



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월14일

(11) 등록번호 10-2793532

(24) 등록일자 2025년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/713 (2006.01) A61K 31/7115 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)

A61K 31/7115 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7008279

(22) 출원일자(국제) 2016년08월25일

심사청구일자 2021년08월25일

(85) 번역문제출일자 2018년03월23일

(65) 공개번호 10-2018-0054640

(43) 공개일자 2018년05월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/048666

(87) 국제공개번호 WO 2017/035340

국제공개일자 2017년03월02일

(30) 우선권주장

62/209,526 2015년08월25일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

W02014089313 A1

W02015077154 A1

Lancet, 제383권, 제9911호, 제60-68면 (2013. 10. 3.)

(73) 특허권자

알닐람 파마슈티칼스 인코포레이티드

미국 매사추세츠주 02142 캠프릿지 헨리 에이. 테르미어 스퀘어 웨스트 켄달 스트리트 675

(72) 발명자

피츠제럴드 케빈

미국 매사추세츠주 02142 캠프릿지 써드 플로어 써드 스트리트 300

(74) 대리인

장훈

전체 청구항 수 : 총 41 항

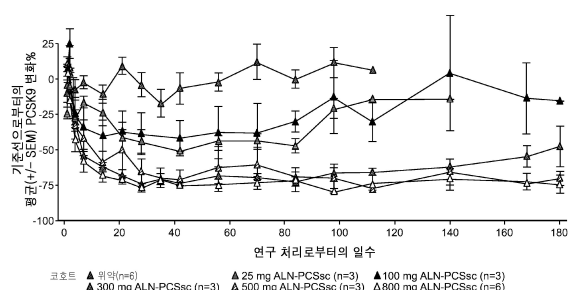
심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 전구단백질 컨버타제 서브틸리신 켄신 (PCSK9) 유전자-관련 장애를 치료하기 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

본 발명은 PCSK9 유전자를 표적화하는 RNAi 작용제, 예를 들어, 이중-가닥 RNAi 작용제를 사용한, 대상체에서의 PCSK9 유전자의 발현의 억제 방법, 및 지질 장애, 예를 들어, 고지혈증을 갖는 대상체를 치료하기 위한 치료 방법 및 예방 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61P 3/06 (2018.01)

명세서

청구범위

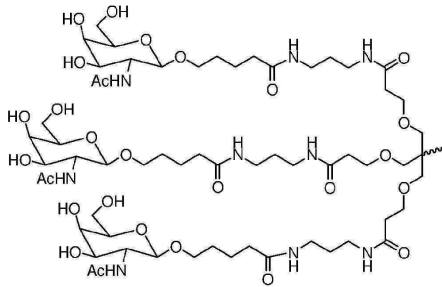
청구항 1

사람 대상체에서 고지혈증을 치료하는 방법에 사용하기 위한 약제학적 조성물로서,

상기 방법은 275 mg 내지 325 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제(agent) 또는 이의 염을 상기 대상체에게 피하 투여함을 포함하고,

상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염은 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 상기 센스 가닥이 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 안티센스 가닥이 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서, a, g, c 및 u가 각각 2'-O-메틸(2'-OMe) A, G, C 및 U이며; Af, Gf, Cf 및 Uf가 각각 2'-플루오로 A, G, C 및 U이며; dT가 2'-데옥시티미딘이며; s가 포스포로티오에이트 결합이고,

상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염이 하기 구조를 갖는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)3 리간드에 컨쥬게이트되는 것인, 약제학적 조성물:



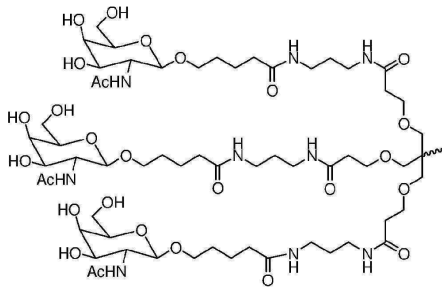
청구항 2

사람 대상체의 혈장 중의 저밀도 지질단백질 콜레스테롤(LDLc)의 수준을 감소시키는 방법에 사용하기 위한 약제학적 조성물로서,

상기 방법은 275 mg 내지 325 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제(agent) 또는 이의 염을 상기 대상체에게 피하 투여함을 포함하고,

상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염은 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 상기 센스 가닥이 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 안티센스 가닥이 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서, a, g, c 및 u가 각각 2'-O-메틸(2'-OMe) A, G, C 및 U이며; Af, Gf, Cf 및 Uf가 각각 2'-플루오로 A, G, C 및 U이며; dT가 2'-데옥시티미딘이며; s가 포스포로티오에이트 결합이고,

상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염이 하기 구조를 갖는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)3 리간드에 컨쥬게이트되는 것인, 약제학적 조성물:



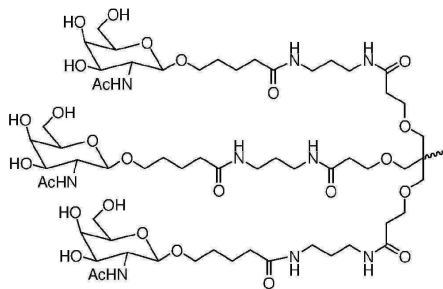
청구항 3

심혈관 질병과 관련된 하나 이상의 위험 인자를 갖는 사람 대상체의 혈장 중의 저밀도 지질단백질 콜레스테롤 (LDLc)의 수준을 감소시키는 방법에 사용하기 위한 약제학적 조성물로서,

상기 방법은 275 mg 내지 325 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제(agent) 또는 이의 염을 상기 대상체에게 피하 투여함을 포함하고,

상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염은 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 상기 센스 가닥이 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 안티센스 가닥이 5'-asCfSaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서, a, g, c 및 u가 각각 2'-O-메틸(2'-OMe) A, G, C 및 U이며; Af, Gf, Cf 및 Uf가 각각 2'-플루오로 A, G, C 및 U이며; dT가 2'-데옥시티미딘이며; s가 포스포로티오에이트 결합이고,

상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염이 하기 구조를 갖는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)3 리간드에 컨쥬게이트되고,



상기 하나 이상의 위험 인자가 당뇨병, 이전의 관상동맥 심장병(CHD) 또는 비관상동맥 죽상경화증의 개인력, 심혈관 질병의 가족력, 흡연, 고혈압 및/또는 비만을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게 300 mg의 고정 용량이 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게 300 mg의 고정 용량이 분기에 1회 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게 300 mg의 고정 용량이 연 2회로 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염이 로딩기(loading phase)에 이어서 유지기(maintenance phase)를 포함하는 투여 방식으로 상기 대상체에게 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 로딩기 동안 상기 대상체에게 투여되는 용량이 유지기 동안 상기 대상체에게 투여되는 용량과 동일한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 고지혈증이 고콜레스테롤혈증인, 약제학적 조성물.

청구항 10

제2항에 있어서, 상기 대상체가 고콜레스테롤혈증을 갖는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 11

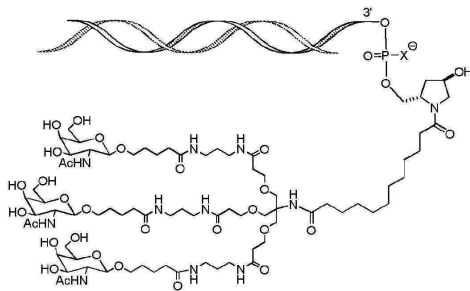
제2항에 있어서, 상기 대상체가 이형접합 LDL 수용체 유전자형을 갖는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 12

제3항에 있어서, 상기 심혈관 질병이 죽상경화증, 관상 동맥 질병, 심장 판막 질병, 부정맥, 심부전, 고혈압, 기립성 저혈압, 쇼크, 심내막염, 대동맥 및 이의 분지의 질병, 말초혈관계 장애, 심장 발작, 심근병증 및 선천성 심장병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염이 하기의 도식에 나타낸 바와 같이 상기 (GalNAc)₃ 리간드에 컨쥬게이트되는 것인, 약제학적 조성물:

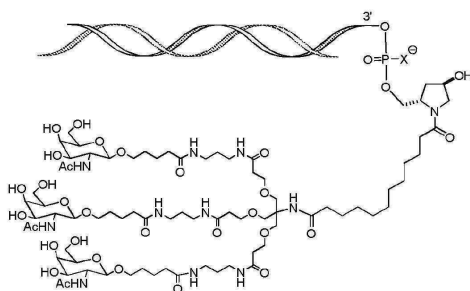


(상기 식에서, X는 O임).

청구항 14

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 가닥이 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687)의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지고, 상기 안티센스 가닥이 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688)의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지며, 여기서, a, g, c 및 u가 각각 2'-O-메틸(2'-OMe) A, G, C 및 U이며; Af, Gf, Cf 및 Uf가 각각 2'-플루오로 A, G, C 및 U이며; dT가 2'-테옥시티미딘이며; s가 포스포로티오에이트 결합이고,

상기 (GalNAc)₃ 리간드가 하기의 도식에 나타낸 바와 같이 상기 센스 가닥의 3' 말단에 컨쥬게이트되는 것인, 약제학적 조성물:



(상기 식에서, X는 O임).

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 이중-가닥 RNAi 작용제가 염 형태인, 약제학적 조성물.

청구항 16

사람 대상체에서 고지혈증을 치료하는 방법에 사용하기 위한 약제학적 조성물로서,

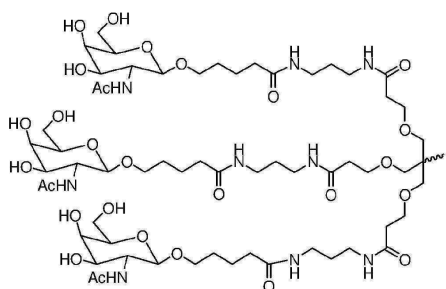
상기 방법은, 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제 또는 이의 염을 로딩기(loading phase)에 이어서 유지기

(maintenance phase)를 포함하는 투여 방식으로 상기 대상체에게 피하 투여함을 포함하고,

상기 로딩기는 275 mg 내지 325 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제 또는 이의 염을 상기 대상체에게 투여함을 포함하고, 상기 유지기는 275 mg 내지 325 mg의 동일한 고정 용량의 RNAi 작용제 또는 이의 염을 상기 대상체에게 투여함을 포함하고,

상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염은 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 상기 센스 가닥이 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 안티센스 가닥이 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서, a, g, c 및 u가 각각 2'-O-메틸(2'-OMe) A, G, C 및 U이며; Af, Gf, Cf 및 Uf가 각각 2'-플루오로 A, G, C 및 U이며; dT가 2'-데옥시티미딘이며; s가 포스포로티오에이트 결합이고,

상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염기 하기 구조를 갖는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)3 리간드에 컨쥬게이
트되는 것인, 약제학적 조성물:



청구항 17

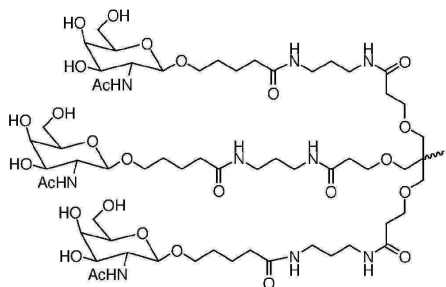
사람 대상체의 혈장 중의 저밀도 지질단백질 콜레스테롤(LDLc)의 수준을 감소시키는 방법에 사용하기 위한 약제학적 조성물로서,

상기 방법은, 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제 또는 이의 염을 로딩기(loading phase)에 이어서 유지기(maintenance phase)를 포함하는 투여 방식으로 상기 대상체에게 피하 투여함을 포함하고,

상기 로딩기는 275 mg 내지 325 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제 또는 이의 염을 상기 대상체에게 투여함을 포함하고, 상기 유지기는 275 mg 내지 325 mg의 동일한 고정 용량의 RNAi 작용제 또는 이의 염을 상기 대상체에게 투여함을 포함하고,

상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염은 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 상기 센스 가닥이 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 안티센스 가닥이 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서, a, g, c 및 u가 각각 2'-O-메틸(2'-OMe) A, G, C 및 U이며; Af, Gf, Cf 및 Uf가 각각 2'-플루오로 A, G, C 및 U이며; dT가 2'-데옥시티미딘이며; s가 포스포로티오에이트 결합이고.

상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염이 하기 구조를 갖는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)3 리간드에 컨쥬게이트되는 것인, 약제학적 조성물:



청구항 18

심혈관 질병과 관련된 하나 이상의 위험 인자를 갖는 사람 대상체의 혈장 중의 저밀도 지질단백질 콜레스테롤

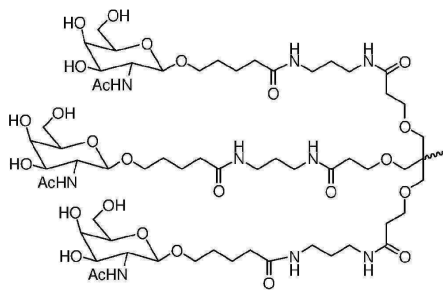
(LDLc)의 수준을 감소시키는 방법에 사용하기 위한 약제학적 조성물로서,

상기 방법은, 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제 또는 이의 염을 로딩기(loading phase)에 이어서 유지기(maintenance phase)를 포함하는 투여 방식으로 상기 대상체에게 피하 투여함을 포함하고,

상기 로딩기는 275 mg 내지 325 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제 또는 이의 염을 상기 대상체에게 투여함을 포함하고, 상기 유지기는 275 mg 내지 325 mg의 동일한 고정 용량의 RNAi 작용제 또는 이의 염을 상기 대상체에게 투여함을 포함하고,

상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염은 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 상기 센스 가닥이 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 안티센스 가닥이 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서, a, g, c 및 u가 각각 2'-O-메틸(2'-OMe) A, G, C 및 U이며; Af, Gf, Cf 및 Uf가 각각 2'-플루오로 A, G, C 및 U이며; dT가 2'-데옥시티미딘이며; s가 포스포로티오에이트 결합이고,

상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염이 하기 구조를 갖는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)3 리간드에 컨쥬게이트되고,



상기 하나 이상의 위험 인자가 당뇨병, 이전의 관상동맥 심장병(CHD) 또는 비관상동맥 죽상경화증의 개인력, 심혈관 질병의 가족력, 흡연, 고혈압 및/또는 비만을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게 투여되는 고정 용량이 300 mg인, 약제학적 조성물.

청구항 20

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유지기가 상기 고정 용량의 상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염을 상기 대상체에게 6개월마다 1회 투여하는 것을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 21

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 로딩기가 300 mg의 고정 용량의 상기 RNAi 작용제 또는 이의 염을 상기 대상체에게 투여함을 포함하고, 상기 유지기가 300 mg의 동일한 고정 용량의 상기 RNAi 작용제 또는 이의 염을 상기 대상체에게 6개월마다 1회 투여함을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 22

제16항에 있어서, 상기 고지혈증이 고콜레스테롤혈증인, 약제학적 조성물.

청구항 23

제17항에 있어서, 상기 대상체가 고콜레스테롤혈증을 갖는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 24

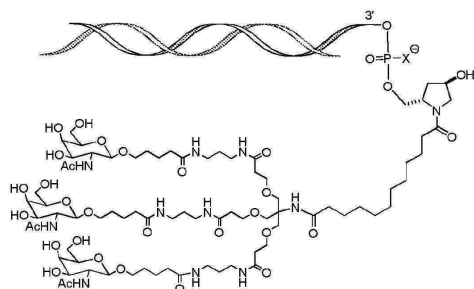
제17항에 있어서, 상기 대상체가 이형접합 LDL 수용체 유전자형을 갖는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 25

제18항에 있어서, 상기 위험 인자가 죽상경화증, 심장 판막 질병, 부정맥, 심부전, 고혈압, 기립성 저혈압, 쇼크, 심내막염, 대동맥 및 이의 분지의 질병, 말초혈관계 장애, 심장 발작, 심근병증 및/또는 선천성 심장병과 관련있는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 26

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염이 하기의 도식에 나타낸 바와 같이 상기 (GalNAc)₃ 리간드에 컨쥬게이트되는 것인, 약제학적 조성물:



(상기 식에서, X는 O임).

청구항 27

제1항 내지 제3항 및 제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, PCSK9 발현이 적어도 30% 억제되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 28

제1항 내지 제3항 및 제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 상기 대상체의 LDLR 유전형 또는 표현형을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제3항 및 제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염의 투여가 상기 대상체 내의 혈청 콜레스테롤의 감소 및/또는 PCSK9 단백질 축적의 감소를 초래하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 30

제1항 내지 제3항 및 제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 상기 대상체 내의 혈청 콜레스테롤 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 31

제1항 내지 제3항 및 제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 추가의 치료제를 상기 대상체에 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 추가의 치료제가 스타틴인, 약제학적 조성물.

청구항 33

제31항에 있어서, 상기 추가의 치료제가 항-PCSK9 항체인, 약제학적 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 항-PCSK9 항체가 알리로쿠맙(alirocumab)(프랄런트(Praluent)), 에볼로쿠맙(evolocumab)(레파타(Repatha)) 및 보코시주맙(bococizumab)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 35

제1항 내지 제3항 및 제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염이 약제학적 조성물로서 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염이 비완충 용액중에 존재하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 비완충 용액이 식염수 또는 물인, 약제학적 조성물.

청구항 38

제35항에 있어서, 상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염이 완충 용액 중에 존재하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 완충 용액이 아세트산염, 시트르산염, 프롤라민, 탄산염 또는 인산염 또는 이들의 염의 조합을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 40

제38항에 있어서, 상기 완충 용액이 인산염 완충 식염수(PBS)인, 약제학적 조성물.

청구항 41

제1항 내지 제3항 및 제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 기재된 방법을 수행하기 위한 키트로서, 상기 키트가

- a) 상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염, 및
- b) 사용 설명서, 및
- c) 선택적으로, 상기 이중-가닥 RNAi 작용제 또는 이의 염을 상기 대상체에게 투여하기 위한 수단을 포함하는 것인, 키트.

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 전체 내용이 본원에 참조로서 포함되는 2015년 8월 25일에 출원된 미국 특허 가출원 제62/209,526호에 대한 우선권의 이익을 주장한다.

[0003] 본 출원은 2012년 12월 5일에 출원된 미국 가출원 제61/733,518호; 2013년 3월 15일에 출원된 미국 가출원 제61/793,530호; 2013년 10월 4일에 출원된 미국 가출원 제61/886,916호; 2013년 10월 17일에 출원된 미국 가출원 제61/892,188호; 2013년 12월 5일에 출원된 PCT 출원 제PCT/US2013/073349호; 및 2015년 6월 5일에 출원된 미국 특허 출원 제14/650,128호에 관한 것이다. 상기 특허 출원의 각각의 전체 내용은 본원에 참조로서 포함된다.

[0004] **서열 목록**

[0005] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자 제출되고, 본원에 전체 내용이 참조로서 포함되는 서열 목록을 포함한다. 2016년 8월 24일에 생성된 상기 ASCII 카피는 121301-04420_SL.txt로 명명되어 있으며, 188,218 바이트 크기이다.

배경 기술

[0006] 전구단백질 전환효소 서브틸리신 켁신 9(proprotein convertase subtilisin kexin 9; PCSK9)는 서브틸리신 세린 프로테아제 과의 구성원이다. 다른 8가지의 포유동물 서브틸리신 프로테아제, PCSK1 내지 PCSK8(PC1/3, PC2, 푸린(furin), PC4, PC5/6, PACE4, PC7 및 S1P/SKI-1이라고도 칭함)은 분비 경로에서 매우 다양한 단백질을 처리하고, 다양한 생물학적 과정에서 역할을 하는 전구단백질 전환효소이다(문헌[Bergeron, F. (2000) *J. Mol. Endocrinol.* 24, 1-22], 문헌[Gensberg, K., (1998) *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 11-17], 문헌[Seidah, N. G. (1999) *Brain Res.* 848, 45-62], 문헌[Taylor, N. A., (2003) *FASEB J.* 17, 1215-1227] 및 문헌[Zhou, A., (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 20745-20748]).

[0007] PCSK9는 콜레스테롤 대사에서 역할을 하는 것으로 제안되었다. PCSK9 mRNA 발현은 마우스에서 식이 콜레스테롤 섭취에 의해 하향-조절되고(문헌[Maxwell, K. N., (2003) *J. Lipid Res.* 44, 2109-2119]), HepG2 세포에서 스타틴에 의해 상향-조절되고(문헌[Dubuc, G., (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1454-1459]), 콜레스테롤 생합성 효소 및 저밀도 지질단백질 수용체(LDLR)와 유사한 스테롤 조절 요소 결합 단백질(SREBP) 유전자 전이 마우스에서 상향조절된다(문헌[Horton, J. D., (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12027-12032]). 더욱이, PCSK9 미스센스(missense) 돌연변이는 상염색체 우성 고콜레스테롤혈증(Hchola3)의 형태와 연관된 것으로 발견되었다(문헌[Abifadel, M., et al. (2003) *Nat. Genet.* 34, 154-156], 문헌[Timms, K. M., (2004) *Hum. Genet.* 114, 349-353], 문헌[Leren, T. P. (2004) *Clin. Genet.* 65, 419-422]). PCSK9는 또한, 일반 집단에서 LDL 콜레스테롤 수준을 결정하는데 역할을 할 수 있는데, 그 이유는 단일-뉴클레오타이드 다형성(SNP)이 일본 집단에서 콜레스테롤 수준과 연관되기 때문이다(문헌[Shioji, K., (2004) *J. Hum. Genet.* 49, 109-114]).

[0008] 상염색체 우성 고콜레스테롤혈증(ADH)은 단일유전 질병이고, 여기서, 환자는 상승된 총 및 LDL 콜레스테롤

수준, 건 황색종(tendon xanthoma), 및 조기 죽상동맥경화증을 나타낸다(문헌[Rader, D. J., (2003) J. Clin. Invest. 111, 1795-1803]). ADH 및 열성 형태, 상염색체 열성 고콜레스테롤혈증(ARH)(문헌[Cohen, J. C., (2003) *Curr. Opin. Lipidol.* 14, 121-127])의 발병기전은 간에 의한 LDL 흡수의 결함에 기인한다. ADH는 LDL 흡수를 방지하는 LDLR 돌연변이에 의해, 또는 LDLR에 결합하는 아포지질단백질 B인 LDL 상의 단백질 내의 돌연변이에 의해 야기될 수 있다. ARH는 클라트린(clathrin)과의 상호작용을 통해 LDLR-LDL 복합체의 세포내 이입에 필요한 ARH 단백질의 돌연변이에 의해 야기된다. 따라서, PCSK9 돌연변이가 Hcho1a3 과에서 원인이 되면, PCSK9는 아마도 수용체 매개된 LDL 흡수에 역할을 하는 것으로 보인다.

[0009] 과발현 연구는 LDLR 수준의 제어, 및 이에 따른 간에 의한 LDL 흡수에서의 PCSK9에 대한 역할을 지적한다(문헌[Maxwell, K. N. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7100-7105], 문헌[Benjannet, S., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 48865-48875], 문헌[Park, S. W., (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 50630-50638]). 마우스에서 3일 또는 4일 동안 마우스 또는 인간 PCSK9의 아데노바이러스 매개된 과발현은 상승된 총 및 LDL 콜레스테롤 수준을 초래하며; 이 효과는 LDLR 낙아웃(knockout) 동물에서는 보이지 않는다(문헌[Maxwell, K. N. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7100-7105], 문헌[Benjannet, S., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 48865-48875], 문헌[Park, S. W., (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 50630-50638]). 또한, PCSK9 과발현은 LDLR mRNA 수준, SREBP 단백질 수준, 또는 SREBP 단백질 핵 대 세포질 비에 영향을 주지 않으면서 간 LDLR 단백질의 심각한 감소를 초래한다.

[0010] 고콜레스테롤혈증 그 자체는 무증상이지만, 장기간의 혈청 콜레스테롤의 상승은 죽상동맥경화증을 야기할 수 있다. 수십년의 기간에 걸쳐, 만성적으로 상승된 혈청 콜레스테롤은 동맥에서의 죽상판의 형성의 원인이 되며, 이는 관련 동맥의 진행성 협착증 또는 심지어 완전한 폐색을 야기할 수 있다. 또한, 보다 작은 판은 파열되고, 혈관이 형성되게 하고, 혈류를 방해하여, 예를 들어, 심근경색증 및/또는 뇌졸중을 초래할 수 있다. 협착증 또는 폐색의 형성이 점진적이면, 조직 및 기관으로의 혈액 공급은 기관 기능이 손상될 때까지 천천히 줄어든다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서, 고지혈증, 예를 들어, 고콜레스테롤혈증과 같은 PCSK9-관련 질병을 위한 효과적인 치료가 해당 분야에 요구된다.

과제의 해결 수단

[0012] 발명의 요약

[0013] 본 발명은 적어도 부분적으로, 화학적 변형을 포함하는 단일 용량의 이중-가닥 RNAi 작용제가 PCSK9의 발현을 억제하기 위한 뛰어난 효력과 내구성성을 보인다는 놀라운 발견에 기초한다. 구체적으로, GalNAc 리간드를 포함하는, 인간 PCSK9 유전자, 예를 들어, 인간 PCSK9 유전자의 뉴클레오티드 3544 내지 3623(SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 3544 내지 3623), 예를 들어, SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 3601 내지 3623을 표적화하는 단일의 고정 용량, 예를 들어, 약 300 mg 내지 약 500 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제가 본원에서 PCSK9 유전자의 활성의 침묵화에 뛰어나게 효율적이며 영구적인 것으로 나타났다.

[0014] 따라서, 본 발명은 PCSK9 유전자의 RNA 전사물의 RNA-유도 침묵화 복합체(RISC)-매개의 절단을 초래하는 iRNA 조성물을 사용한, 대상체에서의 PCSK9 유전자의 발현의 억제 방법, 및 PCSK9 유전자의 발현의 억제 또는 감소로 이익을 얻을 장애, 예를 들어, PCSK9 발현에 의해 매개되는 장애, 예를 들어, 고지혈증, 예를 들어, 고콜레스테롤혈증을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다.

[0015] 일 양태에서, 대상체에서 PCSK9 유전자의 발현을 억제하기 위한 본 발명의 방법 및 PCSK9 유전자의 발현의 억제 또는 감소로 이익을 얻을 장애, 예를 들어, PCSK9 발현에 의해 매개되는 장애, 예를 들어, 고지혈증, 예를 들어, 고콜레스테롤혈증을 갖는 대상체의 치료 방법은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 2의 뉴클레오티드 서열과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이

며, 센스 가닥은 3'-말단에 부착된 리간드에 컨쥬게이트된다.

- [0016] 일 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 PCSK9 유전자의 발현의 억제 방법을 제공한다. 상기 방법은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 대상체에서 PCSK9 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.
- [0017] 또 다른 양태에서, 본 발명은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 대상체에서 LDLc의 수준을 감소시키는 단계를 포함하는 대상체에서의 저밀도 지질단백질(LDLc)의 수준의 감소 방법을 제공하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.
- [0018] 또 다른 양태에서, 본 발명은 PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체를 치료하는 단계를 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.
- [0019] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고지혈증을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 고콜레스테롤혈증을 갖는 대상체를 치료하는 단계를 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.
- [0020] 고정 용량은 1주에 1회, 2주마다 1회, 1개월에 1회, 분기에 1회 또는 연 2회의 간격으로 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0021] 일 구현예에서, 대상체에게 약 25 mg 내지 약 50 mg의 고정 용량이 1주에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 대상체에게 약 50 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량이 2주마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 대상체에게 약 100 mg 내지 약 200 mg의 고정 용량이 1개월에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 대상체에게 약 300 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량이 분기에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 대상체에게 약 300 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량이 연 2회 투여된다.
- [0022] 또한, 본 발명은 RNAi 작용제가 로딩기(loading phase) 및 유지기(maintenance phase)를 포함하는 투여 섭생법에서 투여되는 방법을 제공한다.
- [0023] 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 PCSK9 유전자의 발현의 억제 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 대상체에서 PCSK9 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 1개월에 약 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.
- [0024] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 저밀도 지질단백질(LDLc)의 수준의 감소 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 대상체에서 LDLc의 수준을 감소시키는 단계를 포함하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 1개월에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영

역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.

[0025] 또 다른 양태에서, 본 발명은 PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체를 치료하는 단계를 포함하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 1개월에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.

[0026] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고지혈증을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 고지혈증을 갖는 대상체를 치료하는 단계를 포함하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 1개월에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.

[0027] 이중 가닥 RNAi 작용제는 피하로, 예를 들어, 피하 주사에 의해 또는 근육내로 대상체에게 투여될 수 있다.

[0028] 일 구현예에서, 안티센스 가닥은 표 1에 제공되는 비변형 뉴클레오티드 서열 중 어느 하나로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 이중-가닥 RNAi 작용제는 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 3601 내지 3623을 표적화한다. 일 구현예에서, SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 3601 내지 3623을 표적화하는 작용제는 AD-60212이다.

[0029] 일 구현예에서, 안티센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함한다.

[0030] 일 구현예에서, 센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함한다.

[0031] 일 구현예에서, 이중-가닥 리보핵산 RNAi 작용제는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0032] 일 구현예에서, 실질적으로 센스 가닥의 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다. 또 다른 구현예에서, 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다. 또 다른 구현예에서, 실질적으로 센스 가닥의 뉴클레오티드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0033] 일 구현예에서, 센스 가닥의 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다. 또 다른 구현예에서, 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다. 또 다른 구현예에서, 센스 가닥의 모든 뉴클레오티드 및 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0034] 일 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 PCSK9 유전자의 발현의 억제 방법을 제공한다. 상기 방법은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 대상체에서 PCSK9 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0035] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 저밀도 지질단백질(LDLc)의 수준의 감소 방법을 제공한다. 상기 방법은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 대상체에서 LDLc의 수준을 감소시키는 단계를 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-

CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다.

[0036] 또 다른 양태에서, 본 발명은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체를 치료하는 단계를 포함하는 PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체의 치료 방법을 제공하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다.

[0037] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고지혈증을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 고지혈증을 갖는 대상체를 치료하는 단계를 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다.

[0038] 일 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 PCSK9 유전자의 발현의 억제 방법을 제공한다. 상기 방법은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 그에 의해, 대상체에서 PCSK9 유전자의 발현을 억제하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다.

[0039] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 저밀도 지질단백질(LDLc)의 수준의 감소 방법을 제공한다. 상기 방법은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 그에 의해, 대상체에서 LDLc의 수준을 감소시키며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다.

[0040] 또 다른 양태에서, 본 발명은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 그에 의해, PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체를 치료하는, PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체의 치료 방법을 제공하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다.

[0041] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고지혈증을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 그에 의해, 고지혈증을 갖는 대상체를 치료하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다.

[0042] 고정 용량은 1주에 1회, 2주마다 1회, 1개월에 1회, 분기에 1회 또는 연 2회의 간격으로 대상체에게 투여될 수 있다.

- [0043] 일 구현예에서, 대상체에게 약 25 mg 내지 약 50 mg의 고정 용량이 1주에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 대상체에게 약 50 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량이 2주마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 대상체에게 약 100 mg 내지 약 200 mg의 고정 용량이 1개월에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 대상체에게 약 300 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량이 분기에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 대상체에게 약 300 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량이 연 2회 투여된다.
- [0044] 일 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 PCSK9 유전자의 발현의 억제 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 대상체에서 PCSK9 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 분기에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다.
- [0045] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 저밀도 지질단백질(LDLc)의 수준의 감소 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 대상체에서 LDLc의 수준을 감소시키는 단계를 포함하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 분기에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다.
- [0046] 또 다른 양태에서, 본 발명은 PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체를 치료하는 단계를 포함하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 분기에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다.
- [0047] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고지혈증을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 고지혈증을 갖는 대상체를 치료하는 단계를 포함하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 분기에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다.
- [0048] 일 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 PCSK9 유전자의 발현의 억제 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 그에 의해, 대상체에서 PCSK9 유전자의 발현을 억제하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 분기에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센

스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0049] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 저밀도 지질단백질(LDLc)의 수준의 감소 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 그에 의해, 대상체에서 LDLc의 수준을 감소시키며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 분기에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0050] 또 다른 양태에서, 본 발명은 PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 그에 의해, PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체를 치료하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 분기에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0051] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고지혈증을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 그에 의해, 고지혈증을 갖는 대상체를 치료하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 분기에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오티드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0052] 일 구현예에서, 대상체는 인간이다.

[0053] 일 구현예에서, PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애는 고지혈증, 예를 들어, 고콜레스테롤혈증이다.

[0054] 일 구현예에서, 고지혈증은 고콜레스테롤혈증이다.

[0055] 이중 가닥 RNAi 작용제는 대상체에게 피하로, 예를 들어, 피하 주사에 의해 또는 근육내로 투여될 수 있다.

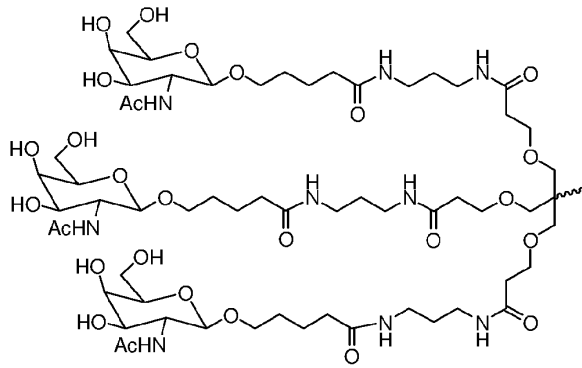
[0056] 일 구현예에서, 센스 가닥은 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 안티센스 가닥은 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며(AD-60212), a, g, c 및 u는 2'-O-메틸(2'-OMe) A, G, C 또는 U이며; Af, Gf, Cf 또는 Uf는 2'-플루오로 A, G, C 또는 U이며; dT는 2'-데옥시티미딘이며; s는 포스포로티오에이트 결합이다.

[0057] 일 구현예에서, 이중-가닥 리보핵산 RNAi 작용제는 리간드를 추가로 포함한다.

[0058] 일 구현예에서, 리간드는 이중-가닥 리보핵산 RNAi 작용제의 센스 가닥의 3' 말단에 컨쥬게이트된다.

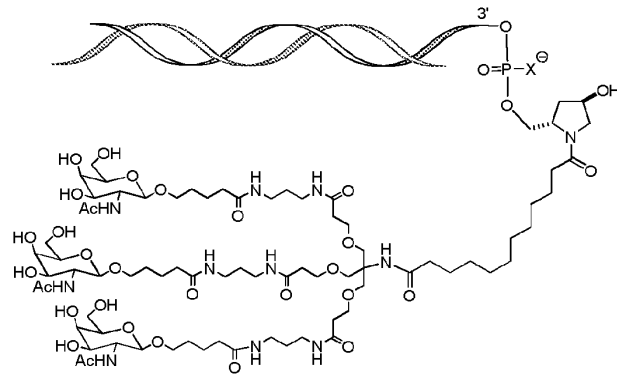
[0059] 일 구현예에서, 리간드는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 유도체이다.

[0060] 일 구현예에서, 리간드는



[0061] 이다.

[0062] 일 구현예에서, 이중-가닥 리보핵산 RNAi 작용제는 하기의 도식에 나타낸 바와 같이 리간드에 컨쥬게이트된다:



[0063]

[0064] 상기 식에서, X는 O 또는 S이다. 일 구현예에서, X는 O이다.

[0065] 일 구현예에서, PCSK9 발현은 적어도 약 30% 억제된다.

[0066] 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 대상체의 LDLR 유전형 또는 표현형을 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0067] 일 구현예에서, 이중-가닥 RNAi 작용제의 투여는 대상체 내의 혈청 콜레스테롤의 감소 및/또는 PCSK9 단백질 축적의 감소를 초래한다.

[0068] 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 대상체에서 혈청 콜레스테롤 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0069] 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 추가의 치료제, 예를 들어, 스타틴 및/또는 항-PCSK9 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 항-PCSK9 항체는 알리로쿠맙(alirocumab)(프랄런트(Praluent)), 에볼로쿠맙(evolocumab)(레파타(Repatha)) 및 보코시주맙(bococizumab)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0070] 일 구현예에서, RNAi 작용제는 약제학적 조성물로서 투여된다.

[0071] RNAi 작용제는 완충 용액, 예를 들어, 식염수 또는 수 중에서 투여되거나, 완충 용액과 함께 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 완충 용액은 아세트산염, 시트르산염, 포플라민, 탄산염 또는 인산염 또는 그들의 임의의 조합을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 완충 용액은 인산염 완충 식염수(PBS)이다.

[0072] 일 양태에서, 본 발명은 대상체에서 PCSK9 유전자의 발현의 억제 방법을 제공한다. 상기 방법은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 단일의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 그에 의해, 대상체에서 PCSK9 유전자의 발현을 억제하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 센스 가닥은 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687)의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 안티센스 가닥은 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688)의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며(AD-60212), a, g, c 및 u는 2'-O-메틸(2'-OMe) A, G, C 또는 U이며; Af, Gf, Cf 또는 Uf는 2'-플루오로 A, G, C 또는 U이며; dT는 2'-데옥시티미딘이며; s는 포스포로티오에이트 결합이다.

[0073] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 저밀도 지질단백질(LDLc)의 수준의 감소 방법을 제공한다. 상기 방법은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 그에 의

해, 대상체에서 LDLc의 수준을 감소시키며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 센스 가닥은 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 안티센스 가닥은 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며(AD-60212), a, g, c 및 u는 2'-O-메틸(2'-OMe) A, G, C 또는 U이며; Af, Gf, Cf 또는 Uf는 2'-플루오로 A, G, C 또는 U이며; dT는 2'-데옥시티미딘이며; s는 포스포로티오에이트 결합이다.

[0074] 또 다른 양태에서, 본 발명은 PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 그에 의해, PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체를 치료하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 센스 가닥은 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 안티센스 가닥은 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며(AD-60212), a, g, c 및 u는 2'-O-메틸(2'-OMe) A, G, C 또는 U이며; Af, Gf, Cf 또는 Uf는 2'-플루오로 A, G, C 또는 U이며; dT는 2'-데옥시티미딘이며; s는 포스포로티오에이트 결합이다.

[0075] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고지혈증을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 그에 의해, 고지혈증을 갖는 대상체를 치료하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 센스 가닥은 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 안티센스 가닥은 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며(AD-60212), a, g, c 및 u는 2'-O-메틸(2'-OMe) A, G, C 또는 U이며; Af, Gf, Cf 또는 Uf는 2'-플루오로 A, G, C 또는 U이며; dT는 2'-데옥시티미딘이며; s는 포스포로티오에이트 결합이다.

[0076] 일 구현예에서, 대상체에는 약 200 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량이 분기에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 대상체에는 약 200 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량이 연 2회 투여된다.

[0077] 일 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 PCSK9 유전자의 발현의 억제 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 그에 의해, 대상체에서 PCSK9 유전자의 발현을 억제하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 분기에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 센스 가닥은 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 안티센스 가닥은 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며(AD-60212), a, g, c 및 u는 2'-O-메틸(2'-OMe) A, G, C 또는 U이며; Af, Gf, Cf 또는 Uf는 2'-플루오로 A, G, C 또는 U이며; dT는 2'-데옥시티미딘이며; s는 포스포로티오에이트 결합이다.

[0078] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 저밀도 지질단백질(LDLc)의 수준의 감소 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 그에 의해, 대상체에서 LDLc의 수준을 감소시키며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 분기에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 센스 가닥은 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 안티센스 가닥은 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며(AD-60212), a, g, c 및 u는 2'-O-메틸(2'-OMe) A, G, C 또는 U이며; Af, Gf, Cf 또는 Uf는 2'-플루오로 A, G, C 또는 U이며; dT는 2'-데옥시티미딘이며; s는 포스포로티오에이트 결합이다.

[0079] 또 다른 양태에서, 본 발명은 PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 그에 의해, PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체를 치료하며, 로딩기는 약 200 mg

내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 분기에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 센스 가닥은 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 안티센스 가닥은 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며(AD-60212), a, g, c 및 u는 2'-O-메틸(2'-OMe) A, G, C 또는 U이며; Af, Gf, Cf 또는 Uf는 2'-플루오로 A, G, C 또는 U이며; dT는 2'-데옥시티미딘이며; s는 포스포로티오에이트 결합이다.

[0080] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고지혈증을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 그에 의해, 고지혈증을 갖는 대상체를 치료하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 분기에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 센스 가닥은 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 안티센스 가닥은 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며(AD-60212), a, g, c 및 u는 2'-O-메틸(2'-OMe) A, G, C 또는 U이며; Af, Gf, Cf 또는 Uf는 2'-플루오로 A, G, C 또는 U이며; dT는 2'-데옥시티미딘이며; s는 포스포로티오에이트 결합이다.

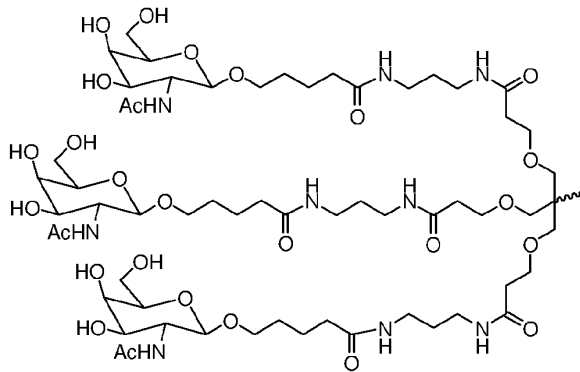
[0081] 일 구현예에서, 대상체에게 약 200 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량으로서 유지 용량이 분기에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 대상체에게 약 200 mg 내지 약 800 mg의 고정 용량으로서 유지 용량이 연 2회 투여된다.

[0082] 일 구현예에서, 이중-가닥 리보핵산 RNAi 작용제는 리간드를 추가로 포함한다.

[0083] 일 구현예에서, 리간드는 이중-가닥 리보핵산 RNAi 작용제의 센스 가닥의 3' 말단에 컨쥬게이트된다.

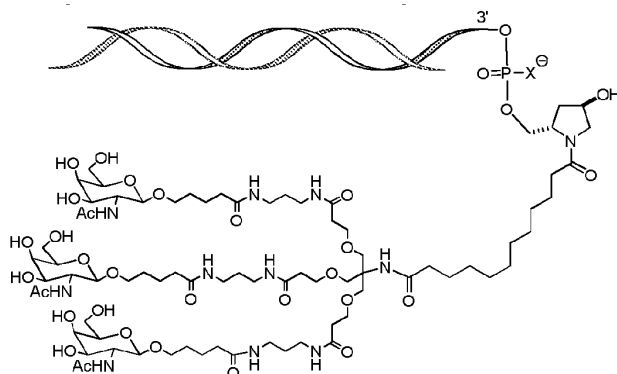
[0084] 일 구현예에서, 리간드는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 유도체이다.

[0085] 일 구현예에서, 리간드는



[0086] 이다.

[0087] 일 구현예에서, 이중-가닥 리보핵산 RNAi 작용제는 하기의 도식에 나타낸 바와 같이 리간드에 컨쥬게이트된다:



[0088]

[0089] 상기 식에서, X는 O 또는 S이다. 일 구현예에서, X는 O이다.

- [0090] 일 구현예에서, 항-PCSK9 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 알리로쿠맙(프랄렌트), 에볼로쿠맙(레파타) 및 보코시주맙으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0091] 일 구현예에서, 상기 방법은 추가의 치료제, 예를 들어, 스타틴을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0092] 일 양태에서, 본 발명은 본 발명의 방법을 수행하기 위한 키트를 제공한다. 키트는 RNAi 작용제 및 사용 설명서 및 선택적으로, 대상체로의 RNAi 작용제의 투여 수단을 포함한다.
- [0093] 본 발명은 하기의 상세한 설명 및 도면에 의해 추가로 예시된다.

도면의 간단한 설명

- [0094] 도 1은 단일의 고정 용량의 AD-60212를 받은 대상체에서의 기준선에 비한 평균 PCSK9 낙다운 백분율로 나타낸 PCSK9 단백질 수준의 낙다운을 보여주는 그래프이다.
- 도 2는 단일의 고정 용량의 AD-60212를 받은 대상체에서의 기준선에 비한 평균 LCL-C 저하 백분율로 나타낸 LCL-c 수준의 저하를 보여주는 그래프이다.
- 도 3은 다수의 고정 용량의 AD-60212를 받은 대상체에서의 기준선에 비한 평균 PCSK9 낙다운 백분율로 나타낸 PCSK9 단백질 수준의 낙다운을 보여주는 그래프이다.
- 도 4는 다수의 고정 용량의 AD-60212를 받은 대상체에서의 기준선에 비한 평균 LCL-C 저하 백분율로 나타낸 LCL-c 수준의 저하를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0095] **상세한 설명**
- [0096] 본 발명은 적어도 부분적으로, 화학적 변형을 포함하는 단일 용량의 이중-가닥 RNAi 작용제가 PCSK9의 발현을 억제하기 위한 뛰어난 효력과 내구성을 보인다는 놀라운 발견에 기초한다. 구체적으로, GalNAc 리간드를 포함하는, 인간 PCSK9 유전자, 예를 들어, 인간 PCSK9 유전자의 뉴클레오티드 3544 내지 3623(SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 3544 내지 3623), 예를 들어, SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 3601 내지 3623을 표적화하는 단일의 고정 용량, 예를 들어, 약 300 mg 내지 약 500 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제가 본원에서 PCSK9 유전자의 활성의 침묵화에 뛰어나게 효율적이며 영구적인 것으로 나타났다.
- [0097] 따라서, 본 발명은 PCSK9 유전자의 RNA 전사물의 RNA-유도 침묵화 복합체(RISC)-매개의 절단을 초래하는 iRNA 조성물을 사용한, PCSK9 유전자의 발현의 억제 방법, 및 PCSK9 유전자의 발현의 억제 또는 감소로 이익을 얻을 장애, 예를 들어, PCSK9 발현에 의해 매개되는 장애, 예를 들어, 고지혈증, 예를 들어, 고콜레스테롤혈증을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다.
- [0098] 하기의 상세한 설명에는 PCSK9 유전자의 발현을 억제하기 위한 iRNA를 함유하는 조성물의 제조 및 이용 방법, 및 이러한 유전자의 발현의 억제 및/또는 감소로 이익을 얻을 질병 및 장애를 갖는 대상체를 치료하기 위한 조성물, 용도 및 방법이 개시되어 있다.
- [0099] **I. 정의**
- [0100] 본 발명을 보다 용이하게 이해할 수 있도록, 소정의 용어가 먼저 정의된다. 또한, 파라미터의 값 또는 값의 범위가 언급될 때는 언제나, 언급된 값의 중간의 값 및 범위도 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도되는 것을 주목해야 한다.
- [0101] 관사("a" 및 "an")는 관사의 문법상 대상이 1개 또는 1개 초과(즉, 적어도 1개)인 것을 의미하기 위해 본원에 사용된다. 예로서, "하나의 요소"는 1개의 요소 또는 1개 초과 요소, 예를 들어, 복수의 요소를 의미한다.
- [0102] 용어 "포함하는"은 어구 "포함하나 그에 한정되지 않는"을 의미하는 것으로 본원에 사용되며, 이와 상호교환 가능하게 사용된다.
- [0103] 용어 "또는"은 문맥에서 명백하게 다르게 나타내지 않는 한, 용어 "및/또는"을 의미하는 것으로 본원에 사용되며, 이와 상호교환 가능하게 사용된다. 예를 들어, "센스 가닥 또는 안티센스 가닥"은 "센스 가닥 또는 안티센스 가닥 또는 센스 가닥 및 안티센스 가닥"으로 이해된다.

- [0104] 용어 "약"은 해당 분야의 전형적인 허용 범위 내인 것을 의미하는 것으로 본원에서 사용된다. 예를 들어, "약"은 평균으로부터 약 2 표준 편차로서 이해될 수 있다. 특정 구현예에서, 약은 +10%를 의미한다. 특정 구현예에서, 약은 +5%를 의미한다. 약이 일련의 수 또는 범위 앞에 존재하는 경우, "약"이 일련의 수 또는 범위의 각각을 수식할 수 있는 것이 이해된다.
- [0105] 수 또는 일련의 수 이전의 용어 "적어도"는 문맥으로부터 명백한 바와 같이 용어 "적어도"에 인접한 수 및 논리적으로 포함될 수 있는 모든 이후의 수 또는 정수를 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 핵산 분자 내의 뉴클레오타이드의 수는 정수여야 한다. 예를 들어, "21개 뉴클레오타이드 핵산 분자의 적어도 18개 뉴클레오타이드"는 18, 19, 20 또는 21개의 뉴클레오타이드가 표기된 특성을 갖는 것을 의미한다. 적어도가 일련의 수 또는 범위 앞에 존재하는 경우, "적어도"가 일련의 수 또는 범위를 각각 수식할 수 있는 것이 이해된다.
- [0106] 본원에 사용되는 바와 같이, "이하" 또는 "미만"은 상기 어구에 인접한 값 및 문맥으로부터 논리적인 논리적으로 더 낮은 값 또는 정수 내지 0으로 이해된다. 예를 들어, "2개 이하의 뉴클레오타이드"의 오버행을 갖는 듀플렉스는 2, 1 또는 0개의 뉴클레오타이드 오버행을 갖는다. "이하"가 일련의 수 또는 범위 앞에 존재하는 경우, "이하"는 일련의 수 또는 범위의 각각을 수식할 수 있는 것이 이해된다.
- [0107] 본원에 사용되는 바와 같이, "PCSK9"는 전구단백질 전환효소 서브틸리신 켄신 9 유전자 또는 단백질을 말한다. 또한, PCSK9는 FH3, HCHOLA3, NARC-1 또는 NARC1로 공지되어 있다. PCSK9라는 용어는 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열이 예를 들어, GenBank 수탁 번호 GI:299523249(SEQ ID NO: 1)에서 찾을 수 있는 인간 PCSK9; 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열이 예를 들어, GenBank 수탁 번호 GI:163644257에서 찾을 수 있는 마우스 PCSK9; 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열이 예를 들어, GenBank 수탁 번호 GI:77020249에서 찾을 수 있는 랫트 PCSK9를 포함한다.
- [0108] PCSK9 mRNA 서열의 추가의 예는 공개적으로 이용 가능한 데이터베이스, 예를 들어, GenBank, UniProt 및 OMIM을 사용하여 용이하게 입수 가능하다.
- [0109] 일 구현예에서, 대상체는 인간, 예를 들어, PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 질병, 장애 또는 질환에 대하여 치료 또는 평가 중인 인간; PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 질병, 장애 또는 질환의 위험이 있는 인간; PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 질병, 장애 또는 질환을 갖는 인간; 및/또는 본원에 기재된 바와 같이 PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 질병, 장애 또는 질환을 위해 치료 중인 인간이다.
- [0110] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 검출 가능하든지, 검출 가능하지 않든지, 비제한적으로 PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애와 관련된 하나 이상의 증상의 완화 또는 개선, 또는 이러한 장애의 진행의 둔화 또는 역행을 포함하는 유익한 또는 요망되는 결과를 말한다. 예를 들어, 고지혈증의 맥락에서, 치료는 혈청 지질 수준의 감소, 예를 들어, 저밀도 지질단백질 콜레스테롤(LDLc)의 감소를 포함할 수 있다. 또한, "치료"는 치료의 부재 하에 예상되는 생존에 비한 생존의 연장을 의미할 수 있다.
- [0111] 본원에 사용되는 바와 같이, "예방" 또는 "예방하는"은 PCSK9 유전자의 발현의 감소로 이익을 얻을 그의 질병, 장애 또는 질환에 관하여 사용되는 경우, 대상체에서 PCSK9 발현에 의해 매개되는 질병, 장애 또는 질환과 관련된 증상, 예를 들어, 심혈관 질병, 예를 들어, 관상 동맥 질병(CAD)(관상동맥 심장병(CHD))으로도 알려져 있음) 또는 일과성 뇌허혈 발작(TIA) 또는 뇌졸중과 같은 증상이 발생할 확률의 감소를 말한다. 이러한 증상의 발생 확률은 예를 들어, PCSK9 발현에 의해 매개되는 질병, 장애 또는 질환, 예를 들어, 고콜레스테롤혈증에 대한 하나 이상의 위험 인자(예를 들어, 당뇨병, 이전의 CHD 또는 비관상동맥 죽상경화증(예를 들어, 복부대동맥류, 말초 동맥 질병 및 경동맥 협착증)의 개인력, 예를 들어, 50세 미만의 남성 친척 또는 60세 미만의 여성 친척에서의 심혈관 질병 가족력, 흡연, 고혈압 및/또는 비만(30 이상의 BMI))를 갖는 개체에서 예를 들어, 관상 동맥 질병이 발생하지 못하거나, 예를 들어, 동일한 위험 인자를 갖고 본원에 기재된 치료를 받지 않은 집단에 비하여 더 낮은 중증도로 관상 동맥 질병이 발생하는 경우에 감소된다. 질병, 장애 또는 질환의 발생 실패, 또는 이러한 질병, 장애 또는 질환과 관련된 증상의 발생의 감소(예를 들어, 그 질병 또는 장애에 대하여 임상적으로 허용되는 척도로 적어도 약 10%), 또는 지연된(예를 들어, 수일, 수주, 수개월 또는 수년) 증상의 발현은 효과적인 예방으로 여겨진다. 예방은 1회 이상의 용량의 투여를 필요로 할 수 있다.
- [0112] 본원에 사용되는 바와 같이, 상호교환 가능하게 사용되는 용어 "PCSK9-관련 질병" 및 "PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애"는 PCSK9 유전자 또는 단백질과 관련된 임의의 질병, 장애 또는 질환을 포함하는 의도이다. 이러한 질병은 예를 들어, 과도한 PCSK9 단백질의 생성에 의해, PCSK9 유전자 돌연변이에 의해, PCSK9 단백질의 비정상적인 절단에 의해, PCSK9와 다른 단백질 또는 다른 내인성 또는 외인성 물질 간의 비정상적인 상호작용에 의해 야기될 수 있다. 예시적인 PCSK9-관련 질병은 지질혈증, 예를 들어, 고지혈증 및 다른 형태의 지질

불균형, 예를 들어, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증 및 이들 장애와 관련된 병리학적 질환, 예를 들어, CHD 및 죽상경화증을 포함한다.

- [0113] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "고콜레스테롤혈증"은 대상체의 혈청에 높은 수준의 콜레스테롤, 예를 들어, 적어도 약 240 mg/dl의 총 콜레스테롤이 존재하는 고지혈증(상승된 수준의 혈 중 지질)의 형태를 말한다.
- [0114] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "심혈관 질병"은 예를 들어, 죽상경화증, 관상 동맥 질병(예를 들어, 동맥의 협착), 심장 판막 질병, 부정맥, 심부전, 고혈압, 기립성 저혈압, 쇼크, 심내막염, 대동맥 및 그의 분지의 질병, 말초혈관계 장애, 심장 발작, 심근병증 및 선천성 심장병을 포함하는 심장 또는 혈관에 영향을 미치는 질병을 말한다.
- [0115] 본원에 사용되는 바와 같이, "치료적 유효량"은 PCSK9 관련 질병을 치료하기 위해 환자에게 투여되는 경우, (예컨대, 기존 질병 또는 질병의 하나 이상의 증상을 감소시키거나, 완화시키거나, 유지시킴으로써) 질병의 치료를 가져오는데 충분한, RNAi 작용제의 양을 포함하는 의도이다. "치료적 유효량"은 RNAi 작용제, 작용제의 투여 방법, 질병 및 그의 중증도 및 치료될 환자의 병력, 연령, 체중, 가족력, 유전적 구성, PCSK9 발현에 의해 매개되는 병적 과정의 단계, 존재한다면, 선행 또는 동시 치료의 유형, 및 기타 개별 특징에 따라 달라질 수 있다.
- [0116] 본원에 사용되는 바와 같이, "예방적 유효량"은 PCSK9-관련 질병의 증상을 아직 경험하거나 나타내지 않지만 질병에 걸리기 쉬울 수 있는 대상체에게 투여되는 경우, 질병 또는 질병의 하나 이상의 증상을 방지하거나 완화시키는데 충분한, RNAi 작용제의 양을 포함하는 의도이다. 질병의 완화는 질병의 과정을 둔화시키거나 이후-발생하는 질병의 중증도를 감소시키는 것을 포함한다. "예방적 유효량"은 RNAi 작용제, 작용제의 투여 방법, 질병의 위험도 및 치료될 환자의 병력, 연령, 체중, 가족력, 유전적 구성, 존재한다면, 선행 또는 동시 치료의 유형, 및 기타 개별 특징에 따라 달라질 수 있다.
- [0117] "치료적 유효량" 또는 "예방적 유효량"은 임의의 치료에 적용될 수 있는 합당한 이익/위험비에서 일부 원하는 국소 또는 전신 효과를 생성하는 RNAi 작용제의 양도 포함한다. 본 발명의 방법에 채용되는 RNAi 작용제는 그러한 치료에 적용될 수 있는 합당한 이익/위험비를 생성하는데 충분한 양으로 투여될 수 있다.
- [0118] 본원에 사용되는 바와 같이, "표적 서열"은 일차 전사 산물의 RNA 가공의 산물인 mRNA를 포함하는, PCSK9 유전자의 전사 동안에 형성된 mRNA 분자의 뉴클레오타이드 서열의 인접 부분을 지칭한다. 일 구현예에서, 서열의 표적 부분은 PCSK9 유전자의 전사 동안에 형성되는 mRNA 분자의 뉴클레오타이드 서열의 부분에서 또는 그 근처에서, 적어도 iRNA-유도 절단을 위한 기질로서 소용되기에 충분히 길 것이다.
- [0119] 표적 서열은 약 9 내지 36개 뉴클레오타이드 길이, 예를 들어, 약 15 내지 30개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 예를 들어, 표적 서열은 약 15 내지 30개 뉴클레오타이드, 15 내지 29개, 15 내지 28개, 15 내지 27개, 15 내지 26개, 15 내지 25개, 15 내지 24개, 15 내지 23개, 15 내지 22개, 15 내지 21개, 15 내지 20개, 15 내지 19개, 15 내지 18개, 15 내지 17개, 18 내지 30개, 18 내지 29개, 18 내지 28개, 18 내지 27개, 18 내지 26개, 18 내지 25개, 18 내지 24개, 18 내지 23개, 18 내지 22개, 18 내지 21개, 18 내지 20개, 19 내지 30개, 19 내지 29개, 19 내지 28개, 19 내지 27개, 19 내지 26개, 19 내지 25개, 19 내지 24개, 19 내지 23개, 19 내지 22개, 19 내지 21개, 19 내지 20개, 20 내지 30개, 20 내지 29개, 20 내지 28개, 20 내지 27개, 20 내지 26개, 20 내지 25개, 20 내지 24개, 20 내지 23개, 20 내지 22개, 20 내지 21개, 21 내지 30개, 21 내지 29개, 21 내지 28개, 21 내지 27개, 21 내지 26개, 21 내지 25개, 21 내지 24개, 21 내지 23개 또는 21 내지 22개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 약 19 내지 약 30개 뉴클레오타이드 길이이다. 다른 구현예에서, 표적 서열은 약 19 내지 약 25개 뉴클레오타이드 길이이다. 또 다른 구현예에서, 표적 서열은 약 19 내지 약 23개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 약 21 내지 약 23개 뉴클레오타이드 길이이다. 상기 언급된 범위 및 길이의 중간의 범위 및 길이도 또한 본 발명의 일부인 것으로 고려된다.
- [0120] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "서열을 포함하는 가닥"은 표준 뉴클레오타이드 명명법을 사용하여 언급된 서열로 기술되는 뉴클레오타이드의 사슬을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 말한다.
- [0121] 각각의 "G", "C", "A", "T" 및 "U"는 일반적으로 각각 염기로서 구아닌, 시토신, 아데닌, 티미딘 및 우라실을 포함하는 뉴클레오타이드를 나타낸다. 그러나 "리보뉴클레오타이드" 또는 "뉴클레오타이드"라는 용어가 하기에서 더 상세히 다루어질 변형 뉴클레오타이드 또는 대용 대체 모이어티(moiety)도 또한 나타낼 수 있다는 것이 이해될 것이다(예를 들어, 표 B 참조). 숙련자는 구아닌, 시토신, 아데닌 및 우라실이 이러한 대체 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 염기쌍 형성 특성을 실질적으로 변경하지 않으면서 다른 모이어티로 대체될 수 있다는 것을 잘 인지하고 있다. 예를 들어, 비제한적으로, 그의 염기로서 이노신을 포함하는 뉴클레

오티드는 아데닌, 시토신 또는 우라실을 포함하는 뉴클레오티드와 염기쌍을 형성할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 특징으로 하는 dsRNA의 뉴클레오티드 서열에서 우라실, 구아닌 또는 아데닌을 포함하는 뉴클레오티드는 예를 들어 이노신을 포함하는 뉴클레오티드로 대체될 수 있다. 또 다른 예에서, 올리고뉴클레오티드 내의 어디든 아데닌 및 시토신은 각각 구아닌 및 우라실로 대체되어, 표적 mRNA와 G-U 위블(Wobble) 염기쌍을 형성할 수 있다. 이러한 대체 모이어티를 포함하는 서열은 본 발명에서 특징으로 하는 조성물 및 방법에 적합하다.

[0122] 본원에 상호교환 가능하게 사용되는 용어 "iRNA", "RNAi 작용제", "iRNA 작용제", "RNA 간섭 작용제"는 그 용어가 본원에 정의된 바와 같은 RNA를 함유하며, RNA-유도 침묵화 복합체(RISC) 경로를 통한 RNA 전사물의 표적화된 절단을 매개하는 작용제를 말한다. iRNA는 RNA 간섭(RNAi)으로 공지된 과정을 통하여 mRNA의 서열-특이적 분해를 유도한다. iRNA는 세포, 예를 들어, 포유동물 대상체와 같은 대상체 내의 세포에서 PCSK9의 발현을 조절, 예를 들어, 억제한다.

[0123] 일 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는 표적 RNA 서열, 예를 들어, PCSK9 표적 mRNA 서열과 상호작용하여, 표적 RNA의 절단을 유도하는 단일 가닥 RNA를 포함한다. 이론에 의해 제한하고자 하지 않고, 세포 내로 도입된 긴 이중 가닥 RNA는 다이스(Dicer)로 공지되어 있는 III형 엔도뉴클레아제에 의해 siRNA로 분해되는 것으로 여겨진다(문헌[Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485]). 다이스, 리보뉴클레아제-III-유사 효소는 dsRNA를 특징적인 2개 염기 3' 오버행을 갖는 19 내지 23개 염기쌍의 짧은 간섭 RNA로 처리한다(문헌[Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363]). 그 다음, siRNA는 RNA-유도 침묵화 복합체(RISC) 내로 혼입되고, 여기서, 하나 이상의 헬리카제(helicase)는 siRNA 듀플렉스를 풀어 내어, 상보적 안티센스 가닥이 표적 인식을 안내하게 한다(문헌[Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). RISC 내의 하나 이상의 엔도뉴클레아제는 적절한 표적 mRNA로의 결합 시에, 표적을 분해하여, 침묵화를 유도한다(문헌[Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188]). 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 세포 내에 생성되며, RISC 복합체의 형성을 촉진시켜, 표적 유전자, 즉, PCSK9 유전자의 침묵화를 초래하는 단일 가닥 RNA(siRNA)에 관한 것이다. 따라서, 용어 "siRNA"는 또한, 상술된 바와 같은 RNAi를 지칭하기 위해 본원에 사용된다.

