가닥은 가이드 가닥상의 상응하는 뉴클레오타이드에 상보적이지 않은 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 이러한 뉴클레오타이드는 가이드 가닥과의 불일치로 지칭된다. 가이드 가닥과의 불일치는 가이드 가닥의 우선적 적재를(loading) 고취할 수 있다(Wu et al., PLoS ONE, vol.6(12):e28580 (2011), 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다). 하나의 실시형태에서, 가이드 가닥과의 적어도 하나의 불일치는 패신저 가닥의 3' 말단에 있을 수 있다. 하나의 실시형태에서, 패신저 가닥의 3' 말단은 가이드 가닥과의 1 내지 5개 불일치를 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 패신저 가닥의 3' 말단은 2 내지 3개의 불일치를 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 패신저 가닥의 3' 말단은 가이드 가닥과 6 내지 10개의 불일치를 포함할 수 있다.
- [0081] 하나의 실시형태에서, saRNA 듀플렉스는 증식 세포에서 효과를 나타낼 수 있다.
- [0082] saRNA 듀플렉스는 표적 안티센스 RNA 전사체의 영역에 대해 siRNA-유사한 상보성, 즉 saRNA 듀플렉스 내 가이드 가닥의 5' 말단으로부터 2 내지 6개의 뉴클레오타이드와 표적 안티센스 RNA 전사체의 한 영역 사이에 100% 상보성을 가진다. 또한, saRNA의 기타 뉴클레오타이드는 표적 안티센스 RNA 전사체의 영역에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 상보성을 가진다. 예를 들면, (5' 말단부터 계수하여) saRNA의 3' 말단까지의 뉴클레오타이드 7은 표적 안티센스 RNA 전사체의 한 영역에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100%의 상보성을 가질 수 있다.
- [0083] 용어 "소형 간섭 RNA" 또는 "siRNA"는 맥락상 RNA 간섭(RNAi) 경로에 관여되고 특정 유전자의 발현을 간섭 또는 저해하는 전형적으로 20-25개의 뉴클레오타이드 길이의 이중 가닥의 RNA를 의미한다. 상기 유전자는 상기 siRNA의 표적 유전자이다. 예를 들면, APOA1 유전자의 발현을 방해하는 siRNA는 "APOA1-siRNA"로 지칭되고, APOA1 유전자는 표적 유전자이다. siRNA는 2개의 가닥의 각 말단에 3' 오버행(overhang)(예를 들면, 2개의 뉴클레오타이드)을 갖는 일반적으로 약 21개의 뉴클레오타이드 길이를 가진다.
- [0084] siRNA는 특정 서열에서 표적 유전자의 하나 이상의 RNA 전사체에 결합하고 이의 절단을 촉진함으로써 표적 유전자 발현을 저해한다. 전형적으로 RNAi에서, RNA 전사체는 mRNA이고, 따라서 mRNA의 절단은 유전자 발현의 하향 조절을 초래한다. 본 발명에서, 어떠한 이론에도 구애받지 않고, 가능한 기작들 중 하나는 본 발명의 saRNA가 표적 안티센스 RNA 전사체의 절단에 의해 표적 유전자 발현을 조절할 수 있다는 것이다.
- [0085] 이중 가닥 saRNA는 하나 이상의 단일 가닥 뉴클레오타이드 오버행을 포함할 수 있다. 이중 가닥 saRNA 및 siRNA의 맥락에서 용어 "오버행" 또는 "테일"은 saRNA 또는 siRNA의 듀플렉스 구조로부터 돌출된 쌍을 이루지 않은 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 의미한다. 예를 들면, saRNA의 한 가닥의 3'-말단이 한 가닥의 5'-말단을 넘어서 뻗어 있거나 그 반대일 경우, 뉴클레오타이드 오버행이 존재한다. saRNA는 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 오버행을 포함할 수 있다; 대안으로, 오버행은 적어도 2개의 뉴클레오타이드, 적어도 3개의 뉴클레오타이드, 적

어도 4개의 뉴클레오타이드, 적어도 5개의 뉴클레오타이드 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 오버행은 데옥시뉴클레오타이드/뉴클레오사이드를 포함하는 뉴클레오타이드/뉴클레오사이드 유사체로 구성될 수 있다. 오버행(들)은 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 이들의 조합상에 있을 수 있다. 추가로, 오버행의 뉴클레오타이드(들)은 saRNA의 안티센스 또는 센스 가닥의 5' 말단, 3' 말단 또는 양 말단 모두에 존재할 수 있다. 2개의 올리고뉴클레오타이드를 하이브리드화시 하나 이상의 단일 가닥의 오버행을 형성하도록 디자인할 경우, 이러한 오버행은 상보성의 결정과 관련하여 불일치로서 간주되지 않는다. 예를 들면, 길이가 19개 뉴클레오타이드인 하나의 올리고뉴클레오타이드 및 길이가 21개 뉴클레오타이드인 다른 올리고뉴클레오타이드를 포함하고 더 긴 올리고뉴클레오타이드가 더 짧은 올리고뉴클레오타이드에 완전히 상보적인 19개 뉴클레오타이드의 서열을 포함하는 saRNA는, 본원에 기재된 목적상 "그래도 완전히 상보적인" 것으로 언급될 수 있다.

[0086] 하나의 실시형태에서, 이중 가닥 saRNA의 안티센스 가닥은 3' 말단 및/또는 5' 말단에 1 내지 10개의 뉴클레오타이드 오버행을 갖는다. 하나의 실시형태에서, 이중 가닥 saRNA의 안티센스 가닥은 이의 3' 말단에 1 내지 4개의 뉴클레오타이드 오버행을 갖거나 이의 3' 말단에 1 내지 2개의 뉴클레오타이드 오버행을 갖는다. 하나의 실시형태에서, 이중 가닥 saRNA의 센스 가닥은 3' 말단 및/또는 5' 말단에 1 내지 10개의 뉴클레오타이드 오버행을 갖는다. 하나의 실시형태에서, 이중 가닥 saRNA의 센스 가닥은 이의 3' 말단에 1 내지 4개의 뉴클레오타이드 오버행을 갖거나 이의 3' 말단에 1 내지 2개의 뉴클레오타이드 오버행을 갖는다. 하나의 실시형태에서, 이중 가닥 saRNA의 센스 가닥과 안티센스 가닥 둘 다는 3' 오버행을 갖는다. 3' 오버행은 하나 이상의 우라실, 예를 들면, 서열 UU 또는 UUU를 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 오버행 내의 뉴클레오타이드들 중 하나 이상은 뉴클레오사이드 티오포스페이트로 치환되고, 여기서 뉴클레오사이드간 연결은 티오포스페이트이다. 하나의 실시형태에서, 오버행은 하나 이상의 데옥시리보뉴클레오사이드, 예를 들면, 서열 dTdT 또는 dTdTdT를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 오버행은 서열 dT\*dT를 포함하고, 여기서 \*은 티오포스페이트 뉴클레오사이드간 연결이다.

[0087] 당업계의 숙련가들은, saRNA가 표적 유전자 발현을 조절하는 기작에 관계없이, 표적 안티센스 RNA 전사체 또는 표적화된 서열에 대한 언급에 의해 본 발명의 saRNA를 정의하는 것이 편리하다는 것을 이해할 것이다. 그러나, 본 발명의 saRNA는 표적 유전자에 대한 언급에 의해 대안적으로 정의될 수 있다. 표적 안티센스 RNA 전사체는 표적 유전자의 암호화 가닥상의 게놈 영역에 대해 상보적이고, 본 발명의 saRNA는 결국 표적 안티센스 RNA 전사체의 한 영역에 대해 상보적이고, 따라서, 본 발명의 saRNA는 표적 유전자의 암호화 가닥상의 영역에 대해 서열 동일성을 갖는 것으로 정의될 수 있다. 표적 안티센스 RNA 전사체에 대한 언급에 의한 본 발명의 saRNA의 정의와 관련하여 본원에서 논의된 모든 특징은 표적 유전자에 대한 언급에 의한 본 발명의 saRNA의 정의에 준용되고, 따라서, 표적 안티센스 RNA 전사체에 대한 상보성의 임의의 논의는 표적 유전자의 게놈 서열에 대한 동일성을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 본 발명의 saRNA는 표적 유전자 상의 게놈 서열에 대해 높은 퍼센트 동일성, 예를 들면, 적어도 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 또는 100% 동일성을 가질 수 있다. 게놈 서열은 표적 유전자는 표적 유전자의 전사 시작 부위의 2000개, 1000개, 500개, 250개 또는 100개 이하의 뉴클레오타이드 업스트림 또는 다운스트림일 수 있다. 이것은 표적 유전자의 프로모터 영역과 정렬될 수 있다. 따라서, saRNA는 표적 유전자의 프로모터 영역과 정렬되는 서열에 대해 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0088] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA를 디자인하기 위해 표적 안티센스 RNA 전사체의 존재가 결정될 필요는 없다. 다시 말해서, saRNA의 디자인은 표적 안티센스 RNA 전사체의 동정을 필요로 하지 않는다. 예를 들면, TSS 코어의 뉴클레오타이드 서열, 즉 표적 유전자의 전사 시작 부위의 2000개 뉴클레오타이드 업스트림부터 표적 유전자의 전사 시작 부위의 2000개 뉴클레오타이드 다운스트림까지의 영역 내의 서열은, 서열분석하거나 데이터 베이스에서 검색함으로써 표적 유전자의 암호화 가닥의 게놈 서열에 의해 수득될 수 있다. 주형 가닥상의 TSS 코어의 1번 위치부터 4001번 위치까지의 임의의 위치에서 시작하는 TSS 코어 내의 표적화된 서열을 선택하고 이어서 이를 사용하여 saRNA 서열을 디자인할 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, saRNA는 표적화된 서열의 역 상보체와 높은 서열 동일성 정도를 갖는다.

[0089] 이어서, 전체 게놈 내의 saRNA 서열의 표적-이탈 히트(hit) 수, 0개 불일치(0mm) 히트 수, 및 1개 불일치(1mm) 히트 수를 결정한다. "표적-이탈 히트 수"란 용어는 표적 유전자의 주형 가닥상의 saRNA의 표적화된 서열과 동일한, 전체 게놈 내의 다른 부위의 수를 의미한다. "0mm 히트 수"란 용어는 그 상보체와 0개 불일치로 하이브리드화하거나 결합할 수 있는 saRNA의 표적 전사체 이외의 공지된 단백질 암호화 전사체의 수를 의미한다. 다시 말하면, "0mm 히트 수"는 saRNA 서열과 완전히 동일한 영역을 포함하는 saRNA의 표적 전사체 이외의, 공지된 단백질 암호화 전사체의 총 수를 계수한 것이다. "1mm 히트 수"란 용어는 그 상보체와 1개의 불일치로 하이브리드화하거나 결합할 수 있는 saRNA의 표적 전사체 이외의 공지된 단백질 암호화 전사체의 수를 의미한다. 다시 말하면, "1mm 히트 수"는 saRNA 서열과 오직 1개의 불일치로 동일한 영역을 포함하는 saRNA의 표적 전사체

이외의, 공지된 단백질 암호화 전사체의 총 수를 계수한 것이다. 하나의 실시형태에서, 표적-이탈 히트를 갖지 않고 0mm 히트를 갖지 않고 1mm 히트를 갖지 않는 saRNA 서열만이 선택된다. 본 출원에 개시된 이러한 saRNA 서열들에 있어, 각각은 표적-이탈 히트를 갖지 않고 0mm 히트를 갖지 않고 1mm 히트를 갖지 않는다.

[0090] 2011년 6월 23일자로 출원된 US 2013/0164846에 개시된 방법(saRNA 알고리즘)(이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 인용된다)을 또한 사용하여 saRNA를 디자인할 수도 있다. saRNA의 디자인은 미국 특허 제8,324,181호 및 미국 특허 제7,709,566호(코레이(Corey) 등), 미국 특허 공보 제2010/0210707호(리(Li) 등) 및 보틸라(Voutilainen) 등), 문헌[Mol Ther Nucleic Acids, vol. 1, e35 (2012)](이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에도 개시되어 있다.

[0091] "존재의 결정"은 적합한 표적 안티센스 RNA 전사체를 동정하기 위해 EST 및/또는 안티센스 RNA 전사체의 데이터를 탐색하거나 세포내 표적 안티센스 RNA 전사체의 물리적 존재를 확인하기 위해 RT PCR 또는 임의의 기타 공지된 기술을 사용하는 것을 의미한다.

[0092] 일부 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 이중 가닥의 분자는 제1 가닥 및 제2 가닥을 포함한다. 이중 가닥일 경우, 듀플렉스의 각 가닥은 적어도 14개 또는 적어도 18개, 예를 들면, 19, 20, 21 또는 22개의 뉴클레오타이드 길이를 가진다. 듀플렉스는 적어도 12개 또는 적어도 15개 또는 적어도 17개 또는 적어도 19개의 뉴클레오타이드의 길이에 걸쳐 하이브리드화될 수 있다. 각 가닥은 정확히 19개의 뉴클레오타이드 길이를 가질 수 있다. 바람직하게, saRNA의 길이는 30개 미만의 뉴클레오타이드인데, 이는 이러한 길이를 초과하는 올리고뉴클레오타이드 듀플렉스가 인터페론 반응이 유도될 위험성을 증가시킬 수 있기 때문이다. 하나의 실시형태에서, saRNA의 길이는 19개 내지 25개 뉴클레오타이드이다. saRNA 듀플렉스를 형성하는 가닥은 길이가 동일하거나 상이할 수 있다.

[0093] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 표적화된 서열에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100% 상보성을 갖는 적어도 14개의 뉴클레오타이드 내지 30개 미만의 뉴클레오타이드의 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 표적화된 서열에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100% 상보성을 갖는 서열은 길이가 적어도 15, 16, 17, 18 또는 19개 뉴클레오타이드, 또는 18 내지 22개 또는 19 내지 21개 또는 정확히 19개이다.

[0094] 본 발명의 saRNA는 표적 안티센스 RNA 전사체에 대해 상보적이지 않은 짧은 3' 또는 5' 서열을 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 이러한 서열은 가닥의 3' 말단에 있다. 상기 서열은 길이가 1 내지 5개의 뉴클레오타이드, 2 또는 3개일 수 있다. 상기 서열은 우라실이고, 따라서 이것은 2 또는 3개의 우라실의 3' 스트레치일 수 있다. 상기 서열은 dT와 같은 하나 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 서열 내의 뉴클레오타이드들 중 하나 이상은 뉴클레오타이드 티오포스페이트로 치환되고, 여기서 뉴클레오타이드간 연결은 티오포스페이트이다. 비제한적 예로서, 서열은 서열 dT\*dT를 포함하며, 여기서 \*는 티오포스페이트 뉴클레오타이드간 연결이다. 이러한 비상보적 서열은 "테일"로서 언급될 수 있다. 3' 테일이 존재할 경우, 가닥은 더 길 수 있는데, 예를 들면, UU 또는 UUU일 수 있는 3' 테일이 더해진 19개 뉴클레오타이드일 수 있다. 이러한 3' 테일은 saRNA와 표적 안티센스 RNA 전사체 간의 상보성을 결정하는 것과 관련하여 불일치로서 간주되지 않는다.

[0095] 따라서, 본 발명의 saRNA는 (i) 표적 안티센스 RNA 전사체의 한 영역에 대해 적어도 80% 상보성을 갖는 서열; 및 (ii) 우라실 잔기를 포함하거나 우라실 잔기로 구성될 수 있는 1 내지 5개의 뉴클레오타이드의 3' 테일로 구성될 수 있다. 따라서, saRNA는 전형적으로, 3' 테일(존재할 경우)을 제외하고 이의 전체 길이에 걸쳐서 표적 안티센스 RNA 전사체의 영역에 대한 상보성을 가질 것이다. 본 출원에 개시된 saRNA 서열들 중 어느 것이라도 임의로 이러한 3' 테일을 포함할 수 있다. 따라서, saRNA 표 및 서열목록에 개시된 saRNA 서열들 중 어느 것이라도 이러한 3' 테일을 포함할 수 있다. 본 발명의 saRNA는 다이서(Dicer) 또는 드로샤(Drosha) 기질 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0096] 본 발명의 saRNA는 플랭킹 서열(fanking sequence)을 함유할 수 있다. 플랭킹 서열은 본 발명의 saRNA의 3' 말단 또는 5' 말단에 삽입될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 플랭킹 서열은 saRNA가 miRNA 입체형태를 갖도록 하는 miRNA의 서열이고, 드로샤 및 다이서로 프로세싱될 수 있다. 비제한적 예에서, 본 발명의 saRNA는 2개의 가닥을 가지며 마이크로RNA 전구체, 예를 들면, miR-30 골격 플랭킹 서열로 클로닝된다.

[0097] 본 발명의 saRNA는 제한 효소 기질 또는 인식 서열을 포함할 수 있다. 제한 효소 인지 서열은 본 발명의 saRNA의 3' 말단 또는 5' 말단에 존재할 수 있다. 제한 효소의 비제한적 예는 NotI 및 AscI를 포함한다.

[0098] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 함께 안정하게 염기-쌍을 이룬 2개의 가닥으로 이루어진다. 일부 실시

형태에서, 패신저 가닥은 가이드 가닥과의 불일치로서 지칭되는, 가이드 가닥상의 상응하는 뉴클레오타이드에 상보적이지 않은 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 가이드 가닥과의 적어도 하나의 불일치는 패신저 가닥의 3' 말단에 있을 수 있다. 하나의 실시형태에서, 패신저 가닥의 3' 말단은 가이드 가닥과의 1 내지 5개의 불일치를 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 패신저 가닥의 3' 말단은 가이드 가닥과의 2 내지 3개의 불일치를 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 패신저 가닥의 3' 말단은 가이드 가닥과의 6 내지 10개의 불일치를 포함할 수 있다.

[0099] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 saRNA는 각 가닥의 3' 말단에 쌍을 이루지 않은 다수의 뉴클레오타이드를 포함하여 3' 오버행을 형성할 수 있다. 각 가닥의 3' 오버행을 형성하는 쌍을 이루지 않은 뉴클레오타이드의 수는 1 내지 5개의 뉴클레오타이드 또는 1 내지 3개의 뉴클레오타이드 또는 2개의 뉴클레오타이드의 범위일 수 있다. 3' 오버행은 상기 언급한 3' 테일에서 형성될 수 있고, 따라서 상기 3' 테일은 이중 가닥 saRNA의 3' 오버행일 수 있다.

[0100] 따라서, 본 발명의 saRNA는 (i) 표적 안티센스 RNA 전사체의 영역과 적어도 80%의 상보성을 갖는 서열 및 (ii) 우라실 잔기를 포함할 수 있는 1 내지 5개의 뉴클레오타이드의 3' 테일로 이루어진다. 본 발명의 saRNA는 3' 테일(존재할 경우)을 제외하고 전체 길이에 걸쳐 표적 안티센스 RNA 전사체의 한 영역과 상보성을 가질 수 있다. 상기에 언급된 바와 같이, "표적 안티센스 RNA 전사체에 대해 상보적인" 대신에, 본 발명의 saRNA는 또한 표적 유전자의 암호화 가닥과 "동일성"을 갖는 것으로 정의될 수 있다. 본 발명의 saRNA는 이중 가닥일 수 있고, (i) 표적 안티센스 RNA 전사체의 한 영역과 적어도 80% 상보성을 갖는 첫번째 서열과 (ii) 1 내지 5개의 뉴클레오타이드의 3' 오버행을 포함하는 첫번째 가닥 및 (i) 상기 첫번째 서열과 함께 듀플렉스를 형성하는 두번째 서열과 (ii) 1 내지 5개의 뉴클레오타이드의 3' 오버행을 포함하는 두번째 가닥으로 이루어질 수 있다.

[0101] 본원에서 설명된 바와 같이, C/EBP $\alpha$  유전자에 대한 서열은 C/EBP $\alpha$ -saRNA를 디자인하기 위해 사용된다. CEBPA 유전자의 표적 안티센스 RNA 전사체의 서열은 C/EBP $\alpha$ -saRNA를 디자인하기 위한 C/EBP $\alpha$  유전자의 서열로부터 결정될 수 있다. 그러나, 이러한 표적 안티센스 RNA 전사체의 존재는 결정될 필요는 없다. 본 발명의 적합한 C/EBP $\alpha$ -saRNA의 서열은 표 1에 제공된다. 따라서, 서열번호 2, 4, 6, 8, 10 및 12로부터 선택된 서열을 포함하는 제1 가닥을 갖는 C/EBP $\alpha$ -saRNA가 제공된다. 임의로, C/EBP $\alpha$ -saRNA는 이들 서열의 3' 말단에서 3' 테일을 포함할 수 있다.

[0102] 단일 가닥 C/EBP $\alpha$ -saRNA는 제1 가닥으로만 이루어지는 반면, 이중 가닥의 C/EBP $\alpha$ -saRNA는 제2 가닥도 갖는다. 단일 가닥의 CEBPA-saRNA는 표 1 및 1A의 안티-센스 가닥으로부터 선택된 서열을 포함한다. 이중 가닥 C/EBP $\alpha$ -saRNA는 표 1 및 표 1A의 안티센스 가닥들로부터 선택된 서열을 포함하는 제1 가닥, 및 표 1 및 표 1A의 상응하는 센스 가닥인 서열을 포함하는 제2 가닥을 포함한다. 안티센스 및/또는 센스 가닥은 3' 오버행을 포함할 수 있다.

[0103] [표 1]

saRNA 서열

	ID	센스 가닥 (패신저)	서열 번호	안티-센스 가닥 (가이드)	서열 번호
인간 C/EBP $\alpha$	AW1	CGGUCAUUGUCACUGGUCA	1	UGACCAGUGACAAUGACCG	2
	AW2	AGCUGAAAGGAUUAUCCU	3	AGGAUGAAUCCUCCAGCU	4
	NR1	ACAUAGUCCAGUGAUUAA	5	UUAUACACUGGGACUAUGU	6
	NR2	GAAUAAGACUUUGUCCAAU	7	AUUGGACAAAGUCUUAUUC	8
	PR1	GCGCGGAUUCUCUUUCAA	9	UUUGAAAGAGAAUCCGCGC	10
	PR2	CCAGGAACUCGUCGUUGAA	11	UUCAACGACGAGUCCUGG	12

[0104]



[0105] [표 1A]

추가의 saRNA 서열

센스 가닥 (패신저)	서열번호	안티-센스 가닥 (가이드)	서열번호
GGUAUACAUCUCAGAGCU	34	AGCUCUGAGGAUGUAUACC	35
CUAGCUUUCUGGUGAGCU	36	AGUCACACCAGAAAGCUAG	37
CGGGCUUGUCGGGAUCUCA	38	UGAGAUCCCGACAAGCCCG	39
GCAUUGGAGCGGUGAGUUU	40	AAACUCACCGCUCCAUGC	41
GGCACAAGGUUAUCCUAAA	42	UUUAGGAUAACCUUGUGCC	43
GCACAAGGUUAUCCUAAA	44	AUUUAGGAUAACCUUGUGC	45
CGGUCAUUGUCACUGGUCA	46	UGACCAGUGACAACGACCG	47
CCAGAACUCGUCGUUGAA	48	UUCAACGACGAGUUCUGG	49

[0106]

[0107] 이기능성 또는 이중-기능성 올리고뉴클레오타이드는 또한 C/EBP  $\alpha$  유전자 발현을 상향조절하고 C/EBP  $\beta$  유전자 발현을 하향조절하도록 디자인된다. 이중-기능성 올리고뉴클레오타이드의 한 가닥은 C/EBP  $\alpha$  유전자 발현을 활성화시키고, 다른 하나는 C/EBP  $\beta$  유전자 발현을 저해한다. 바람직한 이중-기능성 올리고뉴클레오타이드 서열은 표 2A에 제시한다. 각 가닥은 표 2B에 나타난 바와 같은 다이서 기질 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0108] [표 2A]

이기능성 올리고뉴클레오타이드 서열

ID	19 랑체 1 (표적 C/EBP $\beta$ (NM_005194))	19 랑체 2 (표적 C/EBP $\alpha$ -AS (NM_004364))
sa-CEBPA_si-CEBPB-1	AGAAGUUGGCCACUCCAU (서열번호 13)	AUGGAGUCGGCCGACUUCU (서열번호 14)
sa-CEBPA_si-CEBPB-2	AAGAGGUCGGAGAGGAAGU (서열번호 15)	AGUUCUGGGCCGACCUGUU (서열번호 16)
sa-CEBPA_si-CEBPB-3	UUGUACUCGUCGUGUGCU (서열번호 17)	AGAACAGCAACGAGUACCG (서열번호 18)
sa-CEBPA_si-CEBPB-4	UACUCGUCGUGUGCUUGU (서열번호 19)	ACAAGAAGCAACGAGUA (서열번호 20)

[0109]

[0110] [표 2B]

이기능성 올리고뉴클레오타이드 서열의 다이서 기질 서열

ID	다이서 기질 가닥 1(대문자의 RNA; 밑줄친 소문자의 DNA)	다이서 기질 가닥 2(대문자의 RNA; 밑줄친 소문자의 DNA)
sa-CEBPA_si-CEBPB-1	AGAAGUUGGCCACUCCAUUGGGga (서열번호 21)	tCCCCAUGGAGUCGGCCGACUUCUAC (서열번호 22)
sa-CEBPA_si-CEBPB-2	AAGAGGUCGGAGAGGAAGUCGUCgt (서열번호 23)	acGACGAGUUCUGGCCGACCUGUCC (서열번호 24)
sa-CEBPA_si-CEBPB-3	UUGUACUCGUCGUGUGCUUGUCca (서열번호 25)	tgGACAAGAAGCAACGAGUACGGG (서열번호 26)
sa-CEBPA_si-CEBPB-4	UACUCGUCGUGUGCUUGUCCACcg (서열번호 27)	cgGUGACAAGAAGCAACGAGUACC (서열번호 28)

[0111]

[0112] 본 발명의 saRNA는 임의의 적합한 방법에 의해, 예를 들면, 합성적으로 또는 당업계의 숙련가들에게 널리 공지된 표준 분자 생화학 기술을 사용하는 세포에서의 발현에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 saRNA는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성되거나 재조합적으로 생성될 수 있다.

[0113] saRNA의 화학적 변형

[0114] 본원의 saRNA에서, 용어 "변형" 또는 적절하게는 "변형된"은 A, G, U 또는 C 리보뉴클레오타이드와 관련하여 구조적 및/또는 화학적 변형을 의미한다. 본 발명의 saRNA에서의 뉴클레오타이드는 비표준 뉴클레오타이드, 예를 들면, 비-천연적으로 발생하는 뉴클레오타이드 또는 화학적으로 합성된 뉴클레오타이드 또는 데옥시뉴클레오타

이드를 포함할 수 있다. 본 발명의 saRNA는, 예를 들면, 당, 핵염기 또는 뉴클레오사이드간 결합(예를 들면, 연결성 포스페이트/포스포디에스테르 연결/포스포디에스테르 골격)으로의 임의의 유용한 변형을 포함할 수 있다. 피리미딘 핵염기의 하나 이상의 원자는 임의로 치환된 아미노, 임의로 치환된 티올, 임의로 치환된 알킬(예를 들면, 메틸 또는 에틸) 또는 할로(예를 들면, 클로로 또는 플루오로)로 대체되거나 치환될 수 있다. 특정 실시 형태에서, 변형(예를 들면, 하나 이상의 변형)은 당 및 뉴클레오사이드간 결합의 각각에 존재할 수 있다. 본 발명에 따른 변형은 리보핵산(RNA)의 데옥시리보핵산(DNA), 트레오스 핵산(TNA), 글리콜 핵산(GNA), 펩타이드 핵산(PNA), 잠금 핵산(Locked nucleic acid; LNA) 또는 이들의 하이브리드로의 변형일 수 있다.

[0115] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 본원에 기재된 적어도 하나의 변형을 포함할 수 있다.

[0116] 다른 실시형태에서, saRNA는 saRNA 듀플렉스이고, 센스 가닥 및 안티센스 서열은 독립적으로 적어도 하나의 변형을 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 센스 서열은 변형을 포함할 수 있고, 안티센스 가닥은 변형되지 않을 수 있다. 다른 비제한적 예로서, 안티센스 서열은 변형을 포함할 수 있고, 센스 가닥은 변형되지 않을 수 있다. 또 다른 비제한적 예로서, 센스 서열은 하나 이상의 변형을 포함할 수 있고 안티센스 가닥은 하나의 변형을 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 안티센스 서열은 하나 이상의 변형을 포함할 수 있고 센스 가닥은 하나의 변형을 포함할 수 있다.

[0117] 본 발명의 saRNA는 당, 핵염기 및/또는 뉴클레오사이드간 결합의 변형들의 조합을 포함할 수 있다. 이들 조합은 본원 또는 2012년 10월 3일자로 출원된 국제 공개공보 W02013/052523에 기재된 임의의 하나 이상의 변형, 특히 화학식 (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IV1) 및 (IXa)-(IXr))을 포함할 수 있으며, 상기 공개공보의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다.

[0118] 본 발명의 saRNA는 분자의 전체 길이를 따라 균일하게 변형되거나 변형되지 않을 수 있다. 예를 들면, 하나 이상 또는 모든 유형의 뉴클레오타이드(예를 들면, 퓨린 또는 피리미딘, 또는 A, G, U 및 C 중 어느 하나 이상 또는 모두)는 본 발명의 saRNA에 균일하게 변형되거나 변형되지 않을 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 saRNA 중 모든 뉴클레오타이드 X는 변형된 것이고, 여기서, X는 뉴클레오타이드 A, G, U 및 C 중 어느 하나 또는 조합 A+G, A+U, A+C, G+U, G+C, U+C, A+G+U, A+G+C, G+U+C 및 A+G+C 중 어느 하나일 수 있다.

[0119] 상이한 당 변형, 뉴클레오타이드 변형 및/또는 뉴클레오사이드간 결합(예를 들면, 골격 구조)은 saRNA의 다양한 위치에 존재할 수 있다. 당염계의 숙련가들은 뉴클레오타이드 유사체 또는 다른 변형(들)이 saRNA의 기능이 실질적으로 감소되지 않도록 하는 saRNA의 임의의 위치(들)에 위치될 수 있음을 이해할 것이다. 본 발명의 saRNA는 약 1% 내지 약 100%의 변형된 뉴클레오타이드(총 뉴클레오타이드 함량에 관하여 또는 하나 이상 유형의 뉴클레오타이드, 즉 A, G, U 및 C 중 임의의 하나 이상에 관하여) 또는 임의의 개재 백분율(intervening percentage)(예를 들면, 1% 내지 20%, 1% 내지 25%, 1% 내지 50%, 1% 내지 60%, 1% 내지 70%, 1% 내지 80%, 1% 내지 90%, 1% 내지 95%, 10% 내지 20%, 10% 내지 25%, 10% 내지 50%, 10% 내지 60%, 10% 내지 70%, 10% 내지 80%, 10% 내지 90%, 10% 내지 95%, 10% 내지 100%, 20% 내지 25%, 20% 내지 50%, 20% 내지 60%, 20% 내지 70%, 20% 내지 80%, 20% 내지 90%, 20% 내지 95%, 20% 내지 100%, 50% 내지 60%, 50% 내지 70%, 50% 내지 80%, 50% 내지 90%, 50% 내지 95%, 50% 내지 100%, 70% 내지 80%, 70% 내지 90%, 70% 내지 95%, 70% 내지 100%, 80% 내지 90%, 80% 내지 95%, 80% 내지 100%, 90% 내지 95%, 90% 내지 100% 및 95% 내지 100%)을 포함할 수 있다.

[0120] 일부 실시형태에서, 변형은 리보스 환에서 이루어질 수 있다. 리보뉴클레아제로부터 saRNA를 보호하기 위해 리보스상의 2'-OH 그룹은 치환될 수 있다. 예를 들면, -OH 그룹은 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-플루오로(2'-F), 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE), 2'-O-알릴(2'-O-알릴) 등으로 치환될 수 있다.

[0121] 일부 실시형태에서, 변형은 뉴클레오타이드의 바이사이클릭 유도체(LNA, ENA, CLNA, CENA, AENA 등), 어사이클릭(acyclic) 뉴클레오타이드(UNA, PNA 등) 또는 리보스 대신에 피라노스 환을 함유하는 뉴클레오타이드(ANA, HNA)를 포함한다.

[0122] 일부 실시형태에서, 변형은 골격에서 이루어져 saRNA의 뉴클레아제 내성을 증가시킬 수 있다. 비제한적 예에는 포스페이트 그룹(PO)의 포스포로티오에이트(PS) 또는 보라노포스포네이트(PB) 그룹으로의 치환, 3',5'-포스포디에스테르 결합의 2',5'-결합으로의 치환 또는 에스테르 결합 대신에 아마이드 결합 등을 포함한다.

[0123] 일부 실시형태에서, 변형은 핵염기에서 이루어질 수 있다. 예를 들면, 우리딘(U)은 슈도우리딘( $\Psi$ ), 2-티오우리딘(s2U), 디하이드로우리딘(D), 5-브로모-U, 5-요오도-U 등으로 치환될 수 있다. 푸린은 2,6-디아미노푸린으로 치환될 수 있다.

[0124] 일부 실시형태에서, 변형은 saRNA의 말단에서 이루어질 수 있다. 뉴클레아제 내성을 증가시키고 비대칭 RISC 조

립을 촉진하고, 세포내 saRNA 축적을 돕고 saRNA 검출을 가능하게 하기 위해 어떠한 말단 변형이라도 사용할 수 있다. 예를 들면, 형광성 표지 및 바이오틴을 saRNA의 말단에 부착시킬 수 있다. 다른 예에서, 역 테옥시리보스가 saRNA의 말단에서 사용될 수 있다.

[0125] 일부 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 구형 핵산(SNA) 또는 원형 핵산이 되도록 변형될 수 있다. 본 발명의 saRNA의 말단은 화학 시약 또는 효소에 의해 연결시켜 유리 말단을 갖지 않는 구형 saRNA를 생성할 수 있다. 구형 saRNA는 이의 선형 대응물보다 더 안정하고 RNase R 엑소뉴클레아제에 의한 분해에 잘 견딜 것으로 예상된다. 구형 saRNA는 A, G, U 및 C 리보뉴클레오타이드에 대하여 다른 구조적 및/또는 화학적 변형을 추가할 수 포함할 수 있다.

[0126] 일부 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 역 dT 변형을 포함할 수 있다. 역 변형은 5' 말단 또는 3' 말단에서 이루어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드의 2'-OH는 -OMe로 치환되며, 이는 2'-OMe로서 언급된다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드의 2'-OH는 -F로 치환되며, 이는 2'-F로서 언급된다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드들 사이에 포스포로티오에이트 연결이 존재한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 비염기성 변형을 포함할 수 있다.

[0127] 본 발명의 saRNA는 변형들의 조합을 포함할 수 있다. saRNA는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들면, saRNA는 교호되는 2'-F 및 2'-OMe 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, saRNA는 이의 전체 길이에 걸쳐서 변형될 수 있다.

[0128] 가이드 가닥 활성을 간섭하지 않는, 센스 가닥이 불활성화 되도록 하고/하거나 표적-이탈을 감소시키는 어떠한 적합한 변형이라도 사용될 수 있다.

[0129] 표 3은 변형된 CEBPA-saRNA 서열 및 비변형된 CEBPA-saRNA 서열의 비제한적 예를 포함한다. 표 3에서, 소문자는 2'-OMe 변형을 의미한다. '(invdT)'는 3' 및/또는 5' 말단에서의 역 dT의 포함을 의미한다. 'f'는 그 전의 뉴클레오타이드가 2'-F 변형을 가짐을 의미한다. 's'는 뉴클레오타이드들 간에 포스포로티오에이트 연결이 존재함을 의미한다. 'dT'는 테옥시-티미딘을 의미한다. 'dG'는 테옥시-구아노신을 의미한다. 'dA'는 테옥시-아데노신을 의미한다.

[0130] [표 3-1]

변형된 saRNA 서열 - 센스 서열

듀플렉스-ID	센스-ID	센스 서열	서열번호	주
XD-03287	X09198	CGGUCAUUGUCACUGGUCAUU	50	비변형
XD-04353	X12716	cgGfuCfaUfuGfuCfaCfuGfgUfcAfusu	52	
XD-04354	X12718	csgGfuCfaUfuGfuCfaCfuGfgUfcAf(invdt)	54	
XD-04355	X12720	(invdt)cgGfuCfaUfuGfuCfaCfuGfgUfcAf(invdt)	56	
XD-04356	X12721	(invdt)CfdGdGUfCfdAUfUfdGUfCfdACfUfdGdGUfCfdA(invdt)	57	
XD-03302	X09316	GCGGUCAUUGUCACUGGUUU	73	비변형
XD-04358	X12723	gcGfgUfcAfuUfgUfcAfcUfgGfuCfuUfusu	59	
XD-04359	X12725	gscGfgUfcAfuUfgUfcAfcUfgGfuCfuUf(invdt)	61	
XD-04360	X12727	(invdt)gcGfgUfcAfuUfgUfcAfcUfgGfuCfuUf(invdt)	63	
XD-04361	X12728	(invdt)dGCfdGdGUfCfdAUfUfdGUfCfdACfUfdGdGUfCfUfUf(invdt)	64	
XD-03317	X09346	UGAAAGGAUUAUCCUCCUUU	74	비변형
XD-04363	X12730	ugAfaAfgGfaUfuCfaUfcCfuCfcUfuUfusu	66	
XD-04364	X12732	usgAfaAfgGfaUfuCfaUfcCfuCfcUfuUf(invdt)	68	
XD-04365	X12734	(invdt)ugAfaAfgGfaUfuCfaUfcCfuCfcUfuUf(invdt)	70	
XD-04366	X12735	(invdt)UfdGdAdAdAdGdGdAUfUfCfdAUfCfcUfCfcUfUfUf(invdt)	71	

[0131]

[0132] [표 3-2]

변형된 saRNA 서열 - 안티센스 서열

듀플렉스-ID	안티센스-ID	안티센스 서열	서열번호	주
XD-03287	X09199	UGACCAGUGACAAUGACCGUU	51	비변형
XD-04353	X12717	UfGfaCfcAfgUfgAfcAfaUfgAfcCfgsusu	53	
XD-04354	X12719	UfsGfaCfcAfgUfgAfcAfaUfgAfcCfgsusu	55	
XD-04355	X12719	UfsGfaCfcAfgUfgAfcAfaUfgAfcCfgsusu	55	
XD-04356	X12722	UfgaCfCfagUfgaCfaaUfgaCfCfgsusu	58	
XD-03302	X09317	GACCAGUGACAAUGACCGCUU	75	비변형
XD-04358	X12724	AfAfgAfcCfaGfuGfaCfaAfuGfaCfcGfcusu	60	
XD-04359	X12726	AfAfgAfcCfaGfuGfaCfaAfuGfaCfcGfscusu	62	
XD-04360	X12726	AfAfgAfcCfaGfuGfaCfaAfuGfaCfcGfscusu	62	
XD-04361	X12729	gaCfCfagUfgaCfaaUfgaCfCfGcfUfUfusu	65	
XD-03317	X09347	AGGAGGAUGAAUCCUUUCAUU	76	비변형
XD-04363	X12731	AfAfaGfgAfgGfaUfgAfaUfcCfuUfuCfausu	67	
XD-04364	X12733	AfAfaGfgAfgGfaUfgAfaUfcCfuUfuCfasusu	69	
XD-04365	X12733	AfAfaGfgAfgGfaUfgAfaUfcCfuUfuCfasusu	69	
XD-04366	X12736	aggaggaUfgaaUfCfCfUfUfUfCfaUfUfusu	72	

[0133]

[0134]

saRNA 접합체 및 조합

[0135]

접합은 안정성 및/또는 반감기 증가를 초래할 수 있고, 본 발명의 saRNA를 세포, 조직 또는 기관의 특정 부위에 표적화하는데 특히 유용할 수 있다. 본 발명의 saRNA는 다른 폴리뉴클레오타이드, 염료, 중간 삽입제 (intercalating agent)(예를 들면, 아크리딘), 가교결합제(예를 들면, 소랄렌, 미토마이신 C), 포르피린 (TPPC4, 텍사피린, 사피린), 폴리사이클릭 방향족 탄화수소(예를 들면, 페나진, 디하이드로페나진), 인공 엔도 뉴클레아제(예를 들면, EDTA), 알킬화제, 포스페이트, 아미노, 머캅토, PEG(예를 들면, PEG-40K), MPEG, [MPEG]<sub>2</sub>, 폴리아미노, 알킬, 치환된 알킬, 방사성표지 마커, 효소, 합텐(예를 들면, 비오틴), 운반/흡수 촉진제 (예를 들면, 아스피린, 비타민 E, 폴산), 합성 리보뉴클레아제, 단백질, 예를 들면, 당단백질 또는 펩타이드, 예를 들면, 공동-리간드에 대한 특정 친화성을 갖는 분자 또는 항체, 예를 들면, 암 세포, 내피 세포 또는 골 세포와 같은 특정 세포 유형에 결합하는 항체, 호르몬 및 호르몬 수용체, 비-펩타이드성 중, 예를 들면, 지질, 렉틴, 탄수화물, 비타민, 보조인자 또는 약물에 접합되도록 디자인될 수 있다. 핵산 분자에 적합한 접합체는 2012년 12월 14일자로 출원된 국제 공개공보 WO 2013/090648에 개시되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다.

[0136]

본 발명에 따르면, C/EBP α-saRNA는 상이한 기능을 달성하기 위해 RNAi 제제, 작은 간섭 RNA(siRNA), 작은 헤어핀 RNA(shRNA), 긴 비-암호화 RNA(lncRNA), 인핸서 RNA, 인핸서-유도된 RNA 또는 인핸서-구동된 RNA(eRNA), 마이크로RNA(miRNA), miRNA 결합 부위, 안티센스 RNA, 리보자임, 촉매적 DNA, tRNA, 삼중 나선 형성을 유도하는 RNA, 압타머 및 벡터 등의 하나 이상과 함께 투여되거나 또는 이를 암호화할 수 있다. RNAi제, 작은 간섭 RNA(siRNA), 작은 헤어핀 RNA(shRNA), 긴 비-암호화 RNA(lncRNA), 마이크로RNA(miRNA), miRNA 결합 부위, 안티센스 RNA, 리보자임, 촉매적 DNA, tRNA, 삼중 나선 형성을 유도하는 RNA, 압타머 및 벡터의 하나 이상은 하나 이상의 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형은 당 위치에서의 핵산의 화학적 치환, 포스페이트 위치에서의 화학적 치환 및 염기 위치에서의 화학적 치환으로부터 선택될 수 있다. 다른 실시형태에서, 화학적 변형은 변형된 뉴클레오타이드의 도입; 3' 캡핑; 고분자량의 비-면역원성 화합물에 대한 접합; 친지성 화합물에 대한 접합 및 포스포로티오에이트의 포스페이트 골격으로의 도입으로부터 선택된다. 바람직한 실시형태에서, 고분자량의 비-면역원성 화합물은 폴리알킬렌 글리콜이고, 보다 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다.

[0137]

하나의 실시형태에서, C/EBP α-saRNA는 전이유전자에 부착되어 RNA 폴리머라제 II 프로모터로부터 공동 발현될 수 있다. 비제한적 예에서, C/EBP α-saRNA는 녹색 형광 단백질 유전자(GFP)에 부착된다.

[0138]

하나의 실시형태에서, C/EBP α-saRNA는 DNA 또는 RNA 압타머에 부착되고, 이로써 C/EBP α-saRNA-압타머 접합체를 생성할 수 있다. 압타머는 높은 선택성, 친화성 및 안정성을 갖는 올리고뉴클레오타이드 또는 펩타이드이다. 이들은 특이적이고 안정한 3차원 형상으로 추정되고, 이로 인해 표적 분자에 매우 특이적이고 단단한 결합을 제공한다. 압타머는 소분자, 단백질, 핵산 및 심지어 세포, 조직 및 기관과 같은 다양한 분자 표적에 결합하기 위



해 반복된 수 차례의 시험관내 선택법 또는 동등하게는 SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment;기하급수적 농축에 의한 리간드의 체계적 진화)를 통해 조작된 핵산 중일 수 있다. 핵산 압타머는 대표적인 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍 형성 이외의 상호작용을 통해 분자에 특이적인 결합 친화성을 가진다. 과거의 디스플레이 또는 모노클로날 항체(mAb)에 의해 생성된 펩타이드와 같은 핵산 압타머는 선택된 표적에 특이적으로 결합할 수 있고, 결합을 통해 기능하는 분자의 능력을 차단한다. 일부 경우에서, 압타머는 또한 펩타이드 압타머일 수 있다. 임의의 특정 분자 표적의 경우, 핵산 압타머는, 예를 들면, SELEX에 의해 핵산의 조합 라이브러리로부터 동정될 수 있다. 펩타이드 압타머는 효모의 2개의 하이브리드 시스템을 사용하여 확인 될 수 있다. 따라서, 당업계의 숙련가들은 본 발명의 saRNA 또는 세포를 간 세포와 같은 표적 세포에 전달하는데 적합한 압타머를 디자인할 수 있다. DNA 압타머, RNA 압타머 및 펩타이드 압타머가 고려될 수 있다. 간-특이적인 압타머를 사용하는 본 발명의 saRNA의 간으로의 투여가 특히 바람직하다.

[0139] 본원에서 사용된 바와 같이, 전형적인 핵산 압타머는 대략 10 내지 15 kDa(20-45개의 뉴클레오타이드)의 크기를 가지고, 적어도 나노몰 친화성을 갖는 표적에 결합하고, 밀접하게 관련된 표적을 구별한다. 핵산 압타머는 리보핵산, 데옥시리보핵산, 또는 리보핵산과 데옥시리보핵산의 혼합물일 수 있다. 압타머는 단일 가닥의 리보핵산, 데옥시리보핵산, 또는 리보핵산과 데옥시리보핵산의 혼합물일 수 있다. 압타머는 적어도 하나의 화학적 변형을 포함할 수 있다.

[0140] 압타머에 적합한 뉴클레오타이드 길이는 약 15 내지 약 100개의 뉴클레오타이드(nt), 다양한 다른 바람직한 실시형태에서는 15-30 nt, 20-25 nt, 30-100 nt, 30-60 nt, 25-70 nt, 25-60 nt, 40-60 nt, 25-40 nt, 30-40 nt, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40 nt 중의 어느 하나 또는 40-70 nt의 범위이다. 그러나, 서열은 본원에 기재된 거리에서 압타머와 2개의 표적의 상호작용을 수용할 수 있기에 충분한 가요성을 갖도록 디자인될 수 있다. 압타머는 뉴클레아제 및 다른 효소적 활성으로부터 보호를 제공하도록 추가로 변형될 수 있다. 압타머 서열은 당업계에 공지되어 있는 임의의 적합한 방법에 의해 변형될 수 있다.

[0141] C/EBP  $\alpha$ -saRNA-압타머 접합체는 2개의 잔기를 결합시키기 위한 임의의 공지된 방법, 예를 들면, 직접적인 화학 결합 형성, 스트렙타아비딘과 같은 링커를 통한 결합 등을 사용하여 형성될 수 있다.

[0142] 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 항체에 부착될 수 있다. 표적 세포 표면 수용체에 대한 항체를 생성하는 방법은 널리 공지되어 있다. 본 발명의 saRNA 분자는, 예를 들면, RNA 운반체 단백질을 사용하여 공지된 방법으로 이러한 항체에 부착될 수 있다. 이어서, 생성된 복합체는 대상체에 투여되어 수용체-매개된 세포내이입을 통해 표적 세포에 의해 흡수될 수 있다.

[0143] 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 콜레스테롤 모이어티[Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553-6556], 콜산[Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053-1060], 티오에테르, 예를 들면, 베틸-5-트리틸타올[Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306-309; Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765-2770], 티오폴레스테롤[Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533-538], 지방족쇄, 예를 들면, 도데칸다이올 또는 운데실 잔기[Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10:1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49-54], 인지질, 예를 들면, 디-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸-암모늄 1,2-디-O-헥사데실-rac-글리세로-3-H-포스포네이트[Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777-3783], 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜쇄[Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969-973] 또는 아다만탄 아세트산[Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654], 팔미틸 모이어티[Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229-237] 또는 옥타데실 아민 또는 헥실아미노-카보닐옥시콜레스테롤 모이어티[Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923-937]와 같은 지질 잔기와 접합될 수 있으며, 상기 문헌들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다.

[0144] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 마노하란(Manoharan) 등의 미국 공개특허 US 20130184328(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 리간드와 접합된다. 접합체는 리간드-[링커]<sub>임의적</sub>-[테더(tether)]<sub>임의적</sub>-올리고뉴클레오타이드제의식을 가진다. 올리고뉴클레오타이드제는 마노하란 등의 미국 공개특허 US 20130184328(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 화학식 I의 서브유닛을 포함할 수 있다.

[0145] 이러한 핵산/지질 접합체의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 미국 특허 제4,828,979호; 제4,948,882호; 제5,218,105호; 제5,525,465호; 제5,541,313호; 제5,545,730호; 제5,552,538호; 제5,578,717, 5,580,731호; 제

5,591,584호; 제5,109,124호; 제5,118,802호; 제5,138,045호; 제5,414,077호; 제5,486,603호; 제5,512,439호; 제5,578,718호; 제5,608,046호; 제4,587,044호; 제4,605,735호; 제4,667,025호; 제4,762,779호; 제4,789,737호; 제4,824,941호; 제4,835,263호; 제4,876,335호; 제4,904,582호; 제4,958,013호; 제5,082,830호; 제5,112,963호; 제5,214,136호; 제5,082,830호; 제5,112,963호; 제5,214,136호; 제5,245,022호; 제5,254,469호; 제5,258,506호; 제5,262,536호; 제5,272,250호; 제5,292,873호; 제5,317,098호; 제5,371,241, 5,391,723호; 제5,416,203, 5,451,463호; 제5,510,475호; 제5,512,667호; 제5,514,785호; 제5,565,552호; 제5,567,810호; 제5,574,142호; 제5,585,481호; 제5,587,371호; 제5,595,726호; 제5,597,696호; 제5,599,923호; 제5,599,928호 및 제5,688,941호를 포함하나 이에 제한되지 않으며, 이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다.

[0146] 하나의 실시형태에서, saRNA는 마노하란(Manoharan) 등(Alnylam Pharmaceuticals)의 미국 특허 제8106022호 및 제8828956호(이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 인용된다)에 개시된 임의의 탄수화물 리간드와 같은 탄수화물 리간드와 접합된다. 예를 들면, 탄수화물 리간드는 모노사카라이드, 디사카라이드, 트리사카라이드, 테트라사카라이드, 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드일 수 있다. 이러한 탄수화물-접합된 RNA 체제들은 간의 실질 세포를 표적으로 할 수 있다. 하나의 실시형태에서, saRNA는 하나 이상의 탄수화물 리간드, 바람직하게는 2개 또는 3개의 리간드와 접합된다. 하나의 실시형태에서, saRNA는 하나 이상의 갈락토스 모이티와 접합된다. 다른 실시형태에서, saRNA는 적어도 하나의(예를 들면, 2개 또는 3개 또는 그 이상) 락토스 분자(락토스는 갈락토스에 커플링된 글루코스이다)와 접합된다. 또 다른 실시형태에서, saRNA는 적어도 하나의(예를 들면, 2개 또는 3개 또는 그 이상) N-아세틸-갈락토사민(GalNAc), N-Ac-글루코사민(GluNAc) 또는 만노스(예를 들면, 만노스-6-포스페이트)와 접합된다. 하나의 실시형태에서, saRNA는 적어도 하나의 만노스 리간드와 접합되고, 접합된 saRNA는 대식세포를 표적으로 한다.

[0147] 본 발명의 saRNA는 고려되는 특정 방법에서 효과가 있는 것으로 공지된 기타 활성 성분과 함께 제공될 수 있다. 기타 활성 물질은 본 발명의 saRNA와 동시에, 개별적으로 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 상이한 표적 유전자를 조절하는 saRNA와 함께 투여될 수 있다. 비제한적 예는 알부민, 인슐린 또는 HNF4A 유전자를 조절하는 saRNA를 포함한다. 임의의 유전자의 조절은 단일 saRNA 또는 2개 이상의 상이한 saRNA의 조합을 사용하여 달성될 수 있다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA와 함께 투여될 수 있는 saRNA의 비제한적 예는 2012년 6월 20일자로 출원된 국제 공개공보 WO 2012/175958에 개시된 알부민 또는 HNF4A를 조절하는 saRNA, 둘 다 2011년 10월 10일자로 출원된 국제 공개공보 WO 2012/046084 및 WO 2012/046085에 개시된 인슐린을 조절하는 saRNA, 2006년 11월 13일자로 출원된 미국 특허 제7,709,456호 및 2010년 4월 23일자로 출원된 미국 공개특허 US 2010/0273863에 개시된 사람 프로세스테론 수용체, 사람 주요 볼트(vault) 단백질(hMVP), E-카데린 유전자, p53 유전자 또는 PTEN 유전자를 조절하는 saRNA, 및 2006년 4월 11자로 출원된 국제 공개공보 WO 2006/113246에 개시된 p21 유전자를 표적화하는 saRNA를 포함하며, 상기 문헌들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다.

[0148] 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 C/EBP  $\beta$  유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA 또는 siRNA, 즉, C/EBP  $\beta$ -siRNA와 함께 투여된다. 본 발명의 적합한 siRNA의 바람직한 서열은 표 4에 제공된다.

[0149] [표 4]

siRNA 서열

ID	C/EBP $\beta$ -si-1	C/EBP $\beta$ -si-2
표적	ctgagtaatcgcttaaaga	gaaacttttagcgagtcaga
효능	0.7	0.52
위치	1892	239
센스 (패신저)	CUGAGUAAUCGCUAAAGAUU (서열번호 29)	GAAACUUUAGCGAGUCAGAUU (서열번호 31)
안티센스 (가이드)	UCUUUAAGCGAUUACUCAGUU (서열번호 30)	UCUGACUCGUAAAGUUUCUU (서열번호 32)

[0150]

[0151] 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 물질대사, 특히 간 기능을 조절하는 하나 이상의 약물과 함께 투여될 수 있다. 비제한적 예에서, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 스타틴, 심바스타틴, 아토르바스타틴, 로수바스타틴, 에제티미브, 니아신, PCSK9 억제제, CETP 억제제, 클로피브레이트, 페노피브릭, 토코트리엔올, 피토스테롤, 담즙산 격리제, 프로부콜 또는 이들의 조합과 같은 저밀도 지질단백질(LDL) 콜레스테롤 수준을 감소시키는 약물과 함께 투여된다. C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 또한 오리비그(Orvig) 등의 미국 특허 6287586에 개시된 바나듐 비구아니드 복합체

와 함께 투여될 수 있다. 다른 예에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 혈청 콜레스테롤을 저하시키기 위해 로데스(Rhodes)의 국제 공개공보 WO 201102838(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 조성물과 함께 투여될 수 있다. 조성물은 PCSK9 단백질에 선택적으로 결합하여 이를 억제하는 항원 결합 단백질; 및 세포에서 PCSK9 유전자의 발현을 억제하는 RNA 이펙터 인자를 포함한다. 다른 예에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 브룩스 윌슨(Brooks-Wilson) 등의 유럽 특허 EP1854880에 기재된 바와 같이 콜레스테롤 수준을 조절하기 위해 ABC1 생물학적 활성을 갖는 ABC1 폴리펩타이드 또는 ABC1 활성을 갖는 ABC1 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산과 함께 투여될 수 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다.

[0152] 다른 실시형태에서, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 메트포르민, 설포닐우레아, 논설포닐우레아 분비 촉진제,  $\alpha$  글루코시다제 억제제, 티아졸리딘온, 피오글리타존, 로시글리타존, 글루카곤 유사 펩타이드-1 유사체, 디펩티딜 펩타이드-4 억제제 또는 이들의 조합과 같은 인슐린 민감성을 증가시키거나 제2형 당뇨병을 치료하는 약물과 함께 투여된다. 본 발명의 saRNA와 병용하여 투여될 수 있는 기타 간 보호제는 문헌[Adams et al., *Postgraduate Medical Journal*, vol. 82, 315-322 (2006)]에 개시되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다.

[0153] 간키린(*Gankyrin*) 및 FXR 단백질

[0154] 간 세포 암종(HCC)의 발생은 간 과증식 및 간암을 초래하는 유전자 발현의 점진적인 변화를 수반하는 다단계 과정이다. 간암의 발암 동안, 종양 억제 단백질 Rb, p53, 간 세포 핵 인자 4 $\alpha$ (HNF4 $\alpha$ ) 및 C/EBP- $\alpha$ 가 중성화된다. 이들 단백질의 제거는 암에 의해 활성화되는 26S 프로테아좀의 작은 유닛, 간키린에 의해 매개된다. 왕(Wang) 등은 간키린이 C/EBP  $\alpha$ 의 S193-ph 이소형과 상호작용하고 이것을 유비퀴틴프로테아좀 시스템(UPS: ubiquitinproteasome system)-매개된 분해를 위해 표적화하는 것을 개시한다. 간키린 수준은 간암 발생의 초기 단계 동안 상승된다[Wang et al., *J. Clin. Invest*, vol.120(7): 2549-2562 (2010); 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다]. 예를 들면, 간키린 유전자(또한 PSMD10 유전자로도 공지됨)의 siRNA 및/또는 간키린 억제제를 사용하는 간키린의 억제는 HCC를 예방 및/또는 치료할 수 있다.

[0155] 지양(Jiang) 등은 담즙산 수용체(BAR) 또는 NR1H4로도 공지된 파네소이드 X 수용체(FXR)가 HDAC1-C/EBP $\beta$  복합체를 통해 간키린 프로모터를 침묵화(silencing)함으로써 휴지 상태 간에서 간키린의 발현을 억제한다는 것을 밝혀냈다[Jiang et al., *Hepatology*, vol.57(3):1098-1106 (2013); 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다]. 마우스에서의 FXR 신호전달의 결손은 간키린 프로모터의 탈-억제 및 12월령에서 간암의 자발적인 발생을 초래한다. 야생형 마우스에서의 디에틸니트로소아민(DEN)-매개된 간암은 또한 FXR의 감소 및 간키린의 활성화를 수반한다. 노령 마우스에서의 간암 및 사람 환자에서의 간암의 검사에 의하면, FXR은 감소한 반면, 간키린은 간암의 자발적 발생 동안 상승되는 것으로 나타났다. 지양 등은 FXR이 분해로부터 종양 억제 단백질의 후속적인 보호를 초래하는 C/EBP $\beta$ -HDAC1 복합체를 통해 간키린 프로모터를 억제함으로써 간암을 예방하는 것으로 결론 지었다. FXR의 안정화 및 핵 전위는 간키린을 억제한다. 예를 들면, FXR 작용제 또는 활성화제 또는 NR1H4 유전자 활성화제를 사용하는 FXR의 활성화는 HCC를 예방 및/또는 치료할 수 있다.

[0156] 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간키린을 하향조절하거나 FXR를 상향조절하는 하나 이상의 치료제와 병용하여 사용될 수 있다. 병용은 HCC의 예방 및/또는 치료에 대해 상승 효과를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간키린-siRNA와 병용하여 사용될 수 있다. 이중 가닥의 간키린-siRNA는 'RNAi에 의한 내인성 유전자 발현의 억제' 섹션[Higashitsuji et al., *Cancer Cell*, vol.8:75-87 (2005), 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다]에서 히가시즈우지(Higashitsuji) 등에 의해 개시된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 FXR 작용제와 병용하여 사용될 수 있다. FXR 작용제 또는 활성화제의 비제한적 예는 타우로콜산, 오베티콜산(OCA), INT-767(Intercept Pharmaceuticals), INT-777(Intercept Pharmaceuticals), 및 미국 특허출원 US 20140057886, 미국 특허 제8546365호, 미국 특허 제7932244호, 미국 특허출원 US 20140100209, 미국 특허 제8445472호, 미국 특허 제8114862호, 미국 특허출원 US 20140094443, 미국 특허 제8410083호, 미국 특허 제8796249호, 미국 특허출원 US 20140024631, 미국 특허 제8377916호, 미국 특허 제8258267호, 미국 특허 제7786102호, 미국 특허 제7138390호, 미국 특허 제7994352호, 미국 특허 제7858608호, 미국 특허 제7812011호, 미국 특허출원 US 20140148428, 및 미국 특허출원 US 20060252670(이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 임의의 FXR 작용제 또는 활성화제를 포함한다.

[0157] 제형화, 전달, 투여 및 용량

[0158] 약제학적 제형은 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이것은 본원에서 사용되는 바와 같이 목적하는 특정 용량형에 적합화된 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 희석제 또는 다른 액체 비히클, 분산

물 또는 현탁액 보조제, 표면 활성제, 등장화제, 증점제 또는 유화제, 보존제 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 약제학적 조성물을 제형화하기 위한 각종 부형제 및 조성물을 제조하기 위한 기술은 당업계에 공지되어 있다[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다]. 통상적인 부형제 매질의 사용은 본 개시물의 범위 내에서 고려될 수 있지만, 임의의 통상적인 부형제 매질이, 예를 들면, 임의의 바람직하지 못한 생물학적 효과를 생성하거나 약제학적 조성물의 임의의 다른 성분(들)과 유해한 방식으로 상호작용함으로써 물질 또는 이의 유효체와 양립불가능하다면 제외된다.

- [0159] 일부 실시형태에서, 조성물은 사람, 사람 환자 또는 대상체에게 투여된다. 본 개시물의 목적상, 용어 "활성 성분"은 일반적으로 본원에 기재된 바와 같이 전달될 C/EBP  $\alpha$ -saRNA를 의미한다.
- [0160] 비록 본원에 제공된 약제학적 조성물의 설명이 원칙적으로 사람에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물에 관한 것이지만, 이러한 조성물이 일반적으로 임의의 다른 동물, 예를 들면, 비-사람 동물, 예를 들면, 비-사람 포유동물에게 투여하기에 적합하다는 것은 당업계의 숙련가들이라면 이해할 것이다. 각종 동물에게 투여하기에 적합한 조성물을 제공하기 위해서 사람에게 투여하는데 적합한 약제학적 조성물의 변형은 잘 이해되고, 통상의 수의학 약리학자는 존재하는 경우 단지 통상적인 실험으로 이러한 변형을 디자인 및/또는 수행할 수 있다. 약제학적 조성물의 투여가 고려되는 대상체는 사람 및/또는 다른 영장류; 소, 돼지, 말, 양, 고양이, 개, 마우스 및/또는 래트와 같은 상업 관련 포유동물을 포함한 포유동물; 및/또는 가금류, 닭, 오리, 거위 및/또는 칠면조와 같은 상업 관련 조류를 포함한 조류를 포함하나 이들로 제한되지 않는다.
- [0161] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 제형화된 saRNA의 효능은 증식 세포에서 측정할 수 있다.
- [0162] 본원에 기재된 약제학적 조성물의 제형은 약리학 분야에 공지되거나 이후에 개발된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 제조 방법은 활성 성분을 부형제 및/또는 하나 이상의 기타 보조 성분과 연관시키고, 이어서 필요에 따라 및/또는 경우에 따라 생성물을 목적하는 단일 또는 다중 용량 단위로 분할, 성형 및/또는 포장하는 단계를 포함한다.
- [0163] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 단일 단위 용량으로서 및/또는 복수의 단위 단위 용량으로서 제조, 포장 및/또는 대량으로 판매될 수 있다. 본원에서 사용되는 "단위 용량"은 소정량의 활성 성분을 포함하는 약제학적 조성물의 별개의 양이다. 활성 성분의 양은 일반적으로 대상체에게 투여될 활성 성분의 용량 및/또는 이러한 용량의 편리한 분획, 예를 들면, 이러한 용량의 1/2 또는 1/3과 동일하다.
- [0164] 본 발명에 따른 약제학적 조성물 중 활성 성분, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 임의의 추가 성분의 상대량은 치료될 대상체의 정체성, 신장 및/또는 병태에 따라 그리고 추가로 조성물이 투여되는 경로에 따라 달라질 것이다. 예로서, 조성물은 0.1% 내지 100%, 예를 들면, 0.5% 내지 50%, 1 내지 30%, 5 내지 80%, 적어도 80%(w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있다.
- [0165] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 제형은 적어도 하나의 saRNA를 함유할 수 있다. 비제한적 예로서, 제형은 상이한 서열을 갖는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 saRNA를 함유할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 제형은 상이한 서열을 갖는 3개 이상의 saRNA를 함유한다. 하나의 실시형태에서, 제형은 상이한 서열을 갖는 5개 이상의 saRNA를 함유한다.
- [0166] 본 발명의 saRNA는 (1) 안정성을 증가시키고; (2) 세포 형질감염을 증가시키고; (3) (예를 들면, saRNA의 데포 제형으로부터) 지속 또는 지연 방출을 허용하고; (4) 생체분포를 변화시키고 (예를 들면, saRNA를 특정 조직 또는 세포 유형으로 표적화하고); (5) 생체내에서 암호화된 단백질의 번역을 증가시키고/시킴; (6) 생체내에서 암호화된 단백질의 방출 프로파일을 변화시키도록 하나 이상의 부형제를 사용하여 제형화될 수 있다. 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 희석제 또는 다른 액체 비히클, 분산물 또는 현탁액 보조제, 표면 활성제, 등장화제, 증점제 또는 유화제, 보존제와 같은 전통적 부형제 이외에도, 본 발명의 부형제는 리피도이드, 리포솜, 지질 나노입자, 중합체, 리포플렉스, 코어-셸 나노입자, 펩타이드, 단백질, saRNA로 형질감염된 세포(예를 들면, 대상체에 이식하기 위함), 히알루로니다제, 나노입자 모방체 및 이들의 조합을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 따라서, 본 발명의 제형은 하나 이상의 부형제들을 각각 saRNA의 안정성을 증가시키고/거나 saRNA에 의해 세포 형질감염을 증가시키는 양으로 포함할 수 있다. 추가로, 본 발명의 saRNA는 자가-조립 핵산 나노입자를 사용하여 제형화될 수 있다. 본 발명의 saRNA와 함께 제형화에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 및 핵산 전달체는 2012년 12월 14일자로 출원된 국제 공개공보 WO 2013/090648에 개시되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다.



- [0167] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 활성 성분으로서 이중 가닥의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA를 형성하도록 어닐링되는 21개의 뉴클레오타이드 길이인 2개의 단일 RNA 가닥을 포함한다. 조성물은 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM NaCl 및 5mM EDTA로 구성된 염 완충제를 추가로 포함한다.
- [0168] 다른 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 덴드리머로 전달될 수 있다. 덴드리머는 고도로 분지된 거대분자이다. 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 표적화된 생체내 전달을 위한 구조적으로 유연한 폴리(아미도아민)(PAMAM) 덴드리머와 복합체를 형성한다. 복합체는 C/EBP  $\alpha$ -saRNA-덴드리머로 지칭된다. 덴드리머는 고도의 분자 균일성, 협소한 분자량 분포, 특정 크기 및 형상 특징, 및 고도-작용화된 말단 표면을 가진다. 제조 공정은 중앙 개시제 코어로 시작하는 일련의 반복 단계이다. 각 후속 성장 단계는 더 큰 분자 직경 및 분자량, 및 이전 생성 보다 더 반응적인 표면 부위를 갖는 중합체의 새로운 생성을 나타낸다. PAMAM 덴드리머는 자신의 표면 상에 1차 아민기 및 또한 구조의 내부에 3차 아민기를 갖는 효율적인 뉴클레오타이드 전달 시스템이다. 1차 아민기는 뉴클레오타이드 결합에 참여하여 세포 흡수를 촉진시키는 반면, 매립된 3차 아민기는 엔도솜에서 양성자 스폰지로서 작용하고 핵산의 세포질로의 방출을 향상시킨다. 이들 덴드리머는 자신에 의해 수행되는 saRNA를 리보뉴클레아제 분해로부터 보호하고 효율적인 유전자 표적화를 위해 세포내이입을 통해 연장된 기간에 걸쳐 saRNA의 상당한 방출을 달성한다. 이들 나노입자의 생체내 효능은 이미 평가되었으며, 생체분포 연구는 덴드리머가 말초 혈액 단핵 세포에서 우선적으로 축적되고 식별가능한 독성 없이 생존하는 것을 나타낸다[Zhou et al., Molecular Ther. 2011 Vol. 19, 2228-2238; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다]. PAMAM 덴드리머는 트리에탄올아민(TEA) 코어, 디아미노부탄(DAB) 코어, 시스타민 코어, 디아미노핵산(HEX) 코어, 디아모노도데칸(DODE) 코어 또는 에틸렌디아민(EDA) 코어를 포함할 수 있다. 바람직하게, PAMAM 덴드리머는 TEA 코어 또는 DAB 코어를 포함한다.
- [0169] 리피도이드
- [0170] 리피도이드의 합성은 광범위하게 기재되어 있으며, 이들 화합물을 포함하는 제형은 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산의 전달에 특히 적합하다[Mahon et al., Bioconjug Chem. 2010 21:1448-1454; Schroeder et al., J Intern Med. 2010 267:9-21; Akinc et al., Nat Biotechnol. 2008 26:561-569; Love et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 107:1864-1869; Siegwart et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 108:12996-3001; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다].
- [0171] 이들 리피도이드는 설치류 및 비-사람 영장류에서 이중 가닥의 작은 간섭 RNA 분자를 효과적으로 전달하는데 사용되었다[Akinc et al., Nat Biotechnol. 2008 26:561-569; Frank-Kamenetsky et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 105:11915-11920; Akinc et al., Mol Ther. 2009 17:872-879; Love et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 107:1864-1869; Leuschner et al., Nat Biotechnol. 2011 29:1005-1010; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다], 본 개시물은 이들의 제형화 및 saRNA 전달의 용도를 기재한다. 이들 리피도이드를 함유하는 복합체, 미셀, 리포솜 또는 입자는 제조될 수 있고, 따라서 국소 및/또는 전신 투여 경로를 통해 리피도이드 제형의 주입 후 saRNA의 효과적 전달을 초래할 수 있다. saRNA의 리피도이드 복합체는 정맥내, 근육내 또는 피하 경로를 포함하나 이에 제한되지 않는 각종 수단에 의해 투여될 수 있다.
- [0172] 핵산의 생체내 전달은 제형 조성, 입자 폐길화(PEGylation)의 성질, 부하 정도, 올리고뉴클레오타이드 대 지질 비율, 및 입자 크기 등과 같은 생물리학 파라미터를 포함하나 이에 제한되지 않는 다수의 파라미터에 의해 영향을 받을 수 있다[Akinc et al., Mol Ther. 2009 17:872-879; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조에 의해 인용된다]. 예로서, 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG) 지질의 앵커 쇠 길이에서의 작은 변화는 생체내 효능에 유의미한 영향을 초래할 수 있다. 펜타[3-(1-라우릴아미노프로피오닐)]-트리에틸렌테트라민 하이드로클로라이드[TETA-5LAP; aka 98N12-5, Murugaiah et al., Analytical Biochemistry, 401:61 (2010); 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조에 의해 인용된다], C12-200(유도체 및 변이체 포함) 및 Md1을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 리피도이드를 갖는 제형이 생체내 활성에 대해 시험될 수 있다.
- [0173] 본원에서 "98N12-5"로서 언급된 리피도이드는 문헌[Akinc et al., Mol Ther. 2009 17:872-879]에 개시되어 있으며, 상기 문헌의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다(도 2 참조).
- [0174] 본원에서 "C12-200"으로서 언급된 리피도이드는 문헌[Love et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 107:1864-1869](도 2 참조) 및 문헌[Liu and Huang, Molecular Therapy. 2010 669-670](도 2 참조)(이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 기재되어 있다. 리피도이드 제형은 saRNA에 추가하여 3 또는 4 또는 그 이상의 성분을 포함하는 입자를 포함할 수 있다. 예로서, 특정 리피도이드를 갖는 제형은 98N12-5를 포함하나 이에 제한되지 않으며, 42% 리피도이드, 48% 콜레스테롤 및 10% PEG(C14 알킬 쇠 길이)를 함유할 수 있다. 다른

예로서, 특정 리피도이드를 갖는 제형은 C12-200을 포함하나 이에 제한되지 않으며, 50% 리피도이드, 10% 디스테로일포스파티딜 콜린, 38.5% 콜레스테롤 및 1.5% PEG-DMG를 함유할 수 있다.

- [0175] 하나의 실시형태에서, 전신 정맥내 투여를 위한 리피도이드로 제형화된 saRNA는 간을 표적화할 수 있다. 예를 들면, saRNA를 사용하고 42% 98N12-5, 48% 콜레스테롤 및 10% PEG-지질의 지질 물 조성을 포함하고 saRNA에 대한 총 지질의 최종 중량비가 약 7.5 내지 1이고 PEG 지질 상의 알킬 쇠 길이가 C14이고 평균 입자 크기가 대략 50-60 nm인 최종 최적화된 정맥내 제형은, 제형의 간에 대한 분포가 90% 초과되도록 할 수 있다[Akinc et al., Mol Ther. 2009 17:872-879](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다). 다른 예에서, C12-200을 사용하고(US 가출원 61/175,770 및 국제 공개공보 WO2010129709 참조, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다) 리피도이드를 사용하는 정맥내 제형은 50/10/38.5/1.5의 C12-200/디스테로일포스파티딜 콜린/콜레스테롤/PEG-DMG의 몰비, 7 내지 1의 핵산에 대한 총 지질의 중량비를 가질 수 있고, 80 nm의 평균 입자 크기는 saRNA를 전달하는데 효과적일 수 있다[Love et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 107:1864-1869](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다). 다른 실시형태에서, MD1 리피도이드-함유 제형은 생체내에서 saRNA를 간 세포에 효과적으로 전달하는데 사용될 수 있다. 근육내 또는 피하 경로를 위해 최적화된 리피도이드 제형의 특징은 표적 세포 유형 및 세포의 매트릭스를 통해 혈류로 확산하는 제형의 능력에 따라 현저하게 달라질 수 있다. 150 nm 미만의 입자 크기는 내피 천공의 크기로 인해 효과적인 간 세포 전달에 적합할 수 있고[Akinc et al., Mol Ther. 2009 17:872-879](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다), 내피 세포, 골수 세포 및 근육 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는 기타 세포 유형으로 제형을 전달하기 위한 리피도이드-제형화된 saRNA의 사용은 유사하게 크기-제한될 수 없다. 생체내에서 siRNA를 골수 세포 및 내피 세포와 같은 다른 비-간 세포로 전달하기 위한 리피도이드 제형의 사용은 보고되었다[Akinc et al., Nat Biotechnol. 2008 26:561-569; Leuschner et al., Nat Biotechnol. 2011 29:1005-1010; Cho et al. Adv. Funct. Mater. 2009 19:3112-3118; 8<sup>th</sup> International Judah Folkman Conference, Cambridge, MA October 8-9, 2010; 이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다]. 단백질과 같은 골수 세포로의 리피도이드 제형의 효과적인 전달은 유사한 성분 몰비를 가질 수 있다. 리피도이드와 기타 성분(디스테로일포스파티딜 콜린, 콜레스테롤 및 PEG-DMG를 포함하나 이들로 제한되지 않음)은 간 세포, 골수 세포, 근육 세포 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 세포 유형에 전달하기 위해 saRNA의 제형을 최적화하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 성분 몰비는 50% C12-200, 10% 디스테로일포스파티딜콜린, 38.5% 콜레스테롤 및 1.5% PEG-DMG를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다[Leuschner et al., Nat Biotechnol 2011 29:1005-1010](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다). 피하 또는 근육내 전달을 통해 핵산의 세포(예를 들면, 지방 세포 및 근육 세포를 포함하나 이에 제한되지 않음)로의 국소 전달을 위한 리피도이드 제형의 사용은 전신 전달에 바람직한 모든 제형 성분을 필요로 하지 않을 수 있으며, 이와 같이 리피도이드 및 saRNA만을 포함할 수 있다.

[0176] 리포솜, 리포플렉스 및 지질 나노입자

- [0177] 본 발명의 saRNA는 하나 이상의 리포솜, 리포플렉스 또는 지질 나노입자를 사용하여 제형화할 수 있다. 하나의 실시형태에서, saRNA의 약제학적 조성물은 리포솜을 포함한다. 리포솜은 주로 지질 이중층으로 구성될 수 있고 영양소 및 약제학적 제형의 투여를 위한 전달 소포(vesicle)로서 사용될 수 있는 인공적으로 제조된 비히클이다. 리포솜은, 직경이 수백 나노미터일 수 있고 협소한 수성 구획에 의해 분리된 일련의 동심원 이중층을 함유할 수 있는 다층 소포(MLV), 직경이 50 nm 보다 작을 수 있는 작은 단세포 소포(SUV), 및 직경이 50 내지 500 nm일 수 있는 큰 단층(unilamellar) 소포(LUV)와 같은 다양한 크기일 수 있으나 이들로 제한되지 않는다. 리포솜 디자인은 건강하지 않은 조직으로의 리포솜 부착을 향상시키기 위해 또는 세포내이입과 같으나 이에 제한되지 않은 이벤트를 활성화시키기 위해 옅소닌 또는 리간드를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 리포솜은 약제학적 제형의 전달을 향상시키기 위해 낮거나 높은 pH를 가질 수 있다.

- [0178] 리포솜의 형성은 포획된 약제학적 제형 및 리포솜 성분, 지질 소포가 분산되는 매질의 성질, 포획된 물질의 유효 농도 및 이의 잠재 독성, 소포의 적용 및/또는 전달 동안 수반되는 임의의 추가의 과정, 최적화 크기, 의도된 적용을 위한 소포의 다분산도 및 저장수명, 및 배치 대 배치 재현성 및 안전하고 효율적인 리포솜 생성물의 대규모 생산의 가능성과 같으나 이에 제한되지 않는 물리화학적 특징에 의해 좌우될 수 있다.

