(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월20일
(11) 등록번호 10-2501980
(24) 등록일자 2023년02월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
C12Y 305/04004 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7008525
(22) 출원일자(국제) 2017년08월31일
심사청구일자 2020년08월20일
(85) 번역문제출일자 2019년03월25일
(65) 공개번호 10-2019-0042660
(43) 공개일자 2019년04월24일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/071912
(87) 국제공개번호 WO 2018/041973
국제공개일자 2018년03월08일
(30) 우선권주장
1614858.7 2016년09월01일 영국(GB)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
WO2016097212 A1
WO2014011053 A1
Angew. Chem. Int. Ed., 2014, Vol.53, pp.6267-6271
WO2010064231 A1

(73) 특허권자
프로큐알 테라퓨틱스 Ⅱ 비.브이.
네덜란드 레이덴 2333 CK, 제르니케드레프 9
(72) 발명자
투루넨, 잔네 쥬하
네덜란드 레이덴 2333 CK, 제르니케드레프 9, 프로큐알 테라퓨틱스 Ⅱ 비.브이. 내
아알토, 안띠
네덜란드 레이덴 2333 CK, 제르니케드레프 9, 프로큐알 테라퓨틱스 Ⅱ 비.브이. 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김동완

전체 청구항 수 : 총 19 항 심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 **화학적으로 변형된 단일 가닥 RNA-편집 올리고뉴클레오타이드**

(57) 요 약

본 발명은 진핵세포 내에서 표적 RNA 서열 내의 표적 뉴클레오타이드(아데노신)의 특이적 편집을 유도할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다. 이때 상기 올리고뉴클레오타이드는 분자 내에서 헤어핀 또는 스템-루프 구조를 그 자체 내에 지니지 않고 상기 올리고뉴클레오타이드는 표적 RNA 서열 내에 편집되는 뉴클레오타이드에 대향하는 위치에 비-상보적인 뉴클레오타이드를 포함한다.

대 표 도 - 도1

A: *SERPINA1* 를 표적으로 하는 AON ADAR60-1

3′-gacacgacugguagcuGCUcuuucccugacu-5′ (AON)
5′-AUAAGGCUGUGCUGACCAUCGAC**A**AGAAAGGGACUGAAGCUGCUGGGGCCAUGUUUUUAGAG-3′

B: *SERPINA1* 를 표적으로 하는 변형된 염기를 지닌 ADAR60-1 과 유사한 AON

3′-gacacgacugguagcuZXYcuuucccugacu-5′ (AON)
5′-AUAAGGCUGUGCUGACCAUCGAC**A**AGAAAGGGACUGAAGCUGCUGGGGCCAUGUUUUUAGAG-3′

(52) CPC특허분류
C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2310/321 (2013.01)
C12N 2310/344 (2013.01)
C12N 2310/3521 (2013.01)
C12N 2310/533 (2013.01)
C12N 2320/34 (2013.01)

(72) 발명자
클레인, 바르트
네덜란드 레이덴 2333 CK, 제르니케드레프 9, 프로큐알 테라퓨틱스 Ⅱ 비.브이. 내
반 신트 피에트, 렌카
네덜란드 레이덴 2333 CK, 제르니케드레프 9, 프로큐알 테라퓨틱스 Ⅱ 비.브이. 내
보우뎃, 줄리엔 아우구스트 저메인
네덜란드 레이덴 2333 CK, 제르니케드레프 9, 프로큐알 테라퓨틱스 Ⅱ 비.브이. 내

(30) 우선권주장
1616374.3 2016년09월27일 영국(GB)
1621467.8 2016년12월16일 영국(GB)
1703034.7 2017년02월24일 영국(GB)
1707508.6 2017년05월10일 영국(GB)

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포 내에 존재하는 ADAR 효소에 의해 표적 RNA 서열 내의 표적 아데노신을 탈아민화시켜 세포 내의 표적 RNA 서열을 지닌 이중가닥 복합체를 형성할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(AON)에 있어서,

ⅰ) AON은 3개의 연속적 뉴클레오타이드의 중심 트리플렛(Central Triplet)을 포함하고,

ii) 표적 아데노신에 직접 대향하는 뉴클레오타이드는 중심 트리플렛의 중간 뉴클레오타이드이고,

iii) 중심 트리플렛의 중간 뉴클레오타이드는 시티딘이고,

iv) 중심 트리플렛 내의 1개, 2개 또는 3개의 뉴클레오타이드는 당 변형 또는 염기 변형을 포함하여 AON이 표적 아데노신의 탈아민화를 유도하는데 안정성 또는 효과성을 부여하며,

v) AON은 5'-말단 O-6-벤질구아노신을 포함하지 않고,

vi) AON은 SNAP-태그 도메인에 공유결합으로 연결되지 않고,

vii) 중간 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형을 지니지 않고, 및

viii) AON은 포유류 ADAR 효소에 결합할 수 있는 분자내 스템-루프 구조를 형성할 수 있는 부분을 지니지 않음

을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 중심 트리플렛 내의 2개 또는 3개의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형을 지니지 않음을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 중심 트리플렛 내의 2개 또는 3개의 뉴클레오타이드는 2'-O-알킬 변형을 지니지 않음을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 당 변형은 데옥시리보스(DNA), 비잠금 핵산(UNA) 및 2'-플루오로리보스로 구성된 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 AON은 포스포로티오에이트, 3'-메틸렌포스포네이트, 5'-메틸렌포스포네이트, 3'-포스포로아미데이트 및 2'-5'-포스포디에스테르로 구성된 군에서 선택된 분자간 결합 변형을 적어도 하나 이상 포함함

을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 8

제 7항에 있어서, AON의 5' 및 3' 말단의 2, 3, 4, 5 또는 6개 말단 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 결합으로 연결되어 있음을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 염기 변형은 2-아미노퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 3-디아자아데노신, 7-디아자아데노신, 7-메틸아데노신, 8-아지도아데노신, 8-메틸아데노신, 5-하이드록시메틸시토신, 5-메틸시티딘, 피롤로시티딘, 7-아미노메틸-7-디아자구아노신, 7-디아자구아노신, 7-메틸구아노신, 8-아자-7-디아자구아노신, 티에노구아노신, 이노신, 4-티오-우리딘, 5-메톡시우리딘, 디하이드로우리딘 및 슈도우리딘으로 구성된 군에서 선택됨을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 10

삭제

청구항 11

제 1항에 있어서, 중심 트리플렛 외부의 AON 내의 하나 또는 그 이상의 뉴클레오타이드는 DNA, 2'-O-메틸 그룹과 같은 2'-O-알킬 그룹, 2'-O-MOE 그룹, 2'-F 그룹, 2'-NH_2 그룹, 잠금 핵산(LNA) 또는 그의 조합으로 구성된 군에서 선택된 변형을 포함함을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 12

제 1항에 있어서, AON은 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개 뉴클레오타이드보다 길고 100개 뉴클레오타이드보다 짧음을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 13

제 12항에 있어서, AON은 18 내지 70개 뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드

청구항 14

삭제

청구항 15

제 1항에 있어서,

상기 AON은

낭포성 섬유증, 헐러(Hurler) 증후군, 알파-1-항트립신(A1AT) 결핍증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 백반증, 근위축성 경화증, 천식, 지중해 빈혈, 카다실 증후군, 샤르코-마리-투스 병, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 근위부 척수성 근위축증(DSMA), 뒤센/베커 근이영양증, 이영양성 수포성 표피 박리증, 표피 박리증, 파브리 병, Factor V Leiden 관련 질환, 가족성 선종, 용종증, 갈락토스혈증, 고쉐 병, 포도당-6-인산 탈수소 효소, 혈우병, 유전성 혈색소증, 헌터 증후군, 헌팅턴병, 염증성 장질환(IBD), 유전성 다응집 증후군, 레베르 선천성 흑내장, 레쉬-니한 증후군, 린치 증후군, 마르팡 증후군, 뮤코다당증, 근이영양증, 근긴장성 이영양증 Ⅰ형과 Ⅱ형, 신경 섬유

종증, 니만-피크 병 A형, B형과 C형, NY-eso1 관련 암, 포이츠-제거스 증후군, 페닐케톤요증, 폼페 병, 원발성 섬모질환, 프로트롬빈 G20210A 변이와 같은 프로트롬빈 변이 관련 질환, 폐 고혈압, 망막 색소 변성증, 샌드호프 병, 중증 결합 면역 결핍 증후군(SCID), 겸상 적혈구 빈혈, 척추성 근위축증, 스타가르트 병, 테이-삭스 질병, 어셔 증후군, X- 연결된 면역 결핍, 스터지-웨버 증후군 및 암으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 유전 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 16

삭제

청구항 17

ⅰ) 제 1항에 따른 AON을 비-인간 세포에 제공하는 단계;

ii) AON의 세포에 의한 업테이크를 허용하는 단계;

iii) AON을 표적 RNA 서열에 어닐링을 허용하는 단계;

iv) 야생형 효소에서 발견되는 천연 dsRNA 결합 도메인을 포함하는 포유류 ADAR 효소가 표적 RNA 서열에서 표적 아데노신을 이노신으로 탈아민화시키는 것을 허용하는 단계; 및

ⅴ) 선택적으로 RNA 서열 내에서 이노신의 존재를 확인하는 단계;

를 포함하는 비-인간 세포 내 표적 RNA 서열 내에 존재하는 적어도 하나의 특이 표적 아데노신의 탈아민화 방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, 상기 단계 ⅴ)는

a) 표적 RNA를 서열 분석하는 단계;

b) 상기 표적 아데노신이 UGA 또는 UAG 정지 코돈에 위치하고 상기 탈아민화을 통해 UGG 코돈으로 편집된 경우 기능적으로 신장된 전체 길이 또는 야생형 단백질의 존재를 평가하는 단계;

c) 2개의 표적 아데노신이 UAA 정지 코돈에 위치하고 2개의 표적 아데노신의 탈아민화을 통해 UGG 코돈으로 편집된 경우 기능적으로 신장된 전체 길이 또는 야생형 단백질의 존재를 평가하는 단계;

d) 상기 탈아민화에 프리-mRNA의 스플라이싱이 변경되었는지 여부를 평가하는 단계; 및

e) 상기 탈아민화 후 표적 RNA가 기능적으로 신장된 전체 길이 또는 야생형 단백질을 기능적 판독을 사용하여 암호하는 단계;

를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

제 1항에 있어서, AON의 5' 및 3' 말단의 2, 3, 4, 5 또는 6개 말단 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 또는 잠금 핵산(LNA) 결합으로 연결되어 있음을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 21

제 12항에 있어서, AON은 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개 뉴클레오타이드보다 길고 60개 뉴클레오타이

드보다 짧음을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 22

제 13항에 있어서, AON은 18 내지 60개 뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드

청구항 23

제 13항에 있어서, AON은 18 내지 50개 뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드

청구항 24

제 1항에 있어서, AON은 인간 세포 내의 표적 RNA 서열과 이중 가닥 복합체를 형성할 수 있음을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드

청구항 25

제 1항에 있어서, 표적 RNA 서열은 CFTR, CEP290, 알파1-항트립신(A1AT), 구아닌 뉴클레오타이드 결합 단백질(GNAQ) 또는 LRRK2를 암호화하거나, 표적 RNA가 IDUA 유전자에 의해 암호화 됨을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 의약 분야에 관한 것이다. 보다 상세하게는 본 발명은 유전자 변형을 교정하고 및/또는 특정 표적 RNA의 서열을 변경하기 위해 RNA 서열을 단일 가닥 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의해 표적화시키는 RNA 편집 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 올리고뉴클레오타이드에 보다 안정성을 부여하고 RNA-편집 효율을 증가시키는 단일 가닥 RNA-편집 올리고뉴클레오타이드의 화학적 변형에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] RNA 편집은 진핵 세포가 RNA 분자의 서열을 변경시키는 자연적 과정으로 종종 위치 특이적인 정교한 방식으로 진행된다. 이에 따라 게놈 코드화된 RNA 레퍼토리를 10의 몇 승까지 증폭시킨다. RNA 편집 효소는 동물과 식물 전체에 걸쳐 진핵생물 내에서 존재해 왔으며 이러한 프로세스는 선충(Caenorhabditis elegans)과 같은 가장 간단한 생명체에서 인간에 이르기까지 후생동물(metazoans) 내에서 세포의 항상성을 유지하는 데 중요한 역할을 한다.

[0003] RNA 편집의 예로는 아데노신(A)을 이노신(I)으로 전환하는 것과 시티딘(C)을 우리딘(U)으로 전환시키는 것이 있다. 이들은 아데노신 디아미나제 및 시티딘 디아미나제로 불리는 효소를 통해 발생한다. 가장 광범위하게 연구된 RNA 편집 시스템은 아데노신 디아미나제 효소이다.

[0004] 아데노신 디아미나제는 인식 도메인 및 촉매 활성 도메인을 포함하는 다중 도메인 단백질이다. 인식 도메인은 특정한 이중 가닥 RNA(dsRNA) 서열 및/또는 형상을 인식하는 반면 촉매 활성 도메인은 뉴클레오베이스의 탈아민화(deamination)에 의해 표적 RNA의 인근 또는 어느 정도 미리 예정된 위치에서 아데노신을 이노신으로 전환시킨다. 이노신은 세포의 번역화 과정에 의해 구아노신으로 판독된다. 이는 편집된 아데노신이 mRNA 또는 프리-mRNA의 코딩 영역에 존재하면 단백질 서열을 다시 코딩할 수 있는 것이다.

[0005] A로부터 I로의 전환은 또한 표적 mRNA의 5' 비코딩 서열에서 발생할 수 있으며 N- 말단으로 연장된 단백질을 유발하는 원래의 시작 부위의 업스트림에 새로운 번역 시작 부위를 생성한다. 편집 이벤트는 3' UTR에서 발생할 수 있으며 miRNA 기반 조절과 폴리아데닐화에 영향을 미친다. 또한 A로부터 I로의 전환은 프리-mRNA의 인트론 또는 엑손의 스플라이스 엘레멘트에서 발생될 수 있으므로 스플라이싱 패턴의 변경을 야기한다. 결과적으로 엑

손은 포함되거나 스킵핑 될 수 있다. 아데노신 디아미나제는 인간 디아미나제 hADAR1, hADAR2 및 hADAR3을 포함하여 RNA(ADAR)에 작용하는 아데노신 디아미나제라고 불리는 효소 패밀리의 일부이다.

[0006] 아데노신 디아미나제를 적용하는 표적 RNA를 편집하기 위한 올리고뉴클레오타이드의 사용 방법은 당업계에 공지되어 있다. Montiel-Gonzalez 등(PNAS 2013, 110 (45) : 18285-18290)은 boxB RNA헤어핀 서열을 인식하는 박테리오파지 람다 N 단백질에 융합된 hADAR2 단백질의 아데노신 디아미나제 도메인을 포함하는 유전자 공학 융합 단백질을 사용한 표적 RNA의 편집을 기술하였다. hADAR2의 천연 dsRNA 결합 도메인을 제거하여 천연 ADAR의 기질 인식 특성을 제거하고 λ-N-단백질의 boxB 인식 도메인으로 대체하였다.

[0007] 저자들은 편집을 위한 표적 서열에 상보적인 '가이드 RNA' 부분을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제조하고N-도메인-디아미나제 융합 단백질에 의한 서열 특이적 인식을 위해 boxB 부분에 융합시켰다. 이에 따라 가이드 RNA 올리고뉴클레오타이드가 아데노신 디아미나제 융합 단백질을 충실하게 표적 부위로 향하게 인도하여 표적 RNA의 가이드 RNA-지시 부위-특이적 A의 I로의 편집을 가능하게 하는 것을 개시하였다.

[0008] Montiel-Gonzalez 등(2013)의 문헌에 개시된 가이드 RNA는 그 길이가 50 뉴클레오타이드보다 더 길다. 치료용 세팅에서의 이 방법의 단점은 트렁크화 절단된 천연 ADAR 단백질의 아데노신 디아미나제 도메인에 유전적으로 융합된 박테리오파지 λ N-단백질의 boxB 인식 도메인으로 이루어진 융합 단백질에 대한 요구이다.

[0009] 이는 표적 세포가 주요 장애물인 융합 단백질로 형질 도입되거나 표적 세포가 발현을 위해 인공 아데노신 디아미나제 융합 단백질을 코딩하는 핵산 컨스트럭트로 형질 감염되도록 요구한다. 후자의 요구 사항은 유전적 장애를 교정하기 위한 인간 질병 치료와 같이 다세포 생물에서 편집이 이루어질 때 어느 사소한 장애물도 없어야 한다는 조건이 필요하다.

[0010] Vogel 등(2014. Angewandte Chemie Int Ed 53 : 267-271)은 벤질구아노신 치환된 가이드 RNA 및 유전적으로 조작된 융합 단백질을 사용하여 eCFP 및 인자 V 라이덴을 위한 RNA 코딩의 편집을 개시하고 있다. 이때 융합 단백질은 dsRNA 결합 도메인이 결여된 ADAR1 또는 ADAR2의 아데노신 디아미나제 도메인은 O6-알킬구아닌-DNA-알킬전이효소인 SNAP-태그 도메인에 유전적으로 융합시킨 단백질이다.

[0011] 유전적으로 조작된 인공 디아미나제 융합 단백질은 5'-말단 O6-벤질구아노신 변형을 통해 가이드 RNA에 공유 결합되어 있는 SNAP- 태그 도메인을 통해 배양된 HeLa 세포 내의 표적 RNA 내에서 원하는 편집 사이트를 표적화시킬 수 있다. 이 시스템은 Montiel-Gonzalez 등(2013)에 의해 기술된 유전자 조작된 ADAR과 같은 유사한 결점을 지닌다. 그것은 처음에 ADAR 유전자 변형 없이 시스템을 적용하고 이어서 표적 RNA를 보유한 세포를 트랜스펙션시키거나 형질 도입하여 유전자 조작 단백질을 세포에 제공하는 방법이 명확하지 않기 때문이다. 분명히 이 시스템은 예를 들면 치료 환경에서 인간에게 적용하기에 용이하지 않다.

[0012] Woolf 등(Proc Natl Acad Sci USA 92 : 8298-8302)은 25 내지 52 뉴클레오타이드 길이를 지닌 보다 더 긴 단일 가닥 안티센스 RNA 올리고뉴클레오타이드를 사용한 간단한 접근 방법을 개시하였다. 특히 34-머 및 52-머의 보다 긴 올리고뉴클레오타이드는 내인성 ADAR에 의한 표적 RNA의 편집을 증진시킬 수 있는 것으로 이는 표적 RNA 이중 가닥 특성과 여기에 혼성화된 올리고뉴클레오타이드에 기인하는 것이다.

[0013] 표적 RNA 서열에 100% 상보적인 Woolf 등(1995)의 올리고뉴클레오타이드는 마이크로인젝션에 의해 세포 추출물 또는 양서류(Xenopus) 난모세포에서 작용하는 것으로 나타났으며 특이성에 심각한 문제가 있어 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 표적 RNA 가닥 내의 거의 모든 아데노신은 편집되었다.

[0014] 각각의 뉴클레오타이드 내에 2'-O-메틸 변형을 지니고 있는 34개의 뉴클레오타이드 길이를 지닌 올리고뉴클레오타이드를 시험하였으며 Woolf 등(1995)에는 불활성화 됨을 나타내었다.

[0015] 뉴클레아제에 대한 안정성을 확보하기 위해 5'- 말단 및 3'- 말단 5개의 뉴클레오타이드에서 2'-O-메틸-변형된 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드로 변형된 34-머 RNA를 또한 시험하였다. 이 올리고뉴클레오타이드의 중심 비변형 영역은 내인성 ADAR에 의한 표적 RNA의 편집을 촉진하고 말단부 변형은 엑소뉴클레아제 분해에 대한 보호를 제공하는 것으로 나타났다. Woolf 등(1995)은 표적 RNA 서열에서 특이적 표적 아데노신의 탈아민화를 달성하지 못했다.

[0016] 안티센스 올리고뉴클레오타이드 내의 비변형 뉴클레오타이드에 대향하는 거의 모든 아데노신은 편집되었다. 이는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 5'- 및 3'-말단 5개 뉴클레오타이드가 변형된다면 중심부 비변형 영역 내의 뉴클레오타이드에 대향하는 거의 모든 아데노신은 편집되고 또한 아무런 뉴클레오타이드가 변형되지 않았다면 표적 RNA 가닥 내에 거의 모든 아데노신이 편집되는 것이다. ADAR은 어느 이중 가닥 RNA(dsRNA)와도 작용한

다.

[0017] '무차별(promiscuous) 편집'이라고 칭하는 과정을 통해 효소는 dsRNA에서 다수의 아데노신을 편집할 수 있다. 따라서 이러한 무차별 편집을 회피하고 표적 RNA 서열에서 특정 아데노신만을 표적화하는 방법 및 수단이 요구된다.

[0018] Vogel 등(2014)은 편집되지 않아야 하는 아데노신에 대향되는 위치에서 올리고뉴클레오타이드 내에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오타이드를 사용함으로써 오프-표적 편집이 억제될 수 있음을 보여 주었고 표적 RNA에서 특이적으로 표적화된 아데노신에 직접적으로 대향되는 비변형 뉴클레오타이드의 사용을 나타내었다. 그러나 표적 뉴클레오타이드에 특이적 편집 효과는 발생되지 않았으며 이는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 공유 결합을 지니는 재조합 ADAR 효소의 사용 없이도 가능하였다.

[0019] WO 2016/097212는 RNA의 표적화된 편집을 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (AON)를 개시하였으며 이때 AON은 표적 RNA 서열('표적화 부분'으로 지칭됨)에 상보적인 서열 및 스템-루프 구조('리크루트먼트 부분'으로 지칭됨)의 존재를 특징으로 한다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 '악시오머(axiomer) AON' 또는 '셀프-루핑(self-looping) AON'이라고 불린다. 리크루트먼트 부분은 세포에 존재하는 천연 ADAR 효소를 표적 부분과 표적 서열의 혼성화에 의해 형성된 dsRNA로 모집하는 데 작용한다.

[0020] 리크루트먼트 부분으로 인해 컨쥬게이트 엔티티 또는 변형된 재조합 ADAR 효소의 존재가 필요 없게 된다. WO 2016/097212는 리크루트먼트 부분을 천연 기질(예를 들면 GluB 수용체) 또는 ADAR 효소의 dsRNA 결합 영역에 의해 인식되는 것으로 알려진 Z-DNA 구조 중 하나를 모방하는 스템-루프(stem-loop) 구조로 기술한다.

[0021] 스템-루프 구조는 단일 핵산 가닥 내에서 형성된 2개의 분리된 핵산 가닥 또는 분자 내 스템 루프 구조에 의해 형성된 분자간 스템-루프(intermolecular stem-loop) 구조일 수 있다. WO 2016/097212에 기술된 리크루트먼트 부분의 스템-루프 구조는 분자 내 스템-루프 구조이며, AON 자체 내에 형성되고 ADAR을 유도할 수 있다.

[0022] 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 또 다른 편집 기술은 CRISPR/Cas9 시스템으로 알려져 있지만 이 편집 복합체는 DNA에 작용한다. 후자의 방법은 가이드 올리고뉴클레오타이드와 함께 CRISPR/Cas9 효소의 표적 세포 또는 이를 코딩하는 발현 컨스트럭트에 동시 전달을 필요로 하기 때문에 상기 기술된 ADAR 시스템과 동일한 결점이 있다.

[0023] 상기한 바와 같이 포유류 세포에서 심지어 전체 생물체 내에서 내인성 핵산을 특이 적으로 편집하기 위해 내인성 세포 경로 및 자연적으로 이용 가능한 ADAR 효소를 이용할 수 있는 종래 기술의 방법과 관련된 문제점 없을 지니지 않는 새로운 기술 및 화합물에 대한 필요성이 남아있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0024] 본 발명은 하나의 실시형태에서 세포 내에서 특히 인간 세포 내에서 표적 RNA서열과 이중 가닥 복합체를 형성할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(AON)를 사용하여 상기 세포 내에 존재하는 ADAR 효소에 의한 표적 RNA 서열 내의 표적 아데노신의 탈아민화를 통해 3개의 연속적인 뉴클레오타이드의 중심 트리플렛(Central Triplet)을 포함하는 RNA 편집에 관한 표적화 접근법을 제공함으로써 선행 기술에 따른 방법의 결점을 해소한 것이다.

[0025] 상기 표적 아데노신에 직접 대향하는 뉴클레오타이드는 중심 트리플렛의 중간 뉴클레오타이드이고, 중심 트리플렛의 중간 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형을 지니지 않으며; 및 상기 중심 트리플렛의 1, 2 또는 3개의 뉴클레오타이드는 당 변형 및/또는 염기 변형 및/또는 포스포디에스테르 변형(포스포로(디)티오에이트 또는 아미데이트)을 포함한다.

[0026] 본 발명의 AON은 그의 기본 구조가 바람직하게는 단일 가닥 올리고리보뉴클레오타이드이다.

[0027] 본 발명은 또한 바람직하게는 낭포성 섬유증, 헐러(Hurler) 증후군, 알파-1-항트립신(A1AT) 결핍증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 백반증, 근위축성 경화증, 천식, 지중해 빈혈, 카다실 증후군, 샤르코-마리-투스 병, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 근위부 척수성 근위축증(DSMA), 뒤센/베커 근이영양증, 이영양성 수포성 표피 박리증, 표피

박리증, 파브리 병, Factor V Leiden 관련 질환, 가족성 선종, 용종증, 갈락토스혈증, 고쉐 병, 포도당-6-인산 탈수소 효소, 혈우병, 유전성 혈색소증, 헌터 증후군, 헌팅틴병, 염증성 장질환(IBD), 유전성 다응집 증후군, 레베르 선천성 흑내장, 레쉬-니한 증후군, 린치 증후군, 마르팡 증후군, 뮤코다당증, 근이영양증, 근긴장성 이영양증 Ⅰ형과 Ⅱ형, 신경 섬유종증, 니만-피크 병 A형, B형과 C형, NY-eso1 관련 암, 포이츠-제거스 증후군, 페닐케톤요증, 폼페 병, 원발성 섬모질환, 프로트롬빈 G20210A 변이와 같은 프로트롬빈 변이 관련 질환, 폐 고혈압, 망막 색소 변성증, 샌드호프 병, 중증 결합 면역 결핍 증후군(SCID), 겸상 적혈구 빈혈, 척추성 근위축증, 스타가르트 병, 테이-삭스 질병, 어셔 증후군, X-연결된 면역 결핍, 스터지-웨버 증후군 및 암과 같은 유전 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명에 따른 AON에 관한 것이다.

[0028] 본 발명은 세포에서 표적 RNA 서열 내에 존재하는 특정 표적 아데노신의 탈아민화 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 세포에 본 발명에 따른 AON을 제공하는 단계; 상기 AON의 세포에 의한 업테이크를 허용하는 단계; 상기 AON을 표적 RNA 서열에 어닐링을 허용하는 단계; 야생형 효소에서 발견되는 천연 dsRNA 결합 도메인을 포함하는 포유류 ADAR 효소가 표적 RNA 서열에서 표적 아데노신을 이노신으로 탈아민화시키는 것을 허용하는 단계; 및 선택적으로 RNA 서열 내에서 이노신의 존재를 확인하는 단계;로 이루어져 있다.

[0029] 본 발명의 바람직한 실시형태에서 표적 RNA 서열은 CFTR(예를 들면 1784G>A 변이 편집), CEP290(예를 들면 c.2991+1655A>G 변이 편집), 알파1-항트립신(A1AT; 9989G>A 변이 또는 1096G>A 변이 편집), 구아닌 뉴클레오타이드 결합 단백질((GNAQ; 예를 들면 548G>A 변이 편집) 또는 LRRK2(예를 들면 G6055A 변이 편집)를 암호화하며 또한 표적 RNA는 IDUA 유전자(예를 들면 c.1205G>A(W402X) 변이 편집)에 의해 암호화될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 표적 아데노신 A를 굵은체로 하여 인간의 변이된 SERPINA1 표적 RNA 서열 (하부 가닥; 서열번호: 1)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드(AON; 상부 가닥)의 상보성을 나타낸 것이다. ADON60 시리즈의 AON 서열은 3'에서 5'로 나타내었으며(도 2에 나타난 방향과는 대조적으로), AON의 중심 트리플렛에는 밑줄이 그어져 있다. 본 실시예에서 설명한 바와 같이 변형된 중심 트리플렛의 위치는 YXZ로 나타내었다.

