

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0144100

(43) 공개일자 2020년12월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7029911
- (22) 출원일자(국제) 2019년04월11일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년10월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/027021
- (87) 국제공개번호 WO 2019/200124
 국제공개일자 2019년10월17일
- (30) 우선권주장
 62/657,428 2018년04월13일 미국(US)
 62/778,755 2018년12월12일 미국(US)
- (71) 출원인
 다이서나 파마수이티컬, 인크.
 미국 02421 메사추세츠주 렉싱턴 헤이든 애비뉴 33
- (72) 발명자
 왕, 웨이민
 미국 02421 메사추세츠주 렉싱턴 헤이든 애비뉴 33
 다이서나 파마수이티컬, 인크. 내
 나제프, 나임
 미국 02421 메사추세츠주 렉싱턴 헤이든 애비뉴 33
 다이서나 파마수이티컬, 인크. 내
 브라운, 밥 데일
 미국 02421 메사추세츠주 렉싱턴 헤이든 애비뉴 33
 다이서나 파마수이티컬, 인크. 내
- (74) 대리인
 양영준, 이상남

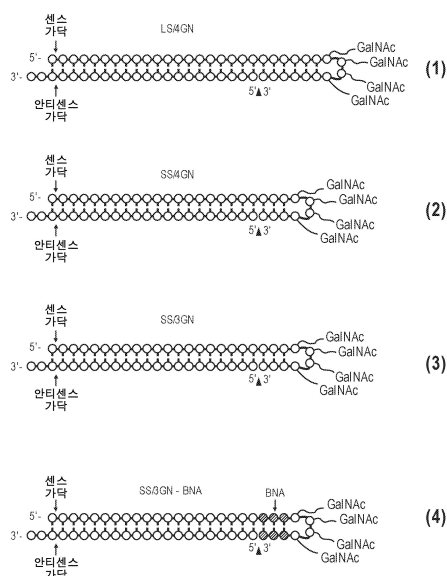
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 Tm-중가 뉴클레오타이드로 변형된 이중-가닥 핵산 억제제 분자

(57) 요약

줄기 루프 구조를 갖는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 갖는 이중-가닥 핵산 억제제 분자가 본 명세서에 제공되며, 상기 줄기 루프 구조의 줄기 부분은 하나 이상의 Tm-중가 뉴클레오타이드를 함유한다. 표적 유전자 발현을 감소시키기 위한 방법 및 조성물 및 관심 질환을 치료하기 위한 방법 및 조성물이 또한 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/111 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/3231 (2013.01)

C12N 2310/351 (2013.01)

C12N 2310/52 (2013.01)

C12N 2310/533 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

이중-가닥 핵산 억제제 분자로서,

21 내지 66개의 뉴클레오타이드를 포함하고 제1 영역 (R1) 및 제2 영역 (R2)을 갖는 센스 가닥;

15 내지 40개의 뉴클레오타이드를 포함하는 안티센스 가닥으로서, 상기 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 별개의 가닥인, 상기 안티센스 가닥;

상기 센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥의 제1 영역에 의해 형성된 제1 듀플렉스 (D1)로서, 15 내지 40개의 염기쌍의 길이를 갖는, 상기 제1 듀플렉스

를 포함하되,

상기 센스 가닥의 제2 영역은 제1 하위영역 (S1), 제2 하위영역 (S2) 및 상기 제1 및 제2 영역을 연결하는 테트라루프 (L)를 포함하되, 상기 제1 및 제2 영역은 제2 듀플렉스 (D2)를 형성하고; 그리고

상기 제2 듀플렉스는 1 내지 6개의 염기쌍의 길이를 가지고, 적어도 하나의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 포함하는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 센스 가닥은 24 내지 35, 28 내지 35, 또는 26 내지 30개의 뉴클레오타이드를 갖는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 18 내지 24, 21 내지 23, 또는 22개의 뉴클레오타이드를 갖는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 그것의 3'-말단에서 1 내지 6개의 뉴클레오타이드의 단일가닥 돌출부를 갖는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 단일가닥 돌출부는 그 길이가 2개의 뉴클레오타이드인, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 듀플렉스는 18 내지 30, 18 내지 24, 또는 19 내지 21개의 염기쌍의 길이를 갖는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 듀플렉스는 1 내지 5개의 염기쌍 또는 1 내지 3개의 염기쌍의 길이를 갖는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 듀플렉스는 1 내지 10개의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유하고, 1 내지 5개의 염기쌍의 길이를 갖거나, 또는 상기 제2 듀플렉스는 1 내지 6개의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유하고, 1 내지 3개의 염기쌍의 길이를 갖는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 가닥은 그 길이가 24 내지 35개의 뉴클레오타이드이고, 상기 안티센스 가닥은 그 길이가 20 내지 24개의 뉴클레오타이드이고, 상기 제1 듀플렉스는 18 내지 24개의 염기쌍의 길이를 가지며, 그리고 상기 제2 듀플렉스는 1 내지 5개의 염기쌍, 3 내지 5개의 염기쌍, 1 내지 3개의 염기쌍, 또는 1 내지 2개의 염기쌍의 길이를 갖는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 가닥은 그 길이가 24 내지 30개의 뉴클레오타이드이고, 상기 안티센스 가닥은 그 길이가 20 내지 24개의 뉴클레오타이드이고, 상기 제1 듀플렉스는 18 내지 24개의 염기쌍의 길이를 가지며, 그리고 상기 제2 듀플렉스는 1 내지 5개의 염기쌍, 3 내지 5개의 염기쌍, 1 내지 3개의 염기쌍, 또는 1 내지 2개의 염기쌍의 길이를 갖는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 듀플렉스는 3개의 염기쌍, 2개의 염기쌍, 또는 1개의 염기쌍의 길이를 갖는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 가닥의 제1 영역은 그 길이가 20개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 상기 센스 가닥의 제2 영역은 그 길이가 10, 8, 또는 6개의 뉴클레오타이드이고;

상기 센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥의 제1 영역에 의해 형성된 제1 듀플렉스는 20개의 염기쌍의 길이를 가지며;

상기 센스 가닥의 상기 제2 영역의 제1 및 제2 핵산에 의해 형성된 제2 듀플렉스는 3개의 염기쌍, 2개의 염기쌍, 또는 1개의 염기쌍의 길이를 가지며, 그리고 테트라루프는 그 길이가 4개의 뉴클레오타이드이고; 그리고

상기 안티센스 가닥은 그 길이가 22개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 그것의 3'-말단에서 2개의 뉴클레오타이드의 단일-가닥 돌출부를 갖는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 센스 가닥의 제2 영역은 그 길이가 6개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 상기 센스 가닥의 제2 영역은 1개의 염기쌍의 길이를 갖는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 14

청구항 1 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 듀플렉스 중 각각의 뉴클레오타이드는 T_m-증가 뉴클레오타이드인, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 15

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 제2 듀플렉스의 외부의 임의의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하지 않는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, 상기 테트라루프는 U₄CG, GNRA, 또는 CUUG, A/UGNN, GGUG, RNYA, 또는 AGNN으로부터 선택된 RNA 테트라루프 또는 d(GNAB), d(CNNG), 또는 d(TNCG)로부터 선택된 DNA 테트라루프인, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 17

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 테트라루프는 서열 GAAA를 갖는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 18

청구항 1 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 T_m-증가 뉴클레오타이드는 이환형 뉴클레오타이드, 삼환형 뉴클레오타이드, G-클램프 및 이의 유사체, 핵시톨 뉴클레오타이드, 및 변형된 뉴클레오타이드로 구성된 군으로부터 선택되며, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 2'-F 또는 2'-OMe를 갖는 당 모이어티의 2'-탄소에서 변형되지 않는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 5-브로모-우라실, 5-아이오도-우라실, 5-프로피닐-변형된 피리미딘, 2-아미노 아데닌, 2-티오 우리딘, 5 Me-티오 우리딘, 또는 슈도 우리딘인, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 20

청구항 1 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 T_m-증가 뉴클레오타이드는 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드를 포함하는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 21

청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 T_m-증가 뉴클레오타이드는 식 I, II, III, IV, Va, 또는 Vb의 구조를 갖는 이환형 뉴클레오타이드를 포함하는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 22

청구항 1 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 T_m-증가 뉴클레오타이드는 식 Ia, Ib, Ic, Id, Ie, 또는 If의 구조를 갖는 이환형 뉴클레오타이드를 포함하는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 23

청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 T_m-증가 뉴클레오타이드는 식 IIa, IIb, IIc, 또는 IId 중 하나 이상의 구조를 갖는 이환형 뉴클레오타이드를 포함하는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 24

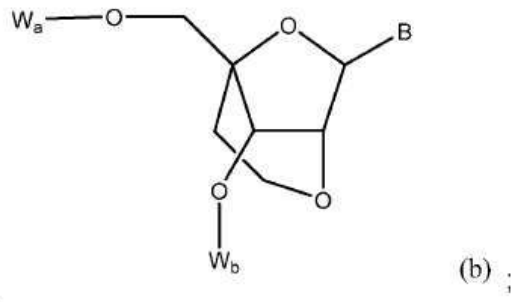
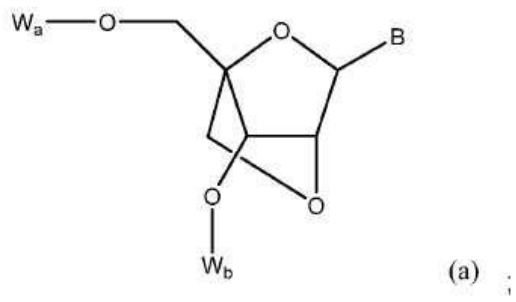
청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 T_m-증가 뉴클레오타이드는 식 IIIa 및/또는 IIIb의 구조를 갖는 이환형 뉴클레오타이드를 포함하는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

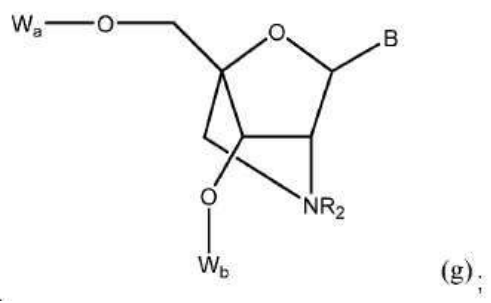
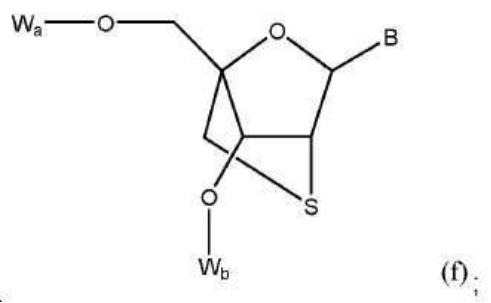
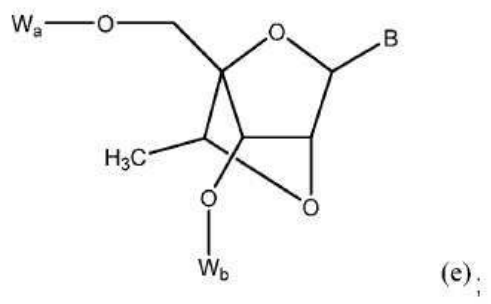
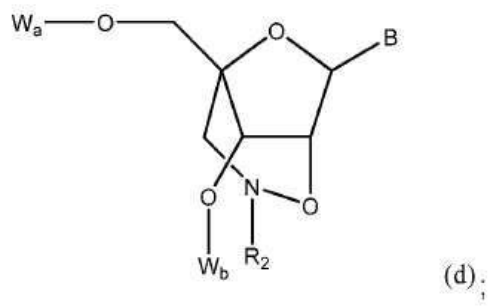
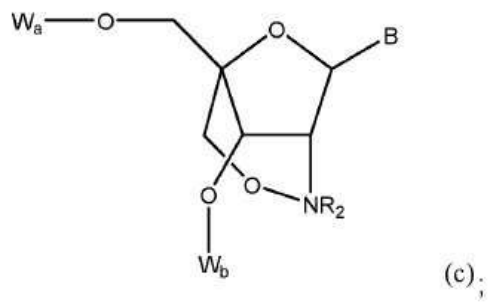
청구항 25

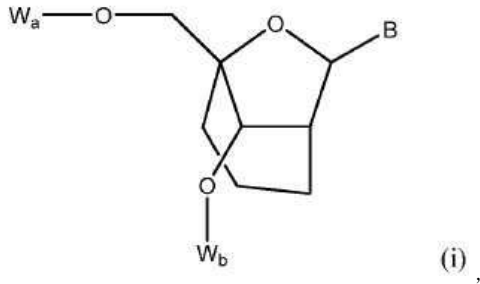
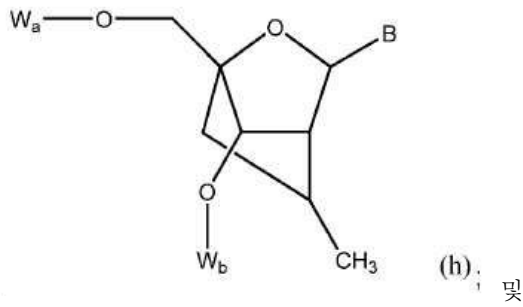
청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 T_m-증가 뉴클레오타이드는 식 IVa 및/또는 IVb의 구조를 갖는 이환형 뉴클레오타이드를 포함하는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 26

청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 T_m-증가 뉴클레오타이드는 하기로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드를 포함하는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자:



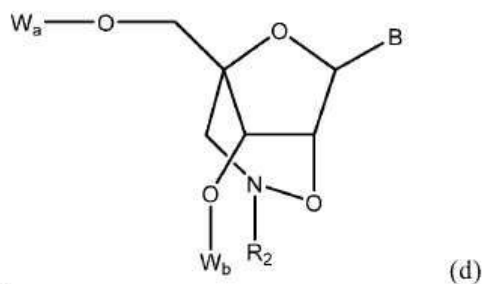
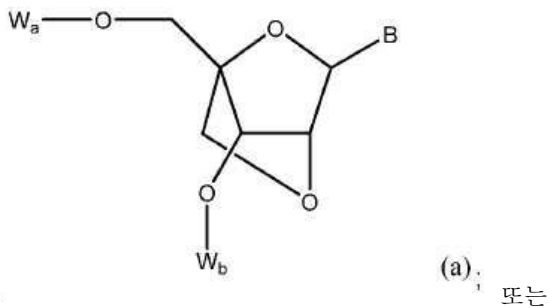




식 중, B는 핵염기이고, R₂는 H 또는 CH₃이고, 그리고 W_a 및 W_b 각각은 독립적으로, H, OH, 하이드록실 보호기, 인 모이어티, 또는 상기 이환형 뉴클레오타이드를 또 다른 뉴클레오타이드에 또는 올리고뉴클레오타이드에 연결시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이고, 그리고 W_a 또는 W_b 중 적어도 하나는 상기 이환형 뉴클레오타이드를 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이다.

청구항 27

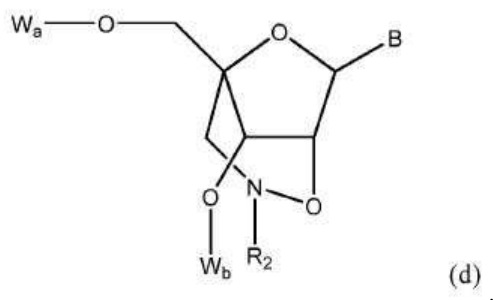
청구항 26에 있어서, 상기 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 하기인, 이중-가닥 핵산 억제제 분자:



식 중, B는 핵염기이고, R₂는 CH₃이고, 그리고 W_a 및 W_b 각각은 독립적으로, H, OH, 하이드록실 보호기, 인 모이어티, 또는 상기 이환형 뉴클레오타이드를 또 다른 뉴클레오타이드에 또는 올리고뉴클레오타이드에 연결시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이고, 그리고 W_a 또는 W_b 중 적어도 하나는 상기 이환형 뉴클레오타이드를 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이다.

청구항 28

청구항 26에 있어서, 상기 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 하기인, 이중-가닥 핵산 억제제 분자:



식 중, B는 핵염기이고, R₂는 CH₃이고, 그리고 W_a 및 W_b 각각은 독립적으로, H, OH, 하이드록실 보호기, 인 모이 어터, 또는 상기 이환형 뉴클레오타이드를 또 다른 뉴클레오타이드에 또는 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이고, 그리고 W_a 또는 W_b 중 적어도 하나는 상기 이환형 뉴클레오타이드를 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이다.

청구항 29

청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 T_m-중가 뉴클레오타이드는 제1 고리를 포함하는 이환형 뉴클레오타이드이고, 상기 제1 고리는 푸라노실, 및 제2 고리를 형성하기 위해 상기 푸라노실의 2'-탄소 및 4'-탄소를 연결하는 브릿지인, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 30

청구항 29에 있어서, 상기 푸라노실의 2'-탄소 및 4'-탄소를 연결하는 브릿지는 하기로 구성된 군으로부터 선택 되는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자:

- a) 예를 들어 4'-CH₂-NH-O-2' (BNA^{NC}로도 알려져 있음) 또는 4'-CH₂-N(CH₃)-O-2' (BNA^{NC}[NMe]로도 알려져 있음)를 포함하는, 4'-CH₂-O-N(R)-2' 및 4'-CH₂-N(R)-O-2' (여기서, R은 H, C₁-C₁₂ 알킬, 또는 보호기임);
- b) 4'-CH₂-2'; 4'-(CH₂)₂-2'; 4'-(CH₂)₃-2'; 4'-(CH₂)₄-O-2' (LNA로도 알려져 있음); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA로도 알려져 있음); 4'-CH(CH₃)-O-2' (cEt로도 알려져 있음); 및 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (cMOE로도 알려져 있음), 및 이의 유사체;
- c) 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' 및 이의 유사체;
- d) 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' 및 이의 유사체;
- e) 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' 및 이의 유사체;
- f) 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' 및 이의 유사체; 및
- g) 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' 및 이의 유사체.

청구항 31

청구항 1 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중-가닥 핵산 억제제는 상기 제2 듀플렉스 외부의 임의의 이 환형 뉴클레오타이드를 함유하지 않는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 32

청구항 1 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 테트라루프는 적어도 하나의 리간드 접합된 뉴클레오타이드를 포함하는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 33

청구항 1 내지 32 중 어느 한 항에 있어서, 상기 테트라루프는 2, 3, 또는 4개의 리간드 접합된 뉴클레오타이드

를 포함하는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 34

청구항 1 내지 33 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드는 GalNAc인, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 35

청구항 34에 있어서, 상기 GalNAc는 상기 당 모이어티의 2'-위치에서 상기 뉴클레오타이드에 접합되는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 36

청구항 1 내지 35 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 5'-말단에서 5'-포스페이트 모방체를 추가로 포함하는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 37

청구항 1 내지 36 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 억제제 분자 중 이중-가닥은 지질 나노입자로 제형화되는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 상기 지질 나노입자는 코어 지질 및 외피 지질을 포함하고, 상기 코어 지질은 제1 양이온성 지질 및 제1 폐길화된 지질을 포함하고, 그리고 상기 외피 지질은 제2 양이온성 지질, 중성 지질, 스테롤, 및 제2 폐길화된 지질을 포함하는, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 39

청구항 38에 있어서, 상기 제1 양이온성 지질은 DL-048이고, 상기 제1 폐길화된 지질은 DSG-MPEG이고, 상기 제2 양이온성 지질은 DL-103이고, 상기 중성 지질은 DSPC이고, 상기 스테롤은 콜레스테롤이고, 그리고 상기 제2 폐길화된 지질은 DSPE-MPEG인, 이중-가닥 핵산 억제제 분자.

청구항 40

청구항 1 내지 39 중 어느 한 항의 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 치료적 유효량 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 41

대상체에서 표적 유전자의 발현을 감소시키는 방법으로서, 청구항 1 내지 40 중 어느 한 항의 이중-가닥 핵산 억제제 분자 또는 약제학적 조성물을 상기 표적 유전자의 발현을 감소시키는데 충분한 양으로 상기 표적 유전자 발현의 감소를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 상기 투여하는 단계는 정맥내, 근육내, 또는 피하 투여를 포함하는, 방법.

청구항 43

청구항 41 또는 42에 있어서, 상기 대상체는 인간인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원에 대한 상호 참조

본원은 2018년 4월 13일에 출원된 미국 가특허출원 번호 62/657,428 및 2018년 12월 12일에 출원된 미국 가특허출원 번호 62/778,755의 이점을 주장하며, 그 출원일에 의존하고, 이들의 전체 개시내용은 본 명세서에 참고로 포함되어 있다.

배경 기술

배경

[0003]

[0004]

올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 폴리머 서열(RNA, DNA 및 이의 유사체)이다. 핵산 억제제 분자는 세포내 RNA 수준을 조정하는 올리고뉴클레오타이드이고, 암, 바이러스성 감염 및 유전적 장애의 치료에서 초기에 가능성을 입증하였다. 핵산 억제제 분자는 RNA 간섭(RNAi)을 포함하는 기전의 다양한 세트를 통해 RNA 발현을 조절할 수 있다.

[0005]

RNAi는, 이중 가닥 RNA 분자(dsRNA)가 dsRNA에 상보적인 서열을 갖는 표적 유전자의 발현을 억제하는 대부분의 진핵생물에서 발견된 보존된 경로이다. 전형적인 RNAi 경로에서, 더 긴 dsRNA 분자는 작은 간섭 RNA("siRNA")라 불리는 더 짧은 RNA 듀플렉스로 다이서(Dicer) 효소에 의해 절단된다. siRNA는 다이서, 트랜스-활성화 반응 RNA-결합 단백질 (TRBP), 및 아르고노트 2 ("Ago2")와 회합하여, 때때로 RNA-유도된 침묵 복합체 ("RISC")로 지칭된, 복합체를 형성한다고 밝혀졌다. Ago2는 일단 활성화되면, siRNA의 안티센스 가닥 (또한 소위 가이드 가닥)을 사용하여 표적 mRNA를 절단하여 상기 표적 mRNA의 절단에 대해 RISC 복합체의 서열 특이성을 유도하는 엔도뉴클레아제이다.

[0006]

다양한 이중-가닥 RNAi 억제제 분자 구조는 수년에 걸쳐 개발되어 왔다. 예를 들어, RNAi 억제제 분자에 관한 초기 작업은, 각각의 가닥이 1 내지 5개의 뉴클레오타이드의 적어도 하나의 3'-돌출부가 있는 19 내지 25개의 뉴클레오타이드의 크기를 갖는, 천연 siRNA를 모방하는 이중-가닥 핵산 분자에 집중하였다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,372,968을 참고한다). 후속으로, 활성 RNAi 억제제 분자에 다이서 효소에 의해 *생체내* 가공된 더 긴 이중-가닥 RNAi 억제제 분자는 개발되었다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,883,996을 참고한다). 후반 작업은, 가닥들 중 하나가 열역학적으로 안정한 테트라루프 구조를 포함하는 구조를 포함하여, 분자의 이중-가닥 표적화 영역을 넘어서 적어도 하나의 가닥의 적어도 하나의 말단이 연장되는 연장된 이중-가닥 핵산 억제제 분자를 개발하였다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,513,207, 미국 특허 번호 8,927,705, WO 2010/033225, 및 WO 2016/100401을 참고하고, 이들 각각은 참고로 전체적으로 포함됨).

[0007]

특정 사례에서, 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드는 특이적 조건, 예컨대 *생체내* 투여 이후 경험된 조건 하에서 바람직할 수 있는 특성을 도입하기 위해 핵산 억제제 분자에 도입되어 왔다. 그와 같은 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드는, 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드의 구조 또는 활성을 분해 또는 방해하는 뉴클레아제 또는 다른 효소에 대해 안정화하도록, 올리고뉴클레오타이드의 세포 흡수를 증가하도록, 또는 올리고뉴클레오타이드의 약동학적 특성을 개선하도록 설계된 것들을 포함한다.

[0008]

그러나, 핵산 억제제 분자에 원하는 특성을 부여하기 위해 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 사용하려는 욕망은 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드가 핵산 억제제 분자의 활성에서 가질 수 있는 임의의 부정적 영향을 최소화하려는 경쟁 욕망 (예를 들어, 유전자 표적 녹다운의 효력 또는 기간에서 임의의 감소 최소화)와 균형이 이루어져야 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0009]

요약

[0010]

줄기 루프 구조를 갖는 센스 가닥 및 별도의 안티센스 가닥을 갖는 이중-가닥 핵산 억제제 분자가 본 명세서에 기재되고, 상기 줄기 루프 구조의 줄기 부분은 적어도 하나의 T_m-증가 뉴클레오타이드를 함유한다. 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 다음을 함유한다: 1) 센스 가닥 (S)의 제1 영역 (R1)과 안티센스 가닥 (AS) 사이의 제1 듀플렉스 (D1); 2) 줄기 루프 구조의 줄기에 해당하는 센스 가닥의 제2 영역 (R2) 중 제2 듀플렉스 (D2); 및 3) R2의 제1 하위영역 (S1) 및 제2 하위영역 (S2)을 연결하는 루프. 도 10a-c을 참고한다. 전형적으로, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 제2 듀플렉스 (D2) 외부의 임의의 T_m-증가 뉴클레오타이드를 함유하지 않는다. 또한, 줄기 루프 구조는 전형적으로 테트라루프를 함유하고, 그리고 센스 가닥의 5'- 또는 3'-말단에 위치한다. T_m-증가 뉴클

레오타이드의, 이들 이중가닥 핵산 억제제 분자의 센스 가닥의 5'- 또는 3'-말단에서 형성된 줄기 듀플렉스 (D2)로의 혼입은 생체내 활성의 그것의 안정성 및 기간을 향상시키고, 그리고 효력을 감소시키지 않으면서 줄기 듀플렉스 (D2)이 단축될 수 있도록 한다. 예를 들어 도 10d를 참고하고; 예를 들어 도 6 및 실시예 3; 도 9 및 실시예 5; 및 도 12 및 실시예 6을 참고한다. T_m -증가 뉴클레오타이드 (즉, 2개의 T_m -증가 뉴클레오타이드) 또는 심지어 단일 쌍을 이루지 않는 T_m -증가 뉴클레오타이드의 단일 염기쌍의 줄기 듀플렉스 (D2)로의 혼입은 T_m -증가 뉴클레오타이드 없는 대조군과 비교하여 효력을 감소시키지 않고, 실제로 향상된 생체내 활성 기간을 향상시켰다. 예를 들어, 도 15a 및 b 및 실시예 5을 참고한다.

- [0011] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는, 다음을 포함한다:
- [0012] 20 내지 66 또는 21 내지 66개의 뉴클레오타이드를 포함하고 제1 영역 (R1) 및 제2 영역 (R2)을 갖는 센스 가닥;
- [0013] 15 내지 40개의 뉴클레오타이드를 포함하는 안티센스 가닥으로서, 상기 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 별개의 가닥인, 안티센스 가닥;
- [0014] 상기 센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥의 제1 영역에 의해 형성된 제1 듀플렉스 (D1)로서, 15 내지 40개의 염기 쌍의 길이를 갖는, 상기 제1 듀플렉스;
- [0015] 상기 센스 가닥의 제2 영역 (R2)은 제1 하위영역 (S1), 제2 하위영역 (S2) 및 상기 제1 및 제2 영역을 연결하는 테트라루프 (L)을 포함하되, 상기 제1 및 제2 영역은 제2 듀플렉스 (D2)를 형성하고; 그리고
- [0016] 상기 제2 듀플렉스는 1 내지 6개의 염기쌍의 길이를 가지며, 그리고 적어도 하나의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스는 3 내지 6개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스는 1 내지 3개의 염기쌍의 길이를 갖는다.
- [0017] 특정 구현예에서, 센스 가닥은 24 내지 35개의 뉴클레오타이드를 갖는다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 28 내지 35개의 뉴클레오타이드를 갖는다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 26 내지 30개의 뉴클레오타이드를 갖는다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 24개의 뉴클레오타이드를 갖는다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 26개의 뉴클레오타이드를 갖는다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 28개의 뉴클레오타이드를 갖는다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 30개의 뉴클레오타이드를 갖는다.
- [0018] 특정 구현예에서, 안티센스 가닥은 20 내지 24개의 뉴클레오타이드를 갖는다. 특정 구현예에서, 안티센스 가닥은 21 내지 23개의 뉴클레오타이드를 갖는다. 특정 구현예에서, 안티센스 가닥은 22개의 뉴클레오타이드를 갖는다. 특정 구현예에서, 안티센스 가닥은 그것의 3'-말단에서 1 내지 6개의 뉴클레오타이드의 단일가닥 돌출부를 갖는다. 특정 구현예에서, 단일가닥 돌출부는 그 길이가 2개의 뉴클레오타이드이다.
- [0019] 특정 구현예에서, 제1 듀플렉스 (D1)는 18 내지 30개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 제1 듀플렉스 (D1)는 18 내지 24개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 제1 듀플렉스 (D1)는 19 내지 21개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 제1 듀플렉스 (D1)는 20개의 염기쌍의 길이를 갖는다.
- [0020] 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2)는 1 내지 5개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스는 1 내지 10개의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유하고, 그리고 1 내지 5개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2)는 3 내지 5개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스는 6 내지 10개의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유하고, 그리고 3 내지 5개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스는 1 내지 6개의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유하고, 그리고 1 내지 3개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스는 6개의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유하고, 그리고 3개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스는 4개의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유하고, 그리고 2개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스는 2개의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유하고, 그리고 1개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스는 3개의 염기쌍의 길이를 가지며 3, 2, 또는 1개의 쌍을 이루지 않는 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유한다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스는 1개 또는 2개의 염기쌍의 길이를 가지고 1개 또는 2개의 쌍을 이루지 않는 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유한다.
- [0021] 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 28 내지 35개의 뉴클레오타이드이고, 상기 안티센스 가닥은 그 길이가

20 내지 24개의 뉴클레오타이드이고, 상기 제1 듀플렉스는 18 내지 24개의 염기쌍의 길이를 가지며, 그리고 상기 제2 듀플렉스는 3 내지 5개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 24 내지 35개의 뉴클레오타이드이고, 상기 안티센스 가닥은 그 길이가 20 내지 24개의 뉴클레오타이드이고, 상기 제1 듀플렉스는 18 내지 24개의 염기쌍의 길이를 가지며, 그리고 상기 제2 듀플렉스는 1 내지 5개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 24 내지 35개의 뉴클레오타이드이고, 상기 안티센스 가닥은 그 길이가 20 내지 24개의 뉴클레오타이드이고, 상기 제1 듀플렉스는 18 내지 24개의 염기쌍의 길이를 가지며, 그리고 상기 제2 듀플렉스는 1 내지 3개의 염기쌍의 길이를 갖는다.

[0022] 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 24 내지 30개의 뉴클레오타이드이고, 상기 안티센스 가닥은 그 길이가 20 내지 24개의 뉴클레오타이드이고, 상기 제1 듀플렉스는 18 내지 24개의 염기쌍의 길이를 가지며, 그리고 상기 제2 듀플렉스는 1 내지 5개의 염기쌍, 3 내지 5개의 염기쌍, 1 내지 3개의 염기쌍, 또는 1 내지 2개의 염기쌍의 길이를 갖는다.

[0023] 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2)는 3개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2)는 2개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2)는 1개의 염기쌍의 길이를 갖는다.

[0024] 특정 구현예에서, 센스 가닥의 제1 영역 (R1)은 그 길이가 20개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 상기 센스 가닥의 제2 영역 (R2)은 그 길이가 6 내지 10개의 뉴클레오타이드이고;

[0025] 상기 센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥의 제1 영역에 의해 형성된 제1 듀플렉스 (D1)은 20개의 염기쌍의 길이를 가지며;

[0026] 상기 센스 가닥의 제2 영역 (R2)의 제1 하위영역 (S1) 및 제2 하위영역 (S2)에 의해 형성된 제2 듀플렉스 (D2)는 1 내지 3개의 염기쌍의 길이를 가지며, 그리고 테트라루프는 그 길이가 4개의 뉴클레오타이드이고; 그리고

[0027] 상기 안티센스 가닥은 그 길이가 22개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 그것의 3'-말단에서 2개의 뉴클레오타이드의 단일-가닥 돌출부를 갖는다. 특정 구현예에서, R2는 그 길이가 6개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 D2는 1개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, R2는 그 길이가 8개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 D2는 2개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, R2는 그 길이가 10개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 D2는 3개의 염기쌍의 길이를 갖는다.

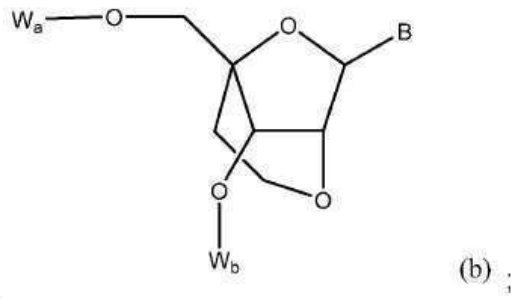
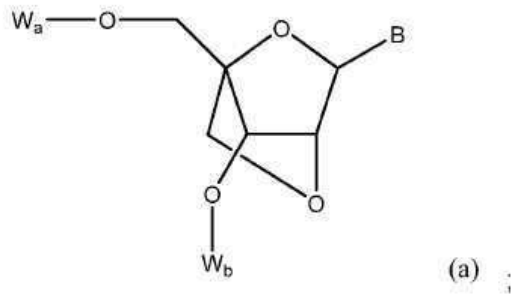
[0028] 특정 구현예에서, 상기 제2 듀플렉스 중 각각의 뉴클레오타이드 (D2)는 T_m -증가 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 역체제 분자는 제2 듀플렉스 (D2) 외부의 임의의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유하지 않는다.

