

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0041973  
(43) 공개일자 2024년04월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7088 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)  
C12N 5/0783 (2010.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 15/1138 (2013.01)  
A61K 31/7088 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7006530  
(22) 출원일자(국제) 2022년08월04일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2024년02월27일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/074555  
(87) 국제공개번호 WO 2023/015265  
국제공개일자 2023년02월09일  
(30) 우선권주장  
63/229,438 2021년08월04일 미국(US)
- (71) 출원인  
피오 파마슈티칼스 코프.  
미국 01752 매사추세츠주 말보로 스위트 101 시마  
라노 드라이브 257
- (72) 발명자  
맥스웰, 펠리사  
미국 01510 매사추세츠 클린턴 플레즌트 스트리트  
83  
카디어, 제임스  
미국 02038 매사추세츠 프랭클린 베이컨 스트리트  
11  
프리카, 사이먼  
미국 01752 매사추세츠 말보로 시마라노 드라이브  
257 스위트 101
- (74) 대리인  
양영준, 김영

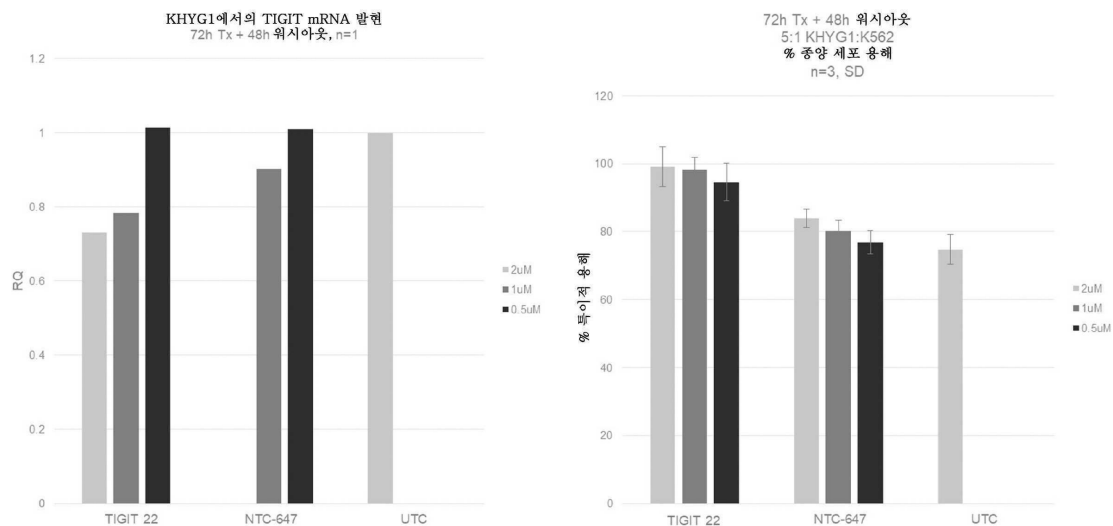
전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 화학적으로 변형된 올리고뉴클레오타이드

## (57) 요약

본 개시내용은, 일부 측면에서, Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT)를 코딩하는 유전자에 대해 지시된 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자에 관한 것이다.

## 대표도



(52) CPC특허분류

**A61P 35/00** (2018.01)

**C07K 14/7051** (2013.01)

**C12N 5/0636** (2023.05)

**C12N 2310/14** (2013.01)

**C12N 2310/315** (2013.01)

**C12N 2310/321** (2013.01)

**C12N 2310/3515** (2013.01)

**C12N 2320/32** (2013.01)

**C12N 2510/00** (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT)를 코딩하는 유전자에 대해 지시된 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자로서, 서열식별번호: 1-6 및 27로부터 선택된 서열의 적어도 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 서열식별번호: 1-6 및 27로부터 선택된 서열을 포함하는 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자.

#### 청구항 3

Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT)를 코딩하는 유전자에 대해 지시된 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자로서, 서열식별번호: 28의 적어도 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 서열에 대해 지시된 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 서열식별번호: 28에 대해 지시된 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 인타실™을 포함하는 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 소수성으로 변형된, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자.

#### 청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 이상의 소수성 집합체에 연결된, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 소수성 집합체가 콜레스테롤인 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1개의 2'-O-메틸 변형 및/또는 적어도 1개의 2'-O-플루오로 변형, 및 적어도 1개의 포스포로티오에이트 변형을 포함하는 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, TIGIT 22 (서열식별번호: 1-2), TIGIT 23 (서열식별번호: 3-4) 및 TIGIT 24 (서열식별번호: 5-6)로부터 선택된 서열을 포함하는 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자.

#### 청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 갖는 센스 가닥 (TIGIT 22 센스 가닥) 및/또는 서열식별번호: 2에 제시된 서열을 갖는 안티센스 가닥 (TIGIT 22 안티센스 가닥)을 포함하는 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자.

#### 청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 3에 제시된 서열을 갖는 센스 가닥 (TIGIT 23 센스 가닥) 및/또는 서열식별번호: 4에 제시된 서열을 갖는 안티센스 가닥 (TIGIT 23 안티센스 가닥)을 포함하는 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자.

#### 청구항 13

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 5에 제시된 서열을 갖는 센스 가닥 (TIGIT 24 센스 가닥) 및/또는 서열식별번호: 6에 제시된 서열을 갖는 안티센스 가닥 (TIGIT 24 안티센스 가닥)을 포함하는 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자.

#### 청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 조성물.

#### 청구항 15

서열식별번호: 1-6 및 27의 적어도 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 포함하는 면역원성 조성물로서, 여기서 숙주 세포는 T-세포, 항원-제시 세포 (APC), 수지상 세포 (DC), 줄기 세포 (SC), 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC), 및 줄기 세포 기억 T-세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 면역원성 조성물.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자가 서열식별번호: 1-6 및 27로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 면역원성 조성물.

#### 청구항 17

Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT)를 코딩하는 유전자에 대해 지시된 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 포함하는 면역원성 조성물로서, 여기서 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 서열식별번호: 28의 적어도 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 서열에 대해 지시되고, 여기서 숙주 세포는 T-세포, 항원-제시 세포 (APC), 수지상 세포 (DC), 줄기 세포 (SC), 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC), 및 줄기 세포 기억 T-세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 면역원성 조성물.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자가 서열식별번호: 28에 대해 지시된 것인 면역원성 조성물.

#### 청구항 19

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자가 인타실™인 면역원성 조성물.

#### 청구항 20

제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자가 소수성으로 변형된 것인 면역원성 조성물.

#### 청구항 21

제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자가 1개 이상의 소수성 접합체에 연결된 것인 면역원성 조성물.

#### 청구항 22

제15항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자가 적어도 1개의 2'-O-메틸 변형 및/또는 적어도 1개의 2'-O-플루오로 변형, 및 적어도 1개의 포스포로티오에이트 변형을 포함하는 것인

면역원성 조성물.

#### 청구항 23

제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 T-세포인 면역원성 조성물.

#### 청구항 24

제23항에 있어서, T-세포가 고친화도 T-세포 수용체 (TCR) 및/또는 키메라 항체 수용체 (CAR)를 발현하는 1개 이상의 트랜스진을 포함하는 것인 면역원성 조성물.

#### 청구항 25

제15항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 건강한 공여자로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

#### 청구항 26

제15항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자가 숙주 세포에서 TIGIT의 적어도 50% 억제를 유도하는 것인 면역원성 조성물.

#### 청구항 27

면역원성 조성물을 생산하는 방법으로서, 숙주 세포 내로 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 도입하는 것을 포함하며, 그 중 적어도 1개는 서열식별번호: 1-6 및 27의 적어도 12개의 인접 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT)를 표적화하는 것이며, 이에 의해 숙주 세포를 생산하고, 여기서 숙주 세포는 T-세포, 항원-제시 세포 (APC), 수지상 세포 (DC), 줄기 세포 (SC), 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC), 및 줄기 세포 기억 T-세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

#### 청구항 28

제27항에 있어서, 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자 중 적어도 1개가 서열식별번호: 1-6 및 27로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 29

면역원성 조성물을 생산하는 방법으로서, 숙주 세포 내로 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 도입하는 것을 포함하며, 그 중 적어도 1개는 서열식별번호: 28의 적어도 12개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 서열에 대해 지시되고, 여기서 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT)를 표적화하는 것이며, 이에 의해 숙주 세포를 생산하고, 여기서 숙주 세포는 T-세포, 항원-제시 세포 (APC), 수지상 세포 (DC), 줄기 세포 (SC), 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC), 및 줄기 세포 기억 T-세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

#### 청구항 30

제29항에 있어서, 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자 중 적어도 1개가 서열식별번호: 28에 대해 지시된 것인 방법.

#### 청구항 31

면역원성 조성물을 생산하는 방법으로서, 숙주 세포 내로 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 도입하는 것을 포함하며, 여기서 숙주 세포는 T-세포, 항원-제시 세포 (APC), 수지상 세포 (DC), 줄기 세포 (SC), 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC), 및 줄기 세포 기억 T-세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

#### 청구항 32

제31항에 있어서, 세포가 T-세포인 방법.

#### 청구항 33

제32항에 있어서, T-세포가 고친화도 T-세포 수용체 (TCR) 및/또는 키메라 항체 수용체 (CAR)를 발현하는 1개 이상의 트랜스جين을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 34

제27항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 건강한 공여자로부터 유래된 것인 방법.

#### 청구항 35

제27항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포를 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하지 않는 위시아웃 배지 중에 24시간 내지 6일 동안 재현탁시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 36

제35항에 있어서, 숙주 세포가 위시아웃 배지 중에 24시간 내지 96시간 동안 재현탁되는 것인 방법.

#### 청구항 37

제36항에 있어서, 숙주 세포가 위시아웃 배지 중에 48시간 동안 재현탁되는 것인 방법.

#### 청구항 38

제37항에 있어서, 숙주 세포가 위시아웃 배지 중에 96시간 동안 재현탁되는 것인 방법.

#### 청구항 39

제27항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하지 않는 위시아웃 배지 중에 재현탁되지 않는 것인 방법.

#### 청구항 40

증식성 질환 또는 감염성 질환을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에게 제14항의 조성물 또는 제15항 내지 제26항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 41

제40항에 있어서, 증식성 질환이 암인 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

- [0001] 관련 출원
- [0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2021년 8월 4일에 출원된 발명의 명칭 "CHEMICALLY MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES"의 미국 가출원 일련 번호 63/229,438의 이익을 주장하며, 그의 전체 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] 전자 서열 목록에 대한 참조
- [0004] 전자 서열 목록의 내용 (R065970058W000-SEQ-JXV.xml; 크기: 103,856 바이트; 및 생성일: 2022년 8월 4일)은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0005] 발명의 분야
- [0006] 일부 측면에서, 본 개시내용은 Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT)를 코딩하는 유전자에 대해 지시된 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자에 관한 것이다.

### 배경 기술

- [0007] 면역계의 생리학적 기능은 신생물성 세포를 인식하고 제거하는 것이다. 따라서, 종양 진행의 측면은 면역 저항성 메커니즘의 발생이다. 일단 발생하면, 이들 저항성 메커니즘은 천연 면역계가 종양 성장에 영향을 미치는

것을 막을 뿐만 아니라, 암에 대한 임의의 면역요법 접근의 효능을 제한한다. 면역 저항성 메카니즘은 때때로 면역 체크포인트로 지칭되는 면역-억제 경로를 수반한다. 입양 세포 전달 (ACT) 치료제를 포함하여, 면역-억제 경로는 종양 세포와 CD8+ 세포독성 T-림프구 사이의 상호작용에서 특히 중요한 역할을 한다.

[0008] 다양한 입양 세포 전달 (ACT) 방법은 환자의 샘플, 예컨대 혈액 또는 종양 물질로부터 수집된 세포의 생체의 처리를 수반한다. 세포-기반 치료의 준비에 수반되는 통상적인 단계는 1차 공급원 (예를 들어, 말초 혈액)으로부터의 세포의 분리, 유전자 편집 (예를 들어, 키메라 항원 수용체 (CAR) T-세포 또는 조작된 T-세포 수용체 (TCR) 세포의 조작), 활성화 및 확장이다.

[0009] 생체의 프로세스 동안, 세포는 그의 치료적 특성, 예컨대 특히 종양으로의 트래픽킹, 생체내 증식 능력 및 장수명, 및 면역억제 환경에서의 그의 효능에 영향을 미칠 수 있는 특정 표현형 변화를 겪는다. 예를 들어, T-세포 분화 및 성숙 상태는 전형적으로 하기 하위유형의 순서를 통해 진행된다: 나이브 (TN) - 줄기 세포 기억 (TSCM) - 중심 기억 (TCM) - 이펙터 기억 (TEM) - 말단 분화된 이펙터 T 세포 (TEFF). CD8+ T 세포 중에서 초기 기억 T-세포 (TSCM/TCM)의 표현형 및 기능적 속성은 보다 분화된 이펙터 세포 (예를 들어, TEM, TEFF 등)보다 더 뛰어난 생체내 확장, 지속성 및 항종양 효능을 입증하는 것으로 관찰되었다.

[0010] 암의 면역요법은 임상 실무에서 점점 더 중요해지고 있다. 면역 반응을 도출하거나 증폭시키도록 설계된 면역요법은 활성화 면역요법으로서 분류될 수 있는 한편, 면역 반응을 감소시키거나 억제하는 면역요법은 억제 면역요법으로서 분류될 수 있다. 암 면역 저항성 메카니즘을 방지하는 하나의 활성화 면역요법 전략은 숙주 면역 반응을 자극하거나 유지시키기 위해 면역 체크포인트를 억제하는 것이다 (예를 들어, 체크포인트-표적화 모노클로날 항체를 사용하는 것에 의함).

[0011] 그러나, 체크포인트 억제제와 조합하여 암 면역요법제를 사용하는 것의 다수의 결점이 존재한다. 예를 들어, 면역 체크포인트 차단은 면역 자기-관용의 파괴로 이어질 수 있고, 이에 의해 "면역 관련 유해 사건"으로 불리는 신규의 자가면역/자가-염증성 부작용 증후군을 유도한다. 추가적으로, 체크포인트 억제제의 독성 프로파일은, 보고된 바로는 다른 부류의 종양학 작용제에 대해 보고된 독성 프로파일과 상이하고, 피부, 위장, 내분비, 폐, 간, 안구 및 신경계를 포함한 다발성 기관계에서 염증 사건을 유도할 수 있다.

## 발명의 내용

[0012] 본 개시내용은 일부 측면에서, Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT)를 코딩하는 유전자에 대해 지시된 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 제공하며, 여기서 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 서열식별번호(SEQ ID NO): 1-6 및 27로부터 선택된 서열의 적어도 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 서열식별번호: 1-6 및 27로부터 선택된 서열을 포함한다.

[0014] 본 개시내용의 또 다른 측면은 Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT)를 코딩하는 유전자에 대해 지시된 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 제공하며, 여기서 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 서열식별번호: 28의 적어도 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 서열에 대해 지시된다.

[0015] 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 서열식별번호: 28에 대해 지시된다.

[0016] 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 인타실(INTASYL)<sup>TM</sup>을 포함한다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 소수성으로 변형된다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 1개 이상의 소수성 접합체에 연결된다. 일부 실시양태에서, 소수성 접합체는 콜레스테롤이다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 적어도 1개의 2'-O-메틸 변형 및/또는 적어도 1개의 2'-O-플루오로 변형, 및 적어도 1개의 포스포로티오에이트 변형을 포함한다.

[0017] 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 TIGIT 22 (서열식별번호: 1-2), TIGIT 23 (서열식별번호: 3-4) 및 TIGIT 24 (서열식별번호: 5-6)로부터 선택된 서열을 포함한다.

[0018] 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 갖는 센스 가닥 (TIGIT 22 센스 가닥) 및/또는 서열식별번호: 2에 제시된 서열을 갖는 안티센스 가닥 (TIGIT 22 안티센스 가닥)을 포함한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 서열식별번호: 3에 제시된 서열을 갖는 센스 가닥 (TIGIT 23 센스 가닥) 및/또는 서열식별번호: 4에 제시된 서열을 갖는 안티센스 가닥 (TIGIT 23 안티센스 가닥)을 포함한다.

다)을 포함한다.

- [0020] 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 서열식별번호: 5에 제시된 서열을 갖는 센스 가닥 (TIGIT 24 센스 가닥) 및/또는 서열식별번호: 6에 제시된 서열을 갖는 안티센스 가닥 (TIGIT 24 안티센스 가닥)을 포함한다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 개시내용의 측면은 서열식별번호: 1-6 및 27의 적어도 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 포함하는 면역원성 조성물을 제공하며, 여기서 숙주 세포는 T-세포, 항원-제시 세포 (APC), 수지상 세포 (DC), 줄기 세포 (SC), 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC) 및 줄기 세포 기억 T-세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0023] 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 서열식별번호: 1-6 및 27로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0024] 본 개시내용의 측면은 Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT)를 코딩하는 유전자에 대해 지시된 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 포함하는 면역원성 조성물을 제공하며, 여기서 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 서열식별번호: 28의 적어도 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 서열에 대해 지시되고, 여기서 숙주 세포는 T-세포, 항원-제시 세포 (APC), 수지상 세포 (DC), 줄기 세포 (SC), 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC), 및 줄기 세포 기억 T-세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 서열식별번호: 28에 대해 지시된다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 인타실™을 포함한다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 소수성으로 변형된다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 1개 이상의 소수성 접합체에 연결된다. 일부 실시양태에서, 소수성 접합체는 콜레스테롤이다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 적어도 1개의 2'-O-메틸 변형 및/또는 적어도 1개의 2'-O-플루오로 변형, 및 적어도 1개의 포스포로티오에이트 변형을 포함한다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 인타실™을 포함한다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 소수성으로 변형된다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 1개 이상의 소수성 접합체에 연결된다. 일부 실시양태에서, 소수성 접합체는 콜레스테롤이다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 적어도 1개의 2'-O-메틸 변형 및/또는 적어도 1개의 2'-O-플루오로 변형, 및 적어도 1개의 포스포로티오에이트 변형을 포함한다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 T-세포이다. 일부 실시양태에서, T-세포는 고친화도 T-세포 수용체 (TCR) 및/또는 키메라 항체 수용체 (CAR)를 발현하는 1개 이상의 트랜스젠을 포함한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 건강한 공여자로부터 유래된 것이다.
- [0029] 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 숙주 세포에서 TIGIT의 적어도 50% 억제를 유도한다.
- [0030] 본 개시내용은 또 다른 측면에서 면역원성 조성물을 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 숙주 세포 내로 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 도입하는 것을 포함하고, 그 중 적어도 1개는 서열식별번호: 1-6 및 27의 적어도 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT)를 표적화하는 것이며, 이에 의해 숙주 세포를 생산하고, 여기서 숙주 세포는 T-세포, 항원-제시 세포 (APC), 수지상 세포 (DC), 줄기 세포 (SC), 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC), 및 줄기 세포 기억 T-세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0031] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자 중 적어도 1개는 서열식별번호: 1-6 및 27로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0032] 본 개시내용의 또 다른 측면은 면역원성 조성물을 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 숙주 세포 내로 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 도입하는 것을 포함하고, 그 중 적어도 1개는 서열식별번호: 28의 적어도 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 서열에 대해 지시되고, 여기서 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT)를 표적화하는 것이며, 이에 의

해 숙주 세포를 생산하고, 여기서 숙주 세포는 T-세포, 항원-제시 세포 (APC), 수지상 세포 (DC), 줄기 세포 (SC), 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC), 및 줄기 세포 기억 T-세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0033] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자 중 적어도 1개는 서열식별번호: 28에 대해 지시된다.

[0034] 본 개시내용의 측면은 면역원성 조성물을 생산하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 숙주 세포 내로 본원에 기재된 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 도입하는 것을 포함하고, 여기서 숙주 세포는 T-세포, 항원-제시 세포 (APC), 수지상 세포 (DC), 줄기 세포 (SC), 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC), 및 줄기 세포 기억 T-세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법이 제공된다.

[0035] 일부 실시양태에서, 세포는 T-세포이다. 일부 실시양태에서, T-세포는 고친화도 T-세포 수용체 (TCR) 및/또는 키메라 항체 수용체 (CAR)를 발현하는 1개 이상의 트랜스젠을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 건강한 공여자로부터 유래된 것이다.

[0036] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 숙주 세포를 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하지 않는 위시아웃 배지 중에 24시간 내지 6일 동안 재현탁시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 위시아웃 배지 중에 24시간 내지 96시간 동안 재현탁된다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 위시아웃 배지 중에 48시간 동안 재현탁된다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 위시아웃 배지 중에 96시간 동안 재현탁된다.

[0037] 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하지 않는 위시아웃 배지 중에 재현탁되지 않는다.

[0038] 본 개시내용의 측면은 증식성 질환 또는 감염성 질환을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 상기 대상체에게 본원에 기재된 조성물 또는 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0039] 일부 실시양태에서, 증식성 질환은 암이다.

[0040] 본 발명의 각각의 제한은 본 발명의 다양한 실시양태를 포괄할 수 있다. 따라서, 어느 하나의 요소 또는 요소들의 조합을 수반하는 본 발명의 각각의 제한은 본 발명의 각각의 측면에 포함될 수 있는 것으로 예상된다. 본 발명은 그의 적용에 있어서 하기 설명에 제시되거나 도면에 예시된 성분의 구축 및 배열의 세부사항으로 제한되지 않는다. 본 발명은 다른 실시양태가 가능하고, 다양한 방식으로 실시되거나 수행될 수 있다.

[0041] 또한, 본원에 사용된 어구 및 용어는 설명의 목적을 위한 것이며, 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다. 본원에서 "비롯한", "포함하는" 또는 "갖는", "함유하는", "수반하는" 및 그의 변형의 사용은 그 뒤에 열거된 항목 및 그의 등가물뿐만 아니라 추가의 항목을 포괄하는 것으로 의도된다.

## 도면의 간단한 설명

[0042] 첨부된 도면은 척도화되어 그려진 것으로 의도되지 않는다. 도면에서, 다양한 도면에 예시된 각각의 동일한 또는 거의 동일한 성분은 같은 숫자로 나타내어진다. 명료함을 위해, 모든 성분이 모든 도면에서 라벨링되지 않을 수 있다. 도면에서:

도 1은 TIGIT를 표적화하는 인타실™ 화합물이 NK 세포의 활성을 증진시키는 능력을 시험하기 위해 이용되는 실험 설정의 개관을 제공한다.

도 2는 TIGIT-표적화 인타실™ 화합물로 처리된 NK 세포에 의한 종양 세포 사멸을 보여준다. TIGIT mRNA 수준은 좌측에 제시되고, 퍼센트 특이적 용해는 우측에 제시된다.

도 3은 96시간 위시아웃 기간 후의 TIGIT-표적화 인타실™ 화합물로 처리된 NK 세포에 의한 종양 세포 사멸을 보여준다. TIGIT 표면 단백질 발현은 좌측에 제시되고, 퍼센트 특이적 용해는 우측에 제시된다. UTC=비-형질감염된 대조군, NTC=비-표적화 대조군.

도 4는 6일 위시아웃 기간 후의 TIGIT-표적화 인타실™ 화합물로 처리된 NK 세포에 의한 종양 세포 사멸을 보여준다. TIGIT 표면 단백질 발현은 좌측에 제시되고, 퍼센트 특이적 용해는 우측에 제시된다. UTC=비-형질감염된 대조군, NTC=비-표적화 대조군.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 일부 측면에서, 본 개시내용은 Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T-세포 면역수용체 (TIGIT)를 표적화하는 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자 (예를 들어, 인타실™)에 관한 것이다. 본원에 개시된 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 면역요법에 사용될 수 있다.
- [0044] 인타실™ 기술은 면역요법을 위해, 예컨대 숙주 세포 (예를 들어, T 세포)에서 관심 유전자를 조정하는 데 특히 적합하다. 인타실™의 여러 이점은 하기를 포함한다: (i) 인타실™은 단기간 내에 개발될 수 있고, "비-약물화 가능한" 표적, 예를 들어 소분자, 예를 들어 전사 인자에 의해 억제하기 어려운 것을 포함한 실질적으로 임의의 표적을 침묵시킬 수 있음; (ii) 대안적 생체의 siRNA 형질감염 기술 (예를 들어, 지질 매개된 형질감염 또는 전기천공)과 비교하여, 인타실™은 T 세포를 포함한 다양한 세포 유형을 높은 세포 생존율을 유지하면서 높은 형질감염 효율로 형질감염시킬 수 있음; (iii) 초기 확장 단계에서 세포 배양 배지에 첨가되는 경우에, 인타실™ 화합물은 8-10 분열 주기 동안 관심 표적의 일시적 침묵을 제공함; (iv) 인타실™은 다중 표적을 동시에 침묵시키기 위해 조합되어 사용될 수 있고, 따라서 상이한 유형의 세포 처리 프로토콜에서의 사용을 위한 상당한 유연성을 제공함.
- [0045] TIGIT에 대해 지시된 인타실™ 화합물이 본원에 기재된다.
- [0046] 본원에 사용된 "핵산 분자"는 인타실™, sd-rxRNA, rxRNAori, 올리고뉴클레오타이드, ASO, siRNA, shRNA, miRNA, ncRNA, cp-lasiRNA, aiRNA, 단일-가닥 핵산 분자, 이중 가닥 핵산 분자, RNA 및 DNA를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 화학적으로 변형된 핵산 분자, 예컨대 화학적으로 변형된 올리고뉴클레오타이드이다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 이중 가닥이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 인타실™ (또한 sd-rxRNA로도 공지됨) 분자이다.
- [0047] 인타실™ (sd-rxRNA) 분자
- [0048] 본 발명의 측면은 TIGIT를 표적화하는 인타실™ 분자에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 인타실™ 분자는 표 1에 제시된 서열 또는 그의 단편을 포함하거나 또는 그로 이루어지거나, 또는 그에 대해 표적화되거나 또는 그에 대해 지시된다.
- [0049] 본원에 사용된 "sd-rxRNA" 또는 "sd-rxRNA 분자" 또는 "인타실™" 또는 "인타실™ 분자" 또는 "인타실™ 화합물"은 자기-전달 RNA 분자, 예컨대 2014년 8월 5일에 허여된 발명의 명칭 "REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS"의 미국 특허 번호 8,796,443, 2015년 7월 14일에 허여된 발명의 명칭 "REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS"의 미국 특허 번호 9,080,171, 2015년 11월 3일에 허여된 발명의 명칭 "REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS"의 미국 특허 번호 9,175,289, 2019년 3월 26일에 허여된 발명의 명칭 "REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS"의 미국 특허 번호 10,240,149, 2020년 9월 15일에 허여된 발명의 명칭 "REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS"의 미국 특허 번호 10,774,330, 2021년 9월 14일에 허여된 발명의 명칭 "REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS"의 미국 특허 번호 11,118,178, 2009년 9월 22일에 출원된 발명의 명칭 "REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS"의 PCT 공개 번호 WO2010/033247 (출원 번호 PCT/US2009/005247), 및 2011년 3월 24일에 출원된 발명의 명칭 "REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS"의 PCT 공개 번호 WO2011/119852 (출원 번호 PCT/US2011/029824)에 기재되고 이로부터 참조로 포함되는 것을 지칭한다. 간략하게, 인타실™ (또한 sd-rxRNA<sup>나노</sup>로도 지칭됨)은 최소 길이 16 개의 뉴클레오타이드를 갖는 가이드 가닥 및 8-18개의 뉴클레오타이드 길이의 패신저 가닥을 포함하는 단리된 비대칭 이중 가닥 핵산 분자이며, 여기서 이중 가닥 핵산 분자는 이중 가닥 영역 및 단일 가닥 영역을 갖고, 단일 가닥 영역은 4-12개의 뉴클레오타이드 길이를 갖고 적어도 3개의 뉴클레오타이드 백본 변형을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 이중 가닥 핵산 분자는 평활한 1개의 단부를 갖거나, 또는 1 또는 2개의 뉴클레오타이드 오버행을 포함한다. 인타실™ 분자는 화학적 변형을 통해, 및 일부 경우에 소수성 접합체의 부착을 통해 최적화될 수 있다. 상기 언급된 특허 및 공보 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0050] 일부 실시양태에서, 인타실™은 가이드 가닥 및 패신저 가닥을 포함하는 단리된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하며, 여기서 이중 가닥인 분자의 영역은 8-15개의 뉴클레오타이드 길이이고, 여기서 가이드 가닥은 4-12개의 뉴클레오타이드 길이인 단일 가닥 영역을 함유하고, 여기서 가이드 가닥의 단일 가닥 영역은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 포스포로티오에이트 변형을 함유하고, 여기서 이중 가닥 핵산의 뉴클레오타이드 중 적어도 40%는 변형된다.
- [0051] 일부 실시양태에서, 인타실™은 가이드 가닥 및 패신저 가닥을 포함하는 단리된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하며, 여기서 이중 가닥인 분자의 영역은 8-15개의 뉴클레오타이드 길이이고, 여기서 가이드 가닥은 4-12개의 뉴클

레오티드 길이인 단일 가닥 영역을 함유하고, 여기서 가이드 가닥의 단일 가닥 영역은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 포스포로티오에이트 변형을 함유하고, 여기서 이중 가닥 핵산의 뉴클레오티드 중 적어도 40%는 변형되고, 여기서 1개의 가닥은 가닥의 5' 또는 3' 단부에서 콜레스테롤에 접합된다. 일부 실시양태에서, 패신저 가닥은 가닥의 5' 또는 3' 단부에서 콜레스테롤에 접합된다.

[0052] 일부 실시양태에서, 인타실™은 가이드 가닥 및 패신저 가닥을 포함하는 단리된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하며, 여기서 이중 가닥인 분자의 영역은 8-15개의 뉴클레오티드 길이이고, 여기서 가이드 가닥은 4-12개의 뉴클레오티드 길이인 단일 가닥 영역을 함유하고, 여기서 가이드 가닥의 단일 가닥 영역은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 포스포로티오에이트 변형을 함유하고, 여기서 이중 가닥 핵산의 뉴클레오티드 중 적어도 40%는 변형되고, 여기서 1개의 가닥, 예를 들어 패신저 가닥은 패신저 가닥의 3' 단부에 접합된 소수성 모이어티를 함유하고, 여기서 소수성 모이어티는 콜레스테롤이다.

[0053] 본 개시내용과 연관된 핵산 분자는 본원에서 단리된 이중 가닥 또는 듀플렉스 핵산, 화학적으로 변형된 이중 가닥 또는 듀플렉스 핵산, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 나노 분자, 나노 RNA, sd-rxRNA<sup>나노</sup>, sd-rxRNA, 인타실™ 또는 본 발명의 RNA 분자로 지칭된다.

[0054] 인타실™ 분자는 통상적인 siRNA와 비교하여 세포에 의해 훨씬 더 효과적으로 흡수된다. 이들 분자는 표적 유전자 발현을 침묵시키는 데 고도로 효율적이고, 이전에 기재된 RNAi 분자에 비해 혈청의 존재 하에서의 높은 활성, 효율적인 자기-전달, 매우 다양한 링커와의 상용성, 및 독성과 연관된 화학적 변형의 존재 감소 또는 완전한 부재를 포함한 유의한 이점을 제공한다.

[0055] 단일-가닥 폴리뉴클레오티드와 대조적으로, 듀플렉스 폴리뉴클레오티드는 전통적으로 견고한 구조 및 막 투과를 어렵게 하는 다수의 음전하를 갖고 있기 때문에 세포로의 전달이 어려웠다. 그러나, 인타실™ 분자는 부분적으로 이중 가닥이긴 하지만, 생체내에서 단일-가닥으로 인식되고, 따라서 세포 막을 가로질러 효율적으로 전달될 수 있다. 그 결과, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 많은 경우에 자기-전달이 가능하다. 따라서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 통상적인 RNAi 작용제와 유사한 방식으로 체제화될 수 있거나, 또는 단독으로 (또는 비-전달 유형 담체와 함께) 세포 또는 대상체로 전달되고 자기-전달되도록 할 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 분자의 한 부분은 통상적인 RNA 듀플렉스와 유사하고 분자의 제2 부분은 단일 가닥인 자기-전달 비대칭 이중 가닥 RNA 분자가 제공된다.

[0056] 일부 측면에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 이중 가닥 영역, 및 5개 이상의 뉴클레오티드의 특이적 화학적 변형 패턴의 단일 가닥 영역을 포함하는 비대칭 구조의 조합을 갖고, 친지성 또는 소수성 분자에 접합된다. 일부 실시양태에서, 이러한 부류의 RNAi 유사 화합물은 시험관내 및 생체내에서 우수한 효능을 갖는다. 단일 가닥 영역에 적용된 포스포로티오에이트 변형과 조합된 견고한 듀플렉스 영역의 크기의 감소는 관찰된 우수한 효능에 기여하는 것으로 여겨진다.

[0057] 일부 실시양태에서, 본 발명의 RNAi 화합물은 8-15개 염기 길이의 듀플렉스 영역 (효율적인 RISC 진입에 요구됨) 및 4-12개의 뉴클레오티드 길이의 단일 가닥 영역을 포함하는 비대칭 화합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 듀플렉스 영역은 13 또는 14개의 뉴클레오티드 길이이고, 일부 실시양태에서, 단일 가닥 영역은 6-7개의 뉴클레오티드 길이이다. RNAi 화합물 (예를 들어, 인타실™ 분자)의 단일 가닥 영역은 또한 2-12개의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결 (포스포로티오에이트 변형으로 지칭됨)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단일 가닥 영역은 6-8개의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결을 포함한다. 추가적으로, 본 발명의 RNAi 화합물은 안정성을 제공하고 RISC 진입과 상용성인 고유한 화학적 변형 패턴을 또한 포함한다. 일부 실시양태에서, 이들 요소의 조합은 시험관내 및 생체내 RNAi 시약의 전달에 고도로 유용한 예상외의 특성을 발생시켰다.