도 2는 본 명세서에 개시된 RNA 편집 및 안정성 평가를 시험하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드(AON) 및 센스올리고뉴클레오타이드(SON)를 나타낸 것이다. 독립적인 서열은 표시된 서열번호를 지닌다. 특정 YXZ 염기 변형은 세 번째 컬럼에 언급되어 있다. 소문자 뉴클레오타이드는 RNA 및 2'-O-메틸 변형된 것이다. 대문자 뉴클레오타이드는 DNA인 괄호 안의 [NNN] 뉴클레오타이드를 제외하고는 RNA이다. (nnn)으로 표시된 소문자 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 RNA로 변형된 뉴클레오타이드이다.

<nnn>으로 표시된 소문자 뉴클레오타이드는 2'-NH_2 RNA로 변형된 뉴클레오타이드이다. {N}으로 표시된 핵산은 비잠금 핵산(UNA)이다. idT는 붕괴에 대한 내성을 강화시키고 PCR 증폭 동안 연장으로부터 AON의 3'-말단을 차단하는 3' 역전된 T 변형을 나타낸다. *=포스포로티오에이트 결합; '=3'-메틸렌포스포네이트 결합; "=5'-메틸렌포스포네이트 결합; ^=3'-포스포로아미데이트 결합; #=2'-5' 포스포디에스테르 결합이다.

도 3은 AON의 뉴클레아제 내성을 나타내며, FBS 함유 배지에서 배양한 후 변성 겔 전기영동에 의해 분석하였다(RX로 표시). 대조군을 PBS에서 배양하였다(CTL). AON의 확인(ADAR60-1 부터 ADAR60-21)은 패널의 상부에 나타내었다(60-1부터 60-21로 약칭, 도 2 참조). 하부 밴드(화살표로 표시)는 AON의 절단으로 인한 분해 생성물이며, 상부 밴드는 전체 길이 AON이다. 마커 레인은 저분자량의 마커를 포함하며 10 내지 100개의 뉴클레오타이드(Affymetrix) 사이의 14개의 올리고뉴클레오타이드 단편을 10개 내지 50개 뉴클레오타이드 사이는 5개 뉴클레오타이드의 증분으로, 50개 내지 100개 뉴클레오타이드 사이는 10개 뉴클레오타이드의 증분으로 표시하였다.

도 4는 표적 아데노신 A를 굵은체로 하여 인간의 변이된 IDUA 표적 RNA 서열(하부 가닥; 서열번호: 2)에 대한 AON(상부 가닥)의 상보성을 나타낸 것이다. ADAR68 시리즈의 AON 서열은 3'에서 5'로 나타내었으며(도 2에 나타난 방향과는 대조적으로), AON의 중심 트리플렛에는 밑줄이 그어져 있다. 본 실시예에서 설명한 바와 같이 변형된 중심 트리플렛의 위치는 XXY로 나타내었다.

도 5는 FBS 함유 배지에서 배양한 후 변성 겔 전기영동에 의해 분석한 변이 마우스 Idua 유전자(Hurler 모델)에 대해 지시된 올리고뉴클레오타이드 ADAR65-1, -18, -20, -21 및 -22의 안정성을 나타낸다. 대조군을 PBS로 배양하였다. 화살표는 붕괴 생성물을 나타낸다. 상부 밴드는 전체길이 AON이다. 마커 레인은 저분자량의 마커를 포함하며 10 내지 100개의 뉴클레오타이드(Affymetrix) 사이의 14개의 올리고뉴클레오타이드 단편을 10개 내지 50

개 뉴클레오타이드 사이는 5개 뉴클레오타이드의 증분으로, 50개 내지 100개 뉴클레오타이드 사이는 10개 뉴클레오타이드의 증분으로 표시하였다. 2 가지 상이한 배양 시간(2시간 및 18시간) 동안의 붕괴에 대한 AON 감수성은 밴드의 비율에 의해 표시되고 하부 생성물의 높은 출현율은 안정성 감소를 나타낸다.

도 6은 도 5와 유사하게 PBS 또는 FBS에서 2시간 또는 18시간 배양한 후 변성 겔 전기영동에 의해 분석한 추가 ADAR65 올리고뉴클레오타이드의 안정성을 나타낸다.

도 7은 4개의 ADAR93 올리고뉴클레오타이드의 안정성을 나타낸 것이며, 그 중 ADAR93-2는 중심 트리플렛에 비변형 RNA를 포함하며 다른 3개(ADAR93-6, -8 및 -9)는 중심 트리플렛에 2개 또는 3개의 DNA 뉴클레오타이드를 지닌다. 추가적인 변형의 차이는 도 2에 나타난 바와 같다. 안정성은 PBS, DMEM + 15% FBS, 단일 공여자 인간 뇌척수액(CSF) 및 성별 혼합 인간 간 리소좀(Lyso)에서 2시간, 24시간 또는 3일 동안 배양한 후 변성 겔 전기영동에 의해 분석하였다.

도 8은 과발현된 ADAR2 및 SERPINA1 변이 ssRNA 표적을 지니는 HEK293 세포 용 해물을 사용하여 시험관 내 편집 분석 후 RT-PCR에 의해 생성된 PCR 단편의 생거 (Sanger) 서열 분석을 나타낸다. ADAR60-1(A) 및 ADAR60-15(B)를 사용하였다. 도 2를 참조한다. 음성 대조군으로는 ADAR60-15를 지니지만 세포 용해물을 지니지 않는 동일한 분석(C)을 사용하였으며 또한 AON 부재 하에서 HEK293 세포 용해물(ADAR2 과발현)을 사용하는 동일한 분석(D)을 사용하였다. 모든 패널 위의 서열은 서열번호: 35이다.

도 9는 세포로부터 RT-PCR 증폭된 GFP RNA의 서열분석 결과를 나타낸 것으로, GFP W57X 컨스트럭트를 안정적으로 발현하고 ADAR2및 개별적으로 2개의 올리고뉴클레오타이드(ADAR59-2 및 ADAR59-10)로 트랜스펙트시킨 것이다. 이때 ADAR59-10의 중심 트리플렛 내의 아데닌은 2-아미노퓨린이었다. ADAR59-2는 이러한 변형을 지니지 않는다(도 2 참조). 이는 RNA 편집 효율에 대한 이 특정 변형의 증진 효과를 나타낸다. 모든 패널 위의 서열은 서열번호: 36이다.

도 10은 마우스 HEPA1-6 세포(A) 및 CMT64 세포(B)로부터 분리된 RNA로부터 cDNA를 통해 생성된 PCR 생성물의 서열분석 결과를 나타낸 것으로, 트랜스펙트 되지 않거나(NT, 좌측 패널) 또는 비-표적화된 대조군 올리고뉴클레오타이드로 트랜스펙트된(NTO, 중간 패널) 또는 ADAR94-1로 트랜스펙트된(우측 패널) 것으로 마우스 *Snrpa* mRNA의 정지 코돈을 편집하였다. 화살표로 표시된 위치에서 백그라운드 수준보다 명확히 높은 RNA 편집이 관찰된다. A 및 B의 모든 3 패널 위의 서열은 서열번호: 37이다.

도 11은 도 10에 기재된 바와 같이 ADAR94-1 단독 또는 SONAR2와의 조합으로 ADAR94-1로 트랜스펙트시킨 마우스 HEPA1-6 세포로부터 분리된 RNA로부터 cDNA를 통해 생성된 PCR 생성물의 서열분석 결과를 나타낸다. 모든 패널 위의 서열은 서열번호: 38이다.

도 12는 트랜스펙트 되지 않은(NT, 좌측 패널), 보호 센스 올리고뉴클레오타이드 SON2에 어닐링된 대조군 올리고뉴클레오타이드(ADAR87-1)로 트랜스펙트된(중간 패널), SON2에 어닐링된 마우스 *Snrpa* RNA(ADAR94-1)를 표적화하는 올리고뉴클레오타이드로 트랜스펙트된(우측 패널) 프라이머리 마우스 폐 세포로부터 분리된 RNA로부터 cDNA를 통해 생성된 PCR 생성물의 서열분석 결과를 나타낸다. ADAR94-1 + SON2(화살표로 표시된 위치)로 트랜스펙트시킨 후 명백한 G 신호의 증가가 관찰되었다. 이는 생체 외 프라이머리 세포에서 내인성 표적에 내인성 ADAR을 이용하여 매우 특이하고 중요한 RNA 편집이 가능하다는 것을 나타낸다. 모든 3 패널 위의 서열은 서열번호: 37이며 도 10과 동일하다.

도 13은 ddPCR에 의해 측정된 총 표적 RNA에서 편집된 mRNA의 백분율로서 AON의 편집 성능을 나타낸다. NT: 비처리.

도 14는 α-L-이듀로니다제 분석에서 측정된 효소 활성(총 단백질 농도로 정규화된 상대 형광 단위로서)을 나타낸 것으로 이는 RNA-편집 AON으로 트랜스펙트시킨 후 RNA 편집의 결과를 wt *Idua* mRNA의 존재로 나타낸 것이다. 변이된 *Idua* 유전자를 지니는 마우스 배아 섬유아세포를 마우스 변이된 *Idua* 유전자를 발현하는 발현 플라스미드로 트랜스펙트 시키고, 연이어 도시된 바와 같이 AON으로 트랜스펙트 시켰다. 각각의 AON에 대해 2회의 중복 측정의 평균치 및 표준편차를 나타내었다. NT : AON으로 트랜스펙트되지 않음.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 상기 논의한 바와 같이, WO 2016/097212는 RNA의 표적화된 편집을 위한 AON을 개시하였으며 AON은 '표적 부분' 및 '리크루트먼트 부분'에 의해 특징지어진다. WO 2016/097212는 리크루트먼트 부분을 천연 기질(예를 들면 GluB 수용체) 또는 ADAR 효소의 dsRNA 결합 영역에 의해 인식되는 것으로 알려진 Z-DNA 구조와 유사한 스템-루

프(stem-loop) 구조로 기술하였다.

[0032] WO 2016/097212에 개시된 리크루트먼트 부분의 스템-루프 구조는 분자 내 스템-루프 구조이며, AON 자체 내에 형성되고 ADAR을 유도할 수 있다. 매우 긴 길이의 AON은 제조시 안정성 및 부작용과 같은 문제로 잠재적 단점이 존재하며 이는 더 짧은 버전 보다 더 높은 생산비용을 요구하는 것이다.

[0033] 본 발명의 AON은 WO 2016/097212에 기술된 바와 같이 리크루트먼트 부분을 포함하지 않는다. 본 발명의 AON은 분자 내 스템-루프 구조를 형성할 수 있는 부분을 포함하지 않는다. 본 발명의 AON은 더 짧아서 생산하기가 더 용이하며, 사용과 제조도 더 용이하다. 또한 ADAR 효소가 세포 내 정상 기능에서 격리되는 단점을 지니지 않는다.

[0034] 예기치 않게 본 발명은 상보적인 표적 RNA 서열 내에 존재하는 표적 아데노신을 탈아민화 하기 위한 표적 RNA에 상보적인 AON을 발견한 것이다. 또한 상기 기재한 바와 같은 리크루트먼트 부분이 결여되었지만 세포 내에 존재하는 ADAR 효소를 이용하여 표적 아데노신을 편집할 수 있는 것으로 나타난다. 바람직한 측면에서 본 발명의 AON은 표적 아데노신의 위치에서 미스매치를 포함하며 대향하는 뉴클레오타이드는 시티딘이다.

[0035] 또한 우리딘이 표적 아데노신에 대향하는 경우(실제로는 미스매치가 아님) AON은 표적 아데노신의 탈아민화를 야기할 수 있다. PCT/EP2017/065467에서는 왓슨-크릭 염기쌍 매칭 법칙에 따라 표적 RNA와 완벽한 염기쌍을 형성하지 않는 뉴클레오타이드에 의해 생성된 dsRNA 내에서 소위 '벌지'로 불리우는 추가적 미스매치도 허용 가능하며 어느 경우에는 표적 RNA 서열의 특이 표적화 편집을 위해 바람직하나 반드시 필요한 것은 아니라고 기술하고 있다.

[0036] RNA 표적 서열에 혼성화할 때 AON내의 벌지의 수는 AON의 길이에 따라 하나(일반적으로 표적 아데노신 위치에서 형성된 벌지) 이상일 수 있다. 추가 벌지-유도 미스매치는 표적 아데노신의 업스트림 및 다운스트림에 존재할 수 있다. 벌지는 단일 미스매치 벌지(하나의 미스매치 염기쌍에 의해 유발됨) 또는 다중 미스매치 벌지(하나 이상의 연속 미스매치 염기쌍, 바람직하게는 2개 또는 3개의 연속 미스매치 염기쌍에 의해 유발됨)일 수 있다.

[0037] 본 발명에 따른 AON은 WO 2016/097212 및 PCT/EP2017/065467에 개시된 올리고뉴클레오타이드보다 특정 이점을 가지며, 이는 헤어핀 또는 스템-루프 구조를 필요로 하지 않기 때문에 본 발명의 AON이 (상당히) 더 짧다. WO 2016/097212에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 세포에 존재하는 ADAR 효소를 격리하는 잠재적 위험성을 지닌다.

[0038] 본 명세서에서 격리시킴의 의미는 천연 ADAR 단백질이 올리고뉴클레오타이드의 표적 부분과 표적 RNA 사이에 생성되는 dsRNA 복합체의 부재 하에서도 올리고뉴클레오타이드에 결합할 수 있음을 의미한다. 표적 RNA 서열의 부재 하에 분자 내 스템-루프 구조의 존재로 인해 올리고뉴클레오타이드에 대한 ADAR의 직접적인 결합은 본 발명의 AON을 사용할 때 발생하지 않는다. 이는 분자 내 스템-루프 구조를 형성할 수 있는 부분을 포함하지 않기 때문이다. 헤어핀 및/또는 (스템-)루프 구조의 존재는 많은 경우 회피하는 것이 바람직하다.

[0039] 본 발명의 중요한 측면은 AON이 하나 이상의 당 변형을 지니는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 것이다. 따라서 AON의 단일 뉴클레오타이드는 하나 또는 둘 이상의 당 변형을 지닐 수 있다. AON 내에서 하나 이상의 뉴클레오타이드는 이러한 당 변형을 지닐 수 있다.

[0040] 본 발명의 중요한 측면은 편집될 필요가 있는 뉴클레오타이드에 대향하는 본 발명의 AON 내의 뉴클레오타이드가 2'-O-메틸 변형(본 명세서 및 다른 부분에서는 종종 2'-OMe 그룹, 2'-O-메틸화 또는 2'-O-메틸 그룹)을 포함하지 않는 것이다.

[0041] 상기 뉴클레오타이드의 3' 및 5' 방향으로 직접 연결된 뉴클레오타이드 (중심 트리플렛의 '인접 뉴클레오타이드')는 이러한 화학적 변형이 결여되어 있는 것이 바람직하지만, 인접 뉴클레오타이드의 하나 또는 둘 모두의 뉴클레오타이드는 2'-O-알킬기(예를 들면 2'-O-메틸기)를 함유할 수 있는 것으로 여겨진다. 중심 트리플렛의 하나 또는 둘 모두의 인접 뉴클레오타이드 또는 3개의 모든 뉴클레오타이드는 2'-OH 또는 이의 호환 가능한 치환(본 명세서에 정의된 바와 같은)일 수 있다.

[0042] 본 발명의 AON의 또 다른 중요한 측면은 생리적 조건 하에서 분자 내 헤어핀 또는 (스템-)루프 구조의 다른 형태 내로 AON이 접힐 수 있게 하는 부분(본 명세서에서 "자동-루프화" 또는 "자체-루프화"라고 함)을 지니지 않는다는 것이다. 이 부분은 표적 아데노신을 포함하는 표적 서열 또는 영역에 상보적이지 않다. 또한 이는 잠재적으로 ADAR을 격리하는 구조로 작용할 수 있다.

[0043] 바람직한 측면에서 본 발명의 단일 가닥 AON은 여러 위치 특히 표적 아데노신에서의 위치에서 선택적으로 미스

매치를 지닐 수 있으나 표적 RNA와 완전한 상보성을 지닌다.

[0044] 본 발명의 바람직한 AON은 5'-말단 O6-벤질구아노신 또는 5'-말단 아미노 변형을 포함하지 않으며 Vogel 등(2014)에 개시된 바와는 반대로 SNAP-태그 도메인(조작된 O6-알킬구아노신-DNA-알킬 전이효소)에 공유 결합되지 않는다.

[0045] SNAP-태그 도메인은 인간 DNA 복구 단백질 O6-알킬구아노신-DNA-알킬 전이효소(AGT)로부터 유도되며, O6-벤질구아노신 유도체를 사용하여 살아있는 세포에서 공유 결합으로 라벨링될 수 있다. Vogel 등(2014)은 20개 또는 17개 뉴클레오타이드의 전체 길이를 지니는 가이드 RNA를 개시하였으며 이때 5' 말단의 첫번째 3개 뉴클레오타이드는 표적 RNA 서열에 결합하지 않으나 가이드 RNA를 SNAP-태그 도메인에 연결시킨다. 따라서 표적 RNA 서열에 결합하는 가이드 RNA의 부분은 14개 또는 17개 뉴클레오타이드 길이이다.

[0046] 5'-말단 O6-벤질구아노신 변형 대신에 5'-말단 아미노 변형을 지니는 동일한 길이의 가이드 RNA가 또한 Vogel 등(2014)에 개시되어 있다. 그러나 표적 RNA 서열의 탈아민화는 매우 적은 양이거나 검출되지 않았다. 하나의 실시형태에서 본 발명의 AON은 표적 RNA 서열과 0, 1, 2 또는 3개의 미스매치를 포함하며 단일 미스매치는 다수의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0047] 유사하게 본 발명의 바람직한 AON은 Montiel-Gonzalez 등(2013)과는 대조적으로 boxB RNA 헤어핀 서열을 포함하지 않는다. Montiel-Gonzalez 등(2013)에서 사용된 boxB RNA 헤어핀 서열은 박테리오파지 람다 N-단백질에 의해 인식되는 17개의 짧은 길이 RNA뉴클레오타이드이다. 박테리오파지의 초기 오페론에서 다운스트림 유전자의 전사는 *nut*로 알려진 프로모터-인접 엘레멘트를 필요로 한다.

[0048] 이 부위는 RNA 내에서 cis 형태로 작용하여 박테리오파지 람다 N 단백질과 숙주 인자로 구성된 전사 항-종결 복합체를 조립한다. *nut*-부위 RNA는 boxB라는 작은 스템-루프 구조를 포함한다. boxB RNA 헤어핀 서열은 헤어핀(스템-루프) 구조를 형성할 수 있는 중단된 회문(interrupted palindrome)으로서 당업계에 공지되어 있다. 그 서열은 서로 다른 게놈 특이적 N 동족체를 코딩하는 박테리오파지 람다의 종류에 따라 다양하다.

[0049] Vogel 등(2014)과 Montiel-Gonzalez 등(2013) 모두는 세포 내에 존재하는 포유류 ADAR 효소를 사용하지 않으며 이러한 ADAR 효소는 야생형 효소에서 발견되는 바와 같은 천연 dsRNA 결합 도메인을 포함한다. Vogel 등(2014)은 SNAP- 태그 도메인에 융합된 ADAR1 또는ADAR2의 아데노신 디아미나제 도메인을 포함하는 유전적으로 조작된 융합 단백질을 사용하고 Montiel-Gonzalez 등은 박테리오파지 람다 N 단백질의 boxB 인식 도메인에 융합된 hADAR2 단백질의 아데노신 디아미나제 도메인을 포함하는 유전자 조작된 융합 단백질을 사용한다.

[0050] 선행 기술과 달리 본 발명의 AON은 세포 내에 존재하는 포유류 ADAR 효소를 사용하며 이러한 ADAR 효소는 야생형 효소에서 발견되는 바와 같은 천연 dsRNA 결합 도메인을 포함한다. 따라서 ADAR의 리크루트먼트를 허용하기 위해 boxB RNA 헤어핀 서열, 5'-말단 O6-벤질구아노신, 5'-말단 아미노 변형 또는 SNAP-태그 도메인을 본 발명의 AON에 통합시킬 필요가 없다.

[0051]

[0052] 따라서 본 발명에 따른 AON은 Vogel 등(Vogel) 및 Montiel-Gonzalez 등(2013)에 개시된 올리고뉴클레오타이드에 비해 특정 이점을 지닌다. 본 발명에 따른 AON은 내인성 세포 경로 및 천연적으로 이용 가능한 ADAR 효소를 이용하여 표적 RNA 서열에서 표적 아데노신을 특이적으로 편집할 수 있다. 하나의 실시형태에서 본 발명의 AON은 인간 O6-알킬구아노신-DNA-알킬 전이효소에 공유 결합되지 않는다.

[0053] 바람직하게는 본 발명의 AON은 폴리펩티드에 공유 결합되지 않는다. 본 발명의 AON의 또 다른 측면에서 AON은 5' 캡을 지니지 않는다. 진핵 생물에서 5' 캡은 5'에서 5'으로 삼인산 연결을 통해 RNA에 연결된 구아노신 뉴클레오타이드로 구성되어 있다. 이 구아노신은 7 위치에서 메틸화되고 7-메틸구아노신으로 불린다.

[0054] 본 발명의 AON은 표적 RNA 서열에서 특이적 표적 아데노신 뉴클레오타이드를 탈 아민화 시킬 수 있다. 따라서 이상적으로 단지 하나의 아데노신 만이 탈아민화 된다. 대안적으로 1, 2 또는 3개의 아데노신 뉴클레오타이드는 예를 들어 표적 아데노신이 서로 인접하여 있을 때 탈아민화된다. 단일 AON내에 2개 이상의 '중심 트리플렛'이 존재할 수 있으며 거리에 의존라여 사용될 수 있다. 그러나 거리가 단일 AON에 의해 다중 표적 아데노신을 커버하기에 너무 크다면 AON은 바람직하게는 특정 및 단일 표적 아데노신에 대향하는 하나의 중심 트리플렛 만을 포함하는 것이 바람직하다.

[0055] 본 발명의 AON의 특징을 살펴 보면, 변형된 재조합 ADAR 발현에 대한 필요성이 없다. AON에 부착된 공액 엔티티

가 필요 없다. 또는 표적 RNA 서열에 상보적이지 않은 긴 리크루트먼트 부분의 존재를 포함하지 않는다.

[0056] 그밖에도 본 발명의 AON은 야생형 효소에서 발견되는 천연 dsRNA 결합 도메인을 포함하는 천연 ADAR 효소에 의해 dsRNA 복합체의 다른 곳에 무차별 편집의 위험이 없이 표적 RNA 서열에 존재하는 표적 아데노신의 이노신으로의 특이적 탈아미노화를 가능하게 한다.

[0057] 표적 부위에 대한 시티딘 디아미나제의 리크루트먼트는 아데노신 디아미나제인 hADAR1 및 hADAR2와 동일한 방식으로 작용한다. 그러나 시티딘 디아미나제는 서로 다른 결합 요건을 가지고 있으며 시티딘의 편집을 결정하는 표적 RNA 서열 내에서 다른 구조로 인식한다.

[0058] 특히 잘 연구된 시티딘 디아미나제는 인간 Apobec1이다. 편집 부위를 표적으로 하고 천연적으로 존재하는 레지던트를 리크루트 하기 위해 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트를 사용하는 RNA 편집의 일반적인 원리는 편집 엔티티를 시티딘 디아미나제와 동일하게 잔류시키며 이는 본 명세서 내에 개시되고 청구된 발명의 한 부분이다.

[0059] ADAR 효소의 천연 표적 분석은 ADAR1 또는 ADAR2에 의해 편집된 RNA 헬릭스를 형성하는 두 가닥 사이의 미스매치가 일반적으로 포함되는 것으로 나타났다. 이러한 미스매치가 편집 반응의 특이성을 향상시키는 것으로 나타났다(Stefl 등. Structure 14 (2): 345-355, Tian 등, 2011. Nucleic Acids Res 39 (13): 5669-5681). AON과 표적 RNA 사이의 짝지음/미스매치 뉴클레오타이드의 최적 패턴의 특징은 또한 효과적인 ADAR-기반 AON 치료법의 개발에 결정적인 것으로 여겨진다.

[0060] 본 발명의 AON의 또 다른 개선된 특징은 적절한 ADAR 결합 및 활성뿐만 아니라 안정성을 보장하기 위해 소정의 스팟에서 특이적 뉴클레오타이드 변형의 사용이다. 이러한 변화는 다양할 수 있으며 AON의 백본, 뉴클레오염기 당 부분 뿐만 아니라 뉴클레오염기 또는 포스포디에스테르 결합에서의 변형을 포함할 수 있다. 그것은 또한 AON의 서열에 걸쳐 다양하게 분포될 수 있다.

[0061] ADAR 효소의 디아미나제 도메인 내의 아미노산 잔기뿐 만 아니라 RNA 결합 도메인 내에서도 아미노산 잔기의 상호 작용을 지원하기 위해서 특정 변형이 요구될 수 있다. 예를 들면 뉴클레오타이드 사이의 포스포로티오에이트 결합 또는 2'-O-메틸 변형은 AON의 일부에서만 허용될 수 있지만, 다른 부분에서는 2'-OH 그룹과 포스페이트를 지닌 효소 간의 중요한 상호 작용을 방해하지 않도록 이들을 피해야한다.

[0062] 이러한 설계 규칙의 일부는 ADAR2의 발표된 구조에 의해 가이드 되는 반면 다른 것들은 경험적으로 정해져야 한다. ADAR1 및 ADAR2에 대한 다른 선호도가 존재할 수 있다. 변형 사항은 AON의 파괴를 막을 수 있도록 선택되어야 한다.

[0063] 특정 뉴클레오타이드 변형은 또한 표적 서열이 ADAR 편집에 최적이 아닌 기질 RNA상의 편집 활성을 강화시키는데 필요할 수 있다. 이전의 연구 결과는 특정 서열 컨텍스트가 편집에 보다 적합하다는 것을 입증하였다. 예를 들면 표적 서열 5'-UAG-3'(중간에 표적 A를 가짐)은 ADAR2에 대해 가장 바람직한 가장 가까운 인접 뉴클레오타이드를 함유하는 반면 5'-CAA-3' 표적 서열은 바람직하지 않다. (Schneider 등, 2014. Nucleic Acids Res 42 (10): e87).

[0064] ADAR2 디아미나제 도메인의 최근 구조 분석은 표적 트리뉴클레오타이드에 대향하는 뉴클레오타이드를 신중하게 선택함으로써 편집능을 향상시킬 수 있음을 시사한다. 예를 들면 5'-CAA-3' 표적 서열이 반대편 가닥 3'-GCU-5' 서열(A-C 미스매치가 중간에 형성됨)과 쌍을 이룬 경우에는 구아노신 염기가 ADAR2의 아미노산 측쇄와 입체적 충돌을 야기하기 때문에 바람직하지 않다.

[0065]

[0066] 그러나 여기에서 이노신과 같은 더 작은 뉴클레오 염기가 입체적 충돌을 일으키지 않고 그 위치에 더 잘 들어맞을 수 있으며 여전히 대향하는 시토신에 염기쌍 형성 가능성을 유지한다고 여겨진다. 차선책의 활성을 향상시킬 수 있는 변형에는 AON의 유연성을 증가시키는 백본 변형의 사용 또는 반대로 편집을 선호하는 형태로의 변형이 포함될 수 있다.

[0067] 본 명세서에 사용된 용어의 정의

[0068] 본 명세서에서 사용 및 정의되는 '중심 트리플렛'는 표적 RNA에서 표적 아데노신에 대향하는 3개의 뉴클레오타이드고, 중심 트리플렛의 중간 뉴클레오타이드는 표적 아데노신에 직접적으로 대향한다. 중심 트리플렛은 AON의 중간에 있어야 할 필요는 없고 AON의 3' 및 5' 말단 부분에 위치할 수 있다. 그러므로 이 측면의 중심은 화학적 변형과 표적 아데노신을 표적으로 할 때 촉매 활성의 중심에 있는 트리플렛의 의미를 더 지닌다.

