



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0095155
(43) 공개일자 2024년06월25일

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7004152
(22) 출원일자(국제) 2022년07월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년02월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/073430
(87) 국제공개번호 WO 2023/283550
국제공개일자 2023년01월12일
(30) 우선권주장
63/218,852 2021년07월06일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
스위치 테라퓨틱스 인크.
미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 이.
해리스 애비뉴 241</p> <p>(72) 발명자
한, 시평
미국 94109 캘리포니아 샌프란시스코 퍼시픽 애비
뉴 1945 #3씨
더프, 로버트
미국 94109 캘리포니아 샌프란시스코 퍼시픽 애비
뉴 1945 #3씨
쉐러, 리사
미국 94109 캘리포니아 샌프란시스코 퍼시픽 애비
뉴 1945 #3씨
(74) 대리인
양영준, 이상남</p> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

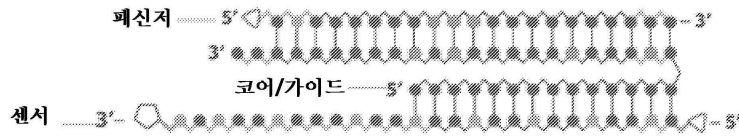
전체 청구항 수 : 총 62 항

(54) 발명의 명칭 **신호 활성화가능한 핵산 복합체**

(57) 요약

본원에 제공된 것은 조건부 활성화가능한 소형 간섭 RNA (siRNA) 복합체, 성분, 조성물, 및 관련 방법 및 시스템을 포함한다. siRNA 복합체는 핵산 복합체의 센서 핵산 가닥 내의 서열을 통해 투입 핵산 가닥에 대한 상보적 결합 시 조건부로 활성화될 수 있다. 활성화 핵산 복합체는 코어 핵산 가닥 및 패신저 핵산 가닥에 의해 형성된 강력한 RNAi 듀플렉스를 방출할 수 있으며, 이는 표적 RNA를 특이적으로 억제할 수 있다.

대표도



- | | | |
|----------------------------------------|--------------------|-------------|
| 전달 리간드, 형광단, 또는 엑소뉴클레아제 | 포스포로티오에이트 | 잠금 핵산 |
| 적합한 키넥터에 부착된 블로키 | C ₃ 키넥터 | 2'-OMed |
| 예: 지방산, Cy3, 또는 트리-에틸렌 글리콜에 부착된 역전된 dT | 스크리닝을 위한 백본 부위 | 2'-F |
| | | 스크리닝을 위한 염기 |

(52) CPC특허분류

A61P 25/28 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2310/321 (2013.01)

C12N 2310/322 (2013.01)

C12N 2310/3231 (2013.01)

C12N 2310/3515 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

핵산 복합체로서,

20-60개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 핵산 가닥;

제1 핵산 가닥의 제1 영역에 결합하여 제1 핵산 듀플렉스를 형성하는 제2 핵산 가닥; 및

제1 핵산 가닥의 제2 영역에 결합하여 제2 핵산 듀플렉스를 형성하는 제3 핵산 가닥으로서, 여기서 제3 핵산 가닥은 오버행을 포함하고, 여기서 상기 오버행은 제1 핵산 가닥에 상보적이지 않고, 투입 핵산 가닥에 결합하여 제1 핵산 가닥으로부터의 제3 핵산 가닥의 치환을 유발할 수 있는 것인 제3 핵산 가닥

을 포함하며,

여기서

제1 핵산 가닥의 제1 영역은 제1 핵산 가닥의 제2 영역의 3'이고,

제3 핵산 가닥은 제1 핵산 가닥의 제1 영역의 3'인 제1 핵산 가닥의 임의의 영역에 결합하지 않고,

제1 핵산 가닥의 제1 영역은 표적 RNA에 상보적인 서열을 포함하며, 여기서 상기 서열은 10-35개 뉴클레오타이드 길이인

핵산 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 표적 RNA에 상보적인 서열이 10-21개 뉴클레오타이드 길이인 핵산 복합체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 제2 핵산 가닥이 제1 핵산 가닥의 제1 영역 내의 17-22개의 연결된 뉴클레오타이드에 결합하여 제1 핵산 듀플렉스를 형성하는 것인 핵산 복합체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 핵산 가닥이 제1 핵산 가닥의 제2 영역 내의 10-30개의 연결된 뉴클레오타이드에 결합하여 제2 핵산 듀플렉스를 형성하는 것인 핵산 복합체.

청구항 5

제4항에 있어서, 제3 핵산 가닥이 제1 핵산 가닥의 제2 영역 내의 약 14개의 연결된 뉴클레오타이드에 결합하여 제2 핵산 듀플렉스를 형성하는 것인 핵산 복합체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산 듀플렉스가 다이서 절단 부위를 포함하지 않는 것인 핵산 복합체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 다이서 절단 부위를 포함하지 않는 핵산 복합체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산 가닥의 제1 영역이 링커를 통해 제1 핵산 가닥의 제2 영역에 연결되는 것인 핵산 복합체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 링커가 C₃ 3-탄소 링커, 뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드, 또는 엑소뉴클레아제 절단-저항성 모이어티, 또는 그의 조합을 포함하는 것인 핵산 복합체.

청구항 10

제9항에 있어서, 변형된 뉴클레오티드가 2'-O-메틸 뉴클레오티드 또는 2'-F 뉴클레오티드이고; 임의로 여기서 2'-O-메틸 뉴클레오티드는 2'-O-메틸아데노신, 2'-O-메틸구아노신, 2'-O-메틸우리딘, 또는 2'-O-메틸시티딘이고 /거나, 여기서 2'-F 뉴클레오티드는 2'-F 아데노신, 2'-F 구아노신, 2'-F 우리딘, 또는 2'-F 시티딘인 핵산 복합체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 핵산 가닥의 5' 말단이 차단 모이어티를 포함하고; 임의로 차단 모이어티는 형광단, 역전된-dT, 트리-에틸렌-글리콜, 지방산, Cy3, 또는 그의 조합이거나 또는 그를 포함하고; 추가로 임의로 여기서 형광단은 포스포로티오에이트 연결을 통해 제2 핵산 가닥의 5' 말단에 부착되는 것인 핵산 복합체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산 가닥이 제1 핵산 듀플렉스에서 3' 오버행을 포함하는 것인 핵산 복합체.

청구항 13

제12항에 있어서, 제1 핵산의 3' 오버행이 1, 2 또는 3개 뉴클레오티드 길이인 핵산 복합체.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 제1 핵산의 3' 오버행이 1개 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하는 것인 핵산 복합체.

청구항 15

제14항에 있어서, 제1 핵산의 3' 오버행 내의 모든 뉴클레오시드간 연결이 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결인 핵산 복합체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산 가닥의 3' 말단에서 마지막 2, 3 또는 4개의 뉴클레오시드들 사이의 뉴클레오시드간 연결(들)이 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결(들)인 핵산 복합체.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산 가닥의 제1 영역이 5' 말단, 3' 말단 또는 둘 다에서 마지막 2 또는 3개의 뉴클레오시드들 사이의 뉴클레오시드간 연결(들)을 제외하고는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하지 않는 것인 핵산 복합체.

청구항 18

제17항에 있어서, 제1 핵산 가닥의 제1 영역이 5' 말단에서 마지막 3개의 뉴클레오시드들 및 3' 말단에서 마지막 3개의 뉴클레오시드들 사이의 뉴클레오시드간 연결(들)을 제외하고는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하지 않는 것인 핵산 복합체.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산 가닥의 제2 영역이 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하지 않는 것인 핵산 복합체.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 핵산 가닥이 제1 핵산 가닥의 제1 영역에 완전히 상보적이고, 그에 의해 제1 핵산 듀플렉스에서 제2 핵산 가닥의 5' 및 3' 말단에 오버행을 형성하지 않는 것인 핵산 복합체.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 핵산 가닥이 제1 핵산 듀플렉스에서 3' 말단, 또는 5' 말단, 또는 둘 다에 오버행을 갖지 않는 것인 핵산 복합체.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 핵산 가닥이 1개 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하는 것인 핵산 복합체.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 핵산 가닥이 5' 말단에서 마지막 2 내지 3개의 뉴클레오시드들 및 3' 말단에서 마지막 2 내지 3개의 뉴클레오시드들 사이의 뉴클레오시드간 연결(들)을 제외하고는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하지 않는 것인 핵산 복합체.

청구항 24

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 핵산 가닥의 5' 말단, 제2 핵산 가닥의 3' 말단, 또는 둘 다에서 마지막 2, 3 또는 4개의 뉴클레오시드들 사이의 뉴클레오시드간 연결(들)이 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결인 핵산 복합체.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 핵산 가닥의 5' 말단이 적어도 1개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하는 것인 핵산 복합체.

청구항 26

제25항에 있어서, 제3 핵산 가닥의 5' 말단에서 마지막 2, 3 또는 4개의 뉴클레오시드가 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결인 핵산 복합체.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산 가닥 내의 뉴클레오시드간 연결의 5% 미만, 10% 미만, 25% 미만, 50% 미만이 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결인 핵산 복합체.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산 가닥이 2개 이하의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하거나, 또는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하지 않는 것인 핵산 복합체.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산 가닥의 제1 영역, 제1 핵산 가닥의 제2 영역, 또는 둘 다의 뉴클레오시드의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 모두가 화학적으로 변형된 것인 핵산 복합체.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산 가닥, 제2 핵산 가닥 및 제3 핵산 가닥 중 하나 이상의 뉴클레오시드의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 모두가 화학적으로 변형된 것인 핵산 복합체.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 복합체의 뉴클레오시드의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 모두가 화학적으로 변형된 것인 핵산 복합체.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적 변형이 핵산 복합체의 뉴클레아제 분해에 저항하거나, 용융 온도 (T_m)를 증가시키거나, 또는 둘 다를 위한 것인 핵산 복합체.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 복합체의 뉴클레오티드의 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 모두가 비-DNA 및 비-RNA 뉴클레오티드인 핵산 복합체.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 핵산 가닥의 뉴클레오시드의 최대 5%, 최대 10%, 또는 최대 15%가 LNA인 핵산 복합체.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 복합체의 염기의 약 10%-50%가 2'-4' 가교 변형을 갖는 것인 핵산 복합체.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 복합체의 염기의 약 10%-50%가 잠금 핵산 (LNA) 또는 그의 유사체인 핵산 복합체.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 복합체의 염기의 약 10%-50%가 2'-O-메틸 변형, 2'-F 변형, 또는 둘 다를 포함하는 것인 핵산 복합체.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 투입 핵산 가닥이 RNA인 핵산 복합체.

청구항 39

제38항에 있어서, 표적 RNA가 mRNA, miRNA, 비-코딩 RNA, 바이러스 RNA 전사체, 세포 RNA 전사체, 또는 그의 조합인 핵산 복합체.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 핵산 가닥의 오버행이 투입 핵산 가닥에 결합하여 토홀드를 형성하고, 그에 의해 제1 핵산 가닥으로부터의 제2 핵산 가닥의 치환을 유발할 수 있는 것인 핵산 복합체.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 핵산 가닥의 오버행이 5 내지 20개 뉴클레오시드 길이, 바람직하게는 8 내지 16개 뉴클레오시드 길이, 보다 바람직하게는 12개 뉴클레오시드 길이이고; 임의로 여기서 제3 핵산 가닥의 오버행이 12개 뉴클레오티드 길이인 핵산 복합체.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 핵산 가닥의 오버행의 모든 뉴클레오시드간 연결이 포스포포티오에이트 뉴클레오시드간 연결인 핵산 복합체.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 핵산 가닥의 5' 말단, 3' 말단, 또는 둘 다가 말단 모이어티를

포함하는 것인 핵산 복합체.

청구항 44

제43항에 있어서, 말단 모이어티가 리간드, 형광단, 엑소뉴클레아제, 지방산, Cy3, 트리-에틸렌 글리콜에 부착된 역전된 dT, 또는 그의 조합을 포함하는 것인 핵산 복합체.

청구항 45

제43항에 있어서, 말단 모이어티가 팔미트산을 포함하고, 임의로 팔미트산은 제3 핵산 가닥의 3' 말단에 부착되는 것인 핵산 복합체.

청구항 46

표적 RNA를 조정하는 방법으로서,

표적 RNA를 포함하는 세포를 제1항 내지 제45항 중 어느 한 항의 핵산 복합체와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 투입 가닥이 제3 핵산 가닥의 오버행에 결합하여 제1 핵산 가닥으로부터의 제3 핵산 가닥의 치환을 유발하고, 그에 의해 표적 RNA에 상보적인 서열을 세포 내로 방출시킴으로써 표적 RNA를 조정하는 것인

표적 RNA를 조정하는 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 세포를 핵산 복합체와 접촉시키는 것이 시험관내, 생체내, 생체외, 또는 그의 조합에서 수행되는 것인 방법.

청구항 48

제46항에 있어서, 세포를 핵산 복합체와 접촉시키는 것이 대상체의 신체 내에서 일어나는 것인 방법.

청구항 49

제46항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 이환 세포이고, 임의로 세포가 암 세포인 방법.

청구항 50

제46항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 뉴런인 방법.

청구항 51

질환 또는 상태를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제45항 중 어느 한 항의 핵산 복합체를 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 투입 가닥이 제3 핵산 가닥의 오버행에 결합하여 제1 핵산 가닥으로부터의 제3 핵산 가닥의 치환을 유발함으로써 표적 RNA에 상보적인 서열을 방출시키고, 그에 의해 대상체에서 표적 RNA의 활성 또는 표적 RNA로부터의 단백질 발현을 감소시켜 질환 또는 상태를 치료하는 것인 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 질환 또는 상태가 암인 방법.

청구항 53

제51항에 있어서, 질환 또는 상태가 신경계 질환, 임의로 중추 신경계 (CNS) 질환 또는 장애이고; 임의로 CNS 질환 또는 장애는 부신백질이영양증, 알츠하이머병, 근위축성 측삭 경화증, 안젤만 증후군, 모세혈관확장성 운동실조, 샤르코-마리-투스 증후군, 코케인 증후군, 난청, 뒤시엔느 근육 이영양증, 간질, 본태성 진전, 유약 X 증후군, 프리드라이히 운동실조, 고셔병, 헌팅턴병, 레쉬-니한 증후군, 메이플 시럽뇨 질환, 멘케스 증후군, 근긴장성 이영양증, 기면증, 신경섬유종증, 니만-픽병, 파킨슨병, 페닐케톤뇨, 프라더-윌리 증후군, 레프슈병, 레트 증후군, 척수성 근육 위축, 척수소뇌성 운동실조, 탄지예르병, 테이-삭스병, 결절성 경화증, 폰 히켈-린다우 증후군, 윌리엄스 증후군, 윌슨병, 젤베거 증후군 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 투여가 우측 피질, 전전두 피질, 감각 피질, 시각 피질, 선조체, 배측 해마, 복측 해마, 시상, 소뇌, 중뇌, 좌측 반구, 우측 반구, 후근 신경절, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 영역 내로의 핵산 복합체의 분포를 유발하는 것인 방법.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, 투여가 후근 신경절 내로의 핵산 복합체의 분포를 일으키는 것인 방법.

청구항 56

제46항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 RNA가 mRNA 또는 miRNA인 방법.

청구항 57

제51항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 복합체가 대상체에게 지질-매개 전달 시스템을 통해, 임의로 리포솜, 나노입자 또는 미셀을 통해 투여되는 것인 방법.

청구항 58

제51항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 복합체가 대상체에게 나노입자, 무기 나노입자, 핵산 지질 입자, 중합체성 나노입자, 지질 나노입자 (LNP), 키토산 및 이눌린 나노입자, 시클로덱스트린 나노입자, 탄소 나노튜브, 리포솜, 미셀 구조, 캡시드, 중합체, 중합체 매트릭스, 히드로겔, 덴드리머, 핵산 나노구조, 엑소솜, GalNAc-접합된 벨리틴-유사 펩티드, 또는 그의 조합을 통해 투여되는 것인 방법.

청구항 59

제51항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 복합체가 그를 필요로 하는 대상체에게 피하 주사, 정맥내 주사, 또는 뇌실내 주사를 통해 투여되는 것인 방법.

청구항 60

제51항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 복합체가 그를 필요로 하는 대상체에게 약 0.1-10 nM, 임의로 약 0.1-1 nM의 농도로 투여되는 것인 방법.

청구항 61

제51항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 2회 이상 수행되고, 여기서 핵산 복합체의 2회 투여는 적어도 6개월 분리되는 것인 방법.

청구항 62

제51항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 복합체의 투여가 의도하지 않은 염증 반응을 유발하지 않는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] <관련 출원에 대한 상호 참조>

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119 (e) 하에 2021년 7월 6일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 63/218,852를 우선권 주장하며, 그의 내용은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] <서열 목록에 대한 참조>

[0004] 본 출원은 전자 포맷의 서열 목록과 함께 출원된다. 서열 목록은 2022년 7월 4일에 생성된 96.3 킬로바이트 크기의 75EN-329793-W0라는 제목의 파일로서 제공된다. 전자 포맷의 서열 목록 내 정보는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0005]

<기술분야>

[0006]

본 개시내용은 일반적으로 핵산 기반 기술 분야, 예를 들어 신호 활성화가능한 소형 간섭 RNA 복합체에 관한 것이다.

배경 기술

[0007]

동적 핵산 나노기술 및 생체분자 컴퓨팅 분야에서의 새로운 개발에도 불구하고, RNA 전사체 (예컨대, mRNA 및 miRNA)를 감지하는 핵산 로직 스위치를 사용할 수 있는 표적화된 RNAi 요법을 개발하고, 그에 의해 RNA 간섭 (RNAi) 요법을 질환-관련 세포의 특정 집단으로 제한하는 데 있어서 도전과제가 여전히 존재한다. 특히, 개선된 약물 효력, 감수성 및 안정성, 낮은 설계 복잡성, 및 낮은 투여량 요건을 갖는 표적화 및 조건부 활성화 RNAi 요법을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

[0008]

본원에 개시된 것은 20-60개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 핵산 가닥; 제1 핵산 가닥의 제1 영역에 결합하여 제1 핵산 듀플렉스를 형성하는 제2 핵산 가닥; 및 제1 핵산 가닥의 제2 영역에 결합하여 제2 핵산 듀플렉스를 형성하는 제3 핵산 가닥을 포함하는 핵산 복합체를 포함하며, 여기서 제3 핵산 가닥은 오버행을 포함하고, 여기서 오버행은 제1 핵산 가닥에 상보적이지 않고 투입 핵산 가닥에 결합하여 제1 핵산 가닥으로부터의 제3 핵산 가닥의 치환을 유발할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 가닥의 제1 영역은 제1 핵산 가닥의 제2 영역의 3'이고, 제3 핵산 가닥은 제1 핵산 가닥의 제1 영역의 3'인 제1 핵산 가닥의 임의의 영역에 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 가닥의 제1 영역은 표적 RNA에 상보적인 서열을 포함하며, 여기서 서열은 예를 들어 10-35개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 RNA에 상보적인 서열은 10-21개 뉴클레오타이드 길이이다.

[0009]

일부 실시양태에서, 제2 핵산 가닥은 제1 핵산 가닥의 제1 영역 내의 17-22개의 연결된 뉴클레오타이드에 결합하여 제1 핵산 듀플렉스를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제3 핵산 가닥은 제1 핵산 가닥의 제2 영역 내의 10-30개의 연결된 뉴클레오타이드에 결합하여 제2 핵산 듀플렉스를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제3 핵산 가닥은 제1 핵산 가닥의 제2 영역 내의 약 14개의 연결된 뉴클레오타이드에 결합하여 제2 핵산 듀플렉스를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 듀플렉스, 핵산 복합체, 또는 둘 다는 다이스 절단 부위를 포함하지 않는다.

[0010]

일부 실시양태에서, 제1 핵산 가닥의 제1 영역은 링커를 통해 제1 핵산 가닥의 제2 영역에 연결된다. 링커는, 예를 들어 C3 3-탄소 링커, 뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드, 또는 엑소뉴클레아제 절단-저항성 모이어티, 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드 또는 2'-F 뉴클레오타이드이다. 일부 실시양태에서, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸아데노신, 2'-O-메틸구아노신, 2'-O-메틸우리딘, 또는 2'-O-메틸시티딘이다. 일부 실시양태에서, 2'-F 뉴클레오타이드는 2'-F 아데노신, 2'-F 구아노신, 2'-F 우리딘, 또는 2'-F 시티딘이다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 가닥의 5' 말단은 차단 모이어티를 포함한다. 차단 모이어티는, 예를 들어 형광단, 역전된-dT, 트리-에틸렌-글리콜, 지방산, Cy3, 또는 그의 조합이거나 또는 그를 포함할 수 있다.

[0011]

형광단은 포스포로티오에이트 연결을 통해 제2 핵산 가닥의 5' 말단에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 가닥은 제1 핵산 듀플렉스에 3' 오버행을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산의 3' 오버행은 1, 2 또는 3개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산의 3' 오버행은 1개 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산의 3' 오버행 내의 모든 뉴클레오타이드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결이다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 가닥의 3' 말단에서 마지막 2, 3 또는 4개의 뉴클레오타이드들 사이의 뉴클레오타이드간 연결(들)은 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결(들)이다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 가닥의 제1 영역은 5' 말단, 3' 말단, 또는 둘 다에서 마지막 2 또는 3개의 뉴클레오타이드들 사이의 뉴클레오타이드간 연결(들)을 제외하고는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 가닥의 제1 영역은 5' 말단에서 마지막 3개의 뉴클레오타이드들 및 3' 말단에서 마지막 3개의 뉴클레오타이드들 사이의 뉴클레오타이드간 연결(들)을 제외하고는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함하지 않는다.

[0012]

일부 실시양태에서, 제1 핵산 가닥의 제2 영역은 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 가닥은 제1 핵산 가닥의 제1 영역에 완전히 상보적이고, 그에 의해 제1 핵산 듀플렉스에서 제2 핵산 가닥의 5' 및 3' 말단에 오버행을 형성하지 않는다.

- [0013] 일부 실시양태에서, 제2 핵산 가닥은 제1 핵산 듀플렉스에서 3' 말단, 또는 5' 말단, 또는 둘 다에 오버행을 갖지 않는다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 가닥은 1개 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 가닥은 5' 말단에서 마지막 2 내지 3개의 뉴클레오시드 및 3' 말단에서 마지막 2 내지 3개의 뉴클레오시드 사이의 뉴클레오시드간 연결(들)을 제외하고는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 가닥의 5' 말단, 제2 핵산 가닥의 3' 말단, 또는 둘 다에서 마지막 2, 3 또는 4개의 뉴클레오시드 사이의 뉴클레오시드간 연결(들)은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다. 일부 실시양태에서, 제3 핵산 가닥의 5' 말단은 적어도 1개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 핵산 가닥의 5' 말단에서 마지막 2, 3 또는 4개의 뉴클레오시드는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 가닥 내의 뉴클레오시드간 연결의 5% 미만, 10% 미만, 25% 미만, 50% 미만은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 가닥은 2개 이하의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하거나, 또는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 가닥의 제1 영역, 제1 핵산 가닥의 제2 영역, 또는 둘 다의 뉴클레오시드의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 모두는 화학적으로 변형된다.
- [0014] 제1 핵산 가닥, 제2 핵산 가닥 및 제3 핵산 가닥 중 하나 이상의 뉴클레오시드의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 모두는 화학적으로 변형될 수 있다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 핵산 복합체의 뉴클레오시드의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 모두는 화학적으로 변형된다. 일부 실시양태에서, 화학적 변형은 핵산 복합체의 뉴클레아제 분해에 저항하거나, 용융 온도 (T_m)를 증가시키거나, 또는 둘 다를 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체의 뉴클레오티드의 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 모두는 비-DNA 및 비-RNA 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 가닥의 뉴클레오시드의 최대 5%, 최대 10%, 또는 최대 15%는 LNA이다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체의 염기의 약 10%-50%는 2'-4' 가교 변형을 갖는다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체의 염기의 약 10%-50%는 잠금 핵산 (LNA) 또는 그의 유사체이다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체의 염기의 약 10%-50%는 2'-O-메틸 변형, 2'-F 변형, 또는 둘 다를 포함한다. 일부 실시양태에서, 투입 핵산 가닥은 RNA이다. 일부 실시양태에서, 표적 RNA는 세포 RNA 전사체이다. 일부 실시양태에서, 표적 RNA는 mRNA, miRNA, 비-코딩 RNA, 바이러스 RNA 전사체, 또는 그의 조합이다.
- [0016] 일부 실시양태에서, 제2 핵산 가닥의 오버행은 투입 핵산 가닥에 결합하여 토홀드를 형성할 수 있고, 그에 의해 제1 핵산 가닥으로부터의 제2 핵산 가닥의 치환을 유발한다. 일부 실시양태에서, 제3 핵산 가닥의 오버행은 5 내지 20개 뉴클레오시드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 핵산 가닥의 오버행은 8 내지 16개 뉴클레오시드 길이, 바람직하게는 12개 뉴클레오시드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 핵산 가닥의 오버행은 12개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 핵산 가닥의 오버행의 모든 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다. 일부 실시양태에서, 제3 핵산 가닥의 5' 말단, 3' 말단, 또는 둘 다는 말단 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 말단 모이어티는 리간드, 형광단, 엑소뉴클레아제, 지방산, Cy3, 트리-에틸렌 글리콜에 부착된 역전된 dT, 또는 그의 조합을 포함한다.
- [0017] 표적 RNA를 조정하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 방법은 표적 RNA를 포함하는 세포를 본원에 개시된 핵산 복합체 중 임의의 하나 이상과 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 투입 가닥이 제3 핵산 가닥의 오버행에 결합하여 제1 핵산 가닥으로부터의 제3 핵산 가닥의 치환을 유발함으로써 표적 RNA에 상보적인 서열을 세포 내로 방출시키고, 그에 의해 표적 RNA를 조정한다.
- [0018] 일부 실시양태에서, 세포를 핵산 복합체와 접촉시키는 것은 시험관내, 생체내, 생체외, 또는 그의 조합에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포를 핵산 복합체와 접촉시키는 것은 대상체의 신체 내에서 일어난다. 세포는, 예를 들어 이환 세포이고, 임의로 세포는 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 뉴런이다.
- [0019] 또한, 제공된 것은 질환 또는 상태의 치료 방법을 포함하며, 여기서 방법은 그를 필요로 하는 대상체에게 본원에 개시된 핵산 복합체 중 하나 이상을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 투입 가닥이 제3 핵산 가닥의 오버행에 결합하여 제1 핵산 가닥으로부터의 제3 핵산 가닥의 치환을 유발함으로써 표적 RNA에 상보적인 서열을 방출시키고, 그에 의해 대상체에서 표적 RNA의 활성 또는 표적 RNA로부터의 단백질 발현을 감소시켜 질환 또는 상태를 치료한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 상태는 중추 신경계 (CNS) 질환 또는 장애 또는 암이다. 일부 실시양태에서, 표적 RNA는 mRNA 또는 miRNA이다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체는 대상체에게 지질-매개 전달 시스템을 통해, 임의로 리포솜, 나노입자 또는 미셀을 통해 투여된다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체는 대상체

에게 나노입자, 무기 나노입자, 핵산 지질 입자, 중합체성 나노입자, 지질 나노입자 (LNP), 키토산 및 이눌린 나노입자, 시클로덱스트린 나노입자, 탄소 나노튜브, 리포솜, 미셀 구조, 캡시드, 중합체, 중합체 매트릭스, 히드로겔, 텐드리머, 핵산 나노구조, 엑소솜, GalNAc-접합된 벨리틴-유사 펩티드, 또는 그의 조합을 통해 투여된다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체는 그를 필요로 하는 대상체에게 피하 주사를 통해 투여된다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체는 그를 필요로 하는 대상체에게 정맥내 주사를 통해 투여된다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체는 그를 필요로 하는 대상체에게 약 0.1-10 nM, 임의로 약 0.1-1 nM의 농도로 투여된다.