[0124] 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제는 세포 또는 유기체 내로 도입되어, 표적 mRNA를 억제하는 단일-가닥 siRNA일 수 있다. 단일-가닥 RNAi 작용제는 RISC 엔도뉴클레아제, 아르코노트(Argonaute) 2에 결합하며, 이는 이어서 표적 mRNA를 절단한다. 단일-가닥 siRNA는 일반적으로 15 내지 30개 뉴클레오티드이며, 화학적으로 변형된다. 단일-가닥 siRNA의 설계 및 시험은 미국 특허 제8,101,348호 및 문헌[Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150: 883-894]에 기재되어 있으며, 그의 각각의 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다. 본원에 기재된 안티센스 뉴클레오티드 서열 중 임의의 것은 본원에 기재된 바와 같은 단일-가닥 siRNA로서 사용되거나, 문헌[Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894]에 기재된 방법에 의해 화학적으로 변형된 것으로서 사용될 수 있다.

[0125] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 조성물, 용도 및 방법에 사용하기 위한 "iRNA"는 이중-가닥 RNA이며, 본원에 "이중 가닥 RNAi 작용제", "이중-가닥 RNA(dsRNA) 분자", "dsRNA 작용제" 또는 "dsRNA"로 지칭된다. 용어 "dsRNA"는 표적 RNA, 즉, PCSK9 유전자에 대하여 "센스" 및 "안티센스" 배향을 갖는 것으로 언급되는 2개의 역평행이며, 실질적으로 상보적인 핵산 가닥을 포함하는 듀플렉스 구조를 갖는 리보핵산 분자의 복합체를 말한다. 본 발명의 일부 구현예에서, 이중-가닥 RNA(dsRNA)는 본원에서 RNA 간섭 또는 RNAi로 지칭되는 전사후 유전자-침묵화 메커니즘을 통하여 표적 RNA, 예를 들어, mRNA의 분해를 촉발시킨다.

[0126] 일반적으로, dsRNA 분자의 각 가닥의 뉴클레오티드의 대부분은 리보뉴클레오티드이나, 본원에 상세히 기술된 바와 같이, 각각의 또는 둘 모두의 가닥은 또한 하나 이상의 비-리보뉴클레오티드, 예를 들어, 데옥시리보뉴클레오티드 및/또는 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에 사용된 바와 같이, "RNAi 작용제"는 화학적 변형을 갖는 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있으며; RNAi 작용제는 다수의 뉴클레오티드에서 실질적인 변형을 포함할 수 있다. 이러한 변형은 본원에 개시되거나 또는 해당 분야에 공지된 모든 유형의 변형을 포함할 수 있다. siRNA 형 분자에 사용되는 바와 같은 임의의 이러한 변형은 본 명세서 및 청구범위의 목적을 위한 "RNAi 작용제"에 포함된다.

[0127] 듀플렉스 영역은 RISC 경로를 통하여 요망되는 표적 RNA의 특이적 분해를 허용하는 임의의 길이의 것일 수 있으며, 약 9 내지 36개 염기쌍 길이의 범위, 예를 들어, 약 15 내지 30개 염기쌍 길이, 예를 들어, 약 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36개 염기쌍 길이, 예를 들어, 약 15 내지 30개, 15 내지 29개, 15 내지 28개, 15 내지 27개, 15 내지 26개, 15 내지 25개, 15 내지 24개, 15 내지 23개, 15 내지 22개, 15 내지 21개, 15 내지 20개, 15 내지 19개, 15 내지 18개, 15 내지 17개, 18 내지 30개, 18 내지 29개, 18 내지 28개, 18 내지 27개, 18 내지 26개, 18 내지 25개,

18 내지 24개, 18 내지 23개, 18 내지 22개, 18 내지 21개, 18 내지 20개, 19 내지 30개, 19 내지 29개, 19 내지 28개, 19 내지 27개, 19 내지 26개, 19 내지 25개, 19 내지 24개, 19 내지 23개, 19 내지 22개, 19 내지 21개, 19 내지 20개, 20 내지 30개, 20 내지 29개, 20 내지 28개, 20 내지 27개, 20 내지 26개, 20 내지 25개, 20 내지 24개, 20 내지 23개, 20 내지 22개, 20 내지 21개, 21 내지 30개, 21 내지 29개, 21 내지 28개, 21 내지 27개, 21 내지 26개, 21 내지 25개, 21 내지 24개, 21 내지 23개 또는 21 내지 22개 염기쌍 길이일 수 있다. 상기 언급된 범위 및 길이의 중간의 범위 및 길이도 또한 본 발명의 일부인 것으로 여겨진다.

[0128] 듀플렉스 구조를 형성하는 2개의 가닥은 하나의 더 큰 RNA 분자의 상이한 부분일 수 있거나, 그들은 개별 RNA 분자일 수 있다. 2개의 가닥이 하나의 더 큰 분자의 일부이고 이에 따라 한 가닥의 3'-말단과 각 다른 가닥의 5'-말단 간의 뉴클레오타이드의 비단절(uninterrupted) 사슬에 의해 결합되어 듀플렉스 구조를 형성하는 경우, 연결 RNA 사슬은 "헤어핀 루프"로 지칭된다. 헤어핀 루프는 쌍을 형성하지 않은 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 헤어핀 루프는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 20개, 적어도 23개 이상의 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 헤어핀 루프는 10개 이하의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, 헤어핀 루프는 8개 이하의 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, 헤어핀 루프는 4 내지 10개의 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, 헤어핀 루프는 4 내지 8개의 뉴클레오타이드일 수 있다.

[0129] dsRNA의 2개의 실질적으로 상보적인 가닥이 개별 RNA 분자에 포함되는 경우, 그들 분자는 공유 결합될 필요는 없지만, 공유 결합될 수 있다. 두 가닥이 한 가닥의 3'-말단과 각각의 다른 가닥의 5'-말단 간의 뉴클레오타이드의 비단절 사슬 이외의 수단에 의해 공유 결합되어, 듀플렉스 구조를 형성하는 경우, 연결 구조는 "링커"로 지칭된다. RNA 가닥은 동일하거나 상이한 수의 뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 최대 염기쌍 개수는 dsRNA의 가장 짧은 가닥 내 뉴클레오타이드에서 듀플렉스에 존재하는 임의의 오버행을 제한 개수이다. RNAi는 듀플렉스 구조에 더하여, 하나 이상의 뉴클레오타이드 오버행을 포함할 수 있다. RNAi 작용제의 일 구현예에서, 적어도 하나의 가닥은 적어도 1개의 뉴클레오타이드의 3' 오버행을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 가닥은 적어도 2개의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 뉴클레오타이드의 3' 오버행을 포함한다. 다른 구현예에서, RNAi 작용제의 적어도 하나의 가닥은 적어도 1개의 뉴클레오타이드의 5' 오버행을 포함한다. 특정 구현예에서, 적어도 하나의 가닥은 적어도 2개의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 뉴클레오타이드의 5' 오버행을 포함한다. 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제의 하나의 가닥의 3' 및 5' 말단 둘 모두는 적어도 1개의 뉴클레오타이드의 오버행을 포함한다.

[0130] 일 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는 dsRNA 작용제이며, 이의 각 가닥은 표적 RNA 서열, 즉, PCSK9 표적 mRNA 서열과 상호작용하는 19 내지 23개 뉴클레오타이드를 포함한다. 이론에 구속되지 않으면서, 세포 내로 도입된 긴 이중 가닥 RNA는 다이서로 공지된 III형 엔도뉴클레아제에 의해 siRNA로 분해된다(문헌[Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485]). 리보뉴클레아제-III-유사 효소인 다이서는 dsRNA를 특징적인 2개 염기 3' 오버행을 갖는 19 내지 23개 염기 쌍의 짧은 간섭 RNA로 처리한다(문헌[Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363]). 이어서, siRNA는 RNA-유도 침묵화 복합체(RISC) 내로 혼입되고, 여기서 하나 이상의 헬리카제가 siRNA 듀플렉스를 풀어 내어, 상보적 안티센스 가닥이 표적 인식을 안내하게 할 수 있다(문헌[Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309]). 적절한 표적 mRNA에 결합 시, RISC 내의 하나 이상의 엔도뉴클레아제는 표적을 절단하여 침묵화를 유도한다(문헌[Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188]).

[0131] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는 표적 RNA 서열, 예를 들어, PCSK9 표적 mRNA 서열과 상호작용하여, 표적 RNA의 절단을 유도하는 24 내지 30개 뉴클레오타이드의 dsRNA이다. 이론에 구속되지 않으면서, 세포 내로 도입된 긴 이중 가닥 RNA는 다이서로 공지된 III형 엔도뉴클레아제에 의해 siRNA로 분해된다(문헌[Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485]). 리보뉴클레아제-III-유사 효소인 다이서는 dsRNA를 특징적인 2개 염기 3' 오버행을 갖는 19 내지 23개 염기 쌍의 짧은 간섭 RNA로 처리한다(문헌[Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363]). 이어서, siRNA는 RNA-유도 침묵화 복합체(RISC) 내로 혼입되고, 여기서 하나 이상의 헬리카제가 siRNA 듀플렉스를 풀어 내어, 상보적 안티센스 가닥이 표적 인식을 안내하게 할 수 있다(문헌[Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309]). 적절한 표적 mRNA에 결합 시, RISC 내의 하나 이상의 엔도뉴클레아제는 표적을 절단하여 침묵화를 유도한다(문헌[Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188]).

[0132] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "뉴클레오타이드 오버행"은 iRNA, 예를 들어, dsRNA의 듀플렉스 구조로부터 돌출하는 쌍을 형성하지 않은 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 지칭한다. 예를 들어, dsRNA의 한 가닥의 3'-말단이 다른 가닥의 5'-말단을 넘어서서 연장되는 경우 또는 그 반대의 경우에, 뉴클레오타이드 오버행이 존재한다.

dsRNA는 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 오버행을 포함할 수 있으며; 대안적으로 오버행은 적어도 2개의 뉴클레오타이드, 적어도 3개의 뉴클레오타이드, 적어도 4개의 뉴클레오타이드, 적어도 5개 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 오버행은 데옥시뉴클레오타이드/뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드/뉴클레오타이드 유사체를 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 오버행(들)은 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 그들의 임의의 조합에 존재할 수 있다. 또한, 오버행의 뉴클레오타이드(들)는 dsRNA의 안티센스 또는 센스 가닥 중 어느 하나의 5'-말단, 3'-말단 또는 둘 모두의 말단에 존재할 수 있다.

[0133] dsRNA의 일 구현예에서, 적어도 하나의 가닥은 적어도 1개의 뉴클레오타이드의 3' 오버행을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 가닥은 적어도 2개의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 뉴클레오타이드의 3' 오버행을 포함한다. 다른 구현예에서, RNAi 작용제의 적어도 하나의 가닥은 적어도 1개의 뉴클레오타이드의 5' 오버행을 포함한다. 특정 구현예에서, 적어도 하나의 가닥은 적어도 2개의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 뉴클레오타이드의 5' 오버행을 포함한다. 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제의 하나의 가닥의 3' 및 5' 말단 둘 모두는 적어도 1개의 뉴클레오타이드의 오버행을 포함한다.

[0134] 특정 구현예에서, dsRNA의 안티센스 가닥은 3'-말단 및/또는 5'-말단에 1 내지 10개 뉴클레오타이드, 예를 들어, 0 내지 3개, 1 내지 3개, 2 내지 4개, 2 내지 5개, 4 내지 10개, 5 내지 10개, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 뉴클레오타이드의 오버행을 갖는다. 일 구현예에서, dsRNA의 센스 가닥은 3'-말단 및/또는 5'-말단에 1 내지 10개 뉴클레오타이드, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 뉴클레오타이드의 오버행을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 오버행 내의 뉴클레오타이드 중 하나 이상은 뉴클레오타이드 티오포스페이트로 대체된다.

[0135] 특정 구현예에서, 센스 가닥 또는 안티센스 가닥 또는 둘 모두 상의 오버행은 10개의 뉴클레오타이드보다 더 긴, 예를 들어, 1 내지 30개 뉴클레오타이드, 2 내지 30개 뉴클레오타이드, 10 내지 30개 뉴클레오타이드, 또는 10 내지 15개 뉴클레오타이드 길이의 연장된 길이를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 연장된 오버행은 듀플렉스의 센스 가닥 상에 존재한다. 특정 구현예에서, 연장된 오버행은 듀플렉스의 센스 가닥의 3' 말단 상에 존재한다. 특정 구현예에서, 연장된 오버행은 듀플렉스의 센스 가닥의 5' 말단 상에 존재한다. 특정 구현예에서, 연장된 오버행은 듀플렉스의 안티센스 가닥 상에 존재한다. 특정 구현예에서, 연장된 오버행은 듀플렉스의 안티센스 가닥의 3' 말단 상에 존재한다. 특정 구현예에서, 연장된 오버행은 듀플렉스의 안티센스 가닥의 5' 말단 상에 존재한다. 특정 구현예에서, 오버행 내의 뉴클레오타이드 중 하나 이상은 뉴클레오타이드 티오포스페이트로 대체된다. 특정 구현예에서, 오버행은 오버행이 생리학적 조건 하에서 안정한 헤어핀 구조를 형성할 수 있게 하는 자가-상보성 부분을 포함한다.

[0136] "블런트" 또는 "블런트 말단"은 이중 가닥 RNAi 작용제의 말단에 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오타이드가 존재하지 않음, 즉, 뉴클레오타이드 오버행이 없는 것을 의미한다. "블런트 말단" RNAi 작용제는 그의 전체 길이에 걸쳐 이중 가닥인, 즉, 분자의 어느 하나의 말단에 뉴클레오타이드 오버행이 없는 dsRNA이다. 본 발명의 RNAi 작용제는 하나의 말단에 뉴클레오타이드 오버행이 있거나(즉, 하나의 오버행 및 하나의 블런트 말단이 있는 작용제) 둘 모두의 말단에 뉴클레오타이드 오버행이 있는 RNAi 작용제를 포함한다.

[0137] 용어 "안티센스 가닥" 또는 "가이드(guide) 가닥"은 표적 서열, 예를 들어, PCSK9 mRNA에 실질적으로 상보적인 영역을 포함하는 iRNA, 예를 들어, dsRNA의 가닥을 말한다. 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "상보성 영역"은 서열, 예를 들어, 표적 서열, 예를 들어, 본원에 정의된 바와 같은 PCSK9 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 안티센스 가닥 상의 영역을 말한다. 상보성 영역이 표적 서열에 완전히 상보적이지 않은 경우, 미스매치가 분자의 내부 또는 말단 영역에 존재할 수 있다. 일반적으로, 대부분의 허용되는 미스매치는 iRNA의 말단 영역, 예를 들어, 5'- 및/또는 3'-말단의 5, 4, 3, 2 또는 1개 뉴클레오타이드 내에 존재한다. 일 구현예에서, 본 발명의 이중 가닥 RNAi 작용제는 안티센스 가닥 내에 뉴클레오타이드 미스매치를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 이중 가닥 RNAi 작용제는 센스 가닥 내에 뉴클레오타이드 미스매치를 포함한다. 일 구현예에서, 뉴클레오타이드 미스매치는 예를 들어, iRNA의 3'-말단으로부터 5, 4, 3, 2 또는 1개의 뉴클레오타이드 이내에 존재한다. 또 다른 구현예에서, 뉴클레오타이드 미스매치는 예를 들어, iRNA의 3'-말단 뉴클레오타이드 내에 존재한다.

[0138] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "센스 가닥" 또는 "패신저(passenger) 가닥"은 그 용어가 본원에 정의된 바와 같은 안티센스 가닥의 영역에 실질적으로 상보적인 영역을 포함하는 iRNA의 가닥을 말한다.

[0139] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "절단 영역"은 절단 부위에 바로 인접하여 위치한 영역을 지칭한다. 절단 부위는 절단이 발생하는 표적상의 부위이다. 일부 구현예에서, 절단 영역은 절단 부위의 어느 하나의 말단의, 그

리고 그에 바로 인접한 3개의 염기를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단 영역은 절단 부위의 어느 하나의 말단의, 그리고 그에 바로 인접한 2개의 염기를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단 부위는 구체적으로 안티센스 가닥의 뉴클레오티드 10 및 11에 의해 결합된 부위에 존재하며, 절단 영역은 뉴클레오티드 11, 12 및 13을 포함한다.

[0140] 본원에 사용되는 바와 같이, 그리고 달리 나타내지 않는 한, 용어 "상보적인"은 제2 뉴클레오티드 서열에 관하여 제1 뉴클레오티드 서열을 설명하기 위해 사용되는 경우에, 숙련자가 이해하는 바와 같이, 제1 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드가 특정 조건 하에서 제2 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드와 혼성화하여 듀플렉스 구조를 형성하는 능력을 말한다. 이러한 조건은, 예를 들어 엄격한 조건일 수 있으며, 여기서, 엄격한 조건은 다음을 포함할 수 있다: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA로 50℃ 또는 70℃에서 12 내지 16시간 이후 세척(예를 들어, 문헌["Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, *et al.* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press"] 참조). 유도체 내에서 겪을 수 있는 생리학적으로 적절한 조건과 같은 다른 조건도 적용할 수 있다. 숙련자는 혼성화된 뉴클레오티드의 궁극적인 응용에 따라 두 서열의 상보성 시험에 가장 적절한 조건 세트를 결정할 수 있을 것이다.

[0141] iRNA 내의, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 dsRNA 내의 상보성 서열은 하나의 또는 둘 모두의 뉴클레오티드 서열의 전장에 걸쳐 제1 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드와 제2 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 염기쌍 형성을 포함한다. 이러한 서열은 본원에서 서로에 대해 "완전히 상보적인" 것으로 지칭될 수 있다. 그러나, 제1 서열이 본원에서 제2 서열에 관하여 "실질적으로 상보적인" 것으로 지칭되는 경우, 두 서열은 완전히 상보적일 수도 있고, 또는 그들은 최대 30개의 염기쌍의 듀플렉스에 대하여, 혼성화 시에 1개 이상의, 그러나 일반적으로는 5, 4, 3 또는 2개 이하의 미스매치 염기쌍을 형성하면서, 그들의 궁극적 응용에 가장 적절한 조건 하에서 혼성화하는 능력, 예를 들어, RISC 복합체를 통한 유전자 발현의 억제를 보유할 수 있다. 그러나, 2개의 올리고뉴클레오티드가 혼성화 시에 1개 이상의 단일 가닥 오버행을 형성하도록 설계되는 경우, 이러한 오버행은 상보성 결정에 관해 미스매치로 간주되어서는 안된다. 예를 들어, 21개 뉴클레오티드 길이인 하나의 올리고뉴클레오티드 및 23개 뉴클레오티드 길이인 또 다른 올리고뉴클레오티드를 포함하는 dsRNA에서, 더 긴 올리고뉴클레오티드가 더 짧은 올리고뉴클레오티드에 대해 완전히 상보적인 21개 뉴클레오티드 서열을 포함하는 경우, 본원에 기재된 목적을 위해 여전히 "완전히 상보적인" 것으로 지칭될 수 있다.

[0142] 본원에 사용되는 "상보적인" 서열은 또한 그들의 혼성화 능력에 대한 상기 요건이 충족되는 한, 비-왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍 및/또는 비천연 및 변형 뉴클레오티드로부터 형성되는 염기쌍을 포함하거나 또는 전적으로 이로 형성될 수 있다. 이러한 비-왓슨-크릭 염기쌍에는 비제한적으로 G:U 위블 또는 후그스타인(Hoogsteen) 염기쌍 형성이 포함된다.

[0143] 본원에서 용어 "상보적인", "완전히 상보적인" 및 "실질적으로 상보적인"은 그들이 사용되는 문맥에서 이해되는 바와 같이, dsRNA의 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이, 또는 iRNA 작용제의 안티센스 가닥과 표적 서열 사이의 염기 매칭에 대해 사용할 수 있다.

[0144] 본원에서 사용되는 바와 같이, 메신저 RNA(mRNA)의 "적어도 일부에 실질적으로 상보적인" 폴리뉴클레오티드는 관심 mRNA(예를 들어, PCSK9를 인코딩하는 mRNA)의 인접 부분에 실질적으로 상보적인 폴리뉴클레오티드를 말한다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 서열이 PCSK9를 인코딩하는 mRNA의 비-단속 부분에 실질적으로 상보적이라면, PCSK9 mRNA의 적어도 일부에 상보적이다.

[0145] 일반적으로, 각 가닥의 대다수의 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드이나, 본원에 상세히 기재되는 바와 같이, 각각의 또는 둘 모두의 가닥은 또한 하나 이상의 비-리보뉴클레오티드, 예를 들어, 데옥시리보뉴클레오티드 및/또는 변형 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, "iRNA"는 화학적 변형이 있는 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 본원에 개시되거나 해당 분야에 알려져 있는 모든 유형의 변형을 포함할 수 있다. iRNA 분자에 사용되는 바와 같은 임의의 이러한 변형은 이러한 설명 및 청구범위의 목적을 위해 "iRNA"에 포함된다.

[0146] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물에 사용하기 위한 작용제는 안티센스 억제 메커니즘을 통해 표적 mRNA를 억제하는 단일-가닥 안티센스 RNA 분자이다. 단일-가닥 안티센스 RNA 분자는 표적 mRNA 내의 서열에 상보적이다. 단일-가닥 안티센스 올리고뉴클레오티드는 mRNA와 염기쌍을 형성함으로써, 그리고 번역 기구를 물리적으로 방해함으로써 화학량론적 방식으로 번역을 억제할 수 있으며, 문헌[Dias, N. *et al.*, (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355]을 참조한다. 단일-가닥 안티센스 RNA 분자는 약 15 내지 약 30개 뉴클레오티드 길이일

수 있으며, 표적 서열에 상보적인 서열을 갖는다. 예를 들어, 단일-가닥 안티센스 RNA 분자는 본원에 기재된 안티센스 서열 중 임의의 것 유래의 적어도 약 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 인접 뉴클레오타이드인 서열을 포함할 수 있다.

II. 본 발명의 방법

본 발명은 대상체에서의 전구단백질 전환효소 서브틸리신 켄신 9(PCSK9) 유전자의 발현의 억제 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 PCSK9 유전자 발현을 하향 조절함으로써 조절될 수 있는 질병 및 질환을 치료하거나 예방하기 위한 치료적 및 예방적 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 조성물을 사용하여, 지질혈증, 예를 들어, 고지혈증 및 다른 형태의 지질 불균형, 예를 들어, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증 및 이들 장애와 관련된 병리학적 질환, 예를 들어, 심장 및 순환계 질병을 치료할 수 있다. PCSK9 유전자 발현을 하향 조절함으로써 조절될 수 있는 기타 질병 및 질환은 니만-픽(Niemann-Pick) 질병, 테이-삭스(Tay-Sachs) 질병, 리소좀산 리파제 결핍 및 고쉐(Gaucher) 질병을 포함하나 이들에 한정되지 않는 리소좀 축적병을 포함한다. 상기 방법은 치료적 유효량 또는 예방적 유효량의 본 발명의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 유효량의 PCSK9 iRNA 작용제를 이형접합 LDLR 유전자형을 갖는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

PCSK9가 LDL 수용체의 수준을 조절하고, 이는 이어서 콜레스테롤-풍부 LDL 입자를 혈장으로부터 제거하기 때문에, PCSK9 유전자 발현의 감소의 효과는 바람직하게는 혈 중, 더욱 특별히는 포유류의 혈청 중 LDLc(저밀도 지질단백질 콜레스테롤) 수준의 감소를 초래한다. 일부 구현예에서, LDLc 수준은 처리전 수준에 비하여 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 감소된다. 따라서, 본 발명은 또한, 대상체의 혈청 중 저밀도 콜레스테롤(LDLc)의 수준의 저하 방법을 제공한다.

본 발명의 특정 구현예에서, 이중-가닥 RNAi 작용제는 대상체에게 고정 용량으로서 투여된다. "고정 용량"(예를 들어, mg의 용량)은 하나의 용량의 iRNA 작용제가 임의의 특정 대상체-관련 인자, 예를 들어, 체중과 관련 없이, 모든 대상체를 위해 사용되는 것을 의미한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 iRNA 작용제는 체중-기초의 용량으로서 대상체에게 투여된다. "체중-기초의 용량"(예를 들어, mg/kg의 용량)은 대상체의 체중에 따라 변환 iRNA 작용제의 용량이다.

특정 구현예에서, RNAi 작용제는 약 100 mg 내지 약 700 mg, 약 150 mg 내지 약 700 mg, 약 200 mg 내지 약 700 mg, 약 250 mg 내지 약 700 mg, 약 300 mg 내지 약 700 mg, 약 350 mg 내지 약 700 mg, 약 400 mg 내지 약 700 mg, 약 450 mg 내지 약 700 mg, 약 500 mg 내지 약 700 mg, 약 550 mg 내지 약 700 mg, 약 600 mg 내지 약 700 mg, 약 650 mg 내지 약 700 mg, 약 100 mg 내지 약 650 mg, 약 150 mg 내지 약 650 mg, 약 200 mg 내지 약 650 mg, 약 250 mg 내지 약 650 mg, 약 300 mg 내지 약 650 mg, 약 350 mg 내지 약 650 mg, 약 400 mg 내지 약 650 mg, 약 450 mg 내지 약 650 mg, 약 500 mg 내지 약 650 mg, 약 550 mg 내지 약 650 mg, 약 600 mg 내지 약 650 mg, 약 100 mg 내지 약 600 mg, 약 150 mg 내지 약 600 mg, 약 200 mg 내지 약 600 mg, 약 250 mg 내지 약 600 mg, 약 300 mg 내지 약 600 mg, 약 350 mg 내지 약 600 mg, 약 400 mg 내지 약 600 mg, 약 450 mg 내지 약 600 mg, 약 500 mg 내지 약 600 mg, 약 550 mg 내지 약 600 mg, 약 100 mg 내지 약 550 mg, 약 150 mg 내지 약 550 mg, 약 200 mg 내지 약 550 mg, 약 250 mg 내지 약 550 mg, 약 300 mg 내지 약 550 mg, 약 350 mg 내지 약 550 mg, 약 400 mg 내지 약 550 mg, 약 450 mg 내지 약 550 mg, 약 500 mg 내지 약 550 mg, 약 100 mg 내지 약 500 mg, 약 150 mg 내지 약 500 mg, 약 200 mg 내지 약 500 mg, 약 250 mg 내지 약 500 mg, 약 300 mg 내지 약 500 mg, 약 350 mg 내지 약 500 mg, 약 400 mg 내지 약 500 mg 또는 약 450 mg 내지 약 500 mg의 고정 용량, 예를 들어, 약 100 mg, 약 125 mg, 약 150 mg, 약 175 mg, 200 mg, 약 225 mg, 약 250 mg, 약 275 mg, 약 300 mg, 약 325 mg, 약 350 mg, 약 375 mg, 약 400 mg, 약 425 mg, 약 450 mg, 약 475 mg, 약 500 mg, 약 525 mg, 약 550 mg, 약 575 mg, 약 600 mg, 약 625 mg, 약 650 mg, 약 675 mg 또는 약 700 mg의 고정 용량으로서 대상체에게 투여된다. 상기 언급된 값의 중간의 값 및 범위도 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도된다.

투여는 예를 들어, 정기적으로 반복될 수 있다. 예를 들어, 고정 용량은 6개월 또는 1년 또는 그 이상의 기간, 즉, 만성 투여 동안 1주에 1회, 2주마다 1회, 1개월에 1회, 분기에 1회 또는 연 2회의 간격으로 대상체에게 투여될 수 있다.

일 구현예에서, 대상체에게 약 25 mg 내지 약 50 mg의 고정 용량이 1주에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 대상체에게 약 50 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량이 2주마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 대상체에게 약 100 mg 내지 약 200 mg의 고정 용량이 1개월에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 대상체에게 약 300 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량이 분기에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 대상체에게 약 300 mg 내지 약 600 mg의

고정 용량이 연 2회(즉, 1년에 2회) 투여된다.

- [0154] 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 PCSK9 유전자의 발현의 억제 방법을 제공한다. 상기 방법은 본 발명의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제, 예를 들어, dsRNA(예를 들어, 본 발명의 dsRNA를 포함하는 약제학적 조성물)를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 총 약 200 mg 내지 약 600 mg의 이중-가닥 RNAi 작용제는 분기마다 또는 연 2회 대상체에게 투여되며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.
- [0155] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 저밀도 지질단백질(LDLc)의 수준의 감소 방법을 제공한다. 상기 방법은 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 대상체에서 LDLc의 수준을 감소시키는 단계를 포함하며, 총 약 200 mg 내지 약 600 mg의 이중-가닥 RNAi 작용제는 분기마다 또는 연 2회 대상체에게 투여되며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.
- [0156] 또 다른 양태에서, 본 발명은 PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애, 예를 들어, 고지혈증, 예를 들어, 고콜레스테롤혈증을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 본 발명의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제, 예를 들어, dsRNA(예를 들어, 본 발명의 dsRNA를 포함하는 약제학적 조성물)를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 총 약 200 mg 내지 약 600 mg의 이중-가닥 RNAi 작용제는 분기마다 또는 연 2회 대상체에게 투여되며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.
- [0157] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고지혈증, 예를 들어, 고콜레스테롤혈증을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 본 발명의 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제, 예를 들어, dsRNA(예를 들어, 본 발명의 dsRNA를 포함하는 약제학적 조성물)를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 총 약 200 mg 내지 약 600 mg의 이중-가닥 RNAi 작용제는 분기마다 또는 연 2회 대상체에게 투여되며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.
- [0158] 상기 나타난 바와 같이, 대상체로의 RNAi 작용제의 투여는 정기적으로, 예를 들어, 1주에 1회, 2주마다 1회, 1개월에 1회, 분기에 1회 또는 연 2회의 간격으로 반복될 수 있다.
- [0159] 따라서, 일부 구현예에서, RNAi 작용제는 가까운 간격의 "로딩기"의 투여를 포함하며, RNAi 작용제가 더 긴 간격으로 투여되는 "유지기"로 이어질 수 있는 투여 섭생법으로 투여된다. 예를 들어, 1개월 동안 주마다 또는 격주의 투여 후에, 투여는 6개월 또는 1년 이상의 기간, 즉, 만성 투여 동안 개월마다 1회 반복될 수 있다.
- [0160] 일 구현예에서, 로딩기는 제1 주 동안 RNAi 작용제의 단일의 투여를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 로딩기는 처음 2주 동안 RNAi 작용제의 단일의 투여를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 로딩기는 제1 개월 동안 RNAi 작용제의 단일의 투여를 포함한다.
- [0161] 특정 구현예에서, RNAi 작용제는 로딩기 동안 약 100 mg 내지 약 700 mg, 약 150 mg 내지 약 700 mg, 약 200 mg 내지 약 700 mg, 약 250 mg 내지 약 700 mg, 약 300 mg 내지 약 700 mg, 약 350 mg 내지 약 700 mg, 약 400 mg 내지 약 700 mg, 약 450 mg 내지 약 700 mg, 약 500 mg 내지 약 700 mg, 약 550 mg 내지 약 700 mg, 약 600 mg 내지 약 700 mg, 약 650 mg 내지 약 700 mg, 약 100 mg 내지 약 650 mg, 약 150 mg 내지 약 650 mg, 약 200 mg 내지 약 650 mg, 약 250 mg 내지 약 650 mg, 약 300 mg 내지 약 650 mg, 약 350 mg 내지 약 650 mg, 약 400 mg 내지 약 650 mg, 약 450 mg 내지 약 650 mg, 약 500 mg 내지 약 650 mg, 약 550 mg 내지 약 650 mg, 약 600 mg 내지 약 650 mg, 약 100 mg 내지 약 600 mg, 약 150 mg 내지 약 600 mg, 약 200 mg 내지 약 600 mg, 약 250 mg 내지 약 600 mg, 약 300 mg 내지 약 600 mg, 약 350 mg 내지 약 600 mg, 약 400 mg 내지 약 600 mg, 약 450 mg 내지 약 600 mg, 약 500 mg 내지 약 600 mg, 약 550 mg 내지 약 600 mg, 약 100 mg 내지 약 550 mg, 약 150 mg 내지 약 550 mg, 약 200 mg 내지 약 550 mg, 약 250 mg 내지 약 550 mg, 약 300 mg 내지 약 550 mg, 약 350 mg 내지 약 550 mg, 약 400 mg 내지 약 550 mg, 약 450 mg 내지 약 550 mg, 약 500 mg 내지 약 550 mg, 약 100 mg 내지 약 500 mg, 약 150 mg 내지 약 500 mg, 약 200 mg 내지 약 500 mg, 약 250 mg 내지 약 500 mg, 약 300 mg 내지 약

500 mg, 약 350 mg 내지 약 500 mg, 약 400 mg 내지 약 500 mg 또는 약 450 mg 내지 약 500 mg의 고정 용량, 예를 들어, 약 100 mg, 약 125 mg, 약 150 mg, 약 175 mg, 200 mg, 약 225 mg, 약 250 mg, 약 275 mg, 약 300 mg, 약 325 mg, 약 350 mg, 약 375 mg, 약 400 mg, 약 425 mg, 약 450 mg, 약 475 mg, 약 500 mg, 약 525 mg, 약 550 mg, 약 575 mg, 약 600 mg, 약 625 mg, 약 650 mg, 약 675 mg 또는 약 700 mg의 고정 용량으로서 대상체에게 투여된다. 상기 언급된 값의 중간의 값 및 범위도 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도된다.

[0162] 일 구현예에서, 유지기는 1개월에 1회, 2개월마다 1회, 3개월마다 1회, 4개월마다 1회, 5개월마다 1회 또는 6개월마다 1회의 대상체로의 소정의 용량의 RNAi 작용제의 투여를 포함한다. 특정 일 구현예에서, 유지 용량은 1개월에 1회 대상체에게 투여된다.

[0163] 유지 용량 또는 용량들은 초기 용량과 동일하거나 초기 용량보다 더 낮을 수 있으며, 예를 들어, 초기 용량의 절반일 수 있다. 예를 들어, 유지 용량은 개월마다 대상체에게 투여되는 약 25 mg 내지 약 100 mg, 예를 들어, 약 25 mg 내지 약 75 mg, 약 25 mg 내지 약 50 mg 또는 약 50 mg 내지 약 75 mg, 예를 들어, 약 25 mg, 약 30 mg, 약 35 mg, 약 40 mg, 약 45 mg, 약 50 mg, 약 55 mg, 약 60 mg, 약 65 mg, 약 70 mg, 약 75 mg, 약 80 mg, 약 85 mg, 약 90 mg, 약 95 mg 또는 약 100 mg일 수 있다. 상기 언급된 값의 중간의 값 및 범위도 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도된다.

[0164] 이들 일정 중 임의의 것은 선택적으로 1회 이상의 반복으로 반복될 수 있다. 반복 횟수는 원하는 효과의 달성, 예를 들면 PCSK9 유전자의 저해의 달성 및/또는 치료적 또는 예방적 효과의 달성, 예를 들면 혈청 콜레스테롤 수준의 감소 또는 고콜레스테롤혈증의 증상의 감소에 따라 달라질 수 있다. 처리 후에, 환자를 그의/그녀의 질환의 변화에 대하여 모니터링할 수 있다. 환자가 현재의 투여량 수준에 유의미하게 반응하지 않는 사례에서 RNAi 작용제의 투여량을 증가시키거나, 병태의 증상의 완화가 관찰된다면, 병태가 제거된다면, 또는 요망되지 않는 부작용이 관찰된다면, 용량을 감소시킬 수 있다.

[0165] 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 PCSK9 유전자의 발현의 억제 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 대상체에서 PCSK9 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 1개월에 약 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.

[0166] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 저밀도 지질단백질(LDLc)의 수준의 감소 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 대상체에서 LDLc의 수준을 감소시키는 단계를 포함하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 1개월에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.

[0167] 또 다른 양태에서, 본 발명은 PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체를 치료하는 단계를 포함하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 1개월에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.

[0168] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고지혈증을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법에서 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제를 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 고지혈증을 갖는 대상체를 치료하는 단계를 포함하며, 로딩기는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 유지기는 약 25 mg 내지 약 100 mg의 고정 용량의 RNAi 작용제를 1개월에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.

월에 1회 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이중-가닥 RNAi 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오타이드 3544 내지 3623과 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 적어도 15개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 상보성 영역을 포함한다.

[0169] 일 구현예에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 이중-가닥 리보핵산(RNAi) 작용제는 이중 가닥 영역을 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685)을 포함하며, 센스 가닥은 뉴클레오타이드 서열 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686)을 포함하며, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다.

[0170] 본원에 사용되는 바와 같이, "대상체"는 인간 또는 비-인간 동물, 바람직하게는 척추동물, 더욱 바람직하게는 포유동물을 포함한다. 대상체는 유전자전이 유기체를 포함할 수 있다. 가장 바람직하게는, 대상체는 인간, 예를 들어, PCSK9-관련 질병을 앓고 있거나, 이에 걸리기 쉬운 인간이다.

[0171] 본 발명의 방법 및 용도는 표적 PCSK9 유전자의 발현이 연장된 기간 동안, 예를 들어, 약 80일, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179 또는 약 180일 이상 동안 감소되도록 본원에 기재된 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0172] 유전자 발현의 감소를 해당 분야에 알려져 있는 임의의 방법에 의해 평가할 수 있다. 예를 들어, PCSK9의 발현의 감소는, 해당 분야의 숙련자에게 일상적인 방법, 예를 들어, 노던 블롯팅, qRT-PCR을 사용하여 PCSK9의 mRNA 발현 수준을 결정함으로써, 해당 분야의 숙련자에게 일상적인 방법, 예를 들어, 웨스턴 블롯팅, 면역학적 기법을 사용하여 PCSK9의 단백질 수준을 결정함으로써, 및/또는 PCSK9의 생물학적 활성, 예를 들어, 하나 이상의 혈청 지질 파라미터, 예를 들어, 총 콜레스테롤 수준, 고밀도 지질단백질 콜레스테롤(HDL) 수준, 비-HDL 수준, 초저밀도 지질단백질 콜레스테롤(VLDL) 수준, 트리글리세리드 수준, Lp(a) 수준 및 지질단백질 입자 크기에서의 효과를 결정함으로써 결정될 수 있다.

[0173] 본 발명의 방법 및 용도에 따른 dsRNA의 투여는 PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체에서 이러한 질병 또는 장애의 중증도, 증후, 증상 및/또는 마커의 감소를 초래할 수 있다. 이러한 맥락에서 "감소"란, 이러한 수준의 통계적으로 유의미한 감소를 의미한다. 감소는 예를 들어, 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 약 100%일 수 있다.

[0174] 질병의 치료 또는 예방의 효능은, 예를 들어, 질병 진행, 질병 관해, 증상 중증도, 혈청 지질 수준(예를 들어, LDLc 수준), 삶의 질, 치료 효과를 유지하기 위해 필요한 약제의 용량, 질병 마커 또는 치료되거나, 예방을 위해 표적화된 주어진 질병에 적절한 임의의 다른 측정 가능한 파라미터의 수준을 측정함으로써 평가될 수 있다. 이러한 파라미터 중 임의의 것 또는 파라미터의 임의의 조합을 측정함으로써 치료 또는 예방의 효능을 모니터링하는 것은 해당 분야의 숙련자의 능력 내에 있다. 예를 들어, 고지혈증의 치료 효능은, 예를 들어, LDLc 수준의 주기적인 모니터링에 의해 평가될 수 있다. 이후의 판독과 초기의 판독의 비교에 의해, 치료가 효과적인지 여부의 지표가 내과의에게 제공된다. 이러한 파라미터 중 임의의 것 또는 파라미터의 임의의 조합을 측정함으로써 치료 또는 예방의 효능을 모니터링하는 것은 해당 분야의 숙련자의 능력 내에 있다.

[0175] 치료 또는 예방 효과는 병태의 하나 이상의 파라미터에 있어서 통계적으로 유의미한 개선이 존재하거나, 달리 예상되는 증상을 악화시키거나 발생시키지 않는 것에 의해 명백해진다. 일례로, 질병의 측정 가능한 파라미터에 있어서 적어도 10%의 바람직한 변화 및 바람직하게는, 적어도 20%, 30%, 40%, 50% 이상은 효과적인 치료를 나타낼 수 있다. 주어진 iRNA 약물 또는 그러한 약물의 제형에 대한 효능은 해당 분야에 알려진 바와 같이 주어진 질병에 대하여 실험 동물 모델을 이용하여 판단될 수도 있다. 실험 동물 모델을 이용하는 경우, 치료의 효능은 마커 또는 증상의 통계적으로 유의미한 감소가 관찰되는 경우 입증된다.

[0176] 대안적으로, 효능은, 임상적으로 허용되는 질병 중증도 등급화 척도에 기초하여 진단 분야의 숙련자에 의해 결정시, 질병의 중증도의 감소에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 적절한 척도를 사용하여 측정되는 질병의 중증도의 완화를 초래하는 임의의 긍정적인 변화는 본원에 기재된 바와 같은 iRNA 또는 iRNA 제형을 사용한 적당한

치료를 나타낸다.

- [0177] 일반적으로, iRNA 작용제는 면역계를 활성화시키지 않으며, 예를 들어, 그것은 사이토카인 수준, 예를 들어, TNF-알파 또는 IFN-알파 수준을 증가시키지 않는다. 예를 들어, 검정, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 시험관내 PBMC 검정에 의해 측정되는 경우, TNF-알파 또는 IFN-알파 수준의 증가는 대조군 dsRNA, 예컨대 PCSK9를 표적화하지 않는 dsRNA로 처리한 대조군 세포의 30%, 20% 또는 10% 미만이다.
- [0178] 또 다른 구현예에서, 저밀도 지질단백질 콜레스테롤(LDLc) 수준이 소정의 최소 수준에 도달하거나 이를 증가하는 경우, 예를 들어, 70 mg/dl, 130 mg/dl, 150 mg/dl, 200 mg/dl, 300 mg/dl 또는 400 mg/dl 초과인 경우 투여가 제공될 수 있다.
- [0179] 감소된 PCSK9 유전자의 효과는 바람직하게는 포유동물의 혈 중, 더욱 특별히는 혈청 중 LDLc(저밀도 지질단백질 콜레스테롤) 수준의 감소를 초래한다. 일부 구현예에서, LDLc 수준은 전처리 수준에 비하여 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 감소된다.
- [0180] 본 발명의 방법의 일부 구현예에서, PCSK9 발현은 연장된 기간, 예를 들어, 적어도 1주, 2주, 3주 또는 4주 이상 동안 감소된다. 예를 들어, 특정 예에서, PCSK9 유전자의 발현은 본원에 기술된 iRNA 작용제의 투여에 의해 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 저해된다. 일부 구현예에서, PCSK9 유전자는 iRNA 작용제의 투여에 의해 적어도 약 60%, 70% 또는 80% 저해된다. 일부 구현예에서, PCSK9 유전자는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 투여에 의해 적어도 약 85%, 90% 또는 95% 저해된다.
- [0181] 본 발명의 RNAi 작용제는 피하, 정맥내, 근육내, 안구내, 기관지내, 흉막내, 복강내, 동맥내, 림프, 뇌척수 및 그들의 임의의 조합을 포함하나 이들에 한정되지 않는 해당 분야에 공지되어 있는 임의의 투여 방식을 사용하여 대상체에게 투여될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 작용제는 피하 투여된다.
- [0182] 일부 구현예에서, 투여는 데포 주사를 통해 이루어진다. 데포 주사는 오랜 기간에 걸쳐 일관된 방식으로 RNAi 작용제를 방출할 수 있다. 따라서, 데포 주사는 요망되는 효과, 예컨대, PCSK9의 요망되는 억제 또는 치료적 또는 예방적 효과를 얻는데 필요한 투여의 빈도를 감소시킬 수 있다. 데포 주사는 더욱 일관된 혈청 농도를 제공할 수도 있다. 데포 주사는 피하 주사 또는 근육내 주사를 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 데포 주사는 피하 주사이다.
- [0183] 일부 구현예에서, 투여는 펌프를 통해 이루어진다. 펌프는 외부 펌프 또는 외과적으로 이식된 펌프일 수 있다. 특정 구현예에서, 펌프는 피하 이식된 삼투 펌프이다. 다른 구현예에서, 펌프는 주입 펌프이다. 주입 펌프는 정맥내, 피하, 동맥 또는 경막의 주입용으로 이용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 주입 펌프는 피하 주입 펌프이다. 다른 구현예에서, 펌프는 RNAi 작용제를 간에 전달하는 외과적으로 이식된 펌프이다.
- [0184] 다른 투여 방식은 경막외, 뇌내, 뇌실내, 비강 투여, 동맥내, 심장내, 골내 주입, 척수강내 및 유리체내 및 폐를 포함한다. 투여의 방식은 국소 치료가 요망되는지 또는 전신 치료가 요망되는지의 여부에 기초하여 그리고 치료될 영역에 기초하여 선택될 수 있다. 투여의 경로 및 부위는 표적화를 향상시키기 위해 선택될 수 있다.
- [0185] iRNA는 소정의 기간에 걸쳐, 예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 약 25분 기간에 걸쳐 정맥내 주입에 의해 투여될 수 있다. 투여는 예를 들어, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월 이상 동안 정기적으로, 예를 들어, 주마다, 격주로(즉, 2주마다) 반복될 수 있다. 초기 치료 섭생법 후에, 치료제는 덜 빈번하게 투여될 수 있다. 예를 들어, 3개월 동안 주마다 또는 격주의 투여 후에, 투여는 6개월 또는 1년 이상 동안 개월마다 1회 반복될 수 있다.
- [0186] iRNA의 투여는 예를 들어, 환자의 세포, 조직, 혈액, 소변 또는 다른 구획에서 PCSK9 수준을 적어도 약 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 약 99% 이상 감소시킬 수 있다.
- [0187] 완전한 용량의 iRNA의 투여 이전에, 환자에 더 적은 용량, 예를 들어, 5% 주입을 투여하고, 유해 효과, 예를 들어, 알러지 반응에 대하여 모니터링할 수 있다. 또 다른 예에서, 원하지 않는 면역자극 효과, 예를 들어, 증가된 사이토카인(예를 들어, TNF-알파 또는 INF-알파) 수준에 대하여 환자를 모니터링할 수 있다.
- [0188] PCSK9 발현에 대한 억제 효과 때문에, 본 발명에 따른 조성물 또는 그로부터 제조되는 약제학적 조성물은 삶의

질을 향상시킬 수 있다.

- [0189] 본 발명의 iRNA는 "네이키드(naked)" 형태로 또는 "유리 iRNA"로서 투여될 수 있다. 네이키드 iRNA는 약제학적 조성물의 부제 하에 투여된다. 네이키드 iRNA는 적합한 완충 용액에 존재할 수 있다. 완충 용액은 아세트산염, 시트르산염, 프롤라민, 탄산염 또는 인산염 또는 그들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 완충 용액은 인산염 완충 식염수(PBS)이다. iRNA를 함유하는 완충 용액의 pH 및 오스몰농도는 그것이 대상체로의 투여에 적합하게 되도록 조정될 수 있다.
- [0190] 대안적으로, 본 발명의 iRNA는 약제학적 조성물, 예를 들어, dsRNA 리포좀 제형으로서 투여될 수 있다.
- [0191] 본 발명은 다른 약제 및/또는 다른 치료 방법, 예를 들어, 알려져 있는 약제 및/또는 알려져 있는 치료 방법, 예를 들어, 이들 장애를 치료하기 위해 현재 채용되는 것들과 조합하여, 예를 들어, PCSK9 발현의 감소 및/또는 억제로 이익을 얻을 대상체, 예를 들어, 고지혈증, 예를 들어, 고콜레스테롤혈증을 갖는 대상체를 치료하기 위한 iRNA 또는 그의 약제학적 조성물의 이용을 위한 방법 및 용도를 추가로 제공한다. siRNA 및 추가의 치료제는 동일한 조성물에서 조합하여 예를 들어, 비경구로 투여될 수 있거나, 추가의 치료제는 개별 조성물의 부분으로서 또는 본원에 기재된 또 다른 방법에 의해 투여될 수 있다.
- [0192] 추가의 치료제의 예는 지질 장애, 예를 들어, 고콜레스테롤혈증, 죽상경화증 또는 이상지질혈증을 치료하는 것으로 공지되어 있는 작용제를 치료하는 것으로 공지되어 있는 것들을 포함한다. 예를 들어, 본 발명에서 특화된 siRNA는 예컨대 HMG-CoA 환원효소 억제제(예컨대, 스타틴), 피브레이트, 담즙산 격리제, 니아신, 항혈소판제, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 안지오텐신 II 수용체 길항제(예컨대 로사르탄 칼륨, 예컨대 머크 앤드 컴퍼니(Merck & Co.)의 코자르(Cozaar)®), 아실CoA 콜레스테롤 아세틸트랜스퍼라아제(ACAT) 억제제, 콜레스테롤 흡수 억제제, 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질(CETP) 억제제, 미세소체 트리글리세리드 전달 단백질(MTTP) 억제제, 콜레스테롤 조절제, 담즙산 조절제, 피옥시즘 증식 활성화 수용체(PPAR) 효능제, 유전자 기반 치료법, 복합 혈관 보호제(예컨대 아테로제닉스(Atherogenics)의 AGI-1067), 당단백질 IIb/IIIa 억제제, 아스피린 또는 아스피린-유사 화합물, IBAT 억제제(예컨대 시오노기(Shionogi)의 S-8921), 스쿠알렌 합성효소 억제제 또는 단백질 화해인 단백질(MCP)-I 억제제와 함께 투여할 수 있다. HMG-CoA 환원효소 억제제의 예에는 아토르바스타틴(atorvastatin)(화이자(Pfizer)의 리피토르(Lipitor)®/타호르(Tahor)/소르티스(Sortis)/토르바스트(Torvast)/카르딜(Cardyl)), 프라바스타틴(pravastatin)(브리스톨-마이어스 스쿼프(Bristol-Myers Squibb)의 프라바콜(Pravachol), 산쿄(Sankyo)의 메발로틴(Mevalotin)/사나프라브(Sanaprab)), 심바스타틴(simvastatin)(머크(Merck)의 조코르(Zocor)®/신바코르(Sinvacor), 보링거 인겔하임(Boehringer Ingelheim)의 데난(Denan), 반유(Banyu)의 리포바스(Lipovas)), 로바스타틴(lovastatin)(머크의 메바코르(Mevacor)/메비나코르(Mevinacor), 벅살(Bexal)의 로바스타티나(Lovastatina), 세파(Cepa); 슈와츠 파마(Schwarz Pharma)의 리포스클레르(Liposcler)), 플루바스타틴(fluvastatin)(노바티스(Novartis)의 레스콜(Lescol)®/로콜(Locol)/로출(Lochol), 푸지사와(Fujisawa)의 크라노크(Cranoc), 솔베이(Solvay)의 디가릴(Digaryl)), 세리바스타틴(cerivastatin)(바이엘(Bayer)의 리포베이(Lipobay)/글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline)의 베이콜(Baycol)), 로수바스타틴(rosuvastatin)(아스트라제네카(AstraZeneca)의 크레스토르(Crestor)®) 및 피티바스타틴(pitavastatin)(이타바스타틴(itavastatin)/리시바스타틴(risivastatin))(닛산 케미컬(Nissan Chemical), 코와 코교(Kowa Kogyo), 산쿄 및 노바티스(Novartis))이 포함된다. 피브레이트의 예에는 예컨대 베자피브레이트(bezafibrate)(예컨대, 로슈(Roche)의 베피잘(Befizal)®/세두르(Cedur)®/베잘립(Bezalip)®, 키세이(Kissei)의 베자톨(Bezatol)), 클로피브레이트(clofibrate)(예컨대, 와이어쓰(Wyeth)의 아트로미드(Atromid-S®), 페노피브레이트(fenofibrate)(예컨대, 푸르니에(Fournier)의 리피딜(Lipidil)/리판틸(Lipantil), 애보트(Abbott)의 트리코르(Tricor)®, 다케다(Takeda)의 리판틸(Lipantil), 제네릭스 제품들), 겐피프로질(gemfibrozil)(예컨대, 화이자의 로피드(Lopid)/리푸르(Lipur)) 및 시프로피브레이트(사노피-신텔라보(Sanofi-Synthelabo)의 모달림(Modalim)®)이 포함된다. 담즙산 격리제의 예에는 예컨대 콜레스티라민(cholestyramine)(브리스톨-마이어스 스쿼프의 퀘스트란(Questran)® 및 퀘스트란 라이트(Questran Light)™), 콜레스티폴(colestipol)(예컨대, 파마시아(Pharmacia)의 콜레스티드(Colestid)), 및 콜레세벨람(colesevelam)(젠자임(Genzyme)/산쿄의 웰콜(WelChol)™)이 포함된다. 니아신 치료의 예에는 예컨대 즉시 방출형 제형, 예컨대 아벤티스(Aventis)의 니코비드(Nicobid), 업셔-스미스(Upsher-Smith)의 니아코르(Niacor), 아벤티스의 니콜라(Nicolar) 및 산와카가쿠(Sanwakagaku)의 페리시트(Perycit)가 포함된다. 니아신 서방형 제형에는 예컨대 코스 파마슈티컬(Kos Pharmaceutical)의 니아스판(Niaspan) 및 업셔-스미스(Upsher-Smith)의 시오-니아신(SIo-Niacin)이 포함된다. 항혈소판제의 예에는 예컨대 아스피린(예컨대, 바이엘의 아스피린), 클로피도그렐(clopidogrel)(사노피-신텔라보/브리스톨-마이어스 스쿼프의 플라빅스(Plavix)), 및 티클로피딘(ticlopidine)(예컨대, 사노피-신텔라보의 티클

리드(Ticlid) 및 다이치(Daiichi)의 파날딘(Panaldine))이 포함된다. PCSK9를 표적화하는 dsRNA와 병용하는데 유용한 다른 아스프린-유사 화합물에는 예컨대 아사카드(Asacard)(서방형 아스피린, 파마시아) 및 파미코그렐(Pamicogrel)(가네보(Kanebo)/안젤리니 리세르슈(Angelini Ricerche)/CEPA)이 포함된다. 안지오텐신 전환효소 억제제의 예에는 예컨대 라미프릴(ramipril)(예컨대, 아벤티스의 알타세(Altace)) 및 에날라프릴(enalapril)(예컨대, 머크 앤드 컴퍼니의 바소텍(Vasotec))이 포함된다. 아실 CoA 콜레스테롤 아세틸트랜스퍼라아제(AC AT) 억제제의 예에는 예컨대 아바시미브(avasimibe)(화이자), 에플루시미베(eflucimibe)(바이오메리외 피에르 파브레(BioMeieux Pierre Fabre)/엘리 릴리(Eli Lilly)), CS-505(산쿄 및 교토(Kyoto)), 및 SMP-797(수미토(Sumit o))이 포함된다. 콜레스테롤 흡수 억제제의 예에는 예컨대 에제티미브(ezet imibe)(머크/쉐링-플라우 파마슈티컬즈(Schering-Plough Pharmaceuticals)의 제티아(Zetia)®) 및 파마퀴시드(Pamaqueside)(화이자)가 포함된다. CETP 억제제의 예에는 예컨대 토르세트라피브(Torcetrapib)(CP-529414로도 불림, 화이자), JTT-705(재팬 타바코(Japan Tobacco)), 및 CETi-I(아반트 이뮤노테라퓨틱스(Avant Immunotherapeutics))가 포함된다. 미세소체 트리글리세리드 전달 단백질(MTTP) 억제제의 예에는 예컨대 임플리타피드(implitapide)(바이엘), R-103757(얀센(Janssen)), 및 CP-346086(화이자)이 포함된다. 다른 콜레스테롤 조절제의 예에는 예컨대 NO-1886(오츠키(Otsuka)/탭 파마슈티컬(TAP Pharmaceutical)), CI-1027(화이자), 및 WAY-135433(와이어스-에이어스트(Wyeth-Ayerst))이 포함된다.

[0193] 담즙산 조절제의 예에는 예컨대 HBS-107(히사미츠(Hisamitsu)/반유(Banyu)), Btg-511(브리티시 테크놀로지 그룹(British Technology Group)), BARI-1453(아벤티스), S-8921(시오노기), SD-5613(화이자) 및 AZD-7806(아스트라제네카)이 포함된다. 피옥시숨 증식 활성화 수용체(PPAR) 효능제의 예에는 예컨대 테사글리타자르(tesaglitazar)(AZ-242)(아스트라제네카), 네토글리타존(Netoglitazone)(MCC-555)(미츠비시(Mitsubishi)/존슨 앤드 존슨(Johnson & Johnson)), GW-409544(리간드 파마슈티컬즈(Ligand Pharmaceuticals)/글락소스미스클라인, GW-501516(리간드 파마슈티컬즈/글락소스미스클라인), LY-929(리간드 파마슈티컬즈 및 엘리 릴리), LY-465608(리간드 파마슈티컬즈 및 엘리 릴리), LY-518674(리간드 파마슈티컬즈 및 엘리 릴리), 및 MK-767(머크 및 교린(Kyorin))이 포함된다. 유전자-기반의 치료법의 예에는 예컨대 AdGWEF 121.10(젠벡(GenVec)), ApoA1(유씨비 파마(UCB Pharma)/그룹 푸르니에(Groupe Fournier)), EG-004(트리남(Trinam))(아크 테라퓨틱스(Ark Therapeutics)), 및 ATP-결합 카세트 수송체-A1(ABCA1)(씨브이 테라퓨틱스(CV Therapeutics)/인사이트(Incyte), 아벤티스, 제논(Xenon))이 포함된다. 당단백질 IIb/IIIa 억제제의 예에는 예컨대 록시피반(roxifiban)(DMP754로도 불림, 브리스톨-마이어스 스텝), 간토피반(Gantofiban)(머크 KGaA/야마노치(Yamanouchi)), 및 크로마피반(밀레니엄 파마슈티컬즈(Millennium Pharmaceuticals))이 포함된다. 스쿠알렌 합성효소 억제제의 예에는 예컨대 BMS-1884941(브리스톨-마이어스 스텝), CP-210172(화이자), CP-295697(화이자), CP-294838(화이자), 및 TAK-475(다케다)가 포함된다. MCP-I 억제제의 예에는 예컨대 RS-504393(로슈 바이오사이언스(Roche Bioscience))이 포함된다. 항죽상경화제 BO-653(추가이 파마슈티컬즈(Chugai Pharmaceuticals)), 및 니코틴산 유도체 니클린(Nyclin)(야마노치 파마슈티컬즈(Yamanouchi Pharmaceuticals))도 본 발명에서 특징으로 하는 dsRNA와 병용 투여하기 적절하다. PCSK9를 표적화하는 dsRNA와 투여하기 적합한 병용 치료의 예에는 예컨대 아드비코르(advicor)(니아신/로바스타틴, 코스 파마슈티컬즈), 암로디핀(amlodipine)/아토르바스타틴(화이자), 및 에제티미브/심바스타틴(예컨대, 비토린(Vytorin)® 10/10, 10/20, 10/40, 및 10/80 정제, 머크/쉐링-플라우 파마슈티컬즈)이 포함된다. PCSK9를 표적화하는 dsRNA와 함께 투여하기 적합한 고콜레스테롤혈증 치료용 작용제에는 예컨대 로바스타틴, 니아신 알토프레브(Altoprev)® 서방형 정제(안드렉스 랩스(Andrx Labs)), 로바스타틴 카듀엣(Caduet)® 정제(화이자), 암로디핀 베실레이트, 아토르바스타틴 칼슘 크레스토르(Crestor)® 정제(아스트라제네카), 로수바스타틴 칼슘 레스콜(Lescol)® 캡슐(노바티스), 플루바스타틴 나트륨 레스콜(Lescol)®(렐리언트(Reliant), 노바티스), 플루바스타틴 나트륨 리피토르(Lipitor)® 정제(파케-다비스(Parke-Davis)), 아토르바스타틴 칼슘 로피브라(Lofibra)® 캡슐(게이트(Gate)), 니아스판 서방형 정제(코스(Kos)), 니아신 프라바콜 정제(브리스톨-마이어스 스텝), 프라바스타틴 나트륨 트리코르(TriCor)® 정제(애보트), 페노피브레이트 비토린(Vytorin)® 10/10 정제(머크/쉐링-플라우 파마슈티컬즈), 에제티미브, 심바스타틴 웰콜(WellChol)™ 정제(산쿄), 콜레세벨람 하이드로클로라이드 제티아(Zetia)® 정제(쉐링(Schering)), 에제티미브 제티아® 정제(머크/쉐링-플라우 파마슈티컬즈), 및 에제티미브 조코르(Zocor)® 정제(머크)가 포함된다.

[0194] 일 구현예에서, iRNA 작용제는 에제티미브/심바스타틴 병용제(예컨대 비토린(Vytorin)®(머크/쉐링-플라우 파마슈티컬즈))와 함께 투여된다.

[0195] 또 다른 구현예에서, iRNA 작용제는 항-PCSK9 항체와 병용 투여된다. 본 발명의 병용 요법에 사용하기 위한 예시적인 항-PCSK9 항체는 예를 들어, 알리로쿠맙(alirocumab)(프랄루엔트(Praluent)), 에볼로쿠맙(evolocumab)

(레파타(Repatha)), 보코시주맵(bococizumab)(PF-04950615, RN316, RN-316, L1L3; 화이자, 리나트(Rinat)), 로델시주맵(lodelcizumab)(LFU720, pJG04; 노바티스), 랄판시주맵(ralpancizumab)(RN317, PF-05335810; 화이자, 리나트), RG7652(MPSK3169A, YW508.20.33b; 제넨테크(Genentech)), LY3015014(릴리(Lilly)), LPD1462(h1F11; 셰링-플라우), AX1(AX189, 1B20, 1D05; 머크 앤드 컴퍼니), ALD306(알테르(Alder)); mAb1(뵈링거) 및 Ig1-PA4(난징 노멀 유니버시티(Nanjing Normal U.))를 포함한다.

