



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0173116
(43) 공개일자 2023년12월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/713 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7036421
- (22) 출원일자(국제) 2022년04월20일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년10월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2022/025648
- (87) 국제공개번호 WO 2022/226127
국제공개일자 2022년10월27일
- (30) 우선권주장
63/177,254 2021년04월20일 미국(US)

- (71) 출원인
아스트라제네카 아일랜드 리미티드
아일랜드 15 더블린 블랜차드스타운 로드 노스 컬리지 비즈니스 앤드 테크놀로지 파크
- (72) 발명자
라사로, 멜리사
미국 02210 매사추세츠 보스턴 씨포트 불러바드 121 스위트 400
맥나이트, 수잔, 파스
미국 02210 매사추세츠 보스턴 씨포트 불러바드 121 스위트 400
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이윤기

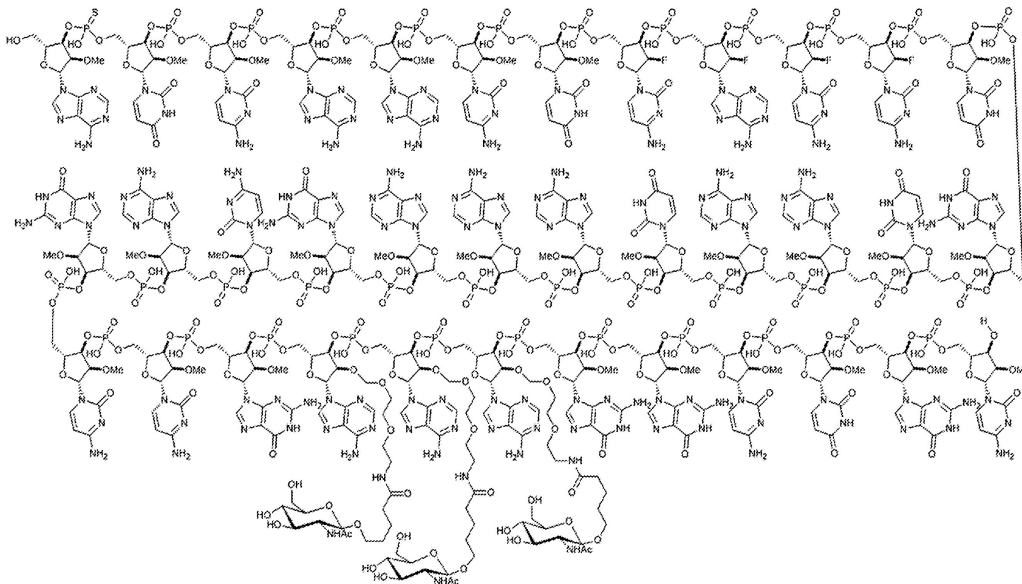
전체 청구항 수 : 총 93 항

(54) 발명의 명칭 보체 성분 3 발현을 저해하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

보체 성분 3(C3) mRNA를 표적화하기 위한 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 함유하는 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)가 본원에 기재된다. RNAi 올리고뉴클레오타이드는 세포에서 C3의 발현, 수준, 및/또는 활성을 저해하는 데 사용될 수 있다. 또한, 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환, 장애, 또는 질병의 예방 또는 치료를 위해 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)를 사용하는 방법이 본원에 기재된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2310/531 (2013.01)

(72) 발명자

듀랙, 헨릭, 티.

미국 02482 매사추세츠 웰레슬리 오버브룩 드라이브 105

박, 지혜

미국 02421 매사추세츠 렉싱턴 하이든 애비뉴 33

브라운, 람, 데일

미국 02421 매사추세츠 렉싱턴 하이든 애비뉴 33

라이, 청중

미국 02421 매사추세츠 렉싱턴 하이든 애비뉴 33

김, 성권

미국 02210 매사추세츠 보스턴 씨포트 볼러마드

121 스위트 400

명세서

청구범위

청구항 1

보체 성분 C3(C3) 발현을 저하시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염으로서, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 듀플렉스 영역을 형성하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 13 또는 SEQ ID NO: 14의 C3 mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하고, 상보성 영역은 적어도 15 개 인접 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 2

제1항에 있어서, 센스 가닥은 15 개 내지 50 개 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 센스 가닥은 18 개 내지 36 개 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 가닥은 15 개 내지 30 개 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 가닥은 22 개 뉴클레오티드 길이이고, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 적어도 19 개 뉴클레오티드 길이, 선택적으로 적어도 20 개 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스 영역을 형성하는, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥은 36 개 뉴클레오티드 길이이고, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 적어도 19 개 뉴클레오티드 길이, 선택적으로 적어도 20 개 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스 영역을 형성하는, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상보성 영역은 적어도 19 개 인접 뉴클레오티드 길이, 선택적으로 적어도 20 개 뉴클레오티드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥의 3' 말단은 S1-L-S2로 제시된 스템 루프를 포함하고, S1은 S2에 상보적이고, L은 3 개 내지 5 개 뉴클레오티드 길이의 S1과 S2 사이의 루프를 형성하는, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 9

제8항에 있어서, L은 트리루프(triloop) 또는 테트라루프인, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 10

제9항에 있어서, L은 테트라루프인, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 11

제10항에 있어서, 테트라루프는 SEQ ID NO: 8의 핵산 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 12

제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, S1 및 S2는 1 개 내지 10 개 뉴클레오타이드 길이이고, 선택적으로 S1 및 S2는 동일한 길이를 갖는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 13

제12항에 있어서, S1 및 S2는 1 개 뉴클레오타이드, 2 개 뉴클레오타이드, 3 개 뉴클레오타이드, 4 개 뉴클레오타이드, 5 개 뉴클레오타이드, 6 개 뉴클레오타이드, 7 개 뉴클레오타이드, 8 개 뉴클레오타이드, 9 개 뉴클레오타이드, 또는 10 개 뉴클레오타이드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 14

제13항에 있어서, S1 및 S2는 6 개 뉴클레오타이드 길이인, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 15

제8항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 스템 루프 영역은 SEQ ID NO: 7과 적어도 85% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 16

제15항에 있어서, 스템 루프 영역은 SEQ ID NO: 7과 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 17

제16항에 있어서, 스템 루프 영역은 SEQ ID NO: 7을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 18

제8항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 스템 루프는 SEQ ID NO: 7에 대해 최대 1 개, 2 개, 또는 3 개의 치환, 삽입, 또는 결실을 갖는 핵산을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 가닥은 하나 이상의 뉴클레오타이드 길이의 3' 오버행 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 20

제19항에 있어서, 안티센스 가닥은 적어도 2 개의 연결된 뉴클레오타이드의 3' 오버행을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 21

제20항에 있어서, 3' 오버행 서열은 2 개 뉴클레오타이드 길이이고, 선택적으로 3' 오버행 서열은 GG인, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 23

제22항에 있어서, 올리고뉴클레오타드는 20 개 내지 50 개의 변형된 뉴클레오타드를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 올리고뉴클레오타드의 모든 뉴클레오타드는 변형되는, RNAi 올리고뉴클레오타드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 뉴클레오타드는 2'-변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 26

제25항에 있어서, 2'-변형은 2'-아미노에틸, 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸, 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산으로부터 선택되는 변형인, RNAi 올리고뉴클레오타드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 27

제26항에 있어서, 2'-변형은 2'-플루오로 또는 2'-O-메틸이고, 선택적으로 2'-플루오로 변형은 2'-플루오로 데옥시리보뉴클레오시드이고/이거나 2'-O-메틸 변형은 2'-O-메틸 리보뉴클레오시드인, RNAi 올리고뉴클레오타드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 28

제27항에 있어서, RNAi 올리고뉴클레오타드는 40 개 내지 50 개의 2'-O-메틸 변형을 포함하고, 선택적으로 RNAi 올리고뉴클레오타드는 40 개 내지 50 개의 2'-O-메틸 리보뉴클레오타드를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 29

제28항에 있어서, 센스 가닥의 1 번 내지 7 번, 11 번 내지 27 번, 및 31 번 내지 36 번 뉴클레오타드 중 적어도 하나 및 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 8 번, 9 번, 11 번 내지 13 번, 및 15 번 내지 22 번 뉴클레오타드 중 하나 이상 또는 이 모두는 2'-O-메틸, 예컨대, 2'-O-메틸 리보뉴클레오시드를 이용하여 변형되는, RNAi 올리고뉴클레오타드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 30

제29항에 있어서, 센스 가닥의 1 번 내지 7 번, 11 번 내지 27 번, 및 31 번 내지 36 번 뉴클레오타드 중 10 개 내지 30 개 및 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 8 번, 9 번, 11 번 내지 13 번, 및 15 번 내지 22 번 뉴클레오타드 중 하나 이상 또는 이 모두는 2'-O-메틸, 예컨대, 2'-O-메틸 리보뉴클레오시드를 이용하여 변형되는, RNAi 올리고뉴클레오타드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 31

제29항에 있어서, 센스 가닥의 1 번 내지 7 번, 12 번 내지 27 번, 및 31 번 내지 36 번 뉴클레오타드 모두 및 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 8 번, 9 번, 11 번 내지 13 번, 및 15 번 내지 22 번 뉴클레오타드 중 하나 이상 또는 이 모두는 2'-O-메틸, 예컨대, 2'-O-메틸 리보뉴클레오시드를 이용하여 변형되는, RNAi 올리고뉴클레오타드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 32

제29항에 있어서, 센스 가닥의 1 번, 2 번, 4 번 내지 7 번, 11 번, 14 번 내지 16 번, 18 번 내지 27 번, 및 31 번 내지 36 번 뉴클레오타드 모두 및 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 9 번, 11 번, 13 번, 15 번, 17 번, 18 번 및 20 번 내지 22 번 뉴클레오타드 중 하나 이상 또는 이 모두는 2'-O-메틸, 예컨대, 2'-O-메틸 리보뉴클레

오시드를 이용하여 변형되는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 33

제28항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 5 개 내지 15 개의 2'-플루오로 변형, 예컨대, 2'-플루오로 데옥시리보뉴클레오타이드를 이용한 변형을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 34

제28항에 있어서, 센스 가닥의 3 번, 8 번, 9 번, 10 번, 11 번, 12 번, 13 번, 및 17 번 뉴클레오타이드 중 적어도 하나 및 안티센스 가닥의 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 7 번, 8 번, 10 번, 12 번, 14 번, 16 번, 및 19 번 뉴클레오타이드 중 하나 이상 또는 이 모두는 2'-플루오로, 예컨대, 2'-플루오로 데옥시리보뉴클레오타이드를 이용하여 변형되는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 35

제34항에 있어서, 센스 가닥의 3 번, 8 번, 9 번, 10 번, 11 번, 12 번, 13 번, 및 17 번 뉴클레오타이드 중 2 개 내지 4 개 및 안티센스 가닥의 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 7 번, 8 번, 10 번, 12 번, 14 번, 16 번, 및 19 번 뉴클레오타이드 중 하나 이상 또는 이 모두는 2'-플루오로, 예컨대, 2'-플루오로 데옥시리보뉴클레오타이드를 이용하여 변형되는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 36

제34항에 있어서, 센스 가닥의 8 번, 9 번, 10 번, 및 11 번 뉴클레오타이드 모두 및 안티센스 가닥의 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 7 번, 10 번, 및 14 번 뉴클레오타이드 중 하나 이상 또는 이 모두는 2'-플루오로, 예컨대, 2'-플루오로 데옥시리보뉴클레오타이드를 이용하여 변형되는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 37

제34항에 있어서, 센스 가닥의 3 번, 8 번 내지 10 번, 12 번, 13 번, 및 17 번 뉴클레오타이드 모두 및 안티센스 가닥의 2 번 내지 5 번, 7 번, 8 번, 10 번, 12 번, 14 번, 16 번, 및 19 번 뉴클레오타이드 중 하나 이상 또는 이 모두는 2'-플루오로, 예컨대, 2'-플루오로 데옥시리보뉴클레오타이드를 이용하여 변형되는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 39

제38항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오타이드간 연결은 포스포포티오에이트 연결인, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 40

제39항에 있어서, RNAi 올리고뉴클레오타이드는 센스 가닥의 1 번 뉴클레오타이드와 2 번 뉴클레오타이드 사이에, 및 안티센스 가닥의 1 번 뉴클레오타이드와 2 번 뉴클레오타이드 사이, 2 번 뉴클레오타이드와 3 번 뉴클레오타이드 사이, 20 번 뉴클레오타이드와 21 번 뉴클레오타이드 사이, 및 21 번 뉴클레오타이드와 22 번 뉴클레오타이드 사이에 포스포포티오에이트 연결을 갖는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 뉴클레오타이드간 연결이 존재하지 않는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오타이드의 당의 4'-탄소는 포스페이트 유사체를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 43

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 가닥의 5' 말단의 첫 번째 위치에 우리딘을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 44

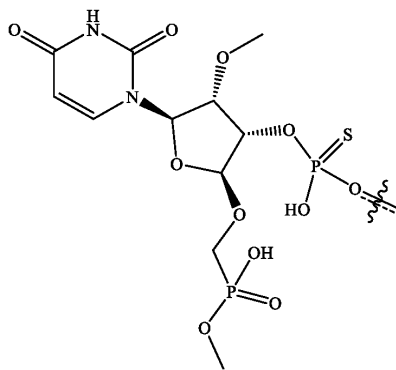
제43항에 있어서, 우리딘은 포스페이트 유사체를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 45

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 포스페이트 유사체는 4'-O-모노메틸 포스포네이트인, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 46

제44항에 있어서, 포스페이트 유사체를 포함하는 우리딘은 하기 구조를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염:



청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드의 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 하나 이상의 표적화 리간드에 컨쥬게이션되는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 48

제47항에 있어서, 각각의 표적화 리간드는 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 폴리펩티드, 또는 지질을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 각각의 표적화 리간드는 N-아세틸갈락토사민(GaINac) 모이어티를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 50

제49항에 있어서, GaINac 모이어티는 1가 GaINac 모이어티, 2가 GaINac 모이어티, 3가 GaINac 모이어티 또는 4가 GaINac 모이어티인, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 51

제8항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi 올리고뉴클레오타이드는 센스 가닥에 컨쥬게이션된 1 개 내지 5 개의 2'-O-N-아세틸갈락토사민(GaINac) 모이어티를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약학적으로

허용되는 염.

청구항 52

제51항에 있어서, 스템 루프의 L의 최대 4 개의 뉴클레오티드는 1가 GalNAc 모이어티에 컨쥬게이션되는, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 53

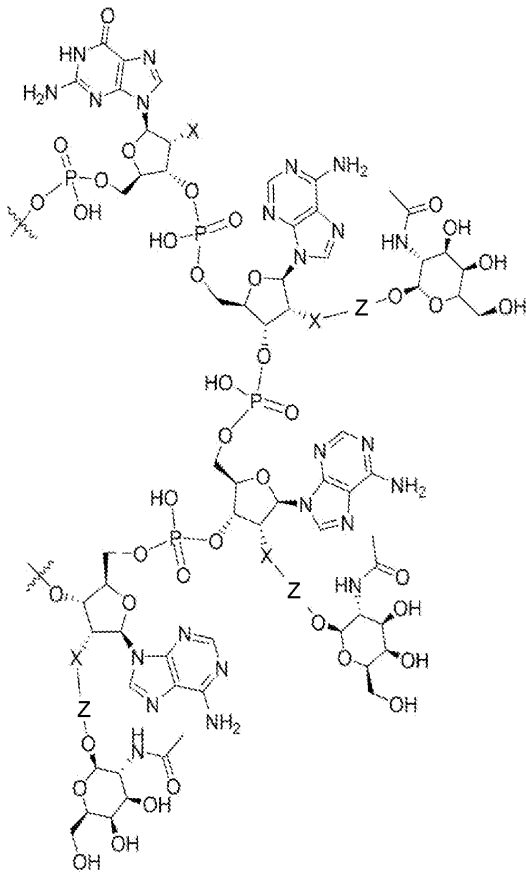
제52항에 있어서, 센스 가닥 상의 28 번 내지 30 번 뉴클레오티드 위치에 있는 뉴클레오티드 중 하나 이상은 1가 GalNAc 모이어티에 컨쥬게이션되는, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 54

제53항에 있어서, 센스 가닥 상의 28 번 내지 30 번 위치에 있는 뉴클레오티드 각각은 1가 GalNAc 모이어티에 컨쥬게이션되는, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 55

제54항에 있어서, 센스 가닥 상의 28 번 내지 30 번 위치에 있는 뉴클레오티드는 하기 구조를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염:



[여기서,

Z는 치환 및 비치환 알킬렌, 치환 및 비치환 알케닐렌, 치환 및 비치환 알키닐렌, 치환 및 비치환 헤테로알킬렌, 치환 및 비치환 헤테로알케닐렌, 치환 및 비치환 헤테로알키닐렌, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된, 1 개 내지 20 개의 포괄적이고 연속적이며 공유 결합된 원자 길이의, 결합, 클릭 화학 핸들 (click chemistry handle), 또는 링커를 나타내고;

X는 O, S, 또는 N임].

청구항 56

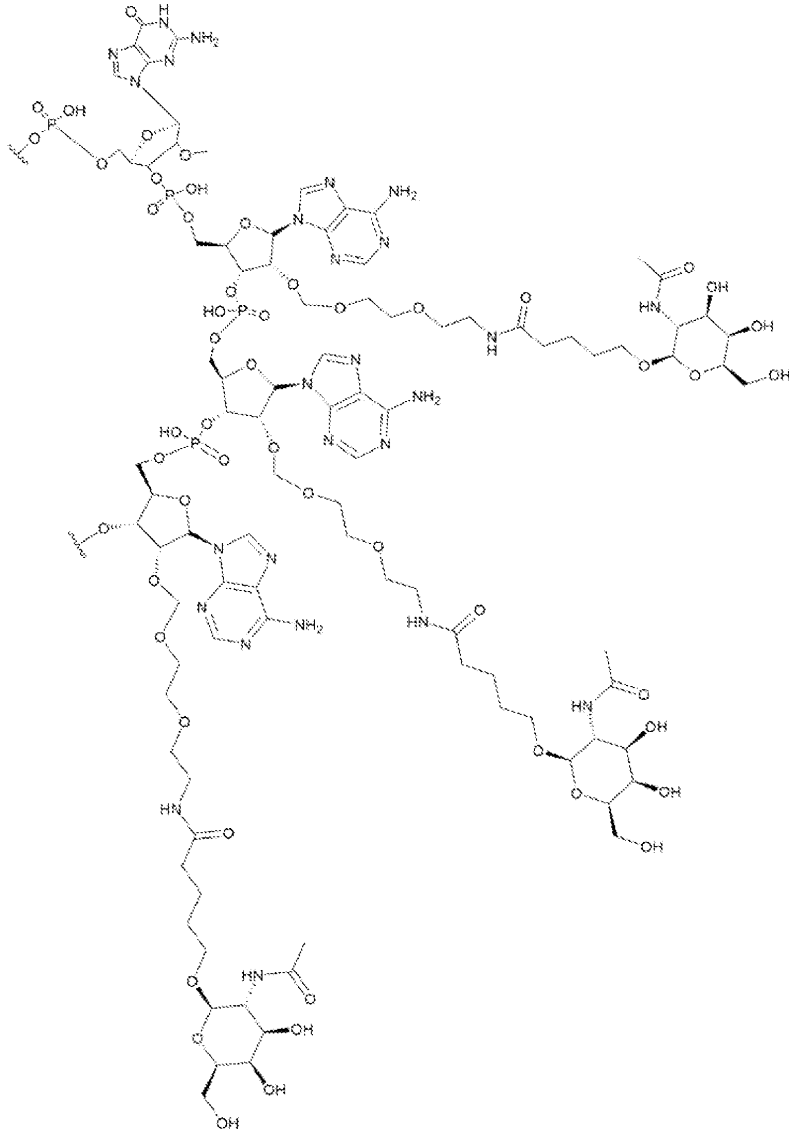
제55항에 있어서, Z는 아세탈 링커인, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 57

제55항 또는 제56항에 있어서, X는 O인, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 58

제54항에 있어서, 센스 가닥 상의 28 번 내지 30 번 위치에 있는 뉴클레오티드는 하기 구조를 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염:



청구항 59

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 4의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 60

제1항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 6의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 61

제1항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은

(a) 각각 SEQ ID NO: 1 및 SEQ ID NO: 3, 및

(b) 각각 SEQ ID NO: 4 및 SEQ ID NO: 6

으로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 62

제1항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 1에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 3에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 63

제1항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 4에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 6에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 64

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 37에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 38에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 65

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 39에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 40에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 66

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항의 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 및 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 또는 희석제를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 67

대상체의 세포를 제1항 내지 제65항 중 어느 한 항의 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 제66항의 약학적 조성물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염과 접촉시키는 단계를 포함하는, 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환을 치료하는 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, 세포는 C3의 mRNA 전사체의 분해가 이루어지기 전에 충분한 시간 동안 접촉되는, 방법.

청구항 69

제67항 또는 제68항에 있어서, 세포에서 C3의 발현은 저하되는, 방법.

청구항 70

제67항 또는 제68항에 있어서, 세포에서 C3의 전사는 저하되는, 방법.

청구항 71

제67항에 있어서, 세포에서 C3의 수준 및/또는 활성은 저하되는, 방법.

청구항 72

제67항에 있어서, C3의 수준 및/또는 활성은 제1항 내지 제65항 중 어느 한 항의 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는

제66항의 약학적 조성물이 투여되지 않은 대상체의 세포에서의 C3의 수준 및/또는 활성화에 비해 10% 내지 100% 저하되는, 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, C3의 수준 및/또는 활성화는 제1항 내지 제65항 중 어느 한 항의 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는 제66항의 약학적 조성물이 투여되지 않은 대상체의 세포에서의 C3의 수준 및/또는 활성화에 비해 50% 내지 99% 저하되는, 방법.

청구항 74

제67항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 포유류인, 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 대상체는 인간인, 방법.

청구항 76

제67항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환, 장애 또는 질병을 갖는 것으로 확인되는, 방법.

청구항 77

제67항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환은 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH), 비정형 용혈성 요독 증후군(aHUS), IgA 신장병증, 루푸스 신염, C3 사구체병증(C3G), 피부근염/자가면역 근염, 전신 경화증, 탈수초성 다발신경병증, 천포창, 막성 신장병증, 국소 분절 사구체 경화증(FSGS), 수포성 유천포창, 후천성 표피박리 수포증(EBA), 점막 유천포창, ANCA 혈관염, 저보체성 두드러기성 혈관염, 면역 복합체 소혈관 혈관염, 피부 소혈관 혈관염, 자가면역 괴사성 근육병증, 이식 기관 거부반응, 예컨대, 신장, 간, 심장 또는 폐 이식 거부반응, 예컨대, 항체 매개 거부반응(AMR), 예컨대, 만성 AMR(cAMR), 항인 지질(aPL) Ab 증후군, 사구체신염, 천식, 고밀도침착병(DDD), 노인성 황반변성(AMD), 전신 홍반성 루푸스(SLE), 류마티스 관절염(RA), 중증 난치성 RA, 펠티 증후군, 다발성 경화증(MS), 외상성 뇌 손상(TBI), 척수 손상, 허혈 재관류 손상, 자간전증, 급성 신장 손상에서의 이식편 기능 지연(DGF-AKI), 심폐 우회-관련 급성 신장 손상, 저산소-허혈성 뇌병증, 투석-유발 혈전증, 타카야스 동맥염, 재발성 다발연골염, 급성/예방 이식편대숙주병, 만성 이식편대숙주병, 베타 지중해빈혈, 줄기 세포 이식-관련 혈전성 미세혈관병증, 담도 폐쇄증, 염증성 간 질환, 베체트병, 허혈성 뇌졸중, 뇌내 출혈, 경피증, 경피증 신발증, 경피증-관련 간질성 폐질환(SSc-ILD), 겸상 적혈구병, 상염색체 우성 다낭성 신장병(ADPKD), 화학요법-유발 말초 신경병증(CIPN), 당뇨병성 신경병증, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 당뇨병성 신장병증, 당뇨병성 망막병증, 지도형 위축증, 폐동맥 고혈압, 난치성 중증 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 특발성 폐섬유증(IPF), 만성 폐 동종이식편 기능장애, 낭성 섬유증의 폐 이환(pulmonary morbidity), 화농성 땀샘염, 비알코올성 지방간 질환(NASH), 강직성 척추염, 조혈 줄기 세포 이식-관련 혈전성 미세혈관병증(HSCT-TMA)(예방), 관상 동맥 질환, 죽상경화증, 골다공증(예방), 골관절염, 고위험 드루젠, 염증성 장질환, 궤양성 대장염, 간질성 방광염, 투석 유발 보체 활성화, 괴저성 농피증, 만성 심부전, 자가면역 심근염, 비용종증, 급성 및 만성 체장염, 죽상경화증, 호산구성 식도염, 호산구성 육아종증, 과호산구성 증후군, 상처 치유 및 혈전성 혈소판 감소성 자반증(TTP)인, 방법.

청구항 78

제67항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는 약학적 조성물은 매일, 매주, 매달, 또는 매년 투여용으로 제형화되는, 방법.

청구항 79

제67항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는 약학적 조성물은 정맥내, 피하, 근육내, 경구, 비강, 설하, 척추강내, 및 피내 투여용으로 제형화되는, 방법.

청구항 80

제79항에 있어서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는 약학적 조성물은 피하 투여용으로 제형화되는, 방법.

청구항 81

제67항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는 약학적 조성물은 약 0.1 mg/kg 내지 약 150 mg/kg 투여량으로 투여하기 위해 제형화되는, 방법.

청구항 82

세포, 세포 집단, 또는 대상체에서 C3 발현을 저하시키는 방법으로서,

i) 세포 또는 세포 집단을 제1항 내지 제65항 중 어느 한 항의 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는 제66항의 약학적 조성물과 접촉시키는 단계; 또는

ii) 제1항 내지 제65항 중 어느 한 항의 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는 제66항의 약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, C3 발현을 저하시키는 것은 C3 mRNA의 양 또는 수준, C3 단백질의 양 또는 수준, 또는 이 둘 모두를 저하시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 84

제83항에 있어서, C3 mRNA의 수준, C3 단백질의 수준, 또는 이 둘 모두는, 제1항 내지 제65항 중 어느 한 항의 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는 제66항의 약학적 조성물이 투여되지 않은 대상체의 세포에서의 C3 mRNA의 수준, C3 단백질의 수준, 또는 이 둘 모두에 비해 10% 내지 100% 저하되는, 방법.

청구항 85

제83항 또는 제84항에 있어서, C3 mRNA의 수준, C3 단백질의 수준, 또는 이 둘 모두는, 제1항 내지 제65항 중 어느 한 항의 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는 제66항의 약학적 조성물이 투여되지 않은 대상체의 세포에서의 C3 mRNA의 수준, C3 단백질의 수준, 또는 이 둘 모두에 비해 50% 내지 99% 저하되는, 방법.

청구항 86

제82항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환, 장애 또는 질병을 갖는, 방법.

청구항 87

제86항에 있어서, 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환, 장애, 또는 질병은 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH), 비정형 용혈성 요독 증후군(aHUS), IgA 신장병증, 루푸스 신염, C3 사구체병증(C3G), 피부근염/자가면역 근염, 전신 경화증, 탈수초성 다발신경병증, 천포창, 막성 신장병증, 국소 분절 사구체 경화증(FSGS), 수포성 유천포창, 후천성 표피박리 수포증(EBA), 점막 유천포창, ANCA 혈관염, 저보체성 두드러기성 혈관염, 면역 복합체 소혈관 혈관염, 피부 소혈관 혈관염, 자가면역 괴사성 근육병증, 이식 기관 거부반응, 예컨대, 신장, 간, 심장 또는 폐 이식 거부반응, 예컨대, 항체 매개 거부반응(AMR), 예컨대, 만성 AMR(cAMR), 항인지질(aPL) Ab 증후군, 사구체신염, 천식, 고밀도침착병(DDD), 노인성 황반변성(AMD), 전신 홍반성 루푸스(SLE), 류마티스 관절염(RA), 중증 난치성 RA, 펠티 증후군, 다발성 경화증(MS), 외상성 뇌 손상(TBI), 척수 손상, 허혈 재관류 손상, 자간전증, 급성 신장 손상에서의 이식편 기능 지연(DGF-AKI), 심폐 우회-관련 급성 신장 손상, 저산소-허혈성 뇌병증, 투석-유발 혈전증, 타카야스 동맥염, 재발성 다발연골염, 급성/예방 이식편대숙주병, 만성 이식편대숙주병, 베타 지중해빈혈, 줄기 세포 이식-관련 혈전성 미세혈관병증, 담도 폐쇄증, 염증성 간 질환, 베체트 병, 허혈성 뇌졸중, 뇌내 출혈, 경피증, 경피증 신발증, 경피증-관련 간질성 폐질환(SSc-ILD), 겸상 적혈구병, 상염색체 우성 다낭성 신장병(ADPKD), 화학요법-유발 말초 신경병증(CIPN), 당뇨병성 신경병증, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 당뇨병성 신장병증, 당뇨병성 망막병증, 지도형 위축증, 폐동맥 고혈압, 난치성 중증 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 특발성 폐섬유증(IPF), 만성 폐 동종이식편 기능장애, 남성 섬유증의 폐 이환, 화농성 땀샘염,

비알코올성 지방간 질환(NASH), 강직성 척추염, 조혈 줄기 세포 이식-관련 혈전성 미세혈관병증(HSCT-TMA)(예방), 관상 동맥 질환, 죽상경화증, 골다공증(예방), 골관절염, 고위험 드루젠, 염증성 장질환, 궤양성 대장염, 간질성 방광염, 투석 유발 보체 활성화, 괴저성 농피증, 만성 심부전, 자가면역 심근염, 비용종증, 급성 및 만성 췌장염, 죽상경화증, 호산구성 식도염, 호산구성 육아종증, 과호산구성 증후군, 상처 치유 및 혈전성 혈소판 감소성 자반증(TTP)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 88

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는 제66항의 약학적 조성물을 포함하는, 키트.

청구항 89

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항, 또는 제66항에 있어서, 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환, 장애 또는 질병의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상체에서 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환, 장애 또는 질병의 예방 또는 치료에 사용하기 위한, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는 약학적 조성물.

청구항 90

제89항에 있어서, 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH), 비정형 용혈성 요독 증후군(aHUS), IgA 신장병증, 루푸스 신염, C3 사구체병증(C3G), 피부근염/자가면역 근염, 전신 경화증, 탈수초성 다발신경병증, 천포창, 막성 신장병증, 국소 분절 사구체 경화증(FSGS), 수포성 유천포창, 후천성 표피박리 수포증(EBA), 점막 유천포창, ANCA 혈관염, 저보체성 두드러기성 혈관염, 면역 복합체 소혈관 혈관염, 피부 소혈관 혈관염, 자가면역 괴사성 근육병증, 이식 기관 거부반응, 예컨대, 신장, 간, 심장 또는 폐 이식 거부반응, 예컨대, 항체 매개 거부반응(AMR), 항인지질(aPL) Ab 증후군, 사구체신염, 천식, 고밀도침착병(DDD), 노인성 황반변성(AMD), 전신 홍반성 루푸스(SLE), 류마티스 관절염(RA), 중증 난치성 RA, 펠티 증후군, 다발성 경화증(MS), 외상성 뇌 손상(TBI), 척수 손상, 허혈 재관류 손상, 자간전증, 급성 신장 손상에서의 이식편 기능 지연(DGF-AKI), 심폐 우회-관련 급성 신장 손상, 저산소-허혈성 뇌병증, 투석-유발 혈전증, 타카야스 동맥염, 재발성 다발연골염, 급성/예방 이식편대숙주병, 만성 이식편대숙주병, 베타 지중해빈혈, 줄기 세포 이식-관련 혈전성 미세혈관병증, 담도 폐쇄증, 염증성 간 질환, 베체트병, 허혈성 뇌졸중, 뇌내 출혈, 경피증, 경피증 신발증, 경피증-관련 간질성 폐질환(SSc-ILD), 겸상 적혈구병, 상염색체 우성 다낭성 신장병(ADPKD), 화학요법-유발 말초 신경병증(CIPN), 당뇨병성 신경병증, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 당뇨병성 신장병증, 당뇨병성 망막병증, 지도형 위축증, 폐동맥 고혈압, 난치성 중증 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 특발성 폐섬유증(IPF), 만성 폐 동종이식편 기능장애, 남성 섬유증의 폐 이환, 화농성 땀샘염, 비알코올성 지방간 질환(NASH), 강직성 척추염, 조혈 줄기 세포 이식-관련 혈전성 미세혈관병증(HSCT-TMA)(예방), 관상 동맥 질환, 죽상경화증, 골다공증(예방), 골관절염, 고위험 드루젠, 염증성 장질환, 궤양성 대장염, 간질성 방광염, 투석 유발 보체 활성화, 괴저성 농피증, 만성 심부전, 자가면역 심근염, 비용종증, 급성 및 만성 췌장염, 죽상경화증, 호산구성 식도염, 호산구성 육아종증, 과호산구성 증후군, 상처 치유 및 혈전성 혈소판 감소성 자반증(TTP)의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상체에서 이들의 예방 또는 치료에 사용하기 위한, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는 약학적 조성물.

청구항 91

제89항 또는 제90항에 있어서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는 약학적 조성물은 피하 투여되는, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는 약학적 조성물.

청구항 92

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, RNA 올리고뉴클레오티드는 약학적으로 허용되는 염을 포함하는, RNA 올리고뉴클레오티드.

청구항 93

제92항에 있어서, 약학적으로 허용되는 염은 나트륨 염인, RNA 올리고뉴클레오티드.

발명의 설명

기술분야

서열 목록

[0001]

[0002]

본 출원은 전자 형식의 서열 목록과 함께 제출되었다. 서열 목록은 크기가 77,827 바이트이고 2021년 4월 20일에 생성된 50694-093W03_Sequence_Listing_4_18_22_ST25_FINAL이라는 명칭의 파일로서 제공된다. 서열 목록의 전자 형식의 정보는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003]

보체계는 면역 복합체의 제거 및 감염원, 외래 항원, 바이러스 감염 세포, 및 종양 세포에 대한 면역 반응에서 중추적 역할을 한다. 보체는 선천적 면역계의 일부를 형성하는 50 개 초과 단백질 군으로 이루어진다. 보체계는 미생물 감염으로부터 신체를 방어할 준비를 하고 조직 지혈을 유지하는 기능을 한다. 보체는 3 개의 경로, 즉, 항체 복합체가 활성화를 촉발시키는 고전 경로, "틱오버(tickover)"라고 불리는 과정에 의해 저수준으로 구성적으로 활성화되고 박테리아 병원체 또는 손상된 조직 표면에 의해 증폭될 수 있는 대체 경로, 또는 특정 박테리아, 진균, 및 바이러스를 포함하는 특정 미생물에서 발견되는 만노스 잔기에 의해 개시되는 렉틴 경로 중 하나에 의해 활성화될 수 있는 엄격하게 조절된 효소 캐스케이드이다. 보체 경로의 제어되지 않은 활성화 또는 불충분한 조절은 전신 염증, 세포 손상 및 조직 손상을 야기할 수 있다. 따라서, 보체 경로는 다수의 다양한 질환의 발병기전에 영향을 미치는 것으로 여겨진다. 보체 경로 활성화의 저해 또는 조절은 유망한 치료적 전략으로 인식되어 왔다. 이들 질환에 이용 가능한 치료 옵션의 수는 제한적이다. 따라서, 보체 경로 활성화 또는 조절장애와 관련된 질환을 치료하기 위한 혁신적인 전략을 개발하는 것은 유의한 충족되지 않은 요구 사항이다.

[0004]

어느 보체 경로가 과정을 시작하는지에 관계없이, 보체 활성화는 캐스케이드의 보체 성분 3(C3)에서 수렴된다. C3 단백질은 보체 활성화, 병원체, 면역 복합체 및 손상된 세포의 옵소닌화 및 제거, 및 체액성 면역 및 T 세포 적응 면역 반응의 조절을 포함하는 몇몇 중요한 생물학적 과정을 주도하는 데 있어 중추적이다.

[0005]

C3는 보체 경로 캐스케이드를 개시하는 것을 돕는 보체계의 통합 단백질이다. 고전 경로, 대체 경로, 또는 렉틴 경로를 통한 C3 활성화는 스플릿 산물 C3a 및 C3b로의 C3의 절단을 초래한다. C3a는 호중구, 호산구, 및 비만 세포에 대한 강력한 아나필라톡신 및 화학유인물질이다. C3b는 대체 경로에서 C3 전환효소 및 3 개의 보체 경로 모두에서 C5 전환효소의 형성에 관여하며, 이는 결과적으로 보체 캐스케이드가 신속하게 하류 말단 보체의 추가 활성화에 이르게 한다. C5 절단은 강력한 화학주성 추진제 및 아나필라톡신이기도 한 C5a, 및 보체 단백질 C6, 7, 8, 및 9와 함께 병원체 또는 조직 표면 상의 기공 형성 복합체 C5b-9로 빠르게 조립되는 C5b의 형성을 초래한다. 결과적으로, C3은 보체 경로 활성화 또는 조절장애와 관련된 질환을 치료하는 방법으로서 보체 경로를 선택적으로 저해하기 위한 저해 또는 침묵을 위한 이상적인 표적일 수 있다.

발명의 내용

[0006]

보체 경로 활성화에서 역할을 하는 것으로 알려진 보체 성분(C3)을 표적화하는 올리고뉴클레오티드(예를 들어, 센스 가닥 올리고뉴클레오티드 및 안티센스 가닥 올리고뉴클레오티드를 포함하는 RNAi 올리고뉴클레오티드)가 본원에 기재된다. RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염(예를 들어, 이의 나트륨 염)은 보체 경로 활성화 또는 조절장애와 관련된 질환을 갖는 환자를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0007]

일 양태에서, 본 개시는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 보체 성분 3(C3) 발현을 저하시키기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 제공하며, 여기서 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 듀플렉스 영역을 형성한다. 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 13 또는 SEQ ID NO: 14의 C3 mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하고, 상보성 영역은 적어도 15 개 인접 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 15 개 내지 50 개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 30 개, 31 개, 32 개, 33 개, 34 개, 35 개, 36 개, 37 개, 38 개, 39 개, 40 개, 41 개, 42 개, 43 개, 44 개, 45 개, 46 개, 47 개, 48 개, 49 개 및 50 개 뉴클레오티드 길이)이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 18 개 내지 36 개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 30 개, 31 개, 32 개, 33 개, 34 개, 35 개, 및 36 개 뉴클레오티드 길이)이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 15 개 내지 30 개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 및 30 개 뉴클레오티드 길이)이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 22 개 뉴클레오티드 길이이고, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 적어도 19 개 뉴클레오티드 길이, 선택적으로 적어도 20 개 뉴

클레오티드 길이의 듀플렉스 영역을 형성한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 36 개 뉴클레오티드 길이이고, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 적어도 19 개 뉴클레오티드 길이, 선택적으로 적어도 20 개 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스 영역을 형성한다. 일부 구현예에서, 상보성 영역은 적어도 19 개 인접 뉴클레오티드 길이, 선택적으로 적어도 20 개 뉴클레오티드 길이이다.

[0008] 일부 구현예에서, 센스 가닥의 3' 말단은 S1-L-S2로 제시된 스템 루프를 포함하며, 여기서 S1은 S2에 상보적이고, L은 3 개 내지 5 개 뉴클레오티드 길이의 S1과 S2 사이의 루프를 형성한다. 일부 구현예에서, L은 트리루프(triloop) 또는 테트라루프이다. 일부 구현예에서, L은 테트라루프이다. 일부 구현예에서, 테트라루프는 SEQ ID NO: 8의 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, S1 및 S2는 1 개 내지 10 개 뉴클레오티드 길이이고, 여기서 선택적으로 S1 및 S2는 동일한 길이를 갖는다. 일부 구현예에서, S1 및 S2는 1 개 뉴클레오티드, 2 개 뉴클레오티드, 3 개 뉴클레오티드, 4 개 뉴클레오티드, 5 개 뉴클레오티드, 6 개 뉴클레오티드, 7 개 뉴클레오티드, 8 개 뉴클레오티드, 9 개 뉴클레오티드, 또는 10 개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, S1 및 S2는 6 개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 스템 루프 영역은 SEQ ID NO: 7과 적어도 85% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 스템 루프 영역은 SEQ ID NO: 7과 적어도 95% 동일성(예를 들어, SEQ ID NO: 7과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 및 100% 동일성)을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 스템 루프 영역은 SEQ ID NO: 7을 포함한다. 일부 구현예에서, 스템 루프는 SEQ ID NO: 7에 대해 최대 1 개, 2 개, 또는 3 개의 치환, 삽입, 또는 결실을 갖는 핵산을 포함한다.

[0009] 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 1 개 이상 뉴클레오티드 길이의 3' 오버행 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 적어도 2 개의 연결된 뉴클레오티드의 3' 오버행을 포함한다. 일부 구현예에서, 3' 오버행 서열은 2 개 뉴클레오티드 길이이고, 여기서 선택적으로 3' 오버행 서열은 GG이다.

[0010] 일부 구현예에서, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 4의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 6의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 (a) 각각 SEQ ID NO: 1 및 SEQ ID NO: 3, 및 (b) 각각 SEQ ID NO: 4 및 SEQ ID NO: 6으로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 1에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 3에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 4에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 6에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 화합물 A에 나타낸 바와 같이, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 37에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 38에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 화합물 B에 나타낸 바와 같이, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 39에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 40에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 화합물 C에 나타낸 바와 같이, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 41에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 42에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 화합물 D에 나타낸 바와 같이, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 43에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 44에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 화합물 E에 나타낸 바와 같이, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 45에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 46에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 화합물 F에 나타낸 바와 같이, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 47에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 48에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 화합물 G에 나타낸 바와 같이, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 49에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 50에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 화합물 H에 나타낸 바와 같이, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 51에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 52에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 화합물 I에 나타낸 바와 같이, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 53에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 54에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0011] 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 본원에 제공되며, 여기서 센스 가닥은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 4와 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 갖고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 6과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 갖는다. 일

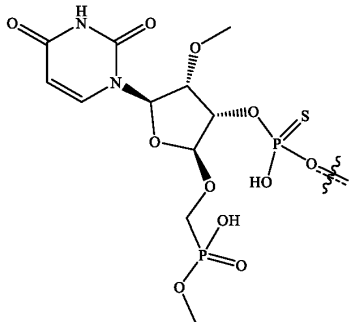
부 구현예에서, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 4와 적어도 95%(예를 들어, 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 6 중 적어도 하나와 적어도 95%(예를 들어, 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 4의 핵산 서열을 갖고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 6의 핵산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 SEQ ID NO: 4 및 SEQ ID NO: 6을 포함한다. 다른 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 SEQ ID NO: 1 및 SEQ ID NO: 3을 포함한다.

[0012] 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 6과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0013] 구현예에서, 센스 가닥은 안티센스 가닥에 상보적이지 않은 스템 루프 영역 및 안티센스 가닥에 실질적으로 상보적인 듀플렉스 영역을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 듀플렉스 영역은 20 개 내지 22 개 뉴클레오티드 길이를 포함한다.

[0014] 다른 구현예에서, 스템 루프 영역은 SEQ ID NO: 7과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 및 99%) 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 스템 루프 영역은 SEQ ID NO: 7과 적어도 95%(예를 들어, 적어도 96%, 97%, 98%, 및 99%) 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 스템 루프 영역은 SEQ ID NO: 7을 포함한다.

[0015] 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오티드의 당의 4'-탄소는 포스페이트 유사체를 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 안티센스 가닥의 5' 말단의 첫 번째 위치에 우리딘을 포함한다. 일부 구현예에서, 우리딘은 포스페이트 유사체를 포함한다. 일부 구현예에서, 포스페이트 유사체는 4'-O-모노메틸 포스포네이트이다. 일부 구현예에서, 포스페이트 유사체를 포함하는 우리딘은 하기 구조를 포함한다:



[0016]

[0017] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 1 개(예를 들어, 적어도 2 개, 5 개, 10 개, 15 개, 20 개, 30 개, 및 40 개)의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 20 개 내지 50 개의 변형된 뉴클레오티드(예를 들어, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 30 개, 31 개, 32 개, 33 개, 34 개, 35 개, 36 개, 37 개, 38 개, 39 개, 40 개, 41 개, 42 개, 43 개, 44 개, 45 개, 46 개, 47 개, 48 개, 49 개, 및 50 개의 변형된 올리고뉴클레오티드)를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 20 개 내지 40 개(예를 들어, 25 개 내지 40 개, 30 개 내지 40 개, 35 개 내지 40 개, 30 개 내지 35 개, 25 개 내지 35 개, 20 개 내지 25 개, 21 개 내지 30 개, 및 31 개 내지 40 개)의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 모든 뉴클레오티드는 변형된다. 일부 구현예에서, 적어도 1 개(예를 들어, 적어도 2 개, 5 개, 10 개, 15 개, 20 개, 30 개, 및 40 개)의 변형된 뉴클레오티드는 2'-변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 2'-변형은 2'-플루오로 또는 2'-O-메틸이고, 여기서, 선택적으로, 2'-플루오로 변형은 2'-플루오로 데옥시리보뉴클레오티드이고/이거나 2'-O-메틸 변형은 2'-O-메틸 리보뉴클레오티드이다.

[0018] 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 40 개 내지 50 개(예를 들어, 41 개, 42 개, 43 개, 44 개, 45 개, 46 개, 47 개, 48 개, 49 개, 및 50 개)의 2'-O-메틸 변형을 포함하고, 여기서 선택적으로 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 40 개 내지 50 개(예를 들어, 41 개, 42 개, 43 개, 44 개, 45 개, 46 개, 47 개, 48 개, 49 개, 및 50 개)의 2'-O-메틸 리보뉴클레오티드를 포함한다. 구현예에서, 센스 가닥의 1 번 내지 7 번, 11 번 내지 27 번, 및 31 번 내지 36 번 뉴클레오티드 중 적

어도 1 개(예를 들어, 적어도 2 개, 적어도 5 개, 적어도 10 개, 적어도 20 개, 및 적어도 30 개) 및 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 8 번, 9 번, 11 번 내지 13 번, 및 15 번 내지 22 번 뉴클레오티드 중 하나 이상 또는 이 모두는 2'-O-메틸, 예컨대, 2'-O-메틸 리보뉴클레오시드를 이용하여 변형된다. 일 구현예에서, 센스 가닥의 1 번 내지 7 번, 11 번 내지 27 번, 및 31 번 내지 36 번 뉴클레오티드 중 10 개 내지 30 개(예를 들어, 12 개 내지 28 개, 12 개 내지 24 개, 12 개 내지 20 개, 12 개 내지 16 개, 16 개 내지 30 개, 20 개 내지 30 개, 및 24 개 내지 30 개) 및 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 8 번, 9 번, 11 번 내지 13 번, 및 15 번 내지 22 번 뉴클레오티드 중 하나 이상 또는 이 모두는 2'-O-메틸, 예컨대, 2'-O-메틸 리보뉴클레오시드를 이용하여 변형된다. 일 구현예에서, 센스 가닥의 1 번 내지 7 번, 12 번 내지 27 번, 및 31 번 내지 36 번 뉴클레오티드 모두 및 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 8 번, 9 번, 11 번 내지 13 번, 및 15 번 내지 22 번 뉴클레오티드 중 하나 이상 또는 이 모두는 2'-O-메틸, 예컨대, 2'-O-메틸 리보뉴클레오시드를 이용하여 변형된다. 일부 구현예에서, 센스 가닥의 1 번, 2 번, 4 번 내지 7 번, 11 번, 14 번 내지 16 번, 18 번 내지 27 번, 및 31 번 내지 36 번 뉴클레오티드 모두 및 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 9 번, 11 번, 13 번, 15 번, 17 번, 18 번 및 20 번 내지 22 번 뉴클레오티드 중 하나 이상 또는 이 모두는 2'-O-메틸, 예컨대, 2'-O-메틸 리보뉴클레오시드를 이용하여 변형된다.

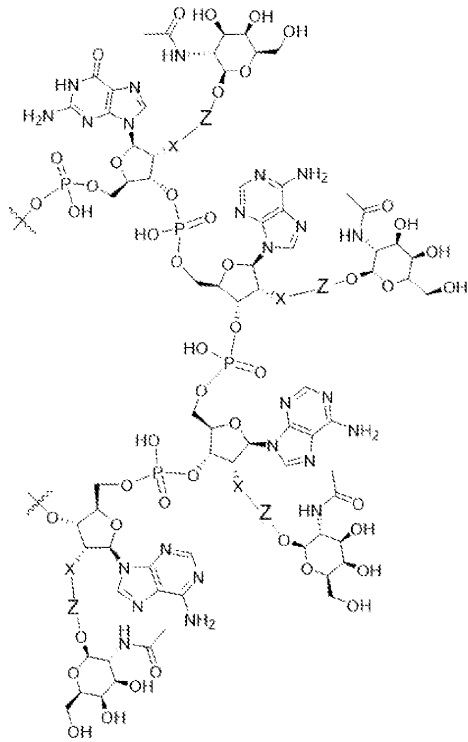
[0019] 또 다른 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 5 개 내지 15 개(예를 들어, 6 개, 7 개, 8 개, 9 개, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개 및 15 개)의 2'-플루오로 변형, 예컨대, 2'-플루오로 데옥시리보뉴클레오시드를 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥의 3 번, 8 번, 9 번, 10 번, 11 번, 12 번, 13 번, 및 17 번 뉴클레오티드 중 적어도 1 개(예를 들어, 적어도 2 개, 3 개, 4 개, 5 개, 6 개, 또는 7 개) 및 안티센스 가닥의 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 7 번, 8 번, 10 번, 12 번, 14 번, 16 번, 및 19 번 뉴클레오티드 중 하나 이상 또는 이 모두는 2'-플루오로, 예컨대, 2'-플루오로 데옥시리보뉴클레오시드를 이용하여 변형된다. 또 다른 구현예에서, 센스 가닥의 3 번, 8 번, 9 번, 10 번, 11 번, 12 번, 13 번, 및 17 번 뉴클레오티드 중 2 개 내지 4 개 및 안티센스 가닥의 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 7 번, 8 번, 10 번, 12 번, 14 번, 16 번, 및 19 번 뉴클레오티드 중 하나 이상 또는 이 모두는 2'-플루오로, 예컨대, 2'-플루오로 데옥시리보뉴클레오시드를 이용하여 변형된다. 또 다른 구현예에서, 센스 가닥의 8 번, 9 번, 10 번, 및 11 번 뉴클레오티드 모두 및 안티센스 가닥의 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 7 번, 10 번, 및 14 번 뉴클레오티드 중 하나 이상 또는 이 모두는 2'-플루오로, 예컨대, 2'-플루오로 데옥시리보뉴클레오시드를 이용하여 변형된다.

[0020] 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 적어도 1 개(예를 들어, 적어도 2 개, 적어도 5 개, 적어도 10 개, 적어도 20 개, 및 적어도 30 개)의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 센스 가닥의 1 번 뉴클레오티드와 2 번 뉴클레오티드 사이에, 및 안티센스 가닥의 1 번 뉴클레오티드와 2 번 뉴클레오티드 사이, 2 번 뉴클레오티드와 3 번 뉴클레오티드 사이, 20 번 뉴클레오티드와 21 번 뉴클레오티드 사이, 및 21 번 뉴클레오티드와 22 번 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 연결을 갖는다.

[0021] 일 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 뉴클레오티드간 연결이 존재하지 않는다.

[0022] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 적어도 하나의 뉴클레오티드는 하나 이상의 표적화 리간드에 컨쥬게이션된다. 일부 구현예에서, 각각의 표적화 리간드는 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 폴리펩티드, 또는 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 각각의 표적화 리간드는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, GalNAc 모이어티는 1가 GalNAc 모이어티, 2가 GalNAc 모이어티, 3가 GalNAc 모이어티 또는 4가 GalNAc 모이어티이다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 센스 가닥에 컨쥬게이션된 1 개 내지 5 개의 2'-O-N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 스템 루프의 L의 최대 4 개의 뉴클레오티드가 1가 GalNAc 모이어티에 컨쥬게이션된다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 센스 가닥에 컨쥬게이션된 1 개 내지 5 개(예를 들어, 2 개, 3 개, 4 개, 및 5 개)의 GalNAc 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 1 개(예를 들어, 적어도 2 개, 또는 적어도 3 개)의 GalNAc 모이어티는 센스 가닥(SEQ ID NO: 8)의 루프 영역에 컨쥬게이션된다. 일부 구현예에서, 센스 가닥 상의 28 번 내지 30 번 뉴클레오티드 위치에 있는 뉴클레오티드 중 하나 이상은 1가 GalNAc 모이어티에 컨쥬게이션된다. 일부 구현예에서, 센스 가닥 상의 28 번 내지 30 번 위치에 있는 뉴클레오티드 각각은 1가 GalNAc 모이어티에 컨쥬게이션된다.

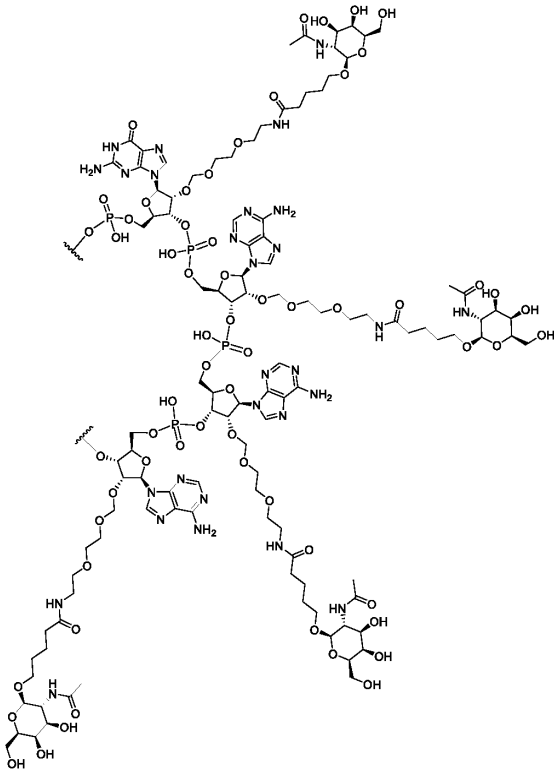
[0023] 일부 구현예에서, 센스 가닥 상의 28 번 내지 30 번 위치에 있는 뉴클레오티드는 하기 구조를 포함한다:



[0024]

[0025] Z는 치환 및 비치환 알킬렌, 치환 및 비치환 알케닐렌, 치환 및 비치환 알키닐렌, 치환 및 비치환 헤테로알킬렌, 치환 및 비치환 헤테로알케닐렌, 치환 및 비치환 헤테로알키닐렌, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된, 1 개 내지 20 개의 포괄적이고 연속적이며 공유 결합된 원자 길이의, 결합, 클릭 화학 핸들 (click chemistry handle), 또는 링커를 나타내고; X는 O, S, 또는 N이다. 일부 구현예에서, Z는 아세탈 링커이다. 일부 구현예에서, X는 O이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥 상의 28 번 내지 30 번 위치에 있는 뉴클레오티드는 하기 구조를 포함한다:

[0026] 일부 구현예에서, 센스 가닥 상의 28 번 내지 30 번 위치에 있는 뉴클레오티드는 하기 구조를 포함한다:



[0027]

[0028] 일 구현예에서, 안티센스 가닥은 13 개 내지 27 개(예를 들어, 13 개 내지 25 개, 13 개 내지 22 개, 13 개 내지 20 개, 13 개 내지 18 개, 13 개 내지 15 개, 15 개 내지 27 개, 18 개 내지 27 개, 20 개 내지 27 개, 22 개 내지 27 개 및 25 개 내지 27 개) 뉴클레오티드 길이이다. 일 구현예에서, 안티센스 가닥은 22 개 뉴클레오티드 길이이다.

[0029] 또 다른 구현예에서, 센스 가닥은 20 개 내지 50 개(예를 들어, 22 개 내지 50 개, 25 개 내지 50 개, 30 개 내지 50 개, 35 개 내지 50 개, 40 개 내지 50 개, 45 개 내지 50 개, 20 개 내지 45 개, 20 개 내지 40 개, 20 개 내지 35 개, 20 개 내지 30 개, 20 개 내지 25 개, 20 개 내지 22 개) 뉴클레오티드 길이이다. 일 구현예에서, 센스 가닥은 30 개 내지 40 개(예를 들어, 31 개, 32 개, 33 개, 34 개, 35 개, 36 개, 37 개, 38 개, 39 개, 및 40 개) 뉴클레오티드 길이이다.

[0030] 일부 구현예에서, 센스 가닥은 안티센스 가닥과 듀플렉스를 형성한다. 일부 구현예에서, 듀플렉스 구조는 센스 가닥 모두 또는 그 일부와 안티센스 가닥 모두 또는 그 일부 사이에 듀플렉스를 포함한다. 일부 구현예에서, 상보성 영역은 20 개 내지 30 개(예를 들어, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개 및 30 개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥 및/또는 센스 가닥은 적어도 2 개(예를 들어, 적어도 3 개, 적어도 4 개, 또는 적어도 5 개)의 연결된 뉴클레오티드의 3' 오버행을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 이중 가닥 리보핵산(dsRNA)이다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 단일 가닥 리보핵산이다.

[0031] 일부 구현예에서, RNA 올리고뉴클레오티드는 약학적으로 허용되는 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 약학적으로 허용되는 염은 나트륨 염이다.

[0032] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 중 임의의 하나(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 중 임의의 것) 및 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0033] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 중 임의의 하나의 적어도 하나의 가닥을 인코딩하는 벡터를 제공한다.

[0034] 또 다른 양태에서, 본 개시는 SEQ ID NO: 33 내지 SEQ ID NO: 36 중 임의의 하나의 DNA 서열을 갖는 본원에 기재된 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 중 임의의 하나의 적어도 하나의 가닥을 인코

당하는 벡터를 제공한다.

- [0035] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 벡터 또는 본원에 기재된 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 중 임의의 하나를 포함하는 세포를 제공한다.
- [0036] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 벡터 또는 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 중 임의의 것(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 중 임의의 것)을 포함하는 세포를 제공한다.
- [0037] 또 다른 양태에서, 본 개시는 대상체의 세포를 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드), 본원에 기재된 약학적 조성물, 본원에 기재된 벡터, 또는 본원에 기재된 세포 중 임의의 것과 접촉시키는 단계를 포함하는, 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 세포는 C3의 mRNA 전사체의 분해가 이루어지기 전에 충분한 시간 동안 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포에서 C3의 발현은 저해된다. 일부 구현예에서, 세포에서 C3의 전사는 저해된다. 일부 구현예에서, 세포에서 C3의 수준 및/또는 활성은 저해된다. 일부 구현예에서, C3의 수준 및/또는 활성은 본원에 기재된 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 약학적 조성물, 벡터, 또는 세포 중 임의의 하나가 투여되지 않은 대상체의 세포에서의 C3의 수준 및/또는 활성에 비해 10% 내지 100% 저해된다(예를 들어, 10% 내지 90%, 10% 내지 80%, 10% 내지 70%, 10% 내지 60%, 10% 내지 50%, 10% 내지 40%, 10% 내지 30%, 10% 내지 20%, 20% 내지 100%, 30% 내지 100%, 40% 내지 100%, 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 70% 내지 100%, 80% 내지 100%, 및 90% 내지 100% 저해된다). 일부 구현예에서, C3의 수준 및/또는 활성은 본원에 기재된 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 약학적 조성물, 벡터, 또는 세포 중 임의의 하나가 투여되지 않은 대상체의 세포에서의 C3의 수준 및/또는 활성에 비해 50% 내지 99%(예를 들어, 50% 내지 90%, 50% 내지 80%, 50% 내지 70%, 50% 내지 60%, 60% 내지 99%, 70% 내지 99%, 80% 내지 99%, 및 90% 내지 99%) 저해된다. 일부 구현예에서, 대상체는 포유류이다. 일부 구현예에서, 대상체는 인간이다.
- [0038] 또 다른 양태에서, 본 개시는 세포, 세포 집단, 또는 대상체에서 C3 발현을 저하시키는 방법을 제공하며, 방법은 i) 세포 또는 세포 집단을 본원에 기재된 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 약학적 조성물, 또는 벡터 중 임의의 하나와 접촉시키는 단계; 또는 ii) 본원에 기재된 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 본원에 기재된 약학적 조성물, 또는 벡터 중 임의의 하나를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, C3 발현을 저하시키는 것은 C3 mRNA의 양 또는 수준, C3 단백질의 양 또는 수준, 또는 이 둘 모두를 저하시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, C3 mRNA의 수준, C3 단백질의 수준, 또는 이 둘 모두는, 본원에 기재된 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 약학적 조성물, 벡터, 또는 세포 중 임의의 하나가 투여되지 않은 대상체의 세포에서의 C3 mRNA의 수준, C3 단백질의 수준, 또는 이 둘 모두에 비해 10% 내지 100% 저해된다(예를 들어, 10% 내지 90%, 10% 내지 80%, 10% 내지 70%, 10% 내지 60%, 10% 내지 50%, 10% 내지 40%, 10% 내지 30%, 10% 내지 20%, 20% 내지 100%, 30% 내지 100%, 40% 내지 100%, 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 70% 내지 100%, 80% 내지 100%, 및 90% 내지 100% 저해된다).
- [0039] 일부 구현예에서, C3 mRNA의 수준, C3 단백질의 수준, 또는 이 둘 모두는, 본원에 기재된 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 약학적 조성물, 벡터, 또는 세포 중 임의의 하나가 투여되지 않은 대상체의 세포에서의 C3 mRNA의 수준, C3 단백질의 수준, 또는 이 둘 모두에 비해 50% 내지 99%(예를 들어, 50% 내지 90%, 50% 내지 80%, 50% 내지 70%, 50% 내지 60%, 60% 내지 99%, 70% 내지 99%, 80% 내지 99%, 및 90% 내지 99%) 저해된다.
- [0040] 일부 구현예에서, 대상체는 보체 경로 활성화 또는 조절장애(예를 들어, 대체 보체 경로, 고전 보체 경로, 및/또는 렉틴 경로의 조절장애)에 의해 매개되거나 이와 관련된 질환을 갖는 것으로 확인된다. 일부 구현예에서, 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되거나 이와 관련된 질환은 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH), 비정형 용혈성 요독 증후군(aHUS), IgA 신장병증, 루푸스 신염, C3 사구체병증(C3G), 피부근염/자가면역 근염, 전신 경화증, 탈수초성 다발신경병증, 천포창, 막성 신장병증, 국소 분절 사구체 경화증(FSGS), 수포성 유천포창, 후천성 포피박리 수포증(EBA), 점막 유천포창, ANCA 혈관염, 저보체성 두드러기성 혈관염, 면역 복합체 소혈관 혈관염, 피부 소혈관 혈관염, 자가면역 괴사성 근육병증, 이식 기관 거부반응, 예컨대, 신장, 간, 심장 또는 폐 이식 거부반응, 예컨대, 항체 매개 거부반응(AMR), 예컨대, 만성 AMR(cAMR), 항인지질(aPL) Ab 증후군, 사구체신염, 천식, 고밀도지침착병(DDD), 노인성 황반변성(AMD), 전신 홍반성 루푸스(SLE), 류마티스 관절염(RA), 중증 난치성 RA, 켈터 증후군, 다발성 경화증(MS), 외상성 뇌 손상(TBI), 척수 손상, 허혈 재관류 손상, 자간전증, 급성 신장 손상에서의 이식편 기능 지연(DGF-AKI), 심폐 우회-관련 급성 신장 손상, 저산소-허혈성 뇌병증, 투석-

유발 혈전증, 타카야스 동맥염, 재발성 다발연골염, 급성/예방 이식편대숙주병, 만성 이식편대숙주병, 베타 지중해빈혈, 줄기 세포 이식-관련 혈전성 미세혈관병증, 담도 폐쇄증, 염증성 간 질환, 베체트병, 허혈성 뇌졸중, 뇌내 출혈, 경피증, 경피증 신발증, 경피증-관련 간질성 폐질환(SSc-ILD), 겸상 적혈구병, 상염색체 우성 다낭성 신장병(ADPKD), 화학요법-유발 말초 신경병증(CIPN), 당뇨병성 신경병증, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 당뇨병성 신장병증, 당뇨병성 망막병증, 지도형 위축증, 폐동맥 고혈압, 난치성 중증 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 특발성 폐섬유증(IPF), 만성 폐 동종이식편 기능장애, 낭성 섬유증의 폐 이환(pulmonary morbidity), 화농성 땀샘염, 비알코올성 지방간 질환(NASH), 강직성 척추염, 조혈 줄기 세포 이식-관련 혈전성 미세혈관병증(HSCT-TMA)(예방), 관상 동맥 질환, 죽상경화증, 골다공증(예방), 골관절염, 고위험 드루젠, 염증성 장질환, 궤양성 대장염, 간질성 방광염, 투석 유발 보체 활성화, 괴저성 농피증, 만성 심부전, 자가면역 심근염, 비용종증, 급성 및 만성 췌장염, 죽상경화증, 호산구성 식도염, 호산구성 육아종증, 과호산구성 증후군, 상처 치유 및 혈전성 혈소판 감소성 자반증(TTP)이다. 일부 구현예에서, 대상체는 항체 매개 거부반응(AMR), 예컨대, 만성 AMR을 갖는 것으로 확인된다.