[0020] 본 명세서에 기재된 대상의 하나 이상의 구현의 세부사항은 첨부 도면 및 하기 설명에 제시된다. 다른 특징, 측면 및 이점은 설명, 도면 및 청구범위로부터 명백해질 것이다. 이 요약도 하기 상세한 설명도 본 발명의 대상의 범주를 정의하거나 제한하는 것으로 해석되지 않는다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본원에 개시된 비제한적 예시적인 핵산 복합체 구축물의 개략적 표현을 나타낸다.
 도 2는 2개의 설계에 기초한 비제한적 예시적인 핵산 복합체 구축물의 개략적 표현을 나타낸다.
 도 3은 코어 핵산 가닥으로부터의 센서 핵산 가닥의 치환 및 코어 핵산 가닥 오버행의 분해 후의 활성 RNAi 듀플렉스의 형성을 나타내는 개략적 다이어그램이다.
 도 4는 3개의 비제한적 예시적인 핵산 복합체 구축물의 서열 다이어그램을 나타낸다. Calc V3P3 패신저: 서열 식별번호: 7; Alt anp sens1: 서열식별번호: 8; Alt anp-calc 코어 1: 서열식별번호: 9; Alt anp sens2: 서열 식별번호: 10; Alt mus-calc 코어2: 서열식별번호: 11; Alt mus-calc 코어 3: 서열식별번호: 12.
 도 5a는 센서 가닥, 패신저 가닥 및 코어 가닥을 포함하는 비제한적 예시적인 핵산 복합체 구축물 T1 CASi의 개략적 표현을 나타낸다. "+/- 팔미트산"은 팔미트산이 말단에서 임의적일 수 있음을 나타낸다. 도 5b-5d는 각각 예시적인 센서 가닥 (도 5b: 서열식별번호: 6), 패신저 가닥 (도 5c: 서열식별번호: 1) 및 코어 가닥 (도 5d: 서열식별번호: 2)의 화학식을 나타낸다. 도 5e는 T1 CASi 구축물, 개별 가닥 및 듀플렉스의 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE) 분석으로부터의 결과를 나타낸다. 도 5f는 T1 CASi 구축물을 제조하는 예시적인 체제를 나타낸다.
 도 6은 본원에 개시된 예시적인 CASi 구축물을 사용하여 평가된 다양한 뇌 영역의 그래프 표현을 나타낸다.
 도 7은 CASi 주사 14일 후, 3' 말단 팔미트산 무함유 T1 CASi 구축물 (상단 패널) 및 3' 말단 팔미트산 함유 T1 CASi 구축물 (하단 패널)로 처리된 마우스의 다양한 뇌 영역에서의 표적 mRNA 수준을 나타내는 그래프를 도시한다.
 도 8은 표준 8개 뉴클레오티드 토홀드 (팔미트산 함유 또는 무함유) ("8 nt toe + PA" 또는 "8 nt toe")를 갖는 CASi 구축물, 12개 뉴클레오티드 토홀드 (12 nt toe)를 갖는 CASi 구축물, 또는 16개 뉴클레오티드 토홀드 (16 nt toe)를 갖는 CASi 구축물로 처리된 마우스의 다양한 뇌 영역에서의 표적 mRNA 수준을 나타내는 다이어그램을 도시한다.
 도 9는 투여 14일, 30일 및 90일 후에 염수 처리된 마우스와 비교하여 CASi 구축물로 처리된 마우스의 다양한 뇌 영역에서의 표적 mRNA 수준을 나타내는 그래프를 도시한다.
 도 10은 투여 30일 및 90일 후에 염수 처리된 마우스와 비교하여 CASi 구축물로 처리된 마우스의 척수에서의 표적 mRNA 수준을 나타내는 그래프를 도시한다.
 도 11은 CASi 투여 30일 후 중추 및 말초 신경계에서의 표적 mRNA 수준을 나타내는 그래프를 도시한다.
 도 12는 염수 처리된 동물 (c)과 비교하여 CASi 처리된 동물 (t)의 다양한 뇌 영역에서의 GFAP mRNA (상부 패널) 및 IBA-1 mRNA (하부 패널) 수준을 나타내는 그래프를 도시한다.
 도면 전체에 걸쳐, 참조 번호는 참조 요소들 사이의 대응을 나타내기 위해 재사용될 수 있다. 도면은 본원에 기재된 예시적 실시양태를 나타내기 위해 제공되며, 본 개시내용의 범주를 제한하도록 의도되지 않는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 하기 상세한 설명에서, 그의 일부를 형성하는 첨부 도면을 참조한다. 도면에서, 문맥이 달리 지시하지 않는 한, 유사한 기호는 전형적으로 유사한 성분을 나타낸다. 상세한 설명, 도면 및 청구범위에 기재된 예시적 실시

양태는 제한적인 것으로 의도되지 않는다. 본원에 제시된 대상의 취지 또는 범주로부터 벗어나지 않으면서, 다른 실시양태가 이용될 수 있고, 다른 변화가 이루어질 수 있다. 본원에 일반적으로 기재되고 도면에 나타난 바와 같은 본 개시내용의 측면은 매우 다양한 상이한 구성으로 배열, 치환, 조합, 분리 및 설계될 수 있으며, 이들 모두는 본원에서 명백하게 고려되고 본 개시내용의 일부를 구성한다는 것이 용이하게 이해될 것이다.

[0023] 본원에 언급된 모든 특허, 공개된 특허 출원, 다른 공개, 및 진뱅크(GenBank)로부터의 서열, 및 다른 데이터베이스는 관련 기술과 관련하여 그 전문이 참조로 포함된다.

[0024] RNA 간섭 (RNAi)은 세포 운명 결정, 분화, 생존 및 바이러스 감염으로부터의 방어에 중요한 유전자의 발현을 조절하는 것을 돕는, 대부분의 진핵생물에서 보존된 고유한 세포 메카니즘이다. 연구자들은 서열-특이적 유전자 침묵을 위한 합성 이중-가닥 RNA를 설계함으로써 이러한 천연 메카니즘을 이용하였다. 동적 핵산 나노기술 및 생체분자 컴퓨팅 분야에서의 신생 개발은 또한 프로그램가능한 RNAi 작용제를 설계하기 위한 개념적 접근법을 제공한다. 그러나, RNA 침묵을 질환-관련 세포의 특정 집단으로 제한하고 정상 조직을 독성 부작용으로부터 보존하기 위해 RNA 전사체 (예컨대, mRNA 및 miRNA)를 감지하는 핵산 로직 스위치를 사용할 수 있는 표적화된 RNAi 요법을 개발하는 데 있어서 도전과제가 여전히 남아있다. 유의한 도전과제는 불량하게 억제된 배경 약물 활성, 약한 활성화 상태 약물 효력, 투입 및 배출 서열 중첩, 높은 설계 복잡성, 짧은 수명 (< 24시간) 및 높은 요구되는 장치 농도 (> 10 nM)를 포함한다.

[0025] 본원에 제공된 것은 조건부 활성화가능한 소형 간섭 RNA (siRNA) 복합체, 성분, 조성물, 및 관련 방법 및 시스템을 포함한다. 조건부 활성화가능한 siRNA 복합체는 siRNA 복합체에 대한 투입 핵산 가닥 (예를 들어, 질환-관련 세포에 대해 특이적인 질환 바이오마커 유전자)의 상보적 결합에 의해 촉발 시 불활성화 상태에서부터 활성화 상태로 스위칭되고, 그에 의해 siRNA 복합체의 RNA 간섭 활성을 활성화시켜 특이적 표적 RNA (예를 들어, 침묵시킬 RNA)를 표적화할 수 있다. 본원에 기재된 핵산 복합체는 낮은 농도에서 개선된 효력 뿐만 아니라 오프-타겟 효과를 감소시킬 수 있는 개선된 특이성으로 질환-관련 세포의 특정 집단에서 표적 RNA를 침묵시키기 위해 조건부 활성화 RNA 간섭 활성을 매개할 수 있다.

[0026] 본원에 개시된 것은 핵산 복합체를 포함한다. 핵산 복합체는 20-60개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 핵산 가닥 (예를 들어, 코어 핵산 가닥), 코어 핵산 가닥의 제1 영역에 결합하여 제1 핵산 듀플렉스 (예를 들어, RNAi 듀플렉스)를 형성하는 제2 핵산 가닥 (예를 들어, 패신저 핵산 가닥), 및 코어 핵산 가닥의 제2 영역에 결합하여 제2 핵산 듀플렉스 (예를 들어, 센서 듀플렉스)를 형성하는 제3 핵산 가닥 (예를 들어, 센서 핵산 가닥)을 포함할 수 있다. 센서 핵산 가닥은 코어 핵산 가닥에 상보적이지 않고, 투입 핵산 가닥에 결합하여 제1 핵산 가닥으로부터의 제3 핵산 가닥의 치환을 유발할 수 있는 오버행을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 코어 핵산 가닥의 제2 영역의 3'이다. 일부 실시양태에서, 센서 핵산 가닥은 코어 핵산 가닥의 제1 영역의 3'인 코어 핵산 가닥의 임의의 영역에 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 표적 RNA에 상보적인 서열을 포함한다. 표적 RNA에 상보적인 서열은 10-35개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.

[0027] 본원에 개시된 것은 표적 RNA를 조정하는 방법을 또한 포함한다. 방법은 표적 RNA를 포함하는 세포를 본원에 기재된 핵산 복합체와 접촉시키는 것을 포함한다. 투입 핵산 가닥의 검출 시, 투입 핵산 가닥은 센서 핵산 가닥의 오버행에 결합하여 코어 핵산 가닥으로부터의 센서 핵산 가닥의 치환을 유발하여 표적 RNA에 상보적인 서열을 세포 내로 방출시키고, 그에 의해 표적 RNA를 조정할 수 있다.

[0028] 본원에 개시된 것은 또한 질환 또는 상태를 치료하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 본원에 기재된 핵산 복합체를 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 투입 핵산 가닥의 검출 시, 투입 가닥은 센서 핵산 가닥의 오버행에 결합하여 코어 핵산 가닥으로부터의 센서 핵산 가닥의 치환을 유발함으로써 표적 RNA에 상보적인 서열을 방출시키고, 그에 의해 대상체에서 표적 RNA의 활성 또는 표적 RNA로부터의 단백질 발현을 감소시켜 질환 또는 상태를 치료할 수 있다.

[0029] 정의

[0030] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 기술 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 기술분야의 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어, 문헌 [Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY 1989)]을 참조한다. 본 개시내용의 목적을 위해, 다음 용어가 하기에 정의된다.

- [0031] 본원에 사용된 용어 "뉴클레오시드"는 리보스 또는 데옥시리보스 당에 공유 연결된 퓨린 또는 피리미딘 염기를 갖는 분자를 지칭한다. 예시적인 뉴클레오시드는 아데노신, 구아노신, 시티딘, 우리딘 및 티미딘을 포함한다.
- [0032] 용어 "뉴클레오티드"는 당 모이어티에 에스테르 연결로 연결된 1개 이상의 포스페이트 기를 갖는 뉴클레오시드를 지칭한다. 예시적인 뉴클레오티드는 뉴클레오시드 모노포스페이트, 디포스페이트 및 트리포스페이트를 포함한다.
- [0033] 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "핵산 분자"는 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 5'과 3' 탄소 원자들 사이의 포스포디에스테르 연결에 의해 함께 연결된 뉴클레오티드들의 중합체를 지칭한다.
- [0034] 용어 "RNA", "RNA 분자" 및 "리보핵산 분자"는 리보뉴클레오티드의 중합체를 지칭한다. 용어 "DNA", "DNA 분자" 및 "데옥시리보핵산 분자"는 데옥시리보뉴클레오티드의 중합체를 지칭한다. DNA 및 RNA는 자연적으로 합성될 수 있다 (예를 들어, 각각 DNA 복제 또는 DNA 전사에 의해). RNA는 전사후 변형될 수 있다. DNA 및 RNA는 또한 화학적으로 합성될 수 있다. DNA 및 RNA는 단일-가닥 또는 다중-가닥 (예를 들어, 이중-가닥 또는 삼중-가닥)일 수 있다. "mRNA" 또는 "메신저 RNA"는 유전자의 DNA 가닥 중 하나에 상보적인 단일-가닥 RNA 분자이다. "miRNA" 또는 "마이크로RNA"는 RNA 침묵 및 유전자 발현의 전사후 조절에서 기능하는 작은 단일-가닥 비-코딩 RNA 분자이다.
- [0035] 용어 "RNA 유사체"는 상응하는 비변경 또는 비변형된 RNA와 비교하여 적어도 하나의 변경 또는 변형된 뉴클레오티드를 갖는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 뉴클레오티드는 상응하는 비변경된 또는 비변형된 RNA와 동일하거나 유사한 성질 또는 기능, 예컨대 염기 쌍을 형성하는 것을 보유할 수 있다.
- [0036] 단일-가닥 폴리뉴클레오티드는 5' 말단 또는 5' 단부 및 3' 말단 또는 3' 단부를 갖는다. 단일-가닥 폴리뉴클레오티드의 용어 "5' 단부", "5' 말단" 및 "3' 단부", "3' 말단"은 단일-가닥 폴리뉴클레오티드의 말단 잔기를 나타내고, 각각의 말단 상의 유리 기의 성질에 기초하여 구별된다. 단일-가닥 폴리뉴클레오티드의 5'-말단은 그의 말단 (5' 말단)에서 데옥시리보스 또는 리보스의 당-고리에 제5 탄소를 갖는 단일-가닥 폴리뉴클레오티드의 말단 잔기를 나타낸다. 단일-가닥 폴리뉴클레오티드의 3'-말단은 그의 말단 (3' 말단)에서 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 당-고리 내 제3 탄소의 히드록실 기에서 종결되는 잔기를 나타낸다. 다양한 경우에 5' 말단 및 3' 말단은, 예를 들어 관능기 또는 다른 화합물의 첨가에 의해 화학적으로 또는 생물학적으로 변형될 수 있으며, 이는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 것이다.
- [0037] 본원에 사용된 용어 "상보적 결합" 및 "상보적으로 결합하다"는 2개의 단일 가닥이 서로 염기 쌍을 형성하여 핵산 듀플렉스 또는 이중-가닥 핵산을 형성하는 것을 의미한다. 본원에 사용된 용어 "염기 쌍"은 왓슨-크릭 염기 쌍형성 규칙에 따른 대향하는 상보적 폴리뉴클레오티드 가닥 또는 서열 상의 염기 쌍 사이의 수소 결합의 형성을 나타낸다. 예를 들어, 정규 왓슨-크릭 DNA 염기 쌍형성에서, 아데닌 (A)은 티민 (T)과 염기 쌍을 형성하고, 구아닌 (G)은 시토신 (C)과 염기 쌍을 형성한다. RNA 염기 쌍형성에서, 아데닌 (A)은 우라실 (U)과 염기 쌍을 형성하고, 구아닌 (G)은 시토신 (C)과 염기 쌍을 형성한다. 안정한 이중-가닥 듀플렉스가 형성될 수 있는 한, 2개의 단일 가닥 사이의 특정 백분율의 미스매치가 허용된다. 일부 실시양태에서, 상보적으로 결합하는 2개의 가닥은 미스매치를 가질 수 있거나, 정확히, 약, 최대, 또는 최대 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 또는 50%일 수 있다.
- [0038] 본원에 사용된 용어 "RNA 간섭", "간섭 RNA" 및 "RNAi"는 RNA의 선택적 세포내 분해를 지칭한다. RNAi는 외래 RNA (예를 들어, 바이러스 RNA)를 제거하기 위해 세포에서 자연적으로 발생할 수 있다. 천연 RNAi는 분해 메카니즘을 다른 유사한 RNA 서열로 지시하는 유리 dsRNA로부터 절단된 단편을 통해 진행된다. RNAi는 또한, 예를 들어 표적 유전자의 발현을 침묵시키기 위해 재조합적으로 개시될 수 있다.
- [0039] 본원에 사용된 용어 "소형 간섭 RNA" 및 "siRNA"는 siRNA가 표적 유전자와 동일한 세포에서 활성화될 때 유전자 또는 표적 유전자의 발현을 감소 또는 억제할 수 있는 RNA 또는 RNA 유사체를 지칭한다. 본원에 사용된 siRNA는 자연 발생 핵산 염기 및/또는 화학적으로 변형된 핵산 염기 (RNA 유사체)를 포함할 수 있다.
- [0040] 핵산 복합체
- [0041] 핵산 복합체의 센서 핵산 가닥 내의 서열을 통해 투입 핵산 가닥 (예를 들어, 표적 세포 (질환-관련 세포 포함)에 대해 특이적인 질환 바이오마커 유전자의 mRNA)에 대한 상보적 결합 시 조건부로 활성화될 수 있는 핵산

복합체가 본원에 제공된다. 활성화 핵산 복합체는 코어 핵산 가닥 및 패신저 핵산 가닥에 의해 형성된 강력한 RNAi 듀플렉스를 방출할 수 있으며, 이는 표적 RNA를 특이적으로 억제하거나 또는 침묵시킬 수 있다. 표적 RNA는 투입 핵산 가닥과 독립적인 서열을 가질 수 있다.

- [0042] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체는 도 1의 비제한적 실시양태에 나타낸 바와 같은 코어 핵산 가닥 (예를 들어, 제1 핵산 가닥), 패신저 핵산 가닥 (예를 들어, 제2 핵산 가닥) 및 센서 핵산 가닥 (예를 들어, 제3 핵산 가닥)을 포함한다. 이들 3개의 가닥은 서로 염기-쌍형성하여, RNAi 듀플렉스 (예를 들어, 제1 핵산 듀플렉스) 및 센서 듀플렉스 (예를 들어, 제2 핵산 듀플렉스)를 형성한다. 코어 핵산 가닥, 패신저 핵산 가닥, 및 센서 핵산 가닥은 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 RNA 유사체이다.
- [0043] 본원에 사용된 용어 "핵산 듀플렉스"는 상보적 결합을 통해 서로 결합된 2개의 단일-가닥 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 핵산 듀플렉스는 나선 구조, 예컨대 이중-가닥 RNA 분자를 형성할 수 있고, 이는 2개의 단일-가닥 폴리뉴클레오티드 사이의 염기 쌍의 비-공유 결합에 의해 및 염기 스택킹 상호작용에 의해 주로 유지된다.
- [0044] 코어 핵산 가닥은 제1 영역 및 제2 영역을 포함할 수 있고, 제1 영역은 제2 영역의 3' 방향에 있다. 다시 말해서, 제1 영역은 코어 핵산 가닥의 3' 단부에 있고, 제2 영역은 코어 핵산 가닥의 5' 단부에 있다. 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 커넥터를 통해 코어 핵산 가닥의 제2 영역에 연결될 수 있고, 이는 5' 커넥터로도 지칭될 수 있다. 5' 커넥터는 2개의 인접한 뉴클레오티드를 연결하는 정상 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결일 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥은 단지 1개의 커넥터 (예를 들어, 5' 커넥터)를 포함하고, 3' 커넥터를 포함하지 않는다.
- [0045] 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 패신저 핵산 가닥에 상보적으로 결합하여 RNAi 듀플렉스 (예를 들어, 제1 핵산 듀플렉스)를 형성한다. 코어 핵산 가닥의 전체 서열이 패신저 핵산 가닥에 상보적으로 결합되지는 않는다. 예를 들어, 코어 핵산 가닥의 제2 영역은 패신저 핵산 가닥에 상보적으로 결합되지 않는다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 패신저 핵산 가닥에 완전히 상보적이고, 그에 의해 코어 핵산 가닥의 제1 영역의 5' 및 3' 말단에 오버행이 없는 평활 단부를 갖는 RNAi 듀플렉스를 형성한다.
- [0046] 일부 실시양태에서, RNAi 듀플렉스의 코어 핵산 가닥은 3' 말단에 짧은 오버행 (예를 들어, 1, 2 또는 3개의 뉴클레오시드)을 갖지만, 3' 오버행은 센서 듀플렉스의 중간으로 다시 연장되어 센서 핵산 가닥과 결합하지 않는다 (예를 들어, 도 1-2 참조). 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥은 코어 핵산 가닥의 제1 영역의 3'에 어떠한 영역도 갖지 않는다.
- [0047] 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 표적 핵산 (예를 들어, 침묵시킬 RNA)에 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 핵산 복합체의 코어 핵산 가닥은 가이드 가닥 (안티센스 가닥)으로서 작용하고, 표적 RNA와 염기 쌍형성하는 데 사용된다. 따라서, 패신저 핵산 가닥은 동일한 표적 핵산에 상동성인 서열을 포함할 수 있다.
- [0048] 핵산 복합체의 활성화 시 (예를 들어, 투입 핵산 가닥에 결합 시), 방출된 RNAi 듀플렉스는 표적 핵산과 코어 핵산 가닥의 제1 영역 사이의 결합을 통해 표적 핵산에 상보적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥 내의 표적 RNA에 상보적인 서열은 약 10-35개 뉴클레오시드 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥은 20-60개의 연결된 뉴클레오시드를 포함한다.
- [0049] 센서 핵산 가닥은 코어 핵산 가닥의 제2 영역에 상보적으로 결합하여 센서 듀플렉스 (예를 들어, 제2 핵산 듀플렉스)를 형성한다. 센서 핵산 가닥은 코어 핵산 가닥의 제1 영역에 결합하지 않고, 코어 핵산 가닥의 제1 영역의 3'인 코어 핵산 가닥의 임의의 영역에도 결합하지 않는다. 센서 핵산 가닥은 또한 패신저 핵산 가닥에 결합하지 않는다.
- [0050] 센서 핵산 가닥은 오버행을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "오버행"은 이중-가닥 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 듀플렉스)의 단부 중 하나에서 돌출된 쌍형성되지 않은 뉴클레오티드의 스트레치를 지칭한다. 오버행은 폴리뉴클레오티드의 어느 한 가닥 상에 있을 수 있고, 가닥의 3' 말단에 (3' 오버행) 또는 가닥의 5' 말단에 (5' 오버행) 포함될 수 있다. 오버행은 센서 핵산 가닥의 3' 말단에 있을 수 있다. 센서 핵산 가닥의 오버행은 코어 핵산 가닥의 임의의 영역에 결합하지 않는다. 센서 핵산 가닥의 오버행은 약 5-20개 뉴클레오시드 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서, 센서 핵산 가닥의 오버행은 약 8-16개 뉴클레오시드 길이, 예를 들어 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 센서 핵산 가닥의 오버행은 12개 뉴클레오시드 길이이다.
- [0051] 센서 핵산 가닥은 투입 핵산 가닥 (예를 들어, 질환-관련 세포에 대해 특이적인 질환 바이오마커 유전자)에 결합할 수 있는 서열을 포함할 수 있다. 활성화 시, 투입 핵산 가닥에 대한 센서 핵산 가닥의 결합은 코어 핵산

가닥으로부터의 센서 핵산 가닥의 치환 및 후속 방출을 유발할 수 있고, 그에 의해 강력한 RNAi 듀플렉스를 방출하고, RNAi 듀플렉스의 RNA 간섭 활성을 스위치 온할 수 있다. 투입 핵산 가닥 또는 검출가능한 양의 투입 핵산 가닥의 부재 하에, 본원에 기재된 핵산 복합체는 불활성화 상태 (스위치 오프)로 유지되고, 코어 핵산 가닥으로부터의 센서 핵산 가닥의 치환은 일어나지 않는다. 따라서, 투입 핵산 가닥은 핵산 복합체 (예를 들어, RNAi 듀플렉스)의 RNA 간섭 활성을 활성화 (스위치 온)시키는 촉발인자로서 작용할 수 있다.

[0052] 본원에 기재된 핵산 복합체의 RNAi 듀플렉스의 길이는 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, RNAi 듀플렉스의 길이는 10-30개 뉴클레오티드일 수 있다. 예를 들어, RNAi 듀플렉스의 길이는 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개일 수 있다. 일부 실시양태에서, RNAi 듀플렉스의 길이는 17-22개 뉴클레오티드일 수 있다.

[0053] 본원에 기재된 핵산 복합체의 센서 듀플렉스의 길이는 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 센서 듀플렉스의 길이는 10-30개 뉴클레오티드일 수 있다. 예를 들어, 센서 듀플렉스의 길이는 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개일 수 있다. 일부 실시양태에서, 센서 듀플렉스의 길이는 약 14개 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 센서 듀플렉스는 RNAi 듀플렉스에 비해 비교적 짧은 길이를 갖는다.

[0054] 일부 실시양태에서, 2개의 듀플렉스 중 하나의 말단에 각각 위치하는 2개의 인접한 뉴클레오티드를 연결하는 정상 포스포디에스테르 연결을 제외하고는, 핵산 복합체의 센서 듀플렉스와 RNAi 듀플렉스 사이에 링커 분자가 존재하지 않는다 (예를 들어, 도 1-2에 제시된 CASi 설계 참조).

[0055] 본원에 기재된 핵산 복합체의 예시적인 비제한적 실시양태가 도 1-2에 예시된다. 예를 들어, 패신저 핵산 가닥 및 코어 핵산 가닥의 제1 영역에 의해 형성된 RNAi 듀플렉스는 약 17-22개 뉴클레오티드 (예를 들어, 21개 뉴클레오티드) 길이를 갖고, 코어 핵산 가닥의 제2 영역 및 센서 핵산 가닥에 의해 형성된 센서 듀플렉스는 약 10-30개 뉴클레오티드 (예를 들어, 14개 뉴클레오티드) 길이를 갖는다. 핵산 복합체의 뉴클레오티드는 광범위하게 변형될 수 있다. 예를 들어, 핵산 복합체 내의 모든 뉴클레오티드가 변형될 수 있다. 패신저 핵산 가닥은 3' 말단에 2개의 연속적인 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결 및 5' 말단에 3개의 연속적인 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함할 수 있다. 패신저 핵산 가닥의 5' 말단은 RNAi 경로 효소 (예를 들어, 다이서, RISC)와의 상호작용을 차단하기 위해 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 통해 차단 모이어티, 예컨대 형광단에 부착될 수 있다. 패신저 핵산 가닥의 5' 말단은 또한 1 또는 2개의 LNA 또는 그의 유사체를 포함할 수 있다. 코어 핵산은 패신저 핵산 가닥에 상보적으로 결합하여 RNAi 듀플렉스를 형성하는 제1 영역 및 센서 핵산 가닥에 상보적으로 결합하여 센서 듀플렉스를 형성하는 제2 영역을 포함한다. 제1 영역은 제2 영역보다 길 수 있고, 따라서 더 짧은 센서 듀플렉스를 제공한다. 제1 영역은 추가의 커넥터 또는 링커 없이 2개의 인접한 뉴클레오티드 사이의 정상 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결을 통해 제2 영역에 연결될 수 있다. 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 3' 말단에 2개의 연속적인 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결 및 5' 말단에 2개의 연속적인 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함할 수 있다. 코어 핵산 가닥의 제2 영역은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 갖지 않을 수 있다. 코어 핵산 가닥은 약 2개 뉴클레오티드 길이의 3' 오버행을 포함할 수 있다. 오버행은 센서 듀플렉스의 중간으로 다시 연장되어 센서 핵산 가닥과 결합하지 않는다. 센서 핵산 가닥은 코어 핵산 가닥의 제2 영역에 상보적인 부분 (예를 들어, 14개 뉴클레오티드) 및 3' 오버행 (예를 들어, 12개 뉴클레오티드)을 포함한다. 센서 핵산 가닥의 3' 오버행 내의 모든 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결일 수 있다. 센서 핵산 가닥의 3' 말단은 말단 모이어티, 예컨대 전달 리간드, 염료 (예를 들어, 형광단) 또는 엑소뉴클레아제에 부착될 수 있다. 센서 핵산 가닥의 5' 말단은 말단 모이어티, 예컨대 지방산, Cy3, 또는 역전된 dT, 트리-에틸렌 글리콜, 또는 트리-에틸렌 글리콜에 부착된 역전된 dT에 부착될 수 있다. 센서 핵산 가닥은 패신저 핵산 가닥 및 코어 핵산 가닥보다 더 높은 백분율의 LNA, 그의 유사체, 또는 다른 2'-4' 가교된 염기를 포함할 수 있다. 코어 핵산 가닥은 LNA, 그의 유사체, 또는 다른 2'-4' 가교된 염기를 포함하지 않을 수 있다.

[0056] 본원에 기재된 핵산 복합체는, 예를 들어 문헌 [Oligonucleotide Synthesis by Herdewijin, Piet (2005) and Modified oligonucleotides: Synthesis and Strategy for Users, by Verma and Eckstein, Annul Rev. Biochem. (1998): 67:99-134] (이들의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 비롯한 관련 기술분야에 널리 공지된 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 표준 방법을 사용하여 합성될 수 있다. 합성된 핵산 복합체는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 바람직한 생리학적 조건 하에 그의 2차 구조를 형성하도록 허용될 수 있다. 형성된 2차 구조는 관련 기술분야에 공지된 표준 방법, 예컨대 화학적 맵핑, NMR 또는 컴퓨터 시뮬레이션을 사용하여 시험될 수 있다. 핵산 복합체 구축물은 목적하는 구조가 수득될 때까지 필요에 따라 화학적 변형 또는

미스매치를 도입하거나 제거함으로써 시험 결과에 따라 추가로 변형될 수 있다.