- [0196] 일 구현예에서, iRNA 작용제를 환자에게 투여한 후 추가의 치료제를 환자에게 투여한다(또는 반대로). 또 다른 구현예에서, iRNA 작용제 및 추가의 치료제를 동시에 투여한다.
- [0197] 또 다른 양태에서, 본 발명은 최종 사용자, 예컨대 돌보미 또는 대상체에게 본원에 기재된 iRNA 작용제를 투여하는 방법을 지시하는 방법을 특징으로 한다. 이 방법은 선택적으로 하나 이상의 용량의 iRNA 작용제를 최종 사용자에게 제공하는 단계, 및 최종 사용자에게 본원에 기재된 섭생법에서 iRNA 작용제를 투여하도록 지시하여, 최종 사용자에게 지시하는 단계를 포함한다.
- [0198] 일 양태에서, 본 발명은 환자의 LDL 저하, HDL 저하 없이 LDL 저하, ApoB 저하, 또는 총 콜레스테롤 저하에 대한 필요성에 근거하여 환자를 선택함으로써 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 예컨대 실질적으로 HDL 수준을 저하시키지 않으면서 환자의 LDL 수준 또는 ApoB 수준을 낮추기에 충분한 양으로 siRNA를 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0199] 유전적 소인은 표적 유전자 관련 질병, 예를 들어, 고지혈증의 발생에서 역할을 수행한다. 따라서, siRNA를 필요로 하는 환자는 가족력을 고려함으로써, 또는 예를 들어, 하나 이상의 유전자 마커 또는 변이체에 대한 스크리닝에 의해 확인할 수 있다. 고지혈증에 수반되는 유전자의 예는 예를 들어, LDL 수용체(LDLR), 아포지질단백질(ApoA1, ApoB, ApoE 등), 콜레스테릴 에스테르 전달 단백질(CETP), 지질단백질 리파제(LPL), 간의 리파제(LIPC), 내피 리파제(EL), 레시틴콜레스테릴 아실트랜스퍼라제(LCAT)가 포함되나 이들에 한정되지 않는다.
- [0200] 의사, 간호사 또는 가족 구성원과 같은 건강관리 제공자는 본 발명의 iRNA 작용제를 처방하거나 투여하기 전에 가족력을 고려할 수 있다. 또한, 시험을 수행하여, 유전형 또는 표현형을 결정할 수 있다. 예를 들어, PCSK9 dsRNA를 환자에게 투여하기 전에, DNA 시험을 환자로부터의 시료, 예를 들어, 혈액 시료에서 수행하여, PCSK9 유전형 및/또는 표현형을 확인할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 관련 유전형 및/또는 표현형, 예를 들어, LDLR 유전형을 확인하기 위한 시험을 수행한다. LDLR 유전자의 유전자 변이체의 예는 해당 분야에서, 예를 들어, 참조로 포함되는 하기의 문헌에서 찾을 수 있다: 문헌[Costanza *et al* (2005) *Am J Epidemiol.* 15;161(8):714-24]; 문헌[Yamada *et al.* (2008) *J Med Genet.* Jan;45(1):22-8, Epub 2007 Aug31]; 및 문헌[Boes *et al* (2009) *Exp. Gerontol* 44: 136-160, Epub 2008 Nov 17].
- [0201] 본 발명은 세포, 예를 들어, 대상체, 예를 들어, 인간 대상체 내의 세포에서의 전구단백질 전환효소 서브틸리신 캐신 9(PCSK9)의 발현의 억제 방법을 추가로 제공한다.
- [0202] 따라서, 본 발명은 세포에서의 PCSK9 유전자의 발현의 억제 방법을 제공한다. 상기 방법은 세포를 세포에서 PCSK9 유전자의 발현을 억제하기 위한 유효량의 RNAi 작용제, 예를 들어, 이중 가닥 RNAi 작용제와 접촉시켜, 그에 의해, 세포에서 PCSK9의 발현을 억제하는 단계를 포함한다.
- [0203] 세포와 이중 가닥 RNAi 작용제의 접촉은 시험관내 또는 생체내에서 행해질 수 있다. 생체내에서의 세포와 RNAi 작용제의 접촉은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체 내의 세포 또는 세포의 군과 RNAi 작용제의 접촉을 포함한다. 시험관내 및 생체내 접촉 방법의 병용도 또한 가능하다. 접촉은 상기 논의된 바와 같이 직접적 또는 간접적일 수 있다. 추가로, 세포의 접촉은 본원에 기재되거나 해당 분야에 알려져 있는 임의의 리간드를 포함하는 표적화 리간드를 통해 달성될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 표적화 리간드는 탄수화물 모이어티, 예를 들어, GalNAc₃ 리간드 또는 관심 부위, 예를 들어, 대상체의 간으로 RNAi 작용제를 유도하는 임의의 다른 리간드이다.
- [0204] 본원에 사용되는 용어 "억제하는"은 "감소시키는", "침묵화시키는", "하향조절하는" 및 기타 유사 용어와 교환 가능하게 이용되며, 임의의 수준의 억제를 포함한다.
- [0205] 어구 "PCSK9의 발현을 억제하는"은 임의의 PCSK9 유전자(예컨대, 마우스 PCSK9 유전자, 랫트 PCSK9 유전자, 원숭이 PCSK9 유전자 또는 인간 PCSK9 유전자) 뿐만 아니라 PCSK9 유전자의 변이체 또는 돌연변이체의 발현의 억제를 나타내는 의도이다. 따라서, PCSK9 유전자는 유전자 조작된 세포, 세포의 군 또는 유기체의 맥락에서 야생형 PCSK9 유전자, 돌연변이 PCSK9 유전자 또는 유전자전이 PCSK9 유전자일 수 있다.
- [0206] "PCSK9 유전자의 발현을 억제하는"은 PCSK9 유전자의 임의의 수준의 억제, 예를 들어, PCSK9 유전자의 발현의

적어도 부분적인 저해를 포함한다. PCSK9 유전자의 발현은 PCSK9 유전자 발현과 관련된 임의의 변수의 수준 또는 수준의 변화, 예를 들어, PCSK9 mRNA 수준, PCSK9 단백질 수준 또는 지질 수준에 기초하여 평가될 수 있다. 이러한 수준은 예를 들어, 대상체로부터 유래되는 시료를 포함하는 개별 세포 또는 세포의 군에서 평가될 수 있다.

[0207] 억제제는 대조군 수준과 비교하여 PCSK9 발현과 관련된 하나 이상의 변수의 절대 또는 상대 수준의 감소에 의하여 평가될 수 있다. 대조군 수준은 해당 분야에 활용되는 임의의 유형의 대조군 수준, 예컨대, 투여전(pre-dose) 기저 수준, 또는 (예컨대, 완충제 유일 대조군 또는 비활성 작용제 대조군과 같은) 대조군으로 처리되거나 미처리된 유사한 대상체, 세포 또는 시료로부터 결정된 수준일 수 있다.

[0208] 본 발명의 방법의 일부 구현예에서, PCSK9 유전자의 발현은 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99% 억제된다.

[0209] PCSK9 유전자의 발현의 억제는 PCSK9 유전자가 전사되고, (예를 들어, 세포 또는 세포들을 본 발명의 RNAi 작용제와 접촉시키거나, 본 발명의 RNAi 작용제를 상기 세포가 존재하거나 존재하였던 대상체에게 투여함으로써) 제1 세포 또는 세포의 군과 실질적으로 동일하지만, 그렇게 처리되지 않은 제2 세포 또는 세포의 군(대조군 세포(들))과 비교하여, PCSK9 유전자의 발현이 억제되도록 처리된 제1 세포 또는 세포의 군(이러한 세포는 예를 들어, 대상체로부터 유래된 시료에 존재할 수 있음)에 의해 발현되는 mRNA의 양의 감소에 의해 나타날 수 있다. 바람직한 구현예에서, 억제제는 처리된 세포에서의 mRNA의 수준을 하기의 식을 사용하여 대조군 세포에서의 mRNA의 수준의 백분율로서 표현함으로써 평가된다:

$$\frac{(\text{대조군 세포에서의 mRNA}) - (\text{처리된 세포에서의 mRNA})}{(\text{대조군 세포에서의 mRNA})} \bullet 100\%$$

[0210] 대안적으로, PCSK9 유전자의 발현의 억제는 기능적으로 PCSK9 유전자 발현, 예를 들어, PCSK9 단백질 발현과 관련된 파라미터, 예를 들어, 지질 수준, 콜레스테롤 수준, 예를 들어, LDLc 수준의 감소의 면에서 평가될 수 있다. PCSK9 유전자 침묵화는 구성적으로 또는 계능 조작에 의해, 그리고 해당 분야에 공지되어 있는 임의의 검정에 의해 PCSK9를 발현하는 임의의 세포에서 결정될 수 있다. 간은 주요 PCSK9 발현 부위이다. 기타 유의미한 발현 부위는 췌장, 신장 및 장을 포함한다.

[0212] PCSK9 단백질의 발현의 억제는 세포 또는 세포의 군에 의해 발현되는 PCSK9 단백질의 수준(예를 들어, 대상체로부터 유래된 시료에 의해 발현되는 단백질의 수준)의 감소에 의해 나타날 수 있다. mRNA 저해의 평가에 대하여 상기 설명된 바와 같이, 처리된 세포 또는 세포의 군에서의 단백질 발현 수준의 억제는 대조군 세포 또는 세포의 군에서의 단백질의 수준의 백분율로서 유사하게 표현될 수 있다.

[0213] PCSK9 유전자의 발현의 억제를 평가하기 위해 사용될 수 있는 대조군 세포 또는 세포의 군은 본 발명의 RNAi 작용제와 아직 접촉된 적이 없는 세포 또는 세포의 군을 포함한다. 예를 들어, 대조군 세포 또는 세포의 군은 대상체를 RNAi 작용제로 처리하기 전에 개별대상체(예를 들어, 인간 또는 동물 대상체)로부터 유래될 수 있다.

[0214] 세포 또는 세포의 군에 의해 발현되는 PCSK9 mRNA의 수준은 mRNA 발현을 평가하기 위한 해당 분야에 공지되어 있는 임의의 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 일 구현예에서, 시료에서의 PCSK9의 발현 수준은 전사된 폴리뉴클레오티드 또는 그의 부분, 예를 들어, PCSK9 유전자의 mRNA를 검출함으로써 결정된다. RNA는 예를 들어, 산 페놀/구아니딘 이소티오시아네이트 추출(RNAzol B; 바이오제네시스(Biogenesis)), RNeasy RNA 제조 키트(퀵아젠(Qiagen) 또는 PAXgene(프레아날리틱스(PreAnalytix), 스위스)을 사용하는 것을 포함하는 RNA 추출 기법을 사용하여 세포로부터 추출될 수 있다. 리보핵산 혼성화를 사용하는 전형적인 검정 형식은 핵 런-온 검정(nuclear run-on assay), RT-PCR, RNase 보호 검정(문헌[Melton *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 12:7035]), 노던 블롯팅(Northern blotting), 동소 혼성화(*in situ* hybridization) 및 마이크로어레이 분석을 포함한다.

[0215] 일 구현예에서, PCSK9의 발현 수준은 핵산 프로브를 사용하여 결정된다. 본원에 사용되는 용어 "프로브"는 특정 PCSK9에 선택적으로 결합할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 프로브는 해당 분야의 숙련자에 의해 합성되거나, 적절한 생물학적 제제로부터 유래될 수 있다. 프로브는 특이적으로 표지되도록 설계될 수 있다. 프로브로 사용될 수 있는 분자의 예에는 RNA, DNA, 단백질, 항체 및 유기 분자가 포함되나, 이들에 한정되지 않는다.

- [0216] 단리된 mRNA는 서던 또는 노던 분석, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 분석 및 프로브 검정을 포함하나 이들에 한정되지 않는 혼성화 또는 증폭 검정에서 사용될 수 있다. mRNA 수준의 결정을 위한 하나의 방법은 단리된 mRNA를 PCSK9 mRNA에 혼성화할 수 있는 핵산 분자(프로브)와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, mRNA는 예를 들어, 아가로스 겔 상에 단리된 mRNA를 전개시키고, mRNA를 겔로부터 막, 예를 들면 니트로셀룰로스로 옮김으로써, 고체 표면 상에 고정되고, 프로브와 접촉한다. 대안적 구현예에서, 프로브(들)는 고체 표면 상에 고정되고, 예를 들어, 아피메트릭스(Affymetrix) 유전자 칩 어레이에서 mRNA가 프로브(들)와 접촉된다. 숙련자는 PCSK9 mRNA의 수준을 결정하는데 사용하기 위한 공지된 mRNA 검출 방법을 쉽게 조정할 수 있다.
- [0217] 시료 내의 PCSK9의 발현 수준을 결정하기 위한 대안적 방법은 예를 들면, RT-PCR(Mullis의 미국 특허 제 4,683,202호(1987)에 개시된 실험 구현예), 리가아제 연쇄 반응(문헌[Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193]), 자립 서열 복제(문헌[Guatelli et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878]), 전사 증폭 시스템(문헌[Kwoh et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177]), Q-베타 복제 효소(문헌[Lizardi et al. (1988) *Bio/Technology* 6:1197]), 회전환 복제(Lizardi 등, 미국 특허 제5,854,033호), 또는 임의의 다른 핵산 증폭 방법 이후, 해당 분야의 숙련자에게 잘 알려진 기법을 사용한 증폭된 분자의 검출에 의한, 예를 들어, 시료 내 mRNA의 핵산 증폭 및/또는 (cDNA를 제조하기 위한) 역전사효소 과정을 포함한다. 이러한 분자가 매우 적은 수로 존재한다면, 이들 검출 계획들이 핵산 분자를 검출하는데 특히 유용하다. 본 발명의 특정 양태에서, PCSK9의 발현 수준은 정량적 형광원 RT-PCR(즉, TaqMan™ 시스템)에 의해 결정된다.
- [0218] PCSK9 mRNA의 발현 수준은 막 블롯(예를 들면, 노던, 서던, 도트 등과 같은 혼성화 분석에 사용됨) 또는 마이크로웰, 시료 튜브, 겔, 비드 또는 섬유(또는 결합 핵산을 포함하는 임의의 고체 지지체)를 사용하여 모니터링될 수 있다. 미국 특허 제5,770,722호, 제5,874,219호, 제5,744,305호, 제5,677,195호 및 제5,445,934호를 참조하며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 또한, PCSK9 발현 수준의 결정은 용액 중 핵산 프로브를 사용하는 것을 포함할 수 있다.
- [0219] 바람직한 구현예에서, mRNA 발현 수준은 분지형 DNA(bDNA) 검정 또는 실시간 PCR(qPCR)을 사용하여 평가된다. 이들 방법의 이용은 본원에 제시된 실시예에 설명되고 예시되어 있다.
- [0220] PCSK9 단백질 발현 수준은 단백질 수준의 측정을 위한 해당 분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들면, 전기영동법, 모세관 전기영동법, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 박막 크로마토그래피(TLC), 고분산(hyperdiffusion) 크로마토그래피, 유체 또는 겔 침강 반응, 흡수 분광법, 비색분석법, 분광분석법, 유세포 분석법, 면역확산법(단일 또는 이중), 면역전기영동법, 웨스턴 블롯팅, 방사성면역검정(RIA), 효소-결합된 면역흡착 검정법(ELISA), 면역형광 검정, 전기화학발광 검정 등을 포함한다.
- [0221] 본원에 사용되는 용어 "시료"는 대상체 내에 존재하는 유체, 세포 또는 조직뿐만 아니라 대상체로부터 단리된 유사한 유체, 세포 또는 조직의 집합을 지칭한다. 생물학적 유체의 예는 혈액, 혈청 및 장막 유체, 혈장, 림프, 소변, 뇌척수액, 타액, 안액 등을 포함한다. 조직 시료는 조직, 기관 또는 국소화된 영역으로부터의 시료를 포함할 수 있다. 예를 들면, 시료는 특정 기관, 기관의 부분 또는 그러한 기관 내의 유체 또는 세포로부터 유래될 수 있다. 특정 구현예에서, 시료는 간(예컨대, 전체 간(whole liver) 또는 간의 특정 세그먼트 또는 예컨대, 간 세포와 같은 간 내의 특정 유형의 세포)으로부터 유래될 수 있다. 바람직한 구현예에서, "대상체로부터 유래된 시료"는 대상체로부터 뽑은 혈액 또는 혈장을 지칭한다. 추가의 구현예에서, "대상체로부터 유래된 시료"는 대상체로부터 유래된 간 조직을 지칭한다.
- [0222] 본 발명의 방법의 일부 구현예에서, RNAi 작용제는 RNAi 작용제가 대상체 내의 특정 부위에 전달되도록 대상체에게 투여된다. PCSK9의 발현의 억제제는 대상체 내의 특정 부위로부터의 유체 또는 조직으로부터 유래된 시료에서 PCSK9 mRNA 또는 PCSK9 단백질의 수준 또는 그의 수준의 변화의 측정을 사용하여 평가될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 부위는 간이다. 상기 부위는 또한 전술된 부위 중 임의의 것으로부터의 세포의 하위항목 또는 하위군일 수도 있다. 또한, 상기 부위는 특정 수용체 유형을 발현하는 세포를 포함할 수 있다.
- [0223] **III. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 iRNA**
- [0224] 세포, 예를 들어, 대상체, 예를 들어, 포유동물, 예를 들어, PCSK9-관련 장애, 예를 들어, 고지혈증, 예를 들어, 고콜레스테롤혈증을 갖는 인간 내의 세포에서 PCSK9 유전자의 발현을 억제하는 이중-가닥 RNAi 작용제의 이용 방법이 본원에 기재된다.
- [0225] 따라서, 본 발명은 청구된 발명에 사용하기 위한 생체 내에서의 표적 유전자(즉, PCSK9 유전자)의 발현을 억제

할 수 있는 이중-가닥 RNAi 작용제를 제공한다.

- [0226] 일 구현예에서, 본 발명의 iRNA, 예를 들어, dsRNA의 RNA는 비변형되며, 예를 들어, 해당 분야에 알려져 있고, 본원에 기재된 화학적 변형 및/또는 컨주게이션을 포함하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 iRNA, 예를 들어, dsRNA의 RNA는 안정성 또는 다른 유리한 특징을 향상시키도록 화학적으로 변형된다. 본 발명의 특정 양태에서, 본 발명의 iRNA의 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된다. 예를 들어, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이고/거나, 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명의 iRNA의 모든 뉴클레오티드는 변형된다. 예를 들어, 센스 가닥의 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이고/거나 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이고/거나 센스 가닥 및 안티센스 가닥 둘 모두의 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다. "실질적으로 모든 뉴클레오티드가 변형된" 본 발명의 iRNA는 대부분 변형되지만, 완전히 변형되지 않으며, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 비변형 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0227] dsRNA는 PCSK9 유전자의 발현에서 형성되는 mRNA의 적어도 일부에 상보적인 상보성 영역을 갖는 안티센스 가닥을 포함한다. 상보성 영역은 약 30개 이하의 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 약 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 또는 18개 이하의 뉴클레오티드 길이)이다. iRNA는 PCSK9 유전자를 발현하는 세포와의 접촉 시에, 예를 들어, PCR 또는 분지형 DNA(bDNA)-기반의 방법에 의해 또는 단백질-기반의 방법에 의해, 예를 들어, 웨스턴 블롯팅 또는 유세포측정 기법을 사용하는 면역형광 분석에 의해 검정시 PCSK9 유전자(예를 들어, 인간 PCSK9 유전자)의 발현을 적어도 약 10% 억제한다.
- [0228] dsRNA는, 상보적이며 혼성화되어, dsRNA가 사용될 조건 하에서 듀플렉스 구조를 형성하는 2개의 RNA 가닥을 포함한다. dsRNA의 한 가닥(안티센스 가닥)은 표적 서열에 실질적으로 상보적이며, 일반적으로 완전히 상보적인 상보성 영역을 포함한다. 표적 서열은 PCSK9 유전자의 발현 동안 형성되는 mRNA의 서열로부터 유래될 수 있다. 다른 가닥(센스 가닥)은 안티센스 가닥에 상보적인 영역을 포함하여, 적합한 조건 하에서 조합되는 경우, 두 가닥이 혼성화하고 듀플렉스 구조를 형성하게 한다. 본원에서 다른 곳에 기재되고 해당 분야에 공지된 바와 같이, dsRNA의 상보성 서열은 또한 개별 올리고뉴클레오티드 상에 존재하는 것과 대조적으로 단일의 핵산 분자의 자가-상보적 영역으로서 포함될 수 있다.
- [0229] 일반적으로, 듀플렉스 구조는 15 내지 30개 염기쌍 길이, 예를 들어, 15 내지 29개, 15 내지 28개, 15 내지 27개, 15 내지 26개, 15 내지 25개, 15 내지 24개, 15 내지 23개, 15 내지 22개, 15 내지 21개, 15 내지 20개, 15 내지 19개, 15 내지 18개, 15 내지 17개, 18 내지 30개, 18 내지 29개, 18 내지 28개, 18 내지 27개, 18 내지 26개, 18 내지 25개, 18 내지 24개, 18 내지 23개, 18 내지 22개, 18 내지 21개, 18 내지 20개, 19 내지 30개, 19 내지 29개, 19 내지 28개, 19 내지 27개, 19 내지 26개, 19 내지 25개, 19 내지 24개, 19 내지 23개, 19 내지 22개, 19 내지 21개, 19 내지 20개, 20 내지 30개, 20 내지 29개, 20 내지 28개, 20 내지 27개, 20 내지 26개, 20 내지 25개, 20 내지 24개, 20 내지 23개, 20 내지 22개, 20 내지 21개, 21 내지 30개, 21 내지 29개, 21 내지 28개, 21 내지 27개, 21 내지 26개, 21 내지 25개, 21 내지 24개, 21 내지 23개 또는 21 내지 22개 염기쌍 길이이다. 상기 언급된 범위 및 길이의 중간의 범위 및 길이도 또한 본 발명의 일부인 것으로 고려된다.
- [0230] 유사하게, 표적 서열에 대한 상보성 영역은 15 내지 30개 뉴클레오티드 길이, 예를 들어, 15 내지 29개, 15 내지 28개, 15 내지 27개, 15 내지 26개, 15 내지 25개, 15 내지 24개, 15 내지 23개, 15 내지 22개, 15 내지 21개, 15 내지 20개, 15 내지 19개, 15 내지 18개, 15 내지 17개, 18 내지 30개, 18 내지 29개, 18 내지 28개, 18 내지 27개, 18 내지 26개, 18 내지 25개, 18 내지 24개, 18 내지 23개, 18 내지 22개, 18 내지 21개, 18 내지 20개, 19 내지 30개, 19 내지 29개, 19 내지 28개, 19 내지 27개, 19 내지 26개, 19 내지 25개, 19 내지 24개, 19 내지 23개, 19 내지 22개, 19 내지 21개, 19 내지 20개, 20 내지 30개, 20 내지 29개, 20 내지 28개, 20 내지 27개, 20 내지 26개, 20 내지 25개, 20 내지 24개, 20 내지 23개, 20 내지 22개, 20 내지 21개, 21 내지 30개, 21 내지 29개, 21 내지 28개, 21 내지 27개, 21 내지 26개, 21 내지 25개, 21 내지 24개, 21 내지 23개 또는 21 내지 22개 뉴클레오티드 길이이다. 상기 언급된 범위 및 길이의 중간의 범위 및 길이도 또한 본 발명의 일부인 것으로 고려된다.
- [0231] 일부 구현예에서, dsRNA는 약 15 내지 약 20개 뉴클레오티드 길이, 또는 약 25 내지 약 30개 뉴클레오티드 길이이다. 일반적으로, dsRNA는 다이스 효소를 위한 기질로 작용하기에 충분히 길다. 예를 들어, 약 21 내지 23개 뉴클레오티드 길이보다 더 긴 dsRNA가 다이스를 위한 기질로 작용할 수 있음이 당업계에 널리 공지되어 있다.

또한, 숙련자가 인식할 것처럼, 절단을 위해 표적화된 RNA의 영역은 혼하게는 보다 큰 RNA 분자, 종종 mRNA 분자의 일부일 것이다. 적절한 경우, mRNA 표적의 "일부"는 RNAi-유도 절단(즉, RISC 경로를 통한 절단)을 위한 기질이 되기에 충분한 길이의 mRNA 표적의 인접 서열이다.

[0232] 특정 구현예에서, 본 발명의 dsRNA 작용제는 PCSK9 유전자의 mRNA 전사물의 적어도 일부에 실질적으로 상보적인 적어도 19개의 인접 뉴클레오타이드의 영역을 갖는 더 긴 길이, 예를 들어, 66개 이하의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 36 내지 66개, 26 내지 36개, 25 내지 36개, 31 내지 60개, 22 내지 43개, 27 내지 53개의 뉴클레오타이드 길이를 포함할 수 있는 RNA 가닥(안티센스 가닥)을 포함할 수 있다. 더 긴 길이의 안티센스 가닥을 갖는 이들 dsRNA 작용제는 바람직하게는 20 내지 60개 뉴클레오타이드 길이의 제2 RNA 가닥(센스 가닥)을 포함하며, 센스 및 안티센스 가닥은 18 내지 30개의 인접 뉴클레오타이드의 듀플렉스를 형성한다.

[0233] 또한, 해당 분야의 숙련자는 듀플렉스 영역이 dsRNA의 일차 기능성 부분, 예를 들어, 약 9 내지 36개 염기쌍, 예를 들어, 약 10 내지 36개, 11 내지 36개, 12 내지 36개, 13 내지 36개, 14 내지 36개, 15 내지 36개, 9 내지 35개, 10 내지 35개, 11 내지 35개, 12 내지 35개, 13 내지 35개, 14 내지 35개, 15 내지 35개, 9 내지 34개, 10 내지 34개, 11 내지 34개, 12 내지 34개, 13 내지 34개, 14 내지 34개, 15 내지 34개, 9 내지 33개, 10 내지 33개, 11 내지 33개, 12 내지 33개, 13 내지 33개, 14 내지 33개, 15 내지 33개, 9 내지 32개, 10 내지 32개, 11 내지 32개, 12 내지 32개, 13 내지 32개, 14 내지 32개, 15 내지 32개, 9 내지 31개, 10 내지 31개, 11 내지 31개, 12 내지 31개, 13 내지 32개, 14 내지 31개, 15 내지 31개, 15 내지 30개, 15 내지 29개, 15 내지 28개, 15 내지 27개, 15 내지 26개, 15 내지 25개, 15 내지 24개, 15 내지 23개, 15 내지 22개, 15 내지 21개, 15 내지 20개, 15 내지 19개, 15 내지 18개, 15 내지 17개, 18 내지 30개, 18 내지 29개, 18 내지 28개, 18 내지 27개, 18 내지 26개, 18 내지 25개, 18 내지 24개, 18 내지 23개, 18 내지 22개, 18 내지 21개, 18 내지 20개, 19 내지 30개, 19 내지 29개, 19 내지 28개, 19 내지 27개, 19 내지 26개, 19 내지 25개, 19 내지 24개, 19 내지 23개, 19 내지 22개, 19 내지 21개, 19 내지 20개, 20 내지 30개, 20 내지 29개, 20 내지 28개, 20 내지 27개, 20 내지 26개, 20 내지 25개, 20 내지 24개, 20 내지 23개, 20 내지 22개, 20 내지 21개, 21 내지 30개, 21 내지 29개, 21 내지 28개, 21 내지 27개, 21 내지 26개, 21 내지 25개, 21 내지 24개, 21 내지 23개 또는 21 내지 22개 염기쌍의 듀플렉스 영역임을 인식할 것이다.

[0234] 따라서, 일 구현예에서, 예를 들어, 15 내지 30개 염기쌍의 기능성 듀플렉스로 처리되고, 절단을 위해 요망되는 RNA를 표적화하는 한, 30개 초과 염기쌍의 듀플렉스 영역을 갖는 RNA 분자 또는 RNA 분자의 복합체는 dsRNA이다. 따라서, 숙련자는 일 구현예에서, miRNA가 dsRNA임을 인식할 것이다. 또 다른 구현예에서, dsRNA는 천연 발생 miRNA가 아니다. 또 다른 구현예에서, PCSK9 발현을 표적화하는데 유용한 iRNA 작용제는 보다 큰 dsRNA의 절단에 의해 표적 세포에서 생성되지 않는다.

[0235] 본원에 기재된 바와 같은 dsRNA는 하나 이상의 단일-가닥 뉴클레오타이드 오버행, 예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개의 뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있다. 적어도 하나의 뉴클레오타이드 오버행을 갖는 dsRNA는 그들의 블런트-말단 대응부에 비하여 예상치 않게 뛰어난 억제 특성을 가질 수 있다. 뉴클레오타이드 오버행은 테옥시뉴클레오타이드/뉴클레오시드를 포함하는 뉴클레오타이드/뉴클레오시드 유사체를 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 오버행(들)은 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 그들의 임의의 조합 상에 존재할 수 있다. 추가로, 오버행의 뉴클레오타이드(들)는 dsRNA의 안티센스 또는 센스 가닥 중 어느 하나의 5'-말단, 3'-말단 또는 둘 모두의 말단 상에 존재할 수 있다. 특정 구현예에서, 더 긴 연장된 오버행이 가능하다.

[0236] dsRNA는 하기에 추가로 논의된 바와 같이, 예를 들어, 바이오서치(Biosearch), 어플라이드 바이오시스템즈, 인코포레이티드(Applied Biosystems, Inc)로부터 상업적으로 입수 가능한 자동화 DNA 합성기의 사용에 의해 해당 분야에 공지되어 있는 표준 방법에 의해 합성될 수 있다.

[0237] 본 발명의 iRNA 화합물은 2-단계 절차를 사용하여 제조될 수 있다. 먼저, 이중-가닥 RNA 분자의 개별 가닥을 따로 제조한다. 그 다음, 성분(component) 가닥을 어닐링시킨다. siRNA 화합물의 개별 가닥은 용액-상 또는 고체-상 유기 합성 또는 둘 모두를 사용하여 제조될 수 있다. 유기 합성은 비천연 또는 변형 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 가닥이 용이하게 제조될 수 있는 이점을 제공한다. 본 발명의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드는 용액-상 또는 고체-상 유기 합성 또는 둘 모두를 사용하여 제조될 수 있다.

[0238] 일 양태에서, 본 발명의 dsRNA는 적어도 2개의 뉴클레오타이드 서열, 센스 서열 및 안티-센스 서열을 포함한다. 센스 가닥은 표 1에 제공되는 서열의 군으로부터 선택되며, 센스 가닥의 상응하는 안티센스 가닥은 표 1의 서열의 군으로부터 선택된다. 이러한 양태에서, 두 서열 중 하나는 두 서열의 다른 서열에 상보적이며, 서열 중 하나는 PCSK9 유전자의 발현에서 생성되는 mRNA의 서열에 실질적으로 상보적이다. 이와 같이, 이러한 양태에서,

dsRNA는 두 올리고뉴클레오타이드를 포함할 것이며, 여기서, 하나의 올리고뉴클레오타이드는 표 1에서 센스 가닥으로 기재되며, 제2 올리고뉴클레오타이드는 표 1에서 센스 가닥의 상응하는 안티센스 가닥으로 기재된다. 일 구현예에서, dsRNA의 실질적으로 상보적인 서열은 개별 올리고뉴클레오타이드 상에 포함된다. 또 다른 구현예에서, dsRNA의 실질적으로 상보적인 서열은 단일의 올리고뉴클레오타이드 상에 포함된다.

[0239] 표 1에서 서열의 일부가 변형된 및/또는 컨주게이트된 서열로서 기재되지만, 본 발명의 iRNA, 예를 들어, 본 발명의 dsRNA의 RNA가 변형되지 않고/거나 컨주게이트되지 않고/거나 본원에 기재된 것과 상이하게 변형되고/거나 컨주게이트된 표 1에 기재된 서열 중 어느 하나를 포함할 수 있는 것이 이해될 것이다.

[0240] 숙련자는 약 20 내지 23개 염기쌍, 예를 들어, 21개 염기쌍의 듀플렉스 구조를 갖는 dsRNA가 RNA 간섭을 유도하는데 특히 효율적인 것으로 설명되는 것을 잘 알고 있다(문헌[Elbashir *et al.*, *EMBO* 2001, 20:6877-6888]). 그러나, 다른 이들은 더 짧거나 더 긴 RNA 듀플렉스 구조도 또한 효율적일 수 있는 것을 발견하였다(문헌[Chu and Rana (2007) *RNA* 14:1714-1719]; 문헌[Kim *et al.* (2005) *Nat Biotech* 23:222-226]). 상기 기재된 구현예에서, 표 1에 제공된 올리고뉴클레오타이드 서열의 성질 때문에, 본원에 기재된 dsRNA는 최소 21개 뉴클레오타이드의 길이의 적어도 하나의 가닥을 포함할 수 있다. 하나 또는 둘 모두의 말단 상의 소수의 뉴클레오타이드를 제한 표 1의 어느 하나의 서열 중 하나를 갖는 보다 짧은 듀플렉스가 상기 기재된 dsRNA와 비교하여 유사하게 효율적일 수 있는 것이 타당하게 예상될 수 있다. 따라서, 표 3, 표 4, 표 5, 표 6, 표 18, 표 19, 표 20, 표 21 및 표 23 중 어느 하나의 서열 중 하나로부터 유래된 적어도 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 인접 뉴클레오타이드의 서열을 가지며, PCSK9 유전자의 발현을 억제하는 그들의 능력이 완전한 서열을 포함하는 dsRNA와 약 5, 10, 15, 20, 25 또는 30% 이하의 억제만큼 상이한 dsRNA가 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 고려된다.

[0241] 또한, 표 1에 제공된 RNA에서 RISC-매개의 절단에 감수성인 PCSK9 전사물 내의 부위(들)를 확인한다. 이와 같이, 본 발명은 이들 부위 중 하나 이내를 표적화하는 iRNA를 추가로 특징으로 한다. 본원에 사용된 바와 같이, iRNA는 iRNA가 특정 부위 내의 어디든 전사물의 절단을 촉진시킨다면, RNA 전사물의 특정 부위 내를 표적화하는 것으로 불린다. 이러한 iRNA는 일반적으로 PCSK9 유전자 내의 선택된 서열에 인접한 영역으로부터 취한 추가의 뉴클레오타이드 서열에 커플링된 표 1에 제공되는 서열 중 하나로부터의 적어도 약 15개의 인접 뉴클레오타이드를 포함할 것이다.

[0242] 표적 서열은 일반적으로 약 15 내지 30개의 뉴클레오타이드 길이이나, 임의의 제공된 표적 RNA의 절단을 유도하기 위하여 이러한 범위 내의 특정 서열의 적합성에는 광범위한 변이가 존재한다. 본원에 나열된 다양한 소프트웨어 패키지 및 지침이 임의의 제공된 유전자 표적에 대한 최적의 표적 서열의 확인을 위한 지침을 제공하나, 제공된 크기(비제한적인 예로, 21개의 뉴클레오타이드)의 "윈도우(window)" 또는 "마스크(mask)"를 표적 RNA 서열 상에 글자 그대로 또는 비유적으로(예를 들어, 인 실리코(in silico)를 포함함) 위치시켜, 표적 서열로 작용할 수 있는 크기 범위 내의 서열을 확인하는 경험적 방법도 또한 수행될 수 있다. 서열 "윈도우"를 최초 표적 서열 위치에서 하나의 뉴클레오타이드만큼 업스트림 또는 다운스트림으로 점진적으로 이동시키으로써, 선택되는 임의의 제공된 표적 크기에 대해 가능한 서열의 완전한 세트가 확인될 때까지 다음의(next) 잠재적 표적 서열을 확인할 수 있다. 최적으로 작용하는 상기 서열을 확인하기 위한 확인된 서열(본원에 기재되어 있거나 해당 분야에 공지된 바와 같은 검정을 이용함)의 체계적 합성 및 시험과 커플링된 상기 과정은 iRNA 작용제로 표적화되는 경우 표적 유전자 발현의 최적의 억제를 매개하는 RNA 서열을 확인할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 표 1에서 확인된 서열이 효율적인 표적 서열임을 나타내나, 동등하거나 보다 나은 억제 특징을 갖는 서열을 확인하기 위해 하나의 뉴클레오타이드만큼 제공된 서열의 업스트림 또는 다운스트림으로 점진적으로 "윈도우를 보행(walking the window)"시키으로써 억제 효능의 추가 최적화가 달성될 수 있음이 고려된다.

[0243] 추가로, 예를 들어, 표 1에서 확인된 임의의 서열에 대하여, 보다 길거나 보다 짧은 서열을 생성시키기 위해 뉴클레오타이드를 체계적으로 추가하거나 제거하고, 상기 지점으로부터 표적 RNA의 위 또는 아래로 더 길거나 짧은 크기의 윈도우를 보행시키함으로써 생성된 서열을 시험함으로써 추가 최적화가 달성될 수 있음이 고려된다. 또한, 새로운 후보 표적을 생성시키기 위한 이러한 방법과 해당 분야에 공지되어 있고/거나 본원에 기재된 바와 같은 억제 검정에서의 표적 서열을 기초로 한 iRNA의 효과에 대한 시험을 커플링시켜, 억제 효능에서 추가의 개선을 야기할 수 있다. 추가로 또한, 이러한 최적화된 서열은, 예를 들어, 본원에 기재되고/거나 해당 분야에 공지된 바와 같은 변형된 뉴클레오타이드의 도입, 오버행 내의 추가 또는 변화, 또는 발현 억제제로서 분자를 추가로 최적화(예를 들어, 혈청 안정성 또는 순환 반감기 증가, 열 안정성 증가, 막횡단 전달 향상, 특정 위치 또는 세포 유형으로의 표적화, 침묵화 경로 효소와의 상호작용 증가, 엔도솜으로부터의 방출 증가)시키기 위한 해당 분야에 공지되고/되거나 본원에 논의된 바와 같은 다른 변형에 의해 조정될 수 있다.

- [0244] 본원에 기재된 바와 같은 iRNA는 표적 서열에 대한 하나 이상의 미스매치를 함유할 수 있다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 iRNA는 3개 이하의 미스매치를 함유한다. iRNA의 안티센스 가닥이 표적 서열에 대한 미스매치를 함유한다면, 미스매치의 영역이 상보성 영역의 중심에 위치되지 않는 것이 바람직하다. iRNA의 안티센스 가닥이 표적 서열에 대한 미스매치를 함유하는 경우, 미스매치가 상보성 영역의 5'- 또는 3'-말단으로부터 마지막 5개의 뉴클레오타이드 내에 존재하도록 제한되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 23개 뉴클레오타이드 iRNA 작용제에 있어서, PCSK9 유전자의 영역에 상보적인 가닥은 일반적으로 중심 13개의 뉴클레오타이드 내에 어떠한 미스매치도 함유하지 않는다. 본원에 기재된 방법 또는 해당 분야에 공지된 방법은 표적 서열에 대하여 미스매치를 함유하는 iRNA가 PCSK9 유전자의 발현을 억제시키는데 효과적인지의 여부를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 특히, PCSK9 유전자 내의 특정 상보성 영역이 집단 내의 다형성 서열 변이를 갖는 것으로 공지된다면, PCSK9 유전자의 발현을 억제하는데 있어서 미스매치를 갖는 iRNA의 효능의 고려가 중요하다.
- [0245] 본 발명에서 특성화된 핵산은 해당 분야에 널리 확립된 방법, 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 문헌 ["Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. *et al.* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA]에 기재된 것들에 의해 합성되고/거나 변형될 수 있다. 변형은, 예를 들어, 말단 변형, 예를 들어, 5'-말단 변형(인산화, 컨쥬게이션, 역전된 결합) 또는 3'-말단 변형(컨쥬게이션, DNA 뉴클레오타이드, 역전된 결합 등); 염기 변형, 예를 들어, 안정화 염기, 불안정화 염기, 또는 파트너의 연장된 레퍼토리와 염기 쌍을 형성하는 염기로의 대체, 염기의 제거(무염기 뉴클레오타이드), 또는 컨쥬게이트된 염기; 당 변형(예를 들어, 2'-위치 또는 4'-위치) 또는 당의 대체; 및/또는 포스포디에스테르 결합의 변형 또는 대체를 포함하는 백본 변형을 포함한다. 본원에 기재된 구현예에서 유용한 iRNA 화합물의 특정 예는 변형된 백본 또는 비-천연 뉴클레오타이드간 결합을 함유하는 RNA를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 변형된 백본을 갖는 RNA는 특히 백본 내에 인 원자를 갖지 않는 것을 포함한다. 본 명세서의 목적상, 해당 분야에 때때로 언급되는 바와 같이, 그들의 뉴클레오타이드간 백본에 인 원자를 갖지 않는 변형된 RNA가 또한 올리고뉴클레오타이드인 것으로 간주될 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 iRNA는 그의 뉴클레오타이드간 백본에 인 원자를 가질 것이다.
- [0246] 변형된 RNA 백본은, 예를 들어, 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 예를 들어, 3'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트, 포스포네이트, 포스포르아미데이트, 예를 들어, 3'-아미노 포스포르아미데이트 및 아미노알킬포스포르아미데이트, 티오노포스포르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 및 정상 3'-5' 결합을 갖는 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결된 유사체, 및 역전된 극성을 갖는 것을 포함하며, 여기서 뉴클레오타이드 단위의 인접한 쌍은 3'-5' 대 5'-3' 또는 2'-5' 대 5'-2'로 연결된다. 다양한 염, 혼합된 염 및 유리산 형태가 또한 포함된다.
- [0247] 상기 인-함유 결합의 제조를 교시하는 대표적 미국 특허는 각각의 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 제3,687,808호; 4,469,863호; 4,476,301호; 5,023,243호; 5,177,195호; 5,188,897호; 5,264,423호; 5,276,019호; 5,278,302호; 5,286,717호; 5,321,131호; 5,399,676호; 5,405,939호; 5,453,496호; 5,455,233호; 5,466,677호; 5,476,925호; 5,519,126호; 5,536,821호; 5,541,316호; 5,550,111호; 5,563,253호; 5,571,799호; 5,587,361호; 5,625,050호; 6,028,188호; 6,124,445호; 6,160,109호; 6,169,170호; 6,172,209호; 6,239,265호; 6,277,603호; 6,326,199호; 6,346,614호; 6,444,423호; 6,531,590호; 6,534,639호; 6,608,035호; 6,683,167호; 6,858,715호; 6,867,294호; 6,878,805호; 7,015,315호; 7,041,816호; 7,273,933호; 7,321,029호; 및 미국 특허 RE39464호를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0248] 인 원자를 포함하지 않는 변형된 RNA 백본은 단쇄 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오타이드간 결합, 혼합된 헤테로원자 및 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오타이드간 결합, 또는 하나 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로사이클릭 뉴클레오타이드간 결합에 의해 형성되는 백본을 갖는다. 이들은 모르폴리노 결합(뉴클레오타이드의 당 부분으로부터 부분적으로 형성됨)을 갖는 백본; 실록산 백본; 설피드, 설픽시드 및 설피온 백본; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 알켄 함유 백본; 설파메이트 백본; 메틸렌이미노 및 메틸렌하이드라지노 백본; 설포네이트 및 설피온아미드 백본; 아미드 백본; 및 혼합된 N, O, S 및 CH₂ 구성성분 부분을 갖는 다른 백본을 포함한다.
- [0249] 상기 올리고뉴클레오타이드의 제조를 교시하는 대표적 미국 특허는 각각의 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 제5,034,506호; 5,166,315호; 5,185,444호; 5,214,134호; 5,216,141호; 5,235,033호; 5,64,562호; 5,264,564호; 5,405,938호; 5,434,257호; 5,466,677호; 5,470,967호; 5,489,677호; 5,541,307호;

5,561,225호; 5,596,086호; 5,602,240호; 5,608,046호; 5,610,289호; 5,618,704호; 5,623,070호; 5,663,312호; 5,633,360호; 5,677,437호; 및 5,677,439호를 포함하나, 이들에 제한되지는 않는다.

[0250] 다른 구현예에서, iRNA에서 사용하는 것으로 고려되는 적합한 RNA 모방체(mimetic)에서, 당 및 뉴클레오시드간 결합 둘 모두, 즉, 뉴클레오타이드 단위의 백본은 신규한 기로 대체된다. 염기 단위는 적절한 핵산 표적 화합물과의 혼성화를 위해 유지된다. 이러한 하나의 올리고머 화합물인, 뛰어난 혼성화 특성을 갖는 것으로 밝혀진 RNA 모방체는 펩티드 핵산(PNA)으로 지칭된다. PNA 화합물에서, RNA의 당 백본은 아마이드 함유 백본, 특히 아미노에틸글리신 백본으로 대체된다. 핵염기는 유지되고, 백본의 아마이드 부분의 아자 질소 원자에 직접적 또는 간접적으로 결합된다. PNA 화합물의 제조를 교시하는 대표적 미국 특허는 각각의 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 제5,539,082호; 5,714,331호; 및 5,719,262호를 포함하나, 이들에 제한되지는 않는다. 본 발명의 iRNA에 사용하기에 적합한 추가의 PNA 화합물은, 예를 들어, 문헌[Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500]에 기재된다.

[0251] 본 발명에서 특성화된 일부 구현예는 포스포로티오에이트 백본을 갖는 RNA 및 헤테로원자 백본, 특히 상기 언급된 미국 특허 제5,489,677호의 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [메틸렌(메틸이미노) 또는 MMI 백본으로 공지됨], $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 및 $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ [여기서, 고유 포스포디에스테르 백본은 $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$ 로 표시됨], 및 상기 언급된 미국 특허 제5,602,240호의 아마이드 백본을 갖는 올리고뉴클레오시드를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 특성화된 RNA는 상기 언급된 미국 특허 제5,034,506호의 모르폴리노 백본 구조를 갖는다.

[0252] 변형된 RNA는 또한 하나 이상의 치환된 당 모이어티를 함유할 수 있다. 본원에서 특성화된 iRNA, 예를 들어, dsRNA는 2'-위치에 OH; F; O-, S-, 또는 N-알킬; O-, S-, 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알킬닐; 또는 O-알킬-O-알킬 중 하나를 포함할 수 있고, 상기 알킬, 알케닐 및 알킬닐은 치환되거나 비치환된 C₁ 내지 C₁₀ 알킬 또는 C₂ 내지 C₁₀ 알케닐 및 알킬닐일 수 있다. 예시적인 적합한 변형은 $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$, 및 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ 를 포함하고, 여기서 n 및 m은 1 내지 약 10이다. 다른 구현예에서, dsRNA는 2' 위치에 C₁ 내지 C₁₀ 저급 알킬, 치환된 저급 알킬, 알크아릴, 아르알킬, O-알크아릴 또는 O-아르알킬, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알크아릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실릴, RNA 절단 기, 리포터 기, 인터칼레이터(intercalator), iRNA의 약동학적 특성을 개선시키기 위한 기, 또는 iRNA의 약력학적 특성을 개선시키기 위한 기, 및 유사한 특성을 갖는 다른 치환기 중 하나를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 2'-메톡시에톡시(2'-O-CH₂CH₂OCH₃, 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로도 공지됨)(문헌[Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504]), 즉, 알콕시-알콕시기를 포함한다. 또 다른 예시적 변형은 2'-디메틸아미노옥시에톡시, 즉, 하기 본원의 실시예에 기재된 바와 같은 2'-DMAOE로도 공지된 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ 기, 및 2'-디메틸아미노에톡시에톡시(2'-O-디메틸아미노에톡시에틸 또는 2'-DMAEOE로도 해당 분야에 공지됨), 즉, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂이다.

[0253] 다른 변형은 2'-메톡시(2'-OCH₃), 2'-아미노프로폭시(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) 및 2'-플루오로(2'-F)를 포함한다. 유사한 변형이 또한 iRNA의 RNA 상의 다른 위치, 특히 3' 말단 뉴클레오타이드 상 또는 2'-5' 연결된 dsRNA 내의 당의 3' 위치 및 5' 말단 뉴클레오타이드의 5' 위치에서 이루어질 수 있다. iRNA는 또한 펜토프라노실 당 대신에 사이클로부틸 모이어티와 같은 당 모방체를 가질 수 있다. 이러한 변형된 당 구조의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 미국 특허 제4,981,957호; 5,118,800호; 5,319,080호; 5,359,044호; 5,393,878호; 5,446,137호; 5,466,786호; 5,514,785호; 5,519,134호; 5,567,811호; 5,576,427호; 5,591,722호; 5,597,909호; 5,610,300호; 5,627,053호; 5,639,873호; 5,646,265호; 5,658,873호; 5,670,633호; 및 5,700,920호를 포함하나, 이들에 제한되지는 않고, 상기 특허 중 특정 특허는 본 출원과 공동으로 소유된다. 상기 특허 각각의 전체 내용은 참조로서 본원에 포함된다.

[0254] iRNA의 RNA는 또한 핵염기(종종, 해당 분야에서 "염기"로 간단히 언급됨) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "비변형된" 또는 "천연" 핵염기는 퓨린 염기 아데닌(A) 및 구아닌(G), 및 피리미딘 염기 티민(T), 시토신(C) 및 우라실(U)을 포함한다. 변형된 핵염기는 다른 합성 및 천연 핵염기, 예를 들어, 테옥시-티민(dT), 5-메틸시토신(5-me-C), 5-하이드록시메틸 시토신, 잔틴, 하이포잔틴, 2-아미노아데닌, 6-메틸 및 아데닌 및 구아닌의 다른 알킬 유도체, 2-프로필 및 아데닌 및 구아닌의 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실,

2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐 우라실 및 시토신, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실(슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-테아자구아닌 및 7-다아자아데닌 및 3-테아자구아닌 및 3-테아자아데닌을 포함한다. 추가의 핵염기는 미국 특허 제3,687,808호에 개시된 것들, 문헌[Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008]에 개시된 것들; 문헌[The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990]에 개시된 것들, 문헌[Englisch *et al.*, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613]에 개시된 것, 및 문헌[Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993]에 개시된 것들을 포함한다. 이들 핵염기 중 특정 핵염기가 본 발명에서 특성화된 올리고머 화합물의 결합 친화성을 증가시키는데 특히 유용하다. 이들은 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린, 예를 들어, 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함한다. 5-메틸시토신 치환은 핵산 듀플렉스 안정성을 0.6 내지 1.2°C까지 증가시키는 것으로 밝혀졌고(문헌[Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278]), 이는 더욱 더 특히 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 조합되는 경우에 예시적인 염기 치환이다.

[0255] 상기 언급된 변형된 핵염기 뿐만 아니라 다른 변형된 핵염기 중 특정 핵염기의 제조를 교시하는 대표적 미국 특허는 각각의 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 상기 언급된 미국 특허 제3,687,808호, 4,845,205호; 5,130,30호; 5,134,066호; 5,175,273호; 5,367,066호; 5,432,272호; 5,457,187호; 5,459,255호; 5,484,908호; 5,502,177호; 5,525,711호; 5,552,540호; 5,587,469호; 5,594,121호, 5,596,091호; 5,614,617호; 5,681,941호; 5,750,692호; 6,015,886호; 6,147,200호; 6,166,197호; 6,222,025호; 6,235,887호; 6,380,368호; 6,528,640호; 6,639,062호; 6,617,438호; 7,045,610호; 7,427,672호; 및 7,495,088호를 포함하나, 이들에 제한되지는 않는다.

[0256] iRNA의 RNA는 또한 하나 이상의 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하도록 변형될 수 있다. "바이사이클릭 당"은 두 원자의 가교에 의해 변형된 푸라노실 고리이다. "바이사이클릭 뉴클레오시드"("BNA")는 당 고리의 2개의 탄소 원자를 연결시켜, 그로 인해, 바이사이클릭 고리계를 형성하는 가교를 포함하는 당 모이어티를 가지는 뉴클레오시드이다. 특정 구현예에서, 가교는 당 고리의 4'-탄소 및 2'-탄소를 연결시킨다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명의 작용제는 또한, 하나 이상의 잠금 핵산(LNA)을 포함하도록 변형될 수 있는 iRNA의 RNA를 포함할 수 있다. 잠금 핵산은, 리보스 모이어티가 2' 및 4' 탄소를 연결시키는 가외의 가교를 포함하는 변형된 리보스 모이어티를 가지는 뉴클레오타이드이다. 달리 말하면, LNA는 4'-CH₂-O-2' 가교를 포함하는 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오타이드이다. 이러한 구조는 3'-엔드 구조 입체형태에서, 리보스를 효과적으로 "잠근다(lock)". siRNA로의 잠금 핵산의 부가는 혈청 중 siRNA 안정성을 증가시키고, 표적외 효과를 감소시키는 것으로 밝혀졌다(문헌[Elmen, J *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447]; 문헌[Mook, OR *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843]; 문헌[Grunweller, A *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193]).

[0257] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서 사용하기 위한 바이사이클릭 뉴클레오시드의 예에는, 제한 없이 4' 및 2' 리보실 고리 원자 사이에 가교를 포함하는 뉴클레오시드가 포함된다. 특정 구현예에서, 본 발명의 안티센스 폴리뉴클레오타이드 작용제에는, 4'에서 2' 가교를 포함하는 하나 이상의 바이사이클릭 뉴클레오시드가 포함된다. 이러한 4'에서 2' 가교 바이사이클릭 뉴클레오시드의 예에는, 이에 제한되는 것은 아니나, 4'-(CH₂)-O-2'(LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2'(ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2'(또한, "구속된 에틸" 또는 "cEt"로 지칭됨) 및 4'-CH(CH₂CH₃)-O-2'(및 그의 유사체; 예컨대 미국 특허 제7,399,845호 참조); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2'(및 그의 유사체; 예컨대 미국 특허 제8,278,283호 참조); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2'(및 그의 유사체; 예컨대 미국 특허 제8,278,425호 참조); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2'(예컨대 미국 특허 공보 제2004/0171570호 참조); 4'-CH₂-N(R)-O-2', 여기서, R은 H, C1-C12 알킬, 또는 보호기임(예컨대 미국 특허 제7,427,672호 참조); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2'(예컨대 문헌[Chattopadhyaya *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134] 참조); 및 4'-CH₂-C(=CH₂)-2'(및 그의 유사체; 예컨대 미국 특허 제8,278,426호 참조)이 포함된다. 상기 문헌의 각각의 전체 내용은 참조로서 본원에 포함된다.

[0258] 잠금 핵산 뉴클레오타이드의 제조를 교시하는 추가의 대표적 미국 특허 및 미국 특허 공보에는, 이에 제한되는 것은 아니나, 그의 각각의 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 제6,268,490호; 제6,525,191호; 제

6,670,461호; 제6,770,748호; 제6,794,499호; 제6,998,484호; 제7,053,207호; 제7,034,133호; 제7,084,125호; 제7,399,845호; 제7,427,672호; 제7,569,686호; 제7,741,457호; 제8,022,193호; 제8,030,467호; 제8,278,425호; 제8,278,426호; 제8,278,283호; US 2008/0039618호; 및 US 2009/0012281호가 포함된다.

- [0259] 예를 들면, α -L-리보푸라노스 및 β -D-리보푸라노스를 포함하는 하나 이상의 입체화학적 당 입체구조를 가지는 임의의 상기 바이사이클릭 뉴클레오시드가 제조될 수 있다(WO 99/14226호 참조).
- [0260] iRNA의 RNA는 또한 하나 이상의 구속된 에틸 뉴클레오티드를 포함하도록 변형될 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, "구속된 에틸 뉴클레오티드" 또는 "cEt"는 4'-CH(CH₃)-O-2' 가교를 포함하는 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 잠금 핵산이다. 일 구현예에서, 구속된 에틸 뉴클레오티드는, 본원에서, "S-cEt"로서 지칭되는 S 입체구조이다.
- [0261] 본 발명의 iRNA는 또한 하나 이상의 "입체구조 제한된 뉴클레오티드"("CRN")를 포함할 수 있다. CRN은 리보스의 C2' 및 C4' 탄소 또는 리보스의 C3 및 -C5' 탄소를 연결시키는 링커를 가지는 뉴클레오티드 유사체이다. CRN은 리보스 고리를 안정한 입체구조로 잠그고, mRNA에 대한 혼성화 친화성을 증가시킨다. 링커는, 안정성 및 친화성을 위한 최적의 위치에 산소가 배치되기에 충분한 길이이며, 이로써, 더욱 적은 리보스 고리 퍼커링(ribose ring puckering)이 초래된다.
- [0262] 상술한 CRN 중 일부의 제조를 교시하는 대표적 공보에는, 이에 제한되는 것은 아니나, 각각의 전체 내용이 참조로 본원에 포함되는 미국 특허 공보 제2013/0190383호; 및 PCT 공보 WO 2013/036868호가 포함된다.
- [0263] 본 발명의 iRNA의 하나 이상의 뉴클레오티드는 또한 하이드록시메틸 치환된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. "하이드록시메틸 치환된 뉴클레오티드"는 또한 "잠금 해제 핵산"("UNA") 변형으로도 지칭되는 비사이클릭 2'-3'-seco-뉴클레오티드이다.
- [0264] UNA의 제조를 교시하는 대표적 미국 공보에는, 이에 제한되는 것은 아니나, 각각의 전체 내용이 참조로 본원에 포함되는 미국 특허 제8,314,227호; 및 미국 특허 공보 제2013/0096289호; 제2013/0011922호; 및 제2011/0313020호가 포함된다.
- [0265] 본 발명의 iRNA의 뉴클레오티드의 다른 변형에는 5' 포스페이트 또는 5' 포스페이트 모방체, 예를 들어, RNAi 작용제의 안티센스 가닥 상의 5'-말단 포스페이트 또는 포스페이트 모방체가 포함된다. 적합한 포스페이트 모방체는 예를 들어, 미국 특허 공보 제2012/0157511호에 개시되어 있으며, 그의 전체 내용은 참조로 본원에 포함된다.
- [0266] RNA 분자 말단에 대한 가능한 안정화 변형에는 N-(아세틸아미노카프로일)-4-하이드록시프롤리놀(Hyp-C6-NHAc), N-(카프로일-4-하이드록시프롤리놀(Hyp-C6), N-(아세틸-4-하이드록시프롤리놀(Hyp-NHAc), 티미딘-2'-O-데옥시티미딘(에테르), N-(아미노카프로일)-4-하이드록시프롤리놀(Hyp-C6-아미노), 2-도코사노일-우리딘-3"-포스페이트, 역위 염기(inverted base) dT(idT) 및 다른 것들이 포함될 수 있다. 이러한 변형의 개시내용은 PCT 공보 제WO 2011/005861호에서 찾아볼 수 있다.
- [0267] A. 모티프를 포함하는 변형된 iRNA
- [0268] 본 발명의 특정 양태에서, 본 발명의 이중-가닥 RNAi 작용제는, 예를 들면, 각각의 전체 내용이 본원에 참조로서 포함되는 각각의 전체 내용이 본원에 참조로서 포함되는 미국 특허 공개 제2014/0315835호 및 PCT 공개 제WO 2013/075035호에 개시된 바와 같이 화학적으로 변형된 작용제를 포함한다. 본원 및 미국 특허 공개 제2014/0315835호 및 PCT 공개 제WO 2013/075035호에 나타난 바와 같이, 특히 절단 부위에 또는 그 부근에, RNAi 작용제의 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥 내로 3개의 연속 뉴클레오티드 상의 3개의 동일한 변형으로 된 모티프를 하나 이상 도입시킴으로써, 뛰어난 결과를 얻을 수 있다. 일부 구현예에서, RNAi 작용제의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 다르게는 완전히 변형될 수 있다. 이들 모티프의 도입은, 존재한다면, 센스 및/또는 안티센스 가닥의 변형 패턴을 방해한다. RNAi 작용제는 임의로, 예를 들면 센스 가닥 상의 GalNAc 유도체 리간드와 컨쥬게이트될 수 있다. 생성된 RNAi 작용제는 뛰어난 유전자 침묵화 활성을 나타낸다.
- [0269] 더욱 구체적으로, 놀랍게도, 이중 가닥 RNAi 작용제의 센스 가닥 및 안티센스 가닥이 RNAi 작용제의 적어도 하나의 가닥의 절단 부위에 또는 그 근처에, 3개의 연속 뉴클레오티드 상의 3개의 동일한 변형으로 된 모티프를 하나 이상 갖도록 완전히 변형되는 경우, RNAi 작용제의 유전자 침묵화 활성이 상당히 증대됨을 발견하였다.
- [0270] 따라서, 본 발명은 생체 내에서 표적 유전자(즉, PCSK9 유전자)의 발현을 억제할 수 있는 이중-가닥 RNAi 작용제를 제공한다. RNAi 작용제는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함한다. RNAi 작용제의 각각의 가닥은 12 내지

30개 뉴클레오타이드 길이의 범위일 수 있다. 예를 들어, 각각의 가닥은 14 내지 30개 뉴클레오타이드 길이, 17 내지 30개 뉴클레오타이드 길이, 25 내지 30개 뉴클레오타이드 길이, 27 내지 30개 뉴클레오타이드 길이, 17 내지 23개 뉴클레오타이드 길이, 17 내지 21개 뉴클레오타이드 길이, 17 내지 19개 뉴클레오타이드 길이, 19 내지 25개 뉴클레오타이드 길이, 19 내지 23개 뉴클레오타이드 길이, 19 내지 21개 뉴클레오타이드 길이, 21 내지 25개 뉴클레오타이드 길이, 또는 21 내지 23개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.

[0271] 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 전형적으로 본원에서 "RNAi 작용제"로도 지칭되는 듀플렉스 이중 가닥 RNA("dsRNA")를 형성한다. RNAi 작용제의 듀플렉스 영역은 12 내지 30개 뉴클레오타이드 쌍 길이일 수 있다. 예를 들어, 듀플렉스 영역은 14 내지 30개 뉴클레오타이드 쌍 길이, 17 내지 30개 뉴클레오타이드 쌍 길이, 27 내지 30개 뉴클레오타이드 쌍 길이, 17 내지 23개 뉴클레오타이드 쌍 길이, 17 내지 21개 뉴클레오타이드 쌍 길이, 17 내지 19개 뉴클레오타이드 쌍 길이, 19 내지 25개 뉴클레오타이드 쌍 길이, 19 내지 23개 뉴클레오타이드 쌍 길이, 19 내지 21개 뉴클레오타이드 쌍 길이, 21 내지 25개 뉴클레오타이드 쌍 길이, 또는 21 내지 23개 뉴클레오타이드 쌍 길이일 수 있다. 또 다른 예에서, 듀플렉스 영역은 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 및 27개 뉴클레오타이드 길이로부터 선택된다.

[0272] 일 구현예에서, RNAi 작용제는 하나 또는 둘 모두의 가닥의 3'-말단, 5'-말단 또는 양 말단에 하나 이상의 오버행 영역 및/또는 캡핑기(capping group)를 포함할 수 있다. 오버행은 1 내지 6개 뉴클레오타이드 길이, 예를 들어 2 내지 6개 뉴클레오타이드 길이, 1 내지 5개 뉴클레오타이드 길이, 2 내지 5개 뉴클레오타이드 길이, 1 내지 4개 뉴클레오타이드 길이, 2 내지 4개 뉴클레오타이드 길이, 1 내지 3개 뉴클레오타이드 길이, 2 내지 3개 뉴클레오타이드 길이, 또는 1 내지 2개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 오버행은 하나의 가닥이 다른 가닥보다 더 긴 결과이거나, 또는 동일한 길이의 가닥 2개가 서로 엇갈린 결과일 수 있다. 오버행은 표적 mRNA와 미스매치를 형성할 수 있거나, 또는 오버행은 표적된 유전자 서열에 상보적일 수 있거나 또는 또 다른 서열일 수 있다. 제1 가닥과 제2 가닥은 또한, 예를 들어, 추가의 염기에 의해 연결되어 헤어핀을 형성할 수 있거나, 또는 다른 비-염기 링커에 의해 연결될 수 있다.