[0058] 안정성을 제공하고 RISC 진입과 상용성인 화학적 변형 패턴은 센스 또는 패신저 가닥, 뿐만 아니라 안티센스 또는 가이드 가닥에 대한 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 패신저 가닥은 안정성이 확인되고 활성을 방해하지 않는 임의의 화학 물질로 변형될 수 있다. 이러한 변형은 2' 리보 변형 (O-메틸, 2' F, 2 데옥시 등) 및 백본 변형, 예컨대 포스포로티오에이트 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 패신저 가닥에서의 화학적 변형 패턴은 패신저 가닥 내의 C 및 U 뉴클레오티드의 O-메틸 변형을 포함하거나, 또는 대안적으로 패신저 가닥은 완전히 O-메틸 변형될 수 있다.

[0059] 일부 실시양태에서, 가이드 가닥은 또한 RISC 진입을 방해하지 않으면서 안정성이 확인된 임의의 화학적 변형에 의해 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥에서의 화학적 변형 패턴은 2' F 변형된 대부분의 C 및 U 뉴클레오티드 및 인산화된 5' 단부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥에서의 화학적 변형 패턴은

위치 1의 2'-O-메틸 변형 및 위치 11-18에서의 C/U 및 5' 단부 화학적 인산화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥에서의 화학적 변형 패턴은 위치 1의 2'-O-메틸 변형 및 위치 11-18에서의 C/U 및 5' 단부 화학적 인산화 및 위치 2-10에서의 C/U의 2'F 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 패신저 가닥 및/또는 가이드 가닥은 적어도 1개의 5-메틸 C 또는 U 변형을 함유한다.

[0060] 일부 실시양태에서, sd-rxRNA (예를 들어, 인타실™ 화합물)의 뉴클레오타이드의 적어도 30%가 변형된다. 예를 들어, 인타실™ 화합물의 뉴클레오타이드의 적어도 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 변형된다. 일부 실시양태에서, 인타실™ 화합물의 뉴클레오타이드의 100%가 변형된다.

[0061] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 상기 기재된 화학적 변형 패턴은 잘 허용되고, 비대칭 RNAi 화합물의 효능을 개선시킨다. 일부 실시양태에서, 기재된 성분 중 임의의 것 (가이드 가닥 안정화, 포스포로티오에이트 스트레치, 센스 가닥 안정화, 소수성 접합체 및/또는 표적화 리간드)의 제거 또는 크기의 증가는 준최적 효능, 및 일부 경우에 효능의 완전한 상실을 유발할 수 있다. 요소의 조합은 세포로의 수동 전달 후 완전히 활성인 화합물의 발생을 유발한다.

[0062] 인타실™은 일부 경우에 신규 유형의 화학을 사용하여 화합물의 소수성을 개선시킴으로써 추가로 개선될 수 있다. 예를 들어, 1종의 화학은 소수성 염기 변형을 사용하는 것과 관련된다. 변형이 염기의 분배 계수의 증가를 발생시키는 한, 임의의 위치의 염기의 염기가 변형될 수 있다. 변형 화학을 위한 바람직한 위치는 피리미딘의 위치 4 및 5이다. 이들 위치의 주요 이점은 (a) 합성이 용이하고 (b) RISC 복합체 로딩 및 표적 인식에 필수적인 염기-쌍형성 및 A형 나선 형성에 대한 방해가 결여되어 있다는 것이다. 일부 실시양태에서, 전체 화합물 효능을 방해하지 않으면서 다중 테옥시 우리딘이 존재하는 인타실™ 화합물이 사용된다. 또한, 소수성 접합체의 구조를 변형시킴으로써 조직 분포 및 세포 흡수에서의 주요 개선이 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 스테롤의 구조는 C17 부착된 쇠를 변경 (증가/감소)시키도록 변형된다. 이러한 유형의 변형은 세포 흡수에서의 유의한 증가 및 생체내 조직 흡수 특성의 개선을 발생시킨다.

[0063] 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 센스 및 안티센스 가닥 각각에 3'-오버행이 있거나 없는 약 13-22개 염기 쌍의 이중 가닥 영역, 및 안티센스 가닥에 약 2-9개 뉴클레오타이드의 3' 단일 가닥 꼬리를 포함하는, 소수성으로 변형된 siRNA-안티센스 하이브리드 분자이다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 적어도 1개의 2'-O-메틸 변형, 적어도 1개의 2'-플루오로 변형, 및 적어도 1개의 포스포로티오에이트 변형, 뿐만 아니라 스테롤, 콜레스테롤, 비타민 D, 나프틸, 이소부틸, 벤질, 인돌, 트립토판, 페닐 등의 소수성 개질제로부터 선택된 적어도 1개의 소수성 변형을 함유한다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 복수의 이러한 변형을 포함한다.

[0064] 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 TIGIT를 코딩하는 유전자를 표적화한다. 본원에 사용된 "TIGIT"는 예를 들어 인터류킨 10 (IL-10) 생산을 증가시킴으로써 CD226/TIGIT-PVR 경로를 통해 T-세포 매개된 면역을 하향조절하는 면역 수용체인, Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T-세포 면역수용체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, TIGIT는 NCBI 참조 서열 번호 NM\_173799.3으로 나타내어지는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 본 개시내용의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자에 의해 표적화될 수 있는 TIGIT 서열의 비제한적 예는 표 1-2에 열거된다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자, 예컨대 인타실™은 서열식별번호: 28-48 중 어느 하나 또는 그의 부분을 표적화한다.

[0065] 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자, 예컨대 인타실™은 표 1 또는 2 내의 서열의 적어도 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자, 예컨대 인타실™은 표 1 또는 2 내의 적어도 1개의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자, 예컨대 인타실™은 서열식별번호: 1-48로부터 선택된 서열의 적어도 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 서열식별번호: 1-27로부터 선택된 서열의 적어도 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 서열식별번호: 1-48로부터 선택된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 갖는 센스 가닥 및/또는 서열식별번호: 2에 제시된 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 서열식별번호: 3에 제시된 서열을 갖는 센스 가닥 및/또는 서열식별번호: 4에 제시된 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함한다. 일

부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 서열식별번호: 5에 제시된 서열을 갖는 센스 가닥 및/또는 서열식별번호: 6에 제시된 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함한다.

[0066] 따라서, 본 발명의 측면은 가이드 (안티센스) 가닥 및 패신저 (센스) 가닥을 포함하는 단리된 이중 가닥 핵산 분자에 관한 것이다. 본원에 사용된 용어 "이중 가닥"은 뉴클레오단량체의 적어도 한 부분이 상보적이고 수소 결합하여 이중 가닥 영역을 형성한, 1개 이상의 핵산 분자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥의 길이는 16-29개의 뉴클레오티드 길이 범위이다. 특정 실시양태에서, 가이드 가닥은 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29개의 뉴클레오티드 길이이다. 가이드 가닥은 표적 유전자에 대해 상보성을 갖는다. 가이드 가닥과 표적 유전자 사이의 상보성은 가이드 가닥의 임의의 부분에 걸쳐 존재할 수 있다. 본원에 사용된 상보성은 완전한 상보성이거나, 또는 가이드 가닥이 RNAi를 매개하는 표적에 대해 충분히 상보성인 한 덜 완전한 상보성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상보성은 가이드 가닥과 표적 사이에서 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 미스매치를 지칭한다. 완전한 상보성은 100% 상보성을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 또한 표적 서열에 비해 삽입, 결실 및 단일 점 돌연변이를 갖는 siRNA 서열이 억제에 대해 효과적인 것으로 밝혀졌다. 또한, siRNA의 모든 위치가 표적 인식에 동등하게 기여하는 것은 아니다. siRNA의 중심에서의 미스매치가 가장 결정적이며, 본질적으로 표적 RNA 절단을 없앤다. 중심의 상류 또는 안티센스 가닥을 참조하여 절단 부위의 상류의 미스매치는 허용되지만, 표적 RNA 절단을 유의하게 감소시킨다. 중심 또는 안티센스 가닥을 참조하여 절단 부위의 하류, 바람직하게는 안티센스 가닥의 3' 단부 근처에 위치하는, 예를 들어 안티센스 가닥의 3' 단부로부터 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 뉴클레오티드의 미스매치는 허용되고, 표적 RNA 절단을 단지 약간 감소시킨다.

[0067] 어떠한 특정한 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 본원에 기재된 이중 가닥 핵산 분자의 일부 실시양태에서, 가이드 가닥은 적어도 16개의 뉴클레오티드 길이이고, RISC에 아르고노트 단백질을 고정시킨다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥이 RISC에 로딩되는 경우에, 이는 규정된 시드 영역을 갖고, 가이드 가닥의 위치 10-11의 맞은 편에서 표적 mRNA 절단이 일어난다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥의 5' 단부는 인산화되거나 또는 인산화될 수 있다. 본원에 기재된 핵산 분자는 최소 촉발 RNA로 지칭될 수 있다.

[0068] 본원에 기재된 이중 가닥 핵산 분자의 일부 실시양태에서, 패신저 가닥의 길이는 8-15개의 뉴클레오티드 길이 범위이다. 본원에 기재된 이중 가닥 핵산 분자의 일부 실시양태에서, 패신저 가닥의 길이는 8-16개의 뉴클레오티드 길이 범위이다. 특정 실시양태에서, 패신저 가닥은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16개의 뉴클레오티드 길이이다. 패신저 가닥은 가이드 가닥에 대해 상보성을 갖는다. 패신저 가닥과 가이드 가닥 사이의 상보성은 패신저 또는 가이드 가닥의 임의의 부분에 걸쳐 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자의 이중 가닥 영역 내에서 가이드 및 패신저 가닥 사이에 100% 상보성이 존재한다.

[0069] 본 발명의 측면은 최소의 이중 가닥 영역을 갖는 이중 가닥 핵산 분자에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 이중 가닥인 분자의 영역은 8-15개의 뉴클레오티드 길이 범위이다. 일부 실시양태에서, 이중 가닥인 분자의 영역은 8-16개의 뉴클레오티드 길이 범위이다. 특정 실시양태에서, 이중 가닥인 분자의 영역은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 이중 가닥 영역은 13 또는 14개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 이중 가닥인 분자의 영역은 13-22개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 이중 가닥인 분자의 영역은 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0070] 가이드 및 패신저 가닥 사이에 100% 상보성이 존재할 수 있거나, 또는 가이드 및 패신저 가닥 사이에 1개 이상의 미스매치가 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중 가닥 분자의 하나의 단부 상에서, 분자는 평할-단부이거나 또는 1개-뉴클레오티드 오버행을 갖는다. 분자의 단일 가닥 영역은 일부 실시양태에서 4-12개의 뉴클레오티드 길이이다. 예를 들어, 단일 가닥 영역은 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 그러나, 특정 실시양태에서, 단일 가닥 영역은 또한 4개 미만 또는 12개 초과 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 특정 실시양태에서, 단일 가닥 영역은 적어도 6 또는 적어도 7개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 단일 가닥 영역은 2-9개의 뉴클레오티드 길이, 예컨대 2 또는 3개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0071] 본 발명과 연관된 RNAi 구축물은 -13 kkal/mol 미만의 열역학적 안정성 ( $\Delta G$ )을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 열역학적 안정성 ( $\Delta G$ )은 -20 kkal/mol 미만이다. 일부 실시양태에서, ( $\Delta G$ )가 -21 kkal/mol 미만인 경우는 효능의 손실이 존재한다. 일부 실시양태에서, -13 kkal/mol 초과 ( $\Delta G$ ) 값은 본 발명의 측면과 상용성이다. 어떠한 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 일부 실시양태에서 비교적 더 높은 ( $\Delta G$ ) 값을 갖는 분자는 비교적 더 높은 농도에서 활성이 될 수 있는 한편, 비교적 더 낮은 ( $\Delta G$ ) 값을 갖는 분자는 비교적 더 낮은 농도에서 활성이 될 수 있다. 일부 실시양태에서, ( $\Delta G$ ) 값은 -9 kkal/mol 초과일 수 있다. 거의 동일

한 설계이지만 보다 낮은 열역학적 안정성을 갖는 분자는 불활성인 것으로 입증되었기 때문에 (Rana et al., 2004), 최소 이중 가닥 영역을 함유하는 본 발명과 연관된 RNAi 구축물에 의해 매개되는 유전자 침묵 효과는 예상외의 것이다.

[0072] 어떠한 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 본원에 기재된 결과는 8-10 bp의 dsRNA 또는 dsDNA의 스트레치가 RISC의 단백질 성분 또는 RISC의 보조-인자에 의해 구조적으로 인식될 것임을 시사한다. 추가적으로, 단백질 성분에 의해 감지될 수 있고/거나 이러한 성분과 상호작용하기에 충분히 안정할 수 있어서 아르고노트 단백질에 로딩될 수 있는 촉발 화합물에 대해 자유 에너지 요건이 존재한다. 허용되는 열역학이 존재하고, 바람직하게는 적어도 8개의 뉴클레오티드인 이중 가닥 부분이 있는 경우에, 듀플렉스는 인식되고 RNAi 기구 내로 로딩될 것이다.

[0073] 일부 실시양태에서, 열역학적 안정성은 LNA 염기의 사용을 통해 증가된다. 일부 실시양태에서, 추가의 화학적 변형이 도입된다. 화학적 변형의 여러 비제한적 예는 5' 포스포이트, 5' 포스포네이트, 5' 비닐 포스포네이트, 2'-O-메틸, 2'-O-에틸, 2'-플루오로, 리보티미딘, C-5 프로피닐-dC (pdC) 및 C-5 프로피닐-dU (pdU); C-5 프로피닐-C (pC) 및 C-5 프로피닐-U (pU); 5-메틸 C, 5-메틸 U, 5-메틸 dC, 5-메틸 dU 메톡시, (2,6-디아미노퓨린), 5'-디메톡시트리틸-N4-에틸-2'-테옥시시티딘 및 MGB (작은 홈 결합제)를 포함한다. 1종 초과 화학적 변형이 동일한 분자 내에서 조합될 수 있다는 것이 인지될 것이다.

[0074] 일부 실시양태에서, 본 개시내용과 연관된 분자는 증가된 효력 및/또는 감소된 독성을 위해 최적화된다. 예를 들어, 가이드 및/또는 패신저 가닥의 뉴클레오티드 길이, 및/또는 가이드 및/또는 패신저 가닥 내 포스포로티오에이트 변형의 수는 일부 측면에서 RNA 분자의 효력에 영향을 미칠 수 있는 한편, 2'-플루오로 (2'F) 변형을 2'-O-메틸 (2'OMe) 변형으로 대체하는 것은 일부 측면에서 분자의 독성에 영향을 미칠 수 있다. 구체적으로, 분자의 2'F 함량의 감소는 분자의 독성을 감소시킬 것으로 예측된다. 또한, RNA 분자 내 포스포로티오에이트 변형의 수는 분자의 세포로의 흡수, 예를 들어 분자의 세포로의 수동 흡수의 효율에 영향을 미칠 수 있다. 본원에 기재된 분자의 바람직한 실시양태는 2'F 변형을 갖지 않지만, 세포 흡수 및 조직 침투에서의 동등한 효능을 특징으로 한다. 이러한 분자는 선행 기술, 예컨대 2'F의 광범위한 사용에 의해 고도로 변형된 문헌 [Accell and Wolfrum]에 기재된 분자에 비해 유의한 개선을 나타낸다.

[0075] 일부 실시양태에서, 가이드 가닥은 대략 18-20개의 뉴클레오티드 길이이고, 대략 2-14개의 포스포이트 변형을 갖는다. 예를 들어, 가이드 가닥은 포스포이트-변형된 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14개 또는 14개 초과 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 가이드 가닥은 RISC 진입을 방해하지 않으면서 증가된 안정성을 부여하는 1종 이상의 변형을 함유할 수 있다. 포스포이트 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 포스포로티오에이트 변형된 뉴클레오티드는 3' 단부, 5' 단부에 있거나 또는 가이드 가닥 전반에 걸쳐 퍼져있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥의 3' 말단의 10개의 뉴클레오티드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 포스포로티오에이트 변형된 뉴클레오티드를 함유한다. 또한, 가이드 가닥은 2'F 및/또는 2'OMe 변형을 함유할 수 있고, 이는 분자 전반에 걸쳐 위치할 수 있다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥의 위치 1의 뉴클레오티드 (가이드 가닥의 가장 5' 위치의 뉴클레오티드)는 2'OMe 변형되고/거나 인산화되고/거나 비닐 포스포네이트를 함유한다. 가이드 가닥 내의 C 및 U 뉴클레오티드는 2'F 변형될 수 있다. 예를 들어, 20개의 뉴클레오티드 가이드 가닥의 위치 2-10 (또는 상이한 길이의 가이드 가닥 내의 상응하는 위치)의 C 및 U 뉴클레오티드는 2'F 변형될 수 있다. 또한, 가이드 가닥 내의 C 및 U 뉴클레오티드는 2'OMe 변형될 수 있다. 예를 들어, 19개의 뉴클레오티드 가이드 가닥의 위치 11-18 (또는 상이한 길이의 가이드 가닥 내의 상응하는 위치)의 C 및 U 뉴클레오티드는 2'OMe 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥의 가장 3' 단부의 뉴클레오티드는 비변형된다. 특정 실시양태에서, 가이드 가닥 내의 대부분의 C 및 U는 2'F 변형되고, 가이드 가닥의 5' 단부는 인산화된다. 다른 실시양태에서, 위치 1, 및 위치 11-18의 C 또는 U는 2'OMe 변형되고, 가이드 가닥의 5' 단부는 인산화된다. 다른 실시양태에서, 위치 1, 및 위치 11-18의 C 또는 U는 2'OMe 변형되고, 가이드 가닥의 5' 단부는 인산화되고, 위치 2-10의 C 또는 U는 2'F 변형된다.

[0076] 일부 측면에서, 패신저 가닥은 대략 11-14개의 뉴클레오티드 길이이다. 패신저 가닥은 증가된 안정성을 부여하는 변형을 함유할 수 있다. 패신저 가닥 내의 1개 이상의 뉴클레오티드는 2'OMe 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 패신저 가닥 내의 C 및/또는 U 뉴클레오티드 중 1개 이상이 2'OMe 변형되거나, 또는 패신저 가닥 내의 모든 C 및 U 뉴클레오티드가 2'OMe 변형된다. 특정 실시양태에서, 패신저 가닥 내의 모든 뉴클레오티드가 2'OMe 변형된다. 패신저 가닥 상의 뉴클레오티드 중 1개 이상은 또한 포스포이트-변형, 예컨대 포스포로티오에이트 변형될 수 있다. 패신저 가닥은 또한 2' 리보, 2'F 및 2' 테옥시 변형 또는 상기의 임의의 조합을 함유할 수 있다. 가이드 및 패신저 가닥 둘 다에 대한 화학적 변형 패턴은 잘 허용될 수 있고, 화학적 변형의 조합은

RNA 분자의 증가된 효능 및 자기-전달로 이어질 수 있다.

- [0077] 본 발명의 측면은, RNAi를 위해 이전에 사용되어 온 분자와 비교하여, 이중 가닥 영역에 비해 연장된 단일-가닥 영역을 갖는 RNAi 구축물에 관한 것이다. 분자의 단일 가닥 영역을 변형시켜 세포 흡수 또는 유전자 침묵을 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 가닥 영역의 포스포로티오에이트 변형은 세포 흡수 및/또는 유전자 침묵에 영향을 미친다. 포스포로티오에이트 변형된 가이드 가닥의 영역은 분자의 단일 가닥 및 이중 가닥 영역 둘 다 내의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 가닥 영역은 2-12개의 포스포로티오에이트 변형을 포함한다. 예를 들어, 단일 가닥 영역은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 포스포로티오에이트 변형을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 단일 가닥 영역은 6-8개의 포스포로티오에이트 변형을 함유한다.
- [0078] 본 발명과 연관된 분자는 또한 세포 흡수를 위해 설계된다. 본원에 기재된 RNA 분자에서, 가이드 및/또는 패신저 가닥은 접합체에 부착될 수 있다. 특정 실시양태에서, 접합체는 소수성이다. 소수성 접합체는 분배 계수가 10 초과인 소분자일 수 있다. 접합체는 스테롤-유형 분자, 예컨대 콜레스테롤, 또는 C17에 부착된 증가된 길이의 다중탄소 쇄를 갖는 분자일 수 있고, 접합체의 존재는 지질 형질감염 시약의 존재 또는 부재 하에 RNA 분자가 세포 내로 수용되는 능력에 영향을 미칠 수 있다. 접합체는 소수성 링커를 통해 패신저 또는 가이드 가닥에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 소수성 링커는 5-12C 길이이고/거나 히드록시피롤리딘-기반이다. 일부 실시양태에서, 소수성 접합체는 패신저 가닥에 부착되고, 패신저 및/또는 가이드 가닥의 CU 잔기는 변형된다. 일부 실시양태에서, 패신저 가닥 및/또는 가이드 가닥 상의 CU 잔기 중 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%가 변형된다. 일부 측면에서, 본 발명과 연관된 분자는 자기-전달된다 (sd). 본원에 사용된 "자기-전달"은 형질감염 시약과 같은 추가의 전달 비히클에 대한 필요 없이 분자가 세포 내로 전달되는 능력을 지칭한다.
- [0079] 본 발명과 연관된 분자는 간으로의 표적화된 전달을 위해 설계된다. 본원에 기재된 RNA 분자에서, 가이드 및/또는 패신저 가닥은 접합체에 부착될 수 있다. 특정 실시양태에서, 접합체는 표적화 리간드이다. 표적화 리간드 접합체는 사카라이드, 예컨대 N-아세틸 갈락토사민 (GalNac) 모이어티 및 그의 유도체일 수 있다. RNA 분자는, 일부 실시양태에서, 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과 GalNac 모이어티를 포함할 수 있다. 표적화 리간드 접합체(들)는 링커를 통해 패신저 또는 가이드 가닥에 부착될 수 있거나, 또는 예를 들어 포스포르아미다이트로서 패신저 또는 가이드 가닥 내로 혼입될 수 있다.
- [0080] 본 발명의 측면은 RNAi에 사용하기 위한 분자를 선택하는 것에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 8-15개의 뉴클레오티드의 이중 가닥 영역을 갖는 분자가 RNAi에서의 사용을 위해 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자는 그의 열역학적 안정성 ( $\Delta G$ )에 기초하여 선택된다. 일부 실시양태에서, -13 kkal/mol 미만의 ( $\Delta G$ )를 갖는 분자가 선택될 것이다. 예를 들어, ( $\Delta G$ ) 값은 -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -21, -22 또는 -22 kkal/mol 미만일 수 있다. 다른 실시양태에서, ( $\Delta G$ ) 값은 -13 kkal/mol 초과일 수 있다. 예를 들어, ( $\Delta G$ ) 값은 -12, -11, -10, -9, -8, -7 또는 -7 kkal/mol 초과일 수 있다.  $\Delta G$ 는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 계산될 수 있다는 것이 인지될 것이다. 일부 실시양태에서,  $\Delta G$ 는 엠폴드(Mfold) 인터넷 사이트 (mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi)를 통해 이용가능한 엠폴드를 사용하여 계산된다.  $\Delta G$ 를 계산하는 방법은 하기 문헌에 기재되어 있으며, 이로부터 참조로 포함된다: 문헌 [Zuker, M. (2003) *Nucleic Acids Res.*, 31(13):3406-15; Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M. and Turner, D. H. (1999) *J. Mol. Biol.* 288:911-940; Mathews, D. H., Disney, M. D., Childs, J. L., Schroeder, S. J., Zuker, M., and Turner, D. H. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:7287-7292; Duan, S., Mathews, D. H., and Turner, D. H. (2006) *Biochemistry* 45:9819-9832; Wuchty, S., Fontana, W., Hofacker, I. L., and Schuster, P. (1999) *Biopolymers* 49:145-165].
- [0081] 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 5'- 및/또는 3'-단부 오버행을 함유한다. 폴리뉴클레오티드의 하나의 단부 상의 뉴클레오티드 오버행의 수 및/또는 서열은 폴리뉴클레오티드의 다른 단부와 동일하거나 상이할 수 있다. 특정 실시양태에서, 오버행 뉴클레오티드 중 1개 이상은 화학적 변형(들), 예컨대 포스포로티오에이트 또는 2'-OMe 변형을 함유할 수 있다.
- [0082] 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 비변형된다. 다른 실시양태에서, 적어도 1개의 뉴클레오티드가 변형된다. 추가 실시양태에서, 변형은 가이드 서열의 5'-단부로부터의 제2 뉴클레오티드에서 2'-H 또는 2'-변형된 리보스 당을 포함한다. "제2 뉴클레오티드"는 폴리뉴클레오티드의 5'-단부로부터의 두번째 뉴클레오티드로서 정의된다.

- [0083] 본원에 사용된 "2'-변형된 리보스 당"은 2'-OH 기를 갖지 않는 리보스 당을 포함한다. "2'-변형된 리보스 당"은 2'-데옥시리보스 (이는 비변형된 정규 DNA 뉴클레오타이드에서 발견됨)를 포함하지 않는다. 예를 들어, 2'-변형된 리보스 당은 2'-O-알킬 뉴클레오타이드, 2'-데옥시-2'-플루오로 뉴클레오타이드, 2'-데옥시 뉴클레오타이드, 또는 그의 조합일 수 있다.
- [0084] 특정 실시양태에서, 2'-변형된 뉴클레오타이드는 피리미딘 뉴클레오타이드 (예를 들어, C /U)이다. 2'-O-알킬 뉴클레오타이드의 예는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드 또는 2'-O-알릴 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0085] 특정 실시양태에서, 상기 언급된 5'-단부 변형을 갖는 본 발명의 sd-rxRNA 폴리뉴클레오타이드는 명시된 5'-단부 변형을 갖지 않는 유사한 구축물과 비교하여 유의하게 (예를 들어, 적어도 약 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 그 초과로) 더 낮은 "오프-타겟" 유전자 침묵을 나타내어, RNAi 시약 또는 치료제의 전체 특이성을 크게 개선시킨다.
- [0086] 본원에 사용된 "오프-타겟" 유전자 침묵은, 예를 들어 안티센스 (가이드) 서열과 비의도 표적 mRNA 서열 사이의 허위 서열 상동성으로 인한 비의도 유전자 침묵을 지칭한다.
- [0087] 본 발명의 이러한 측면에 따르면, 특정 가이드 가닥 변형은 RNAi 활성을 유의하게 감소시키지 않으면서 (또는 RNAi 활성의 감소가 전혀 없이) 뉴클레아제 안정성을 추가로 증가시키고/거나 인터페론 유도를 저하시킨다.
- [0088] 변형의 특정 조합은, 표적 유전자 발현을 억제하는 증진된 능력, 증진된 혈청 안정성 및/또는 증가된 표적 특이성 등에 의해 일부 증명된 바와 같이, 추가의 예상외의 이점을 발생시킬 수 있다.
- [0089] 특정 실시양태에서, 가이드 가닥은 가이드 가닥의 5'-단부 상의 제2 뉴클레오타이드에서 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고, 다른 변형된 뉴클레오타이드는 포함하지 않는다.
- [0090] 다른 측면에서, 본 발명의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자 구조는 마이크로RNA 메커니즘에 의해 서열-의존성 유전자 침묵을 매개한다. 본원에 사용된 용어 "마이크로RNA" ("miRNA")는 또한 관련 기술분야에서 "소형 일시적 RNA" ("stRNA")로도 지칭되고, 이는 (예를 들어, 바이러스, 포유동물 또는 식물 계통에 의해) 유전적으로 코딩되고 RNA 침묵을 지시하거나 매개할 수 있는 소형 (10-50개의 뉴클레오타이드) RNA를 지칭한다. "miRNA 장애"는 miRNA의 이상 발현 또는 활성을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 지칭할 것이다.
- [0091] 마이크로RNA는 마우스, 유충 및 포유동물에서 중요 경로, 예컨대 발생 및 암에서의 표적 유전자를 하향-조절하는 데 수반된다. 마이크로RNA 메커니즘을 통한 유전자 침묵은 miRNA 및 그의 표적 메신저 RNA (mRNA)의 특이적이지만 불완전한 염기-쌍형성에 의해 달성된다. 표적 mRNA 발현의 마이크로RNA-매개된 하향-조절에는 다양한 메커니즘이 사용될 수 있다.
- [0092] miRNA는 식물 및 동물의 발생 동안 전사 후 또는 번역 수준에서 유전자 발현을 조절할 수 있는 대략 22개의 뉴클레오타이드의 비코딩 RNA이다. miRNA의 1종의 통상의 특색은 이것이 모두 pre-miRNA로 불리는 대략 70개의 뉴클레오타이드 전구체 RNA 스템-루프로부터 대개는 다이스, RNase III-유형 효소 또는 그의 상동체에 의해 절단된다는 것이다. 자연 발생 miRNA는 생체내 내인성 유전자에 의해 발현되고, 헤어핀 또는 스템-루프 전구체 (pre-miRNA 또는 pri-miRNA)로부터 다이스 또는 다른 RNase에 의해 프로세싱된다. miRNA는 생체내에서 일시적으로 이중 가닥 듀플렉스로 존재할 수 있지만, 오직 1개의 가닥만이 RISC 복합체에 의해 포획되어 유전자 침묵을 지시한다.
- [0093] 일부 실시양태에서, 세포 흡수 및 miRNA 활성의 억제에 효과적인 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 화합물의 버전이 기재된다. 본질적으로, 화합물은 RISC 진입 버전과 유사하지만, 절단을 차단하고 RISC 작용의 효과적인 억제제로서 작용하도록 대형 가닥의 화학적 변형 패턴이 제조된다. 예를 들어, 화합물은 이전에 기재된 포스포로티오에이트 함량으로 완전히 또는 대부분 O-메틸 변형될 수 있다. 이들 유형의 화합물에 대해, 5' 인산화는 일부 실시양태에서 필요하지 않다. 이중 가닥 영역의 존재는 세포 흡수 및 효율적인 RISC 로딩을 촉진하기 때문에 바람직하다.
- [0094] 서열-특이적 조절제로서 소형 RNA를 사용하는 또 다른 경로는 RNA 간섭 (RNAi) 경로이며, 이는 세포에서 이중 가닥 RNA (dsRNA)의 존재에 대한 진화적으로 보존된 반응이다. dsRNA는 다이스에 의해 ~20-염기쌍 (bp) 듀플렉스의 소형-간섭 RNA (siRNA)로 절단된다. 이들 소형 RNA는 RNA-유도된 침묵 복합체 (RISC)로 불리는 다중단백질 이펙터 복합체로 어셈블리된다. 이어서, siRNA는 완전한 상보성을 갖는 표적 mRNA의 절단을 가이드한다.
- [0095] 생물발생, 단백질 복합체 및 기능의 일부 측면은 siRNA 경로와 miRNA 경로 사이에 공유된다. 단일-가닥 폴리뉴

클레오티드는 siRNA 메카니즘에서 dsRNA를, 또는 miRNA 메카니즘에서 마이크로RNA를 모방할 수 있다.

- [0096] 특정 실시양태에서, 변형된 RNAi 구축물은 동일한 서열을 갖는 비변형된 RNAi 구축물과 비교하여 혈청 및/또는 뇌 척수액에서 개선된 안정성을 가질 수 있다.
- [0097] 특정 실시양태에서, RNAi 구축물의 구조는 인간, 마우스 및 다른 설치류, 및 다른 비-인간 포유동물로부터의 1차 세포를 포함한 포유동물 1차 세포와 같은 1차 세포에서 인터페론 반응을 유도하지 않는다. 특정 실시양태에서, RNAi 구축물은 또한 무척추동물 유기체에서 표적 유전자의 발현을 억제하는 데 사용될 수 있다.
- [0098] 대상 구축물의 생체내 안정성을 추가로 증가시키기 위해, 구조의 3'-단부는 보호기(들)에 의해 차단될 수 있다. 예를 들어, 역전된 뉴클레오티드, 역전된 무염기성 모이어티 또는 아미노-단부 변형된 뉴클레오티드와 같은 보호기가 사용될 수 있다. 역전된 뉴클레오티드는 역전된 테옥시뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 역전된 무염기성 모이어티는 역전된 테옥시무염기성 모이어티, 예컨대 3',3'-연결된 또는 5',5'-연결된 테옥시무염기성 모이어티를 포함할 수 있다.
- [0099] 본 발명의 RNAi 구축물은 표적 유전자(들)에 의해 코딩된 임의의 표적 단백질의 합성을 억제할 수 있다. 본 발명은 시험관내 또는 생체내 세포에서 표적 유전자의 발현을 억제하는 방법을 포함한다. 이로서, 본 발명의 RNAi 구축물은 표적 유전자의 과다발현을 특징으로 하는 질환을 갖는 환자를 치료하는 데 유용하다.
- [0100] 표적 유전자는 세포에 대해 내인성 또는 외인성 (예를 들어, 바이러스에 의해 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 세포 내로 도입됨)일 수 있다. 이러한 방법은 RNA를 표적 유전자의 발현을 억제하기에 충분한 양으로 세포 내로 도입하는 것을 포함할 수 있다. 예로서, 이러한 RNA 분자는, 조성물이 표적 유전자의 발현을 억제하도록 표적 유전자의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 가이드 가닥을 가질 수 있다.
- [0101] 본 발명은 또한 본 발명의 핵산을 발현하는 벡터, 및 이러한 벡터 또는 핵산을 포함하는 세포에 관한 것이다. 상기 세포는 생체내 또는 배양물 내의 포유동물 세포, 예컨대 인간 세포일 수 있다.
- [0102] 본 발명은 추가로 대상 RNAi 구축물 및 제약상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0103] 본 방법은 시험관내, 생체의 또는 생체내, 예를 들어 배양물 내의 포유동물 세포, 예컨대 배양물 내의 인간 세포에서 수행될 수 있다.
- [0104] 표적 세포 (예를 들어, 포유동물 세포)는 전달 시약, 예컨대 지질 (예를 들어, 양이온성 지질) 또는 리포솜의 존재 하에 접촉될 수 있다.
- [0105] 본 발명의 또 다른 측면은 포유동물 세포에서 표적 유전자의 발현을 억제하는 방법을 제공하며, 이는 포유동물 세포를 대상 RNAi 구축물을 발현하는 벡터와 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0106] 본 발명의 한 측면에서, 약 16개 내지 약 30개의 뉴클레오티드 크기 범위의 제1 폴리뉴클레오티드; 약 26개 내지 약 46개의 뉴클레오티드 크기 범위의 제2 폴리뉴클레오티드를 포함하는 보다 긴 듀플렉스 폴리뉴클레오티드가 제공되며, 여기서 제1 폴리뉴클레오티드 (안티센스 가닥)는 제2 폴리뉴클레오티드 (센스 가닥) 및 표적 유전자 둘 다에 상보적이고, 여기서 둘 다의 폴리뉴클레오티드는 듀플렉스를 형성하고, 여기서 제1 폴리뉴클레오티드는 6개의 염기 길이보다 더 긴 단일 가닥 영역을 함유하며 대안적인 화학적 변형 패턴으로 변형되고/거나 세포 전달을 용이하게 하는 접합체 모이어티를 포함한다. 이러한 실시양태에서, 패신저 가닥의 뉴클레오티드 중 약 40% 내지 약 90%, 가이드 가닥의 뉴클레오티드 중 약 40% 내지 약 90%, 및 제1 폴리뉴클레오티드의 단일 가닥 영역의 뉴클레오티드 중 약 40% 내지 약 90%는 화학적으로 변형된 뉴클레오티드이다.
- [0107] 한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 듀플렉스에서 화학적으로 변형된 뉴클레오티드는 관련 기술분야에 공지된 임의의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 상기에서 상세하게 논의된 바와 같은 것일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 화학적으로 변형된 뉴클레오티드는 2' F 변형된 뉴클레오티드, 2'-O-메틸 변형된 및 2' 테옥시 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 특정한 실시양태에서, 화학적으로 변형된 뉴클레오티드는 뉴클레오티드 염기의 "소수성 변형"으로 인한 것이다. 또 다른 특정한 실시양태에서, 화학적으로 변형된 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트이다. 추가의 특정한 실시양태에서, 화학적으로 변형된 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트, 2'-O-메틸, 2' 테옥시, 소수성 변형 및 포스포로티오에이트의 조합이다. 이들 군의 변형은 리보스 고리, 백본 및 뉴클레오티드의 변형을 지칭하는 것이므로, 일부 변형된 뉴클레오티드가 모든 3가지 변형 유형의 조합을 보유하는 것이 실현 가능하다.
- [0108] 또 다른 실시양태에서, 화학적 변형은 듀플렉스의 다양한 영역에 걸쳐 동일하지 않다. 특정한 실시양태에서,

제1 폴리뉴클레오타이드 (패신저 가닥)는 다양한 위치에서 다수의 다양한 화학적 변형을 갖는다. 이러한 폴리뉴클레오타이드의 경우에, 뉴클레오타이드의 최대 90%가 화학적으로 변형될 수 있고/거나 도입된 미스매치를 가질 수 있다.