- [0057] 핵산 구조의 설계 및 분석을 돕기 위해 적합한 소프트웨어 스위트가 사용될 수 있다. 예를 들어, 누팩(Nupack)을 사용하여 듀플렉스의 형성을 체크하고 듀플렉스의 열역학적 안정성을 등급화할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 설계 도구를 사용하여 LNA 변형의 배치를 최적화할 수 있다.
- [0058] RNA 간섭
- [0059] 핵산 복합체의 센서 핵산 가닥 내의 서열에 상보적인 서열을 갖는 투입 핵산 (예를 들어, 질환-관련 세포에 대해 특이적인 핵산)의 검출에 반응하여, 조립된 불활성화 상태에서부터 활성화 상태로 스위칭되어 특이적 표적 핵산에 대해 작용 (예를 들어, 분해 또는 억제)하도록 (예를 들어, 표적 세포에 대해 특이적인 유전자의 mRNA의 존재에 대한 신호를 통해) 조건부로 활성화될 수 있는 핵산 복합체가 본원에 기재된다.
- [0060] 조립된 불활성화 배열에서, 핵산 복합체의 센서 핵산 가닥은 RNAi 듀플렉스의 효소적 프로세싱을 억제함으로써, RNAi 활성을 스위치 오프된 상태로 유지한다.
- [0061] 핵산 복합체의 센서 핵산 가닥에 상보적인 투입 핵산 가닥이 존재하는 경우, 투입 핵산 가닥은 토홀드 매개 가닥 치환을 통해 코어 핵산 가닥으로부터 센서 핵산 가닥의 분리를 유도함으로써 핵산 복합체를 활성화시킬 수 있다. 치환은 투입 핵산 가닥과 센서 핵산 가닥의 오버행 사이의 상보적 결합을 통해 센서 핵산 가닥의 3' 또는 5' 말단에 형성된 토홀드 (예를 들어, 센서 핵산 가닥의 3' 말단에 형성된 토홀드)로부터 시작될 수 있다.
- [0062] 센서 핵산 가닥의 제거 후에, 코어 핵산 가닥의 제2 영역은 뉴클레아제 (예를 들어, 엑소뉴클레아제)에 의해 분해될 수 있는 5' 오버행이 된다. 이러한 분해는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드 및/또는 엑소뉴클레아제 절단-저항성 모이어티의 존재로 인해 RNAi 듀플렉스의 5' 단부에서 중단되고, 따라서 필요한 경우에 추가의 엔도뉴클레아제 프로세싱 및 RNA-유도된 침묵 복합체 (RISC) 로딩을 위한 활성 RNAi 듀플렉스가 된다. RISC는 siRNA 또는 miRNA의 한 가닥을 혼입하는 다중단백질 복합체이고, 상보적 표적 핵산을 인식하기 위한 주형으로서 siRNA 또는 miRNA를 사용한다. 표적 핵산이 확인되면, RISC는 RNase (예를 들어, 아르코노트)를 활성화시키고, 절단에 의해 표적 핵산을 억제한다. 일부 실시양태에서, 다이스는 RNAi 듀플렉스를 RISC 내로 로딩하는 데 요구되지 않는다. 도 3은 코어 핵산 가닥으로부터의 센서 핵산 가닥의 치환 및 코어 핵산 가닥 오버행의 분해 후의 활성 RNAi 듀플렉스의 형성을 나타내는 개략적 다이어그램이다.
- [0063] 이어서, 패신저 핵산 가닥은 폐기되고, 코어 핵산 가닥 (코어 핵산 가닥의 제1 영역)은 RICS 내로 혼입된다. 본원에 개시된 핵산 복합체의 코어 핵산 가닥은 가이드 가닥 (안티센스 가닥)으로서 작용하고, 표적 RNA와 염기쌍형성하는 데 사용된다. 패신저 핵산 가닥은 코어 핵산 가닥의 RICS 내로의 로딩 전에 보호 가닥으로서 작용한다. RICS는 코어 핵산 가닥, 특히 코어 핵산 가닥의 제1 영역에 상보적인 서열을 갖는 표적 RNA를 인식하기 위한 주형으로서 혼입된 코어 핵산 가닥을 사용한다. 표적 RNA에 결합 시, 결합된 표적 RNA를 분해할 수 있는 RICS의 촉매 성분인 아르코노트가 활성화된다. 표적 RNA가 분해될 수 있거나, 또는 표적 RNA의 번역이 억제될 수 있다.
- [0064] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체는 다이스 절단 부위를 갖지 않고, 따라서 핵산 복합체에 의해 매개되는 RNAi 간섭은 다이스-매개 절단을 우회할 수 있다.
- [0065] 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 바와 같이, 다이스는 이중-가닥 RNA (dsRNA) 분자를 약 20-25개 뉴클레오타이드 길이의 dsRNA의 짧은 단편으로 절단함으로써 RNAi 경로를 개시할 수 있는 RNase III 패밀리 내의 엔도리보뉴클레아제이다.
- [0066] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체는 본원에 기재된 핵산 복합체가 다이스 프로세싱을 우회할 수 있다는 점에서 WO/2020/033938로서 공개된 관련 국제 출원에 개시된 조건부 활성화 소형 간섭 RNA (CondsRNA)와 구별된다.
- [0067] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 핵산 복합체는 다이스 결합을 방해하는 구조적 특징을 갖는다. 일부 실시양태에서, RNAi 듀플렉스는 다이스 기질을 생성하지 않는다. 예를 들어, 패신저 핵산 가닥 및 코어 핵산 가닥의 제1 영역에 의해 형성된 RNAi 듀플렉스는 3' 및/또는 5' 오버행을 갖지 않고, 대신에 패신저 핵산 가닥을 다이스 결합에 불리하게 할 수 있는 평활 단부를 형성한다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥은 약 17-22개 뉴클레오타이드 길이를 가지며, 이는 패신저 핵산 가닥이 다이스 절단을 우회하기에 충분히 짧게 한다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥은 패신저 핵산 가닥의 3' 및/또는 5' 단부에 대한 G/C 풍부 염기를 갖지 않는다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥은 다이스 결합을 피하기 위해 말단 모이어티 및/또는 차단 모이어티에 부

착된다.

- [0068] 활성화 시, 본원에 기재된 핵산 복합체는 표적 세포에서 표적 핵산을 억제할 수 있고, 따라서 표적 세포에서 표적 핵산의 발현의 감소 또는 상실을 유발할 수 있다. 표적 세포는 질환 또는 장애와 연관되거나 관련된 세포이다. 본원에 사용된 용어 "연관된", "관련된"은 질환 또는 상태의 발생이 표적 세포의 발생을 동반하도록 하는 세포와 질환 또는 상태 사이의 관계를 지칭하며, 이는 원인-효과 관계 및 징후/증상-질환 관계를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본원에 사용된 표적 세포는 전형적으로 투입 핵산의 검출가능한 발현을 갖는다.
- [0069] 일부 실시양태에서, 표적 세포에서의 표적 핵산의 발현은 약, 적어도, 또는 적어도 약 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%, 99%, 또는 100%, 또는 임의의 이들 값 사이의 수 또는 범위로 억제된다.
- [0070] 본원에 사용된 유전자 발현의 억제는 표적 세포에서 표적 유전자로부터의 단백질 및/또는 mRNA 생성물의 수준의 부재 또는 관찰가능한 감소를 지칭한다. 억제 정도는 실시예에서 입증된 바와 같이 표적 유전자의 발현 수준의 검사에 의해 평가될 수 있다.
- [0071] 일부 실시양태에서, 유전자 발현은 그의 단백질 생성물이 용이하게 검정되는 리포터 또는 약물 내성 유전자의 사용에 의해 검정될 수 있다. 예시적인 리포터 유전자는 아세토히드록시산 신타제 (AHAS), 알칼리성 포스파타제 (AP), 베타 갈락토시다제 (LacZ), 베타 글루쿠로니다제 (GUS), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제 (CAT), 녹색 형광 단백질 (GFP), 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 루시페라제 (Luc), 노팔린 신타제 (NOS), 옥토펜 신타제 (OCS), 및 그의 유도체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 암피실린, 블레오마이신, 클로람페니콜, 겐타마이신, 히그로마이신, 카나마이신, 린코마이신, 메토티렉세이트, 포스포노트리신, 퓨로마이신 및 테트라시클린에 대한 내성을 부여하는 다수의 선택 마커가 이용가능하다. 유전자 발현량의 정량화는 핵산 복합체로 처리되지 않은 세포 또는 음성 또는 양성 대조군으로 처리된 세포와 비교하여 억제 정도를 결정할 수 있게 한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 바와 같은 다양한 생화학적 기술, 예컨대 RNA 용액 혼성화, 뉴클레아제 보호, 노던 혼성화, 역전사, 마이크로어레이를 사용한 유전자 발현 모니터링, 항체 결합, 효소 연결 면역흡착 검정 (ELISA), 웨스턴 블롯팅, 방사선면역검정 (RIA), 다른 면역검정, 및 형광 활성화 세포 분석 (FACS)이 사용될 수 있다.
- [0072] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 핵산 복합체는 개선된 스위칭 성능 및 감소된 오프-타겟 효과를 나타낸다. 본원에 개시된 핵산 복합체는 핵산 복합체가 불활성화 상태 (스위치 오프)로 있을 때 감소된 원치않는 RNAi 활성을 가질 수 있고, 핵산 복합체가 투입 핵산 가닥의 검출 시 활성화될 때 증진된 RNAi 활성을 가질 수 있다.
- [0073] 일부 실시양태에서, 비-표적 세포 (예를 들어, 투입 핵산 가닥을 갖지 않는 세포)에서의 표적 핵산의 발현은 약, 최대, 또는 최대 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 또는 임의의 이들 값 사이의 수 또는 범위로 억제된다. 비-표적 세포는 표적 세포 이외의 대상체의 세포를 포함할 수 있다.
- [0074] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체는 증진된 효력을 가지며, 따라서 낮은 농도에서 RNAi 활성을 유발할 수 있다. 비특이적, 오프-타겟 효과 및 독성 (예를 들어, 바람직하지 않은 염증유발 반응)은 낮은 농도의 핵산 복합체를 사용함으로써 최소화될 수 있다.
- [0075] 본원에 개시된 핵산 복합체의 농도는 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 핵산 복합체는 정확히, 약, 최대, 또는 최대 약 0.001 nM, 0.01 nM, 0.02 nM, 0.03 nM, 0.04 nM, 0.05 nM, 0.06 nM, 0.07 nM, 0.08 nM, 0.09 nM, 0.1 nM, 0.2 nM, 0.3 nM, 0.4 nM, 0.5 nM, 0.6 nM, 0.7 nM, 0.8 nM, 0.9 nM, 1.0 nM, 1.5 nM, 2.0 nM, 2.5 nM, 3.0 nM, 3.5 nM, 4.0 nM, 4.5 nM, 5.0 nM, 5.5 nM, 6.0 nM, 6.5 nM, 7.0 nM, 7.5 nM, 8.0 nM, 8.5 nM, 9.0 nM, 9.5 nM, 10 nM, 11 nM, 12 nM, 13 nM, 14 nM, 15 nM, 16 nM, 17 nM, 18 nM, 19 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위의 농도로 제공될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 핵산 복합체는 약 0.1-10 nM, 바람직하게는 약 0.1-1 nM의 농도로 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 핵산 복합체는 0.1 nM 이하의 형질감염 농도를 갖는다.
- [0076] 본원에 기재된 핵산 복합체는 낮은 농도에서 지속적이고 일관되게 강력한 억제 효과를 허용할 수 있다. 예를

들어, 핵산 복합체는 연장된 시간 기간, 예컨대 1시간, 2시간, 6시간, 12시간, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간, 84시간, 96시간, 5일, 6일, 7일, 2주, 또는 임의의 이들 값 사이의 수 또는 범위, 또는 그 초과 동안 활성을 유지할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체는 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어도 36시간, 적어도 48시간, 적어도 60시간, 적어도 72시간, 적어도 84시간, 또는 적어도 96시간 동안 활성을 유지할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체는 최대 30일, 최대 60일, 또는 최대 90일 동안 활성을 유지할 수 있다.

[0077] 화학적 변형

[0078] 본원에 기재된 핵산 복합체에 포함된 핵산 가닥 (코어 핵산 가닥, 패시저 핵산 가닥 및/또는 센서 핵산 가닥)은 비-표준, 변형된 뉴클레오티드 (뉴클레오티드 유사체) 또는 비-표준, 변형된 뉴클레오시드 (뉴클레오시드 유사체)를 포함하는 비-표준, 변형된 핵산 가닥일 수 있다. 용어 "뉴클레오티드 유사체" 또는 "변형된 뉴클레오티드"는 비-자연 발생 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드를 포함한, 1종 이상의 변형 (예를 들어, 화학적 변형)을 포함하는 비-표준 뉴클레오티드를 지칭한다. 용어 "뉴클레오시드 유사체" 또는 "변형된 뉴클레오시드"는 시티딘, 우라실, 아데노신, 구아노신 및 티미딘 이외의 비-자연 발생 뉴클레오시드를 포함한, 1종 이상의 변형 (예를 들어, 화학적 변형)을 포함하는 비-표준 뉴클레오시드를 지칭한다. 변형된 뉴클레오시드는 포스페이트 기가 없는 변형된 뉴클레오티드일 수 있다. 화학적 변형은 1개 이상의 원자 또는 모이어티를 상이한 원자 또는 상이한 모이어티 또는 관능기 (예를 들어, 메틸 기 또는 히드록실 기)로 대체하는 것을 포함할 수 있다.

[0079] 변형은 뉴클레오티드/뉴클레오시드의 특정 화학적 특성을 변경시키기 위해, 예컨대 열역학적 안정성을 증가시키기 위해, 뉴클레아제 분해에 대한 저항성 (예를 들어, 엑소뉴클레아제 저항성)을 증가시키기 위해, 및/또는 결합 특이성을 증가시키고 오프-타겟 효과를 최소화하기 위해 도입된다. 예를 들어, 열역학적 안정성은 용융 온도 T_m 의 측정에 기초하여 결정될 수 있다. 보다 높은 T_m 은 보다 열역학적으로 안정한 화학 물질과 연관될 수 있다.

[0080] 일부 실시양태에서, 변형은 핵산 복합체 내의 핵산 가닥 중 하나 이상이 엑소뉴클레아제 분해/절단에 저항하도록 할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "엑소뉴클레아제"는 폴리뉴클레오티드 쇄의 단부 (엑소)로부터 한 번에 하나씩 뉴클레오티드를 절단함으로써 작용하는 효소의 유형을 나타낸다. 3' 또는 5' 단부에서 포스포디에스테르 결합을 파괴하는 가수분해 반응이 일어난다. 3' 및 5' 엑소뉴클레아제는 높은 효율 및 빠른 동역학적 속도로 세포에서 RNA 및 DNA를 분해할 수 있고, 세포들 사이의 간질 공간 및 혈장에서 RNA 및 DNA를 분해할 수 있다. 폴리뉴클레오티드 쇄의 중간 (엔도)에서 포스포디에스테르 결합을 절단하는 엔도뉴클레아제가 밀접하게 관련된 다. 3' 및 5' 엑소뉴클레아제 및 엑소뉴클레올리틱 복합체는 세포에서 RNA 및 DNA를 분해할 수 있고, 세포들 사이의 간질 공간 및 혈장에서 RNA 및 DNA를 분해할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "엑소리보뉴클레아제"는 RNA 분자의 5' 단부 또는 3' 단부로부터 말단 뉴클레오티드를 제거함으로써 RNA를 분해하는 효소인 엑소뉴클레아제 리보뉴클레아제를 지칭한다. 5' 단부로부터 뉴클레오티드를 제거하는 효소는 5'-3' 엑소리보뉴클레아제로 칭해지고, 3' 단부로부터 뉴클레오티드를 제거하는 효소는 3'-5' 엑소리보뉴클레아제로 칭해진다.

[0081] 변형은 포스포네이트 변형, 리보스 변형 (당 부분에서), 및/또는 염기 변형을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바람직한 변형된 뉴클레오티드는 당- 및/또는 백본-변형된 리보뉴클레오티드를 포함한다.

[0082] 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 뉴클레오티드의 당 부분에 대한 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오티드의 2' OH-기는 H, OR, R, F, Cl, Br, I, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, COOR, 또는 OR로부터 선택된 기에 의해 대체될 수 있고, 여기서 R은 치환 또는 비치환된 C₁-C₆ 알킬, 알케닐, 알킬닐, 아릴 등이다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 2' OH-기는 2' O-메틸 기에 의해 대체되고, 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드는 2'-O-메틸 뉴클레오티드 또는 2'-O-메틸 뉴클레오시드 (2'-OMe)이다. 2'-O-메틸 뉴클레오티드 또는 2'-O-메틸 뉴클레오시드는 2'-O-메틸아데노신, 2'-O-메틸구아노신, 2'-O-메틸우라실, 또는 2'-O-메틸시티딘일 수 있다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드의 2' OH-기는 플루오린 (F)에 의해 대체되고, 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드는 2'-F 뉴클레오티드 또는 2'-F 뉴클레오시드 (2'-데옥시-2'-플루오로 또는 2'-F)이다. 2'-F 뉴클레오티드 또는 2'-F 뉴클레오시드는 2'-F-아데노신, 2'-F-구아노신, 2'-F-우라실, 또는 2'-F-시티딘일 수 있다. 변형은 또한 다른 변형, 예컨대 뉴클레오시드 유사체 포스포르아미다이트를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 글리콜 핵산이 사용될 수 있다.

[0083] 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 예를 들어 포스페이트 기의 산소 중 하나 이상을 황 또는 메틸 기로

치환함으로써 뉴클레오타이드의 포스페이트 기에서의 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드의 포스페이트 기의 비가교 산소 중 하나 이상은 황에 의해 대체된다.

[0084] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 가닥은 포스포디에스테르 연결이 아닌 1개 이상의 비-표준 뉴클레오시드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 가닥은 1개 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "포스포로티오에이트 연결" (PS)은 비가교 산소 중 하나가 황에 의해 대체된 뉴클레오타이드들 사이의 결합을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 비가교 산소 둘 다는 황 (PS2)에 의해 대체될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비가교 산소 중 하나는 메틸 기에 의해 대체될 수 있다. 본원에 기재된 용어 "포스포디에스테르 연결"은 포스페이트가 2개의 당을 가교하는 DNA 및 RNA에서의 정상 당 포스페이트 백본 연결을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥, 패신저 핵산 가닥 및/또는 센서 핵산 가닥에서의 1개 이상의 포스포로티오에이트 연결의 도입은 변형된 뉴클레오타이드에 뉴클레아제 (예를 들어, 엔도뉴클레아제 및/또는 엑소뉴클레아제)에 대한 증가된 저항성을 부여할 수 있다.

[0085] 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 염기 부분에 대한 변형 또는 그의 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어, 우리딘 및 시티딘 잔기는 슈도우리딘, 2-티오우리딘, N6-메틸아데노신, 5-메틸시티딘 또는 우리딘 및 시티딘 잔기의 다른 염기 유사체로 치환될 수 있다. 아데노신은 후그스틴 (예를 들어, 7-트리아졸로-8-아자-7-데아자아데노신) 및/또는 아데노신의 왓슨-크릭(Watson-Crick) 페이스 (예를 들어, N2-알킬-2-아미노퓨린)에 대한 변형을 포함할 수 있다. 아데노신 유사체의 예는 또한 후그스틴 또는 왓슨-크릭 페이스-국제화된 N-에틸피페리딘 트리아졸-변형된 아데노신 유사체, N-에틸피페리딘 7-EAA 트리아졸 (예를 들어, 7-EAA, 7-에틸닐-8-아자-7-데아자아데노신) 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 확인가능한 다른 아데노신 유사체를 포함한다. 시토신은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 확인가능한 임의의 적합한 시토신 유사체로 치환될 수 있다. 예를 들어, 시토신은 대등한 염기 쌍형성 충실도, 열 안정성 및 높은 형광을 나타낸 6'-페닐피롤로시토신 (PhpC)으로 치환될 수 있다.

[0086] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 핵산 복합체 내의 1개 이상의 뉴클레오타이드는 범용 염기로 치환될 수 있다. 용어 "범용 염기"는 각각의 천연 뉴클레오타이드와 염기 쌍을 형성하면서 이들 사이에 거의 구별되지 않는 뉴클레오타이드 유사체를 지칭한다. 범용 염기의 예는 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 C-페닐, C-나프틸 및 다른 방향족 유도체, 이노신, 아졸 카르복시아미드, 및 니트로아졸 유도체, 예컨대 3-니트로피롤, 4-니트로인돌, 5-니트로인돌, 및 6-니트로인돌을 포함하나 이에 제한되지는 않는다 (예를 들어, 문헌 [Loakes, 2001, Nucleic Acids Research, 29, 2437-2447] 참조).

[0087] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 염기 변형은 핵산 복합체를 뉴클레아제에 대해 보다 저항성 있게 하면서 선천성 면역 인식을 감소시킬 수 있다. 본원에 개시된 핵산 복합체에 사용될 수 있는 염기 변형의 예는 또한, 예를 들어 문헌 [Hu et al. (Signal Transduction and targeted Therapy 5: 101 (2020))]에 기재되어 있으며, 그의 내용은 그 전문이 참조로 포함된다.

[0088] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체에 포함된 핵산 가닥 (코어 핵산 가닥, 패신저 핵산 가닥 및/또는 센서 핵산 가닥)은 1개 이상의 잠금 핵산 또는 그의 유사체를 포함할 수 있다. 예시적인 잠금 핵산 유사체는 예를 들어 그의 상응하는 잠금 유사체 포스포르아미다이트 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백한 다른 유도체를 포함한다.

[0089] 본원에 사용된 용어 "잠금 핵산" (LNA)은 변형된 RNA 뉴클레오타이드를 나타낸다. LNA 뉴클레오타이드의 리보스 모이어티는 2' 및 4' 탄소를 연결하는 추가의 가교 (2'-O, 4'-C 메틸렌 가교)로 변형된다. 가교는 리보스를 3'-엔도 구조적 입체형태로 "잠그고", 리보푸라노스 고리의 가요성을 제한하여, 그에 의해 구조를 단단한 비시클릭 형태로 잠근다. LNA 뉴클레오타이드는 원할 때마다 올리고뉴클레오타이드 내의 DNA 또는 RNA 염기와 혼합될 수 있다. 본원에 개시된 핵산 복합체 내로의 LNA의 혼입은 열 안정성 (예를 들어, 용융 온도), 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 특이성 뿐만 아니라 대립유전자 구별에서의 정확도를 증가시킬 수 있다. LNA 올리고뉴클레오타이드는 상보적 단일-가닥 RNA 및 상보적 단일- 또는 이중-가닥 DNA에 대한 혼성화 친화도를 나타낸다. LNA에 관한 추가의 정보는 예를 들어 www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/locked-nucleic-acids-faq.html에서 찾아볼 수 있다. 일부 실시양태에서, 글리콜 핵산이 사용될 수 있다.

[0090] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체에 포함된 핵산 가닥 (코어 핵산 가닥, 패신저 핵산 가닥, 및/또는 센서 핵산 가닥)은 2'-4' 가교 변형 (예를 들어, 2'-4' 가교된 염기)을 갖는 다른 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 2'-4' 가교 변형은 뉴클레오타이드의 2' 및 4' 탄소를 연결하는 가교의 도입을 지칭한다. 가교는 2'-O, 4'-C 메틸렌 가교 (예를 들어, LNA에서)일 수 있다. 가교는 또한 2'-O,

4'-C 에틸렌 가교 (예를 들어, 에틸렌-가교된 핵산 (ENA)에서) 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 확인 가능한 임의의 다른 화학적 연결일 수 있다.

[0091] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체에서의 LNA, 그의 유사체, 또는 2'-4' 가교 변형을 갖는 다른 화학적으로 변형된 뉴클레오티드의 도입은 혼성화 안정성 뿐만 아니라 미스매치 구별을 증진시킬 수 있다. 예를 들어, 센서 핵산 가닥을 LNA, 그의 유사체, 또는 2'-4' 가교 변형을 갖는 다른 화학적으로 변형된 뉴클레오티드와 함께 포함하는 핵산 복합체는 (예를 들어, 투입 핵산 가닥과 센서 핵산 가닥 사이의 상보적 결합에서) 매칭된 및 미스매칭된 투입 핵산 가닥 사이를 구별하기 위한 증진된 감수성을 가질 수 있다.

[0092] 일부 실시양태에서, 핵산 복합체의 핵산 가닥 중 하나 이상은 가닥의 3' 및/또는 5' 말단에 연결된 화학적 모이어티를 포함할 수 있다. 말단 모이어티는 하나 이상의 임의의 적합한 말단 링커 또는 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 말단 모이어티는 올리고뉴클레오티드를 또 다른 분자 또는 특정한 표면과 연결하기 위한 링커 (비오틴, 아미노-변형체, 알킨, 티올 변형체, 아지드, N-히드록시숙신이미드, 및 콜레스테롤), 염료 (예를 들어, 형광단, Cy3, 또는 암 켄처), 플루오린 변형된 리보스, 공간 (예를 들어, C3 스페이서, 스페이서 9, 스페이서 18, d스페이서, 트리-에틸렌 글리콜 스페이서, 핵사-에틸렌 글리콜 스페이서), 클릭 화학에 수반되는 모이어티 및 화학적 변형 (예를 들어, 알킨 및 아지드 모이어티), 및 3' 및 5' 단부를 다른 화학적 모이어티, 예컨대 항체, 금 또는 다른 금속성 나노입자, 중합체 나노입자, 덴드리머 나노입자, 소분자, 단일 쇄 또는 분지형 지방산, 펩티드, 단백질, 압타머, 및 다른 핵산 가닥 및 핵산 나노구조에 부착시키는 데 사용될 수 있는 임의의 링커 또는 말단 변형을 포함할 수 있다. 말단 모이어티는 영상화 및 검출에 사용되는 형광 표지로서의 역할을 할 수 있다. 말단 모이어티는 또한 단일-가닥 핵산을 뉴클레아제 분해로부터 보호하는 하나 이상의 엑소뉴클레아제 절단-저항성 기 또는 모이어티 (예를 들어, 엑소뉴클레아제 절단-저항성 모이어티)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 말단 모이어티는 또한 RNAi 경로 효소, 예컨대 다이서 및 RISC와의 상호작용을 차단하는 차단 모이어티로서 작용할 수 있다. 말단 모이어티는 또한 핵산 전달 및 본 개시내용의 다른 곳에 기재된 특이적 세포 유형에 대한 핵산 복합체의 표적화에 사용하기에 적합한 리간드를 포함할 수 있다. 센서 핵산 가닥의 말단에 부착될 수 있는 추가의 링커 및 말단 변형은 www.idtdna.com/pages/products/custom-dna-rna/oligo-modifications and www.glenresearch.com/browse/labels-and-modifiers에 기재되어 있으며, 그의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 본원에 개시된 조성물에 사용될 수 있는 엑소뉴클레아제 차단 모이어티의 예는, 예를 들어 WO/2020/033938로서 공개된 국제 특허 출원에 기재되어 있으며, 그의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0093] 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드에 대한 추가의 변형, 예컨대 문헌 [Hu et al. (Signal Transduction and targeted Therapy 5: 101 (2020))] (그의 내용은 그 전문이 참조로 포함됨)에 기재된 변형이 또한 본원에 기재된 핵산 복합체의 하나 이상의 가닥에 도입될 수 있다.

[0094] 리보스 변형

[0095] 핵산 복합체의 변형된 뉴클레오시드의 백분율은 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체의 변형된 뉴클레오시드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 또는 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95%일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 핵산 복합체의 변형된 뉴클레오시드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 또는 적어도 약 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%, 99% 또는 100%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체의 뉴클레오티드의 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위가 변형된다 (예를 들어, 비-DNA 및 비-RNA임). 일부 실시양태에서, 핵산 복합체의 모든 뉴클레오티드는 변형된다 (예를 들어, 비-DNA 및 비-RNA임).

[0096] 핵산 복합체의 하나 이상의 가닥 내의 변형된 뉴클레오시드의 백분율은 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 코어 핵산 가닥 내의 변형된 뉴클레오시드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 또는 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95%일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 코어 핵산 가닥 내의 변형된 뉴클레오시드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 또는 적어도 약 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%, 99% 또는 100%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다. 일부 실시양태에

서, 코어 핵산 가닥의 모든 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형된다.

- [0097] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 코어 핵산 가닥의 제1 영역 내의 변형된 뉴클레오타이드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 또는 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95%일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 코어 핵산 가닥의 제1 영역 내의 변형된 뉴클레오타이드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 또는 적어도 약 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%, 99%, 또는 100%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제1 영역의 모든 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형된다.
- [0098] 본원에 기재된 코어 핵산 가닥의 제2 영역 내의 변형된 뉴클레오타이드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 또는 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95%일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 코어 핵산 가닥의 제2 영역 내의 변형된 뉴클레오타이드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 또는 적어도 약 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%, 99%, 또는 100%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제2 영역의 모든 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형된다.
- [0099] 본원에 기재된 패신저 핵산 가닥 내의 변형된 뉴클레오타이드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 또는 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95%일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 패신저 핵산 가닥 내의 변형된 뉴클레오타이드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 또는 적어도 약 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%, 99% 또는 100%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥의 모든 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형된다.
- [0100] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 센서 핵산 가닥 내의 변형된 뉴클레오타이드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 또는 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95%일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 센서 핵산 가닥 내의 변형된 뉴클레오타이드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 또는 적어도 약 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%, 99%, 또는 100%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서, 센서 핵산 가닥의 모든 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형된다.
- [0101] 코어 핵산 가닥, 패신저 핵산 가닥 및 센서 핵산 가닥 중 하나 이상에서의 변형된 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드 및/또는 2'-F 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0102] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체 내의 2'-O-메틸 뉴클레오타이드 및/또는 2'-F 뉴클레오타이드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 적어도 약, 최대, 또는 최대 약 10%-50%일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 핵산 복합체 내의 2'-O-메틸 뉴클레오타이드 및/또는 2'-F 뉴클레오타이드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 적어도 약, 최대, 또는 최대 약 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%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다.
- [0103] 본원에 기재된 코어 핵산 가닥 내의 2'-O-메틸 뉴클레오타이드 및/또는 2'-F 뉴클레오타이드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 적어도 약, 최대, 또는 최대 약 10%-50%일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 코어 핵산 가닥 내의 2'-O-메틸 뉴클레오타이드 및/또는 2'-F 뉴클레오타이드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 적어도 약, 최대, 또는 최대 약 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%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다.
- [0104] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 패신저 핵산 가닥 내의 2'-O-메틸 뉴클레오타이드 및/또는 2'-F 뉴클레오타이드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 적어도 약, 최대, 또는 최대 약 10%-50%일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 패신저 핵산 가닥 내의 2'-O-메틸 뉴클레오타이드 및/또는 2'-F 뉴클레오타이드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 적어도 약, 최대, 또는 최대 약 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%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다.