- [0179] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 약제학적 조성물은 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DODMA) 리포솜, DiLa2 리포솜(Marina Biotech; 워싱턴주 보셀), 1,2-디리놀레일옥시-3-디메틸아미노프로판(DLin-DMA), 2,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란(DLin-KC2-DMA) 및 MC3(US20100324120; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다), 및 DOXIL<sup>®</sup> (Janssen Biotech, Inc.; 펜실베이니아주 호섬)과 같으나 이에 제

한되지 않는 소분자 약물을 전달할 수 있는 리포솜으로부터 형성된 것들과 같은 리포솜을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [0180] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 약제학적 조성물은 시험관내 및 생체내 올리고뉴클레오타이드 전달에 적합한 것으로 이미 기재되었고 밝혀진 안정화된 플라스미드-지질 입자(SPLP) 또는 안정화된 핵산 지질 입자(SNALP)의 합성으로부터 형성된 것들과 같은 리포솜을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다[Wheeler et al. Gene Therapy. 1999 6:271-281; Zhang et al. Gene Therapy. 1999 6:1438-1447; Jeffs et al. Pharm Res. 2005 22:362-372; Morrissey et al., Nat Biotechnol. 2005 2:1002-1007; Zimmermann et al., Nature. 2006 441:111-114; Heyes et al. J Contr Rel. 2005 107:276-287; Semple et al. Nature Biotech. 2010 28:172-176; Judge et al. J Clin Invest. 2009 119:661-673; deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19:125-132;(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다). 휠러(Wheeler) 등에 의한 최초 제조 방법은 나중에 제프스(Jeffs) 등에 의해 개선되었으며 자발적 소포 형성 방법으로 언급되는 세제 투석 방법이었다. 리포솜 제형은 saRNA에 추가하여 3 또는 4개의 지질 성분으로 구성될 수 있다. 예로서, 리포솜은 제프스 등에 의해 기술된 바와 같이 55% 콜레스테롤, 20% 디스테로일포스파티딜콜린(DSPC), 10% PEG-S-DSG, 및 15% 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DODMA)을 함유할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 다른 예에서, 특정 리포솜 제형은 헤예스(Heyes) 등에 의해 기술된 바와 같이 48% 콜레스테롤, 20% DSPC, 2% PEG-c-DMA 및 30% 양이온성 지질을 함유할 수 있지만 이에 제한되지 않으며, 여기서 양이온성 지질은 1,2-디스테아로일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DSDMA), DODMA, DLin-DMA 또는 1,2-디리놀레닐옥시-3-디메틸아미노프로판(DLenDMA)일 수 있다. 다른 예에서, 핵산-지질 입자는 입자에 존재하는 총 지질의 약 50 mol% 내지 약 85 mol%를 포함하는 양이온성 지질; 입자에 존재하는 총 지질의 약 13 mol % 내지 약 49.5 mol%를 포함하는 비-양이온성 지질; 및 마클라클란(Maclachlan) 등의 국제 공개공보 WO2009127060(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같이 입자에 존재하는 총 지질의 약 0.5 mol % 내지 약 2 mol %를 포함하는 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질을 포함할 수 있다. 다른 예에서, 핵산-지질 입자는 마클라클란 등의 미국 공개특허 US 2006008910(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 임의의 핵산-지질 입자일 수 있다. 비제한적 예로서, 핵산-지질 입자는 화학식 I의 양이온성 지질, 비-양이온성 지질, 및 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질을 포함할 수 있다.
- [0181] 하나의 실시형태에서, saRNA는 기능성화된 지질 이중층들 사이에 가교결합을 가질 수 있는 지질 소포로 제형화될 수 있다.
- [0182] 하나의 실시형태에서, 리포솜은 발리(Bally) 등의 미국 특허 제5595756호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 당-변형된 지질을 함유할 수 있다. 지질은 약 10 mol %의 양의 강글리오사이드 및 세레브로사이드일 수 있다.
- [0183] 하나의 실시형태에서, saRNA는 양이온성 지질을 포함하는 리포솜으로 제형화될 수 있다. 리포솜은 국제 공개공보 WO2013006825(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같이 1:1 과 20:1 사이의 양이온성 지질 중 질소 대 saRNA 중 포스페이트의 몰비(N:P 비)를 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 리포솜은 20:1 초과 또는 1:1 미만의 N:P 비를 가질 수 있다.
- [0184] 하나의 실시형태에서, saRNA는 지질-다가 양이온 착물로 제형화될 수 있다. 지질-다가 양이온 착물은 당업계에 공지된 방법 및/또는 미국 공개특허 US 20120178702(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같이 달성될 수 있다. 비제한적 예로서, 다가 양이온은 폴리라이신, 폴리오르니틴 및/또는 폴리아르기닌과 같으나 이에 제한되지 않는 폴리펩타이드 또는 양이온성 펩타이드, 및 국제 공개공보 WO2012013326(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 양이온성 펩타이드를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, saRNA는 콜레스테롤 또는 디올레오일 포스파티딜에탄올아민(DOPE)과 같으나 이에 제한되지 않는 중성 지질을 추가로 포함할 수 있는 지질-다가 양이온 착물로 제형화될 수 있다.
- [0185] 리포솜 제형은 양이온성 지질 성분의 선택, 양이온성 지질의 포화도, 폐길화의 성질, 모든 성분과 생물리학적 파라미터, 예를 들면, 크기의 비율에 의해 영향을 받을 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 샘플(Semple) 등 [Semple et al. Nature Biotech. 2010 28:172-176](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 의한 하나의 예에서, 리포솜 제형은 57.1 % 양이온성 지질, 7.1% 디팔미토일포스파티딜콜린, 34.3 % 콜레스테롤 및 1.4% PEG-c-DMA 로 구성되어 있다.
- [0186] 일부 실시형태에서, 지질 나노입자(LNP) 제형 중 PEG의 비율은 증가 또는 감소될 수 있고/거나, PEG 지질의 탄소 수 길이는 C14 에서 C18 로 개질되어 LNP 제형의 약동학 및/또는 생체분포를 변화시킬 수 있다. 비제한적 예로서, LNP 제형은 양이온성 지질, DSPC 및 콜레스테롤과 비교하여 1-5%의 지질 몰비의 PEG-c-DOMG 를 함유할 수



있다. 다른 실시형태에서, PEG-c-DOMG는 PEG-DSG(1,2-디스테아로일-sn-글리세롤, 메톡시폴리에틸렌 글리콜) 또는 PEG-DPG(1,2-디팔미토일-sn-글리세롤, 메톡시폴리에틸렌 글리콜)과 같으나 이에 제한되지 않는 PEG 지질로 대체될 수 있다. 양이온성 지질은 Dlin-MC3-DMA, Dlin-DMA, C12-200 및 Dlin-KC2-DMA와 같으나 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 지질로부터 선택될 수 있다.

[0187] 하나의 실시형태에서, saRNA는 국제 공개공보 WO2012170930(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 지질 나노입자와 같은 지질 나노입자로 제형화될 수 있다.

[0188] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 제형에 사용될 수 있는 양이온성 지질은 국제 공개공보 WO 2012040184, WO 2011153120, WO 2011149733, WO 2011090965, WO 2011043913, WO 2011022460, WO 2012061259, WO 2012054365, WO 2012044638, WO 2010080724, WO 201021865 및 WO 2008103276, 미국 특허 제7,893,302호, 제7,404,969호 및 제8,283,333호 및 미국 공개특허 US 20100036115 및 US 20120202871(이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 양이온성 지질로부터 선택될 수 있으나 이들로 제한되지 않는다. 다른 실시형태에서, 양이온성 지질은 국제 공개공보 WO 2012040184, WO 2011153120, WO 2011149733, WO 2011090965, WO 2011043913, WO 2011022460, WO 2012061259, WO 2012054365 및 WO 2012044638(이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 화학식 A로부터 선택될 수 있으나 이들로 제한되지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 양이온성 지질은 국제 공개공보 WO 2008103276의 화학식 CLI-CLXXIX, 미국 특허 7,893,302의 화학식 CLI-CLXXIX, 미국 특허 7,404,969의 화학식 CLI-CLXXXXII 및 미국 공개특허 US 20100036115의 화학식 I-VI(이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)로부터 선택될 수 있으나 이들로 제한되지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 양이온성 지질은 가우체론(Gaucheron) 등의 미국 특허 제7223887호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 양이온성 지질과 같은 다가 양이온성 지질일 수 있다. 양이온성 지질은 가우체론 등의 미국 특허 제7223887호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같이 2개의 4차 아민기를 포함하는 양으로 하전된 헤드 그룹(head group) 및 4개의 탄화수소 쇄를 포함하는 소수성 부분을 가질 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 양이온성 지질은 마이어르(Maier) 등의 미국 공개특허 US 20130195920(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 생분해성 지질과 같이 생분해성일 수 있다. 양이온성 지질은 마이어르 등의 미국 공개특허 US 20130195920(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)의 화학식 I-IV에 개시된 양이온성 지질의 지질 잔기에 위치한 하나 이상의 생분해성 그룹을 가질 수 있다. 비제한적 예로서, 양이온성 지질은 (20Z,23Z)-N,N-디메틸노나코사-20,23-디엔-10-아민, (17Z,20Z)-N,N-디메틸헥사코사-17,20-디엔-9-아민, (1Z,19Z)-N,N-디메틸펜타코사-16,19-디엔-8-아민, (13Z,16Z)-N,N-디메틸도코사-13,16-디엔-5-아민, (12Z,15Z)-N,N-디메틸헤니코사-12,15-디엔-4-아민, (14Z,17Z)-N,N-디메틸트리코사-14,17-디엔-6-아민, (15Z,18Z)-N,N-디메틸테트라코사-15,18-디엔-7-아민, (18Z,21Z)-N,N-디메틸헵타코사-18,21-디엔-10-아민, (15,18)-N,N-디메틸테트라코사-15,18-디엔-5-아민, (14Z,17Z)-N,N-디메틸트리코사-14,17-디엔-4-아민, (19Z,22Z)-N,N-디메틸옥타코사-19,22-디엔-9-아민, (18Z,21Z)-N,N-디메틸헵타코사-18,21-디엔-8-아민, (17Z,20Z)-N,N-디메틸헥사코사-17,20-디엔-7-아민, (16Z,19Z)-N,N-디메틸펜타코사-16,19-디엔-6-아민, (22Z,25Z)-N,N-디메틸헨트리아콘타-22,25-디엔-10-아민, (21Z,24Z)-N,N-디메틸트리아콘타-21,24-디엔-9-아민, (18Z)-N,N-디메틸헵타코스-18-엔-10-아민, (17Z)-N,N-디메틸헥사코스-17-엔-9-아민, (19Z,22Z)-N,N-디메틸옥타코사-19,22-디엔-7-아민, N,N-디메틸헵타코산-10-아민, (20Z,23Z)-N-에틸-N-메틸노나코사-20,23-디엔-10-아민, 1-[(11Z,14Z)-1-노닐아이코사-11,14-디엔-1-일]피롤리딘, (20Z)-N,N-디메틸헵타코스-20-엔-10-아민, (15Z)-N,N-디메틸헵타코사-15-엔-10-아민, (14Z)-N,N-디메틸노나코스-14-엔-10-아민, (17Z)-N,N-디메틸노나코스-17-엔-10-아민, (24Z)-N,N-디메틸트리트리아콘트-24-엔-10-아민, (20Z)-N,N-디메틸노나코스-20-엔-10-아민, (22Z)-N,N-디메틸헨트리아콘트-22-엔-10-아민, (16Z)-N,N-디메틸펜타코스-16-엔-8-아민, (12Z,15Z)-N,N-디메틸-2-노닐헤니코사-12,15-디엔-1-아민, (13Z,16Z)-N,N-디메틸-3-노닐도코사-13,16-디엔-1-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헵타데칸-8-아민, 1-[(1S,2R)-2-헥실사이클로프로필]-N,N-디메틸노나데칸-10-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]노나데칸-10-아민, N,N-디메틸-21-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헤니코산-10-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2S)-2-[(1R,2R)-2-펜틸사이클로프로필]메틸]사이클로프로필]노나데칸-10-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헥사데칸-8-아민, N,N-디메틸-[(1R,2S)-2-운데실사이클로프로필]테트라데칸-5-아민, N,N-디메틸-3-{7-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헵틸}도데칸-1-아민, 1-[(1R,2S)-2-헵틸사이클로프로필]-N,N-디메틸옥타데칸-9-아민, 1-[(1S,2R)-2-데실사이클로프로필]-N,N-디메틸헨타데칸-6-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헨타데칸-8-아민, R-N,N-디메틸-1-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, S-N,N-디메틸-1-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, 1-{2-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-1-[(옥틸옥시)메틸]에틸}피롤리딘, (2S)-N,N-디메틸-1-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-3-[(5Z)-옥트-5-엔-1-일옥시]프로판-2-아

민, 1-{2-[(9Z, 12Z)-옥타데카-9, 12-디엔-1-일옥시]-1-[(옥틸옥시)메틸]에틸}아제티딘, (2S)-1-(헥실옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z, 12Z)-옥타데카-9, 12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, (2S)-1-(헵틸옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z, 12Z)-옥타데카-9, 12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, N,N-디메틸-1-(노닐옥시)-3-[(9Z, 12Z)-옥타데카-9, 12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, N,N-디메틸-1-[(9Z)-옥타데카-9-엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민; (2S)-N,N-디메틸-1-[(6Z, 9Z, 12Z)-옥타데카-6, 9, 12-트리엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, (2S)-1-[(11Z, 14Z)-아이코사-11, 14-디엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(헵틸옥시)프로판-2-아민, (2S)-1-(헥실옥시)-3-[(11Z, 14Z)-아이코사-11, 14-디엔-1-일옥시]-N,N-디메틸프로판-2-아민, 1-[(11Z, 14Z)-아이코사-11, 14-디엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, 1-[(13Z, 16Z)-도코사-13, 16-디엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, (2S)-1-[(13Z, 16Z)-도코사-13, 16-디엔-1-일옥시]-3-(헥실옥시)-N,N-디메틸프로판-2-아민, (2S)-1-[(13Z)-도코스-13-엔-1-일옥시]-3-(헥실옥시)-N,N-디메틸프로판-2-아민, 1-[(13Z)-도코스-13-엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, 1-[(9Z)-헥사데카-9-엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, (2R)-N,N-디메틸-H(1-메토일옥틸)옥시]-3-[(9Z, 12Z)-옥타데카-9, 12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, (2R)-1-[(3, 7-디메틸옥틸)옥시]-N,N-디메틸-3-[(9Z, 12Z)-옥타데카-9, 12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, N,N-디메틸-1-(옥틸옥시)-3-[(8-[(1S, 2S)-2-{[(1R, 2R)-2-헵틸사이클로프로필]메틸}사이클로프로필]옥틸)옥시]프로판-2-아민, N,N-디메틸-1-[[8-(2-옥틸사이클로프로필)옥틸]옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민 및 (11E, 20Z, 23Z)-N,N-디메틸노나코사-11, 20, 2-트리엔-10-아민 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성질체로부터 선택될 수 있다.

- [0189] 하나의 실시형태에서, 지질은 국제 공개공보 WO 2012170889(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 것들과 같은 분해성 지질일 수 있다.
- [0190] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 나노입자는 본원에 개재되고/되거나 당업계에 공지된 하나 이상의 양이온성 중합체를 포함할 수 있다.
- [0191] 하나의 실시형태에서, 양이온성 지질은 당업계에 공지된 방법에 의해 및/또는 국제 공개공보 WO 2012040184, WO 2011153120, WO 2011149733, WO 2011090965, WO 2011043913, WO 2011022460, WO 2012061259, WO2012054365, WO 2012044638, WO 2010080724 및 WO 201021865(이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같이 합성될 수 있다.
- [0192] 하나의 실시형태에서, saRNA의 LNP 제형은 PEG-c-DOMG를 3% 지질 몰비로 함유할 수 있다. 다른 실시형태에서, saRNA의 LNP 제형은 PEG-c-DOMG를 1.5% 지질 몰비로 함유할 수 있다.
- [0193] 하나의 실시형태에서, saRNA의 약제학적 조성물은 국제 공개공보 WO 2012099755(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 기재된 폐길화 지질들 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.
- [0194] 하나의 실시형태에서, LNP 제형은 PEG-DMG 2000 (1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000])을 함유할 수 있다. 하나의 실시형태에서, LNP 제형은 PEG-DMG 2000, 당업계에 공지된 양이온성 지질 및 하나 이상의 기타 성분을 함유할 수 있다. 다른 실시형태에서, LNP 제형은 PEG-DMG 2000, 당업계에 공지된 양이온성 지질, DSPC 및 콜레스테롤을 함유할 수 있다. 비제한적 예로서, LNP 제형은 PEG-DMG 2000, DLin-DMA, DSPC 및 콜레스테롤을 함유할 수 있다. 다른 비제한적 예로서, LNP 제형은 PEG-DMG 2000, DLin-DMA, DSPC 및 콜레스테롤을 2:40:10:48의 몰비로 함유할 수 있다(문헌[Geall et al., Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines, PNAS 2012; PMID: 22908294]을 참조; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다). 다른 비제한적 예로서, 본원에 기재된 saRNA는 미국 공개특허 US 20120207845(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같이 비경구 경로에 의해 전달될 나노입자로 제형화될 수 있다. 양이온성 지질은 또한 마노하란 등의 미국공개 특허 US 20130156845 및 마노하란 등의 미국 공개특허 US 20130129785, 와산(Wasan) 등의 국제 공개공보 WO 2012047656, 첸(Chen) 등의 국제 공개공보 WO 2010144740, 안셀(Ansell) 등의 국제 공개공보 WO 2013086322 또는 마노하란 등의 국제 공개공보 WO 2012016184(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 양이온성 지질일 수 있다.
- [0195] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 호프(Hope) 등의 미국 공개특허 US 20130017223(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 제1 및 제2 양이온성 지질과 같은 복수의 양이온성 지질을 사용하여 제형화될 수 있다. 제1 양이온성 지질은 제1 특성에 기초하여 선택될 수 있고, 제2 양이온성 지질은 제2 특성에 기초하여 선택될 수 있으며, 여기서, 특성들은 미국 공개특허 US 20130017223(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개략적으로 나타난 같이 결정될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 제1 및 제2 특성은 상보적이다.

- [0196] 다른 실시형태에서, saRNA는 하나 이상의 양이온성 지질 및 하나 이상의 제2 지질을 포함하는 지질 입자 및 하나 이상의 핵산을 사용하여 제형될 수 있으며, 여기서, 지질 입자는 쿨리스(Cullis) 등의 미국 공개특허 US 20120276209(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같은 고체 코어를 포함한다.
- [0197] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 사티시찬드란(Satishchandran) 등의 EP2298358(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같은 수중유 (o/w) 유화액 중의 양이온성 양친매성 물질과 복합체를 형성할 수 있다. 양이온성 양친매성 물질은 양이온성 지질, 변형되거나 변형되지 않은 스페르민, 부피바카인 또는 벤즈알코늄 클로라이드일 수 있으며, 오일은 식물성 또는 동물성 오일일 수 있다. 비제한적 예로서, 10% 이상의 핵산-양이온성 양친매성 물질 복합체는 수중유 유화액의 오일 상에 존재한다(예를 들면, 사티시찬드란 등의 유럽 공개특허 EP 2298358(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 복합체를 참조).
- [0198] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 양이온성 화합물과 중성 지질의 혼합물을 포함하는 조성물을 사용하여 제형화될 수 있다. 비제한적 예로서, 양이온성 화합물은 안셀 등의 국제 공개공보 WO 1999010390(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 화학식 (I)일 수 있으며, 중성 지질은 디아실포스파티딜콜린, 디아실포스파티딜에탄올아민, 세라미드 및 스핑고미엘린으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0199] 하나의 실시형태에서, LNP 제형은 국제 공개공보 WO 2011127255 또는 WO 2008103276(이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 기재된 방법으로 제형화될 수 있다. 비제한적 예로서, 본 발명의 saRNA는 국제 공개공보 WO 2011127255 및/또는 WO2008103276(이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 기재된 임의의 지질 나노입자(LNP) 제형에 캡슐화될 수 있다.
- [0200] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 LNP 제형은 다가 양이온성 조성물을 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 다가 양이온성 조성물은 미국 공개특허 US 20050222064(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)의 화학식 1-60으로부터 선택될 수 있다. 다른 실시형태에서, 다가 양이온성 조성물을 포함하는 LNP 제형은 생체내 및/또는 시험관내에서 본원에 기재된 saRNA의 전달에 사용될 수 있다.
- [0201] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 LNP 제형은 투과성 증강 분자를 추가로 포함할 수 있다. 비제한적 투과성 증강 분자는 미국 공개특허 US 20050222064(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시되어 있다.
- [0202] 하나의 실시형태에서, 약제학적 조성물은 DiLa2 리포솜(Marina Biotech; 워싱턴주 보셀), SMARTICLES<sup>®</sup>/NOV340(Marina Biotech; 워싱턴주 보셀), 리포솜 기반 중성 DOPC (1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린)(예를 들면, 난소암을 위한 siRNA 전달[Landen et al. Cancer Biology & Therapy 2006 5(12)1708-1713](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)) 및 히알루로난-코팅된 리포솜(Quiet Therapeutics; Israel)과 같으나 이에 제한되지 않는 리포솜으로 제형화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 판즈너(Panzner)의 국제 공개공보 WO 2008/043575 및 에슬러(Essler) 등의 미국 공개특허 US 8580297(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 임의의 양쪽성 리포솜을 사용하여 제형화될 수 있다. 양쪽성 리포솜은 양이온성 양친매성 물질, 음이온성 양친매성 물질 및 임의로 하나 이상의 중성 양친매성 물질을 포함하는 지질들의 혼합물을 포함할 수 있다. 양쪽성 리포솜은 양쪽성 분자를 기본으로 하는 양쪽성 화합물을 포함할 수 있으며, 이의 헤드 그룹은 하나 이상의 양쪽성 그룹으로 치환된다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 에슬러 등의 미국 공개특허 US 20140227345(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같이 4와 9 사이의 등전점을 갖는 하나 이상 양쪽성 그룹을 포함하는 양쪽성 지질을 사용하여 제형화될 수 있다.
- [0203] 나노입자 제형은 탄수화물 운반체 및 핵산 분자(예를 들면, saRNA)를 포함하는 탄수화물 나노입자일 수 있다. 비제한적 예로서, 탄수화물 운반체는 무수물-개질된 피토글리코겐 또는 글리코겐-유형 물질, 피토글리코겐 옥테닐 석시네이트, 피토글리코겐 베타-텍스트린, 무수물-개질된 피토글리코겐 베타-텍스트린을 포함할 수 있으나 이들로 제한되지 않는다. (예를 들면, 국제 공개공보 WO 2012109121 참조, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다).
- [0204] 지질 나노입자 제형은 급속히 제거되는 지질 나노입자(reLNP)로서 알려진 생분해성 양이온성 지질로 양이온성 지질을 대체함으로써 개선될 수 있다. DlinDMA, Dlin-KC2-DMA 및 Dlin-MC3-DMA와 같으나 이에 제한되지 않는 이온화 가능한 양이온성 지질은 시간 경과에 따라 혈장 및 조직에 축적되는 것으로 나타났으며, 잠재적 독성일 수 있다. 급속히 제거되는 지질의 급속한 대사는 지질 나노입자의 내약성(tolerability) 및 치료 지수를 래트에서 1 mg/kg 용량에서 10 mg/kg 용량까지 10비수로 개선시킬 수 있다. 효소적으로 분해되는 에스테르 결합의 포함은 reLNP 제형의 활성을 여전히 유지하면서 양이온성 성분의 분해 및 대사 프로파일을 향상시킬 수 있다. 에스테르 결합은 지질 쇄 내에 내부적으로 위치할 수 있거나 지질 쇄의 말단에서 말단에 위치할 수 있다. 내부

에스테르 결합은 지질 쇠 중의 임의의 탄소를 대체할 수 있다.

- [0205] 하나의 실시형태에서, saRNA는 ATUPLEX™ 시스템, DACC 시스템, DBTC 시스템 및 기타 siRNA-리포플렉스 기술 (Silence Therapeutics; London, United Kingdom), STEMFECT™ (STEMGENT®; Cambridge, MA), 및 핵산의 폴리 에틸렌이민(PEI) 또는 프로타민-기반 표적화 및 비-표적화된 전달과 같으나 이에 제한되지 않는 리포플렉스로서 제형화될 수 있다[Aleku et al. Cancer Res. 2008 68:9788-9798; Strumberg et al. Int J Clin Pharmacol Ther 2012 50:76-78; Santel et al., Gene Ther 2006 13:1222-1234; Santel et al., Gene Ther 2006 13:1360-1370; Gutbier et al., Pulm Pharmacol. Ther. 2010 23:334-344; Kaufmann et al. Microvasc Res 2010 80:286-293 Weide et al. J Immunother. 2009 32:498-507; Weide et al. J Immunother. 2008 31:180-188; Pascolo Expert Opin. Biol. Ther. 4:1285-1294; Fotin-Mleczek et al., 2011 J. Immunother. 34:1-15; Song et al., Nature Biotechnol. 2005, 23:709-717; Peer et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 6:104:4095-4100; deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19:125-132](이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다).
- [0206] 하나의 실시형태에서, 이러한 제형들은 또한 제조될 수 있거나, 이들이 간 세포, 면역 세포, 종양 세포, 내피 세포, 항원 제시 세포 및 백혈구를 포함하나 이에 제한되지 않는 생체내 다양한 세포 유형에 수동적으로 또는 능동적으로 유도되도록 조성 변경될 수 있다[Akinc et al. Mol Ther. 2010 18:1357-1364; Song et al., Nat Biotechnol. 2005 23:709-717; Judge et al., J Clin Invest. 2009 119:661-673; Kaufmann et al., Microvasc Res 2010 80:286-293; Santel et al., Gene Ther 2006 13:1222-1234; Santel et al., Gene Ther 2006 13:1360-1370; Gutbier et al., Pulm Pharmacol. Ther. 2010 23:334-344; Basha et al., Mol. Ther. 2011 19:2186-2200; Fenske and Cullis, Expert Opin Drug Deliv. 2008 5:25-44; Peer et al., Science. 2008 319:627-630; Peer and Lieberman, Gene Ther. 2011 18:1127-1133](이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다). 간 세포에 대한 제형의 수동 표적화의 일례는 아포지질단백질 E에 결합하고 이들 제형의 생체내 간세포로의 흡수 및 결합을 촉진하는 것으로 나타난 Dlin-DMA, Dlin-KC2-DMA 및 Dlin-MC3-DMA-기반 지질 나노 입자 제형을 포함한다[Akinc et al. Mol Ther. 2010 18:1357-1364](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다). 제형은 또한 폴레이트, 트랜스페린, N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 및 항체 표적화된 접근법으로 예시된 바와 같으나 이들로 제한되지 않는 표면 상에서 다양한 리간드의 발현을 통해 선택적으로 표적화될 수 있다 [Kolhatkar et al., Curr Drug Discov Technol. 2011 8:197-206; Musacchio and Torchilin, Front Biosci. 2011 16:1388-1412; Yu et al., Mol Membr Biol. 2010 27:286-298; Patil et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2008 25:1-61; Benoit et al., Biomacromolecules. 2011 12:2708-2714; Zhao et al., Expert Opin Drug Deliv. 2008 5:309-319; Akinc et al., Mol Ther. 2010 18:1357-1364; Srinivasan et al., Methods Mol Biol. 2012 820:105-116; Ben-Arie et al., Methods Mol Biol. 2012 757:497-507; Peer 2010 J Control Release. 20:63-68; Peer et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 104:4095-4100; Kim et al., Methods Mol Biol. 2011 721:339-353; Subramanya et al., Mol Ther. 2010 18:2028-2037; Song et al., Nat Biotechnol. 2005 23:709-717; Peer et al., Science. 2008 319:627-630; Peer and Lieberman, Gene Ther. 2011 18:1127-1133] (이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다).
- [0207] 하나의 실시형태에서, saRNA는 고체 지질 나노입자로서 제형화된다. 고체 지질 나노입자(SLN)는 평균 직경이 10nm와 1000nm 사이인 구형일 수 있다. SLN 은 친지성 분자를 용해할 수 있고 계면활성제 및/또는 유화제로 안정화될 수 있는 고체 지질 코어 매트릭스를 보유한다. 추가의 실시형태에서, 지질 나노입자는 자가-조립형 지질-중합체 나노입자일 수 있다[Zhang et al., ACS Nano, 2008, 2 (8), pp 1696-1702](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다).
- [0208] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 제어된 방출 및/또는 표적화된 전달을 위해 제형화될 수 있다. 본원에서 사용된 "제어된 방출"은 치료 결과를 발생하기 위해 특정 패턴의 방출에 따르는 약제학적 조성물 또는 화합물 방출 프로파일을 의미한다. 하나의 실시형태에서, saRNA는 제어된 방출 및/또는 표적화된 전달을 위해 본원에 기재되고/되거나 당업계에 공지된 전달제 내로 캡슐화될 수 있다. 본원에 사용되는 용어 "캡슐화하다"란, 포위하거나 둘러싸거나 감싸는 것을 의미한다. 이것은 본 발명의 화합물의 제형에 관한 것이기 때문에, 캡슐화는 실질적이거나 완전하거나 부분적일 수 있다. 용어 "실질적으로 캡슐화된"은 본 발명의 약제학적 조성물 또는 화합물의 적어도 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.9, 99.9% 초과 또는 99.999% 초과가 전달제 내에 포위되거나 둘러싸이거나 감싸질 수 있는 것을 의미한다. "부분적으로 캡슐화된"은 본 발명의 약제학적 조성물 또는 화합물의 10, 10, 20, 30, 40, 50% 미만이 전달제 내에 포위되거나 둘러싸이거나 감싸질 수 있는 것



을 의미한다. 유리하게, 캡슐화는 형광 및/또는 전자 현미경 사진을 사용하여 본 발명의 약제학적 조성물 또는 화합물의 이탈 또는 활성을 측정함으로써 결정될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 약제학적 조성물 또는 화합물의 적어도 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.9, 99.99% 또는 99.99% 초과가 전달제 내로 캡슐화된다.

[0209] 다른 실시형태에서, saRNA는 지질 나노입자 또는 급속하게 제거되는 지질 나노입자 내로 캡슐화되고, 이어서 지질 나노입자 또는 급속하게 제거되는 지질 나노입자는 본원에 기재되어 있고/있거나 당업계에 공지되어 있는 중합체, 하이드로겔 및/또는 수술 밀봉제에 캡슐화될 수 있다. 비제한적 예로서, 중합체, 하이드로겔 또는 수술 밀봉제는 PLGA, 에틸렌 비닐 아세테이트(EVAc), 폴록사머, GELSITE<sup>®</sup> (Nanotherapeutics, Inc. 플로리다주 엘라추아), HYLENEX<sup>®</sup> (Halozyme Therapeutics, 캘리포니아주 샌디에고), 수술 밀봉제, 예를 들면, 피브리노겐 중합체(Ethicon Inc. Cornelia, GA), TISSELL<sup>®</sup> (Baxter International, Inc Deerfield, IL), PEG계 밀봉제, 및 COSEAL<sup>®</sup> (Baxter International, Inc Deerfield, IL)일 수 있다.

[0210] 다른 실시형태에서, 지질 나노입자는 대상체에 주사될 때 겔을 형성할 수 있는 당업계에 공지된 임의의 중합체에 캡슐화될 수 있다. 다른 비제한적 예로서, 지질 나노입자는 생분해성일 수 있는 중합체 매트릭스에 캡슐화될 수 있다.

[0211] 하나의 실시형태에서, 제어된 방출 및/또는 표적화된 전달을 위한 saRNA 제형은 또한 하나 이상의 제어된 방출 코팅을 포함할 수 있다. 제어된 방출 코팅은 OPADRY<sup>®</sup>, 폴리비닐피롤리돈/비닐 아세테이트 공중합체, 폴리비닐피롤리돈, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, EUDRAGIT RL<sup>®</sup>, EUDRAGIT RS<sup>®</sup> 및 셀룰로스 유도체, 예를 들면, 에틸셀룰로스 수성 분산물(AQUACOAT<sup>®</sup> 및 SURELEASE<sup>®</sup>)을 포함하나 이들로 제한되지 않는다.

[0212] 하나의 실시형태에서, 제어된 방출 및/또는 표적화된 전달 제형은 다가 양이온 측쇄를 함유할 수 있는 하나 이상의 분해성 폴리에스테르를 포함할 수 있다. 분해성 폴리에스테르는 폴리(세린 에스테르), 폴리(L-락티드-코-L-라이신), 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르), 및 이들의 조합을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 다른 실시형태에서, 분해성 폴리에스테르는 폐기물된 중합체를 형성하기 위해서 PEG 접합체를 포함할 수 있다.

[0213] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 마노하란 등의 미국 공개특허 US 20130202652(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 표적화 잔기와 같은 표적화 잔기를 갖는 표적화 지질을 사용하여 제형화될 수 있다. 비제한적 예로서, 마노하란 등의 미국 공개특허 US 20130202652의 화학식 I의 표적화 잔기는 지질이 목적하는 기관, 조직, 세포, 세포 유형 또는 아형, 또는 소기관으로 국소화되기에 유리하도록 하기 위해서 선택될 수 있다. 본 발명에서 고려되는 비제한적 표적화 잔기는 트랜스페린, 아니스아미드, RGD 펩타이드, 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 푸코오스, 항체 또는 압타머를 포함한다.

[0214] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 치료학적 나노입자에 캡슐화될 수 있다. 치료학적 나노입자는 본원에 기재된 방법 및 국제 공개공보 WO 2010005740, WO 2010030763, WO 2010005721, WO 2010005723, WO 2012054923, 미국 공개특허 US 20110262491, US 20100104645, US 20100087337, US 20100068285, US 20110274759, US 20100068286 및 US20120288541 및 미국 특허 제8,206,747호, 제8,293,276호, 제8,318,208호 및 제8,318,211호(이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)과 같으나 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 방법에 의해 제형화될 수 있다. 다른 실시형태에서, 치료 중합체 나노입자는 미국 공개특허 US 20120140790(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 방법에 의해 확인될 수 있다.

[0215] 하나의 실시형태에서, 치료학적 나노입자는 서방출을 위해 제형화될 수 있다. 본원에 사용되는 "서방출"은 특정 기간에 걸쳐 방출 속도에 따르는 약제학적 조성물 또는 화합물을 의미한다. 기간은 시간, 일, 주, 월 및 년을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 비제한적 예로서, 서방출 나노입자는 중합체 및 치료제, 예를 들면, 본 발명의 saRNA를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다 (국제 공개공보 WO 2010075072 및 미국 공개특허 US 20100216804, US 20110217377 및 US 20120201859 참조; 이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다).

[0216] 하나의 실시형태에서, 치료학적 나노입자는 표적 특이적이도록 제형화될 수 있다. 비제한적 예로서, 치료학적 나노입자는 코르티코스테로이드를 포함할 수 있다(국제 공개공보 WO 2011084518을 참조; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다.). 하나의 실시형태에서, 치료학적 나노입자는 암 특이적이도록 제형화될 수 있다. 비



제한적 예로서, 치료학적 나노입자는 국제 공개공보 WO2008121949, WO2010005726, WO2010005725, WO2011084521 및 미국 공개특허 US20100069426, US20120004293 및 US20100104655(이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 기재된 나노입자로 제형화될 수 있다.

- [0217] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 나노입자는 중합체성 매트릭스를 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 나노입자는 폴리에틸렌, 폴리카보네이트, 폴리무수물, 폴리하이드록시산, 폴리프로필푸머레이트, 폴리카프로락톤, 폴리아미드, 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르, 폴리(오르토에스테르), 폴리시아노아크릴레이트, 폴리비닐 알코올, 폴리우레탄, 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리시아노아크릴레이트, 폴리우레아, 폴리스티렌, 폴리아민, 폴리라이신, 폴리(에틸렌 이민), 폴리(세린 에스테르), 폴리(L-락티드-코-L-라이신), 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르) 또는 이들의 조합과 같으나 이들로 제한되지 않는 2개 이상의 중합체를 포함할 수 있다.
- [0218] 하나의 실시형태에서, 치료학적 나노입자는 디블록 공중합체를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 디블록 공중합체는, 폴리에틸렌, 폴리카보네이트, 폴리무수물, 폴리하이드록시산, 폴리프로필푸머레이트, 폴리카프로락톤, 폴리아미드, 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르, 폴리(오르토에스테르), 폴리시아노아크릴레이트, 폴리비닐 알코올, 폴리우레탄, 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리시아노아크릴레이트, 폴리우레아, 폴리스티렌, 폴리아민, 폴리라이신, 폴리(에틸렌 이민), 폴리(세린 에스테르), 폴리(L-락티드-코-L-라이신), 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르) 또는 이들의 조합과 같으나 이에 제한되지 않는 중합체와 함께 PEG를 포함할 수 있다.
- [0219] 비제한적 예로서, 치료학적 나노입자는 PLGA-PEG 블록 공중합체를 포함한다(미국 공개특허 US 20120004293 및 미국 특허 제8,236,330호 참조; 이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다). 다른 비제한적 예에서, 치료학적 나노입자는 PEG와 PLA 또는 PEG와 PLGA의 디블록 공중합체를 포함하는 스텔스(stealth) 나노입자이다(미국 특허 제8,246,968호 및 국제 공개공보 WO 2012166923 참조; 이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다).
- [0220] 하나의 실시형태에서, 치료학적 나노입자는 미국 특허 제8,263,665호 및 제8,287,910호(이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 기재된 멀티블록 공중합체와 같은 멀티블록 공중합체를 포함할 수 있으나 이들로 제한되지 않는다.
- [0221] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 블록 공중합체는 비-중합체성 미셀 및 블록 공중합체를 포함하는 다중 이온 착물에 포함될 수 있다(예를 들면, 미국 공개특허 US 20120076836 참조; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다).
- [0222] 하나의 실시형태에서, 치료학적 나노입자는 하나 이상의 아크릴 중합체를 포함할 수 있다. 아크릴 중합체는 아크릴산, 메타크릴산, 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴레이트 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴레이트, 시아노에틸 메타크릴레이트, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 폴리시아노아크릴레이트 및 이들의 조합을 포함하나 이들로 제한되지 않는다.
- [0223] 하나의 실시형태에서, 치료학적 나노입자는 폴리라이신, 폴리에틸렌 이민, 폴리(아미도아민) 덴드리머, 폴리(베타-아미노 에스테르)(예를 들면, 미국 특허 제8,287,849호를 참조; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다) 및 이들의 조합과 같으나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 아민-함유 중합체를 포함할 수 있다.
- [0224] 하나의 실시형태에서, 치료학적 나노입자는 다가 양이온성 측쇄를 함유할 수 있는 하나 이상의 분해성 폴리에스테르를 포함할 수 있다. 분해성 폴리에스테르는 폴리(세린 에스테르), 폴리(L-락티드-코-L-라이신), 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르) 및 이들의 조합을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 다른 실시형태에서, 분해성 폴리에스테르는 폐기화된 중합체를 형성하기 위해 PEG 접합체를 포함할 수 있다.
- [0225] 다른 실시형태에서, 치료학적 나노입자는 하나 이상의 표적화 리간드의 접합체화를 포함할 수 있다. 표적화 리간드는 모노클로날 항체와 같으나 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 리간드일 수 있다[Kirpotin et al, Cancer Res. 2006 66:6732-6740](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다).
- [0226] 하나의 실시형태에서, 치료학적 나노입자는 암을 표적화하는데 사용될 수 있는 수용액으로 제형화될 수 있다(국제 공개공보 WO 2011084513 및 미국 공개특허 US 20110294717 참조; 이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다).
- [0227] 하나의 실시형태에서, saRNA는 합성 나노운반체에 캡슐화, 연결 및/또는 결합될 수 있다. 합성 나노운반체는 국

제 공개공보 WO 2010005740, WO 2010030763, WO 201213501, WO 2012149252, WO 2012149255, WO 2012149259, WO 2012149265, WO 2012149268, WO 2012149282, WO 2012149301, WO 2012149393, WO 2012149405, WO 2012149411, WO 2012149454 및 WO 2013019669, 및 미국 공개특허 US 20110262491, US 20100104645, US 20100087337 및 US 20120244222 (이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 것들을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 합성 나노운반체는 당업계에 공지되어 있는 방법 및/또는 본원에 기재된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 비제한적 예로서, 합성 나노운반체는 국제 공개공보 WO 2010005740, WO 2010030763 및 WO 201213501 및 미국 공개특허 US 20110262491, US 20100104645, US 20100087337 및 US 2012024422, (이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 기재된 방법으로 제형화될 수 있다. 다른 실시형태에서, 합성 나노운반체 제형은 국제 공개공보 WO 2011072218 및 미국 특허 제8,211,473호(이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 기재된 방법으로 동결건조될 수 있다.

[0228] 하나의 실시형태에서, 합성 나노운반체는 본원에 기재된 saRNA를 방출하기 위해 반응성 그룹을 포함할 수 있다 (국제 공개공보 WO 20120952552 및 미국 공개특허 US 20120171229 참조; 이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다).

[0229] 하나의 실시형태에서, 합성 나노운반체는 표적화된 방출을 위해 제형화될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 합성 나노운반체는 특정 pH에서 및/또는 원하는 시간 간격 후에 saRNA를 방출하도록 제형화될 수 있다. 비제한적 예로서, 합성 나노입자는 24 시간 후 및/또는 4.5의 pH에서 saRNA를 방출하도록 제형화될 수 있다(국제 공개공보 WO 2010138193 및 WO 2010138194 미국 공개특허 US 20110020388 및 US 20110027217 참조; 이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다).

[0230] 하나의 실시형태에서, 합성 나노운반체는 본원에 기재된 saRNA의 제어된 방출 및/또는 서방출을 위해 제형화될 수 있다. 비제한적 예로서, 서방출을 위한 합성 나노운반체는 당업계에 공지된 방법으로, 본원에 기재된 방법으로 및/또는 국제 공개공보 WO 2010138192 및 미국 공개특허 제20100303850호(이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같이 제형화될 수 있다.

[0231] 하나의 실시형태에서, 나노입자는 경구 투여를 위해 최적화될 수 있다. 나노입자는 키토산 또는 이의 유도체와 같으나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 양이온성 생체고분자를 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 나노입자는 미국 공개특허 제20120282343호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 기재된 방법으로 제형화될 수 있다.

[0232] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 마노하란 등의 미국 특허 제8575123호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같은 모듈식 조성물로 제형화될 수 있다. 비제한적 예로서, 모듈식 조성물은 핵산, 예를 들면, 본 발명의 saRNA, 하나 이상의 엔도솜 분해성 성분 및 하나 이상의 표적화 리간드를 포함할 수 있다. 모듈식 조성물은 마노하란 등의 미국 특허 제8575123호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 임의의 화학식과 같은 화학식을 가질 수 있다.

[0233] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 포거롤스(Fougerolles) 등의 미국 특허 제8546554호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 것들과 같은 안정한 핵산-지질 입자(SNALP)를 형성하기 위해 지질 제형으로 캡슐화될 수 있다. 지질은 양이온성 또는 비이온성일 수 있다. 하나의 비제한적 예에서, 지질 대 핵산 비(질량/질량 비)(예를 들면, 지질 대 saRNA 비)는 약 1:1 내지 약 50:1, 약 1:1 내지 약 25:1, 약 3:1 내지 약 15:1, 약 4:1 내지 약 10:1, 약 5:1 내지 약 9:1 또는 약 6:1 내지 약 9:1 또는 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 또는 11:1의 범위일 것이다. 다른 예에서, SNALP는 40% 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노에틸-[1,3]-디옥솔란(지질 A), 10% 디올레오일포스파티딜콜린(DSPC), 40% 콜레스테롤 및 10% 폴리에틸렌글리콜(PEG)-C-DOMG(몰%)을 포함하고 63.0±20 nm의 입자 크기 및 0.027의 핵산/지질 비를 가진다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 람(Lam) 등의 미국 특허 제7189705호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같은 엔도솜 막 탈안정화제를 포함하는 핵산-지질 입자를 사용하여 제형화될 수 있다. 비제한적 예로서, 엔도솜 막 탈안정화제는  $Ca^{2+}$  이온일 수 있다.

[0234] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 아키네(Akine) 등의 미국 특허 제8148344호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 제형화된 지질 입자(FLiP)를 사용하여 제형화될 수 있다. 아키네 등은 FLiP가 하나 이상의 단일 또는 이중 가닥의 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 여기서, 올리고뉴클레오타이드는 접합된 올리고뉴클레오타이드가 응집, 혼합 또는 결합되어 있는 하나 이상의 유화액 또는 리포솜 및 친지성 물질에 접합되어 있다. 놀랍게도, 이들 입자는 아키네 등의 미국 특허 제8148344호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같이 올리고뉴클레오타이드를 심장, 폐 및 근육으로 효과적으로 전달하는

것으로 나타났다.

- [0235] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 탐 등의 미국 특허 제6086913호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 기재된 바와 같은 발현 벡터를 지질 제형에 포함하는 조성물을 사용하여 세포에 전달될 수 있다. 탐에 의해 개시된 조성물은 혈청-안정하며 아데노 관련 바이러스 (AAV)로부터의 제1 및 제2 역 반복 서열, AAV로부터의 rep 유전자 및 핵산 단편을 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 탐의 발현 벡터는 지질과 복합체를 형성한다.
- [0236] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 포거롤스 등의 미국 공개특허 US 20120270921(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 지질 제형을 사용하여 제형화될 수 있다. 하나의 비제한적 예에서, 지질 제형은 미국 공개특허 US 20120270921(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 화학식 A의 양이온성 지질을 포함할 수 있다. 다른 비제한적 예에서, 미국 공개특허 US 20120270921(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)의 표 A에 개시된 예시적 핵산-지질 입자의 조성물은 본 발명의 saRNA와 사용될 수 있다.
- [0237] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 마우리(Maurer) 등의 미국 공개특허 US 20120276207(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 지질 입자에 완전히 캡슐화될 수 있다. 입자는 탈안정화제 용매 중에서 예비형성된 소포와 치료제의 혼합물을 형성하기 위해 예비형성된 지질 소포, 하전된 치료제 및 탈안정화제를 포함하는 지질 조성물을 포함할 수 있으며, 상기 탈안정화 용매는 소포를 방해하지 않고 예비형성된 지질 소포의 막을 탈안정화시키기에 효과적이다.
- [0238] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 접합된 지질을 사용하여 제형화될 수 있다. 비제한적 예에서, 접합된 지질은 린 등의 미국 공개특허 US 20120264810(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같은 화학식을 가질 수 있다. 접합된 지질은 양이온성 지질, 중성 지질, 및 응집을 감소시킬 수 있는 지질을 추가로 포함하는 지질 입자를 형성할 수 있다.
- [0239] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 피츠제랄드(Fitzgerald) 등의 미국 특허출원 20120244207(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같은 중성 리포솜 제형으로 제형화될 수 있다. 어구 "중성 리포솜 제형"은 생리학적 pH에서 거의 중성이거나 중성 표면 전하를 갖는 리포솜 제형을 의미한다. 생리학적 pH는, 예를 들면, 약 7.0 내지 약 7.5, 또는, 예를 들면, 약 7.5, 또는, 예를 들면, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4 또는 7.5, 또는, 예를 들면, 7.3, 또는, 예를 들면, 7.4일 수 있다. 중성 리포솜 제형의 예는 이온화 가능한 지질 나노입자(iLNP)이다. 중성 리포솜 제형은 이온화 가능한 양이온성 지질, 예를 들면, DLin-KC2-DMA를 포함할 수 있다.
- [0240] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 하전된 지질 또는 아미노 지질을 사용하여 제형화될 수 있다. 본원에 사용되는 용어 "하전된 지질"은 1개 또는 2개의 지방 아실 또는 지방 알킬 쇠 및 4차 아미노 헤드 그룹을 갖는 지질을 포함하는 것을 의미한다. 4차 아민은 영구 양 전하를 지닌다. 헤드 그룹은 생리학적 pH에서 양성자화될 수 있는 1차, 2차 또는 3차 아민과 같은 이온 가능한 그룹을 임의로 포함할 수 있다. 4차 아민의 존재는 4차 아민이 없는 구조적으로 유사한 화합물 (예를 들면, 4차 아민은 3차 아민으로 대체된다)의 이온화 가능한 그룹의 pKa에 상대적으로 이온화 가능한 그룹의 pKa를 변화시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, "아미노 지질"로서 언급된다. 비제한적 예에서, 아미노 지질은 홉(Hope) 등의 미국 공개특허 US 20110256175(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 아미노 지질일 수 있다. 예를 들면, 아미노 지질은 홉 등의 미국 공개특허 US 20110256175(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 구조 (II), DLin-K-C2-DMA, DLin-K2-DMA, DLin-K6-DMA로서 개시된 구조를 가질 수 있다. 다른 예에서, 아미노 지질은 무티아(Muthiah) 등의 국제 공개공보 WO 2009132131(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같은 구조 (I), (II), (III) 또는 (IV), 또는 4-(R)-DUn-K-DMA (VI), 4-(S)-DUn-K-DMA (V)를 가질 수 있다. 다른 예에서, 본원에 기재된 임의의 제형에 사용되는 하전된 지질은 마노하란 등의 EP2509636(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 임의의 하전된 지질일 수 있다.
- [0241] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 지질, 리포솜 또는 리포플렉스를 함유하는 연합 복합체를 사용하여 제형화될 수 있다. 비제한적 예에서, 연합 복합체는 마노하란 등의 미국 특허 제8034376호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 화학식 (I)로 정의된 구조를 각각 가지는 하나 이상의 화합물, 화학식 (XV)로 정의된 구조를 갖는 PEG-지질, 스테로이드 및 핵산을 포함한다. saRNA는 미국 특허 제8034376호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 임의의 연합 복합체를 사용하여 제형화될 수 있다.

- [0242] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 역 헤드 그룹 지질을 사용하여 제형화될 수 있다. 비제한적 예로서, saRNA는 룡(Leung) 등의 국제 공개공보 WO 2011056682(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 구조 (A) 또는 구조 (I)을 갖는 지질과 같은 헤드 그룹을 포함하는 쌍성 이온성 지질(여기서, 양 전하는 아실 쇠 영역 가까이에 위치하고, 음 전하는 헤드 그룹의 원위 말단부에 위치한다)을 사용하여 제형화될 수 있다.
- [0243] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 지질 이중층 운반체 내로 제형화될 수 있다. 비제한적 예로서, saRNA는 컬리스(Cullis) 등의 국제 공개공보 WO 1999018933(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 기재된 바와 같이 약 5 mol% 내지 약 20 mol%의 양의 응집 방지제, 약 0.5 mol% 내지 약 50 mol%의 양의 양이온성 지질, 및 융합성 지질 및 세제의 지질 혼합물을 포함하는 지질-세제 혼합물과 배합되어 핵산-지질-세제 혼합물을 제공하고; 이어서, 완충된 염 용액에 대하여 상기 핵산-지질-세제 혼합물을 투석하여 상기 세제를 제거하고, 상기 핵산을 지질 이중층 운반체에 캡슐화하고, 지질 이중층-핵산 조성물을 제공할 수 있으며, 여기서, 상기 완충된 염 용액은 상기 핵산의 약 40 % 내지 약 80 %를 캡슐화하기에 충분한 이온 강도를 가진다.
- [0244] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 saRNA를 심장, 간 또는 종양 조직 부위로 선택적으로 표적화할 수 있는 핵산-지질 입자로 제형화될 수 있다. 예를 들면, 핵산-지질 입자는 컬리스 등의 유럽 공개특허 EP1328254(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 바와 같이 (a) 핵산; (b) 1.0 mol % 내지 45 mole %의 양이온성 지질; (c) 0.0 mol % 내지 90 mol %의 다른 지질; (d) 1.0 mol % 내지 10 mol %의 이중층 안정화 성분; (e) 0.0 mol % 내지 60 mol %의 콜레스테롤; 및 (f) 0.0 mol % 내지 10 mol %의 양이온성 중합체 지질을 포함할 수 있다. 컬리스는 상기 양이온성 지질, 이중층 안정화 성분, 다른 지질, 콜레스테롤 및 양이온성 중합체 지질 각각의 양의 변화가 심장, 간 또는 종양 조직 부위에 대한 조직 선택성을 부여하고, 이에 의해 핵산을 상기 심장, 간 또는 종양 조직 부위로 선택적으로 표적화할 수 있는 핵산-지질 입자를 확인할 수 있는 것을 교시한다.
- [0245] 전달
- [0246] 본 발명은 약물 전달 과학의 진보와 유사하게 고려되는 임의의 적절한 경로에 의해 치료, 약제, 진단 또는 영상화 중 어느 하나를 위한 saRNA의 전달을 포함한다. 전달은 나형(naked)이거나 제형화될 수 있다.
- [0247] 본 발명의 saRNA는 세포에 나형으로 전달될 수 있다. 본원에서 사용되는 "나형"란, 형질감염 촉진제가 없이 saRNA를 전달하는 것을 의미한다. 예를 들면, 세포에 전달되는 saRNA는 어떠한 변형도 함유할 수 없다. 나형의 saRNA는 당업계에서 공지된 투여 경로 및 본원에 기재된 투여 경로를 사용하여 세포에 전달될 수 있다.
- [0248] 본 발명의 saRNA는 본원에 기재된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 변형되고/되거나 변형될 수 없는 saRNA를 함유할 수 있다. 제형은 세포 관통제, 약제학적으로 허용되는 담체, 전달제, 생분해성 또는 생체적합성 중합체, 용매 및 서방출 전달 데포를 추가로 포함할 수 있으나 이들로 제한되지 않는다. 제형화된 saRNA는 당업계에 공지된 투여 경로 및 본원에 기재된 투여 경로를 사용하여 세포에 전달될 수 있다.
- [0249] 조성물은 또한 카테터를 통해, 젤, 분말, 연고, 크림, 젤, 로션 및/또는 점적제에 의해, 조성물로 피복되거나 함침된 직물 또는 생분해성 물질 등과 같은 기재를 사용함으로써 기관 또는 조직으로의 직접 전달을 위해 직접 침지 또는 입욕(bathing)을 포함하나 이에 제한되지 않는 당업계의 수개 방식 중 어느 하나의 방식으로 제형화될 수 있다. 본 발명의 saRNA는 또한 레트로바이러스 복제 벡터 (RRV)로 클로닝되어 세포에 형질도입될 수 있다.
- [0250] 투여
- [0251] 본 발명의 saRNA는 치료학적으로 유효한 결과를 초래하는 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 이들은 장관, 위 장관, 경막외, 경구, 경피, 경막외(경막 주위), 내뇌(대뇌내), 뇌실내(대뇌실내), 피내(피부상으로의 적용), 진피내(피부 자체 내), 피하(피부 아래), 비강 투여(코를 통해), 정맥내(정맥 내로), 동맥내(동맥 내로), 근육내(근육 내로), 심장내(심장 내로), 골내 주입(골수 내로), 복강내(척추관 내로), 복강내(복막 내로의 주입 또는 주사), 방광내 주입, 유리체내(눈을 통해), 음경해면체내 주사(음경의 기저부), 질내 투여, 자궁내, 양막외 투여, 경피(전신 분포를 위한 무손상 피부를 통한 확산), 경점막(점막을 통한 확산), 흡입(코흡입), 설하, 구순하, 관장, 점안제(결막 상으로) 또는 점이제를 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 조성물은 이들이 혈뇌 장벽, 혈관 장벽 또는 기타 상피 장벽을 가로지르도록 허용하는 방식으로 투여될 수 있다. 2012년 12월 14일자로 출원된 국제 공개공보 WO 2013/090648(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 투여 경로는 본 발명의 saRNA를 투여하는데 사용될 수 있다.



- [0252] 투여형
- [0253] 본원에 기재된 약제학적 조성물은 국소, 비강내, 기관내 또는 주사가능한(예를 들면, 정맥내, 안구내, 유리체내, 근육내, 심장내, 복강내, 피하) 형태와 같은 본원에 기재된 투여형으로 제형화될 수 있다. 2012년 12월 14일자로 출원된 국제 공개공보 WO 2013/090648(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 액체 투여형, 주사가능 제제, 폐형(pulmonary forms) 및 고체 투여형은 본 발명의 saRNA를 위한 투여형으로서 사용될 수 있다.
- [0254] **II. 사용 방법**
- [0255] 본 발명의 하나의 측면은 C/EBP  $\alpha$ -saRNA, 및 C/EBP  $\alpha$ -saRNA 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 사용하는 방법을 제공한다. C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 C/EBP  $\alpha$  유전자 발현을 조절한다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$  유전자의 발현은 본 발명의 saRNA의 부재하의 C/EBP  $\alpha$  유전자의 발현과 비교하여 본 발명의 saRNA의 존재하에 적어도 20, 30, 40%, 보다 바람직하게는 적어도 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 80% 증가된다. 추가의 바람직한 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$  유전자의 발현은 본 발명의 saRNA의 부재하의 C/EBP  $\alpha$  유전자의 발현과 비교하여 본 발명의 saRNA의 존재하에 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10배, 보다 바람직하게는 적어도 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50배, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 60, 70, 80, 90, 100배 증가된다.
- [0256] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 saRNA의 유전자 발현의 증가는 증식 세포에서 나타난다.
- [0257] **대사작용 조절**
- [0258] 간 세포는 일반적으로 수개의 중요한 기능의 유지에 중요한 것으로 인식된다. 예를 들면, 이들은 탄수화물 및 지질 대사작용 및 외인성 및 내인성 화합물의 탈독성화를 조절할 수 있다. C/EBP  $\alpha$ 는 이것이 지방 세포, 제2형 폐포 세포 및 간 세포를 포함한 다수의 세포 유형의 분화에 중요한 역할을 하는 다양한 조직에서 발현된다. 마우스에서, C/EBP  $\alpha$ 는 지방, 간 및 폐 조직에서 가장 풍부하게 발견된다. C/EBP  $\alpha$ 의 기능 역할은 알파-1-항트립신, 트랜스티레틴 및 알부민을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 더욱이, 간 세포주(HepG2)에서의 C/EBP  $\alpha$  유전자의 발현은 내인성 기질의 대사에 참여하고 중요 생체이물의 탈독성화 및 대사 활성화에 중요한 역할을 하는 모노옥시게나제의 슈퍼패밀리인 사이토크롬 P450(CYP)의 수준 증가를 초래한다[Jover et al., FEBS Letters, vol. 431(2), 227-230 (1998)](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다).
- [0259] 비-알코올성 지방간 질환(NAFLD)은 전세계 주요 건강 문제이며, 미국에서 3명중 1명에서 발생한다. NAFLD는 과도한 알코올 사용에 의해 유발되지 않은 간 세포에서의 여분의 지방(지질)의 축적이다. 이것은 간 중량의 5% 내지 10% 초과가 지방이라면 지방간(지방증)으로 지칭된다. NAFLD는 지방간염, 경화증 및 간암으로 진행할 수 있다. 이것은 대사성 증후군, 인슐린 내성, 제2형 당뇨병, 고지혈증, 고혈압, 비만증 등과 같은 대사성 장애와 관련된다. 치료 방법은 저밀도 지질단백질(LDL) 콜레스테롤 수준을 저하시키고, 인슐린 민감성을 향상시키고, 대사성 위험 요인, 체중 감소 등을 치료하는 것을 포함한다[Adams et al., Postgraduate Medical Journal, vol. 82, 315-322 (2006); Musso et al., Curr. Opin. Lipidol., vol. 22(6), 489-496 (2011)](이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다).
- [0260] C/EBP  $\alpha$  단백질은 간 기능 및 대사작용을 조절하는데 있어 중요한 역할을 한다. CD36 단백질 수준의 저하에 의한 지방산 흡수의 감소, 스테롤 조절 요소-결합 단백질(SREBP), 탄수화물-반응 요소-결합 단백질(ChREBP) 및 지방산 신타제(FAS) 단백질 수준의 저하에 의한 새로운 지질생성의 감소, 퍼옥시좀 증식인자-활성화 수용체 알파(PPAR  $\alpha$ ) 및 퍼옥시좀 증식인자-활성화 수용체 감마 공활성 인자 1-알파 & -베타(PGC-1  $\alpha$  &  $\beta$ ) 단백질 수준의 증가에 의한  $\beta$ -산화 증가, 아포지질단백질 C-III(APOC3) 및 저밀도 지질단백질 수용체(LDLR) 단백질 수준의 저하에 의한 간 지질 과부하의 감소, PGC-1  $\beta$  단백질 수준의 증가에 의한 섬유증으로의 진행 감소, 및 퍼옥시좀 증식인자-활성화 수용체 감마(PPAR  $\gamma$ ) 단백질 수준의 증가에 의한 인슐린 내성의 감소를 포함한 간에 대한 C/EBP  $\alpha$ 의 일차 효과는 도 1에 도시된다. 더욱이, C/EBP  $\alpha$ 는 도 2에 도시된 바와 같이 지방 조직에 대해 이차 효과를 가진다. 백색 지방 조직(WAT)은 지질생성 및 지방 저장 조직일 뿐만 아니라 에너지 항상성, 지질 대사, 식욕, 불임, 및 면역 및 스트레스 반응을 조절하는 중요한 내분비 기관이다. 갈색 지방 조직(BAT)은 WAT와 비교하여 다수의 더 작은 지질 액적 및 훨씬 더 큰 수의 철-함유 미토콘드리아를 함유한다. 이것은 영양 에너지학, 에너지 균형 및 체중에 현저한 역할을 한다. BAT의 위축이 비만증과 관련된다는 증거가 있다. 특히, 연구들은 BAT의 열발생 손상이 설치류에서 비만증의 병인에 중요한 것으로 나타났다[Trayhurn P., J. Biosci., vol. 18(2), 161-173 (1993)]. C/EBP  $\alpha$ 는 간 지방증 및 인슐린 내성을 감소시키고 PGC-1  $\alpha$  단백질 수준을

증가시키며, 이것은 결국 WAT의 갈색화 일으키고, WAT를 BAT로 변하게 하고, 이어서 BAT를 활성화시키고, 이에 의해 체지방 및 체중을 감소시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간 기능을 조절하고, 지방증을 감소시키고, 혈청 지질을 감소시키고, NAFLD를 치료하고, 인슐린 내성을 치료하고, 에너지 소비를 증가시키고, 지방증을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0261] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 치료에 의해 시험관내 및 생체내에서 간 대사 유전자를 조절하는 방법이 제공된다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 치료에 의해 시험관내 및 생체내에서 NAFLD에 수반된 간 유전자를 조절하는 방법이 또한 제공된다. 유전자는 스테롤 조절 요소-결합 인자 1(SREBF-1 또는 SREBF), 분화 36(CD36)의 클러스터, 아세틸-CoA 카복실라제 2(ACACB), 아포지질단백질 C-III(APOC3), 미세소체 트리글리세라이드 전이 단백질(MTP), 퍼옥시좀 증식인자-활성화 수용체 감마 공활성인자 1 알파 (PPAR  $\gamma$ -CoA1  $\alpha$  또는 PPARGC1A), 저밀도 지질단백질 수용체(LDLR), 퍼옥시좀 증식인자-활성화 수용체 감마 공활성인자 1 베타(PPAR  $\gamma$ -CoA1  $\beta$  또는 PERC), 퍼옥시좀 증식인자-활성화 수용체 감마(PPAR  $\gamma$ ), 아세틸-CoA 카복실라제 1(ACACA), 탄수화물-반응 요소-결합 단백질(ChREBP 또는 MLXIPL), 퍼옥시좀 증식인자-활성화 수용체 알파(PPAR  $\alpha$  또는 PPARG), FASN(지방산 신타제), 디글리세라이드 아실트랜스퍼라제-2(DGAT2), 및 라파마이신의 포유동물 표적(mTOR)을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간 세포에서 SREBF-1 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 바람직하게는 적어도 40% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간 세포에서 CD36 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간 세포에서 ACACB 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90%, 100%, 125%, 150% 증가시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간 세포에서 APOC3 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간 세포에서 MTP 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간 세포에서 PPAR  $\gamma$ -CoA1  $\alpha$  유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90%, 100%, 125%, 150%, 보다 바람직하게는 적어도 175%, 200%, 250%, 300% 증가시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간 세포에서 PPAR  $\gamma$  유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90%, 100%, 125%, 150%, 보다 바람직하게는 적어도 175%, 200%, 250%, 300% 증가시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간 세포에서 PPAR  $\alpha$  유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90%, 100%, 125%, 150%, 보다 바람직하게는 적어도 175%, 200%, 250%, 300% 증가시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간 세포에서 MLXIPL 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간 세포에서 FASN 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간 세포에서 DGAT2 유전자의 발현을 적어도 10%, 20%, 바람직하게는 적어도 30%, 40%, 50% 감소시킨다.

[0262] C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 또한 BAT 세포에서 상기에 기재된 간 대사 유전자의 발현을 조절한다. 다른 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 BAT 세포에서 SREBP 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 바람직하게는 적어도 40% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 BAT 세포에서 CD36 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 BAT 세포에서 LDLR 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 BAT 세포에서 PPARGC1A 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 바람직하게는 적어도 40% 증가시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 BAT 세포에서 APOC 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 99% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 BAT 세포에서 ACACB 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 BAT 세포에서 PERC 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 BAT 세포에서 ACACA 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90%, 100%, 125%, 150% 증가시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 BAT 세포에서 MLXP1 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 바람직하게는 적어도 50% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 BAT 세포에서 MTOR 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 바람직하게는 적어도 50%, 75% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 BAT 세포에서 PPARG 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90%, 100%, 125%, 150%, 보다 바람직하게는 적어도 200%, 250%, 300%, 350%, 400% 증가시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 BAT 세포에서 FASN 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90% 증가시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 BAT 세포에서 DGAT 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%,

90%, 100%, 125%, 150%, 보다 바람직하게는 적어도 200%, 250%, 300% 증가시킨다.

[0263]

C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 또한 WAT 세포에서 상기에 기재된 간 대사 유전자의 발현을 조절한다. 다른 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 WAT 세포에서 SREBP 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 바람직하게는 적어도 40% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 WAT 세포에서 CD36 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 WAT 세포에서 LDLR 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 WAT 세포에서 PPARGC1A 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 바람직하게는 적어도 40% 증가시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 WAT 세포에서 MTP 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 배, 보다 바람직하게는 적어도 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0배 증가시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 WAT 세포에서 APOC 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 99% 증가시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 WAT 세포에서 ACACB 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 WAT 세포에서 PERC 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 WAT 세포에서 ACACA 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 90%, 95% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 WAT 세포에서 MLX1PL 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 바람직하게는 적어도 50% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 WAT 세포에서 MTOR 유전자의 발현을 적어도 20%, 30%, 40%, 바람직하게는 적어도 50%, 75% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 WAT 세포에서 FASN 유전자의 발현을 적어도 5%, 10%, 바람직하게는 적어도 15%, 20% 감소시킨다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 WAT 세포에서 DGAT 유전자의 발현을 적어도 10%, 20%, 30%, 보다 바람직하게는 적어도 40%, 50% 감소시킨다.

[0264]

다른 실시형태에서, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA를 이를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써 인슐린 민감성(IR)을 감소시키거나 인슐린 민감성을 증가시키는 방법이 제공된다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA를 이를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써 제2형 당뇨병, 고인슐린혈증 및 지방증을 치료하는 방법이 또한 제공된다. 간 세포가 인슐린에 내성이어서 인슐린을 효과적으로 사용할 수 없다면, 고혈당증이 발생한다. 후속적으로, 췌장의 베타 세포는 고인슐린혈증 및 제2형 당뇨병을 유발시키는 인슐린의 생성을 증가시킨다. 다수의 조절인자는 간 세포의 인슐린 내성에 영향을 미친다. 예를 들면, 스테롤 조절 요소-결합 단백질 1(SREBP1 또는 SREBP)은 콜레스테롤의 마스터 조절인자이고, 인슐린 내성 증가와 관련된다. 콜레스테릴 에스테르 전이 단백질(CETP)의 상향조절은 인슐린 내성 증가와 관련된다. 간 지방산 트랜스카제/분화 36(FAT/CD36)의 클러스터의 상향조절은 인슐린 내성, 고인슐린혈증, 비알코올성 지방간염(NASH)을 앓는 환자에서의 지방증 증가와 관련된다. 지질단백질 리파제 유전자(LPL)의 간-특이적 과발현은 간-특이적 인슐린 내성을 일으킨다. 간 X 수용체 유전자(LXR)는 간에서 스테롤 조절 요소-결합 단백질(SREBP)-1c-유도된 지방산 합성의 인슐린-매개된 활성화에서 중심 역할을 한다. 기타 요인은 트리글리세라이드 합성을 조절하는 디글리세라이드 아실트랜스퍼라제-2(DGAT2)와 지방산 생합성을 조절하는 지방산 신타제(FASN)를 포함한다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간 세포에서 FAT/CD36 유전자의 발현을 무처리 간 세포와 비교하여 적어도 25%, 바람직하게는 적어도 50%, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 보다 더욱 바람직하게는 90% 감소시킨다. 다른 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간 세포에서 LPL 유전자의 발현을 무처리 간 세포와 비교하여 적어도 20, 30, 40%, 바람직하게는 적어도 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95%, 보다 바람직하게는 적어도 100, 150, 200, 250, 300, 350 및 400% 증가시킨다. 다른 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간 세포에서 LXR 유전자의 발현을 무처리 간 세포와 비교하여 적어도 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95%, 보다 바람직하게는 적어도 100, 150, 200, 250, 300, 350 및 400%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 450, 500, 550, 600% 증가시킨다. 다른 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 SREBP1 유전자의 발현을 감소시킨다. 다른 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 DGAT2 유전자의 발현을 감소시킨다. 다른 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 CETP 유전자의 발현을 감소시킨다. 또 다른 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 FASN 유전자의 발현을 감소시킨다.

[0265]

C/EBP  $\alpha$ -saRNA에 의해 조절될 수 있는 NAFLD 및 IR 유전자의 요약은 표 5에 나타나 있다. 표 5의 약어: NAFLD: 비-알코올성 지방간 질환; IR: 인슐린 내성; DNL: 새로운 지질생성; FA: 지방산; TG: 트리글리세라이드; LPL: 지질단백질 리파제; HP: 간 리파제; CHOL: 콜레스테롤.

[0266] [표 5]

C/EBP  $\alpha$ -saRNA 로 조절될 수 있는 NAFLD 및 IR 유전자

유전자명	기작	기능/암호화된 생성물-참조	NAFLD에서의 탈조절	IR에서의 탈조절
CD36	FA 흡수	스캐빈저 수용체, 간 및 지방 조직에서의 유리 FA 수송체; 지방 조직 아포토시스 및 염증을 조절	상향	상향
PPAR $\gamma$	DNL	지질 축적 및 대사작용에 관여하는 유전자를 활성화시킴; 지질 항상성 유지에 요구됨; 지방 조직에서 높게 간에서 매우 낮게 발현됨; 지방세포 분화 및 인슐린 민감성에 연루됨	상향	하향
PPAR $\gamma$ - CoA 1 $\beta$ (PERC)	DNL	SREBP-1에 대한 전사 공동 활성인자; 지질생성 및 VLDL 합성을 항상시킴; 갈색 지방 및 심장에서 고도로 발현되고 공복 동안 간에서 유도됨; 미토콘드리아 생물발성 및 산화적 대사작용, 지질생성 및 TG 분비의 주요 조절인자	상향	상향
SREBP-1c	DNL	전사 인자, 글루코스 이용 및 FA 합성에 관여하는 유전자를 유도함; 지방생성 유전자에 대한 인슐린 작용의 주요 매개인자; 지방생성을 조절함	상향	상향
ChREBP (MLX1PL)	DNL	글루코스에 의해 활성화되는 전사 인자; 당분해성 및 지방생성 유전자를 유도함; 지방 조직 지방산 합성 및 전신 인슐린 민감성의 주요 결정인자	상향	상향
FAS	DNL	FA 생합성의 최종 단계를 촉매하는 효소	상향	상향
ACACA (ACC1)	DNL	세포질 내의 FA 합성을 위해 말로닐- CoA의 합성을 촉매하는 효소	상향	상향
ACACB (ACC2)	$\beta$ -산화	미토콘드리아 $\beta$ -산화의 저해제로서 작용하는, 말로닐-CoA의 합성을 촉매하는 효소	상향	상향
PPAR $\alpha$	$\beta$ -산화	FA의 산화에 관여하는 유전자를 활성화시킴, 간에서의 지질 대사의 주요 조절인자; 대부분 간에서 발현됨; 글루코스 항상성유지, 인슐린 민감성, 지방 축적 및 지방 조직 글루코스 사용의 조절에 관여함	하향	하향
PPAR $\gamma$ - CoA 1 $\alpha$	$\beta$ -산화	미토콘드리아 생물학 및 에너지 항상성유지를 조절하는 전사 공동 활성인자; 미토콘드리아 생체내 합성에서 결정적 역할; PPAR $\alpha$ 와 상호작용하여 FA의 미토콘드리아	하향	하향

[0267]

		$\beta$ -산화를 증가시킴		
DGAT2	TG 합성	TG의 합성시 최종 반응을 촉매하는 효소	상향	상향
APOC3	TG 농도	LPL 및 HP를 저해하는 단백질; 혈장 TG 농도의 조절에 관여함; 지방증- 축진(pro-steatotic)	상향	상향
LDLR	CHOL 농도	저밀도 지단백질 수용체; 혈액 CHOL 수준 조절시 결정적 역할; 신체로부터 대부분의 과도한 CHOL의 제거를 책임지는 기관인 간에 풍부함	하향	변화 없음
MTP (MTTP1)	지단백질 조립	TG의 운반체; VLDL 조립에서 중심 역할; 주로 간에서 발현됨	하향	변화 없음
mTOR	지방 덩어리	지방 조직 덩어리의 가능한 조절인자; 지방분해, 지방생성 및 지방세포 생성에서 중심 역할	상향	상향

[0268]



C/EBP  $\alpha$ -saRNA로 조절될 수 있는 NAFLD 및 IR 유전자 (표 5 계속)

유전자명	간에서의 에세티립의 효과	C/EBP $\alpha$ 의 효과		
		간	WAT	BAT
CD36	경미한 하향	하향	하향	하향
PPAR $\gamma$	상향	상향	변화 없음	변화 없음
PPAR $\gamma$ -CoA 1 $\beta$ (PERC)	상향	상향	하향	상향
SREBP-1c	상향	하향	하향	하향
ChREBP (MLX1PL)	상향	하향	상향	상향
FAS	하향	하향	경미한 상향	상향
ACACA (ACC1)	경미한 상향	변화 없음	하향	상향
ACACB (ACC2)	상향	상향	하향	하향
PPAR $\alpha$	상향	상향	하향	상향
PPAR $\gamma$ -CoA 1 $\alpha$	상향	상향	상향	상향
DGAT2	경미한 하향	경미한 하향	하향	상향
APOC3	하향	하향	상향	하향
LDLR	경미한 하향	하향	상향	경미한 하향
MTP (MTTP1)	상향	하향	상향	하향
mTOR	변화 없음	변화 없음	하향	하향

[0269]

[0270]

본 발명의 하나의 실시형태에서, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA 처리에 의해 시험관내에서 혈청 콜레스테롤 수준을 저하시키는 방법이 제공된다. C/EBP  $\alpha$ -saRNA에 의한 혈청 콜레스테롤 수준은 비처리 혈청 콜레스테롤 수준과 비교하여 적어도 25%, 바람직하게는 50%, 보다 바람직하게는 75% 감소시킨다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA를 투여함으로써 간 세포에서 LDL 및 트리글리세라이드 수준을 저하시키고 생체내에서 순환 LDL 수준을 증가시키는 방법이 또한 제공된다. 순환 LDL 수준은 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 부재하의 순환 LDL 수준과 비교하여 적어도 2배, 바람직하게는 3배, 바람직하게는 4배, 바람직하게는 5배, 바람직하게는 10배, 바람직하게는 15배 증가할 수 있다. 간 트리글리세라이드 수준은 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 부재하의 간 트리글리세라이드 수준과 비교하여 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 또는 70% 감소할 수 있다. 간 LDL 수준은 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 부재하의 간 LDL 수준과 비교하여 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 또는 70% 감소할 수 있다.

[0271]

본 발명의 하나의 실시형태에서, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA를 이를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써 NAFLD를 치료하고 지방간 크기를 감소시키는 방법이 제공된다. C/EBP  $\alpha$ -saRNA에 의해 치료된 환자의 지방간 크기는 무처리 환자와 비교하여 적어도 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 감소한다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA를 이를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써 체중을 감소시키고 비만증을 치료하는 방법이 또한 제공된다. C/EBP  $\alpha$ -saRNA에 의해 치료된 환자의 체중은 C/EBP  $\alpha$ -saRNA로 치료되지 않은 환자의 체중보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 또는 70% 감소될 수 있다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 1회 용량, 2회 용량, 3회 용량 또는 그 이상 투여될 수 있다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 치료에 의해 유리 지방산의 간 흡수를 감소시키는 방법이 또한 제공된다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 치료에 의해 백색 지방 조직(WAT) 염증을 감소시키는 방법이 또한 제공된다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 치료에 의해 새로운 지질생성을 감소시키는 방법이 또한 제공된다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 치료에 의해 간에서의 베타-산화를 증가시키는 방법이 또한 제공된다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 치료에 의해 간에서의 갈색 지방 조직 (BAT)을 증가시키는 방법이 또한 제공된다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 치료에 의해 간 지질 흡수를 감소시키는 방법이 또한 제공된다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 치료에 의해 WAT에서 지질생성을 감소시키는 방법이 또한 제공된다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 치료에 의해 간에서 지질 저장을 감소시키는 방법이 또한 제공된다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 치료에 의해 간에서 지질 과부하를 감소시키는 방법이 또한 제공된다.

[0272]

다른 실시형태에서, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간 기능을 증가시키는데 사용된다. 하나의 비제한적 예에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 알부민 유전자의 발현을 증가시키고, 이에 의해 혈청 알부민 및 비결합된 빌리루빈 수준을 증가시킨다. 알부민 유전자의 발현은 본 발명의 saRNA의 부재하의 알부민 유전자의 발현과 비교하여 본 발명의 saRNA의 존재하에 20, 30, 40% 이상, 보다 바람직하게는 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 80% 이상 증가시킬 수 있다. 추가의 바람직한 실시형태에서, 알부민 유전자의 발현은 본 발명의 saRNA의 부재하의 알부민 유전자의 발현과 비교하여 본 발명의 saRNA의 존재하에 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10배, 보다 바람직하게는 적어도 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50배, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 60, 70, 80,

90, 100배 증가된다. 다른 비제한적 예에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 알라닌 트랜스아미나제(ALT), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST), 감마 글루타밀 트랜스펩티다제(GGT), 알파페토프로테인(AFP) 및 간 세포 성장 인자(HGF)의 양을 감소시킨다. ALT, AST, GGT, AFP 또는 HGF의 양은 본 발명의 saRNA의 부재하의 임의의 ALT, AST, GGT, AFP 또는 HGF의 양과 비교하여 본 발명의 saRNA의 존재하에 적어도 20, 30, 40%, 보다 바람직하게는 적어도 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 80% 감소될 수 있다.

[0273] 다른 실시형태에서, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 C/EBP 계열의 다른 막의 수준을 조절하도록 투여된다. C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 용량에 따라 C/EBP  $\beta$ , C/EBP  $\gamma$ , C/EBP  $\delta$  및 C/EBP  $\zeta$ 의 발현을 증가시킨다. 또 다른 실시형태에서, 세포에서의 C/EBP  $\alpha$  또는 C/EBP  $\beta$  단백질 이소형의 비율은 상기 세포와 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA를 접촉시킴으로써 조절된다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ 의 42KDa 이소형은 증가된다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\beta$ 의 30KDa 이소형은 감소된다.

[0274] *ecCEBPA*

[0275] CEBPA 유전자좌로부터 전사된 기능성 ncRNA, 여분의 암호화 CEBPA (*ecCEBPA*)는 DNA 메틸트랜스퍼라제(DNMT1)와 상호작용하여 CEBPA 유전자 메틸화를 방지함으로써 CEBPA 메틸화를 조절한다. *ecCEBPA* 녹다운은 CEBPA mRNA 발현의 감소 및 DNA 메틸화의 현저한 증가를 유발하는 것으로 밝혀졌다[Ruscio et al., Nature, vol. 503:371-376 (2013)](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다). 다른 실시형태에서, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 *ecCEBPA* 수준을 상향조절하는데 사용된다.

[0276] 수술 치료

[0277] 간절제술, 간 또는 간 조직의 수술 절제는 간 부전, 알부민 및 응고 인자의 생성 감소를 유발할 수 있다. 간절제술 후 적절한 수술 관리가 필요하다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간절제술 후 수술 관리를 위해 사용되어 간 재생을 촉진시키고 생존률을 증가시킨다.

[0278] 과증식성 장애

[0279] 본 발명의 하나의 실시형태에서, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 과증식성 세포의 세포 증식을 감소시키는데 사용된다. 과증식성 세포의 예는 암 세포, 예를 들면, 암종, 육종, 림프종 및 모세포종을 포함한다. 이러한 암 세포는 양성 또는 악성일 수 있다. 과증식성 세포는 류마티스 관절염, 염증성 장 질환 또는 건선증과 같은 자가면역 질환으로부터 유발될 수 있다. 과증식성 세포는 또한 알레르기 항원에 접촉된 과민성 면역계 환자 내에서 유발될 수 있다. 과민성 면역계를 수반하는 이러한 질환은 천식, 알레르기성 비염, 습진 및 알레르기 반응, 예를 들면, 알레르기성 과민증을 포함할 수 있으나 이들로 제한되지 않는다. 하나의 실시형태에서, 종양 세포의 발생 및/또는 성장이 억제된다. 바람직한 실시형태에서, 고형 종양 세포의 증식이 억제된다. 다른 바람직한 실시형태에서, 종양 세포의 전이가 예방된다. 다른 바람직한 예에서, 미분화 종양 세포의 증식이 억제된다.