[0109] 또 다른 실시양태에서, 제1 또는 제2 폴리뉴클레오타이드의 화학적 변형은 우리딘 및 시토신의 5' 위치 변형 (4-피리딜, 2-피리딜, 인돌릴, 페닐 ( $C_6H_5OH$ ); 트립토판닐 ( $C_8H_6N$ ) $CH_2CH(NH_2)CO$ ), 이소부틸, 부틸, 아미노벤질; 페닐; 나프틸 등)을 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 여기서 화학적 변형은 뉴클레오타이드의 염기 쌍형성 능력을 변경시킬 수 있다. 가이드 가닥의 경우에, 본 발명의 이러한 측면의 중요한 특색은 안티센스의 5' 단부에 대한 화학적 변형의 위치 및 순서이다. 예를 들어, 가이드 가닥의 5' 단부의 화학적 인산화는 통상적으로 효능에 유익하다. 센스 가닥의 시드 영역 (5' 단부에 대해 위치 2-7)에서의 O-메틸 변형은 일반적으로 잘 허용되지 않는 반면에, 2'F 및 데옥시는 잘 허용된다. 가이드 가닥의 중앙 부분 및 가이드 가닥의 3' 단부는 적용되는 화학적 변형의 유형에 있어서 보다 허용성이다. 데옥시 변형은 가이드 가닥의 3' 단부에서 허용되지 않는다.

[0110] 본 발명의 이러한 측면의 고유한 특색은 염기에 대한 소수성 변형의 사용을 수반한다. 한 실시양태에서, 소수성 변형은 바람직하게는 가이드 가닥의 5' 단부 근처에 위치하며, 다른 실시양태에서 이는 가이드 가닥의 중간에 국재화되고, 다른 실시양태에서 이는 가이드 가닥의 3' 단부에 국재화되며, 또 다른 실시양태에서 이는 폴리뉴클레오타이드의 전체 길이에 걸쳐 분포한다. 동일한 유형의 패턴이 듀플렉스의 패신저 가닥에 적용가능하다.

[0111] 분자의 다른 부분은 단일 가닥 영역이다. 단일 가닥 영역은 7 내지 40개의 뉴클레오타이드 범위로 예상된다.

[0112] 한 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오타이드의 단일 가닥 영역은 40% 내지 90% 소수성 염기 변형, 40%-90% 포스포티오에이트, 40%-90% 리보스 모이어티의 변형 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 변형을 함유한다.

[0113] RISC 복합체에 로딩되는 가이드 가닥 (제1 폴리뉴클레오타이드)의 효율은 고도로 변형된 폴리뉴클레오타이드로 인해 변경될 수 있고, 따라서 한 실시양태에서, 듀플렉스 폴리뉴클레오타이드는 효율적인 가이드 가닥 로딩을 촉진하기 위해 가이드 가닥 (제1 폴리뉴클레오타이드) 상의 뉴클레오타이드 9, 11, 12, 13 또는 14 및 센스 가닥 (제2 폴리뉴클레오타이드) 상의 대향하는 뉴클레오타이드 사이에서 미스매치를 포함한다.

[0114] 듀플렉스 특징

[0115] 본 발명의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 2개의 개별 상보적 핵산 가닥에 의해 형성될 수 있다. 듀플렉스 형성은 표적 유전자를 함유하는 세포의 내부 또는 외부에서 일어날 수 있다.

[0116] 본원에 사용된 용어 "듀플렉스"는 상보적 서열에 수소 결합된 이중 가닥 핵산 분자(들)의 영역을 포함한다. 본 발명의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 표적 유전자에 대해 센스인 뉴클레오타이드 서열 및 표적 유전자에 대해 안티센스인 상보적 서열을 포함할 수 있다. 센스 및 안티센스 뉴클레오타이드 서열은 표적 유전자 서열에 상응하고, 예를 들어 표적 유전자 억제를 달성하기 위해 표적 유전자 서열과 동일하거나 충분히 동일하다 (예를 들어, 약 적어도 약 98% 동일, 96% 동일, 94%, 90% 동일, 85% 동일 또는 80% 동일함).

[0117] 특정 실시양태에서, 본 발명의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 그의 전장에 걸쳐 이중 가닥이고, 즉 분자의 어느 하나의 단부에 오버행 단일-가닥 서열을 갖지 않고, 즉 평활-단부이다. 다른 실시양태에서, 개별 핵산 분자는 상이한 길이일 수 있다. 다시 말해서, 본 발명의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 그의 전체 길이에 걸쳐 이중 가닥이 아니다. 예를 들어, 2개의 개별 핵산 분자가 사용되는 경우에, 분자 중 1개, 예를 들어 안티센스 서열을 포함하는 제1 분자는 이에 혼성화한 제2 분자보다 더 길 수 있다 (분자의 한 부분이 단일-가닥으로 남음). 마찬가지로, 단일 핵산 분자가 사용되는 경우에, 분자의 한 부분은 어느 한 단부에서 단일-가닥으로 남을 수 있다.

[0118] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 미스매치 및/또는 루프 또는 돌출을 함유하지만, 올리고뉴클레오타이드 길이의 적어도 약 70%에 걸쳐 이중 가닥이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드 길이의 적어도 약 80%에 걸쳐 이중 가닥이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드 길이의 적어도 약 90%-95%에 걸쳐 이중 가닥이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드 길이의 적어도 약 96%-98%에 걸쳐 이중 가닥이다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 적어도 또는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 미스매치를 함유한다.

[0119] 변형

- [0120] 본 발명의 뉴클레오타이드는 당 모이어티, 포스포디에스테르 연결 및/또는 염기를 포함한 다양한 위치에서 변형될 수 있다.
- [0121] 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드의 염기 모이어티가 변형될 수 있다. 예를 들어, 피리미딘 염기는 피리미딘 고리의 2, 3, 4, 5 및/또는 6 위치에서 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시토신의 엑소시클릭 아민이 변형될 수 있다. 또한, 퓨린 염기가 변형될 수 있다. 예를 들어, 퓨린 염기는 1, 2, 3, 6, 7 또는 8 위치에서 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 아데닌의 엑소시클릭 아민이 변형될 수 있다. 일부 경우에, 염기 모이어티의 고리의 질소 원자는 또 다른 원자, 예컨대 탄소로 치환될 수 있다. 염기 모이어티에 대한 변형은 임의의 적합한 변형일 수 있다. 변형의 예는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 염기 변형은 알킬화된 퓨린 또는 피리미딘, 아실화된 퓨린 또는 피리미딘, 또는 다른 헤테로사이클을 포함한다.
- [0122] 일부 실시양태에서, 피리미딘은 5 위치에서 변형될 수 있다. 예를 들어, 피리미딘의 5 위치는 알킬 기, 알킬닐 기, 알케닐 기, 아실 기 또는 그의 치환된 유도체로 변형될 수 있다. 다른 예에서, 피리미딘의 5 위치는 히드록실 기 또는 알콕실 기 또는 그의 치환된 유도체로 변형될 수 있다. 또한, 피리미딘의  $N^4$  위치는 알킬화될 수 있다. 추가의 예에서, 피리미딘 5-6 결합은 포화될 수 있고/거나, 피리미딘 고리 내의 질소 원자는 탄소 원자로 치환될 수 있고/거나,  $O^2$  및  $O^4$  원자는 황 원자로 치환될 수 있다. 다른 변형도 또한 가능하다는 것이 이해될 것이다.
- [0123] 다른 예에서, 퓨린의  $N^7$  위치 및/또는  $N^2$  및/또는  $N^3$  위치는 알킬 기 또는 그의 치환된 유도체로 변형될 수 있다. 추가의 예에서, 제3 고리는 퓨린 비시클릭 고리계에 융합될 수 있고/거나 퓨린 고리계 내의 질소 원자는 탄소 원자로 치환될 수 있다. 다른 변형도 또한 가능하다는 것이 이해될 것이다.
- [0124] 5 위치에서 변형된 피리미딘의 비제한적 예는 미국 특허 5591843, 미국 특허 7,205,297, 미국 특허 6,432,963, 및 미국 특허 6,020,483에 개시되어 있고;  $N^4$  위치에서 변형된 피리미딘의 비제한적 예는 미국 특허 5,580,731에 개시되어 있고; 8 위치에서 변형된 퓨린의 비제한적 예는 미국 특허 6,355,787 및 미국 특허 5,580,972에 개시되어 있고;  $N^6$  위치에서 변형된 퓨린의 비제한적 예는 미국 특허 4,853,386, 미국 특허 5,789,416, 및 미국 특허 7,041,824에 개시되어 있고; 2 위치에서 변형된 퓨린의 비제한적 예는 미국 특허 4,201,860 및 미국 특허 5,587,469에 개시되어 있으며, 이들 모두는 본원에 참조로 포함된다.
- [0125] 변형된 염기의 비제한적 예는  $N^4, N^4$ -에타노시토신, 7-데아자크산토신, 7-데아자구아노신, 8-옥소- $N^6$ -메틸아데닌, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록실메틸) 우라실, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸 우라실, 디히드로우라실, 이노신,  $N^6$ -이소펜테닐아데닌, 1-메틸아데닌, 1-메틸슈도우라실, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신,  $N^6$ -메틸아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸 우라실, 5-메톡시 아미노메틸-2-티오우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오- $N^6$ -이소펜테닐아데닌, 슈도우라실, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 2-티오시토신, 및 2,6-디아미노퓨린을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염기 모이어티는 퓨린 또는 피리미딘 이외의 다른 헤테로시클릭 염기일 수 있다. 헤테로시클릭 염기는 임의로 변형 및/또는 치환될 수 있다.
- [0126] 당 모이어티는 천연, 비변형 당, 예를 들어 모노사카라이드 (예컨대, 펜토스, 예를 들어 리보스, 데옥시리보스), 변형된 당 및 당 유사체를 포함한다. 일반적으로, 뉴클레오단량체, 특히 당 모이어티의 가능한 변형은, 예를 들어 히드록실 기 중 1개 이상의 할로젠, 헤테로원자, 지방족 기의 대체, 또는 히드록실 기의 에테르, 아민, 티올 등으로서의 관능화를 포함한다.
- [0127] 하나의 유용한 변형된 뉴클레오단량체 군은 2'-O-메틸 뉴클레오타이드이다. 이러한 2'-O-메틸 뉴클레오타이드는 "메틸화된" 것으로 언급될 수 있으며, 상응하는 뉴클레오타이드는 비메틸화된 뉴클레오타이드로부터 알킬화 후에 생성되거나 또는 메틸화된 뉴클레오타이드 시약으로부터 직접 생성될 수 있다. 변형된 뉴클레오단량체는 비변형된 뉴클레오단량체와 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 메틸화된 및 비메틸화된 뉴클레오단량체 둘 다를 함유할 수 있다.
- [0128] 일부 예시적인 변형된 뉴클레오단량체는 당- 또는 백본-변형된 리보뉴클레오타이드를 포함한다. 변형된 리보뉴클레오타이드는 (자연 발생 염기 대신) 비-자연 발생 염기, 예컨대 5'-위치에서 변형된 우리딘 또는 시티딘, 예를

들어 5'-(2-아미노)프로필 우리딘 및 5'-브로모 우리딘; 8-위치에서 변형된 아데노신 및 구아노신, 예를 들어 8-브로모 구아노신; 데아자 뉴클레오티드, 예를 들어 7-데아자-아데노신; 및 N-알킬화된 뉴클레오티드, 예를 들어 N6-메틸 아데노신을 함유할 수 있다. 또한, 당-변형된 리보뉴클레오티드는 2'-OH 기가 H, 알콕시 (또는 OR), R 또는 알킬, 할로젠, SH, SR, 아미노 (예컨대  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NHR}$ ,  $\text{NR}_2$ ), 또는 CN 기에 의해 대체될 수 있고, 여기서 R은 저급 알킬, 알케닐, 또는 알킬닐이다.

[0129] 또한, 변형된 리보뉴클레오티드는 인접 리보뉴클레오티드에 연결된 포스포디에스테르 기가 변형된 기, 예를 들어 포스포로티오에이트 기에 의해 대체될 수 있다. 보다 일반적으로, 다양한 뉴클레오티드 변형이 조합될 수 있다.

[0130] 안티센스 (가이드) 가닥이 표적 유전자 (또는 유전자들)의 적어도 한 부분과 실질적으로 동일할 수 있지만, 적어도 염기 쌍형성 특성과 관련하여, 서열은 예를 들어 표적 유전자의 표현형의 발현을 억제하는 데 유용하기 위해 완전히 동일할 필요는 없다. 일반적으로, 보다 높은 상동성이 보다 짧은 안티센스 유전자의 사용을 보완하기 위해 사용될 수 있다. 일부 경우에, 안티센스 가닥은 일반적으로 (안티센스 배향이지만) 표적 유전자와 실질적으로 동일할 것이다.

[0131] 2'-O-메틸 변형된 RNA의 사용은 또한 세포 스트레스 반응을 최소화하는 것이 바람직한 상황에서 유익할 수 있다. 2'-O-메틸 뉴클레오단량체를 갖는 RNA는 비변형된 RNA를 인식하는 것으로 생각되는 세포 기구에 의해 인식되지 않을 수 있다. 2'-O-메틸화된 또는 부분적으로 2'-O-메틸화된 RNA의 사용은 표적 RNA 억제를 유지하면서 이중 가닥 해산에 대한 인터페론 반응을 회피할 수 있다. 이는, 예를 들어 인터페론 반응을 유도하는 짧은 RNAi (예를 들어, siRNA) 서열 및 인터페론 반응을 유도할 수 있는 보다 긴 RNAi 서열 둘 다에서 인터페론 또는 다른 세포 스트레스 반응을 회피하는 데 유용할 수 있다.

[0132] 전체적으로, 변형된 당은 D-리보스, 2'-O-알킬 (2'-O-메틸 및 2'-O-에틸 포함), 즉 2'-알콕시, 2'-아미노, 2'-S-알킬, 2'-할로 (2'-플루오로 포함), 2'-메톡시메톡시, 2'-알릴옥시 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 2'-프로파르길, 2'-프로필, 에티닐, 에테닐, 프로페닐 및 시아노 등을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 당 모이어티는 핵소스일 수 있고, 문헌 [Augustyns, K., et al., Nucl. Acids. Res. 18:4711 (1992)]에 기재된 바와 같이 올리고뉴클레오티드 내로 혼입될 수 있다. 예시적인 뉴클레오단량체는, 예를 들어 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 5,849,902에서 찾아볼 수 있다.

[0133] 구체적 관능기 및 화학 용어의 정의는 하기에서 보다 상세히 기재된다. 본 발명의 목적상, 화학 원소는 문헌 [Handbook of Chemistry and Physics, 75<sup>th</sup> Ed.]의 표지 안쪽의 원소 주기율표, CAS 버전에 따라 확인되고, 구체적 관능기는 일반적으로 본원에 기재된 바와 같이 정의된다. 추가적으로, 유기 화학, 뿐만 아니라 구체적 관능성 모이어티 및 반응성의 일반 원리는 문헌 [Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999]에 기재되어 있고, 그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0134] 본 발명의 특정 화합물은 특정한 기하 또는 입체이성질체 형태로 존재할 수 있다. 본 발명은 시스- 및 트랜스-이성질체, R- 및 S-거울상이성질체, 부분입체이성질체, (d)-이성질체, (l)-이성질체, 그의 라세미 혼합물, 및 그의 다른 혼합물을 포함한 모든 이러한 화합물이 본 발명의 범주 내에 속하는 것으로 고려한다. 추가의 비대칭 탄소 원자가 치환기, 예컨대 알킬 기에 존재할 수 있다. 모든 이러한 이성질체, 뿐만 아니라 그의 혼합물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0135] 임의의 다양한 이성질체 비를 함유하는 이성질체 혼합물이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 예를 들어, 단지 2종의 이성질체만이 조합되는 경우에, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2, 99:1, 또는 100:0 이성질체 비를 함유하는 혼합물이 모두 본 발명에 의해 고려된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 보다 복잡한 이성질체 혼합물에 대해 유사한 비가 고려된다는 것을 용이하게 인지할 것이다.

[0136] 예를 들어, 본 발명의 화합물의 특정한 거울상이성질체를 목적으로 하는 경우에, 이는 비대칭 합성 또는 키랄 보조제를 이용한 유도체화에 의해 제조될 수 있고, 여기서 생성된 부분입체이성질체 혼합물은 순수한 목적하는 거울상이성질체를 제공하기 위해 분리되고 보조기 절단된다. 대안적으로, 분자가 염기성 관능기, 예컨대 아미노, 또는 산성 관능기, 예컨대 카르복실을 함유하는 경우에, 적절한 광학-활성 산 또는 염기를 사용하여 부분입체이성질체 염을 형성한 후, 이에 따라 형성된 부분입체이성질체를 관련 기술분야에 널리 공지된 분별 결정화 또는 크로마토그래피 방법에 의해 분할하고, 후속해서 순수한 거울상이성질체를 회수한다.

[0137] 특정 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 3' 및 5' 말단을 포함한다 (원형 올리고뉴클레오티드

제외). 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 3' 및 5' 말단은, 예를 들어 3' 또는 5' 연결을 변형시킴으로써 뉴클레아제로부터 실질적으로 보호될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,849,902 및 WO 98/13526). 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 "차단기"의 포함에 의해 저항성이 될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "차단기"는 합성을 위한 보호기 또는 커플링기로서 올리고뉴클레오타이드 또는 뉴클레오단량체에 부착될 수 있는 치환기 (예를 들어, OH 기 이외의 것)를 지칭한다 (예를 들어, FITC, 프로필 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ ), 글리콜 ( $\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ ) 포스페이트 ( $\text{PO}_3^{2-}$ ), 히드로젠 포스포네이트 또는 포스포르아미다이트). "차단기"는 또한 올리고뉴클레오타이드의 5' 및 3' 말단을 보호하는 "단부 차단기" 또는 "엑소뉴클레아제 차단기", 예컨대 변형된 뉴클레오타이드 및 비-뉴클레오타이드 엑소뉴클레아제 저항성 구조를 포함한다.

[0138] 예시적인 단부-차단기는 캡 구조 (예를 들어, 7-메틸구아노신 캡), 예를 들어 3'-3' 또는 5'-5' 단부 역전을 갖는 역전된 뉴클레오단량체 (예를 들어, 문헌 [Ortiagao et al., 1992. Antisense Res. Dev. 2:129] 참조), 메틸포스포네이트, 포스포르아미다이트, 비-뉴클레오타이드 기 (예를 들어, 비-뉴클레오타이드 링커, 아미노 링커, 접합체) 등을 포함한다. 3' 말단 뉴클레오단량체는 변형된 당 모이어티를 포함할 수 있다. 3' 말단 뉴클레오단량체는 올리고뉴클레오타이드의 3'-엑소뉴클레아제 분해를 방지하는 차단기에 의해 임의로 치환될 수 있는 3'-O를 포함한다. 예를 들어, 3'-히드록실은 3'→3' 뉴클레오타이드간 연결을 통해 뉴클레오타이드로 에스테르화될 수 있다. 예를 들어, 알킬옥시 라디칼은 메톡시, 에톡시 또는 이소프로폭시, 및 바람직하게는 에톡시일 수 있다. 임의로, 3' 말단에서 3'→3' 연결된 뉴클레오타이드는 치환 연결에 의해 연결될 수 있다. 뉴클레아제 분해를 감소시키기 위해, 가장 5'의 3'→5' 연결은 변형된 연결, 예를 들어 포스포로티오에이트 또는 P-알킬옥시포스포트리 에스테르 연결일 수 있다. 바람직하게는, 2개의 가장 5'의 3'→5' 연결이 변형된 연결이다. 임의로, 5' 말단 히드록시 모이어티는 인 함유 모이어티, 예를 들어 포스페이트, 포스포로티오에이트 또는 P-에톡시포스페이트로 에스테르화될 수 있다.

[0139] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 바와 같은 합성 방법이 다양한 보호기를 사용한다는 것을 인지할 것이다. 본원에 사용된 용어 "보호기"는 특정한 관능성 모이어티, 예를 들어 O, S 또는 N을 일시적으로 차단하여 반응이 다관능성 화합물의 또 다른 반응성 부위에서 선택적으로 수행될 수 있도록 하는 것을 의미한다. 특정 실시양태에서, 보호기는 양호한 수율로 선택적으로 반응하여 계획된 반응에 대해 안정한 보호된 기질을 제공하고; 보호기는 용이하게 이용가능한, 바람직하게는 다른 관능기를 공격하지 않는 비-독성 시약에 의해 양호한 수율로 선택적으로 제거될 수 있어야 하며; 보호기는 용이하게 분리가능한 유도체를 (보다 바람직하게는 신규 입체생성 중심의 생성 없이) 형성하고; 보호기는 추가 반응 부위를 회피하도록 최소의 추가의 관능성을 갖는다. 본원에 상술된 바와 같이, 산소, 황, 질소 및 탄소 보호기가 사용될 수 있다. 히드록실 보호기는 메틸, 메톡실메틸 (MOM), 메틸티오메틸 (MTM), t-부틸티오메틸, (페닐디메틸실릴)메톡시메틸 (SMOM), 벤질옥시메틸 (BOM), p-메톡시벤질옥시메틸 (PMBM), (4-메톡시페녹시)메틸 (p-AOM), 구아이어아콜메틸 (GUM), t-부톡시메틸, 4-펜테닐옥시메틸 (POM), 실록시메틸, 2-메톡시에톡시메틸 (MEM), 2,2,2-트리클로로에톡시메틸, 비스(2-클로로에톡시)메틸, 2-(트리메틸실릴)에톡시메틸 (SEMOR), 테트라히드로피라닐 (THP), 3-브로모테트라히드로피라닐, 테트라히드로티오피라닐, 1-메톡시시클로헥실, 4-메톡시테트라히드로피라닐 (MTHP), 4-메톡시테트라히드로티오피라닐, 4-메톡시테트라히드로티오피라닐 S,S-디옥시드, 1-[(2-클로로-4-메틸)페닐]-4-메톡시피페리딘-4-일 (CTMP), 1,4-디옥산-2-일, 테트라히드로푸라닐, 테트라히드로티오푸라닐, 2,3,3a,4,5,6,7,7a-옥타히드로-7,8,8-트리메틸-4,7-메타노벤조푸란-2-일, 1-에톡시에틸, 1-(2-클로로에톡시)에틸, 1-메틸-1-메톡시에틸, 1-메틸-1-벤질옥시에틸, 1-메틸-1-벤질옥시-2-플루오로에틸, 2,2,2-트리클로로에틸, 2-트리메틸실릴에틸, 2-(페닐셀레닐)에틸, t-부틸, 알릴, p-클로로페닐, p-메톡시페닐, 2,4-디니트로페닐, 벤질, p-메톡시벤질, 3,4-디메톡시벤질, o-니트로벤질, p-니트로벤질, p-할로벤질, 2,6-디클로로벤질, p-시아노벤질, p-페닐벤질, 2-피콜릴, 4-피콜릴, 3-메틸-2-피콜릴 N-옥시드, 디페닐메틸, p,p'-디니트로벤즈히드릴, 5-디벤조수메틸, 트리페닐메틸, α-나프틸디페닐메틸, p-메톡시페닐디페닐메틸, 디(p-메톡시페닐)페닐메틸, 트리(p-메톡시페닐)메틸, 4-(4'-브로모페닐)디페닐메틸, 4,4',4"-트리스(4,5-디클로로프탈이미도페닐)메틸, 4,4',4"-트리스(레볼리노일옥시페닐)메틸, 4,4',4"-트리스(벤조일옥시페닐)메틸, 3-(이미다졸-1-일)비스(4',4"-디메톡시페닐)메틸, 1,1-비스(4-메톡시페닐)-1'-피레닐메틸, 9-안트릴, 9-(9-페닐)크산테닐, 9-(9-페닐-10-옥소)안트릴, 1,3-벤조디티올란-2-일, 벤즈이소티아졸릴 S,S-디옥시드, 트리메틸실릴 (TMS), 트리에틸실릴 (TES), 트리아이소프로필실릴 (TIPS), 디메틸이소프로필실릴 (IPDMS), 디에틸이소프로필실릴 (DEIPS), 디메틸텍실실릴, t-부틸디메틸실릴 (TBDMS), t-부틸디페닐실릴 (TBDPS), 트리벤질실릴, 트리-p-크실릴실릴, 트리페닐실릴, 디페닐메틸실릴 (DPMS), t-부틸메톡시페닐실릴 (TBMPs), 포르메이트, 벤조일포르메이트, 아세테이트, 클로로아세테이트, 디클로로아세테이트, 트리클로로아세테이트, 트리플루오로아세테이트, 메톡시아세테이트, 트리페닐메톡시아세테이트,

페녹시아세테이트, p-클로로페녹시아세테이트, 3-페닐프로피오네이트, 4-옥소펜타노에이트 (레불리네이트), 4,4-(에틸렌디티오)펜타노에이트 (레불리노일디티오아세탈), 피발로에이트, 아다만토에이트, 크로토네이트, 4-메톡시크로토네이트, 벤조에이트, p-페닐벤조에이트, 2,4,6-트리메틸벤조에이트 (메시토에이트), 알킬 메틸 카르보네이트, 9-플루오레닐메틸 카르보네이트 (Fmoc), 알킬 에틸 카르보네이트, 알킬 2,2,2-트리클로로에틸 카르보네이트 (Troc), 2-(트리메틸실릴)에틸 카르보네이트 (TMSEC), 2-(페닐술포닐) 에틸 카르보네이트 (Psec), 2-(트리페닐포스포니오) 에틸 카르보네이트 (Peoc), 알킬 이소부틸 카르보네이트, 알킬 비닐 카르보네이트 알킬 알릴 카르보네이트, 알킬 p-니트로페닐 카르보네이트, 알킬 벤질 카르보네이트, 알킬 p-메톡시벤질 카르보네이트, 알킬 3,4-디메톡시벤질 카르보네이트, 알킬 o-니트로벤질 카르보네이트, 알킬 p-니트로벤질 카르보네이트, 알킬 S-벤질 티오펜카르보네이트, 4-에톡시-1-나프틸 카르보네이트, 메틸 디티오펜카르보네이트, 2-아이오도벤조에이트, 4-아지도부티레이트, 4-니트로-4-메틸펜타노에이트, o-(디브로모메틸)벤조에이트, 2-포르밀벤젠술포네이트, 2-(메틸티오메톡시)에틸, 4-(메틸티오메톡시)부티레이트, 2-(메틸티오메톡시메틸)벤조에이트, 2,6-디클로로-4-메틸페녹시아세테이트, 2,6-디클로로-4-(1,1,3,3-테트라메틸부틸)페녹시아세테이트, 2,4-비스(1,1-디메틸프로필)페녹시아세테이트, 클로로디페닐아세테이트, 이소부티레이트, 모노숙시노에이트, (E)-2-메틸-2-부텐노에이트, o-(메톡시카르보닐)벤조에이트, α-나프토에이트, 니트레이트, 알킬 N,N,N',N'-테트라메틸포스포로디아미데이트, 알킬 N-페닐카르바메이트, 보레이트, 디메틸포스포노티오일, 알킬 2,4-디니트로페닐술포네이트, 술포에이트, 메탄술포네이트 (메실레이트), 벤질술포네이트, 및 토실레이트 (Ts)를 포함한다. 1,2- 또는 1,3-디올을 보호하기 위해, 보호기는 메틸렌 아세탈, 에틸리덴 아세탈, 1-t-부틸에틸리덴 케탈, 1-페닐에틸리덴 케탈, (4-메톡시페닐)에틸리덴 아세탈, 2,2,2-트리클로로에틸리덴 아세탈, 아세토니드, 시클로헥실리덴 케탈, 시클로헥실리덴 케탈, 시클로헥실리덴 케탈, 벤질리덴 아세탈, p-메톡시벤질리덴 아세탈, 2,4-디메톡시벤질리덴 케탈, 3,4-디메톡시벤질리덴 아세탈, 2-니트로벤질리덴 아세탈, 메톡시메틸렌 아세탈, 에톡시메틸렌 아세탈, 디메톡시메틸렌 오르토 에스테르, 1-메톡시에틸리덴 오르토 에스테르, 1-에톡시에틸리덴 오르토 에스테르, 1,2-디메톡시에틸리덴 오르토 에스테르, α-메톡시벤질리덴 오르토 에스테르, 1-(N,N-디메틸아미노)에틸리덴 유도체, α-(N,N'-디메틸아미노)벤질리덴 유도체, 2-옥시시클로헥실리덴 오르토 에스테르, 디-t-부틸실릴렌 기 (DTBS), 1,3-(1,1,3,3-테트라이소프로필디실록사닐리덴) 유도체 (TIPDS), 테트라-t-부톡시디실록산-1,3-디일리덴 유도체 (TBDS), 시클릭 카르보네이트, 시클릭 보로네이트, 에틸 보로네이트, 및 페닐 보로네이트를 포함한다. 아미노-보호기는 메틸 카르바메이트, 에틸 카르바메이트, 9-플루오레닐메틸 카르바메이트 (Fmoc), 9-(2-술포)플루오레닐메틸 카르바메이트, 9-(2,7-디브로모)플루오레닐메틸 카르바메이트, 2,7-디-t-부틸-[9-(10,10-디옥소-10,10,10,10-테트라히드로티오택산틸)]메틸 카르바메이트 (DBD-Tmoc), 4-메톡시페나실 카르바메이트 (Phenoc), 2,2,2-트리클로로에틸 카르바메이트 (Troc), 2-트리메틸실릴에틸 카르바메이트 (Teoc), 2-페닐에틸 카르바메이트 (hZ), 1-(1-아다만틸)-1-메틸에틸 카르바메이트 (Adpoc), 1,1-디메틸-2-할로에틸 카르바메이트, 1,1-디메틸-2,2-디브로모에틸 카르바메이트 (DB-t-BOC), 1,1-디메틸-2,2,2-트리클로로에틸 카르바메이트 (TCBOC), 1-메틸-1-(4-비페닐)에틸 카르바메이트 (Bpoc), 1-(3,5-디-t-부틸페닐)-1-메틸에틸 카르바메이트 (t-Bumeoc), 2-(2'- 및 4'-피리딜)에틸 카르바메이트 (Pyoc), 2-(N,N-디시클로헥실카르복사아미도)에틸 카르바메이트, t-부틸 카르바메이트 (BOC), 1-아다만틸 카르바메이트 (Adoc), 비닐 카르바메이트 (Voc), 알릴 카르바메이트 (Alloc), 1-이소프로필알릴 카르바메이트 (Ipaoc), 신나밀 카르바메이트 (Coc), 4-니트로신나밀 카르바메이트 (Noc), 8-퀴놀릴 카르바메이트, N-히드록시피페리딘 카르바메이트, 알킬디티오 카르바메이트, 벤질 카르바메이트 (Cbz), p-메톡시벤질 카르바메이트 (Moz), p-니트로벤질 카르바메이트, p-브로모벤질 카르바메이트, p-클로로벤질 카르바메이트, 2,4-디클로로벤질 카르바메이트, 4-메틸술포닐벤질 카르바메이트 (MsZ), 9-안트릴메틸 카르바메이트, 디페닐메틸 카르바메이트, 2-메틸티오에틸 카르바메이트, 2-메틸술포닐에틸 카르바메이트, 2-(p-톨루엔술포닐)에틸 카르바메이트, [2-(1,3-디티아닐)]메틸 카르바메이트 (Dmoc), 4-메틸티오펜 카르바메이트 (Mtpc), 2,4-디메틸티오펜 카르바메이트 (Bmpc), 2-포스포니오에틸 카르바메이트 (Peoc), 2-트리페닐포스포니오이소프로필 카르바메이트 (Ppoc), 1,1-디메틸-2-시아노에틸 카르바메이트, m-클로로-p-아실옥시벤질 카르바메이트, p-(디히드록시보릴)벤질 카르바메이트, 5-벤즈이속사졸릴메틸 카르바메이트, 2-(트리플루오로메틸)-6-크로모닐메틸 카르바메이트 (Troc), m-니트로페닐 카르바메이트, 3,5-디메톡시벤질 카르바메이트, o-니트로벤질 카르바메이트, 3,4-디메톡시-6-니트로벤질 카르바메이트, 페닐(o-니트로페닐)메틸 카르바메이트, 페노티아지닐-(10)-카르보닐 유도체, N'-p-톨루엔술포닐아미노카르보닐 유도체, N'-페닐아미노티오펜카르보닐 유도체, t-아밀 카르바메이트, S-벤질 티오펜카르바메이트, p-시아노벤질 카르바메이트, 시클로부틸 카르바메이트, 시클로헥실 카르바메이트, 시클로헥실 카르바메이트, 시클로프로필메틸 카르바메이트, p-데실옥시벤질 카르바메이트, 2,2-디메톡시카르보닐비닐 카르바메이트, o-(N,N-디메틸카르복사아미도)벤질 카르바메이트, 1,1-디메틸-3-(N,N-디메틸카르복사아미도)프로필 카르바메이트, 1,1-디메틸프로피닐 카르바메이트, 디(2-피리딜)메틸 카르바메이트, 2-푸라닐메틸 카르바메이트, 2-아이오도에틸 카르바메이트, 이소보르닐 카르바메이트, 이소부틸 카르바메이트, 이소