[0029] 특정 구현예에서, 테트라루프는 UNCG, GNRA, CUUG, A/UGNN, GGUG, RNYA, AGNN 또는 d(GNAB), d(CNNG), 또는 d(TNCG)로부터 선택된 DNA 테트라루프로부터 선택된 RNA 테트라루프이다. 특정 구현예에서, 테트라루프는 서열 GAAA를 갖는다.

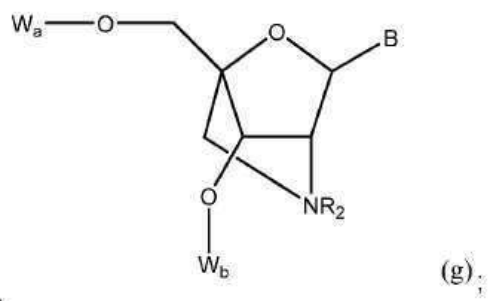
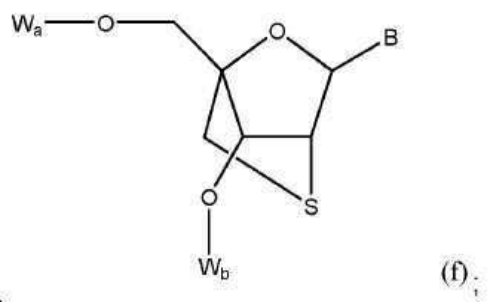
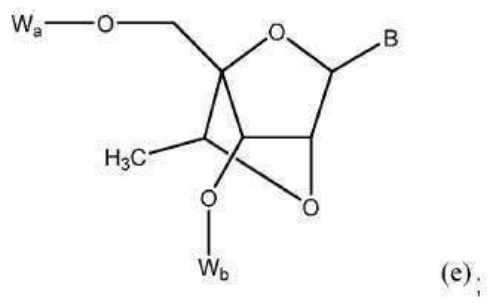
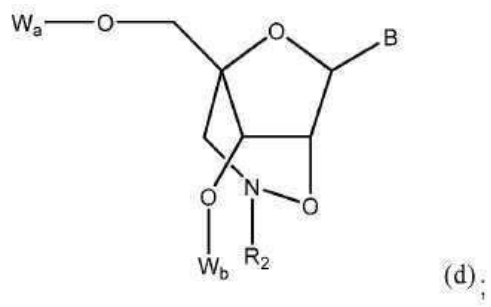
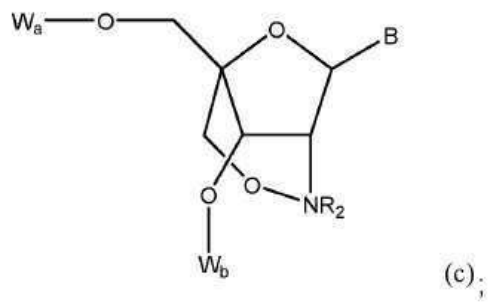
[0030] 특정 구현예에서, T_m -증가 뉴클레오타이드는 이환형 뉴클레오타이드, 삼환형 뉴클레오타이드, G-클램프 및 이의 유사체, 핵시톨 뉴클레오타이드, 및 변형된 뉴클레오타이드로 구성된 군으로부터 선택되되, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 2'-F 또는 2'-OMe를 갖는 당 모이어티의 2'-탄소에서 변형되지 않는다. 특정 구현예에서 변형된 뉴클레오타이드는 5-브로모-우라실, 5-아이오도-우라실, 5-프로피닐-변형된 피리미딘, 2-아미노 아데닌, 2-티오 우리딘, 5 Me-티오 우리딘, 또는 슈도 우리딘이다.

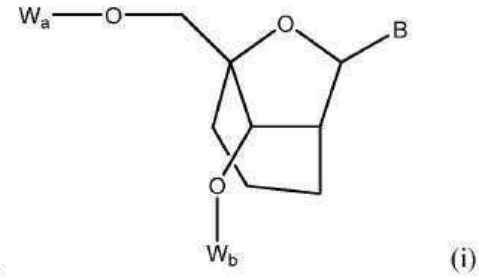
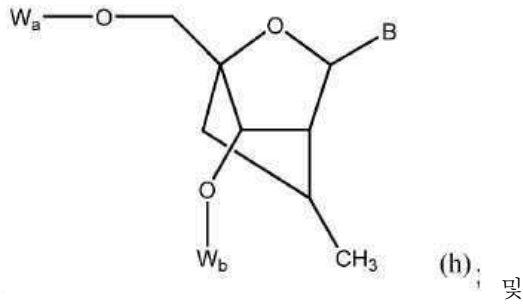
[0031] 특정 구현예에서, T_m -증가 뉴클레오타이드는 이환형 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 이환형 뉴클레오타이드는 식 I, II, III, IV, Va, 또는 Vb의 구조를 갖는다. 특정 구현예에서, 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 식 Ia, Ib, Ic, Id, Ie, 또는 If 중 하나 이상의 구조를 갖는다. 특정 구현예에서, 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 식 IIa, IIb, IIc, 또는 IId 중 하나 이상의 구조를 갖는다. 특정 구현예에서, 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 식 IIIa 및/또는 IIIb의 구조를 갖는다. 특정 구현예에서, 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 식 IVa 및/또는 IVb의 구조를 갖는다.

[0032] 특정 구현예에서, 이환형 뉴클레오타이드는 하기 중 하나 이상이다:



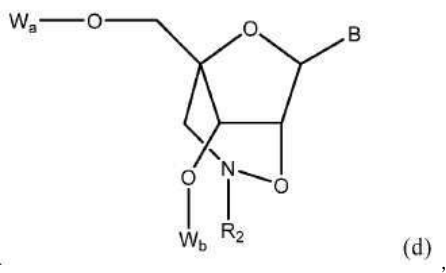
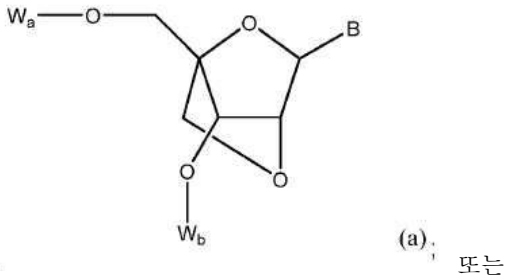
[0033] 20





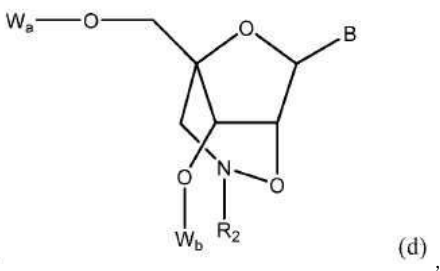
식 중, B는 핵염기이고, R₂는 H 또는 CH₃이고, 그리고 W_a 및 W_b 각각은 독립적으로, H, OH, 하이드록실 보호기, 인 모이어티, 또는 상기 이환형 뉴클레오타이드를 또 다른 뉴클레오타이드에 또는 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이고, 그리고 W_a 또는 W_b 중 적어도 하나는 상기 이환형 뉴클레오타이드를 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이다.

특정 구현예에서, 이환형 뉴클레오타이드는 하기이다:



식 중, B, W_a, 및 W_b는 상기에 기재된 바와 같고, 그리고 R₂는 CH₃이다.

특정 구현예에서, 이환형 뉴클레오타이드는 하기이다:



- [0045] 식 중, B, W_a, 및 W_b는 상기에 기재된 바와 같고, 그리고 R₂는 CH₃이다.
- [0046] 특정 구현예에서, 이환형 뉴클레오타이드는 제1 고리를 포함하고, 상기 제1 고리는 푸라노실, 및 제2 고리를 형성하기 위해 상기 푸라노실의 2'-탄소 및 4'-탄소를 연결하는 브릿지이다.
- [0047] 특정 구현예에서, 상기 푸라노실의 2'-탄소 및 4'-탄소를 연결하는 브릿지는 하기로 구성된 군으로부터 선택된다:
- [0048] a) 예를 들어 4'-CH₂-NH-O-2' (BNA^{NC}로도 알려져 있음) 또는 4'-CH₂-N(CH₃)-O-2' (BNA^{NC}[NMe]로도 알려져 있음)를 포함하는, 4'-CH₂-O-N(R)-2' 및 4'-CH₂-N(R)-O-2' (여기서, R은 H, C₁-C₁₂ 알킬, 또는 보호기임);
- [0049] b) 4'-CH₂-2'; 4'-(CH₂)₂-2'; 4'-(CH₂)₃-2'; 4'-(CH₂)-O-2' (LNA로도 알려져 있음); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA로도 알려져 있음); 4'-CH(CH₃)-O-2' (cEt로도 알려져 있음); 및 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (cMOE로도 알려져 있음), 및 이의 유사체;
- [0050] c) 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' 및 이의 유사체;
- [0051] d) 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' 및 이의 유사체;
- [0052] e) 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' 및 이의 유사체;
- [0053] f) 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' 및 이의 유사체; 및
- [0054] g) 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' 및 이의 유사체.
- [0055] 특정 구현예에서, 이중가닥 핵산 억제제는 제2 듀플렉스 외부의 임의의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하지 않는다.
- [0056] 특정 구현예에서, 테트라루프는 적어도 하나의 리간드 접합된 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 테트라루프는 2, 3, 또는 4개의 리간드 접합된 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 리간드는 GalNAc이다. 특정 구현예에서, GalNAc는 당 모이어티의 2'-위치에서 뉴클레오타이드에 접합된다.
- [0057] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제는 상기 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 5'-말단에서 5'-포스페이트를 추가로 포함한다.
- [0058] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 지질 나노입자로 제형화된다. 특정 구현예에서, 지질 나노입자는 코어 지질 및 외피 지질을 포함하고, 상기 코어 지질은 제1 양이온성 지질 및 제1 폐길화된 지질을 포함하고, 그리고 상기 외피 지질은 제2 양이온성 지질, 중성 지질, 스테롤, 및 제2 폐길화된 지질을 포함한다. 특정 구현예에서, 제1 양이온성 지질은 DL-048이고, 제1 폐길화된 지질은 DSG-mPEG이고, 제2 양이온성 지질은 DL-103이고, 중성 지질은 DSPC이고, 스테롤은 콜레스테롤이고, 그리고 제2 폐길화된 지질은 DSPE-mPEG이다.
- [0059] 또 다른 양태는 본 명세서에서 기재된 바와 같은 줄기/루프-함유 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 치료적 유효량 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0060] 또 다른 양태는 대상체에서 표적 유전자의 발현을 감소시키는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 이중-가닥 핵산 억제제 분자 또는 약제학적 조성물을 상기 표적 유전자의 발현을 감소시키는데 충분한 양으로 감소를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 투여 단계는 정맥내, 근육내, 또는 피하 투여를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 대상체는 인간이다.

도면의 간단한 설명

- [0061] 본 명세서의 일부를 구성하고 상기에 포함되는, 수반되는 도면들은 특정 구현예를 예시하고, 서면 설명과 함께, 본 명세서에서 개시된 조성물 및 방법의 특정 원칙을 설명하는 역할을 한다.

도 1은 실시예 1에서 논의된 바와 같이 인간 SAA1 유전자에서 동일한 서열을 표적으로 하는 4개의 예시적인 이중-가닥 핵산 억제제 분자 (작제물 1 내지 4)의 구조를 개략적으로 도시한다. 작제물 1의 센스 가닥은 6개의 염기쌍의 줄기 듀플렉스, 본 명세서에서 일명 "긴 줄기", 및 테트라루프를 포함한다. 테트라루프의 각각의 뉴클레오타이드는 단일 GalNAc 분자에 접합된다. 작제물 1은 또한 소위 "LS/4GN"이다. 작제물 2의 센스 가닥은 3개의

염기쌍의 줄기 듀플렉스, 본 명세서에서 일명 "짧은 줄기," 및 테트라루프를 포함한다. 테트라루프의 각각의 뉴클레오타이드는 단일 GalNAc 분자에 접합된다. 작제물 2은 또한 소위 "SS/4GN"이다. 작제물 3은 3개의 염기쌍의 짧은 줄기를 가지며, 작제물 2 와 동일하고, 단, 테트라루프의 4개의 뉴클레오타이드 중 단지 3개는 GalNAc에 접합된다. 작제물 3은 또한 소위 "SS/3GN"이다. 작제물 4는 3개의 염기쌍의 짧은 줄기를 가지며, 작제물 3과 동일하고, 단, 줄기에서 6개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유한다. 작제물 4는 또한 소위 "SS/3GN-BNA"이다.

도 2는, 실시예 1에서 설명된 바와 같이, hSAA1을 발현하기 위해 AAV9 벡터로 이전에 투약된 CD-1 마우스에 작제물 1 내지 4 (참고 도 1)의 투여 이후 인간 SAA1 단백질의 녹다운을 도시한다. 작제물 4 (SS/3GN-BNA)의 짧은 줄기에서 이환형 뉴클레오타이드의 봉입은 긴 줄기 및 짧은 줄기 대조군과 비교하여 hSAA1 녹다운의 효력 및 기간을 개선했다.

도 3a는 실시예 2에서 논의된 바와 같이 인간 APOC3 유전자에서 동일한 서열을 표적으로 하는 6개의 예시적인 이중-가닥 핵산 억제제 분자 (작제물 5-10)의 구조를 개략적으로 도시한다. 작제물 5-10에서, 안티센스 (또는 가이드) 가닥의 1번 위치에서의 뉴클레오타이드는 2'-OMe 변형을 함유한다. 긴 줄기 작제물 5 (LS/4GN) 및 8 (LS/3GN)은 동일하고, 단, 작제물 5 중 테트라루프는 단일 GalNAc에 접합된 4개의 뉴클레오타이드를 함유하고, 반면에 작제물 8 중 테트라루프는 단일 GalNAc에 접합된 3개의 뉴클레오타이드를 함유한다. 짧은 줄기 작제물 6 (SS/4GN) 및 9 (SS/3GN)은 동일하고, 단, 작제물 6 중 테트라루프는 단일 GalNAc에 접합된 4개의 뉴클레오타이드를 함유하고, 반면에 작제물 9 중 테트라루프는 단일 GalNAc에 접합된 3개의 뉴클레오타이드를 함유한다. 짧은 줄기 작제물 7 (SS/4GN-BNA) 및 10 (SS/3GN-BNA)은 작제물 6 (SS/4GN) 및 9 (SS/3GN), 각각과 동일하고, 단, 작제물 7 및 10는 줄기 듀플렉스에서 6개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유한다.

도 3b는 실시예 2에서 논의된 바와 같이 인간 APOC3 유전자에서 동일한 서열을 표적으로 하는 6개의 예시적인 이중-가닥 핵산 억제제 분자 (작제물 11-16)의 구조를 개략적으로 도시한다. 작제물 11-16에서, 안티센스 (또는 가이드) 가닥 중 1번 위치에서의 뉴클레오타이드는 2'-F 변형을 함유한다. 긴 줄기 작제물 11 (LS/4GN) 및 14 (LS/3GN)은 동일하고, 단, 작제물 11 중 테트라루프는 단일 GalNAc에 접합된 4개의 뉴클레오타이드를 함유하고, 반면에 작제물 14 중 테트라루프는 단일 GalNAc에 접합된 3개의 뉴클레오타이드를 함유한다. 짧은 줄기 작제물 12 (SS/4GN) 및 15 (SS/3GN)은 동일하고, 단, 작제물 12 중 테트라루프는 단일 GalNAc에 접합된 4개의 뉴클레오타이드를 함유하고, 반면에 작제물 15 중 테트라루프는 단일 GalNAc에 접합된 3개의 뉴클레오타이드를 함유한다. 짧은 줄기 작제물 13 (SS/4GN-BNA) 및 16 (SS/3GN-BNA)은 작제물 12 (SS/4GN) 및 15 (SS/3GN), 각각과 동일하고, 단, 작제물 13 및 16는 줄기에서 6개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유한다.

도 4는, 실시예 2에서 설명된 바와 같이, CD-1 마우스에 작제물 5-16 (참고 도 3a 및 3b)의 투여 이후 APOC3 mRNA의 녹다운을 도시한다. 작제물 7 (SS/4GN-BNA), 10 (SS/3GN-BNA), 13 (SS/4GN-BNA), 및 16 (SS/3GN-BNA)의 짧은 줄기에서 이환형 뉴클레오타이드의 봉입은 긴 줄기 및 짧은 줄기 대조군과 비교하여 APOC3 녹다운의 효력 및 기간을 개선했다.

도 5는, 실시예 3 및 5에서 논의된 바와 같이, 인간 PCSK9 유전자 (작제물 17-19)에서 동일한 서열을 표적하는 3개의 예시적인 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 구조를 개략적으로 도시한다. 작제물 17 (LS/3GN) 및 18 (SS/3GN)은 동일하고, 단, 작제물 17은 긴 줄기 (6개의 염기 쌍)을 함유하고 작제물 18은 짧은 줄기 (3개의 염기 쌍)을 함유한다. 짧은 줄기 작제물 18 및 19 (SS/3GN-BNA)는 동일하고, 단, 작제물 19는 줄기에서 6개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유한다.

도 6은, 실시예 3에서 설명된 바와 같이, 11 및 19일째에 hPCSK9 발현 플라스미드로 또한 투약된 CD-1 마우스에 작제물 17-19 (참고 도 5)의 투여 이후 12 및 20 일째에 인간 PCSK9 mRNA의 녹다운을 도시한다. 작제물 19 (SS/3GN-BNA)의 짧은 줄기에서 이환형 뉴클레오타이드의 봉입은 긴 줄기 및 짧은 줄기 대조군과 비교하여 PCSK9 녹다운의 효력 및 기간을 개선했다.

도 7는 실시예 4에서 논의된 바와 같이 인간 PCSK9 유전자에서 동일한 서열을 표적으로 하는 2개의 예시적인 이중-가닥 핵산 억제제 분자 (작제물 20 내지 21)의 구조를 개략적으로 도시한다. 작제물 20 (LS/3GN) 및 21 (SS/3GN-BNA)은 동일하고, 단, 작제물 20은 긴 줄기 (6개의 염기쌍)를 가지며, 그리고 작제물 21은 6개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하는 짧은 줄기 (3개의 염기쌍)을 갖는다.

도 8은, 실시예 4에서 설명된 바와 같이, hPCSK9를 발현하는 AAV9 벡터로 이전에 투약된 C57BL/6 마우스에 작제물 20 및 21 (참고 도 7)의 투여 이후 인간 PCSK9 단백질의 녹다운을 도시한다. 작제물 21 (SS/3GN-BNA)의 짧은 줄기에서 이환형 뉴클레오타이드의 봉입은 긴 줄기 대조군과 비교하여 PCSK9 녹다운의 효력 및 기간을

개선했다.

도 9는, 실시예 5에서 설명된 바와 같이, *가우시아* 루시페라제 유전자 (리포터 유전자)의 3-미번역된 영역에서 인간 PCSK9 표적 부위를 발현하는 AAV9 벡터로 이전에 투약된 C57BL/6 마우스에 작제물 17 및 19 (참고 도 5)의 투여 이후 *가우시아* 루시페라제의 녹다운을 도시한다. 작제물 19 (SS/3GN-BNA)의 짧은 줄기에서 이환형 뉴클레오타이드의 봉입은 긴 줄기 대조군과 비교하여 루시페라제 리포터 유전자의 PCSK9-특이적 녹다운의 기간을 개선했다.

도 10a는, 안티센스 가닥 ("AS") 및 센스 가닥 ("S")이 있는 예시적인 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 개략도를 도시하고, 여기에서 상기 센스 가닥은 줄기 루프 구조를 함유한다.

도 10b는, 도 10a에서처럼 동일한 예시적인 개략도를 도시한다. 도 10b에서, 센스 가닥은 안티센스 가닥 (AS)과 듀플렉스를 형성하는 제1 영역 (R1) 및 제2 하위영역 (S2)과 제1 하위영역 (S1)을 결합하는 루프 (L)를 포함하는 제2 영역 (R2)으로 추가 분할되고, 여기에서 S1 및 S2는 듀플렉스, 본 명세서에서 일명 "줄기" 또는 "줄기 듀플렉스"를 형성하도록 서로에 대해서 충분히 상보적이다.

도 10c는 도 10a 및 10b와 동일한 예시적인 개략도를 도시한다. 도 10c의 개략도는 핵산 억제제 분자에서 제1 듀플렉스 (D1) 및 제2 듀플렉스 (D2)를 도시한다. 제1 듀플렉스 (D1)는 센스 가닥의 제1 영역 (R1)과 안티센스 가닥 (AS) 사이에 형성된다. 제2 듀플렉스 (D2) 또는 "줄기"는 센스 가닥 (S)의 제2 영역 (R2)의 제1 하위영역 (S1)과 제2 하위영역 (S2) 사이에 형성된다.

도 10d는 예시적인 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 개략도를 도시하고, 상기 제2 듀플렉스 (D2)는 도 10c에서 도시된 제2 듀플렉스보다 더 짧다.

도 11a는 실시예 6에서 논의된 바와 같이 관심 유전자 서열을 표적으로 하는 예시적인 긴 줄기 이중-가닥 핵산 억제제 분자 ("작제물 22")의 구조를 개략적으로 도시한다. 작제물 22의 센스 가닥은 6개의 염기쌍의 줄기 듀플렉스 및 테트라루프를 포함한다. 테트라루프의 4개의 뉴클레오타이드 중 2개는 단일 GalNAc 분자에 접합된다.

도 11b는 실시예 6에서 논의된 바와 같이 관심 유전자 서열을 표적으로 하는 예시적인 긴 줄기 이중-가닥 핵산 억제제 분자 ("작제물 23")의 구조를 개략적으로 도시한다. 작제물 23의 센스 가닥은 6개의 염기쌍의 줄기 듀플렉스 및 트리루프를 포함한다. 작제물 23의 구조는 작제물 22의 구조와 동일하고, 단, 작제물 23은 테트라루프 대신에 트리루프를 함유한다.

도 11c는 실시예 6에서 논의된 바와 같이 관심 유전자 서열을 표적으로 하는 예시적인 짧은 줄기 이중-가닥 핵산 억제제 분자 ("작제물 24")의 구조를 개략적으로 도시한다. 작제물 24의 센스 가닥은 3개의 염기쌍의 줄기 듀플렉스 (상기 줄기 루프 구조의 줄기 부분 중 각각의 뉴클레오타이드는 BNA임), 및 테트라루프를 포함한다. 테트라루프의 4개의 뉴클레오타이드 중 2개는 단일 GalNAc 분자에 접합된다.

도 11d는 실시예 6에서 논의된 바와 같이 관심 유전자 서열을 표적으로 하는 예시적인 짧은 줄기 이중-가닥 핵산 억제제 분자 ("작제물 25")의 구조를 개략적으로 도시한다. 작제물 25의 센스 가닥은 3개의 염기쌍의 줄기 듀플렉스 (상기 줄기 루프 구조의 줄기 부분 중 각각의 뉴클레오타이드는 BNA임), 및 트리루프를 포함한다. 작제물 25의 구조는 작제물 24의 구조와 동일하고, 단, 작제물 25는 테트라루프 대신에 트리루프를 함유한다.

도 11e는 실시예 6에서 논의된 바와 같이 관심 유전자 서열을 표적으로 하는 예시적인 짧은 줄기 이중-가닥 핵산 억제제 분자 ("작제물 26")의 구조를 개략적으로 도시한다. 작제물 26의 센스 가닥은 2개의 염기쌍의 줄기 듀플렉스 (상기 줄기 루프 구조의 줄기 부분 중 각각의 뉴클레오타이드는 BNA임), 및 테트라루프를 포함한다. 테트라루프의 4개의 뉴클레오타이드 중 2개는 단일 GalNAc 분자에 접합된다.

도 11f는 실시예 6에서 논의된 바와 같이 관심 유전자 서열을 표적으로 하는 예시적인 짧은 줄기 이중-가닥 핵산 억제제 분자 ("작제물 27")의 구조를 개략적으로 도시한다. 작제물 27의 센스 가닥은 2개의 염기쌍의 줄기 듀플렉스 (상기 줄기 루프 구조의 줄기 부분 중 각각의 뉴클레오타이드는 BNA임), 및 트리루프를 포함한다. 작제물 27의 구조는 작제물 28의 구조와 동일하고, 단, 작제물 27는 테트라루프 대신에 트리루프를 함유한다.

도 11g는 실시예 6에서 논의된 바와 같이 관심 유전자 서열을 표적으로 하는 예시적인 짧은 줄기 이중-가닥 핵산 억제제 분자 ("작제물 28")의 구조를 개략적으로 도시한다. 작제물 28의 센스 가닥은 1개의 염기쌍의 줄기 듀플렉스 (상기 줄기 루프 구조의 줄기 부분 중 뉴클레오타이드 둘 모두는 BNA임), 및 테트라루프를 포함한다. 테트라루프의 4개의 뉴클레오타이드 중 2개는 단일 GalNAc 분자에 접합된다.

도 11h는 실시예 6에서 논의된 바와 같이 관심 유전자 서열을 표적으로 하는 예시적인 짧은 줄기 이중-가닥 핵산 억제제 분자 ("작제물 29")의 구조를 개략적으로 도시한다. 작제물 29의 센스 가닥은 1개의 염기쌍의 줄기 듀플렉스 (상기 줄기 루프 구조의 줄기 부분 중 뉴클레오타이드 둘 모두는 BNA임), 및 트리루프를 포함한다. 작제물 29의 구조는 작제물 28의 구조와 동일하고, 단, 작제물 29는 테트라루프 대신에 트리루프를 함유한다.

도 11i는 실시예 6에서 논의된 바와 같이 관심 유전자 서열을 표적으로 하는 예시적인 긴 줄기 이중-가닥 핵산 억제제 분자 ("작제물 30")의 구조를 개략적으로 도시한다. 작제물 30의 센스 가닥은 6개의 염기쌍의 줄기 듀플렉스 및 테트라루프를 포함한다. 테트라루프의 4개의 뉴클레오타이드 중 3개는 단일 GalNAc 분자에 접합된다.

도 12는, 실시예 6에서 기재된 바와 같이, CD-1 마우스에 작제물 22-30 (참고 도 11a-i) 투여 4일 후 남아있는 표적 유전자 mRNA의 퍼센트를 도시한다. 이환형 뉴클레오타이드를 함유하고 2 또는 3개의 염기 쌍의 줄기를 갖는 짧은 줄기 작제물 (작제물 24 내지 27)은 6개의 염기 쌍의 줄기를 갖는 긴 줄기 작제물 (작제물 22, 23, 및 30)과 비교하여 표적 유전자 mRNA의 유사한 녹다운을 나타냈다. 단일 염기 쌍의 줄기를 갖는 트리루프-함유 작제물 (작제물 29)는 표적 mRNA 발현을 감소시키지 않았고, 반면에 단일 염기 쌍의 줄기를 갖는 테트라루프-함유 작제물 (작제물 28)은 표적 mRNA 발현의 강력한 감소를 나타냈다.

도 13은 이중-가닥 핵산 억제제 분자를 제형화하는데 사용될 수 있는 지질 나노입자 (LNP)의 하나의 비제한적인 구현예를 도시한다. LNP는 하기 코어 지질: DL-048 (양이온성 지질) 및 DSG-mPEG (폐길화된 지질), 그리고 하기 외피 지질: DL-103 (양이온성 지질), DSPC, 콜레스테롤, 및 DSPE-mPEG (폐길화된 지질)을 포함한다.

도 14a는, 실시예 5에서 논의된 바와 같이, 인간 PCSK9 유전자에서 동일한 서열을 표적하는 2개의 대조군 이중-가닥 핵산 억제제 분자 (작제물 17 및 18)의 구조를 개략적으로 도시한다. 작제물 17 및 18은 동일하고, 단, 작제물 17은 긴 줄기 (6개의 염기 쌍)를 함유하고 작제물 18은 짧은 줄기 (3개의 염기 쌍)를 함유한다. 작제물 17도 작제물 18도 줄기에서 T_m-증가 뉴클레오타이드를 함유하지 않는다.

도 14b는, 실시예 5에서 논의된 바와 같이, 인간 PCSK9 유전자에서 동일한 서열을 표적하는 3개의 예시적인 이중-가닥 핵산 억제제 분자 (작제물 19, 31, 및 32)의 구조를 개략적으로 도시한다. 빗금친 원은 BNA를 표시한다. 작제물 18 및 19는 동일하고, 단, 작제물 19는 줄기에서 6개의 이환형 뉴클레오타이드 (3개의 BNA 염기 쌍)를 함유한다. 작제물 31은 작제물 19와 동일하고 단, 작제물 31은 줄기에서 4개의 이환형 뉴클레오타이드 (2개의 BNA 염기 쌍)를 함유한다. 작제물 32는 작제물 19와 동일하고 단, 작제물 32는 줄기에서 2개의 이환형 뉴클레오타이드 (1개의 BNA 염기 쌍)를 함유한다.

도 14c는, 실시예 5에서 논의된 바와 같이, 인간 PCSK9 유전자에서 동일한 서열을 표적하는 3개의 예시적인 이중-가닥 핵산 억제제 분자 (작제물 33-35)의 구조를 개략적으로 도시한다. 빗금친 원은 BNA를 표시한다. 작제물 33은 줄기에서 3개의 쌍을 이루지 않는 이환형 뉴클레오타이드 (3개의 BNA)를 함유한다. 작제물 34는 작제물 33과 동일하고 단, 작제물 34는 줄기에서 2개의 쌍을 이루지 않는 이환형 뉴클레오타이드 (2개의 BNA)를 함유한다. 작제물 35는 작제물 33과 동일하고, 단, 작제물 35는 줄기에서 1개의 쌍을 이루지 않는 이환형 뉴클레오타이드 (1개의 BNA)를 함유한다.

도 15a는, 실시예 5에서 설명된 바와 같이, *가우시아* 루시페라제 유전자 (리포터 유전자)의 3'-미번역된 영역에서 인간 PCSK9 표적 부위를 발현하는 AAV9 벡터로 이전에 투약된 C57BL/6 마우스에 작제물 17-19, 31, 및 32 (참고 도 14a 및 14b)의 투여 이후 2 내지 8 주에서 *가우시아* 루시페라제의 녹다운을 도시한다. 작제물 19, 31, 및 32의 짧은 줄기에서 3, 2, 또는 1개의 BNA 염기 쌍의 봉입은 긴 줄기 및 짧은 줄기 대조군과 비교하여 루시페라제 리포터 유전자의 PCSK9-특이적 녹다운의 효력 및 기간을 개선했다.

도 15b는, 실시예 5에서 설명된 바와 같이, *가우시아* 루시페라제 유전자 (리포터 유전자)의 3'-미번역된 영역에서 인간 PCSK9 표적 부위를 발현하는 AAV9 벡터로 이전에 투약된 C57BL/6 마우스에 작제물 33-35 (참고 도 14c)의 투여 이후 *가우시아* 루시페라제의 녹다운을 도시한다. 작제물 33-35의 짧은 줄기에서 1, 2, 또는 3개의 쌍을 이루지 않는 이환형 뉴클레오타이드 (BNA)의 봉입은 긴 줄기 및 짧은 줄기 대조군과 비교하여 루시페라제 리포터 유전자의 PCSK9-특이적 녹다운의 기간을 개선했고, 줄기에서 연속적인 BNA의 수로서 개선하는 기간은 1부터 3까지 증가했다.

도 16a는, 실시예 7에서 논의된 바와 같이, 인간 APOC3 유전자에서 동일한 서열을 표적하는 4개의 예시적인 이중-가닥 핵산 억제제 분자 (작제물 5, 7, 36, 및 37)의 구조를 개략적으로 도시한다. 빗금친 원은 BNA를 표시한다. 작제물 5 및 7은 실시예 2에서 또한 사용되었다. 작제물 5는 줄기에서 임의의 T_m-증가 뉴클레오타이드 없이

긴 줄기 (6개의 염기 쌍)을 함유하는 대조군이다. 작제물 7은 짧은 줄기 (3개의 염기 쌍)을 가지며, 줄기에서 6개의 이환형 뉴클레오타이드 (3개의 BNA 염기 쌍)을 함유한다. 작제물 36은 작제물 7과 동일하고 단, 작제물 36은 줄기에서 4개의 이환형 뉴클레오타이드 (2개의 BNA 염기 쌍)을 함유한다. 작제물 37은 작제물 7과 동일하고, 단, 작제물 37은 줄기에서 2개의 이환형 뉴클레오타이드 (1개의 BNA 염기 쌍)을 함유한다.

도 16b는, 실시예 7에서 논의된 바와 같이, 인간 APOC3 유전자에서 동일한 서열을 표적하는 4개의 예시적인 이중-가닥 핵산 억제제 분자 (작제물 38-41)의 구조를 개략적으로 도시한다. 빗금친 원은 BNA를 표시한다. 작제물 38은 짧은 줄기 (3개의 염기 쌍)을 가지며, 줄기의 최상부 가닥에서 연속적으로 배열된 3개의 쌍을 이루지 않는 이환형 뉴클레오타이드 (3개의 BNA - 최상부)를 함유한다. 작제물 39는 짧은 줄기 (3개의 염기 쌍)을 가지며, 줄기의 최하부 가닥에서 연속적으로 배열된 3개의 쌍을 이루지 않는 이환형 뉴클레오타이드 (3개의 BNA - 최하부)를 함유한다. 작제물 40은 작제물 39와 동일하고, 단, 작제물 40은 줄기에서 2개의 쌍을 이루지 않는 이환형 뉴클레오타이드 (2개의 BNA)를 함유한다. 작제물 41은 작제물 39와 동일하고, 단, 작제물 41은 줄기에서 1개의 쌍을 이루지 않는 이환형 뉴클레오타이드 (1개의 BNA)를 함유한다.