[0105] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 센서 핵산 가닥 내의 2'-O-메틸 뉴클레오시드 및/또는 2'-F 뉴클레오시드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 적어도 약, 최대, 또는 최대 약 10%-50%일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 센서 핵산 가닥 내의 2'-O-메틸 뉴클레오시드 및/또는 2'-F 뉴클레오시드의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 적어도 약, 최대, 또는 최대 약 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%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다.

[0106] 포스페이트 변형

[0107] 본원에 기재된 핵산 복합체 내의 뉴클레오티드에 대한 포스페이트 변형의 백분율은 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 변형은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이거나 또는 그를 포함한다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥 내의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결의 백분율은 5% 미만, 10% 미만, 25% 미만, 50% 미만, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위이다. 예를 들어, 코어 핵산 가닥 내 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결의 백분율은 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%, 그 미만, 또는 대략 그 미만, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위이다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥은 2개 이하의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결 변형을 포함하지 않는다.

[0108] 코어 핵산 가닥 내의 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결의 백분율은 약, 적어도, 또는 적어도 약 50%, 80% 또는 95%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다. 예를 들어, 코어 핵산 가닥 내 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결의 백분율은 약, 적어도, 또는 적어도 약 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%, 99%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위이다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥 내 모든 뉴클레오시드간 연결은 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결이다.

[0109] 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제1 영역의 3' 말단은 적어도 1개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결 (예를 들어, 1, 2 또는 3개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결)을 포함한다. 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결은 코어 핵산 가닥의 제1 영역의 3' 말단에서 마지막 2, 3, 또는 4개의 뉴클레오시드들 사이에 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제1 영역의 5' 말단은 적어도 1개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결 (예를 들어, 1, 2 또는 3개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결)을 포함한다. 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결은 코어 핵산 가닥의 제1 영역의 5' 말단에서 마지막 2, 3, 또는 4개의 뉴클레오시드들 사이에 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제1 영역의 5' 말단 및 코어 핵산 가닥의 제1 영역의 3' 말단 각각은 독립적으로 1개 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결 (예를 들어, 1, 2 또는 3개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 제1 영역의 5' 말단, 3' 말단, 또는 둘 다에서 마지막 2 또는 3개의 뉴클레오시드들 사이의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결(들)을 제외하고는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하지 않는다. 예를 들어, 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 제1 영역의 5' 말단에서 마지막 3개의 뉴클레오시드들 및 3' 말단에서 마지막 3개의 뉴클레오시드들 사이의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결(들)을 제외하고는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하지 않는다.

[0110] 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제2 영역 내의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결의 백분율은 5% 미만, 10% 미만, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위이다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제2 영역은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하지 않는다.

[0111] 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥은 1개 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함한다. 패신저 핵산 가닥 내의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결의 백분율은 5% 미만, 10% 미만, 25% 미만, 50% 미만, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다. 예를 들어, 패신저 핵산 가닥 내의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결의 백분율은 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%, 그 미만, 또는 대략 그 미만, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위이다.

[0112] 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥의 5' 말단은 1개 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결 (예를 들어, 1, 2 또는 3개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥의 3' 말단은 적어도 1개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결 (예를 들어, 1, 2 또는 3개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥의 5' 말단 및 패신저 핵산 가닥의 3' 말단 각각은 독립적으로 1개 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결 (예를 들어, 1, 2 또는 3개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥은 패신저 핵산 가닥의 5' 말단, 3' 말단, 또는 둘 다에서 마지막 2, 3 또는 4개의 뉴클레오시드들 사이의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결(들)을 제외하고는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥은 패신저 핵산 가닥의 5' 말단에서 마지막 2 내지 3개의 뉴클레오시드들 및 3' 말단에서 마지막 2 내지 3개의 뉴클레오시드들 사이의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결(들)을 제외하고는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하지 않는다.

[0113] 센서 핵산 가닥은 1개 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함할 수 있다. 센서 핵산 가닥 내의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결의 백분율은 5% 미만, 10% 미만, 25% 미만, 50% 미만, 60% 미만, 70% 미만, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다. 예를 들어, 센서 핵산 가닥 내의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결의 백분율은 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%, 그 미만, 또는 대략 그 미만, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위이다.

[0114] 일부 실시양태에서, 센서 핵산 가닥의 5' 말단은 적어도 1개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결 (예를 들어, 1, 2 또는 3개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센서 핵산 가닥의 3' 말단은 적어도 1개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결 (예를 들어, 1 내지 20개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센서 핵산 가닥의 5' 말단 및 센서 핵산 가닥의 3' 말단 각각은 독립적으로 1개 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결 (예를 들어, 5' 말단에 1, 2 또는 3개 또는 3' 말단에 1 내지 20개)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센서 핵산 가닥은 패신저 핵산 가닥의 5' 말단, 3' 말단, 또는 둘 다에서의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결(들)을 제외하고는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥의 3' 말단에서의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결은 패신저 핵산 가닥의 단일-가닥 오버행 내에 있다.

[0115] LNA, 그의 유사체 및 2'-4'가교 변형

[0116] 핵산 복합체의 LNA 또는 그의 유사체의 백분율은 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체의 LNA 또는 그의 유사체의 백분율은 약 10%-50%일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 핵산 복합체의 LNA 또는 그의 유사체의 백분율은 약, 최대, 최대 약 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%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다.

[0117] 핵산 복합체의 하나 이상의 가닥 내의 LNA 또는 그의 유사체의 백분율은 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 코어 핵산 가닥 내의 LNA 또는 그의 유사체의 백분율은 정확히, 약, 최대, 또는 최대 약 5%, 10% 또는 15%일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 코어 핵산 가닥의 LNA 또는 그의 유사체의 백분율은 정확히, 약, 최대, 또는 최대 약 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다.

[0118] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 패신저 핵산 가닥 내의 LNA 또는 그의 유사체의 백분율은 정확히, 약, 최대, 또는 최대 약 5%, 10% 또는 15%일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 패신저 핵산 가닥의 LNA 또는 그의 유사체의 백분율은 정확히, 약, 최대, 또는 최대 약 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서, 5% 초과, 10% 초과, 또는 15% 초과 의 본원에 기재된 패신저 핵산 가닥 내의 LNA 또는 그의 유사체의 백분율은 핵산 복합체의 RNAi 활성을 감소시킬 수 있다.

- [0119] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 센서 핵산 가닥 내의 LNA 또는 그의 유사체의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 적어도 약, 최대, 또는 최대 약 10%-50%일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 센서 핵산 가닥의 LNA 또는 그의 유사체의 백분율은 정확히, 약, 적어도, 적어도, 최대, 또는 최대 약 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%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다.
- [0120] 핵산 복합체의 2'-4' 가교 변형의 백분율은 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체의 2'-4' 가교 변형의 백분율은 약 10%-50%일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 핵산 복합체의 2'-4' 가교 변형의 백분율은 약, 최대, 최대 약 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%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다.
- [0121] 코어 가닥
- [0122] 본원에 기재된 핵산 복합체의 코어 핵산 가닥은 제1 영역 및 제2 영역을 포함할 수 있다. 제1 영역은 제2 영역의 3' 방향에 있다.
- [0123] 코어 핵산 가닥의 길이는 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥은 20-60개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들어, 코어 핵산 가닥은 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 또는 60개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 코어 핵산 가닥의 제1 영역의 길이는 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 10-30개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들어, 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 17-22개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0124] 코어 핵산 가닥의 제2 영역의 길이는 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제2 영역의 길이는 10-30개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들어, 코어 핵산 가닥의 제2 영역은 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 코어 핵산 가닥의 제1 영역 및 제2 영역은 동일한 길이 또는 상이한 길이를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제2 영역은 코어 핵산 가닥의 제1 영역에 비해 비교적 짧은 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제2 영역은 약 14개의 연결된 뉴클레오타이드를 갖는다.
- [0125] 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 표적 RNA에 상보적인 서열을 포함한다. 표적 RNA에 상보적인 서열의 길이는 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 RNA에 상보적인 서열은 10-35개 뉴클레오타이드 길이이다. 예를 들어, 표적 RNA에 상보적인 서열은 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, 또는 35개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 표적 RNA에 상보적인 서열은 10-21개 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0126] 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 패신저 핵산 가닥에 상보적인 서열을 포함한다. 패신저 핵산 가닥에 상보적인 서열의 길이는 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥에 상보적인 서열은 17-22개 뉴클레오타이드 길이이다. 예를 들어, 패신저 핵산 가닥에 상보적인 서열은 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥에 상보적인 코어 핵산 가닥의 서열은 약 21개 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0127] 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 커넥터를 통해 코어 핵산 가닥의 제2 영역에 연결된다. 예를 들어, 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 5' 커넥터를 통해 코어 핵산 가닥의 제2 영역에 연결된다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥은 단지 1개의 커넥터 (예를 들어, 5' 커넥터)를 포함하고, 3' 커넥터를 포함하지 않는다.
- [0128] 5' 커넥터는 3-탄소 링커 (C_3 링커), 뉴클레오타이드, 본원에 기재된 임의의 변형된 뉴클레오타이드, 또는 코어 핵산 가닥이 단일-가닥인 경우 (예를 들어, 코어 핵산 가닥으로부터의 센서 핵산 가닥의 치환 후) 엑소뉴클레아제 절단에 저항할 수 있는 임의의 모이어티를 포함할 수 있다. 예를 들어, 5' 커넥터는 2'-F 뉴클레오타이드, 예컨대 2'-F-아데노신, 2'-F-구아노신, 2'-F-우리딘, 또는 2'-F-시티딘을 포함할 수 있다. 5' 커넥터는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 예컨대 2'-O-메틸아데노신, 2'-O-메틸구아노신, 2'-O-메틸우리딘, 또는 2'-O-메틸시티딘을 포함

할 수 있다. 5' 커넥터는 자연 발생 뉴클레오타이드, 예컨대 시티딘, 우리딘, 아데노신 또는 구아노신을 포함할 수 있다. 코어 핵산 가닥의 5' 커넥터는 단일-가닥 형태인 경우 엑소뉴클레아제에 의해 절단가능한 포스포디에스테르 연결 (포스포디에스테르 5' 및 3' 연결)을 포함할 수 있다. 코어 핵산 가닥의 5' 커넥터 및/또는 3' 커넥터는 단일-가닥 형태인 경우 엑소뉴클레아제 절단에 저항할 수 있는 임의의 적합한 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 5' 커넥터는 2개의 인접한 뉴클레오타이드를 연결하는 정상 포스포디에스테르 연결을 제외하고는 링커 분자를 포함하지 않는다 (예를 들어, 도 1-2에 제시된 CASi 설계 참조).

[0129] 5' 커넥터는 C₃ 3-탄소 링커, 뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 (예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 2'-F 뉴클레오타이드), 단일 가닥 형태인 경우 엑소뉴클레아제에 의해 절단가능한 포스포디에스테르 5' 및 3' 연결을 갖는 뉴클레오타이드, 또는 그의 조합이거나 또는 그를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 5' 커넥터는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 예컨대 2'-O-메틸아데노신, 2'-O-메틸구아노신, 2'-O-메틸우리딘, 또는 2'-O-메틸시티딘 이거나 또는 그를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 5' 커넥터는 2'-F 뉴클레오타이드, 예컨대 2'-F-아데노신, 2'-F-구아노신, 2'-F-우리딘, 또는 2'-F-시티딘이거나 또는 그를 포함할 수 있다.

[0130] 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 5' 커넥터는 C₃ 3-탄소 링커가 아니거나 또는 그를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 5' 커넥터로서 C₃ 3-탄소 링커를 갖지 않는 것이 유리하다.

[0131] 일부 실시양태에서, 5' 커넥터로서 C₃ 3-탄소 링커를 갖지 않는 핵산 복합체가 보다 높은 RNA 간섭 활성을 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 5' 커넥터로서 C₃ 3-탄소 링커를 갖지 않는 것은 핵산 복합체의 RNA 간섭 활성을 5' 커넥터로서 C₃ 3-탄소 링커를 갖는 핵산 복합체보다 적어도 약 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 또는 임의의 이들 값 사이의 수 또는 범위만큼 더 크게 증가시킬 수 있다.

[0132] 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥은 5' 커넥터를 포함하지 않는다. 대신에, 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 2개의 인접한 뉴클레오타이드를 연결하는 표준 포스포디에스테르 연결을 통해 제2 영역에 연결된다.

[0133] 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제1 영역과 제2 영역 사이에 5' 커넥터를 갖지 않는 것은 핵산 복합체의 RNA 간섭 활성을 5' 커넥터로서 링커 (예를 들어, C₃ 3-탄소 링커, 뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드, 또는 다른 모이어티)를 갖는 핵산 복합체보다 적어도 약 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배 또는 임의의 이들 값 사이의 수 또는 범위만큼 더 크게 증가시킬 수 있다.

[0134] 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥은 오버행을 갖는다. 오버행은 코어 핵산 가닥의 3' 말단에 있을 수 있다 (3' 오버행). 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥은 3' 말단에 짧은 오버행 (예를 들어, 1-3개의 뉴클레오타이드)을 가질 수 있지만, 3' 오버행은 센서 듀플렉스의 중간으로 다시 연장되어 센서 핵산 가닥과 결합하지 않는다 (예를 들어, 도 1-2 참조). 오버행의 길이는 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 3' 오버행은 약 1 내지 3개 뉴클레오타이드 길이이다. 예를 들어, 3' 오버행은 1, 2 또는 3개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 오버행은 1개 이상의 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 2'-O-메틸 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 3' 오버행은 2개의 2'-O-메틸 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다 (예를 들어, 도 1-2에 나타난 CASi 설계 참조). 오버행은 변형된 뉴클레오타이드간 연결, 예컨대 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 오버행 내의 모든 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형된다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 3' 오버행 내의 모든 뉴클레오타이드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결이다.

[0135] 패신저 핵산 가닥

[0136] 본원에 기재된 핵산 복합체의 패신저 핵산 가닥은 코어 핵산 가닥의 제1 영역에 상보적으로 결합하여 RNAi 듀플렉스 (예를 들어, 제1 핵산 듀플렉스)를 형성한다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제1 영역은 표적 핵산 가닥에 상보적인 서열을 포함하고, 핵산 복합체의 패신저 핵산 가닥은 표적 핵산 가닥에 상동성인 서열을 포함할 수 있다.

[0137] 본원에 사용된 용어 "상동" 또는 "상동성"은 적어도 2개의 서열 사이의 서열 동일성을 지칭한다. 2개의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여 용어 "서열 동일성" 또는 "동일성"은 명시된 비교 윈도우에 걸쳐 최대 상응성을 위해 정렬될 때 동일한 2개의 서열 내의 뉴클레오타이드 염기 또는 잔기를 지칭한다.

- [0138] 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥과 표적 핵산 또는 그의 부분 사이의 서열 동일성은 정확히, 약, 적어도, 또는 적어도 약 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%, 99%, 100%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다. 핵산 복합체의 패신저 핵산 가닥은 표적 핵산 또는 그의 일부에 대해 실질적으로 동일한, 예를 들어 적어도 80%, 90% 또는 100% 동일한 서열을 가질 수 있다.
- [0139] 패신저 핵산 가닥의 길이는 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥은 10-35개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들어, 코어 핵산 가닥은 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, 또는 35개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥은 17-21개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0140] 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥은 RNAi 듀플렉스에서 3' 오버행, 5' 오버행, 또는 둘 다를 갖는다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥은 3' 오버행을 갖고, 3' 오버행은 1 내지 5개 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0141] 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥의 오버행은 투입 핵산 가닥에 결합하여 토홀드를 형성할 수 있고, 그에 의해 토홀드 매개된 가닥 치환을 개시하고 코어 핵산 가닥으로부터의 패신저 핵산 가닥의 치환을 유발한다.
- [0142] 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥의 오버행은 5 내지 20개 뉴클레오타이드 길이이다. 예를 들어, 패신저 핵산 가닥의 오버행은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥의 오버행은 9개 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0143] 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥의 오버행의 1개 이상의 뉴클레오타이드간 연결은 오버행을 분해로부터 보호할 수 있는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결이다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥의 오버행의 모든 뉴클레오타이드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결일 수 있다.
- [0144] 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥은 코어 핵산 가닥의 제1 영역에 완전히 상보적이어서, RNAi 듀플렉스에서 패신저 핵산 가닥의 5' 및 3' 말단에 오버행을 형성하지 않는다. 따라서, 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥은 RNAi 듀플렉스에서 3' 오버행, 5' 오버행, 또는 둘 다를 갖지 않는다. 일부 실시양태에서, 오버행을 갖지 않는 평활 단부를 갖는 것은 패신저 핵산 가닥을 다이스 결합에 불리하게 만들고, 그에 의해 다이스-매개 절단을 우회할 수 있다.
- [0145] 일부 실시양태에서, 패신저 핵산 가닥은 말단 모이어티 및/또는 차단 모이어티에 부착된다. 패신저 핵산 가닥이 RNAi 경로 효소 (예를 들어, 다이스, RISC)와 상호작용하는 것을 차단할 수 있는 본원에 기재된 임의의 적합한 말단 모이어티가 사용될 수 있다. 차단 모이어티는 하나 이상의 적합한 말단 링커 또는 변형, 예컨대 단일-가닥 핵산을 뉴클레아제 분해로부터 보호할 수 있는 블로커, 예컨대 엑소뉴클레아제 차단 모이어티를 포함할 수 있다. 적합한 차단 모이어티의 예는 염료 (예를 들어, 형광단, Cy3, 암 켄처), 역전된 dT, 올리고뉴클레오타이드를 또 다른 분자 또는 특정한 표면과 연결하기 위한 링커 (비오틴, 아미노-변형제, 알킨, 티올 변형제, 아지드, N-히드록시숙신이미드, 및 콜레스테롤), 공간 (예를 들어, C3 스페이서, 스페이서 9, 스페이서 18, d스페이스, 트리-에틸렌 글리콜 스페이서, 헥사-에틸렌 글리콜 스페이서), 지방산, 1개 이상의 변형된 뉴클레오타이드 (예를 들어, 2'-O-메틸, 2'-F, PS 백본 연결, LNA, 및/또는 2'-4' 가교된 염기) 또는 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 패신저 핵산의 5' 말단은 역전된-dT, 트리-에틸렌-글리콜, 또는 형광단에 부착된다. 예를 들어, 형광단은 포스포로티오에이트 연결을 통해 패신저 핵산 가닥의 5' 말단에 부착될 수 있다.
- [0146] 센서 핵산 가닥
- [0147] 본원에 기재된 핵산 복합체의 센서 핵산 가닥은 코어 핵산 가닥의 제2 영역에 상보적인 영역을 포함하여 센서 듀플렉스 (예를 들어, 제2 핵산 듀플렉스)를 형성한다. 코어 핵산 가닥의 제2 영역에 상보적인 영역의 길이는 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제2 영역에 상보적인 영역은 10-35개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들어, 코어 핵산 가닥의 제2 영역에 상보적인 센서 핵산 가닥 내의 영역은 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, 또는 35개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제2 영역에 상보적인 센서 핵산 가닥 내의 영역은 10-30개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 핵산 가닥의 제2 영역에 상보적인 센서 핵산 가닥 내의 영역은 약 14개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함한다.

- [0148] 센서 핵산 가닥은 코어 핵산 가닥의 제1 영역에 결합하지 않고 코어 핵산 가닥의 제1 영역의 임의의 영역 3'에도 결합하지 않는다.
- [0149] 센서 핵산 가닥은 오버행을 포함할 수 있다. 오버행은 센서 핵산 가닥의 3' 단부 또는 5' 단부, 또는 둘 다에 있을 수 있다. 예를 들어, 오버행은 코어 핵산 가닥의 제2 영역에 결합된 상보적인 영역의 3'에 있을 수 있다. 오버행은 코어 핵산 가닥에 상보적이지 않고, 투입 핵산 가닥에 결합할 수 있으며, 그에 의해 토홀드 매개 가닥 치환을 개시하고 코어 핵산 가닥으로부터의 센서 핵산 가닥의 치환을 유발한다.
- [0150] 센서 핵산 가닥에서 오버행의 길이는 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 오버행의 길이는 5-20개의 연결된 뉴클레오티드일 수 있다. 예를 들어, 센서 핵산 가닥에서 오버행의 길이는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 뉴클레오티드 길이를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 센서 핵산 가닥의 오버행은 12개 뉴클레오티드 길이이다.
- [0151] 센서 핵산 가닥의 오버행은 염기-쌍형성 친화도, 단일-가닥 오버행의 뉴클레아제 저항성, 및 가닥의 허위 엑소 뉴클레아제 유도된 활성화를 피하기 위한 열역학적 안정성을 개선시키기 위해 도입된 뉴클레오티드 변형을 포함할 수 있다. 예시적인 변형은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 확인가능한 2'-O-메틸 변형, 2'-플루오로 변형, 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결, LNA의 포함 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 센서 핵산 가닥의 오버행 내의 뉴클레오시드간 연결의 적어도 50%는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다. 예를 들어, 센서 핵산 가닥의 오버행 내의 뉴클레오시드간 연결의 적어도 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%, 99%, 또는 임의의 2개의 값 사이의 수 또는 범위는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다. 일부 실시양태에서, 센서 핵산 가닥의 오버행 내의 모든 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다.
- [0152] 센서 핵산 가닥의 5' 말단 및/또는 3' 말단은 말단 모이어티를 포함할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 적합한 말단 모이어티가 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 말단 모이어티는 트리- 또는 헥사-에틸렌 글리콜 스페이서, C3 스페이서, 역전된 dT, 아민 링커, 리간드 (예를 들어, 전달 리간드), 형광단, 엑소뉴클레아제, 지방산, Cy3, 트리-에틸렌 글리콜에 부착된 역전된 dT, 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 센서 핵산 가닥의 3' 말단은 전달 리간드, 염료 (예를 들어, 형광단) 또는 엑소뉴클레아제에 부착될 수 있다. 5' 말단은 지방산, 염료 (예를 들어, Cy3), 역전된 dT, 트리-에틸렌 글리콜, 또는 트리-에틸렌 글리콜에 부착된 역전된 dT에 부착될 수 있다. 3' 말단에 부착된 전달 리간드는 핵산 복합체를 본 개시내용의 다른 곳에 기재된 특이적 세포 유형에 표적화하는 데 사용하기 위한 임의의 적합한 리간드일 수 있다. 일부 실시양태에서, 전달 리간드는 팔미트산이다. 일부 실시양태에서, 팔미트산은 센서 핵산 가닥의 3' 말단에 부착된다. 일부 실시양태에서, 센서 핵산의 3' 말단에 부착된 팔미트산이 있는 센서 핵산 가닥을 포함하는 핵산 복합체 구축물은 3' 말단 팔미트산이 없는 상응하는 구축물과 비교하여 표적 핵산의 보다 높은 정도의 억제력을 달성할 수 있다.
- [0153] 센서 핵산 가닥의 서열은 투입 핵산 가닥 또는 그의 일부를 감지하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 투입 바이오마커의 서열로부터, 투입 가닥에 대해 안티센스인 모든 가능한 센서 절편의 목록이 생성될 수 있다. 표적 동물의 트랜스크립토미에서의 고유성에 대한 센서 서열을 NCBI BLAST를 사용하여 순위화할 수 있다. 인간 암 세포주의 경우, 서열을 BLASTn 알고리즘을 사용하여 인간 전사체 및 게놈 수집에 대해 체크할 수 있다. 일부 실시양태에서, 공지된 또는 예측된 RNA 전사체에 대해 17개 초과 염기의 서열 상보성 및 완전한 오버행 상보성을 갖는 센서 절편이 제거될 수 있다. 본원에 기재된 핵산 복합체에 사용될 수 있는 센서 핵산 가닥의 설계 특색의 예는, 예를 들어 WO/2020/033938에 기재되어 있으며, 그의 내용은 본원에 참조로 포함된다.
- [0154] 투입 핵산 가닥
- [0155] 본원에 기재된 투입 핵산 가닥은 핵산 복합체 내의 센서 핵산의 서열에 결합 시 핵산 복합체 (예를 들어, RNAi 듀플렉스)의 RNA 간섭 활성을 활성화 (스위치 온)시키는 촉발인자로서 작용한다.
- [0156] 투입 핵산 가닥은 핵산 복합체의 센서 핵산 내의, 예컨대 센서 핵산의 오버행 영역 내의 서열에 상보적인 서열을 포함한다. 투입 핵산 가닥과 센서 핵산 가닥 (예를 들어, 오버행) 사이의 상보적 결합은 코어 핵산 가닥으로부터의 센서 핵산 가닥의 치환을 유발하고, 그에 의해 패신저 핵산 가닥 및 코어 핵산 가닥의 제1 영역에 의해 형성된 RNAi 듀플렉스의 RNA 간섭 활성을 활성화시킨다.
- [0157] 투입 핵산 가닥은 표적 세포 (예를 들어, 암 세포)의 세트에서 비교적 높은 발현 수준으로 및 비-표적 세포 (예

를 들어, 정상 세포)의 세트에서 비교적 낮은 발현 수준으로 존재하는 세포 RNA 전사체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체는 표적 세포에서 활성화 (스위치 온)되는 반면에; 비-표적 세포에서, 핵산 복합체는 불활성화 상태 (스위치 오프)로 유지된다.

- [0158] 표적 세포에서, 투입 핵산 가닥은 비-표적 세포에서보다 정확히, 약, 적어도, 또는 적어도 약 2배, 5배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 또는 100배 더 높은 수준으로 발현될 수 있다.
- [0159] 표적 세포에서, 투입 핵산 가닥은 정확히, 약, 적어도, 적어도 약 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000개 전사체의 수준으로 발현될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-표적 세포에서, 투입 핵산 가닥은 50개 미만, 40개 미만, 30개 미만, 20개 미만, 또는 10개 미만의 전사체의 수준으로 발현된다. 바람직하게는, 비-표적 세포는 투입 핵산 가닥의 검출가능한 발현을 갖지 않는다.
- [0160] 투입 핵산 가닥은 mRNA, miRNA, 또는 비-코딩 RNA, 예컨대 바이러스의 긴 비-코딩 RNA, RNA 단편, 또는 RNA 전사체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 투입 핵산 가닥은, 질환의 진행을 유발하고 이에 따라 RNAi 요법에 표적화된 세포의 세트에서 발현되는 RNA 전사체이다. 비-표적 세포는 통상적으로 표적 RNA의 침묵이 요법에 유익하지 않은 부작용을 유발할 수 있는 세포의 세트이다. 투입 RNA가 표적 세포에서 과다발현되는 질환 또는 상태를 치료하기 위해, 센서 핵산 가닥이 투입 RNA 서열에 상보적인 서열을 포함하도록 핵산 복합체를 설계할 수 있다. 핵산 복합체의 투여 시, 투입 RNA에 대한 센서 핵산 가닥의 결합은 표적 세포에서 센서 듀플렉스로부터의 RNAi 듀플렉스의 해리를 유도함으로써 질환 또는 상태를 표적화하는 RNAi를 활성화시킨다.
- [0161] 일부 실시양태에서, 투입 핵산 가닥은 바이오마커를 포함한다. 용어 "바이오마커"는 질환 또는 장애, 질환 또는 장애에 대한 감수성, 및/또는 치료 또는 다른 개입에 대한 반응의 지표인 핵산 서열 (DNA 또는 RNA)을 지칭한다. 바이오마커는 유전자의 발현, 기능 또는 조절을 반영할 수 있다. 투입 핵산 가닥은 관련 기술분야에 공지된 임의의 질환 바이오마커를 포함할 수 있다.
- [0162] 일부 실시양태에서, 투입 핵산 가닥은 mRNA, 예를 들어 세포 유형 또는 세포 상태 특이적 mRNA이다. 세포 유형 또는 세포-상태 특이적 mRNA의 예는 C3, GFAP, NPPA, CSF1R, SLC1A2, PLP1, 및 MBP mRNA를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 투입 핵산은 hsa-mir-23a-3p, hsa-mir-124-3p 및 hsa-mir-29b-3p를 포함하나 이에 제한되지는 않는 마이크로RNA (miRNA로도 공지됨)이다. 일부 실시양태에서, 투입 핵산 가닥은 비-코딩 RNA, 예를 들어 MALAT1 (전이 연관 폐 선암종 전사체 1, NEAT2 (비코딩 핵-풍부화된 풍부 전사체 2)로도 공지됨)이다.
- [0163] 표적 RNA
- [0164] 코어 핵산 가닥의 제1 영역은, 예를 들어 표적-특이적 RNA 간섭을 지시하기 위해 표적 RNA에 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 RNA는 세포 RNA 전사체이다. 표적 RNA는 mRNA, miRNA, 비-코딩 RNA, 바이러스 RNA 전사체, 또는 그의 조합일 수 있다.
- [0165] 본원에 사용된 "표적 RNA"는 그의 발현이 RNA 간섭을 통해 선택적으로 억제 또는 침묵되는 RNA를 지칭한다. 표적 RNA는 그의 발현 또는 활성이 질환, 장애 또는 상태와 연관된 임의의 세포 유전자 또는 유전자 단편을 포함하는 표적 유전자일 수 있다. 표적 RNA는 또한 그의 발현 또는 활성이 질환, 장애 또는 특정 상태와 연관된 외래 또는 외인성 RNA 또는 RNA 단편 (예를 들어, 바이러스 RNA 전사체 또는 프로-바이러스 유전자)일 수 있다.
- [0166] 표적 RNA는 종양유전자, 시토키닌 유전자, 이디오타입 단백질 유전자 (Id 단백질 유전자), 프리온 유전자, 혈관 신생을 유도하는 단백질을 발현하는 유전자, 부착 분자, 세포 표면 수용체, 전이 및/또는 침습 과정에 수반되는 단백질의 유전자, 프로테이나제의 유전자, 아폽토시스 및 세포 주기를 조절하는 단백질의 유전자, EGF 수용체를 발현하는 유전자, 다중-약물 내성 1 유전자 (MDR1), 인간 유두종 바이러스, C형 간염 바이러스 또는 인간 면역 결핍 바이러스의 유전자, 심장 비대에 수반되는 유전자, 또는 그의 단편을 포함할 수 있다.
- [0167] 표적 RNA는 아폽토시스에 수반되는 단백질을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 예시적인 표적 RNA 유전자는 bcl-2, p53, 카스파제, 세포독성 시토카인, 예컨대 TNF- α 또는 Fas 리간드, 및 아폽토시스를 매개할 수 있는 것으로 관련 기술분야에 공지된 다수의 다른 유전자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 표적 RNA는 세포 성장에 수반되는 유전자를 포함할 수 있다. 예시적인 표적 RNA 유전자는 종양유전자 (예를 들어, ABLI, BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSF1R, ERBA, ERBB, EBRB2, ETSI, ETSI, ETV6, FGR, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM 1, PML, RET, SRC, TALI, TCL3, 및 YES를 코딩하는 유전자), 뿐만 아니라 종양 억제 단백질 (예를 들어, APC, BRCA1, BRCA2, MADH4, MCC, NF 1, NF2, RB 1, TP53, 및 WTI)을 코딩하는 유전자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 표적 RNA는 인간 주요 조직적합성

복합체 (MHC) 유전자 또는 그의 단편을 포함할 수 있다. 예시적인 MHC 유전자는 MHC 부류 I 유전자, 예컨대 부류 I cc쇄 유전자에 대한 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C 하위영역 내의 유전자, 또는 β_2 -미크로글로불린 및 MHC 부류 II 유전자, 예컨대 부류 II α 쇄 및 β 쇄 유전자의 DP, DQ 및 DR 하위영역의 유전자 중 임의의 것 (즉, DP α , DP β , DQ α , DQ β , DR α 및 DR β)을 포함한다.