[0273] 일 구현예에서, RNAi 작용제의 오버행 영역 내의 뉴클레오타이드는 각각 독립적으로, 변형된 2'-당, 예를 들어, 2'-F, 2'-O-메틸, 티미딘(T), 2'-O-메톡시에틸-5-메틸우리딘(Teo), 2'-O-메톡시에틸아데노신(Aeo), 2'-O-메톡시에틸-5-메틸시티딘(m5Ceo), 및 그들의 임의의 조합을 포함하나 이들에 한정되지 않는 변형 또는 비변형된 뉴클레오타이드일 수 있다. 예를 들어, TT는 어느 한 가닥 상의 어느 한 말단에 대한 오버행 서열일 수 있다. 오버행은 표적 mRNA와 미스매치를 형성할 수 있거나, 또는 오버행은 표적된 유전자 서열에 상보적일 수 있거나 또는 또 다른 서열일 수 있다.

[0274] RNAi 작용제의 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 양 가닥 모두에서 5'- 또는 3'-오버행은 인산화될 수 있다. 일부 구현예에서, 오버행 영역(들)은 2개의 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트를 가지는 2개의 뉴클레오타이드를 포함하며, 2개의 뉴클레오타이드는 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 일 구현예에서, 오버행은 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 양 가닥의 3'-말단에 존재한다. 일 구현예에서, 이러한 3'-오버행은 안티센스 가닥에 존재한다. 일 구현예에서, 이러한 3'-오버행은 센스 가닥에 존재한다.

[0275] RNAi 작용제는, RNAi의 전반적인 안정성에 영향을 미치지 않으면서 이의 간섭 활성을 강화할 수 있는 단일의 오버행만을 함유할 수 있다. 예를 들어, 단일-가닥 오버행은 센스 가닥의 3'-종말단에 위치하거나, 또는 다르게는, 안티센스 가닥의 3'-종말단에 위치할 수 있다. RNAi는 또한, 안티센스 가닥의 5'-말단 (또는 센스 가닥의 3'-말단)에 위치하거나 또는 그 반대로 위치하는 블런트 말단을 가질 수 있다. 일반적으로, RNAi의 안티센스 가닥은 3'-말단에 뉴클레오타이드 오버행을 가지며, 5'-말단은 블런트이다. 이론에 구속되지 않으면서, 안티센스 가닥의 5'-말단 및 안티센스 가닥의 3'-말단 오버행에서의 비대칭적 블런트 말단은 가이드 가닥이 RISC 과정으로 로딩되는 것을 돕는다.

[0276] 일 구현예에서, RNAi 작용제는 19개 뉴클레오타이드 길이의 이중 말단 블런트머(bluntmer)이며, 센스 가닥은 5' 말단으로부터 위치 7, 8, 9에, 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 2'-F 변형으로 된 모티프를 적어도 하나 포함한다. 안티센스 가닥은 5' 말단으로부터 위치 11, 12, 13에 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 2'-O-메틸 변형으로 된 모티프를 적어도 하나 포함한다.

[0277] 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제는 20개 뉴클레오타이드 길이의 이중 말단 블런트머이며, 센스 가닥은 5' 말단으로부터 위치 8, 9, 10에 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 2'-F 변형으로 된 모티프를 적어도 하나 포함한다. 안티센스 가닥은 5' 말단으로부터 위치 11, 12, 13에 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 2'-O-메틸 변형으로 된 모티프를 적어도 하나 포함한다.

- [0278] 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제는 21개 뉴클레오타이드 길이의 이중 말단 블런트머이며, 센스 가닥은 5' 말단으로부터 위치 9, 10, 11에 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 2'-F 변형으로 된 모티프를 적어도 하나 포함한다. 안티센스 가닥은 5' 말단으로부터 위치 11, 12, 13에 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 2'-O-메틸 변형으로 된 모티프를 적어도 하나 포함한다.
- [0279] 일 구현예에서, RNAi 작용제는 21개 뉴클레오타이드 센스 가닥 및 23개 뉴클레오타이드 안티센스 가닥을 포함하며, 센스 가닥은 5' 말단으로부터 위치 9, 10, 11에 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 2'-F 변형으로 된 모티프를 적어도 하나 포함하며; 안티센스 가닥은 5' 말단으로부터 위치 11, 12, 13에 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 2'-O-메틸 변형으로 된 모티프를 적어도 하나 포함하고, RNAi 작용제의 하나의 말단은 블런트인 한편, 다른 말단은 2개 뉴클레오타이드 오버행을 포함한다. 바람직하게는, 2개 뉴클레오타이드 오버행은 안티센스 가닥의 3'-말단에 존재한다. 2개 뉴클레오타이드 오버행이 안티센스 가닥의 3'-말단에 존재하는 경우, 말단의 3개의 뉴클레오타이드 사이에 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합이 존재할 수 있으며, 3개의 뉴클레오타이드 중 2개는 오버행 뉴클레오타이드이고, 제3 뉴클레오타이드는 오버행 뉴클레오타이드 바로 옆의 쌍을 형성한 뉴클레오타이드이다. 일 구현예에서, RNAi 작용제는 추가로 센스 가닥의 5'-말단 및 안티센스 가닥의 5'-말단 둘 모두에서 말단의 3개의 뉴클레오타이드 사이에 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합을 갖는다. 일 구현예에서, 모티프의 일부인 뉴클레오타이드를 포함하는 RNAi 작용제의 센스 가닥 및 안티센스 가닥 내의 모든 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다. 일 구현예에서, 각 잔기는 예를 들어, 교대 모티프에서, 독립적으로 2'-O-메틸 또는 3'-플루오로로 변형된다. 선택적으로, RNAi 작용제는 리간드(바람직하게는 GaINAc₃)를 더 포함한다.
- [0280] 일 구현예에서, RNAi 작용제는 센스 및 안티센스 가닥을 포함하며, 센스 가닥은 25 내지 30개 뉴클레오타이드 잔기 길이이며, 5' 말단 뉴클레오타이드(위치 1)에서 시작하여, 제1 가닥의 위치 1 내지 23은 적어도 8개의 리보뉴클레오타이드를 포함하고; 안티센스 가닥은 36 내지 66개 뉴클레오타이드 잔기 길이이며, 3' 말단 뉴클레오타이드에서 시작하여, 센스 가닥의 위치 1 내지 23과 쌍을 형성하는 위치에 적어도 8개의 리보뉴클레오타이드를 포함하여, 듀플렉스를 형성하며; 안티센스 가닥의 적어도 3' 말단 뉴클레오타이드는 센스 가닥과 쌍을 형성하지 않으며, 최대 6개의 연속 3' 말단 뉴클레오타이드는 센스 가닥과 쌍을 형성하지 않고, 이에 의해, 1 내지 6개의 뉴클레오타이드의 3' 단일 가닥 오버행을 형성하고; 안티센스 가닥의 5' 말단은 센스 가닥과 쌍을 형성하지 않는 10 내지 30개의 연속 뉴클레오타이드를 포함하여, 이에 의해, 10 내지 30개 뉴클레오타이드의 단일 가닥 5' 오버행을 형성하고; 센스 및 안티센스 가닥이 최대 상보성을 위해 정렬되는 경우, 적어도 센스 가닥 5' 말단 및 3' 말단 뉴클레오타이드는 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드와 염기 쌍을 형성하여, 이에 의해, 센스 및 안티센스 가닥 간에 실질적으로 듀플렉스인 영역을 형성하며; 안티센스 가닥은, 이중 가닥 핵산이 포유동물 세포로 도입되는 경우, 표적 유전자 발현을 감소시키도록, 적어도 19개의 리보뉴클레오타이드의 안티센스 가닥 길이를 따라 표적 RNA에 충분히 상보적이고; 센스 가닥은 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 2'-F 변형으로 된 모티프를 적어도 하나 함유하며, 모티프 중 적어도 하나는 절단 부위에 또는 그 근처에 존재한다. 안티센스 가닥은 절단 부위에 또는 그 근처에 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 2'-O-메틸 변형으로 된 모티프를 적어도 하나 포함한다.
- [0281] 일 구현예에서, RNAi 작용제는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, RNAi 작용제는 적어도 25개, 최대 29개 뉴클레오타이드인 길이를 갖는 제1 가닥, 및 5' 말단으로부터 위치 11, 12, 13에 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 2'-O-메틸 변형으로 된 모티프를 적어도 하나 갖는 최대 30개 뉴클레오타이드인 길이를 갖는 제2 가닥을 포함하고; 제1 가닥의 3' 말단 및 제2 가닥의 5' 말단은 블런트 말단을 형성하며, 제2 가닥은 그의 3' 말단에서 제1 가닥보다 1 내지 4개 뉴클레오타이드가 더 길고, 듀플렉스 영역은 적어도 25개 뉴클레오타이드 길이인 영역이며, 제2 가닥은 RNAi 작용제가 포유동물 세포 내로 도입되는 경우 표적 유전자 발현을 감소시키도록 적어도 19개 뉴클레오타이드의 제2 가닥 길이를 따라, 표적 mRNA에 충분히 상보적이고, RNAi 작용제의 다이버 절단은 바람직하게는 제2 가닥의 3' 말단을 포함하는 siRNA를 초래하여, 포유동물에서 표적 유전자의 발현을 감소시킨다. 선택적으로, RNAi 작용제는 리간드를 더 포함한다.
- [0282] 일 구현예에서, RNAi 작용제의 센스 가닥은 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 동일한 변형으로 된 모티프를 적어도 하나 포함하며, 모티프 중 하나는 센스 가닥 내의 절단 부위에 존재한다.
- [0283] 일 구현예에서, RNAi 작용제의 안티센스 가닥은 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 동일한 변형으로 된 모티프를 적어도 하나 포함할 수 있으며, 모티프 중 하나는 안티센스 가닥의 절단 부위에 또는 그 근처에 존재한다.
- [0284] 17 내지 23개 뉴클레오타이드 길이의 듀플렉스 영역을 가지는 RNAi 작용제에서, 안티센스 가닥의 절단 부위는 전형적으로 5'-말단으로부터 대략 위치 10, 11 및 12에 존재한다. 따라서, 3개의 동일한 변형으로 된 모티프는 안티센스 가닥의 위치 9, 10, 11; 위치 10, 11, 12; 위치 11, 12, 13; 위치 12, 13, 14; 또는 위치 13, 14, 15에

존재할 수 있으며, 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 제1 뉴클레오티드로부터 시작하여 계수하거나, 또는 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 듀플렉스 영역 내의 쌍을 형성하는 제1 뉴클레오티드로부터 시작하여 계수한다. 안티센스 가닥 내의 절단 부위는 또한, 5'-말단으로부터 RNAi의 듀플렉스 영역의 길이에 따라 변할 수도 있다.

[0285] RNAi 작용제의 센스 가닥은, 가닥의 절단 부위에, 3개의 연속 뉴클레오티드 상의 3개의 동일한 변형으로 된 모티프를 적어도 하나 포함할 수 있으며; 안티센스 가닥은 가닥의 절단 부위에 또는 그 근처에, 3개의 연속 뉴클레오티드 상의 3개의 동일한 변형으로 된 모티프를 적어도 하나 가질 수 있다. 센스 가닥과 안티센스 가닥이 dsRNA 듀플렉스를 형성하는 경우, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 또한, 센스 가닥 상의 3개의 뉴클레오티드로 된 하나의 모티프와 안티센스 가닥 상의 3개의 뉴클레오티드로 된 하나의 모티프가 적어도 하나의 뉴클레오티드 중첩을 가지도록, 즉, 센스 가닥 내의 모티프의 3개의 뉴클레오티드 중 적어도 하나가 안티센스 가닥 내의 모티프의 3개의 뉴클레오티드 중 적어도 하나와 염기 쌍을 형성하도록 정렬될 수 있다. 다르게는, 적어도 2개의 뉴클레오티드가 중첩될 수 있거나, 3개 모두의 뉴클레오티드가 중첩될 수 있다.

[0286] 일 구현예에서, RNAi 작용제의 센스 가닥은 3개의 연속 뉴클레오티드 상의 3개의 동일한 변형으로 된 모티프를 하나 초과로 포함할 수 있다. 제1 모티프는 가닥의 절단 부위에 또는 그 근처에 존재할 수 있으며, 다른 모티프는 wing(wing) 변형일 수 있다. 본원에서, 용어 "wing 변형"은 동일한 가닥의 절단 부위에서 또는 그 근처에서 모티프로부터 분리된, 가닥의 또 다른 부분에 존재하는 모티프를 지칭한다. wing 변형은 제1 모티프에 인접해 있거나, 또는 적어도 하나 이상의 뉴클레오티드에 의해 분리된다. 모티프가 서로 바로 인접해 있는 경우 모티프의 화학적 성질은 서로 구별되며, 모티프가 하나 이상의 뉴클레오티드에 의해 분리되어 있는 경우, 화학적 성질은 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 2개 이상의 wing 변형이 존재할 수 있다. 예를 들어, 2개의 wing 변형이 존재하는 경우, 각각의 wing 변형은 절단 부위에 또는 그 근처에 존재하는 제1 모티프에 대해 하나의 말단에서 또는 선도 모티프의 어느 하나의 측에 존재할 수 있다.

[0287] 센스 가닥과 같이, RNAi 작용제의 안티센스 가닥은 3개의 연속 뉴클레오티드 상의 3개의 동일한 변형으로 된 모티프를 1개 초과하여 포함할 수 있으며, 모티프 중 적어도 하나는 가닥의 절단 부위에 또는 그 근처에 존재한다. 이러한 안티센스 가닥은 또한, 센스 가닥에 존재할 수 있는 wing 변형과 유사한 정렬에서 wing 변형을 하나 이상 포함할 수도 있다.

[0288] 일 구현예에서, RNAi 작용제의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥 상의 wing 변형은 전형적으로, 가닥의 3'-말단, 5'-말단 또는 양 말단 모두에 처음의 1개 또는 2개의 말단 뉴클레오티드를 포함하지 않는다.

[0289] 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥 상의 wing 변형은 전형적으로, 가닥의 3'-말단, 5'-말단 또는 양 말단 모두에 듀플렉스 영역 내에 처음의 1개 또는 2개의 쌍을 형성하는 뉴클레오티드를 포함하지 않는다.

[0290] RNAi 작용제의 센스 가닥 및 안티센스 가닥이 각각 적어도 하나의 wing 변형을 포함하는 경우, wing 변형은 듀플렉스 영역의 동일한 말단에 존재할 수 있으며, 1, 2 또는 3개의 뉴클레오티드의 중첩을 가진다.

[0291] RNAi 작용제의 센스 가닥 및 안티센스 가닥이 각각 적어도 2개의 wing 변형을 포함하는 경우, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은, 하나의 가닥으로부터 2개의 변형이 각각 듀플렉스 영역의 하나의 말단에 존재하고, 1, 2 또는 3개 뉴클레오티드의 중첩을 갖거나; 하나의 가닥으로부터 2개의 변형이 각각 듀플렉스 영역의 다른 말단에 존재하고, 1, 2 또는 3개의 뉴클레오티드 중첩을 갖거나; 하나의 가닥의 2개의 변형이 선도 모티프의 각각의 측에 존재하고, 듀플렉스 영역에서 1, 2 또는 3개 뉴클레오티드의 중첩을 갖도록 정렬될 수도 있다.

[0292] 일 구현예에서, 모티프의 일부인 뉴클레오티드를 포함하는 RNAi 작용제의 센스 가닥 및 안티센스 가닥 내의 모든 뉴클레오티드는 변형될 수 있다. 각각의 뉴클레오티드는, 비-연결 포스페이트 산소 중 하나 또는 둘 다 및/또는 연결 포스페이트 산소 중 하나 이상의 변경; 리보스 당의 구성성분의, 예를 들어, 리보스 당의 2'-하이드록실의 변경; 포스페이트 모이어티의 "데포스포" 링커로의 다수의 대체; 천연 발생 염기의 변형 또는 대체; 및 리보스-포스페이트 골격의 대체 또는 변형을 하나 이상 포함할 수 있는 동일하거나 상이한 변형으로 변형될 수 있다.

[0293] 핵산이 서브유닛의 폴리머이기 때문에, 다수의 변형은 핵산에서 반복되는 위치에서 발생하며, 이는 예를 들어, 염기, 또는 포스페이트 모이어티, 또는 포스페이트 모이어티의 비-연결 O의 변형이다. 일부 경우에, 변형은 핵산의 모든 대상 위치에서 발생할 것이지만, 많은 경우 그렇지 않을 것이다. 예를 들어, 변형은 3' 또는 5' 말단 위치에서만 발생할 수 있으며, 가닥의 말단 영역, 예를 들어 말단 뉴클레오티드 상의 위치, 또는 마지막 2, 3, 4, 5, 또는 10개 뉴클레오티드에서만 발생할 수 있다. 변형은 이중 가닥 영역, 단일 가닥 영역, 또는 두 영역

모두에서 발생할 수 있다. 변형은 RNA의 이중 가닥 영역에서만 발생할 수 있거나, 또는 RNA의 단일 가닥 영역에서만 발생할 수 있다. 예를 들어, 비-연결 0 위치에서의 포스포로티오에이트 변형은 한 말단 또는 양 말단 모두에서만 발생할 수 있거나, 가닥의 말단 영역, 예를 들어, 말단 뉴클레오타이드 상의 위치 또는 마지막 2, 3, 4, 5, 또는 10개 뉴클레오타이드에서만 발생할 수 있거나, 또는 이중 가닥 및 단일 가닥 영역, 특히 말단에서 발생할 수 있다. 5' 말단 또는 말단들은 인산화될 수 있다.

[0294] 예를 들어, 안정성을 증대시키거나, 오버행에 특정 염기를 포함하거나, 또는 단일 가닥 오버행, 예를 들어 5' 또는 3' 오버행 또는 둘 다에 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 대리물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 오버행에 퓨린 뉴클레오타이드를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 구현예에서, 3' 또는 5' 오버행 내의 염기 중 모두 또는 일부는 예를 들어, 본원에서 기술된 변형으로 변형될 수 있다. 변형으로는, 예를 들어, 해당 분야에 공지된 변형을 가지는 리보스 당의 2' 위치에서의 변형의 사용, 예를 들어, 핵염기의 리보당 대신에 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드, 2'-데옥시-2'-플루오로(2'-F) 또는 2'-O-메틸의 사용, 및 포스페이트 기에서의 변형, 예를 들어, 포스포로티오에이트 변형이 포함될 수 있다. 오버행은 표적 서열과 상동성일 필요가 없다.

[0295] 일 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 각각의 잔기는 독립적으로 LNA, HNA, CeNA, 2'-메톡시메틸, 2'-O-메틸, 2'-O-알릴, 2'-C-알릴, 2'-데옥시, 2'-하이드록실 또는 2'-플루오로로 변형된다. 가닥은 변형을 하나 초과로 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 잔기는 각각 독립적으로 2'-O-메틸 또는 2'-플루오로로 변형된다.

[0296] 적어도 2개의 상이한 변형은 전형적으로, 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 존재한다. 그들 2개의 변형은 2'-O-메틸 또는 2'-플루오로 변형, 또는 그외의 변형일 수 있다.

[0297] 일 구현예에서, N_a 및/또는 N_b 는 교대 패턴의 변형을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "교대 모티프"는 하나 이상의 변형을 갖는 모티프를 지칭하며, 각각의 변형은 하나의 가닥의 교대 뉴클레오타이드에서 발생한다. 교대 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 2개마다 하나, 또는 뉴클레오타이드 3개마다 하나 또는 유사한 패턴을 지칭할 수 있다. 예를 들어, A, B 및 C가 각각 뉴클레오타이드에 대한 하나의 유형의 변형을 나타내는 경우, 교대 모티프는 "ABABABABAB...", "AABBAABBAAB...", "AABAABAABAAB...", "AAABAAABAAAB...", "AAABBBAAABBB..." 또는 "ABCABCABCABC..." 등일 수 있다.

[0298] 교대 모티프에 포함되는 변형의 유형은 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 예를 들어, A, B, C, D가 각각 뉴클레오타이드 상에서 하나의 유형의 변형을 나타내는 경우, 교대 패턴, 즉 2개 뉴클레오타이드마다의 변형은 동일할 수 있지만, 센스 가닥 또는 안티센스 가닥은 각각 교대 모티프 예컨대 "ABABAB...", "ACACAC...", "BDBDBD..." 또는 "CDCDCD..." 등에서의 몇몇 가능한 변형으로부터 선택될 수 있다.

[0299] 일 구현예에서, 본 발명의 RNAi 작용제는, 안티센스 가닥에서의 교대 모티프에 대한 변형 패턴에 비하여 이동된, 센스 가닥에서의 교대 모티프에 대한 변형 패턴을 포함한다. 이 이동은, 센스 가닥의 뉴클레오타이드의 변형된 기가 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드의 상이하게 변형된 기에 상응하도록 이루어질 수 있으며, 그 반대이기도 하다. 예를 들어, 센스 가닥이 dsRNA 듀플렉스에서 안티센스 가닥과 쌍을 형성하는 경우, 센스 가닥 내의 교대 모티프는 가닥의 5'-3'으로부터 "ABABAB"로 시작할 수 있으며, 안티센스 가닥 내의 교대 모티프는 듀플렉스 영역 내의 가닥의 5'-3'으로부터 "BABABA"로부터 시작할 수 있다. 또 다른 예로서, 센스 가닥 내의 교대 모티프는 가닥의 5'-3'으로부터 "AABBAABB"로 시작할 수 있으며, 안티센스 가닥 내의 교대 모티프는 듀플렉스 영역 내의 가닥의 5'-3'으로부터 "BBAABBAA"로 시작하여, 센스 가닥과 안티센스 가닥 간의 변형 패턴의 완전하거나 또는 부분적인 이동이 존재하도록 할 수 있다.

[0300] 일 구현예에서, RNAi 작용제는 처음의 안티센스 가닥 상의 2'-O-메틸 변형 및 2'-F 변형의 교대 모티프의 패턴에 대해 이동을 갖는 처음의 센스 가닥 상의 2'-O-메틸 변형 및 2'-F 변형의 교대 모티프의 패턴을 포함하며, 즉, 센스 가닥 상의 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드는 안티센스 가닥 상의 2'-F 변형된 뉴클레오타이드와 염기 쌍을 형성하며, 그 반대이기도 하다. 센스 가닥의 위치 1은 2'-F 변형으로 시작할 수 있으며, 안티센스 가닥의 위치 1은 2'-O-메틸 변형으로 시작할 수 있다.

[0301] 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 동일한 변형으로 된 모티프를 하나 이상 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥에 도입하는 것은, 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥에 존재하는 초기 변형 패턴을 방해한다. 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 동일한 변형으로 된 모티프 하나 이상을 센스 및/또는 안티센스 가닥에 도입함으로써 센스 및/또는 안티센스 가닥의 변형 패턴을 방해하는 것은 놀랍게도, 표적 유전자에 대한 유전자 침묵화 활성을 증대시킨다.

- [0302] 일 구현예에서, 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 동일한 변형으로 된 모티프가 임의의 가닥에 도입되는 경우, 모티프의 옆에 있는 뉴클레오타이드의 변형은 모티프의 변형과 상이한 변형이다. 예를 들어, 모티프를 포함하는 서열의 부분은 "...N_aYYN_b...", "Y"는 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 동일한 변형으로 된 모티프의 변형을 나타내며, "N_a" 및 "N_b"는 Y의 변형과 상이한 모티프 "YYY"의 옆에 있는 뉴클레오타이드에 대한 변형을 나타내며, N_a 및 N_b는 동일하거나 또는 상이한 변형일 수 있다. 다르게는, N_a 및/또는 N_b는 wing 변형이 존재하는 경우 존재하거나 또는 부재할 수 있다.
- [0303] RNAi 작용제는 적어도 하나의 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합을 더 포함할 수 있다. 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합 변형은 가닥의 임의의 위치에서, 센스 가닥 또는 안티센스 가닥 또는 둘 모두의 가닥의 임의의 뉴클레오타이드에서 발생할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드간 결합 변형은 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥 상의 모든 뉴클레오타이드에서 발생할 수 있거나; 각각의 뉴클레오타이드간 결합 변형은 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥 상의 교대 패턴으로 발생할 수 있거나; 또는 센스 가닥 또는 안티센스 가닥은 교대 패턴에서 뉴클레오타이드간 결합 변형 둘 다를 포함할 수 있다. 센스 가닥 상의 뉴클레오타이드간 결합 변형의 교대 패턴은 안티센스 가닥과 동일하거나 또는 상이할 수 있으며, 센스 가닥 상의 뉴클레오타이드간 결합 변형의 교대 패턴은 안티센스 가닥 상의 뉴클레오타이드간 결합 변형의 교대 패턴에 대해 이동을 가질 수 있다. 일 구현예에서, 이중-가닥 RNAi 작용제는 6 내지 8개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 일 구현예에서, 안티센스 가닥은 5'-말단에 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 및 3'-말단에 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합을 포함하며, 센스 가닥은 5'-말단 또는 3'-말단 중 어느 한쪽에 적어도 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다.
- [0304] 일 구현예에서, RNAi는 오버행 영역에 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합 변형을 포함한다. 예를 들어, 오버행 영역은 2개의 뉴클레오타이드 간에 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합을 가지는 2개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드간 결합 변형은 또한, 듀플렉스 영역 내의 쌍을 형성하는 말단 뉴클레오타이드와 오버행 뉴클레오타이드를 연결하도록 이루어질 수 있다. 예를 들어, 적어도 2, 3, 4개 또는 모든 오버행 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합을 통해 연결될 수 있으며, 선택적으로, 오버행 뉴클레오타이드의 옆에 있는 쌍을 형성하는 뉴클레오타이드와 오버행 뉴클레오타이드를 연결하는 추가의 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합이 존재할 수 있다. 예를 들어, 3개의 말단 뉴클레오타이드 간에는 적어도 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합이 존재할 수 있으며, 3개의 뉴클레오타이드 중 2개는 오버행 뉴클레오타이드이며, 제3 뉴클레오타이드는 오버행 뉴클레오타이드 옆에 있는 쌍을 형성하는 뉴클레오타이드이다. 이들 3개의 말단 뉴클레오타이드는 안티센스 가닥의 3'-말단, 센스 가닥의 3'-말단, 안티센스 가닥의 5'-말단 및/또는 안티센스 가닥의 5' 말단에 존재할 수 있다.
- [0305] 일 구현예에서, 2개 뉴클레오타이드 오버행은 안티센스 가닥의 3'-말단에 존재하며, 3개의 말단 뉴클레오타이드 사이에는 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합이 존재하고, 3개의 뉴클레오타이드 중 2개는 오버행 뉴클레오타이드이며, 제3 뉴클레오타이드는 오버행 뉴클레오타이드 옆에 있는 쌍을 형성하는 뉴클레오타이드이다. 선택적으로, RNAi 작용제는 추가로 센스 가닥의 5'-말단과 안티센스 가닥의 5'-말단 둘 모두에서 3개의 말단 뉴클레오타이드 간에 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합을 가질 수 있다.
- [0306] 일 구현예에서, RNAi 작용제는 듀플렉스 내에서 표적과의 미스매치(들), 또는 그들의 조합을 포함한다. 미스매치는 오버행 영역 또는 듀플렉스 영역에서 발생할 수 있다. 염기 쌍은 해리 또는 용융을 촉진하는 그들의 특성을 기반으로 순위화될 수 있다(예를 들어, 특정 쌍형성의 회합 또는 해리의 자유 에너지를 기반으로, 가장 간단한 방법은 개별 쌍 기준으로 쌍을 시험하는 것이지만, 다음의 인접한 또는 유사한 분석이 또한 사용될 수 있음). 해리의 촉진 면에서, A:U는 G:C보다 바람직하며; G:U는 G:C보다 바람직하고; I:C는 G:C보다 바람직하다(I=이노신). 미스매치, 예를 들어, 비-표준(canonical) 또는 표준 이외의 쌍형성(본원에서 다른 곳에 기재된 바와 같음)은 표준(A:T, A:U, G:C) 쌍형성보다 바람직하며; 보편적인 염기를 포함하는 쌍형성이 표준 쌍형성보다 바람직하다.
- [0307] 일 구현예에서, RNAi 작용제는 듀플렉스의 5' 말단에 안티센스 가닥의 해리를 촉진하기 위해, 독립적으로 A:U, G:U, I:C, 및 미스매치된 쌍, 예를 들어, 비-표준 또는 표준 이외의 쌍형성 또는 보편적인 염기를 포함하는 쌍형성의 군으로부터 선택되는 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 듀플렉스 영역 내의 처음의 1, 2, 3, 4 또는 5개의 염기 쌍 중 적어도 하나를 포함한다.

- [0308] 일 구현예에서, 안티센스 가닥 내의 5'-말단으로부터 듀플렉스 영역 내의 위치 1의 뉴클레오티드는 A, dA, dU, U, 및 dT로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 다르게는, 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 듀플렉스 영역 내의 처음 1, 2 또는 3개의 염기 쌍 중 적어도 하나는 AU 염기쌍이다. 예를 들어, 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 듀플렉스 영역 내의 처음의 염기 쌍은 AU 염기 쌍이다.
- [0309] 또 다른 구현예에서, 센스 가닥의 3'-말단에서의 뉴클레오티드는 데옥시-티민(dT)이다. 또 다른 구현예에서, 안티센스 가닥의 3'-말단에서의 뉴클레오티드는 데옥시-티민(dT)이다. 일 구현예에서, 센스 및/또는 안티센스 가닥의 3'-말단에 데옥시-티민 뉴클레오티드, 예를 들어, 2개의 dT 뉴클레오티드의 짧은 서열이 존재한다.
- [0310] 일 구현예에서, 센스 가닥 서열은 화학식 (I)로 표시될 수 있다:
- [0311] [화학식 I]
- [0312] $5' n_p-N_a-(X X X)_i-N_b-Y Y Y-N_b-(Z Z Z)_j-N_a-n_q 3'$
- [0313] 상기 식에서:
- [0314] i 및 j는 각각 독립적으로 0 또는 1이고;
- [0315] p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 6이며;
- [0316] N_a 는 각각 독립적으로 0 내지 25개의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열을 나타내고, 각각의 서열은 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오티드를 포함하며;
- [0317] N_b 는 각각 독립적으로 0 내지 10개의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열을 나타내며;
- [0318] n_p 및 n_q 는 각각 독립적으로 오버행 뉴클레오티드를 나타내며;
- [0319] 여기서, N_b 및 Y는 동일한 변형을 가지지 않으며;
- [0320] XXX, YYY 및 ZZZ는 각각 독립적으로 3개의 연속 뉴클레오티드 상의 3개의 동일한 변형으로 된 하나의 모티프를 나타낸다. 바람직하게는, YYY는 모든 2'-F 변형된 뉴클레오티드이다.
- [0321] 일 구현예에서, N_a 및/또는 N_b 는 교대 패턴의 변형을 포함한다.
- [0322] 일 구현예에서, YYY 모티프는 센스 가닥의 절단 부위에 또는 그 근처에 존재한다. 예를 들어, RNAi 작용제가 17 내지 23개 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스 영역을 가지는 경우, YYY 모티프는 센스 가닥의 절단 부위에 또는 그 부근에 존재할 수 있으며(예를 들어, 위치 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 또는 11, 12, 13에 존재할 수 있음), 5'-말단으로부터 제1 뉴클레오티드에서 시작하여 계수하거나; 또는 선택적으로, 5'-말단으로부터 듀플렉스 영역 내의 쌍을 형성한 제1 뉴클레오티드에서 시작하여 계수한다.
- [0323] 일 구현예에서, i는 1이고, j는 0이거나, 또는 i는 0이고, j는 1이거나, 또는 i 및 j는 둘 모두 1이다. 따라서, 센스 가닥은 하기 화학식으로 표시될 수 있다:
- [0324] [화학식 Ib]
- [0325] $5' n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3'$;
- [0326] [화학식 Ic]
- [0327] $5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q 3'$; 또는
- [0328] [화학식 Id]
- [0329] $5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3'$.
- [0330] 센스 가닥이 화학식 Ib로 표시되는 경우, N_b 는 0 내지 10개, 0 내지 7개, 0 내지 5개, 0 내지 4개, 0 내지 2개 또는 0개의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열을 나타낸다. N_a 는 각각 독립적으로, 2 내지 20개, 2 내지 15개, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열을 나타낼 수 있다.

- [0331] 센스 가닥이 화학식 Ic로 표시되는 경우, N_b 는 0 내지 10개, 0 내지 7개, 0 내지 10개, 0 내지 7개, 0 내지 5개, 0 내지 4개, 0 내지 2개 또는 0개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. N_a 는 각각 독립적으로, 2 내지 20개, 2 내지 15개, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낼 수 있다.
- [0332] 센스 가닥이 화학식 Id로 표시되는 경우, N_b 는 각각 독립적으로, 0 내지 10개, 0 내지 7개, 0 내지 5개, 0 내지 4개, 0 내지 2개 또는 0개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 바람직하게는, N_b 는 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다. N_a 는 각각 독립적으로, 2 내지 20개, 2 내지 15개, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낼 수 있다.
- [0333] 각각의 X, Y 및 Z는 서로 동일하거나 또는 상이할 수 있다.
- [0334] 다른 구현예에서, i는 0이고, j는 0이고, 센스 가닥은 하기 화학식으로 표시될 수 있다:
- [0335] [화학식 Ia]
- [0336] $5' n_p-N_a-YYY-N_a-n_q 3'$
- [0337] 센스 가닥이 화학식 Ia로 표시되는 경우, N_a 는 각각 독립적으로 2 내지 20개, 2 내지 15개, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낼 수 있다.
- [0338] 일 구현예에서, RNAi의 안티센스 가닥 서열은 화학식 II로 표시될 수 있다:
- [0339] [화학식 II]
- [0340] $5' n_q'-N_a'-(Z'Z'Z')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(X'X'X')_l-N'a'-n_p' 3'$
- [0341] 상기 식에서:
- [0342] k 및 l은 각각 독립적으로 0 또는 1이고;
- [0343] p' 및 q'은 각각 독립적으로 0 내지 6이며;
- [0344] N_a' 은 각각 독립적으로 0 내지 25개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고, 각각의 서열은 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함하며;
- [0345] N_b' 은 각각 독립적으로 0 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내며;
- [0346] n_p' 및 n_q' 은 각각 독립적으로 오버행 뉴클레오타이드를 나타내며;
- [0347] 여기서, N_b' 및 Y'는 동일한 변형을 가지지 않으며;
- [0348] X'X'X', Y'Y'Y' 및 Z'Z'Z'은 각각 독립적으로 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 동일한 변형으로 된 하나의 모티프를 나타낸다.
- [0349] 일 구현예에서, N_a' 및/또는 N_b' 은 교대 패턴의 변형을 포함한다.
- [0350] Y'Y'Y' 모티프는 안티센스 가닥의 절단 부위에 또는 그의 근처에 존재한다. 예를 들어, RNAi 작용제가 17 내지 23개 뉴클레오타이드 길이의 듀플렉스 영역을 가지는 경우, Y'Y'Y' 모티프는 안티센스 가닥의 위치 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; 또는 13, 14, 15에 존재할 수 있으며, 5'-말단으로부터 제1 뉴클레오타이드에서 시작하여 계수하거나; 또는 선택적으로, 5'-말단으로부터 듀플렉스 영역 내의 쌍을 형성하는 제1 뉴클레오타이드에서 시작하여 계수한다. 바람직하게는, Y'Y'Y' 모티프는 위치 11, 12, 13에 존재한다.
- [0351] 일 구현예에서, Y'Y'Y' 모티프는 모두 2'-OMe 변형된 뉴클레오타이드이다.
- [0352] 일 구현예에서, k는 1이고, l는 0이거나, 또는 k는 0이고, l은 1이거나, 또는 k 및 l은 둘 모두 1이다.
- [0353] 따라서, 안티센스 가닥은 하기 화학식으로 표시될 수 있다:
- [0354] [화학식 IIb]

- [0355] $5' n_q-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_p' 3'$;
- [0356] [화학식 IIc]
- [0357] $5' n_q-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-n_p' 3'$ (IIc) ; 또는
- [0358] [화학식 IId]
- [0359] $5' n_q-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-N_a'-n_p' 3'$.
- [0360] 안티센스 가닥이 화학식 IIb로 표시되는 경우, N_b' 은 0 내지 10개, 0 내지 7개, 0 내지 10개, 0 내지 7개, 0 내지 5개, 0 내지 4개, 0 내지 2개 또는 0개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. N_a' 은 각각 독립적으로, 2 내지 20개, 2 내지 15개, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.
- [0361] 안티센스 가닥이 화학식 IIc로 표시되는 경우, N_b' 은 0 내지 10개, 0 내지 7개, 0 내지 10개, 0 내지 7개, 0 내지 5개, 0 내지 4개, 0 내지 2개 또는 0개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. N_a' 은 각각 독립적으로, 2 내지 20개, 2 내지 15개, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.
- [0362] 안티센스 가닥이 화학식 IId로 표시되는 경우, N_b' 은 각각 독립적으로, 0 내지 10개, 0 내지 7개, 0 내지 10개, 0 내지 7개, 0 내지 5개, 0 내지 4개, 0 내지 2개 또는 0개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. N_a' 은 각각 독립적으로 2 내지 20개, 2 내지 15개, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 바람직하게는, N_b 는 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.
- [0363] 다른 구현예에서, k 는 0이고, l 는 0이고, 안티센스 가닥은 하기 화학식으로 표시될 수 있다:
- [0364] [화학식 Ia]
- [0365] $5' n_p-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q' 3'$.
- [0366] 안티센스 가닥이 화학식 IIa로 표시되는 경우, N_a' 은 각각 독립적으로, 2 내지 20개, 2 내지 15개, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.
- [0367] 각각의 X' , Y' 및 Z' 는 서로 동일하거나 또는 상이할 수 있다.
- [0368] 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 각각의 뉴클레오타이드는 독립적으로 LNA, HNA, CeNA, 2'-메톡시에틸, 2'-O-메틸, 2'-O-알릴, 2'-C-알릴, 2'-하이드록실, 또는 2'-플루오로로 변형될 수 있다. 예를 들어, 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드는 각각 독립적으로 2'-O-메틸 또는 2'-플루오로로 변형된다. 각각의 X , Y , Z , X' , Y' 및 Z' 은 특히 2'-O-메틸 변형 또는 2'-플루오로 변형을 나타낼 수 있다.
- [0369] 일 구현예에서, RNAi 작용제의 센스 가닥은, 듀플렉스 영역이 21개 뉴클레오타이드인 경우, 가닥의 위치 9, 10 및 11에 존재하는 YYY 모티프를 포함할 수 있으며, 5'-말단으로부터 제1 뉴클레오타이드에서 시작하여 계수하거나, 또는 선택적으로, 5'-말단으로부터 듀플렉스 영역 내의 쌍을 형성하는 제1 뉴클레오타이드에서 시작하여 계수하고; Y 는 2'-F 변형을 나타낸다. 센스 가닥은 듀플렉스 영역의 반대쪽 말단에 XXX 모티프 또는 ZZZ 모티프를 쌍 변형으로서 추가로 포함할 수 있으며; XXX 및 ZZZ는 각각 독립적으로 2'-OMe 변형 또는 2'-F 변형을 나타낸다.
- [0370] 일 구현예에서, 안티센스 가닥은 가닥의 위치 11, 12 및 13에 존재하는 Y'Y'Y' 모티프를 포함할 수 있으며, 5'-말단으로부터 제1 뉴클레오타이드에서 시작하여 계수하거나, 또는 선택적으로, 5'-말단으로부터 듀플렉스 영역 내의 쌍을 형성한 제1 뉴클레오타이드에서 시작하여 계수하며; Y' 은 2'-O-메틸 변형을 나타낸다. 안티센스 가닥은 듀플렉스 영역의 반대쪽 말단에 X'X'X' 모티프 또는 Z'Z'Z' 모티프를 쌍 변형으로서 추가로 포함할 수 있으며; X'X'X' 및 Z'Z'Z'은 각각 독립적으로 2'-OMe 변형 또는 2'-F 변형을 나타낸다.
- [0371] 상기 화학식 Ia, Ib, Ic 및 Id 중 어느 하나로 표시되는 센스 가닥은, 각각 화학식 IIa, IIb, IIc 및 IId 중 어느 하나로 표시되는 안티센스 가닥과 듀플렉스를 형성한다.

- [0372] 따라서, 본 발명의 방법에 이용하기 위한 RNAi 작용제는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함할 수 있으며, 각각의 가닥은 14 내지 30개의 뉴클레오타이드를 가지며, RNAi 듀플렉스는 화학식 III으로 표시된다:
- [0373] [화학식 III]
- $$\begin{aligned} \text{센스:} & \quad 5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3' \\ \text{안티센스:} & \quad 3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5' \end{aligned}$$
- [0374]
- [0375] 상기 식에서:
- [0376] i, j, k, 및 l은 각각 독립적으로 0 또는 1이고;
- [0377] p, p', q, 및 q'은 각각 독립적으로 0 내지 6이며;
- [0378] N_a 및 N_a'은 각각 독립적으로, 0 내지 25개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고, 각각의 서열은 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함하며;
- [0379] N_b 및 N_b'은 각각 독립적으로 0 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내며;
- [0380] n_p', n_p, n_q', 및 n_q는 각각 존재하거나 존재하지 않을 수 있으며, 각각 독립적으로 오버행 뉴클레오타이드를 나타내고;
- [0381] XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' 및 Z'Z'Z'은 각각 독립적으로 3개의 연속 뉴클레오타이드 상의 3개의 동일한 변형으로 된 하나의 모티프를 나타낸다.
- [0382] 일 구현예에서, i는 0이고, j는 0이거나; 또는 i는 1이고, j는 0이거나; 또는 i는 0이고, j는 1이거나; 또는 i 및 j는 둘 모두 0이거나; 또는 i 및 j 둘 모두 1이다. 또 다른 구현예에서, k는 0이고, l은 0이거나; 또는 k는 1이고, l은 0이거나; 또는 k는 0이고, l은 1이거나; 또는 k 및 l은 둘 모두 0이거나; 또는 k 및 l은 둘 모두 1이다.
- [0383] RNAi 듀플렉스를 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 예시적인 조합은 하기 화학식을 포함한다:
- [0384] [화학식 IIIa]
- $$\begin{aligned} & 5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3' \\ & 3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5' \end{aligned}$$
- [0385]
- [0386] [화학식 IIIb]
- $$\begin{aligned} & 5' n_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3' \\ & 3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5' \end{aligned}$$
- [0387]
- [0388] [화학식 IIIc]
- $$\begin{aligned} & 5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_a - n_q 3' \\ & 3' n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5' \end{aligned}$$
- [0389]
- [0390] [화학식 IIId]
- $$\begin{aligned} & 5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3' \\ & 3' n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5' \end{aligned}$$
- [0391]
- [0392] RNAi 작용제가 화학식 IIIa로 표시되는 경우, N_a는 각각 독립적으로 2 내지 20개, 2 내지 15개, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.
- [0393] RNAi 작용제가 화학식 IIIb로 표시되는 경우, N_b는 각각 독립적으로 1 내지 10개, 1 내지 7개, 1 내지 5개 또는 1 내지 4개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. N_a는 각각 독립적으로 2 내지 20개, 2 내지 15개, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.

다.

- [0394] RNAi 작용제가 화학식 IIIc로 표시되는 경우, N_b , N_b' 은 각각 독립적으로 0 내지 10개, 0 내지 7개, 0 내지 10개, 0 내지 7개, 0 내지 5개, 0 내지 4개, 0 내지 2개 또는 0개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. N_a 는 각각 독립적으로 2 내지 20개, 2 내지 15개, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.
- [0395] RNAi 작용제가 화학식 IIId로 표시되는 경우, N_b , N_b' 은 각각 독립적으로 0 내지 10개, 0 내지 7개, 0 내지 10개, 0 내지 7개, 0 내지 5개, 0 내지 4개, 0 내지 2개 또는 0개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. N_a , N_a' 은 각각 독립적으로 2 내지 20개, 2 내지 15개, 또는 2 내지 10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. N_a , N_a' , N_b 및 N_b' 은 각각 독립적으로, 교대 패턴의 변형을 포함한다.
- [0396] 화학식 III, IIIa, IIIb, IIIc, 및 IIId에서 X, Y 및 Z 각각은 서로 동일하거나 또는 상이할 수 있다.
- [0397] RNAi 작용제가 화학식 III, IIIa, IIIb, IIIc 및 IIId로 표시되는 경우, Y 뉴클레오타이드 중 적어도 하나가 Y' 뉴클레오타이드 중 하나와 염기 쌍을 형성할 수 있다. 대안적으로, Y 뉴클레오타이드 중 적어도 2개는 상응하는 Y' 뉴클레오타이드와 염기 쌍을 형성하거나; 또는 3개의 Y 뉴클레오타이드 모두가 상응하는 Y' 뉴클레오타이드와 염기 쌍을 형성한다.
- [0398] RNAi 작용제가 화학식 IIIb 또는 IIId로 표시되는 경우, Z 뉴클레오타이드 중 적어도 하나가 Z' 뉴클레오타이드 중 하나와 염기 쌍을 형성할 수 있다. 대안적으로, Z 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 상응하는 Z' 뉴클레오타이드와 염기 쌍을 형성하거나; 또는 3개의 Z 뉴클레오타이드 모두가 상응하는 Z' 뉴클레오타이드와 염기 쌍을 형성한다.
- [0399] RNAi 작용제가 화학식 IIIc 또는 IIId로 표시되는 경우, X 뉴클레오타이드 중 적어도 하나가 X' 뉴클레오타이드 중 하나와 염기 쌍을 형성할 수 있다. 대안적으로, X 뉴클레오타이드 중 적어도 2개가 상응하는 X' 뉴클레오타이드와 염기 쌍을 형성하거나; 또는 3개의 X 뉴클레오타이드 모두가 상응하는 X' 뉴클레오타이드와 염기 쌍을 형성한다.
- [0400] 일 구현예에서, Y 뉴클레오타이드 상의 변형은 Y' 뉴클레오타이드 상의 변형과 상이하고/거나, Z 뉴클레오타이드 상의 변형은 Z' 뉴클레오타이드 상의 변형과 상이하고/거나, X 뉴클레오타이드 상의 변형은 X' 뉴클레오타이드 상의 변형과 상이하다.
- [0401] 일 구현예에서, RNAi 작용제가 화학식 IIId로 표시되는 경우, N_a 변형은 2'-O-메틸 또는 2'-플루오로 변형이다. 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제가 화학식 IIId로 표시되는 경우, N_a 변형은 2'-O-메틸 또는 2'-플루오로 변형이고, n_p '은 0 초과이며, 적어도 하나의 n_p '은 포스포로티오에이트 결합을 통해 인접한 뉴클레오타이드에 결합된다. 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제가 화학식 IIId로 표시되는 경우, N_a 변형은 2'-O-메틸 또는 2'-플루오로 변형이고, n_p '은 0 초과이며, 적어도 하나의 n_p '은 포스포로티오에이트 결합을 통해 인접한 뉴클레오타이드에 결합되고, 센스 가닥은 2가 또는 3가 분지형 링커를 통해 부착된 하나 이상의 GalNAc 유도체에 컨쥬게이트된다(하기에서 기술됨). 또 다른 구현예에서, RNAi 작용제가 화학식 IIId로 표시되는 경우, N_a 변형은 2'-O-메틸 또는 2'-플루오로 변형이고, n_p '은 0 초과이며, 적어도 하나의 n_p '은 포스포로티오에이트 결합을 통해 인접한 뉴클레오타이드에 결합되고, 센스 가닥은 적어도 하나의 포스포로티오에이트 결합을 포함하고, 센스 가닥은 2가 또는 3가 분지형 링커를 통해 부착된 하나 이상의 GalNAc 유도체에 컨쥬게이트된다.
- [0402] 일 구현예에서, RNAi 작용제가 화학식 IIIa로 표시되는 경우, N_a 변형은 2'-O-메틸 또는 2'-플루오로 변형이고, n_p '은 0 초과이며, 적어도 하나의 n_p '은 포스포로티오에이트 결합을 통해 인접한 뉴클레오타이드에 결합되고, 센스 가닥은 적어도 하나의 포스포로티오에이트 결합을 포함하고, 센스 가닥은 2가 또는 3가 분지형 링커를 통해 부착된 하나 이상의 GalNAc 유도체에 컨쥬게이트된다.
- [0403] 일 구현예에서, RNAi 작용제는 화학식 III, IIIa, IIIb, IIIc 및 IIId로 표시되는 적어도 2개의 듀플렉스를 포함하는 다량체이며, 듀플렉스는 링커에 의해 결합된다. 링커는 절단 가능하거나 또는 비-절단 가능할 수 있다. 선택적으로, 다량체는 리간드를 더 포함한다. 듀플렉스 각각은 동일한 유전자 또는 2개의 상이한 유전자를 표적화할 수 있거나; 또는 듀플렉스 각각은 2개의 상이한 표적 부위에서 동일한 유전자를 표적화할 수 있다.

- [0404] 일 구현예에서, RNAi 작용제는 화학식 III, IIIa, IIIb, IIIc 및 IIId로 표시되는 3, 4, 5, 6개 이상의 듀플렉스를 포함하는 다량체이며, 듀플렉스는 링커에 의해 결합된다. 링커는 절단 가능하거나 또는 비-절단 가능할 수 있다. 선택적으로, 다량체는 리간드를 더 포함한다. 듀플렉스 각각은 동일한 유전자 또는 2개의 상이한 유전자를 표적화할 수 있거나; 또는 듀플렉스 각각은 2개의 상이한 표적 부위에서 동일한 유전자를 표적화할 수 있다.
- [0405] 일 구현예에서, 화학식 III, IIIa, IIIb, IIIc 및 IIId로 표시되는 2개의 RNAi 작용제는 5' 말단에서 서로 결합되며, 3' 말단 중 하나 또는 둘 모두는 리간드에 선택적으로 컨쥬게이트된다. 작용제 각각은 동일한 유전자 또는 2개의 상이한 유전자를 표적화할 수 있거나; 또는 작용제 각각은 2개의 상이한 표적 부위에서 동일한 유전자를 표적화할 수 있다.
- [0406] 다양한 공개문헌에, 본 발명의 방법에 이용될 수 있는 다량체 RNAi 작용제가 기술되어 있다. 이러한 공개문헌에는, 각각 그 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 W02007/091269호, 미국 특허 제7858769호, W02010/141511호, W02007/117686호, W02009/014887호 및 W02011/031520호가 포함된다.
- [0407] 하기에 더욱 상세히 기술되는 바와 같이, RNAi 작용제로의 하나 이상의 탄수화물 모이어티의 컨쥬게이션을 포함하는 RNAi 작용제는 RNAi 작용제의 하나 이상의 특성을 최적화할 수 있다. 많은 경우, 탄수화물 모이어티는 RNAi 작용제의 변형된 서브유닛에 부착될 것이다. 예를 들어, dsRNA 작용제의 하나 이상의 리보뉴클레오티드 서브유닛의 리보스 당은 또 다른 모이어티, 예를 들어, 탄수화물 리간드가 부착된 비-탄수화물(바람직하게는, 사이클릭) 담체로 대체될 수 있다. 서브유닛의 리보스 당이 그와 같이 대체된 리보뉴클레오티드 서브유닛은 본원에서, 리보스 대체 변형 서브유닛(RRMS)으로 지칭된다. 사이클릭 담체는 카보사이클릭 고리계일 수 있으며, 즉, 모든 고리 원자가 탄소 원자이거나, 또는 헤테로사이클릭 고리계일 수 있으며, 즉, 하나 이상의 고리 원자가 헤테로원자, 예컨대 질소, 산소, 황일 수 있다. 사이클릭 담체는 모노사이클릭 고리계일 수 있거나, 또는 2개 이상의 고리, 예를 들어, 융합 고리를 포함할 수 있다. 사이클릭 담체는 완전 포화 고리계일 수 있거나, 또는 그것은 하나 이상의 이중 결합을 포함할 수 있다.
- [0408] 리간드는 담체를 통해 폴리뉴클레오티드에 부착될 수 있다. 담체는, (i) 적어도 하나의 "백본 부착점", 바람직하게는 2개의 "백본 부착점", 및 (ii) 적어도 하나의 "테더링(tethering) 부착점"을 포함한다. 본원에 사용되는 "백본 부착점"은 작용기, 예를 들어 하이드록실 기, 또는, 일반적으로 백본, 예를 들어, 리보핵산의 포스페이트, 또는 변형된 포스페이트, 예를 들어, 황 함유 백본으로의 담체의 혼입에 적절하며 이에 이용 가능한 결합을 지칭한다. 일부 구현예에서, "테더링 부착점"(TAP)은, 선택된 모이어티를 연결하는(백본 부착점을 제공하는 원자와 구별되는) 사이클릭 담체의 구성 고리 원자, 예컨대 탄소 원자 또는 헤테로원자를 지칭한다. 모이어티는, 예를 들어, 탄수화물, 예를 들어 단당류, 이당류, 삼당류, 사당류, 올리고당 및 다당류일 수 있다. 선택적으로, 선택된 모이어티는 개재 테더링(intervening tethering)에 의해 사이클릭 담체에 연결된다. 따라서, 사이클릭 담체는 종종 작용기, 예를 들어 아미노기를 포함하거나, 또는 일반적으로, 또 다른 화학적 엔티티, 예를 들어 리간드의 구성 고리로의 혼입 또는 테더링에 적절한 결합을 제공할 것이다.
- [0409] RNAi 작용제는 담체를 통해 리간드에 컨쥬게이트될 수 있으며, 담체는 사이클릭 기 또는 비사이클릭 기일 수 있으며; 바람직하게는, 사이클릭 기는 피롤리딘, 피라졸리딘, 피라졸리딘, 이미다졸리딘, 이미다졸리딘, 피페리딘, 피페라지딘, [1,3]디옥솔란, 옥사졸리딘, 이속사졸리딘, 모르폴리딘, 티아졸리딘, 이소티아졸리딘, 퀴녹살리딘, 피리다지노딘, 테트라하이드로푸릴 및 데칼린으로부터 선택되며; 바람직하게는, 비사이클릭 기는 세리놀 백본 또는 디에탄올아민 골격으로부터 선택된다.
- [0410] 구체적인 특정 구현예에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 RNAi 작용제는 표 3, 표 4, 표 5, 표 6, 표 18, 표 19, 표 20, 표 21 및 표 23 중 어느 하나에 열거된 작용제의 군으로부터 선택되는 작용제이다. 이들 작용제는 리간드를 더 포함할 수 있다.
- [0411] **IV. 리간드에 컨쥬게이트된 iRNA**
- [0412] 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 iRNA의 RNA의 또 다른 변형은 iRNA의 활성화, 세포 분포, 또는 세포 흡수를 향상시키는 하나 이상의 리간드, 모이어티 또는 컨쥬게이트를 RNA에 화학적으로 연결시키는 것을 포함한다. 이러한 모이어티는 지질 모이어티, 예를 들어, 콜레스테롤 모이어티(문헌[Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556]), 콜산(문헌[Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060]), 티오에테르, 예를 들어, 베릴-S-트리틸올(문헌[Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309]; 문헌[Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770]), 티오콜레스테롤(문헌[Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538]), 지방족 사슬, 예를 들어, 도데칸디올 또는 운데

실 잔기(문헌[Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118]; 문헌[Kabanov *et al.*, *FEBS Lett*, 1990, 259:327-330]; 문헌[Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49-54]), 인지질, 예를 들어, 디-핵사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸-암모늄 1,2-디-0-핵사데실-rac-글리세로-3-포스포네이트(문헌[Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654]; 문헌[Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783]), 폴리 아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬(문헌[Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973]), 또는 아다만탄 아세트산(문헌[Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654]), 팔미틸 모이어티(문헌[Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237]), 또는 옥타데실아민 또는 핵실아미노-카 보닐옥시콜레스테롤 모이어티(문헌[Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937])를 포함하 나, 이들에 제한되지는 않는다.

[0413] 일 구현예에서, 리간드는 혼입되는 iRNA 작용제의 분포, 표적화 또는 수명을 변경시킨다. 바람직한 구현예에서, 리간드는, 예를 들어, 이러한 리간드가 부재하는 중에 비해 선택된 표적, 예를 들어, 분자, 세포 또는 세포 유 형, 구획, 예를 들어, 세포 또는 기관 구획, 조직, 기관 또는 신체의 영역에 대하여 향상된 친화성을 제공한다. 바람직한 리간드는 듀플렉스화된 핵산 내의 듀플렉스 쌍 형성에 참여하지 않을 것이다.

[0414] 리간드는 천연 발생 물질, 예를 들어, 단백질(예를 들어, 인간 혈청 알부민(HSA), 저밀도 지질단백질(LDL), 또 는 글로불린); 탄수화물(예를 들어, 텍스트란, 풀루란(pullulan), 키틴, 키토산, 이눌린, 사이클로덱스트린, N-아세틸갈락토사민 또는 히알루론산); 또는 지질을 포함할 수 있다. 리간드는 또한 제조합 또는 합성 분자, 예를 들어, 합성 폴리머, 예를 들어, 합성 폴리아미노산일 수 있다. 폴리아미노산의 예는 폴리라이신(PLL), 폴리 L-아스파르트산, 폴리 L-글루탐산, 스티렌-말레산 무수물 코폴리머, 폴리(L-락티드-코-글리콜리드) 코폴리머, 디 비닐 에테르-말레산 무수물 코폴리머, N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아미드 코폴리머(HMPA), 폴리에틸렌 글리 콜(PEG), 폴리비닐 알콜(PVA), 폴리우레탄, 폴리(2-에틸아크릴산), N-이소프로필아크릴아미드 폴리머 또는 폴리 포스포진인 폴리아미노산을 포함한다. 폴리아민의 예는 폴리에틸렌이민, 폴리라이신(PLL), 스페르민, 스페르미 딘, 폴리아민, 슈도펩티드-폴리아민, 펩티드모방체(peptidomimetic) 폴리아민, 텐드리머 폴리아민, 아르기닌, 아미딘, 프로타민, 양이온성 지질, 양이온성 포르피린, 폴리아민의 4차염, 또는 알파 나선형 펩티드를 포함한다.

[0415] 리간드는 또한 표적화 기, 예를 들어, 세포 또는 조직 표적화 작용제, 예를 들어, 렉틴, 당단백질, 지질 또는 단백질, 예를 들어, 신장 세포와 같은 특정 세포 유형에 결합하는 항체를 포함할 수 있다. 표적화 기는 갑상샘 자극호르몬, 멜라노트로핀, 렉틴, 당단백질, 계면활성제 단백질 A, 뮤신 탄수화물, 다가 락토스, 일가 또는 다 가 갈락토스, N-아세틸-갈락토사민, N-아세틸-글루코사민 다가 만노스, 다가 푸코스, 당화된 폴리아미노산, 트 랜스페린, 비스포스포네이트, 폴리글루타메이트, 폴리아스파르테이트, 지질, 콜레스테롤, 스테로이드, 담즙산, 엽산염, 비타민 B12, 비타민 A, 비오틴, 또는 RGD 펩티드 또는 RGD 펩티드 모방체일 수 있다. 특정 구현예에서, 리간드는 일가 또는 다가 갈락토스를 포함한다. 특정 구현예에서, 리간드는 콜레스테롤을 포함한다.

[0416] 리간드의 다른 예는 염료, 삽입제(intercalating agent)(예를 들어, 아크리딘), 가교제(예를 들어, 소랄렌 (psoralene), 미토마이신 C), 포르피린(TPPC4, 텍사피린(texaphyrin), 사피린(Sapphyrin)), 폴리사이클릭 방향 족 탄화수소(예를 들어, 페나진(phenazine), 디하이드로페나진(dihydrophenazine)), 인공 엔도뉴클레아제(예를 들어, EDTA), 친유성 분자, 예를 들어, 콜레스테롤, 콜산, 아다만탄 아세트산, 1-피렌 부티르산, 디하이드로테 스토스테론, 1,3-비스-0(핵사데실)글리세롤, 제라닐옥시핵실기, 핵사데실글리세롤, 보르네올, 멘톨, 1,3-프로판 디올, 헵타데실기, 팔미트산, 미리스트산, 03-(올레오일)리토콜산, 03-(올레오일)콜렌산, 디메톡시트리틸, 또는 페녹사진) 및 펩티드 컨쥬게이트(예를 들어, 안테나페디아(antennapedia) 펩티드, Tat 펩티드), 알킬화제, 포스 페이트, 아미노, 머캡토, PEG(예를 들어, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, 폴리아미노, 알킬, 치환된 알킬, 방사성 표 지된 마커, 효소, 합텐(예를 들어, 비오틴), 운반/흡수 촉진제(예를 들어, 아스피린, 비타민 E, 엽산), 합성 리 보뉴클레아제(예를 들어, 이미다졸, 비스이미다졸, 히스타민, 이미다졸 클러스터, 아크리딘-이미다졸 컨쥬게이 트, 테트라아자마크로사이클의 Eu3+ 복합체), 디니트로페닐, HRP, 또는 AP를 포함한다.

[0417] 리간드는 단백질, 예를 들어, 당단백질, 또는 펩티드, 예를 들어, 공동-리간드에 대한 특이적 친화성을 갖는 분 자, 또는 항체, 예를 들어, 간 세포와 같은 특정 세포 유형에 결합하는 항체일 수 있다. 리간드는 또한 호르몬 및 호르몬 수용체를 포함할 수 있다. 그들은 또한 비-펩티드 중, 예를 들어, 지질, 렉틴, 탄수화물, 비타민, 보 조인자, 다가 락토스, 다가 갈락토스, N-아세틸-갈락토사민, N-아세틸-글루코사민 다가 만노스, 또는 다가 푸코 스를 포함할 수 있다. 리간드는, 예를 들어, 지질다당류, p38 MAP 키나제의 활성화제, 또는 NF-κB의 활성화제 일 수 있다.

