(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월04일
(11) 등록번호 10-2759742
(24) 등록일자 2025년01월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 7/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1137 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0080886
(22) 출원일자 2023년06월23일
심사청구일자 2024년03월08일
(65) 공개번호 10-2024-0002200
(43) 공개일자 2024년01월04일
(30) 우선권주장
63/355,210 2022년06월24일 미국(US)
22209113.4 2022년11월23일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
KR102234623 B1*
WO2016100401 A1
WO2019006375 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
노보 노르디스크 에이/에스
덴마크 박스베르트 (우편번호 디케이-2880) 노보 알레 1
다이서나 파마수이티컬, 인크.
미국 02421 메사추세츠주 렉싱턴 헤이든 애비뉴 75
(72) 발명자
블루아 안나 린다
덴마크 2880 박스베르트 노보 알레 1
프리스트 크리스티나 마리
덴마크 2880 박스베르트 노보 알레 1
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

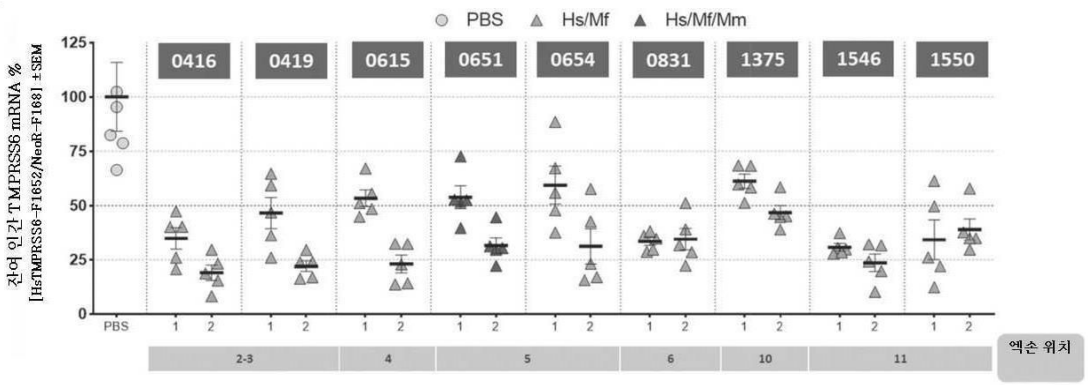
전체 청구항 수 : 총 18 항 심사관 : 정이든

(54) 발명의 명칭 **막관통 세린 프로테아제 6(TMPRSS6) 발현을 억제하기 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

TMPRSS6 발현을 억제하는 올리고뉴클레오티드가 본원에 제공된다. 또한, 이를 포함하는 조성물 및 이의 용도, 특히 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 및/또는 병태의 치료와 관련된 용도가 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2024.01)
A61P 7/00 (2018.01)
C12N 2310/14 (2013.01)
C12N 2310/315 (2013.01)
C12N 2310/321 (2013.01)
C12N 2310/322 (2013.01)
(72) 발명자
박 지혜
덴마크 2880 박스바에르트 노보 알레 1
두덱 헨릭
덴마크 2880 박스바에르트 노보 알레 1

명 세 서

청구범위

청구항 1

막관통 세린 프로테아제 6(*TMPRSS6*) 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 이중체 영역을 형성하고, 센스 가닥은 서열번호 844에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고 안티센스 가닥은 서열번호 600에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

청구항 2

제1 항에 있어서, 센스 가닥은 서열번호 579에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 RNAi 올리고뉴클레오티드.

청구항 3

제1 항에 있어서, 3' 말단 근위의 센스 가닥은 S1-Lp-S2로 제시된 줄기-루프를 포함하며, S1은 S2에 상보성이고, Lp는 3 내지 5개 뉴클레오티드의 길이로 S1과 S2 사이에 루프를 형성하는 것을 특징으로 하는 RNAi 올리고뉴클레오티드.

청구항 4

제2 항에 있어서, 3' 말단 근위의 센스 가닥은 S1-Lp-S2로 제시된 줄기-루프를 포함하며, S1은 S2에 상보성이고, Lp는 4개 뉴클레오티드의 길이로 S1과 S2 사이에 루프를 형성하는 것을 특징으로 하는 RNAi 올리고뉴클레오티드.

청구항 5

제4 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 RNAi 올리고뉴클레오티드.

청구항 6

제4 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 모든 뉴클레오티드는 변형되고, 각각의 변형된 뉴클레오티드는 2'-플루오로 또는 2'-O-메틸인 것을 특징으로 하는 RNAi 올리고뉴클레오티드.

청구항 7

제6 항에 있어서,

센스 가닥은 36개의 뉴클레오티드를 포함하고 안티센스 가닥은 22개의 뉴클레오티드를 포함하며, 각각의 가닥의 뉴클레오티드는 5'에서 3'로 번호가 매겨지고;

센스 가닥의 위치 1-7, 12-27, 및 31-36, 및 안티센스 가닥의 위치 1, 6, 8, 9, 11-13, 및 15-22 모두는 2'-O-메틸(2'-OMe) 변형을 포함하고;

센스 가닥의 위치 8-11, 및 안티센스 가닥의 위치 2, 3, 4, 5, 7, 10 및 14 모두는 2'-플루오로(2'-F) 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 RNAi 올리고뉴클레오티드.

청구항 8

제4 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 적어도 하나의 뉴클레오티드는 하나 이상의 표적화 리간드에 접합되는 것을 특징으로 하는 RNAi 올리고뉴클레오티드.

청구항 9

제8 항에 있어서, 각각의 표적화 리간드는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티를 포함하는 것을 특징으로 하

는 RNAi 올리고뉴클레오티드.

청구항 10

제9 항에 있어서, 루프 Lp의 5'에서 3'까지의 제2, 제3 및 제4 뉴클레오티드는 각각 1가 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티에 접합되는 것을 특징으로 하는 RNAi 올리고뉴클레오티드.

청구항 11

제4 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 포스포로티오에이트 결합을 포함하는 것을 특징으로 하는 RNAi 올리고뉴클레오티드.

청구항 12

제11 항에 있어서,

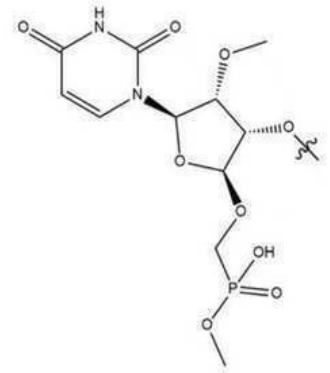
안티센스 가닥은 22개의 뉴클레오티드를 포함하고;

각각의 가닥의 뉴클레오티드는 5'에서 3'로 번호가 매겨지고;

센스 가닥의 위치 1과 2 사이, 및 안티센스 가닥의 위치 1과 2 사이, 위치 2와 3 사이, 위치 3과 4 사이, 위치 20과 21 사이, 및 위치 21과 22 사이에는 포스포로티오에이트 결합이 제공되는 것을 특징으로 하는 RNAi 올리고뉴클레오티드.

청구항 13

제4 항에 있어서, 안티센스 가닥의 5'-말단 뉴클레오티드는 하기 화학식 1a (Me포스포네이트-4O-mU)에 따른 구조를 포함하는 것을 특징으로 하는 RNAi 올리고뉴클레오티드



.

청구항 14

제4 항에 있어서, 안티센스 가닥은 5'-GG-3'의 3' 오버행을 포함하는 것을 특징으로 하는 RNAi 올리고뉴클레오티드.

청구항 15

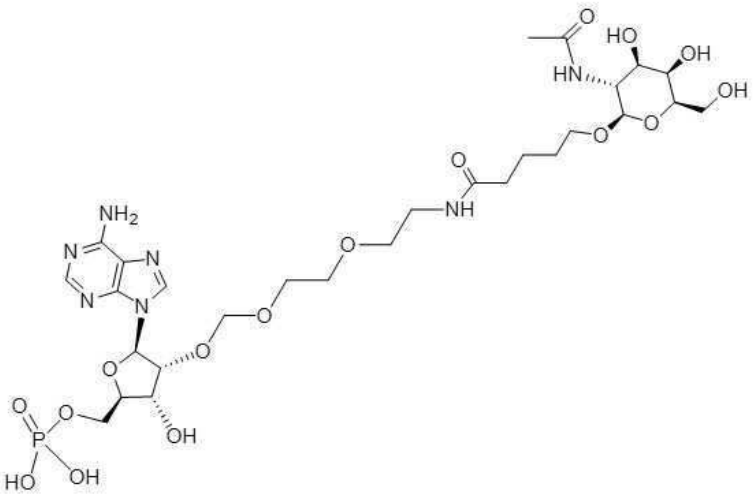
TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며,

센스 가닥은 5'-[mGs][mG][mU][mG][mC][mU][mA][fC][fU][fC][fU][mG][mG][mU][mA][mU][mU][mU][mC][mA][mG][mC]

[mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 621)의 서열 및 이의 모든 변형을 포함하고,

안티센스 가닥은 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fGs][fAs][fA][fA][mU][fA][mC][mC][fA][mG][mA][mG][fU][mA][mG][mC][mA][mC][mCs][mGs][mG]-3' (서열번호 642)의 서열 및 이의 모든 변형을 포함하며, mC, mA, mG, mU=2'-OMe 리보뉴클레오시드이고; fA, fC, fG,

fU=2'F 리보뉴클레오시드이고; s=포스포로티오에이트이고, ademA-GalNAc =



인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

청구항 16

제1 항 내지 제15 항 중 어느 한 항에 따른 RNAi 올리고뉴클레오티드, 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 전달제 또는 부형제를 포함하는, 혈색소 침착증 또는 베타-지중해빈혈의 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물.

청구항 17

제16 항에 있어서, 혈색소 침착증은 유전성 혈색소 침착증인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 18

제16 항에 따른 약학적 조성물을 포함하는 의약.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] *TMPRSS6* 발현을 억제하는 올리고뉴클레오티드가 본원에 제공된다.

배 경 기 술

[0002] 철은 모든 살아있는 유기체의 생물학적으로 필수적인 성분인 미량 영양소이다. 이는 적절한 적혈구생성 기능, 산화 대사, 세포 면역 반응, 및 수많은 다른 세포 과정에 필요하다. 유리 형태에서, 철은 산화-환원 반응에 관여함으로써, 기관 손상을 초래할 수 있는 산화성 스트레스인 유리 라디칼의 형성을 초래한다. 살아있는 유기체는 세포막 및 생물학적 유체를 통해 유리 철을 수송하고, 이를 무독성의 용이하게 이동 가능한 형태로 저장하여 철 독성을 회피하는 단백질 시스템을 개발해 왔다. 인간 신체에서, 철은 주로 헴(hem) 화합물, 헴 효소, 또는 비-헴 화합물로서 단백질에 결합된 복잡한 형태로 존재한다. 철 흡수는 2가 금속 수송 1에 의해, 장세포에 의해 발생하고, 십이지장 및 상부 공장(jejunum) 내에서 발생한다. 그런 다음, 철은 십이지장 점막을 가로질러 혈액 내로 전달되고, 여기에서 이러한 철은 트랜스페린에 의해, 적혈구생성을 위해 세포 또는 골수로 수송된다. 철은 다수의 다양한 세포 기능에 필요하기 때문에, 철 항상성을 유지하기 위해서는 철의 흡수, 수송, 보관 및 이용 간의 일정한 균형이 요구된다. 헵시딘은 *HAMP* 유전자에 의해 암호화된 순환 펩티드 호르몬으로서, 철 항상성을 유지하는 데 중요한 역할을 하는 간에 의해 분비된다. 헵시딘 발현은 철 섭취의 변화에 의해 직접적으로 조절되고, 그의 억제는 생체이용 가능한 혈청 철 수치의 증가를 초래한다. 헵시딘은 식단으로부터 철을 흡수하는 십이지장 장세포의 세포막에 국소화된 주요 철 방출체인 페로포르틴, 및 막상 적혈구로부터 철을 재활용하는 대식세포에 직접 결합함으로써, 혈장으로의 철 플럭스를 차단한다. 페로포르틴에 대한 헵시딘 결합은 그의 내재화 및 후속 리소좀 분해를 유발하여, 순환계로의 철 방출을 차단한다. 간 헵시딘 발현은 염증(염증성 사이토카인) 및 높은 혈청 철 수치는 헵시딘 상향조절을 초래하는 3개의 독립적인 경로에 의해 조절되는 반면, 적혈구 생성에

대한 높은 철 수요를 촉진하는 상승된 적혈구생성에 의해 하향조절된다. 이와 달리 헵시딘 수치가 높은 경우, 혈청 철 수치는 감소하여 빈혈을 초래할 수 있다. 헵시딘 수치가 낮은 경우, 혈색소 침착증과 같은 질환 상태에서, 철 수치가 상승하고 과부하가 발생할 수 있다.

[0003] 병리학적 상황에서, 헵시딘의 장기간 억제는 종종 혈장 철-감지 신호전달 경로에서의 기능 상실(예를 들어, 유전성 혈색소 침착증)의 결과로서의 헵시딘의 기능 부전 발현으로 인해 일차 철 과부하를 초래한다. 상승된 기능 장애성 적혈구생성(예를 들어, 베타 지중해빈혈)의 상황에서, 헵시딘은 하향조절되어 이차 철 과부하를 초래한다. 일차 및 이차 철 과부하의 병태생리학적 결과는 공통적이며, 이로 인해 유리 혈장 철이 축적되고, 장기에 축적되어 질병 진행 시 손상을 초래하게 된다.

[0004] TMPRSS6(막관통 프로테아제, 세린 6)은 II형 세린 프로테아제를 암호화하고, 주로 간에서 발현된다. TMPRSS6은 철 결핍에 의해 촉발되는 막관통 신호전달 경로에 참여하고 헵시딘을 암호화하는 유전자인 *HAMP* 활성화의 다양한 경로를 억제한다.

[0005] 연구에 따르면, β-지중해빈혈 인터미디어 및 유전성 혈색소 침착증의 마우스 모델에서, 헵시딘의 상향조절은 비정상적인 적혈구생성을 개선하고 철 과부하를 예방하거나 제한한다(Gardenghi 등, **J. Clin. Invest.**, 2010; Guo 등, **J. Clin. Invest.**, 2013, Schmidt 등, **Blood** 2013; Casu 등, **Blood** 2016; Ramos 등, **Blood** 2012). HFE 연관 유전성 혈색소 침착증은 가장 흔한 유형의 유전적 철 과부하 장애이며, 북유럽 모집단에서 p.C282Y 돌연변이의 높은 유병률을 갖는다(Alexander 및 Kowdley, **Genetics in Medicine**, 2009). 간에서의 헵시딘 생성 손상은 HFE 연관 혈색소 침착증에서 철 과부하를 초래하는 것으로 여겨진다. 이러한 맥락에서, 철 과부하는 종종 간경화증 및 당뇨병과 같은 합병증뿐만 아니라 다른 영향을 받은 기관의 부전을 초래한다.

[0006] 헵시딘 발현을 억제함에 있어서의 그 역할과 일관되게, TMPRSS6에서의 돌연변이는 철-불응성, 철-결핍 빈혈과 같은 질환을 초래한다. 헵시딘 발현은 TMPRSS6 -/- 마우스에서 상당히 상승되며, Hfe-/- 마우스에서의 TMPRSS6의 감소는 철 과부하 표현형을 개선할 수 있다(Du 등, **Science** 2008; Folgueras 등, **Blood** 2008; Finberg KE 등, **Blood**, 2011).

[0007] 이러한 증거는 철 과부하와 관련된 질환의 치료에서 TMPRSS6 표적화의 역할을 시사한다. 이러한 질환에 대한 현재의 치료 방법은 제한적이다. 따라서, 철 과부하와 관련된 장애의 효과적인 치료를 위한 방법이 현재 필요하며, 본 발명은 이러한 요구를 해결한다.

발명의 내용

[0008] 본 개시는, 부분적으로, 시험관 내 및 생체 내에서 *TMPRSS6* 발현을 감소시키는 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)의 발견에 기초한다. *TMPRSS6*의 비정상적인 발현은 변경된 *헵시딘* 발현 및 혈청 철 수치와 관련이 있는 것으로 밝혀졌다. 본원에서 입증된 바와 같이, *TMPRSS6* RNAi 올리고뉴클레오티드의 투여 후, 혈청 철 및 혈청 철 포화도는 생체 내에서 감소된다. 이론에 구속되지 않고, *TMPRSS6*의 억제는 헵시딘 발현을 증가시키고, 이에 후속하여 철 과부하를 방지하는 혈청 철 수치를 감소시킨다. 따라서, 이론에 구속되지 않고, *TMPRSS6*을 표적화하는 올리고뉴클레오티드는 헵시딘 결핍 또는 억제와 관련된 질환 또는 장애를 치료하는 데 유용하다.

[0009] 따라서, 일부 양태에서, 본 개시는 막관통 세린 프로테아제 6(*TMPRSS6*) 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 이중체 영역을 형성하고, 여기에서 안티센스 가닥은 서열번호 661 내지 852 중 어느 하나의 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상보성 영역은 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드 길이이다.

[0010] 일부 구현예에서, 센스 가닥은 15 내지 50개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 18 내지 36개 뉴클레오티드 길이이다.

[0011] 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 15 내지 30개 뉴클레오티드 길이이다.

[0012] 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 22개 뉴클레오티드 길이이되, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 적어도 19개 뉴클레오티드 길이, 선택적으로 적어도 20개 뉴클레오티드 길이의 이중체 영역을 형성한다. 일부 구현예에서, 상보성 영역은 적어도 19개의 연속적인 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 상보성 영역은 적어도 20개의 연속적인 뉴클레오티드 길이이다.

[0013] 일부 양태에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 이중 가닥 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는:

[0014] (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 상기 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하되, 상기 상보성 영역은 서열번호 1 내지 192로부터 선택되는, 안티센스 가닥, 및

[0015] (ii) 안티센스 가닥에 대해 상보성 영역을 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함하되, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0016] 일부 양태에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 이중 가닥 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는:

[0017] (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 서열번호 1 내지 192로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하되, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 상보성인, 안티센스 가닥, 및

[0018] (ii) 안티센스 가닥에 대해 상보성 영역을 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함하되, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0019] 일부 구현예에서, 센스 가닥의 3' 말단은 S1-Lp-S2로 제시된 줄기-루프를 포함하되, S1은 S2에 상보성이고, 여기에서 Lp는 3 내지 5개 뉴클레오티드의 길이로 S1과 S2 사이에 루프를 형성한다. 일부 구현예에서, Lp는 트리루프 또는 테트라루프이다. 일부 구현예에서, Lp는 테트라루프이다. 일부 구현예에서, 테트라루프는 서열 5'-GAAA-3'을 포함한다. 일부 구현예에서, S1 및 S2는 1 내지 10개 뉴클레오티드 길이이고 동일한 길이를 갖는다. 일부 구현예에서, S1 및 S2는 1개 뉴클레오티드, 2개 뉴클레오티드, 3개 뉴클레오티드, 4개 뉴클레오티드, 5개 뉴클레오티드, 6개 뉴클레오티드, 7개 뉴클레오티드, 8개 뉴클레오티드, 9개 뉴클레오티드, 또는 10개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, S1 및 S2는 6개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 줄기-루프는 서열 5'-GCAGCCGAAAGGCUGC-3' (서열번호 856)을 포함한다.

[0020] 일부 구현예에서, 센스 가닥의 3' 말단에 근위인 센스 가닥은 S1-Lp-S2로 제시된 줄기-루프를 포함하되, S1은 S2에 상보성이고, 여기에서 Lp는 3 내지 5개 뉴클레오티드의 길이로 S1과 S2 사이에 루프를 형성한다. 일부 구현예에서, Lp는 트리루프 또는 테트라루프이다. 일부 구현예에서, Lp는 테트라루프이다. 일부 구현예에서, 테트라루프는 서열 5'-GAAA-3'을 포함한다. 일부 구현예에서, S1 및 S2는 1 내지 10개 뉴클레오티드 길이이고 동일한 길이를 갖는다. 일부 구현예에서, S1 및 S2는 1개 뉴클레오티드, 2개 뉴클레오티드, 3개 뉴클레오티드, 4개 뉴클레오티드, 5개 뉴클레오티드, 6개 뉴클레오티드, 7개 뉴클레오티드, 8개 뉴클레오티드, 9개 뉴클레오티드, 또는 10개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, S1 및 S2는 6개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 줄기-루프는 서열 5'-GCAGCCGAAAGGCUGC-3' (서열번호 856)을 포함한다.

[0021] 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 하나 이상의 뉴클레오티드 길이의 3'-오버행 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 오버행은 퓨린 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 3' 오버행 서열은 2개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3' 오버행은 AA, GG, AG, 및 GA로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 오버행은 GG 또는 AA이다. 일부 구현예에서, 오버행은 GG이다.

[0022] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 2'-변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 2'-변형은 2,-아미노에틸, 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸, 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산으로부터 선택되는 변형이다. 일부 구현예에서, 변형은 2'-플루오로 및 2'-O-메틸로부터 선택되는 2'-변형이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥의 뉴클레오티드의 약 10 내지 15%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 또는 15%는 2'-플루오로 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 뉴클레오티드의 약 25 내지 35%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34% 또는 35%는 2'-플루오로 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드의 약 25 내지 35%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34% 또는 35%는 2'-플루오로 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 5'에서 3'까지 위치 1 내지 36을 갖는 36개 뉴클레오티드를 포함하되, 위치 8 내지 11은 2'-플루오로 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 5'에서 3'까지 위치 1 내지 22를 갖는 22개 뉴클레오티드를 포함하되, 위치 2, 3, 4, 5, 7, 10 및 14는 2'-플루오로 변형을 포함한다.

[0023] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드간 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 (i) 위치 1과 2 사이, 및 위치 2와 3 사이; 또는 (ii) 위치 1과 2 사이, 위치 2와 3 사이, 및 위치 3과 4 사이의 포스포로티오에이트 결합을 포함하되, 위치는 5'에서 3'까지 1 내지 4로 번호가 매겨진다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 22개 뉴클레오티드 길이이되, 안티센스 가닥은 위치 20과 21 사이 및 위치 21과 22 사이의 포스포로티오에이트 결합을 포함하며, 여기에서 위치는 5'에서 3'까지 1 내지 22로 번호가 매겨진다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 22개 뉴클레오티드 길이이되, 안티센스 가닥은 위치 1과 2 사이, 위치 2와 3 사이, 위치 3과 4 사이, 위치 20과 21 사이, 및 위치 21과 22 사이의 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 위치 1과 2 사이의 포스포로티오에이트 결합을 포함하되, 위치는 5'에서 3'까지 번호가 매겨진다.

[0024] 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오티드의 당의 4'-탄소는 포스페이트 유사체를 포함한다. 일부 구현예에서, 포스페이트 유사체는, 옥시메틸 포스포네이트, 비닐 포스포네이트, 또는 말로닐 포스포네이트이되, 선택적으로 포스페이트 유사체는 4'-옥시메틸포스포네이트를 포함하는 4'-포스페이트 유사체이다.

[0025] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 적어도 하나의 뉴클레오티드는 하나 이상의 표적화 리간드에 접합된다. 일부 구현예에서, 각각의 표적화 리간드는 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 또는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기 루프는 줄기 루프의 하나 이상의 뉴클레오티드에 접합된 하나 이상의 표적화 리간드를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 표적화 리간드는 루프의 하나 이상의 뉴클레오티드에 접합된다. 일부 구현예에서, 루프는 5'에서 3'까지 1 내지 4로 번호가 매겨지는 4개의 뉴클레오티드를 포함하되, 위치 2, 3 및 4에서의 뉴클레오티드는 각각 하나 이상의 표적화 리간드를 포함하고, 여기에서 표적화 리간드는 동일하거나 상이하다. 일부 구현예에서, 각각의 표적화 리간드는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, GalNAc 모이어티는 1가 GalNAc 모이어티, 2가 GalNAc 모이어티, 3가 GalNAc 모이어티 또는 4가 GalNAc 모이어티이다. 일부 구현예에서, 줄기-루프의 Lp의 최대 4개의 뉴클레오티드는 각각 1가 GalNAc 모이어티에 접합된다.

[0026] 일부 구현예에서, 상보성 영역은 mRNA 표적 서열에 대해 전체적으로 상보성이다. 일부 구현예에서, 상보성 영역은 mRNA 표적 서열에 대해 부분적으로 상보성이다. 일부 구현예에서, 상보성 영역은 mRNA 표적 서열에 대해 4개 이하의 불일치를 포함한다.

[0027] 일부 구현예에서, 상보성 영역은 안티센스 가닥의 뉴클레오티드 위치 2 내지 8에서 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 완전히 상보성이고, 여기에서 뉴클레오티드 위치는 5'에서 3'로 번호가 매겨진다. 일부 구현예에서, 상보성 영역은 안티센스 가닥의 뉴클레오티드 위치 2 내지 11에서 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 완전히 상보성이고, 여기에서 뉴클레오티드 위치는 5'에서 3'로 번호가 매겨진다.

[0028] 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 579-580, 585-587, 590 및 595-597 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 서열번호 600-601, 606-608, 611 및 616-618 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0029] 일부 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0030] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0031] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0032] c) 각각 서열번호 595 및 616;

[0033] d) 각각 서열번호 590 및 611;

[0034] e) 각각 서열번호 596 및 617;

[0035] f) 각각 서열번호 597 및 618;

[0036] g) 각각 서열번호 585 및 606;

[0037] h) 각각 서열번호 586 및 607; 및

[0038] i) 각각 서열번호 587 및 608.

[0039] 일부 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0040] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0041] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0042] c) 각각 서열번호 590 및 611;

[0043] d) 각각 서열번호 597 및 618; 및

[0044] e) 각각 서열번호 586 및 607.

[0045] 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 579에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 600에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 580에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 601에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 590에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 611에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 597에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 618에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 586에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 607에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0046] 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 22개 뉴클레오티드 길이이다.

[0047] 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 서열번호 600-601, 606-608, 611 및 616-618 로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0048] 일부 구현예에서, 센스 가닥은 36개 뉴클레오티드 길이이다.

[0049] 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 579-580, 585-587, 590 및 595-597로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0050] 일부 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0051] a) 각각 서열번호 621 및 642;

[0052] b) 각각 서열번호 622 및 643;

[0053] c) 각각 서열번호 637 및 658;

[0054] d) 각각 서열번호 632 및 653;

[0055] e) 각각 서열번호 638 및 659;

[0056] f) 각각 서열번호 639 및 660;

[0057] g) 각각 서열번호 627 및 648;

[0058] h) 각각 서열번호 628 및 649; 및

[0059] i) 각각 서열번호 629 및 650.

[0060] 일부 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0061] a) 각각 서열번호 621 및 642;

[0062] b) 각각 서열번호 622 및 643;

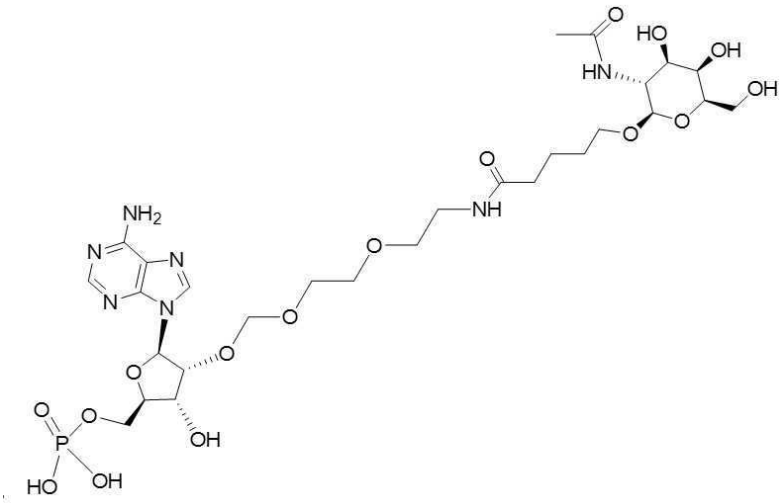
[0063] c) 각각 서열번호 632 및 653;

[0064] d) 각각 서열번호 639 및 660; 및

[0065] e) 각각 서열번호 628 및 649.

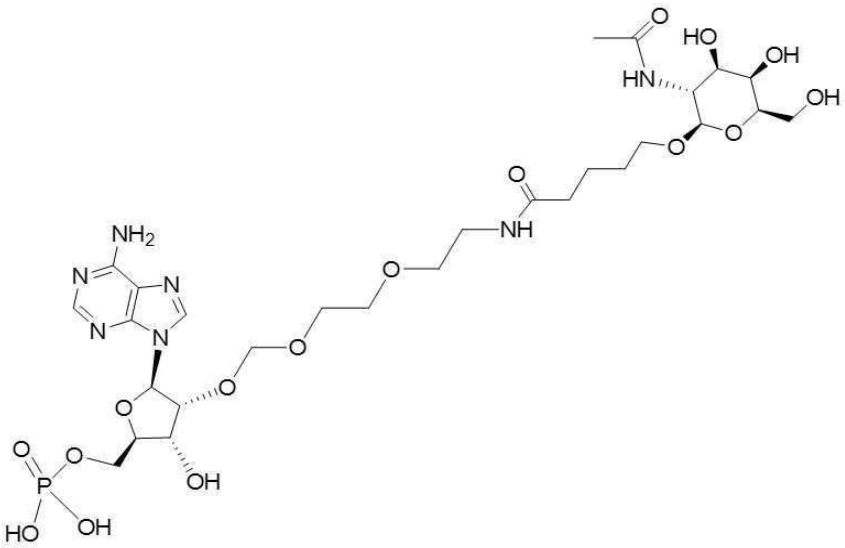
[0066] 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 621에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 642에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 622에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 643에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 632에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 653에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 639에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 660에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 628에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 649에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0067] 일부 양태에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥은 서열 5'-[mGs][mG][mU][mG][mC][mU][mA][fC][fU][fC][fU][mG][mG][mU][mA][mU][mU][mU][mC][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 621) 및 이의 모든 변형을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fGs][fAs][fA][fA][mU][fA][mC][mC][fA][mG][mA][mG][fU][mA][mG][mC][mA][mC][mCs][mGs][mG]-3' (서열번호 642), 및 이의 모든 변형을 포함하며, 여기에서, mC, mA, mG, mU = 2'-OMe 리보뉴클레오시드이고; fA, fC, fG, fU = 2'-F 리보뉴클레오시드이고; s = 포스포로티오에이트이되, ademA-GalNAc =



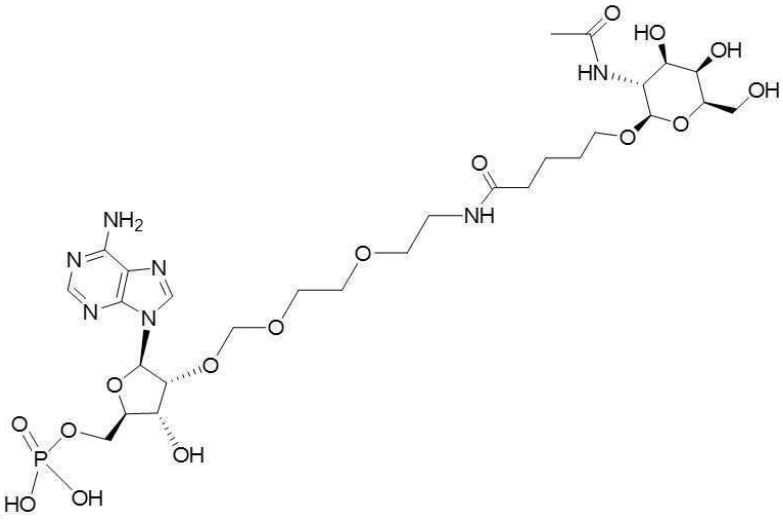
[0068] 이다.

[0069] 일부 양태에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함함하되, 센스 가닥은 서열 5'-[mGs][mC][mU][mA][mC][mU][mC][fU][fG][fG][fU][mA][mU][mU][mU][mC][mC][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 622) 및 이의 모든 변형을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fUs][fAs][fG][fG][mA][fA][mA][mU][fA][mC][mC][mA][fG][mA][mG][mU][mA][mG][mCs][mGs][mG]- 3'(서열번호 643), 및 이의 모든 변형을 포함하며, 여기에서, mC, mA, mG, mU = 2'-OMe 리보뉴클레오시드이고; fA, fC, fG, fU = 2'-F 리보뉴클레오시드이고; s = 포스포로티오에이트이되, ademA-GalNAc =



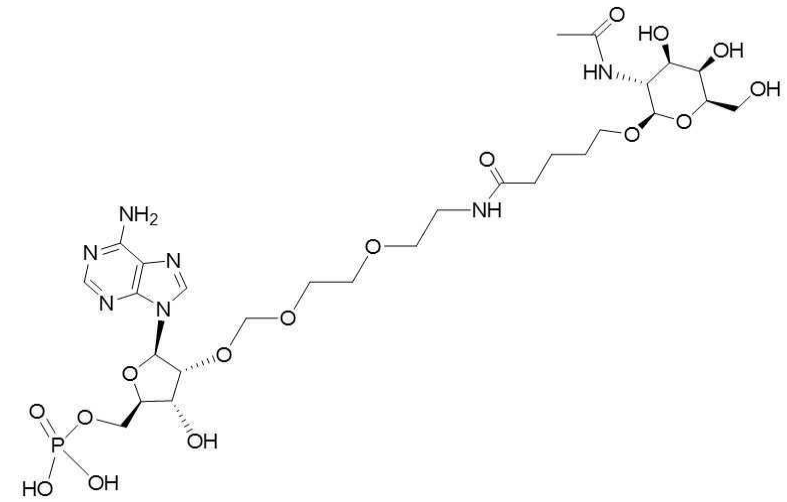
[0070] 이다.

[0071] 일부 양태에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함함하되, 센스 가닥은 서열 5'-[mCs][mU][mC][mA][mC][mC][mU][fG][fC][fU][fU][mC][mU][mU][mC][mU][mG][mG][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 632) 및 이의 모든 변형을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fAs][fCs][fC][fA][mG][fA][mA][mG][fA][mA][mG][mC][fA][mG][mG][mU][mG][mA][mGs][mGs][mG]-3' (서열번호 653), 및 이의 모든 변형을 포함하며, 여기에서, mC, mA, mG, mU = 2'-OMe 리보뉴클레오시드이고; fA, fC, fG, fU = 2'-F 리보뉴클레오시드이고; s = 포스포로티오에이트이되, ademA-GalNAc =



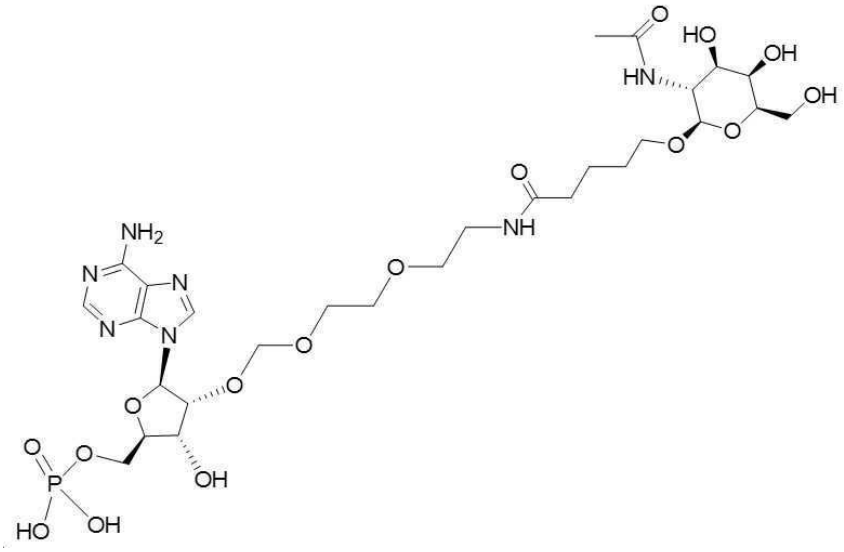
[0072] 이다.

[0073] 일부 양태에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함함하되, 센스 가닥은 서열 5'-[mAs][mG][mU][mG][mU][mG][mA][fA][fA][fG][fA][mC][mA][mU][mA][mG][mC][mU][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 639) 및 이의 모든 변형을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fCs][fAs][fG][fC][mU][fA][mU][mG][fU][mC][mU][mU][fU][mC][mA][mC][mA][mC][mUs][mGs][mG]-3' (서열번호 660), 및 이의 모든 변형을 포함하며, 여기에서, mC, mA, mG, mU = 2'-OMe 리보뉴클레오시드이고; fA, fC, fG, fU = 2'-F 리보뉴클레오시드이고; s = 포스포로티오에이트이되, ademA-GalNAc =



[0074] 이다.

[0075] 일부 양태에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥은 서열 5'--[mGs][mG][mG][mU][mG][mC][mA][fC][fU][fA][fU][mG][mG][mC][mU][mU][mG][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 628) 및 이의 모든 변형을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fUs][fAs][fC][fA][mA][fG][mC][mC][fA][mU][mA][mG][fU][mG][mC][mA][mC][mC][mCs][mGs][mG] -3' (서열번호 649), 및 이의 모든 변형을 포함하며, 여기에서, mC, mA, mG, mU = 2'-OMe 리보뉴클레오시드이고; fA, fC, fG, fU = 2'-F 리보뉴클레오시드이고; s = 포스포로티오에이트이되, ademA-GalNAc =



[0076] 이다.

[0077] 일부 양태에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥은 서열번호 621을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 642를 포함하며, 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사물에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 RNAi는 도 14a에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태이다.

[0078] 일부 양태에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥은 서열번호 632를 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 653을 포함하며, 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사물에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 RNAi는 도 14b에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태이다.

[0079] 일부 양태에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥은 서열번호 639를 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 660을 포함하며, 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사물에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기

RNAi는 도 14c에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태이다.

[0080] 일부 양태에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥은 서열번호 628을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 649를 포함하며, 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사물에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 RNAi는 도 14d에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태이다.

[0081] 일부 양태에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥은 서열번호 621을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 642를 포함하며, 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사물에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 RNAi는 도 10a-b에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태이다.

[0082] 일부 양태에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥은 서열번호 632를 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 653을 포함하며, 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사물에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 RNAi는 도 11a-b에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태이다.

[0083] 일부 양태에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥은 서열번호 639를 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 660을 포함하며, 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사물에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 RNAi는 도 12a-b에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태이다.

[0084] 일부 양태에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥은 서열번호 628을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 649를 포함하며, 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사물에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 RNAi는 도 13a-b에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태이다.

[0085] 일부 구현예에서, 본 개시는 본원에 기술된 RNAi 올리고뉴클레오티드 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 전달제 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0086] 일부 구현예에서, 본 개시는 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공하며, 방법은, 본원에 기술된 바와 같은 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적 조성물의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 이에 의해 대상체를 치료한다. 일부 구현예에서, 헵시딘 발현은 RNAi 올리고뉴클레오티드를 투여한 후 증가된다. 일부 구현예에서, 혈청 내 철 포화도 수치는 RNAi 올리고뉴클레오티드의 투여 후 감소된다. 일부 구현예에서, 혈청 철 수치는 RNAi 올리고뉴클레오티드를 투여한 후 감소된다.

[0087] 일부 구현예에서, 본 개시는 올리고뉴클레오티드를 대상체에게 전달하는 방법을 제공하며, 방법은 본원에 개시된 바와 같은 약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0088] 일부 구현예에서, 본 개시는 세포, 세포 집단 또는 대상체에서 *TMPRSS6* 발현을 감소시키는 방법을 제공하며, 방법은 다음의 단계를 포함한다:

[0089] i. 세포 또는 세포 집단을 본원에 기술된 RNAi 올리고뉴클레오티드, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물과 접촉시키는 단계; 또는

[0090] ii. 본원에 기술된 RNAi 올리고뉴클레오티드, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계.

[0091] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키는 단계는 *TMPRSS6* mRNA의 양 또는 수치, 마트립타아제-2 단백질의 양 또는 수치, 또는 둘 모두를 감소시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키면 헵시딘 생성이 증가한다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키면 혈청 철 수치가 감소한다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키면 혈청 철 포화도가 감소한다.

[0092] 일부 구현예에서, 대상체는 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 갖는다. 일부 구현예에서, 헵시딘 결핍과 관련된 질환, 장애 또는 병태는 혈색소 침착증 또는 베타-지중해빈혈이다. 일부 구현예에서, 헵시딘 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태는 진성 적혈구증가증이다.

[0093] 일부 구현예에서. RNAi 올리고뉴클레오티드, 또는 약학적 조성물은 제2 조성물 또는 치료제와 조합하여 투여된다.

[0094] 일부 구현예에서, 본 개시는 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태의 치료, 선택적으로 혈색소침착증(예를 들어, 유전성 혈색소 침착증), 진성 적혈구증가증 또는 베타-지중해빈혈의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서의, 본원에 기술된 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 약학적 조성물의 용도를 제공한다.

[0095] 일부 구현예에서, 본 개시는 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태의 치료, 선택적으로 혈색소침착증(예를 들어, 유전성 혈색소 침착증), 진성 적혈구증가증 또는 베타-지중해빈혈의 치료에 사용하기 위한, 또는 사용에 적합한, 본원에 기술된 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 약학적 조성물을 제공한다.

[0096] 일부 구현예에서. 본 개시는, 본원에 개시된 헵시틴 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체에게 투여하기 위한, RNAi 올리고뉴클레오티드, 선택적인 약학적으로 허용 가능한 담체, 및 지침을 포함하는 패키지 첨부물을 포함하는 키트를 제공한다.

[0097] 일부 구현예에서, 본 개시는, 사용을 위한, 또는 사용에 적합한, 본원에 기술된 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 약학적 조성물, 또는 키트를 제공하며, 여기에서 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태는 혈색소 침착증(예를 들어, 유전성 혈색소 침착증), 진성 적혈구증가증 또는 베타-지중해빈혈이다.

도면의 간단한 설명

[0098] **도 1a** 및 **도 1b**는 GalNAc-접합된 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드로 치료한 후, 인간 *TMPRSS6*을 외인성으로 발현하는 마우스의 간 중 잔여 인간 *TMPRSS6* mRNA의 백분율(%)을 나타내는 그래프(수력학적 주입 모델)를 제공한다. PBS 중 제형화된 1 mg/kg 또는 2 mg/kg의 표시된 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드를 CD-1 마우스에게 피하 투여하였다. 투여 후 4일차 마우스에게 인간 *TMPRSS6*을 암호화하는 DNA 플라스미드를 수력학적으로 주사(HDI)하였다. 인간 *TMPRSS6* mRNA의 수치를 18시간 후에 수집된 간으로부터 3' qPCR 검정(**도 1a**) 및 5' qPCR 검정(**도 1b**)을 사용하여 결정하였다. Hs/Mf = 작제물은 인간 및 원숭이 *TMPRSS6* 특이적이고; Hs-Mf-Mm = 작제물은 인간, 원숭이 및 쥣과 *TMPRSS6* 특이적이다.

도 2는 **도 1a-1b**의 마우스 간 중 잔여 쥣과 *TMPRSS6* mRNA의 백분율(%)를 나타내는 그래프를 제공한다.

도 3a-3d는 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드 -0416(**도 3a**), -0651(**도 3b**), -0831(**도 3c**), 및 -1546(**도 3d**)의 변형 패턴을 도시하는 개략도를 제공한다. 센스 가닥은 36-뉴클레오티드 가닥의 뉴클레오티드 27-30개의 테트라루프 구조를 포함한다. 안티센스 가닥은 상보성이며 2-뉴클레오티드 오버행을 포함한다.

도 4a-4f는 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드로 치료한 후, NHP(비-인간 영장류)의 간 중 잔여 내인성 원숭이 *TMPRSS6* mRNA의 백분율(%)을 나타내는 그래프를 제공한다. PBS 중 제형화된 1 mg/kg 또는 4 mg/kg의 표시된 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드를 마카카 원숭이(*Macaca fascicularis*)에게 0, 28, 56, 84 및 112일차에 피하 투여하였다. 간 샘플은 -7일차(투여 1주 전)(**도 4a**); 28일차(**도 4b**); 56일차(**도 4c**); 84일차(**도 4d**); 112일차(**도 4e**); 및 168일차(**도 4f**)에 채취하고, 원숭이 *TMPRSS6* mRNA의 수치를 PBS로 치료한 동물에 대한 qPCR 검정을 사용하여 결정하였다.

도 5a-5f는 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드로 치료한 후, NHP(비-인간 영장류)의 간 중 잔여 내인성 원숭이 *헵시딘* mRNA의 백분율(%)을 나타내는 그래프를 제공한다. PBS 중 제형화된 1 mg/kg 또는 4 mg/kg의 표시된 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드를 마카카 원숭이(*Macaca fascicularis*)에게 0, 28, 56, 84 및 112일차에 피하 투여하였다. 간 샘플을 -7일차(투여 1주 전)(**도 5a**); 28일차(**도 5b**); 56일차(**도 5c**); 84일차(**도 5d**); 112일차(**도 5e**); 및 168일차(**도 5f**)에 채취하고, 원숭이 *헵시딘* mRNA의 수치를 PBS로 치료한 동물에 대한 qPCR 검정을 사용하여 결정하였다.

도 6a-6f는 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드로 치료한 후, 원숭이에서의 혈청 철 수치를 나타내는 그래프를 제공한다. PBS 중 제형화된 1 mg/kg 또는 4 mg/kg의 표시된 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드를 마카카 원숭이(*Macaca fascicularis*)에게 0, 28, 56, 84 및 112일차에 피하 투여하였다. 혈청 샘플을 -7일차(투여 1주 전)(**도 6a**); 28일차(**도 6b**); 56일차(**도 6c**); 84일차(**도 6d**); 112일차(**도 6e**); 및 168일차(**도 6f**)에 채취하고, 혈청 철 수치의 수치를 결정하였다.

도 7a-7b는, 1 mg/kg 및 4 mg/kg의 투여량 각각에 대해 PBS 대조군 치료된 동물과 비교하여 **도 6a-6f**에서 측정된 혈청 철 수치를 나타내는 그래프를 제공한다.