[0280] 세포 증식의 억제 또는 증식 감소란, 증식이 감소하거나 완전히 정지하는 것을 의미한다. 따라서, "증식 감소"는 "증식 억제"의 한 실시형태이다. 세포 증식은 본 발명의 saRNA에 의한 처리 전에 상기 세포의 증식과 비교하거나 동등한 미처리 세포의 증식과 비교하여 본 발명의 saRNA의 존재하에 적어도 20%, 30% 또는 40%, 또는 바람직하게는 적어도 45, 50, 55, 60, 65, 70 또는 75%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 80, 90 또는 95% 감소한다. 세포 증식이 과증식성 세포에서 억제되는 실시형태에서, "동등한" 세포는 또한 과증식성 세포이다. 바람직한 실시형태에서, 증식은 동등한 건강한 (비-과증식성) 세포의 증식 속도에 필적하는 속도까지 감소한다. 대안적으로 볼 때, "세포 증식의 억제"는 과증식의 억제 또는 증식의 정상적인 건강한 수준에 도달하도록 세포 증식을 조절하는 것이다.

[0281] 하나의 비제한적 예에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 백혈병 및 림프종 세포의 증식을 감소시키는데 사용된다. 바람직하게, 상기 세포는 Jurkat 세포(급성 T 세포 림프종 세포주), K562 세포(적백혈병 세포주), U373 세포(아교모세포종 세포주) 및 32Dp210 세포(글수성 백혈병 세포주)를 포함한다.

[0282] 다른 비제한적 예에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 난소암 세포, 간암 세포, 췌장암 세포, 유방암 세포, 전립선암 세포, 랫트 간암 세포 및 인슐린종 세포의 증식을 감소시키는데 사용된다. 바람직하게, 상기 세포는 PE01 및 PE04(난소암 세포주), HepG2(간세포 암종 세포주), Panc1(사람 췌장 암종 세포주), MCF7(사람 유방 선암종 세포주), DU145(사람 전이성 전립선암 세포주), 랫트 간 간 세포 및 MIN6(랫트 인슐린종 세포주)을 포함한다.

[0283] 다른 비제한적 예에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 C/EBP  $\beta$  유전자를 표적화하는 siRNA와 함께 사용되어 종양 세포 증식을 감소시킨다. 종양 세포는 HepG2 세포와 같은 간세포 암종 세포 및 MCF7 세포와 같은 유방암 세포를 포함할 수

있다.

- [0284] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 과증식성 장애를 치료하는데 사용된다. 종양 및 암은 특정한 관심 대상의 과증식성 장애 및 모든 유형의 종양 및 암을 나타내며, 예를 들면, 고형 종양 및 혈액암이 포함된다. 암의 예는 자궁 경부암, 자궁암, 난소암, 신장암, 담낭암, 간암, 두경부암, 편평 세포 암종, 위장암, 유방암, 전립선암, 고환암, 폐암, 비-소세포 폐암, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 백혈병(예를 들면, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병 및 만성 골수성 백혈병), 뇌암(예를 들면, 별아교세포종, 아교모세포종, 수모세포종), 신경모세포종, 육종, 결장암, 직장암, 위암, 항문암, 방광암, 자궁내막암, 형질세포종, 림프종, 망막모세포종, 윌름즈 종양(Wilm's tumor), 유잉 육종, 흑색종 및 기타 피부암을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 간암은 담관암종, 간모세포종, 혈관육종 또는 간세포 암종 (HCC)을 포함할 수 있으나 이들로 제한되지 않는다. HCC가 특히 관심대상이다.
- [0285] 1차 간암은 전세계적으로 15번째로 가장 빈번한 암이고, 암-관련 사망의 3번째로 가장 흔한 원인이다. HCC는 대다수의 1차 간암을 대표한다[El-Serag et al., Gastroenterology, vol. 132(7), 2557-2576 (2007)](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다). HCC는 암 세포 생물학, 면역계 및 다양한 병인학 (바이러스, 독성 및 일반)을 포함한 여러 요소의 상호작용에 의해 영향을 받는다. HCC 환자의 대부분은 간경화의 배경으로부터 악성 종양으로 발전한다. 현재, 대부분의 환자는 진행악화 단계에서 진단받고, 따라서 HCC 환자의 대부분의 5년 생존률은 여전히 암울하다. 절제술, 국소 절제 및 간 이식은 현재 HCC를 치유할 가능성을 가진 유일한 치료 옵션이다. 그러나, 개별적인 간 기능 및 종양 부하의 평가에 기초하여, 환자의 약 5 내지 15% 만이 수술 치료를 받을 수 있다. C/EBP 전사 인자의 계열에 대한 결합 부위는 정상 간 세포 기능의 유지 및 손상에 대한 반응 (알부민, 인터류킨 6 반응, 에너지 항상성, 오르니틴 회로 조절 및 혈청 아밀로이드 A 발현)에 관여하는 다수의 유전자의 프로모터 영역에 존재한다. 본 발명은 C/EBP α-saRNA를 이용하여 C/EBP α 유전자의 발현을 조절하고 간경화 및 HCC를 치료한다.
- [0286] 본 발명의 방법은 종양 용적을 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90% 감소시킬 수 있다. 바람직하게, 하나 이상의 새로운 종양의 발생이 억제된다, 예를 들면, 본 발명에 따라 치료되는 대상체는 보다 적고/적거나 보다 작은 종양을 발생시킨다. 보다 적은 종양이란, 대상체가 설정 기간에 걸쳐 동등한 대상체 보다 적은 종양 수를 발생시키는 것을 의미한다. 예를 들면, 대상체는 대응하는 대조군 (미처리) 환자 보다 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5개 적은 종양을 발생시킨다. 보다 작은 종양이란, 종양의 중량 및/또는 용적이 대응하는 대상체의 종양 보다 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90% 작은 것을 의미한다. 본 발명의 방법은 종양 부하를 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90% 감소시킨다.
- [0287] 정해진 기간은 임의의 적합한 기간, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개월 또는 년일 수 있다.
- [0288] 하나의 비제한적 예에서, 세포, 조직, 기관 또는 대상체와 본 발명의 C/EBP α-saRNA를 접촉시키는 것을 포함하는, 미분화 종양을 치료하는 방법이 제공된다. 미분화 종양은 일반적으로 미분화된 것들과 비교하여 더 불량한 예후를 가진다. 종양의 분화 정도가 예후와 관계가 있기 때문에, 분화성 생물작용제의 사용이 유익한 항-증식 약물일 수 있는 것으로 가정한다. C/EBP α는 골수 분화를 회복시키고 급성 골수성 백혈병에서 조혈 세포의 과증식을 예방하는 것으로 알려져 있다. 바람직하게, C/EBP α-saRNA로 치료될 수 있는 미분화 종양은 미분화 소세포 폐 암종, 미분화 췌장 선암종, 미분화 사람 췌장 암종, 미분화 사람 전이성 전립선암 및 미분화 사람 유방암을 포함한다.
- [0289] 하나의 비제한적 예에서, C/EBP α-saRNA는 표적화된 생체내 전달을 위한 C/EBP α-saRNA-덴드리머로서 언급되는 PAMAM 덴드리머에 복합체를 형성한다. 정맥내 주사된 C/EBP α-saRNA-덴드리머의 치료 효과는 실시예 1에 나타낸 바와 같이 임상학적으로 관련있는 래트 간 종양 모델에서 입증된다. 48 시간 간격으로 꼬리 정맥 주사를 통한 3회 용량 후, 치료된 경화 래트는 1주일 이내에 혈청 알부민 수준의 현저한 증가를 나타냈다. 간 종양 부하는 C/EBP α-saRNA 덴드리머 치료된 그룹에서 현저하게 감소하였다. 본 연구는, 처음으로, 작은 활성화 RNA 분자에 의해 표적화된 유전자가 전신 정맥내 투여로 사용되어 HCC 경화 래트에서 간 기능을 개선하고 동시에 종양 부하를 감소시킬 수 있는 것을 입증한다.
- [0290] 하나의 실시형태에서, C/EBP α-saRNA는 종양유전자 및 종양 억제 유전자를 조절하는데 사용된다. 바람직하게, 종양유전자의 발현이 하향조절될 수 있다. 종양유전자의 발현은 본 발명의 C/EBP α-saRNA의 부재하의 발현과 비교하여 본 발명의 C/EBP α-saRNA의 존재하에 적어도 20, 30, 40%, 보다 바람직하게는 적어도 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% 감소시킨다. 추가의 바람직한 실시형태에서, 종양유전자의 발현은 본 발명의 C/EBP α-saRNA의 부재하의 발현과 비교하여 본 발명의 C/EBP α-saRNA의 존재하에 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10배, 보다 바람직하게는 적어도 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50배, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 60, 70, 80, 90, 100배 감소한다. 바람직하게, 종양 억제 유전자의 발현이 억제될 수 있다. 종양 억제 유전자의 발현은 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 부재하의 발현과 비교하여 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 존재하에 적어도 20, 30, 40%, 보다 바람직하게는 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 100% 증가한다. 추가의 바람직한 실시형태에서, 종양 억제 유전자의 발현은 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 부재하의 발현과 비교하여 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 존재하에 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10배, 보다 바람직하게는 적어도 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50배, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 60, 70, 80, 90, 100배 증가한다. 종양유전자 및 종양 억제 유전자의 비제한적 예는 Bcl-2-관련 X 단백질(BAX), BH3 상호작용 도메인 치사 작용제(BID), 카스파제 8(CASP8), 비활성 동족체 2-상호작용 단백질(DAB2IP), 간암 1 결손(DLC1), Fas 표면 치사 수용체(FAS), 취약 히스티딘 트리아드(FHIT), 성장 정지 및 DNA-손상-유도성-베타(GADD45B), 고슴도치 상호작용 단백질(HHIP), 인슐린-유사 성장 인자 2(IGF2), 림프 인헨서-결합 인자 1(LEF1), 포스포타제 및 텐신 동족체(PTEN), 단백질 티로신 키나제 2(PTK2), 망막모세포종 1(RB1), 소모-관련 전사 인자 3(RUNX3), SMAD 계열 구성원 4(SMAD4), 사이토카인 신호전달의 억제인자(3SOCS3), 형질전환 성장 인자, 베타 수용체 II(TGFB2), 종양 괴사 인자(리간드) 상위계열 구성원 10(TNFSF10), P53, 디스인테그린 및 메탈로프로테이나제 도메인-함유 단백질 17(ADAM17), v-akt 무린 흡선종 바이러스 종양유전자 동족체 1(AKT1), 안지오펜이에틴 2(ANGPT2), B-세포 CLL/림프종 2(BCL2), BCL2-유사 1(BCL2L1), 바콜로바이러스 IAP 반복 함유 2(BIRC2), 바콜로바이러스 IAP 반복 함유 5(BIRC5), 케모카인(C-C 모티프) 리간드 5(CCL5), 사이클린 D1(CCND1), 사이클린 D2(CCND2), 카데린 1(CDH1), 카데린 13(CDH13), 사이클린-의존성 키나제 억제제 1A(CDKN1A), 사이클린-의존성 키나제 억제제 1B(CDKN1B), 사이클린-의존성 키나제 억제제 2A(CDKN2A), CASP8 및 FADD-유사 아포토시스 조절인자(CFLAR), 카테닌(카데린-관련 단백질) 베타 1(CTNNB1), 케모카인 수용체 4(CXCR4), E2F 전사 인자 1(E2F1), 상피 성장 인자(EGF), 상피 성장 인자 수용체(EGFR), E1A 결합 단백질 p300(EP300), Fas(TNFRSF6)-관련 치사 도메인(FADD), fms-관련 티로신 키나제 1(FLT1), 프리즐드(frizzled) 계열 수용체 7(FZD7), 글루타타온 S-트랜스퍼라제 pi 1(GSTP1), 간 세포 성장 인자(HGF), 하베이(Harvey) 래트 육종 바이러스 종양유전자 동족체(HRAS), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 1(IGFBP1), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 3(IGFBP3), 인슐린 수용체 기질 1(IRS1), 인테그린 베타 1(ITGB1), 키나제 삽입 도메인 수용체(KDR), 골수 세포 백혈병 서열 1(MCL1), met 프로토-종양유전자(MET), mutS 동족체 2(MSH2), mutS 동족체 3(MSH3), 메타데린(MTDH), v-myc 조류 골수구 종종 바이러스 종양유전자 동족체(MYC), B-세포 1의 카파 경 폴리펩타이드 유전자 인헨서의 핵 인자(NFKB1), 신경모세포종 RAS 바이러스(v-ras) 종양유전자 동족체(NRAS), 오피오이드 결합 단백질/세포 부착 분자-유사(OPCML), 혈소판-유래된 성장 인자 수용체, 알파 폴리펩타이드(PDGFR $\alpha$ ), 펩티딜프롤릴 시스/트랜스 아이소머라제, NIMA-상호작용 1(PIN1), 프로스타글란딘-엔도퍼옥사이드 신타제 2(PTGS2), PYD 및 CARD 도메인 함유(PYCARD), ras-관련 C3 보툴리눔 독소 기질 1(RAC1), Ras 결합(RaIGDS/AF-6) 도메인 계열 구성원 1(RASSF1), 릴린(RELN), ras 동족체 계열 구성원 A(RHOA), 분비된 프리즐드-관련 단백질 2(SFRP2), SMAD 계열 구성원 7(SMAD7), 사이토카인 신호전달 1의 억제인자(SOCS1), 신호 변환인자 및 전사 3의 활성인자(STAT3), 전사 인자 4(TCF4), 텔로머라제 역 전사효소(TERT), 혈질전환 성장 인자 알파(TGFA), 형질전환 성장 인자 베타 1(TGFB1), 툴-유사 수용체 4(TLR4), 종양 괴사 인자 수용체 상과 구성원 10b(TNFRSF10B), 혈관 내피 성장 인자 A(VEGFA), 윌름즈 종양 1(WT1), 아포토시스(XIAP)의 X-결합 억제제, 및 Yes-관련 단백질 1(YAP1)을 포함한다.

[0291] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA를 이를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써 백혈구 수치를 증가시키는 방법이 제공된다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA를 환자에게 투여함으로써 패혈증 또는 만성 염증 질환(예들 들면, 간염 및 간경화)을 앓고 있는 환자 및 면역약화 환자(예를 들면, 화학요법 치료중인 환자)에 대한 백혈구 감소증을 치료하는 방법이 또한 제공된다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA를 이를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써 백혈병 및 림프종을 포함한 전 B 세포 및 B 세포 악성종양을 치료하는 방법이 또한 제공된다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA를 이를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써 백혈구, 조혈 또는 중간엽 줄기 세포를 동원하는 방법이 또한 제공된다. 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA로 치료된 환자의 백혈구 수치는 C/EBP  $\alpha$ -saRNA 무치료와 비교하여 적어도 50%, 75%, 100%, 보다 바람직하게는 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5배, 보다 바람직하게는 적어도 6, 7, 8, 9, 10배 증가한다.

[0292] 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 간세포 암종의 치료에서 마이크로RNA(miRNA 또는 miR)를 조절하는데 사용된다. 마이크로RNA는 유전자 발현을 조절하는 작은 비-암호화 RNA이다. 이들은 중요한 생리학적 기능에 연루되어 있으며, 이들은 발암의 모든 단일 단계에 관련되어 있을 수 있다. 이들은 전형적으로 21개의 뉴클레오타이드를 가지며, 상기 mRNA의 3'-미번역 영역(3'-UTR)에 결합함으로써 mRNA 번역의 차단 또는 mRNA 분해의 유도를 통해 전사 후 수준에서 유전자 발현을 조절한다.



- [0293] 종양에서, miRNA 발현의 조절은 종양 발생에 영향을 미친다. HCC에서, 다른 암에서 처럼, miRNA는 세포 성장 및 증식, 세포 대사 및 분화, 아포토시스, 혈관신생, 전이 및 최종 예후에 영향을 미치는 종양유전자 또는 종양 억제 유전자로서 기능한다[Lin et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 375, 315-320 (2008); Kutay et al., J. Cell. Biochem., vol. 99, 671-678 (2006); Meng et al., Gastroenterology, vol. 133(2), 647-658 (2007)] (이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다). 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 C/EBP  $\alpha$  유전자의 발현 및/또는 기능을 조절하고 또한 HCC 세포에서 miRNA 수준을 조절한다. 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA에 의해 조절될 수 있는 miRNA의 비제한적 예는 hsa-let-7a-5p, hsa-miR-133b, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-96-5p, hsa-miR-184, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-15a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-134, hsa-let-7g-5p, hsa-let-7c, hsa-miR-218-5p, hsa-miR-206, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-1, hsa-miR-150-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-127-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-144-3p, hsa-miR-128, hsa-miR-215, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-30c-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-9-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-183-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-138-5p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-181d, hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-210, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-372, hsa-miR-149-5p 및 hsa-miR-32-5p를 포함한다.
- [0294] 하나의 비제한적 예에서, miRNA는 발암성 miRNA이며, C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 부재와 비교하여 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 존재하에 적어도 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 및 3배 하향조절된다. 다른 비제한적 예에서, miRNA는 종양 억제 miRNA이며, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 부재와 비교하여 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 존재하에 적어도 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1배, 보다 바람직하게는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10배, 보다 보다 바람직하게는 적어도 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50배, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 60, 70, 80, 90, 100배 상향조절된다.
- [0295] 줄기 세포 조절
- [0296] 본 발명의 일부 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 자가-재생 다능성 인자를 조절하고 줄기 세포 분화에 영향을 미치는데 사용된다. 관심대상 단백질을 발현시키거나 세포를 다양한 세포 표현형으로 변경시키기 위한 세포의 표현형 변경은 다양한 임상학적, 치료적 및 연구 설정에서 사용되었다. 세포의 표현형 변화는 현재 DNA 또는 바이러스 벡터로부터 단백질을 발현시킴으로써 달성된다. 현재, 파킨슨병 및 당뇨병과 같은 각종 질환 및 척수 손상과 같은 손상을 위한 치료 옵션으로서 사람 배아 줄기 세포의 사용을 평가하기 위한 연구가 수행되고 있다. 배아 줄기 세포는 임의의 분화 세포 유형을 생성하기 위한 다능성을 유지하면서 무기한으로 성장하는 능력을 가진다.
- [0297] 다능성 인자, 세포 표현형 변경 인자, 전환분화 인자, 분화 인자 및 탈분화 인자와 같은 다수의 인자는, 개인 재생 의학, 세포 치료 및 기타 질환 치료의 분야에 유용한 세포 표현형을 변경시키는데 이용된다. 예를 들면, 줄기 세포의 자가-재생 및 다능성 특성은 OCT4, SOX2, NANOG 및 KLF 유전자를 포함한 코어 조절 회로에서 전사 인자 및 염색질 리모델링 효소와 같은 유전자의 배열에 의해 조절된다[Bourillot et al., BMC Biology, 8:125 (2010)](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다). 자가-조절 네트워크를 위한 조절 회로는 또한 다운스트림 유전자에 영향을 미친다. 올리고뉴클레오타이드는 코어 조절 회로를 조절하는데 이용되었다. 수(Xu) 등은 miRNA-145가 OCT4, SOX2 및 KLF4의 3'-UTR을 표적화하는 것을 개시하였다. miRNA-145의 감소는 분화를 손상시키고, OCT4, SOX2 및 KLF4를 상승시킨다[Xu et al., Cell, vol. 137, 1-12 (2009)](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다).
- [0298] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 자가-재생 다능성 유전자를 조절하는데 사용된다. 다능성 유전자의 비제한적 예는 SOX2, OCT4, cKit, KLF4, KLF2, KLF5, NANOG, CDX2 및 SALL4를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 다능성 유전자의 발현은 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 부재와 비교하여 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 존재하에 적어도 20%, 30% 또는 40%, 바람직하게는 적어도 45, 50, 55, 60, 65, 70 또는 75%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 80, 90 또는 95% 감소한다. 다른 실시형태에서, 다능성 유전자의 발현은 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 부재와 비교하여 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 존재하에 적어도 20%, 30% 또는 40%, 보다 바람직하게는 적어도 45, 50, 55, 60, 65,



70 또는 75%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 80% 감소한다. 바람직한 실시형태에서, 다능성 유전자의 발현은 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 부재하의 발현과 비교하여 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA의 존재하에 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10배, 보다 바람직하게는 적어도 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50배, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 60, 70, 80, 90, 100배 증가한다.

[0299] 하나의 실시형태에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 세포의 상피-간엽 전환 (EMT)을 조절하는데 사용된다. 일부 종양은 자가-재생하고 분화를 통해 암 세포의 다양한 계통으로의 종양-개시 능력을 유지할 수 있는 암 줄기 세포 또는 암 줄기-유사 세포를 함유한다. EMT는 암 줄기-유사 세포, 종양 공격성 및 전이성, 및 종양 재발과 관련되는 것으로 입증되었다[Kong et al., Cancers, vol. 3(1), 716-729 (2011)]. miR-200 및 miR-134와 같은 miRNA, 섬유아 세포 성장 인자(FGF), 표피 성장 인자(EGF), 혈소판-유래 성장 인자(PDGF)와 같은 성장 인자 뿐만 아니라 Notch-1 및 Wnt 신호전달 경로와 같은 인자를 포함한 EMT를 조절하는 다수의 인자가 존재한다. 하나의 비제한적 예에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 miR-134의 발현을 조절함으로써 EMT를 조절한다. 다른 비제한적 예에서, C/EBP  $\alpha$ -saRNA는 RUNX3, CTNNB1, HGF, SMAD7 또는 TGFBI 유전자의 발현을 조절함으로써 EMT를 조절한다.

### [0300] III. 키트 및 장치

#### [0301] 키트

[0302] 본 발명은 본 발명의 방법을 편리하게 및/또는 효과적으로 수행하기 위한 각종 키트를 제공한다. 전형적으로, 키트는 사용자가 대상체(들)의 다수의 치료를 수행하고/하거나 다수의 실험을 수행하도록 하기에 충분한 양 및/또는 수의 성분을 포함할 것이다.

[0303] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 saRNA를 포함하는 키트는 증식 세포와 함께 사용되어 효능을 나타낼 수 있다.

[0304] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA, 또는 C/EBP  $\alpha$ -saRNA, 다른 유전자를 조절하는 saRNA, siRNA 및 miRNA의 조합을 포함하는, 시험관내 또는 생체내에서 유전자의 발현을 조절하기 위한 키트를 제공한다. 키트는 제형 조성물을 형성하기 위해 포장재 및 설명서 및/또는 전달제를 추가로 포함할 수 있다. 전달제는 본원에 기재된 식염수, 완충 용액, 리피도이드, 텐드리머 또는 임의의 전달제를 포함할 수 있다. 유전자의 비제한적 예는 C/EBP  $\alpha$ , C/EBP 계열의 다른 구성원, 알부민 유전자, 알파-태아단백질 유전자, 간 특이적 인자 유전자, 성장 인자, 핵 인자 유전자, 종양 억제 유전자, 다능성 인자 유전자를 포함한다.

[0305] 하나의 비제한적 예에서, 완충 용액은 염화나트륨, 염화칼슘, 포스페이트 및/또는 EDTA를 포함할 수 있다. 다른 비제한적 예에서, 완충 용액은 식염수, 2mM 칼슘 함유 식염수, 5% 수크로오스, 2mM 칼슘 함유 5% 수크로오스, 5% 만니톨, 2mM 칼슘 함유 5% 만니톨, 링거 락테이트, 염화나트륨, 2mM 칼슘 함유 염화나트륨 및 만노스를 포함할 수 있으나 이들로 제한되지 않는다(미국 공개특허 US 20120258046 참조; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다). 또 다른 비제한적 예에서, 완충 용액은 침전될 수 있거나 동결건조될 수 있다. 각 성분의 양은 일관되게 재현가능한 높은 농도의 식염수 또는 단순한 완충 제형을 가능하도록 달라질 수 있다. 성분은 또한 기간에 걸쳐 및/또는 다양한 조건 하에 완충 용액 중에서 saRNA의 안정성을 증가시키기 위해서 달라질 수 있다.

[0306] 다른 실시형태에서, 본 발명은 상기 세포에 도입될 때 세포 증식을 억제하기에 유효한 양으로 제공된 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA; 임의로, 표적 세포의 증식을 추가로 억제하기 위한 siRNA 및 miRNA; 및 포장재 및 설명서 및/또는 제형 조성물을 형성하기 위한 전달제를 포함하는, 세포 증식을 조절하기 위한 키트를 제공한다.

[0307] 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 saRNA 분자; 임의로, LDL 감소 약물; 및 포장재 및 설명서 및/또는 제형 조성물을 형성하기 위한 전달제를 포함하는, 세포에서 LDL 수준을 감소시키기 위한 키트를 제공한다.

[0308] 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA; 임의로, siRNA, eRNA 및 lncRNA; 및 포장재 및 설명서 및/또는 제형 조성물을 형성하기 위한 전달제를 포함하는, 세포에서 miRNA 발현 수준을 조절하기 위한 키트를 제공한다.

#### [0309] 장치

[0310] 본 발명은 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA가 혼입될 수 있는 장치를 제공한다. 이들 장치는 인간 환자와 같은 이를 필요로 하는 대상체에게 즉시 전달되도록 이용가능한 안정한 제형을 포함한다. 이러한 대상체의 비제한적 예는 암, 종양 또는 간경화와 같은 과증식성 장애; 및 NAFLD, 비만증, 고 LDL 콜레스테롤 또는 제2형 당뇨병과 같은 대사성 장애를 앓는 환자를 포함한다.

- [0311] 장치의 비제한적 예는 펌프, 카테터, 니들, 경피 패치, 가압 후각 전달 장치, 이온영동 장치 및 다층 미세유체 장치를 포함한다. 장치는 단일, 복수 또는 분할-투약 요법에 따라 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA를 전달하는데 사용될 수 있다. 장치는 생물학적 조직을 가로질러, 피내로, 피하로 또는 근육내로 본 발명의 C/EBP  $\alpha$ -saRNA를 전달하는데 사용될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드를 전달하는데 적합한 장치의 더 많은 예는 2012년 12월 14일자로 출원된 국제 공개공보 WO 2013/090648(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시되어 있다.
- [0312] **정의**
- [0313] 편의상, 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에 사용된 특정 용어 및 어구의 의미는 하기에 제공된다. 본 명세서의 다른 부분의 용어의 용법과 본 섹션에서 제공된 용어의 정의 사이에 명백한 불일치가 존재한다면, 본 섹션의 정의가 우선한다.
- [0314] 약: 본원에 사용되는 용어 "약"은 인용된 값의  $\pm$  10%를 의미한다.
- [0315] 병용하여 투여되는: 본원에 사용되는 용어 "병용하여 투여되는" 또는 "병용 투여"란, 2개 이상의 제제, 예를 들면, saRNA가 환자에 대해 각 제제의 효과의 중복이 존재할 수 있도록 동일한 시간에서 또는 간격 내에서 대상체에게 투여되는 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 이들은 서로 약 60, 30, 15, 10, 5 또는 1분 내에 투여된다. 일부 실시형태에서, 제제의 투여는 병용(예를 들면, 상승) 효과가 달성되기에 충분히 함께 가까이 이격되어 있다.
- [0316] 아미노산: 본원에 사용되는 용어 "아미노산" 및 "아미노산들"은 모든 자연적으로 발생하는 L-알파-아미노산을 의미한다. 아미노산은 다음과 같이 1-문자 또는 3-문자 지정에 의해 확인된다: 아스파르트산 (Asp:D), 이소류신 (Ile:I), 트레오닌 (Thr:T), 류신 (Leu:L), 세린 (Ser:S), 티로신 (Tyr:Y), 글루탐산 (Glu:E), 페닐알라닌 (Phe:F), 프롤린 (Pro:P), 히스티딘 (His:H), 글라이신 (Gly:G), 라이신 (Lys:K), 알라닌 (Ala:A), 아르기닌 (Arg:R), 시스테인 (Cys:C), 트립토판 (Trp:W), 발린 (Val:V), 글루타민 (Gln:Q), 메티오닌 (Met:M), 아스파라긴 (Asn:N), 여기서, 아미노산은 먼저 열거된 후, 각각 3개 및 1개의 문자 코드에 의해 삽입구로서 열거된다.
- [0317] 동물: 본원에 사용되는 용어 "동물"은 동물계의 모든 구성원을 의미한다. 일부 실시형태에서, "동물"은 발생의 임의의 단계에서의 사람을 의미한다. 일부 실시형태에서, "동물"은 발생의 임의의 단계에서 비-사람 동물을 의미한다. 특정 실시형태에서, 비-사람 동물은 포유동물(예를 들면, 설치류, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 양, 소, 영장류 또는 돼지)이다. 일부 실시형태에서, 동물은 포유동물, 조류, 파충류, 양서류, 어류 및 벌레를 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 동물은 유전자이식 동물, 유전자 조작 동물 또는 클론이다.
- [0318] 대략: 하나 이상의 관심대상의 값에 적용될 때, 본원에 사용되는 용어 "대략" 또는 "약"은 표시된 기준 값과 유사한 값을 의미한다. 특정 실시형태에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 달리 명시되지 않거나 달리 문맥으로부터 명백하지 않다면, 표시된 기준 값의 한쪽 방향으로 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 그 이하(초과 또는 미만) 내를 충족하는 값의 범위를 의미한다 (이러한 수치가 가능한 값을 100%를 초과하는 것은 제외함).
- [0319] 와 연합된: 2개 이상의 잔기에 관해서 사용될 때, 본원에 사용되는 용어 "와 연합된", "접합된", "결합된", "부착된" 및 및 "테더링된"은 잔기들이 직접 또는 결합체로서 작용하는 하나 이상의 추가의 잔기를 통해 서로 물리적으로 연합되거나 연결되어 구조가 사용되는 조건, 예를 들면, 생리학적 조건 하에 잔기들이 여전히 물리적으로 연합되도록 충분히 안정한 구조를 형성하는 것을 의미한다. "연합"은 직접 공유 화학 결합을 엄격하게 있을 필요는 없다. 이것은 또한 "연합된" 실체가 여전히 물리적으로 연결되어 있도록 충분히 안정한 연결에 기초하여 이온 결합 또는 수소 결합 또는 하이브리드화를 제시할 수 있다.
- [0320] 2기능성: 본원에 사용되는 용어 "2기능성" 리란, 적어도 2가지 기능을 유지할 수 있는 임의의 물질, 분자 또는 잔기를 의미한다. 기능은 동일한 결과 또는 상이한 결과에 영향을 미칠 수 있다. 기능을 생성하는 구조는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0321] 생체적합성: 본원에 사용되는 용어 "생체적합성"은 면역계에 의해 손상, 독성 또는 거부 위험을 거의 제기하지 않는, 살아있는 세포, 조직, 기관 또는 계와의 적합성을 의미한다.
- [0322] 생분해성: 본원에 사용되는 용어 "생분해성"은 생물체의 작용에 의해 무해한 생성물로 분쇄될 수 있는 것을 의미한다.
- [0323] 생물학적으로 활성: 본원에 사용되는 어구 "생물학적으로 활성"은 생물학적 시스템 및/또는 유기체에서 활성을

갖는 임의의 물질의 특징을 의미한다. 예를 들면, 유기체에 투여될 때 그 유기체에 생물학적 영향을 미치는 물질은 생물학적으로 활성인 것으로 간주된다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 saRNA는 비록 saRNA의 일부가 생물학적으로 활성이거나 생물학적으로 간주되는 활성을 모방할 지라도 생물학적으로 활성인 것으로 간주될 수 있다.

[0324] 암: 본원에 사용되는 개체에서의 용어 "암"은 제어되지 않는 증식, 불멸, 전이 잠재성, 급속 성장 및 증식 속도 및 특정한 특징적인 형태학적 특징과 같은 암-유발 세포를 대표하는 특징을 보유하는 세포의 존재를 의미한다. 종종, 암세포는 종양의 형태일 것이지만, 이러한 세포는 개체 내에 단독으로 존재할 수 있거나, 백혈구 세포와 같은 독립적인 세포로서 혈류에서 순환할 수 있다.

[0325] 세포 성장: 본원에 사용되는 용어 "세포 성장"은 원칙적으로 세포 구성원에서의 성장과 관련되는데, 비록 성장의 작은 성분이 특정 상황에서 개별 세포의 세포 크기 또는 세포질 용적의 증가로 인해서 일 수 있지만, 이는 후자의 속도가 세포 사멸(예를 들면, 아포토시스 또는 괴사에 의해)의 속도 보다 높아서 세포의 집단의 크기로 증가할 때 세포 생식(즉, 증식)에 의해 일어난다. 따라서, 세포 성장을 억제하는 제제는 이들 두 반대 과정 사이의 평형이 변화되도록 증식을 저해하거나 세포사를 자극하거나 이들 둘 다에 의해 그렇게 할 수 있다.

[0326] 세포 유형: 본원에 사용되는 용어 "세포 유형"은 소정의 공급원 (예를 들면, 조직, 기관)으로부터의 세포 또는 주어진 분화 상태에서의 세포, 또는 주어진 병리학 또는 유전자 구성과 관련된 세포를 의미한다.

[0327] 염색체: 본원에 사용되는 용어 "염색체"는 세포에서 발견되는 DNA 및 단백질의 조직화된 구조를 의미한다.

[0328] 상보적인: 본원에 사용되는 용어 "상보적인"은 이것이 핵산에 관한 것일 때, 뉴클레오타이드들 또는 핵산들 사이의 염기쌍 형성 또는 하이브리드화를 의미하며, 예를 들면, 이중 가닥의 DNA 분자의 2개의 가닥 사이 또는 올리고뉴클레오타이드 프로브와 표적 사이는 상보적이다.

[0329] 상태: 본원에 사용되는 용어 "상태"는 임의의 세포, 기관, 기관계 또는 유기체의 상황을 의미한다. 상태는 질병 상태 또는 단순히 생리학적 제시 또는 독립체의 상황을 반영할 수 있다. 상태는 질병의 육안 제시와 같은 표현형 상태 또는 상태와 관련된 단백질 발현 프로파일 또는 기본 유전자와 같은 유전자형 상태로서 특성화될 수 있다. 상태는 양성 또는 악성일 수 있다.

[0330] 제어된 방출: 본원에 사용되는 용어 "제어된 방출"은 치료 결과를 가져오도록 특정 패턴의 방출에 따르는 약제학적 조성물 또는 화합물 방출 프로파일을 의미한다.

[0331] 세포증식억제: 본원에 사용되는 "세포증식억제"란, 세포(예를 들면, 포유동물 세포(예를 들면, 사람세포)), 세균, 바이러스, 진균, 원생동물, 기생충, 프리온 또는 이들의 조합의 성장, 분열 또는 증식을 저해, 감소 또는 억제하는 것을 의미한다.

[0332] 세포독성: 본원에 사용되는 "세포독성"은 세포(예를 들면, 포유동물 세포(예를 들면, 사람세포)), 세균, 바이러스, 진균, 원생동물, 기생충, 프리온 또는 이들의 조합에 대한 사멸 또는 손상 유발, 독성 또는 치명적인 효과를 의미한다.

[0333] 전달: 본원에 사용되는 "전달"은 화합물, 물질, 독립체, 잔기, 화물 또는 페이로드(payload)를 전달하는 작용 또는 방식을 의미한다.

[0334] 전달제: 본원에 사용되는 "전달제"는 적어도 부분적으로, 본 발명의 saRNA의 표적화된 세포로의 생체내 전달을 용이하게 하는 임의의 물질을 의미한다.

[0335] 탈안정화: 본원에 사용되는 용어 "탈안정화", "탈안정화하다" 또는 "탈안정화 영역"은 동일 영역 또는 분자의 초기 야생형 또는 본래의 형태 보다 덜 안정한 영역 또는 분자를 의미한다.

[0336] 검출가능한 표지: 본원에 사용되는 "검출가능한 표지"는 방사선, 형광, 화학발광, 효소 활성, 흡광도 등을 포함한 당업계에 공지된 방법에 의해 용이하게 검출되는 다른 독립체와 부착되거나, 도입되거나 연결되는 하나 이상의 마커, 신호 또는 잔기를 의미한다. 검출가능 표지는 방사성 동위원소, 형광단, 발색단, 효소, 염료, 금속 이온, 리간드, 예를 들면, 비오틴, 아비딘, 스트렙타아비딘 및 합텐, 양자점 등을 포함한다. 검출가능 표지는 본원에 개시된 펩타이드, 단백질 또는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들면, saRNA의 임의의 위치에 위치할 수 있다. 이들은 이 경우가 존재할 수 있다면 N- 또는 C-말단 또는 5' 또는 3' 말단에 위치하는 아미노산, 펩타이드, 단백질 또는 폴리뉴클레오타이드 내에 존재할 수 있다.

[0337] 캡슐화하다: 본원에 사용되는 용어 "캡슐화하다"는 포위하거나 둘러싸거나 감싸는 것을 의미한다.

- [0338] 조작된: 본원에 사용되는, 본 발명의 실시형태는 이들이 구조적이든지 화학적이든지 개시점, 야생형 또는 토종 분자로부터 변하는 특징 또는 특성을 가지도록 디자인될 때 "조작된"다.
- [0339] 동등한 대상체: 본원에 사용되는, "동등한 대상체"는 예를 들면, 유사한 연령, 성별 및 건강, 예를 들면, 간 건강 또는 암 단계의 대상체일 수 있거나, 본 발명에 따른 치료 전에 동일한 대상체일 수 있다. 대응하는 대상체는 본 발명에 따른 saRNA에 의한 치료를 받지 않는 점에서 "미처리된"다 그러나, 본 발명의 saRNA에 의해 치료되는 대상체가 동일하거나 동등한 통상적인 항암 치료를 받는다면, 대상체는 통상적인 항암 치료를 받을 수 있다.
- [0340] 엑소솜: 본원에 사용되는, "엑소솜"은 포유동물 세포에 의해 분비된 소포를 의미한다.
- [0341] 발현: 본원에 사용되는 핵산 서열의 "발현"은 하나 이상의 하기 이벤트를 의미한다: (1) DNA 서열로부터 RNA 주형의 생성 (예를 들면, 전사에 의해); (2) RNA 전사체의 가공 (예를 들면, 스플라이싱, 편집, 5' 캡 형성 및/또는 3' 말단 가공); (3) RNA의 폴리펩타이드 또는 단백질로의 번역; 및 (4) 폴리펩타이드 또는 단백질의 번역 후 변형.
- [0342] 특징: 본원에 사용되는 "특징"은 특질, 특성 또는 독특한 요소를 의미한다.
- [0343] 제형: 본원에 사용되는 "제형"은 적어도 본 발명의 saRNA 및 전달제를 포함한다.
- [0344] 단편: 본원에서 사용되는 "단편"은 일부를 의미한다. 예를 들면, 단백질의 단편은 배양된 세포로부터 분리된 전체 길이 단백질을 분해시킴으로써 수득된 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.
- [0345] 기능성: 본원에 사용되는 "기능성" 생물학적 분자는 이것이 특징으로 하는 특성 및/또는 활성을 발휘하는 형태의 생물학적 분자이다.
- [0346] 유전자: 본원에 사용되는 용어 "유전자"는 대조군 및 폴리펩타이드 또는 전구물질을 생성하는데 필요한 가장 빈번한 암호화 서열을 포함하는 핵산 서열을 의미한다. 그러나, 유전자는 번역될 수 없고, 그 대신에 조절 또는 구조 RNA 분자를 암호화할 수 있다.
- [0347] 유전자는 식물, 진균, 동물, 세균 계통 또는 에피솜, 진핵세포, 핵 또는 플라스미드 DNA, cDNA, 바이러스 DNA 또는 화학적으로 합성된 DNA를 포함한 당업계에 공지된 임의의 공급원으로부터 전체적으로 또는 부분적으로 유래할 수 있다. 유전자는 발현 산물의 생물학적 활성 또는 화학 구조, 발현의 속도 또는 발현 조절의 방식에 영향을 미칠 수 있는 암호화 또는 미번역 영역에 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 이러한 변형은 하나 이상의 뉴클레오타이드의 돌연변이, 삽입, 결손 및 치환을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 유전자는 연속적인 암호화 서열을 구성하거나, 이것은 적절한 스플라이스 접합에 의해 결합되는 하나 이상의 인트론을 포함할 수 있다.
- [0348] 유전자 발현: 본원에 사용되는 용어 "유전자 발현"은 핵산 서열이 성공적인 전사 및 대부분의 경우에는 단백질 또는 펩타이드를 생성하기 위한 번역을 수행하는 과정을 의미한다. 명확화를 위해, "유전자 발현"의 측정에 대해 언급될 때, 이것은 측정물이 전사의 핵산 산물, 예를 들면, RNA 또는 mRNA, 또는 번역의 아미노산 산물, 예를 들면, 폴리펩타이드 또는 펩타이드일 수 있는 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. RNA, mRNA, 폴리펩타이드 및 펩타이드의 양 또는 수준의 측정 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다.
- [0349] 계놈: 용어 "계놈"은 핵 DNA 성분, 염색체 또는 염색체의 DNA 뿐만 아니라 세포질 도메인(예를 들면, 미토콘드리아 DNA)을 포함한 유기체의 전체 DNA 성분을 포함하는 것으로 의도된다.
- [0350] 상동성: 본원에 사용되는 용어 "상동성"은 중합체성 분자들 사이, 예를 들면, 핵산 분자들 (예를 들면, DNA 분자들 및/또는 RNA 분자들) 사이 및/또는 폴리펩타이드 분자들 사이의 전체적 관련성을 의미한다. 일부 실시형태에서, 중합체성 분자들은 이들의 서열이 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일 또는 유사하다면 서로 "상동"인 것으로 간주된다. 용어 "상동"은 반드시 적어도 2개의 서열 (폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열) 상이의 비교를 의미한다. 본 발명에 따르면, 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열은 이들이 암호화하는 폴리펩타이드가 적어도 약 20개의 아미노산의 적어도 하나의 스트레치에 대해 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 심지어 99% 라면, 상동인 것으로 간주된다. 일부 실시형태에서, 상동 폴리뉴클레오타이드 서열은 적어도 4 내지 5개의 독특하게 특정된 아미노산의 스트레치를 암호화하는 능력을 특징으로 한다. 길이가 60개의 뉴클레오타이드 미만인 폴리뉴클레오타이드 서열의 경우, 상동성은 적어도 4 내지 5개의 독특하게 특정된 아미노산의 스트레치를 암호화하는 능력에 의해 측정된다. 본 발명에 따르면, 2개의 단백질 서열은 단백질이 적어도 약 20개의 아미노산의 적어도 하나의 스트



레이에 대해 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 동일하다면, 상동인 것으로 간주된다.

- [0351] 용어 "과증식성 세포"는 동등한 건강한 세포("대조군"으로서 언급될 수 있다)의 증식 속도와 비교하여 비정상적으로 높은 속도로 증식하는 임의의 세포를 의미할 수 있다. "동등한 건강한" 세포는 정상적이고 건강한 세포의 대응물이다. 따라서, 이것은 비교측정 세포로서 동일한 기능(들)을 수행하는, 예를 들면, 동일 기관으로부터의 동일한 유형의 세포이다. 예를 들면, 과증식성 간 세포의 증식은 건강한 간 세포를 기준으로 하여 평가되어야 하는 반면, 과증식성 전립선 세포의 증식은 건강한 전립선 세포를 기준으로 하여 평가되어야 한다.
- [0352] 증식의 "비정상적으로 높은" 속도란, 동등한 건강한 (비-과증식성) 세포의 증식 속도와 비교하여 과증식성 세포의 증식의 속도는 적어도 20, 30, 40%, 또는 적어도 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75%, 또는 적어도 80% 증가하는 것을 의미한다. 증식의 "비정상적으로 높은" 속도란, 또한 동등한 건강한 세포의 증식 속도와 비교하여 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10배, 또는 적어도 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50배, 또는 적어도 60, 70, 80, 90, 100배 증가하는 속도를 의미할 수 있다.
- [0353] 본원에 사용되는 용어 "과증식성 세포"는 대부분의 세포와 비교하여 당연히 더 높은 속도로 증식하지만 건강한 세포인 세포를 의미하는 것이 아니다. 일생을 통해 끊임없이 분열하는 것으로 알려진 세포의 예는 피부 세포, 위장관의 세포, 혈액 세포 및 골수 세포이다. 그러나, 이러한 세포가 건강한 대응물 보다 더 높은 속도로 증식할 때, 이들은 과증식성이다.
- [0354] 과증식성 장애: 본원에 사용되는 "과증식 장애"는 상기에서 정의된 바와 같은 과증식성 세포를 포함하는 임의의 장애일 수 있다. 과증식성 장애의 예는 암, 건선성 관절염, 류마티스 관절염과 같은 신생물 장애, 염증성 장 질환과 같은 위장 과증식성 장애, 건선, 라이터 증후군, 모공성 홍색 비강진을 포함하는 피부 질환, 및 각질화 장애의 과증식성 변이체를 포함한다.
- [0355] 당업계의 숙련가들은 과증식성 세포를 동정하는 방법을 충분히 인지하고 있다. 동물에서 과증식성 세포의 존재는 X-선, MRI 또는 CT 스캔과 같은 스캔을 사용하여 동정할 수 있다. 과증식성 세포는 또한 동정될 수 있거나, 세포의 증식은 MTT, XTT, MTS 또는 WST-1 검정과 같은 세포 증식 검정을 사용하여 시험관내에서 샘플의 배양을 통해 검정될 수 있다. 시험관내 세포 증식은 또한 유세포측정법을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0356] 동일성: 본원에 사용되는 용어 "동일성"은 중합체성 분자들 사이, 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드 분자들 (예를 들면, DNA 분자들 및/또는 RNA 분자들) 사이 및/또는 폴리펩타이드 분자들 사이의 전반적인 관련성을 의미한다. 예를 들면, 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열의 퍼센트 동일성의 계산은 최적 비교 목적을 위해 2개의 서열을 정렬함으로써 수행될 수 있다(예를 들면, 갭이 최적 정렬을 위해 제1 및 제2 핵산 서열 중 하나 또는 둘 다에 도입될 수 있으며, 비-동일성 서열은 비교 목적을 위해 무시될 수 있다). 특정 실시형태에서, 비교 목적을 위해 정렬되는 서열의 길이는 기준 서열의 길이의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100% 이다. 이어서, 상응하는 뉴클레오타이드 위치에서의 뉴클레오타이드가 비교된다. 제1 서열의 위치가 제2 서열의 상응하는 위치와 동일한 뉴클레오타이드에 의해 점유될 때, 분자들은 그 위치에서 동일하다. 2개의 서열 사이의 퍼센트 동일성은 갭의 수를 고려하여 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수, 및 2개의 서열의 최적 정렬을 도입하기 위해 필요한 각 갭의 길이의 함수이다. 2개의 서열 사이의 서열의 비교와 퍼센트 동일성의 측정은 수학적 알고리즘을 사용하여 수행할 수 있다. 예를 들면, 2개의 뉴클레오타이드 서열의 퍼센트 동일성은 문헌[Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991] (이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 것과 같은 방법을 사용하여 측정할 수 있다. 예를 들면, 2개의 뉴클레오타이드 서열 사이의 퍼센트 동일성은 문헌[Meyers and Miller, CABIOS, 1989, 4:11-17] 에 개시된 알고리즘을 사용하여 측정할 수 있으며, 이 문헌은 PAM120 중앙 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭 페널티를 사용하여 ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 도입되었다. 대안으로, 2개의 뉴클레오타이드 서열 사이의 퍼센트 동일성은 NWSgapdna.CMP 매트릭스를 사용하여 GCG 소프트웨어 패키지에 GAP 프로그램을 사용하여 측정하였다. 서열들 사이에 퍼센트 동일성을 측정하는데 흔히 사용되는 방법은 문헌[Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48:1073 (1988)](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에 개시된 것들을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 동일성의 측정 기술은 대중이 이용가능한 컴퓨터 프로그램으로 성분화되어 있다. 2개의 서열 사이의 상동성을 측정하기 위한 컴퓨터 소프트웨어의 예는



GCG 프로그램 패키지[Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1), 387 (1984)], BLASTP, BLASTN 및 FASTA[Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215, 403 (1990)] 를 포함하나 이들로 제한되지 않는다.

- [0357] **유전자의 발현을 저해하다:** 본원에 사용되는 어구 "유전자의 발현을 저해하다"는 유전자의 발현 산물의 양의 감소를 초래하는 것을 의미한다. 발현 산물은 유전자(예를 들면, mRNA)로부터 전사된 RNA 또는 유전자로부터 전사된 mRNA로부터 번역된 폴리펩타이드일 수 있다. 전형적으로, mRNA의 수준의 감소는 이로부터 번역된 폴리펩타이드의 수준의 감소를 초래한다. 발현 수준은 mRNA 또는 단백질을 측정하기 위한 표준 기술을 사용하여 측정할 수 있다.
- [0358] **시험관내:** 본원에 사용되는 용어 "시험관내"는 유기체 (예를 들면, 동물, 식물 또는 미생물)가 아니라 인공 환경에서, 예를 들면, 시험관 또는 반응 용기에서, 세포 배양물에서, 페트리 디쉬 등에서 일어나는 이벤트를 의미한다.
- [0359] **생체내:** 본원에 사용되는 용어 "생체내"는 유기체 (예를 들면, 동물, 식물, 미생물 또는 이의 세포 또는 조직) 내에서 일어나는 이벤트를 의미한다.
- [0360] **단리된:** 본원에 사용되는 용어 "단리된"은 연합되는(자연적이든지 실험 환경이든지) 성분의 적어도 일부로부터 분리된 물질 또는 독립체를 의미한다. 단리된 물질은 이들이 연합된 물질에 관하여 다양한 수준의 순도를 가질 수 있다. 분리된 성분 및/또는 독립체는 이들이 초기에 연합되는 다른 성분의 적어도 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 그 이상으로부터 분리될 수 있다. 일부 실시형태에서, 단리된 제제는 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 초과, 또는 약 99% 초과 순도이다. 본원에 사용되는 바와 같이, 물질은 다른 성분이 실질적으로 없다면 "순수"하다. 실질적으로 단리된: "실질적으로 단리된"은 화합물이 형성되거나 검출된 환경으로부터 실질적으로 분리되는 것을 의미한다. 부분적 분리는, 예를 들면, 본 발명의 화합물이 농축된 조성물을 포함할 수 있다. 실질적 분리는 본 발명의 화합물 또는 이의 염의 적어도 약 50중량%, 적어도 약 60중량%, 적어도 약 70중량%, 적어도 약 80중량%, 적어도 약 90중량%, 적어도 약 95중량%, 적어도 약 97중량% 또는 적어도 약 99중량% 함유하는 조성물을 포함할 수 있다. 화합물 및 이의 염을 단리하는 방법은 당업계에서 통상적이다.
- [0361] **표지:** 용어 "표지"는 물질, 화합물 또는 목적물이 검출가능할 수 있도록 목적물에 도입되는 물질 또는 화합물을 의미한다.
- [0362] **링커:** 본원에 사용되는 링커는 원자의 그룹, 예를 들면, 10 내지 1,000개의 원자를 의미하며, 탄소, 아미노, 알킬아미노, 산소, 황, 설펍사이드, 설포닐, 카보닐 및 이민과 같은 원자 또는 그룹을 포함할 수 있으나 이들로 제한되지 않는다. 링커는 핵염기 또는 제1 말단의 당 잔기 상에서 변형된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드에 부착될 수 있고, 제2 말단에서 페이로드, 예를 들면, 검출제 또는 치료제에 부착될 수 있다. 링커는 핵산 서열로의 도입을 방해하지 않는 충분한 길이일 수 있다. 링커는 본원에 기재된 바와 같이 saRNA 접합체의 형성 뿐만 아니라 페이로드의 투여와 같은 임의의 유용한 목적을 위해 사용될 수 있다. 링커에 도입될 수 있는 화학 그룹의 예는 알킬, 알케닐, 알킬닐, 아미도, 아미노, 에테르, 티오에테르, 에스테르, 알킬렌, 헥세로알킬렌, 아릴 또는 헥세로사이클릴을 포함하나 이들로 제한되지 않으며, 이들의 각각은 본원에 기재된 바와 같이 임의로 치환될 수 있다. 링커의 예는 불포화 알칸, 폴리에틸렌 글리콜 (예를 들면, 에틸렌 또는 프로필렌 글리콜 단량체 단위, 예를 들면, 디에틸렌 글리콜, 디프로필렌 글리콜, 트리에틸렌 글리콜, 트리프로필렌 글리콜, 테트라에틸렌 글리콜 또는 테트라에틸렌 글리콜), 및 텍스트란 중합체 및 이의 유도체를 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 다른 예는 링커 내에 절단가능한 잔기, 예를 들면, 디설파이드 결합(-S-S-) 또는 아조 결합(-N=N-)(이들은 환원제 또는 광분해를 사용하여 절단될 수 있다)를 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 선택적으로 절단가능한 결합의 비제한적 예는, 예를 들면, 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 또는 다른 환원제 및/또는 광분해의 사용에 의해 절단될 수 있는 아미도 결합 뿐만 아니라, 예를 들면, 산성 또는 염기성 가수분해에 의해 절단될 수 있는 에스테르 결합을 포함한다.
- [0363] **전이:** 본원에 사용되는 용어 "전이"은 암이 일차 종양으로서 먼저 발생하는 장소로부터 체내의 먼 위치까지 퍼지는 과정을 의미한다. 전이성은 또한 일차 종양의 확산으로부터 유발된 암을 의미한다. 예를 들면, 유방암을 앓고 있는 사람은 림프계, 간, 골 또는 폐에서의 전이를 나타낼 수 있다.
- [0364] **변형된:** 본원에 사용되는 "변형된"은 본 발명의 분자의 하전된 상태 또는 구조를 의미한다. 분자는 화학적으로, 구조적으로 및 작용기적으로 다수의 방식으로 변형될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 saRNA 분자는 비-천연 뉴클레오사이드 및/또는 뉴클레오타이드의 도입에 의해 변형된다.

- [0365] 자연적으로 발생하는: 본원에 사용되는 "자연적으로 발생하는"은 인공 보조제 없이 자연에 존재하는 것을 의미한다.
- [0366] 핵산: 본원에 사용되는 용어 "핵산"은 하나 이상의 뉴클레오타이드, 즉, 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 둘 다를 포함하는 분자를 의미한다. 상기 용어는 리보뉴클레오타이드 및 데옥시리보뉴클레오타이드의 중합체 및 단량체를 포함하며, 여기서 리보뉴클레오타이드 및/또는 데옥시리보뉴클레오타이드는 중합체의 경우에 5' 내지 3' 결합을 통해 함께 결합한다. 리보뉴클레오타이드 및 데옥시리보뉴클레오타이드 중합체는 단일 또는 이중 가닥일 수 있다. 그러나, 결합은 당업계에 공지된 임의의 결합, 예를 들면, 5' 내지 3' 결합을 포함하는 핵산을 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드는 자연적으로 발생하거나, 자연적으로 발생하는 염기쌍과 염기쌍 형성 관계를 형성할 수 있는 합성으로 제조된 유사체일 수 있다. 염기쌍 형성 관계를 형성할 수 있는 비-자연적으로 발생하는 염기의 예는 아자 및 데아자 피리미딘 유사체, 아자 및 데아자 퓨린 유사체, 및 기타 헤테로 사이클릭 염기 유사체를 포함하나 이들로 제한되지 않으며, 여기서, 피리미딘 환의 탄소 및 질소 원자의 하나 이상은 헤테로원자, 예를 들면, 산소, 황, 셀레늄, 인 등에 의해 치환된다.
- [0367] 환자: 본원에 사용되는 "환자"는 치료를 추구하거나 치료의 필요성이 있거나 치료를 필요로 하거나 치료를 받고 있거나 치료를 받을 예정인 대상체 또는 특정 질병 또는 상태 동안 훈련된 전문가에 의해 치료 중인 대상체를 의미한다.
- [0368] 펩타이드: 본원에 사용되는 "펩타이드"는 50개 이하의 길이의 아미노산, 예를 들면, 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50개의 길이의 아미노산이다.
- [0369] 약제학적으로 허용되는: 본원에서 사용되는 어구 "약제학적으로 허용되는"은 타당한 의학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 다른 문제 또는 합병증 없이, 사람 및 동물의 조직과의 접촉하여 사용하기에 적합하고 합리적인 이익/위험 비에 따르는 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여형을 의미한다.
- [0370] 약제학적으로 허용되는 부형제: 본원에서 사용되는 어구 "약제학적으로 허용되는 부형제"는 본원에 기재된 화합물 이외의 다른 임의의 성분 (예를 들면, 활성 화합물을 현탁시키거나 용해시킬 수 있는 비히클)을 의미하며, 환자에서 실질적으로 무독성 및 비-염증성인 특성을 가진다. 부형제는, 예를 들면, 부착 방지제, 산화 방지제, 결합제, 코팅, 압축 보조제, 붕해제, 염료(착색제), 연화제, 유화제, 충전제(희석제), 필름 형성제 또는 코팅, 향미제, 향료, 활주제 (유동 개선제), 윤활제, 보존제, 인쇄 잉크, 흡착제, 현탁제, 분산제, 감미료 및 수화수를 포함한다. 부형제의 예는 부틸화 하이드록시톨루엔 (BHT), 탄산칼슘, 인산칼슘 (이염기), 칼슘 스테아레이트, 크로스카멜로오스, 가교결합된 폴리비닐 피롤리돈, 시트르산, 크로스포비돈, 시스테인, 에틸셀룰로스, 젤라틴, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 락토오스, 마그네슘 스테아레이트, 말티톨, 만니톨, 메티오닌, 메틸셀룰로스, 메틸 파라벤, 미세결정질 셀룰로스, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 피롤리돈, 포비돈, 전호화분 녹말, 프로필 파라벤, 레티닐 팔미테이트, 셀락, 이산화규소, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 나트륨 시트레이트, 나트륨 전분 글리콜레이트, 소르비톨, 전분 (옥수수), 스테아르산, 수크로오스, 탈크, 이산화티탄, 비타민 A, 비타민 E, 비타민 C 및 자일리톨을 포함하나 이들로 제한되지 않는다.
- [0371] 약제학적으로 허용되는 염: 본 개시물은 또한 본원에 기재된 화합물의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다. 본원에 사용되는 "약제학적으로 허용되는 염"은 기존 산 또는 염기 모이어터를 이의 염 형태로 전환시킴으로써 (예를 들면, 유리 염기 그룹과 적절한 유기산을 반응시킴으로써) 모 화합물이 변형되는 개시된 화합물의 유도체를 의미한다. 약제학적으로 허용되는 염의 예는 아민과 같은 염기성 잔기의 무기산 또는 유기산 염; 카복시산과 같은 산 잔기의 알칼리 또는 유기 염 등을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 대표적인 산 부가 염은 아세테이트, 아디페이트, 알지네이트, 아스코르베이트, 아스파르테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 바이셀포네이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르설포네이트, 시트레이트, 사이클로펜탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설포네이트, 에탄설포네이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페이트, 헤미설포네이트, 헵토네이트, 헥사노에이트, 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 하이드로요오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 락토바이오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 설포네이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올리에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 펙테네이트, 피셀페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 석시네이트, 설포네이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 툴루엔설포네이트, 운데카노에이트, 발레레이트 염 등을 포함한다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리 토 금속 염은 나트륨, 리튬, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등 뿐만 아니라, 비독성 암모늄, 4급 암모늄, 및 암모늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 에틸아민 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 아민 양이온을 포함한다. 본 개

시물의 약제학적으로 허용되는 염은, 예를 들면, 무독성 무기염 또는 유기염으로부터 형성된 모 화합물의 통상적인 무독성 염을 포함한다. 본 개시물의 약제학적으로 허용되는 염은 염기성 또는 산성 잔기를 함유하는 모 화합물로부터 통상적인 화학 방법에 의해 합성될 수 있다. 일반적으로, 이러한 염은 이들 화합물의 유리산 또는 염기 형태와 화학량론적 양의 적절한 염기 또는 산을 물 중에서 또는 유기 용매 중에서 또는 이들 둘 다의 혼합물 중에서 반응시킴으로써 제조될 수 있으며; 일반적으로 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판올 또는 아세토니트릴과 같은 비수성 매질이 바람직하다. 적합한 염의 목록은 문헌[*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P.H. Stahl and C.G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, and Berge et al., *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 1-19 (1977)](이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에서 찾아볼 수 있다.

[0372] **약제학적으로 허용되는 용매화물:** 본원에 사용되는 용어 "약제학적으로 허용되는 용매화물"은 적합한 용매의 분자가 결정 격자에 혼입되어 있는 본 발명의 화합물을 의미한다. 적합한 용매는 투여되는 투여형에서 생리학적으로 내약성이다. 예를 들면, 용매화물은 유기 용매, 물 또는 이들의 혼합물을 포함하는 용매로부터 결정화, 재결정화 또는 침전에 의해 제조할 수 있다. 적합한 용매의 예는 에탄올, 물(예를 들면, 1수화물, 2수화물 및 3수화물), *N*-메틸피롤리딘(NMP), 디메틸 설펍사이드(DMSO), *N,N*'-디메틸포름아미드(DMF), *N,N*'-디메틸아세트아미드(DMAC), 1,3-디메틸-2-이미다졸리딘(DMEU), 1,3-디메틸-3,4,5,6-테트라하이드로-2-(1H)-피리미디논(DMPU), 아세토니트릴(ACN), 프로필렌 글리콜, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 2-피롤리돈, 벤질 벤조에이트 등이다. 물이 용매일 때, 용매화물은 "수화물"로 언급된다.

[0373] **약리 효과:** 본원에 사용되는 "약리 효과"는, 유기체 또는 시스템이 외인성 제제와 접촉되거나 이에 노출된 후에 일어나는 유기체 또는 시스템의 측정가능한 생물학적 현상이다. 약리 효과는 하나 이상의 증상의 치료, 개선, 질병, 장애, 상태 또는 감염의 개시의 진단, 예방 및 지연과 같은 치료학적으로 유효한 결과를 유발할 수 있다. 이러한 생물학적 현상의 측정은 다른 생물학적 현상에 대해 정량적, 정성적 또는 상대적일 수 있다. 정량적 측정은 통계학적으로 유의할 수 있다. 정량적 측정은 정도 또는 종류에 의해 상이할 수 있으며, 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상 상이할 수 있다. 이들은 존재 또는 부재로서, 보다 양호 또는 보다 불량, 보다 큼 또는 보다 작음으로 관찰할 수 있다. 외인성 제제는, 약리 효과를 언급할 때, 전체적으로 또는 부분적으로, 유기체 또는 시스템에 대한 이물질이다. 예를 들면, 야생형 생체분자에 대한 변형은, 구조적이든지 화학적이든지 간에, 외인성 제제를 생성할 것이다. 마찬가지로, 야생형 분자를 유기체 또는 시스템에서 자연스럽게 발견되지 않는 화합물, 분자 또는 물질로 도입하거나 이들과의 조합하는 것은 또한 외인성 제제를 생성할 것이다. 본 발명의 saRNA는 외인성 제제를 포함한다. 약리 효과의 예는 호중구, 망상 적혈구, 과립구, 적혈구(적혈구), 거핵구, 혈소판, 단핵구, 결합 조직 대식세포, 상피 랑게르한스 세포, 파골 세포, 수지상 세포, 미세아교 세포, 호중구, 호산구, 호염구, 비만 세포, 헬퍼 T 세포, 억제인자 T 세포, 세포독성 T 세포, 자연 살해 T 세포, B 세포, 자연 살해 세포 또는 망상 적혈구의 증가 또는 감소와 같은 세포 수치의 변화를 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 약리 효과는 또한 혈액 화학, pH, 헤모글로빈, 헤마토크리트의 변화, 간 효소 AST 및 ALT와 같으나 이에 제한되지 않는 효소의 수준의 변화, 지질 프로파일 변화, 전기 분해, 대사 마커, 호르몬 또는 기타 마커 또는 당업계의 숙련자들에게 공지된 프로파일에서의 변화를 포함할 수 있다.

[0374] **약리화학적:** 본원에 사용되는 "약리화학적"은 물리적 및/또는 화학적 특성에 관한 것을 의미한다.

[0375] **예방:** 본원에 사용되는 용어 "예방"은 감염, 질환, 장애 및/또는 상태의 발생을 부분적으로 또는 완전히 지연시키는 것; 하나 이상의 증상, 특징, 또는 특정 감염, 질환, 장애 및/또는 상태의 임상학적 소견의 발생을 부분적으로 또는 완전히 지연시키는 것; 하나 이상의 증상, 특징, 또는 특정 감염, 질환, 장애 및/또는 상태의 소견의 발생을 부분적으로 또는 완전히 지연시키는 것; 감염, 특정 질환, 장애 및/또는 상태로부터 진행을 부분적으로 또는 완전히 지연시키는 것; 및/또는 감염, 질환, 장애 및/또는 상태와 관련된 병리학을 발생시킬 위험을 감소시키는 것을 포함한다.

[0376] **프로드럭:** 본 개시물은 또한 본원에 기재된 화합물의 프로드럭을 포함한다. 본원에 사용되는 "프로드럭"은 물질, 분자 또는 독립체가 화학적 또는 물리적 변화시에 치료제로서 작용할 것으로 예상되는 형태인 임의의 물질, 분자 또는 독립체를 의미한다. 프로드럭은 일부 방식으로 공유 결합되거나 격리되며, 포유동물 대상체에게 투여전, 투여시 또는 투여후 활성 약물 잔기로 방출되거나 전환된다. 프로드럭은 변형물이 통상의 조작으로 또는 생체내에서 모 화합물로 절단되는 방식으로 화합물에 존재하는 작용성 그룹을 변형시킴으로써 제조될 수 있다. 프로드럭은 하이드록실, 아미노, 설피드릴, 또는 카복실 그룹이 포유동물 대상체에 투여될 때 절단되어 유

리 하이드록실, 아미노 설피드릴 또는 카복실 그룹을 각각 형성하는 임의의 그룹에 결합되는 화합물을 포함한다. 프로드럭의 제조 및 사용은 문헌[T. Higuchi and V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, and in *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987](이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다)에서 논의된다.

- [0377] 진단: 본원에 사용되는 용어 "진단"은 특정 생물학적 이벤트가 미래에 일어나거나 일어날 가능성이 매우 큰 진술 또는 주장을 의미한다.
- [0378] 진행: 본원에 사용되는 용어 "진행" 또는 "암 진행"은 질환 또는 상태의 진행악화 또는 이들로의 악화를 의미한다.
- [0379] 증식하다: 본원에 사용되는 용어 "증식하다"는 성장하거나, 확장하거나, 증가하거나, 급격하게 성장, 확장 및 증가를 일으키는 것을 의미한다. "증식성"은 증식하는 능력을 갖는 것을 의미한다. "항-증식성"은 증식 특성에 반대되거나 부적절한 특성을 갖는 것을 의미한다.
- [0380] 단백질: "단백질"은 펩타이드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산 잔기들의 중합체를 의미한다. 본원에 사용되는 상기 용어는 임의의 크기, 구조 또는 기능의 단백질, 폴리펩타이드 및 펩타이드를 의미한다. 그러나, 전형적으로, 단백질은 적어도 50개 길이의 아미노산일 것이다. 일부 예에서, 암호화된 단백질은 약 50개의 아미노산 보다 작다. 이 경우, 폴리펩타이드는 펩타이드로 지칭된다. 단백질이 짧은 펩타이드라면, 이것은 적어도 약 10개의 길이의 아미노산 잔기일 것이다. 단백질은 자연적 발생, 재조합, 합성 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 단백질은 또한 자연적으로 발생하는 단백질 또는 펩타이드의 단편을 포함할 수 있다. 단백질은 단일 분자일 수 있거나, 다중-분자 복합체일 수 있다. 단백질이란 용어는 또한 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연적으로 발생하는 아미노산의 인공적 화학 유사체인 아미노산 중합체에 적용된다.
- [0381] 단백질 발현: 용어 "단백질 발현"은 아미노산 서열 또는 단백질의 검출가능한 수준이 발현되도록 핵산 서열이 번역을 수행하는 과정을 의미한다.
- [0382] 정제된: 본원에 사용되는, "정제하다", "정제된" 및 "정제"는 원하지 않는 성분, 물질 오염, 혼합물 또는 결합으로부터 실질적으로 순수하거나 깨끗하게 하는 것을 의미한다.
- [0383] 퇴행: 본원에 사용되는 용어 "퇴행" 또는 "퇴행의 정도"는 암 진행의 표현형 또는 유전자형의 반전을 의미한다. 암 진행의 서행 또는 정지는 퇴행으로서 간주될 수 있다.
- [0384] 샘플: 본원에 사용되는 용어 "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 조직, 세포 또는 성분 부분(예를 들면, 혈액, 점액, 림프액, 활액, 뇌척수액, 타액, 양수, 양막 제대혈, 소변, 질액 및 정액을 포함하나 이들로 제한되지 않는 체액)의 서브셋을 의미한다. 샘플은 예를 들면, 혈장, 혈청, 척수액, 림프액, 피부의 외부 부분, 호흡기, 장관, 및 비뇨 생식관, 눈물, 타액, 젖, 혈액 세포, 종양, 기관을 포함하나 이들로 제한되지 않는, 조직, 세포 또는 성분 부분의 전체 유기체 또는 하위부분으로부터 제조된 균질물, 동결건조물 또는 추출물, 또는 분획 또는 이의 부분을 추가로 포함할 수 있다. 샘플은 단백질 또는 핵산 분자와 같은 세포 성분을 함유할 수 있는 영양 브로쓰 또는 겔와 같은 배지를 의미한다.
- [0385] 신호 서열: 본원에 사용되는 어구는 "신호 서열"은 단백질의 수송 또는 국소화를 유도할 수 있는 서열을 의미한다.
- [0386] 신호 단위 용량: 본원에 사용되는 "신호 단위 용량"은 1회 용량/한꺼번에/단일 경로/단일 접촉점, 즉 단일 투여 이벤트로 투여되는 임의의 치료제의 용량이다.
- [0387] 유사성: 본원에 사용되는 용어 "유사성"은 중합체성 분자들 사이, 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드 분자들(예를 들면, DNA 분자들 및/또는 RNA 분자들) 사이 및/또는 폴리펩타이드 분자들 사이의 전반적인 관련성을 의미한다. 중합체성 분자들 서로의 퍼센트 유사성의 계산은 퍼센트 유사성의 계산이 당업계에서 이해되는 바와 같이 보존적 치환을 고려하는 것을 제외하고는 퍼센트 동일성의 계산과 동일한 방식으로 수행될 수 있다.
- [0388] 분할 용량: 본원에 사용되는 "분할 용량"은 단일 단위 용량 또는 총 1일 용량을 2개 이상의 용량으로 분할하는 것이다.
- [0389] 안정한: 본원에 사용되는 "안정한"은 반응 혼합물로부터 순도의 유용한 정도까지 분리하기에 충분히 강건(robust)하고, 바람직하게는 강력한 치료제로 제형화할 수 있는 화합물을 의미한다.



- [0390] **안정화된**: 본원에 사용되는 용어 "안정화하다", "안정화된", "안정화된 영역"은 안정하게 하거나 안정해지는 것을 의미한다.
- [0391] **대상체**: 본원에 사용되는 용어 "대상체" 또는 "환자"는 예를 들면, 실험, 진단, 예방 및/또는 치료 목적으로 본 발명에 따른 조성물이 투여될 수 있는 임의의 유기체를 의미한다. 전형적인 대상체는 동물(예를 들면, 마우스, 래트, 토끼, 비-사람 영장류 및 사람) 및/또는 식물을 포함한다.
- [0392] **실질적으로**: 본원에 사용되는 용어 "실질적으로"는 관심대상의 특징 또는 특성의 총 또는 거의 총 크기 또는 정도를 나타내는 정량적 상태를 의미한다. 생물학 기술 분야의 당업계의 숙련가들은 생물학적 및 화학적 현상이 설령 가능하더라도 드물게 완료되고/되거나 완성도까지 진행하거나 절대적인 결과를 달성하거나 회피하는 것을 이해할 것이다. 따라서, 용어 "실질적으로"는 본원에 사용되어 다수의 생물학적 및 화학적 현상에 내재하는 완성도의 잠재적 부족을 포괄한다.
- [0393] **실질적으로 동일한**: 본원에 사용되는 바와 같이, 이것은 용량 사이의 시간 차이에 관한 것일 때, 용어는  $\pm 2\%$ 를 의미한다.
- [0394] **실질적으로 동시에**: 본원에 사용되는 바와 같이, 이것이 복수의 용량에 관한 것일 때, 용어는 2초 이내를 의미한다.
- [0395] **앓고 있는**: 질환, 장애 및/또는 상태를 "앓고 있는" 개체들은 질환, 장애 및/또는 상태의 하나 이상으로 진단 받았거나 이들을 나타낸다.
- [0396] **에 감수성인**: 질환, 장애 및/또는 상태에 "에 감수성인" 개체는 질환, 장애 및/또는 상태의 증상으로 진단을 받지 않았고/있거나 이들을 나타낼 수 없지만, 질환 또는 이의 증상을 발전시킬 경향을 품고 있다. 일부 실시형태에서, 질환, 장애 및/또는 상태(예를 들면, 암)에 걸리기 쉬운 개체는 다음 중 하나 이상을 특징으로 할 수 있다. (1) 질환, 장애 및/또는 상태의 발생과 관련된 유전자 돌연변이; (2) 질환, 장애 및/또는 상태의 발생과 관련된 유전자 다형성; (3) 질환, 장애 및/또는 상태와 관련된 단백질 및/또는 핵산의 발현 및/또는 활성의 증가 및/또는 감소; (4) 질환, 장애 및/또는 상태의 발생과 관련된 거동 및/또는 생활방식; (5) 질환, 장애 및/또는 상태의 가족력; 및 (6) 질환, 장애 및/또는 상태의 발생과 관련된 미생물에 대한 노출 및/또는 이에 의한 감염. 일부 실시형태에서, 질환, 장애 및/또는 상태에 걸리기 쉬운 개체는 질환, 장애 및/또는 상태를 발생시킬 것이다. 일부 실시형태에서, 질환, 장애 및/또는 상태에 걸리기 쉬운 개체는 질환, 장애 및/또는 상태를 발생시키지 않을 것이다.
- [0397] **서방출**: 본원에 사용되는 용어 "서방출"은 특정 기간에 걸쳐 방출 속도에 따르는 약제학적 조성물 또는 화합물 방출 프로파일을 의미한다.
- [0398] **합성**: 용어 "합성"은 사람의 손에 의해 생성, 제조 및/또는 제작되는 것을 의미한다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 또는 기타 분자의 합성은 화학적 또는 촉매적일 수 있다.
- [0399] **표적화된 세포**: 본원에 사용되는 "표적화된 세포"는 관심대상의 임의의 하나 이상의 세포를 의미한다. 세포는 시험관내, 생체내, 동일반응계내 또는 유기체의 조직 또는 기관에서 발견될 수 있다. 유기체는 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 사람, 가장 바람직하게는 환자일 수 있다.
- [0400] **치료제**: 용어 "치료제"는 대상체에게 투여될 때, 치료적, 진단적 및/또는 예방적 효과를 가지고/거나 목적하는 생물학적 및/또는 약리학적 효과를 유도하는 임의의 제제를 의미한다.
- [0401] **치료학적 유효량**: 본원에 사용되는 용어 "치료학적 유효량"은 감염, 질환, 장애 및/또는 상태를 앓고 있거나 이들에 걸리기 쉬운 대상체에게 투여될 때, 감염, 질환, 장애 및/또는 상태의 증상을 치료 또는 개선하거나 이들의 발생을 진단, 예방 및/또는 지연시키기에 충분한 전달될 제제(예를 들면, 핵산, 약물, 치료제, 진단제, 예방제 등)의 양을 의미한다.
- [0402] **치료학적으로 유효한 결과**: 본원에 사용되는 용어 "치료학적으로 유효한 결과"는 감염, 질환, 장애 및/또는 상태를 앓고 있거나 이들에 걸리기 쉬운 대상체에서 감염, 질환, 장애 및/또는 상태의 증상을 치료 또는 개선하거나 이들의 발생을 진단, 예방 및/또는 지연시키기에 충분한 결과를 의미한다.
- [0403] **총 1일 용량**: 본원에 사용되는, "총 1일 용량"은 24시간 내에 제공되거나 처방되는 양이다. 이것은 단일 단위 용량으로 투여될 수 있다.
- [0404] **전사 인자**: 본원에 사용되는 용어 "전사 인자"는 예를 들면, 전사의 활성화 또는 억제에 의해 DNA의 RNA로의 전



사를 조절하는 DNA-결합 단백질을 의미한다. 일부 전사 인자는 단독으로 전사의 조절을 가져오는 반면, 다른 것들은 다른 단백질과 협력하여 작용한다. 일부 전사 인자는 특정 조건 하에 전사를 활성화와 억제 둘 다 할 수 있다. 일반적으로, 전사 인자는 특정 표적 서열 또는 표적 유전자의 조절 영역에서 특정한 공통 서열과 매우 유사한 서열에 결합한다. 전사 인자는 표적 유전자의 전사를 단독으로 또는 다른 분자와의 복합체를 형성하여 조절할 수 있다.

[0405] 치료: 본원에 사용되는 용어 "치료"는 특정 감염, 질환, 장애 및/또는 상태의 하나 이상의 증상 또는 특징의 개시를 부분적으로 또는 완전히 완화, 개선, 향상, 경감 또는 지연시키거나 이들의 진행을 억제하거나, 이들의 중증도를 감소시키고/거나 이들의 발생을 감소시키는 것을 의미한다. 예를 들면, 암의 "치료"란, 종양의 생존, 성장 및/또는 확산을 억제하는 것을 의미한다. 치료제는 질환, 장애 및/또는 상태의 징후를 나타내지 않는 대상체에게 및/또는 질환, 장애 및/또는 상태와 관련된 병변을 발생시킬 위험을 감소시킬 목적으로 질환, 장애 및/또는 상태의 초기 징후만을 나타내는 대상체에게 투여될 수 있다.

[0406] 어구 "치료 방법" 이의 등가물은, 예를 들면, 암에 적용될 때, 개체에서 암 세포의 수를 감소, 제거 또는 예방하거나 암의 증상을 완화시키도록 디자인된 작용의 절차 또는 과정을 의미한다. 암 또는 다른 증식성 장애의 "치료 방법"은 반드시 암 세포 또는 다른 장애가 실제로 완전히 제거될 것, 세포 또는 장애의 수가 실제로 감소할 것, 또는 암 또는 다른 장애의 증상이 실제로 완화될 것을 의미하지는 않는다. 종종, 암의 치료 방법은 심지어 성공 가능성이 낮아도 수행될 것이지만, 개체의 병력 및 추정 생존 예방이 그럼에도 불구하고 전반적인 유익한 작용 과정으로 간주된다.

[0407] 종양 성장: 본원에 사용되는 용어 "종양 성장" 또는 "종양 전이 성장"은, 달리 명시되지 않는다면, 종양유전자에 흔히 사용되는 바와 같이 사용되며, 상기 용어는 원칙적으로 주로 종양 세포 성장의 결과로서 종양 또는 종양 전이의 질량 또는 용적의 증가와 관련된다.

[0408] 종양 부하: 본원에 사용되는 용어 "종양 부하"는 대상체에 의해 수행된 3mm 초과 직경을 갖는 모든 종양 소절의 총 종량 용적을 의미한다..

[0409] 종양 용적: 본원에 사용되는 용어 "종양 용적"은 종량의 크기를 의미한다. 종양 용적(mm<sup>3</sup>)은 다음 수학적식에 의해 계산된다: 용적 = (넓이)<sup>2</sup> x 길이/2

[0410] 변형되지 않은: 본원에 사용되는 "변형되지 않은"은 어쨌든 변화되기 전의 임의의 물질, 화합물 또는 분자를 의미한다. 변화되지 않은은, 향상은 아니지만, 생체분자의 야생형 또는 토종 형태를 의미한다. 분자는 일련의 변형을 겪을 수 있고, 이에 의해 각각의 변형된 분자는 후속적 변형을 위한 "변형된" 시작 분자로서 작용할 수 있다.