[0168] 표적 RNA는 병원체-연관 단백질을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 병원체 연관 단백질은 숙주의 면역억제, 병원체의 복제, 병원체의 전파, 또는 감염의 유지에 수반되는 바이러스 단백질, 또는 병원체의 숙주 내로의 진입, 병원체 또는 숙주에 의한 약물 대사, 병원체의 게놈의 복제 또는 통합, 숙주에서의 감염의 확립 또는 확산, 또는 차세대 병원체의 조립을 용이하게 하는 숙주 단백질을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 병원체는 바이러스, 예컨대 헤르페스바이러스 (예를 들어, 단순 포진, 수두-대상포진 바이러스, 엡스타인-바르 바이러스, 시토크로바이러스 (CMV)), C형 간염, HIV, JC 바이러스), 박테리아 또는 효모일 수 있다.

[0169] 표적 RNA는 중추 신경계 (CNS)의 질환 또는 상태와 연관된 유전자를 포함할 수 있다. CNS 질환 또는 상태와 연관된 예시적인 유전자는 APP, MAPT, SOD1, BACE1, CASP3, TGM2, NFE2L3, TARDBP, ADRB1, CAMK2A, CBLN1, CDK5R1, GABRA1, MAPK10, NOS1, NPTX2, NRG1, NTS, PDCD2, PDE4D, PENK, SYT1, TTR, FUS, LRDD, CYBA, ATF3, ATF6, CASP2, CASP1, CASP7, CASP8, CASP9, HRK, C1QB, BNIP3, MAPK8, MAPK14, Rac1, GSK3B, P2RX7, TRPM2, PARG, CD38, STEAP4, BMP2, GJA1, TYROBP, CTGF, ANXA2, RHOA, DUOX1, RTP801, RTP801L, NOX4, NOX1, NOX2 (gp91pho, CYBB), NOX5, DUOX2, NOXO1, NOXO2 (p47phox, NCF1), NOXA1, NOXA2 (p67phox, NCF2), p53 (TP53), HTRA2, KEAP1, SHC1, ZNHIT1, LGALS3, HI95, SOX9, ASPP1, ASPP2, CTSD, CAPNS1, FAS 및 FASLG, NOGO 및 NOGO-R; TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, IL1bR, MYD88, TICAM, TIRAP, 및 HSP47을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0170] 제약 조성물 및 투여 방법

[0171] 조성물

[0172] 또한, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 복합체를 1종 이상의 상용성이고 제약상 허용되는 담체와 조합하여 포함하는 제약 조성물이 본원에 제공된다.

[0173] 본원에 기재된 핵산 복합체는 적합하게 제제화되고, 구축물의 충분한 부분이 세포에 진입하여 이것이 발생하는 경우 유전자 침묵을 유도하도록 하는 임의의 수단에 의해 세포 환경 내로 도입될 수 있다.

[0174] 핵산 복합체는 전달 동안 흡수(uptake), 분포 및/또는 흡수(absorption)의 보조를 위해 다른 분자, 분자 구조, 화합물 또는 작용제의 혼합물, 또는 다른 제제와 혼합, 캡슐화, 접합 또는 회합될 수 있다.

[0175] 어구 "제약상 허용되는"은 타당한 의학적 판단의 범주 내에서 합리적인 이익/위험 비에 상응하게 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 이들 작용제, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 지칭하기 위해 본원에 사용된다.

[0176] 본원에 사용된 어구 "제약상 허용되는 담체"는 대상 화학물질을 신체의 한 기관 또는 부분으로부터 신체의 또 다른 기관 또는 부분으로 운반 또는 수송하는 데 수반되는 제약상 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클, 예컨대 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질을 의미한다. 각각의 담체는 제제의 다른 성분과 상용성이고 대상체에게 유해하지 않다는 의미에서 "허용되는" 것이어야 한다. 제약상 허용되는 담체로서의 역할을 할 수 있는 물질의 일부 예는 다음을 포함한다: (1) 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; (2) 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; (3) 셀룰로스 및 그의 유도체, 예컨대 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; (4) 분말화 트라가칸트; (5) 맥아; (6) 젤라틴; (7) 활석; (8) 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌제 왁스; (9) 오일, 예컨대 땅콩 오일, 목화씨 오일, 홍화 오일, 참깨 오일, 올리브 오일, 옥수수 오일 및 대두 오일; (10) 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; (11) 폴리올, 예컨대 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; (12)에스테르, 예컨대 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; (13) 찬천; (14) 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; (15) 알긴산; (16) 발열원-무함유 물; (17) 등장성 염수; (18) 링거액; (19)에틸 알콜; (20) 포스페이트 완충제 용액; 및 (21) 제약 제제에 사용되는 다른 비-독성 상용성 물질.

[0177] 일부 실시양태에서, 제약상 허용되는 담체는 제약상 허용되는 염을 포함한다. 본원에 사용된 "제약상 허용되는 염"은 본원에 기재된 조성물의 성분 중 하나의 산 형태의 염을 포함한다. 이들은 아민의 유기 또는 무기 산 염을 포함한다. 바람직한 산 염은 히드로클로라이드, 아세테이트, 살리실레이트, 니트레이트 및 포스페이트이다.

다른 적합한 제약상 허용되는 염은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 다양한 무기 및 유기 산의 염기성 염을 포함한다.

- [0178] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체와 함께 사용될 제약상 허용되는 염은 (1) 양이온, 예컨대 소듐, 칼륨, 암모늄, 마그네슘, 칼슘, 폴리아민, 예컨대 스페르민 및 스페르미딘 등을 사용하여 형성된 염; (2) 무기 산, 예를 들어 염산, 브로민화수소산, 황산, 인산, 질산 등을 사용하여 형성된 산 부가염; (3) 유기 산, 예컨대 예를 들어 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 숙신산, 말레산, 푸마르산, 글루콘산, 시트르산, 말산, 아스코르브산, 벤조산, 탄닌산, 팔미트산, 알긴산, 폴리글루탐산, 나프탈렌술폰산, 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 나프탈렌 디술폰산, 폴리갈락투론산 등을 사용하여 형성된 염; 및 (4) 원소 음이온, 예컨대 염소, 브로민 및 아이오딘으로부터 형성된 염을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0179] 전달 소포
- [0180] 본원에 기재된 핵산 복합체를 전달하기 위해 다양한 전달 시스템, 예컨대 특히 항체 접합체, 미셀, 천연 폴리사카라이드, 펩티드, 합성 양이온성 중합체, 마이크로입자, 지질-기반 나노백터가 사용될 수 있다.
- [0181] 본원에 기재된 핵산 복합체의 전달에 사용되는 전달 시스템 및 관련 부형제는 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 전달 시스템은 조직 침투, 세포 흡수를 용이하게 하고 혈관외유출 및 엔도솜 이탈을 방지하기 위해 이용되는 투여 방식, 제제의 유형, 표적 부위, 및 치료될 질환 또는 장애의 유형에 기초하여 선택될 수 있다.
- [0182] 일부 실시양태에서, 핵산 복합체는 하나 이상의 중합체와 함께 제제화되어 핵산 복합체 및 다차원 중합체 네트워크를 함유하는 초분자 복합체를 형성할 수 있다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있다. 초분자 복합체는 임의의 적합한 형태를 취할 수 있고, 바람직하게는 입자의 형태이다.
- [0183] 핵산 복합체는 지질-매개 전달 시스템을 통해 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체는 캡슐화되거나 또는 리포솜과 회합될 수 있다. 예를 들어, 핵산 복합체는 낮은 이온 강도의 수성 매질에 현탁된 다가양이온성 축합제 및 양이온성 소포-형성 지질로 형성된 양이온성 리포솜과 축합될 수 있다.
- [0184] 본원에 사용된 용어 "리포솜"은, 수성 내부를 캡슐화하는, 전형적으로 하나 이상의 지질 이중층 상에 형성된 외부 지질 쉘을 갖는 지질 소포를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 리포솜은 약 20-80 몰 퍼센트의 양이온성 소포-형성 지질과 나머지 중성 소포-형성 지질 및/또는 다른 성분으로 구성된 양이온성 리포솜이다. 본원에 사용된 "소포-형성 지질"은 소수성 및 극성 머리기 모이어티를 갖고, 그 자체로 물 중에서 이중층 소포로 자발적으로 형성될 수 있는 임의의 양친매성 지질 (예를 들어, 인지질)을 지칭한다. 바람직한 소포-형성 지질은 아실 사슬이 전형적으로 약 14-22개의 탄소 원자 길이이고 다양한 불포화도를 갖는 디아실-쇄 지질, 예컨대 인지질이다.
- [0185] 양이온성 소포-형성 지질은 작동 pH, 예를 들어 pH 4-9에서 극성 머리가 알짜 양전하를 갖는 소포-형성 지질이다. 예는 인지질 (예를 들어, 포스파티딜에탄올아민), 당지질 (예를 들어, 양이온성 극성 머리를 갖는 세레브로시드 및 강글리오시드), 콜레스테롤 아민 및 관련 양이온성 스테롤 (예를 들어, 1,2-디올레일옥시-3-(트리메틸아누노) 프로판 (DOTAP), N-[1-(2,3-디테트라데실옥시)프로필]-N,N-디메틸-N-히드록시에틸암모늄 브로마이드 (DMRIE), N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N-디메틸-N-히드록시 에틸암모늄 브로마이드 (DORIE), N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA), 3β [N-(N',N'-디메틸아미노에탄)카르바모일]콜레스테롤 (DC-Cho1), 및 디메틸디옥타데실암모늄 (DDAB))을 포함한다.
- [0186] 중성 소포-형성 지질은 알짜 전하를 갖지 않거나 또는 극성 머리에 음전하를 갖는 지질을 적은 백분율로 포함하는 소포-형성 지질이다. 소포-형성 지질의 예는 인지질, 예컨대 포스파티딜콜린 (PC), 포스파티딜 에탄올아민 (PE), 포스파티딜이노시톨 (PI), 및 스펅고미엘린 (SM), 및 콜레스테롤, 콜레스테롤 유도체, 및 다른 비하전된 스테롤을 포함한다.
- [0187] 일부 실시양태에서, 본원에 사용된 전달 시스템은 나노입자 (NP), 무기 나노입자 (예를 들어, 실리카 NP, 금 NP, Qdot, 초상자성 산화철 NP, 상자성 란타나이드 이온) 및 다른 나노물질, 핵산 지질 입자, 중합체성 나노입자, 리피도이드 나노입자 (LNP), 키토산 및 이눌린 나노입자, 시클로덱스트린 나노입자, 탄소 나노튜브, 리포솜, 미셀 구조, 캡시드, 중합체 (예를 들어, 폴리에틸렌이민, 음이온성 중합체), 중합체 매트릭스, 히드로겔, 덴드리머 (예를 들어, 폴리-프로필렌이민 (PPI) 및 폴리-아미도아민 (PAMAM)), 핵산 나노구조, 엑소솜, 및 GalNAc-접합된 펩티드-유사 펩티드 (NAG-MLP)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체는 완충제 용액, 예컨대 포스페이트 완충 염수 용액 중에서 제제화될 수 있다.
- [0188] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체는 리피도이드 나노입자 (LNP)를 통해 전달된다. LNP는 이온화

가능한 LNP, 양이온성 LNP 및/또는 중성 LNP를 포함할 수 있다. 이온화가능한 LNP는 순환 동안 거의 비하전되지만, 낮은 pH 환경에서, 예를 들어 엔도솜 및 리소솜에서 양성자화된다. 양이온성 LNP는 혈액 순환에서 및 엔도솜 또는 리소솜에서 구성적 양전하를 나타낸다. 중성 LNP는 중성이고, 순환 동안 및 엔도솜 또는 리소솜에서 비하전된다.

- [0189] 본원에 기재된 핵산 복합체는 네이키드로 제공되거나 또는 리간드에 접합될 수 있다. 네이키드 siRNA는 siRNA와 공유 또는 비공유 회합된 전달 시스템을 함유하지 않는 시스템을 지칭한다. 네이키드 형태로 전달되는 경우, 네이키드 siRNA는 표적 부위, 예컨대 비교적 폐쇄되고 소수의 뉴클레아제를 함유하는 특정 기관 (예를 들어, 눈)에 국부로 주사될 수 있다.
- [0190] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체는 리간드에 부착 (예를 들어, 융합 또는 접합)되어, 리간드와 세포 또는 조직의 표면 수용체 사이의 특이적 인식 및 상호작용에 의해 siRNA를 목적하는 조직 및 세포로 수송할 수 있는 리간드-siRNA 접합체를 형성할 수 있다. 통상의 표적화 리간드는 탄수화물, 압타머, 항체 또는 항체 단편, 펩티드 (예를 들어, 세포-침투 펩티드, 엔도솜용해 펩티드), 및 소분자 (예를 들어, N-아세틸갈락토사민 (GalNAc)), 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 다른 것을 포함한다.
- [0191] 일부 실시양태에서, 핵산 복합체는 압타머에 접합된다. 본원에 사용된 용어 "압타머"는 특이적 표적에 고친화도 및 특이성으로 결합하는 올리고뉴클레오티드 또는 펩티드 분자를 지칭한다. 특히, 핵산 압타머는, 예를 들어 다양한 분자 표적, 예컨대 소분자, 단백질, 핵산, 및 심지어 세포, 조직 및 유기체에 결합하기 위해 반복된 라운드의 시험관내 선택 또는 동등하게 SELEX (지수적 풍부화에 의한 리간드의 체계적 진화)를 통해 조작된 핵산 종을 포함할 수 있다. 펩티드 압타머는 세포 내부의 단백질-단백질 상호작용에 특이적으로 결합하여 이를 방해하도록 설계된 펩티드이다. 특히, 펩티드 압타머는, 예를 들어 효모 2-하이브리드 (Y2H) 시스템으로부터 유래된 선택 전략에 따라 유래될 수 있다. 압타머는 항체의 분자 인식 특성에 필적하는 분자 인식 특성을 제공하기 때문에 생명공학 및 치료 용도에 유용하다.
- [0192] 일부 실시양태에서, 핵산 복합체는 소분자에 접합된다. 본원에 사용된 용어 "소분자"는 합성 또는 생물학적 기원의 것이고, 단량체 및/또는 1차 대사물을 포함할 수 있지만, 중합체가 아닌 유기 화합물을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 소분자는 단백질 또는 핵산이 아니고, 내인성 (예를 들어, 표적의 억제 또는 활성화) 또는 외인성 (예를 들어, 세포 신호전달)인 생물학적 역할을 하며, 분자 생물학에서 도구로서 사용되거나, 또는 의학에서 약물로서 적합한 분자를 포함할 수 있다. 소분자는 또한 천연 생물학적 분자와 관계가 없을 수 있다. 전형적으로, 소분자는 1 kg/mol 미만의 몰 질량을 갖는다. 예시적인 소분자는 2차 대사물 (예컨대, 악티노마이신-D), 특정 항바이러스 약물 (예컨대, 아만타딘 및 리만타딘), 기형유발물질 및 발암물질 (예컨대, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트), 천연 생성물 (예컨대, 페니실린, 모르핀 및 파클리탁셀) 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 확인가능한 추가의 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체는 GalNAc에 접합된다.
- [0193] 핵산 복합체를 특이적 세포 유형에 표적화하는 데 사용하기에 적합한 리간드의 예는 상피 암종 및 골수 줄기 세포의 폴레이트 수용체에 결합할 수 있는 폴레이트, 다양한 세포의 비타민 수용체에 결합할 수 있는 수용성 비타민, CD4⁺ 림프구의 CD4에 결합할 수 있는 피리독살 포스페이트, 간 간세포 및 혈관 내피 세포의 LDL에 결합할 수 있는 아포지단백질, 인슐린 수용체에 결합할 수 있는 인슐린, 내피 세포의 트랜스페린 수용체에 결합할 수 있는 트랜스페린, 간 간세포의 아시알로당단백질 수용체에 결합할 수 있는 갈락토스, E에 결합할 수 있는 시알릴-루이스_x, 활성화 내피 세포의 P 셀렉틴, 호중구 및 백혈구의 L 셀렉틴에 결합할 수 있는 Mac-1, 종양 상피 세포의 Flk-1,2에 결합할 수 있는 VEGF, 종양 상피 세포의 FGF 수용체에 결합할 수 있는 염기성 FGF, 상피 세포의 EFG 수용체에 결합할 수 있는 EFG, 혈관 내피 세포의 α_vβ₁인테그린에 결합할 수 있는 VCAM-1, 혈관 내피 세포의 α_vβ₂인테그린에 결합할 수 있는 ICAM-1, 혈관 내피 세포 및 활성화 혈소판의 α_vβ₃인테그린에 결합할 수 있는 PECAM-1/CD31, 아테롬성동맥경화판에서 내피 세포 및 평활근 세포의 α_vβ₁인테그린 및 α_vβ₅인테그린에 결합할 수 있는 오스테오펀틴, 종양 내피 세포 및 혈관 평활근 세포의 α_vβ₃인테그린에 결합할 수 있는 RGD 서열, 또는 CD4⁺ 림프구의 CD4에 결합할 수 있는 HIV GP 120/41 또는 GP120, 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 확인가능한 기타 것들을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0194] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체의 전달은 표적 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 초과가 핵산 복합체를 혼입하도록 한다. 일부 실시양태에서, 약 0.1-10 nm 핵산 복합체가 표적 세

포에 전달된다.

- [0195] 제제
- [0196] 임의의 적합한 제약 제제가 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 제약 조성물은 하기를 위해 적합화된 것들을 비롯하여 고체 또는 액체 형태로의 투여를 위해 특별히 제제화될 수 있다: (1) 경구 투여, 예를 들어 드렌치 (수성 또는 비-수성 용액 또는 현탁액), 정제, 볼루스, 분말, 과립, 페이스트; (2) 예를 들어 멸균 용액 또는 현탁액으로서, 예를 들어 피하, 근육내 또는 정맥내 주사에 의한 비경구 투여; (3) 예를 들어 피부에 적용되는 크림, 연고 또는 스프레이로서 국소 적용; (4) 예를 들어 폐사리, 크림 또는 발포체로서 질내로 또는 직장내로; 또는 (5) 예를 들어 히드로겔 조성물을 함유하는 수성 에어로졸, 리포솜 제제 또는 고체 입자로서 에어로졸. 제약 조성물은 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함할 수 있다.
- [0197] 본 개시내용의 방법에 유용한 제제는 경구, 비강, 국소 (협착 및 설하 포함), 직장, 질, 에어로졸 및/또는 비경구 투여에 적합한 것을 포함한다. 제제는 편리하게는 단위 투여 형태로 제공될 수 있고, 제약 기술분야에 널리 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료될 숙주, 특정한 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 생성하는 RNAi 구축물의 양일 것이다. 일반적으로, 100 퍼센트 중에서, 이 양은 활성 성분의 약 1% 내지 약 99%, 바람직하게는 약 5% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 약 10% 내지 약 30%의 범위일 것이다.
- [0198] 경구 투여에 적합한 제제는 캡슐, 카세, 환제, 정제, 로젠지 (향미 베이스, 통상적으로 수크로스 및 아카시아 또는 트라가칸트를 사용함), 분말, 과립의 형태로, 또는 수성 또는 비-수성 액체 중 용액 또는 현탁액으로서, 또는 수중유 또는 유중수 액체 에멀전으로서, 또는 엘릭시르 또는 시럽으로서, 또는 파스틸 (불활성 기재, 예컨대 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로스 및 아카시아를 사용함)로서 및/또는 구강 세정제 등으로서 존재할 수 있으며, 각각은 활성 성분으로서 미리 결정된 양의 호흡 탈코플링제를 함유한다. 핵산 복합체 조성물은 또한 볼루스, 연약 또는 페이스트로서 투여될 수 있다.
- [0199] 경구 투여를 위한 고체 투여 형태 (캡슐, 정제, 환제, 당의정, 분말, 과립 등)에서, 활성 성분은 1종 이상의 제약상 허용되는 담체, 예컨대 시트르산나트륨 또는 인산이칼슘, 및/또는 하기 중 임의의 것과 혼합된다: (1) 충전제 또는 증량제, 예컨대 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및/또는 규산; (2) 결합제, 예컨대, 예를 들어 카르복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로스 및/또는 아카시아; (3) 합습제, 예컨대 글리세롤; (4) 봉해제, 예컨대 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 실리케이 트 및 탄산나트륨; (5) 용해 지연제, 예컨대 파라핀; (6) 흡수 촉진제, 예컨대 4급 암모늄 화합물; (7) 습윤제, 예컨대, 예를 들어 아세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테아레이트; (8) 흡수제, 예컨대 카올린 및 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예컨대 활석, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 술페이트, 및 그의 혼합물; 및 (10) 착색제. 캡슐, 정제 및 환제의 경우, 제약 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 부형제, 예컨대 락토스 또는 유당, 뿐만 아니라 고분자량 폴리 에틸렌 글리콜 등을 사용하여 연질 및 경질-충전 젤라틴 캡슐에서 충전제로서 사용될 수 있다.
- [0200] 정제는 임의로 1종 이상의 보조 성분과 함께 압축 또는 성형에 의해 제조될 수 있다. 압축 정제는 결합제 (예를 들어, 젤라틴 또는 히드록시프로필메틸 셀룰로스), 윤활제, 불활성 희석제, 보존제, 봉해제 (예를 들어, 소듐 스타치 글리콜레이트 또는 가교 소듐 카르복시메틸 셀룰로스), 표면-활성제 또는 분산제를 사용하여 제조될 수 있다. 성형된 정제는 불활성 액체 희석제로 습윤화된 분말 펩티드 또는 펩티드모방체의 혼합물을 적합한 기계에서 성형함으로써 제조될 수 있다.
- [0201] 본 개시내용의 제약 조성물 중 활성 성분의 실제 투여량 수준은 대상체에게 독성이 아니면서 특정한 대상체, 조성물 및 투여 방식에 대해 목적하는 치료 반응을 달성하는 데 효과적인 활성 성분의 양을 획득하도록 본 발명의 방법에 의해 결정될 수 있다.
- [0202] 정제, 및 다른 고체 투여 형태, 예컨대 당의정, 캡슐, 환제 및 과립은 코팅 및 셸, 예컨대 장용 코팅 및 제약-제제화 기술분야에 널리 공지된 다른 코팅으로 임의로 스코어링되거나 제조될 수 있다. 이들은 또한, 예를 들어 목적하는 방출 프로파일을 제공하는 다양한 비율의 히드록시프로필메틸 셀룰로스, 다른 중합체 매트릭스, 리포솜 및/또는 마이크로구체를 사용하여 그 안의 활성 성분의 느린 또는 제어 방출을 제공하도록 제제화될 수 있다. 이들은, 예를 들어 박테리아-보유 필터를 통한 여과에 의해, 또는 사용 직전에 멸균수 또는 일부 다른 멸균 주사가능한 매질 중에 용해될 수 있는 멸균 고체 조성물의 형태로 멸균제를 혼입함으로써 멸균될 수 있다.

이들 조성물은 또한 임의로 불투명화제를 함유할 수 있고, 활성 성분(들)만을 또는 우선적으로 위장관의 특정 부분에서 임의로 지연된 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 포매 조성물의 예는 중합체 물질 및 왁스를 포함한다. 활성 성분은 또한 적절한 경우에 상기 기재된 부형제 중 1종 이상을 갖는 마이크로-캡슐화된 형태일 수 있다.

- [0203] 경구 투여를 위한 액체 투여 형태는 제약상 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함한다. 활성 성분에 추가로, 액체 투여 형태는 관련 기술분야에서 통상적으로 사용되는 불활성 희석제, 예컨대 예를 들어 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (특히, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 배아, 올리브, 피마자 및 참깨 오일), 글리세롤, 테트라히드로푸릴 알콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 그의 혼합물을 함유할 수 있다.
- [0204] 불활성 희석제 이외에, 경구 조성물은 또한 아주반트, 예컨대 습윤제, 유화제 및 현탁화제, 감미제, 향미제, 착색제, 펄프제 및 보존제를 포함할 수 있다.
- [0205] 현탁액은 활성제에 추가로 현탁화제, 예를 들어 에톡실화 이소스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미세결정질 셀룰로스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 한천-한천 및 트라가칸트, 및 그의 혼합물을 함유할 수 있다.
- [0206] 직장 또는 질 투여를 위한 제제는 좌제로서 제공될 수 있으며, 이는 1종 이상의 호흡 탈커플링제를, 예를 들어 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌제 왁스 또는 살리실레이트를 포함하는 1종 이상의 적합한 비자극성 부형제 또는 담체와 혼합함으로써 제조될 수 있고, 실온에서는 고체이지만 체온에서는 액체이고, 따라서 직장 또는 질 강에서 용융되어 활성제를 방출할 것이다.
- [0207] 질 투여에 적합한 제제는 또한 적절한 것으로 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 이러한 담체를 함유하는 페사리, 탐폰, 크림, 젤, 페이스트, 발포제 또는 스프레이 제제를 포함한다.
- [0208] 히드로겔 조성물의 국소 또는 경피 투여를 위한 투여 형태는 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 활성 성분은 멸균 조건 하에 제약상 허용되는 담체, 및 필요할 수 있는 임의의 보존제, 완충제 또는 추진제와 혼합될 수 있다.
- [0209] 연고, 페이스트, 크림 및 젤은 호흡 탈커플링에 추가로 부형제, 예컨대 동물성 및 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 활석 및 산화아연, 또는 그의 혼합물을 함유할 수 있다.
- [0210] 안과용 제제, 안연고, 분말, 용액 (예를 들어, 점안제) 등이 또한 본 개시내용의 범주 내에 있는 것으로 고려된다.
- [0211] 본 발명의 제약 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올 (예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 그의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대 올리브 오일, 및 주사가능한 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트를 포함한다. 적절한 유동성은, 예를 들어 코팅 물질, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- [0212] 이들 조성물은 또한 아주반트, 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 함유할 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등을 포함시킴으로써 보장될 수 있다. 등장화제, 예컨대 당, 염화나트륨 등을 조성물에 포함시키는 것이 또한 바람직할 수 있다. 또한, 주사가능한 제약 형태의 지속 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예컨대 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시킴으로써 이루어질 수 있다.
- [0213] 본원에 기재된 제약 조성물은 치료 유효량의 핵산 복합체를 포함한다.
- [0214] 본원에 사용된 어구 "치료 유효량"은 함리적인 이익/위험 비로 일부 목적하는 치료 효과, 예를 들어 암 치료를 생성하는 데 효과적인 본원에 개시된 핵산 복합체의 양을 의미한다. 치료 유효량은 또한 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 이해되는 바와 같이 구축물의 구조, 이용된 투여 경로, 표적 부위, 및 치료될 특정 질환 또는 장애에 따라 달라진다. 예를 들어, 질환 또는 장애와 연관된 측정가능한 파라미터의 적어도 20% 감소가 있는 경우에 주어진 임상 치료가 효과적인 것으로 간주되는 경우, 그 질환 또는 장애의 치료를 위한 구축물의 치료 유효

효량은 그 측정가능한 파라미터의 적어도 20% 감소를 달성하는 데 필요한 양이다.