- [0418] 리간드는 물질, 예를 들어, 세포의 미세관, 미세섬유, 및/또는 중간의 필라멘트를 붕괴시킴으로써 예를 들어, 세포의 세포골격을 붕괴시켜, 세포로의 iRNA 작용제의 흡수를 증가시킬 수 있는 약물일 수 있다. 약물은, 예를 들어, 탁손(taxon), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 사이토칼라신(cytochalasin), 노코다졸(nocodazole), 자플라키놀리드(japlakinolide), 라트룬쿨린 A(latrunculin A), 팔로이딘(phalloidin), 스윈홀리드 A(swinholide A), 인다노신(indanocine), 또는 미오서빈(myoservin)일 수 있다.
- [0419] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 iRNA에 부착된 리간드는 약동학적 조절제(PK 조절제)로 작용한다. PK 조절제는 친유성기(lipophile), 담즙산, 스테로이드, 인지질 유사체, 펩티드, 단백질 결합 작용제, PEG, 비타민 등을 포함한다. 예시적인 PK 조절제는 콜레스테롤, 지방산, 콜산, 리토콜산, 디알킬글리세리드, 디아실글리세리드, 인지질, 스펅고지질, 나프록센, 이부프로펜, 비타민 E, 비오틴 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다수의 포스포로티오에이트 결합을 포함하는 올리고뉴클레오티드는 또한 혈청 단백질에 결합하는 것으로 공지되어 있고, 이에 따라 짧은 올리고뉴클레오티드, 예를 들어, 백본 내에 다수의 포스포로티오에이트 결합을 포함하는 약 5개의 염기, 10개의 염기, 15개의 염기 또는 20개의 염기의 올리고뉴클레오티드가 또한 리간드(예를 들어, PK 조절 리간드)로서 본 발명에 적용 가능하다. 또한, 혈청 성분(예를 들어, 혈청 단백질)에 결합하는 aptamer가 또한 본원에 기재된 구현예에서 PK 조절 리간드로 사용하기에 적합하다.
- [0420] 본 발명의 리간드-컨쥬게이트된 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드(하기 기재)로의 연결 분자의 부착으로부터 유래되는 것과 같은 펜던트 반응성 작용기를 지니는 올리고뉴클레오티드의 사용에 의해 합성될 수 있다. 이러한 반응성 올리고뉴클레오티드는 상업적으로 입수 가능한 리간드, 다양한 보호기 중 어느 하나를 갖는 합성된 리간드 또는 그에 부착된 연결 모이어티를 갖는 리간드와 직접 반응할 수 있다.
- [0421] 본 발명의 컨쥬게이트에 사용되는 올리고뉴클레오티드는 널리 공지되어 있는 고체상 합성 기법을 통하여 편리하게 그리고 일상적으로 제조될 수 있다. 이러한 합성을 위한 장비는 예를 들어, 어플라이드 바이오시스템즈(미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재)를 포함하는 몇몇 판매처에 의해 시판된다. 해당 분야에 공지되어 있는 이러한 합성을 위한 임의의 다른 수단이 추가로 또는 대안적으로 사용될 수 있다. 또한, 다른 올리고뉴클레오티드, 예를 들어, 포스포로티오에이트 및 알킬화 유도체를 제조하기 위해 유사한 기법을 사용하는 것이 공지되어 있다.
- [0422] 본 발명의 리간드-컨쥬게이트된 올리고뉴클레오티드 및 리간드-분자 함유 서열-특이적 연결 뉴클레오타이드에서, 올리고뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오타이드는 표준 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 전구체, 또는 연결 모이어티를 이미 갖고 있는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 컨쥬게이트 전구체, 리간드 분자를 이미 갖고 있는 리간드-뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드-컨쥬게이트 전구체, 또는 비-뉴클레오타이드 리간드-함유 빌딩 블록(building block)을 사용하여 적합한 DNA 합성기에서 조립될 수 있다.
- [0423] 연결 모이어티를 이미 갖고 있는 뉴클레오타이드-컨쥬게이트 전구체를 사용하는 경우, 서열-특이적 연결 뉴클레오타이드의 합성이 전형적으로 완료된 다음, 리간드 분자는 연결 모이어티와 반응하여, 리간드-컨쥬게이트된 올리고뉴클레오타이드를 형성한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 또는 연결된 뉴클레오타이드는 표준 포스포르아미디트 및 상업적으로 입수 가능하며 올리고뉴클레오타이드 합성에서 일상적으로 사용되는 비-표준 포스포르아미디트에 더하여, 리간드-뉴클레오타이드 컨쥬게이트로부터 유래된 포스포르아미디트를 사용하여 자동화 합성기에 의해 합성된다.
- [0424] A. 지질 컨쥬게이트
- [0425] 일 구현예에서, 리간드 또는 컨쥬게이트는 지질 또는 지질-계 분자이다. 이러한 지질 또는 지질-계 분자는 바람직하게는 혈청 단백질, 예를 들어, 인간 혈청 알부민(HSA)에 결합한다. HSA 결합 리간드는 표적 조직, 예를 들어, 신체의 비-신장 표적 조직으로의 컨쥬게이트의 분포를 가능하게 한다. 예를 들어, 표적 조직은 간의 실질 세포를 포함하는 간일 수 있다. HSA에 결합할 수 있는 다른 분자가 또한 리간드로 사용될 수 있다. 예를 들어, 나프록센(naproxen) 또는 아스피린을 사용될 수 있다. 지질 또는 지질-계 리간드는 (a) 컨쥬게이트의 분해에 대한 내성을 증가시킬 수 있고/있거나, (b) 표적 세포 또는 세포막으로의 표적화 또는 운반을 증가시킬 수 있고/있거나, (c) 혈청 단백질, 예를 들어, HSA에 대한 결합을 조절하기 위해 사용될 수 있다.
- [0426] 지질계 리간드는 표적 조직으로의 컨쥬게이트의 결합을 억제, 예를 들어, 조절하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, HSA에 더욱 강하게 결합하는 지질 또는 지질-계 리간드는 신장으로 표적화될 가능성이 더 적고, 따라서 신체로부터 제거될 가능성이 더 적을 것이다. HSA에 덜 강하게 결합하는 지질 또는 지질-계 리간드는 컨쥬게이트를 신장으로 표적화시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0427] 바람직한 구현예에서, 지질계 리간드는 HSA에 결합한다. 바람직하게는, 이는 컨쥬게이트가 바람직하게는 비-신

장 조직으로 분포되도록 하기에 충분한 친화성으로 HSA에 결합한다. 그러나, 친화성은 HSA-리간드 결합이 역전될 수 없을 만큼 너무 강하지 않은 것이 바람직하다.

[0428] 또 다른 바람직한 구현예에서, 지질계 리간드는 HSA에 약하게 결합하거나 전혀 결합하지 않아, 컨쥬게이트가 바람직하게는 신장에 분포되게 할 것이다. 신장 세포로 표적화되는 다른 모이어티가 또한 지질계 리간드 대신에 또는 지질계 리간드에 더하여 사용될 수 있다.

[0429] 또 다른 양태에서, 리간드는 표적 세포, 예를 들어, 증식하는 세포에 의해 흡수되는 모이어티, 예를 들어, 비타민이다. 이들은, 예를 들어, 악성 또는 비-악성 유형, 예를 들어, 암 세포의 원치 않는 세포 증식을 특징으로 하는 장애를 치료하는데 특히 유용하다. 예시적인 비타민은 비타민 A, E, 및 K를 포함한다. 다른 예시적인 비타민은 비타민 B, 예를 들어, 엽산, B12, 리보플라빈, 비오틴, 피리독살 또는 표적 세포, 예를 들어, 간 세포에 의해 흡수되는 다른 비타민 또는 영양소를 포함한다. 또한, HSA 및 저밀도 지질단백질(LDL)이 포함된다.

[0430] B. 세포 투과 작용제

[0431] 또 다른 양태에서, 리간드는 세포-투과 작용제, 바람직하게는 나선형 세포-투과 작용제이다. 바람직하게는, 상기 작용제는 양친매성이다. 예시적 작용제는 펩티드, 예를 들어, tat 또는 안테노페디아(antennopedia)이다. 상기 작용제가 펩티드인 경우, 이는 변형되어, 펩티드모방체(peptidylmimetic), 인버토머(invertomer), 비-펩티드 또는 슈도-펩티드 결합, 및 D-아미노산의 사용을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 나선형 작용제는 바람직하게는 친유성 및 소수성 상을 갖는 알파-나선형 작용제이다.

[0432] 리간드는 펩티드 또는 펩티드모방체일 수 있다. 펩티드모방체(본원에서 올리고펩티드모방체로도 지칭)는 천연 펩티드와 유사한 규정된 3-차원 구조로 폴딩될 수 있는 분자이다. iRNA 작용제로의 펩티드 및 펩티드모방체의 부착은, 예를 들어, 세포 인식 및 흡수를 향상시킴으로써 iRNA의 약동학적 분포에 영향을 미칠 수 있다. 펩티드 또는 펩티드모방체 모이어티는 약 5 내지 50개 아미노산 길이, 예를 들어, 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개 아미노산 길이일 수 있다.

[0433] 펩티드 또는 펩티드모방체는, 예를 들어, 세포 투과 펩티드, 양이온성 펩티드, 양친매성 펩티드, 또는 소수성 펩티드(예를 들어, 주로 Tyr, Trp 또는 Phe로 구성됨)일 수 있다. 펩티드 모이어티는 텐드리머 펩티드, 구속된 펩티드 또는 가교된 펩티드일 수 있다. 또 다른 대안에서, 펩티드 모이어티는 소수성 막 전위 서열(MTS)을 포함할 수 있다. 예시적인 소수성 MTS-함유 펩티드는 아미노산 서열 AAVALLPAVLLALLAP(SEQ ID NO: 3)를 갖는 RFGF이다. 소수성 MTS를 함유하는 RFGF 유사체(예를 들어, 아미노산 서열 AALLPVLLAAP(SEQ ID NO: 4))가 또한 표적화 모이어티일 수 있다. 펩티드 모이어티는 세포막을 가로지르는 펩티드, 올리고뉴클레오타이드 및 단백질을 포함하는 큰 극성 분자를 가질 수 있는 "전달" 펩티드일 수 있다. 예를 들어, HIV Tat 단백질(GRKKRRQRRPPQ(SEQ ID NO: 5)) 및 드로소필라(Drosophila) 안테나페디아 단백질(RQIKIWFAQNRRMKWKK(SEQ ID NO: 6))로부터의 서열은 전달 펩티드로서 작용할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 파지-디스플레이 라이브러리, 또는 1-비드-1-화합물(OBOC) 조합 라이브러리로부터 확인된 펩티드와 같은 펩티드 또는 펩티드모방체는 DNA의 무작위 서열에 의해 인코딩될 수 있다(문헌[Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991]). 세포 표적화 목적을 위해 혼입된 단량체 단위를 통하여 dsRNA 작용제에 결합된 펩티드 또는 펩티드모방체의 예는 아르기닌-글리신-아스파르트산(RGD)-펩티드, 또는 RGD 모방체이다. 펩티드 모이어티는 약 5개의 아미노산 내지 약 40개의 아미노산 길이의 범위일 수 있다. 펩티드 모이어티는, 예를 들어, 안정성을 증가시키거나 입체구조 특성을 유도하기 위해 구조적 변형을 가질 수 있다. 하기 기재되는 구조적 변형 중 임의의 변형이 이용될 수 있다.

[0434] 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기 위한 RGD 펩티드는 선형 또는 환형일 수 있으며, 변형되어, 예를 들어, 글리코실화 또는 메틸화되어, 특정 조직(들)으로의 표적화를 용이하게 할 수 있다. RGD-함유 펩티드 및 펩티드모방체는 D-아미노산 및 합성 RGD 모방체를 포함할 수 있다. RGD에 더하여, 인테그린 리간드를 표적화하는 다른 모이어티를 사용할 수 있다. 이러한 리간드의 바람직한 컨쥬게이트는 PECAM-1 또는 VEGF를 표적화한다.

[0435] "세포 투과 펩티드"는 세포, 예를 들어, 미생물 세포, 예를 들어, 박테리아 또는 진균 세포, 또는 포유동물 세포, 예를 들어, 인간 세포를 투과할 수 있다. 미생물 세포-투과 펩티드는, 예를 들어, α -나선형 선형 펩티드(예를 들어, LL-37 또는 세로핀 P1(Ceropin P1)), 이황화 결합-함유 펩티드(예를 들어, α -디펜신(α -defensin), β -디펜신 또는 박테네신(bactenecin)), 또는 단지 1개 또는 2개의 우세 아미노산을 함유하는 펩티드(예를 들어, PR-39 또는 인돌리시딘(indolicidin))일 수 있다. 세포 투과 펩티드는 또한 핵 위치 신호(NLS)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 세포 투과 펩티드는 SV40 큰 T 항원의 NLS 및 HIV-1 gp41의 융합 펩티드 도메인으로부터 유래되는 MPG와 같은 양분된 양친매성 펩티드일 수 있다(문헌[Simeoni *et al.*, Nucl.Acids Res.

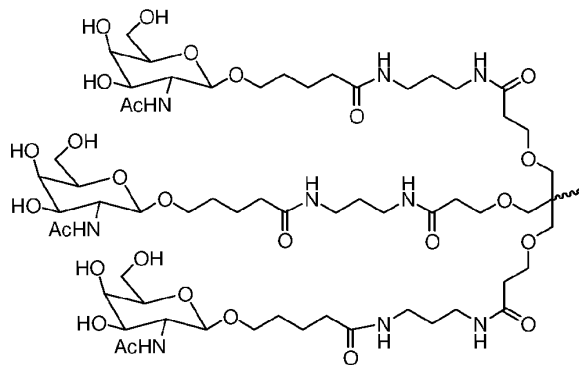
31:2717-2724, 2003]).

C. 탄수화물 컨쥬게이트

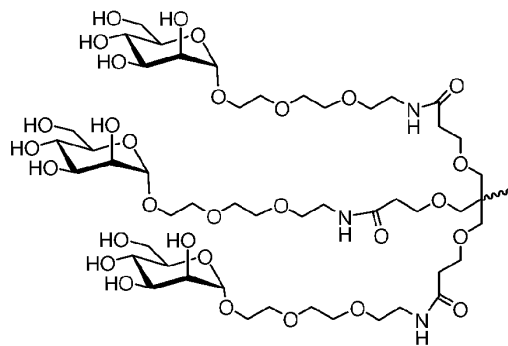
본 발명의 조성물 및 방법의 일부 구현예에서, iRNA 올리고뉴클레오티드는 탄수화물을 더 포함한다. 탄수화물 컨쥬게이트된 iRNA는 핵산 및 본원에 기재된 바와 같은 생체 내 치료 용도에 적합한 조성물의 생체내 전달에 유리하다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "탄수화물"은 그 자체가 각각의 탄소 원자에 결합된 산소, 질소 또는 황 원자와 함께 적어도 6개의 탄소 원자(선형이거나, 분지형이거나, 환형일 수 있음)를 갖는 하나 이상의 단당류 단위로 구성되는 탄수화물인 화합물; 또는 각각의 탄소 원자에 결합된 산소, 질소 또는 황 원자와 함께 적어도 6개의 탄소 원자(선형이거나, 분지형이거나, 환형일 수 있음)를 각각 갖는 하나 이상의 단당류 단위로 구성되는 탄수화물 모이어티를 그의 일부로서 갖는 화합물을 나타낸다. 대표적인 탄수화물은 당(단당류, 이당류, 삼당류 및 약 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의 단당류 단위를 함유하는 올리고당류), 및 다당류, 예를 들어, 전분, 글리코젠, 셀룰로스 및 다당류 검을 포함한다. 특이적인 단당류는 C5 이상(예를 들어, C5, C6, C7 또는 C8)의 당을 포함하고; 이당류 및 삼당류는 2개 또는 3개의 단당류 단위(예를 들어, C5, C6, C7 또는 C8)를 갖는 당을 포함한다.

일 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기 위한 탄수화물 컨쥬게이트는 단당류이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기 위한 탄수화물 컨쥬게이트는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

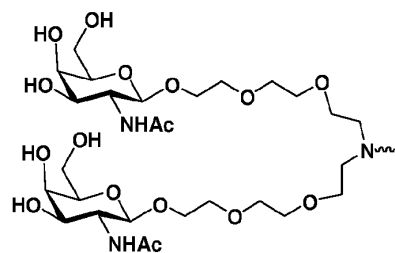
[화학식 II]



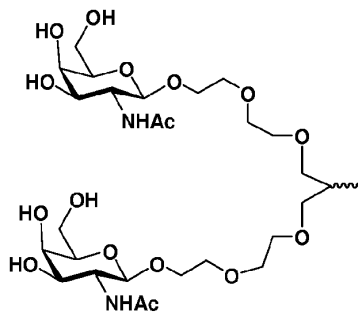
[화학식 III]



[화학식 IV]

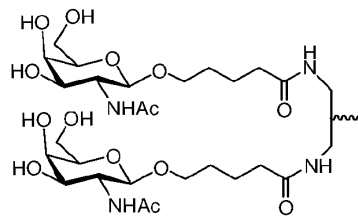


[화학식 V]



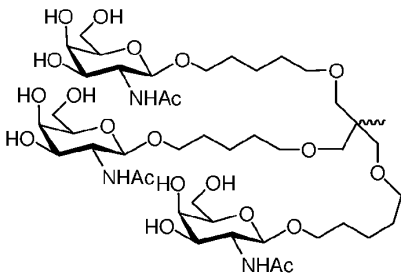
[0446]

[0447] [화학식 VI]



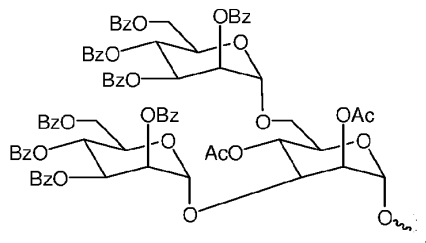
[0448]

[0449] [화학식 VII]



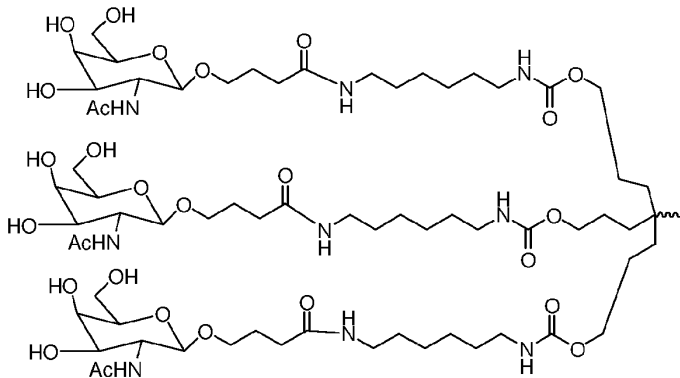
[0450]

[0451] [화학식 VIII]



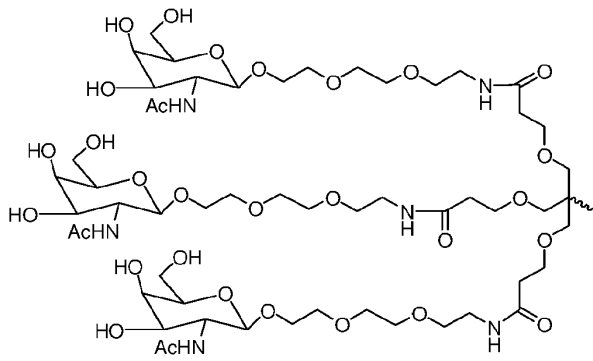
[0452]

[0453] [화학식 IX]



[0454]

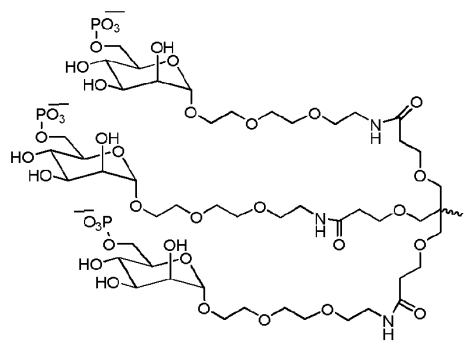
[0455] [화학식 X]



[0456]

[0457]

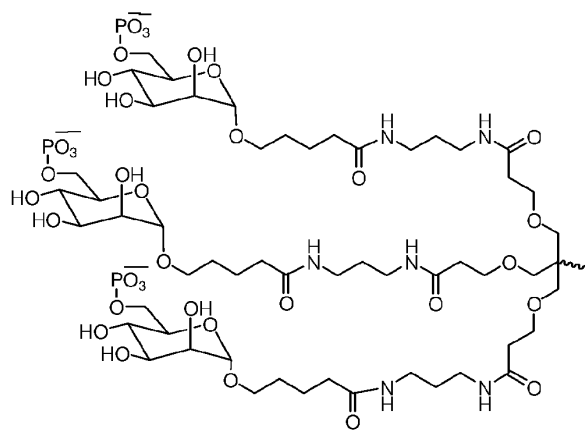
[화학식 XI]



[0458]

[0459]

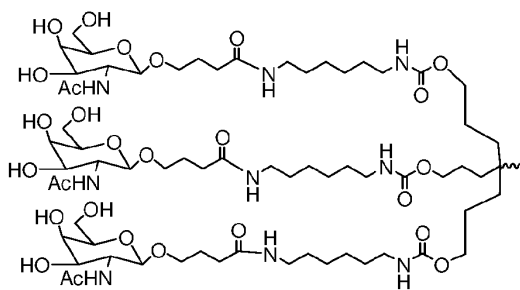
[화학식 XII]



[0460]

[0461]

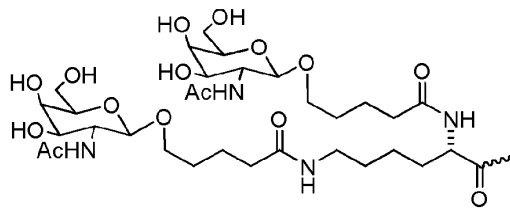
[화학식 XIII]



[0462]

[0463]

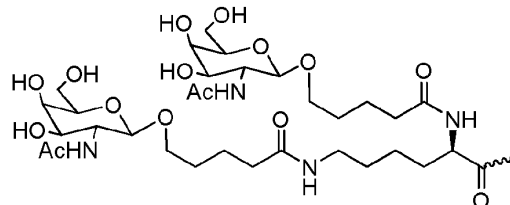
[화학식 XIV]



[0464]

[0465]

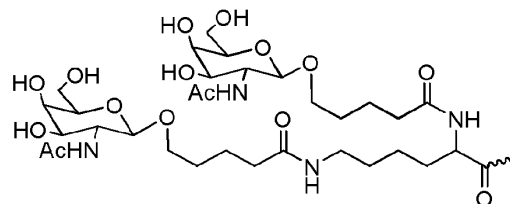
[화학식 XV]



[0466]

[0467]

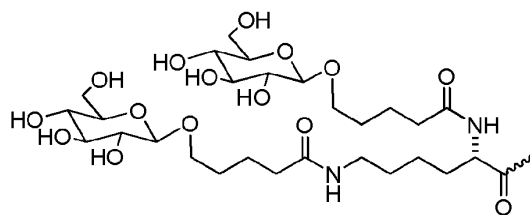
[화학식 XVI]



[0468]

[0469]

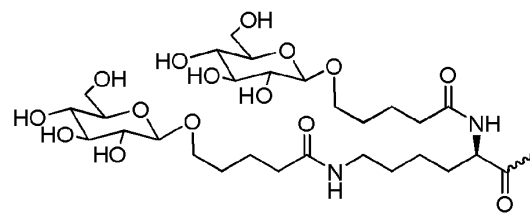
[화학식 XVII]



[0470]

[0471]

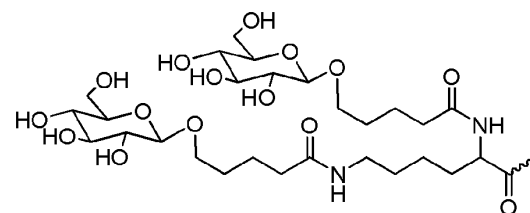
[화학식 XVIII]



[0472]

[0473]

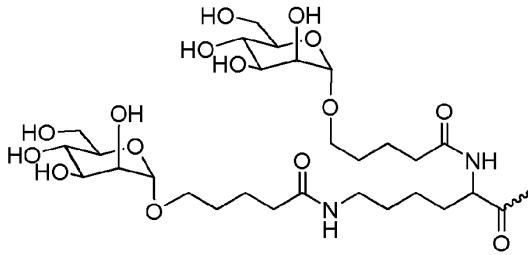
[화학식 XIX]



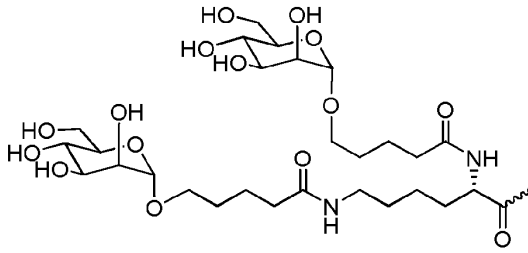
[0474]

[0475]

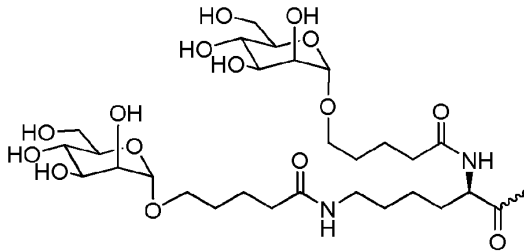
[화학식 XX]



[화학식 XXI]

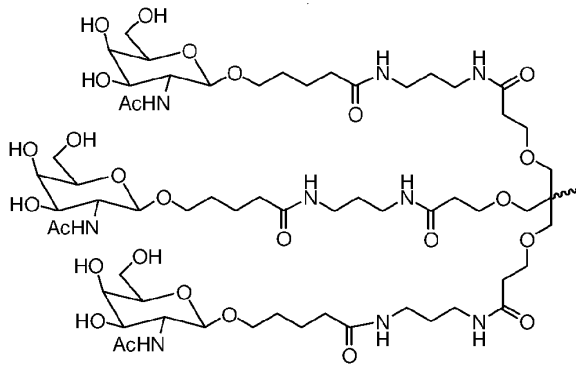


[화학식 XXII]



일 구현예에서, 당당류는 N-아세틸갈락토사민, 예를 들어,

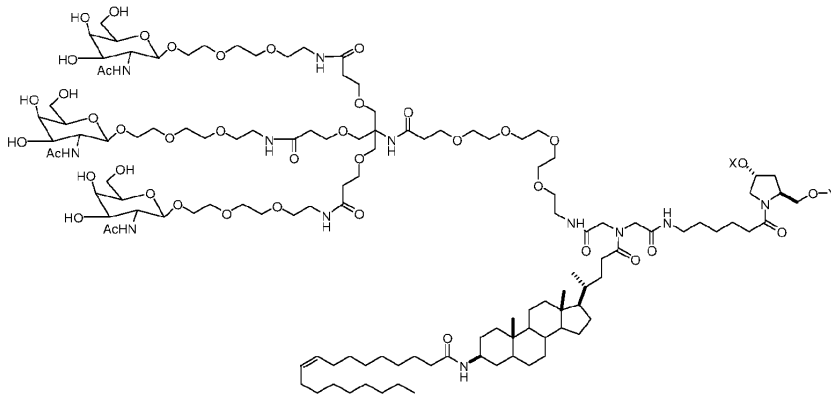
[화학식 II]



이다.

본원에 기재된 구현예에 사용하기 위한 또 다른 대표적인 탄수화물 컨쥬게이트는 하기 화학식을 포함하나 이에 제한되지 않는다:

[0485] [화학식 XXIII]



[0486]

[0487] 상기 식에서, X 또는 Y 중 하나가 올리고뉴클레오티드인 경우, 다른 것은 수소이다.

[0488]

본 발명의 특정 구현예에서, GalNAc 또는 GalNAc 유도체는 1가 링커를 통해 본 발명의 iRNA 작용제에 부착된다. 일부 구현예에서, GalNAc 또는 GalNAc 유도체는 2가 링커를 통해 본 발명의 iRNA 작용제에 부착된다. 본 발명의 또 다른 구현예에서, GalNAc 또는 GalNAc 유도체는 3가 링커를 통해 본 발명의 iRNA 작용제에 부착된다.

[0489]

일 구현예에서, 본 발명의 이중 가닥 RNAi 작용제는 iRNA 작용제에 부착된 하나의 GalNAc 또는 GalNAc 유도체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 이중 가닥 RNAi 작용제는 각각이 독립적으로 복수의 1가 링커를 통해 이중 가닥 RNAi 작용제의 복수의 뉴클레오티드에 부착된 복수의(예를 들어, 2, 3, 4, 5 또는 6개의) GalNAc 또는 GalNAc 유도체를 포함한다.

[0490]

일부 구현예에서, 예를 들어, 본 발명의 iRNA 작용제의 2개의 가닥이 한 가닥의 3'-말단과 각각의 다른 가닥의 5'-말단 간의 비단속 뉴클레오티드 사슬에 의해 연결되어, 복수의 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오티드를 포함하는 헤어핀 루프를 형성하는 하나의 더 큰 분자의 일부인 경우, 헤어핀 루프 내의 각각의 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오티드는 독립적으로 1가 링커를 통해 부착된 GalNAc 또는 GalNAc 유도체를 포함할 수 있다. 헤어핀 루프는 또한, 듀플렉스의 하나의 가닥 내의 연장된 오버행에 의해 형성될 수도 있다.

[0491]

일부 구현예에서, 탄수화물 컨쥬게이트는 상술된 바와 같은 하나 이상의 추가의 리간드, 예컨대 비제한적으로, PK 조절제 및/또는 세포 투과 펩티드를 더 포함한다.

[0492]

본 발명에서 이용하기 적합한 추가의 탄수화물 컨쥬게이트는 PCT 공개 제WO 2014/179620호 및 WO 2014/179627호에 기재된 것들을 포함하며, 그 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0493]

D. 링커

[0494]

일부 구현예에서, 본원에 기재된 컨쥬게이트 또는 리간드는 절단 가능하거나 또는 절단 가능하지 않을 수 있는 다양한 링커를 사용하여 iRNA 올리고뉴클레오티드에 부착될 수 있다.

[0495]

용어 "링커" 또는 "연결기"는 화합물의 2개의 부분을 연결시키는, 예를 들어, 화합물의 2개 부분을 공유적으로 부착시키는 유기 모이어티를 의미한다. 링커는 통상적으로 직접 결합 또는 원자, 예를 들어, 산소 또는 황, 단위, 예를 들어, NR₈, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH 또는 원자의 사슬, 예를 들어, 비제한적으로, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알케닐, 치환되거나 비치환된 알킬닐, 아릴알킬, 아릴알케닐, 아릴알킬닐, 헤테로아릴알킬, 헤테로아릴알케닐, 헤테로아릴알킬닐, 헤테로사이클릴알킬, 헤테로사이클릴알케닐, 헤테로사이클릴알킬닐, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 알킬아릴알킬, 알킬아릴알케닐, 알킬아릴알킬닐, 알케닐아릴알킬, 알케닐아릴알케닐, 알케닐아릴알킬닐, 알킬닐아릴알킬, 알킬닐아릴알케닐, 알킬닐아릴알킬닐, 알킬헤테로아릴알킬, 알킬헤테로아릴알케닐, 알킬헤테로아릴알킬닐, 알케닐헤테로아릴알킬, 알케닐헤테로아릴알케닐, 알케닐헤테로아릴알킬닐, 알킬닐헤테로아릴알킬, 알킬닐헤테로아릴알케닐, 알킬닐헤테로아릴알킬닐, 알킬헤테로사이클릴알킬, 알킬헤테로사이클릴알케닐, 알킬헤테로사이클릴알킬닐, 알케닐헤테로사이클릴알킬, 알케닐헤테로사이클릴알케닐, 알케닐헤테로사이클릴알킬닐, 알킬닐헤테로사이클릴알킬, 알킬닐헤테로사이클릴알케닐, 알킬닐헤테로사이클릴알킬닐, 알킬아릴, 알케닐아릴, 알킬닐아릴, 알킬헤테로아릴, 알케닐헤테로아릴, 알킬닐헤테로아릴을 포함하며, 하나 이상의 메틸렌은 O, S, S(O), SO₂, N(R₈), C(O), 치환되거나 비치환된 아릴, 치환되거나 비치환된 헤테로아릴, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릭에 의해 개재

되거나 종결될 수 있고, R8은 수소, 아실, 지방족 또는 치환된 지방족이다. 일 구현예에서, 링커는 약 1 내지 24개의 원자, 2 내지 24개, 3 내지 24개, 4 내지 24개, 5 내지 24개, 6 내지 24개, 6 내지 18개, 7 내지 18개, 8 내지 18개의 원자, 7 내지 17개, 8 내지 17개, 6 내지 16개, 7 내지 16개 또는 8 내지 16개의 원자이다.

[0496] 절단 가능한 연결기는 세포 외부에서 충분히 안정적이거나, 표적 세포로의 진입시 절단되어 링커가 함께 고정시킨 2개의 부분을 방출시키는 것이다. 바람직한 구현예에서, 절단 가능한 연결기는 대상체의 혈액 내, 또는 제2 참조 조건(예를 들어, 혈액 또는 혈청에서 발견되는 조건을 모방하거나 나타내도록 선택될 수 있음)하에서 보다 표적 세포 내 또는 제1 참조 조건(예를 들어, 세포내 조건을 모방하거나 나타내도록 선택될 수 있음)하에서 적어도 약 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 이상 또는 적어도 약 100배 더 신속하게 절단된다.

[0497] 절단 가능한 연결기는 절단 작용제, 예를 들어, pH, 산화환원 전위 또는 분해성 분자의 존재에 감수성이다. 일반적으로, 절단 작용제는 혈청 또는 혈액 내에서보다 세포 내부에서 더욱 일반적이거나, 더 높은 수준 또는 활성으로 발견된다. 이러한 분해성 작용제의 예는 환원에 의해 산화환원 절단 가능한 연결기를 분해시킬 수 있는, 세포 내에 존재하는, 예를 들어, 머캅탄과 같은 산화 또는 환원 효소 또는 환원제를 포함하는, 특정 기질에 대해 선택되거나 기질 특이성을 갖지 않는 산화환원 작용제; 에스테라제; 산성 환경을 발생시킬 수 있는 엔도솜 또는 작용제, 예를 들어, 5 이하의 pH를 초래하는 엔도솜 또는 작용제; 일반 산으로 작용함으로써 산 절단 가능한 연결기를 가수분해시키거나 분해시킬 수 있는 효소인 펩티다제(기질 특이적일 수 있음), 및 포스파타제를 포함한다.

[0498] 절단 가능한 연결기, 예를 들어, 이황화 결합은 pH에 감수성일 수 있다. 인간 혈청의 pH는 7.4인 한편, 평균 세포내 pH는 약 7.1 내지 7.3의 범위로 약간 낮다. 엔도솜은 5.5 내지 6.0의 범위의 더욱 산성인 pH를 갖고, 리소솜은 약 5.0에서 더욱 더 산성 pH를 갖는다. 일부 링커는 바람직한 pH에서 절단됨으로써, 세포 내부의 리간드로부터, 또는 세포의 요망되는 구획으로 양이온성 지질을 방출시키는 절단 가능한 연결기를 가질 것이다.

[0499] 링커는 특정 효소에 의해 절단될 수 있는 절단 가능한 연결기를 포함할 수 있다. 링커 내로 혼입된 절단 가능한 연결기의 유형은 표적화되는 세포에 좌우될 수 있다. 예를 들어, 간-표적화 리간드는 에스테르기를 포함하는 링커를 통해 양이온성 지질에 연결될 수 있다. 간 세포에는 에스테라제가 풍부하고, 이에 따라, 링커는 에스테라제가 풍부하지 않은 세포 유형에서보다 간 세포에서 더욱 효과적으로 절단될 것이다. 에스테라제가 풍부한 다른 세포-유형은 폐, 신장 피질, 및 고환의 세포를 포함한다.

[0500] 펩티드 결합을 함유하는 링커는 펩티다제가 풍부한 세포 유형, 예를 들어, 간 세포 및 운할막세포를 표적화하는 경우에 사용될 수 있다.

[0501] 일반적으로, 절단 가능한 후보 연결기의 적합성은 후보 연결기를 절단시키는 분해성 작용제(또는 조건)의 능력을 시험함으로써 평가될 수 있다. 또한, 혈액 내에서 또는 다른 비-표적 조직과 접촉시 절단에 저항하는 능력에 대해 절단 가능한 후보 연결기를 시험하는 것이 요망될 것이다. 따라서, 제1 조건과 제2 조건 사이의 절단에 대한 상대 감수성을 결정할 수 있으며, 제1 조건은 표적 세포 내에서의 절단을 나타내도록 선택되고, 제2 조건은 다른 조직 또는 생물학적 유체, 예를 들어, 혈액 또는 혈청에서의 절단을 나타내도록 선택된다. 평가는 무세포 시스템, 세포, 세포 배양물, 기관 또는 조직 배양물, 또는 전체 동물에서 수행될 수 있다. 무세포 또는 배양물 조건에서 최초 평가를 수행하고, 전체 동물에서 추가의 평가에 의해 확인하는 것이 유용할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 유용한 후보 화합물은 혈액 또는 혈청(또는 세포외 조건을 모방하도록 선택된 시험관 내 조건 하)에 비해 세포(또는 세포내 조건을 모방하도록 선택된 시험관 내 조건 하)에서 적어도 약 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 약 100배 더 신속히 절단된다.

[0502] i. 산화환원 절단 가능한 연결기

[0503] 일 구현예에서, 절단 가능한 연결기는 환원 또는 산화 시에 절단되는 산화환원 절단 가능한 연결기이다. 환원적 절단 가능한 연결기의 예는 이황화물 연결기(-S-S-)이다. 절단 가능한 후보 연결기가 적합한 "환원적 절단 가능한 연결기"인지, 또는 예를 들어, 특정 iRNA 모이어티 또는 특정 표적화 작용제와 함께 사용하기에 적합한지 결정하기 위해, 본원에 기재된 방법을 참조할 수 있다. 예를 들어, 후보물질은 세포, 예를 들어, 표적 세포에서 관찰될 절단 속도를 모방하는 해당 분야에 공지된 시약을 이용하여 디티오프레이톨(DTT), 또는 다른 환원제와의 인큐베이션에 의해 평가될 수 있다. 후보물질은 또한 혈액 또는 혈청 조건을 모방하도록 선택되는 조건 하에서 평가될 수 있다. 일 구현예에서, 후보 화합물은 혈액 내에서 최대 약 10%까지 절단된다. 다른 구현예에서, 유용한 후보 화합물은 혈액(또는 세포외 조건을 모방하도록 선택된 시험관 내 조건 하)에 비해 세포(또는 세포내 조

건을 모방하도록 선택된 시험관 내 조건 하)에서 적어도 약 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 약 100배 더 신속히 분해된다. 후보 화합물의 절단 속도는 세포내 매질을 모방하도록 선택된 조건 하에서 표준 효소 동역학 검정을 이용하여 결정될 수 있고, 세포외 매질을 모방하도록 선택된 조건과 비교될 수 있다.

[0504] *ii. 포스페이트-기반의 절단 가능한 연결기*

[0505] 또 다른 구현예에서, 절단 가능한 링커는 포스페이트-기반의 절단 가능한 연결기를 포함한다. 포스페이트-기반의 절단 가능한 연결기는 포스페이트기를 분해하거나 가수분해시키는 작용제에 의해 절단된다. 세포 내에서 포스페이트기를 절단시키는 작용제의 예는 세포 내의 포스파타제와 같은 효소이다. 포스페이트-기반의 연결기의 예는 $-O-P(O)(OR_k)-O-$, $-O-P(S)(OR_k)-O-$, $-O-P(S)(SR_k)-O-$, $-S-P(O)(OR_k)-O-$, $-O-P(O)(OR_k)-S-$, $-S-P(O)(OR_k)-S-$, $-O-P(S)(OR_k)-S-$, $-S-P(S)(OR_k)-O-$, $-O-P(O)(R_k)-O-$, $-O-P(S)(R_k)-O-$, $-S-P(O)(R_k)-O-$, $-S-P(S)(R_k)-O-$, $-S-P(O)(R_k)-S-$, $-O-P(S)(R_k)-S-$ 이다. 바람직한 구현예는 $-O-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(S)(SH)-O-$, $-S-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(O)(OH)-S-$, $-S-P(O)(OH)-S-$, $-O-P(S)(OH)-S-$, $-S-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(O)(H)-O-$, $-O-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-O-$, $-S-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-S-$, $-O-P(S)(H)-S-$ 이다. 바람직한 구현예는 $-O-P(O)(OH)-O-$ 이다. 이들 후보물질은 상기 기재된 것들과 유사한 방법을 이용하여 평가될 수 있다.

[0506] *iii. 산 절단 가능한 연결기*

[0507] 또 다른 구현예에서, 절단 가능한 링커는 산 절단 가능한 연결기를 포함한다. 산 절단 가능한 연결기는 산성 조건 하에서 절단되는 연결기이다. 바람직한 구현예에서, 산 절단 가능한 연결기는 약 6.5 이하(예를 들어, 약 6.0, 5.75, 5.5, 5.25, 5.0 이하)의 pH를 갖는 산성 환경 내에서, 또는 일반 산으로 작용할 수 있는 효소와 같은 작용제에 의해 절단된다. 세포 내에서, 특정한 낮은 pH 소기관, 예를 들어, 엔도솜 및 리소솜이 산 절단 가능한 연결기에 대한 절단 환경을 제공할 수 있다. 산 절단 가능한 연결기의 예는 하이드라존, 에스테르, 및 아미노산의 에스테르를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 산 절단 가능한 기는 일반식 $-C=NN-$, $C(O)O$, 또는 $-OC(O)$ 를 가질 수 있다. 에스테르(알콕시기)의 산소에 부착된 탄소가 아릴기, 치환된 알킬기, 또는 3차 알킬기, 예를 들어, 디메틸 펜틸 또는 t-부틸인 경우가 바람직한 구현예이다. 이들 후보물질은 상기 기재된 것들과 유사한 방법을 이용하여 평가될 수 있다.

[0508] *iv. 에스테르-기반의 연결기*

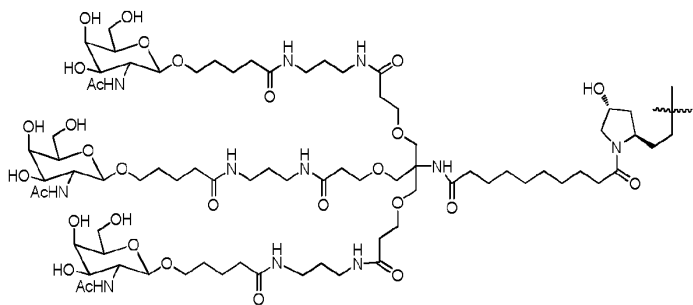
[0509] 또 다른 구현예에서, 절단 가능한 링커는 에스테르-기반의 절단 가능한 연결기를 포함한다. 에스테르-기반의 절단 가능한 연결기는 세포 내의 에스테라제 및 아미다제와 같은 효소에 의해 절단된다. 에스테르-기반의 절단 가능한 연결기의 예는 알킬렌, 알케닐렌 및 알키닐렌기의 에스테르를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 에스테르 절단 가능한 연결기는 일반식 $-C(O)O-$, 또는 $-OC(O)-$ 를 갖는다. 이들 후보물질은 상기 기재된 것과 유사한 방법을 이용하여 평가될 수 있다.

[0510] *v. 펩티드-기반의 절단기*

[0511] 또 다른 구현예에서, 절단 가능한 링커는 펩티드-기반의 절단 가능한 연결기를 포함한다. 펩티드-기반의 절단 가능한 연결기는 세포 내의 펩티다제 및 프로테아제와 같은 효소에 의해 절단된다. 펩티드-기반의 절단 가능한 연결기는 아미노산 사이에 형성되어, 올리고펩티드(예를 들어, 디펩티드, 트리펩티드 등) 및 폴리펩티드를 제공하는 펩티드 결합이다. 펩티드-기반의 절단 가능한 기는 아마이드기($-C(O)NH-$)를 포함하지 않는다. 아마이드기는 임의의 알킬렌, 알케닐렌 또는 알키닐렌 사이에 형성될 수 있다. 펩티드 결합은 펩티드 및 단백질을 생성시키기 위해 아미노산 사이에 형성되는 아마이드 결합의 특별한 유형이다. 펩티드 기반의 절단기는 일반적으로 아미노산 사이에 형성되어, 펩티드 및 단백질을 제공하는 펩티드 결합(즉, 아마이드 결합)으로 제한되고, 전체 아마이드 작용기를 포함하지 않는다. 펩티드-기반의 절단 가능한 연결기는 일반식 $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$ 를 가지며, 여기서 RA 및 RB는 2개의 인접한 아미노산의 R 기이다. 이들 후보물질은 상기 기재된 것과 유사한 방법을 이용하여 평가될 수 있다.

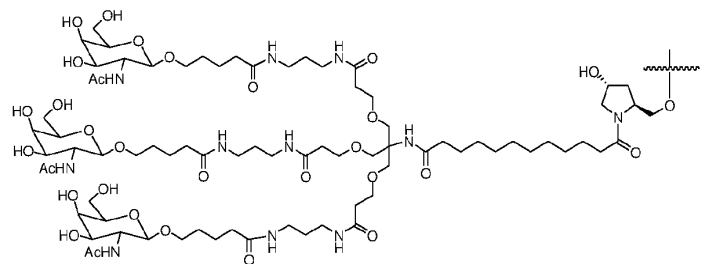
[0512] 일 구현예에서, 본 발명의 iRNA는 링커를 통해 탄수화물에 컨쥬게이트된다. 본 발명의 조성물 및 방법의 링커를 갖는 iRNA 탄수화물 컨쥬게이트의 비제한적인 예에는 하기 화학식이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다:

[0513] [화학식 XXIV]



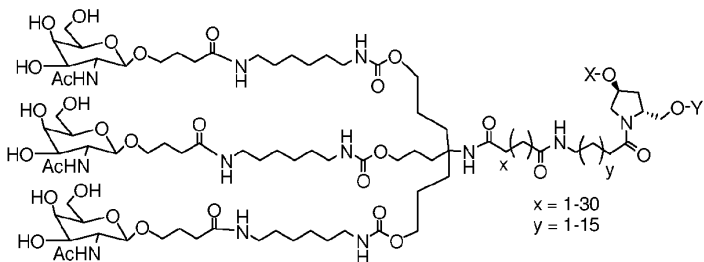
[0514]

[0515] [화학식 XXV]



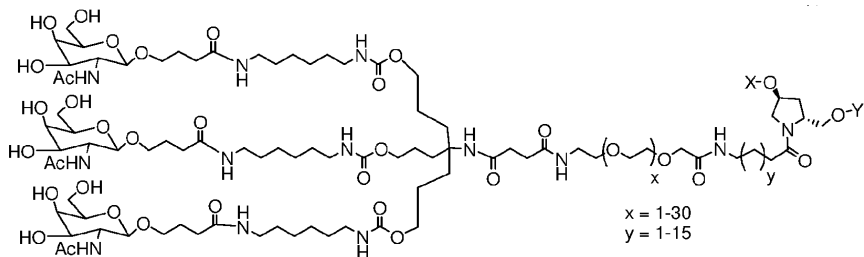
[0516]

[0517] [화학식 XXVI]



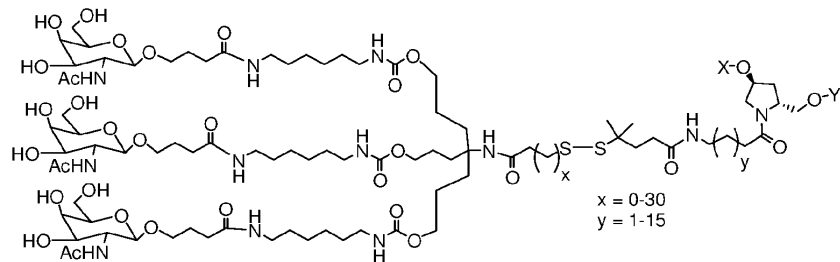
[0518]

[0519] [화학식 XXVII]



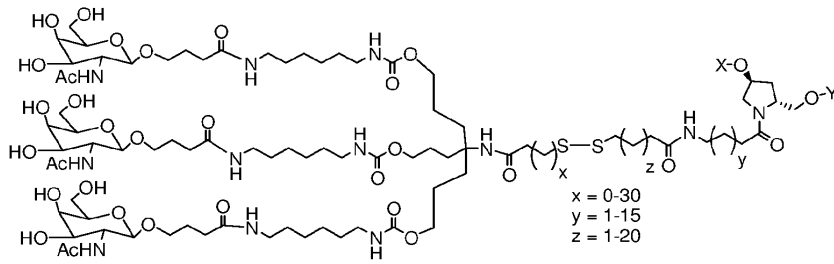
[0520]

[0521] [화학식 XXVIII]

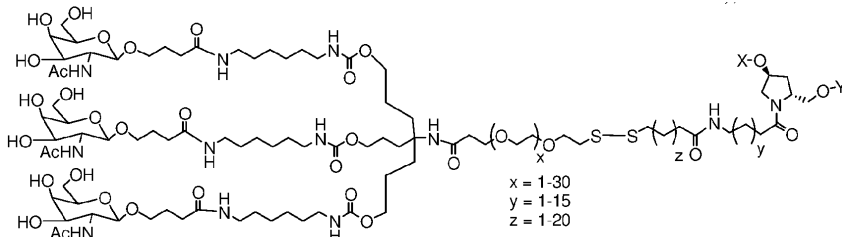


[0522]

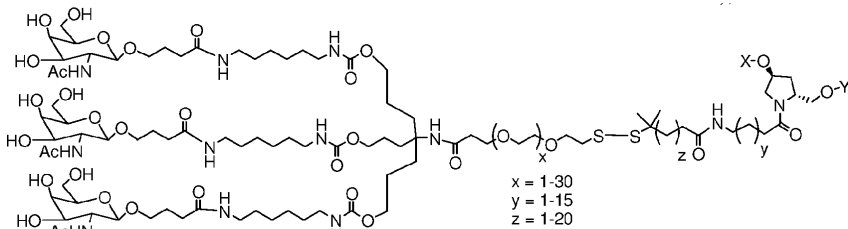
[0523] [화학식 XXIX]



[화학식 XXX]



[화학식 XXXI]



상기 식에서,

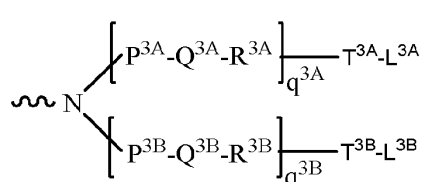
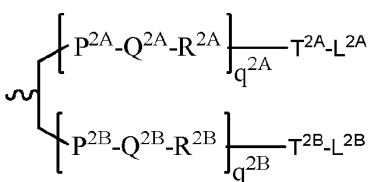
X 또는 Y 중 하나가 올리고뉴클레오타이드인 경우, 다른 것은 수소이다.

본 발명의 조성물 및 방법의 특정 실시형태에서, 리간드는 2가 또는 3가 분지형 링커를 통하여 부착된 하나 이상의 GalNAc(N-아세틸갈락토사민) 유도체이다.

일 구현예에서, 본 발명의 dsRNA는 화학식 (XXXII) 내지 (XXXV) 중 어느 하나에 나타난 구조의 군으로부터 선택되는 2가 또는 3가 분지형 링커에 컨쥬게이트된다:

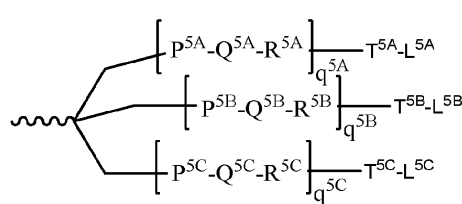
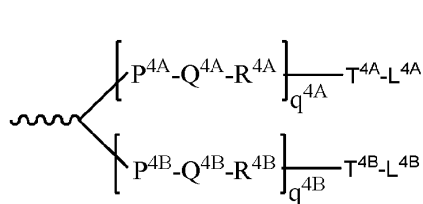
[화학식 XXXII]

[화학식 XXXIII]



[화학식 XXXIV]

[화학식 XXXV]



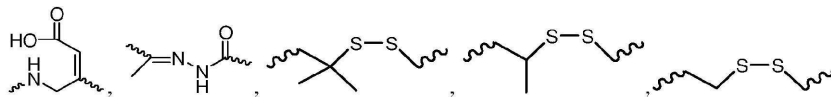
상기 식에서,

[0538] q2A, q2B, q3A, q3B, q4A, q4B, q5A, q5B 및 q5C는 각각의 경우 독립적으로, 0 내지 20을 나타내며, 여기서, 반복 단위는 동일하거나 상이할 수 있으며;

[0539] P^{2A}, P^{2B}, P^{3A}, P^{3B}, P^{4A}, P^{4B}, P^{5A}, P^{5B}, P^{5C}, T^{2A}, T^{2B}, T^{3A}, T^{3B}, T^{4A}, T^{4B}, T^{4A}, T^{5B}, T^{5C}는 각각의 경우 독립적으로, 부재, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH 또는 CH₂O이며;

[0540] Q^{2A}, Q^{2B}, Q^{3A}, Q^{3B}, Q^{4A}, Q^{4B}, Q^{5A}, Q^{5B}, Q^{5C}는 각각의 경우 독립적으로, 부재, 알킬렌, 치환된 알킬렌이며, 여기서, 하나 이상의 메틸렌은 O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C 또는 C(O) 중 하나 이상에 의해 개재되거나, 종결될 수 있으며;

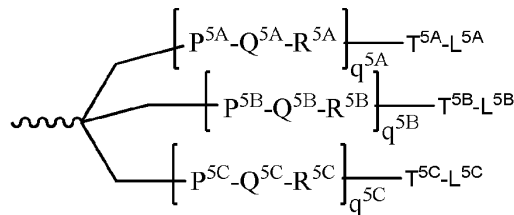
[0541] R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{5C}는 각각의 경우 각각 독립적으로, 부재, NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-O,



또는 헤테로사이클릴이며;

[0542] L^{2A}, L^{2B}, L^{3A}, L^{3B}, L^{4A}, L^{4B}, L^{5A}, L^{5B} 및 L^{5C}는 리간드; 즉, 각각의 경우 각각 독립적으로, 단당류(예를 들어, GalNAc), 이당류, 삼당류, 사당류, 올리고당류 또는 다당류를 나타내고; R^a는 H 또는 아미노산 측쇄이다. 3가 컨쥬게이팅 GalNAc 유도체, 예를 들어 화학식 XXXVI의 것들은 표적 유전자의 발현을 억제하기 위한 RNAi 작용제와 함께 사용하기에 특히 유용하다:

[0543] [화학식 XXXVI]



[0544]

[0545] 상기 식에서,

[0546] L^{5A}, L^{5B} 및 L^{5C}는 단당류, 예를 들어, GalNAc 유도체를 나타낸다.

[0547] GalNAc 유도체를 컨쥬게이트시키는 적합한 2가 및 3가 분지형 링커 기의 예에는 화학식 II, VII, XI, X 및 XIII로서 상기에 언급된 구조가 포함되나 이에 한정되지 않는다.

[0548] RNA 컨쥬게이트의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 미국 특허 제4,828,979호; 4,948,882호; 5,218,105호; 5,525,465호; 5,541,313호; 5,545,730호; 5,552,538호; 5,578,717호; 5,580,731호; 5,591,584호; 5,109,124호; 5,118,802호; 5,138,045호; 5,414,077호; 5,486,603호; 5,512,439호; 5,578,718호; 5,608,046호; 4,587,044호; 4,605,735호; 4,667,025호; 4,762,779호; 4,789,737호; 4,824,941호; 4,835,263호; 4,876,335호; 4,904,582호; 4,958,013호; 5,082,830호; 5,112,963호; 5,214,136호; 5,082,830호; 5,112,963호; 5,214,136호; 5,245,022호; 5,254,469호; 5,258,506호; 5,262,536호; 5,272,250호; 5,292,873호; 5,317,098호; 5,371,241호; 5,391,723호; 5,416,203호; 5,451,463호; 5,510,475호; 5,512,667호; 5,514,785호; 5,565,552호; 5,567,810호; 5,574,142호; 5,585,481호; 5,587,371호; 5,595,726호; 5,597,696호; 5,599,923호; 5,599,928호 및 5,688,941호; 6,294,664호; 6,320,017호; 6,576,752호; 6,783,931호; 6,900,297호; 7,037,646호; 8,106,022호를 포함하나, 이에 제한되지 않으며, 각각의 전체 내용은 참조로서 본원에 포함된다.

[0549] 제공된 화합물 내의 모든 위치가 균일하게 변형될 필요는 없고, 사실상, 상기 언급된 변형 중 하나보다 많은 변형이 단일 화합물 내 또는 심지어 iRNA 내의 단일의 뉴클레오타이드에 혼입될 수 있다. 본 발명은 또한 키메라 화합물인 iRNA 화합물을 포함한다.

[0550] 본 발명의 맥락에서 "키메라" iRNA 화합물 또는 "키메라"는 dsRNA 화합물의 경우에 적어도 하나의 단량체 단위, 즉, 뉴클레오티드로 각각 구성된 2개 이상의 화학적으로 별개의 영역을 함유하는 iRNA 화합물, 바람직하게는 dsRNA이다. 이들 iRNA는 통상적으로, 뉴클레아제 분해에 대한 증가된 내성, 증가된 세포 흡수, 및/또는 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화성을 iRNA에 부여하도록 RNA가 변형된 적어도 하나의 영역을 함유한다. iRNA의 추가의 영역은 RNA:DNA 또는 RNA:RNA 혼성물을 절단시킬 수 있는 효소에 대한 기질로 작용할 수 있다. 예를 들어, RNase H는 RNA:DNA 듀플렉스의 RNA 가닥을 절단시키는 세포 엔도뉴클레아제이다. 따라서, RNase H의 활성화는 RNA 표적의 절단을 초래하고, 이에 의해 유전자 발현의 iRNA 억제에 효능을 크게 향상시킨다. 결과적으로, 키메라 dsRNA가 사용되는 경우 동일한 표적 영역에 혼성화되는 포스포로티오에이트 대역시 dsRNA에 비해, 더 짧은 iRNA를 이용하여 유사한 결과가 종종 획득될 수 있다. RNA 표적의 절단은 일상적으로 겔 전기영동 및, 필요시, 해당 분야에 공지된 관련된 핵산 혼성화 기법에 의해 검출될 수 있다.

[0551] 특정 예에서, iRNA의 RNA는 비-리간드 기에 의해 변형될 수 있다. iRNA의 활성, 세포 분포 또는 세포 흡수를 향상시키기 위해 다수의 비-리간드 분자가 iRNA에 컨주게이션되고, 이러한 컨주게이션을 수행하기 위한 절차는 과학 문헌에서 이용 가능하다. 이러한 비-리간드 모이어티는 지질 모이어티, 예를 들어, 콜레스테롤(문헌[Kubo, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61]; 문헌[Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553]), 콜산(문헌[Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053]), 티오에테르, 예를 들어, 핵실-S-트리틸티오(문헌[Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306]; 문헌[Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765]), 티오콜레스테롤(문헌[Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533]), 지방족 사슬, 예를 들어, 도데칸디올 또는 운데실 잔기(문헌[Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10:111]; 문헌[Kabanov et al., *FEBS Lett*, 1990, 259:327]; 문헌[Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49]), 인지질, 예를 들어, 디-핵사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸 암모늄 1,2-디-0-핵사데실-rac-글리세롤-3-H-포스포네이트(문헌[Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651]; 문헌[Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777]), 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬(문헌[Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969]), 또는 아다만탄 아세트산(문헌[Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651]), 팔미틸 모이어티(문헌[Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229]), 또는 옥타데실아민 또는 핵실아미노-카보닐-옥시콜레스테롤 모이어티(문헌[Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923])를 포함한다. 이러한 RNA 컨주게이트의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허가 상기에 나열되어 있다. 통상적 컨주게이션 프로토콜은 서열의 하나 이상의 위치에 아미노링커를 갖는 RNA의 합성을 포함한다. 이후, 아미노기는 적절한 커플링 또는 활성화 시약을 이용하여 컨주게이션되는 분자와 반응된다. 컨주게이션 반응은 용액 상에서 고체 지지체에 여전히 고정된 RNA와 함께 수행될 수 있거나, RNA의 분해 후에 수행될 수 있다. HPLC에 의한 RNA 컨주게이트의 정제는 통상적으로 순수한 컨주게이트를 제공한다.

[0552] IV. 본 발명의 iRNA의 전달

[0553] 세포, 예를 들어, 인간 대상체(예를 들어, PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 장애를 갖는 대상체와 같이 본 발명의 iRNA의 전달을 필요로 하는 대상체)와 같은 대상체 내의 세포로의 본 발명의 iRNA의 전달은 다수의 상이한 방식으로 달성될 수 있다. 예를 들어, 전달은 세포를 시험관 내 또는 생체 내에서 본 발명의 iRNA와 접촉시킴으로써 수행될 수 있다. 또한, 생체 내 전달은 iRNA, 예를 들어, dsRNA를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여함으로써 직접적으로 수행될 수 있다. 대안적으로, 생체 내 전달은 iRNA를 인코딩하고 이의 발현을 유도하는 하나 이상의 벡터를 투여함으로써 간접적으로 수행될 수 있다. 이들 대안은 하기에 추가로 논의된다.