도 8a-8f는 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드로 치료한 후, 원숭이에서의 혈청 철 포화도 수치를 나타내는 그래프를 제공한다. PBS 중 제형화된 1 mg/kg 또는 4 mg/kg의 표시된 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오

티드를 마카카 원숭이(*Macaca fascicularis*)에게 0, 28, 56, 84 및 112일차에 피하 투여하였다. 혈청 샘플을 -7일차(투여 1주 전)(**도 8a**); 28일차(**도 8b**); 56일차(**도 8c**); 84일차(**도 8d**); 112일차(**도 8e**); 및 168일차(**도 8f**)에 채취하고, 혈청 철 포화도를 결정하였다.

도 9a-9b는, 1 mg/kg 및 4 mg/kg의 투여량 각각에 대해 PBS 대조군 치료된 동물과 비교하여 **도 8a-8f**에서 측정된 혈청 철 포화도를 나타내는 그래프를 제공한다.

도 10a-b는 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드 -0416의 화학적 연신을 제공하며, 여기에서 A 및 B는 도 10a와 도 10b 사이의 결합을 식별한다.

도 11a-b는 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드 -0651의 화학적 연신을 제공하며, 여기에서 A 및 B는 도 11a와 도 11b 사이의 결합을 식별한다.

도 12a-b는 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드 -0831의 화학적 연신을 제공하며, 여기에서 A 및 B는 도 12a와 도 12b 사이의 결합을 식별한다.

도 13a-b는 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드 -1546의 화학적 연신을 제공하며, 여기에서 A 및 B는 도 13a와 도 13b 사이의 결합을 식별한다.

도 14a-d는 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드 -0416(**도 14a**), -0651(**도 14b**), -0831(**도 14c**), 및 -1546(**도 14d**)의 화학식을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0099] 막관통 세린 프로테아제 6(TMPRSS6)은 세포의 표면에 위치한 II형 막관통 세린 프로테이나아제인 마트립타아제-2를 암호화한다. 마트립타아제-2 단백질은 헵시딘을 조절함으로써 철 항상성에 기능한다.

[0100] 일부 양태에 따르면, 본 개시는 간에서의 *TMPRSS6* 발현을 감소시키는 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)를 제공한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환을 치료하도록 설계된다. 일부 측면에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 세포(예를 들어, 간 중의 세포) 또는 기관(예를 들어, 간)에서 감소시킴으로써 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0101] ***TMPRSS6* 발현의 올리고뉴클레오티드 억제제**

[0102] *TMPRSS6 표적화 서열*

[0103] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 *TMPRSS6* mRNA를 포함하는 표적 서열에 표적화된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드는 *TMPRSS6* mRNA 서열 내의 표적 서열에 표적화된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드는 *TMPRSS6* mRNA 서열 내의 표적 서열에 상응한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드, 또는 이의 부분, 단편, 또는 가닥(예를 들어, 이중-가닥(ds) RNAi 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥 또는 가이드 가닥)은 *TMPRSS6* mRNA를 포함하는 표적 서열에 결합하거나 어닐링됨으로써, *TMPRSS6* 발현을 억제한다

[0104] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 생체 내 *TMPRSS6* 발현을 억제하기 위한 목적으로 *TMPRSS6* 표적 서열에 표적화된다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 표적 서열에 표적화된 올리고뉴클레오티드에 의한 *TMPRSS6* 발현의 억제 양 또는 정도는 올리고뉴클레오티드의 효능과 상관된다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 표적 서열에 표적화된 올리고뉴클레오티드에 의한 *TMPRSS6* 발현의 억제의 양 또는 정도는 올리고뉴클레오티드로 치료한 헵타딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 가진 대상체 또는 환자에서의 치료적 이익의 양 또는 정도와 상관된다.

[0105] 다수의 상이한 종(예를 들어, 인간, 시노몰구스 원숭이, 및 마우스; 예를 들어, 실시예 2 참조)의 mRNA를 포함하는, *TMPRSS6*을 암호화하는 mRNA의 뉴클레오티드 서열을 검사함으로써, 그리고 시험관 내 및 생체 내 시험(예를 들어, 실시예 2 내지 5 참조)의 결과로서, *TMPRSS6* mRNA의 특정 뉴클레오티드 서열은 올리고뉴클레오티드 기반 억제에 대해 다른 것보다 더 순응적이며, 따라서 본원의 올리고뉴클레오티드에 대한 표적 서열로서 유용하다는 것이 발견되었다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 표적 서열은 서열번호 661-852 중 어느 하나의 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 표적 서열은 서열번호 844, 841, 818, 794 또는 762에 제시된 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 표적 서열은 서열번호 844에 제시된 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 표적 서열은 서열번호 841에 제시된 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 표적 서열은 서열번호 818에 제시된 서열을 포함하거나 이로 이루

어진다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 표적 서열은 서열번호 794에 제시된 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 표적 서열은 서열번호 762에 제시된 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0106] *TMPRSS6 표적화 서열*

[0107] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 세포에서의 *TMPRSS6* mRNA의 표적화 및 *TMPRSS6* 발현의 억제 및/또는 감소를 위한 목적으로 하는 *TMPRSS6* mRNA에 대한 상보성 영역을 (예를 들어, *TMPRSS6* mRNA의 표적 서열 내에) 갖는다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 상보성(Watson-Crick) 염기 페어링에 의해 *TMPRSS6* 표적 서열에 결합하거나 어닐링하는 상보성 영역을 갖는 *TMPRSS6* 표적화 서열(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥 또는 가이드 가닥)을 포함한다. 표적화 서열 또는 상보성 영역은 일반적으로 *TMPRSS6* 발현을 억제 및/또는 감소시키기 위한 목적으로 올리고뉴클레오티드(또는 이의 가닥)를 *TMPRSS6* mRNA에 결합 또는 어닐링할 수 있는 적절한 길이 및 염기 함량이다. 일부 구현예에서, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 적어도 약 12개, 적어도 약 13개, 적어도 약 14개, 적어도 약 15개, 적어도 약 16개, 적어도 약 17개, 적어도 약 18개, 적어도 약 19개, 적어도 약 20개, 적어도 약 21개, 적어도 약 22개, 적어도 약 23개, 적어도 약 24개, 적어도 약 25개, 적어도 약 26개, 적어도 약 27개, 적어도 약 28개, 적어도 약 29개 또는 적어도 약 30개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 약 12 내지 약 30개(예를 들어, 12 내지 30개, 12 내지 22개, 15 내지 25개, 17 내지 21개, 18 내지 27개, 19 내지 27개, 또는 15 내지 30개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 약 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 적어도 18개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 적어도 19개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 적어도 20개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 적어도 21개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 적어도 22개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 적어도 23개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 적어도 24개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 661-852 중 어느 하나의 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하고, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 18개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 661-852 중 어느 하나의 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하고, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 19개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 193-384 중 어느 하나의 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하고, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 20개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 193-384 중 어느 하나의 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하고, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 21개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 193-384 중 어느 하나의 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하고, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 22개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 193-384 중 어느 하나의 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하고, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 23개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 193-384 중 어느 하나의 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하고, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 24개 뉴클레오티드 길이이다.

[0108] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 *TMPRSS6* 표적 서열에 완전히 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역(예를 들어, 이중 가닥 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥 또는 가이드 가닥)을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 *TMPRSS6* 표적 서열에 대해 부분적으로 상보성이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 *TMPRSS6* 표적 서열에 완전히 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 *TMPRSS6* 표적 서열에 부분적으로 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함한다.

[0109] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 661-852 중 어느 하나의 서열에 완전히 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 844, 841, 818, 794, 및 762에 제시된 서열에 완전히 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 661-852 중 어느 하나의 서열에 부분적으로 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 844, 841, 818, 794, 및 762에 제시된 서열에 부분적으로 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함한다.

[0110] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 *TMPRSS6* mRNA 내의 뉴클

레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하되, 뉴클레오티드의 연속 서열은 약 12 내지 약 30개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 12 내지 30개, 12 내지 28개, 12 내지 26개, 12 내지 24개, 12 내지 20개, 12 내지 18개, 12 내지 16개, 14 내지 22개, 16 내지 20개, 18 내지 20개, 또는 18 내지 19개 뉴클레오티드 길이)이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 *TMPRSS6* mRNA 내의 뉴클레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하되, 뉴클레오티드의 연속 서열은 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 *TMPRSS6* mRNA 내의 뉴클레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하되, 뉴클레오티드의 연속 서열은 19개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 *TMPRSS6* mRNA 내의 뉴클레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하되, 뉴클레오티드의 연속 서열은 20개 뉴클레오티드 길이이다.

[0111] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 661-852 중 어느 하나의 뉴클레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하되, 선택적으로 뉴클레오티드의 연속 서열은 19개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 844, 841, 818, 794, 및 762 중 어느 하나의 뉴클레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하되, 선택적으로 뉴클레오티드의 연속 서열은 19개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 376, 373, 350, 326, 및 294 중 어느 하나의 뉴클레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하되, 선택적으로 뉴클레오티드의 연속 서열은 20개 뉴클레오티드 길이이다.

[0112] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 상응하는 *TMPRSS6* 표적 서열과 하나 이상의 염기쌍(bp) 불일치를 갖는 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적화 서열 또는 상보성 영역이 적절한 혼성화 조건 하에서 *TMPRSS6* mRNA에 결합하거나 어닐링하는 능력 및/또는 올리고뉴클레오티드가 *TMPRSS6* 발현을 억제하는 능력이 유지되는 경우, 표적 서열 또는 상보성 영역은 이에 상응하는 *TMPRSS6* 표적 서열과 최대 약 1개, 최대 약 2개, 최대 약 3개, 최대 약 4개, 최대 약 5개 등의 불일치를 가질 수 있다. 대안적으로, 표적화 서열 또는 상보성 영역이 적절한 혼성화 조건 하에서 *TMPRSS6* mRNA에 결합하거나 어닐링하는 능력 및/또는 올리고뉴클레오티드가 *TMPRSS6* 발현을 억제하는 능력이 유지되는 경우, 표적 서열 또는 상보성 영역은 이에 상응하는 *TMPRSS6* 표적 서열과 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 또는 5개 이하의 불일치를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 상응하는 표적 서열과 1개의 불일치를 갖는 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 상응하는 표적 서열과 2개의 불일치를 갖는 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 상응하는 표적 서열과 3개의 불일치를 갖는 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 상응하는 표적 서열과 4개의 불일치를 갖는 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 상응하는 표적 서열과 5개의 불일치를 갖는 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 이에 상응하는 표적 서열과 2개 이상의 불일치(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 불일치)를 갖는 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하되, 적어도 2개의 불일치(예를 들어, 모든 불일치)는 연속적으로 위치하거나(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 불일치가 연이어 위치함), 불일치는 표적화 서열 또는 상보성 영역 전체에 걸쳐 산재한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 이에 상응하는 표적 서열과 2개 이상의 불일치(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 불일치)를 갖는 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하되, 적어도 2개의 불일치(예를 들어, 모든 불일치)는 연속적으로 위치하거나(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 불일치가 연이어 위치함), 적어도 하나 이상의 불일치되지 않은 염기쌍이 불일치, 또는 이의 조합 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 661-852 중 어느 하나의 뉴클레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하되, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 이에 상응하는 *TMPRSS6* 표적 서열과 최대 약 1개, 최대 약 2개, 최대 약 3개, 최대 약 4개, 최대 약 5개 등의 불일치를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 661-852 중 어느 하나의 뉴클레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하되, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 이에 상응하는 *TMPRSS6* 표적 서열과 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 또는 5개 이하의 불일치를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 661-852 중 어느 하나의 뉴클레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하되, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 이에 상응하는 *TMPRSS6* 표적 서열과 최대 약 1개, 최대 약 2개, 최대 약 3개, 최대 약 4개, 최대 약 5개 등의 불일치를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 844, 841, 818, 794, 및 762 중 어느 하나의 뉴클레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하되, 표적화 서열 또는 상보성 영역은 이에 상응하는 *TMPRSS6* 표적 서열과 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 또는 5개 이하의 불일치를 가질 수

있다.

[0113] *올리고뉴클레오티드의 유형*

[0114] RNAi 올리고뉴클레오티드, 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO), miRNA 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 올리고뉴클레오티드 유형 및/또는 구조가 본원의 방법에서 *TMPRSS6*을 표적화하는 데 유용하다. 본원 또는 다른 곳에 기술된 올리고뉴클레오티드 유형 중 어느 하나는 *TMPRSS6* 발현을 억제하기 위한 목적으로 *TMPRSS6* 표적화 서열을 통합하기 위한 프레임워크로서의 용도에 고려된다.

[0115] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 Dicer 관여의 상류 또는 하류에서 RNA 간섭(RNAi) 경로와 결합함으로써 *TMPRSS6* 발현을 억제한다. 예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드는 1 내지 5개의 뉴클레오티드의 적어도 하나의 3' 오버행을 갖는 약 19 내지 25개 뉴클레오티드의 크기를 갖는 각각의 가닥으로 개발되었다(예를 들어, 미국 특허 제8,372,968호참조). 활성 RNAi 산물을 생성하기 위해 Dicer에 의해 가공되는 더 긴 올리고뉴클레오티드 또한 개발되었다(예를 들어, 미국 특허 제8,883,996호참조). 추가의 연구는, 가닥 중 하나가 열역학적으로 안정화하는 테트라루프 구조를 포함하는 구조를 포함하는, 적어도 하나의 가닥의 적어도 하나의 단부가 이중체 표적화 영역을 넘어 연장되는, 연장된 dsRNA를 생산하였다(예를 들어, 미국 특허 제8,513,207호 및 제8,927,705호, 및 국제 특허 출원 공개 제WO 2010/033225호 참조). 이러한 구조는 (분자의 한쪽 또는 양쪽에 있는) 단일-가닥(ss) 연장부뿐만 아니라 이중-가닥(ds) 연장부를 포함할 수 있다.

[0116] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 Dicer의 관여(예를 들어, Dicer 절단부)의 하류에서 RNAi 경로와 결합한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드는 Dicer 기질이다. 일부 구현예에서, 내인성 Dicer 처리 시, *TMPRSS6* 발현을 감소시킬 수 있는 19 내지 23개 뉴클레오티드 길이의 이중-가닥 핵산이 생산된다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 안티센스 가닥의 3' 말단에 오버행(예를 들어, 1, 2 또는 3개 뉴클레오티드 길이)을 갖는다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, siRNA)는 표적 RNA에 대해 안티센스인 21-뉴클레오티드 가이드 가닥 및 상보성 패신저 가닥을 포함하며, 여기에서 두 가닥 모두는 3' 말단 중 하나 또는 둘 모두에서 19-bp 이중체 및 2개 뉴클레오티드 오버행을 형성하도록 어닐링된다. 23개 뉴클레오티드의 가이드 가닥 및 21개 뉴클레오티드의 패신저 가닥을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 더 긴 올리고뉴클레오티드 설계 또한 이용 가능하며, 여기에서 분자의 우측(패신저 가닥의 3' 말단/가이드 가닥의 5' 말단)에는 무딘 말단이 있고, 분자의 좌측(패신저 가닥의 5' 말단/가이드 가닥의 3' 말단)에는 2개의 뉴클레오티드 3'-가이드 가닥 오버행이 있다. 이러한 분자에서, 21 bp 이중체 영역이 존재한다. 예를 들어, 미국 특허 제9,012,138호; 제9,012,621호; 및 제9,193,753호를 참조한다.

[0117] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 센스 및 안티센스 가닥으로 포함하며, 이 둘 모두는 약 17 내지 36개(예를 들어, 17 내지 36개, 20 내지 25개, 또는 21 내지 23개) 범위의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드는 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥 및 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함하되, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 센스 및 안티센스 가닥으로 포함하며, 이 둘 모두는 약 19 내지 22개 범위의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 및 안티센스 가닥은 동일한 길이를 갖는다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 센스 및 안티센스 가닥으로 포함하며, 여기에서 센스 가닥 또는 안티센스 가닥 중 하나, 또는 센스 및 안티센스 가닥 둘 모두에는 3'-오버행이 있다. 일부 구현예에서, 센스 및 안티센스 가닥 둘 모두의 길이가 약 21 내지 23개 뉴클레오티드의 범위인 올리고뉴클레오티드의 경우, 센스, 안티센스, 또는 센스 및 안티센스 가닥 둘 모두에서의 3' 오버행은 1개 또는 2개 뉴클레오티드 길이이다. 일 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 22개 뉴클레오티드의 가이드 가닥 및 20개 뉴클레오티드의 패신저 가닥을 가지며, 여기에서 분자의 우측(패신저 가닥의 3' 말단/가이드 가닥의 5' 말단)에는 무딘 말단이 있고, 분자의 좌측(패신저 가닥의 5' 말단/가이드 가닥의 3' 말단)에는 2개의 뉴클레오티드 3'-가이드 가닥 오버행이 있다. 이러한 분자에서, 20 bp 이중체 영역이 존재한다.

[0118] 본원의 조성물 및 방법과 함께 사용하기 위한 다른 올리고뉴클레오티드 설계는 다음을 포함한다: 16량체 siRNA(예를 들어, Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Blackburn (편집), ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 2006 참조), shRNA(예를 들어, 19 bp 또는 이보다 짧은 줄기를 가짐; 예를 들어, Moore 등 (2010) Methods Mol. Biol. 629:141-158 참조), 무딘 siRNA(예를 들어, 19 bp 길이를 가짐; 예를 들어, Kraynack & Baker (2006) RNA 12:163-176 참조), 비대칭 siRNA(aiRNA; 예를 들어, Sun 등 (2008) Nat. Biotechnol. 26:1379-82 참조), 비대칭으로 보다 짧은 이중체 siRNA(예를 들어, Chang 등 (2009) Mol. Ther. 17:725-32 참조), 포크 siRNA(예

를 들어, Hohjoh (2004) FEBS Lett. 557:193-98 참조), ss siRNA(Elsner (2012) Nat. Biotechnol. 30:1063 참조), 덤벨-형상 원형 siRNA(예를 들어, Abe 등, (2007) J. Am. Chem. Soc. 129:15108-09 참조), 및 소형 내부 분할 간섭 RNA(siRNA; 예를 들어, Bramsen 등 (2007) Nucleic Acids Res. 35:5886-97 참조). 일부 구현예에서 *TMPRSS6*의 발현을 감소시키거나 억제하기 위해 사용될 수 있는 올리고뉴클레오티드 구조의 추가적인 비제한적인 예는, 마이크로RNA(miRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA) 및 짧은siRNA이다(예를 들어, Hamilton 등 (2002) EMBO J. 21:4671-79 참조; 또한, 미국 특허 출원 공개 제2009/0099115호 참조).

[0119] 또한, 일부 구현예에서, 본원의 *TMPRSS6* 발현을 감소시키거나 억제하기 위한 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥(ss)이다. 이러한 구조는 단일-가닥 RNAi 분자를 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 최근의 노력은 ss RNAi 분자의 활성을 입증하였다(예를 들어, Matsui 등 (2016) Mol. Ther. 24:946-55 참조). 그러나, 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)이다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는, 5'에서 3' 방향으로 기재될 때, 특정 핵산의 표적화된 분절의 역방향 보체를 포함하고, (예를 들어, 갭머로서) 적절하게 변형되어, 세포 중 표적 mRNA의 번역을 억제하도록, 또는 (예를 들어, 혼합체로서) 세포에서 그의 표적 RNA의 RNaseH 매개 절단을 유도하는, 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이다. 본원에서 사용하기 위한 ASO는, 예를 들어, 미국 특허 제9,567,587호에 도시된 바와 같이, 당업계에 공지된 임의의 적절한 방식으로 변형될 수 있다(예를 들어, 핵염기의 길이, 당 모이어티(피리미딘, 퓨린), 및 핵염기의 헤테로시클릭 부분의 변경을 포함함). 또한, ASO는 특정 표적 유전자의 발현을 감소시키기 위해 수십 년 동안 사용되어 왔다(예를 들어, Bennett 등 (2017) Annu. Rev. Pharmacol. 57:81-105 참조).

[0120] 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 *TMPRSS6* mRNA와 상보성 영역을 공유한다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 NM_001289000.2로서 식별된 인간 TMPRSS6 유전자의 다양한 영역을 표적화한다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 15 내지 50개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 15 내지 25개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 22개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 서열번호 661-852 중 어느 하나에 상보성이다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 적어도 19개의 연속 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 표적 서열과 1, 2 또는 3개 뉴클레오티드만큼 상이하다.

[0121] *이중 가닥 올리고뉴클레오티드*

[0122] 일부 양태에서, 본 개시는, (본원에서 패신저 가닥으로도 지칭되는) 센스 가닥 및 (본원에서 가이드 가닥으로도 지칭되는) 안티센스 가닥을 포함하는, (예를 들어, RNAi 경로를 통해) *TMPRSS6* mRNA를 표적화하고 *TMPRSS6* 발현을 억제하기 위한 이중 가닥(ds) RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 별도의 가닥이고 공유 연결되지 않는다. 일부 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 공유 연결된다. 일부 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 이중체 영역을 형성하되, 센스 가닥 및 안티센스 가닥, 또는 이의 일부는 상보적 방식으로 (예를 들어, Watson-Crick 염기 페어링에 의해) 서로 결합한다.

[0123] 일부 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 제1 영역(R1)은 제1 이중체(D1)를 형성한다. 일부 구현예에서, D1은 적어도 약 15개(예를 들어, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 또는 적어도 21개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, D1은 약 12 내지 30개 뉴클레오티드의 범위의 길이(예를 들어, 약 12 내지 30개, 12 내지 27개, 15 내지 22개, 18 내지 22개, 18 내지 25개, 18 내지 27개, 18 내지 30개, 또는 21 내지 30개 뉴클레오티드 길이)이다. 일부 구현예에서, D1은 적어도 12개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 적어도 12개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 25개, 또는 적어도 30개 뉴클레오티드 길이)이다. 일부 구현예에서, D1은 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, D1은 20개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 D1은 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 전체 길이에 걸쳐지지 않는다. 일부 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 D1은 센스 가닥 또는 안티센스 가닥 중 하나, 또는 둘 모두의 전체 길이에 걸쳐 있다. 소정의 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 D1은 센스 가닥 및 안티센스 가닥 둘 모두의 전체 길이에 걸쳐 있다.

[0124] 일부 구현예에서, 센스 가닥은 제2 영역(R2)을 갖되, R2는 제1 하위영역(S1), 루프(Lp), 예컨대 테트라루프(테트라Lp) 또는 트리루프(트리Lp), 및 제2 하위영역(S2)을 포함하고, 여기에서 Lp는 S1과 S2 사이에 위치하고, S1과 S2는 제2 이중체(D2)를 형성한다. D2는 다양한 길이를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, D2는 약 1 내지 6 bp

길이이다. 일부 구현예에서, D2는 2-6, 3-6, 4-6, 5-6, 1-5, 2-5, 3-5 또는 4-5 bp 길이이다. 일부 구현예에서, D2는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 bp 길이이다. 일부 구현예에서, D2는 6 bp 길이이다.

[0125] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 서열번호 193-384 중 어느 하나의 서열을 갖는 센스 가닥 및 서열번호 385-576 중 어느 하나의 서열을 포함하는 안티센스 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 서열번호 661-852 중 어느 하나의 서열을 갖는 센스 가닥 및 서열번호 1-192 중 어느 하나의 서열을 포함하는 안티센스 서열을 포함한다.

[0126] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, **표 4**에 열거된 바와 같은, 서열번호 577-597 중 어느 하나의 서열을 갖는 센스 가닥 및 서열번호 598-618으로부터 선택되는 상보성 서열을 포함하는 안티센스 서열을 포함한다.

[0127] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 다음으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함한다:

[0128] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0129] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0130] c) 각각 서열번호 595 및 616;

[0131] d) 각각 서열번호 590 및 611;

[0132] e) 각각 서열번호 596 및 617;

[0133] f) 각각 서열번호 597 및 618;

[0134] g) 각각 서열번호 585 및 606;

[0135] h) 각각 서열번호 586 및 607; 및

[0136] i) 각각 서열번호 587 및 608.

[0137] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 다음으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함한다:

[0138] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0139] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0140] c) 각각 서열번호 590 및 611;

[0141] d) 각각 서열번호 597 및 618; 및

[0142] e) 각각 서열번호 586 및 607.

[0143] 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 579의 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 600의 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 580의 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 601의 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 590의 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 611의 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 597의 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 618의 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 서열번호 586의 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열번호 607의 서열을 포함한다.

[0144] 일부 구현예에서, 서열 목록에 제시된 서열은 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드) 또는 다른 핵산의 구조를 기술하는 데 지칭될 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 구현예에서, 실제 올리고뉴클레오티드 또는 다른 핵산은, 특정 서열과 본질적으로 동일하거나 유사한 상보성 특성을 유지하면서, 해당 서열과 비교 시, 하나 이상의 대체 뉴클레오티드(예를 들어, DNA 뉴클레오티드의 RNA 또는 RNA 뉴클레오티드의 DNA 대응체) 및/또는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드 및/또는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드 연결부 및/또는 하나 이상의 다른 변형을 가질 수 있다.

[0145] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 센스 가닥, 및 Dicer 효소에 의해 작용될 때 성숙한 RISC에 혼입되는 안티센스 가닥을 생성하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 25-뉴클레오티드 센스 가닥 및

Dicer 효소에 의해 작용될 때 성숙한 RISC에 혼입되는 안티센스 가닥을 생성하는 27-뉴클레오티드 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 25-뉴클레오티드 센스 가닥은 서열번호 193-384로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 27-뉴클레오티드 센스 가닥은 서열번호 385-576으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 가닥은 27개 뉴클레오티드보다 길다(예를 들어, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개 뉴클레오티드). 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 가닥은 25개 뉴클레오티드보다 길다(예를 들어, 26, 27, 28, 29 또는 30개 뉴클레오티드). 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 가닥은 서열번호 577-597로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하되, 뉴클레오티드 서열은 27개 뉴클레오티드 보다 길다(예를 들어, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개 뉴클레오티드). 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 가닥은 서열번호 577-597로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하되, 뉴클레오티드 서열은 25개 뉴클레오티드 보다 길다(예를 들어, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오티드).

[0146] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 다른 5' 말단과 비교 시, 열역학적으로 덜 안정한 5' 말단을 갖는다. 일부 구현예에서, 센스 가닥의 3' 말단에서의 무딘 말단 및 안티센스 가닥의 3' 말단에서의 3'-오버행을 포함하는 비대칭 올리고뉴클레오티드가 제공된다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥 상의 3' 오버행은 약 1 내지 8개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 뉴클레오티드 길이)이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 안티센스(가이드) 가닥의 3' 말단에 두 개(2개)의 뉴클레오티드를 포함하는 오버행을 갖는다. 그러나, 다른 오버행도 가능하다. 일부 구현예에서, 오버행은 1 내지 6개 뉴클레오티드, 선택적으로, 1 내지 5개, 1 내지 4개, 1 내지 3개, 1 내지 2개, 2 내지 6개, 2 내지 5개, 2 내지 4개, 2 내지 3개, 3 내지 6개, 3 내지 5개, 3 내지 4개, 4 내지 6개, 4 내지 5개, 5 내지 6개 뉴클레오티드, 또는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 뉴클레오티드의 길이를 포함하는 3'-오버행이다. 그러나, 일부 구현예에서, 오버행은 1 내지 6개 뉴클레오티드, 선택적으로, 1 내지 5개, 1 내지 4개, 1 내지 3개, 1 내지 2개, 2 내지 6개, 2 내지 5개, 2 내지 4개, 2 내지 3개, 3 내지 6개, 3 내지 5개, 3 내지 4개, 4 내지 6개, 4 내지 5개, 5 내지 6개 뉴클레오티드, 또는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 뉴클레오티드의 길이를 포함하는 5'-오버행이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 661-852 중 어느 하나의 뉴클레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역, 및 1 내지 6개 뉴클레오티드의 길이를 포함하는 5'-오버행을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 577-597로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥을 포함하되, 올리고뉴클레오티드는 1 내지 6개 뉴클레오티드의 길이를 포함하는 5'-오버행을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 598-618로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하되, 올리고뉴클레오티드는 1 내지 6개 뉴클레오티드의 길이를 포함하는 5'-오버행을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 577-597로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 598-618로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하되, 올리고뉴클레오티드는 1 내지 6개 뉴클레오티드의 길이를 포함하는 5'-오버행을 포함한다.

[0147] 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 3' 말단 상의 두개(2개)의 말단 뉴클레오티드가 변형된다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 3' 말단 상의 두개(2개)의 말단 뉴클레오티드는 표적 mRNA(예를 들어, *TMPRSS6* mRNA)와 상보성이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 3' 말단 상의 두개(2개)의 말단 뉴클레오티드는 표적 mRNA와 상보성이 아니다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥의 3' 말단 상의 두개(2개)의 말단 뉴클레오티드는 쌍을 이루지 않는다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥의 3' 말단 상의 두개(2개)의 말단 뉴클레오티드는 쌍을 이루지 않은 구아닌(예를 들어, 5'-GG-3')을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥의 3' 말단 상의 두개(2개)의 말단 뉴클레오티드는 표적 mRNA와 상보성이 아니다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 각각의 3' 말단 상의 두개(2개)의 말단 뉴클레오티드는 구아닌(GG)이다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드의 각각의 3' 말단 상의 두개(2개)의 말단 GG 뉴클레오티드는 표적 mRNA와 상보성이 아니다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 661-852 중 어느 하나의 뉴클레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하되, 본원의 올리고뉴클레오티드의 안티센스의 3' 말단 상의 두개(2개)의 말단 뉴클레오티드는 쌍을 이루지 않은 GG를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1-192로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하되, 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥의 3' 말단 상의 두개(2개)의 말단 뉴클레오티드는 쌍을 이루지 않은 GG를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 577-597로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 598-618로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하되, 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥의 3' 말단 상의 두개(2개)의 말단 뉴클레오티드는 쌍을 이루지 않은 GG를 포함한다.

[0148] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)를 포함하는 센스 및 안티센스 가닥 사이에는 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개)의 불일치(들)가 있다. 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 하나 이상의 불일치가 있는 경우, 이들은 연속적으로(예를 들어, 2, 3개 이상 연이어) 위치하거나 상보성 영역 전체에 걸쳐 산재될 수 있다. 일부 구현예에서, 센스 가닥의 3' 말단은 하나 이상의 불일치를 포함한다. 일부 구현예에서, 두개(2개)의 불일치는 센스 가닥의 3' 말단에 혼입된다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드의 센스 가닥의 3' 말단에서의 분절의 염기 불일치, 또는 불안정화는 올리고뉴클레오티드의 효능을 개선시키거나 증가시킨다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0149] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0150] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0151] c) 각각 서열번호 595 및 616;

[0152] d) 각각 서열번호 590 및 611;

[0153] e) 각각 서열번호 596 및 617;

[0154] f) 각각 서열번호 597 및 618;

[0155] g) 각각 서열번호 585 및 606;

[0156] h) 각각 서열번호 586 및 607; 및

[0157] i) 각각 서열번호 587 및 608,

[0158] 여기에서 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에는 하나 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의) 불일치(들)가 존재한다.

[0159] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함한다:

[0160] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0161] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0162] c) 각각 서열번호 590 및 611;

[0163] d) 각각 서열번호 597 및 618; 및

[0164] e) 각각 서열번호 586 및 607,

[0165] 여기에서 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에는 하나 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의) 불일치(들)가 존재한다.

[0166] *안티센스 가닥*

[0167] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어 RNAi 올리고뉴클레오티드)의 안티센스 가닥은 "가이드 가닥"으로 지칭된다. 예를 들어, RNA-유도 침묵 복합체(RISC)와 체결되고 Ago2와 같은 아르고노트(*Argonaute*) 단백질에 결합하거나, 하나 이상의 유사한 인자와 체결되거나 결합하고, 표적 유전자의 침묵을 유도하는 안티센스 가닥과 같은 안티센스 가닥은 가이드 가닥으로서 지칭된다. 일부 구현예에서, 가이드 가닥에 상보성인 영역을 포함하는 센스 가닥은 본원에서 "패신저 가닥"으로 지칭된다.

[0168] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 최대 약 50개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 최대 50개, 최대 40개, 최대 35개, 최대 30개, 최대 27개, 최대 25개, 최대 21개, 최대 19개, 최대 17개, 또는 최대 12개 뉴클레오티드 길이)의 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 약 12개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 적어도 12개, 적어도 15개, 적어도 19개, 적어도 21개, 적어도 22개, 적어도 25개, 적어도 27개, 적어도 30개, 적어도 35개, 또는 적어도 38개 뉴클레오티드 길이)의 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 약 12 내지 약 40개(예를 들어, 12 내지 40개, 12 내지 36개, 12 내지 32개, 12 내지 28개, 15 내지 40개, 15 내지 36개, 15 내지 32개, 15 내지 28개, 17 내지 22개, 17 내지 25개, 19 내지 27개, 19 내지 30개, 20 내지 40개, 22 내지 40개, 25 내지 40개,

또는 32 내지 40개) 뉴클레오티드 범위의 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 15 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나의 안티센스 가닥은 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 또는 40개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 22개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 포함한다.

[0169] 일부 구현예에서, *TMPRSS6*을 표적화하기 위한 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 385-576 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 서열번호 385-576 중 적어도 하나에 제시된 서열의 적어도 약 12개(예를 들어, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 또는 적어도 23개)의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6*을 표적화하기 위한 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 598-618 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 서열번호 598-618 중 적어도 하나에 제시된 서열의 적어도 약 12개(예를 들어, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 또는 적어도 23개)의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6*을 표적화하기 위한 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 598-618 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 서열번호 600, 601, 611, 618, 및 607 중 적어도 하나에 제시된 서열의 적어도 약 12개(예를 들어, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 또는 적어도 23개)의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6*을 표적화하기 위한 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 600, 601, 611, 618, 및 607 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 안티센스 가닥을 포함한다.

[0170] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1-192로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 서열번호 184, 181, 158, 134, 및 102로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다.

[0171] *센스 가닥*

[0172] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* mRNA를 표적화하고 *TMPRSS6* 발현을 억제하기 위한 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 661-852 중 어느 하나에 제시된 센스 가닥 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* mRNA를 표적화하고 *TMPRSS6* 발현을 억제하기 위한 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 193-384 중 어느 하나에 제시된 센스 가닥 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 서열번호 193-384 중 어느 하나에 제시된 서열의 적어도 약 12개(예를 들어, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 또는 적어도 23개)의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 센스 가닥을 갖는다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 서열번호 661-852 중 어느 하나에 제시된 서열의 적어도 약 12개(예를 들어, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 또는 적어도 19개)의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 센스 가닥을 갖는다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* mRNA를 표적화하고 *TMPRSS6* 발현을 억제하기 위한 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 서열번호 577-597 중 어느 하나에 제시된 센스 가닥 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 서열번호 577-597 중 어느 하나에 제시된 서열의 적어도 약 12개(예를 들어, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 또는 적어도 23개)의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 센스 가닥을 갖는다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* mRNA를 표적화하고 *TMPRSS6* 발현을 억제하기 위한 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 서열번호 579, 580, 590, 597, 및 586 중 어느 하나에 제시된 센스 가닥 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 서열번호 579, 580, 590, 597, 및 586 중 어느 하나에 제시된 서열의 적어도 약 12개(예를 들어, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 또는 적어도 23개)의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 센스 가닥을 갖는다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* mRNA를 표적화하고 *TMPRSS6* 발현을 억제하기 위한 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 서열번호 844, 841, 818, 794, 및 762 중 어느 하나에 제시된 센스 가닥 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 서열번호 844, 841, 818, 794, 및

762 중 어느 하나에 제시된 서열의 적어도 약 12개(예를 들어, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 또는 적어도 19개)의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 센스 가닥을 갖는다.

[0173] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 최대 약 50개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 최대 50개, 최대 40개, 최대 36개, 최대 30개, 최대 27개, 최대 25개, 최대 21개, 최대 19개, 최대 17개, 또는 최대 12개 뉴클레오티드 길이)의 센스 가닥(또는 패신저 가닥)을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 적어도 약 12개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 적어도 12개, 적어도 15개, 적어도 19개, 적어도 21개, 적어도 25개, 적어도 27개, 적어도 30개, 적어도 36개, 또는 적어도 38개 뉴클레오티드 길이)의 센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 약 12 내지 약 50개(예를 들어, 12 내지 50개, 12 내지 40개, 12 내지 36개, 12 내지 32개, 12 내지 28개, 15 내지 40개, 15 내지 36개, 15 내지 32개, 15 내지 28개, 17 내지 21개, 17 내지 25개, 19 내지 27개, 19 내지 30개, 20 내지 40개, 22 내지 40개, 25 내지 40개, 또는 32 내지 40개) 뉴클레오티드 범위의 센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 15 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 18 내지 36개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 36개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함한다.

[0174] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 센스 가닥의 3' 말단 근위의 줄기-루프 구조를 포함하는 센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 센스 가닥의 제1 영역(R1)의 3' 말단에서 줄기-루프 구조를 포함하는 센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기-루프는 가닥내 염기 페어링에 의해 형성된다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 그의 5' 말단 근위에 줄기-루프 구조를 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 제1 영역(R1)의 5' 말단에 줄기-루프 구조를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기-루프의 줄기는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14개 뉴클레오티드 길이의 이중체를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기-루프의 줄기는 2개 뉴클레오티드 길이의 이중체를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기-루프의 줄기는 3개 뉴클레오티드 길이의 이중체를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기-루프의 줄기는 4개 뉴클레오티드 길이의 이중체를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기-루프의 줄기는 5개 뉴클레오티드 길이의 이중체를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기-루프의 줄기는 6개 뉴클레오티드 길이의 이중체를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기-루프의 줄기는 7개 뉴클레오티드 길이의 이중체를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기-루프의 줄기는 8개 뉴클레오티드 길이의 이중체를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기-루프의 줄기는 9개 뉴클레오티드 길이의 이중체를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기-루프의 줄기는 10개 뉴클레오티드 길이의 이중체를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기-루프의 줄기는 11개 뉴클레오티드 길이의 이중체를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기-루프의 줄기는 12개 뉴클레오티드 길이의 이중체를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기-루프의 줄기는 13개 뉴클레오티드 길이의 이중체를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기-루프의 줄기는 14개 뉴클레오티드 길이의 이중체를 포함한다.

[0175] 일부 구현예에서, 줄기-루프는 분해(예를 들어, 효소적 분해)에 대한 올리고뉴클레오티드 보호를 제공하고, 표적 세포, 조직 또는 기관(예를 들어, 간), 또는 둘 모두에 대한 표적화 및/또는 전달을 촉진하거나 개선한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 줄기-루프의 루프는 표적 mRNA(예를 들어, *TMPRSS6* mRNA)에 대한 표적화, 표적 유전자 발현의 억제(예를 들어, *TMPRSS6* 발현), 및/또는 표적 세포, 조직 또는 기관(예를 들어, 간), 또는 이의 조합 내로의 전달, 흡수, 및/또는 침투를 촉진, 개선, 또는 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 뉴클레오티드로 구성된다. 일부 구현예에서, 줄기-루프 자체 또는 줄기-루프에 대한 변형(들)은 올리고뉴클레오티드의 고유 유전자 발현 억제 활성에 영향을 미치지 않거나 실질적으로 영향을 미치지 않지만, (예를 들어, 분해에 대한 보호를 제공하는) 안정성 및/또는 표적 세포, 조직 또는 기관(예를 들어, 간)에 대한 올리고뉴클레오티드의 전달, 흡수 및/또는 침투를 촉진, 개선 또는 증가시킨다. 특정 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 (예를 들어, 3' 말단에서, 3' 말단 근위에서 및/또는 센스 가닥의 제1 영역(R1)의 3' 말단에서) 다음과 같이 제시되는 줄기-루프를 포함하는 센스 가닥을 포함한다: S1-Lp-S2로서, S1은 S2에 상보성이고, Lp는 S1과 S2 사이에서 최대 약 10개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 뉴클레오티드 길이)의 연결된 뉴클레오티드의 단일-가닥 루프를 형성하는, S1-L-S2. 일부 구현예에서, 루프(Lp)는 3개 뉴클레오티드 길이이다(본원에서 "트리루프"로 지칭됨). 일부 구현예에서, 루프(Lp)는 4개 뉴클레오티드 길이이다(본원에서 "테트라루프"로 지칭됨). 일부 구현예에서, 루프(Lp)는 5개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 루프(Lp)는 6개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 루프(Lp)는 7개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 루프(Lp)는

8개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 루프(Lp)는 9개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 루프(Lp)는 10개 뉴클레오티드 길이이다.

[0176] 일부 구현예에서, 테트라루프는 서열 5'-GAAA-3'을 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기 루프는 서열 5'-GCAGCCGAAAGGCUGC-3' (서열번호 856)을 포함한다.

[0177] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 661-852 중 어느 하나의 뉴클레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하고, 올리고뉴클레오티드는 (예를 들어, 3' 말단에서, 3' 말단 근위에서 및/또는 센스 가닥의 제1 영역(R1)의 3' 말단에서) 다음과 같이 제시된 줄기-루프를 포함하는 센스 가닥을 포함한다: S1-Lp-S2로서, S1은 S2에 상보성이고, Lp는 S1과 S2 사이에서 최대 약 10개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 뉴클레오티드 길이)의 단일-가닥 루프를 형성하는, S1-L-S2. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 661-852 중 어느 하나의 뉴클레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역을 포함하고, 올리고뉴클레오티드는 (예를 들어, 3' 말단에서, 3' 말단 근위에서 및/또는 센스 가닥의 제1 영역(R1)의 3' 말단에서) 다음과 같이 제시된 줄기-루프를 포함하는 센스 가닥을 포함한다: S1-Lp-S2로서, S1은 S2에 상보성이고, Lp는 S1과 S2 사이에서 4개 뉴클레오티드 길이의 단일-가닥 루프를 형성하는, S1-L-S2.

[0178] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 구조 S1-Lp-S2를 갖는 줄기-루프의 루프(Lp)는 트리루프(트리Lp)이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 661-852 중 어느 하나의 뉴클레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역 및 트리루프를 포함한다. 일부 구현예에서, 트리루프는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드, 리간드(예를 들어, 전달 리간드), 및 이의 조합을 포함한다.

[0179] 일부 구현예에서, 전술한 바와 같은 구조 S1-Lp-S2를 갖는 줄기-루프의 루프(Lp)는 본원에 참조로서 통합되는 미국 특허 제10,131,912호에 기술된 바와 같은 테트라루프(테트라Lp)이다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 서열번호 661-852 중 어느 하나의 뉴클레오티드의 연속 서열에 상보성인 표적화 서열 또는 상보성 영역 및 테트라루프를 포함한다. 일부 구현예에서, 테트라루프는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드, 리간드(예를 들어, 전달 리간드), 및 이의 조합을 포함한다.

[0180] *이중체 길이*

[0181] 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 적어도 12개(예를 들어, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 또는 적어도 21개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 12 내지 30개 뉴클레오티드의 범위의 길이(예를 들어, 약 12 내지 30개, 12 내지 27개, 12 내지 22개, 15 내지 25개, 18 내지 30개, 18 내지 22개, 18 내지 25개, 18 내지 27개, 18 내지 30개, 19 내지 30개, 또는 21 내지 30개 뉴클레오티드 길이)이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 12개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 13개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 14개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 15개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 16개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 17개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 18개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 19개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 20개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 21개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 22개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 23개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 24개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 25개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 26개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 27개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 28개 뉴클레오티드 길이이다. 일부

구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 29개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 30개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 전체 길이에 걸쳐지지 않는다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이의 이중체는 센스 또는 안티센스 가닥 중 어느 하나의 전체 길이에 걸쳐 있다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이의 이중체는 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 전체 길이에 걸쳐 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0182] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0183] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0184] c) 각각 서열번호 595 및 616;

[0185] d) 각각 서열번호 590 및 611;

[0186] e) 각각 서열번호 596 및 617;

[0187] f) 각각 서열번호 597 및 618;

[0188] g) 각각 서열번호 585 및 606;

[0189] h) 각각 서열번호 586 및 607; 및

[0190] i) 각각 서열번호 587 및 608,

[0191] 여기에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 12 내지 30개 뉴클레오티드의 범위의 길이(예를 들어, 약 12 내지 30개, 12 내지 27개, 12 내지 22개, 15 내지 25개, 18 내지 30개, 18 내지 22개, 18 내지 25개, 18 내지 27개, 18 내지 30개, 19 내지 30개, 또는 21 내지 30개 뉴클레오티드 길이)이다.

[0192] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0193] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0194] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0195] c) 각각 서열번호 590 및 611;

[0196] d) 각각 서열번호 597 및 618; 및

[0197] e) 각각 서열번호 586 및 607,

[0198] 여기에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 이중체는 12 내지 30개 뉴클레오티드의 범위의 길이(예를 들어, 약 12 내지 30개, 12 내지 27개, 12 내지 22개, 15 내지 25개, 18 내지 30개, 18 내지 22개, 18 내지 25개, 18 내지 27개, 18 내지 30개, 19 내지 30개, 또는 21 내지 30개 뉴클레오티드 길이)이다.

[0199] *올리고뉴클레오티드 말단*

[0200] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 가닥 중 하나 또는 둘 모두의 말단은 무딘 말단을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 이는 안티센스 가닥의 3' 말단에 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 가닥 중 하나 또는 둘 모두의 말단은 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 오버행을 포함한다. 일부 구현예에서, 오버행을 포함하는 하나 이상의 뉴클레오티드는 짝을 이루지 않은 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥의 3' 말단 및 안티센스 가닥의 5' 말단은 무딘 말단을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥의 5' 말단 및 안티센스 가닥의 3' 말단은 무딘 말단을 포함한다.

[0201] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 가닥 중 하나 또는 둘 모두의 3' 말단은 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 3'-오버행을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥은 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함하는

3'-오버행을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 안티센스 가닥은 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 3'-오버행을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥 및 안티센스 가닥 둘 모두는 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 3'-오버행을 포함한다.

[0202] 일부 구현예에서, 3'-오버행은 약 한개(1개) 내지 이십개(20개) 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 약 20개 뉴클레오티드 길이)이다. 일부 구현예에서, 3' 오버행은 약 한개(1개) 내지 열아홉개(19개), 한개(1개) 내지 열여덟개(18개), 한개(1개) 내지 열일곱개(17개), 한개(1개) 내지 열여섯개(16개), 한개(1개) 내지 열다섯개(15개), 한개(1개) 내지 열네개(14개), 한개(1개) 내지 열세개(13개), 한개(1개) 내지 열두개(12개), 한개(1개) 내지 열한개(11개), 한개(1개) 내지 열개(10개), 한개(1개) 내지 아홉개(9개), 한개(1개) 내지 여덟개(8개), 한개(1개) 내지 일곱개(7개), 한개(1개) 내지 여섯개(6), 한개(1개) 내지 다섯개(5), 한개(1개) 내지 네개(4), 한개(1개) 내지 세개(3), 또는 약 한개(1개) 내지 두개(2개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 한개(1개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 두개(2개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 세개(3개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 네개(4개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 다섯개(5개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 여섯개(6개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 일곱개(7개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 여덟개(8개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 아홉개(9개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 열개(10개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 열한개(11개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 열두개(12개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 열세개(13개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 열네개(14개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 열다섯개(15개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 열여섯개(16개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 열일곱개(17개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 열여덟개(18개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 열아홉개(19개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 이십개(20개) 뉴클레오티드 길이이다.