니코티닐 카르바메이트, p-(p'-메톡시페닐아조)벤질 카르바메이트, 1-메틸시클로부틸 카르바메이트, 1-메틸시클로헥실 카르바메이트, 1-메틸-1-시클로프로필메틸 카르바메이트, 1-메틸-1-(3,5-디메톡시페닐)에틸 카르바메이트, 1-메틸-1-(p-페닐아조페닐)에틸 카르바메이트, 1-메틸-1-페닐에틸 카르바메이트, 1-메틸-1-(4-피리딜)에틸 카르바메이트, 페닐 카르바메이트, p-(페닐아조)벤질 카르바메이트, 2,4,6-트리-t-부틸페닐 카르바메이트, 4-(트리메틸암모늄)벤질 카르바메이트, 2,4,6-트리메틸벤질 카르바메이트, 포름아미드, 아세트아미드, 클로로아세트아미드, 트리클로로아세트아미드, 트리플루오로아세트아미드, 페닐아세트아미드, 3-페닐프로판아미드, 피콜린아미드, 3-피리딜카르복사미드, N-벤조일페닐알라닐 유도체, 벤즈아미드, p-페닐벤즈아미드, o-니트로페닐아세트아미드, o-니트로페녹시아세트아미드, 아세트아세트아미드, (N'-디티오벤질옥시카르보닐아미노)아세트아미드, 3-(p-히드록시페닐)프로판아미드, 3-(o-니트로페닐)프로판아미드, 2-메틸-2-(o-니트로페녹시)프로판아미드, 2-메틸-2-(o-페닐아조페녹시)프로판아미드, 4-클로로부탄아미드, 3-메틸-3-니트로부탄아미드, o-니트로신나미드, N-아세틸메티오닌 유도체, o-니트로벤즈아미드, o-(벤조일옥시메틸)벤즈아미드, 4,5-디페닐-3-옥사졸린-2-온, N-프탈아미드, N-디티아숙신이미드 (Dts), N-2,3-디페닐말레이미드, N-2,5-디메틸피롤, N-1,1,4,4-테트라메틸디실릴아자시클로펜탄 부가물 (STABASE), 5-치환된 1,3-디메틸-1,3,5-트리아자시클로헥산-2-온, 5-치환된 1,3-디벤질-1,3,5-트리아자시클로헥산-2-온, 1-치환된 3,5-디니트로-4-피리돈, N-메틸아민, N-알릴아민, N-[2-(트리메틸실릴)에톡시]메틸아민 (SEM), N-3-아세톡시프로필아민, N-(1-이소프로필-4-니트로-2-옥소-3-플루오로-3-일)아민, 4급 암모늄 염, N-벤질아민, N-디(4-메톡시페닐)메틸아민, N-5-디벤조수메틸아민, N-트리페닐메틸아민 (Tr), N-[(4-메톡시페닐)디페닐메틸]아민 (MMTr), N-9-페닐플루오레닐아민 (PhF), N-2,7-디클로로-9-플루오레닐메틸렌아민, N-페로세닐메틸아미노 (Fcm), N-2-피콜릴아미노 N'-옥시드, N-1,1-디메틸티오메틸렌아민, N-벤질리덴아민, N-p-메톡시벤질리덴아민, N-디페닐메틸렌아민, N-[(2-피리딜)메시틸]메틸렌아민, N-(N',N'-디메틸아미노메틸렌)아민, N,N'-이소프로필리덴디아민, N-p-니트로벤질리덴아민, N-살리실리덴아민, N-5-클로로살리실리덴아민, N-(5-클로로-2-히드록시페닐)페닐메틸렌아민, N-시클로헥실리덴아민, N-(5,5-디메틸-3-옥소-1-시클로헥세닐)아민, N-보란 유도체, N-디페닐보란산 유도체, N-[페닐(펜타카르보닐크로뮴- 또는 텅스텐)카르보닐]아민, N-구리 킬레이트, N-아연 킬레이트, N-니트로아민, N-니트로소아민, 아민 N-옥시드, 디페닐포스핀아미드 (Dpp), 디메틸티오포스핀아미드 (Mpt), 디페닐티오포스핀아미드 (Ppt), 디알킬 포스포르아미데이트, 디벤질 포스포르아미데이트, 디페닐 포스포르아미데이트, 벤젠술폰아미드, o-니트로벤젠술폰아미드 (Nps), 2,4-디니트로벤젠술폰아미드, 펜타클로로벤젠술폰아미드, 2-니트로-4-메톡시벤젠술폰아미드, 트리페닐메틸술폰아미드, 3-니트로피리딘술폰아미드 (Npys), p-톨루엔술폰아미드 (Ts), 벤젠술폰아미드, 2,3,6-트리메틸-4-메톡시벤젠술폰아미드 (Mtr), 2,4,6-트리메톡시벤젠술폰아미드 (Mtb), 2,6-디메틸-4-메톡시벤젠술폰아미드 (Pme), 2,3,5,6-테트라메틸-4-메톡시벤젠술폰아미드 (Mte), 4-메톡시벤젠술폰아미드 (Mbs), 2,4,6-트리메틸벤젠술폰아미드 (Mts), 2,6-디메톡시-4-메틸벤젠술폰아미드 (iMds), 2,2,5,7,8-펜타메틸크로만-6-술폰아미드 (Pmc), 메탄술폰아미드 (Ms), β-트리메틸실릴에탄술폰아미드 (SES), 9-안트라센술폰아미드, 4-(4',8'-디메톡시나프틸메틸)벤젠술폰아미드 (DNMBS), 벤질술폰아미드, 트리플루오로메틸술폰아미드, 및 페나실술폰아미드를 포함한다. 예시적인 보호기는 본원에서 상술된다. 그러나, 본 발명은 이들 보호기로 제한되는 것으로 의도되지 않고; 오히려 다양한 추가의 등가의 보호기가 상기 기준을 사용하여 용이하게 확인될 수 있고 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다는 것이 인지될 것이다. 추가적으로, 다양한 보호기가 문헌 [Protective Groups in Organic Synthesis, Third Ed. Greene, T.W. and Wuts, P.G., Eds., John Wiley & Sons, New York: 1999]에 기재되어 있고, 그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0140]

본원에 기재된 바와 같은 화합물은 임의의 수의 치환기 또는 관능성 모이어티로 치환될 수 있다는 것이 인지될 것이다. 일반적으로, 용어 "임의로"가 선행되는지 여부에 관계없이, 용어 "치환된" 및 본 발명의 화학식에 함유된 치환기는, 주어진 구조에서의 수소 라디칼의 명시된 치환기의 라디칼로의 대체를 지칭한다. 임의의 주어진 구조에서 1개 초과와 위치가 명시된 기로부터 선택된 1개 초과와 치환기로 치환될 수 있는 경우에, 치환기는 모든 위치에서 동일하거나 상이할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "치환된"은 유기 화합물의 모든 허용되는 치환기를 포함하는 것으로 고려된다. 넓은 측면에서, 허용되는 치환기는 유기 화합물의 비-시클릭 및 시클릭, 분지형 및 비분지형, 카르보시클릭 및 헤테로시클릭, 방향족 및 비방향족 치환기를 포함한다. 질소와 같은 헤테로원자는 수소 치환기 및/또는 헤테로원자의 원자를 만족시키는 본원에 기재된 유기 화합물의 임의의 허용되는 치환기를 가질 수 있다. 또한, 본 발명은 유기 화합물의 허용되는 치환기에 의해 어떠한 방식으로든 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 본 발명에 의해 고려되는 치환기 및 가변기의 조합은 바람직하게는, 예를 들어 감염성 질환 또는 증식성 장애의 치료에 유용한 안정한 화합물의 형성을 발생시키는 조합이다. 본원에 사용된 용어 "안정한"은 바람직하게는, 제조가 가능하도록 충분한 안정성을 보유하며, 검출되기에 충분한 시간 동안, 바람직하게는 본원에 상술된 목적에 유용하기에 충분한 시간 동안 화합물의 완전성을 유지하는 화합물을 지칭한다.

- [0141] 본원에 사용된 용어 "지방족"은, 1개 이상의 관능기로 임의로 치환된, 포화 및 불포화 둘 다의 직쇄 (즉, 비분지형), 분지형, 비-시클릭, 시클릭 또는 폴리시클릭 지방족 탄화수소를 포함한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 인지될 바와 같이, "지방족"은 본원에서 알킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 및 시클로알키닐 모이어티를 포함하나 이에 제한되지는 않는 것으로 의도된다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "알킬"은 직쇄형, 분지형 및 시클릭 알킬 기를 포함한다. 유사한 규정이 "알케닐", "알키닐" 등과 같은 다른 일반 용어에 적용된다. 또한, 본원에 사용된 용어 "알킬", "알케닐", "알키닐" 등은 치환 및 비치환된 기 둘 다를 포괄한다. 특정 실시양태에서, 본원에 사용된 "저급 알킬"은 1-6개의 탄소 원자를 갖는 알킬 기 (시클릭, 비-시클릭, 치환, 비치환, 분지형 또는 비분지형)를 나타내는 데 사용된다.
- [0142] 특정 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알킬, 알케닐 및 알키닐 기는 1-20개의 지방족 탄소 원자를 함유한다. 특정의 다른 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알킬, 알케닐 및 알키닐기는 1-10개의 지방족 탄소 원자를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알킬, 알케닐 및 알키닐 기는 1-8개의 지방족 탄소 원자를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알킬, 알케닐 및 알키닐기는 1-6개의 지방족 탄소 원자를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알킬, 알케닐 및 알키닐기는 1-4개의 탄소 원자를 함유한다. 따라서, 예시적인 지방족 기는, 예를 들어 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, 시클로프로필, -CH<sub>2</sub>-시클로프로필, 비닐, 알릴, n-부틸, sec-부틸, 이소부틸, tert-부틸, 시클로부틸, -CH<sub>2</sub>-시클로부틸, n-펜틸, sec-펜틸, 이소펜틸, tert-펜틸, 시클로펜틸, -CH<sub>2</sub>-시클로펜틸, n-헥실, sec-헥실, 시클로헥실, -CH<sub>2</sub>-시클로헥실 모이어티 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않으며, 이는 다시 1개 이상의 치환기를 보유할 수 있다. 알케닐 기는, 예를 들어 에테닐, 프로페닐, 부테닐, 1-메틸-2-부텐-1-일 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 대표적인 알키닐 기는 에티닐, 2-프로피닐 (프로파르길), 1-프로피닐 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0143] 본 발명의 화합물의 상기 기재된 지방족 (및 다른) 모이어티의 치환기의 일부 예는 지방족; 헤테로지방족; 아릴; 헤테로아릴; 아릴알킬; 헤테로아릴알킬; 알콕시; 아릴옥시; 헤테로알콕시; 헤테로아릴옥시; 알킬티오; 아릴티오; 헤테로알킬티오; 헤테로아릴티오; -F; -Cl; -Br; -I; -OH; -NO<sub>2</sub>; -CN; -CF<sub>3</sub>; -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>; -CHCl<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>OH; -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH; -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; -C(O)R<sub>x</sub>; -CO<sub>2</sub>(R<sub>x</sub>); -CON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -OC(O)R<sub>x</sub>; -OCO<sub>2</sub>R<sub>x</sub>; -OCON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -N(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -S(O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>; -NR<sub>x</sub>(CO)R<sub>x</sub>를 포함하나 이에 제한되지는 않고, 여기서 각 경우의 R<sub>x</sub>는 독립적으로 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알킬, 또는 헤테로아릴알킬을 포함하나 이에 제한되지는 않고, 여기서 상기 및 본원에 기재된 지방족, 헤테로지방족, 아릴알킬, 또는 헤테로아릴알킬 치환기 중 임의의 것은 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형, 시클릭 또는 비-시클릭일 수 있고, 여기서 상기 및 본원에 기재된 아릴 또는 헤테로아릴 치환기 중 임의의 것은 치환 또는 비치환될 수 있다. 일반적으로 적용가능한 치환기의 추가의 예는 본원에 기재된 구체적 실시양태에 의해 예시된다.
- [0144] 본원에 사용된 용어 "헤테로지방족"은, 예를 들어 탄소 원자 대신 1개 이상의 산소, 황, 질소, 인 또는 규소 원자를 함유하는 지방족 모이어티를 지칭한다. 헤테로지방족 모이어티는 분지형, 비분지형, 시클릭 또는 비-시클릭일 수 있고, 포화 및 불포화 헤테로사이클, 예컨대 모르폴리노, 피롤리디닐 등을 포함한다. 특정 실시양태에서, 헤테로지방족 모이어티는 그의 수소 원자 중 1개 이상을 지방족; 헤테로지방족; 아릴; 헤테로아릴; 아릴알킬; 헤테로아릴알킬; 알콕시; 아릴옥시; 헤테로알콕시; 헤테로아릴옥시; 알킬티오; 아릴티오; 헤테로알킬티오; 헤테로아릴티오; -F; -Cl; -Br; -I; -OH; -NO<sub>2</sub>; -CN; -CF<sub>3</sub>; -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>; -CHCl<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>OH; -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH; -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; -C(O)R<sub>x</sub>; -CO<sub>2</sub>(R<sub>x</sub>); -CON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -OC(O)R<sub>x</sub>; -OCO<sub>2</sub>R<sub>x</sub>; -OCON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -N(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -S(O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>; -NR<sub>x</sub>(CO)R<sub>x</sub>를 포함하나 이에 제한되지는 않는 1개 이상의 모이어티로 독립적으로 대체하는 것에 의해 치환되며, 여기서 각 경우의 R<sub>x</sub>는 독립적으로 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알킬, 또는 헤테로아릴알킬을 포함하나 이에 제한되지는 않고, 여기서 상기 및 본원에 기재된 지방족, 헤테로지방족, 아릴알킬, 또는 헤테로아릴알킬 치환기 중 임의의 것은 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형, 시클릭 또는 비-시클릭일 수 있고, 여기서 상기 및 본원에 기재된 아릴 또는 헤테로아릴 치환기 중 임의의 것은 치환 또는 비치환될 수 있다. 일반적으로 적용가능한 치환기의 추가의 예는 본원에 기재된 구체적 실시양태에 의해 예시된다.
- [0145] 본원에 사용된 용어 "할로" 및 "할로젠"은 플루오린, 염소, 브로민 및 아이오딘으로부터 선택된 원자를 지칭한다.
- [0146] 용어 "알킬"은 직쇄 알킬 기 (예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실 등), 분지쇄 알킬 기 (이소프로필, tert-부틸, 이소부틸 등), 시클로알킬 (지환족) 기 (시클로프로필, 시클로펜틸,

시클로헥실, 시클로헵틸, 시클로옥틸), 알킬 치환된 시클로알킬 기, 및 시클로알킬 치환된 알킬 기를 포함한 포화 지방족 기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 직쇄 또는 분지쇄 알킬은 그의 백본에 6개 이하의 탄소 원자 (예를 들어, 직쇄의 경우  $C_1-C_6$ , 분지쇄의 경우  $C_3-C_6$ ), 보다 바람직하게는 4개 이하의 탄소 원자를 갖는다. 마찬가지로, 바람직한 시클로알킬은 그의 고리 구조에 3-8개의 탄소 원자를 갖고, 보다 바람직하게는 고리 구조에 5 또는 6개의 탄소를 갖는다. 용어  $C_1-C_6$ 은 1 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 알킬 기를 포함한다.

[0147] 더욱이, 달리 명시되지 않는 한, 용어 알킬은 "비치환된 알킬" 및 "치환된 알킬" 둘 다를 포함하고, 이들 중 후자는 탄화수소 백본의 1개 이상의 탄소 상의 수소를 대체하는 독립적으로 선택된 치환기를 갖는 알킬 모이어티를 지칭한다. 이러한 치환기는, 예를 들어 알케닐, 알키닐, 할로젠, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 아릴카르보닐옥시, 알콕시카르보닐옥시, 아릴옥시카르보닐옥시, 카르복실레이트, 알킬카르보닐, 아릴카르보닐, 알콕시카르보닐, 아미노카르보닐, 알킬아미노카르보닐, 디알킬아미노카르보닐, 알킬티오카르보닐, 알콕실, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 시아노, 아미노 (알킬 아미노, 디알킬아미노, 아릴아미노, 디아릴아미노, 및 알킬아릴아미노 포함), 아실아미노 (알킬카르보닐아미노, 아릴카르보닐아미노, 카르바모일 및 우레이도 포함), 아미디노, 이미노, 술프히드릴, 알킬티오, 아릴티오, 티오카르복실레이트, 술페이트, 알킬술피닐, 술포네이트, 술포모일, 술포아미도, 니트로, 트리플루오로메틸, 시아노, 아지도, 헤테로시클릴, 알킬아릴, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티를 포함할 수 있다. 시클로알킬은, 예를 들어 상기 기재된 치환기로 추가로 치환될 수 있다. "알킬아릴" 또는 "아릴알킬" 모이어티는 아릴 (예를 들어, 페닐메틸 (벤질))로 치환된 알킬이다. 용어 "알킬"은 또한 천연 및 비천연 아미노산의 측쇄를 포함한다. 용어 "n-알킬"은 직쇄 (즉, 비분지형) 비치환된 알킬 기를 의미한다.

[0148] 용어 "알케닐"은, 상기 기재된 알킬에 대해 길이 및 가능한 치환 면에서 유사하지만 적어도 1개의 이중 결합을 함유하는 불포화 지방족 기를 포함한다. 예를 들어, 용어 "알케닐"은 직쇄 알케닐 기 (예를 들어, 에틸레닐, 프로페닐, 부테닐, 펜테닐, 헥세닐, 헵테닐, 옥테닐, 노네닐, 데세닐 등), 분지쇄 알케닐 기, 시클로알케닐 (치환족) 기 (시클로프로페닐, 시클로펜테닐, 시클로헥세닐, 시클로헵테닐, 시클로옥테닐), 알킬 또는 알케닐 치환된 시클로알케닐 기, 및 시클로알킬 또는 시클로알케닐 치환된 알케닐 기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 직쇄 또는 분지쇄 알케닐 기는 그의 백본에 6개 이하의 탄소 원자를 갖는다 (예를 들어, 직쇄의 경우  $C_2-C_6$ , 분지쇄의 경우  $C_3-C_6$ ). 마찬가지로, 시클로알케닐 기는 그의 고리 구조에 3-8개의 탄소 원자를 가질 수 있고, 보다 바람직하게는 고리 구조에 5 또는 6개의 탄소를 갖는다. 용어  $C_2-C_6$ 은 2 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 알케닐 기를 포함한다.

[0149] 더욱이, 달리 명시되지 않는 한, 용어 알케닐은 "비치환된 알케닐" 및 "치환된 알케닐" 둘 다를 포함하고, 이들 중 후자는 탄화수소 백본의 1개 이상의 탄소 상의 수소를 대체하는 독립적으로 선택된 치환기를 갖는 알케닐 모이어티를 지칭한다. 이러한 치환기는, 예를 들어 알킬 기, 알키닐 기, 할로젠, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 아릴카르보닐옥시, 알콕시카르보닐옥시, 아릴옥시카르보닐옥시, 카르복실레이트, 알킬카르보닐, 아릴카르보닐, 알콕시카르보닐, 아미노카르보닐, 알킬아미노카르보닐, 디알킬아미노카르보닐, 알킬티오카르보닐, 알콕실, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 시아노, 아미노 (알킬 아미노, 디알킬아미노, 아릴아미노, 디아릴아미노, 및 알킬아릴아미노 포함), 아실아미노 (알킬카르보닐아미노, 아릴카르보닐아미노, 카르바모일 및 우레이도 포함), 아미디노, 이미노, 술프히드릴, 알킬티오, 아릴티오, 티오카르복실레이트, 술페이트, 알킬술피닐, 술포네이트, 술포모일, 술포아미도, 니트로, 트리플루오로메틸, 시아노, 아지도, 헤테로시클릴, 알킬아릴, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티를 포함할 수 있다.

[0150] 용어 "알키닐"은, 상기 기재된 알킬에 대해 길이 및 가능한 치환 면에서 유사하지만 적어도 1개의 삼중 결합을 함유하는 불포화 지방족 기를 포함한다. 예를 들어, 용어 "알키닐"은 직쇄 알키닐 기 (예를 들어, 에티닐, 프로피닐, 부티닐, 펜티닐, 헥시닐, 헵티닐, 옥티닐, 노니닐, 데시닐 등), 분지쇄 알키닐 기, 및 시클로알킬 또는 시클로알케닐 치환된 알키닐 기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 직쇄 또는 분지쇄 알키닐 기는 그의 백본에 6개 이하의 탄소 원자를 갖는다 (예를 들어, 직쇄의 경우  $C_2-C_6$ , 분지쇄의 경우  $C_3-C_6$ ). 용어  $C_2-C_6$ 은 2 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 알키닐 기를 포함한다.

[0151] 더욱이, 달리 명시되지 않는 한, 용어 알키닐은 "비치환된 알키닐" 및 "치환된 알키닐" 둘 다를 포함하고, 이들 중 후자는 탄화수소 백본의 1개 이상의 탄소 상의 수소를 대체하는 독립적으로 선택된 치환기를 갖는 알키닐 모이어티를 지칭한다. 이러한 치환기는, 예를 들어 알킬 기, 알키닐 기, 할로젠, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 아릴카르보닐옥시, 알콕시카르보닐옥시, 아릴옥시카르보닐옥시, 카르복실레이트, 알킬카르보닐, 아릴카르보닐,

알콕시카르보닐, 아미노카르보닐, 알킬아미노카르보닐, 디알킬아미노카르보닐, 알킬티오카르보닐, 알콕실, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 시아노, 아미노 (알킬 아미노, 디알킬아미노, 아릴아미노, 디아릴아미노, 및 알킬아릴아미노 포함), 아실아미노 (알킬카르보닐아미노, 아릴카르보닐아미노, 카르바모일 및 우레이도 포함), 아미디노, 이미노, 술폰히드릴, 알킬티오, 아릴티오, 티오카르복실레이트, 술페이트, 알킬술피닐, 술폰네이트, 술폰아미도, 니트로, 트리플루오로메틸, 시아노, 아지도, 헤테로시클릴, 알킬아릴, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티를 포함할 수 있다.

[0152] 탄소의 수가 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 "저급 알킬"은, 상기 정의된 바와 같지만 그의 백본 구조에 1 내지 5개의 탄소 원자를 갖는 알킬 기를 의미한다. "저급 알케닐" 및 "저급 알키닐"은 예를 들어, 2-5개의 탄소 원자의쇄 길이를 갖는다.

[0153] 용어 "알콕시"는 산소 원자에 공유 연결된, 치환 및 비치환된 알킬, 알케닐 및 알키닐 기를 포함한다. 알콕시 기의 예는 메톡시, 에톡시, 이소프로필옥시, 프로폭시, 부톡시 및 펜톡시 기를 포함한다. 치환된 알콕시 기의 예는 할로젠화된 알콕시 기를 포함한다. 알콕시 기는 독립적으로 선택된 기, 예컨대 알케닐, 알키닐, 할로젠, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 아릴카르보닐옥시, 알콕시카르보닐옥시, 아릴옥시카르보닐옥시, 카르복실레이트, 알킬카르보닐, 아릴카르보닐, 알콕시카르보닐, 아미노카르보닐, 알킬아미노카르보닐, 디알킬아미노카르보닐, 알킬티오카르보닐, 알콕실, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 시아노, 아미노 (알킬 아미노, 디알킬아미노, 아릴아미노, 디아릴아미노 및 알킬아릴아미노 포함), 아실아미노 (알킬카르보닐아미노, 아릴카르보닐아미노, 카르바모일 및 우레이도 포함), 아미디노, 이미노, 술폰히드릴, 알킬티오, 아릴티오, 티오카르복실레이트, 술페이트, 알킬 술피닐, 술폰네이트, 술폰아미도, 니트로, 트리플루오로메틸, 시아노, 아지도, 헤테로시클릴, 알킬아릴 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티로 치환될 수 있다. 할로젠 치환된 알콕시 기의 예는 플루오로메톡시, 디플루오로메톡시, 트리플루오로메톡시, 클로로메톡시, 디클로로메톡시, 트리클로로메톡시 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0154] 용어 "헤테로원자"는 탄소 또는 수소 이외의 임의의 원소의 원자를 포함한다. 바람직한 헤테로원자는 질소, 산소, 황 및 인이다.

[0155] 용어 "히드록시" 또는 "히드록실"은 -OH 또는  $-O^-$  (적절한 반대이온을 가짐)를 갖는 기를 포함한다.

[0156] 용어 "할로젠"은 플루오린, 브로민, 염소, 아이오딘 등을 포함한다. 용어 "퍼할로겐화"는 일반적으로, 모든 수소가 할로젠 원자에 의해 대체된 모이어티를 지칭한다.

[0157] 용어 "치환된"은, 모이어티 상에 위치할 수 있으며 분자가 그의 의도된 기능을 수행하게 하는, 독립적으로 선택된 치환기를 포함한다. 치환기의 예는 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴,  $(CR'R'')_{0-3}NR'R''$ ,  $(CR'R'')_{0-3}CN$ ,  $NO_2$ , 할로젠,  $(CR'R'')_{0-3}C$ (할로젠)<sub>3</sub>,  $(CR'R'')_{0-3}CH$ (할로젠)<sub>2</sub>,  $(CR'R'')_{0-3}CH_2$ (할로젠),  $(CR'R'')_{0-3}CONR'R''$ ,  $(CR'R'')_{0-3}S(O)_{1-2}NR'R''$ ,  $(CR'R'')_{0-3}CHO$ ,  $(CR'R'')_{0-3}O(CR'R'')_{0-3}H$ ,  $(CR'R'')_{0-3}S(O)_{0-2}R'$ ,  $(CR'R'')_{0-3}O(CR'R'')_{0-3}H$ ,  $(CR'R'')_{0-3}COR'$ ,  $(CR'R'')_{0-3}CO_2R'$ , 또는  $(CR'R'')_{0-3}OR'$  기를 포함하며; 여기서 각각의 R' 및 R''는 각각 독립적으로 수소, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알키닐, 또는 아릴 기이거나, 또는 R' 및 R''는 함께 벤질리덴 기 또는  $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$  기이다.

[0158] 용어 "아민" 또는 "아미노"는 질소 원자가 적어도 1개의 탄소 또는 헤테로원자에 공유 결합된 화합물 또는 모이어티를 포함한다. 용어 "알킬 아미노"는 질소가 적어도 1개의 추가의 알킬 기에 결합된 기 및 화합물을 포함한다. 용어 "디알킬 아미노"는 질소 원자가 적어도 2개의 추가의 알킬 기에 결합된 기를 포함한다.

[0159] 용어 "에테르"는 2개의 상이한 탄소 원자 또는 헤테로원자에 결합된 산소를 함유하는 화합물 또는 모이어티를 포함한다. 예를 들어, 상기 용어는 또 다른 알킬 기에 공유 결합된 산소 원자에 공유 결합된 알킬, 알케닐 또는 알키닐 기를 지칭하는 "알콕시알킬"을 포함한다.

[0160] 용어 "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드 서열", "핵산", "핵산 분자", "핵산 서열" 및 "올리고뉴클레오티드"는 2개 이상의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 DNA, RNA, 또는 그의 유도체 또는 변형된 버전일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 염기 모이어티, 당 모이어티 또는 포스페이트 백본에서 변형되어, 예를 들어 분자의 안정성, 그의 혼성화 파라미터 등을 개선시킬 수 있다. 폴리뉴클레오티드는, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-아이오도우라실, 하이포크산틴, 크산틴, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록실메틸) 우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우

리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, 베타-D-갈락토실케오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N6-아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실케오신, 5'-메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 와이부톡소신, 슈도우라실, 케오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산, 5-메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-N-2-카르복시프로필) 우라실 및 2,6-디아미노퓨린을 포함하나 이에 제한되지는 않는 군으로부터 선택된 변형된 염기 모이어티를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 변형된 당 모이어티 (예를 들어, 2'-플루오로리보스, 리보스, 2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸시티딘, 아라비노스 및 헥소스) 및/또는 변형된 포스페이트 모이어티 (예를 들어, 포스포티오에이트 및 5'-N-포스포아미다이트 연결)를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 서열은 전형적으로, 세포 기구에 의해 사용되는 정보를 포함한 유전자 정보를 운반하여 단백질 및 효소를 생성한다. 이들 용어는 이중- 또는 단일-가닥 게놈 및 cDNA, RNA, 임의의 합성 및 유전자 조작된 폴리뉴클레오타이드, 및 센스 및 안티센스 폴리뉴클레오타이드 둘 다를 포함한다. 이는 단일- 및 이중 가닥 분자, 즉, DNA-DNA, DNA-RNA, 및 RNA-RNA 하이브리드, 뿐만 아니라 염기를 아미노산 백본에 접합시킴으로써 형성된 "단백질 핵산" (PNA)을 포함한다.

[0161] 용어 "표적화 모이어티" 또는 "표적화 리간드"는 N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸 갈락토사민 (GalNac)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0162] 용어 "염기"는 공지된 퓨린 및 피리미딘 헤테로시클릭 염기, 테아자퓨린, 및 그의 유사체 (헤테로시클릭 치환된 유사체, 예를 들어 아미노에톡시 페녹사진 포함), 유도체 (예를 들어, 1-알킬-, 1-알케닐-, 헤테로방향족- 및 1-알킬닐 유도체) 및 호변이성질체를 포함한다. 퓨린의 예는 아데닌, 구아닌, 이노신, 디아미노퓨린 및 크산틴 및 그의 유사체 (예를 들어, 8-옥소-N<sup>6</sup>-메틸아데닌 또는 7-디아자크산틴) 및 유도체를 포함한다. 피리미딘은 예를 들어 티민, 우라실 및 시토신, 및 그의 유사체 (예를 들어, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-(1-프로피닐)우라실, 5-(1-프로피닐)시토신 및 4,4-에타노시토신)를 포함한다. 적합한 염기의 다른 예는 비-퓨리닐 및 비-피리미디닐 염기, 예컨대 2-아미노피리딘 및 트리아진을 포함한다.

[0163] 일부 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오단량체는 RNA 뉴클레오타이드이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오단량체는 변형된 RNA 뉴클레오타이드이다. 따라서, 올리고뉴클레오타이드는 변형된 RNA 뉴클레오타이드를 함유한다.

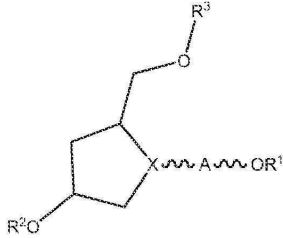
[0164] 용어 "뉴클레오시드"는 당 모이어티, 바람직하게는 리보스 또는 데옥시리보스에 공유 부착된 염기를 포함한다. 바람직한 뉴클레오시드의 예는 리보뉴클레오시드 및 데옥시리보뉴클레오시드를 포함한다. 뉴클레오시드는 또한 아미노산 또는 아미노산 유사체에 연결된 염기를 포함하며, 이는 유리 카르복실 기, 유리 아미노 기 또는 보호기를 포함할 수 있다. 적합한 보호기는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (문헌 [P. G. M. Wuts and T. W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2<sup>nd</sup> Ed., Wiley-Interscience, New York, 1999] 참조).

[0165] 용어 "뉴클레오타이드"는 포스페이트 기 또는 포스페이트 유사체를 추가로 포함하는 뉴클레오시드를 포함한다.

[0166] 핵산 분자는 세포로의 분자의 표적화 및/또는 전달을 위해 소수성 모이어티와 회합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 소수성 모이어티는 링커를 통해 핵산 분자와 회합된다. 특정 실시양태에서, 회합은 비공유 상호작용을 통한다. 다른 실시양태에서, 회합은 공유 결합을 통한다. 핵산 분자는 세포로의 분자의 표적화 및/또는 전달을 위해 표적화 리간드 모이어티와 회합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 표적화 리간드 모이어티는 포스포로아미다이트로서 또는 대안적으로 링커를 통해 핵산 분자와 회합된다. 특정 실시양태에서, 회합은 비공유 상호작용을 통한다. 다른 실시양태에서, 회합은 공유 결합을 통한다. 관련 기술분야에 공지된 임의의 링커는 핵산을 소수성 모이어티와 회합시키는 데 사용될 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 링커는 공개된 국제 PCT 출원, WO 92/03464, WO 95/23162, WO 2008/021157, WO 2009/021157, WO 2009/134487, WO 2009/126933, 미국 특허 출원 공개 2005/0107325, 미국 특허 5,414,077, 미국 특허 5,419,966, 미국 특허 5,512,667, 미국 특허 5,646,126, 및 미국 특허 5,652,359에 기재되어 있고, 이들은 본원에 참조로 포함된다. 링커는 다중-원자 링커에 대한 공유 결합만큼 단순할 수 있다. 링커는 시클릭 또는 비-시클릭일 수 있다. 링커는 임의로 치환될 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커는 핵산으로부터 절단될 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커는 생리학적 조건 하에 가수분해될 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커는 효소 (예를 들어, 에스테라제 또는 포스포디에스테라제)에 의해 절단될 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커는 핵산을 소수성 모이어티로부터 분리하기 위해 스페이서 요소를 포함한다. 스페이서 요소는 1 내지 30개의 탄소 또는 헤테로원자를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커 및/또는 스페이서 요소는 양성자화가능한 관능기를 포함한다. 이러한 양성자화가능한 관능기는 핵산 분자의 엔

도습 이탈을 촉진할 수 있다. 또한, 양성자화가능한 관능기는 세포로의 핵산의 전달을 보조할 수 있고, 예를 들어 분자의 전체적인 전하를 중성화할 수 있다. 다른 실시양태에서, 링커 및/또는 스페이서 요소는 생물학적으로 불활성이다 (즉, 이는 생성된 핵산 분자에 생물학적 활성 또는 기능을 부여하지 않음).