도 17은, 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CD-1 마우스에 작제물 5, 7, 및 36-41 (참고 도 16a 및 16b)의 투여 이후 7 일째에 전혈내 APOC3 단백질의 녹다운을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

본 개시내용이 더 용이하게 이해되도록, 소정의 용어가 먼저 하기에 정의된다. 하기 용어 및 다른 용어에 대한 추가적인 정의는 본 명세서에 걸쳐 기재될 수 있다. 하기에 기재된 용어의 정의가 참고로 포함된 출원 또는 특허에서의 정의와 불일치하는 경우에, 본 명세서에 기재된 정의는 용어의 의미를 이해하기 위해 사용되어야 한다.

본 명세서 및 첨부된 청구항들에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "한", "하나", 및 "상기"는 문맥에서 달리 명확히 명시되지 않는 한 복수의 참조를 포함한다. 따라서, 예를 들어, "한 방법" 지칭은 본 명세서에서 기재된 및/또는 본 개시내용 등의 판독시 당업자들에 명백해질 유형의 단계들 및/또는, 하나 이상의 방법을 포함한다.

투여하다: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 대상체에게 조성물을 "투여하는"은 조성물을 대상체와 접촉, 적용 또는 제공하는 것을 의미한다. 투여는, 예를 들어, 국소, 경구, 피하, 근육내, 복강내, 정맥내, 척추강내 및 진피내를 포함하는, 임의의 수의 경로로 달성될 수 있다.

아실: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "아실"은 알킬카보닐, 사이클로알킬카보닐 및 아릴카보닐 모이어티를 지칭한다.

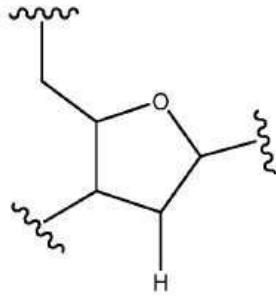
알콕시: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "알콕시"는 산소 원자를 통해 분자 모이어티에 부착된 알킬 기를 지칭한다.

알케닐: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "알케닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 갖고 약 2 내지 약 20개의 탄소 원자의 범위를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 하이드로카르빌 기를 지칭한다. "**치환된 알케닐**"은 하나 이상의 치환체를 추가로 보유하는 알케닐 기를 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "**저급 알케닐**"은 2 내지 약 6개의 탄소 원자를 갖는 알케닐 모이어티를 지칭한다.

알킬: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "알킬"은 1 내지 최대 약 20개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 하이드로카르빌 기를 지칭한다. 본 명세서에서 나타날 때는 언제나, 수치 범위, 예컨대 "**C₁-C₆ 알킬**"은, 용어 "알킬"이 또한 탄소 원자의 수치 범위가 지정되지 않은 경우를 포함하여도, 알킬 기가 단 1개의 탄소 원자, 2개의 탄소 원자, 3개의 탄소 원자, 등, 최대 및 6개의 탄소 원자를 포함할 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 용어 "알킬"은 C₁-C₁₀ 사이의 하위-범위 (예를 들어 C₁-C₆)을 지칭할 수 있다. "**치환된 알킬**"은 치환체를 보유하는 알킬 모이어티를 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "**저급 알킬**"은 1 내지 약 6개의 탄소 원자를 갖는 알킬 모이어티를 지칭한다.

알키닐: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "알키닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖고 약 2 내지 약 20개의 탄소 원자의 범위를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 하이드로카르빌 기를 지칭한다. "**치환된 알키닐**"은 하나 이상의 치환체를 추가로 보유하는 알키닐 기를 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "**저급 알키닐**"은 약 2 내지 약 6개의 탄소 원자를 갖는 알키닐 모이어티를 지칭한다.

- [0071] **안티센스 가닥:** 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥: 안티센스 가닥 및 센스 가닥을 포함한다. 안티센스 가닥 또는 이의 영역은 표적 핵산의 상응하는 영역에 부분적으로, 실질적으로 또는 완전히 상보성이다. 또한, 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 안티센스 가닥 또는 이의 영역은 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 센스 가닥 또는 이의 영역에 부분적으로, 실질적으로 또는 완전히 상보성이다. 특정 구현예에서, 안티센스 가닥은 상기 표적 핵산 서열에 비-상보성인 뉴클레오타이드를 또한 함유할 수 있다. 비-상보성 뉴클레오타이드는 상보성 서열의 어느 한쪽에 있을 수 있거나 상보성 서열의 양쪽에 있을 수 있다. 특정 구현예에서, 안티센스 가닥 또는 이의 영역이 센스 가닥 또는 이의 영역에 부분적으로 또는 실질적으로 상보성인 경우, 비-상보성 뉴클레오타이드는 상보성의 하나 이상의 영역 (예를 들어, 하나 이상의 미스매치) 사이 위치할 수 있다. 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 안티센스 가닥은 또한 일명 가이드 가닥이다.
- [0072] **대략:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "대략" 또는 "약"은, 하나 이상의 관심 값에 적용된 경우, 언급된 기준값에 유사한 값을 지칭한다. 특정 구현예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 달리 언급되지 않는 한 또는 문맥으로부터 달리 분명하지 않는 한 언급된 기준값의 어느 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 미만에 해당하는 값의 범위 (초과 또는 미만)를 지칭한다 (그와 같은 수가 가능한 값의 100 %를 초과할 경우 제외).
- [0073] **아릴:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "아릴"은 5 내지 최대 19개의 탄소 원자의 범위를 갖는 방향족 단환형 또는 다환형 기를 지칭한다. "**치환된 아릴**"은 하나 이상의 치환체를 추가로 보유하는 아릴 기를 지칭한다.
- [0074] **이환형 뉴클레오타이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "이환형 뉴클레오타이드"는 이환형 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0075] **이환형 당 모이어티:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "이환형 당 모이어티"는, 이환형 구조를 초래하는, 제2 고리를 형성하기 위해 4 내지 7 원 고리의 2개의 원자를 연결하는 브릿지를 포함하는 4 내지 7 원 고리를 포함하는 (비제한적으로 푸라노실을 포함하는) 변형된 당 모이어티를 지칭한다. 전형적으로, 4 내지 7 원 고리는 당이다. 일부 구현예에서, 4 내지 7-원 고리는 푸라노실이다. 특정 구현예에서, 브릿지는 상기 푸라노실의 2'-탄소 및 4'-탄소를 연결한다.
- [0076] **상보성:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "상보성"은 2개의 뉴클레오타이드가 서로 염기 쌍을 형성하도록 허용하는 2개의 뉴클레오타이드 사이에서 (예를 들어, 2개의 대향하는 핵산에서 또는 단일 핵산 가닥의 대향하는 영역에서) 구조 관계를 지칭한다. 예를 들어, 대향하는 핵산의 피리미딘 뉴클레오타이드에 상보성인 1개의 핵산의 퓨린 뉴클레오타이드는 서로 수소 결합을 형성함으로써 함께 염기 짝짓기할 수 있다. 일부 구현예에서, 상보성 뉴클레오타이드는 왓슨-크릭(Watson-Crick) 방식으로 또는 안정한 듀플렉스의 형성을 허용하는 임의의 다른 방식으로 염기 짝짓기할 수 있다. "**완전히 상보성**" 또는 100 % 상보성은 제1 올리고뉴클레오타이드 가닥의 또는 제1 올리고뉴클레오타이드 가닥의 분절의 각각의 뉴클레오타이드 단량체가 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥의 또는 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥의 분절의 각각의 뉴클레오타이드 단량체와 염기 쌍을 형성할 수 있는 상황을 지칭한다. 100 % 미만 상보성은 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥 (또는 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥의 2개의 분절)의 전부가 아닌, 일부 뉴클레오타이드 단량체가 서로 염기 쌍을 형성할 수 있는 상황을 지칭한다. "**실질적인 상보성**"은 서로에 90 % 또는 그 초과 상보성을 나타내는 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥 (또는 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥의 분절)을 지칭한다. "**충분한 상보성**"은 표적 mRNA와 핵산 억제제 분자 사이 상보성을 지칭하여, 이로써 표적 mRNA에 의해 인코딩된 단백질의 양에서 감소는 없다.
- [0077] **상보성 가닥:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "상보성 가닥"은 다른 가닥에 부분적으로, 실질적으로 또는 완전히 상보적인 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 가닥을 지칭한다.
- [0078] **사이클로알킬:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "사이클로알킬"은 3 내지 12개의 탄소, 예를 들어, 3 내지 8개의 탄소 및, 예를 들어, 3 내지 6개의 탄소를 함유하는 환형 (즉, 고리-함유) 탄화수소 기를 지칭한다. "**치환된 사이클로알킬**"은 하나 이상의 치환체를 추가로 보유하는 사이클로알킬 기를 지칭한다.
- [0079] **테옥시리보푸라노실:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "테옥시리보푸라노실"은 자연 발생 DNA에서 발견되고, 아래 설명된 바와 같이, 2'-탄소에서 수소 기를 갖는 푸라노실을 지칭한다:



[0080]

[0081]

데옥시리보뉴클레오타이드: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "데옥시리보뉴클레오타이드"는 당 모이어티의 2'-위치에서 수소 기를 갖는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 천연 뉴클레오타이드 또는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 변형된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0082]

dsRNAi 억제제 분자: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "dsRNAi 억제제 분자"는 센스 가닥 (패신저) 및 안티센스 가닥 (가이드)를 갖는 이중-가닥 핵산 억제제 분자를 지칭하되, 안티센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 일부는 표적 mRNA의 절단에서 아르고노트 2 (Ago2) 엔도뉴클레아제에 의해 사용된다.

[0083]

듀플렉스: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "듀플렉스"는, 핵산 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)와 관련하여, 뉴클레오타이드의 2개의 역평행 서열의 상보성 염기 짝짓기를 통해 형성된 구조를 지칭한다.

[0084]

부형제: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "부형제"는, 예를 들어 원하는 일관성 또는 안정화 효과에 기여하거나 제공하기 위해 조성물에서 포함될 수 있는 비-치료제를 지칭한다.

[0085]

푸라노실: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "푸라노실"은 4개의 탄소 원자 및 1개의 산소 원자가 있는 5-원 고리를 포함하는 구조를 지칭한다.

[0086]

할로: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어들 "할로" 및 "할로겐"은 교환가능하고 불소, 염소, 브롬 및 요오드로부터 선택된 원자를 지칭한다.

[0087]

복소환: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어들 "복소환" 또는 "복소환형"은 고리 구조의 일부로서 하나 이상의 헤테로원자 (예를 들어, N, O, S, 등)를 함유하고 3 내지 최대 14개의 탄소 원자의 범위를 갖는 비-방향족 환형 (즉, 고리-함유) 기를 지칭한다. "**치환된 복소환형**" 또는 "**치환된 복소환**"은 하나 이상의 치환체를 추가로 보유하는 복소환형 기를 지칭한다.

[0088]

뉴클레오타이드간 연결 기: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "뉴클레오타이드간 연결 기" 또는 "뉴클레오타이드간 연결"은 2개의 뉴클레오사이드 모이어티를 공유적으로 연결할 수 있는 화학 기를 지칭한다. 전형적으로, 화학 기는 포스포 또는 포스포이트 기를 함유하는 인-함유 연결 기이다. 포스포 연결 기는 포스포디에스테르 연결, 포스포로디티오에이트 연결, 포스포로티오에이트 연결, 포스포트리에스테르 연결, 티오노알킬포스포네이트 연결, 티오알킬포스포트리에스테르 연결, 포스포르아미다이트 연결, 포스포네이트 연결 및/또는 보라노포스페이트 연결을 포함하는 의미이다. 많은 인-함유 연결은, 예를 들어, 미국 특허 번호 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697 및 5,625,050에서 개시된 바와 같이, 당해 분야에서 잘 알려져 있다. 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 인 원자를 함유하지 않는 하나 이상의 뉴클레오타이드간 연결 기, 그와 같은 단쇄 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오타이드간 연결, 혼합된 헤테로원자 및 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오타이드간 연결, 또는, 비제한적으로, 실록산 골격; 설퍼아이드, 설퍼사이드 및 설퍼 골격; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 리보아세틸 골격; 알켄 함유 골격; 설퍼메이트 골격; 메틸렌이미노 및 메틸렌히드라지노 골격; 설퍼네이트 및 설퍼아미드 골격; 및 아마이드 골격을 갖는 것들을 포함하는, 하나 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 복소환형 뉴클레오타이드간 연결을 함유한다. 비-인 함유 연결은, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269 및 5,677,439에서 개시된 바와 같이, 당해 분야에서 잘 알려져 있다.

- [0089] **루프**: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "루프"는 핵산의 단일 가닥에 의해 형성된 구조를 지칭하되, 특정 단일가닥 뉴클레오타이드 영역을 축적하는 상보성 영역은 상보성 영역 사이 단일가닥 뉴클레오타이드 영역이 듀플렉스 형성 또는 왓슨-크릭 염기 짝짓기로부터 배제되는 방식으로 혼성화한다. 루프는 임의의 길이의 단일가닥 뉴클레오타이드 영역이다. 루프의 예는 헤어핀 및 테트라루프와 같은 구조에서 존재하는 쌍을 이루지 않는 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0090] **용융 온도**: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "용융 온도" 또는 " T_m "은 듀플렉스 핵산의 2개의 가닥이 분리하는 온도를 의미한다. T_m 은 상보성 핵산의 2개의 가닥 또는 이의 일부의 듀플렉스 안정성 또는 결합 친화도의 측정치로서 종종 사용된다. T_m 은 혼성화의 형성 및 고장 (용융)을 결정하기 위해 UV 스펙트럼을 사용함으로써 측정될 수 있다. 혼성화 동안 발생하는, 염기 적층은 UV 흡수에서의 감소 (흡광감소성)에 의해 동반된다. 결과적으로, UV 흡수에서의 감소는 더 높은 T_m 을 표시한다.
- [0091] **변형된 핵염기**: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "변형된 핵염기"는 천연 핵염기 또는 보편적인 핵염기가 아닌 임의의 핵염기를 지칭한다. 적합한 변형된 핵염기는 디아미노퓨린 및 그것의 유도체, 알킬화된 퓨린 또는 피리미딘, 아실화된 퓨린 또는 피리미딘 티올화된 퓨린 또는 피리미딘, 및 기타 동종의 것을 포함한다. 다른 적합한 변형된 핵염기는 퓨린 및 피리미딘의 유사체를 포함한다. 적합한 유사체는 비제한적으로, 1-메틸아데닌, 2-메틸아데닌, N6-메틸아데닌, N6-이소펜틸아데닌, 2-메틸티오-N6-이소펜틸아데닌, N,N-디메틸아데닌, 8-브로모아데닌, 2-티오시토신, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, 5-에틸시토신, 4-아세틸시토신, 1-메틸구아닌, 2-메틸구아닌, 7-메틸구아닌, 2,2-디메틸구아닌, 8-브로모구아닌, 8-클로로구아닌, 8-아미노구아닌, 8-메틸구아닌, 8-티오구아닌, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-아이오도우라실, 5-에틸우라실, 5-프로필우라실, 5-메톡시우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 5-(카복시하이드록시메틸)우라실, 5-(메틸아미노메틸)우라실, 5-(카복시메틸아미노메틸)-우라실, 2-티오우라실, 5-메틸-2-티오우라실, 5-(2-브로모비닐)우라실, 우라실-5-옥시아세트산, 우라실-5-옥시아세트산 메틸 에스테르, 슈도우라실, 1-메틸슈도우라실, 쿠에오신, 하이포잔틴, 잔틴, 2-아미노퓨린, 6-하이드록시아미노퓨린, 니트로피롤릴, 니트로인돌릴 및 디플루오로톨릴, 6-티오피린 및 2,6-디아미노퓨린 니트로피롤릴, 니트로인돌릴 및 디플루오로톨릴을 포함한다. 전형적으로, 핵염기는 질소성 염기를 함유한다. 특정 구현예에서, 핵염기는 질소 원자를 함유하지 않는다. 예를 들어, 미국 공개 특허 출원 번호 20080274462를 참고한다.
- [0092] **변형된 뉴클레오사이드**: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "변형된 뉴클레오사이드"는 (본 명세서에서 정의된 바와 같이) 포스페이트 기 또는 변형된 포스페이트 기에 연결되지 않고 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 변형된 핵염기, (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 보편적인 핵염기 또는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 변형된 당 모이어티 중 하나 이상을 함유하는 당 (예를 들어, 데옥시리보스 또는 리보오스 또는 이의 유사체)와의 N-글리코시드 연결에서 복소환형 질소성 염기를 지칭한다. 변형된 또는 보편적인 핵염기 (또한 본 명세서에서 일명 염기 유사체)는 일반적으로 뉴클레오사이드 당 모이어티의 1'-위치에 위치하고 1'-위치에서 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실 이외의 핵염기를 지칭한다. 특정 구현예에서, 변형된 또는 보편적인 핵염기는 질소성 염기이다. 특정 구현예에서, 변형된 핵염기는 질소 원자를 함유하지 않는다. 예를 들어, 미국 공개 특허 출원 번호 20080274462를 참고한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 (무염기성) 핵염기를 함유하지 않는다. 본 개시내용의 맥락에서 적합한 변형된 또는 보편적인 핵염기 또는 변형된 당은 본 명세서에 기재되어 있다.
- [0093] **변형된 뉴클레오타이드**: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "변형된 뉴클레오타이드"는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 포스페이트 기 또는 변형된 포스페이트 기에 연결되고 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 변형된 핵염기, (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 보편적인 핵염기, 또는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 변형된 당 모이어티 중 하나 이상을 함유하는 당 (예를 들어, 리보오스 또는 데옥시리보스 또는 이의 유사체)와의 N-글리코시드 연결에서 복소환형 질소성 염기를 지칭한다. 변형된 또는 보편적인 핵염기 (또한 본 명세서에서 일명 염기 유사체)는 뉴클레오사이드 당 모이어티의 1'-위치에 일반적으로 위치하고 1'-위치에서 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실 이외의 핵염기를 지칭한다. 특정 구현예에서, 변형된 또는 보편적인 핵염기는 질소성 염기이다. 특정 구현예에서, 변형된 핵염기는 질소 원자를 함유하지 않는다. 예를 들어, 미국 공개 특허 출원 번호 20080274462를 참고한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 (무염기성) 핵염기를 함유하지 않는다. 본 개시내용의 맥락에서 적합한 변형된 또는 보편적인 핵염기, 변형된 당 모이어티, 또는 변형된 포스페이트 기는 본 명세서에 기재되어 있다.

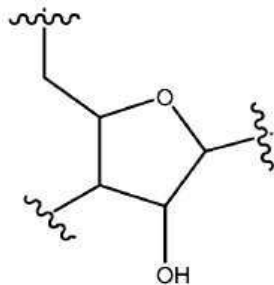
- [0094] **변형된 포스페이트 기:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "변형된 포스페이트 기"는 천연 뉴클레오타이드에서 발생하지 않고, 인 원자를 포함하는 포스페이트 및 포스페이트 (예를 들어 아세테이트)를 포함하지 않는 음이온성 포스페이트를 포함하여, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 비-자연 발생 포스페이트를 포함하는 포스페이트 기의 변형을 지칭한다. 변형된 포스페이트 기는 또한, 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 예를 들어, 포스포로티오에이트를 포함하는, 인-함유 뉴클레오타이드간 연결 기, 및 비-인 함유 연결 기 둘 모두를 포함하는, 비-자연 발생 뉴클레오타이드간 연결 기를 포함한다.
- [0095] **변형된 당 모이어티:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "변형된 당 모이어티"는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 치환된 당 모이어티 또는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 당 유사체를 지칭한다.
- [0096] **천연 핵염기:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "천연 핵염기"는 RNA 및 DNA의 5일째, 자연 발생 복소환형 핵염기, 즉, 퓨린 염기: 아데닌 (A) 및 구아닌 (G), 및 피리미딘 염기: 티민 (T), 시토신 (C), 및 우라실 (U)을 지칭한다.
- [0097] **천연 뉴클레오사이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "천연 뉴클레오사이드"는 포스페이트 기에 연결되지 않는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 천연 당 모이어티와의 N-글리코시드 연결에서 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 천연 핵염기를 지칭한다.
- [0098] **천연 뉴클레오타이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "천연 뉴클레오타이드"는 포스페이트 기에 연결되지 않는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 천연 당 모이어티와의 N-글리코시드 연결에서 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 천연 핵염기를 지칭한다.
- [0099] **천연 당 모이어티:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "천연 당 모이어티"는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 리보푸라노실 또는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 데옥시리보푸라노실을 지칭한다.
- [0100] **핵산 억제제 분자:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "핵산 억제제 분자"는 표적 유전자의 발현을 감소하거나 제거하는 올리고뉴클레오타이드 분자를 지칭하되 상기 올리고뉴클레오타이드 분자는 표적 유전자 mRNA에서 서열을 구체적으로 표적하는 영역을 함유한다. 전형적으로, 핵산 억제제 분자의 표적화 영역은 명시된 표적 유전자에 핵산 억제제 분자의 효과를 유도하기 위해 표적 유전자 mRNA에서 서열에 충분히 상보성인 서열을 포함한다. 핵산 억제제 분자는 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 및/또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0101] **핵염기:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "핵염기"는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 천연 핵염기, (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 변형된 핵염기, 또는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 보편적인 핵염기를 지칭한다.
- [0102] **뉴클레오사이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "뉴클레오사이드"는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 천연 뉴클레오사이드 또는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 변형된 뉴클레오사이드를 지칭한다.
- [0103] **뉴클레오타이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "뉴클레오타이드"는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 천연 뉴클레오타이드 또는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 변형된 뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0104] **돌출부:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "돌출부"는 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 어느 한쪽 가닥의 어느 한쪽 단부에서 말단 비-염기 짝짓기 뉴클레오타이드(들)을 지칭한다. 특정 구현예에서, 돌출부는 제1 가닥 또는 영역이 듀플렉스를 형성하는 상보성 가닥의 말단을 넘어 확장하는 하나의 가닥 또는 영역에서 비롯한다. 염기 쌍의 수소 결합을 통해 듀플렉스를 형성할 수 있는 2개의 올리고뉴클레오타이드 영역의 한쪽 또는 양쪽은 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 영역에 의해 공유된 상보성의 3'- 및/또는 5'-말단을 넘어 확장하는 5'- 및/또는 3'-말단을 가질 수 있다. 듀플렉스의 3'- 및/또는 5'-말단을 넘어 확장하는 단일-가닥 영역은 돌출부로 지칭된다.
- [0105] **약제학적 조성물:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "약제학적 조성물"은 약리적 유효량의 이중-가닥 핵산 억제제 분자 및 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다.
- [0106] **약제학적으로 허용가능한 부형제:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용가능한 부형제"는 부형제가 합리적인 유익/유해 비율에 비례한 과도한 유해한 부작용 (예컨대 독성, 자극, 및 알러지성 반응) 없이 인간 및/또는 동물과의 사용에 적합한 것임을 의미한다.
- [0107] **포스페이트 모방체:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "포스페이트 모방체"는 포스페이트 기의 정전 및 입

체 특성을 모방하는 올리고뉴클레오타이드의 5'-단부 말단에서 화학 모이어티를 지칭한다. 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부착될 수 있는 많은 포스페이트 모방체는 개발되어 왔다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,927,513; Prakash 등 NUCLEIC ACIDS RES., 2015,43(6):2993-3011을 참고한다). 전형적으로, 이들 5'-포스페이트 모방체는 포스파타제-저항성 연결을 함유한다. 적합한 포스페이트 모방체는, 국제공개 번호 WO 2018/045317(이는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되어 있음)에서 기재된 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드의 5'-단부 뉴클레오타이드의 당 모이어티 (예를 들어, 리보오스 또는 데옥시리보스 또는 이의 유사체)의 4'-탄소에 결합되는 5'-포스포네이트, 예컨대 5'-메틸렌포스포네이트 (5'-MP) 및 5'-(E)-비닐포스포네이트 (5'-VP) 그리고 4'-포스페이트 유사체, 예컨대 4'-옥시메틸포스포네이트, 4'-티오메틸포스포네이트, 또는 4'-아미노메틸포스포네이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 4'-옥시메틸포스포네이트는 식 $-O-CH_2-PO(OH)_2$ 또는 $-O-CH_2-PO(OR)_2$ 에 의해 제시되고, 식 중 R은 H, CH_3 , 알킬 기, 또는 보호기로부터 독립적으로 선택된다. 특정 구현예에서, 알킬 기는 CH_2CH_3 이다. 더욱 전형적으로, R은 H, CH_3 , 또는 CH_2CH_3 으로부터 독립적으로 선택된다. 다른 변형은 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 대하여 개발되어 왔다 (예를 들어, WO 2011/133871을 참고한다).

[0108] **보호기:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "보호기"는 원하는 반응의 특정 조건 하에서 작용기를 가역적으로 무반응성으로 만드는 기로서 종래의 화학적 의미에서 사용된다. 원하는 반응 후, 보호기는 제거되어 보호된 작용기를 탈보호할 수 있다. 모든 보호기는 합성중인 분자의 실질적인 부분을 파괴하지 않는 조건 하에서 제거 가능해야 한다.

[0109] **감소하다(한다):** 용어 "감소하다" 또는 "감소한다"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 당업계에서 일반적으로 허용되는 바와 같이 그것의 의미를 지칭한다. 핵산 억제제 분자와 관련하여, 상기 용어는, 핵산 억제제 분자의 부재 하에서 관측된 것 미만으로, 유전자의 발현, 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 서브유닛을 인코딩하는 RNA 분자 또는 등가 RNA 분자의 수준, 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 서브유닛의 활성에서의 감소를 일반적으로 지칭한다.

[0110] **리보푸라노실:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "리보푸라노실"은 자연 발생 RNA에서 발견되고 아래 설명된 바와 같이, 2'-탄소에 하이드록실 기를 갖는 푸라노실을 지칭한다:



[0111]

[0112] **리보뉴클레오타이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "리보뉴클레오타이드"는 당 모이어티의 2'-위치에서 하이드록실 기를 갖는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 천연 뉴클레오타이드 또는 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 변형된 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0113] **센스 가닥:** 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥: 안티센스 가닥 및 센스 가닥을 포함한다. 센스 가닥 또는 이의 영역은 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 안티센스 가닥 또는 이의 영역에 부분적으로, 실질적으로 또는 완전히 상보성이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 또한 안티센스 가닥에 비-상보성인 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 비-상보성 뉴클레오타이드는 상보성 서열의 어느 한쪽에 있을 수 있거나 상보성 서열의 양쪽에 있을 수 있다. 특정 구현예에서, 센스 가닥 또는 이의 영역이 안티센스 가닥 또는 이의 영역에 부분적으로 또는 실질적으로 상보성인 경우, 비-상보성 뉴클레오타이드는 상보성의 하나 이상의 영역 (예를 들어, 하나 이상의 미스매치) 사이 위치할 수 있다. 센스 가닥은 또한 소위 패신저 가닥이다.

[0114] **대상체:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는, 마우스, 토끼, 및 인간을 포함하는, 임의의 포유동물을 의미한다. 일 구현예에서, 대상체는 인간이다. 용어들 "개체" 또는 "환자"는 "대상체"와 교환가능하기 위한 것이다.

[0115] **치환체 또는 치환된:** 용어들 "치환체" 또는 "치환된"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 주어진 구조내 수소 라디칼의, 치환체의 라디칼로의 대체를 지칭한다. 임의의 주어진 구조내 1개 초과 위치가 1개 초과의 치환체로

치환될 수 있는 경우, 치환체는 달리 나타내지 않는 한 모든 위치에서 어느 한쪽 동일 또는 상이할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "치환된"은 유기 화합물과 양립가능한 모든 허용되는 치환체를 포함하도록 고려된다. 허용되는 치환체는 유기 화합물의 비환형 및 환형, 분지 및 비분지, 탄소환형 및 복소환형, 방향족 및 비방향족 치환체를 포함한다. 본 개시내용은 유기 화합물의 허용되는 치환체에 의해 임의의 방식으로 제한되지 위한 것은 아니다.

[0116] **치환된 당 모이어티:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "치환된 당 모이어티"는 하나 이상의 변형을 포함하는 푸라노실을 포함한다. 전형적으로, 변형은 당의 2'-, 3'-, 4'-, 또는 5'-탄소 위치에서 발생한다. 특정 구현예에서, 치환된 당 모이어티는 푸라노실의 4-탄소와 2'-탄소를 연결하는 브릿지를 포함하는 이환형 당 모이어티이다.

[0117] **당 유사체:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "당 유사체"는 푸라노실을 포함하지 않고 뉴클레오타이드의 자연 발생 당 모이어티를 대체할 수 있는 구조를 지칭하고, 이로써 생성된 뉴클레오타이드는 (1) 올리고뉴클레오타이드로의 혼입 및 (2) 상보성 뉴클레오타이드에 대한 혼성화를 할 수 있다. 그와 같은 구조는 전형적으로 푸라노실, 예컨대 상이한 수의 원자를 포함하는 고리 (예를 들어, 4, 6, 또는 7-원 고리)에 대한 상대적으로 단순한 변화; 푸라노실의 산소의 비-산소 원자 (예를 들어, 탄소, 황, 또는 질소)로의 대체; 또는 원자의 수에서의 변화 및 산소의 대체 둘 모두를 포함한다. 그와 같은 구조는 또한 치환된 당 모이어티에 대하여 기재된 것들과 상응하는 치환을 포함할 수 있다. 당 유사체는 또한 더욱 복잡한 당 대체물질 (예를 들어, 펩타이드 핵산의 비-고리계)를 포함한다. 당 유사체는 비제한적으로 모폴리노, 사이클로핵세닐 및 사이클로핵시톨을 포함한다.

[0118] **당 모이어티:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "당 모이어티"는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드의 천연 당 모이어티 또는 변형된 당 모이어티를 지칭한다.

[0119] **표적 부위:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "표적 부위" "표적 서열", "표적 핵산", "표적 영역", "표적 유전자"는 상호교환적으로 사용되고 그 표적 서열에 부분적으로, 실질적으로, 또는 완벽하게 또는 충분히 상보성인 그것의 가이드/안티센스 영역 내에서 서열을 함유하는 RNAi 억제제 분자에 의해 매개된 절단에 대하여, 예를 들어, "표적되는" RNA 또는 DNA 서열을 지칭한다.

[0120] **테트라루프:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "테트라루프"는 인접한 왓슨-크릭 혼성화된 뉴클레오타이드의 안정성에 기여하는 안정한 이차 구조를 형성하는 루프 (단일가닥 영역)를 지칭한다. 이론에 제한됨 없이, 테트라루프는 적층 상호작용에 의해 인접한 왓슨-크릭 염기 쌍을 안정화할 수 있다. 또한, 테트라루프내 뉴클레오타이드 중에서 상호작용은 비제한적으로 비-왓슨-크릭 염기 짝짓기, 적층 상호작용, 수소 결합, 및 접촉 상호작용을 포함한다 (Cheong 등, *Nature* 1990; 346(6285):680-2; Heus and Pardi, *Science* 1991; 253(5016):191-4). 테트라루프는 랜덤 염기로 이루어지는 단순 모델 루프 서열로부터 예상된 것보다 더 높은 인접한 듀플렉스의 용융 온도 (T_m)에서의 증가를 부여한다. 예를 들어, 테트라루프는 적어도 2개의 염기 쌍 길이의 듀플렉스를 포함하는 헤어핀에 10 mM NaHPO₄ 내 적어도 50 °C, 적어도 55 °C, 적어도 56 °C, 적어도 58 °C, 적어도 60 °C, 적어도 65 °C 또는 적어도 75 °C의 용융 온도를 부여할 수 있다. 테트라루프는 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드, 및 이들의 조합을 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, 테트라루프는 4개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 특정 구현예에서, 테트라루프는 5개의 뉴클레오타이드로 구성된다.

[0121] RNA 테트라루프의 예는 테트라루프의 UNGC 계열 (예를 들어, UUCG), 테트라루프의 GNRA 계열 (예를 들어, GAAA), 및 CUUG 테트라루프를 포함하는, 테트라루프의 CUYG 계열을 포함한다. (Woese 등, *PNAS*, 1990, 87(21):8467-71; Antao 등, *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19(21):5901-5). RNA 테트라루프의 다른 예는 GANC, A/UGNN, 및 UUUM 테트라루프 계열 (Thapar 등, *Wiley Interdiscip. Rev RNA*, 2014, 5(1):1-28) 및 GGUG, RNYA, 및 AGNN 테트라루프 계열 (Bottaro 등, *Biophys J.*, 2017, 113:257-67)을 포함한다. DNA 테트라루프의 예는 테트라루프의 d(GNNA) 계열 (예를 들어, 테트라루프의 d(GTTA), d(GNRA)) 계열, 테트라루프의 d(GNAB) 계열, 테트라루프의 d(CNNG) 계열, 및 테트라루프의 d(TNCG) 계열 (예를 들어, d(TTCG))를 포함한다. (Nakano 등 *Biochemistry*, 2002, 41(48):14281-14292. Shinji 등, *Nippon Kagakkai Koen Yokoshu*, 2000, 78(2):731).