[0203] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0204] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0205] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0206] c) 각각 서열번호 595 및 616;

[0207] d) 각각 서열번호 590 및 611;

[0208] e) 각각 서열번호 596 및 617;

[0209] f) 각각 서열번호 597 및 618;

[0210] g) 각각 서열번호 585 및 606;

[0211] h) 각각 서열번호 586 및 607; 및

[0212] i) 각각 서열번호 587 및 608,

[0213] 여기에서, 안티센스 가닥은 약 한개(1개) 내지 이십개(20개) 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 약 20개 뉴클레오티드 길이)의 3'-오버행을 포함하되, 선택적으로 3'-오버행은 두개(2개) 뉴클레오티드 길이이다.

[0214] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0215] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0216] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0217] c) 각각 서열번호 590 및 611;

[0218] d) 각각 서열번호 597 및 618; 및

[0219] e) 각각 서열번호 586 및 607,

[0220] 여기에서, 안티센스 가닥은 약 한개(1개) 내지 이십개(20개) 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 약 20개 뉴클레오티드 길이)의 3'-오버행을 포함하되, 선택적으로 3'-오버행은 두개(2개) 뉴클레오티드 길이이다.

[0221] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 가닥 중 하나 또는 둘 모두의 5' 말단은 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 5'-오버행을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥은 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 5'-오버행을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 안티센스 가닥은 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 5'-오버행을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥 및 안티센스 가닥 둘 모두는 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 5'-오버행을 포함한다.

[0222] 일부 구현예에서, 5'-오버행은 약 한개(1개) 내지 이십개(20개) 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 약 20개 뉴클레오티드 길이)이다. 일부 구현예에서, 5' 오버행은 약 한개(1개) 내지 열아홉개(19개), 한개(1개) 내지 열여덟개(18개), 한개(1개) 내지 열일곱개(17개), 한개(1개) 내지 열여섯개(16개), 한개(1개) 내지 열다섯개(15개), 한개(1개) 내지 열네개(14개), 한개(1개) 내지 열세개(13개), 한개(1개) 내지 열두개(12개), 한개(1개) 내지 열한개(11개), 한개(1개) 내지 열개(10개), 한개(1개) 내지 아홉개(9개), 한개(1개) 내지 여덟개(8개), 한개(1개) 내지 일곱개(7개), 한개(1개) 내지 여섯개(6), 한개(1개) 내지 다섯개(5), 한개(1개) 내지 네개(4), 한개(1개) 내지 세개(3), 또는 약 한개(1개) 내지 두개(2개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 한개(1개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 두개(2개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 세개(3개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 네개(4개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 다섯개(5개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 여섯개(6개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 일곱개(7개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 여덟개(8개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 아홉개(9개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 열개(10개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 열한개(11개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 열두개(12개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 열세개(13개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 열네개(14개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 열다섯개(15개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 열여섯개(16개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 열일곱개(17개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 열여덟개(18개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 열아홉개(19개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5'-오버행은 이십개(20개) 뉴클레오티드 길이이다.

[0223] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0224] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0225] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0226] c) 각각 서열번호 595 및 616;

[0227] d) 각각 서열번호 590 및 611;

[0228] e) 각각 서열번호 596 및 617;

[0229] f) 각각 서열번호 597 및 618;

[0230] g) 각각 서열번호 585 및 606;

[0231] h) 각각 서열번호 586 및 607; 및

[0232] i) 각각 서열번호 587 및 608,

[0233] 여기에서, 안티센스 가닥은 약 한개(1개) 내지 이십개(20개) 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 약 20개 뉴클레오티드 길이)의 5'-오버행을 포함하되, 선택적으로 5'-오버행은 두개(2개) 뉴클레오티드 길이이다.

[0234] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0235] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0236] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0237] c) 각각 서열번호 590 및 611;

[0238] d) 각각 서열번호 597 및 618; 및

[0239] e) 각각 서열번호 586 및 607,

[0240] 여기에서, 안티센스 가닥은 약 한개(1개) 내지 이십개(20개) 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 약 20개 뉴클레오티드 길이)의 5'-오버행을 포함하되, 선택적으로 5'-오버행은 두개(2개) 뉴클레오티드 길이이다.

[0241] 일부 구현예에서, 센스 및/또는 안티센스 가닥의 3' 말단 또는 5' 말단을 포함하는 하나 이상의 (예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의) 뉴클레오티드가 변형된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 3' 말단 중 하나 또는 두개의 말단 뉴클레오티드가 변형된다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 3' 말단에서의 마지막 뉴클레오티드는, 2' 변형을 포함하거나, 2'-O-메톡시에틸을 포함하도록 변형된다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 3' 말단에서의 마지막 하나 또는 두개의 말단 뉴클레오티드는 표적과 상보성이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 3' 말단에서의 마지막 하나 또는 두개의 뉴클레오티드는 표적과 상보성이 아니다.

[0242] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥의 3' 말단은 본원에 기술된 줄기-루프를 포함하고 안티센스 가닥의 3' 말단은 본원에 기술된 3'-오버행을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 본원에 개시된 니킹된 테트라루프를 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥의 3' 말단은 줄기-루프를 포함하고, 여기에서 루프는 본원에 기술된 테트라루프를 포함하고, 안티센스 가닥의 3' 말단은 본원에 기술된 3'-오버행을 포함한다. 일부 구현예에서, 3'-오버행은 두개(2개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3'-오버행을 포함하는 두개(2개)의 뉴클레오티드 둘 모두는 구아닌(G) 핵염기를 포함한다. 안티센스 가닥의 3'-오버행을 포함하는 뉴클레오티드 중 하나 또는 둘 모두는 표적 mRNA와 상보성이 아닐 수 있다. 일반적으로, 안티센스 가닥의 3'-오버행을 포함하는 뉴클레오티드 중 하나 또는 둘 모두는 표적 mRNA와 상보성이 아니다.

[0243] *올리고뉴클레오티드 변형*

[0244] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 변형을 포함한다. 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 특이성, 안정성, 전달, 생체이용률, 뉴클레아제 분해에 대한 내성, 면역원성, 염기쌍 특성, RNA 분포 및 세포 흡수, 및 치료 또는 연구 용도와 관련된 다른 특징을 개선하거나 제어하기 위해 다양한 방식으로 변형될 수 있다.

[0245] 일부 구현예에서, 변형은 변형된 당이다. 일부 구현예에서, 변형은 5'-말단 포스페이트 기이다. 일부 구현예에서, 변형은 변형된 뉴클레오티드간 결합이다. 일부 구현예에서, 변형은 변형된 염기이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드는 본원에 기술된 변형 중 어느 하나 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 변형된 당, 5'-말단 포스페이트 기, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드간 결합, 및 적어도 하나의 변형된 염기를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을

포함한다:

[0246] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0247] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0248] c) 각각 서열번호 595 및 616;

[0249] d) 각각 서열번호 590 및 611;

[0250] e) 각각 서열번호 596 및 617;

[0251] f) 각각 서열번호 597 및 618;

[0252] g) 각각 서열번호 585 및 606;

[0253] h) 각각 서열번호 586 및 607; 및

[0254] i) 각각 서열번호 587 및 608,

[0255] 여기에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 변형된 당, 5'-말단 포스페이트 기, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드간 결합, 및 적어도 하나의 변형된 염기를 포함한다.

[0256] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0257] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0258] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0259] c) 각각 서열번호 590 및 611;

[0260] d) 각각 서열번호 597 및 618; 및

[0261] e) 각각 서열번호 586 및 607,

[0262] 여기에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 변형된 당, 5'-말단 포스페이트 기, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드간 결합, 및 적어도 하나의 변형된 염기를 포함한다.

[0263] 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)에 대한 변형의 수 및 이들 뉴클레오티드 변형의 위치는 올리고뉴클레오티드의 특성에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 지질 나노입자(LNP) 또는 유사한 담체에 접합되거나 이에 내장됨으로써 생체 내 전달될 수 있다. 그러나, 올리고뉴클레오티드가 LNP 또는 유사한 담체에 의해 보호되지 않는 경우, 뉴클레오티드 중 적어도 일부가 변형되는 것이 유리할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 모든 또는 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드의 절반 이상이 변형된다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드의 절반 미만이 변형된다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드를 포함하는 모든 뉴클레오티드의 당 모이어티는 2' 위치에서 변형된다. 변형은 가역적이거나 비가역적일 수 있다.

[0264] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 원하는 특성(예를 들어, 효소 분해로부터의 보호, 생체 내 투여 후 원하는 세포를 표적화하는 능력, 및/또는 열역학적 안정성)을 야기하기에 충분한 수 및 유형의 변형된 뉴클레오티드를 갖는다.

[0265] *당 변형*

[0266] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 변형된 당을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 당(본원에서 당 유사체로도 지칭됨)은, 예를 들어, 당의 2', 3', 4' 및/또는 5' 탄소 위치에서 하나 이상의 변형이 발생하는 변형된 데옥시리보오스 또는 리보오스 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 당은 또한 잠금 핵산("LNA"; 예를 들어, Koshkin 등 (1998) Tetrahedon 54:3607-30 참조), 잠금 해제 핵산("UNA"; 예를 들어, Snead 등 (2013) Mol. Ther-Nucl. Acids 2:e103 참조) 및 가교 핵산("BNA"; 예를 들어, Imanishi & Obika (2002) Chem Commun. (Camb) 21:1653-59 참조)에 제시된 것들과 같은 비천연 대체 탄소 구조를 포함할 수 있다.

[0267] 일부 구현예에서, 당의 뉴클레오티드 변형은 2'-변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 2'-변형은, 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-플루오로(2'-F), 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-

메톡시에틸(2'-MOE). 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA) 또는 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)일 수 있다. 일부 구현예에서, 변형은 2'-F. 2'-OMe 또는 2'-MOE이다. 일부 구현예에서, 당의 변형은 당 고리의 변형을 포함하며, 이는 당 고리의 하나 이상의 탄소의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오티드의 당의 변형은 당의 1'-탄소 또는 4'-탄소에 연결된 당의 2'-산소, 또는 에틸렌 또는 메틸렌 가교를 통해 1'-탄소 또는 4'-탄소에 연결된 2'-산소를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 2'-탄소 내지 3'-탄소 결합이 결여된 비고리형 당을 갖는다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는, 예를 들어 당의 4' 위치에, 티올 기를 갖는다.

[0268] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 적어도 약 1개(예를 들어, 적어도 1개, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 35개, 적어도 40개, 적어도 45개, 적어도 50개, 적어도 55개, 적어도 60개, 또는 그 이상)의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 가닥은 적어도 약 1개(예를 들어, 적어도 1개, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 35개, 또는 그 이상)의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥은 적어도 약 1개(예를 들어, 적어도 1개, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 적어도 20개, 또는 그 이상)의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0269] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 가닥의 모든 뉴클레오티드가 변형된다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오티드가 변형된다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 모든 뉴클레오티드(즉, 센스 가닥 및 안티센스 가닥 둘 모두)가 변형된다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 2'-변형(예를 들어, 2'-F 또는 2'-OMe, 2'-MOE, 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산)을 포함한다.

[0270] 일부 구현예에서, 본 개시는 상이한 변형 패턴을 갖는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 실시예 및 서열 목록에 제시된 바와 같은 변형 패턴을 갖는 센스 가닥 및 실시예 및 서열 목록에 제시된 바와 같은 변형 패턴을 갖는 안티센스 가닥을 포함한다.

[0271] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 2'-F로 변형된 뉴클레오티드를 갖는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 2'-F 및 2'-OMe로 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 2'-F로 변형된 뉴클레오티드를 갖는 센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 2'-F 및 2'-OMe로 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 센스 가닥을 포함한다.

[0272] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드는 2'-플루오로 변형을 포함하는 센스 가닥의 뉴클레오티드를 약 10 내지 15%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 또는 15%로 갖는 센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥의 뉴클레오티드의 약 11%는 2'-플루오로 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드는 2'-플루오로 변형을 포함하는 안티센스 가닥의 뉴클레오티드를 약 25 내지 35%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 또는 35%로 갖는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 뉴클레오티드의 약 32%는 2'-플루오로 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 2'-플루오로 변형을 포함하는 뉴클레오티드를 약 15 내지 25%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 또는 25%로 갖는다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오티드의 약 19%의 뉴클레오티드는 2'-플루오로 변형을 포함한다.

[0273] 본원에서 사용되는 바와 같이, 센스 및 안티센스 가닥의 올리고뉴클레오티드 번호는 각각 5' 말단에서 "위치 1"로 시작한다.

[0274] 일부 구현예에서, 센스 가닥의 위치 8, 9, 10 또는 11 중 하나 이상은 2'-F 기로 변형된다. 일부 구현예에서, 센스 가닥의 위치 3, 8, 9, 10, 12, 13, 및 17 중 하나 이상은 2'-F 기로 변형된다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 위치 2, 3, 4, 5, 7, 10, 및 14 중 하나 이상은 2'-F 기로 변형된다. 일부 구현예에서, 위치 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 및 19 중 하나 이상은 2'-F 기로 변형된다. 일부 구현예에서, 센스 가닥의 위치 1 내지 7 및 12 내지 20의 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티는 2'-OMe로 변형된다. 일부 구현예에서, 센스 가닥의 위치 1 내지 7, 12-27, 및 31-36의 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티는 2'-OMe로 변형된다. 일부 구현예에서, 센스 가닥의 위치 6, 9, 11-13, 15, 17, 18, 및 20-22의 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티는 2'-OMe로 변형된다.

[0275] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0276] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0277] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0278] c) 각각 서열번호 595 및 616;

[0279] d) 각각 서열번호 590 및 611;

[0280] e) 각각 서열번호 596 및 617;

[0281] f) 각각 서열번호 597 및 618;

[0282] g) 각각 서열번호 585 및 606;

[0283] h) 각각 서열번호 586 및 607; 및

[0284] i) 각각 서열번호 587 및 608,

[0285] 여기에서, 센스 가닥의 위치 8, 9, 10 또는 11 중 하나 이상은 2'-F 기로 변형된다.

[0286] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0287] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0288] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0289] c) 각각 서열번호 590 및 611;

[0290] d) 각각 서열번호 597 및 618; 및

[0291] e) 각각 서열번호 586 및 607,

[0292] 여기에서, 센스 가닥의 위치 8, 9, 10 또는 11 중 하나 이상은 2'-F 기로 변형된다.

[0293] 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 안티센스 가닥을 포함하되, 안티센스 가닥은, 2'-F로 변형된 안티센스 가닥의 위치 2, 5 및 14에서의 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티, 및 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA), 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형을 갖는 변형된 안티센스 가닥의 나머지 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티를 갖는다.

[0294] 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 안티센스 가닥을 포함하되, 안티센스 가닥은, 2'-F로 변형된 안티센스 가닥의 위치 1, 2, 5 및 14에서의 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티, 및 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA), 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형을 갖는 변형된 안티센스 가닥의 나머지 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티를 갖는다.

[0295] 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 안티센스 가닥을 포함하되, 안티센스 가닥은, 2'-F로 변형된 안티센스 가닥의 위치 2, 4, 5 및 14에서의 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티, 및 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA), 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형을 갖는 변형된 안티센스 가닥의 나머지 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티를 갖는다.

[0296] 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 안티센스 가닥을 포함하되, 안티센스 가닥은, 2'-F로 변형된 안티센스 가닥의 위치 1, 2, 3, 5, 7 및 14에서의 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티, 및 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA), 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형을 갖는 변형된 안티센스 가닥의 나머지 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티를 갖는다.

[0297] 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 안티센스 가닥을 포함하되, 안티센스 가닥은, 2'-F로 변형된 안티센스 가닥의 위치 2, 3, 4, 5, 7 및 14에서의 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티, 및 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE),

2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA), 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형을 갖는 변형된 안티센스 가닥의 나머지 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티를 갖는다.

[0298] 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 안티센스 가닥을 포함하되, 안티센스 가닥은, 2'-F로 변형된 안티센스 가닥의 위치 1, 2, 3, 5, 10 및 14에서의 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티, 및 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA), 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형을 갖는 변형된 안티센스 가닥의 나머지 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티를 갖는다.

[0299] 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 안티센스 가닥을 포함하되, 안티센스 가닥은, 2'-F로 변형된 안티센스 가닥의 위치 2, 3, 4, 5, 10 및 14에서의 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티, 및 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA), 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형을 갖는 변형된 안티센스 가닥의 나머지 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티를 갖는다.

[0300] 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 안티센스 가닥을 포함하되, 안티센스 가닥은, 2'-F로 변형된 안티센스 가닥의 위치 2, 3, 5, 7, 10 및 14에서의 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티, 및 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA), 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형을 갖는 변형된 안티센스 가닥의 나머지 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티를 갖는다.

[0301] 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 안티센스 가닥을 포함하되, 안티센스 가닥은, 2'-F로 변형된 안티센스 가닥의 위치 2, 3, 4, 5, 7, 10 및 14에서의 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티, 및 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA), 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형을 갖는 변형된 안티센스 가닥의 나머지 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티를 갖는다.

[0302] 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 안티센스 가닥을 포함하되, 안티센스 가닥은, 2'-F로 변형된 안티센스 가닥의 위치 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 및 19에서의 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티, 및 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA), 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형을 갖는 변형된 안티센스 가닥의 나머지 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티를 갖는다.

[0303] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 위치 1, 위치 2, 위치 3, 위치 4, 위치 5, 위치 6, 위치 7, 위치 8, 위치 9, 위치 10, 위치 11, 위치 12, 위치 13, 위치 14, 위치 15, 위치 16, 위치 17, 위치 18, 위치 19, 위치 20, 위치 21, 또는 위치 22에서 2'-F로 변형된 당 모이어티를 갖는 안티센스 가닥을 포함한다.

[0304] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 위치 1, 위치 2, 위치 3, 위치 4, 위치 5, 위치 6, 위치 7, 위치 8, 위치 9, 위치 10, 위치 11, 위치 12, 위치 13, 위치 14, 위치 15, 위치 16, 위치 17, 위치 18, 위치 19, 위치 20, 위치 21, 또는 위치 22에서 2'-OMe로 변형된 당 모이어티를 갖는 안티센스 가닥을 포함한다.

[0305] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 위치 1, 위치 2, 위치 3, 위치 4, 위치 5, 위치 6, 위치 7, 위치 8, 위치 9, 위치 10, 위치 11, 위치 12, 위치 13, 위치 14, 위치 15, 위치 16, 위치 17, 위치 18, 위치 19, 위치 20, 위치 21, 또는 위치 22에서 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA) 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형으로 변형된 당 모이어티를 갖는 안티센스 가닥을 포함한다.

[0306] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 위치 1, 위치 2, 위치 3, 위치 4, 위치 5, 위치 6, 위치 7, 위치 8, 위치 9, 위치 10, 위치 11, 위치 12, 위치 13, 위치 14, 위치 15, 위치 16, 위치 17, 위치 18, 위

치 19, 위치 20, 위치 21, 또는 위치 22에서 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA) 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형으로 변형된 당 모이어티를 갖는 안티센스 가닥을 포함한다.

[0307] 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 위치 8-11에서 2'-F로 변형된 당 모이어티를 갖는 센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 위치 3, 8, 9, 10, 12, 13 및 17에서 2'-F로 변형된 당 모이어티를 갖는 센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 위치 1 내지 7 및 12 내지 17 또는 12 내지 20에서 2'OMe로 변형된 당 모이어티를 갖는 센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 위치 1 내지 7, 12 내지 27 및 31 내지 36에서 2'OMe로 변형된 당 모이어티를 갖는 센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥은, 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA) 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형을 갖는 변형된 센스 가닥의 위치 1 내지 7 및 12 내지 17 또는 12 내지 20에서의 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티를 갖는다. 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 위치 1-2, 4-7, 11, 14-16 및 18-20에서 2'OMe로 변형된 당 모이어티를 갖는 센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥은, 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA) 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형을 갖는 변형된 센스 가닥의 위치 1 내지 2, 4 내지 7, 11, 14-16, 및 18-20에서의 뉴클레오티드 각각의 당 모이어티를 갖는다.

[0308] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 위치 1, 위치 2, 위치 3, 위치 4, 위치 5, 위치 6, 위치 7, 위치 8, 위치 9, 위치 10, 위치 11, 위치 12, 위치 13, 위치 14, 위치 15, 위치 16, 위치 17, 위치 18, 위치 19, 위치 20, 위치 21, 위치 22, 위치 23, 위치 24, 위치 25, 위치 26, 위치 27, 위치 28, 위치 29, 위치 30, 위치 31, 위치 32, 위치 33, 위치 34, 위치 35, 또는 위치 36에서 2'-F로 변형된 당 모이어티를 갖는 센스 가닥을 포함한다.

[0309] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 위치 1, 위치 2, 위치 3, 위치 4, 위치 5, 위치 6, 위치 7, 위치 8, 위치 9, 위치 10, 위치 11, 위치 12, 위치 13, 위치 14, 위치 15, 위치 16, 위치 17, 위치 18, 위치 19, 위치 20, 위치 21, 위치 22, 위치 23, 위치 24, 위치 25, 위치 26, 위치 27, 위치 28, 위치 29, 위치 30, 위치 31, 위치 32, 위치 33, 위치 34, 위치 35, 또는 위치 36에서 2'-OMe로 변형된 당 모이어티를 갖는 센스 가닥을 포함한다.

[0310] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 위치 1, 위치 2, 위치 3, 위치 4, 위치 5, 위치 6, 위치 7, 위치 8, 위치 9, 위치 10, 위치 11, 위치 12, 위치 13, 위치 14, 위치 15, 위치 16, 위치 17, 위치 18, 위치 19, 위치 20, 위치 21, 위치 22, 위치 23, 위치 24, 위치 25, 위치 26, 위치 27, 위치 28, 위치 29, 위치 30, 위치 31, 위치 32, 위치 33, 위치 34, 위치 35, 또는 위치 36에서 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA) 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형으로 변형된 당 모이어티를 갖는 센스 가닥을 포함한다.

[0311] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 위치 1, 위치 2, 위치 3, 위치 4, 위치 5, 위치 6, 위치 7, 위치 8, 위치 9, 위치 10, 위치 11, 위치 12, 위치 13, 위치 14, 위치 15, 위치 16, 위치 17, 위치 18, 위치 19, 위치 20, 위치 21, 위치 22, 위치 23, 위치 24, 위치 25, 위치 26, 위치 27, 위치 28, 위치 29, 위치 30, 위치 31, 위치 32, 위치 33, 위치 34, 위치 35, 또는 위치 36에서 2'-O-프로파르길, 2'-O-프로필아민, 2'-아미노, 2'-에틸, 2'-아미노에틸(EA), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA) 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산(2'-FANA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형으로 변형된 당 모이어티를 갖는 센스 가닥을 포함한다.

[0312] *5'-말단 포스페이트*

[0313] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 안티센스 가닥은 5'-말단 포스페이트를 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오티드의 5'-말단 포스페이트기는 Ago2와의 상호작용을 향상시킨다. 그러나, 5'-포스페이트기를 포함하는 올

리고뉴클레오티드는 생체 내에서 이들의 성능 및/또는 생체이용률을 제한할 수 있는, 인산화효소 또는 다른 효소를 통한 분해에 민감할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 이러한 분해에 내성이 있는 5' 포스페이트의 유사체를 포함한다. 일부 구현예에서, 포스페이트 유사체는 옥시메틸 포스포네이트, 비닐 포스포네이트 또는 말로닐 포스포네이트, 또는 이들의 조합이다. 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 말단은 천연 5'-포스페이트기의 정전기 및 입체 특성을 모방하는 화학적 모이어티("포스페이트 모방체")에 부착된다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0314] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0315] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0316] c) 각각 서열번호 595 및 616;

[0317] d) 각각 서열번호 590 및 611;

[0318] e) 각각 서열번호 596 및 617;

[0319] f) 각각 서열번호 597 및 618;

[0320] g) 각각 서열번호 585 및 606;

[0321] h) 각각 서열번호 586 및 607; 및

[0322] i) 각각 서열번호 587 및 608,

[0323] 여기에서, 올리고뉴클레오티드는 5'-말단 포스페이트, 선택적으로 5'-말단 포스페이트 유사체를 포함한다.

[0324] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0325] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0326] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0327] c) 각각 서열번호 590 및 611;

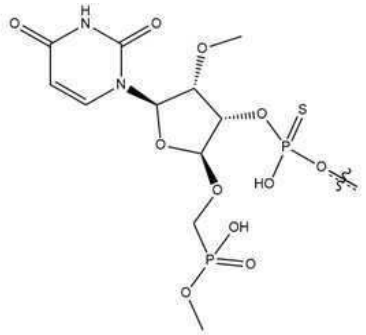
[0328] d) 각각 서열번호 597 및 618; 및

[0329] e) 각각 서열번호 586 및 607,

[0330] 여기에서, 올리고뉴클레오티드는 5'-말단 포스페이트, 선택적으로 5'-말단 포스페이트 유사체를 포함한다.

[0331] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 당의 4'-탄소 위치에 포스페이트 유사체("4'-포스페이트 유사체"로 지칭됨)를 갖는다. 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 제WO 2018/045317호를 참조한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 5'-말단 뉴클레오티드에 4'-포스페이트 유사체를 포함한다. 일부 구현예에서, 포스페이트 유사체는 옥시메틸 포스포네이트이며, 여기에서 옥시메틸기의 산소 원자는 당 모이어티 또는 이의 유사체에 (예를 들어, 이의 4'-탄소에서) 결합된다. 다른 구현예에서, 4'-포스페이트 유사체는 티오메틸포스포네이트 또는 아미노메틸포스포네이트이며, 여기에서 티오메틸기의 황 원자 또는 아미노 메틸기의 질소 원자는 당 모이어티 또는 이의 유사체의 4'-탄소에 결합된다. 특정 구현예에서, 4'-포스페이트 유사체는 옥시메틸 포스포네이트이다. 일부 구현예에서, 옥시메틸 포스포네이트는 화학식 $-O-CH_2-PO(OH)_2$, $-O-CH_2-PO(OR)_2$, 또는 $-O-CH_2-PO(OH)(R)$로 표시되며, 여기에서 R은 -H, $-CH_3$, 알킬기, $-CH_2CH_2CN$, $-CH_2OCOC(CH_3)_3$, $-CH_2OCH_2CH_2Si(CH_3)_3$ 또는 보호기로부터 독립적으로 선택된다. 특정 구현예에서, 알킬기는 CH_2CH_3이다. 보다 일반적으로, R은 H, CH_3 또는 CH_2CH_3으로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, R은 CH_3이다. 일부 구현예에서, 4'-포스페이트 유사체는 4'-옥시메틸 포스포네이트이다.

[0332] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 5'-말단 뉴클레오티드에서 4'-포스페이트 유사체를 포함하는 안티센스 가닥을 포함하되, 5'-말단 뉴클레오티드는 다음의 구조를 포함한다:

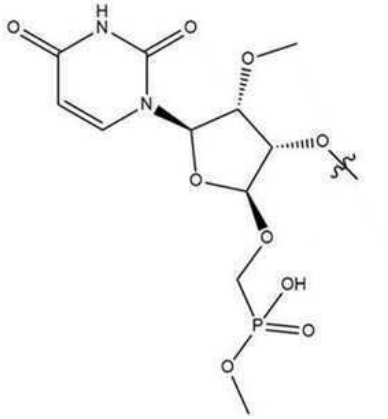


[0333]

[0334] (화학식 1)

[0335] 4'-O'-모노메틸포스포네이트-2'-O-메틸우리딘 포스포로티오에이트[Me포스포네이트-4O-mUs].

[0336] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 5'-말단 뉴클레오티드에서 4'-포스페이트 유사체를 포함하는 안티센스 가닥을 포함하되, 5'-말단 뉴클레오티드는 다음의 구조를 포함한다:



[0337]

[0338] (화학식 1a)

[0339] 4'-O'-모노메틸포스포네이트-2'-O-메틸우리딘[Me포스포네이트-4O-mU].

[0340] 화학식 1a는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 결합이 제공될 경우, 4'-O-모노메틸포스포네이트-2'-O-메틸우리딘 포스포로티오에이트[Me포스포네이트-4O-mUs]로서 지칭될 수 있다.

[0341] *변형된 뉴클레오티드간 결합*

[0342] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 변형된 뉴클레오티트간 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, 포스페이트 변형 또는 치환은 적어도 약 1개(예를 들어, 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 또는 적어도 5개)의 변형된 뉴클레오티드간 결합을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 생성한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나는 약 1 내지 약 10개(예를 들어, 1 내지 10개, 2 내지 8개, 4 내지 6개, 3 내지 10개, 5 내지 10개, 1 내지 5개, 1 내지 3개, 또는 1 내지 2개)의 변형된 뉴클레오티드간 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 변형된 뉴클레오티드간 결합을 포함한다.

[0343] 변형된 뉴클레오티드간 결합은 포스포로디티오에이트 결합, 포스포로티오에이트 결합, 포스포트리에스테르 결합, 티오노알킬포스포네이트 결합, 포스포라미디트 결합, 포스포네이트 결합 또는 보라노포스페이트 결합일 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나의 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이다.

[0344] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 센스 가닥의 위치 1 및 2 중 하나 이상, 안티센스 가닥의 위치 1 및 2, 안티센스 가닥의 위치 2 및 3, 안티센스 가닥의 위치 3 및 4, 안티센스 가닥의 위치 20 및 21, 및 안티센스 가닥의 위치 21 및 22 사이에서 포스포로티오에이트 결합을 갖는다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드는, 각각의 센스 가닥의 위치 1 및 2, 안티센스 가닥의 위치 1 및 2, 안티센스 가닥의 위치 2 및 3, 안티센스 가닥의 위치 20 및 21, 및 안티센스 가닥의 위치 21

및 22 사이에서 포스포로티오에이트 결합을 갖는다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0345] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0346] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0347] c) 각각 서열번호 595 및 616;

[0348] d) 각각 서열번호 590 및 611;

[0349] e) 각각 서열번호 596 및 617;

[0350] f) 각각 서열번호 597 및 618;

[0351] g) 각각 서열번호 585 및 606;

[0352] h) 각각 서열번호 586 및 607; 및

[0353] i) 각각 서열번호 587 및 608.

[0354] 여기에서, 올리고뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드간 결합을 포함한다.

[0355] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0356] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0357] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0358] c) 각각 서열번호 590 및 611;

[0359] d) 각각 서열번호 597 및 618; 및

[0360] e) 각각 서열번호 586 및 607,

[0361] 여기에서, 올리고뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드간 결합을 포함한다.

[0362] *염기 변형*

[0363] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 하나 이상의 변형된 핵염기를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 핵염기(본원에서 염기 유사체로도 지칭됨)는 뉴클레오티드 당 모이어티의 1' 위치에서 연결된다. 특정 구현예에서, 변형된 핵염기는 질소계 염기이다. 일부 구현예에서, 변형된 핵염기는 질소 원자를 함유하지 않는다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2008/0274462호를 참조한다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 범용 염기를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 핵염기를 함유하지 않는다(무염기). 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0364] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0365] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0366] c) 각각 서열번호 595 및 616;

[0367] d) 각각 서열번호 590 및 611;

[0368] e) 각각 서열번호 596 및 617;

[0369] f) 각각 서열번호 597 및 618;

[0370] g) 각각 서열번호 585 및 606;

[0371] h) 각각 서열번호 586 및 607; 및

[0372] i) 각각 서열번호 587 및 608.

[0373] 여기에서, 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 핵염기를 포함한다.

[0374] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0375] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0376] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0377] c) 각각 서열번호 590 및 611;

[0378] d) 각각 서열번호 597 및 618; 및

[0379] e) 각각 서열번호 586 및 607,

[0380] 여기에서, 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 핵염기를 포함한다.

[0381] 일부 구현예에서, 범용 염기는 변형된 뉴클레오티드 중 뉴클레오티드 당 모이어티의 1' 위치, 또는 뉴클레오티드 당 모이어티 치환에서의 등가의 위치에 위치하는 헤테로시클릭 모이어티이며, 이는, 이중체에 존재할 때, 이중체의 구조를 실질적으로 변경시키지 않고 하나 이상의 유형의 염기에 대향하여 위치될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 핵산(예를 들어, *TMPRSS6* mRNA)에 완전히 상보성인 기준 단일 가닥 핵산(예를 들어, 올리고뉴클레오티드)과 비교하여, 범용 염기를 함유하는 단일 가닥 핵산은 상보성 핵산으로 형성된 이중체보다 낮은 T_m를 갖는 표적 핵산을 갖는 이중체를 형성한다. 일부 구현예에서, 범용 염기가 단일 불일치를 생성하도록 염기와 치환되는 기준 단일 가닥 핵산과 비교할 때, 범용 염기를 함유하는 단일 가닥 핵산은, 불일치된 염기를 포함하는 핵산으로 형성된 이중체보다 더 높은 T_m을 갖는 표적 핵산을 갖는 이중체를 형성한다.

[0382] 범용 결합 뉴클레오티드의 비제한적인 예는, 이노신, 1-β-D-리보푸라노실-5-니트로인돌 및/또는 1-β-D-리보푸라노실-3-니트로피롤을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다(미국 특허 출원 공개 제2007/0254362호; Van Aerschot 등 (1995) Nucleic Acids Res. 23:4363-4370; Loakes 등 (1995) Nucleic Acids Res. 23:2361-66; 및 Loakes & Brown (1994) Nucleic Acids Res. 22:4039-43 참조).

[0383] *표적화 리간드*

[0384] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)를 하나 이상의 세포 또는 세포 유형, 조직, 기관, 또는 해부학적 영역 또는 구획으로 표적화하는 것이 바람직하다. 이러한 전략은 치료된 유기체에 대한 바람직하지 않은 효과를 피하고/하거나 올리고뉴클레오티드 또는 이의 효과(예를 들어, *TMPRSS6* 발현의 억제 또는 감소)로부터 이익을 얻지 못하는 세포, 조직, 기관 또는 해부학적 영역 또는 구획에 대한 올리고뉴클레오티드의 과도한 손실을 피하는 데 도움이 될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 특정 세포 또는 세포 유형, 조직, 기관, 또는 해부학적 영역 또는 구획에 대한 표적화 및/또는 전달을 용이하게 하도록(예를 들어, 간으로의 올리고뉴클레오티드의 전달을 용이하게 하도록) 변형된다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 표적화 리간드(들)에 접합된 적어도 하나의 뉴클레오티드(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 그 이상의 뉴클레오티드)를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0385] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0386] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0387] c) 각각 서열번호 595 및 616;

[0388] d) 각각 서열번호 590 및 611;

[0389] e) 각각 서열번호 596 및 617;

[0390] f) 각각 서열번호 597 및 618;

[0391] g) 각각 서열번호 585 및 606;

[0392] h) 각각 서열번호 586 및 607; 및

[0393] i) 각각 서열번호 587 및 608,

[0394] 여기에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 뉴클레오티드에 접합된 표적화 리간드를 포함한다.

[0395] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0396] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0397] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0398] c) 각각 서열번호 590 및 611;

[0399] d) 각각 서열번호 597 및 618; 및

[0400] e) 각각 서열번호 586 및 607,

[0401] 여기에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 뉴클레오티드에 접합된 표적화 리간드를 포함한다.

[0402] 일부 구현예에서, 표적화 리간드는 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 또는 단백질(예를 들어, 항체 또는 항체 단편), 또는 지질의 일부를 포함한다. 특정 구현예에서, 표적화 리간드는 적어도 하나의 GalNAc 모이어티를 포함하는 탄수화물이다.

[0403] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)의 1개 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 뉴클레오티드는 각각 별도의 표적화 리간드(예를 들어, GalNAc 모이어티)에 접합된다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 2 내지 4개의 뉴클레오티드는 각각 별도의 표적화 리간드에 접합된다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드는, 표적화 리간드가 칫솔의 솔과 유사하고, 올리고뉴클레오티드가 칫솔과 유사하도록, 센스 또는 안티센스 가닥의 단부 중 하나에서 2 내지 4개의 뉴클레오티드에 접합된다(예를 들어, 표적화 리간드는 센스 또는 안티센스 가닥의 5' 또는 3' 말단 상에서 2 내지 4개의 뉴클레오티드 오버행 또는 연장부에 접합된다), 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥의 5' 또는 3' 말단에 줄기-루프를 포함할 수 있고, 줄기의 루프의 1, 2, 3 또는 4개 뉴클레오티드는 표적화 리간드에 개별적으로 접합될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시에서 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 센스 가닥의 3' 말단에 줄기-루프를 포함하되, 줄기-루프의 루프는 트리루프 또는 테트라루프를 포함하고, 여기에서 트리루프 또는 테트라루프를 포함하는 3 또는 4개 뉴클레오티드는 표적화 리간드에 각각 개별적으로 접합된다. 일부 구현예에서, 본 개시에서 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 센스 가닥의 3' 말단에 줄기-루프를 포함하되, 줄기-루프의 루프는 테트라루프를 포함하고, 여기에서 테트라루프의 3개 뉴클레오티드는 표적화 리간드에 개별적으로 접합된다.

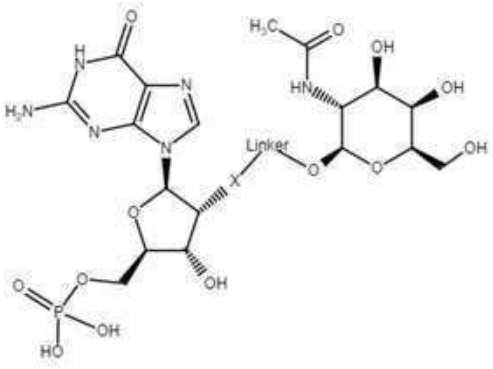
[0404] GalNAc는 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)에 대한 고친화성 탄수화물 리간드이며, 이는 간세포의 표면에서 주로 발현되고 말단 갈락토오스 또는 GalNAc 잔기(아시알로당단백질)를 함유하는 순환 당단백질의 결합, 내재화 및 후속 제거에 주요 역할을 한다. 본 개시의 올리고뉴클레오티드에 대한 GalNAc 모이어티의 (간접적 또는 직접적) 접합을 사용하여 이들 올리고뉴클레오티드를 세포 상에서 발현된 ASGPR에 표적화할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 적어도 하나 이상의 GalNAc 모이어티에 접합되되, GalNAc 모이어티는 인간 간 세포(예를 들어, 인간 간세포) 상에서 발현된 ASGPR에 올리고뉴클레오티드를 표적화한다. 일부 구현예에서, GalNAc 모이어티는 올리고뉴클레오티드를 간에 표적화한다.

[0405] 일부 구현예에서, 본 개시의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 1가 GalNAc 모이어티에 직접 또는 간접적으로 접합된다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 1가 GalNAc에 직접 또는 간접적으로 접합된다(즉, 2, 3 또는 4개의 1가 GalNAc 모이어티에 접합되고, 일반적으로 3 또는 4개의 1가 GalNAc 모이어티에 접합된다). 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 2가 GalNAc, 3가 GalNAc 또는 4가 GalNAc 모이어티에 접합된다. 일부 구현예에서, 2가, 3가 또는 4가 GalNAc 모이어티는 분지형 링커를 통해 올리고뉴클레오티드에 접합된다. 일부 구현예에서, 1가 GalNAc 모이어티는 제1 뉴클레오티드에 접합되고 2가, 3가 또는 4가 GalNAc 모이어티는 분지형 링커를 통해 제2 뉴클레오티드에 접합된다.

[0406] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)의 하나(1개) 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 뉴클레오티드는 각각 GalNAc 모이어티에 접합된다. 일부 구현예에서, 테트라루프의 두개(2개) 내지 네개(4개)의 뉴클레오티드는 각각 별도의 GalNAc 모이어티에 접합된다. 일부 구현예에서, 트리루프의 하나(1개) 내지 세개(3개)의 뉴클레오티드는 각각 별도의 GalNAc 모이어티에 접합된다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드는, GalNAc 모이어티가 칫솔의 솔과 유사하고, 올리고뉴클레오티드가 칫솔과 유사하도록, 센스 또는 안티센스 가닥의 단부 중 하나에서 두개(2개) 내지 네개(4개)의 뉴클레오티드에 접합된다(예

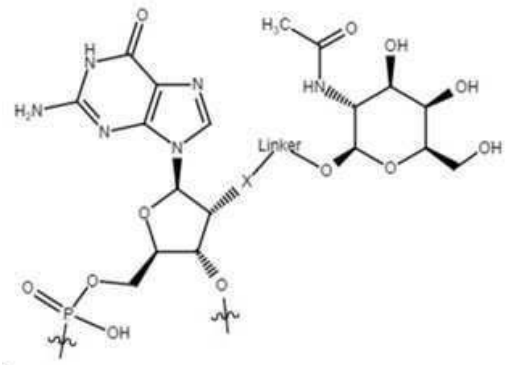
를 들어, 리간드는 센스 또는 안티센스 가닥의 5' 또는 3' 말단 상에서 두개(2개) 내지 네개(4개)의 뉴클레오티드 오버행 또는 연장부에 접합된다), 일부 구현예에서, GalNAc 모이어티는 센스 가닥의 뉴클레오티드에 접합된다. 예를 들어, 세개(3개) 또는 네개(4개)의 GalNAc 모이어티가 센스 가닥의 테트라루프에서 뉴클레오티드에 접합될 수 있으며, 여기에서 각각의 GalNAc 모이어티는 하나(1개)의 뉴클레오티드에 접합된다.

[0407] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 테트라루프를 포함하되, 테트라루프(테트라Lp)는 아데닌(A) 및 구아닌(G) 뉴클레오티드의 임의의 조합이다. 일부 구현예에서, 테트라루프(테트라Lp)는 아래의 화학식 2에 도시된 바와 같이, 본원에 기술된 임의의 링커를 통해 테트라루프의 하나 이상의 구아닌(G) 뉴클레오티드 중 어느 하나에 부착된 1가 GalNAc 모이어티를 포함한다(X = 헤테로원자):

[0408] 

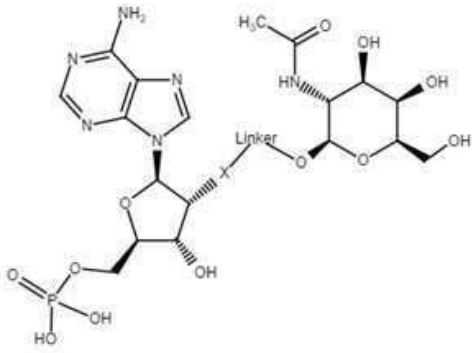
[0409] (화학식 2).

[0410] 올리고뉴클레오티드 중 포함되었을 때, 화학식 2는 이웃하는 뉴클레오티드에 공유 결합될 수 있는 것으로 이해된다. 일부 구현예에서, 테트라루프(테트라Lp)는 아래의 화학식 2a에 도시된 바와 같이, 본원에 기술된 임의의 링커를 통해 테트라루프의 하나 이상의 구아닌(G) 뉴클레오티드 중 어느 하나에 부착된 1가 GalNAc 모이어티를 포함한다(X = 헤테로원자):

[0411] 

[0412] (화학식 2a).

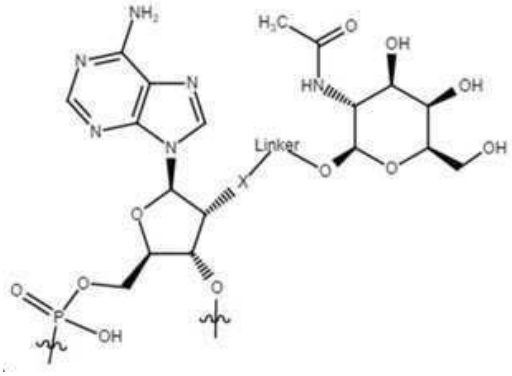
[0413] 일부 구현예에서, 테트라루프(테트라Lp)는 아래의 화학식 3에 도시된 바와 같이, 본원에 기술된 임의의 링커를 통해 테트라루프의 하나 이상의 아데닌(A) 뉴클레오티드 중 어느 하나에 부착된 1가 GalNAc를 갖는다(X = 헤테로원자):



[0414]

[0415] (화학식 3).

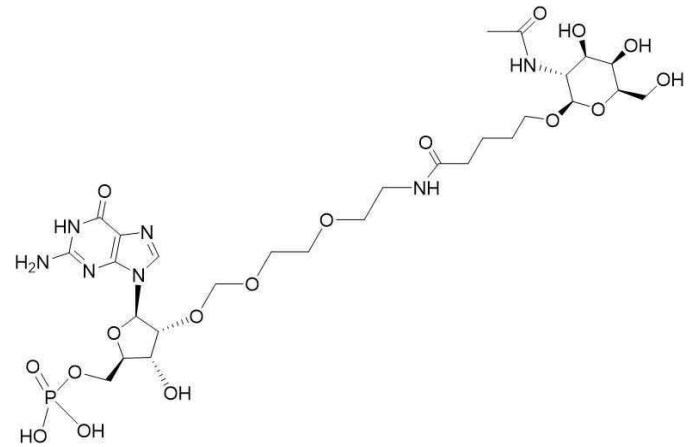
[0416] 올리고뉴클레오티드 중 포함되었을 때, 화학식 3은 이웃하는 뉴클레오티드에 공유 결합될 수 있는 것으로 이해된다. 일부 구현예에서, 테트라루프(테트라Lp)는 아래의 화학식 3a에 도시된 바와 같이, 본원에 기술된 임의의 링커를 통해 테트라루프의 하나 이상의 아데닌(A) 뉴클레오티드 중 어느 하나에 부착된 1가 GalNAc를 갖는다(X = 헤테로원자):



[0417]

[0418] (화학식 3a).