[0069] AON은 때로는 표적 서열을 5'에서 3'으로 표시할 때 3'에서 5'로 기술될 수 있다. 그러나 본 명세서 내에서 AON 내의 뉴클레오타이드의 서열은 논의될 때 마다 항상 AON의 5'에서 3'으로 이다. 예를 들면 ADAR60-1 중심 트리플렛의 첫번째 뉴클레오타이드는 5'-UCG-3' 트리플렛의 U이다. 상기 위치는 또한 AON 내의 특정 뉴클레오타이드의 관점에서 5'에서 3'으로 방향성을 유지하면서 표시될 수 있으며 이 경우 상기 뉴클레오타이드의 5' 뉴클레오타이드 이외는 음성 위치로 표시되고 3' 뉴클레오타이드는 양성 위치로 표시된다.

[0070] 예를 들면 중심 트리플렛의 C는 표적화된 아데노신에 대향하는 (0 위치)의 뉴클레오타이드고 U는 이 경우 -1 뉴클레오타이드고 G는 +1 뉴클레오타이드이다.

[0071] 본 명세서에 개시된 바와 같이 및 본 명세서 내에 개시된 AON의 대부분의 예에서 중심 트리플렛 외부의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형된 것이다. 그러나 이는 본 발명의 AON의 요구 사항은 아니다. 이 뉴클레오타이드에서 2'-O-메틸화를 사용하면 AON의 부분의 적절한 안정성을 보장하지만, 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE) 변형과 같은 다른 변형이 또한 적용될 수 있다.

[0072] 본 명세서에서 사용된 '아데닌' '구아닌' '시토신' '티민' '우라실' 및 '하이포크산틴'(이노신의 뉴클레오염기)은 핵산 염기를 의미한다.

[0073] '아데노신' '구아노신' '시티딘' '티미딘' '우리딘' 및 '이노신'이라는 용어는 (데 옥시)리보실 당과 연결된 핵산 염기를 의미한다.

[0074] 용어 '뉴클레오사이드'는 (데옥시)리보실 당과 연결된 핵산 염기를 의미한다.

[0075] 용어 '뉴클레오타이드'는 각각의 핵산 염기 (데옥시)리보실포스포 링커 뿐만 아니라 리보스 잔기 또는 포스포기의 화학적 변형을 포함한다. 따라서 용어는 잠금(locked) 리보실 모이어티(당업계에 공지된 메틸렌기 또는 임의의 다른기로 구성된 2'-4' 브리지를 포함)를 포함하는 뉴클레오타이드를 포함하고 포스포디에스테르, 포스포트리에스테르, 포스포로(디)티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트 링커 등을 포함하는 뉴클레오타이드 등을 포함한다.

[0076] 때때로 아데노신과 아데닌, 구아노신과 구아닌, 시토신과 시티딘, 우라실과 우리딘, 티민과 티미딘, 이노신과 하이포크산틴은 상응하는 뉴클레오 염기, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 지칭하기 위해 상호 교환적으로 사용된다.

[0077] 때때로 뉴클레오 염기, 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드라는 용어는 문맥에 분명히 다르게 요구되지 않는 한 상호 교환하여 사용할 수 있다.

[0078] '올리고뉴클레오타이드'에 대한 언급이 있을 때 마다 다르게 지시하지 않는 한 올리고리보뉴클레오타이드 및 데옥시올리고리보뉴클레오타이드를 의미한다. '올리고리보뉴클레오타이드'에 대한 언급이 있을 때마다 A, G, C, U 또는 I 염기를 포함할 수 있다. '데옥시올리고뉴클레오타이드'를 언급할 때마다 염기 A, G, C, T 또는 I를 포함할 수 있다. 바람직한 측면에서 본 발명의 AON은 화학적 변형을 포함할 수 있는 올리고리보뉴클레오타이드다.

[0079] 시토신과 같은 올리고뉴클레오타이드를 언급할 때는 5-메틸시토신, 5-하이드록시메틸시토신, 피롤로시티딘 및 β-D-글루코실-5-하이드록시-메틸시토신이 포함될 수 있다. 아데닌을 언급할 때는 2-아미노퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 3-디아자아데노신, 7-디아자아데노신, 8-디아자아데노신, 8-메틸아데노신, 7-아미노메틸-7-디아자구아노신, 7-디아자구아노신, N6-메틸아데닌 및 7-메틸아데닌이 포함될 수 있다.

[0080] 우라실을 언급할 때는 5-메톡시우라실, 5-메틸우라실, 디히드로우라실, 슈도 우라실 및 티에노우라실, 디하이드로우라실, 4-티오우라실 및 5-하이드록시메틸우라실이 포함될 수 있다. 구아노신을 언급할 때는 7-메틸구아노신, 8-아자-7-디아자구아노신, 티에노구아노신 및 1-메틸구아노신이 포함될 수 있다.

[0081] 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 언급할 때마다 2'-데옥시, 2'-하이드록시, 2-플루오로리보스 및 예를 들면 2'-O-메틸과 같은 2'-O-치환된 변이체와 같은 리보퓨라노스 유도체 뿐만 아니라 2'-4' 가교된 변이체를 포함하는 다른 변이체가 포함된다.

[0082] 올리고뉴클레오타이드를 언급할 때마다, 2개의 모노뉴클레오타이드 사이의 연결은 포스포디에스테르, 포스포트리에스테르, 포스포(디)티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포아미드 연결 등을 포함하는 포스포디에스테르 연결 뿐만 아니라 그의 변형체일 수 있다.

[0083] 용어 '포함하는(comprising)'은 '구성된(consisting)' 뿐만 아니라 '포함하는(including)'을 포함한다. 'X를

포함하는' 조성물은 X만으로 구성될 수 있거나 예를 들면 X + Y와 같이 부가적인 것을 포함할 수도 있다.

[0084] 수치 값 x와 관련하여 '약'이라는 용어는 선택 사항이며 예를 들면 x±10 %를 의미한다.

[0085] '실질적으로(substantially)'라는 용어는 '완전히'라는 의미를 제외하지는 않는다. '실질적으로 Y를 함유하지 않는' 조성물의 의미는 Y를 완전히 포함하지 않을 수도 있다. 이와 관련하여 '실질적으로'라는 용어를 본 발명의 정의로부터 생략시킬 수도 있다.

[0086] 핵산 서열과 관련하여 '다운스트림'이라는 용어는 3' 방향으로 서열을 따라 더 나아간 것을 의미한다. 용어 '업스트림'은 그 반대를 의미한다. 따라서 폴리펩티드를 암호화하는 임의의 서열에서 개시 코돈은 센스 가닥의 중지 코돈의 업스트림에 있지만 안티센스 가닥의 중지 코돈의 다운스트림에 있다.

[0087] '혼성화'에 대한 언급은 일반적으로 특이적 혼성화를 의미하며 비특이적 혼성화를 배제한다. 특이적 혼성화는 프로브와 표적 사이의 안정한 상호 작용의 대부분이 프로브와 표적이 적어도 70 % 이상, 바람직하게 적어도 80 % 이상, 보다 바람직하게는 최소 90 % 이상의 서열 동일성을 지닌다.

[0088] 용어 "미스매치"는 본 명세서 내에서 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍 페어링 규칙에 따라 완벽한 염기쌍을 형성하지 않는 이중 가닥 RNA 복합체 내의 대향하는 뉴클레오타이드를 의미한다. 미스매치 염기쌍은 G-A, C-A, U-C, A-A, G-G, C-C, U-U 염기쌍이다. 일부 실시형태에서 본 발명의 AON은 0, 1, 2 또는 3개의 미스 매치를 포함하며 단일 미스매치는 몇 개의 연이은 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 워블 염기쌍은 G-U, I-U, I-A 및 I-C 염기쌍 등이다.

[0089] 본 발명에 따른 AON은 예를 들면 모든 뉴클레오타이드에 2'-O-메틸화 당 잔기(2'-OMe)를 제공함으로써 거의 대부분이 화학적으로 변형될 수 있다. 그러나 표적 아데노신에 대향하는 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형을 포함하지 않으며 또한 아데노신에 대향하는 뉴클레오타이드에 인접한 2개의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 2'-O-메틸 변형을 포함하지 않는다.

[0090] AON의 모든 뉴클레오타이드가 2'-O-메틸 변형(중심트리플렛 포함)을 보유하는 완전한 변형은 RNA 편집이 진행되는 한 비기능성 올리고뉴클레오타이드를 초래하며 아마도 표적 위치에서 ADAR 활성을 방해하기 때문이다. 일반적으로 표적 RNA의 아데노신은 2'-O-메틸기를 지닌 대향하는 뉴클레오타이드를 제공하거나 대향하는 염기로서 구아노신 또는 아데노신을 제공함으로써 편집으로부터 보호될 수 있는데 이 두개의 핵산 염기는 대향하는 아데노신의 편집을 또한 감소시킬 수 있기 때문이다.

[0091] 다양한 화학 및 변형이 본 발명에 따라 용이하게 사용될 수 있도록 올리고뉴클레오타이드 분야에서 공지되어 있다. 뉴클레오타이드 사이의 통상적 인터뉴클레오타이드 결합은 포스포로티오에이트 에스테르 또는 포스포로디티오에이트 에스테르를 각각 생성하기 위한 포스포디에스테르 결합의 모노- 또는 디-티오화에 의해 변경될 수 있다. 아미드화 및 펩티드 링커를 포함하는 인터뉴클레오사이드 결합의 다른 변형이 가능하다.

[0092] 바람직한 측면에서 본 발명의 AON은 AON의 말단 부위에서 바람직하게는 5'및 3' 말단 모두에서 뉴클레오타이드 간에 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의 포스포로티오에이트 결합을 지니며 이는 4개의 포스포로티오에이트 결합을 지닌 경우 궁극적으로 5개의 뉴클레오타이드가 이 결합에 따라 연결된다. 당업자는 그러한 결합의 수는 표적 서열에 따라 또는 독성과 같은 다른 측면에 기초하여 각각의 말단에서 변동될 수 있음을 이해하여야 할 것이다

[0093] 리보스 당은 2'-O 모이어티를 저급 알킬(2'-O-메틸과 같은 C1-4), 알케닐(C2-4), 알키닐(C2-4), 메톡시에틸(2'-O-MOE), -H(DNA에서와 같이) 또는 다른 치환기로 변형시킬 수 있다. 2'-OH 기의 바람직한 치환기는 메틸, 메톡시에틸 또는 3,3'-디메틸알릴기이다. 후자는 혼성화의 효율을 향상시키면서 그것의 부피로 인해 뉴클레아제의 감수성을 억제하는 특성이 공지되어 있다(Angus & Sproat.1993, FEBS Vol. 325, no.1, 2, 123-7).

[0094] 선택적으로 리보스 고리 내부에 2'-4' 분자내 브리지(일반적으로 2' 산소와 4' 탄소 사이의 메틸렌 브리지)를 포함하는 잠금 핵산 서열(LNA)이 적용될 수 있다. 퓨린 뉴클레오 염기 및/또는 피리미딘 뉴클레오 염기는 예를 들면 헤테로시클릭 고리의 아민화 또는 탈아민화에 의해 그 특성을 변경하도록 변형될 수 있다. 정확한 화학 및 포맷은 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트로부터 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트로의 적용을 통해 수행될 수 있으며 당업자의 희망 및 선호도에 따라 결정될 수 있다.

[0095] 올리고뉴클레오타이드에서 4개 이상의 연속적인 DNA 뉴클레오타이드 또는 4개의 연속적인 데옥시리보스는 RNaseH에 의한 표적 RNA의 절단을 유도하는 이른바 갭머(gapmer)를 생성한다고 여겨진다. 이는 RNA 동족체 서열에 어닐링될 때이다. 본 발명에 따르면 표적 RNA의 RNaseH 절단은 일반적으로 가능한 한 피해야 한다.

[0096] 본 발명에 따른 AON은 일반적으로 10개 뉴클레오타이드 보다 길어야 하며 바람직하게는 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 더욱 바람직하게는 17개 이상의 뉴클레오타이드다. 하나의 실시형태에서 본 발명에 따른 AON은 20개 이상의 뉴클레오타이드다. 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 100개 뉴클레오타이드보다 짧고 더욱 바람직하게는 60개 이하이다. 하나의 실시형태에서 본 발명에 따른 AON은 50개 뉴클레오타이드보다 짧다.

[0097] 바람직한 측면에서 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드는 18 내지 70개의 뉴클레오타이드를 포함하고 보다 바람직하게는 18 내지 60개의 뉴클레오타이드를 포함하며 더욱 바람직하게는 18 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 따라서 가장 바람직한 측면에서 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0098] RNA 편집 엔티티(인간 ADAR 효소와 같은)가 다양한 인자에 따라 다양한 특이성으로 dsRNA 구조를 편집한다는 것은 당업계에 공지되어 있다. 하나의 중요한 요소는 dsRNA 서열을 구성하는 두 가닥의 상보성 정도이다. 두 가닥의 완전한 상보성은 비대칭 방식으로 아데노신 탈아민화를 위한 hADAR의 촉매 도메인을 유발하여 어느 정도 마주보는 아데노신과 반응하게 된다.

[0099] hADAR1 및 hADAR2의 특이성은 dsRNA 결합 도메인이 아직 명확하게 정의되지 않은 상태에서 위치시키는데 도움을 줄 수 있는 dsRNA내의 다수의 미스매치를 허용함으로써 증가시킬 수 있다. 또한 탈아민화 반응 그 자체는 편집될 아데노신에 대향하는 미스매치를 포함하는 AON을 제공함으로써 향상될 수 있다. 상기 미스매치는 바람직하게는 편집될 아데노신에 대향하는 시티딘을 지닌 표적화 부분을 제공함으로써 생성된다.

[0100] 대안적으로 또한 우리딘이 아데닌에 대향하여 쌍을 이루면 '미스매치'가 발생하지 않을 것이고, 이는 U 와 A가 페어 쌍이기 때문이다. 표적 가닥에서 아데노신의 탈아민화 시 표적 가닥은 대부분의 생화학적 프로세스를 위해 세포의 생화학적 장치에 의해 G로서 "판독되는" 이노신을 얻을 수 있을 것이다. 따라서 A에서 I 로의 전환 후에 미스 매치는 해결되고 이는 I는 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트의 표적 부위에서 대향하는 C와 완벽한 염기쌍을 형성할 수 있기 때문이다.

[0101] 편집으로 인해 미스매치가 해결된 후 기질이 방출되며 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트-편집 엔티티 복합체가 표적 RNA 서열로부터 방출된다. 이는 스플라이싱 및 트랜스레이션과 같은 다운스트림 생화학적 프로세스에 이용 가능하게 된다.

[0102] 표적 RNA 서열을 편집하는 특이성의 수준은 적용에 따라 달라질 수 있다. 본 특허 출원의 지침에 따라 당업자는 요청에 따라 올리고뉴클레오타이드의 상보적 부분을 설계할 수 있으며 소정의 시행착오를 통해 원하는 결과를 얻을 수 있다.

[0103] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 통상적으로 정상 뉴클레오타이드 A, G, U 및 C를 포함하지만 예를 들면 하나 이상의 G 뉴클레오타이드 대신에 이노신 (I)을 포함할 수도 있다.

[0104] 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트와 중복되는 영역에서 표적 RNA 서열 내의 아데노신의 바람직하지 않은 편집을 방지하기 위해서 올리고뉴클레오타이드는 화학적으로 변형될 수 있다. 당업계에서는 표적 RNA 서열에서 아데노신에 대향하는 뉴클레오사이드의 리보실 부분의 2'-O-메틸화가 ADAR에 의한 아데노신의 탈아민화를 현저히 감소시키는 것으로 나타났다(Vogel 등, 2014).

[0105] 이것은 치료 환경에서 그러한 AON을 사용하는 것에 대한 심각한 결점이며 적어도 부분적으로 본 발명의 목적은 AON에서 변형되지 않은 RNA 뉴클레오타이드를 지니는 문제를 해결하여 분해되기 쉽도록 하는 것이다.

[0106] 세포에서 RNA 편집 분자는 일반적으로 포유류를 포함한 후생 동물에서 발견되는 ADAR 효소와 같이 본질적으로 단백질 형태이다. 바람직하게는 편집 엔티티는 효소 보다 바람직하게는 아데노신 디아미나제 또는 시티딘 디아미나제 더욱 바람직하게는 아데노신 디아미나제이다. 가장 흥미로운 것들은 hADAR1 p110 및 p150과 같은 임의의 이소형을 포함하는 인간 ADAR, hADAR1 및 hADAR2이다.

[0107] 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트를 편리하게 디자인할 수 있는 당업계에 공지된 RNA 편집 효소는 인간 또는 인간 세포에서 hADAR1 및 hADAR2와 같은 RNA(ADAR)에 작용하는 아데노신 디아미나제 및 시티딘 디아미나제를 포함한다. 인간 ADAR3(hADAR3)은 선행 기술에 기재되어 있지만, 디아미나제 활성이 없는 것으로 보고되었다. hADAR1은 2개의 이소형이 존재하는 것으로 알려져 있다. 150 kDa의 인터페론 유도성 버전과 더 짧은 100 kDa 버전이 공통적인 프리-mRNA로부터 선택적인 스플라이싱을 통해 생성된다.

[0108] 결과적으로 세포 내에 존재하는 150kDa 이소형의 수준은 인터페론 특히 인터페론-감마(IFN-γ)에 의해 영향을 받을 수 있다. hADAR1은 또한 TNF-α에 의해 유도될 수 있다. 이는 본 발명에 따른 인터페론-감마 또는 TNF-알파 및 올리고뉴클레오타이드를 복합 제품으로나 또는 동시에 또는 임의의 순서로 별도의 제품으로서 환자에게 투여되는 병용 요법을 개발할 수 있는 기회를 제공한다. 특정 질환 상태는 환자의 특정 조직에서 증가된 IFN-감마 또는 TNF-알파 수준과 이미 일치할 수 있어 병태적 조직을 보다 구체적으로 편집할 수 있는 더 많은 기회를 제공할 수 있다.

[0109] 본 발명의 AON에서의 화학적 변형의 예로는 예를 들면 잠금 핵산 LNA와 같은 당(리보스) 모이어티 내에 가교결합 치환체와 같은 당 모이어티의 변형이며 이는 상기 특정된 길이를 지닌 2'-O 원자의 알킬(2'-O-메틸과 같은), 알키닐(2'-O-알키닐), 알케닐(2'-O-알케닐), 알콕시알킬(메톡시에틸: 2'-O-MOE 과 같은)기로의 치환에 의한 것이다.

[0110] 또한 주쇄의 포스포디에스테르기는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포르아미데이트 등의 뉴클레오사이드 분자간 결합을 생성하기 위한 티오에이션, 디티오화, 아미드화 등에 의해 변형될 수 있다. 인터뉴클레오타이드 결합은 전체 또는 부분적으로 펩티드 핵산 서열 등을 생성하는 펩티드 결합으로 대체될 수 있다.

[0111] 대안적 또는 부가적으로 핵산 염기는 (탈)아민화에 의해 변형되어 이노신 또는 2'6'-디아미노퓨린 등을 생성할 수 있다. 추가적인 변형은 CpG 서열과 관련된 것으로 알려진 잠재적인 면역원성을 감소시키기 위해 뉴클레오타이드의 시티딘 부분에서 C5의 메틸화일 수 있다.

[0112] dsRNA 복합체가 표적 RNA 서열의 A를 I로 탈아민화시키는 ADAR 효소를 리크루트하는 경우 편집될 아데노신과 대향하는 뉴클레오타이드 사이에 염기쌍, 미스매치, 벌지 또는 워블은 아데노신, 구아노신, 우리딘 또는 시티딘 잔기일 수 있다. 바람직하게는 시티딘 잔기이다. 편집 부위에 대향하는 잠재적 미스매치 (우리딘이 적용되지 않은 경우)를 제외하고 AON의 나머지 부분은 표적 RNA와 완벽하게 상보적일 수 있다.

[0113]

[0114] 그러나 본 명세서에 개시한 바와 같이 특정 측면에서 본 발명은 한정된 수의 불완전 매치를 포함하는 AON에 관한 것이다. 세포 내의 편집 엔티티가 다른 표적 부위로 리디렉트되는 정도는 편집 분자의 인식 도메인을 위한 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드의 친화도를 변화시켜 조절함으로써 가능함이 당업자에 의해 이해될 것이다. 정확한 변형은 일부 시행착오 및/또는 올리고뉴클레오타이드와 편집 분자의 인식 도메인 사이의 구조적 상호 작용에 기초한 계산 방법을 통해 결정될 수 있다.

[0115] 추가적 또는 선택적으로 세포에 존재하는 편집 엔티티를 리크루트하고 리디렉션하는 정도는 올리고뉴클레오타이드의 용량 및 투약 요법에 의해 조절될 수 있다. 이것은 시험자(시험관 내) 또는 임상의에 의해 결정될 수 있으며 보통 임상 1상 및/또는 2상 임상 시험에서 결정된다. 본 발명은 진핵 생물 바람직하게는 후생동물 보다 바람직하게는 포유동물 세포에서 표적 RNA 서열의 변형에 관한 것이다. 원칙적으로 본 발명은 임의의 포유류 종으로부터의 세포와 함께 사용될 수 있지만 바람직하게는 인간 세포와 함께 사용되는 것이다.

[0116] 본 발명은 임의의 기관에서 세포와 함께 사용될 수 있다. 피부, 폐, 심장, 신장, 간, 췌장, 장, 근육, 동맥, 눈, 뇌, 혈액 등을 포함한다. 본 발명은 인간 대상의 질환 상태에 관련된 세포, 조직 또는 기관의 서열을 변형시키는데 특히 적합하다. 그러한 세포는 폐 또는 위장관 상피 세포, 생식 기관 세포, 근육 세포, 눈 세포, 피부 세포, 간, 신장, 췌장과 같은 조직 및 장기 세포, 면역 세포, 암세포, 샘 세포, 뇌 세포 등을 들 수 있다.

[0117] 본 발명은 또한 세포주 또는 배아줄기(ES)세포와 같이 생물체 내에 자연적으로 존재하지 않는 세포를 포유동물 세포와 함께 사용할 수 있다. 본 발명은 다능성 줄기세포, 전능성 줄기세포, 배아 줄기세포, 유도된 다능성 줄기세포 등을 포함한 다양한 유형의 줄기 세포와 함께 사용될 수 있다. 상기 세포는 시험관 내 또는 생체 내에 위치할 수 있다. 본 발명의 하나의 이점은 생체 내에서 원래의 세포와 동일하게 사용될 수 있고 배양된 세포에도 사용될 수 있다는 것이다.

[0118] 일정 실시형태에서 세포는 생체 외에서 처리된 다음 생체 내로 도입된다. 예를 들면 원래 유도된 생체 내로 재도입된다. 본 발명은 또한 소위 장기 유사체(organoid) 내의 세포에서 표적 RNA 서열을 편집하는데 사용될 수 있다. 장기 유사체는 3차원적 체외에서 유래 조직으로 여겨지지만 개별적인 격리 조직을 생성하기 위한 특정 조건을 사용하여 유도된다(예를 들면 Lancaster & Knoblich, Science 2014, 345, No. 6194 1247125 참조).

[0119] 치료 환경에서 환자의 세포로부터 체외에서 유래될 수 있기 때문에 유용하며 장기 유사체는 일반적인 이식보다 거부될 가능성이 적은 자가 물질로서 환자에게 다시 도입될 수 있다. 따라서 또 다른 바람직한 실시형태에 따르

면 본 발명은 환자로부터 취한 조직 샘플(예를 들면 위장관; Sala 등, J Surg Res. 2009; 156 (2): 205-12, 또한 Sato et al. Gastroenterology 2011; 141: 1762-72)로부터의 장기 유사체 상에서 본 발명에 따른 RNA 편집을 사용하여 장기 유사체 또는 장기 유사체 내에 존재하는 줄기 세포를 환자의 장기 기능을 개선시키기 위해 환자에게 재이식하기 위한 것이다.

[0120] 처치된 세포는 일반적으로 유전적 변이를 지니며 이러한 변이는 이형 접합 또는 동형 접합일 수 있다. 본 발명은 전형적으로 N이 G, C, U(DNA 레벨 T에서)인 경우 N에서 A로 변이, 바람직하게는 G에서 A로의 점 변이, 또는 N이 A, G, U(DNA 레벨 T에서)인 경우 N에서 C로의 변이, 바람직하게는 U에서 C로의 점 변이로 변형하여 사용하기 위한 것이다. 특히 흥미있는 변이를 포함하는 유전자는 다음에서 논의된다.

[0121] 그러나 일정 실시형태에서 본 발명은 문제의 질환에 대한 유용한 연구 도구를 제공하기 위해 질병 관련 변이를 세포주 또는 동물에 도입함으로써 반대 방향으로 사용된다. 질병 모델을 생성하는 예로서 선천적인 아동 실명의 가장 흔한 형태인 레베르 선천성 흑내장의 기반을 형성하는 암호화 스플라이싱 부위를 생성시키기 위해 CEP290 유전자 내에 변이를 생성시켜 인간 세포에서 편집 활동을 리크루트하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 제공하기 위한 것이다.

[0122] 표적 유전자의 변이 버전이 다른 방식으로 번역되어 질병을 완화 시키도록 특정 변이 RNA의 스플라이싱을 변경하는 것과 같이 비-변이된 서열이 RNA 편집의 표적으로 되는 것을 또한 예상할 수 있다. 당업자는 다양한 목적으로 표적 RNA를 변형시킬 수 있는 모든 유형의 가능성을 알고 있다.

[0123] RNA 편집을 통해 되돌릴 수 있는 변이는 염색체 또는 미토콘드리아 DNA 나 pre-mRNA, 리보솜 RNA 또는 미토콘드리아 RNA를 포함한 RNA와 같은 다른 형태의 DNA 수준에서 발생할 수 있다. 세포 또는 대상이 감염된 진균류, 효모, 기생충, 키네 토플라스티드, 박테리아, 파지, 바이러스 등을 포함하는 병원체의 표적 RNA에 변화가 있을 수 있다. 이어서 편집은 그러한 세포, 대상 또는 병원균 내부의 표적 서열상의 RNA 수준에서 발생할 수 있다.

[0124] 바이러스와 같은 특정 병원체는 핵산, DNA 또는 RNA를 감염된 숙주(세포)의 세포로 방출한다. 다른 병원체는 감염된 숙주에 상주하거나 순환한다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트는 세포가 편집이 발생하는 곳에서 투여된 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트와 양립 가능한 편집 엔티티를 함유하는 한 감염된 진핵 숙주의 세포에 존재하는 표적 RNA 서열을 편집하거나 진핵 생물 숙주 내에 존재하는 병원체의 세포 내 RNA 서열을 편집하는데 사용될 수 있다.

[0125]

[0126] 이론에 구속되지 않는다면 hADAR1 및 hADAR2를 통한 RNA 편집은 전사 또는 스플라이싱 중인 핵 또는 mRNA, miRNA 또는 ncRNA가 편집 가능한 곳인 세포질 내에서 1차 전사체 위에서 일어나는 것으로 생각된다. 편집 효소의 상이한 이소-형은 예를 들면 hADAR1 p110은 핵에서 주로 발견되고 hADAR1 p150은 세포질에서 발견되어 차별적으로 국소화 되는 것으로 알려져 있다. 시티딘 디아미나제에 의한 RNA 편집은 mRNA 수준에서 일어나는 것으로 생각된다. 성숙한 mRNA에서 미토콘드리아 RNA 코돈이나 비 코딩 서열의 편집은 배제되지 않는다.

[0127] 본 발명은 편집될 부위를 표적화할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 진핵 세포에서 표적 RNA 서열을 변화시키고 편집 반응을 일으키기 위해 세포에 상주하는 RNA 편집 실체를 리크루트하는데 사용된다. 바람직한 편집 반응은 아데노신 탈아민화 및 시티딘 탈아민화이며 각각 아데노신을 이노신으로 전환시키고 시티틴을 우리딘으로 전환시킨다.