#### [0411] 등가물 및 범위

[0412] 당업계 숙련가들은 본원에 기재된 본 발명에 따른 특정 실시형태에 대한 다수의 등가물을 통상적인 실험을 사용하여 인식하거나 확인할 수 있다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명으로 한정되는 것으로 의도되지 않고 첨부된 청구범위에서 설명된 바와 같다.

[0413] 청구범위에서, 단수("a" "an") 및 "상기(the)"와 같은 표현은 달리 반대로 명시되거나 달리 문맥으로부터 명백하지 않다면 하나 이상을 의미한다. 그룹의 하나 이상의 구성원 사이에 "또는" 을 포함하는 청구범위 또는 상세한 설명은 그룹 구성원의 1개, 1개 이상 또는 모두가 존재하거나 사용되거나 달리 소정의 생성물 또는 방법과 관련되지 않거나 달리 이와 반대로 명시되지 않거나 달리 문맥으로부터 명백하지 않다면, 만족된 것으로 간주된다. 본 발명은 그룹의 정확히 하나의 구성원이 존재하거나 사용되거나 달리 소정의 생성물 또는 방법과 관련되지 않는 실시형태를 포함한다. 본 발명은 그룹의 정확히 하나 이상 또는 모든 구성원이 존재하거나 사용되거나 달리 소정의 생성물 또는 방법과 관련되지 않는 실시형태를 포함한다.

[0414] 용어 "포함하는"은 개방적인 것으로 의도되며, 추가의 요소 또는 단계를 포함하는 것을 허용한다.

[0415] 범위가 주어지는 경우, 종점이 포함된다. 더욱이, 달리 명시되지 않거나 달리 문맥 및 당업계의 숙련가들의 이해로부터 명백하지 않다면, 범위로서 표현된 값은, 맥락에 의해 명백히 지시되지 않을 경우, 본 발명의 상이한 실시형태에서 명시된 범위 내의 임의의 구체적 값 또는 하위범위를 그 범위의 하한치의 단위의 1/10까지 추정할 수 있다.

[0416] 또한, 종래 기술 내에 속하는 본 발명의 임의의 특정 실시형태는 청구항들 중 어느 하나 이상의으로부터 명백하

게 배제될 수 있음이 이해될 것이다. 상기 실시형태는 당업계의 숙련가들에게 공지되어 있는 것으로 간주되기 때문에, 본원에서 배제가 명백하게 제시되어 있지 않더라도, 상기 실시형태는 배제될 수 있다. 본 발명의 조성물의 임의의 특정 실시형태(예를 들면, 임의의 핵산 또는 이에 의해 암호화된 단백질; 임의의 제조 방법; 임의의 사용 방법 등)는, 종래 기술의 존재에 관련되든지 관련되지 않든지 간에, 어느 하나 이상의 청구항으로부터 배제될 수 있다.

[0417] 모든 인용된 출처, 예를 들면, 참조문헌, 공보, 데이터베이스, 데이터베이스 항목, 및 본원에 인용된 종래 기술은 비록 인용에서 명백히 진술되지 않더라도 본 출원에 참조로서 인용된다. 인용된 출처와 본 출원의 진술이 상충하는 경우, 본 출원의 진술이 우선할 것이다.

[0418] 본 발명은 하기의 비제한적 실시예에 의해 추가로 설명할 것이다.

[0419] **실시예**

[0420] 재료 및 절차는 PCT 출원 제PCT/IB2014/003054호에서 개시되었다.

[0421] **실시예 1. C/EBP $\alpha$ -saRNA 시험관내 연구**

[0422] AW51(aka CEBPA-AW1-510000)을 Hep3B, HepG2, PLC/PRF/5, SNU475 세포와 같은 HCC 세포주의 패널에서 형질감염시켰다. 상기 세포는, 접종시 50nM AW51으로 역방향 역방향 형질감염(reverse transfection)시키고 24시간 후에 전방향 형질감염(forward transfection)시키고 72시간째에 수거하였다. CEBPA mRNA 및 알부민(ALB) mRNA 수준을 측정하였다. CEBPA 및 ALB mRNA의 상향조절은 도 4A 내지 4D 및 도 5A 내지 5D에 도시된 바와 같이 관찰되었다.

AW51 안티센스 서열 (X09317)	GACCAGUGACAAUGACCGCUU	서열번호 93
AW51 센스 서열 (X09316)	GCGGUCAUUGUCACUGGUCUU	서열번호 94

[0423]

[0424] **실시예 2. 변형된 CEBPA-saRNA는 CEBPA를 상향조절한다**

[0425] 표 3의 변형된 CEBPA-saRNA를 DU145 세포에서 형질감염시켰다. 세포를 접종시 2.5 nM 및 10 nM 변형된 EBPA-saRNA로 역방향 형질감염시키고 24시간 후에 전방향 형질감염시키고 72시간째에 수거하였다. EBPA 및 GAPDH mRNA 수준을 측정하였다. 표 6, 도 6A의 결과는 CEPBA-saRNA가 상당한 변형을 용인하게 할 수 있음을 보여준다.

[0426] [표 6-1]

DU145 세포에서의 CEBPA mRNA 수준

듀플렉스 ID	상대적 mRNA CEBPA 2.5nM	SD	상대적 mRNA CEBPA 10nM	SD
XD-03287	2.47405519	0.35441301	4.807203057	1.77941471
XD-04353	2.240846151	0.56776333	2.948275905	0.55264149
XD-04354	2.847748677	0.7442053	3.130235184	0.54793146
XD-04355	2.946658233	0.66053501	2.892767048	0.37945239
XD-04356	1.864020365	0.49485233	2.109506219	0.55126016
XD-03302	3.271904091	0.84352676	9.550389237	1.59963498
XD-04358	1.35233741	0.28653345	1.384020564	0.13677222
XD-04359	1.399054988	0.26024787	1.486989819	0.07346068
XD-04360	1.211792463	0.06559519	1.721136011	0.54936887
XD-04361	1.221228236	0.05912314	1.802248329	0.58804132
XD-03317	3.170377201	0.54481336	7.878877604	2.12261544
XD-04363	1.041339997	0.06854357	1.025008603	0.10910861
XD-04364	0.810622945	0.15207354	0.917036666	0.07051729
XD-04365	0.892397193	0.11321896	0.960369198	0.11671288
XD-04366	1.235336205	0.24529118	1.031610064	0.10794732
스크램블	1.50761893	0.49259555	0.977396047	0.25336725
F-Luc	1.679417472	0.53349959	1.177929847	0.22429314
MeF	1.519521651	0.23368363	1.418274737	0.26159698
Aha-1	1.400196465	0.28373253	1.44526965	0.20604682

[0427]

[0428] [표 6-1]

DU145 세포에서의 GAPDH mRNA 수준

듀플렉스 ID	gapdh 2.5nM	SD	gapdh 10nM	SD
XD-03287	0.30012213	0.04872709	0.15487859	0.021476125
XD-04353	0.38430764	0.05893013	0.21179771	0.023662437
XD-04354	0.278508	0.0151083	0.21589058	0.025144858
XD-04355	0.33891401	0.03684563	0.23096784	0.039633795
XD-04356	0.66440667	0.09665852	0.34165265	0.068757809
XD-03302	0.48401386	0.0938301	0.15074631	0.023836647
XD-04358	0.99270067	0.10679351	0.60215746	0.076308233
XD-04359	0.93338175	0.08896079	0.55308903	0.050195732
XD-04360	1.14035319	0.05727254	0.47614574	0.040400001
XD-04361	1.19595973	0.10526669	0.46229043	0.060483173
XD-03317	0.59089619	0.10261665	0.15368292	0.02885901
XD-04363	1.42967486	0.10493026	0.93230015	0.188124401
XD-04364	1.51612477	0.20993157	1.02248778	0.070857079
XD-04365	1.31858062	0.12189526	1.07045908	0.136617289
XD-04366	1.02824228	0.13557063	0.58889998	0.03921991
스크램블	0.9596105	0.1991626	0.88815236	0.227402132
F-Luc	0.95681136	0.1749612	1.06219451	0.229513678
MeF	0.81949497	0.03521342	0.71848557	0.094709517
Aha-1	0.94853936	0.10607439	0.72142219	0.134524626

[0429]

[0430] 하기 표는 본 실시예에서 사용된 대조군들을 포함한다. Aha1 siRNA는 형질감염 대조군으로서 사용하였고 2.5 nM

및 10 nM의 농도에서 형질감염시켰다.

[표 7-1]

대조군 - 센스 서열

듀플렉스-ID	센스-ID	센스 서열	서열번호	주
XD-03291	X09206	ACUACUGAGUGACAGUAGAUU	33	스크램블, 비변형
XD-03292	X09208	CuUACGcUGAGUACUUCGAsusu	78	Fluc, 변형됨
XD-00033	X00122	GGAuGAAGuGGAGAuAGudTsdT	79	AHA1 siRNA, 형질감염 대조군
XD-00376	X01162	GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfACfdTsdT	80	MeF 디자인, 음성 대조군

[표 7-2]

대조군 - 안티센스 서열

듀플렉스-ID	안티-센스-ID	안티-센스 서열	서열번호	주
XD-03291	X09207	UCUACUGUCACUCAGUAGUUU	81	스크램블, 비변형
XD-03292	X09209	UcGAAGuAcUCAGcGUAAGsusu	82	Fluc, 변형됨
XD-00033	X00123	ACuAAUCUCcACUUCaUCCdTsdT	83	AHA1 siRNA, 형질감염 대조군
XD-00376	X01163	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT	84	MeF 디자인, 음성 대조군

CEBPA-saRNA를 GalNac 클러스터(GalNac- CEBPA-saRNA로서 언급됨)와 접합시키고 DU145 세포에 형질감염시킨다. 세포를 접종시 2.5 nM, 10 nM 또는 50 nM GalNac-CEBPA-saRNA로 역방향 형질감염시키고 24시간 후에 전방향 형질감염시키고 72시간째에 수거하였다. CEBPA 및 알부민 mRNA 수준을 측정한다.

AW51(aka CEBPA- AW1-510000)을 GalNac 클러스터와 접합시키고 DU145 세포에서 형질감염시킨다. 세포를 접종시 2.5 nM, 10 nM 또는 50 nM GalNac-CEBPA-saRNA로 역방향 형질감염시키고, 24시간 후에 전방향 형질감염시키고 72시간째에 수거한다. CEBPA 및 알부민 mRNA 수준을 측정한다.

### 실시예 3. saRNA 및 siRNA의 시험관내 용량 반응 및 효능 비교

3종의 비변형된 CEBPA-saRNA (XD-03287, XD-03302, XD-03317)의 DU145 세포에서의 EC50을 DU145 세포에서의 AHA1 및 CEBPA에 대한 siRNA의 IC50과 비교하였다.

saRNA의 EC50 시험을 위해, DU145 세포(p15, 8000개 세포/웰)를 0시간째(리포펙타민 2000, 0.4 $\mu$ l/웰)에 CEBPA-saRNA로 역방향 형질감염시키고 24시간째에 전방향 형질감염시키고 72시간째에 수거하였다. XD-03287, XD-03302, XD-03317을 100nM로부터 일련의 2 $\times$ 희석액 중에서 투약하였다. CEBPA mRNA 수준을 GAPDH로 정규화하였다.

siRNA의 IC50 시험을 위해, DU145 세포(p15, 8000개 세포/웰)를 0시간째에 단일 형질감염시키고 24시간째에 수거하였다. 라이프 테크놀로지스(Life Technologies) CEBPA-siRNA 및 Axo unmod AHA1을 50nM로부터의 일련의 5 $\times$ 희석액 중에서 투약하였다.

[0441] [표 8]

saRNA, siRNA 및 대조군의 서열:

듀플렉스-ID	센스-ID	센스 서열	안티센스-ID	안티센스 서열	주
XD-03287	X09198	CGGUCAUUGUCACUG GUCAUU (서열번호 50)	X09199	UGACCAGUGACAAUGACCGUU (서열번호 51)	CEBPA-saRNA
XD-03302	X09316	GCGGUCAUUGUCACUGGUCUU (서열번호 85)	X09317	GACCAGUGACAAUGACCGCUU (서열번호 86)	CEBPA-saRNA
XD-03317	X09346	UGAAAGGAUUAUCCUCCUUU (서열번호 87)	X09347	AGGAGGAUGAAUCCUUUCAUU (서열번호 88)	CEBPA-saRNA
XD-01030	X02807	GGAUGAAGUGGAGAUUAGUdT (서열번호 89)	X02812	ACUAAUCCACUUAUCCdT (서열번호 90)	Aha-1 siRNA, 비변형
XD-00194	X00539	cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTs (서열번호 91)	X00540	UCGAAGuACUcAGCGuAAGdT (서열번호 92)	Fluc, 음성 대조군
s2890					siRNA 표적화 CEBPA(공급원: life technologies)

[0442]

[0443] [표 9]

saRNA 및 siRNA의 농도(nM):

siRNA	50	10	2	0.4	0.08	0.016	0.0032	0.00064	0.000128	0.0000256
saRNA	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0.390625	0.1953125

[0444]

[0445] siRNA의 IC50은 표 10 및 도 7A 내지 7C에 도시하였다. saRNA의 EC50 값은 표 11 및 도 8A 내지 8C에 도시하였다. saRNA/siRNA에 대한 기울기 비는 약 5이며, 이는 상이한 메카니즘을 제시한다. 기울기 평균 및 비의 계산을 위해, 기울기를 100%의 Y-축 범위에 대해 정규화하였다. 이것은 siRNA(CEBPA-siRNA 및 Aha-1-siRNA)에 대한 약 0.5 및 saRNA(XD-03287, XD-03302 및 XD-03317)에 대한 약 2.7이라는 결과를 초래하였다. EC50 및 IC50은 최대 활성의 절반의 척도인 변곡점(IP)이다. 따라서, CEBPA-saRNA는 매우 강력하였으며 낮은 nM 범위의 IC50을 갖는다.

[0446] [표 10]

siRNA 및 대조군의 IC50:

siRNA 듀플렉스 ID	s2890 (CEBPA siRNA)	XD-00194 (FLuc)	XD-01030 (Aha-1 siRNA)
IC50 (nM)	0.049	NA	0.0079
IP (nM)	0.0018	NA	0.0030
기울기	-0.43	NA	-0.59

[0447]

[0448] [표 11]

saRNA의 EC50 값

saRNA 듀플렉스 ID	XD-03287	XD-03302	XD-03317
EC50 (nM)	2.50	5.83	4.66
IP (nM)	5.42	6.24	5.58
기울기	1.91	1.82	2.19

[0449]

[0450] **실시예 4. 인간 간세포에서 CEBPA-saRNA를 이용한 시험관내 연구**

[0451] 1차 인간 간세포(LifeTechnologies, HMCPTS)를 비증식 배지에 위치시켰다. 접종 당일에, 세포를 역방향 형질감염 단계에 적용시켰고, 이때 세포가 단일층으로서 부착하기 전에 saRNA 형질감염 복합체를 세포에 첨가하였다.



24시간 후에, 배지를 교환하고, 전방향 형질감염을 수행하였다. 다음날, 배지를 교환하고, 분석을 위해 세포를 수거하기 전에 세포를 추가로 24시간 동안 항온배양하였다. 간세포를 AW51로 형질감염시켰다. CEBPA 및 알부민 mRNA 수준을 48시간째 및 72시간째에 측정하였다. Aha-1-siRNA 및 Fluc를 대조군으로서 사용하였다. Aha1, 알부민, CEBPA 상대적 발현은 표 12 및 도 9A에 도시하였다.

- [0452] 재료
- [0453] 1차 간세포 해동 배지: 냉동보존된 간세포 회복 배지(CHRM), 50 mL(라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 CM7000)
- [0454] 1차 간세포 플레이팅 배지: 소 태아 혈청, 가열 불활성화됨 - 50 mL (라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 16140-071)
- [0455] 인슐린-트랜스페린-셀레늄(100X) - 5 mL (라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 41400-045)
- [0456] HEPES(1M) - 5 mL (라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 15630-056)
- [0457] L-글루타민-페니실린-스트렙토마이신 용액 - 5 mL (Sigma 카탈로그 번호 G1 146)
- [0458] 텍사메타손 - 40 ng/mL 최종 농도(Sigma 카탈로그 번호 D8893)가 될 때까지
- [0459] 윌리엄스 E 배지, 페놀 레드 없음 - 전체 500 mL(라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 A12176-01)가 될 때까지
- [0460] 1차 간세포 유지 배지: 1차 간세포 유지
- [0461] 보충물(라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 CM4000)
- [0462] 윌리엄스 E 배지, 페놀 레드 없음 - 전체 500 mL(라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 A12176-01)가 될 때까지
- [0463] 1차 간세포 배양 플레이트: 콜라겐 I, 코팅된 플레이트, 24웰(Life Technologies 카탈로그 번호 A1 1428-02)
- [0464] 형질감염 시약: HiPerFect 형질감염 시약(Qiagen 카탈로그 번호 301704)
- [0465] Opti-MEM I 환원 혈청 배지, 페놀 레드 없음(라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 11058-021)
- [0466] 프로토콜
- [0467] saRNA 어닐링:
- [0468] 각각의 동결건조된 saRNA 가닥을 RNase-비함유 10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA에 1 mM까지 재현탁시켰다. 이를 잘 혼합하여 재현탁을 완료하였다. 등용적의 센스 및 안티센스 가닥들을 온화한 와동(vortexing)에 의해 함께 혼합하였다. 합한 가닥들을 함유한 튜브를 95℃로 가열된 물의 비이커 내에 위치시켰다. 상기 비커를 덮개로 덮고 실온으로 냉각시켰다. 후속적으로 RNase-비함유 물을 사용하여 희석을 수행하였다. 일반적으로 24 웰 포맷을 위해, 스톱 용액을 10  $\mu$ M으로 희석시켰다. 분취액 어닐링된 saRNA를 분취하고 -20℃에서 저장하였다.
- [0469] 1차 간세포의 해동 및 플레이팅:
- [0470] CHRM 및 플레이팅 배지를 수조에서 37℃로 가온시켰다. 냉동보존된 간세포를 얼음 결정이 유지되지 않을 때까지 37℃ 수조에서 해동시켰다. 바이알을 70% 에탄올을 사용하여 소독하였다. 멸균 조직 배양 후드에서, 상기 해동된 간세포를 바로 CHRM로 이전시켰다. 간세포를 실온에서 10분 동안 100×g(Thermo F-G1 고정각 로터에서 900 rpm)으로 원심분리하였다. 상청액을 폐병에 조심스럽게 부었다. 펠렛을 1×106개의 냉동보존된 세포당 1 mL의 플레이팅 배지에 재현탁시켰다. NucleoCounter NC-200 응집된 세포 검정을 사용하여 세포를 계수하여 세포 생존성을 측정하였다. 2.0×105개 생존 세포를 24웰 플레이트 내의 웰당 500  $\mu$ L 플레이팅 배지에 플레이팅하였다.
- [0471] 역방향 형질감염(접종 직후)
- [0472] 각 웰을 형질감염되도록 하기 위해, 12  $\mu$ L의 10  $\mu$ M saRNA를 85  $\mu$ L Opti-MEM에 희석시켰다. 각 웰을 형질감염되도록 하기 위해, 3  $\mu$ L HiPerFect를 첨가하고 와동에 의해 잘 혼합하였다. 형질감염물을 실온에서 15분 동안 항온배양하였다. 100  $\mu$ L 형질감염 복합체를 200 nM의 최종 saRNA 농도를 위해 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 가습된 항온배양기 내에서 5% CO2를 이용하여 37℃에서 항온배양하였다. 5시간 후, 배지를 500  $\mu$ L 사전가온된 유지 배지로 교환하였다.
- [0473] 전방향 형질감염(접종 24시간 후):
- [0474] 각 웰을 형질감염되도록 하기 위해, 12  $\mu$ L의 10  $\mu$ M saRNA를 85  $\mu$ L Opti-MEM에 희석시켰다. 각 웰을 형질감염되도록

록 하기 위해, 3 $\mu$ l HiPerFect를 첨가하고 와동에 의해 잘 혼합하였다. 형질감염물을 실온에서 15분 동안 항온배양하였다. 항온배양 동안, 배지를 웰당 500 $\mu$ l의 새로운 사전가온된 유지 배지로 교환하였다. 100 $\mu$ l 형질감염 복합체를 200 nM의 최종 saRNA 농도에 대해 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 항온배양기로 복귀시켰다. 24시간 후, 배지를 500 $\mu$ l의 새로운 사전가온된 유지 배지로 교환하였다. 최고조의 유전자 활성화는 세포 접종 후 72시간째에 발생하였다. 이때 다운스트림 분석을 위해 세포 및/또는 상청액을 수집하였다.

[표 12-1]

Aha1-siRNA, Fluc 및 AW51 형질감염 후 48 시간째에서의 Aha1, 알부민 및 CEBPA 유전자의 상대적 발현

	Aha1 발현	알부민 발현	CEBPA 발현
비처리	1	1	1
Aha1	0.1	0.9	1.4
Flu	1.5	1.0	1.6
AW51	1.5	1.1	1.5

[표 12-2]

Aha1-siRNA, Fluc 및 AW51 형질감염 후 72 시간째에서의 Aha1, 알부민 및 CEBPA 유전자의 상대적 발현

	Aha1 발현	알부민 발현	CEBPA 발현
비처리	1	1	1
Aha1	0.1	0.6	1.0
Flu	0.8	0.7	1.4
AW51	0.9	0.65	1.6

분화하는 1차 인간 간세포에서의 saRNA 형질감염 프로토콜

1차 인간 간세포(LifeTechnologies, HMCPTS)를 분화 배지에 위치시켰다. 접종 당일에, 세포를 역방향 형질감염 단계에 적용시켰고, 이때 세포가 단일층으로서 부착하기 전에 saRNA 형질감염 복합체를 세포에 첨가하였다. 24 시간 후에, 배지를 교환하고, 전방향 형질감염을 수행하였다. 다음날, 배지를 교환하고, 분석을 위해 세포를 수거하기 전에 세포를 추가로 24시간 동안 항온배양하였다. 간세포를 AW51로 형질감염시켰다. CEBPA 및 알부민 mRNA 수준을 48시간째 및 72시간째에 측정하였다. Aha1-siRNA 및 Fluc를 대조군으로서 사용하였다. Aha1, 알부민, CEBPA 상대적 발현은 표 13 및 도 9B에 도시하였다.

재료

1차 간세포 해동 배지:

냉동보존된 간세포 회복 배지(CHRM), 50 mL(라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 CM7000)

1차 간세포 플레이팅 배지: 소 태아 혈청, 가열 불활성화됨 - 50 mL(라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 16140-071)

인슐린-트랜스페린-셀레늄(100X) - 5 mL(라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 41400-045)

HEPES(1M) - 5 mL(라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 15630-056)

L-글루타민-페니실린-스트렙토마이신 용액 - 5 mL(Sigma 카탈로그 번호 G1 146)

텍사메타손 - 40 ng/mL 최종 농도(Sigma 카탈로그 번호 D8893)가 될 때까지

윌리엄스 E 배지, 페놀 레드 없음 - 전체 500 mL(라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 A12176-01)가 될 때까지

1차 간세포 유지 배지:

- [0491] 1차 간세포 유지 보충물(라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 CM4000)
- [0492] 간세포 성장 인자 인간 - 40 ng/mL 최종 농도(Sigma 카탈로그 번호 H5791)가 될 때까지
- [0493] 상피 성장 인자 인간 - 20 ng/mL 최종 농도(Sigma 카탈로그 번호 E9644)가 될 때까지
- [0494] 니코틴아미드 - 2.5 $\mu$ g/mL 최종 농도(Sigma 카탈로그 번호 N0636)가 될 때까지
- [0495] 윌리엄스 E 배지, 페놀 레드 없음 - 전체 500 mL(라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 A12176-01)가 될 때까지
- [0496] 1차 간세포 배양 플레이트:
- [0497] 콜라겐 I, 코팅된 플레이트, 24웰(라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 A1 1428-02)
- [0498] 형질감염 시약:
- [0499] HiPerFect 형질감염 시약(Qiagen 카탈로그 번호 301704)
- [0500] Opti-MEM I 환원 혈청 배지, 페놀 레드 없음 (라이프 테크놀로지스 카탈로그 번호 11058-021)
- [0501] **프로토콜**
- [0502] **saRNA 어닐링:**
- [0503] 각각의 동결건조된 saRNA 가닥을 RNase-비함유 10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA에 1 mM까지 재현탁시켰다. 이를 잘 혼합하여 재현탁을 완료하였다. 등용적의 센스 및 안티센스 가닥들을 온화한 와동에 의해 함께 혼합하였다. 튜브를 합한 가닥들과 함께 95 $^{\circ}$ C로 가열된 물의 비이커 내에 위치시켰다. 상기 비커를 덮개로 덮고 실온으로 냉각시켰다. 후속적으로 RNase-비함유 물을 사용하여 희석을 수행하였다. 일반적으로 24웰 포맷을 위해, 스톱 용액을 10  $\mu$ M으로 희석시켰다. 어닐링된 saRNA를 분취하고 -20 $^{\circ}$ C에서 저장하였다.
- [0504] **1차 간세포의 해동 및 플레이팅:**
- [0505] CHRM 및 플레이팅 배지를 수조에서 37 $^{\circ}$ C로 가온시켰다. 냉동보존된 간세포를 얼음 결정이 유지되지 않을 때까지 37 $^{\circ}$ C 수조에서 해동시켰다. 바이알을 70% 에탄올을 사용하여 소독하였다. 멸균 조직 배양 후드에서, 상기 해동된 간세포를 바로 CHRM로 이전시켰다. 간세포를 실온에서 10분 동안 100 $\times$ g(Thermo F-G1 고정각 로터에서 900 rpm)으로 원심분리하였다. 상청액을 폐병에 조심스럽게 부었다. 펠렛을 1 $\times$ 10<sup>6</sup>개의 냉동보존된 세포당 1 mL의 플레이팅 배지에 재현탁시켰다. NucleoCounter NC-200 응집된 세포 검정을 사용하여 세포를 계수하여 세포 생존성을 측정하였다. 1.0 $\times$ 10<sup>5</sup>개 생존 세포를 24웰 플레이트 내의 웰당 500 $\mu$ L 플레이팅 배지에 플레이팅하였다.
- [0506] **역방향 형질감염(접종 직후):**
- [0507] 각 웰을 형질감염되도록 하기 위해, 3 $\mu$ L의 10  $\mu$ M saRNA를 94 $\mu$ L Opti-MEM에 희석시켰다. 각 웰을 형질감염되도록 하기, 3 $\mu$ L HiPerFect를 첨가하고 와동에 의해 잘 혼합하였다. 형질감염물을 실온에서 15분 동안 항온배양하였다. 100 $\mu$ L 형질감염 복합체를 50 nM의 최종 saRNA 농도에 대해 각 웰에 첨가하였다.
- [0508] 플레이트를 가습된 항온배양기 내에서 5% CO<sub>2</sub>를 이용하여 37 $^{\circ}$ C에서 항온배양하였다. 5시간 후, 배지를 500 $\mu$ L 사전가온된 유지 배지로 교환하였다.
- [0509] **전방향 형질감염(접종 24시간 후):**
- [0510] 각 웰을 형질감염되도록 하기 위해, 3 $\mu$ L의 10  $\mu$ M saRNA를 94 $\mu$ L Opti-MEM에 희석시켰다. 각 웰을 형질감염되도록 하기 위해, 3 $\mu$ L HiPerFect를 첨가하고 와동에 의해 잘 혼합하였다.
- [0511] 형질감염물을 실온에서 15분 동안 항온배양하였다. 항온배양 동안, 배지를 웰당 500 $\mu$ L의 새로운 사전가온된 유지 배지로 교환하였다. 100 $\mu$ L 형질감염 복합체를 50 nM의 최종 saRNA 농도를 위해 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 항온배양기로 복귀시켰다. 24시간 후, 배지를 500 $\mu$ L의 새로운 사전가온된 유지 배지로 교환하였다. 최고조의 유전자 활성화는 세포 접종 후 72시간째에 발생하였다. 이때 다운스트림 분석을 위해 세포 및/또는 상청액을 수집하였다.

[0512] [표 13-1]

Aha1-siRNA, Fluc 및 AW51 형질감염 후 48 시간째에서의 Aha1, 알부민 및 CEBPA 유전자의 상대적 발현

	Aha1 발현	알부민 발현	CEBPA 발현
비처리	1	1	1
Aha1	0.1	0.8	1.1
Flu	1.6	0.7	2.0
AW51	2.2	0.9	3.2

[0513]

[0514] [표 13-2]

Aha1-siRNA, Fluc 및 AW51 형질감염 후 72 시간째에서의 Aha1, 알부민 및 CEBPA 유전자의 상대적 발현

	Aha1 발현	알부민 발현	CEBPA 발현
비처리	1	1	1
Aha1	0.1	0.8	0.6
Flu	1.4	1.0	1.0
AW51	1.3	5.0	2.9

[0515]

[0516] 표 12 내지 13 및 도 9A/9B는, 간세포를 증식 배지에 노출시킬 경우에 CEBPA-saRNA가 간세포에서 CEBPA 및 알부민을 상향조절함을 보여준다. 따라서, CEBPA-saRNA는 증식 세포에서 효능을 나타낸다. siRNA는 증식 세포 및 비증식 세포 둘 다에서 효능을 나타낸다.

[0517] **실시예 5. CEBPA-saRNA를 이용한 시험관내 연구**

[0518] 간 세포주에서 CEBPA-51의 생물학적 효과

[0519] **연구의 목적:** 본 연구의 목적은 고도로 분화된 HCC(HepG2, Hep3B) 또는 불량하게 분화된 HCC(PLCPRF5)를 대표하는 HCC 세포주들에서 내인성 CEBPA 전사체 수준을 측정하고, CEBPA-51로 형질감염시킨 후 CEBPA mRNA 및 C/EBP- $\alpha$  단백질 발현의 상대적 증가를 측정하는 것이다. 또한, 세포 증식에 미치는 C/EBP- $\alpha$  상향조절의 효과를 평가하였다.

[0520] HEP3B, HEPG 및 PLCPRF5를 포함하는 간 세포주의 패널을 CEBPA-51로 형질감염시켰다. C/EBP- $\alpha$  단백질을 형질감염 후 72시간째부터 세포 용해물에서 웨스턴 블롯에 의해 검출하였다(정량: RC-DC 브래드포드(Bradford) 검정, 기준 단백질: 튜불린). CEBPA의 내인성 전사체 수준은 PLCPRF5 세포와 비교해 Hep3B 및 HepG2 세포에서 유의적으로 높았다. CEBPA-51로의 처리는, 비형질감염된 대조군 및 비특이적 RNA 듀플렉스(siFLUC)로의 처리와 비교해 모든 3종의 시험된 HCC 세포주에서 CEBPA mRNA 전사체 수준의 유의적 증가 및 증가된 C/EBP- $\alpha$  단백질 수준을 초래하였다(도 10A 및 10B).

[0521] 세포 증식을 WST-1 증식 검정 및 SRB 비색 검정으로 측정하였다. 결과는 도 11A 내지 11F에 도시하였다. CEBPA-51은 HEP3B 및 HEPG2 세포주에서는 대조군과 비교해 세포 증식을 감소시켰지만 PLCPRF5 세포에서는 세포 증식을 감소시키지 않았다. 따라서, HepG2 및 Hep3B 세포에서는 세포 증식을 억제하는 CEBPA-51의 능력이 확인되었다. 반대로, PLCPRF5세포는 CEBPA-51 처리에 의해 영향을 받지 않았다.

[0522] AW51의 표적-이탈 분석:

[0523] AW51의 특이성은 예측된 표적-이탈 부위로부터 확인되었다. 생물정보학 표적-이탈 분석을 수행하였다. AW51은 임의의 기타 인간 전사체와의 적어도 2개의 불일치를 갖는다. 오직 4개의 표적-이탈만이 예측되었으며 안티센스 가닥에 대한 2개의 불일치가 있었다. 표적 이탈은 24시간 항온배양했을 때 시험관내에서 HuH7 세포 및 Panc-1 세포에서 측정되었다. mRNA 수준을 gapdh에 대해 정규화하였고, 결과는 도 12A(HuH7 세포) 내지 12b(Panc-1 세포)에 도시하였다. AW51 형질감염 후에 잠재적 표적-이탈의 발현 패턴은 어떠한 유전자도 AW51에 의해 유의적으

로 영향을 받지 않음을 나타냈다.

[0524] **실시예 6. CEBPA-saRNA의 메카니즘 연구**

[0525] 가닥 선택/동정 및 절단 분석

[0526] 5' 말단에서의 역 비염기성 변형(inverted abasic modification)은 Ago2 복합체에서 가이드 위치로의 적재를 방지하는 것으로 나타났다. C/EBPA-saRNA의 안티센스 가닥(AS) 및 센스 가닥(SS)을 5' 말단(b)에서 역 비염기성 변형으로 차단시키고, C/EBPA mRNA 발현을 측정하고 C/EBPA mRNA 발현에 미치는 AS 및/또는 SS 가닥 차단 영향 측정하였다.

[0527] RNAi는 표적 mRNA의 절단을 수반한다. 비절단성 서열, 중심의 3개 염기쌍의 돌연변이를 시험하여(CEBPA-AW01-510500), CEBPA-saRNA가 표적 EST(AW665812)를 절단하는지 여부를 측정하였다. 중심의 3개 염기쌍의 돌연변이는, 어떤 가닥이 가이드로서 작용하는지에 상관없이, 절단 불가능한 saRNA를 생성시킨다.

[0528] 모든 saRNA를 물 속에서 합성하고 어닐링시켰다. RP-HPLC는 90% 순도를 갖는다. 올리고뉴클레오타이드 샘플의 서열을 다음 표에 도시하였다.

올리고 ID	서열 (상단의 SS)	서열번호	주
NC-500000	5' -ACUACUGAGUGACAGUAGAUU-3'	95	비표적화 '스크램블' (음성 대조군)
	3' -UUUGAUGACUCACUGUCAUCU-5'	96	
CEBPA-AW01-510000 (AW51, AW-51 또는 AW51)	5' -GCGGUCAUUGUCACUGGUCUU-3'	97	비변형된 'AW1-51' (양성 대조군)
	3' -UUCGCCAGUACAGUACCAG-5'	98	
CEBPA-AW01-510012	5' -bGCGGUCAUUGUCACUGGUCUU-3'	99	SS에서만 5' 역 무염기성 변형
	3' -UUCGCCAGUACAGUACCAG-5'	98	
CEBPA-AW01-510013	5' -GCGGUCAUUGUCACUGGUCUU-3'	97	AS에서만 5' 역 무염기성 변형
	3' -UUCGCCAGUACAGUACCAGb-5'	100	
CEBPA-AW01-510014	5' -bGCGGUCAUUGUCACUGGUCUU-3'	99	SS와 AS 둘 다에서의 역 무염기성 변형(음성 대조군)
	3' -UUCGCCAGUACAGUACCAGb-5'	100	
CEBPA-AW01-510500	5' -GCGGUCAUACACACUGGUCUU-3'	101	돌연변이된 3개 중심 염기쌍
	3' -UUCGCCAGUAUGUGUACCAG-5'	102	

[0529]

[0530] **중요 요약**

[0531] **형질감염.** 세포를 1 $\mu$ l 리포펙타민 2000(라이프 테크놀로지스, 캘리포니아주 칼스바드)를 이용하여 10 nM의 최종 올리고뉴클레오타이드 농도에서 24웰 디쉬 내에서 웰당 100,000개 세포로 형질감염시켰다. 동일한 조건을 전방향 및 역방향 형질감염을 위해 사용하였다.

[0532] **RNA 단리.** 전체 RNA를 제조업자의 프로토콜(Qiagen, 네덜란드 펜로)에 따라서 RNeasy 미니 키트를 사용하여 단리시켰다.

[0533] **상보적 DNA(cDNA) 합성.** cDNA를, 20 $\mu$ l 반응물(Qiagen) 중의 500 ng RNA와 함께 제조업자의 프로토콜에 따라서 Quantitect Reverse Transcription 키트를 사용하여 합성하였다.

[0534] **정량적 PCR.** 정량적 PCR을 제조업자의 프로토콜에 따라서 Applied Biosystems 7900HT 실시간 PCR 시스템(라이프 테크놀로지스)상에서 QuantiFast SYBR Green PCR 마스터 믹스(Qiagen)를 사용하여 수행하였다. 반응을 각 반응마다 12.5ng cDNA를 이용하여 삼중 웰에서 수행하였다.

[0535] **세포주**

[0536] HepG2 간세포 암종 세포를 37°C와 5% CO<sub>2</sub>에서 유지되는 항온배양기 내에서 10% 소태아 혈청 및 IX L-글루타민-페니실린-스트렙토마이신 용액(Sigma-Aldrich, 미주리주 세인트 루이스)이 보충된 RPMI 배지에서 유지시켰다.

[0537] **실험 디자인**

[0538] 실험을 삼중 웰에서 수행하였다. HepG2 세포를 24웰 디쉬에 접종하고, 리포펙타민 2000을 사용하여 10 nM(f.c.)의 각 시험 항목으로 역방향 형질감염시켰다. 24시간의 항온배양 기간 후, 추가의 전방향 형질감염 단계를 리포펙타민 2000을 사용하여 10 nM(f.c.)의 각 시험 항목으로 수행하였다. 예비 실험으로 최대 saRNA 활성이 두 번째 형질감염 후에 관찰된다는 것이 결정되었다. 두 번째 형질감염 후 48시간째에, 세포를 용해시키고 수집하여, 정량적 역전사-PCR(qRT-PCR)에 의해 CEBPA 및 알부민 mRNA 수준을 측정하였다.



- [0539] 데이터 평가
- [0540] 실시한 PCR 결과를  $\Delta \Delta Ct$  방법을 사용하여 분석하였다. Ct 값을 SDS 소프트웨어(라이프 테크놀로지스)를 사용하여 측정하고, 상대적 양을 비형질감염된 세포에 대한 정규화에 의해 계산하였다. 추가로, 하우스키핑 유전자(housekeeping gene) GAPDH를 내부 대조군으로서 사용하였다. 형질감염 실험을 삼중으로 수행하였다: qPCR의 측정을 삼중으로 수행하였다. 통계학적 유의성을 t검정과 웰치스 수정(Welch's correction)을 사용하여 측정하였다.
- [0541] 결과 및 논의
- [0542] 비형질감염된 세포와 비교해, 2 내지 2.5배 CEBPA mRNA 하향조절은 비변형된 AW1-51 서열, SS상에서 변형된 AW1-51(CEBPA-AW01-510012) 및 내부 서열 돌연변이를 갖는 AW1-51(CEBPA-AW01-510500)로 형질감염된 세포들에서 관찰되었고(도 13A),  $p < 0.01$ 에서 모두 통계학적으로 유의적이었다. 비특이적 대조군(NC-500000), AS상에서 변형된 AW1-51(CEBPA-AW01-510013) 또는 양 가닥 모두에서 변형된 AW1-51(CEBPA-AW01-510014)로 형질감염된 후에는 CEBPA mRNA의 하향조절이 관찰되지 않았다. 이러한 활성화 패턴과 일치하는 것은 CEBPA 전사 활성화를 위한 다운스트림 표적인 알부민 발현이며,  $p < 0.05$ 에서 통계학적으로 유의적이었다(도 13B).
- [0543] 5' 역 비염기성 변형은 가닥이 적재되는 것을 차단하는 것으로 공지되어 있고, 양 가닥 모두에 이러한 변형을 갖는 올리고, CEBPA-AW01-510014는 불활성인 것으로 예측된다. 이것은 실험에서 확인될 수 있다. 따라서, SS에서의 역 비염기성 변형을 이용하였을 때는 CEBPA 활성화가 관찰되지만 AS에서의 역 비염기성 변형을 이용하였을 때는 CEBPA 활성화가 관찰되지 않았다는 것은, AS가 CEBPA mRNA 발현을 촉발하기 위해 Ago2로 적재되는 가이드 가닥임을 가리킨다.
- [0544] Ago2에 의한 표적의 절단은 가이드 가닥과 표적 서열(해당 유전자로부터 발생한 게놈 DNA 또는 안티센스 RNA 전사체) 사이의 중요한 서열내 불일치에 의해 억제된다. 중요한 돌연변이를 함유하는 CEBPA-saRNA 서열(CEBPA-AW01-510500)은 돌연변이되지 않은 올리고와 비교하여 CEBPA 활성화의 차이를 나타내지 않았으며, 이것은 CEBPA 서열의 절단이 saRNA 활성을 위해 필요함을 가리킨다.
- [0545] 결론
- [0546] AW1-51의 안티센스 가닥이 saRNA 활성을 책임지는 가이드 가닥이라는 것이 입증되었다. 추가로, 센스 가닥상의 5' 역 비염기성 변형은 CEBPA 유전자 활성화에 어떠한 영향도 주지 않은 것으로 나타났다. 또한, Ago2에 의한 표적 안티센스 RNA 절단은 saRNA 활성을 촉발하기 위해 필요하지 않았다.
- [0547] **실시예 7. 1차 인간 간세포에서의 CEBPA-51 saRNA 활성**
- [0548] 이미 나타난 바와 같이, CEBPA-saRNA는 증식 간세포에서는 CEBPA mRNA 및 알부민 mRNA를 상향조절하지만 휴지기 간세포에서는 그렇지 않다(도 9A 및 도 9B). 본 연구에서는, 증식 간세포에 미치는 CEBPA-saRNA의 효과를 다시 평가하였고(도 14), 알부민 분비(도 15) 및 다운스트림 마커(도 16A 내지 도 16F)에 미치는 효과를 또한 연구하였다.
- [0549] 정상 인간 1차 인간 간세포에서의 CEBPA-51의 효과를 평가하였다. 배양물 중의 1차 간세포는 증식하지 않았기 때문에, 본 연구는 CEBPA-51가 성장 인자 및 사이토킨의 존재하에 증식하도록 유도되는 1차 간세포에서 CEBPA 전사체 및 알부민을 상향조절함을 입증한다. 추가로, 본 연구는 CEBPA-51이 효과적 간 기능에 매우 중요한 인자들의 조절을 유발함을 보여준다; 이러한 인자는 간 알라닌 글리옥실레이트 아미노트랜스퍼라제, 오르니틴 트랜스카바밀라제, 알부민, CYP3A4 및 HNF4A를 포함한다.
- [0550] 본 연구의 목적은 CEBPA 및 알부민 발현에 미치는 정상 인간 1차 간세포에서의 CEBPA-51의 효능을 확립하는 것이다. 추가로, 간 기능에 중요한 인자들을 또한 스크리닝하여, CEBPA-51가 유리한 효과를 부여하였는지 여부를 평가하였다. 이러한 인자들은 다음을 포함하였다:
- [0551] - 알라닌-글리옥실레이트 아미노트랜스퍼라제(AGXT). AGXT 발현은 간 특이적이고 간세포의 대사 기능을 위해 요구된다.
- [0552] - 알부민. 혈청 알부민은 인간 혈장의 주요 단백질이며 오로지 간에 의해서만 합성된다. 이의 주요 기능은 혈액의 교질 삼투압을 조절하는 것뿐만 아니라 지용성 호르몬, 담즙산염, 비접합된 빌리루빈, 아포단백질, 칼슘 및 특정 약물(와파린, 클로피브레이트 등)에 대한 운반체로서 작용하는 것이다.
- [0553] - 시토크롬 P450 3A4(CYP3A4Y). CYP3A4는 약물 대사작용에 관여하는 산화 효소의 시토크롬 P450 계열의 구성원

이다. CYP3A4는 주로 간에서 발견된다. 이러한 시토크롬 P450 계열의 몇몇 다른 구성원들이 있지만, CYP3A4가 가장 흔하고 다재다능한 구성원이다.

[0554] - 오르니틴 트랜스카바밀라제(OTC). OTC는 카바모일 포스페이트와 오르니틴 간의 반응을 촉매하여 우레아 사이클의 부분으로서 미토콘드리아에서 시트룰린과 포스페이트를 형성하는 효소이다.

[0555] - 간세포 핵 인자 4- $\alpha$  (HNF4A). HNF4A는 지질 수송 및 약물과 글루코스 대사작용에 관여하는 유전자에 대한 간-특이적 전사 인자의 마스터 조절인자로서 인식되는 간 특이적 전사 인자이다.

[0556] CEBPA-51의 표적 관여(target engagement)를 확인하기 위해, CEBPA 및 알부민 전사체 수준이 또한 간 기능 프로브와 함께 확인되었다. 추가로, 알부민 특이적 항체를 이용한 ELISA를 수행하여, CEBPA-51로의 형질감염 후 세포 배양 배지에서 알부민 분비를 측정하였다.

[0557] 재료 및 방법

[0558] 본 실험을 위한 시험 항목은 MTL-CEBPA의 API인 CEBPA-51이었다. 또한, 비표적화 듀플렉스인 siFLUC를 음성 대조군으로서 사용하였고 형질감염 효율 대조군으로서 Aha-1 siRNA를 사용하였다. 이러한 RNA 올리고뉴클레오타이드(하기 표 참조)들은 상업적으로 합성하였고(ST Pharm, 대한민국 서울, 부록의 분석증명서), 어닐링하고, -20℃에서 RNase-비함유 H<sub>2</sub>O 중 10  $\mu$ M 분취액 중에서 저장하였다.

올리고 ID	서열 (상단의 SS)	서열번호	주
siFLUC	5' -mCmUmUAmCGmCmUGAGmUAmCmUmCGAdTpsdT-3'	103	비표적화 대조군
	3' -dTpsdTGAAmUGCGAmCUCAmUGAAGCU-5'	104	
Aha1-siRNA	5' -GGAmUGAAGmUGGAGAmUmUAGmUdTpsdT-3'	105	형질감염 효율 대조군
	3' -dTpsdTCCUAmCCUAmCCUUAAmUCA -5'	106	
CEBPA-51	5' -bmGmCGmGUCAUUmGUCAmCUGGUCmUmU-3'	107	MTL-CEBPA 의 API
	3' -mUmUCGCCAGUAACAGUGACCAG-5'	108	

[0559]

[0560] b: 5' 역 비염기성 당 캡

[0561] m: 2'-O-메틸 변형된 염기

[0562] d: 데옥시리보뉴클레오타이드

[0563] ps: 포스포로티오에이트

[0564] 중요 시약

[0565] 1차 간세포 해동 배지. 냉동보존된 간세포 회복 배지(CHRM)를 각 바이알(라이프 테크놀로지스, CM7000)을 해동하기 위해 사용하였다.

[0566] 1차 간세포 플레이팅 배지. 소태아 혈청, 가열 불활성화된-50ml(라이프 테크놀로지스, 16140-071 );인슐린-트랜스페린-셀레늄(100x)-5ml(라이프 테크놀로지스, 41400-045); HEPES(1M)-5ml(라이프 테크놀로지스, 15630-056); L-글루타민-페니실린-스트렙토마이신 용액-5ml(Sigma, G1146); 텍사메타손-40ng/ml 최종 농도(Sigma, D8893); 페놀 레드 비함유 윌리엄스 E 배지(라이프 테크놀로지스, A12176-01).

[0567] 1차 간세포 유지 배지. 1차 간세포 유지 Supplement (라이프 테크놀로지스, CM4000); 인간 간세포 성장 인자-40ng/ml 최종 농도 (Sigma, H5791); Epidermal 성장 인자- 20ng/ml 최종 농도 (Sigma, E9644), 니코틴아미드-2.5ug/ml 최종 농도 (Sigma N0636); 페놀 레드 free 윌리엄스 E 배지- 500ml (라이프 테크놀로지스, A12176-01).

[0568] 형질감염. 24웰 콜라겐 코팅된 디쉬에서 50 nM의 최종 올리고뉴클레오타이드 농도에서 웰당 100,000개 세포로 3  $\mu$ l의 HiPerFect 형질감염 시약(Qiagen, 301704)을 사용하여 세포를 형질감염시켰다. 세포를 플레이팅 배지에서 5시간 동안 항온배양하여 유지 배지로 교체하기 전에 단일층이 형성되도록 하였다. 두번째 (전방향) 형질감염을 위해, 역방향 형질감염과 동일한 조건을 사용하였다. 유지 배지는 실험의 유지 기간 동안 사용하였다.

[0569] RNA 단리. 전체 RNA를 제조업자의 프로토콜(Qiagen, 네덜란드 펜로)에 따라서 RNeasy 미니 키트를 사용하여 단리시켰다.

[0570] 상보적 DNA(cDNA) 합성. cDNA를 제조업자의 프로토콜에 따라서 Quantitect Reverse Transcription 키트

(Qiagen)를 사용하고 20 $\mu$ l 반응물 중의 500 ng RNA를 사용하여 합성하였다.

- [0571] 정량적 PCR. 정량적 PCR을 제조업자의 프로토콜에 따라서 Applied Biosystems 7900HT 실시간 PCR 시스템(라이프 테크놀로지스)상에서 Quantitect SYBR Master Mix (Qiagen)를 사용하여 수행하였다. 반응을 삼중 웰에서 수행하였다.
- [0572] 알부민 효소 연계된 면역흡착 검정(ELISA). 각 실험 그룹에서 항온배양된 1차 세포로부터의 배양 배지를 제조업자의 지침에 따라서 인간 알부민 ELISA 정량 세트(Bethyl Laboratories Inc, 미국)를 사용하여 알부민 함량에 대해 측정하였다. 알부민에 대한 인간 특이적 항체를 Costar-3596-96웰 플레이트-(평저, TC 처리된, 비피로겐, 폴리스티렌, 멸균 플레이트(Corning, 미국)의 각 웰에 고정시켰다. 사내에서 제조된 시약은 다음을 포함하였다:
- [0573] ELISA 플레이트 코팅 완충액. 0.05M 카보네이트-바이카보네이트, (Sigma, C-3041) pH 9.6.
- [0574] ELISA 세척 완충액. 50mM Tris; 0.14M NaCl; 0.05% Tween 20(Sigma, P1379) pH 8.0).
- [0575] ELISA 차단 완충액. 50mM Tris; 0.14M NaCl; 1% BSA(Sigma, A-4503), pH8.0).
- [0576] 샘플/접합제 완충액. 50mM Tris; 0.14M NaCl; 1% BSA(Sigma, A-4503); 0.05% Tween 20 (Sigma, PI 379).
- [0577] 효소 기질 완충액. 3,3', 5,5' 테트라메틸벤지딘(Sigma, T0440). ELISA 중지 용액. (Sigma, S5814).
- [0578] 세포주
- [0579] 인간 정상 1차 간세포를 라이프 테크놀로지스(HMCPTS)로부터 구입하였다. 모든 반복물은 동일한 배치로부터 유도되었다(HU8200-A).
- [0580] 실험 디자인
- [0581] 상대적 유전자 발현
- [0582] 표적 전사체의 상대적 정량을 위해, 실험을 삼중으로 수행하였다. 세포를 여전히 현탁액 중에 있도록 하면서(역방향 형질감염) 50nM(f.c)의 CEBPA-51로 초기 형질감염시킨 후, 인간 1차 간세포를 1차 간세포 플레이트링 배지에서 웰당 100,000개 세포의 밀도로 24 콜라겐-코팅된 웰 디쉬(라이프 테크놀로지스, A11428-02)에 접종시켰다. 이어서, 플레이트링 배지를 유지 배지로 대체하기 전에 세포를 5시간 동안 단일층을 형성하도록 하였다. 역방향 형질감염 후 24시간째에, 두번째(전방향) 형질감염을 50nM의 CEBPA-51을 사용하여 수행하였다. 역방향 형질감염 후 72시간째의 수거 시점까지 24시간마다 새로운 유지 배지로 대체시켰으며, 이때 세포로부터 추출된 전체 RNA를 유전자 발현에 대해 스크리닝하였다.
- [0583] ELISA
- [0584] 본 연구의 72시간 시점에서 배양 배지를 ELISA를 위해 96웰 플레이트의 웰에 고정된 인간 특이적 항-알부민(Bethyl Laboratories, A80-129A)을 사용하여 수거하였다. 표준 곡선의 공지된 알부민 양(Bethyl Laboratories, RSI 0-110-4)을 10 $\mu$ g/ml; 400ng/ml; 200ng/ml; 100ng/ml; 50ng/ml; 25ng/ml; 12.5ng/ml 및 6.25ng/ml에서 첨가하였다. 샘플 및 공지된 대조 양을 실온(20 내지 25 $^{\circ}$ C)에서 3시간 동안 회전 플레이트상의 ELISA 플레이트에서 항온배양되도록 하였다. 제조업자의 프로토콜에 상세히 열거된 바와 같이 적절한 횟수의 세척 후, HRP 검출 항체(Bethyl Laboratories, A80-129P)를 1:150,000의 농도로 첨가하고 실온(20 내지 25 $^{\circ}$ C)에서 회전 플레이트상에서 3시간 동안 항온배양하였다. 5회 세척 후, TMB 기질을 첨가하고, 효소 색상 반응이 전개될 때까지 실온에서 항온배양하였다. ELISA 중지 용액을 첨가하여 반응을 중지시키고, 이때 450nm의 광학 밀도에서의 흡광도를 플레이트 리더에서 측정하였다.
- [0585] 데이터 평가
- [0586] 상대적 발현
- [0587] 실시간 PCR 결과를 Livak 방법(2<sup>-</sup>ΔΔCT)(Livak K & Schmittgen TD, 2001)을 사용하여 분석하였다. Ct 값을 SDS 소프트웨어(라이프 테크놀로지스)를 사용하여 측정하고, 상대적 양을 비형질감염된 세포에 대한 정규화에 의해 계산하였다. 하우스키핑 유전자 GAPDH는 내부 대조군으로서 사용된다. 형질감염 실험을 삼중으로 수행하였다; qPCR의 측정을 삼중으로 수행하였다. 통계학적 유의성을 비모수 t검정과 웰치스 수정을 사용하여 측정하였다.
- [0588] ELISA
- [0589] 미지의 샘플 중의 인간 알부민의 양을 측정하기 위한 표준 곡선을, 곡선-피팅 소프트웨어(엑셀)를 사용하여, 수

직(Y)축상의 각 표준 농도 대 수평(X)축상의 상응하는 인간 알부민 농도에 대해 블랭크 값을 제외한 평균 흡광도 값으로서 작성하였다. 미지의 샘플 중의 인간 알부민 농도의 양을 미지의 샘플에 대해 수득된 흡광도 값(Y축)과 상관관계가 있는 인간 알부민 농도(X축)를 사용하여 계산하였다.

[0590] 결과 및 논의

[0591] 1차 인간 간세포로의 CEBPA-51의 형질감염은 CEBPA 전사체 수준뿐만 아니라 알부민의 유의적 2.5배 증가를 유도한다(도 14A 및 14B). 효율적 형질감염 효율을 확인하기 위해, Aha1-siRNA를 대조군으로서 사용하였고 이는 표적 전사체의 7배 감소를 나타냈다(도 14C).

[0592] 정상 인간 1차 간세포에서의 CEBPA-51의 생물학적 효과

[0593] CEBPA-51 형질감염 후 CEBPA 전사체의 내인성 발현 수준의 증가를 확인한 후, 세포로부터의 배양 배지를 분비된 알부민 수준에 대해 측정하였다. 인간 특이적 항-알부민 항체를 사용한 ELISA 검정은 간세포로부터 알부민 분비의 유의적 1.3배 증가를 확인시켜 주었다(도 15).

[0594] 증가된 CEBPA 및 알부민 전사체 수준이 또한 간 기능에 중요한 인자의 양성적 조절을 반영하였는지 여부를 평가하기 위해, 잇따른 전사체의 발현 수준을 CEBPA-51로 형질감염된 1차 간세포에서 평가하였다: 도 16A 알라닌-글리옥실레이트 아미노트랜스퍼라제(AGXT)는 1.4배 증가하였다; 도 16B 알부민은 1.5배 증가하였다; 도 16C 시토크롬 P450 3A4(CYP3A4)는 1.5배 증가하였다; 도 16D 오르니틴 트랜스카바밀라제(OTC)는 2.3배 증가하였다; 도 16E 간세포 핵 인자 4- $\alpha$  (HNF4A)는 1.5배 증가하였다; 도 16F CEBPA는 1.6배 증가하였다.

[0595] 결론

[0596] CEBPA는 간에 풍부한 중요한 전사 인자로서 인식된다. 이의 생물학적 기능은 넉아웃 및 넉인 트랜스제닉 동물 연구에서 보다 명백해지고 있다. 본 연구는 CEBPA-51의 전사적 반응이 정상 인간 1차 간세포에서 간세포 기능과 더욱 관련된 CEBPA 및 이의 다운스트림 이펙터의 하향조절을 유도함을 입증한다. 정상 1차 간세포는 CEBPA-51 형질감염에 유리하게 반응하는데, 알부민 분비가 유의적으로 증가되고 해독 효소들의 유의적으로 상향조절된 것으로 밝혀졌다.

[0597] 실시예 8. 시노물구스 섬유아세포에서의 CEBPA-saRNA saRNA 활성

[0598] 세포주

[0599] 1차 시노물구스 간세포를 프리마사이트 셀 테크놀로지(Primacyt Cell Technology)(독일 슈베린)로부터 입수하였다. CYNOM-K1 시노물구스 배아 섬유아세포(Public Health England, 영국 솔즈베리)를 37°C와 5% CO<sub>2</sub>에서 유지되는 항온배양기 내에서 10% 소태아 혈청, 1% 비필수 아미노산(라이프 테크놀로지스) 및 1X L-글루타민-페니실린-스트렙토마이신 용액(Sigma- Aldrich, 미주리주 세인트 루이스)가 보충된 MEM 배지에서 유지시켰다. 교차반응성을 확인하기 위해 시노물구스 세포에서 CEBPA mRNA를 상향조절하는 CEBPA-51의 능력을 평가하였다. 먼저, CEBPA-51 표적 부위에서의 시노물구스 게놈 서열을 검증하였다. 상기 서열은 공개적으로 입수가 가능한 데이터베이스로부터 접근되었을 뿐만 아니라 gDNA-유래의 PCR 산물의 직접적 서열분석에 의해 검증되었다. CEBPA51 표적 서열을 BLAST를 사용할 때의 마카카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*)(시노물구스 원숭이) 게놈에 대한 질의 검색으로서 사용하였다. 질의를 CEBPA의 게놈 위치에 대해 맵핑하였으며, CEBPA-51의 서열과 게놈 표적 부위 간에 불일치는 없었다. 이러한 서열 정보를 검증하기 위해, gDNA를 1차 시노물구스 간세포로부터 단리시켰고, 직접적 서열분석을 위해 표적 부위의 PCR 생성물을 생성시켰다. 생성된 서열은 공개된 시노물구스 게놈 서열 및 CEBPA-51 표적 부위에 대한 불일치 없이 정렬된다.

[0600] 시노물구스 게놈 표적 서열을 확인한 후, CEBPA-51가 교차-반응성이고 간세포 이외의 세포에서 CEBPA mRNA를 상향조절할 수 있는지 여부를 결정하기 위해 CEBPA-51을 시노물구스 섬유아세포 내로 형질감염시켰다. 비형질감염된 세포, siFLUC 형질감염된 세포 및 CEBPA51 형질감염된 세포에서의 mRNA 수준을 측정하였다. 실험은 삼중으로 수행하였다. CYNOM-K1 세포를 웰당 100,000개 세포로 24웰 디쉬에 접종시키고 리포펙타민 2000을 사용하여 20 nM(f.c.)의 각 시험 항목으로 역방향 형질감염시켰다. 24시간의 항온배양 기간 후, 추가의 전방향 형질감염 단계를 리포펙타민 2000을 사용하여 20 nM(f.c.)의 각 시험 항목으로 수행하였다. 예비 실험에 의해, 최대 saRNA 활성은 두번째 형질감염 후에 관찰된 것으로 결정되었다. 두번째 형질감염 후 24시간째에, 세포를 용해시키고 수집하여 정량적 역전사-PCR (qRT-PCR)에 의해 CEBPA mRNA 수준을 측정하였다. 도 17에 도시된 바와 같이, 세포를 CEBPA-51로 재차 형질감염시킨 후 24시간째에 비형질감염된 세포와 비교해, 2배의 CEBPA mRNA 상향조절이 관찰되었고, 한편 siFLUC를 사용하였을 때 상향조절은 관찰되지 않았다. 이러한 상향조절은  $p < 0.05$ 에서 통계학



적으로 유의적이다.

- [0601] 따라서, CEBPA-saRNA의 교차-반응성이 시노물구스 세포주에서 확인되었다. 시노물구스의 게놈 서열은 BLAST 데이터베이스에 따르면 CEBPA-51 표적 서열과의 불일치를 함유하지 않는다. 이는 1차 시노물구스 gDNA의 서열분석에 의해 추가로 검증되었다. 이어서, CEBPA-51의 교차-반응성이 시노물구스 섬유아세포에서의 형질감염 및 CEBPA 유전자 활성화에 의해 확인되었다.
- [0602] **실시예 9. 래트, 시노물구스 원숭이 및 인간 혈청에서의 시험관내 안정성 분석**
- [0603] 본 연구는 37℃에서 120분에 걸쳐서 EDTA-K2로 응고 방지된 래트, 시노물구스 원숭이 및 인간 혈청에서 CEBPA-51의 안정성 및 리포솜-제형화된 MTL-CEBPA를 조사하는 시험관내 안정성 분석이다.
- [0604] PBS 중의 3 $\mu$ l의 50uM CEBPA-51 용액 또는 3 $\mu$ l의 MTL-CEBPA 용액을 30 $\mu$ l의 혈장과 혼합하고 37℃에서 0, 5, 10, 20, 30, 60 및 120분 동안 혈장 중에서 항온배양하였다. PBS 중의 3 $\mu$ l의 CEBPA-51 용액 또는 30 $\mu$ l PBS 중의 3 $\mu$ l MTL-CEBPA 용액의 항온배양은 비특이적 분해에 대한 대조군으로서 사용하였다. 항온배양은 에펜도르프 마스터사이클러(Eppendorf Mastercycler) 내의 밀봉된 96웰 PCR 플레이트에서 수행하였다. 항온배양은 혈장 샘플에 존재하는 모든 뉴클레아제를 분해하는 프로테이나제 K 처리에 의해 지시된 시점에서 중지하였다. 프로테이나제 K 처리 후, CEBPA-51은 샘플 및 SDS를 함유하는 용해 완충액 중에서 안정하고, CEBPA-51은 MTL-CEBPA 중의 LNP 제형으로부터 방출된다.
- [0605] 이어서, 샘플을 변성 조건 하에 상승된 pH(11) 및 40℃에서 ThermoFisher DNA Pac PA200 컬럼(4x250 mm)상에서 일반적 AEX-HPLC 방법에 의해 분석하였다. 1 mL/min의 유속에서 18분 동안 250 내지 620 mM의 브롬화나트륨 구배를 사용하여 RNA 가닥을 HPLC 컬럼으로부터 분리시키고 용출시켰다. 검출을 260nm에서 UV 검출기로 수행하였다.
- [0606] 이러한 조건들하에, 단독의 CEBPA-51 또는 MTL-CEBPA로부터 방출된 CEBPA-51의 2개의 단일 가닥들을 서로 그리고 분해 산물로부터 분리시켰고, 뚜렷이 다른 피크로서 평가할 수 있었다. 기준 단일 가닥을 이용할 수 없었고 AEX-HPLC를 질량분광분석법과 병용할 수 없었기 때문에, 2개의 단일 가닥의 배정은 불가능하였다. 따라서, 상기 2개의 가닥을 구배 용출 동안 체류 시간에 따라서 제1 가닥 및 제2 가닥으로 표지하였다. 데이터 평가를 위해, 단독의 CEBPA-51 및 MTL-CEBPA 중의 CEBPA-51을 평가하였다. T=0에서의 피크 면적을 100%로 설정하고, 모든 다른 시점을 각 종의 혈장에 대한 T=0에서의 피크 면적에 대해 정규화하였다. 이어서, 데이터를 T=0에 대해 정규화된 온전한 가닥 %로서 보고하였다.
- [0607] 결과
- [0608] 제형화 없는 CEBPA-51:
- [0609] CEBPA-51은 EDTA로 응고방지된 래트 혈장 중에서 비교적 안정하고, 첫번째 피크의 15% 분해 및 두번째 피크의 8% 분해가 관찰되었다(도 18A 참조). CEBPA-51은 인간 혈장 중에서 2시간에 걸쳐서 약 50%까지 분해된다(도 18B 참조). CEBPA-51은 시노물구스 원숭이 혈장 중에서 최소로 안정하며, 두 가닥 모두의 약 85%가 2시간 이내에 분해되었다(도 18C 참조).
- [0610] 데이터는 단독의 CEBPA-51이 인간 및 시노물구스 원숭이 혈장 중에서 덜 안정하지만 래트 혈장 중에서는 2시간에 걸쳐서 비교적 안정함을 입증한다. 어떠한 이론에도 구애받지 않고, 래트 혈장 중에서, RNA의 분해는 이가 양이온에 의존하는 3'-엑소뉴클레아제에 의해 주로 유도된다. 따라서, 응고방지제로서 EDTA의 사용은 이러한 분해 경로를 효율적으로 차단하며, CEBPA-51은 비교적 안정하다. 대조적으로, 인간 및 시노물구스 원숭이 혈장에서의 주요 분해 경로는 RNase A에 의존한다. 이러한 엔도뉴클레아제의 활성은 이가 양이온과 독립적이며 따라서 리포솜 제형에 의한 보호가 없는 상태의 CEBPA-51은 상기 종들의 혈장 중에서 분해된다.
- [0611] 리포솜 제형화된 CEBPA-51 :
- [0612] MTL-CEBPA 중의 CEBPA-51은 모든 종들의 혈장 중에서 2시간에 걸쳐서 안정하였고 유의적 분해는 관찰되지 않았다(도 19A, 19B 및 19C 참조). 이는 MTL-CEBPA 중의 LNP 제형이 2시간에 걸쳐서 안정하며 혈장 중 분해로부터 CEBPA-51을 완벽하게 보호한다는 것을 가리킨다.
- [0613] 본 결과로부터, MTL-CEBPA 제형이 혈장 중에서 적어도 2시간에 걸쳐서 온전하다고 결론지을 수 있다.
- [0614] **실시예 10. 래트에서의 생체내 약동학**



- [0615] 본 연구는, 그룹 1에서 2.175 mg/kg MTL-CEBPA를 1회의 단일 IV 적용하고 그룹 2에서 1.5 mg/kg CEBPA-51을 1회의 단일 IV 적용한 후 래트 혈장 샘플 중의 CEBPA-51 및 리포솜-제형화된 MTL-CEBPA를 조사하는 PK 연구이다. 각 그룹은 3마리의 수컷 래트로 구성되었다. 두 그룹 모두에 대해 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, 24시간 및 48시간 후에 채혈하였다.
- [0616] 혈장의 분취액을 SDS 함유 완충액 시스템에서 프로테이나제 K 처리에 의해 균질화하였다. 프로테이나제 K 분해 후, 3M KCl를 이용하여 SDS를 침전시키고 원심분리하여 제거하였다. 상청액을 상보적 15량체 형광 표지된 펩타이드 핵산(PNA)-프로브의 존재하에 가열하여, PNA와 단독의 CEBPA-51 또는 리포솜 제형화된 MTL-CEBPA로부터 방출된 CEBPA-51의 안티센스 가닥 간의 안정한 듀플렉스를 특이적으로 형성시켰다. PNA는 CEBPA-51(본 실시예에서 모 화합물로서 언급됨) 간에 듀플렉스를 형성시켰지만, 합성으로부터의 대사산물 또는 불순물도 형성되었다. 이어서, 형성된 듀플렉스를 형광 검출기에 결합된 비-변성 음이온 교환-고성능 액체 크로마토그래피(AEX-HPLC)에 의해 분석하였다. 대사산물 또는 합성 불순물을 AEX-HPLC에 의해 주요 화합물로부터 분리시켰다.
- [0617] CEBPA-51의 농도를 미처리된 혈장 용해물에 첨가된 모 화합물의 공지된 농도로부터 생성된 외부 보정 곡선을 사용하여 계산하였다. 총 피크 면적에서 모 화합물의 피크 면적을 공제하여 각 샘플에 대한 총 대사산물/합성 불순물 수준을 측정하였다. 이어서, 생성된 피크 면적을 외부 보정 곡선에 대해 정량하였다.
- [0618] 결과
- [0619] 제형화 없는 CEBPA-51:
- [0620] CEBPA-51로 처리된 래트로부터 수득된 혈장 중에서 모 화합물의 고 분해가 관찰되었다. 모 화합물은 첫번째 샘플링 시점(투여 후 15분째, 도 20A 및 20B를 참조)에서만 검출되었다. 대사산물은 60분째까지 검출되었지만, 투여 후 2시간째에는 검출 한계치 미만(BDL)이었다.
- [0621] 리포솜 제형화된 CEBPA-51:
- [0622] MTL-CEBPA 제형은 혈장 중에서 높은 안정성을 나타냈다. 모 화합물은 MTL-CEBPA로 처리된 래트로부터 수득된 모든 혈장 용해물에서 발견되었다. 모 화합물과 대사산물 간의 비는 약 9:1, 즉, 리포솜 제형화된 그룹에서의 온전한 모 화합물의 약 88%이었다. 이후의 시점들에서, 시그널이 크로마토그램에서 대부분의 작은 부위 피크에 대한 검출 한계치 미만이었으므로, 모 화합물의 상대적 함량은 "대사산물/불순물"에 비하여 증가되었다(도 21A 참조). 투여 후 48시간째에 CEBPA-51은 래트 혈장 중에서 여전히 검출 가능하였다(도 21A 및 21B 참조).
- [0623] 본 연구는, 검출된 RNA의 약 10%를 차지하는 MTL-CEBPA의 IV 투여 후 관찰된 대사산물이 강력한 대사작용보다는 RNA 합성 과정에서 비롯될 수 있음을 제시한다. 그러나, 비-캡슐화된 화합물(CEBPA-51)과의 비교가 비제형화된 CEBPA-51의 혈장 불안정성 및 극도로 빠른 청소율로 인해 실현할 수 없기 때문에, dsRNA의 대사적 전환이 배제될 수 없다.
- [0624] **실시예 11. CEBPA-saRNA를 이용한, CCL4 유도성 간 부전증/섬유증의 생체내 연구**
- [0625] 간 섬유증은 만성 바이러스성 간염(예: B형 및 C형 간염), 알코올 남용, 약물 과량복용/독성, 담즙정체 간 손상, 간세포의 선천성 이상 또는 자가면역 공격과 같은 만성 염증성 간 질환의 병리학적 결과이다. 이것은 세포외 기질(ECM) 및 콜라겐의 침착을 초래하는 간 정상세포(hepatic stellate cell)(HSC) 증식 및 간섬유모세포-유사 세포로의 분화를 특징으로 한다. 사염화탄소(CCL4) 유도성 간 섬유증은 잘 확립되어 있으며 간 섬유증 및 간경화증 연구를 위해 널리 채택되는 설치류 실험 모델이다. 래트에게 사염화탄소를 만성으로 투여하면 심각한 간 기능 장애와 함께 조직학적으로 관찰 가능한 간 섬유증이 유도된다.
- [0626] 10주간의 긴 연구를 MTL-CEBPA로서 언급되는 양쪽성 리포솜(NOV340 Smarticle 리포솜(공급원: Marina Biotech))으로 제형화된 CEBPA51로 수행하였다. CEBPA51(XD-03934)는 AW51와 동일한 서열을 갖지만, 센스 가닥 상에 2'-O-Me 및 5' 역 비염기성 변형을 갖는다. NOV340은 Mochol, Chems, DOPE, 및 POPC를 포함한다. 스프래그 다울리(Sprague Dawley) 래트의 간 부전은 사염화탄소(CCL4)를 주 2회 복강내 투여함으로써 유도하였다. 출발 체중이 120 내지 150g인 수컷 스프래그 다울리 래트들을 사용하였다. 상기 동물들에게 CCL4: 올리브유(1:1 비)의 주사액을 주 2회 동안 1주일에 2 ml/kg으로 주 2회 복강내 투여한 다음, 8주 동안 주 2회 1 ml/kg를 복강내 투여하였다. 동물을 주 2회 칭량하고 22 ± 3°C 온도, 50 ± 20% 습도, 각각 12시간의 명/암 주기 및 시간당 15 내지 20회의 신선한 공기 변화의 제어된 환경에서 유지시켰다. 연구 기간 동안 동물을 그룹 단위(3마리 동물/케이지)로 사육하고, 오토클레이브된 콘코브를 깔개로서 사용하고, 인증된 방사능 처리된 실험실 설치류 식이(Irradiated Laboratory Rodent Diet)(Nutrilab brand, Tetragon Chemie Pvt. Ltd, 방갈로르))를 자율 급식하

였다.

CEBPA51 안티센스 (X11283)	GACCAGUGACAAUGACCGCuu	서열번호 109
CEBPA51 센스 (X11273)	(역 무염기성)gcGgUCAUUGUCAcUGGUCuu (소문자는 2' O-Me 변형을 나타낸다)	서열번호 110

[0627]

[0628]

랫트들을 빌리루빈, 체중 및 AST에 기초하여 무작위화하였다. 랫트들을 그룹 1: 삼 대조군; 그룹 2: 경로 대조군(Path control)-1; 그룹 3: 경로 대조군-2; 그룹 4: 시험 화합물 -0.3 mg/kg; 그룹 5: 시험 화합물 -1 mg/kg; 그룹 6: 시험 화합물 -3 mg/kg으로 그룹화하였다. 시험 화합물 = MTL-CEBPA. 그룹 4 내지 6의 랫트들은 CCL4를 지속적으로 주사하면서 8주째부터 시작하여 2주 동안 시험 화합물로 최대 3 mg/kg까지 꼬리 정맥 주사를 통해 처리하였다. 그룹 3의 랫트들에게는 NOV340/siFLUC를 3 mg/kg로 투여하였다. 시험 화합물은 8주째, 8.5주째, 9주째 및 9.5주째에 정맥내 주사하였다.

그룹 번호	그룹	CCL4 투여 기간	처리	경로	투약 용법	n	안락사
1	삼	-	-	-	-	5	10 주
2	Path 대조군 -1	8 주 동안 투여되는 CCL4	-	-	-	9	10 주
3	Path 대조군 -2	10 주 동안 투여되는 CCL4	비히클	정맥내	8 주째, 8.5 주째, 9 주째 및 9.5 주째	9	10 주
4	시험 화합물	10 주 동안 투여되는 CCL4	0.3 mg/kg	정맥내	8 주째, 8.5 주째, 9 주째 및 9.5 주째	9	10 주
5	시험 화합물	10 주 동안 투여되는 CCL4	1 mg/kg	정맥내	8 주째, 8.5 주째, 9 주째 및 9.5 주째	9	10 주
6	시험 화합물	10 주 동안 투여되는 CCL4	3 mg/kg	정맥내	8 주째, 8.5 주째, 9 주째 및 9.5 주째	9	10 주

[0629]

[0630]

경로 대조군-1 그룹에서 간 기능 시험, 하이드록시프롤린 수준 및 조직병리학을 수행하여 8주간의 CCL4 투여 후 섬유증 상태를 평가하였다. 경로 대조군-2 그룹에서 간 기능 시험, 하이드록시프롤린 수준 및 조직병리학을 수행하여 10주간의 CCL4 투여 후 섬유증 상태를 평가하였다. 시험 화합물의 효능을 질환의 진행을 제한하거나 섬유증을 역전시키는 이의 능력에 의해 평가하였다. 평가된 파라미터는 체중(매 3일마다 1회), 간 기능 시험(0일, 42일(6주째), 56일째(8주째), 63일째(9주째) 및 70일째(10주째), 연구 종결시의 조직병리학 및 연구 종결시의 하이드록실 프롤린 검정(경로 대조군-1의 경우 8주째 및 나머지 그룹의 경우 10주째)이었다. 조직병리학은 연구 종결시에 모든 동물들에게 대해 수행된 H&E 염색, 메이슨 트리크롬 염색 및 시리우스 레드 염색을 포함하였다. 간 기능 시험은 0주째, 4주째, 6주째, 8주째, 9주째 및 10주째에 수행된 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST), 알칼리 포스파타제(ALP), 감마-글루타밀 트랜스펩티다제(GGT), 총 빌리루빈(TBIL), 총 단백질(TP), 알부민, 글로불린 및 알부민/글로불린 비를 포함하였다. 도 22a 내지 22k에 도시된, 8주째, 9주째 및 10주째에서의 파라미터는 빌리루빈(75% 감소, 도 22f), 순환 알라닌 및 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(60% 감소, 도 22b 및 도 22c) 및 프로트롬빈 시간(20% 감소, 도 22i)를 포함하는 임상적으로 관련된 파라미터들의 역전 및 거의 정상화를 입증하였다. 또한, 혈청 알부민(도 22h) 및 총 단백질(도 22g)의 유의적 증가 및 알칼리 포스파타제(ALP)(도 22d) 및 감마-글루타밀-트랜스펩티다제(GGT)(도 22e)의 유의적 감소가 있었다. 간 하이드록시프롤린은 용량-의존적 방식으로 유의적으로 감소하였다(도 22k). 체중의 유의적 증가가 관찰되었으며 이와 연관된 독성은 없었다(도 22a).

[0631]

병리학적 결과는 도 23에 도시하였다. 나이브 동물은 갈색이 도는 핑크색이며 매끄럽고 뚜렷한 경계선을 갖는 건강한 간을 가졌다. CCL4 및 비히클 대조군으로 처리된 동물들의 간은 표면상에 퍼져있는 다수의 경변성 결절을 갖는 더 열고 더 단단한 간을 가졌다. CCL4 및 MTL-CEBPA(0.3 mg/kg)로 처리된 동물들의 간은 표면상에 퍼져있는 작은 결절을 갖는 더 열고 더 단단한 간을 가졌다. 간 색상은 CCL4 및 비히클 대조군의 간 색상보다 어두웠다. CCL4 및 MTL-CEBPA(3 mg/kg)로 처리된 동물들의 간은 불균일한 표면 및 매우 경미한 결절화를 갖는 정상 의 갈색이었다.