[0041] 일부 구현예에서, 본 개시는 대상체의 세포를 본원에 기재된 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 약학적 조성물, 벡터, 또는 세포 중 임의의 하나와 접촉시키는 단계를 포함하는, 항체 매개 거부반응(AMR), 예컨대, 만성 AMR(cAMR)을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 약학적 조성물, 벡터, 또는 세포 중 임의의 하나는 항체 매개 거부반응(AMR), 예컨대, 만성 AMR(cAMR)의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상체에서 항체 매개 거부반응(AMR), 예컨대, 만성 AMR(cAMR)의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0042] 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 약학적 조성물, 벡터, 또는 세포는 매일, 매주, 매달, 또는 매년 투여용으로 제형화된다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 약학적 조성물, 벡터, 또는 세포는 정맥내, 피하, 근육내, 경구, 비강, 설하, 척추강내, 및 피내 투여용으로 제형화된다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 약학적 조성물, 벡터, 또는 세포는 피하 투여용으로 제형화된다.

[0043] 일 구현예에서, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염), 또는 이의 조성물은 매일, 매주, 매달, 또는 매년 투여용으로 제형화된다. 일 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 피하, 정맥내, 근육내, 경구, 비강, 설하, 척추강내, 및 피내 투여용으로 제형화된다. 일 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 피하 투여용으로 제형화된다. 일 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 약 0.1 mg/kg 내지 약 150 mg/kg(예를 들어, 0.1 mg/kg 내지 125 mg/kg, 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg, 0.1 mg/kg 내지 75 mg/kg, 0.1 mg/kg 내지 50 mg/kg, 0.1 mg/kg 내지 25 mg/kg, 0.1 mg/kg 내지 15 mg/kg, 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg, 0.1 mg/kg 내지 5 mg/kg, 5 mg/kg 내지 150 mg/kg, 25 mg/kg 내지 150 mg/kg, 및 50 mg/kg 내지 150 mg/kg) 투여량으로 투여하기 위해 제형화된다. 일 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 약 0.5 mg/kg 내지 약 15 mg/kg(예를 들어, 0.5 mg/kg 내지 13 mg/kg, 0.5 mg/kg 내지 10 mg/kg, 0.5 mg/kg 내지 5 mg/kg, 0.5 mg/kg 내지 1 mg/kg, 1 mg/kg 내지 15 mg/kg, 5 mg/kg 내지 15 mg/kg, 및 10 mg/kg 내지 15 mg/kg) 투여량으로 투여하기 위해 제형화된다.

[0044] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 추가 치료제와 조합하여 투여하기 위해 제형화된다.

[0045] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염), 본원에 기재된 약학적 조성물, 본원에 기재된 벡터, 또는 본원에 기재된 세포를 포함하는 키트를 제공한다.

[0046] 또 다른 양태에서, 본 개시는 보체 경로 활성화 또는 조절장애(예를 들어, 대체, 고전, 및/또는 렉틴 경로의 활성화 또는 조절장애)에 의해 매개되거나 이와 관련된 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염), 본원에 기재된 약학적 조성물, 본원에 기재된 벡터, 또는 기재된 세포를 제공한다.

[0047] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염), 약학적 조성물, 조성물, 벡터, 또는 세포를 제공하며, 여기서 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 약학적 조성물, 조성물, 벡터, 또는 세포는 피하 투여되거나 피하 투여용으로 제형화된다.

도면의 간단한 설명

[0048]

도 1a는 화합물 A의 안티센스 가닥의 화학 구조를 보여준다.

도 1b는 화합물 A의 센스 가닥의 화학 구조를 보여준다.

도 1ca 및 도 1cb는 화합물 A의 RNAi 올리고뉴클레오티드의 화학 구조를 보여준다.

도 1d는 화합물 A의 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 대한 핵산 서열을 보여준다.

도 1e는 화합물 A의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드의 개략도를 보여준다.

도 2aa 및 도 2ab는 화합물 B의 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 화학 구조를 보여준다.

도 2b는 화합물 B의 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 대한 핵산 서열을 보여준다.

도 3a는 세포를 1 nM 양의 다양한 올리고뉴클레오티드로 처리한 후 잔여 C3 mRNA의 퍼센트를 측정된 HepG2 세포에서 완료된 시험관내 스크린의 결과를 보여주는 그래프이다.

도 3b는 0.1 nM, 및 1 nM 양의 다양한 올리고뉴클레오티드로 세포를 처리한 결과로서 잔여 C3 mRNA의 퍼센트를 측정된 HepG2 세포에서 완료된 시험관내 스크린의 결과를 보여주는 그래프이다.

도 4a는 화합물 A 내지 화합물 I의 RNAi 올리고뉴클레오티드의 개략도이다.

도 4b는 유체역학 주사 후 인간 C3 cDNA를 발현하는 CD-1 마우스에서 화합물 A, 화합물 B, 및 화합물 C의 생체내 스크린의 결과를 보여주는 그래프이다. 인산염 완충 식염수(PBS) 대조군과 비교하여 1 mg/kg의 화합물 A, 화합물 B 및 화합물 C의 단회 피하 용량 투여 4 일 후에 간에서 인간 C3 mRNA 퍼센트의 RT-qPCR 측정.

도 4c는 유체역학 주사 후 인간 C3 cDNA를 발현하는 CD-1 마우스에서 화합물 A, 화합물 D, 화합물 E, 화합물 F, 화합물 G, 화합물 H, 및 화합물 I의 생체내 스크린의 결과를 보여주는 그래프이다. PBS 대조군과 비교하여 0.5 mg/kg의 화합물 A, 화합물 D, 화합물 E, 화합물 F, 화합물 G, 화합물 H 및 화합물 I의 단회 피하 용량 투여 4 일 후에 간에서 인간 C3 mRNA 퍼센트의 RT-qPCR 측정.

도 5는 대조군으로서 투여된 PBS와 비교하여 4 mg/kg 화합물 A, 화합물 B, 또는 화합물 C 내지 화합물 I 중 임의의 하나의 단회 용량을 이용한 투약 전, 처리 28 일 후 및 처리 56 일 후 사이노몰구스 마카크(*cynomolgus macaque*)의 간에서 C3 mRNA 퍼센트의 측정을 보여주는 그래프이다.

도 6a는 대조군으로서 투여된 PBS와 비교하여 0 일차, 28 일차, 56 일차, 및 84 일차에 1 mg/kg 또는 2 mg/kg 화합물 A 또는 화합물 B를 이용한 처리 후 사이노몰구스 마카크의 간에서 C3 mRNA의 퍼센트의 측정을 보여주는 그래프이다.

도 6b는 대조군으로서 투여된 PBS와 비교하여 1 mg/kg 또는 2 mg/kg 화합물 A 또는 화합물 B를 이용한 처리 후 사이노몰구스 마카크의 혈청에서 C3의 퍼센트의 측정을 보여주는 그래프이다.

도 7은 2 mg/kg의 화합물 A 또는 화합물 B의 단회 용량 후 28 일째에 사이노몰구스 마카크의 간에서 C3 mRNA로서 측정된 화합물 A 및 화합물 B에 대한 대략적인 ED₅₀을 보여주는 그래프이다.

도 8은 WIESLAB® ELISA-기반 기능 검정에 의해 측정된 바와 같은 0 일차, 28 일차, 56 일차 및 84 일차에 2 mg/kg 화합물 A 또는 화합물 B를 이용한 처리 후 사이노몰구스 마카크의 혈청에서 보체 활성화(AP)의 퍼센트를 보여주는 그래프이다. PBS는 대조군으로서 동일한 다회용량 요법으로 투여되었다.

도 9는 토끼 적혈구 방법의 용혈에 의해 측정된 바와 같은 0 일차, 28 일차, 56 일차 및 84 일차에 1 mg/kg 또는 2 mg/kg 화합물 A를 이용한 처리 후 사이노몰구스 마카크의 혈청으로부터의 용해의 퍼센트를 보여주는 그래프이다. PBS는 대조군으로서 동일한 다회용량 요법으로 투여되었다.

도 10a는 대조군으로서 투여된 PBS와 비교하여 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 및 6 mg/kg의 화합물 J의 단회 피하 용량 투여 후 CD-1 마우스의 간에서 C3 mRNA 퍼센트의 RT-qPCR 측정을 보여주는 그래프이다. 간 녹다운의 수준을 70 일 동안 추적하였고, 측정을 위해 각각의 시점에 5 마리의 마우스를 희생시켰다.

도 10b는 대조군으로서 투여된 PBS와 비교하여 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 및 6 mg/kg의 화합물 J의 단회 피하 용량 투여 후 70 일 기간에 걸친 CD-1 마우스의 혈청에서 C3 순환 단백질 퍼센트의 ELISA 검정 측정을 보여주는 그래프이다.

도 11은 672 시간의 기간에 걸친 6 mg/kg의 화합물 J의 단회 피하 용량이 투여된 CD-1 마우스의 혈장, 간,

신장, 및 비장 조직에서 siRNA 노출량의 스템 루프-qPCR 측정을 보여주는 그래프이다. 측정을 위해 각각의 시점에 5 마리의 마우스를 희생시켰다.

도 12a는 대조군으로서 투여된 PBS와 비교하여 0 일차, 14 일차, 28 일차, 및 42 일차에 1 mg/kg 또는 6 mg/kg 화합물 J의 4 회 용량 투여 후 70 일의 기간에 걸친 CD-1 마우스의 간에서 C3 mRNA의 퍼센트의 RT-qPCR 측정을 보여주는 그래프이다.

도 12b는 0 일차, 14 일차, 28 일차 및 42 일차에 1 mg/kg 또는 6 mg/kg 화합물 J의 4 회 용량 투여 후 70 일의 기간에 걸친 CD-1 마우스에서 C3 혈청 단백질의 ELISA 검정 측정을 보여주는 그래프이다. C3 수준은 PBS 대조군으로부터 측정된 C3 혈청 수준 대비 백분율로 계산되었다(n=5/시점).

도 13a는 0 일차, 14 일차, 28 일차, 및 42 일차에 1 mg/kg 화합물 J의 4 회 용량이 투약된 CD-1 마우스의 간 조직에서 화합물 J의 농도의 스템 루프-qPCR 측정을 보여주는 그래프이다.

도 13b는 0 일차, 14 일차, 28 일차, 및 42 일차에 1 mg/kg 화합물 J의 4 회 용량이 투약된 CD-1 마우스의 혈장에서 화합물 J의 농도의 스템 루프-qPCR 측정을 보여주는 그래프이다.

도 14는 나이브 C57BL/6 마우스 및 대조군으로서 연령 매칭 PBS-처리 NZB/W F1과 비교하여 21 주령부터 37 주령까지 18주 동안 매달 0.5 mg/kg, 3 mg/kg, 또는 6 mg/kg의 화합물 J로 처리된 NZB/W F1 마우스의 신장에서 사구체 보체 침착을 모니터링하기 위한 C3 및 프로퍼딘에 대한 형광 태그의 인 시츄(in situ) 혼성화를 보여주는 일련의 이미지이다.

도 15a는 21 주령에 0.5 mg/kg, 3 mg/kg, 또는 6 mg/kg의 화합물 J의 매달 피하 용량을 제공받고 29 주령에 종료한 후(n=10/시점) NZB/W F1 마우스의 간에서 C3 mRNA의 백분율을 보여주는 그래프이다.

도 15b는 21 주령에 0.5 mg/kg, 3 mg/kg, 또는 6 mg/kg의 화합물 J의 매달 피하 용량을 제공받고 29 주령에 종료한 후(n=10/시점) NZB/W F1 마우스의 C3 혈청 단백질의 백분율을 보여주는 그래프이다.

도 16a는 21 주령에 시작하여 0.5 mg/kg, 3 mg/kg, 또는 6 mg/kg의 화합물 J가 피하 투약된 29 주령 NZB/W F1 마우스에서 IgG 포획에 의해 순환 면역 복합체를 측정된 450 nm에서 측정된 흡광도를 보여주는 그래프이다.

도 16b는 21 주령에 시작하여 0.5 mg/kg, 3 mg/kg, 또는 6 mg/kg의 화합물 J가 매달 투약된 37 주령 NZB/W F1 마우스에서 C1q 포획에 의해 순환 면역 복합체를 측정된 450 nm에서 측정된 흡광도를 보여주는 그래프이다.

도 17은 PBS 대조군과 비교하여 8 주령부터 16 주령까지 2 주마다 6 mg/kg의 화합물 J의 피하 용량으로 처리된 MRL/lpr 마우스의 사구체 상의 보체 침착을 모니터링하기 위한 C3 및 프로퍼딘에 대한 형광 태그의 인 시츄 혼성화를 보여주는 일련의 이미지이다.

도 18은 PBS 대조군과 비교하여 4 개월령부터 8 개월령까지 4 개월 동안 매달 0.5 mg/kg, 3 mg/kg 또는 6 mg/kg의 화합물 J로 처리된 CFH^{-/-} 마우스의 신장에서 사구체 보체 침착을 모니터링하기 위한 C3 및 프로퍼딘에 대한 형광 태그의 인 시츄 혼성화를 보여주는 일련의 이미지이다. 신장을 수집하고 마지막 용량 4 주 후에 영상화하였다.

도 19는 대조군으로서 PBS가 투여된 CFH^{-/-} 마우스와 비교하여 4 개월령부터 8 개월령까지 4 개월 동안 매달 0.5 mg/kg, 3 mg/kg 또는 6 mg/kg의 화합물 J로 처리된 CFH^{-/-} 마우스의 간에서 C3 mRNA의 퍼센트의 RT-qPCR 측정을 보여주는 그래프이다.

도 20a는 0 일차, 및 3 일차의 LPS 부스터로 관절염이 유도된 다음 -7 일차, 0 일차 및 7 일차에 1 mg/kg 또는 6 mg/kg 용량의 화합물 J의 3 회 용량으로 예방적으로 처리된 콜라겐 항체-유도 관절염 모델로부터의 뒷발의 임상 점수를 보여주는 그래프이다. PBS 처리 CAIA 동물이 대조군으로 사용되었다.

도 20b는 0 일차 및 3 일차의 LPS 부스터로 관절염이 유도된 다음 질환 유도 후 5 일차에 1 mg/kg 또는 6 mg/kg 용량의 화합물 J의 단회 용량으로 치료적으로 처리된 콜라겐 항체-유도 관절염 모델로부터의 뒷발의 임상 점수를 보여주는 그래프이다. PBS 처리 CAIA 동물이 대조군으로 사용되었다.

도 21a는 0 일차에 콜라겐 항체가 투여되고 3 일차에 LPS 부스터가 투여되어 관절염이 유도된 다음 -7 일차, 0 일차 및 7 일차에 6 mg/kg 용량의 화합물 J의 3 회 용량으로 예방적으로 처리된 CAIA 마우스 모델의 11 일차 뒷 발 염증의 일련의 이미지이다. PBS 처리 CAIA 동물이 대조군으로 사용되었다.

도 21b는 0 일차에 콜라겐 항체가 투여되고 3 일차에 LPS 부스터가 투여되어 관절염이 유도된 다음 질환 유도

후 5 일차에 화합물 J의 단회 6 mg/kg 용량으로 치료적으로 처리된 CAIA 마우스 모델의 13 일차 뒷발 염증의 일련의 이미지이다. PBS 처리 CAIA 동물이 대조군으로 사용되었다.

도 22a는 -7 일차, 0 일차 및 7 일차에 6 mg/kg 용량의 화합물 J의 3 회 용량을 이용한 예방적 처리 후 뒷발로의 단핵 세포 침윤의 저하를 나타내는 H&E 염색에 대한 일련의 이미지이다. 나이브 및 PBS 처리 CAIA 동물이 각각 염증에 대한 음성 대조군 및 양성 대조군으로 사용되었다.

도 22b는 질환 유도 5 일 후에 CAIA-유도 관절염 마우스 모델에서 단회 6 mg/kg 용량의 화합물 J를 이용한 치료적 처리 후 뒷발로의 단핵 세포 침윤의 저하를 나타내는 H&E 염색에 대한 일련의 이미지이다. 나이브 및 PBS 처리 CAIA 동물이 각각 염증에 대한 음성 대조군 및 양성 대조군으로 사용되었다.

도 23은 동물이 -7 일차, 0 일차 및 7 일차에 6 mg/kg 화합물 J의 3 회 용량으로 예방적으로 처리된 후 CAIA-유도 관절염 모델의 무릎 관절에서 연골 미란 및 판누스 형성의 예방을 나타내는 사프란인 O 염색 및 단핵 세포 침윤의 저하를 나타내는 H&E 염색에 대한 일련의 이미지이다. 나이브 및 PBS 처리 CAIA 동물이 각각 음성 대조군 및 양성 대조군으로 사용되었다.

도 24a는 동물이 질환 유도 후 5 일차에 6 mg/kg 화합물 J의 단회 용량으로 치료적으로 처리된 후 CAIA-유도 관절염 모델의 무릎 관절에서 단핵 세포 침윤의 저하를 나타내는 H&E 염색에 대한 일련의 이미지이다. 나이브 및 PBS 처리 CAIA 동물이 각각 음성 대조군 및 양성 대조군으로 사용되었다.

도 24b는 동물이 질환 유도 후 5 일차에 6 mg/kg 화합물 J의 단회 용량으로 치료적으로 처리된 후 CAIA-유도 관절염 모델의 무릎 관절에서 연골 미란 및 판누스 형성의 예방을 나타내는 사프란인 O 염색에 대한 일련의 이미지이다. 나이브 및 PBS 처리 CAIA 동물이 각각 음성 대조군 및 양성 대조군으로 사용되었다.

도 25는 질환 유도 후 5 일차에 6 mg/kg의 화합물 J의 단회 용량을 이용한 치료적 처리 후 면역 세포 침윤의 저하를 나타내는 CAIA-유도 관절염 동물의 뒷발의 림프구(CD45+) 염색에 대한 일련의 이미지이다. 나이브 및 PBS 처리 CAIA 동물이 각각 음성 대조군 및 양성 대조군으로 사용되었다.

도 26은 질환 유도 후 5 일차에 6 mg/kg의 화합물 J의 단회 용량을 이용한 치료적 처리 후 면역 세포 침윤의 저하를 나타내는 CAIA-유도 관절염 동물의 뒷발의 호중구 및 대식세포(CD11b+) 염색에 대한 일련의 이미지이다. 나이브 및 PBS 처리 CAIA 동물이 각각 음성 대조군 및 양성 대조군으로 사용되었다.

도 27은 질환 유도 후 5 일차에 6 mg/kg의 화합물 J의 단회 용량을 이용한 치료적 처리 후 면역 세포 침윤의 저하를 나타내는 CAIA-유도 관절염 동물의 뒷발의 대식세포(F4/80+) 염색에 대한 일련의 이미지이다. 나이브 및 PBS 처리 CAIA 동물이 각각 음성 대조군 및 양성 대조군으로 사용되었다.

도 28은 질환 유도 후 5 일차에 단회 6 mg/kg 용량의 화합물 J를 이용한 치료적 처리 후 CAIA-유도 동물의 뒷발에 대한 국소 보체 발현 및 CD45+ 세포(녹색 - 림프구) 침윤을 모니터링하기 위한 C3 mRNA(적색)에 대한 형광 태그의 인 시츄 혼성화에 대한 일련의 이미지이다.

도 29는 질환이 0 일차에 유도되고, 0 일차 및 1 일차에 2 회 용량의 백일해 독소를 제공받은 다음, 질환 유도 후 7 일차에 시작하여 6 mg/kg 용량의 화합물 J의 5 주마다의 용량으로 치료적으로 처리된 MOG-유도 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE) 마우스를 사용한 두 실험으로부터의 평균 임상 점수를 보여주는 그래프이다. PBS 처리 EAE 동물이 질환 양성 대조군으로 사용되고 C3-결핍(C3-/-)이 C3 발현에 대한 음성 대조군으로 사용되었다.

도 30은 나이브, PBS 처리 EAE 마우스(질환 대조군), 및 C3-결핍 마우스 MOG-유도 EAE와 비교하여 6 mg/kg의 화합물 J의 5 주마다의 용량 후 MOG-유도 EAE 마우스의 룩솔 패스트 블루(Luxol fast blue) 착수 염색에 대한 일련의 대표적인 이미지이다.

도 31a는 나이브, PBS-처리 EAE 마우스(양성 대조군), 나이브 C3 결핍 마우스(C3-/-) 및 C3 결핍 마우스 MOG-유도 EAE(음성 대조군)와 비교하여 6 mg/kg의 화합물 J의 5 주마다의 용량 후 MOG-유도 EAE 마우스에서 간 C3 mRNA의 양을 보여주는 그래프이다.

도 31b는 나이브, PBS-처리 EAE 마우스(질환 양성 대조군), 나이브 C3-결핍 마우스(C3-/-) 및 C3 결핍 마우스 MOG-유도 EAE(C3 발현에 대한 음성 대조군)와 비교하여 6 mg/kg의 화합물 J의 5 주마다의 용량 후 MOG-유도 EAE 마우스에서 혈청 C3의 양을 보여주는 그래프이다.

도 32a는 3 mg/kg의 화합물 A의 단회 IV 또는 SC 용량 투여 후 사이노물구스 마카크의 혈장에서 시간(단위: hr) 대비 화합물 A의 평균 농도를 보여주는 그래프이다.

도 32b는 3 mg/kg의 화합물 A의 단회 IV 또는 SC 용량 투여 후 사이노몰구스 마카크의 간에서 시간(단위: hr) 대비 화합물 A의 평균 농도를 보여주는 그래프이다.

도 33은 식염수(대조군)와 비교하여 SC 또는 IV 주사에 의해 3 mg/kg의 화합물 A의 단회 용량 후 사이노몰구스 마카크의 간에서의 평균 퍼센트(±SD) C3 mRNA 발현을 보여주는 그래프이다.

도 34는 식염수(대조군)와 비교하여 3 mg/kg의 화합물 A의 단회 IV 또는 SC 용량 투여 후 사이노몰구스 마카크의 혈청에서의 평균 발현(±SD) C3 단백질을 보여주는 그래프이다.

도 35는 식염수(대조군)와 비교하여 3 mg/kg의 화합물 A의 단회 IV 또는 SC 용량 투여 후 사이노몰구스 마카크에서의 보체 C3 고전 경로 활성을 보여주는 그래프이다.

도 36은 식염수(대조군)와 비교하여 3 mg/kg의 화합물 A의 단회 IV 또는 SC 용량 투여 후 사이노몰구스 마카크에서의 보체 C3 렉틴 경로 활성을 보여주는 그래프이다.

도 37은 식염수(대조군)와 비교하여 3 mg/kg의 화합물 A의 단회 IV 또는 SC 용량 투여 후 사이노몰구스 마카크에서의 보체 C3 대체 경로 활성을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

[0049]

본원에서 사용되는 "약" 및 "대략"이라는 용어는 언급된 값의 ± 10%이고 선택적으로는 언급된 값의 ± 5%, 또는 더욱 선택적으로는 언급된 값의 ± 2%인 양을 지칭한다.

[0050]

[0051]

본원에서 사용되는 "투여하는" 및 "투여"는 대상체에게 약학적 제제를 제공하는 임의의 방법을 지칭한다. 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드는 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 투여될 수 있다. 올리고뉴클레오티드를 투여하기 위한 적합한 방법은, 예를 들어, 경구로, 주사에 의해(예를 들어, 정맥내, 복강내, 근육내, 유리체내, 및 피하), 점적 주입 제제 등을 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드를 투여하는 방법은 피하 투여를 포함할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이 제조된 올리고뉴클레오티드는 당업계에 공지된 바와 같이, 치료될 장애 및 대상체의 연령, 질병, 및 체중에 따라 다양한 형태로 투여될 수 있다. 제제는 예방적으로 투여될 수 있고; 즉, 질환 또는 질병이 발병할 가능성을 감소시키기 위해 투여된다.

[0052]

본원에서 사용되는 "C3의 수준 및/또는 활성을 저하시키는 작용제"는 세포 또는 대상체에서, 예컨대, 대상체의 세포 또는 혈청에서 C3의 수준 또는 발현을 저하시키기 위해 사용(예를 들어, 투여)될 수 있는 본원에 개시된 임의의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)를 지칭한다. "C3의 수준을 저하시키는", "C3의 발현을 저하시키는", 및 "C3의 전사를 저하시키는"은, 예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드(예컨대, 본원에 기재된 것들)를 세포 또는 대상체에게 투여함으로써 세포 또는 대상체에서 C3 mRNA 및/또는 C3 단백질의 수준을 감소시키거나, 발현을 감소시키거나, 전사를 감소시키는 것을 의미한다. C3 mRNA 및/또는 C3 단백질의 수준은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용하여(예를 들어, 세포 또는 대상체에서 C3 mRNA의 수준 또는 C3 단백질의 수준을 측정함으로써) 측정될 수 있다. 저하는 치료 전과 비교하여 또는 비치료 대상체(예를 들어, 보체 활성화 또는 조절장애(예를 들어, C3의 활성화 또는 조절장애)와 관련된 질환 또는 장애가 있는 대상체)에서의 C3 mRNA 또는 C3 단백질의 수준에 비해 또는 대조군 대상체(예를 들어, 건강한 대상체(예를 들어, 보체 활성화 또는 조절장애(예를 들어, C3의 활성화 또는 조절장애)와 관련된 질환 또는 장애가 없는 대상체)에 비해 세포 또는 대상체에서 약 5% 이상(예를 들어, 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 약 100%)의 C3 mRNA 및/또는 C3 단백질의 수준, 발현, 또는 전사의 감소일 수 있다. C3은 임의의 C3(예를 들어, 마우스 C3, 래트 C3, 원숭이 C3, 또는 인간 C3 등), 뿐만 아니라 C3의 변이체 또는 돌연변이체일 수 있다. 따라서, C3은 유전적으로 조작된 세포, 세포군, 또는 유기체의 맥락에서 야생형 C3, 돌연변이체 C3, 또는 트랜스제닉 C3일 수 있다. "C3의 활성을 저하시키는 것"은 또한 C3과 관련된 활성의 수준을 감소시키는 것(예를 들어, 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환과 관련된 보체 경로의 활성화를 저하시킴으로써)를 의미한다. C3의 활성은 약 5% 이상(예를 들어, 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 약 100%) 감소될 수 있다. C3의 활성 수준은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 저하는 적어도 약 5% 이상(예를 들어, 본원에 개시된 RNAi 올리고뉴클레오티드로 치료되지 않은 세포 또는 대상체에 비해 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 약 100% 이상)의 C3 mRNA 및/또는 C3 단백질의 수준, 발현 또는 전사의 감소일 수 있다. C3 mRNA 및/또는 C3 단백질의 수준, 발현 또는 전사의 이러한 저하는 적어도 1 일 이상(예를 들어, 적어도 2 일, 3 일, 4 일, 5

일, 10 일, 15 일, 20 일, 30 일, 40 일, 50 일, 60 일, 70 일, 80 일, 90 일, 100 일, 110 일, 120 일 이상)의 기간 동안 일어날 수 있다. 저하는 적어도 75 mg/dL 내지 175 mg/dL(예를 들어, 75 mg/dL 내지 100 mg/dL, 75 mg/dL 내지 125 mg/L, 75 mg/dL 내지 150 mg/dL, 150 mg/dL 내지 175 mg/dL, 125 mg/dL 내지 175 mg/dL, 및 100 mg/dL 내지 175 mg/dL)의 치료받은 대상체(예를 들어, 인간 대상체)의 혈중 C3 단백질의 양의 감소일 수 있다.

[0053] "대체 뉴클레오시드" 또는 "대체 뉴클레오티드"라는 용어는 본원에 기재된 것들과 같은 대체 당 또는 대체 핵염기를 갖는 뉴클레오시드를 지칭한다. 대체 뉴클레오시드는 핵염기 모이어티가 퓨린 또는 피리미딘을 변형된 퓨린 또는 피리미딘, 예컨대, 치환된 퓨린 또는 치환된 피리미딘으로 변화시킴으로써 변형된 뉴클레오시드, 예컨대, 이소시토신, 슈도이소시토신, 5-메틸 시토신, 5-티오졸로-시토신, 5-프로피닐-시토신, 5-프로피닐-우리딘, 5-브로모우리딘, 5-티아졸로-우리딘, 2-티오-우리딘, 슈도우리딘, 1-메틸슈도우리딘, 5-메톡시우리딘, 2'-티오-티민, 이노신, 디아미노퓨린, 6-아미노퓨린, 2-아미노퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 및 2-클로로-6-아미노퓨린으로부터 선택된 "대체 핵염기"를 포함할 수 있다. 대체 뉴클레오시드는 또한 당 모이어티가 변형된 뉴클레오시드; 예를 들어, 2'-O-메틸아데노신, 2'-O-메틸구아노신, 2'-O-메틸시토신, 2'-O-메틸우리딘, 2-플루오로-데옥시아데노신, 2-플루오로-데옥시구아노신, 2-플루오로-데옥시시티딘, 및 2-플루오로-데옥시우리딘을 포함할 수 있다.

[0054] 대체 우라실을 갖는 예시적인 핵염기는 슈도우리딘(ψ), 피리딘-4-온 리보뉴클레오시드, 5-아자-우리딘, 6-아자-우리딘, 2-티오-5-아자-우리딘, 2-티오-우리딘(s^2U), 4-티오-우리딘(s^4U), 4-티오-슈도우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 5-하이드록시-우리딘(ho^5U), 5-아미노알릴-우리딘, 5-할로-우리딘(예를 들어, 5-아이오도-우리딘 또는 5-브로모-우리딘), 3-메틸-우리딘(m^3U), 5-메톡시-우리딘(mo^5U), 5-옥시아세트산(cmo^5U), 5-옥시아세트산 메틸 에스테르($mcmo^5U$), 5-카복시메틸-우리딘(cm^5U), 1-카복시메틸-슈도우리딘, 5-카복시하이드록시메틸-우리딘(chm^5U), 5-카복시하이드록시메틸-우리딘 메틸 에스테르($mchm^5U$), 5-메톡시카보닐메틸-우리딘(mcm^5U), 5-메톡시카보닐메틸-2-티오-우리딘(mcm^5s^2U), 5-아미노메틸-2-티오-우리딘(nm^5s^2U), 5-메틸아미노메틸-우리딘(mnm^5U), 5-메틸아미노메틸-2-티오-우리딘(mnm^5s^2U), 5-메틸아미노메틸-2-셀레노-우리딘(mnm^5se^2U), 5-카바모일메틸-우리딘(ncm^5U), 5-카복시메틸아미노메틸-우리딘($cmnm^5U$), 5-카복시메틸아미노메틸-2-티오-우리딘($cmnm^5s^2U$), 5-프로피닐-우리딘, 1-프로피닐-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-우리딘(τm^5U), 1-타우리노메틸-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-2-티오-우리딘(τm^5s^2U), 1-타우리노메틸-4-티오-슈도우리딘, 5-메틸-우리딘(m^5U , 즉, 핵염기 데옥시티민을 갖는), 1-메틸-슈도우리딘($m^1\psi$), 5-메틸-2-티오-우리딘(m^5s^2U), 1-메틸-4-티오-슈도우리딘($m^1s^4\psi$), 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 3-메틸-슈도우리딘($m^3\psi$), 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 디하이드로우리딘(D), 디하이드로슈도우리딘, 5,6-디하이드로우리딘, 5-메틸-디하이드로우리딘(m^5D), 2-티오-디하이드로우리딘, 2-티오-디하이드로슈도우리딘, 2-메톡시-우리딘, 2-메톡시-4-티오-우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 3-(3-아미노-3-카복시프로필)우리딘(acp^3U), 1-메틸-3-(3-아미노-3-카복시프로필)슈도우리딘($acp^3\psi$), 5-(이소펜테닐아미노메틸)우리딘(inm^5U), 5-(이소펜테닐아미노메틸)-2-티오-우리딘(inm^5s^2U), α -티오-우리딘, 2'-O-메틸-우리딘(Um), 5,2'-O-디메틸-우리딘(m^5Um), 2'-O-메틸-슈도우리딘(ψm), 2-티오-2'-O-메틸-우리딘(s^2Um), 5-메톡시카보닐메틸-2'-O-메틸-우리딘(mcm^5Um), 5-카바모일메틸-2'-O-메틸-우리딘(ncm^5Um), 5-카복시메틸아미노메틸-2'-O-메틸-우리딘($cmnm^5Um$), 3,2'-O-디메틸-우리딘(m^3Um), 및 5-(이소펜테닐아미노메틸)-2'-O-메틸-우리딘(inm^5Um), 1-티오-우리딘, 데옥시티미딘, 2'-F-아라-우리딘, 2'-F-우리딘, 2'-OH-아라-우리딘, 5-(2-카보메톡시비닐)우리딘, 및 5-[3-(1-E-프로페닐아미노)우리딘을 포함한다.

[0055] 대체 시토신을 갖는 예시적인 핵염기는 5-아자-시티딘, 6-아자-시티딘, 슈도이소시티딘, 3-메틸-시티딘(m^3C), N4-아세틸-시티딘(ac^4C), 5-포밀-시티딘(f^5C), N4-메틸-시티딘(m^4C), 5-메틸-시티딘(m^5C), 5-할로-시티딘(예를 들어, 5-아이오도-시티딘), 5-하이드록시메틸-시티딘(hm^5C), 1-메틸-슈도이소시티딘, 피롤로-시티딘, 피롤로-슈도이소시티딘, 2-티오-시티딘(s^2C), 2-티오-5-메틸-시티딘, 4-티오-슈도이소시티딘, 4-티오-1-메틸-슈도이소시티딘, 4-티오-1-메틸-1-데아자-슈도이소시티딘, 1-메틸-1-데아자-슈도이소시티딘, 제블라린, 5-아자-제블라린,

5-메틸-제볼라린, 5-아자-2-티오-제볼라린, 2-티오-제볼라린, 2-메톡시-시티딘, 2-메톡시-5-메틸-시티딘, 4-메톡시-슈도이소시티딘, 4-메톡시-1-메틸-슈도이소시티딘, 리시딘(k_2C), α -티오-시티딘, 2'-O-메틸-시티딘(Cm), 5,2'-O-디메틸-시티딘(m^5Cm), N4-아세틸-2'-O-메틸-시티딘(ac^4Cm), N4,2'-O-디메틸-시티딘(m^4Cm), 5-포밀-2'-O-메틸-시티딘(f^5Cm), N4,N4,2'-O-트리메틸-시티딘(m^4_2Cm), 1-티오-시티딘, 2'-F-아라-시티딘, 2'-F-시티딘, 및 2'-OH-아라-시티딘을 포함한다.

[0056] 대체 아데닌을 갖는 예시적인 핵염기는 2-아미노-퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 2-아미노-6-할로-퓨린(예를 들어, 2-아미노-6-클로로-퓨린), 6-할로-퓨린(예를 들어, 6-클로로-퓨린), 2-아미노-6-메틸-퓨린, 8-아지도-아데노신, 7-데아자-아데닌, 7-데아자-8-아자-아데닌, 7-데아자-2-아미노-퓨린, 7-데아자-8-아자-2-아미노-퓨린, 7-데아자-2,6-디아미노퓨린, 7-데아자-8-아자-2,6-디아미노퓨린, 1-메틸-아데노신(m^1A), 2-메틸-아데닌(m^2A), N6-메틸-아데노신(m^6A), 2-메틸티오-N6-메틸-아데노신(ms^2m^6A), N6-이소펜테닐-아데노신(i^6A), 2-메틸티오-N6-이소펜테닐-아데노신(ms^2i^6A), N6-(시스-하이드록시이소펜테닐)아데노신(io^6A), 2-메틸티오-N6-(시스-하이드록시이소펜테닐)아데노신(ms^2io^6A), N6-글리시닐카바모일-아데노신(g^6A), N6-트레오닐카바모일-아데노신(t^6A), N6-메틸-N6-트레오닐카바모일-아데노신(m^6t^6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐카바모일-아데노신(ms^2g^6A), N6,N6-디메틸-아데노신(m^6_2A), N6-하이드록시노발릴카바모일-아데노신(hn^6A), 2-메틸티오-N6-하이드록시노발릴카바모일-아데노신(ms^2hn^6A), N6-아세틸-아데노신(ac^6A), 7-메틸-아데닌, 2-메틸티오-아데닌, 2-메톡시-아데닌, α -티오-아데노신, 2'-O-메틸-아데노신(Am), N6,2'-O-디메틸-아데노신(m^6Am), N6,N6,2'-O-트리메틸-아데노신(m^6_2Am), 1,2'-O-디메틸-아데노신(m^1Am), 2'-O-리보실아데노신(포스페이트)(Ar(p)), 2-아미노-N6-메틸-퓨린, 1-티오-아데노신, 8-아지도-아데노신, 2'-F-아라-아데노신, 2'-F-아데노신, 2'-OH-아라-아데노신, 및 N6-(19-아미노-헨타옥사노나데실)-아데노신을 포함한다.

[0057] 대체 구아닌을 갖는 예시적인 핵염기는 이노신(I), 1-메틸-이노신(m^1I), 와이오신(imG), 메틸와이오신(mimG), 4-데메틸-와이오신(imG-14), 이소와이오신(imG2), 와이부토신(yW), 피옥시와이부토신($oxyW$), 하이드록시와이부토신(OhyW), 저변형 하이드록시와이부토신(OhyW*), 7-데아자-구아노신, 쿠에오신(Q), 에폭시쿠에오신(oQ), 갈락토실-쿠에오신(galQ), 만노실-쿠에오신(manQ), 7-시아노-7-데아자-구아노신(preQ_b), 7-아미노메틸-7-데아자-구아노신(preQ_i), 아르케오신(G^+), 7-데아자-8-아자-구아노신, 6-티오-구아노신, 6-티오-7-데아자-구아노신, 6-티오-7-데아자-8-아자-구아노신, 7-메틸-구아노신(m^7G), 6-티오-7-메틸-구아노신, 7-메틸-이노신, 6-메톡시-구아노신, 1-메틸-구아노신(m^1G), N2-메틸-구아노신(m^2G), N2,N2-디메틸-구아노신(m^2_2G), N2,7-디메틸-구아노신($m^{2,7}G$), N2, N2,7-디메틸-구아노신($m^{2,2,7}G$), 8-옥소-구아노신, 7-메틸-8-옥소-구아노신, 1-메틸-6-티오-구아노신, N2-메틸-6-티오-구아노신, N2,N2-디메틸-6-티오-구아노신, α -티오-구아노신, 2'-O-메틸-구아노신(Gm), N2-메틸-2'-O-메틸-구아노신(m^2Gm), N2,N2-디메틸-2'-O-메틸-구아노신(m^2_2Gm), 1-메틸-2'-O-메틸-구아노신(m^1Gm), N2,7-디메틸-2'-O-메틸-구아노신($m^{2,7}Gm$), 2'-O-메틸-이노신(Im), 1,2'-O-디메틸-이노신(m^1Im), 2'-O-리보실구아노신(포스페이트)(Gr(p)), 1-티오-구아노신, O6-메틸-구아노신, 2'-F-아라-구아노신, 및 2'-F-구아노신을 포함한다.

[0058] 핵염기 모이어티는 각각의 상응하는 핵염기에 대한 문자 코드, 예를 들어, A, T, G, C, 또는 U로 표시될 수 있고, 여기서 각각의 문자는 동등한 기능의 대체 핵염기를 선택적으로 포함할 수 있다.

[0059] 본원에서 사용되는 "안티센스"라는 용어는 내인성 유전자(예를 들어, C3)의 발현을 방해하도록 유전자, 일차 전사체, 또는 가공된 mRNA(예를 들어, C3의 서열(예를 들어, SEQ ID NO: 12)) 모두 또는 그 일부에 충분히 상보적인 올리고뉴클레오티드를 지칭한다.

[0060] "안티센스 가닥" 및 "가이드 가닥"이라는 용어는 표적 서열, 예를 들어, C3 mRNA(예를 들어, SEQ ID NO: 12)에 실질적으로 상보적인 영역을 포함하는 RNAi 올리고뉴클레오티드(예를 들어, dsRNA)의 가닥을 지칭한다.

- [0061] 수 또는 일련의 수 앞에 있는 "적어도"라는 용어는 "적어도"라는 용어에 인접한 수, 및 문맥상 명백한 바와 같이, 논리적으로 포함될 수 있는 모든 후속하는 수 또는 정수를 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 핵산 분자에서 뉴클레오티드의 수는 정수여야 한다. 예를 들어, "21-뉴클레오티드 핵산 분자의 적어도 10 개의 뉴클레오티드"는 10 개 내지 21 개의 뉴클레오티드의 범위, 예를 들어, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 또는 21 개의 뉴클레오티드 등이 지시된 성질을 갖는 것을 의미한다. "적어도"가 일련의 수 또는 범위 앞에 존재할 때, "적어도"는 그 일련의 또는 범위의 수 각각을 수식할 수 있는 것으로 이해된다.
- [0062] 본원에서 사용되는 "감쇠하다"라는 용어는 저하시키거나 효과적으로 중단시키는 것을 의미한다. 비-제한적인 예로서, 본원에 제공된 치료 중 하나 이상은 대상체에서 보체 경로 활성화 또는 조절장애(예를 들어, C3 활성화 또는 조절장애)에 의해 매개되는 질환의 발병 또는 진행을 저하시키거나 효과적으로 중단시킬 수 있다. 이러한 감쇠는, 예를 들어, 본원에 개시된 보체 경로 활성화 또는 조절장애와 관련된 질환 중 하나 이상과 같은 보체 경로 활성화 또는 조절장애와 관련된 질환의 하나 이상의 양태(예를 들어, 증상, 조직 특성, 및 세포, 염증성 또는 면역학적 활성 등)의 감소에 의해 예시될 수 있다.
- [0063] "cDNA"라는 용어는 mRNA 서열의 DNA 등가물인(즉, 티미딘으로 치환된 우리딘을 갖는) 핵산 서열을 지칭한다. 일반적으로, 당업자는 cDNA 서열이, 우리딘이 티미딘으로 판독되는 것을 제외하고는, mRNA 서열과 동일하다는 것을 이해할 것이기 때문에, cDNA 및 mRNA라는 용어는 특정 유전자(예를 들어, C3 유전자)와 관련하여 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0064] 본원에서 사용되는 "C3" 및 "상보적 성분 3"이라는 용어는 상보적 성분 3을 인코딩하는 단백질 또는 유전자를 지칭한다. "C3"이라는 용어는 야생형 C3 단백질의 천연 변이체, 예컨대, NCBI 참조 번호: NP_000055.2 또는 SEQ ID NO: 11에 제시된 야생형 인간 C3의 아미노산 서열과 적어도 85%의 동일성(예를 들어, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9% 이상의 동일성)을 갖는 단백질을 지칭한다. "C3"이라는 용어는 또한 야생형 C3 폴리뉴클레오티드의 천연 변이체, 예컨대, NCBI 참조 번호: NM_000064.4 또는 SEQ ID NO: 12에 제시된 야생형 인간 C3의 핵산 서열과 적어도 85%의 동일성(예를 들어, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9% 이상의 동일성)을 갖는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.
- [0065] 본원에서 사용되는 "조합 요법" 또는 "~와 조합하여 투여되는"은 2 개(또는 그 초과)의 상이한 작용제 또는 치료가 특정 질환 또는 질병에 대해 정의된 치료 요법의 일부로서 대상체에게 투여되는 것을 의미한다. 치료 요법은 대상체에 대한 별개의 작용제의 효과가 중첩되도록 각각의 작용제의 용량 및 투여 주기를 규정한다. 일부 구현예에서, 둘 이상의 작용제의 전달은 동시적 또는 동시발생적이며, 작용제는 공동-제형화될 수 있다. 일부 구현예에서, 둘 이상의 작용제는 공동-제형화되지 않고 처방된 요법의 일부로서 순차적인 방식으로 투여된다. 일부 구현예에서, 둘 이상의 작용제 또는 치료의 조합 투여는 장애와 관련된 증상, 또는 다른 파라미터의 저하가 단독으로 또는 다른 것의 부재 하에 전달되는 하나의 작용제 또는 치료에서 관찰될 것보다 크게 되도록 한다. 두 치료의 효과는 부분적으로 상가적이거나, 전체적으로 상가적이거나, 상가적인 것보다 클 수 있다(예를 들어, 상승작용적). 각각의 치료제의 순차적인 또는 실질적으로 동시적인 투여는 경구 경로, 정맥내 경로, 근육내 경로, 및 점막 조직을 통한 직접 흡수를 포함하지만, 이로 제한되지 않는 임의의 적절한 경로에 의해 영향을 받을 수 있다. 치료제는 동일한 경로 또는 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 조합물의 제1 치료제는 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있는 반면, 조합물의 제2 치료제는 경구 투여될 수 있다.
- [0066] 본원에서 사용되는 "보체 경로 활성화 또는 조절장애"라는 용어는 병원체에 대한 숙주 방어를 제공하고 면역 복합체 및 손상된 세포를 제거하기 위한 및 면역조절을 위한, 고전 경로, 대체 경로, 및 렉틴 경로를 포함하는 보체 경로의 능력의 임의의 이상을 지칭한다. 보체 경로 활성화 또는 조절장애는 유체 상 및 세포 표면에서 발생할 수 있고, 과도한 보체 활성화 또는 불충분한 조절을 야기할 수 있고, 이 둘 모두는 조직 손상으로 이어진다.
- [0067] 본원에서 사용되는 "상보적인"은 제2 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 서열과 관련하여 제1 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 서열을 기술하는 데 사용되는 경우, 당업자가 이해할 바와 같이, 제1 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드가 특정 조건 하에 제2 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드와 혼성화되고 듀플렉스 구조를 형성하는 능력을 지칭한다. 이러한 조건은, 예를 들어, 엄격한 조건일 수 있으며, 여기서, 엄격한 조건은 다음을 포함할 수 있다: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA로 50°C 또는 70°C, 12 시간 내지 16 시간 동안, 및 이어서 세척(예를 들어, 문헌["Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook 등 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press] 참조). 유기체 내에서 직면할 수 있는 생

리학적으로 적절한 조건과 같은 다른 조건도 적용할 수 있다. 당업자는 혼성화된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 궁극적인 적용에 따라 두 서열의 상보성 시험에 가장 적절한 조건 세트를 결정할 수 있을 것이다. 본원에 사용되는 "상보적인" 서열은 또한 이들의 혼성화 능력에 대한 상기 요건이 충족되는 한, 비-왓슨-크릭(non-Watson-Crick) 염기 쌍 및/또는 비천연 및 대체 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드로부터 형성되는 염기 쌍을 포함하거나 전체적으로 이로부터 형성될 수 있다. 이러한 비-왓슨-크릭 염기 쌍은 G:U 위블(Wobble) 또는 후그스테인(Hoogstein) 염기 쌍형성을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 본원에 기재된 바와 같은, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드) 내, 또는 올리고뉴클레오티드와 표적 서열 사이의 상보적 서열은 하나의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 서열 또는 두 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 서열 모두의 전장에 걸쳐 제1 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드의, 제2 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드에 대한 염기 쌍형성을 포함한다. 이러한 서열은 본원에서 서로에 대해 "완전히 상보적인" 것으로 지칭될 수 있다. 제1 서열이 제2 서열에 대해 "실질적으로 상보적인" 것으로 지칭되는 경우, 두 서열은 완전히 상보적일 수 있거나, 이들은 최대 30 개의 염기 쌍의 듀플렉스에 대하여, 혼성화 시에 1 개 이상의, 그러나 일반적으로는 5 개, 4 개, 3 개 또는 2 개 이하의 미스매치 염기 쌍을 형성하면서 이들의 궁극적 적용에 가장 적절한 조건 하에서 혼성화되는 능력, 예를 들어, RISC 경로를 통한 발현의 저하를 보유할 수 있다. "실질적으로 상보적인"은 또한 관심 mRNA의 인접 부분(예를 들어, C3을 인코딩하는 mRNA)에 실질적으로 상보적인 올리고뉴클레오티드를 지칭할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 서열이 C3을 인코딩하는 mRNA의 비-중단 부분에 실질적으로 상보적인 경우, C3 mRNA의 적어도 일부에 상보적이다. 그러나, 2 개의 올리고뉴클레오티드가 혼성화 시 하나 이상의 단일 가닥 오버행을 형성하도록 설계된 경우, 이러한 오버행은 상보성의 결정과 관련하여 미스매치로 간주되지 않을 것이다. 예를 들어, 22 개의 연결된 뉴클레오시드 길이의 하나의 올리고뉴클레오티드 및 20 개의 뉴클레오시드 길이의 또 다른 올리고뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 이들이 상이한 길이를 갖더라도 본원에 기재된 목적을 위해 "완전히 상보적인" 것으로 지칭될 수 있다.

[0068] 본원에서 사용되는 "상보적 올리고뉴클레오티드"는 표준 왓슨-크릭 상보성 규칙에 따라 염기 쌍을 이룰 수 있는 것들이다. 구체적으로, 퓨린은 시토신과 쌍을 이룬 구아닌(G:C) 및 DNA의 경우에 티민과 쌍을 이룬 아데닌(A:T), 또는 RNA의 경우에 우라실과 쌍을 이룬 아데닌(A:U)의 조합을 형성하도록 피리미딘과 염기 쌍을 이룰 것이다. 2 개의 올리고뉴클레오티드는, 각각 서로 실질적으로 상보적인 적어도 하나의 영역을 갖는 경우, 이들이 서로 완전히 상보적이지는 않더라도 서로 혼성화될 수 있는 것으로 이해된다.

[0069] 본원에서 사용되는 "세포를 올리고뉴클레오티드와 접촉시키는"이라는 어구는 당업계에 공지된 방법에 의해 세포를 올리고뉴클레오티드, 예컨대, 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드(예를 들어, 단일 가닥 RNA 또는 듀플렉스를 형성하는 이중 가닥 RNA)와 접촉시키는 것을 포함한다. 세포를 올리고뉴클레오티드와 접촉시키는 것은 시험관내에서 세포를 올리고뉴클레오티드와 접촉시키거나 생체내에서 세포를 올리고뉴클레오티드와 접촉시키는 것을 포함한다. 접촉은 직접적으로 또는 간접적으로 수행될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 방법을 수행하는 개체에 의해 세포와 물리적으로 접촉될 수 있거나, 대안적으로, RNAi 올리고뉴클레오티드는 후속하여 세포와 접촉하게 되거나 세포와의 접촉을 허용할 상황에 놓일 수 있다. 시험관내에서 세포를 접촉시키는 것은, 예를 들어, 세포를 올리고뉴클레오티드와 인큐베이션시킴으로써 수행될 수 있다. 세포를 생체내에서 접촉시키는 것은, 예를 들어, 올리고뉴클레오티드를 세포가 위치되는 조직 내에 또는 그 부근에 주사함으로써, 또는 RNAi 올리고뉴클레오티드를 또 다른 영역, 예를 들어, 혈류 또는 피하 공간에 주사함으로써 수행될 수 있고, 그에 따라 작용제는 후속하여 접촉될 세포가 위치되는 조직에 도달할 것이다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 관심 부위에 올리고뉴클레오티드를 지향시키는 리간드를 함유할 수 있고/있거나 이에 커플링될 수 있거나, 관심 표적 부위에 올리고뉴클레오티드를 전달하는 벡터(예를 들어, 바이러스 벡터)로 통합될 수 있다. 시험관내 접촉 방법과 생체내 접촉 방법의 조합도 가능하다. 예를 들어, 세포는 또한 시험관내에서 올리고뉴클레오티드와 접촉되고 후속하여 대상체에 이식될 수 있다.

[0070] "인접한 핵염기 영역"이라는 용어는 표적 핵산에 상보적인 올리고뉴클레오티드의 영역(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥)을 지칭한다. 이 용어는 본원에서 "인접 뉴클레오티드 서열" 또는 "인접 핵염기 서열"이라는 용어와 상호교환적으로 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 모든 뉴클레오티드는 인접 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 영역에 존재한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 인접 뉴클레오티드 영역을 포함하고, 선택적으로 추가의 뉴클레오티드(들) 또는 뉴클레오시드(들)를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 링커 영역은 표적 핵산에 상보적일 수 있거나 상보적이지 않을 수 있다. 인접 뉴클레오티드 영역의 뉴클레오티드 사이에 존재하는 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함할 수

있다. 또한, 인접 뉴클레오티드 영역은 하나 이상의 당-변형된 뉴클레오시드를 포함할 수 있다.

- [0071] 본원에서 사용되는 "데옥시리보뉴클레오티드"라는 용어는 리보뉴클레오티드와 비교하여 이의 펜토스 당의 2' 위치에서 하이드록실 대신에 수소를 갖는 뉴클레오티드를 지칭한다. 변형된 데옥시리보뉴클레오티드는 당, 포스포이트 기 또는 염기에서 또는 이의 변형 또는 치환을 포함하는, 2' 위치가 아닌 곳에 원자의 하나 이상의 변형 또는 치환을 갖는 데옥시리보뉴클레오티드이다.
- [0072] 본원에서 사용되는 "질환"이라는 용어는 신체 기능, 시스템, 또는 기관의 중단, 정지 또는 장애를 지칭한다. 관 심 질환 또는 장애는, 예컨대, 본원에 기재된 치료 방법에 의해 C3에 표적화되는 본원에 기재된 바와 같은 올리고뉴클레오티드(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 단일 가닥 또는 듀플렉스를 형성하는 이중 가닥 RNA 작제 물)를 이용한 치료로부터 이익을 얻을 것들을 포함한다. 본원에 기재된 조성물 및 방법을 이용하여 치료될 수 있는 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되거나 이와 관련된 질환 또는 장애의 비-제한적인 예는, 예를 들어, 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH), 비정형 용혈성 요독 증후군(aHUS), IgA 신장병증, 루푸스 신염, C3 사구체병증(C3G), 피부근염/자가면역 근염, 전신 경화증, 탈수초성 다발신경병증, 천포창, 막성 신장병증, 국소 분절 사구체 경화증(FSGS), 수포성 유천포창, 후천성 표피박리 수포증(EBA), 점막 유천포창, ANCA 혈관염, 저보 체성 두드러기성 혈관염, 면역 복합체 소혈관 혈관염, 피부 소혈관 혈관염, 자가면역 괴사성 근육병증, 이식 기 관 거부반응, 예컨대, 신장, 간, 심장 또는 폐 이식 거부반응, 예컨대, 항체 매개 거부반응(AMR), 예컨대, 만성 AMR(cAMR), 항인지질(aPL) Ab 증후군, 사구체신염, 천식, 고밀도침착병(DDD), 노인성 황반변성(AMD), 전신 홍반 성 루푸스(SLE), 류마티스 관절염(RA), 중증 난치성 RA, 펠티 증후군, 다발성 경화증(MS), 외상성 뇌 손상(TBI), 척수 손상, 허혈 재관류 손상, 자간전증, 급성 신장 손상에서의 이식편 기능 지연(DGF-AKI), 심폐 우회- 관련 급성 신장 손상, 저산소-허혈성 뇌병증, 투석-유발 혈전증, 타카야스 동맥염, 재발성 다발연골염, 급성/예 방 이식편대숙주병, 만성 이식편대숙주병, 베타 지중해빈혈, 줄기 세포 이식-관련 혈전성 미세혈관병증, 담도 폐쇄증, 염증성 간 질환, 베체트병, 허혈성 뇌졸중, 뇌내 출혈, 경피증, 경피증 신발증, 경피증-관련 간질성 폐 질환(SSc-ILD), 겸상 적혈구병, 상염색체 우성 다낭성 신장병(ADPKD), 화학요법-유발 말초 신경병증(CIPN), 당 뇨병성 신경병증, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 당뇨병성 신장병증, 당뇨병성 망막병증, 지도형 위축증, 폐동맥 고혈압, 난치성 중증 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 특발성 폐섬유증(IPF), 만성 폐 동종이식편 기능장애, 남성 섬 유증의 폐 이환, 화농성 뱀집염, 비알코올성 지방간 질환(NASH), 강직성 척추염, 조혈 줄기 세포 이식-관련 혈 전성 미세혈관병증(HSCT-TMA)(예방), 관상 동맥 질환, 죽상경화증, 골다공증(예방), 골관절염, 고위험 드루젠, 염증성 장질환, 케양성 대장염, 간질성 방광염, 투석 유발 보체 활성화, 괴저성 농피증, 만성 심부전, 자가면역 심근염, 비용종증, 급성 및 만성 췌장염, 죽상경화증, 호산구성 식도염, 호산구성 육아종증, 과호산구성 증후군, 상처 치유 및 혈전성 혈소판 감소성 자반증(TTP)과 같은, 예를 들어, 피부 장애, 신경 장애, 신장 장애 (nephrology disorder), 급성 환자 치료, 류마티스 장애, 폐 장애, 피부과 장애, 혈액 장애, 및 안과 장애를 포 함한다.
- [0073] 본원에서 사용되는 "듀플렉스"라는 용어는 핵산(예를 들어, 올리고뉴클레오티드)과 관련하여 뉴클레오티드의 2 개의 역평행 서열의 상보적 염기 쌍형성을 통해 형성된 구조를 지칭한다.
- [0074] 본원에서 사용되는 바와 같이, (예를 들어, 세포 또는 대상체에서) C3의 수준 및/또는 활성을 저하시키는 작 용제(예를 들어, 본원에 기재된 RNAi 올리고뉴클레오티드)의 "유효량", "치료적 유효량", 및 "충분한 양"이라는 용어는 인간을 포함하는 대상체에게 투여된 경우, 임상 결과를 포함하는 유의한 또는 바람직한 결과를 달성하기 에 충분한 양을 지칭하고, 이와 같이 "유효량" 또는 이에 대한 동의어는 그것이 적용되는 맥락에 좌우된다. 예 를 들어, 보체 경로 활성화 또는 조절장애와 관련된 질환을 치료하는 맥락에서, 이는 C3의 수준 및/또는 활성을 저하시키는 작용제의 투여 없이 얻어진 반응과 비교하여 치료 반응을 달성하기에 충분한 C3의 수준 및/또는 활 성을 저하시키는 작용제의 양이다. 이러한 양에 상응할 본원에 기재된 C3의 수준 및/또는 활성을 저하시키는 주 어진 작용제의 양은 다양한 요인, 예컨대, 주어진 작용제, 약학적 제형, 투여 경로, 질환 또는 장애의 유형, 대 상체의 신원(예를 들어, 연령, 성별 및/또는 체중) 또는 치료될 숙주 등에 따라서 달라질 것이지만, 그럼에도 불구하고 당업자에 의해 관례대로 결정될 수 있다. 또한, 본원에서 사용되는 바와 같이, 본 개시의 C3의 수준 및/또는 활성을 저하시키는 작용제의 "치료적 유효량"은 대조군과 비교하여 대상체에서 유의한 또는 요망되는 결과를 초래하는 양이다. 본원에 정의된 바와 같이, 본 개시의 C3의 수준 및/또는 활성을 저하시키는 작용제의 치료적 유효량은 당업자에 공지된 일상적인 방법에 의해 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 투여 요법은 최적의 치료 반응을 제공하도록 조정될 수 있다.
- [0075] 본원에서 사용되는 "부형제"라는 용어는, 예를 들어, 요망되는 컨시스턴시 또는 안정화 효과를 제공하거나 이에

기여하는 조성물에 포함될 수 있는 비-치료제를 지칭한다.