[0128] 변화는 암호화 스플라이싱 부위 내에서는 엑손 스플라이싱 사일런서 또는 인핸서를 변화시킴으로써 정지 코돈의 도입 또는 제거를 통해 코돈의 용도 또는 스플라이싱 행태로 엑손 내에서 표적 RNA에서 번역된 단백질의 아미노산을 변화시킴으로서 이루어지거나 인트론 내에서 인트론 스플라이싱 사일런서 또는 인트론 스플라이싱 인핸서, 브랜치 포인트를 변화시켜 스플라이싱을 변화시킴으로서 인트론 내에서 RNA 안정성 구조 또는 기능에 영향을 미치는 임의의 5' 또는 3' 비번역 영역에 도입할 수 있다.

[0129] 표적 RNA 서열은 점 변이(전이 또는 형질 전환)와 같은 수정 또는 변경을 원하는 변이를 포함할 수 있다. 선택적으로 표적 RNA 서열을 의도적으로 변이시켜 변형된 표현형(또는 RNA 바이러스와 같은 RNA 기반 유기체의 경우에는 유전자형)을 생성할 수 있는데 여기서 이전에 변이가 없었던 곳에서 의도적으로 변이를 창출할 수도 있다. 예를 들면 표적 RNA 서열에서 변화 (변이)를 지니는 세포주 또는 동물을 생성할 수 있는데 이는 질병을 연구하기 위한 동물 또는 장기 유사체 모델 시스템으로 질병에 대한 화합물의 시험과 같은 분석 시험에서 사용될 수 있다.

[0130] 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트 및 방법은 예를 들면 화합물 스크리닝, 단백질 공학 등을 포함하는 추가 시험을 위해 다양한 단백질 이소형을 코딩하기 위해 다양한 종류의 표적 RNA를 지닌 세포 뱅크를 제조하기 위한 스크리닝 시스템(정렬된 포맷으로)을 통해 사용될 수 있다. 표적 RNA는 임의의 세포 또는 바이러스 RNA 서열 일 수 있으며 보다 일반적으로는 pre-mRNA 또는 단백질 코딩 기능을 갖는 mRNA이다.

[0131] 순수하게 쉽게 참고하기 위해 본 발명을 제한하고자 하는 의도 없이 하기 표 1은 본 발명의 올리고뉴클레오타이드에 의해 지시된 아데노신 디아미나제 편집에 의해 야기될 수 있는 잠재 코돈 변화를 설명하기 위해 제공된다. 표 1은 특히 임의의 RNA에서의 코딩 서열에 대한 본 발명의 적용 가능성의 제한으로 해석되지 않으며 이미 지적한 바와 같이 본 발명은 miRNAs, tRNAs, rRNAs 내의 코딩 영역, 인트론, 5'- 또는 3'-비번역 영역과 같은 비-코딩 엑손에서 아데노신을 포함하는 임의의 RNA 표적 내에서 실용화될 수 있다.

[0132] 적용 가능성의 폭에 대한 오해를 피하기 위해 코딩 관점에서 중요하지 않은 변경 ('침묵')도 단백질의 유전자 발현을 변경시킬 수 있으며 동일한 아미노산에 대한 일부 코돈이 다른 것보다 더 선호될 수 있다. 예를 들면 상이한 전사 안정성 또는 번역 효율에 영향을 주어 인코딩된 단백질을 변화 없이도 단백질을 많거나 적게 생성할 수 있다.

표 1

표적 코돈	아미노산	변경된 코돈	아미노산
AAA	Lys	GAA	Glu
		AGA	Arg
		AAG	Lys
		GGA	Gly
		AGG	Arg
		GAG	Glu
		GGG	Gly
AAC	Asn	GAC	Asp
		AGC	Ser
		GGC	Gly
AAG	Lys	GAG	Glu
		AGG	Arg
		GGG	Gly
AAU	Arg	GAU	Asp
		AGU	Ser
		GGU	Gly
ACA	Thr	GCA	Ala
		ACG	Thr
		GCG	Ala
ACC	Thr	GCC	Ala
ACG	Thr	GCG	Ala
ACU	Thr	GCU	Ala
AGA	Arg	GGA	Gly
		AGG	Arg
		GGG	Gly
AGC	Ser	GGC	Gly
AGG	Arg	GGG	Gly
AGU	Ser	GGU	Gly
AUA	Ile	GAU	Asp
		AUG	Met
		GUG	Val

[0133]

AUC	Ile	GUC	Val
AUG	Met	GUG	Val
AUU	Ile	GUU	Val
CAA	Gln	CGA	Arg
		CAG	Gln
		CGG	Arg
CAC	His	CGC	Arg
CAG	Gln	CGG	Arg
CAU	His	CGU	Arg
CCA	Pro	CCG	Pro
CGA	Arg	CGG	Arg
CUA	Leu	CUG	Leu
GAA	Glu	GGA	Gly
		GAG	Glu
		GGG	Gly
GCA	Ala	GCG	Ala
GUA	Val	GUG	Val
GGA	Gly	GGG	Gly
GAC	Asp	GGC	Gly
GAG	Glu	GGG	Gly
GAU	Asp	GGU	Gly
UAA	Stop	UGA	Stop
		UAG	Stop
		UGG	Trp
UCA	Ser	UCG	Ser
UGA	Stop	UGG	Trp
UUA	Leu	UUG	Leu
UAC	Tyr	UGC	Cys
UAG	Stop	UGG	Trp
UAU	Tyr	UGU	Cys

[0134]

[0135] 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 편집하기 위한 특히 흥미로운 표적 아데노신은 촉매 작용 부위, 다른 단백질에 대한 결합 부위, 기질에 의한 결합, 국소화된 도메인과 같은 주요 기능 또는 특징을 정의하는 아미노산 잔기에 대한 코돈의 일부이기 때문이다. 글리코실화, 히드록실화, 미리스닐화, 프로테아제에 의한 단백질 분해(단백질을 성숙시키기 위한 또는 세포 내 전달의 일부로서) 등과 같은 동시- 또는 후-번역을 통한 변형을 포함한다.

[0136] 유전자 질환의 숙주는 G 에서A 로 변이에 의해 유발되며 변이된 표적 아데노신에서 아데노신 탈아민화는 변이를 야생형으로 되돌릴 수 있기 때문에 바람직한 표적 질환이 된다. 그러나 유익한 효과를 얻기 위해서는 야생형으로의 역전이 항상 필요한 것은 아니다. 야생형 뉴클레오타이드가 G가 아닌 경우 표적에서A에서 G로의 변형은 또한 유익할 수 있다. 어떤 경우에는 이것이 예상될 수 있으며 다른 경우에는 약간의 시험이 필요할 수 있다.

[0137] 특정 상황에서, 야생형이 G가 아닌 경우 표적 RNA의 A로부터의 G로의 변형은 침묵(상이한 아미노산으로 번역되지 않음)될 수 있거나 그렇지 않으면 비효과적 일 수 있다(예를 들면 아미노산은 치환되었지만 단백질 구조와 기능을 파괴하지 않는 보존적 치환체를 구성함). 또한 아미노산은 변화에 대해 일정한 견고성을 갖는 기능성 도메인의 일부일 수 있다. 본 발명에 따른 편집에 의한 A에서 G로의 전환이 비암호화 RNA 또는 RNA의 비암호화 부분에 있는 경우 그 결과는 본래 변이보다 중요하지 않거나 심각하지 않을 수도 있다.

[0138] 당업자는 본 발명의 적용성이 매우 넓고 질병의 예방 또는 치료에 국한되지 않는다는 것을 이해할 것이다. 본

발명은 또한 그러한 변형이 예를 들면 세포 또는 비인간 동물 모델에서 질병 상태를 유도하는 경우에도 그 효과를 연구하기 위해 전 사체를 변형시키는 데 사용될 수 있다.

[0139] 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드로 예방 및/또는 치료될 수 있는 유전 장애의 바람직한 예는 표적 RNA에서 하나 이상의 아데노신의 변형이 (잠재적으로) 유익한 변화를 가져올 수 있는 임의의 질환이다.

[0140] 특별한 관심의 변이를 함유하는 본 발명에 따른 잠재적 표적 RNA 서열인 전사 된 RNA 서열은 CFTR 유전자(낭포성 섬유증 막 관통 전도 조절제), 디스트로핀, 헌팅틴, 뉴로피브로민 1, 뉴로피브로민 2, 헤모글로빈의 β-글로빈 사슬, CEP290(중심성 단백질 290kDa), 베타-헥소스아미니다제 A의 HEXA 유전자, 어셔 증후군(Usher syndrome)이라는 유전적 실명증의 원인인 어셔 유전자(예를 들면 USH2B 암호화하는 Usherin) 중 하나를 포함한다. 보다 광범위한 목록이 아래에 추가로 제시된다. 따라서 표적 서열이 선택되고 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트는 변이를 정정하기 위해 원하는 변형을 포함할 것이다.

[0141] CF 변이 기술 분야의 당업자는 R117H, G542X, G551D, R553X, W1282X 및 N1303K를 포함하여 1000 내지 2000개의 변이가 CFTR 유전자에 알려져 있음을 인식하고 있다.

[0142] 일반적으로, 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트를 사용하여 역전될 수 있는 임의의 표적 RNA에서의 변이는 아데노신 디아미나제 리크루트의 경우에는 G에서 A로 변이이고, 시티딘 디아미나제 리크루트의 경우에는 U 에서 C로 변이이며 그에 따라 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트를 설계할 수 있다. 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트를 사용하여 표적화될 수 있는 변이는 아데노신 디아미나제를 리크루트 하는 경우에는 C 에서 A로, U 에서 A로(DNA 수준에서는 T 에서 A로) 변이이며 시티딘 디아미나제 리크루트의 경우에는 A 에서 C로 및 G 에서 C로 변이이다.

[0143] 후자의 상황에서 RNA 편집이 반드시 변이를 야생형으로 되돌릴 수는 없지만 편집 된 뉴클레오타이드는 원래의 변이보다 개선될 수 있다. 예를 들어 번역시 절단 단백질을 생성하는 프레임 내 정지 코돈이 일으키는 변이는 그 위치의 원래 아미노산이 아닐 수 있는 아미노산을 코딩하는 코돈으로 변경될 수 있지만, 적어도 일부 기능을 가진 전체 길이 단백질, 절단된 단백질 보다 적어도 더 많은 기능성을 지닐 수 있다.

[0144] 표적 서열은 진핵 세포 바람직하게는 포유류 세포 보다 바람직하게는 인간 세포에 내생적이다. 따라서 표적 서열은 예를 들어 세포 이력의 어느 시점에서 인위적으로 도입 된 형질 전환 유전자 또는 표지 유전자가 아니라 세포 내에 자연적으로 존재하는 유전자(변이 또는 비변이 형태)이다.

[0145] 본 발명은 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드를 적용함으로써 야생형 서열을 변이된 서열로 변경시키는 것도 유용할 수 있으므로 변이를 교정하는 것에 국한되지 않는다. 야생형 아데노신을 변형시키는 것이 유리할 수 있는 하나의 예는 예를 들면 상기 엑손의 스플라이싱에 필요한 분지 사이트인 아데노신을 변형시킴으로써 엑손의 스킵핑(skipping)을 유발하는 것이다.

[0146] 또 다른 실시예로는 아데노신이 단백질 결합을 위한 인식 서열을 정의하거나 그 부분이거나 RNA의 안정성을 정의하는 2차 구조에 관여하는 경우이다. 그러므로 상기에서 언급한 바와 같이 본 발명은 질병에 대한 연구 도구를 제공하고 기존의 변이보다 덜 해로운 새로운 변이를 도입하는 데 사용될 수 있다.

[0147] 투여될 올리고뉴클레오타이드의 양, 용량 및 투여 방법은 세포 유형, 치료될 질병, 목표 인구집단, 투여 방식(예: 전신 대 국소), 질병의 중증도 및 수용 가능한 부작용 수준에 따라 상이할 수 있으나 시험관 내 연구, 전임상 및 임상 시험을 통해 얻어진 시행착오를 통해 평가할 수 있다.

[0148] 시험은 변형된 서열이 쉽게 발견되는 표현형 변화를 유도할 때 특히 간단하다. 더 많은 용량의 올리고뉴클레오타이드가 세포 내의 핵산 편집 실체(예: ADAR)와 결합하여 RNA 편집에 자유롭게 참여할 수 있는 개체의 양을 고갈시킬 수 있지만 일상적인 용량 시험은 주어진 올리고뉴클레오타이드 및 주어진 표적에 대한 그러한 효과를 나타낼 수 있을 것이다.

[0149] 하나의 적합한 시험 기법은 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트를 세포주 또는 시험 생물체에 전달한 다음 그 이후 다양한 시점에서 생검 시료를 채취하는 것을 포함한다. 표적 RNA의 서열은 생검 시료 내에서 평가할 수 있으며 변형된 세포의 비율을 쉽게 판독할 수 있다. 이 시험이 한 번 수행 된 후에는 지식이 보존되고 생체 검사 샘플을 채취할 필요 없이 추후의 전달을 수행할 수 있다.

[0150] 따라서 본 발명의 방법은 세포의 표적 RNA 서열에서 원하는 변화의 존재를 확인하여 표적 RNA 서열이 변형되었음을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 이 단계는 전형적으로, 상기 논의 된 바와 같이 표적 RNA의 관련 부분 또는 그의 cDNA 카피(또는 표적 RNA가 프리-mRNA 인 경우 그의 스플라이싱 생성물의 cDNA 카피)의 시퀀싱 및 서

열 변화를 쉽게 확인할 수 있다.

[0151] 선택적으로 변형은 표적 RNA에 의해 코딩되는 단백질이 이온 채널일 때 유도성 전류와 같은 일부 기능적 판독에 의해 단백질 수준(길이, 글리코실화, 기능 등)에서 평가될 수 있다. CFTR 기능의 경우에는 인간을 포함하는 포유류에서의 Ussing chamber 분석 또는 NPD 시험은 기능의 회복 또는 기능을 평가하기 위해 당업자에게 이미 공지되어 있다.

[0152] 세포에서 RNA 편집이 일어난 후에 변형된 RNA는 예를 들면 세포 분열, 편집된 RNA의 제한된 반감기 등에 기인하여 시간이 지남에 따라 희석될 수 있다. 따라서 실제 치료학적 측면에서 본 발명의 방법은 시간이 지나도 이점을 유지할 수 있을 정도로 충분한 표적 DNA가 변형되어 환자에게 가시적 이익을 제공할 때까지 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트를 반복적으로 전달하여야 하는 것이다.

[0153] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 특히 치료용으로 적합하고 따라서 본 발명은 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 일부 실시형태에서 약제학적으로 허용 가능한 담체는 생리 식염수일 수 있다. 등장액 또는 저장액이 유용할 수 있으며 특히 폐 전달에 유용할 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 약제학적 조성물을 포함하는 전달 장치(예를 들면 주사기, 흡입기, 분무기)를 제공할 수 있다.

[0154] 본 발명은 또한 본 명세서에서 기술한 바와 같이 포유동물 바람직하게는 인간 세포에서 표적 RNA 서열을 변화시키는 방법에 사용하기 위한 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 유사하게 본 발명은 본 명세서 내에 기재된 포유동물 바람직하게는 인간 세포에서 표적 RNA 서열을 변화시키는 약제의 제조에 있어서 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트의 용도를 제공한다.

[0155] 본 발명은 또한 세포에서 표적 RNA 서열에 존재하는 적어도 하나의 특정 표적 아데노신의 탈아민화 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 세포에 본 발명에 따른 AON을 제공하는 단계; 상기 AON의 세포에 의한 흡수를 허용하는 단계; 상기 AON을 표적 RNA 서열에 어닐링시키는 단계; 야생형 효소에서 발견되는 천연 dsRNA 결합 도메인을 포함하는 포유동물 ADAR 효소가 상기 표적 RNA 서열에서 상기 표적 아데노신을 이노신으로 탈아민화시키는 것을 허용하는 단계; 및 선택적으로 RNA 서열에서 상기 이노신의 존재를 확인하는 단계;를 포함한다.

[0156] 본 발명에 따른 AON의 세포 내로의 도입은 당업자에게 공지된 일반적인 방법에 의해 수행된다. 탈아민화 후 효과의 판독(표적 RNA 서열의 변경)은 상이한 방식으로 모니터링될 수 있다. 따라서 표적 아데노신의 목적하는 탈아미노화가 실제로 일어났는지 여부를 확인하는 단계는 일반적으로 표적 RNA 서열에서 표적 아데노신의 위치 및 아데노신의 존재에 의해 초래되는 효과인 점 변이, 정지 코돈, 비정상적 스플라이스 부위, 대안적인 스플라이스 부위, 결과 단백질의 미스 폴딩 등이다.

[0157] 따라서 바람직한 측면에서 A 에서 I 로 전환의 궁극적인 탈아민화 효과는 다음과 같은 식별 단계로 인식할 수 있다. 표적 RNA를 서열 분석하는 단계; 상기 표적 아데노신이 UGA 또는 UAG 정지 코돈에 위치하고 상기 탈아민화을 통해 UGG 코돈으로 편집된 경우 기능적으로 신장된 전체 길이 및/또는 야생형 단백질의 존재를 평가하는 단계; 2개의 표적 아데노신이 UAA 정지 코돈에 위치하고 2개의 표적 아데노신의 탈아민화을 통해 UGG 코돈으로 편집된 경우 기능적으로 신장된 전체 길이 및/또는 야생형 단백질의 존재를 평가하는 단계; 상기 탈아민화에 프리-mRNA의 스플라이싱이 변경되었는지 여부를 평가하는 단계; 상기 탈아민화 후 표적 RNA가 기능적으로 신장된 전체 길이 및/또는 야생형 단백질을 기능적 판독을 사용하여 암호화하는 단계;를 포함한다.

[0158] UAA 정지 코돈이 있는 경우 두 아데노신이 모두 탈아민화할 필요가 있다. 따라서 본 발명은 또한 서로 인접한 2개의 아데노신이 ADAR과 같은 RNA 편집 효소에 의해 공동 탈아민화되는 올리고뉴클레오타이드 및 방법에 관한 것이다. 이 특별한 경우에 UAA 정지 코돈은 UGG Trp-코딩 코돈으로 전환된다(표 1 참조).

[0159] 아데노신의 이노신으로의 탈아민화는 더 이상 표적 위치에서 변이된 A를 더 이상 지니지 않는 단백질을 유도할 수 있기 때문에 이노신으로의 탈아민화의 확인은 또한 기능적 판독일 수 있으며 예를 들면 기능성 단백질이 존재하거나 심지어 아데노신의 존재에 의해 야기되는 질병이 부분적으로 역전될 수 있다. 기능적 평가와 같은 본원에 언급된 질병 각각에 대한 평가는 일반적으로 당업자에게 공지된 방법에 따른다.

[0160] 표적 아데노신의 존재가 비정상 스플라이싱을 일으키는 경우 판독은 비정상 스플라이싱이 여전히 일어나고 있는지 또는 그렇지 않은지에 대한 평가일 수 있다. 다른 한편으로 표적 아데노신의 탈아민화를 통해 스플라이싱 부위를 도입하고자 할 때 유사한 접근법이 필요한 스플라이싱 유형이 실제로 일어나고 있는지 여부를 체크하는데 사용될 수 있다. 표적 아데노신의 탈아민화 후 이노신의 존재를 확인하는 매우 적합한 방법은 당업자에게 공지

된 방법을 사용하고 RT-PCR 및 서열 분석 방법이다.

[0161] 본 발명은 세포 내에 존재하는 표적 RNA 서열내의 표적 아데노신을 탈아민화시켜, 세포 내에서 바람직하게는 인간 세포 내에서 표적 RNA 서열과 함께 이중가닥 복합체를 형성할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(AON)에 관한 것으로 상기 AON 은 3개의 연속적 뉴클레오타이드의 중심 트리플렛을 포함하는 것이다. 표적 아데노신에 직접적으로 대향하는 뉴클레오타이드는 중심 트리플렛의 중간 뉴클레오타이드고, 상기 중심 트리플렛 내의 1, 2 또는 3개의 뉴클레오타이드가 당 변형 및/또는 염기 변형을 지니고 있으나 단 중간 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형을 지니지 않는 것이다.

[0162] 본 발명의 뉴클레오타이드의 당 및/또는 염기 변형은 당 및/또는 염기 변형을 수반하지 않는 AON과 비교하여 AON을 보다 안정하게 하고 및/또는 표적 아데노신의 탈아민화의 개선된 유도를 유발시킨다. 바람직한 실시형태에서 이중 가닥 복합체가 형성될 때 표적 아데노신에 직접적으로 대향하는 비상보적 뉴클레오타이드는 시티딘이다.

[0163] 이런 시티딘은 AON에서 5' 및 3' 방향으로 직접 연결된 뉴클레오타이드와 함께 본원에서 정의된 바와 같이 중심 트리플렛을 형성한다. 중심 트리플렛 외부의 AON과 표적 RNA 서열 사이에 추가적인 미스매치가 있을 수 있지만 중심 트리플렛의 중심에 있는 시티딘은 세포내 존재하는 ADAR에 의해 편집될 수 있도록 표적 서열에서 표적 아데노신과 적어도 하나의 미스매치를 형성한다.

[0164] 세포는 인간 세포가 바람직하며 ADAR은 바람직하게는 인간 ADAR보다 바람직하게는 재조합 수단에 의해 과발현되지 않는 세포 내의 내인성 ADAR이다. 어느 경우에도 중심 트리플렛의 중간 뉴클레오타이드에는 2'-O-메틸 변형이 존재하지 않는다. 이는 세포 RNA 편집 효소가 작용할 수 있게 한다. 하나의 실시형태에서 중간 뉴클레오타이드 이외의 중심 트리플렛의 1 또는 2개의 뉴클레오타이드는 이노신으로 대체된다.

[0165] 이는 ADAR 효소와 더 적합한 것이 선호될 수 있다. 한편 다른 바람직한 실시형태에서 AON은 포유류 ADAR 효소에 결합할 수 있는 분자 내 스템-루프(stem-loop) 구조를 형성할 수 있는 부분을 포함하지 않는다.

[0166] 도 1, 2 및 4에서 예시한 것처럼 중심 트리플렛은 YXZ 또는 XXY로 표시된다. 다른 염기 변형이 제공된다. 당업자는 이러한 염기 변형이 중심 트리플렛내의 뉴클레오타이드에 대향하는 뉴클레오타이드에 특정 의존성이 있다는 것을 이해한다.

[0167] 따라서 X가 표적 아데노신에 대향하는 중간 뉴클레오타이드인 YXZ를 예를 들면, X는 시티딘, 5-메틸시티딘, 5-하이드록시메틸시티딘, 우리딘 또는 피롤로시티딘일 수 있고, 반면에 중심 트리플렛에 대향하는 뉴클레오타이드에 따라 Y 및/또는 Z는 이노신, 5-메틸시티딘, 피롤로시티딘, 슈도우리딘, 4-티오우리딘, 티에노우리딘, 2-아미노우리딘, 2,6-디아미노우리딘, 티에노구아노신, 5-메톡시우리딘, 디하이드로우리딘, 5-하이드록시메틸시티딘, 5-메틸우리딘, 8-아자-7-디아자구아노신, 7-아미노메틸-7-디아자구아노신, 7-메틸아데노신, 8-메틸아데노신, 3-디아자구아노신, 7-디아자구아노신, 8-디아자구아노신 등을 사용할 수 있다. 또한 표적 RNA 서열과 그에 관련된 질병에 따라 달라질 수도 있다.

[0168] 또한 바람직한 실시형태에서 상기 염기 변형은 2-아미노퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 3-디아자아데노신, 7-디아자아데노신, 7-메틸아데노신, 8-아지도아데노신, 8- 메틸아데노신, 5-하이드록시메틸시티딘, 5-메틸시티딘, 피롤로시티딘,7-아미노메틸-7-디아자구아노신,7-디아자구아노신,7-메틸구아노신,8-아자-7-구아노신, 티에노구아노신, 이노신, 4-티오-우리딘, 5-메톡시우리딘, 5-메틸우리딘, 디하이드로우리딘, 슈도우리딘 및 티에노우리딘으로 이루어진 군에서 선택된 것이다.

[0169] .

[0170] 또 다른 바람직한 실시형태에서 당 변형은 데옥시리보스(즉 DNA), 비잠금(unlocked) 핵산(UNA) 및 2'-2'-플루오로리보스로 이루어진 군에서 선택된다. 특히 바람직한 실시형태에서 본 발명은 표적 아데노신에 직접적으로 대향하는 뉴클레오타이드가 중심 트리플렛의 중간 뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 3개의 연속적 뉴클레오타이드의 중심 트리플렛을 포함하는 AON에 관한 것이다. 특히 중심 트리플렛내의 1개 바람직하게는 2개 및 훨씬 더 바람직하게는 3개의 뉴클레오타이드는 DNA 뉴클레오타이드로 AON에게 표적 아데노신의 탈아민화 유도에 더 큰 안정성 및/또는 효율성을 부여하게 된다.

[0171] 또 다른 바람직한 측면에서 AON의 나머지는 반드시 필수는 아니지만 바람직하게는 2'-O-메틸 변형된 RNA 뉴클레오타이드로 구성된다. 다른 안정화 변형은 중심 트리플렛 외부에서 사용될 수 있다. 본 발명에 따라 표적화된 편집과 완전히 양립 가능한 다른 리보스 변형은 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE), LNA, 2'-F 및 2'-NH_2이다. 중심 트

리플렛 외부의 뉴클레오타이드의 당 변형(본원에 열거된)의 상이한 조합이 적용될 수 있다.

[0172] 또 다른 바람직한 측면에서 본 발명에 따른 AON은 포스포로티오에이트, 3'-메틸렌포스포네이트(즉 3'-O-메틸포스포네이트 인터뉴클레오타이드 연결기), 5'-메틸렌포스포네이트(즉 5'-O-메틸포스포네이트 인터뉴클레오타이드 연결기), 3'-포스포로아미데이트(즉 N-3'-포스포로아미데이트 인터뉴클레오타이드 연결기) 및 2'-5'-포스포디에스테르(즉 2'-5'-포스포디에스테르 인터뉴클레오타이드 연결기)를 포함한다.

[0173] 포스포로티오에이트 결합이 특히 바람직하다. 본 발명에 따른 더욱 바람직한 AON은 AON의 5' 및 3' 말단의 2, 3, 4, 5 또는 6개 말단 뉴클레오타이드가 포스포로티오에이트 결합으로 연결되어 있고, 바람직하게는 5' 및 3' 말단의 5개의 뉴클레오타이드가 포스포로티오에이트 결합으로 연결된 것이다. 본 명세서 내에 개시된 바와 같이 중심 트리플렛 내의 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 결합을 통해 연결될 수 있고 RNA 편집에서 활성뿐만 아니라 안정한 AON을 제공하기 위해 바람직하게는 중심 트리플렛에 하나 이상의 그러한 연결이 존재하는 것으로 보인다.

[0174] 추가의 바람직한 실시형태에서 AON은 증가된 안정성을 위해 보호 센스 올리고뉴클레오타이드(SON)에 어닐링되며 이는 이중 가닥 안티센스 올리고뉴클레오타이드 + SON 복합체의 보다 안정한 특성으로 인한 장기간의 활성을 예측한다. SON은 반드시 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 동일한 길이일 필요는 없고 더 길거나 더 짧거나 길이가 같을 수도 있다.

[0175] 바람직한 하나의 측면에서 중심 트리플렛 외부의 AON 내의 모든 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸기 또는 2'-O-메톡시에틸기와 같은 2'-O-알킬기를 포함한다. 중심 트리플렛 외부의 뉴클레오타이드는 DNA 스트레치가 갭머(gapmer)를 초래하지 않는 한 DNA일 수 있다. 또한 AON은 바람직하게는 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개의 뉴클레오타이드보다 길고 바람직하게는 100개 뉴클레오타이드보다 짧고 보다 바람직하게는 60개 뉴클레오타이드보다 짧다.