- [0632] 조직학 염색 결과는 도 24a 내지 24c에 도시하였다. 도 24a는 삼 대조군이다. 도 24b는 NOV340/siFluc 처리(음성 대조군)를 받은 CCL4-처리된 래트이다. 도 24c는 MTL-CEBPA 처리를 받은 CCL4-처리된 래트이다. MTL-CEBPA 처리된 동물들은 대조군의 동물들보다 섬유성 조직 및 유사 소엽편(pseudolobule) 형성이 감소되었다.
- [0633] 상기 논의된 데이터는 CEBPA-saRNA는 모든 임상적 관련 파라미터들에 걸쳐서 간 부전을 역전시켰음을 보여주었다. 많은 파라미터들은 정상으로 역전되었다. 혈청 알부민 수준은 정상보다 훨씬 더 양호하였다.
- [0634] **실시예 12. 급성 간 부전 치료의 생체내 연구**
- [0635] 급성 간 부전(ALF)은 높은 사망률을 갖는 임상적 병태이다. 급성 간 부전(ALF)은 알려진 이전의 간 질환이 없는 환자에서 간세포 기능의 급속하고 심각한 악화를 특징으로 하는 병태이다. 본 연구에서는 간독성 약물 티오아세트아미드(TAA)를 사용하여 ALF를 유도하였다. SD 래트에서 티오아세트아미드(TAA) 유도성 급성 간 부전 모델을 확립하기 위해, 다음의 파라미터들을 측정하였다: a) 생존율; b) 간 기능 시험(LFT) 및 생화학적 파라미터.
- [0636] 시험 시스템
- [0637] 시험 종: 래투스 노르베지쿠스(*Rattus norvegicus*).
- [0638] 스트레인: 스프래그 다울리 래트(SD 래트).
- [0639] 성별: 수컷.
- [0640] 체중/연령: 150 내지 200g /7주 내지 8주.
- [0641] 그룹의 수: 동물의 수/그룹: 8.
- [0642] 공급원: 할란 실험실(Harlan Laboratories).
- [0643] 연구 기간: 7일
- [0644] 6주 내지 7주령의 수컷 SD 래트를 할란으로부터 구입하였다. 동물들은  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$  온도,  $50 \pm 20\%$  습도, 각각 12시간의 명/암 주기 및 시간당 15 내지 20회의 신선한 공기 변화의 제어된 환경에서 유지시켰다. 동물을 그룹 단위(케이지당 3마리 동물)로 사육하고, 오토클레이브된 콘코브를 깔개로서 사용하였다. 수령 즉시, 동물들을 1주 동안 검역소에서 보관하였다. 지워지지 않는 마커펜을 사용하여 동물들의 꼬리의 기저에 임시 번호를 부여하였다. 검역 후, 동물들을 실험실로 옮기고 실험 개시 전에 1주 동안 순화를 위해 보관하였다.
- [0645] 실험: EM-360 임상적 화학 분석기(Erba Mannheim, 독일)
- [0646] 질환 유도
- [0647] 모든 동물들을 기초 파라미터에 대한 10% 미만의 그룹간 변이를 고려하여 -2일째의 기초 체중, 빌리루빈 및 AST에 기초하여 네 그룹으로 무작위화하였다. 케이지는 연구 번호, 연구 코드, 그룹 번호, 성별, 용량, 케이지 번호, 동물의 수 및 동물 번호 상세사항을 나타내는 케이지 카드로 식별할 수 있게 하였다. 그룹 1 내지 4: 모든 연구 동물들은 0일째에 염수 중 TAA를 350 mg/kg(mpk), 용적 5ml /kg의 용량으로 1회 복강내(i.p) 주사로 투여하였다. 그룹 1은 어떠한 처리도 받지 않았으며 병리학적 대조군으로서 사용하였다. MTL-CEBPA를 TAA 주사 후 24시간째에 그룹 2에, 0시간째에 그룹 3에 그리고 24시간째에 그룹 4에 정맥내 주사하였다. 동물들을 1일째, 2일째, 3일째, 4일째 및 5일째에 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST), 알칼리 포스파타제(ALP), 감마-글루타밀 트랜스퍼타제(GGT), 총 빌리루빈(TBIL), 총 단백질(TP), 알부민(ALB) 및 암모니아와 같은 생화학적 파라미터 및 LFT에 대해 평가하였다. 연구 종료시에, 모든 이용가능한 동물들을 CO2 질식으로 안락사시키고, 혈장을 수거하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하였다.

실험 그룹:

그룹	그룹의 설명	유도	처리	동물의 수	시험 용량
그룹 1 (G1)	TAA 대조군	TAA 350mpk 복강내	NA	8	NA
그룹 2 (G2)	MTL-CEBPA (- 24h)	TAA 350mpk 복강내	MTL-CEBPA (TAA 전 24 시간)	8	3mpk
그룹 3 (G3)	MTL-CEBPA (0h)	TAA 350mpk 복강내	MTL-CEBPA (TAA 전 0 시간)	8	3mpk
그룹 4 (G4)	MTL-CEBPA (24h)	TAA 350mpk 복강내	MTL-CEBPA (TAA 후 24 시간)	8	3mpk

[0648]

- [0649] MTL-CEBPA의 투여
- [0650] 시험 항목 MTL-CEBPA를 적당한 1회용 주사기와 바늘을 사용하여 꼬리 정맥을 통해 정맥내 투여하였다. 그룹 2, 3 및 4의 동물들에게 MTL-CEBPA를 투여하였다. 모든 용량은 1 ml/동물 체중 kg의 용량 용적으로 투여하였다.
- [0651] 관찰
- [0652] 체중 및 동물 사망률
- [0653] 모든 동물들의 초기 체중을 개별적으로 기록하였으며 이후 7일의 전체 연구 기간 동안 1일 1회 기록하였다. 전반적 건강 관찰을 매일 해당일의 동일한 시간에 수행하였다. 이는 각성도, 모발의 질감, 케이지 이동 및 코, 안구, 구강 및 귀로부터의 임의의 분비물의 존재를 포함한다. 모든 그룹 동물들은 TAA 투여로 인한 사망률에 대해 매일 모니터링하였다.
- [0654] 생화학적 분석-LFT(무작화를 위해)
- [0655] 2일째에, 혈액 샘플을 광 이소플루란 마취 하에 안구 뒤 천자 방법에 의해 수거하고, ALT, AST, ALP, GGT, TBIL, TP, ALB 및 암모니아를 추정하기 위해 혈장을 완전 자동화 무작위적 접근 임상적 화학 분석기(EM-360, Make: Erba Mannheim, 독일)에 의해 분리시켰다. 이어서, 동물들을 총 빌리루빈, 체중 및 AST에 기초하여 무작위화하였다.
- [0656] TAA 주사 후 생화학적 파라미터, LFT의 평가
- [0657] 혈액 샘플을 광 이소플루란 마취 하에 안구 뒤 천자 방법에 의해 모든 동물들로부터 수거하고(TAA 주사 후 1일째부터 연구 종료까지), ALT, AST, ALP, GGT, TBIL, TP, ALB 및 암모니아를 추정하기 위해 혈장을 분리시켰다.
- [0658] 통계학적 분석
- [0659] 통계학적 분석은 1원 또는 2원 변량분석(ANOVA)을 사용한 후에, 해당되는 모든 경우에 더넷 다중 비교 검정(Dunnett's multiple comparison test)을 사용하여 수행하였다.  $p < 0.05$ 는 통계학적으로 유의적인 것으로 간주되었다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로서 표현하였다.
- [0660] 결과
- [0661] 간 기능 파라미터 및 체중
- [0662] 2일째에, 모든 동물들은 TAA 주사를 위해 총 빌리루빈(TB), 체중 및 AST 수준에 기초하여 네 그룹으로 무작위화하여 ALF를 유도하였고, MTL-CEBPA의 경우 예방적(prophylactic), 동시적(concurrent) 및 방지적(preventive) 치료를 유도하였다.
- 빌리루빈, 체중 및 AST에 기초한 그룹 무작위화:
- | 그룹                  | n | 총 빌리루빈 (mg/dl)  | 체중 (g)          | AST (U/L)      |
|---------------------|---|-----------------|-----------------|----------------|
| 1. TAA 대조군          | 8 | 0.09 $\pm$ 0.01 | 263.8 $\pm$ 2.5 | 91.5 $\pm$ 7.6 |
| 2. MTL-CEBPA (-24h) | 8 | 0.08 $\pm$ 0.01 | 267.0 $\pm$ 4.4 | 92.9 $\pm$ 4.0 |
| 3. MTL-CEBPA (0h)   | 8 | 0.09 $\pm$ 0.01 | 266.5 $\pm$ 4.2 | 91.2 $\pm$ 4.6 |
| 4. MTL-CEBPA (24h)  | 8 | 0.09 $\pm$ 0.01 | 266.5 $\pm$ 6.4 | 90.7 $\pm$ 4.6 |
- [0663] 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로서 표현하였다
- [0664] 병리학적 대조군(TAA 대조군)은 2일째, 3일째, 4일째( $p < 0.01$ ) 및 5일째( $p < 0.05$ )에 이의 기초 체중에 비해서 체중의 유의적 감소를 나타냈다. 그룹 2, 그룹 3 및 그룹 4에서 MTL-CEBPA를 상이한 시간 간격으로 정맥내 투여하는 것은 상이한 일자에서의 TAA 대조군과 비교하여 1일째부터 5일째까지 유의적 체중 변화를 나타내지 않았다.
- [0665] TAA 및 시험 항목 처리 그룹에서는 전체 연구 기간(7일) 동안 사망은 관찰되지 않았다. 동물들을 국소(주사 부위) 및 전신 임상 징후에 대해 정기적으로 모니터링하였다. 모든 동물들은 TAA 주사 후 1일째에 무기력한 상태이고 그 다음날에 정상으로 회복된 것으로 확인되었다.

동물의 1 일 평균 체중:

그룹 번호	n	-2 일	1 일	2 일	3 일	4 일	5 일
1. TAA 대조군	8	263.8	253.3	245.3	246.8	246.7	248.6
2. MTL-CEBPA (-24h)	8	267.0	254.6	248.6	253.3	257.1	266.4
3. MTL-CEBPA (0h)	8	266.5	249.7	244.6	248.6	252.7	260.1
4. MTL-CEBPA (24h)	8	266.5	253.4	244.3	246.2	250.3	262.0

[0666]

[0667]

생화학적 분석

[0668]

TAA의 단일 복강내 주사는, 이의 기본 측정치와 비교하여, 1일째( $p<0.05$ ) 및 2일째( $p<0.001$ )의 ALT, 1일째 및 2일째( $p<0.001$ )의 AST, 3일째( $p<0.05$ )의 GGT, 3일째( $p<0.05$ )의 빌리루빈과 같은 대부분의 간 기능 파라미터의 유의적이지 않은 증가 및 1일째( $p<0.01$ ), 2일째( $p<0.001$ ), 3일째( $p<0.05$ )의 알부민 및 1일째 및 2일째( $p<0.001$ )의 암모니아와 같은 기타 파라미터의 유의적 감소를 야기하였다.

[0669]

예방적(prophylactic), 동시적(concurrent)이지만 방지적(preventive)이지 않은 MTL-CEBPA 주사는 처리 후 상이한 일자들에서 TAA 대조군과 비교하여 ALT( $p<0.05$ ), AST( $p<0.05$ ), ALP( $p<0.001$ ), GGT( $p<0.05$ ), 빌리루빈( $p<0.05$ )과 같은 간 기능 파라미터 및 총 단백질( $p<0.01$ ), 알부민( $p<0.01$ ) 및 암모니아( $p<0.01$ )와 같은 기타 파라미터의 유의적 개선을 나타냈다(도 25a 내지 25h).

[0670]

논의 및 결론

[0671]

본 연구에서는, TAA 주사액을 복강내로 투여하여 급성 간 부전 모델을 SD 래트에서 확립시켰다. TAA 주사 후에 어떠한 그룹에서도 사망은 관찰되지 않았다. TAA 주사는 병리학적 대조군(TAA 대조군) 동물에서 관찰된 이의 기본 수준과 비교하여 AST, ALT, 빌리루빈, GGT, 총 단백질, 알부민 및 암모니아와 같은 간 생화학적 파라미터의 유의적 변화를 초래하였다. MTL-CEBPA 처리는 TAA 주사액이 예방적으로(-24시간) 및 동시적으로(0시간) 주사되었을 경우에 LFT 파라미터 및 암모니아의 유의적 개선을 나타냈다.

[0672]

### 실시예 13. 당뇨병 치료의 생체내 연구

[0673]

글루코스 대사작용의 조절에서의 CEBPA의 역할을 고려하여, 당뇨병의 래트 모델에서 연구를 수행하여 CEBPA 활성화가 임상적으로 관련된 혈액 파라미터를 개선시킬 수 있는지 여부를 측정하였다. 고지방 식이에 의해 6마리의 위스타 래트들에서 II형 당뇨병을 유도하였다. 이어서, 상기 래트들을 총 4.35mg/kg CEBPA-saRNA(AW1-50) 또는 NOV340 리포솜에서 제형화된 비-표적화 FLUC siRNA로 처리하였다. 마지막 처리한지 6일 후, 혈청 화학 및 체중의 변화를 평가하기 위해 혈액을 채취하고 동물들을 희생시켰다.

[0674]

실험 그룹 및 용량:

그룹	시험 물품	용량
대조군	NOV340-siFLUC	1.45mg/kg, 3 용량
처리군	NOV340-CEBPA (즉, MTL-CEBPA)	1.45mg/kg, 3 용량

[0675]

[0676]

도 26A 내지 26N에 도시된 바와 같이, 대조군과 비교하여, NOV340-CEBPA로 처리된 래트들은 간 콜레스테롤, 혈청 AST, 공복 글루코스 및 트리글리세라이드 대 HDL-c의 비의 유의적 감소를 나타냈다. 상기 래트들은 또한 체중뿐만 아니라 간 대 체중의 비의 유의적 감소를 나타냈다(도 26L 및 도 26N). 인슐린 수준은 CEBPA-saRNA 처리(도 26K)에 의해 증가한다. 이러한 결과는 CEBPA-saRNA에 따른 CEBPA 상향조절이 당뇨병의 관리에 유익할 수 있음을 나타낸다. CEBPA-saRNA는 지방간 질환 및 인슐린 내성을 치료하기 위해서 사용될 수도 있다.

[0677]

### 실시예 14. NASH 치료의 생체내 연구

[0678]

비알코올성 지방간염(NASH)은 간내 지방 축적에 의해 유발될 수 있는 간 염증 및 손상이다. 이는 비알코올성 지방 간 질환으로 지칭되는 병태들의 그룹의 일부이다. NASH는 간의 흉터형성을 유발할 수 있고 이는 경화증으로 이어질 수 있다. NASH 치료시 MTL-CEBPA의 효과는 동물 사료와 함께 메티오닌 콜린 결핍(MCD) 식이를 사용하여 연구한다. MCD 식이는 NASH와 유사한 간 손상을 초래한다.

[0679]

본 연구에서는, CEBPA-saRNA를 사용하여 C57BL/6 마우스에서 MCD-유도성 NASH를 치료하였다. 연구 기간은 6주였



다. 수컷 7 내지 8주령 C57B/L6 마우스를 0일째에 체중에 기초하여 무작위화하였다. 그룹 1은 4주 동안 정상 식이를 섭취하였으며, 그룹 2는 6주 동안 정상 식이를 섭취하였다. 그룹 3은 4주 동안 MCD 식이를 섭취하고, 그룹 4 내지 8은 6주 동안 MCD 식이를 섭취하였다. 4주째에, 처리 그룹(그룹 4 내지 8)은 빌리루빈, 체중 및 ALT 수준에 기초하여 무작위화하였다. 그룹 4 내지 8은 주 2회(4주째, 4.5주째, 5주째 및 5.5주째) 정맥내 주사를 통해 PBS 처리 또는 치료학적 처리를 하였다.

[0680] 4주째에, 그룹 1 및 3을 무작위화하였다. 6주째에, 그룹 2 및 그룹 4 내지 8을 종료하였다. 간 기능 시험(LFT)(ALT, AST, ALP, 알부민, 총 빌리루빈 및 간 트리글리세라이드(TG)) 및 간의 조직병리학(H&E 염색, 오일 레드 O 염색 및 메이슨 트리크롬)을 수행하였다. 혈청 사이토킨/마커(IL1 $\beta$ , IL6 및 TNF- $\alpha$ ) 및  $\alpha$ 2 매크로글로불린을 측정하였다.

[0681] 연구 그룹 및 처리 설명은 하기에 요약되어 있다:

그룹 번호	그룹	동물의 수	처리	투약 용법 /ROA
G1	정상 식이 대조군(4주), 4주째에 종결됨	5	-	N/A
G2	정상 식이 대조군 (6주), 6주째에 종결됨.	5	-	N/A
G3	MCD 식이 대조군(4주), 4주째에 종결됨.	10	-	N/A
G4	MCD 식이 대조군(6주) +PBS 처리.	10	PBS 처리	주 2회, 정맥내 주사, 4주째부터 6주째까지
G5	MCD + NOV340/siFLUC 대조군 3mpk 치료제.	10	NOV340/siFLUC 3mpk	주 2회, 정맥내 주사, 4주째부터 6주째까지
G6	MCD + MTL-CEBPA 0.3mpk 치료제.	10	MTL-CEBPA 0.3mpk	주 2회, 정맥내 주사, 4주째부터 6주째까지
G7	MCD + MTL-CEBPA 1mpk 치료제.	10	MTL-CEBPA 1mpk	주 2회, 정맥내 주사, 4주째부터 6주째까지
G8	MCD + MTL-CEBPA 3mpk 치료제.	10	MTL-CEBPA 3mpk	주 2회, 정맥내 주사, 4주째부터 6주째까지

[0682]

[0683] 도 27a 내지 27b는 체중 및 음식 소비 변화를 도시한 것이다. 예상대로, MCD 식이 처리는 연구 전반에 걸쳐서 체중 및 음식 소비의 유의적 감소를 나타냈다. 처리 그룹(G5 내지 G8)은 MCD 식이 대조군과 비교하여 체중 및 음식 섭취의 유의적 변화를 나타내지 않았다. 따라서, MTL-CEBPA 처리는 체중 및 음식 소비를 변화시키지 않았다. 도 27c 내지 27g는 ALT, AST, ALP, 빌리루빈 및 알부민 수준 변화를 포함하는 LFT 결과를 나타냈다. MCD 식이가 공급된 동물들은 정상 식이 대조군과 비교하여 ALT, AST, 빌리루빈과 같은 LFT 파라미터의 유의적 증가 및 단백질 수준의 감소를 나타냈다. MTL-CEBPA로의 처리는 ALT 및 AST 수준의 유의적 감소를 나타냈다. MTL-CEBPA 처리된 동물들에서 ALP 및 빌리루빈의 감소도 관찰되었다. 도 27h는 간 트리글리세라이드(TG) 수준 변화를 나타냈다. 간 TG는 MCD 식이 대조군에서 유의적으로 증가되었다. MTL-CEBPA로의 처리는 간 TG 수준의 유의적 감소를 나타냈으며, 간 TG는 정상 수준으로 역전되었다.

[0684] 따라서, CEBPA-saRNA 처리는 NASH를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

# [0685] **실시예 15. CEBPA-saRNA를 이용한 기타 생체내 연구 - DEN-유도성 HCC의 래트 모델에서 MTL-CEBPA 효능의 평가**

[0686] 본 연구의 목적은 MTL-CEBPA 처리에 의한 CEBPA 활성화가 HCC 래트 모델에서 임상 파라미터를 개선시킬 수 있는지 여부를 조사하는 것이었다.

[0687] **실험 디자인:** 수컷 위스타 래트들을 DEN로 처리하여 HCC를 유도하였다. 간략하게 언급하면, 동물들을 9주 동안 DEN으로 처리한 후, 3주 동안 처리를 하지 않았다. 이어서, 동물들을 체중(6 내지 7마리 수컷/그룹)에 따라 세 그룹으로 무작위화하였다. 그룹 1을 1일째에 희생시켜 처리전 대조군으로서 사용하고, 그룹 2 및 3을 4 mg/kg의 용량에서 NOV340(siFLUC)에서 제형화된 비-표적화 dsRNA 또는 MTL-CEBPA로 3회(1일, 3일 및 5일째) 정맥내 처리하였다. 12일째, 혈액을 채취하고, 모든 동물들을 희생시켰다. 종양 및 간 중량을 측정하고, mRNA 분석을 위해 간 조직 절편을 즉시 급속-냉동시켰다. CEBPA 및 알부민 mRNA 수준을 qRT-PCR(하우스키핑 유전자: GAPDH; 삼중으로 측정됨)에 의해 측정하였다.

[0688] **결과:** 도 28에 도시된 바와 같이, NOV340/siFLUC(비-표적화 리포솜 대조군, 비히클-대조군)와 비교해, MTL-

CEBPA로 처리된 동물들은 간에서 CEBPA mRNA 발현의 유의적 증가를 나타냈다. 알부민 mRNA 발현이 증가되는 경향이 관찰되었으며, 이는 통계학적으로 유의적이지 않았다.

[0689] 도 29A 내지 29I에 도시된 바와 같이, NOV340/siFLUC 대조군과 비교하여, MTL-CEBPA로 처리된 래트들은 혈청 암모니아( $p < 0.05$ )의 유의적 감소뿐만 아니라 체중(bw), 중앙 체적, 콜레스테롤 및 헤모글로빈의 변화를 나타냈으며, 이러한 변화는 통계학적으로 유의적이 되는 경향이 있었다(bw:  $p = 0.063$ ; 중앙 체적:  $p = 0.10$ ; 콜레스테롤:  $p = 0.08$ ; 헤모글로빈:  $p = 0.05$ ). 처리전 대조군과 비교하여, MTL-CEBPA로 처리된 래트들은 AST, ALT 및 빌리루빈의 유의적 감소를 나타냈다( $p < 0.05$ ).

[0690] 결론: HCC의 DEN-유성 래트 모델에서, MTL-CEBPA 처리는 NOV340/siFLUC 대조군과 비교하여 표적 관여(간에서 CEBPA mRNA의 상향조절) 및 헤모글로빈, 암모니아 및 콜레스테롤을 포함하는 몇몇 질환 마커의 개선을 초래하였다. 동물 수가 적기 때문에 통계학적으로 유의적이지 않지만, MTL-CEBPA로 처리된 그룹은 중앙 성장을 억제하는 경향을 나타냈으며, 이때 평균 중앙 크기는 NOV340/siFLUC 대조군에 비해 80% 작았다. 처리전 질환 대조군과의 비교에서 나타난 바와 같이, MTL-CEBPA는 질환 증상을 안정화시켰을 뿐만 아니라, AST, ALT 및 빌리루빈을 포함하는 일부 간 독성 혈청 마커를 역전시켰으며, 이는 CCL4 섬유증 모델에서 이들 마커들에서 나타난 이득들과 일치한다. 종합하면, 이러한 결과들은 MTL-CEBPA가 널리 이용되는 DEN-유도성 간 섬유증 및 HCC의 래트 모델에서 간 기능을 개선시키고 중앙 성장을 감소시킬 수 있음을 나타낸다.

#### [0691] 실시예 16. Ago 단백질과의 CEBPA-saRNA 상호작용의 연구

[0692] HepG2 세포를 바이오티닐화된 안티센스 가닥(AS) 및 센스 가닥(ss)-CEBPA51로 형질감염시키고, 비형질감염 대조군 또는 스크램블-바이오틴(scramble-biotin) 대조군과 비교하였다. 수거 시점(72시간)에, 바이오티닐화된 접합체를 1% 포름알데히드와 가교결합시키고 이어서 스트렙타비딘 아가로스 비이드상에 고정시켰다. 이어서, 항-Ago1, Ago2, Ago3 및 Ago4와의 공동-면역침전(Co-IP)을 수행하였다. 이소형 IgG는 음성 대조군으로서 사용하였다. 이어서, 공동-면역침전된 접합체를 다이아비드-단백질 G(Dynabead-Protein-G)를 이용하여 고정시켰다. 풀다운(pulldown) 면역 복합체를 세척하고 자기 컬럼에서 용출시켰다. 이어서, 샘플을 SDS-PAGE에서 분리시키고, 각각의 아르곤노트(Argonaute) 단백질에 대한 웨스턴 블롯팅을 위해 PVDF로 이전시켰다.

[0693] 도 30A에 도시된 바와 같이, Ago2는 SS-바이오틴 가닥과 비교하여 AS-바이오틴 가닥에서 강력하게 나타난다. Ago1 3 및 4는 두 가닥 중 어느 가닥에도 존재하지 않는 것으로 보인다. 이는 CEBPA-saRNA의 안티-센스 가닥이 Ago2와 연합하고 기타 아르곤노트와는 연합하지 않음을 나타낸다.

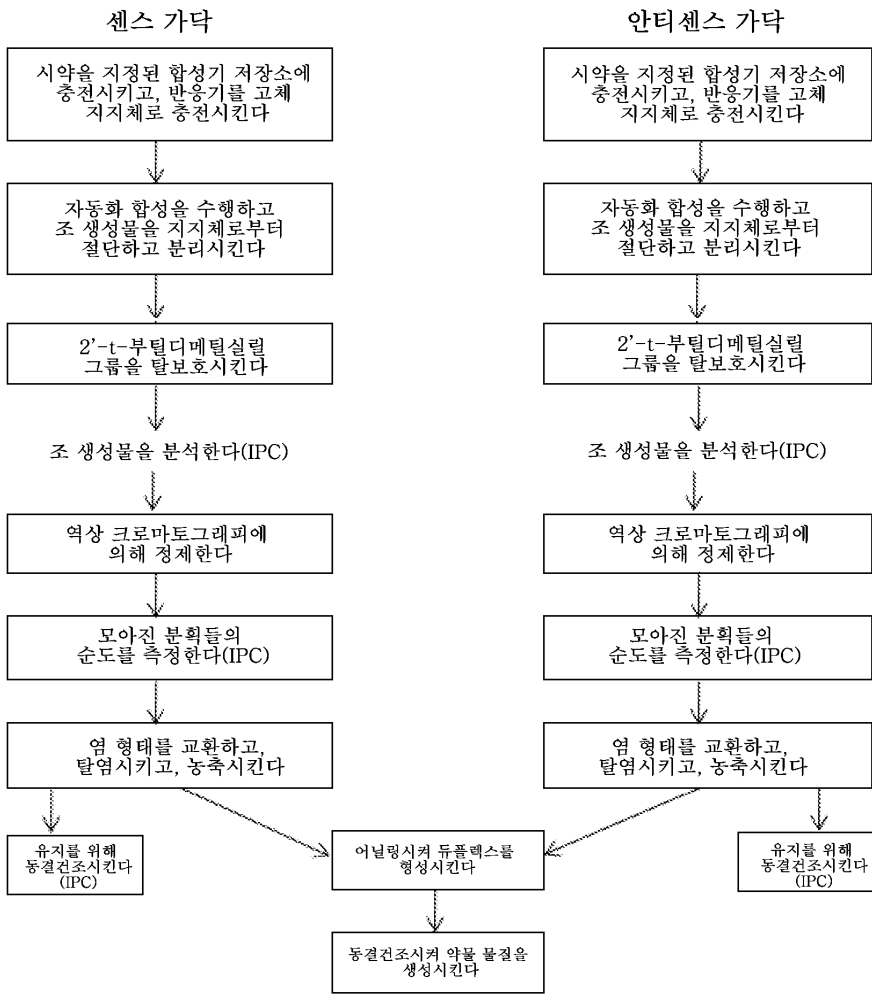
[0694] 추가적 연구에서, Ago2를 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 세포에서 녹아웃시켰다. 야생형 및 Ago2 녹아웃 세포를 24웰 플레이트에 웰당  $9.8 \times 10^5$ 로 접종시켰다. 20nM의 CEBPA51 및 Fluc를 이전에 설명한 바와 같이 형질감염시켰다(전방향 + 역방향). RNA를 수거하여 48시간 시점에서의 saRNA의 활성을 측정하였다. 도 30B에 도시된 바와 같이, CEBPA 전사체 수준은 Fluc에 비하여 CEBPA51 형질감염된 야생형 세포에서 2배 증가하였다. 도 30C는 p21 전사체 수준이 Fluc에 비하여 CEBPA51 형질감염된 야생형 세포에서 4배 증가하였음을 나타냈다. 그러나, Ago2 녹아웃 세포에서는 CEBPA 유도 또는 p21 유도가 측정되지 않았다. saRNA에 의한 유전자 활성화를 위해 Ago2가 요구됨이 입증된다.

#### [0695] 실시예 17. CEBPA-saRNA의 제형

[0696] CEBPA-51 saRNA를 리포솜 내로 캡슐화시킨다. 이용되는 전달 기술은 마리나 바이오테크(Marina Biotech)가 소유한 NOV340 SMARTICLES<sup>®</sup> 기술이다. 이들 나노입자의 지질 성분은 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(POPC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE), 콜레스테릴-헤미석시네이트(CHEMS) 및 4-(2-아미노에틸)-모르폴리노-콜레스테릴 헤미석시네이트(MOCHOL)로 구성된다. NOV340은 6:24:23:47의 몰비의 POPC, DOPE, CHEMS 및 MOCHOL로 구성된다. 나노입자들은 생리학적 pH에서 음이온성이며, 이들의 특이적 지질 비는 리포솜에 "pH-조정 가능한" 특징 및 전하를 부여하며, 이는 미세환경의 주변 pH에 따라서 변화하여 생리학적 막을 가로지르는 이동을 촉진한다. 과도한 즉각적 간 분리(hepatic sequestration)를 피하기 위해 SMARTICLES<sup>®</sup> 나노입자를 대략 약 50 내지 약 150 nm 또는 약 100 내지 약 120 nm의 평균 직경으로 크기 조정하여, 정맥내 주사 후 보다 연장된 전신 분포 및 개선된 혈청 안정성을 촉진함으로써 보고된 간, 비장 및 골수 내의 고수준과 함께 보다 광범위한 조직 분포를 초래하였다.



[0699] CEBPA-51 합성의 전반적 개요는 다음과 같다:



[0700]

[0701]

CEBPA-51 합성의 상세한 흐름도는 다음과 같다:

단계 번호	시간	조건	활성	IPC
(단계 1 내지 9: 각각 센스 및 안티센스가닥에 대해 개별적임)				
1.	12-15 시간	24° C ± 3° C	고체상 합성	N/A
			↓	
2.	1-2 시간	아세트니트릴 중의 50% TEA 24° C ± 3° C H <sub>2</sub> O 중의 40% 메틸아민, 40° C ± 2° C	탈보호 / 지지체로부터 절단	N/A
			↓	
3.	2 시간	TEA · 3HF (순수), 65° C ± 2° C	탈보호	UV, RP-HPLC, LCMS
			↓	
4.	12-15 시간	A 완충액 (50mM TEAA) B 완충액 (아세트니트릴), 65° C ± 1° C	역상 크로마토그래피에 의한 정제	UV, RP-HPLC
			↓	
5.	≤ 1 시간	TEAA/아세트니트릴	분획들의 풀링	UV, RP-HPLC, LCMS
			↓	
6.	≤ 8 시간	10-25° C	한외여과 (농도)	UV
			↓	
7.	≤ 8 시간	0.2M 인산나트륨, 10-25° C	한외여과 (염/완충액 교환)	UV
			↓	
8.	12-15 시간	10-25° C	한외여과 (물 교환 / 농도)	UV, 전도도
			↓	
9.	≤ 1 시간	24° C ± 3° C	0.2 μm 여과	RP-HPLC
			↓	
듀플렉스에 대해 1 회 실시된 후속적 단계 10 내지 14				
			↓	
10.	1 시간	24° C ± 3° C	듀플렉스의 어닐링 (센스 및 안티센스가닥 용액을 사용함)	SE-HPLC
			↓	
11.	≤ 1 시간	24° C ± 3° C	0.2 μm 여과	

[0702]

단계 번호	시간	조건	활성	IPC
			↓	
12.	3 내지 4 일	10% 미만의 물 함량까지 - 45° C 에서 냉동 건조시킴.	동결건조	
			↓	
13.	≤ 1 시간	24° C ± 3° C	칭량/패키징	CEBPA-51 방출 시험
			↓	
14.	운송까지	≤ -20° C	저장	

[0703]

[0704]

용액 중에 존재하는 CEBPA-51의 전반적 크기 및 순도를 크기 배제 크로마토그래피(SE-HPLC)에 의해 측정하여, 주로 이중 가닥 버전과 단일 가닥 버전을 구별하였다. CEBPA-51 이중 가닥의 용점은 서열 특이적이다. 이는 듀



플렉스의 가열 유도된 '용융'(탈하이브리드화) 동안 생성되는 UV(260nm에서) 대 T(℃) 곡선의 변곡점으로서 측정된다. 이러한  $T_m$  값은 260 nm에서 증가된 흡광도(흡광증가 효과(hyperchrome effect))와 관련되어 81.3℃인 것으로 측정되었다. 소광계수는 나트륨 염으로서 90% 이상 함량의 올리고뉴클레오타이드에 기초하여 260 nm 및 25℃에서 PBS 중에서 측정되었다. 분자량은 제조 과정 동안 LC-MS에 의해 두 단일 가닥 모두에 대해 측정한다. 방출 시험을 위해, 듀플렉스를 단일 가닥으로 분리시키고, 각 피크를 IPRP-HPLC와 ESI-MS를 병용하여 수행하는 MS에 의해 분석하였다.

[0705] 불순물

[0706] 생성물 관련 불순물:

[0707] 잠재적 생성물 관련 불순물은 다량체, 응집체뿐만 아니라 연장된 또는 절두된/분해된 형태들이다. 이러한 불순물은 SE-HPLC에 의해 제어된다.

[0708] 추가로, 불완전 또는 비효율적 합성의 결과로서, 결실에 의해 달라진 중합체 부산물, 예를 들면, n-1 또는 n-2 뉴클레오타이드(즉, "n=21"일 때, 센스 및 안티센스 가닥들의 전체 세 길이에 대해 21량체 대신에 20량 또는 19량체)가 발생할 수 있다. 또한, 1개 또는 2개의 뉴클레오타이드만큼의 서열 연장이 발생하여 n+1 또는 n+2 올리고뉴클레오타이드(22량체 또는 23량체)가 생성될 수 있다. 그러나, 후자는 발생 가능성이 보다 낮다. 이러한 변이체들은 제한된 분해능으로 인해 SE-HPLC에 의해 동정될 수 없지만, IPRP-HPLC에 의해 측정될 수 있다.

[0709] 게다가, 리보뉴클레오타이드의 부정-혼입(mis-incorporation) 또는 변형이 또한 발생하여 생성물 관련 불순물이 초래될 수도 있다. 후자는 이온쌍 역상 고압 크로마토그래피(IPRP-HPLC) MS 또는 MS/MS-서열분석에 의해 검출된다.

[0710] 공정 관련 불순물:

[0711] 잠재적 공정 관련 불순물은 화학적 합성으로부터의 잔류 시약, 반응물 및 용매를 포함한다. 생산 공정에서 사용된 소정의 고체상 RNA 합성 및 시약에 기초하여, 다음의 공정 관련 불순물들이 예상될 수 있다(표 14):

[0712] [표 14]

CEBPA-51 생산의 공정 관련 불순물

잔류 용매	기준	실제 결과
아세트니트릴(클래스 2)	합성	n.d.* (< 410 ppm)
DMSO-디메틸설폭사이드(클래스 3)	합성	n.d.* (< 5000 ppm)
톨루엔(클래스 2)	합성	n.d.* (< 890 ppm)
TEA, 트리에틸아민	합성	(< 320 ppm)

\* n.d. = "검출되지 않음"(LoQ 미만)

[0713]

[0714] 제형

[0715] 필요량의 CEBPA-51을 주위 온도에서 나트륨 아세테이트/슈크로스 완충액(pH 4.0)에 용해시키고, 필요량의 지질을 55℃에서 무수 에탄올에 용해시켰다. 리포솜은 직교류 에탄올 분사 기술에 의해 제조한다. 리포솜 형성 직후, 현탁액을 염화나트륨/포스페이트 완충액(pH 9.0)을 사용하여 일렬로 희석시켰다. 수집된 중간체 생성물을 공극 크기가 0.2 $\mu$ m인 폴리카보네이트 막을 통해 압출시킨다. 한외여과에 의해 표적 saRNA 농축을 달성한다. 후속적으로 슈크로스/포스페이트 완충액(pH 7.5)을 이용하여 투석여과하여 비-캡슐화 약물 물질 및 잔류 에탄올을 제거한다. 이후, 농축된 리포솜 현탁액을 0.2 $\mu$ m 여과하고 5 $\pm$ 3℃에서 저장한다. 마지막으로, 벌크 생성물을 제형화하고 0.2 $\mu$ m 여과하고 20ml 바이알에 충전시킨다.

[0716] MTL-CEBPA는 농축된 주입용 용액으로서 존재한다. 각 바이알은 20ml의 슈크로스/포스페이트 완충액(pH 약 7.5) 중에 50mg의 CEBPA-51(saRNA)을 함유한다.

[0717] MTL-CEBPA의 조성은 하기 표 15에 제공되어 있다.

[0718] [표 15]

MTL-CEBPA의 정량적 및 정성적 조성(2.5mg/ml)

성분명	기능	참조	양 (ml 당)
CEBPA-51(saRNA)	활성 약제학적 성분	제조업체의 사양	2.5 mg/ml
1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(POPC)		제조업체의 사양	4.65 mg/ml
1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE)	막 형성 융합성 지질	제조업체의 사양	18.0 mg/ml
콜레스테릴 헤미석시네이트(CHEMS)	음이온성 양쪽성 지질	제조업체의 사양	11.3 mg/ml
콜레스테릴-4-[[2-(4-모르폴리닐)에틸]아미노]-4-옥소부타노에이트(MOCHOL)	양이온성 양쪽성 지질	제조업체의 사양	27.0 mg/ml
슈크로스	동결보호제, 오스몰랄 농도 제어	BP, JP, NF, EP	92.4 mg/ml
인산수소이나트륨, 이수화물	완충액 pH 조정	BP, USP, EP	1.44 mg/ml
인산이수소칼륨	완충액 pH 조정	EP, BP, NF	0.2 mg/ml
염화칼륨(KCl)	이온강도 조정제	EP, BP, USP	0.2 mg/ml
주사용수(WFI)	용매	WFI (USP, EP)	첨가하여 1 ml가 되는 양

[0719]

[0720]

MTL-CEBPA는 현탁액의 형태로 제공되며 마개가 있는 유리 바이알에 포장될 것이다. 20 ml가 주사기에 의해 1차 용기로부터 채취될 수 있는 것을 보장하기 위해, 20.6 ml(21.4g에 상당함)이 과충전된다. 제조 과잉은 없다. 제형은 다음과 같다:

	ml당 양	바이알당 양
MTL-CEBPA	2.5mg	50mg

[0721]

[0722]

#### 부형제

[0723]

MTL-CEBPA 중의 부형제는 두 그룹으로 분류될 수 있다: 리포솜-형성 지질 부형제(NOV340 - 마리나 바이오테크가 소유한 Smarticles<sup>®</sup> 기술) 및 완충액 형성 부형제 슈크로스 및 포스페이트(또한 표 15를 참조). 리포솜 및 이의 조성의 개발은 문헌[Andreakos E. et al., Arthritis Rheum, vol. 60(4): 994-1005 (2009)](이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다)에 설명되어 있다. 사용되는 슈크로스-포스페이트-완충액(pH 7.5)은 부형제 및 약물 물질과 우수한 양립가능성을 갖는다.

[0724]

리포솜-형성 지질 부형제는 하기 표 16에 제시한 바와 같은 6:24:23:47의 몰비의 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(POPC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE), 콜레스테릴-헤미석시네이트(CHEMS) 및 4-(2-아미노에틸)-모르폴리노-콜레스테릴 헤미석시네이트(MOCHOL)로 구성된다.

[0725] [표 16]

NOV340의 지질 성분

약어 명칭	화합물명	화학식	분자량 [g/mol]
POPC	1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린	$C_{42}H_{82}NO_8P$	760.08
DOPE	1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민	$C_{41}H_{78}NO_8P$	743.55
CHEMS	3 $\beta$ -하이드록시-5-콜레스텐 3-헤미석시날 5-콜레스텐 · 3 $\beta$ -올 3-헤미석시네이트	$C_{31}H_{50}O_4$	486.37
MOCHOL	4-(2-아미노에틸)-모르폴리노-콜레스테롤 헤미석시네이트	$C_{37}H_{62}N_2O_4$	598.90
용매: 에탄올, 지질 비: 6:24:23:47의 몰비의 POPC:DOPE:CHEMS:MOCHOL			

[0726]

[0727] MTL-CEBPA 생산 공정의 전반적 개요는 도 31에 도시되어 있다. 하기 표 17은 상세한 공정이다.

[0728] [표 17]

MTL-CEBPA 생산의 흐름도(단계 1 내지 9)

단계 번호	시간	조건	활동	제조 공정 중 제어(In-Process Control)(IPC)
1. a)	10 내지 18 시간	에탄올 중의 지질 (POPC, DOPE, CHEMS), 55°C ± 5° C	지질 용액의 제조	n.a.
	1 내지 5 시간	에탄올 중의 지질 (POPC, DOPE, CHEMS, MOCHOL), 55°C ± 5° C	지질 용액의 제조	지질 농도
b)	n.d.	CEBPA-51(나트륨 아세테이트/슈크로스 완충액(pH 4.0) 중의 RNA), 15-25°C	CEBPA-51 용액의 제조 ↓	CEBPA-51 농도
2.	n.d.	100 mM NaCl/136 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 9.0 완충액, 15-25°C	에탄올 희석 및 pH 조정 ↓	입자 크기, 크기 분포.
3.	1 - 4 시간	pH 7.5 ± 0.5, 15- 25°C에서 CEBPA-51 리포솜	리포솜의 압출 ↓	입자 크기, 크기 분포.
4.	2 - 5 시간	pH 7.5, 15-25°C에서 PB-슈크로스 중의 CEBPA-51 리포솜	한외여과 /회석여과 및 완충액 교환 ↓	CEBPA-51 농도, 지질 농도, pH, 오스몰랄 농도, 제타 전위, 리보그린 검정, 입자 크기, 크기 분포.
5.	< 2 시간	PB-슈크로스 완충액 중의 농축된 벌크 리포솜, 15-25°C	0.2 μm 여과 (바이오버든 감소) ↓	-상기한 바와 같음-
6.	< 2 시간	PB-슈크로스(pH 7.5)로 희석; 15-25°C	벌크 생성물의 농도 조정 및 0.2 μm 여과 (멸균 여과) ↓	멸균 여과 전의 바이오버든 시험
7.	3 - 8 시간	15-25°C	충전 및 캡핑 ↓	육안 검사
8.		≤ -20° C	최종 약품 바이알 ↓	DP 방출 시험
9.	사용/운송까지	≤ -20° C	저장	

[0729]

[0730]

지질을 에탄올에 용해시키고 CEBPA-51을 나트륨 아세테이트/슈크로스 완충액 (pH 4.0)(단계 1a 및 단계 1b)에 별도로 용해시켜 MTL-CEBPA를 제조하였다.

[0731]

이어서, 두 용액을 분사 공정을 통해 배합하여 1차 비히클을 형성시키고, 이후 pH 조정 완충액(염화나트륨/포스페이트 완충액 pH 9.0)을 첨가하여 에탄올 농도를 급속도로 감소시키고 pH를 급속도로 증가시킨다(단계 2).

[0732]

이어서, 중간체 리포솜 혼합물을 폴리카보네이트 막을 통해 압출시켜 대형 입자 및 응집체의 크기를 감소시킨다(단계 3).

[0733]

이어서, 벌크 혼합물을 한외여과에 의해 농축시키고, 완충액을 적어도 7 용적의 슈크로스/포스페이트 완충액(pH 7.5)으로 교환하여, 에탄올과 염의 농도를 감소시킨다(단계 4). 이어서, 바이오버든(bioburden) 감소를 위해 상기 벌크 생성물을 0.2μm 필터에 통과시킨다(단계 5). 상기 생성물을 최종 표적 농도로 조정하고 0.2μm 멸균 여과에 의해 멸균한다(단계 6). 후속적으로, 벌크 생성물을 멸균 바이알에 충전시킨다(단계 8). 하기 각각의 도면에 현재의 제조과정 중의 제어가 도시되어 있다. 본 문헌에 정의된 사양에 따르는 약품의 최종 방출을 약품에

대해 수행한다.

- [0734] 최종 바이알 충전 및 방출을 포함하는 공정 완료 후, 전체 DP 바이알을  $-20^{\circ}\text{C}$  이하에서 저장한다(단계 9).
- [0735] pH 4.0 완충액에 가용화된 CEBPA-51는 이러한 환경에서 양으로 하전되는 MOCHOL과 상호작용하므로, 리포좀 제형화시 지질 대 약물 비는 리포좀 내의 RNA의 캡슐화 효율을 위해 매우 중요하다. 캡슐화 수율을 최적화하기 위해, EtOH 용액 중의 지질 농도를 일정하게 유지시키고, 용액 중의 CEBPA-51 농도를 1.06 내지 3.44 mg/ml의 범위로 변경하였다. 수득된 결과는 용액 중 CEBPA-51 농도를 감소시킴으로써 캡슐화 효율의 약간의 증가가 있음을 명백히 보여주었다.
- [0736] **용기 폐쇄 시스템**
- [0737] MTL-CEBPA를 위해 선택된 용기 폐쇄 시스템은 20 mm 폐쇄부를 갖는 표준 20ml 혈청 바이알 입체형태이다. 유리 바이알은 최소의 누출 가능성으로 생성물의 우수한 보호를 제공하는 투명한 USP I형 봉규산 유리로부터 제조된다. 이러한 유형의 유리는 또한 동결된 제품의 저장에 있어 결정적인 우수한 열 안정성을 갖는다. 마개는 표준 클로로부틸 고무 화합물로부터 제조되며, 생성물-접촉면은 생성물 흡착 잠재성을 최소화하는 플루오로중합체로 코팅된다. 마지막으로, 알루미늄 크립트 캡은 마개의 안전한 밀봉을 바이알에 제공하며, 사용시까지 잠재적 오염으로부터 고무 격막의 외부 계면을 보호한다.
- [0738] 미생물학적 속성
- [0739] MTL-CEBPA는 멸균 1회용 바이알로서 제공된다. 미생물 성장을 저해하기 위해 보존제는 첨가되지 않는다. 고무 마개 및 알루미늄 크립트 캡을 갖는 표준 유리 혈청은 미생물 오염을 방지하는 널리 입증된 장벽을 제공할 수 있다.
- [0740] MTL-CEBPA의 바이오버들은  $0.2\mu\text{m}$  필터를 통해 여과하여 감소시킨다. 멸균 바이알에 충전시키지 직전에, 생성물을 멸균 등급  $0.2\mu\text{m}$  필터에 통과시켜 멸균시킨다(단계 6, DP). 모든 패키징 부품들은 멸균된 "즉시 사용가능한" 상태로 제공된다. 상기 부품들은 추가 처리 없이 ISO 등급 5 환경에서 무균 조건하에 취급된다.
- [0741] MTL-CEBPA는  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 동결 저장되고 광으로부터 보호된다. 운송은 드라이 아이스로 충전된 냉각기에서 수행된다. MTL-CEBPA는  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 저장될 경우에 다소 감소되거나 변화되는 경향을 나타내지 않으면서(분석적 변동성의 범위 내에서) 최대 6개월 동안 안정하다. 동결 조건하에 재료 품질의 빠른 감소는 아주 가능성이 없는 것으로 간주되기 때문에,  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 저장되는 재료에 대해 12개월의 유통기한이 제안된다.
- [0742] MTL-CEBPA는 정맥내 주입(250 mL)에 의해 투여한다. 농도에 관계없이 250 mL의 용적을 수득하기 위해, 2.5 mg/mL saRNA의 농도의 MTL-CEBPA를 현탁액을 정맥내용 0.9% 생리식염수에 희석시키기 전에 실온에서 해동시킨다.
- [0743] (발포를 피하기 위해) 주입 백을 수동으로 뒤집어서 시험 항목과 희석제를 함께 혼합한다.
- [0744] MTL-CEBPA는 주입 펌프를 사용하여 60분에 걸쳐서 일정한 속도로 정맥(말초혈관 또는 중심혈관)에 투여한다.
- [0745] 제조된 용액의 저장: 실온(15 내지  $25^{\circ}\text{C}$ ), 이때 최대 예상 사용되는 유통기한은 적어도 6시간.
- [0746] CEBPA-51 saRNA 및 MTL-CEBPA의 특성들은 표 18-1 및 표 18-2에 제시되어 있다: 일반적으로, MTL-CEBPA는 유백색 현탁액이다. 형광 검출에 의해 측정된 saRNA 캡슐화는  $> 75\%$ 이다. 동적 광 산란에 의해 측정된 입자 크기는 약 50 nm 내지 약 150 nm 또는 약 100 내지 약 140 nm이다. 동적 광 산란에 의해 측정된 다분산도 지수는  $< 0.200$ 이다. 동적 광 산란에 의해 측정된 제타 전위는 pH 7.2 내지 7.8에서  $< -30.0\text{ mV}$ 이다. 전위차법에 의해 측정된 pH 값은 약 7.2 내지 약 7.8이다. 빙점 강하에 의해 측정된 오스몰랄 농도는 약 280 내지 약 400 mOsmol/kg이다. RP-HPLC에 의해 측정된 불순물 saRNA는  $< 15\%$ 이다.
- [0747] saRNA 캡슐화: RiboGreen과 saRNA 복합체화로부터의 형광 강도를 측정하여 총 및 "외부" 유리 saRNA 함량을 정량하여, %캡슐화를 측정한다. 약품 샘플 용액을 2가지 상이한 조건, 외부 saRNA에 대해 미처리된 샘플 및 총 saRNA에 대해 Triton X-100으로 처리된 샘플
- [0748] RNA의 함량을 농도를 알고 있는 표준으로부터 생성된 보정 곡선을 사용하여 측정한다.



[0749] 캡슐화된 saRNA의 함량%는 다음과 같이 계산한다:

$$E(\%) = \frac{C_T - C_F}{C_T} \cdot 100$$

[0750]

[0751] E (%)% 캡슐화된 saRNA

[0752] C<sub>T</sub> saRNA의 총 함량

[0753] C<sub>F</sub> 유리(외부) saRNA의 함량

[0754] 입자 크기 및 다분산도 지수: 리포좀의 입자 크기 및 PDI는 Zetasizer Nano ZS 장비(Malvern)를 사용하여 광자 상관 분광법(PCS)에 의해 측정한다.

[0755] 제타 전위: 표면 전위는 Zetasizer Nano ZS 장비(Malvern)를 사용하여 레이저 도플러 속도/레이저 도플러 유속 계(LDV/LDA)에 의해 측정한다.

[0756] pH: 리포좀 약품의 pH는 유리 전극을 사용하여 20 내지 25℃에서 측정한다.

[0757] 오스몰랄 농도: 오스몰랄 농도의 측정은 Osmomat 030(Gonotec)를 사용하는 순수(純水)와 비교한 빙점 강하의 원리에 기초한다.

[0758] 잔류 에탄올: 리포좀 커큐민 약품 중의 잔류 에탄올은 불꽃 이온화 검출기(GC/FID)를 사용하여 헤드스페이스 가스 크로마토그래피에 의해 정량한다.

[0759] 불순물 saRNA: saRNA 불순물의 함량(면적%)는 Waters XBridge C18 컬럼(4.6×100mm, 3.5μm 입자 크기)을 사용하여 이온쌍-역상(IPRP) HPLC에 의해 정량한다. 나노입자는 2% Triton X-100 완충액으로 파괴시키고, 방출된 saRNA는 물과 100% 메탄올 중의 100mM 헥사플루오로이소프로판올(HFIP)/7mM 트리에틸아민(TEA)의 구배를 사용하여 HPLC에서 분리시킨다. RNA는 260nm에서 검출된다. 총 피크 면적(100%)에서 주요 가닥(안티센스, 센스 가닥)의 피크 면적(%)을 공제하여 불순물의 함량(면적%)을 결정한다.

[0760] [표 18-1]

CEBPA-51의 특성

분석 시험	사양		결과
	단일 가닥	듀플렉스	
외관		백색 내지 담황색 분말	일치
동정 (LC-MS) - 센스 - 안티센스	6920 ± 3 Da 6723 ± 3 Da	6920 ± 3 Da 6723 ± 3 Da	6920 Da 6722 Da
순도 (RP-IP HPLC, 면적%) - 센스 - 안티센스 - 듀플렉스	NLT 90% NLT 90%	NLT 90%	96.90% 90.50% 92.60%
순도 (/EX HPLC, 면적%) - 센스 - 안티센스 - 듀플렉스	NLT 85% NLT 85%	NLT 85%	94.60% 92.20% 94.30%
순도 (SEC HPLC, 면적%)		NLT 90%	99.5%
바이오버든		NMT 100 CFU/g	30 CFU/g
세균 내독소		NMT 1 EU/mg	< 0.25 EU/mg
물 함량(카를-피셔)		NMT 10%	5%
나트륨 함량 (/GP-MS) (무수물 기준)		보고	5.6% w/w
UV에 의한 올리고뉴클레오타이드 함량 (무수물 기준)		보고	1040 µg/mg

[0761]

[0762] [표 18-2]

MTL-CEBPA의 특성

시험 방법	결과
외관	유백색
총 saRNA	2.50 - 2.56 mg/ml
saRNA 캡슐화	83% - 85%
MoChol 함량	24.9 - 26.9 mg/ml
DOPE 함량	17.3 - 18.4 mg/ml
CHEMS 함량	11.0 - 11.5 mg/ml
POPC 함량	4.7 - 4.8 mg/ml
콜레스테롤 함량	0.9 - 1.0 mg/ml
입자 크기 (z-평균)	107 nm - 112 nm
다분산도 지수	0.160 - 0.169
제타 전위	-35.6 - -39.1 mV
saRNA 불순물	5.9% - 6%
잔류 에탄올	≤0.5 % w/v
pH	7.4 - 7.6
오스몰랄 농도	349 mOsmol/kg
육안으로 보이지 않는 입자(Subvisible particle)	≥10 μm: 2 입자/용기 ≥ 25 μm: < 1 입자/용기
추출가능한 용적	통과
내독소	< 0.5 EU/ml
멸균	통과/성장 없음

[0763]

[0764] 실시예 18. 1차 인간 PBMC에서의 CEBPA-51의 면역안정성 연구

[0765] **연구 목표:** 본 연구의 목적은 인간 혈구에서 생체의 TLR 경로의 활성화에 의해 측정된, CEBPA-51의 면역안정성을 평가하는 것이었다.

[0766] **실험 디자인:** CEBPA-51에 의한 사이토킨 유도는 2명의 인간 공여자로부터 분리된 말초혈 단핵 세포(huPBMC)를 이용하여 시험하였다.

[0767] **TNF-α:** huPBMC를 형질감염 시약으로서 Dotap을 사용하여 133nM의 CEBPA-51 또는 대조군 서열 RD-01010(양성 대조군) 및 RD-01011(음성 대조군)로 삼중으로 형질감염시켰다. 단독의 형질감염 시약은 모의(mock) 대조군으로서 사용하였다. 또한, 대조군 ODN2216(CpG-올리고뉴클레오타이드) 및 RD-01002(콜레스테롤-접합된 siRNA)을 형질감염 없이 바로 500 nM의 농도로 첨가하였다. 20시간의 항온배양 후, 삼중 형질감염으로부터의 상청액을 풀링(pool)하고, TNF-α 분비를 시판 인간 TNF-α ELISA 검정을 사용하여 측정하였다(이중으로 측정된 샘플).

[0768] **IFN-α:** HuPBMC형질감염 시약으로서 Geneporter-2를 사용하여 133nM의 CEBPA-51 또는 대조군 서열 RD-01010(양성 대조군) 및 RD-01011(음성 대조군)로 삼중으로 형질감염시켰다. 단독의 형질감염 시약은 모의 대조군으로서 사용하였다. 또한, 대조군 ODN2216(CpG-올리고뉴클레오타이드) 및 RD-01002(콜레스테롤-접합된 siRNA)을 형질감염 없이 바로 500 nM의 농도로 첨가하였다. 20시간의 항온배양 후, 삼중 형질감염으로부터의 상청액을 풀링하고, IFN-α 분비를 시판 인간 IFN-α ELISA 검정을 사용하여 측정하였다(이중으로 측정된 샘플).

[0769] **결과:** 인간 PBMC에 의한 사이토킨 TNF-α 및 IFN-α의 분비를 CEBPA-51 또는 대조군 올리고뉴클레오타이드들로 형질감염시킨 후 측정하였다. CEBPA-51은 20시간의 항온배양 후에 세포 배양 배지로의 어떠한 유의적인 사이토킨 분비도 유발하지 않은 반면에, 양성 대조군은 예상되는 사이토킨 방출을 촉발하였다(도 32A 및 32B 참조).

[0770] **결론:** CEBPA-51은 CEBPA-51의 형질감염 후의 사이토킨 TNF-α 및 IFN-α 방출 결여에 의해 나타난 바와 같이 인간 PBMC에서 TLR-8 or TLR7/9 경로의 활성화를 촉발하지 않았다. 이러한 결과들은 화학적으로 변형된 saRNA는 면역자극성 활성을 갖지 않는다.

[0771] 실시예 19. I기 연구 및 안전한 출발 용량의 선택

[0772] 제안된 최초의 인간 임상 시험(first-in-human clinical trial)

- [0773] FIH 연구는 진행성 간암을 갖는 환자에서 RNA 올리고뉴클레오타이드 MTL-CEBPA의 안전성 및 내약성 (tolerability)을 조사하기 위한 RNA 올리고뉴클레오타이드 MTL-CEBPA를 이용한 다기관(multi-centre), 개방 표지(open-label) I기 임상 연구일 것이다.
- [0774] 징후
- [0775] 어떠한 요법 또는 수술에도 부적합한 것으로 간주되거나 국소-영역 요법 및 소라페닙 후에 진행되고 있는, 간세포 암종을 특징으로 하는 조작학적 진행성 암 또는 여분의 1차 간암 유형으로부터 유래된 2차 간 종양 소견을 나타내는 진행기 암을 갖는 환자의 치료.
- [0776] 연구 목적
- [0777] 1차 목적:
- [0778] 간세포 암종을 특징으로 하는 조작학적 진행기 암 또는 여분의 1차 간암 유형으로부터 유래된 2차 간 종양 소견을 나타내는 진행기 암을 갖는 참가자들에 대한 3주 동안의 주 1회 MTL-CEBPA 투여의 안전성 및 내약성을 측정하는 것.
- [0779] 2차 목적:
- [0780] MTL-CEBPA의 2기 권장용량(RP2D)을 측정; MTL-CEBPA의 약동학적(PK) 파라미터를 특징 규명; MTL-CEBPA의 약력학적(PD) 과정을 평가, 특히 혈청 알부민 및 빌리루빈에 미치는 MTL-CEBPA 효과의 특징 규명; MTL-CEBPA 투여 후에 HCC 환자에서 건강 관련 삶의 질의 변화를 평가하는 것.
- [0781] 바이오마커
- [0782] 바이오마커 전략
- [0783] 예측 바이오마커
- [0784] 포함/배제 바이오마커
- [0785] 지금까지, MTL-CEBPA에 대한 예측 바이오마커 또는 유전자 시그니처(gene signature)는 동정되지 않았다. 따라서, 연구를 위한 환자 적격 기준은 이러한 바이오마커를 포함하지 않는다.
- [0786] 탐색 예측 바이오마커
- [0787] CEBPA-51 및 톨 화합물에 의한 전임상 데이터 및 과학문헌은 CEBPA에 대항한 saRNA에 대한 HCC 반응에 관한 다수의 바이오마커 가설을 제시한다. 예를 들면, CEBPA saRNA에 대한 반응으로서 종양 세포 성장 정지는 CEBPA 발현의 기본 수준에 의해 좌우될 수 있다. C/EBP- $\alpha$  단백질을 불활성화시키는 특정 조절 기작은, 예를 들면, PI3K-AKT 경로 활성화 또는 C/EBP- $\beta$ 의 우성-음성 형태의 과발현의 결과로서 Ser193의 탈인산화를 포함하는 CEBPA saRNA에 대한 내성을 초래할 수 있다.
- [0788] 본 연구는 종양 반응의 예측 탐색 바이오마커를 포함하지 않는다. 그러나, 종양 민감성/내성의 바이오마커의 후향적 분석을 성취된 생검에 기초하여 수행할 수 있다.
- [0789] 예를 들면, 인슐린 및 TNF- $\alpha$ 를 통한 특정 내분비 루프가 CEBPA 활성을 조절하는 것으로 공지되어 있지만, MTL-CEBPA에 대한 섬유증 또는 경화증 간의 반응성에 대한 확정적 바이오마커 가설은 지금까지 수립되지 않았다. 예측 바이오마커의 전향적 분석은 현재 구상되어 있지 않다; 그러나, 후향적 분석은 성취된 조직에 기초하여 수행할 수 있다.
- [0790] 반응 바이오마커
- [0791] 표적 관여
- [0792] CEBPA-51 saRNA의 분자 표적은 CEBPA 프로모터이다. CEBPA 전사의 상향 조절은 CEBPA mRNA의 qRT-PCR을 통해 또는 C/EBP- $\alpha$  단백질의 면역역 샘플 통해 조직 샘플에서 측정할 수 있다.
- [0793] 몇몇 탐색 접근법은 CEBPA 발현의 변화를 측정하고 기작 증명을 확립하기 위해 계속될 것이다. 확장기 동안, 순환 종양 세포(CTC)가 C/EBP- $\alpha$  단백질 수준의 면역염색을 위해 처리 전/처리 후에 수집될 것이다. 본 발명자들이 임의의 일치된 처리 전/처리 후 생검으로부터 충분한 조직을 수득할 경우, 본 발명자들은 전임상 모델에서 사용된 qRT-PCR 방법에 의해 CEBPA mRNA 수준을 검토하는 것뿐만 아니라 면역염색에 의해 C/EBP- $\alpha$  단백질 수준

을 검토하는 것을 목표로 할 수 있다. WBC와 같은 대용 조직의 사용은 지금까지 검증되지 않았지만, 일단 MTD가 확립되면 도입될 수 있는 표적 관여를 입증하기 위한 또 다른 잠재적 옵션으로서 조사될 것이다.

[0794] PD 바이오마커

[0795] PD 바이오마커는 C/EBP- $\alpha$ 의 직접적 전사적 제어하에 있는 간-특이적 유전자 및 이의 각각의 단백질 생성물(근위 바이오마커)뿐만 아니라 C/EBP- $\alpha$ -의존적 분화 또는 증식 프로그램의 마커인 다운스트림 유전자 표적 및 단백질(원위 바이오마커)을 포함한다. C/EBP- $\alpha$ 의 몇몇 근위 바이오마커는, 예를 들면, 알부민, AFP, 트랜스페린 및 응혈 인자를 포함하여 혈청 중에서 모니터링될 수 있는 분비성 단백질이다.

[0796] 샘플 채취의 용이성과 검증된 임상 검정의 입수 가능성 때문에 1차 간-특이적 바이오마커로서 혈청 알부민이 선택되었다. 기타 혈청 기반 바이오마커는 추가의 탐색 PD 바이오마커로서 조사 중에 있다.

[0797] 처리 전/처리 후 종양 생검의 입수 가능성에 따라서, 세포 주기 조절 단백질 p21의 변화를 종양 세포 종양 정지의 마커로서 IHC에 의해 종양 절편에서 평가할 것이다.

[0798] 대용 효능 바이오마커

[0799] 혈청 알부민 및 총 빌리루빈 수준은 본 연구에서 2차 종점이다. 알부민 및 빌리루빈은 전체 간 기능 상태의 검증된 바이오마커이다. 또한, 알부민과 빌리루빈 혈청 수준(ALBI 등급)의 결합된 측정은 진행성 HCC 및 간 질환이 있는 환자에서 생존과 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 혈청 알부민과 빌리루빈 둘 다는 간 질환의 전임상 모델에서 MTL-CEBPA 처리에 반응하는 것으로 나타났으며, 대조군과 비교하여 알부민의 개선 및 빌리루빈 수준의 거의 정상화가 있었다.

[0800] CTC 및 순환 DNA가 확장기 동안 종양 반응의 탐색 바이오마커로서 수집될 것이다. 혈청  $\alpha$ -태아단백질(AFP)은 HCC 부하의 검증된 마커이다. 그러나, AFP 유전자도 또한 정상 간에서 C/EBP- $\alpha$ 의 제어하에 있으며, MTL-CEBPA 처리는 AFP 혈청 수준을 증가시킬 것으로 예상된다. 이러한 간 및 종양에서 반대되는 반응 때문에, AFP 수준은 신중하게 해석될 필요가 있을 것이다.

[0801] 효능 바이오마커

[0802] 간 기능 상태는 알부민, 총 단백질, 빌리루빈, ALP, GGT, ALT, AST 및 암모니아 수준을 포함하는 혈청 화학에 의해 평가될 것이다. MTL-CEBPA 처리에 대한 종양 반응은 CT 또는 MRI에 의해 모니터링될 것이고 표준 기준(RECIST)을 사용하여 평가될 것이다.

[0803] 약물 PK 및 생체분포

[0804] MTL-CEBPA의 ADME 모니터링은 혈장 중 총 API 수준의 측정으로 제한될 것이다. 유리 dsRNA의 빠른 대사작용 및 청소 때문에, 주로 총 API 수준가 캡슐화된 CEBPA-51를 대표할 것이다. 나노입자 및 이의 지질 성분은 별도로 모니터링되지 않을 것이다. 순환 중의 온전한 나노입자의 수준은 총 API 수준에 비례하는 것으로 가정된다. CEBPA-51의 조직 생체분포 및 대사산물은 측정되지 않을 것이다.

[0805] 바이오마커 검정

[0806] 모든 혈청 바이오마커는 공인된 현지 실험실에 의해 평가될 것이다. 생검에서의 유전자 발현은 검증된 면역조직화학(IHC) 검정에 의해 측정될 것이다.

[0807] 환자의 혈장 중의 총 API를 측정하기 위해 프로그램-특이적 PK 검정이 개발되었다. 상기 검정은 두 RNA 가닥을 분리시키는 CEBPA-51의 가열-변성에 이은 고정된 상보적 PNA 프로브에 대한 안티센스 가닥의 하이브리드화에 기초한다. 이와 같이 검정은 RNA 듀플렉스 그 자체보다는 안티센스 가닥(및 PNA 프로브에 하이브리드화할 수 있는 이의 대사산물) 중 임의의 것의 농도를 측정한다. 상기 검정은 독일 소재의 악소랩스 게엠베하(Axolabs GmbH)에 의해 비임상 및 임상용으로 개발되고 검증되었다.

[0808] 연구 결과 측정

[0809] 1차 결과 척도

[0810] 활력징후(혈압, 맥박, 체온, 호흡률을 포함), ECG(12 리드(lead)) 및 안정성 실험실 데이터(혈액학, 응혈, 임상 화학, 보체 인자 B(Bb)의 응고 및 활성화 단편 및 보체 성분 3a(C3a)을 포함)뿐만 아니라 내약성에 관한 참가자와 조사자 둘 다의 평가 서술이 수집될 것이다.



- [0811] 첫번째 MTL-CEBPA 주입 후 기록된 모든 이상사례는 중증도, 예측성 및 '비관련', '가능함', '개연성 있음' 또는 '확실한'과 같은 연구 약물과의 관련성에 대해 등급이 매겨질 것이다.
- [0812] MTL-CEBPA의 안정성 및 내약성은 독성 기준(NCI CTCAE v 4.03)에 따라 등급이 매겨지고 신체 계통 및 진단에 따라 분류된 이상사례의 빈도의 측면에서 평가될 것이다.
- [0813] 2차 결과 척도
- [0814] 정맥내 투여 후 혈장 중 MTL-CEBPA의 약동학적(PK) 특성을 측정하기 위해, MTL-CEBPA의 혈장 농도는 하이브리드 화 기반 HPLC-검정을 사용하여 정의된 시점에서 분석될 것이다.
- [0815] 본 프로토콜은 알부민, 빌리루빈, 간 효소 수준, 케모킨 및 종양 마커를 포함하는 대용 PD 바이오마커의 측정치들을 수집할 계획이다. 종양 조직에서의 유전자 및 단백질 발현도 또한 정맥내 투여 후 간 종양 환자에서 MTL-CEBPA의 약력학적 특징의 측정을 지원한다.
- [0816] 건강 관련 삶의 질 설문 데이터는 자기 기입식 FACT-Hep 설문지를 사용하여 1일째, 15일째, 8주째 및 1b부의 EOS에 수집될 것이다.
- [0817] 연구 디자인
- [0818] 본 연구는 두 부분의, 다기관, 개방 표지 인간에서 최초의 I기 임상 연구이다: 용량 증량(dose escalation)에 이어서 용량 확대(dose expansion)
- [0819] 1a부 - 용량 증량
- [0820] 본 연구의 용량 증량 부분은 표준 3+3 디자인에 따른다. 용량은 약 20 내지 약 160 mg/m<sup>2</sup>이다. 적격성 기준을 충족하는 진행성 HCC를 갖는 참가자 또는 2차 간 종양을 갖는 참가자는, 약물 관련 3등급 독성(NCI-CTCAE 버전 4.03)의 발생 또는 혈청 알부민의 최대 개선이 상기 정의된 바와 같이 관찰될 때까지, 각각 다음 용량에서 3명의 참가자의 6개의 코호트(cohort)로 모집될 것이다: 28, 47, 70, 98, 130, 160 mg/m<sup>2</sup>. 용량 증량 과정은 상기 기재한 바와 같다. 용량 및 스케줄은 연구로부터 생성된 데이터에 따라서 변형될 수 있다.
- [0821] 첫번째 용량 코호트에서, 첫번째 참가자는 연구 출발 용량에서 MTL-CEBPA 처리를 받는다. MTL-CEBPA가 3주 동안 주 1회 60분에 걸쳐서 정맥내 주입에 의해 투여되고, 이어서 1주일의 휴지기가 뒤따른다; 이것이 4주 사이클로서 정의된다. MTL-CEBPA의 출발 용량의 결정은 설치류 및 시노물구스 원숭이에서의 GLP 독성 연구에 기초하였다. 이러한 데이터에 기초하여, MTL-CEBPA 28 mg/m<sup>2</sup>의 출발 용량이 인간에서 안전한 출발 용량인 것으로 간주되었다.
- [0822] 임상적 이득을 얻은 본 연구의 1a부의 참가자들은 추가의 사이클을 받게될 것이다. 참가자들은 또한 특별 배려로 계속해서 MTL-CEBPA를 투여받을 수 있다; 조사자는 참가자가 치료를 지속할 수 있기 전에 사례별로 후원자와 상의하여야만 한다.
- [0823] 이러한 환자 그룹에서 RP2D를 확인하기 위해 HCC만을 갖는 3명의 참가자들의 추가 코호트가 1a부의 완료 후 및 1b부를 시작하기 전에 추가될 수 있다. 상기 코호트는, 임상 데이터의 검토 및 본 연구의 1a부의 HCC 참가자의 모집 후에 PI 및 후원자의 안전위원회에 의해 적절한 것으로 간주될 경우에만 고려될 것이다.
- [0824] RP2D는 안전성 검토 위원회(SRC)에 의해 본 연구의 용량 확대 부분에서 참가자 집단에 대한 유리한 위험/유익성 보상을 최대화하는 가장 적절한 용량으로서 정의될 것이다.
- [0825] 1b부- 용량 확대
- [0826] 일단 RP2D가 수득되면, 12 내지 15명의 적절한 진행성 HCC 참가자들의 추가 그룹이 순차적으로 모집될 것이다. 각 참가자는 2회의 사이클 동안 등재될 것이며, 참가자가 연구에서 철수할 때까지 RP2D에서 MTL-CEBPA가 투여될 것이다.
- [0827] 임상적 이득을 얻는 본 연구의 1b부의 참가자들은 추가의 사이클을 받게될 것이다. 참가자들은 또한 특별 배려로 계속해서 MTL-CEBPA를 투여받을 수 있다. 조사자는 참가자가 치료를 지속할 수 있기 전에 사례별로 후원자와 상의하여야만 한다.
- [0828] 연구 종전

- [0829] 1차 중점
- [0830] 1a부에서, 1차 중점은 다음과 같이 정의되는 용량 제한 독성(DLT)일 것이다: 3일이 넘는 적절한 치료에도 불구하고 등급 > 3 오심, 구토 및 설사; 기저선과 비교하여 2포인트 초과 환자의 활동 상태의 감소; 7일 초과하여 등급 > 3 피로; 등급 > 3 헤모글로빈, 혈소판 또는 중성구 비정상 실험실 수치, 5일 초과 골수억제; 등급 > 3 빌리루빈 비정상 실험실 수치(>3.0 x ULN); 등급 4 AST 및/또는 AST 비정상 실험실 수치(>20.0 x ULN)를 포함하는 일반적인 이상사례 범주(Common Terminology Criteria for Adverse Events)(CTCAE) v4.03에 따른 3등급 이상의 임의의 약물 관련 독성 등급.
- [0831] 임의의 잠재적 DLT의 평가는 처음 28일(즉, 첫번째 사이클) 동안 수행될 것이다. 코호트의 모든 환자들은 임의의 용량 증량이 일어날 수 있기 전에 DLT 기간을 완료해야 한다; 이를 위해, 가능한 처리 관련 부작용을 평가하기 위해 세번째 용량이 본 연구의 1a부 동안 이전의 코호트의 최종 참가자에게 투여된 후에 7일 이상의 간격이 의무적이다.
- [0832] 1b부에서, MTL-CEBPA의 안정성 및 내약성은 독성 기준(NCI CTCAE v 4.03)에 따라 등급이 매겨지고 신체 계통 및 진단에 따라 분류된 이상사례의 빈도의 측면에서 평가될 것이다.
- [0833] 2차 중점
- [0834] PK 파라미터는 최대 혈장 농도(C<sub>max</sub>), 최대 혈장 농도까지의 시간(T<sub>max</sub>), 혈장 농도 곡선하 면적(AUC) 및 정맥 내 투여 후 MTL-CEBPA의 반감기(t<sub>1/2</sub>)에 의해 정의되리 것이다.
- [0835] 본 프로토콜은 알부민, 빌리루빈, 간 효소 수준, 케모킨, CTC, 종양 마커 및 종양 조직내 유전자 및 단백질 발현 수준을 포함하는 대용 바이오마커의 기저선으로부터의 변화의 서술적 분석을 사용하여 진행성 HCC 참가자 또는 2차 간 종양 소견을 나타내는 참가자에서 MTL-CEBPA의 임상 효능(PD)을 평가할 계획이다. 참가자들의 건강 관련 삶의 질은 FACT-Hep 스코어의 기저선으로부터의 변화의 서술적 분석을 사용하여 평가될 것이다.
- [0836] 연구 등재 및 철회
- [0837] 스크리닝 기간 동안, 참가자가 ICF에 서명한 후, 다음의 기준들이 평가될 것이다; 각 환자는 본 연구 동안 모든 포함 요건을 충족해야 하며 배제 요건 중 어느 것도 충족하지 않아야 한다. 어떤 상황에서도 이 원칙에 대한 예외가 있으며, 포기는 부적절하고 GCP에 따르지 않는 것으로 간주될 경우에는 후원자에 의해 승인되지 않을 것이다.
- [0838] 참가자들은 모집 순서에 따라서 순차적으로 특별한 참가 ID를 배정받을 것이다(예를 들면, 001, 002 등).
- [0839] 포함 기준
- [0840] 참가자들은 본 연구에 참가할 자격이 있기 위해서 다음의 모든 포함 기준을 충족해야 한다.
- [0841] **용량 증량을 위한 포함 기준(1a부)**
- [0842] 본 연구의 용량 증량 부분은 진행성 HCC 또는 2차 간 종양을 갖는 환자들을 모집하는데 중점을 둘 것이다. 모집은 관찰된 독성에 따라 좌우될 것이다. 그럼에도 불구하고, 프로토콜은 1a부에서 최대 30명의 참가자를 모집하는 것을 목표로 한다.
- [0843] 진행성 HCC 환자에 대한 포함 기준: 조직학적으로 확인된 진행성 HCC; 수술 또는 어떠한 치료에도 부적격한 것으로 간주되고 국소-영역 요법 및/또는 소라페닙 후에 진행되고 있는 환자(나이프 소라페닙 환자는 적격하다); MRI 또는 CT로 측정된 표적 병변 크기가  $\geq 1.0\text{cm}$ 인 적어도 하나의 측정 가능한 병변; 차일드-푸(Child-Pugh) A 또는 클래스 B7 질환; 혈소판  $\geq 75 \times 10^9/\text{L}$ ; 혈청 알부민  $> 28 \text{ g/L}$  및  $< 35 \text{ g/L}$ ; ALT 및 AST  $\leq 5 \times \text{ULN}$ .
- [0844] 2차 간 암 환자에 대한 포함 기준: 조직학적으로 확인된 진행성 여분의 간 고형 종양 및 이전의 표준 요법에 난치성인 불치성 간 종양을 갖거나 표준 요법이 존재하지 않는 환자; 간에 위치한 MRI 또는 CT로 측정된 표적 병변 크기가  $\geq 1.0\text{cm}$ 인 적어도 하나의 측정 가능한 병변; 혈소판  $\geq 100 \times 10^9/\text{L}$ ; 혈청 알부민  $> 25 \text{ g/L}$ ; ALT 및 AST  $\leq 3 \times \text{ULN}$ .
- [0845] 기타 포함 기준: 임의의 특수한 시험 절차 전에 입수된 서면동의서; 16세 이상의 남성 또는 여성; ECOG 활동 상태 0 및 1; 입수가 가능한 보편 종양 조직 또는 전처리 종양 생검을 수행하는 능력 및 수행하고자 하는 의향; 빌리루빈  $\leq 50 \mu\text{mol/L}$ , WBC  $\geq 2.0 \times 10^9/\text{L}$ , 절대 호중구 계수  $\geq 1.5 \times 10^9/\text{L}$ , 헤모글로빈  $\geq 9.0 \text{ g/dL}$  또는 프로트롬

빈 시간(PT) <20초에 의해 입증되는 허용되는 실험실 파라미터; 혈청 크레아티닌  $\leq 1.5 \times \text{ULN}$  또는 계산된 크레아티닌 청소율  $\geq 60 \text{ mL/분/1.73 m}^2$ (CKD-EPI 식을 사용하여 추정됨)에 의해 입증되는 허용되는 간 기능; 임신 가능성이 있는 여성에 대한 음성 혈액 임신 테스트; 스크리닝 시작 전 적어도 2개월 동안 확립된 호르몬 피임약 처리를 사용하는, 전체 연구 동안 임신 가능성이 있는 여성에서 안전한 피임; 임신 가능성이 있는 여성(스크리닝 시작 전 적어도 2개월 동안 호르몬 피임약을 사용하지 않는)의 경우, 전체 연구 동안 효과적 출산 제어 방법을 위한 기준을 충족하는 이중 피임 방법이 요구되며, 즉 콘돔, 패서리 또는 자궁내 장치와 같은 적어도 2가지의 효과적 출산 제어 방법이 사용되어야 한다; 임신 가능성이 있는 파트너가 있는 남성 참가자는 그의 파트너가 시험 동안 그리고 마지막 투약 후 3개월 동안 다른 피임 방법을 사용하는 것 이외에도 장벽 피임을 사용하는 것이 요구된다. 남성 참가자는 또한 임신한 또는 수유 여성과의 성관계를 삼가하거나 콘돔을 사용하도록 권고될 것이다. 예정된 방문, 치료 계획, 실험실 시험 및 기타 연구 과정을 포함하는 모든 프로토콜 요건을 충족하고자 하는 의향 또는 이러한 요건을 충족하는 능력.

[0846] **용량 확대를 위한 포함 기준(1b부)**

[0847] 본 프로토콜은 12 내지 15명의 진행성 HCC 참가자를 모집하는 것을 목표로 한다.