- [0076] "G", "C", "A", "T" 및 "U"는 각각 일반적으로 구아닌, 시토신, 아데닌, 티미딘 및 우라실을 염기로서 각각 함유하는 뉴클레오티드를 의미하지만, 리보스 및 데옥시리보스 이외에 대체 당 모이어티를 포함할 수 있다. 또한, "뉴클레오티드"라는 용어는 또한 하기에 추가로 상세히 설명되는 바와 같이 대체 뉴클레오티드 또는 대응 교체 모이어티를 지칭할 수 있음이 이해된다. 당업자는 구아닌, 시토신, 아데닌 및 우라실이 이러한 교체 모이어티를 지니는 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드의 염기 쌍형성 성질을 실질적으로 변경하지 않으면서 다른 모이어티에 의해 교체될 수 있음을 잘 알고 있다. 예를 들어, 비제한적으로, 이노신을 이의 염기로서 포함하는 뉴클레오티드는 아데닌, 시토신 또는 우라실을 함유하는 뉴클레오티드와 염기 쌍을 이룰 수 있다. 따라서, 우라실, 구아닌 또는 아데닌을 함유하는 뉴클레오티드는, 예를 들어, 이노신을 함유하는 뉴클레오티드에 의해 본 개시에서 특색을 이루는 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에서 교체될 수 있다. 또 다른 예에서, 올리고뉴클레오티드의 어느 곳에서나 아데닌 및 시토신은 각각 구아닌 및 우라실로 교체되어 표적 mRNA와 G-U 위블 염기 쌍을 형성할 수 있다. 이러한 교체 모이어티를 함유하는 서열은 본 개시에서 특색을 이루는 조성물 및 방법에 적합하다.
- [0077] 본원에서 사용되는 "저해제"라는 용어는 단백질(예를 들어, C3)의 수준 및/또는 활성을 저하시키는 임의의 작용제를 지칭한다. 저해제의 비-제한적인 예는 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드, 예를 들어, dsRNA, siRNA, 또는 shRNA)를 포함한다. 본원에서 사용되는 "저하시키는"이라는 용어는 "침묵시키는", "하향조절하는", "억제하는" 및 다른 유사한 용어와 상호교환적으로 사용되며, 5% 이상(예를 들어, 10%, 15%, 25%, 35%, 50%, 75%, 및 100%)의 임의의 수준의 저하를 포함한다. 건강한 인간의 혈청에서 발견되는 C3 단백질의 전형적인 수준은 약 75 mg/dL 내지 175 mg/dL(예를 들어, 75 mg/dL 내지 100 mg/dL, 75 mg/dL 내지 125 mg/L, 75 mg/dL 내지 150 mg/dL, 150 mg/dL 내지 175 mg/dL, 125 mg/dL 내지 175 mg/dL, 및 100 mg/dL 내지 175 mg/dL)이다.
- [0078] "수준"은 선택적으로 참조와 비교하여 단백질, 또는 단백질(예를 들어, C3)을 인코딩하는 mRNA의 수준 또는 활성을 의미한다. 참조는 본원에 정의된 바와 같은 임의의 유용한 참조일 수 있다. 단백질의 "감소된 수준" 또는 "증가된 수준"은 참조와 비교하여 각각 단백질 수준의 감소 또는 증가(예를 들어, 참조와 비교하여, 예를 들어, 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%, 약 150%, 약 200%, 약 300%, 약 400%, 약 500% 이상의 감소 또는 증가; 예를 들어, 참조와 비교하여 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 50%, 약 75%, 약 100%, 또는 약 200% 초과 감소 또는 증가; 예를 들어, 참조와 비교하여 약 0.01 배 미만, 약 0.02 배, 약 0.1 배, 약 0.3 배, 약 0.5 배, 약 0.8 배 이하의 감소 또는 증가; 또는, 예를 들어, 참조와 비교하여 약 1.2 배 초과, 약 1.4 배, 약 1.5 배, 약 1.8 배, 약 2.0 배, 약 3.0 배, 약 3.5 배, 약 4.5 배, 약 5.0 배, 약 10 배, 약 15 배, 약 20 배, 약 30 배, 약 40 배, 약 50 배, 약 100 배, 약 1000 배 이상의 감소 또는 증가)를 의미한다. 단백질 또는 mRNA의 수준은 샘플에서 총 단백질 또는 mRNA에 대한 질량/부피(예를 들어, g/dL, mg/mL, μg/mL, ng/mL) 또는 백분율로 표현될 수 있다.
- [0079] 본원에서 사용되는 "루프"라는 용어는 (예를 들어, 포스페이트 완충제 또는 세포에서) 적절한 혼성화 조건 하에 쌍을 이루지 않은 영역에 축적(flank)해 있는 2 개의 역평행 영역이 혼성화되어 듀플렉스("스텝"으로 지칭됨)를 형성하도록 서로에 대해 충분히 상보적인 핵산의 2 개의 역평행 영역이 축적해 있는 핵산(예를 들어, 올리고뉴클레오티드)의 쌍을 이루지 않은 영역을 지칭한다.
- [0080] 본원에서 사용되는 "변형된 뉴클레오티드간 연결"이라는 용어는 포스포디에스테르 결합을 포함하는 참조 뉴클레오티드간 연결과 비교하여 하나 이상의 화학적 변형을 갖는 뉴클레오티드간 연결을 지칭한다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 비천연 발생 연결이다. 통상적으로, 변형된 뉴클레오티드간 연결은 변형된 뉴클레오티드간 연결이 존재하는 핵산에 하나 이상의 바람직한 성질을 부여한다. 예를 들어, 변형된 뉴클레오티드는 열 안정성, 분해에 대한 내성, 뉴클레아제 내성, 용해도, 생체이용률, 생물활성, 저하된 면역원성 등을 개선할 수 있다.
- [0081] 본원에서 사용되는 "변형된 뉴클레오티드"라는 용어는 아데닌 리보뉴클레오티드, 구아닌 리보뉴클레오티드, 시토신 리보뉴클레오티드, 우라실 리보뉴클레오티드, 아데닌 데옥시리보뉴클레오티드, 구아닌 데옥시리보뉴클레오티드, 시토신 데옥시리보뉴클레오티드 및 티미딘 데옥시리보뉴클레오티드로부터 선택된 상응하는 참조 뉴클레오티드와 비교하여 하나 이상의 화학적 변형을 갖는 뉴클레오티드를 지칭한다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 비천연 발생 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 이의 당, 핵염기 및/또는 포스

페이트 기에서 하나 이상의 화학적 변형을 갖는다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 상응하는 참조 뉴클레오타이드에 컨주게이션된 하나 이상의 화학적 모이어티를 갖는다. 통상적으로, 변형된 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드가 존재하는 핵산에 하나 이상의 바람직한 성질을 부여한다. 예를 들어, 변형된 뉴클레오타이드는 열 안정성, 분해에 대한 내성, 뉴클레아제 내성, 용해도, 생체이용률, 생물활성, 저하된 면역원성 등을 개선할 수 있다.

- [0082] "닉킹된(nicked) 테트라루프 구조"는 별개의 센스(패신저) 가닥 및 안티센스(가이드) 가닥의 존재에 의해 특징 규명되는 RNAi 올리고뉴클레오타이드의 구조이고, 여기서 센스 가닥은 안티센스 가닥과의 상보성 영역을 가지며, 가닥 중 적어도 하나, 일반적으로 센스 가닥은 적어도 하나의 가닥 내에 형성된 인접한 스템 영역을 안정화시키도록 구성된 테트라루프를 갖는다. 닉킹된 테트라루프 구조는 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드에서 단일 파손을 야기하고, 그에 따라 이들은 더 이상 공유 연결에 의해 해당 부위에 접합되지 않는다.
- [0083] "핵염기" 및 "염기"라는 용어는 핵산 혼성화에서 수소 결합을 형성하는 뉴클레오시드 및 뉴클레오타이드에 존재하는 퓨린(예를 들어, 아데닌 및 구아닌) 및 피리미딘(예를 들어, 우라실, 티민 및 시토신) 모이어티를 포함한다. 본 개시의 맥락에서, 핵염기라는 용어는 또한 천연-발생 핵염기와는 상이할 수 있지만 핵산 혼성화 동안 기능적인 대체 핵염기를 포괄한다. 이러한 맥락에서, "핵염기"는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티미딘, 우라실, 잔틴 및 하이포잔틴과 같은 천연 발생 핵염기뿐만 아니라 대체 핵염기 둘 모두를 지칭한다. 이러한 변이체는, 예를 들어, 문헌[Hirao 등(Accounts of Chemical Research, vol. 45: page 2055, 2012)] 및 문헌[Bergstrom(Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl. 37 1.4.1, 2009)]에 기재되어 있다.
- [0084] "뉴클레오시드"라는 용어는 핵염기 및 당 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 단량체 단위를 지칭한다. 뉴클레오시드는 천연-발생뿐만 아니라, 대체 뉴클레오시드, 예컨대, 본원에 기재된 것들을 포함할 수 있다. 뉴클레오시드의 핵염기는 천연-발생 핵염기 또는 대체 핵염기일 수 있다. 유사하게, 뉴클레오시드의 당 모이어티는 천연-발생 당 또는 대체 당일 수 있다.
- [0085] 본원에서 사용되는 "뉴클레오타이드"는 뉴클레오시드 및 뉴클레오시드간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 단량체 단위를 지칭한다. 뉴클레오시드간 연결은 포스페이트 연결을 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다. 유사하게, "연결된 뉴클레오시드"는 포스페이트 연결에 의해 연결될 수 있거나 연결되지 않을 수 있다. 포스페이트, 포스포로티오에이트, 및 보로노포스페이트 연결을 포함하지만 이로 제한되지 않는 많은 "대체 뉴클레오시드간 연결"이 당업계에 공지되어 있다. 대체 뉴클레오시드는 바이사이클릭 뉴클레오시드(BNA)(예를 들어, 잠금 뉴클레오시드(LNA) 및 구속된 에틸(cEt) 뉴클레오시드), 펩티드 뉴클레오시드(PNA), 포스포트리에스테르, 포스포로티오네이트, 포스포라미데이트, 및 본원에 기재된 것들을 포함하는 네이티브 뉴클레오시드의 포스페이트 백본의 다른 변이체를 포함한다.
- [0086] 본원에서 사용되는 "올리고뉴클레오타이드"라는 용어는, 예를 들어, 100 개 미만 뉴클레오타이드 길이의 짧은 핵산을 지칭한다. 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 듀플렉스 영역을 가질 수 있거나 갖지 않을 수 있다. 비-제한적인 일련의 예로서, 올리고뉴클레오타이드는 소형 간섭 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 다이스 기질 간섭 RNA(dsiRNA), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 짧은 siRNA, 또는 단일 가닥 siRNA일 수 있지만, 이로 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 RNAi 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0087] 본원에서 사용되는 "오버행"이라는 용어는 하나의 가닥 또는 영역과 듀플렉스를 형성하는 상보적 가닥의 말단을 넘어 연장되는 하나의 가닥 또는 영역으로부터 생성된 말단 비-염기 쌍 뉴클레오타이드(들)를 지칭한다. 일부 구현예에서, 오버행은 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)의 5' 말단 또는 3' 말단에서 듀플렉스 영역으로부터 연장되는 하나 이상의 쌍을 이루지 않은 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 오버행은 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)의 안티센스 가닥 또는 센스 가닥 상의 3' 오버행 또는 5' 오버행이다.
- [0088] 본원에서 사용되는 "이를 필요로 하는 환자" 또는 "이를 필요로 하는 대상체"라는 용어는 질환 또는 장애, 예컨대, 보체 조절장애(예를 들어, C3과 관련된 조절장애, 예컨대, 보체 경로(예를 들어, 대체 경로, 고전 경로, 및 /또는 렉틴 경로) 중 하나 또는 이 모두의 조절장애)에 의해 매개되는 질환의 치료에 대한 필요성에 기초한 대상체의 확인을 지칭한다. 대상체는, 예를 들어, 당업자(예를 들어, 의사)에 의한 조기 진단에 기초하여, 예를 들어, 질환 또는 장애(예를 들어, 본원에 개시된 보체 경로 활성화 또는 조절장애와 관련된 질환 또는 장애)의 치료가 필요한 것으로 확인될 수 있다.

[0089] 참조 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드 서열에 대한 "서열 동일성 퍼센트(%)"는 최대 서열 동일성 퍼센트를 달성하기 위해, 필요한 경우, 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후 참조 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드 서열 내의 핵산 또는 아미노산과 동일한 후보 서열 내의 핵산 또는 아미노산의 백분율로서 정의된다. 핵산 또는 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, 또는 Megalign 소프트웨어와 같은 공개적으로 입수 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 이용하여 당업자의 역량 내에 있는 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 당업자는, 비교 중인 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 예를 들어, 서열 동일성 퍼센트 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 BLAST를 이용하여 생성될 수 있다. 예시로서, (대안적으로, 주어진 핵산 또는 아미노산 서열 B 대비, 그에 비한, 또는 그와의 특정 서열 동일성 퍼센트를 갖는 주어진 핵산 또는 아미노산 서열 A이라는 말로 표현될 수 있는) 주어진 핵산 또는 아미노산 서열 B 대비, 그에 비한, 또는 그와의 주어진 핵산 또는 아미노산 서열 A의 서열 동일성 퍼센트는 하기와 같이 계산된다:

[0090] $(\text{분수 } X/Y) \times 100$

[0091] 여기서, X는 A 및 B의 서열 정렬 프로그램(예를 들어, BLAST)에 의해 해당 프로그램의 정렬에서 동일한 매치로서 점수화된 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 수이고, Y는 B에서 핵산의 총 수이다. 핵산 또는 아미노산 서열 A의 길이가 핵산 또는 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, B에 대한 A의 서열 동일성 퍼센트는 A에 대한 B의 서열 동일성 퍼센트와 같지 않을 것이 인지될 것이다.

[0092] 본원에서 사용되는 "약학적으로 허용되는 부형제"는, 환자에서 실질적으로 비독성 및 비염증성인 성질을 갖는 본원에 기재된 화합물 이외의 임의의 성분(예를 들어, 활성 화합물을 현탁시키거나 용해시킬 수 있는 비히클)을 지칭한다. 부형제는, 예를 들어, 접착 방지제, 항산화제, 결합제, 코팅제, 압착 보조제, 봉해제, 염료(색소), 연화제, 유화제, 충전제(회석제), 필름 형성제 또는 코팅제, 향료, 방향제, 활택제(유동 향상제), 윤활제, 보존제, 인쇄 잉크, 흡착제, 현탁제 또는 분산제, 감미료 및 수화수를 포함할 수 있다. 예시적인 부형제는 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 탄산칼슘, 인산칼슘(이염기성), 스테아르산칼슘, 크로스카멜로스, 가교된 폴리비닐 피롤리돈, 시트르산, 크로스포비돈, 시스테인, 에틸셀룰로스, 젤라틴, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 락토스, 스테아르산마그네슘, 말티톨, 만니톨, 메티오닌, 메틸셀룰로스, 메틸 파라벤, 미정질 셀룰로스, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 피롤리돈, 포비돈, 호화녹말, 프로필 파라벤, 레티닐 팔미테이트, 셀락, 이산화규소, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 시트르산나트륨, 나트륨 전분 글리콜레이트, 솔비톨, 전분(옥수수), 스테아르산, 수크로스, 활석, 이산화티탄, 비타민 A, 비타민 E, 비타민 C, 및 자일리톨을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0093] 본원에서 사용되는 "약학적으로 허용되는 염"이라는 용어는 본원에 기재된 화합물 중 임의의 것의 화합물의 임의의 약학적으로 허용되는 염을 의미한다. 예를 들어, 본원에 기재된 화합물 중 임의의 것의 약학적으로 허용되는 염은 건전한 의학적 판단의 범위 내에 있고 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉시켜 사용하기에 적합하고 합리적인 이익/위험비에 상응하는 것들을 포함한다. 약학적으로 허용되는 염은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 약학적으로 허용되는 염은 문헌[Berge 등, J. Pharmaceutical Sciences 66:1-19, 1977] 및 문헌[Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, (Eds. P.H. Stahl and C.G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008]에 기재되어 있다. 염은 본원에 기재된 화합물의 최종 단리 및 정제 동안인 시추에서 제조될 수 있거나 유리 염기 기를 적합한 유기산과 반응시켜 별개로 제조될 수 있다. 본원에 기재된 화합물은 약학적으로 허용되는 염으로서 제조될 수 있도록 이온화 가능한 기를 가질 수 있다. 이들 염은 무기 또는 유기 산을 포함하는 산 부가염일 수 있거나, 염은, 본원에 기재된 화합물의 산성 형태의 경우, 무기 염기 또는 유기 염기로부터 제조될 수 있다. 빈번하게는, 화합물은 약학적으로 허용되는 산 또는 염기의 부가 생성물로서 제조된 약학적으로 허용되는 염으로서 제조되거나 사용된다. 적합한 약학적으로 허용되는 산 및 염기 및 적절한 염의 제조 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 염은 무기 및 유기 산 및 염기를 포함하는 약학적으로 허용되는 비독성 산 및 염기로부터 제조될 수 있다. 대표적인 산 부가염은 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스코르베이트, 아스파테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 바이설포에이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포설포네이트, 시트레이트, 사이클로펜탄프로피오네이트, 다이글루코네이트, 도데실설포에이트, 에탄설포네이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페이트, 헤미설포에이트, 헵토네이트, 핵사노에이트, 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 하이드로아이오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 락토바이오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 설포에이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올레에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼설포에이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 석시

네이트, 셀페이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 톨루엔설포네이트, 운테카노에이트, 및 발레레이트 염을 포함한다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리성 토금속 염은 나트륨, 리튬, 칼륨, 칼슘 및 마그네슘뿐만 아니라, 암모늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민 및 에틸아민을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 비독성 암모늄, 4차 암모늄 및 아민 양이온을 포함한다.

[0094] 본원에서 사용되는 "약학적 조성물"이라는 용어는, 약학적으로 허용되는 부형제와 제형화된, 및 선택적으로 포유류에서 질환의 치료를 위한 치료 요법의 일부로서 정부 규제 기관의 승인을 받아 제조되거나 판매되는 본원에 기재된 바와 같은 화합물(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)을 함유하는 조성물을 지칭한다. 약학적 조성물은, 예를 들어, 피하 투여용, 정맥내 투여용(예를 들어, 입자성 색전이 없는 멸균 용액으로서 그리고 정맥내 용도에 적합한 용매계에서); 척추강내 주사용; 뇌실내 주사용; 뇌실질내 주사용; 단위 투여형의 경구 투여용(예를 들어, 정제, 캡슐, 당의정, 겔캡(gelcap), 또는 시럽); 국소 투여용(예를 들어, 크림, 젤, 로션 또는 연고로서); 또는 임의의 다른 약학적으로 허용되는 제형으로 제형화될 수 있다.

[0095] 본원에서 사용되는 "포스페이트 유사체"라는 용어는 포스페이트 기의 정전기적 및/또는 입체적 성질을 모방하는 화학적 모이어티를 지칭한다. 일부 구현예에서, 포스페이트 유사체는 대개 효소적 제거에 민감한 5'-포스페이트 대신에 올리고뉴클레오티드의 5' 말단 뉴클레오티드에 위치한다. 일부 구현예에서, 5' 포스페이트 유사체는 포스파타제-내성 연결을 함유한다. 포스페이트 유사체의 예는 5' 포스포네이트, 예컨대, 5' 메틸렌포스포네이트(5'-MP) 및 5'-(E)-비닐포스포네이트(5'-VP)를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 5'-말단 뉴클레오티드에서 당의 4'-탄소 위치에 포스페이트 유사체("4'-포스페이트 유사체"로 지칭됨)를 갖는다. 4'-포스페이트 유사체의 예는 옥시메틸포스포네이트이고, 여기서 옥시메틸 기의 산소 원자는 당 모이어티(예를 들어, 이의 4'-탄소에서) 또는 이의 유사체에 결합된다. 예를 들어, 포스페이트 유사체에 관한 내용 각각이 본원에 참조로 포함되는 제US 2019/0177729호를 참조한다. 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 대한 다른 변형예가 개발되었다(예를 들어, 포스페이트 유사체에 관한 내용 각각이 본원에 참조로 포함되는, 제WO 2011/133871호; 미국 특허 번호 제8,927,513호; 및 문헌[Prakash 등 (2015), *Nucleic Acids Res.*, 43(6):2993-3011] 참조).

[0096] 본원에서 사용되는 "프로브"라는 용어는 특정 서열, 예를 들어, 핵산 분자, 예컨대, mRNA에 선택적으로 결합할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 프로브는 당업계의 널리 공지되고 통상적인 방법을 이용하여 합성되거나 적절한 생물학적 체제로부터 유래될 수 있다. 프로브는 특이적으로 설계되어 표지될 수 있다. 프로브로서 이용될 수 있는 분자의 예는 RNA, DNA, 단백질, 항체, 및 유기 분자를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0097] 본원에서 사용되는 바와 같이, 유전자의 "저하된 발현"이라는 용어는 적절한 참조 세포 또는 대상체와 비교하여, 유전자에 의해 인코딩된 RNA 전사체 또는 단백질의 양의 감소 및/또는 세포 또는 대상체에서 유전자의 활성의 양의 감소를 지칭한다. 예를 들어, 세포를 RNAi 올리고뉴클레오티드(예를 들어, C3 mRNA 서열에 상보적인 안티센스 가닥을 갖는 것)로 처리하는 행위는 RNAi 올리고뉴클레오티드로 처리되지 않은 세포와 비교하여(예를 들어, C3 유전자에 의해 인코딩된) RNA 전사체, 단백질 및/또는 활성의 양의 감소를 초래할 수 있다. 유사하게, 본원에서 사용되는 "발현을 저하시키는"은 유전자(예를 들어, C3) 발현의 저하를 초래하는 행위를 지칭한다. 발현의 저하는 본원에 기재된 바와 같이, (예를 들어 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드와 접촉되지 않은 세포에, 예를 들어 대비하여) C3의 혈청 농도의 감소에 의해 평가될 수 있다. 대안적으로, 발현의 저하는 C3 mRNA의 전사 및/또는 번역 수준의 감소(예를 들어, 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드와 접촉되지 않은 세포에 비해, 예를 들어, 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 55%, 또는 60% 이상의 저하, 예컨대, 1% 내지 60% 이상 범위의 저하)에 의해 평가될 수 있다.

[0098] "참조"는 단백질 또는 mRNA 수준 또는 활성을 비교하는 데 사용되는 임의의 유용한 참조를 의미한다. 참조는 비교 목적으로 사용되는 임의의 샘플, 표준, 표준 곡선 또는 수준일 수 있다. 참조는 일반 참조 샘플 또는 참조 표준 또는 수준일 수 있다. "참조 샘플"은, 예를 들어, 대조군, 예를 들어, "정상 대조군"과 같은 사전 결정된 음성 대조군 값 또는 동일한 대상체로부터 채취한 이전 샘플; 정상 세포 또는 정상 조직과 같은 정상적인 건강한 대상체로부터의 샘플; 질환이 없는 대상체로부터의 샘플(예를 들어, 세포 또는 조직); 질환으로 진단받았지만 아직 본원에 기재된 화합물로 치료되지 않은 대상체로부터의 샘플; 본원에 기재된 화합물로 치료받은 대상체로부터의 샘플; 또는 알려진 정상 농도의 정제된 단백질(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 것)의 샘플일 수 있다. "참조 표준 또는 수준"은 참조 샘플로부터 도출된 값 또는 수를 의미한다. "정상 대조군 값"은 비-질환 상태를 나타내는 사전 결정된 값, 예를 들어, 건강한 대조군 대상체에서 예상되는 값이다. 전형적으로, 정상 대조군 값은 범위("X와 Y 사이"), 높은 임계값("X보다 높지 않음") 또는 낮은 임계값("X보다 낮지 않음")으로 표현된다. 특정 바이오마커에 대한 정상 대조군 값 내의 측정된 값을 갖는 대상체는 전형적으로 그 바이오마커에 대한 "정상 한계 이내"로 지칭된다. 정상적인 참조 표준 또는 수준은 질환 또는 장애(예를 들어, 보체 경로 활성

화 또는 조절장애와 관련된 질환 또는 장애)가 없는 정상 대상체; 본원에 기재된 화합물로 치료받은 대상체로부터 도출된 값 또는 수일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 참조 샘플, 표준 또는 수준은 다음의 기준, 즉, 연령, 체중, 성별, 병기 및 전반적인 건강 중 적어도 하나에 의해 대상체 샘플에 매칭된다. 정상 참조 범위 내에서, 정제된 올리고뉴클레오타이드 또는 단백질, 예컨대, 본원에 기재된 임의의 것의 수준의 표준 곡선이 또한 참조로서 사용될 수 있다.

[0099] 본원에서 사용되는 "상보성 영역"이라는 용어는 내인성 유전자(예를 들어, C3)의 발현을 방해하는 유전자, 일차 전사체, 서열(예를 들어, 표적 서열, 예를 들어, C3 뉴클레오타이드 서열), 또는 가공된 mRNA 모두 또는 그 일부에 실질적으로 상보적인 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 가닥 상의 영역을 지칭한다. 상보성 영역이 표적 서열에 완전히 상보적이지는 않은 경우, 미스매치는 분자의 내부 또는 말단 영역에 있을 수 있다. 일반적으로, 가장 관용되는 미스매치는 말단 영역, 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)의 5'-말단 및/또는 3'-말단의 5 개, 4 개, 3 개, 또는 2 개 뉴클레오타이드 내에 있다.

[0100] 본원에서 사용되는 "리보뉴클레오타이드"라는 용어는 이의 2' 위치에 하이드록실 기를 함유하는 이의 펜토스 당으로서 리보스를 갖는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 변형된 리보뉴클레오타이드는 리보스, 포스페이트 기 또는 염기에서 또는 이의 변형 또는 치환을 포함하는, 2' 위치가 아닌 곳에 원자의 하나 이상의 변형 또는 치환을 갖는 리보뉴클레오타이드이다.

[0101] 본원에서 사용되는 "RNAi 올리고뉴클레오타이드"라는 용어는 (a) 센스 가닥(패신저) 및 안티센스 가닥(가이드)을 갖는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드(여기서, 안티센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 일부는 표적 mRNA의 절단에서 아르고노트 2(Ago2) 엔도뉴클레아제에 의해 사용됨) 또는 (b) 단일 안티센스 가닥을 갖는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드(여기서, 안티센스 가닥(또는 그 안티센스 가닥의 일부)은 표적 mRNA의 절단에서 Ago2 엔도뉴클레아제에 의해 사용됨)을 지칭한다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오타이드는 용어가 본원에 정의된 바와 같은 뉴클레오시드를 함유하는 루프 영역, 예컨대, 스템 루프를 포함한다. RNAi 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어, RNA-유도 침묵 복합체(RISC) 경로를 통해 RNA 전사체의 표적화된 절단을 매개하는 dsRNA, siRNA, 및 shRNA를 포함한다. RNAi 올리고뉴클레오타이드는 RNA 간섭(RNAi)으로 알려진 과정을 통해 mRNA의 서열-특이적 분해를 지시한다. RNAi 올리고뉴클레오타이드는 세포, 예를 들어, 포유류 대상체와 같은 대상체 내의 세포에서 C3의 발현을 저하시킨다. 일반적으로, RNAi 올리고뉴클레오타이드의 대부분의 뉴클레오시드는 리보뉴클레오시드이지만, 본원에 상세히 기재된 바와 같이, 각각의 가닥 또는 두 가닥 모두는 하나 이상의 비-리보뉴클레오시드, 예를 들어, 테옥시리보뉴클레오시드 및/또는 대체 뉴클레오시드도 포함할 수 있다. RNAi 올리고뉴클레오타이드는 실질적으로 듀플렉스 형태이다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오타이드의 듀플렉스 영역(들)의 상보적 염기 쌍은 공유적으로 별개의 핵산 가닥의 뉴클레오타이드의 역평행 서열 사이에 형성된다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오타이드의 듀플렉스 영역(들)의 상보적 염기 쌍은 공유적으로 연결된 핵산 가닥의 뉴클레오타이드의 역평행 서열 사이에 형성된다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오타이드의 듀플렉스 영역(들)의 상보적 염기 쌍은 함께 염기 쌍을 이루는 뉴클레오타이드의 상보적인 역평행 서열을 제공하기 위해 폴딩되는(예를 들어, 헤어핀을 통해) 단일 핵산 가닥으로부터 형성된다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오타이드는 서로 완전히 듀플렉스화된 2 개의 공유적으로 별개인 핵산 가닥을 포함한다. 그러나, 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오타이드는 부분적으로 듀플렉스화된, 예를 들어, 하나의 말단 또는 두 말단 모두에 오버행을 갖는 2 개의 공유적으로 별개인 핵산 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi 올리고뉴클레오타이드는 부분적으로 상보적인 뉴클레오타이드의 역평행 서열을 포함하고, 따라서 내부 미스매치 또는 말단 미스매치를 포함할 수 있는 하나 이상의 미스매치를 가질 수 있다.

[0102] 본원에서 사용되는 "센스 가닥" 및 "패신저 가닥"이라는 용어는 안티센스 가닥의 영역에 실질적으로 상보적인 영역을 포함하는 RNAi 올리고뉴클레오타이드의 가닥을 지칭한다. 안티센스 가닥의 영역에 상보적인 센스 가닥의 영역은 표적 유전자(예를 들어, C3 유전자)의 일부와 적어도 85%(예를 들어, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 및 100%) 동일하다. 예를 들어, 센스 가닥은, 예를 들어, 적어도 10 개 내지 36 개의 뉴클레오타이드에 걸쳐, 예를 들어, 10 개 내지 31 개의 뉴클레오타이드, 10 개 내지 26 개의 뉴클레오타이드, 10 개 내지 20 개의 뉴클레오타이드, 또는 10 개 내지 15 개의 뉴클레오타이드 길이 등에 걸쳐 SEQ ID NO: 12의 일부와 적어도 85% 동일한 영역을 가질 수 있다.

[0103] "작은 간섭 RNA"로도 알려진 "siRNA" 및 "짧은 간섭 RNA"라는 용어는 RNA 간섭을 지시하거나 매개할 수 있는 약 10 개 내지 50 개 뉴클레오타이드 길이인 RNA 작용제, 선택적으로 RNAi 작용제(가닥이 선택적으로, 예를 들어, 1 개, 2 개 또는 3 개의 오버행 연결된 뉴클레오시드를 포함하는 오버행 말단을 가짐)를 지칭한다. 천연-발생 siRNA는 세포의 RNAi 기구(예를 들어, 다이스 또는 이의 상동체)에 의해 더 긴 dsRNA 분자(예를 들어, 25 개 초

과의 연결된 뉴클레오시드 길이)로부터 생성된다.

- [0104] 본원에서 사용되는 "가닥"이라는 용어는 뉴클레오티드간 연결(예를 들어, 포스포디에스테르 연결, 포스포로티오 에이트 연결)을 통해 함께 연결된 뉴클레오티드의 단일 인접 서열을 지칭한다. 일부 구현예에서, 가닥은 2 개의 자유 말단, 예를 들어, 5'-말단 및 3'-말단을 갖는다.
- [0105] 본원에서 사용되는 "대상체"라는 용어는, 예를 들어, 실험, 진단, 예방, 및/또는 치료 목적으로 본 개시에 따른 조성물이 투여될 수 있는 임의의 유기체를 지칭한다. 전형적인 대상체는 임의의 동물(예를 들어, 포유류, 예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 비인간 영장류, 및 인간)을 포함한다. 대상체는 치료를 받으려 하거나 필요로 하거나, 치료를 요구하거나, 치료를 받고 있거나, 추후 치료를 받을 수 있거나, 특정 질환 또는 질병에 대해 숙련된 전문가에 의해 관리되는 인간 또는 동물일 수 있다.
- [0106] "당" 또는 "당 모이어티"는 푸라노스 고리를 갖는 천연 발생 당을 포함한다. 당은 또한 뉴클레오시드의 푸라노스 고리를 교체할 수 있는 구조로서 정의되는 "대체 당"을 포함한다. 특정 구현예에서, 대체 당은 비-푸라노스 (또는 4'-치환된 푸라노스) 고리 또는 고리계 또는 개방계이다. 이러한 구조는 천연 푸라노스 고리, 예컨대, 6-원 고리에 대한 단순한 변화를 포함하거나, 펩티드 핵산에 사용되는 비-고리계를 갖는 경우와 같이 더 복잡할 수 있다. 대체 당은 또한 푸라노스 고리가, 예를 들어, 모르폴리노 또는 핵시톨 고리계와 같은 또 다른 고리계로 교체된 당 대용물을 포함할 수 있다. 모티프를 갖는 올리고뉴클레오티드의 제조에 유용한 당 모이어티는, 비제한적으로, β -D-리보스, β -D-2'-데옥시리보스, 치환된 당(예컨대, 2', 5' 및 비스 치환된 당), 4'-S-당(예컨대, 4'-S-리보스, 4'-S-2'-데옥시리보스 및 4'-S-2'-치환된 리보스), 바이사이클릭 대체 당(예컨대, 2'-O-CH₂-4' 또는 2'-O-(CH₂)₂-4' 브릿징된 리보스 유래 바이사이클릭 당) 및 당 대용물(예컨대, 리보스 고리가 모르폴리노 또는 핵시톨 고리계로 교체된 경우)을 포함한다. 각각의 위치에 사용되는 헤테로사이클릭 염기 및 뉴클레오시드간 연결의 유형은 가변적이며 모티프를 결정하는 요인이 아니다. 대체 당 모이어티를 갖는 대부분의 뉴클레오시드에서, 헤테로사이클릭 핵염기는 일반적으로 혼성화를 허용하도록 유지된다.
- [0107] 본원에서 사용되는 "스텝 루프"라는 용어는 하나가 5'에서 3' 방향으로 관독되고 다른 하나가 3'에서 5' 방향으로 관독될 때 2 개의 영역이 상보적인 뉴클레오티드 서열을 갖고 두 영역 사이의 뉴클레오티드가 쌍을 이루지 않은 루프를 형성하는 올리고뉴클레오티드의 영역을 지칭한다. 스텝 루프 영역은 헤어핀 또는 헤어핀 루프로도 지칭될 수 있다.
- [0108] 본원에서 사용되는 "가닥"이라는 용어는 연결된 뉴클레오시드의 사슬을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. "핵염기 서열을 포함하는 가닥"은 표준 핵염기 명명법을 사용하여 지칭되는 서열에 의해 기재된 연결된 뉴클레오시드의 사슬을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다.
- [0109] 본원에서 사용되는 "합성"이라는 용어는 (예를 들어, 기계(예를 들어, 고체 상태 핵산 합성기)를 사용하여) 인공적으로 합성되거나, 달리 정상적으로 분자를 생성하는 천연 공급원(예를 들어, 세포 또는 유기체)으로부터 유래되지 않은 핵산 또는 다른 분자를 지칭한다.
- [0110] 본원에서 사용되는 "표적" 또는 "표적화"라는 용어는 C3 유전자 또는 C3 유전자 산물을 인코딩하는 C3 mRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 예를 들어, 이는 당업자에게 공지된 방법(예를 들어, 안티센스 및 RNA 간섭 분야에서)에 의해 (예를 들어, 유전자 또는 mRNA에 의해 인코딩된 단백질의 수준을 저하시킴으로써) 상기 유전자 또는 상기 mRNA를 저해할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다.
- [0111] 본원에서 사용되는 "표적화 리간드"라는 용어는 관심 조직 또는 세포의 동족 분자(예를 들어, 수용체)에 선택적으로 결합하고 관심 조직 또는 세포에 다른 물질을 표적화하려는 목적으로 또 다른 물질에 컨쥬게이션 가능한 분자(예를 들어, 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 폴리펩티드 또는 지질)를 지칭한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 표적화 리간드는 올리고뉴클레오티드를 관심 특정 조직 또는 세포로 표적화하려는 목적으로 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드를 함유하는 벡터(예를 들어, 바이러스 벡터)에 컨쥬게이션될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드는 세포 표면 수용체에 선택적으로 결합한다. 따라서, 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 또는 벡터에 컨쥬게이션될 때 표적화 리간드는 세포의 표면 상에 발현된 수용체에 대한 선택적 결합 및 올리고뉴클레오티드, 표적화 리간드 및 수용체를 포함하는 복합체의 세포에 의한 엔도솜 내재화를 통해 올리고뉴클레오티드의 특정 세포 내로의 전달을 용이하게 한다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드는 올리고뉴클레오티드가 세포에서 표적화 리간드로부터 방출되도록 세포 내재화 후에 또는 그동안 절단되는 링커를 통해 올리고뉴클레오티드에 컨쥬게이션된다.

- [0112] 본원에서 사용되는 "테트라루프"라는 용어는 뉴클레오티드의 측접 서열의 혼성화에 의해 형성된 인접 듀플렉스의 안정성을 증가시키는 루프를 지칭한다. 안정성의 증가는 뉴클레오티드의 무작위로 선택된 서열로 이루어진 유사한 길이의 일련의 루프로부터 평균적으로 예상되는 인접한 스템 듀플렉스의 T_m 보다 높은 인접한 스템 듀플렉스의 용융 온도(T_m)의 증가로 검출 가능하다. 예를 들어, 테트라루프는 적어도 2 개 염기 쌍 길이인 듀플렉스를 포함하는 헤어핀에 10 mM NaHPO₄에서 적어도 50°C, 적어도 55°C, 적어도 56°C, 적어도 58°C, 적어도 60°C, 적어도 65°C 또는 적어도 75°C의 용융 온도를 부여할 수 있다. 일부 구현예에서, 테트라루프는 스테킹 상호작용에 의한 인접한 스템 듀플렉스에서 염기 쌍을 안정화시킬 수 있다. 또한, 테트라루프 내의 뉴클레오티드 간의 상호작용은 비-왓슨-크릭 염기 쌍형성, 스테킹 상호작용, 수소 결합 및 접촉 상호작용을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다(문헌[Cheong 등, Nature 1990 Aug. 16; 346(6285):680-2; Heus 및 Pardi, Science 1991 Jul. 12; 253(5016):191-4]). 일부 구현예에서, 테트라루프는 3 개 내지 6 개의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어지며, 전형적으로 4 개 내지 5 개의 뉴클레오티드이다. 특정 구현예에서, 테트라루프는 변형될 수 있거나 변형되지 않을 수 있는 (예를 들어, 표적화 모이어티에 컨주게이션될 수 있거나 컨주게이션되지 않을 수 있는) 3 개, 4 개, 5 개 또는 6 개의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어진다. 일 구현예에서, 테트라루프는 4 개의 뉴클레오티드로 이루어진다. 임의의 뉴클레오티드가 테트라루프에 사용될 수 있고, 이러한 뉴클레오티드에 대한 표준 IUPAC-IUB 기호는 문헌[Cornish-Bowden (1985) Nucl. Acids Res. 13: 3021-3030]에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다. 예를 들어, 문자 "N"은 임의의 염기가 그 위치에 있을 수 있음을 의미하기 위해 사용될 수 있고, 문자 "R"은 A(아데닌) 또는 G(구아닌)가 그 위치에 있을 수 있음을 나타내기 위해 사용될 수 있고, "B"는 C(시토신), G(구아닌), 또는 T(티민)가 그 위치에 있을 수 있음을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 테트라루프의 예는 테트라루프의 UCG 패밀리를 (예를 들어, UUCG), 테트라루프의 GNRA 패밀리를 (예를 들어, GAAA), 및 CUUG 테트라루프(문헌[Woese 등, Proc Natl Acad Sci USA. 1990 November; 87(21):8467-71; Antao 등, Nucleic Acids Res. 1991 Nov. 11; 19(21):5901-5])를 포함한다. DNA 테트라루프의 예는 테트라루프의 d(GNNA) 패밀리를 (예를 들어, d(GTTA)), 테트라루프의 d(GNRA) 패밀리를, 테트라루프의 d(GNAB) 패밀리를, 테트라루프의 d(CNNG) 패밀리를, 및 테트라루프의 d(TNCG) 패밀리를 (예를 들어, d(TTCG))를 포함한다. 예를 들어, 관련 개시에 대해 본원에 참조로 포함되는 문헌[Nakano 등, Biochemistry, 41 (48), 14281-14292, 2002. SHINJI 등, Nippon Kagakkai Koen Yokoshu VOL. 78th; NO. 2; pg. 731 (2000)]을 참조한다. 일부 구현예에서, 테트라루프는 닉킹된 테트라루프 구조 내에 함유된다.
- [0113] "치료적-유효량" 또는 "예방적 유효량"은 요망되는 국소 또는 전신 효과, 예를 들어, 보체 경로 활성화 또는 조절장애로부터 초래되는 질환의 하나 이상의 증상의 치료를 초래하는 본 개시의 올리고뉴클레오티드 조성물(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드, 예컨대, dsRNA)의 (단회 또는 다회 용량으로 투여되는) 양을 지칭한다. 본 개시의 방법에 이용된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 이러한 치료에 적용 가능한 합리적인 이익/위험비를 초래하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다.
- [0114] 본원에서 사용되는 "치료하다"라는 용어는, 예를 들어, 기존 질병(예를 들어, 질환, 장애)와 관련하여 대상체의 건강 및/또는 웰빙을 개선하려는 목적으로, 또는 질병의 발생 가능성을 예방하거나 감소시키기 위해 대상체에게 치료제(예를 들어, 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드)를 투여함으로써 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료를 제공하는 행위를 지칭한다. 일부 구현예에서, 치료는 대상체가 경험하는 질병(예를 들어, 질환, 장애)의 적어도 하나의 징후, 증상 또는 기여 요인의 빈도 또는 중증도를 저하시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 핵산 또는 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는, 예를 들어, 본원에 개시된 보체 경로 활성화 또는 조절장애와 관련된 질환 중 하나 이상과 같은 보체 경로의 장애의 세포 및 임상 징후를 제어하는 데 사용된다.
- [0115] **상세한 설명**
- [0116] 보체 경로 활성화에서 역할을 하는 것으로 알려진 보체 성분(C3)을 표적화하는 올리고뉴클레오티드, 예를 들어, 센스 가닥 올리고뉴클레오티드 및 안티센스 가닥 올리고뉴클레오티드를 포함하는 RNAi 올리고뉴클레오티드, 및 이의 약학적으로 허용되는 염이 본원에 기재된다. 올리고뉴클레오티드는 세포에서 (예를 들어, 간세포에 의해) C3의 수준 및/또는 활성을 감소시키기 위해 투여될 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 생체내에서 투여될 수 있고, 세포(예를 들어, 간세포; 예컨대, 시알로당단백질 수용체(ASGPR)에 결합함으로써)에 의해 내재화될 수 있다. 세포 내재화 후, 올리고뉴클레오티드는 RNA-유도 침묵 복합체(RISC)에 의해 결합되고 C3 mRNA에 표적화되어, C3 mRNA의 분해를 개시하고 이의 번역을 차단할 수 있다.
- [0117] 보체 조절장애에 의해 매개되는 질환은 대개 보체 과잉활성에 기인한다. C3의 발현 수준을 저하시키는, 본원에

기재된 올리고뉴클레오타이드의 투여를 통해 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되거나 이와 관련된 질환을 치료하는 방법이 본원에 기재된다. 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드 및 조성물에 의해 치료될 수 있는 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되거나 이와 관련된 장애의 예는, 예를 들어, 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH), 비정형 용혈성 요독 증후군(aHUS), IgA 신장병증, 루푸스 신염, C3 사구체병증(C3G), 피부근염/자가면역 근염, 전신 경화증, 탈수초성 다발신경병증, 천포창, 막성 신장병증, 국소 분절 사구체 경화증(FSGS), 수포성 유천포창, 후천성 표피박리 수포증(EBA), 점막 유천포창, ANCA 혈관염, 저보체성 두드러기성 혈관염, 면역복합체 소혈관 혈관염, 피부 소혈관 혈관염, 자가면역 괴사성 근육병증, 이식 기관 거부반응, 예컨대, 신장, 간, 심장 또는 폐 이식 거부반응, 예컨대, 항체 매개 거부반응(AMR), 예컨대, 만성 AMR(cAMR), 항인지질(aPL) Ab 증후군, 사구체신염, 천식, 고밀도침착병(DDD), 노인성 황반변성(AMD), 전신 홍반성 루푸스(SLE), 류마티스 관절염(RA), 중증 난치성 RA, 펠티 증후군, 다발성 경화증(MS), 외상성 뇌 손상(TBI), 척수 손상, 허혈 재관류 손상, 자간전증, 급성 신장 손상에서의 이식편 기능 지연(DGF-AKI), 심폐 우회-관련 급성 신장 손상, 저산소-허혈성 뇌병증, 투석-유발 혈전증, 타카야스 동맥염, 재발성 다발연골염, 급성/예방 이식편대숙주병, 만성 이식편대숙주병, 베타 지중해빈혈, 줄기 세포 이식-관련 혈전성 미세혈관병증, 담도 폐쇄증, 염증성 간 질환, 베체트 병, 허혈성 뇌졸중, 뇌내 출혈, 경피증, 경피증 신발증, 경피증-관련 간질성 폐질환(SSc-ILD), 겸상 적혈구병, 상염색체 우성 다낭성 신장병(ADPKD), 화학요법-유발 말초 신경병증(CIPN), 당뇨병성 신경병증, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 당뇨병성 신장병증, 당뇨병성 망막병증, 지도형 위축증, 폐동맥 고혈압, 난치성 중증 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 특발성 폐섬유증(IPF), 만성 폐 동종이식편 기능장애, 남성 섬유증의 폐 이환, 화농성 땀샘염, 비알코올성 지방간 질환(NASH), 강직성 척추염, 조혈 줄기 세포 이식-관련 혈전성 미세혈관병증(HSCT-TMA)(예방), 관상 동맥 질환, 죽상경화증, 골다공증(예방), 골관절염, 고위험 드루젠, 염증성 장질환, 궤양성 대장염, 간질성 방광염, 투석 유발 보체 활성화, 괴저성 농피증, 만성 심부전, 자가면역 심근염, 비용종증, 급성 및 만성 췌장염, 죽상경화증, 호산구성 식도염, 호산구성 육아종증, 과호산구성 증후군, 상처 치유 및 혈전성 혈소판 감소성 자반증(TTP)과 같은, 예를 들어, 피부 장애, 신경 장애, 신장 장애, 급성 환자 치료, 류마티스 장애, 폐 장애, 피부과 장애, 혈액 장애, 및 안과 장애를 포함한다.

[0118] 본원에 기재된 조성물 및 방법은 C3 유전자의 영역과 실질적인 서열 동일성을 갖는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)를 특징으로 한다.

[0119] 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)는, 예를 들어, 세포(예를 들어, 간세포), 예컨대, 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 인간) 내의 세포에서 C3의 수준 및/또는 활성을 저하시킴으로써 보체 경로 활성을 조절하는 데 사용될 수 있다. 전체 설계는 보체 경로의 C3을 표적화하고, 대체, 고진, 및 렉틴 경로 중 다른 경로의 활성화는 그대로 남겨둔다(보호). 따라서, 본 개시는 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환 또는 장애, 예를 들어, C3의 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법을 특징으로 한다.

[0120] **보체 성분 3 표적 서열**

[0121] 치료적 이점을 달성하기 위해 사용될 수 있는 C3 발현의 올리고뉴클레오타이드-기반 저해제가 본원에 제공된다. C3 mRNA의 검사(예를 들어, 실시예 3 참조) 및 시험관내 및 생체내 시험을 통해, C3 mRNA의 서열은 올리고뉴클레오타이드-기반 저해에 순응하기 때문에 표적화 서열로서 유용한 것으로 발견되었다. 예를 들어, C3 표적 서열은 참조 서열 NM_0.000064.4(SEQ ID NO: 12)를 갖는 호모 사피엔스 보체 C3의 4121 번 내지 4141 번 및 780 번 내지 798 번 뉴클레오타이드에 각각 상응하는 SEQ ID No: 13 또는 SEQ ID No: 14에 제시된 바와 같은 서열을 포함할 수 있거나 이로 이루어질 수 있다. 이들 C3 서열은 이와 최대 85%의 서열 동일성을 갖는 각각 본원에 기재된 화합물 A 및 화합물 B의 표적 서열, 및 이의 변이체일 수 있다. 화합물 A 및 화합물 B(및 본원에 기재된 이의 변이체)는 또한 각각 참조 서열 XM_015122636.2 및 XM_005587719.2로 레서스 마카크 및 사이노몰구스 마카크 보체 C3을 효과적으로 표적화할 수 있다. 또한, C3 표적 서열은 화합물 J(예를 들어, SEQ ID NO: 15의 센스 서열 및 SEQ ID NO: 16의 안티센스 서열을 갖는 RNAi 올리고뉴클레오타이드)의 표적일 수 있는 참조 서열 NM_009778.3(SEQ ID NO: 32)과 무스 무스쿨루스 보체 C3의 2903 번 내지 2922 번 뉴클레오타이드에 상응하는 SEQ ID NO: 31에 제시된 바와 같은 서열을 포함할 수 있거나 이로 이루어질 수 있다. 화합물 J는 또한 참조 서열 NM_016994.2를 갖는 라투스 노르베기쿠스(*Rattus norvegicus*) 보체 C3을 표적화할 수 있다. C3 mRNA의 이들 영역은 C3 mRNA 발현 및 후속 C3 단백질 발현을 저해하려는 목적으로 본원에 기재된 dsRNA 작용제와 같은 RNAi 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 표적화될 수 있다.

[0122] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드) 작용제의 안티센스 가닥은 세포에서 mRNA를 표적화하고 이의 발현을 저해하려는 목적을 위해 (예를 들어, C3 mRNA의 표적 서열 내

에서) C3 mRNA에 대한 상보성 영역을 갖도록 설계될 수 있다. 상보성 영역은 일반적으로 이의 전사를 저해하려는 목적을 위해 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드) 또는 이의 가닥의, C3 mRNA로의 어닐링을 촉진하기에 적합한 길이 및 염기 함량을 갖는다. 상보성 영역은 적어도 11 개, 예를 들어, 적어도 12 개, 적어도 13 개, 적어도 14 개, 적어도 15 개, 적어도 16 개, 적어도 17 개, 적어도 18 개, 적어도 19 개 또는 적어도 20 개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 12 개 내지 30 개(예를 들어, 12 개 내지 30 개, 12 개 내지 22 개, 15 개 내지 25 개, 17 개 내지 21 개, 18 개 내지 27 개, 19 개 내지 27 개, 또는 15 개 내지 30 개) 뉴클레오타이드 길이의 범위인 C3 mRNA에 대한 상보성 영역을 가질 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개 또는 30 개 뉴클레오타이드 길이인 C3에 대한 상보성 영역을 가질 수 있다. 일부 예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 19 개 뉴클레오타이드 길이인 C3 mRNA에 대한 상보성 영역을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 상보성 영역(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 가닥)은 20 개 뉴클레오타이드 길이인 SEQ ID NO: 12에 제시된 바와 같은 서열의 뉴클레오타이드의 인접 서열에 상보적일 수 있다.

[0123] 특정 예에서, 본 개시의 RNAi 올리고뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 12에 제시된 바와 같은 서열에 적어도 부분적으로 상보적인(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 가닥 상의) 상보성 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 12에 제시된 바와 같은 서열에 완전히 상보적인(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 가닥 상의) 상보성 영역을 포함할 수 있다. (예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 가닥 상의) 올리고뉴클레오타이드의 상보성 영역은 12 개 내지 20 개(예를 들어, 12 개 내지 20 개, 12 개 내지 18 개, 12 개 내지 16 개, 12 개 내지 14 개, 14 개 내지 20 개, 14 개 내지 18 개, 14 개 내지 16 개, 16 개 내지 20 개, 16 개 내지 18 개, 또는 18 개 내지 20 개) 뉴클레오타이드 길이의 범위인 SEQ ID NO: 12에 제시된 바와 같은 서열의 뉴클레오타이드의 인접 서열에 상보적일 수 있다. 일부 구현예에서, (예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 가닥 상의) 올리고뉴클레오타이드의 상보성 영역은 19 개 뉴클레오타이드 길이인 SEQ ID NO: 12에 제시된 바와 같은 서열의 뉴클레오타이드의 인접 서열에 상보적일 수 있다. 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 상보성 영역(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 가닥)은 20 개 뉴클레오타이드 길이인 SEQ ID NO: 12에 제시된 바와 같은 서열의 뉴클레오타이드의 인접 서열에 상보적일 수 있다.

[0124] SEQ ID NO: 12에 제시된 바와 같은 서열의 인접 뉴클레오타이드에 상보적인 올리고뉴클레오타이드의 상보성 영역은 안티센스 가닥의 전체 길이 중 일부에 걸쳐 있을 수 있다. 예를 들어, SEQ ID NO: 12에 제시된 바와 같은 서열의 인접 뉴클레오타이드에 상보적인 올리고뉴클레오타이드의 상보성 영역은 안티센스 가닥의 전체 길이의 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 90%, 적어도 95%, 및 적어도 99%)에 걸쳐 있을 수 있다. 특정 구현예에서, SEQ ID NO: 12에 제시된 바와 같은 인접 뉴클레오타이드에 상보적인 올리고뉴클레오타이드의 상보성 영역은 안티센스 가닥의 전체 길이에 걸쳐 있을 수 있다.

[0125] C3 mRNA에 대한 상보성 영역은 C3 mRNA의 상응하는 서열과 비교하여 하나 이상의 미스매치를 가질 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, 20 개 내지 50 개 뉴클레오타이드 길이의 올리고뉴클레오타이드, 예컨대, 20 개 내지 25 개 뉴클레오타이드 길이(예를 들어, 22 개 뉴클레오타이드 길이)의 올리고뉴클레오타이드) 상의 상보성 영역은 적절한 혼성화 조건 하에 C3 mRNA와 상보적 염기 쌍을 형성하는 능력을 유지한다면, 최대 1 개, 최대 2 개, 최대 3 개, 최대 4 개, 또는 최대 5 개의 미스매치를 가질 수 있다. 대안적으로, 올리고뉴클레오타이드 상의 상보성 영역은 적절한 혼성화 조건 하에 C3 mRNA와 상보적 염기 쌍을 형성하는 능력을 유지한다면, 1 개 이하, 2 개 이하, 3 개 이하, 4 개 이하, 또는 5 개 이하의 미스매치를 가질 수 있다. 상보성 영역에 하나 초과 미스매치가 존재하는 경우, 미스매치는 올리고뉴클레오타이드가 적절한 혼성화 조건 하에 C3 mRNA와 상보적 염기 쌍을 형성하는 능력을 유지한다면, 연속적으로(예를 들어, 2 개, 3 개, 4 개, 또는 5 개가 연속으로) 위치되거나 상보성 영역 전체에 걸쳐 산재될 수 있다. 예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 12의 상응하는 C3 서열에 대해 최대 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 또는 5 개의 미스매치를 갖는 SEQ ID NO: 4의 서열을 갖는 센스 올리고뉴클레오타이드 및 이의 변이체, 또는 SEQ ID NO: 4의 서열에 대해 최대 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 또는 5 개의 미스매치를 갖는 SEQ ID NO: 6의 상응하는 안티센스 서열 및 이의 변이체를 포함할 수 있다.

[0126] **올리고뉴클레오타이드의 유형**

[0127] RNAi, 안티센스 miRNA, shRNA 등을 포함하는, 본 개시의 방법에서 C3을 표적화하는 데 유용한 올리고뉴클레오타이드의 다양한 구조가 존재한다. 본원 또는 다른 곳에 기재된 구조 중 임의의 것은 본원에 기재된 서열(예를 들어, C3의 핫스팟 서열, 예컨대, SEQ ID NO: 13 또는 SEQ ID NO: 14의 것들)을 포함하거나 표적화하기 위한 프

레이워크로서 사용될 수 있다.

[0128] 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)인 본원에 기재된 조성물은 C3 mRNA(예를 들어, SEQ ID NO: 12)를 표적화하는 저해 작제물(예를 들어, 이를 인코딩하는 핵산 백터)을 인코딩한다. C3 발현의 발현을 저하시키기 위한 올리고뉴클레오티드는 다이스서 개입의 상류 또는 하류에서 RNA 간섭(RNAi) 경로에 관여할 수 있다. 예를 들어, 19 개 내지 25 개 뉴클레오티드 길이를 갖고 1 개 내지 5 개 뉴클레오티드 사이에 3' 오버행을 갖는 센스 가닥 또는 안티센스 가닥 중 적어도 하나를 갖는 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)가 개발되었다(예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제8,372,968호 참조). 활성 RNAi 산물을 생성하기 위해 다이스서에 의해 가공되는 더 긴 올리고뉴클레오티드도 개발되었다(예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제8,883,996호 참조). 추가로, 센스 가닥 또는 안티센스 가닥이 열역학적-안정화 테트라루프 구조(thermodynamically-stabilizing tetraloop structure)를 포함하도록 안티센스 가닥 및 센스 가닥 중 하나 또는 이 둘 모두의 5' 말단 또는 3' 말단 중 하나 또는 이 둘 모두가 듀플렉스 표적화 영역을 넘어 연장되는, 연장된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)가 생성되었다(예를 들어, 이들 올리고뉴클레오티드의 이들의 개시에 대해 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제8,513,207호 및 제8,927,705호뿐만 아니라 제WO2010033225호 참조). 이러한 구조는 분자의 5' 말단 및 3' 말단 중 하나 또는 이 둘 모두의 단일 가닥 연장부뿐만 아니라 RNAi 연장부를 포함할 수 있다.

[0129] 추가로, 또는 대안적으로, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 다이스서에 의한 절단 후를 의미하는 다이스서 개입의 하류에서 RNA 간섭 경로에 관여하도록 설계될 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥의 3' 말단에 1 개, 2 개, 또는 3 개의 뉴클레오티드를 포함하는 오버행을 가질 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오티드, 예컨대, siRNA는 표적 RNA(예를 들어, SEQ ID NO: 13 및 SEQ ID NO: 14)에 대한 안티센스인 22-뉴클레오티드 가이드 가닥 및 상보적인 패신저 가닥을 포함할 수 있고, 여기서 두 가닥 모두는 어닐링되어 20-bp 듀플렉스, 및 3' 말단 중 하나 또는 이 둘 모두에 2 개의 뉴클레오티드 오버행을 형성한다. 23 개 뉴클레오티드의 가이드 가닥 및 21 개 뉴클레오티드의 패신저 가닥을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 더 긴 올리고뉴클레오티드 설계가 또한 이용 가능하며, 여기서 패신저 가닥의 3' 말단 및 가이드 가닥의 5' 말단 상에 평활 말단, 및 패신저 가닥의 분자 5'-말단 및 가이드 가닥의 3'-말단의 좌측에 2 개의 뉴클레오티드 3'-가이드 가닥 오버행이 있다. 이러한 분자에는 21 개의 염기 쌍 듀플렉스 영역이 있다(더 긴 올리고뉴클레오티드에 관한 이들의 개시에 대해 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제9,012,138호, 제9,012,621호, 및 제9,193,753호 참조).

[0130] 본원에 개시된 바와 같은 올리고뉴클레오티드는 둘 모두 17 개 내지 26 개(예를 들어, 17 개 내지 26 개, 20 개 내지 25 개, 또는 21 개 내지 23 개) 뉴클레오티드 길이의 범위인 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 둘 모두 19 개 내지 22 개 뉴클레오티드 길이의 범위인 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함할 수 있다. 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 또한 동일한 길이를 가질 수 있다. 대안적으로, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 또는 안티센스 가닥 중 어느 하나, 또는 센스 가닥과 안티센스 가닥 둘 모두에 3'-오버행이 있도록 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함할 수 있다. 예를 들어, 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 센스 가닥과 안티센스 가닥 둘 모두 상의 3' 오버행은 1 개 또는 2 개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 22 개 뉴클레오티드의 안티센스 가닥 및 20 개 뉴클레오티드의 센스 가닥을 가지며, 여기서 분자의 "우측"에는(즉, 패신저 가닥의 3'-말단 및 가이드 가닥의 5'-말단에는) 평활 말단, 및 분자의 "좌측"에는(즉, 패신저 가닥의 5'-말단 및 가이드 가닥의 3'-말단에는) 2 개의 뉴클레오티드 3'-가이드 가닥 오버행이 있다. 이러한 분자에는, 예를 들어, 20 개 염기 쌍 듀플렉스 영역이 존재할 수 있다.

[0131] 본원에 개시된 조성물 및 방법과 사용하기 위한 다른 올리고뉴클레오티드 설계는, 예를 들어, 16-mer siRNA(예를 들어, 문헌[Nucleic Acids in Chemistry and Biology. Blackburn (ed.), Royal Society of Chemistry, 2006] 참조), shRNA(예를 들어, 19 bp 또는 더 짧은 스템을 가짐; 예를 들어, 문헌[Moore 등, *Methods Mol. Biol.* 2010; 629:141-158] 참조), 평활 siRNA(blunt siRNA)(예를 들어, 19 bps 길이; 예를 들어, 문헌[Kraynack 및 Baker, *RNA* Vol. 12, p163-176 (2006)] 참조), 비대칭 siRNA(aiRNA; 예를 들어, 문헌[Sun 등, *Nat. Biotechnol.* 26, 1379-1382 (2008)] 참조), 비대칭 짧은-듀플렉스 siRNA(예를 들어, 문헌[Chang 등, *Mol Ther.* 2009 Apr; 17(4): 725-32] 참조), 포크 siRNA(예를 들어, 문헌[Hohjoh, *FEBS Letters*, Vol 557, issues 1-3; Jan 2004, p 193-198] 참조), 단일 가닥 siRNA(문헌[Elsner; *Nature Biotechnology* 30, 1063 (2012)]), 아령-형상 원형 siRNA(예를 들어, 문헌[Abe 등, *J Am Chem Soc* 129: 15108-15109 (2007)] 참조), 및 작은 내부 세그먼트화된 간섭 RNA(siRNA; 예를 들어, 문헌[Bramsens 등, *Nucleic Acids Res.* 2007 Sep; 35(17): 5886-5897] 참조)를 포함한다. 전술한 참조문헌 각각은 그 안의 관련 개시에 대해 그 전체가 참조로 포함된다. C3의

발현을 저하시키거나 저해하기 위해 일부 구현예에서 사용될 수 있는 올리고뉴클레오티드 구조의 추가의 비-제한적 예는 마이크로RNA(miRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 및 짧은 siRNA이다(문헌[Hamilton 등, *Embo J.*, 2002, 21(17): 4671-4679] 참조; 또한 미국 특허 출원 공개 제2009/0099115호 참조).

[0132] 올리고뉴클레오티드

[0133] RNAi 경로를 통해 C3 발현을 표적화하기 위한 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 일반적으로 서로 듀플렉스를 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 갖는다. 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 단일 가닥 또는 이중 가닥 리보핵산(dsRNA)일 수 있다. 또한, 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 공유적으로 연결되지 않을 수 있으며; 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 니킹될 수 있다. 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 약학적으로 허용되는 염의 형태일 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 나트륨 염의 형태일 수 있다.

[0134] 전술한 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드) 서열은 세포 내에서 합성될 수 있는 RNA 서열로서 표현되지만; 이들 서열은 또한 본 개시의 벡터에 혼입될 수 있는 상응하는 DNA(예를 들어, cDNA)로서 표현될 수 있다. 당업자는 cDNA 서열이 티미딘으로의 우라실의 치환을 제외하고는 mRNA 서열과 동등하며, 본원에서 동일한 목적, 즉, C3 mRNA의 발현을 저해하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드의 생성을 위해 사용될 수 있음을 이해할 것이다. DNA의 경우, 안티센스 핵산을 함유하는 폴리뉴클레오티드는 DNA 서열이다. DNA 서열은 화합물 A 또는 화합물 B의 안티센스 가닥에 상응할 수 있고, 각각 SEQ ID NO: 34 또는 SEQ ID NO: 35의 폴리뉴클레오티드 서열을 가질 수 있거나, 이와 적어도 85% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. DNA 서열은 화합물 A 또는 화합물 B의 센스 가닥에 상응할 수 있고, 각각 SEQ ID NO: 33 또는 SEQ ID NO: 35의 폴리뉴클레오티드 서열을 가질 수 있거나, 이와 적어도 85% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. RNA 벡터의 경우, 트랜스진 카세트에 본원에 기재된 안티센스 DNA 서열의 RNA 등가물이 혼입된다.

[0135] 특정 구현예에서, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 4 또는 SEQ ID NO: 5와 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 센스 가닥은 화합물 B의 경우에서와 같이, SEQ ID NO: 4의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2와 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 센스 가닥은 화합물 A의 경우에서와 같이, SEQ ID NO: 1의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0136] 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 6과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 3과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 안티센스 가닥은 화합물 B의 경우에서와 같이, SEQ ID NO: 6의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고/있거나, 안티센스 가닥은 화합물 A의 경우에서와 같이, SEQ ID NO: 3의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0137] 또한, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 4 또는 SEQ ID NO: 5와 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 6과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 도 2b의 화합물 B에 대해 제시된 바와 같이 SEQ ID NO: 4 또는 SEQ ID NO: 5의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 SEQ ID NO: 6의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 함유할 수 있다.

[0138] 추가로, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2와 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 3과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 도 1d 및 도 1e의 화합물 A에 대해 제시된 바와 같이 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 SEQ ID NO: 3의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 함유할 수 있다. 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID

NO: 4, 및 SEQ ID NO: 5 중 임의의 하나에 제시된 바와 같은 서열을 갖는 센스 가닥 및 SEQ ID NO: 3 및 SEQ ID NO: 6으로부터 선택된 상보적 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함할 수 있다.