[0176] 또 다른 바람직한 실시형태에서 AON은 18 내지 70개의 뉴클레오타이드를 포함하고 보다 바람직하게는 18 내지 60개의 뉴클레오타이드를 포함하고 더욱 더 바람직하게는 18 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 본 발명은 또한 제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 따른 AON 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0177] 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드는 예를 들면 생리식염수 현탁액 필요시 약학적 용도와 부합되는 첨가제 부형제 및 기타 성분을 포함하는 수용액으로 투여하는 것이 적합하다. 농도 범위는 1 ng/ml 내지 1 g/ml 범위 바람직하게는 10 ng/ml 내지 500 mg/ml 범위 보다 바람직하게는 100 ng/ml 내지 100 mg/ml 범위이다. 투여량은 약 1㎍/kg 내지 약 100 mg/kg 바람직하게는 약 10 ㎍/kg 내지 약 10 mg/kg 보다 바람직하게는 약 100 ㎍/kg 내지 약 1 mg/kg의 범위일 수 있다. 투여는 흡입(예: 분무), 비강내, 경구, 주사 또는 주입, 정맥내, 피하, 피부내, 두개내, 근육내, 기관내, 복강내, 직장내, 종양내 직접 주입에 의한 것일 수 있다. 투여는 고체 형태, 분말 형태, 환제 형태 또는 인간에서 약제학적 용도와 양립 가능한 임의의 다른 형태일 수 있다.

[0178] 본 발명은 또한 바람직하게는 낭포성 섬유증, 알비니즘, 알파-1-항트립신(A1AT) 결핍증, 알츠하이머병, 근위축성 경화증, 천식, 지중해 빈혈, 카다실 증후군, 샤르코-마리-투스 병, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 근위부 척수성 근위축증(DSMA), 뒤센/베커 근이영양증, 이영양성 수포성 표피 박리증, 표피 박리증, 파브리 병, Factor V Leiden 관련 질환, 가족성 선종, 용종증, 갈락토스혈증, 고쉐 병, 포도당-6-인산 탈수소 효소, 혈우병, 유전성 혈색소증, 헌터 증후군, 헌팅턴병, 헐러 증후군, 염증성 장질환(IBD), 유전성 다응집 증후군, 레베르 선천성 흑내장, 레쉬-니한 증후군, 린치 증후군, 마르팡 증후군, 뮤코다당증, 근이영양증, 근긴장성 이영양증 Ⅰ형과 Ⅱ형, 신경 섬유종증, 니만-피크 병 A형, B형과 C형, NY-eso1 관련 암, 파킨슨 병, 포이츠-제거스 증후군, 페닐케톤요증, 폼페 병, 원발성 섬모질환, 프로트롬빈 G20210A 변이와 같은 프로트롬빈 변이 관련 질환, 폐 고혈압, 망막 색소 변성증, 샌드호프 병, 중증 결합 면역 결핍 증후군(SCID), 겸상 적혈구 빈혈, 척추성 근위축증, 스타가르트 병, 테이-삭스 질병, 어셔 증후군, X- 연결된 면역 결핍, 스터지-웨버 증후군 및 암과 같은 유전 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명에 따른 AON에 관한 것이다.

[0179] 일부 실시형태에서 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트는 전신적으로 전달될 수 있지만 표적 서열의 표현형이 나타나는 세포에 올리고뉴클레오타이드를 전달하는 것이 보다 일반적이다. 예를 들면 CFTR의 돌연변이는 주로 폐 상피 조직에서 나타나는 낭포성 섬유증을 일으키므로 CFTR 표적 서열에서는 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트를 구체적으로 폐에 직접 전달하는 것이 바람직하다.

[0180] 이는 흡입에 의해 편리하게 달성될 수 있다. 전형적인 분무기 사용을 통해 분말 또는 에어로졸을 제공한다.

PARI eFlow (Rapid) 또는 Respironics의 i-neb를 포함하는 소위 진동 메쉬를 사용하는 분무기가 특히 바람직하다. 본 발명자들은 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트의 흡입 사용이 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트의 전신 분포 및 장, 간, 췌장, 신장 및 타액선 조직의 세포에 의한 흡수를 유도할 수 있다는 것을 발견했다.

[0181] 따라서 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트의 흡입 전달은 이들 세포를 효율적으로 표적화할 수 있고, CFTR 유전자 표적화의 경우 낭포성 섬유증과 관련된 위장관 증상의 개선을 유도할 수 있다. 다른 표적 서열의 경우 질환 및/또는 표적 기관에 따라 투여는 국소(예를 들어 피부), 피내, 피하, 근육 내, 정맥 내, 구강 내, 안구 내 주사 등일 수 있다.

[0182] 일부 질병에서는 점액층의 두께가 증가하여 폐를 통한 약의 흡수가 감소된다. 그러한 질병 중 하나는 만성 기관지염이며 다른 예는 낭포성 섬유증이다. DNase, 고장 식염수 또는 Bronchitol이라는 이름으로 상업적으로 입수할 수 있는 만니톨과 같은 다양한 형태의 점액 정상화제가 사용 가능하다.

[0183] 점액 정상화제와 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트를 같은 RNA 편집 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트와 조합하여 사용되는 경우 이는 의약품의 유효성을 증가시킬 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트의 투여 바람직하게는 인간 대상으로의 투여는 바람직하게는 본 명세서 내에 기재된 점액 정상화제와 같은 점액 정상화제와 결합하여 투여하는 것이다.

[0184] 또한 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트의 투여는 예를 들면 Kalydeco(ivacaftor; VX-770)와 같은 보강제 화합물 예를 들면 VX-809(lumacaftor) 및/또는 VX 661과 같은 교정 화합물과 결합하여 CF의 치료를 위한 작은 분자의 투여와 병용하여 투여할 수 있다. CF 내에서 다른 병용 치료법은 IFN-감마 또는 TNF-알파를 사용하여 아데노신 디아미나제의 유도제와 병용하여 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트를 사용할 수 있다.

[0185] 선택적으로 또는 점액 정상화제와 함께 점액 침투 입자 또는 나노입자의 전달은 RNA 편집 분자를 폐 및 장 상피 세포로 효율적으로 전달하기 위해 적용될 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트를 피험자, 바람직하게는 인간 피험자에게 투여하는 것은 점액 침투 입자 또는 나노입자를 통한 전달을 사용하는 것이 바람직하다.

[0186] 만성 및 급성 폐 감염은 낭포성 섬유증과 같은 질병을 지닌 환자에게 종종 나타난다. 항생제 치료는 세균 감염 및 점액 농축 및/또는 바이오필름 형성과 같은 증상을 감소시킨다. 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트와 조합된 항생제의 사용은 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트를 표적 세포에 보다 용이하게 접근케 하여 RNA 편집의 효율성을 증가시킬 수 있다.

[0187] 따라서 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트의 피험자, 바람직하게는 인간 피험자로의 투여는 박테리아 감염 및 점액 농축 및/또는 바이오필름 형성과 같은 증상의 감소를 위한 항생제 치료와 바람직하게 조합된다. 항생제는 전신적으로 또는 국소적으로 또는 모두 투여될 수 있다.

[0188] 예를 들어 낭포성 섬유증 환자에서의 적용을 위해 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트 또는 패킹된 또는 복합화된 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 컨스트럭트는 DNase, 만니톨, 고장성 식염수와 같은 점막 정상화제 및/또는 항생제 및/또는 예를 들면 ivacaftor와 같은 보강제 화합물, 예를 들면 lumacaftor 및/또는 VX-661과 같은 교정 화합물과 같은 CF의 치료를 위해 작은 분자와 조합시켜 사용할 수 있다.

[0189] 표적 세포에 대한 접근성을 증가시키기 위해 Broncheo-Alveolar Lavage(BAL)가 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 투여 전에 폐를 세정하는데 적용될 수 있다.

[0190] 본 발명의 발명자들은 RNA를 표적으로 하고 ADAR 효소의 리크루트 수율을 증가시키고 안정화시키기 위해 AON에 대한 특정 변형이 본 명세서 내에 개시되어 있다. 그러나 안정성은 별도이다. 뉴클레아제 매개 붕괴를 방지함으로써 AON을 안정화시킴과 더불어 ADAR 효소의 결합 및/또는 촉매 활성을 증진시키고 바람직하게는 개선시키도록 변형된 뉴클레오타이드가 이상적으로 선택된다.

[0191] ADAR2 디아미나제 도메인과 dsRNA 기질 사이의 상호 작용에 대한 알려진 구조적 특징(Matthews 등, 2016. Nat Struct Mol Biol 23: 426-433에서 아주 자세하게 제공됨)이 ADAR2 효소의 촉매 중심에 가장 적합하게 변형된 AON을 합리적으로 선택하는데 사용될 수 있다. Matthews 등(2016)에 개시된 (착색된) 구조로부터 ADAR2가 dsRNA 나선의 작은 홈에서 편집 부위와 접촉한다는 것을 알 수 있다.

[0192] 본 명세서 내의 도 2를 참조하면, 패널 A : dsRNA 나선형 축에 수직형 복합체의 구조를 나타낸다. 분홍색 RNA 가닥은 편집된 가닥이며 파란색 가닥은 상보적인 가닥이다. 플립-아웃된 표적 염기(N)는 빨간색으로

표시되었다. 단백질은 작은 홈을 통해 나선과 접촉한다. 패널 B : dsRNA 나선 축을 따르는 구조를 나타낸다. 패널 C : ADAR2 E488Q 디아미나제 도메인과 RNA 이중체 사이의 접촉을 요약한 것이다.

[0193] 빨간색은 편집된 표적 가닥을 나타내고 파란색은 상보적인 가닥을 나타낸다(여기에 제시된 AON은 균등). 점선은 디아미나제 도메인의 아미노산 측쇄(아미노산 동일성 및 위치 표시)와 RNA 가닥의 상호 작용을 나타낸다. Matthews 등(2016)의 도 5A는 표적 가닥 상에서 편집된 부위에 대한 5' 뉴클레오타이드와 다른 가닥상의 상보적인 뉴클레오타이드 사이의 상호 작용을 공간-충진 모델로 상세히 나타낸 것이다.

[0194] 상부 패널에서 5' 뉴클레오타이드는 우리딘이고 대향하는 아데노신에 대한 상호 작용은 ADAR2 디아미나제 도메인의 글리신 489에 의해 안정화된다. 하부 패널은 C(5' 방향의 편집된 뉴클레오타이드)와 상보적인 G간의 상호 작용 모델을 나타낸 것이다. 이 경우 글리신과의 상호 작용은 2-아미노 그룹과 충돌하여 편집 효율성을 떨어뜨린다. 대향하는 가닥(또는 AON)에서 구아노신 염기를 이노신으로 대체하면 이러한 입체적 충돌을 해결할 수 있다.

[0195] 염기 변형을 위하여 본 발명자들은 나선의 주요 홈 내로 투영된 화학적 변형 (Sharma 및 Watts 2015, Future Med. Chem. 7 (16), 2221-2242)이 적어도 ADAR2의 기능에 상호 저해함을 추론하였다. 도 2와 하기 실시예를 서로 다른 AON의 예시로 참고하기 바란다.

[0196] 피리미딘 뉴클레오타이드의 경우, 그러한 변형은 염기 내 4번 또는 5번 위치에 치환기를 포함한다. 4-티오우리딘(예: ADAR60-13 참조), 5-메틸우리딘(예: ADAR60-14 참조), 5-메톡시우리딘(예: ADAR60-26 참조) , 5-메틸시티딘(예: ADAR60-9, -11 부터 -16, -20, -26, -27 및 -29 부터 -32 및 ADAR68-1 부터 -6 참조) 및 5-하이드록시메틸시티딘(예: ADAR60-28 참조) 등이다.

[0197] 퓨린 뉴클레오타이드의 경우, 염기의 7번 및 8번 위치의 치환체는 주요 그루브에 유사하게 직접 작용한다. 7-메틸구아노신, 7-디아자구아노신, 8-아자-7-디아자구아노신, 7-아미노메틸-7-디아자구아노신, 7-메틸아데노신, 8-메틸아데노신, 3-디아자아데노신, 7-디아자아데노신 또는 8-아지도아데노신(예: 각각 ADAR60-29, -30, -31 및 -32 및 ADAR68-1, -2, -3, -4 및 -5 참조) 등이다.

[0198] AON의 골격의 변형(즉, 뉴클레오타이드의 리보실기 또는 뉴클레오타이드 결합의 변형)에 대하여, 본 발명의 발명자는 RNA 나선의 A 형 구조를 변화시키지 않는 변형은 단지 ADAR2의 기능을 일부 저해하는 것으로 추론하였다. ADAR2 디아미나제 도메인의 구조 정보는 또한 특정 위치에서 인산 그룹 및 2'-하이드록실 그룹과 같은 효소의 아미노산 측쇄에 의해 접촉되는 화학 그룹을 보유하는 것이 중요하다는 것을 제안한다.

[0199] 이러한 기능의 유지를 허용하는 수정에는 UNA(예: ADAR60-8 및 -9 참조), 3'-메틸렌포스포네이트, 5'-메틸렌포스포네이트, 3'-포스포로아미데이트 또는 2'-5' 포스포디에스테르 변형(각각 ADAR60-22, -23, -24 및 -25 참조)을 들 수 있다. 이 경우, ADAR2에 의한 직접 상호 작용은 특정 뉴클레오타이드 상에 치환체에는 존재하지 않는다. 또한 다른 화학적 그룹은 뉴클레아제로부터 AON을 보호하기 위해 사용될 수 있지만 예를 들면 2'-플루오로 변형 또는 2'-H(데옥시)는 자연 발생 하이드록실 그룹(예를 들어, ADAR60-7 참조)보다 크지 않기 때문에 ADAR2에 입체적인 간섭을 일으키지 않을 정도로 충분히 작은 것이다.

[0200] 변형된 뉴클레오타이드는 뉴클레아제로부터 강화된 보호를 제공하고 ADAR2 바인딩에 대한 간섭을 최소화할 뿐만 아니라 특히 ADAR2의 기능을 증가시키기 위해 선택될 수 있다. 특정 뉴클레오타이드 변형은 특히 표적 서열이 ADAR 편집에 최적이 아닌 기질 RNA상의 편집 활성을 향상시키는데 필요할 수 있다. 이전의 연구 결과는 특정 서열 컨텍스트가 편집에 보다 적합하다는 것을 입증하였다.

[0201] 예를 들어 표적 서열 5'-UAG-3'(중간에 표적 A를 가짐)은 ADAR2에 대해 가장 바람직한 가장 인접한 이웃 뉴클레오타이드를 함유하는 반면, 5'-CAA-3' 표적 서열은 바람직하지 않다(Schneider 등, 2014). ADAR2 디아미나제 도메인의 구조 분석은 표적 트리뉴클레오타이드에 대향하는 뉴클레오타이드를 주의깊게 선택하여 편집을 향상시킬 수 있음을 암시한다(Matthews 등, 2016). 예를 들어, 반대 가닥(A-C 미스매치가 중간에 형성됨) 상의 3'-GCU-5' 서열과 페어를 이루는 5'-CAA-3' 표적 서열은 구아노신 염기의 아미노기와 ADAR2의 아미노산 측쇄 간의 입체적 충돌을 야기한다.

[0202] 그러나 이노신과 같은 아미노기가 결여된 더 작은 핵 염기가 입체적 충돌을 일으키지 않고 이 위치에 더 적합할 수 있으며 대향하는 시토신에 대한 염기쌍 형성 가능성이 여전히 유지된다고 가정한다(예: ADAR60-10 부터 -19, 및 -26, -27, -28 및 -32 참조). 이노신은 또한 다른 서열 컨텍스트에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 표적 서열 5'-UAG-3'은 AON 중심 트리플렛 서열 5'-CCI-3'과 쌍을 이루어 표적 아데노신이 헬릭스를 튀어 나와 효소의 활

성 부위에서 요구되는 증가된 유연성을 제공할 수 있는 U-I 위블 염기 페어를 형성할 수 있게 한다.

[0203] 골격의 변형은 또한 효소의 활성 부위에서 기질을 정확하게 위치시키는 중요한 엘레멘트로서 제시된 편집 부위를 둘러싼 뉴클레오타이드에 대한 증가된 유연성을 제공하는 것과 같이 뉴클레아제 보호를 넘어서는 추가적인 이점을 가질 수 있다. UNA 당 부분의 개방 구조가 증가된 움직임을 허용하기 때문에 그러한 백본 변형 중 하나이다(ADAR60-8 및 -9 참조). 반대로 최적이 아닌 서열의 활성을 증강시키는 변형은 또한 편집이 선호되는 형태로 유도하는 골격 변형의 사용을 포함한다.

[0204] 실시예

[0205] (실시예 1) 안정성을 증가시키기 위해 인간 SERPINA1 RNA를 표적으로 하는

[0206] AON의 화학적 변형

[0207] 미공개 특허 출원 PCT/EP2017/065467에는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (AON)의 사용에 의한 표적화된 A-I 편집 방법이 기재되어 있다. 이 AON의 대부분의 뉴클레오타이드가 2'-O-메틸화 RNA이고 포스포로티오에이트 결합을 지니고 있는 반면 표적 아데노신 및 그것의 2개의 인접한 뉴클레오타이드에 직접 대향하고 있는 중간 뉴클레오타이드를 지닌 AON의 부분에는 보통 3개의 비변형된 RNA 뉴클레오타이드('중심 트리플렛')를 포함하고 있다.

[0208] 이것은 중심 트리플렛의 뉴클레오타이드가 2'-O-메틸화되면 A에서 I로 편집이 강력하게 저해된다는 것을 이전에 알고 있었기 때문이다(Vogel 등, 2014). 그러나 변형되지 않은 RNA 뉴클레오타이드를 함유하는 AON은 이들 위치에서 잔기를 가수 분해할 수 있는 뉴클레아제로 인해 본질적 생물학적으로 불안정하다. 이는 치료제가 목표에 도달하기 전에 분해될 수 있으므로 AON의 효율적인 사용에 대한 단점이 될 수 있다.

[0209] 본 발명의 발명자는 중심 트리플렛에서 비변형된 RNA 뉴클레오타이드를 지니는 AON의 안정성 및 2'-O-메틸화 이외의 화학적 변형을 사용하여 그러한 AON의 안정성이 증가될 수 있는지 여부를 조사하였다.

[0210] 첫째, RNA 편집을 위해 선택된 표적은 A1AT-결핍(A1ATD)의 원인인 SERPINA1 RNA의 c.1096G>A 변이였다. A1ATD는 명세서 내에 설명된 접근법을 사용하여 RNA 편집을 위한 질병 표적의 예로 사용한다. 도 1A 및 B에서, SERPINA1 표적에 대한 예시적인 AON의 상보성이 개략적으로 도시되어 있다. 표적 서열에 대한 ADAR60-1 상보성은 도 1A에 표시되어있는 반면 ADAR60 시리즈 (5'-YXZ-3') 내의 중심 트리플렛은 도 1B에 표시되어 있다.

[0211] 중심 트리플렛의 뉴클레오타이드의 염기내 및 골격내에 다양한 변형을 갖는 변이 RNA를 표적으로 하는 다수의 AON을 +37℃에서 30분간 15% 우태아 혈청(FBS)을 함유하는 세포 배양 배지(MEM)에서 배양하여 안정성을 시험하였다(RX). 음성 대조군으로서 AON을 인산염 완충 생리식염수(PBS; CTL)내에서 인큐베이션 시켰다. 이어서 샘플을 변성 폴리아크릴아미드겔(8M 우레아를 지닌 15 % PAGE 겔)에서 리졸브하고 이어서 톨루이딘 블루로 염색하여 AON 및 이의 단편을 시각화하였다.

[0212] 각각의 서열과 그 변형을 지닌 AON을 도 2에 나타내었다. 도 3의 세 패널은 ADAR60 시리즈의 AON을 사용한 안정성 분석의 결과를 나타낸다. 변형되지 않은 5'-UCG-3' RNA 중심 트리플렛을 포함하는 ADAR60-1은 FBS 존재 하에서 약 50% 까지 30분 이내에 효율적으로 붕괴된다. AON이 대조군 완충액에서 인큐베이션 될 때 약간의 붕괴가 나타난다. 3개의 RNA 뉴클레오타이드의 위치가 이동되어도 분해 속도는 감소하지 않는다(ADAR60-3).

[0213] 중요하게는 변형되지 않은 RNA 뉴클레오타이드의 수를 2개(3개 대신)로 낮추면 붕괴가 감소한다(ADAR60-2). 여기에 음성 대조군으로 사용되는 완전히 2'-O-메틸화 AON은 중심 트리플렛이 DNA 뉴클레오타이드(ADAR60-6)로 변경된 곳의 AON과 마찬가지로 이러한 조건(ADAR60-4) 하에서 안정적으로 유지된다. 이는 중심 트리플렛이 2'-O-메틸화 되지 않았을 경우에 나타나며 AON이 붕괴되는 경향이 있으며 최소한 중심 트리플렛에 적어도 하나의 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드를 추가하거나 전체 중심 트리플렛을 DNA 뉴클레오타이드로 수정해야 한다.

[0214] 당의 또 다른 변형으로 중심 트리플렛의 3개 위치 중 2개에서 잠금 핵산(UNA)으로 RNA를 대체하면 안정성이 향상되고(ADAR60-8), 또한 트리플렛의 중간을 5-메틸시토신으로 염기 변형을 결합시켜도 더욱 안정성이 향상된다(ADAR60-9). 중심 트리플렛의 첫 번째 위치 이후에 하나의 포스포로티오에이트 결합의 포함(별표가 포스포로티오에이트 결합을 나타내는 5'-U*CG-3')은 유의미한 안정성의 증가를 나타내지 않는다(ADAR60-5). 실시예 2의 하단에는 포스포로티오에이트 결합의 수를 증가하는 방향으로 추가적 시험이 나타나 있다.

[0215] 구아노신을 이노신으로 대체하면 붕괴가 현저히 감소한다(ADAR60-10). 이런 변형을 5-메틸시티딘을 위해 시티딘 대체에 결합시킬 때(ADAR60-11) 이런 변형을 슈도우리딘을 위해 우리딘 대체에 결합시키는 경우보다 더 안정성이 증가한다(ADAR60-12).

[0216] 중심 트리플렛의 모든 3개 뉴클레오타이드를 변형된 뉴클레오타이드로 대체하면 안정성에 가장 큰 영향을 주는 것으로 나타난다. 각각의 위치에 정확한 변형은 다양하게 제공되고 이는 AON의 안정성에 큰 영향을 미친다. ADOR60-12와 또 다르게 유사한 AON에서 슈도우리딘을 4- 티오우리딘(ADAR60-13) 또는 2,6-디아미노퓨린(ADAR60-16)으로 대체하면 상당한 안정성을 지닌 AON이 얻어진다. 한편 대조적으로 5-메틸우리딘(ADAR60-14)은 안정성을 감소시킨다. 티에노우리딘(ADAR60-15)은 AON의 거의 완전한 붕괴를 야기하고 이는 변형되지 않은 RNA 트리플렛 보다 더 많은 붕괴를 야기하는 것이다.

[0217] 중심 트리플렛에서 중간 C의 피롤로시티딘으로의 대체는 5-메틸시티딘 보다 더 유의미한 안정성을 부여한다: 피롤로시티딘과 이노신을 지닌 AON은 트리플렛의 첫 번째 위치에 슈도우리딘 또는 변형되지 않은 우리딘을 포함하는지 여부와 관계없이 이 조건하에서 거의 완전한 안정성을 부여하는 것이다(각각 ADAR60-18 및 ADAR60-17). 우리딘을 티에노우리딘으로 또 다시 대체하면(ADAR60-19) 이 콘텍스트 내에서 안정성의 저하를 야기시킨다. 그러나 ADAR60-15와 같은 정도는 아니다.

[0218] 중심 트리플렛의 다른 두 위치와 유사하게 마지막 위치도 안정성을 위해 서로 다른 염기의 변형을 도입할 수 있다. 여기에 이노신 대신 티에노구아노신을 슈도우리딘과 5-메틸시티딘 또는 피롤로시티딘을 결합시켜 사용한다(각각 ADAR60-20 및 ADAR60-21). 두 개의 AON 모두는 이러한 조건 하에서 충분히 안정하다: 티에노구아노신에 의한 증가된 안정성은 다른 유사한 ADAR60-12 및 ADAR60-20과 비교할 때 현저한 것이다.

[0219] 증가된 안정화에 대해 유사한 효과를 얻기 위한 추가적 결합은 예를 들면 구아노신을 7-메틸구아노신, 7-디아자구아노신, 8-아자-7-디아자구아노신 또는 7-아미노메틸-7-디아자구아노신으로 대체하는 것이다(각각 ADAR60-29, -30, -31 및 -32 참조). 또는 시티딘을 5-하이드록시메틸시토신(ADAR60-28 참조) 또는 우리딘을 5-메톡시우리딘 또는 디하이드로우리딘(각각 ADAR60-26 및 -27 참조)으로 대체하는 것이다. 중심 트리플렛의 당 및 골격 변형을 통해 안정화가 달성되며 이는 2'-플루오로, 3'-메틸렌포스포네이트, 5'-메틸렌포스포네이트, 3'-포스포로아미데이트 또는 2'-5'포스포디에스테르 변형을 들 수 있다(2'에서 5' 골격 결합; 각각 ADAR60-7, -22, -23, -24 및 -25 참조).

[0220] 본 실시예에서 나타내는 결과는 모든 변형이 RNA 편집 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 붕괴를 감소시키는데 유용하지는 않지만 많은 변형이 안정성을 증가시키고 중심 트리플렛 내 또는 그 주변의 변형이 조심스럽게 선택되어야 한다는 것을 나타낸다.

[0221] 특정 화학 물질로 중심 트리플렛의 뉴클레오타이드를 변형하면 올리고뉴클레오타이드의 안정성이 확실히 증가한다. 결론적으로 본 실시예에서 제시된 결과는 중심 트리플렛 내의 뉴클레오타이드의 변형 또는 결합이 안정성을 향상시키고 한번의 여러 염기의 변형은 점진적 안정화를 부여함을 나타낸다.

[0222] (실시예 2) 안정성을 증가시키기 위한 마우스 Idua RNA를 표적으로 하는 AON

[0223] 내에서 포스포로티오에이트 결합

[0224] 이전 실시예에서 중심 트리플렛 내의 첫 번째 위치 이후에 하나의 포스포로티오에이트 결합이 포함되어도 안정적으로 안정성을 증가시키지 못하는 것이 나타났다(도 3A; ADAR60-5). 이를 더 상세히 조사하기 위해 중심 트리플렛 영역 내에 보다 많은 포스포로티오에이트 결합을 포함시키는 것이 어떤 영향을 미치고 안정성을 증가시킬지 여부를 시험하였다.

[0225] 이를 위해 본 발명자들은 IDUA 유전자의 c.1205G>A(W402X) 변이에 의해 인간에 발병하는 뮤코 다당증 유형 I-헐러(MPS IH)로도 알려진 헐러 증후군을 모델 시스템으로 선택하였다. 변이된 인간 유전자의 표적 서열은 5'-UAG-3'(표적 A가 중간에 있음, 도 4A 참조) 이었고, AON의 중심 트리플렛은 5'-CCA-3'(중간의 미스매치된 C; 5'-XXY-3' 표기법에 대해서는 도 4B 참조) 또는 5'-CUA-3'이 된다.

[0226] 변이에 대한 마우스 모델도 존재하며(W392X) Idua 유전자가 변이된 것이다. 헐러 마우스 모델은 추가 생체 내 실험에도 사용되었다(아래 참조). 변이된 마우스 Idua 유전자를 표적으로 하기 위해 일련 번호 ADAR65를 지니는 올리고뉴클레오타이드를 디자인하였다(도 2 참조). ADAR65-1, ADAR65-18, ADAR65-20, ADAR65-21 및 ADAR65-22는 추가의 포스포로티오에이트 결합이 올리고뉴클레오타이드의 안정성을 증가시키는지를 측정하기 위해 사용되었다.