[0848] 조직학적으로 증명된 진행성 HCC; 수술 또는 어떠한 다른 치료에도 적격하지 않은 것으로 간주되고 국소-영역 요법 및/또는 소라페닙 후에 진행되고 있는 환자(나이브 소라페닙 환자는 적격하다); MRI 또는 CT로 측정된 표적 병변(들) 크기가  $\geq 1.0\text{cm}$ 인 적어도 하나의 측정 가능한 병변; 차일드-푸 A 또는 B7 질환; 혈소판  $\geq 75 \times 10^9/\text{L}$ ; 혈청 알부민  $> 28 \text{ g/L}$  및  $< 35 \text{ g/L}$ ; ALT 및 AST  $\leq$  정상 범위의 상한치의 5배를 갖는 간 부전; 임의의 특수한 시험 과정 전에 입수된 서면동의서; 16세 이상의 남성 또는 여성; ECOG 활동 상태 0 및 1; 입수가 가능한 보편 중앙 조직 또는 처리전 중앙 생검을 수행하는 능력 및 수행하고자 하는 의향; 빌리루빈  $\leq 50 \mu\text{mol/L}$ , WBC  $\geq 2.0 \times 10^9/\text{L}$ , 절대 호중구 계수  $\geq 1.5 \times 10^9/\text{L}$ , 헤모글로빈  $\geq 9.0 \text{ g/dL}$  또는 프로트롬빈 시간(PT) <20초에 의해 입증되는 허용되는 실험실 파라미터; 혈청 크레아티닌  $\leq 1.5 \times \text{ULN}$  또는 계산된 크레아티닌 청소율  $\geq 60 \text{ mL/분/1.73 m}^2$ (CKD-EPI 식을 사용하여 추정됨)에 의해 입증되는 허용되는 간 기능; 임신 가능성이 있는 여성에 대한 음성 혈액 임신 테스트; 스크리닝 시작 전 적어도 2개월 동안 확립된 호르몬 피임약 처리를 사용하는, 전체 연구 동안 임신 가능성이 있는 여성에서 안전한 피임; 임신 가능성이 있는 여성(스크리닝 시작 전 적어도 2개월 동안 호르몬 피임약을 사용하지 않는)의 경우, 전체 연구 동안 효과적 출산 제어 방법을 위한 기준을 충족하는 이중 피임 방법이 요구되며, 즉 콘돔, 패서리 또는 자궁내 장치와 같은 적어도 2가지의 효과적 출산 제어 방법이 사용되어야 한다; 임신 가능성이 있는 파트너가 있는 남성 참가자는 그의 파트너가 시험 동안 그리고 마지막 투약 후 3개월 동안 다른 피임 방법을 사용하는 것 이외에도 장벽 피임을 사용하는 것이 요구된다. 남성 참가자는 또한 임신한 또는 수유 여성과의 성관계를 삼가하거나 콘돔을 사용하도록 권고될 것이다. 예정된 방문, 치료 계획, 실험실 시험 및 기타 연구 과정을 포함하는 모든 프로토콜 요건을 충족하고자 하는 의향 또는 이러한 요건을 충족하는 능력.

[0849] 참가자 배제 요건

[0850] 참가자는 다음의 배제 기준들 중 어느 하나라도 충족되는 경우에는 본 연구에 참가하지 않아야 한다.

[0851] 진행성 HCC 환자를 위한 배제 기준: 차일드-푸 클래스 B8, B9 또는 C;

[0852] 마지막 28일 이내에 TACE, 소라페닙 또는 화학요법으로 처리된 환자.

[0853] 기타 배제 기준: 15일 이내 전신 암-지향성 치료 또는 30일 이내 조사 약물 전; 등급  $> 1$  스크리닝시에 치료 관련 독성(탈모는 제외); 임상적으로 유의적인 암 복수를 갖는 환자; 식도 정맥류로 인한 출혈의 임의의 에피소드 또는 마지막 3개월 이내의 기타 비제어된 출혈; 첫번째 MTL-CEBPA 주사 전 마지막 7일 이내에 혈청 알부민이 투여된 환자; 인간 면역결핍증 바이러스(HIV)로의 공지된 감염; 중추신경계(CNS) 전이를 갖는 환자; 뉴욕심장학회(New York Heart Association) (NYHA) 클래스 I보다 큰 것으로서 특징지워지는 심부전증의 징후 및 증상; 프리데리시아(Fridericia) 보정 공식을 사용하여 보정된,  $\geq 450 \text{ ms}$  (남성) 및  $\geq 460 \text{ ms}$  (여성)로서 정의된 연장된 QT(QTc) 간격으로 나타내지는 환자; 또는 기타 임상적으로 유의적인 심장 이상; 마지막 30일 이내의 대수술; 패혈증, 폐색성황달 또는 뇌병증을 갖는 환자; 특발성 세균성 복막염 또는 신부전증 또는 물질 또는 부형제에 대한 알레르기 반응의 증거; 임신한 또는 수유 여성; 조사자의 판단하에 프로토콜 특이적 절차에 따르는 환자의 능력에 영향을 줄 수 있는 임의의 기타 병태(예를 들면, 알려진 또는 의심되는 불량한 순응도 등).

[0854] 처리 배정 과정

- [0855] **1a부 - 용량 증량**
- [0856] 참가자들은 2회 사이클 동안 등재될 것이다. 본 연구의 용량 증량 단계는 도 33에 도시된 바와 같은 표준 3+3 디자인에 따른다. 3명의 적절한 환자들의 6개 코호트가 다음 용량에서 계획된다: 28, 47, 70, 98, 130, 160 mg/m<sup>2</sup>. 개별적 용량은 뒤부아 & 뒤부아(DuBois & DuBois) (133) 체표면적(BSA) 계산을 사용한 가장 최근의 환자의 신장 및 체중에 기초할 것이다.
- [0857] 각각의 용량 코호트에서 첫번째 환자는 연구 출발 용량에서 MTL-CEBPA 처리를 받는다. MTL-CEBPA는 3주 동안 1주 1회로 1일째, 8일째 및 15일째에 정맥내 주입에 의해 60분에 걸쳐서 투여되고 이어서 1주일의 휴지기가 뒤따른다. 이것이 한 사이클로서 정의된다.
- [0858] 처리 관련 부작용을 평가될 수 있도록, 후속적 참가자는 첫번째 환자의 첫번째 투약 후 7일 이상 후에 모집될 것이다.
- [0859] 상기 정의된 바와 같은 임의의 잠재적 DLT의 평가는 처음 28일(즉, 첫번째 사이클) 동안 수행될 것이다.
- [0860] 이상사례 또는 독성이 명백해질 수 있도록 하기 위해 이전의 코호트의 마지막 참가자의 최종 투약 사이에 7일 이상의 간격이 경과하여야 한다. 다음 코호트로 진행하려는 결정은 SRC에 의한 이전 코호트 안정성 및 모든 참가자들에 대한 임상 데이터의 검토를 필요로 할 것이다. 검토 후, 다음 코호트가 개시될 수 있다. 그 결정은 문서로 기록될 것이며, 기록은 시험 마스터 파일(Trial Master File)(TMF)에서 유지될 것이다.
- [0861] 용량 코호트의 3명의 환자에서 DLT로서 정의되는 독성이 발생할 경우, 다음 용량 수준으로의 용량 증량이 수행될 수 있다. 용량 코호트의 3명의 환자 중 1명에서 DLT가 있을 경우, 이러한 용량에 3명의 추가 참가자가 등재될 것이다. 상기 3명의 추가 참가자에서 추가 DLT 발생이 없을 경우, 다음 용량 수준으로의 증량이 수행될 수 있다. 그러나 이러한 6명의 환자(3+3) 중 2명 이상이 DLT 소견을 나타낼 경우, 추가 용량 증량 단계는 없을 것이며 용량 수준은 최대 허용 용량(maximum tolerated dose)(MTD)으로서 간주될 것이다. 추가로, 2명의 참가자가 단일 코호트에서 DLT 소견을 나타낼 경우, 추가의 용량 증량 단계는 없을 것이며 용량 수준은 MTD로서 간주될 것이다. 모든 용량 증량 결정은 SRC의 판단에 기초할 것이다.
- [0862] HCC만을 갖는 3명의 환자의 추가 코호트가 1a부의 완료 후 및 1b부를 시작하기 전에 추가될 수 있고, 1a부와 동일한 투약 용법을 사용하여 MTL-CEBPA의 중간 용량이 투여될 수 있다. 상기 코호트는, 임상 데이터의 검토 및 본 연구의 1a부의 HCC 참가자의 모집 후에 PI 및 후원자의 안전위원회에 의해 적절한 것으로 간주될 경우에만 고려될 것이다.
- [0863] RP2D는 SRC에 의해 본 연구의 용량 확대 부분에서 참가자 집단을 위한 유리한 위험/유익성 보상을 최대화하는 가장 적절한 용량으로서 정의될 것이다. 도 33은 용량 증량의 흐름도이다.
- [0864] **1b부 - 용량 확대**
- [0865] 본 연구의 증량 부분의 완료 후, 진행성 HCC 소견을 나타내는 12 내지 15명의 적절한 참가자들이 2회의 사이클 동안 본 연구의 용량 확대 부분으로 순차적으로 등재될 것이며 RP2D에서 MTL-CEBPA가 투여될 것이다.
- [0866] 철회의 이유
- [0867] 참가자는 다음의 이유들로 본 연구를 중단할 수 있다:
- [0868] 환자 결정: 참가자는 어느 때라도 자유롭게 불이익 없이 그/그녀의 본 연구 참여로부터 철회할 수 있다; 전술한 바와 같은 예방적 과정으로 제어되지 않는, 등급 >3 본 연구 의약에 대한 주입 관련 알레르기 반응; 본 연구에 의 지속적 참가가 참가자에게 최선의 이익이 되지 않을 정도로 임의의 임상 이상사례(AE), 실험실 이상, 병발성 질병 또는 기타 의학적 병태 또는 상황이 일어나거나 악화된다; 조사자의 판단하에 참가자가 임상적 이득을 얻지 못할 경우 확인된 질환 진행; 조사자에 의해 판단된 본 프로토콜에 대한 심각한 불응성; 참가자가 임신하게 된다; 참가자가 사망한다.
- [0869] 연구-특이적 중단 기준: 이득과 함께 혈청 알부민의 증가 $\geq 45$  mg/L의 존재; 참가자는 연구 중단이 참가자의 최선의 이익이 될 경우 또는 참가자의 반응이 긍정적이고 수술, RFA, TACE 또는 소라페닙과 같은 본 연구의 시작 시에는 부적절하였던(즉, 병기 이동) 다른 통상의 요법을 받을 수 있을 경우 조사자에 의해 본 연구 의약을 중단하도록 권고될 수 있다.
- [0870] 연구 종료



- [0871] 환자들은 어느 때라도 자유롭게 추가 치료에 대한 불이익 없이 본 연구(IP 및 평가)로부터 철수 할 수 있다. 그/그녀의 본 연구 참여를 철회할 수 있다(동의 철회); 이러한 참가자들은 항상 그 이유(들) 및 임의의 AE의 존재에 대한 질문을 받을 것이다. 가능한 한, 참가자들은 조사자들에 의해 관찰되고 평가될 것이다. AE는 추적 조사될 것이다.
- [0872] 생존은, 공개적으로 입수가 가능한 공급원 또는 참가 의료진과의 접촉에 기초하여, 예정된 연구 종결시 및 참가자가 동의를 철회하는 경우에 조사될 수 있다. 이들 데이터는 eCRF에서 수집될 것이다.
- [0873] 참가자가 추적 조사에서 누락되는 것을 방지하기 위해, 친지 연락처를 포함하는 이들의 상세 연락처가 초기에 수집되고 현장 직원 또는 대표에 의해 정기적으로 갱신되어야 한다.
- [0874] 투약 계획
- [0875] MTL-CEBPA의 투여는 3주 동안 주 1회가 될 것이며 이어서 1주일의 휴지기가 뒤따를 것이다[3주 + 1주 = 4주 = 1 사이클] 다른 스케줄 및 용량은 진행중인 전임상 실험 또는 본 연구로부터 생성된 데이터로부터의 결과에 따라서 조사될 것이다.
- [0876] 3명의 적절한 참가자들의 6개 코호트가 다음 용량에서 계획된다: 28, 47, 70, 98, 130, 160 mg/m<sup>2</sup>.
- [0877] 추가의 승인된 치료 옵션이 존재하지 않는 1차 또는 2차 간 종양 환자들 중에서 계획된 FIH 1기 연구에서의 치료로부터 임상적으로 이득을 얻은 환자, 즉 임상적 이득이 지속되는 한 치료가 지속될 수 있는 환자의 경우에는 연장된 치료가 허용된다.
- [0878] 인간 출발 용량의 계산에 대한 고려
- [0879] MTL-CEBPA는 2가지 간 질환 모델에서 효과적이었다. CCL4 모델에서, 0.3 mg/kg만큼 낮은 용량의 격주 투여는 한 서브세트의 질환 증상들의 감소 또는 역전을 나타냈다. 그러나, 혈청 알부민 및 간 하이드록시프로필린을 포함하는, 질환과 관련된 것으로 고려되는 일부 바이오마커에 미치는 최대의 영향을 위해서는 3 mg/kg의 최고 용량이 요구되었다.
- [0880] 따라서, 상기 모델에서 최대로 효과적인 용량은 2주 격주 용법의 경우에 3 mg/kg 이상일 가능성이 있다. 1회 용량 수준(4 mg/kg의 3회 투약)만을 DEN 모델에서 평가하였다. 따라서, 더 낮은 용량이 활성을 갖는지 또는 더 높은 용량이 관찰된 종양에 미치는 영향 및 기타 질환 평가 기준을 추가 개선시킬 수 있는지 여부는 분명하지 않다. 따라서, 1주일의 처리에 효과적인 용량은 4 mg/kg로서 추정된다.
- [0881] MTL-CEBPA를 사용하였을 때의 래트 PK 데이터에 기초하여, CCL4 및 DEN 모델에서 2주 1회 및 3주 1회 스케줄은 순환계내 약물 축적을 유도하지 않아서 인간 용량 추정이 단일 용량에 기초할 수 있도록 해야 한다. 종합하면 그리고 DEN 모델에서의 매우 짧은 처리 기간을 고려하면, 3 내지 4 mg/kg의 반복 용량이 의미있는 항종양 효과를 위해 충분할 수 있고 0.3 내지 3 mg/kg의 용량이 간 기능의 개선을 위해 충분할 수 있다.
- [0882] 비임상 독성 프로그램은 독성동태학 프로파일링 및 국소 내약성 평가를 포함하여 래트 및 시노물구스 원숭이에서 반복-용량 독성 시험하는 것을 포함한다.
- [0883] 7.5 mg/kg에서 4주 동안 3일 연속 매일 주입(1시간 주입)에 의해 시노물구스 원숭이에게 투여된 MTL-CEBPA(총 12회 투여)는 임상적으로 내약성이 우수하였고, 오직 체중, 음식 소비, 임상 징후, 혈액학적, 응혈 및 혈청 임상 화학 파라미터의 일시적인 유해하지 않은 변화뿐만 아니라 혈소판 계수의 감소 및 대안적 및 전형적 보체 경로의 활성화만을 유도하였다. 1개월의 연구 기간 동안 주 3회로 투여된 7.5 mg/kg는 시노물구스 원숭이에서 NOAEL로서 정의되었다. 7.5 mg/kg에서 4주 동안 3일 연속 정맥내 경로(1시간 주입)에 의해 래트에게 투여된 MTL-CEBPA(총 12회 투여)는 몇몇 동물에서 더 적은 체중 증가 및 음식 섭취, 임상 징후, 혈액학적, 응혈 및 혈청 임상 화학 파라미터의 다양한 변화뿐만 아니라 주입 부위에서의 국소 반응을 유도하였다. 이의 정도가 작고 가역적이기 때문에, 이러한 임상적 병리상태 변화는 유해한 것으로 간주되지 않았다. 조직학적으로, 주요 조사결과는 미립자 시험 항목의 청소율을 반영할 수 있는 일부 기관 또는 조직내의 대식세포 공포형성이었으며, 이는 유해한 것으로 간주되지 않았다. 1개월의 연구 기간 동안 주 3회로 투여된 7.5 mg/kg는 래트에서 HNSTD로서 정의되었다.
- [0884] 처리 기간의 말기에 원숭이 또는 래트에서의 MTL-CEBPA-관련 안과학적 또는 심혈관 조사결과는 없었다.
- [0885] 시험관내 면역원성 검정을 CEBPA-51로 형질감염된 1차 인간 말초혈 단핵구(PBMC)를 사용하여 수행하였다. TNF- $\alpha$  및 IFN- $\alpha$ 의 평가는 톨 유사 수용체(toll-like receptor)(TLR) 경로 유도의 측면에서 유도를 나타내지 않았



고 이에 따라 면역자극성 활성을 나타내지 않았다.

- [0886] 상기한 바와 같이 1개월의 연구 기간 동안 주 3회로 투여된 7.5 mg/kg는 래트에서 HNSTD로서 정의되었고 원숭이에서는 MTL-CEBPA에 대해 NOAEL로서 정의되었다. 동물에서 사람으로의 용량 추정이 전통적으로 체표면적(BSA)-관련 스케일링 또는 유사 수학적 패러다임이 기초하였지만, 이러한 관습은 소분자 항암제로 수행된 연구로부터 파생된것이고 MTL-CEBPA와 같은 리포좀 또는 기타 지질 입자 내의 RNA로 이루어진 생성물을 이용한 용량 추정에 적절할 가능성이 매우 적다.
- [0887] BSA 기반 교차-종 스케일링을 위한 원 추진력은, 예측된 세포독성 항암제에 대한 인간 민감성 하의 체중 관련 MTD로부터 직접적 추정 및 종 전체에 걸친 MTD의 더 우수한 상관관계가 용량이 체표면적당 표현되었을 때 수득되었다는 보고로부터 기인한 것이었다. 보다 큰 종과 대비한 소분자 항암제에 대한 설치류와 같은 보다 작은 종의 민감성이 보다 적은 주된 이유는 보다 작은 종은 이러한 분자를 간 시토크롬 P450 시스템을 통해서 고등한 종보다 더 빠르게 대사시키는 경향이 있으며/있거나 혈액 구획으로부터 더 빠른 청소율을 나타낸다는 것이며, 이러한 것들이 총체적으로 인간을 포함하는 고등한 종보다 더 빠르거나 더 광범위한 해독에 기여한다.
- [0888] 비임상적 개발을 통해 발전된 많은 지질-제형화된 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 설치류의 MTD는 원숭이 또는 기타 비-설치류 종의 MTD와 유사하거나 더 낮은 경향이 있는데, MTL-CEBPA가 그러한 경우이다. 이러한 패턴은 원숭이와 같은 더 큰 종과 대비하여 설치류에서 더 큰 MTD를 예측할 수 있는 BSA-기반 스케일링의 근본 원칙과 일치하지 않는다. 핵산 페이로드도 부형제도 간 시토크롬 P450 시스템과 현저하게 상호작용하지 않는 것으로 나타났다(또는 예측될 수 있고) 제형이 미립자 형태로 혈류를 횡단하여 소분자 약물과 다른 독특한 약동학 및 청소 경로를 나타내지 때문에, 제형화된 올리고뉴클레오타이드 생성물이 소분자 항암 약물과 상이하게 거동한다는 것은 놀라운 것이 아니다.
- [0889] 활성 saRNA 성분(CEBPA-51)에 대한 혈장 AUC가 유사한 용량 수준에서 원숭이에서보다 래트에서 실질적으로 낮아도, 독성들 중 어느 것도 혈액 성분과의 상호작용에서 기인하지 않고 관찰된 주요 효과(즉, 다양한 조직에서 대식세포의 공포형성)가 혈액 농도가 아니라 조직과 상관관계가 있는 것으로 예측될 수 있기 때문에 MTL-CEBPA에 의해 생성된 독성은 순환계내 약물의 양과 관련되지 않는다. 사실, 래트의 순환계로부터 보다 빠른 MTL-CEBPA(CEBPA-51) 청소는 대식세포에 의한 보다 신속한 흡수를 반영할 가능성이 매우 크고, 이러한 신속한 흡수는 대식세포의 보다 큰 활성화 및 이러한 활성화에 의한 더 현저한 후속적 결과를 야기할 수 있고, 이것이 원숭이와 대비하여 래트에서 보다 큰 독성의 이유가 될 수 있다. 따라서, 동일한 mg/kg 용량 수준에서 원숭이와 대비하여 래트에서의 더 적은 혈장 노출이 종래의 BSA 기반 스케일링과 일치하는 것으로 보일 수 있지만, 이러한 차이는 명백히 래트에서의 더 적은 독성 정도와 상관관계가 있지 않으며, 래트의 혈액 구획으로부터 입자의 더 빠른 청소는 실제로 더 큰 독성의 근간이 될 수 있다. 다시 말하면, 이러한 유형의 약품의 경우, 종 전체에 걸쳐서 노출을 비교할 때, 더 낮은 AUC 값으로 반영되는 더 빠른 청소는 세포독성 항암제에서 보여지는 바와 같이 더 적은 민감성을 부여하는 것으로 해석되지 않아야 한다.
- [0890] 따라서, BSA 기반 스케일링은 시노물구스 원숭이 NOAEL 및 래트 HNSTD로부터 인간-등가 용량(HED) 계산에 적용될 수 없다. 원숭이가 MTL-CEBPA에 대한 인간 민감성의 더 우수한 예측변수가 될 수 있는 것으로도 생각되고 있지만, 이것은 현재로서는 증명될 수 없다. 따라서, 줄잡아 약리학적 활성 및 임상 효능이 저하될 정도로 너무 낮게 저하되지 않으면서, 충분한 안전성 확보를 달성하는 초기 임상 시험에 적절한 출발 용량 수준을 동정하고자 시도하는 차원에서, 래트에서의 7.5 mg/kg/adm의 HNSTD(4주 동안 3×매주 투약) 및 원숭이에서의 NOAEL보다 10배 미만의 용량 수준, 즉 0.75 mg/kg이 적절한 선택인 것으로 사료된다. 이러한 제안된 출발 용량 수준은, 4주 래트 및 원숭이 연구의 HNSTD에서 용량이 초기 시험을 위해 의도된 주 1회 투약과 대조적으로 각 주에 3일 연속 투여되었다는 점을 고려할 경우에 매우 적게 견적된 것이다. 따라서, MTL-CEBPA가, 주 1회 60분 정맥내(i.v.) 주입으로서 투여되는 0.75 mg/kg (28 mg/m<sup>2</sup>)의 의도된 초기 용량으로 인간에서 사용되는 것을 불가능하게 할 수 있는 흔치않은 또한 걱정스러운 독성 징후 없이, 안전하게 내약성이 우수한 것으로 예측된다고 결론이 내려진다. 약리학에 기초하여, 본 발명자들은 0.3 내지 3.0 mg/kg로부터 간 기능 이득 및 약 4mg/kg에서 중앙 이득을 볼 수 있을 것이라 예측하였다. 따라서, 용량 증량이 직접적 항-종양 활성을 달성하기 위해 요구될 수 있으나, 0.75 mg/kg의 용량에서 출발하는 것은 간 개선으로부터 이득을 얻을 잠재적 기회를 초기 환자에게 제공한다.
- [0891] 조사용 생성물의 투여량, 제조 및 투여
- [0892] 용량 증량 및 용량 확대 동안, 투여량은 스케줄에 따를 것이다. 용량은 뒤부아 & 뒤부아(133) 체표면적(BSA) 계

산을 사용한 가장 최근의 환자의 신장 및 체중에 기초할 것이다:

- [0893]  $BSA (m^2) = 0.007184 \times \text{신장}(cm)^{0.725} \times \text{체중}(kg)^{0.425}$
- [0894] MTL-CEBPA는 약품을 정맥내용 0.9% 생리식염수에 희석시키기 전에 실온에서 해동시킨다. 제조된 주입 백의 용적은 농도에 관계없이 250 mL여야 하고 필터가 없는 주입 펌프를 사용하여 60분에 걸쳐서 일정한 속도로 투여되어야 한다(IMP 취급에 관한 보다 상세한 지침에 대해서는 약학 매뉴얼(Pharmacy manual)을 참조한다).
- [0895] 제제는 최대 6시간의 사용 유효기한으로 실온(25℃)에서 보관되어야 한다.
- [0896] IMP와 희석제 및/또는 주입 장치 간의 양립성 문제는 예상되지 않는다.
- [0897] 참가자를 위한 조사 생성물 투약의 변형
- [0898] 진행중인 전임상 실험 또는 본 연구로부터 생성된 데이터로부터의 결과에 따라서 기타 스케줄 및 투여량이 조사될 수 있다.
- [0899] 등급 >3 주입 반응(예를 들면, 혈압 저하, 안면 홍조, 흉부 고통, 흉부고혈압, 등 또는 복부 통증, 심박수 상승, 발한)의 경우, 주입은 증상이 진정될 때까지 즉시 중단되어야 한다; 이어서, 주입이 재시작될 수 있다. 증상이 다시 나타날 경우, 조사자는 주입을 중단하여야 한다. 이 시점에서 투여된 주입 용적은 CRF에 저장될 것이다. 조사자는 실행전 임의의 용량 변형에 대해 의료 모니터 요원과 상의하여야 한다. 이로 인해 남은 매주 용량은 그 후 이틀에 걸쳐서 동일하게 분할될 수 있다. 후속적 투여는 상기한 바와 같은 3일 투여 스케줄에 따를 수 있다.
- [0900] 투약의 변경에도 불구하고 증상이 지속될 경우, 처리는 중단되어야 하고 참가자는 본 연구에서 철수하도록 권고되어야 한다.
- [0901] 병용 의약/처리
- [0902] 연구 처리를 시작하기 전 4주 이내에 임의의 처리 및 연구 동안 받게되는 모든 병용 처리에 관한 정보는 그 처리의 이유와 함께 eCRF에 기록될 것이다.
- [0903] 금지된 의약 및 절차
- [0904] 참가자의 시험 참여 동안 다음의 의약들이 금지된다: 기타 조사용 제제; 항-신생물제.
- [0905] 예방용 의약 및 절차
- [0906] 모든 참가자들은 주입 반응 잠재성을 감소시키기 위해 MTL-CEBPA가 투약되기 전에 예비투약될 것이다(사용 금지되지 않는 한). 예비의약은 다음과 같이 주입이 시작되기 30분 내지 60분 전에 투여되어야 한다: 스테로이드 1회 용량(즉, 텍사메타손 경구 8mg 또는 정맥내 10mg); 경구 H2 차단제 1회 용량(즉, 라니티딘 150mg 또는 파모티딘 20mg 또는 동등한 기타 H2 차단제 투약); 경구 H1 차단제 1회 용량, 10mg 세티리진(참가자가 세티리진을 허용하지 않는다면, 하이드록시진 25mg 또는 펙소페나딘으로 대체될 수 있다).
- [0907] 조사용 의약품의 과도투약
- [0908] MTL-CEBPA는 조사용 제제이며 본 프로토콜에서 언급된 것들 이외의 모든 병태들에 대해서는 사용이 금지된다.
- [0909] 만약 과다투약이 발생한다면, 금지된 해독제는 없다. 과다투약에 기인한 증상 및 징후는 전신적으로 치료되어야 한다. 부주의하게 의도된 용량보다 고 용량으로 투여된 어떠한 환자라도 면밀히 모니터링되고 회복될 때까지 적절한 지지적 조치(supportive care)로 관리되어야 하고 기대하에 추적 조사되어야 한다.
- [0910] 이러한 과다투약은 다음과 같이 기록되어야 한다: AE/SAE와 연관된 과다투약은 관련 AE/SAE 모듈상에서 eCRF에 AE 진단/증상으로서 기록된다; 연관된 증상이 없는 과다투약은 과다투약 eCRF 모듈상에만 기록된다.
- [0911] 연구 과정 중에 과다투약이 발생할 경우, 진료소 담당자는 1일 이내에, 즉, 즉시, 늦어도 진료소 담당자가 이를 인지한 날의 그 다음날이 끝나기 전까지 PI에게 통지하여야 한다. 과다투약은 PI에 의해 후원자에게 보고될 것이다.
- [0912] SAE와 연관된 과다투약의 경우, 표준 보고 시각표가 적용된다. 다른 과다투약의 경우, 보고는 30일 이내에 완료되어야 한다.
- [0913] 임신 및 모계 노출

- [0914] MTL-CEBPA는 조사용 제제이기 때문에, 임신한 여성에는 사용이 금지되고 이와 같이 임신한 여성은 본 연구에서 배제된다. 임신 가능성이 있는 모든 여성들의 경우, 장벽 피임이 사용되며 MTL-CEBPA 처리의 종료 후 적어도 3개월 동안 지속되어야 한다. 그러나, 참가자가 연구 동안 장벽 피임을 사용하였음에도 불구하고 임신하게 된다면, 즉각적 연구 중단이 요구된다.
- [0915] 연구 의약이 정자 또는 정액에 영향을 미칠지 여부가 공지되어 있지 않고 따라서 남성은 처리 기간 동안 및 최종 처리 후 적어도 3개월 동안 신뢰할 수 있는 장벽 형태의 피임을 사용하도록 권고된다.
- [0916] 연구 스케줄
- [0917] 연구 스케줄은 본 연구의 1a부 및 1b부에 적용된다. 각 처리 사이클은 1일째, 8일째 및 15일째에서의 3주 투여에 이어서 1주의 휴지기로 이루어진다.
- [0918] **스크리닝 방문(-21일째 내지 -1일째):** 다음의 데이터가 등재시에 수집되고 CRF의 적절한 섹션에 기록될 것이다: ICF에 서명한 날짜; 인구학적 데이터, 전체 병력, 신체 검사, 활력징후의 기록, 활동도 스코어, 체중(kg), 신장(cm) 및 허리둘레 치수(cm). 사전 및 병용 의약. 임신 가능성이 있는 여성의 혈액 임신 테스트. 혈액학의 평가를 위한 공복 혈액 샘플링, 응고 프로파일, 임상적 생화학(LFT, 신장 프로파일을 포함), 지질 프로파일, 적절한 종양 마커(들), 사이토킨 프로파일 및 보체 활성화 인자 Bb 및 C3a. 12 리드 ECG. 흉부 X-선. RECIST 보고를 이용한 간 및 복부의 MRI 또는 CT 스캔. (주: 이전의 스캔이 연구 처리 시작하기 전 1개월 이내에 입수가 가능할 경우 스캔은 반복되지 않아야 한다). 파이프로스캔(Fibroscan)은 HCC 환자들에서만 수행될 것이다. FDG-PET 스캔(오직 1b부만). 종양 조직의 방사선학 유도 간 생검은 기록물이 입수가 가능하지 않은 환자들에서 수행될 것이다. 종양 조직은 포르말린-고정된 파라핀-포매된(FFPE) 샘플일 것이다.
- [0919] 포함 범위 밖에 있는 혈청 알부민 수준으로 인해 첫번째 스크리닝 방문에 실패한 참가자는 14일 후에 재스크리닝될 수 있다. 세번째 스크리닝은 허용되지 않는다.
- [0920] **1일째, 8일째 및 15일째 방문(+/- 2일):** 달리 명시하지 않는 한, 절차 및 평가는 투약 전에 착수되어야 한다. 표준 신체 검사, 체중 및 허리둘레 치수. 이전 방문 이후의 새로운 증상 및 새로운 의약의 기록, 활동도 스코어, 12 리드 ECG. 투약 전 1일째 및 투약 후 15일째, 8주째 및 연구 방문의 종료(오직 1b부의 참가자만)시의 FACT-Hep 삶의 질 설문지. 정맥(말초 또는 중심)에 캐놀라를 위치시킨다. 혈액학의 6시간 공복 혈액 샘플링 평가, 응고 프로파일 및 임상적 생화학(LFT 및 신장 기능 시험을 포함) 및 보체 활성화 인자 Bb 및 C3a. 8일째 및 15일째만: 적절한 종양 마커 및 사이토킨 프로파일을 위한 혈액 샘플링. 필요에 따라 MTL-CEBPA 주입 전 30분 동안 캐놀라를 통해 예비-의약을 투여한다. MTL-CEBPA를 투약 스케줄에 따라서 60분에 걸쳐서 캐놀라를 통해 정맥내 투여한다. 투약 전 및 투여 후 15분, 30분, 1시간 및 2시간 시점에서의 활력징후(체중 및 허리둘레 치수 이외의) 기록. 다음 시점에서의 PK 주입 전과 후의 PK 샘플(오직 1일째 및 8일째에서 1a부 참가자들만): 투약 전, 주입 직후, 주입 완료부터 0.25시간, 1시간, 3시간 및 6시간. 투약 후 15일째에서의 FDG-PET 스캔(오직 1b부의 참가자만) (주: PK를 제외한 모든 처리 전 혈액 샘플은 MTL-CEBPA 투여 전날에 취하여 분석할 수 있다)
- [0921] **2일째, 9일째 및 16일째 방문:** 새로운 증상 및 의약의 기록, 활력 징후 및 활동도 스코어. 혈액학의 6시간 공복 혈액 샘플링 평가, 응고 프로파일 및 임상적 생화학(LFT 및 신장 기능 시험을 포함) 및 보체 활성화 인자 Bb 및 C3a. 주입 완료 후 24시간째에 PK(2일째 및 9일째에서 1a부 참가자들만).
- [0922] **3일째 및 10일째 방문:** 1a부의 참가자들에 대해서만 48시간 PK 샘플링.
- [0923] **4일째 및 11일째 방문:** 1a부의 참가자들에 대해서만 72시간 PK 샘플링.
- [0924] **22일째 방문(+/- 2일):** 표준 신체 검사. 새로운 증상 및 의약의 기록, 활력 징후 및 활동도 스코어. 임신 가능성이 있는 여성에 대한 혈액 임신 테스트. 혈액학의 평가를 위한 6시간 공복 혈액 샘플링, 응고 프로파일, 임상적 생화학(LFT 및 신장 프로파일을 포함), 지질 프로파일, 적절한 종양 마커(들), 사이토킨 프로파일 및 보체 활성화 인자 Bb 및 C3a. FACT-Hep 삶의 질 설문지 기입(1b부만). 흉부 X-선.
- [0925] **8주 - 사이클 2의 22일째 방문(+/- 2일):** 상기 열거된 22일째 조사 및 절차 이외에도, 다음의 영상화 절차가 수행되어야 한다: MRU CT 스캔이 수행되고 이후 8주마다 수행될 것이다; FDG-PET는 1b부의 참가자들에 대해서만 8주째에 수행될 것이고 이후에 반복되지 않을 것이다.
- [0926] **연구 방문의 종료(마지막 투약 후 29일 또는 14일 +/- 7일째):** 표준 신체 검사, 체중 및 허리둘레 치수. 이전 방문 이후의 새로운 증상 및 새로운 의약의 기록, 활력 징후 및 활동도 스코어. FACT-Hep 삶의 질 설문지 기입(1b부만). 임신 가능성이 있는 여성에 대한 혈액 임신 테스트. 혈액학의 6시간 공복 혈액 샘플링 평가, 응고 프

로파일 및 임상적 생화학(LFT 및 신장 프로파일을 포함) 및 보체 활성화 인자 Bb 및 C3a. 조기 철수 참가자들에 대해서만(즉, 22일째에는 수행되지 않음) 공복 지질 프로파일, 적절한 종양 마커(들) 및 사이토킨 프로파일을 위한 혈액 샘플링. 파이프로스캔(HCC 참가자들에서만). 종양 생검; 처리 후 생검이 매우 요망되며 조사자 판단 하에 수행될 것이다.

[0927] **조기 종료 방문:** 참가자가 연구에서 철할 경우, 상기한 평가가 착수되어야 한다.

[0928] **스케줄에 없는 방문:** 이상사례 추적 조사를 위해 스케줄에 없는 방문 또는 전화 연락이 수행될 수 있다.

[0929] **임신 방문:** 참가자가 연구 동안 임신하게 될 경우, 참가자는 연구 처리를 즉시 중단하도록 권고 받아야 한다. 철수 이유는 eCRF에 기록될 것이고, 연구 방문 종료를 위해 모든 평가를 완료하여 상기한 바와 같은 연구 약물의 안정성을 평가하기 위해, 참가자는 조사자(들)에 의해 관찰되고 평가될 것이다.

[0930] **반응자를 위한 처리 계획:** 1a부 및 1b부의 참가자들은 2사이클 동안 초기에 등재된다. 첫번째 사이클의 종료시에, 참가자들이 임상 이득(예를 들면, 간 기능의 개선)을 나타내고 본 연구를 지속하기로 동의한다면, 참가자들은 동일한 처리 용법에 기초하여(PK 샘플링은 배제) MTL-CEBPA의 추가 사이클(들)을 받을 수 있다. 두번째 사이클의 종료시에, 종양 반응이 평가될 것이고; 종양 진행을 나타내지 않은 참가자들은 2회의 추가 처리 사이클을 추가로 받을 것이다.

[0931] 이 시점에서, 참가자들은 연구 중단이 참가자의 최선의 이익이 될 경우 또는 참가자의 반응이 긍정적이고 수술, RFA, TACE 또는 소라페닙과 같은 본 연구의 시작시에는 부적절하였던(즉, 병기 이동) 다른 통상의 요법을 받을 수 있을 경우 조사자에 의해 본 연구 의약을 중단하도록 권고 받을 수 있다.

[0932] 참가자들은 치료에 대한 반응이 지속되는 한 MTL-CEBPA의 추가 사이클을받을 기회를 얻게 될 것이다.

[0933] 연구 절차/평가 - 환자 보고된 결과

[0934] 1일 및 15일째 및 8주째에 RP2D 수준(1b부)으로 MTL-CEBPA를 투여한 후 암 요법-간담즙(FACT-Hep) 버전 4 설문지의 기능적 평가를 사용하여 건강 관련 삶의 질의 변화를 평가할 것이다.

[0935] FACT-Hep 설문지

[0936] 암 요법-간담즙(FACT-Hep)의 기능적 평가는 검증된 건강 관련 삶의 질 설문지이며 간담즙 암종과 연관된 증상 및 부작용을 측정하도록 특수하게 고안된 FACT-General과 18항목 모듈이 결합된 것이다. FACT-G는 신체적, 사회적/가족, 감정적 및 기능적 웰빙을 포함하는 삶의 질의 4개 차원을 측정하는 다차원적 27-항목 기구이다. FACT-Hep는 또한 간담즙 암종의 증상 및 치료의 부작용을 평가하는 18항목 모듈을 포함한다.

[0937] 평가 방법

[0938] FACTHep는 예방된 방문시에 종이 형태의 설문지를 사용하여 자기-기입될 것이다. 설문지는 투약 전 1일째 및 투약 후 15일째 및 이어서 22일째(8주)에 평가될 것이다.

[0939] PRO 설문지의 기입

[0940] FACIT 스케일은 참가자 자기-기입을 위해 고안된 것이지만, 면접 형식에 의해 기입될 수도 있다. 자기-기입을 위해, 참가자는 페이지의 최상단의 간략한 설명을 읽도록 지시를 받아야 한다. 참가자의 정확한 이해가 확인된 후, 참가자는 모든 항목을 거르지 않고 순서대로 완료하도록 촉구되어야 한다. 예를 들면, 참가자가 현재 어떠한 치료도 받지않고 있을 경우, 참가자는 질문에 대한 "전혀 없음"에 0표를 해야 한다. 면접식 기입은 면접관이 편향되지 않은 참가자 반응을 유도하도록 적절하게 훈련되었을 경우에 적절한 것으로 간주된다.

[0941] 스코어 매기기

[0942] FACT-Hep는 5개 차원을 포함한다: "신체적 웰빙", "사회적/가족 웰빙", "감정적 웰빙", "기능적 웰빙" 및 "추가적 염려". 각각의 차원은 5개 수준을 갖는다: "전혀 없음", "약간", "다소", "꽤 많은" 및 "매우 많은". 참가자는 지난 7일까지 FACT-Hep상의 질문에 적용되는 그/그녀의 반응을 나타내기 위해 한 줄당 하나의 번호에 0표하거나 표시함으로써 FACT-Hep에 그/그녀의 현재 건강 상태를 등급화한다. 이것이 FACT-Hep 스코어이다.

[0943] 실험실 안정성 평가

[0944] 샘플 수집 시간은 본 연구 사건 스케줄에 포함된다. 방법 및 참고 범위의 상세 사항은 TMF에 저장될 것이다. 기저선으로부터 유의적으로 변화되었고 임상적으로 염려되는 것으로 간주되는 실험실 값은 이상사례로서 기록되고



적절하다면 추적 조사되어야 한다.

[0945] 1 사이클에 걸쳐서 각 참가자로부터 수집될 추정 혈액 용적은 하기 제시한다:

평가	샘플 용적 (mL)	샘플의 수	총 용적(mL)
안전성			
생화학 [a]	3.5	9	31.5
혈장 암모니아 [a]	4	9	36
종양 마커 [a]	2.5	5	12.5
공복 글루코스	2	9	18
혈액학	3	9	27
응혈	4	9	36
보체 (C3a 및 Bb)	2	9	18
혈청 임신 테스트 [b]	2	2	4
약동학			
혈장 MTL-CEBPA	5	18	90
약리학			
사이토킨	3	6	18
총: 남성			287
여성			291

[0946]

[0947] [a] PD 바이오마커가 검토될 수 있도록 총 단백질, 알부민, 총 빌리루빈, ALT, AST, 혈장 암모니아, 종양 마커 총 콜레스테롤, HDL-C 및 트리글리세라이드가 평가될 것이다. [b] 임신 가능성이 있는 여성의 경우.

[0948] 각 방문시마다 각 참가자로부터 50mL 미만이 채취해질 것이며 4주 사이클마다 총 300mL 미만이 채취될 것이다.

[0949] 현지 실험실 시험

[0950] 실험실 안정성 평가를 위한 모든 샘플은 각 조사 지역에서 지역 관행에 따라서 수집되고 통상의 시험을 위한 표준 방법을 사용하여 현지 실험실에서 분석될 것이다. 모든 혈액 샘플은 MTL-CEBPA 주입 전에 스크리닝시 및 1일째, 2일째, 8일째, 9일째, 15일째, 16일째, 22일째 및 EOS에서 수집되어야 한다(지질 프로파일은 제외).

[0951] 임상적 생화학 및 혈액학 파라미터가 측정될 것이다. 간 기능, 암모니아 및 글루코스뿐만 아니라 지질 프로파일을 포함하는 임상적 생화학 샘플은 공복 상태에서 수집되어야 한다(혈액 채취 6시간 전).

혈청 생화학 파라미터	
나트륨	총 빌리루빈 [a]
칼륨	ALP [a]
칼슘	알라닌 트랜스아미나제 (ALT) [a]
인산염	아스파르테이트 트랜스아미나제 (AST) [a]
우레아(BUN)	감마 글루타밀 트랜스퍼라제 (GGT) [a]
공복 글루코스	혈장 암모니아 [a]
총 단백질 [a]	총 콜레스테롤 [b]
크레아티닌	HDL-C [b]
알부민 [a]	트리글리세라이드 [b]

[0952]

[0953] [a] 스크리닝시 적격성이 검토되고 PD 바이오마커가 검토될 수 있도록 총 단백질, 알부민, 총 빌리루빈, ALT, AST 및 혈장 암모니아가 평가될 것이다. [b] 진단용 PD 바이오마커가 검토될 수 있도록 총 콜레스테롤, HDL-C 및 트리글리세라이드가 스크리닝시, 각 사이클(22일)의 종결시 및 EOS(조기 철수 참가자의 경우)에 평가될 것이다.



혈액학 파라미터	
백혈구 (WBC)	림프구 절대치 및 %
적혈구 (RBC)	단핵구 절대치 및 %
헤모글로빈 (Hb)	호산구 절대치 및 %
글리코실화된 헤모글로빈(HbA1c)	호염기구 절대치 및 %
호중구 절대치 및 %	혈소판

응혈 파라미터	
국제 표준화 비 (INR)	프로트롬빈 시간(PT)
활성화된 부분적 트롬보플라스틴 시간 (aPTT)	

보체 활성화 파라미터	
보체 인자 B(Bb)의 활성화 단편	
보체 성분 3a (C3a)	

[0954]

[0955]

임신 테스트(혈액)

[0956]

임신 가능성이 있는 여성의 경우에 스크리닝시, 22일째 및 이후 매 8주마다(참가자가 추가 치료 사이클을 받을 경우) 인간 용모 성선자극호르몬(hCG)가 측정될 것이다.

[0957]

종양 마커(들)

[0958]

하기 목록 중에서 가장 적합한 마커(들)이 암 병력에 기초하여 선택되고 스크리닝시, 8일째, 15일째, 22일째 및 EOS(조기 철수 참가자의 경우에)에 수행될 것이다.

종양 마커	
알파-태아단백질 (AFP)	암배아 항원(CEA)
암 항원 125 (CA125)	암 항원 15-3
탄수화물 항원 19-9 (CA 19-9)	(CA15-3)

[0959]

[0960]

영상화

[0961]

흉부 X-선: 흉부 X-선은 스크리닝 동안 및 4주째에 수행될 것이다. 참가자가 추가의 MTL-CEBPA 사이클을 받을 경우에 추가의 X-선이 12주째 및 이후에 관리 표준에 따라서 수행될 것이다.

[0962]

MRI 또는 CT 스캔: 흉부 및 복부의 MRI 또는 CT 스캔이 스크리닝 동안(연구 약물의 첫번째 투약 전 1개월 이내) 및 8주째에 수행될 것이다. MRI이 바람직한 방법이지만, CT 스캔이 허용된다; MRI이 사용되었는지 CT 스캔이 사용되었는지 간에, 각 참가자를 위한 평가 방법의 일관성을 유지하는 것이 중요하다.

[0963]

이어서, MRI/CT 스캔이 매 8주마다 수행될 것이다.

[0964]

파이브로스캔: MTL-CEBPA 처리 전과 후에 간의 섬유증 특징을 평가하기 위해 파이브로스캔이 스크리닝시 및 연구 종결시 오직 HCC 참가자들에서만 수행될 것이다.

[0965]

FDG-PET 스캔: 간 대사작용 및 종양은 1b부에 등재된 참가자들에서만 FDG-PET 스캔을 사용하여 평가될 것이다. FDG-PET 스캔은 스크리닝 동안, MTL-CEBPA 주입 후 15일째 및 재병기결정(restaging) CT시(즉, 8주째)에 수행될 것이다.

[0966]

환자는 PET 연구를 시작하기 적어도 6시간 동안은 어떠한 음식 또는 당이라도 소비하는 것이 허용되지 않는다(즉, FDG 주사 시간에 관하여). 실제로, 이는 오전에 PET 연구를 받기로 예정된 환자들은 자정 후에 섭취해서는 안되고 바람직하게는 PET 연구 전 저녁 동안 가벼운 식사(알코올 없음)를 섭취하여야 함을 의미한다. 오후 PET 연구가 예정된 환자들은 오전 8.00시 전에 가벼운 아침식사(즉, 2개 이하의 샌드위치, 당 또는 당 함유 샌드위치 속 재료 없음)를 섭취할 수 있다. 의약은 처방 대로 투여될 수 있다.

[0967]

간 생검

[0968]

입수 가능한 경우, 포르말린 고정된 파라핀 포매된(FFPE) 종양 블록 형태의 보관 종양 샘플이 각 환자마다 수집될 것이다. 종양 블록을 수득하는 것이 가능하지 않거나 종양 블록이 존재하지 않을 경우, 참가자는 사전 동의서 과정의 일부분으로서 스크리닝시 생검에 동의하여야 한다.

- [0969] 보관 종양 조직은 조사팀에 의해 요청되어 상기한 바와 같이 발송되어야 한다. 보관 종양 블록은 연구 종료시 또는 요청시, 필요에 따라 더 빨리 공급원으로 되돌아갈 것이다.
- [0970] 처리 후 간 종양 생검은 EOS 방문시에 매우 요망된다.
- [0971] 임의의 응혈 비정상상을 교정하기 위한 새로운 동결된 혈장 및 혈소판의 투여가 필요에 따라 실시되어야 한다.
- [0972] 약동학(PK)
- [0973] PK 혈액 샘플, 5 mL의 전혈은 첫번째 사이클의 1일째, 2일째, 3일째 및 4일째, 8일째, 9일째, 10일째, 11일째에 그리고 다음 시점: 연구 약물의 투약 전, 주입 완료 직후, 이어서 주입 완료로부터 0.25시간, 1시간, 3시간, 6시간, 24시간, 48시간 및 72시간 시점에서 본 연구의 용량 증량 부분의 각 5개 코호트의 각 참가자로부터 EDTA 튜브에 수집될 것이다.
- [0974] 임상 직원은 예정된 시점에서 PK 분석을 위한 혈액 샘플을 채취하도록 촉구된다. 그러나, 예정된 샘플 시간으로부터 이탈은 프로토콜 이탈로서 간주되지 않는다. 채혈의 정확한 시각 및 날짜는 명백한 포맷을 사용하여 기록되어야 한다.
- [0975] MTL-CEBPA의 혈장 농도는 하이브리드화 기반 HPLC 검정을 사용하여 정의된 시점에서 집중적으로 분석될 것이다.
- [0976] 표본 제조, 취급 및 저장에 대한 지침은 하기 기재된다.
- [0977] 약력학(PD)
- [0978] 간 기능 시험, AFP 종양 마커(HCC 참가자의 경우), 사이토킨 프로파일 및 CEBPA 유전자 발현이 MTL-CEBPA의 약리학적 효과의 대응 바이오마커로서 동정되었다.
- [0979] 간 기능 시험: 알라닌 트랜스아미나제(ALT), 혈청 알부민, 혈장 암모니아, 아스파르테이트 트랜스아미나제(AST) 및 총 빌리루빈은 1일째(투약 전), 2일째, 8일째(투약 전), 15일째(투약 전), 22일째 및 EOS 방문시에 취해질 것이다. 이들 샘플은 현지 실험실에서 분석될 것이다.
- [0980] AFP 종양 마커: AFP는 1일째(투약 전), 8일째(투약 전), 15일째(투약 전), 22일째 및 EOS 방문(조기 철수 참가자의 경우)시에 시험될 것이다. 이들 샘플은 현지 실험실에서 분석될 것이다.
- [0981] 지질 프로파일: 진단용 PD 바이오마커가 검토될 수 있도록 총 콜레스테롤, HDL-C 및 트리글리세라이드는 각 사이클의 1일째, 8일째, 15일째, 22일째 및 EOS(조기 철수 참가자의 경우)시에 평가될 것이다.
- [0982] 사이토킨 프로파일: IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN-g, IL-4, IL-17a, IL-10은 스크리닝, 8일째(투약 전), 15일째(투약 전), 22일째 방문시 및 EOS 방문(조기 철수 참가자의 경우)시에 시험될 것이다. 샘플은 중앙 실험실에서 분석될 것이다.
- [0983] 유전자 발현: CEBPA 유전자 발현은 스크리닝 방문 및 EOS 방문시에 보관 종양 조직 및/또는 새로운 생검 조직으로부터 수득된 포르말린-고정된 파라핀-포매된(FFPE) 종양 생검 샘플에서 면역화학 염색 검정을 사용하여 CEBP  $\alpha$  및 p21 단백질 발현을 사용하여 연구될 것이다.
- [0984] 표본 제조, 취급 및 운송
- [0985] 표본 제조, 취급 및 저장에 대한 지침은 하기 기재된다.
- [0986] PK 샘플 및 사이토킨 프로파일 샘플을 제외한 모든 샘플들은 현지 관행에 따라서 현지에서 수집되고 통상의 시험을 위한 표준 방법을 사용하여 현지 실험실에서 분석될 것이다.
- [0987] 상세한 지침을 제공하는 조사자들에 대한 실험실 매뉴얼이 연구 시작 전에 각 연구 지역에 제공될 것이다. 조사자 및 위임된 현장 직원은 실험실 매뉴얼에 정의된 절차에 따라야 한다.
- [0988] PK 샘플의 경우, 5mL의 전혈이 EDTA-처리된 튜브내로 수집된다. EDTA 튜브를 샘플링 직후 가공하고 냉장 원심분리기(4°C)를 사용하여 원심분리하여 혈장을 생성시킨다. 일단 수득되면, 혈장은 병상에서 100 $\mu$ L의 적어도 2개의 분취액으로 분할될 수 있다. 분취액은, -80°C에서 저장하기 전, 상기 언급한 동일한 프로토콜 및 액체 질소 또는 드라이 아이스를 사용한 순간 동결(snap frozen) 후에 원심분리될 것이다. 혈액 수집부터 혈장 저장까지 권장 시간은 30분이다.
- [0989] 사이토킨 프로파일의 경우, 3 mL가 EDTA-처리된 튜브 내로 수집될 것이다. 상기 튜브는 혈장을 생성시키기 위해

원심분리될 것이다. 샘플은 중앙 실험실로 발송되기 전 현장에서 -80℃에서 동결 저장될 것이다(하기 섹션 참조).

- [0990] 보관 중앙 블록은 가능할 경우 관련 병리학 부서에 의해 요청되어야 한다. 새로이 획득된 중앙 조직 샘플은 포르말린-고정된, 파라핀-포매(FFPE)되어야 한다. 블록(바람직하게는) 또는 슬라이드는 IHC 염색 시험을 착수하기로 계약된 중앙 실험실로 발송될 것이다(하기 섹션 참조)
- [0991] 이상사례(AE)
- [0992] 이상사례(AE)는 약제학적 제품의 연구 처리와의 인과 관계와 상관없는, 약제학적 제품이 투여되는 환자 또는 임상적 조사 참가자에서 임의의 원치않는 의학적 발생(이미 존재하는 의학적 병태의 악화를 포함)으로서 정의된다. 따라서, AE는 이상 조사 결과(예: 실험실 검사결과, 심전도), 증상(들)(예: 오심, 흉부 통증), 징후(예: 빈맥, 간 비대) 또는 조사용 의약품(IMP)과 시간적으로 연관된 질환을 포함하는 불리하고 의도되지 않은 징후일 수 있다.
- [0993] AE는 사전동의로부터 연구 방문의 종결까지 연구 전반에 걸쳐서 수집될 것이다. "심각한 이상사례"에 대한 기준을 충족하지 않는 국소 및 전신 반응을 포함하는 모든 AE는 적절한 eCRF에 저장되어야 한다.
- [0994] 참가자에 의해 자발적으로 보고되거나 연구 직원으로부터의 미정 질문(open question)에 대한 응답으로서 보고되었거나 관찰에 의해 밝혀진 모든 AE가 수집되어 CRF에 기록될 것이다. AE 수집시, 진단의 기록이 징후 및 증상의 목록의 기록에 바람직하다(가능할 경우). 그러나, 진단이 알려져 있고 일반적으로 진단의 일부가 아닌 다른 징후 또는 증상이 있을 경우, 이러한 진단 및 각 징후 또는 증상은 별도로 기록될 것이다.
- [0995] 사전동의서가 서명될 때에 존재하는 의학적 병태는 과거 병력으로서 간주되어야 하며 AE로서 보고되지 않아야 한다. 그러나, 그 병태가 ICF에 서명한 후 어느 때라도 악화될 경우, 이는 AE로서 기록되어야 한다.
- [0996] AE 변수
- [0997] 다음의 변수들이 각 AE를 위해 수집될 것이다: 진단/증상(글자 그대로). AE가 시작한 날짜(개시 날짜) 및 중단된 날짜(해결 날짜). NCI-CTCAE 최대 중증도. AE가 심각한지 그렇지 않은지 여부(중증도). 조사용 생성물에 대한 조사자 인과관계 등급화. AE가 심각한지 심각하지 않은지 여부(중증도). 조사용 생성물에 대한 조사자 인과관계 등급화. IMP와 관련하여 취해진 조치. AE 발생한 환자의 IP로부터 철수 여부. 결과.
- [0998] 또한, 다음의 변수들이 SAE를 위해 수집될 것이다: AE가 심각한 AE의 기준을 충족한 날짜. 조사자가 심각한 AE를 인지하게 된 날짜. 심각으로서 분류한 이유. 입원 날짜. 퇴원 날짜. 입원 이유. 가능한 사망 원인. 사망 날짜. 수행된 사후검사. 연구 절차(들)과 관련된 인과관계 평가. 기타 의약과 관련된 인과관계 평가. 추가의 연구 약물과 관련된 인과관계 평가. AE의 설명.
- [0999] 연구 동안에 발생하는 모든 AE는 관계와 상관없이 적절하게 문서로 기록되어야 한다. 모든 AE는 AE가 안정화되거나 적절한 해결책이 있을 때까지 현지 관행에 따라서 추적 조사될 것이다.
- [1000] 모든 AE는 중증도 및 연구 약물과의 관계에 대해 등급화되어야 한다.
- [1001] 참가자를 위한 MTL-CEBPA 투여의 변경
- [1002] 연구로부터 생성된 임상 데이터에 따라서 대안적 또는 중간 용량 및 스케줄이 요구될 수 있다. 이는 스케줄변경, 요구되는 용량의 나누기, 감소 또는 감량(de-escalating)을 포함할 수 있다.
- [1003] 환자를 위한 스케줄 변경
- [1004] 투약 방문은 본 프로토콜에 명시된 바와 같은 허용되는 시간 범위 내에서 계획되어야 한다. 그러나, 참가자가 예정된 투약일에 참석할 수 없는 경우에(예를 들면, 참가자가 몸이 불편함을 느낄 때), 투약은 스케줄변경될 수 있고 후속적 연구 방문 시기는 그에 맞춰 변경되어야 한다.
- [1005] MTL-CEBPA의 투여는 최대 1주까지 지연될 수 있다. 참가자가 다음 투약 날짜에 참석할 수 없는 경우, 참가자는 본 연구로부터 철수되어야 하고 EOS 연구 방문이 예정되어야 한다.
- [1006] 환자를 위한 용량 및 스케줄 변경
- [1007] 등급  $\geq 3$  주입 반응의 경우, 상기 언급된 절차를 따라야 한다. 이러한 절차 후에 초기 용량은 연속된 3일에 걸쳐서 분할될 수 있다.

[1008] 분할된 용량 스케줄의 예는 하기 제시한다.

출발 용량	28 mg/m <sup>2</sup> 1 일, 8 일, 15 일
3 일 연속하여 분할 투약	14 mg/m <sup>2</sup> 1 일, 2 일, 3 일, 8 일, 9 일, 10 일, 15 일, 16 일, 17 일

[1009]

[1010] 3일에 걸친 분할 투여의 경우, PK 샘플은 1일째 및 8일째에 계획된 바와 같이 취해져야 하며 이어서 2일째, 3일째 및 9일째, 10일째에 예비-투약되어야 한다.

[1011] 어떠한 경우라도, 용량 및 스케줄 변경은 실행 전 의약 모니터 요원과 상의되어야 한다.

[1012] 참가자를 위한 용량 변경

[1013] 감량하거나(특정 스케줄상의 출발 용량이 독성을 야기하여 MTD가 초과될 경우) 용량을 감소하려는 결정은 SRC에 의해 권고될 것이다.

#### [1014] 실시예 20. 제형 최적화 연구

[1015] NOV340은 올리고뉴클레오타이드의 캡슐화를 위해 사용되는 잘 확립된 리포솜 제형이다. 표 19는 제형의 지질 조성을 몰비로 제시한다.

[1016] [표 19]

NOV340의 조성

지질	몰비
POPC (1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린)	6
DOPE (1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민)	24
Chems (콜레스테릴-헤미석시네이트)	23
MoChol (콜레스테릴-4-[[2-(4-모르폴리닐)에틸]아미노]-4-옥소부타노에이트)	47

[1017]

[1018] 본 최적화 연구는 리포솜 내로의 CEBPA-51의 캡슐화 효율을 개선하기 위해 수행되었다. 공정 개발 및 NOV340 리포솜에 제형화된 올리고뉴클레오타이드의 최적화에 대한 당사의 경험에 기초하여, CEBPA-51용으로 최적화될 가장 중요한 파라미터는 캡슐화 효율이다. 캡슐화 효율(%)는 리포솜-연합된 올리고뉴클레오타이드(캡슐화되고 막 결합된)의 양을 물 함량 및 불순물을 제외한 캡슐화용으로 의도된 API 용액에 용해된 총 양으로 나눈 값이다. 작은 규모로 제조할 경우의 높은 공정 손실(process loss)도 또한 캡슐화 효율을 계산할 때 고려되어야 한다. 이러한 손실은 샘플링 및 필터 유닛 및 배관내 무용 용적 때문이다. 제조 규모가 증가될 경우에 공정 손실은 감소될 것이다. 따라서, 지질 회수에 기초한 캡슐화 효율도 또한 계산된다. 캡슐화 효율을 개선하기 위해, RNA와 지질 간의 상호작용의 최대화는 시도되는 가장 합리적인 방향이었다. 이를 달성하기 위해, 2가지의 상이한 파라미터를 변화시키고 평가하였다. 첫번째는 리포솜 형성시의 지질 대 약물 비였고, 두번째는 CEBPA-51을 용해시키기 위해 사용되는 완충액의 pH였다. RNA와 지질 제형 간의 상호작용은 주로 MoChol과 올리고뉴클레오타이드 간에 발생한다. MoChol은 산성 배지에서 양으로 하전되는 6.5의 pKa를 갖는 양쪽성 지질이다.

[1019] 양으로 하전된 MoChol과 음으로 하전된 RNA 간의 상호작용은 리포솜 내로의 RNA의 캡슐화를 증가시킨다. 따라서, 본 발명자들의 가설은 API 완충액의 pH를 감소시키는 것은 증가된 MoChol 전하를 야기하여 MoChol과 CEBPA-51 간의 상호작용 증가 및 캡슐화 효율 증가로 이어질 수 있다는 것이었다. 두번째 옵션은 최적의 지질 대 약물 비 또는 단순히 "포화점"(MoChol과 상호작용할 수 있는 CEBPA-51의 최대량)을 동정하는 것이었다. 따라서, 다양한 지질 대 약물 비를 리포솜 제조 실험 과정 중에 시험하였다. 지질 약물 비는 API 용액 중의 CEBPA-51의 농도를 감소시켜 변화시켰다. 7가지의 상이한 CEBPA-51 농도를 시험하였다.

[1020] 방법

[1021] 리포솜 제조

[1022] 리포솜은 직교류 에탄올 분사 방법에 의해 제조하였다. 간략하게 언급하면, 지질(POPC, Chems 및 DOPE)을 55℃에서 무수 EtOH에 용해시킨다. 완전한 가용화 후, 상기 용액을 사전 칭량된 MoChol을 함유하는 다른 병으로 정

량적으로 옮긴다. Chol로의 MoChol 분해를 최소화하기 위해 무수 EtOH의 선택 및 두 단계의 지질 가용화가 필요한 것으로 확인되었다. 지질의 완전한 용해 후, 에탄올성 지질 용액을 0.2 $\mu$ m 필터를 통해 여과하고 분사기로 옮기고, 이를 가열 캐비닛에서 55°C에서 템퍼링한다. 한편, 올리고뉴클레오타이드를 Na-아세테이트/슈크로스 완충액에 용해시키고 RT에서 0.2 $\mu$ m 필터를 통해 API 완충액 병으로 여과한다. NOV340 제형화를 위한 API 완충액의 표준 pH는 pH 4이지만, 본 최적화 연구에서는 pH 3.5 및 pH 4.0의 완충액이 사용되었다. 리포솜은 액상 용액이 분사 모듈에서 API 완충액과 혼합될 경우에 발포성이다. 리포솜 제형화 직후, 리포솜 제형의 pH를 중화시키기 위해 희석 완충액(RT에서 NaCl/Na2HPO4 pH 9.0)을 이용한 일련 희석 단계가 존재한다. 리포솜 제형화된 올리고뉴클레오타이드를 IV 병에 수집하고 압출 전에 30분 동안 실온에서 교반한다. 이어서, 상기 중간제 현탁액을 0.2 $\mu$ m 폴리카보네이트 막을 통해 압출시켜 리포솜의 크기 및 PDI를 개량한다. 압출 후, 유리 RNA 및 EtOH를 투석여과에 의해 제거하고 한외여과에 의해 표적 saRNA 농도로 농축시킨다. 바이알 내로 충전하기 전에, 리포솜 생성물을 0.2 $\mu$ m 필터를 통해 멸균 여과한다.

[1023] 리포솜의 크기 측정

[1024] 리포솜 크기의 결정을 위한 측정을 Malvern Nano ZS(224ZS/S OP/002)를 사용하여 동적-광-산란(DLS)에 의해 수행하였다. 이러한 시스템은 633 nm 파장의 4 mW 헬륨/네온 레이저가 장착되어 있으며 173°의 검출각에서 비침습적 후방산란 기술로 리포솜 샘플을 측정한다. 리포솜을 수성상에 희석시켜 최적의 리포솜 농도에 도달하도록 하였고, 실험을 25°C에서 수행하였다. 그 결과는 리포솜 균질성을 측정하는 다분산도 지수와 함께 리포솜 현탁액(z-평균 평균)의 평균 직경으로 제시한다.

[1025] 리포솜의 제타 전위 측정

[1026] 리포솜의 제타 전위를 224/SOP/012에 따라서 Malvern Nano ZS를 사용하여 최종 벌크 생성물로부터 측정하였다.

[1027] RNA-소광계수의 정량

[1028] RNA의 정량을 221/SOP/012에 따라서 OD 260에서 분광광도계에 의해 수행하였다. RNA를 API 용액 및 최종 벌크 생성물 중에서 정량한다. CEBPA-51 제형 개발의 매우 초기 단계에서, saRNA의 각 단일 가닥의 소광계수를 측정하였다. 따라서, saRNA의 정량을 각 단일 가닥의 소광계수 값의 평균치를 사용하여 수행하였다. 흡광증가 효과로 인해, 평균 소광계를 사용한 saRNA의 정량은 캡슐화 효율 값을 30% 낮은 범위로 감소시켰다. 개발 기간 동안, STPharm에 의해 정확한 소광계수 값을 측정하여 정확한 saRNA 정량 및 최적화된 캡슐화 효율을 야기하였다. CEBPA-51의 정량을 위해 사용된 첫번째 소광계수는 30.17(L/(몰·cm))이었고 갱신된 값은 20.68 (L/(몰·cm))이었다.

[1029] 지질의 정량

[1030] 샘플 중의 지질 농도를 221/SOP/012에 따라서 HPLC를 사용하여 벌크 용적으로부터 측정하였다.

[1031] 결과 및 논의

[1032] 구 소광계수와 신 소광계수 간의 비교

[1033] 표 20은 제형의 공정 최적화를 시작하기 전의 샘플에 대한 두 소광계수 둘다에 의해 계산된 도출된 캡슐화 효율을 열거한 것이다. 도출된 값으로부터, 갱신된 소광계수는 리포솜으로의 CEBPA-51의 캡슐화 효율을 현저하게 개선시킨다는 것이 명백하다. 그러나, 최종 제형에서의 saRNA의 수율을 최적화하기 위해 추가의 최적화 연구를 수행하였다. 정말로, 거의 30%의 초기 캡슐화 효율로부터, 최적화된 제형화는 거의 60%의 캡슐화 효율을 초래하였다.



[1034] [표 20]

구 소광계수 값 및 신 소광계수 값에 의해 계산된 리포솜내로의 CEBPA-51 캡슐화의 효율

캡슐화 효율 (%)		
샘플명	구 소광계수 30.17 (L/(몰 · cm))를 사용하여 계산됨	신 소광계수 20.68 (L/(몰 · cm))를 사용하여 계산됨
IV/MIT/120315/1	24.7	36.0
IV/MIT/120315/2	33.7	49.1
IV/MIT/120315/3	27.3	39.8
IV/MIT/250315/1	39.2	57.3
IV/MIT/250315/2	24.6	35.9
IV/MIT/250315/3	27.8	40.5
IVMIT/300315/1	29.7	43.3
IV/MIT/300315/2	23.5	34.2

[1035]

[1036] pH 3.5 완충액에 가용화된 API를 이용한 리포솜 제조

[1037] 캡슐화 효율에 미치는 API 용액의 pH의 효과를 연구하기 위해, API 용액의 pH를 pH 4.0에서 pH 3.5로 감소시켰다. 또한, 캡슐화 효율에 미치는 지질 대 약물 비의 효과를 연구하기 위해, API 용액 중의 3가지 상이한 CEBPA-51 농도를 사용하였다. 표 21은 pH 3.5의 API 용액을 사용하여 제조된 모든 제형들 및 이들의 특징들을 열거한 것이다. 표 22, 23 및 24는 pH 3.5의 API 용액을 사용하여 제조된 제형을 pH 4.0의 API 용액을 사용하여 제조된 각각의 제형과 비교하여 나타낸다. 도 34는 표 22, 23 및 24에 나타난 결과를 그래프로써 제시한다. 수득된 결과로부터, API 완충액의 pH 변화는 단지 API 용액 중의 낮은 RNA 농도(1.85 mg/mL)에서만 캡슐화 효율을 다소 증가시켰다. 다른 2가지 시험 농도(2.25 및 2.65 mg/mL)와 관련하여, 이러한 방향으로 향하는 명백한 경향은 관찰되지 않았다. 추가로, pH의 감소는 크기 및 PdI가 증가된 리포솜을 형성시켰다. 이러한 크기 및 PdI의 증가는, RNA 손실 및 공정 기간을 증가시킬 수 있기 때문에 권장되지 않는 추가의 배제 사이클을 필요로 할 수 있다. 따라서, 4.0에서 3.5로의 분사 완충액 pH의 감소는 선택사항이 아니다. 지질 대 약물 비의 변경과 관련하여, API 완충액 중의 RNA 농도가 감소됨에 따라 캡슐화 효율이 증가된다는 것이 주지되었다. 이러한 경향은 API 용액의 두 pH 값 모두에 있어 유사한 것으로 보인다.

[1038] [표 21]

pH 3.5 의 완충액을 사용하여 제조된 리포솜 샘플

샘플명	IV/MIT/25031 5/3	IV/MIT/15041 5/1	IV/MIT/15041 5/4	IV/MIT/15041 5/3	IV/MIT/15041 5/2
API 용액 중의 [CEBPA-51] (mg/mL)	2.65	2.65	2.65	2.25	1.85
최종 생성물 중의 [CEBPA-51] (mg/mL)	1.014	1.667	1.981	1.791	2.009
캡슐화 효율 (%)	40.53	32.72	37.8	41.47	56
최종 생성물 중의 [POPC] (mg/mL)	1.67	3.36	4.21	3.82	4.01
최종 생성물 중의 [DOPE] (mg/mL)	6.68	13.38	16.5	14.96	16.10
최종 생성물 중의 [Chems] (mg/mL)	4.05	8.30	10.25	9.34	9.90
최종 생성물 중의 [MoChol] (mg/mL)	10.42	20.13	24.13	22.96	23.87
최종 생성물 중의 총 [지질] (mg/mL)	22.82	45.17	55.09	51.08	53.88
지질 회수에 기초한 캡슐화 효율 (%)	52.47	42.91	41.38	47.87	62.03
최종 생성물의 크기 /PdI (nm/PdI)	125.5/0.176	124.7/0.184	125.6/0.185	116.1/0.190	109.6/0.195
최종 생성물 중의 CEBPA-51 의 최대 실현 가능한 농도 (mg/mL)	2.65	2.28	2.36	2.22	2.42

[1039]

[표 22]

pH 3.5 및 pH 4.0 완충액을 사용하여 제조된 샘플들 간의 비교. 분사 완충액 중의 CEBPA-51 농도는 2.65 mg/mL 이다.

API 용액의 pH	pH 3.5				pH4.0		
API 용액 중의 [CEBPA-51](mg/mL)	2.65						
샘플명	IV/MIT/250315/3	IV/MIT/300315/2	IV/MIT/150415/1	IV/MIT/150415/4	IV/MIT/120315/1	IV/MIT/300315/1	IV/MIT/160415/1
최종 생성물 중의 [CEBPA-51] (mg/mL)	1.017	1	1.667	1.981	1.104	1.486	2.03
캡슐화 효율 (%)	40.53	34.2	32.72	37.80	36.0	43.3	41.89
지질 회수에 기초한 캡슐화 효율 (%)	52.47	44.33	42.91	41.38	40.80	54.31	51.02
IV 리포솜의 크기 및 PDI(nm/PDI)	159.0/0.321	144.4/0.372	158.8/0.511	128.2/0.398	136.8/0.220	148.5/0.250	151.1/0.259
최종 생성물의 크기 및 PDI (nm/PDI)	124.7/0.184	128.2/0.207	125.6/0.185	116.1/0.190	128.0/0.149	132/0.154	n.a.

[1040]

[1041] [표 23]

pH 3.5 및 pH 4.0 완충액을 사용하여 제조된 샘플들 간의 비교. 분사 완충액 중의 CEBPA-51 농도는 2.25 mg/mL 이다.

API 용액의 pH	pH 3.5	pH4.0	
API 용액 중의 [CEBPA-51] (mg/mL)	2.25		
샘플명	IV/MIT/250315/3	IV/MIT/140415/2	IV/MIT/050515/2
최종 생성물 중의 [CEBPA-51] (mg/mL)	1.79	2.23	2.62
캡슐화 효율 (%)	41.47	51.65	47.66
지질 회수에 기초한 캡슐화 효율 (%)	47.87	56.12	52.71
IV 리포솜의 크기 및 PdI (nm/PdI)	128.2/0.398	130.6/0.220	140.5/0.249
최종 생성물 의 크기 및 PdI (nm/PdI)	116.1/0.190	127/0.152	131.3/0.166

[1042]

[1043] [표 24]

pH 3.5 및 pH 4.0 완충액을 사용하여 제조된 샘플들 간의 비교. 분사 완충액 중의 CEBPA-51 농도는 1.85 mg/mL 이다.

API 용액의 pH	pH3.5	pH4.0
API 용액 중의 [CEBPA-51] (mg/mL)	1.85	
샘플명	IV/MIT/150415/2	IV/MIT/120315/2
최종 생성물 중의 [CEBPA-51] (mg/mL)	2.01	1.13
캡슐화 효율 (%)	56.01	49.14
지질 회수에 기초한 캡슐화 효율(%)	62.03	52.64
IV 리포솜의 크기 및 PdI (nm/PdI)	112.2/0.294	132.9/0.233
최종 생성물 의 크기 및 PdI (nm/PdI)	109.6/0.195	124.6/0.150

[1044]

[1045] 지질 대 약물 비의 최적화

[1046] 리포솜 제형화시의 지질 대 약물 비는 리포솜 내의 RNA의 캡슐화 효율을 위해 매우 중요하다. 캡슐화 효율을 최적화하기 위해, EtOH 용액 중의 지질 농도를 일정하게 유지시키고, 용액 중의 CEBPA-51 농도를 1.06 내지 3.44 mg/mL의 범위로 변경하였다. 모든 기타 공정 파라미터는 일정하게 유지시켰으며, API 용액의 pH는 pH 4.0에서 유지시켰다. 도 35에서, 동일한 결과가 그래프로서 플롯팅되어 있다. 수득된 결과로부터, API 용액 중의 CEBPA-51 농도를 감소시킴으로써 캡슐화 효율이 다소 증가되는 경미한 경향이 있음이 명백하다. 현 시점에서, 최종 생성물 중의 지질 농도가 saRNA의 최대 수용을 달성하고자 시도할 때 고려되어야 하는 주요 결과라는 것을 언급하는 것은 중요하다. 반면에, 최종 생성물 중의 증가된 지질 농도는 최종 0.2 $\mu$ m 여과시 결정적인 것이 될 수 있으며, 동시에 너무 많은 지질이 필터 막 영역에 노출시 필터 막을 차단할 수 있다. 따라서, 목적은 RNA 손실을 최소화하는 것 뿐만 아니라 최종 생성물 중의 CEBPA-51 농도가 증가되도록 할 수 있는 최적의 지질 농도를 달성하는 것이다.

[1047] [표 25]

pH 4.0의 완충액을 사용하여 제조된 리포솜 샘플.

샘플명	IV/MIT/120 315/3	IV/MIT/120 315/1	IV/MIT/300 315/1	IV/MIT/290 415/1	IV/MIT/290 415/2	IV/MIT/1 70415/1
API 용액 중의 [CEBPA-51] (mg/mL)	3.44	2.65	2.65	2.52	2.52	2.38
최종 생성물 중의 [CEBPA-51] (mg/mL)	1.781	1.10	1.486	2.27	1.94	1.69
캡슐화 효율 (%)	39.76	35.99	43.28	46.74	45.41	50.37
최종 생성물 중의 [POPC] (mg/mL)	2.75	2.27	2.30	3.88	3.43	2.75
최종 생성물 중의 [DOP7.06E] (mg/mL)	11.39	9.48	9.35	15.30	13.28	10.96
최종 생성물 중의 [Chems] (mg/mL)	6.61	5.61	5.47	9.55	8.47	7.06
최종 생성물 중의 [MoChol] (mg/mL)	17.17	14.55	15.16	22.92	19.92	16.72
최종 생성물 중의 총 [지질] (mg/mL)	37.94	31.92	32.27	51.66	45.10	37.49
지질 회수에 기초한 캡슐화 효율(%)	42.71	40.80	54.31	54.10	52.38	58.17
최종 생성물 의 크기/PdI (nm/PdI)	139.2/0.13 5	128.0/0.14 9	132.0/0.15 4	128.1/0.14 9	130.8/0.15 5	127.2/0. 150
최종 생성물 중의 CEBPA-51의 최대 실현 가능한 농도(mg/mL)	3.17	2.25	2.70	2.76	2.72	2.80

[1048]

[1049] 최적화 연구의 확인

[1050] 리포솜으로의 saRNA의 캡슐화 효율의 최적화를 지향하는 모든 실험을 수행한 후, 보다 큰 용적의 2개의 최종 배치를 제조하여 결과를 확인하였다. 표 26은 도출된 데이터를 제시하며, 상기 데이터는 또한 모든 제조된 기타 배치의 결과와 함께 도 35에 그래프로써도 제시되어 있다. 수득된 데이터는, 분사 완충액 중의 CEBPA-51의 농도를 2.38 mg/mL로 설정하기로 한 결정이 saRNA의 보다 높은 캡슐화 효율 및 최종 리포솜 생성물 중의 보다 높은 CEBPA-51 농도 둘 다를 야기하기 때문에 이러한 결정을 명백히 확인시켜 준다.

[1051] [표 26]

도출된 결과의 확인을 위해 제조된 리포솜 샘플.

샘플명	IV/MIT/270515/1	IV/MIT/280515/1
API 용액 중의 [CEBPA-51] (mg/mL)	2.52	2.38
최종 생성물 중의 [CEBPA-51] (mg/mL)	2.29	2.65
캡슐화 효율 (%)	44.62	51.0
최종 생성물 중의 [POPC] (mg/mL)	4.53	4.79
최종 생성물 중의 [DOP7.06E] (mg/mL)	17.38	18.46
최종 생성물 중의 [Chems] (mg/mL)	11.00	11.71
최종 생성물 중의 [MoChol] (mg/mL)	25.88	27.91
최종 생성물 중의 총 [지질] (mg/mL)	58.79	62.88
지질 회수에 기초한 캡슐화 효율 (%)	47.18	53.81
최종 생성물 의 크기/PdI (nm/PdI)	130.8/0.143	124.6/0.141
최종 생성물 중의 CEBPA-51의 최대 실현 가능한 농도(mg/mL)	2.59	2.80

[1052]

[1053] 결론

[1054] 본 연구는 리포솜으로의 CEBPA-51의 캡슐화 효율을 최적화하였다. 도출된 결과는 리포솜의 제조가 pH 4.0의 API 완충액을 사용하여 수행되어야 하고 API 용액 중의 CEBPA-51 농도가 약 2.38 mg/mL에서 설정되어야 함을 나타낸다. 이러한 설정은 올리고뉴클레오타이드를 NOV340을 사용하여 제형화할 경우에 유도되는 전형적 수율인 50%보다 높은 범위의 수율로 리포솜 제형을 생성시켜야 한다.

[1055] **실시예 21. 사용 안정성 연구**

[1056] 51.80 내지 296.00mg MTL-CEBPA를 250 ml의 총 주입 용적까지 희석시켜 주입 백 내의 최종 농도가 0.21 내지 1.18 mg/ml가 되도록 하였다. 한가지 유형의 주입 백(Baxter VIAFLO 250ml 염화나트륨 0.9% 정맥내 주입 BP)이 사용되었으며, 평가를 위해 각각 2가지의 전형적인 스페이스 라인(space line)(PVC 및 PVC-비함유)이 선택되었다. 최악의 시나리오로서 본 사용 연구를 위해 0.21mg/ml의 최저 용량(28 mg/m<sup>2</sup>의 임상 용량 수준에 상당함)이 선택되었다.

[1057] 재료

[1058] 5개의 바이알 MTL-CEBPA 약품, 롯데 MIT1215-A, saRNA 함량: 2.5mg/ml; 공칭 용적 20 ml; 주입 백: 4×Baxter VIAFLO 250 ml 염화나트륨 0.9% 정맥내 주입 BP(참조번호: FE1322); 주입 스페이스 라인: 1) 2×Braun Infusomat® 스페이스 라인 - Neutrapur(폴리우레탄) PVC-비함유(참조번호: 8700110SP); 2) 2× Braun Infusomat® 스페이스 라인 - PVC (DEHP-비함유)(참조번호: 8700036SP); 바늘: 예를 들면, BD Mirolance(참조번호: 301300); 주사기: 예를 들면, BD 주사기(참조번호: 309658); 항온배양기 QC-GTBS01MM (23 내지 27℃).