- [0215] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 제약 조성물은 치료될 대상체 (예를 들어, 동물 또는 인간)에서 표적 유전자의 발현을 억제하기에 충분한 적합한 투여량으로 핵산 복합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체의 적합한 투여량은 1일에 대상체의 체중 1 킬로그램당 0.001 내지 0.25 밀리그램의 범위, 또는 1일에 체중 1 킬로그램당 0.01 내지 20 마이크로그램의 범위, 또는 1일에 체중 1 킬로그램당 0.01 내지 10 마이크로그램의 범위, 또는 1일에 체중 1 킬로그램당 0.10 내지 5 마이크로그램의 범위, 또는 1일에 체중 1 킬로그램당 0.1 내지 2.5 마이크로그램의 범위이다. 핵산 복합체를 포함하는 제약 조성물은 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회, 또는 필요에 따라 또는 의사에 의해 처방되어 투여될 수 있다. 본원에 기재된 제약 조성물은 또한 하루에 걸쳐 적절한 간격으로 투여되는 2, 3, 4, 5, 6회 또는 그 초과와 하위-용량을 포함하는 투여 단위로 제공될 수 있다. 투여 단위는 또한 제어된 방식으로 수일에 걸쳐 지속적으로 방출될 수 있는 단일 용량 (예를 들어, 지속 또는 제어 방출 제제를 사용함)을 위해 배합될 수 있다.
- [0216] 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 바와 같이, 본원에 기재된 제약 조성물의 적합한 투여 단위는 세포 배양 검정으로부터 수득된 데이터로부터 추정될 수 있고, 동물 연구에서 수득된 데이터로부터 추가로 결정될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 제약 조성물의 독성 및 치료 효능은, 예를 들어 LD50 (집단의 50%에 치사성인 용량) 및 ED50 (집단의 50%에서 치료상 유효한 용량)을 결정하기 위한 세포 배양물 또는 실험 동물에서의 표준 제약 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성 및 치료 효과 사이의 용량 비는 치료 지수이고, 이는 비 LD50/ED50으로 표현될 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 조성물이 바람직하다. 특정한 전달 시스템과 조합된 조성물의 적합한 투여량은 독성을 최소화하기 위해, 예컨대 비표적화된 세포에 대한 잠재적 손상을 최소화하고 부작용을 감소시키기 위해 선택될 수 있다.
- [0217] 투여
- [0218] 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 바와 같이, 본원에 기재된 핵산 복합체 및 그의 조성물은 대상체에 게 임의의 적합한 투여 경로를 사용하여 투여될 수 있다. 핵산 복합체 및 그의 조성물은 표적 부위에 국부로 또는 전신으로 투여될 수 있다.
- [0219] 본원에 사용된 용어 "국부 투여" 또는 "국소 투여"는 조성물이 개체의 신체와 접촉하여, 신체 내의 생성된 조성물 위치가 국소이도록 하는 임의의 투여 경로를 나타낸다 (영상화가 바람직한 특정 조직, 기관 또는 다른 신체 부분으로 제한됨). 예시적인 국부 투여 경로는 바늘에 의한 특정한 조직 내로의 주사, 위장관 내로의 위관영양, 및 히드로겔 조성물을 함유하는 용액을 피부 표면 상에 확산시키는 것을 포함한다.
- [0220] 본원에 사용된 용어 "전신 투여"는 핵산 복합체 조성물을 개체의 신체와 접촉시켜, 신체 내의 생성된 조성물 위치가 전신 (영상화가 요구되는 특정 조직, 기관 또는 다른 신체 부분에 제한되지 않음)이 되도록 하는 임의의 투여 경로를 나타낸다. 전신 투여는 경장 및 비경구 투여를 포함한다. 경장 투여는 물질이 소화관을 통해 제공되는 전신 투여 경로이고, 경구 투여, 위 섭식 튜브에 의한 투여, 십이지장 섭식 튜브에 의한 투여, 위루술, 경장 영양 및 직장 투여를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 비경구 투여는 물질이 소화관 이외의 경로에 의해 제공되는 전신 투여 경로이고, 정맥내 투여, 동맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내, 투여, 복강내 투여 및 방광내 주입을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0221] 일부 실시양태에서, 투여 방법은 에어로졸 전달, 비강 전달, 질 전달, 직장 전달, 협측 전달, 안구 전달, 국부 전달, 국소 전달, 수조내 전달, 복강내 전달, 경구 전달, 근육내 주사, 정맥내 (IV) 주사, 피하 (SC) 주사, 결절내 주사, 종양내 주사, 복강내 주사 및/또는 피내 주사, 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 투여는 또한 부위-특이적 주사 (예를 들어, 눈 또는 뇌척수액에서)일 수 있다.
- [0222] 일부 실시양태에서, 투여는 생체의 형질도입, 세포 주사, 피하 주사, 정맥내 주사, 척수강내 전달, 뇌실내 주사, 피내 주사, 유리체내 전달, 종양내 전달, 또는 국소 적용 (예를 들어, 국소 점안제)일 수 있다.
- [0223] 투여 방법은 표적 부위, 표적화된 세포/조직의 유형, 및 구축물이 제체화되는 방법에 따라 달라진다. 일부 실시양태에서, 지질 제제는, 예컨대 정맥내, 근육내 또는 복강내 주사에 의해, 또는 경구로 또는 흡입 또는 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 다른 방법에 의해 동물에게 투여될 수 있다.
- [0224] 일부 실시양태에서, 투여는 표피 및 진피 아래의 지방 조직으로의 SC 주사일 수 있다. 일부 실시양태에서, SC 투여는 본원에 기재된 리간드-접합된 핵산 복합체와 연관될 수 있다. 일부 실시양태에서, SC 투여는 체순환 및 림프계의로의 진입으로의 약물의 보다 느린 방출 속도를 제공하여, 흡수를 매개하는 세포 수용체의 체순환을 위한 보다 많은 시간을 제공할 수 있다. 일부 실시양태에서, SC 투여는 투여하기에 더 빠르고 더 용이하여, 치료 부

답을 감소시킬 수 있다.

- [0225] 일부 실시양태에서, 투여는 혈액 뇌 장벽을 통한 약물의 침투를 허용하는 임의의 투여 경로일 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여 경로는 직접 뇌 주사, 막횡단 확산, 또는 뇌척수액 내로 직접 치료 물질의 뇌실내 주입일 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여는 선조체내 주사, 척수강내 주사, 뇌내 주사, 실질내 주사, 비강내 전달 또는 뇌실내 주사일 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여는 뇌로의 약물 분포를 제한하는 혈액-뇌 장벽 및 다른 메카니즘을 우회하는 CNS 내로의 뇌실내 주사일 수 있으며, 이는 보다 높은 약물 농도가 중앙 구획에 진입하는 것을 가능하게 한다.
- [0226] 일부 실시양태에서, IV 투여는, 예를 들어 본원에 기재된 나노입자 및 지질 나노입자 체제화된 핵산 복합체와 연관될 수 있다. 일부 실시양태에서, IV 투여는 간에서의 초회 통과 대사를 피할 수 있고, 전신 순환을 통해 표적 조직에 대한 신속한 접근을 제공한다.
- [0227] 표적 부위
- [0228] 본원에 기재된 조성물은 임의의 적합한 표적 부위에 투여될 수 있다. 표적 부위는 시험관내, 생체내 또는 생체 외일 수 있다. 예시적인 표적 부위는 1차 포유동물 세포, 불멸화 세포주, 종양 세포, 줄기 세포 등을 포함한 시험관내 배양물에서 성장된 세포를 포함할 수 있다. 추가의 예시적인 표적 부위는 대상체의 생체의 배양물 내의 세포, 조직 및 기관, 및 생체내 세포, 조직, 기관 또는 기관계, 예를 들어 폐, 뇌, 신장, 간, 심장, 중추 신경계, 말초 신경계, 위장계, 순환계, 면역계, 골격계, 감각계, 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 확인 가능한 추가의 환경을 포함한다.
- [0229] 일부 실시양태에서, 표적 부위는 중추 신경계 (예를 들어, 뇌 및 척수), 말초 신경계 (예를 들어, 척수로부터 분지된 신경) 및 중추 및 말초 신경계 사이의 기능 및 경로에 관여하는 결합 조직/기관 (예를 들어, 후근 및 복근)이다. 표적 부위는 뇌, 척수, 두개 신경, 말초 신경, 신경근, 자율 신경계, 신경근 접합부 및 근육을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 부위는 중추 신경계이다.
- [0230] 표적 부위는 질환 또는 장애의 부위를 포함할 수 있거나, 또는 질환 또는 장애의 부위에 근접할 수 있다. 질환 또는 장애의 하나 이상의 부위의 위치는 미리 결정될 수 있다. 질환 또는 장애의 하나 이상의 부위의 위치는 방법 동안 (예를 들어, 영상화-기반 방법, 예컨대 초음파 또는 MRI에 의해) 결정될 수 있다. 표적 부위는 조직, 예컨대 예를 들어 부신 조직, 충수 조직, 방광 조직, 골, 장 조직, 뇌 조직, 유방 조직, 기관지, 관상 조직, 귀 조직, 식도 조직, 눈 조직, 담낭 조직, 생식기 조직, 심장 조직, 시상하부 조직, 신장 조직, 대장 조직, 장 조직, 후두 조직, 간 조직, 폐 조직, 림프절, 구강 조직, 코 조직, 횡장 조직, 부갑상선 조직, 뇌하수체 조직, 전립선 조직, 직장 조직, 타액선 조직, 골격근 조직, 피부 조직, 소장 조직, 척수, 비장 조직, 위 조직, 흉선 조직, 기관 조직, 갑상선 조직, 요관 조직, 요도 조직, 연질 및 결합 조직, 복막 조직, 혈관 조직 및/또는 지방 조직을 포함할 수 있다. 조직은 염증발생 조직일 수 있다. 조직은 (i) 등급 I, 등급 II, 등급 III 또는 등급 IV 암성 조직; (ii) 전이성 암성 조직; (iii) 혼합 등급 암성 조직; (iv) 하위-등급 암성 조직; (v) 건강한 또는 정상 조직; 및/또는 (vi) 암성 또는 비정상 조직을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여 시, 핵산 복합체 및 그의 조성물은 암성 조직의 혈관계에 축적된다. 일부 실시양태에서, 표적 부위는 고형 종양을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 부위는 조직, 예를 들어 회색질, 백질, 신경절, 신경, 신경내막, 신경 다발막, 신경외막을 포함할 수 있다.
- [0231] 일부 실시양태에서, 핵산 복합체 또는 그의 조성물이 투여될 수 있는 표적 부위는 이용되는 투여 방식 및 치료될 질환 또는 장애의 유형에 따라 상이한 실시양태에서 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 부위는 안구 조직, 호흡기계, 근육, 간, 중추 신경계, 고형 종양, 조혈계, 피부, 눈, 태반, 골, 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백한 바와 같은 개체에서의 다른 표적 부위와 관련될 수 있다.
- [0232] 영상화와 관련하여 본원에 사용된 용어 "개체" 또는 "대상체" 또는 "환자"는 동물, 특히 고등 동물, 특히 척추동물, 예컨대 포유동물, 보다 특히 인간을 포함한다.
- [0233] 일부 실시양태에서, 표적 부위 외부 (예를 들어, 대상체의 혈액 순환, 혈청 또는 혈장 중)의 핵산 복합체의 농도에 대한 대상체의 표적 부위에서의 핵산 복합체의 농도의 비는 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체의 표적 부위에서의 핵산 복합체의 농도 대 표적 부위 외부 (예를 들어, 대상체의 혈액 순환, 혈청 또는 혈장 중)의 핵산 복합체의 농도의 비는 정확히, 또는 약, 적어도, 적어도 약, 최대, 또는 최대 약 1:1, 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 1.6:1, 1.7:1, 1.8:1, 1.9:1, 2:1, 2.5:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 21:1, 22:1, 23:1, 24:1, 25:1, 26:1,

27:1, 28:1, 29:1, 30:1, 31:1, 32:1, 33:1, 34:1, 35:1, 36:1, 37:1, 38:1, 39:1, 40:1, 41:1, 42:1, 43:1, 44:1, 45:1, 46:1, 47:1, 48:1, 49:1, 50:1, 51:1, 52:1, 53:1, 54:1, 55:1, 56:1, 57:1, 58:1, 59:1, 60:1, 61:1, 62:1, 63:1, 64:1, 65:1, 66:1, 67:1, 68:1, 69:1, 70:1, 71:1, 72:1, 73:1, 74:1, 75:1, 76:1, 77:1, 78:1, 79:1, 80:1, 81:1, 82:1, 83:1, 84:1, 85:1, 86:1, 87:1, 88:1, 89:1, 90:1, 91:1, 92:1, 93:1, 94:1, 95:1, 96:1, 97:1, 98:1, 99:1, 100:1, 200:1, 300:1, 400:1, 500:1, 600:1, 700:1, 800:1, 900:1, 1000:1, 2000:1, 3000:1, 4000:1, 5000:1, 6000:1, 7000:1, 8000:1, 9000:1, 10000:1, 또는 상기 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다.

[0234] 표적 부위는 표적 세포를 포함할 수 있다. 표적 세포는 종양 세포 (예를 들어, 고형 종양 세포)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체의 표적 부위에 대한 본원에 기재된 핵산 복합체 및/또는 조성물의 투여는 표적 세포의 적어도 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 100%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위의 사멸을 유발한다. 핵산 복합체 및/또는 조성물의 투여 후 표적 세포 사멸 대 비-표적 세포 사멸의 비는 적어도 약 2:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체 및/또는 조성물의 투여 후 표적 세포 사멸 대 비-표적 세포 사멸의 비는 정확히, 또는 약, 또는 적어도, 또는 적어도 약, 또는 최대, 또는 최대 약 1:1, 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 1.6:1, 1.7:1, 1.8:1, 1.9:1, 2:1, 2.5:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 21:1, 22:1, 23:1, 24:1, 25:1, 26:1, 27:1, 28:1, 29:1, 30:1, 31:1, 32:1, 33:1, 34:1, 35:1, 36:1, 37:1, 38:1, 39:1, 40:1, 41:1, 42:1, 43:1, 44:1, 45:1, 46:1, 47:1, 48:1, 49:1, 50:1, 51:1, 52:1, 53:1, 54:1, 55:1, 56:1, 57:1, 58:1, 59:1, 60:1, 61:1, 62:1, 63:1, 64:1, 65:1, 66:1, 67:1, 68:1, 69:1, 70:1, 71:1, 72:1, 73:1, 74:1, 75:1, 76:1, 77:1, 78:1, 79:1, 80:1, 81:1, 82:1, 83:1, 84:1, 85:1, 86:1, 87:1, 88:1, 89:1, 90:1, 91:1, 92:1, 93:1, 94:1, 95:1, 96:1, 97:1, 98:1, 99:1, 100:1, 200:1, 300:1, 400:1, 500:1, 600:1, 700:1, 800:1, 900:1, 1000:1, 2000:1, 3000:1, 4000:1, 5000:1, 6000:1, 7000:1, 8000:1, 9000:1, 10000:1, 또는 상기 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다.

[0235] 일부 실시양태에서, 표적 세포는 신경 세포 및 신경교 세포, 예컨대 피라미드 세포, 푸르킨에 세포, 과립 세포, 방추 뉴런, 중형 돌기 뉴런, 개재뉴런, 성상세포, 상의 세포, 소교세포, 펩지교세포, 및 펩지교세포 전구 세포를 포함할 수 있다. 표적 세포는 또한 후근 신경절, 복근 신경절 및 자율 신경절을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체 및/또는 조성물의 대상체의 표적 부위로의 투여는 표적 세포에서의 표적 핵산 발현을 적어도 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 100%, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위로 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체 및/또는 조성물의 투여 후 표적 세포 대 비-표적 세포에서의 표적 핵산의 감소 비는 적어도 약 2:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 비는 정확히, 또는 약, 또는 적어도, 또는 적어도 약, 또는 최대, 또는 최대 약 1:1, 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 1.6:1, 1.7:1, 1.8:1, 1.9:1, 2:1, 2.5:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 21:1, 22:1, 23:1, 24:1, 25:1, 26:1, 27:1, 28:1, 29:1, 30:1, 31:1, 32:1, 33:1, 34:1, 35:1, 36:1, 37:1, 38:1, 39:1, 40:1, 41:1, 42:1, 43:1, 44:1, 45:1, 46:1, 47:1, 48:1, 49:1, 50:1, 51:1, 52:1, 53:1, 54:1, 55:1, 56:1, 57:1, 58:1, 59:1, 60:1, 61:1, 62:1, 63:1, 64:1, 65:1, 66:1, 67:1, 68:1, 69:1, 70:1, 71:1, 72:1, 73:1, 74:1, 75:1, 76:1, 77:1, 78:1, 79:1, 80:1, 81:1, 82:1, 83:1, 84:1, 85:1, 86:1, 87:1, 88:1, 89:1, 90:1, 91:1, 92:1, 93:1, 94:1, 95:1, 96:1, 97:1, 98:1, 99:1, 100:1, 200:1, 300:1, 400:1, 500:1, 600:1, 700:1, 800:1, 900:1, 1000:1, 2000:1, 3000:1, 4000:1, 5000:1, 6000:1, 7000:1, 8000:1, 9000:1, 10000:1, 또는 상기 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위일 수 있다.

[0236] 표적 RNA를 조정하는 방법

[0237] 또한, 본원에 기재된 핵산 복합체 또는 그의 조성물을 사용하여 표적 RNA를 조정하는 방법이 본원에 제공된다. 방법은 표적 RNA를 포함하는 세포를 본원에 기재된 핵산 복합체와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 투입 핵산 가닥의 검출 시, 투입 가닥은 센서 핵산 가닥의 오버행에 결합하여 코어 핵산 가닥으로부터의 센서 핵산 가닥의 전환을 유발하여 표적 RNA에 상보적인 서열을 세포 내로 방출시키고, 그에 의해 표적 RNA를 조정할 수 있다.

[0238] 세포를 핵산 복합체와 접촉시키는 것은 시험관내, 생체내 또는 생체외에서 세포로 수행될 수 있다. 예를 들어, 세포는 1차 포유동물 세포, 불멸화 세포주, 종양 세포, 줄기 세포 등을 포함한 시험관내 배양물에서 성장한 세포일 수 있다. 세포는 대상체의 생체외 배양물 내의 세포, 조직 및 기관, 및 생체내 세포, 조직, 기관 또는 기

관계, 예를 들어 폐, 뇌, 신장, 간, 심장, 중추 신경계, 말초 신경계, 위장계, 순환계, 면역계, 골격계, 감각계, 개체의 신체 내 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 확인가능한 추가의 환경을 포함할 수 있다. 세포는 이환 세포 또는 장애의 세포일 수 있다. 세포는 암 세포일 수 있다. 세포를 핵산 복합체와 접촉시키는 것은 또한 시험관내, 생체외, 또는 생체내, 예를 들어 대상체의 신체 내에서 일어날 수 있다.

[0239] 질환 또는 장애를 치료하는 방법

[0240] 또한, 본원에 기재된 핵산 복합체 또는 그의 조성물을 사용하여 질환 또는 상태를 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 방법은 본원에 기재된 핵산 복합체를 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 투입 핵산 가닥의 검출 시, 투입 핵산 가닥은 센서 핵산 가닥의 오버행에 결합하여 코어 핵산 가닥으로부터의 센서 핵산 가닥의 치환을 유발함으로써 표적 RNA에 상보적인 서열을 방출시키고, 그에 의해 대상체에서 표적 RNA의 활성 또는 표적 RNA로부터의 단백질 발현을 감소시켜 질환 또는 상태를 치료할 수 있다.

[0241] 본원에 사용된 용어 "상태"는 개체에 대한 완전한 신체적, 정신적 및 사회적 행복의 상태와 연관된 표준 신체적 상태에 일치하지 않는, 개체의 신체의 신체적 상태 (전체로서 또는 그의 일부 중 하나 이상으로서)를 나타낸다. 본원에 기재된 상태는 장애 및 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 여기서 용어 "장애"는 신체 또는 그의 부분 중 임의의 것의 기능적 이상과 연관된 살아있는 개체의 상태를 나타내고, 용어 "질환"은 신체 또는 그의 부분 중 임의의 것의 정상적 기능을 손상시키고 전형적으로 구별되는 징후 및 증상에 의해 나타나는 살아있는 개체의 상태를 나타낸다.

[0242] 본원에 사용된 용어 "치료"는 환자가 나타내는 질환, 장애 또는 생리학적 상태에 반응하여 이루어지는 개입을 지칭한다. 치료의 목적은 증상의 완화 또는 예방, 질환, 장애 또는 상태의 진행 또는 악화의 둔화 또는 정지, 및 질환, 장애 또는 상태의 완화 중 하나 이상을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 용어 "치료하다" 및 "치료"는, 예를 들어 대상체가 장애 또는 다른 위험 인자를 발생시킬 위험을 감소시키는 치유적 치료, 예방적 치료 및 적용을 포함한다. 치료는 장애의 완전한 치유를 필요로 하지 않고, 증상 또는 기저 위험 인자를 감소시키는 실시양태를 포괄한다. 일부 실시양태에서, "치료"는 치유적 치료 및 예방적 또는 방지적 조치 둘 다를 지칭한다. 치료를 필요로 하는 대상체는 이미 질환 또는 장애 또는 바람직하지 않은 생리학적 상태를 갖는 대상체 뿐만 아니라 질환 또는 장애 또는 바람직하지 않은 생리학적 상태를 예방해야 하는 대상체를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "예방"은 이들 증상을 나중에 발현하는 개체의 부담을 감소시키는 임의의 활성을 지칭한다. 이는 1차, 2차 및/또는 3차 예방 수준으로 일어날 수 있으며, 여기서 a) 1차 예방은 증상/장애/상태의 발생을 피하고; b) 2차 예방 활동은 상태/장애/증상 치료의 초기 단계를 목표로 하여, 그에 의해 개입이 상태/장애/증상의 진행 및 증상의 출현을 예방할 기회를 증가시키고; c) 3차 예방은, 예를 들어 기능을 회복시키고/거나 임의의 상태/장애/증상 또는 관련 합병증을 감소시킴으로써 이미 확립된 상태/장애/증상의 부정적 영향을 감소시킨다. 용어 "예방하다"는 사건 가능성의 100% 제거를 요구하지 않는다. 오히려, 이는 사건의 발생 가능성이 화합물 또는 방법의 존재 하에 감소되었음을 나타낸다.

[0243] 표적 RNA는 그의 발현 또는 활성이 질환 또는 장애 (예를 들어, 신경계 질환 또는 암)와 연관된, 본원에 기재되거나 관련 기술분야에 공지된 임의의 유전자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 신경계 질환은 헌팅턴병이고, 표적 RNA는 HTT 유전자를 포함한다.

[0244] 핵산 복합체의 센서 핵산 가닥은 질환 또는 장애, 예컨대 중추 신경계의 질환 또는 장애 또는 암과 관련된, 본원에 기재되거나 관련 기술분야에 공지된 임의의 바이오마커를 검출하도록 설계될 수 있다. 바이오마커는 세포 유형 특이적 또는 선택적이 아닌 범용 mRNA (예를 들어, mir-23a-3p)일 수 있다. 바이오마커는 또한 세포 유형 또는 세포-상태 특이적 또는 선택적 mRNA, 예컨대 중추 신경계의 세포에 대해 특이적인 mRNA (예를 들어, GFAP mRNA)일 수 있다.

[0245] 일부 실시양태에서, 핵산 복합체는 그를 필요로 하는 대상체에게 약 0.001-10 nM의 농도로 투여된다. 예를 들어, 핵산 복합체는 정확히, 약, 최대, 또는 최대 약 0.001 nM, 0.002 nM, 0.004 nM, 0.006 nM, 0.008 nM, 0.01 nM, 0.02 nM, 0.03 nM, 0.04 nM, 0.05 nM, 0.06 nM, 0.07 nM, 0.08 nM, 0.09 nM, 0.1 nM, 0.2 nM, 0.3 nM, 0.4 nM, 0.5 nM, 0.6 nM, 0.7 nM, 0.8 nM, 0.9 nM, 1.0 nM, 1.5 nM, 2.0 nM, 2.5 nM, 3.0 nM, 3.5 nM, 4.0 nM, 4.5 nM, 5.0 nM, 5.5 nM, 6.0 nM, 6.5 nM, 7.0 nM, 7.5 nM, 8.0 nM, 8.5 nM, 9.0 nM, 9.5 nM, 10 nM, 또는 이들 값 중 임의의 2개 사이의 수 또는 범위의 농도로 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체는 약 0.004-1.0 nM의 농도로 제공된다.

[0246] 일부 실시양태에서, 핵산 복합체는 그를 필요로 하는 대상체에게 약 1-100 mg/kg 대상체 체중, 바람직하게는

10-50 mg/kg 대상체 체중의 투여량으로 투여된다. 대안적으로, 투여량은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 치료될 대상체, 치료될 상태의 중증도 및 반응성, 투여 방식, 및 처방 의사의 판단에 기초하여 기초 및 계산될 수 있다.

[0247] 일부 실시양태에서, 대상체는 치료를 위해 핵산 복합체를 1, 2, 3, 4회 또는 그 초과로 투여받을 수 있다. 일부 실시양태에서, 목적하는 치료 결과를 달성하기 위해 최대 1, 2, 3 또는 4회의 투여가 필요하다. 일부 실시양태에서, 단지 1회의 투여가 필요하다. 핵산 복합체의 2회 투여는 적합한 시간 기간으로 분리될 수 있다. 2회 투여 사이의 적합한 시간 기간은 또 다른 2회 투여 사이의 적합한 시간 기간과 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 일부 실시양태에서, 2회 투여 사이의 시간 기간은 약, 적어도, 또는 적어도 약 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월 또는 그 초과일 수 있다. 일부 실시양태에서, 임의의 2회 투여 사이의 시간 기간은 적어도 6개월일 수 있다.

[0248] 다양한 질환 및 장애가 본원에 제공된 임의의 하나 이상의 핵산 복합체 조성물로 치료될 수 있다. 본원에 개시된 질환 및 장애는 림프종으로의 HIV 감염, A형 혈우병, B형 혈우병, 고콜레스테롤혈증, 아테롬성동맥경화성 심혈관 질환, 신장애, 만성 B형 간염, 급성 간혈성 포르피린증, 비정형 용혈성 요독성 증후군, 원발성 고옥살산뇨증, 유전성 트랜스티레틴 아밀로이드증 (hATTR), α1-항트립신 결핍 간 질환, B형 간염, 겸상 적혈구 질환, 원발성 고옥살산뇨증, 유잉 육종, 진행성 부인과암, III/IV기 난소암, 췌장암, 진행성 고형 종양, 간세포성 암종/간암, 림프종 및 백혈병, 심장 질환, 심부전, 켈로이드, 비대성 흉터, 재발성 또는 불응성 B 세포 림프종, 비대성 반흔, 연령-관련 황반 변성, 망막 반흔형성, 심장 수술, 심장 비대, 비-동맥성 전방 허혈성 시신경병증, 알포트 증후군, HIV 감염/AIDS, 췌장관 선암종/췌장암, 안구 건조 질환, 및 다양한 고형 종양을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0249] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 암일 수 있다. 암은 고형 종양, 액상 종양, 또는 그의 조합일 수 있다. 본원에 기재된 핵산 복합체 또는 그의 조성물은 임의의 적합한 투여 경로를 사용하여 종양을 포함하는 세포, 조직 및/또는 기관에 투여될 수 있다. 예를 들어, 핵산 복합체 또는 그의 조성물은 피하 주사 또는 종양내 전달을 통해 종양을 포함하는 세포, 조직 및/또는 기관에 투여될 수 있다.