[0122] **T_m -증가 뉴클레오타이드:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 " T_m -증가 뉴클레오타이드"는 T_m -증가 뉴클레오타이드 없는 올리고뉴클레오타이드 듀플렉스와 비교하여 올리고뉴클레오타이드 듀플렉스의 용융 온도 (T_m)를 증가시키는 뉴클레오타이드를 지칭한다. T_m -증가 뉴클레오타이드는, 비제한적으로, 이환형 뉴클레오타이드, 삼환형 뉴클레오타이드, G-클램프 및 이의 유사체, 및 핵시톨 뉴클레오타이드를 포함한다. 변형된 당 모이어티 또는 변형된 핵염기를 갖는 특정 변형된 뉴클레오타이드는 또한 올리고뉴클레오타이드 듀플렉스의 T_m 을 증가시키는데 사

용될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 " T_m -증가 뉴클레오타이드"는 구체적으로 2'-OMe 또는 2'-F가 있는 당 모이어티의 2'-위치에서 변형된 뉴클레오타이드를 배제한다.

[0123] **트리루프:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "트리루프"는 인접한 왓슨-크릭 혼성화된 뉴클레오타이드의 안정성에 기여하고 3개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 안정한 이차 구조를 형성하는 루프 (단일가닥 영역)를 지칭한다. 이론에 제한됨 없이, 트리루프는 트리루프 내에서 뉴클레오타이드의 비-왓슨-크릭 염기 짝짓기 및 염기-적층 상호작용에 의해 안정화될 수 있다. (Yoshizawa 등, Biochemistry 1997; 36, 4761-4767). 트리루프는 또한 랜덤 염기로 이루어지는 단순 모델 루프 서열로부터 예상된 것보다 더 높은 인접한 듀플렉스의 용융 온도 (T_m)에서의 증가를 부여할 수 있다. 트리루프는 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드, 및 이들의 조합을 함유할 수 있다. 트리루프의 예는 트리루프의 GNA 계열 (예를 들어, GAA, GTA, GCA, 및 GGA)를 포함한다. (Yoshizawa 1997).

[0124] **치료적 유효량:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "치료적 유효량" 또는 "약리적 유효량"은 의도된 약리학적, 치료적 또는 예방적 결과를 생산하는데 효과적인 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 그 양을 지칭한다.

[0125] **보편적인 핵염기:** 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "보편적인 핵염기"는 자연 발생 핵산에서 전형적으로 발견된 염기들 중 하나 초과와 짝짓기할 수 있고 따라서 듀플렉스에서 그와 같은 자연 발생 염기를 치환할 수 있는 염기를 지칭한다. 염기는 각각의 자연 발생 염기와 짝짓기할 필요가 없다. 예를 들어, 특정 염기는 퓨린과 단독으로 또는 선택적으로, 또는 피리미딘과 단독으로 또는 선택적으로 짝짓기한다. 보편적인 핵염기는 왓슨-크릭 또는 비-왓슨-크릭 상호작용 (예를 들어, 휴그스틴 상호작용)을 통해 수소 결합을 형성함으로써 염기 짝짓기할 수 있다. 대표적 보편적인 핵염기는 이노신 및 그것의 유도체를 포함한다.

[0126] 상세한 설명

[0127] 본원은 줄기 루프 구조를 갖는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 갖는 이중-가닥 핵산 억제제 분자를 제공하되, 상기 줄기 루프 구조의 줄기 부분은 적어도 하나의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유한다. 실시예에서 나타난 바와 같이, T_m -증가 뉴클레오타이드, 예컨대 이환형 뉴클레오타이드의, 줄기 루프 구조의 줄기 부분으로의 혼입은, 부분적으로, 생체내 표적 mRNA 녹다운의 향상된 기간에 의해 입증된 바와 같이, 이중-가닥 핵산 억제제 분자에 증가된 안정성을 부여한다. 이환형 뉴클레오타이드의, 줄기 루프 구조의 줄기 부분으로의 혼입이 효력 감소 없이 줄기 부분이 단축됨을 허용함에 따라, 더 짧은 센스 가닥의 사용을 또한 허용한다. 더 짧은 센스 가닥의 사용은 제조 공정에서의 이점, 시간 및 비용 모두의 감소를 부여한다. 줄기의 길이 감소는 또한 그것의 감소된 분자량으로 인해 물 기준 상에서 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 더 많은 양을 투여하는 것이 가능하기 때문에 투약에서 이점을 부여한다.

[0128] 질환 치료용 조성물 및 방법을 포함하는, 시험관내 또는 생체내 표적 유전자의 수준 또는 발현을 감소시키기 위한 T_m -증가 뉴클레오타이드-변형된, 줄기 루프 핵산 억제제 분자 및 동종을 포함하는 조성물의 사용 방법이 또한 제공된다.

[0129] T_m -증가 뉴클레오타이드

[0130] 본 명세서에 개시된 핵산 억제제 분자는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 및 상기 센스 가닥에 존재하는 줄기 루프 구조의 줄기 부분 (D2)에서 적어도 하나의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유한다. 예를 들어, 도 10d를 참고한다. T_m -증가 뉴클레오타이드는 비제한적으로, 이환형 뉴클레오타이드, 삼환형 뉴클레오타이드, G-클램프 및 이의 유사체, 핵시톨 뉴클레오타이드, 또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0131] 이환형 뉴클레오타이드

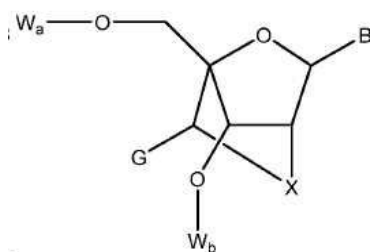
[0132] 이환형 뉴클레오타이드는 전형적으로 4 내지 7 원 고리의 2개의 원자를 연결하여 제2 고리를 형성함으로써, 이환형 구조를 생성하는 브릿지를 포함하는 (푸라노실을 비제한적으로 포함하는) 4 내지 7 원 고리를 갖는 당 모이어티를 갖는다. 그와 같은 이환형 뉴클레오타이드는 이환형 핵산 및 잠금 핵산, 각각에 대해 BNA 및 LNA를 포함하는 다양한 명칭을 갖는다. 이환형 뉴클레오타이드의 합성 및 핵산 화합물로의 그것의 혼입은 또한 예를 들어, Singh 등, Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin 등, TETRAHEDRON, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt 등, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar 등, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh 등, J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; U.S. 특허 번호 7,427,672, 7,053,207, 6,794,499, 6,770,748, 6,268,490 및 6,794,499; 및 공개된 U.S. 출원 20040219565, 20040014959,

20030207841, 20040192918, 20030224377, 20040143114 및 20030082807를 포함하는 문헌에서 보고되어 있고; 이들 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되어 있다.

[0133] T_m -증가 뉴클레오타이드는 이환형 당 모이어티를 포함하는 이환형 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정 구현예에서, 이환형 당 모이어티는 4 내지 7 구성원의 제1 고리 및 당 모이어티의 제1 고리의 임의의 2개의 원자를 연결하여 제2 고리를 형성하는 노쓰(North)-유형 당 확인을 형성하는 브릿지를 포함한다. 특정 구현예에서, 브릿지는 제1 고리의 2'-탄소 및 4'-탄소를 연결하여 제2 고리를 형성한다.

[0134] 전형적으로, 브릿지는 2 내지 8개의 원자를 함유한다. 특정 구현예에서, 브릿지는 3개의 원자를 함유한다. 특정 구현예에서, 브릿지는 4개의 원자를 함유한다. 특정 구현예에서, 브릿지는 5개의 원자를 함유한다. 특정 구현예에서, 브릿지는 6개의 원자를 함유한다. 특정 구현예에서, 브릿지는 7개의 원자를 함유한다. 특정 구현예에서, 브릿지는 8개의 원자를 함유한다. 특정 구현예에서, 브릿지는 8개 초과 원자를 함유한다.

[0135] 특정 구현예에서, 이환형 당 모이어티는 제2 고리를 형성하기 위해 상기 푸라노실의 2'-탄소 및 4'-탄소를 연결하는 브릿지를 포함하는 치환된 푸라노실이다. 특정 구현예에서, 이환형 뉴클레오타이드는 식 I의 구조를 갖는다:



식 I

[0136] 식 중, B는 핵염기이고;

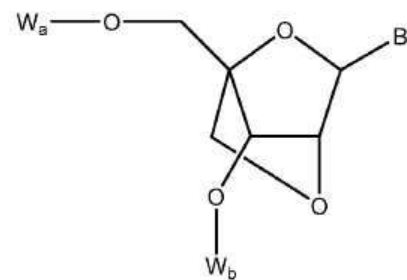
[0138] 식 중, G는 H, OH, NH_2 , $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬, $\text{C}_2\text{-C}_6$ 알케닐, $\text{C}_2\text{-C}_6$ 알키닐, 치환된 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬, 치환된 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 알케닐, 치환된 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 알키닐, 아실, 치환된 아실, 치환된 아미드, 티올, 또는 치환된 티오이고;

[0139] 식 중, X는 O, S, 또는 NR_1 이되, R_1 은 H, $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬, $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알콕시, 벤젠 또는 피렌이고; 그리고

[0140] 식 중, W_a 및 W_b 각각은 독립적으로, H, OH, 하이드록실 보호기, 인 모이어티, 또는 식 I에 의해 제시된 뉴클레오타이드를 또 다른 뉴클레오타이드에 또는 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이고, 그리고 W_a 또는 W_b 중 적어도 하나는 식 I에 의해 제시된 뉴클레오타이드를 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이다.

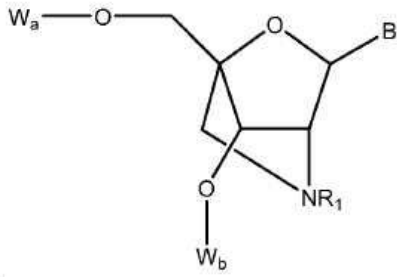
[0141] 식 I의 특정 구현예에서, G는 H이고, 그리고 X는 NR_1 이되, R_1 은 벤젠 또는 피렌이다. 식 I의 특정 구현예에서, G는 H이고, 그리고 X는 S이다.

[0142] 식 I의 특정 구현예에서, G는 H이고, 그리고 X는 O이다:



식 Ia

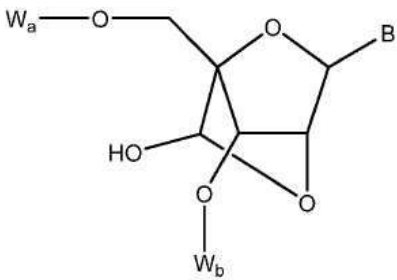
[0144] 식 I의 특정 구현예에서, G는 H이고, 그리고 X는 NR_1 이되, R_1 은 H, CH_3 , 또는 OCH_3 이다:



[0145] 식 Ib

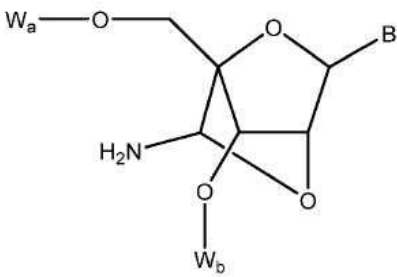
[0146] 식 I의 특정 구현예에서, G는 OH 또는 NH₂이고, 그리고 X는 O이다.

[0147] 식 I의 특정 구현예에서, G는 OH이고, 그리고 X는 O이다:



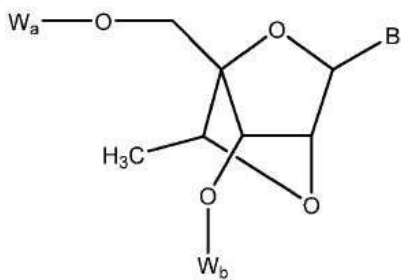
[0148] 식 Ic

[0149] 식 I의 특정 구현예에서, G는 NH₂이고, 그리고 X는 O이다:



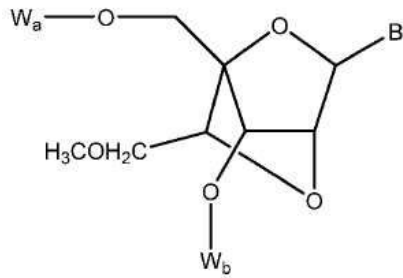
[0150] 식 Id

[0151] 식 I의 특정 구현예에서, G는 CH₃ 또는 CH₂OCH₃이고, 그리고 X는 O이다. 식 I의 특정 구현예에서, G는 CH₃이고, 그리고 X는 O이다:



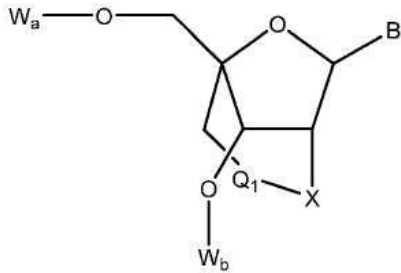
[0152] 식 Ie

[0153] 식 I의 특정 구현예에서, G는 CH₂OCH₃이고, 그리고 X는 O이다:



[0154] 식 II f

[0155] 특정 구현예에서, 이환형 뉴클레오타이드는 식 II의 구조를 갖는다:



[0156] 식 II

[0157] 식 중, B는 핵염기이고;

[0158] 식 중, Q_1 은 CH_2 또는 O이고;

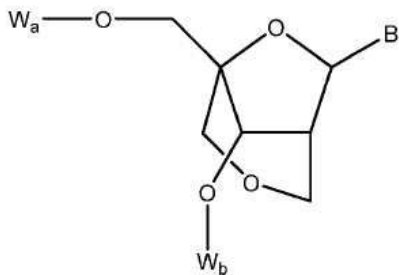
[0159] 식 중, X는 CH_2 , O, S, 또는 NR_1 이되, R_1 은 H, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, 벤젠 또는 피렌이고;

[0160] Q_1 이 O이면, X는 CH_2 이고;

[0161] Q_1 이 CH_2 이면, X는 CH_2 , O, S, 또는 NR_1 이되, R_1 은 H, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, 벤젠 또는 피렌이고;

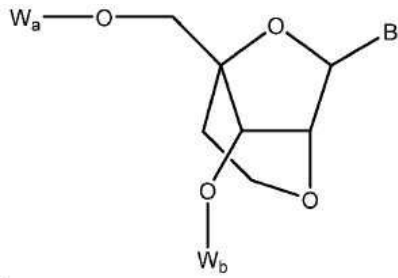
[0162] 식 중, W_a 및 W_b 각각은 독립적으로, H, OH, 하이드록실 보호기, 인 모이어티, 또는 식 II에 의해 제시된 뉴클레오타이드를 또 다른 뉴클레오타이드에 또는 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이고, 그리고 W_a 또는 W_b 중 적어도 하나는 식 II에 의해 제시된 뉴클레오타이드를 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이다.

[0163] 식 II의 특정 구현예에서, Q_1 은 O이고, 그리고 X는 CH_2 이다:



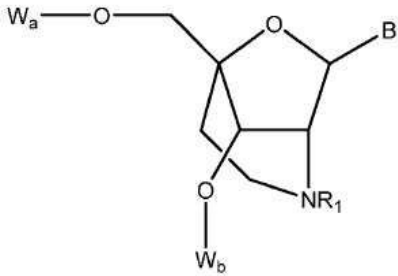
[0164] 식 II a

[0165] 식 II의 특정 구현예에서, Q_1 은 CH_2 이고, 그리고 X는 O이다:



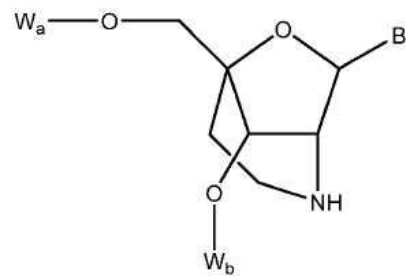
식 IIb

식 II의 특정 구현예에서, Q_1 은 CH_2 이고, 그리고 X는 NR_1 이되. R_1 은 H, CH_3 또는 OCH_3 이다:



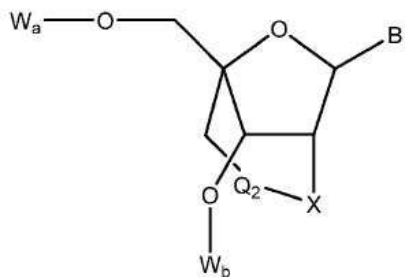
식 IIc

식 II의 특정 구현예에서, Q_1 은 CH_2 이고, 그리고 X는 NH이다:



식 IIId

특정 구현예에서, 이환형 뉴클레오타이드는 식 III의 구조를 갖는다:



식 III

식 중, B는 핵염기이고;

식 중, Q_2 는 O 또는 NR_1 이되, R_1 은 H, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, 벤젠 또는 피렌이고;

식 중, X는 CH_2 , O, S, 또는 NR_1 이되, R_1 은 H, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, 벤젠 또는 피렌이고;

식 중, Q_2 가 O이면, X는 NR_1 이고;

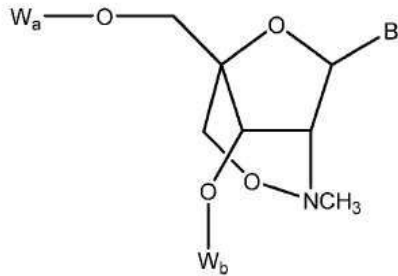
식 중, Q_2 가 NR_1 이면, X는 O 또는 S이고;

식 중, W_a 및 W_b 각각은 독립적으로, H, OH, 하이드록실 보호기, 인 모이어티, 또는 식 III에 의해 제시된 뉴클레오타이드를 또 다른 뉴클레오타이드에 또는 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이고, 그리고, W_a 또는 W_b 중 적어도 하나는 식 III에 의해 제시된 뉴클레오타이드를 올리고뉴클레오타이드에 부착

시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이다.

[0179] 식 III의 특정 구현예에서, Q_2 는 O이고, 그리고 X는 NR_1 이다. 식 III의 특정 구현예에서, Q_2 는 O이고, 그리고 X는 NR_1 이되, R_1 은 C_1 - C_6 알킬이다. 식 III의 특정 구현예에서, Q_2 는 O이고, 그리고 X는 NR_1 이고, 그리고 R_1 은 H 또는 CH_3 이다.

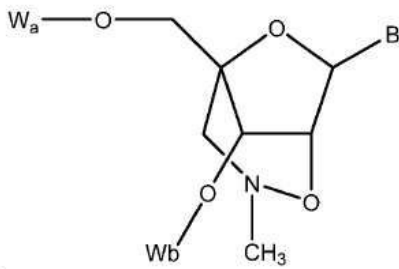
[0180] 식 III의 특정 구현예에서, Q_2 는 O이고, 그리고 X는 NR_1 이고, 그리고 R_1 은 CH_3 이다:



[0181] 식 IIIa

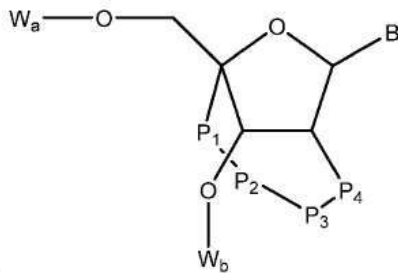
[0182] 식 III의 특정 구현예에서, Q_2 는 NR_1 이고, 그리고 X는 O이다. 식 III의 특정 구현예에서, Q_2 는 NR_1 이되, R_1 은 C_1 - C_6 알킬이고, 그리고 X는 O이다.

[0183] 식 III의 특정 구현예에서, Q_2 는 NCH_3 이고, 그리고 X는 O이다:



[0184] 식 IIIb

[0185] 특정 구현예에서, 이환형 뉴클레오타이드는 식 IV의 구조를 갖는다:



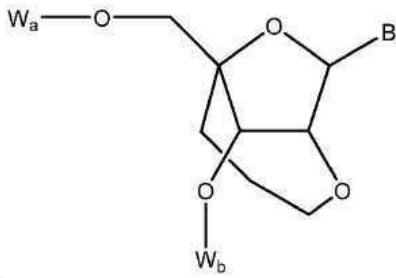
[0186] 식 IV

[0187] 식 중, B는 핵염기이고;

[0188] 식 중, P_1 및 P_3 은 CH_2 이고, P_2 은 CH_2 또는 O이고, 그리고 P_4 는 O이고; 그리고

[0189] 식 중, W_a 및 W_b 각각은 독립적으로, H, OH, 하이드록실 보호기, 인 모이어티, 또는 식 IV에 의해 제시된 뉴클레오타이드를 또 다른 뉴클레오타이드에 또는 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이고, W_a 또는 W_b 중 적어도 하나는 식 IV에 의해 제시된 뉴클레오타이드를 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이다.

[0190] 식 IV의 특정 구현예에서, P_1 , P_2 , 및 P_3 은 CH_2 이고, 그리고 P_4 는 O이다:

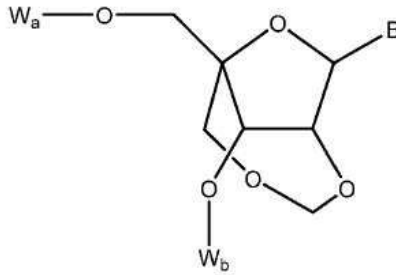


[0191]

식 IVa

[0192]

식 IV의 특정 구현예에서, P₁ 및 P₃은 CH₂이고, P₂은 O이고, 그리고 P₄는 O이다:

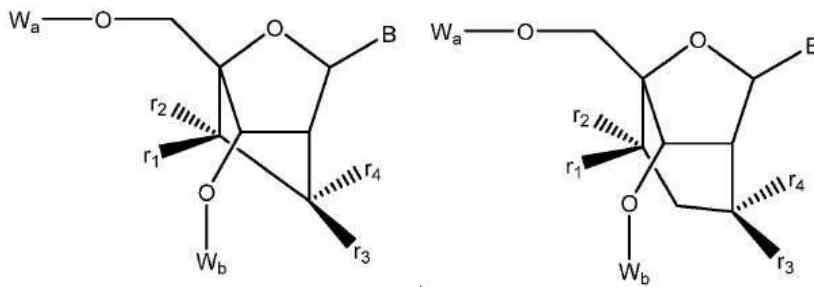


[0193]

식 IVb

[0194]

특정 구현예에서, 이환형 뉴클레오타이드는 식 Va 또는 Vb의 구조를 갖는다:



[0195]

식 Va 식 Vb

[0196]

식 중, B는 핵염기이고;

[0197]

식 중, r₁, r₂, r₃, 및 r₄ 각각은 독립적으로 H, 할로젠, C₁-C₁₂ 알킬, 치환된 C₁-C₁₂ 알킬, C₂-C₁₂ 알케닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알케닐, C₂-C₁₂ 알키닐; 치환된 C₂-C₁₂ 알키닐; C₁-C₁₂ 알콕시; 치환된 C₁-C₁₂ 알콕시, OT₁, ST₁, SOT₁, SO₂T₁, NT₁T₂, N₃, CN, C(=O)OT₁, C(=O)NT₁T₂, C(=O)T₁, O-C(=O)NT₁T₂, N(H)C(=NH)NT₁T₂, N(H)C(=O)NT₁T₂ 또는 N(H)C(=S)NT₁T₂이되, 각각의 T₁ 및 T₂은 독립적으로 H, C₁-C₆ 알킬, 또는 치환된 C₁-C₁₆ 알킬이거나; 또는

[0198]

r₁ 및 r₂ 또는 r₃ 및 r₄는 함께 =C(r₅)(r₆)이되, r₅ 및 r₆ 각각은 독립적으로 H, 할로젠, C₁-C₁₂ 알킬, 또는 치환된 C₁-C₁₂ 알킬이고; 그리고

[0199]

식 중, W_a 및 W_b 각각은 독립적으로, H, OH, 하이드록실 보호기, 인 모이어티, 또는 식 V에 의해 제시된 뉴클레오타이드를 또 다른 뉴클레오타이드에 또는 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이고, 그리고 식 중, W_a 또는 W_b 중 적어도 하나는 식 V에 의해 제시된 뉴클레오타이드를 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이다.

[0200]

특정 구현예에서, 이환형 당 모이어티는 제2 고리를 형성하기 위해 상기 푸라노실의 2'-탄소 및 4'-탄소를 연결하는 브릿지를 포함하는 치환된 푸라노실이되, 상기 푸라노실의 2'-탄소 및 4'-탄소를 연결하는 브릿지는, 비제한적으로 다음을 포함한다:

[0201]

a) 예를 들어 4'-CH₂-NH-O-2' (BNA^{NC}로도 알려져 있음), 4'-CH₂-N(CH₃)-O-2' (BNA^{NC}[NMe]로도 알려져 있음, 본 명

[0202]

세서에 전체적으로 참고로 포함되어 있는 미국 특허 번호 7,427,672에 기재된 바와 같음)를 포함하는, 4'-CH₂-O-N(R)-2' 및 4'-CH₂-N(R)-O-2'(여기서, R은 H, C₁-C₁₂ 알킬, 또는 보호기임);

[0203] b) 4'-CH₂-2'; 4'-(CH₂)₂-2'; 4'-(CH₂)₃-2'; 4'-(CH₂)-O-2' (LNA로도 알려져 있음); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA로도 알려져 있음); 4'-CH(CH₃)-O-2' (cEt로도 알려져 있음); 및 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (cMOE로도 알려져 있음), 및 이의 유사체 (본 명세서에 전체적으로 참고로 포함되어 있는 미국 특허 번호 7,399,845에 기재된 바와 같음);

[0204] c) 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' 및 이의 유사체 (본 명세서에 전체적으로 참고로 포함되어 있는 미국 특허 번호 8,278,283에 기재된 바와 같음);

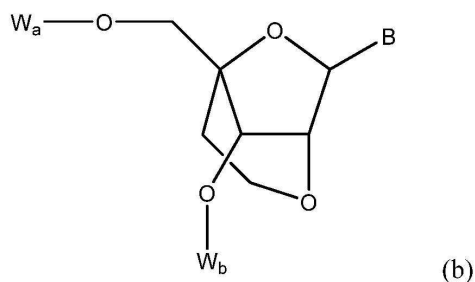
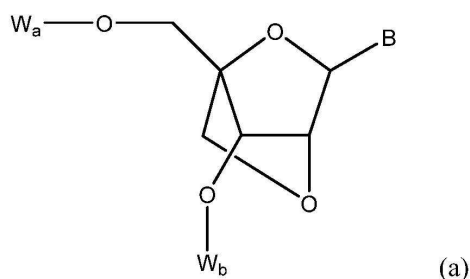
[0205] d) 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' 및 이의 유사체 (본 명세서에 전체적으로 참고로 포함되어 있는 미국 특허 번호 8,278,425에 기재된 바와 같음);

[0206] e) 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' 및 이의 유사체 (본 명세서에 전체적으로 참고로 포함되어 있는 미국 특허 공보 번호 2004/0171570에 기재된 바와 같음);

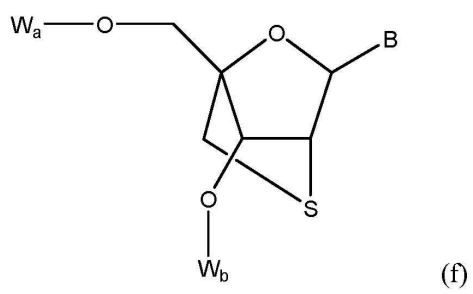
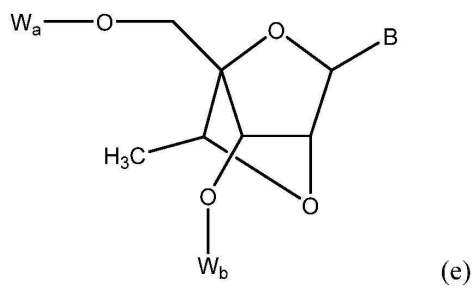
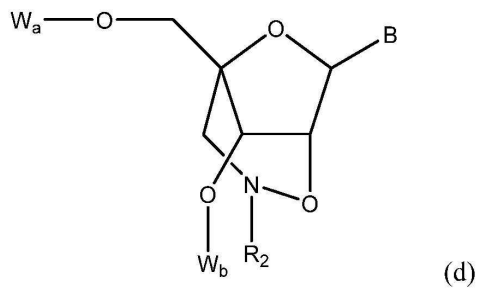
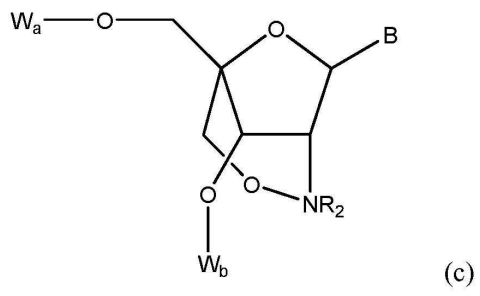
[0207] f) 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' 및 이의 유사체 (본 명세서에 전체적으로 참고로 포함되어 있는 Chattopadhyaya 등, J. Org. Chem., 2009, 74, 118-34에 기재된 바와 같음); 및

[0208] g) 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' 및 이의 유사체 (본 명세서에 전체적으로 참고로 포함되어 있는 미국 특허 번호 8,278,426에 기재된 바와 같음).

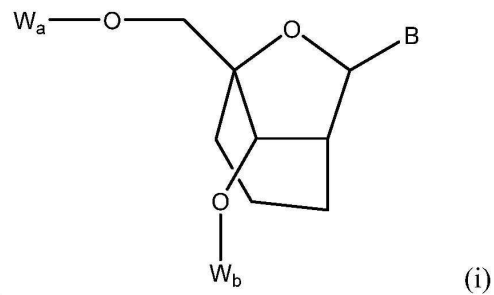
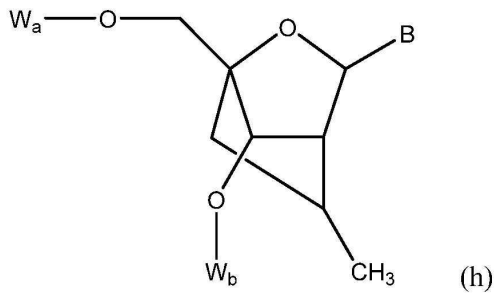
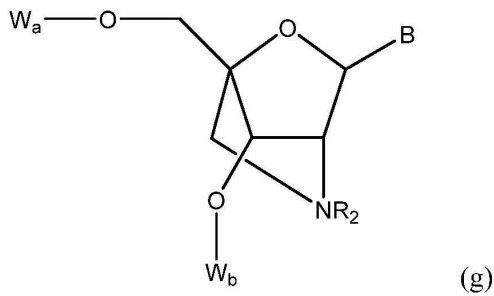
[0209] 특정 구현예에서, 이환형 뉴클레오타이드 (BN)은 하기 중 하나 이상이다: 아래에서 나타낸 바와 같은 (a) 메틸렌옥시 BN, (b) 에틸렌옥시 BN, (c) 아미노옥시 BN; (d) 옥시아미노 BN, (e) 메틸(메틸렌옥시) BN (구속된 에틸 또는 cET로도 알려져 있음), (f) 메틸렌-티오 BN, (g) 메틸렌 아미노 BN, (h) 메틸 탄소환형 BN, 및 (i) 프로필렌 탄소환형 BN.



[0210]



[0211]



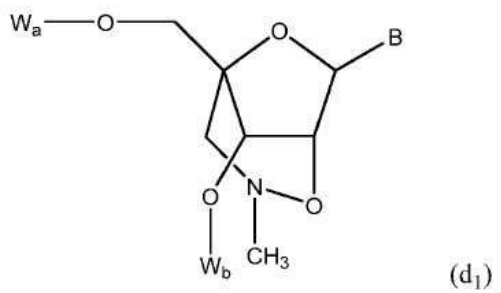
[0212]

[0213]

상기의 (a) 내지 (i)의 이환형 뉴클레오타이드에서, B는 핵염기이고, R₂는 H 또는 CH₃이고, 그리고 W_a 및 W_b 각각은 독립적으로, H, OH, 하이드록실 보호기, 인 모이어티, 또는 상기 이환형 뉴클레오타이드를 또 다른 뉴클레오타이드에 또는 올리고뉴클레오타이드에 연결시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이고, 그리고 W_a 또는 W_b 중 적어도 하나는 상기 이환형 뉴클레오타이드를 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 뉴클레오타이드간 연결 기이다.

[0214]

옥시아미노 BN (d)의 일 구현예에서, R₂는 아래와 같이 CH₃이다 (BNA^{NC} [NMe]로도 알려져 있음):



[0215]

[0216]

특정 구현예에서, 이환형 당 모이어티 및 그와 같은 이환형 당 모이어티를 혼입하는 이환형 뉴클레오타이드는 이성질체 구성에 의해 추가로 정의된다. 특정 구현예에서, 이환형 당 모이어티 또는 뉴클레오타이드는 α-L 구성이다. 특정 구현예에서, 이환형 당 모이어티 또는 뉴클레오타이드는 β-D 구성이다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 이환형 당 모이어티 또는 뉴클레오타이드는 α-L 구성 (α-L LNA)에서 2'-O-CH₂-4')를 포함한다. 특정 구현예에서, 이환형 당 모이어티 또는 뉴클레오타이드는 R 구성이다. 특정 구현예에서, 이환형 당 모이어티 또는 뉴클레오타이드는 S 구성이다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 이환형 당 모이어티 또는 뉴클레오타이드는 S-구성에서 4'-CH(CH₃)-O-2' 브릿지 (즉, cEt)를 포함한다.