[1059] 투약 용액의 제조, 샘플링 및 저장

[1060] 약 21ml 0.9% 생리식염수를 제거하고 약 21 ml의 약품으로 대체시켜 MIT 1215-A(2.5 mg/ml)를 주입 백에 희석시켰다. 각 스페이스 라인에 대한 이중 백을 제조하여 총 4개의 주입 백을 생성하였다. 백을 식염수 제거 전과 후 및 약품 첨가 후에 칭량하였다. 1.04 g/ml의 밀도를 첨가된 약품의 계산을 위해 사용하였다. 2개의 백(#1 및 #2)을 PVC-비함유 스페이스 라인과 연결시키고, 나머지 2개의 백(#3 및 #4)을 PVC 스페이스 라인과 연결시켰다. 백을 24시간 동안 25 ± 2℃에서 저장하였다.

[1061] [표 27]

투약 용액의 제조

백 ID	염수 제거 전 백 중량 [g]	염수 제거 후 백 중량 [g]	제거된 염수 용적(계산됨) [ml] <sup>1)</sup>	약품 첨가 후 중량 [g]	첨가된 약품(계산됨) [ml] <sup>2)</sup>
#1	285.47	264.47	21.00	285.71	20.42
#2	285.21	264.83	20.38	286.26	20.61
#3	281.36	260.73	20.63	282.47	20.90
#4	284.43	263.44	20.99	285.02	20.75

<sup>1)</sup> 염수 밀도: 1.00 g/ml

<sup>2)</sup> DP 밀도: 0.04 g/ml

[1062]

[1063] 샘플(시점 및 백당 4×0.5 ml)을 백 제조 직후(시점 0시간), 8시간 후 및 24시간 후에 스페이스 라인을 통해 수집하고 -20 ± 5℃에서 저장하였다. 8시간 및 24시간의 시점에서, 재료가 스페이스 라인에서 항온배양되는 것이 아니라 주입 백으로부터의 샘플 재료가 수집되었음을 보장하기 위해 스페이스 라인을 샘플링 전에 약 30ml를 사용하여 퍼징하였다. 모든 샘플의 분석을 SEC-HPLC(함량) 및 RP-HPLC(지질)의 단일 분석적 실행 내에서 수행하였다.

[1064] 시험 및 허용 기준



[1065] 개요

시험/분석	방법	허용 기준 DP (희석 전)	허용 기준 DP (희석 후; 표적 농도)
총 saRNA 함량	SEC-HPLC 222/SOP/013	2.5 ± 0.5 mg/ml	0.21 ± 0.04 mg/ml
POPC 함량	RP-HPLC 222/SOP/018	3.5 - 5.8 mg/ml	0.29 - 0.49 mg/ml
DOPE 함량	RP-HPLC 222/SOP/018	13.5 - 22.6 mg/ml	1.13 - 1.90 mg/ml
CHEMS 함량	RP-HPLC 222/SOP/018	8.5 - 14.1 mg/ml	0.71 - 1.18 mg/ml
MOCHOL 함량	RP-HPLC 222/SOP/018	20.3 - 33.8 mg/ml	1.71 - 2.84 mg/ml
콜레스테롤 함량	RP-HPLC 222/SOP/018	≤ 2.0 mg/ml	≤ 0.17 mg/ml

[1066]

[1067] 허용 기준은 주입용 현탁액의 제조시 약 12배의 각 희석 인자를 고려하여 약품(DP) 사양에 기초하여 적용하였으며, 즉 2.5 ± 0.5 mg/ml 내지 0.21 ± 0.04 mg/ml의 saRNA 함량을 희석시켰다.

[1068] 결과

[1069] saRNA 함량

[1070] 총 saRNA 함량을 222/SOP/013에 따라서 UV 검출을 이용하여 RP-HPLC에 의해 측정하였다. 모든 샘플을 동일한 HPLC 순서로 분석하였다. 결과는 표 28에 열거되어 있다. 모든 백은 표적 값에 가까운 saRNA 농도를 함유하였고 관찰 기간 전반 동안 0.21 ± 0.04 mg/ml의 허용 기준을 충족하였다.

[1071] [표 28]

주입 백 내의 saRNA 함량(mg/ml)

	백 #1 (PVC 비함유)	백 #2 (PVC 비함유)	백 #3 (PVC)	백 #4 (PVC)
0 시간	0.20	0.20	0.20	0.20
8 시간	0.19	0.19	0.20	0.20
24 시간	0.20	0.19	0.20	0.20
허용 기준 0.21 ± 0.04 mg/ml	충족	충족	충족	충족

[1072]

[1073] POPC 함량

[1074] 총 POPC 함량은 222/SOP/018에 따라서 CAD 검출을 이용하여 RP-HPLC에 의해 측정하였다. 모든 샘플을 동일한 HPLC 순서로 분석하였다. 결과는 표 29에 열거되어 있다. 모든 백은 표적 값에 가까운 POPC 농도를 함유하였고 관찰 기간 전반 동안 0.29 내지 0.49 mg/ml의 허용 기준을 충족하였다.

[1075] [표 29]

주입 백 내의 POPC 함량(mg/ml)

시점	백 #1 (PVC 비함유)	백 #2 (PVC 비함유)	백 #3 (PVC)	백 #4 (PVC)
0 시간	0.32	0.40	0.40	0.37
8 시간	0.39	0.36	0.36	0.36
24 시간	0.34	0.30	0.34	0.32
허용 기준 0.29 - 0.49 mg/ml	충족	충족	충족	충족

[1076]

[1077] DOPE 함량

[1078] 총 DOPE 함량은 222/SOP/018에 따라서 CAD 검출을 이용하여 RP-HPLC에 의해 측정하였다. 모든 샘플을 동일한 HPLC 순서로 분석하였다. 결과는 표 30에 열거되어 있다. 모든 백은 표적 값에 가까운 DOPE 농도를 함유하였고 관찰 기간 전반 동안 1.13 내지 1.90 mg/ml의 허용 기준을 충족하였다.

[1079] [표 30]

주입 백 내의 DOPE 함량 (mg/ml)

시점	백 #1 (PVC 비함유)	백 #2 (PVC 비함유)	백 #3 (PVC)	백 #4 (PVC)
0 시간	1.27	1.51	1.52	1.45
8 시간	1.50	1.40	1.38	1.41
24 시간	1.31	1.17	1.30	1.24
허용 기준 1.13 - 1.90 mg/ml	충족	충족	충족	충족

[1080]

[1081] CHEMS 함량

[1082] 총 CHEMS 함량은 222/SOP/018에 따라서 CAD 검출을 이용하여 RP-HPLC에 의해 측정하였다. 모든 샘플을 동일한 HPLC 순서로 분석하였다. 결과는 표 31에 열거되어 있다.

[1083] [표 31]

주입 백 내의 CHEMS 함량 (mg/ml)

시점	백 #1 (PVC 비함유)	백 #2 (PVC 비함유)	백 #3 (PVC)	백 #4 (PVC)
0 시간	0.73	0.81	0.86	0.81
8 시간	0.83	0.77	0.75	0.78
24 시간	0.72	0.66	0.73	0.70
허용 기준 0.71 - 1.18 mg/ml	충족	0 시간, 8 시간에서 충족 24 시간에서 실패	충족	0 시간, 8 시간에서 충족 24 시간에서 실패

[1084]

[1085] MoChol 함량

[1086] 총 MoChol 함량은 222/SOP/018에 따라서 CAD 검출을 이용하여 RP-HPLC에 의해 측정하였다. 모든 샘플을 동일한 HPLC 순서로 분석하였다. 결과는 표 32에 열거되어 있다. 모든 백은 표적 값에 가까운 MoChol 농도를 함유하였고 관찰 기간 전반 동안 1.71 내지 2.84 mg/ml의 허용 기준을 충족하였다.

[1087] [표 32]

주입 백 내의 MoChol 함량 (mg/ml)

시점	백 #1 (PVC 비함유)	백 #2 (PVC 비함유)	백 #3 (PVC)	백 #4 (PVC)
0 시간	1.75	2.02	2.06	1.95
8 시간	2.00	1.86	1.84	1.89
24 시간	1.72	1.55	1.75	1.64
허용 기준 1.71 - 2.84 mg/ml	충족	0 시간, 8 시간에서 충족 24 시간에서 실패	충족	0 시간, 8 시간에서 충족 24 시간에서 실패

[1088]

[1089] 콜레스테롤 함량

[1090] 총 콜레스테롤 함량은 222/SOP/018에 따라서 CAD 검출을 이용하여 RP-HPLC에 의해 측정하였다. 모든 샘플을 동일한 HPLC 순서로 분석하였다. 결과는 표 33에 열거되어 있다. 모든 백은 최대 허용되는 한계치보다 낮은 콜레스테롤 농도를 함유하였고 관찰 기간 전반 동안  $\leq 0.17$ 의 허용 기준을 충족하였다.

[1091] [표 33]

주입 백 내의 콜레스테롤 함량 (mg/ml)

시점	백 #1 (PVC 비함유)	백 #2 (PVC 비함유)	백 #3 (PVC)	백 #4 (PVC)
0 시간	0.06	0.08	0.08	0.08
8 시간	0.09	0.08	0.08	0.09
24 시간	0.09	0.09	0.10	0.09
허용 기준 $\leq 0.17$ mg/ml	충족	충족	충족	충족

[1092]

[1093] 결론

[1094] 실온에서 24시간 기간에 걸쳐서 주입 백 내의 MTL-CEBPA의 안정성 및 의도된 주입 라인과의 양립성을 확인하기 위해 사용 연구를 수행하였다.

[1095] 결과는 약품이 0.21 mg/ml의 의도된 최저 임상 용량에서 적어도 8시간에 걸쳐서 안정하고 양립성임을 확인시켜 준다.

[1096] 따라서, 선택된 재료(주입 백 및 스페이스 라인)는 약품과 양립성이고 적어도 8시간의 시간 기간 내에서 MTL-CEBPA의 임상 연구에서 사용될 수 있다는 결론이 내려질 수 있다.

[1097] **실시예 22. MTL-CEBPA에 대한 안정성 연구**

[1098]  $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 장기간 저장을 수행하였다. 가속화된 조건하의 안정성을 2 내지  $8^\circ\text{C}$ 에서 조사하였다. 파라미터를 나타내는 안정성의 동정을 위한 스트레스 시험 연구를  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  및  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 저장함으로써 수행하였다. 표 34는 기간, 조건 및 현재 입수가 가능한 데이터를 포함하여 이러한 안정성 연구에서 시험된 배치들의 개요를 제공한다.

[1099] 안정성 프로그램에서 사용된 분석 방법은 외관, pH, 검정, 순도, 지질 함량 및 입자 특징에 대한 시험을 포함한다.

[1100] [표 34]

MTL-CEBPA 약물 생성물의 안정성 연구

시험된 배치	제조일자	안정성 연구 시작	기간	조건	입수 가능한 데이터
MIT0615-A	06.2015	25.06.2015	0 - 36 M	$-20 \pm 5^\circ\text{C}$	0 - 3 개월
		02.11.2015	0 - 72 h	$25 \pm 2^\circ\text{C}$	0 - 72 시간
		02.11.2015	0 - 72 h	$40 \pm 2^\circ\text{C}$	0 - 72 시간
MIT1215-A	12.2015	03.12.2015	0 - 24 M	$-20 \pm 5^\circ\text{C}$	0 - 1 개월
		03.12.2015	0 - 6 M	$5 \pm 3^\circ\text{C}$	0 - 1 개월
		18.01.2016	0-24 h	$25 \pm 2^\circ\text{C}$	0 - 24 시간

[1101]

[1102] 안정성 요약 및 결론

[1103] 장기간 저장 조건( $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ )에서 저장된 MTL-CEBPA(MIT0615-A)의 1개 배치에 대한 안정성 데이터가 입수가가능하였다.  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  및  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 저장된 동일한 배치에 대한 스트레스 시험 데이터가 입수가가능하였다.

[1104]  $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 최대 6개월 동안 저장된 MIT0615-A의 경우 변화는 관찰되지 않았다. 스트레스 조건( $25 \pm 2^\circ\text{C}$  및  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ )하에 저장된 샘플은 저장시 MOCHOL의 분해 및 콜레스테롤로의 전환에 의해 MOCHOL의 감소를 나타냈다. 이러한 분해는  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 와 비교해  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 더 두드러졌다.

[1105]  $25^\circ\text{C}$ 에서 3일(72시간) 동안의 스트레스 시험하에, 주요 지질, 모르폴리노에탄아민 콜레스테롤(MOCHOL)은 33.2에서 27.8 mg/ml로 감소(16% 감소)한 한편,  $40^\circ\text{C}$ 에서 3일 후에 MOCHOL의 함량은 30.1에서 22.5 mg/ml로 감소(25% 감소)하였다. MOCHOL의 감소는 분해 생성물 콜레스테롤의 형성에 해당하며, 상기 콜레스테롤은  $25^\circ\text{C}$ 에서 3일 후에 1.1에서 2.2 mg/ml로 증가하였고  $40^\circ\text{C}$ 에서 3일 후에는 1.0에서 8.2 mg/ml로 증가하였다. 기타 지질 부형제는 가속화된 조건하에 현저한 변화를 나타내지 않았다. 기타 지질, 총 saRNA 함량 및 이의 불순물에 있어 현저한 변화는 관찰되지 않았다. 표 35 내지 38은 상이한 조건들에서의 MTL-CEBPA의 안정성 및 스트레스 시험 결과를

제시한다.

[1106] [표 35]

-20 ± 5℃에서 배치 MIT1215-A 의 장기간 안정성(장기간, -20 ± 5℃)

파라미터	허용 기준	0 개월	1 개월	3 개월	6 개월
외관	유백색 현탁액	통과	통과	통과	통과
총 saRNA 함량	2.5 ± 0.5 mg/ml	2.6	2.6	2.6	2.6
saRNA 캡슐화	≥ 75 %	83	81	80	78
POPC 함량	3.5 - 5.80 mg/ml	4.8	4.2	4.8	4.6
DOPE 함량	13.5 - 22.6 mg/ml	18.4	17.0	18.9	16.9
CHEMS 함량	8.5 - 14.1 mg/ml	11.5	10.4	11.6	10.8
MOCHOL 함량	20.3 - 33.8 mg/ml	26.9	24.6	27.2	24.2
콜레스테롤 함량	≤ 2.0 mg/ml	1.0	0.8	1.0	1.1
입자 크기	100 - 140 nm	107	108	108	108
다분산도 지수	≤ 0.200	0.169	0.159	0.163	0.167
제타 전위	pH 7.2 - 7.8 에서 ≤ -30.0 mV	-39.1	-38.5	-36.6	-35.2
pH	7.2 - 7.8	7.4	-	-	-
오스몰랄 농도	280 - 400 mOsmol/kg	349	-	-	-
불순물 saRNA	≤ 15 %	6	7	5	7
육안으로 보이지 않는 입자	입자 ≥ 10 μm: ≤ 3000 /바이알 입자 ≥ 25 μm: ≤ 300 /바이알	2 < 1			-
내독소	≤ 5.0 EU/ml	< 0.5			-
멸균	성장 없음	통과			-

[1107]

[1108] [표 36]

5 ± 3℃에서 배치 MIT1215-A 의 가속화된 안정성

파라미터	허용 기준	0 개월	1 개월
외관	유백색 현탁액	통과	통과
총 saRNA	2.5 ± 0.5 mg/ml	2.5	2.6
saRNA 캡슐화	≥ 75 %	85	82
POPC 함량	3.5 - 5.80 mg/ml	4.7	4.4
DOPE 함량	13.5 - 22.6 mg/ml	17.3	16.0
CHEMS 함량	8.5 - 14.1 mg/ml	11.0	10.2
MOCHOL 함량	20.3 - 33.8 mg/ml	24.9	22.3
콜레스테롤 함량	≤ 2.0 mg/ml	0.9	1.9
입자 크기	100 - 140 nm	112	113
다분산도 지수	≤ 0.200	0.160	0.140
제타 전위	pH 7.2 - 7.8 에서 ≤ -30.0 mV	-35.6	-36.1
pH	7.2 - 7.8	7.6	7.4
오스몰랄 농도	280 - 400 mOsmol/kg	334	341
불순물 saRNA	≤ 15 %	6	7

[1109]

[1110] [표 37]

25 ± 2℃에서 배치 MIT0615-A 의 스트레스 시험 데이터

파라미터	허용 기준	시점 [시간]					
		0	8	16	24	48	72
총 saRNA	보고 결과 - [mg/ml]	2.6	2.6	2.7	2.6	2.6	2.6
POPC 함량	보고 결과 - [mg/ml]	5.5	5.2	5.5	5.3	5.3	4.9
DOPE 함량	보고 결과 - [mg/ml]	22.6	21.2	22.4	21.8	21.7	20.3
CHEMS 함량	보고 결과 - [mg/ml]	13.8	13.7	13.1	13.3	13.4	12.7
MOCHOL 함량	보고 결과 - [mg/ml]	33.2	31.0	32.4	31.5	30.4	27.8
콜레스테롤 함량	보고 결과 - [mg/ml]	1.1	1.2	1.4	1.5	1.9	2.2
불순물 saRNA	보고 결과 - [%]	8	8	8	8	7	5

[1111]



[1112] [표 38]

40 ± 2℃에서 배치 MIT0615-A의 스트레스 시험 데이터

파라미터	허용 기준	시점 [시간]					
		0	8	16	24	48	72
총 saRNA	보고 결과 - [mg/ml]	2.6	2.6	2.7	2.6	2.5	2.6
POPC 함량	보고 결과 - [mg/ml]	5.0	5.4	5.3	4.3	5.6	5.8
DOPE 함량	보고 결과 - [mg/ml]	20.6	22.1	21.5	17.7	22.5	23.3
CHEMS 함량	보고 결과 - [mg/ml]	12.5	13.6	12.8	10.7	13.7	14.2
MOCHOL 함량	보고 결과 - [mg/ml]	30.1	31.1	28.0	22.1	24.4	22.5
콜레스테롤 함량	보고 결과 - [mg/ml]	1.0	1.9	2.6	2.8	5.8	8.2
불순물 saRNA	보고 결과 - [%]	6	7	7	7	5	6

[1113]

[1114] MTL-CEBPA는 장기간 저장 조건(-20±5℃)에서 저장할 경우에 적어도 6개월 동안 안정하며, 이는 분석적 변동성으로부터 유도된 것 외에는 감소 또는 변화 경향이 없음을 나타낸다. MTL-CEBPA는 가속화된 조건하에 2 내지 8℃(5 ± 3℃)에서 적어도 1개월 동안 안정하다.

[1115] **실시예 23. CEBPA-saRNA를 이용한 CCL4 유도성 간 경화증의 생체내 연구**

[1116] 본 연구는 복수(腹水) 및 생존을 이용하여 실시예 11을 반복함으로써 지연된 투여를 조사하는 것이었다. 사염화탄소(CCL4) 유도성 간 섬유증은 간 섬유증 및 경화증의 연구를 위한 잘 확립되어 있고 널리 채택되는 설치류 실험 모델이다. 래트에게 사염화탄소를 만성으로 투여하면 심각한 간 기능 장애와 함께 조직학적으로 관찰 가능한 간 섬유증이 유도된다.

[1117] 스프래그 다울리 래트에서 간 경화증은 CCL4를 복강내 주사하여 유도하였다. CCL4 처리된 동물은 연구 전반에 걸쳐서 현저한 체중 감소를 나타냈다. CCL4 처리된 동물은 최대 8주 동안 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST), 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT), 알칼리 포스파타제(ALP), 프로트롬빈 시간(PT) 및 빌리루빈과 같은 간 기능 시험(LFT) 파라미터의 현저한 증가를 나타냈지만, GGT의 증가는 나타내지 않았다(첫번째 무작위화). 경로 대조군 동물에서 최대 8주 동안 암모니아의 현저한 증가 및 총 단백질의 현저한 감소.

[1118] 8주째에 MTL-CEBPA(1 mpk) 처리는 동물들의 체중의 현저한 개선을 나타냈다. LFT 및 암모니아 수준은 13주째까지 현저하게 역전되었다. 총 단백질 수준은 현저하게 증가되었다. 11주째에 MTL-CEBPA(1 mpk) 처리도 또한 13주째까지 LFT 및 암모니아 수준의 현저한 역전을 나타냈다. 도 36은 8주째부터의 MTL-CEBPA 처리가 고암모니아혈증을 역전시켰음을 보여주었다.

[1119] 도 37A 및 도 37B는 MTL-CEBPA 처리가 복수를 감소시켰음을 보여주었다. 복수는 육안/신체 검사에 기초하여 0 내지 3의 스케일로 평가하였다. 복수의 부재는 0으로서; 간신히 감지 가능할 경우에는 1로서; 옆구리 팽창을 동반한 다량의 복수는 2로서; 및 팽팽한 복수는 3으로서 기록하였다. 복수는 9주째부터 지속적으로 뚜렷하였으며 13주째에 높은 스코어에 이르렀다.

[1120] MTL-CEBPA 처리는 도 38A 및 도 38B의 생존 그래프에 도시된 바와 같이 현저한 생존 개선을 야기하였다.

[1121] **실시예 24. 마우스 및 래트에서의 CEBPA-51 교차-반응성**

[1122] **연구 목표:** 본 연구의 목적은 래트 및 마우스가 전임상 간 질환 모델 및 MTL-CEBPA/CEBPA-51을 이용한 비임상 독성학 연구용으로 적절한 설치류 종인지 여부를 조사하는 것이었다.

[1123] **실험 디자인:** 본 연구는 3부분, 1) 데이터베이스 검색으로부터 서열 일치(match), 2) 래트 및 마우스 게놈 DNA(gDNA)의 서열분석, 및 3) 래트 및 마우스 세포주에서 CEBPA의 상향조절을 확인.

[1124] 첫째, CEBPA의 서열 상동성을 공개적으로 입수가능한 데이터베이스(BLAST 검색)을 사용하여 평가하였다. CEBPA-51 표적 서열을 BLAST를 사용할 때 래투스 노르베지쿠스(*Rattus norvegicus*)(위스타 스트레인) 및 무스 무스쿨

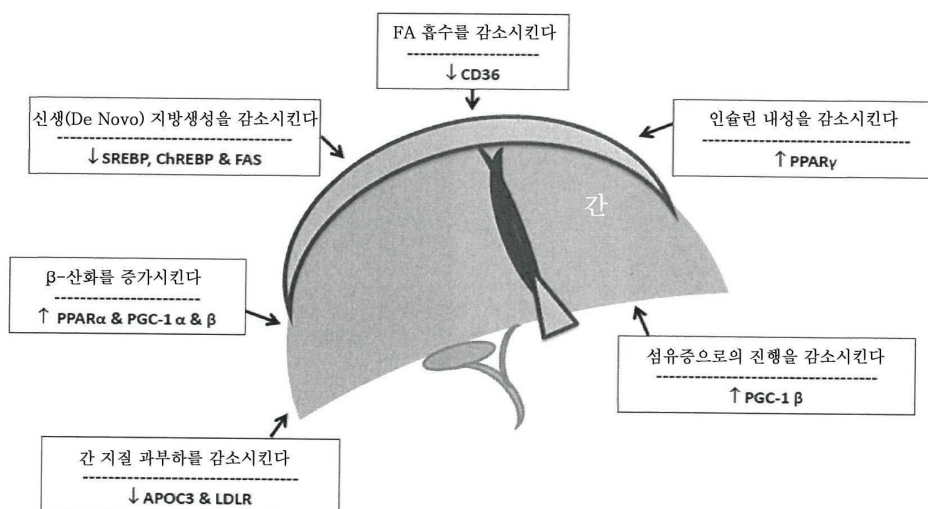
러스(*Mus musculus*)(C57BL/6J 스트레인) 계놈에 대한 질의 검색으로서 사용하였다.

- [1125] 추가로, 계놈 DNA를 래트 및 마우스 간엽으로부터 단리시키고, 표적 부위의 PCR 생성물을 직접적 서열분석으로부터 생성시켰다. 이어서, 수득된 서열을 BLAST를 통해 공개된 래트 서열 및 마우스 서열과 비교하였다.
- [1126] 이어서, CEBPA-51을 래트 간 클론-9 세포 및 마우스 간 AML12 세포로 형질감염시키고 CEBPA mRNA의 상향조절을 측정하여 기능적 교차반응성을 평가하였다. 세포를 리포펙타민 2000을 사용하여 20nM(f.c.)의 각 시험 항목(CEBPA-51 또는 siFLUC, 비표적화 siRNA)으로 역방향 형질감염시키고 이어서 리포펙타민 2000을 사용하여 각 시험 항목의 추가의 전방향 형질감염 단계(20nM f.c.)를 수행하였다. 두번째 형질감염 후 24시간째에 CEBPA mRNA 수준을 qRT-PCR(하우스킵핑 유전자: 삼중으로 측정된 GAPDH)에 의해 측정하였다.
- [1127] **결과:** BLAST 검색은 CEBPA-51의 서열과 래트 및 마우스 표적 부위(CEBPA 유전자의 계놈 위치) 간의 불일치의 부재를 확인시켜 주었다. 또한, CEBPA-51과 래트 및 마우스 간으로부터의 gDNA로부터 유도된 증폭된 서열을 비교하였을 때 불일치가 발견되지 않았다.
- [1128] CEBPA-51을 래트 클론-9 세포 및 마우스 AML12 세포로 형질감염시킨 결과, 각각 2배(n=1) 및 1.7배(n=2) CEBPA mRNA 상향조절된 반면에, 비표적화 대조군 RNA 듀플렉스(siFLUC)을 사용하였을 때에는 상향조절이 관찰되지 않았다.
- [1129] **결론:** 래트 및 마우스 CEBPA의 계놈 서열은 BLAST 데이터베이스에 따르는 CEBPA-51 표적 서열과 동일하다. 이는 래트 및 마우스 간 gDNA의 서열분석에 의해 추가로 검증되었다. CEBPA-51의 기능적 교차반응성은 래트 및 마우스 간 세포주에서의 초기 연구에서 CEBPA 유전자 상향조절이 입증됨으로써 검증되었다. 따라서, 간암 및 간 질환의 래트 및 마우스 모델은 MTL-CEBPA 활성의 전임상 평가에 적절하며, 래트는 MTL-CEBPA의 비임상 독성학 시험에 적절한 설치류 종인 것으로 간주된다.
- [1130] 기타 실시형태
- [1131] 본 발명이 이의 상세한 설명과 함께 설명되었지만, 상기 설명은 본 발명을 예시하고자 하는 것이고 이의 범위를 제한하는 것이 아니며, 이의 범위는 첨부된 청구범위에 의해 한정됨을 이해하여야 한다. 다른 측면, 이점 및 변형은 하기 청구범위 내에 있다.

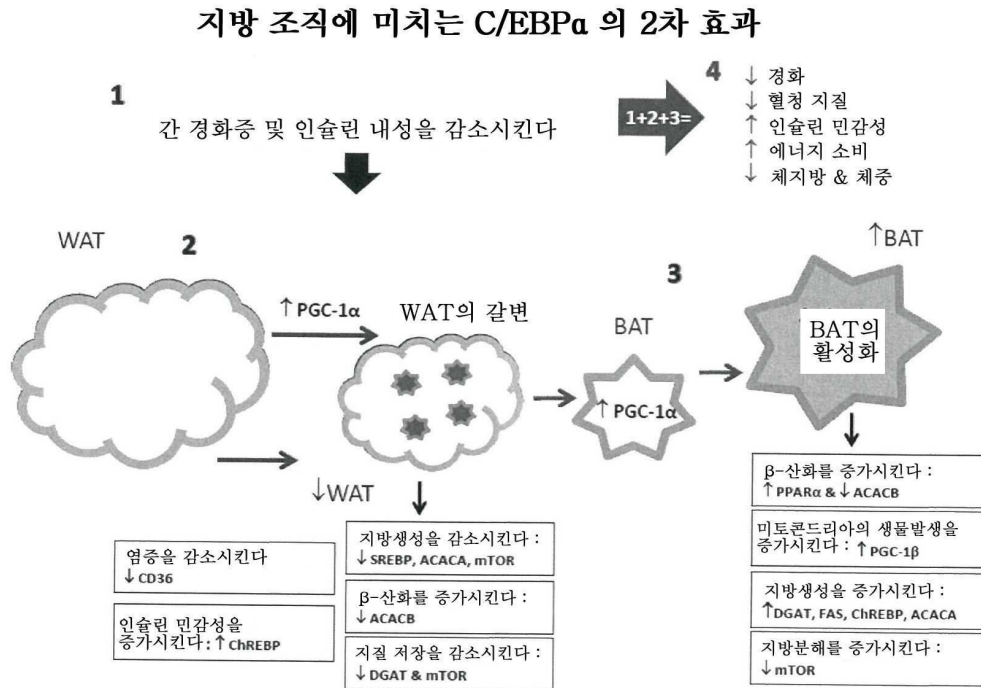
## 도면

### 도면1

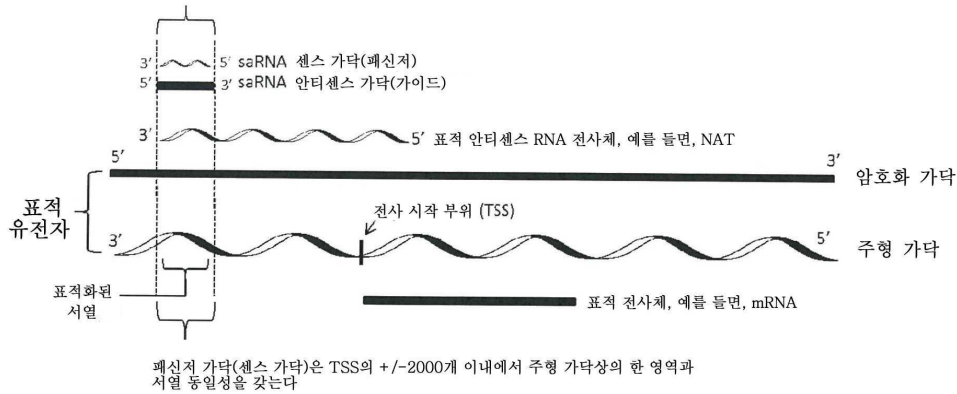
간에 미치는 C/EBPα의 1차 효과



도면2



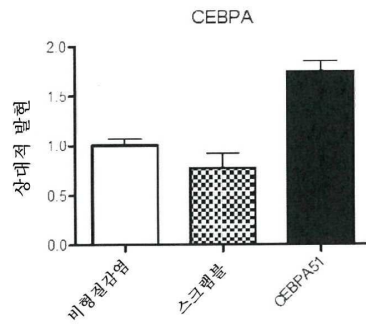
도면3



도면4

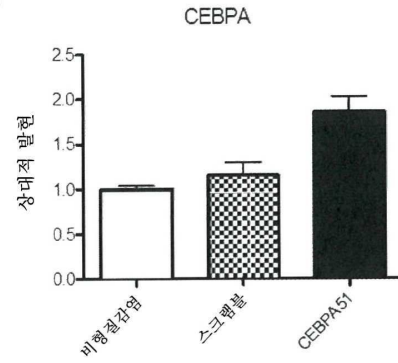
도. 4A

Hep3B



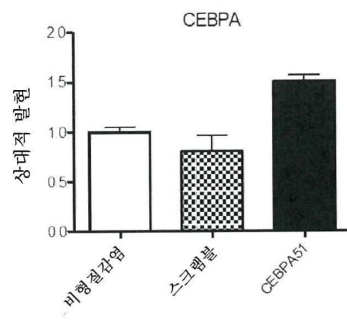
도. 4B

HepG2



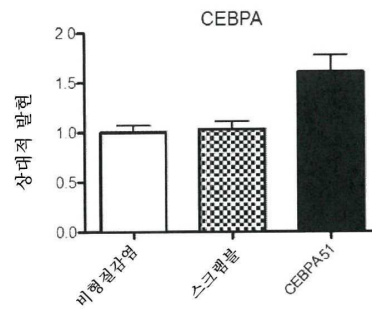
도. 4C

PLC/PRF/5



도. 4D

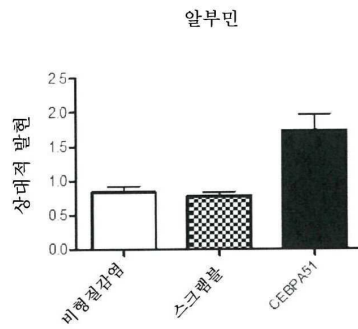
SNU475



도면5

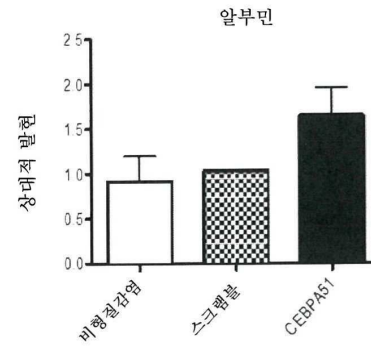
도. 5A

Hep3B



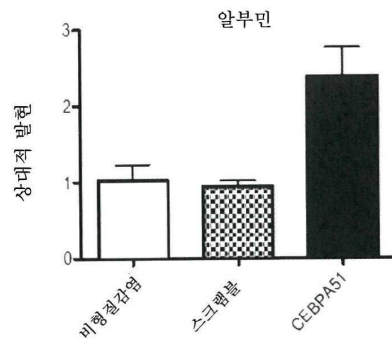
도. 5B

HepG2



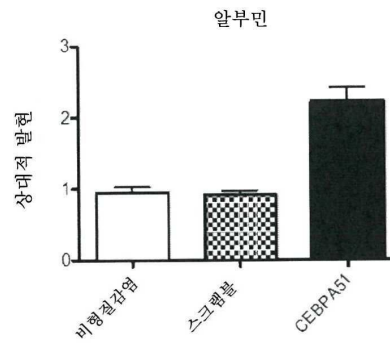
도. 5C

PLC/PRF/5



도. 5D

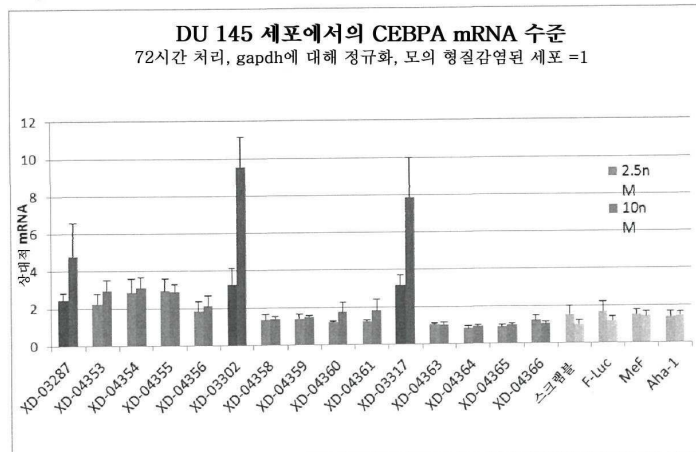
SNU475



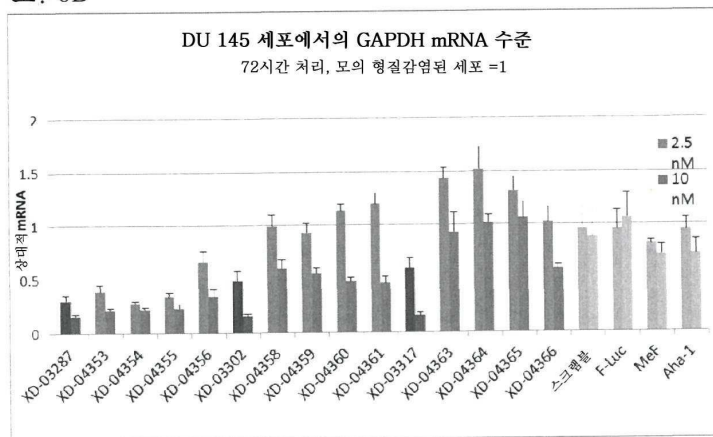


도면6

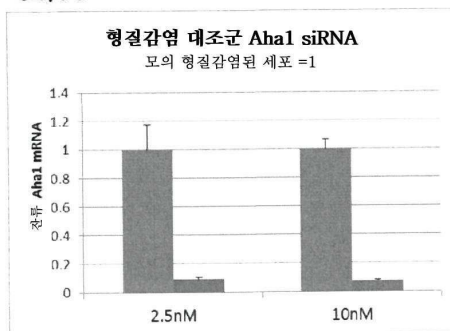
도. 6A



도. 6B

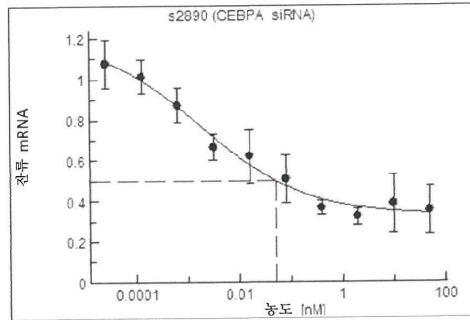


도. 6C



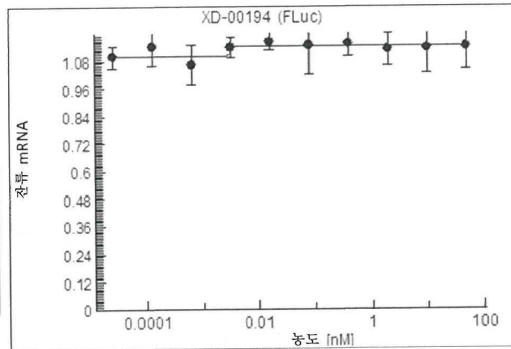
도면7

도.7A



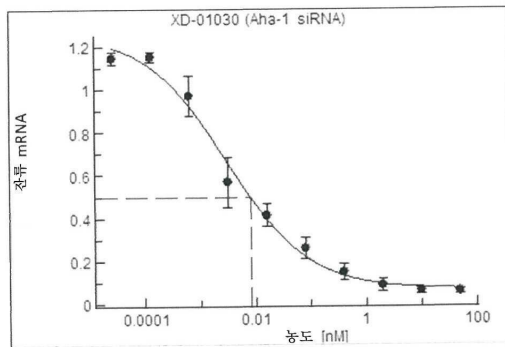
x-축 농도 [nM]  
y-축 잔류 mRNA

도.7B



x-축 농도 [nM]  
y-축 잔류 mRNA

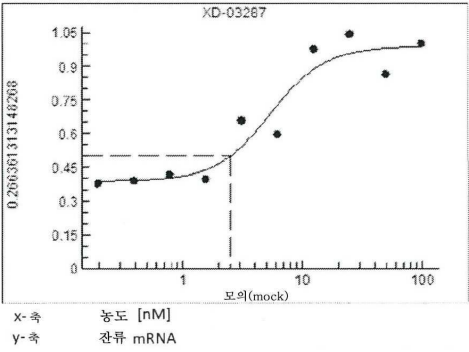
도.7C



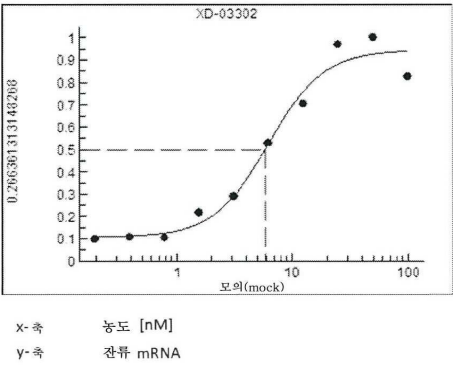
x-축 농도 [nM]  
y-축 잔류 mRNA

도면8

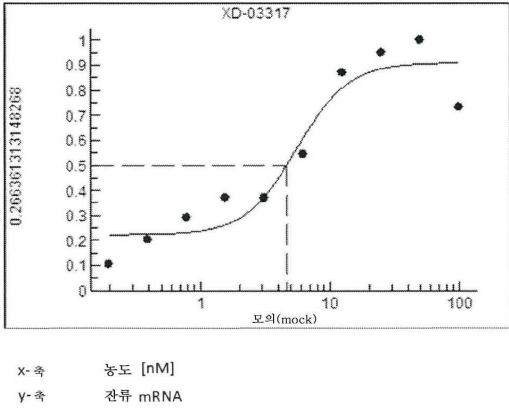
도. 8A



도 8B

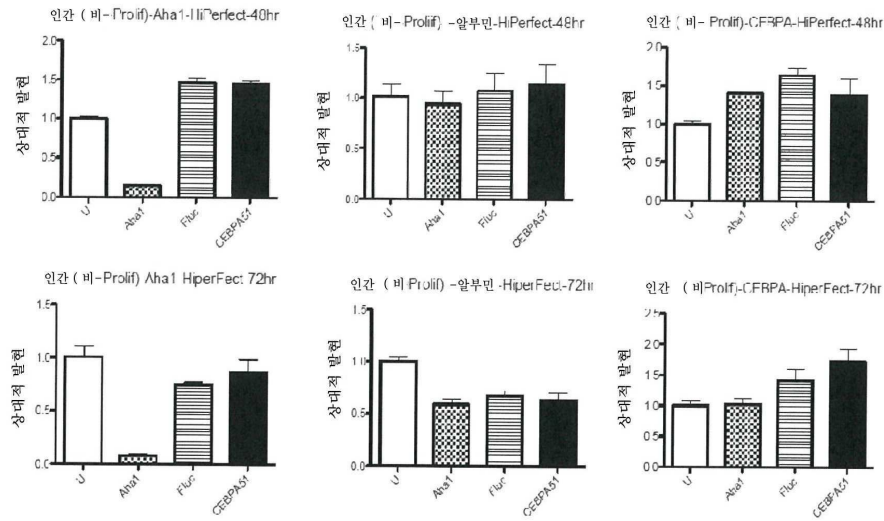


도. 8C

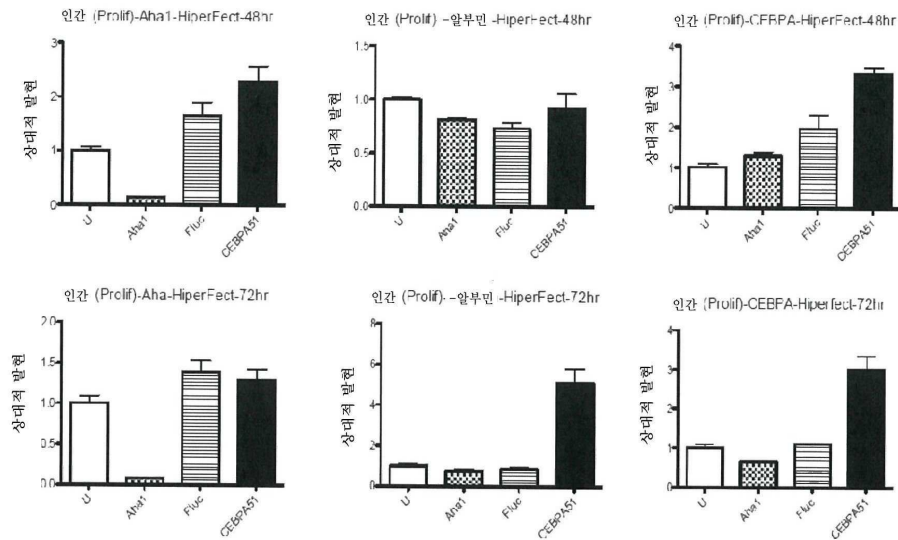


도면9

도. 9A

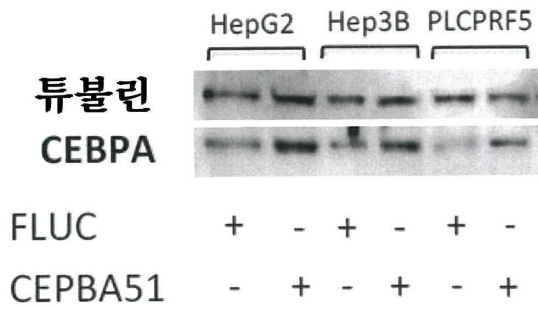


도. 9B

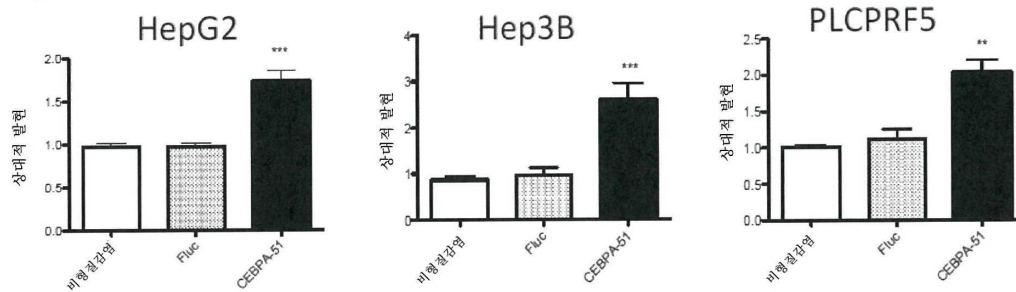


도면10

도.10A

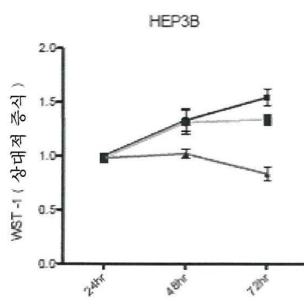


도. 10B

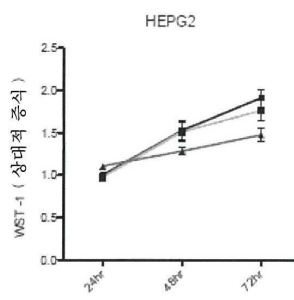


도면11

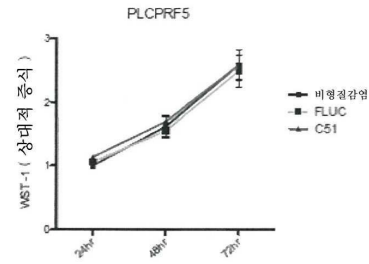
도 11A



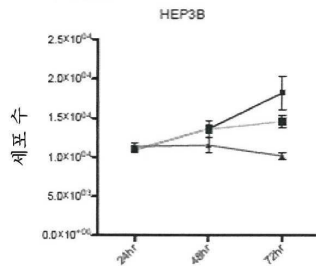
도 11B



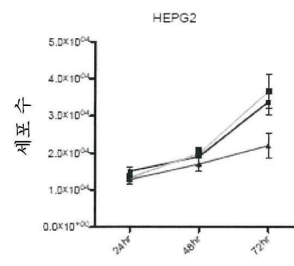
도 11C



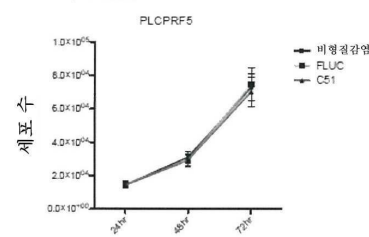
도 11D



도 11E



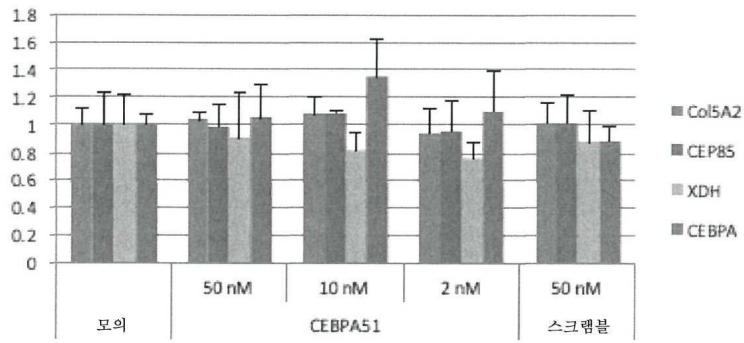
도 11F



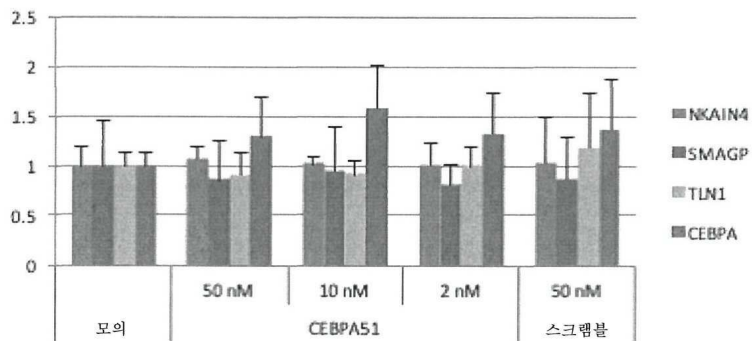


도면12

도 12A

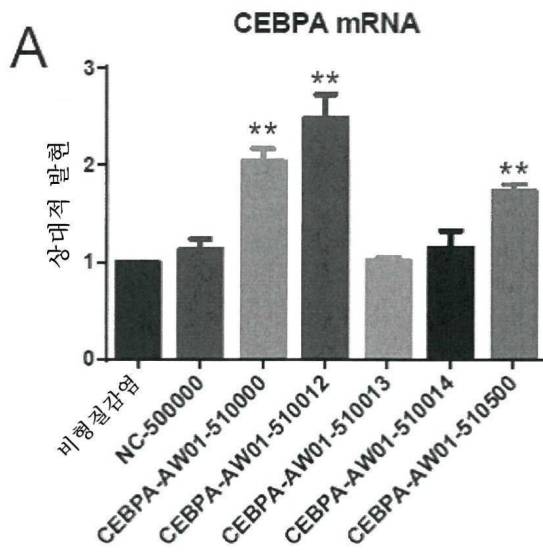


도 12B

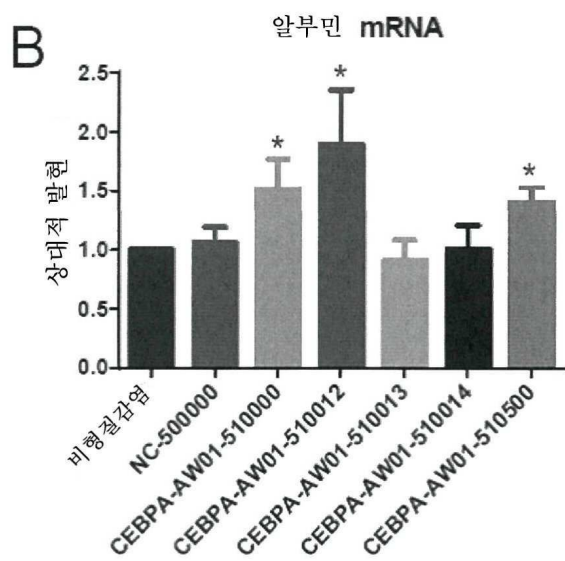


도면13

도 13A

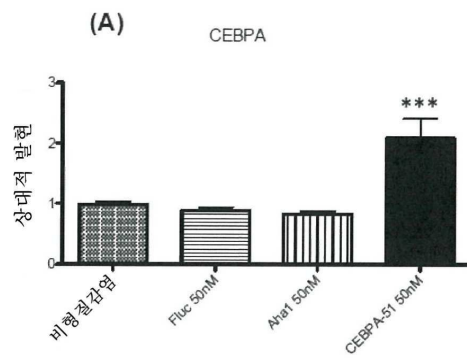


도 13B

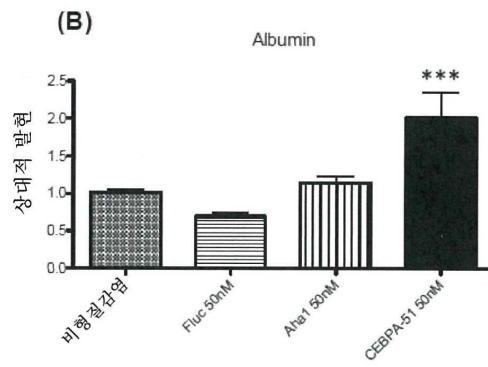


도면14

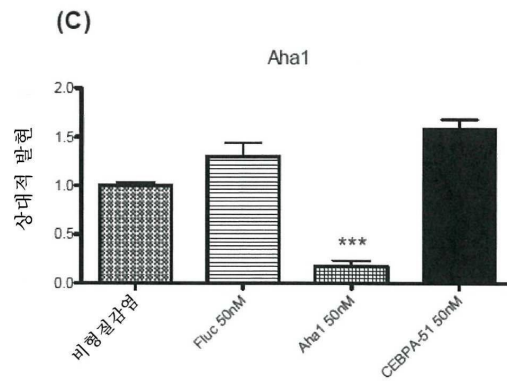
도 14A



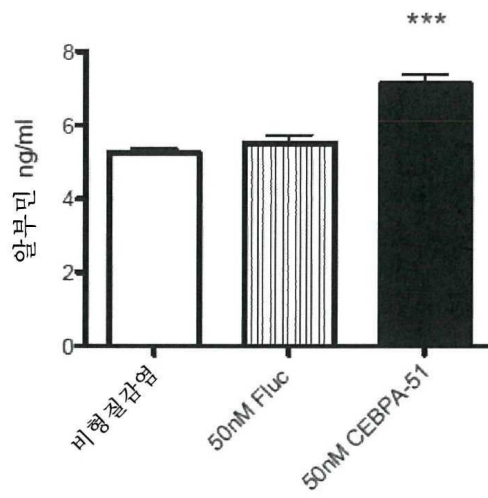
도 14B



도 14C



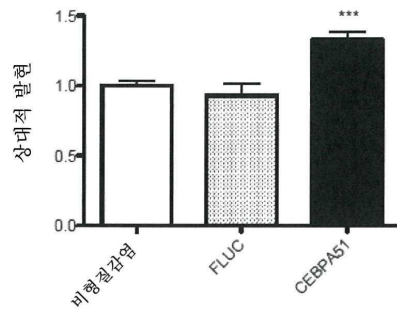
도면15



도면16

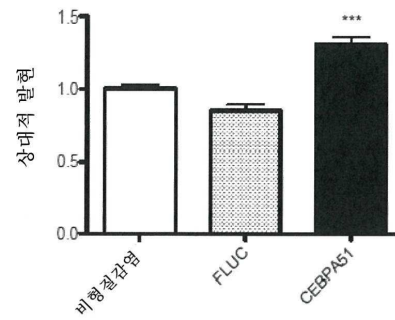
도 16A

알라닌 글리옥실레이트 아미노트랜스퍼라제



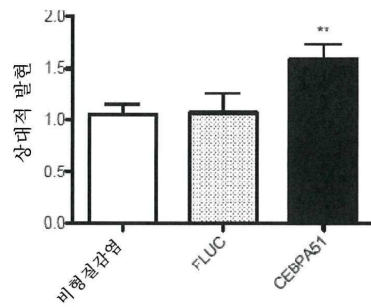
도 16B

알부민



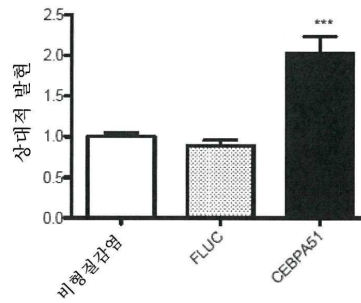
도 16C

CYP3A4



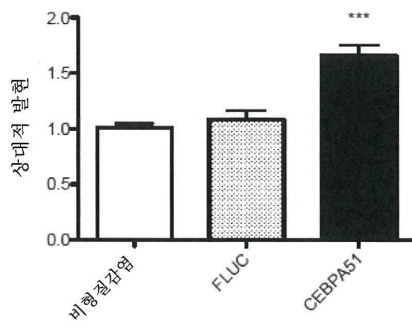
도 16D

오르니틴 트랜스카바밀라제



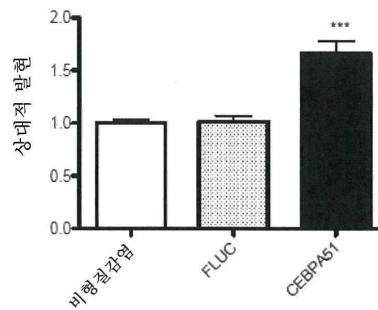
도 16E

HNF4A



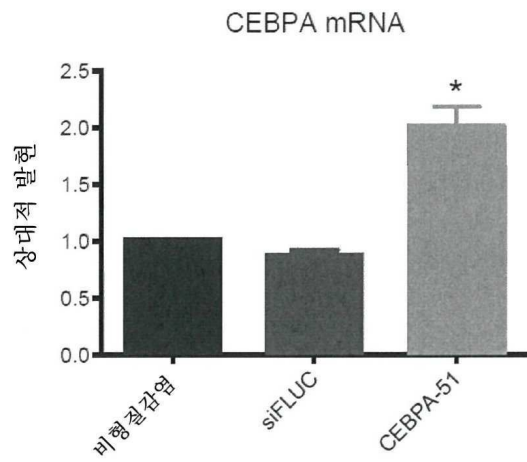
도 16F

CEBPA



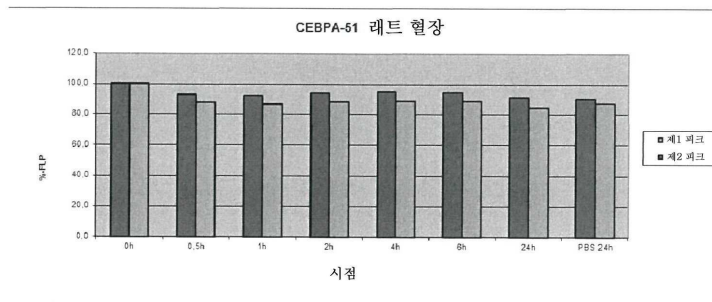


도면17

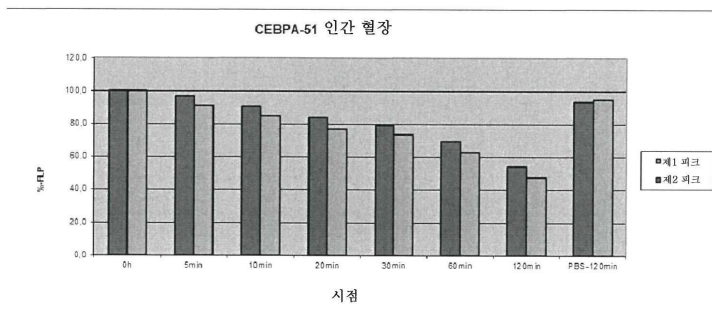


도면18

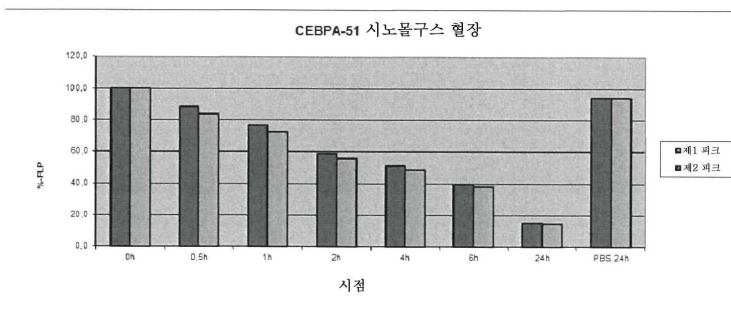
도 18A



도 18B

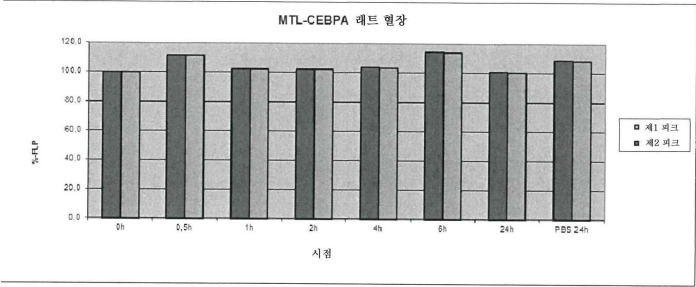


도 18C

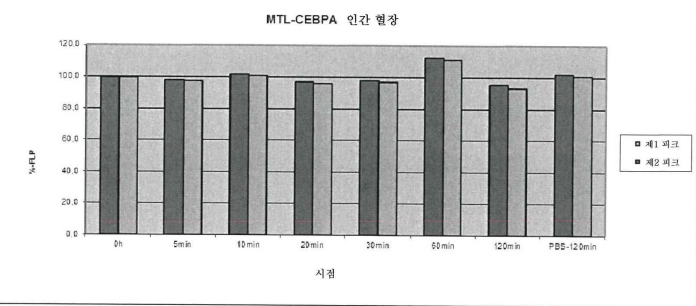


도면19

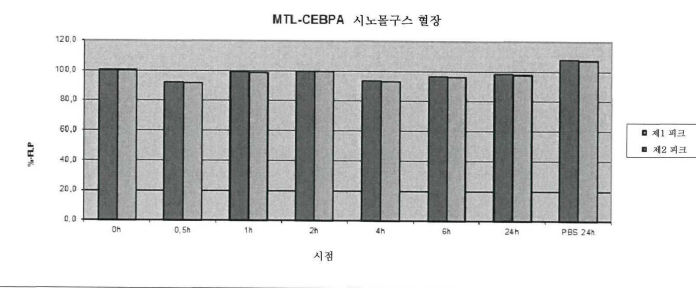
도 19A



도 19B

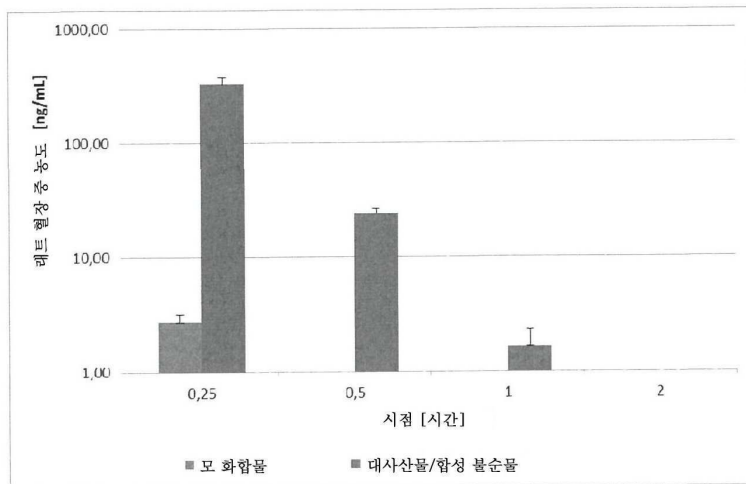


도 19C

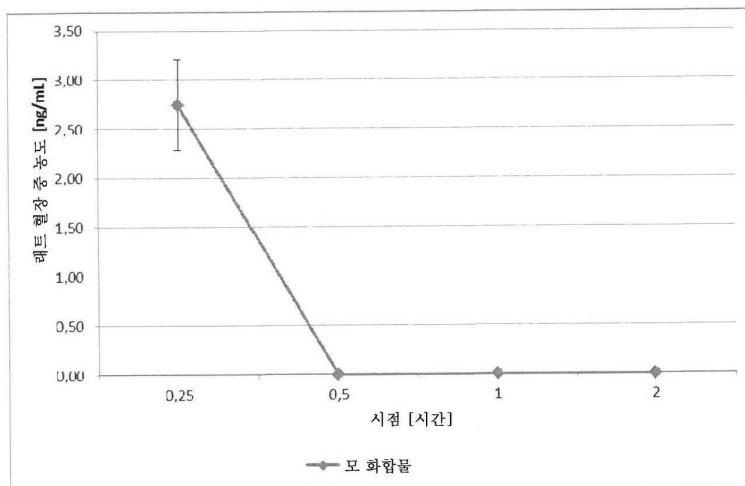


도면20

도 20A

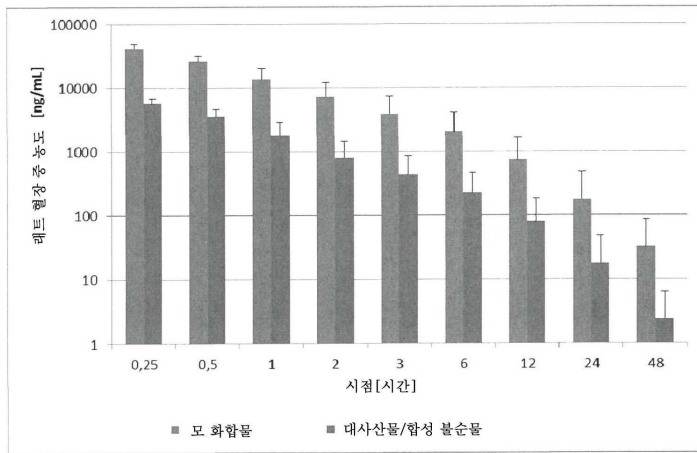


도 20B

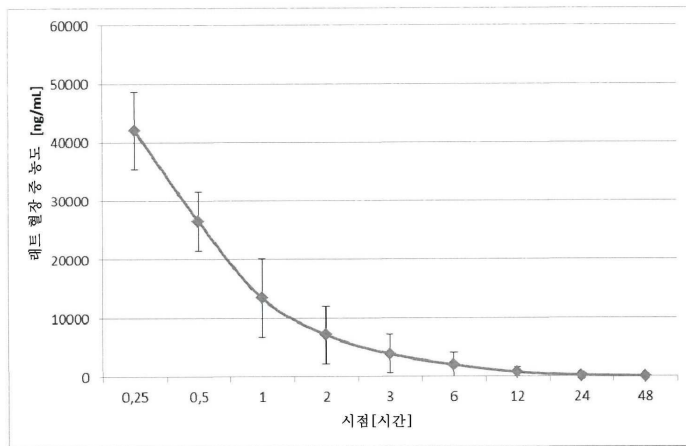


도면21

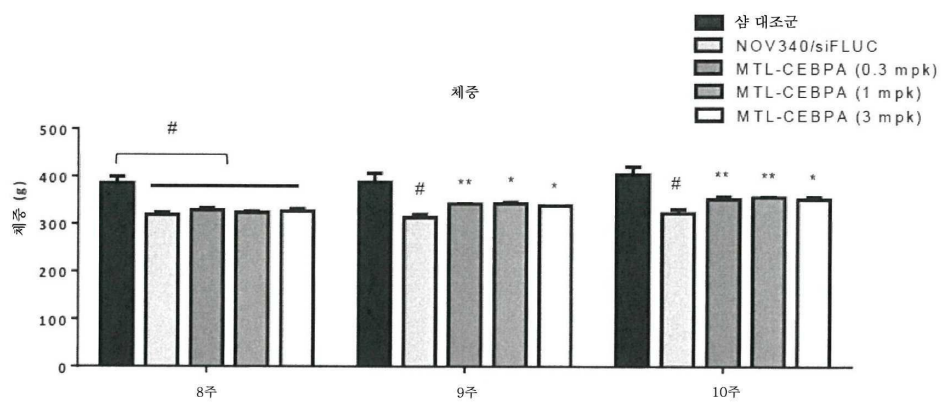
도 21A



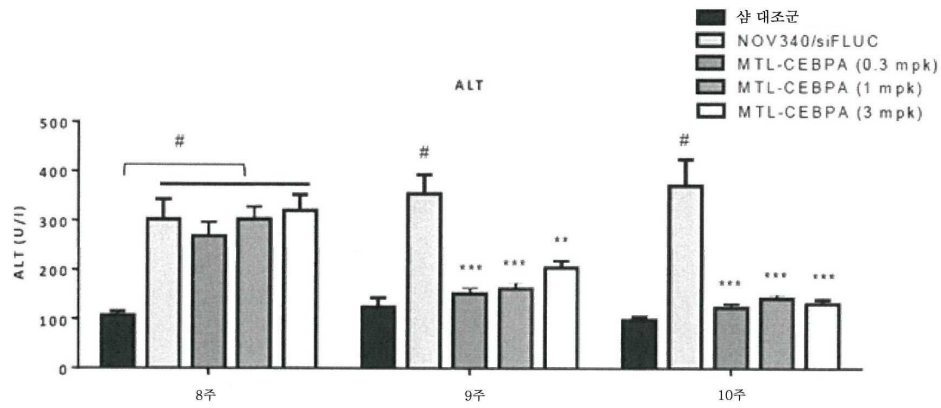
도 21B



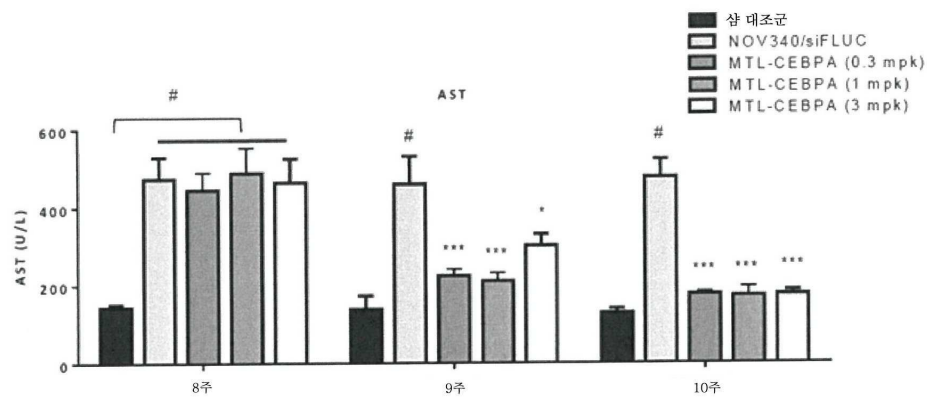
도면22a



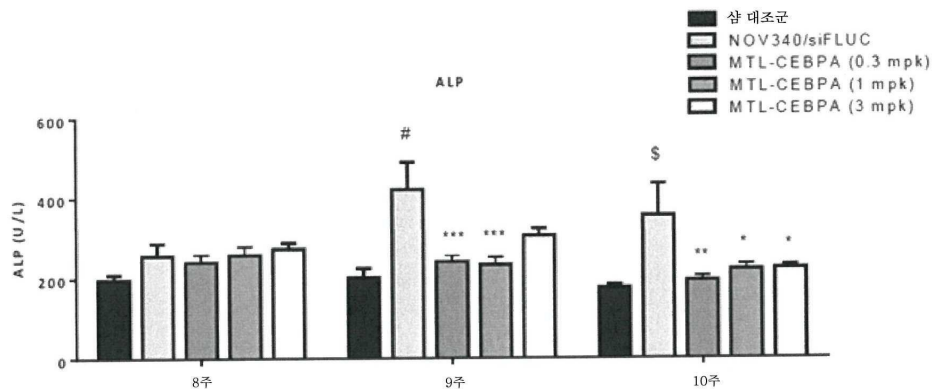
도면22b



도면22c

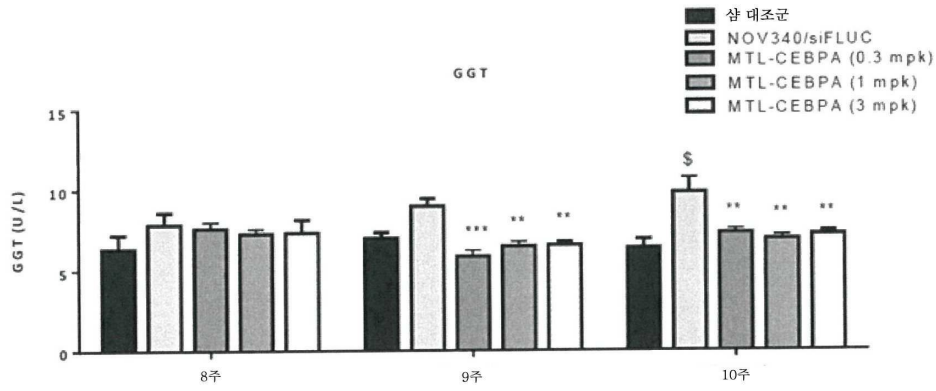


도면22d

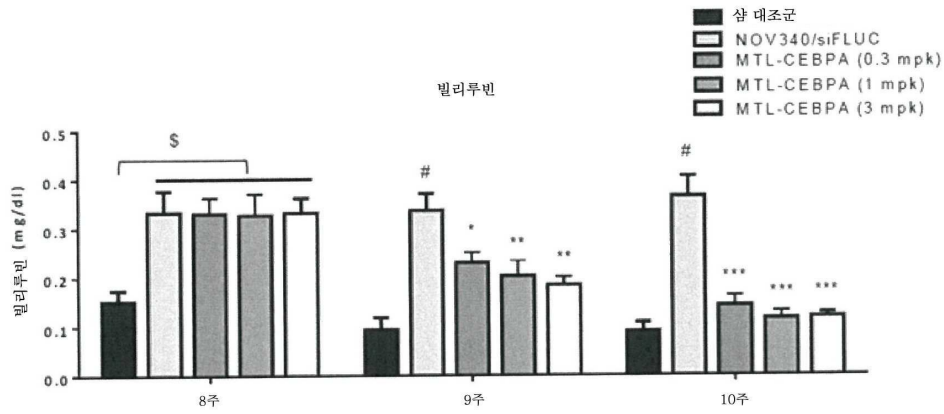




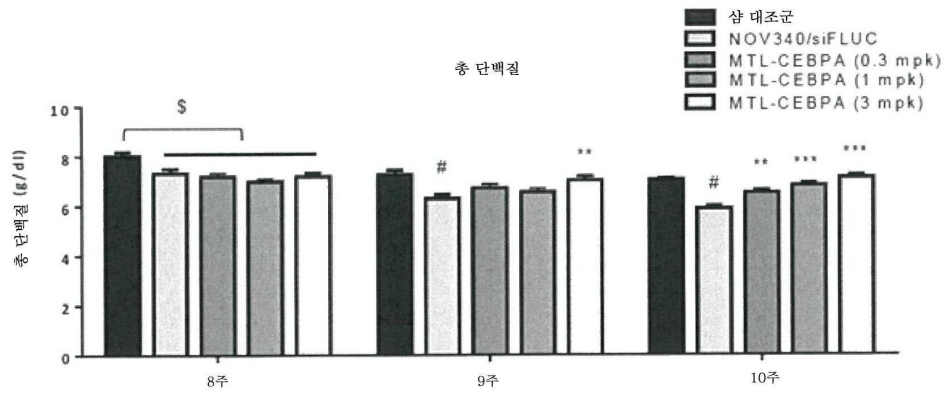
도면22e



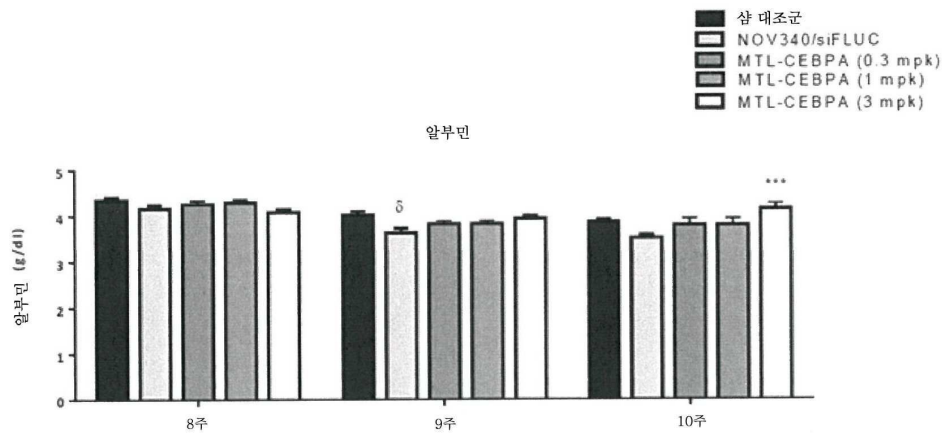
도면22f



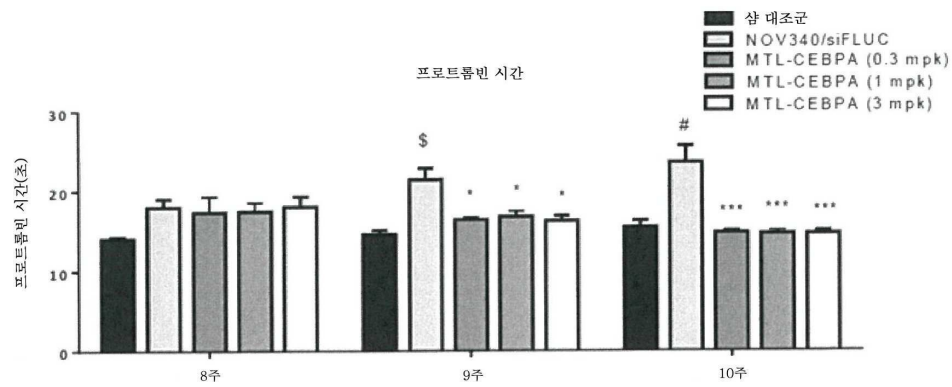
도면22g



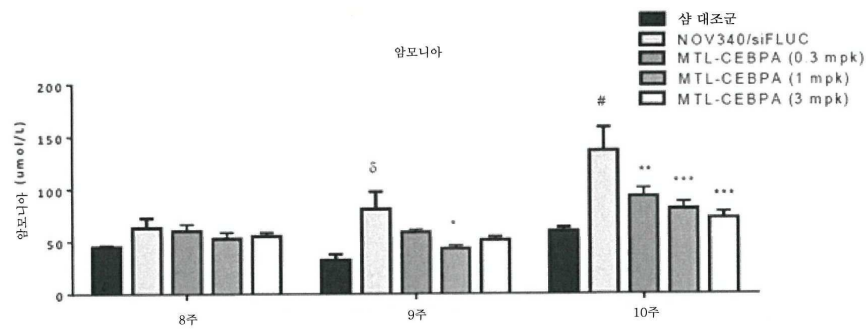
도면22h



도면22i

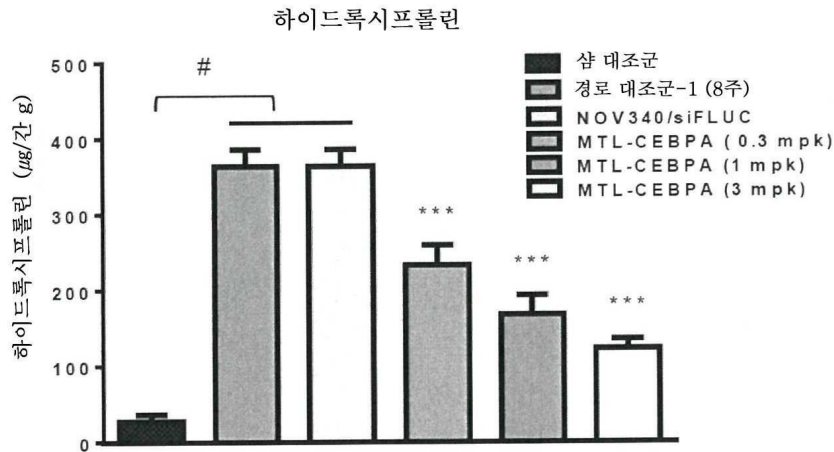


도면22j



데이터는 평균±SEM로서 나타낸다. sham 대조군에 대한 <sup>#</sup>p < 0.001, <sup>\$</sup>p < 0.01 및 <sup>δ</sup>p < 0.05  
NOV340/siFLUC에 대한 \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001

도면22k



# p<0.001 샴 대조군과 비교한 경우

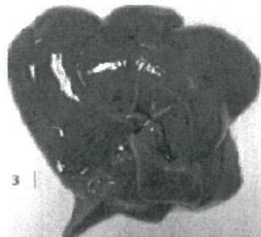
\*\*\*p<0.001 NOV340/siFLUC과 비교한 경우

1원 ANOVA에 이어서 더넷 다중 비교 검정

도면23

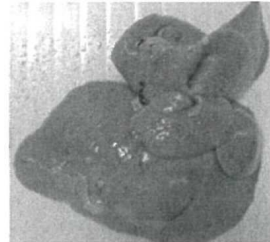
나이프 동물

건강하고 갈색이  
도는 핑크색이며  
매끄럽고 뚜렷한  
경계선을 가짐



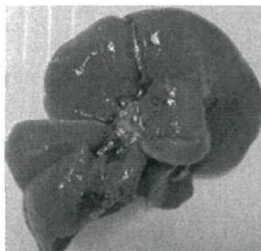
CCl4 + 대조군

더 열고 더 단단하며  
표면상에 퍼져있는  
다수의 경변성  
결절을 가짐



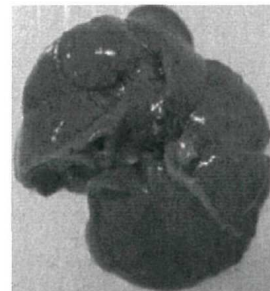
CCl4 + MTL-CEBPA  
(0.3 mpk)