[0167] 특정 실시양태에서, 표적화 모이어티 및/또는 링커 및 소수성 모이어티를 갖는 핵산 분자는 본원에 기재된 화학식을 갖는다. 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖고:



[0168]

[0169] 여기서

[0170] X는 N 또는 CH이고;

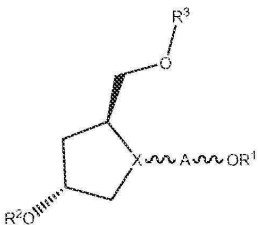
[0171] A는 결합; 치환 또는 비치환된, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 지방족; 또는 치환 또는 비치환된, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이고;

[0172] R¹은 소수성 모이어티이고;

[0173] R²는 수소; 산소-보호기; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 지방족; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족; 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 아실; 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 아릴; 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 헤테로아릴이고;

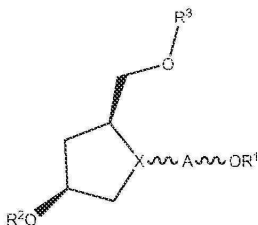
[0174] R³은 핵산이다.

[0175] 특정 실시양태에서, 분자는 하기 화학식을 갖는다:



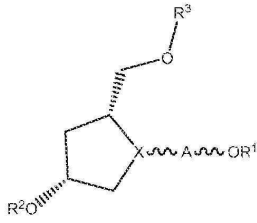
[0176]

[0177] 특정 실시양태에서, 분자는 하기 화학식을 갖는다:



[0178]

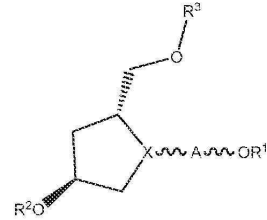
[0179] 특정 실시양태에서, 분자는 하기 화학식을 갖는다:



[0180]

[0181]

특정 실시양태에서, 분자는 하기 화학식을 갖는다:



[0182]

[0183]

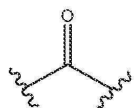
특정 실시양태에서, X는 N이다. 특정 실시양태에서, X는 CH이다.

[0184]

특정 실시양태에서, A는 결합이다. 특정 실시양태에서, A는 치환 또는 비치환된, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 지방족이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 지방족이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환된, 비분지형 지방족이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환된, 비분지형 알킬이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환된, 비분지형  $C_{1-20}$  알킬이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환된, 비분지형  $C_{1-12}$  알킬이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환된, 비분지형  $C_{1-10}$  알킬이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환된, 비분지형  $C_{1-8}$  알킬이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환된, 비분지형  $C_{1-6}$  알킬이다. 특정 실시양태에서, A는 치환 또는 비치환된, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환된, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환된, 비분지형 헤테로지방족이다.

[0185]

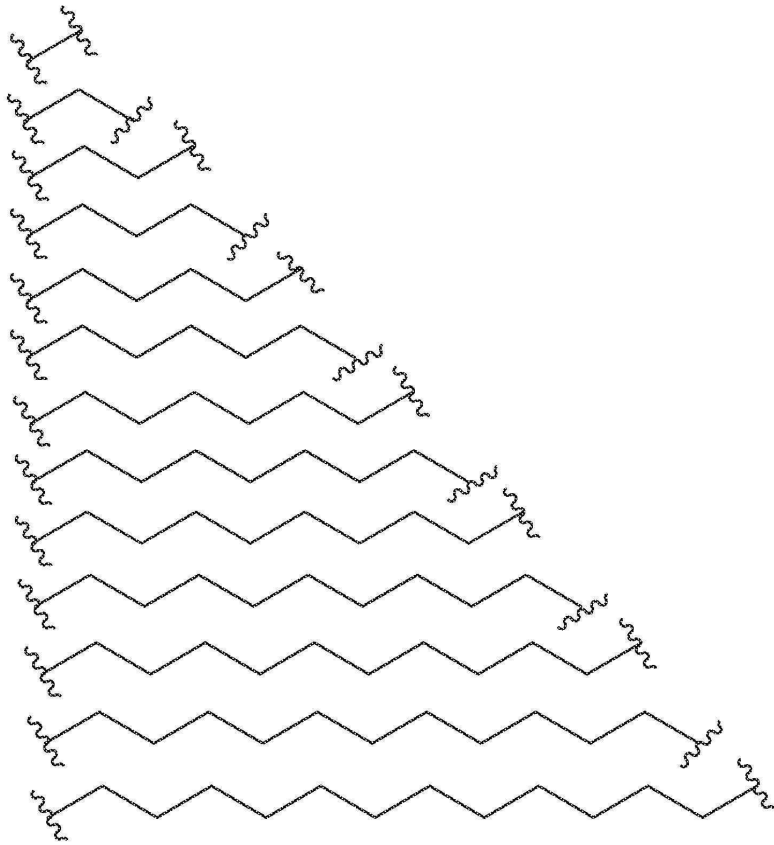
특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:



[0186]

[0187]

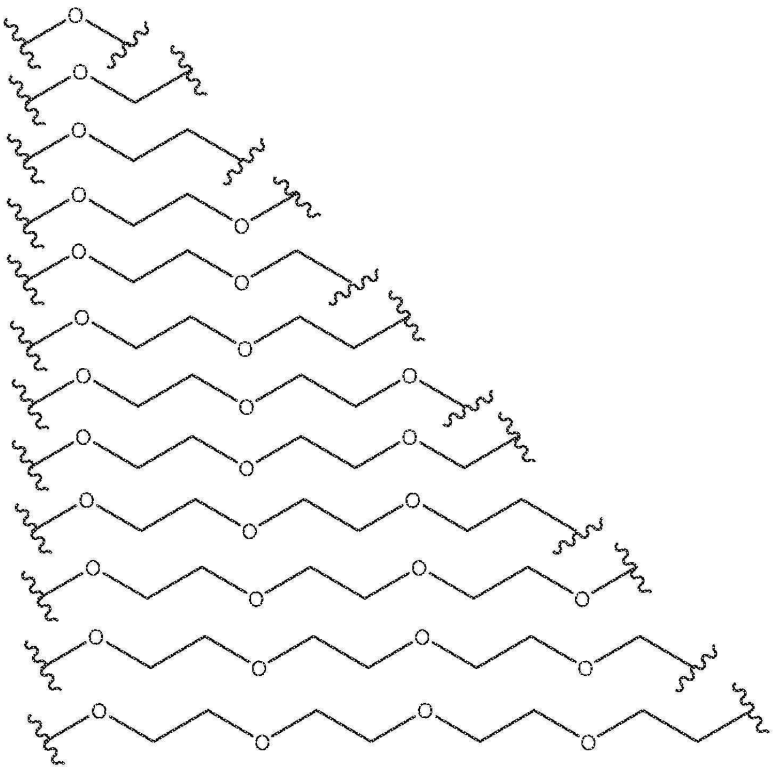
특정 실시양태에서, A는 하기 화학식 중 하나를 갖는다:



[0188]

[0189]

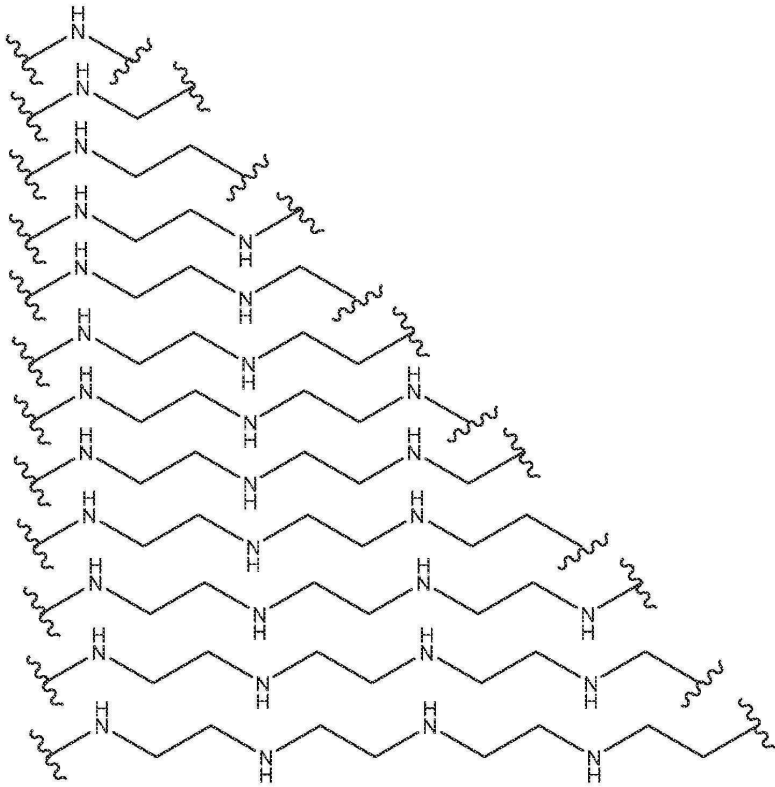
특정 실시양태에서, A는 하기 화학식 중 하나를 갖는다:



[0190]

[0191]

특정 실시양태에서, A는 하기 화학식 중 하나를 갖는다:



[0192]

[0193]

특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:



[0194]

[0195]

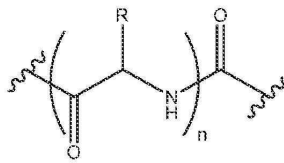
특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:



[0196]

[0197]

특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖고:



[0198]

[0199]

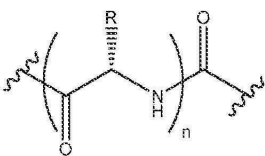
여기서

[0200]

각 경우에  $R$ 은 독립적으로 천연 또는 비천연 아미노산의 측쇄이고;

[0201]

$n$ 은 1 내지 20의 정수이다. 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:



[0202]

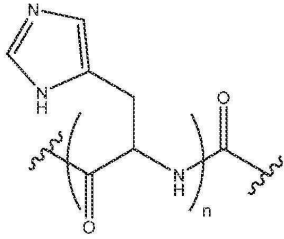
[0203]

특정 실시양태에서, 각 경우에  $R$ 은 독립적으로 천연 아미노산의 측쇄이다. 특정 실시양태에서,  $n$ 은 1 내지 15

의 정수이다. 특정 실시양태에서,  $n$ 은 1 내지 10의 정수이다. 특정 실시양태에서,  $n$ 은 1 내지 5의 정수이다.

[0204]

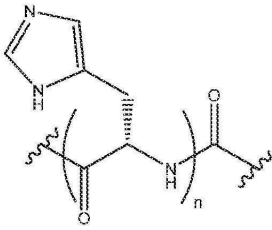
특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖고:



[0205]

[0206]

여기서  $n$ 은 1 내지 20의 정수이다. 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:



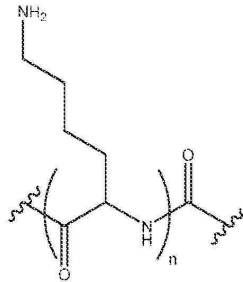
[0207]

[0208]

특정 실시양태에서,  $n$ 은 1 내지 15의 정수이다. 특정 실시양태에서,  $n$ 은 1 내지 10의 정수이다. 특정 실시양태에서,  $n$ 은 1 내지 5의 정수이다.

[0209]

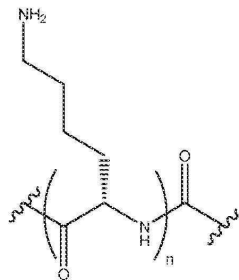
특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖고:



[0210]

[0211]

여기서  $n$ 은 1 내지 20의 정수이다. 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:

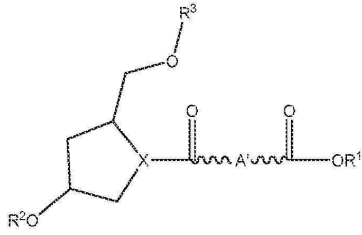


[0212]

[0213]

특정 실시양태에서,  $n$ 은 1 내지 15의 정수이다. 특정 실시양태에서,  $n$ 은 1 내지 10의 정수이다. 특정 실시양태에서,  $n$ 은 1 내지 5의 정수이다.

[0214] 특정 실시양태에서, 분자는 하기 화학식을 갖고:

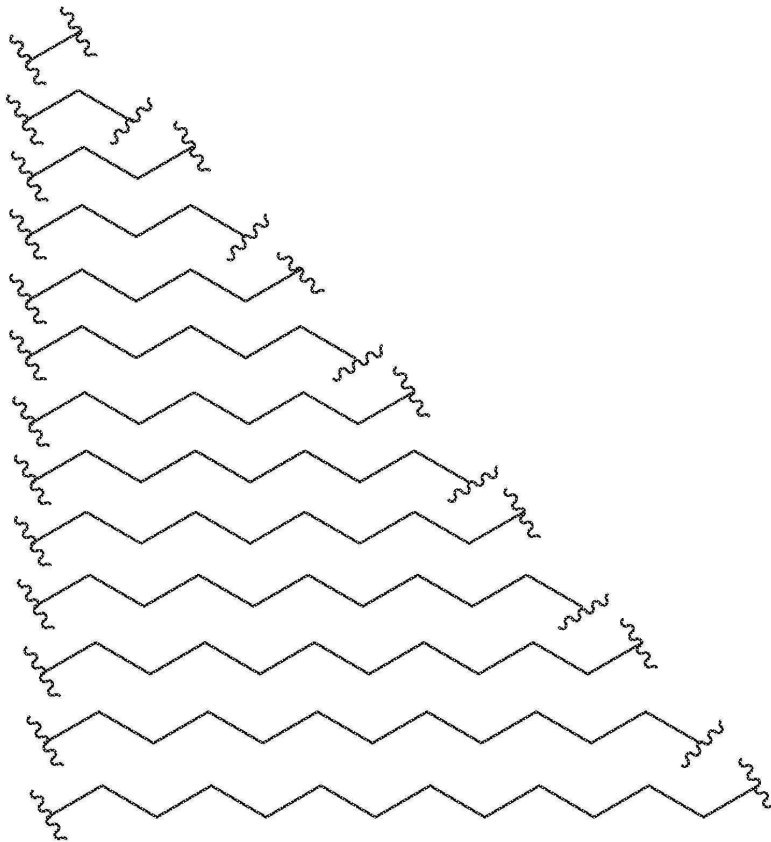


[0215]

[0216] 여기서 X, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, 및 R<sup>3</sup>은 본원에 정의된 바와 같고;

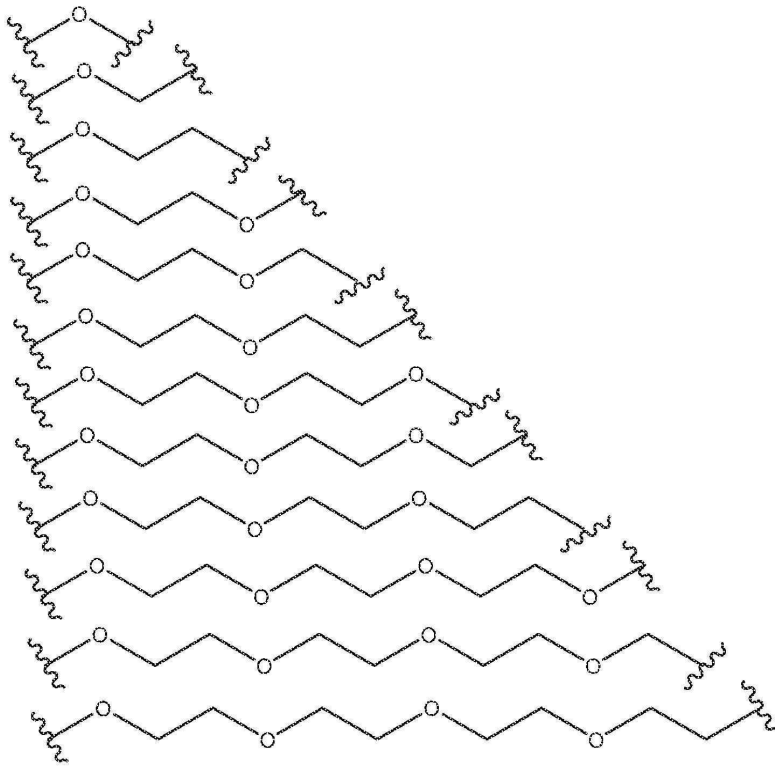
[0217] A'는 치환 또는 비치환된, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 지방족; 또는 치환 또는 비치환된, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이다.

[0218] 특정 실시양태에서, A'는 하기 화학식 중 하나를 갖는다:



[0219]

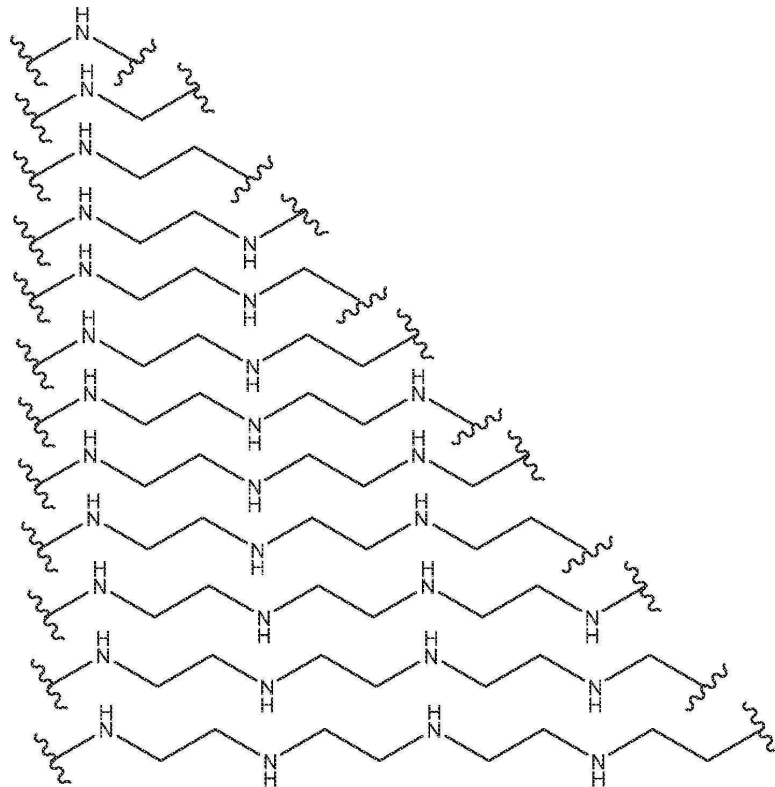
[0220] 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식 중 하나를 갖는다:



[0221]

[0222]

특정 실시양태에서, A는 하기 화학식 중 하나를 갖는다:



[0223]

[0224]

특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:



[0225]

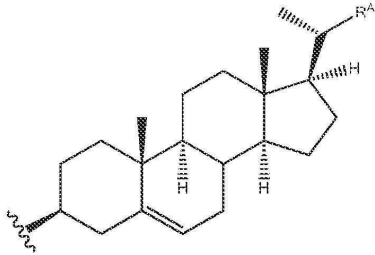
[0226] 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:



[0227]

[0228] 특정 실시양태에서,  $R^1$ 은 스테로이드이다. 특정 실시양태에서,  $R^1$ 은 콜레스테롤이다. 특정 실시양태에서,  $R^1$ 은 친지성 비타민이다. 특정 실시양태에서,  $R^1$ 은 비타민 A이다. 특정 실시양태에서,  $R^1$ 은 비타민 E이다.

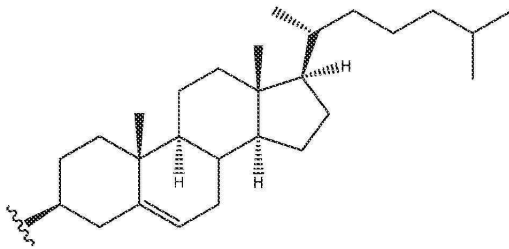
[0229] 특정 실시양태에서,  $R^1$ 은 하기 화학식을 갖고:



[0230]

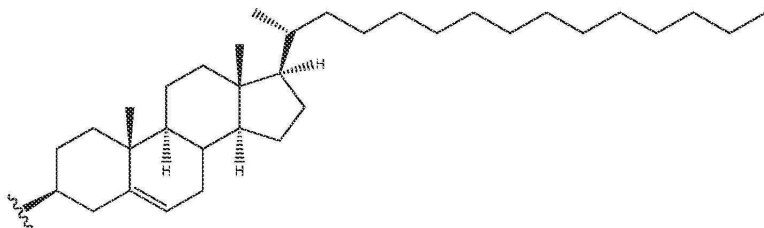
[0231] 여기서  $R^A$ 는 치환 또는 비치환된, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 지방족; 또는 치환 또는 비치환된, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이다.

[0232] 특정 실시양태에서,  $R^1$ 은 하기 화학식을 갖는다:



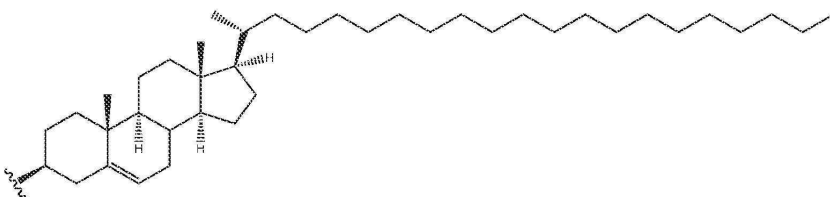
[0233]

[0234] 특정 실시양태에서,  $R^1$ 은 하기 화학식을 갖는다:



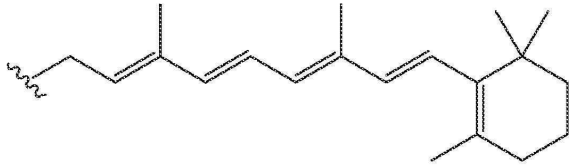
[0235]

[0236] 특정 실시양태에서,  $R^1$ 은 하기 화학식을 갖는다:



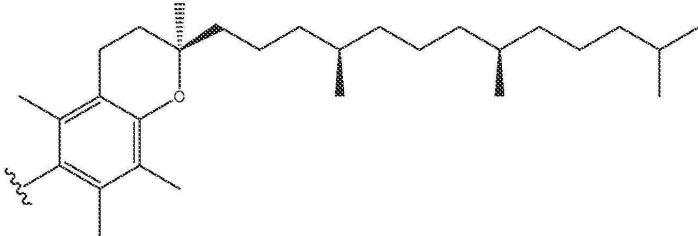
[0237]

[0238] 특정 실시양태에서,  $R^1$ 은 하기 화학식을 갖는다:



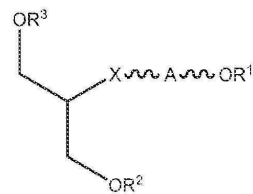
[0239]

[0240] 특정 실시양태에서, R<sup>1</sup>은 하기 화학식을 갖는다:



[0241]

[0242] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖고:



[0243]

[0244] 여기서

[0245] X는 N 또는 CH이고;

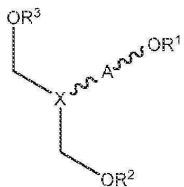
[0246] A는 결합; 치환 또는 비치환된, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 지방족; 또는 치환 또는 비치환된, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이고;

[0247] R<sup>1</sup>은 소수성 모이어티이고;

[0248] R<sup>2</sup>는 수소; 산소-보호기; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 지방족; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족; 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 아실; 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 아릴; 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 헤테로아릴이고;

[0249] R<sup>3</sup>은 핵산이다.

[0250] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖고:



[0251]

[0252] 여기서

[0253] X는 N 또는 CH이고;

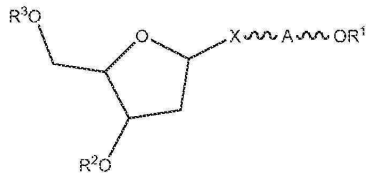
[0254] A는 결합; 치환 또는 비치환된, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 지방족; 또는 치환 또는 비치환된, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이고;

[0255]  $R^1$ 은 소수성 모이어티이고;

[0256]  $R^2$ 는 수소; 산소-보호기; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 지방족; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족; 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 아실; 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 아릴; 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 헤테로아릴이고;

[0257]  $R^3$ 은 핵산이다.

[0258] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖고:



[0259]

[0260] 여기서

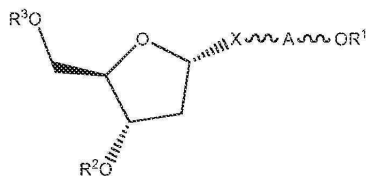
[0261] X는 N 또는 CH이고;

[0262] A는 결합; 치환 또는 비치환된, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 지방족; 또는 치환 또는 비치환된, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이고;

[0263]  $R^1$ 은 소수성 모이어티이고;

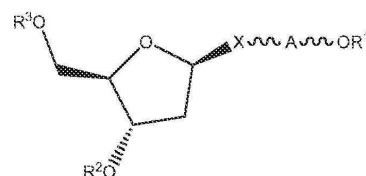
[0264]  $R^2$ 는 수소; 산소-보호기; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 지방족; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족; 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 아실; 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 아릴; 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 헤테로아릴이고;

[0265]  $R^3$ 은 핵산이다. 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



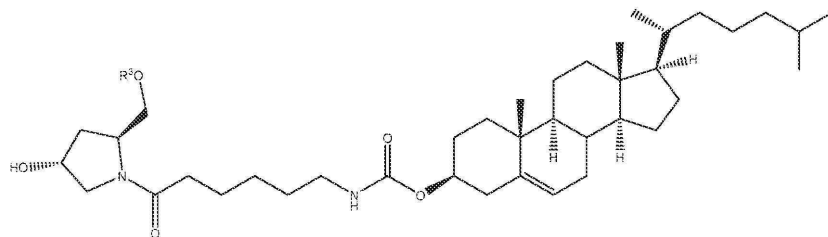
[0266]

[0267] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



[0268]

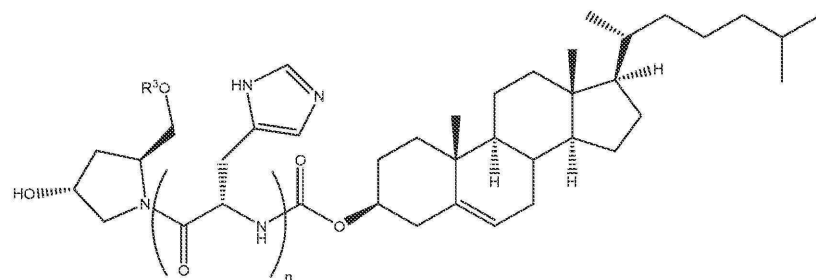
[0269] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖고:



[0270]

[0271] 여기서  $R^3$ 은 핵산이다.

[0272] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖고:

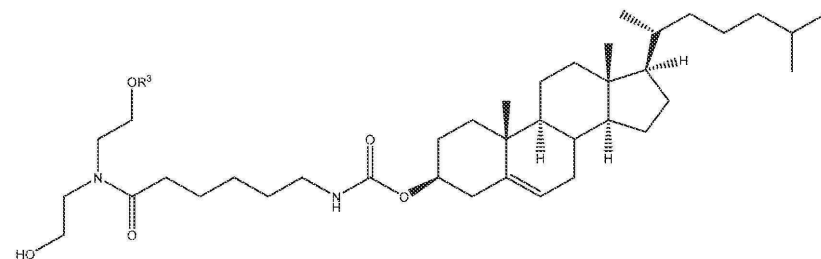


[0273]

[0274] 여기서  $R^3$ 은 핵산이고;

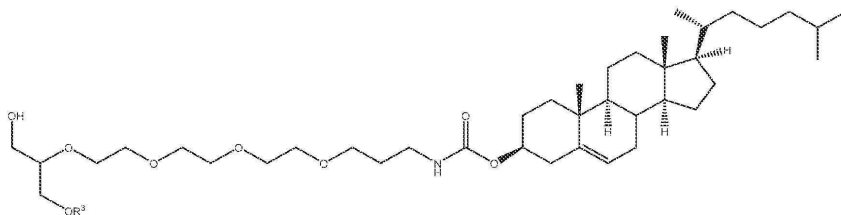
[0275]  $n$ 은 1 내지 20의 정수이다.

[0276] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



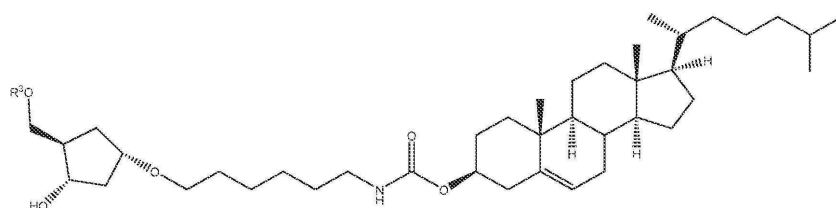
[0277]

[0278] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



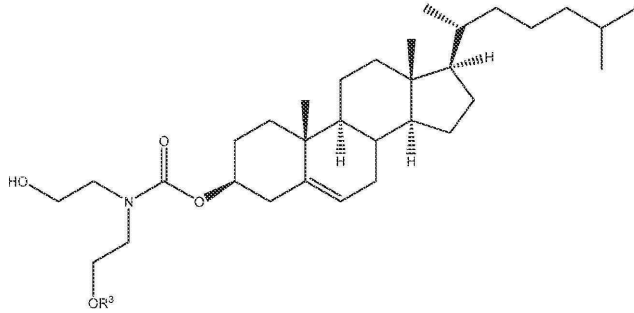
[0279]

[0280] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



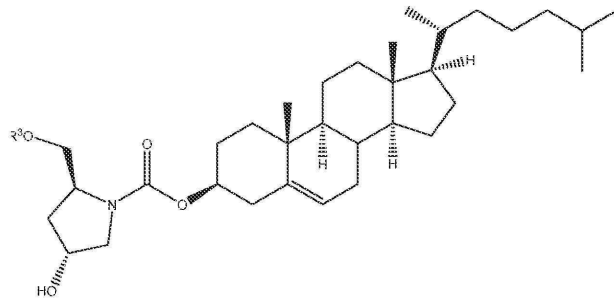
[0281]

[0282] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



[0283]

[0284] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



[0285]

[0286] 본원에 사용된 용어 "링커"는 뉴클레오단량체에 인접하여 공유 커플링된, 자연 발생의 비변형된 포스포디에스테르 모이어티 ( $-O-(PO^{2-})-O-$ )를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "치환기 연결"은 뉴클레오단량체에 인접하여 공유 커플링된, 천연 포스포디에스테르 기의 임의의 유사체 또는 유도체를 포함한다. 치환기 연결은 포스포디에스테르 유사체, 예를 들어 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 및 P-에티옥시포스포디에스테르, P-에톡시포스포디에스테르, P-알킬옥시포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, 및 인 무함유 연결, 예를 들어 아세탈 및 아마이드를 포함한다. 이러한 치환기 연결은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Bjergarde et al., 1991. Nucleic Acids Res. 19:5843; Caruthers et al., 1991. Nucleosides Nucleotides. 10:47]). 특정 실시양태에서, 비-가수분해성 연결, 예컨대 포스포로티오에이트 연결이 바람직하다.

[0287] 특정 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 소수성으로 변형된 뉴클레오티드 또는 "소수성 변형"을 포함한다. 본원에 사용된 "소수성 변형"은 (1) 염기의 전체 소수성이 유의하게 증가되고/거나 (2) 염기가 여전히 규칙적인 왓슨-크릭 상호작용에 가깝게 형성할 수 있도록 변형된 염기를 지칭한다. 염기 변형의 여러 비제한적 예는 5-위치 우리딘 및 시티딘 변형, 예컨대 페닐, 4-피리딜, 2-피리딜, 인돌릴, 및 이소부틸, 페닐 ( $C_6H_5OH$ ); 트립토판닐 ( $(C_8H_6N)CH_2CH(NH_2)CO$ ), 이소부틸, 부틸, 아미노벤질; 페닐; 및 나프틸을 포함한다.

[0288] 단부 (3' 또는 5' 단부), 루프 영역, 또는 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자의 임의의 다른 부분에 부착될 수 있는 다른 유형의 접합체는 스테롤, 스테롤 유형 분자, 펩티드, 소분자, 단백질 등을 포함한다. 일부 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자, 예컨대 sd-rxRNA (인타실™)는 1종 초과 접합체 (동일하거나 상이한 화학적 성질)를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합체는 콜레스테롤이다. 대안적으로, 일부 실시양태에서, 접합체는 GalNac이다.

[0289] 일부 실시양태에서, 가이드 가닥의 5' 단부에 관하여 제1 뉴클레오티드는 2'-O-메틸 변형을 갖고, 임의로 여기서 2'-O-메틸 변형은 5P-2'O-메틸 U 변형 또는 5' 비닐 포스포네이트 2'-O-메틸 U 변형이다. 표적 유전자 특이성을 증가시키거나 또는 오프-타겟 침묵 효과를 감소시키기 위한 또 다른 방법은 가이드 서열의 제2 5'-단부 뉴클레오티드에 상응하는 위치에 2'-변형 (예컨대 2'-O 메틸 변형)을 도입하는 것이다. 본 발명의 안티센스 (가이드) 서열은 RNA-유사 및 DNA-유사 영역을 포함하는 "키메라 올리고뉴클레오티드"일 수 있다.