[0250] 암은 결장암, 직장암, 신세포 암종, 간암, 폐의 비소세포 암종, 소장암, 식도암, 흑색종, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 악성 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부암, 위암, 고환암, 자궁암, 난관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 호지킨병, 비-호지킨 림프종, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연부 조직 육종, 요도암, 음경암, 소아기 고형 종양, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신우 암종, 중추 신경계 (CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척수축 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 표피양암, 편평 세포암, T-세포 림프종, 환경적으로 유발된 암, 상기 암의 조합, 및 상기 암의 전이성 병변으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0251] 암은 혈액암, 예를 들어 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 급성 백혈병, 급성 림프성 백혈병 (ALL), B-세포 급성 림프성 백혈병 (B-ALL), T-세포 급성 림프성 백혈병 (T-ALL), 만성 골수 백혈병 (CML), B 세포 전림프구성 백혈병, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 미만성 대 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 소세포- 또는 대세포-여포성 림프종, 악성 림프증식성 상태, MALT 림프종, 외투 세포 림프종, 변연부 림프종, 다발성 골수종, 골수이형성증 및 골수이형성 증후군, 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 형질모구성 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 또는 전-백혈병일 수 있다.

[0252] 본원에 개시된 핵산 복합체 및 조성물을 사용하여 예방 및/또는 치료될 수 있는 암의 비제한적 예는 다음을 포함한다: 신암; 신장암; 다형성 교모세포종; 전이성 유방암; 유방 암종; 유방 육종; 신경섬유종; 신경섬유종증; 소아 종양; 신경모세포종; 악성 흑색종; 표피의 암종; 백혈병, 예컨대 비제한적으로 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 예컨대 골수모구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성, 적백혈병 백혈병 및 근이형성 증후군, 만성 백혈병, 예컨대 비제한적으로 만성 골수구성 (과립구성) 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 모발상 세포 백혈병; 진성 다혈구혈증; 림프종, 예컨대 비제한적으로 호지킨병, 비-호지킨병; 다발성 골수종, 예컨대 비제한적으로 무증상 다발성 골수종, 비분비성 골수종, 골경화성 골수종, 형질 세포 백혈병, 고립형질세포종 및 수질의 형질세포종; 발덴스트롬 마크로글로불린혈증; 의미 불명의 모노클로날 감마글로불린병증; 양성 모노클로날 감마글로불린병증; 중쇄 질환; 골암 및 결합 조직 육종, 예컨대 비제한적으로 골 육종, 골수종 골 질환, 다발성 골수종, 진주종-유발 골 골육종, 골의 파제트병, 골육종, 연골육종, 유잉 육종, 악성 거대 세포 종양, 골의 섬유육종, 척삭종, 골막 육종, 연부-조직 육종, 혈관육종 (혈관육종), 섬유육종, 카포시 육종, 평활근육종, 지방육종, 림프관 육종, 신경초종, 횡문근육종 및 활막 육종; 뇌 종양, 예컨대 비제한적으로 신경

교종, 성상세포종, 뇌간 신경교종, 상의세포종, 뿔지교종, 비신경교 종양, 청신경초종, 두개인두종, 수모세포종, 수막종, 송과체종, 송과체모세포종, 및 원발성 뇌 림프종; 유방암, 예컨대 비제한적으로 선암종, 소엽성 (소세포) 암종, 관내 암종, 수질성 유방암, 점액성 유방암, 관상 유방암, 유두상 유방암, 파제트병 (소아 파제트병 포함) 및 염증성 유방암; 부신암, 예컨대 비제한적으로, 크롬친화세포종 및 부신피질 암종; 갑상선암, 예컨대 비제한적으로, 유두상 또는 여포성 갑상선암, 수질성 갑상선암 및 역형성 갑상선암; 췌장암, 예컨대 비제한적으로 인슐린종, 가스트린종, 글루카곤종, VIP종, 소마토스타틴-분비 종양, 및 카르시노이드 또는 도세포 종양; 뇌하수체암, 예컨대 비제한적으로, 쿠싱병, 프로락틴-분비 종양, 선단비대증, 및 요붕증; 안암, 예컨대 비제한적으로, 안구 흑색종, 예컨대 홍채 흑색종, 맥락막 흑색종, 및 모양체 흑색종, 및 망막모세포종; 질암, 예컨대 편평 세포 암종, 선암종, 및 흑색종; 외음부암, 예컨대 편평 세포 암종, 흑색종, 선암종, 기저 세포 암종, 육종, 및 파제트병; 자궁경부암, 예컨대 비제한적으로, 편평 세포 암종, 및 선암종; 자궁암, 예컨대 비제한적으로, 자궁내막 암종 및 자궁 육종; 난소암, 예컨대 비제한적으로, 난소 상피 암종, 경계성 종양, 배세포 종양, 및 기질 종양; 자궁경부 암종; 식도암, 예컨대 비제한적으로 편평 세포암, 선암종, 선양 낭성 암종, 점액표피양 암종, 선편평상피 암종, 육종, 흑색종, 형질세포종, 사마귀양 암종, 및 귀리 세포 (소세포) 암종; 위암, 예컨대 비제한적으로, 선암종, 진균성 (폴립성), 궤양성, 표재성 확산성, 미만성 확산성, 악성 림프종, 지방육종, 섬유육종 및 암육종; 결장암; 결장직장암, KRAS 돌연변이된 결장직장암; 결장 암종; 직장암; 간암, 예컨대 비제한적으로, 간세포성 암종 및 간모세포종, 담낭암, 예컨대 선암종; 담관암종, 예컨대 비제한적으로, 유두상, 결절성 및 미만성; 폐암, 예컨대 KRAS-돌연변이된 비소세포 폐암, 비소세포 폐암, 편평 세포 암종 (표피양 암종), 선암종, 대세포 암종 및 소세포 폐암; 폐 암종; 고환암, 예컨대 비제한적으로, 배 종양, 정상피종, 역형성, 전형적 (전형적), 정모세포성, 비정상피종, 배아성 암종, 기형종 암종, 융모막암종 (난황낭 종양), 전립선암, 예컨대 비제한적으로, 안드로겐-비의존성 전립선암, 안드로겐-의존성 전립선암, 선암종, 평활근육종 및 횡문근육종; 음경암; 구강암, 예컨대 비제한적으로 편평 세포 암종; 기저암; 타액선암, 예컨대 비제한적으로 선암종, 점액표피양 암종, 및 선낭성 암종; 인두암, 예컨대 비제한적으로 편평 세포암, 및 사마귀양; 피부암, 예컨대 비제한적으로 기저 세포 암종, 편평 세포 암종 및 흑색종, 표재 확산성 흑색종, 결절성 흑색종, 악성 흑자 흑색종, 말단흑자 흑색종; 신장암, 예컨대 비제한적으로 신세포암, 선암종, 부신종, 섬유육종, 이행 세포암 (신우 및/또는 자궁); 신암종; 윌름스 종양; 및 방광암, 예컨대 비제한적으로 이행 세포 암종, 편평 세포암, 선암종, 암육종. 일부 실시양태에서, 암은 점액육종, 골원성 육종, 내피육종, 림프관내피육종, 증피종, 활막종, 혈관모세포종, 상피 암종, 낭선암종, 기관지원성 암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두상 암종 또는 유두상 선암종이다.

[0253] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 신경계 질환 또는 장애일 수 있다. 신경계 질환 또는 장애는 뇌, 척수, 두개 신경, 말초 신경, 신경근, 자율 신경계, 신경근 접합부, 및 근육을 포함한 중추 및 말초 신경계의 질환 또는 장애이다. 신경계 장애는 간질, 알츠하이머병 및 다른 치매, 뇌혈관 질환, 예컨대 졸중, 편두통 및 다른 두통 장애, 다발성 경화증, 파킨슨병, 신경감염, 뇌 종양, 및 두부 외상으로 인한 신경계의 외상성 장애를 포함할 수 있다.

[0254] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 신경변성 질환 또는 장애이다. 신경변성 질환 또는 장애는 중추 신경계 또는 말초 신경계의 구조 및 기능의 진행성 변성을 특징으로 하는 이질적인 장애의 그룹이다. 일부 실시양태에서, 신경변성 질환은 임의의 기저 외상 또는 감염에 의해 유발되지 않는 신경 세포의 기능의 연속적 및 진행성 악화에 의해 표시되는 질환이다. 예시적인 신경변성 질환 또는 장애는 알츠하이머병 (AD), 헌팅톤병 (HD), 파킨슨병 (PD), 근위축성 측삭 경화증 (ALS) 및 프리온 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0255] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 중추 신경계 (CNS)의 질환 또는 상태이다. CNS의 예시적인 질환 또는 상태는 부신백질이영양증, 알츠하이머병, 근위축성 측삭 경화증, 안젤만 증후군, 모세혈관확장성 운동실조, 샤르코-마리-투스 증후군, 코케인 증후군, 난청, 뒤시엔느 근육 이영양증, 간질, 본태성 진전, 유약 X 증후군, 프리드라이히 운동실조, 고셔병, 헌팅톤병, 레쉬-니한 증후군, 메이플 시럽노 질환, 멘케스 증후군, 근긴장성 이영양증, 기면증, 신경섬유종증, 니만-픽병, 파킨슨병, 페닐케톤뇨, 프라더-윌리 증후군, 레프숨병, 레트 증후군, 척수성 근육 위축, 척수소뇌성 운동실조, 탄지예르병, 테이-삭스병, 결절성 경화증, 폰 히펠-린다우 증후군, 윌리엄스 증후군, 윌슨병 및 젤베거 증후군을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0256] 일부 실시양태에서, CNS 질환은 운동 장애, 기억 장애, 중독, 주의력 결핍/과잉행동 장애 (ADHD), 자폐증, 양극성 장애, 우울증, 뇌염, 간질/발작, 편두통, 다발성 경화증, 신경변성 장애, 정신 질환, 신경염증성 질환, 알츠하이머병, 헌팅톤병, 파킨슨병, 투렛 증후군, 이상긴장증, 또는 그의 조합이다. 일부 실시양태에서, 질환은 신경염증성 질환이다. 예를 들어, 신경염증성 질환은 파킨슨병, 알츠하이머병, 다발성 경화증, 또는 그의 조합이

다.

- [0257] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 중추 신경계 (CNS) 또는 말초 신경계 (PNS) 질환 또는 상태일 수 있다. 본원에 기재된 핵산 복합체 또는 그의 조성물은 임의의 적합한 투여 경로를 이용하여 CNS 및/또는 PNS의 세포, 조직 및/또는 기관에 투여될 수 있다. 예를 들어, 핵산 복합체 또는 그의 조성물은 척수강내 주사, 뇌실내 주사, 또는 뇌내 주사를 통해 대상체의 CNS 및/또는 PNS의 세포, 조직 및/또는 기관에 투여되어 혈액-뇌 장벽을 침투할 수 있다. 일부 실시양태에서, CNS 및/또는 PNS의 세포(들), 조직(들) 및/또는 기관(들)은 손상되거나 또는 염증이 생긴 세포(들), 조직(들) 또는 기관(들)을 포함한다. 일부 실시양태에서, CNS 및/또는 PNS의 세포(들), 조직(들) 및/또는 기관(들)은 뇌, 백질, 회백질, 뇌간, 소뇌, 간뇌, 대뇌, 척수, 두개 신경, 후근 신경절, 상기 중 임의의 것의 세포(들), 상기 중 임의의 것의 조직(들), 또는 그의 조합을 포함한다.
- [0258] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 본원에 기재된 핵산 복합체를 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하여, 핵산 복합체가 신경계의 하나 이상의 영역 내로 분포되도록 하고, 그에 의해 대상체의 신경계의 하나 이상의 영역에서 표적 RNA의 활성화 또는 표적 RNA로부터의 단백질 발현을 감소시켜 신경계 질환 또는 장애를 치료하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 복합체의 투여는 중추 신경계, 말초 신경계, 또는 둘 다를 포함하는 신경계의 하나 이상의 영역에 대한 핵산 복합체의 분포를 허용한다.
- [0259] 일부 실시양태에서, 핵산 복합체의 투여는 중추 및 말초 신경계 사이의 기능 및 경로에 수반되는 결합 조직/기관을 포함하는 신경계의 하나 이상의 영역에 대한 핵산 복합체의 분포를 허용한다. 일부 실시양태에서, 신경계의 하나 이상의 영역은 PNS에서 CNS로 감각 신경 신호를 운반하는 후근 신경절을 포함한다.
- [0260] 일부 실시양태에서, 핵산 복합체의 투여는 중추 신경계의 하나 이상의 영역에 대한 핵산 복합체의 분포를 허용한다. 중추 신경계의 하나 이상의 영역은 뇌, 백질, 회백질, 뇌간, 소뇌, 간뇌, 대뇌, 척수, 뇌 신경, 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 중추 신경계의 하나 이상의 영역은 척수, 대뇌 (예를 들어, 전두엽, 두정엽, 후두엽, 측두엽, 좌반구, 및 우반구), 뇌 피질 (예를 들어, 전전두 피질, 감각 피질, 시각 피질, 청각 피질, 운동 피질), 기저 신경절 (예를 들어, 선조체), 시상, 하시상부, 시상상부, 시상하부, 편도체, 해마 (예를 들어, 복측 해마, 배측 해마, 및 중간 해마), 소뇌, 뇌간 (예를 들어, 중뇌, 교뇌, 연수), 좌반구, 우반구, 뇌량, 또는 그의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, CNS의 하나 이상의 영역은 뇌 피질, 구상회의 피질, 해마, 뇌량, 원개, 측뇌실, 분계섬유줄, 꼬리 조가비핵, 내포, 조롱박 피질, 담창구, 시삭, 편도체, 전교련, 복측 선조체, 외측 후각로, 소뇌, 교뇌, 수질, 중소뇌각, 또는 그의 조합을 포함한다.
- [0261] 일부 실시양태에서, 핵산 복합체를 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것은 표적 세포에서의 표적 핵산의 발현의 감소 또는 상실을 유발한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체의 투여 후 표적 핵산의 감소는 투여 전 표적 핵산의 수준에 비해 약, 적어도, 또는 적어도 약 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%, 99%, 또는 임의의 2개 값 사이의 수 또는 범위이다. 일부 실시양태에서, 감소는 우측 피질, 전전두 피질, 감각 피질, 시각 피질, 선조체, 배측 해마, 복측 해마, 시상, 소뇌, 중뇌, 좌측 반구, 우측 반구, 척수 상부, 척수 하부, 후근 신경절, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 영역 중 하나 이상에서 발생한다.
- [0262] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 복합체는 치료될 대상체에서 안전성 및 내약성을 달성하면서 특이적이고 강력하다. 예를 들어, 핵산 복합체의 투여는 투여 전 수준에 비해 대상체에서 체중, 염증 마커, 혈액 화학, 및/또는 간, 신장, 췌장 효소의 유의한 증가 또는 감소를 초래하지 않는다 (예를 들어, 기준 값의 플러스 또는 마이너스 5%, 또는 차이가 통계적으로 유의하지 않음). 일부 실시양태에서, 핵산 복합체의 투여는 의도하지 않은 염증 반응을 유도하지 않는다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 핵산 복합체의 투여는 투여 전 수준에 비해 대상체의 신경교세포 원섬유성 산성 단백질 (GFAP) 및/또는 이온화된 칼슘-결합 어댑터 분자 1 (IBA-1) 수준의 상승을 초래하지 않는다.
- [0263] 키트
- [0264] 또한, 용기, 팩 또는 분배기와 같은 적합한 포장 내에 본원에 기재된 1종 이상의 조성물을 포함하는 키트가 본원에 제공되며, 사용에 대한 지침서, 임상 연구의 논의, 부작용의 목록 등을 포함할 수 있는 서면 자료를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 키트는 또한 정보, 예컨대 학술 참고문헌, 패키지 삽입물, 임상 시험 결과, 및/또는 이들의 요약서 등을 포함할 수 있으며, 이는 조성물의 활성화 및/또는 이점을 나타내거나 또는 확립하고/거나, 용량, 투여, 부작용, 약물 상호작용, 또는 건강 관리 제공자에게 유용한 다른 정보를 기재한다. 이러한 정보는

다양한 연구, 예를 들어 생체내 모델을 수반하는 실험 동물을 사용한 연구 및 인간 임상 시험에 기초한 연구의 결과에 기초할 수 있다. 키트는 본원에 기재된 하나 이상의 단위 용량을 포함할 수 있다. 조성물은 부품들의 키트 형태일 수 있다. 부분들의 키트에서, 본원에 개시된 조성물의 1종 이상의 성분은 서로 독립적으로 제공되고 (예를 들어, 구축물, 부형제 및/또는 희석제가 개별 조성물로서 제공됨), 이어서 조성물을 생성하기 위해 (예를 들어, 사용자에 의해) 사용된다.

- [0265] 실시예
- [0266] 상기 논의된 실시양태의 일부 측면은 하기 실시예에 추가로 상세하게 개시되며, 이는 어떠한 방식으로든 본 개시내용의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0267] 실시예 1
- [0268] RNAi 활성의 결정
- [0269] 본 실시예는 본원에 기재된 다양한 핵산 복합체 구축물의 RNAi 활성을 수행하는 것을 기재한다.
- [0270] 도 4에 나타난 CASi siRNA 구축물의 상이한 변이체를 RNAi 활성에 대해 시험할 수 있다. 구축물의 센서 가닥은 투입 핵산, 예컨대 심방 나트륨이노 펩티드 (ANP)를 코딩하는 NPPA 유전자 서열을 감지하도록 설계될 수 있다. 구축물을 시험하기 위해, CASi siRNA 구축물을 1x 포스페이트 완충 염수 중에서 패신저 가닥, 코어 가닥 및 센서 가닥을 열적으로 어닐링함으로써 조립할 수 있다. 이중 루시페라제 검정을 사용하여 CASi siRNA 구축물의 RNAi 활성을 측정할 수 있다. 리포펙타민 2000을 사용하여, CASi siRNA 구축물을 칼시뉴린 유전자 표적 서열 (PPP3A)을 보유하는 이중 루시페라제 벡터와 함께 HCT 116 세포 내로 공동-형질감염시킬 수 있다. 48시간 후, 세포를 용해시키고, 표적 서열을 보유하는 레닐라 루시페라제의 발광 값을 참조 대조군으로서 사용될 수 있는 반딧불이 루시페라제와 비교함으로써 표적 유전자의 녹다운에 대해 검정할 수 있다. CASi siRNA 구축물을 조립하는 방법 및 절차, 세포 형질감염, 및 이중 루시페라제 검정의 예는, 예를 들어 국제 출원 WO/2020/033938 (그의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다. 본원에 기재된 RNA 복합체는 RNAi 활성을 갖는 것으로 예상된다.
- [0271] 실시예 2
- [0272] 예시적인 T1 조건부 활성화 siRNA (T1 CASi)의 구현
- [0273] 본 실시예는 T1 CASi 구축물의 구현을 기재하고, 중추 및 말초 신경계에서의 T1 CASi 구축물의 RNAi 활성을 추가로 입증한다.
- [0274] T1 CASi는 센서 가닥, 코어 가닥, 및 패신저 가닥으로 이루어진다 (도 5a). 센서 가닥은 뇌 조직에서 높은 발현을 갖는 마이크로RNA인 mir23a-3p의 가이드 가닥에 상보적이다. 코어 가닥은 2개의 도메인을 갖는다. 제1 도메인은 센서 가닥에 상보적이어서 센서 듀플렉스의 형성을 허용한다. 제2 도메인은 설치류 및 영장류 헌팅틴 유전자 mRNA 둘 다에 상보적이다. 패신저 가닥은 코어 가닥의 제2 도메인에 상보적이고, 코어 가닥과 염기 쌍을 형성하여 siRNA를 형성한다. 팔미트산 리간드를 센서 가닥에 첨가하여 전달을 증진시킬 수 있다. 일부 T1 CASi 구축물에서, 팔미트산은 센서 가닥의 3' 단부에 부착된다.
- [0275] 하기 표 1은 예시적인 T1 CASi 구축물 및 가닥의 서열 다이어그램을 제공한다. mir23 센서 가닥 (팔미트산을 포함하는 8 nt), HTT 패신저 가닥, 및 mir23-HTT 코어 가닥의 화학식은 각각 도 5b, 5c 및 5d에 나타나 있다.

표 1. 예시적인 T1 CASi 가닥의 서열.	
HTT 패신저 가닥	mU*mU*mA.mU.mA.mU.fc.mA.fG.fU.fA.mA.mA.mG.mA.mG.mA.mU.mU*mA*mA (서열식별번호: 1)
mir23-HTT 코어 가닥	mG.mC.mC.mA.mG.mG.mG.mA.mU.mU.mU.mC.mC.mG.mU*fU*mA.mA.mU.fc.mU.mC.mU.mU.mU.mA.mC.fU.mG.fA.mU.mA.mU.mA.mA*mU*mU (서열식별번호: 2)
mir23 센서 (12 nt)	mC*+G.mG.mA.mA.mA.mU.mC.mC.mC.mU.mG.mG.mC*mA*mA*+T*mG*+T*mG*+A*mU*mU*mU*mU*mU*/3AmMC6T/ (서열식별번호: 3)
mir23 센서 (16 nt)	mC*+G.mG.mA.mA.mA.mU.mC.mC.mC.mU.mG.mG.mC*mA*mA*+T*mG*+T*mG*+A*mU*mU*mU*mU*mA*mU*mU*mU*mA*/3AmMC6T/ (서열식별번호: 4)
mir23 센서 (팔미트산을 함유하지 않은 8 nt)	/5Sp9/*mC*mG*+G.mA.+A.mA.mU.+C.mC.mC.+T.mG*+G*mC*mA*mA*+T*mG*+T*mG*+A*+T (서열식별번호: 5)
mir23 센서 (팔미트산을 함유한 8 nt)	/5Sp9/*mC*mG*+G.mA.+A.mA.mU.+C.mC.mC.+T.mG*+G*mC*mA*mA*+T*mG*+T*mG*+A*+T*/Pal m/ (서열식별번호: 6)
/5Sp9/ = 5' 트리에틸렌 글리콜 스페이스 /Pal m/ = 팔미트산 * = 포스포로티오에이트 백본 변형 . = 포스포디에스테르 백본 mA, mG, mC, mU = 2'-O-메틸 염기 +A, +T, +C, +G = 잠금 핵산 (LNA) 염기 fA, fU, fC, fG = 2'-플루오로 염기	

[0276]

[0277]

구축물을 열 어닐링에 의해 조립하였다. 가닥을 PBS 완충제 중에서 1:1:1.1 비의 패신저:코어:센서로 혼합한 다음, 75°C 초과로 가열하고, 이어서 실온으로 냉각시켰다. 비-변성 PAGE 겔을 사용하여 조립된 구축물 (도 5e의 레인 2)을 개별 가닥 (도 5e의 레인 3: 코어 가닥; 도 5e의 레인 4: 패신저 가닥) 및 2-가닥 하위-조립체 (도 5e의 레인 1: RNAi 듀플렉스)와 비교하였다. 단일 가닥 (레인 3 및 4) 및 듀플렉스 (레인 1)보다 느린 이동을 갖는 단일 밴드 (레인 2)의 존재는 정확한 구축물의 조립을 나타낸다.

[0278]

조립된 구축물을 1x PBS 중에서 ~3 mM 농도로 농축시킨 다음, 뇌실내 주사 (ICV)에 의해 야생형 마우스의 우심실로 전달하였다. 마우스를 주사 14, 30, 또는 90일 후에 희생시켰다. 뇌를 수집하고, 9개의 영역으로 절개하였다: 감각 피질, 시각 피질, 전전두 피질, 선조체, 시상, 배측 해마 (해마), 복측 해마, 중간뇌 (중뇌) 및 소뇌 (도 6). 각각의 뇌 영역으로부터의 조직을 용해시키고, qPCR에 의해 HTT mRNA 발현에 대해 검정하였다. HTT mRNA의 녹다운은 구축물-처리된 마우스에서의 mRNA 수준을 염수-처리된 마우스와 비교함으로써 결정하였다.

[0279]

도 7은 주사 14일 후 상이한 뇌 영역에서의 3' 말단 팔미트산 함유 (하단 패널) 및 3' 말단 팔미트산 무함유 (상단 패널) mir23-HTT 구축물의 mRNA 녹다운을 나타낸다. 결과는 3' 말단 팔미트산 함유 mir23-HTT 구축물이 3' 말단 팔미트산 무함유 mir23-HTT 구축물에 비해 모든 뇌 영역에 걸쳐 더 높은 정도의 HTT mRNA 녹다운 (더 낮은 양의 잔류 HTT mRNA)을 달성한다는 것을 입증한다.

[0280]

도 8은 표준 8개 뉴클레오티드 토홀드 (팔미트산 함유 및 무함유), 연장된 12개 뉴클레오티드 토홀드, 또는 16개 뉴클레오티드 토홀드를 갖는 mir23-HTT 구축물의 mRNA 녹다운을 나타내는 다이어그램을 도시한다. 데이터는 토홀드 길이 및 팔미트산이 상이한 뇌 영역에서 mir23-HTT CASi 활성에 대해 상이한 효과를 갖는다는 것을 시사한다. 8개 뉴클레오티드 토홀드 및 팔미트산을 갖는 CASi 구축물은 뇌 영역에 걸쳐 전반적으로 최상의 녹다운 효과를 달성하였다. 팔미트산 무함유의 경우, 토홀드 길이를 8 nt에서 12 nt로 증가시키는 것이 피질 및 해마에서의 녹다운 활성을 개선시켰다.

[0281]

도 9는 우심실에서의 편측 ICV에 의한 단일 15 nmol 투여량 (425 µg)의 주사 14일, 30일 및 90일 후 mir23-HTT 구축물 (표준 8개 뉴클레오티드 토홀드 및 3' 팔미트산 함유)의 mRNA 녹다운을 나타낸다. 데이터는 모든 뇌 영역에서 mir23-HTT CASi 구축물에 의한 강력하고 지속적인 녹다운을 시사한다. 뇌의 전전두 피질, 감각 피질, 시각 피질, 선조체, 배측 해마, 복측 해마, 시상, 중뇌, 소뇌, 우측 반구 및 좌측 반구 영역을 포함한 뇌 영역에서 통계적으로 유의한 RNAi 활성이 관찰되었다. 데이터는 또한, RNAi 활성이 심지어 주사 90일 후에도 강력하게 남아있고, 따라서 보다 적은 투여 빈도 및 투여 사이의 보다 긴 시간 간격을 갖는 투여 요법을 가능하

게 한다는 것을 입증한다.

[0282] 도 10은 척수에서의 mir23-HTT 구축물의 HTT mRNA 녹다운을 나타낸다. 데이터는 약 80% 표적 녹다운 비율이 주사 30일 후 또는 심지어 90일 후에도 척수에 여전히 남아있음을 입증한다.

[0283] 도 11은 CASi 투여 30일 후 다양한 뇌 영역에서의 HTT mRNA 수준을 나타낸다. 5 nM mir23-HTT CASi 구축물 (8개 뉴클레오티드 토홀드, 팔미트산 함유)을 편측 ICV 주사를 통해 동물에게 투여하였다. 뇌 영역 및 척수에 추가로, 마우스로부터 10개의 후근 신경절 (DRG)을 또한 수집하고, HTT mRNA 녹다운에 대해 시험하였다. 중추 신경계 및 DRG에 전반적으로 약 25% HTT mRNA 녹다운이 관찰되었다. 결과는 중추 신경계에서 통계적으로 유의한 RNAi 활성이 관찰될 뿐만 아니라, CASi 구축물이 또한 중추 투여로부터 말초 신경 영역에 효과적으로 도달하고, 중추 신경계와 비교하여 DRG에서 대등한 녹다운을 달성하였음을 시사한다.

[0284] mir23-HTT CASi 구축물 (팔미트산 함유 8개 뉴클레오티드 토홀드)을 또한 15 nmol (425 µg)로 ICV 주사를 통해 마우스에 투여하여, 정상세포 (GFAP) 및 소교세포 (IBA-1) 활성화를 측정함으로써 CNS 염증에 대해 시험하였다. 도 12는 주사 14일 후 염수 처리된 동물 (c)과 비교하여 CASi 처리된 동물 (t)의 다양한 뇌 영역에서의 qPCR에 의한 GFAP mRNA 및 IBA-1 mRNA의 측정을 나타낸다. CASi로 처리된 마우스는 염수-처리된 마우스와 비교하여 상승된 GFAP mRNA 또는 IBA-1 mRNA를 나타내지 않았으며, 이는 구축물의 주사가 의도하지 않은 염증 반응을 유도하지 않았음을 나타낸다.

[0285] 용어

[0286] 이전에 기재된 실시양태 중 적어도 일부에서, 실시양태에 사용된 하나 이상의 요소는 이러한 대체가 기술적으로 실현가능하지 않는 한 또 다른 실시양태에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 청구된 대상의 범주로부터 벗어나지 않으면서 상기 기재된 방법 및 구조에 대해 다양한 다른 생략, 부가 및 변형이 이루어질 수 있음을 알 것이다. 모든 이러한 변형 및 변화는 첨부된 청구범위에 의해 정의된 바와 같은 대상의 범주 내에 속하는 것으로 의도된다.

[0287] 본원에서 실질적으로 임의의 복수 및/또는 단수 용어의 사용과 관련하여, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 문맥 및/또는 적용에 적절한 바와 같이 복수로부터 단수로 및/또는 단수로부터 복수로 해석할 수 있다. 다양한 단수형/복수형 순열은 명확성을 위해 본원에 명백하게 기재될 수 있다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 단수 형태는 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 본원에서 "또는"에 대한 임의의 언급은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 포괄하는 것으로 의도된다.