더 열고 더 단단하며  
표면상에 퍼져있는  
작은 결절을 가짐

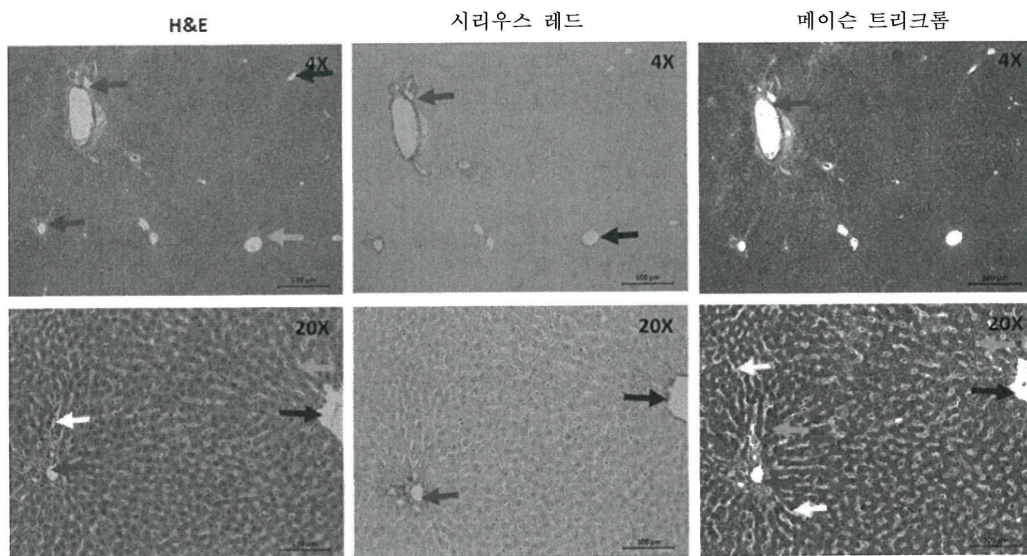


CCl4 + MTL-CEBPA  
(3.0 mpk)

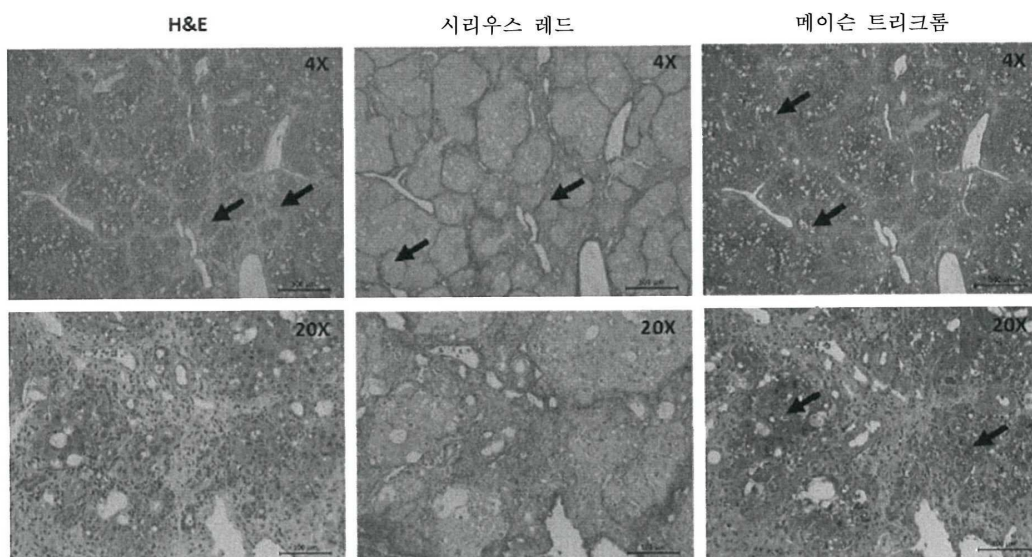
정상이며 불균일한  
표면 및 매우 경미한  
결절화를 가짐



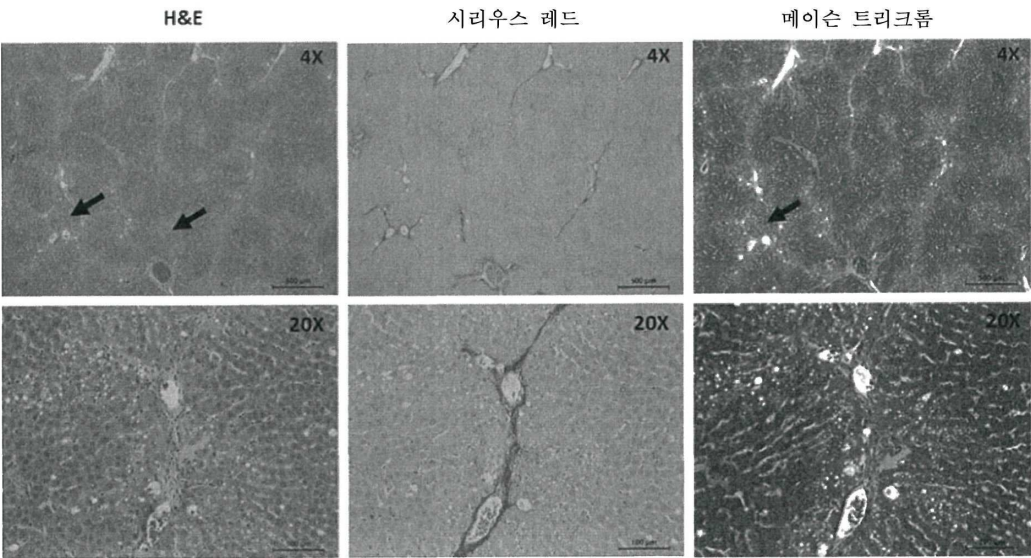
도면24a



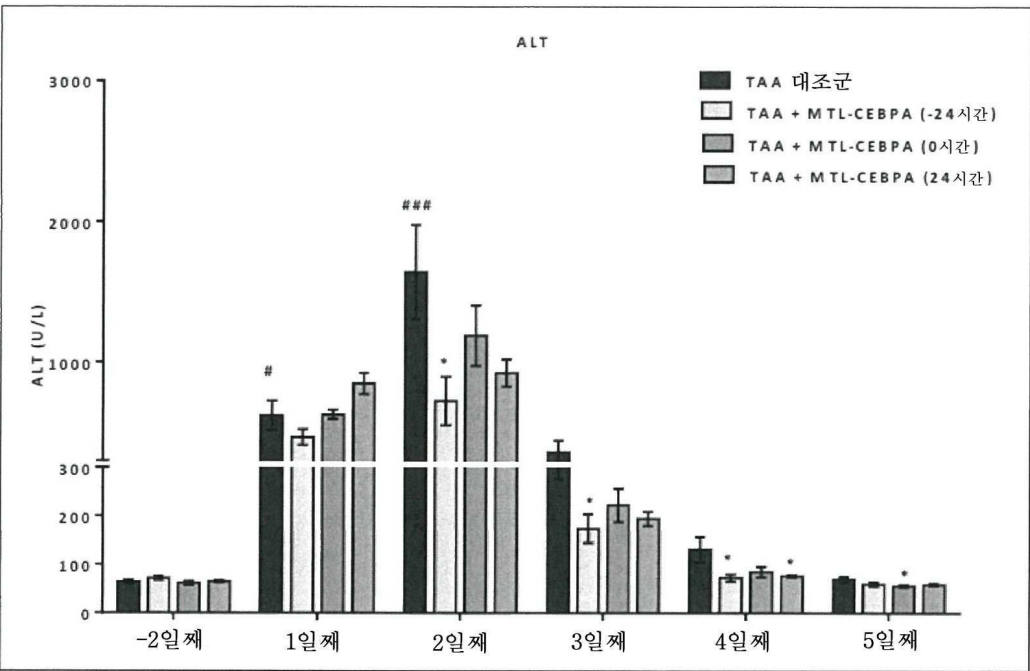
도면24b



도면24c

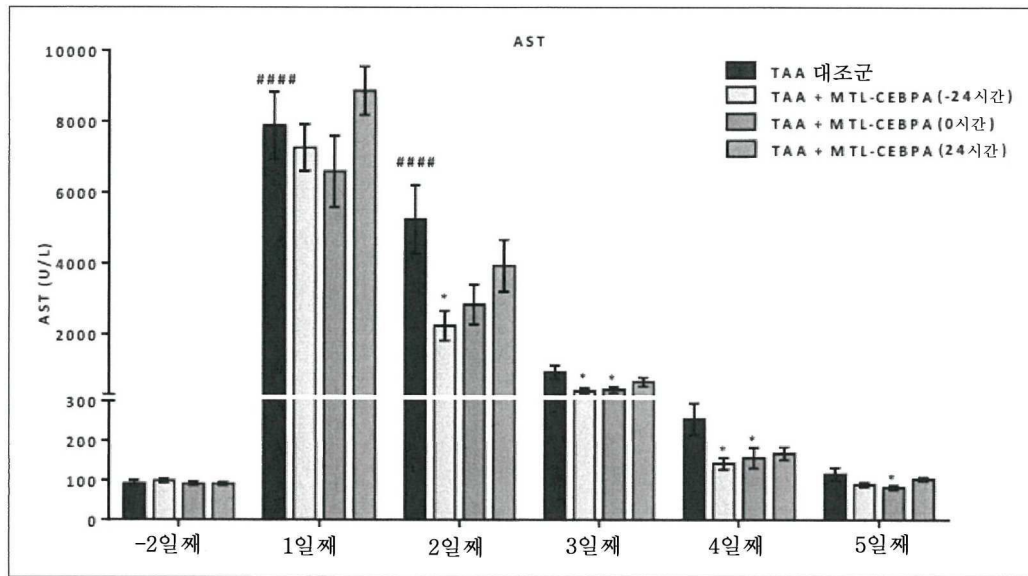


도면25a

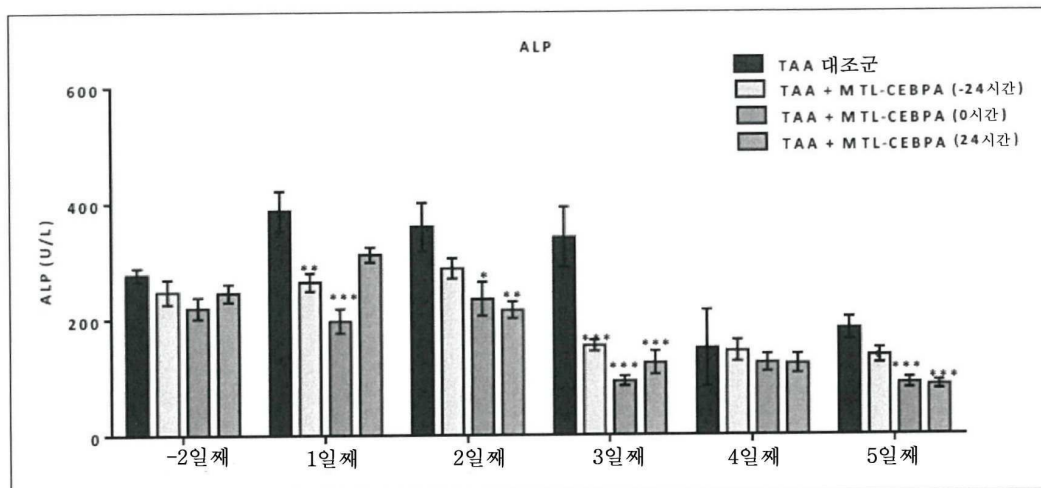




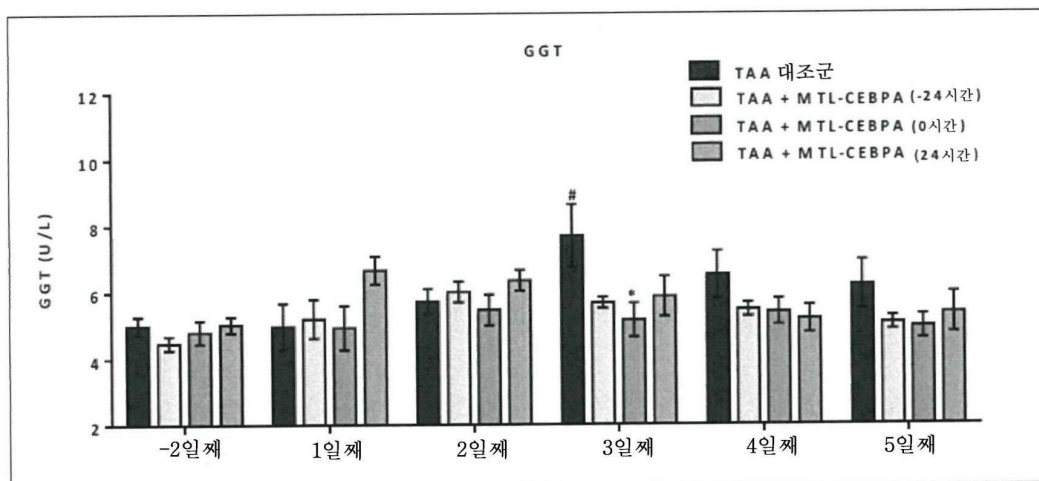
도면25b



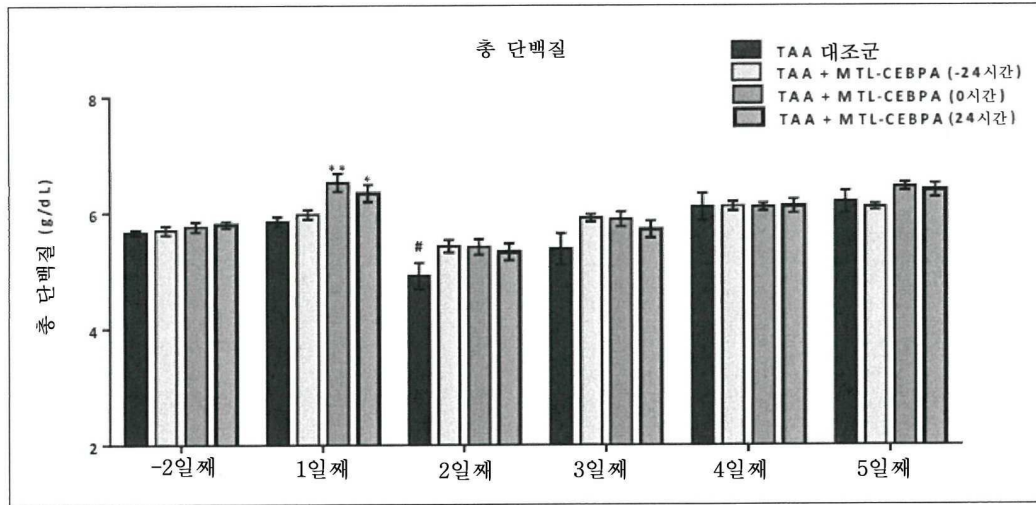
도면25c



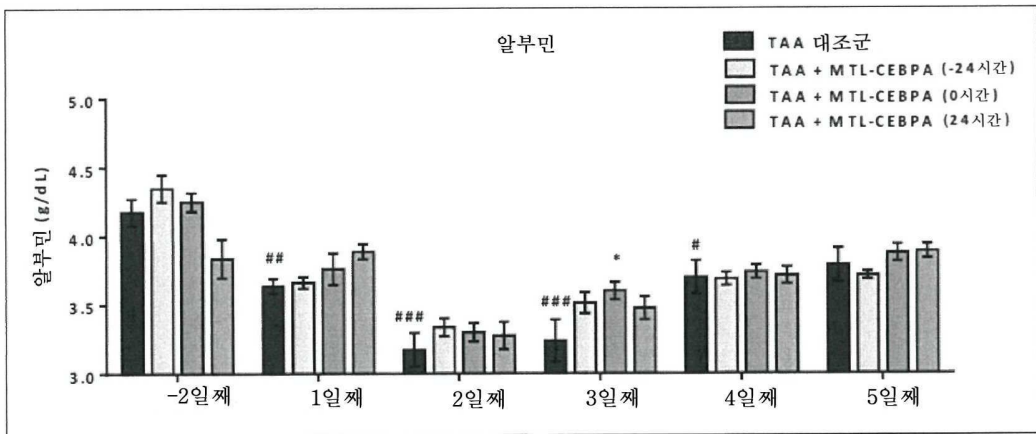
도면25d



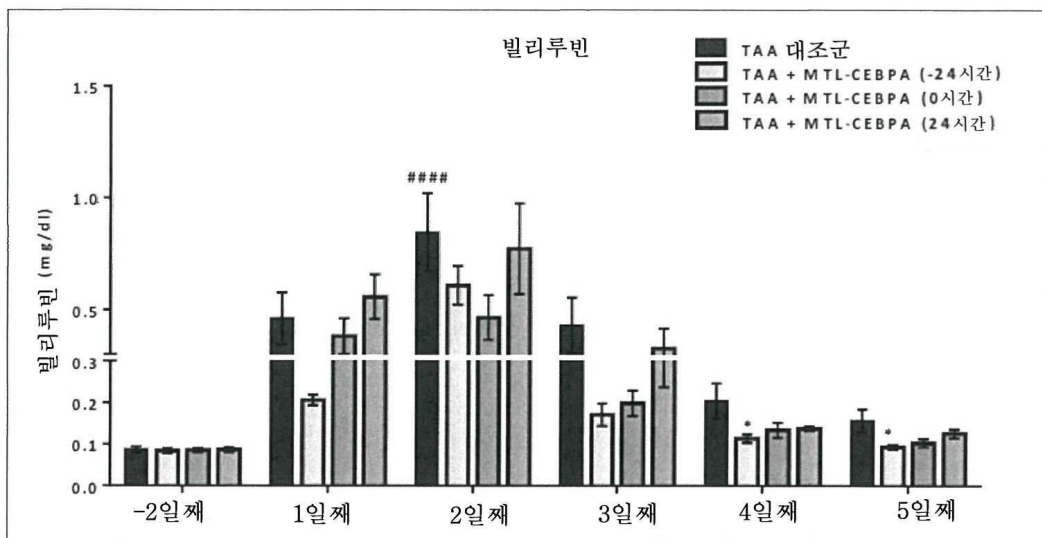
도면25e



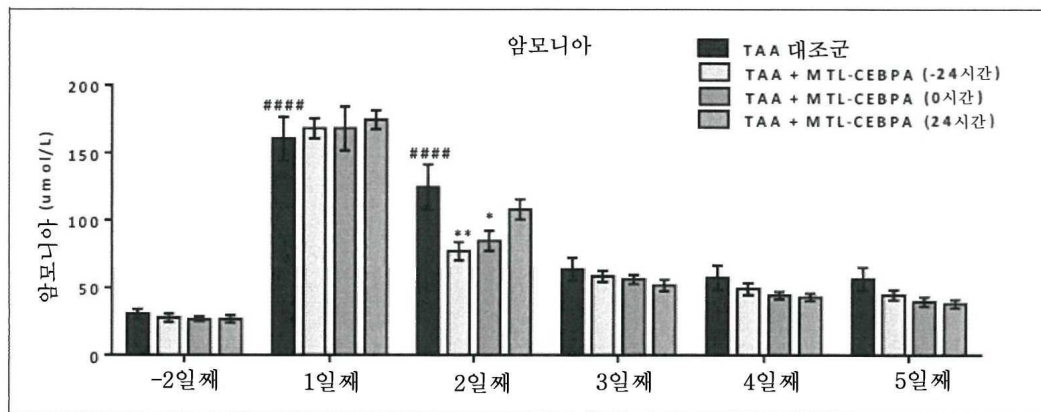
도면25f



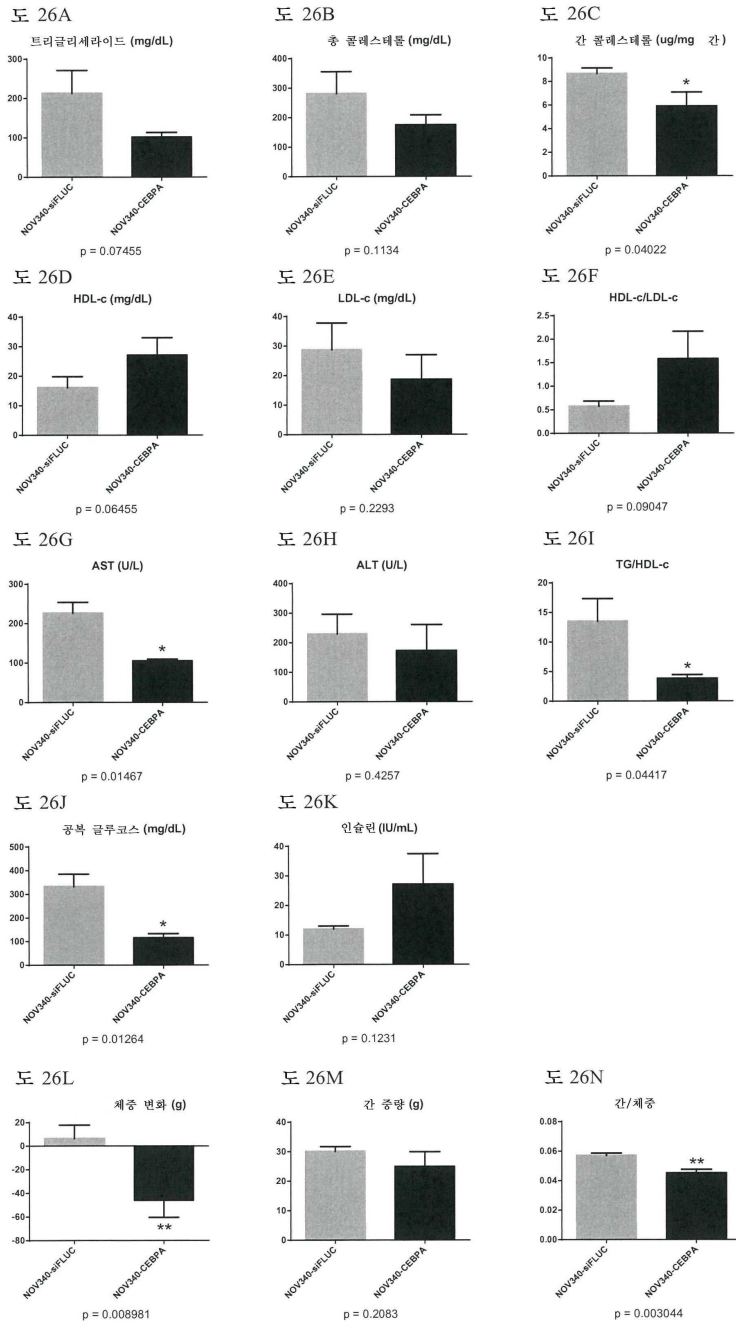
도면25g



도면25h

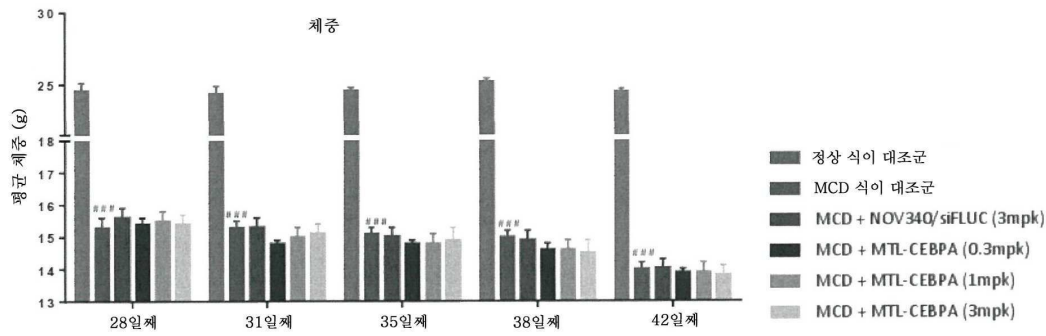


도면26

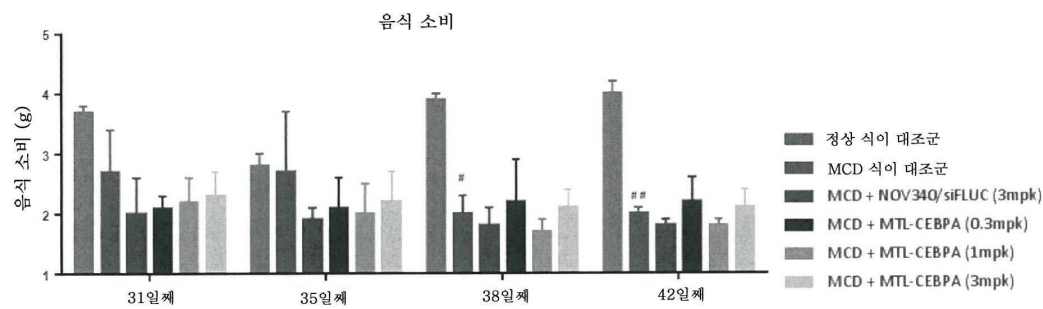


대조군 동물과 비교한 통계학적 유의성: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

도면27a

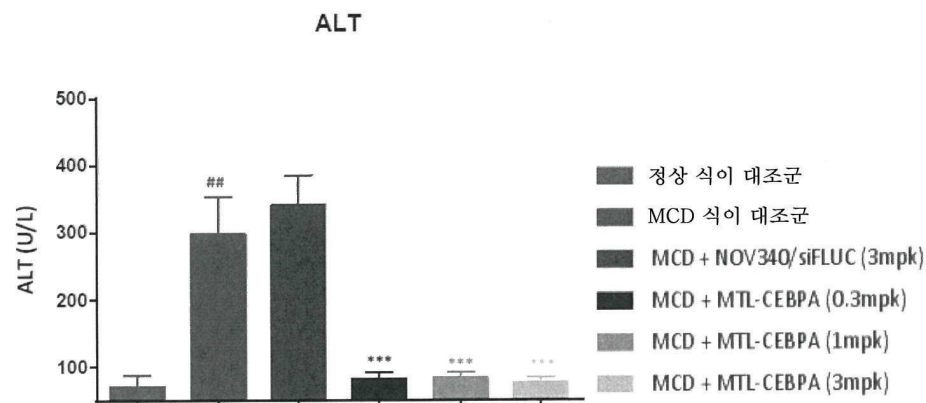


도면27b



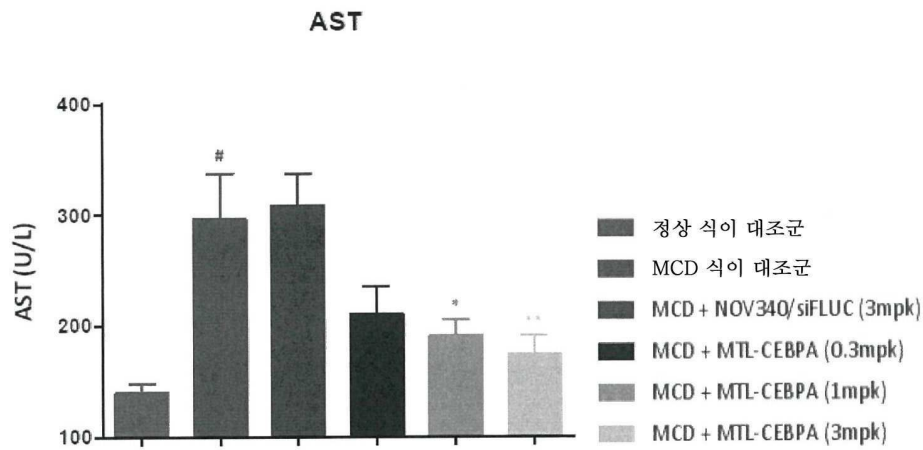
- # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  & ### $p < 0.001$  정상 식이 그룹과 비교한 경우 1원 ANOVA에 이어서 터키 다중 비교 검정
- 처리군은 MCD 식이 대조군과 비교하여 체중 및 음식 섭취의 유의적 변화를 나타내지 않았다.

도면27c

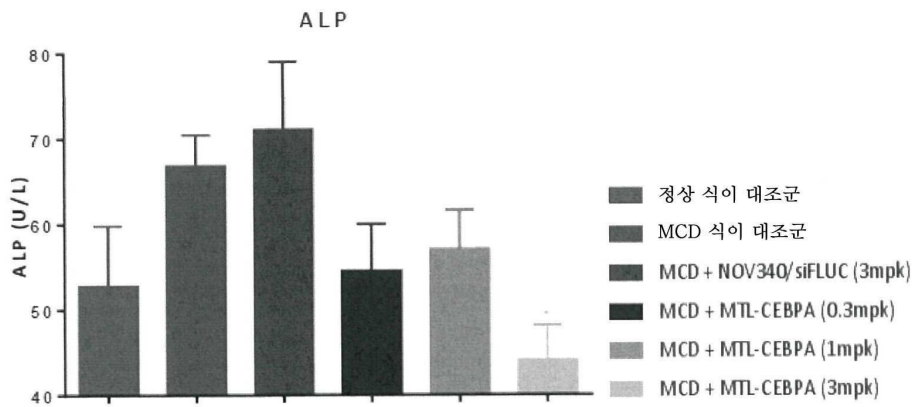




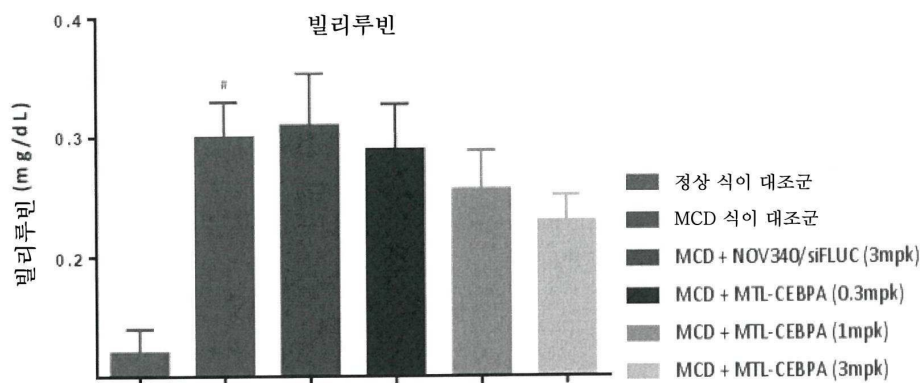
도면27d



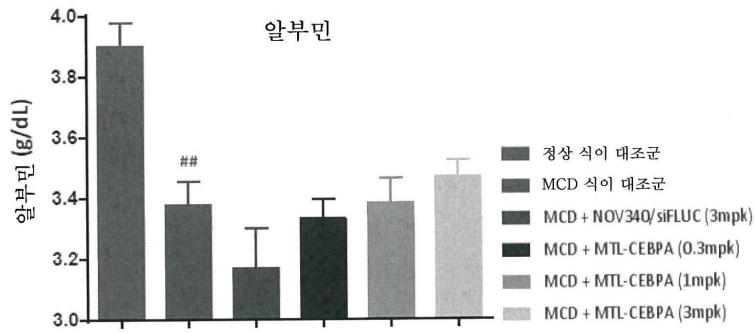
도면27e



도면27f



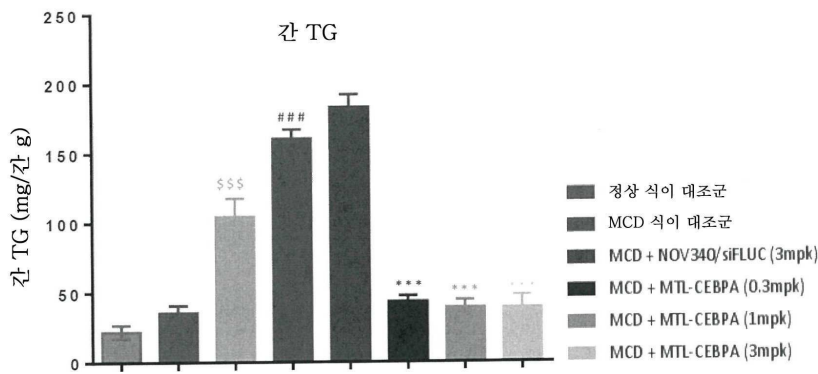
도면27g



\* $p < 0.05$  & \*\* $p < 0.01$ , 1원 ANOVA에 이어서 터키 다중 비교 검정, 정상 식이 대조군과 비교한 경우

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  & \*\*\* $p < 0.001$ , MCD 식이 대조군과 비교한 경우

도면27h

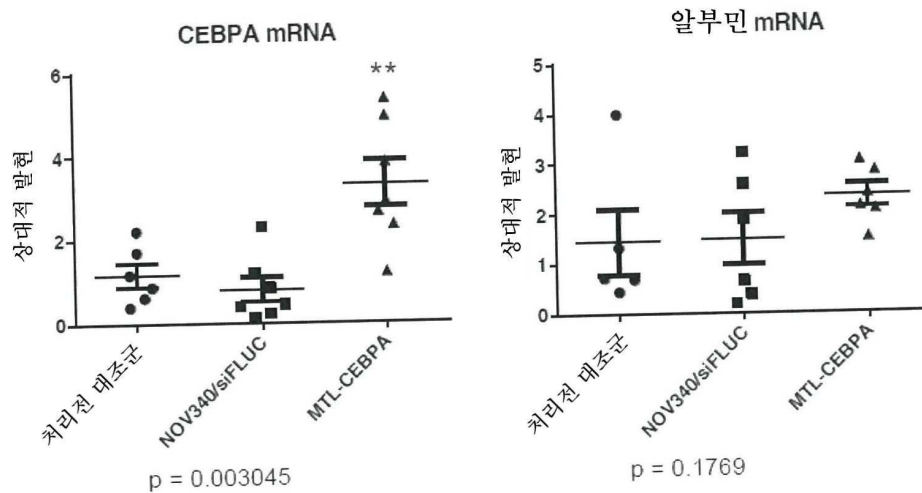


\*\*\* $p < 0.001$ , 1원 ANOVA에 이어서 터키 다중 비교 검정, 정상 식이 그룹과 비교한 경우(6주)

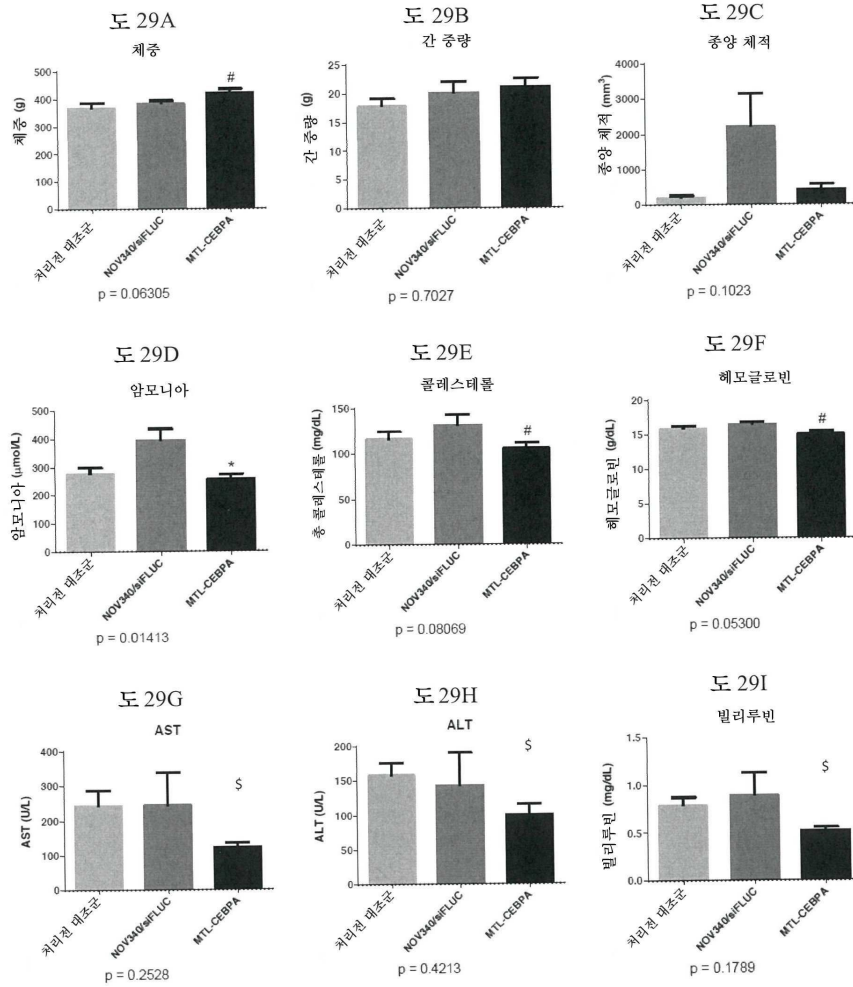
\*\*\* $p < 0.001$ , MCD 식이 대조군과 비교한 경우(6주)

\$\$\$ $p < 0.001$ , 정상 식이 그룹과 비교한 경우(4주)

도면28

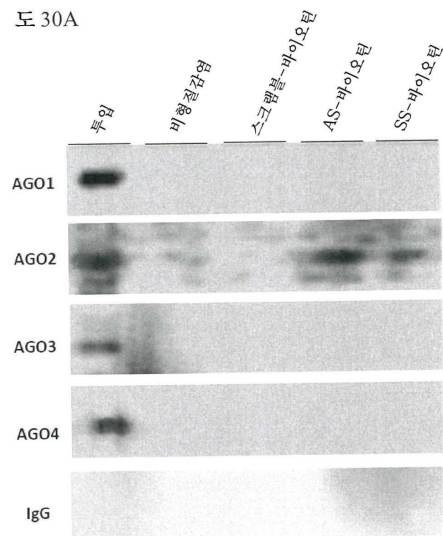


도면29

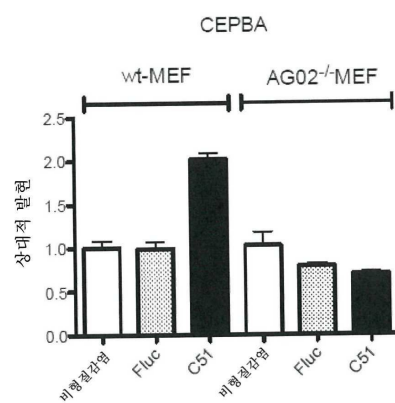


도면 30

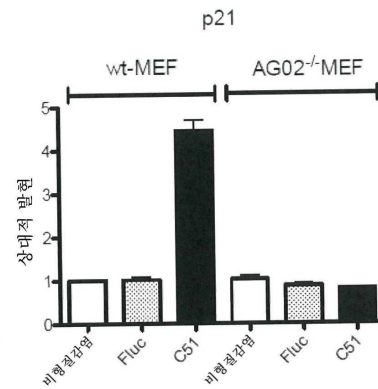
도 30A



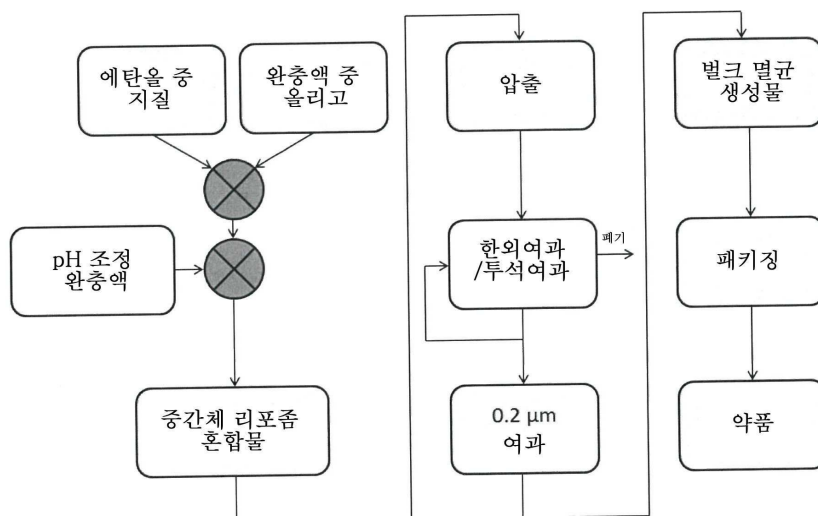
도 30B



도 30C

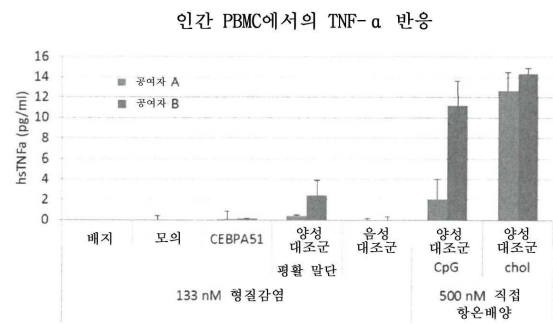


도면31

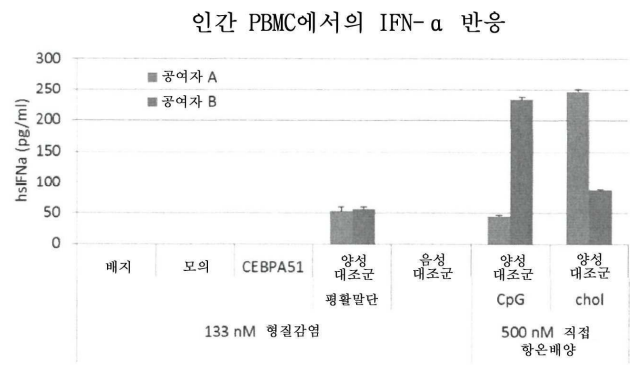


도면32

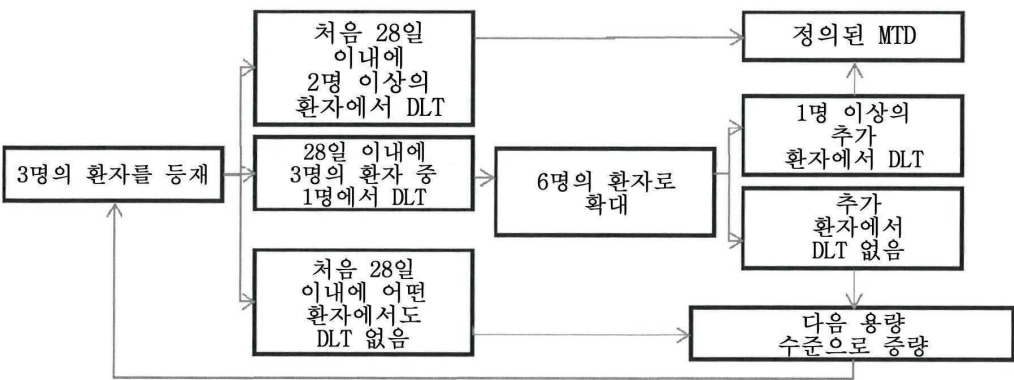
도 32A



도 32B

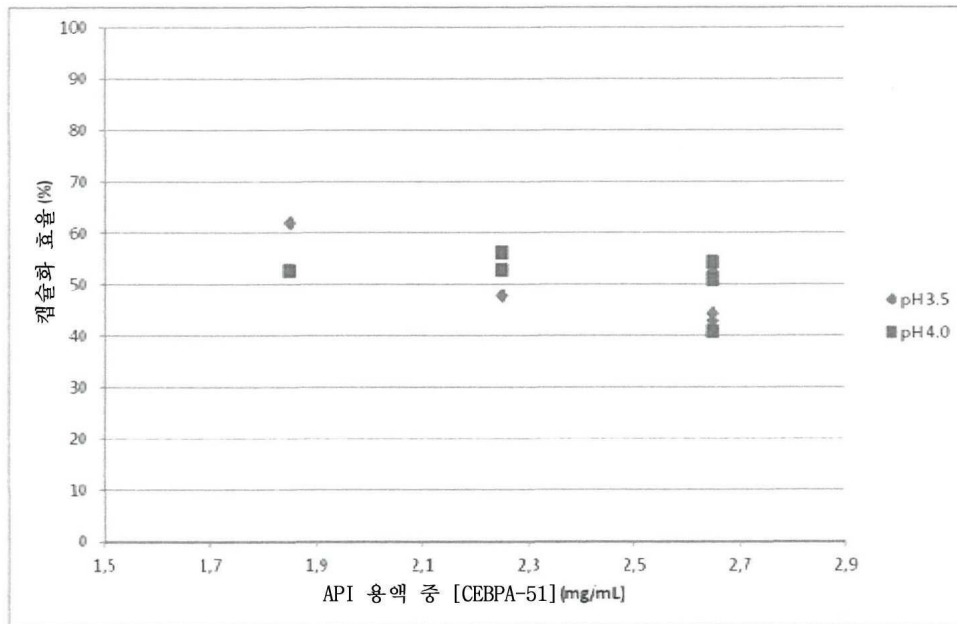


도면33

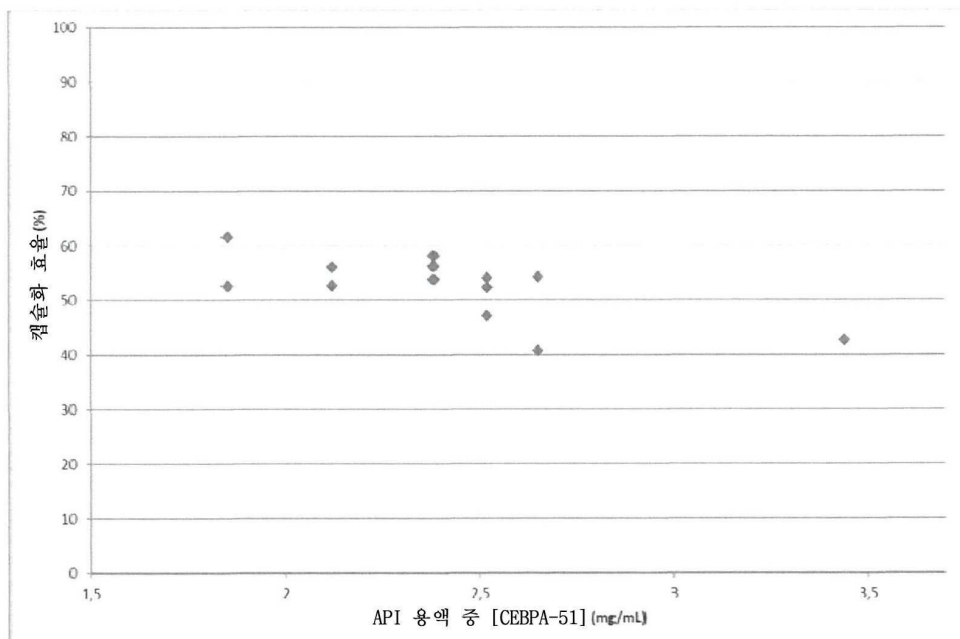




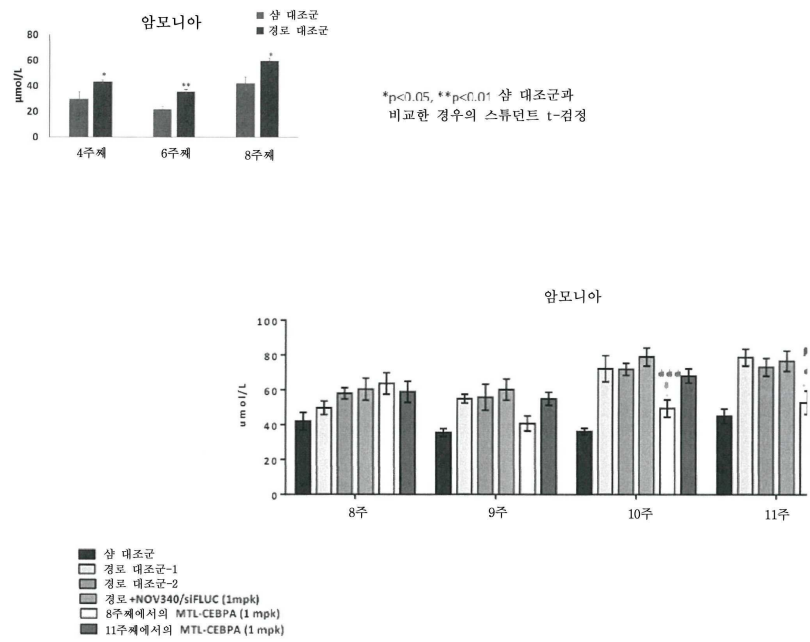
도면34



도면35

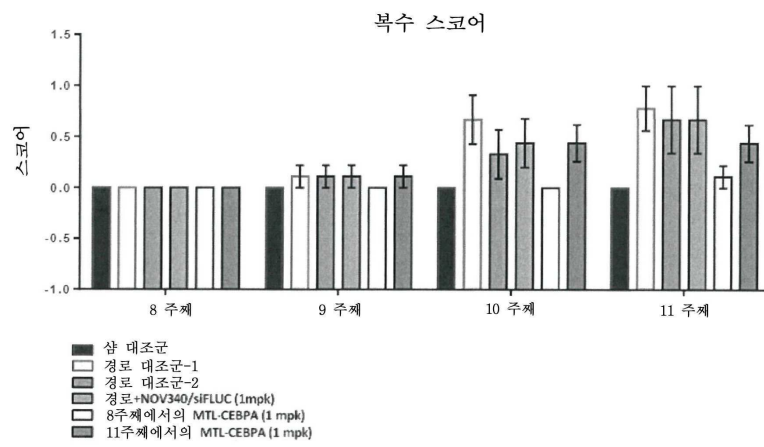


도면36

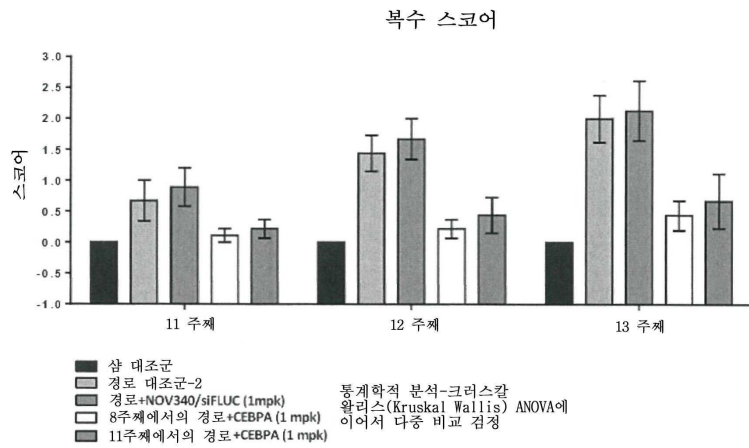


도면37

도 37A

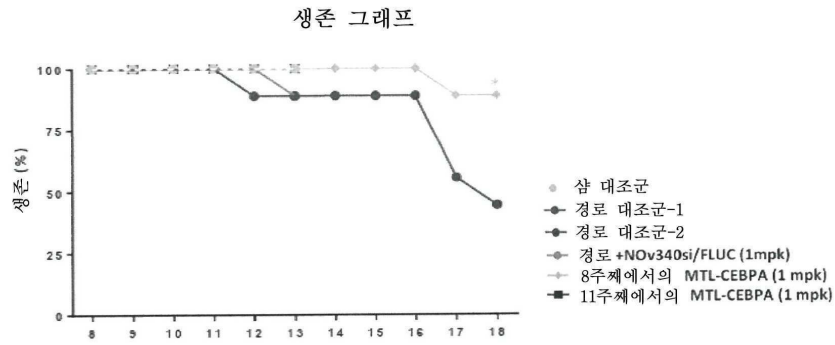


도 37B

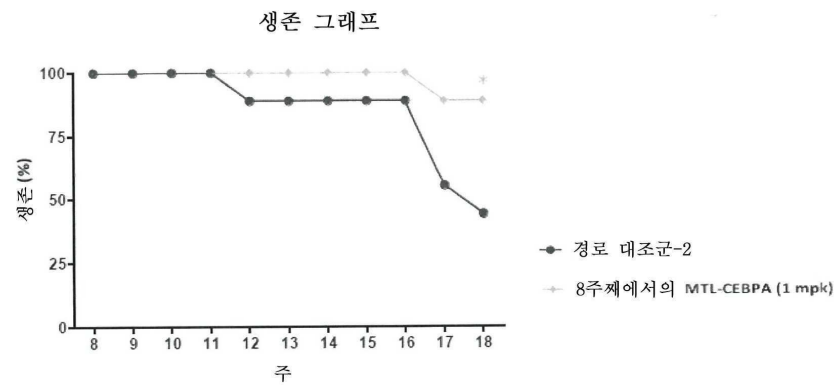


도면38

도 38A



도 38B



카이 제곱 검정  
경로 대조군-2와 비교한 \*  $p < 0.05$

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MINA THERAPEUTICS LIMITED

<120> C/EBP ALPHA SARNA COMPOSITIONS AND METHODS OF USE

<130> 2058.1015PCT

<150> US 62/150,889

<151> 2015-04-22

<150> US 62/235,778

<151> 2015-10-01

<150> US 62/308,521

<151> 2016-03-15

<160> 129

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 1  
 cggucauugu cacugguca 19

<210> 2  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 2  
 ugaccaguga caaugaccg 19

<210> 3  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 3  
 agcugaaagg auucauccu 19

<210> 4  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 4  
 aggaugaauc cuuccagcu 19

<210> 5



<211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     oligonucleotide  
 <400> 5  
 acauaguccc agugauuuaa 19  
 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     oligonucleotide  
 <400> 6  
 uuaaucacug ggacuaugu 19  
 <210> 7  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     oligonucleotide  
 <400> 7  
 gaauaagacu uuguccaau 19  
 <210> 8  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     oligonucleotide  
 <400> 8  
 auuggacaaa gucuuauuc 19  
 <210> 9  
 <211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 9

gcgcggauuc uuuucaaa 19

<210> 10

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 10

uuugaaagag aaucgcgc 19

<210> 11

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 11

ccaggaacuc gucuugaa 19

<210> 12

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 12

uucaacgacg aguuccugg 19

<210> 13

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 13

agaaguuggc cacuuccau

19

<210> 14

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 14

auggagucgg ccgacuucu

19

<210> 15

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 15

aagaggucgg agaggaagu

19

<210> 16

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 16

aguuccuggc cgaccuguu

19

<210> 17

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide  
 <400> 17  
 uuguacucgu cgcugugcu 19  
 <210> 18  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide  
 <400> 18  
 agaacagcaa cgaguaccg 19  
 <210> 19  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide  
 <400> 19  
 uacucgucgc ugugcuugu 19  
 <210> 20  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide  
 <400> 20  
 acaagaacag caacgagua 19  
 <210> 21  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 21  
agaaguuggc cacuuccaug gggga 25  
<210> 22  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 22  
tcccccaugg agucggccga cuucuaac 27  
<210> 23  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 23  
aagaggucgg agaggaaguc gucgt 25  
<210> 24  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 24

acgacgaguu ccuggccgac cuguucc	27
<210> 25	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide	
<400> 25	
uuguacucgu cgcugugcuu gucca	25
<210> 26	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide	
<400> 26	
tggacaagaa cagcaacgag uaccggg	27
<210> 27	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide	
<400> 27	
uacucgucgc ugugcuuguc caccg	25
<210> 28	
<211> 27	



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 28

cgguggacaa gaacagcaac gaguacc 27

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 29

cugaguaauc gcuuaagau u 21

<210> 30

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 30

ucuuuaagcg auuacucagu u 21

<210> 31

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 31

gaaacuuuag cgagucagau u 21

<210> 32

<211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     oligonucleotide  
 <400> 32  
 ucugacucgc uaaaguuuu u 21  
 <210> 33  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     oligonucleotide  
 <400> 33  
 acuacugagu gacaguagau u 21  
 <210> 34  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     oligonucleotide  
 <220><223> Sense strand starting at position 17 of SEQ ID NO: 67  
 <400> 34  
 ggauuacauc cucagagcu 19  
 <210> 35  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     oligonucleotide  
 <220><223> Antisense strand to SEQ ID NO: 34  
 <400> 35  
 agcucugagg auguauacc 19

<210> 36

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Sense strand starting at position 46 of SEQ ID NO: 67

<400> 36

cuagcuuucu ggugugacu 19

<210> 37

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Antisense strand to SEQ ID NO: 36

<400> 37

agucacacca gaaagcuag 19

<210> 38

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Sense strand starting at position 305 of SEQ ID NO: 67

<400> 38

cgggcuuguc gggauca 19

<210> 39

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Antisense strand to SEQ ID NO: 37

<400> 39

ugagaucacg acaagcccg 19

<210> 40

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Sense strand starting at position 457 of SEQ ID NO: 67

<400> 40

gcuauggagc ggugaguuu 19

<210> 41

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Antisense strand to SEQ ID NO: 40

<400> 41

aaacucacacg cuccaauac 19

<210> 42

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Sense strand starting at position 486 of SEQ ID NO: 67

<400> 42

ggcacaaggu uauccuaaa 19

<210> 43

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Antisense strand to SEQ ID NO: 42

<400> 43

uuuaggauaa ccuugugcc

19

<210> 44

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Sense strand starting at position 487 of SEQ ID NO: 67

<400> 44

gcacaagguu auccuaau

19

<210> 45

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Antisense strand to SEQ ID NO: 44

<400> 45

auuuaggaua accuugugc

19

<210> 46

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Sense strand starting at position 883 of SEQ ID NO: 67

<400> 46

cggucauugu cacugguca

19

<210> 47  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <220><223> Antisense strand to SEQ ID NO: 46  
 <400> 47  
 ugaccaguga caaugaccg 19  
 <210> 48  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <220><223> Sense strand starting at position 1616 of SEQ ID NO: 67  
 <400> 48  
 ccaggaacuc gucuugaa 19  
 <210> 49  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <220><223> Antisense strand to SEQ ID NO: 48  
 <400> 49  
 uucaacgacg aguuccugg 19  
 <210> 50  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 50



cggucauugu cacuggucau u

21

<210> 51

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 51

ugaccaguga caaugaccgu u

21

<210> 52

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base  
 <222> (8)..(8)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (9)..(9)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (10)..(10)  
 <223>  
 > 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (11)..(11)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (15)..(15)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (16)..(16)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (17)..(17)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (18)..(18)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 52

cggucauugu cacuggucau u

21

<210> 53

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(7)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (8)..(8)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (9)..(9)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (11)..(11)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (15)..(15)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (16)..(16)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (17)..(17)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (18)..(18)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (19)..(21)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 53

ugaccaguga caaugaccgu u

21

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (1)..(2)

<223> Phosphorothioate linkage

<220>

><221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (6)..(6)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (7)..(7)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (8)..(8)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (9)..(9)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (11)..(11)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (15)..(15)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (16)..(16)  
  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base



<222> (17)..(17)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (20)..(20)

<223> Inverted nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (20)..(20)

<223> Deoxy-nucleotide

<400> 54

cggucauugu cacuggucat

20

<210> 55

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (1)..(2)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base  
 <222> (6)..(6)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (7)..(7)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base  
 <222> (8)..(8)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (9)..(9)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (11)..(11)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (15)..(15)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'F modified nucleotide

<220>

><221> modified\_base

<222> (19)..(21)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (19)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 55

ugaccaguga caaugaccgu u

21

<210> 56

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> Inverted nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> Deoxy-nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (2)..(3)

<223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (6)..(6)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (7)..(7)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
  
 <222> (8)..(8)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (9)..(9)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (11)..(11)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (14)..(14)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (21)..(21)

<223> Inverted nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (21)..(21)

<223> Deoxy-nucleotide

<400> 56

tcggucauug ucacugguca t

21

<210> 57

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide  
<220><221> modified\_base  
<222> (1)..(1)  
<223> Inverted nucleotide  
<220><221> modified\_base  
  
<222> (1)..(1)  
<223> Deoxy-nucleotide  
<220><221> modified\_base  
<222> (2)..(2)  
<223> 2'F modified nucleotide  
<220><221> modified\_base  
<222> (3)..(4)  
<223> Deoxy-nucleotide  
<220><221> modified\_base  
<222> (5)..(6)  
<223> 2'F modified nucleotide  
<220><221> modified\_base  
<222> (7)..(7)  
<223> Deoxy-nucleotide  
<220><221> modified\_base  
<222> (8)..(9)  
<223> 2'F modified nucleotide  
<220><221> modified\_base  
<222> (10)..(10)  
<223> Deoxy-nucleotide  
<220><221> modified\_base  
<222> (11)..(12)  
  
<223> 2'F modified nucleotide  
<220><221> modified\_base  
<222> (13)..(13)  
<223> Deoxy-nucleotide  
<220><221> modified\_base



<222> (14)..(15)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (16)..(17)  
 <223> Deoxy-nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (18)..(19)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (20)..(21)  
 <223> Deoxy-nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Inverted nucleotide  
 <400> 57  
 tcggucauug ucacugguca t

21

<210> 58  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (2)..(3)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (4)..(5)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (6)..(7)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base  
 <222> (8)..(8)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (9)..(10)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (11)..(11)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (12)..(13)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (15)..(16)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (17)..(18)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (19)..(21)  
  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (20)..(21)  
 <223> Phosphorothioate linkage  
 <400> 58  
 ugaccaguga caaugaccgu u  
 <210> 59  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

21

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (12)..(12)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (15)..(15)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (16)..(16)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (17)..(17)  
  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (18)..(18)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (19)..(19)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (20)..(20)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (21)..(21)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (22)..(23)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (22)..(23)

<223> Phosphorothioate linkage

<400

> 59

gcggucauug ucacuggucu uuu

23

<210> 60

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (11)..(11)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (12)..(12)  
  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (15)..(15)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (16)..(16)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (17)..(17)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (18)..(18)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220  
 ><221> modified\_base  
 <222> (19)..(19)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (20)..(20)  
 <223> 2'F modified nucleotide



<220><221> modified\_base

<222> (21)..(23)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (22)..(23)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 60

aagaccagug acaaugaccg cuu

23

<210> 61

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (1)..(2)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (7)..(7)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (8)..(8)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (9)..(9)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (11)..(11)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (15)..(15)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (16)..(16)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (17)..(17)  
 <223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (22)..(22)

<223> Inverted nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (22)..(22)

<223> Deoxy-nucleotide

<400> 61

gcggucauug ucacuggucu ut

22

<210> 62

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (4)..(4)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (6)..(6)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (7)..(7)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
  
 <222> (8)..(8)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (9)..(9)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (11)..(11)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
  
 <220><221> modified\_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> modified\_base

<222> (21)..(23)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (22)..(23)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 62

aagaccagug acaaugaccg cuu

23

<210> 63

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> Inverted nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> Deoxy-nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (2)..(3)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (11)..(11)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (14)..(14)  
  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (15)..(15)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (16)..(16)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (17)..(17)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (18)..(18)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (19)..(19)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (20)..(20)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220  
 ><221> modified\_base  
 <222> (21)..(21)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base



<222> (22)..(22)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (23)..(23)

<223> Inverted nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (23)..(23)

<223> Deoxy-nucleotide

<400> 63

tgcggucauu gucacugguc uut

23

<210> 64

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> Inverted nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(2)

<223> Deoxy-nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (4)..(5)

<223> Deoxy-nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (6)..(7)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (8)..(8)

<223> Deoxy-nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (9)..(10)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (11)..(11)

<223> Deoxy-nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (12)..(13)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (14)..(14)

<223> Deoxy-nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (15)..(16)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (17)..(18)

<223> Deoxy-nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (19)..(22)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (23)..(23)

<223> Inverted nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (23)..(23)

<223> Deoxy-nucleotide

<400> 64

tgccggucauu gucacugguc uut

23

<210> 65

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (3)..(4)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (5)..(6)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (8)..(9)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (11)..(12)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (14)..(15)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (16)..(17)

<223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (18)..(18)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (19)..(21)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (22)..(23)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (22)..(23)  
 <223> Phosphorothioate linkage  
 <400> 65  
 gaccagugac aaugaccgcu uuu

23

<210> 66  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     oligonucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (1)..(2)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (3)..(3)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'F modified nucleotide

<220

><221> modified\_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (22)..(23)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (22)..(23)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 66

ugaaaggauu cauccuccuu uuu

23

<210> 67

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (6)..(6)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (7)..(7)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
  
 <222> (8)..(8)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (9)..(9)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (11)..(11)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (14)..(14)



<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (21)..(23)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (22)..(23)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 67

aaaggaggau gaaucuuuc auu

23

<210> 68

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (1)..(2)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'0-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (11)..(11)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (15)..(15)  
  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (16)..(16)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (17)..(17)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (18)..(18)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (19)..(19)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (20)..(20)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (21)..(21)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220  
 ><221> modified\_base

<222> (22)..(22)

<223> Inverted nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (22)..(22)

<223> Deoxy-nucleotide

<400> 68

ugaaaggauu cauccuccuu ut

22

<210> 69

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base  
 <222> (9)..(9)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (10)..(10)  
 <223>  
 > 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (11)..(11)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (15)..(15)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (16)..(16)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221>  
 > modified\_base  
 <222> (17)..(17)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (18)..(18)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (19)..(19)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base  
 <222> (20)..(20)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (21)..(23)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (21)..(23)  
 <223> Phosphorothioate linkage  
 <400> 69  
 aaaggaggau gaauccuuuc auu

23

<210> 70  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     oligonucleotide  
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
     oligonucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Inverted nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Deoxy-nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (2)..(3)  
 <223> 2'0-Me modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (5)..(5)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'F modified nucleotide



<220><221> modified\_base  
 <222> (17)..(17)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide

<

220><221> modified\_base  
 <222> (18)..(18)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (19)..(19)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base  
 <222> (20)..(20)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (21)..(21)  
 <223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base  
 <222> (22)..(22)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (23)..(23)  
 <223> Inverted nucleotide

<220><221> modified\_base  
 <222> (23)..(23)

<223> Deoxy-nucleotide

<400> 70

tugaaaggau ucauccuccu uut

23

<210> 71

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Inverted nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Deoxy-nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
  
 <222> (2)..(2)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (3)..(9)  
 <223> Deoxy-nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (10)..(12)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Deoxy-nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (14)..(22)  
 <223> 2'F modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (23)..(23)  
 <223> Inverted nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (23)..(23)  
 <223> Deoxy-nucleotide  
 <400> 71  
 tugaaaggau ucauccuccu uut  
  
 <210> 72  
 <211> 23  
 <212> RNA

23

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(7)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (9)..(11)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (12)..(18)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (22)..(23)

<223> 2'O-Me modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (22)..(23)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 72

aggaggauga auccuuuau uuu

23

<210> 73

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide	
<400> 73	
gcggucuuug ucacuggucu u	21
<210> 74	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 74	
ugaaaggauu cauccuccuu u	21
<210> 75	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 75	
gaccagugac aaugaccgu u	21
<210> 76	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 76	
aggaggaua auccuuucau u	21
<210> 77	
<211> 4001	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 77	
tcctctccc accaggggta tacatcctca gagctgaccc acgacctagc tttctggtgt	60

gactcgggggt gggggctccc actggtcacc tggtagaccc catcgagtg agttccgccc	120
caagggaag cccagcctat agcaggctgg ggtgggtgt gtgcggagg aggtgggaga	180
ggcgtggaac tagagaccct ccaccticat gtagaactag gggaacaacc ttaggttcca	240
agccccaagt ccctatgttt ccaccccttt ctaaggacag gcgtggagga gcggctgggg	300
ctggcgggct tgtcgggac tcagctccct gagccctcct cctgccacgg gcctgctccc	360
ctccttctct catgggggtc tgctgtagcc tcgggaagga ggcaggaaac ctccaaataa	420
aatgacaagg cacgatttgc tccccctact cagtaggcat tggagcggtg agtttgcatt	480
tccaaggcac aaggttatcc taaatactag agttgccggg ctccagctc agccccaaga	540
attctccct cctcgcaggg agaagccacc gcctggcccc ctcatcttag acgcaccaag	600
tccggcgag aggaaggag gggacacgcg gagcaggcca ggctttcagg aggcaccgga	660
atctcctagt cctggctcgc acggctcggg caagcctcga gatccggcga ccccaaacca	720
ctccctgggt ccccgccgga ggctggccca gggcggctcc acagccgcgc gcctcacgcg	780
cagttgcca tggccttgac caaggagctc tctggcagct ggcggaagat gccccgcagc	840
gtgtccagtt cgcggtcag ctgttccacc cgttgcgca ggcggtcatt gtcactggtc	900
agctccagca cttctgctg cgtctccacg ttgcgctgct tggccttgct gcggctcttg	960
cgcaccgca tgttgttgct ctcgcgccgc acccggtact cgttgcgtgt cttgtccacc	1020
gacttcttgg ctttgccgc gccgctgcc ccactcgcgc ggaggtcggg gtgcgcggcg	1080
cccagccct tgagcgcgt gccagggccc ggagggccg cggcaccgag cgcgggcgcg	1140
gggtgcgggc tgggcacggg cgtggcggc ggcggtgggt gaccgggctg caggtgcatg	1200
gtggtctggc cgagtgccg gatctggaac tgcaggtgcg gggcgccag gtgcgcgggc	1260
ggcggtgctg ggtgcgggtg cgagggcggc ggcgccggcg gcggttgta agggaagagg	1320
ccggccagcg ccagctgctt ggcttcatcc tctcgcggg gctcctgctt gatcaccagc	1380
ggccgcagcg ccggcgcccc gacgcgctcg tacagggct ccagcctgcc gtccaggtag	1440
ccggcgccg cgagccgta gccggcggg ggcccgctcg ctccccggg catgacggcg	1500
ccgccggg gcgcgggc gcccggttag tcaaagtcgc cgcccgcc gccgcccgtg	1560
gggccacgg ccgccttggc cttctcctgc tgccgctgt gctggaacag gtccggcagg	1620
aactcgtct tgaaggcg gcggctcatg taggcctga tgtcatgga cgtctcgtgc	1680
tcgcagatgc cccccagcg ctccggggcg gcaggtgggg cgggaggctg cgcggggccc	1740
gcgccccgg gaaagccgaa ggcgcgctg ctggcgctg gcgggggct ctgcaggtgg	1800
ctgctcatcg gggcgcggc ctcgcctcg tagaagtcgg ccgactccat gggggagtta	1860

gagtttctccc ggcatggcga gcctcggcgg cctccagcct gcgcggggcg tcgccgccgc 1920

ccaccgggag accctgtctg cccgcgcccg cgcacctccg ggtcgcgaat ggcccggccc 1980

gcgccggccc agcttttata cccggcaggc cgcgtcgcgc cctagagtcc gaggcggcct 2040

ctgtccccgg gctgcggcgg cgcggcgctt gctgggtcct agcgcgcggc cggcatgggg 2100

cggcgaacca gcgcggcaca gcgccgcgt cccaggcag gccgcggcgc aacgccacc 2160

gcctccagcg cgcgcagcag agcccgggcg ctgcgtccaa gctccgcccc cggcccggcc 2220

gtcgcggccc cgcgcacgtg gtcggtagcg gggggcccct cctcctgcct gccctaggcg 2280

cccgtatcca gccacggcgg ggagcccagg agtatcccga ggctgcacgg ggtaggggtg 2340

gggggcggag ggcgagtcct ggtcttgagc tgctggggcg cggattctct ttc aaagcca 2400

gaaccaggcc tgtcccgac ccgcgtcccg gggaggtgc agcgcagagc agcggggctg 2460

gggccggtgg ggggcgcttt gggacgcgcg gagaggtcct gagcgcggtg gctctgcgtc 2520

tcctagctct gatctccagg ctaccctgt gattccgcgc agaggtacct ctcgaggac 2580

gccggggctc catgggcggc gccgcgcagg gcgctaggac cccgcgggga gcggaggcgg 2640

cctcggcccc ggagcctgga ggacctggcc ggtcgatccg cccgggctgg aaaactttct 2700

ttataattac ttctccaggt cggagcgcgc ggcttgctag gcgcgcgggg cggcgctgt 2760

taccggcgt ggagtcgcg atttttttc ctgcgggacc gcggggcccc ccagactagc 2820

ggagctggac gccggggcga gcacggggag gggcgcaccg agggaggaga caaacctaac 2880

tctggggcgg gattccgag gcggggggcg cagccctcga ggcccgaagc caccgttcc 2940

tccccgcct cccattcag gtgggcgcca acggcgggag cgagggtgtc caggccgcgg 3000

ggctgccagg tccgagcac cacagggaga actctgcca gtggttcgcc gggcgctgta 3060

gtccccgga tcctagggac cgaggcggcc agccctggg gcccttagt tcgggcagct 3120

aatgtctca ccgcggcggg ggaaggagct tgccaccgag acccccagcc acgtgcgtcc 3180

ctgcattct ttaccggggc cggggtggcg gctacggacc gtcagctggg ccagatgga 3240

gtcttgggag cctcaagtg tctctgtcc ttcccgcgc cgcctctgc cactggcgt 3300

gaggcctgac gccgcctcg tcccgctag aggcgcgctt gcctacaggt gagggagac 3360

ccccttacc gacagtggc ttaggcctgg caaggcgcca cgaccgccc aggagccccg 3420

gagggggcac agctaaaaac accgtggag agccccgagc ttccacgac atcgagtaa 3480

agaagcagtt tcacttgggc aacgcacact gcgtttaat caagttccta ttcaacatag 3540

tcccagtgat taatagccca actgcttctg ttccgtcca gagctcataa acaagatatt 3600

tttagcttga cgcttttggg cgggagggag taaaaaccag atacgttaaa taaatatccc 3660  
gatgtgagcc ggagagctgc ttgtgagcc aaatgcagga ccattcata tagcattcac 3720  
ctgtggaggg agacctggac ggaaatcaaa aagcaccaag agcgatttgc gtttttttct 3780  
gcggtgctaa aactaatggc ttttctacc taggaacaaa gaaacgccac tgtacatgca 3840  
cggttcccg cctgtggagt tgtgggagga aggcgatgtc tggccttttt tgcacagctg 3900  
ctgttgctg ccagagatc gggaactctg cccgtagga ctggaagaaa cctcagtaat 3960  
gggaataaga ctttgtcaa tagggggctg atgaatgtgt g 4001

<210> 78

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (19)..(21)

<223> Phosphorothioate linkages

<220>

<221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<400> 78

cuuacgcuga guacuucgau u

21

<210> 79

<211> 21



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (15)..(16)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkages

<400> 79

ggaugaagug gagauuagut t

<210> 80

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220><221> modified\_base

21

<222> (4)..(5)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(10)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (14)..(17)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 80

ggaucaucuc aagucuuact t

21

<210> 81

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 81

ucuacuguca cucaguaguu u

21

<210> 82

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222>

> (19)..(21)

<223> Phosphorothioate linkages

<220>

<221> modified\_base

<222> (19)..(21)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<400> 82

ucgaaguacu cagcguaagu u

21

<210> 83

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkages

<400> 83

acuaaucucc acucaucct t

21

<210> 84

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222>

> (2)..(2)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(9)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (17)..(19)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 84

guaagacuug agaugaucct t 21

<210> 85

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 85

gcggucauug ucacuggucu u 21

<210> 86

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 86

gaccagugac aaugaccgcu u 21

<210> 87

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 87

ugaaaggauu cauccuccuu u 21

<210> 88

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 88

aggaggauga auccuuuau u 21

<210> 89

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 89

ggaugaagug gagauuagut t 21

<210> 90

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 90

acuaaucucc acuucaucct t 21

<210> 91

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(3)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(8)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (14)..(17)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 91

cuuacgcuga guacuucgat t

21

<210> 92

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> misc\_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 92

ucgaaguacu cagcguaagt t

21

<210> 93

<211> 21



<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 93

gaccagugac aaugaccgcu u 21

<210> 94

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 94

gcggucauug ucacuggucu u 21

<210> 95

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 95

acuacugagu gacaguagau u 21

<210> 96

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 96

ucuacuguca cucaguaguu u 21

<210> 97

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 97

gcggucauug ucacuggucu u

21

<210> 98

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 98

gaccagugac aaugaccgcu u

21

<210> 99

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> Inverted abasic modification

<400> 99

gcggucauug ucacuggucu u

21

<210> 100

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> Inverted abasic modification

<400> 100

gaccagugac aaugaccgcu u

21

<210> 101

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 101

gcggucacac acacuggucu u

21

<210> 102

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 102

gaccagugug uaugaccgcu u

21

<210> 103

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(3)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (7)..(8)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (14)..(17)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 103

cuuacgcuga guacuucgat t

21

<210> 104

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 104

ucgaaguacu cagcguaagt t

21

<210> 105

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (15)..(16)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 105

ggaugaagug gagauuagut t

21

<210> 106

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 106

acuaaucucc acuucaucct t

21

<210> 107

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> Inverted abasic modification

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<400> 107

gcggucauug ucacuggucu u 21

<210> 108

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<400> 108

gaccagugac aaugaccgcu u 21

<210> 109

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<400> 109

gaccagugac aaugaccgcu u 21

<210> 110

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base



<222> (1)..(1)  
 <223> Inverted abasic modification  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(2)  
 <223> 2'-OMe modified nucleotide  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 2'-OMe modified nucleotide  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 2'-OMe modified nucleotide  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 2'-OMe modified nucleotide  
 <220>  
  
 <221> modified\_base  
 <222> (20)..(21)  
 <223> 2'-OMe modified nucleotide  
 <400> 110  
 gcggucaaug ucacuggucu u  
 <210> 111  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic oligonucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (2)..(2)  
 <223> 2'-OMe modified nucleotide  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (7)..(7)

21

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (20)..(23)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<400> 111

cuuacgcuga guacuucgas usu

23

<210> 112

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (15)..(16)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 112

ggaugaagug gagauuagut t

21

<210> 113

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (5)..(6)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (8)..(11)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (15)..(18)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 113

ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 114

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic oligonucleotide

<400> 114

ucuacuguca cucaguaguu u 21

<210> 115

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (19)..(23)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<400> 115

ucgaaguacu cagcguaags usu

23

<210> 116

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkages

<400> 116

acuaaucucc acucaucct t

21

<210> 117

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (8)..(10)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (18)..(19)

<223> 2'F modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkages

<400> 117

guaagacuug agaugaucct t

21

<210> 118

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic oligonucleotide  
 <400> 118  
 cggucauugu cacuggucau u 21  
 <210> 119  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic oligonucleotide  
 <400> 119  
 ugaccaguga caaugaccgu u 21  
 <210> 120  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic oligonucleotide  
 <400> 120  
  
 gcggucauug ucacuggucu u 21  
 <210> 121  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic oligonucleotide  
 <400> 121  
 gaccagugac aaugaccgu u 21  
 <210> 122  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic oligonucleotide  
 <400> 122  
 ugaaaggauu cauccuccuu u 21  
 <210> 123  
 <211> 21

<212> RNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 123

aggaggauga auccuuuau u 21

<210> 124

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkages

<400> 124

ggaugaagug gagauuagut t 21

<210> 125

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 125

acuaaucucc acuucaucct t 21

<210> 126

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (1)..(3)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(8)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (14)..(17)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkages

<400> 126

cuuacgcuga guacuucgat t

21

<210> 127

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (7)..(7)



<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220><221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkages

<400> 127

ucgaaguacu cagcguaagt t

21

<210> 128

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> Inverted abasic modification

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(2)

<223>

2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<400> 128

gcggucauug ucacuggucu u

21

<210> 129

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-OMe modified nucleotide

<400> 129

gaccagugac aaugaccgcu u

21