[0554] 일반적으로, (시험관 내 또는 생체 내에서) 핵산 분자를 전달하는 임의의 방법이 본 발명의 iRNA와의 사용을 위해 조정될 수 있다(예를 들어, 전문이 참조로서 본원에 포함되는, 문헌[Akhtar S. and Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144] 및 W094/02595호 참조). 생체 내 전달을 위하여, iRNA 분자를 전달하기 위해 고려할 요인에는 예를 들어, 전달된 분자의 생물학적 안정성, 비특이적 효과의 방지, 및 표적 조직 내의 전달된 분자의 축적이 포함된다. iRNA의 비특이적 효과는, 예를 들어, 조직으로의 직접적인 주사 또는 이식에 의한 또는 제제를 국소 투여함에 의한 국소 투여에 의해 최소화될 수 있다. 치료 부위로의 국소 투여는 작용제의 국소 농도를 최대화시키고, 작용제에 의해 달리 손상될 수 있거나, 작용제를 분해시킬 수 있는 전신 조직으로의 작용제의 노출을 제한하고, iRNA 분자의 보다 적은 총 용량이 투여되게 한다. 여러 연구에서 iRNA가 국소 투여되는 경우 유전자 생성물의 성공적인 낙다운이 밝혀졌다. 예를 들어, 사이노몰거스(cynomolgus) 원숭이에서의 유리체내 주사(문헌[Tolentino, MJ., et al (2004) *Retina* 24:132-138]) 및 마우스에서의 망막하 주사(문헌[Reich, SJ., et al (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216])에 의한 VEGF dsRNA의 안구내 전달은 둘 모두가 연령-관련

항반 변성의 실험 모델에서 신생혈관증식을 방지하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 마우스에서의 dsRNA의 직접적인 종양내 주사는 종양 체적을 감소시키고(문헌[Pille, J., *et al* (2005) *Mol. Ther.* 11 :267-274]), 종양을 갖는 마우스의 생존을 연장시킬 수 있다(문헌[Kim, WJ., *et al* (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350]; 문헌[Li, S., *et al* (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523]). RNA 간섭은 또한 직접 주사에 의한 CNS로의 국소 전달(문헌[Dorn, G., *et al.* (2004) *Nucleic Acids* 32:e49]; 문헌[Tan, PH., *et al* (2005) *Gene Ther.* 12:59-66]; 문헌[Makimura, H., *et al* (2002) *BMC Neurosci.* 3:18]; 문헌[Shishkina, GT., *et al* (2004) *Neuroscience* 129:521-528]; 문헌[Thakker, ER., *et al* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275]; 문헌[Akaneya, Y., *et al* (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602]) 및 비내 투여에 의한 폐로의 국소 전달(문헌[Howard, KA., *et al* (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484]; 문헌[Zhang, X., *et al* (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684]; 문헌[Bitko, V., *et al* (2005) *Nat. Med.* 11:50-55])을 이용하여 성공적인 것으로 밝혀졌다. 질병의 치료를 위해 iRNA를 전신 투여하기 위해, RNA는 변형되거나 또는 대안적으로 약물 전달 시스템을 이용하여 전달될 수 있고; 둘 모두의 방법은 생체 내에서 엔도뉴클레아제 및 엑소뉴클레아제에 의한 dsRNA의 신속한 분해를 방지하는 작용을 한다. RNA 또는 약제학적 담체의 변형은 또한 표적 조직으로의 iRNA 조성물의 표적화를 가능하게 하고, 요망되지 않는 표적의 효과를 회피시킬 수 있다. iRNA 분자는 세포 흡수를 향상시키고 분해를 방지하기 위해 콜레스테롤과 같은 친유성 기로의 화학적 컨쥬게이션에 의해 변형될 수 있다. 예를 들어, 친유성 콜레스테롤 모이어티에 컨쥬게이트된 ApoB에 대해 유도된 iRNA를 마우스에 전신 주사하고, 간 및 공장 둘 모두에서 apoB mRNA의 낙다운을 초래하였다(문헌[Soutschek, J., *et al* (2004) *Nature* 432:173-178]). 암타머로의 iRNA의 컨쥬게이션은 전립선암의 마우스 모델에서 종양 성장을 억제하고, 종양 퇴화를 매개하는 것으로 밝혀졌다(문헌[McNamara, JO., *et al* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24: 1005-1015]). 대안적인 구현예에서, iRNA는 약물 전달 시스템, 예를 들어, 나노입자, 덴드리머, 폴리머, 리포솜, 또는 양이온성 전달 시스템을 이용하여 전달될 수 있다. 양으로 하전된 양이온성 전달 시스템은 iRNA 분자(음으로 하전됨)의 결합을 촉진시키고, 또한 음으로 하전된 세포막에서의 상호작용을 향상시켜, 세포에 의한 iRNA의 효과적인 흡수를 가능하게 한다. 양이온성 지질, 덴드리머 또는 폴리머는 iRNA에 결합될 수 있거나, iRNA를 둘러싸는 소포 또는 미셀(micelle)을 형성하도록 유도될 수 있다(예를 들어, 문헌[Kim SH., *et al* (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116] 참조). 소포 또는 미셀의 형성은 전신 투여되는 경우 iRNA의 분해를 추가로 방지한다. 양이온성-iRNA 복합체를 제조하고 투여하는 방법은 충분히 해당 분야의 숙련자의 능력 내이다(예를 들어, 전문이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Sorensen, DR., *et al* (2003) *J. Mol. Biol.* 327:761-766]; 문헌[Verma, UN., *et al* (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300]; 문헌[Arnold, AS *et al* (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205] 참조). iRNA의 전신 전달에 유용한 약물 전달 시스템의 일부 비제한적인 예는 DOTAP(상기 문헌[Sorensen, DR., *et al* (2003)]; 상기 문헌[Verma, UN., *et al* (2003)]), 올리고펙타민(Oligofectamine), "고체 핵산 지질 입자"(문헌[Zimmermann, TS., *et al* (2006) *Nature* 441:111-114]), 카디오리핀(문헌[Chien, PY., *et al* (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328]; 문헌[Pal, A., *et al* (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091]), 폴리에틸렌이민(문헌[Bonnet ME., *et al* (2008) *Pharm. Res.* Aug16 Epub ahead of print]; 문헌[Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659]), Arg-Gly-Asp(RGD) 펩티드(문헌[Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487]), 및 폴리아미도아민(문헌[Tomalia, DA., *et al* (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67]; 문헌[Yoo, H., *et al* (1999) *Pharm. Res.* 16: 1799-1804])을 포함한다. 일부 구현예에서, iRNA는 전신 투여를 위해 사이클로덱스트린과 복합체를 형성한다. iRNA 및 사이클로덱스트린의 투여 방법 및 약제학적 조성물은 전문이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 제7,427,605호에서 찾을 수 있다.

[0555] A. 벡터에 의해 인코딩된 본 발명의 iRNA

[0556] PCSK9 유전자를 표적화하는 iRNA는 DNA 또는 RNA 벡터로 삽입된 전사 단위로부터 발현될 수 있다(예를 들어, 문헌[Couture, A, *et al.*, *TIG.* (1996), 12:5-10]; 국제 PCT 공개 WO 00/22113호(Skillern, A. 등), 국제 PCT 공개 WO 00/22114호(Conrad) 및 미국 특허 제6,054,299호(Conrad) 참조). 발현은 사용되는 특정 작제물(construct) 및 표적 조직 또는 세포 유형에 따라 일시적(약 몇시간 내지 몇주)이거나 지속적(몇주 내지 몇개월 이상의 기간)일 수 있다. 이들 전이유전자(transgene)는 선형 작제물, 원형 플라스미드, 또는 바이러스 벡터로서 도입될 수 있고, 이는 통합 벡터 또는 비-통합 벡터일 수 있다. 전이유전자는 또한 염색체의 플라스미드로서 유전되도록 작제될 수 있다(문헌[Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92: 1292]).

[0557] iRNA의 개별 가닥 또는 가닥들은 발현 벡터 상의 프로모터로부터 전사될 수 있다. 2개의 개별 가닥이, 예를 들어, dsRNA를 발생시키도록 발현되어야 하는 경우, 2개의 개별 발현 벡터가 표적 세포 내로 동시-도입(예를 들어, 트랜스펙션(transfection) 또는 감염에 의한)될 수 있다. 대안적으로, dsRNA의 각각의 개별 가닥은 동일 발현 플라스미드에 위치되는 두 프로모터 모두에 의해 전사될 수 있다. 일 구현예에서, dsRNA는 링커 폴리뉴클

레오티드 서열에 의해 연결된 역위 반복 폴리뉴클레오티드로서 발현되어, dsRNA가 스템 및 루프 구조를 갖게 한다.

- [0558] iRNA 발현 벡터는 일반적으로 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터이다. 진핵 세포와 상용성인 발현 벡터, 바람직하게는 척추동물 세포와 상용성인 발현 벡터가 본원에 기재된 바와 같은 iRNA의 발현을 위한 재조합 작제물을 생성시키는데 사용될 수 있다. 진핵 세포 발현 벡터는 해당 분야에 널리 공지되어 있고, 이는 다수의 상업적 공급원으로부터 이용 가능하다. 통상적으로, 요망되는 핵산 세그먼트의 삽입을 위한 편리한 제한 부위를 함유하는 이러한 벡터가 제공된다. iRNA 발현 벡터의 전달은 예를 들어, 정맥내 또는 근내 투여에 의한, 환자로부터 체외 이식된 표적 세포로의 투여 후 환자로의 재도입에 의한, 또는 요망되는 표적 세포로의 도입을 가능하게 하는 임의의 다른 수단에 의한 전신 전달일 수 있다.
- [0559] iRNA 발현 플라스미드는 양이온성 지질 담체(예를 들어, 올리고펙타민) 또는 비-양이온성 지질-계 담체(예를 들어, Transit-TKO™)와의 복합체로서 표적 세포로 트랜스펙션될 수 있다. 1주 이상의 기간에 걸쳐 표적 RNA의 상이한 영역을 표적화하는 iRNA-매개의 낙다운을 위한 다수의 지질 트랜스펙션이 또한 본 발명에 의해 고려된다. 숙주 세포로의 벡터의 성공적인 도입이 다양한 공지된 방법을 이용하여 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 일시적 트랜스펙션은 리포터, 예를 들어, 형광 마커, 예를 들어, 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein, GFP)을 이용하여 신호화될 수 있다. 생체 외에서의 세포의 안정적 트랜스펙션은 특정 환경적 요인(예를 들어, 항생제 및 약물)에 대한 내성, 예를 들어, 하이그로마이신 B 내성을 갖는 트랜스펙션된 세포를 제공하는 마커를 이용하여 보장될 수 있다.
- [0560] 본원에 기재된 방법 및 조성물과 함께 이용될 수 있는 바이러스 벡터 시스템은 (a) 아데노바이러스 벡터; (b) 렌티바이러스 벡터, 물론이냐와 백혈병 바이러스 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 레트로바이러스 벡터; (c) 아데노-연관 바이러스 벡터; (d) 단순 헤르페스 바이러스 벡터; (e) SV40 벡터; (f) 폴리오마 바이러스 벡터; (g) 유두종 바이러스 벡터; (h) 피코나바이러스 벡터; (i) 수두 바이러스 벡터, 예컨대 오르토폭스, 예를 들어 우두 바이러스 벡터 또는 조류두, 예컨대 카나리아 수두 또는 계두; 및 (j) 헤파-의존성 또는 무기력 아데노바이러스를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 복제-결함 바이러스가 또한 유리할 수 있다. 상이한 벡터가 세포의 게놈 내로 혼입되거나 혼입되지 않을 것이다. 작제물은 요망된다면 트랜스펙션을 위한 바이러스 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, 작제물은 에피솜 복제가 가능한 벡터, 예를 들어, EPV 및 EBV 벡터 내로 혼입될 수 있다. iRNA의 재조합 발현을 위한 작제물은 일반적으로 표적 세포에서의 iRNA의 발현을 보장하기 위해 조절 요소, 예를 들어, 프로모터, 인핸서 등을 필요로 할 것이다. 벡터 및 작제물을 고려하는 다른 양태가 하기에 추가로 기재된다.
- [0561] iRNA의 전달에 유용한 벡터는 요망되는 표적 세포 또는 조직에서 iRNA의 발현에 충분한 조절 요소(프로모터, 인핸서 등)를 포함할 것이다. 조절 요소는 구성성 또는 조절/유도성 발현을 제공하도록 선택될 수 있다.
- [0562] iRNA의 발현은, 예를 들어, 특정 생리학적 조절인자, 예를 들어, 순환 글루코스 수준, 또는 호르몬에 민감한 유도성 조절 서열을 이용함으로써 정밀하게 조절될 수 있다(문헌[Docherty *et al.*, 1994, *FASEB J.* 8:20-24]). 세포 또는 포유동물에서 dsRNA 발현의 조절에 적합한 이러한 유도성 발현 시스템은, 예를 들어, 엑디손(ecdysone), 에스트로겐, 프로게스테론, 테트라사이클린, 이량체화의 화학적 유도제, 및 이소프로필-베타-D1-티오갈락토포피라노시드(IPTG)에 의한 조절을 포함한다. 해당 분야의 숙련자는 iRNA 전이유전자의 의도된 용도에 기초하여 적절한 조절/프로모터 서열을 선택할 수 있을 것이다.
- [0563] iRNA를 인코딩하는 핵산 서열을 함유하는 바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터가 사용될 수 있다(문헌[Miller *et al.*, *Meth. Enzymol.* 217:581-599 (1993)] 참조). 이들 레트로바이러스 벡터는 바이러스 게놈의 정확한 패키징 및 숙주 세포 DNA로의 통합에 필요한 성분을 함유한다. iRNA를 인코딩하는 핵산 서열이 환자로의 핵산의 전달을 용이하게 하는 하나 이상의 벡터 내로 클로닝된다. 레트로바이러스 벡터에 관한 더욱 세부사항은, 예를 들어, 화학요법에 더욱 내성인 줄기 세포를 제조하기 위해 조절 줄기 세포로 *mdr1* 유전자를 전달하기 위한 레트로바이러스 벡터의 사용을 기재하는 문헌[Boesen *et al.*, *Biotherapy* 6:291-302 (1994)]에서 찾을 수 있다. 유전자 요법에서의 레트로바이러스 벡터의 사용을 예시하는 다른 참조문헌은 문헌[Clowes *et al.*, *J. Clin. Invest.* 93:644-651 (1994)]; 문헌[Kiem *et al.*, *Blood* 83:1467-1473 (1994)]; 문헌[Salmons and Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993)]; 및 문헌[Grossman and Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993)]이다. 사용에 고려되는 렌티바이러스 벡터는, 예를 들어, 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 제6,143,520호; 5,665,557호; 및 5,981,276호에 기재된 HIV 기반의 벡터를 포함한다.

- [0564] 본 발명의 iRNA의 전달에서 사용하기 위해 아데노바이러스가 또한 고려된다. 아데노바이러스는, 예를 들어, 호흡기 상피로 유전자를 전달하기 위한 특히 매력적인 비히클이다. 아데노바이러스는 천연에서 호흡기 상피를 감염시키고, 여기서 이들은 가벼운 질병을 야기시킨다. 아데노바이러스 기반의 전달 시스템에 대한 다른 표적은 간, 중추신경계, 내피 세포 및 근육이다. 아데노바이러스는 분열하지 않는 세포를 감염시킬 수 있는 장점을 갖는다. 문헌[Kozarsky and Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993)]에서는 아데노바이러스-기반의 유전자 요법의 개관이 제시되어 있다. 문헌[Bout *et al.*, *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994)]에서는 레서스 원숭이의 호흡기 상피로 유전자를 운반하기 위한 아데노바이러스 벡터의 사용이 설명되어 있다. 유전자 요법에서의 아데노바이러스의 사용의 다른 예는 문헌[Rosenfeld *et al.*, *Science* 252:431-434 (1991)]; 문헌[Rosenfeld *et al.*, *Cell* 68:143-155 (1992)]; 문헌[Mastrangeli *et al.*, *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993)]; PCT 공개 W094/12649호; 및 문헌[Wang, *et al.*, *Gene Therapy* 2:775-783 (1995)]에서 찾을 수 있다. 본 발명에서 특성화된 iRNA를 발현시키기에 적합한 AV 벡터, 재조합 AV 벡터를 작제하기 위한 방법, 및 표적 세포로 벡터를 전달하기 위한 방법은 문헌[Xia H *et al.* (2002), *Nat. Biotech.* 20:1006-1010]에 기재되어 있다.
- [0565] 또한, 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터가 본 발명의 iRNA를 전달하기 위해 사용될 수 있다(문헌[Walsh *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993)]; 미국 특허 제5,436,146호). 일 구현예에서, iRNA는, 예를 들어, U6 또는 H1 RNA 프로모터, 또는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터를 갖는 재조합 AAV 벡터로부터의 2개의 개별, 상보적인 단일-가닥 RNA 분자로서 발현될 수 있다. 본 발명에서 특성화된 dsRNA를 발현시키기에 적합한 AAV 벡터, 재조합 AV 벡터를 작제하기 위한 방법, 및 표적 세포 내로 벡터를 전달하기 위한 방법은, 전체 개시내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Samulski R *et al.* (1987), *J. Virol.* 61:3096-3101]; 문헌[Fisher K J *et al.* (1996), *J. Virol.* 70: 520-532]; 문헌[Samulski R *et al.* (1989), *J. Virol.* 63:3822-3826]; 미국 특허 제5,252,479호; 미국 특허 제5,139,941호; 국제 특허 출원 제WO 94/13788호; 및 국제 특허 출원 제WO 93/24641호에 기재되어 있다.
- [0566] 본 발명의 iRNA의 전달에 적합한 또 다른 바이러스 벡터는 수두 바이러스, 예를 들어, 우두 바이러스, 예를 들어, 약독화된 우두, 예를 들어, 변형된 바이러스 앙카라(Modified Virus Ankara, MVA) 또는 NYVAC, 조류두, 예를 들어, 계두 또는 카나리아 수두이다.
- [0567] 바이러스 벡터의 향성(tropism)은 다른 바이러스로부터의 외피 단백질 또는 다른 표면 항원으로 벡터를 슈도타이핑(pseudotyping)시키거나, 적절한 경우 상이한 바이러스 캡시드 단백질을 치환시킴으로써 변형될 수 있다. 예를 들어, 렌티바이러스 벡터는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 광견병, 에볼라, 모콜라(Mokola) 등으로부터의 표면 단백질로 슈도타이핑될 수 있다. AAV 벡터는 상이한 캡시드 단백질 혈청형을 발현하도록 벡터를 조작함으로써 상이한 세포를 표적화하도록 제조될 수 있으며; 예를 들어, 전체 개시내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Rabinowitz J E *et al.* (2002), *J Virol* 76:791-801]을 참조한다.
- [0568] 벡터의 약제학적 제제는 허용되는 희석제 중에 벡터를 포함할 수 있거나, 유전자 전달 비히클이 매립(imbedding)되는 서방형 매트릭스를 포함할 수 있다. 대안적으로, 완전한 유전자 전달 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터가 재조합 세포로부터 온전하게 생성될 수 있는 경우, 약제학적 제제는 유전자 전달 시스템을 생성하는 하나 이상의 세포를 포함할 수 있다.
- [0569] **V. 본 발명의 약제학적 조성물**
- [0570] 본 발명은 또한 본 발명의 iRNA를 포함하는 약제학적 조성물 및 제형을 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 iRNA 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 본원에 제공된다.
- [0571] 어구 "약제학적으로 허용되는"은 타당한 의학적 판단의 범위 내에서, 합리적인 이익/위험 비에 상응하여 과도한 독성, 자극, 알러지 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 대상체 및 동물 대상체의 조직과 접촉시켜 사용하기에 적합한 이들 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여형을 언급하기 위해서 본원에서 사용된다.
- [0572] 본원에 사용되는 바와 같은 어구 "약제학적으로 허용되는 담체"는 대상 화합물을 한 기관 또는 신체의 부분으로부터 또 다른 기관 또는 신체의 부분으로 운반하거나 수송하는데 관여하는 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클, 예컨대 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 제조 보조제(예컨대, 윤활제, 활석 마그네슘, 칼슘 또는 아연 스테아레이트, 또는 스테아르산), 또는 물질 캡슐화 용매를 의미한다. 각각의 담체는 제형의 다른 성분과의 상용성의 의미에서 "허용"되어야 하며, 치료할 대상체에게 유해하지 않다. 약제학적으로 허용되는 담체로서 작용할 수 있는 물질의 몇몇 예는 (1) 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; (2) 전분, 예컨대 옥

수수 전분 및 감자 전분; (3) 셀룰로스 및 이의 유도체, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; (4) 분말화된 트래거캔트; (5) 맥아; (6) 젤라틴; (7) 윤활제, 예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 라우릴 설페이트 및 활석; (8) 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌제 왁스; (9) 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유, 홍화씨유, 참깨유, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; (10) 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; (11) 폴리올, 예컨대 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; (12) 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트 및 에틸 라우레이트; (13) 한천; (14) 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; (15) 알긴산; (16) 발열성 물질-비함유 수; (17) 등장성 식염수; (18) 링거 용액; (19) 에틸 알콜; (20) pH 완충 용액; (21) 폴리에스테르, 폴리카보네이트 및/또는 폴리무수물; 및 (22) 증량제, 예를 들어, 폴리펩티드 및 아미노산; (23) 혈청 성분, 예를 들어, 혈청 알부민, HDL 및 LDL; 및 (22) 약제학적 제형에 사용되는 다른 비-독성 상용성 물질을 포함한다.

[0573] iRNA를 함유하는 약제학적 조성물은 PCSK9의 발현 또는 활성과 관련된 질병 또는 장애, 예를 들어, PCSK9 발현의 감소로 이익을 얻을 질병 또는 장애를 치료하는데 유용하다. 이러한 약제학적 조성물은 전달 방식에 기초하여 제형화된다. 일 예는 비경구 전달을 통한, 예를 들어, 피하(SC), 근육내(IM) 또는 정맥내(IV) 전달에 의한 전신 투여를 위해 제형화되는 조성물이다. 또 다른 예는 예컨대 연속 펌프 주입에 의한 예를 들어, 뇌로의 주입에 의한 뇌실질로의 직접 전달을 위해 제형화되는 조성물이다. 본 발명의 약제학적 조성물은 PCSK9 유전자의 발현을 억제하기에 충분한 투여량으로 투여될 수 있다.

[0574] 바람직하게는, 본 발명의 방법에서, iRNA 작용제는 고정 용량으로서 대상체에게 투여된다. 특정 일 구현예에서, 고정 용량의 본 발명의 iRNA 작용제는 사전결정된 체중 또는 연령에 기반한다.

[0575] 일부 구현예에서, RNAi 작용제는 약 200 mg 내지 약 850 mg, 약 200 mg 내지 약 500 mg, 약 200 mg 내지 약 400 mg, 약 200 mg 내지 약 300 mg, 약 100 mg 내지 약 800 mg, 약 100 mg 내지 약 750 mg, 약 100 mg 내지 약 700 mg, 약 100 mg 내지 약 650 mg, 약 100 mg 내지 약 600 mg, 약 100 mg 내지 약 550 mg, 약 100 mg 내지 약 500 mg, 약 200 mg 내지 약 850 mg, 약 200 mg 내지 약 800 mg, 약 200 mg 내지 약 750 mg, 약 200 mg 내지 약 700 mg, 약 200 mg 내지 약 650 mg, 약 200 mg 내지 약 600 mg, 약 200 mg 내지 약 550 mg, 약 200 mg 내지 약 500 mg, 약 300 mg 내지 약 850 mg, 약 300 mg 내지 약 800 mg, 약 300 mg 내지 약 750 mg, 약 300 mg 내지 약 700 mg, 약 300 mg 내지 약 650 mg, 약 300 mg 내지 약 600 mg, 약 300 mg 내지 약 550 mg, 약 300 mg 내지 약 500 mg, 약 400 mg 내지 약 850 mg, 약 400 mg 내지 약 800 mg, 약 400 mg 내지 약 750 mg, 약 400 mg 내지 약 700 mg, 약 400 mg 내지 약 650 mg, 약 400 mg 내지 약 600 mg, 약 400 mg 내지 약 550 mg 또는 약 400 mg 내지 약 500 mg의 고정 용량으로서 투여된다.

[0576] 일부 구현예에서, RNAi 작용제는 약 100 mg, 약 125 mg, 약 150 mg, 약 175 mg, 200 mg, 약 225 mg, 약 250 mg, 약 275 mg, 약 300 mg, 약 325 mg, 약 350 mg, 약 375 mg, 약 400 mg, 약 425 mg, 약 450 mg, 약 475 mg, 약 500 mg, 약 525 mg, 약 550 mg, 약 575 mg, 약 600 mg, 약 625 mg, 약 650 mg, 약 675 mg, 약 700 mg, 약 725 mg, 약 750 mg, 약 775 mg, 약 800 mg, 약 825 mg 또는 약 850 mg의 고정 용량으로서 투여된다.

[0577] 일부 구현예에서, 대상체에는 다중의 용량의 치료량의 iRNA가 예를 들어, 피하 또는 근육내 투여된다.

[0578] iRNA는 약제학적 조성물에서 적합한 부피의 조성물, 예를 들어, 약 1.0 ml, 1.1 ml, 1.2 ml, 1.3 ml, 1.4 ml, 1.5 ml, 1.6 ml, 1.7 ml, 1.8 ml, 1.9 ml 또는 약 2.0 ml의 약제학적 조성물이 대상체에게 투여되도록 적합한 농도로 제형화될 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 본 발명의 iRNA 작용제는 적합한 약제학적 조성물에서 약 200 mg/ml로 제형화되어, 대상체로의 약 1.5 ml의 제형의 투여가 300 mg의 고정 용량의 작용제를 제공하게 한다.

[0579] 본원에 기재된 바와 같이, 단일 용량의 iRNA 작용제 또는 이러한 작용제를 포함하는 약제학적 조성물은 이후의 용량이 1주, 2주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월 또는 6개월 이하의 간격으로 투여되도록 장기 지속적일 수 있다.

[0580] 일부 구현예에서, 대상체에게 반복 용량의 치료량의 iRNA가 예를 들어, 피하 또는 근육내 투여된다. 반복-용량 섭생법은 정기적으로, 예를 들어, 1개월에 1회, 2개월마다 1회, 분기에 1회, 4개월마다 1회, 5개월마다 1회 또는 연 2회의 치료량의 iRNA의 투여를 포함할 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, 단일 용량의 본 발명의 약제학적 조성물은 분기마다 1회(qQ) 투여된다. 본 발명의 다른 구현예에서, 단일 용량의 본 발명의 약제학적 조성물은 연 2회(즉, 6개월마다) 투여된다. 투여는 예를 들어, 6개월, 1년, 2년 이상 동안 분기마다 1회 반복될 수 있으며, 예를 들어, 만성적으로 투여될 수 있다.

- [0581] 일부 구현예에서, RNAi 작용제는 로딩기에 이어서 유지기를 포함하는 투여 섭생법으로 투여된다.
- [0582] 로딩기는 예를 들어, 약 100 mg 내지 약 700 mg, 약 150 mg 내지 약 700 mg, 약 200 mg 내지 약 700 mg, 약 250 mg 내지 약 700 mg, 약 300 mg 내지 약 700 mg, 약 350 mg 내지 약 700 mg, 약 400 mg 내지 약 700 mg, 약 450 mg 내지 약 700 mg, 약 500 mg 내지 약 700 mg, 약 550 mg 내지 약 700 mg, 약 600 mg 내지 약 700 mg, 약 650 mg 내지 약 700 mg, 약 100 mg 내지 약 650 mg, 약 150 mg 내지 약 650 mg, 약 200 mg 내지 약 650 mg, 약 250 mg 내지 약 650 mg, 약 300 mg 내지 약 650 mg, 약 350 mg 내지 약 650 mg, 약 400 mg 내지 약 650 mg, 약 450 mg 내지 약 650 mg, 약 500 mg 내지 약 650 mg, 약 550 mg 내지 약 650 mg, 약 600 mg 내지 약 650 mg, 약 100 mg 내지 약 600 mg, 약 150 mg 내지 약 600 mg, 약 200 mg 내지 약 600 mg, 약 250 mg 내지 약 600 mg, 약 300 mg 내지 약 600 mg, 약 350 mg 내지 약 600 mg, 약 400 mg 내지 약 600 mg, 약 450 mg 내지 약 600 mg, 약 500 mg 내지 약 600 mg, 약 550 mg 내지 약 600 mg, 약 100 mg 내지 약 550 mg, 약 150 mg 내지 약 550 mg, 약 200 mg 내지 약 550 mg, 약 250 mg 내지 약 550 mg, 약 300 mg 내지 약 550 mg, 약 350 mg 내지 약 550 mg, 약 400 mg 내지 약 550 mg, 약 450 mg 내지 약 550 mg, 약 500 mg 내지 약 550 mg, 약 100 mg 내지 약 500 mg, 약 150 mg 내지 약 500 mg, 약 200 mg 내지 약 500 mg, 약 250 mg 내지 약 500 mg, 약 300 mg 내지 약 500 mg, 약 350 mg 내지 약 500 mg, 약 400 mg 내지 약 500 mg 또는 약 450 mg 내지 약 500 mg의 고정 용량, 예를 들어, 약 100 mg, 약 125 mg, 약 150 mg, 약 175 mg, 200 mg, 약 225 mg, 약 250 mg, 약 275 mg, 약 300 mg, 약 325 mg, 약 350 mg, 약 375 mg, 약 400 mg, 약 425 mg, 약 450 mg, 약 475 mg, 약 500 mg, 약 525 mg, 약 550 mg, 약 575 mg, 약 600 mg, 약 625 mg, 약 650 mg, 약 675 mg 또는 약 700 mg의 고정 용량으로, 제1 주 동안의 RNAi 작용제의 단일의 투여, 처음 2주 동안의 RNAi 작용제의 단일의 투여 또는 제1 개월 동안의 RNAi 작용제의 단일의 투여를 포함할 수 있다. 상기 언급된 값의 중간값 및 범위도 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도된다.
- [0583] 유지기는 대상체로의 소정의 용량의 RNAi 작용제의 1개월에 1회, 2개월마다 1회, 3개월마다 1회, 4개월마다 1회, 5개월마다 1회 또는 6개월마다 1회의 투여를 포함할 수 있다. 특정 일 구현예에서, 유지 용량은 대상체에게 1개월에 1회 투여된다.
- [0584] 유지 용량 또는 용량들은 초기 용량과 동일하거나 초기 용량보다 더 낮을 수 있으며, 예를 들어, 초기 용량의 절반일 수 있다. 예를 들어, 유지 용량은 개월마다 대상체에게 투여되는 약 25 mg 내지 약 100 mg, 예를 들어, 약 25 mg 내지 약 75 mg, 약 25 mg 내지 약 50 mg 또는 약 50 mg 내지 약 75 mg, 예를 들어, 약 25 mg, 약 30 mg, 약 35 mg, 약 40 mg, 약 45 mg, 약 50 mg, 약 55 mg, 약 60 mg, 약 65 mg, 약 70 mg, 약 75 mg, 약 80 mg, 약 85 mg, 약 90 mg, 약 95 mg 또는 약 100 mg일 수 있다. 상기 언급된 값의 중간값 및 범위도 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도된다.
- [0585] 약제학적 조성물은 소정의 기간에 걸쳐, 예를 들어, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 11분, 12분, 13분, 14분, 15분, 16분, 17분, 18분, 19분, 20분 및 21분, 22분, 23분, 24분 또는 약 25분 기간에 걸쳐 정맥내 주입에 의해 투여될 수 있다. 투여는 예를 들어, 예를 들어 1개월, 2개월, 3개월, 4개월 이상 동안 정기적으로, 예를 들어, 매주, 격주(즉, 2주마다)로 반복될 수 있다. 초기 치료 섭생법 후, 상기 치료는 덜 빈번하게 투여될 수 있다. 예를 들어, 3개월 동안의 매주 또는 격주의 투여 후에, 6개월 또는 1년 이상 동안, 개월마다 1회 반복 투여될 수 있다.
- [0586] 숙련자는 질병 또는 질환의 중증도, 이전의 치료, 대상체의 일반 건강 및/또는 연령 및 존재하는 기타 질병을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 특정 인자는 대상체를 효과적으로 치료하는데 필요한 투여량 및 시기에 영향을 줄 수 있다는 것을 알 것이다. 또한, 대상체를 치료적 유효량의 조성물로 치료하는 것은 단일의 치료 또는 일련의 치료를 포함할 수 있다. 본 발명에 포함되는 개별 iRNA에 대한 효과적인 투여량 및 생체 내 반감기의 추정치는 본원의 다른 곳에 기술된 바와 같이, 종래 방법을 이용하거나, 적절한 동물 모델을 이용한 생체 내 시험을 기초로 이루어질 수 있다.
- [0587] 본 발명의 약제학적 조성물은 국소 치료가 요망되는지 전신 치료가 요망되는지 여부 및 치료될 부위에 따라 수 많은 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 (예컨대, 경피 패치에 의한) 국소, 예컨대, 분무기에 의한 것을 비롯하여 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 통기(insufflation)에 의한 폐; 기관내, 비강내, 상피 및 경피, 경구 또는 비경구일 수 있다. 비경구 투여는 정맥내, 동맥내, 피하, 복막내 또는 근육내 주사 또는 주입; 예컨대, 이식된 장치를 통해 피하; 또는 예컨대, 뇌실질 내, 척수강내 또는 뇌실내 투여에 의한 두개내를 포함한다.
- [0588] iRNA는 간(예컨대, 간의 간세포)과 같은 특정 조직을 표적화하는 방식으로 전달될 수 있다.

- [0589] 국소 투여를 위한 약제학적 조성물 및 제형은 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 점적액, 좌제, 액체 및 분말을 포함할 수 있다. 통상적인 약제학적 담체, 수성, 분말 또는 유성 베이스(oily bases), 증점제 등은 필요하거나 바람직할 수 있다. 코팅된 콘돔, 장갑 등도 유용할 수 있다. 적합한 국소 제형으로는 본 발명에서 특성화된 iRNA가 지질, 리포솜, 지방산, 지방산 에스테르, 스테로이드, 킬레이트제 및 계면활성제와 같은 국소 전달 작용제와 혼합되어 있는 것들을 포함한다. 적합한 지질 및 리포솜으로는 중성(예컨대, 디올레오일포스파티딜 DOPE 에탄올아민, 디미리스토일포스파티딜 콜린 DMPC, 디스테아로일포스파티딜 콜린), 음성(예컨대, 디미리스토일포스파티딜 글리세롤 DMPG) 및 양이온성(예컨대, 디올레오일테트라메틸아미노프로필 DOTAP 및 디올레오일포스파티딜 에탄올아민 DOTMA)이 포함된다. 본 발명에서 특성화된 iRNA는 리포솜 내에서 캡슐화될 수 있거나, 거기에, 특히 양이온성 리포솜에 복합체를 형성할 수 있다. 대안적으로, iRNA는 지질, 특히 양이온성 지질에 복합체화될 수 있다. 적합한 지방산 및 에스테르는 아라키돈산, 올레산, 에이코산산, 라우르산, 카프릴산, 카프르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 디카프레이트, 트리카프레이트, 모노올레인, 디라우린, 글리세릴 1-모노카프레이트, 1-도데실아자사이클로헥탄-2-온, 아실카르니틴, 아실콜린, 또는 C₁₋₂₀ 알킬 에스테르(예컨대, 이소프로필미리스테이트 IPM), 모노글리세리드, 디글리세리드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하지만, 여기에 한정되지 않는다. 국소 제형은 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제6,747,014호에 상세히 기술되어 있다.
- [0590] 경구 투여를 위한 조성물 및 제형은 분말 또는 과립, 미립자, 나노입자, 물 또는 비수성 매질 중 현탁액 또는 용액, 캡슐, 젤 캡슐, 사세(sachet), 정제 또는 소형 정제(minitabiet)를 포함한다. 증점제, 향미제, 희석제, 유화제, 분산 보조제 또는 결합제가 바람직할 수 있다. 일부 구현예에서, 경구 제형은 본 발명에서 특성화된 dsRNA가 하나 이상의 투과 향상제 계면활성제 및 킬레이터와 함께 투여되는 것들이다. 적합한 계면활성제는 지방산 및/또는 이의 에스테르 또는 염, 담즙산 및/또는 이의 염을 포함한다. 적합한 담즙산/염은 케노데옥시콜산(CDCA) 및 우르소데옥시케노데옥시콜산(UDCA), 콜산, 데하이드로콜산, 데옥시콜산, 글루콜산(glucolic acid), 글리콜산(glycholic acid), 글리코데옥시콜산, 타우로콜산, 타우로데옥시콜산, 나트륨 타우로-24,25-디하이드로-푸시데이트 및 나트륨 글리코디하이드로푸시데이트를 포함한다. 적합한 지방산은 아라키돈산, 운데칸산, 올레산, 라우르산, 카프릴산, 카프르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 디카프레이트, 트리카프레이트, 모노올레인, 디라우린, 글리세릴 1-모노카프레이트, 1-도데실아자사이클로헥탄-2-온, 아실카르니틴, 아실콜린, 또는 모노글리세리드, 디글리세리드 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염(예를 들어, 나트륨)을 포함한다. 일부 구현예에서, 투과 향상제의 조합, 예를 들어, 담즙산/염과 조합된 지방산/염이 사용된다. 예시적 조합은 라우르산, 카프르산 및 UDCA의 나트륨 염이다. 추가 투과 향상제는 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-20-세틸 에테르를 포함한다. 본 발명에서 특성화된 dsRNA는 분무되는 건조 입자를 포함하는 과립 형태로 경구 전달될 수 있거나, 복합체화되어 미립자 또는 나노입자를 형성할 수 있다. dsRNA 복합체화 작용제는 폴리-아미노산; 폴리이민; 폴리아크릴레이트; 폴리알킬아크릴레이트, 폴리옥세탄, 폴리알킬시아노아크릴레이트; 양이온화된 젤라틴, 알부민, 전분, 아크릴레이트, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 및 전분; 폴리알킬시아노아크릴레이트; DEAE-유도체화된 폴리이민, 폴루란, 셀룰로스 및 전분을 포함한다. 적합한 복합체화 작용제는 키토산, N-트리메틸키토산, 폴리-L-라이신, 폴리히스티딘, 폴리오르니틴, 폴리스페르민, 프로타민, 폴리비닐피리딘, 폴리티오디에틸아미노메틸에틸렌 P(TDAE), 폴리아미노스티렌(예를 들어, p-아미노), 폴리(메틸시아노아크릴레이트), 폴리(에틸시아노아크릴레이트), 폴리(부틸시아노아크릴레이트), 폴리(이소부틸시아노아크릴레이트), 폴리(이소헥실시아노아크릴레이트), DEAE-메타크릴레이트, DEAE-헥실아크릴레이트, DEAE-아크릴아미드, DEAE-알부민 및 DEAE-텍스트란, 폴리메틸아크릴레이트, 폴리헥실아크릴레이트, 폴리(D,L-락트산), 폴리(DL-락틱-코-글리콜산)(PLGA), 알기네이트, 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 포함한다. dsRNA에 대한 경구 제형 및 이들의 제조는 각각이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 6,887,906호, 미국 공개 제20030027780호 및 미국 특허 제 6,747,014호에 상세히 기재되어 있다.
- [0591] 비경구, 실질내(뇌로의 투여), 척수강내, 뇌실내 또는 간내 투여를 위한 조성물 및 제형은 완충제, 희석제 및 다른 적합한 첨가제, 예를 들어, 비제한적으로, 투과 향상제, 담체 화합물 및 다른 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 또한 함유할 수 있는 멸균 수용액을 포함할 수 있다.
- [0592] 본 발명의 약제학적 조성물은, 비제한적인 예로, 용액, 에멀전 및 리포솜-함유 제형을 포함한다. 이들 조성물은 사전형성된 액체, 자가-유화 고체 및 자가-유화 반고체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 다양한 성분으로부터 생성될 수 있다. 간 장애, 예를 들어, 간 암종을 치료하는 경우 간을 표적화하는 제형이 특히 바람직하다.
- [0593] 단위 투여형으로 편리하게 제공될 수 있는 본 발명의 약제학적 제형은 약제학 산업에서 널리 공지된 통상적인 기법에 따라 제조될 수 있다. 이러한 기법은 활성 성분이 약제학적 담체(들) 또는 부형제(들)와 회합되게 하는

단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 활성 성분과 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 둘 모두를 균일하고 친밀하게 회합되게 한 후, 필요시 생성물을 성형시킴으로써 제조된다.

[0594] 본 발명의 조성물은 많은 가능한 투여형, 예를 들어, 비제한적으로, 정제, 캡슐, 겔 캡슐, 액체 시럽, 연질 겔, 좌제 및 관장제 중 임의의 것으로 제형화될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 수성, 비수성 또는 혼합된 매질 중의 현탁액으로 제형화될 수 있다. 수성 현탁액은, 예를 들어, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스, 소르비톨 및/또는 텍스트란을 포함하는 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 더 함유할 수 있다. 현탁액은 또한 안정화제를 함유할 수 있다.

[0595] A. 추가의 제형

[0596] i. 에멀전

[0597] 본 발명의 조성물은 에멀전으로 제조되고 제형화될 수 있다. 에멀전은 통상적으로 통상 0.1 μm 직경을 초과하는 점적액의 형태의 또 다른 액체에 분산된 한 액체의 불균일계이다(예를 들어, 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY]; 문헌[Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199]; 문헌[Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245]; 문헌[Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335]; 문헌[Higuchi *et al.*, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack PublishingCo., Easton, Pa., 1985, p. 301] 참조). 에멀전은 종종 서로 친밀히 혼합되고 분산된 2개의 비혼화성 액체 상을 포함하는 2상 시스템이다. 일반적으로, 에멀전은 유중수(w/o) 또는 수중유(o/w) 종류일 수 있다. 수성상이 다량의 유성상으로 미세한 소적으로서 미분되고 분산되는 경우, 생성된 조성물은 유중수(w/o) 에멀전으로 언급된다. 대안적으로, 유성상이 다량의 수성상으로 미세한 소적으로서 미분되고 분산되는 경우, 생성된 조성물은 수중유(o/w) 에멀전으로 언급된다. 에멀전은 분산된 상에 더하여 추가의 성분, 및 수성상 또는 유성상 중 용액으로 존재하거나, 그 자체가 개별 상으로 존재할 수 있는 활성 약물을 함유할 수 있다. 약제학적 부형제, 예를 들어, 유화제, 안정화제, 염료, 및 향산화제가 또한 필요시 에멀전에 존재할 수 있다. 약제학적 에멀전은 또한, 예를 들어, 유중수중유(o/w/o) 및 수중유중수(w/o/w) 에멀전의 경우에서와 같이 2개보다 많은 상으로 구성되는 다중 에멀전일 수 있다. 이러한 복합 제형은 종종 간단한 2원 에멀전이 제공하지 않는 특정한 이점을 제공한다. o/w 에멀전의 개별 오일 소적이 작은 물 소적을 둘러싸는 다중 에멀전이 w/o/w 에멀전을 구성한다. 마찬가지로, 유성 연속 상 내에서 안정화된 물의 소구체 내에서 둘러싸인 오일 소적의 시스템이 o/w/o 에멀전을 제공한다.

[0598] 에멀전은 열역학적 안정성이 거의 없거나 없는 것을 특징으로 한다. 종종, 에멀전의 분산되거나 불연속적인 상이 외부 또는 연속 상으로 잘 분산되고, 유화제의 수단 또는 제형의 점도를 통해 이러한 형태로 유지된다. 에멀전의 상 중 어느 상이든 에멀전-유형 연고 베이스 및 크림의 경우에서와 같이 반고체 또는 고체일 수 있다. 에멀전을 안정화시키는 다른 수단은 에멀전의 어느 상으로 혼입될 수 있는 유화제의 사용을 수반한다. 유화제는 합성 계면활성제, 천연 발생 유화제, 흡수 베이스, 및 미분된 고체의 4개의 부류로 넓게 분류될 수 있다(예를 들어, 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY]; 문헌[Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199] 참조).

[0599] 표면활성제로도 공지된 합성 계면활성제는 에멀전의 제형에서 광범위하게 적용 가능하며, 이는 문헌에 개관되어 있다(예를 들어, 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY]; 문헌[Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285]; 문헌[Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199] 참조). 계면활성제는 통상적으로 양친매성이고, 친수성 및 소수성 부분을 포함한다. 계면활성제의 친수성 대 소수성 특성의 비는 친수성/친유성 균형(HLB)으로 명명되었으며, 이는 제형의 제조에서 계면활성제를 분류하고 선택하는데 있어서 가치있는 도구이다. 계면활성제는 친수성 기의 특성을 기초로 하여 비이온성, 음이온성, 양이온성 및 양쪽성으로 상이한 부류로 분류될 수 있다(예를 들어, 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,

Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms], 문헌[Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285] 참조).

[0600] 에멀전 제형에서 사용되는 천연 발생 유화제는 라놀린, 밀랍, 포스파티드, 레시틴 및 아카시아를 포함한다. 흡수 베이스는 무수 라놀린 및 친수성 페트로라툼(petrolatum)과 같이 이들이 이들의 반고체 경도를 유지하면서 w/o 에멀전을 형성시키기 위해 물을 흡수할 수 있도록 하는 친수성 특성을 갖는다. 미분된 고체가 또한, 특히 계면활성제와 조합되고, 점성 제제 내에서 우수한 유화제로서 사용되어 왔다. 이들은 극성 무기 고체, 예를 들어, 중금속 하이드록시드, 비팽윤 점토, 예를 들어, 벤토나이트, 애타풀자이트(attapulgit), 핵토라이트, 카올린, 몬토모릴로나이트, 콜로이드 알루미늄 실리케이트 및 콜로이드 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 안료 및 비극성 고체, 예를 들어, 탄소 또는 글리세릴 트리스테아레이트를 포함한다.

[0601] 매우 다양한 비-유화 물질이 또한 에멀전 제형에 포함되며, 이들은 에멀전의 특성에 기여한다. 이들은 지방, 오일, 왁스, 지방산, 지방 알콜, 지방 에스테르, 보습제, 친수성 콜로이드, 보존제 및 항산화제를 포함한다(문헌 [Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335]; 문헌[Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199]).

[0602] 친수성 콜로이드 또는 하이드로콜로이드는 천연 발생 검(gum) 및 합성 폴리머, 예를 들어, 다당류(예를 들어, 아카시아, 한천, 알긴산, 카라기난(carrageenan), 구아 검, 카라야 검(karaya gum), 및 트래거캔트), 셀룰로스 유도체(예를 들어, 카복시메틸셀룰로스 및 카복시프로필셀룰로스), 및 합성 폴리머(예를 들어, 카보머, 셀룰로스 에테르, 및 카복시비닐 폴리머)를 포함한다. 이들은 물 내에서 분산되거나 팽창하여, 분산된-상 소적 주위에 강한 계면 필름을 형성시키고, 외부 상의 점도를 증가시킴으로써 에멀전을 안정화시키는 콜로이드 용액을 형성시킨다.

[0603] 에멀전은 종종 미생물의 성장을 용이하게 지원할 수 있는 다수의 성분, 예를 들어, 탄수화물, 단백질, 스테롤 및 포스파티드를 함유하므로, 이들 제형은 종종 보존제를 포함한다. 에멀전 제형에 포함되는 일반적으로 사용되는 보존제는 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 4차 암모늄 염, 벤즈알코늄 클로라이드, p-하이드록시벤조산의 에스테르 및 붕산을 포함한다. 제형의 변패를 방지하기 위해 항산화제가 또한 에멀전 제형에 통상 첨가된다. 사용되는 항산화제는 유리 라디칼 제거제, 예를 들어, 토코페롤, 알킬 갈레이트, 부틸화된 하이드록시아니솔, 부틸화된 하이드록시톨루엔, 또는 환원제, 예를 들어, 아스코르브산 및 나트륨 메타비설피트, 및 항산화제 상승작용제, 예를 들어, 시트르산, 타르타르산 및 레시틴일 수 있다.

[0604] 피부, 경구 및 비경구 경로를 통한 에멀전 제형의 적용 및 이들의 제조 방법은 문헌에 개관되어 있다(예를 들어, 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY]; 문헌[Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199] 참조). 제형화의 용이성, 뿐만 아니라 흡수로부터의 효능 및 생체이용률의 견지로 인해, 경구 전달을 위한 에멀전 제형이 매우 다양하게 사용되어 왔다(예를 들어, 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY]; 문헌[Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245]; 문헌[Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199] 참조). 광유 베이스 설사제, 지용성 비타민 및 고지방 영양 제제가 특히 o/w 에멀전으로서 통상 경구로 투여되는 물질이다.

[0605] ii. 마이크로에멀전

[0606] 본 발명의 일 구현예에서, iRNA 및 핵산의 조성물은 마이크로에멀전으로서 제형화된다. 마이크로에멀전은 단일의 광학적으로 등방성이고, 열역학적으로 안정적인 액체 용액인 물, 오일 및 양친매성의 시스템으로 정의될 수 있다(예를 들어, 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY]; 문헌[Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245] 참조). 통상적으로, 마이크로에멀전은 먼저 계면활성제 수용액에 오일을 분산시킨 후, 충분한 양의 제4 성분, 일반적으로 중간 사슬-길이 알콜을 첨가하여 투명한 시스템을 형성시

킴으로써 제조되는 시스템이다. 따라서, 마이크로에멀전은 또한 표면-활성 분자의 계면 필름에 의해 안정화되는 2개의 비혼화성 액체의 열역학적으로 안정적이고, 등방성의 투명한 분산액으로 기재되어 왔다(문헌[Leung and Shah, in: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215]). 마이크로에멀전은 통상 오일, 물, 계면활성제, 보조계면활성제 및 전해질을 포함하는 3 내지 5개의 성분의 조합을 통해 제조된다. 마이크로에멀전이 유중수(w/o) 유형인지 또는 수중유(o/w) 유형인지의 여부는 사용되는 오일 및 계면활성제의 특성, 및 계면활성제 분자의 극성 헤드 및 탄화수소 꼬리의 구조 및 기하학적 팩킹에 좌우된다(문헌[Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271]).

[0607] 상 도표(phase diagram)를 이용한 현상학적 방법이 광범위하게 연구되어 왔고, 마이크로에멀전을 제형화시키는 방법의 광범위한 지식을 해당 분야의 숙련자에게 제공하였다(예를 들어, 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY]; 문헌[Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245]; 문헌[Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335] 참조). 통상적인 에멀전에 비해, 마이크로에멀전은 자발적으로 형성되는 열역학적으로 안정적인 소적의 제형에서 수-불용성 약물을 용해시키는 장점을 제공한다.

[0608] 마이크로에멀전의 제조에서 사용되는 계면활성제는 단독이거나 보조계면활성제와 조합된 이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, Brij 96, 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르, 폴리글리세롤 지방산 에스테르, 테트라글리세롤 모노라우레이트(ML310), 테트라글리세롤 모노올레에이트(MO310), 헥사글리세롤 모노올레에이트(PO310), 헥사글리세롤 펜타올레에이트(PO500), 데카글리세롤 모노카프레이트(MCA750), 데카글리세롤 모노올레에이트(MO750), 데카글리세롤 세퀴올레에이트(SO750), 데카글리세롤 테카올레에이트(DA0750)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 보조계면활성제, 보통 단쇄 알콜, 예를 들어, 에탄올, 1-프로판올, 및 1-부탄올은 계면활성제 필름으로 침투하고, 그 결과로서 계면활성제 분자 사이에서 생성된 빈 공간으로 인해 무질서한 필름을 생성시킴으로써 계면 유동성을 증가시키는 작용을 한다. 그러나, 마이크로에멀전은 보조계면활성제의 사용 없이 제조될 수 있고, 무알콜 자가-유화 마이크로에멀전 시스템이 해당 분야에 공지되어 있다. 수성상은 통상적으로 물, 약물의 수용액, 글리세롤, PEG300, PEG400, 폴리글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 에틸렌 글리콜의 유도체일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 오일상은 물질, 예를 들어, Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, 지방산 에스테르, 중간 사슬(C8-C12) 모노, 디 및 트리-글리세리드, 폴리옥시에틸화된 글리세릴 지방산 에스테르, 지방 알콜, 폴리글리콜화된 글리세리드, 포화 폴리글리콜화된 C8-C10 글리세리드, 식물성 오일 및 실리콘 오일을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0609] 마이크로에멀전은 약물 용해 및 약물의 향상된 흡수의 견지에서 특히 흥미롭다. 펩티드를 포함하는 약물의 경구 생체이용률을 향상시키기 위해 지질 기반의 마이크로에멀전(o/w 및 w/o 둘 모두)이 제안되었다(예를 들어, 미국 특허 제6,191,105호; 7,063,860호; 7,070,802호; 7,157,099호; 문헌[Constantinides *et al.*, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390]; 문헌[Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205] 참조). 마이크로에멀전은 개선된 약물 용해, 효소 가수분해로부터 약물의 보호, 막 유동성 및 투과성의 계면활성제-유도 변화로 인한 약물 흡수의 가능한 향상, 제조의 용이성, 고체 투여형에 비한 경구 투여의 용이성, 개선된 임상 효력 및 감소된 독성의 이점을 제공한다(예를 들어, 미국 특허 제6,191,105호; 7,063,860호; 7,070,802호; 7,157,099호; 문헌[Constantinides *et al.*, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385]; 문헌[Ho *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143] 참조). 종종, 마이크로에멀전은, 이들의 성분이 주위 온도에서 함께 모이는 경우에 자발적으로 형성될 수 있다. 이는 열불안정성 약물, 펩티드 또는 iRNA를 제형화하는 경우에 특히 유리할 수 있다. 마이크로에멀전은 미용 및 약제학적 적용 둘 모두에서 활성 성분의 경피 전달에서 효과적이다. 본 발명의 마이크로에멀전 조성물 및 제형이 위장관으로부터의 iRNA 및 핵산의 증가된 전신 흡수를 촉진할 뿐만 아니라, iRNA 및 핵산의 국소 세포 흡수를 개선시킬 것이 예상된다.

[0610] 본 발명의 마이크로에멀전은 또한 제형의 특성을 개선시키고, 본 발명의 iRNA 및 핵산의 흡수를 향상시키기 위해, 추가의 성분 및 첨가제, 예를 들어, 소르비탄 모노스테아레이트(Grill 3), 라브라솔(Labrasol), 및 투과 향상제를 함유할 수 있다. 본 발명의 마이크로에멀전에서 사용되는 투과 향상제는 5개의 광범위한 범주인 계면활성제, 지방산, 담즙산염, 킬레이트제, 및 비-킬레이트화 비-계면활성제 중 하나에 속하는 것으로 분류될 수 있다(문헌[Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92]). 이들 부류 각각은 상기에 논의된다.

- [0611] *iii. 미립자*
- [0612] 본 발명의 RNAi 작용제는 입자, 예를 들어, 미립자 내로 혼입될 수 있다. 미립자는 분무-건조에 의해 생성될 수 있으나, 또한 동결건조, 증발, 유동층 건조, 진공 건조 또는 이들 기법의 조합을 포함하는 다른 방법에 의해 생성될 수도 있다.
- [0613] *iv. 투과 향상제*
- [0614] 일 구현예에서, 본 발명은 동물의 피부로의 핵산, 특히 iRNA의 효율적인 전달을 달성하기 위해 다양한 투과 향상제를 이용한다. 대부분의 약물은 이온화된 형태 및 비이온화된 형태 둘 모두로 용액 중에 존재한다. 그러나, 보통 지질 용해성 또는 친지성 약물만이 세포막을 용이하게 가로지른다. 가로지르는 막이 투과 향상제로 처리되는 경우 비-친지성 약물도 세포막을 가로지를 수 있는 것으로 밝혀졌다. 세포막을 가로지르는 비-친지성 약물의 확산을 돕는 것에 더하여, 침투 향상제는 또한 친지성 약물의 투과성을 향상시킨다.
- [0615] 투과 향상제는 5가지의 광범위한 범주, 즉, 계면활성제, 지방산, 담즙산염, 킬레이트제, 및 비-킬레이트화 비-계면활성제 중 하나에 속하는 것으로 분류될 수 있다(예를 들어, 문헌[Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002]; 문헌[Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92] 참조). 투과 향상제의 상기 언급된 부류 각각은 하기에 더욱 상세히 기재된다.
- [0616] 계면활성제(또는 "표면-활성제")는 수용액에 용해되는 경우, 점막을 통한 iRNA의 흡수가 향상되는 결과와 함께, 용액의 표면 장력 또는 수용액과 또 다른 액체 사이의 계면 장력을 감소시키는 화학적 엔티티(entity)이다. 담즙산 염 및 지방산에 더하여, 이들 투과 향상제는, 예를 들어, 나트륨 라우릴 설페이트, 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르 및 폴리옥시에틸렌-20-세틸 에테르(예를 들어, 문헌[Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002]; 문헌[Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92] 참조); 및 퍼플루오게 에멀전(perfluorochemical emulsions), 예를 들어, FC-43(문헌[Takahashi *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252] 참조)을 포함한다.
- [0617] 투과 향상제로 작용하는 다양한 지방산 및 이들의 유도체는, 예를 들어, 올레산, 라우르산, 카프르산(n-데칸산), 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 디카프레이트, 트리카프레이트, 모노올레인(1-모노올레오일-rac-글리세롤), 디라우린, 카프릴산, 아라키돈산, 글리세롤 1-모노카프레이트, 1-도데실아자사이클로헥탄-2-온, 아실카르니틴, 아실콜린, 이들의 C₁₋₂₀ 알킬 에스테르(예를 들어, 메틸, 이소프로필 및 t-부틸), 및 이들의 모노- 및 디-글리세리드(즉, 올레에이트, 라우레이트, 카프레이트, 미리스테이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 리놀레에이트 등)를 포함한다(예를 들어, 문헌[Touitou, E., *et al.* Enhancement in Drug Delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006]; 문헌[Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92]; 문헌[Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33]; 문헌[El Hariri *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654] 참조).
- [0618] 담즙의 생리학적 역할은 지질 및 지용성 비타민의 분산 및 흡수의 촉진을 포함한다(예를 들어, 문헌[Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002]; 문헌[Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman *et al.* Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935] 참조). 다양한 천연 담즙산 염, 및 이들의 합성 유도체가 투과 향상제로서 작용한다. 따라서, 용어 "담즙산 염"은 담즙의 천연 발생 성분 중 임의의 성분 뿐만 아니라 이들의 합성 유도체 중 임의의 유도체를 포함한다. 적합한 담즙산 염은, 예를 들어, 콜산(또는 이의 약제학적으로 허용되는 나트륨 염, 나트륨 콜레이트), 테하이드로콜산(나트륨 테하이드로콜레이트), 데옥시콜산(나트륨 데옥시콜레이트), 글루콜산(나트륨 글루콜레이트), 글리콜산(나트륨 글리코콜레이트), 글리코데옥시콜산(나트륨 글리코데옥시콜레이트), 타уро콜산(나트륨 타уро콜레이트), 타уро데옥시콜산(나트륨 타уро데옥시콜레이트), 케노데옥시콜산(나트륨 케노데옥시콜레이트), 우르소데옥시콜산(UDCA), 나트륨 타уро-24,25-디하이드로-푸시데이트(STDHF), 나트륨 글리코디하이드로푸시데이트 및 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르(POE)를 포함한다(예를 들어, 문헌[Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002]; 문헌[Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92]; 문헌[Swinyard, Chapter 39 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783]; 문헌[Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33]; 문헌[Yamamoto *et al.*, J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25]; 문헌[Yamashita *et*

al., J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583] 참조).

[0619] 본 발명과 관련하여 사용되는 킬레이트제는 점막을 통한 iRNA의 흡수가 향상되는 결과와 함께, 용액으로부터의 금속 이온과 함께 복합체를 형성함으로써 용액으로부터의 금속 이온을 제거하는 화합물로 정의될 수 있다. 본 발명에서 투과 향상제로서의 이들의 이용과 관련하여, 킬레이트제는 대부분의 특성화된 DNA 뉴클레아제가 촉매 작용을 위해 2가 금속 이온을 필요로 하고, 이에 따라 킬레이트제에 의해 억제됨에 따라 DNase 억제제로서 또한 작용하는 추가 장점을 갖는다(문헌[Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339]). 적합한 킬레이트제는 이 나트륨 에틸렌디아민테트라아세트레이트(EDTA), 시트르산, 살리실레이트(예를 들어, 나트륨 살리실레이트, 5-메톡시살리실레이트 및 호모나일레이트), 콜라겐의 N-아실 유도체, 라우레트-9 및 베타-디케톤의 N-아미노 아실 유도체(에나민)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다(예를 들어, 문헌[Katdare, A. *et al.*, Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006]; 문헌[Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92]; 문헌[Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33]; 문헌[Buur *et al.*, J. Control Rel., 1990, 14, 43-51] 참조).

[0620] 본원에서 사용되는 바와 같이, 비-킬레이트화 비-계면활성제 투과 향상 화합물은 킬레이트제 또는 계면활성제로서 무의미한 활성을 나타내지만, 그럼에도 불구하고 소화관 점막(alimentary mucosa)을 통해 iRNA의 흡수를 향상시키는 화합물로 정의될 수 있다(예를 들어, 문헌[Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33] 참조). 이러한 부류의 투과 향상제는, 예를 들어, 불포화 사이클릭 우레아, 1-알킬- 및 1-알케닐아자사이클로-알칸온 유도체(문헌[Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92]); 및 비-스테로이드성 항-염증제, 예를 들어, 디클로페낙 나트륨, 인도메타신 및 페닐부타존(문헌[Yamashita *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626])을 포함한다.

[0621] 세포 수준에서 iRNA의 흡수를 향상시키는 작용제가 또한 본 발명의 약제학적 조성물 및 다른 조성물에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 양이온성 지질, 예를 들어, 리포펙틴(미국 특허 제5,705,188호(Junichi 등)), 양이온성 글리세롤 유도체, 및 다가양이온성 분자, 예를 들어, 폴리라이신(PCT 출원 WO 97/30731호(Lollo 등))이 또한 dsRNA의 세포 흡수를 향상시키는 것으로 공지되어 있다. 시판되는 트랜스펙션 시약의 예는, 예를 들어, 특히 리포펙타민(Lipofectamine)TM(인비트로젠(Invitrogen); 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재), 리포펙타민 2000TM(인비트로젠; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재), 293fectinTM(인비트로젠; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재), 셀펙틴(Cellfectin)TM(인비트로젠; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재), DMR1E-CTM(인비트로젠; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재), 프리스타일(FreeStyle)TM MAX(인비트로젠; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재), 리포펙타민TM 2000 CD(인비트로젠; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재), 리포펙타민TM(인비트로젠; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재), RNAiMAX(인비트로젠; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재), 올리고펙타민(Oligofectamine)TM(인비트로젠; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재), 옵티펙트(Optifect)TM(인비트로젠; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재), X-tremeGENE Q2 트랜스펙션 시약(로슈(Roche); 스위스 그렌짜체스트라체 소재), DOTAP 리포솜 트랜스펙션 시약(스위스 그렌짜체스트라체 소재), DOSPER 리포솜 트랜스펙션 시약(스위스 그렌짜체스트라체 소재), 또는 Eugene(스위스 그렌짜체스트라체 소재), 트랜스펙탐(Transfectam)[®] 시약(프로메가(Promega); 미국 위스콘신주 매디슨 소재), 트랜스펙스트(TransFast)TM 트랜스펙션 시약(프로메가; 미국 위스콘신주 매디슨 소재), TfxTM-20 시약(프로메가; 미국 위스콘신주 매디슨 소재), TfxTM-50 시약(프로메가; 미국 위스콘신주 매디슨 소재), 드림펙트(DreamFect)TM(오지 바이오사이언스즈(OZ Biosciences); 프랑스 마르세이유 소재), 에코트랜스펙트(EcoTransfect)(오지 바이오사이언스즈; 프랑스 마르세이유 소재), 트랜스패스(TransPass)^a D1 트랜스펙션 시약(뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs); 미국 매사추세츠주 업스위치 소재), 리오벡(LyoVec)TM/리포젠(LipoGen)TM(인비보젠(Invivogen); 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), 퍼펙틴(PerFectin) 트랜스펙션 시약(젠란티스(Genlantis); 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), 뉴로포터(NeuroPORTER) 트랜스펙션 시약(젠란티스; 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), 진포터(GenePORTER) 트랜스펙션 시약(젠란티스; 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), 진포터(GenePORTER) 2 트랜스펙션 시약(젠란티스; 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), 사이토펙틴(Cytofectin) 트랜스펙션 시약(젠란티스; 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), 배큘로포터(BaculoPORTER) 트랜스펙션 시약(젠란티스; 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), 트로간포터(TroganPORTER)TM 트랜스펙션 시약(젠란티스; 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), 리보펙트(RiboFect)(바이오라인(Bioline); 미국 매사추세츠주 톤턴 소재), 플라스펙트(PlasFect)(바이오라인; 미국 매사추세츠주 톤턴 소재), 유니펙터(UniFECTOR)(비-브리지 인터내셔널(B-Bridge International); 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재), 슈어펙터(SureFECTOR)(비-브리지 인터내셔널; 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재) 또는 하이펙트(HiFect)TM(비-브리지 인터내셔널, 미국 캘리포니아주

마운틴 뷰 소재)를 포함한다.