- [0217] **삼환형 뉴클레오타이드**
- [0218] 특정 구현예에서, T_m -증가 뉴클레오타이드는 삼환형 뉴클레오타이드일 수 있다. 삼환형 뉴클레오타이드의 합성 및 핵산 화합물의 그것의 혼입은 예를 들어, Steffens 등, J. Am. Chem. Soc. 1997;119:11548-11549; Steffens 등, J. Org. Chem. 1999;121(14):3249-3255; Renneberg 등, J. Am. Chem. Soc. 2002;124:5993-6002; Ittig 등, NUCLEIC ACIDS RES. 2004;32(1):346-353; Scheidegger 등, Chemistry 2006;12:8014-8023; Ivanova 등, Oligonucleotides 2007;17:54-65를 포함하는 문헌에 보고되어 있고; 이들 각각은 각각의 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되어 있다.
- [0219] 특정 구현예에서, 삼환형 뉴클레오타이드는 트리사이클로 뉴클레오타이드 (또한 소위 트리사이클로 DNA)이되, 상기 3'-탄소 및 5'-탄소 중심은 예를 들어 아래에서 논의된 바와 같이 사이클로프로판 고리에 융합된 에틸렌에 의해 연결된다: Leumann CJ, Bioorg. Med. Chem. 2002; 10:841-854 및 공개된 U.S. 출원 2015/0259681 및 2018/0162897(이들 각각은 본 명세서에 참고로 포함되어 있음). 특정 구현예에서, 삼환형 뉴클레오타이드는 제2 고리를 형성하기 위해 상기 푸라노실의 2'-탄소 및 4'-탄소를 연결하는 브릿지를 포함하는 치환된 푸라노실 고리를 포함하고, 그리고 제3 융합 고리는 예를 들어, 공개된 U.S. 출원 2015/0112055(이는 본 명세서에 참고로 포함되어 있음)에서 논의된 바와 같이 5'-탄소를, 상기 푸라노실의 2'-탄소 및 4'-탄소를 연결하는 브릿지의 메틸렌 기에 연결하는 기로부터 생성된다.
- [0220] **다른 T_m -증가 뉴클레오타이드**
- [0221] 이환형 및 삼환형 뉴클레오타이드 외에, 다른 T_m -증가 뉴클레오타이드는 본 명세서에 기재된 핵산 억제제 분자에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 특정 구현예에서, T_m -증가 뉴클레오타이드는 G-클램프, 구아니딘 G-클램프 또는 이의 유사체 (Wilds 등, Chem, 2002;114:123 및 Wilds 등, Chim Acta 2003;114:123), 헥시톨 뉴클레오타이드 (Herdewijn, Chem. Biodiversity 2010;7:1-59), 또는 변형된 뉴클레오타이드이다. 변형된 뉴클레오타이드는 예를 들어 다음을 포함하는 본 명세서에서 기재된 바와 같은 변형된 핵염기를 가질 수 있다: 5-브로모-우라실, 5-아이오도-우라실, 5-프로피닐-변형된 피리미딘, 또는 2-아미노 아데닌 (또한 소위 2,6-디아미노퓨린) (Deleavey 등, Chem. & Biol. 2012;19:937-54) 또는 2- 티오 우리딘, 5 Me-티오 우리딘, 및 슈도 우리딘. 변형된 뉴클레오타이드는 또한 예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함되어 있는 미국 특허 번호 8,975,389에 기재되어 있거나, 본 명세서에 기재된 바와 같은 변형된 당 모이어티를 가질 수 있고, 단, T_m -증가 뉴클레오타이드는 2'-F 또는 2'-OMe를 갖는 당 모이어티의 2'-탄소에서 변형되지 않는다.
- [0222] 특정 구현예에서, T_m -증가 뉴클레오타이드는 이환형 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, T_m -증가 뉴클레오타이드는 삼환형 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, T_m -증가 뉴클레오타이드는 G-클램프, 구아니딘 G-클램프 또는 이의 유사체이다. 특정 구현예에서, T_m -증가 뉴클레오타이드는 헥시톨 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, T_m -증가 뉴클레오타이드는 이환형 또는 삼환형 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, T_m -증가 뉴클레오타이드는 이환형 뉴클레오타이드, 삼환형 뉴클레오타이드, 또는 G-클램프, 구아니딘 G-클램프 또는 이의 유사체이다. 특정 구현예에서, T_m -증가 뉴클레오타이드는 이환형 뉴클레오타이드, 삼환형 뉴클레오타이드, G-클램프, 구아니딘 G-클램프 또는 이의 유사체, 또는 헥시톨 뉴클레오타이드이다.
- [0223] 특정 구현예에서, T_m -증가 뉴클레오타이드는 혼입당 적어도 2°C까지 핵산 억제제 분자의 제2 듀플렉스 (D2)의 T_m 을 증가시킨다. 특정 구현예에서, T_m -증가 뉴클레오타이드는 혼입당 적어도 3°C까지 D2의 T_m 을 증가시킨다. 특정 구현예에서, T_m -증가 뉴클레오타이드는 혼입당 적어도 4°C까지 D2의 T_m 을 증가시킨다. 특정 구현예에서, T_m -증가 뉴클레오타이드는 혼입당 적어도 5°C까지 D2의 T_m 을 증가시킨다.
- [0224] **T_m -증가 뉴클레오타이드-변형된, 핵산 억제제 분자**
- [0225] 본원은 줄기 루프 구조를 갖는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 갖는 이중-가닥 핵산 억제제 분자를 개시하되, 상기 줄기 루프 구조의 줄기 부분은 적어도 하나의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유하고, 그리고 상기 센스 가닥 및 안티센스 가닥은, 각각이 5'-및 3'-말단을 가짐으로써 인접 올리고뉴클레오타이드를 형성하지 않는 별도의 가닥이다. 전형적인 줄기/루프-함유 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 센스 가닥 ("S") 및 안티센스 가닥 ("AS")이 강조된 도 10a에 나타나 있다.

- [0226] 센스 가닥은 도 10b 및 10c에서 나타난 바와 같이 안티센스 가닥 (AS)과 함께 제1 듀플렉스 (D1)를 형성하는 제1 영역 (R1) 및 제1 하위영역 (S1)을 제2 하위영역 (S2)과 연결하는 루프 (L)를 포함하는 제2 영역 (R2)으로 추가로 분할될 수 있다. S1 및 S2는 제2 듀플렉스 (D2), 또한 일명 줄기 또는 줄기 듀플렉스를 형성하도록 서로에 대해서 충분히 상보적이다. 예를 들어 도 10c 및 10d를 참고한다. 특정 구현예에서, 루프는 테트라루프이다. 제2 듀플렉스 (D2)는 하나 이상의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유한다. 전형적으로, T_m -증가 뉴클레오타이드는 이환형 뉴클레오타이드이다. 그러나, 본 명세서에 기재된 모든 이중-가닥 핵산 억제제 분자에서, 본 명세서에서 정의된 바와 같은 임의의 T_m -증가 뉴클레오타이드는, 이환형 뉴클레오타이드를 대체할 수 있다. 전형적으로, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 제2 듀플렉스 (D2) 외부의 임의의 T_m -증가 뉴클레오타이드 (예를 들어, 이환형 뉴클레오타이드)를 함유하지 않는다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 분자는 dsRNAi 억제제 분자이다.
- [0227] 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 특정 구현예에서, 센스 가닥은 적어도 하나의 T_m -증가 뉴클레오타이드 (예를 들어, 이환형 뉴클레오타이드)를 함유하는 줄기 듀플렉스 (D2) 및 루프 (L)를 함유하고, 그리고 그 길이가 20 내지 66 또는 21 내지 66개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 줄기 듀플렉스는 그 길이가 1 내지 6개의 염기쌍이다. 특정 구현예에서, 줄기 듀플렉스는 그 길이가 3 내지 6개의 염기쌍이다. 특정 구현예에서, 줄기 듀플렉스는 그 길이가 1 내지 3개의 염기쌍이다. 특정 구현예에서, 안티센스 가닥은 그 길이가 15 내지 40개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 루프는 그 길이가 3 내지 20개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 루프는 그 길이가 3 내지 8개의 뉴클레오타이드이다. 전형적으로, 루프는 테트라루프이다. 그러나, 본 명세서에 기재된 모든 이중-가닥 핵산 억제제 구현예에서, 테트라루프는 트리루프, 예컨대 뉴클레오타이드 서열 GAA를 갖는 트리루프로 대체될 수 있다.
- [0228] 특정 구현예에서, 센스 가닥은 줄기 듀플렉스 (D2) 및 테트라루프 (L)을 함유하고, 그리고 그 길이가 20 내지 66개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 안티센스 가닥은 그 길이가 15 내지 40개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 24 내지 54개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 24 내지 44개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 24 내지 38개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 줄기 듀플렉스 (D2)와 테트라루프 (L)를 함유하는 센스 가닥의 연장된 부분은 가닥의 3'-말단 상에 있다. 특정 다른 구현예에서, 줄기 (D2)와 테트라루프 (L)를 함유하는 센스 가닥의 연장된 부분은 가닥의 5'-말단 상에 있다.
- [0229] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하고, 상기 센스 및 안티센스 가닥은 별도의 가닥이고, 그리고 18 내지 24개의 염기쌍의 제1 듀플렉스 (D1)을 형성하고, 그리고 센스 가닥은 제2 듀플렉스 (D2) 및 테트라루프 (L)을 포함하고, 그리고 그 길이가 24 내지 36개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 상기 안티센스 가닥은 그 길이가 20 내지 24개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 28 내지 36, 28 내지 35, 또는 28 내지 34개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 24 내지 35개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 24 내지 34개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 26 내지 30개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 30 내지 32개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 24개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 26개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 28개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 30개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 32개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 34개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2)는 1 내지 5개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 1개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 2개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 3개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 안티센스 가닥은 그것의 3'-말단에서의 1, 2, 3, 또는 4개의 뉴클레오타이드의 단일-가닥 돌출부를 갖는다. 전형적으로, 안티센스 가닥의 3'-말단에서의 단일-가닥 돌출부는 2개의 뉴클레오타이드로 구성된다.
- [0230] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하고, 상기 센스 및 안티센스 가닥은 별도의 가닥이고, 그리고 19 내지 21개의 염기쌍의 제1 듀플렉스 (D1)를 포함하고, 상기 센스 가닥은 제2 듀플렉스 (D2) 및 테트라루프 (L)을 포함하고, 그리고 그 길이가 24 내지 34개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 상기 안티센스 가닥은 그 길이가 20 내지 23개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 28 내지 34개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 24 내지 30개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 제2 듀플렉스 (D2)는 1 내지 3개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 1개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 2개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 3개의 염

기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 그 길이가 30 내지 32개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 D2는 3 내지 5개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 3개의 염기쌍의 길이를 갖는다.

[0231] 특정 구현예에서, 안티센스 가닥은 그것의 3'-말단에서의 1 내지 6개의 뉴클레오타이드의 단일-가닥 돌출부를 갖는다. 특정 구현예에서, 안티센스 가닥은 그것의 3'-말단에서의 1, 2, 3, 또는 4개의 뉴클레오타이드의 단일-가닥 돌출부를 갖는다. 전형적으로, 안티센스 가닥의 3'-말단에서의 단일-가닥 돌출부는 2개의 뉴클레오타이드로 구성된다.

[0232] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하고, 상기 센스 및 안티센스 가닥은 별도의 가닥이고, 그리고 19 내지 21개의 염기쌍의 제1 듀플렉스 (D1)를 포함하고, 상기 센스 가닥은 19 내지 21개의 뉴클레오타이드의 제1 영역 (R1), 및 제1 하위영역 (S1)을 제2 하위영역 (S2)에 연결시키는 테트라루프 (L)을 포함하는 6 내지 16개의 뉴클레오타이드의 제2 영역 (R2)을 가지며, 각각의 S1 및 S2는 그 길이가 1 내지 6개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 제2 듀플렉스 (D2)를 형성하도록 서로에 대해서 충분히 상보적이고, 그리고 상기 안티센스 가닥은 그 길이가 20 내지 24개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 안티센스 가닥은 그것의 3'-말단에서 2개의 뉴클레오타이드의 단일-가닥 돌출부를 갖는다. 특정 구현예에서, R2는 그 길이가 10 내지 16개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, R2는 그 길이가 6개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, R2는 그 길이가 8개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, R2는 그 길이가 10개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 각각의 S1 및 S2는 그 길이가 1 내지 5개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 각각의 S1 및 S2는 그 길이가 1 내지 3개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 각각의 S1 및 S2는 그 길이가 3 내지 5개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 각각의 S1 및 S2는 그 길이가 1개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 각각의 S1 및 S2는 그 길이가 2개의 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 각각의 S1 및 S2는 그 길이가 3개의 뉴클레오타이드이다.

[0233] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하고, 상기 센스 및 안티센스 가닥은 별도의 가닥이고, 그리고 20개의 염기쌍의 제1 듀플렉스 (D1)을 형성하고, 상기 센스 가닥은 20개의 뉴클레오타이드의 제1 영역 (R1), 및 제1 하위영역 (S1)을 제2 하위영역 (S2)에 연결시키는 테트라루프 (L)을 포함하는 10개의 뉴클레오타이드의 제2 영역 (R2)을 가지며, 각각의 S1 및 S2는 그 길이가 3개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 3개의 염기쌍의 제2 듀플렉스 (D2)를 형성하고, 그리고 상기 안티센스 가닥은 그 길이가 22개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 그것의 3'-말단에서 2개의 뉴클레오타이드의 단일-가닥 돌출부를 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 제2 듀플렉스 중 각각의 뉴클레오타이드 (D2)는 이환형 뉴클레오타이드이고, 그리고 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 제2 듀플렉스 (D2)의 외부의 임의의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하지 않는다. 특정 구현예에서, D2는 2개의 염기쌍을 형성하는 4개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유한다. 특정 구현예에서, D2는 1개의 염기쌍을 형성하는 2개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유한다. 특정 구현예에서, D2는 3개의 쌍을 이루지 않는 이환형 뉴클레오타이드를 함유한다. 특정 구현예에서, D2는 2개의 쌍을 이루지 않는 이환형 뉴클레오타이드를 함유한다. 특정 구현예에서, D2는 1개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유한다. 다른 곳에 기재된 바와 같이, 각각의 이들 구현예에서, 이환형 뉴클레오타이드는 상이한 T_m-증가 뉴클레오타이드에 의해 대체될 수 있다.

[0234] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하고, 상기 센스 및 안티센스 가닥은 별도의 가닥이고, 그리고 20개의 염기쌍의 제1 듀플렉스 (D1)을 형성하고, 상기 센스 가닥은 20개의 뉴클레오타이드의 제1 영역 (R1), 및 제1 하위영역 (S1)을 제2 하위영역 (S2)에 연결시키는 테트라루프 (L)를 포함하는 10개의 뉴클레오타이드의 제2 영역 (R2)을 가지며, 각각의 S1 및 S2는 그 길이가 2개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 2개의 염기쌍의 제2 듀플렉스 (D2)를 형성하고, 그리고 상기 안티센스 가닥은 그 길이가 22개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 그것의 3'-말단에서 2개의 뉴클레오타이드의 단일-가닥 돌출부를 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 제2 듀플렉스 중 각각의 뉴클레오타이드 (D2)는 이환형 뉴클레오타이드이고, 그리고 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 제2 듀플렉스 (D2)의 외부의 임의의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하지 않는다. 특정 구현예에서, D2는 1개의 염기쌍을 형성하는 2개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유한다. 특정 구현예에서, D2는 2개의 쌍을 이루지 않는 이환형 뉴클레오타이드를 함유한다. 특정 구현예에서, D2는 1개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유한다. 다른 곳에 기재된 바와 같이, 각각의 이들 구현예에서, 이환형 뉴클레오타이드는 상이한 T_m-증가 뉴클레오타이드에 의해 대체될 수 있다.

[0235] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하고, 상기 센스 및 안티센스 가닥은 별도의 가닥이고, 그리고 20개의 염기쌍의 제1 듀플렉스 (D1)을 형성하고, 상기 센스 가닥은 20개의 뉴클레오타이드의 제1 영역 (R1), 및 제1 하위영역 (S1)을 제2 하위영역 (S2)에 연결시키는 테트라루프 (L)을

포함하는 10개의 뉴클레오타이드의 제2 영역 (R2)을 가지며, 각각의 S1 및 S2는 그 길이가 1개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 1개의 염기쌍의 제2 듀플렉스 (D2)를 형성하고, 그리고 상기 안티센스 가닥은 그 길이가 22개의 뉴클레오타이드이고, 그리고 그것의 3'-말단에서 2개의 뉴클레오타이드의 단일-가닥 돌출부를 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 제2 듀플렉스 중 각각의 뉴클레오타이드 (D2)는 이환형 뉴클레오타이드 (또는 이환형 뉴클레오타이드 이외의 T_m -증가 뉴클레오타이드)이고, 그리고 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 제2 듀플렉스 (D2) 외부의 임의의 이환형 뉴클레오타이드 (또는 이환형 뉴클레오타이드 이외의 T_m -증가 뉴클레오타이드)를 함유하지 않는다. 특정 구현예에서, 테트라루프는 다음의 서열: UCG (예를 들어, UUCG, UCCG, UACG, 또는 UGCG), GNRA (예를 들어, GAAA, GGAA, GAGA, GCAA, 또는 GUAA), CUYG (예를 들어, CUUG), GANC, A/UGNN (예를 들어, UGAA), 및 UUUM, GGUG, RNYA (예를 들어, AACAA), 및 AGNN (예를 들어, AGUA, AGAA, 또는 AGGG), GGAG, UUUG, CAAC, CUUGU, GACAA, 또는 GAAGA 중 하나를 갖되, N은 임의의 핵염기이고, R은 퓨린이고, Y는 피리미딘이고, 그리고 M은 A 또는 C이다. 특정 구현예에서, 테트라루프는 UCG, GNRA, 또는 CUUG로부터 선택된 RNA 테트라루프이다. 특정 구현예에서, 테트라루프는 서열 GNRA를 갖는다. 특정 구현예에서, 테트라루프는 서열 GAAA를 갖는다. 특정 구현예에서, 테트라루프는 d(GNAB), d(CNNG), 또는 d(TNCG)로부터 선택된 DNA 테트라루프이다.

[0236] 본 명세서에 기재된 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2)는 1 내지 5개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 1 내지 3개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 1 내지 2개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 3 내지 4개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 3 내지 5개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 1개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 2개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 3개의 염기쌍의 길이를 갖는다.

[0237] 본 명세서에 기재된 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2)는 2 내지 12개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하고, 3 내지 6개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 1 내지 6 또는 2 내지 6개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하고, 1 내지 3개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 1 내지 10 또는 2 내지 10개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하고, 3 내지 5개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 1 내지 8 또는 2 내지 8개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하고, 3 내지 4개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 6개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하고, 3개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 4개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하고, 2개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 2개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하고, 1개의 염기쌍의 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, D2는 3개의 쌍을 이루지 않는 이환형 뉴클레오타이드를 함유한다. 특정 구현예에서, D2는 2개의 쌍을 이루지 않는 이환형 뉴클레오타이드를 함유한다. 특정 구현예에서, D2는 1개의 쌍을 이루지 않는 이환형 뉴클레오타이드를 함유한다. 특정 구현예에서, D2 중 각각의 뉴클레오타이드는 이환형 뉴클레오타이드이다. 다른 곳에 기재된 바와 같이, 각각의 이들 구현예에서, 이환형 뉴클레오타이드는 상이한 T_m -증가 뉴클레오타이드에 의해 대체될 수 있다.

[0238] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 센스 가닥의 제1 영역 (R1) 또는 안티센스 가닥에서 임의의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하지 않는다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 제2 듀플렉스 (D2)의 외부의 임의의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하지 않는다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 센스 가닥의 제1 영역 (R1) 또는 안티센스 가닥에서 임의의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유하지 않는다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 제2 듀플렉스 (D2) 외부의 임의의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유하지 않는다.

[0239] 이중-가닥 핵산 분자의 제2 듀플렉스 (D2) 중 하나 이상의 이환형 뉴클레오타이드는 본 명세서에 기재되거나 달리 당업계에서 이용가능한 이환형 뉴클레오타이드 중 임의의 것일 수 있다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 분자는 제2 듀플렉스 (D2) 중 적어도 2개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하고, 그리고 제2 듀플렉스 중 각각의 이환형 뉴클레오타이드는 동일하다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 분자는 제2 듀플렉스 (D2) 중 적어도 2개의 상이한 이환형 뉴클레오타이드를 함유한다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 분자는 제2 듀플렉스 (D2) 중 이환형 뉴클레오타이드 이외의 적어도 2개의 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유하고, 그리고 제2 듀플렉스 중 각각의 T_m -증가 뉴클레오타이드는 동일하다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 분자는 제2 듀플렉스 (D2) 중 적어도 (이환형 뉴클레오타이드 이외의) 2개의 상이한 T_m -증가 뉴클레오타이드를 함유한다.

[0240] 본 명세서에 기재된 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2) 중 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 이환형 당 모이어티를 포함하되, 상기 이환형 당 모이어티는 상기 푸라노실의 2'-탄소 및

4'-탄소를 연결하는 브릿지를 포함하는 치환된 푸라노실이다.

[0241] 본 명세서에 기재된 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2) 중 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 식 I, II, III, IV, Va, 또는 Vb의 구조를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2) 중 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 식 I의 구조를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2) 중 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 식 II의 구조를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2) 중 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 식 III의 구조를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2) 중 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 식 IV의 구조를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2) 중 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 식 Va의 구조를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2) 중 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 식 Vb의 구조를 갖는다.

[0242] 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2) 중 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 식 Ia, Ib, Ic, Id, Ie, 또는 If 중 하나 이상의 구조를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2) 중 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 식 IIa, IIb, IIc, 또는 IId 중 하나 이상의 구조를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2) 중 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 식 IIIa 및/또는 IIIb의 구조를 갖는다. 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2) 중 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드는 식 IVa 및/또는 IVb의 구조를 갖는다.

[0243] 특정 구현예에서, 제2 듀플렉스 (D2) 중 적어도 하나의 이환형 뉴클레오타이드 (BN)은 하기 중 하나 이상이다: (a) 메틸렌옥시 BN, (b) 에틸렌옥시 BN, (c) 아미노옥시 BN; (d) 옥시아미노 BN, (e) 메틸(메틸렌옥시) BN (구속된 에틸 또는 cET로도 알려져 있음), (f) 메틸렌-티오 BN, (g) 메틸렌 아미노 BN, (h) 메틸 탄소환형 BN, 및 (i) 프로필렌 탄소환형 BN. 일 구현예에서, 적어도 하나의 BN은 (a) 메틸렌옥시 BN 또는 (d) 옥시아미노 BN)이 되, R₂는 CH₃이다. 일 구현예에서, 적어도 하나의 BN은 옥시아미노 BN (d)이 되 R₂는 CH₃이다.

[0244] 다른 변형

[0245] 본 명세서에 기재된 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 제2 듀플렉스 (D2)에서 적어도 하나의 T_m-증가 뉴클레오타이드 이외에 다른 뉴클레오타이드 변형을 함유할 수 있다. 전형적으로, 다중 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 뉴클레오타이드는 분자의 다양한 특성 예컨대 뉴클레아제에 대한 내성 또는 낮아진 면역원성을 개선하기 위해 변형된다. 예를 들어, Bramsen 등 (2009), NUCLEIC ACIDS RES., 37, 2867-2881을 참고한다. 많은 뉴클레오타이드 변형은, 특히 핵산 억제제 분자에 대해 올리고뉴클레오타이드 분야에서 사용되었다. 그와 같은 변형은 당 모이어티, 포스포디에스테르 결합, 및 핵염기를 포함하는 뉴클레오타이드의 임의의 부분에서 행해질 수 있다. 뉴클레오타이드 변형의 전형적인 예는 비제한적으로, 2'-F, 2'-O-메틸 ("2'-OMe" 또는 "2'-OCH₃"), 및 2'-O-메톡시에틸 ("2'-MOE" 또는 "2'-OCH₂CH₂OCH₃")을 포함한다. 변형은 또한 본 명세서에서 기재된 바와 같이 5'-탄소와 같은 뉴클레오타이드의 당 모이어티의 다른 일부에서 일어날 수 있다.

[0246] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 또한 당해 분야에서 알려진 바와 같이 그리고 본 명세서에서 기재된 바와 같이 1'-위치에서 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실 이외의 하나 이상의 변형된 핵염기를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 변형된 또는 보편적인 핵염기는 질소성 염기이다. 특정 구현예에서, 변형된 핵염기는 질소 원자를 함유하지 않는다. 예를 들어, U.S. 공개 특허 출원 번호 20080274462를 참고한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 핵염기 (무염기성)를 함유하지 않는다. 변형된 핵염기의 전형적인 예는 5'-메틸시토신이다.

[0247] RNA 및 DNA의 천연 발생 뉴클레오타이드간 연결은 3'-내지 5'-포스포디에스테르 결합이다. 변형된 포스포디에스테르 결합은 인 원자를 함유하는 뉴클레오타이드간 연결기 및 인 원자, 당해 분야에서 알려진 바와 같은 그리고 본 명세서에서 기재된 바와 같은 인 원자를 함유하지 않는 뉴클레오타이드간 연결기를 포함하는 비-자연 발생 뉴클레오타이드간 연결 기를 포함한다. 전형적으로, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 본 명세서에서 기재된 바와 같은 하나 이상의 인-함유 뉴클레오타이드간 연결 기를 함유한다. 다른 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 뉴클레오타이드간 연결 기 중 하나 이상은 본 명세서에서 기재된 바와 같은 비-인 함유 연결기이다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 하나 이상의 인-함유 뉴클레오타이드간 연결 기 및 하나 이상의 비-인 함유 뉴클레오타이드간 연결 기를 함유한다.

[0248] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 적어도 하나의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 기를 함유한다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 10개 미만, 예컨대 5개 미만의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 기를 함유한다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 4개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 기를 함유한다.

- [0249] 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 센스 및/또는 안티센스 가닥의 5'-말단은 천연 치환체, 예컨대 하이드록실 또는 포스페이트 기를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 하이드록실 기는 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 센스 및/또는 안티센스 가닥의 5'-단부 말단에 부착된다. 특정 구현예에서, 포스페이트 기는 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 센스 및/또는 안티센스 가닥의 5'-단부 말단에 부착된다. 전형적으로, 포스페이트는 올리고뉴클레오타이드 합성 전에 단량체에 첨가된다. 다른 구현예에서, 5'-인산화는, 핵산 억제제 분자가, 예를 들어, 세포질 C1p1 키나제에 의해 사이토졸에 도입된 후에 자연적으로 달성된다. 일부 구현예에서, 5'-말단 포스페이트는 포스페이트 기, 예컨대 5'-일인산염 $[(HO)_2(O)P-O-5']$, 5'-디포스페이트 $[(HO)_2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5']$ 또는 5'-삼인산 $[(HO)_2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5']$ 이다.
- [0250] 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 센스 및/또는 안티센스 가닥의 5'-말단은 또한 변형될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 센스 및/또는 안티센스 가닥의 5'-말단은 포스포르아미데이트 $[(HO)_2(O)P-NH-5']$, $(HO)(NH_2)(O)P-O-5']$ 에 부착된다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 센스 및/또는 안티센스 가닥의 5'-단부 말단은 포스페이트 모방체에 부착된다. 적합한 포스페이트 모방체는 5'-포스포네이트, 예컨대 5'-메틸렌포스포네이트 (5'-MP), 5'-(E)-비닐포스포네이트 (5'-VP)를 포함한다. Lima 등, Cell, 2012, 150-883-94; WO 2014/130607. 다른 적합한 포스페이트 모방체는 국제공개 번호 WO 2018/045317(이는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되어 있음)에 기재된 바와 같이 올리고뉴클레오타이드의 5'-단부 뉴클레오타이드의 당 모이어티 (예를 들어, 리보오스 또는 데옥시리보오스 또는 이의 유사체)의 4'-탄소에 결합된 4-포스페이트 유사체를 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 센스 및/또는 안티센스 가닥의 5'-말단은 옥시메틸포스포네이트에 부착되되, 상기 옥시메틸 기의 산소 원자는 당 모이어티 또는 이의 유사체의 4'-탄소에 결합된다. 다른 구현예에서, 포스페이트 유사체는 티오메틸포스포네이트 또는 아미노메틸포스포네이트이되, 상기 티오메틸 기의 황 원자 또는 아미노메틸 기의 질소 원자는 당 모이어티 또는 이의 유사체의 4'-탄소에 결합된다.
- [0251] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 하나 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드를 포함한다. 전형적으로, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 5개 미만의 데옥시리보뉴클레오타이드를 함유한다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 하나 이상의 리보뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 모든 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드이다.
- [0252] 특정 구현예에서, 당 모이어티를 함유하는 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 줄기 (제2 듀플렉스 또는 D2) 외부의 하나 이상의 뉴클레오타이드는 본 명세서에서 기재된 바와 같이 이환형 또는 삼환형 뉴클레오타이드에 존재하는 변형된 고리 구조를 비제한적으로 포함하는 변형된 고리 구조, 및 잠금해제 핵산 ("UNA")을 갖는다 (예를 들어, Snead 등 (2013), Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2,e103(doi: 10.1038/mtna.2013.36)을 참고한다).
- [0253] 특정 구현예에서 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 1개 또는 2개의 뉴클레오타이드는 글루타티온-민감한 모이어티로 가역적으로 변형된다. 전형적으로, 글루타티온-민감한 모이어티는 당 모이어티의 2'-탄소에 위치하고, 설포닐 기를 포함한다. 특정 구현예에서, 글루타티온-민감한 모이어티는, 예를 들어, 국제공개 번호 WO 2018/045317(이는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되어 있음)에 기재된 바와 같이 포스포르아미다이트 올리고뉴클레오타이드 합성 방법과 양립가능하다. 특정 구현예에서, 2개 초과 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 뉴클레오타이드는 글루타티온-민감한 모이어티로 가역적으로 변형된다. 특정 구현예에서, 대부분의 뉴클레오타이드는 글루타티온-민감한 모이어티로 가역적으로 변형된다. 특정 구현예에서, 모든 또는 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드는 글루타티온-민감한 모이어티로 가역적으로 변형된다.
- [0254] 적어도 하나의 글루타티온-민감한 모이어티는 전형적으로 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 5'- 또는 3'-단부 뉴클레오타이드에 위치한다. 그러나, 적어도 하나의 글루타티온-민감한 모이어티는 이중-가닥 핵산 억제제 분자에서 관심 임의의 뉴클레오타이드에 위치할 수 있다.
- [0255] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 완전히 변형되고, 상기 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오타이드가 변형되고; 전형적으로, 모든 뉴클레오타이드는 상기 당 모이어티의 2'-위치에서 변형된다. 특정 구현예에서, 완전히 변형된 핵산 억제제 분자는 가역 변형을 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 센스 가닥의 적어도 1, 예컨대 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 또는 36개의 뉴클레오타이드는 변형된다. 일부 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 안티센스 가닥의 적어도 1, 예컨대 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24개의 뉴클레오타

이드가 변형된다.

- [0256] 특정 구현예에서, 완전히 변형된 핵산 억제제 분자는 하나 이상의 가역, 글루타티온-민감한 모이어티로 변형된다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드는 변형된다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 뉴클레오타이드의 절반 초과는 가역 변형 이외의 화학 변형으로 변형된다. 특정 구현예에서, 1 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 뉴클레오타이드의 절반 미만은 가역 변형 이외의 화학 변형으로 변형된다. 변형은 핵산 억제제 분자 상의 기에서 일어날 수 있거나 또는 상이한 변형된 뉴클레오타이드는 산재될 수 있다.
- [0257] 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 특정 구현예에서, 1개 내지 모든 뉴클레오타이드는 2'-탄소에서 변형된다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 2'-F, 2'-OMe, 및/또는 2'-MOE로 부분적으로 또는 완전히 변형된다. 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 특정 구현예에서, 1개 내지 모든 인 원자는 변형되고, 1개 내지 모든 뉴클레오타이드는 당 모이어티의 2'-탄소에서 변형된다.
- [0258] 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 특정 구현예에서, 센스 및 안티센스 가닥 상의 모든 뉴클레오타이드는 당 모이어티의 2'-탄소에서 변형된다. 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 특정 구현예에서, 센스 및 안티센스 가닥 상의 모든 뉴클레오타이드는 상기 센스 가닥의 제2 영역 (R2)에서 뉴클레오타이드를 제외하고 당 모이어티의 2'-탄소에서 2'-F 또는 2'-OMe로 변형된다. 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 특정 구현예에서, 센스 및 안티센스 가닥 상의 모든 뉴클레오타이드는 T_m-증가 뉴클레오타이드를 제외하고 2'-F 또는 2'-OMe로 줄기 (제2 듀플렉스 또는 D2)에서 당 모이어티의 2'-탄소에서 변형된다. 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 특정 구현예에서, 센스 및 안티센스 가닥 상의 모든 뉴클레오타이드는 줄기 (제2 듀플렉스 또는 D2)에서 T_m-증가 뉴클레오타이드 및 당 리간드 모이어티, 예컨대 GalNAc에 접합된 루프 영역에서 뉴클레오타이드를 제외하고 2'-F 또는 2'-OMe로 당 모이어티의 2'-탄소에서 변형된다.
- [0259] **표적 유전자 발현을 감소시키는 방법**
- [0260] 본 명세서에서 기재된 바와 같은 이중-가닥 핵산 억제제 분자는, 관심 임의의 표적 유전자의 표적 mRNA 발현을 감소시키는 방법에서 사용될 수 있다. 전형적으로, mRNA 발현을 감소시키는 방법은 표적 유전자의 mRNA 발현을 감소시키는데 충분한 양으로 본 명세서에서 기재된 바와 같은 이중-가닥 핵산 억제제 분자를, 감소를 필요로 하는 샘플 또는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 본 방법은 *시험관내* 또는 *생체내*에서 수행될 수 있다.
- [0261] 표적 RNA의 수준 또는 활성은 현재 당업계에서 알려진 또는 나중에 개발되는 적합한 방법에 의해 결정될 수 있다. 표적 유전자의 "발현" 및/또는 표적 RNA를 측정하는데 사용된 방법이 표적 유전자 및 그것의 인코딩된 RNA의 특성에 좌우될 수 있음이 인정될 수 있다. 예를 들어, 표적 RNA 서열이 단백질을 인코딩하는 경우, 용어 "발현"은 (어느 한쪽 게놈성 또는 외인성 기원의) 표적 유전자로부터 유래된 단백질 또는 표적 RNA/전사체를 지칭할 수 있다. 그와 같은 사례에서 상기 표적 RNA의 발현은 직접적으로 표적 RNA/전사체의 양을 측정함으로써 또는 표적 RNA/전사체에 의해 인코딩된 단백질의 양을 측정함으로써 결정될 수 있다. 단백질은 단백질 검정에서 예컨대 염색 또는 면역블로팅에 의해 측정될 수 있거나, 단백질이 측정될 수 있는 반응을 촉매화하면, 반응 속도 측정에 의해 측정될 수 있다. 모든 그와 같은 방법은 당해 기술에 공지되어 있고 사용될 수 있다. 표적 RNA 수준이 측정되는 경우, RNA 수준의 기술적으로 인식된 검출 방법 (예를 들어, RT-PCR, 노던 블로팅, 등)은 사용될 수 있다. 상기 측정은 세포, 세포 추출물, 조직, 조직 추출물 또는 또 다른 적합한 원료 물질에서 실시될 수 있다.
- [0262] **약제학적 조성물**
- [0263] 본 개시내용은 본 명세서에서 기재된 바와 같은 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 치료적 유효량, 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0264] 이들 약제학적 조성물은 종래의 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있거나 멸균 여과될 수 있다. 수득한 수용액은 있는 그대로 사용하기 위해 포장되거나, 또는 동결건조될 수 있고, 상기 동결건조된 제제는 투여 전에 멸균 수성 부형제와 조합된다. 제제의 pH는 전형적으로 3 내지 11, 더 바람직하게는 5 내지 9 또는 6 내지 8, 및 가장 바람직하게는 7 내지 8, 예컨대 7 내지 7.5일 것이다.
- [0265] 본 개시내용의 약제학적 조성물은 치료 용도를 위해 적용된다. 따라서, 본 개시내용의 일 측면은 대상체에게 본 개시내용의 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 투여함으로써 질환 또는 병태를 앓고 있는 인간을 비제한적으로 포함하는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있는 약제학적 조성물을 제공한다. 특정 구현예에서, 질환 또는 병

태은 암, 본 명세서에서 기재된 바와 같이.