[0139] 또한, 하기 제시된 바와 같이, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 37의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 38의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0140] 안티센스 가닥(SEQ ID NO: 38):

[0141] 5' [Me포스포네이트-40-mU]-S-fU-S-fU-fA-fU-mU-fA-mC-mA-fG-mG-mU-mG-fA-mG-mU-mU-mG-mA-mU-S-mG-S-mG 3'

[0142] 에 혼성화된

[0143] 센스 가닥(SEQ ID NO: 37):

[0144] 5' mA-S-mU-mC-mA-mA-mC-mU-fC-fA-fC-fC-mU-mG-mU-mA-mA-mU-mA-mA-mA-mG-mC-mA-mG-mC-mC-mG-[ademA-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-mG-mG-mC-mU-mG-mC 3'

[0145] 여기서, 도 1e에 제시된 바와 같이, mX는 2'-O-메틸 리보뉴클레오티드이고, fX는 2'-플루오로-데옥시리보뉴클레오티드이고, [ademA-GalNAc]는 2'-O-GalNAc-변형된 아데노신이고, [Me포스포네이트-40-mU]는 4'-O-모노메틸포스포네이트-2'-O-메틸 우리딘이고, "-"는 포스포디에스테르 연결을 나타내고, "-S-"는 포스포로티오에이트 연결을 나타낸다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 38의 약학적으로 허용되는 염(예를 들어, 나트륨 염)일 수 있다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 37의 약학적으로 허용되는 염(예를 들어, 나트륨 염)일 수 있다.

[0146] 또한, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 1과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 3과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 화합물 A에 대해 제시된 바와 같이 SEQ ID NO: 1의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 SEQ ID NO: 3의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 함유할 수 있다. 센스 가닥은 SEQ ID NO: 4와 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 6과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 화합물 B에 대해 제시된 바와 같이 SEQ ID NO: 4의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 SEQ ID NO: 6의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 함유할 수 있다. 센스 가닥은 SEQ ID NO: 17과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 18과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 화합물 C에 대해 제시된 바와 같이 SEQ ID NO: 17의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 SEQ ID NO: 18의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 함유할 수 있다. 센스 가닥은 SEQ ID NO: 19와 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 20과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 화합물 D에 대해 제시된 바와 같이 SEQ ID NO: 19의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 SEQ ID NO: 20의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 함유할 수 있다. 센스 가닥은 SEQ ID NO: 21과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 22와 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 화합물 E에 대해 제시된 바와 같이 SEQ ID NO: 21의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 SEQ ID NO: 22의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 함유할 수 있다. 센스 가닥은 SEQ ID NO: 23과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 24와 적어도

85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 화합물 F에 대해 제시된 바와 같이 SEQ ID NO: 23의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 SEQ ID NO: 24의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 함유할 수 있다. 센스 가닥은 SEQ ID NO: 25와 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 26과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 화합물 G에 대해 제시된 바와 같이 SEQ ID NO: 25의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 SEQ ID NO: 26의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 함유할 수 있다. 센스 가닥은 SEQ ID NO: 27과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 28과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 화합물 H에 대해 제시된 바와 같이 SEQ ID NO: 27의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 SEQ ID NO: 28의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 함유할 수 있다. 센스 가닥은 SEQ ID NO: 29와 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 30과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 화합물 I에 대해 제시된 바와 같이 SEQ ID NO: 29의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 SEQ ID NO: 30의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 함유할 수 있다. 센스 가닥은 SEQ ID NO: 15와 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 16과 적어도 85%(예를 들어, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 및 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 화합물 J에 대해 제시된 바와 같이 SEQ ID NO: 15의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥 및 SEQ ID NO: 16의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 함유할 수 있다. 센스 가닥 및 안티센스 가닥 쌍의 예에 대해서는 표 1을 참조한다.

[0147] [표 1]

[0148] C3 mRNA를 표적화하는 RNAi 올리고뉴클레오티드

작제물	센스 가닥	SEQ ID NO:	안티센스 가닥	SEQ ID NO:	표적 서열 뉴클레오티드 (C3 mRNA)
1	AUCAACUCACCU GUAUAAAGCAG CCGAAAGGCUGC	1	UUUAAUUACAGGUGAGUU GAUGG	3	SEQ ID NO: 12의 4122 내지 4141
2	AUCAACUCACCU GUAUAAAA	2			
3	AGAAAUUCUACU ACAUCUAAAGCAG CCGAAAGGCUGC	4	UUAGAUGUAGUAGAAUU UCUGG	6	SEQ ID NO: 12의 780 내지 798
4	AGAAAUUCUACU ACAUCUAA	5			
5	AGGAAUGAGAAU CAACAAAAAGCA GCCGAAAGGCUGC	15	UUUUGUUGAUUCUCAUU CCUG	16	SEQ ID NO: 32의 2903 내지 2922

[0149]

[0150] 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 듀플렉스 영역을 포함한다. 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스는 10 개 내지 30 개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 및 30 개 뉴클레오티드 길이)일 수 있다. 이에 따라, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스는 15 개 내지 25 개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 및 25 개 뉴클레오티드 길이)일 수 있다. 일부 구현예

에서, 듀플렉스 영역은 20 개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.

- [0151] 안티센스 가닥과 듀플렉스를 형성하는 센스 가닥 상의 영역은 SEQ ID NO: 2 및 SEQ ID NO: 5 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드 서열과 적어도 85%(예를 들어, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 동일한 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 안티센스 가닥과 듀플렉스를 형성하는 센스 가닥 상의 영역은 SEQ ID NO: 2 및 SEQ ID NO: 5 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.
- [0152] 또한, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스는 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 전체 길이에 걸쳐 있지 않을 수 있다.
- [0153] 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)는 22 개 보다 긴 뉴클레오타이드(예를 들어, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 30 개, 31 개, 32 개, 33 개, 34 개, 35 개, 36 개, 37 개, 38 개, 39 개 또는 40 개 뉴클레오타이드 길이)인 센스 가닥, 예컨대, 36-뉴클레오타이드 센스 가닥, 및 18 개 내지 36 개 뉴클레오타이드 길이인 안티센스 가닥, 예컨대, 22-뉴클레오타이드 안티센스 가닥을 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)는 다이스서 효소에 의해 작용될 때, 안티센스 가닥이 성숙 RISC에 혼입되는 결과에 이르도록 하는 길이를 갖는다.
- [0154] 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 다른 5' 말단에 비해 열역학적으로 덜 안정한 하나의 5' 말단을 가질 수 있다. 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 센스 가닥의 3' 말단에 평활 말단 및 안티센스 가닥의 3' 말단에 오버행 포함하는 비대칭 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 안티센스 가닥 상의 3' 오버행은 1 개 내지 8 개 뉴클레오타이드 길이(예를 들어, 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개, 6 개, 7 개 또는 8 개 뉴클레오타이드 길이)일 수 있다. 예를 들어, 안티센스 가닥 상의 3' 오버행은 2 개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 전형적으로, RNAi에 대한 올리고뉴클레오타이드는 안티센스, 가이드, 가닥의 3' 말단 상에 2-뉴클레오타이드 오버행을 갖지만; 다른 오버행이 가능하다. 다른 구현예에서, 3' 오버행은 1 개 내지 6 개 뉴클레오타이드, 선택적으로 1 개 내지 5 개, 1 개 내지 4 개, 1 개 내지 3 개, 1 개 내지 2 개, 2 개 내지 6 개, 2 개 내지 5 개, 2 개 내지 4 개, 2 개 내지 3 개, 3 개 내지 6 개, 3 개 내지 5 개, 3 개 내지 4 개, 4 개 내지 6 개, 4 개 내지 5 개, 5 개 내지 6 개 뉴클레오타이드, 또는 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개, 또는 6 개 뉴클레오타이드의 길이를 가질 수 있다. 일부 예에서, 올리고뉴클레오타이드는 5' 말단에 오버행을 가질 수 있다. 오버행은 1 개 내지 6 개 뉴클레오타이드, 선택적으로 1 개 내지 5 개, 1 개 내지 4 개, 1 개 내지 3 개, 1 개 내지 2 개, 2 개 내지 6 개, 2 개 내지 5 개, 2 개 내지 4 개, 2 개 내지 3 개, 3 개 내지 6 개, 3 개 내지 5 개, 3 개 내지 4 개, 4 개 내지 6 개, 4 개 내지 5 개, 5 개 내지 6 개 뉴클레오타이드, 또는 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개, 또는 6 개 뉴클레오타이드의 길이를 포함하는 5' 오버행일 수 있다.
- [0155] 안티센스 가닥의 3' 말단 상의 2 개의 말단 뉴클레오타이드는 변형될 수 있다. 특정 구현예에서, 안티센스 가닥의 3' 말단 상의 2 개의 말단 뉴클레오타이드는 표적 C3 mRNA와 상보적일 수 있다. 대안적으로, 안티센스 가닥의 3' 말단 상의 2 개의 말단 뉴클레오타이드는 표적 C3 mRNA와 상보적이지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 3' 말단 상의 2 개의 말단 뉴클레오타이드는 GG일 수 있다. 전형적으로, 올리고뉴클레오타이드의 각각의 3' 말단 상의 2 개의 말단 GG 뉴클레오타이드 중 하나 또는 이 모두는 표적과 상보적이지 않다.
- [0156] 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이의 상보성에는 하나 이상(예를 들어, 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개)의 미스매치가 있을 수 있다. 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 하나 초과 미스매치가 있는 경우, 이들은 연속적으로(예를 들어, 2 개, 3 개 이상이 연속으로) 위치되거나, 상보성 영역 전체에 걸쳐 산재될 수 있다. 예를 들어, 센스 가닥의 3' 말단은 하나 이상의 미스매치를 함유할 수 있다. 따라서, 2 개의 미스매치가 센스 가닥의 3' 말단에 혼입될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드의 센스 가닥의 3'-말단에서 세그먼트의 염기 미스매치 또는 불안정화는, 가능하게는 다이스서에 의한 가공을 용이하게 함으로써, RNAi에서 합성 듀플렉스의 효능을 개선할 수 있다.
- [0157] 일부 구현예에서, 서열 목록에 제시된 서열은 올리고뉴클레오타이드 또는 다른 핵산의 구조를 기술하는 데 언급될 수 있음이 인지되어야 한다. 이러한 구현예에서, 실제 올리고뉴클레오타이드 또는 다른 핵산은 특정 서열과 본질적으로 동일하거나 유사한 상보성 성질을 유지하면서 특정 서열과 비교하여 하나 이상의 대체 뉴클레오타이드(예를 들어, DNA 뉴클레오타이드의 RNA 대응물 또는 RNA 뉴클레오타이드의 DNA 대응물) 및/또는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드 및/또는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드간 연결 및/또는 하나 이상의 다른 변형을 가질 수 있다.
- [0158] *안티센스 가닥*
- [0159] 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 가닥은 가이드 가닥으로 지칭될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 가닥이 RNA-유도

침묵 복합체(RISC)와 맞물리고 아르고노트 단백질에 결합하거나, 하나 이상의 유사한 인자와 맞물리거나 이에 결합하고 표적 유전자의 직접적인 침묵을 유발할 수 있는 경우, 안티센스 가닥은 가이드 가닥으로 지칭될 수 있다.

- [0160] 특정 구현예에서, 안티센스 가닥은 센스 가닥보다 길이가 더 적은 뉴클레오타이드이다. 일부 예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)는 10 개 내지 40 개 뉴클레오타이드(예를 들어, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 30 개, 31 개, 32 개, 33 개, 34 개, 35 개, 36 개, 37 개, 38 개, 39 개, 및 40 개 뉴클레오타이드) 길이를 포함하는 안티센스 가닥을 가질 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)는 15 개 내지 30 개 뉴클레오타이드(예를 들어, 15 개, 16 개, 17 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 및 30 개 뉴클레오타이드) 길이를 포함하는 안티센스 가닥을 가질 수 있다. 예를 들어, 안티센스 가닥은 20 개 내지 25 개 뉴클레오타이드(예를 들어, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 및 25 개 뉴클레오타이드) 길이를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 안티센스 가닥은 22 개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.
- [0161] 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 12의 서열에 상보적인 12 개 내지 22 개 뉴클레오타이드(예를 들어, 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 및 22 개 뉴클레오타이드) 길이의 인접 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 12의 서열에 상보적인 15 개 내지 21 개 뉴클레오타이드(예를 들어, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 및 21 개 뉴클레오타이드) 길이의 인접 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 12의 서열에 상보적인 19 개 뉴클레오타이드 길이의 인접 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함할 수 있다.
- [0162] 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 6의 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 도 2b에 제시된 화합물 B에서와 같이, SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 6의 약학적으로 허용되는 염(예를 들어, 나트륨 염)일 수 있다. SEQ ID NO: 6은 도 1b에 제시된 바와 같은 화학 구조를 가질 수 있다. 대안적으로, 안티센스 가닥은 도 1d 및 도 1e에 제시된 화합물 A에서와 같이, SEQ ID NO: 3의 서열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 SEQ ID NO: 3의 약학적으로 허용되는 염(예를 들어, 나트륨 염)일 수 있다.
- [0163] 또한, 안티센스 가닥의 5' 말단에서 첫 번째 위치는 우리딘일 수 있다. 우리딘은 포스페이트 유사체를 포함할 수 있으며; 예를 들어, 우리딘은 4'-O-모노메틸포스포네이트-2'-O-메틸 우리딘일 수 있다.
- [0164] *센스 가닥*
- [0165] 올리고뉴클레오타이드의 센스 가닥은 패신저 가닥으로 지칭될 수 있다. 특정 구현예에서, 패신저 가닥은 가이드 가닥보다 길이가 더 긴 뉴클레오타이드이다. 일부 예에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)는 10 개 내지 45 개 뉴클레오타이드(예를 들어, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 30 개, 31 개, 32 개, 33 개, 34 개, 35 개, 36 개, 37 개, 38 개, 39 개, 40 개, 41 개, 42 개, 43 개, 44 개, 및 45 개 뉴클레오타이드) 길이를 포함하는 센스 가닥을 가질 수 있다. 이에 따라, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)는 20 개 내지 50 개 뉴클레오타이드(예를 들어, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 30 개, 31 개, 32 개, 33 개, 34 개, 35 개, 36 개, 37 개, 38 개, 39 개, 40 개, 41 개, 42 개, 43 개, 44 개, 45 개, 46 개, 47 개, 48 개, 49 개, 및 50 개 뉴클레오타이드) 길이를 포함하는 센스 가닥을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 센스 가닥은 20 개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 다른 구현예에서, 센스 가닥은 36 개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.
- [0166] 올리고뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 12의 서열에 대해 7 개 내지 36 개 뉴클레오타이드(예를 들어, 7 개, 8 개, 9 개, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 30 개, 31 개, 32 개, 33 개, 34 개, 35 개, 및 36 개 뉴클레오타이드) 길이의 인접 서열을 포함하는 센스 가닥을 가질 수 있다. 이에 따라, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 12의 10 개 내지 30 개 뉴클레오타이드(예를 들어, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 및 30 개 뉴클레오타이드) 길이의 인접 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 19 개 뉴클레오타이드 길이

인 SEQ ID NO: 12의 서열에 대해 뉴클레오티드의 인접 서열을 포함하는 센스 가닥을 포함할 수 있다.

[0167] 센스 가닥은 이의 3'-말단에 스템 루프를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 이의 5' 말단에 스템 루프를 포함한다. 스템 루프를 포함하는 센스 가닥은 10 개 내지 50 개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 30 개, 31 개, 32 개, 33 개, 34 개, 35 개, 36 개, 37 개, 38 개, 39 개, 40 개, 41 개, 42 개, 43 개, 44 개, 45 개, 46 개, 47 개, 48 개, 49 개 및 50 개 뉴클레오티드 길이)의 범위일 수 있다. 이에 따라, 스템 루프를 포함하는 센스 가닥은 20 개 내지 40 개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 30 개, 31 개, 32 개, 33 개, 34 개, 35 개, 36 개, 37 개, 38 개, 39 개, 및 40 개 뉴클레오티드 길이)의 범위일 수 있다. 예를 들어, 스템 루프를 포함하는 센스 가닥은 36 개 뉴클레오티드 길이일 수 있다.

[0168] 또한, 센스 가닥 상의 스템 루프 영역은 그 자체로 듀플렉스 영역을 형성할 수 있다. 스템 루프에 포함된 듀플렉스 영역은 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개, 6 개, 7 개, 8 개, 9 개, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 또는 14 개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 예를 들어, 스템 루프에 포함된 듀플렉스 영역은 6 개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 스템 루프는 RNAi 올리고뉴클레오티드에 분해(예를 들어, 효소 분해)에 대한 보호를 제공할 수 있고, 표적 세포로의 전달을 위한 표적화 특성을 촉진할 수 있다. 예를 들어, 루프는 올리고뉴클레오티드의 유전자 발현 저해 활성에 실질적으로 영향을 미치지 않으면서 변형이 이루어질 수 있는 첨가된 뉴클레오티드를 제공할 수 있다. 특정 구현예에서, 센스 가닥이 S₁-L-S₂(여기서, S₁은 S₂에 상보적이고, L은 최대 10 개 뉴클레오티드 길이(예를 들어, 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개, 6 개, 7 개, 8 개, 9 개, 또는 10 개 뉴클레오티드 길이)의 S₁과 S₂ 사이의 루프를 형성함)로 제시된 스템 루프를(예를 들어, 이의 3'-말단에) 포함하는 올리고뉴클레오티드가 본원에 제공된다. 따라서, S₁과 S₂ 사이의 루프는 본원에 기재된 바와 같이 테트라루프를 형성하는 4 개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 구현예에서, S₁ 영역은 6 개 뉴클레오티드 길이이고, S₂ 영역은 6 개 뉴클레오티드 길이이고, L 영역은 4 개 뉴클레오티드 테트라루프이다.

[0169] 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)의 센스 가닥은 스템 루프 영역 및 안티센스 가닥과 듀플렉스를 형성하는 영역을 포함할 수 있다. 스템 루프 영역은 SEQ ID NO: 7의 올리고뉴클레오티드 서열과 적어도 85%(예를 들어, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 9%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 스템 루프 영역은 SEQ ID NO: 7의 올리고뉴클레오티드 서열을 갖는다.

[0170] 스템 루프의 루프(L)는(예를 들어, 니킹된 테트라루프 구조 내의) 테트라루프일 수 있다. 스템 루프의 루프는 SEQ ID NO: 8의 뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다. 테트라루프는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드, 및 이들의 조합을 함유할 수 있다. 전형적으로, 스템 루프의 루프는 4 개 내지 5 개의 뉴클레오티드를 갖는다. 그러나, 일부 구현예에서, 스템 루프의 루프는 3 개 내지 6 개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 스템 루프의 루프는 3 개, 4 개, 5 개, 또는 6 개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 스템 루프의 루프는 구아노신 및 아데노신 핵산 잔기의 조합을 포함할 수 있다.

[0171] 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, 및 SEQ ID NO: 5 중 임의의 하나의 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 센스 가닥 서열을 포함할 수 있다. 센스 가닥은 도 2b에 제시된 화합물 B 에서와 같이, SEQ ID NO: 4의 서열을 가질 수 있다. SEQ ID NO: 4는 도 1a에 제시된 바와 같은 화학 구조를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 4의 약학적으로 허용되는 염(예를 들어, 나트륨 염)일 수 있다. 대안적으로, 센스 가닥은 도 1d 및 도 1e에 제시된 화합물 A 에서와 같이, SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 SEQ ID NO: 1의 약학적으로 허용되는 염(예를 들어, 나트륨 염)일 수 있다.

[0172] **올리고뉴클레오티드 변형**

[0173] 올리고뉴클레오티드는 특이성, 안정성, 전달, 생체이용률, 뉴클레아제 분해 내성, 면역원성, 염기-쌍형성 성질, RNA 분포 및 세포 흡수 및 치료 또는 연구 용도와 관련된 기타 특징을 개선하거나 제어하기 위해 다양한 방식으로 변형될 수 있다(문헌[Bramsen 등, *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37, 2867-2881; Bramsen 등, *Frontiers in Genetics*, 3 (2012): 1-22] 참조). 따라서, 일부 구현예에서, 본 개시의 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 적합한 변형을 포함할 수 있다. 변형된 뉴클레오티드는 이의 염기 또는 핵염기, 당(예를 들어, 리보스, 데옥시리

보스) 또는 포스페이트 기에 변형이 있을 수 있다.

[0174] 올리고뉴클레오타이드 상의 변형의 수 및 이들 뉴클레오타이드 변형의 위치는 올리고뉴클레오타이드의 성질에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 지질 나노입자(LNP) 또는 유사한 담체에 이들을 컨주게이션시키거나 이들을 포괄시킴으로써 생체내에서 전달될 수 있다. 그러나, 올리고뉴클레오타이드가 LNP 또는 유사한 담체에 의해 보호되지 않는 경우, 뉴클레오타이드 중 적어도 일부가 변형되는 것이 유리할 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드 중 임의의 것의 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 모두, 또는 실질적으로 모두가 변형된다. 특정 구현예에서, 뉴클레오타이드는 절반 넘게 변형된다. 다른 구현예에서, 뉴클레오타이드는 절반 미만만 변형된다. 전형적으로, 네이티브 전달의 경우, 모든 당은 2'-위치에서 변형된다. 이들 변형은 가역적이거나 비가역적일 수 있다. 본원에 개시된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드는 요망되는 특성(예를 들어, 효소 분해로부터의 보호, 생체내 투여 후 요망되는 세포를 표적화하는 능력, 및/또는 열역학적 안정성)을 야기하기에 충분한 수 및 유형의 변형된 뉴클레오타이드를 가질 수 있다.

[0175] 당 변형

[0176] 본원에서 당 유사체로도 지칭되는 변형된 당은 하나 이상의 변형이 당의 2', 3', 4' 및/또는 5' 탄소 위치에서 발생하는 변형된 데옥시리보스 또는 리보스 모이어티를 포함한다. 변형된 당은 또한 잠금 핵산("LNA")(문헌 [Koshkin 등 (1998), Tetrahedron 54, 3607-3630] 참조), 비잠금 핵산("UNA")(문헌 [Snead 등 (2013), Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2, e103] 참조), 및 브릿징된 핵산("BNA")(문헌 [Imanishi 및 Obika (2002), The Royal Society of Chemistry, Chem. Commun., 1653-1659] 참조)에 존재하는 것들과 같은 비천연 대체 탄소 구조를 포함할 수 있다. Koshkin 등, Snead 등, 및 Imanishi 및 Obika의 문헌은 당 변형에 관한 이들의 개시에 대해 본원에 참조로 포함된다.

[0177] 당에서의 뉴클레오타이드 변형은 2'-변형을 포함할 수 있다. 2'-변형은 2'-아미노에틸, 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸, 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산일 수 있다. 전형적으로, 변형은 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 또는 2'-O-메톡시에틸이다. 일부 구현예에서, 변형은 2'-플루오로 및/또는 2'-O-메틸이다. 일부 구현예에서, 2'-플루오로 변형은 2'-플루오로 데옥시리보뉴클레오시드이고/이거나 2'-O-메틸 변형은 2'-O-메틸 리보뉴클레오시드이다. 당에서의 변형은 당 고리의 하나 이상의 탄소의 변형을 가질 수 있는 당 고리의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드의 당의 변형은 당의 1'-탄소 또는 4'-탄소에 연결된 당의 2'-산소, 또는 에틸렌 또는 메틸렌 브릿지를 통해 1'-탄소 또는 4'-탄소에 연결된 2'-산소를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-탄소 대 3'-탄소 결합이 결여된 비환식 당을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는, 예를 들어, 당의 4' 위치에 티올기를 가질 수 있다.

[0178] 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)는 적어도 1 개(예를 들어, 적어도 1 개, 적어도 5 개, 적어도 10 개, 적어도 15 개, 적어도 20 개, 적어도 25 개, 적어도 30 개, 적어도 35 개, 적어도 40 개, 적어도 45 개, 적어도 50 개, 적어도 55 개, 적어도 60 개 이상)의 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드의 센스 가닥은 적어도 1 개(예를 들어, 적어도 1 개, 적어도 5 개, 적어도 10 개, 적어도 15 개, 적어도 20 개, 적어도 25 개, 적어도 30 개, 적어도 35 개 이상)의 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 가닥은 적어도 1 개(예를 들어, 적어도 1 개, 적어도 5 개, 적어도 10 개, 적어도 15 개, 적어도 20 개 이상)의 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0179] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)는 20 개 내지 50 개(예를 들어, 20 개 내지 30 개, 24 개 내지 30 개, 28 개 내지 30 개, 30 개 내지 40 개, 34 개 내지 40 개, 38 개 내지 44 개, 44 개 내지 50 개, 및 48 개 내지 50 개)의 변형된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다.

[0180] 올리고뉴클레오타이드의 센스 가닥의 모든 뉴클레오타이드는 변형될 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오타이드는 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 센스 가닥과 안티센스 가닥 둘 모두를 포함하는 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)의 모든 뉴클레오타이드가 변형된다. 변형된 뉴클레오타이드는 2'-변형(예를 들어, 2'-플루오로 또는 2'-O-메틸)일 수 있다. 뉴클레오타이드에 대한 2'-변형은 2'-플루오로 및/또는 2'-O-메틸일 수 있고, 여기서, 선택적으로, 2'-플루오로 변형은 2'-플루오로 데옥시리보뉴클레오시드이고/이거나 2'-O-메틸 변형은 2'-O-메틸 리보뉴클레오시드이다.

[0181] 본 개시는 상이한 변형 패턴을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 40 개 내지 50 개(예를 들어, 41 개, 2 개, 43 개, 44 개, 45 개, 46 개, 47 개, 48 개,

및 49 개)의 2'-O-메틸 변형을 포함할 수 있다. 변형된 올리고뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 4의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 센스 가닥, 및 SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 6의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함할 수 있다(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 4의 센스 가닥 및 SEQ ID NO: 6의 안티센스 가닥을 포함할 수 있거나, RNAi 올리고뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 1의 센스 가닥 및 SEQ ID NO: 3의 안티센스 가닥을 가질 수 있음). 일부 구현예에서, 이들 올리고뉴클레오타이드의 경우, 센스 가닥의 1 번, 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 6 번, 7 번, 11 번, 12 번, 13 번, 14 번, 15 번, 16 번, 17 번, 18 번, 19 번, 20 번, 21 번, 22 번, 23 번, 24 번, 25 번, 26 번, 27 번, 31 번, 32 번, 33 번, 34 번, 35 번, 및 36 번 위치 중 하나 이상, 및/또는 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 8 번, 9 번, 11 번, 12 번, 13 번, 15 번, 16 번, 17 번, 18 번, 19 번, 20 번, 21 번, 및 22 번 위치 중 하나 이상은 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오시드, 예컨대, 2'-O-메틸 리보뉴클레오시드를 이용하여 변형된다. 일부 구현예에서, 센스 가닥의 1 번, 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 6 번, 7 번, 12 번, 13 번, 14 번, 15 번, 16 번, 17 번, 18 번, 19 번, 20 번, 21 번, 22 번, 23 번, 24 번, 25 번, 26 번, 27 번, 31 번, 32 번, 33 번, 34 번, 35 번, 및 36 번 위치 모두, 및 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 8 번, 9 번, 11 번, 12 번, 13 번, 15 번, 16 번, 17 번, 18 번, 19 번, 20 번, 21 번, 및 22 번 위치 모두는 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오시드, 예컨대, 2'-O-메틸 리보뉴클레오시드를 이용하여 변형된다. 다른 구현예에서, 센스 가닥의 1 번, 2 번, 4 번, 5 번, 6 번, 7 번, 11 번, 14 번, 15 번, 16 번, 18 번, 19 번, 20 번, 21 번, 22 번, 23 번, 24 번, 25 번, 26 번, 27 번, 31 번, 32 번, 33 번, 34 번, 35 번, 및 36 번 위치 중 하나 이상, 및/또는 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 9 번, 11 번, 13 번, 15 번, 17 번, 18 번, 20 번, 21 번, 및 22 번 위치 중 하나 이상은 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오시드, 예컨대, 2'-O-메틸 리보뉴클레오시드를 이용하여 변형된다. 특정 구현예에서, 센스 가닥의 1 번, 2 번, 4 번, 5 번, 6 번, 7 번, 11 번, 14 번, 15 번, 16 번, 18 번, 19 번, 20 번, 21 번, 22 번, 23 번, 24 번, 25 번, 26 번, 27 번, 31 번, 32 번, 33 번, 34 번, 35 번, 및 36 번 위치 모두, 및/또는 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 9 번, 11 번, 13 번, 15 번, 17 번, 18 번, 20 번, 21 번, 및 22 번 위치 모두는 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오시드, 예컨대, 2'-O-메틸 리보뉴클레오시드를 이용하여 변형된다.

[0182] 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 5 개 내지 15 개(예를 들어, 6 개, 7 개, 8 개, 9 개, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 및 14 개)의 2'-플루오로 변형을 가질 수 있다. 이들 올리고뉴클레오타이드의 경우, 센스 가닥의 8 번, 9 번, 10 번, 11 번, 12 번, 13 번, 및 17 번 위치 중 하나 이상, 및/또는 안티센스 가닥의 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 7 번, 10 번, 14 번, 16 번, 및 19 번 위치 중 하나 이상은 2'-플루오로 변형된 뉴클레오시드를 이용하여 변형될 수 있다. 예를 들어, 센스 가닥의 8 번, 9 번, 10 번, 및 11 번 위치 모두, 및/또는 안티센스 가닥의 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 7 번, 10 번, 및 14 번 위치 모두는 2'-플루오로 변형된 뉴클레오시드를 이용하여 변형될 수 있다. 다른 구현예에서, 센스 가닥의 3 번, 8 번, 10 번, 12 번, 13 번, 및 17 번 위치 중 하나 이상, 및/또는 안티센스 가닥의 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 7 번, 8 번, 10 번, 12 번, 14 번, 16 번, 및 19 번 위치 중 하나 이상이 변형될 수 있다. 또 다른 예에서, 센스 가닥의 3 번, 8 번, 9 번, 10 번, 12 번, 13 번, 및 17 번 위치 모두, 및/또는 안티센스 가닥의 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 7 번, 8 번, 10 번, 12 번, 14 번, 16 번, 및 19 번 위치 모두는 2'-플루오로 변형된 뉴클레오시드를 이용하여 변형될 수 있다.

[0183] SEQ ID NO: 1의 서열을 갖는 센스 가닥, 및 SEQ ID NO: 3의 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 센스 가닥의 1 번 내지 7 번, 12 번 내지 27 번, 및 31 번 내지 36 번 위치 중 하나 이상, 및/또는 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 8 번, 9 번, 11 번 내지 13 번, 및 15 번 내지 22 번 위치 중 하나 이상은 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오시드를 이용하여 변형될 수 있다. 또한, 센스 가닥의 1 번 내지 7 번, 12 번 내지 27 번, 및 31 번 내지 36 번 위치 모두, 및/또는 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 8 번, 9 번, 11 번 내지 13 번, 및 15 번 내지 22 번 위치 중 하나 이상은 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오시드를 이용하여 변형될 수 있다. SEQ ID NO: 1의 서열을 갖는 센스 가닥, 및 SEQ ID NO: 3의 서열을 갖는 안티센스 가닥을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 센스 가닥의 8 번 내지 11 번 위치 중 하나 이상, 및 안티센스 가닥의 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 7 번, 10 번, 및 14 번 위치 중 하나 이상은 2'-플루오로 변형된 뉴클레오시드를 이용하여 변형될 수 있다. 이에 따라, 센스 가닥의 8 번 내지 11 번 위치 모두, 및 안티센스 가닥의 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 7 번, 10 번, 및 14 번 위치 모두는 2'-플루오로 변형된 뉴클레오시드를 이용하여 변형될 수 있다.

[0184] 예를 들어, SEQ ID NO: 1의 서열을 갖는 센스 가닥, 및 SEQ ID NO: 3의 서열을 갖는 안티센스 가닥을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 센스 가닥의 1 번 내지 7 번, 12 번 내지 27 번, 및 31 번 내지 36 번 위치 모두, 및/또는 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 8 번, 9 번, 11 번 내지 13 번, 및 15 번 내지 22 번 위치 중 하나 이상은 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오시드를 이용하여 변형될 수 있고; 센스 가닥의 8 번 내지 11 번 위치 모두, 및 안티센스 가닥의 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 7 번, 10 번, 및 14 번 위치 모두는 2'-플루오로를 이용하여 변형될 수

있고, 여기서 센스 가닥의 화학 구조는 도 1a에 도시되어 있고, 안티센스 가닥은 도 1b에 도시되어 있고, RNAi 올리고뉴클레오타이드는 도 1ca 및 도 1cb에 도시되어 있다.

[0185] SEQ ID NO: 4의 서열을 갖는 센스 가닥, 및 SEQ ID NO: 6의 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 센스 가닥의 1 번, 2 번, 4 번, 5 번, 6 번, 7 번, 11 번, 14 번, 15 번, 16 번, 18 번, 19 번, 20 번, 21 번, 22 번, 23 번, 24 번, 25 번, 26 번, 27 번, 31 번, 32 번, 33 번, 34 번, 35 번, 및 36 번 위치 중 하나 이상, 및/또는 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 9 번, 11 번, 13 번, 15 번, 17 번, 18 번, 20 번, 21 번, 및 22 번 위치 중 하나 이상은 2'-O-메틸을 이용하여 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 센스 가닥의 1 번, 2 번, 4 번, 5 번, 6 번, 7 번, 11 번, 14 번, 15 번, 16 번, 18 번, 19 번, 20 번, 21 번, 22 번, 23 번, 24 번, 25 번, 26 번, 27 번, 31 번, 32 번, 33 번, 34 번, 35 번, 및 36 번 위치 모두, 및 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 9 번, 11 번, 13 번, 15 번, 17 번, 18 번, 20 번, 21 번, 및 22 번 위치 모두는 2'-O-메틸을 이용하여 변형될 수 있다. 추가로, SEQ ID NO: 4의 서열을 갖는 센스 가닥, 및 SEQ ID NO: 6의 서열을 갖는 안티센스 가닥을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 센스 가닥의 3 번, 8 번, 9 번, 10 번, 12 번, 13 번, 및 17 번 위치 중 하나 이상, 및/또는 안티센스 가닥의 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 7 번, 8 번, 10 번, 12 번, 14 번, 16 번, 및 19 번 위치 중 하나 이상은 2'-플루오로를 이용하여 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 센스 가닥의 3 번, 8 번, 9 번, 10 번, 12 번, 13 번, 및 17 번 위치 모두, 및 안티센스 가닥의 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 7 번, 8 번, 10 번, 12 번, 14 번, 16 번, 및 19 번 위치 모두는 2'-플루오로를 이용하여 변형된다. 예를 들어, SEQ ID NO: 4의 서열을 포함하는 센스 가닥, 및 SEQ ID NO: 6의 서열을 갖는 안티센스 가닥을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 센스 가닥의 1 번, 2 번, 4 번, 5 번, 6 번, 7 번, 11 번, 14 번, 15 번, 16 번, 18 번, 19 번, 20 번, 21 번, 22 번, 23 번, 24 번, 25 번, 26 번, 27 번, 31 번, 32 번, 33 번, 34 번, 35 번, 및 36 번 위치 모두, 및 안티센스 가닥의 1 번, 6 번, 9 번, 11 번, 13 번, 15 번, 17 번, 18 번, 20 번, 21 번, 및 22 번 위치 모두는 2'-O-메틸을 이용하여 변형될 수 있고; 센스 가닥의 3 번, 8 번, 9 번, 10 번, 12 번, 13 번, 및 17 번 위치 모두, 및 안티센스 가닥의 2 번, 3 번, 4 번, 5 번, 7 번, 8 번, 10 번, 12 번, 14 번, 16 번, 및 19 번 위치 모두는 2'-플루오로를 이용하여 변형될 수 있고; 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 화학 구조는 도 2aa 및 도 2ab에 도시되어 있다.

[0186] 일부 구현예에서, 말단 3'-말단 기(예를 들어, 3'-하이드록실)는 포스페이트 기 또는 다른 기를 이용하여 변형될 수 있는데, 이는, 예를 들어, 링커, 어댑터 또는 표지를 부착하기 위해 또는 또 다른 핵산에 대한 올리고뉴클레오타이드의 직접 리게이션을 위해 사용될 수 있다.

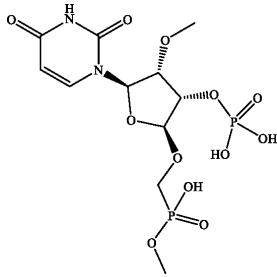
[0187] 5' 말단 포스페이트

[0188] 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)의 5'-말단 포스페이트 기는 아르코노트 2와의 상호작용을 향상시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)는 안티센스 가닥의 5' 말단의 첫 번째 위치에 우리딘을 포함한다. 그러나, 5'-포스페이트 기를 갖는 올리고뉴클레오타이드는 포스파타제 또는 다른 효소를 통한 분해에 민감할 수 있는데, 이는 생체내에서 이들의 생체이용률을 제한할 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 이러한 분해에 내성인 5' 포스페이트의 유사체를 포함한다. 따라서, 안티센스 가닥의 5' 말단에서 우리딘은 포스페이트 유사체를 포함할 수 있다. 포스페이트 유사체는 옥시메틸포스포네이트, 비닐포스포네이트, 또는 말로닐포스포네이트일 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오타이드 가닥의 5' 말단은 천연 5'-포스페이트 기("포스페이트 모방체")의 정전기적 및 입체적 성질을 모방하는 화학적 모이어티에 부착될 수 있다(포스페이트 유사체에 관한 내용이 본원에 참조로 포함되는 문헌[Prakash 등, Nucleic Acids Res. 2015 Mar 31; 43(6): 2993-3011] 참조). 5' 말단에 부착될 수 있는 다수의 포스페이트 모방체가 개발되었다(포스페이트 유사체에 관한 내용이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제8,927,513호 참조). 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 대한 다른 변형이 개발되었다(포스페이트 유사체에 관한 내용이 본원에 참조로 포함되는 제WO 2011/133871호 참조). 특정 구현예에서, 하이드록실 기는 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 부착될 수 있다.

[0189] 올리고뉴클레오타이드는 당의 4'-탄소 위치에 "4'-포스페이트 유사체"로 지칭되는 포스페이트 유사체를 가질 수 있다. 예를 들어, 포스페이트 유사체에 관한 내용이 본원에 참조로 포함되는 제WO 2018/045317호를 참조한다. 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 5'-말단 뉴클레오타이드에 4'-포스페이트 유사체를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 포스페이트 유사체는 옥시메틸포스포네이트이고, 여기서 옥시메틸 기의 산소 원자는 당 모이어티(예를 들어, 이의 4'-탄소에서) 또는 이의 유사체에 결합한다. 다른 구현예에서, 4'-포스페이트 유사체는 티오메틸포스포네이트 또는 아미노메틸포스포네이트이고, 여기서 티오메틸 기의 황 원자 또는 아미노메틸 기의 질소 원자는 당 모이어티 또는 이의 유사체의 4'-탄소에 결합한다. 특정 구현예에서, 4'-포스페이트 유사체는 옥시메틸

포스포네이트이다. 일부 구현예에서, 옥시메틸포스포네이트는 화학식 $-O-CH_2-PO(OH)_2$ 또는 $-O-CH_2-PO(OR)_2$ 로 표현되고, 여기서 R은 H, CH_3 , 알킬 기, CH_2CH_2CN , $CH_2OCOC(CH_3)_3$, $CH_2OCH_2CH_2Si(CH_3)_3$, 또는 보호 기로부터 독립적으로 선택된다. 특정 구현예에서, 알킬 기는 CH_2CH_3 이다. 더욱 전형적으로, R은 H, CH_3 , 또는 CH_2CH_3 으로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, R은 CH_3 이다. 일부 구현예에서, 4'-포스페이트 유사체는 5'-메톡시포스포네이트-4'-옥시이다. 일부 구현예에서, 4'-포스페이트 유사체는 4'-(메틸 메톡시포스포네이트)이다. 일부 구현예에서, 포스페이트 유사체는 4'-O-모노메틸포스포네이트 유사체이다.

[0190] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드에 부착된 포스페이트 유사체는 메톡시 포스포네이트(MOP)이다. 올리고뉴클레오티드에 부착된 포스페이트 유사체는 5' 모노메틸 보호된 MOP일 수 있다. 일부 구현예에서, 포스페이트 유사체를 포함하는 하기 우리딘 뉴클레오티드는, 예를 들어, 안티센스 가닥의 첫 번째 위치에서 사용될 수 있다:



[0191]

[0192] 여기서, 변형된 뉴클레오티드는 [Me포스포네이트-40-mU] 또는 5'-메톡시, 포스포네이트-4'옥시-2'-O-메틸우리딘으로 지칭된다. 5'-메톡시, 포스포네이트-4'옥시-2'-O-메틸우리딘은 안티센스 가닥의 5' 말단에서 제1 뉴클레오티드일 수 있다. 예를 들어, SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 6의 5' 말단에서 제1 뉴클레오티드는 5'-메톡시, 포스포네이트-4'옥시-2'-O-메틸우리딘일 수 있다.

[0193] 변형된 뉴클레오티드간 연결

[0194] 올리고뉴클레오티드에서 포스페이트 변형 또는 치환은 적어도 1 개(예를 들어, 적어도 1 개, 적어도 2 개, 적어도 3 개, 적어도 5 개, 또는 적어도 6 개)의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 생성할 수 있다. 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 임의의 하나는 1 개 내지 10 개(예를 들어, 1 개 내지 10 개, 2 개 내지 8 개, 4 개 내지 6 개, 3 개 내지 10 개, 5 개 내지 10 개, 1 개 내지 5 개, 1 개 내지 3 개 또는 1 개 내지 2 개)의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 임의의 하나는 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개, 6 개, 7 개, 8 개, 9 개, 또는 10 개의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 5 개의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드의 센스 가닥은 1 개의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있고, 안티센스 가닥은 4 개의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다.

[0195] 변형된 뉴클레오티드간 연결은 포스포로디오에이트 연결, 포스포로티오에이트 연결, 포스포트리에스테르 연결, 티오노알킬포스포네이트 연결, 티오알킬포스포트리에스테르 연결, 포스포라미다이트 연결, 포스포네이트 연결 또는 보라노포스페이트 연결일 수 있다. 본원에 개시된 바와 같은 올리고뉴클레오티드 중 임의의 하나의 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드간 연결은 포스포로티오에이트 연결일 수 있다. 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 모든 변형된 뉴클레오티드간 연결은 포스포로티오에이트 연결일 수 있다.

[0196] 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥의 1 번 및 2 번 위치, 안티센스 가닥의 1 번 및 2 번 위치, 안티센스 가닥의 2 번 및 3 번 위치, 안티센스 가닥의 20 번 및 21 번 위치, 및 안티센스 가닥의 21 번 및 22 번 위치 중 하나 이상 사이에 포스포로티오에이트 연결을 가질 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드의 센스 가닥은 센스 가닥의 1 번 및 2 번 위치, 안티센스 가닥의 1 번 및 2 번 위치, 안티센스 가닥의 2 번 및 3 번 위치, 안티센스 가닥의 20 번 및 21 번 위치, 및 안티센스 가닥의 21 번 및 22 번 위치 사이에 포스포로티오에이트 연결을 가질 수 있다. 따라서, SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 4의 서열을 갖는 센스 가닥은 1 번과 2 번 위치 사이에 포스포로티오에이트 연결을 가질 수 있고, SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 6의 서열을 갖는 안티센스 가닥은 1 번과 2 번, 2 번과 3 번, 20 번과 21 번, 및 21 번과 22 번 위치 사이에 포스포로티오에이트 연결을 가질 수 있다.

[0197] **염기 변형**

[0198] 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 핵염기를 가질 수 있다. 본원에서 염기 유사체로도 지칭되는 변형된 핵염기는 뉴클레오티드 당 모이어티의 1' 위치에 연결될 수 있다. 변형된 핵염기는 질소성 염기일 수 있다. 특정 구현예에서, 변형된 핵염기는 질소 원자를 함유할 수 있다. 변형된 핵염기에 관한 내용이 본원에 참조로 포함되는 미국 공개 특허 출원 제2008/0274462호를 참조한다. 변형된 뉴클레오티드는 또한 보편 염기를 포함할 수 있다. 그러나, 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 핵염기(예를 들어, 무염기성)를 함유하지 않을 수 있다.

[0199] 일부 구현예에서, 보편 염기는 변형된 뉴클레오티드에서 뉴클레오티드 당 모이어티의 1' 위치, 또는 뉴클레오티드 당 모이어티 치환에서 동등한 위치에 위치한 헤테로사이클릭 모이어티이며, 이는 듀플렉스에 존재할 때, 듀플렉스의 구조를 실질적으로 변경하지 않으면서 1 개를 넘는 유형의 염기 반대편에 위치할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 핵산에 완전히 상보적인 참조 단일 가닥 핵산(예를 들어, 올리고뉴클레오티드)과 비교하여, 보편 염기를 함유하는 단일 가닥 핵산은 상보적 핵산으로 형성된 듀플렉스보다 낮은 T_m 을 갖는 표적 핵산과 듀플렉스를 형성한다. 그러나, 일부 구현예에서, 단일 미스매치를 생성하기 위해 보편 염기가 염기로 교체된 참조 단일 가닥 핵산과 비교하여, 보편 염기를 함유하는 단일 가닥 핵산은 미스매치 염기를 포함하는 핵산으로 형성된 듀플렉스보다 더 높은 T_m 을 갖는 표적 핵산과 듀플렉스를 형성한다. 보편 결합 뉴클레오티드의 비-제한적인 예는 이노신, 1- β -D-리보푸라노실-5-니트로인돌, 및/또는 1- β -D-리보푸라노실-3-니트로피롤을 포함한다(제US 2007/0254362호; 문헌[Van Aerschot 등, *Nucleic Acids Res.* 1995 Nov 11;23(21):4363-70; Loakes 등, *Nucleic Acids Res.* 1995 Jul 11;23(13):2361-6; Loakes 등, *Nucleic Acids Res.* 1994 Oct 11;22(20):4039-43] 참조. 전술한 내용 각각은 염기 변형에 관한 이들의 개시에 대해 본원에 참조로 포함됨).

[0200] **가역적 변형**

[0201] 표적 세포에 도달하기 전에 생체내 환경으로부터 올리고뉴클레오티드를 보호하기 위한 특정 변형들이 이루어질 수 있지만, 이들은 올리고뉴클레오티드의 효능 또는 활성을, 그것이 표적 세포의 시토졸에 도달할 때 저하시킬 수 있다. 분자가 세포 외부의 바람직한 성질을 유지하도록 가역적 변형이 이루어질 수 있으며, 이는 이후 세포의 시토졸 환경에 진입할 때 제거된다. 가역적 변형은, 예를 들어, 세포 내 효소의 작용 또는 세포 내부의 화학적 조건에 의해(예를 들어, 세포 내 글루타티온에 의한 환원을 통해) 제거될 수 있다.

[0202] 가역적으로 변형된 뉴클레오티드는 글루타티온-민감성 모이어티를 포함할 수 있다. 전형적으로, 핵산 분자는 사이클릭 디설파이드 모이어티를 이용하여 화학적으로 변형되어 뉴클레오티드간 디포스페이트 연결에 의해 생성된 음전하를 차폐하고 세포 흡수 및 뉴클레아제 내성을 개선할 수 있다. 이러한 변형의 이들의 개시에 대해 각각이 참조로 포함되는 Traversa Therapeutics, Inc.("Traversa")에 원래 양도된 제US 2011/0294869호, Solstice Biologics, Ltd.("Solstice")에 원래 양도된 PCT 공개 제WO 2015/188197호, 문헌[Meade 등, *Nature Biotechnology*, 2014,32:1256-1263("Meade")], Merck Sharp & Dohme Corp에 원래 양도된 PCT 공개 제WO 2014/088920호를 참조한다. 뉴클레오티드간 디포스페이트 연결의 가역적 변형은 시토졸(예를 들어, 글루타티온)의 환원 환경에 의해 세포 내에서 절단되도록 설계된다. 초기 예는 세포 내부에서 절단 가능한 것으로 보고된 중화 포스포트리에스테르 변형을 포함한다(문헌[Dellinger 등, *J. Am. Chem. Soc.* 2003,125:940-950] 참조).

[0203] 이러한 가역적 변형은 올리고뉴클레오티드가 뉴클레아제 및 다른 가혹한 환경 조건(예를 들어, pH)에 노출될 생체내 투여(예를 들어, 세포의 혈액 및/또는 리소솜/엔도솜 구획을 통한 통과(transit)) 동안 보호를 가능하게 한다. 글루타티온 수준이 세포의 공간에 비해 더 높은 세포의 시토졸 내로 방출될 때, 변형이 역전되고. 그 결과 올리고뉴클레오티드가 절단된다. 가역적이고 글루타티온에 민감한 모이어티를 사용하면, 비가역적 화학적 변형을 사용하여 이용 가능한 옵션과 비교하여 관심 올리고뉴클레오티드에 입체적으로 더 큰 화학 기를 도입할 수 있다. 이들 더 큰 화학 기는 시토졸에서 제거될 것이므로 세포의 시토졸 내부에 있는 올리고뉴클레오티드의 생물학적 활성을 방해하지 않을 것이다. 결과적으로, 이들 더 큰 화학 기는 뉴클레아제 내성, 친유성, 전하, 열안정성, 특이성 및 저하된 면역원성과 같은 다양한 이점을 뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드에 부여하도록 조작될 수 있다. 글루타티온-민감성 모이어티의 구조는 이의 방출 동역학을 변경하도록 조작될 수 있다.

[0204] 일부 구현예에서, 글루타티온-민감성 모이어티는 뉴클레오티드의 당에 부착된다. 일부 구현예에서, 글루타티온-민감성 모이어티는 변형된 뉴클레오티드의 당의 2' 탄소에 부착된다. 일부 구현예에서, 글루타티온-민감성 모이어티는, 예를 들어, 변형된 뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드의 5'-말단 뉴클레오티드일 때, 당의 5'-탄소에

위치한다. 일부 구현예에서, 글루타티온-민감성 모이어티는, 예를 들어, 변형된 뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드의 3'-말단 뉴클레오티드일 때, 당의 3'-탄소에 위치한다. 일부 구현예에서, 글루타티온-민감성 모이어티는 설포닐 기를 포함한다. 예를 들어, 관련 개시에 대해 내용이 본원에 참조로 포함되는 미국 공개 출원 번호 제 2019/0177355호를 참조한다.

[0205] 표적화 리간드

[0206] 본 개시의 올리고뉴클레오티드를 하나 이상의 세포 또는 하나 이상의 기관(예를 들어, 간 세포)으로 표적화하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 전략은 다른 기관에서 바람직하지 않은 효과를 피하는 데 도움이 될 수 있거나 올리고뉴클레오티드에 대한 이익을 얻지 못할 세포, 조직 또는 기관에 대한 올리고뉴클레오티드의 과도한 손실을 피할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 특정 조직, 세포 또는 기관의 표적화를 용이하게 하기 위해, 예를 들어, 간으로의 올리고뉴클레오티드의 전달을 용이하게 하기 위해 변형될 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 간의 간세포로의 올리고뉴클레오티드의 전달을 용이하게 하도록 변형될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 표적화 리간드에 컨주게이션된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0207] 표적화 리간드는 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 단백질의 일부(예를 들어, 항체 또는 항체 단편) 또는 지질을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드는 압타머이다. 예를 들어, 표적화 리간드는 중앙 맥관구조 또는 신경아교종 세포를 표적화하는 데 사용되는 RGD 펩티드, 락토페린을 이송하는 중앙 맥관구조 또는 스토마(stoma)를 표적화하는 CREKA 펩티드, 또는 CNS 맥관구조에서 발견되는 트랜스페린 수용체를 표적화하는 압타머, 또는 신경아교종 세포에서 EGFR을 표적화하는 항-EGFR 항체일 수 있다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드는 하나 이상의 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티이다.

[0208] 올리고뉴클레오티드의 1 개 이상(예를 들어, 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개 또는 6 개)의 뉴클레오티드는 각각 별개의 표적화 리간드에 컨주게이션된다. 일부 예에서, 올리고뉴클레오티드의 2 개 내지 4 개의 뉴클레오티드는 각각 별개의 표적화 리간드에 컨주게이션된다. 표적화 리간드는 표적화 리간드가 칫솔의 강모와 유사하고 올리고뉴클레오티드가 칫솔과 유사하도록 센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 양 말단에서 2 개 내지 4 개의 뉴클레오티드에 컨주게이션된다(예를 들어, 리간드는 센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 5' 말단 또는 3' 말단 상의 2 개 내지 4 개의 뉴클레오티드 오버행 또는 연장부에 컨주게이션됨). 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥의 5' 말단 또는 3' 말단에 스템 루프를 포함할 수 있고, 스템 루프의 1 개, 2 개, 3 개 또는 4 개의 뉴클레오티드는 표적화 리간드에 개별적으로 컨주게이션될 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥의 3' 말단에 스템 루프를 포함하고, 스템 루프의 3 개의 뉴클레오티드는 표적화 리간드에 개별적으로 컨주게이션된다.

[0209] 일부 구현예에서, 대상체의 간의 간세포에 대한 C3의 발현을 저하시키는 올리고뉴클레오티드를 표적화하는 것이 바람직하다. 임의의 적합한 간세포 표적화 모이어티가 이러한 목적을 위해 사용될 수 있다.

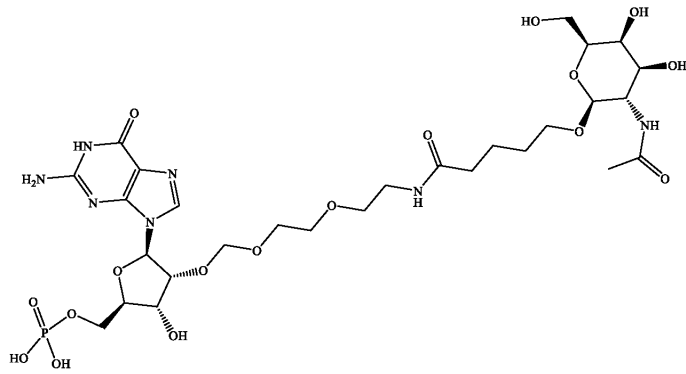
[0210] GalNAc는 주로 간세포의 정현과 표면에서 발견되는 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)에 대한 고친화성 리간드이며, 말단 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기(아시알로당단백질)를 함유하는 순환 글리코단백질의 결합, 내재화 및 후속 제거에 중요한 역할을 한다. 본 개시의 올리고뉴클레오티드에 대한 GalNAc 모이어티의 간접적 또는 직접적인 컨주게이션은 이들 올리고뉴클레오티드를 이들 간세포에서 발견되는 ASGPR에 표적화하는 데 사용될 수 있다.

[0211] 예를 들어, 본 개시의 올리고뉴클레오티드는 1가 GalNAc에 직접적으로 또는 간접적으로 컨주게이션될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 하나 초과(예를 들어, 2 개, 3 개, 또는 4 개 이상)의 1가 GalNAc에 직접적으로 또는 간접적으로 컨주게이션될 수 있고, 전형적으로 3 개 또는 4 개의 1가 GalNAc 모이어티에 컨주게이션된다. GalNAc 모이어티(들)는 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드의 루프 영역 내에 존재할 수 있다. GalNAc 모이어티는 간세포 상의 ASGPR에 대한 본 개시의 올리고뉴클레오티드를 표적화하는 데 사용될 수 있고; 이 시점에, GalNAc 컨주게이션된 올리고뉴클레오티드는 내재화되고 RNA-유도 침묵 복합체(RISC)로 불리는 세포 내 RNAi 기구로 통합될 수 있다. 이러한 복합체 내의 RISC 아르고노트-2(Argo-2) 단백질은 상보적 C3 mRNA에 대한 올리고뉴클레오티드 듀플렉스의 안티센스 가닥을 표적화하고 이의 분해를 개시하여, 표적의 번역을 차단한다.

[0212] 일부 구현예에서, 스템 루프의 루프(L)의 2 개 내지 4 개의 뉴클레오티드는 각각 별개의 GalNAc 모이어티에 컨주게이션된다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 스템의 루프의 3 개의 뉴클레오티드는 3 개의 별개의 1가 GalNAc 모이어티에 직접적으로 또는 간접적으로 컨주게이션될 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티

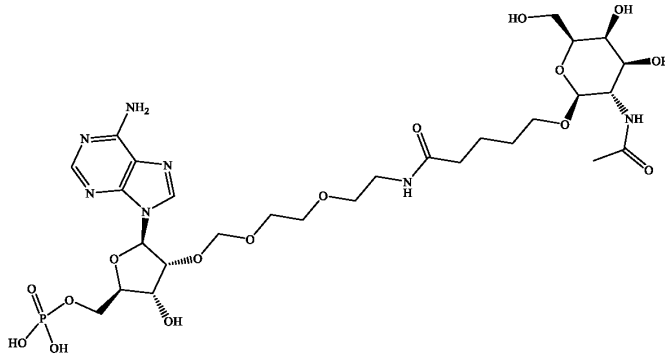
드는 하나 이상의 2가 GalNAc, 3가 GalNAc, 또는 4가 GalNAc 모이어티에 컨주게이션된다.

[0213] 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드는 하기에 도시된 바와 같이, [ademG-GalNAc] 또는 2'-아미노디에톡시메탄올-구아닌-GalNAc로 지칭되는 구아닌 핵염기에 부착된 1가 GalNAc를 포함할 수 있다:



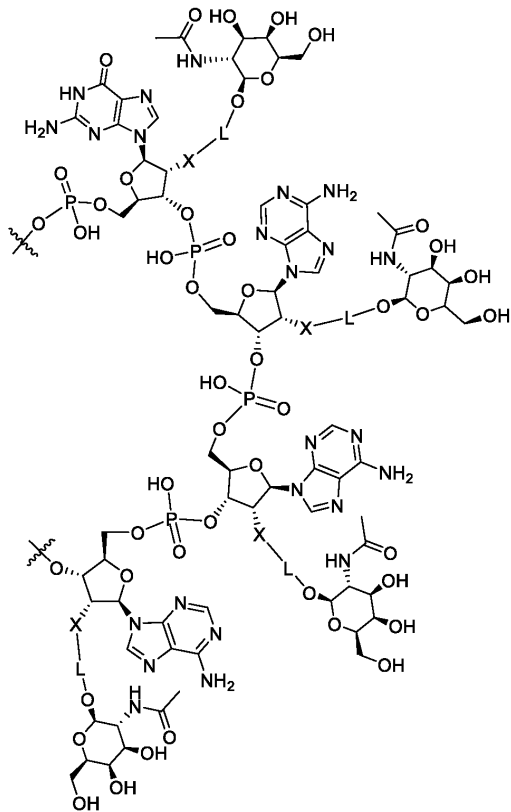
[0214]

[0215] 추가적으로, 또는 대안적으로, 본원의 올리고뉴클레오티드는 하기에 도시된 바와 같은 [ademA-GalNAc] 또는 2'-아미노디에톡시메탄올-아데닌-GalNAc로 지칭되는 아데닌 핵염기에 부착된 1가 GalNAc를 포함할 수 있다.



[0216]

[0217] 이러한 컨주게이션의 예는 5'에서 3'으로의 뉴클레오티드 서열 GAAA(SEQ ID NO: 8)(L = 링커, X = 헤테로원자)를 포함하는 루프에 대해 하기에 제시되어 있고, 스템 부착점이 나타나 있다. 이러한 루프는, 예를 들어, 도 1a에 제시된 분자의 27 번 내지 30 번 뉴클레오티드 위치에 존재할 수 있다. 화학식에서, $\frac{3}{2}$ 는 올리고뉴클레오티드 가닥에 대한 부착점이다.



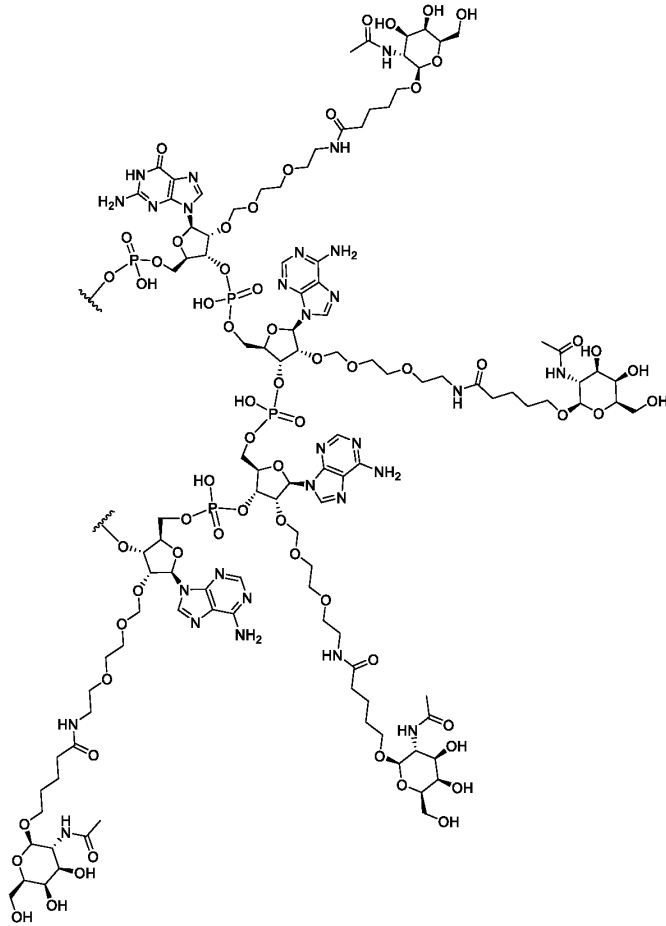
[0218]

[0219]

적절한 방법 또는 화학(예를 들어, 클릭 화학)이 이용되어 뉴클레오티드에 표적화 리간드를 연결할 수 있다. 표적화 리간드는 클릭 링커를 사용하여 뉴클레오티드에 컨쥬게이션될 수 있다. 또한, 아세탈-기반 링커는 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 중 임의의 하나의 뉴클레오티드에 표적화 리간드를 컨쥬게이션시키는 데 사용될 수 있다. 아세탈-기반 링커는, 예를 들어, 2016년 6월 23일에 공개되고 이러한 링커에 관한 내용이 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 출원 공개 번호 제WO 2016/100401 A1호에 개시되어 있다. 링커는 불안정한 링커일 수 있다. 그러나, 다른 구현예에서, 링커는 안정하다(비-불안정).