[0227] 놀랍게도 중심 트리플렛 영역에 3개 이상의 포스포로티오에이트를 포함시키면 AON의 안정성이 증가한다(도 5). ADAR65-1은 중심 트리플렛 영역에서 추가적인 포스포로티오에이트 결합을 지니고 있지 않으며 충분하게 붕괴되는 반면 ADAR65-22는 중심 트리플렛 영역 내에 6개의 포스포로티오에이트 결합을 지니고 있으며 FBS 내에서 18

시간 배양한 후에도 더 안정하였다.

[0228] 유사하게 중심 트리플렛 영역에서 5개와 3개의 포스포로티오에이트 결합을 각각 지니는 ADAR65-20과 ADAR65-21의 안정성은 올리고뉴클레오타이드의 말단 연결기를 제외하고는 중심 트리플렛 영역에 추가 포스포로티오에이트가 없는 ADAR65-18 (ADAR65-1과 같이) 보다 증가하였다.

[0229] 5-메틸시티딘과 데옥시 2-아미노퓨린과 같은 염기 변형은 데옥시리보스(DNA), 2'-O-메틸, 2'-플루오로 및 인산염 골격(포스포로티오에이트 결합)과 같은 리보스 변형이 결합되어 있다. ADAR65-13,-14, -16, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29 및 -30은 이전에 설명한 것과 동일한 에세이를 사용하여 안정성을 테스트하였다(도 2). 도 6에 나타난 바와 같이 FBS 내에서 18시간 배양한 후에도 다양한 결합이 안정성을 향상시킬 수 있도록 사용됨을 나타낸다.

[0230] 또한 중심 트리플렛 내에서 RNA(ADAR93-2) 또는 DNA(ADAR93-6, ADAR93-8, ADAR93-9) 및 다양한 수의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드(ADAR93-2에서 28개, ADAR93-6에서 8개, ADAR93-8의 21개, ADAR93-9의 22개)를 지닌 AON을 다양한 생물학적 용액 내에서 안정성을 분석하였다. PBS를 음성 대조군으로 사용하였다. AON이 혈액 및 중추 신경계에서 작용할 수 있는 생리 조건을 모방하기 위해 AON을 각각 15% FBS 또는 단일 공여자 인간 뇌척수액(CSF)을 함유하는 세포 배양 배지(DMEM)에서 배양하였다.

[0231] 리소좀과 뉴클레아제의 산성 미세 환경이 AON 안정성에 영향을 미치는지를 평가하기 위해 올리고뉴클레오타이드를 혼합 젠더 인간 간 라이소솜(Lyso)에서 배양하였다. 200 pmol의 AON을 각각의 조건하에서 2시간, 24시간 또는 3일 동안 인큐베이션 시킨 후 변성 폴리아크릴아미드 겔(8 M 요소를 지닌 12% PAGE 겔)에서 샘플을 분리하였다.

[0232]

[0233] 겔을 톨루이딘 블루 용액으로 염색하고 물에서 염색을 제거하여 AON 및 그의 단편을 시각화하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었으며 중심 트리플렛(ADAR93-2)내에 변형 없는 RNA를 지닌 올리고뉴클레오타이드가 FBS, CSF 및 Lyso에서 붕괴되기 쉽다는 것을 알 수 있다. 그 이유는 거의 모든 올리고뉴클레오타이드가 다른 환경 하에서 급속히 붕괴되기 때문이다. PBS내에서만 상대적으로 안정성이 유지된다. 그러나 중심 트리플렛을 2개 또는 3개의 DNA 뉴클레오타이드를 포함하도록 변경하면 세 가지 다른 환경에서 올리고뉴클레오타이드의 안정성이 최대 3일까지 현저히 증가한다.

[0234] 인간 IDUA 유전자의 c.1205G>A(W402X) 변이를 잠재적으로 표적으로 삼는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 ADAR68, ADAR68-1, -2, -3, -4 및 -5도 설계되었다. 변형된 중심 트리플렛은 예를 들면 7-메틸아데노신, 8-메틸아데노신, 3-디아자아데노신, 7-디아자아데노신, 또는 8-아지도아데노신과 같은 아데노신을 대체하는 뉴클레오타이드와 결합된 2개의 5-메틸시티딘으로 구성되어 있다(도 2 내의 ADAR68-1, -2, -3, -4 및 -5). 그러나 아데노신은 또한 이노신(ADAR68-6)과 같은 우리딘에 대향하는 워블 염기쌍을 형성할 수 있는 변형된 염기로 대체될 수 있다. 이러한 AON은 안정성과 표적 서열의 RNA를 편집할 수 있는 능력을 시험하였다.

[0235] (실시예 3) 중심 트리플렛 내에서 결합된 화학적 염기 변형을 지닌 AON의

[0236] RNA 편집 활성

[0237] 뉴클레아제에 대한 올리고뉴클레오타이드의 안정성을 증가시키기 위해 뉴클레오타이드 포스포디에스테르, 당 및 염기 변형이 사용된다. 중요하게는 본 발명의 발명자가 이러한 화학적 뉴클레오타이드 변형이 AON의 그의 표적 RNA에 대한 결합의 증가, 더 나은 인지를 위하거나 그의 특이적인 표적 RNA 서열을 지닌 AON의 이중 가닥 복합체 상에 작용하는 단백질의 효소 활성을 증가시키는 것과 같은 다른 목적을 위해 사용 될 수 있다는 것을 인식하게 된 것이다.

[0238] 본 발명자들은 처음에는 AON의 중심 트리플렛의 뉴클레오타이드 염기 화학적 변형의 조합이 ADAR2의 편집 활성을 향상시킬 수 있는지 여부를 측정해 보았다. 이를 위해 ADAR60-1 및 ADAR60-15(도 2 및 3 참조)를 사용하여 인간 변이 SERPINA1 표적 RNA 분자에 대한 ADAR2 효소의 편집 활성의 향상에 미치는 영향을 조사하였다. 이 두 개의 AON 모두는 동일한 서열과 길이를 공유하며 둘 다 중심 트리플렛 외부의 리보스 당의 2'-O-메틸 변형뿐만 아니라 인산기의 화학적 포스포로티오에이트 변형을 지닌다.

[0239] ADAR60-1의 중심 트리플렛의 뉴클레오타이드는 변형되지 않은 반면 ADAR60-15의 중심 트리플렛의 뉴클레오타이드 염기는 도 2에 나타난 바와 같이 화학적으로 변형되었다. 5-메틸시티딘은 편집을 위해 표적 아데노신에 대향시킨다. ADAR60-1과 ADAR60-15는 모두 ADAR2(ADAR2a)의 과발현된 이소폼 2 을 지닌 HEK293 세포 용해물과

c.1096G>A 변이를 수반하는 SERPINA1 표적 RNA를 사용하여 시험관 내 편집 에세이를 통해 시험하였다. 세포 용해물이 없는 ADAR60-15 및 과발현된 ADAR2a를 지닌 올리고뉴클레오타이드가 없는HEK293 세포 용해물을 음성 대조군으로 사용하였다.

[0240] SERPINA1 주형 ssRNA는 MEGAscript Kit(Life Technology)를 사용하여 당업자에게 공지된 일반적인 기술로 제조자 프로토콜에 따라 500ng의 SERPINA1mut DNA 서열(SERPINA1mut gBlocks® 유전자 단편으로부터 PCR로 증폭)의 T1promoterF1 정방향 프라이머(5'-GCGAAGCTTAATACGACTC-3'; 서열번호: 3) 및 Serpina1-R2 역방향 프라이머(5'-CCATGAAGAGGGGAGACTTC-3'; 서열번호: 4)를 사용한 시험관 내 전사에 의해 수득되었다.

[0241] SERPINA1mut DNA 주형은 다음 서열을 지닌다(표적 아데노신을 굵게 표시하고 밑줄침).

[0242] 5'-GCGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGGTCAACTGGGCATCACTAAGG

[0243] TCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCACCCCT

[0244] GAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGAC**A**AGAAAG

[0245] GGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATCC

[0246] CCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAAT

[0247] ACCAAGTCTCCCCTCTTCATGG-3'(서열번호: 5)

[0248] 표적 ssRNA는 다음 서열을 지닌다(표적 아데노신은 굵은 글씨 및 밑줄침) :

[0249] 5'-UCAACUGGGCAUCACUAAGGUCUUCAGCAAUGGGGCUGACCUCUCCGGGG

[0250] UCACAGAGGAGGCACCCCUGAAGCUCUCCAAGGCCGUGCAUAAGGCUGUGCUG

[0251] ACCAUCGAC**A**AGAAAGGGACUGAAGCUGCUGGGGCCAUGUUUUUAGAGGCCAU

[0252] ACCCAUGUCUAUCCCCCCCGAGGUCAAGUUCAACAAACCCUUUGUCUUCUUAAU

[0253] GAUUGAACAAAAUACCAAGUCUCCCCUCUUCAUGG-3'(서열번호: 6)

[0254] 표적 ssRNA를 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 사용하여 겔 정제하였다. 용해물을 얻기 위해 HEK293 세포를 먼저 리포펙타민 3000을 사용하여 500 ng의 ADARB1 발현 플라스미드(OriGene)로 하루 밤 트랜스펙트 시켰다. 세포를 Lysis-M 시약을 사용하여 용해시켰다. 200 nM AONs 및 90 nM SERPINA1 주형 ssRNA를 30℃에서 30분 동안 시험관 내에서 편집 에세이 완충액과 함께 사전 인큐베이션 시켰다. 사전 인큐베이션 후 세포 용해물(10 ㎕)을 첨가하고 반응 혼합물은 30℃에서 30분 동안 연이어 37℃에서 30분 동안 인큐베이션 시켰다.

[0255] 이어서 페놀 클로로포름 추출에 의해 표적화된 RNA를 추출하고 Maxim RT 시약을 사용하여 제조사 프로토콜을 사용하여 Serpina1-F2 정방향 프라이머(5'- TCAACTGGGCATCACTAAGG-3'; 서열번호: 7) 및 Serpina1-R2 역방향 프라이머(상기 참조)로 반응시켜 cDNA를 PCR로 증폭시키고 Serpina1-R1 프라이머(5'-CATGAAGAGGGGAGACTTGG-3'; 서열번호: 8)를 사용하여 Sanger 서열 분석법에 의해 분석하였다.

[0256] 도 8은 ADAR60-1이 SERPINA1mut ssRNA 표적과 함께 인큐베이션 시킬 때 A에서 G로의 변화가 감지되지 않음을 나타낸다(패널 A, 화살표로 표시된 위치). 대조적으로 ADAR60-15(패널 B)의 사용은 명확하게 검출 가능하고 A에서 G로 변화를 나타내며 표적 SERPINA1 RNA의 편집을 확인한다. 음성 대조군 반응(패널 C 및 D)은 A에서 G로 편집을 나타내지 않았다. ADAR60-15의 뉴클레오타이드 염기 화학적 변형은 그러한 변형이 없는 올리고뉴클레오타이드(ADAR60-1)와 비교하여 ADAR2의 RNA 편집 활성을 향상시킬 수 있다고 결론지었다.

[0257] (실시예 4) 중심 트리플렛에서 2-아미노퓨린 변형을 포함하는 AON을

[0258] 사용하여 GFP 표적 RNA내에서 비-센스 변이의 RNA 편집

[0259] RNA 편집을 세포 게놈에 안정적으로 통합된 녹색 형광 단백질(GFP)을 인코딩하는 발현 컨스트럭트를 함유하는 세포에서 조사하였다.(자세한 내용 및 컨스트럭트에 대해서는 WO 2016/097212 참조). 이 컨스트럭트 내에서 종료 코돈(TAG)이 코돈 위치 57에 도입되어 표적 RNA에서 트리플렛 UAG를 생성하였다. 이 트리플렛의 중간에 아데노신에서 RNA를 편집하면 Trp 인코딩 코돈이 생기고 전체 길이의 단백질이 발현된다. 컨스트럭트 및 세포주(안정하게 통합된 GFP W57X 플라스미드를 함유하는 세포)는 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 생성하였다.

[0260] 표적 RNA의 다른 아데노신이 편집되지 않도록 종료 코돈에 대향하는 AON의 3개 뉴클레오타이드(올리고뉴클레오

타이드의 5'-CCA-3', 중간에 C는 미스매치 됨, 도 2의 ADAR59-2 및 ADAR59-10 참조)는 2'-O-메틸 변형을 포함하지 않는 반면 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 다른 모든 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형을 포함한다. 또한 모든 시험된 올리고뉴클레오타이드의 각각의 측면 말단 5개 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 결합으로 연결되어있는 반면 나머지 결합은 정상 결합이었다.

[0261] ADAR59-10에서 올리고뉴클레오타이드의 중심 트리플렛의 A는 2-아미노퓨린으로 화학적으로 변형된 반면 ADAR59-2는 특별한 변형을 지니지 않는다. Matthews 등(2016)은 이 위치에서 2-아미노퓨린 변형은 활성화의 감소(그러나 폐지되지 않은)를 초래한다는 것을 나타낸다. 그러나 이 변형은 간접적으로 RNA 편집을 향상시킬 수 있는데 예를 들면 잠재적으로 향상된 핵산 분해 효소 저항성을 제공하거나 세포 프로세스를 향상시킬 수 있다.

[0262] 안정한 GFP W57X 함유 세포를 먼저 ADAR2 과발현 플라스미드 1㎍으로 트랜스펙션 시킨 다음(상기 실시예 참조), 24시간 후 별도의 배치(각각 Lipofectamine 2000)로 150 nM의 올리고를 트랜스펙션 시켰다. 그런 다음 AON 트랜스펙션 24시간 후 cDNA 합성을 위해 RNA를 분리하고 RT-PCR 및 서열분석을 수행하여 RNA 편집이 발생했는지 여부를 측정하였다.

[0263] 도 9에 나타난 바와 같이 ADAR59-10에서 관찰된 편집 수준은 2-아미노퓨린 변형(ADAR59-2)이 없는 대조군 보다 개선되었다. 이는 촉매 활동 자체에는 부정적인 영향을 미치지만 간접적인 방법으로 AON 변형이 전반적인 편집 수준에 긍정적인 영향을 줄 수 있음을 나타낸다. 향상된 안정성 및/또는 편집 활성(본 명세서에 개시됨)을 지탱하는 다른 변형된 뉴클레오타이드와 이러한 변형을 조합함으로써 RNA 편집을 효율적으로 활성화시키는 안정한 AON을 생산하는 것이 가능하다.

[0264] (실시예 5) 중심 트리플렛에서 DNA 변형을 포함하는 AON을 이용한 GFP 표적

[0265] RNA 내에서 비-센스 변이의 편집

[0266] 상기 실시예에서 설명한 것과 유사하게 GFPstop57 플라스미드를 사용하여 효율적인 RNA 편집을 위해 AON의 다수의 다른 변형을 조사하였다. 이를 위해 올리고뉴클레오타이드 ADAR59-2, ADAR59-10 및 ADAR59-22를 대조군 올리고뉴클레오타이드 ADAR65-1 및 어느 올리고뉴클레오타이드에도 트랜스펙트 시키지 않은 대조군과 비교하였다. 구체적으로 0.3×10^{6} MCF-7 세포를 6 웰 플레이트의 웰 당 10% FBS가 함유된 DMEM에 시드 접종하였다. 24시간 후 세포를 Lipofectamine 2000을 사용하여 50 ng GFPstop57 플라스미드로 트랜스펙션 시켰다.

[0267] 다시 24 시간 후 선택된 세포 샘플을 Lonofectamine 2000을 사용하여 100 nM의 AON으로 각각 트랜스펙션 시켰다. 다시 24시간 후 용출된 세포로부터 RNA를 분리하여 cDNA 합성을 위한 주형으로 사용하고 이를 500ng RNA 투입을 통해 Maxima cDNA 합성 키트를 사용하여 반응시켰다. 이 시료를 드랍렛 디지털 PCR(ddPCR)을 이용한 정량적 편집 분석에 사용하였다. 핵산 표적 서열의 절대적 정량화를 위한 ddPCR 분석은 Bio-Rad의 QX-200 드랍렛 디지털 PCR 시스템을 사용하여 수행되었다.

[0268] ddPCR 프로브 슈퍼믹스 no dUTP(Bio Rad)로 하기 유전자 특이 프로브를 결합시킨 정방 및 역방 프라이머와 함께 Taqman SNP 유전자형 분석(Thermo Fisher Scientific)을 RT-PCR로부터 수득된 1㎕의 cDNA를 사용하여 20㎕의 반응 혼합물의 총 혼합물 내에서 수행시켰다:

[0269] 정방 프라이머: 5'-ACCCTTAAATTTATTTGCACTA-3' (서열번호: 9)

[0270] 역방 프라이머: 5'-CACCATAAGAGAAAGTA-3' (서열번호: 10)

[0271] 야생형 프로브 - FAM NFQ 표지: 5'-CTGTTCCATGGCCAAC-3' (서열번호: 11)

[0272] 변이 프로브 - VIC NFQ 표지: 5'-CTGTTCCATAGCCAAC-3' (서열번호: 12)

[0273] 다중 채널 피펫을 사용하여 ddPCR 카트리지(Bio Rad)의 중간 열에 cDNA를 포함한 총 20 ㎕의 PCR 믹스를 충전시켰다. 전사체는 2개의 카트리지로 분리하였다. 하단 열은 프로브(Bio Rad) 드랍렛 생성 오일 70 ㎕로 충전시켰다. 고무 개스킷 교체 후 QX200 드랍렛 생성기에서 드랍렛이 생성되었다.

[0274] 카트리지 맨 위 열의 오일 에멀젼 40 ㎕를 96 웰 PCR 플레이트에 이송시켰다. PCR 플레이트는 PX1 플레이트 실러를 사용하여 170℃에서 4초 동안 주석 포일로 밀봉하고 그 후 PCR 프로그램을 수행하였다: 95℃에서 10분 동안 효소 활성화 1 사이클, 95℃에서 30초 동안 변성 40 사이클, 59.7℃에서 1분 동안 어닐링/연장, 98℃에서 10분 동안 효소 비활성화 1 사이클 수행 후 이어서 8℃에서 보관한다.

[0275] PCR 이후 플레이트를 판독하고 QX200 드랍렛 판독기로 분석하였다. GFPstop57 유래 RNA 상에서 상기 논의한 바

와 같이 서로 다른 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 RNA 편집 후 수득된 cDNA에 대한 ddPCR의 결과를 표 2에 나타내었다. 이는 PCR 생성물 집단 내에는 플라스미드 단독 또는 대조군 올리고뉴클레오타이드와 함께 트랜스펙션 시킨 후에 어떠한 중량 카피도 검출될 수 없음을 나타내는 것이다.

[0276] 그러나 ADAR59-2, ADAR59-10 및 ADAR59-22를 사용한 트랜스펙션은 전체 개체군에서 상당량의 야생형 카피를 초래하였다. ADAR59-22(표적 아데노신에 대향하는 C 주변의 2개의 DNA 뉴클레오타이드를 운반함)를 사용하여 RNA를 8.3 중량% 카피까지 편집할 수 있었다.

[0277] 이것은 중심 트리플렛 내에서 DNA 뉴클레오타이드를 사용하는 것이 내인성 ADAR 효소를 이용한 효율적인 RNA 편집에 유리하다는 것을 나타낸다. 이는 추가 RNA 편집 효소가 이 실험에 사용되지 않았기 때문이다.

표 2

[0278]

시료	변이 카피수/μl	야생형 카피수/μl	총량내야생형%
50ng GFPstp + 올리고 없음	40,2	0	0,0
50ng GFPstp + ADAR65-1	42,1	0	0,0
50ng GFPstp + ADAR59-2	60,5	2,8	4,4
50ng GFPstp + ADAR59-10	121	6,8	5,3
50ng GFPstp + ADAR59-22	173	15,7	8,3

[0279] ㎕ 당 변이체(Mut) 카피의 수와 ㎕ 당 야생형(WT) 카피의 수. 전체 집단 중 야생형 카피의 백분율은 오른쪽 컬럼에 표시되어 있다.

[0280] 따라서 바람직한 실시형태에서 본 발명은 본 발명에 따른 AON에 관한 것이며 이때 중심 트리플렛 내의 뉴클레오타이드는 DNA 뉴클레오타이드이고 더욱 바람직하게는 중심 트리플렛의 표적 아데노신에 대향하는 C에 각각 인접한 2개의 뉴클레오타이드가 DNA 뉴클레오타이드인 것이다.

[0281] (실시예 6) 시험관 내의 내인성 표적 위에 내인성 ADAR을 이용한 RNA 편집

[0282] 내인성 ADAR 단백질을 지닌 내인성 표적에 대해 RNA 편집을 할 수 있는지 여부를 어느 것도 과발현 없이 측정하였다. 마우스 작은 핵 리보뉴클레오프로테인 폴리펩티드 A(SNRPA)를 인코딩 RNA를 배지 풍부한 유비퀴터스 발현으로 인한 내인성 표적으로 선정하였다. SNRPA는 전구체 RNA의 5' 스플라이스 부위에 결합하고 스플라이싱에 필요한 U1 작은 핵 리보 뉴클레오프로테인의 스템 루프 Ⅱ와 관련되어 있다.

[0283] 단백질은 이량체를 통해 자체 mRNA의 폴리아데닐화 억제에 의해 그 자체를 자동 조절하고 스플라이싱과 폴리아데닐화의 커플링에 연관되어 있다. AON은 마우스 Snrpa (프리-)mRNA의 야생형 종결 코돈(UAG)을 편집하여 메신저의 연장을 유도하고 다운스트림 서열에 의해 암호화 된 25개 아미노산의 증가로 더 큰 단백질을 야기하도록 설계되었다.

[0284] SNRPA 단백질의 원래 크기는 약 31.68 kDa이며 확대된 단백질은 약 34.43 kDa로 계산된다. 도 2는 중심 트리플렛에 3개의 DNA 뉴클레오타이드를 포함하고 다른 모든 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형 RNA인 ADAR94-1의 서열을 나타낸다. 양쪽 말단의 5개의 말단 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 결합으로 연결되어 있다. 중심 트리플렛 외부의 표적 서열과 비교하여 벌지를 포함하는 ADAR94-1은 HEPA1-6 및 CMT-64 세포주에서 시험하였다(PCT/EP2017/065467 참조). HEPA1-6은 C57/L 마우스에서 야기된 BW7756 마우스 간암에서 유래한다.

[0285] CMT-64는 C57BL/lcrf 마우스내의 프라이머리 폐암 종양 덩어리에서 분리되었다. HEPA1-6의 경우 1.75×10^5 세포/웰 밀도로, CMT-64의 경우 1.5×10^5 세포/웰의 밀도로 트랜스펙션하기 앞서 세포를 24시간 전에 6 웰 플레이트에 도말하였다. 두 세포주 모두 정규 배양 배지(DMEM + 10 % FBS)에서 배양하였다. 세포는 트랜스펙션 시키지 않거나 (NT 대조군), 무관한 비표적 올리고로 트랜스페션시키거나(NTO 대조군; 200 nM의 50-머 올리고뉴클레오타이드),100 nM ADAR94-1의 최종 농도에 AON을 더 안정화시키는 것으로 여겨지는 올리고뉴클레오타이드(SON2, 도 2 참조)인 마우스 특이적 Snrpa-관련 센스 올리고뉴클레오타이드를 추가하여 제조사 프로토콜에 따라 Lipofectamine 2000(Invitrogen)을 사용하여 트랜스펙션 시켰다.

[0286] 미공개 특허출원 GB 1700939.0은 RNA 편집에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (AON)를 안정화시키기 위한 센스 올리고뉴클레오타이드(SON)의 보호 용도에 대해 기술하고 있다. ADAR94-1 및 SON2를 100 μM의 스톡에 희석시키

고 1:1 비율로 혼합한 다음 어닐링 프로그램으로 인큐베이션 시켰다.: 60℃ 5분, 55℃ 5분, 50℃ 5분, 45℃ 5분, 40℃ 5분, 35℃ 5분, 30℃ 5분, 20℃ 5분, 사용시까지 10℃이었다.

[0287] 트랜스펙션 전에 배지를 1.7 mL/웰의 신선한 배지로 대체하고 트랜스펙션 혼합물(300 ㎕)을 첨가하여 총 2 mL/웰을 제조하였다. 트랜스펙션 24시간 후, 2mL의 신선한 배지를 각각의 웰에 첨가하였다. 세포를 24시간 더 인큐베이션 시켰다. 그런 다음 배지를 제거하고 세포를 1xPBS로 한번 세척한 후, 세포 용해물을 위해 각 웰에 350㎕의 Trizol을 첨가하였다. 이어서 용해된 세포를 수집하고 제조자가 제공한 지침에 따라 RNA를 Direct-Zol RNA miniprep(Zymo)으로 추출하였다.

[0288] 이 키트의 on-column DNAse를 사용하지 않기로 선택하고 대신 TURBO DNA-free™ 키트를 사용하여 RNA 샘플의 DNAse 처리에 사용하였다. 이를 위해 각 시료에 0.5 ㎕의 RNAse 저해제를 첨가하고 나머지 단계는 제조사의 지침에 따라 수행하였다. Nanodrop을 이용하여 RNA 농도를 측정하였고 Maxima 역전사효소 키트(ThermoFisher Scientific)를 사용하여 400 ng의 RNA를 cDNA 합성에 사용하였다.

[0289] PCR은 당업자에게 일반적으로 공지된 방법을 사용하여 정방 프라이머 Fw1_mSNRPA(5'-GCCTTCGTGGAGTTTGACA-3' 서열번호: 13) 및 역방 프라이머Rev1_mSNRPA(5'-ACACACGGCTCTGAGAAGGT-3' 서열번호: 14)를 사용하여 수행되었다. PCR 생성물을 Agilent 2100 Bioanalyzer에서 검사하고 Nucleo-Spin Gel과 PCR clean-up 키트(Macherey-Nagel)로 정제하였다. 정제된 생성물을 서열 결정 프라이머 Snrp-1-Fw1(5'-CGTGGAGTTTGACAATGAAGT-3' 서열번호: 15)로 서열분석 하였다.

[0290] HEPA1-6 세포에 대한 서열분석 결과는 도 10A에 도시되어 있고 CMT64 세포에 대한 서열분석 결과는 도 10B에 도시되어 있다. 분명히 비-트랜스펙트된 (NT, 왼쪽 패널) 및 비-표적 올리고뉴클레오타이드(NTO, 중간 패널) 대조군은 정지 코돈(화살표로 표시된 정지 코돈의 중간 위치)에서 검출 가능한 RNA 편집을 나타내지 않았다. 그러나 오른쪽 패널에서 분명히 알 수 있듯이 CMT64 세포에서와 같이 HEPA1-6 세포내에서 모두 ADAR94-1 올리고뉴클레오타이드(여기서는 보호 SON2 올리고뉴클레오타이드와 함께)를 사용할 때 유의미한 RNA 편집이 검출되었다.

[0291] 도 11은 이 SNRPA RNA 편집이 SON을 보호하지 않고도 달성할 수 있지만 SON을 추가하면 RNA 편집 수준이 높아진다는 것을 나타낸다. 이 +/- SON 실험을 위한 절차는 위에서 설명한 것과 유사하고 HEPA1-6 세포에서 수행되었다.

[0292] 이러한 결과는 모델로서 Snrpa 표적 RNA를 사용하는 비-제한적 실시예에서 내인성 표적 RNA 서열에 내인성 ADAR 효소를 사용하여 RNA 편집을 달성할 수 있음을 나타낸다. 중요한 것은 AON의 중심 트리플렛이 세 개의 순차적 DNA 뉴클레오타이드로 구성되어있을 때(나머지 AON은 RNA 뉴클레오타이드로 구성되는 반면), 2'-O-메틸 변형된 RNA는 매우 명확하고 상당한 수준의 RNA 편집이 가능함을 나타낸다.

[0293] 따라서 바람직한 실시형태에서 본 발명은 표적 아데노신에 직접적으로 대향하는 뉴클레오타이드가 중심 트리플렛의 중간 뉴클레오타이드인 3개의 순차적 뉴클레오타이드의 중심 트리플렛을 포함하는 RNA 편집 AON에 관한 것으로, 여기서 1, 바람직하게는 2, 가장 바람직하게는 상기 중심 트리플렛 내의 3개의 뉴클레오타이드 모두가 AON을 보다 안정하게 및/또는 표적 아데노신의 탈아민화 유도에 보다 효과적인 것으로 만드는 DNA 뉴클레오타이드이다. 다른 바람직한 측면에서 AON의 나머지는 바람직하게는 2'-O-메틸 변형된 RNA 뉴클레오타이드로 구성된다.