[0290] 용어 "RNase H 활성화 영역"은 RNase H를 동원하여 올리고뉴클레오티드가 결합하는 표적 RNA 가닥을 절단할 수 있는 올리고뉴클레오티드, 예를 들어 키메라 올리고뉴클레오티드의 영역을 포함한다. 전형적으로, RNase 활성화 영역은 DNA 또는 DNA-유사 뉴클레오단량체의 최소 코어 (적어도 약 3-5개, 전형적으로 약 3-12개, 보다 전형적으로는 약 5-12개, 보다 바람직하게는 약 5-10개의 인접 뉴클레오단량체)를 함유한다. (예를 들어, 미국 특

허 번호 5,849,902 참조). 바람직하게는, RNase H 활성화 영역은 약 9개의 인접 데옥시리보스 함유 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0291] 용어 "비-활성화 영역"은 RNase H를 동원하거나 활성화시키지 않는 안티센스 서열, 예를 들어 키메라 올리고뉴클레오타이드의 영역을 포함한다. 바람직하게는, 비-활성화 영역은 포스포로티오에이트 DNA를 포함하지 않는다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 비-활성화 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 비-활성화 영역은 뉴클레아제에 대해 안정화될 수 있거나, 또는 표적에 상보적이고 올리고뉴클레오타이드에 의해 결합될 표적 핵산 분자와 수소 결합을 형성함으로써 표적에 대한 특이성을 제공할 수 있다.

[0292] 한 실시양태에서, 인접 폴리뉴클레오타이드의 적어도 한 부분은 치환기 연결, 예를 들어 포스포로티오에이트 연결에 의해 연결된다.

[0293] 특정 실시양태에서, 가이드 서열 (2'-변형되거나 변형되지 않음)을 넘어 대부분의 또는 모든 뉴클레오타이드가 포스포로티오에이트 연결에 의해 연결된다. 이러한 구조물은 혈청 단백질에 대한 그의 보다 높은 친화도로 인해 개선된 약동학을 갖는 경향이 있다. 폴리뉴클레오타이드의 비-가이드 서열 부분에서의 포스포로티오에이트 연결은 일반적으로, 일단 가이드 가닥이 RISC로 로딩되면 가이드 가닥 활성을 방해하지 않는다. 일부 실시양태에서, 높은 수준의 포스포로티오에이트 변형은 개선된 전달로 이어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 가이드 및/또는 패시저 가닥은 완전히 포스포로티오에이트화된다.

[0294] 본 발명의 안티센스 (가이드) 서열은 "모르폴리노 올리고뉴클레오타이드"를 포함할 수 있다. 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 비-이온성이고, RNase H-비의존성 메카니즘에 의해 기능한다. 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드의 4가지 유전자 염기 (아데닌, 시토신, 구아닌 및 티민/우라실) 각각은 6-원 모르폴린 고리에 연결된다. 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어 비-이온성 포스포로디아미테이트 서브유닛간 연결에 의해 4종의 상이한 서브유닛 유형을 연결하는 것에 의해 생성된다. 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레아제에 대한 완전한 저항성 (Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1996. 6:267); 예측가능한 표적화 (Biochemica Biophysica Acta. 1999. 1489:141); 세포에서의 신뢰가능한 활성 (Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:63); 탁월한 서열 특이성 (Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:151); 최소의 비-안티센스 활성 (Biochemica Biophysica Acta. 1999. 1489:141); 간단한 삼투 또는 스크레이프 전달 (Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:291)을 포함한 많은 이점을 갖는다. 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 고용량에서의 그의 비-독성으로 인해 또한 바람직하다. 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드의 제조에 대한 논의는 문헌 [Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:187]에서 찾아볼 수 있다.

[0295] 본원에 기재된 화학적 변형은 RISC로의 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 로딩을 촉진하는 것으로 여겨진다. 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드는 RISC로의 로딩 및 유전자 침묵의 유도에서 활성인 것으로 밝혀졌다. 그러나, 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드의 경우에 활성의 수준은 듀플렉스 폴리뉴클레오타이드와 비교하여 2 내지 4 자릿수 더 낮은 것으로 보인다.

[0296] 본 발명은, (a) 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드의 안정성을 유의하게 증가시키고, (b) RISC 복합체로의 폴리뉴클레오타이드의 효율적인 로딩을 촉진하고, (c) 세포에 의한 단일 가닥 뉴클레오타이드의 흡수를 개선시킬 수 있는 화학적 변형 패턴에 대한 기재를 제공한다. 화학적 변형 패턴은 리보스, 백본, 소수성 뉴클레오시드 및 접합체 유형의 변형의 조합을 포함할 수 있다. 또한, 일부 실시양태에서, 단일 폴리뉴클레오타이드의 5' 단부는 화학적으로 인산화될 수 있다.

[0297] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 RISC 억제 폴리뉴클레오타이드의 기능을 개선시키는 화학적 변형 패턴에 대한 기재를 제공한다. 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드는 사전로딩된 RISC 복합체의 활성을 기질 경쟁 메카니즘을 통해 억제하는 것으로 밝혀졌다. 통상적으로 안타고미르로 불리는 이들 유형의 분자의 경우, 활성은 통상적으로 고농도를 필요로 하고, 생체내 전달은 매우 효과적이지 않다. 본 발명은 (a) 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드의 안정성을 유의하게 증가시키고/거나, (b) RISC에 의해 폴리뉴클레오타이드를 기질로서 효율적으로 인식하는 것을 촉진하고/거나, (c) 세포에 의한 단일 가닥 뉴클레오타이드의 흡수를 개선시킬 수 있는 화학적 변형 패턴에 대한 기재를 제공한다. 화학적 변형 패턴은 리보스, 백본, 소수성 뉴클레오시드 및 접합체 유형의 변형의 조합을 포함할 수 있다.

[0298] 본 발명에 의해 제공된 변형은 모든 폴리뉴클레오타이드에 적용가능하다. 이는 단일 가닥 RISC 진입 폴리뉴클레오타이드, 단일 가닥 RISC 억제 폴리뉴클레오타이드, 가변 길이 (15-40 bp)의 통상적인 듀플렉스 폴리뉴클레오타이드, 비대칭 듀플렉스 폴리뉴클레오타이드 등을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 5' 단부, 리보스, 백본 및 소수성 뉴클

레오시드 변형을 포함한 매우 다양한 화학적 변형 패턴으로 변형될 수 있다.

[0299]

합성

[0300]

본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들어 효소적 합성 및/또는 화학적 합성을 사용하여 합성될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 시험관내 (예를 들어, 효소적 합성 및 화학적 합성을 사용하여) 또는 생체내 (관련 기술분야에 널리 공지되어 있는 재조합 DNA 기술을 사용하여) 합성될 수 있다.

[0301]

일부 실시양태에서, 화학적 합성이 변형된 폴리뉴클레오타이드에 사용된다. 선형 올리고뉴클레오타이드의 화학적 합성은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 용액 또는 고체 상 기술에 의해 달성될 수 있다. 바람직하게는, 합성은 고체 상 방법에 의한다. 올리고뉴클레오타이드는 포스포르아미다이트, 포스포이트 트리에스테르, H-포스포네이트 및 포스포트리에스테르 방법을 포함한 여러 상이한 합성 절차 중 임의의 것에 의해, 전형적으로 자동화된 합성 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0302]

올리고뉴클레오타이드 합성 프로토콜은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 미국 특허 번호 5,830,653; WO 98/13526; 문헌 [Stec et al., 1984. J. Am. Chem. Soc. 106:6077; Stec et al., 1985. J. Org. Chem. 50:3908; Stec et al., J. Chromatog. 1985. 326:263; LaPlanche et al., 1986. Nucl. Acid. Res. 1986. 14:9081; Fasman G. D., 1989. Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 1989. CRC Press, Boca Raton, Fla.; Lamone. 1993. Biochem. Soc. Trans. 21:1]; 미국 특허 번호 5,013,830; 미국 특허 번호 5,214,135; 미국 특허 번호 5,525,719; 문헌 [Kawasaki et al., 1993. J. Med. Chem. 36:831]; WO 92/03568; 미국 특허 번호 5,276,019; 및 미국 특허 번호 5,264,423에서 찾아볼 수 있다.

[0303]

선택되는 합성 방법은 목적하는 올리고뉴클레오타이드의 길이에 좌우될 수 있고, 이러한 선택은 통상의 기술자의 기술 내에서 이루어진다. 예를 들어, 포스포르아미다이트 및 포스포이트 트리에스테르 방법은 175개 이상의 뉴클레오타이드를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 생성할 수 있는 한편, H-포스포네이트 방법은 100개 미만의 뉴클레오타이드의 올리고뉴클레오타이드에 대해 잘 작용한다. 변형된 염기가 올리고뉴클레오타이드 내로 혼입되는 경우에, 특히 변형된 포스포디에스테르 연결이 사용되는 경우에, 합성 절차는 필요한 경우에 공지된 절차에 따라 변경된다. 이와 관련하여, 문헌 [Uhlmann et al., (1990, Chemical Reviews 90:543-584)]은 변형된 염기 및 변형된 포스포디에스테르 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 제조에 대한 참조를 제공하며, 이에 대한 절차를 요약한다. 올리고뉴클레오타이드를 제조하는 다른 예시적인 방법은 문헌 [Sonveaux. 1994. "Protecting Groups in Oligonucleotide Synthesis"; Agrawal. Methods in Molecular Biology 26:1]에 교시되어 있다. 예시적인 합성 방법은 또한 문헌 ["Oligonucleotide Synthesis - A Practical Approach" (Gait, M. J. IRL Press at Oxford University Press. 1984)]에 교시되어 있다. 또한, 변형된 뉴클레오타이드를 갖는 일부 서열을 포함하여, 규정된 서열의 선형 올리고뉴클레오타이드는 여러 상업적 공급원으로부터 용이하게 입수가 가능하다.

[0304]

올리고뉴클레오타이드는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 또는 겔 크로마토그래피 및 고압 액체 크로마토그래피를 포함한 다수의 크로마토그래피 방법 중 임의의 것에 의해 정제될 수 있다. 뉴클레오타이드 서열, 특히 비변형된 뉴클레오타이드 서열을 확인하기 위해, 올리고뉴클레오타이드는 막삼(Maxam) 및 길버트(Gilbert) 서열분석, 생어(Sanger) 서열분석, 모세관 전기영동 서열분석, 이동 스팟 서열분석 절차를 포함하는 공지된 절차 중 임의의 것에 의해, 또는 하이본드(Hybond) 종이에 결합된 올리고뉴클레오타이드의 선택적 화학적 분해를 사용하는 것에 의하는 DNA 서열분석에 적용될 수 있다. 또한, 짧은 올리고뉴클레오타이드의 서열은 레이저 탈착 질량 분광분석법에 의해 또는 고속 원자 충격에 의해 분석될 수 있다 (McNeal, et al., 1982, J. Am. Chem. Soc. 104:976; Viari, et al., 1987, Biomed. Environ. Mass Spectrom. 14:83; Grotjahn et al., 1982, Nuc. Acid Res. 10:4671). 서열분석 방법은 또한 RNA 올리고뉴클레오타이드에 대해서도 이용가능하다.

[0305]

합성된 올리고뉴클레오타이드의 품질은, 예를 들어 문헌 [Bergot and Egan. 1992. J. Chrom. 599:35]의 방법을 사용하여 모세관 전기영동 및 변성 강음이온 HPLC (SAX-HPLC)에 의해 올리고뉴클레오타이드를 시험함으로써 검증될 수 있다.

[0306]

다른 예시적인 합성 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Second Edition (1989); DNA Cloning, Volumes I and II (DN Glover Ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M J Gait Ed, 1984; Nucleic Acid Hybridisation (B D Hames and S J Higgins eds. 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); 또는 연속 간행물, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.)] 참조).

- [0307] 특정 실시양태에서, 대상 RNAi 구축물 또는 적어도 그의 부분은 대상 구축물을 코딩하는 발현 벡터로부터 전사된다. 임의의 관련 기술분야에서 인식되는 벡터가 이러한 목적을 위해 사용될 수 있다. 전사된 RNAi 구축물은 목적하는 변형 (예컨대 비변형된 센스 가닥을 변형된 것으로 대체하는 것 등)이 수행되기 전에, 단리 및 정제될 수 있다.
- [0308] 전달/운반
- [0309] 어떠한 특정한 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, 본 발명자들은 본원에 기재된 이중 가닥 핵산 분자 (예를 들어, 인타실™)의 패신저 가닥 및 가이드 가닥 상의 특정한 변형 패턴이 가이드 가닥의 핵 내로의 진입을 용이하게 하며, 여기서 가이드 가닥은 유전자 침묵 (예를 들어, 표적 유전자, 예컨대 TIGIT의 침묵)을 매개한다고 믿는다.
- [0310] 어떠한 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, 여러 잠재적 작용 메카니즘이 이러한 활성을 설명할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 핵산 분자 (예를 들어, 인타실™)의 가이드 가닥 (예를 들어, 안티센스 가닥)은 패신저 가닥으로부터 해리되고, 단일 가닥으로서 핵 내로 진입할 수 있다. 일단 핵 내에 있으면, 단일 가닥 가이드 가닥은 RNase H 또는 또 다른 리보뉴클레아제와 회합하여 표적 (예를 들어, TIGIT)을 절단할 수 있다 ("안티센스 작용 메카니즘"). 일부 실시양태에서, 핵산 분자 (예를 들어, 인타실™)의 가이드 가닥 (예를 들어, 안티센스 가닥)은 세포질에서 또는 핵 외부에서 아르고노트 (Ago) 단백질과 회합하여 로딩된 Ago 복합체를 형성할 수 있다. 이러한 로딩된 Ago 복합체는 핵 내로 전위된 다음, 표적 (예를 들어, TIGIT)을 절단할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자 (예를 들어, 인타실™)의 둘 다의 가닥 (예를 들어, 듀플렉스)이 핵에 진입할 수 있고, 가이드 가닥은 RNase H, Ago 단백질 또는 또 다른 리보뉴클레아제와 회합하여 표적 (예를 들어, TIGIT)을 절단할 수 있다.
- [0311] 통상의 기술자는 본원에 기재된 이중 가닥 분자의 센스 가닥 (예를 들어, 인타실™ 센스 가닥)이 본원에 기재된 이중 가닥 핵산 분자의 가이드 가닥의 전달로 제한되지 않는다는 것을 인지한다. 오히려, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 패신저 가닥은 특정 분자 (예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, ASO)를 세포의 핵에 표적화할 목적으로 상기 다른 분자에 연결 (예를 들어, 공유 결합, 비-공유 결합, 접합, 상보성 영역을 통해 혼성화 등)된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 센스 가닥에 연결된 분자는 합성 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 연결된 센스 가닥은 8-15개의 뉴클레오타이드 길이이고, 화학적으로 변형되고, 소수성 접합체를 포함한다.
- [0312] 어떠한 특정한 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, ASO는 수소 결합에 의해 상보적 패신저 가닥에 연결될 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용은 단리된 핵산 분자를 세포에 투여하는 것을 포함하는, 핵산 분자를 세포에 전달하는 방법을 제공하며, 여기서 단리된 핵산은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)에 상보적인 센스 가닥을 포함하고, 여기서 센스 가닥은 8-15개의 뉴클레오타이드 길이이고, 적어도 2개의 포스포로티오에이트 변형을 포함하고, 센스 가닥 내의 피리미딘 중 적어도 50%는 변형되고, 여기서 분자는 소수성 접합체를 포함한다.
- [0313] 세포에 의한 올리고뉴클레오타이드의 흡수
- [0314] 올리고뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드 조성물은 1종 이상의 세포 또는 세포 용해물과 접촉되고 (즉, 그와 접촉하게 됨, 또한 본원에서 그에 투여 또는 전달되는 것으로도 지칭됨), 그에 의해 흡수된다. 용어 "세포"는 원핵 및 진핵 세포, 바람직하게는 척추동물 세포, 보다 바람직하게는 포유동물 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 조성물은 박테리아 세포와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 조성물은 진핵 세포 (예를 들어, 식물 세포, 포유동물 세포, 절지동물 세포, 예컨대 곤충 세포)와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 조성물은 줄기 세포와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 조성물은 간 세포, 예컨대 간세포와 접촉되고, 수용체 매개된 흡수를 통해 흡수된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 조성물은 인간 세포 (예를 들어, 호중구, T 세포, B 세포, 단핵구/대식세포, 및 그의 조합) 또는 인간 세포주 (예를 들어, T 세포주, 예컨대 Jurkat 세포)와 접촉된다.
- [0315] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 조성물은 시험관내, 예를 들어 시험 튜브 또는 배양 접시 내에서, (그리고 대상체 내로 도입될 수 있거나 또는 도입되지 않을 수 있음) 또는 생체내, 예를 들어 포유동물 대상체와 같은 대상체 내에서, 또는 생체외에서 세포와 접촉될 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 국소적으로 또는 전기천공을 통해 투여된다. 올리고뉴클레오타이드는 세포내이입에 의해 느린 속도로 세포에 의해 흡수되지만,

세포내이입된 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 격리되며, 예를 들어 표적 핵산 분자에 대한 혼성화에 이용가능하지 않다. 한 실시양태에서, 세포 흡수는 전기천공 또는 인산칼슘 침전에 의해 용이해질 수 있다. 그러나, 이들 절차는 시험관내 또는 생체의 실시양태의 경우에만 유용하고, 편리하지 않으며, 일부 경우에 세포 독성과 연관된다.

[0316] 또 다른 실시양태에서, 세포 내로의 올리고뉴클레오타이드의 전달은 인산칼슘, DMSO, 글리세롤 또는 텍스트란, 전기천공을 포함한 관련 기술분야에서 인식되는 적합한 방법에 의해, 또는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용한, 예를 들어 양이온성, 음이온성 또는 중성 지질 조성물 또는 리포솜을 사용한 형질감염에 의해 증진될 수 있다 (예를 들어, WO 90/14074; WO 91/16024; WO 91/17424; 미국 특허 번호 4,897,355; 문헌 [Bergan et al., 1993. Nucleic Acids Research. 21:3567] 참조). 올리고뉴클레오타이드의 증진된 전달은 또한 벡터 (예를 들어, 문헌 [Shi, Y. 2003. Trends Genet 2003 Jan. 19:9; Reichhart J M et al., Genesis. 2002. 34(1-2):1604, Yu et al., 2002. Proc. Natl. Acad Sci. USA 99:6047; Sui et al., 2002. Proc. Natl. Acad Sci. USA 99:5515] 참조) 바이러스, 폴리아민, 또는 폴리리신, 프로타민 또는 Ni, N12-비스 (에틸) 스페르민과 같은 화합물을 사용한 다가양이온 집합체 (예를 들어, 문헌 [Bartzatt, R. et al.1989. Biotechnol. Appl. Biochem. 11:133; Wagner E. et al., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. 88:4255] 참조)의 사용에 의해 매개될 수 있다.

[0317] 올리고뉴클레오타이드의 흡수에 사용되는 프로토콜은 다수의 인자에 좌우될 것이며, 가장 중요한 것은 사용되는 세포의 유형이다. 흡수에 중요한 다른 인자는 올리고뉴클레오타이드의 성질 및 농도, 세포의 전면생장률, 세포 배양의 유형 (예를 들어, 현탁 배양 또는 플레이트링) 및 세포가 성장하는 배지의 유형을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0318] 면역원성 조성물 및 그의 생산 방법

[0319] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 면역원성 조성물을 생산하는 데 유용하다. 본원에 사용된 "면역원성 조성물"은 본원에 기재된 바와 같은 화학적으로 변형된 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포, 및 임의로 1종 이상의 제약상 허용되는 부형제 또는 담체를 포함하는 조성물이다. 어떠한 특정한 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 본 개시내용에 의해 기재된 바와 같은 면역원성 조성물은 1종 이상의 면역 체크포인트 단백질 (예를 들어, TIGIT)의 감소된 (예를 들어, 억제된) 발현 또는 활성을 특징으로 하고, 따라서 일부 실시양태에서 대상체의 면역 반응을 자극하는 데 유용하다.

[0320] 본원에 사용된 "숙주 세포"는 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자가 도입된 세포이다. 전형적으로, 숙주 세포는 포유동물 세포, 예를 들어 인간 세포, 마우스 세포, 래트 세포, 돼지 세포 등이다. 그러나, 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 비-포유동물 세포, 예를 들어 원핵 세포 (예를 들어, 박테리아 세포), 효모 세포, 곤충 세포 등이다. 일반적으로, 숙주 세포는 공여자, 예컨대 건강한 공여자로부터 유래된다 (예를 들어, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산이 도입되는 세포는 공여자, 예컨대 건강한 공여자로부터 채취됨). 예를 들어, 세포 또는 세포들은 공여자, 예컨대 건강한 공여자, 예컨대 골수 또는 혈액으로부터 수득된 생물학적 샘플로부터 분리될 수 있다. 본원에 사용된 "건강한 공여자"는 증식성 장애 또는 감염성 질환 (예를 들어, 박테리아, 바이러스 또는 기생충 감염)을 갖지 않거나 또는 갖는 것으로 의심되지 않는 대상체를 지칭한다. 그러나, 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 예를 들어 자가 세포 요법과 관련하여 증식성 질환 또는 감염성 질환을 갖는 (또는 갖는 것으로 의심되는) 대상체로부터 유래된다.

[0321] 일부 실시양태에서, 세포 (예를 들어, 숙주 세포)는 면역 세포, 예를 들어 T-세포, B-세포, 수지상 세포 (DC), 과립구, 대식세포 등이다. 일부 실시양태에서, 세포 (예를 들어, 숙주 세포)는 면역 세포, 예컨대 줄기 세포 (SC) 또는 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)로 분화할 수 있는 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포 (예를 들어, 숙주 세포)는, 예를 들어 문헌 [Gattinoni et al., (2017) Nature Medicine 23; 18-27]에 기재되고 그로부터 참조로 포함되는 바와 같은 줄기 세포 기억 T-세포이다.

[0322] 일부 실시양태에서, 세포 (예를 들어, 숙주 세포)는 T-세포, 예컨대 킬러 T-세포, 헬퍼 T-세포 또는 조절 T-세포이다. 일부 실시양태에서 T-세포는 킬러 T-세포 (예를 들어, CD8+ T-세포)이다. 일부 실시양태에서, T-세포는 헬퍼 T-세포 (예를 들어, CD4+ T-세포)이다. 일부 실시양태에서, T-세포는 활성화된 T-세포 (예를 들어, 항원 제시 세포 상의 MHC 부류 II 분자에 의해 펩티드 항원이 제시된 T-세포)이다.

[0323] 일부 실시양태에서, T-세포는 고친화도 T-세포 수용체 (TCR) 및/또는 키메라 항체 수용체 (CAR)를 발현하는 1개 이상의 트랜스젠을 포함한다.

[0324] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 세포 (예를

들어, 공여자로부터 수득된 면역 세포)에 도입하여 숙주 세포를 생산하는 것이 숙주 세포에서 면역 체크포인트 단백질 (예를 들어, TIGIT) 발현 또는 활성의 유의한 감소를 발생시킨다는 발견에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하지 않는 세포 (예를 들어, 동일한 세포 유형의 면역 세포)에 비해 면역 체크포인트 단백질의 약 5% 내지 약 50% 감소된 발현을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하지 않는 세포 (예를 들어, 동일한 세포 유형의 면역 세포) (예를 들어, 증식성 질환 또는 감염성 질환을 갖거나 또는 갖는 것으로 의심되는 대상체의 면역 세포)에 비해 면역 체크포인트 단백질의 50% 초과 (예를 들어, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 100%, 또는 51% 내지 100%의 약 임의의 백분율)의 감소된 발현을 특징으로 한다.

[0325] 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 의해 기재된 바와 같은 면역원성 조성물은 복수의 숙주 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 숙주 세포는 약 10,000개의 숙주 세포 (예를 들어, 10,000개의 숙주 세포/대상체 kg), 약 50,000개의 숙주 세포 (예를 들어, 50,000개의 숙주 세포/대상체 kg), 약 100,000개의 숙주 세포 (예를 들어, 100,000개의 숙주 세포/대상체 kg), 약 250,000개의 숙주 세포 (예를 들어, 250,000개의 숙주 세포/대상체 kg), 약 500,000개의 숙주 세포 (예를 들어, 500,000개의 숙주 세포/대상체 kg), 약  $1 \times 10^6$  개의 숙주 세포 (예를 들어,  $1 \times 10^6$  개의 숙주 세포/대상체 kg), 약  $5 \times 10^6$  개의 숙주 세포 (예를 들어,  $5 \times 10^6$  개의 숙주 세포/대상체 kg), 약  $1 \times 10^7$  개의 숙주 세포 (예를 들어,  $1 \times 10^7$  개의 숙주 세포/대상체 kg), 약  $1 \times 10^8$  개의 숙주 세포 (예를 들어,  $1 \times 10^8$  개의 숙주 세포/대상체 kg), 약  $1 \times 10^9$  개의 숙주 세포 (예를 들어,  $1 \times 10^9$  개의 숙주 세포/대상체 kg), 또는  $1 \times 10^9$  개 초과인 숙주 세포 (예를 들어,  $1 \times 10^9$  개 초과인 숙주 세포/대상체 kg)이다. 일부 실시양태에서, 복수의 숙주 세포는 약  $1 \times 10^5$  내지  $1 \times 10^{14}$  개의 숙주 세포 (예를 들어,  $1 \times 10^5$  내지  $1 \times 10^{14}$  개의 숙주 세포/kg 대상체)이다.

[0326] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용에 의해 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 생산하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포 내로 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 도입하는 것을 포함하고, 여기서 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자는 TIGIT를 표적화하는 것이며, 이에 의해 숙주 세포를 생산한다.

[0327] 면역원성 조성물을 생산하는 (예를 들어, 숙주 세포를 생산하는) 방법은 시험관내, 생체외, 또는 생체내, 예를 들어 배양물 내의 포유동물 세포, 예컨대 배양물 내의 인간 세포에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 세포 (예를 들어, 공여자로부터 수득된 세포)를 전달 시약, 예컨대 지질 (예를 들어, 양이온성 지질) 또는 리포솜의 존재 하에 접촉시켜, 본 개시내용의 다른 곳에 추가로 상세하게 기재된 바와 같이, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자의 세포 내로의 진입을 용이하게 할 수 있다.

[0328] 일부 실시양태에서, 면역원성 조성물을 생산하는 (예를 들어, 숙주 세포를 생산하는) 방법은 숙주 세포 (예를 들어, 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하는 세포)를 워시아웃 기간에 적용하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 사용된 "워시아웃 기간"은 숙주 세포가 워시아웃 배지 (1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하지 않는 배지) 중에 현탁된 동안의 시간을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 워시아웃 기간은 24시간 - 6일 (예를 들어, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간, 84시간, 96시간, 108시간, 120시간, 136시간 또는 144시간)이다. 일부 실시양태에서, 워시아웃 기간은 24시간이다. 일부 실시양태에서, 워시아웃 기간은 48시간이다. 일부 실시양태에서, 워시아웃 기간은 96시간이다. 일부 실시양태에서, 워시아웃 기간은 6일이다.

[0329] 일부 실시양태에서, 면역원성 조성물을 생산하는 (예를 들어, 숙주 세포를 생산하는) 방법은 숙주 세포 (예를 들어, 1개 이상의 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하는 세포)를 워시아웃 기간에 적용하는 것을 포함하지 않는다.

[0330] 담체 및 착화제

[0331] 본 개시내용은 추가로 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 구축물 및 제약상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 RNAi 구축물 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다.

[0332] 본원에 사용된 "제약상 허용되는 담체"는 적절한 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제

및 흡수 지연제 등을 포함한다. 제약 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 활성 성분과 비상용성인 임의의 통상적인 매질 또는 작용제를 제외하고, 이를 치료 조성물에서 사용할 수 있다. 보충 활성 성분이 또한 조성물 내로 혼입될 수 있다.

[0333] 예를 들어, 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 비경구 투여를 위해 리포솜, 또는 폴리에틸렌 글리콜로 변형되거나 양이온성 지질과 혼합된 리포솜 내로 혼입될 수 있다. 리포솜 내로의 추가의 물질, 예를 들어 특이적 표적 세포 상에서 발견되는 막 단백질에 대해 반응성인 항체의 혼입은 올리고뉴클레오타이드를 특이적 세포 유형 (예를 들어, 면역 세포, 예컨대 NK-세포)에 대해 표적화하는 것을 도울 수 있다.

[0334] 캡슐화제는 소포 내의 올리고뉴클레오타이드를 포획한다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 담체 또는 비히클, 예를 들어 리포솜 또는 미셀과 회합될 수 있지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 인지되는 바와 같이 다른 담체가 사용될 수 있다. 리포솜은 생물학적 막과 유사한 구조를 갖는 지질 이중층으로 이루어진 소포이다. 이러한 담체는 올리고뉴클레오타이드의 세포 흡수 또는 표적화를 용이하게 하거나, 올리고뉴클레오타이드의 약동학적 또는 독성학적 특성을 개선시키는 데 사용된다.

[0335] 또한, 예를 들어 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는, 활성 성분이 함유된 제약 조성물이 지질 층에 부착된 수성 중심 층으로 이루어진 소체에 분산되거나 다양하게 존재하는, 리포솜 내에 캡슐화되어 투여될 수 있다. 용해도에 따라, 올리고뉴클레오타이드는 수성 층 및 지질 층 둘 다에, 또는 일반적으로 리포솜 현탁액으로 불리는 것에 존재할 수 있다. 소수성 층은, 일반적으로 그러나 비배타적으로, 인지질, 예컨대 레시틴 및 스펅고미엘린, 스테로이드, 예컨대 콜레스테롤, 어느 정도의 이온성 계면활성제, 예컨대 디아세틸포스페이트, 스테아릴아민 또는 포스파티드산, 또는 소수성 성질의 다른 물질을 포함한다. 리포솜의 직경은 일반적으로 약 15 nm 내지 약 5 마이크로미터의 범위이다.

[0336] 약물 전달 비히클로서 리포솜을 사용하는 것은 여러 이점을 제공한다. 리포솜은 세포내 안정성을 증가시키고, 흡수 효율을 증가시키고, 생물학적 활성을 개선시킨다. 리포솜은 세포 막을 구성하는 지질과 유사한 방식으로 배열된 지질로 이루어진 중공 구형 소포이다. 이들은 수용성 화합물을 포획하기 위한 내부 수성 공간을 갖고, 0.05 내지 수 마이크로미터 직경 크기의 범위를 갖는다. 여러 연구는, 리포솜이 핵산을 세포로 전달할 수 있고 핵산은 생물학적으로 활성인 상태로 유지된다는 것을 제시하였다. 예를 들어, 원래 연구 도구로서 설계된 지질 전달 비히클, 예컨대 리포펙틴(Lipofectin) 또는 리포펙타민(LIPOFECTAMINE)<sup>TM</sup> 2000은 무손상 핵산 분자를 세포에 전달할 수 있다.

[0337] 리포솜을 사용하는 특정 이점은, 하기의: 이것이 비-독성이며 조성물 내에서 생분해성이고; 긴 순환 반감기를 나타내고; 인식 분자가 조직으로의 표적화를 위해 그의 표면에 용이하게 부착될 수 있다는 것을 포함한다. 마지막으로, 리포솜-기반 제약을 액체 현탁액 또는 동결건조된 생성물로 비용-효과적으로 제조하는 것은, 허용 가능한 약물 전달 시스템으로서의 본 기술의 실현가능성을 입증하였다.

[0338] 일부 측면에서, 본 발명과 연관된 제제는, 자연 발생 또는 화학적 합성 또는 변형된 포화 및 불포화 지방산 잔기 부류에 대해 선택될 수 있다. 지방산은 트리글리세리드, 디글리세리드 또는 개별 지방산의 형태로 존재할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 비경구 영양을 위한 약리학에서 현재 사용되는 지방산 및/또는 지방 에멀전의 널리 검증된 혼합물의 사용을 활용할 수 있다.

[0339] 리포솜 기반 제제는 올리고뉴클레오타이드 전달을 위해 광범위하게 사용된다. 그러나, 대부분의 상업적으로 입수 가능한 지질 또는 리포솜 제제는 적어도 1종의 양으로 하전된 지질 (예를 들어, 양이온성 지질)을 함유한다. 이러한 양으로 하전된 지질의 존재는, 높은 정도의 올리고뉴클레오타이드 로딩을 수득하고 리포솜 융합생성 특성을 증진시키기 위해 필수적인 것으로 여겨진다. 기능적인 양으로 하전된 지질 화학을 확인하기 위해 여러 방법이 수행되고 공개되었다. 그러나, 양이온성 지질을 함유하는 상업적으로 입수 가능한 리포솜 제제는 높은 수준의 독성을 특징으로 한다. 생체내 제한된 치료 지수는 양으로 하전된 지질을 함유하는 리포솜 제제가 RNA 침묵을 달성하는 데 요구되는 농도보다 단지 약간 더 높은 농도에서 독성 (예를 들어, 간 효소의 상승)과 연관된다는 것을 밝혀내었다.

[0340] 본 발명과 연관된 핵산은 소수성으로 변형될 수 있고, 이는 중성 나노수송체 내에 포괄될 수 있다. 중성 나노수송체에 대한 추가의 설명은 2009년 9월 22일에 출원된 발명의 명칭 "Neutral Nanotransporters"의 PCT 출원 PCT/US2009/005251로부터 참조로 포함된다. 이러한 입자는 비-하전된 지질 혼합물 내로의 정량적 올리고뉴클레오타이드 혼입을 가능하게 한다. 이러한 중성 나노수송체 조성물에서 양이온성 지질의 독성 수준의 결여는 중요한 특색이다.