[0220]

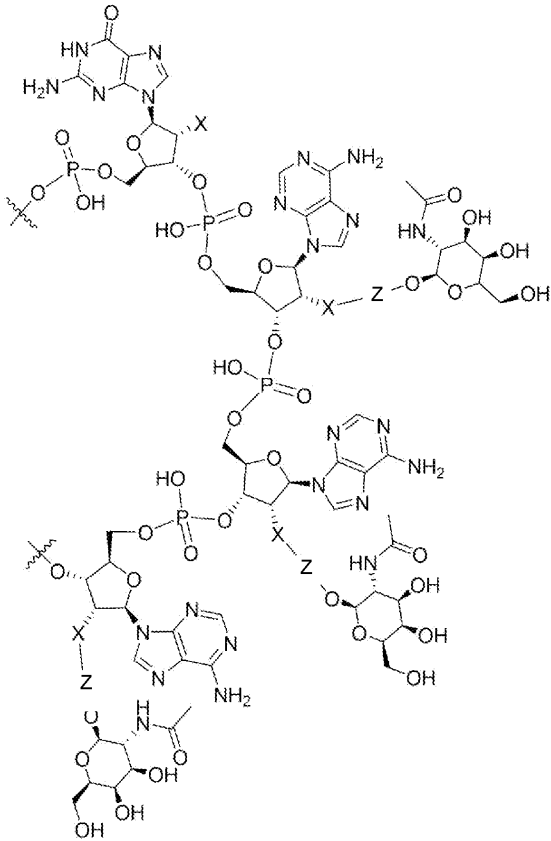
5'에서 3'으로의 뉴클레오티드 GAAA(SEQ ID NO: 8)를 포함하는 테트라루프에 대한 예가 하기에 제시되어 있으며, 여기서 네(4) 개의 GalNAc 모이어티는 아세탈 링커를 사용하여 루프의 뉴클레오티드에 부착된다. 이러한 루프는 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드에 존재할 수 있다(예를 들어, SEQ ID NO: 1 및 SEQ ID NO: 4의 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드의 27 번 내지 30 번 위치 참조). 화학식에서, $\frac{3}{2}$ 는 올리고뉴클레오티드 가닥에 대한 부착점이다.



[0221]

[0222]

일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 테트라루프를 갖는 센스 가닥을 포함하고, 여기서 세(3) 개의 GalNAc 모이어티는 테트라루프를 포함하는 뉴클레오티드에 컨쥬게이션되고, 각각의 GalNAc 모이어티는 한(1) 개의 뉴클레오티드에 컨쥬게이션된다. 일부 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 GalNAc-컨쥬게이션된 뉴클레오티드를 포함하는 테트라루프를 갖는 센스 가닥을 포함하고, 여기서 테트라루프는 하기 구조를 포함한다:



[0223]

[0224]

여기서,

[0225]

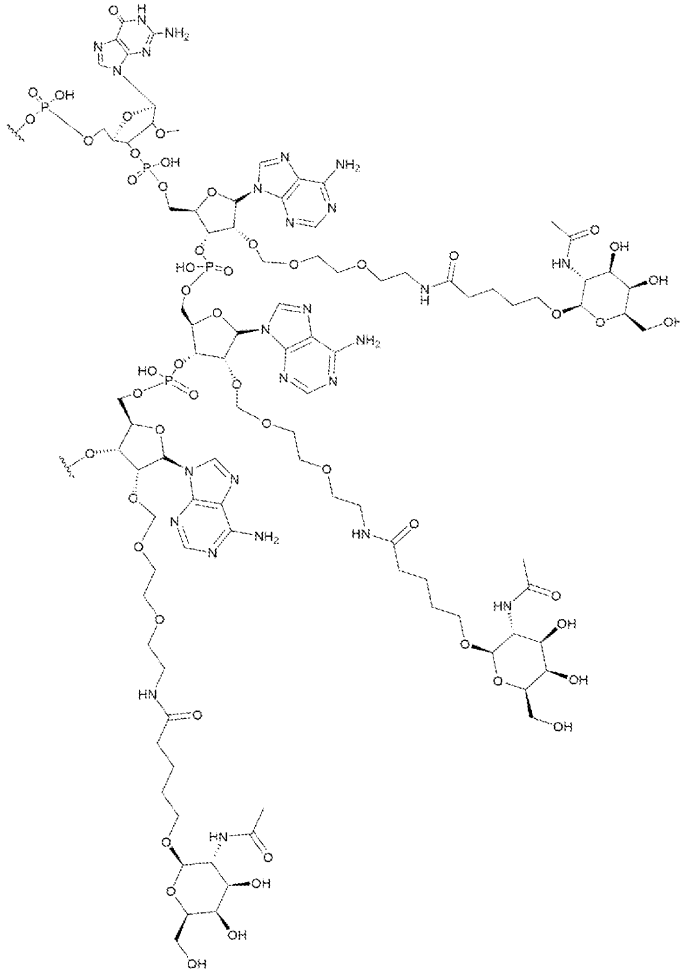
Z는 치환 및 비치환 알킬렌, 치환 및 비치환 알케닐렌, 치환 및 비치환 알키닐렌, 치환 및 비치환 헤테로알킬렌, 치환 및 비치환 헤테로알케닐렌, 치환 및 비치환 헤테로알키닐렌, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된, 1 개 내지 20 개의 포괄적이고 연속적이며 공유 결합된 원자 길이의, 결합, 클릭 화학 핸들, 또는 링커를 나타내고;

[0226]

X는 O, S, 또는 N이다.

[0227]

또 다른 구현예에서, 본원의 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드)는 뉴클레오타이드에 컨쥬게이션된 세(3) 개의 GalNAc 모이어티를 포함하는 테트라루프를 갖는 센스 가닥을 포함하고, 여기서 테트라루프는 하기 구조를 포함한다:



[0228]

[0229]

일부 구현예에서, 표적화 리간드(예를 들어, GalNAc 모이어티)와 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드) 사이에 듀플렉스 연장부(예를 들어, 최대 3 개, 4 개, 5 개, 또는 6 개의 염기 쌍 길이)가 제공된다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드(예를 들어, GalNAc 모이어티)와 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오타이드) 사이의 듀플렉스 연장부는 6 개 염기 쌍 길이이다.

[0230]

제형

[0231]

올리고뉴클레오타이드 사용을 용이하게 하기 위해 다양한 제형이 개발되었다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 분해를 최소화하거나, 전달 및/또는 흡수를 용이하게 하거나, 제형 내의 올리고뉴클레오타이드에 또 다른 유익한 성질을 제공하는 제형을 사용하여 대상체 또는 세포 환경에 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, C3의 발현을 저하시키기 위한 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, 단일 가닥 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드)를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 이러한 조성물은 표적 세포의 즉각적인 환경 또는 전신으로 대상체에게 투여될 때, 올리고뉴클레오타이드의 충분한 부분이 세포로 진입하여 C3 발현을 저하시키도록 적합하게 제형화될 수 있다. 다양한 적합한 올리고뉴클레오타이드 제형 중 임의의 것이 본원에 개시된 바와 같은 C3의 저하를 위한 올리고뉴클레오타이드를 전달하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드, 약학적 조성물, 벡터, 또는 세포는 인산염 완충 식염수, 리포솜, 마이셀 구조, 벡터, 및 캡시드와 같은 완충 용액에서 제형화된다.

[0232]

본원에 개시된 바와 같은 제형은 부형제를 포함할 수 있다. 부형제는 활성 성분의 개선된 안정성, 개선된 흡수, 개선된 용해도, 및/또는 치료적 향상을 조성물에 부여할 수 있다. 부형제는 완충제(예를 들어, 시트르산나트륨, 인산나트륨, 트리스 염기, 또는 수산화나트륨) 또는 비히클(예를 들어, 완충 용액, 페트로라툼, 디메틸 설폭사이드 또는 광유)일 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 이의 저장 수명을 연장하기 위해 동결건조된 후 사용(예를 들어, 대상체에게 투여) 전에 용액으로 만들어질 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드 중 임의의 하나를 포함하는 조성물 중의 부형제는 동결보호제(예를 들어, 만니톨, 락토스, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 폴리비닐 피롤리돈) 또는 붕괴 온도 조절제(예를 들어, 텍스트란, 피콜 또는 젤라틴)일 수 있다.

[0233]

올리고뉴클레오타이드를 포함하는 약학적 조성물은 이의 의도된 투여 경로와 양립 가능하도록 제형화될 수 있다.

투여 경로의 예는 비경구, 예를 들어, 피하, 정맥내, 피내, 경구(예를 들어, 흡입), 경피(국소), 경점막, 및 직장 투여(예를 들어, 피하 투여)를 포함한다.

[0234] 주사용으로 적합한 약학적 조성물은 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액, 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여의 경우, 적합한 담체는 생리 식염수, 정균수, Cremophor EL(BASF, 파시파니, N.J.) 또는 인산염 완충 식염수(PBS)를 포함한다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적절한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 많은 경우, 조성물 중에 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알코올, 예컨대, 만니톨, 및 소르비톨, 염화나트륨을 포함하는 것은 선택적일 것이다. 멸균 주사용 용액은 필요량의 올리고뉴클레오티드를 필요에 따라 상기 열거된 성분 중 하나 또는 이의 조합과 함께 선택된 용매 중에 혼입시킨 후, 여과 멸균시켜 제조할 수 있다.

[0235] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물은 멸균수(또는 주사용수(WFI))를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물은 PBS를 포함한다.

[0236] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물은 WFI에 보존제-비함유 멸균 용액을 포함한다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물의 pH는 약 7.2(예를 들어, pH 7.2)이다. 일부 구현예에서, 용액의 pH를 7.2의 표적으로 조정하기 위해, 필요한 경우, 0.1 N NaOH 또는 0.1 N HCl이 적정될 수 있다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물 중 RNAi 올리고뉴클레오티드의 유리산 형태의 농도는 약 160 mg/mL(예를 들어, 160 mg/mL)이다. WFI는 일부 구현예에서 유리 산 형태로서 총 농도를 약 160 mg/mL로 만들기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 충전 부피는 2 mL 유리 바이알 내로 약 1.3 mL이다. 일부 구현예에서, 용액은 이의 투여 경로로서 환자에게 피하로 제공될 것으로 예상된다.

[0237] 일부 구현예에서, 조성물은 적어도 약 0.1%의 치료제(예를 들어, C3 발현을 저하시키기 위한 올리고뉴클레오티드) 또는 그 이상을 함유할 수 있지만, 활성 성분(들)의 백분율은 총 조성물의 중량 또는 부피의 약 1% 내지 약 80% 이상일 수 있다. 용해도, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 제품 유효 기간, 뿐만 아니라 기타 약리학적 고려사항과 같은 요인은 이러한 약학적 제형을 제조하는 기술 분야의 당업자에 의해 고려될 것이며, 따라서 다양한 투여량 및 치료 요법이 바람직할 수 있다.

[0238] 다수의 구현예가 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 임의의 것의 간-표적화된 전달에 관한 것이지만, 다른 조직의 표적화도 고려된다.

[0239] **약학적 용도**

[0240] 세포 또는 대상체에서 C3의 발현을 저하시키려는 목적으로 유효량의 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드) 중 임의의 하나를 세포 또는 대상체에 전달하는 방법이 본원에 개시된다.

[0241] 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 임의의 적절한 핵산 전달 방법을 이용하여 보체 경로 활성화 또는 조절장애(예를 들어, C3의 활성화 또는 조절장애)에 의해 매개되는 질환 또는 장애가 있는 대상체의 세포에 도입될 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드를 함유하는 용액을 주사하는 것, 올리고뉴클레오티드에 의해 덮인 입자에 의한 충격, 세포 또는 유기체를 올리고뉴클레오티드를 함유하는 용액에 노출시키는 것, 또는 올리고뉴클레오티드의 존재 하에 세포막의 전기천공에 의해 세포로 전달될 수 있다.

[0242] 양이온성 지질을 갖는 올리고뉴클레오티드의 제형은 세포로의 올리고뉴클레오티드의 형질감염을 용이하게 하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 양이온성 지질, 예컨대, 리포펙틴, 양이온성 글리세롤 유도체 및 다중양이온성 분자(예를 들어, 폴리리신)가 사용될 수 있다. 적합한 지질은 올리고펙타민, 리포펙타민(Life Technologies), NC388(Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., Boulder, Colo.), 또는 FuGene 6(Roche)을 포함하고, 이들 모두는 제조업체의 지침에 따라 사용될 수 있다.

[0243] 따라서, 일부 구현예에서, 제형은 지질 나노입자를 포함한다. 일부 구현예에서, 부형제는 리포솜, 지질, 지질 복합체, 마이크로스피어, 마이크로입자, 나노스피어 또는 나노입자를 포함하거나, 이를 필요로 하는 대상체의 세포, 조직, 기관 또는 신체에 투여하기 위해 달리 제형화될 수 있다(예를 들어, 문헌[Remington: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 22nd edition, Pharmaceutical Press, 2013] 참조).

[0244] 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드의 효과적인 세포 내 농도는 또한 올리고뉴클레오티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 안정적인 발현을 통해(예를 들어, 포유류 세포의 핵 또는 미토콘드리아 게놈으로의 통합에 의해) 또는 폴리뉴클레오티드와 접촉된 세포(예를 들어, 올리고뉴클레오티드를 인코딩하는 플라스미드 또는 다른 벡터

(예를 들어, 바이러스 벡터)에서 일시적인 발현에 의해 달성될 수 있다. 발현 벡터의 예는, 예를 들어, 제WO 1994/011026호에 개시되어 있으며, 본원에 참조로 포함된다. 본원에 기재된 조성물 및 방법에 사용하기 위한 발현 벡터는 C3 발현을 저하시키는 올리고뉴클레오티드 서열뿐만 아니라, 예를 들어, 이들 작용제의 발현 및/또는 포유류 세포의 계층으로의 이들 폴리뉴클레오티드 서열의 통합에 사용되는 추가 서열 요소를 함유한다. 발현 벡터는 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 또는 아데노-관련 바이러스 벡터일 수 있다.

[0245] 올리고뉴클레오티드를 세포로 전달하기 위한 다른 방법, 예컨대, 지질-매개 담체 수송, 화학적-매개 수송, 양이온성 리포솜 형질감염, 예컨대, 칼슘 포스페이트, 및 올리고뉴클레오티드를 포함하는 벡터도 사용될 수 있다. 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드의 전달에 사용되는 벡터는 바이러스 벡터, 예컨대, 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터), 아데노바이러스 벡터(예를 들어, Ad5, Ad26, Ad34, Ad35, 및 Ad48), 및 아데노-관련 바이러스 벡터(AAV)(예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, 및 AAV10)일 수 있다.

[0246] 일부 예에서, 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드는 세포에서 올리고뉴클레오티드(예를 들어, 이의 센스 가닥 및 안티센스 가닥)를 발현하도록 조작된 트랜스진의 형태로 전달될 수 있다. 트랜스진은 상기 기재된 바와 같은 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 백시니아 바이러스, 폭스바이러스, 아데노-관련 바이러스, 또는 단순 포진 바이러스) 또는 비-바이러스 벡터(예를 들어, 플라스미드 또는 합성 mRNA)를 사용하여 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 트랜스진은, 예를 들어, 작용원에서 또는 그 부근에서(예를 들어, 간 내에서 또는 그 부근에서) 또는 혈류 내에서 대상체로 직접 주사될 수 있다.

[0247] **C3 저해**

[0248] 투여 시, 본 개시의 올리고뉴클레오티드는 C3 mRNA에 결합하고 이의 발현을 저해할 수 있다. C3 유전자의 발현의 저해는 C3 유전자가 전사되고 C3 유전자의 발현이 저해되도록 처리된(예를 들어, 세포 또는 세포들을 본 개시의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)와 접촉시킴으로써, 또는 세포가 있거나 존재했던 대상체에 본 개시의 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)를 투여함으로써) 제1 세포 또는 세포군(이러한 세포는, 예를 들어, 대상체로부터 유래된(예를 들어, 얻어진) 샘플에 존재할 수 있음)에 의해 발현되는 mRNA의 양의 저하(그와 같이 처리되지 않은 제1 세포 또는 세포군과 실질적으로 동일한 제2 세포 또는 세포군(올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)로 처리되지 않았거나 관심 유전자로 표적화된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)로 처리되지 않은 대조군 세포(들)과 비교하여)에 의해 나타날 수 있다. 표적 mRNA의 수준은 RT-qPCR과 같은 당업자에게 널리 공지된 기법을 사용하여 측정될 수 있다. 저해 정도는 하기와 관련하여 표현될 수 있다:

$$\frac{(\text{대조군 세포 중 mRNA}) - (\text{처리된 세포 중 mRNA})}{(\text{대조군 세포 중 mRNA})} \times 100\%$$

[0249] C3 유전자의 발현 수준의 변화는 C3 유전자 발현, 예를 들어, C3 단백질 발현, C3 단백질 활성화, 또는 C3 신호전달 경로에 기능적으로 연관된 파라미터의 저하와 관련하여 평가될 수 있다. C3 유전자 침묵은 발현 작용제로부터 내인성 또는 이중성인 C3을 발현하는 임의의 세포에서 당업계에 공지된 임의의 검정에 의해 결정될 수 있다.

[0251] C3 mRNA의 저해 결과는 세포 또는 대상체의 하나 이상의 성질을 평가하기 위한 적절한 검정에 의해, 또는 C3 발현을 나타내는 분자(예를 들어, RNA, 단백질)를 평가하는 생화학적 기법에 의해 확인될 수 있다. 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드가 C3의 발현 수준을 저하시키는 정도는 적절한 대조군과 발현 수준(예를 들어, 올리고뉴클레오티드가 전달되지 않았거나 음성 대조군이 전달된 세포 또는 세포 집단에서 C3 mRNA 발현의 수준)을 비교함으로써 평가된다. C3 mRNA 발현의 적절한 대조군 수준은 대조군 수준이 매번 측정될 필요가 없도록 사전 결정된 수준 또는 값일 수 있다. 사전 결정된 수준 또는 값은 중앙값 또는 평균과 같은 단일 컷-오프 값을 포함하는 다양한 형태를 취할 수 있다. 예를 들어, 사전 결정된 수준 또는 값은 건강한 대상체의 혈청에서 전형적으로 발견되는 C3 단백질의 수준에 상응하는 75 mg/dL 내지 175 mg/dL의 C3 단백질 수준 또는 이와 유사한 수준일 수 있다.

[0252] 샘플에서 발현 C3 mRNA의 수준은, 예를 들어, 전사된 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 일부, 예를 들어, mRNA를 검출함으로써 결정될 수 있다. RNA는, 예를 들어, 페놀산/구아니딘 이소티오시아네이트 추출(RNAzol™ B; Biogenesis), RNEASY™ RNA 제조 키트(Qiagen) 또는 PAXGENE™ (PreAnalytix, 스위스)의 사용을 포함하는 RNA 추출 기법을 이용하여 세포로부터 추출될 수 있다. 샘플에서 C3 mRNA는 또한 실시간 PCR(RT-PCR)을 사용하여 결정

될 수 있다. 예를 들어, RNA는 TissueLyser II(Qiagen)를 사용하여 QIAzol Lysis 시약에서 조직 샘플을 균질화하고 제조업체의 지침에 따라 MAGMAX[®] Technology(ThermoFisher Scientific)를 사용하여 정제함으로써 추출될 수 있다. 고�용량 cDNA 역전사 키트(ThermoFisher Scientific)는 이후 cDNA를 제조하는 데 사용될 수 있다. C3 및 하우스킵 대조군(housekeep control)에 대한 특정 프라이머 및 프로브를 CFX384 실시간 PCR 검출 시스템(Bio-Rad Laboratories)에서 PCR에 사용하고, BioRad CFX Maestro 소프트웨어를 사용하여 Ct 값을 추정하고; 발현 수준을 EXCEL[®]에서 계산하고 Prism(GraphPad)에 플롯팅하였다. RT-PCR에 사용된 프라이머는 표 2에 기재되어 있다.

[0253] [표 2]

[0254] RT-PCR에 사용된 프라이머

유전자 표적	프라이머	서열/프로브 ID	염료 및 캔체 표지	SEQ ID NO:
무스 무스쿨루스 (Mm) C3	mC3 F4080	AAT GAG GCC TTC TCT CTA ACA	N/A	55
Mm C3	mC3 R4183	ACT TCT TGC AGG TGA CTT TG	N/A	56
Mm C3	mC3 P4125	/56-FAM/TT GTC GGT G/ZEN/G TGG CAG TGT ATC AT/3IABkFQ/	FAM/ZEN/IABkFQ	--
Mm HPRT F576	정방향	CAA ACT TTG CTT TCC CTG GT	N/A	57
Mm HPRT R664	역방향	CAA AGT CTG GCC TGT ATC	N/A	58
Mm HPRT P616	프로브	TGGTTAAGGTTGCAAGCTTGCTGGTG	5'-Hex, Zen, 3'- IABkFQ	--
hC3 F1313	정방향	CCA AAC TCA GCA TCA ACA CAC	N/A	59
hC3 R1419	역방향	CTG CAT GGT CCT GGT AGC	N/A	60
hC3 P1339	프로브	/56-FAM/AG CCA GAA G/ZEN/C CCT TGA GCA TCA C/3IABkFQ/	FAM/ZEN/IABkFQ	
hC3 F4147	정방향	GCC AAA GAT CAA CTC ACC TGT A	N/A	61
hC3 R4296	역방향	AGA CAT AGT GGC ATC CTG GT	N/A	62
hC3 P4197	프로브	/56-FAM/CC TCT TTT C/ZEN/T GTT TCC GGT GCT GGT /3IABkFQ/	FAM/ZEN/IABkFQ	--
원숭이 C3	Taqman	Mf02794722_m1	5'-FAM	--
NeoR-F172	정방향	AAT GAA CTG CAG GAC GAG G	NA	63
(네오마이신 내성)	역방향	AGG TGA GAT GAC AGG AGA TCC	NA	64
HDI 실험	프로브	/5HEX/CAC TGA AGC /ZEN/GGG AAG GGA CTG G/3IABkFQ/	5'-Hex, Zen, 3'- IABkFQ	--
RhHPRT1	RhHPRT1- F583	CTT TCC TTG GTC AGG CAG TAT	NA	65
RhHPRT1	RhHPRT1- R642	CAA CAC TTC GTG GAG TCC TT	NA	66
RhHPRT1	RhHPRT1- R607	/5HEX/CC AAA GAT G/ZEN/G TCA AGG TCG CAA GC/3IABkFQ/	5'-HEX, ZEN, 3' IABkFQ	--
RhPPIB	Taqman	Mf02802985_m1	5'-VIC-MGB	---

[0255]

[0256] 리보핵산 혼성화를 이용하는 전형적인 검정 포맷은 핵 런-온(run-on) 검정, RT-PCR, RNase 보호 검정, 노던 블롯팅, 인 시츄 혼성화, 및 마이크로어레이 분석을 포함한다. 순환 mRNA는 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는 PCT 공개 제W02012/177906호에 기재된 방법을 이용하여 검출될 수 있다. 관심 유전자의 발현 수준은 또한 핵산 프로브를 사용하여 결정될 수 있다.

[0257] 단리된 mRNA는 노던 또는 서던 분석, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 분석 및 프로브 어레이를 포함하지만, 이로 제한되지 않는 혼성화 또는 증폭 검정에 사용될 수 있다. mRNA 수준을 결정하는 하나의 방법은, 단리된 mRNA를 관심 유전자의 mRNA에 혼성화될 수 있는 핵산 분자(프로브)와 접촉시키는 것을 포함한다. mRNA는, 예를 들어, 아가로스 겔 상에 단리된 mRNA를 러닝시키고 mRNA를 겔로부터 막, 예컨대, 니트로셀룰로스로 전달함으로써, 고체 표면 상에 고정되고 프로브와 접촉될 수 있다. 프로브(들)는 또한 고체 표면 상에 고정될 수 있고, mRNA는, 예를 들어, AFFYMETRIX[®] GENECHIP[®] 어레이에서 프로브(들)와 접촉된다. 당업계에서 공지된 mRNA 검출 방법은 관심 유전자의 mRNA 수준을 결정하는 데 사용하기에 적합할 수 있다.

[0258] 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 결정하기 위한 대안적인 방법은, 예를 들어, RT-PCR(Mullis, 1987, 미국

특허 번호 제4,683,202에 제시된 실험 구현예), 리가제 연쇄 반응(Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193), 자가-지속 서열 복제(Guatelli 등 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), 전사 증폭 시스템(Kwoh 등 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), Q-베타 레플리카제(Lizardi 등 (1988) Bio/Technology 6:1197), 롤링 서클 복제(Lizardi 등, 미국 특허 번호 제5,854,033호) 또는 임의의 다른 핵산 증폭 방법에 의해, 예를 들어, 샘플에서 mRNA의 (cDNA를 제조하기 위한) 핵산 증폭 및/또는 역방향 전사효소의 과정, 이어서 당업자에게 공지된 기법을 이용하여 증폭된 분자의 검출을 포함한다. 이들 검출 방식은, 이러한 분자가 매우 낮은 수로 존재할 경우 핵산 분자의 검출에 특히 유용하다. 본 개시의 특정 양태에서, 관심 유전자 (예를 들어, C3)의 발현 수준은 정량적 형광 RT-PCR(즉, TAQMAN™ System) 또는 DUAL-GLO® 루시페라제 검정에 의해 결정된다.

[0259] 관심 유전자의 mRNA의 발현 수준은 멤브레인 블롯(예컨대, 노던, 서던, 도트 등과 같은 혼성화 분석에 사용됨), 또는 마이크로웰, 샘플 튜브, 겔, 비드 또는 섬유(또는 결합된 핵산을 포함하는 임의의 고체 지지체)를 사용하여 모니터링될 수 있다. 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제5,770,722호; 제5,874,219호; 제5,744,305호; 제5,677,195호; 및 제5,445,934호를 참조한다. 유전자 발현 수준의 결정은 또한 용액 중에서 핵산 프로브를 이용하는 것을 포함할 수 있다.

[0260] 상기 기재된 검정을 이용하여, C3 mRNA 저하의 양에 기초하여 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드를 이용한 치료의 효과에 관해 결정이 이루어질 수 있다. C3 mRNA의 수준의 저하는 C3 mRNA의 적절한 대조군 수준 또는 치료 전 대상체에서 C3의 수준에 비해 1% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 15% 이하, 20% 이하, 25% 이하, 30% 이하, 35% 이하, 40% 이하, 45% 이하, 50% 이하, 55% 이하, 60% 이하, 70% 이하, 80% 이하, 또는 90% 이하까지의 저하일 수 있다. 적절한 대조군 수준은 본원에 기재된 바와 같이 올리고뉴클레오티드와 접촉되지 않은 세포 또는 세포 집단에서의 C3 mRNA 발현의 수준일 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법에 따른 세포로의 올리고뉴클레오티드의 전달의 효과는 유한한 기간 후에 평가된다. 예를 들어, C3 mRNA의 수준은 세포에서 적어도 8 시간, 12 시간, 18 시간, 24 시간; 또는 올리고뉴클레오티드를 세포에 도입한 지 적어도 3 일, 4 일, 5 일, 10 일, 15 일, 20 일, 30 일, 40 일, 50 일, 60 일, 70 일, 또는 80 일 후에 분석될 수 있다.

[0261] 또한, C3 유전자를 저해하는 것은 세포 또는 세포군에 의해 발현되는 C3 단백질의 수준(예를 들어, 대상체로부터 유래된 샘플에서 발현된 단백질의 수준)의 저하에 의해 나타날 수 있는 C3 단백질 발현의 저해를 초래할 수 있다. 상기 설명된 바와 같이, mRNA 억제의 평가를 위하여, 처리된 세포 또는 세포군에서의 단백질 발현 수준의 저하는 유사하게 대조군 세포 또는 세포군에서의 단백질 수준의 백분율로 표현될 수 있다.

[0262] C3 단백질 발현의 저해 결과는 세포 또는 대상체의 하나 이상의 성질을 평가하기 위한 적절한 검정에 의해, 또는 C3 단백질 발현을 나타내는 분자를 평가하는 생화학적 기법에 의해 확인될 수 있다. 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드가 C3 단백질의 발현 수준을 저하시키는 정도는 적절한 대조군과 발현 수준(예를 들어, 올리고뉴클레오티드가 전달되지 않았거나 음성 대조군이 전달된 세포 또는 세포 집단에서 C3 단백질 발현의 수준)을 비교함으로써 평가된다. C3 단백질 발현의 적절한 대조군 수준은 대조군 수준이 매번 측정될 필요가 없도록 사전 결정된 수준 또는 값, 예컨대, 정상 범위, 예를 들어, 혈청 중 75 mg 내지 175 mg인 것으로 결정된 C3 단백질의 양일 수 있다. 사전 결정된 수준 또는 값은 중앙값 또는 평균과 같은 단일 컷-오프 값을 포함하는 다양한 형태를 취할 수 있다.

[0263] C3 유전자의 발현에 의해 생성된 C3 단백질의 수준은 단백질 수준의 측정을 위해 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어, 전기영동, 모세관 전기영동, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 액체 크로마토그래피 탠덤 질량 분석법(LC/MS/MS), 박층 크로마토그래피(TLC), 과확산 크로마토그래피(hyperdiffusion chromatography), 유체 또는 겔 침전 반응, 흡수 분광법, 비색 검정, 분광광도 검정, 유세포 분석, 면역확산(단일 또는 이중), 면역전기영동, 웨스턴 블롯팅, 방사선면역검정(RIA), 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA), 면역형광 검정, 전기화학발광 검정 등을 포함한다. 이러한 검정은 또한 관심 유전자에 의해 생성된 단백질의 존재 또는 복제를 나타내는 단백질의 검출에 사용될 수 있다. 추가로, 상기 검정은 단백질 기능의 회복 또는 변화를 초래함으로써 대상체에게 치료 효과 및 이익을 제공하고/하거나, 대상체의 장애를 치료하고/하거나, 대상체에서 장애의 증상을 저하시키는 관심 mRNA 서열의 변화를 보고하는 데 사용될 수 있다.

[0264] 상기 기재된 검정을 이용하여, C3 단백질 저하의 양에 기초하여 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드를 이용한 치료의 효과에 관해 결정이 이루어질 수 있다. C3 단백질 수준의 저하는 C3의 적절한 대조군 수준(예를 들어, 약 75 mg/dL 내지 175 mg/dL)과 비교하여 1% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 15% 이하, 20% 이하, 25% 이하, 30% 이하, 35% 이하, 40% 이하, 45% 이하, 50% 이하, 55% 이하, 60% 이하, 70% 이하, 80% 이하, 또는 90% 이하까지의 저

하일 수 있다. 적절한 대조군 수준은 본원에 기재된 바와 같이 올리고뉴클레오티드와 접촉되지 않은 세포 또는 세포 집단에서 C33 발현의 수준일 수 있다. 본원에 개시된 방법에 따른 세포로의 올리고뉴클레오티드의 전달의 효과는 유한한 기간 후에 평가될 수 있다. 예를 들어, C3의 수준은 세포에서 적어도 8 시간, 12 시간, 18 시간, 24 시간; 또는 올리고뉴클레오티드를 세포에 도입한 지 적어도 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 7 일, 또는 14 일 후에 분석될 수 있다. C3의 수준은 대상체의 재치료가 필요한지 여부를 평가하기 위해 결정될 수 있다. 예를 들어, C3의 수준이 치료전 수준(또는 치료전 수준의 적어도 약 20% 이상(예를 들어, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상)인 수준)으로 증가하는 경우, 대상체는 재치료를 필요로 할 수 있다.

[0265] 또한, 본원에 기재된 방법을 이용하여 C3 유전자를 저해하는 것은 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환을 갖는 것으로 확인된 대상체의 세포에서 C3 mRNA 전사의 저하를 초래할 수 있다. 본원에 제공된 방법은 임의의 적절한 세포 유형(예를 들어, C3을 발현하는 세포, 예컨대, 간세포)에서 유용하다. 일부 구현예에서, 세포는 대상체로부터 얻어졌고 제한된 수의 계대를 거쳤을 수 있는 일차 세포이며, 그에 따라 세포는 이의 천연 표현형 성질을 실질적으로 유지한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드가 전달되는 세포는 생체의 또는 시험관내에 있다(즉, 배양 중인 세포 또는 세포가 존재하는 유기체로 전달될 수 있음). 특정 구현예에서, 간세포에서만 C3의 발현을 저하시키려는 목적으로 유효량의 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드(들)를 세포에 전달하는 방법이 제공된다.

[0266] 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드(들)의 유효량은 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환 또는 장애, 예컨대, 본원에 기재된 질환 또는 장애 중 하나의 증상의 저하를 초래하는 올리고뉴클레오티드(들)의 양으로서 결정될 수 있다. 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환 또는 장애의 증상의 저하는, 예를 들어, 담당자에게 공지된 임상 평가를 이용하여 결정 시, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 100%의 저하일 수 있다. 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환 또는 장애의 증상의 저하량은 대상체가 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드(들), 약학적 조성물(들), 벡터(들), 또는 세포(들)로 다시 치료받는 것을 필요로 하는 경우를 결정하는 데 사용될 수 있다. 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환의 저하를 결정하기 위한 검정의 예는 순환 C3 단백질의 측정 및/또는 정량화, 기능적 검정(예를 들어, WEISLAB® 검정 및 용혈 검정)을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. C3(또는 C3 절단 산물) 침착의 정량화는 IHC 또는 면역형광을 통해; 및 특정 질환 바이오마커를 통해 수행될 수 있다.

[0267] 또한, 듀플렉스 폴리펩티드로서 센스 가닥과 안티센스 가닥 둘 모두를 포함하는 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드는 임의의 적절한 핵산 전달을 이용하여 대상체의 세포에 도입될 수 있다. 듀플렉스 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드를 함유하는 용액을 주사하는 것, 올리고뉴클레오티드에 의해 덮인 입자에 의한 충격, 세포 또는 유기체를 올리고뉴클레오티드를 함유하는 용액에 노출시키는 것, 또는 올리고뉴클레오티드의 존재 하에 세포막의 전기천공에 의해 세포로 전달될 수 있다. 듀플렉스 올리고뉴클레오티드는 또한 지질-매개 담체 수송, 화학적-매개 수송, 양이온성 리포솜 형질감염, 예컨대, 칼슘 포스페이트, 및 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 핵산을 인코딩하는 벡터를 사용하여 세포로 전달될 수 있다. 듀플렉스 올리고뉴클레오티드의 전달에 사용되는 벡터는 바이러스 벡터, 예컨대, 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터), 아데노바이러스 벡터(예를 들어, Ad5, Ad26, Ad34, Ad35, 및 Ad48), 및 아데노-관련 바이러스 벡터(AAV)(예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, 및 AAV9)일 수 있다.

[0268] **치료 방법**

[0269] 또한, 대상체에서, 예를 들어, 본원에 개시된 보체 경로 활성화 또는 조절장애와 관련된 질환 중 하나 이상을 포함하는 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환을 본원에 기재된 조성물(예를 들어, 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드를 인코딩하는 벡터, 벡터를 함유하는 세포, 및 약학적 조성물)의 투여에 의해 치료하는 방법이 본원에 개시된다. 방법은 본원에 기재된 RNAi 올리고뉴클레오티드의 약학적으로 허용되는 염(예를 들어, 나트륨 염)의 투여에 의해 대상체에서 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환의 치료를 포함할 수 있다. 본원에 기재된 방법은 전형적으로 유효량, 즉, 바람직한 치료 결과(예를 들어, C3 발현의 녹다운)를 초래할 수 있는 양의 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 치료적으로 허용되는 양은 보체 경로 활성화 또는 조절장애(예를 들어, C3의 활성화 또는 조절장애)에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 치료할 수 있는 양일 수 있다. 임의의 하나의 대상체에 대한 적절한 투여량은 대상체의 크기, 체표면적, 연령, 투여될 특정 조성물, 조성물 내 활성 성분(들), 투여 시간 및 경로, 일반적인 건강 및 동시에 투여되는 다른 약물을 포함하는 특정 요인에 좌우될 것이다. 이러한 치료는, 예를 들어, 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 임의의 유형의 질환 또는 장애를 늦추거나,

증지시키거나, 예방하는 데 사용될 수 있고, 예방적으로 또는 치료적으로 투여될 수 있다. 예방제의 투여는 질환 또는 장애가 예방되거나, 대안적으로 이의 진행이 지연되도록 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환 또는 장애에 특유한 증상의 검출 또는 징후 전에 일어날 수 있다. 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환의 위험이 있는 대상체는, 예를 들어, 당업계에 공지된 진단 또는 예후 검정 중 하나 또는 이들의 조합에 의해 확인될 수 있다.

[0270] 본원에 개시된 조성물은 임의의 표준 방법을 이용하여 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 조성물 중 임의의 하나는 장내(예를 들어, 경구로, 위영양관에 의해, 십이지장 영양관(duodenal feeding tube)에 의해, 위루술을 통해 또는 직장으로), 비경구(예를 들어, 피하 주사, 정맥내 주사 또는 주입, 동맥내 주사 또는 주입, 골내 주입, 근육내 주사, 뇌내 주사, 뇌실내 주사, 척추강내), 국소적으로(예를 들어, 피부의, 흡입, 점안제를 통해, 또는 점막을 통해), 또는 표적 기관(예를 들어, 대상체의 간) 내로의 직접 주사에 의해 투여될 수 있다. 전형적으로, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 정맥내 또는 피하로 투여된다. 임의의 주어진 경우 투여에 가장 적합한 경로는 투여되는 특정 조성물, 대상체, 치료되는 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 특정 질환 또는 장애, 약학적 제형화 방법, 투여 방법(예를 들어, 투여 시간 및 투여 경로), 대상체의 연령, 체중, 성별, 치료되는 질환의 중증도, 대상체의 식이, 및 대상체의 배설물에 따라 달라질 것이다.

[0271] 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체는 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드를, 예를 들어, 매년(예를 들어, 12 개월마다 1 회), 반년마다(예를 들어, 6 개월마다 1 회), 연 4 회(예를 들어, 3 개월마다 1 회), 격월로(예를 들어, 2 개월마다 1 회), 매달, 또는 매주 투여받을 수 있다. 다른 예에서, 올리고뉴클레오티드는 1 주, 2 주, 또는 3 주마다 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 매일 투여될 수 있다.

[0272] 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환에 대해 치료받을 대상체는 인간 또는 비인간 영장류 또는 또 다른 포유류 대상체(예를 들어, 인간)일 수 있다. 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드로 치료받을 수 있는 다른 예시적인 대상체는 개 및 고양이와 같은 가축화된 동물(domesticated animal); 말, 소, 돼지, 양, 염소, 및 닭과 같은 가축; 및 마우스, 래트, 기니피그, 및 햄스터와 같은 동물을 포함한다.

[0273] **투여량**

[0274] 본 개시의 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물)의 투여량은 화합물의 약력학적 성질, 투여 방식, 수용자의 연령, 건강, 및 체중, 증상의 본질 및 정도, 치료의 빈도 및/또는 존재하는 경우, 동시 치료의 유형, 및 치료받을 대상체에서의 화합물의 제거율과 같은 다수의 요인에 따라 달라질 수 있다. 당업자는 상기 요인에 기초하여 적절한 투여량을 결정할 수 있다.

[0275] 본 개시의 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 다음 중 하나 이상(예를 들어, 2 개 이상, 3 개 이상, 4 개 이상)을 초래하기에 효과적인 양으로 및 그러한 시간 동안 투여될 수 있다: (a) 대상체의 세포에서 C3 단백질의 발현 감소, (b) 대상체의 세포에서 C3의 전사 저하, (c) 대상체의 세포에서 C3 단백질의 수준 저하, (d) 대상체의 세포 내 C3 단백질의 활성 저하; 및/또는 (e) 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상 저하.

[0276] 따라서, 본 개시는 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환을 치료하는 방법에 관한 것이며, 여기서 방법은 대상체에서 C3 mRNA에 특이적으로 결합하고 C3 단백질의 발현을 저해하는 유효량의 기재된 올리고뉴클레오티드를 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 본 개시는 치료적 유효량의 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드, 약학적 조성물, 벡터, 또는 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0277] 개시된 방법 및 조성물을 이용하여 치료될 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환은, 예를 들어, 본원에 개시된 보체 경로 활성화 또는 조절장애와 관련된 질환 중 하나 이상일 수 있다.

[0278] 보체 경로 활성화 또는 조절장애에 의해 매개되는 질환의 치료는 본원에 기재된 것들과 같은 C3 mRNA의 발현 및/또는 번역(예를 들어, C3 단백질의 발현)을 저해하는 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)의 투여에 의해 달성될 수 있다.

[0279] 개시된 조성물은 당업자에 의해 적절한 것으로 결정된 양으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드는 초기에 임상 반응에 따라 필요한 경우 조정될 수 있는 적합한 투여량으로 투여될 수 있다.

[0280] 일부 예에서, 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 대상체 체중의 0.01 mg/kg 내지 100 mg/kg(예를 들어, 0.01 mg/kg 내지 1 mg/kg, 1 mg/kg 내지 5 mg/kg, 5 mg/kg 내지 20 mg/kg, 20 mg/kg 내지 50 mg/kg, 50 mg/kg 내지 100 mg/kg)의 용량으로 투여된다. 특정 예에서, 올리고뉴클레오티드는 대상체 체중의 0.01 mg/kg 내지 50 mg/kg(예를 들어, 0.01 mg/kg 내지 1 mg/kg, 1 mg/kg 내지 5 mg/kg, 5 mg/kg 내지 10 mg/kg, 10 mg/kg 내지 20 mg/kg, 20 mg/kg 내지 30 mg/kg, 30 mg/kg 내지 40 mg/kg, 40 mg/kg 내지 50 mg/kg)의 농도로 투여된다. 다른 예에서, 올리고뉴클레오티드는 대상체 체중의 0.01 mg/kg 내지 20 mg/kg(예를 들어, 0.01 mg/kg 내지 1 mg/kg, 1 mg/kg 내지 5 mg/kg, 5 mg/kg 내지 10 mg/kg, 10 mg/kg 내지 15 mg/kg, 15 mg/kg 내지 20 mg/kg)의 농도로 투여된다. 다른 예에서, 올리고뉴클레오티드는 대상체 체중의 0.01 mg/kg 내지 15 mg/kg(예를 들어, 0.01 mg/kg 내지 1 mg/kg, 1 mg/kg 내지 2 mg/kg, 2 mg/kg 내지 5 mg/kg, 5 mg/kg 내지 8 mg/kg, 8 mg/kg 내지 10 mg/kg, 10 mg/kg 내지 12 mg/kg, 12 mg/kg 내지 15 mg/kg)의 농도로 투여된다. 다른 예에서, 올리고뉴클레오티드는 대상체 체중의 0.01 mg/kg 내지 10 mg/kg(예를 들어, 0.01 mg/kg 내지 1 mg/kg, 1 mg/kg 내지 2 mg/kg, 2 mg/kg 내지 5 mg/kg, 5 mg/kg 내지 8 mg/kg, 8 mg/kg 내지 10 mg/kg)의 농도로 투여된다. 다른 예에서, 올리고뉴클레오티드는 대상체 체중의 0.01 mg/kg 내지 5 mg/kg(예를 들어, 0.01 mg/kg 내지 1 mg/kg, 1 mg/kg 내지 2 mg/kg, 2 mg/kg 내지 3 mg/kg, 3 mg/kg 내지 4 mg/kg, 4 mg/kg 내지 5 mg/kg)의 농도로 투여된다. 다른 예에서, 올리고뉴클레오티드는 대상체 체중의 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg(0.1 mg/kg 내지 1 mg/kg, 1 mg/kg 내지 5 mg/kg, 5 mg/kg 내지 10 mg/kg, 10 mg/kg 내지 15 mg/kg, 및 15 mg/kg 내지 20 mg/kg)의 농도로 투여된다. 다른 예에서, 올리고뉴클레오티드는 대상체 체중의 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg(예를 들어, 0.1 mg/kg 내지 1 mg/kg, 1 mg/kg 내지 2 mg/kg, 2 mg/kg 내지 5 mg/kg, 5 mg/kg 내지 7 mg/kg, 및 7 mg/kg 내지 10 mg/kg)의 농도로 투여된다. 다른 예에서, 올리고뉴클레오티드는 대상체 체중의 0.1 mg/kg 내지 5 mg/kg(예를 들어, 0.1 mg/kg 내지 1 mg/kg, 2 mg/kg 내지 3 mg/kg, 3 mg/kg 내지 4 mg/kg, 및 4 mg/kg 내지 5 mg/kg)의 농도로 투여된다. 다른 예에서, 올리고뉴클레오티드는 대상체 체중의 1 mg/kg 내지 50 mg/kg(예를 들어, 1 mg/kg 내지 10 mg/kg, 10 mg/kg 내지 20 mg/kg, 20 mg/kg 내지 30 mg/kg, 30 mg/kg 내지 40 mg/kg, 및 40 mg/kg 내지 50 mg/kg)의 농도로 투여된다. 다른 예에서, 올리고뉴클레오티드는 대상체 체중의 1 mg/kg 내지 20 mg/kg(예를 들어, 1 mg/kg 내지 5 mg/kg, 5 mg/kg 내지 10 mg/kg, 10 mg/kg 내지 15 mg/kg, 및 15 mg/kg 내지 20 mg/kg)의 농도로 투여된다. 다른 예에서, 올리고뉴클레오티드는 대상체 체중의 1 mg/kg 내지 10 mg/kg(예를 들어, 1 mg/kg 내지 2 mg/kg, 2 mg/kg 내지 5 mg/kg, 5 mg/kg 내지 7 mg/kg, 및 7 mg/kg 내지 10 mg/kg)의 농도로 투여된다. 다른 예에서, 올리고뉴클레오티드는 대상체 체중의 1 mg/kg 내지 5 mg/kg(예를 들어, 1 mg/kg 내지 2 mg/kg, 2 mg/kg 내지 3 mg/kg, 3 mg/kg 내지 4 mg/kg, 및 4 mg/kg 내지 5 mg/kg)의 농도로 투여된다. 다른 예에서, 올리고뉴클레오티드는 30 mg/kg 내지 300 mg/kg(예를 들어, 30 mg/kg 내지 200 mg/kg, 30 mg/kg 내지 100 mg/kg, 30 mg/kg 내지 50 mg/kg, 50 mg/kg 내지 300 mg/kg, 100 mg/kg 내지 300 mg/kg, 200 mg/kg 내지 300 mg/kg, 및 250 mg/kg 내지 300 mg/kg)의 농도로 투여된다.

[0281] 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 대상체 체중의 10 mg/kg 미만(예를 들어, 9 mg/kg 이하, 8 mg/kg 이하, 7 mg/kg 이하, 6 mg/kg 이하, 5 mg/kg 이하, 4 mg/kg 이하, 3 mg/kg 이하, 2 mg/kg 이하, 1 mg/kg 이하)의 용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 약 10 mg/kg 이하의 용량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 약 9 mg/kg 이하(예를 들어, 8.9 mg/kg, 8 mg/kg, 7 mg/kg, 5 mg/kg, 3 mg/kg, 및 1 mg/kg 이하)의 용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 약 8 mg/kg 이하(예를 들어, 7.9 mg/kg, 7 mg/kg, 5 mg/kg, 3 mg/kg, 및 1 mg/kg 이하)의 용량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 약 7 mg/kg 이하(예를 들어, 6.9 mg/kg, 6 mg/kg, 4 mg/kg, 2 mg/kg, 및 1 mg/kg 이하)의 용량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드)는 약 6 mg/kg 이하(예를 들어, 5.9 mg/kg, 5 mg/kg, 3 mg/kg, 및 1 mg/kg 이하)의 용량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 약 5 mg/kg 이하(예를 들어, 4.9 mg/kg, 4 mg/kg, 3 mg/kg, 2 mg/kg, 및 1 mg/kg 이하)의 용량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 약 4 mg/kg 이하(예를 들어, 3.9 mg/kg, 3 mg/kg, 2 mg/kg, 및 1 mg/kg 이하)의 용량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 약 3 mg/kg 이하(예를 들어, 2.9 mg/kg, 2.5 mg/kg, 2 mg/kg, 1 mg/kg 이하)의 용량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 약 2 mg/kg 이하(예를 들어, 1.9 mg/kg, 1.5 mg/kg, 1 mg/kg, 및 0.5 mg/kg 이하)의 용량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 약 1 mg/kg 이하(예를 들어, 0.9 mg/kg, 0.8 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.2 mg/kg, 및 0.1 mg/kg 이

하)의 용량으로 투여된다.

- [0282] 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 대상체 체중의 약 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg, 약 0.2 mg/kg 내지 10 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 10 mg/kg, 약 0.4 mg/kg 내지 10 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 10 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 10 mg/kg, 약 2 mg/kg 내지 10 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 10 mg/kg, 약 4 mg/kg 내지 10 mg/kg, 약 5 mg/kg 내지 10 mg/kg, 약 6 mg/kg 내지 10 mg/kg, 약 7 mg/kg 내지 10 mg/kg, 약 8 mg/kg 내지 10 mg/kg, 또는 약 9 mg/kg의 용량으로 투여된다.
- [0283] 다른 예에서, 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 RNAi 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물)의 투여량은 예방적 또는 치료적 유효량이다. 일부 경우에, 바이러스 벡터(예를 들어, rAAV 벡터)는 대상체 당 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 또는 10^{15} 개능 카피(GC)의 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, rAAV는 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 또는 10^{14} GC/kg(대상체의 총 중량)의 용량으로 투여된다.
- [0284] 선택적으로, 개시된 올리고뉴클레오티드는 본원에 기재된 바와 같이 대상체에게 전달하기에 적합한 약학적으로 허용되는 조성물의 일부로서 투여될 수 있다. 개시된 작용제는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있는 바와 같이, 요망되는 투여량을 제공하고/하거나 치료적으로 유익한 효과를 이끌어내기에 충분한 양으로 이들 조성물 내에 포함된다.
- [0285] 본원에 기재된 개시된 조성물은 대상체를 치료하거나 상기 기재된 결과 중 하나(예를 들어, 대상체에서 질환의 하나 이상의 증상의 저하)를 달성하기에 충분한 양(예를 들어, 유효량)으로 및 그러한 시간 동안 투여될 수 있다. 개시된 조성물은 1 회 또는 1 회 넘게 투여될 수 있다. 개시된 조성물은 1 일 1 회, 1 일 2 회, 1 일 3 회, 2 일마다 1 회, 주 1 회, 주 2 회, 주 3 회, 격주로 1 회, 월 1 회, 격월로 1 회, 연 2 회, 또는 연 1 회 투여될 수 있다. 치료는 불연속적(예를 들어, 주사) 또는 연속적(예를 들어, 임플란트 또는 주입 펌프를 통한 치료)일 수 있다. 대상체는 치료에 사용되는 조성물 및 투여 경로에 따라 본 개시의 조성물을 투여한 지 1 주, 2 주, 1 개월, 2 개월, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월 이상 후에 치료 효능에 대해 평가될 수 있다. 대상체는 불연속적 기간(예를 들어, 1 개월, 2 개월, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월, 10 개월, 11 개월, 또는 12 개월) 동안 또는 질환 또는 질병이 완화될 때까지 치료받을 수 있거나, 치료는 치료되는 질환 또는 질병의 중증도 및 본질에 따라 만성(예를 들어, 대상체의 일생 동안)일 수 있다. 예를 들어, PNH로 진단되고 본원에 개시된 조성물로 치료받는 대상체는 초기 또는 후속 치료 라운드가 피로, 쇠약, 숨가쁨, 멍 또는 출혈이 쉬움, 재발성 감염, 중증 두통, 혈전, 및 출혈 조절의 어려움, 또는 대상체의 세포 또는 혈청 중 C3 mRNA의 수준 또는 C3 단백질 수준의 저하와 같은 PNH와 관련된 증상 중 임의의 하나의 저하를 포함하는 치료적 이점을 이끌어내지 못하는 경우 1 회 이상(예를 들어, 1 회, 2 회, 3 회, 4 회, 5 회, 6 회, 7 회, 8 회, 9 회, 10 회 이상)의 추가 치료를 받을 수 있다.
- [0286] **키트**
- [0287] 본 개시는 또한 (a) 본원에 기재된 세포 또는 대상체에서 C3의 수준 및/또는 활성을 저하시키는 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드) 작용제 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 및 선택적으로 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물 포함하는 키트를 특징으로 한다. 키트는 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드(들)(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드(들))를 인코딩하는 벡터 또는 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드(들)(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드(들))를 인코딩하는 벡터를 포함하는 세포를 함유할 수 있다. 키트는 또한 본원에 기재된 방법 중 임의의 것을 수행하기 위한 지침서가 있는 패키지 삽입물을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 키트는 (a) 본원에 기재된 세포 또는 대상체에서 C3의 수준 및/또는 활성을 저하시키는 올리고뉴클레오티드(예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드) 작용제를 포함하는 약학적 조성물, (b) 추가의 치료제, 및 (c) 본원에 기재된 방법 중 임의의 것을 수행하기 위한 지침서가 있는 패키지 삽입물을 포함한다.
- [0288] **실시예**
- [0289] 하기 실시예는 단지 예시를 위한 것이며, 어떠한 방식으로든 본 개시를 제한하려는 것이 아니다.
- [0290] **실시예 1: RNAi 올리고뉴클레오티드의 제조**
- [0291] *올리고뉴클레오티드 합성 및 정제*
- [0292] 이 실시예 및 전술한 실시예에 기재된 RNAi 올리고뉴클레오티드는 본원에 기재된 방법을 이용하여 화학적으로

합성하였다. 일반적으로, RNAi 올리고뉴클레오티드를, 공지된 포스포라미다이트 합성(예를 들어, 문헌[Hughes 및 Ellington (2017) Cold Spring Harb Perspect Biol. 9(1):a023812; Beaucage S.L., Caruthers M.H., *Studies on Nucleotide Chemistry V: Deoxynucleoside Phosphoramidites—A New Class of Key Intermediates for Deoxypolynucleotide Synthesis*, Tetrahedron Lett. 1981;22:1859-1862. doi: 10.1016/S0040-4039(01)90461-7] 참조)을 이용하는 것 이외에, 19mer 내지 23mer siRNA에 대해 기재된 바와 같은 고상 올리고뉴클레오티드 합성 방법(예를 들어, 문헌[Scaringe 등 (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:5433-5441 및 Usman 등 (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109:7845-7845] 참조; 또한, 미국 특허 제5,804,683호; 제5,831,071호; 제5,998,203호; 제6,008,400호; 제6,111,086호; 제6,117,657호; 제6,353,098호; 제6,362,323호; 제6,437,117호 및 제6,469,158호 참조)을 이용하여 합성하였다.

[0293] 19mer 코어 서열을 갖는 RNAi 올리고뉴클레오티드를 25mer 센스 가닥 및 27mer 안티센스 가닥을 갖는 작제물로 포맷하여 RNAi 기구에 의한 가공을 가능하게 하였다. 19mer 코어 서열은 C3 mRNA에서의 영역에 상보적이었다.

[0294] 개별 RNA 가닥을 표준 방법(Integrated DNA Technologies; 코럴빌, IA)에 따라 합성하고 HPLC 정제하였다. 예를 들어, RNA 올리고뉴클레오티드를 고상 포스포라미다이트 화학을 사용하여 합성하고, 표준 기법(Damha & Olgivie (1993) *Methods Mol. Biol.* 20:81-114; Wincott 등 (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:2677-2684)을 사용하여 NAP-5 컬럼(Amersham Pharmacia Biotech; 피스카터웨이, NJ)에서 탈보호 및 탈염시켰다. 올리고머를 15 min 스텝 선형 구배를 사용하여 Amersham Source 15Q 컬럼(1.0 cm × 25 cm; Amersham Pharmacia Biotech)에서 이온-교환 고성능 액체 크로마토그래피(IE-HPLC)를 사용하여 정제하였다. 구배는 90:10 완충제 A:B 내지 52:48 완충제 A:B로 다양하였고, 여기서 완충제 A는 100 mM 트리스 pH 8.5이고, 완충제 B는 100 mM 트리스 pH 8.5, 1 M NaCl이었다. 260 nm에서 샘플을 모니터링하고, 전장 올리고뉴클레오티드 중에 상응하는 피크를 수집하고, 푸울링하고, NAP-5 컬럼 상에서 탈염시키고, 동결 건조시켰다.

[0295] 각각의 올리고머의 순도를 Beckman PACE 5000(Beckman Coulter, Inc.; 풀러턴, CA)에서 모세관 전기영동(CE)에 의해 결정하였다. CE 모세관은 100 μm의 내경을 가지며 ssDNA 100R 겔(Beckman-Coulter)을 함유하였다. 전형적으로, 약 0.6 nmole의 올리고뉴클레오티드를 모세관 내로 주입하고, 444 V/cm의 전기장에서 작동시키고, 260 nm에서의 UV 흡광도로 검출하였다. 변성 트리스-보레이트-7 M-요소 실험 완충제를 Beckman-Coulter로부터 구입하였다. 후술되는 실험에 사용하기 위해 CE에 의해 평가된 바와 같이 적어도 90% 순수한 올리고리보뉴클레오티드를 얻었다. 제조업체의 권장 프로토콜에 따라 VOYAGER-DE™ BIOSPECTROMETRY™ Work Station(Applied Biosystems; 포스터 시티, CA)에서 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 비행시간(MALDI-TOF) 질량 분광법에 의해 화합물 동일성을 확인하였다. 모든 올리고머의 상대 분자 질량을 얻었으며, 이는 대개 예상 분자 질량의 0.2% 이내였다.

[0296] *듀플렉스의 제조*

[0297] 100 mM 아세트산칼륨, 30 mM HEPES, pH 7.5로 이루어진 듀플렉스 완충제에 단일 가닥 RNA 올리고머를 (예를 들어, 100 μM 농도로) 재현탁시켰다. 상보적 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 등몰량으로 혼합하여, 예를 들어, 50 μM 듀플렉스의 최종 용액을 수득하였다. 샘플을 RNA 완충제(IDT)에서 5'에 대해 100°C까지 가열하고, 사용 전에 실온까지 냉각되게 하였다. RNAi 올리고뉴클레오티드를 -20°C에서 저장하였다. 단일 가닥 RNA 올리고머를 동결 건조시키거나, 뉴클레아제가 없는 물에 -80°C에서 저장하였다.

[0298] **실시예 2: C3-표적화 RNAi 올리고뉴클레오티드의 생성**

[0299] *C3 mRNA 표적 서열의 확인*

[0300] 보체는 항체 복합체가 활성화를 촉발시키는 보체 고전 경로(CCP)를 포함하는 몇몇 상이한 경로에 의해 활성화될 수 있는 엄격하게 조절된 효소 캐스케이드이다. 어느 경로가 과정을 시작하는지에 관계없이, 보체 활성화는 캐스케이드의 C3에서 수렴된다. 일단 활성화되면, C3은 절단되어 이펙터 분자 C3a 및 C3b를 형성하여, 염증, 조직에서의 C3b의 침착, 및 말단 보체 활성화 및 추가 조직 손상을 야기한다.

[0301] C3 발현의 RNAi 올리고뉴클레오티드 저해제를 생성하기 위해, 컴퓨터-기반 알고리즘을 사용하여 RNAi 경로에 의한 C3 발현의 저해를 검정하기에 적합한 C3 mRNA 표적 서열을 컴퓨터로 확인하였다. 각각이 인간 C3 mRNA의 적합한 C3 표적 서열(표 3 참조)에 대한 상보성 영역을 갖는 300 개 초과와 RNAi 올리고뉴클레오티드 가이드(안티센스) 가닥 서열을 제조하고, C3 발현 저해에 대해 시험관내에서 검정하였다. 이들 RNAi 올리고뉴클레오티드로부터, 9 개의 서브세트(표 4 참조)를 추가 연구를 위해 선택하였다. 알고리즘에 의해 확인된 9 개의 가이드 서열의 서브세트는 또한 원숭이 C3 mRNA의 상응하는 C3 표적 서열(SEQ ID NO: 67; 표 3)에 상보적이었다. 뉴클레

오티드 서열 유사성을 갖는 상동성 C3 mRNA 표적 서열에 대한 상보성 영역을 포함하는 C3 RNAi 올리고뉴클레오티드는 상동성 C3 mRNA를 표적화하는 능력을 갖는 것으로 예측된다.

[0302] [표 3]

[0303] 인간 및 원숭이 C3 mRNA의 서열

종	참조 서열 번호	SEQ ID NO
인간 (Hs)	NM_000064.4	12
사이노몰구스 원숭이 (Mf)	XM_005587719.2	67

[0304]

[0305] 실시예 3: 시험관내에서 C3 발현을 저해하기 위한 RNAi 올리고뉴클레오티드의 확인

[0306] C3 mRNA를 저하시키기 위해 실시예 1 및 실시예 2에 기재된 바와 같이 생성된 RNAi 올리고뉴클레오티드(dsiRNA 올리고뉴클레오티드로서 포맷됨)의 활성을 시험관내 세포-기반 검정을 사용하여 측정하였다. 간략하게, 내인성 C3을 발현하는 HepG2 인간 간 세포를 다중-웰 세포-배양 플레이트의 개별 웰에 나타낸 바와 같이 1 nM의 RNAi 올리고뉴클레오티드(도 3a)로 또는 도 3a에서 스크리닝된 RNAi 올리고뉴클레오티드의 서브세트 2 개의 상이한 농도(0.1 nM 및 1 nM)(도 3b)에서 형질감염시켰다. 세포를 형질감염시킨 후 24 hr 동안 유지한 다음, 형질감염된 세포로부터의 C3 mRNA의 수준을 TAQMAN®-기반 qPCR 검정을 사용하여 결정하였다. 2 개의 RT-qPCR 검정인 3' 검정 및 5' 검정을 사용하여 각각 HEX 및 FAM 프로브에 의해 측정된 바와 같은 mRNA 수준을 결정하였다. RT-qPCR에 의해 결정된 바와 같은 C3 mRNA 수준의 저해에 기초하여 추가의 생체내 분석을 위해 RNAi 올리고뉴클레오티드 후보의 서브세트를 선택하였다.

[0307] 실시예 4: 인간 C3 cDNA를 발현하는 마우스(HDI 마우스)에서 RNAi 올리고뉴클레오티드의 스크리닝

[0308] 실시예 3으로부터의 RNAi 올리고뉴클레오티드 후보(또는 "화합물")의 서브세트를 인간 C3 cDNA를 발현하는 마우스에서 스크리닝하였다. 인간 C3 cDNA를 발현하는 벡터로 형질감염된 CD-1 마우스에 0.5 mg/kg 또는 1 mg/kg의 선택된 화합물(화합물 A 내지 화합물 I)의 단회 피하 용량을 투여하였다. 특정 프로브를 사용하여 RT-qPCR에 의해 결정된 바와 같이 간 균질액으로부터의 인간 C3 mRNA 수준의 평가를 위해 4 일 후에 동물을 희생시켰다. 형질감염된 마우스에서 적어도 50% 녹다운 역가를 나타낸 화합물을 사이노몰구스 마카크에서의 시험을 위해 선택하였다. 9 개의 화합물의 서브세트(즉, 화합물 A, 화합물 B, 화합물 C, 화합물 D, 화합물 E, 화합물 F, 화합물 G, 화합물 H, 및 화합물 I)의 생체내 스크리닝 결과는 도 4b 및 도 4c에 도시되어 있고, 이들의 상응하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 표 4 및 도 4a에 요약되어 있다. 데이터는 PBS 처리된 마우스 대비 간에서의 잔여 C3 mRNA의 백분율로 표현된다.