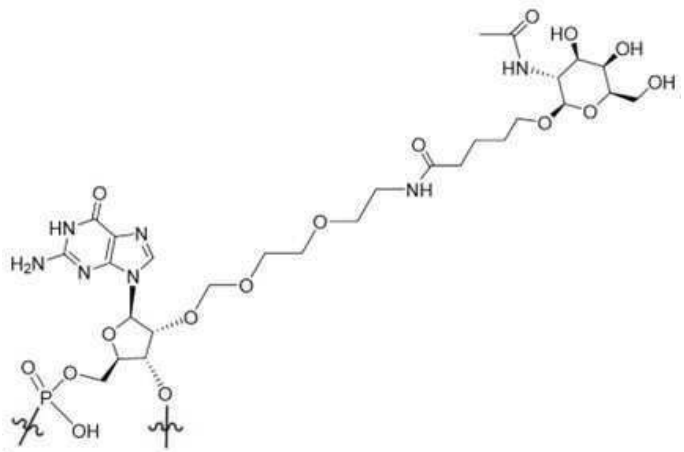
[0419] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 아래에 도시된 바와 같이 (화학식 4), [ademG-GalNAc] 또는 2'-아미노디에톡시메탄올-구아닌-GalNAc로 지칭되는 구아닌(G) 뉴클레오티드에 부착된 1가 GalNAc 모이어티를 포함한다:



[0420]

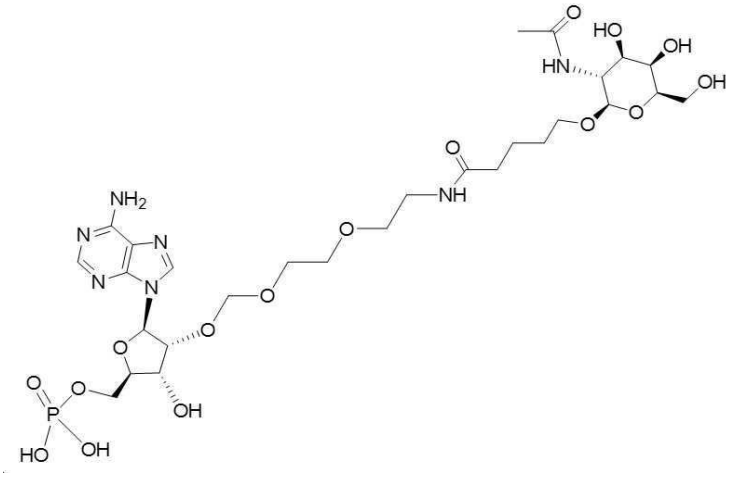
[0421] (화학식 4).

[0422] 올리고뉴클레오티드 중 포함되었을 때, 화학식 4는, 아래의 화학식 4a에 나타낸 경우와 같이, 이웃하는 뉴클레오티드에 결합될 수 있는 것으로 이해된다:

[0423] 

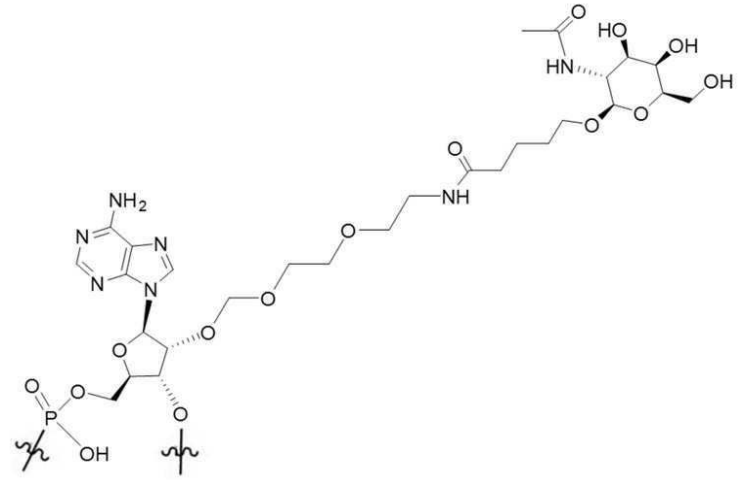
[0424] (화학식 4a).

[0425] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 아래에 도시된 바와 같이(화학식 5), [ademA-GalNAc] 또는 2'-아미노디에톡시메탄올-아데닌-GalNAc로 지칭되는 아데닌 뉴클레오티드에 부착된 1가 GalNAc 모이어티를 포함한다:

[0426] 

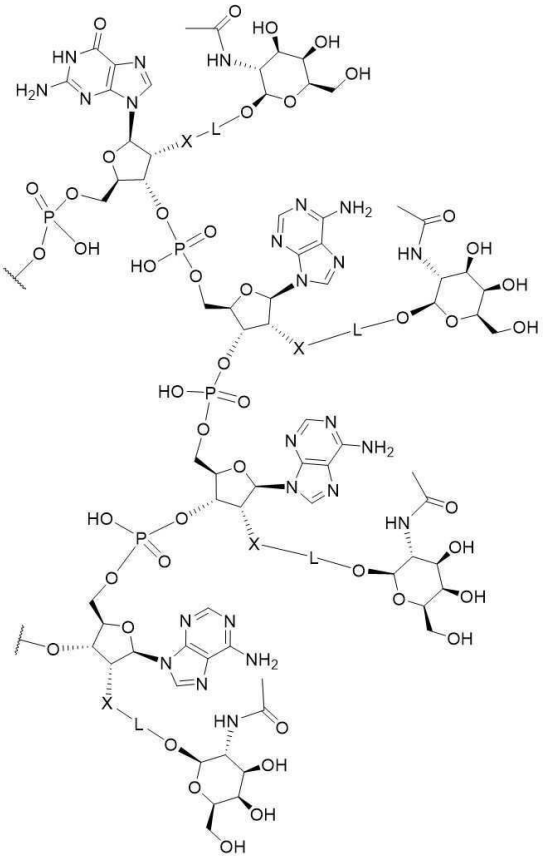
[0427] (화학식 5).

[0428] 올리고뉴클레오티드 중 포함되었을 때, 화학식 5는, 아래의 화학식 5a에 나타낸 경우와 같이, 이웃하는 뉴클레오티드에 결합될 수 있는 것으로 이해된다:

[0429] 

[0430] (화학식 5a).

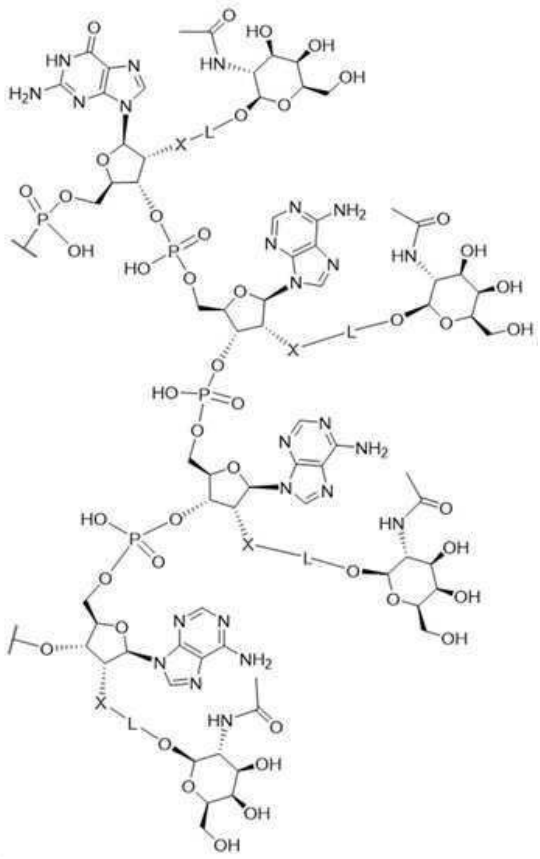
[0431] 이러한 접합의 예는 5'에서 3'까지 뉴클레오티드 서열 GAAA를 포함하는 루프에 대해 아래에 도시되어 있다(화학식 6)(L = 링커, X = 헤테로원자). 이러한 루프는, 예를 들어, 본원에서 제공된 센스 가닥의 위치 27 내지 30에 존재할 수 있다. 화학식 중, ≈ 은 올리고뉴클레오티드 가닥에 대한 부착점을 기술하기 위해 사용된다(화학식 6).



[0432]

[0433] (화학식 6).

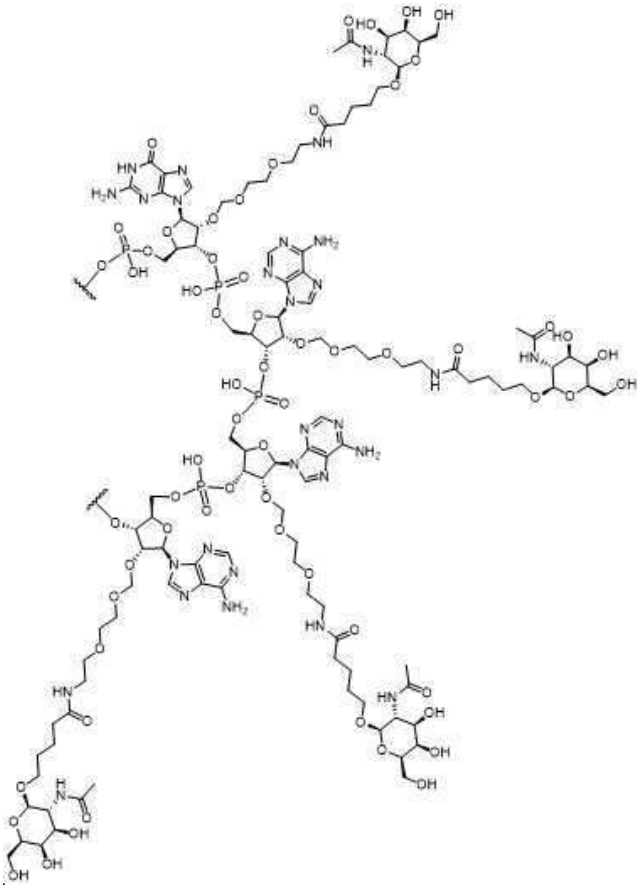
[0434] 이러한 접합의 또 다른 예는 5'에서 3'까지 뉴클레오티드 서열 GAAA를 포함하는 루프에 대해 아래에 도시되어 있다(화학식 6a)(L = 링커, X = 헤테로원자). 이러한 루프는, 예를 들어, 본원에서 제공된 센스 가닥의 위치 27 내지 30에 존재할 수 있다. 화학식 중, ≈ 은 올리고뉴클레오티드 가닥에 대한 부착점을 기술하기 위해 사용된다.



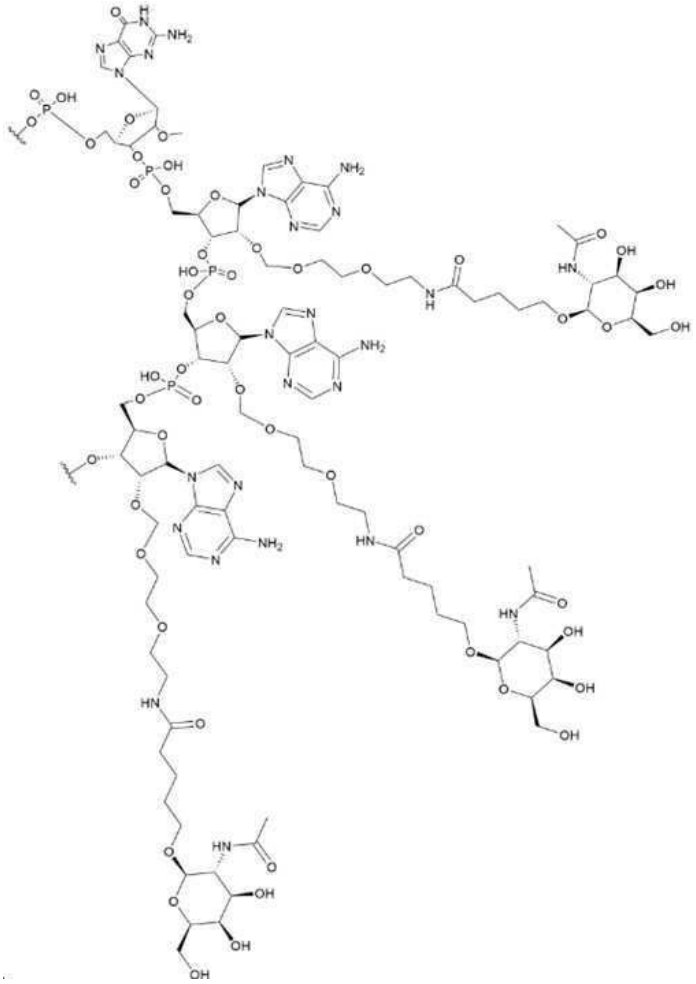
[0435]

[0436] (화학식 6a).

[0437] 적절한 방법 또는 화학검사(예를 들어, 클릭 화학검사)를 사용하여 표적화 리간드를 뉴클레오티드에 연결할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드는 클릭 링커를 사용하여 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)를 포함하는 뉴클레오티드에 접합된다. 일부 구현예에서, 아세탈계 링커는 표적화 리간드를 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나의 뉴클레오티드에 접합시키는 데 사용된다. 아세탈계 링커는, 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 제WO2016/100401호에 개시되어 있다. 일부 구현예에서, 링커는 불안정한 링커이다. 그러나, 다른 구현예에서, 링커는 안정적이다. 아세탈 링커를 사용하여 GalNAc 모이어티가 루프의 뉴클레오티드에 부착되는, 5'에서 3'까지 뉴클레오티드 GAAA를 포함하는 루프에 대한 실시예가 아래에 도시되어 있다(화학식 7 및 화학식 8). 이러한 루프는, 예를 들어, 센스 가닥의 위치 27 내지 30 중 어느 하나에 존재할 수 있다. 화학식 중,  은 올리고뉴클레오티드 가닥에 대한 부착점이다(화학식 7 및 화학식 8).

[0438] 

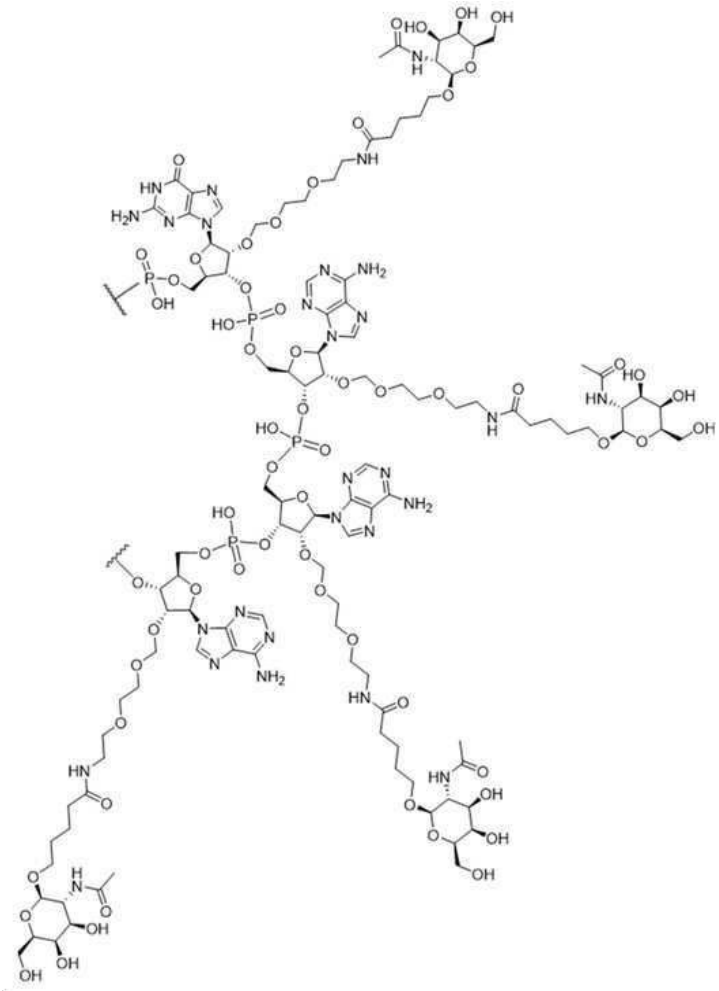
[0439] (화학식 7), 또는



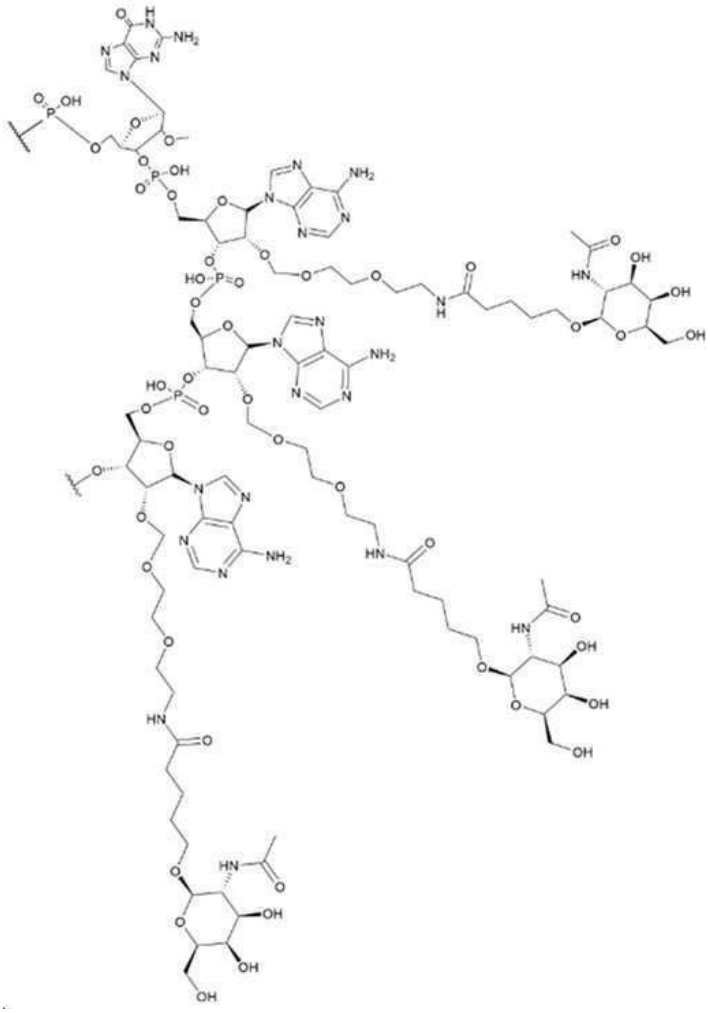
[0440]

[0441] (화학식 8).

[0442] 아세탈 링커를 사용하여 GalNAc 모이어티가 루프의 뉴클레오티드에 부착되는, 5'에서 3'까지 뉴클레오티드 GAAA를 포함하는 루프에 대한 실시예가 아래에 도시되어 있다(화학식 7a 및 화학식 8a). 이러한 루프는, 예를 들어, 센스 가닥의 위치 27 내지 30 중 어느 하나에 존재할 수 있다. 화학식 중, 은 올리고뉴클레오티드 가닥에 대한 부착점이다(화학식 7a 및 화학식 8a).

[0443] 

[0444] (화학식 7a), 또는



[0445]

[0446] (화학식 8a).

[0447] 언급된 바와 같이, 다양한 적절한 방법 또는 화학적 합성 기술(예를 들어, 클릭 화학검사)를 사용하여 표적화 리간드를 뉴클레오티드에 연결할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드는 클릭 링커를 사용하여 뉴클레오티드에 접합된다. 일부 구현예에서, 아세탈계 링커는 표적화 리간드를 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나의 뉴클레오티드에 접합시키는 데 사용된다. 아세탈계 링커는, 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 제 WO2016/100401호에 개시되어 있다. 일부 구현예에서, 링커는 불안정한 링커이다. 그러나, 다른 구현예에서, 링커는 안정적인 링커이다.

[0448] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 이에 접합된 GalNAc를 갖지 않는다.

[0449] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0450] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0451] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0452] c) 각각 서열번호 595 및 616;

[0453] d) 각각 서열번호 590 및 611;

[0454] e) 각각 서열번호 596 및 617;

[0455] f) 각각 서열번호 597 및 618;

[0456] g) 각각 서열번호 585 및 606;

[0457] h) 각각 서열번호 586 및 607; 및

[0458] i) 각각 서열번호 587 및 608,

[0459] 여기에서, 올리고뉴클레오티드는 뉴클레오티드에 접합된 적어도 하나의 GalNAc 모이어티를 포함한다.

[0460] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0461] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0462] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0463] c) 각각 서열번호 590 및 611;

[0464] d) 각각 서열번호 597 및 618; 및

[0465] e) 각각 서열번호 586 및 607,

[0466] 여기에서, 올리고뉴클레오티드는 뉴클레오티드에 접합된 적어도 하나의 GalNAc 모이어티를 포함한다.

[0467] *TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 예시적인 올리고뉴클레오티드*

[0468] 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 모든 뉴클레오티드는 변형되고, 여기에서 안티센스 가닥은 서열번호 661-852 중 어느 하나의 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하고, 여기에서 상보성 영역은 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 5'-말단 뉴클레오티드는 본원에 기술된 바와 같은, 4'-O-모노메틸포스포네이트-2'-O-메틸우리딘[Me포스포네이트-4O-mU]를 포함한다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 5'-말단 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 하나 이상의 2'-플루오로(2'-F) 및 2'-O-메틸(2'-OMe) 변형된 뉴클레오티드 및 적어도 하나의 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 네개(4개)의 포스포로티오에이트 결합을 포함하고, 센스 가닥은 하나(1개)의 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 다섯개(5개)의 포스포로티오에이트 결합을 포함하고, 센스 가닥은 하나(1개)의 포스포로티오에이트 결합을 포함한다.

[0469] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 193-384 중 어느 하나의 서열을 갖는 센스 가닥 및 서열번호 385-576으로부터 선택되는 상보성 서열을 포함하는 안티센스 서열을 포함한다.

[0470] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 577-597 중 어느 하나의 서열을 갖는 센스 가닥 및 서열번호 598-618로부터 선택되는 상보성 서열을 포함하는 안티센스 서열을 포함한다.

[0471] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 619-639 중 어느 하나의 서열을 갖는 센스 가닥 및 서열번호 640-660으로부터 선택되는 상보성 서열을 포함하는 안티센스 서열을 포함한다.

[0472] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는:

[0473] 36 뉴클레오티드의 센스 가닥으로서, 위치 8 내지 11에 2'-F 변형된 뉴클레오티드, 위치 1 내지 7, 12 내지 27, 및 31 내지 36에 2'-OMe 변형된 뉴클레오티드, 위치 28, 29 및 30에 GalNAc-접합된 뉴클레오티드; 및 위치 1과 2 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함하는, 센스 가닥;

[0474] 22 뉴클레오티드의 안티센스 가닥으로서, 위치 2, 3, 4, 5, 7, 10 및 14에 2'-F 변형된 뉴클레오티드, 위치 1, 6, 8, 9, 11 내지 13, 및 15 내지 22에 2'-OMe, 위치 1과 2, 위치 2와 3, 위치 3과 4, 위치 20과 21, 및 위치 21과 22 사이에 포스포로티오에이트 결합, 및 위치 1에 4'-포스페이트 유사체를 포함하는 5'-말단 뉴클레오티드를 포함하되, 선택적으로, 5'-말단 뉴클레오티드는 4'-O-모노메틸포스포네이트-2'-O-메틸우리딘[Me포스포네이트-4O-mU]을 포함하는, 안티센스 가닥을 포함하되; 안티센스 가닥의 위치 1 내지 20은 센스 가닥의 위치 1 내지

20과 이중체 영역을 형성하고, 센스 가닥의 위치 21 내지 36은 줄기-루프를 형성하고, 여기에서 위치 27 내지 30은 줄기-루프의 루프를 형성하되, 선택적으로 위치 27 내지 30은 테트라루프를 포함하고, 안티센스 가닥의 위치 21 및 22는 오버행을 포함하고, 여기에서 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0475] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0476] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0477] c) 각각 서열번호 595 및 616;

[0478] d) 각각 서열번호 590 및 611;

[0479] e) 각각 서열번호 596 및 617;

[0480] f) 각각 서열번호 597 및 618;

[0481] g) 각각 서열번호 585 및 606;

[0482] h) 각각 서열번호 586 및 607; 및

[0483] i) 각각 서열번호 587 및 608.

[0484] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는:

[0485] 36 뉴클레오티드의 센스 가닥으로서, 위치 8 내지 11에 2'-F 변형된 뉴클레오티드, 위치 1 내지 7, 12 내지 27, 및 31 내지 36에 2'-OMe 변형된 뉴클레오티드, 위치 28, 29 및 30에 GalNAc-접합된 뉴클레오티드; 및 위치 1과 2 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함하는, 센스 가닥;

[0486] 22 뉴클레오티드의 안티센스 가닥으로서, 위치 2, 3, 4, 5, 7, 10 및 14에 2'-F 변형된 뉴클레오티드, 위치 1, 6, 8, 9, 11 내지 13, 및 15 내지 22에 2'-OMe, 위치 1과 2, 위치 2와 3, 위치 3과 4, 위치 20과 21, 및 위치 21과 22 사이에 포스포로티오에이트 결합, 및 위치 1에 4'-포스페이트 유사체를 포함하는 5'-말단 뉴클레오티드를 포함하되, 선택적으로, 5'-말단 뉴클레오티드는 4'-O-모노메틸포스포네이트-2'-O-메틸우리딘[Me포스포네이트-4O-mU]을 포함하는, 안티센스 가닥을 포함하되; 안티센스 가닥의 위치 1 내지 20은 센스 가닥의 위치 1 내지 20과 이중체 영역을 형성하고, 센스 가닥의 위치 21 내지 36은 줄기-루프를 형성하고, 여기에서 위치 27 내지 30은 줄기-루프의 루프를 형성하되, 선택적으로 위치 27 내지 30은 테트라루프를 포함하고, 안티센스 가닥의 위치 21 및 22는 오버행을 포함하고, 여기에서 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0487] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0488] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0489] c) 각각 서열번호 590 및 611;

[0490] d) 각각 서열번호 597 및 618; 및

[0491] e) 각각 서열번호 586 및 607.

[0492] 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 TMPRSS6-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 579에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 600에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 TMPRSS6-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 580에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 601에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 590에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 611에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 597에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 618에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 586에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하

는 센스 가닥 및 서열번호 607에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다.

[0493] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 184에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역을 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함하되, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0494] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 181에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역을 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함하되, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0495] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 158에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역을 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함하되, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0496] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 134에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역을 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함하되, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0497] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 102에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역을 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함하되, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0498] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 184에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역 및 3' 말단에 줄기-루프를 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함하되, 줄기-루프는 S1-Lp-S2로서 제시되고, 여기에서 S1은 S2에 상보성이고 Lp는 S1과 S2 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성하고, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0499] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 181에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역 및 3' 말단에 줄기-루프를 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함하되, 줄기-루프는 S1-Lp-S2로서 제시되고, 여기에서 S1은 S2에 상보성이고 Lp는 S1과 S2 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성하고, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0500] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA

표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 158에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역 및 3' 말단에 줄기-루프를 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함하되, 줄기-루프는 S1-Lp-S2로서 제시되고, 여기에서 S1은 S2에 상보성이고 Lp는 S1과 S2 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성하고, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0501] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 134에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역 및 3' 말단에 줄기-루프를 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함하되, 줄기-루프는 S1-Lp-S2로서 제시되고, 여기에서 S1은 S2에 상보성이고 Lp는 S1과 S2 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성하고, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0502] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 102에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역 및 3' 말단에 줄기-루프를 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함하되, 줄기-루프는 S1-Lp-S2로서 제시되고, 여기에서 S1은 S2에 상보성이고 Lp는 S1과 S2 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성하고, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0503] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 184에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역을 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥으로서, 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역은 서열번호 844에 제시된 센스 가닥을 포함하되, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0504] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 181에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역을 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥으로서, 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역은 서열번호 841에 제시된 센스 가닥을 포함하되, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0505] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 158에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역을 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥으로서, 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역은 서열번호 818에 제시된 센스 가닥을 포함하되, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0506] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 134에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역을 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥으로서, 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역은 서열번호 794에 제시된 센스 가닥을 포함하되, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0507] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고

뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 102에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역을 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥으로서, 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역은 서열번호 762에 제시된 센스 가닥을 포함하되, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0508] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 184에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역 및 3' 말단에 줄기-루프를 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥으로서, 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역은 서열번호 844에 제시되는, 센스 가닥을 포함하되, 줄기-루프는 S1-Lp-S2로서 제시되고, 여기에서 S1은 S2에 상보성이고 Lp는 S1과 S2 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성하고, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0509] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 181에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역 및 3' 말단에 줄기-루프를 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥으로서, 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역은 서열번호 841에 제시되는, 센스 가닥을 포함하되, 줄기-루프는 S1-Lp-S2로서 제시되고, 여기에서 S1은 S2에 상보성이고 Lp는 S1과 S2 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성하고, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0510] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 158에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역 및 3' 말단에 줄기-루프를 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥으로서, 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역은 서열번호 818에 제시되는, 센스 가닥을 포함하되, 줄기-루프는 S1-Lp-S2로서 제시되고, 여기에서 S1은 S2에 상보성이고 Lp는 S1과 S2 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성하고, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0511] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 134에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역 및 3' 말단에 줄기-루프를 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥으로서, 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역은 서열번호 794에 제시되는, 센스 가닥을 포함하되, 줄기-루프는 S1-Lp-S2로서 제시되고, 여기에서 S1은 S2에 상보성이고 Lp는 S1과 S2 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성하고, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0512] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하되, 상보성 영역은 서열 번호 102에 제시된 상보성 영역인, 안티센스 가닥; 및 (ii) 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역 및 3' 말단에 줄기-루프를 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥으로서, 안티센스 가닥에 대한 상보성 영역은 서열번호 762에 제시되는, 센스 가닥을 포함하되, 줄기-루프는 S1-Lp-S2로서 제시되고, 여기에서 S1은 S2에 상보성이고 Lp는 S1과 S2 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성하고, 안티센스 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥이다.

[0513] 일부 구현예에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)를 제공하되, 올리고뉴클레오티드는 다음에 따른 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함한다:

[0514] **센스 가닥:** 5'-mX-*S*-mX-mX-mX-mX-mX-mX-fX-fX-fX-fX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-[ademX-GalNAc]-[ademX-GalNAc]-[ademX-GalNAc]-mX-mX-mX-mX-mX-mX- 3';

[0515] 다음으로 혼성화됨:

[0516] **안티센스 가닥:** 5'-[Me포스포네이트-4O-mX]-*S*-fX-*S*-fX-*S*-fX-fX-mX-fX-mX-mX-fX-mX-mX-mX-fX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-*S*-mX-*S*-mX-3';

[0517] 여기에서, mX = 2'-*O*-메틸 변형된 뉴클레오티드이고,

[0518] fX = 2'-플루오로 변형된 뉴클레오티드이고,

[0519] -*S*- = 포스포로티오에이트 결합이고,

[0520] - = 포스포디에스테르 결합이고,

[0521] [Me포스포네이트-4O-mX] = 4'-O-모노메틸포스포네이트-2'-O-메틸 변형된 뉴클레오티드이고,

[0522] ademX-GalNAc = 뉴클레오티드에 부착된 GalNAc이다.

[0523] 일부 구현예에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함함하되, 센스 가닥은 서열 5'--[mGs][mG][mU][mG][mC][mU][mA][fC][fU][fC][fU][mG][mG][mU][mA][mU][mU][mU][mC][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 621) 및 이의 모든 변형을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fGs][fAs][fA][fA][mU][fA][mC][mC][fA][mG][mA][mG][fU][mA][mG][mC][mA][mC][mCs][mGs][mG]-3' (서열번호 642), 및 이의 모든 변형을 포함하며, 여기에서, mC, mA, mG, mU = 2'-OMe 리보뉴클레오시드이고; fA, fC, fG, fU = 2'-F 리보뉴클레오시드이고; s = 포스포로티오에이트이되, ademA-GalNAc = GalNAc 변형 아데닌 뉴클레오티드이다.

[0524] 일부 구현예에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함함하되, 센스 가닥은 서열 5'-[mGs][mC][mU][mA][mC][mU][mC][fU][fG][fG][fU][mA][mU][mU][mU][mC][mC][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 622) 및 이의 모든 변형을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fUs][fAs][fG][fG][mA][fA][mA][mU][fA][mC][mC][mA][fG][mA][mG][mU][mA][mG][mCs][mGs][mG] 3' (서열번호 643), 및 이의 모든 변형을 포함하며, 여기에서, mC, mA, mG, mU = 2'-OMe 리보뉴클레오시드이고; fA, fC, fG, fU = 2'-F 리보뉴클레오시드이고; s = 포스포로티오에이트이되, ademA-GalNAc = GalNAc 변형 아데닌 뉴클레오티드이다.

[0525] 일부 구현예에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함함하되, 센스 가닥은 서열 5'-[mCs][mU][mC][mA][mC][mC][mU][fG][fC][fU][fU][mC][mU][mU][mC][mU][mG][mG][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 632) 및 이의 모든 변형을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fAs][fCs][fC][fA][mG][fA][mA][mG][fA][mA][mG][mC][fA][mG][mG][mU][mG][mA][mGs][mGs][mG] -3' (서열번호 653), 및 이의 모든 변형을 포함하며, 여기에서, mC, mA, mG, mU = 2'-OMe 리보뉴클레오시드이고; fA, fC, fG, fU = 2'-F 리보뉴클레오시드이고; s = 포스포로티오에이트이되, ademA-GalNAc = GalNAc 변형 아데닌 뉴클레오티드이다.

[0526] 일부 구현예에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함함하되, 센스 가닥은 서열 5'-[mAs][mG][mU][mG][mU][mG][mA][fA][fA][fG][fA][mC][mA][mU][mA][mG][mC][mU][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]3' (서열번호 639) 및 이의 모든 변형을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fCs][fAs][fG][fC][mU][fA][mU][mG][fU][mC][mU][mU][fU][mC][mA][mC][mA][mC][mUs][mGs][mG] -3' (서열번호 660), 및 이의 모든 변형을 포함하며, 여기에서, mC, mA, mG, mU = 2'-OMe 리보뉴클레오시드이고; fA, fC, fG, fU = 2'-F 리보뉴클레오시드이고; s = 포스포로티오에이트이되, ademA-GalNAc = GalNAc 변형 아데닌

뉴클레오티드이다.

[0527] 일부 양태에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함함하되, 센스 가닥은 서열 5'-[mGs][mG][mG][mU][mG][mC][mA][fC][fU][fA][fU][mG][mG][mC][mU][mU][mG][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]3' (서열번호 628) 및 이의 모든 변형을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fUs][fAs][fC][fA][mA][fG][mC][mC][fA][mU][mA][mG][fU][mG][mC][mA][mC][mC][mCs][mGs][mG] -3' (서열번호 649), 및 이의 모든 변형을 포함하며, 여기에서, mC, mA, mG, mU = 2'-OMe 리보뉴클레오시드이고; fA, fC, fG, fU = 2'-F 리보뉴클레오시드이고; s = 포스포로티오에이트이되, ademA-GalNAc = GalNAc 변형 아데닌 뉴클레오티드이다.

[0528] 일부 구현예에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)를 제공하되, 올리고뉴클레오티드는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함한다:

[0529] a) 각각 서열번호 621 및 642;

[0530] b) 각각 서열번호 622 및 643;

[0531] c) 각각 서열번호 637 및 658;

[0532] d) 각각 서열번호 632 및 653;

[0533] e) 각각 서열번호 638 및 659;

[0534] f) 각각 서열번호 639 및 660;

[0535] g) 각각 서열번호 627 및 648;

[0536] h) 각각 서열번호 628 및 649; 및

[0537] i) 각각 서열번호 629 및 650.

[0538] 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 621에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 642에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 622에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 643에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 632에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 653에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 639에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 660에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 628에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 649에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다.

[0539] 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 621에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 642에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사체에 대한 상보성 영역을 포함하고, 여기에서 상기 RNAi는 도 14a에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태이다.

[0540] 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 621에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 642에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사체에 대한 상보성 영역을 포함하고, 여기에서 상기 RNAi는 도 10a-b에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태이다.

[0541] 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 632에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 653에 제시된 뉴클레오티드 서

열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사체에 대한 상보성 영역을 포함하고, 여기에서 상기 RNAi는 도 14b에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태이다.

[0542] 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 632에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 653에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사체에 대한 상보성 영역을 포함하고, 여기에서 상기 RNAi는 도 11a-b에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태이다.

[0543] 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 639에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 660에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사체에 대한 상보성 영역을 포함하고, 여기에서 상기 RNAi는 도 14c에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태이다.

[0544] 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 639에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 660에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사체에 대한 상보성 영역을 포함하고, 여기에서 상기 RNAi는 도 12a-b에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태이다.

[0545] 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 628에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 649에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사체에 대한 상보성 영역을 포함하고, 여기에서 상기 RNAi는 도 14d에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태이다.

[0546] 일부 구현예에서, 본 개시에 의해 제공된 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 *TMPRSS6*-표적화 올리고뉴클레오티드는 서열번호 628에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열번호 649에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사체에 대한 상보성 영역을 포함하고, 여기에서 상기 RNAi는 도 13a-b에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태이다.

[0547] ***제형***

[0548] 올리고뉴클레오티드 사용을 위해 다양한 제형(예를 들어, 약학적 제형)이 개발되었다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 분해를 최소화하고, 전달 및/또는 흡수를 용이하게 하거나, 제형에서 올리고뉴클레오티드에 또 다른 유익한 특성을 제공하는 제형을 사용하여 대상체 또는 세포 환경에 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)를 포함하는 조성물은 *TMPRSS6*의 발현을 감소시킨다. 이러한 조성물은, 대상체에게 투여될 때, 표적 세포의 즉각적인 환경 또는 전신적으로, 올리고뉴클레오티드의 충분한 부분이 세포 내로 진입하여 *TMPRSS6* 발현을 감소시키도록 적절히 제형화될 수 있다. 임의의 다양한 적절한 올리고뉴클레오티드 제형이 본원에 개시된 바와 같은 *TMPRSS6*의 감소를 위한 올리고뉴클레오티드를 전달하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 인산염 완충 식염수 용액, 리포좀, 미셀라 구조, 및 캡시드와 같은 완충 용액으로 제형화된다. 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나는 핵산으로서 제공될 뿐만 아니라, 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 제공될 수 있다.

[0549] 양이온성 지질을 갖는 올리고뉴클레오티드의 제형이 올리고뉴클레오티드의 세포 내로의 형질감염을 용이하게 하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 리포펙틴, 양이온성 글리세롤 유도체, 및 다중양이온성 분자(예를 들어, 폴리리신)와 같은 양이온성 지질이 사용될 수 있다. 적절한 지질은 올리고펙타민, 리포펙타민(Life Technologies), NC388(Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., Boulder, Colo.), 또는 FuGene 6(Roche)을 포함하며, 이들 모두는 제조업체의 지침에 따라 사용될 수 있다.

[0550] 따라서, 일부 구현예에서, 제형은 지질 나노입자를 포함한다. 일부 구현예에서, 부형제는 리포좀, 지질, 지질 복합체, 미소구체, 극미립자, 나노구체 또는 나노입자를 포함하거나, 그렇지 않으면 이를 필요로 하는 대상체의 세포, 조직, 기관 또는 신체에 투여하기 위해 제형화될 수 있다(예를 들어, Remington: **THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY**, 제22판, Pharmaceutical Press, 2013 참조).

[0551] 일부 구현예에서, 본원의 제형은 부형제를 포함한다. 일부 구현예에서, 부형제는 활성 성분의 안정성 개선, 흡수 개선, 용해도 개선 및/또는 치료 개선을 조성물에 부여한다. 일부 구현예에서, 부형제는 완충제(예를 들어, 구연산나트륨, 인산나트륨, 트리스 염기, 또는 수산화나트륨) 또는 비히클(예를 들어, 완충 용액, 바셀린, 디메틸 설폭시드, 또는 광유)이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 그의 사용기간을 연장시키기 위해 동결

건조되고, 이후 사용 전(예를 들어, 대상체에게 투여하기 전)에 용액으로 제조된다. 따라서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나를 포함하는 조성물 중의 부형제는 동결건보보호제(예를 들어, 만니톨, 락토오스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리비닐피롤리돈) 또는 붕괴 온도 조절제(예를 들어, 덱스트란, Ficoll™ 또는 젤라틴)일 수 있다.

[0552] 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 의도된 투여 경로에 적합하도록 제형화된다. 투여 경로의 예는 비경구(예를 들어, 정맥내, 근육내, 복강내, 피내, 피하), 경구(예를 들어, 흡입), 경피(예를 들어, 국소), 경점막 및 직장 투여를 포함한다.

[0553] 주사 가능한 용도에 적합한 약학적 조성물은 멸균 수용액(가용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 주사 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여의 경우, 적합한 담체는 생리식염수, 정균수, Cremophor EL™(BASF, Parsippany, N.J.) 또는 인산염 완충 식염수(PBS)를 포함한다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적절한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산액 매질일 수 있다. 많은 경우에, 조성물에 등장성 제제, 예를 들어, 당, 만니톨과 같은 폴리알코올, 소르비톨, 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 멸균 주사 가능한 용액은, 필요에 따라, 위에서 열거된 성분 중 하나 또는 조합을 갖는 선택된 용매에 필요한 양의 올리고뉴클레오티드를 혼입한 다음, 여과 멸균함으로써 제조될 수 있다.

[0554] 일부 구현예에서, 활성 성분(들)의 백분율은 총 조성물의 중량 또는 부피의 약 1% 내지 약 80% 이상일 수 있지만, 조성물은 치료제(예를 들어, *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드)의 적어도 약 0.1% 이상을 함유할 수 있다. 용해도, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 제품 사용기간, 및 다른 약리학적 고려사항과 같은 인자는 이러한 약학적 제형을 제조하는 당업자에 의해 고려될 것이며, 따라서 다양한 투여량 및 치료 요법이 바람직할 수 있다.

[0555] ***사용 방법***

[0556] *TMPRSS6 발현의 감소*

[0557] 일부 구현예에서, 본 개시는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위해 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)의 유효량을 세포 또는 세포 집단과 접촉시키거나 세포 집단에 전달하기 위한 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현의 감소는 세포에서 *TMPRSS6* mRNA, 마트립타아제-2 단백질, 또는 마트립타아제-2 활성의 양 또는 수치의 감소를 측정함으로써 결정된다. 해당 방법은 본원에 기술되고 당업자에게 공지된 것들을 포함한다.

[0558] 본원에 제공된 방법은 임의의 적절한 세포 유형에 유용하다. 일부 구현예에서, 세포는 *TMPRSS6* mRNA를 발현하는 임의의 세포(예를 들어, 간세포)이다. 일부 구현예에서, 세포는 대상체로부터 수득된 일차 세포이다. 일부 구현예에서, 일차 세포는 세포가 그의 천연 표현형 특성을 실질적으로 유지하도록 제한된 수의 계대를 거쳤다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드가 전달되는 세포는 생체 외 또는 시험관 내 전달된다(즉, 배양 중인 세포 또는 세포가 상주하는 유기체에 전달될 수 있다).

[0559] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 올리고뉴클레오티드를 함유하는 용액의 주입, 올리고뉴클레오티드로 덮인 입자에 의한 충돌, 올리고뉴클레오티드를 함유하는 용액에 대한 세포 또는 세포 집단의 노출, 또는 올리고뉴클레오티드의 존재 중 세포막의 전기천공을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 당업계에 공지된 핵산 전달 방법을 사용하여 세포 또는 세포 집단에 전달된다. 올리고뉴클레오티드를 세포에 전달하기 위한 당업계에 공지된 다른 방법, 예컨대 지질-매개 담체 수송, 화학적-매개 수송, 및 양이온성 리포좀 형질감염, 예컨대 인산칼슘 등을 사용할 수 있다.

[0560] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현의 감소는 *TMPRSS6* 발현과 연관된 세포 또는 세포 집단의 하나 이상의 분자, 특성 또는 특성을 평가하는 분석 또는 기술에 의해, 또는 세포 또는 세포 집단(예를 들어, *TMPRSS6* mRNA 또는 마트립타아제-2 단백질)에서 *TMPRSS6* 발현을 직접적으로 나타내는 분자를 평가하는 분석 또는 기술에 의해 결정된다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드가 *TMPRSS6* 발현을 감소시키는 정도는 올리고뉴클레오티드와 접촉된 세포 또는 세포 집단에서의 *TMPRSS6* 발현을 적절한 대조군(예를 들어, 올리고뉴클레오티드와 접촉되지 않거나 대조군 올리고뉴클레오티드와 접촉된 적절한 세포 또는 세포 집단)과 비교함으로써 평가된다. 일부 구현예에서, 대조군 세포 또는 세포 집단에서 *TMPRSS6* 발현의 대조군 양 또는 수치가 사전에 결정됨으로써, 모든 경우의 대조군 양 또는 수치가 측정될 필요는 없다. 사전에 결정된 수치 또는 값은 다양한 형태를 취할 수

있다. 일부 구현예에서, 사전에 결정된 수치 또는 값은 중앙 값 또는 평균과 같은 단일 컷오프 값일 수 있다.

[0561] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)를 세포 또는 세포 집단에 접촉시키거나 전달하면, 올리고뉴클레오티드와 접촉하지 않거나 대조군 올리고뉴클레오티드와 접촉한 세포 또는 세포 집단에 비해 *TMPRSS6* 발현이 감소한다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현의 감소는 대조군 *TMPRSS6*의 발현의 양 또는 수치에 비해 약 1% 이하, 약 5% 이하, 약 10% 이하, 약 15% 이하, 약 20% 이하, 약 25% 이하, 약 30% 이하, 약 35% 이하, 약 40% 이하, 약 45% 이하, 약 50% 이하, 약 55% 이하, 약 60% 이하, 약 70% 이하, 약 80% 이하, 또는 약 90% 이하이다. 일부 구현예에서, 대조군 *TMPRSS6* 발현의 양 또는 수치는 본원의 올리고뉴클레오티드와 접촉되지 않은 세포 또는 세포 집단에서의 *TMPRSS6* mRNA 및/또는 마트립타아제-2 단백질의 양 또는 수치이다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* mRNA 발현은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 측정된다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* mRNA 발현은 qPCR에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, TMPRSS6 단백질 발현은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 측정된다. 일부 구현예에서, TMPRSS6 단백질 발현은 ELISA에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, TMPRSS6 단백질 발현은 웨스턴 블롯에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 본원의 방법에 따른 세포 또는 세포 집단에 대한 본원의 올리고뉴클레오티드의 전달 효과는 임의의 유한한 기간 또는 시간(예를 들어, 분, 시간, 일, 주, 월) 후에 평가된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현은, 올리고뉴클레오티드를 세포 또는 세포 집단에 접촉시키거나 전달한 후, 적어도 약 4시간, 약 8시간, 약 12시간, 약 18시간, 약 24시간; 또는 적어도 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 21일, 약 28일, 약 35일, 약 42일, 약 49일, 약 56일, 약 63일, 약 70일, 약 77일, 또는 약 84일 이상의 시간 후, 해당 세포 또는 세포 집단에서 결정된다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현은 올리고뉴클레오티드를 세포 또는 세포 집단에 접촉시키거나 전달한 후, 적어도 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 또는 약 6개월 이상의 시간 후, 해당 세포 또는 세포 집단에서 결정된다.