- [0341] PCT/US2009/005251에서 입증된 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드는 양이온성 지질이 없는 지질 혼합물 내에 효과적으로 혼입될 수 있으며, 이러한 조성물은 기능적인 방식으로, 치료적 올리고뉴클레오타이드를 세포로 효과적으로 전달할 수 있다. 예를 들어, 지방 혼합물이 포스파티딜콜린 기반 지방산 및 콜레스테롤과 같은 스테롤로 구성된 경우에, 높은 수준의 활성이 관찰되었다. 예를 들어, 하나의 바람직한 중성 지방 혼합물 제제는 적어도 20%의 DOPC 또는 DSPC 및 적어도 20%의 스테롤, 예컨대 콜레스테롤로 구성된다. 심지어 1:5만큼 낮은 지질 대 올리고뉴클레오타이드 비도 비-하전된 제제에서 올리고뉴클레오타이드의 완전한 캡슐화를 얻기에 충분한 것으로 제시되었다.
- [0342] 중성 나노수송체 조성물은 중성 지방 제제로의 올리고뉴클레오타이드의 효율적인 로딩을 가능하게 한다. 조성물은 분자의 소수성이 증가되도록 하는 방식으로 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하고 (예를 들어, 소수성 분자가 올리고뉴클레오타이드 말단 또는 비-말단 뉴클레오타이드, 염기, 당 또는 백본 상의 소수성 분자에 (공유 또는 비-공유) 부착됨), 변형된 올리고뉴클레오타이드는 중성 지방 제제 (예를 들어, 적어도 25%의 콜레스테롤 및 25%의 DOPC 또는 그의 유사체를 함유함)와 혼합된다. 화물 분자, 예컨대 또 다른 지질이 조성물에 또한 포함될 수 있다. 제제의 일부가 올리고뉴클레오타이드 그 자체로 구축된 이러한 조성물은 중성 지질 입자 내 올리고뉴클레오타이드의 효율적인 캡슐화를 가능하게 한다.
- [0343] 일부 측면에서, 바람직한 제제와의 소수성 올리고뉴클레오타이드의 복합체화 시, 50 내지 140 nm 크기 범위의 안정한 입자가 형성될 수 있다. 제제는 그 자체로 전형적으로 작은 입자를 형성하지 않고, 오히려 응집체를 형성하며, 이는 소수성 변형된 올리고뉴클레오타이드의 첨가 시 안정한 50-120 nm 입자로 변환된다.
- [0344] 일부 실시양태에서, 중성 나노수송체 조성물은 소수성 변형된 폴리뉴클레오타이드, 중성 지방 혼합물, 및 임의로 화물 분자를 포함한다. 본원에 사용된 "소수성 변형된 폴리뉴클레오타이드"는 폴리뉴클레오타이드를 변형 전의 폴리뉴클레오타이드보다 더 소수성으로 만드는 적어도 1종의 변형을 갖는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 (예를 들어, sd-rxRNA)이다. 변형은 소수성 분자를 폴리뉴클레오타이드에 (공유 또는 비-공유) 부착시킴으로써 달성될 수 있다. 일부 경우에, 소수성 분자는 친지성 기이거나 또는 이를 포함한다.
- [0345] 용어 "친지성 기"는 물에 대한 그의 친화도보다 지질에 대해 더 높은 친화도를 갖는 기를 의미한다. 친지성 기의 예는 콜레스테롤, 콜레스테릴 또는 변형된 콜레스테릴 잔기, 아다만틴, 디히드로테스테론, 장쇄 알킬, 장쇄 알케닐, 장쇄 알킬닐, 올레일-리토콜산, 콜렌산, 올레오일-콜렌산, 팔미틸, 헵타데실, 미리시틸, 담즙산, 콜산 또는 타우로콜산, 데옥시콜레이트, 올레일 리토콜산, 올레오일 콜렌산, 당지질, 인지질, 스펡고지질, 이소프레노이드, 예컨대 스테로이드, 비타민, 예컨대 비타민 E, 포화 또는 불포화 지방산, 지방산 에스테르, 예컨대 트리글리세리드, 피렌, 포르피린, 텍사피린, 아다만탄, 아크리딘, 비오틴, 쿠마린, 플루오레세인, 로다민, 텍사스-레드, 디곡시게닌, 디메톡시트리틸, t-부틸디메틸실릴, t-부틸디페닐실릴, 시아닌 염료 (예를 들어, Cy3 또는 Cy5), 핵스트 33258 염료, 프소랄렌, 또는 이부프로펜을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 콜레스테롤 모이어티는 환원될 수 있거나 (예를 들어, 콜레스탄에서와 같음) 또는 치환될 수 있다 (예를 들어, 할로겐에 의함). 1개의 분자에서 상이한 친지성 기의 조합이 또한 가능하다.
- [0346] 소수성 분자는 폴리뉴클레오타이드의 다양한 위치에 부착될 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 소수성 분자는 폴리뉴클레오타이드의 말단 잔기, 예컨대 폴리뉴클레오타이드의 3' 또는 5'-단부에 연결될 수 있다. 대안적으로, 내부 뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 분지 상의 뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 소수성 분자는, 예를 들어 뉴클레오타이드의 2'-위치에 부착될 수 있다. 소수성 분자는 또한 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드의 헤테로시클릭 염기, 당 또는 백본에 연결될 수 있다.
- [0347] 소수성 분자는 링커 모이어티에 의해 폴리뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 임의로, 링커 모이어티는 비-뉴클레오타이드 링커 모이어티이다. 비-뉴클레오타이드 링커는 예를 들어, 무염기성 잔기 (디스페이서(dSpacer)), 올리고에틸렌글리콜, 예컨대 트리에틸렌글리콜 (스페이서 9) 또는 헥사에틸렌글리콜 (스페이서 18), 또는 알칸-디올, 예컨대 부탄디올이다. 스페이서 단위는 바람직하게는 포스포디에스테르 또는 포스포로티오에이트 결합에 의해 연결된다. 링커 단위는 분자 내에 단지 1회 나타날 수 있거나, 또는 예를 들어 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트 또는 아마이드 연결을 통해 수회 혼입될 수 있다.
- [0348] 전형적인 접합 프로토콜은 서열의 1개 이상의 위치에 아미노링커를 보유하는 폴리뉴클레오타이드의 합성을 수반하지만, 링커는 요구되지 않는다. 이어서, 아미노 기는 적절한 커플링 또는 활성화 시약을 사용하여 접합되는 분자와 반응된다. 접합 반응은 여전히 고체 지지체에 결합되어 있는 폴리뉴클레오타이드와, 또는 용액 상에서 폴리뉴클레오타이드의 후속 절단에 의해 수행될 수 있다. 전형적으로, 변형된 폴리뉴클레오타이드를 HPLC에 의해 정제

하여 순수한 물질을 생성한다.

- [0349] 일부 실시양태에서, 소수성 분자는 스테롤 유형 접합체, 피토스테롤 접합체, 콜레스테롤 접합체, 변경된 측쇄 길이를 갖는 스테롤 유형 접합체, 지방산 접합체, 임의의 다른 소수성 기 접합체, 및/또는 내부 뉴클레오시드의 소수성 변형이며, 이는 미셀에 혼입되기에 충분한 소수성을 제공한다.
- [0350] 본 발명의 목적상, 용어 "스테롤"은 A-고리의 3-위치에 히드록실 기를 갖는, 스테로이드의 하위군인 스테로이드 알코올을 지칭한다. 이는 HMG-CoA 리덕타제 경로를 통해 아세틸-조효소 A로부터 합성된 양친매성 지질이다. 전체 분자는 매우 편평하다. A 고리 상의 히드록실 기는 극성이다. 지방족 쇄의 나머지는 비극성이다. 통상적으로 스테롤은 위치 17에 8 탄소 쇄를 갖는 것으로 간주된다.
- [0351] 본 발명의 목적상, 용어 "스테롤 유형 분자"는 스테롤과 구조가 유사한 스테로이드 알코올을 지칭한다. 주요 차이는 고리의 구조 및 측쇄에 부착된 위치 21에서의 탄소의 수이다.
- [0352] 본 발명의 목적상, 용어 "피토스테롤" (또한 식물 스테롤로도 불림)은 식물에서 자연 발생하는 피토케미칼인, 스테로이드 알코올의 군이다. 200종 초과와 상이한 공지된 피토스테롤이 존재한다.
- [0353] 본 발명의 목적상, 용어 "스테롤 측쇄"는 스테롤-유형 분자의 위치 17에 부착된 측쇄의 화학적 조성을 지칭한다. 표준 정의에서, 스테롤은 위치 17에서 8 탄소 쇄를 보유하는 4 고리 구조로 제한된다. 본 발명에서, 통상적인 것보다 더 길고 더 짧은 측쇄를 갖는 스테롤 유형 분자가 기재된다. 측쇄는 분지형이거나 또는 이중 백본을 함유할 수 있다.
- [0354] 따라서, 본 발명에 유용한 스테롤은, 예를 들어 콜레스테롤, 뿐만 아니라 위치 17이 2-7개 또는 9개 초과와 탄소의 부착된 측쇄를 갖는 고유한 스테롤을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리카본 고리의 길이는 5 내지 9개의 탄소로 다양하다. 이러한 접합체는 특히 간으로의 전달에 있어서 유의하게 양호한 생체내 효능을 가질 수 있다. 이들 유형의 분자는 통상적인 콜레스테롤에 접합된 올리고뉴클레오티드보다 5 내지 9배 더 낮은 농도에서 작용할 것으로 예상된다.
- [0355] 대안적으로, 폴리뉴클레오티드는 소수성 분자로서 기능하는 단백질, 펩티드 또는 양으로 하전된 화합물질에 결합될 수 있다. 단백질은 프로타민, dsRNA 결합 도메인 및 아르기닌 풍부 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 예시적인 양으로 하전된 화합물질은 스페르민, 스페르미딘, 카다베린 및 푸트레신을 포함한다.
- [0356] 또 다른 실시양태에서, 소수성 분자 접합체는 소수성 변형, 포스포로티오에이트 변형 및 2' 리보 변형을 함유하나 이에 제한되지는 않는 폴리뉴클레오티드의 특이적 화학적 변형 패턴 (본원에 상세히 기재된 바와 같음)과 조합되는 경우에 훨씬 더 높은 효능을 입증할 수 있다.
- [0357] 또 다른 실시양태에서 스테롤 유형 분자는 자연 발생 피토스테롤일 수 있다. 다중탄소 쇄는 9개보다 더 길 수 있고, 선형, 분지형일 수 있고/거나 이중 결합을 함유할 수 있다. 일부 피토스테롤-함유 폴리뉴클레오티드 접합체는 다양한 조직으로의 폴리뉴클레오티드의 전달에 있어서 유의하게 더 강력하고 활성일 수 있다. 일부 피토스테롤은 조직 선호도를 입증할 수 있고, 이에 따라 특정한 조직에 특이적으로 RNAi를 전달하는 방법으로서 사용될 수 있다.
- [0358] 소수성으로 변형된 폴리뉴클레오티드는 중성 지방 혼합물과 혼합되어 미셀을 형성한다. 중성 지방산 혼합물은, 소수성으로 변형된 폴리뉴클레오티드를 갖는 미셀을 형성할 수 있는 생리학적 pH 또는 그 근처에서 알짜 중성 또는 약간 알짜 음전하를 갖는 지방의 혼합물이다. 본 발명의 목적상, 용어 "미셀"은 비하전된 지방산과 인지질의 혼합물에 의해 형성된 소형 나노입자를 지칭한다. 중성 지방 혼합물은, 독성을 유발하지 않는 양으로 존재하는 한, 양이온성 지질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 중성 지방 혼합물은 양이온성 지질이 없다. 양이온성 지질이 없는 혼합물은 양이온성 지질이 총 지질의 1% 미만 및 바람직하게는 0%인 혼합물이다. 용어 "양이온성 지질"은 생리학적 pH 또는 그 근처에서 알짜 양전하를 갖는 지질 및 합성 지질을 포함한다. 용어 "음이온성 지질"은 생리학적 pH 또는 그 근처에서 알짜 음전하를 갖는 지질 및 합성 지질을 포함한다.
- [0359] 중성 지방은 강력하지만 비공유 인력 (예를 들어, 정전기적, 반 데르 발스, 파이-적층 등의 상호작용)에 의해 본 발명의 올리고뉴클레오티드에 결합한다.
- [0360] 중성 지방 혼합물은, 자연 발생 또는 화학적 합성 또는 변형된 포화 및 불포화 지방산 잔기 부류로부터 선택된 제제를 포함할 수 있다. 지방산은 트리글리세리드, 디글리세리드 또는 개별 지방산의 형태로 존재할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 비경구 영양을 위한 약리학에서 현재 사용되는 지방산 및/또는 지방 에밀전의 널리 검증

된 혼합물의 사용을 활용할 수 있다.

- [0361] 중성 지방 혼합물은 바람직하게는 콜린 기반 지방산 및 스테롤의 혼합물이다. 콜린 기반 지방산은, 예를 들어 합성 포스포콜린 유도체, 예컨대 DDPC, DLPC, DMPC, DPPC, DSPC, DOPC, POPC, 및 DEPC를 포함한다. DOPC (화학물질 등록 번호 4235-95-4)는 디올레오일포스파티딜콜린 (또한 디엘라이도일포스파티딜콜린, 디올레오일-PC, 디올레오일포스포콜린, 디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 디올레일포스파티딜콜린으로도 공지됨)이다. DSPC (화학물질 등록 번호 816-94-4)는 디스테아로일포스파티딜콜린 (또한 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린으로도 공지됨)이다.
- [0362] 중성 지방 혼합물에서 스테롤은, 예를 들어 콜레스테롤일 수 있다. 중성 지방 혼합물은 완전히 콜린 기반 지방산 및 스테롤로 이루어질 수 있거나 또는 임의로 화물 분자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 중성 지방 혼합물은 적어도 20% 또는 25%의 지방산 및 20% 또는 25%의 스테롤을 가질 수 있다.
- [0363] 본 발명의 목적상, 용어 "지방산"은 통상적인 기재의 지방산을 지칭한다. 이는 개별 물질로서 또는 2- 및 트리글리세리드의 형태로 존재할 수 있다. 본 발명의 목적상, 용어 "지방 에멀전"은, 식이로 충분한 지방을 얻을 수 없는 대상체에게 정맥내로 주어지는 안전한 지방 체제를 지칭한다. 이는 대두 오일 (또는 다른 자연 발생 오일) 및 난 인지질의 에멀전이다. 지방 에멀전은 일부 불용성 마취제 체제를 위해 사용된다. 본 개시내용에서, 지방 에멀전은 인트라리피드, 리포신, 뉴트리리피드와 같이 상업적으로 입수가 가능한 체제, 특정한 지방산이 풍부화되거나 또는 완전히 신생의- 지방산 및 인지질의 체제화된 조합물인 변형된 상업적 체제의 일부일 수 있다.
- [0364] 한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 조성물과 접촉되는 세포는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 혼합물 및 지질, 예를 들어 상기 기재된 지질 또는 지질 조성물 중 1종을 포함하는 혼합물과 약 12시간 내지 약 24시간 동안 접촉된다. 또 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 조성물과 접촉되는 세포는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 혼합물 및 지질, 예를 들어 상기 기재된 지질 또는 지질 조성물 중 1종을 포함하는 혼합물과 약 1 내지 약 5일 동안 접촉된다. 한 실시양태에서, 세포는 지질 및 올리고뉴클레오티드를 포함하는 혼합물과 약 3일 내지 약 30일만큼 오래 접촉된다. 또 다른 실시양태에서, 지질을 포함하는 혼합물은 세포와 적어도 약 5 내지 약 20일 동안 접촉된 상태로 유지된다. 또 다른 실시양태에서, 지질을 포함하는 혼합물은 세포와 적어도 약 7 내지 약 15일 동안 접촉된 상태로 유지된다.
- [0365] 체제 중 50%-60%는 임의로, 임의의 다른 지질 또는 분자일 수 있다. 이러한 지질 또는 분자는 본원에서 화물 지질 또는 화물 분자로서 지칭된다. 화물 분자는 인트라리피드, 소분자, 융합생성 펩티드 또는 지질, 또는 세포 흡수, 엔도솜 방출 또는 조직 분포 특성을 변경시키기 위해 첨가될 수 있는 다른 소분자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 특성이 바람직한 경우에, 화물 분자를 용인하는 능력은 이들 입자의 특성의 조정에 중요하다. 예를 들어, 일부 조직 특이적 대사물의 존재는 조직 분포 프로파일을 극적으로 변경시킬 수 있다. 예를 들어, 다양한 포화도를 갖는 보다 짧거나 보다 긴 지방쇄가 풍부화된 인트라리피드 유형 체제의 사용은 이들 유형의 체제의 조직 분포 프로파일 (및 그의 로딩)에 영향을 미친다.
- [0366] 본 발명에 따른 유용한 화물 지질의 예는 융합생성 지질이다. 예를 들어, 쯔비터이온성 지질 DOPE (화학물질 등록 번호 4004-5-1, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민)는 바람직한 화물 지질이다.
- [0367] 인트라리피드는 하기 조성으로 구성될 수 있다: 1,000 mL에: 정제된 대두 오일 90 g, 정제된 난 인지질 12 g, 무수 글리세롤 22 g, 1000 mL까지의 충분량의 주사용수가 함유됨. pH는 수산화나트륨을 사용하여 대략 pH 8로 조정된다. 에너지 함량/L: 4.6 MJ (190 kcal). 오스몰알농도 (대략): 300 mOsm/kg 물. 또 다른 실시양태에서, 지방 에멀전은 주사용수 중 5% 홍화 오일, 5% 대두 오일, 유화제로서 첨가되는 난 포스파티드 최대 1.2% 및 2.5% 글리세린을 함유하는 리포신이다. 이는 또한 pH 조정을 위해 수산화나트륨을 함유할 수 있다. pH 8.0 (6.0 - 9.0). 리포신은 276 m Osmol/리터 (실제값)의 오스몰농도를 갖는다.
- [0368] 화물 지질의 아이덴티티, 양 및 비에서의 변동은 이들 화합물의 세포 흡수 및 조직 분포 특징에 영향을 미친다. 예를 들어, 지질 꼬리의 길이 및 포화가능성 수준은 간, 폐, 지방 및 심근세포로의 상이한 흡수에 영향을 미칠 것이다. 비타민 또는 상이한 형태의 스테롤과 같은 특수한 소수성 분자의 첨가는 특정한 화합물의 대사에 수반되는 특수한 조직에 대한 분포를 유리하게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비타민 A 또는 E가 사용된다. 복합체는 상이한 올리고뉴클레오티드 농도에서 형성되며, 보다 높은 농도는 보다 효율적인 복합체 형성에 유리하다.
- [0369] 또 다른 실시양태에서, 지방 에멀전은 지질의 혼합물을 기초로 한다. 이러한 지질은 천연 화합물, 화학적으로

합성된 화합물, 정제된 지방산 또는 임의의 다른 지질을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 지방 에멀전 조성물은 전적으로 인공적이다. 특정한 실시양태에서, 지방 에멀전은 70% 초과 리놀레산이다. 또 다른 특정한 실시양태에서, 지방 에멀전은 적어도 1%의 카르디올리핀이다. 리놀레산 (LA)은 불포화 오메가-6 지방산이다. 이는 18-탄소 쇠 및 2개의 시스 이중 결합을 갖는 카르복실산으로 이루어진 무색 액체이다.

[0370] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 지방 에멀전의 조성의 변경은 소수성으로 변형된 폴리뉴클레오티드의 조직 분포를 변경시키는 방식으로 사용된다. 이러한 방법론은 특정한 조직으로의 폴리뉴클레오티드의 특이적 전달을 제공한다.

[0371] 또 다른 실시양태에서, 화물 분자의 지방 에멀전은 70% 초과 리놀레산 ( $C_{18}H_{32}O_2$ ) 및/또는 카르디올리핀을 함유한다.

[0372] 인트라리피드와 같은 지방 에멀전은 이전에 일부 비-수용성 약물 (예컨대 프로포폴, 이는 디프리반(Diprivan)으로 재-제제화됨)을 위한 전달 제제로서 사용되었다. 본 발명의 고유한 특색은, (a) 변형된 폴리뉴클레오티드를 소수성 화합물(들)과 조합하여 지방 미셀에 혼입될 수 있도록 하는 개념 및 (b) 이를 지방 에멀전과 혼합하여 가역적 담체를 제공하는 것을 포함한다. 혈류로의 주사 후, 미셀은 통상적으로 알부민, HDL, LDL 및 다른 것을 포함한 혈청 단백질에 결합한다. 이러한 결합은 가역적이고, 결국 지방이 세포에 의해 흡수된다. 이어서, 미셀의 일부로서 혼입된 폴리뉴클레오티드는 세포의 표면에 인접하여 전달될 것이다. 그 후, 세포 흡수는 스테롤 유형 전달을 포함하나 이에 제한되지는 않는 가변 메커니즘을 통해 일어날 수 있다.

[0373] 착화제는 강력하지만 비공유 인력 (예를 들어, 정전기적, 반 데르 발스, 파이-적층 등의 상호작용)에 의해 본 발명의 올리고뉴클레오티드에 결합한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 착화제로 착화하여 올리고뉴클레오티드의 세포 흡수를 증가시킬 수 있다. 착화제의 예는 양이온성 지질을 포함한다. 양이온성 지질을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 세포에 전달할 수 있다. 그러나, 상기 논의된 바와 같이, 양이온성 지질이 없는 제제가 일부 실시양태에서 바람직하다.

[0374] 용어 "양이온성 지질"은 극성 및 비-극성 도메인 둘 다를 갖고, 생리학적 pH에서 또는 그 부근에서 양으로 하전될 수 있고, 다가음이온, 예컨대 핵산에 결합하고, 세포 내로의 핵산의 전달을 용이하게 하는 지질 및 합성 지질을 포함한다. 일반적으로, 양이온성 지질은 아민, 아마이드 또는 그의 유도체의 포화 및 불포화 알킬 및 지환족 에테르 및 에스테르를 포함한다. 양이온성 지질의 직쇄 및 분지형 알킬 및 알케닐 기는, 예를 들어 1 내지 약 25개의 탄소 원자를 함유할 수 있다. 바람직한 직쇄 또는 분지형 알킬 또는 알케닐 기는 6개 이상의 탄소 원자를 갖는다. 지환족 기는 콜레스테롤 및 다른 스테로이드 기를 포함한다. 양이온성 지질은 예를 들어  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $F^-$ , 아세테이트, 트리플루오로아세테이트, 술페이트, 니트라이트 및 니트레이트를 비롯한 다양한 반대이온 (음이온)으로 제조될 수 있다.

[0375] 양이온성 지질의 예는 폴리에틸렌아민, 폴리아미도아민 (PAMAM) 별형 덴드리머, 리포펙틴 (DOTMA 및 DOPE의 조합), 리포펙타제, 리포펙타민™ (예를 들어, 리포펙타민™ 2000), DOPE, 시토펙틴 (길리아드 사이언시스(Gilead Sciences), 캘리포니아주 포스터 시티), 및 유펙틴 (JBL, 캘리포니아주 샌 루이스 오비스포)을 포함한다. 예시적인 양이온성 리포솜은 N-[1-(2,3-디올레일옥시)-프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA), N-[1-(2,3-디올레일옥시)-프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 메틸술페이트 (DOTAP),  $3\beta$ -[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)카르바모일]콜레스테롤 (DC-Chol), 2,3-디올레일옥시-N-[2(스페르민카르복시아미도)에틸]-N,N-디메틸-1-프로판아미늄 트리플루오로아세테이트 (DOSPA), 1,2-디미리스틸옥시프로필-3-디메틸-히드록시에틸 암모늄 브로마이드; 및 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (DDAB)로부터 제조될 수 있다. 예를 들어, 양이온성 지질 N-(1-(2,3-디올레일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA)는 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드의 안티센스 효과를 1000-배 증가시키는 것으로 발견되었다. (Vlassov et al., 1994, Biochimica et Biophysica Acta 1197:95-108). 또한, 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 폴리 (L-리신) 또는 아비딘과 복합체화될 수 있으며, 지질은 이 혼합물, 예를 들어 스테릴-폴리 (L-리신)에 포함될 수 있거나 또는 포함되지 않을 수 있다.

[0376] 양이온성 지질은 올리고뉴클레오티드를 세포에 전달하기 위해 관련 기술분야에서 사용되어 왔다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,855,910; 5,851,548; 5,830,430; 5,780,053; 5,767,099; 문헌 [Lewis et al., 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3176; Hope et al., 1998. Molecular Membrane Biology 15:1] 참조). 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 흡수를 용이하게 하기 위해 사용될 수 있는 다른 지질 조성물이 청구된 방법과 함께 사용될 수 있다. 상기 열거된 것에 더하여, 다른 지질 조성물이 또한 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 미국 특허 번호 4,235,871; 미국 특허 번호 4,501,728; 4,837,028; 4,737,323에 교시된 것을 포함한다.

- [0377] 한 실시양태에서, 지질 조성물은 올리고뉴클레오타이드의 지질-매개된 형질감염을 증진시키기 위한 작용제, 예를 들어 바이러스 단백질을 추가로 포함할 수 있다 (Kamata, et al., 1994. Nucl. Acids. Res. 22:536). 또 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어 미국 특허 5,736,392에 교시된 바와 같이 올리고뉴클레오타이드, 펩티드 및 지질을 포함하는 조성물의 일부로서 세포와 접촉된다. 또한, 혈청 저항성인 개선된 지질이 기재되어 있다 (Lewis, et al., 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. 93:3176). 양이온성 지질 및 다른 착화제는 세포내이입을 통해 세포로 운반되는 올리고뉴클레오타이드의 수를 증가시키는 작용을 한다.
- [0378] 또 다른 실시양태에서, N-치환된 글리신 올리고뉴클레오타이드 (펩토이드)를 사용하여 올리고뉴클레오타이드의 흡수를 개선시킬 수 있다. 펩토이드는 형질감염을 위한 양이온성 지질-유사 화합물을 생성하는 데 사용되어 왔다 (Murphy, et al., 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. 95:1517). 펩토이드는 표준 방법을 사용하여 합성할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Zuckermann, R. N., et al., 1992. J. Am. Chem. Soc. 114:10646; Zuckermann, R. N., et al., 1992. Int. J. Peptide Protein Res. 40:497]). 양이온성 지질 및 펩토이드, 립토이드의 조합이 또한 대상 올리고뉴클레오타이드의 흡수를 개선시키는 데 사용될 수 있다 (Hunag, et al., 1998. Chemistry and Biology. 5:345). 립토이드는 펩토이드 올리고뉴클레오타이드를 정교화하고 아미노 말단 하위단량체를 그의 아미노 기를 통해 지질에 커플링시킴으로써 합성될 수 있다 (Hunag, et al., 1998. Chemistry and Biology. 5:345).
- [0379] 양으로 하전된 아미노산이 고도로 활성인 양이온성 지질을 생성하는 데 사용될 수 있다는 것은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (Lewis et al., 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:3176). 한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드를 전달하기 위한 조성물은 친지성 모이어티에 연결된 다수의 아르기닌, 리신, 히스티딘 또는 오르니틴 잔기를 포함한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,777,153 참조).
- [0380] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드를 전달하기 위한 조성물은 약 1 내지 약 4개의 염기성 잔기를 갖는 펩티드를 포함한다. 이들 염기성 잔기는 예를 들어 펩티드의 아미노 말단, C-말단, 또는 내부 영역에 위치할 수 있다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 관련 기술분야에 정의되어 있다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 글리신 (또한 비극성으로 간주될 수도 있음), 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다. 염기성 아미노산을 제외하고, 펩티드의 대부분의 또는 모든 다른 잔기는 비-염기성 아미노산, 예를 들어 리신, 아르기닌 또는 히스티딘 이외의 아미노산으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 긴 중성 측쇄를 갖는 중성 아미노산이 우세하게 사용된다.
- [0381] 한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드를 전달하기 위한 조성물은 1개 이상의 감마 카르복시글루탐산 잔기, 또는  $\gamma$ -Gla 잔기를 갖는 천연 또는 합성 폴리펩티드를 포함한다. 이들 감마 카르복시글루탐산 잔기는 폴리펩티드가 서로 및 막 표면에 결합하게 할 수 있다. 다시 말해서, 일련의  $\gamma$ -Gla를 갖는 폴리펩티드는 RNAi 구축물이 그것이 접촉하게 되는 어떠한 막에도 침착하도록 돕는 일반적 전달 양식으로서 사용될 수 있다. 이는 RNAi 구축물이 혈류로부터 소거되는 것을 느리게 하고, 표적으로 귀소할 기회를 증진시킬 수 있다.
- [0382] 감마 카르복시글루탐산 잔기는 천연 단백질에 존재할 수 있다 (예를 들어, 프로트롬빈은 10개의  $\gamma$ -Gla 잔기를 가짐). 대안적으로, 이는 예를 들어 비타민 K-의존성 카르복실라제를 사용한 카르복실화에 의해, 정제되거나 재조합적으로 생성되거나 또는 화학적으로 합성된 폴리펩티드 내로 도입될 수 있다. 감마 카르복시글루탐산 잔기는 연속적 또는 비-연속적일 수 있으며, 폴리펩티드에서의 이러한 감마 카르복시글루탐산 잔기의 총 수 및 위치를 조절 / 미세 조정하여 폴리펩티드의 다양한 수준의 "점착성"을 달성할 수 있다.
- [0383] 한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 조성물과 접촉되는 세포는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 혼합물 및 지질, 예를 들어 상기 기재된 지질 또는 지질 조성물 중 1종을 포함하는 혼합물과 약 12시간 내지 약 24시간 동안 접촉된다. 또 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 조성물과 접촉되는 세포는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 혼합물 및 지질, 예를 들어 상기 기재된 지질 또는 지질 조성물 중 1종을 포함하는 혼합물과 약 1 내지 약 5일 동안 접촉된다. 한 실시양태에서, 세포는 지질 및 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 혼합물과 약 3일 내지 약 30일만큼 오래 접촉된다. 또 다른 실시양태에서, 지질을 포함하는 혼합물은 세포와 적어도 약 5 내지 약 20일 동안 접촉된 상태로 유지된다. 또 다른 실시양태에서, 지질을 포함하는 혼합물은 세포와 적어도 약 7 내지 약 15일 동안 접촉된 상태로 유지된다.

- [0384] 예를 들어, 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 조성물은 본원에 기재된 바와 같이 장기간의 인큐베이션 기간 동안 지질, 예컨대 시토크틴 CS 또는 GSV (글렌 리서치(Glen Research)로부터 입수가능함; 버지니아주 스틸링), GS3815, GS2888의 존재 하에 세포와 접촉될 수 있다.
- [0385] 한 실시양태에서, 지질 및 올리고뉴클레오타이드 조성물을 포함하는 혼합물과의 세포의 인큐베이션은 세포의 생존율을 감소시키지 않는다. 바람직하게는, 형질감염 기간 후에, 세포는 실질적으로 생존가능하다. 한 실시양태에서, 형질감염 후에, 세포는 적어도 약 70% 내지 적어도 약 100% 생존가능하다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 적어도 약 80% 내지 적어도 약 95% 생존가능하다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 적어도 약 85% 내지 적어도 약 90% 생존가능하다.
- [0386] 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는, 본원에서 "수송 펩티드"로 지칭되는, 올리고뉴클레오타이드를 세포 내로 수송하는 펩티드 서열을 부착시키는 것에 의해 변형된다. 한 실시양태에서, 조성물은 단백질을 코딩하는 표적 핵산 분자에 상보적인 올리고뉴클레오타이드, 및 공유 부착된 수송 펩티드를 포함한다.
- [0387] 용어 "수송 펩티드"는 세포에의 올리고뉴클레오타이드의 수송을 용이하게 하는 아미노산 서열을 포함한다. 연결된 모이어티의 세포 내로의 수송을 용이하게 하는 예시적인 펩티드는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 HIV TAT 전사 인자, 락토페린, 헤르페스 VP22 단백질 및 섬유모세포 성장 인자 2를 포함한다 (Pooga et al., 1998. Nature Biotechnology. 16:857; 및 Derossi et al., 1998. Trends in Cell Biology. 8:84; Elliott and O'Hare. 1997. Cell 88:223).
- [0388] 올리고뉴클레오타이드는 공지된 기술, 예를 들어 문헌 [Prochiantz, A. 1996. Curr. Opin. Neurobiol. 6:629; Derossi et al., 1998. Trends Cell Biol. 8:84; Troy et al., 1996. J. Neurosci. 16:253, Vives et al., 1997. J. Biol. Chem. 272:16010]을 사용하여 수송 펩티드에 부착될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 활성화된 티올 기를 보유하는 올리고뉴클레오타이드는 그러한 티올 기를 통해 수송 펩티드에 존재하는 시스테인에 (예를 들어 문헌 [Derossi et al., 1998. Trends Cell Biol. 8:84; Prochiantz. 1996. Current Opinion in Neurobiol. 6:629; Allinquant et al., 1995. J Cell Biol. 128:919]에 교시된 바와 같이 안테나페디아 호메오도메인의 제2 및 제3 나선 사이의  $\beta$  턴에 존재하는 시스테인에) 연결된다. 또 다른 실시양태에서, Boc-Cys-(Npys)OH 기가 최종 (N-말단) 아미노산으로서 수송 펩티드에 커플링될 수 있고, SH 기를 보유하는 올리고뉴클레오타이드가 펩티드에 커플링될 수 있다 (Troy et al., 1996. J. Neurosci. 16:253).
- [0389] 한 실시양태에서, 연결기는 뉴클레오단량체에 부착될 수 있고, 수송 펩티드는 링커에 공유 부착될 수 있다. 한 실시양태에서, 링커는 수송 펩티드에 대한 둘 다의 부착 부위로서 기능할 수 있고, 뉴클레아제에 대해 안정성을 제공할 수 있다. 적합한 링커의 예는 치환 또는 비치환된  $C_1$ - $C_{20}$  알킬 쇠,  $C_2$ - $C_{20}$  알케닐 쇠,  $C_2$ - $C_{20}$  알키닐 쇠, 펩티드, 및 헤테로원자 (예를 들어, S, O, NH 등)를 포함한다. 다른 예시적인 링커는 이관능성 가교제, 예컨대 술포숙신아미드-4-(말레이미도페닐)-부티레이트 (SMPB)를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Smith et al., Biochem J 1991.276: 417-2] 참조).
- [0390] 한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 유전자를 세포 내로 전달하기 위해 수용체-매개된 세포내이입 메커니즘을 이용하는 분자 접합체로서 합성된다 (예를 들어, 문헌 [Bunnell et al., 1992. Somatic Cell and Molecular Genetics. 18:559] 및 그에 인용된 참고문헌 참조).
- [0391] RNAi 시약의 시험관내 및/또는 생체내 전달을 위한 다른 담체는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 이는 대상 RNAi 구축물을 (예를 들어, 숙주 세포, 예컨대 T 세포에) 전달하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부만 언급하여, 미국 특허 출원 공보 20080152661, 20080112916, 20080107694, 20080038296, 20070231392, 20060240093, 20060178327, 20060008910, 20050265957, 20050064595, 20050042227, 20050037496, 20050026286, 20040162235, 20040072785, 20040063654, 20030157030, WO 2008/036825, W004/065601, 및 AU2004206255B2를 참조하며, 이들 모두는 참조로 포함된다.
- [0392] 치료 방법
- [0393] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용에 의해 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 대상체 (예를 들어, 증식성 질환 또는 감염성 질환을 갖거나 또는 갖는 것으로 의심되는 대상체)에게 투여함으로써 증식성 질환 또는 감염성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 어떠한 특정한 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물은, 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 단백질의 감소된 발현을 특징으로 하고, 따라서 면역 체크포인트 단백질의 증가된 발현을 특징으로 하는 특정 증식성 질환 또는 감염성 질환을 갖는 대

상체의 면역계를 자극하는 데 유용하다.