[0309] [표 4]

[0310] 화합물 A 내지 화합물 I의 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 요약

화합물	센스 가닥 SEQ ID NO:	변형이 있는 센스 가닥 SEQ ID NO:	안티센스 가닥 SEQ ID NO:	변형이 있는 안티센스 가닥 SEQ ID NO:
A	1	37	3	38
B	4	39	6	40
C	17	41	18	42
D	18	43	20	44
E	21	45	22	46
F	23	47	24	48
G	25	49	26	50
H	27	51	28	52
I	29	53	30	54

[0311]

[0312] 실시예 5: 사이노몰구스 마카크에서 RNAi 올리고뉴클레오티드의 스크리닝

[0313] 실시예 4, 표 4 및 도 4a에 기재된 바와 같이, 마우스 스크리닝 동안 사전 선택된 모든 화합물 A 내지 화합물 I를 4 mg/kg의 화합물 A 내지 화합물 I의 단회 피하 투여 후 C3 mRNA 침묵의 지속기간 동안 사이노몰구스 마카크(NHP)에서 시험하였다. 모든 시험된 동물(n=5/화합물)의 간 생검을 투약 전 및 주사 후 28 일차 및 56 일차에

수집하였다. 도 5에 입증된 바와 같이, RT-qPCR에 의해 결정된 바와 같이 정규화된 기준선 수준 및 시간-매칭 PBS 대조군과 비교하여 시험된 대부분의 화합물에 대해 간 C3 mRNA 수준의 적어도 50% 저하가 있었다. 다회용량 연구에서 시험을 위해 단회 투여 후 사이노물구스 마카크의 간에서의 C3 mRNA의 녹다운 수준에 기초하여 2 개의 주요 화합물(화합물 A 및 화합물 B)을 선택하였다.

[0314] 다회 용량 NHP 연구에서 추가 평가를 위해 단회 용량 연구로부터 화합물 A 및 화합물 B를 선택하였다. 사이노물구스 마카크에게 총 4 회 용량으로 0 일차, 28 일차, 56 일차, 및 84 일차에 1 mg/kg 또는 2 mg/kg을 피하 투약하였다. RT-qPCR에 의한 간 C3 mRNA 수준의 평가를 위해 투약 전 및 초기 처리 후 28 일차, 56 일차 및 112 일차에 간 생검을 수집하였다(도 6a). C3 ELISA 키트(도 6b)에 의한 C3 단백질 수준, WIESLAB® AP 검정(도 8)에 의한 및 토끼 적혈구의 용혈(도 9)에 의한 보체 활성의 평가를 위해 투약 전, 초기 용량 후 1 일차, 14 일차, 28 일차, 42 일차, 56 일차, 70 일차, 84 일차, 98 일차 및 112 일차에 혈청 샘플을 수집하였다. C3 간 mRNA, C3 혈청 단백질 및 기능 검정으로부터 대조군으로서 PBS-처리 동물을 사용하였다. 화합물 A 또는 화합물 B를 이용한 사이노물구스 마카크의 다중 처리는, 도 6a, 도 6b, 도 8, 및 도 9에 각각 도시된 바와 같이, 화합물 A 및 화합물 B의 다회 투여 후 간에서의 C3 mRNA 침묵 기간 지속, 혈청 중 순환 C3의 유의한 저하, 대체 경로 보체 활성의 95% 초과 저하, 및 용혈 검정에서의 토끼 적혈구 용해의 완전한 저해를 야기하였다.

[0315] 화합물 A 및 화합물 B의 역가를 단회 및 다회용량 NHP 연구 둘 모두에 대한 28 일차 결과를 조합함으로써 계산하였다. 화합물 A(0.65 mg/kg) 및 화합물 B(0.55 mg/Kg)에 대한 대략적인 ED₅₀을 두 화합물 모두에 대해 생성된 용량-반응 곡선으로부터 계산하였다(도 7).

[0316] **실시예 6: CD-1 마우스에서 C3 발현에 대한 화합물 J의 약동학적 및 약력학적 연구**

[0317] CD-1 마우스를 화합물 J(화합물 A에 대한 무린 대용물)로 처리하여 화합물 J 투여의 결과로서 마우스에서 간 C3 mRNA 녹다운의 퍼센트 및 혈청 C3 단백질 수준을 평가하였다. 화합물 J 투여의 결과로서 간 C3 mRNA의 녹다운 퍼센트는 RT-qPCR을 사용하여 측정하였다. 혈청 중 C3의 양은 마우스 C3 ELISA 검정을 사용하여 측정하였다. 마우스는 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 또는 6 mg/kg의 화합물 J의 단회 피하 용량을 제공받았다. 화합물 J의 단회 투여는, 6 mg/kg 용량을 제공받은 동물로부터의 간에서 C3 mRNA가 90% 넘게 저하되는(n=5 마리 마우스/시점), 간 C3 mRNA의 용량-의존적 간 C3 mRNA 녹다운 백분율을 나타냈다. mRNA 녹다운의 최하점은 도 10a에 도시된 바와 같이 6 mg/Kg 용량 후 3 일 내지 14 일이었다. CD-1 마우스의 혈청 중 C3 단백질의 백분율을 연구 과정에 걸쳐 측정하였고, 이는 그에 상응하여 억제되었다(도 10b).

[0318] 6 mg/kg의 화합물 J의 단회 피하 용량이 투여된 CD-1 마우스의 혈장, 간, 신장, 및 비장 조직에서 화합물 J의 양을, 용량을 제공받은 후 672 시간의 기간에 걸쳐 스템 루프-qPCR을 사용하여 측정하였다(도 11). 약동학적 분석은 화합물 J의 가장 높은 노출이 간, 및 이어서 비장, 신장, 및 혈장에서 있었음을 나타냈다(도 11).

[0319] 70 일 기간에 걸쳐 수행된 다회용량 연구에서, C3 mRNA 퍼센트를 RT-qPCR을 사용하여 측정하였고, 혈청 중 C3 단백질의 양을 마우스 C3 ELISA 검정에 의해 측정하였으며, 여기서 CD-1 마우스는 도 12a 및 도 12b에 각각 도시된 바와 같이 0 일차, 14 일차, 28 일차, 및 42 일차에 1 mg/kg 또는 6 mg/kg의 화합물 J의 4 회 용량을 제공받았다. 이러한 요법은 각각 간 C3 mRNA 및 혈청 단백질 수준의 약 75% 및 95% 초과 녹다운을 초래하였다. 간 생검 및 혈청 수집을 초기 용량 후 3 일차, 14 일차, 17 일차, 28 일차, 31 일차, 42 일차, 45 일차, 56 일차, 및 70 일차에 수행하였다. 1 mg/kg의 4 회 용량 후 화합물 J의 간 및 혈장 농도를 도 13a 및 도 13b에 각각 도시된 바와 같이 스템 루프 qPCR(SL-qPCR)을 사용하여 간 생검 및 혈장 샘플로부터 분석하였다. PBS-처리 CD-1 마우스를 C3 간 mRNA와 C3 혈청 단백질 수준 둘 모두에 대한 대조군으로 사용하였다.

[0320] 이러한 다회용량 연구는 화합물 J(화합물 A에 대한 무린 대용물)가 70 일의 과정에 걸쳐 지속된 간 C3 mRNA의 용량-의존적 녹다운을 나타냈음을 보여주었다. 순환 C3 단백질 수준의 저하는 간에서 관찰된 C3 mRNA의 저하에 상응하였다. 또한, 투약받은 동물로부터의 화합물 J의 혈장 및 간 농도는 격주 투약(1 mg/kg) 시 화합물 J의 축적을 나타내지 않았다(각각 도 13a 및 도 13b).

[0321] **실시예 7: 루푸스 신염 모델인 NZB/W F1 마우스에서 C3 발현에 대한 화합물 J의 효과**

[0322] NZB/W F1 루푸스 마우스 모델을 사용하여 화합물 J로 질환 모델에서 기전 증명을 시험하였다. NZB/W F1 동물에게 0.5 mg/kg, 3 mg/kg, 또는 6 mg/kg 용량의 화합물 J를 21 주령에 시작하여 4 주마다 피하 투여하였다(n=10/그룹). PBS-처리 동물을 음성 대조군으로 사용하고, CD1-마우스로부터의 신장을 비질환 대조군으로 사용하였다. 37 주령에, C3 및 프로퍼딘 사구체 침착을 화합물 J-처리된 동물 및 PBS-대조군 동물로부터의 신장의 면역형광 영상화에 의해 평가하였다(도 14). 29 주령에, 간 C3 mRNA의 퍼센트를 RT-qPCR을 사용하여 측정하고(도 15a),

혈청 중 C3 단백질의 양을 화합물 J의 각각의 용량 수준에 대해 마우스 C3 ELISA 검정을 사용하여 정량화하였다 (도 15b). 화합물 J를 이용한 다회 용량 처리 후, 화합물 J-처리 동물로부터 관찰된 C3 및 프로퍼딘 사구체 침착의 용량 의존적 저하가 있었다. 화합물 J를 이용한 NZB/W F1 마우스의 다회용량 처리는 16 주의 과정에 걸쳐 지속된 간 C3 mRNA의 용량-의존적 녹다운을 나타냈다. 순환 C3 단백질 수준의 저하(도 15a)는 간에서 관찰된 C3 mRNA의 저하(도 15b)에 상응하였다.

[0323] ELISA 검정에 의해 순환 IgG 면역 복합체(CIC)를 측정하기 위해 29 주령 및 37 주령에 각각 화합물 J를 이용한 처리 8 주 및 16 주 후 혈청 샘플을 수집하였다(도 16a 및 도 16b). 화합물 J를 이용한 다회 용량 처리 후, PBS-처리 대조군으로부터 관찰된 CIC 수준과 비교하여 C3 발현의 간 녹다운에 의한 순환 면역 복합체 수준의 증가는 없었다.

[0324] **실시예 8: 루푸스 신염 모델인 MRL/lpr 마우스에서 C3 발현에 대한 화합물 J의 효과**

[0325] MRL/lpr 루푸스 마우스 모델을 사용하고 화합물 J로 처리하였다. 마우스는 6 mg/kg의 화합물 J의 다회 용량을 제공받았다. 도 17은 6 mg/kg의 화합물 J의 다회 용량으로 처리된 MRL/lpr 마우스의 신장으로부터 C3 사구체 침착의 저하를 보여준다. 도 17에 도시된 바와 같이 8 주령부터 16 주령까지 2 주마다 6 mg/kg의 화합물 J의 피하 용량으로 처리된 동물의 신장 샘플로부터 프로퍼딘 침착물의 저하가 또한 관찰되었다.

[0326] **실시예 9: 보체 조절장애 모델인 Cfh^{-/-} 마우스에서 C3 발현에 대한 화합물 J의 효과**

[0327] 보체 인자 H(Cfh^{-/-})가 결핍된 마우스에게 4 개월령부터 8 개월령까지 0.5 mg/kg, 3 mg/kg, 또는 6 mg/kg의 화합물 J의 월 4 회 용량을 투여하였다. 모든 처리군으로부터의 신장을 화합물 J의 마지막 용량 4 주 후에 수집하고, 면역형광 분석을 수행하여 CFH^{-/-} 처리 동물의 사구체에서 C3 및 프로퍼딘 침착 둘 모두를 가시화하였다. 도 18은 증가하는 다회 용량의 화합물 J로 처리된 CFH^{-/-} 마우스의 신장으로부터의 C3 사구체 침착의 용량 의존적 저하를 보여준다. 도 18에 도시된 바와 같이 16 주령부터 32 주령까지 4 주마다 피하 용량의 화합물 J로 처리된 동물의 신장 샘플로부터 프로퍼딘 침착의 저하가 또한 관찰되었다. 간 C3 mRNA의 퍼센트를 RT-qPCR을 사용하여 측정하였다(도 19). 처리는 신장에서 C3 및 프로퍼딘 침착을 제거하였다. 또한, 화합물 J를 이용한 처리는 또한 이들 마우스에서 혈청 C5 수준을 정규화하였다(C5 소비는 이 모델에서 보체 조절장애의 특징임).

[0328] **실시예 10: CAIA-유도 관절염 마우스 모델에서 C3 발현에 대한 화합물 J의 효과**

[0329] 류마티스 관절염에 대한 단순 모델인 콜라겐 항체-유도 관절염(CAIA) 유도 관절염 마우스 모델을 사용하여 관절염과 관련된 증상을 치료하는 데 있어서 화합물 J의 효과를 연구하였다. 0 일차에 마우스에 콜라겐 항체를 투여하고, 이어서 3 일차에 LPS 부스터를 투여함으로써 CAIA-유도 관절염 마우스 모델을 생성하였다. 화합물 J를 예방 연구와 치료 연구 둘 모두에서 시험하였다. 3 mg/kg 또는 6 mg/kg의 화합물 J를 동물에게, 예방 연구의 경우 -7 일차에 투약하거나(도 20a), 치료 연구의 경우 질환 발병 후 5 일차에 투약하였다(도 20b). 뒷발 염증을 10 일차에 시각적으로 분석하였고, 예방 연구와 치료 연구 둘 모두로부터의 결과가 각각 도 21a 및 도 21b에 도시되어 있다. 화합물 J를 이용한 예방적 처리는 이 모델의 특유의 특징인 뒷발의 종창을 예방하였다(도 21a). 화합물 J를 이용한 치료적 처리는 PBS-처리 대조군 동물과 비교할 때 단회 용량 후 임상 질환 징후를 완전히 역전시켰다(도 21b).

[0330] 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색은 뒷발 및 무릎의 생검에서 수행하였고, 6 mg/kg의 화합물 J의 단회 용량으로, 예방적으로는 3 회 용량으로(도 22a) 또는 치료적으로는 단회 용량으로(각각 도 22b 및 도 24a) 처리된 마우스에서 국소 단핵 세포 침윤의 저하를 나타냈다. 추가로, 림프구(CD45 양성 세포), 백혈구(CD11b 양성 세포) 및 대식세포(F4/80 양성 세포) 마커 염색을 각각 도 25, 도 26, 및 도 27에 도시된 바와 같이 생검 샘플에 대해 수행하여, 6 mg/kg의 화합물 J를 이용한 치료적 처리의 결과로서 국소 염증의 저하를 나타냈다. 생검 샘플을 또한 사프란인 O로 염색하여 CAIA-유도 관절염 마우스 모델의 무릎에서 연골을 가시화하였다. 6 mg/kg의 화합물 J로 처리된 동물은 예방적으로(도 23) 또는 치료적으로(도 24b) 처리될 때 PBS-처리 마우스와 비교하여 연골 미란의 현저한 저하를 나타냈다. 6 mg/kg 화합물 J로 처리한 및 처리하지 않은 CAIA-유도 관절염 마우스에 대한 염증의 국소 부위에서의 보체 발현을 평가하기 위해 생검 샘플에 대해 C3 및 CD45 mRNA에 대한 인 시추 혼성화를 이용한 실험을 수행하였고, 이는 도 28에 도시되어 있다. 화합물 J를 이용한 C3의 간 녹다운은 대조군으로서 PBS-처리 동물과 비교하여 화합물 J를 이용한 치료적 처리로 림프구(CD45 양성 세포)의 침윤 및 국소 C3 mRNA 발현을 저하시켰다.

[0331] **실시예 11: 다발성 경화증 마우스 모델에서 C3 발현에 대한 화합물 J의 효과.**

[0332] 신경염증 및 탈수초의 면역-매개 기전을 조사하는 데 널리 사용되는 모델인 수초 회소돌기아교세포 당단백질(MOG)-유도 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE) 마우스 모델을 6 mg/kg 용량의 화합물 J로 예방적으로 처리하였다(n=2 실험). 화합물 J를 이용한 처리 후 간 C3 mRNA 수준뿐만 아니라 혈청 중 C3 단백질을 도 31a 및 도 31b에 도시된 바와 같이 각각 RT-qPCR 및 마우스 C3 ELISA 검정을 이용하여 평가하였다. 유사하게, PBS로 처리된 C3 결핍 마우스 및 MOG-유도 EAE C3 결핍 마우스 좌상(strain)과 비교하여 6 mg/kg 투여량의 화합물 J로 처리된 후 MOG-유도 EAE 마우스의 혈청 중 C3의 양뿐만 아니라 화합물 J를 이용한 처리 후 잔여 C3 mRNA의 퍼센트를 평가하였다. 화합물 J를 이용한 C3의 간 녹다운은 수행된 두 실험 모두에서 질환의 중증도를 저하시켰다(도 29). 화합물 J 처리에 의한 간 녹다운으로 관찰된 중증도의 저하는 C3 결핍 동물(전체적 녹아웃)에서의 임상 관찰과 유사하였다.

[0333] 요추 척수 샘플을 또한 화합물 J로 처리된 MOG-유도 EAE 마우스로부터 획득하였다. 도 30에 도시된 바와 같이 수초화뿐만 아니라 단핵 세포 침윤을 가시화하기 위해 척수 샘플에서 H&E 염색과 함께 특수 패스트 블루 염색을 수행하였다. 특수 패스트 블루 척수 샘플을 도 30에 도시된 바와 같이 6 mg/kg의 화합물 J, PBS, 및 C3 결핍 마우스로 처리된 질환 동물 간에 비교하였다. 화합물 J로 처리된 MOG-유도 동물은 MOD-유도 EAE C3-결핍 마우스에서 관찰된 수준과 유사한 탈수초의 저하 및 면역 세포 침윤의 예방을 나타냈다.

[0334] 단백질질 단백질(PLP)-유도 EAE 모델에서 유사한 결과가 관찰되었다. 질환 중증도는 C3 siRNA 처리로 저하되었지만, 이 동물 모델의 특징인 재발을 예방하기에는 충분하지 않았다.

[0335] **실시예 12: 유리 흡수, 분포, 대사 및 배설(ADME) 연구**

[0336] PBS(n=18) 또는 단회 피하(SC) 주사를 통해 3 mg/kg, 10 mg/kg, 또는 100 mg/kg의 화합물 A(n=39/코호트), 또는 단회 정맥내(IV) 주사를 통해 3 mg/kg(n=36)이 투여된 수컷 CD-1 마우스에서 약동학적 및 생체분포 연구를 수행하였다. 생체이용률은 3 mg/kg의 IV 대 SC 용량 후 AUC_{last}의 비교에 기초하여 대략 18%였다. 그러나, 간 노출은 3 mg/kg IV 및 SC 코호트 간에 유사하였다. 3 mg/kg 용량 그룹과 비교하여 혈장 노출은 10 mg/kg 그룹의 경우 대략적으로 용량-비례 방식으로 및 100 mg/kg 그룹의 경우 용량-비례 방식보다 크게 증가하였다. C_{max} 및 AUC_{last}에 기초한 간 노출은 간으로의 분포 과정의 포화를 나타내는 3 mg/kg 용량 그룹과 비교하여 10 mg/kg에서 대략 용량 비례 방식으로 및 100 mg/kg에서 용량 비례 방식보다 적게 증가하였다. 간에서의 제거 반감기는 2.1 일 내지 4 일의 범위였다.

[0337] **실시예 13: 화합물 A의 혈소판 활성화**

[0338] 화합물 A로 자극된 인간 전혈에서 혈소판 활성화의 평가는 혈소판 활성화를 유도하지 않았다. 전혈 샘플(5 명의 남성 공여자 및 5 명의 여성 공여자)을 10 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 또는 300 µg/mL의 화합물 A 또는 PBS로 자극하였다.

[0339] **실시예 14: 사이노몰구스 원숭이에서 화합물 A의 내약성**

[0340] 화합물 A의 투약의 내약성을 나이브 수컷 및 암컷 사이노몰구스 원숭이에서의 연구에서 평가하였다. 0 일차에 인산염 완충 식염수(PBS), n=12) 또는 1.5 mg/kg(저) 또는 3 mg/kg(고) 용량 수준의 화합물 A의 SC 용량을 동물에게 투여하고(n=6/코호트), 간 생검을 21 일차에 수행하여 간 C3 녹다운의 수준을 결정하였다. 이러한 분석에 기초하여, 28 일차, 56 일차 및 84 일차에 투약 수준을 3 mg/kg(저용량의 경우) 또는 6 mg/kg(고용량의 경우)으로 조정하여 각각 대략 75% 및 90%의 C3 mRNA 녹다운을 시도하였다. 혈액 샘플을 -21 일차, -7 일차, -3 일차, 0 일차, 28 일차, 56 일차 및 112 일차에 수집하고, 혈청학 및 혈액 또는 분변 PCR에 의한 잠복 바이러스 및/또는 감염의 잠재적 재활성화에 대하여 모니터링하기 위해 총 28 개의 병원체의 바이러스, 박테리아 및 기생충 시험을 연구 전, 56 일차에 및 부검 시 수행하였다. 감염의 잠재적 증거를 결정하기 위해 임상 병리학자에 의한 평가를 위한 말기 부검(terminal necropsy)을 수행하였다. CBC, 응고, 임상 화학 및 소변검사와 함께 혈청 중 순환 C3 단백질 수준의 중간 측정을 또한 수행하였다. 저용량 또는 고용량의 화합물 A를 투약한 후 49 일차 내에, 순환 C3 단백질 수준의 대략 80% 저하와 함께 각각 대략 75% 또는 80%의 간 C3 mRNA 녹다운이 달성되었다. 간 C3 mRNA 및 C3 단백질 수준의 이들 저하는 연구가 종료되었을 때 112 일차까지 평가된 모든 시점에 지속되었다. 부검 시 육안 또는 현미경 소견은 없었고 예정되지 않은 사망은 없었다. 체중, 간 기능 시험, 혈구 수, 혈액 화학, 및 지질 대사 파라미터는 만성 화합물 A 처리에 의해 영향을 받지 않았고, PBS가 투약된

코호트와 비교하여 처리된 원숭이에서 증가된 병원성 기생충, 박테리아 또는 바이러스 감염의 증거는 없었다.

[0341]

실시예 15: CD-1 및 NZB/W F1 마우스에서 화합물 J의 내약성

[0342]

화합물 J의 만성 투약의 내약성을 CD-1 및 NZB/W F1 마우스에서 평가하였다. CD-1 마우스에 PBS 또는 화합물 J(1 mg/kg 또는 100 mg/kg)의 SC 용량을 매달 총 4 회 투여하고, 마지막 용량 1 개월 후에 희생시키고, 바이러스 또는 박테리아 감염 및 조직학적 변화의 증거에 대해 맹검 병리학자에 의해 평가하였다. 처리-관련 조직병리학적 변화 또는 증가된 감염은 관찰되지 않았다. 유사하게, NZB/W F1 마우스는 4 주마다 1 mg/kg 또는 6 mg/kg 화합물 J를 28 주령부터 40 주령까지 투여받고 44 주령에 말기 희생을 거치거나, 24 주령부터 내지 36 주령까지 투여받고 40 주령에 말기 희생을 거쳤다. 감염 증가의 증거는 바이러스, 박테리아 병원체 및 기생충의 패널에 대한 혈청학적 및 PCR 시험에 의해 검출되지 않았고, 처리군에 대해 맹검인 수의 병리학자에 의해 평가된 말기 부검에서는 임의의 처리-관련 변화가 확인되지 않았다.

[0343]

실시예 16: 사이노몰구스 원숭이에서 화합물 A의 안전성 약리학 연구

[0344]

화합물 A를 사이노몰구스 원숭이에서 피하 안전성 약리학 연구에서 평가하였다. 4 마리의 동물에게 7 일마다 1 회 PBS, 또는 증가하는 단회 용량의 화합물 A(30 mg/kg, 100 mg/kg 및 300 mg/kg 용량 수준)를 투여하였고, 각각의 투약 시기에 대해 동일한 4 마리의 동물을 사용하였다. 심혈관(예를 들어, ECG, 혈압, 심박수 등), 호흡(호흡수) 및 신경계(기능 관찰 종합 평가(functional observational battery)) 중점의 평가뿐만 아니라 임상 평가를 포함하는 안전성 약리학을 이 연구 동안 수행하였다. 임의의 용량 수준에서 심혈관 또는 호흡기 효과가 관찰되지 않았다. 30 또는 100 mg/kg 화합물 A에서 신경학적 효과가 관찰되지 않았다. 300 mg/kg에서, 투약 후 4 시간 및 24 시간째에 3 마리의 동물에서 약간 내지 경미한 떨림(사지 또는 전신)의 임상 관찰이 주목되었다. 300 mg/kg에서 관찰된 신경학적 관찰은 유해한 것으로 간주되었다. 따라서, 최대무독성량(no-observed-adverse-effect level; NOAEL)은 100 mg/kg인 것으로 결정하였다. 추가로, 시험관내 소핵 검정 및 시험관내 박테리아 역돌연변이 검정을 포함한 유전 독성 평가는 각각 소핵 유도 및 돌연변이유발 활성에 대해 음성이었다.

[0345]

실시예 17: 사이노몰구스 원숭이에서 화합물 A의 PK/PD 연구

[0346]

단회 용량 PK/PD 연구를 사이노몰구스 원숭이에서 수행하였다. 동물은 0 일차에 SC 용량의 PBS(대조군) 또는 단회 SC 용량 또는 IV 용량의 3 mg/kg 화합물 A를 제공받았다(그룹 당 n=5). 혈장, 소변, 및 조직에서 화합물 A 농도를 평가하였다. 간 생검을 2 일차, 35 일차, 70 일차, 112 일차, 158 일차 및 252 일차에 수행하여 간 C3 mRNA 수준(일차 약력학적 마커)을 평가하였다. 순환 C3 단백질 수준 및 보체 기능 활성은 연구 전반에 걸쳐 평가된 추가적인 PD 마커였다.

[0347]

화합물 A의 농도를 형광 검출(AEX-HPLC-FD) 방법으로 적격한 혼성화-기반 음이온 교환 고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 혈장, 간, 및 소변에서 결정하였다. 원숭이 간에서 보체 성분 3(C3) mRNA 발현의 저하를 실시 간 정량적 폴리머라제 연쇄 반응(RT-qPCR)을 이용하여 측정하였다. 원숭이 혈청 중 C3 단백질은 ELISA를 사용하여 측정하였고, 보체 기능 활성(고전 경로, 만노스-결합 렉틴 경로(MBL), 및 대체 경로)은 WIESLAB® 검정을 사용하여 측정하였다.

[0348]

시간 경과에 따른 화합물 A의 혈장 농도를 사용하여 개별 동물에 대한 비구획적 PK 프로파일을 생성하였다(그룹 평균은 도 32a에 플롯팅됨). SC 투여 후 혈장 T_{max} 범위는 1 시간 내지 6 시간이었고, IV 투여에 대한 T_{max}는 모든 동물에 대해 0.25 시간(첫 번째 수집된 시점)이었다. 화합물 A의 혈장 농도는 IV 경로와 비교하여 SC 경로의 경우 더 느린 분포 단계와 함께 2상 방식으로 감소하였다. 2상 감소는 주로 간으로의 초기 빠른 분포 단계, 및 이어서 더 느린 제거 단계를 나타낸다. 혈장 반감기는 SC 그룹에서 5 마리 동물 중 1 마리(2.51 시간) 및 IV 그룹에서 5 마리 동물 중 2 마리(평균 = 1.21 시간)에 대해 보고되었다. 나머지 동물에 대한 반감기는 말기 단계 속도 상수에 대한 허용 기준이 충족되지 않았기 때문에 보고되지 않았다. 화합물 A의 생체이용률은 AUC_{last}에 기초한 IV 용량에 비해 SC 용량에 대해 대략 28.5%였다.

[0349]

시간 경과에 따른 화합물 A의 간 농도를 사용하여 개별 동물에 대한 비구획적 PK 프로파일을 생성하였다(그룹 평균은 도 32b에 플롯팅됨). 간에서의 반감기를 SC 그룹과 IV 그룹 둘 모두의 5 마리 동물 모두에 대해 계산하였고, 각각 13 일 내지 20 일 및 20 일 내지 33 일의 범위였다.

[0350]

각각의 동물에 의해 각각의 수집 시간 간격 내에 소변으로 배설된 화합물 A의 총량을 사용하여 총 배설된 약물 및 배설된 약물 %를 계산하였다. 화합물 A의 평균 소변 배설은 SC 그룹 및 IV 그룹의 경우 각각 4.3% 및 4.8%였다.

- [0351] 3 mg/kg의 화합물 A의 단회 SC 또는 IV 투여 후, 원숭이 간에서 C3 mRNA 발현의 저하는 2 일차에 관찰되었고(SC 만), 투약 후 35 일차에 최대 저하에 도달하였다(두 용량 경로 모두에 대해 대략 70%)(도 33). 114 일차 내에 거의 기준선 수준으로 복귀하면서 시간 경과에 따른 C3 mRNA 발현의 점진적인 회복이 관찰되었다. 이러한 회복은 두 투여 경로 모두에 대해 최대 252 일차까지 유지되었다.
- [0352] 화합물 A의 단회 3 mg/kg SC 투여 후, 혈청 C3 단백질의 저하가 7 일차부터 70 일차까지 관찰되었다(도 34). 혈청 중 최대 평균 C3 단백질 수준은 투약 후 28 일째에 54.7% 감소하고, 168 일차 내에 투약 전 수준으로 회복되었다. 대조군에 비해, 단회 3 mg/kg IV 용량의 화합물 A가 투여된 동물에서 혈청 C3 단백질 수준의 저하는 없었다.
- [0353] 대조군에 비해 SC 그룹 또는 IV 그룹에서 고전 보체에 대한 효과는 없었다(도 35). 렉틴 및 대체 경로의 기능은 14 일차, 28 일차, 및 35 일차에 SC 그룹의 대조군에 비해 저하되었다. 렉틴 경로의 기능은 3 일 모두에 최소로(대략 13%) 저하된 반면(도 36), 대체 경로의 기능은 각각 14 일차, 28 일차, 및 35 일차에 87%, 85%, 및 73% 저하되었다(도 37). 경로 기능은 렉틴 경로의 경우 70 일차 및 대체 경로의 경우 168 일차 내에 기준선 수준으로 복귀하였다.
- [0354] 화합물 A의 단회 3 mg/kg SC 투여 후, 최대 mRNA 저하는 35 일차에 70%였고, C3 단백질의 최대 저하는 28 일차에 54.7%였으며, 대체 경로 활성의 최대 저하는 14 일차에 87% 이상이었다. mRNA 발현은 168 일차 내에 기준선 수준으로 회복되었고, C3 단백질 발현은 28 일차 내에 기준선으로 복귀하였고, 대체 경로 기능은 168 일차 내에 회복되었다.
- [0355] **실시예 18: CD-1 마우스 및 사이노몰구스 원숭이에서의 독성 연구**
- [0356] 마우스에서 6 개월 독성 연구 및 사이노몰구스 원숭이에서 9 개월 독성 연구를 수행하였다. 이들 연구에서 용량 수준의 범위는 가장 높은 의도된 임상 용량의 예상 노출에 비해 적어도 10 배 노출 배수를 달성하도록 선택하였다.
- [0357] 무린 연구에서, CD-1 마우스에서의 PBS 또는 화합물 A(30 mg/kg, 100 mg/kg, 또는 300 mg/kg)의 반복-용량(4 주마다; 7 회 용량) SC 투여의 잠재적 독성 및 임의의 소견의 잠재적 가역성을 8 주 회복 기간 후 평가하였다. 투약 코호트 당 10 마리의 수컷 및 10 마리의 암컷 마우스를 연구의 투약 부분 동안 평가하고, 6 마리의 수컷 및 6 마리의 암컷을 회복 단계 동안 유지하였다. 또한, 화합물 A의 독성동태학적 특성을 하위 연구에서 결정하였다(n = 111). 30 mg/kg, 100 mg/kg, 및 300 mg/kg의 수준으로 투약된 화합물 A는 화합물 A-관련 사망률 또는 유해 소견(adverse finding) 없이 잘 관용되었다. 임상 병리학 소견은 171 일차에 최소로 증가된 알라닌 아미노 트랜스퍼라제 및 최소로 감소된 트리글리세리드를 포함하였고, 회복 기간의 말미에는 완전한 또는 부분적 가역성이 분명히 나타났다. 화합물 A-관련 비-유해 현미경 소견은 간의 최소의 또는 경미한 혼합 세포 염증, 간세포 핵세포거대증(hepatocellular karyocytomegaly), 유사분열 증가, 및 회복 안락사 시 여전히 존재하는 최소의 또는 경미한 증가된 유사분열 및 간세포 핵세포거대증과 함께 말기 안락사 시 난형 세포 증식을 포함하였다. 이들 결과에 기초하여, NOAEL은 300 mg/kg인 것으로 간주하였고, 이는 169 일차에 수컷 및 암컷에 대해 각각 760,000 hr*ng/mL 및 543,000 hr*ng/mL의 평균 AUC_{last} 값 및 160000 ng/mL 및 96400 ng/mL의 평균 C_{max} 값에 상응하였다.
- [0358] 원숭이 연구에서, 화합물 A의 반복 SC 투약(총 10 회 용량에 대해 4 주마다 0 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg)의 잠재적 독성, 및 8 주 회복 기간 후 임의의 효과의 가역성, 지속성, 또는 발생 지연을 평가하였다. 4 마리의 수컷 및 4 마리의 암컷 원숭이를 주요 투약 연구에서 각각의 용량 코호트에 포함시켰고, 2 마리의 수컷 및 2 마리의 암컷을 2 개월 회복 기간에 포함시켰다. 또한, 화합물 A의 독성동태 및 PD 특성을 결정하였다. 사이노몰구스 원숭이에 대한 9 개월 동안의 화합물 A의 반복 SC 투여는 잘 관용되었다. 화합물 A의 반복-용량 투여는 하기 파라미터에서 시험 항목-관련 변화를 초래하지 않았다: 임상 관찰, 신경학적 검사, 안과 검사, 체중, 정성적 식량 소비, 혈액학, 임상 화학, 소변검사, 사이토카인(즉, MCP-1, TNF- α , IL-8, IL-1RA, G-CSF, IFN- γ , IL-1 β , 및 IP-1), 보체 인자 Bb 및 C3a, 육안 병리학, 또는 연구의 투약 단계 동안의 기관 중량. 또한, 이 연구 동안 조기 사망은 없었고, 모든 동물은 예정된 부검까지 생존하였다. 피브리노겐의 화합물 A-관련 비-유해 증가는 100 mg/kg/용량 이상에서 발생하였다. 30 mg/kg/용량 이상에서, 간뿐만 아니라 다수의 다른 조직에서 비-유해 현미경 소견(액포/파립 대식세포)이 있었다. 관찰된 소견에 기초하여, NOAEL은 1330000 hr*ng/mL의 관련 AUC_{last} 및 70900 ng/mL의 C_{max}와 함께 300 mg/kg/용량인 것으로 결정하였다(수컷과 암컷 합산, 253 일차).

- [0359] 시험관내 소핵 검정 및 시험관내 박테리아 역 돌연변이 검정을 포함한 유전 독성 평가는 각각 돌연변이유발 활성 및 소핵 유도에 대해 음성이었다.
- [0360] 전체 데이터에 기초하여, NOAEL은 300 mg/kg인 것으로 간주된다. 매주 증가하는 용량을 이용한 연구에서 주목된 신경학적 임상 징후(예를 들어, 떨림)는 매달 투약을 이용한 9 개월 원숭이 독성 연구에서 주목되지 않았다.
- [0361] **실시예 19: AMR 모델인 사이노몰구스 원숭이에서 C3 발현에 대한 화합물 B의 효과**
- [0362] 신장 동종이식편을 제공받은 4 마리의 감염된 사이노몰구스 원숭이에서 약리학 연구를 수행하였다. 이 연구에서, 동물은 화합물 B의 SC 용량을 총 4 개월에 걸쳐 4 주마다 1 회 제공받았다.
- [0363] **실시예 20: 인간에서의 용량 범위 연구**
- [0364] 최초 인간 대상(FIH: First-In-Human) 임상 연구를 위해 보체 유발 질환이 있는 환자에서 다중 상승 용량(MAD) 코호트와 조합하여 건강한 지원자에서 단일 상승 용량(SAD) 연구를 수행하였다. 건강한 지원자 및 환자는 화합물 A를 제공받기 전에 *나이세리아 메닝지티데스(Neisseria meningitides)* 타입 A, C, W, Y, 및 B, *스트렙토코커스 뉴모니아에(Streptococcus pneumoniae)*, 및 *헤모필루스 인플루엔자(Haemophilus influenzae)* 타입 B에 대한 예방용 백신접종을 제공받았다.
- [0365] **실시예 21: 인간에서 화합물 A를 이용한 다발성 경화증 치료**
- [0366] 다발성 경화증을 앓고 있는 대상체를 화합물 A를 함유하는 약학적 조성물(예를 들어, 대상체 체중의 약 0.01 mg/kg 내지 50 mg/kg 용량)로 치료하였다. 대상체는 약 12 개월 이상의 기간 동안(예를 들어, 증상이 해소되거나 안정화될 때까지) 약 주 1 회의 빈도로, 예를 들어, 피하 주사에 의해 조성물을 투여받았다. 대략 월 1 회로 대상체의 증상 및 혈청 C3 수준을 임상외에 의해 평가하여 화합물 A의 효능을 평가하였다. 대상체의 혈청 C3은 혈청 샘플을 사용하여 정량화되고, 화합물 A가 투여되기 전 대상체의 혈청에서 확인된 C3 단백질의 양과, 또는 C3 단백질의 대조군 양 또는 정상 대상체(예를 들어, 질환이 없는 대상체)로부터의 혈청 샘플에 존재하는 C3 단백질의 양에 비해 비교될 수 있다. 화합물 A를 이용한 치료는 혈청 중 C3 단백질의 양이 감소하는, 즉, 화합물 A를 이용한 치료 전 혈청 중 C3 단백질의 양과 비교하여 적어도 10% 감소하는 경우 효과적인 것으로 결정된다. 추가로, 다발성 경화증과 관련된 대상체의 증상, 예컨대, 흐릿한 시야, 어눌한 말씨, 현기증, 따끔거림, 조절력 부족, 및 불안정한 걸음걸이는 화합물 A가 투여되기 전에 대상체가 경험하였던 증상과 비교하여, 및/또는 위약 대조군 대상체와 비교하여 대상체가 경험하는 증상 중 임의의 것 또는 그 전부의 감소가 있는지 평가하기 위해 임상외에 의해 평가될 수 있다.
- [0367] **실시예 22: 인간에서 화합물 A를 이용한 관절염 치료**
- [0368] 관절염으로 진단된 대상체를 화합물 A를 함유하는 약학적 화합물(예를 들어, 약 1.5 mg/kg의 용량)로 치료하였다. 대상체는 약 6 개월 이상의 기간 동안(예를 들어, 증상이 해소되거나 안정화될 때까지) 약 월 1 회의 빈도로, 예를 들어, 피하 주사에 의해 조성물을 투여받았다. 1 개월 또는 2 개월마다 화합물 A의 효능을 평가하기 위해 임상외에 의해 대상체를 평가하였다(예를 들어, 대상체의 증상 및/또는 혈청 C3 수준을 평가함으로써). 대상체의 혈청 C3은 대상체로부터의 혈청 샘플을 사용하여 정량화되고, 화합물 A가 투여되기 전 대상체의 혈청에서 확인된 C3 단백질의 양과, 또는 C3 단백질의 대조군 양 또는 정상 대상체(예를 들어, 질환이 없는 대상체)로부터의 혈청 샘플에 존재하는 C3 단백질의 양에 비해 비교되고/되거나, 위약-치료 환자로부터의 혈청 샘플에 존재하는 C3 단백질의 양과 비교된다. 화합물 A를 이용한 치료는 혈청 중 C3 단백질의 양이 화합물 A를 이용한 치료 전의 혈청 중 C3 단백질의 양과 비교하여 적어도 10% 감소하는 경우 효과적인 것으로 결정된다. 추가로, 통증, 강직, 종창, 발적, 및 감소된 운동 범위를 포함하여 관절염과 관련된 대상체의 증상은 화합물 A가 투여되기 전에 대상체가 경험하였던 증상과 비교하여 대상체가 경험하는 증상 중 임의의 것 또는 그 전부의 감소가 있는지 평가하기 위해 임상외에 의해 평가될 수 있다.
- [0369] **실시예 23. C3 평가 검정**
- [0370] 혈장 또는 조직에서의 화합물 A의 평가, WIESLAB[®] 보체 기능 활성 검정, 순환 C3의 평가, C3 mRNA 발현 수준, 및 약동학적 검정을 포함하는 다양한 검정은 C3 수준에 대한 화합물 A의 효과를 특징규명하기 위해 본원에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다.
- [0371] *화합물 A의 약동학적 검정*
- [0372] 마우스 및 원숭이의 혈장 중 화합물 A 또는 화합물 J의 농도를 측정하였다. 혈장 샘플(블랭크, 미지(unknown),

표준, 및 QC 샘플)을 효소적으로 처리하고, 이어서 화합물 A 또는 화합물 J의 안티센스 가닥에 대한 서열 상보성을 갖는 펩티드 핵산(PNA) 프로브와 혼성화시켰다. 샘플을 형광 검출기가 장착된 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 주입하였다. DNAPAC™ PA200 분석 컬럼을 사용하는 Shimadzu Prominence 시스템에서 구매 시스템을 사용하여 크로마토그래피 분리를 수행하였다. 형광 검출기로 436 nm(Ex) 내지 484 nm(Em)의 신호를 모니터링하였다. 대사산물의 체류 시간을 확인하기 위해, 개체 및 혼합물의 참조 샘플을 제조하고 주사하였다. 화합물 A의 피크 및 이의 예상 대사산물을 성공적으로 분리하였다. 원숭이 또는 무린 혈장 중 화합물 A 또는 화합물 J의 정량화를 각각 선형 회귀를 사용하여 수행하였다. 이 검정을, 예를 들어, 상기 기재된 바와 같이 실시예 6, 실시예 12, 및 실시예 17에 사용하였다.

[0373] WIESLAB® 보체 기능 활성 검정(CCP, CAP, CLP)

[0374] 보체 활성화의 결과로서 생성된 인간 말단 보체 복합체(C5b-9) 복합체를 검출하기 위해 신생항원에 특이적인 표지된 항체를 사용하는 WIESLAB® 보체계 스크린 검정을 사용하여 보체 고전 경로(CCP), CAP, 및 보체 렉틴 경로 활성을 평가하였다. 검정은 또한 사이노물구스 원숭이 C5b-9를 검출할 수 있다. 생성된 신생항원의 양은 개별 경로의 기능적 활성 수준에 비례하였다. 검정의 미세역가 스트립의 웰을 고전, 또는 대체, 또는 렉틴 경로의 특정 활성제로 코팅하였다. 원숭이 혈청 샘플을 각각의 경로만이 활성화되도록 보장하는 차단제를 함유하는 희석제에 희석하였다. 웰을 세척하고, C5b-9를 발현된 신생항원에 특이적인 알칼리성 포스파타제-표지된 항체로 검출하였다. 보체 활성화의 양은 405 nm에서의 흡광도에 의해 측정된 색 강도와 상관관계가 있었다. 시험 키트에 제공된 양성 대조군에 대한 값은 100% 보체 활성화로 규정하였다. 모든 측정된 값을 하기와 같이 결정된 보체 활성 퍼센트(%)로 표현하였다:

[0375]
$$[(\text{샘플} - \text{음성 대조군}) / (\text{양성 대조군} - \text{음성 대조군})] * 100$$

[0376] 이 검정은, 예를 들어, 상기 실시예 17에서 이용하였다.

[0377] 순환 C3 단백질 수준

[0378] 인간 혈청 중 보체 C3 농도의 정량적 측정을 위해 설계된 인간 보체 C3 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA) 키트(cat#Ab108823, Abcam, 케임브리지, UK)를 사용하여 사이노물구스 순환 C3 단백질 수준의 평가를 평가하였다. 원숭이 C3과 교차-반응성이 있기 때문에, 이 키트를 또한 사이노물구스 혈청 샘플에서 순환 C3 단백질의 결정에 사용하였다. 보체 C3 특이적 항체를 96-웰 플레이트 상에 사전 코팅하고 차단하였다. 표준 또는 시험 샘플을 웰에 첨가한 후, 보체 C3 특이적 비오틴화된 검출 항체를 첨가하고, 이어서 세척 완충제를 첨가하였다. 스트렙타비딘-퍼옥시다제 컨주게이트를 첨가하고, 결합되지 않은 컨주게이트를 세척 완충제로 제거하였다. 테트라메틸벤지딘(TMB)을 사용하여 스트렙타비딘-퍼옥시다제 효소 반응을 가시화하였다. 산성 정지 용액을 첨가한 후 황색으로 변하는 청색 산물을 생성하는 스트렙타비딘-퍼옥시다제에 의해 TMB를 산화시켰다. 황색 착색의 밀도는 플레이트에 포획된 보체 C3의 양에 정비례하였다. 샘플의 역-계산된 농도를 보정 표준에 의해 생성된 곡선 맞춤 회귀 프로그램에 의해 결정하였다. 이 검정은, 예를 들어, 상기 실시예 14 및 실시예 17에서 이용하였다.

[0379] C3 mRNA 발현 수준

[0380] C3 mRNA 발현의 평가를 멀티플렉스 상대 정량화 실시간 역전사효소 PCR 검정을 이용하여 사이노물구스 원숭이 간 샘플에서 결정하였다. mRNA를 동결된 간 조직으로부터 분리하고, 이어서 mRNA 정량화 및 상보적 DNA(cDNA)로의 전사를 수행하였다. cDNA는 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이소머라제 B(PPIB)로의 정규화와 함께 C3 mRNA 수준을 측정하는 qPCR 반응을 위한 주형으로서 사용하였다. 처리군에서 C3 mRNA의 정도를 비처리군 또는 투약전 군에 대비 발현의 퍼센트(PPIB mRNA 수준으로 정규화됨)로서 계산하였고, 여기서 대조군에서의 C3 mRNA 발현은 100%로 설정되었다.

[0381] 약동학적 검정

[0382] 인간 혈장 중 화합물 A의 농도를 HPLC-FD 분석 방법을 이용하여 측정하였다. 혈장 샘플(블랭크, 미지, 표준, 및 품질 관리[QC] 샘플)을 프로테이나제 K로 효소적으로 처리하고, 이어서 화합물 A의 안티센스 가닥에 대한 서열 상보성을 갖는 PNA 프로브와 혼성화시켰다. 샘플을 형광 검출기가 장착된 HPLC에 주입하였다. DNAPAC™ PA200 분석 컬럼을 사용하는 Shimadzu Prominence 시스템에서 구매 시스템을 사용하여 크로마토그래피 분리를 수행하였다. 형광 검출기로 436 nm(Ex) 내지 484 nm(Em)의 신호를 모니터링하였다. LC 구매 조건을 화합물 A의 잠재적 대사산물의 체류 시간에 기초하여 조정하고 결정하였다. 대사산물의 체류 시간을 평가하기 위해, 개체 및 혼합물의 참조 샘플을 제조하고 주사하였다. 화합물 A 및 대사산물의 피크를 분리하였다. 인간 혈장 중 화합물 A의

정량화를 선형 회귀를 사용하여 수행하였다.

[0383] 항약물 항체 검정

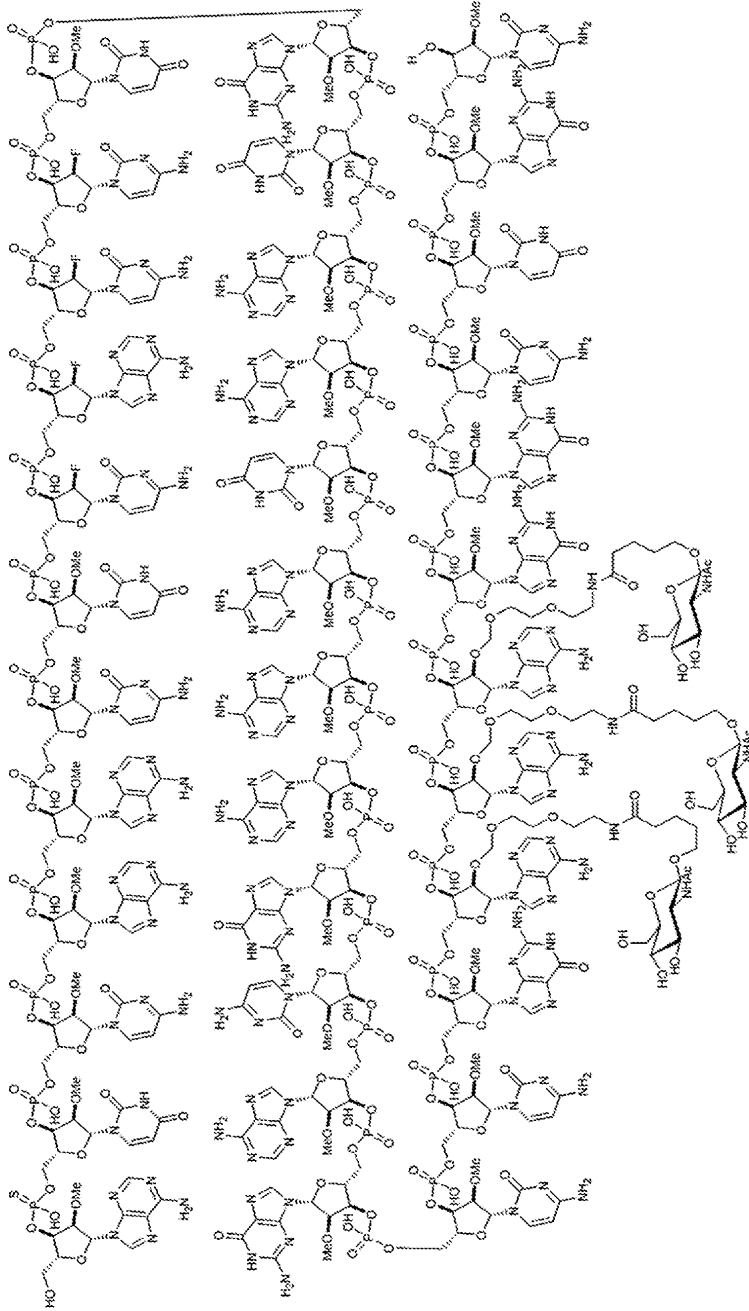
[0384] 인간 혈청 중 화합물 A에 대한 항약물 항체(ADA) 검정은 개발 중이며 전기화학발광(ECL) 브릿징 검정을 사용하여 수행될 예정이다. 양성 대조군(PC)은 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH)-컨쥬게이션된 화합물 A 및 변형된 화합물 A 서열에 상응하는 다양한 길이의 KLH-컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드로 이루어진 면역원성 카테일에 대해 면역화된 토끼로부터 생성되고 있다. PC, 음성 대조군(NC), 및 연구 샘플은 주위 실온에서 산 해리 단계를 거친 후, TRIS, 비오틴-화합물 A, 및 루테늄-표지된 화합물 A를 함유하는 플레이트에 첨가되어, 샘플에 존재하는 표지된 화합물 A와 화합물 A 항체 사이에서 브릿징 복합체의 형성을 가능하게 할 것이다. 인큐베이션 후, NC, PC, 및 연구 샘플은 스트렙타비딘-코팅된 플레이트로 옮겨지고 암소에서 1 시간 동안 인큐베이션될 것이고, 그동안 약물은 ADA 브릿징 복합체를 포획하는 플레이트에 결합한다. 이어서, 플레이트를 세척하고, Meso Scale Discovery® (MSD®) 판독 완충제를 첨가하여 ECL 신호를 생성하였는데, 이는 샘플에 존재하는 ADA의 양에 정비례하였다. ADA 검정은 임상 샘플의 평가 전에 검증될 것이다.

[0385] 기타 구현예

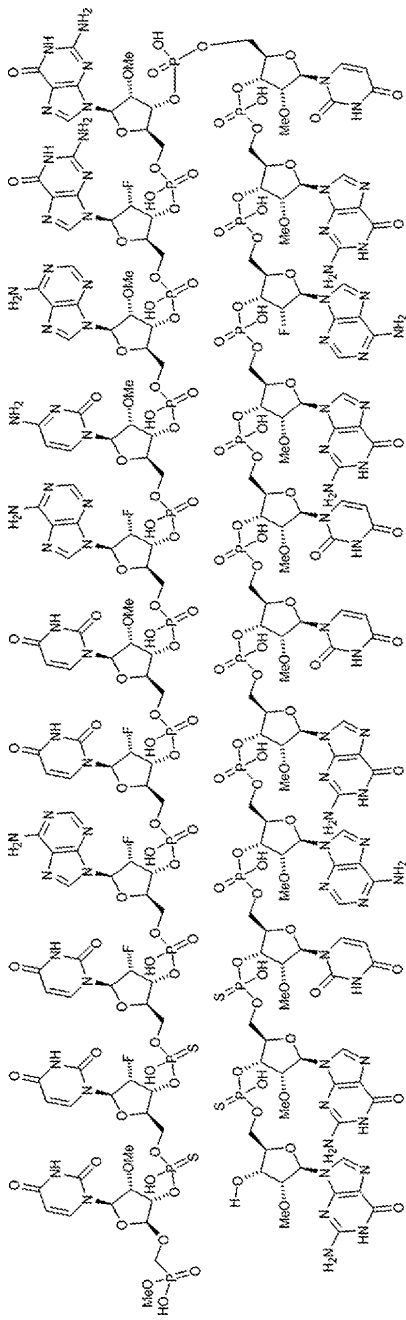
[0386] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은 각각의 독립적인 간행물 또는 특허 출원이 참조로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 지시된 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다. 특정 구현예가 본원에 기재되어 있지만, 당업자는, 일반적으로 본원에 기재된 원리를 따르는 변형, 사용, 또는 개조를 포함하고 당업계에 공지된 것이거나 당업계의 통상적인 관행 내에 있으며 본원에서 상기에 기재된 필수 특징에 적용될 수 있고 다음의 청구범위에 포함되는 본 개시의 예외 항목을 포함하는 추가 수정 및 구현예가 포괄된다는 것을 인지할 것이다.

도면

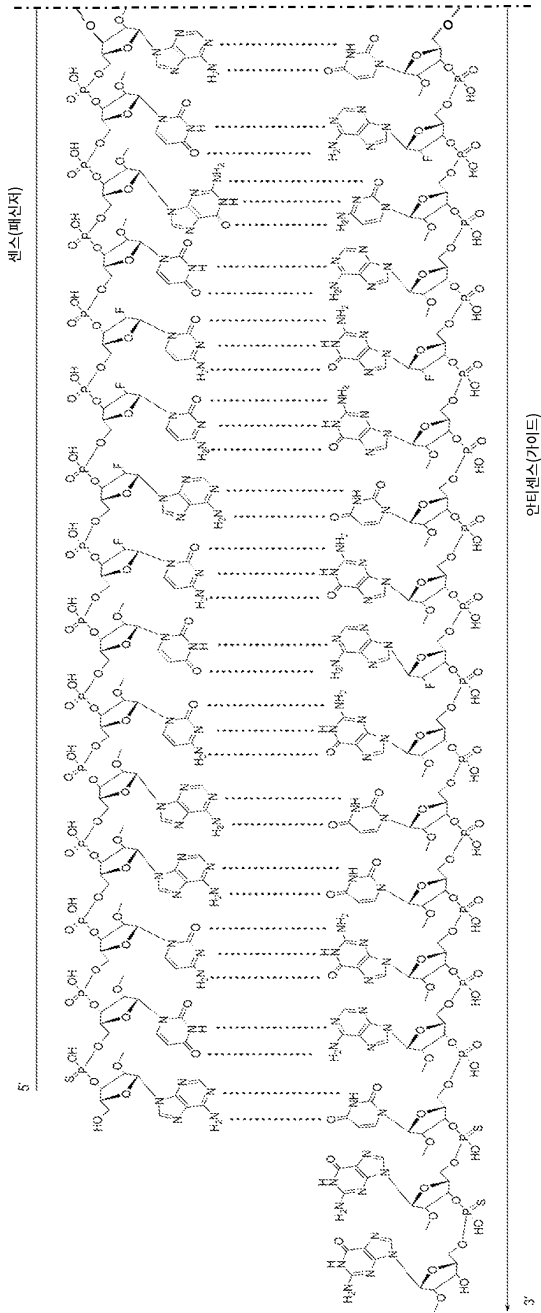
도면1a



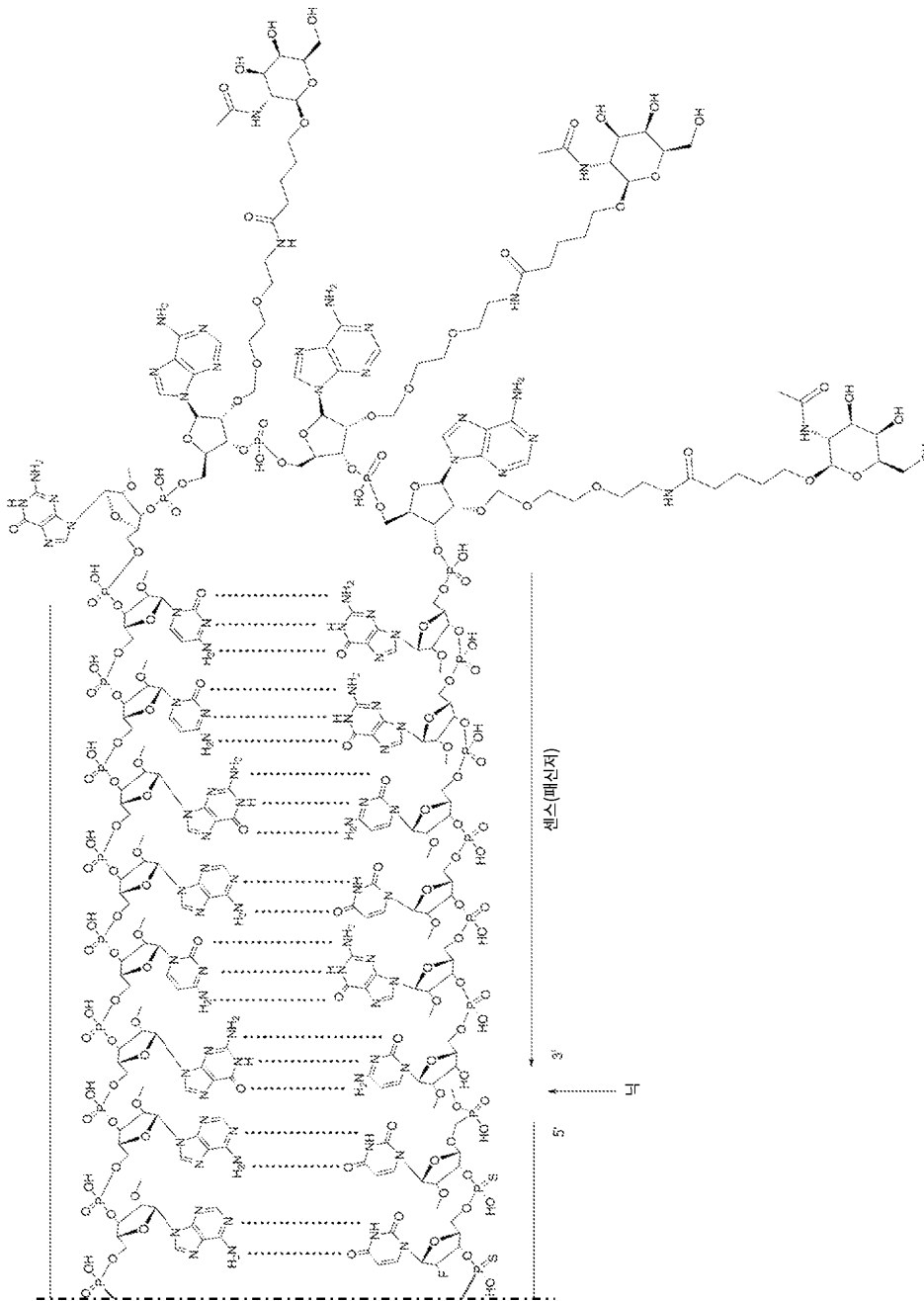
도면1b



도면1ca



도면1cb



도면1d

화합물 A 센스

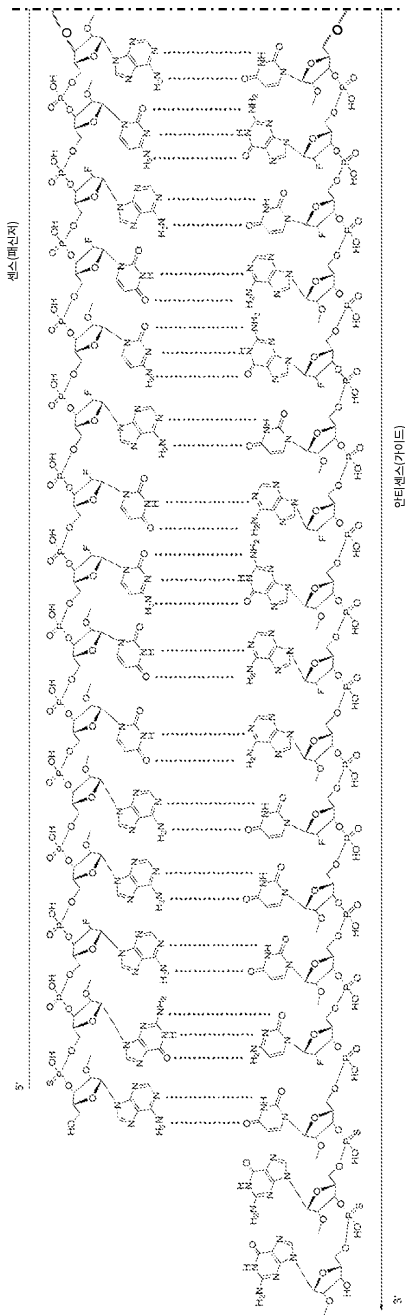
가닥(SEQIDNO: 1)

5' - AUCAACUCACCCUGUAAUAAAGCAGCCGAAAGGCUGC - 3'

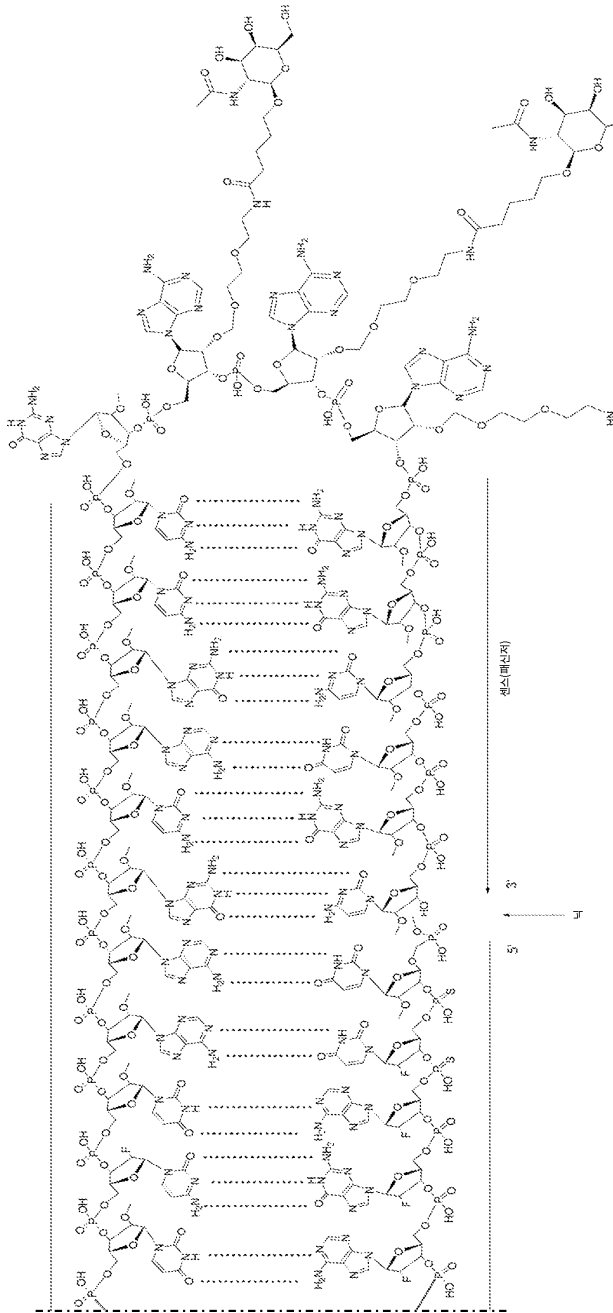
안티센스 가닥 (SEQIDNO: 3)