[0294] (실시예 7) 생체 밖에서 내인성 표적상의 내인성 ADAR을 이용한 RNA 편집

[0295] 상기 실시예에서 기술한 바와 같이 Snrpa 표적 서열의 시험관 내 ADAR 매개 RNA 편집의 증거를 발견한 후, 동일한 ADAR94-1 올리고뉴클레오타이드(도 2 및 실시예 6 참조)를 사용하여 마우스 야생형 원발성 폐 세포에서 내인성 ADAR 단백질로 생체 밖에서 RNA 편집을 수행할 수 있는지 여부를 조사하였다. Miltenyi Biotec의 마우스 폐 해리 키트(Article nr. 130-095-927)를 사용하여 C57BL/6J 배경을 갖는 마우스로부터 세포를 분리하였다. 요약하면 모든 시약은 제조사에 의한 무균 조건 하에서 제조되었다.

[0296] 마우스를 CO_2로 질식 희생시키고 PBS로 관류시켰다. 마우스 폐를 체내에서 절개하고 얼음 위에서 PBS를 함유하는 50 ml 튜브로 옮겼다. 이어서 마우스 폐를 단일엽(single lobes)으로 해부하고 키트-특이적 효소 믹스를 함유하는 완만한 MACS C- 튜브로 이송 시켰다. 조직은 부드러운 MACS 프로그램 37C_m_LDK_1을 사용하여 처리하였다. 프로그램 종료 후 샘플을 MACS SmartStrainer(70 μm)에 적용하고 4℃에서 10 분간 300xg로 원심 분리시켰다. 상등액을 버리고 세포를 10 ml DMEM + 10% FBS에 재현탁하고 추가 처리 될 때까지 적절한 배양 플라스크에서 계수하고 배양하였다. 트랜스펙션을 위해 세포를 3.0×10^5 세포/웰의 밀도로 도말시켰다.

[0297] 올리고뉴클레오타이드를 실시예 6에서 기술된 바와 같이 SON2에 어닐링시켰다. 세포를 트랜스펙션 시키지 않고(NT) 인간 SNRPA 서열(ADAR87-1 + SON2)을 표적으로하는 100 nM 올리고의 최종 농도로 트랜스펙션시키거나, 사용자 지침에 따라 Turbofect(ThermoFisher Scientific)를 사용하여 마우스 SNRPA 서열(ADAR94-1 + SON2)을 표적으로 최종 농도 100 nM으로 올리고를 트랜스펙션 시켰다. ADAR87-1의 서열은 도 2를 참조한다(PCT/EP2017/065467 참조).

[0298] 트랜스펙션 6시간 후, 배지를 신선한 DMEM + 10% FBS로 대체하고 세포를 트랜스펙션 후 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후, 세포를 1xPBS로 한번 세척하고 세포 용해를 위해 각 웰에 Trizol 350㎕를 첨가하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 RNA를 Direct-Zol RNA miniprep(Zymo)로 추출하였다. RNA 농도는 Nanodrop을 사용하여 측정하였으며 500ng RNA는 Maxima 역전사효소 키트(ThermoFisher Scientific)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 cDNA 합성에 사용되었다.

[0299] 당업자에게 일반적으로 공지된 방법을 사용하여 정방 프라이머 Fw2_mSNRPA(5'-GCTCTCCATGCTCTTCAACC-3' 서열번호: 16) 및 역방 프라이머 Rev2_mSNRPA(5'-TCAGGGACTGAGCCAAGG-3' 서열번호: 17)를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 생성물을 Agilent 2100 Bioanalyzer에서 검사하고 Nucleo-Spin Gel과 PCR 클린업 키트(Macherey-Nagel)로 정제하였다. 정제된 생성물을 서열분석 프라이머 Snrp-1-Fw1(상기 참조)로 서열분석하였다. 서열분석 결과는 도 12에 나타내었다.

[0300] TAG 정지 코돈 내의 표적 A는 화살표로 나타내었다. ADAR 매개 편집은 TAG 코돈 내의 A 피크 아래에 G 피크로서 DNA 서열에서 시각화할 수 있다. 트랜스펙트 되지 않은(NT, 좌측) 및 비-표적 대조군 올리고뉴클레오타이드(ADAR87-1 + SON2, 중간)는 TAG 정지 코돈에서 검출 가능한 RNA 편집을 나타내지 않았다. 그러나 세포가 ADAR94-1 + SON2(우측 패널)로 트랜스펙트 될 때 명확하게 감지할 수 있는 편집이 TAG 정지 코돈에서 관찰된다.

[0301] 내인성 Snrpa 표적 RNA를 모델로 사용하여 내인성 ADAR을 통해 RNA 편집이 가능하다고 결론지었다. 또한 본 실시예에서 사용된 세포가 마우스로부터 직접 분리됨에 따라 (치료학적) 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 내인성 표적에 내인성 ADAR을 지니는 부위 특이적 RNA 편집이 생체 내에서 실행 가능함을 나타낸다. 또한 실시예 6에서 이미 나타낸 바와 같이 표적화 AON의 중심 트리플렛이 3개의 연속적 DNA 뉴클레오타이드로 구성되는 경우 (AON의 나머지는 바람직하게는 2'-O-메틸 변형된 RNA 뉴클레오타이드로 구성된다) RNA 편집이 매우 명확하고 유의미하게 ADAR의 내인성 수준으로 달성될 수 있음을 나타낸다.

[0302] (실시예 8) ddPCR에 의해 측정된 Snrpa (프리-)mRNA 상의 마우스 야생형

[0303] 프라이머리 폐 세포에서 RNA 편집

[0304] 또한 중심 트리플렛 외의 위치에서 뉴클레오사이드의 화학적 변형이 RNA 편집 능력의 향상을 위해 측정되었다. ADAR89-10, -15 및 -20을 사용하여 상기 실시예에서 개시된 바와 같이 Snrpa 모델에서도 이러한 테스트를 수행하였다. -1 위치의 뉴클레오사이드 리보스는 2'-O-메틸 변형된 것이고 +2 및 +3 위치의 뉴클레오사이드는 ADAR89-10의 2'-O-메틸, ADAR89-15의 데옥시리보스(DNA) 및 ADAR89-20의 2'-NH_2와 같은 변형을 포함한다(도 2).

이들 AON의 편집 능력은 이전 실시예에서 기술된 바와 같은 프라이머리 폐 세포 검정에서 시험하였고 ddPCR 기술에 의해 다음과 같이 분석하였다.

[0305] 핵산 표적 서열의 절대적 정량화는 BioRad의 QX-200 드랍렛 디지털 PCR 시스템을 사용하여 수행하였다. ddPCR 프로브 슈퍼믹스 no dUTP(Bio Rad)로 하기 유전자 특이 프로브를 결합시킨 정방 및 역방 프라이머와 함께 Taqman SNP 유전자형 분석을 RT-PCR로부터 수득된 1㎕의 cDNA(1/10 희석)를 사용하여 20㎕의 반응 혼합물의 총 혼합물 내에서 수행시켰다:

[0306] 정방 프라이머 5'-GCAAGGCTTTAAGATCACACAAA-3' (서열번호: 18)

[0307] 역방 프라이머 5'-GGAAGGGACTGGGGTACTC-3' (서열번호: 19)

[0308] 야생형 프로브 (HEX IBFQ 표지) 5'-TTTGCCAAGAAGTAGCGCCTTTCCCT-3'

[0309] (서열번호: 20)

[0310] 변이 프로브(FAM IBFQ 표지) 5'-TTTGCCAAGAAGTGGCGCCTTTCCCT-3'

[0311] (서열번호: 21)

[0312] 다중 채널 피펫을 사용하여 ddPCR 카트리지(Bio Rad)의 중간 열에 cDNA를 포함한 총 20 ㎕의 PCR 믹스를 충전시

켰다. 전사체는 2개의 카트리지로 분리하였다. 하단 열은 프로브(Bio Rad) 드랍렛 생성 오일 70 ㎕로 충전시켰다.

[0313] 고무 개스킷 교체 후 QX200 드랍렛 생성기에서 드랍렛이 생성되었다. 카트리지 맨 위 열의 오일 에멀젼 40 ㎕를 96 웰 PCR 플레이트에 이송시켰다. PCR 플레이트는 PX1 플레이트 실러를 사용하여 170℃에서 4분 동안 주석 포일로 밀봉하고 그 후 PCR 프로그램을 수행하였다: 95℃에서 10분 동안 효소 활성화 1 사이클, 95℃에서 30초 동안 변성 40 사이클, 63.8℃에서 1 분 동안 어닐링/연장, 98℃에서 10분 동안 효소 비활성화 1 사이클 수행 후 이어서 8℃에서 보관한다.

[0314] PCR 프로그램 이후 플레이트를 판독하고 QX200 드랍렛 판독기로 다음 설정을 사용하여 분석하였다: 절대 정량, 프로브 슈퍼믹스 no dUTP, Ch1 FAM 야생형 및 CH2 HEX 변이 등이다. 도 13에서 제시된 결과는 모든 RNA에 의해 표적 RNA의 중요한 편집이 이루어졌으며 ADAR89-20에서 가장 잘 수행되었음을 나타낸다.

[0315] (실시예 9) RNA 편집을 위해 마우스 IDUA RNA를 표적으로 하는 AON 내의

[0316] 화학적 변형

[0317] 본 발명자들은 안정화를 위한 추가적 변형이 결합될 수 있는지 및 이러한 결합을 지닌 AON이 헐러(Hurler) 모델에서 RNA 편집 기능을 위해 작동할 수 있는지를 시험하였다(실시예 2 참조). 야생형 서열의 회복 상의 이들 AON의 영향을 마우스 Idua 유전자에 의해 인코딩된 α-L-이듀로니다제 효소의 활성을 측정하는 에세이를 통해 시험하였다.

[0318] W392X 변이 마우스로부터 유래된 불멸화된 마우스 배아 섬유아세포(샘플 당 70,000개)를 성장 배지(DMEM/10 % FCS)에서 배양하고, Lipofectamine 3000을 사용하여 전체길이 Idua W392X cDNA를 운반하는 1㎍의 발현 플라스미드로 트랜스펙션 시켰다. 24시간 후 세포를 ADAR65 시리즈의 각각의 AON의 100 nM(최종 농도)으로 유사하게 트랜스펙션 시키고(안정성 결과는 도 5 및 도 6 참조) 48시간 동안 추가 배양하였다.

[0319] 세포를 수집하고 mPER 완충액 (Thermo Scientific # 78501)에서 용해시켰다. 세포 프래그먼트를 원심 분리에 의해 용해물로부터 제거하고 효소 5 에세이를 위해 25㎕의 상등액을 사용하였다: 0.4M 소디움 포메이트 완충액(pH 3.5) 내의 360 μM의 4-메틸움베리페릴 α-L-이듀로니드 25 ㎕를 이 용해물 시료에 첨가하고 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션 하였다. 0.17M 글리신 완충액(pH 9.9) 200㎕를 가하여 반응을 종결시킨 후 형광 강도를 측정하였다(여기 파장 365nm, 발광 450nm). 결과는 BCA 분석(PierceTM BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific)으로 측정한 바와 같으며 시료의 총 단백질 농도로 정규화시켰다.

[0320] 도 14에 제공된 결과는 모든 트랜스펙트 된 ADAR65 올리고뉴클레오타이드가 비-트랜스펙트된(NT) 수준 이상의 α-L-이듀로니다제 효소 활성을 증가시킬 수 있음을 나타내며, 표적 (프리-)mRNA는 편집되었음을 나타낸다. 실제로 적용된 AON의 대부분이 표적 RNA를 매우 효율적으로 편집하는 것을 나타낸다.

[0321] 안정성 에세이(도 5 및 도 6) 비교를 통해 많은 AON(특히 ADAR65-23 내지 ADAR65-30)은 높은 안정성을 나타내며 α-L-이듀로니다제의 효소 활성을 회복시키는 우수한 능력을 나타낸다. 중심 트리플렛 내의 DNA 뉴클레오타이드 및 2'-플루오로 변형 및 포스포로티오에이트 결합의 사용이 본 발명의 유용하고 바람직한 실시형태임을 나타낸다.

도면

도면1

A: *SERPINA1* 를 표적으로 하는 AON ADAR60-1

```
      3′-gacacgacugguagcuGCUcuuucccugacu-5′ (AON)
5′-AUAAGGCUGUGCUGACCAUCGACAAGAAAGGGACUGAAGCUGCUGGGGCCAUGUUUUUAGAG-3′
```

B: *SERPINA1* 를 표적으로 하는 변형된 염기를 지닌 ADAR60-1 과 유사한 AON

```
      3′-gacacgacugguagcuZXYcuuucccugacu-5′ (AON)
5′-AUAAGGCUGUGCUGACCAUCGACAAGAAAGGGACUGAAGCUGCUGGGGCCAUGUUUUUAGAG-3′
```

도면2a

AON 명칭	서열 5' -> 3'	염기 변형
ADAR60-1	u*c*a*g*ucccuuucUCGucgauggucagc*a*c*a*g (서열번호: 22)	
ADAR60-2	u*c*a*g*ucccuuucuCGucgauggucagc*a*c*a*g	
ADAR60-3	u*c*a*g*ucccuuucuCGUcgauggucagc*a*c*a*g	
ADAR60-4	u*c*a*g*ucccuuucucgucgauggucagc*a*c*a*g	
ADAR60-5	u*c*a*g*ucccuuucU*CGucgauggucagc*a*c*a*g	
ADAR60-6	u*c*a*g*ucccuuuc[TCG]ucgauggucagc*a*c*a*g	
ADAR60-7	u*c*a*g*ucccuuuc(ucg)ucgauggucagc*a*c*a*g	
ADAR60-8	u*c*a*g*ucccuuuc{U}C{G}ucgauggucagc*a*c*a*g	
ADAR60-9	u*c*a*g*ucccuuuc{U}X{G}ucgauggucagc*a*c*a*g	X: 5-메틸시티딘
ADAR60-10	u*c*a*g*ucccuuucUCZucgauggucagc*a*c*a*g	Z: 이노신
ADAR60-11	u*c*a*g*ucccuuucUXZucgauggucagc*a*c*a*g	X: 5-메틸시티딘, Z: 이노신
ADAR60-12	u*c*a*g*ucccuuucYXZucgauggucagc*a*c*a*g	Y: 슈도우리딘, X: 5-메틸시티딘, Z: 이노신
ADAR60-13	u*c*a*g*ucccuuucYXZucgauggucagc*a*c*a*g	Y: 4-티오우리딘, X: 5-메틸시티딘, Z: 이노신
ADAR60-14	u*c*a*g*ucccuuucYXZucgauggucagc*a*c*a*g	Y: 5-메틸우리딘, X: 5-메틸시티딘, Z: 이노신
ADAR60-15	u*c*a*g*ucccuuucYXZucgauggucagc*a*c*a*g	Y: 티에노우리딘, X: 5-메틸시티딘, Z: 이노신

도면2b

ADAR60-16	u*c*a*g*ucccuuucYXZucgauggucagc*a*c*a*g	Y: 2,6-디아미노퓨린, X: 5-메틸시티딘, Z: 이노신
ADAR60-17	u*c*a*g*ucccuuucUXZucgauggucagc*a*c*a*g	X: 피롤로시티딘, Z: 이노신
ADAR60-18	u*c*a*g*ucccuuucYXZucgauggucagc*a*c*a*g	Y: 슈도우리딘, X: 피롤로시티딘, Z: 이노신
ADAR60-19	u*c*a*g*ucccuuucYXZucgauggucagc*a*c*a*g	Y: 티에노우리딘, X: 피롤로시티딘, Z: 이노신
ADAR60-20	u*c*a*g*ucccuuucYXZucgauggucagc*a*c*a*g	Y: 슈도우리딘, X: 5-메틸시티딘, Z: 티에노구아노신
ADAR60-21	u*c*a*g*ucccuuucYXZucgauggucagc*a*c*a*g	Y: 슈도우리딘, X: 피롤로시티딘, Z: 티에노구아노신
ADAR60-22	u*c*a*g*ucccuuucU`C`G`ucgauggucagc*a*c*a*g	
ADAR60-23	u*c*a*g*ucccuuucU"C"G"ucgauggucagc*a*c*a*g	
ADAR60-24	u*c*a*g*ucccuuucU^C^G^ucgauggucagc*a*c*a*g	
ADAR60-25	u*c*a*g*ucccuuucU#C#G#ucgauggucagc*a*c*a*g	
ADAR60-26	u*c*a*g*ucccuuucYXZucgauggucagc*a*c*a*g	Y: 5-메톡시우리딘, X: 5-메틸시티딘, Z: 이노신
ADAR60-27	u*c*a*g*ucccuuucYXZucgauggucagc*a*c*a*g	Y: 디하이드로우리딘, X: 5-메틸시티딘, Z: 이노신
ADAR60-28	u*c*a*g*ucccuuucYXZucgauggucagc*a*c*a*g	Y: 슈도우리딘, X: 5-하이드록시메틸시티딘, Z: 이노신
ADAR60-29	u*c*a*g*ucccuuucYXZucgauggucagc*a*c*a*g	Y: 슈도우리딘, X: 5-메틸시티딘, Z: 7-메틸구아노신

도면2c

ADAR60-30	u*c*a*g*ucccuuucYXZucgauggucagc*a*c*a*g	Y: 슈도우리딘, X: 5-메틸시티딘, Z: 7-디아자구아노신
ADAR60-31	u*c*a*g*ucccuuucYXZucgauggucagc*a*c*a*g	Y: 슈도우리딘, X: 5-메틸시티딘, Z: 8-아자-7-디아자구아노신
ADAR60-32	u*c*a*g*ucccuuucYXZucgauggucagc*a*c*a*g	Y: 슈도우리딘, X: 5-메틸시티딘, Z: 7-아미노메틸 -7-디아자구아노신
ADAR68	c*c*u*g*cgacacuucggcCCAgagcugcucc*u*c*a*u (서열번호: 23)	
ADAR68-1	c*c*u*g*cgacacuucggcXXYgagcugcucc*u*c*a*u	X: 5-메틸시티딘, Y: 7-메틸아데노신
ADAR68-2	c*c*u*g*cgacacuucggcXXYgagcugcucc*u*c*a*u	X: 5-메틸시티딘, Y: 8-메틸아데노신
ADAR68-3	c*c*u*g*cgacacuucggcXXYgagcugcucc*u*c*a*u	X: 5-메틸시티딘, Y: 3-디아자아데노신
ADAR68-4	c*c*u*g*cgacacuucggcXXYgagcugcucc*u*c*a*u	X: 5-메틸시티딘, Y: 7-디아자아데노신
ADAR68-5	c*c*u*g*cgacacuucggcXXYgagcugcucc*u*c*a*u	X: 5-메틸시티딘, Y: 8-아지도아데노신
ADAR68-6	c*c*u*g*cgacacuucggcXXYgagcugcucc*u*c*a*u	X: 5-메틸시티딘, Y: 이노신
ADAR59-2	c*a*u*u*gaagaagauaagagaaaguacugagaaguguuggCCAuggaacag*g*u*a*g (서열번호: 24)	
ADAR59-10	c*a*u*u*gaagaagauaagagaaaguacugagaaguguuggCCZuggaacag*g*u*a*g	Z: 2-아미노퓨린
ADAR59-22	c*a*u*u*gaagaagauaagagaaaguacugagaaguguugg[C]C[A]uggaacag*g*u*a*g	
ADAR94-1	g*a*c*u*gagguacuccuuagagaaaggug[CCA]cuucuuggcaa*a*g*g*a (서열번호: 25)	
SON2	a*a*g*a*A*G*U*G*G*C*A*c*c*u*u (서열번호: 26)	
ADAR87-1	g*u*a*g*gcaugggaggaaaaggugCCAcuucuuggcaa*a*g*g*a (서열번호: 27)	

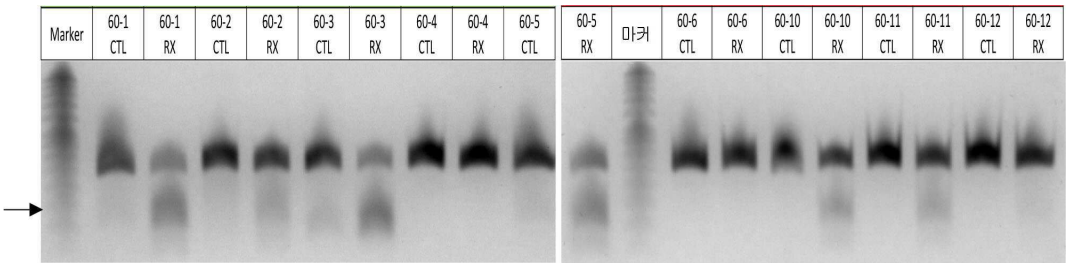
도면2d

ADAR65-1	c*u*g*u*ccaacacagccccagccuuugagaccucugcCCAgaguuguu*c*u*c*c (서열번호: 28)	
ADAR65-13	c*u*g*u*ccaacacagccccagccuuugagaccucuguCC[A]gaguuguu*c*u*c*c idT	
ADAR65-14	c*u*g*u*ccaacacagccccagccuuugagaccucugucC[A]gaguuguu*c*u*c*c idT	
ADAR65-15	c*u*g*u*ccaacacagccccagccuuugagaccucuguXC[A]gaguuguu*c*u*c*c idT	X: 5-메틸시티딘
ADAR65-16	c*u*g*u*ccaacacagccccagccuuugagaccucugucC[X]gaguuguu*c*u*c*c idT	X: 데옥시 2-아미노퓨린
ADAR65-18	c*u*g*u*ccaacacagccccagccuuugagaccucugucC[A]gaauuguu*c*u*c*c idT (서열번호: 29)	
ADAR65-19	c*u*g*u*ccaacacagccccagccuuugagaccucugucC[AGA]guuguu*c*u*c*c idT	
ADAR65-20	c*u*g*u*ccaacacagccccagccuuugagaccucuguc*C*[A]*G*A*guuguu*c*u*c*c idT	
ADAR65-21	c*u*g*u*ccaacacagccccagccuuugagaccucuguc*C*[A]*gaguuguu*c*u*c*c idT	
ADAR65-22	c*u*g*u*ccaacacagccccagccuuugagaccucug*u*C*C*A*g*aguuguu*c*u*c*c idT	
ADAR65-23	c*u*g*u*ccaacacagccccagccuuugagaccucuguc(caga)guuguu*c*u*c*c	
ADAR65-24	c*u*g*u*ccaacacagccccagccuuugagaccucugu[CCA]gaguuguu*c*u*c*c	
ADAR65-25	c*u*g*u*c*c*a*a*c*a*c*a*gccccagccuuugagaccucugu[CCA]gaguuguu*c*u*c*c	
ADAR65-26	c*u*g*u*ccaacacagccc*c*a*g*c*c*u*u*u*g*a*gaccucugu[CCA]gaguuguu*c*u*c*c	
ADAR65-27	c*u*g*u*c*c*a*a*c*a*c*a*gccc*c*a*g*c*c*u*u*u*g*a*gaccucugu[CCA]gaguuguu*c*u*c*c	
ADAR65-28	c*u*g*u*ccaacacagccccagccuuugagaccucuguc[CA]gaguuguu*c*u*c*c	
ADAR65-29	c*u*g*u*ccaacacagccccagccuuugagaccucugu[C](c)[A]gaguuguu*c*u*c*c	
ADAR65-30	c*u*g*u*ccaacacagccccagccuuugagaccucugu[C*C*A*]gaguuguu*c*u*c*c	
ADAR65-31	c*u*g*u*ccaacacagccccagccuuugagaccucugu[CCA]gaguuguu*c*u*c*c idT	
ADAR93-2	a*c*a*c*a*G*cuc*c*a*g*c*c*u*u*u*G*A*gaccu*c*u*g*cCCAGaguu*g*u*u*c*u*c*c (서열번호: 30)	

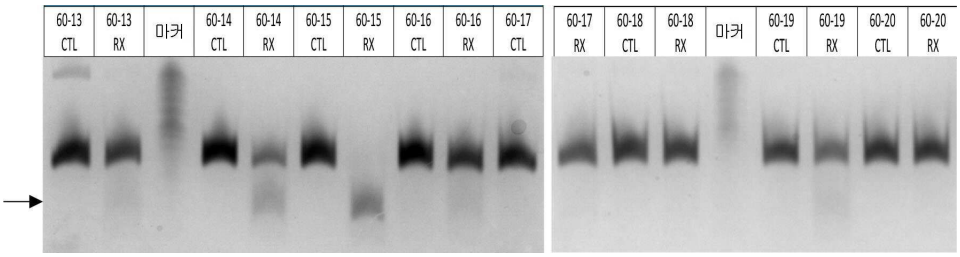
도면2e

ADAR93-6	c*a*c*a*gccccagccuuugagaccucugu[CCA]gaguuguu*c*u*c*c (서열번호: 31)	
ADAR93-8	c*a*c*a*g*c*c*c*c*a*g*c*c*u*u*u*g*agaccucugu[CCA]gaguuguu*c*u*c*c (서열번호: 32)	
ADAR93-9	c*a*c*a*gccc*c*a*g*c*c*u*u*u*g*a*gaccucugcc*[C*A]*gaauuguu*c*u*c*c (서열번호: 33)	
ADAR89-10	g*a*c*u*gagguacuccauagggaaaggcacC[A]cuucuuggcaa*a*g*g*a (서열번호: 34)	
ADAR89-15	g*a*c*u*gagguacuccauagggaaaggcacC[ACU]ucuuggcaa*a*g*g*a	
ADAR89-20	g*a*c*u*gagguacuccauagggaaaggcacC[A]<cu>ucuuggcaa*a*g*g*a	

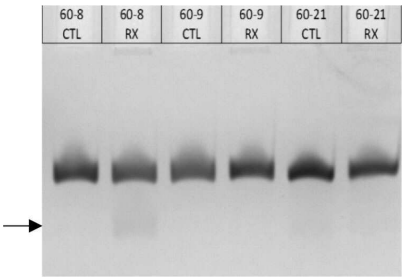
도면3a



도면3b



도면3c



도면4

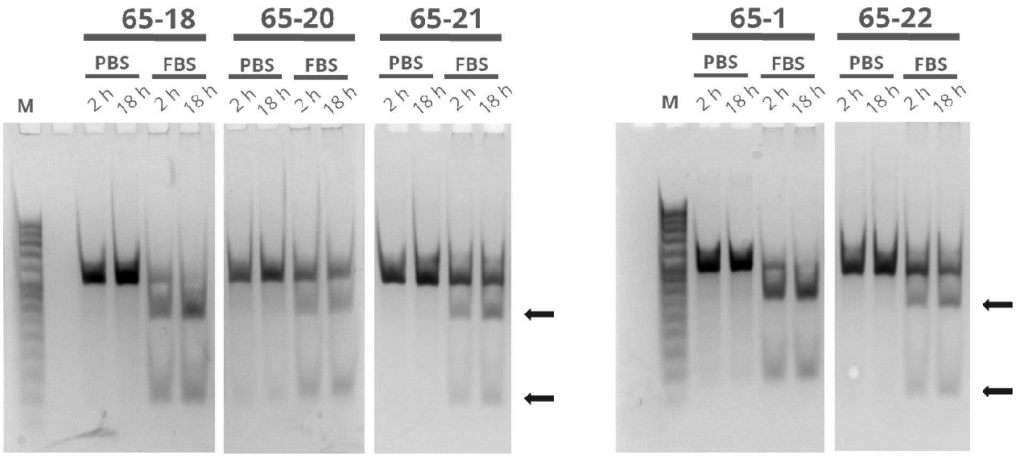
A: *IDUA* 를 표적으로 하는 AON ADAR68

3′-uacuccucgucgagACCcggcuucacagcgucc-5′ (AON)
5′-GCCCCGCAGAUGAGGAGCAGCUCU**A**GGCCGAAGUGUCGCAGGCCGGGACCGUCC3′