[0622] 투여된 핵산의 투과를 향상시키기 위해 글리콜, 예를 들어, 에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜, 피룰, 예를 들어, 2-피룰, 아존, 및 테르펜, 예를 들어, 리모넨 및 멘톤을 포함하는 다른 작용제가 사용될 수 있다.

[0623] v. 담체

[0624] 본 발명의 특정 조성물은 또한 제형 내에 담체 화합물을 포함한다. 본원에 사용되는 바와 같이, "담체 화합물" 또는 "담체"는 비활성(즉, 그 자체로 생물학적 활성을 갖지 않음)이지만, 예를 들어, 생물학적 활성 핵산을 분해시키거나, 순환으로부터 이의 제거를 촉진시킴으로써 생물학적 활성을 갖는 핵산의 생체이용률을 감소시키는 생체 내 과정에 의해 핵산으로 인식되는 핵산 또는 이의 유사체를 나타낼 수 있다. 핵산 및 담체 화합물(통상적으로, 후자 물질은 과량)의 동시투여는 추정상 공통의 수용체에 대한 담체 화합물과 핵산 사이의 경쟁으로 인해 간, 신장 또는 다른 순환의 저장소에서 회수되는 핵산의 양의 실질적인 감소를 초래할 수 있다. 예를 들어, 간 조직에서의 부분적인 포스포로티오에이트 dsRNA의 회수는, 폴리이노신산, 텍스트란 설페이트, 폴리시티드산(polycytidic acid) 또는 4-아세트아미도-4'이소티오시아노-스틸벤-2,2'-디설폰산과 함께 동시투여되는 경우에 감소될 수 있다(문헌[Miyao *et al.*, DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121]; 문헌[Takakura *et al.*, DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183]).

[0625] vi. 부형제

[0626] 담체 화합물과 대조적으로, "약제학적 담체" 또는 "부형제"는 동물에게 하나 이상의 핵산을 전달하기 위한 약제학적으로 허용되는 용매, 현탁화제 또는 임의의 다른 약리학적으로 비활성인 비히클이다. 부형제는 액체이거나 고체일 수 있고, 핵산 및 제공된 약제학적 조성물의 다른 성분과 조합되는 경우에 요망되는 벌크, 경도 등을 제공하기 위해 염두에 둔 계획된 투여 방식에 따라 선택된다. 통상적인 약제학적 담체는 결합제(예를 들어, 전호화 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스 등); 충전제(예를 들어, 락토스 및 다른 당, 미정질 셀룰로스, 펙틴, 젤라틴, 칼슘 설페이트, 에틸 셀룰로스, 폴리아크릴레이트 또는 칼슘 하이드로젠 포스페이트 등); 윤활제(예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 활석, 실리카, 콜로이드성 이산화규소, 스테아르산, 금속 스테아레이트, 수소화된 식물성 오일, 옥수수 전분, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 벤조에이트, 나트륨 아세테이트 등); 봉해제(예를 들어, 전분, 나트륨 전분 글리콜레이트 등); 및 습윤제(예를 들어, 나트륨 라우릴 설페이트 등)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0627] 핵산과 유해하게 반응하지 않는 비-비경구 투여에 적합한 약제학적으로 허용되는 유기 또는 무기 부형제가 또한 본 발명의 조성물을 제형화하기 위해 사용될 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체는 물, 염 용액, 알콜, 폴리에틸렌 글리콜, 젤라틴, 락토스, 아밀로스, 마그네슘 스테아레이트, 활석, 규산, 점성 파라핀, 하이드록시메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0628] 핵산의 국소 투여를 위한 제형은 멸균 및 비-멸균 수용액, 통상적인 용매, 예를 들어, 알콜 중 비-수성 용액, 또는 액체 또는 고체 오일 베이스 중 핵산의 용액을 포함할 수 있다. 용액은 또한 완충제, 희석제 및 다른 적합한 첨가제를 함유할 수 있다. 핵산과 유해하게 반응하지 않는 비-비경구 투여에 적합한 약제학적으로 허용되는 유기 또는 무기 부형제가 사용될 수 있다.

[0629] 적합한 약제학적으로 허용되는 부형제는 물, 염 용액, 알콜, 폴리에틸렌 글리콜, 젤라틴, 락토스, 아밀로스, 마그네슘 스테아레이트, 활석, 규산, 점성 파라핀, 하이드록시메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0630] vii. 기타 성분

[0631] 본 발명의 조성물은 해당 분야에서 확립된 사용 수준으로 약제학적 조성물에서 통상적으로 발견되는 다른 보조 성분을 추가로 함유할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 조성물은 추가의 상용성인 약제학적 활성 물질, 예를 들어, 향소양제, 수렴제, 국소 마취제 또는 항염증제를 함유할 수 있거나, 본 발명의 조성물의 다양한 투여형을 물리적으로 제형화시키는데 유용한 추가 물질, 예를 들어, 염료, 향미제, 보존제, 항산화제, 유백제, 증점제 및 안정화제를 함유할 수 있다. 그러나, 이러한 물질은 첨가되는 경우 본 발명의 조성물의 성분의 생물학적 활성을 과도하게 방해하지 않아야 한다. 상기 제형은 멸균될 수 있고, 요망시, 제형의 핵산(들)과 유해하게 상호작용하지 않는 보조제, 예를 들어, 윤활제, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 삼투압에 영향을 미치는 염, 완충제, 착색제, 향미제 및/또는 방향성 물질 등과 혼합될 수 있다.

[0632] 수성 현탁액은, 예를 들어, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 소르비톨 및/또는 텍스트란을 포함하는 현탁액의 점도

를 증가시키는 물질을 함유할 수 있다. 현탁액은 또한 안정화제를 함유할 수 있다.

[0633] 일부 구현예에서, 본 발명에서 특성화된 약제학적 조성물은 (a) 하나 이상의 iRNA 화합물 및 (b) 비-RNAi 메커니즘에 의해 작용하며, 용혈성 장애를 치료하는데 유용한 하나 이상의 작용제를 포함한다. 이러한 작용제의 예는 항염증제, 지방증 방지제(anti-steatosis agent), 항바이러스제 및/또는 항섬유증제를 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 또한, 간을 보호하기 위해 통상적으로 사용되는 다른 물질, 예를 들어, 실리마린(silymarin)도 또한 본원에 기재된 iRNA와 함께 사용될 수 있다. 간 질병을 치료하는데 유용한 다른 작용제에는 텔비부딘(telbivudine), 엔테카비르(entecavir) 및 프로테아제 억제제, 예를 들어, 텔라프레비르(telaprevir) 및 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2005/0148548호, 2004/0167116호 및 2003/0144217호(Tung 등); 및 미국 특허 출원 공개 제2004/0127488호(Hale 등)에 개시된 다른 것들이 포함된다.

[0634] 이러한 화합물의 독성 및 치료 효능은, 예를 들어, LD50(집단의 50%에 치사인 용량) 및 ED50(집단의 50%에서 치료적으로 효과적인 용량)을 결정하기 위해 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 용량 비는 치료 지수이고, 이는 LD50/ED50 비로 표현될 수 있다. 높은 치료 지수를 나타내는 화합물이 바람직하다.

[0635] 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 수득된 데이터가 인간에서 사용하기 위한 소정의 범위의 투여량을 제형화시키는데 사용될 수 있다. 본 발명에서 본원에 특성화된 조성물의 투여량은 일반적으로 독성이 거의 없거나 없이 ED50을 포함하는 소정의 범위의 순환 농도 내에 속한다. 투여량은 이용되는 투여형 및 이용되는 투여 경로에 따라 이러한 범위 내에서 달라질 수 있다. 본 발명에서 특성화된 방법에서 사용되는 임의의 화합물에 대해, 치료적 유효 용량은 세포 배양 검정으로부터 먼저 추정될 수 있다. 용량은 세포 배양물에서 결정되는 바와 같은 IC50(즉, 증상의 최대의 절반의 억제를 달성하는 시험 화합물의 농도)을 포함하는 화합물 또는, 적절한 경우, 표적 서열의 폴리펩티드 생성물의 순환 혈장 농도 범위를 달성(예를 들어, 폴리펩티드의 감소된 농도를 달성)하도록 동물 모델에서 제형화될 수 있다. 이러한 정보는 인간에서 유용한 용량을 더욱 정확히 결정하기 위해 이용될 수 있다. 혈장에서의 수준은, 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다.

[0636] 투여에 더하여, 상기 논의된 바와 같이, 본 발명에 특성화된 iRNA는 PCSK9 발현에 의해 매개되는 병리학적 과정의 치료에 효과적인 다른 공지된 작용제와 병용 투여될 수 있다. 임의의 사례에서, 투여 의사는 해당 분야에 공지되거나 본원에 기재된 표준 효능 척도를 이용하여 관찰된 결과를 기초로 하여 iRNA 투여의 양 및 시기를 조정할 수 있다.

[0637] VI. 키트

[0638] 본 발명은 또한, iRNA 작용제 중 임의의 것을 사용하고/거나 본 발명의 방법 중 임의의 것을 수행하기 위한 키트를 제공한다. 이러한 키트는 하나 이상의 RNAi 작용제(들) 및 사용설명서, 예를 들면 세포를 PCSK9의 발현을 억제하기에 유효한 양의 RNAi 작용제(들)와 접촉시킴으로써, 세포에서 PCSK9의 발현을 억제하기 위한 설명서를 포함한다. 키트는 세포를 RNAi 작용제와 접촉시키기 위한 수단(예를 들면, 주사 장치), 또는 PCSK9의 억제를 측정하기 위한 수단(예를 들면, PCSK9 mRNA 단백질의 억제를 측정하기 위한 수단)을 선택적으로 더 포함할 수 있다. PCSK9의 억제를 측정하기 위한 이러한 수단은 예를 들어, 혈장 시료와 같은 대상체로부터의 시료를 얻기 위한 수단을 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 대상체에게 RNAi 작용제(들)를 투여하기 위한 수단 또는 치료적 유효량 또는 예방적 유효량을 결정하기 위한 수단을 선택적으로 더 포함할 수 있다.

[0639] 달리 정의되지 않으면, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 방법 및 물질과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명에서 특성화된 iRNA 및 방법의 실시 또는 시험에 이용될 수 있다고 하더라도, 적합한 방법 및 물질은 하기에 기술되어 있다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고문헌, 및 서열 목록 및 도면은 그 전체가 참고로 포함된다. 상충하는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 좌우할 것이다. 또한, 물질, 방법 및 실시에는 예시적인 것일 뿐이며 한정되는 의도는 아니다.

[0640] 실시예

[0641] 실시예 1. *GalNAc-컨쥬게이트된 올리고뉴클레오타이드의 합성*

[0642] 인간 PCSK9 유전자(SEQ ID NO: 1)의 뉴클레오타이드 3544 내지 3623을 표적화하는 일련의 siRNA 듀플렉스를 설계하고, 합성하였다. 또한, 다양한 뉴클레오타이드 변형을 갖는 이들 동일한 서열을 합성하고, 3가 *GalNAc*와 컨쥬게이트시켰다. 변형된 듀플렉스의 센스 및 안티센스 가닥 서열은 표 1에 나타나 있다.

표 B: 핵산 서열 표현에 사용되는 뉴클레오타이드 단량체의 약어

약어	뉴클레오타이드(들)
A	아데노신-3'-포스페이트
Ab	베타-L-아데노신-3'-포스페이트
Af	2'-플루오로아데노신-3'-포스페이트
Afs	2'-플루오로아데노신-3'-포스포로티오에이트
As	아데노신-3'-포스포로티오에이트
C	시티딘-3'-포스페이트
Cb	베타-L-시티딘-3'-포스페이트
Cf	2'-플루오로시티딘-3'-포스페이트
Cfs	2'-플루오로시티딘-3'-포스포로티오에이트
Cs	시티딘-3'-포스포로티오에이트
G	구아노신-3'-포스페이트
Gb	베타-L-구아노신-3'-포스페이트
Gbs	베타-L-구아노신-3'-포스포로티오에이트
Gf	2'-플루오로구아노신-3'-포스페이트
Gfs	2'-플루오로구아노신-3'-포스포로티오에이트
Gs	구아노신-3'-포스포로티오에이트
T	5'-메틸우리딘-3'-포스페이트
Tf	2'-플루오로-5-메틸우리딘-3'-포스페이트
Tfs	2'-플루오로-5-메틸우리딘-3'-포스포로티오에이트
Ts	5-메틸우리딘-3'-포스포로티오에이트
U	우리딘-3'-포스페이트
Uf	2'-플루오로우리딘-3'-포스페이트
Ufs	2'-플루오로우리딘-3'-포스포로티오에이트
Us	우리딘-3'-포스포로티오에이트
N	임의의 뉴클레오타이드(G, A, C, T 또는 U)
a	2'-O-메틸아데노신-3'-포스페이트
as	2'-O-메틸아데노신-3'-포스포로티오에이트
c	2'-O-메틸시티딘-3'-포스페이트
cs	2'-O-메틸시티딘-3'-포스포로티오에이트
g	2'-O-메틸구아노신-3'-포스페이트
gs	2'-O-메틸구아노신-3'-포스포로티오에이트

[0643]

약어	뉴클레오타이드(들)
t	2'-0-메틸-5-메틸우리딘-3'-포스페이트
ts	2'-0-메틸-5-메틸우리딘-3'-포스포로티오에이트
u	2'-0-메틸우리딘-3'-포스페이트
us	2'-0-메틸우리딘-3'-포스포로티오에이트
dT	2'-테옥시티미딘-3'-포스페이트
dTs	2'-테옥시티미딘-3'-포스포로티오에이트
dU	2'-테옥시우리딘-3'-포스페이트
dUs	2'-테옥시우리딘-3'-포스포로티오에이트
s	포스포로티오에이트 결합
L96	N-[트리스(GalNAc-알킬)-아미도테카노일)]-4-하이드록시프롤리놀 Hyp-(GalNAc-알킬)3
(Aeo)	2'-0-메톡시에틸아데노신-3'-포스페이트
(Aeos)	2'-0-메톡시에틸아데노신-3'-포스포로티오에이트
(Geo)	2'-0-메톡시에틸구아노신-3'-포스페이트
(Geos)	2'-0-메톡시에틸구아노신-3'-포스포로티오에이트
(Teo)	2'-0-메톡시에틸-5-메틸우리딘-3'-포스페이트
(Teos)	2'-0-메톡시에틸-5-메틸우리딘-3'-포스포로티오에이트
(m5Ceo)	2'-0-메톡시에틸-5-메틸시티딘-3'-포스페이트
(m5Ceos)	2'-0-메톡시에틸-5-메틸시티딘-3'-포스포로티오에이트
(A3m)	3'-0-메틸아데노신-2'-포스페이트
(A3mx)	3'-0-메틸-자일로푸라노실아데노신-2'-포스페이트
(G3m)	3'-0-메틸구아노신-2'-포스페이트
(G3mx)	3'-0-메틸-자일로푸라노실구아노신-2'-포스페이트
(C3m)	3'-0-메틸시티딘-2'-포스페이트
(C3mx)	3'-0-메틸-자일로푸라노실시티딘-2'-포스페이트
(U3m)	3'-0-메틸우리딘-2'-포스페이트
(U3mx)	3'-0-메틸자일로우리딘-2'-포스페이트
(Chd)	2'-0-헥사데실-시티딘-3'-포스페이트
(pshe)	하이드록시에틸포스포로티오에이트
(Uhd)	2'-0-헥사데실-우리딘-3'-포스페이트
(Tgn)	티미딘-글리콜 핵산(GNA) S-이성질체
(Cgn)	시티딘-글리콜 핵산(GNA)
(Chd)	2'-0-헥사데실-시티딘-3'-포스페이트
(Ggn)	2'-0-헥사데실-시티딘-3'-포스페이트
(Agn)	아데노신-글리콜 핵산(GNA)
P	5'-포스페이트

[0644]

약어	뉴클레오타이드(들)
(m5Cam)	2'-0-(N-메틸아세트아미드)-5-메틸시티딘-3'-포스페이트
(m5Cams)	2'-0-(N-메틸아세트아미드)-5-메틸시티딘-3'-포스포로티오에이트
(Tam)	2'-0-(N-메틸아세트아미드)터미딘-3'-포스페이트
(Tams)	2'-0-(N-메틸아세트아미드)터미딘-3'-포스포로티오에이트
(Aam)	2'-0-(N-메틸아세트아미드)아데노신-3'-포스페이트
(Aams)	2'-0-(N-메틸아세트아미드)아데노신-3'-포스포로티오에이트
(Gam)	2'-0-(N-메틸아세트아미드)구아노신-3'-포스페이트
(Gams)	2'-0-(N-메틸아세트아미드)구아노신-3'-포스포로티오에이트
(Uyh)	2'-0-(1-핵산-4-메틸렌-1,2,3-트리아졸릴)-우리딘-3'-포스페이트
(Ayh)	2'-0-(1-핵산-4-메틸렌-1,2,3-트리아졸릴)-아데노신-3'-포스페이트
(Gyh)	2'-0-(1-핵산-4-메틸렌-1,2,3-트리아졸릴)-구아노신-3'-포스페이트
(Cyh)	2'-0-(1-핵산-4-메틸렌-1,2,3-트리아졸릴)-시티딘-3'-포스페이트
(iA)	역위 아데노신-5'-포스페이트
(iC)	역위 시티딘-5'-포스페이트

[0645]

표 1. 인간 PCSK9(SBQ ID NO: 1)의 뉴클레오타이드 3544 내지 3623을 표적화하는 이중-가닥 리보핵산 (RNAi) 작용제

뉴클레오타이드 ID	센스 ID	SEQ ID NO:	센스 서열(5'에서 3')	NM_174936.3에 서의 시작	안티센스 ID	SEQ ID NO:	안티센스 서열(5'에서 3')
AD-53806	A-110717	7	CfaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	8	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717	9	CfaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	10	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717	11	CfaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	12	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717	13	CfaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	14	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717	15	CfaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	16	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717	17	CfaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	18	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717.6	19	CfaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	20	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717.7	21	CfaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	22	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717.8	23	CfaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	24	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717.9	25	CfaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	26	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56979	A-116393	27	caaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	28	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56979	A-116393	29	caaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	30	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56975	A-116394	31	(iC)jaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	32	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56975	A-116394	33	(iC)jaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	34	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56975	A-116394	35	(iC)jaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	36	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56975	A-116394	37	(iC)jaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	38	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56975	A-116394	39	(iC)jaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	40	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56983	A-116400	41	CbaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	42	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56983	A-116400	43	CbaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	44	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56983	A-116400	45	CbaAfgCfaGfacfAFUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	46	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu

[0646]

[0647]

듀플렉스 ID	센스 ID	SEQ ID NO:	센스 시열(5'에서 3')	NM_174936.3에 서의 시작	안티센스 ID	SEQ ID NO:	안티센스 시열(5'에서 3')
AD-56983	A-116400	47	CbaAfgCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	48	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56983	A-116400	49	CbaAfgCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	50	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56977	A-116406	51	CfaagCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	52	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56977	A-116406	53	CfaagCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	54	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56977	A-116406	55	CfaagCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	56	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56976	A-116407	57	CfaagCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	58	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56976	A-116407	59	CfaagCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	60	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56980	A-116408	61	CfaagCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	62	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56980	A-116408	63	CfaagCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	64	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56984	A-116409	65	CfaagCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	66	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56984	A-116409	67	CfaagCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	68	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56987	A-116410	69	CfaagCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	70	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56987	A-116410	71	CfaagCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	72	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56991	A-116415	73	CfaagCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	74	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56993	A-116416	75	CfaagCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	76	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56995	A-116417	77	CfaagCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	78	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56978	A-116418	79	CfaAfgCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	80	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56978	A-116418	81	CfaAfgCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	82	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56981	A-116419	83	CfaAfgCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	84	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56985	A-116420	85	CfaAfgCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	86	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56988	A-116421	87	CfaAfgCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	88	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu
AD-56988	A-116421	89	CfaAfgCfagCfAfAfUfuUfAfUfcUfuUfuUfUfL96	3544	A-109589	90	aAfAfAfGfAfUfAfAfAugUfcUfgCfuUfIgsCfIsu

[0648]

뉴폴렉스 ID	센스 ID	SEQ ID NO:	센스 서열(5'에서 3')	NM_174936.3에 서의 시작	인티센스 ID	SEQ ID NO:	인티센스 서열(5'에서 3')
			6				
AD-56988	A-116421	91	CfaAIGcGfagCfaCfAUFuUfaUFaUFCUUFuUfuUfL96	3544	A-109589	92	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56982	A-116426	93	CfaAfgcaGfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	94	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56982	A-116426	95	CfaAfgcaGfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	96	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56986	A-116428	97	CfaAfgCfagaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	98	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56986	A-116428	99	CfaAfgCfagaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	100	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56989	A-116430	101	CfaAfgCfaCfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	102	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56990	A-116432	103	CfaAfgCfaCfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	104	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56992	A-116434	105	CfaAfgCfaCfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	106	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56992	A-116434	107	CfaAfgCfaCfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	108	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56994	A-116436	109	CfaAfgCfaCfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	110	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56994	A-116436	111	CfaAfgCfaCfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	112	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56996	A-116438	113	caagCfaCfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	114	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57001	A-116440	115	CfaAfgcagaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	116	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57007	A-116442	117	CfaAfgCfaCfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	118	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57013	A-116444	119	CfaAfgCfaCfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	120	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57019	A-116446	121	CfaAfgCfaCfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	122	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57022	A-116448	123	CfaAfgCfaCfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	124	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57025	A-116449	125	CfaAfgCfaCfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	126	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56997	A-116450	127	CfaAfgCfaCfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	128	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57002	A-116452	129	CfaAfgCfaCfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	130	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57008	A-116453	131	CfaAfgCfaCfaCfaUfUfaUfcUfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	132	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu

[0649]

뉴플렉스 ID	세스 ID	SEQ ID NO:	세스 서열(5'에서 3')	NM_174936.3에 서의 시작	안티센스 ID	SEQ ID NO:	안티센스 서열(5'에서 3')
AD-57014	A-116454	133	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	134	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-57020	A-116455	135	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	136	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-57020	A-116455	137	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	138	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-57026	A-116457	139	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	140	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-57003	A-116460	141	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	142	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-57009	A-116462	143	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	144	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-57015	A-116464	145	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	146	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-57023	A-116467	147	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	148	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-57027	A-116469	149	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	150	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-56998	A-116471	151	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	152	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-57004	A-116473	153	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	154	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-57010	A-116475	155	CfaagCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	156	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-57016	A-116477	157	caAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	158	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-56999	A-116479	159	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	160	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-56999	A-116479	161	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	162	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-57021	A-116481	163	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	164	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-57024	A-116483	165	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	166	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-57005	A-116486	167	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	168	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-57011	A-116488	169	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	170	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu
AD-57017	A-116490	171	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfuU96	3544	A-109589	172	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCtuUfgsCfsu

뷰플렉스 ID	센스 ID	SEQ ID NO:	센스 서열(5'에서 3')	NM_174936.3에 서의 시각	안티센스 ID	SEQ ID NO:	안티센스 서열(5'에서 3')
AD-57000	A-116492	173	Cf(Aeo)Atf(Geo)CfagGacAfuUfuUfaUfcUf(Teo)Uf(Teo)UfL96	3544	A-109589	174	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57000	A-116492	175	Cf(Aeo)Atf(Geo)CfagGacAfuUfuUfaUfcUf(Teo)Uf(Teo)UfL96	3544	A-109589	176	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57000	A-116492	177	Cf(Aeo)Atf(Geo)CfagGacAfuUfuUfaUfcUf(Teo)Uf(Teo)UfL96	3544	A-109589	178	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57006	A-116494	179	Cf(Aeo)Atf(Geo)CfagGacAfuUfuUfaUfcUf(Teo)Uf(Teo)UfL96	3544	A-109589	180	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57006	A-116494	181	Cf(Aeo)Atf(Geo)CfagGacAfuUfuUfaUfcUf(Teo)Uf(Teo)UfL96	3544	A-109589	182	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57006	A-116494	183	Cf(Aeo)Atf(Geo)CfagGacAfuUfuUfaUfcUf(Teo)Uf(Teo)UfL96	3544	A-109589	184	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57012	A-116498	185	Cf(Aeo)Atf(Geo)CfagGacAfuUfuUfaUfcUf(Teo)Uf(Teo)UfL96	3544	A-109589	186	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57018	A-116500	187	Cf(Aeo)Atf(Geo)CfagGacAfuUfuUfaUfcUf(Teo)Uf(Teo)UfL96	3544	A-109589	188	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53812	A-110718	189	AfagGcAfgAfcAfuUfuUfaUfcUf(Teo)UfL96	3545	A-109591	190	uChAfaAfaAfgAfuUfaaGfuGfuGfuGfcsc
AD-53818	A-110719	191	AfgCfagCfagAfuUfuUfaUfcUf(Teo)UfL96	3546	A-109593	192	uCfcAfaAfaGfaUfaaaUfgUfcUfgCfufsg
AD-53766	A-110679	193	GfcAfgAfcAfuUfuUfaUfcUf(Teo)UfL96	3547	A-109513	194	aCfcCfaAfaAfgAfuUfaaAfuGfuGfuGfcsc
AD-53772	A-110680	195	AfgAfcAfuUfuUfaUfcUf(Teo)UfL96	3549	A-109515	196	aGfagCfcCfaAfaAfgauAfaAfuGfuGfuGfcsc
AD-53824	A-110720	197	GfcAfuUfuUfaUfcUf(Teo)UfL96	3550	A-109595	198	aAfgAfcCfcAfaAfgauAfaAfuUfgUfcUfg
AD-53778	A-110681	199	AfcAfuUfuUfaUfcUf(Teo)UfL96	3551	A-109517	200	aCfagCfcCfcAfaagAfuUfaAfuGfuGfcsc
AD-53784	A-110682	201	UfuUfaUfcUf(Teo)UfL96	3554	A-109519	202	aGfgAfcAfgAfcCfcAfaAfaAfuUfg
AD-53829	A-110721	203	UfuAfuGfuUfuUfgGfgUfcUf(Teo)UfL96	3555	A-109597	204	aAfgCfagCfagCfcAfaAfaAfuUfgAfsu
AD-53790	A-110683	205	UfaUfcUfuUfuGfgGfgUfcUf(Teo)UfL96	3556	A-109521	206	aGfagCfcAfcAfcCfcAfaAfaAfuUfgAfsu

- 92 -

[0652]

뷰폴렉스 ID	센스 ID	SEQ ID NO:	센스 서열(5'에서 3')	NM_174936.3에 서의 시작	안티센스 ID	SEQ ID NO:	안티센스 서열(5'에서 3')
AD-59186		251	CfsusAfgAfcCfuGfuFuuuugCfuuuugul96	3601		252	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59171		253	CfsusAfgAfcCfuGfuFuuuugCfuuuugul96	3601		254	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59176		255	CfsusAfgAfcCfuGfuFuuuugCfuuuugul96	3601		256	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59170		257	CfsusagacCfuGfuFuuuugCfuuuugul96	3601		258	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59175		259	CfsusagacCfuGfuFuuuugCfuuuugul96	3601		260	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59179		261	csusagacCfuGfuFuuuugCfuuuugul96	3601		262	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59218		263	CfsusAfgAfcCfuGfuFuuuugCfuuuugul96	3601		264	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59222		265	CfsusAfgAfcCfuGfuFuuuugCfuuuugul96	3601		266	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59226		267	CfsusagacCfuGfuFuuuugCfuuuugul96	3601		268	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59230		269	CfsusagacCfuGfuFuuuugCfuuuugul96	3601		270	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59235		271	csusagacCfuGfuFuuuugCfuuuugul96	3601		272	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59207		273	CfsusAfgAfcCfuGfuFuuuugCfuuuugul96	3601		274	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59211		275	CfsusAfgAfcCfuGfuFuuuugCfuuuugul96	3601		276	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59215		277	CfsusagacCfuGfuFuuuugCfuuuugul96	3601		278	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59219		279	CfsusagacCfuGfuFuuuugCfuuuugul96	3601		280	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59223		281	csusagacCfuGfuFuuuugCfuuuugul96	3601		282	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59181		283	CfsusAfgAfcCfuGfuFuufjgCfuufjgsUfL96	3601		284	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59172		285	CfsusAfgAfcCfuGfuFuufjgCfuufjgsUfL96	3601		286	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59177		287	CfsusAfgAfcCfuGfuFuufjgCfsuUfsgsUfL96	3601		288	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59180		289	CfsusAfgAfcCfuGfuFuufjgCfsuUfsgsUfsl96	3601		290	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa

듀플렉스 ID	센스 ID	SEQ ID NO:	센스 서열(5'에서 3')	NM_174936.3에 서의 시작	안티센스 ID	SEQ ID NO:	안티센스 서열(5'에서 3')
AD-59200		323	(C3m)AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgU96	3601		324	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59203		325	(m5Cam)usAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgU96	3601		326	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59204		327	(m5Cam)(Tam)AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgU96	3601		328	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59188		329	(m5Cams)(Tams)AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgU96	3601		330	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59191		331	(m5Cams)usAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgU96	3601		332	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59213		333	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgU96	3601		334	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a
AD-59217		335	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgU96	3601		336	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfg(C3m)(A3m)a
AD-59221		337	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgU96	3601		338	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(Aam)a
AD-59225		339	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgU96	3601		340	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfg(Gam)(Aam)a
AD-59229		341	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgU96	3601		342	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(Aams)a
AD-59234		343	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgU96	3601		344	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfg(Gams)(Aams)a
AD-59238		345	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgU96	3601		346	(A3m)CfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59241		347	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgU96	3601		348	as(C3m)aAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59245		349	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgU96	3601		350	(Aam)CfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59250		351	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgU96	3601		352	as(m5Cam)aAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsa
AD-59196		353	usAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgU96	3601		354	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[0658]

듀플렉스 ID	센스 ID	SEQ ID NO:	센스 서열(5'에서 3')	NM_174936.3에 서의 시작	안티센스 ID	SEQ ID NO:	안티센스 서열(5'에서 3')
AD-56618	A-115537	475	CtuagAfcuGruFuFuUfgcuFuUfgul96	3603	A-115540	476	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGruFuUfgsasa
AD-56624	A-115538	477	CtuagAfcuGruFuFuUfgcuFuUfgul96	3603	A-115540	478	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGruFuUfgsasa
AD-56630	A-115539	479	CtuagaccuGruFuFuUfgcuFuUfgul96	3603	A-115540	480	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGruFuUfgsasa
AD-56636	A-110695.8	481	CfuAfgAfcCfuGruFuFuUfgCfuUfuUfgul96	3603	A-115541	482	aCfaaaAfgCfaAfaacAfggnCfuUfgsasa
AD-56642	A-115535	483	CtuagAfcCfuGruFuFuUfgCfuUfuUfgul96	3603	A-115541	484	aCfaaaAfgCfaAfaacAfggnCfuUfgsasa
AD-56648	A-115536	485	CtuagAfcCfuGruFuFuUfgCfuUfuUfgul96	3603	A-115541	486	aCfaaaAfgCfaAfaacAfggnCfuUfgsasa
AD-56654	A-115537	487	CtuagAfcuGruFuFuUfgcuFuUfgul96	3603	A-115541	488	aCfaaaAfgCfaAfaacAfggnCfuUfgsasa
AD-56613	A-115538	489	CtuagAfcuGruFuFuUfgcuFuUfgul96	3603	A-115541	490	aCfaaaAfgCfaAfaacAfggnCfuUfgsasa
AD-56619	A-115539	491	CtuagaccuGruFuFuUfgcuFuUfgul96	3603	A-115541	492	aCfaaaAfgCfaAfaacAfggnCfuUfgsasa
AD-56614	A-110695.9	493	CfuAfgAfcCfuGruFuFuUfgCfuUfuUfgul96	3603	A-115548	494	aCfaAfaAfaAfgCfaAfaacAfgGruCfuUfgsAfsa
AD-56620	A-115542	495	CfuAfgAfcCfuGruFuFuUfgCfuUfuUfgul96	3603	A-115548	496	aCfaAfaAfaAfgCfaAfaacAfgGruCfuUfgsAfsa
AD-56626	A-115543	497	CfuAfgAfcCfuGruFuFuUfgCfuUfuUfgul96	3603	A-115548	498	aCfaAfaAfaAfgCfaAfaacAfgGruCfuUfgsAfsa
AD-56632	A-115544	499	CfuAfgAfcCfuGruFuFuUfgCfuUfuUfgul96	3603	A-115548	500	aCfaAfaAfaAfgCfaAfaacAfgGruCfuUfgsAfsa
AD-56638	A-115545	501	CfuAfgAfcCfuGruFuFuUfgCfuUfuUfgul96	3603	A-115548	502	aCfaAfaAfaAfgCfaAfaacAfgGruCfuUfgsAfsa
AD-56644	A-115546	503	CfuAfgAfcCfuGruFuFuUfgCfuUfuUfgul96	3603	A-115548	504	aCfaAfaAfaAfgCfaAfaacAfgGruCfuUfgsAfsa
AD-56650	A-115547	505	CfuAfgAfcCfuGruFuFuUfgCfuUfuUfgul96	3603	A-115548	506	aCfaAfaAfaAfgCfaAfaacAfgGruCfuUfgsAfsa
AD-56656	A-110695	507	CfuAfgAfcCfuGruFuFuUfgCfuUfuUfgul96	3603	A-115549	508	aCfaAfaAfaAfgCfaAfaacAfgGruCfuUfgsAfsa
AD-56662	A-115542	509	CfuAfgAfcCfuGruFuFuUfgCfuUfuUfgul96	3603	A-115549	510	aCfaAfaAfaAfgCfaAfaacAfgGruCfuUfgsAfsa
AD-56668	A-115543	511	CfuAfgAfcCfuGruFuFuUfgCfuUfuUfgul96	3603	A-115549	512	aCfaAfaAfaAfgCfaAfaacAfgGruCfuUfgsAfsa
AD-56673	A-115544	513	CfuAfgAfcCfuGruFuFuUfgCfuUfuUfgul96	3603	A-115549	514	aCfaAfaAfaAfgCfaAfaacAfgGruCfuUfgsAfsa

[illegible]

등록번호	센스 ID	SEQ ID NO:	센스 사양(5'에서 3')	NM_174936.3에 서의 시작	안타센스 ID	SEQ ID NO:	안티센스 서열(5'에서 3')
AD-60906	A-117428	641	CfsusAfgAfecfGUGURUfuUgCfuUfuUgUfl.96	3602	A-122309	642	asCfsaAfaAfGcTf(Ayh)AfaacAfgGfcUfuAlgsasa
AD-60907	A-117428	643	CfsusAfgAfecfGUGURUfuUgCfuUfuUgUfl.96	3602	A-122310	644	asCfsaAfaAfGcTfAif(Ayh)aaacAfgGfcUfuAlgsasa
AD-60908	A-117428	645	CfsusAfgAfecfGUGURUfuUgCfuUfuUgUfl.96	3602	A-122311	646	asCfsaAfaAfGcTfAif(Ayh)aacAfgGfcUfuAlgsasa
AD-60909	A-117428	647	CfsusAfgAfecfGUGURUfuUgCfuUfuUgUfl.96	3602	A-122312	648	asCfsaAfaAfGcTfAifAif(Ayh)acAfgGfcUfuAlgsasa
AD-60910	A-117428	649	CfsusAfgAfecfGUGURUfuUgCfuUfuUgUfl.96	3602	A-122313	650	asCfsaAfaAfGcTf(Ayh)AfaacAf(Gyhh)GfuCf(Uyhh) Algsasa
AD-60911	A-122307	651	Cfsus(Ayhh)(Gyhh)(Ayhh)(Cyhh)CfuGURUfuUf(Gyhh)Cf(Uyhh)Uf(Uyhh)Uf(Gyhh)Ufl.96	3602	A-117429	652	asCfsaAfaAfGcTfAfaaAcAfgGfcUfuAlgsasa
AD-60912	A-122308	653	(Cyhu)u(Ayhh)(Gyhh)(Ayhh)(Cyhh)CfuGURUfuUf(Gyhh)Cf(Uyhh)Uf(Uyhh)Uf(Gyhh)Ufl.96	3602	A-117429	654	asCfsaAfaAfGcTfAfaaAcAfgGfcUfuAlgsasa
AD-60913	A-122307	655	Cfsus(Ayhh)(Gyhh)(Ayhh)(Cyhh)CfuGURUfuUf(Gyhh)Cf(Uyhh)Uf(Uyhh)Uf(Gyhh)Ufl.96	3602	A-122309	656	asCfsaAfaAfGcTf(Ayh)AfaacAfgGfcUfuAlgsasa
AD-60914	A-122307	657	Cfsus(Ayhh)(Gyhh)(Ayhh)(Cyhh)CfuGURUfuUf(Gyhh)Cf(Uyhh)Uf(Uyhh)Uf(Gyhh)Ufl.96	3602	A-122310	658	asCfsaAfaAfGcTfAfaaAcAfgGfcUfuAlgsasa
AD-60915	A-122307	659	Cfsus(Ayhh)(Gyhh)(Ayhh)(Cyhh)CfuGURUfuUf(Gyhh)Cf(Uyhh)Uf(Uyhh)Uf(Gyhh)Ufl.96	3602	A-122311	660	asCfsaAfaAfGcTfAif(Ayh)aacAfgGfcUfuAlgsasa
AD- 579285	A-117428	661	CfsusAfgAfecfGUGURUfuUgCfuUfuUgUfl.96	3602	A-117429	662	asCfsaAfaAfGcTfAfaaAcAfgGfcUfuAlgsasa
AD-60916	A-122307	663	Cfsus(Ayhh)(Gyhh)(Ayhh)(Cyhh)CfuGURUfuUf(Gyhh)Cf(Uyhh)Uf(Uyhh)Uf(Gyhh)Ufl.96	3602	A-122312	664	asCfsaAfaAfGcTfAfaaAcAfgGfcUfuAlgsasa
AD-60917	A-122307	665	Cfsus(Ayhh)(Gyhh)(Ayhh)(Cyhh)CfuGURUfuUf(Gyhh)Cf(Uyhh)Uf(Uyhh)Uf(Gyhh)Ufl.96	3602	A-122313	666	asCfsaAfaAfGcTf(Ayh)AfaacAf(Gyhh)GfuCf(Uyhh) Algsasa
AD-60918	A-122308	667	(Cyhu)u(Ayhh)(Gyhh)(Ayhh)(Cyhh)CfuGURUfuUf(Gyhh)Cf(Uyhh)Uf(Uyhh)Uf(Gyhh)Ufl.96	3602	A-122309	668	asCfsaAfaAfGcTf(Ayh)AfaacAfgGfcUfuAlgsasa
AD-60919	A-122308	669	(Cyhu)u(Ayhh)(Gyhh)(Ayhh)(Cyhh)CfuGURUfuUf(Gyhh)Cf(Uyhh)Uf(Uyhh)Uf(Gyhh)Ufl.96	3602	A-122310	670	asCfsaAfaAfGcTfAfaaAcAfgGfcUfuAlgsasa

플렉스 ID	센스 ID	SEQ ID NO:	센스 서열(5'에서 3')	NM_174936.3에 서의 시작	안티센스 ID	SEQ ID NO:	안티센스 서열(5'에서 3')
AD-60920	A-122308	671	(Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGufuufuuf(Gyh)Cf(Uyh)Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfU.96	3602	A-122311	672	asCfsaAfaAfgCfaAf(Ayh)acAfgGfuCfuAfgsasa
AD-60921	A-122308	673	(Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGufuufuuf(Gyh)Cf(Uyh)Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfU.96	3602	A-122312	674	asCfsaAfaAfgCfaAfa(Ayh)cAfgGfuCfuAfgsasa
AD-60922	A-122308	675	(Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGufuufuuf(Gyh)Cf(Uyh)Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfU.96	3602	A-122313	676	asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAf(Gyh)GfuCf(Uyh)Afgsasa
AD-58900		677	CfsaAfgCfaGfaCfaUfUfaUfUfUfUfU.96	3602		678	asAfsaAfaAfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgscsu
AD-59849	A-121244	679	CfsusAfgAfcCfuGufuufuUfgcuuuuugul.96	3602		680	asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa
AD-60688	A-120188	681	csusagacCfuGfuuuuuguuuugul.96	3602		682	asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa
AD-60212	A-122088	683	csusagacCfuGfuufUuugcuuuuugul.96	3602		684	asCfsaAfaAfaAfgCfaAfaAfcAfgCfuGuagsasa

실시예 2: AD-60212의 단계 I 임상 시험

단일 용량 상승(SAD) 군 및 다중-용량 상승(MAD) 군을 포함하는 단계 I, 무작위, 단일-맹검, 위약-제어 연구를 스타틴과 함께 또는 이것 없이 상승된 저밀도 지질단백질 콜레스테롤(LDLc 또는 LDL-C)을 갖는 대상체에서 행하여, 피하 투여되는 AD-60212의 안전성, 내약성, 약동학 및 약력학을 평가하였다.

더욱 구체적으로, 연구의 SAD 단계에서, 100 mg/dl 이상(2.6 mmol/l 이상)의 기준선 LDL-C 및 400 mg/dl 미만(4.5 mmol/l 미만)의 공복 트리글리세리드를 갖는 건강한 자원자 대상체에서 25 mg, 100 mg, 300 mg, 500 mg 또는 800 mg의 단일의 피하 고정 용량의 AD-60212(ALN-PCSSc)가 PCSK9 단백질 및 LDL-C 둘 모두를 낮추는 능력을 시험하였다. 연구의 MAD 단계에서, 스크리닝 이전에 30일 이상 동안 안정한 용량의 스타틴과 함께 또는 이것 없이, 100 mg/dl 이상의 LDL-C 및 400 mg/dl 미만(4.5 mmol/l 미만)의 공복 트리글리세리드를 갖는 대상체를 AD-60212의 다수의 피하 주사로 처리하여, PCSK9 단백질 및 LDL-C 둘 모두를 낮추는 AD-60212의 능력을 시험하였다. 연구의 다수의 투여 군에서 대상체에게 단일의 125 mg의 고정 용량의 AD-60212를 4주 동안 1주마다 1회(125 mg qW x 4), 또는 단일의 250 mg의 고정 용량의 AD-60212를 1개월 동안 2주마다 1회(250 mg q2W x 2) 또

는 스타틴 치료법 없이 단일의 300 mg의 고정 용량의 AD-60212를 2개월 동안 1개월마다 1회(300 mg qM x 2), 또는 스타틴 치료법과 함께 단일의 300 mg의 고정 용량의 AD-60212를 2개월 동안 1개월마다 1회(300 mg qM x 2), 또는 스타틴 치료법 없이, 단일의 500 mg의 고정 용량의 AD-60212를 2개월 동안 1개월마다 1회(500 mg qM x 2), 또는 스타틴 치료법과 함께 단일의 500 mg의 고정 용량의 AD-60212를 2개월 동안 1개월마다 1회(500 mg qM x 2) 투여하였다.

[0667] 혈장 PCSK9 단백질 수준을 ELISA 검정을 사용하여 결정하고, 혈청 LDL-C 수준을 β -정량화(벨기에 루벤 소재의 메드페이스 리퍼런스 레보러토리즈(Medpace Reference Laboratories))에 의해 직접 결정하였다. 총 콜레스테롤, 고밀도 지질단백질 콜레스테롤(HDL-C), 비-HDL-C(HDL-C를 제한 총 콜레스테롤), 아포지질단백질 B, 지질단백질 (a) 및 트리글리세리드의 수준도 또한 결정하였다.

[0668] SAD 단계의 연구에서 대상체의 코호트 인구통계학 및 기준선 특징은 표 2A에 제공되어 있으며, MAD 단계의 연구에서 대상체의 코호트 인구통계학 및 기준선 특징은 표 2B에 제공되어 있다.

[0669] AD-60212의 비변형 센스 및 안티센스 서열은 하기와 같다:

[0670] 센스 - 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3'(SEQ ID NO: 686); 및

[0671] 안티센스 - 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3'(SEQ ID NO: 685).

[0672] AD-60212의 변형된 센스 및 안티센스 서열은 하기와 같다:

[0673] 센스 - 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3'(SEQ ID NO: 687); 및

[0674] 안티센스 - 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3'(SEQ ID NO: 688).

[0675] SAD 단계

[0676] AD-60212는 SAD 단계에서 모든 용량 수준에서 널리 용인되었으며, 유해 사례(AE)로 인한 처리 중단이 존재하지 않았으며, 심각한 AE가 보고되지 않았다.

[0677] 기준선에 비한 평균 PCSK9 낙다운 백분율로 나타낸 단일 용량 코호트에서의 PCSK9 단백질 수준의 낙다운은 도 1에 나타나 있으며, 기준선에 비한 평균 LDL-C 저하 백분율로서 나타낸 단일 용량 코호트에서의 LDL-C 수준의 저하는 도 2에 나타나 있다. 표 3은 SAD 단계에서 투여 후 84일 및 180일의 PCSK9의 단백질 수준, LDL-C의 수준, 총 콜레스테롤의 수준, HDL-C의 수준, 비-HDL-C의 수준, 아포지질단백질 B의 수준, 트리글리세리드의 수준 및 아포지질단백질 a의 수준의 기준선으로부터의 평균(SD) 변화 백분율을 제공한다.

[0678] 데이터는 AD-60212의 투여가 300 mg까지 PCSK9 수준을 용량-의존적 방식으로 감소시키는 것을 보여준다. 300 mg 이상의 용량은 PCSK9 수준의 유사한 지속적인 감소를 야기하였으며, 이는 적어도 6개월의 기간에 걸쳐 유지되었다. 25-mg 및 100-mg 용량 코호트에서 PCSK9 수준은 제180일까지 기준선으로 복귀되었다(마지막 3회의 측정의 평균은 기준선의 80% 이상임). 300 mg 이상의 용량을 받은 대상체(n=12)에서, PCSK9 수준의 기준선으로부터의 개별의 상대 감소 최대치는 89%(800-mg 용량, 제112일)였다. 평균 최대 감소 백분율(개별 최하점에서의 평균 감소 백분율)은 82%였으며, 800-mg 용량 코호트에서 관찰되었다. ALN-PCSSc 300 내지 800 mg을 받는 대상체(용량 군마다 n=2 내지 6)에서의 PCSK9 수준의 기준선으로부터의 변화는 처리 후 7±1일부터 처리 후 112일까지 모든 11개의 측정점에 있어서 위약-처리 대상체에서보다 유의미하게 더 컸다($P \leq 0.011$).

[0679] 데이터는 AD-60212 투여가 300 mg까지 용량-의존적 LDL-C 감소를 초래하는 것을 추가로 보여주며, 300 mg에서 거의 최대의 감소가 달성되었다. LDL-C 감소는 300 내지 800 mg 용량 범위에 걸쳐 유사하였다. 이들 용량을 받는 대상체(n=12)에서, LDL-C의 기준선으로부터의 개별 감소 최대치는 78%(500-mg 용량; 제56일)였다. 평균 최대치 및 최대 최소-제공 평균(LSM) 감소 백분율은 59%였으며, 500 및 800-mg 코호트에서 관찰되었다. LDL-C 수준은 25-mg 및 100-mg 용량의 마지막 투여 후 180일까지 기준선 수준을 향해 복귀되었다. LDL-C 감소는 300 mg 이상의 용량 이후 적어도 180일까지 유지되었다. ALN-PCSSc 300 내지 800 mg을 받는 대상체(n=3 내지 6)에서의 기준선으로부터의 LDL-C 감소는 처리 후 14 ± 2일부터 처리 후 112일까지 모든 10회의 측정에서 위약에 비하여 통계적으로 유의미하였다($P \leq 0.037$).

[0680] 또한, 총 콜레스테롤, 비-HDL-C, 아포지질단백질 B 및 지질단백질 (a) 농도의 감소가 AD-60212-처리된 대상체에서 보고되었다. 이들 파라미터의 감소는 대다수의 비교에 있어서 위약에 비하여 통계적으로 유의미하였다.

[0681] MAD 단계

- [0682] 또한, AD-60212는 MAD 단계에서 모든 용량 수준에서 널리 용인되었으며, 유해 사례(AE)로 인한 처리 중단이 존재하지 않았으며, 심각한 AE가 보고되지 않았다.
- [0683] 기준선에 비한 평균 PCSK9 낙다운 백분율로 나타낸 다중 용량 코호트에서의 PCSK9 단백질 수준의 낙다운은 도 3에 나타나 있으며, 기준선에 비한 평균 LDL-C 저하 백분율로서 나타낸 다중 용량 코호트에서의 LDL-C 수준의 저하는 도 4에 나타나 있다. 표 4는 SAD 단계에서 투여 후 84일 및 180일의 PCSK9의 단백질 수준, LDL-C의 수준, 총 콜레스테롤의 수준, HDL-C의 수준, 비-HDL-C의 수준, 아포지질단백질 B의 수준, 트리글리세리드의 수준 및 아포지질단백질 a의 수준의 기준선으로부터의 평균(SD) 변화 백분율을 제공한다.
- [0684] 데이터는 PCSK9 단백질 수준이 연구되는 모든 처리 섭생법을 사용한 AD-60212의 투여 후에 감소되는 것을 보여준다. 감소는 모든 다중 용량 코호트에 걸쳐 유사하였으며, 마지막 투여 후 적어도 6개월 동안 감소가 유지되었다. 공개된 문헌(문헌[Khera AV, et al. (2015) *Am J Cardiol* 115:178-82]; 문헌[GuoYL, et al. (2013) *Clin Drug Investig* 33:877-83])과 일치하게, PCSK9의 기준선 값은 안정한 용량의 스타틴을 받는 대상체에서 더 높았다. PCSK9의 감소는 기준선 PCSK9 수준과 독립적이었으며, 스타틴 치료법과 관계 없이 대상체에서 유사하였다. PCSK9의 기준선으로부터의 개별 감소 최대치는 94%였다(스타틴과 동시-투여되는 500 mg QMx2, 제63일). 평균 최대 감소 백분율은 89%였으며, 스타틴과 동시-처리된 500-mg 용량을 받는 대상체에서 관찰되었다. 단일요법(즉, 스타틴 없이; 용량 군마다 n=3 내지 6)으로서 다중 용량의 AD-60212를 받는 대상체에서의 기준선으로부터의 PCSK9 농도의 변화는 처리 후 4일부터 제126일까지 모든 15개의 측정점에 대하여 위약보다 유의미하게 더 높았다($P \leq 0.002$).
- [0685] 데이터는 유사한 지속적인 LDL-C 감소가 모든 다중 용량 AD-60212 처리 섭생법으로 달성되었음을 추가로 보여준다. LDL-C 감소는 기준선 LDL-C 수준과 독립적이었으며, 스타틴 동시-치료법과 함께 또는 이것 없이 유사하였다. 개별 LDL-C 감소 최대치는 83%(스타틴과 동시-투여되는 500 mg QMx2, 제29일)였다. LDL-C의 평균 최대 감소 백분율은 64%였으며, 60%의 LSM 감소가 스타틴 없이 300-mg 용량을 받은 코호트에서 관찰되었다. 모든 MD 코호트에서의 LDL-C 저하는 적어도 6개월 동안 지속되었다.
- [0686] AD-60212 단일요법 대상체(n=3 내지 6)에서의 기준선으로부터의 LDL-C의 변화는 처리 섭생법에 따라, 약 8주 내지 약 17주 범위의 기간에 걸쳐 위약과 유의미하게 상이하였다($P \leq 0.05$).
- [0687] 또한, 총 콜레스테롤, 비-HDL-C, 아포지질단백질 B 및 지질단백질 (a) 농도의 감소가 ALN-PCSSc-처리 대상체에서 보고되었다. 이들 파라미터의 감소는 대다수의 비교에 있어서 위약에 비하여 통계적으로 유의미하였다.
- [0688] 약술하면, LDL-C 수준을 감소시키기 위한, PCSK9를 표적화하는 AD-60212의 피하 투여는 단일 용량의 25 내지 800 mg에서, 그리고 28일 기간에 걸친 총 500 내지 1000 mg의 2 내지 4회의 투여의 MD 섭생법에서 널리 용인되었다.
- [0689] 도 1 및 도 2 및 표 3에 나타낸 바와 같이, 고정 용량(300 mg 이상의 AD-60212)의 단일의 피하 주사는 단일 투여 이후 6개월에 걸친 기간 동안 PCSK9의 지속적인 낙다운 및 LDL-C의 저하를 초래하였다. 단일의 고정 용량의 AD-60212의 투여 후에, 82%의 평균 PCSK9 감소 최대치 및 최대 78%의 LDL-C 저하 감소 최대치, 59%의 평균 LDL-C 감소 최대치와 함께 최대 89%의 PCSK9 낙다운 최대치가 존재하였다. 또한, LDL-C는 단일의 투여 후 140일에 평균 44%로 유의미하게 감소되었다($P < 0.001$).
- [0690] 도 3 및 도 4 및 표 4에 나타낸 바와 같이, 개월마다 2회의 고정 용량의 AD-60212는 동시의 스타틴 투여와 함께 또는 이것 없이, 89%의 평균 PCSK9 감소 최대치 및 최대 83%의 LDL-C의 감소 최대치, 64%의 평균 LDL-C 감소 최대치와 함께 최대 94%의 PCSK9의 낙다운 최대치를 초래하였다.
- [0691] 이들 데이터는 단일 용량의 AD-60212(300 mg 이상) 및 본원에 나타낸 모든 다중 용량이 PCSK9 및 LDL-C 둘 모두의 순환 농도의 고도로 지속적인 감소와 관련이 있었음을 보여준다. 이들 용량에서, PCSK9 및 LDL-C에 대한 효과는 처리 후 적어도 180일 동안 유의미하게 감소 유지되어, 최대 76%의 PCSK9 감소 및 최대 48%의 LDL-C 감소가 마지막 AD-60212 주사 후 6개월에 여전히 명백하게 하였으며, 투여 후 6개월 기간에 걸쳐 현저하게 적은 변이를 보여주었다. 스타틴 치료법에 부가되는 경우 가산적인 혈청 LDL-C 저하가 AD-60212에서 획득되었으며, 병용 요법은 어느 하나의 작용제의 안전성 및 내약성에도 영향을 미치지 않았다.
- [0692] SAD 및 MAD 단계 둘 모두에서, 총 콜레스테롤, 비-HDL-C, 아포지질단백질 B 및 지질단백질 (a) 농도의 감소가 AD-60212-처리 대상체에서 관찰되었다. 이들 파라미터의 감소는 대다수의 비교에 있어서 위약에 비하여 통계적으로 유의미하였다.

표 2A. SMD 코호트 인구통계학 및 기준선 특징.

	단일 용량 상승 단계							위약	
	위약 (n=6)	25 mg (n=3)	100 mg (n=3)	300 mg (n=3)	500 mg (n=3)	800 mg (n=6)	총 (n=24)	스타틴 존재 (n=4)	스타틴 부재 (n=8)
연령, 세 평균 (SD)	48 (14.2)	47 (14.2)	48 (6.2)	48 (12.7)	39 (14.0)	49 (6.7)	47 (10.7)	58 (3.0)	51 (14.2)
성별, n(%)									
남성	2 (33.3%)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	5 (83.3%)	19 (79.2%)	2 (50.0%)	6 (75.0%)
인종, n(%)									
백인	4 (66.7%)	2 (66.7%)	3 (100%)	1 (33.3%)	3 (100%)	3 (50.0%)	16 (66.7%)	4 (100%)	7 (87.5%)
흑인 또는 아프리카 카레 미국인	2 (33.3%)	1 (33.3%)	0	1 (33.3%)	0	0	4 (16.7%)	0	0
아시아인	0	0	0	1 (33.3%)	0	1 (16.7%)	2 (8.3%)	0	0
기타	0	0	0	0	0	2 (33.3%)	2 (8.3%)	0	1 (12.5%)
체중, kg 평균 (SD)	70.6 (12.04)	84.5 (2.11)	77.3 (6.66)	81.2 (11.04)	71.6 (7.93)	74.0 (6.01)	75.5 (9.16)	74.3 (5.07)	77.6 (10.31)
신장, cm 평균 (SD)	168 (10.6)	175 (2.3)	174 (5.1)	173 (9.6)	175 (3.1)	169 (5.5)	172 (7.2)	168 (10.5)	171 (9.3)
BMI, kg/m ² 평균 (SD)	24.9 (3.17)	27.7 (0.21)	25.5 (2.10)	27.0 (1.29)	23.4 (3.01)	25.9 (1.60)	25.6 (2.39)	26.5 (2.72)	26.7 (2.64)

[0693]

[0694]

LDL-C, mmol/L 평균 (SD)	3.4 (0.50)	4.6 (1.31)	3.9 (0.92)	4.2 (0.95)	3.1 (0.44)	4.1 (0.74)	3.8 (0.85)	3.7 (2.32)	3.4 (0.54)
TG, mmol/L 평균 (SD)	0.8 (0.14)	1.3 (0.67)	2.0 (1.16)	1.5 (0.55)	1.8 (0.95)	1.3 (0.24)	1.4 (0.65)	1.7 (0.53)	1.4 (0.43)
PCSK9, µg/L 평균 (SD)	278.95 (99.53)	342.65 (67.89)	233.77 (39.17)	253.82 (22.36)	263.23 (24.98)	279.62 (66.90)	276.32 (68.28)	460.69 (56.295)	276.23 (58.69)

BMI = 체질량지수; LDL-C = 저밀도 지단단백질 콜레스테롤; PCSK9 = 전구단백질 전환효소 시그널리신/캐신 9형; QMx2 = 2회의 개별마다의 투여; QMx4 = 4회의 주마다의 투여; Q2Mx2 = 2회의 격주 투여; SD = 표준 편차; TG = 트리글리세리드.
콜레스테롤에 대한 값을 mg/dL로 전환시키기 위하여 38.67을 곱한다. TG에 대한 값을 mg/dL로 전환시키기 위하여 88.57을 곱한다.

표 2B. MAD 코호트 인구통계학 및 기준선 특징.

	다중 용량 단계									
	위약		ALN-PCSc							
	스타틴 준제 (n=4)	스타틴 부제 (n=8)	300 mg QMx2 스타틴 준제 (n=4)	300 mg QMx2 스타틴 부제 (n=6)	500 mg QMx2 스타틴 준제 (n=5)	500 mg QMx2 스타틴 부제 (n=6)	125 mg QMx4 스타틴 부제 (n=6)	250 mg Q2Mx2 스타틴 부제 (n=6)	총 (n=45)	
연령, 세 평균 (SD)	58 (3.0)	51 (14.2)	52 (21.6)	47 (8.7)	56 (11.5)	42 (16.1)	55 (9.4)	61 (6.3)	52 (12.7)	
성별, n(%)										
남성	2 (50.0%)	6 (75.0%)	2 (50.0%)	6 (100%)	2 (40.0%)	3 (50.0%)	4 (66.7%)	4 (66.7%)	29 (64.4%)	
인종, n(%)										

백인	4	7	3	6	3	5	5	3	36
흑인 또는 아프리카계 미국인	0 (100%)	0 (87.5%)	0 (75.0%)	0 (100%)	1 (60.0%)	0 (83.3%)	0 (83.3%)	1 (50.0%)	2 (80.0%)
아시아인	0	0	1 (25.0%)	0	1 (20.0%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)	0	4 (8.9%)
기타	0	1 (12.5%)	0	0	0	0	0	2 (33.3%)	3 (6.7%)
체중, kg 평균 (SD)	74.3 (5.07)	77.6 (10.31)	85.0 (22.04)	77.8 (15.19)	71.9 (11.03)	64.9 (7.86)	73.1 (7.07)	83.2 (8.12)	75.8 (12.03)
신장, cm 평균 (SD)	168 (10.5)	171 (9.3)	176 (12.5)	175 (7.4)	167 (11.7)	168 (5.3)	167 (6.9)	176 (10.1)	171 (9.2)
BMI, kg/m ² 평균 (SD)	26.5 (2.72)	26.7 (2.64)	27.1 (3.59)	25.2 (2.95)	25.7 (1.97)	23.0 (2.34)	26.2 (2.72)	27.0 (1.93)	25.9 (2.72)
LDL-C, mmol/L 평균 (SD)	3.7 (2.32)	3.4 (0.54)	3.7 (0.79)	3.7 (0.52)	2.7 (0.51)	3.2 (1.29)	3.6 (0.48)	3.8 (0.37)	3.5 (0.92)
TG, mmol/L 평균 (SD)	1.7 (0.53)	1.4 (0.43)	1.5 (0.98)	1.5 (1.02)	1.1 (0.50)	1.0 (0.23)	1.0 (0.29)	1.8 (0.78)	1.4 (0.56)
PCSK9, µg/L 평균 (SD)	460.69 (56.295)	276.23 (58.69)	460.69 (209.435)	311.47 (59.85)	433.44 (107.28)	288.07 (69.07)	380.03 (50.63)	288.73 (53.53)	348.34 (103.99)

BMI = 체질량지수; LDL-C = 저밀도 지질단백질 콜레스테롤; PCSK9 = 전구단백질 전환효소 서브틸리신/켄신 9형; QMx2 = 2회의 개월마다의 투여;
 QWx4 = 4회의 주마다의 투여; Q2Wx2 = 2회의 격주 투여; SD = 표준 편차; TG = 트리글리세리드.
 콜레스테롤에 대한 값을 mg/dL로 전환시키기 위하여 38.67을 곱한다. TG에 대한 값을 mg/dL로 전환시키기 위하여 88.57을 곱한다.