[0288] 일반적으로, 본원, 특히 첨부된 청구범위 (예를 들어, 첨부된 청구범위의 주요부)에서 사용된 용어는 일반적으로 "개방" 용어로서 의도된다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 것이다 (예를 들어, 용어 "포함하는"은 "포함하나 이에 제한되지는 않는"으로서 해석되어야 하고, 용어 "갖는"은 "적어도 갖는"으로서 해석되어야 하고, 용어 "포함하다"는 "포함하나 이에 제한되지는 않는"으로서 해석되어야 하는 등임). 특정 수의 도입된 청구항 인용이 의도되는 경우, 이러한 의도는 청구항에서 명백하게 언급될 것이고, 이러한 인용이 없는 경우에는 이러한 의도가 존재하지 않는다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 추가로 이해될 것이다. 예를 들어, 이해를 돕기 위해, 하기 첨부된 청구범위는 청구범위 인용을 도입하기 위해 도입 어구 "적어도 하나" 및 "하나 이상"의 사용을 함유할 수 있다. 그러나, 이러한 어구의 사용은, 심지어 동일한 청구항이 도입 어구 "하나 이상" 또는 "적어도 하나" 및 부정관사를 포함하는 경우에도, 부정관사에 의한 청구항 인용의 도입이 이러한 도입된 청구항 인용을 함유하는 임의의 특정 청구항을 단지 하나의 이러한 인용을 함유하는 실시양태로 제한함을 암시하는 것으로 해석되어서는 안되며 (예를 들어, 부정관사는 "적어도 하나" 또는 "하나 이상"을 의미하는 것으로 해석되어야 함); 청구항 인용을 도입하기 위해 사용된 정관사의 사용에도 동일하게 적용된다. 또한, 특정 수의 도입된 청구항 인용이 명백하게 언급되더라도, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이러한 인용이 적어도 인용된 수를 의미하는 것으로 해석되어야 함을 인식할 것이다 (예를 들어, 다른 수식 없이 "2개의 인용"의 드문 인용은 적어도 2개의 인용, 또는 2개 이상의 인용을 의미함). 게다가, "A, B 및 C 중 적어도 하나 등"과 유사한 관계가 사용되는 경우, 일반적으로 이러한 구성은 관련 기술분야의 통상의 기술자가 관계를 이해하는 의미로 의도된다 (예를 들어, "A, B 및 C 중 적어도 하나를 갖는 시스템"은 A 단독, B 단독, C 단독, A 및 B 함께, A 및 C 함께, B 및 C 함께, 및/또는 A, B 및 C 함께 등을 갖는 시스템을 포함하나 이에 제한되지는 않음). "A, B 또는 C 중 적어도 하나 등"과 유사한 관계가 사용되는 경우, 일반적으로 이러한 구성은 관련 기술분야의 통상의 기술자가 관계를 이해하는 의미로 의도된다 (예를 들어, "A, B 또는 C 중 적어도 하나를 갖는 시스템"은 A 단독, B 단독, C 단독, A 및 B 함께, A 및 C 함께, B 및 C 함께, 및/또는 A, B 및 C 함께 등을 갖는 시스템을 포함하나 이에 제한되지는 않음). 추가로, 상세한 설명, 청구범위 또는 도면에서 2개 이상의 대안

적 용어를 제시하는 사실상 임의의 이접 단어 및/또는 어구는 용어 중 하나, 용어 중 어느 하나 또는 두 용어 모두를 포함하는 가능성을 고려하는 것으로 이해되어야 함이 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 것이다. 예를 들어, 어구 "A 또는 B"는 "A" 또는 "B" 또는 "A 및 B"의 가능성을 포함하는 것으로 이해될 것이다.

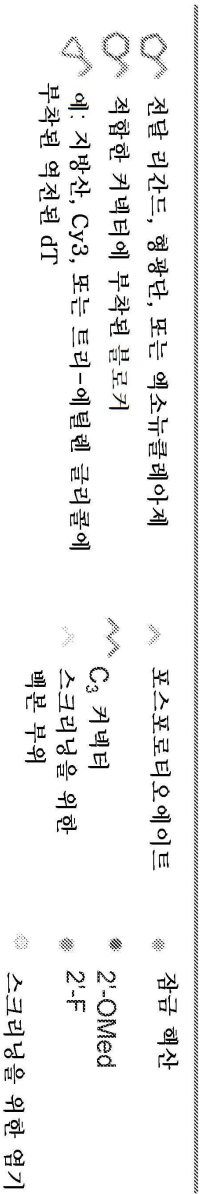
[0289] 또한, 본 개시내용의 특색 또는 측면이 마쿠쉬 군의 관점에서 기재되는 경우, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 개시내용이 또한 마쿠쉬 군의 임의의 개별 구성원 또는 구성원의 하위군의 관점에서 기재된다는 것을 인식할 것이다.

[0290] 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 임의의 및 모든 목적을 위해, 예컨대 서면 설명을 제공하는 관점에서, 본원에 개시된 모든 범위는 또한 임의의 및 모든 가능한 하위-범위 및 그의 하위-범위의 조합을 포괄한다. 임의의 열거된 범위는 동일한 범위가 적어도 동등한 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/10 등으로 나뉘어짐을 충분히 기재하고 이를 가능하게 하는 것으로 용이하게 인식될 수 있다. 비제한적 예로서, 본원에 논의된 각각의 범위는 아래 1/3, 중간 1/3 및 위 1/3 등으로 용이하게 나누어질 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 또한 이해될 바와 같이, "이하", "적어도", "초과", "미만" 등과 같은 모든 언어는 언급된 수를 포함하고, 상기 논의된 바와 같은 하위-범위로 후속적으로 나누어질 수 있는 범위를 지칭한다. 최종적으로, 관련 기술분야의 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이, 범위는 각각의 개별 구성원을 포함한다. 따라서, 예를 들어 1-3개의 물품을 갖는 군은 1, 2, 또는 3개의 물품을 갖는 군을 지칭한다. 유사하게, 1-5개의 물품을 갖는 군은 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 물품을 갖는 군 등을 지칭한다.

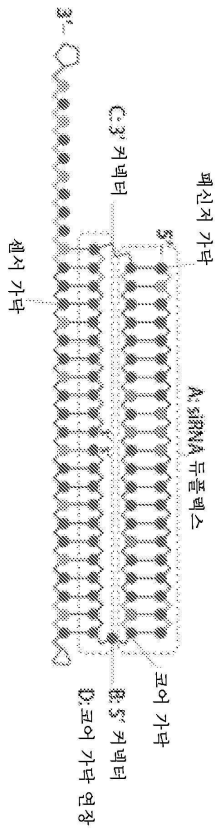
[0291] 다양한 측면 및 실시양태가 본원에 개시되었지만, 다른 측면 및 실시양태가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 본원에 개시된 다양한 측면 및 실시양태는 예시의 목적을 위한 것이고, 제한적인 것으로 의도되지 않으며, 진정한 범주 및 취지는 하기 청구범위에 의해 나타내어진다.

도면

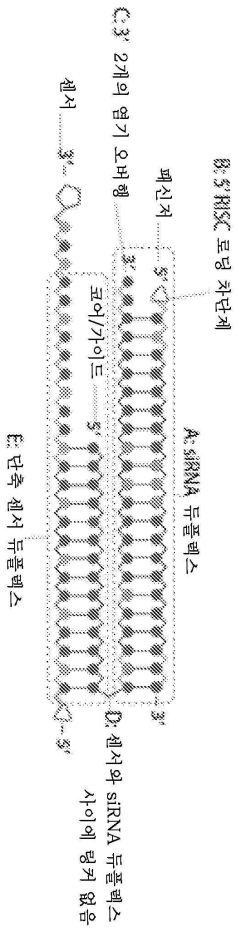
도면1



실제 1



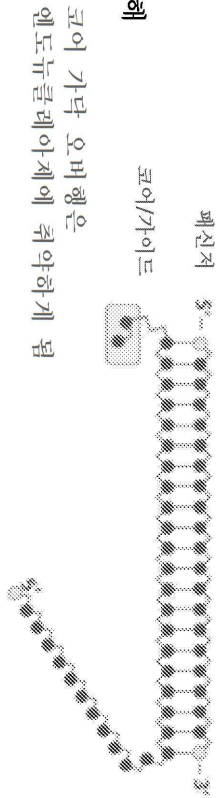
실제 2



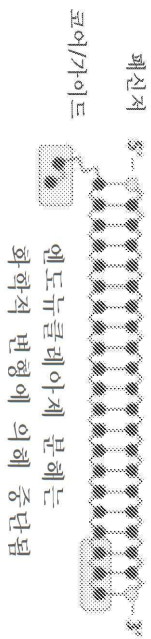
도면 2

- 전달 리간드, 형광단, 또는 엑소뉴클레아제
- 적합한 키넥터에 부착된 블로커
- △ 예: 지방산, Cy3, 또는 트리-에틸렌 글리콜에 부착된 역전된 dT
- △ 포스포로티오에이트
- △ 키넥터
- △ 스크리닝을 위한 펩톤 부위
- 잠금 핵산
- 2'-OMe
- 2'-F
- 스크리닝을 위한 염기

센서 가닥은
도홀드 매개된
가닥 치환에 의해
제거됨



엔도뉴클레아제는
siRNA 도메인을 활성
siRNA로 변환시킴

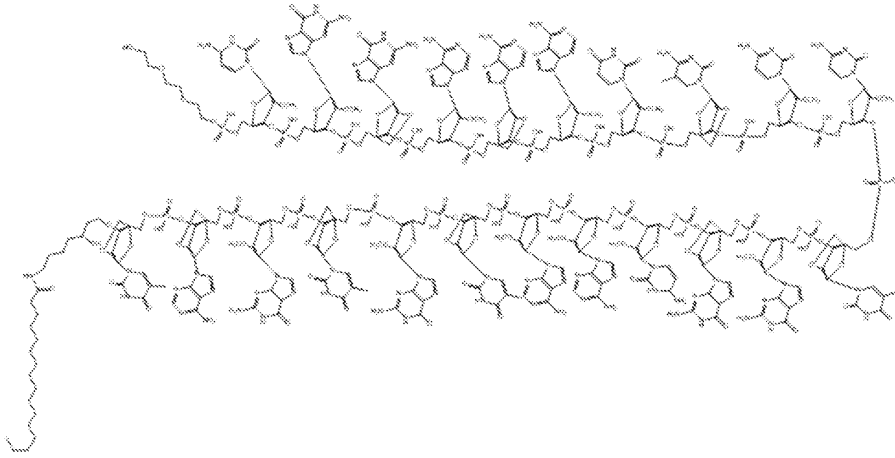


도면3

- ① 전달 리간드, 핵광단, 또는 엑소뉴클레아제
- ② 적합한 키넥틴에 부착된 블로키
- ③ 예: 계방산, Cy3, 또는 트리-에틸렌 글리콜에 부착된 역전된 dT
- ④ 포스포모티오에이트
- ⑤ C₃ 키넥틴
- ⑥ 스크리닝을 위한 백본 부위
- ⑦ 잠금 핵산
- ⑧ Z-DNA
- ⑨ Z-F
- ⑩ 스크리닝을 위한 염기

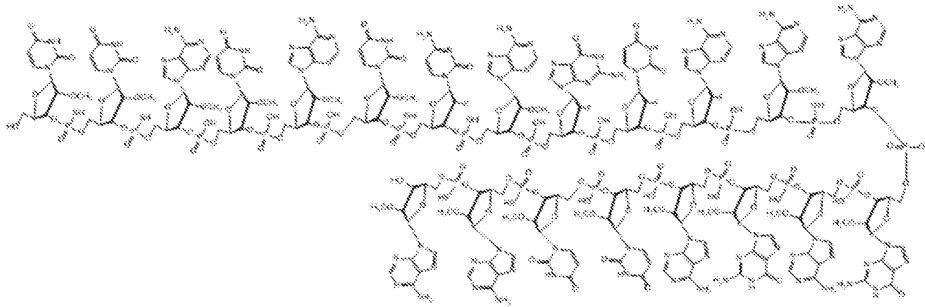
도면5b

트리에폭시글리콜 *mC*₂mC*⁺G.mA.*A.mA.mC.*C.mC.mC.*T.mC*⁺G*₂mC*₂mA*⁺T*₂mC*⁺T*₂mC*⁺A*⁺T*⁺ 팔미트산



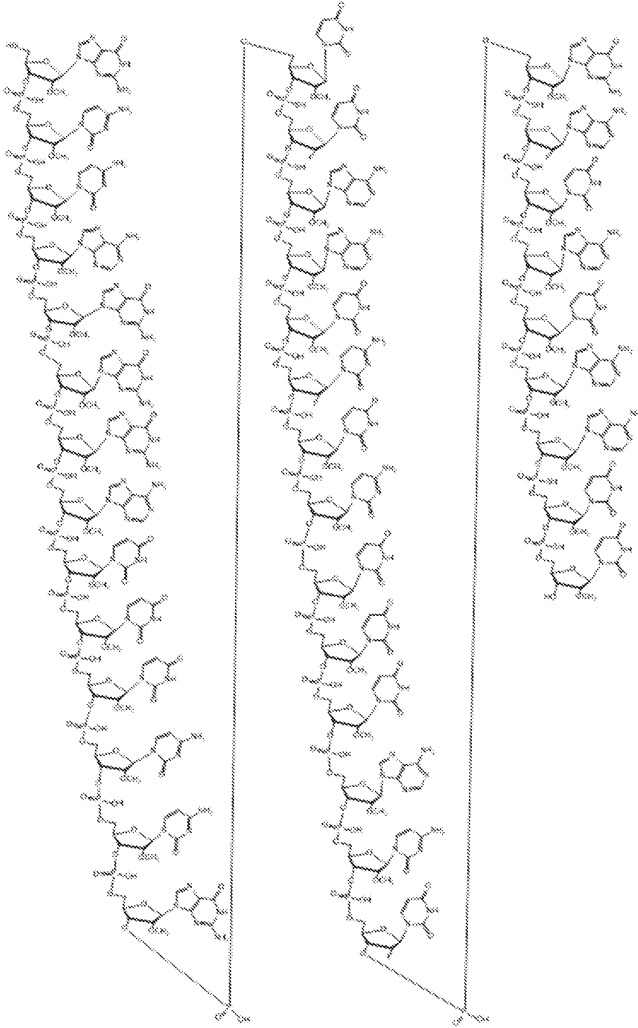
도면5c

[mC][mU][mA][mU][m.A][mC][PC][m.A][PC][PC][CA][m.A][m.A][mG][m.A][mC][m.A][mU][m.A][m.A]

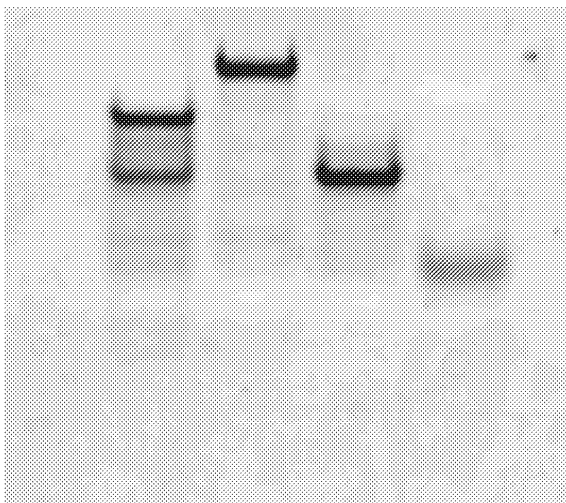


도면5d

[mG][mC][mC][mA][mG][mG][mG][mA][mU][mU][mU][mC][mC][mG][mUs][[Us][mA][mA][mU][[FC][mU]
[mC][mU][mU][mU][mA][mC][[U][mG][[FA][mU][mA][mU][mA][mAs][mUs][mU]



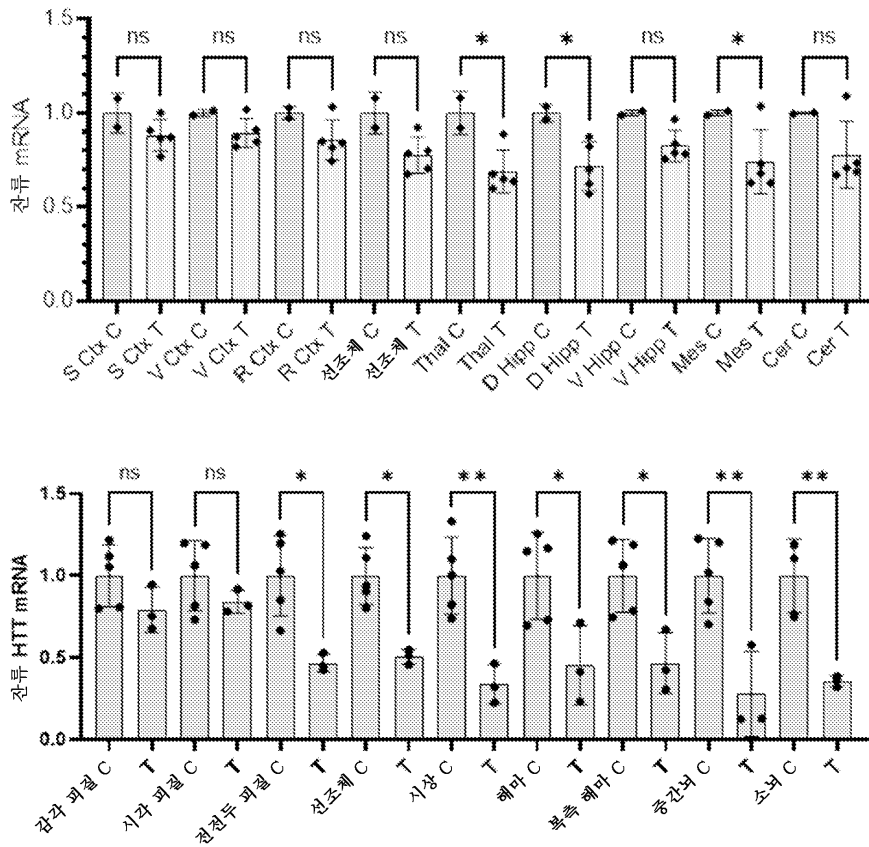
도면5e



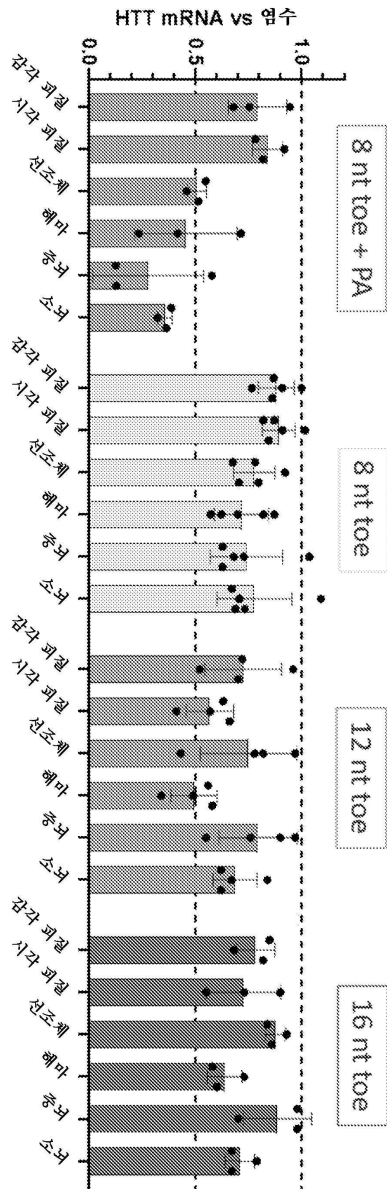
도면5f

CAS miR23R HTT T1 PALM 제조		70 μM				
중부액		1100.0 ul				
10xPBS		110.0 ul				
1xH2O		0.0 ul				
성분 명칭		사용 (ul)	공정 c 목적	개 목적 (c 스텝 (μM))		
페인저	HTT V3P11	188.5	70	1	70	408,409,6586
코어	miR23 V3C2	201.5	70	1	70	382,170,7514
센서	Alt miR23 센서 1 아이노 Palm	710.0	70	1.1	77	109

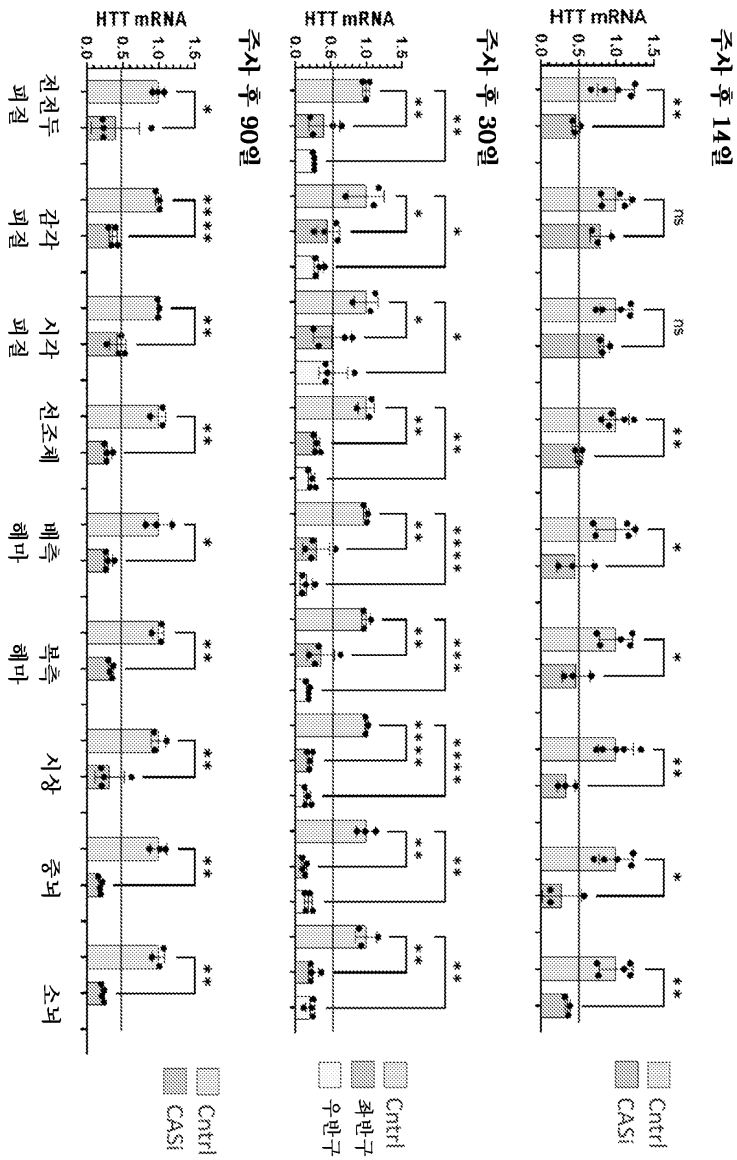
도면7



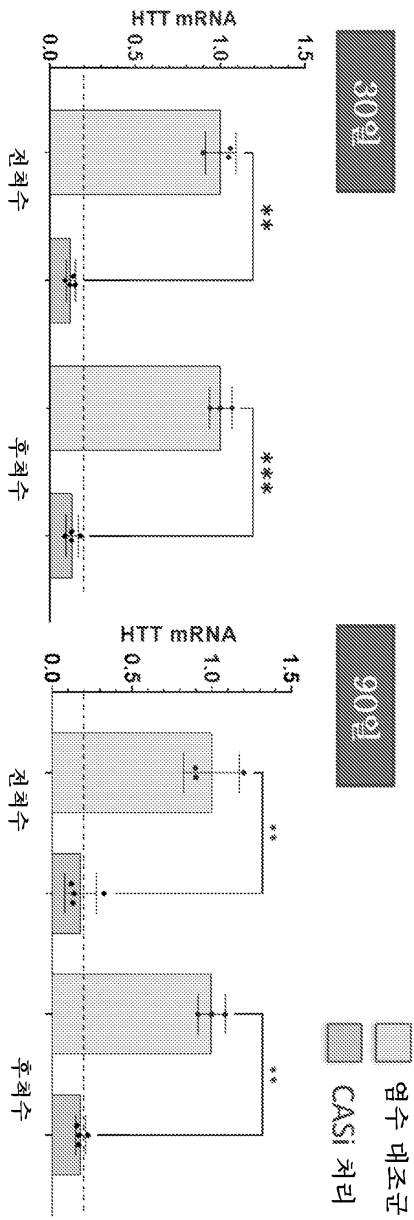
도면8



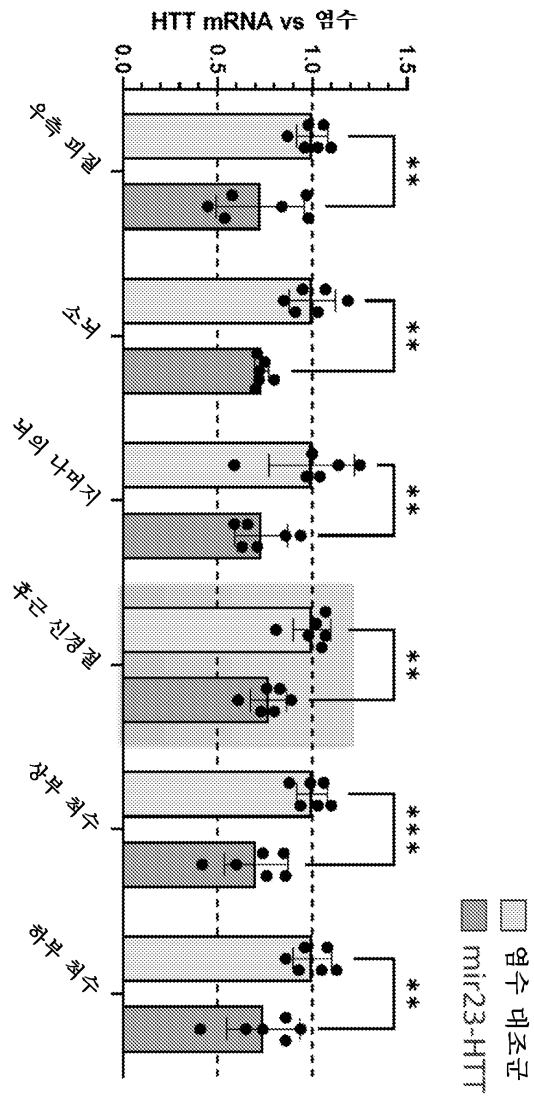
도면9



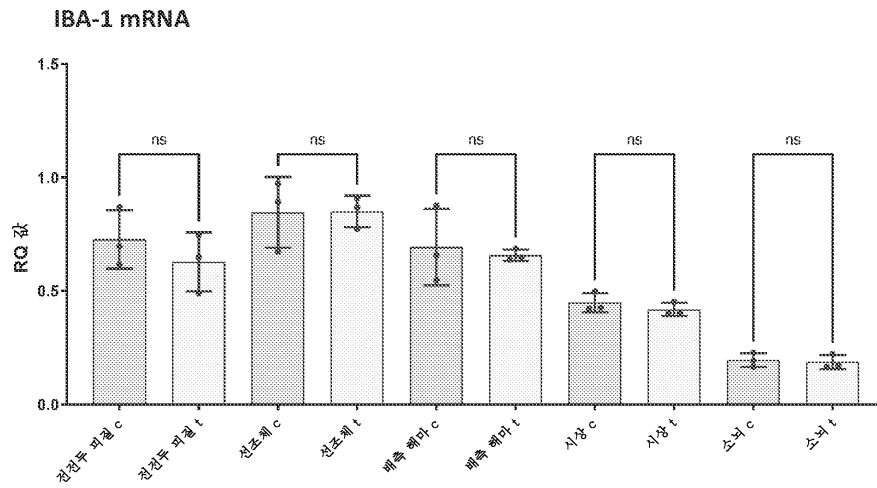
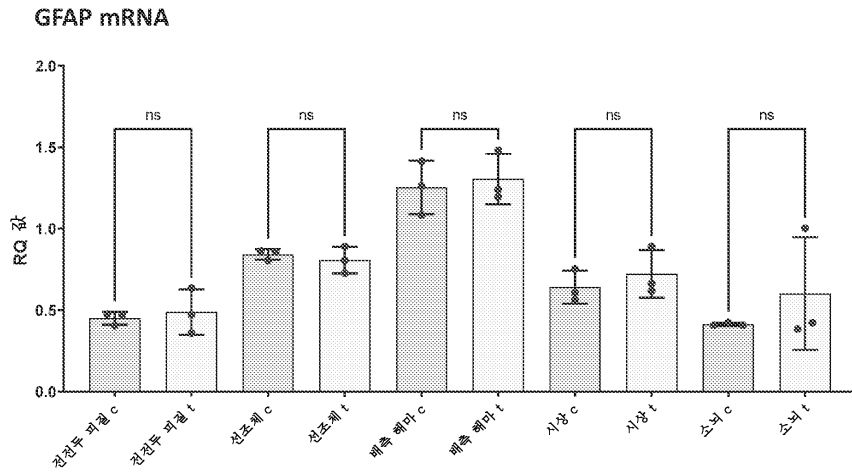
도면10



도면11



도면12



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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