[0266] 특정 구현예에서, 본 개시내용은 필요로 하는 대상체의 치료용 약제의 제조를 위한, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 약제학적 조성물의 치료적 유효량의 용도를 특징으로 한다. 특정 구현예에서, 상기 대상체는 본 명세서에서 기재된 바와 같은 암을 가지고 있다.

[0267] **약제학적으로-허용가능한 부형제**

[0268] 본 개시내용에 유용한 약제학적으로-허용가능한 부형제는 전형적으로 종래의 것이다. Remington's Pharmaceutical Sciences(E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition, 1975)는, 하나 이상의 치료적 조성물의 약제학적 전달에 적합한 조성물 및 제형을 기재하고 있다. 약제학적으로-허용가능한 부형제로서 쓰일 수 있는 물질의 일부 예는 다음을 포함한다: 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 그것의 유도체, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 맥아; 젤라틴; 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌약 왁스; 오일, 예컨대 땅콩 오일, 목화씨 오일, 잇꽃 오일, 참깨 오일, 올리브 오일, 옥수수 오일 및 대두 오일; 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 알루미늄 하이드록사이드; (등장성 염수; 링거액); 에틸 알코올; pH 완충 용액; 폴리올, 예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 및 기타 동종의 것; 및 약제학적 제형에 이용된 다른 무독성 양립가능한 물질.

[0269] **투약 형태**

[0270] 약제학적 조성물은 통상적인 실시예 따라 선택될 수 있는 임의의 의도된 투여 경로를 위해 종래의 부형제로 제형화될 수 있다.

[0271] 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 본 명세서에서 기재된 바와 같은 이중-가닥 핵산 억제제 분자를 함유하고, 예를 들어, 피하, 근육내, 정맥내 또는 경막외 주입에 의해 비경구 투여에 적합하다. 전형적으로, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 비경구 투여를 위해 액체 형태로 제형화된다.

[0272] 비경구 투여에 적합한 투약 형태는, 예로써, 멸균 수용액, 염수, 저분자량 알코올 예컨대 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 젤라틴, 지방산 에스테르 예컨대 에틸 올레에이트, 및 기타 동종의 것을 포함하는 비경구 투여를 위한 하나 이상의 적합한 비히클을 전형적으로 포함한다. 비경구 제형은 당, 알코올, 산화방지제, 완충액, 정균제, 제형을 의도된 수령체의 혈액과 등장성으로 만드는 용질 또는 현탁화제 또는 증점제를 함유할 수 있다. 적절한 유체성은, 예를 들어, 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 이중-가닥 핵산 억제제를 함유하는 액체 제형은 동결건조될 수 있고 멸균 주입가능 용액과의 재구성 추후 사용을 위해 보관될 수 있다.

[0273] 약제학적 조성물은 잘 알려진 기술을 사용하여 국소 또는 경피 투여, 직장 또는 질 투여, 안구 투여, 비강 투여, 볼 투여, 또는 설하 투여를 포함하는 다른 투여 경로를 위해 또한 제형화될 수 있다.

[0274] **전달 제제**

[0275] 본 명세서에서 기재된 바와 같은 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 혼합되고, 캡슐화되고, 접합되거나 또는 달리 예를 들어 다음을 포함하는 다른 분자, 분자 구조 또는 화합물의 혼합물과 결합될 수 있다: 리포솜 및 지질 예컨대 U.S. 특허 번호 6,815,432, 6,586,410, 6,858,225, 7,811,602, 7,244,448 및 8,158,601에 개시된 것들; 폴리머성 물질 예컨대 U.S. 특허 번호 6,835,393, 7,374,778, 7,737,108, 7,718,193, 8,137,695 및 U.S. 공개특허 출원 번호 2011/0143434, 2011/0129921, 2011/0123636, 2011/0143435, 2011/0142951, 2012/0021514, 2011/0281934, 2011/0286957 및 2008/0152661에 개시된 것들; 캡시드, 캡소이드, 또는 흡수, 분포 또는 흡수를 돕기 위한 수용체 표적화 분자.

[0276] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 지질 나노입자 (LNP)에서 제형화된다. 지질-핵산 나노입자는 전형적으로, 복합체를 형성하기 위해 지질을 핵산과 혼합시켜 자발적으로 형성된다. 원하는 입자 크기 분포에 따라, 수득한 나노입자 혼합물은 예를 들어, 씨모배럴 압출기, 예컨대 LIPEX[®] 압출기 (Northern Lipids, Inc)를 사용하여 폴리카보네이트 멤브레인 (예를 들어, 100 nm 컷-오프)를 통해 선택적으로 압출될 수 있다. 치료 용도로 지질 나노입자를 제조하기 위해, 예를 들어, 투석 또는 접선 유동 여과에 의해 달성될 수 있는 나노입자 및/또는 교환 완충액을 형성하기 위해 사용된 용매 (예를 들어, 에탄올)를 제거하는 것이 바람직할 수 있다. 핵산 간섭 분자를 함유하는 지질 나노입자를 제조하는 방법은, 예를 들어 U.S. 공개 특허 출원 번호 2015/0374842 및

2014/0107178에 개시된 바와 같이 당해 기술에 공지되어 있다.

- [0277] 특정 구현예에서, LNP는 양이온성 리포좀 및 폐길화된 지질을 포함하는 코어 지질 구성요소를 포함한다. LNP는 하나 이상의 외피 지질, 예컨대 양이온성 지질, 구조 또는 중성 지질, 스테롤, 폐길화된 지질, 또는 이들의 혼합물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0278] LNP에서 사용하기 위한 양이온성 지질은 예를 들어 U.S. 공개 특허 출원 번호 2015/0374842 및 2014/0107178에서 논의된 바와 같이 당해 기술에 공지되어 있다. 전형적으로, 양이온성 지질은 생리적 pH에서 순(net) 양전하를 갖는 지질이다. 특정 구현예에서, 양이온성 리포좀은 DODMA, DOTMA, DL-048, 또는 DL-103이다. 특정 구현예에서 구조 또는 중성 지질은 DSPC, DPPC 또는 DOPC이다. 특정 구현예에서, 스테롤은 콜레스테롤이다. 특정 구현예에서, 폐길화된 지질은 DMPE-PEG, DSPE-PEG, DSG-PEG, DMPE-PEG2K, DSPE-PEG2K, DSG-PEG2K, 또는 DSG-mPEG이다. 일 구현예에서, 양이온성 지질은 DL-048, 폐길화된 지질은 DSG-mPEG이고, 그리고 하나 이상의 외피 지질은 DL-103, DSPC, 콜레스테롤, 및 DSPE-mPEG이다. 예를 들어, 이중-가닥 핵산 억제제 분자를 제형화하기 위해 사용될 수 있는 LNP의 하나의 비제한적인 구현예를 도시하는 도 13을 참고한다.
- [0279] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 올리고뉴클레오타이드의 관심 조직으로의 전달을 유도하는 리간드에 공유적으로 접합된다. 많은 그와 같은 리간드가 탐구되었다. 예를 들어, Winkler, Ther. Deliv. 4(7): 791-809 (2013)를 참고한다. 예를 들어, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 올리고뉴클레오타이드의 간으로의 흡수를 지시하기 위해 하나 이상의 당 리간드 모이어티 (예를 들어, N-아세틸갈락토사민 (GalNAc))에 접합될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,994,517; 미국 특허 번호 5,574,142; WO 2016/100401을 참고한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 리간드는 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 테트라루프에서 하나 이상의 뉴클레오타이드에 접합된다.
- [0280] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 테트라루프 중 2 내지 4개의 당 리간드 모이어티에 접합된다. 일 구현예에서, 테트라루프 중 뉴클레오타이드의 2개는 당 리간드 모이어티에 접합된다. 일 구현예에서, 테트라루프 중 뉴클레오타이드의 3개는 당 리간드 모이어티에 접합된다. 또 다른 구현예에서, 테트라루프 중 뉴클레오타이드의 4개는 당 리간드 모이어티에 접합된다. 특정 구현예에서, 당 리간드 모이어티는 GalNAc이다. 사용될 수 있는 다른 리간드는 비제한적으로, 만노스-6-포스페이트, 콜레스테롤, 폴레이트, 트랜스페린, 및 갈락토스를 포함한다 (다른 특이적 예시적인 리간드에 대해, 예를 들어, WO 2012/089352를 참고한다).
- [0281] 리간드는 올리고뉴클레오타이드의 관심 조직에의 전달을 유도할 수 있는 한 뉴클레오타이드의 임의의 일부에 접합될 수 있다. 특정 구현예에서, 리간드 (예를 들어, GalNAc)은 당 모이어티의 2'-위치에서 뉴클레오타이드에 접합된다.
- [0282] **투여/치료의 방법**
- [0283] 하나의 구현예는 장애를 치료하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 대상체에게 본 명세서에서 기재된 바와 같은 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 치료적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0284] 특정 구현예에서 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 증식성, 염증성, 자가면역, 신경, 안구, 호흡, 대사, 피부과, 청각적, 간, 신장, 또는 감염성 질환과 관련된 증상의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다. 하나의 구현예는 증식성, 염증성, 자가면역, 신경, 안구, 호흡, 대사, 피부과, 청각적, 간, 신장, 또는 감염성 질환을 치료하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 대상체에게 본 명세서에서 기재된 바와 같은 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 치료적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0285] 특정 구현예에서, 장애는 희귀 질환, 만성 간 질환, 만성 신장 질환, 심혈관 질환 또는 바이러스 감염성 질환이다. 특정 구현예에서, 장애는 원발성 수산과잉뇨증 (PH1, PH2, 또는 PH3) 또는 특발성 수산과잉뇨증을 포함하는 수산과잉뇨증이다. 특정 구현예에서, 장애는 만성 신장 장애 (CKD)이다. 특정 구현예에서, 장애는 피루베이트 탈수소효소 결핍이다. 특정 구현예에서, 장애는 알파-1 항트립신 (A1AT) 결핍이다.
- [0286] 특정 구현예에서, 장애는 암이다. 그와 같은 암의 비-제한적인 예는 담관 암, 방광암, 이행 세포 암종, 요상피 암종, 뇌암, 신경아교종, 별아교세포종, 유방 암종, 화생 암종, 자궁경부암, 자궁경부 편평상피 세포 암종, 직장암, 결장직장 암종, 결장암, 선천성 비폴립증 결장직장암, 결장직장 선암종, 위장 간질성 종양 (GIST), 자궁 내막암종, 자궁내막 기질 육종, 식도암, 식도 편평상피 세포 암종, 식도 선암종, 안구 흑색종, 포도막 흑색종, 담낭 암종, 담낭 선암종, 신장 세포 암종, 투명 세포 신장 세포 암종, 이행 세포 암종, 요상피 암종, 윌름스 종양, 백혈병, 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 림프구성 (CLL), 만성 골수성 (CML), 만성 골수단핵구성 (CMML), 간암, 간 암종, 간종양, 간세포 암종, 담관암종, 간모세포종, 폐암, 비-소세

포 폐암 (NSCLC), 중피종, B-세포 림프종, 비-호지킨 림프종, 미만성 큰 B-세포 림프종, 외투 세포 림프종, T-세포 림프종, 비-호지킨 림프종, 전구체 T-림프아구성 림프종/백혈병, 주변 T-세포 림프종, 다발성 골수종, 비인두 암종 (NPC), 신경교세포종, 구강인두 암, 구강 편평상피 세포 암종, 골육종, 난소 암종, 췌장 암, 췌장 관상 선암종, 가성유두상 신생물, 샘파리 세포 암종, 전립선암, 전립선 선암종, 피부암, 흑색종, 악성 흑색종, 피부 흑색종, 소장 암종, 위암, 위 암종, 위장 간질성 종양 (GIST), 자궁암, 또는 자궁 육종을 포함한다. 전형적으로, 본 개시내용은 본 명세서에서 기재된 바와 같은 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 투여함으로써 간암, 간 암종, 간종양, 간세포 암종, 담관암종 및 간모세포종을 치료하는 방법을 특징으로 한다.

[0287] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 대상체에서 표적 유전자의 발현을 감소시키는 방법을 제공하되, 상기 방법은 상기 표적 유전자의 발현을 감소시키는데 충분한 양으로 약제학적 조성물을 감소를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 약제학적 조성물은 본 명세서에서 기재된 바와 같은 이중-가닥 핵산 억제제 분자 및 본 명세서에 또한 기재된 바와 같은 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다.

[0288] 표적 유전자는 임의의 포유동물로부터의 표적 유전자, 예컨대 인간 표적 유전자일 수 있다. 임의의 표적 유전자는 본 방법에 따라 침묵화될 수 있다. 특정 구현예에서, 표적 유전자는 예를 들어, AGXT, GRHPR, HOGA1, HAO1, SERPINA1, 또는 LDHA를 포함하여 만성 간 질환 또는 만성 신장 질환과 관련된다. 특정 구현예에서, 표적 유전자는, 예를 들어, HBV 유전자 또는 HCV 유전자를 포함하여 바이러스 감염성 질환과 관련된다. 특정 구현예에서, 표적 유전자는 예를 들어, APOC3 또는 PCSK9를 포함하여 심혈관 질환과 관련된다. 특정 구현예에서, 표적 유전자는, 예를 들어, ALDH2를 포함하여 알코올 대사 및 간 기능과 관련된다.

[0289] 다른 예시적인 표적 유전자는 비제한적으로, KRAS, 인자 VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA1, TTR, PDGF 베타 유전자, Erb-B 유전자, Src 유전자, CRK 유전자, GRB2 유전자, Ras 유전자, MEKK 유전자, JNK 유전자, RAF 유전자, Erk1/2 유전자, PCNA(p21) 유전자, MYB 유전자, JUN 유전자, FOS 유전자, BCL-2 유전자, 사이클린 D 유전자, VEGF 유전자, EGFR 유전자, 사이클린 A 유전자, 사이클린 E 유전자, WNT-1 유전자, 베타-카테닌 유전자, c-MET 유전자, PKC 유전자, NFkB 유전자, STAT3 유전자, 서바이빈 유전자, Her2/Neu 유전자, 토포이소머라제 I 유전자, 토포이소머라제 II 알파 유전자, p73 유전자, p21(WAF1/CIP1) 유전자, p27(KIP1) 유전자, PPM1D 유전자, Ras 유전자, 카베올린 I 유전자, MIB I 유전자, MTA1 유전자, M68 유전자, 종양 억제인자 유전자에서의 돌연변이, p53 종양 억제인자 유전자, 및 이들의 조합을 포함한다.

[0290] 투약 및 스케줄

[0291] 전형적으로, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 비경구로 (예컨대 정맥내, 근육내, 또는 피하 투여를 통해) 투여된다. 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 국소 투여 또는 전신 투여를 통해 전달된다. 그러나, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은, 예를 들어, 볼, 설하, 직장, 질, 요도내, 국소, 안구내, 비강내, 및/또는 귀내를 포함하는 당해 분야에 알려진 임의의 방법에 의해 또한 투여될 수 있고, 상기 투여는 정제, 캡슐, 과립, 수성 현탁액, 젤, 스프레이, 좌약, 고약, 연고, 등을 포함할 수 있다.

[0292] 특정 구현예에서, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 일당 수령체의 체중 킬로그램당 20 마이크로그램 내지 10 밀리그램, 킬로그램당 100 마이크로그램 내지 5 밀리그램, 0.25 밀리그램 내지 5.0 밀리그램, 또는 킬로그램당 0.5 내지 3.0 밀리그램의 투약량으로 투여된다. 전형적으로, 이중-가닥 핵산 억제제 분자는 일당 수령체의 체중 킬로그램당 약 0.25 내지 2.0 밀리그램의 투약량으로 투여된다.

[0293] 본 개시내용의 약제학적 조성물은 매일, 또는 간헐적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 간헐적 투여는 주당 1 내지 6 일, 개월당 1 내지 6 일, 매주 1회, 격주 1회, 매월 1회, 격월 1회, 3개월마다 1회, 또는 연간 1회 또는 2회 투여될 수 있거나 또는 다중 매년, 매월, 매주, 또는 일일 용량으로 분할될 수 있다. 일부 구현예에서, 간헐적 투약은 초기 이중-가닥 핵산 억제제 분자 투여와 함께 주기적으로 이어서 최대 1주, 최대 1개월, 최대 2개월, 최대 3개월 또는 최대 6개월 또는 그 초과 동안) 투여 없는 휴지기를 갖는 투여를 의미하거나 격일, 주, 개월 또는 년에서의 투여를 의미할 수 있다.

[0294] 이중-가닥 핵산 억제제 분자의 치료적 유효량은 투여 경로 및 환자의 물리적 특성, 예컨대 대상체의 크기 및 체중, 질환 진행 또는 침투의 규모, 대상체의 연령, 건강, 및 성별을 따를 수 있고 이들 및 다른 인자에 따라 필요에 따라 조정될 수 있다.

[0295] 실시예

[0296] 실시예 1: 생체내 SAA1 mRNA 녹다운

[0297] CD-1 암컷 마우스를 연구 그룹으로 분할하고 그 그룹에 할당된 테스트 혈청 아밀로이드 A1 (SAA1) 핵산 억제제 분자를 투약했다. 실시예 1에서 사용된 테스트 SAA1 핵산 억제제 분자는 도 1에 도시되어 있다. GalNAc 및 이환형 뉴클레오타이드에 접합된 루프에서의 뉴클레오타이드를 제외하고, 테스트 SAA1 핵산 억제제 분자에서의 모든 다른 뉴클레오타이드는 2'-F 또는 2'-OMe를 갖는 당 모이어티의 2'-위치에서 변형된다. 테스트 SAA1 핵산 억제제 분자는 하기의 관점에서 상이했다: 줄기 부분의 길이 (짧은 길이 대 긴 길이); 이환형 뉴클레오타이드의 존재 또는 부재; 및 루프에서 GalNAc의 수 (3 대 4). 도 1에서의 SAA1 핵산 억제제 분자는 하기 표에 요약되어 있다:

표 1: 도 1에서의 SAA1 핵산 억제제

#	명칭	줄기 길이	이환형 뉴클레오타이드	루프에서 GalNAc	G1
1	LS/4GN	긴	없음	4	2' -F
2	SS/4GN	짧음	없음	4	2' -F
3	SS/3GN	짧음	없음	3	2' -F
4	SS/3GN-BNA	짧음	BNA	3	2' -F

[0298]

[0299] 짧은 줄기 작제물 2 및 3은 단지 루프에서 GalNAc의 수에서의 차이(4 대 3)만 있고 동일하다. 긴 줄기 작제물 1은 짧은 줄기 작제물 2와 동일하지만 단, 작제물 1은 6개 염기쌍의 줄기 듀플렉스를 가지고, 반면에 작제물 2는 3개 염기쌍의 줄기 듀플렉스를 갖는다. 짧은 줄기 작제물 3 및 4는 단지 작제물 4의 줄기에 6개의 이환형 뉴클레오타이드가 존재하는 차이만 있고 동일하다. 작제물 4에 사용된 이환형 뉴클레오타이드는 BNA^{NC} [NMe]이며, 여기서 이환형 뉴클레오타이드의 2'-탄소와 4'-탄소를 연결하는 브릿지는 4'-CH₂-N(CH₃)-O-2'이다.

[0300] TBG (티록신 결합 글로불린) 프로모터 하에서 인간 SAA1 (NM_000331.5) 유전자 (hSAA1)를 인코딩하는 AAV9 (아데노-관련된 바이러스) 벡터가 Vigene Biosciences Inc에 의해 합성되었다. CD-1 암컷 마우스에 마우스 당 5x10¹² 복제의 바이러스 게놈에서 hSAA1-AAV9 벡터로 정맥내로 투약하였다. 마우스는 테일-니클을 사용하여 매주 채혈하여 10ul 전혈을 취하여 hSAA1 ELISA 완충액에 1:20으로 즉시 희석하였고 분석 시까지 -20℃에서 보관하였다. 3주 후, 마우스 혈액에서 hSAA1 단백질의 순환 수준을 hSAA1 ELISA 키트 (InvitrogenTM Cat.no KHA0011; Thermo Fisher Scientific, 매사추세츠 주 월샘 소재)를 사용하여 결정하였다. 마우스를 각각의 그룹에서 hSAA1 단백질의 비교할만한 평균 순환 농도를 달성하기 위한 노력으로, 3주차에서 순환하는 hSAA1 농도에 기초하여 4개의 그룹으로 분류하였다. 그 다음 마우스에 PBS 또는 1 mg/kg의 각각의 SAA1 핵산 억제제 분자를 연구 0일째에서 피하로 투약하였다. 마우스는 그 후에 매주 채혈하고 전혈을 수집하고 분석하여 실험의 종료 시까지 순환하는 hSAA1 수준을 측정하였다. 순환하는 hSAA1 농도는 각각의 마우스에 대한 투여전 (hSAA1-AAV9 후 3주차) 수준 및 시간 매칭된 PBS 그룹으로 정규화함에 의해 표현되었다.

[0301] 이환형 뉴클레오타이드를 함유하는 짧은 줄기 (줄기에서 3개의 염기쌍) SAA1 핵산 억제제 분자는 이환형 뉴클레오타이드가 없는 상응하는 짧은 줄기 대조군에 비교되었다. 그것은 또한 이환형 뉴클레오타이드가 없는 더 긴 줄기 대조군 (줄기에서 6개의 염기쌍)에 비교되었다. 도 2에서 나타난 바와 같이, 짧은 줄기에 이환형 뉴클레오타이드를 함유하는 SAA1 핵산 억제제 분자는 상응하는 짧은 줄기 및 긴 줄기 대조군과 비교하여 SAA1 녹다운의 유의미하게 개선된 효력 및 기간을 나타냈다.

[0302] 실시예 2: 간에서 생체내 APOC3 mRNA 녹다운

[0303] CD-1 암컷 마우스를 연구 그룹으로 분할하고 그 그룹에 할당된 테스트 아포지질단백질 C3 (APOC3) 핵산 억제제 분자를 투약하였다. 실시예 2에서 사용된 테스트 APOC3 핵산 억제제 분자는 도 3a 및 3b에 도시되어 있다. GalNAc 및 이환형 뉴클레오타이드에 접합된 루프에서의 뉴클레오타이드를 제외하고, 테스트 APOC3 핵산 억제제 분자에서의 모든 다른 뉴클레오타이드는 2'-OMe 또는 2'-F를 갖는 당 모이어티의 2'-위치에서 변형된다. 테스트 APOC3 핵산 억제제 분자는 하기의 관점에서 상이했다: 줄기 부분의 길이 (짧은 길이 대 긴 길이); 이환형 뉴클레오타이드의 존재 또는 부재; 루프에서 GalNAc의 수 (3 대 4); 및 가이드 가닥의 위치 1 (G1) (2'-OMe 대 2'-

F). 도 3a에서의 APOC3 핵산 억제제 분자는 하기 표에 요약되어 있다:

표 2: 도 3a에서의 APOC3 핵산 억제제 (G1에서 2' -OMe)

#	명칭	줄기 길이	이환형 뉴클레오타이드	루프에서 GalNAc	G1
5	LS/4GN	긴	없음	4	2' -OMe
6	SS/4GN	짧음	없음	4	2' -OMe
7	SS/4GN-BNA	짧음	BNA	4	2' -OMe
8	LS/3GN	긴	없음	3	2' -OMe
9	SS/3GN	짧음	없음	3	2' -OMe
10	SS/3GN-BNA	짧음	BNA	3	2' -OMe

[0304]

[0305]

긴 줄기 작제물 5 및 8은 단지 루프에서 GalNAc의 수에서의 차이(4 대 3)만 있고 동일하다. 긴 줄기 작제물 5는 짧은 줄기 작제물 6과 동일하지만 단, 작제물 5는 6개 염기쌍의 줄기 듀플렉스를 가지고, 반면에 작제물 6은 6개의 이환형 뉴클레오타이드를 갖는 3개 염기쌍의 줄기 듀플렉스를 갖는다. 짧은 줄기 작제물 6 및 7은 단지 작제물 7의 줄기에 6개의 이환형 뉴클레오타이드가 존재하는 차이만 있고 동일하다. 작제물 7에서 사용된 이환형 뉴클레오타이드는 BNA^{NC} [NMe]이다. 짧은 줄기 작제물 6 및 9는 루프에서 GalNAc의 수 (4 대 3)를 제외하고 동일하다. 유사하게, BNA-함유 짧은 줄기 작제물 7 및 10은 루프에서 GalNAc의 수 (4 대 3)를 제외하고 동일하다. 짧은 줄기 작제물 9 및 10은 단지 작제물 10의 줄기에 6개의 이환형 뉴클레오타이드가 존재하는 차이만 있고 동일하다. 작제물 10에서 사용된 이환형 뉴클레오타이드는 BNA^{NC} [NMe]이다.

[0306]

도 3b에서의 APOC3 핵산 억제제 분자는 하기 표에 요약되어 있다:

표 3: 도 3b에서의 APOC3 핵산 억제제 (G1에서 2' -F)

#	명칭	줄기 길이	이환형 뉴클레오타이드	루프에서 GalNAc	G1
11	LS/4GN	긴	없음	4	2' -F
12	SS/4GN	짧음	없음	4	2' -F
13	SS/4GN-BNA	짧음	BNA	4	2' -F
14	LS/3GN	긴	없음	3	2' -F
15	SS/3GN	짧음	없음	3	2' -F
16	SS/3GN-BNA	짧음	BNA	3	2' -F

[0307]

[0308]

긴 줄기 (또는 LS) 작제물 11 및 14는 단지 루프에서 GalNAc의 수에서의 차이(4 대 3)만 있고 동일하다. 긴 줄기 작제물 11은 짧은 줄기 (또는 SS) 작제물 12와 동일하지만 단, 작제물 11은 6개 염기쌍의 줄기 듀플렉스를 가지고, 반면에 작제물 12는 6개의 이환형 뉴클레오타이드를 갖는 3개 염기쌍의 줄기 듀플렉스를 갖는다. 짧은 줄기 작제물 12 및 13은 단지 작제물 13의 줄기에 6개의 이환형 뉴클레오타이드가 존재하는 차이만 있고 동일하다. 작제물 13에서 사용된 이환형 뉴클레오타이드는 BNA^{NC} [NMe]이다. 짧은 줄기 작제물 12 및 15는 루프에서 GalNAc의 수 (4 대 3)를 제외하고 동일하다. 유사하게, BNA-함유 짧은 줄기 작제물 13 및 16은 루프에서 GalNAc의 수 (4 대 3)를 제외하고 동일하다. 짧은 줄기 작제물 15 및 16은 단지 작제물 16의 줄기에 6개의 이환형 뉴클레오타이드가 존재하는 차이만 있고 동일하다. 작제물 16에서 사용된 이환형 뉴클레오타이드는 BNA^{NC} [NMe]이다.

[0309] 동물에 1 mg/kg의 할당된 APOC3 핵산 억제제 분자를 피하로 투약하였다. 간 조직은 2개의 4 mm 펀치 생검을 취함에 의해 수집하여 이후의 mRNA 분석을 위해 Invitrogen™ RNeasy™ 용액 (Thermo Fisher Scientific, 매사추세츠 주 월샘 소재)에 보관하였다.

[0310] 이환형 뉴클레오타이드를 함유하는 짧은 줄기 (줄기에 3개의 염기쌍) APOC3 핵산 억제제 분자가 이환형 뉴클레오타이드가 없는 상응하는 짧은 줄기 버전에 비교되었다. 그것은 또한 이환형 뉴클레오타이드가 없는 더 긴 줄기 버전 (줄기에 6개의 염기쌍)에 비교되었다. 도 4에 도시된 데이터로 입증된 바와 같이, 짧은 줄기에 이환형 뉴클레오타이드를 함유하는 APOC3 핵산 억제제 분자는 상응하는 짧은 줄기 및 긴 줄기 대조군과 비교하여 28일째에서 야생형 마우스 내 APOC3 mRNA의 유의미하게 많은 녹다운을 나타냈다. 주제는 가이드 위치 1에서 2'-OMe 또는 2'-F를 갖는 핵산 억제제 분자에서 관측되었다. 주제는 또한 루프에서 사용된 GalNAc 리간드의 수 (4개의 GalNAc 대 3개의 GalNAc)에 무관하게 동일하였다.

[0311] **실시예 3: HDI 마우스 모델에서 PCSK9 mRNA 녹다운**

[0312] 유체역학적 주입 (HDI) 마우스 모델을 사용하여 PCSK9 mRNA 녹다운을 연구하였다. HDI는 정맥내 꼬리 주입을 통해 마우스 내 간세포에 핵산을 전달하기 위해 사용된 방법이다. 이 실험에서, HDI는 아래에 더 상세히 설명된 바와 같이 인간 PCSK9를 함유하는 플라스미드 DNA를 전달하기 위해 사용되었다.

[0313] CD-1 암컷 마우스를 연구 그룹으로 분할하고 그 그룹에 할당된 테스트 PCSK9 핵산 억제제 분자를 투약하였다. 실시예 3에서 사용된 테스트 PCSK9 핵산 억제제 분자는 도 5에 도시되어 있다. GalNAc 및 이환형 뉴클레오타이드에 접합된 루프에서의 뉴클레오타이드를 제외하고, 테스트 PCSK9 핵산 억제제 분자에서의 모든 다른 뉴클레오타이드는 2'-OMe 또는 2'-F를 갖는 당 모이어티의 2'-위치에서 변형된다 (변형 패턴 2 또는 "M2"). 테스트 PCSK9 핵산 억제제 분자는 하기의 관점에서 상이했다: 줄기 부분의 길이 (짧은 길이 대 긴 길이) 및 이환형 뉴클레오타이드의 존재 또는 부재. 도 5에서의 PCSK9 핵산 억제제 분자는 하기 표에 요약되어 있다:

표 4: 도 5에서 PCSK9 핵산 억제제

#	명칭	변형 패턴	줄기 길이	이환형 뉴클레오타이드	루프에서 GalNAc	G1
17	LS/3GN	패턴 2	긴	없음	3	2' -OMe
18	SS/3GN	패턴 2	짧음	없음	3	2' -OMe
19	SS/3GN-BNA	패턴 2	짧음	BNA	3	2' -OMe

[0314]

[0315] 긴 줄기 작제물 17은 짧은 줄기 작제물 18과 동일하지만 단, 작제물 17은 6개 염기쌍의 줄기 듀플렉스를 가지고, 반면에 작제물 18은 3개 염기쌍의 줄기 듀플렉스를 갖는다. 짧은 줄기 작제물 18 및 19는 단지 작제물 19의 줄기에 6개의 이환형 뉴클레오타이드가 존재하는 차이만 있고 동일하다. 작제물 16에서 사용된 이환형 뉴클레오타이드는 BNA^{NC} [NMe]이다.

[0316] 마우스에는 0.5 mg/kg의 할당된 시험품을 피하로 투약하였다. 마우스에서 인간 PCSK9를 발현시키기 위한 플라스미드가 설계되었다 (pCDNA3/hPCSK9). 시험품의 피하 투약 후 11일 또는 19일째에, 2 mL의 pCDNA3/hPCSK9 (PBS에 현탁된 1×10^{12} 복제)를 꼬리 정맥에 정맥내 주입에 의해 마우스에 투여하였다. 12일 또는 20일째에 간 조직을 2개의 4 mm 펀치 생검을 취함에 의해 수집하고 제조자의 프로토콜에 따라 RNA 단리, cDNA 합성, 및 q-RT PCR로 가공하였다.