[0562] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 가닥(예를 들어, 그의 센스 및 안티센스 가닥)을 세포에서 발현하도록 조작된 이식유전자의 형태로 전달된다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 본원에 개시된 임의의 올리고뉴클레오티드를 발현하도록 조작된 이식유전자하여 사용해 전달된다. 이식유전자는 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 우두 바이러스, 폭스바이러스, 아데노-연관 바이러스, 또는 단순 포진 바이러스) 또는 비-바이러스 벡터(예를 들어, 플라스미드 또는 합성 mRNA)를 사용하여 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 이식유전자는 대상체에게 직접 주입될 수 있다.

[0563] *치료 방법*

[0564] 본 개시는 약제로서 사용하기 위한, 특히 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 및 병태의 치료를 위한 방법에 사용하기 위한 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)를 제공한다. 본 개시는 또한, *TMPRSS6* 발현의 감소로부터 이익을 얻을 대상체(예를 들어, 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 갖는 인간)를 치료하기 위해 사용하기 위한, 또는 사용에 적합한 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 일부 양태에서, 본 개시는 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 가진 대상체를 치료하기 위해 사용하기 위한, 또는 사용에 적합한 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 일부 구현예에서, TMPRSS6 감소를 필요로 하는 대상체는 철 축적 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있거나 이에 대한 위험이 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 조성물, 화합물 및 방법은 개체에서 철 수치를 감소시키는 데 사용하기 위해 제공된다. 일부 구현예에서, 철 축적은 대상체의 질환, 장애 또는 병태로 인한 것이다. 일부 구현예에서, 질환, 장애 및/또는 병태는 유전성 혈색소 침착증과 같은 혈색소 침착증이다. 일부 구현예에서, 질환, 장애 및/또는 병태는 β-지중해빈혈이다. 일부 구현예에서, 질환, 장애 및/또는 병태는 진성 적혈구증가증이다. 본 개시는 또한, 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위한 약제 또는 약학적 조성물의 제조에 사용하기 위한, 또는 사용에 적합한 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 일부 구현예에서, 사용하기 위한, 또는 사용에 적합한 올리고뉴클레오티드는, *TMPRSS6* mRNA를 표적화하고, (예를 들어, RNAi 경로를 통해) *TMPRSS6* 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 사용하기 위한, 또는 사용에 적합한 올리고뉴클레오티드는, *TMPRSS6* mRNA를 표적화하고, *TMPRSS6* mRNA, 마트립타아제-2 단백질 및/또는 TMPRSS6 활성의 양 또는 수치를 감소시킨다.

[0565] 본 개시는 또한 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드로 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있거나, 앓고 있는 것으로 의심되거나, 발병 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 개시는 본원의 올리고뉴클레오티드를 사용하여 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태의 발병 또는 진행을 치료하거나 약화시키는 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 갖는 대상체에서 하나 이상

의 치료적 이점을 달성하는 방법을 제공한다. 본원의 방법의 일부 구현예에서, 대상체는 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나 이상의 치료적 유효량을 투여하는 단계에 의해 치료된다. 일부 구현예에서, 치료는 *TMPRSS6* 발현을 감소시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 치료적으로 치료된다. 일부 구현예에서, 대상체는 예방적으로 치료된다.

[0566] 본원의 방법의 일부 구현예에서, 본원의 하나 이상의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드), 또는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물은, 대상체에서 *TMPRSS6* 발현이 감소됨으로써 해당 대상체를 치료하도록, 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 가진 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 대상체에서의 *TMPRSS6* mRNA의 양 또는 수치는 감소된다. 일부 구현예에서, 대상체에서의 마트립타아제-2 단백질의 양 또는 수치는 감소된다. 일부 구현예에서, 대상체에서의 마트립타아제-2 활성의 양 또는 수치는 감소된다.

[0567] 본원의 방법의 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드), 또는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물은, 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 또는 약학적 조성물의 투여 전 *TMPRSS6* 발현과 비교할 때, *TMPRSS6* 발현이 적어도 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 99%를 초과하여 감소되도록, 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현은, 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티트들 또는 약학적 조성물을 투여받지 않거나, 대조군 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드들, 약학적 조성물 또는 치료제를 투여받은 대상체(예를 들어, 기준 또는 대조군 대상체)의 *TMPRSS6* 발현과 비교할 때, 적어도 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 99%를 초과하여 대상체에서 감소된다.

[0568] 본원의 방법의 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드들(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드), 또는 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드들을 포함하는 약학적 조성물은, 올리고뉴클레오티드 또는 약학적 조성물의 투여 전 *TMPRSS6* mRNA의 양 또는 수치와 비교할 때, *TMPRSS6* mRNA의 양 또는 수치가 적어도 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 99%를 초과하여 감소되도록, 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* mRNA의 양 또는 수치는, 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티트들 또는 약학적 조성물을 투여받지 않거나, 대조군 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드들, 약학적 조성물 또는 치료제를 투여받은 대상체(예를 들어, 기준 또는 대조군 대상체)의 *TMPRSS6* mRNA의 양 또는 수치와 비교할 때, 적어도 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 99%를 초과하여 대상체에서 감소된다.

[0569] 본원의 방법의 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드들, 또는 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드들을 포함하는 약학적 조성물은, 올리고뉴클레오티드 또는 약학적 조성물의 투여 전 마트립타아제-2 단백질의 양 또는 수치와 비교할 때, 마트립타아제-2 단백질의 양 또는 수치는 적어도 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 99%를 초과하여 감소되도록, 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 마트립타아제-2 단백질의 양 또는 수치는, 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티트들 또는 약학적 조성물을 투여받지 않거나, 대조군 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드들, 약학적 조성물 또는 치료제를 투여받은 대상체(예를 들어, 기준 또는 대조군 대상체)의 마트립타아제-2 단백질의 양 또는 수치와 비교할 때, 적어도 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 99%를 초과하여 대상체에서 감소된다.

[0570] 본원의 방법의 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드들(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드), 또는 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드들을 포함하는 약학적 조성물은, 올리고뉴클레오티드 또는 약학적 조성물의 투여 전 *TMPRSS6* 활성의 양 또는 수치와 비교할 때, *TMPRSS6* 유전자 활성/발현의 양 또는 수치가 적어도 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 99%를 초과하여 감소되도록, 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 활성의 양 또는 수치는, 올리고뉴클레오티드 또는 약학적 조성물을 투여받지 않거나, 대조군 올리고뉴클레오티드, 약학적 조성물 또

는 치료제를 투여받은 대상체(예를 들어, 기준 또는 대조군 대상체)의 *TMPRSS6* 활성의 양 또는 수치와 비교할 때, 적어도 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 99%를 초과하여 대상체에서 감소된다.

[0571] 본원의 방법의 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드), 또는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물은, 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 또는 약학적 조성물의 투여 전 헵시딘 생성과 비교할 때, 헵시딘 생성이 적어도 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 99%를 초과하여 증가되도록, 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 헵시딘 생성은, 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티트들 또는 약학적 조성물을 투여받지 않거나, 대조군 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드들, 약학적 조성물 또는 치료제를 투여받은 대상체(예를 들어, 기준 또는 대조군 대상체)의 헵시딘 생성과 비교할 때, 적어도 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 99%를 초과하여 대상체에서 증가된다.

[0572] 본원의 방법의 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드), 또는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물은, 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 또는 약학적 조성물의 투여 전 혈청 철과 비교할 때, 혈청 철이 적어도 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 99%를 초과하여 감소되도록, 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 혈청 철은, 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티트들 또는 약학적 조성물을 투여받지 않거나, 대조군 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드들, 약학적 조성물 또는 치료제를 투여받은 대상체(예를 들어, 기준 또는 대조군 대상체)의 혈청 철과 비교할 때, 적어도 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 99%를 초과하여 대상체에서 감소된다.

[0573] 본원의 방법의 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드), 또는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물은, 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 또는 약학적 조성물의 투여 전 혈청 철 포화도와 비교할 때, 혈청 철 포화도가 적어도 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 99%를 초과하여 감소되도록, 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 혈청 철 포화도는, 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티트들 또는 약학적 조성물을 투여받지 않거나, 대조군 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드들, 약학적 조성물 또는 치료제를 투여받은 대상체(예를 들어, 기준 또는 대조군 대상체)의 혈청 철 포화도와 비교할 때, 적어도 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 99%를 초과하여 대상체에서 감소된다.

[0574] 대상체에서 또는 대상체로부터의 샘플에서, *TMPRSS6* 발현, *TMPRSS6* mRNA, 마트립타아제-2 단백질, 마트립타아제-2 활성, 또는 *TMPRSS6* 발현의 조절과 관련이 있거나 이에 의해 영향을 받는 바이오마커(예를 들어, 혈장 바이오마커)의 양 또는 수치를 결정하기 위한 적절한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 또한, 본원에 제시된 실시예는 *TMPRSS6* 발현을 결정하는 방법을 예시한다.

[0575] 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현, *TMPRSS6* mRNA, 마트립타아제-2 단백질, 마트립타아제-2 활성의 양 또는 수치, 또는 *TMPRSS6* 발현의 조절에 관련되거나 이에 의해 영향을 받는 바이오마커, 또는 이들의 임의의 조합은, 세포(예를 들어, 간세포), 세포 군 또는 세포 집단(예를 들어, 오르가노이드), 기관(예를 들어, 간), 혈액 또는 이의 분획(예를 들어, 혈장), 조직(예를 들어, 간 조직), 샘플(예를 들어, 간 생검 샘플), 또는 대상체로부터 수득되거나 단리된 임의의 다른 적절한 생물학적 물질에서 감소된다. 일부 구현예에서, *TMPRSS6* 발현, *TMPRSS6* mRNA, 마트립타아제-2 단백질, 마트립타아제-2 활성의 양 또는 수치, 또는 *TMPRSS6* 발현의 조절에 관련되거나 이에 의해 영향을 받는 바이오마커, 또는 이들의 임의의 조합은, 하나 이상의 유형의 세포(예를 들어, 간세포 및 하나 이상의 다른 유형(들)의 세포), 하나 이상의 세포 군, 하나 이상의 기관(예를 들어, 간 및 하나 이상의 다른 기관(들)) 하나 이상의 혈액의 분획(예를 들어, 혈장 및 하나 이상의 다른 혈액 분획(들)), 하나 이상의 유형의 조직(예를 들어, 간 조직 및 하나 이상의 다른 유형(들)의 조직), 또는 하나 이상의 유형의 샘플(예를 들어, 간 생검 샘플 및 하나 이상의 다른 유형(들)의 생검 샘플)에서 감소된다.

[0576] 이들의 높은 특이성으로 인해, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 세포

및 조직(들), 또는 기관(들)(예를 들어, 간)의 표적 유전자의 표적 mRNA(예를 들어, *TMPRSS6* mRNA)를 특이적으로 표적화한다. 질환을 예방하는 데 있어서, 표적 유전자는 질환의 개시 또는 유지에 필요하거나, 질환에 걸릴 높은 위험도에 연관되는 것으로 식별된 유전자일 수 있다. 질환을 치료하는 데 있어서, 올리고뉴클레오티드는 질환을 매개하는 것으로 나타내거나 이를 담당하는 세포, 조직(들), 또는 기관(들)(예를 들어, 간)과 접촉하게 될 수 있다. 예를 들어, 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 장애 또는 병태와 연관된 야생형(즉, 천연) 또는 돌연변이된 유전자의 전부 또는 일부와 실질적으로 동일한 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 간세포 또는 다른 간 세포와 같은 관심 세포 또는 조직 유형 내로 접촉하게 되거나 도입될 수 있다.

[0577] 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태의 예는, 이에 한정되지 않지만, 혈색소 침착증(예를 들어, 유전성 혈색소 침착증), 베타-지중해빈혈, 진성 적혈구증가증, 철-불응성 철 결핍 빈혈을 포함한다.

[0578] 일부 구현예에서, 표적 유전자는 인간 표적과 같은 임의의 포유동물 유래의 표적 유전자일 수 있다. 임의의 표적 유전자는 본원에 기술된 방법에 따라 침묵화될 수 있다.

[0579] 본원에 기술된 방법은 일반적으로 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)의 유효량, 즉 바람직한 치료 결과를 생산하거나 생성하는 양을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 치료적으로 허용 가능한 양은 질환 또는 장애를 치료적으로 치료하는 양일 수 있다. 임의의 하나의 대상체에 대한 적절한 투여량은 대상체의 크기, 체표면적, 연령, 투여될 조성물, 조성물 중 활성 성분(들), 투여 시간 및 경로, 일반적인 건강 상태, 및 동시에 투여되는 다른 약물을 포함하는 특정 인자에 따라 달라질 것이다.

[0580] 일부 구현예에서, 대상체에게, 장내로(예를 들어, 경구, 위 공급관, 십이지장 공급관, 위절개술 또는 직장으로), 비경구적으로(예를 들어, 피하 주사, 정맥 주사 또는 주입, 동맥 주사 또는 주입, 골내 주입, 근육내 주사, 뇌내 주사, 뇌실내 주사, 척수강내로), 국소적으로(예를 들어, 경피, 흡입, 점안액 또는 점막을 통해), 또는 표적 기관(예를 들어, 대상체의 간)으로의 직접 주사에 의해 본원의 조성물 중 어느 하나(예를 들어, 본원에 기재된 RNAi 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물)가 투여된다. 일반적으로, 본원의 올리고뉴클레오티드는 정맥내 투여되거나 피하 투여된다.

[0581] 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드) 또는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물은 단독으로 또는 조합하여 투여된다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 동시에, 순차적으로(임의의 순서로), 또는 간헐적으로 투여된다. 예를 들어, 2개의 올리고뉴클레오티드를 동시에 공동 투여할 수 있다. 대안적으로, 하나의 올리고뉴클레오티드가 투여되고, 임의의 시간(예를 들어, 1시간, 1일, 1주 또는 1개월)이 지난 후 제2 올리고뉴클레오티드가 투여될 수 있다.

[0582] 일부 구현예에서, 치료되는 대상체는 인간 또는 비인간 영장류 또는 다른 포유류 대상체이다. 다른 예시적인 대상체는 개 및 고양이와 같은 가축; 말, 소, 돼지, 양, 염소 및 닭과 같은 가축; 및 마우스, 랫트, 기니피그 및 햄스터와 같은 동물을 포함한다.

[0583] ***키트***

[0584] 일부 구현예에서, 본 개시는 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)를 포함하는 키트, 및 이의 사용 지침을 제공한다. 일부 구현예에서, 키트는 본원의 올리고뉴클레오티드, 및 키트 및/또는 이의 임의의 구성 요소의 사용 지침을 포함하는 패키지 삽입물을 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 적절한 용기에, 본원의 올리고뉴클레오티드, 하나 이상의 대조군, 및 당업계에 공지된 다양한 완충액, 시약, 효소 및 다른 표준 성분을 포함한다. 일부 구현예에서, 용기는 올리고뉴클레오티드가 배치되는 적어도 하나의 바이알, 웰, 시험 튜브, 플라스크, 병, 주사기, 또는 다른 용기 수단을 포함하고, 일부 경우에는 적절히 분취된다. 추가 구성 요소가 제공되는 일부 구현예에서, 키트는 해당 구성 요소가 배치되는 추가 용기를 포함한다. 키트는 또한, 상업적 판매를 위하여 올리고뉴클레오티드 및 임의의 다른 시약을 폐쇄적으로 함유하기 위한 수단을 포함할 수 있다. 이러한 용기는 원하는 바이알이 보유되는 주사 또는 취입 성형 플라스틱 용기를 포함할 수 있다. 용기 및/또는 키트에는 사용 지침 및/또는 경고가 표시된 라벨이 포함될 수 있다.

[0585] 일부 구현예에서, 키트는, 이를 필요로 하는 대상체에서 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태의 진행을 치료하거나 지연시키기 위한, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드), 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 또는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물, 및 지침을 포함한다.

[0586] ***정의***

[0587] 본원에서 사용되는 용어 "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 표적 mRNA의 전부 또는 일부에 상보성인 서열, 특히 mRNA로 이중체를 형성할 수 있는 시드 서열을 갖는 핵산 기반 분자를 포함한다. 따라서, 본원에서 사용되는 용어 "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 "상보성 핵산-기반 억제제" 또는 "가이드 가닥"으로서 지칭될 수 있다.

[0588] 본원에서 사용되는 바와 같이, 하나 이상의 관심 값에 적용되는 "대략" 또는 "약"은 언급된 기준 값과 유사한 값을 지칭한다. 특정 구현예에서, "약"은 문맥으로부터 달리 언급되거나 달리 명백하지 않는 한, 언급된 기준 값의 어느 방향으로든 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그보다 크거나 적은 값의 범위를 지칭한다(이러한 수가 가능한 100%를 초과하는 경우는 제외함).

[0589] 본원에서 사용되는 바와 같이, "투여하다", "투여함", "투여" 등은 약학적으로 유용한 방식으로 (예를 들어, 대상체의 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위해) 기질(예를 들어, 올리고뉴클레오티드)을 대상체에게 제공하는 것을 지칭한다.

[0590] 본원에서 사용되는 바와 같이, "약화시키다", "약화함", "약화" 등은 감소시키거나 효과적으로 중단시키는다는 것을 지칭한다. 비제한적인 예로서, 본원의 치료제 중 하나 이상은 대상체에서 철-불응성 철 결핍 빈혈, 혈색소침착증 또는 베타-지중해빈혈의 발병 또는 진행을 감소시키거나 효과적으로 중단시킬 수 있다. 이러한 감쇠는, 예를 들어, 대상체에서의, 치료되지 않을 경우 예상되는, 철-불응성 철 결핍성 빈혈, 혈색소 침착증, 또는 베타-지중해빈혈의 하나 이상의 양태(예를 들어, 증상, 조직 특성, 및 세포, 염증성, 또는 면역학적 활성, 등)의 감소, 혈색소 침착증 또는 베타-지중해빈혈의 하나 이상의 양태의 진행(악화)의 미검출, 또는 철-불응성 철 결핍성 빈혈, 혈색소 침착증, 또는 베타-지중해빈혈이 검출되지 않는 양태로 예시될 수 있다.

[0591] 본원에서 사용되는 바와 같이, "상보성"은 2개의 뉴클레오티드가 서로 염기쌍을 형성할 수 있게 하는 2개의 뉴클레오티드 사이(예를 들어, 2개의 대향하는 핵산 상에서 또는 단일 핵산 가닥의 대향하는 영역 상에서의)의 구조적 관계를 지칭한다. 예를 들어, 대향하는 핵산의 피리미딘 뉴클레오티드에 상보성인 하나의 핵산의 퓨린 뉴클레오티드는 서로 수소 결합을 형성함으로써 함께 염기쌍을 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 상보성 뉴클레오티드는 Watson-Crick 방식으로 또는 안정적인 이중체의 형성을 가능하게 하는 임의의 다른 방식의 염기쌍일 수 있다. 일부 구현예에서, 2개의 핵산은 본원에 기술된 바와 같이, 상보성 영역을 형성하기 위해 서로 상보성인 다수의 뉴클레오티드 영역을 가질 수 있다.

[0592] 본원에서 사용되는 바와 같이, "데옥시리보뉴클레오티드"는 리보뉴클레오티드와 비교할 때, 이의 오탄당의 2' 위치에 히드록실 대신에 수소를 갖는 뉴클레오티드를 지칭한다. 변형된 데옥시리보뉴클레오티드는 당, 포스페이트기 또는 염기 중, 또는 이들의 변형 또는 치환을 포함하는, 2' 위치 이외의 원자의 하나 이상의 변형 또는 치환을 갖는 데옥시리보뉴클레오티드이다.

[0593] 본원에서 사용되는 바와 같이, "이중-가닥 올리고뉴클레오티드" 또는 "ds 올리고뉴클레오티드"는 실질적으로 이중체 형태인 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 일부 구현예에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 이중체 영역(들)의 상보성 염기쌍은 공유적으로 분리된 핵산 가닥의 뉴클레오티드의 역평행 서열 사이에 형성된다. 일부 구현예에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 이중체 영역(들)의 상보성 염기쌍은 공유적으로 연결된 핵산 가닥의 뉴클레오티드의 역평행 서열 사이에 형성된다. 일부 구현예에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 이중체 영역(들)의 상보성 염기쌍은 함께 염기쌍을 이루는 뉴클레오티드의 상보성 역평행 서열을 제공하도록, (예를 들어, 헤어핀을 통해) 접히는 단일 핵산 가닥으로부터 형성된다. 일부 구현예에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 서로 완전히 이중체화되는 2개의 공유적으로 분리된 핵산 가닥을 포함한다. 그러나, 일부 구현예에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 부분적으로 이중체화된 (예를 들어, 한쪽 또는 양쪽 말단에 오버행을 갖는) 2개의 공유적으로 분리된 핵산 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 부분적으로 상보성인 뉴클레오티드의 역평행 서열을 포함함으로써, 내부 불일치 또는 말단 불일치를 포함할 수 있는 하나 이상의 불일치를 가질 수 있다.

[0594] 본원에서 사용되는 바와 같이, 핵산(예를 들어, 올리고뉴클레오티드)과 관련하는 "이중체"는 뉴클레오티드의 2개의 역평행 서열의 상보성 염기 페어링을 통해 형성된 구조를 지칭한다.

[0595] 본원에서 사용되는 바와 같이, "부형제"는, 예를 들어 원하는 일관성 또는 안정화 효과를 제공하거나 이에 기여하기 위해 조성물에 포함될 수 있는 비치료제를 지칭한다.

[0596] 본원에서 사용되는 바와 같이, "간세포" 또는 "간세포들"는 간의 실질 조직의 세포를 지칭한다. 이들 세포는 간 중량의 약 70% 내지 85%를 구성하고, 혈청 알부민, FBN 및 응고 인자의 프로트롬빈기를 제조한다(인자 3 및 4

제외). 간세포 계통 세포에 대한 마커는 트랜스티레틴(Ttr), 글루타민 합성효소(Glul), 간세포 핵 인자 1a(Hnf1a) 및 간세포 핵 인자 4a(Hnf4a)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 성숙한 간세포에 대한 마커는 시토크롬 P450(Cyp3a11), 시토크롬 P450 3A4 (CYP3A4), 푸마릴아세토아세테이트 가수분해효소(Fah), 포도당 6-인산염(G6p), 알부민(Alb) 및 OC2-2F8을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, Huch 등, (2013) Nature 494:247-50을 참조한다.

[0597] 본원에서 사용되는 바와 같이, "간독성 제제"는 그 자체가 간에 독성이거나 간에 독성인 대사산물을 형성하도록 가공될 수 있는 화학 화합물, 바이러스 또는 다른 물질을 지칭한다. 간독성제는 사염화탄소(CCl_4), 아세트아미노펜(파라세타몰), 염화비닐, 비소, 클로로포름, 비스테로이드성 항염증제(예를 들어, 아스피린 및 페닐부타존)를 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0598] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "*TMPRSS6*"은 막관통 프로테아제 세린 6을 지칭한다. TMPRSS6 유전자는 체내 철 균형을 조절하기 위해 헵시딘과 함께 신호전달 경로에서 기능하는 마트립타아제-2 단백질을 암호화한다. 마트립타아제-2

[0599] 본원에서 사용되는 바와 같이, "불안정한 링커"는 (예를 들어, 산성 pH에 의해) 절단될 수 있는 링커를 지칭한다. "매우 안정적인 링커"는 절단될 수 없는 링커를 지칭한다.

[0600] 본원에서 사용되는 바와 같이, "변형된 뉴클레오티드간 결합"은 포스포디에스테르 결합을 포함하는 기준 뉴클레오티드간 결합과 비교할 때 하나 이상의 화학적 변형을 갖는 뉴클레오티드간 결합을 지칭한다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 비-자연 발생 결합이다. 일반적으로, 변형된 뉴클레오티드간 결합은 해당 변형된 뉴클레오티드간 결합이 존재하는 핵산에 하나 이상의 바람직한 특성을 부여한다. 예를 들어, 변형된 뉴클레오티드간 결합은 열 안정성, 분해 저항성, 뉴클레아제 내성, 용해도, 생체이용률, 생물활성, 면역원성 감소 등을 개선할 수 있다.

[0601] 본원에서 사용되는 바와 같이, "변형된 뉴클레오티드"는, 아데닌 리보뉴클레오티드, 구아닌 리보뉴클레오티드, 시토신 리보뉴클레오티드, 우라실 리보뉴클레오티드, 아데닌 데옥시리보뉴클레오티드, 구아닌 데옥시리보뉴클레오티드, 시토신 데옥시리보뉴클레오티드 및 티미딘 데옥시리보뉴클레오티드로부터 선택된 상응하는 기준 뉴클레오티드와 비교할 때, 하나 이상의 화학적 변형을 갖는 뉴클레오티드를 지칭한다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 비-자연 발생 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 당, 핵염기 및/또는 포스페이트기에 하나 이상의 화학적 변형을 갖는다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 상응하는 기준 뉴클레오티드에 접합된 하나 이상의 화학적 모이어티를 갖는다. 일반적으로, 변형된 뉴클레오티드는 해당 변형된 뉴클레오티드가 존재하는 핵산에 하나 이상의 바람직한 특성을 부여한다. 예를 들어, 변형된 뉴클레오티드는 열 안정성, 분해 저항성, 뉴클레아제 내성, 용해도, 생체이용률, 생물활성, 면역원성 감소 등을 개선할 수 있다. 변형되는 올리고뉴클레오티드를 지칭할 때, 내부에 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 지칭하는 것으로 이해될 수 있다. 완전히 변형되는 올리고뉴클레오티드를 지칭할 때, 그 안의 모든 뉴클레오티드가 변형된 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드를 지칭하는 것으로 이해될 수 있다. 상기 변형된 뉴클레오티드는 동일한 변형을 포함할 필요는 없다.

[0602] 본원에서 사용되는 바와 같이, "니킹 테트라루프 구조"는, 센스 가닥이 안티센스 가닥과 상보성 영역을 가지며, 적어도 하나의 가닥, 대체로 센스 가닥이 적어도 하나의 가닥 내에 형성된 인접 줄기 영역을 안정화시키도록 구성된 테트라루프를 갖는, 별도의 센스(패신저) 및 안티센스(가이드) 가닥을 특징으로 하는 RNAi 올리고뉴클레오티드의 구조를 지칭한다. 구조는 센스 가닥과 안티센스 가닥의 골격 사이의 불연속부에 의해, 통상적으로 센스 가닥과 안티센스 가닥의 인접 뉴클레오티드의 오탄당 사이의 불연속부에 의해 니킹되는 것으로 언급된다. 루프가 테트라루프일 수 있거나 그렇지 않을 수 있는 경우(예를 들어, 센스 가닥이 트리루프, 테트라루프 또는 본원에 개시된 다른 유형의 루프를 형성할 때, 니킹 구조를 지칭할 수 있음), "니킹 구조"는 일반적으로 이와 동일한 정의로 지칭될 수 있다.

[0603] 본원에서 사용되는 바와 같이, "올리고뉴클레오티드"는 짧은 핵산(예를 들어, 약 100개 뉴클레오티드 미만의 길이)을 지칭한다. 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥(ss) 또는 이중 가닥(ds)일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오시드, 리보뉴클레오시드, 또는 이들 모두의 조합을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 리보뉴클레오시드를 포함하는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 "dsRNA"로서 지칭된다. 올리고뉴클레오티드는 이중체 영역을 가질 수도 있고 갖지 않을 수도 있다. 비제한적인 예의 세트로서, 올리고뉴클레오티드는, 작은 간섭 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), Dicer 기질 간섭 RNA(DsiRNA), 안티센스 올리고뉴

클레오티드, 짧은 siRNA 또는 ss siRNA일 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0604] 본원에서 사용되는 바와 같이, "오버행"은 하나의 가닥 또는 영역이 이중체를 형성하는 상보성 가닥의 말단을 지나 연장되는 하나의 가닥 또는 영역으로부터 생성된 말단 비-염기 쌍을 이루는 뉴클레오티드(들)를 지칭한다. 일부 구현예에서, 오버행은 올리고뉴클레오티드의 5' 말단 또는 3' 말단에서(또는 이의 근위에서) 이중체 영역으로부터 연장되는 하나 이상의 쌍을 이루지 않은 뉴클레오티드를 포함한다. 소정의 구현예에서, 오버행은 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥 또는 센스 가닥 상의 3'- 또는 5'-오버행이다.

[0605] 본원에서 사용되는 바와 같이, 특징부는 가닥의 3' 말단 또는 5' 말단에서, "그 내부에", "그 위에(상에)" 또는 "그에"로 제공되는 것으로 설명될 수 있다. 예를 들어, 당 변형, 뉴클레오티드간 변형, 뉴클레오티드 불일치 및 오버행과 같은, 주어진 가닥 단부에 기술된 뉴클레오티드 특징부는 정의된 가닥 말단에 (예를 들어, 센스 가닥의 3' 말단에서) 근위인 가닥의 뉴클레오티드(들)를 지칭하는 것으로 이해된다.

[0606] 본원에서 사용되는 바와 같이, "포스페이트 유사체"는 포스페이트기의 정전기 및/또는 입체 특성을 모방하는 화학적 모이어티를 지칭한다. 일부 구현예에서, 포스페이트 유사체는 생물학적 시스템에서 포스페이트기의 정전기 및/또는 입체 특성을 모방한다. 일부 구현예에서, 포스페이트 유사체는 종종 효소 제거에 민감한 5'-포스페이트를 대신하여 올리고뉴클레오티드의 5'-말단 뉴클레오티드에 위치한다. 일부 구현예에서, 5'-포스페이트 유사체는 포스파타아제-저항성 결합을 함유한다. 포스페이트 유사체의 예는, 5'-메틸렌 포스포네이트(5'-MP) 및 5'-(E)-비닐포스포네이트(5'-VP)와 같은 5'-포스포네이트를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 뉴클레오티드의 5'-단부에서 당의 4'-탄소 위치에 포스페이트 유사체("4'-포스페이트 유사체"로 지칭됨)를 갖는다. 4'-포스페이트 유사체의 예는 옥시메틸 포스포네이트이며, 여기에서 옥시메틸기의 산소 원자는 당 모이어티 또는 이의 유사체에 (예를 들어, 이의 4'-탄소에서) 결합된다. 예를 들어, 미국 특허 공개 제2019-0177729호를 참조한다. 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 대한 다른 변형이 개발되었다(예를 들어, 국제 특허 출원 제WO 2011/133871호; 미국 특허 제8,927,513호; 및 Prakash 등 (2015) NUCLEIC ACIDS RES. 43:2993-3011 참조).

[0607] 본원에서 사용되는 바와 같이, 유전자(예를 들어, *TMPRSS6*)의 "감소된 발현"은 적절한 기준(예를 들어, 기준 세포, 세포 집단, 샘플 또는 대상체)과 비교했을 때, 유전자에 의해 암호화된 RNA 전사체(예를 들어, *TMPRSS6* mRNA) 또는 단백질의 양 또는 수치의 감소 및/또는 세포, 세포 집단, 샘플, 또는 대상체에서의 유전자의 활성의 양 또는 수치의 감소를 지칭한다. 예를 들어, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, *TMPRSS6* mRNA를 포함하는 뉴클레오티드 서열에 상보성인 뉴클레오티드 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오티드)와 세포를 접촉시키는 행위는 올리고뉴클레오티드로 치료되지 않은 세포와 비교했을 때, (예를 들어, RNAi 경로에 의한 *TMPRSS6* mRNA의 분해를 통해) *TMPRSS6* mRNA, 마트립타아제-2 단백질 및/또는 활성의 양 또는 수치의 감소를 초래할 수 있다. 유사하게, 그리고 본원에서 사용되는 바와 같이, "발현의 감소"는 유전자(예를 들어, *TMPRSS6*)의 발현 감소를 초래하는 작용을 지칭한다.

[0608] 본원에서 사용되는 바와 같이, "*TMPRSS6* 발현의 감소"는 적절한 기준(예를 들어, 기준 세포, 세포 집단, 샘플 또는 대상체)과 비교했을 때, 세포, 세포 집단, 샘플, 또는 대상체에서의 *TMPRSS6* mRNA, 마트립타아제-2 단백질 및/또는 마트립타아제-2 활성의 양 또는 수치의 감소를 지칭한다.

[0609] 본원에서 사용되는 바와 같이, "상보성 영역"은 적절한 혼성화 조건(예를 들어, 인산염 완충액, 세포 등) 하에서 뉴클레오티드의 2개의 서열 사이의 혼성화를 허용하기 위해 뉴클레오티드의 역평행 서열에 대해 충분히 상보성인 핵산(예를 들어, 올리고뉴클레오티드)의 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드는 mRNA 표적 서열에 대해 상보성인 영역을 갖는 표적화 서열을 포함한다. 상보성 영역은 주어진 길이일 수 있고, 뉴클레오티드간 결합을 통해 함께 인접하게 연결된 다수의 뉴클레오티드를 지칭하는 다수의 연속 뉴클레오티드(예를 들어, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드 길이)에 의해 식별될 수 있다.

[0610] 본원에서 사용되는 바와 같이, "리보뉴클레오티드"는 그의 2' 위치에 히드록실기를 함유하는, 그의 오탄당으로서 리보오스를 갖는 뉴클레오티드를 지칭한다. 변형된 리보뉴클레오티드는 리보오스, 포스페이트기 또는 염기 중, 또는 이들의 변형 또는 치환을 포함하는, 2' 위치 이외의 원자의 하나 이상의 변형 또는 치환을 갖는 리보뉴클레오티드이다.

[0611] 본원에서 사용되는 바와 같이, "RNAi 올리고뉴클레오티드"는 (a) 센스 가닥(패신저) 및 안티센스 가닥(가이드)을 갖는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드로서, 안티센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 부분은 표적 mRNA(예를 들어, *TMPRSS6* mRNA)의 절단에서 아르고노트(*Argonaute*) 2(Ago2) 엔도뉴클레아제에 의해 사용되는, 이중 가닥 올리고

뉴클레오티드, 또는 (b) 단일 안티센스 가닥을 갖는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드로서, 해당 안티센스 가닥(또는 해당 안티센스 가닥의 부분)은 표적 mRNA(예를 들어, *TMPRSS6* mRNA)의 절단에서 Ago2 엔도뉴클레아제에 의해 사용되는, 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 중 하나를 지칭한다.

[0612] 본원에서 사용되는 바와 같이, "가닥"은 뉴클레오티드간 결합(예를 들어, 포스포디에스테르 결합 또는 포스포로티오에이트 결합)을 통해 함께 연결된 뉴클레오티드의 단일 연속 서열을 지칭한다. 일부 구현예에서, 가닥은 2개의 자유 단부(예를 들어, 5' 단부 및 3' 단부)를 갖는다.

[0613] 본원에서 사용되는 바와 같이, "대상체"는 마우스, 토끼 비-인간 영장류(NHP) 및 인간을 포함하는 임의의 포유동물을 의미한다. 일 구현예에서, 대상체는 인간 또는 NHP이다. 또한, "개체" 또는 "환자"는 "대상체"와 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0614] 본원에서 사용되는 바와 같이, "합성"은 인공적으로 합성되거나 (예를 들어, 기계(예를 들어, 고상 핵산 합성기)를 사용하여), 그렇지 않으면 분자를 정상적으로 생산하는 천연 공급원(예를 들어, 세포 또는 유기체)으로부터 유래되지 않는 핵산 또는 다른 분자를 지칭한다.

[0615] 본원에서 사용되는 바와 같이, "표적화 리간드"는 관심 조직 또는 세포의 동족 분자(예를 들어, 수용체)에 선택적으로 결합하고 관심 조직 또는 세포에 대한 다른 물질을 표적화하기 위한 목적으로 다른 물질에 접합 가능한 분자(예를 들어, 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 폴리펩티드, 또는 지질, 예컨대, 예를 들어 GalNAc 모이어티)를 지칭한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 표적화 리간드는 올리고뉴클레오티드를 특정 관심 특정 조직 또는 세포에 표적화하기 위한 목적으로 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드는 세포 표면 수용체에 선택적으로 결합한다. 따라서, 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드에 접합될 때, 표적화 리간드는 세포의 표면에 발현된 수용체에 대한 선택적 결합 및 올리고뉴클레오티드를 포함하는 복합체의 세포에 의한 엔도솜 내재화를 통해 특정 세포 내로의 올리고뉴클레오티드의 전달을 용이하게 한다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드는, 올리고뉴클레오티드가 세포 내의 표적화 리간드로부터 방출되도록 세포 내재화 후 또는 그 동안에 절단되는 링커를 통해 올리고뉴클레오티드에 접합된다.

[0616] 본원에서 사용되는 바와 같이, "표적 서열"은 일차 전사 산물의 RNA 처리의 산물인 mRNA를 포함하는 *TMPRSS6* 유전자(예를 들어, 서열번호 853, 854 및 855)의 전사 동안 형성된 mRNA 분자의 뉴클레오티드 서열의 연속적인 부분을 지칭한다. 일부 구현예에서, 서열의 표적 부분은, 적어도 *TMPRSS6* 유전자의 전사 동안 형성된 mRNA 분자의 뉴클레오티드 서열의 해당 부분 또는 그 근처에서 RNAi-유도 절단을 위한 기질로서 기능하기에 충분하도록 길 것이다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 *TMPRSS6* 유전자의 단백질 코딩 영역 내에 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 *TMPRSS6* 유전자의 3' UTR 내에 있다.

[0617] 본원에서 사용되는 바와 같이, "표적화 서열"은 표적 서열에 대해 완전히 또는 부분적으로 상보성인 뉴클레오티드 서열을 지칭한다.

[0618] 본원에서 사용되는 바와 같이, "루프", "트리루프", 또는 "테트라루프"는, 적절한 혼성화 조건(예를 들어, 세포 중 인산염 완충액) 하에서, 쌍을 이루지 않은 영역의 측면에 있는 2개의 역평행 영역을 혼성화함으로써 이중체("줄기"로서 지칭됨)를 형성하도록 서로 충분히 상보적인 핵산의 2개의 역평행 영역이 측면에 위치하는 핵산의 쌍을 이루지 않은 영역(예를 들어, 올리고뉴클레오티드)을 지칭한다. 루프는 뉴클레오티드의 측면 서열의 혼성화에 의해 형성되는 인접 이중체의 안정성을 증가시킨다. 안정성의 증가는, 뉴클레오티드의 무작위로 선택된 서열로 이루어진 유사한 길이의 루프 세트로부터 평균적으로 예상되는 인접 줄기 이중체의 T_m보다 높은 인접 줄기 이중체의 용융 온도(Tm)의 증가로서 검출 가능하다. 예를 들어, 루프(예를 들어, 테트라루프 또는 트리루프)는 적어도 2개 염기쌍(bp) 길이의 이중체를 포함하는 헤어핀에 대해, 10 mM Na_2HPO_4에서, 적어도 약 50℃, 적어도 약 55℃, 적어도 약 56℃, 적어도 약 58℃, 적어도 약 60℃, 적어도 약 65℃, 또는 적어도 약 75℃의 T_m를 부여할 수 있다. 일부 구현예에서, 테트라루프는 적어도 2개 염기쌍(bp) 길이의 이중체를 포함하는 헤어핀에 대해, 10 mM Na_2HPO_4에서, 적어도 약 50℃, 적어도 약 55℃, 적어도 약 56℃, 적어도 약 58℃, 적어도 약 60℃, 적어도 약 65℃, 또는 적어도 약 75℃의 Tm를 부여할 수 있다. 일부 구현예에서, 루프는 상호작용을 적층함으로써 인접한 줄기 이중체에서 bp를 안정화시킬 수 있다. 또한, 루프에서의 뉴클레오티드 간 상호작용은, 비-Watson-Crick 염기 페어링, 적층 상호작용, 수소 결합 및 접촉 상호작용(Cheong 등 (1990) Nature 346:680-82; Heus & Pardi (1991) Science 253:191-94)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 루프는 3 내지 6개 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어지며, 일반적으로는 4 내지 5개 뉴클레오티드이다. 특정 구현예에서, 루프는 변형되거나 변형되지 않을 수 있는(예를 들어, 표적화 모이어티/표적화 리간드에 접합되거나 접합되지 않

을 수 있는), 3, 4, 5 또는 6개 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어진다. 일 구현예에서, 3개의 뉴클레오티드로 이루어지는 루프는 트리루프이다. 일 구현예에서, 4개의 뉴클레오티드로 이루어지는 루프는 테트라루프이다. 임의의 뉴클레오티드가 테트라루프에 사용될 수 있고, 이러한 뉴클레오티드에 대한 표준 IUPAC-IUB 기호가 Cornish-Bowden (1985) Nucleic Acids Res. 13:3021-30에 기술된 바와 같이 사용될 수 있다. 예를 들어, 문자 "N"은 임의의 염기가 해당 위치에 있을 수 있다는 것을 의미하는데 사용될 수 있고, 문자 "R"은 A(아데닌) 또는 G(구아닌)가 해당 위치에 있을 수 있다는 것을 나타내기 위해 사용될 수 있고, "B"는 C(시토신), G(구아닌), 또는 T(티민)가 해당 위치에 있을 수 있다는 것을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 테트라루프의 예는, 테트라루프의 UNCG 계열(예를 들어, UUCG), 테트라루프의 GNRA 계열(예를 들어, GAAA), 및 CUUG 테트라루프를 포함한다(Woese 등 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. *USA* 87:8467-71; Antao 등 (1991) Nucleic Acids Res. 19:5901-05). DNA 테트라루프의 예는, 테트라루프의 d(GNNA) 계열(예를 들어, d(GTTA)), 테트라루프의 d(GNRA) 계열, 테트라루프의 d(GNAB) 계열, 테트라루프의 d(CNNG) 계열, 및 테트라루프의 d(TNCG) 계열(예를 들어, d(TTCG))를 포함한다. 예를 들어, Nakano 등 (2002) Biochem. 41:14281-92; Shinji 등 (2000) Nippon Kagakkai Koen Yokoshu 78:731을 참조한다. 일부 구현예에서, 테트라루프는 니킹된 테트라루프 구조 내에 포함된다.

[0619] 본원에서 사용되는 바와 같이, "치료" 또는 "치료함"은, 예를 들어, 기존의 병태(예를 들어,질환, 장애)에 대해 대상체의 건강 및/또는 안녕을 개선하거나 병태의 발생 가능성을 예방하거나 감소시키기 위한 목적으로 치료제(예를 들어, 본원의 올리고뉴클레오티드)를 대상체에게 투여함으로써, 이를 필요로 하는 대상체에게 치료를 제공하는 행위를 지칭한다. 일부 구현예에서, 치료는 대상체가 경험하는 병태(예를 들어, 질환, 장애)의 적어도 하나의 징후, 증상 또는 기여 인자의 빈도 또는 중증도를 감소시키는 것을 포함한다.

[0620] "약학적으로 허용 가능한"은 해당 물질 또는 조성물이 포유류의 치료에 화학적 및/또는 독성학적으로 적합하다는 것을 나타낸다.

[0621] 본원에서 사용되는 바와 같이, ≀ 은 부착 지점을 설명하는 데 사용된다.