- [0394] 본원에 사용된 "증식성 질환"은 세포의 과다 증식 및 세포 매트릭스의 전환을 특징으로 하는 질환 및 장애, 예컨대 암, 아테롬성동맥경화증, 류마티스 관절염, 건선, 특발성 폐 섬유증, 경피증, 간 경변증 등을 지칭한다. 암의 예는 소세포 폐암, 결장암, 유방암, 폐암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 흑색종, 혈액 악성종양 예컨대 만성 골수성 백혈병 (CML) 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0395] 대상체의 예는 포유동물, 예를 들어 인간 및 다른 영장류; 소, 돼지, 말 및 농장 (농업용) 동물; 개, 고양이 및 다른 가정용 애완동물; 마우스, 래트 및 트랜스제닉 비-인간 동물을 포함한다.
- [0396] 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 의해 기재된 바와 같은 면역원성 조성물은 입양 세포 전달 (ACT) 치료 방법에 의해 대상체에게 투여된다. ACT 양식의 예는 자가 세포 요법 (예를 들어, 대상체 자신의 세포를 떼어내어, 유전자-변형하고, 대상체에게 돌려보냄) 및 이종 세포 요법 (예를 들어, 세포를 공여자로부터 떼어내어, 유전자-변형하고, 수용자 내로 넣음)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, ACT는 인간 세포주 (예를 들어, Jurkat 세포)로 수행된다. 일부 실시양태에서, ACT 치료 방법에 이용되는 세포는 선택된 항체 모이어티에 기초하여 표적 항원에 대한 특이성을 나타내는 조작된 세포 수용체인 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 유전자-변형될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, CAR T-세포 (예를 들어 CART)는 ACT 요법의 목적을 위해 본원에 기재된 방법을 사용하여 화학적으로 변형된 이종 가닥 핵산으로 형질감염될 수 있다. 다른 면역 세포, 예컨대 호중구, B 세포, 단핵구/대식세포, 및 그의 조합이 본원에 개시된 ACT 요법을 위해 T 세포에 더하여 또는 그 대신 사용될 수 있다.
- [0397] 생체내 적용과 관련하여, 본 발명의 제제는 선택된 투여 경로에 적합화된 다양한 형태로, 예를 들어 비경구로, 경구로 또는 복강내로 환자에게 투여될 수 있다. 바람직한 비경구 투여는 하기 경로에 의한 투여를 포함한다: 정맥내; 근육내; 종양내로; 간질로; 동맥내로; 피하; 안구내; 활막내; 경피를 포함한 경상피; 흡입을 통한 폐; 안과적; 설하 및 협측; 안과적인 것을 포함하여 국소로; 피부; 안구; 직장; 및 취입을 통한 비강 흡입.
- [0398] 비경구 투여를 위한 제약 제제는 수용성 또는 수분산성 형태의 활성 화합물의 수용액을 포함한다. 또한, 적절한 유성 주사 현탁액으로서의 활성 화합물의 현탁액을 투여할 수 있다. 적합한 친지성 용매 또는 비히클은 지방 오일, 예를 들어 참깨 오일 또는 합성 지방산 에스테르, 예를 들어 에틸 올레에이트 또는 트리글리세리드를 포함한다. 수성 주사 현탁액은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 함유할 수 있고, 예를 들어 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 소르비톨 또는 텍스트란을 포함하며, 임의로 현탁액은 또한 안정화제를 함유할 수 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 액체 용액, 바람직하게는 생리학상 수용성인 완충제, 예컨대 헵스 용액 또는 링거액 중에 제제화될 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오타이드는 고체 형태로 제제화되고, 사용 직전에 재용해되거나 현탁될 수 있다. 동결건조 형태가 또한 본 발명에 포함된다.
- [0399] 약물 전달 비히클은, 예를 들어 시험관내, 전신 투여를 위해 선택될 수 있다. 이들 비히클은 느린 방출 저장소로서의 역할을 하거나 또는 그의 내용물을 표적 세포에 직접 전달하도록 설계될 수 있다. 일부 직접 전달 약물 비히클의 사용의 이점은 흡수당 다중 분자가 전달된다는 것이다. 이러한 비히클은 달리 혈류로부터 신속하게 소거될 약물의 순환 반감기를 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 카테고리에 속하는 이러한 특수화된 약물 전달 비히클의 일부 예는 리포솜, 히드로겔, 시클로덱스트린, 생분해성 나노캡슐 및 생체접착성 마이크로구체이다.
- [0400] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 활성 양의 투여는 목적하는 결과를 달성하는 데 필요한 투여량 및 기간에서 효과적인 양으로 정의된다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드의 활성 양은 세포의 유형, 사용되는 올리고뉴클레오타이드, 및 생체내 용도, 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 도출하는 올리고뉴클레오타이드의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 세포 내에서의 올리고뉴클레오타이드의 치료 수준의 확립은 흡수 및 유출 또는 분해 속도에 의존한다. 분해 정도의 감소는 올리고뉴클레오타이드의 세포내 반감기를 연장시킨다. 따라서, 예를 들어 포스페이트 백본의 변형을 갖는 화학적으로 변형된 올리고뉴클레오타이드는 상이한 투여를 필요로 할 수 있다.
- [0401] 면역원성 조성물의 정확한 투여량 및 투여되는 용량의 수는 실험적으로 및 임상 시험에서 생성된 데이터에 좌우될 것이다. 여러 인자, 예컨대 목적하는 효과, 전달 비히클, 질환 적응증, 및 투여 경로가 투여량에 영향을 미칠 것이다. 투여량은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있고, 대상 제약 조성물로 제제화될 수 있다. 바람직하게는, 치료 지속기간은 적어도 질환 증상의 과정을 통해 연장될 것이다.
- [0402] 투여 요법은 최적의 치료 반응을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 면역원성 조성물은 반복적으로 투여

될 수 있고, 예를 들어, 여러 용량이 매일 투여될 수 있거나, 또는 용량은 치료 상황의 위급성에 의해 지시되는 바와 같이 비례적으로 감소될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 대상체에게 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자 또는 면역원성 조성물을 투여하는 적절한 용량 및 스케줄, 그것이 세포 또는 대상체에게 투여되어야 하는지를 용이하게 결정할 수 있을 것이다.

[0403] 예컨대 피내 주사 또는 피하 전달을 통한 면역원성 조성물의 투여는 투여 요법의 시험을 통해 최적화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 투여가 충분하다. 투여된 면역원성 조성물의 효과를 추가로 연장시키기 위해, 조성물은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 친숙한 바와 같이 느린 방출 제제 또는 장치로 투여될 수 있다.

[0404] 다른 실시양태에서, 화학적으로 변형된 이중 가닥 핵산 분자 또는 면역원성 조성물은 다수회 투여된다. 일부 경우에, 이는 매일, 1주 2회, 매주, 2주마다, 3주마다, 매월, 2개월마다, 3개월마다, 4개월마다, 5개월마다, 6개월마다 또는 6개월 마다보다 덜 빈번하게 투여된다. 일부 경우에, 이는 1일, 1주, 1개월 및/또는 1년에 다수회 투여된다. 예를 들어, 이는 대략 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간 또는 12시간 초과마다 투여될 수 있다. 이는 1일에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10회 또는 10회 초과로 투여될 수 있다.

[0405] 본 발명의 측면은 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 것에 관한 것이다. 일부 경우에, 대상체는 환자이고, 면역원성 조성물을 투여하는 것은 의사의 사무실에서 조성물을 투여하는 것을 수반한다.

[0406] 일부 실시양태에서, 1종 초과 면역원성 조성물이 동시에 투여된다. 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10종 또는 10종 초과 상이한 조성물을 함유하는 조성물이 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은 2 또는 3종의 상이한 면역원성 조성물을 포함한다.

[0407] 자기-전달 RNAi 면역요법제

[0408] 그의 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 10,934,550에 기재된 바와 같이, 면역억제 메카니즘에 수반되는 특이적 유전자를 표적화하고 녹다운시키도록 설계된 특정한 인타실™ 작용제로 세포를 처리함으로써 면역요법제를 생산하였다. 여러 세포 및 세포주가 인타실™ 화합물로 성공적으로 처리되었고, 명시된 인간 세포에서 표적화된 유전자 발현의 적어도 70%를 녹다운시키는 것으로 나타났다.

[0409] 이들 연구는 통상적으로 형질감염에 대해 매우 저항성인 세포에서 표적 유전자의 발현을 억제하기 위한 이들 면역원성 작용제의 유용성을 입증하였고, 작용제가 임의의 세포 유형에서 표적 세포의 발현을 감소시킬 수 있음을 시사하였다.

[0410] 본 발명의 목적상, 범위는 본원에서 "약" 하나의 특정한 값으로부터 및/또는 "약" 또 다른 특정한 값까지로 표현될 수 있다. 이러한 범위가 표현되는 경우에, 또 다른 실시양태는 하나의 특정한 값으로부터 및/또는 다른 특정한 값까지를 포함한다. 유사하게, 값이 선행하는 "약"의 사용에 의해 근사치로 표현되는 경우에, 특정한 값은 또 다른 실시양태를 형성하는 것으로 이해될 것이다. 추가로, 각각의 범위의 종점은 다른 종점과 관련해서도, 또한 다른 종점과 독립적으로도 유의한 것으로 이해될 것이다.

[0411] 또한, 본 발명의 목적상, 용어 "하나의" 물질은 그러한 물질 중 하나 이상을 지칭하며; 예를 들어, "단백질" 또는 "핵산 분자"는 그러한 화합물 중 하나 이상 또는 적어도 하나의 화합물을 지칭한다. 따라서, 용어, "하나", "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 또한, 용어 "포함하는", "비롯한" 및 "갖는"은 상호교환가능하게 사용될 수 있음을 주목해야 한다. 또한, "로 이루어진 군으로부터 선택된" 화합물은 2종 이상의 화합물의 혼합물 (즉, 조합물)을 포함하는 하기 목록의 화합물 중 1종 이상을 지칭한다.

[0412] 본 발명에 따르면, 단리된 또는 생물학적으로 순수한 단백질 또는 핵산 분자는 그의 천연 환경으로부터 벗어난 화합물이다. 따라서, "단리된" 및 "생물학적으로 순수한"은 화합물이 정제된 정도를 반드시 반영하지는 않는다. 본 발명의 단리된 화합물은 그의 천연 공급원으로부터 수득될 수 있거나, 분자 생물학 기술을 사용하여 생산될 수 있거나, 또는 화학적 합성에 의해 생산될 수 있다.

[0413] 본원에 기재된 조성물 및 방법은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이는 어떠한 방식으로든 추가로 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 출원의 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌 (문헌 참고문헌, 허여된 특허, 공개된 특허 출원, 및 동시-계류 특허 출원 포함)의 전체 내용은 명백하게 본원에 참조로 포함된다.

[0414] 실시예

[0415] 실시예 1: 자기-전달 RNAi 면역요법제

[0416] TIGIT (NCBI 진뱅크 수탁 번호 NM\_173799)를 코딩하는 유전자를 독점적 알고리즘을 사용하여 분석하여 바람직한 인타실™ 표적화 서열 및 표적 영역을 확인하였다. (표 1.)

[0417] Tigit 1-Tigit 20에 대한 서열은 이전에 미국 특허 공개 번호 2020/0215113에 개시되었고, 이로부터 참조로 포함되며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0418] Tigit 21은 추가의 바람직한 인타실™ 표적화 서열로서 본원에서 확인되었다.

[0419] 표 1 TIGIT-표적화 서열 및 유전자 영역

|          | TIGIT                      |                           |            |                                                     |            |
|----------|----------------------------|---------------------------|------------|-----------------------------------------------------|------------|
| 올리고 ID   |                            | 서열                        | SEQ ID NO: | 유전자 영역                                              | SEQ ID NO: |
| Tigit 1  | TIGIT_NM_173799<br>인간 840  | CUUUUGUCUUUGCU<br>AUUUAUA | 7          | CTTCTGGAAGATACACTTTGTCTTTG<br>CTATTATAGATGAATATA    | 28         |
| Tigit 2  | TIGIT_NM_173799<br>인간 2827 | UAAUUGGUUAAGC<br>AUAAAA   | 8          | CAAGATGTGCTGTATAATTGGTATAA<br>GCATAAAATCACACTAGA    | 29         |
| Tigit 3  | TIGIT_NM_173799<br>인간 2436 | CAAAUUGGAAGUGA<br>ACUAAA  | 9          | ATAGAACACAATTCACAAATTGGAAG<br>TGAACATAAAATGTAAATGAC | 30         |
| Tigit 4  | TIGIT_NM_173799<br>인간 2364 | GUUUGCUGUGGCAG<br>UUUACA  | 10         | CGTAAAAATGTTGTTGTTTGTCTGTGGC<br>AGTTTACAGCATTTTCT   | 31         |
| Tigit 5  | TIGIT_NM_173799<br>인간 1039 | GAUCAUAAUUGCAA<br>AAUUAA  | 11         | AGTAACGTGGATCTTGATCATAAATG<br>CAAAATTAAAAATATCTT    | 32         |
| Tigit 6  | TIGIT_NM_173799<br>인간 559  | CGCGUUGACUAGAA<br>AGAAGA  | 12         | AGTCACTGTGGTGGTGCCTTGACTA<br>GAAAGAAGAAAGCCCTCAG    | 33         |
| Tigit 7  | TIGIT_NM_173799<br>인간 2666 | UUUAAUAGAAGAC<br>ACUGAA   | 13         | TTTGAAAAAATTTTAAATAGAAC<br>TCACTGAACTAGATTCTC       | 34         |
| Tigit 8  | TIGIT_NM_173799<br>인간 2406 | GCAAAUCUGUUGGA<br>AAUAGA  | 14         | TCTTGCAAAATTAGTGCAAAATCTGTTG<br>GAAATAGAACACAATTCA  | 35         |
| Tigit 9  | TIGIT_NM_173799<br>인간 2391 | UCUUGCAAAAUUAG<br>UGCAAA  | 15         | AGTTTACAGCATTTTCTTGCAAAAT<br>AGTGCAAAATCTGTTGAA     | 36         |
| Tigit 10 | TIGIT_NM_173799<br>인간 2284 | ACAUAGGAAGAAUG<br>AACUGA  | 16         | TCTACCAAAATGGGTTACATAGGAAGA<br>ATGAACTGAAATCTGTCCA  | 37         |
| Tigit 11 | TIGIT_NM_173799<br>인간 2262 | UCACUUUCUACCA<br>AAUGGG   | 17         | ATTATTATTATTTTCACTTTTCTACC<br>AAATGGGTTACATAGGA     | 38         |
| Tigit 12 | TIGIT_NM_173799<br>인간 2531 | GUGUUAUUUAACAU<br>AAUUUA  | 18         | TGGACTGAGAGTTGGGTGTTATTTAAC<br>ATAATTAAGGTAATTGGG   | 39         |
| Tigit 13 | TIGIT_NM_173799<br>인간 924  | UGUGUGUUCAGUUG<br>AGUGAA  | 19         | GTGTGTGTATGTGTGTGTGTGTTCAGT<br>TGAGTGAATAAATGTCAT   | 40         |
| Tigit 14 | TIGIT_NM_173799<br>인간 847  | CUUUGCUAUUUAUAG<br>AUGAAU | 20         | AAGATACACTTTTGTCTTTGCTATTAT<br>AGATGAATATATAAGCAG   | 41         |
| Tigit 15 | TIGIT_NM_173799<br>인간 2637 | GAAAUUGGAUUCAA<br>UUUGAA  | 21         | ATGGGTCAGGTTACTGAAATGGGATT<br>CAATTTGAAAAAATTTT     | 42         |
| Tigit 16 | TIGIT_NM_173799<br>인간 2453 | AAAAUGUAAUGACG<br>AAAAAGG | 22         | AATTGGAAGTGAACATAAATGTAAATG<br>ACGAAAAAGGAGTAGTGTT  | 43         |
| Tigit 17 | TIGIT_NM_173799<br>인간 2280 | GGUUAACAUAGGAAG<br>AAUGAA | 23         | CTTTTCTACCAAAATGGGTTACATAGGA<br>AGAATGAACTGAAATCTG  | 44         |
| Tigit 18 | TIGIT_NM_173799<br>인간 2206 | UUUAGCAACAAGAC<br>AAUUUA  | 24         | GGGGTTGACAATTGTTTATGCAACAA<br>GACAATTCAACTATTCTC    | 45         |
| Tigit 19 | TIGIT_NM_173799<br>인간 850  | UGCUAUUAUGAUG<br>AAUUAUA  | 25         | ATACACTTTGTCTTTGCTATTATAGA<br>TGAATATATAAGCAGCTG    | 46         |
| Tigit 20 | TIGIT_NM_173799<br>인간 2862 | GAGAUUUAAUUAUGA<br>AUAAUA | 26         | TCACACTAGATTCTGGAGATTTAATAT<br>GAATAATAAGAAATACAT   | 47         |
| Tigit 21 | TIGIT_NM_173799<br>인간 171  | UCUAUCAUCUUACA<br>AUGUCA  | 27         | GCAGAGAAAGGTGGCTCTATCATCTT<br>ACAATGTCACCTCTCCTCC   | 48         |

[0420]

[0421] 실시예 2: 평가된 인타실™ 화합물의 화학적 변형 및 구조

[0422] 진신 투여 후 간에서 유전자 발현 수준을 감소시키는 능력을 평가하기 위해 인타실™ 화합물을 설계하고 합성하였다. 인타실™ 서열의 비제한적 예는 표 2에 제시된다.

[0423] 표 2. TIGIT 인타실™ 서열 (패신저/센스 가닥; 가이드/안티센스 가닥)

| 듀플렉스 ID  | 가닥 ID | 서열                                                             | SEQ ID NO: |
|----------|-------|----------------------------------------------------------------|------------|
| Tigit 22 | 22915 | fC.mA.fU.mC.fU.mU.fA.mC.fA.mA.fU.mG.fU*mC*fA.TEG-Chl           | 1          |
|          | 22916 | P.mU.fG.mA.fC.mA.fU.mU.fG.mU.fA.mA.fG.mA.fU*mG*fA*mU*fA*mG*fA  | 2          |
| Tigit 23 | 22915 | fC.mA.fU.mC.fU.mU.fA.mC.fA.mA.fU.mG.fU*mC*fA.TEG-Chl           | 3          |
|          | 22917 | VP.mU.fG.mA.fC.mA.fU.mU.fG.mU.fA.mA.fG.mA.fU*mG*fA*mU*fA*mG*fA | 4          |
| Tigit 24 | 27384 | fU.mG.fA.mC.fU.mA.fG.mA.fA.mA.fG.mA.fA*mG*fA.TEG-Chl           | 5          |
|          | 27380 | P.mU.fC.mU.fU.mC.fU.mU.fU.mC.fU.mA.fG.mU.fC*mA*fA*mC*fG*mC*fG  | 6          |

[0424]

[0425] 약어 풀이

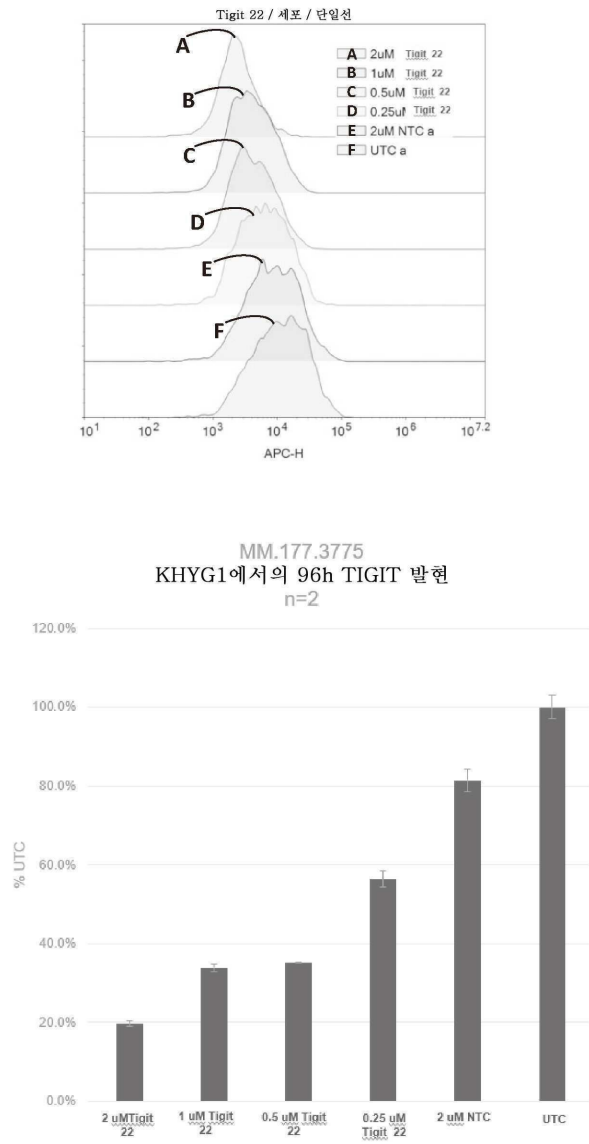
[0426] A = 아데노신

- [0427] G = 구아노신
- [0428] U = 우리딘
- [0429] C = 시토딘
- [0430] m = 2'-O-메틸 뉴클레오타이드
- [0431] f = 2' 플루오로 뉴클레오타이드
- [0432] Y = 5 메틸 우리딘
- [0433] X = 5 메틸 시토딘
- [0434] \* = 포스포로티오에이트 연결
- [0435] . = 포스포디에스테르 연결
- [0436] TEG-Chl = 콜레스테롤-TEG-글리세릴
- [0437] P = 5' 무기 포스페이트
- [0438] VP - 5'비닐 포스포네이트
- [0439] 실시예 3: 유동 세포측정법에 의한 KHYG-1 세포에서의 TIGIT 단백질의 침묵
- [0440] KHYG1 세포를 RPMI + 10% FBS + 100 IU/mL rhIL-2 (페프로테크(Peprotech))에서 배양하였다. 형질감염을 위해 세포를 배양 배지 중 0.3e6개 세포/mL의 밀도로 수집하였다. 세포를 2  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M 및 0.25  $\mu$ M의 최종 농도를 위해 인타실™ 화합물을 함유하는 24-웰 플레이트에 직접 첨가하였다. 플레이트를 부드럽게 흔들어 세포 및 화합물의 철저한 혼합을 보장하였다. 형질감염을 각각의 조건에 대해 이중으로 수행하였다. 세포를 실험 지속기간 동안 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 유지시켰다. 96시간 후에, 유동 세포측정법에 의한 표면 TIGIT 단백질의 분석을 위해 세포를 수집하였다.
- [0441] 세포를 유동 세포측정 분석을 위해 96-웰 V-바닥 플레이트에 수집하고, 제조업체의 권장사항에 따라 4°C에서 염색하였다. 간략하게, 각각의 조건에 대한 세포 현탁액 30  $\mu$ L를 96-웰 V-바닥 플레이트에서 펠릿화하였다. 세포를 TIGIT-APC 항체 (알앤디 시스템즈)를 함유하는 세포 염색 완충제 중에 재현탁시키고, 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 세포 염색 완충제로 2회 세척하고, 80  $\mu$ L의 최종 부피로 재현탁시켰다. 세포를 노보사이트 유동 세포측정기 (ACEA)를 사용하여 분석하고, 노보익스프레스(NovoExpress) 소프트웨어 (ACEA)를 사용하여 분석하였다. 25  $\mu$ L의 세포 현탁액을 각각의 샘플에 대해 수집하였다.
- [0442] 도 1에 제시된 바와 같이, TIGIT 발현은 인타실™-Tigit와의 인큐베이션 후에 KHYG-1 세포 상에서 하향조절되었다 (UTC는 비처리 대조군을 나타냄).
- [0443] 실시예 4: TIGIT-처리된 자연 킬러 세포에 의한 증진된 종양 세포 사멸
- [0444] KHYG1 자연 킬러 (NK) 세포를 TIGIT-22 인타실™ 화합물로 72시간 동안 배양물 중에서 처리하였다. 72시간 후, 세포를 펠릿화하고, 인타실™ 화합물의 부재 하의 신선한 배지 중에 추가의 48시간 동안 재현탁시켰다. 이어서, KHYG1 세포를 TIGIT mRNA 수준에 대해 분석하고 (도 2, 좌측 그래프), DELFIA 세포독성 검정을 (5:1 E:T 비에서) 사용하여 그의 종양 사멸 활성 (K562 세포)을 결정하였다 (도 2, 우측 그래프). TIGIT-22 인타실™ 화합물로 처리한 KHYG1 세포는 대조군과 비교하여 증진된 종양 세포 활성을 입증하였다.
- [0445] KHYG1 NK 세포를 TIGIT 22 인타실™ 화합물로 48시간 동안 배양물 중에서 처리하였다. 48시간 후, 세포를 펠릿화하고, 인타실™ 화합물의 부재 하의 신선한 배지 중에 위시아웃 기간 (96시간 또는 6일) 동안 재현탁시켰다. 위시아웃 기간 후에, TIGIT 22 인타실™ 화합물로 처리한 KHYG1 세포를 표면 TIGIT 단백질 수준에 대해 분석하고 (도 3 및 4, 좌측 그래프), DELFIA 세포독성 검정을 (5:1 E:T 비) 사용하여 그의 종양 사멸 활성 (K562 세포)을 결정하였다 (도 3 및 4, 우측 그래프). TIGIT 22 인타실™ 화합물로 처리한 KHYG1 세포는 대조군과 비교하여 증진된 종양 세포 사멸 활성을 입증하였다.
- [0446] 등가물
- [0447] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상용 실험만을 사용하여 본원에 기재된 본 발명의 구체적 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 하기 청구범위에 의해 포괄되는 것으로

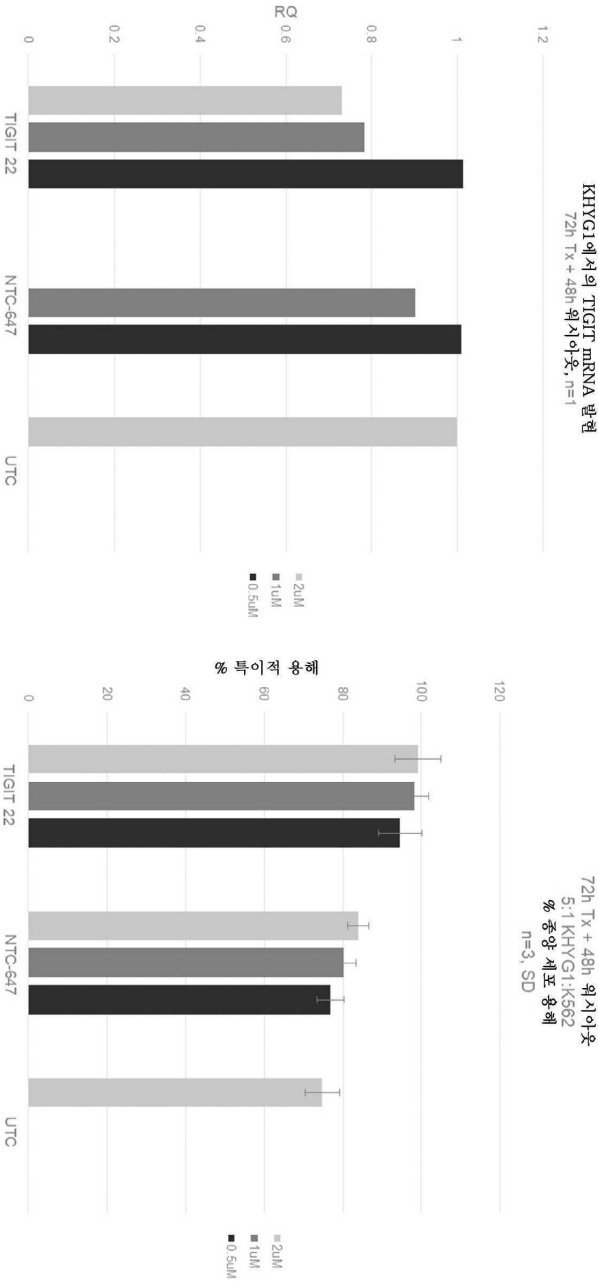
의도된다. 특히 문헌을 비롯한 모든 참고문헌은 그 전문이 참조로 포함된다.

## 도면

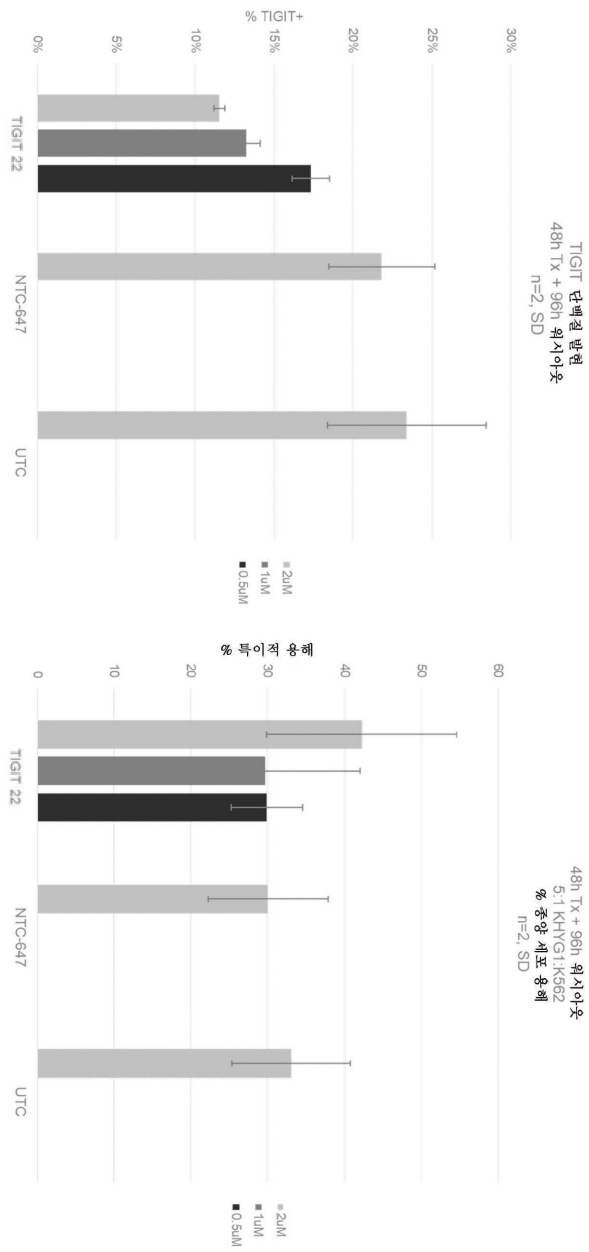
### 도면1



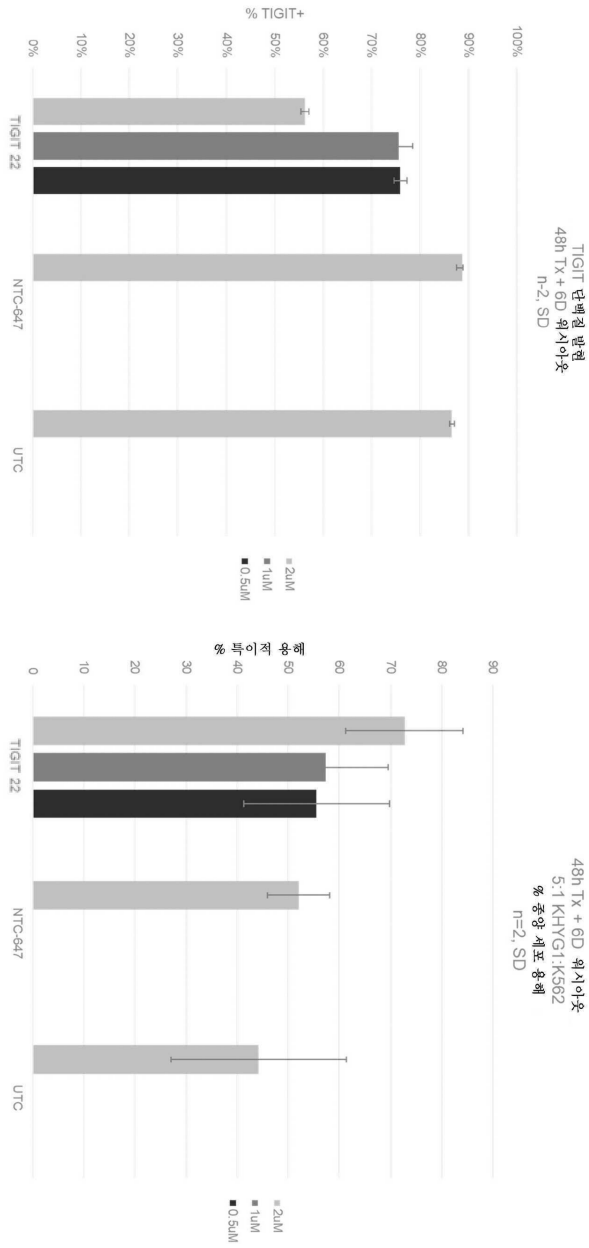
도면2



도면3



도면4



## 서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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