5' - UUUAUUACAGGUGAGUUGAUGG - 3'

도면2aa



도면2ab



도면2b

화합물 B

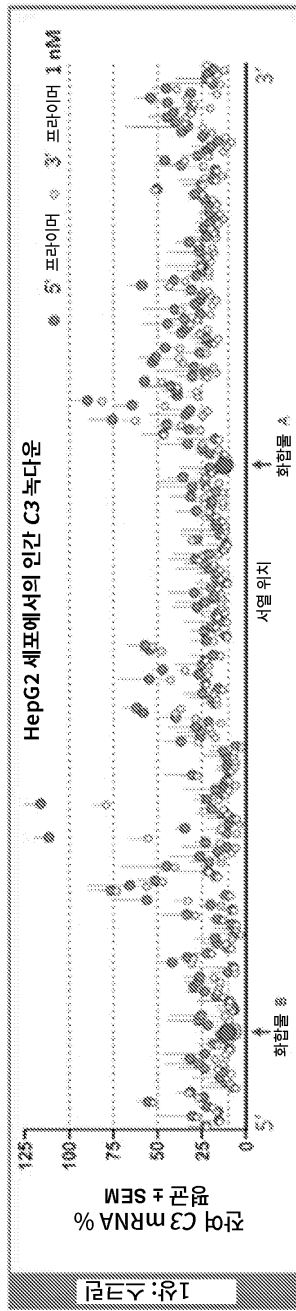
센스 가닥 (SEQ ID NO: 4)

5' - AGAAUUCUACUACAUCUAAGCAGCCGAAAGGCUGC - 3'

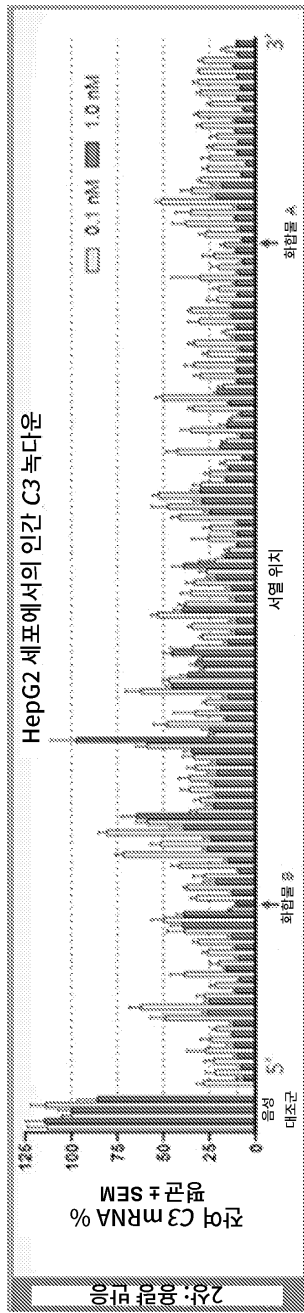
안티센스 가닥 (SEQ ID NO: 6)

5' - UUAGAUGUAGUAGAAUUUCUGG - 3'

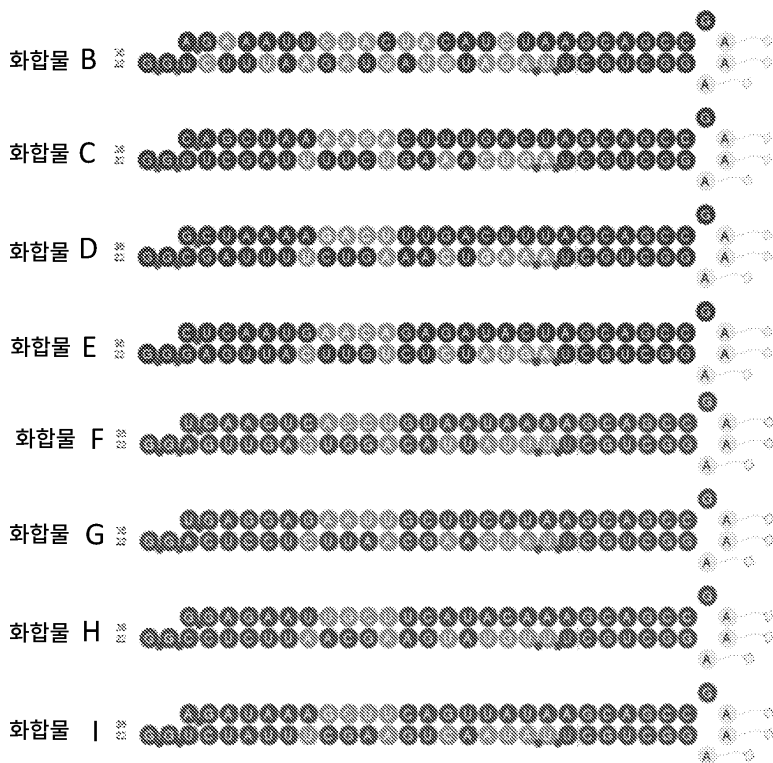
도면3a



도면3b

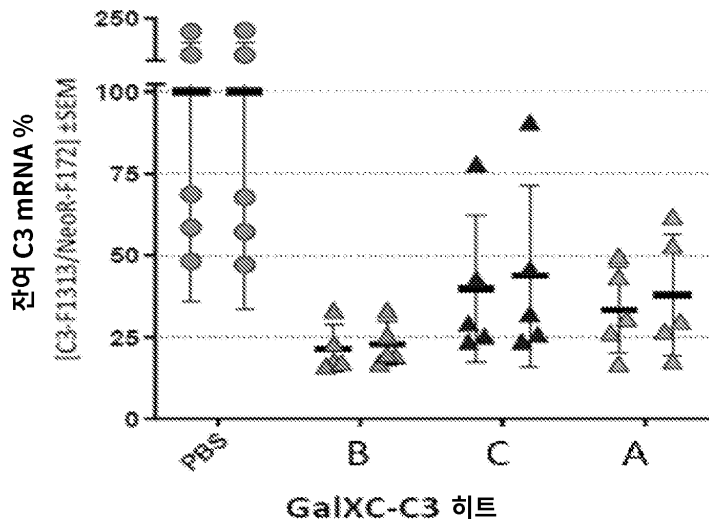


도면4a

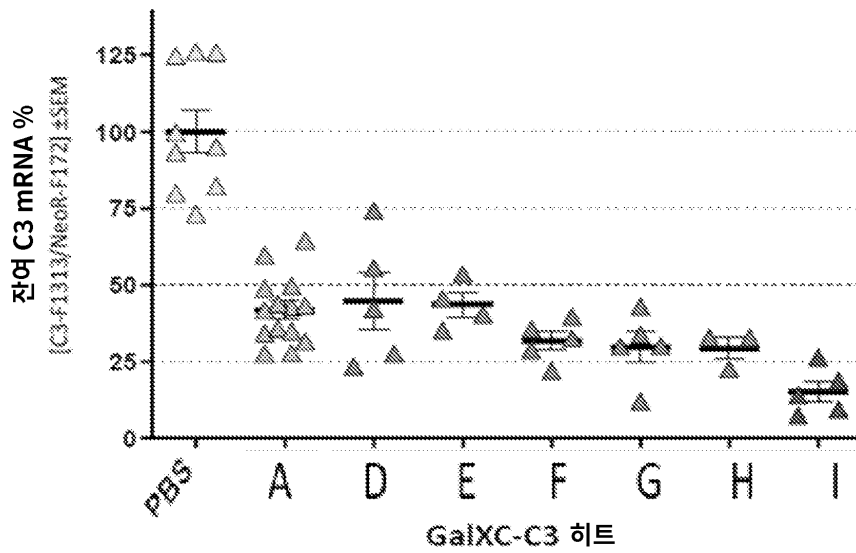


코드	약어	명칭
A	[ademA-GalNAc]	2'-아미노 디에톡시메탄올-아데닌-GalNAc
	[fA]	2'-플루오로아데노신
	[fAs]	2'-플루오로아데노신 포스포리티오에이트
	[fC]	2'-플루오로시티딘
	[fG]	2'-플루오로구아노신
	[fU]	2'-플루오로우리딘
	[fUs]	2'-플루오로우리딘 포스포리티오에이트
	[mA]	2'-O-메틸아데노신
	[mAs]	2'-O-메틸아데노신 포스포리티오에이트
	[mC]	2'-O-메틸시티딘
	[mCs]	2'-O-메틸시티딘 포스포리티오에이트
	[Me포스포네이트-4O-mUs]	5'-메톡시, 포스포네이트-4'옥시-2'-O-메틸우리딘 포스포리티오에이트
	[mG]	2'-O-메틸구아노신
	[mGs]	2'-O-메틸구아노신 포스포리티오에이트
	[mU]	2'-O-메틸우리딘
	[mUs]	2'-O-메틸우리딘 포스포리티오에이트