[0622] **본 발명의 추가 구현예 목록**

[0623] 1. 막관통 세린 프로테아제 6(*TMPRSS6*) 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 상기 센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥은 이중체 영역을 형성하고, 여기에서 상기 안티센스 가닥은 서열번호 661 내지 852 중 어느 하나의 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 상보성 영역은 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0624] 2. 막관통 세린 프로테아제 6(*TMPRSS6*) 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 이중체 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 661 내지 852 중 어느 하나에 제시된 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 상보성 영역은 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0625] 3. 구현예 1 또는 구현예 2에 있어서, 센스 가닥은 15 내지 50개 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0626] 4. 구현예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 18 내지 36개 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0627] 5. 구현예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥은 15 내지 30개 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0628] 6. 구현예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥은 22개 뉴클레오티드 길이이되, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 적어도 19개 뉴클레오티드 길이, 선택적으로 적어도 20개 뉴클레오티드 길이의 이중체 영역을 형성하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0629] 7. 구현예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥은 22개 뉴클레오티드 길이이되, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 적어도 20개 뉴클레오티드 길이의 이중체 영역을 형성하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0630] 8. 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 상보성 영역은 적어도 18개의 연속 뉴클레오티드 길이, 선택적으로 상보성 영역은 적어도 19개 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0631] 9. 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상보성 영역은 적어도 19개의 연속 뉴클레오티드 길이인,

RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0632] 10. 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 상보성 영역은 적어도 19개의 연속 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0633] 11. 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상보성 영역은 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0634] 12. *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 이중 가닥 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는:

[0635] (i) 19 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥으로서, 상기 안티센스 가닥은 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하되, 상기 상보성 영역은 서열번호 1 내지 192로부터 선택되는, 안티센스 가닥, 및

[0636] (ii) 상기 안티센스 가닥에 대해 상보성 영역을 포함하는 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함하되, 상기 안티센스 및 센스 가닥은 상기 안티센스 가닥의 3' 말단에서 1 내지 4개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 비대칭 이중체 영역을 형성하는 별도의 가닥인, 이중 가닥 RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0637] 13. 구현예 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥의 3' 말단은 S1-Lp-S2로 제시된 줄기-루프를 포함하되, S1은 S2에 상보성이고, 여기에서 Lp는 3 내지 5개 뉴클레오티드의 길이로 S1과 S2 사이에 루프를 형성하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0638] 14. 구현예 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 S1-Lp-S2 근위 3' 말단으로 제시된 줄기-루프를 포함하되, S1은 S2에 상보성이고, 여기에서 Lp는 3 내지 5개 뉴클레오티드의 길이로 S1과 S2 사이에 루프를 형성하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0639] 15. 구현예 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥 근위 3' 말단은 S1-Lp-S2로 제시된 줄기-루프를 포함하되, S1은 S2에 상보성이고, 여기에서 Lp는 3 내지 5개 뉴클레오티드의 길이로 S1과 S2 사이에 루프를 형성하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0640] 16. 구현예 13 내지 15 중 어느 하나에 있어서, Lp는 트리루프 또는 테트라루프인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0641] 17. 구현예 13 내지 16 중 어느 하나에 있어서, Lp는 테트라루프인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0642] 18. 구현예 17에 있어서, 테트라루프는 서열 5'-GAAA-3'를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0643] 19. 구현예 13 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 루프는 서열 5'-GAAA-3'를 포함하는 테트라루프인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0644] 20. 구현예 13 내지 19 중 어느 하나에 있어서, S1 및 S2는 1개 뉴클레오티드, 2개 뉴클레오티드, 3개 뉴클레오티드, 4개 뉴클레오티드, 5개 뉴클레오티드, 6개 뉴클레오티드, 7개 뉴클레오티드, 8개 뉴클레오티드, 9개 뉴클레오티드, 또는 10개 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0645] 21. 구현예 13 내지 19 중 어느 하나에 있어서, S1 및 S2는 1개 뉴클레오티드, 2개 뉴클레오티드, 3개 뉴클레오티드, 4개 뉴클레오티드, 5개 뉴클레오티드, 6개 뉴클레오티드, 7개 뉴클레오티드, 8개 뉴클레오티드, 9개 뉴클레오티드, 또는 10개 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0646] 22. 구현예 13 내지 21 중 어느 하나에 있어서, S1 및 S2는 1 내지 10개 뉴클레오티드 길이이고, 서로 동일한 길이를 갖는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0647] 23. 구현예 13 내지 22 중 어느 하나에 있어서, S1 및 S2는 6개 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0648] 24. 구현예 13 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 줄기-루프는 서열 5'-GCAGCCGAAAGGCUGC-3'(서열번호 856)을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0649] 25. 구현예 13 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에는 불연속부가 형성되어, 니킹된 구조를 형성하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0650] 26. 구현예 13 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에는 불연속부가 형성되어, 니킹된 테트라루프 구조를 형성하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0651] 27. 구현예 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥은 하나 이상의 뉴클레오티드 길이의 3' 오버행 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0652] 28. 구현예 27에 있어서, 오버행은 퓨린 뉴클레오티드를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0653] 29. 구현예 27-28 중 어느 하나에 있어서, 3' 오버행 서열은 2개 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0654] 30. 구현예 27 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 3' 오버행은 AA, GG, AG, 및 GA로부터 선택되는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0655] 31. 구현예 30에 있어서, 오버행은 GG 또는 AA인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0656] 32. 구현예 30-31 중 어느 하나에 있어서, 오버행은 GG인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0657] 33. 구현예 27 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 3' 오버행은 5'-AA-3', 5'-GG-3', 5'-AG-3', 및 5'-GA-3'로부터 선택되는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0658] 34. 구현예 33에 있어서, 오버행은 5'-GG-3' 또는 5'-AA-3'인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0659] 35. 구현예 33-34 중 어느 하나에 있어서, 오버행은 5'-GG-3'인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0660] 36. 구현예 1 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0661] 37. 구현예 1 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 올리고뉴클레오티드는 완전히 변형되는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0662] 38. 구현예 1 내지 37 중 어느 하나에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 모든 뉴클레오티드는 변형되는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0663] 39. 구현예 1 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 올리고뉴클레오티드는 부분적으로 변형되는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0664] 40. 구현예 36 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 뉴클레오티드에 접합된 표적화 리간드를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0665] 41. 구현예 36 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 변형된 뉴클레오티드는 뉴클레오티드에 접합된 표적화 리간드를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0666] 42. 구현예 36 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 올리고뉴클레오티드는 2'-변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0667] 43. 구현예 36 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 변형된 뉴클레오티드는 2'-변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0668] 44. 구현예 42-43 중 어느 하나에 있어서, 2'-변형은 2'-아미노에틸, 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸, 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산으로부터 선택되는 변형인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0669] 45. 구현예 42 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 2'-변형은 2'-플루오로(2'-F) 및 2'-O-메틸(2'-OMe)로부터 선택되는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0670] 46. 구현예 36 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 변형은 2'-플루오로(2'-F) 및 2'-O-메틸(2'-OMe)로부터 선택되는 2'-변형인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0671] 47. 구현예 36 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥의 뉴클레오티드의 약 10 내지 15%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 또는 15%는 2'-플루오로(2'-F) 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0672] 48. 구현예 36 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥의 뉴클레오티드의 약 25 내지 35%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 또는 35%는 2'-플루오로(2'-F) 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0673] 49. 구현예 36 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드의 약 25 내지 35%,

25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 또는 35%는 2'-플루오로(2'-F) 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0674] 50. 구현예 1 내지 49 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 5'에서 3'까지 위치 1 내지 36을 갖는 36개 뉴클레오티드를 포함하되, 위치 8 내지 11은 2'-플루오로(2'-F) 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0675] 51. 구현예 1 내지 50 중 어느 하나에 있어서,

[0676] 센스 가닥은 5'에서 3'으로 번호가 매겨진 36개의 뉴클레오티드를 포함하고;

[0677] 센스 가닥의 위치 8 내지 11 모두는 2'-플루오로(2'-F) 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0678] 52. 구현예 1 내지 51 중 어느 하나에 있어서,

[0679] 센스 가닥은 5'에서 3'으로 번호가 매겨진 36개의 뉴클레오티드이고;

[0680] 센스 가닥의 위치 8 내지 11 모두는 2'-플루오로(2'-F) 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0681] 53. 구현예 1 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥은 5'에서 3'까지 위치 1 내지 22를 갖는 22개 뉴클레오티드를 포함하되, 위치 2, 3, 4, 5, 7, 10 및 14은 2'-플루오로(2'-F) 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0682] 54. 구현예 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서,

[0683] 안티센스 가닥은 5'에서 3'으로 번호가 매겨진 22개의 뉴클레오티드를 포함하고;

[0684] 안티센스 가닥의 위치 2, 3, 4, 5, 7, 10 및 14 모두는 2'-플루오로(2'-F) 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0685] 55. 구현예 1 내지 54 중 어느 하나에 있어서,

[0686] 안티센스 가닥은 5'에서 3'으로 번호가 매겨진 22개의 뉴클레오티드이고;

[0687] 안티센스 가닥의 위치 2, 3, 4, 5, 7, 10 및 14 모두는 2'-플루오로(2'-F) 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0688] 56. 구현예 1 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 5'에서 3'까지 위치 1 내지 36을 갖는 36개 뉴클레오티드를 포함하되, 위치 1-7, 12-27, 및 31-36은 2'-O-메틸 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0689] 57. 구현예 1 내지 56 중 어느 하나에 있어서,

[0690] 센스 가닥은 5'에서 3'으로 번호가 매겨진 36개의 뉴클레오티드를 포함하고;

[0691] 센스 가닥의 위치 1-7, 12-27, 및 31-36 모두는 2'-O-메틸 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0692] 58. 구현예 1 내지 57 중 어느 하나에 있어서,

[0693] 센스 가닥은 5'에서 3'으로 번호가 매겨진 36개의 뉴클레오티드이고;

[0694] 센스 가닥의 위치 1-7, 12-27, 및 31-36 모두는 2'-O-메틸 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0695] 59. 구현예 1 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥은 5'에서 3'까지 위치 1 내지 22을 갖는 22개 뉴클레오티드를 포함하되, 위치 1, 6, 8, 9, 11-13, 및 15-22는 2'-O-메틸 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0696] 60. 구현예 1 내지 59 중 어느 하나에 있어서,

[0697] 안티센스 가닥은 5'에서 3'으로 번호가 매겨진 22개의 뉴클레오티드를 포함하고;

[0698] 안티센스 가닥의 위치 1, 6, 8, 9, 11-13, 및 15-22 모두는 2'-O-메틸 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0699] 61. 구현예 1 내지 60 중 어느 하나에 있어서,

[0700] 안티센스 가닥은 5'에서 3'으로 번호가 매겨진 22개의 뉴클레오티드이고;

[0701] 안티센스 가닥의 위치 1, 6, 8, 9, 11-13, 및 15-22 모두는 2'-O-메틸 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티

드.

[0702] 62. 구현예 1 내지 61 중 어느 하나에 있어서,

[0703] 센스 가닥은 36개의 뉴클레오티드를 포함하고, 안티센스 가닥은 22개의 뉴클레오티드를 포함하며, 상기 가닥 각각의 뉴클레오티드는 5'에서 3'로 번호가 매겨지고;

[0704] 센스 가닥의 위치 1-7, 12-27, 및 31-36 모두, 및 안티센스 가닥의 위치 1, 6, 8, 9, 11-13, 및 15-22는 2'-O-메틸 변형을 포함하고;

[0705] 센스 가닥의 8-11 위치 및 안티센스 가닥의 위치 2, 3, 4, 5, 7, 10 및 14 모두는 2'-플루오로 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0706] 63. 구현예 1 내지 62 중 어느 하나에 있어서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드간 결합을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0707] 64. 구현예 63에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드간 결합은 포스포로티오에이트 결합인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0708] 65. 구현예 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 포스포로티오에이트 결합을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0709] 66. 구현예 1 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥은 (i) 위치 1과 2 사이, 및 위치 2와 3 사이; 또는 (ii) 위치 1과 2 사이, 위치 2와 3 사이, 및 위치 3과 4 사이의 포스포로티오에이트 결합을 포함하되, 상기 위치는 5'에서 3'까지 1 내지 4로 번호가 매겨지는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0710] 67. 구현예 1 또는 66 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥은 22개 뉴클레오티드 길이이되, 안티센스 가닥은 위치 20과 21 사이 및 위치 21과 22 사이의 포스포로티오에이트 결합을 포함하고, 여기에서 상기 위치는 5'에서 3'까지 1 내지 22로 번호가 매겨지는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0711] 68. 구현예 1 내지 67 중 어느 하나에 있어서,

[0712] 안티센스 가닥은 5'에서 3'으로 번호가 매겨진 22개의 뉴클레오티드를 포함하고;

[0713] 안티센스 가닥의 위치 1과 2 사이, 위치 2와 3 사이, 및 위치 3과 4 사이, 위치 20과 21 사이, 및 위치 21과 22 사이에는 포스포로티오에이트 결합이 제공되는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0714] 69. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 위치 1과 2 사이의 포스포로티오에이트 결합을 포함하고, 여기에서 상기 위치는 5'에서 3'까지 번호가 매겨지는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0715] 70. 구현예 1 내지 69 중 어느 하나에 있어서,

[0716] 안티센스 가닥은 22개의 뉴클레오티드를 포함하고;

[0717] 각각의 가닥의 뉴클레오티드는 5'에서 3'로 번호가 매겨지고;

[0718] 안티센스 가닥의 위치 1과 2 사이, 위치 2와 3 사이, 및 위치 3과 4 사이, 위치 20과 21 사이, 및 위치 21과 22 사이에는 포스포로티오에이트 결합이 제공되는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0719] 71. 구현예 1 내지 70 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오티드의 당의 4'-탄소는 포스페이트 유사체를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0720] 72. 구현예 71에 있어서, 포스페이트 유사체는, 옥시메틸 포스포네이트, 비닐 포스포네이트, 또는 말로닐 포스포네이트이되, 선택적으로 포스페이트 유사체는 4'-옥시메틸포스포네이트를 포함하는 4'-포스페이트 유사체인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0721] 73. 구현예 1 내지 72 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥의 5'-말단 뉴클레오티드는 화학식 1a(Me포스포네이트-4O-mU)에 따른 구조를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0722] 74. 구현예 1 내지 73 중 어느 하나에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 적어도 하나의 뉴클레오티드는 하나 이상의 표적화 리간드에 접합되는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0723] 75. 구현예 74에 있어서, 각각의 표적화 리간드는 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 또는 폴리펩티드를 포

함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0724] 76. 구현예 13 내지 75 중 어느 하나에 있어서, 줄기 루프는 줄기 루프의 하나 이상의 뉴클레오티드에 접합된 하나 이상의 표적화 리간드를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0725] 77. 구현예 74 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 표적화 리간드는 루프의 하나 이상의 뉴클레오티드에 접합되는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0726] 78. 구현예 13 내지 77 중 어느 하나에 있어서, 루프(Lp)는 5'에서 3'까지 1 내지 4로 번호가 매겨지는 4개의 뉴클레오티드를 포함하되, 위치 2, 3 및 4에서의 뉴클레오티드는 각각 하나 이상의 표적화 리간드를 포함하고, 여기에서 상기 표적화 리간드는 동일하거나 상이한, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0727] 79. 구현예 74 내지 78 중 어느 하나에 있어서, 각각의 표적화 리간드는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0728] 80. 구현예 79에 있어서, GalNAc 모이어티는 1가 GalNAc 모이어티, 2가 GalNAc 모이어티, 3가 GalNAc 모이어티 또는 4가 GalNAc 모이어티인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0729] 81. 구현예 79-80 중 어느 하나에 있어서, GalNAc 모이어티는 1가 GalNAc 모이어티인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0730] 82. 구현예 13 내지 81 중 어느 하나에 있어서, 줄기-루프의 Lp의 최대 4개의 뉴클레오티드는 각각 1가 GalNAc 모이어티에 접합되는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0731] 83. 구현예 13 내지 82 중 어느 하나에 있어서, 루프 Lp는 5' 에서 3'으로 길이 1 내지 4로 번호가 매겨지는 4개의 뉴클레오티드이고, 여기에서 위치 2, 3 및 4에서의 루프 Lp 뉴클레오티드는 각각 1가 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티에 접합되는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0732] 84. 구현예 13 내지 82 중 어느 하나에 있어서, 루프 Lp는 4개의 뉴클레오티드 길이이고, 루프 Lp의 5'에서 3'까지의 제2, 제3 및 제4 뉴클레오티드는 각각 1가 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티에 접합되는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0733] 85. 구현예 1 내지 구현예 84 중 어느 하나에 있어서, 상보성 영역은 mRNA 표적 서열에 대해 완전히 상보성인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0734] 86. 구현예 1 내지 구현예 84 중 어느 하나에 있어서, 상보성 영역은 mRNA 표적 서열에 대해 부분적으로 상보성인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0735] 87. 구현예 1 내지 84 및 구현예 86 중 어느 하나에 있어서, 상보성 영역은 mRNA 표적 서열에 대해 4개 이하의 불일치를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0736] 88. 구현예 1 내지 87 중 어느 하나에 있어서, 상보성 영역은 안티센스 가닥의 뉴클레오티드 위치 2 내지 8에서 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 완전히 상보성이고, 여기에서 뉴클레오티드 위치는 5'에서 3'로 번호가 매겨지는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0737] 89. 구현예 1 내지 88 중 어느 하나에 있어서, 상보성 영역은 안티센스 가닥의 뉴클레오티드 위치 2 내지 11에서 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 완전히 상보성이고, 여기에서 상기 뉴클레오티드 위치는 5'에서 3'로 번호가 매겨지는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0738] 90. 구현예 1 내지 89 중 어느 하나에 있어서, *TMPRSS6* mRNA 표적 서열은 서열 번호 844에 제시된 바와 같은, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0739] 91. 구현예 1 내지 90 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥은 서열 번호 184에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 선택적으로 센스 가닥은 서열 번호 844에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는. RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0740] 92. 구현예 1 내지 91 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 서열 번호 579-580, 585-587, 590 및 595-597 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0741] 93. 구현예 1 내지 92 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 서열 번호 579-580, 585-587, 590 및 595-597로부토 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0742] 94. 구현예 1 내지 93 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥은 서열 번호 600-601, 606-608, 611 및 616-618 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0743] 95. 구현예 1 내지 94 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥은 서열 번호 600-601, 606-608, 611 및 616-618로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0744] 96. 구현예 1 내지 95중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드:

[0745] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0746] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0747] c) 각각 서열번호 595 및 616;

[0748] d) 각각 서열번호 590 및 611;

[0749] e) 각각 서열번호 596 및 617;

[0750] f) 각각 서열번호 597 및 618;

[0751] g) 각각 서열번호 585 및 606;

[0752] h) 각각 서열번호 586 및 607; 및

[0753] i) 각각 서열번호 587 및 608.

[0754] 97. 구현예 1 내지 96중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드:

[0755] a) 각각 서열번호 579 및 600;

[0756] b) 각각 서열번호 580 및 601;

[0757] c) 각각 서열번호 590 및 611;

[0758] d) 각각 서열번호 597 및 618; 및

[0759] e) 각각 서열번호 586 및 607.

[0760] 98. 구현예 1 내지 97 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥은 서열 번호 600에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 선택적으로 센스 가닥은 서열 번호 579에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는. RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0761] 99. 구현예 1 내지 98 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 서열 번호 579에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 번호 600에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는. RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0762] 100. 구현예 1 내지 97 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 서열 번호 580에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 번호 601에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는. RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0763] 101. 구현예 1 내지 97 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 서열 번호 590에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 번호 611에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는. RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0764] 102. 구현예 1 내지 97 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 서열 번호 597에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 번호 618에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는. RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0765] 103. 구현예 1 내지 97 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 서열 번호 586에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 번호 607에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는. RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0766] 104. 구현예 1 내지 103 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥은 22개 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0767] 105. 구현예 1 내지 104 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 36개 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0768] 106. 구현예 1 내지 105중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부

터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드:

[0769] a) 각각 서열번호 621 및 642;

[0770] b) 각각 서열번호 622 및 643;

[0771] c) 각각 서열번호 637 및 658;

[0772] d) 각각 서열번호 632 및 653;

[0773] e) 각각 서열번호 638 및 659;

[0774] f) 각각 서열번호 639 및 660;

[0775] g) 각각 서열번호 627 및 648;

[0776] h) 각각 서열번호 628 및 649; 및

[0777] i) 각각 서열번호 629 및 650.

[0778] 107. 구현예 1 내지 106중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드:

[0779] a) 각각 서열번호 621 및 642;

[0780] b) 각각 서열번호 622 및 643;

[0781] c) 각각 서열번호 632 및 653;

[0782] d) 각각 서열번호 639 및 660; 및

[0783] e) 각각 서열번호 628 및 649.

[0784] 108. 구현예 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 서열 번호 621에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 번호 642에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는. RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0785] 109. 구현예 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 가닥은 서열 번호 642에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 선택적으로 센스 가닥은 서열 번호 621에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는. RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0786] 110. 구현예 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 서열 번호 622에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 번호 643에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는. RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0787] 111. 구현예 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 서열 번호 632에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 번호 653에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는. RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0788] 112. 구현예 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 서열 번호 639에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 번호 660에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는. RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0789] 113. 구현예 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 센스 가닥은 서열 번호 628에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열 번호 649에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는. RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0790] 114. 막관통 세린 프로테아제 6(*TMPRSS6*) 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 이중체 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되,

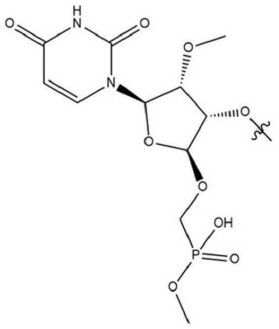
[0791] 상기 안티센스 가닥은 22개의 뉴클레오티드를 포함하고, 서열번호 600에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 센스 가닥은 36개의 뉴클레오티드를 포함하고, 서열번호 579에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 가닥들 중 각각의 뉴클레오티드는 5'에서 3'로 번호가 매겨지며;

[0792] 상기 센스 가닥의 위치 1-7, 12-27, 및 31-36 모두 및 상기 안티센스 가닥의 1, 6, 8, 9, 11-13, 및 15-22는 2'-O-메틸(2'-OMe) 변형을 포함하고, 센스 가닥의 위치 8-11 및 안티센스 가닥의 위치 2, 3, 4, 5, 7, 10 및 14 모두는 2'-플루오로(2'-F) 변형을 포함하고;

[0793] 상기 안티센스 가닥의 위치 1과 2 사이, 위치 2와 3 사이, 위치 3과 4 사이, 위치 20과 21 사이, 및 위치 21과 22 사이에는 포스포로티오에이트 결합이 제공되고;

[0794] 상기 센스 가닥 근위 3' 말단은 S1-Lp-S2, S1로서 제시되는 줄기-루프를 포함하되, S1은 S2에 대해 상보성이고, Lp는 4개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성하며, 여기에서 상기 루프 Lp의 5'에서 3'까지의 제2, 제3 및 제4 뉴클레오티드는 각각 1가 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티에 접합되고;

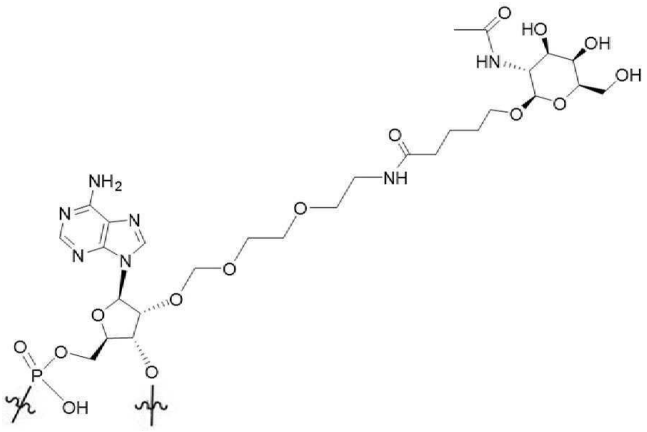
[0795] 상기 안티센스 가닥의 5'-말단 뉴클레오티드는 화학식 1a(Me포스포네이트-4O-mU)에 따른 구조를 포함하는. RNAi 올리고뉴클레오티드.



[0796] .

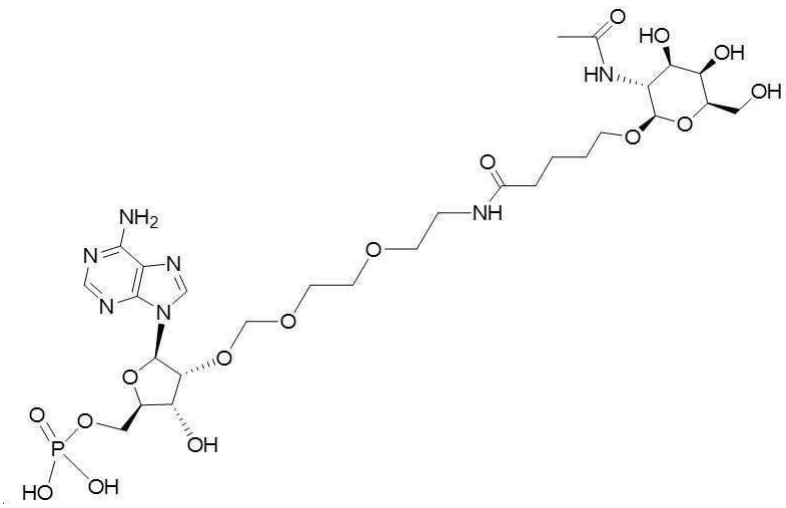
[0797] 115. 구현예 114에 있어서, 안티센스 가닥은 하나 이상의 퓨린 뉴클레오티드 길이의 3' 오버행을 포함하되, 선택적으로 상기 3' 오버행은 5'-GG-3'인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0798] 116. 구현예 114-115 중 어느 하나에 있어서, 1가 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티에 접합된 루프 Lp의 뉴클레오티드는 각각 화학식 5a에 따른 구조를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드:



[0799] .

[0800] 117. *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 상기 센스 가닥은 서열 5'-[mGs][mG][mU][mG][mC][mU][mA][fC][fU][fC][fU][mG][mG][mU][mA][mU][mU][mU][mC][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]--3' (서열번호 621) 및 이의 모든 변형을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fGs][fAs][fA][fA][mU][fA][mC][mC][fA][mG][mA][mG][fU][mA][mG][mC][mA][mC][mCs][mGs][mG]-3' (서열번호 642), 및 이의 모든 변형을 포함하며, 여기에서, mC, mA, mG, mU = 2'-OMe 리보뉴클레오시드이고; fA, fC, fG, fU = 2'-F 리보뉴클레오시드이고; s = 포스포로티오에이트이되, ademA-GalNAc =



[0801] (화학식 5)인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0802] 118. *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되,

[0803] 상기 센스 가닥은 서열 5'-[mGs][mG][mU][mG][mC][mU][mA][fC][fU][fC][fU][mG][mG][mU][mA][mU][mU][mU][mC][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 621) 및 이의 모든 변형을 포함하고;

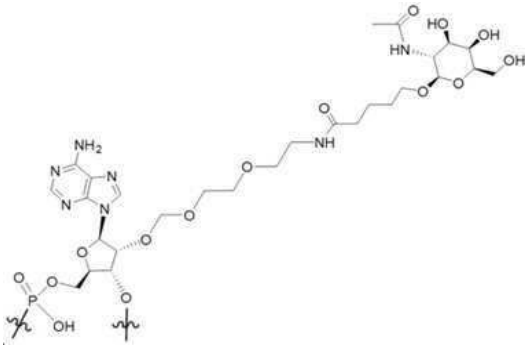
[0804] 상기 안티센스 가닥은 서열 5'-[포스포네이트-4O-mUs][fGs][fAs][fA][fA][mU][fA][mC][mC][fA][mG][mA][mG][fU][mA][mG][mC][mA][mC][mCs][mGs][mG]-3' (서열번호 642) 및 이의 모든 변형을 포함하고;

[0805] mC, mA, mG, mU는 2'-O-메틸(2'-OMe) 변형된 뉴클레오티드를 나타내고;

[0806] fA, fC, fG, fU는 2'-플루오로(2'-F) 변형된 뉴클레오티드를 나타내고;

[0807] s는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 결합을 나타내고;

[0808] adema-GalNAc는 화학식 5a에 따른 구조를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드:



[0809]

[0810] 119. *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되,

[0811] 상기 센스 가닥은 서열 5'-[mGs][mG][mU][mG][mC][mU][mA][fC][fU][fC][fU][mG][mG][mU][mA][mU][mU][mU][mC][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 621) 및 이의 모든 변형을 포함하고;

[0812] 상기 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fGs][fAs][fA][fA][mU][fA][mC][mC][fA][mG][mA][mG][fU][mA][mG][mC][mA][mC][mCs][mGs][mG]-3' (서열

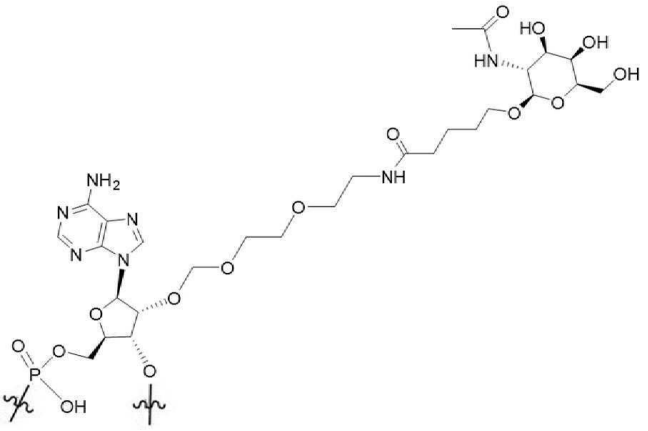
번호 642) 및 이의 모든 변형을 포함하고;

[0813] mC, mA, mG, mU는 2'-O-메틸(2'-OMe) 변형된 뉴클레오티드를 나타내고;

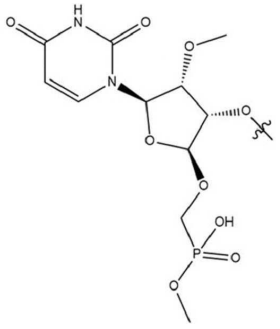
[0814] fA, fC, fG, fU는 2'-플루오로(2'-F) 변형된 뉴클레오티드를 나타내고;

[0815] s는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 결합을 나타내고;

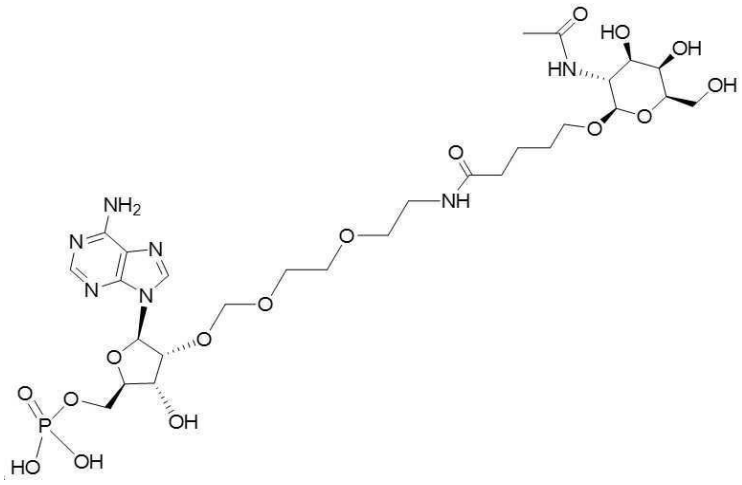
[0816] adema-GalNAc는 화학식 5a에 따른 구조를 포함하고:

[0817]  ;

[0818] Me포스페이트-4O-mU는 화학식 1a에 따른 구조를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0819]  .

[0820] 120. *TMPRSS6* 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함함하되, 센스 가닥은 서열 5'-[mGs][mC][mU][mA][mC][mU][mC][fU][fG][fG][fU][mA][mU][mU][mU][mC][mC][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 622) 및 이의 모든 변형을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fUs][fAs][fG][fG][mA][fA][mA][mU][fA][mC][mC][mA][fG][mA][mG][mU][mA][mG][mCs][mGs][mG]-3' (서열번호 643), 및 이의 모든 변형을 포함하며, 여기에서, mC, mA, mG, mU = 2'-OMe 리보뉴클레오시드이고; fA, fC, fG, fU = 2'-F 리보뉴클레오시드이고; s = 포스포로티오에이트이되, ademA-GalNAc =



[0821] (화학식 5)인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0822] 121. TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되,

[0823] 상기 센스 가닥은 서열 5'-[mGs][mC][mU][mA][mC][mU][mC][fU][fG][fG][fU][mA][mU][mU][mU][mC][mC][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 622) 및 이의 모든 변형을 포함하고;

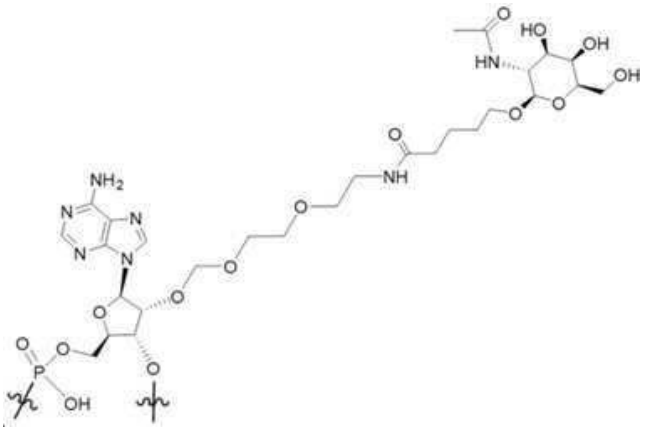
[0824] 상기 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fUs][fAs][fG][fG][mA][fA][mA][mU][fA][mC][mC][mA][fG][mA][mG][mU][mA][mG][mCs][mGs][mG]-3′ (서열번호 643) 및 이의 모든 변형을 포함하고;

[0825] mC, mA, mG, mU는 2'-O-메틸(2'-OMe) 변형된 뉴클레오티드를 나타내고;

[0826] fA, fC, fG, fU는 2'-플루오로(2'-F) 변형된 뉴클레오티드를 나타내고;

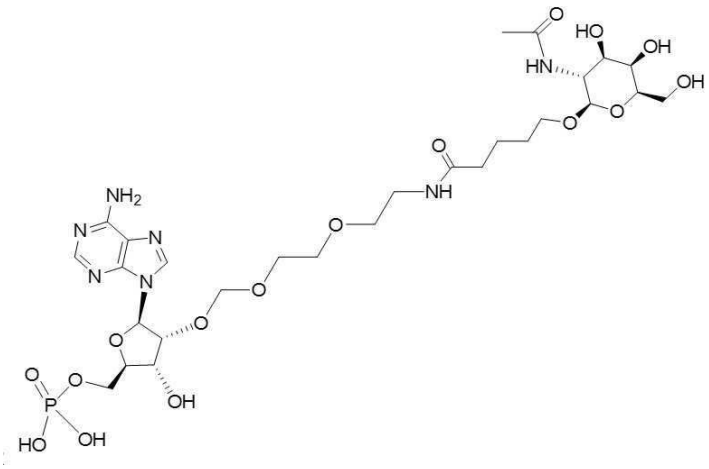
[0827] s는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 결합을 나타내고;

[0828] adema-GalNAc는 화학식 5a에 따른 구조를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드:



[0829] .

[0830] 122. TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 상기 센스 가닥은 서열 5'-[mCs][mU][mC][mA][mC][mC][mU][fG][fC][fU][fU][mC][mU][mU][mC][mU][mG][mG][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 632) 및 이의 모든 변형을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fAs][fCs][fC][fA][mG][fA][mA][mG][fA][mA][mG][mC][fA][mG][mG][mU][mG][mA][mGs][mGs][mG]-3′ (서열번호 653), 및 이의 모든 변형을 포함하며, 여기에서, mC, mA, mG, mU = 2'-OMe 리보뉴클레오시드이고; fA, fC, fG, fU = 2'-F 리보뉴클레오시드이고; s = 포스포로티오에이트이되, ademA-GalNAc =

[0831]  (화학식 5)인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0832] 123. TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되,

[0833] 상기 센스 가닥은 서열 5'-[mCs][mU][mC][mA][mC][mC][mU][fG][fC][fU][fU][mC][mU][mU][mC][mU][mG][mG][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 632) 및 이의 모든 변형을 포함하고;

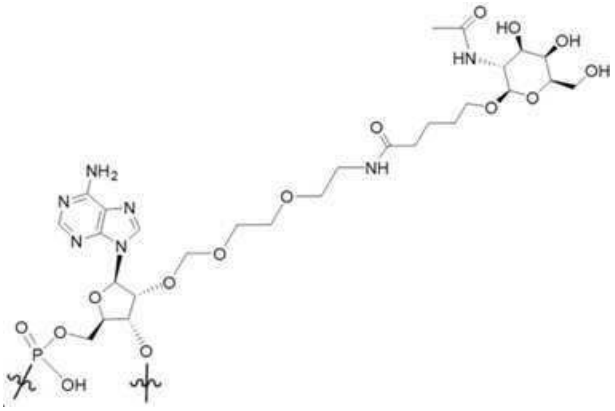
[0834] 상기 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fAs][fCs][fC][fA][mG][fA][mA][mG][fA][mA][mG][mC][fA][mG][mG][mU][mG][mA][mGs][mGs][mG]-3' (서열번호 653) 및 이의 모든 변형을 포함하고;

[0835] mC, mA, mG, mU는 2'-O-메틸(2'-OMe) 변형된 뉴클레오티드를 나타내고;

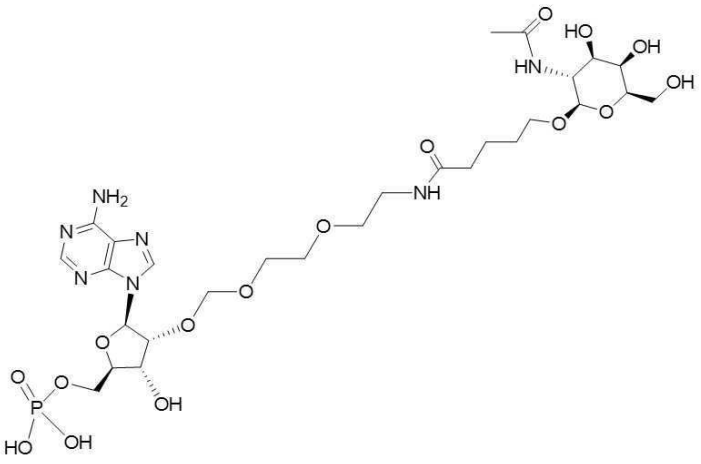
[0836] fA, fC, fG, fU는 2'-플루오로(2'-F) 변형된 뉴클레오티드를 나타내고;

[0837] s는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 결합을 나타내고;

[0838] adema-GalNAc는 화학식 5a에 따른 구조를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드:

[0839]  .

[0840] 124. TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 상기 센스 가닥은 서열 5'-[mAs][mG][mU][mG][mU][mG][mA][fA][fA][fG][fA][mC][mA][mU][mA][mG][mC][mU][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 639) 및 이의 모든 변형을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fCs][fAs][fG][fC][mU][fA][mU][mG][fU][mC][mU][mU][fU][mC][mA][mC][mA][mC][mUs][mGs][mG]-3′ (서열번호 660), 및 이의 모든 변형을 포함하며, 여기에서, mC, mA, mG, mU = 2'-OMe 리보뉴클레오시드이고; fA, fC, fG, fU = 2'-F 리보뉴클레오시드이고; s = 포스포로티오에이트이되, ademA-GalNAc =



[0841] (화학식 5)인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0842] 125. TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되,

[0843] 상기 센스 가닥은 서열 5'-[mAs][mG][mU][mG][mU][mG][mA][fA][fA][fG][fA][mC][mA][mU][mA][mG][mC][mU][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 639) 및 이의 모든 변형을 포함하고;

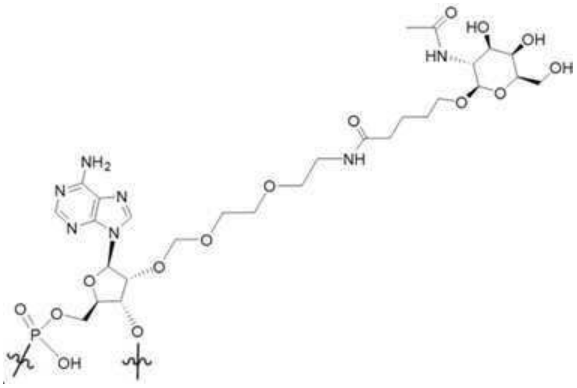
[0844] 상기 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fCs][fAs][fG][fC][mU][fA][mU][mG][fU][mC][mU][mU][fU][mC][mA][mC][mA][mC][mUs][mGs][mG]-3' (서열번호 660) 및 이의 모든 변형을 포함하고;

[0845] mC, mA, mG, mU는 2'-O-메틸(2'-OMe) 변형된 뉴클레오티드를 나타내고;

[0846] fA, fC, fG, fU는 2'-플루오로(2'-F) 변형된 뉴클레오티드를 나타내고;

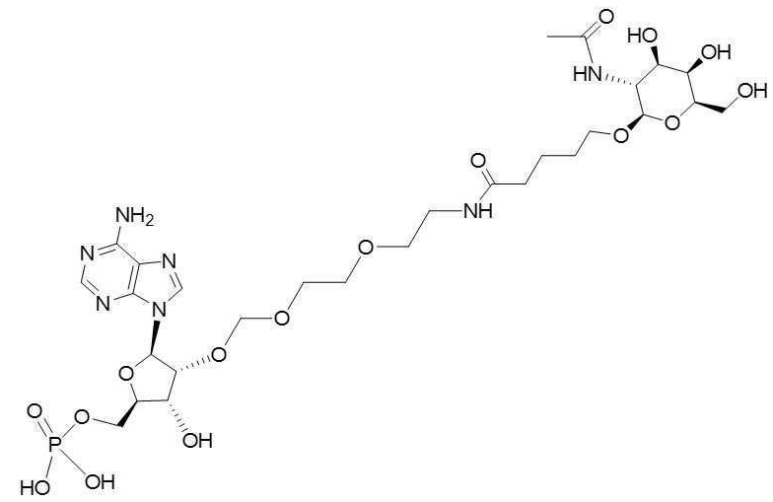
[0847] s는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 결합을 나타내고;

[0848] adema-GalNAc는 화학식 5a에 따른 구조를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드:



[0849] .

[0850] 126. TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함함하되, 상기 센스 가닥은 서열 5'-[mGs][mG][mG][mU][mG][mC][mA][fC][fU][fA][fU][mG][mG][mC][mU][mU][mG][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 628) 및 이의 모든 변형을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fUs][fAs][fC][fA][mA][fG][mC][mC][fA][mU][mA][mG][fU][mG][mC][mA][mC][mC][mCs][mGs][mG]-3' (서열번호 649), 및 이의 모든 변형을 포함하며, 여기에서, mC, mA, mG, mU = 2'-OMe 리보뉴클레오시드이고; fA, fC, fG, fU = 2'-F 리보뉴클레오시드이고; s = 포스포로티오에이트이되, ademA-GalNAc =



[0851] (화학식 5)인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0852] 127. TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되,

[0853] 상기 센스 가닥은 서열 5'-[mGs][mG][mG][mU][mG][mC][mA][fC][fU][fA][fU][mG][mG][mC][mU][mU][mG][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (서열번호 628) 및 이의 모든 변형을 포함하고;

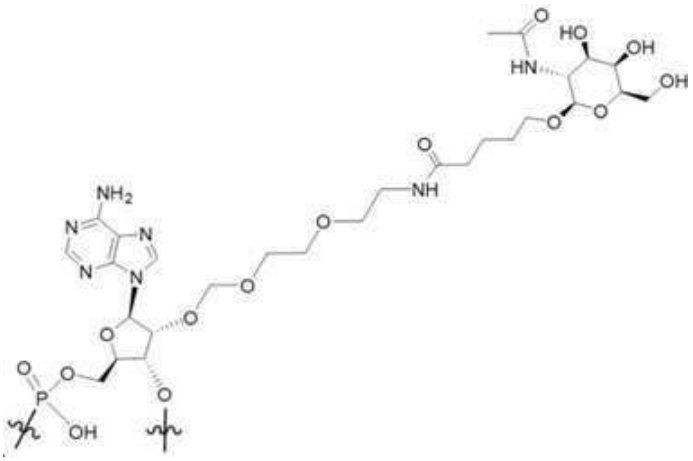
[0854] 상기 안티센스 가닥은 서열 5'-[Me포스포네이트-4O-mUs][fUs][fAs][fC][fA][mA][fG][mC][mC][fA][mU][mA][mG][fU][mG][mC][mA][mC][mC][mCs][mGs][mG]-3' (서열번호 649) 및 이의 모든 변형을 포함하고;

[0855] mC, mA, mG, mU는 2'-O-메틸(2'-OMe) 변형된 뉴클레오티드를 나타내고;

[0856] fA, fC, fG, fU는 2'-플루오로(2'-F) 변형된 뉴클레오티드를 나타내고;

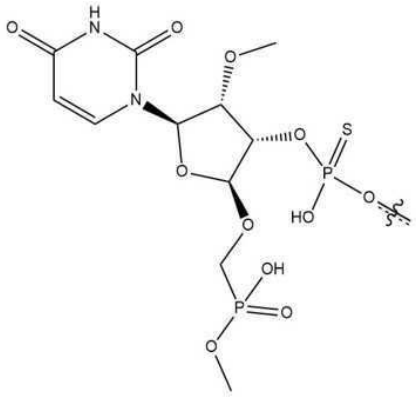
[0857] s는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 결합을 나타내고;

[0858] adema-GalNAc는 화학식 5a에 따른 구조를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드:



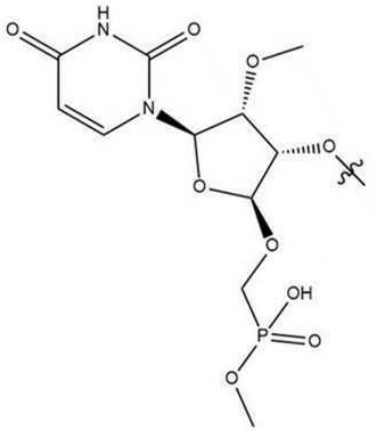
[0859]

[0860] 128. 구현예 116 내지 127 중 어느 하나에 있어서, Me포스포네이트-4O-mUs는 화학식 1에 따른 구조를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드:



[0861] .

[0862] 129. 구현예 116 내지 127 중 어느 하나에 있어서, Me포스포네이트-4O-mU는 화학식 1a에 따른 구조를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드:



[0863] .

[0864] 130. TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 상기 센스 가닥은 서열번호 621을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 642를 포함하며, 상기 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사물에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 올리고뉴클레오티드는 도 10a-b에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0865] 131. TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 상기 센스 가닥은 서열번호 621을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 642를 포함하며, 상기 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사물에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 올리고뉴클레오티드는 도 14a에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0866] 132. TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 상기 센스 가닥은 서열번호 632를 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 653을 포함하며, 상기 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사물에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 올리고뉴클레오티드는 도 11a-b에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0867] 133. TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 상기 센스 가닥은 서열번호 632를 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 653을 포함하며, 상기 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사물에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 올리고뉴클레오티드는 도 14b에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0868] 134. TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 상기 센스 가닥은 서열번호 639를 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 660을 포함하며, 상기 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사물에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 올리고뉴클레오티드는 도 12a-b에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0869] 135. TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥

및 안티센스 가닥을 포함하되, 상기 센스 가닥은 서열번호 639를 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 660을 포함하며, 상기 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사물에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 올리고뉴클레오티드는 도 14c에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0870] 136. TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 상기 센스 가닥은 서열번호 628을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 649를 포함하며, 상기 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사물에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 올리고뉴클레오티드는 도 13a-b에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0871] 137. TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하되, 상기 센스 가닥은 서열번호 628을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 649를 포함하며, 상기 안티센스 가닥은 TMPRSS6 RNA 전사물에 대한 상보성 영역을 포함하며, 여기에서 상기 올리고뉴클레오티드는 도 14d에 도시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체의 형태인, RNAi 올리고뉴클레오티드.

[0872] 138. 구현예 1 내지 137 중 어느 하나의 RNAi 올리고뉴클레오티드, 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 전달제 또는 부형제를 포함하는, 약학적 조성물.

[0873] 139. 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은, 구현예 1 내지 137 중 어느 하나의 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 구현예 138에 따른 약학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 이에 의해 상기 대상체를 치료하는, 방법.