[0317] 도 6에서 나타난 바와 같이, 짧은 줄기에 이환형 뉴클레오타이드를 함유하는 PCSK9 핵산 억제제 분자는 상기 연구에서 상응하는 짧은 줄기 및 긴 줄기 대조군과 비교하여 개선된 효력 및 기간 (12 및 20일째)을 나타냈다.

[0318] **실시예 4: AAV 마우스 모델에서 PCSK9 mRNA 녹다운**

[0319] C57BL/6J 암컷 마우스에 인간 PCSK9를 발현하는 아데노바이러스-관련된 바이러스 (AAV) 플라스미드 (pAAV9-hPCSK9)인, pAAV9-hPCSK9 (1×10^{12} 복제)를 정맥내로 주입하였다. 동물은 측면 꼬리 정맥 천자를 통해 매주 채혈되었고 혈액은 혈장으로 가공되었다. 인간 PCSK9 발현은 제조자의 프로토콜에 따라 측정되었다 (인간 PCSK9

ELISA 키트, ab209884, Abcam, 영국 캄브릿지 소재). 인간 PCSK9 발현이 안정화될 때, 동물에 1 mg/kg의 할당된 테스트 PCSK9 핵산 억제제 분자를 피하로 투약하였다. 다시, 동물을 매주 채혈하여 녹다운의 기간을 결정하였다.

[0320] 이에 사용된 테스트 PCSK9 핵산 억제제 분자는 도 7에 도시되어 있다. 테스트 PCSK9 핵산 억제제 분자의 뉴클레오타이드 서열은 실시예 3에서 사용된 것들과 동일하다. GalNAc 및 이환형 뉴클레오타이드에 접합된 루프에서의 뉴클레오타이드를 제외하고, 테스트 PCSK9 핵산 억제제 분자에서의 모든 다른 뉴클레오타이드는 2'-OMe 또는 2'-F를 갖는 당 모이어티의 2'-위치에서 변형된다 (변형 패턴 1 또는 "M1"). 테스트 PCSK9 핵산 억제제 분자는 하기의 관점에서 상이했다: 줄기 부분의 길이 (짧은 길이 대 긴 길이) 및 이환형 뉴클레오타이드의 존재 또는 부재. 도 7에서의 PCSK9 핵산 억제제 분자는 하기 표에 요약되어 있다:

표 5: 도 7에서 PCSK9 핵산 억제제

#	명칭	변형 패턴	줄기 길이	이환형 뉴클레오타이드	루프에서 GalNAc	G1
20	LS/3GN	패턴 1	긴	없음	3	2'-OMe
21	SS/3GN-BNA	패턴 1	짧음	BNA	3	2'-OMe

[0321] 긴 줄기 작제물 20은 6개 염기쌍의 줄기 듀플렉스를 가지고, 반면에 짧은 줄기 작제물 21은 6개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하는 3개 염기쌍의 줄기 듀플렉스를 갖는다. 양 작제물 20 및 21은 테트라루프에 3개의 GalNAc 접합된 뉴클레오타이드를 함유하지만, 테트라루프의 처음 3개의 뉴클레오타이드는 작제물 20에서 접합된 GalNAc이고 반면에 마지막 3개의 뉴클레오타이드는 작제물 21에서 접합된 GalNAc이다. 이들 차이 이외에, 작제물 20과 21은 동일하다. 작제물 21에 사용된 이환형 뉴클레오타이드는 BNA^{NC} [NMe]이다.

[0323] 도 8에서 나타낸 바와 같이, 짧은 줄기에서 이환형 뉴클레오타이드를 함유하는 PCSK9 핵산 억제제 분자는 상응하는 긴 줄기 대조군에 비교하여 개선된 효력 및 기간 (2 내지 7주차)을 나타냈다.

[0324] **실시예 5: 루시퍼라제 리포터를 사용한 AAV 마우스 모델에서 PCSK9 억제**

[0325] 또 다른 실험에서, C57BL/6J 암컷 마우스에 *가우시아* 루시퍼라제의 3'-미번역된 영역에서 PCSK9 표적 부위를 발현하는 상이한 AAV9 플라스미드를 정맥내로 주입하였다 (1×10^{12} 복제). PCSK9 표적 부위는 이 실험에서 사용된 테스트 핵산 억제제 분자에 대해 특이적이다. 이런 식으로, 루시퍼라제 발현은 플라스미드 DNA 내에 부위-특이적인 절단을 조정하는 테스트 핵산 억제제 분자의 능력을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 동물은 측면 꼬리 정맥 천자를 통해 매주 채혈되었고 혈액은 혈장으로 가공되었다. *가우시아* 루시퍼라제 발현은 제조자의 프로토콜에 따라 측정되었다 (PierceTM *가우시아* 루시퍼라제 글로우 검정 키트, #16161, Thermo Fisher Scientific, 매사추세츠 주 월샘 소재). 루시퍼라제 발현이 안정화될 때, 동물에 1 mg/kg의 할당된 시험품을 피하로 투약하였다. 동물을 매주 채혈하여 녹다운의 기간을 결정하였다.

[0326] 사용된 테스트 PCSK9 핵산 억제제 분자는 도 5에 도시되어 있다 (작제물 17 및 19). 테스트 PCSK9 핵산 억제제 분자의 뉴클레오타이드 서열은 실시예 3 및 4에서 사용된 것들과 동일하다. GalNAc 및 이환형 뉴클레오타이드에 접합된 루프에서의 뉴클레오타이드를 예외로 하여, 테스트 PCSK9 핵산 억제제 분자에서의 모든 다른 뉴클레오타이드는 2'-OMe 또는 2'-F를 갖는 당 모이어티의 2'-위치에서 변형된다 (변형 패턴 2 또는 "M2"). 테스트 PCSK9 핵산 억제제 분자는 하기의 관점에서 상이했다: 줄기 부분의 길이 (짧은 길이 대 긴 길이) 및 이환형 뉴클레오타이드의 존재 또는 부재. 이 실험에서 사용된 PCSK9 핵산 억제제 분자는 하기 표에 요약되어 있다:

표 6: PCSK9 핵산 억제제 (도 5)

#	명칭	변형 패턴	줄기 길이	이환형 뉴클레오타이드	루프에서 GalNAc	G1
17	LS/3GN	패턴 2	긴	없음	3	2' -OMe
19	SS/3GN-BNA	패턴 2	짧음	BNA	3	2' -OMe

[0327]

[0328]

짧은 줄기 작제물 19는 긴 줄기 작제물 17과 동일하지만 단, 작제물 17은 6개 염기쌍의 줄기 듀플렉스를 가지고, 반면에 작제물 19는 6개의 이환형 뉴클레오타이드를 함유하는 3개 염기쌍의 줄기 듀플렉스를 갖는다. 작제물 19에서 사용된 이환형 뉴클레오타이드는 BNA^{NC} [NMe]이다.

[0329]

AAV9 플라스미드를 사용한 부위-특이적인 PCSK9 표적 서열로 마우스를 형질감염시킨, 이 AAV 마우스 모델에서, 짧은 줄기에 이환형 뉴클레오타이드를 함유하는 핵산 억제제 분자는 어떤 이환형 뉴클레오타이드도 함유하지 않는 긴 줄기 대조군과 비교하여 다시 한번 효력의 개선된 기간을 나타냈다. 짧은 줄기 작제물 19는 전체 7-주 연구에 걸쳐서 루시퍼라제 수준을 20 % 아래로 유지하였고, 반면에 긴 줄기 대조군 (작제물 17)으로는 4주차까지 루시퍼라제 수준이 약 20 % 증가하였고 7일째까지 약 70 %로 꾸준히 증가했다. 도 9.

[0330]

관련된 연구에서, 추가의 테스트 PCSK9 핵산 억제제 분자를 상기에 기재된 바와 같이, 이 AAV 마우스 모델에서 시험하였다. 추가의 테스트 PCSK9 핵산 억제제 분자는 도 14b-c에 도시되어 있고 3개의 BNA 염기쌍, 2개의 BNA 염기쌍, 또는 1개의 BNA 염기쌍, 또는 3개의 쌍을 이루지 않는 BNA, 2개의 쌍을 이루지 않는 BNA 또는 1개의 BNA를 함유하는 단축된 줄기 작제물 (3개의 염기쌍)을 함유한다. 임의의 BNA가 없고 긴 줄기 작제물 (총 6개의 염기쌍) 또는 단축된 줄기 작제물 (3개의 염기쌍)을 함유하는 대조군 PCSK9 핵산 억제제 분자가 또한 시험되었다 (실시예 3으로부터의 작제물 17 및 18). 도 14a. 모든 테스트 및 대조군 PCSK9 작제물이 2주까지 PCSK9 mRNA의 강력한 녹다운을 나타냈지만, 각각의 BNA-함유 단축된 줄기 작제물은, 줄기에 단일의 쌍을 이루지 않는 BNA를 함유하는, 작제물 35 (도 14c)를 포함하여, BNA를 함유하지 않는 모체, 단축된 줄기 작제물에 비교하여 개선된 효력 및 기간을 나타냈다. 도 15a-b. 또한, 단축된 줄기에서 단일 BNA 염기쌍은 PCSK9 mRNA 녹다운의 기간 및 효력을 증가시키기에 충분하였지만, 줄기에 더 많은 BNA 염기쌍 (예를 들어, 2 또는 3개의 염기쌍)을 추가하는 것은 효력 또는 기간을 추가로 고양하는 것으로 나타나지 않았다. 도 15a. 그에 반해서, 줄기의 한쪽에 쌍을 이루지 않는 BNA를 추가하는 것은 증가된 줄기에서 연속적인 BNA의 수와 같이 PCSK9 mRNA 녹다운 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 도 15b.

[0331]

실시예 6: 테트라루프 및 트리루프를 함유하는 핵산 억제제 분자를 사용한 ALDH2 표적 유전자 mRNA의 생체내 녹다운

[0332]

3개의 염기쌍을 넘는 줄기의 길이를 감소시키는 것 (D2)이 mRNA 녹다운 활성에 어떻게 영향을 미치는지를 평가하기 위해 루프에 3개 또는 4개의 뉴클레오타이드를 갖는 추가의 작제물을 설계하였다. CD-1 암컷 마우스를 연구 그룹으로 분할하고 그 그룹에 할당된 테스트 핵산 억제제 분자를 투약하였다. 실시예 6에서 사용된 테스트 핵산 억제제 분자 (작제물 22-30)는 도 11a-i에 도시되어 있다. GalNAc 및 이환형 뉴클레오타이드에 접합된 루프에서의 뉴클레오타이드를 제외하고, 테스트 핵산 억제제 분자에서의 모든 다른 뉴클레오타이드는 2'-OMe 또는 2'-F를 갖는 당 모이어티의 2'-위치에서 변형된다. 테스트 핵산 억제제 분자는 하기의 관점에서 상이했다: 줄기 부분의 길이 (6개의 염기쌍, 3개의 염기쌍, 2개의 염기쌍, 및 1개의 염기쌍); 이환형 뉴클레오타이드의 존재 또는 부재; 루프부 (테트라루프 대 트리루프)의 길이; 및 루프에서 GalNAc의 수. 도 11a-i에서의 핵산 억제제 분자는 하기 표에 요약되어 있다:

표 7: 도 11에서의 테스트 핵산 억제제

도	명칭	루프 길이	줄기 길이	이환형 뉴클레오타이드	GalNAc
11A	작제물 22	4	6 개의 염기쌍	없음	2
11B	작제물 23	3	6 개의 염기쌍	없음	2
11C	작제물 24	4	3 개의 염기쌍	BNA	2
11D	작제물 25	3	3 개의 염기쌍	BNA	2
11E	작제물 26	4	2 개의 염기쌍	BNA	2
11F	작제물 27	3	2 개의 염기쌍	BNA	2
11G	작제물 28	4	1 개의 염기쌍	BNA	2
11H	작제물 29	3	1 개의 염기쌍	BNA	2
11I	작제물 30	4	6 개의 염기쌍	없음	3

[0333]

[0334]

긴 줄기 (6개의 염기쌍) 작제물 22 및 23은 단지 루프에서 뉴클레오타이드의 수에서의 차이 (테트라루프 대 트리루프)만 있고 동일하다. 작제물 30은 작제물 22와 동일하지만 단, 작제물 30은 테트라루프에 접합된 3개의 GalNAc을 함유하고, 반면에 작제물 22는 테트라루프에 접합된 2개의 GalNAc을 함유한다. 작제물 24 (3개의 염기쌍 줄기)는 작제물 25 (3개의 염기쌍 줄기)와 동일하지만 단, 작제물 24는 테트라루프를 가지고, 반면에 작제물 25는 트리루프를 갖는다. 작제물 26 및 27 (2개의 염기쌍 줄기)은 단지 작제물 26이 테트라루프를 가지고, 반면에 작제물 27이 트리루프를 가지는 차이만 있고 동일하다. 작제물 28 및 29 (1개의 염기쌍 줄기)는 작제물 28이 테트라루프를 가지고, 반면에 작제물 29가 트리루프를 가지는 차이만 있고 동일하다. 작제물 24 내지 29에서 사용된 이환형 뉴클레오타이드는 BNA^{NC} [NMe]이다.

[0335]

동물에 단일 0.5 mg/kg 투약의 할당된 테스트 핵산 억제제 분자를 피하로 투약하고 마우스를 투약후 4일에 희생시켰다. 간 조직은 2개의 4 mm 펀치 생검을 취함에 의해 수집하여 이후의 mRNA 분석을 위해 InvitrogenTM RNeasyTM 용액 (Thermo Fisher Scientific, 매사추세츠 주 월샘 소재)에 보관하였다. 조직 샘플은 TissueLyser II (Qiagen, 캘리포니아 주 발렌시아 소재)를 사용하여 QIAzol[®] Lysis 시약에서 균질화시켰다. 그 다음 제조사 지침에 따라 MagMAX 기술을 사용하여 RNA를 정제하였다 (ThermoFisher Scientific, 매사추세츠 주 월샘 소재). 고용량 cDNA 역전사 키트 (ThermoFisher Scientific, 매사추세츠 주 월샘 소재)를 사용하여 cDNA를 준비하였다. 표적 서열에 대한 프라이머를 CFX384 실시간 PCR 검출 시스템 (Bio-Rad Laboratories, Inc., 캘리포니아 주 헤라클레스 소재) 상에서 PCR을 위해 사용하였다.

[0336]

짧은 줄기 테스트 핵산 억제제 분자 (작제물 24 내지 29)는 테스트 핵산 분자의 상응하는 긴 줄기 버전 (작제물 22, 23, 및 30)에 비교되었다. 도 12에서 입증된 바와 같이, 줄기에 3개의 염기쌍 (6개의 이환형 뉴클레오타이드) 또는 2개의 염기쌍 (4개의 이환형 뉴클레오타이드)을 함유하는 짧은 줄기 작제물 (작제물 24 내지 27)은 줄기에 6개의 염기쌍 (및 무 이환형 뉴클레오타이드)을 함유하는 긴 줄기 작제물 (작제물 22, 23, 및 30)에 비교하여 표적 유전자 mRNA의 유사한 녹다운을 나타냈다. 다른 한편으로는, 줄기에 1개의 염기쌍 (2개의 이환형 뉴클레오타이드)을 갖는 짧은 줄기 작제물 (작제물 28 및 29)은 많은 뉴클레오타이드가 루프에 존재하는 방식에 의존하여 현저하게 상이한 mRNA 억제 활성을 나타냈다. 트리루프를 함유하는 작제물 29는 표적 유전자 mRNA의 녹다운을 나타내지 않았고, 반면에 테트라루프를 함유하는 작제물 28은 표적 유전자 mRNA의 실질적인 녹다운을 나타냈다. 도 12.

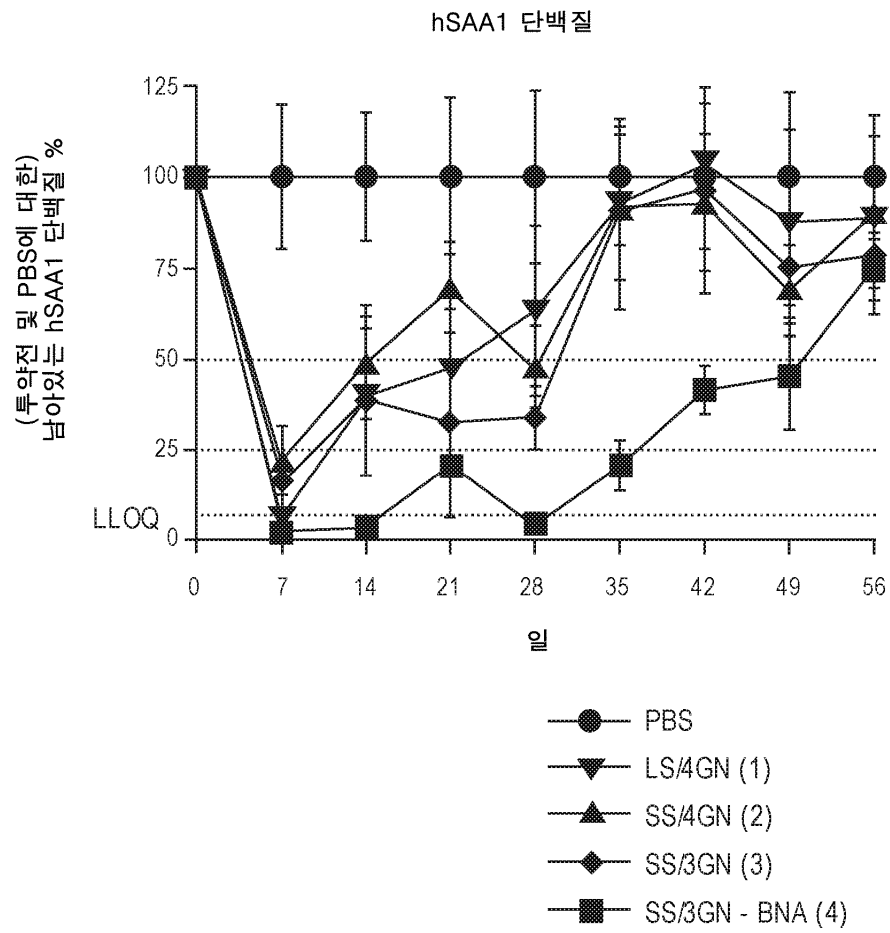
[0337]

실시예 7: 혈액에서 생체내 APOC3 단백질 녹다운

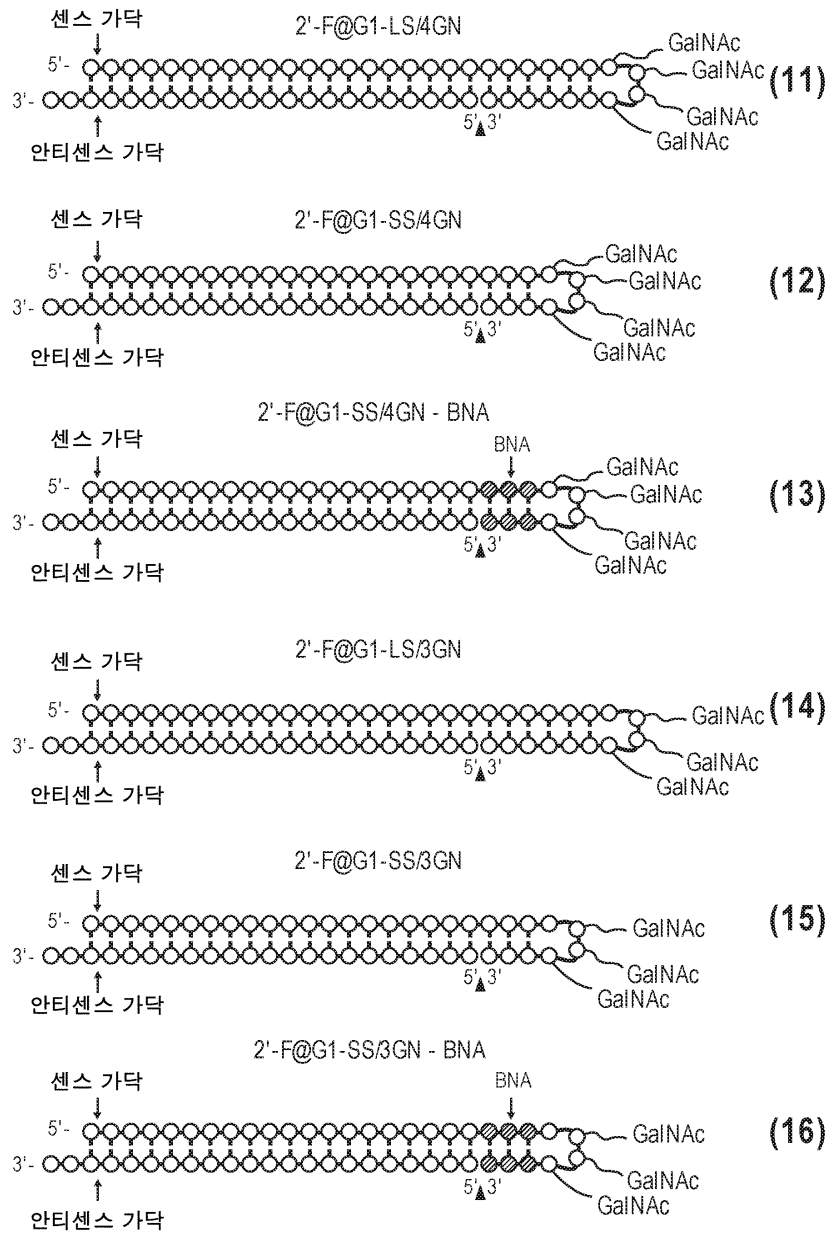
[0338]