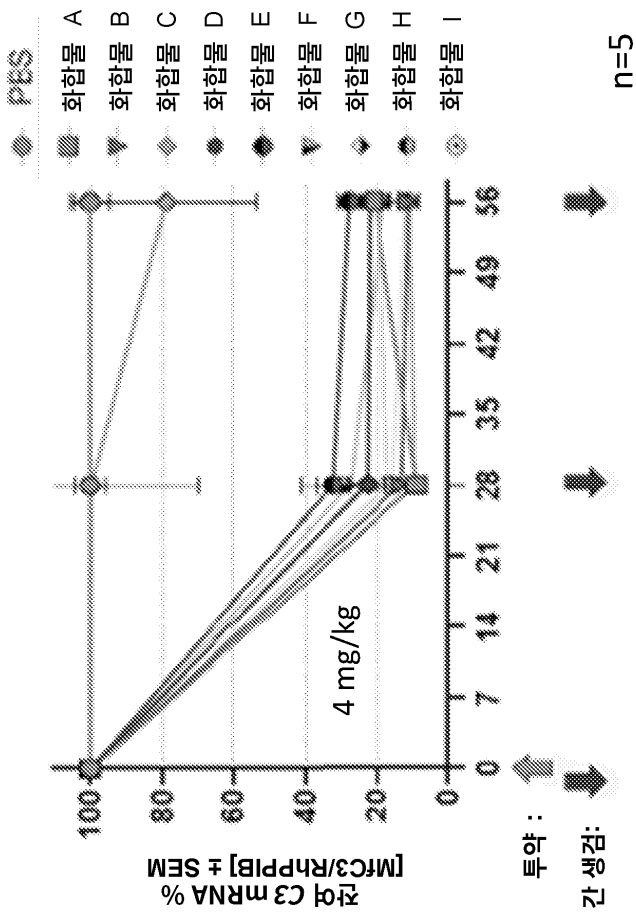
도면4b



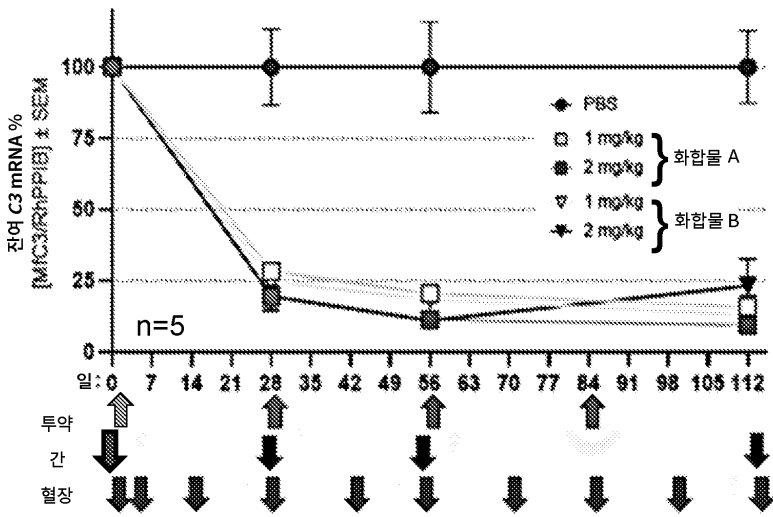
도면4c



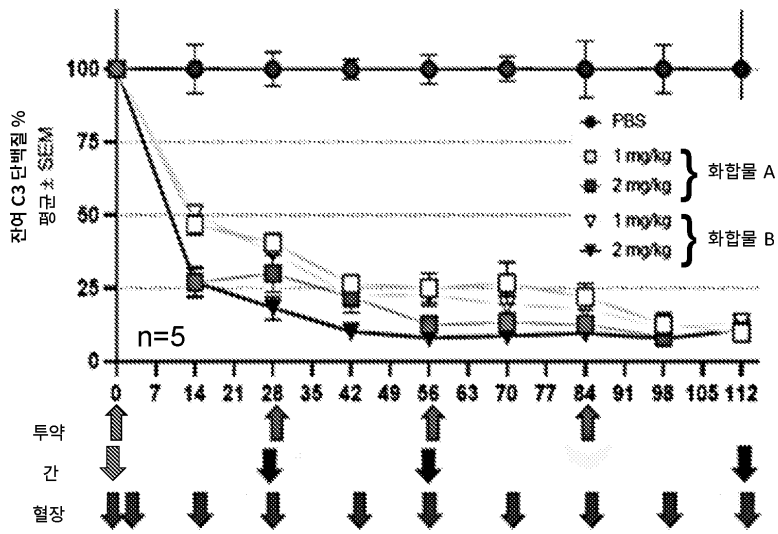
도면5



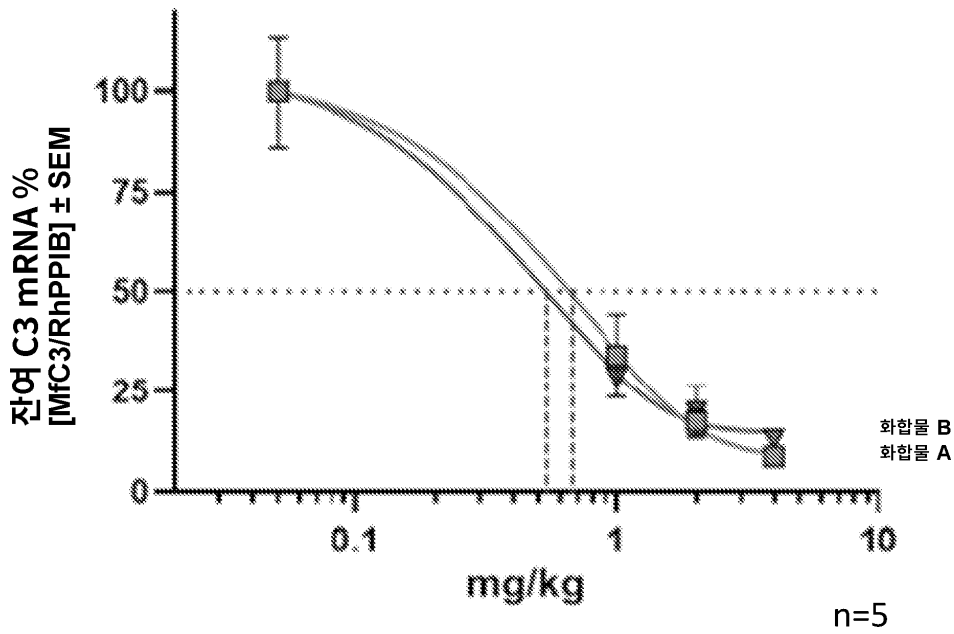
도면6a



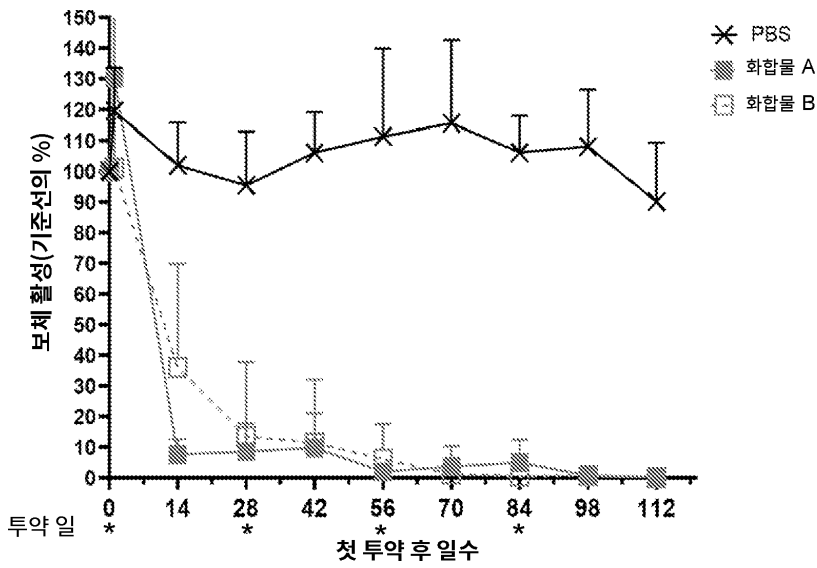
도면6b



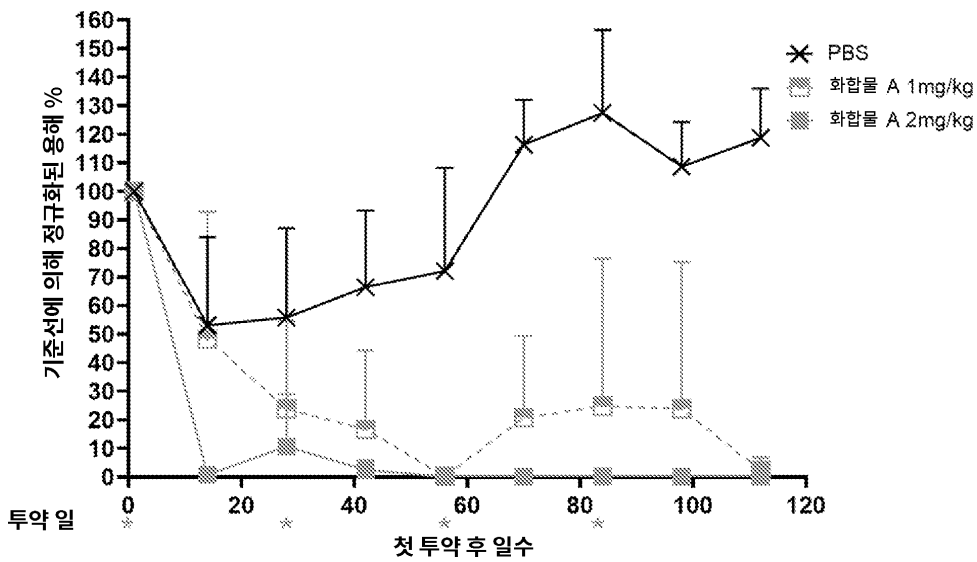
도면7



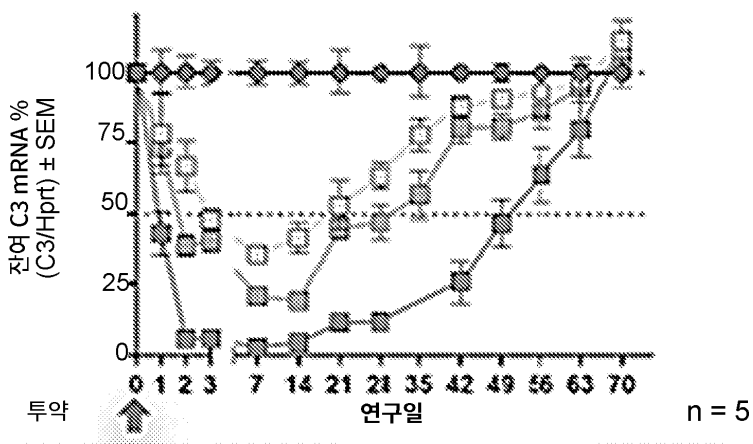
도면8



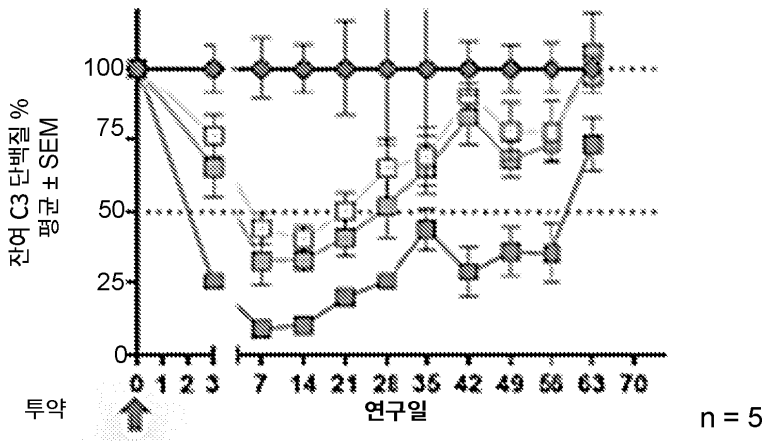
도면9



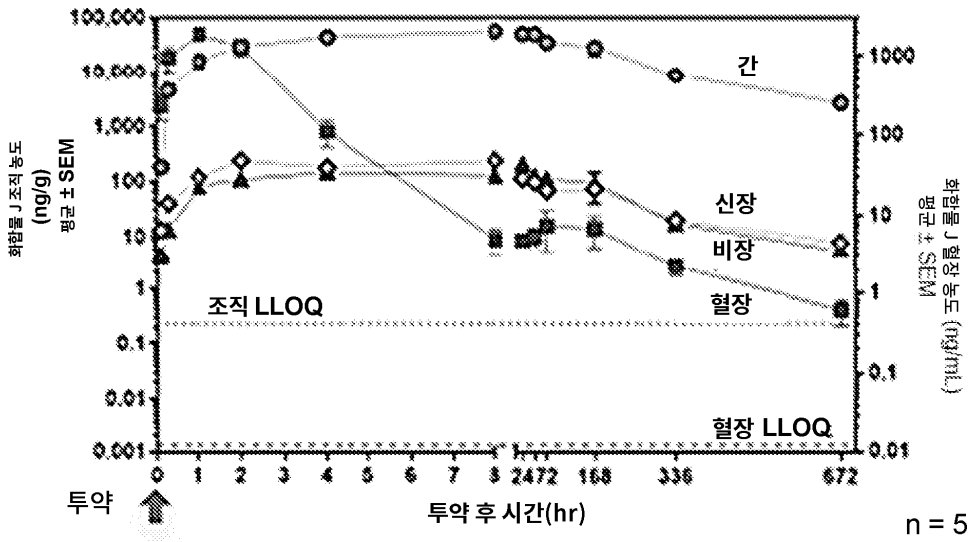
도면10a



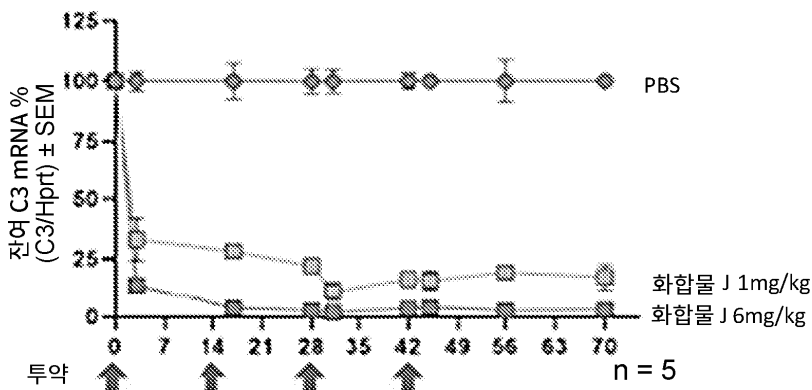
도면10b



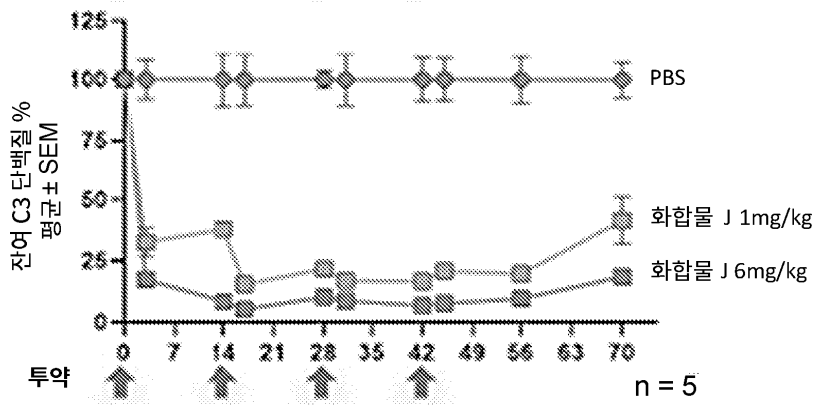
도면11



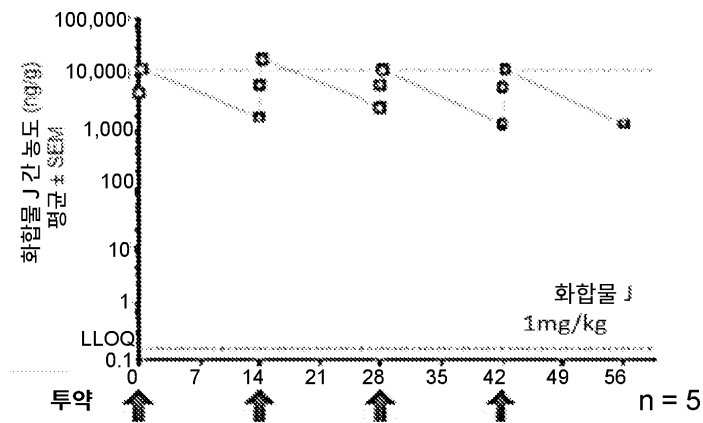
도면12a



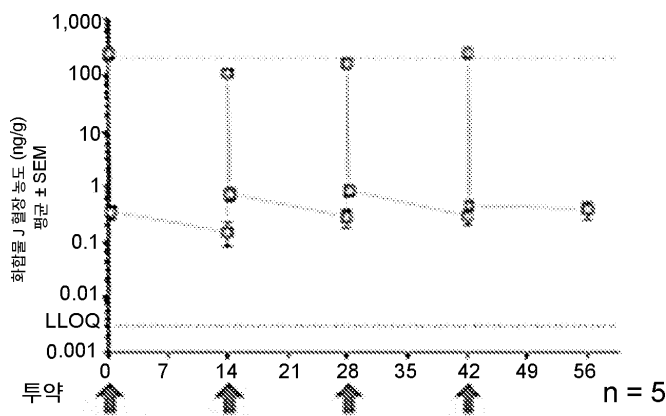
도면12b



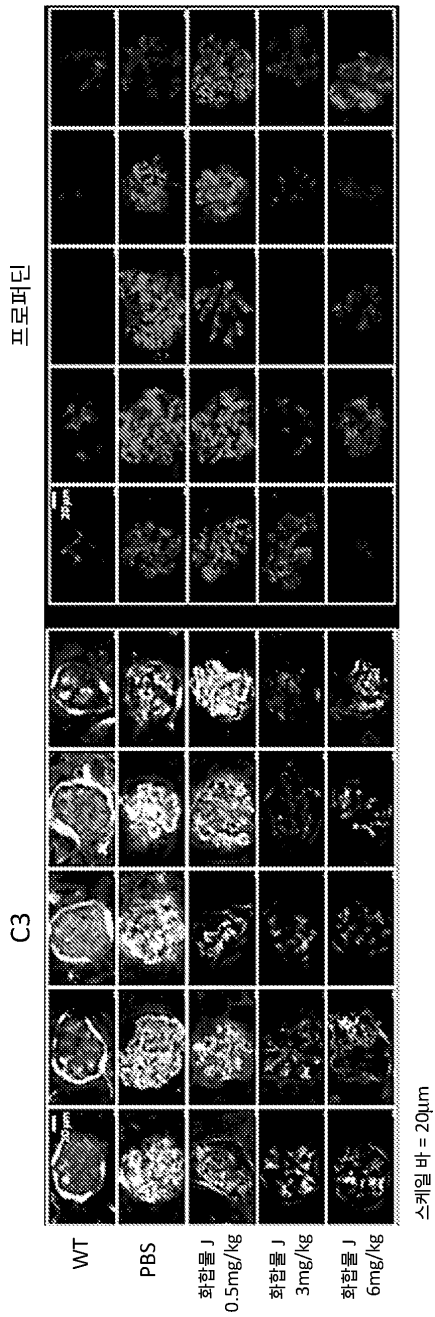
도면13a



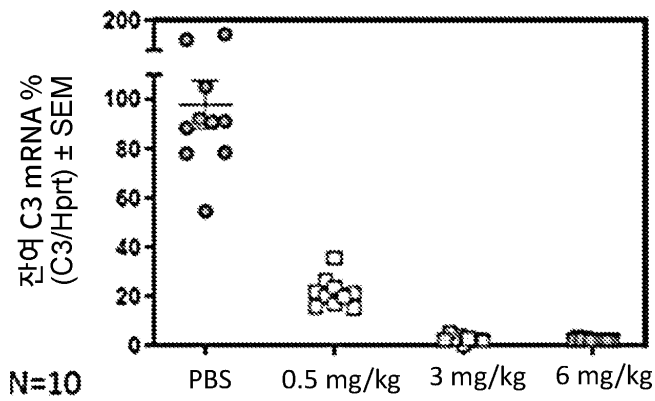
도면13b



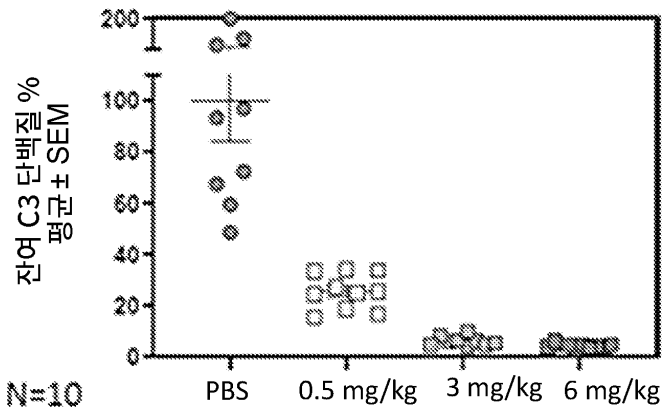
도면14



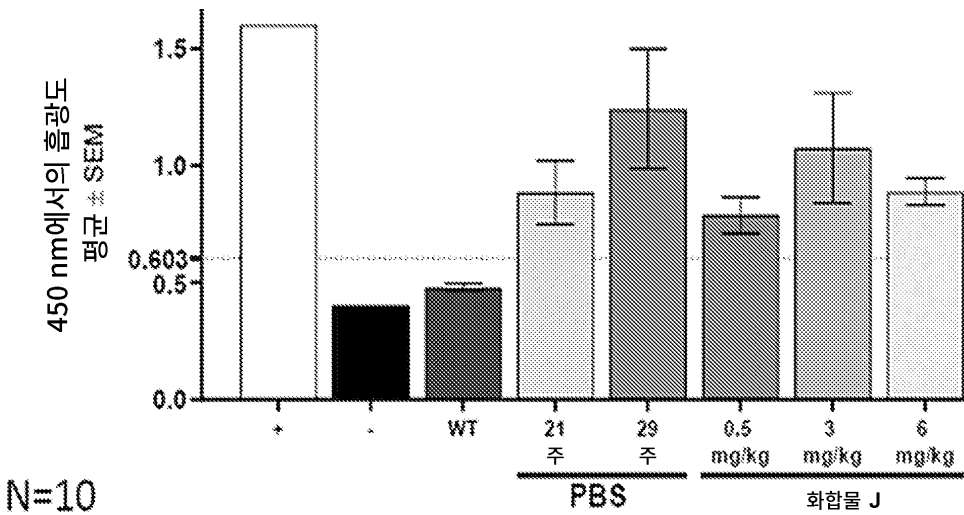
도면15a



도면15b

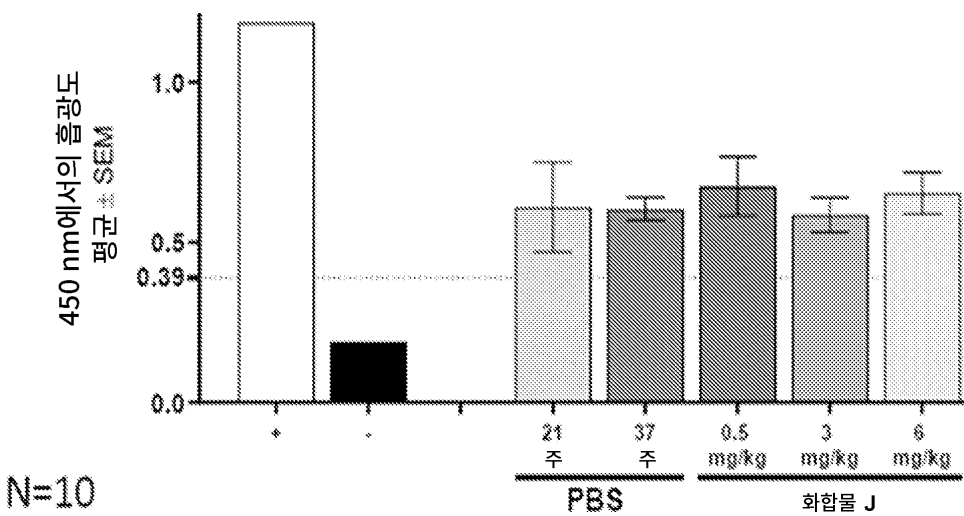


도면16a



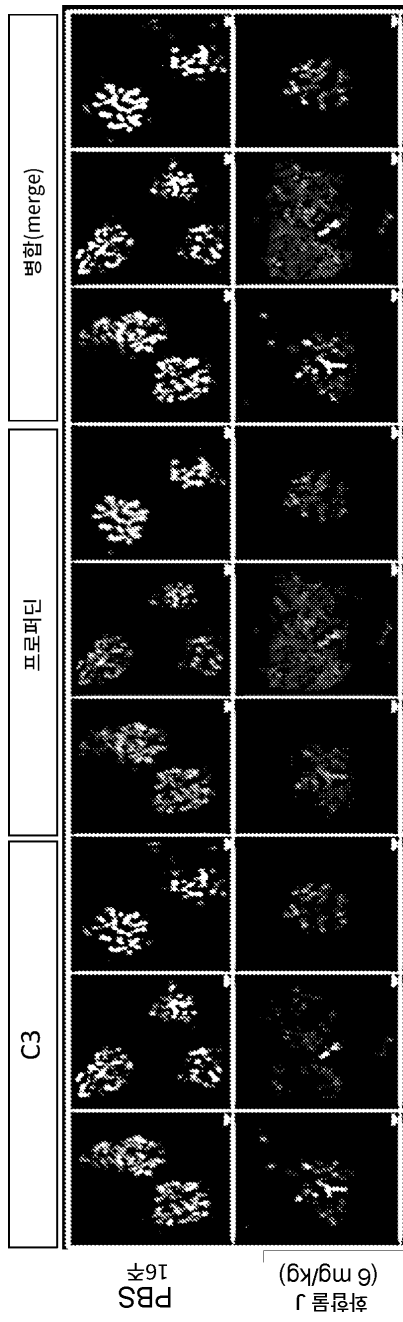
N=10

도면16b

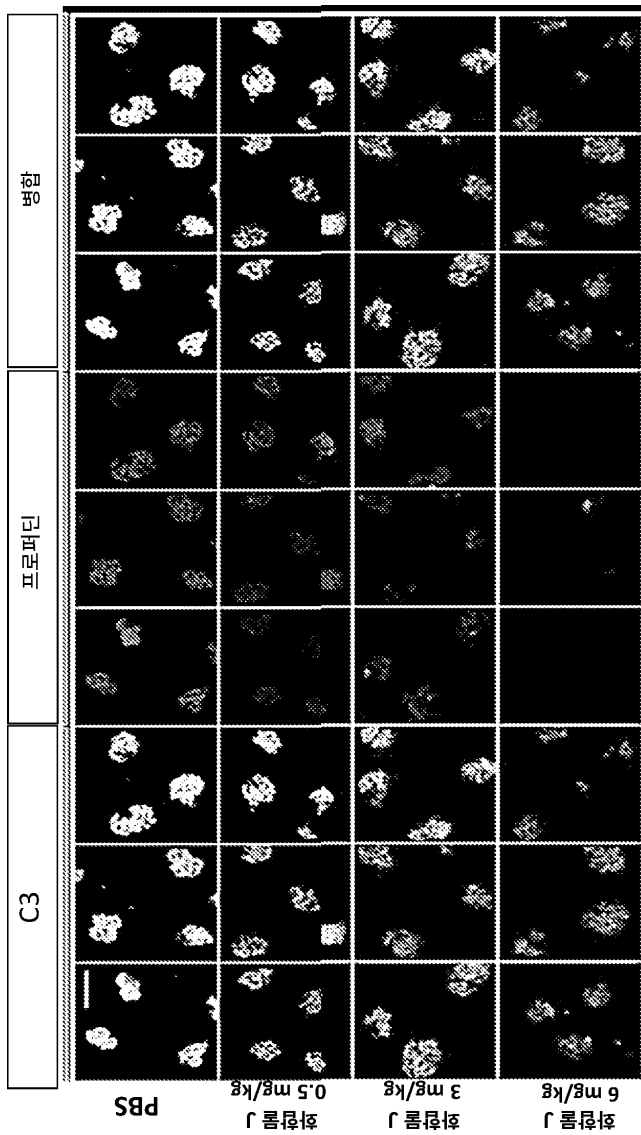


N=10

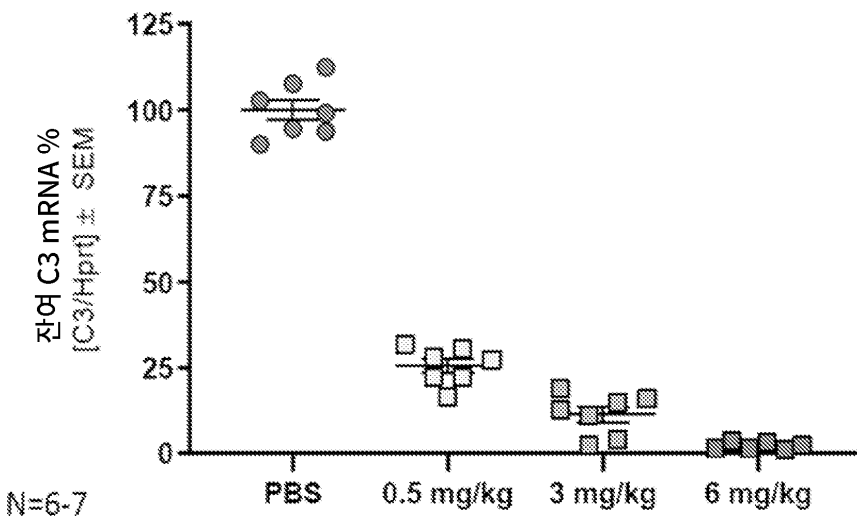
도면17



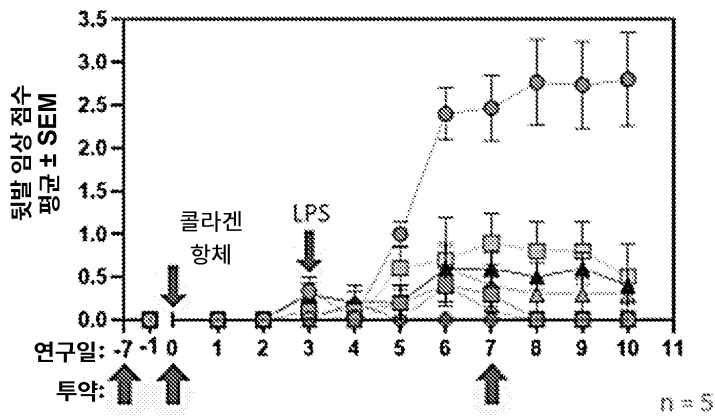
도면18



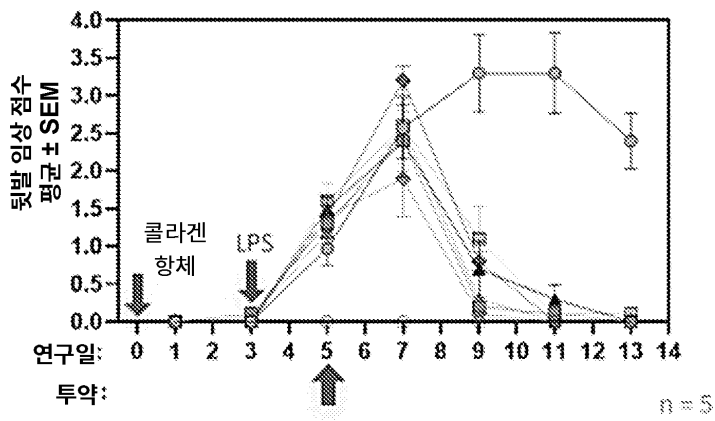
도면19



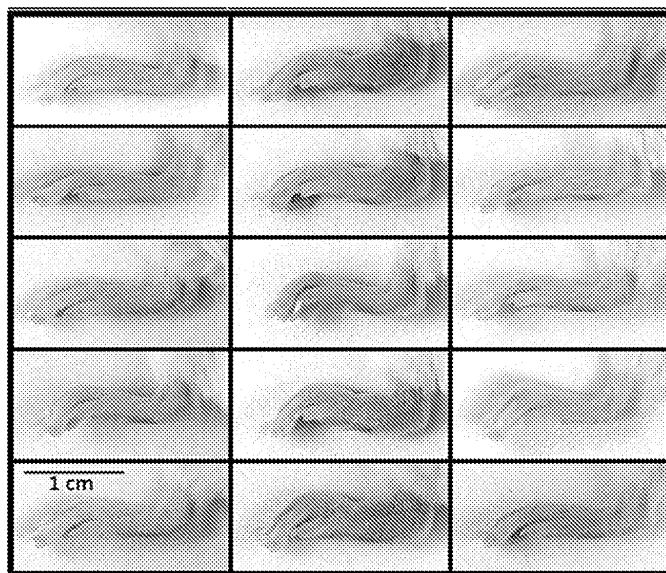
도면20a



도면20b

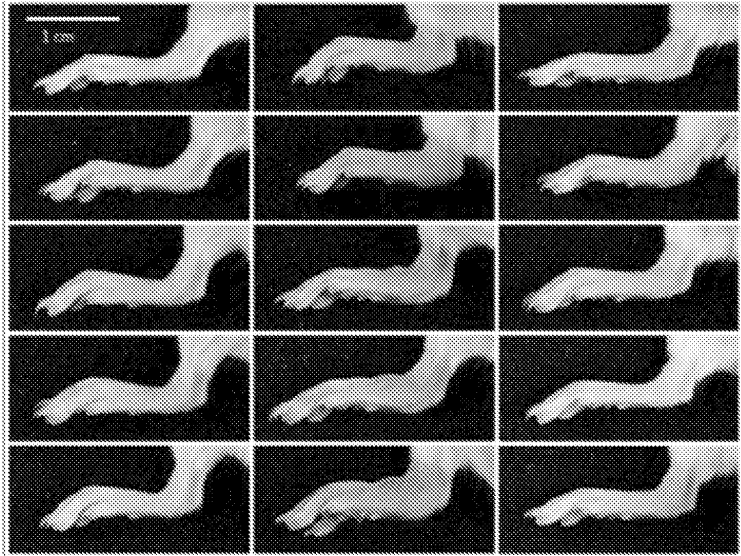


도면21a



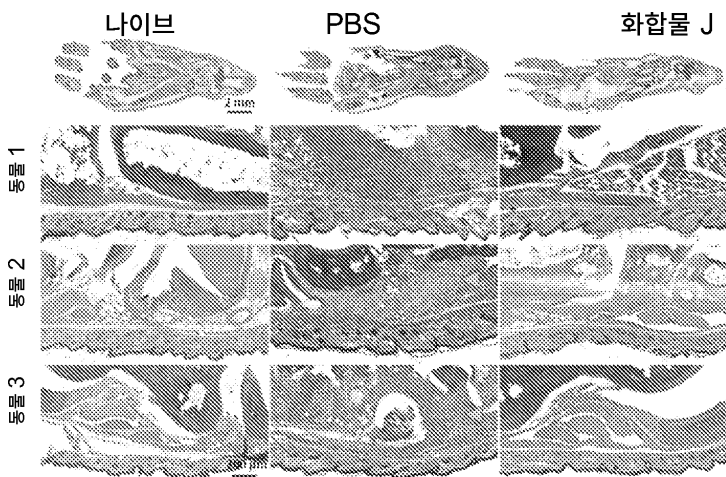
스케일 바 = 1cm

도면21b

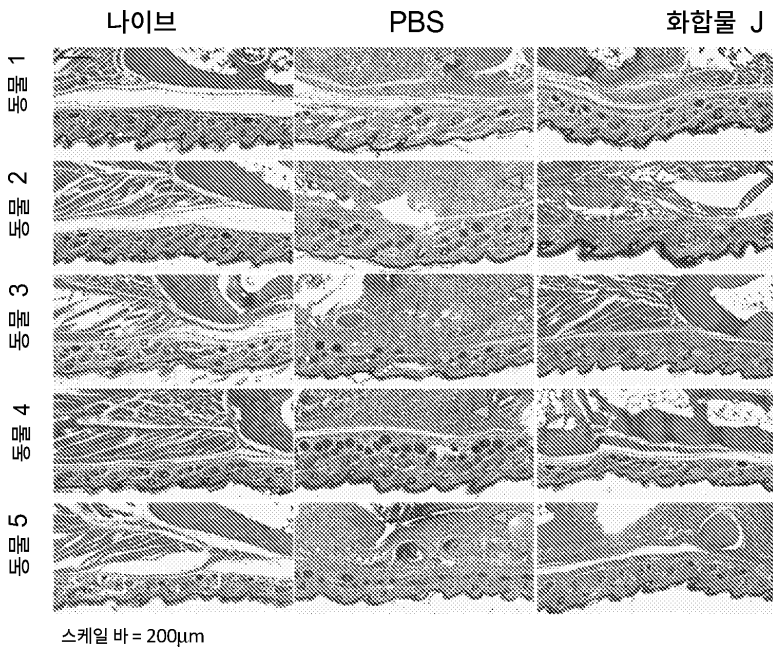


스케일 바 = 1cm

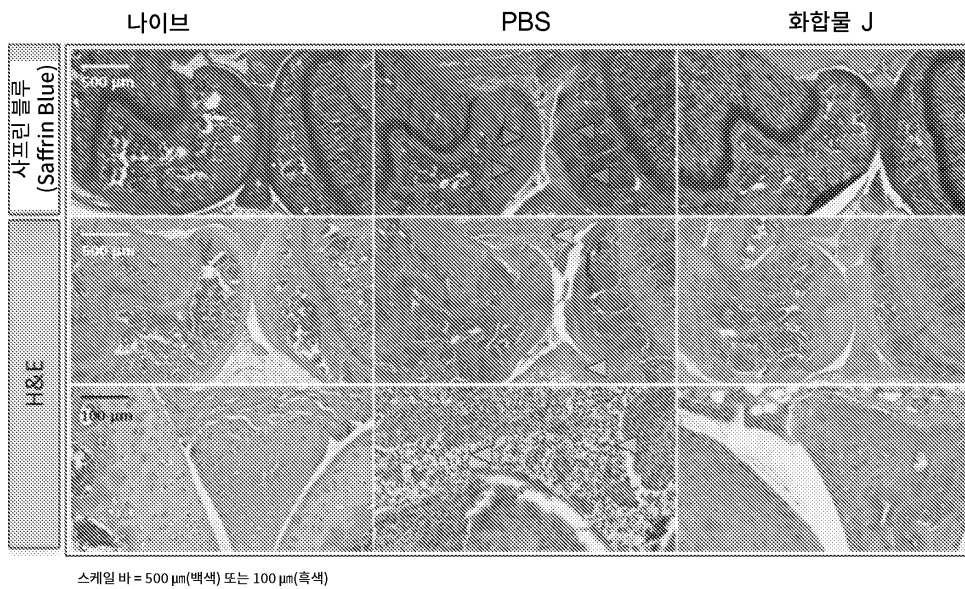
도면22a



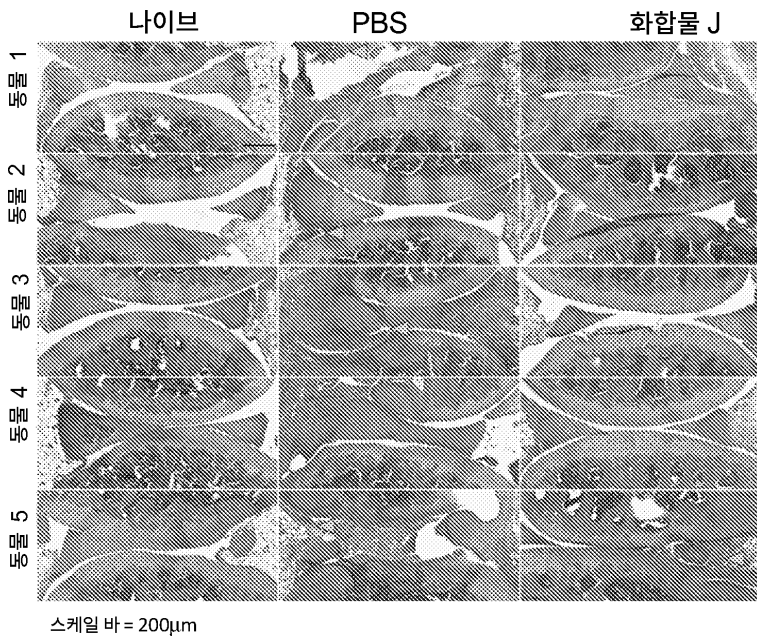
도면22b



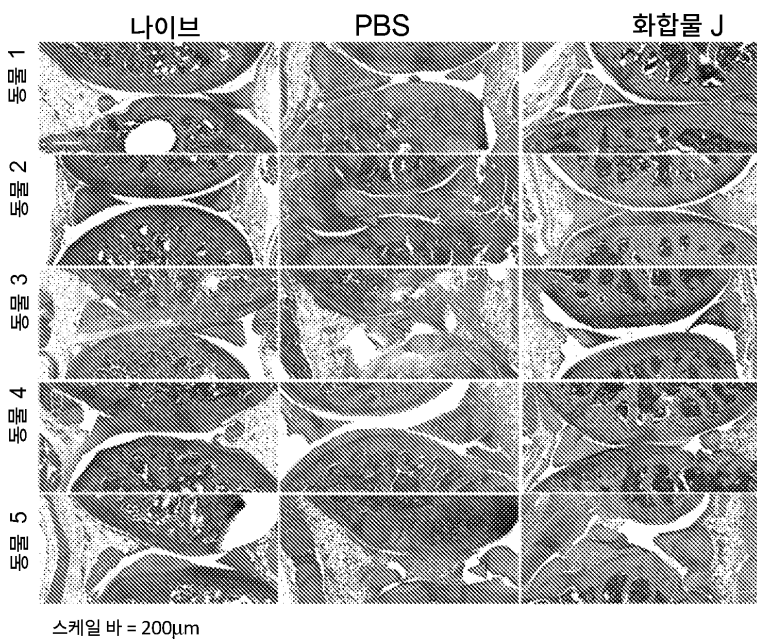
도면23



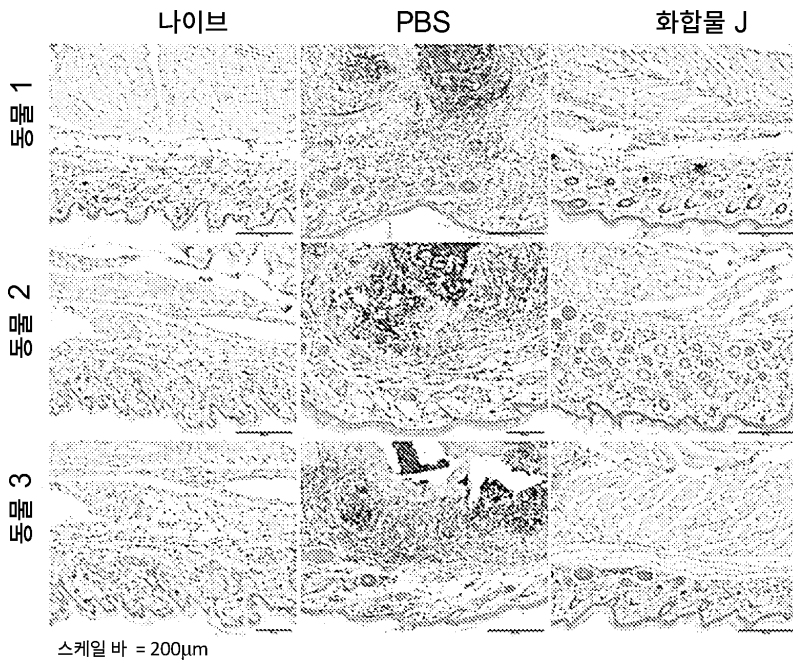
도면24a



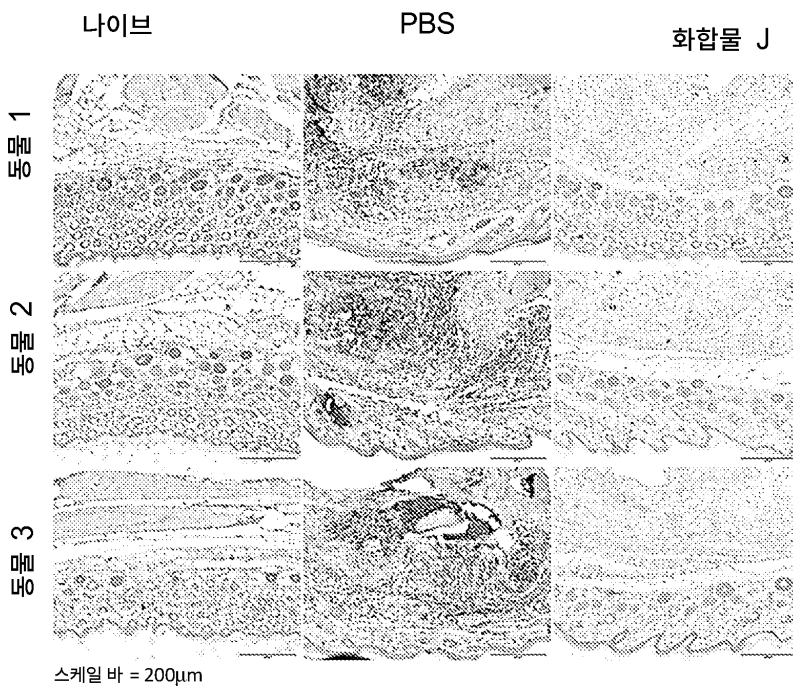
도면24b



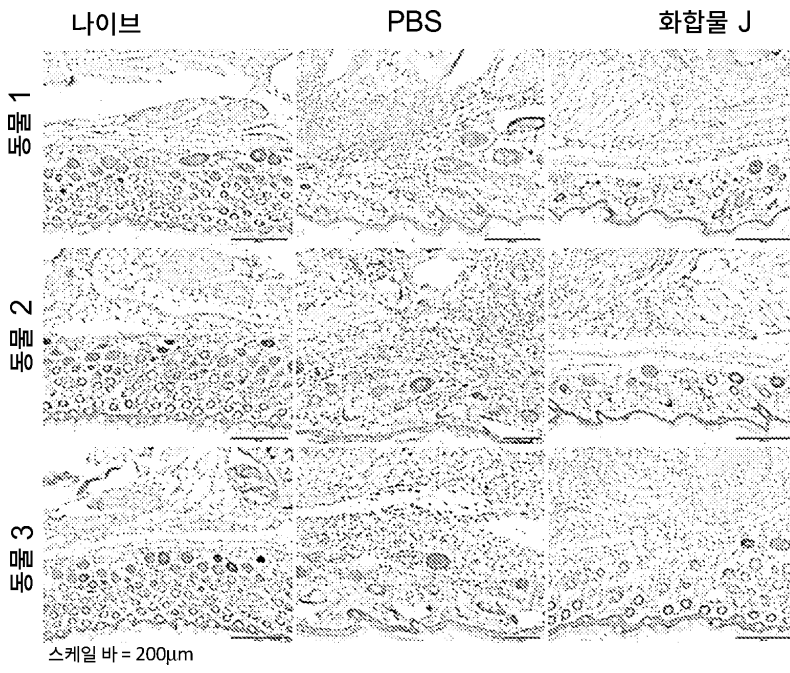
도면25



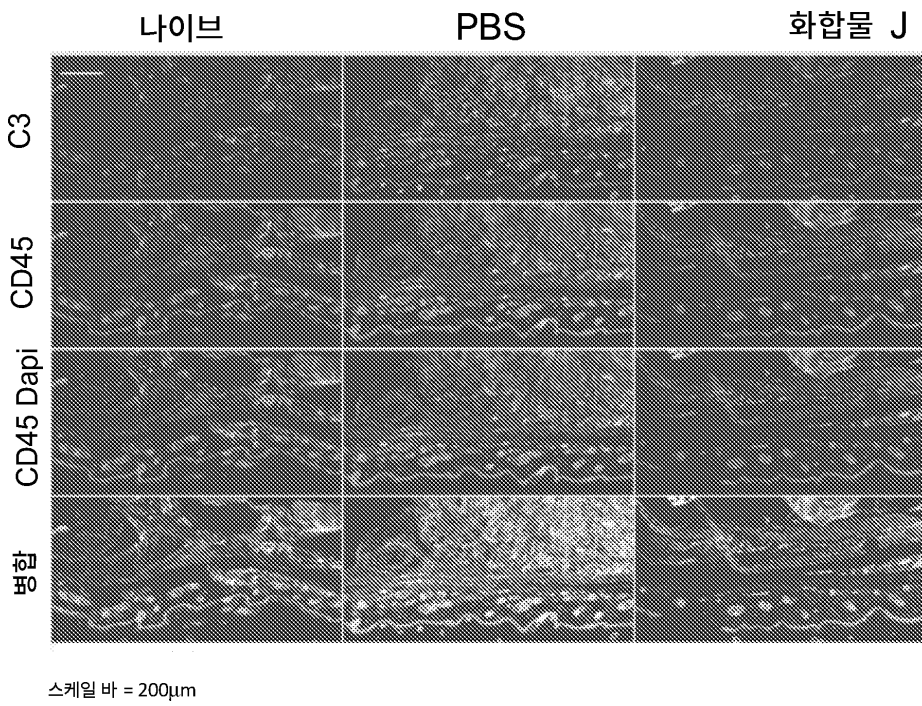
도면26



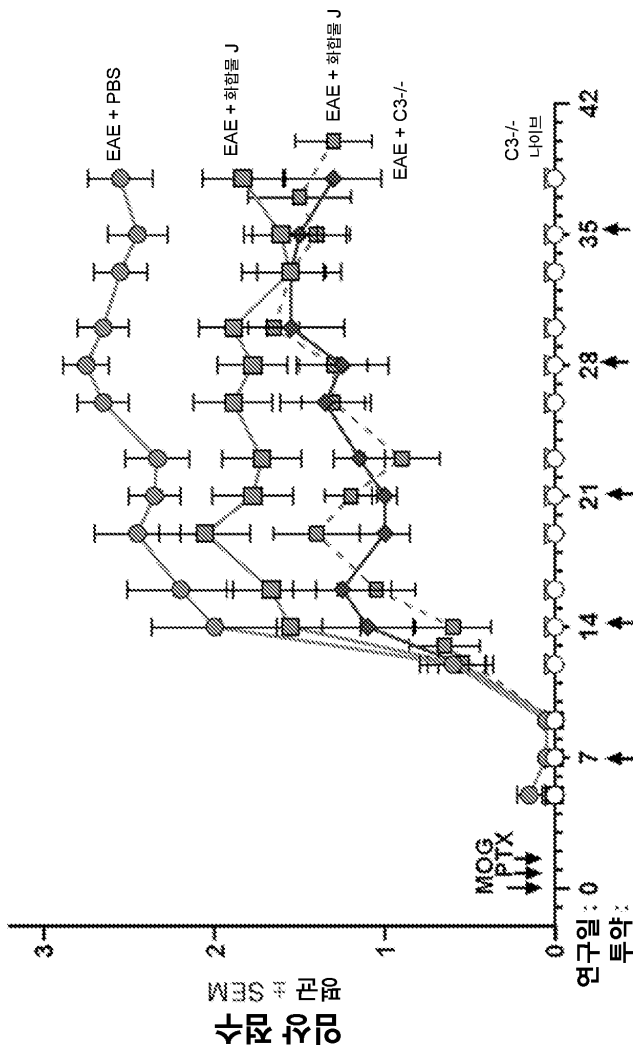
도면27



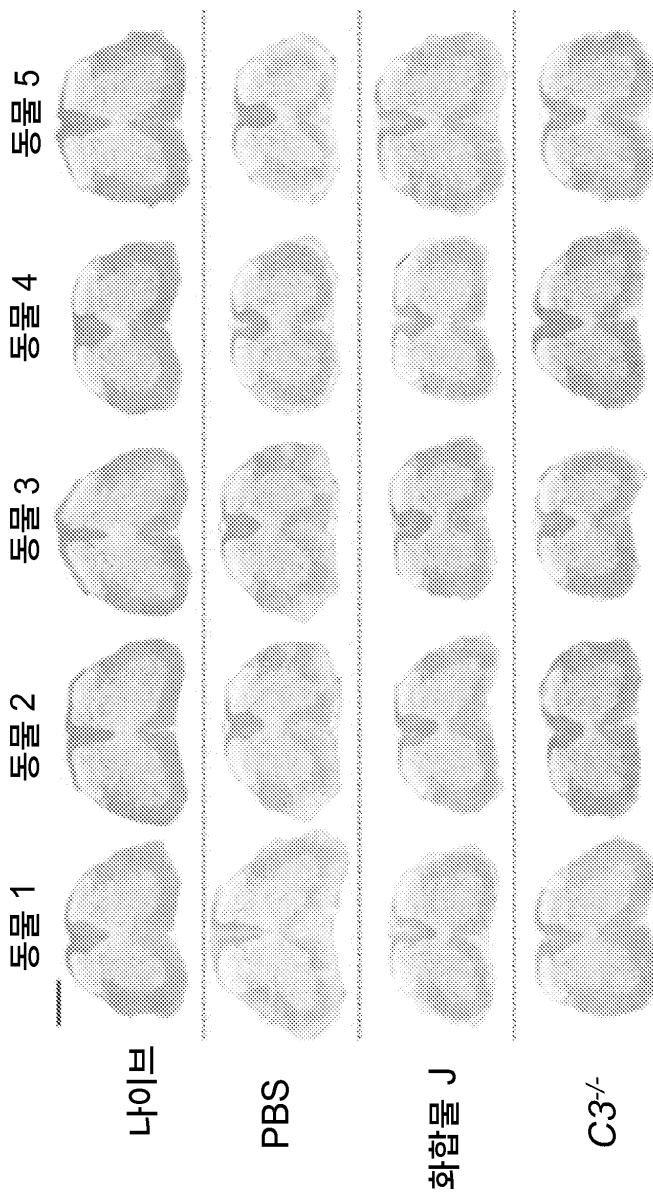
도면28



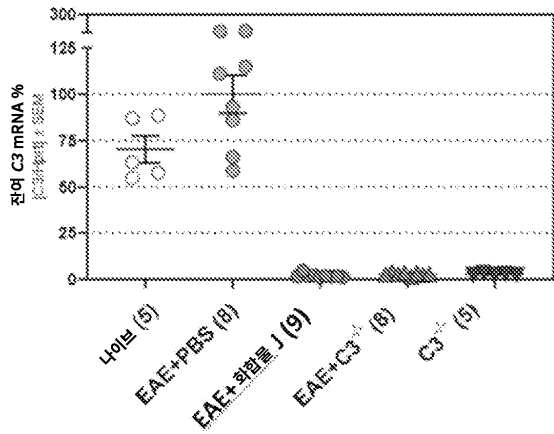
도면29



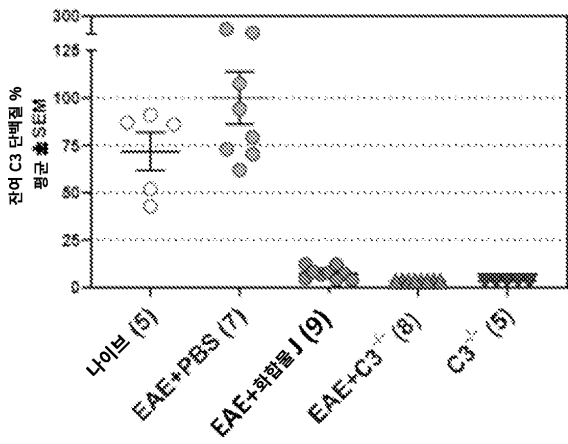
도면30



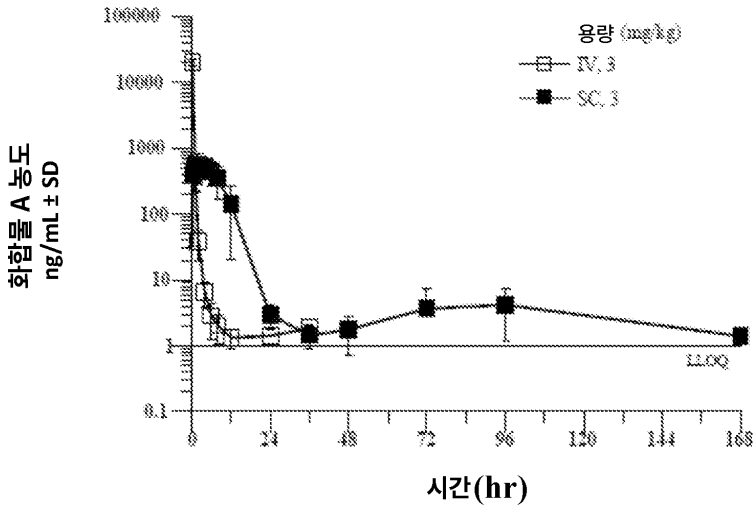
도면31a



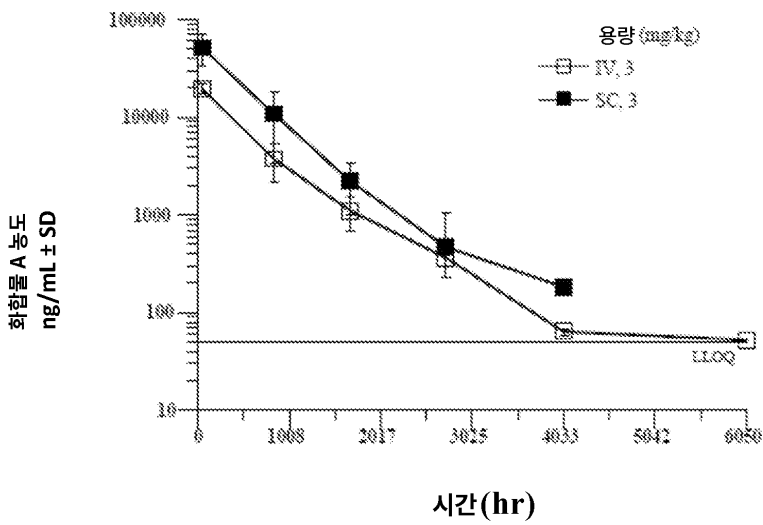
도면31b



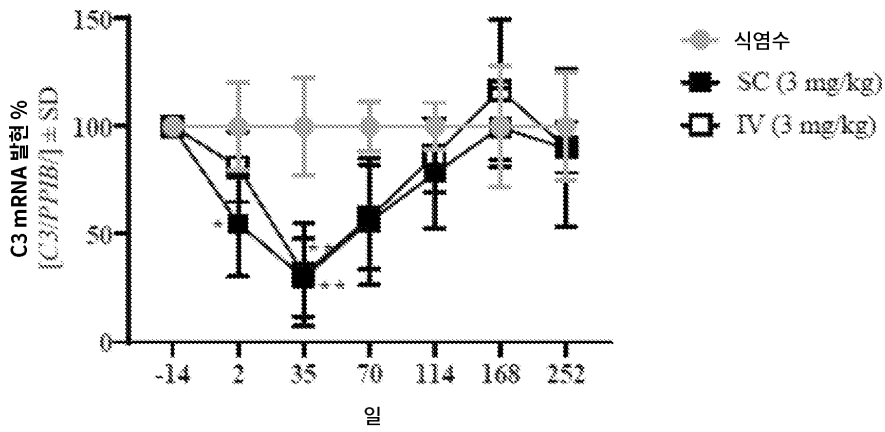
도면32a



도면32b

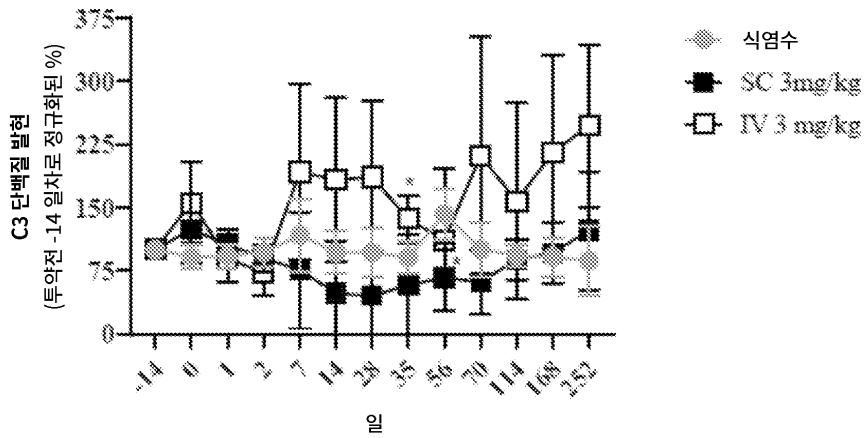


도면33



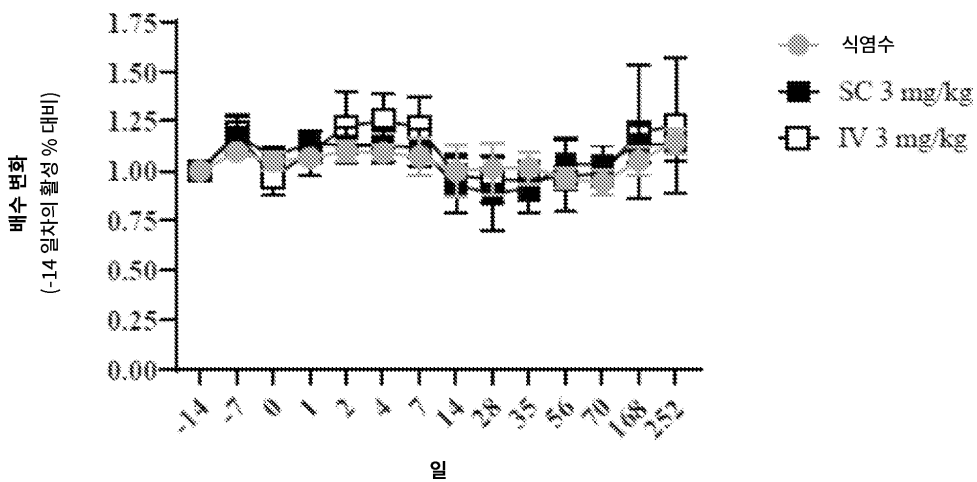
* p < 0.05, ** p < 0.01

도면34

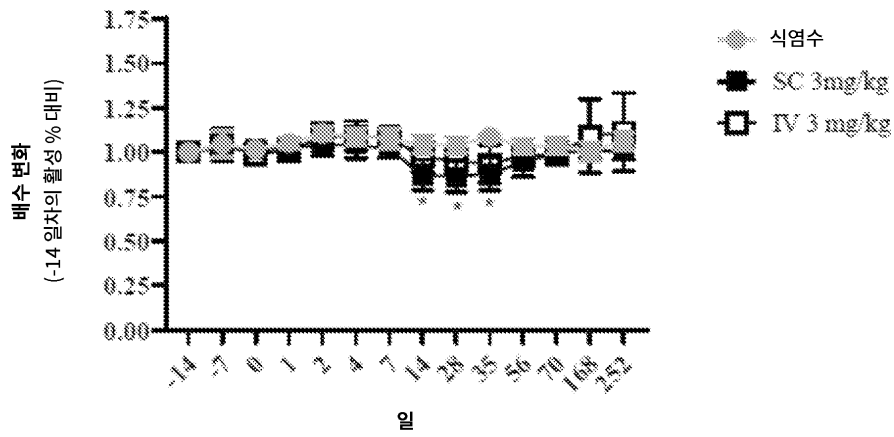


* p < 0.05

도면35

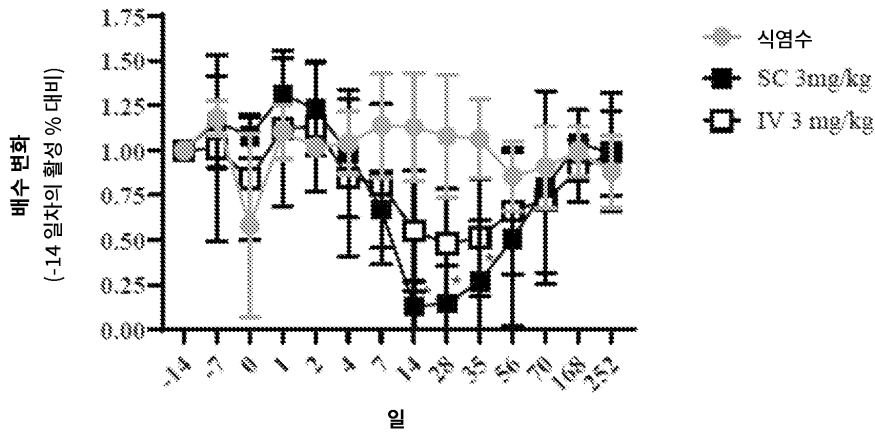


도면36



* p < 0.05

도면37



* p < 0.05

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Alexion Pharmaceuticals, Inc.

<120> Compositions and Methods for Inhibiting Complement Component 3
Expression

<130> 50694-093W03

<150> US 63/177,254

<151> 2021-04-20

<160> 67

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 36

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 1
 aucaacucac cuguauuaaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 2
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 2
 aucaacucac cuguauuaaa 20
 <210> 3
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 3
 uuuuuuacag gugaguugau gg 22
 <210> 4
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 4
 agaaaucua cuacaucuaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 5
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 5
 agaaaucua cuacaucuaa 20

<210> 6
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 6
 uuagauguag uagaauuucu gg 22
 <210> 7
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 7
 gcagccgaaa ggcugc 16

 <210> 8
 <211> 4
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 8
 gaaa 4
 <210> 9
 <211> 58
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 9
 aucaacucac cuguauuaaa gcagccgaaa ggcugcuuaa uuacagguga guugaugg 58
 <210> 10
 <211> 58
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 10

agaaaauucua cuacaucuaa gcagccgaaa ggcugcuuag auguaguaga auucugg

58

<210> 11

<211> 1663

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Gly Pro Thr Ser Gly Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Thr His

1 5 10 15

Leu Pro Leu Ala Leu Gly Ser Pro Met Tyr Ser Ile Ile Thr Pro Asn

20 25 30

Ile Leu Arg Leu Glu Ser Glu Glu Thr Met Val Leu Glu Ala His Asp

35 40 45

Ala Gln Gly Asp Val Pro Val Thr Val Thr Val His Asp Phe Pro Gly

50 55 60

Lys Lys Leu Val Leu Ser Ser Glu Lys Thr Val Leu Thr Pro Ala Thr

65 70 75 80

Asn His Met Gly Asn Val Thr Phe Thr Ile Pro Ala Asn Arg Glu Phe

85 90 95

Lys Ser Glu Lys Gly Arg Asn Lys Phe Val Thr Val Gln Ala Thr Phe

100 105 110

Gly Thr Gln Val Val Glu Lys Val Val Leu Val Ser Leu Gln Ser Gly

115 120 125

Tyr Leu Phe Ile Gln Thr Asp Lys Thr Ile Tyr Thr Pro Gly Ser Thr

130 135 140

Val Leu Tyr Arg Ile Phe Thr Val Asn His Lys Leu Leu Pro Val Gly

145 150 155 160

Arg Thr Val Met Val Asn Ile Glu Asn Pro Glu Gly Ile Pro Val Lys

165 170 175

Gln Asp Ser Leu Ser Ser Gln Asn Gln Leu Gly Val Leu Pro Leu Ser

180 185 190

Trp Asp Ile Pro Glu Leu Val Asn Met Gly Gln Trp Lys Ile Arg Ala

Val Gly Asn Ser Asn Asn Tyr Leu His Leu Ser Val Leu Arg Thr Glu
 450 455 460

Leu Arg Pro Gly Glu Thr Leu Asn Val Asn Phe Leu Leu Arg Met Asp
 465 470 475 480

Arg Ala His Glu Ala Lys Ile Arg Tyr Tyr Thr Tyr Leu Ile Met Asn
 485 490 495

Lys Gly Arg Leu Leu Lys Ala Gly Arg Gln Val Arg Glu Pro Gly Gln
 500 505 510

Asp Leu Val Val Leu Pro Leu Ser Ile Thr Thr Asp Phe Ile Pro Ser
 515 520 525

Phe Arg Leu Val Ala Tyr Tyr Thr Leu Ile Gly Ala Ser Gly Gln Arg
 530 535 540

Glu Val Val Ala Asp Ser Val Trp Val Asp Val Lys Asp Ser Cys Val
 545 550 555 560

Gly Ser Leu Val Val Lys Ser Gly Gln Ser Glu Asp Arg Gln Pro Val
 565 570 575

Pro Gly Gln Gln Met Thr Leu Lys Ile Glu Gly Asp His Gly Ala Arg
 580 585 590

Val Val Leu Val Ala Val Asp Lys Gly Val Phe Val Leu Asn Lys Lys
 595 600 605

Asn Lys Leu Thr Gln Ser Lys Ile Trp Asp Val Val Glu Lys Ala Asp
 610 615 620

Ile Gly Cys Thr Pro Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Ala Gly Val Phe Ser
 625 630 635 640

Asp Ala Gly Leu Thr Phe Thr Ser Ser Ser Gly Gln Gln Thr Ala Gln
 645 650 655

Arg Ala Glu Leu Gln Cys Pro Gln Pro Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser
 660 665 670

Val Gln Leu Thr Glu Lys Arg Met Asp Lys Val Gly Lys Tyr Pro Lys
 675 680 685

Glu Leu Arg Lys Cys Cys Glu Asp Gly Met Arg Glu Asn Pro Met Arg

Arg Thr Leu Asp Pro Glu Arg Leu Gly Arg Glu Gly Val Gln Lys Glu

945 950 955 960

Asp Ile Pro Pro Ala Asp Leu Ser Asp Gln Val Pro Asp Thr Glu Ser

 965 970 975

Glu Thr Arg Ile Leu Leu Gln Gly Thr Pro Val Ala Gln Met Thr Glu

 980 985 990

Asp Ala Val Asp Ala Glu Arg Leu Lys His Leu Ile Val Thr Pro Ser

 995 1000 1005

Gly Cys Gly Glu Gln Asn Met Ile Gly Met Thr Pro Thr Val Ile

 1010 1015 1020

Ala Val His Tyr Leu Asp Glu Thr Glu Gln Trp Glu Lys Phe Gly

 1025 1030 1035

Leu Glu Lys Arg Gln Gly Ala Leu Glu Leu Ile Lys Lys Gly Tyr

 1040 1045 1050

Thr Gln Gln Leu Ala Phe Arg Gln Pro Ser Ser Ala Phe Ala Ala

 1055 1060 1065

Phe Val Lys Arg Ala Pro Ser Thr Trp Leu Thr Ala Tyr Val Val

 1070 1075 1080

Lys Val Phe Ser Leu Ala Val Asn Leu Ile Ala Ile Asp Ser Gln

 1085 1090 1095

Val Leu Cys Gly Ala Val Lys Trp Leu Ile Leu Glu Lys Gln Lys

 1100 1105 1110

Pro Asp Gly Val Phe Gln Glu Asp Ala Pro Val Ile His Gln Glu

 1115 1120 1125

Met Ile Gly Gly Leu Arg Asn Asn Asn Glu Lys Asp Met Ala Leu

 1130 1135 1140

Thr Ala Phe Val Leu Ile Ser Leu Gln Glu Ala Lys Asp Ile Cys

 1145 1150 1155

Glu Glu Gln Val Asn Ser Leu Pro Gly Ser Ile Thr Lys Ala Gly

 1160 1165 1170

Asp Phe Leu Glu Ala Asn Tyr Met Asn Leu Gln Arg Ser Tyr Thr

Asp Thr Asp Asp Leu Lys Gln Leu Ala Asn Gly Val Asp Arg Tyr
 1415 1420 1425
 Ile Ser Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Ala Phe Ser Asp Arg Asn Thr
 1430 1435 1440
 Leu Ile Ile Tyr Leu Asp Lys Val Ser His Ser Glu Asp Asp Cys
 1445 1450 1455
 Leu Ala Phe Lys Val His Gln Tyr Phe Asn Val Glu Leu Ile Gln
 1460 1465 1470
 Pro Gly Ala Val Lys Val Tyr Ala Tyr Tyr Asn Leu Glu Glu Ser
 1475 1480 1485
 Cys Thr Arg Phe Tyr His Pro Glu Lys Glu Asp Gly Lys Leu Asn
 1490 1495 1500
 Lys Leu Cys Arg Asp Glu Leu Cys Arg Cys Ala Glu Glu Asn Cys
 1505 1510 1515
 Phe Ile Gln Lys Ser Asp Asp Lys Val Thr Leu Glu Glu Arg Leu
 1520 1525 1530
 Asp Lys Ala Cys Glu Pro Gly Val Asp Tyr Val Tyr Lys Thr Arg
 1535 1540 1545
 Leu Val Lys Val Gln Leu Ser Asn Asp Phe Asp Glu Tyr Ile Met
 1550 1555 1560
 Ala Ile Glu Gln Thr Ile Lys Ser Gly Ser Asp Glu Val Gln Val
 1565 1570 1575
 Gly Gln Gln Arg Thr Phe Ile Ser Pro Ile Lys Cys Arg Glu Ala
 1580 1585 1590
 Leu Lys Leu Glu Glu Lys Lys His Tyr Leu Met Trp Gly Leu Ser
 1595 1600 1605
 Ser Asp Phe Trp Gly Glu Lys Pro Asn Leu Ser Tyr Ile Ile Gly
 1610 1615 1620
 Lys Asp Thr Trp Val Glu His Trp Pro Glu Glu Asp Glu Cys Gln
 1625 1630 1635
 Asp Glu Glu Asn Gln Lys Gln Cys Gln Asp Leu Gly Ala Phe Thr

1640 1645 1650
 Glu Ser Met Val Val Phe Gly Cys Pro Asn
 1655 1660

<210> 12
 <211> 5231
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

actcctcccc atcctctccc tctgtccctc tgtccctctg accctgcaact gtcccagcac 60

catgggaccc acctcaggtc ccagcctgct gctcctgcta ctaaccacc tccccctggc 120

tctggggagt cccatgtact ctatcatcac cccaacatc ttgcggctgg agagcgagga 180

gaccatggtg ctggaggccc acgacgcgca aggggatggt ccagtcactg ttactgtcca 240

cgacttccca ggcaaaaaac tagtgctgtc cagtgagaag actgtgctga ccctgccac 300

caaccacatg ggcaacgtca ctttcacgat cccagccaac agggagtcca agtcagaaaa 360

ggggcgcaac aagttcgtga ccgtgcaggc caccttcggg acccaagtgg tggagaaggt 420

ggtgctggtc agcctgcaga gcgggtacct cttcatccag acagacaaga ccatctacac 480

ccctggctcc acagttctct atcggatctt caccgtcaac cacaagctgc taccctggg 540

ccggacggtc atggtcaaca ttgagaacc ggaaggcatc ccggtcaagc aggactcctt 600

gtcttctcag aaccagcttg gcgtcttgcc cttgtcttgg gacattccgg aactcgtcaa 660

catgggccag tggaagatcc gagcctacta tgaaaactca ccacagcagg tcttctccac 720

tgagtttgag gtgaaggagt acgtgctgcc cagtttcgag gtcatagtgg agcctacaga 780

gaaattctac tacatctata acgagaagg cctggaggtc accatcaccg ccaggttctc 840

ctacgggaag aaagtggagg gaactgcctt tgtcatcttc gggatccagg atggcgaaca 900

gaggatttcc ctgcctgaat ccctcaagcg cattccgatt gaggatggct cgggggaggt 960

tgtgctgagc cggaaggtag tgctggacgg ggtgcagaac ccccagcag aagacctggt 1020

ggggaagtct ttgtacgtgt ctgccaccgt catcttgcac tcaggcagtg acatggtgca 1080

ggcagagcgc agcgggatcc ccatcgtgac ctctccctac cagatccact tcaccaagac 1140

acccaagtag tcaaaaccag gaatgccctt tgacctcatg gtgttcgtga cgaacctga 1200

tggctctcca gcctaccgag tccccctggc agtccagggc gaggacactg tgcagtctct 1260

aaccaggga gatggcgtgg ccaaaactcag catcaacaca caccacagcc agaagccctt 1320

gagcatcacg gtgcgcacga agaagcagga gctctcggag gcagagcagg ctaccaggac 1380

catgcaggct ctgccttaca gcaccgtggg caactccaac aattacctgc atctctcagt 1440
 gctacgtaca gagctcagac ccggggagac cctcaacgtc aacttctcc tgcgaatgga 1500
 ccgcgcccc gaggccaaga tccgtacta cacctacctg atcatgaaca agggcaggct 1560
 gtgaaggcg ggacgccagg tgcgagagcc cggccaggac ctggtggtgc tgcccctgtc 1620
 catcaccacc gacttcatcc ctctcttccg cctggtggcg tactacacgc tgatcggtgc 1680
 cagcgccag agggagggtg tggccgactc cgtgtgggtg gacgtcaagg actcctgcgt 1740

 gggctcgctg gtggtaaaa gcggccagtc agaagaccgg cagcctgtac ctgggcagca 1800
 gatgacctg aagatagagg gtgaccacgg ggccccggtg gtactggtgg ccgtggacia 1860
 gggcgtgttc gtgtgaata agaagaaca actgacgcag agtaagatct gggacgtggt 1920
 ggagaaggca gacatcggt gcacccccgg cagtgggaag gattacgccg gtgtcttctc 1980
 cgacgcagg ctgacctca cgagcagcag tggccagcag accgccaga gggcagaact 2040
 tcagtcccc cagccagccg cccgccgacg ccgttccgtg cagctcacgg agaagcgaat 2100
 ggacaaagtc ggcaagtacc ccaaggagct gcgaagtgc tgcgaggacg gcatgcggga 2160

 gaaccccatg aggttctcgt gccagcgcg gacccttcc atctccctgg gcgaggcgtg 2220
 caagaagtc ttctggact gctgcaacta catcacagag ctgcggcggc agcacgcgcg 2280
 ggccagccac ctgggcctgg ccaggagtaa cctggatgag gacatcattg cagaagagaa 2340
 catcgtttcc cgaagtgagt tcccagagag ctggctgtgg aacgttgagg acttgaaaga 2400
 gccaccgaaa aatggaatct ctacgaagct catgaatata ttttgaaag actccatcac 2460
 cacgtgggag attctggctg tgagcatgtc ggacaagaaa gggatctgtg tggcagacc 2520
 ctctgaggtc acagtaatgc aggacttctt catcgacctg cggctaccct actctgttgt 2580

 tcgaaacgag caggtggaat tccgagccgt tctctacaat taccggcaga accaagagct 2640
 caaggtgagg gtggaactac tccacaatcc agccttctgc agcctggcca ccaccaagag 2700
 gcgtcaccag cagaccgtaa ccatcccc caagtctcgt ttgtccgttc catatgtcat 2760
 cgtgccgcta aagaccggcc tgcaggaagt ggaagtcaag gctgctgtct accatcattt 2820
 catcagtgac ggtgtcagga agtccctgaa ggtcgtgccg gaaggaatca gaatgaaca 2880
 aactgtggct gttcgcacc tggatccaga acgctgggc cgtgaaggag tgcagaaaga 2940
 ggacatccca cctgcagacc tcagtacca agtcccggac accgagtctg agaccagaat 3000

 tctcctgcaa gggaccccag tggcccagat gacagaggat gccgtcgacg cggaacggct 3060
 gaagcacctc attgtgacc cctcgggctg cggggaacag aacatgatcg gcatgacgcc 3120
 cacggtcate gctgtgcatt acctggatga aacggagcag tgggagaagt tcggcctaga 3180
 gaagcggcag gggcccttgg agctcatcaa gaaggggtac acccagcagc tggccttcag 3240

acaaccagc tctgctttg cggccttctg gaaacgggca cccagcacct ggctgaccgc 3300
ctacgtggtc aaggtcttct ctctggctgt caacctcctc gccatcgact cccaagtcct 3360
ctgcggggct gttaaatggc tgatcctgga gaagcagaag cccgacgggg tcttccagga 3420

ggatgcgcc gtgatacacc aagaaatgat tggtaggatta cggaacaaca acgagaaaga 3480
catggcctc acggcctttg ttctcatctc gctgcaggag gctaaagata ttgtaggaga 3540
gcaggtaaac agcctgccag gcagcatcac taaagcagga gacttccttg aagccaacta 3600
catgaaccta cagagatcct acactgtggc cattgctggc tatgctctgg cccagatggg 3660
caggctgaag gggcctcttc ttaacaaatt tctgaccaca gccaagata agaaccgtg 3720
ggaggaccct ggtaagcagc tctacaacgt ggaggccaca tcctatgcc tcttgccct 3780
actgcagcta aaagacttg actttgtgcc tcccgctctg cgttggctca atgaacagag 3840

atactacggt ggtggctatg gctctacceca ggccaccttc atggtgttcc aagccttggc 3900
tcaataccia aaggacgcc ctgaccacca ggaactgaac ctgatgtgt cctccaact 3960
gcccagccgc agctccaaga taccaccag tatccactgg gaatctgcca gcctctgag 4020
atcagaagag accaaggaaa atgagggttt cacagtcaca gctgaaggaa aaggccaagg 4080
caccttgtcg gtggtgacaa tgtaccatgc taaggccaaa gatcaactca cctgtaataa 4140
attcgacctc aaggtcacca taaaaccagc accggaacaa gaaaagagc ctcaggatgc 4200
caagaacact atgatecttg agatctgtac caggtaccgg ggagaccagg atgceactat 4260

gtctatattg gacatatcca tgatgactgg ctttgcctca gacacagatg acctgaagca 4320
gctggccaat ggtgttgaca gatacatctc caagatgag ctggacaaag ctttctccga 4380
taggaacacc ctcatcatct acctggacaa ggtctcacac tctgaggatg actgtctagc 4440
tttcaaagt accaactact ttaatgtaga gcttatccag cctggagcag tcaaggtcta 4500
cgctattac aaactggagg aaagetgtac ccggttctac catccgaaa aggaggatgg 4560
aaagctgaac aagctctgcc gtgatgaact gtgccgctgt gctgaggaga attgcttcat 4620
acaaaagtgc gatgacaagg tcacctgga agaacggctg gacaaggcct gtgagccagg 4680

agtggactat gtgtacaaga cccgactggt caaggttcag ctgtccaatg actttgacga 4740
gtacatcatg gccattgagc agaccatcaa gtcaggctcg gatgaggtgc aggttgaca 4800
gcagcgcacg ttcatcagcc ccatcaagtg cagagaagcc ctgaagctgg aggagaagaa 4860
acactacctc atgtggggtc tctctccga ttctgggga gagaagccca acctcagcta 4920
catcatcggg aaggacactt gggtaggaca ctggcccag gagacgaat gccaagacga 4980
agagaaccag aaacaatgcc aggacctcgg cgccttcacc gagagcatgg ttgtctttgg 5040

gtgcccacac tgaccacacc cccattcccc cactccagat aaagcttcag ttatatctca 5100

 cgtgtctgga gttctttgcc aagagggaga ggctgaaatc cccagccgcc tcacctgcag 5160
 ctcagetcca tectacttga aacctcacct gttcccaccg cattttctcc tggcgttcgc 5220
 ctgctagtgt g 5231
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 13
 atcaactcac ctgtaataaa 20
 <210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct

 <400> 14
 agaaattcta ctacatcta 19
 <210> 15
 <211> 37
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 15
 aggaaugaga aucaacaaaa agcagccgaa aggcugc 37
 <210> 16
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 16
 uuuuguugau ucucuuuccu g 21
 <210> 17

<211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct
 <400> 17
 cagcuaaaag acuuugacua gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 18
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 18
 uagucaaagu cuuuuagcug gg 22
 <210> 19
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 19
 gcuaaaagac uuugacuuua gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 20
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 20
 uaaagucaaa gucuuuuagc gg 22
 <210> 21
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 21

cucaaugaac agagauacua gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 22	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 22	
uaguaucucu guucauugag gg	22
<210> 23	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 23	
ucaacucacc uguauaaaa gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 24	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 24	
uuuuuuuaca ggugaguuga gg	22
<210> 25	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 25	
ugaggagaau ugcucauaa gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 26	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Construct	
<400> 26	
uuauagaagca auucuccuca gg	22
<210> 27	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 27	
ggagaauugc uucauacaaa gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 28	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 28	
uuuguauгаа gcaauucucc gg	22
<210> 29	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 29	
agauaaagcu ucaguauaa gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 30	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 30	
uuauaacuga agcuuuaucu gg	22
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 31

aggaatgaga atcaacaaaa 20

<210> 32

<211> 5139

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 32

agagaggaga gccatataaa gagccagcgg ctacagcccc agctcgcctc tgcccacccc 60

tgccccttac cccttcattc cttccacctt tttccttcac tatgggacca gcttcagggt 120

cccagctact agtgctactg ctgctgttgg ccagctcccc attagctctg gggatcccca 180

tgtattccat cactactccc aatgtcctac ggtggagag cgaagagacc atcgtactgg 240

aggccccaga tgctcagggt gacatcccag tcacagtcac tgtgcaagac ttcctaaaga 300

ggcaagtgct gaccagtgag aagacagtgt tgacaggagc cagtggacat ctgagaagcg 360

tctccatcaa gattccagcc agtaaggaat tcaactcaga taaggagggg cacaagtacg 420

tgacagtggg ggcaaacctc ggggaaacgg tggaggagaa agcagtgatg gtaagcttcc 480

agagtgggta cctcttcac cagacagaca agaccatcta caccctggc tccactgtct 540

tatatcggat cttcactgtg gacaacaacc tactgcccgt gggcaagaca gtcgtcatcc 600

tcattgagac ccccgatggc attcctgtca agagagacat tctgtcttcc aacaaccaac 660

acggcatctt gcctttgtct tggaaacttc ctgaactggt caacatgggg cagtggaaga 720

tccgagcctt ttacgaacat gcgccgaagc agatcttctc cgcagagttt gaggtgaagg 780

aatacgtgct gccagtttt gaggtccggg tggagccac agagacattt tattacatcg 840

atgacccaaa tggcctggaa gtttccatca tagccaagtt cctgtacggg aaaaactggt 900

acgggacagc cttcgtgatt tttgggttcc aggatggcga taagaagatt tctctggccc 960

actccctcac gcgcgtagtg attgaggatg gtgtggggga tgcagtgctg acccggaagg 1020

tgctgatgga ggggttacgg ccttccaacg ccgacgcctt ggtggggaag tcctgtatg 1080

tctccgtcac tgcacatctg cactcaggta gtgacatggt agaggcagag cgcagtggga 1140

tcccgatgt cacttccccg taccagatcc acttcacaa gacacccaaa ttcttcaagc 1200

cagccatgcc ctttgacctc atggtgttcg tgaccaacce cgatggctct cggccagca 1260

aagtgtggt ggtcactcag ggatctaag caaaggctct cacccaagat gatggcgtgg 1320

ccaagctaag catcaacaca cccaacagcc gccaacccct gaccatcaca gtccgcacca 1380
 agaaggacac tctcccagaa tcacggcagg ccaccaagac aatggaggcc catccctaca 1440
 gcactatgca caactccaac aactacctac acttgtcagt gtcacgaatg gagctcaagc 1500
 cgggggacaa cctcaatgtc aacttccacc tgcgcacaga cccaggccat gaggccaaga 1560
 tccgatacta cacctacctg gttatgaaca aggggaagct cctgaaggca ggccgccagg 1620

tfcgggagcc tggccaggac ctggtggctc tgtccctgcc catcactcca gagtttattc 1680
 cttcatttcg cctggtggct tactacacc tgattggagc tagtggccag agggaggtgg 1740
 tggctgactc tgtgtgggtg gatgtgaagg attcctgtat tggcacgctg gtggtgaagg 1800
 gtgaccaag agataacat ctcgcacctg ggcaacaaac gacactcagg attgaaggaa 1860
 accagggggc ccgagtgggg ctagtggctg tggacaaggg agtgtttgtg ctgaacaaga 1920
 agaacaaact cacacagagc aagatctggg atgtggtaga gaaggcagac attggtctca 1980
 ccccaggcag tgggaagaac tatgtctgtg tcttcatgga tgcaggcctg gccttcaaga 2040

caagccaagg actgcagact gaacagagag cagatcttga gtcaccaag ccagcagccc 2100
 gccgccgtcg ctcagtacag ttgatggaaa gaaggatgga caaagctggt cagtacactg 2160
 acaaggtctc tcggaagtgt tgtgaggatg gtatgcggga taccctatg agatacagct 2220
 gccagcgccg ggcacgcctc atcaccagg gcgagaactg cataaaggcc tcatagact 2280
 gctgcaacca catcaccaag ctgcgtgaac aacacagaag agaccacgtg ctgggcctgg 2340
 ccaggagtga attggaggaa gacataattc cagaagaaga tattatctct agaagccact 2400
 tcccacagag ctggttgtgg accatagaag agttgaaaga accagagaaa aatggaatct 2460

ctacgaaggt catgaacatc tttctcaaag attccatcac cacctgggag attctggcag 2520
 tgagcttgtc agacaagaaa gggatctgtg tggcagacc ctatgagatc agagtgatgc 2580
 aggacttctt cattgacctg cggctgcect actctgtagt gcgcaacgaa caggtggaga 2640
 tcagagctgt gctcttcaac taccgtgaac aggaggaact taaggtgagg gtggaactgt 2700
 tgcataatcc agccttctgc agcatggcca ccgccaagaa tcgctacttc cagaccatca 2760
 aaatccctcc caagtectcg gtggetgtac cgtatgcat tgtccccttg aagatcggcc 2820
 aacaagaggt ggaggtcaag gctgctgtct tcaatcactt catcagtgat ggtgtcaaga 2880

agacactgaa ggtcgtgcca gaaggaatga gaatcaaca aactgtggcc atccatacac 2940
 tggaccaga gaagctcggc caagggggag tgcagaaggt ggatgtgcct gccgcagacc 3000
 ttagcgacca agtgccagac acagactctg agaccagaat tatcctgcaa gggagcccgg 3060
 tggttcagat ggetgaagat gctgtggacg gggagcggct gaaacacctg atcgtgacce 3120
 ccgcaggctg tggggaacag aacatgattg gcatgacacc aacagtcatt gcggtacact 3180

acctggacca gaccgaacag tgggagaagt tcggcataga gaagaggcaa gaggccctgg 3240
 agctcatcaa gaaagggtag acccagcagc tggccttcaa acagcccagc tctgcctatg 3300

 ctgccttcaa caaccggccc cccagcacct gctgacagc ctactggtc aaggtcttct 3360
 ctctagctgc caacctcatc gccatcgact ctacgtcct gtgtggggct gttaatggt 3420
 tgattctgga gaaacagaag cgggatggtg tctttcagga ggatgggccc gtgattcacc 3480
 aagaaatgat tggtagcttc cggaacgcca aggaggcaga tgtgtcactc acagccttcg 3540
 tcctcatcgc actgcaggaa gccagggaca tctgtgaggg gcaggtcaat agccttctctg 3600
 ggagcatcaa caaggcaggg gagtatattg aagccagtta catgaacctg cagagacat 3660
 acacagtggc cattgctggg tatgcctgg cctgatgaa caaactggag gaaccttacc 3720

 tcggcaagtt tctgaacaca gccaaagatc ggaaccgctg ggaggagcct gaccagcagc 3780
 tctacaacgt agaggccaca tcttacgccc tctggcctt gctgctgctg aaagactttg 3840
 actctgtgcc ccctgtagtg cgctggctca atgagcaaag atactacgga ggcggctatg 3900
 gctccacca ggctacctc atggtattcc aagccttggc ccaatatcaa acagatgtcc 3960
 ctgaccataa ggacttgaac atggatgtgt ccttccacct ccccagccgt agctctgcaa 4020
 ccacgtttcg cctgctctgg gaaaatggca acctcctgcg atcggaagag accaagcaaa 4080
 atgaggcctt ctctctaaca gccaaaggaa aaggccgagg cacattgtcg gtggtggcag 4140

 tgtatcatgc caaactcaaa agcaaagtca cctgcaagaa gtttgacctc agggtcagca 4200
 taagaccagc ccctgagaca gccaaagac cggaggaagc caagaatacc atgttcttg 4260
 aaatctgcac caagtaactg ggagatgtgg acgccaactat gtccatcctg gacatctcca 4320
 tgatgactgg ctttgcctca gacacaaagg acctggaact gctggcctct ggagtagata 4380
 gatacatctc caagtacgag atgaacaaag ctttctccaa caagaacacc ctcatcatct 4440
 acctagaaaa gatttcacac accgaagaag actgcctgac cttcaaagtt caccagtact 4500
 ttaatgtggg acttatccag cccgggtcgg tcaaggtcta ctctattac aacctcgagg 4560

 aatcatgcac ccggttctat catccagaga aggacgatgg gatgctcagc aagctgtgcc 4620
 acagtgaaat gtgccggtgt gctgaagaga actgcttcat gcaacagtca caggagaaga 4680
 tcaacctgaa tgtccggcta gacaaggctt gtgagcccgg agtcgactat gtgtacaaga 4740
 ccgagctaac caacatagag ctgttggatg attttgatga gtacaccatg accatccagc 4800
 aggtcatcaa gtcaggctca gatgaggtgc aggcagggca gcaacgcaag ttcacagcc 4860
 acatcaagtg cagaaacgcc ctgaagctgc agaaaggaa gaagtacctc atgtggggcc 4920

tctcctctga ccctctgggga gaaaagccca acaccagcta catcattggg aaggacacgt 4980

gggtggagca ctggcctgag gcagaagaat gccaggatca gaagtaccag aaacagtgcg 5040

aagaacttgg ggcattcaca gaatctatgg tggtttatgg ttgtccaac tgactacagc 5100

ccagccctct aataaagctt cagttgtatt tcaccatc 5139

<210> 33

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 33

atcaactcac ctgtaataaa gcagccgaaa ggctgc 36

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 34

tttattacag gtgagttgat gg 22

<210> 35

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 35

agaaattcta ctacatctaa gcagccgaaa ggctgc 36

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 36

ttagatgtag tagaatttct gg 22

<210> 37

<211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyladenosine phosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> cm

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> cm

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-fluorocytidine

<220>

<221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-fluoroadenosine

<220><221> modified_base

<222> (10)..(11)

<223> 2'-fluorocytidine

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(16)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(20)
 <223>
 > 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (24)..(24)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (25)..(26)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (27)..(27)
 <223> gm

<220><221> modified_base

<222> (28)..(30)

<223> 2'aminodiethoxymethanol-Adenine-GalNAc

<220><221> modified_base

<222> (31)..(32)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (33)..(33)

<223> cm

<220><221> modified_base

<222> (34)..(34)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (35)..(35)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (36)..(36)

<223> cm

<400> 37

aucaacucac cuguauauaaa gcagccgaaa ggcugc

36

<210> 38

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5'Methoxy, Phosphonate-4'oxy- 2'-O-methyluridine phosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-fluorouridine phosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-fluorouridine
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-fluoroadenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-fluorouridine
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-fluoroadenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> cm
 <220><221> modified_base

 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-fluoroguanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-fluoroadenosine

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-methyluridine phosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-methylguanosine phosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (22)..(22)

<223> gm

<400> 38

uuuauuacag gugaguugau gg

22

<210> 39

<211> 36

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyladenosine phosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-fluoroadenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(5)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(7)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-fluorocytidine
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <
 223> 2'-fluorouridine
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-fluoroadenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-fluorouridine
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-fluoroadenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> um
 <220>
 ><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-fluorocytidine
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(20)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (24)..(24)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (25)..(26)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (27)..(27)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (28)..(30)
 <223> 2'aminodiethoxymethanol-Adenine-GalNAc

<220><221> modified_base

<222> (31)..(32)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (33)..(33)

<223> cm

<220><221> modified_base

<222> (34)..(34)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (35)..(35)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (36)..(36)

<223> cm

<400> 39

agaaaauuca cuacaucuaa gcagccgaaa ggcugc

36

<210> 40

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5'Methoxy, Phosphonate-4'oxy- 2'-O-methyluridine phosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-fluorouridine phosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-fluoroadenosine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-fluoroguanosine

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-fluoroadenosine

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-fluoroguanosine

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-fluorouridine

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-fluoroguanosine

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-fluoroadenosine

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-fluoroadenosine

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-fluorouridine
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(18)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-fluorocytidine
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-methyluridine phosphorothioate
 <220><221> modified_base

 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-methylguanosine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> gm
 <400> 40
 uuagauguag uagaauuucu gg

 <210> 41
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-methylcytidine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <
 <222> (3)..(3)

22

<223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(7)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(9)
 <223> 2'-fluoroadenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-fluoroguanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-fluoroadenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> cm
 <220><
 221> modified_base
 <222> (13)..(15)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> cm

<220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> cm
 <220>
 ><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (24)..(24)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (25)..(26)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (27)..(27)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (28)..(30)
 <223> 2'aminodiethoxymethanol-Adenine-GalNAc
 <220><221> modified_base
 <222> (31)..(32)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (33)..(33)
 <223> cm
 <220><221> modified_base

<222> (34)..(34)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (35)..(35)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (36)..(36)

<223> cm

<400> 41

cagcuaaaag acuuugacua gcagccgaaa ggcugc

36

<210> 42

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5'Methoxy, Phosphonate-4'oxy- 2'-O-methyluridine phosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-fluoroadenosine phosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-fluoroguanosine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-fluorouridine

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-fluorocytidine

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-fluoroadenosine
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-methyladenosine
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> gm
<220><221>
modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-fluorouridine
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> cm
<220><221> modified_base
<222> (12)..(13)
<223> um
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-fluorouridine
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> um
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-O-methyladenosine
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> gm
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> cm

<220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(21)
 <223> 2'-O-methylguanosine phosphorothioat
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> gm
 <400> 42
 uagucaaagu cuuuuagcug gg
 <210> 43
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-methylguanosine phosphorothioate
 <220><221> modified_base

 <222> (2)..(2)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(7)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-fluoroguanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-fluoroadenosine

22

<220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-fluorocytidine
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-fluorouridine
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(13)
 <223>
 > um
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(19)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <
 223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base
<222> (24)..(24)
<223> gm
<220><221> modified_base
<222> (25)..(26)
<223> cm
<220><221> modified_base
<222> (27)..(27)
<223> gm
<220><221> modified_base
<222> (28)..(30)
<223> 2'aminodiethoxymethanol-Adenine-GalNAc
<220><221> modified_base
<222> (31)..(32)
<223> gm
<220><221> modified_base
<222> (33)..(33)
<223> cm
<220><221> modified_base
<222> (34)..(34)
<223> um
<220><221> modified_base

<222> (35)..(35)
<223> gm
<220><221> modified_base
<222> (36)..(36)
<223> cm
<400> 43
gcuaaaagac uuugacuuua gcagccgaaa ggcugc
<210> 44
<211> 22
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct

36

<220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Methoxy, Phosphonate-4'oxy- 2'-O-methyluridine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-fluoroadenosine phosphorothioate
 <220><221> modified_base

 <222> (3)..(4)
 <223> 2'-fluoroadenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-fluoroguanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-fluorocytidine
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(9)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-fluoroadenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)

 <223>
 > um
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> cm

<220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-fluorouridine
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(17)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-methylcytidine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-methylguanosine phosphorothioate

 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> gm
 <400> 44
 uaaagucaaa gucuuuuagc gg
 <210> 45
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-methylcytidine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> um

22

<220><221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> cm
<220><221> modified_base
<222> (4)..(5)
<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> um
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> gm
<220><221> modified_base
<222> (8)..(9)
<223> 2'-fluoroadenosine
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-fluorocytidine
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-fluoroadenosine
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> gm
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-methyladenosine
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)

<223> gm
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> um
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-methyladenosine
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> cm
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> um
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-O-methyladenosine
<220><221> modified_base
<222> (21)..(21)
<223> gm
<220><221> modified_base

<222> (22)..(22)
<223> cm
<220><221> modified_base
<222> (23)..(23)
<223> 2'-O-methyladenosine
<220><221> modified_base
<222> (24)..(24)
<223> gm
<220><221> modified_base
<222> (25)..(26)
<223> cm
<220><221> modified_base
<222> (27)..(27)
<223> gm
<220><221> modified_base

<222> (28)..(30)
 <223> 2'aminodiethoxymethanol-Adenine-GalNAc
 <220><221> modified_base
 <222> (31)..(32)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (33)..(33)
 <223> cm
 <220><221>
 > modified_base
 <222> (34)..(34)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (35)..(35)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (36)..(36)
 <223> cm
 <400> 45
 cucaaugaac agagauacua gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 46
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Methoxy, Phosphonate-4'oxy- 2'-O-methyluridine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222>
 (2)..(2)
 <223> 2'-fluoroadenosine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-fluoroguanosine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-fluorouridine

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-fluoroadenosine

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-fluorocytidine

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> cm

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-fluorouridine

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (12)..(13)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-fluorocytidine

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-O-methylguanosine phosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (22)..(22)

<223> gm

<400> 46

uaguaucucu guucauugag gg

22

<210> 47

<211> 36

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyluridine phosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223>

> cm

<220><221> modified_base

<222> (3)..(4)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> cm

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> cm

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-fluoroadenosine

<220><221> modified_base

<222> (9)..(10)

<223> 2'-fluorocytidine

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-fluorouridine

<220><221> modified_base

<222>

(12)..(12)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (14)..(15)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (17)..(20)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (22)..(22)

<223> cm

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (24)..(24)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (25)..(26)

<223> cm

<220><221> modified_base

<222> (27)..(27)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (28)..(30)

<223> 2'aminodiethoxymethanol-Adenine-GalNAc

<220><221> modified_base

<222> (31)..(32)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (33)..(33)

<223> cm

<220><221> modified_base

<222> (34)..(34)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (35)..(35)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (36)..(36)

<223> cm

<400> 47

ucaacucacc uguauaaaa gcagccgaaa ggcugc

36

<210> 48

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5'Methoxy, Phosphonate-4'oxy- 2'-O-methyluridine phosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-fluorouridine phosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (3)..(4)

<223> 2'-fluorouridine

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-fluoroadenosine

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-fluorouridine

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> cm

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-fluoroadenosine

<220><221> modified_base

<222> (11)..(12)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> um
 <220><221>
 > modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-fluoroguanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(18)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-methyladenosine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-methylguanosine phosphorothioate

 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> gm
 <400> 48
 uuuuauuaca ggugaguuga gg
 <210> 49
 <211> 36

<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<220><221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 2'-O-methyluridine phosphorothioate
<220><221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> gm
<220><221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-methyladenosine
<220><221> modified_base
<222> (4)..(5)

<223> gm
<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-methyladenosine
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> gm
<220><221> modified_base
<222> (8)..(9)
<223> 2'-fluoroadenosine
<220><221> modified_base
<222> (10)..(11)
<223> 2'-fluorouridine
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> gm
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> cm
<220><221> modified_base

<222> (14)..(15)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> cm

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (19)..(20)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (22)..(22)

<223> cm

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (24)..(24)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (25)..(26)

<223> cm

<220><221> modified_base

<222> (27)..(27)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (28)..(30)
 <223> 2'aminodiethoxymethanol-Adenine-GalNAc
 <220><221> modified_base
 <222> (31)..(32)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (33)..(33)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (34)..(34)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (35)..(35)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (36)..(36)
 <223> cm
 <400> 49
 ugaggagaau ugcucauaa gcagccgaaa ggcugc

36

<210> 50
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Methoxy, Phosphonate-4'oxy- 2'-O-methyluridine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-fluorouridine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-fluoroadenosine
 <220><221> modified_base

<222> (4)..(4)
 <223> 2'-fluorouridine
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-fluoroguanosine

 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-fluoroadenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-fluoroadenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(13)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222>
 (14)..(14)
 <223> 2'-fluorocytidine
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> um
 <220><221> modified_base

<222> (16)..(17)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-methyladenosine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-methylguanosine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)

 <223> gm
 <400> 50
 uuaugaagca auuccucca gg
 <210> 51
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-methylguanosine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base

22

<222> (4)..(4)
 <223> gm
 <220><221> modified_base

 <222> (5)..(6)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-fluorouridine
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-fluoroguanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-fluorocytidine
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-fluorouridine
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223>
 > cm
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> um
 <220><221> modified_base

<222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(20)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222>
 > (23)..(23)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (24)..(24)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (25)..(26)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (27)..(27)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (28)..(30)
 <223> 2'aminodiethoxymethanol-Adenine-GalNAc
 <220><221> modified_base
 <222> (31)..(32)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (33)..(33)

<223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (34)..(34)
 <223> um
 <220><221> modified_base

 <222> (35)..(35)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (36)..(36)
 <223> cm
 <400> 51
 ggagaaugc uucauacaaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 52
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Methoxy, Phosphonate-4'oxy- 2'-O-methyluridine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-fluorouridine phosphorothioate
 <220><221> modified_base

 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-fluorouridine
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-fluoroguanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-fluorouridine
 <220><221> modified_base

<222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-fluorouridine
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)

 <223> 2'-fluoroadenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-fluoroadenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(16)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)

<223> um
 <220><221> modified_base
 <222>
 > (19)..(19)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-methylcytidine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-methylguanosine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> gm
 <400> 52
 uuuguauгаа gcaauucucc gg
 <210> 53
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <
 223> 2'-O-methyladenosine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> um
 <220><221> modified_base

22

<222> (5)..(7)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-fluoroguanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-fluorocytidine
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(11)
 <223>
 > 2'-fluorouridine
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(16)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(20)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base

<222> (21)..(21)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (24)..(24)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (25)..(26)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (27)..(27)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (28)..(30)
 <223> 2'aminodiethoxymethanol-Adenine-GalNAc
 <220><221> modified_base
 <222> (31)..(32)
 <223> gm
 <220><221>
 > modified_base
 <222> (33)..(33)
 <223> cm
 <220><221> modified_base
 <222> (34)..(34)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (35)..(35)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (36)..(36)

<223> cm
 <400> 53
 agauaaagcu ucaguuauaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 54
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Methoxy, Phosphonate-4'oxy- 2'-O-methyluridine phosphorothioate

 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-fluorouridine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-fluoroadenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-fluorouridine
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-fluoroadenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-methyladenosine
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-fluorocytidine
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> um

 <220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-fluoroadenosine

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> gm

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> cm

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-fluorouridine

<220><221> modified_base

<222> (15)..(16)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> um

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> cm

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-methyluridine phosphorothioate

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-methylguanosine phosphorothioate
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> gm
 <400> 54
 uuauaacuga agcuuuau cu gg 22
 <210> 55
 <211> 21
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 55
 aatgaggcct tctctctaac a 21
 <210> 56
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 56
 acttcttgca ggtgactttg 20
 <210> 57
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 57
 caaactttgc tttccctggt 20
 <210> 58
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 58

caacaaagtc tggcctgtat c	21
<210> 59	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 59	
ccaaactcag catcaacaca c	21
<210> 60	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 60	
ctgcatggtc ctggtagc	18
<210> 61	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 61	
gccaaagatc aactcacctg ta	22
<210> 62	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 62	
agacatagtg gcatcctggt	20
<210> 63	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	

<400> 63	
aatgaactgc aggacgagg	19
<210> 64	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 64	
aggtgagatg acaggagatc c	21
<210> 65	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 65	
ctttccttgg tcaggcagta t	21
<210> 66	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 66	
caacacttcg tggagtcctt	20
<210> 67	
<211> 5126	
<212> DNA	
<213> <i>Macaca fascicularis</i>	
<400> 67	
aaagccaact ccagcagtca ctgctcactc ctccccatcc tctcctctg tcctctgtc	60
cctctgacce tgcactgtcc cagcaccatg ggactcaact caggteccag cctgtgtctc	120
ctgtactactaa tccacctccc cctggctctg gggactecca tgtactctat gatcacceca	180
aacgtcttgc ggctggagag tgaggagacc gtggtgctgg aggcccatga cgccaatggg	240
gatgttccgg tcaactgtcac tgtccacgac ttcccaggca aaaaactggt gctgtccagt	300

gagaagaccg tgctgacccc tgccaccagc cacatgggca gcgtcaccat caggatccca 360

 gccacaagg agttcaagtc agaaaagggg cacaacaagt tcgtgactgt gcaggccacc 420
 ttcggggccc aagtgggtga gaaggtggta ctggctcagcc ttcagagcgg gtacctcttc 480
 atccagacag acaagacat ctacaccct ggctccacag ttctctgtcg gatcttcacc 540
 gtcaaccaca agctgctacc cgtgggccgg acggtcgtgg tcaacattga gaaccggac 600
 ggcatcccgg tcaagcagga ctcttgtct tctcagaacc aatttggcat cttgcccttg 660
 tcttgggaca ttccggaact cgtcaacatg ggccagtga agatccgagc ctactatgaa 720
 aattcgcgcg aacaggtctt ctccactgag ttgaggtga aggagtacgt gctgccccagt 780

 ttcgaggta tagtggagcc tacagagaaa ttctactaca tctataacca gaaggcctg 840
 gaggtacca tcaccgccag gttctctat gaaagaaag tggaggaac tgcctttgtc 900
 atcttcggga tccaggatgg cgagcagagg atttccctgc ctgaatccct caagcgcac 960
 cagattgagg atggctcagg agaccccgtg ctgagccgga aggtactgct ggacggggtg 1020
 cagaatcccc gaccggaaga cctagtgggg aagtccttgt atgtgtctgt caccgttacc 1080
 ctgcaactcag gcagtacat ggtgcaggcg gagcgcagcg ggatcccat cgtgacctct 1140
 ccctaccaga tccacttcac caagacgcc aagtacttca aaccaggaat gcctttgac 1200

 ctcatggtgt tcgtgacgaa ccccgatggc tctccagcct accgagtccc cgtggcagtc 1260
 cagggcgagg acgtgtgca gtcttaacc cagggagacg gcgtggccaa actcagcatc 1320
 aacacacacc ccagccagaa gcccttgagc atcacggtgc gcacgaagaa gcgggagctc 1380
 tcggaggcgg agcaggetac caggacatg gaggtcagc cctacagcac cgtgggcaac 1440
 tccaacaatt acctgcatct ctcagtcca cgtgcagagc tcagacctgg ggagaccctc 1500
 aacgtcaact tctctctgag aatggaccgc acccaggagg ccaagatccg ctactacacc 1560
 tacctgatta tgaacaaagg caagetgtt aaggtgggac gccaggtgag agagcctggc 1620

 caggacctgg tgggtgtgcc cctgtccatc accaccgact tcatcccttc cttccgcctg 1680
 gtggcctaact acacgtgat cggcgccaac ggccagaggg aagtgggtgc cgactccgtg 1740
 tgggtggacg tcaaggactc ttgcgtgggc tcgctggtgg taaaaagcgg ccagtcagaa 1800
 gacaggcagc cttaccgg gcagcagatg acctgaaga tagagggtga ccacggggcc 1860
 cgggtgggac tgggtgctgt ggacaagggc gtgtttgtgc tgaataagaa gaacaagctg 1920
 acgcagagta agatctggga cgtggtggag aaggcagaca tcggctgcac cccaggcagt 1980
 gggaaggatt acgtggtgt cttctcgat gcaggcctga cctttgcgag cagcagtggc 2040

cagcagacgg cccagagggc agaacttcag tgcccacagc cagccgcccg ccgacgccgt 2100
 tccgtgcagc tcgcgagaa gagaatggac aaagtgtgac agtaccctca ggagctgcgc 2160
 aagtgtcgc agcacggtat gcgggagaac cccatgaggt tctcatgcca gcgcccggacc 2220
 cgttacatca ccctggacga ggcgtgcaag aaggccttcc tggactgctg caactacatc 2280
 accgagctgc ggcggcagca cgcgcgggcc agtcacctgg gcctggccag gagtaacctg 2340
 gatgaggaca tcatgcaga agagaacatc gtttcccga gtgagttccc agagagttgg 2400
 ctgtggaaga ttgaagagtt gaaagaggca ccgaaaaacg gaatctccac gaagctcatg 2460

 aatatat ttt tgaagactc catcaccacg tgggagattc tggccgtgag ctgtgcagac 2520
 aagaaagga tctgtgtggc agacccttc gaggtcacag taatgcagga cttcttcac 2580
 gacctgcgcg tacctactc tgttgttcga aacgagcagg tggaaatccg agctgttctc 2640
 tacaattacc ggcagaacca agagctcaag gtgaggtgg aactactcca caatccagcc 2700
 ttctgcagcc tggccaccgc caagaggcgt caccagcaga ccgtaacat ccccccaag 2760
 tcctcgtgt ccgttcctta tgtcatcgtg ccctaaga ccggccagca ggaagtggaa 2820
 gtcaaggctg ccgtctacca tttttcacc agtgacggtg tcaggaagtc cctgaagtc 2880

 gtgccggaag gaatcagaat gaacaaaact gtggctgttc gcacgtgga tccagaacgc 2940
 ctgggcccagg aaggagtca gagagaggac gtcccactg cagacctcag tgaccaagtc 3000
 ccggacaccg agctgagac cagaattctc ctgcaagga ccccgggtgc ccagatgaca 3060
 gaggatgcca tcgatcgga acggctgaag cacctcatg tgacccctc ggctgcgga 3120
 gaacagaaca tgatccatc gacgccaca gtcatcgtg tgattacct ggatgaaacg 3180
 gaacagtggg agaagttcgg cccggagaag cggcaggggg cttggagct catcaagaag 3240
 gggtagacc agcagctggc cttcagaca ccagctctg ctttgcggc cttcctgaac 3300

 cgggcacca gcacctggct gaccgcctac gtggtaagg tcttctctt ggctgtcaac 3360
 ctcatgcca tcgactcca ggtcctctg cgggctgtta aatggctgat cctggagaag 3420
 cagaagccc acgggtctt ccaggagat gcgccctga tacatcaaga aatgactggt 3480
 ggattccgga acaccaacga gaaagacatg gcctcacgg ctttgttct catctcgtg 3540
 caagaggcta aagagattg cgaggagcag gtcaacagcc tgcccggcag catcactaaa 3600
 gcaggagact tcttgaagc caactacatg aacctacaga gatctacac tgtggccatc 3660
 gctgcctatg ccctggccca gatggcagg ctgaaggac ctttctcaa caaattctg 3720

 accacagcca aagataagaa ccgctgggag gagcctggc agcagctcta caatgtggag 3780
 gccacatcct atgccctctt ggccctactg cagctaaaag actttgactt tgtgcctccc 3840
 gtcgtcgtt ggctcaatga acagagatac tacggtggtg gctatggctc taccaggcc 3900

accttcatgg tgttccaagc cttggctcaa taccaaaagg atgtccctga tcacaaggaa 3960
 ctgaacctgg atgtgtccct ccaactgcc agtcgcagct ccaagatcat ccaccgtatc 4020
 cactgggaat ctgccagcct cctgcgatca gaagagacca aggaaaatga gggtttcaca 4080
 gtcacagctg aaggaaaagg ccaaggcacc ttgtcggtag tgacaatgta ccatgctaag 4140

 gccaaaggtc aactcacctg taataaatc gacctcaagg tcaccataaa accagcaccg 4200
 gaaacagaaa agaggcctca ggatgccaag aacactatga tccttgagat ctgtaccagg 4260
 taccggggag accaggatgc cactatgtct atactggaca tatccatgat gactggcttc 4320
 gttccagaca catgatgact caagcagctg gcaaacggcg ttgacagata catctccaag 4380
 tatgagctgg acaaagcctt ctccgatagg aacacctca tcatctacct ggacaaggtc 4440
 tcacactctg aggatgactg tatagctttc aaagttcacc aatattttaa tgtagagctt 4500
 atccagcctg gtgcagtcaa ggtctacgcc tattacaacc tggcggaaag ctgtaccggg 4560

 ttctaccacc cagaaaagga ggatggaaag ctgaacaagc tctgtcgtga tgagctgtgc 4620
 cgctgtgctg aggagaattg cttcatacaa aagttggatg acaaagtcac cctggaagaa 4680
 cggctggaca aggcctgtga gccaggagtg gactatgtgt acaagaccg actggtcaag 4740
 gcccgactgt ccaatgactt tgacgagtac atcatggcca ttgagcagat catcaagtca 4800
 ggctcggatg aggtgcaggt tggacaacag cgcacgttca tcagcccat caagtgcagg 4860
 gaagccctga agctggagga gagaaacac tacctcatgt ggggtctctc ctccgatttc 4920
 tggggagaga aaccaatct cagctacatc atcgggaagg acacctgggt ggagcactgg 4980

 cccgaggagg acgaatgcca agatgaagag aaccagaaac aatgccagga cctcggcacc 5040
 ttactgaga acatggttgt ctttgggtgc cccaactgac cacacccca ttccccact 5100
 cccaataaag cttcagttat atttca 5126