[0874] 140. 구현예 139에 있어서, RNAi 올리고뉴클레오티드를 투여하는 단계 후, (i) 헵시딘 발현이 증가되거나; (ii) 혈청 철 수치가 감소되거나; (iii) 혈청 철 포화도가 감소되거나; (iv) (i)-(iii)의 임의의 조합이 이루어지는, 방법.

[0875] 141. 올리고뉴클레오티드를 대상체에게 전달하는 방법으로서, 상기 방법은 구현예 138의 약학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0876] 142. 세포, 세포 집단 또는 대상체에서 TMPRSS6 발현을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은:

[0877] i) 구현예 1 내지 137 중 어느 하나에 따른 RNAi 올리고뉴클레오티드, 또는 구현예 138의 약학적 조성물과 상기 세포 또는 세포 집단을 접촉시키는 단계; 또는

[0878] ii) 구현예 1 내지 137 중 어느 하나에 따른 RNAi 올리고뉴클레오티드, 또는 구현예 138의 약학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0879] 143. 구현예 142에 있어서, TMPRSS6 발현을 감소시키는 단계는 TMPRSS6 mRNA의 양 또는 수치, 마트립타아제-2 단백질의 양 또는 수치, 또는 둘 모두를 감소시키는 단계를 포함하는, 방법.

[0880] 144. 구현예 142 또는 143에 있어서, TMPRSS6 발현을 감소시키는 단계는 (i) 헵시딘 생성의 증가; (ii) 혈청 철 포화도의 감소; (iii) 혈청 철의 감소; 또는 (iv) (i)-(iii)의 임의의 조합을 초래하는, 방법.

[0881] 145. 구현예 142 내지 144 중 어느 하나에 있어서, 대상체는 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 갖는, 방법.

[0882] 146. 구현예 139 내지 140 및 145 중 어느 하나에 있어서, 헵시딘 결핍과 연관된 질환, 장애 또는 병태는 유전성 혈색소 침착증과 같은 혈색소 침착증인, 방법.

[0883] 147. 구현예 139 내지 140 및 145 중 어느 하나에 있어서, 헵시딘 결핍과 연관된 질환, 장애 또는 병태는 베타-지중해빈혈인, 방법.

[0884] 148. 구현예 139 내지 140 및 145 중 어느 하나에 있어서, 헵시딘 결핍과 연관된 질환, 장애 또는 병태는 진성 적혈구증가증인, 방법.

[0885] 149. 구현예 139 및 148 중 어느 하나에 있어서, RNAi 올리고뉴클레오티드, 또는 약학적 조성물은 제2 조성물 또는 치료제와 조합하여 투여되는, 방법.

[0886] 150. 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태의 치료, 선택적으로 유전성 혈색소 침착증과 같은 혈색소 침착증, 진성 적혈구증가증 또는 베타-지중해빈혈의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서의, 구현예 1 내지 137 중 어느 하나에 따른 RNAi 올리고뉴클레오티드, 또는 구현예 138에 따른 약학적 조성물의 용도.

[0887] 151. 의약으로서 사용하기 위한, 구현예 1 내지 137 중 어느 한 하나에 따른 RNAi 올리고뉴클레오티드, 또는 구현예 138에 따른 약학적 조성물.

[0888] 152. 의약으로서 사용하기 위한, 구현예 1 내지 137 중 어느 한 하나에 따른 RNAi 올리고뉴클레오티드, 또는 구현예 138에 따른 약학적 조성물.

[0889] 153. 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태의 치료, 선택적으로 유전성 혈색소 침착증과 같은 혈색소 침착증, 진성 적혈구증가증 또는 베타-지중해빈혈의 치료에 사용하기 위한, 또는 사용에 적합한, 구현예 1 내지 137 중 어느 한 하나에 따른 RNAi 올리고뉴클레오티드, 또는 구현예 138에 따른 약학적 조성물.

[0890] 154. 유전성 혈색소 침착증과 같은 혈색소 침착증의 치료에 사용하기 위한, 구현예 1 내지 137 중 어느 한 하나에 따른 RNAi 올리고뉴클레오티드, 또는 구현예 138에 따른 약학적 조성물.

[0891] 155. 진성 적혈구증가증의 치료에 사용하기 위한, 구현예 1 내지 137 중 어느 한 하나에 따른 RNAi 올리고뉴클레오티드, 또는 구현예 138에 따른 약학적 조성물.

[0892] 156. 베타-지중해빈혈의 치료에 사용하기 위한, 구현예 1 내지 137 중 어느 한 하나에 따른 RNAi 올리고뉴클레오티드, 또는 구현예 138에 따른 약학적 조성물.

[0893] 157. 유전성 혈색소 침착증과 같은 혈색소 침착증 또는 베타-지중해빈혈의 치료에 사용하기 위한, 구현예 1 내지 137 중 어느 한 하나에 따른 RNAi 올리고뉴클레오티드, 또는 구현예 138에 따른 약학적 조성물.

[0894] 158. 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체에게 투여하기 위한, 구현예 1 내지 137 중 어느 하나의 RNAi 올리고뉴클레오티드, 선택적인 약학적으로 허용 가능한 담체, 및 지침을 포함하는 패키지 첨부물을 포함하는, 키트.

[0895] 159. 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체에게 투여하기 위한, 구현예 1 내지 137 중 어느 하나의 RNAi 올리고뉴클레오티드, 또는 구현예 138의 약학적 조성물, 및 선택적인 약학적으로 허용 가능한 담체, 및 지침을 포함하는 패키지 첨부물을 포함하는, 키트.

[0896] 160. 구현예 150의 용도, 구현예 151 내지 157 중 어느 한 하나에 따른, 사용하기 위한, 또는 사용에 적합한, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 약학적 조성물. 또는 구현예 158 및 159 중 어느 한 항에 따른, 키트에 있어서, 헵시딘 결핍 또는 억제와 연관된 질환, 장애 또는 병태는 유전성 혈색소 침착증과 같은 혈색소 침착증, 진성 적혈구증가증 또는 베타-지중해빈혈인, 용도.

[0897] **실시예**

[0898] ***실시예 1: RNAi 올리고뉴클레오티드의 제조***

[0899] ***올리고뉴클레오티드 합성 및 정제***

[0900] 전술한 예에 기술된 올리고뉴클레오티드(RNAi 올리고뉴클레오티드)를 본원에 기술된 방법을 사용하여 화학적으로 합성하였다. 대체로, RNAi 올리고뉴클레오티드는, 공지된 포스포라미디트 합성(예를 들어, Hughes 및 Ellington (2017) Cold Spring Harb Perspect Biol. 9(1):a023812; Beaucage S.L., Caruthers M.H. *Studies on Nucleotide Chemistry V: Deoxynucleoside Phosphoramidites — A New Class of Key Intermediates for Deoxypolynucleotide Synthesis*, Tetrahedron Lett. 1981;22:1859-62. Doi: 10.1016/S0040-4039(01)90461-7 참조)을 사용하는 것 외에, 19 내지 23량체 siRNA에 대해 기술된 바와 같은 고상 올리고뉴클레오티드 합성 방법(예를 들어, Scaringe 등(1990) Nucleic Acids Res. 18:5433-5441 및 Usman 등(1987) J. Am. Chem. Soc. 109:7845-45 참조; 또한, 미국 특허 제5,804,683호; 제5,831,071호; 제5,998,203호; 제6,008,400호; 제6,111,086호; 제6,117,657호; 제6,353,098호; 제6,362,323호; 제6,437,117호 및 제6,469,158호 참조)을 사용하여 합성되었다. 19량체 코어 서열을 갖는 dsRNAi 올리고뉴클레오티드를 25량체 센스 가닥 및 27량체 안티센스 가닥을 갖는 구조물로 포맷하여 RNAi 기구에 의한 프로세싱이 가능하게 하였다. 19량체 코어 서열은 *TMPRSS6* mRNA의 영역에 상보성이다.

[0901] 개별 RNA 가닥을 합성하고, 표준 방법(Integrated DNA Technologies; Coralville, IA)에 따라 HPLC로 정제하였다. 예를 들어, RNA 올리고뉴클레오티드는 고상 포스포라미디트 화학을 사용하여 합성되었고, 표준 기술(Damha & Olgivie (1993) Methods Mol. Biol. 20:81-114; Wincott 등 (1995) Nucleic Acids Res. 23:2677-84)을 사용하여 NAP-5 컬럼(Amersham Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ) 상에서 탈보호되고 탈염되었다. 올리고머를 15분 단계-선형 기울기를 사용하여 Amersham Source 15Q 컬럼(1.0 cm X 25 cm; Amersham Pharmacia Biotech) 상

에서 이온-교환 고성능 액체 크로마토그래피(IE-HPLC)를 사용하여 정제하였다. 구배는 90:10 완충액 A:B 내지 52:48 완충액 A:B까지 변하였으며, 여기에서 완충액 A는 100 mM 트리스 pH 8.5이고, 완충액 B는 100 mM 트리스 pH 8.5, 1 M NaCl이다. 260 nm에서 샘플을 모니터링하고, 전장 올리고뉴클레오티드 종에 상응하는 피크를 수집하고, 풀링하고, NAP-5 컬럼 상에서 탈염하고, 동결 건조시켰다.

[0902] 각각의 올리고머의 순도는 Beckman PACE 5000(Beckman Coulter, Inc.; Fullerton, CA)) 상의 모세관 전기영동(CE)로 결정되었다. CE 모세관은 내경 100 μm이고 ssDNA 100R 겔(Beckman-Coulter)을 함유한다. 일반적으로, 약 0.6 nmole의 올리고뉴클레오티드를 모세관 내로 주입하고, 444 V/cm의 전기장에서 작동시키고, 260 nm에서의 UV 흡광도로 검출하였다. Denaturing Tris-Borate-7 M-요소 실행 완충액을 Beckman-Coulter로부터 구입하였다. 아래에 기술된 실험에 사용하기 위해 CE으로 평가된 바와 같이, 적어도 90% 순수한 올리고리보뉴클레오티드를 수득하였다. 제조사의 권장 프로토콜에 따라, Voyager DE™ Biospectometry Work Station(Applied Biosystems; Foster City, CA)에서 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 비행시간(MALDI-TOF) 질량 분광분석법으로 화합물 동일성을 확인하였다. 모든 올리고머의 상대 분자 질량을 수득하였으며, 이는 종종 예상 분자 질량의 0.2% 이내였다.

[0903] *이중체의 제조*

[0904] 100 mM 칼륨 아세테이트, 30 mM HEPES, pH 7.5로 이루어진 이중체 완충액에 단일 가닥 RNA 올리고머를 (예를 들어, 100 μM 농도로) 재현탁하였다. 상보성 센스 및 안티센스 가닥을 동일한 몰 양으로 혼합하여, 예를 들어, 50 μM 이중체의 최종 용액을 수득하였다. 샘플을 RNA 완충액(IDT) 중에서 5분 동안 100℃까지 가열하고, 사용 전에 실온으로 냉각시켰다. RNAi 올리고뉴클레오티드를 -20℃에서 보관하였다. 단일 가닥 RNA 올리고머를 동결 건조하거나, 뉴클레아제가 없는 물에서 -80℃로 보관하였다.

[0905] ***실시예 2: TMPRSS6-표적화 GalNAc-접합 RNAi 올리고뉴클레오티드의 생성***

[0906] 막관통 프로테아제, 세린 6(TMPRSS6)은 세포 표면에서 발견되는 II형 막관통 세린 프로테아제이다. 단백질은 신호전달 경로에서 헵시딘과 함께 작용하여 체내의 철 균형을 조절한다.

[0907] *TMPRSS6 mRNA 표적 서열의 식별*

[0908] *TMPRSS6* RNAi 올리고뉴클레오티드를 생성하기 위해, 컴퓨터 기반 알고리즘을 사용하여 RNAi 경로에 의한 *TMPRSS6* 발현의 억제를 분석하기에 적합한 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열을 연산적으로 식별하였다. 알고리즘은 인간(Hs) 또는 쥣과(Mm) mRNA의 적절한 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 각각 갖는 RNAi 올리고뉴클레오티드 가이드(안티센스) 가닥 서열을 제공하였다(예를 들어, 각각 서열번호 853 및 854; 표 1). 종에 걸친 서열 보존으로 인해, 인간 *TMPRSS6* mRNA에 대해 식별된 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열 중 일부는 쥣과(Mm) *TMPRSS6* mRNA(서열번호 854; 표 1) 및/또는 시노몰구스 원숭이(Mf) *TMPRSS6* mRNA(서열번호 855; 표 1)의 상응하는 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열과 상동체이다. 뉴클레오티드 서열 유사성을 갖는 상동성 *TMPRSS6* mRNA 표적 서열에 대해 상보성 영역을 포함하는 *TMPRSS6* RNAi 올리고뉴클레오티드는 상동성 *TMPRSS6* mRNA(예를 들어, 인간 *TMPRSS6* 및 원숭이 *TMPRSS6* mRNAs)를 표적화하는 능력을 가질 것으로 예측된다.

[표 1]

예시적인 인간 *TMPRSS6*, 원숭이 *TMPRSS6*, 및 쥣과 *TMPRSS6* mRNA 서열

종	GenBank 참조 서열 #	서열번호
인간(Hs)	NM_001289000.2	853
쥣과(Mm)	NM_001355601.1	854
시노몰구스 원숭이(Mf)	XM_005567384.2	855

[0909]

[0910] 특히, 실시예 1에 기술된 바와 같이 합성된 올리고뉴클레오티드를 사용하여, 36-량체 패신저 가닥 및 22-량체 가이드 가닥을 갖는 니킹된 테트라루프 GalNAc-접합된 구조(본원에서 "GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드" 또는 "GalNAc-*TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드"로 지칭됨)를 포함하는 이중-가닥 RNAi 올리고뉴클레오티드를 생성하였다. 또한, 패신저 가닥 및 가이드 가닥을 포함하는 뉴클레오티드 서열은 변형된 뉴클레오티드 및 포스포로티오에이트 결합의 구별되는 패턴을 갖는다. 테트라루프를 포함하는 뉴클레오티드 중 3개는 GalNAc 모이어티에 각각 접합되었다(CAS#14131-60-3). 각 가닥의 변형 패턴은 아래에 예시되어 있다:

[0911] **센스 가닥:**

[0912] 5'-[mXs][mX][mX][mX][mX][mX][mX][fX][fX][fX][fX][mX][mX][mX][mX]
[mX][mX][mX][mX][mX][mX][mX][mX][mX][mX][mX][mX][mX][ademX-GalNAc][ademX-GalNAc][ademX-GalNAc][mX][mX][mX][mX][mX][mX]- 3'

[0913] 다음으로 혼성화됨:

[0914] **안티센스 가닥:**

[0915] 5'-[Me포스포네이트-4O-mXs][fXs][fXs][fX][fX][mX][fX][mX][mX]
[fX][mX][mX][mX][fX][mX][mX][mX][mX][mX][mXs][mXs][mX]- 3'

[표 2]

변형 키

기호	변형/결합
[Me포스포네이트-4O-mXs]	이웃 뉴클레오티드에 대한 포스포로티오에이트 결합을 갖는 4'-O-모노메틸포스포네이트-2'-O-메틸 변형된 뉴클레오티드
[ademX-GalNAc]	뉴클레오티드에 부착된 GalNAc
[mXs]	이웃 뉴클레오티드에 대한 포스포로티오에이트 결합을 갖는 2'-*O*-메틸 변형된 뉴클레오티드
[fXs]	이웃 뉴클레오티드에 대한 포스포로티오에이트 결합을 갖는 2'-플루오로 변형된 뉴클레오티드
[mX]	이웃 뉴클레오티드에 대한 포스포디에스테르 결합을 갖는 2'-*O*-메틸 변형된 뉴클레오티드
[fX]	이웃 뉴클레오티드에 대한 포스포디에스테르 결합을 갖는 2'-플루오로 변형된 뉴클레오티드

[0916] 위의 변형 패턴 및 변형 키에서의 "X"는 핵염기를 지칭하는 것으로 이해된다.

[0917] *시험관 내 세포 기반 분석*

[0918] *TMPRSS6* mRNA를 감소시키는 GalNAc-접합 TMPRSS6 올리고뉴클레오티드의 능력을 시험관 내 세포 기반 분석을 사용하여 측정하였다. 요약하면, 내인성 인간 *TMPRSS6* 유전자를 발현하는 인간 Hep3B 세포를 다중-웰 세포 배양 플레이트의 별도의 웰에서 1 nM의 GalNAc-접합 TMPRSS6 올리고뉴클레오티드로 형질감염시켰다. 변형된 GalNAc-접합 TMPRSS6 올리고뉴클레오티드로 형질감염시킨 후 24시간 동안 세포를 유지시킨 다음, TAQMAN®-기반 qPCR 검정을 사용하여 형질감염된 세포로부터의 남아 있는 *TMPRSS6* mRNA의 양을 결정하였다. 6-카르복시-플루오레세인(FAM)에 접합된 PCR 프로브를 사용하여 측정함으로써, 2개의 qPCR 검정, 즉 3' 검정 및 5' 검정을 사용하여 *TMPRSS6* mRNA 수치를 결정하였다. 이들 검정은 아래의 표 3에서 식별된다. 잔여 mRNA의 백분율(%)에 대해 프라이머 쌍을 분석하였다.

[표 3]

qPCR 검정

3' 검정	순방향-1652 (F1652)	AGCCTGATTGTCTCAACGG	서열번호 857
	역방향-1725	CTGGAAGGTGAATGTCCCAC	서열번호 858
	프로브-1676	ACGAAGAGCAGTGCCAGGAAGG	서열번호 859
5' 검정	순방향-394 (F394)	GTACTCAATCGCCACTTCTCC	서열번호 860
	역방향-539	GAATAGACGGAGCTGGAGTTG	서열번호 861
	프로브-450	CAGTGAAACCGCCAAAGCCCAG	서열번호 862

[0919]

[0920] 결과는, *TMPRSS6* mRNA를 표적화하도록 설계된 GalNAc-접합 TMPRSS6 올리고뉴클레오티드가, GalNAc-접합 TMPRSS6 올리고뉴클레오티드-형질감염된 세포 중 *TMPRSS6* mRNA의 감소된 양으로 결정했을 때, 대조군 세포에 비해, 해당 세포에서 *TMPRSS6* 발현을 억제하였음을 나타냈고, GalXC-접합 올리고뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열이 RNAi 올리고뉴클레오티드를 생성하여 *TMPRSS6* 발현을 억제하는 데 유용하다는 것을 나타냈다.

[0921] ***실시예 3: GalNAc-접합 TMPRSS6 RNAi 올리고뉴클레오티드는 생체 내에서 인간 및 쥣과 TMPRSS6 발현을 억제함***

[0922] 생체 내 *TMPRSS6* 발현을 감소시키는 RNAi 올리고뉴클레오티드의 능력을 평가하기 위해, HDI 마우스 모델을 사용하였다.

[0923] 표 4에 나타낸 9개의 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드를 평가하였다. 선택된 올리고뉴클레오티드는 실시예 2의 스크린에서 *TMPRSS6* 발현을 억제하기 위해 RNAi 올리고뉴클레오티드를 생성하는 데 사용된 뉴클레오티드 서열에 기초하였다.

[0924] 올리고뉴클레오티드를 마우스 간의 간세포에서 인간 *TMPRSS6* mRNA를 일시적으로 발현하도록 조작된 마우스에서 평가하였다. 요약하면, 6 내지 8주령의 암컷 CD-1 마우스(n = 5)에게 PBS로 제형화된 1 mg/kg 또는 2 mg/kg의 농도의 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드를 피하 투여하였다. 마우스의 대조군(n = 5)에게는 PBS만을 투여하였다. 3일(72시간) 후, 마우스에게, 유비쿼터스 시토메갈로바이러스(CMV) 프로모터 서열의 조절 하에서, 25 μg의 오픈 리딩 프레임(ORF) 인간 *TMPRSS6* 유전자를 암호화하는 DNA 플라스미드(NM_153609를 함유하는 pCMV6_TMPRSS6(Cat #: SC306623, Origene))을 수력학적으로 주사(HDI)하였다. DNA 플라스미드의 도입 후 1일차에, HDI 마우스로부터 간 샘플을 수집하였다. 이들 HDI 마우스로부터 유래된 총 RNA에 대해 qRT-PCR 검정을 수행하여 *TMPRSS6* mRNA 수치를 결정하였다. 구체적으로, RNA를 간 조직으로부터 추출하여, qPCR에 의해 인간 및 내인성 쥣과 *TMPRSS6* mRNA 수치를 결정하였다(neoR 유전자에 대해 정규화됨). 인간 *TMPRSS6* mRNA의 수치를, 인간 *TMPRSS6* mRNA에 특이적인 프라이머 쌍 및 형광 표지된 프로브로 이루어진 5' 및 3' PrimeTime™ qPCR 프로브 검정(IDT)을 사용하여 결정하였다. 쥣과 *TMPRSS6*의 수치를 유사하게 측정하였다. 치료된 마우스의 샘플 중 잔여 인간 및 내인성 쥣과 *TMPRSS6* mRNA의 백분율은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$("델타-델타 Ct") 방법(Livak 및 Schmittgen (2001) Methods 25:402-408)을 사용하여 결정하였다. DNA 플라스미드 상에 포함된 NeoR 유전자를 사용하여 형질감염 효율에 대해 값을 정규화하였다.

[표 4]

HDI 스크리닝에 대한, GalNAc-접합된 인간 *TMPRSS6* RNAi 올리고뉴클레오티드

	종 표적	미변형 센스 가닥 (서열번호)	미변형 안티센스 가닥 (서열번호)	변형된 센스 가닥 (서열번호)	변형된 안티센스 가닥 (서열번호)
TMPRSS6-416	Hs/Mf	579	600	621	642
TMPRSS6-0419	Hs/Mf	580	601	622	643
TMPRSS6-0615	Hs/Mf	595	616	637	658
TMPRSS6-0651	Hs/Mf/Mm	590	611	632	653
TMPRSS6-0654	Hs/Mf	596	617	638	659
TMPRSS6-0831	Hs/Mf	597	618	639	660
TMPRSS6-1375	Hs/Mf	585	606	627	648
TMPRSS6-1546	Hs/Mf	586	607	628	649
TMPRSS6-1550	Hs/Mf	587	608	629	650

[0925]

[0926] 도 1a 및 1b, 및 표 5의 5' 및 3' qPCR 검정에 나타낸 바와 같이, 각각의 올리고뉴클레오티드는 2 mg/kg에서 TMPRSS6 발현을 적어도 50%만큼 감소시켰다. TMPRSS6-0416, -0831, 및 -1546은 가장 강력한 올리고뉴클레오티드였고, 더 낮은 1 mg/kg 농도에서 TMPRSS6 발현을 50% 넘게 감소시켰다. 이러한 데이터는 GalNAc-변형 올리고뉴클레오티드가 생체 내에서 인간 *TMPRSS6* 발현을 성공적으로 감소시켰음을 입증하였다.

[표 5]

도 1a 및 1b로부터의 5' 및 3' 검정의 요약

	Hs *TMPRSS6*-5'/F394				Hs *TMPRSS6*-3'/F1652			
	1 mg/kg		2 mg/kg		1 mg/kg		2 mg/kg	
작제물	잔여%	SEM	잔여%	SEM	잔여%	SEM	잔여%	SEM
TMPRSS6-416	36.1	5.7	19.7	3.6	34.9	5.0	18.9	3.6
TMPRSS6-0419	44.0	5.5	19.0	3.0	46.6	7.2	22.0	2.5
TMPRSS6-0615	51.7	3.5	20.5	3.4	53.4	3.8	23.0	4.1
TMPRSS6-0651	46.0	4.0	31.7	3.5	53.9	5.3	31.5	3.7
TMPRSS6-0654	53.1	8.5	32.0	4.7	59.4	8.7	31.2	8.2
TMPRSS6-0831	33.8	2.7	29.1	4.5	33.4	1.8	34.5	5.0
TMPRSS6-1375	61.9	4.2	46.0	6.1	61.2	3.3	46.8	3.2
TMPRSS6-1546	26.4	1.5	26.1	3.9	30.6	1.7	23.5	4.1
TMPRSS6-1550	35.0	10.7	40.8	5.7	34.2	9.2	39.0	4.9

[0927]

[0928] 도 2에 나타낸 바와 같이, 인간 *TMPRSS6*에 추가하여, 쥣과 *TMPRSS6*에 대한 특이성을 갖는, GalNAc-접합 *TMPRSS6*6 RNAi 올리고뉴클레오티드 *TMPRSS6*-0651은 2 mg/kg에서 내인성 쥣과 *TMPRSS6* 발현을 적어도 50% 감소시켰다. 이러한 데이터는 GalNAc-변형 올리고뉴클레오티드가 생체 내에서 내인성 쥣과 *TMPRSS6* 발현을 성공적으로 감소시켰음을 입증하였다.

[0929] ***실시예 4: GalNAc-접합 TMPRSS6 RNAi 올리고뉴클레오티드는 생체 내에서 원숭이 TMPRSS6 발현을 억제함***

[0930] 생체 내 *TMPRSS6* 발현을 감소시키는 RNAi 올리고뉴클레오티드의 능력을 평가하기 위해, 원숭이(Cynomolgus macaques) 모델을 사용하였다.

[0931] 표 6에 제시되고 도 3a-3d에 도시된 4개의 변형된 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드를 평가하였다. 선택된 올리고뉴클레오티드는 실시예 2의 스크린 및 실시예 3의 결과에 기초하였다. 요약하면, 본원에서 일반적으로 원숭이로 지칭되는 시노몰구스 원숭이에게, 표시된 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드를 1 mg/kg 또는 4 mg/kg의 농도로 PBS에 제형화하여 0, 28, 56, 84 및 112일차에 피하 투여하였다. 원숭이의 대조군(n = 5)에게는 PBS만을 투여하였다. 이들 원숭이로부터 유래된 총 RNA에 대해 qRT-PCR 검정을 수행하여 *TMPRSS6* mRNA 수치를 결정하였다. 구체적으로, 간 조직으로부터 RNA를 추출하여 -7, 28, 56, 84, 112 및 168일차에 qPCR(B2M 유전자에 대해 정규화됨)에 의해 원숭이 *TMPRSS6* mRNA 수치를 결정하였다. 원숭이 *TMPRSS6* mRNA의 수치를, 원숭이 *TMPRSS6* mRNA에 특이적인 프라이머 쌍 및 형광 표지된 프로브로 이루어진 PrimeTime™ qPCR 프로브 검정(IDT)을 사용하여 결정하였다. 치료된 원숭이의 샘플 중 잔여 원숭이 *TMPRSS6* mRNA의 백분율은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$("델타-델타 Ct") 방법(Livak 및 Schmittgen (2001) Methods 25:402-408)을 사용하여 결정하였다.

[표 6]

NHP 스크리닝에 대한, GalNAc-접합 원숭이 *TMPRSS6* RNAi 올리고뉴클레오티드

	종 표적	미변형 센스 가닥 (서열 번호)	미변형 안티센스 가닥 (서열 번호)	변형된 센스 가닥 (서열 번호)	변형된 안티센스 가닥 (서열 번호)
TMPRSS6-416	Hs/Mf	579	600	621	642
TMPRSS6-0651	Hs/Mf/Mm	590	611	632	653
TMPRSS6-0831	Hs/Mf	597	618	639	660
TMPRSS6-1546	Hs/Mf	586	607	628	649

[0932]

[0933] 각각 -7, 28, 56, 84, 112, 및 168일차의 샘플 각각에 상응하는 도 4a-4f에 나타낸 바와 같이, 각각의 올리고뉴클레오티드는 연구 과정 전체에 걸쳐(즉, 168일차까지) 1 mg/kg 및 4 mg/kg 모두에서 *TMPRSS6* 발현을 50% 이상 감소시켰다. 이러한 데이터는 GalNAc-변형 올리고뉴클레오티드가 생체 내에서 원숭이 *TMPRSS6* 발현을 성공적으로 감소시켰음을 입증하였다.

[0934] ***실시예 5: GalNAc-접합 TMPRSS6 RNAi 올리고뉴클레오티드는 생체 내에서 철 항상성을 조절함***

[0935] *TMPRSS6*에서 기능 상실 돌연변이는 헵시딘 혈장 수치를 상승시키고, 철-불응성, 철-결핍 빈혈을 포함하는 중증 장애로 이어진다. 헵시딘 단백질은 철 항상성의 조절자이며, 순환계로의 철의 진입을 유도한다. *헵시딘* 수치가 높은 경우, 혈청 철 수치는 감소하여 빈혈을 초래할 수 있다. 헵시딘 수치가 낮은 경우, 혈색소 침착증과 같은 질환 상태에서, 철 수치가 상승하고 과부하가 발생할 수 있다. *TMPRSS6*은 *헵시딘* 발현을 억제하는 것으로 알려져 있으므로, *TMPRSS6*의 억제는 *헵시딘* 발현을 조절하고 혈청 철 수치 및 포화도를 변화시킬 수 있다.

[0936] 철 항상성의 변화를 평가하기 위해, *TMPRSS6*의 억제 후 *헵시딘*, 혈청 철, 및 혈청 철 포화도의 수치를 측정하였다. 표 6에 제시되고 도 3a-3d에 도시된 4개의 변형된 GalNAc-접합 *TMPRSS6* 올리고뉴클레오티드를 실시예 4에 기술된 바와 같이 시노몰구스 원숭이에게 투여하였다. 이들 원숭이로부터 유래된 총 RNA에 대해 qRT-PCR 검정을 수행하여 *헵시딘* mRNA 수치를 결정하였다. 구체적으로, 간 조직으로부터 RNA를 추출하여 -7, 28, 56, 84, 112 및 168일차에 qPCR(B2M 유전자에 대해 정규화됨)에 의해 원숭이 *헵시딘* mRNA 수치를 결정하였다. 원숭이 *헵시딘* mRNA의 수치를, 원숭이 *TMPRSS6* mRNA에 특이적인 프라이머 쌍 및 형광 표지된 프로브로 이루어진 PrimeTime™ qPCR 프로브 검정(IDT)을 사용하여 결정하였다. 치료된 원숭이의 샘플 중 잔여 원숭이 *헵시딘* mRNA의 백분율은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$("델타-델타 Ct") 방법(Livak 및 Schmittgen (2001) Methods 25:402-408)을 사용하여 결정하였다.

[0937] 각각 -7, 28, 56, 84, 112, 및 168일차의 샘플 각각에 상응하는 도 5a-5f에 나타낸 바와 같이, 모든 올리고뉴클레오티드에 대해 56일차(도 5c)까지 *헵시딘*의 상당한 상향조절이 관찰되었다. *헵시딘*의 상향조절은 연구의 나머지 기간 동안 168일차까지 관찰되었다. 이러한 데이터는 *TMPRSS6*를 억제하기 위한 GalNAc-변형 올리고뉴클레오티드가 생체 내에서 *헵시딘* 발현의 증가를 성공적으로 감소시켰음을 입증하였다.

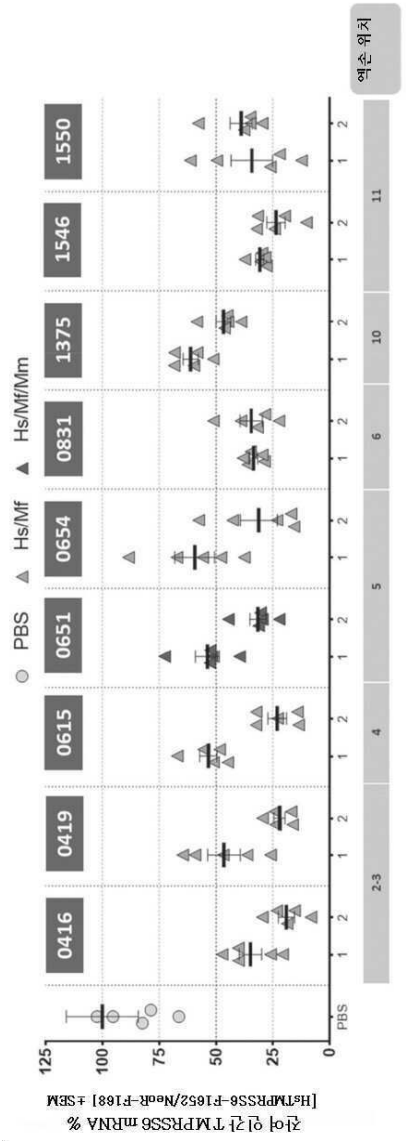
[0938] 혈청 철 및 혈청 철 포화도를 측정하기 위해, -7, 28, 56, 84, 112 및 168일차에 동물로부터 혈청을 채취하였다. Cornell 수의과 진단 실험실(Cornell Veterinary Diagnostic Lab.)에서 수행된 철 패널 분석을 사용하여 철의 수치를 측정하였다.

[0939] 도 6a-6f 및 도 7a-7b에 나타낸 바와 같이, 혈청 철의 투여량 의존적 감소는 28일 후 및 대체적으로 각 올리고뉴클레오티드에 대한 168일 연구 전반에 걸쳐 관찰되었다. 유사하게, 도 8a-8f 및 도 9a-9b에 나타낸 바와 같이, 혈청 철 포화도의 투여량 의존적 감소는 28일 후 및 대체적으로 각 올리고뉴클레오티드에 대한 168일 연구 전반에 걸쳐 관찰되었다. 종합적으로, 이러한 데이터는 *TMPRSS6*을 억제하기 위한 GalNAc-변형 올리고뉴클레오티드가 생체 내에서 혈청 철 및 혈청 철 포화도를 성공적으로 감소시켰음을 입증하였다. 후속적으로, 유리 철을 감소시키는 것은 유전성 혈색소 침착증(일차성 철 과부하) 및 베타-지중해빈혈(이차성 철 과부하)과 같은 철 과부하 질환을 가진 환자에게 도움이 될 수 있으며, 진성 적혈구증가증에서 관찰된 바와 같이, 조절-오류 적혈구생성 및 상승을 제한할 것이다.

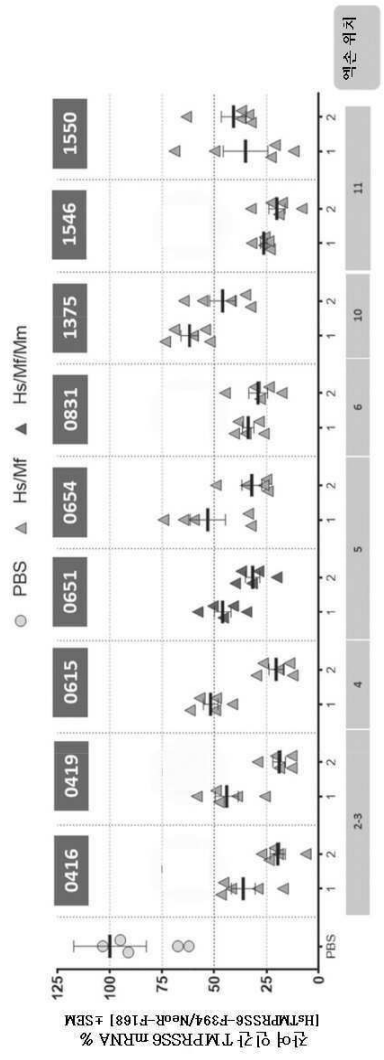
[0940] 본 발명의 특정 특징들이 본원에 예시되고 기술되었지만, 많은 변형, 치환, 변경 및 균등물이 이제 당업자에게 발생할 것이다. 따라서, 첨부된 청구범위는 본 발명의 진정한 사상 내에 속하는 모든 이러한 수정 및 변경을 포함하도록 의도된 것임을 이해해야 한다.

도면

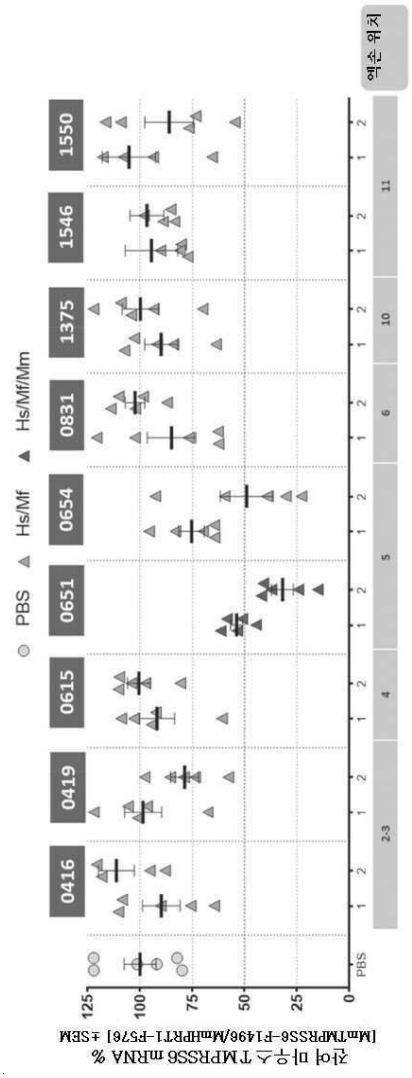
도면1a



도면1b


PBS
Hs/Mf
Hs/Mf/Mm
0416
0419
0615
0651
0654
0831
1375
1546
1550
엑손 위치
2-3
4
5
6
10
11
125
100
75
50
25
0
PBS
간에 인간 TMPRSS6 mRNA %
[hsTMPRSS6-P394/NeoR-P168] ±SEM