CD-1 암컷 마우스를 연구 그룹으로 분할하고 그 그룹에 할당된 테스트 아포지질단백질 C2 (APOC3) 핵산 억제제

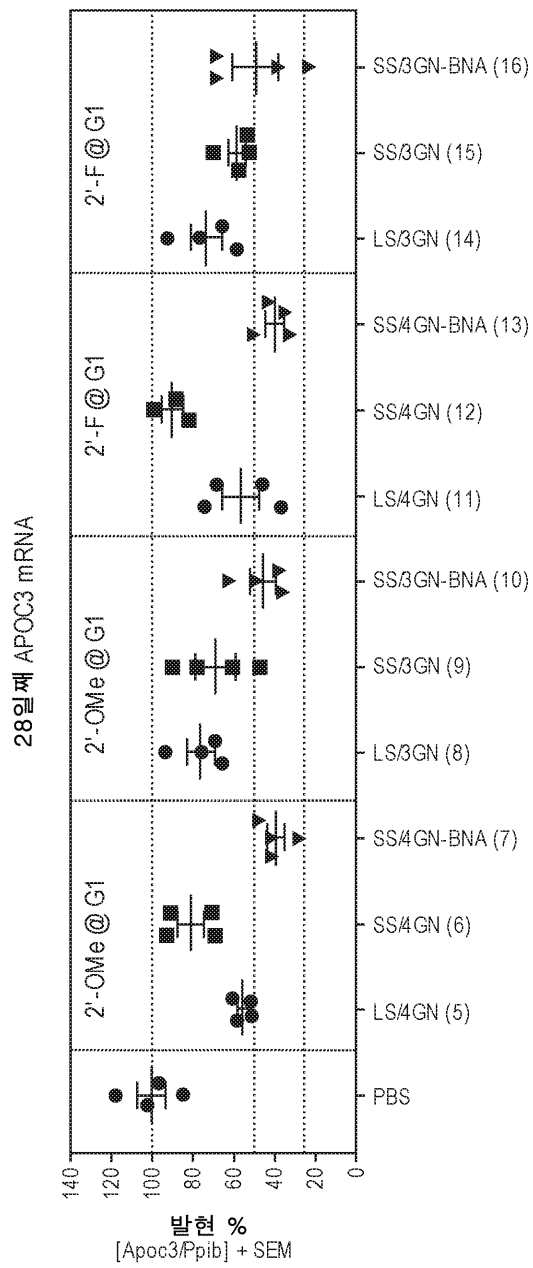
도면2



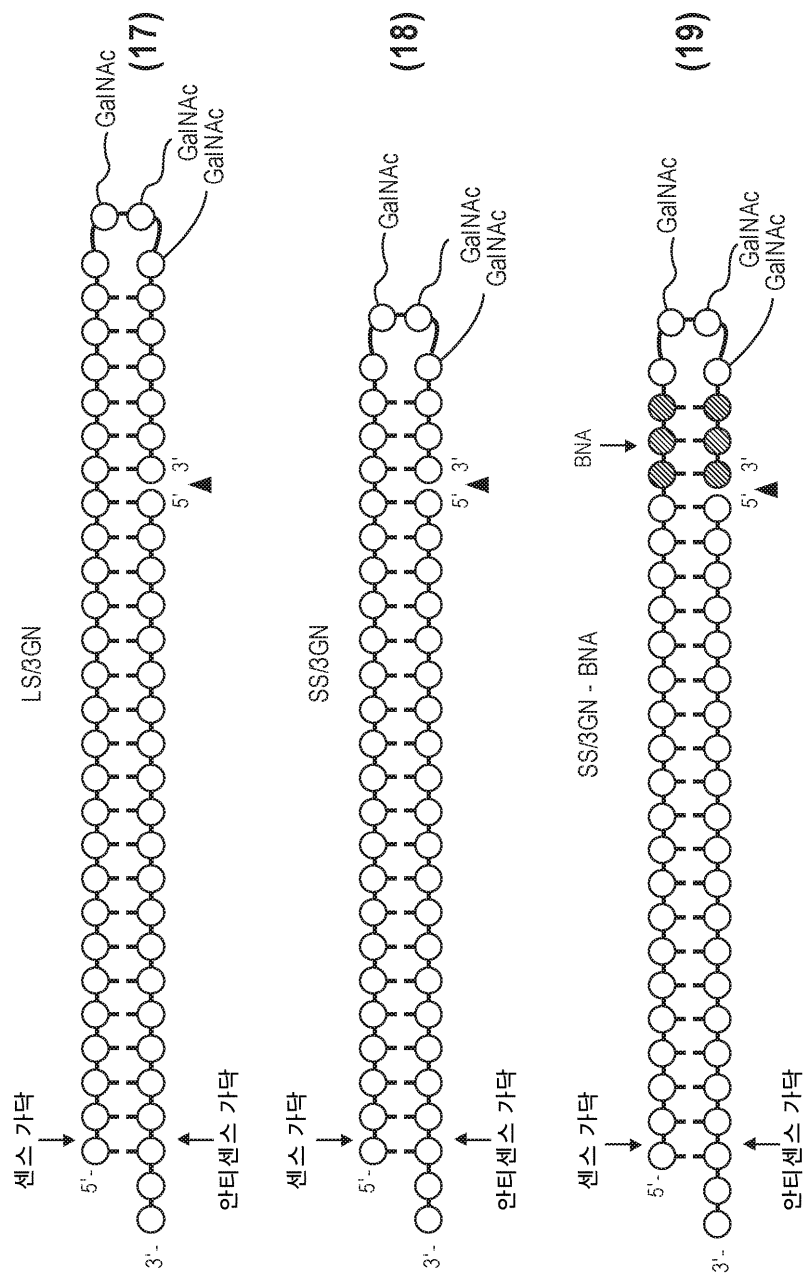
도면3b



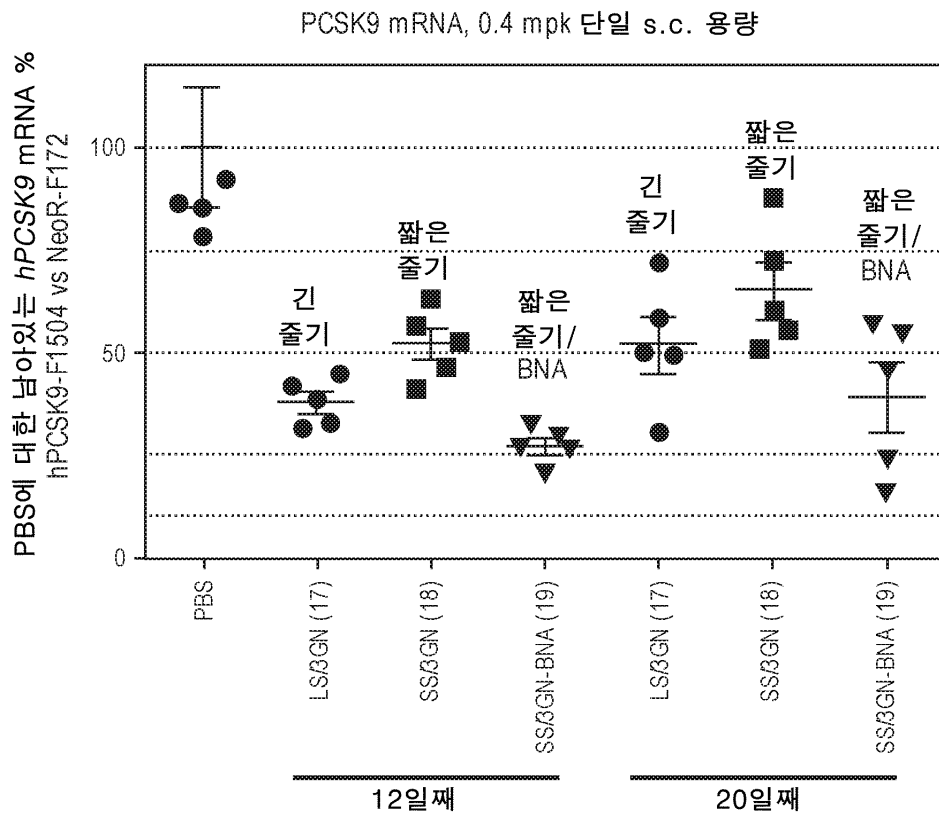
도면4



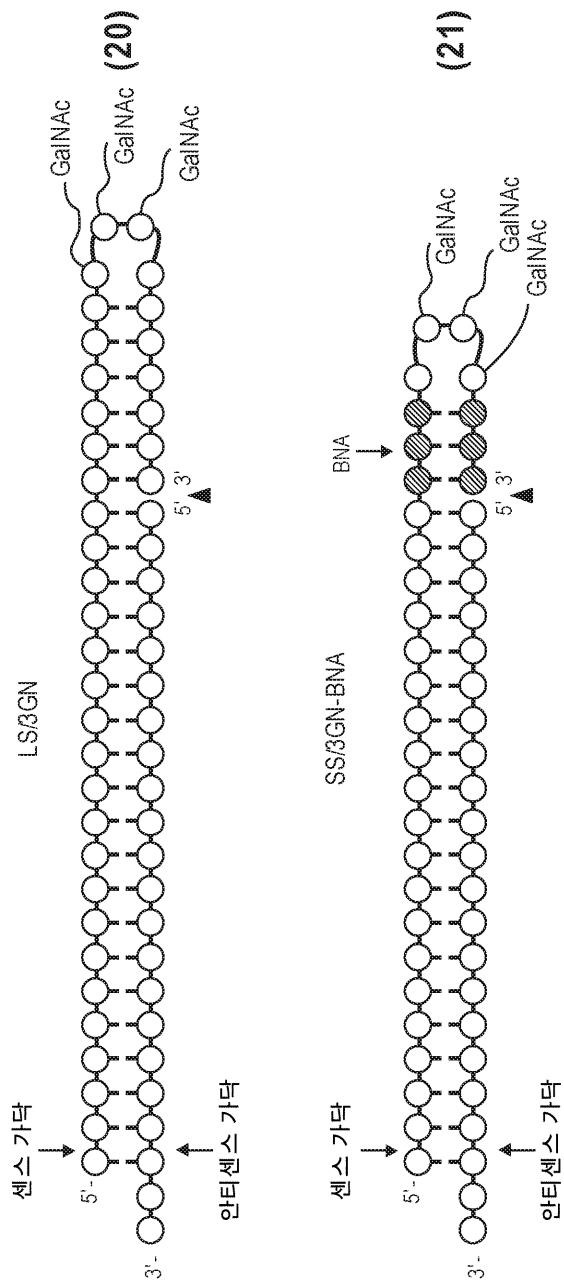
도면5



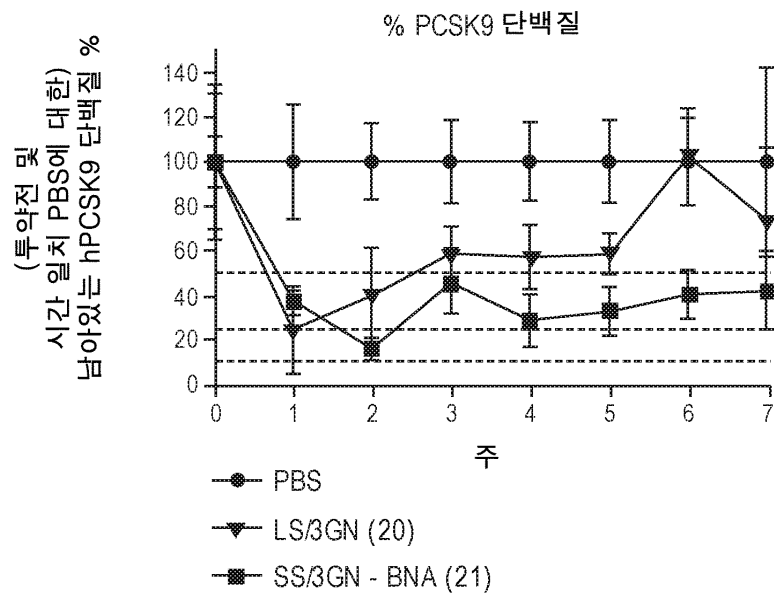
도면6



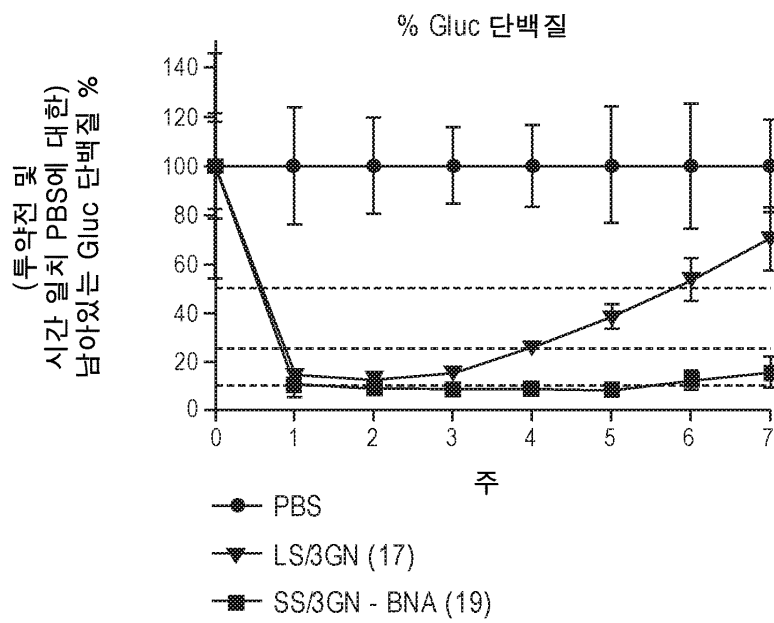
도면7



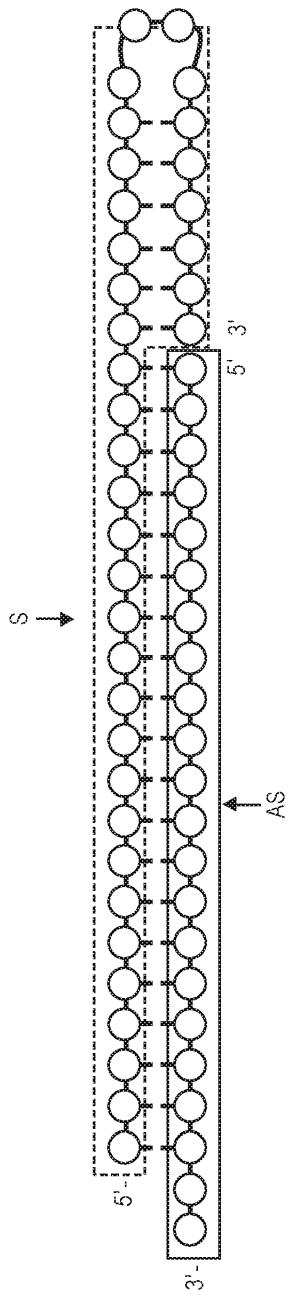
도면8



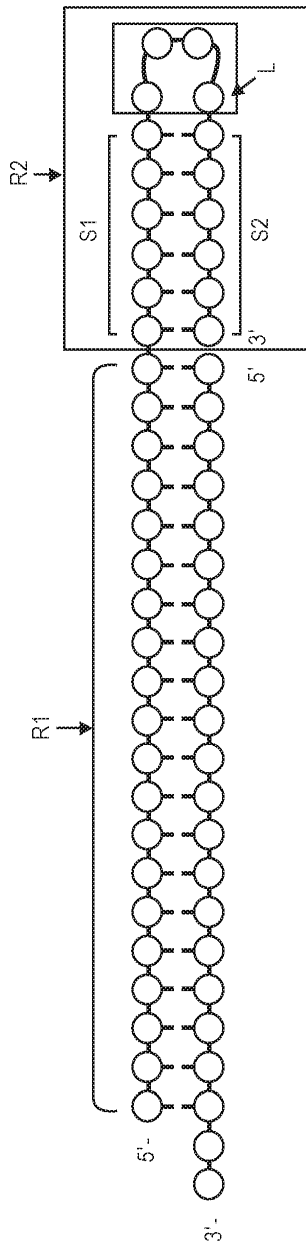
도면9



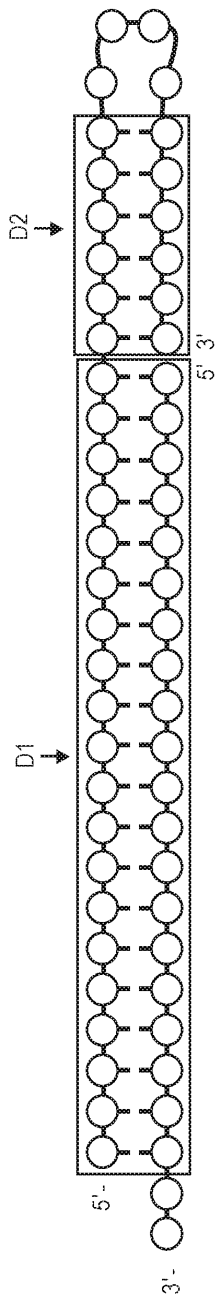
도면10a



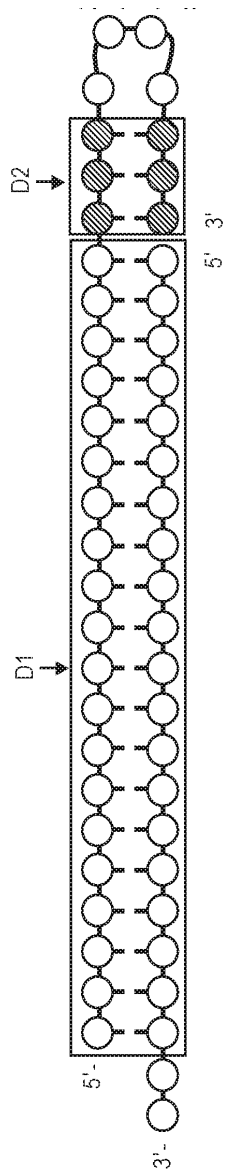
도면10b



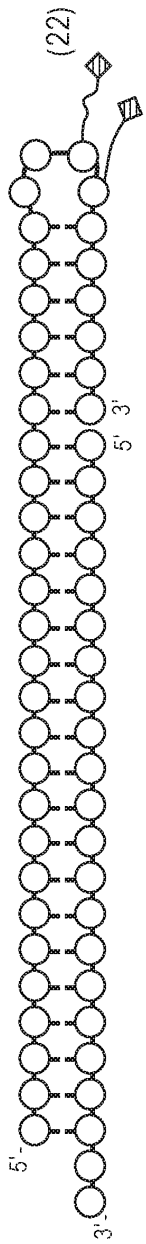
도면10c



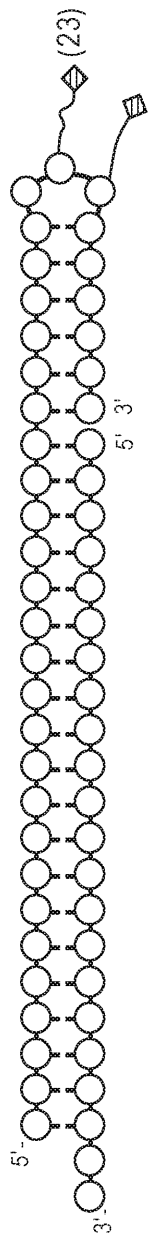
도면10d



도면11a

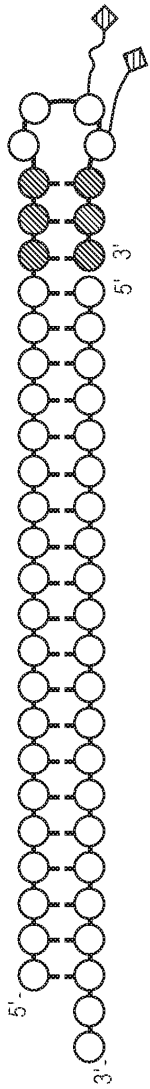


도면11b

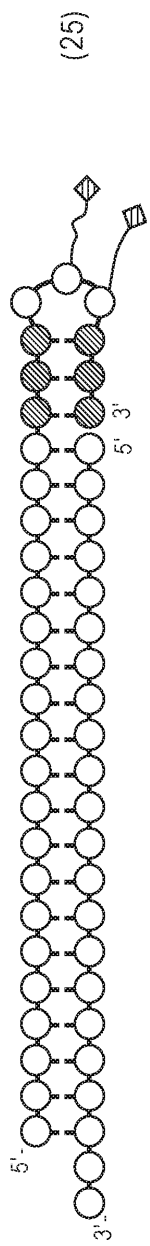


도면11c

(24)

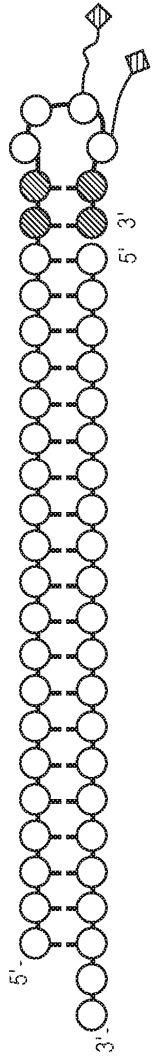


도면11d



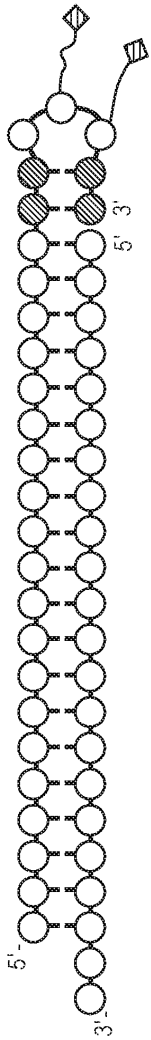
도면11e

(26)

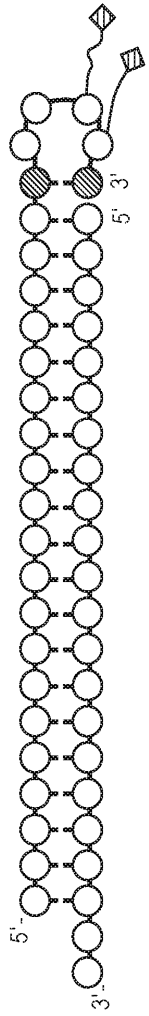


도면11f

(27)



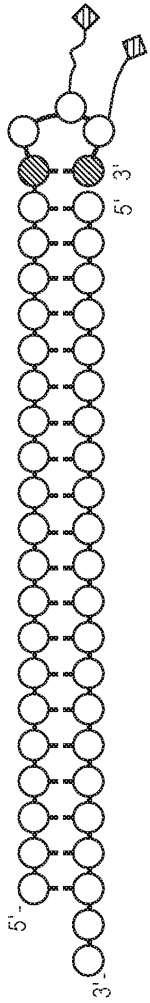
도면11g



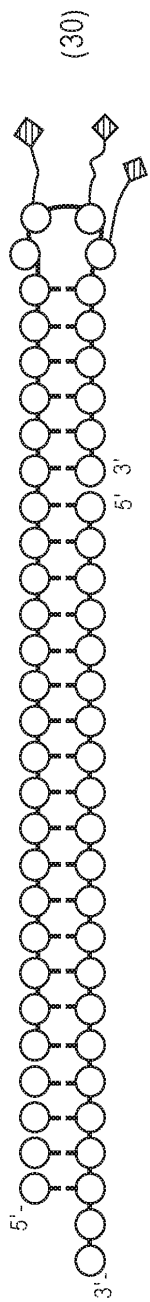
(28)

도면 11h

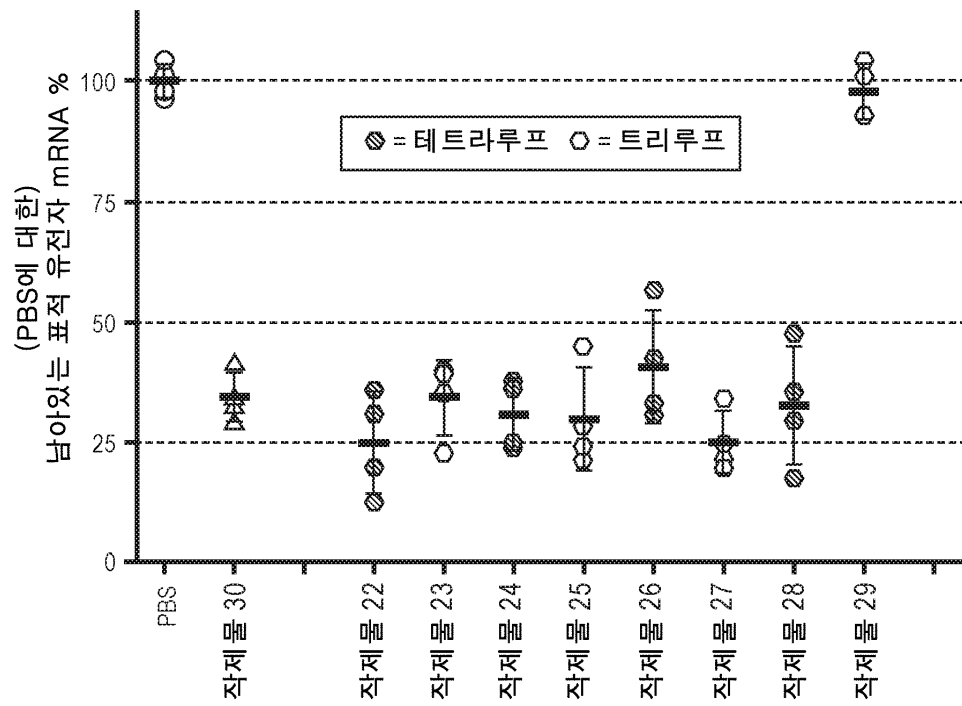
(29)



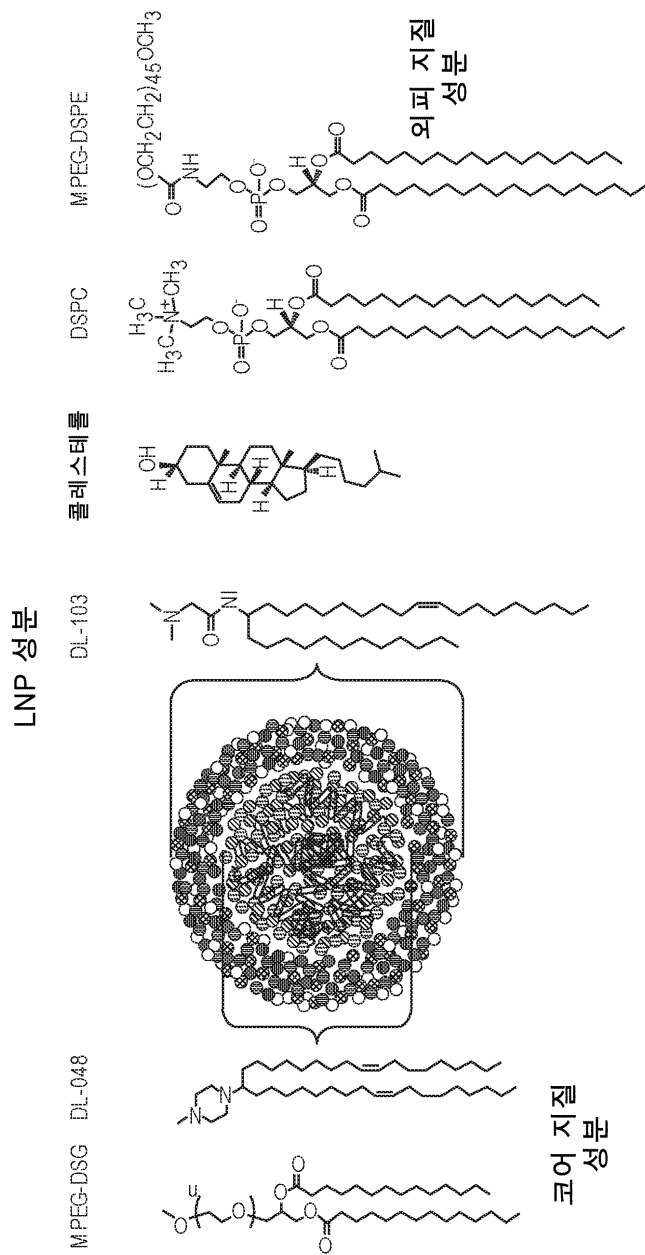
도면11i



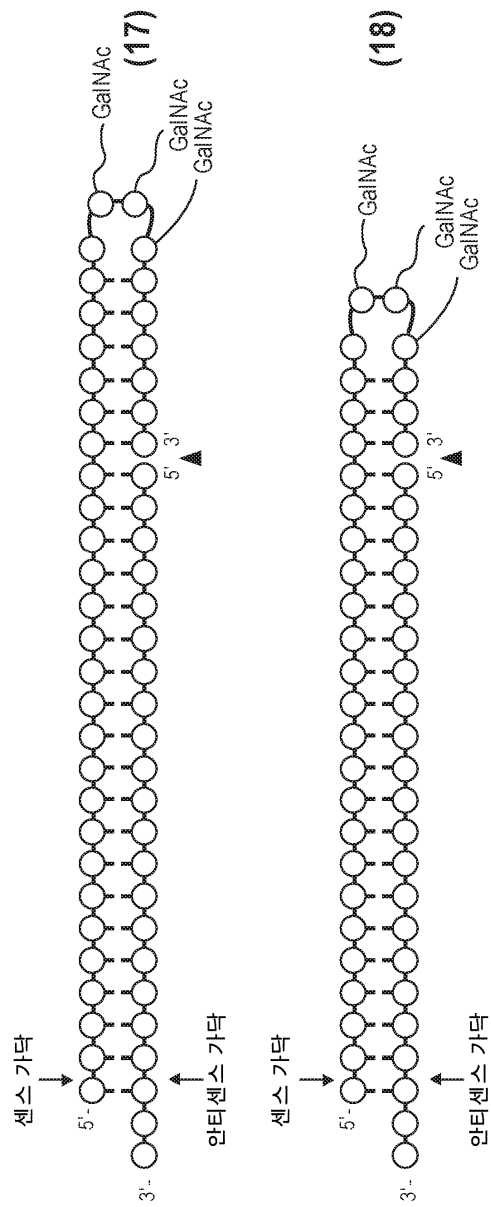
도면12



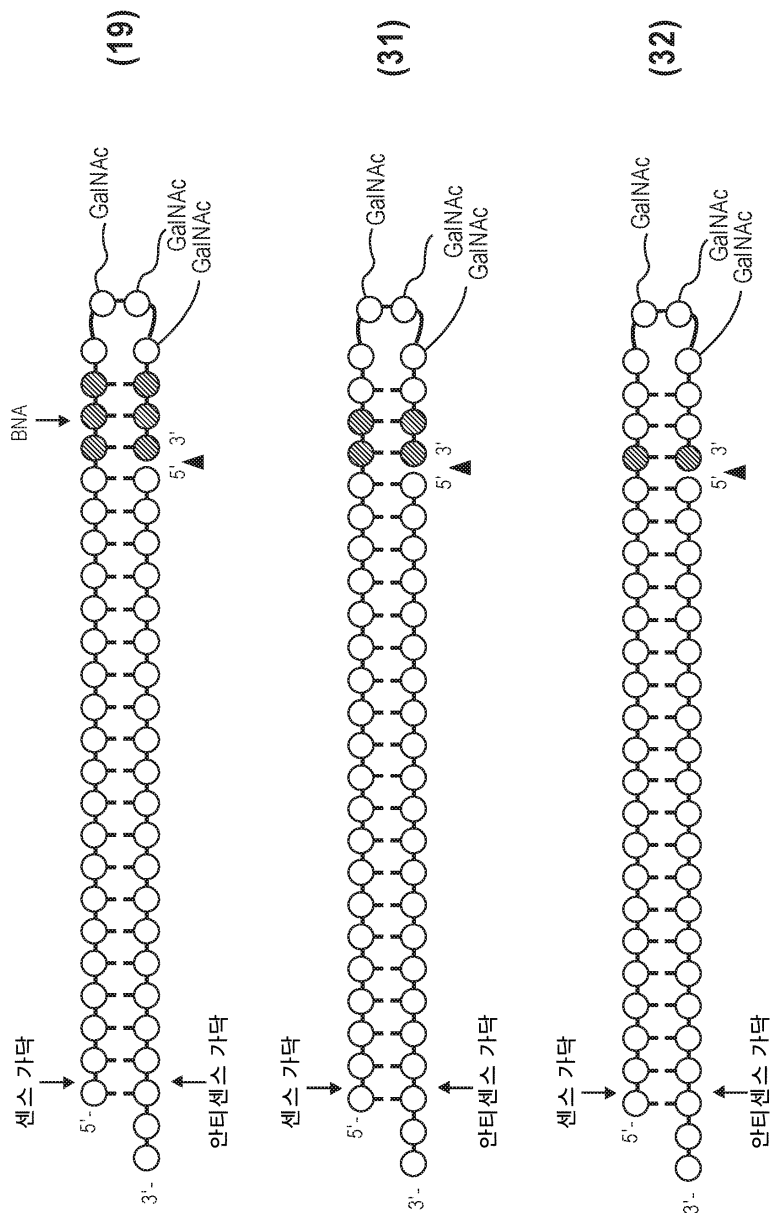
도면13



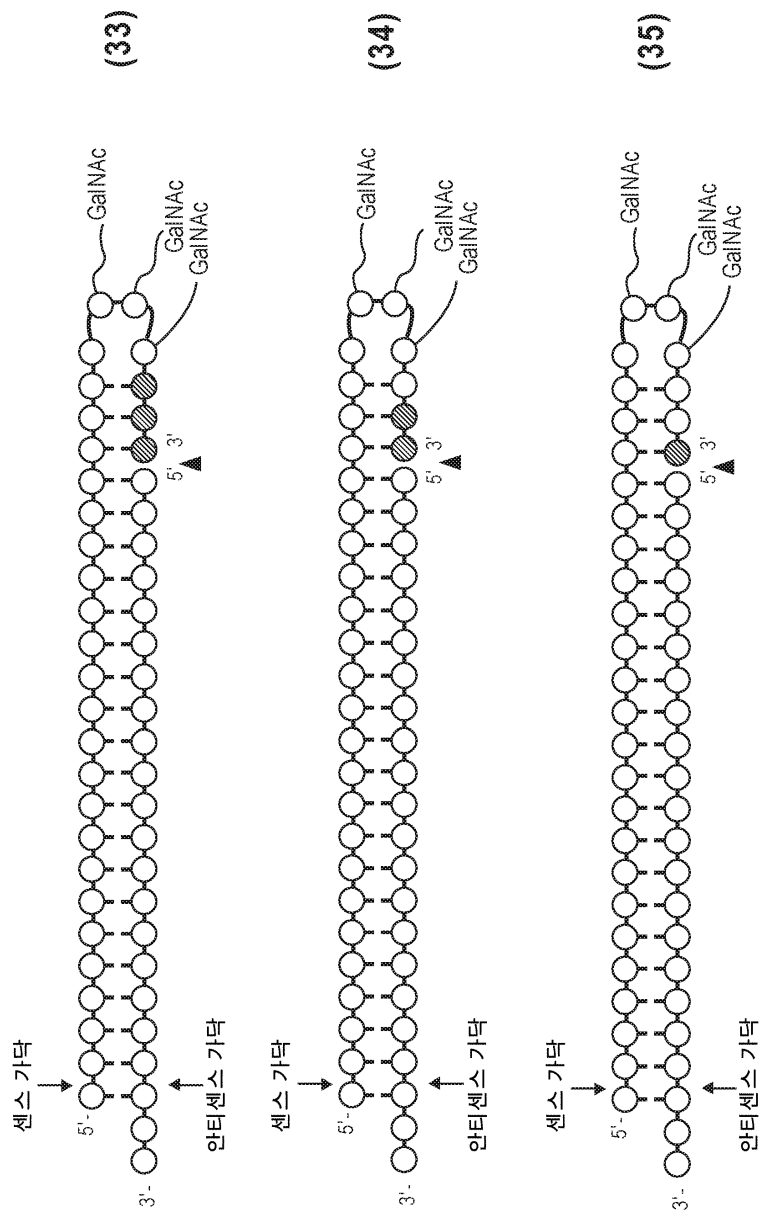
도면14a



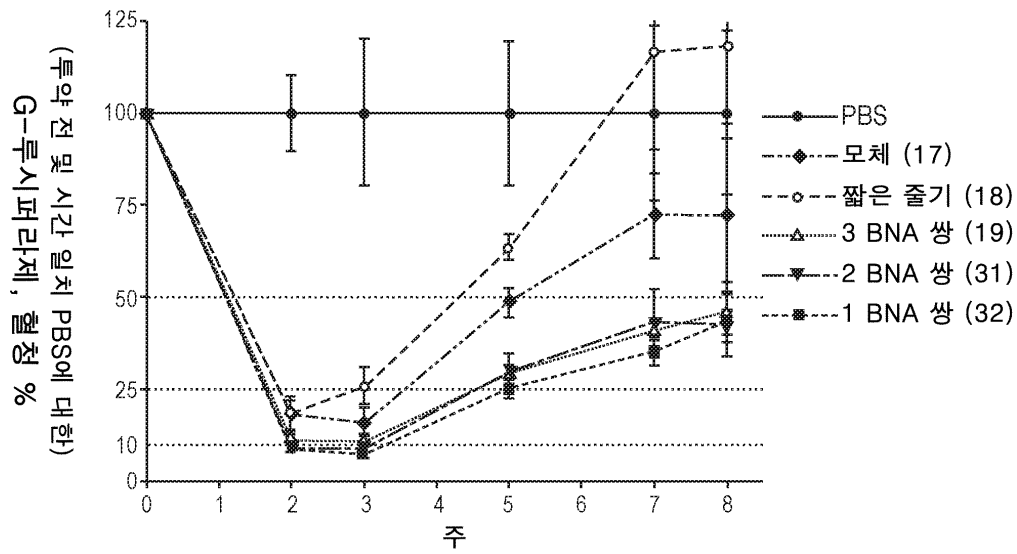
도면14b



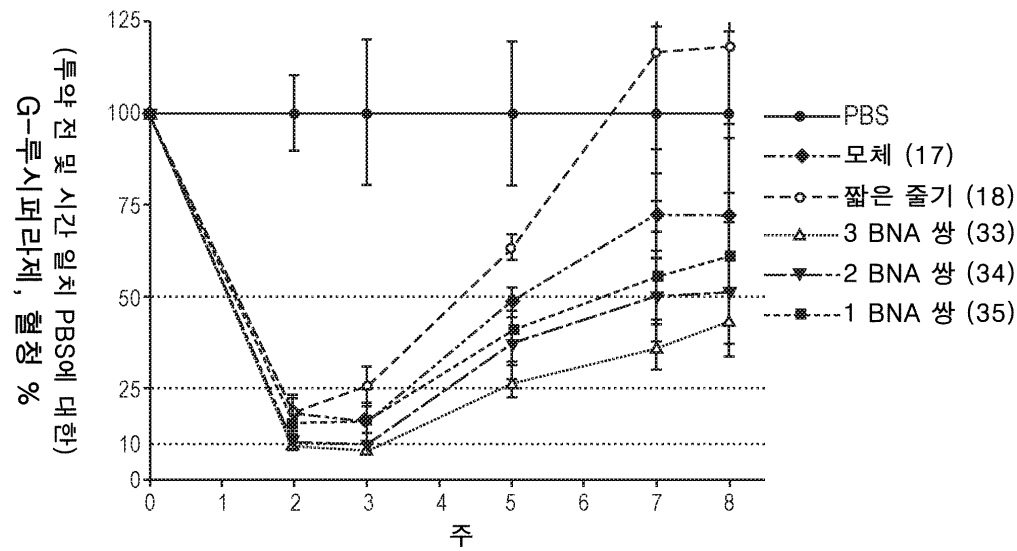
도면14c



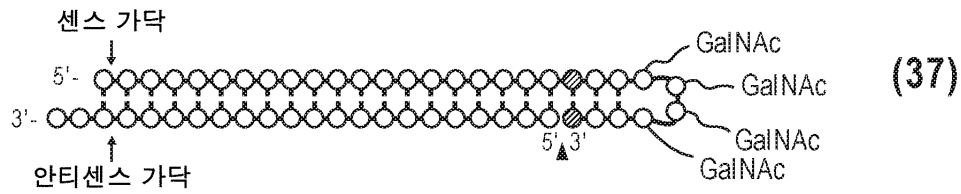
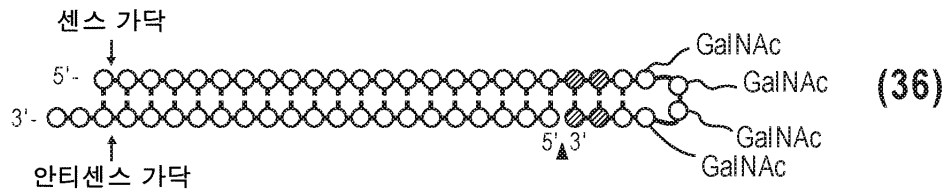
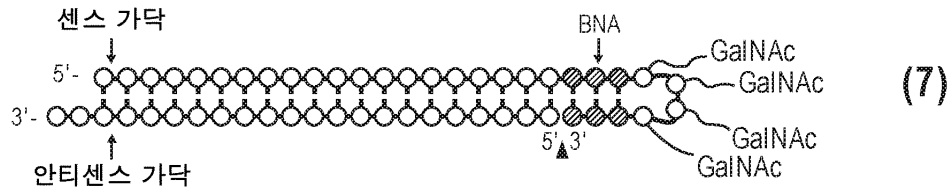
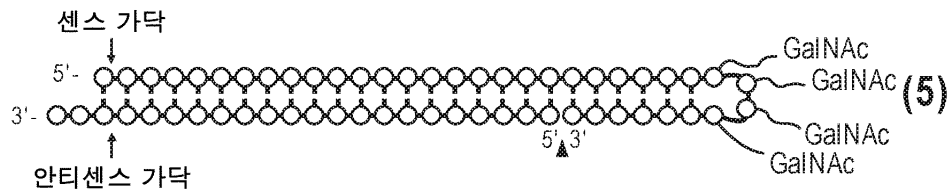
도면15a



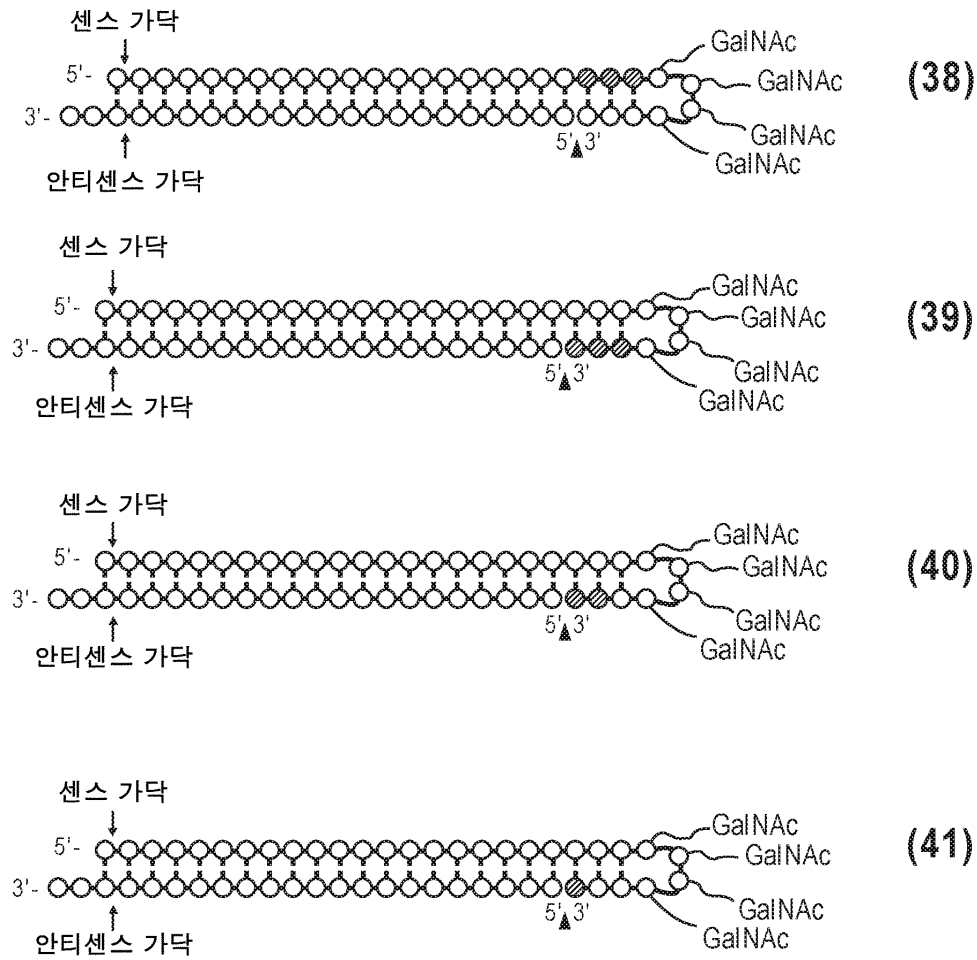
도면15b



도면16a



도면16b



도면17