[0696]

표 3: SAD 단계에서 약력학적 파라미터의 표준편차(SD) 변화 백분율(약력학적 집단)									
	위약 (n=6)	ALN-PCSec							
		25 mg (n=3)	100 mg (n=3)	300 mg (n=3)	500 mg (n=3)	800 mg (n=6)			
PCSK9									
제84일									
n	5	2	3	3	3	6			
평균(SD) 변화 백분율	-0.1 (14.3)	-47.3 (7.2)	-29.9 (12.9)	-72.6 (12.1)	-68.7 (9.8)	-72.2 (8.5)			
제180일									
n	NA	NA	2	3	2	4			
평균(SD) 변화 백분율	NA	NA	-15.7 (0.2)	-47.8 (24.8)	-70.3 (6.6)	-74.3 (13.2)			
개발 최저점에서의 평균 (SD) 변화 백분율 ^a	-29.4 (9.53)	-54.3 (4.75)	-48.9 (27.37)	-77.9 (3.49)	-75.7 (11.75)	-82.3 (4.85)			
개발 최저점에서의 평균(SD) 변화 백분율 ^b	-17.5 (19.56)	-51.2 (0.56)	-41.7 (21.28)	-74.0 (0.57)	-77.7 (1.28)	-79.4 (3.27)			
개발 최저점까지의 시간, 일	35	42	42	42	112	98			
LDL-C									
제84일									
n	5	2	3	3	3	5			
평균(SD) 변화 백분율	-7.5 (15.6)	-27.9 (11.4)	-36.6 (6.1)	-48.4 (19.0)	-47.6 (15.2)	-41.9 (12.3)			

표 3: SAD 단계에서 약력학적 파라미터의 기준선으로부터의 평균(SD) 변화 백분율(약력학적 점단)						
	위약 (n=6)	ALN-PCSec				
		25 mg (n=3)	100 mg (n=3)	300 mg (n=3)	500 mg (n=3)	800 mg (n=6)
제180일						
n	NA	NA	2	3	2	4
평균(SD) 변화 백분율	NA	NA	-26.3 (2.1)	-47.8 (0.5)	-37.9 (21.7)	-35.2 (16.8)
개별 최저점에서의 평균 (SD) 변화 백분율 ^a	-18.7 (5.61)	-34.5 (8.62)	-42.9 (15.35)	-55.0 (10.03)	-55.1 (19.93)	-59.2 (12.25)
군 최저점에서의 평균(SD) 변화 백분율 ^b	-8.6 (18.07)	-27.9 (11.43)	-38.7 (2.07)	-48.4 (18.99)	-55.1 (24.46)	-51.8 (8.44)
군 최저점까지의 시간, 일	98	84	140	84	98	35
총 플라스테롤						
제84일	-1.3 (11.7)	-20.2 (9.4)	-18.2 (10.7)	-30.9 (9.4)	-24.2 (10.2)	-28.1 (11.7)
제180일	NA	NA	-14.1 (2.9)	-30.5 (5.7)	-23.5 (11.1)	-25.0 (12.2)
HDL-C						
제84일	11.7 (14.4)	8.3 (10.3)	19.6 (17.7)	50.5 (71.3)	6.5 (6.4)	1.9 (17.0)
제180일	NA	NA	18.1 (26.3)	12.8 (42.5)	-2.8 (2.8)	-0.2 (16.4)
비-HDL-C						
제84일	-6.6 (12.2)	-25.5 (11.3)	-28.8 (7.5)	-47.2 (19.2)	-34.1 (12.6)	-36.0 (12.6)
제180일	NA	NA	-21.2 (3.6)	-38.0 (12.6)	-29.5 (13.6)	-30.4 (13.4)
아포지질단백질 B						
제84일	-10.0 (15.6)	-18.2 (9.7)	-28.1 (15.6)	-45.5 (20.5)	-36.0 (11.7)	-44.5 (11.8)
제180일	NA	NA	-30.5 (7.6)	-37.6 (12.2)	-29.2 (18.8)	-27.7 (13.6)
트리글리세리드						

[0697]

표 3: SAD 단계에서 약력학적 파라미터의 기준치으로부터의 평균(SD) 변화 백분율(약력학적 점단)							
	위약 (n=6)	ALN-PCSSc					
		25 mg (n=3)	100 mg (n=3)	300 mg (n=3)	500 mg (n=3)	800 mg (n=6)	
제84일	-12.4 (7.9)	-9.0 (19.7)	-9.6 (20.2)	-25.1 (29.2)	15.1 (28.1)	24.6 (48.2)	
제180일	NA	NA	-18.7 (35.5)	45.0 (105.8)	-8.6 (10.1)	-7.4 (23.2)	
지질단백질 (a)							
제84일	6.7 (25.7)	-2.8 (29.0)	-20.1 (3.5)	-33.8 (46.7)	-30.4 (27.0)	-22.1 (20.8)	
제180일	NA	NA	6.6 (23.7)	-37.9 (35.8)	-31.1 (26.7)	-2.5 (18.9)	

HDL-C = 고밀도 지질단백질 콜레스테롤; LDL-C = 저밀도 지질단백질 콜레스테롤; NA = 해당 없음; PCSK9 = 전구단백질 전환효소 서브틸리시/캐신 9형; SD = 표준 편차.

^a 대상체마다 기준선 값으로부터의 가장 큰 투여 후 감소 백분율로서 정의되는 개별 최저점 값. 그 다음 이들 값을 합산하였다.

^b 군 최저점은 연구 동안 기준선 값으로부터의 가장 큰 투여 후 평균 변화 백분율로서 정의된다.

표 4: MAD 단계에서 약력학적 파라미터의 기준으로부터의 평균(SD) 변화 백분율(약력학적 집단)									
	위약			ALN-PCSsc					
	스타틴 준제 (n=3)	스타틴 부제 (n=8)	300 mg QMx2 스타틴 준제 (n=3)	300 mg QMx2 스타틴 부제 (n=6)	500 mg QMx2 스타틴 준제 (n=5)	500 mg QMx2 스타틴 부제 (n=6)	125 mg QWx4 스타틴 부제 (n=6)	250 mg Q2Wx2 스타틴 부제 (n=6)	
PCSK9									
마지막 투여 후 84일									
n	3	6	3	6	5	6	6	6	6
평균(SD) 변화 백분율	-0.5 (33.4)	1.3 (36.7)	-78.1 (3.9)	-70.6 (10.9)	-82.6 (9.5)	-74.2 (8.3)	-75.0 (7.5)	-78.0 (6.8)	
마지막 투여 후 180일									
n	NA	NA	1	6	4	6	6	6	6
평균(SD) 변화 백분율	NA	NA	-69.7 (NC)	-62.6 (10.7)	-75.9 (10.8)	-72.3 (14.3)	-63.3 (14.5)	-67.4 (9.9)	
개별 최저점에서의 평균(SD) 변화 백분율 ^a	-42.4 (3.76)	-25.3 (20.51)	-86.1 (2.06)	-80.4 (4.92)	-88.5 (3.67)	-81.5 (5.73)	-83.8 (2.13)	-82.7 (2.81)	
군 최저점에서의 평균(SD) 변화 백분율 ^b	-21.2(8.9)	-6.1 (NC)	-83.6 (4.06)	-73.1 (6.31)	-85.2 (1.83)	-79.9 (5.35)	-80.3 (4.73)	-79.4 (3.83)	
군 최저점까지의 시간, 일	28	91	56	56	84	84	77	35	
LDL-C									
마지막 투여 후 84일									
n	3	5	3	6	5	6	6	6	6
평균(SD) 변화 백분율	0.9 (33.3)	-7.0 (11.6)	-44.7 (21.2)	-48.8 (9.0)	-38.9 (13.6)	-48.5 (14.2)	-41.8 (8.8)	-50.0 (10.5)	
마지막 투여 후 180일									
n	NA	NA	1	6	4	6	6	6	6

[0699]

표 4: MAD 단계에서 약력학적 파라미터의 기준선으로부터의 평균(SD) 변화 배분율(약력학적 집단)									
	위약			ALN-PCSSc					
	스타틴 준제 (n=3)	스타틴 부제 (n=8)	300 mg QMx2 스타틴 준제 (n=3)	300 mg QMx2 스타틴 부제 (n=6)	500 mg QMx2 스타틴 준제 (n=5)	500 mg QMx2 스타틴 부제 (n=6)	125 mg QWx4 스타틴 부제 (n=6)	250 mg Q2Wx2 스타틴 부제 (n=6)	
평균(SD) 변화 배 분율	NA	NA	-30.0 (NC)	-44.3 (12.8)	-44.2 (26.2)	-45.3 (16.1)	-34.5 (5.8)	-42.1 (16.6)	
개별 최저점에서의 평균 (SD) 변화 배분율 ^a	-27.7 (13.19)	-19.2 (9.68)	-53.8 (19.78)	-64.4 (13.22)	-59.9 (18.14)	-56.2 (14.59)	-52.1 (4.75)	-60.4 (11.02)	
군 최저점에서의 평균 (SD) 변화 배분율 ^b	-18.4 (17.7)	-16.3 (NC)	-46.7 (18.29)	-55.7 (13.20)	-48.9 (23.77)	-51.9 (14.97)	-44.8 (4.07)	-54.8 (7.77)	
군 최저점까지의 시간, 일	35	105	70	70	140	140	63	49	
총 콜레스테롤									
마지막 투여 후 84일	2.9 (25.1)	-11.8 (11.3)	-24.2 (13.4)	-39.9 (7.4)	-28.6 (16.1)	-25.8 (9.3)	-25.9 (5.4)	-32.0 (7.4)	
마지막 투여 후 180일	NA	NA	-13.9 (NA)	-26.0 (6.5)	-25.0 (19.6)	-24.2 (12.8)	-22.2 (4.7)	-26.4 (13.9)	
HDL-C									
마지막 투여 후 84일	10.6 (11.8)	-2.1 (15.1)	11.2 (9.4)	13.5 (15.6)	5.2 (15.9)	13.1 (15.9)	7.3 (3.9)	7.0 (15.8)	
마지막 투여 후 180일	NA	NA	20.5 (NA)	7.5 (7.7)	3.8 (10.6)	6.0 (12.7)	3.5 (6.5)	10.2 (11.0)	
비-HDL-C									
마지막 투여 후 84일	1.3 (36.5)	-15.1 (11.2)	-35.2 (10.7)	-55.3 (12.7)	-43.4 (19.1)	-43.6 (11.8)	-37.4 (9.6)	-42.5 (9.2)	
마지막 투여 후 84일	NA	NA	-25.5 (NA)	-35.5 (8.0)	-36.4 (22.0)	-37.7 (15.4)	-31.1 (4.9)	-36.6 (16.3)	
아포지립단백질 B									
마지막 투여 후 84일	-6.1 (31.7)	-15.3 (11.0)	-36.8 (9.7)	-51.5 (10.7)	-40.1 (14.0)	-45.3 (11.9)	-36.4 (10.1)	-42.7 (9.9)	

[0700]

[0701]

표 4: MAD 단계에서 약력학적 파라미터의 기준으로부터의 평균(SD) 변화 백분율(약력학적 집단)									
	위약		ALN-PCSSc						
	스타틴 준제 (n=3)	스타틴 부제 (n=8)	300 mg QMx2 스타틴 준제 (n=3)	300 mg QMx2 스타틴 부제 (n=6)	500 mg QMx2 스타틴 준제 (n=5)	500 mg QMx2 스타틴 부제 (n=6)	125 mg QWx4 스타틴 부제 (n=6)	250 mg Q2Wx2 스타틴 부제 (n=6)	
마지막 투여 후 180일	NA	NA	-24.1 (NA)	-35.1 (10.1)	-34.9 (21.3)	-37.4 (14.8)	-24.4 (3.1)	-36.5 (15.7)	
트리글리세리드									
마지막 투여 후 84일	1.5 (45.7)	-8.1 (33.8)	-8.8 (6.5)	-39.3 (13.8)	-16.6 (15.2)	-0.1 (24.5)	-7.5 (19.0)	-18.0 (12.0)	
마지막 투여 후 180일	NA	NA	-13.1 (NA)	7.4 (37.3)	7.2 (23.1)	6.1 (15.8)	-0.7 (28.9)	21.3 (48.7)	
지질단백질 (a)									
마지막 투여 후 84일	3.2 (20.9)	-14.7 (18.6)	-17.9 (42.5)	-19.4 (24.9)	-28.9 (28.0)	-27.6 (15.6)	-27.4 (8.9)	-25.3 (12.9)	
마지막 투여 후 180일	NA	NA	-12.2 (NA)	-15.9 (26.6)	-23.7 (26.4)	-27.7 (23.7)	-29.0 (15.3)	-28.9 (12.6)	

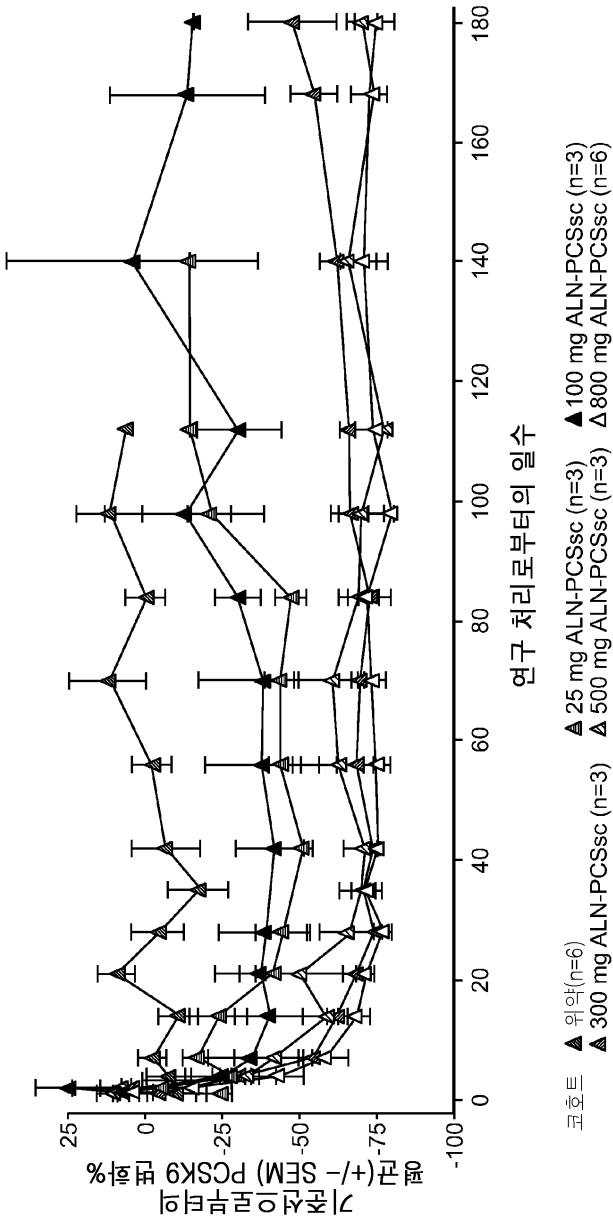
HDL-C = 고밀도 지질단백질 콜레스테롤; LDL-C = 저밀도 지질단백질 콜레스테롤; NA = 해당 없음; NC = 계산되지 않음; PCSK9 = 전구단백질 전환효소 서브틸리신/펩티다제; QMx2 = 2회의 개월마다의 투여; QWx4 = 4회의 주마다의 투여; Q2Wx2 = 2회의 격주 투여; SD = 표준 편차.

^a 대상제마다 기준선 값으로부터의 가장 큰 투여 후 감소 백분율로서 정의되는 개별 최저점 값. 그 다음 이들 값을 합산하였다.

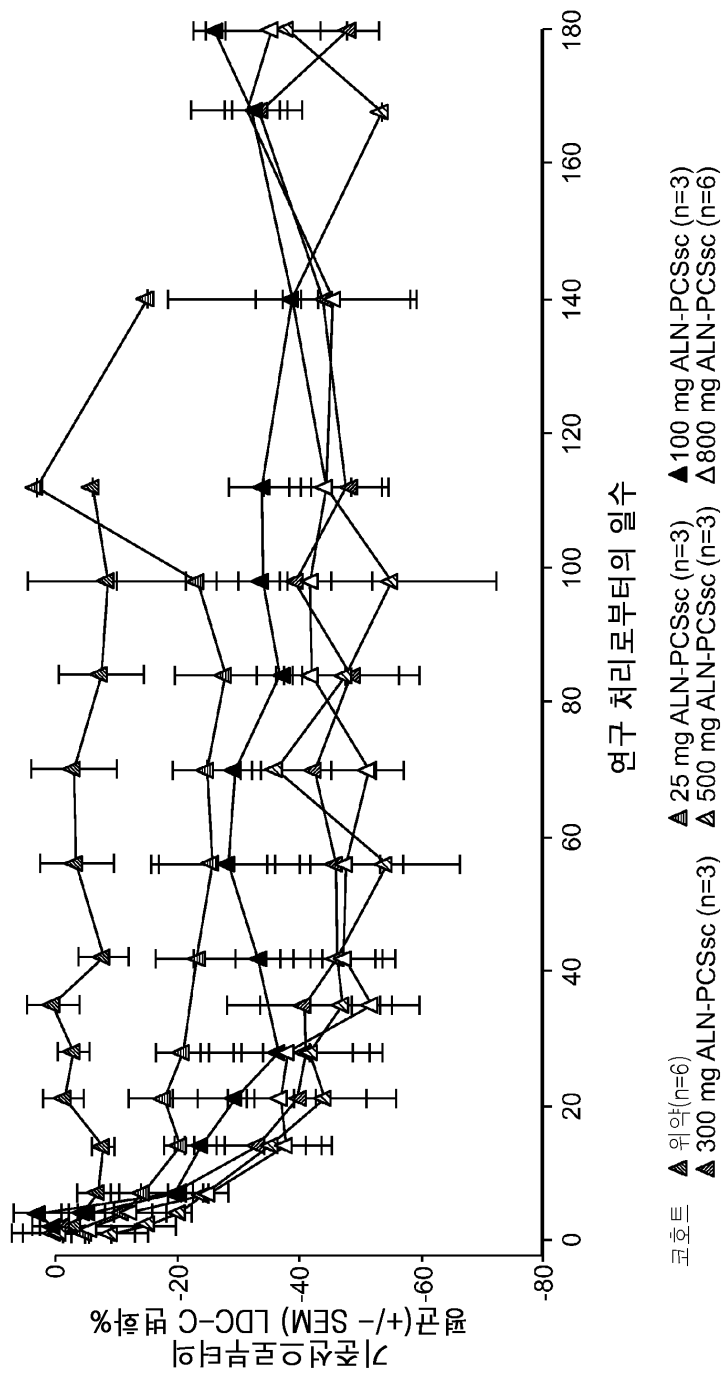
^b 군 최저점을 연구 동안 기준선 값으로부터의 가장 큰 평균 투여 후 변화 백분율로서 정의된다.

도면

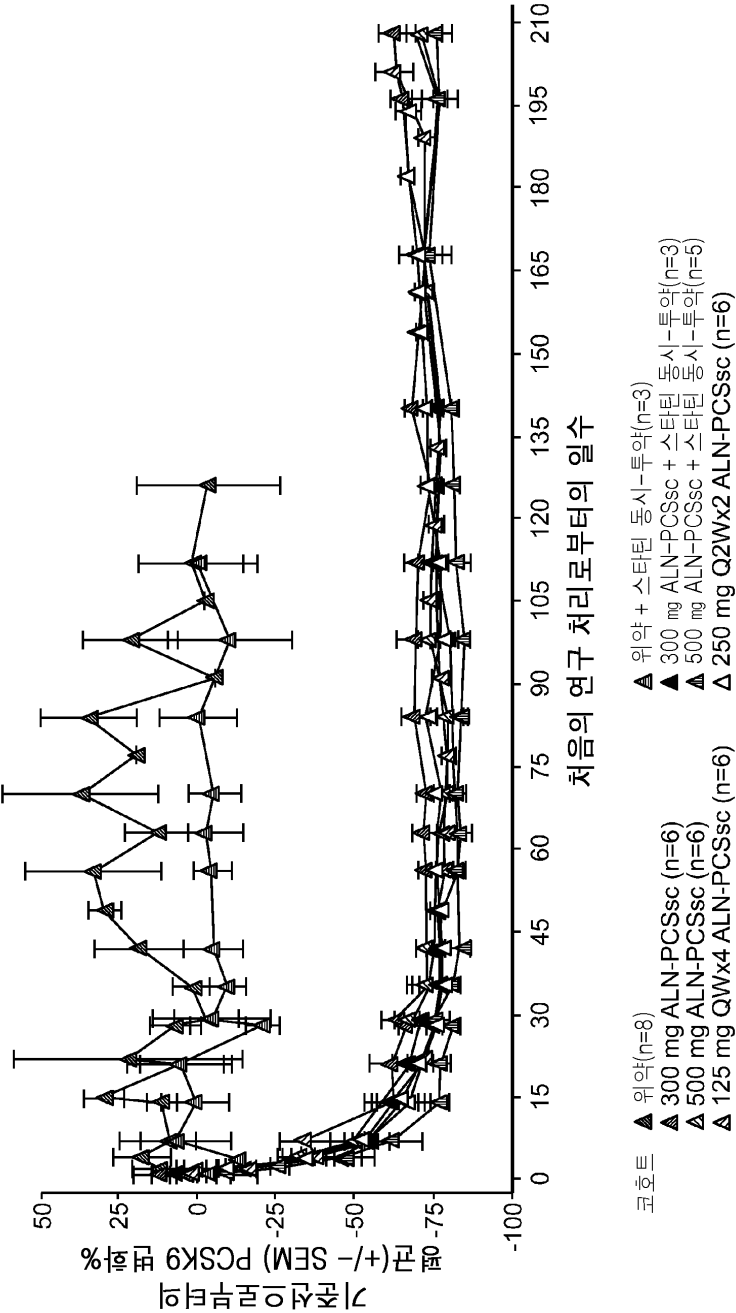
도면1



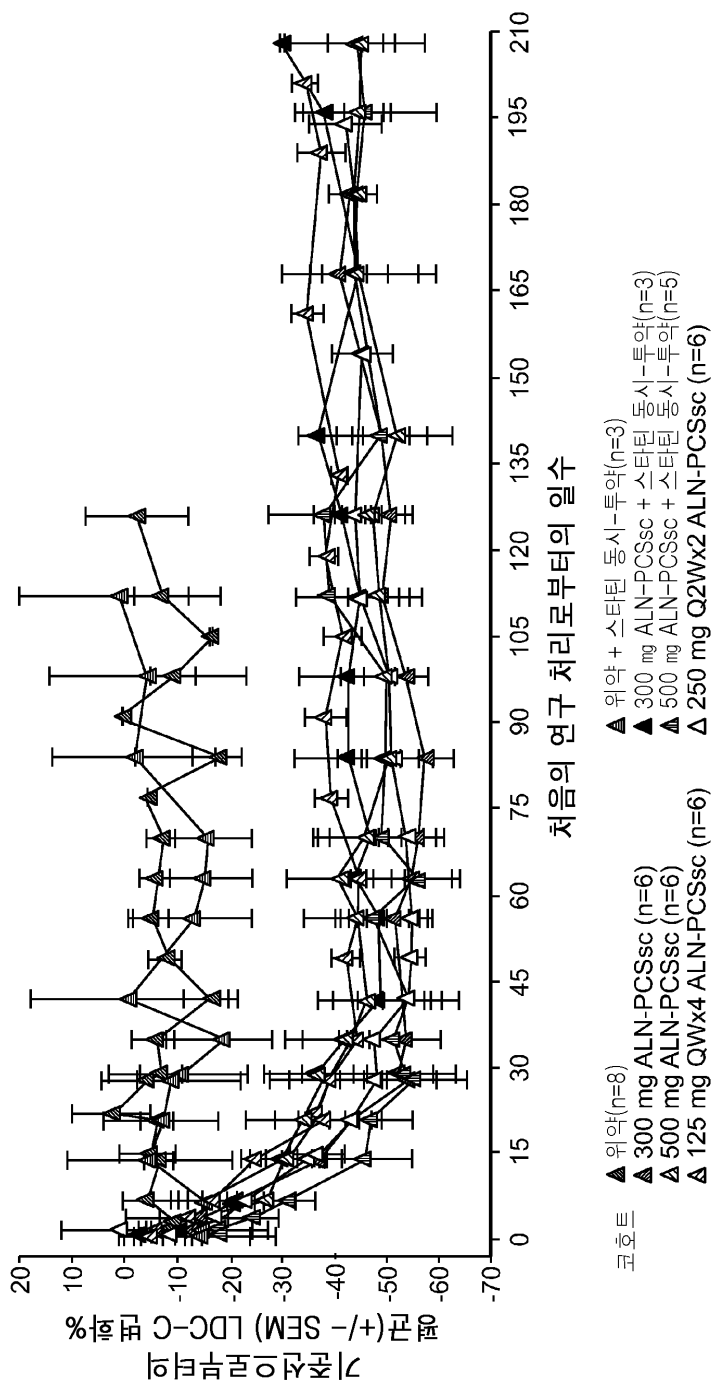
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.
- <120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING A PROPROTEIN
CONVERTASE SUBTILISIN KEXIN (PCSK9) GENE-ASSOCIATED
DISORDER
- <130> 121301-04420
- <150> 62/209,526

<151> 2015-08-25

<160> 688

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 3731

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gtccgatggg gctctgggtg cgtgatctgc gcgccccagg cgtcaagcac ccacacccta	60
gaagggtttcc gcagcgacgt cgaggcgctc atggttgcag gcgggcgcgc cgtttcagtt	120
cagggtctga gcctggagga gtgagccagg cagtgcagact ggctcgggcg ggccgggacg	180
cgctggtgca gcagcggctc ccagctccca gccaggattc cgcgcgcccc ttcacgcgcc	240
ctgctcctga acttcagctc ctgcacagtc ctccccaccg caaggtctca ggccgcgcgc	300
gcgtggaccg cgcacggcct ctaggtctcc tcgccaggac agcaacctct cccctggccc	360
tcatgggcac cgtcagctcc aggcggctct ggtggccgct gccactgctg ctgctgctgc	420
tgctgtctct ggggtcccgc gggcccgctg cgcaggagga cgaggacggc gactacgagg	480
agctggtgct agccttgctg tccgaggagg acggcctggc cgaagcacc gagcacggaa	540
ccacagccac ctccaccgc tgcgccaagg atccgtggag gttgcctggc acctacgtgg	600
tggtgctgaa ggaggagacc cacctctcgc agtcagagcg cactgcccgc cgcctgcagg	660
cccaggtcgc ccgcccggga tacctacca agatcctgca tgtcttccat ggccttcttc	720
ctggcttctt ggtgaagatg agtggcgacc tgctggagct ggccttgaag ttgccccatg	780
tcgactacat cgaggaggac tcctctgtct ttgccagag catcccgtag aacctggagc	840
ggattacccc tccacggtag cgggcggatg aataccagcc ccccgacgga ggcagcctgg	900
tggaggtgta tctcctagac accagcatac agagtaccca ccgggaaatc gagggcaggg	960
tcatggtcac cgacttcgag aatgtgcccg aggaggacgg gaccgccttc cacagacagg	1020
ccagcaagtg tgacagtcac ggcacccacc tggcaggggt ggtcagcggc cgggatgccg	1080
gcgtggccaa ggggtgccagc atgcgcagcc tgcgcgtgct caactgcca ggggaaggga	1140
cggttagcgg caccctcata ggcctggagt ttattcggaa aagccagctg gtccagcctg	1200
tggggccact ggtggtgctg ctgcccctgg cgggtgggta cagccgcgtc ctcaacgccg	1260
cctgccagcg cctggcgagg gctggggtcg tctggtcac cgctgcggc aacttcggg	1320
acgatgcctg cctctactcc ccagcctcag ctcccagggt catcacagtt ggggccacca	1380

atgccaaga ccagccggtg accctgggga ctttggggac caactttggc cgctgtgtgg	1440
acctctttgc cccaggggag gacatcattg gtgcctccag cgactgcagc acctgctttg	1500
tgtcacagag tgggacatca caggetgctg cccacgtggc tggcattgca gccatgatgc	1560
tgtctgccga gccggagctc accctggccg agttgaggca gagactgac cacttctctg	1620
ccaaagatgt catcaatgag gcctggttcc ctgaggacca gcgggtactg accccaacc	1680
tggtagccgc cctgcccccc agcacccatg gggcaggttg gcagctgttt tgcaggactg	1740
tatggtcagc acactcgggg cctacacgga tggccacagc cgtcgccgc tgcgcccag	1800
atgaggagct gctgagctgc tccagtttct ccaggagtgg gaagcggcgg ggcgagcgca	1860
tggaggccca agggggcaag ctggctctgc gggcccacaa cgcttttggg ggtgagggtg	1920
tctacccat tgccaggctc tgcctgtac cccaggccaa ctgcagcgtc cacacagctc	1980
caccagctga ggccagcatg gggaccctg tccactgcca ccaacagggc cagctcctca	2040
caggctgcag ctcccactgg gaggtggagg accttggcac ccacaagccg cctgtgctga	2100
ggccacgagg tcagcccaac cagtgcgtgg gccacaggga ggccagcatc cacgttctct	2160
gctgccatgc cccaggtctg gaatgcaaag tcaaggagca tggaaatccg gccctcagg	2220
agcaggtgac cgtggcctgc gaggagggct ggaccctgac tggctgcagt gccctcctg	2280
ggacctccca cgtcctgggg gcctacgcc tagacaacac gtgtgtagtc aggagccggg	2340
acgtcagcac tacaggcagc accagcgaag gggccgtgac agccgttgcc atctgtgccc	2400
ggagccggca cctggcgagc gcctcccagg agctccagt acagcccat cccaggatgg	2460
gtgtctgggg agggtaagg gctgggctg agctttaaaa tggttccgac ttgtccctct	2520
ctcagccctc catggcctgg cacgagggga tgggatgct tccgccttc cggggctgct	2580
ggcctggccc ttgagtgggg cagctcctt gcctggaact cactcactct ggggtgcctc	2640
tccccagggt gaggtgccag gaagctccct cctcactgt ggggcatttc accattcaaa	2700
caggtcgagc tgtgtcggg tgctgccagc tgctccaat gtgccgatgt ccgtgggcag	2760
aatgactttt attgagctct tgttccgtgc caggcattca atcctcaggt ctccaccaag	2820
gaggcaggat tcttcccatg gataggggag ggggcggtag gggctgcagg gacaaacatc	2880
gttgggggt gagtgtgaaa ggtgctgat gcctcatct ccagctaact gtggagaagc	2940
ccctgggggc tccctgatta atggaggctt agctttctgg atggcatcta gccagaggct	3000
ggagacaggt gcgcccctgg tggtcacagg ctgtgccttg gtttctgag ccacctttac	3060
tctgctctat gccaggctgt gctagcaaca ccaaagggt gcctgcgggg agccatcacc	3120

taggactgac tcggcagtgt gcagtgggtgc atgcactgtc tcagccaacc cgctccacta	3180
cccggcaggg tacacattcg caccctact tcacagagga agaaacctgg aaccagaggg	3240
ggcgtgcctg ccaagctcac acagcaggaa ctgagccaga aacgcagatt gggctggctc	3300
tgaagccaag ccctttctta cttcacccgg ctgggtcctt catttttacg ggtaacagtg	3360
aggctgggaa ggggaacaca gaccaggaag ctcggtgagt gatggcagaa cgatgcctgc	3420
aggcatggaa ctttttccgt tatcacccag gcctgattca ctggcctggc ggagatgctt	3480
ctaaggcatg gtcgggggag agggccaaca actgtccctc cttgagcacc agccccaccc	3540
aagcaagcag acatttatct tttgggtctg tcctctctgt tgccttttta cagccaactt	3600
ttctagacct gttttgcttt tgtaacttga agatatttat tctgggtttt gtagcatttt	3660
tattaatatg gtgacttttt aaaataaaaa caaacaacg ttgtcctaac aaaaaaaaaa	3720
aaaaaaaaa a	3731
<210> 2	
<211> 3731	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 2	
tttttttttt tttttttttt tgtaggaca acgtttgttt gtttttattt taaaaagtca	60
ccatattaat aaaaatgcta caaaaccag aataaatatc ttcaagttac aaaagcaaaa	120
caggtctaga aaagttaggt gtaaaaaggc aacagagagg acagaccaa aagataaatg	180
tctgcttgct tgggtggggc tgggtgctcaa ggaggacag ttgttggtccc tctccccga	240
ccatgcctta gaagcatctc cgccaggcca gtgaatcagg cctgggtgat aacggaaaaa	300
gttccatgcc tgcaggcatc gttctgccat cactcacga gtttcttggc ctgtgttccc	360
cttcccagcc tcactgttac ccgtaaaaat gaggagccca gccgggtgaa gtaagaagag	420
gcttggtctc agagccagcc caatctgcgt ttctggctca gttctgtctg tgtgagcttg	480
gcaggcacgc ccctctggt tccaggtttc ttctctgtg aagtaggggt gcgaatgtgt	540
accctgccgg gtagtggagc gggttggctg agacagtga tgcaccactg cacactgccg	600
agtcagtctt aggtgatggc tccccgagg ccacctttgg gtgttgctag cacagcctgg	660
catagagcag agtaaagggt gctcaggaaa ccaaggcaca gcctgtgacc accaggggcg	720
cacctgtctc cagcctctgg ctgatgcca tcagaaaagc taagcctcca ttaatcaggg	780
agccccagg ggctttctca cagttagctg gagatgaggg ccatcagcac ctttcacact	840
caccccccaa cgatgtttgt ccctgcagcc cctaccgcc cctccctat ccatgggaag	900

aatcctgcct ccttgggtga gacctgagga ttgaatgcct ggcacggaac aagagctcaa 960

taaaagtcac tctgcccacg gacatcggca cattgggagc agctggcagc acccgagcac 1020

agctcgacct gtttgaatgg tgaaatgcc caccagttagg gagggagctt cctggcacct 1080

ccacctgggg aggaggcacc cagagttagt gatttccagg caaggaggct gcccactca 1140

agggccaggc cagcagcccc ggaaaggcgg aagcatcccc atcccctcgt gccaggccat 1200

ggagggtga gagagggaca agtcggaacc attttaaagc tcagccccag cccttgacct 1260

tccccagaca cccatcctgg gatggggctg tcaactggagc tcctgggagg cctgcgccag 1320

gtgccggctc cggcagcaga tggcaacggc tgcacggcc ccttcgctgg tgctgcctgt 1380

agtgtgtacg tcccggctcc tgactacaca cgtgttgtct acggcgtagg cccccaggac 1440

gtgggaggtc ccaggaggag cactgcagcc agtcagggtc cagccctcct cgcaggccac 1500

ggtcacctgc tctgagggg cggggattcc atgctccttg actttgcatt ccagacctgg 1560

ggcatggcag caggaagcgt ggatgctggc ctccctgtgg ccacgcact ggttgggctg 1620

acctcgtggc ctacgacag gcggcttgtg ggtgccaagg tcctccacct ccagtgggga 1680

gctgcagcct gtgaggacgt ggccctgttg gtggcagtgg acacgggtcc ccatgtctggc 1740

ctcagctggt ggagctgtgt ggacgtgca gttggcctgg ggtagcaggc agcacctggc 1800

aatggcgtag acacctcac ccccaaaagc gttgtgggcc cggcagacca gcttgcccc 1860

ttgggcctcc atgcgtcgc cccgccgtt cccactcctg gagaaactgg agcagctcag 1920

cagctcctca tctggggcgc agcggggcag ggctgtggcc atccgttag gccccagtg 1980

tgctgacat acagtctgc aaaacagctg ccaacctgcc ccatgggtgc tggggggcag 2040

ggcggccacc aggttggggg tcagtaccg ctggtcctca gggaaccagg cctcattgat 2100

gacatctttg gcagagaagt ggatcagtct ctgctcaac tcggccaggg tgagctccgg 2160

ctcggcagac agcatcatgg ctgcaatgcc agccacgtgg gcagcagcct gtgatgtccc 2220

actctgtgac acaaagcagg tgctgcagtc gctggaggca ccaatgatgt cctcccctgg 2280

ggcaaagagg tccacacagc ggccaaagt ggccccaaa gtccccaggg tcaccggctg 2340

gtcttgggca ttggtggccc caactgtgat gacctcggga gctgaggctg gggagtagag 2400

gcaggcatcg tcccgaagt tgccggcagc ggtgaccagc acgacccag ccctcgccag 2460

gcgtgtggcag gcggcgttga ggacgcggct gtaccacccc gccaggggca gcagcaccac 2520

cagtggcccc acaggctgga ccagctggct tttccgaata aactccaggc ctatgagggt 2580

gccgctaacc gtgcccttcc cttggcagtt gagcacgcgc aggtctgcga tgctggcacc 2640

cttggccacg ccggcatccc ggccgtgac caccctgcc aggtgggtgc catgactgtc 2700
acacttctgt gcctgtctgt ggaagcgggt cccgtcctcc tcgggcacat tctcgaagtc 2760
ggtgaccatg accctgccct cgatttcccg gtggtcactc tgtatgctgg tgtctaggag 2820
atacacctcc accaggctgc ctccgtcggg gggtggtat tcatccgcc ggtaccgtgg 2880
aggggtaatc cgctccaggt tccacgggat gctctgggca aagacagagg agtcctctc 2940
gatgtagtgc acatggggca acttcaaggc cagctccagc aggtcgccac tcatcttcac 3000
caggaagcca ggaagaaggc catggaagac atgcaggatc ttggtgaggt atccccggcg 3060

ggcagcctgg gcctgcaggc ggccggcagt gcgtctgac tgcgagaggt ggtctctctc 3120
cttcagcacc accacgtagg tgccaggcaa cctccacgga tccttggcgc agcgggtggaa 3180
ggtggctgtg gticcgtgct cgggtgcttc ggccaggccg tcctcctcgg aacgcaaggc 3240
tagcaccagc tcctcgtagt cgccgtctc gtctcctgc gcacgggcgc ccgcgggacc 3300
caggagcagc agcagcagca gcagcagtgg cagcggccac caggaccgcc tggagctgac 3360
ggtgccccatg agggccaggg gagaggttgc tgtcctggcg aggagaccta gaggccgtgc 3420
gcggtccacg ccggcggcgc cttgagcctt gcggtgggga ggactgtgca ggagctgaag 3480

ttcaggagca gggcgctga agggcgcgcg ggaatcctgg ctgggagctg ggagccgctg 3540
ctgcaacgac gcgtccggc ccgcccagc cagtctcact gcctggctca ctctccagg 3600
ctcagacct gaactgaac gcggcgcccg cctgcaacca tgagcgctc gacgtcgtg 3660
cggaaacctt ctagggtgtg ggtgcttgac gcctggggcg cgcagatcac gccaccagag 3720
cccatcgga c 3731

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

RFGE peptide"

<400> 3

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro

1 5 10 15

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

RFGE analogue peptide"

<400> 4

Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro

1 5 10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 5

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Pro Pro Gln

1 5 10

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Drosophila sp.

<400> 6

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 7

caagcagaca uuuaucuuuu u

21

<210>

8

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 8

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 9

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 9

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 10

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 10

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 11

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 12

<

211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 12

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 13

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 13

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 14

<211

> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 14

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 15

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 15
caagcagaca uuuaucuuuu u 21
<210> 16
<211>
23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 16
aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
<210> 17
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 17
caagcagaca uuuaucuuuu u 21
<210> 18
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 18
aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
<210> 19
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 19

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 20

<211> 23

<

212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 20

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 21

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 21

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 22

<211> 23

<212

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 22

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 23

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 23

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 24

<211> 23

<212>

RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 24

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 25

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 25

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 26

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 26
 aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
 <210> 27
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 27
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 28
 <211> 23
 <212> RNA
 <
 213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 28
 aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
 <210> 29
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 29
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 30
 <211> 23
 <212> RNA
 <213>
 > Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 30

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 31

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 31

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 32

<211> 23

<212> RNA

<213>

Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 32

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 33

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 33

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 34

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 34

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 35

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 35

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 36

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<

220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 36

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 37

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 37

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 38

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220

><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 38

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 39

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 39

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 40

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 40

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 41

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source


```

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<400> 41
caagcagaca uuuaucuuuu u                21
<210> 42
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><
221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<400> 42
aaaaagauaa augucugcuu gcu              23
<210> 43
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<400> 43
caagcagaca uuuaucuuuu u                21
<210> 44
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221>
> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<400> 44
aaaaagauaa augucugcuu gcu              23
<210> 45
<211> 21

```

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 45

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 46

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221>

source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 46

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 47

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 47

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 48

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 48

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
 <210> 49
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 49
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 50
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <
 223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 50
 aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
 <210> 51
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 51
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 52
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223>

```

> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
    oligonucleotide"
<400> 52
aaaaagauaa augucugcuu gcu                23
<210> 53
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
    oligonucleotide"
<400> 53
caagcagaca uuuaucuuuu u                  21
<210> 54
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223>
    /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
    oligonucleotide"
<400> 54
aaaaagauaa augucugcuu gcu                23
<210> 55
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
    oligonucleotide"
<400> 55
caagcagaca uuuaucuuuu u                  21
<210> 56
<211> 23
<212> RNA

```

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 56

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 57

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 57

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 58

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 58

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 59

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 59

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

```

<210> 60
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<
400> 60
aaaaagauaa augucugcuu gcu                23
<210> 61
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<400> 61
caagcagaca uuuaucuuuu u                21
<210> 62
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<400>
> 62
aaaaagauaa augucugcuu gcu                23
<210> 63
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

```


oligonucleotide"

<400> 63

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 64

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400>

64

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 65

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 65

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 66

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 66

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 67

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 67

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 68

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 68

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 69

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 69

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 70

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 70

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<

210> 71
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 71
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 72
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 72
 aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
 <210>
 > 73
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 73
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 74
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 74
 aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
 <210>
 75
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 75
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 76
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 76
 aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
 <210> 77
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 77
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 78
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 78

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 79

<

211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 79

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 80

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 80

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 81

<211

> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 81

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 82

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 82

aaaaagauaa augucugcuu guc 23

<210> 83

<211>

21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 83

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 84

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 84

aaaaagauaa augucugcuu guc 23

<210> 85

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 85
caagcagaca uuuaucuuuu u 21
<210> 86
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 86
aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
<210> 87
<211> 21
<
212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 87
caagcagaca uuuaucuuuu u 21
<210> 88
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 88
aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
<210> 89
<211> 21
<212
> RNA
<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 89

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 90

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 90

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 91

<211> 21

<212>

RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 91

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 92

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 92

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 93

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 93

caagcagaca uuuaucuuuu u

21

<210> 94

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 94

aaaaagauaa augucugcuu gu

23

<210> 95

<211> 21

<212> RNA

<

213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 95

caagcagaca uuuaucuuuu u

21

<210> 96

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 96

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
 <210> 97
 <211> 21
 <212> RNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 97
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 98
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 98
 aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
 <210> 99
 <211> 21
 <212> RNA
 <213>
 Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 99
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 100
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 100

aaaaagauaa augucugcuu gcg 23

<210> 101

<211> 21

<212> RNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 101

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 102

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 102

aaaaagauaa augucugcuu gcg 23

<210> 103

<211> 21

<212> RNA

<

213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 103

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 104

<211> 23

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 104
 aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
 <210> 105
 <211> 21
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 105
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 106
 <211> 23
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 106
 aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
 <210> 107
 <211> 21
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 107

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 108

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 108

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 109

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 109

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 110

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 110

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 111

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 111

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 112

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 112

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 113

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 113

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 114

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 114

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 115

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 115

caagcagaca uuuaucuuuu u

21

<210> 116

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 116

aaaaagauaa augucugcuu gu

23

<210> 117

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 117

caagcagaca uuuaucuuuu u

21

<210> 118

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 118

aaaaagauaa augucugcuu guc 23
 <210> 119
 <211> 21
 <212> RNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 119
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 120
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 120
 aaaaagauaa augucugcuu guc 23
 <210> 121
 <211> 21
 <212> RNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 121
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 122
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 122

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 123

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 123

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 124

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 124

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 125

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 125

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 126

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 126

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 127

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 127

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 128

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 128

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 129

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 129

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 130

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 130

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 131

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 131

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 132

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 132

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 133

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 133

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 134

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 134

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 135

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 135

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 136

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 136

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 137

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 137

caagcagaca uuuaucuuuu u

21

<210> 138

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 138

aaaaagauaa augucugcuu gu

23

<210> 139

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 139

caagcagaca uuuaucuuuu u

21

<210> 140

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 140

aaaaagauaa augucugcuu guc 23

<210> 141

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 141

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 142

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 142

aaaaagauaa augucugcuu guc 23

<210> 143

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 143

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 144

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 144

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 145

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 145

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 146

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 146

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 147

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 147

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 148

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 148

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 149

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 149

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 150

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 150

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 151

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 151

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 152

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 152

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 153

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 153

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 154

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 154

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 155

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 155

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 156

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 156

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 157

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 157

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 158

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 158

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 159

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 159

caagcagaca uuuaucuuuu u

21

<210> 160

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 160

aaaaagauaa augucugcuu gu

23

<210> 161

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 161

caagcagaca uuuaucuuuu u

21

<210> 162

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 162

aaaaagauaa augucugcuu guc 23
 <210> 163
 <211> 21
 <212> RNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 163
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 164
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 164
 aaaaagauaa augucugcuu guc 23
 <210> 165
 <211> 21
 <212> RNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 165
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 166
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 166

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 167

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 167

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 168

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 168

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 169

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 169

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 170

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 170

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 171

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 171

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 172

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 172

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 173

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 173

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 174

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 174

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 175

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 175

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 176

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 176

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 177

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 177

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 178

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 178

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 179

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 179

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 180

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 180

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 181

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 181

caagcagaca uuuaucuuuu u

21

<210> 182

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 182

aaaaagauaa augucugcuu gu

23

<210> 183

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 183

caagcagaca uuuaucuuuu u

21

<210> 184

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 184

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
 <210> 185
 <211> 21
 <212> RNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 185
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 186
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 186
 aaaaagauaa augucugcuu gcu 23
 <210> 187
 <211> 21
 <212> RNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 187
 caagcagaca uuuaucuuuu u 21
 <210> 188
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 188

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 189

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 189

aagcagacau uuaucuuuug a 21

<210> 190

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 190

ucaaaagaua aaugucugcu ugc 23

<210> 191

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 191

agcagacauu uaucuuuugg a 21

<210> 192

<211> 23

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 192
 uccaaaagau aaaugucugc uug 23
 <210> 193
 <211> 21
 <212> RNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 193
 gcagacauuu aucuuuuggg u 21
 <210> 194
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 194
 acccaaaaga uaaaugucug cuu 23
 <210> 195
 <211> 21
 <212> RNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 195

agacauuuau cuuuuggguc u 21

<210> 196

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 196

agacccaaaa gauaaauguc ugc 23

<210> 197

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 197

gacauuuauuc uuuuuggguc u 21

<210> 198

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 198

aagacccaaa agauaaaugu cug 23

<210> 199

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 199

acaauuuau cu uuugggucug u 21

<210> 200

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 200

acagacccaa aagauaaaug ucu 23

<210> 201

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 201

uuuauuuuuu gggucugucc u 21

<210> 202

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 202

aggacagacc caaaagauaa aug 23

<210> 203

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 203

uuauuuuug ggucuguccu u

21

<210> 204

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 204

aaggacagac caaaagaua auu

23

<210> 205

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 205

uaucuuuugg gucuguccu u

21

<210> 206

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 206

agaggacaga cccaaaagau aaa 23

<210> 207

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 207

aucuuuuggg ucuguccucu u 21

<210> 208

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 208

aagaggacag acccaaaaga uaa 23

<210> 209

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 209

ucuuuugggu cuguccuc u 21

<210> 210

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 210
agagaggaca gacccaaaag aua 23
<210> 211
<211> 21
<212> RNA

<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 211
uuuugggucu guccucucug u 21
<210> 212
<211> 23
<212> RNA

<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 212
acagagagga cagacccaaa aga 23
<210> 213
<211> 21
<212> RNA

<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 213
uuugggucug uccucucugu u 21
<210> 214
<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 214

aacagagagg acagaccaa aag 23

<210> 215

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 215

uugggucugu ccucucuguu u 21

<210> 216

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 216

aaacagagag gacagacca aaa 23

<210> 217

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 217

ugggucuguc cucucuguug a 21

<210> 218

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 218

ucaacagaga ggacagaccc aaa 23

<210> 219

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 219

gggucugucc ucucuguugc a 21

<210> 220

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 220

ugcaacagag aggacagacc caa 23

<210> 221

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 221

ggucuguccu cucuguugcc u 21

<210> 222

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 222

aggcaacaga gaggacagac cca 23

<210> 223

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 223

gucuguccuc ucuguugccu u 21

<210> 224

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 224

aaggcaacag agaggacaga ccc 23

<210> 225

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 225

ucuguccucu cuguugccuu u

21

<210> 226

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 226

aaaggcaaca gagaggacag acc

23

<210> 227

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 227

cuguccucuc uguugccuuu u

21

<210> 228

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 228

aaaaggcaac agagaggaca gac 23

<210> 229

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 229

uguccucucu guugccuuuu u 21

<210> 230

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 230

aaaaaggcaa cagagaggac aga 23

<210> 231

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 231

guccucucug uugccuuuuu a 21

<210> 232

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 232

uaaaaaggca acagagagga cag 23

<210> 233

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 233

uuuucuagac cuguuuugcu u 21

<210> 234

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 234

aagcaaaaca ggucuagaaa agu 23

<210> 235

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 235

uuucuagacc uguuuugcuu u 21

<210> 236

<211> 23

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 236
 aaagcaaac aggucuagaa aag 23
 <210> 237
 <211> 21
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 237
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 238
 <211> 23
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 238
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23
 <210> 239
 <211> 21
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 239

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 240

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 240

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 241

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 241

uucuagaccu guuuugcuuu u 21

<210> 242

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 242

aaaagcaaaa caggucuaga aaa 23

<210> 243

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 243

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 244

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 244

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 245

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 245

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 246

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 246

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 247

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 247

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 248

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 248

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 249

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 249

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 250

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 250

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 251

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 251

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 252

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 252

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 253

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 253

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 254

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 254

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 255

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 255

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 256

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 256

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 257

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 257

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 258

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 258

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 259

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 259

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 260

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 260

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 261

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 261

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 262

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 262

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 263

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 263

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 264

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 264

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 265

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 265

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 266

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 266

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 267

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 267

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 268

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 268

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 269

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 269

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 270

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 270

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 271

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 271

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 272

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 272

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 273

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 273

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 274

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 274

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 275

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 275

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 276

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 276

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 277

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 277

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 278

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 278

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 279

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 279

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 280

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 280

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 281

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 281

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 282

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 282

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 283

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 283

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 284

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 284

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 285

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 285

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 286

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 286

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 287

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 287

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 288

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 288

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 289

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 289

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 290

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 290

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 291

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 291

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 292

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 292

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 293

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 293

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 294

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 294

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 295

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 295

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 296

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 296

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 297

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 297

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 298

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 298

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 299

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 299

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 300

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 300

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 301

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 301

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 302

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 302

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 303

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 303

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 304

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 304

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 305

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 305

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 306

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 306

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 307

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 307

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 308

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 308

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 309

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 309

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 310

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 310

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 311

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 311

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 312

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 312

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 313

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 313

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 314

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 314

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 315

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 315

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 316

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 316

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 317

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 317

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 318

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 318

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 319

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 319

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 320

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 320

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 321

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 321

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 322

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 322

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 323

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 323

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 324

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 324

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 325

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 325

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 326

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 326

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 327

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 327

ctagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 328

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 328

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 329

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 329

ctagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 330

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 330

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 331

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 331

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 332

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<

220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 332

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 333

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 333

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 334

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 334

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 335

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 335

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 336

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 336

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 337

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 337

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 338

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 338

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 339

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 339

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 340

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 340

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 341

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 341

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 342

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 342

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 343

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 343

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 344

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 344

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 345

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 345

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 346

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 346

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 347

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 347

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 348

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 348

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 349

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 349

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 350

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 350

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 351

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 351

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 352

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 352

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 353
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 353
 uagaccuguu uugcuuuugu 20
 <210> 354
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 354
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23
 <210> 355
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 355
 agaccuguuu ugcuuuugu 19
 <210> 356
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 356

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 357

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 357

ucuagaccug uuuugcuuuu gu 22

<210> 358

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 358

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 359

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 359

uucuagaccu guuuugcuuu ugu 23

<210> 360

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 360

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 361

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 361

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 362

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 362

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 363

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 363

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 364

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 364

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 365

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 365

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 366

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 366

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 367

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 367

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 368

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 368

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 369

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 369

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 370

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 370

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 371

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 371

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 372

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 372

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 373

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 373

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 374

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 374

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 375
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 375
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 376
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 376
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23
 <210> 377
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 377
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 378
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 378

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 379

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 379

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 380

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 380

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 381

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 381

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 382

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 382

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 383

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 383

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 384

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 384

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 385

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 385

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 386

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 386

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 387

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 387

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 388

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 388

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 389

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 389

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 390

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 390

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 391

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 391

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 392

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 392

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 393

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 393

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 394

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 394

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 395

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 395

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 396

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 396

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 397
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 397
 ucuagaccug uuuugcuuuu u 21
 <210> 398
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 398
 aaaaagcaaa acaggucuag aaa 23
 <210> 399
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 399
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 400
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 400

acaaaagcaa aacaggucua ga 22

<210> 401

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 401

uagaccuguu uugcuuuugu 20

<210> 402

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 402

acaaaagcaa aacaggucua ga 22

<210> 403

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 403

agaccuguuu ugcuuuuugu 19

<210> 404

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 404

acaaaagcaa aacaggucua ga

22

<210> 405

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 405

uagaccuguu uugcuuuugu

20

<210> 406

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 406

acaaaagcaa aacaggucua ga

22

<210> 407

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 407

uagaccuguu uugcuuuugu

20

<210> 408

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 408

acaaaagcaa aacaggucua ga

22

<210> 409

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 409

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 410

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 410

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 411

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 411

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 412

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 412

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 413

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 413

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 414

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 414

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 415

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 415

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 416

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 416

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 417

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 417

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 418

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 418

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 419
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 419
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 420
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 420
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23
 <210> 421
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 421
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 422
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 422

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 423

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 423

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 424

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 424

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 425

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 425

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 426

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 426

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 427

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 427

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 428

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 428

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 429

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 429

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 430

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 430

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 431

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 431

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 432

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 432

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 433

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 433

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 434

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 434

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 435

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 435

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 436

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 436

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 437

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 437

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 438

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 438

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 439

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 439

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 440

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 440

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 441
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 441
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 442
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 442
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23
 <210> 443
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 443
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 444
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 444

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 445

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 445

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 446

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 446

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 447

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 447

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 448

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 448

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 449

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 449

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 450

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 450

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 451

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 451

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 452

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 452

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 453

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 453

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 454

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 454

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 455

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 455

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 456

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 456

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 457

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 457

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 458

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 458

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 459

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 459

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 460

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 460

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 461

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 461

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 462

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 462

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 463
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 463
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 464
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 464
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23
 <210> 465
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 465
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 466
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 466

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 467

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 467

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 468

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 468

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 469

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 469

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 470

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 470

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 471

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 471

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 472

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 472

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 473

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 473

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 474

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 474

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 475

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 475

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 476

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 476

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 477

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 477

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 478

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 478

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 479

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 479

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 480

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 480

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 481

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 481

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 482

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 482

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 483

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 483

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 484

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 484

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 485
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 485
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 486
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 486
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23
 <210> 487
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 487
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 488
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 488

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 489

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 489

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 490

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 490

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 491

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 491

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 492

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 492

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 493

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 493

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 494

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 494

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 495

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 495

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 496

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 496

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 497

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 497

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 498

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 498

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 499

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 499

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 500

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 500

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 501

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 501

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 502

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 502

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 503

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 503

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 504

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 504

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 505

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 505

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 506

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 506

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 507
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 507
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 508
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 508
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23
 <210> 509
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 509
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 510
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 510

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 511

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 511

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 512

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 512

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 513

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 513

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 514

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 514

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 515

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 515

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 516

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 516

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 517

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 517

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 518
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 518
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 519
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 519
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 520
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 520
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 521
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 521

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 522

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 522

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 523

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 523

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 524

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 524

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 525

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 525

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 526

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 526

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 527

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 527

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 528

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 528

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 529
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 529
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 530
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 530
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23
 <210> 531
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 531
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 532
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 532

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 533

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 533

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 534

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 534

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 535

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 535

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 536

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 536

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 537

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 537

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 538

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 538

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 539

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 539

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 540

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 540

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 541

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 541

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 542

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 542

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 543

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 543

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 544

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 544

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 545

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 545

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 546

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 546

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 547

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 547

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 548

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 548

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 549

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 549

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 550

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 550

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 551
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 551
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 552
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 552
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23
 <210> 553
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 553
 agaccuguuu ugcuuuugu 19
 <210> 554
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 554

acaaaagcaa aacaggucua g 21

<210> 555

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 555

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 556

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 556

acaaaagcaa aacaggucua g 21

<210> 557

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 557

agaccuguuu ugcuuuugu 19

<210> 558

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 558

acaaaagcaa aacaggucua g

21

<210> 559

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 559

uagaccuguu uugcuuuugu

20

<210> 560

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 560

acaaaagcaa aacaggucua g

21

<210> 561

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 561

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 562

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 562

acaaaagcaa aacaggucua g

21

<210> 563

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 563

uagaccuguu uugcuuuugu a

21

<210> 564

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 564

uacaaaagca aaacaggucu aga

23

<210> 565

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 565

uagaccuguu uugcuuuugu 20

<210> 566

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 566

acaaaagcaa aacaggucua 20

<210> 567

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 567

gaccuguuuu gcuuuugu 18

<210> 568

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 568

acaaaagcaa aacaggucua 20

<210> 569

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 569

agaccuguuu ugcuuuugu 19

<210> 570

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 570

acaaaagcaa aacaggucua 20

<210> 571

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 571

uagaccuguu uugcuuuugu 20

<210> 572

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 572

acaaaagcaa aacaggucua 20

<210> 573
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 573
 agaccuguuu ugcuuuugu 19
 <210> 574
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 574
 acaaaagcaa aacaggucua g 21
 <210> 575
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 575
 agaccuguuu ugcuuuugu 19
 <210> 576
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 576

acaaaagcaa aacaggucua g 21

<210> 577

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 577

agaccuguuu ugcuuuugu 19

<210> 578

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 578

acaaaagcaa aacaggucua g 21

<210> 579

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 579

agaccuguuu ugcuuuugu 19

<210> 580

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 580

acaaaagcaa aacaggucua g

21

<210> 581

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 581

agaccuguuu ugcuuuugu

19

<210> 582

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 582

acaaaagcaa aacaggucua g

21

<210> 583

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 583

agaccuguuu ugcuuuugu

19

<210> 584

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 584

acaaaagcaa aacaggucua g

21

<210> 585

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 585

agaccuguuu ugcuuuugu

19

<210> 586

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 586

acaaaagcaa aacaggucua g

21

<210> 587

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 587

agaccuguuu ugcuuuugu 19

<210> 588

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 588

acaaaagcaa aacaggucua g 21

<210> 589

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 589

agaccuguuu ugcuuuugu 19

<210> 590

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 590

acaaaagcaa aacaggucua g 21

<210> 591

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 591

agaccuguuu ugcuuuugu 19

<210> 592

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 592

acaaaagcaa aacaggucua g 21

<210> 593

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 593

agaccuguuu ugcuuuugu 19

<210> 594

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 594

acaaaagcaa aacaggucua g 21

<210> 595
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 595
 agaccuguuu ugcuuuugu 19
 <210> 596
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 596
 acaaaagcaa aacaggucua g 21
 <210> 597
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 597
 agaccuguuu ugcuuuugu 19
 <210> 598
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 598

acaaaagcaa aacaggucua g 21

<210> 599

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 599

agaccuguuu ugcuuuugu 19

<210> 600

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 600

acaaaagcaa aacaggucua g 21

<210> 601

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 601

agaccuguuu ugcuuuugu 19

<210> 602

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 602

acaaaagcaa aacaggucua g

21

<210> 603

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 603

agaccuguuu ugcuuuugu

19

<210> 604

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 604

acaaaagcaa aacaggucua g

21

<210> 605

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 605

gaccuguuuu gcuuuugu

18

<210> 606

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 606

acaaaagcaa aacagguca a

21

<210> 607

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 607

agaccuguuu ugcuuuugu

19

<210> 608

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 608

acaaaagcaa aacaggucu

19

<210> 609

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 609

gaccuguuuu gcuuuugu 18

<210> 610

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 610

acaaaagcaa aacaggucu 19

<210> 611

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 611

uuuuguaacu ugaagauuu u 21

<210> 612

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 612

aaauaucuuc aaguacaaa agc 23

<210> 613

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 613

uuuguaacuu gaagauuuu a 21

<210> 614

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 614

uaaaauaucuu caaguuacaa aag 23

<210> 615

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 615

uuguaacuug aagauuuua u 21

<210> 616

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 616

auaaaauaucu ucaaguuaca aaa 23

<210> 617
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 617
 uguaacuuga agauuuuuu u 21
 <210> 618
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 618
 aauaaaauauc uucaaguac aaa 23
 <210> 619
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 619
 guaacuugaa gauuuuuuu u 21
 <210> 620
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 620

aaaauaaaau cuucaaguua caa 23

<210> 621

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 621

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 622

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 622

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 623

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 623

cuagaccugu uuugcuuuug a 21

<210> 624

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 624

ucaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 625

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 625

guagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 626

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 626

acaaaagcaa aacaggucua cuu

23

<210> 627

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 627

gaagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 628

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 628

acaaaagcaa aacaggucuu cuu

23

<210> 629

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 629

gaugaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 630

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 630

acaaaagcaa aacaggucuu cuu

23

<210> 631

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 631

gaugaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 632

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 632

acaaaagcaa aacaggucan caa 23

<210> 633

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 633

caucaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 634

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 634

acaaaagcaa aacaggugau gaa 23

<210> 635

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 635

cuucuccugu uuugcuuuug u 21

<210> 636

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 636

acaaaagcaa aacaggagaa gaa 23

<210> 637

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 637

cuacugcugu uuugcuuuug u 21

<210> 638

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 638

acaaaagcaa aacagcagua gaa 23

<210> 639
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 639
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 640
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 640
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23
 <210> 641
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 641
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 642
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 642

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 643

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 643

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 644

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 644

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 645

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 645

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 646

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 646

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 647

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 647

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 648

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 648

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 649

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 649

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

```

<210> 650
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<400> 650
acaaaagcaa aacaggucua gaa                23

<210> 651
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<400> 651
cuagaccugu uuugcuuuug u                21

<210> 652
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<400> 652
acaaaagcaa aacaggucua gaa                23

<210> 653
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

```

oligonucleotide"

<400> 653

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 654

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 654

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 655

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 655

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 656

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 656

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 657

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 657

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 658

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 658

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 659

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 659

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 660

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 660

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 661
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 661
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 662
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 662
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23
 <210> 663
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 663
 cuagaccugu uuugcuuuug u 21
 <210> 664
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 664

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 665

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 665

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 666

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 666

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 667

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 667

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 668

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 668

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 669

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 669

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 670

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 670

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 671

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 671

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 672

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 672

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 673

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 673

cuagaccugu uuugcuuuug u

21

<210> 674

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 674

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 675

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 675

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 676

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 676

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 677

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 677

caagcagaca uuuaucuuuu u 21

<210> 678

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 678

aaaaagauaa augucugcuu gcu 23

<210> 679

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 679

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 680

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 680

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 681

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 681

cuagaccugu uuugcuuuug u 21

<210> 682

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 682

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 683
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 683
 cuagaccugu tuugcuuuug u 21

<210> 684
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 684
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 685
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 685
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 686
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 686

cuagaccugu tuugcuuuug u 21

<210> 687

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 687

cuagaccugu tuugcuuuug u 21

<210> 688

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 688

acaaaagcaa aacaggucua gaa 23