도면2



도면3a



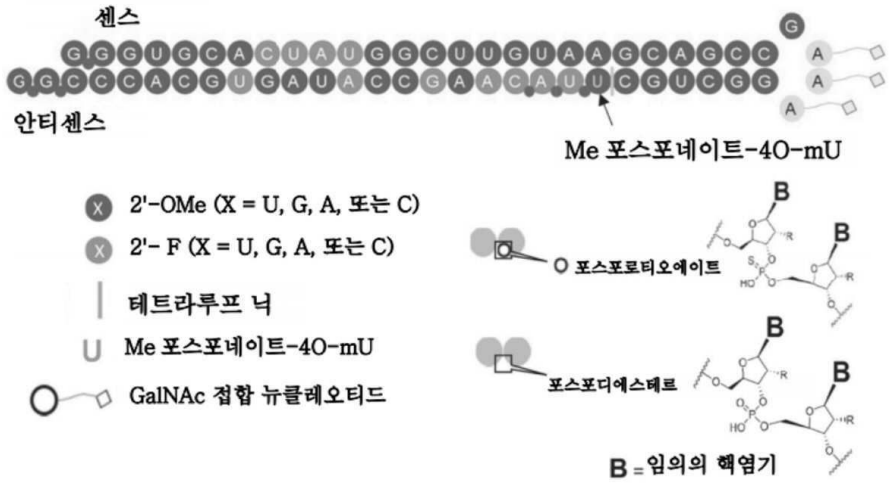
도면3b



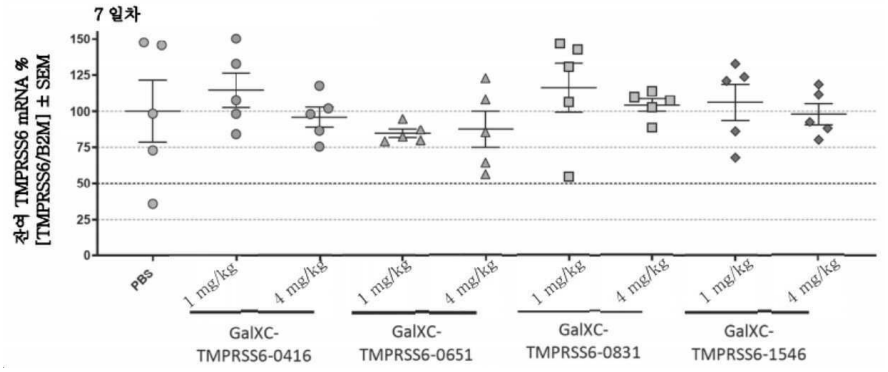
도면3c



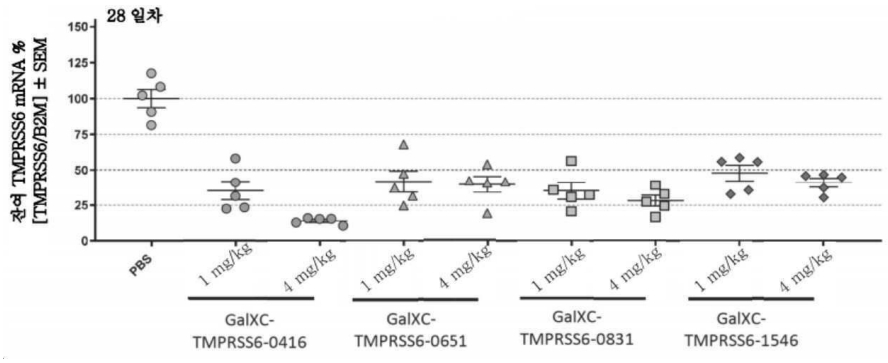
도면3d



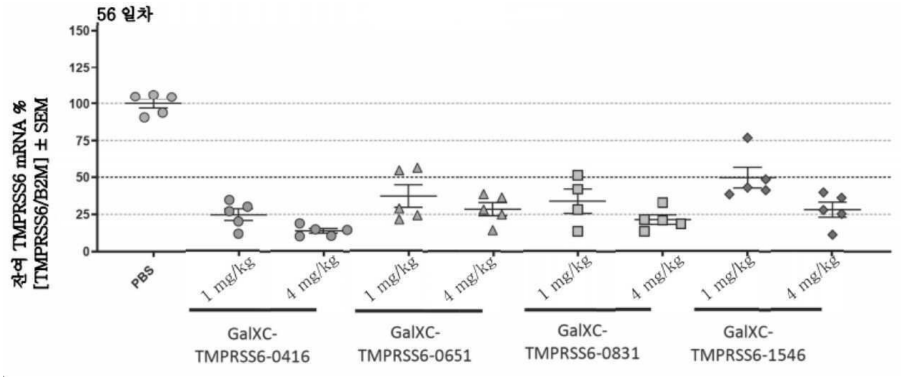
도면4a



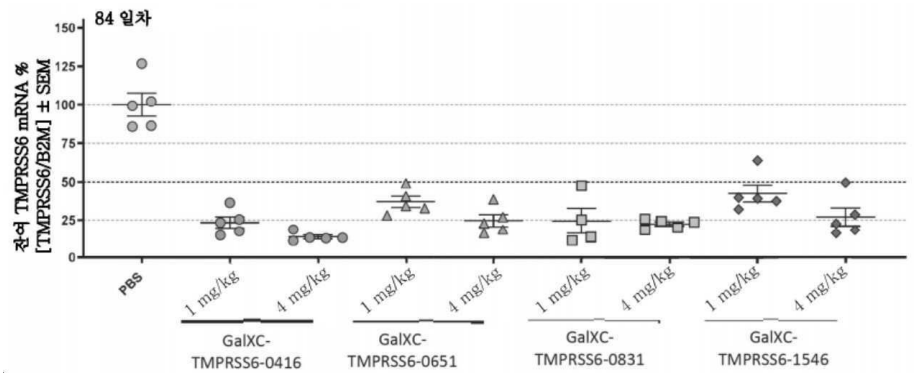
도면4b



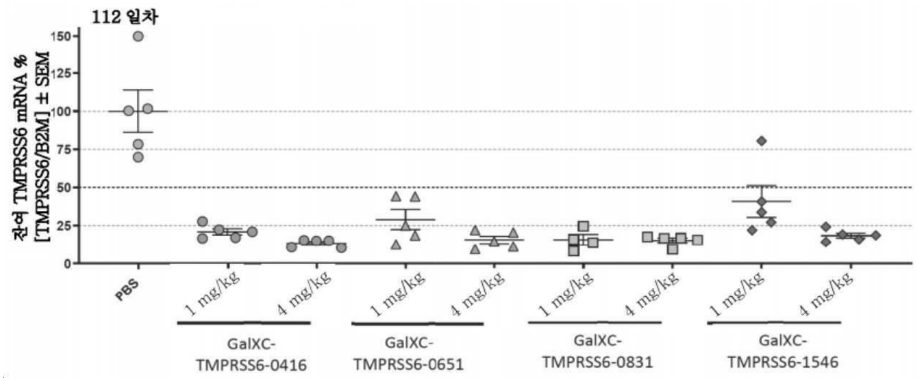
도면4c



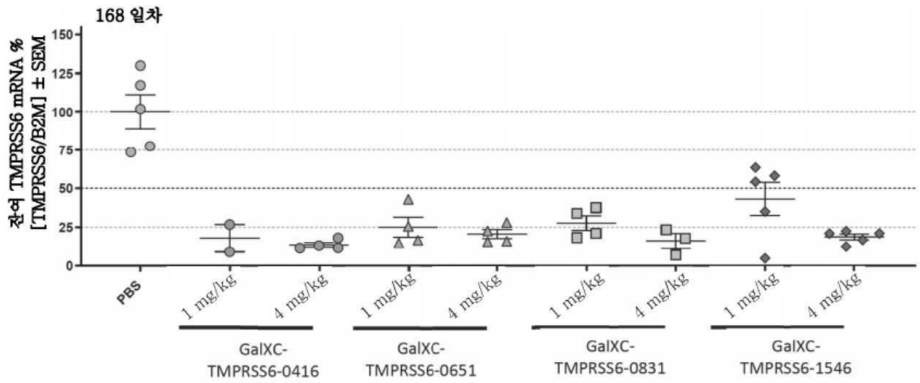
도면4d



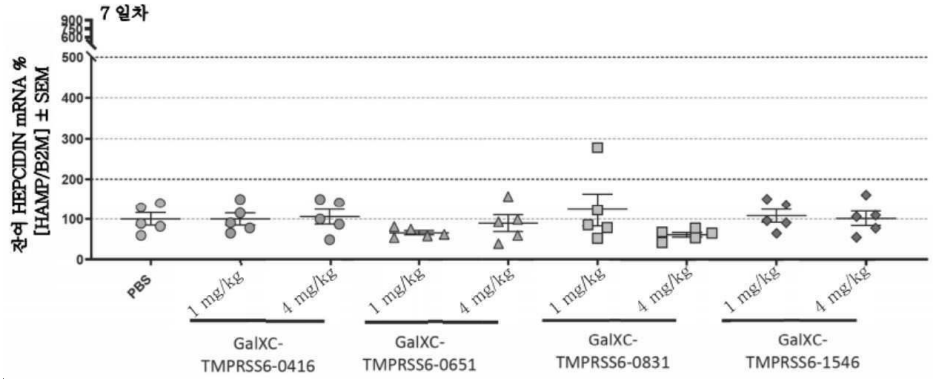
도면4e



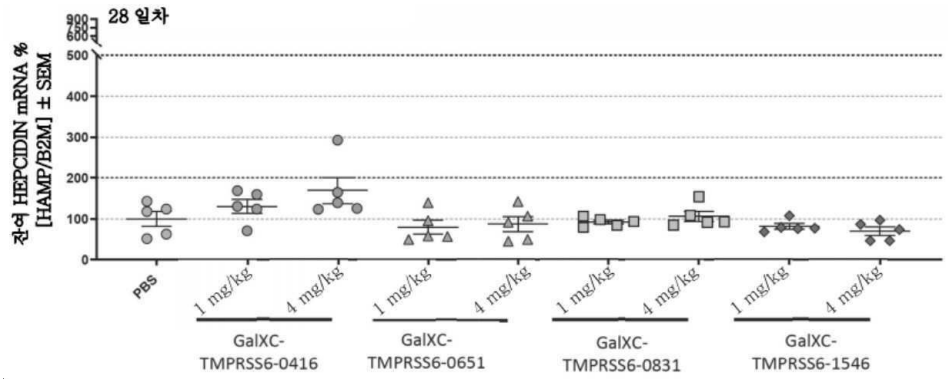
도면4f



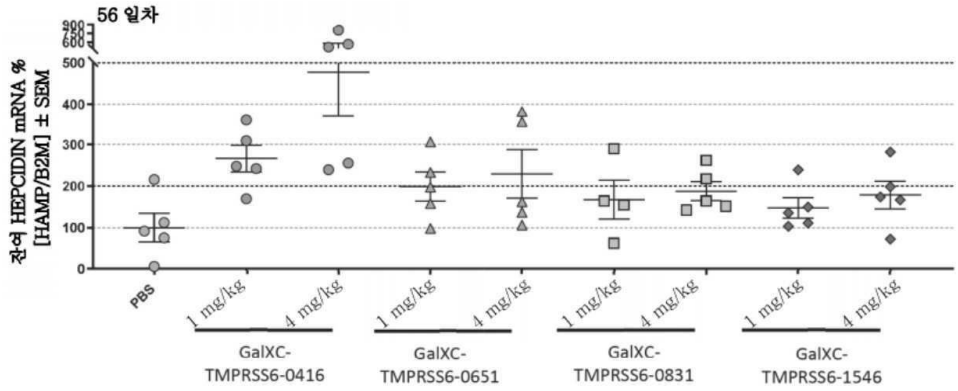
도면5a



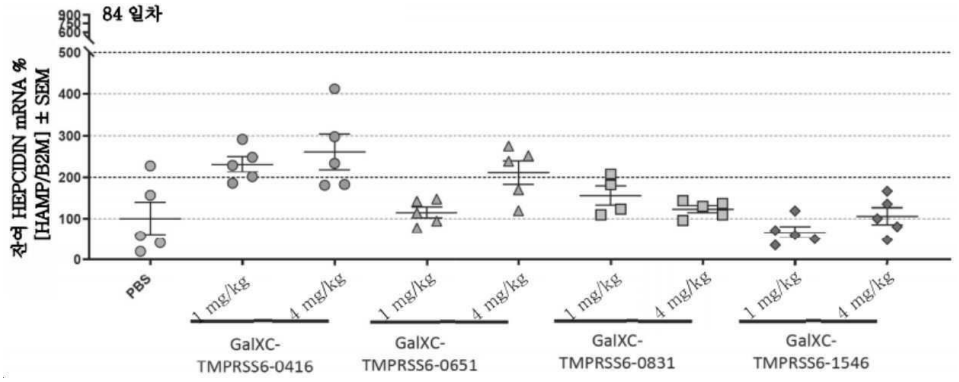
도면5b



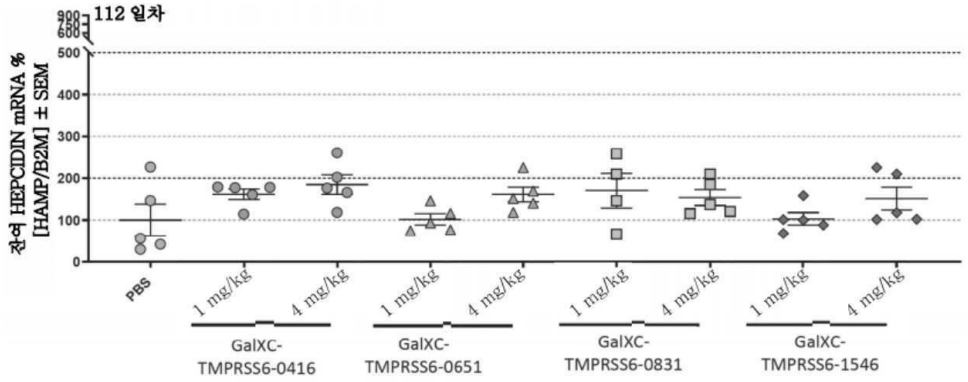
도면5c



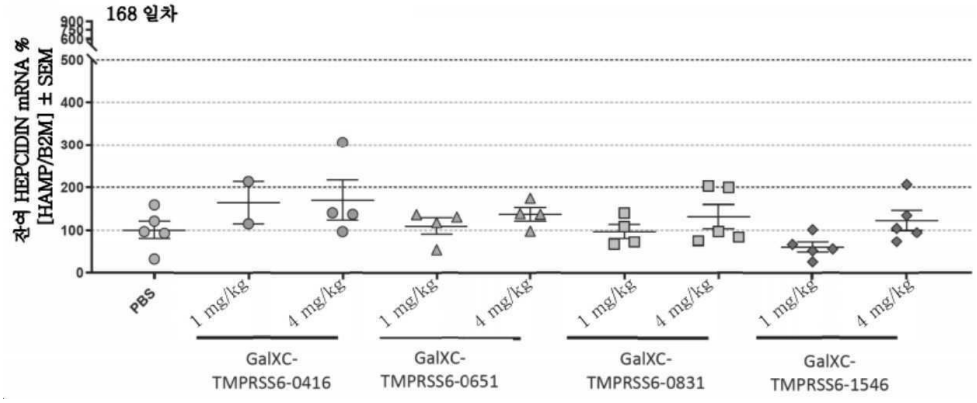
도면5d



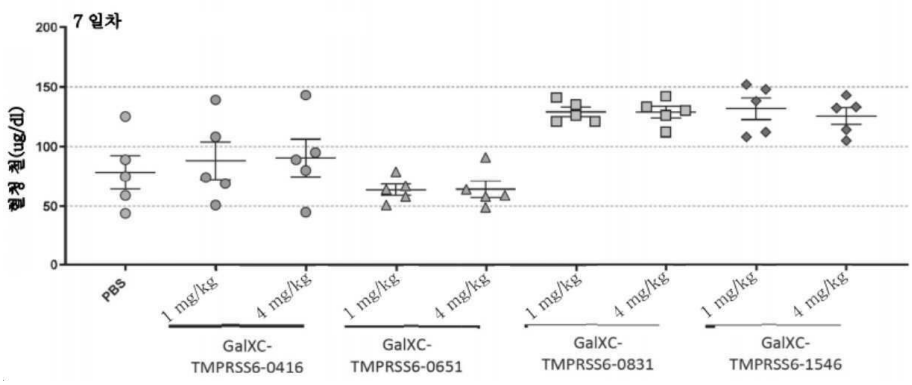
도면5e



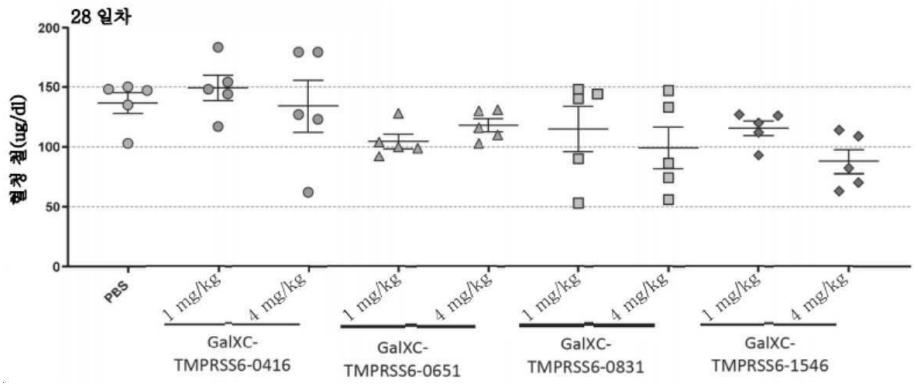
도면5f



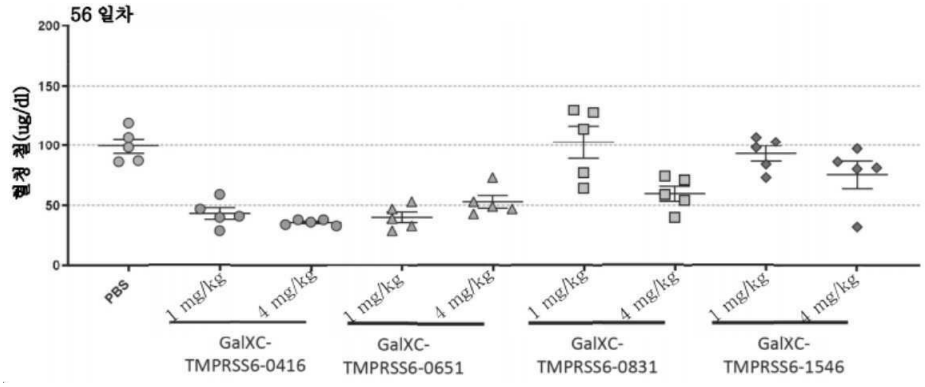
도면6a



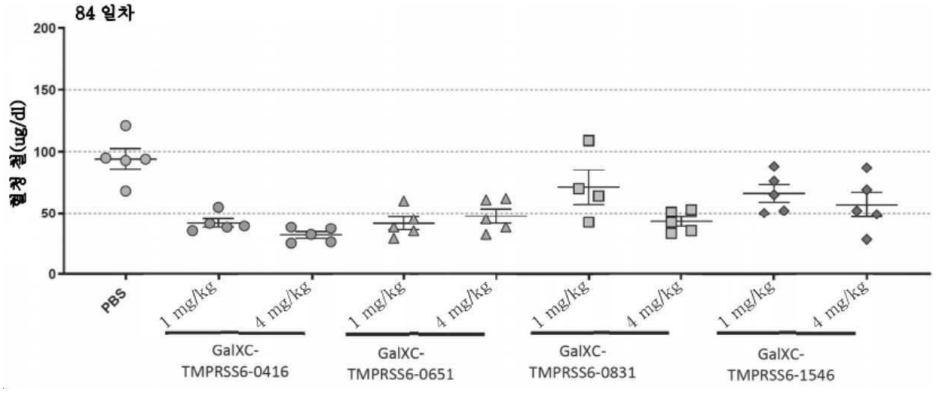
도면6b



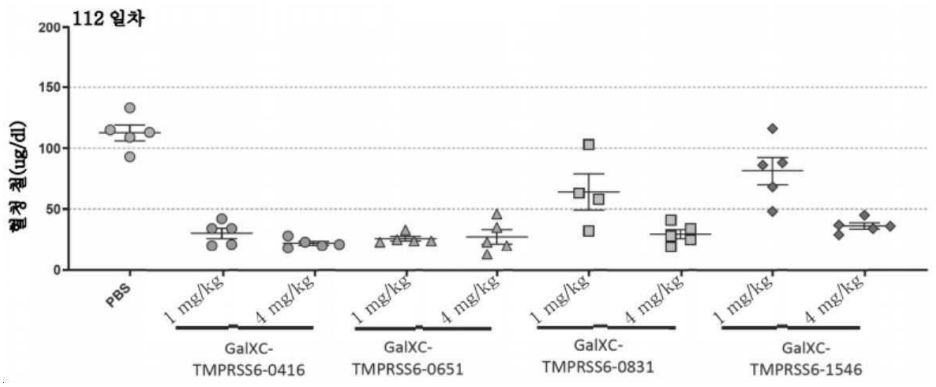
도면6c



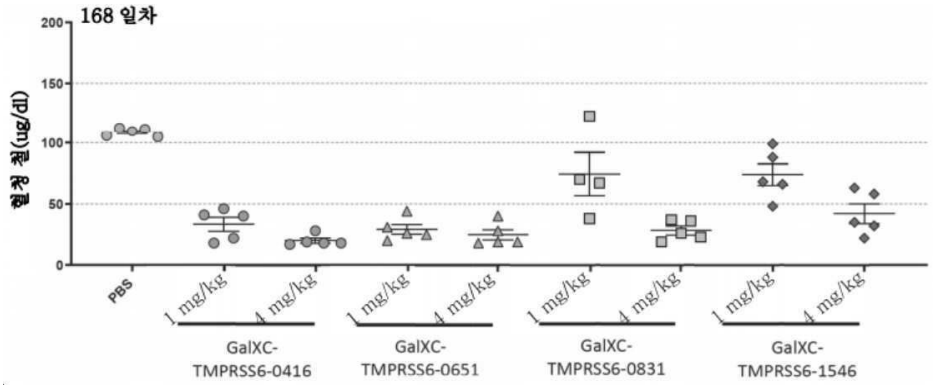
도면6d



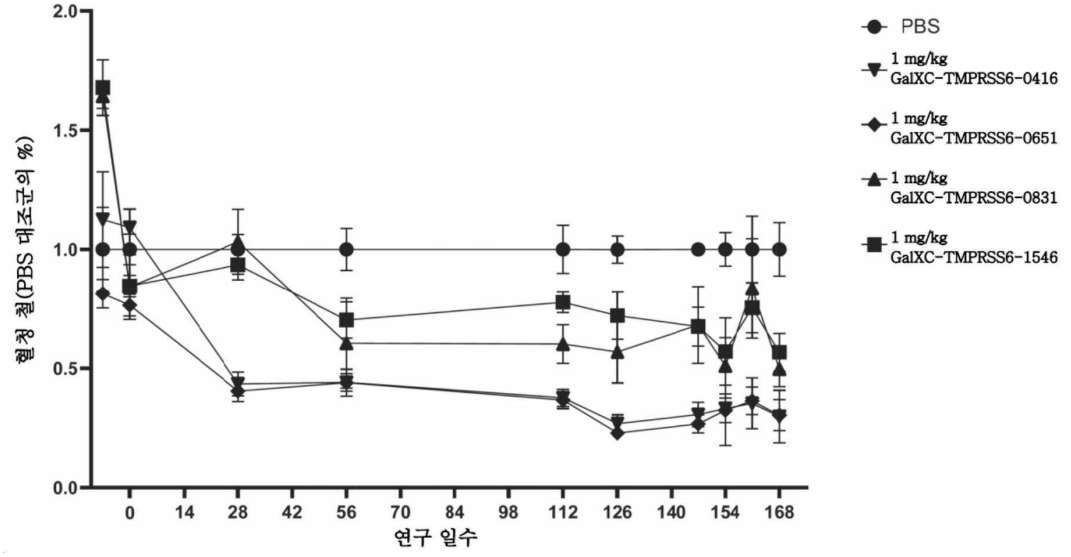
도면6e



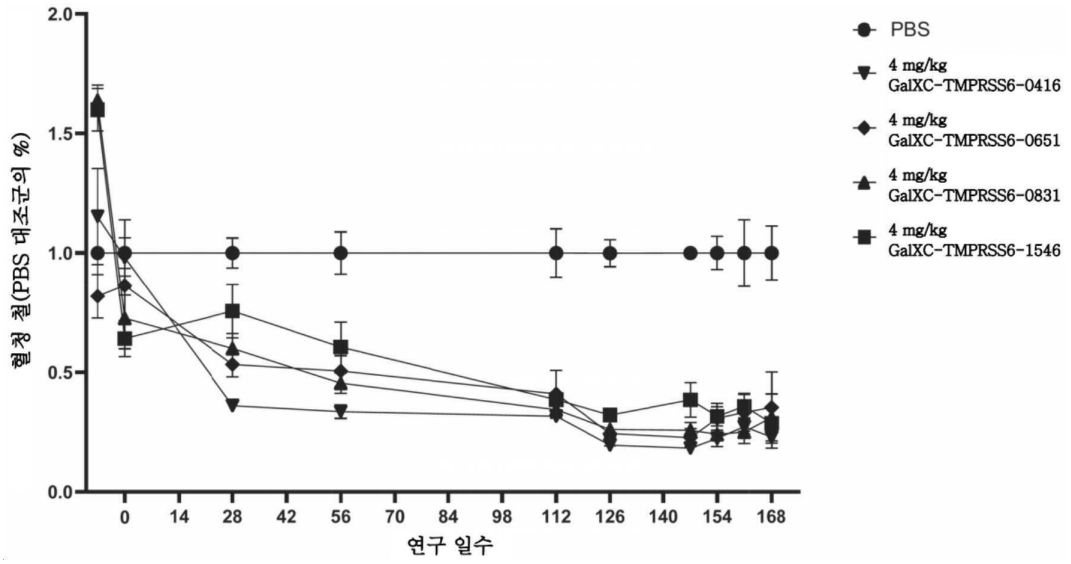
도면6f



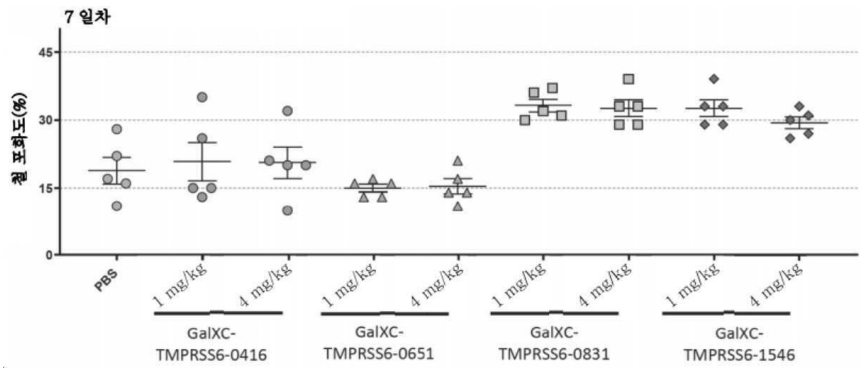
도면7a



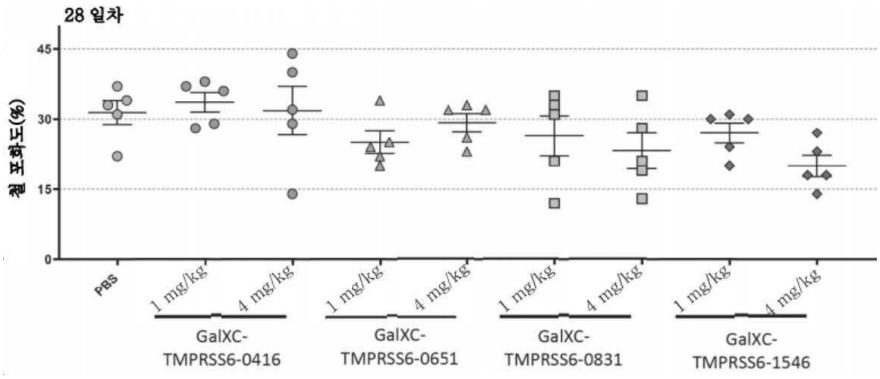
도면7b



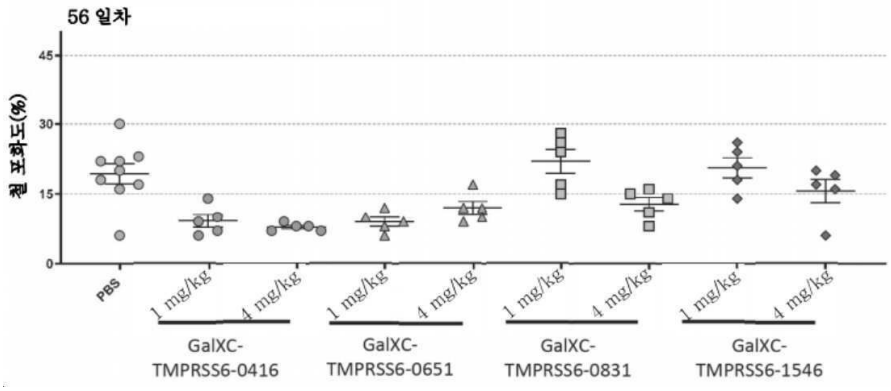
도면8a



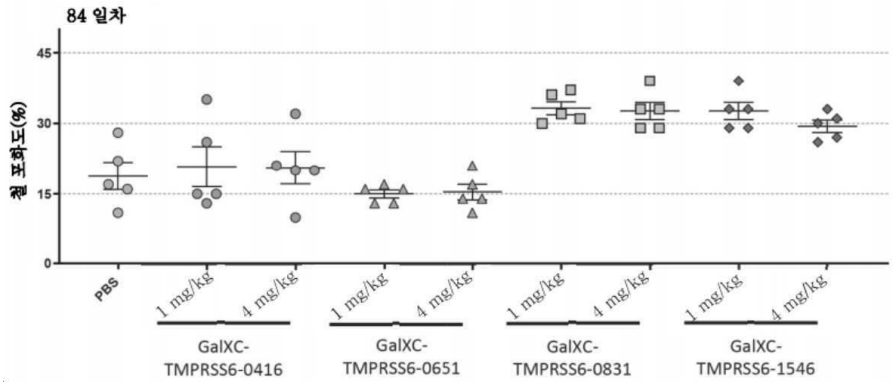
도면8b



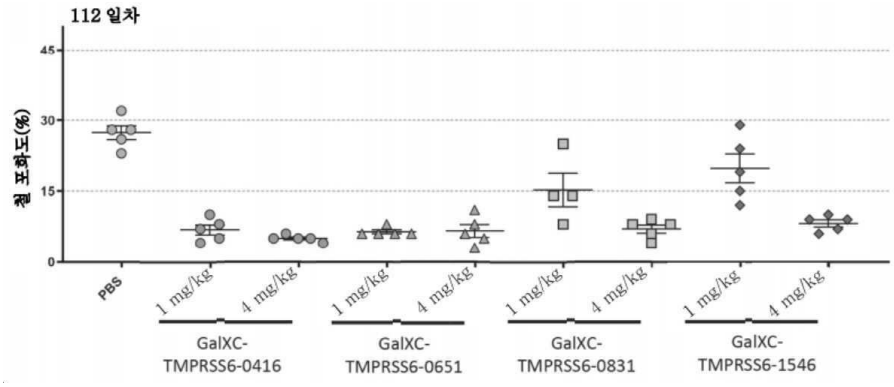
도면8c



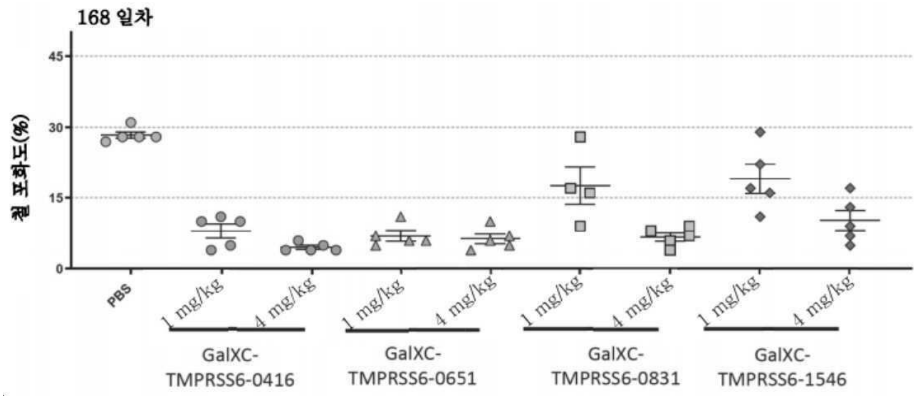
도면8d



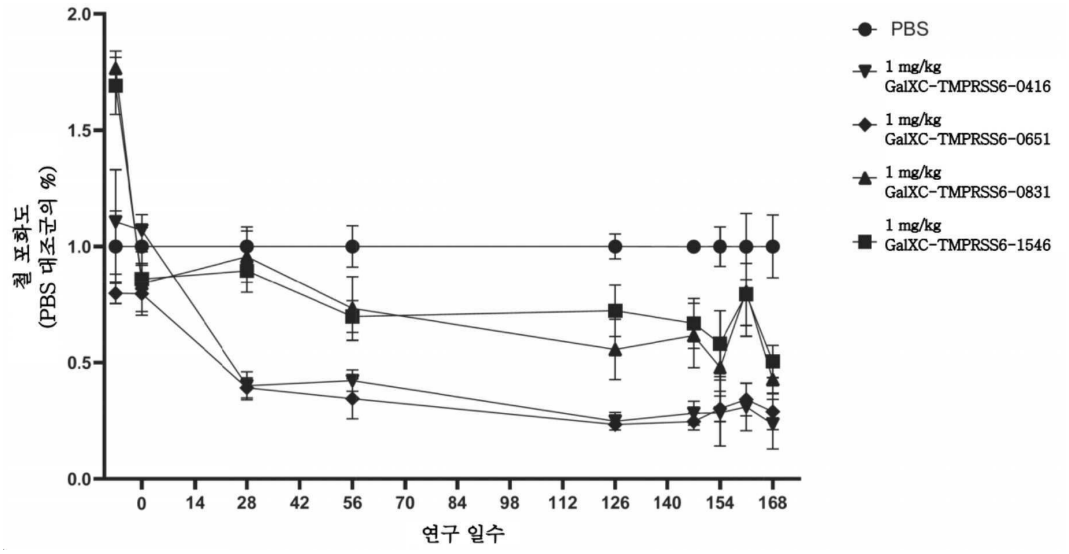
도면8e



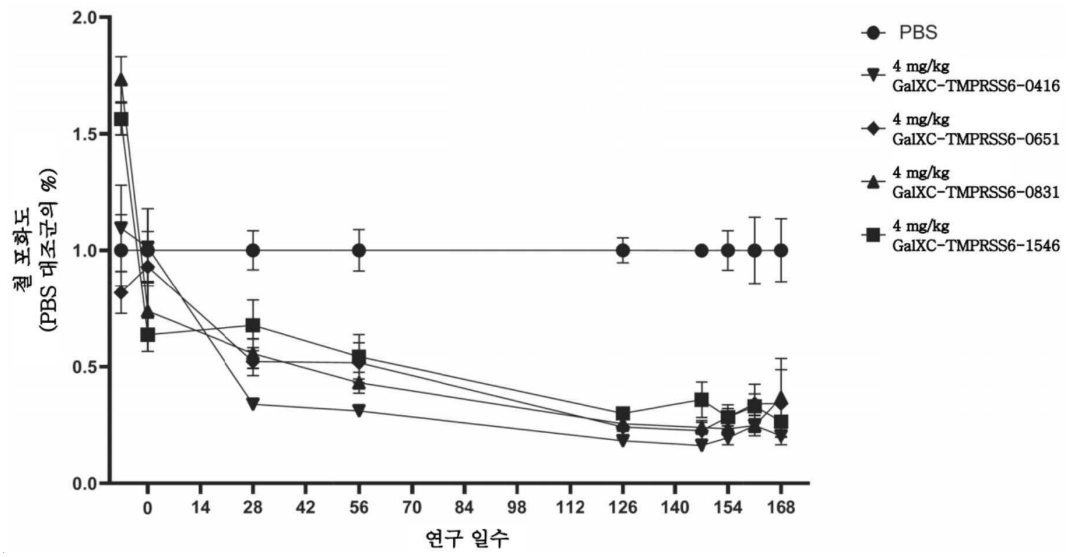
도면8f



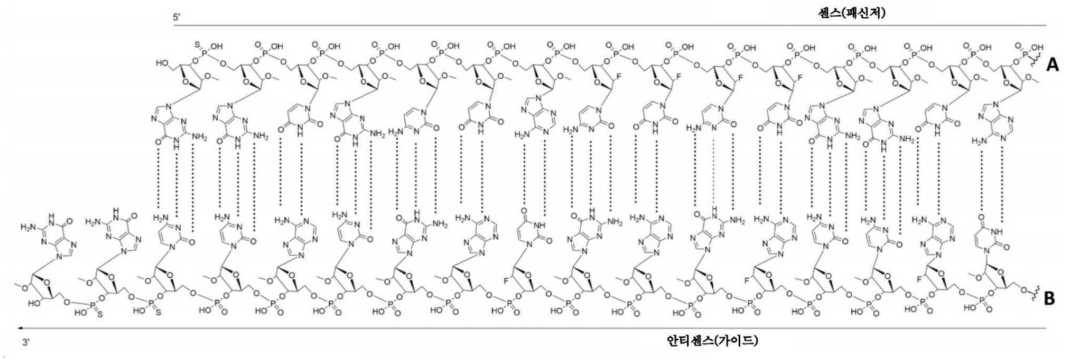
도면9a



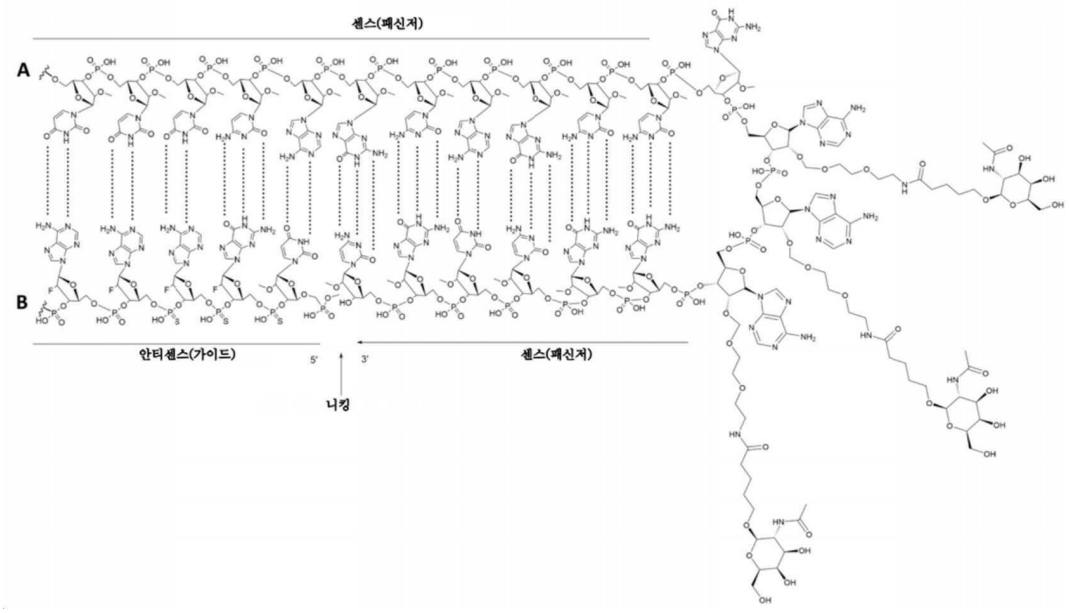
도면9b



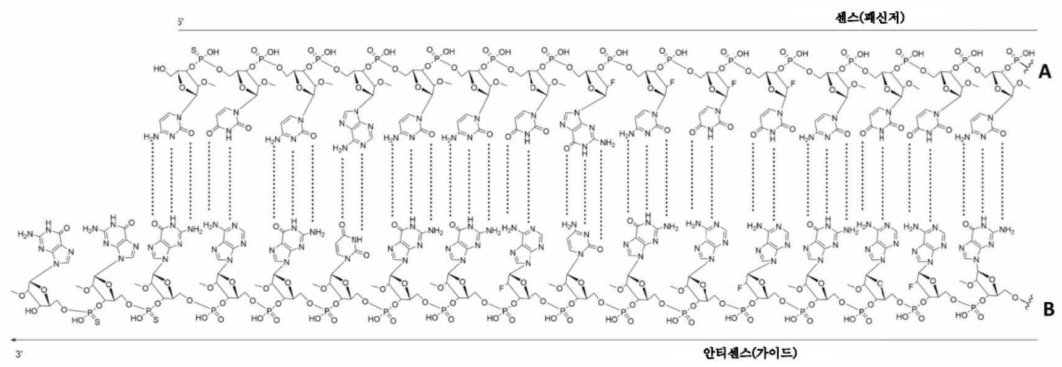
도면10a



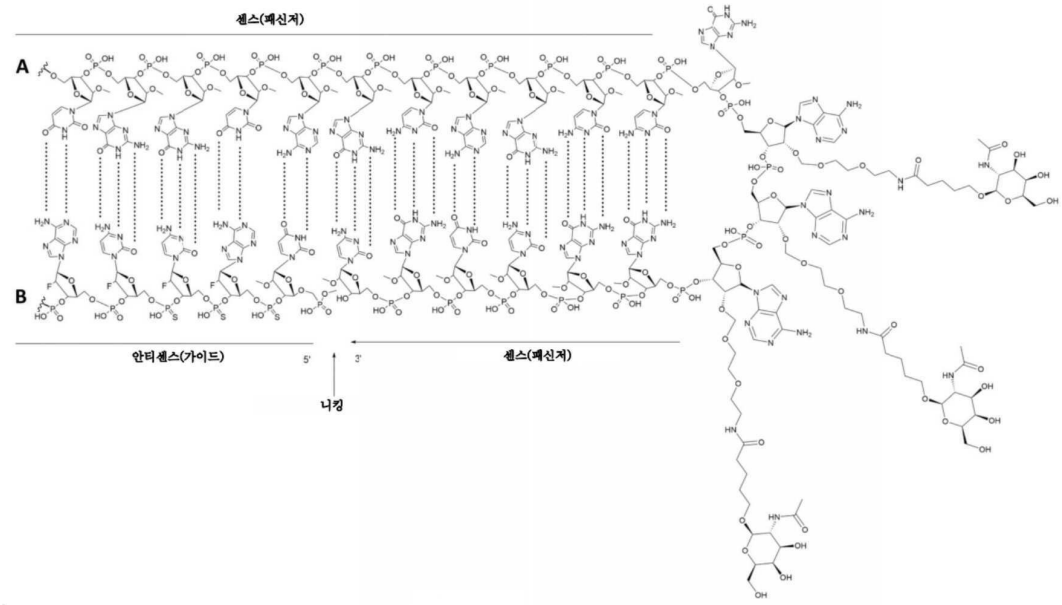
도면10b



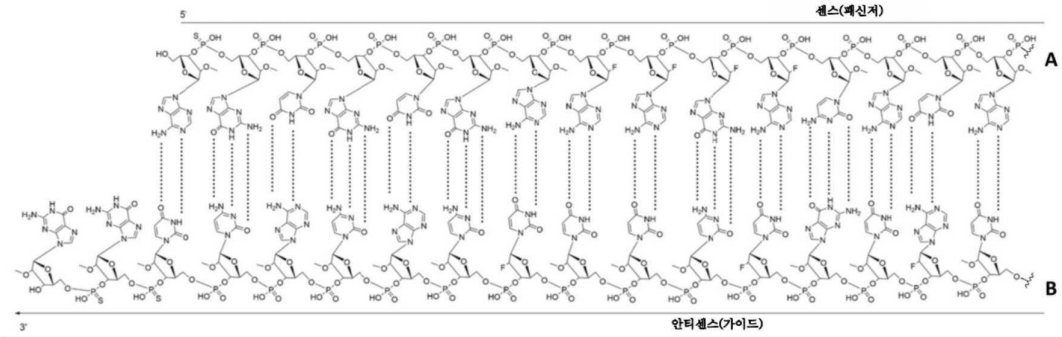
도면11a



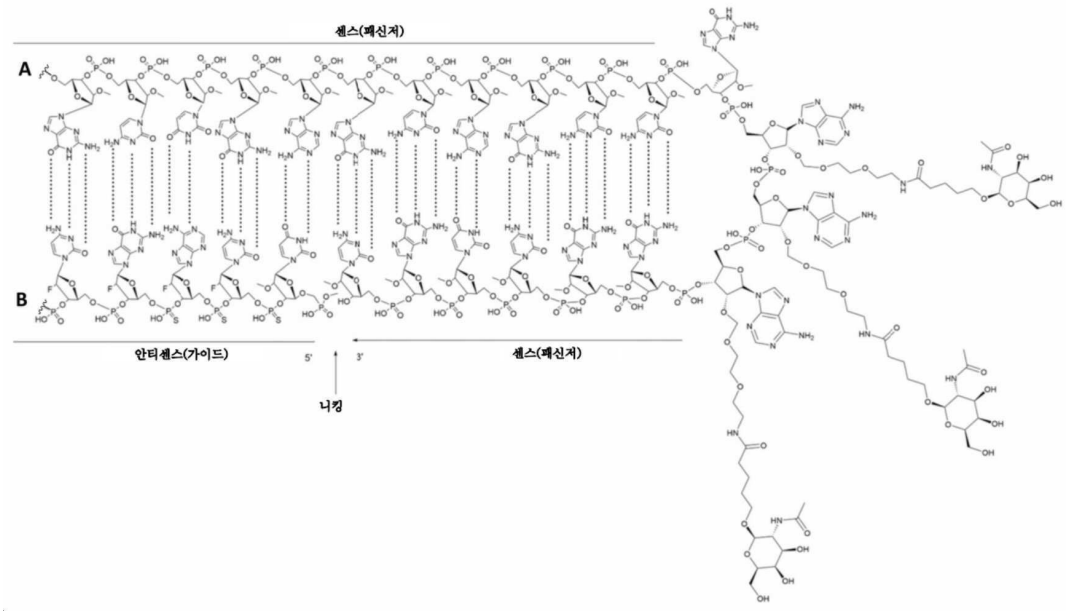
도면11b



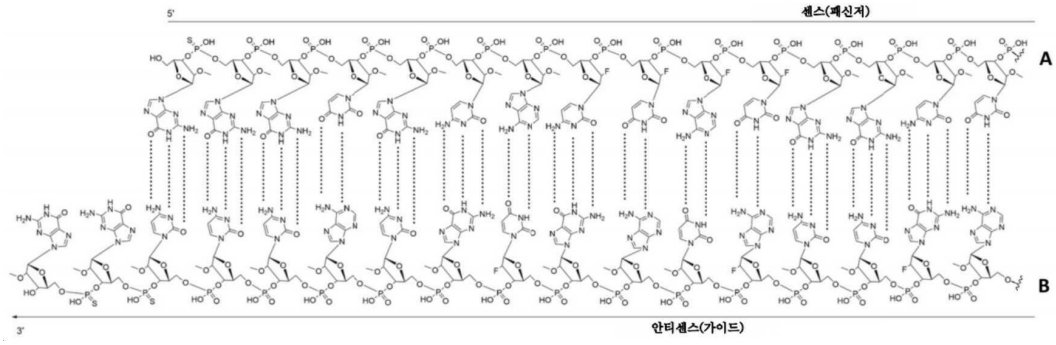
도면12a



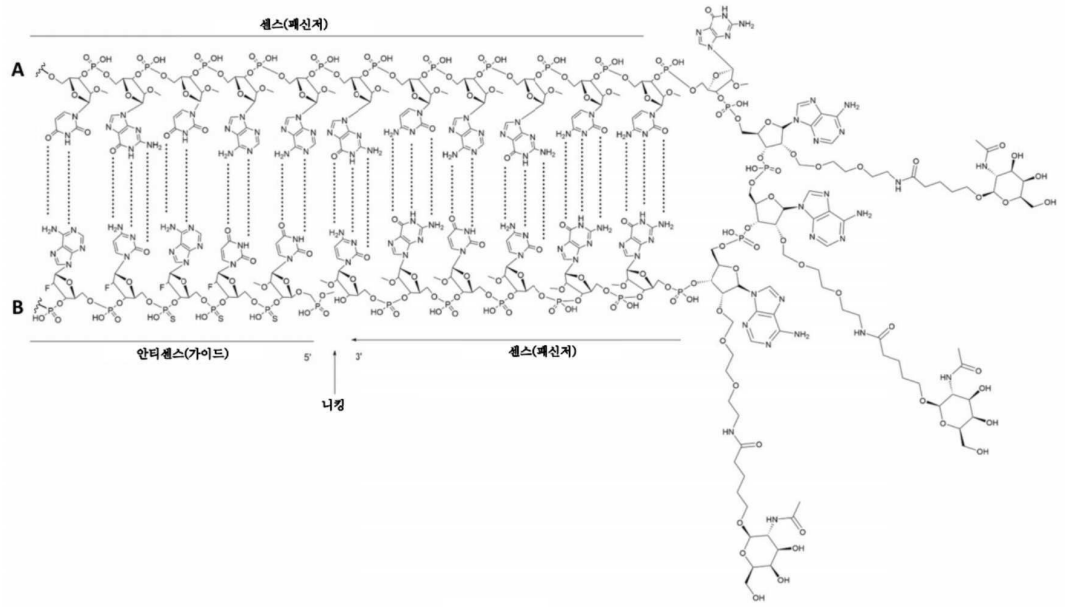
도면12b



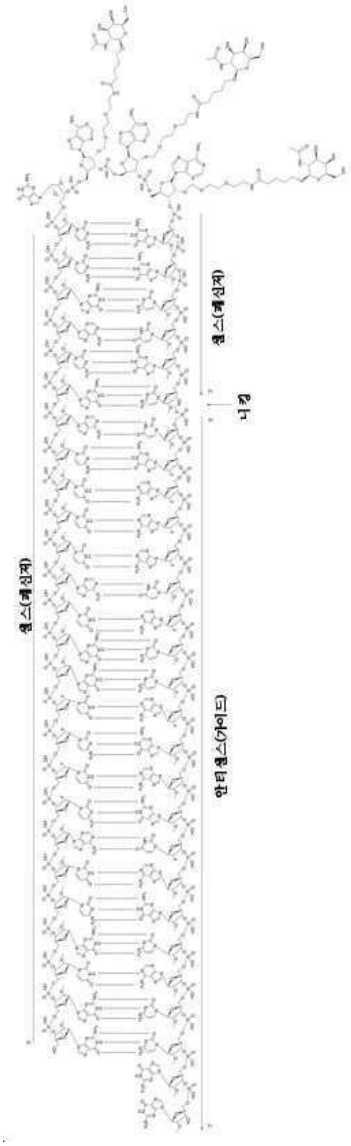
도면13a



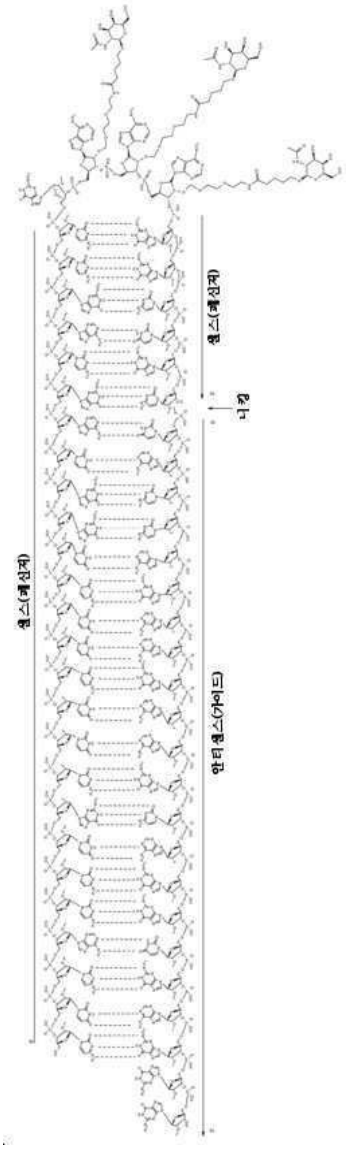
도면13b



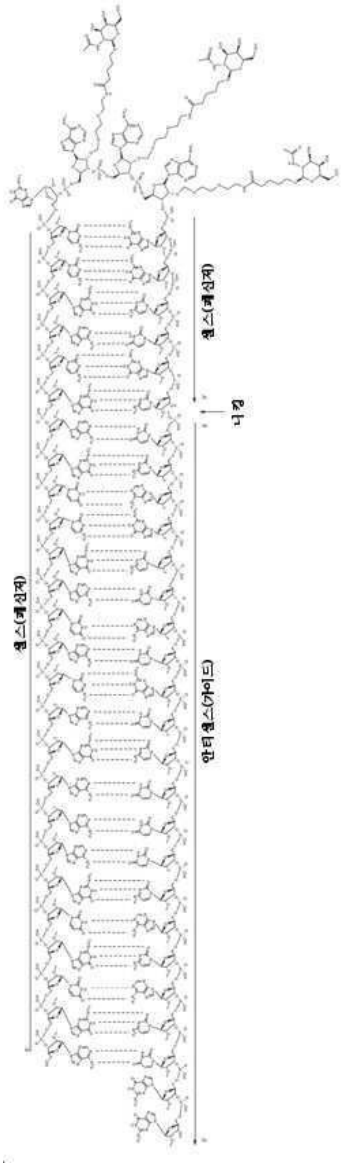
도면14a



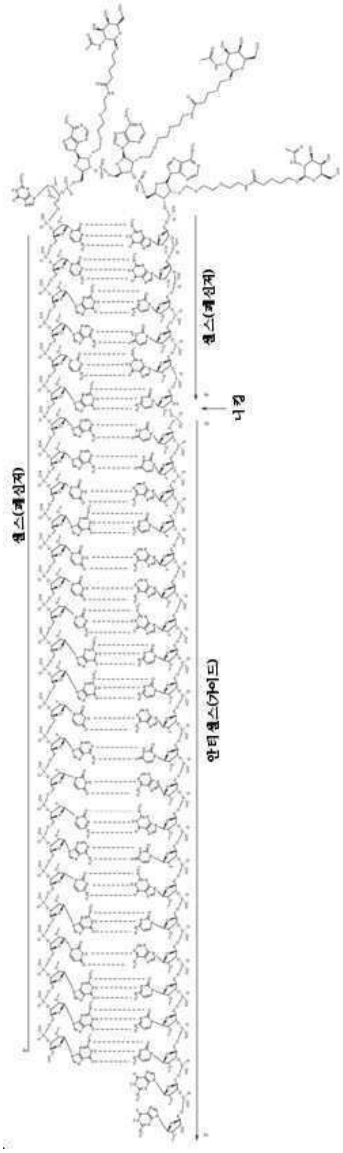
도면14b



도면14c



도면14d



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.