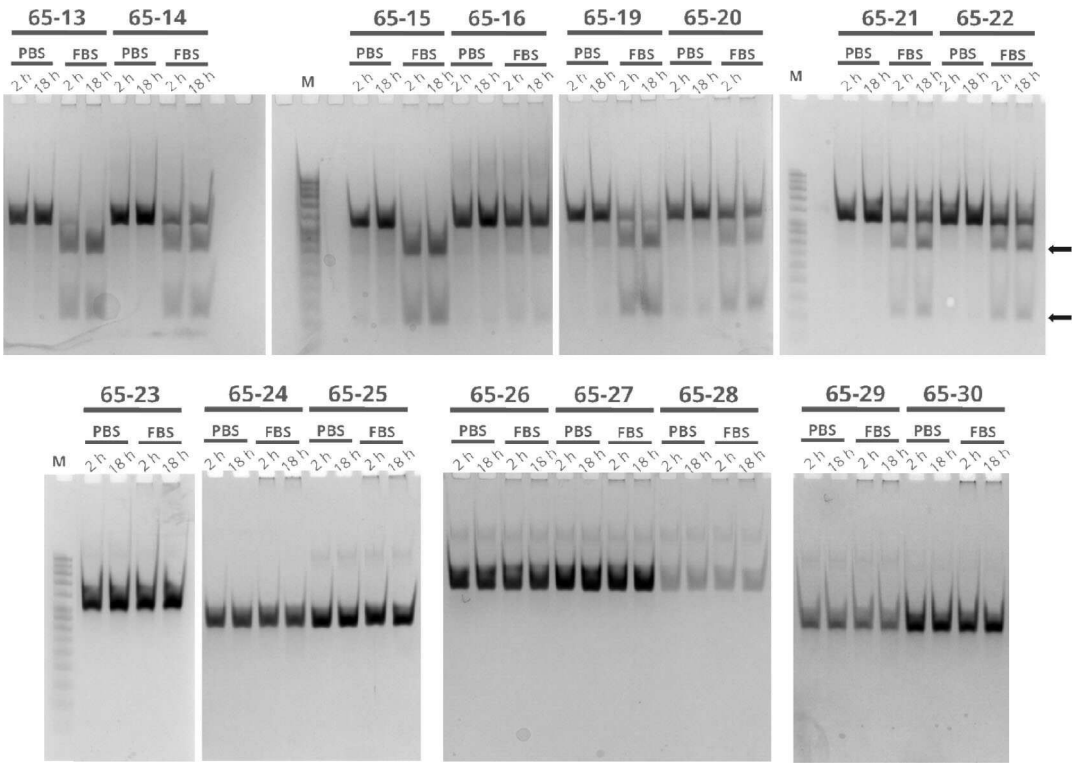
B: *IDUA* 를 표적으로 하는 변형된 염기를 지닌 ADAR68 과 유사한 AON

3′-uacuccucgucgagYXXcggcuucacagcgucc-5′ (AON)
5′-GCCCCGCAGAUGAGGAGCAGCUCU**A**GGCCGAAGUGUCGCAGGCCGGGACCGUCC3′

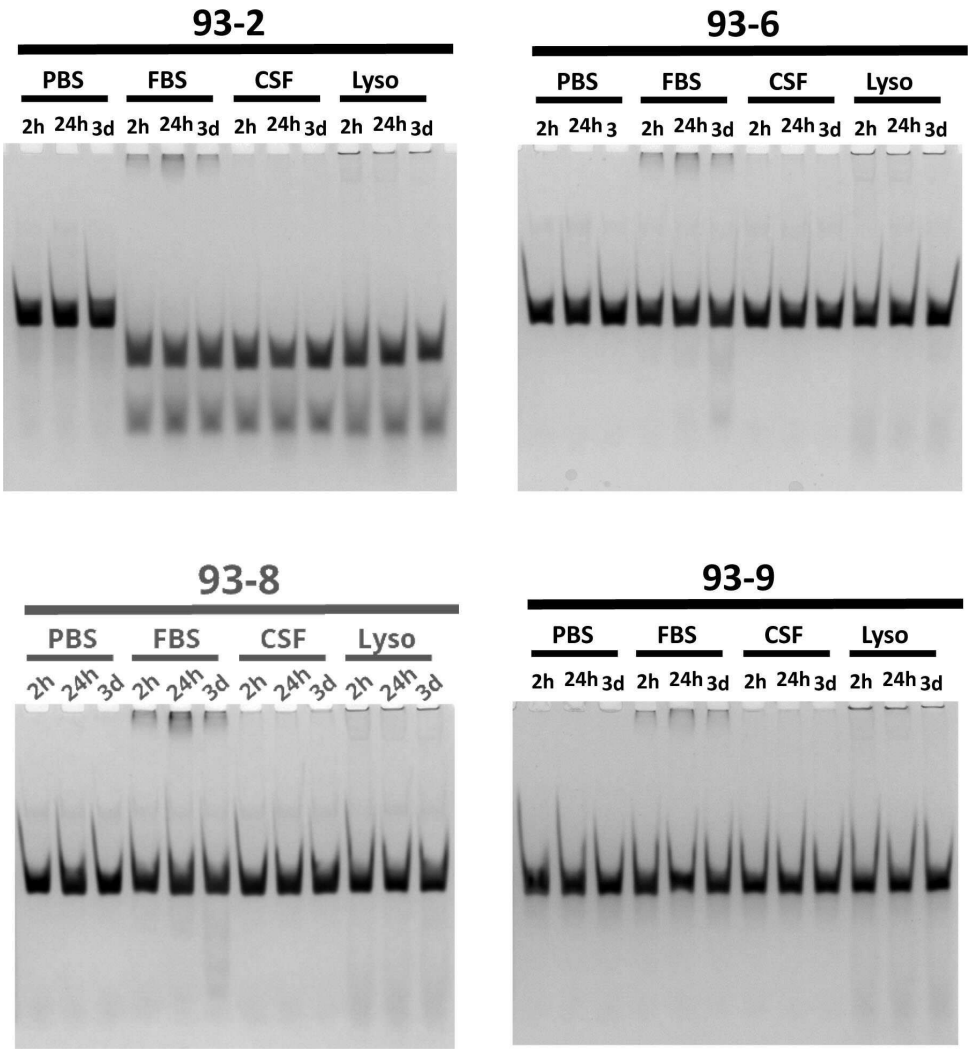
도면5


65-18
65-20
65-21
65-1
65-22
PBS
FBS
M
2 h
18 h

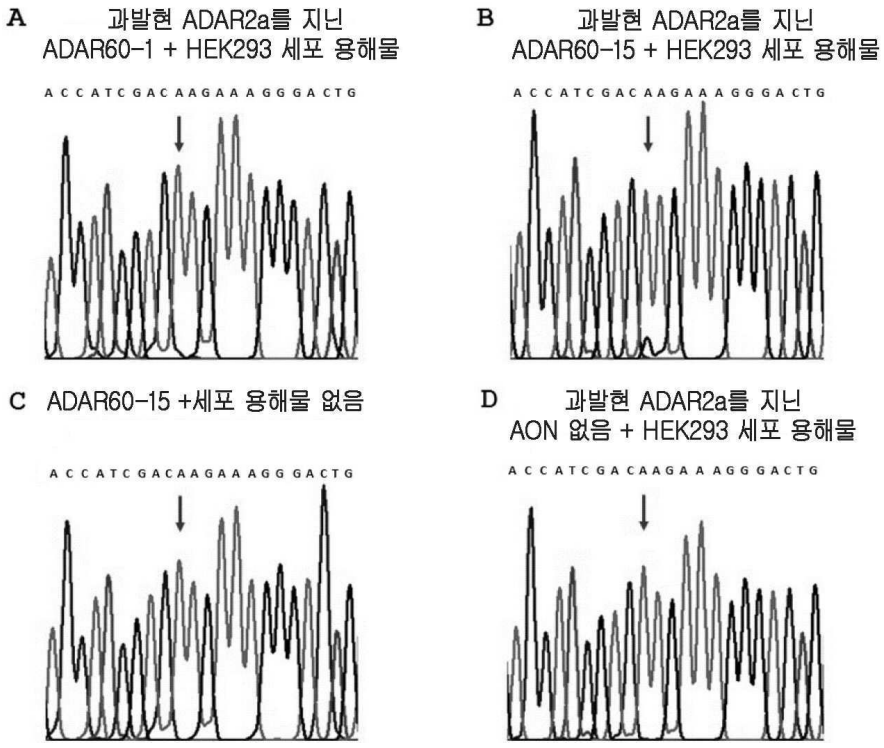
도면6


65-13
65-14
65-15
65-16
65-19
65-20
65-21
65-22
65-23
65-24
65-25
65-26
65-27
65-28
65-29
65-30
PBS
FBS
M
2 h
18 h

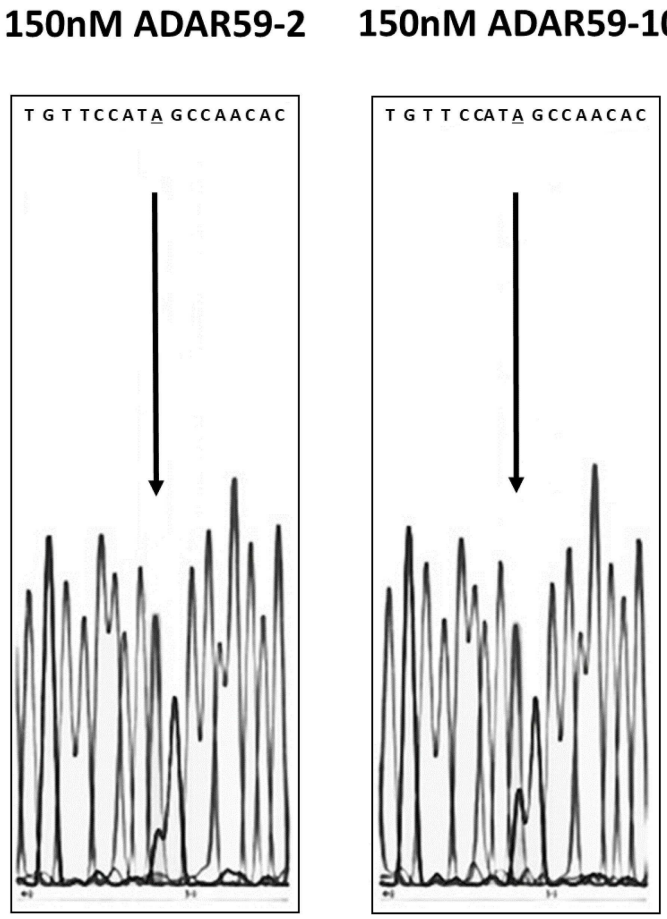
도면7


93-2
PBS
FBS
CSF
Lyso
2h 24h 3d 2h 24h 3d 2h 24h 3d 2h 24h 3d
93-6
PBS
FBS
CSF
Lyso
2h 24h 3 2h 24h 3d 2h 24h 3d 2h 24h 3d
93-8
PBS
FBS
CSF
Lyso
2h 24h 3d 2h 24h 3d 2h 24h 3d 2h 24h 3d
93-9
PBS
FBS
CSF
Lyso
2h 24h 3d 2h 24h 3d 2h 24h 3d 2h 24h 3d

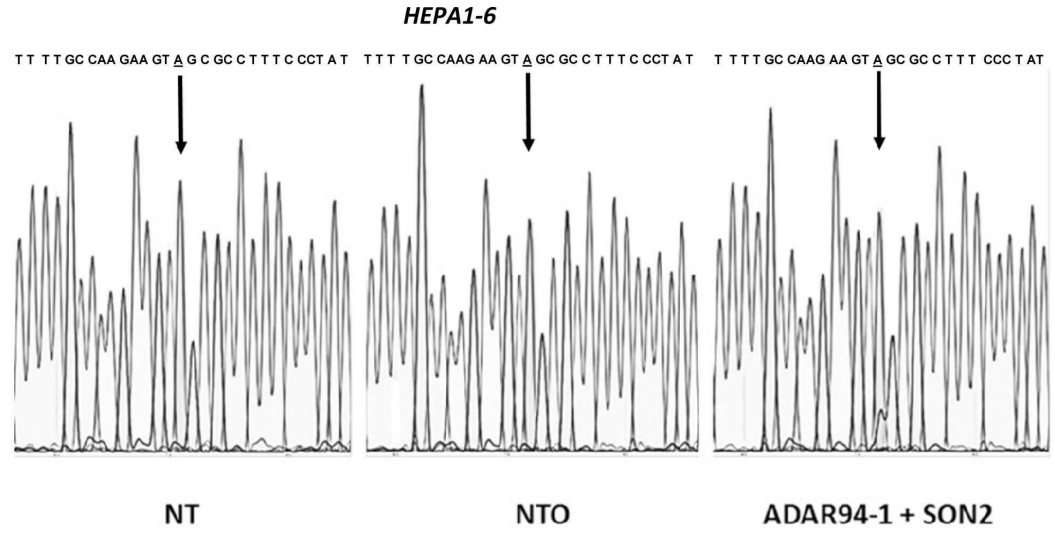
도면8


A
과발현 ADAR2a를 지닌
ADAR60-1 + HEK293 세포 용해물
A C C A T C G A C A A G A A A G G G A C T G
B
과발현 ADAR2a를 지닌
ADAR60-15 + HEK293 세포 용해물
A C C A T C G A C A A G A A A G G G A C T G
C
ADAR60-15 +세포 용해물 없음
A C C A T C G A C A A G A A A G G G A C T G
D
과발현 ADAR2a를 지닌
AON 없음 + HEK293 세포 용해물
A C C A T C G A C A A G A A A G G G A C T G

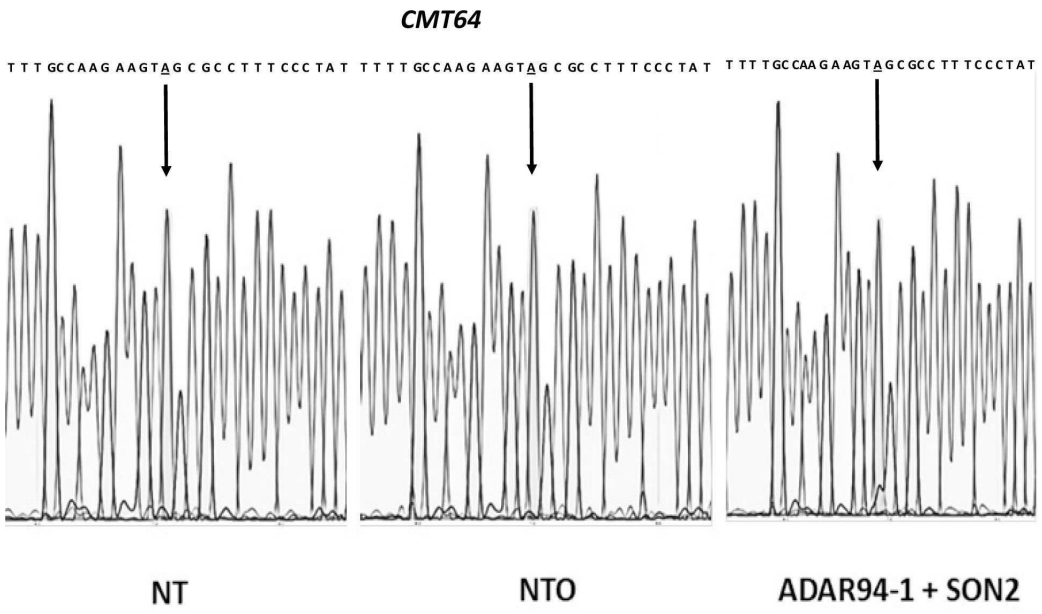
도면9


150nM ADAR59-2
150nM ADAR59-10
T G T T C C A T A G C C A A C A C
T G T T C C A T A G C C A A C A C

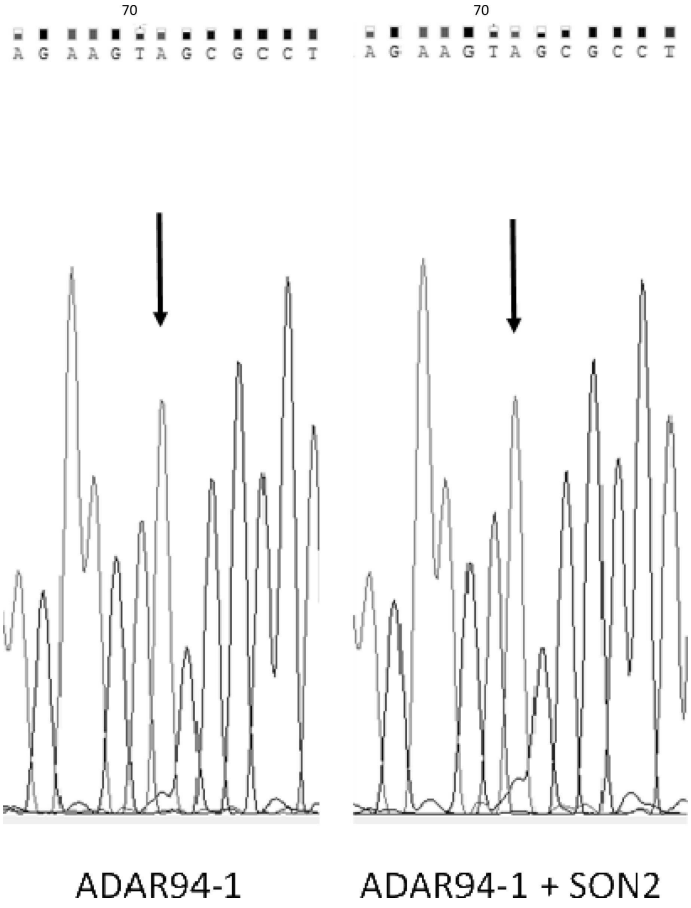
도면10a


HEPA1-6
TT TT GC CAA GAA GT A G C GC C TTT C CCT A T
TTT T GC CAAG AA GT A GC GC C TTT C CCT A T
T TTT GC CAAG AA GT A GC GC C TTT CCC T AT
NT
NTO
ADAR94-1 + SON2

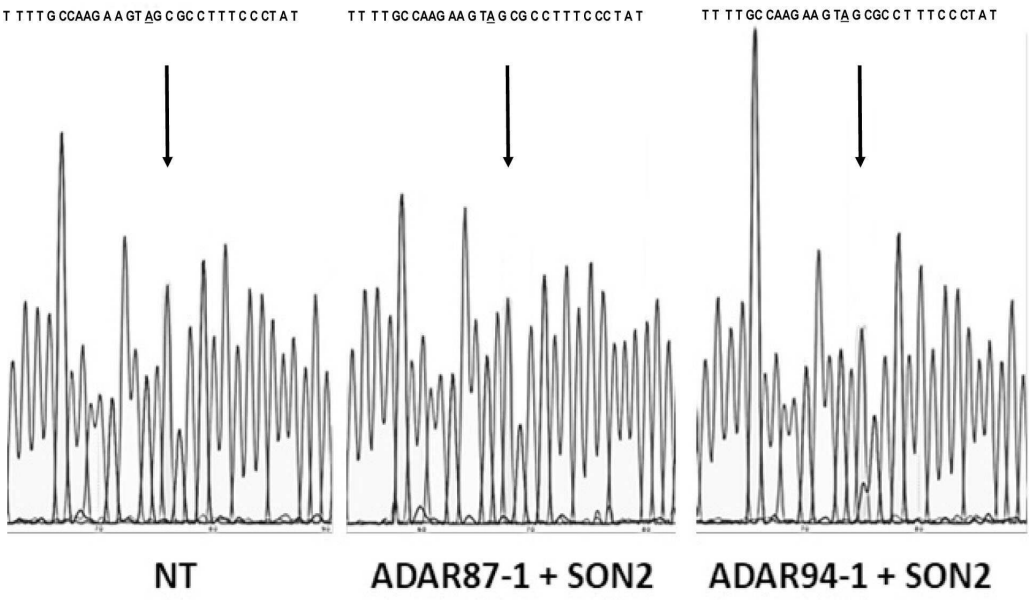
도면10b


CMT64
T T T GC CAA G AA GT A G C GC C TTT CCC TA T
TTTT GC CAAG AA GT A G C GC C TTT CCC TA T
T TTT GC CAA G AA GT A GC GC C TT TCCC TAT
NT
NTO
ADAR94-1 + SON2

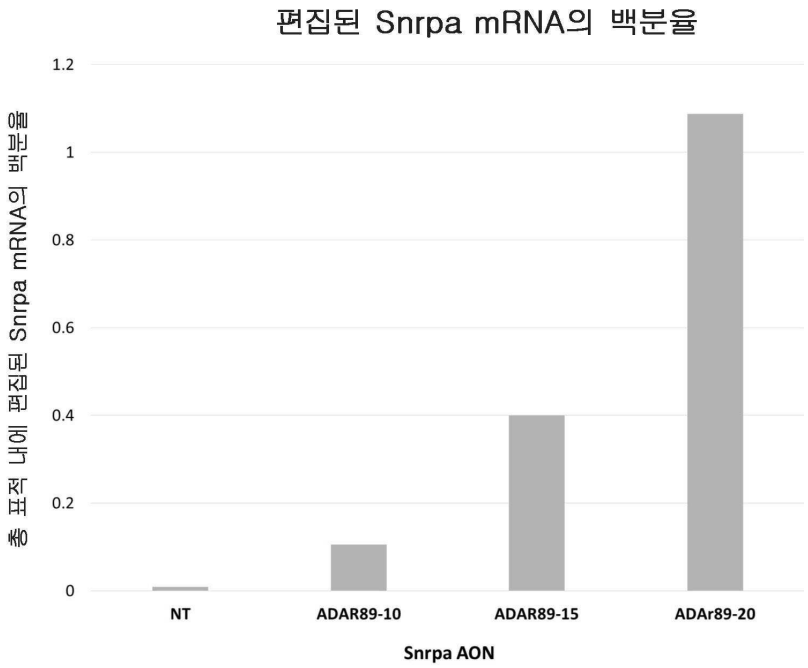
도면11


70
A G A A G T A G C G C C T
70
A G A A G T A G C G C C T
ADAR94-1
ADAR94-1 + SON2

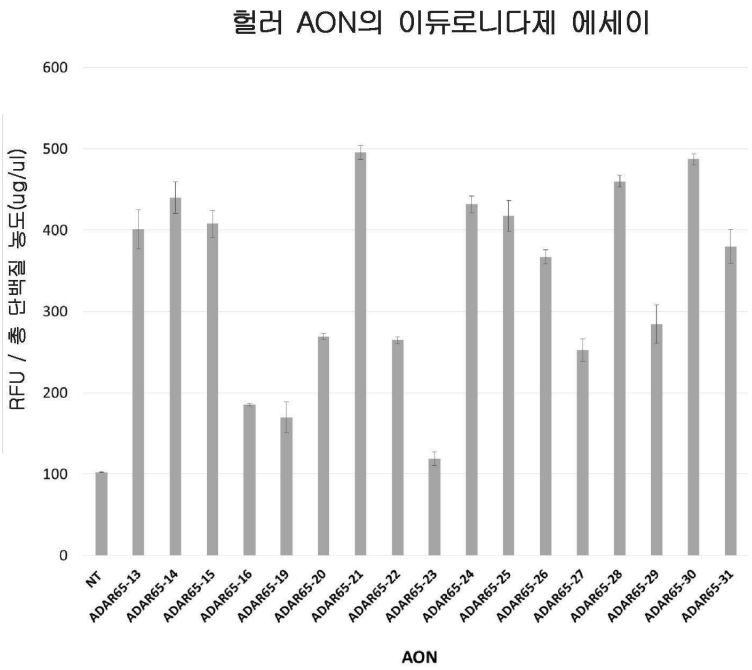
도면12


T T T T G C C A A G A A G T A G C G C C T T T C C C T A T
T T T T G C C A A G A A G T A G C G C C T T T C C C T A T
T T T T G C C A A G A A G T A G C G C C T T T C C C T A T
NT
ADAR87-1 + SON2
ADAR94-1 + SON2

도면13



도면14



서 열 목 록

<110> ProQR Therapeutics II B.V.

Turunen, Janne J.

Aalto, Antti

Klein, Bart

van Sint Fiet, Lenka

Boudet, Julien A.G.

<120> CHEMICALLY MODIFIED SINGLE-STRANDED RNA-EDITING OLIGONUCLEOTIDES

<130> FP-1527

<140> PCT/EP2017/071912

<141> 2017-08-31

<150> GB 1614858.7

<151> 2016-09-01

<150> GB 1616374.3

<151> 2016-09-27

<150> GB 1621467.8

<151> 2016-12-16

<150> GB 1703034.7

<151> 2017-02-24

<150> GB 1707508.6

<151> 2017-05-10

<160> 38

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 62

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

auaaggcugu gcugaccauc gacaagaaag ggacugaagc ugcuggggcc auguuuuuag 60

ag 62

<210> 2

<211> 54

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gccccgcaga ugaggagcag cucuaggccg aagugucgca ggccgggacc gucc 54

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T1promoterF1 forward primer

<400> 3

gcgaagctta atacgactc 19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Serpina1-R2 reverse primer

<400> 4

ccatgaagag gggagacttc 20

<210> 5

<211> 273

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gcgaagctta atacgactca ctatagggtc aactgggcat cactaaggtc ttcagcaatg 60

gggctgacct ctccggggtc acagaggagg cacccctgaa gctctccaag gccgtgcata 120

aggctgtgct gaccatcgac aagaaaggga ctgaagctgc tggggccatg tttttagagg 180

ccatacccat gtctatcccc cccgaggtca agttcaacaa acccтttgtc ttcttaatga 240

ttgaacaaaa taccaagtct cccctcttca tgg 273

<210> 6

<211> 245

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ucaacugggc aucacuaagg ucuucagcaa uggggcugac cucuccgggg ucacagagga 60

ggcaccccug aagcucucca aggccgugca uaaggcugug cugaccaucg acaagaaagg 120

gacugaagcu gcuggggcca uguuuuuaga ggccauaccc augucuaucc cccccgaggu 180

caaguucaac aaacccuuug ucuucuuaau gauugaacaa aauaccaagu cuccccucuu 240

caugg 245

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Serpina1-F2 forward primer

<400> 7

tcaactgggc atcactaagg 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Serpina1-R1 primer

<400> 8

catgaagagg ggagacttgg 20

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 9

acccttaaat ttatttgcac ta 22

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 10

caccataaga gaaagta 17

<210> 11

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Wildtype probe

<400> 11

ctgttccatg gccaac 16

<210> 12

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant probe

<400> 12

ctgttccata gccaac 16

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fw1_mSNRPA

<400> 13

gccttcgtgg agtttgaca 19

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Rev1_mSNRPA

<400> 14

acacacggct ctgagaaggt 20

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Snrp-1-Fw1

<400> 15

cgtggagttt gacaatgaag t 21

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fw2_mSNRPA

<400> 16

gctctccatg ctcttcaacc 20

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rev2_mSNRPA

<400> 17

tcagggactg agccaagg 18

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 18

gcaaggcttt aagatcacac aaa 23

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 19

ggaagggact ggggtactc 19

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> wt probe

<400> 20

tttgccaaga agtagcgcct ttccct 26

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutant probe

<400> 21

tttgccaaga agtggcgcct ttccct 26

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ADAR60-1

<220><221> modified_base

<222> (13)

<223> p

<220><221> modified_base

<222> (13)

<223> s4u

<220><221> modified_base

<222> (13)

<223> t

<220><221> misc_feature

<222> (13)

<223> thienouridine

<220><221> misc_feature

<222> (13)

<223> 2,6-diaminopurine

<220><221> modified_base

<222> (13)

<223> mo5u

<220><221> modified_base

<222> (13)

<223> d

<220><221> misc_feature

<222> (14)

<223> 5-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (14)

<223> pyrrolocytidine

<220><221> misc_feature

<222> (14)

<223> hydroxymethylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (15)

<223> i

<220><221> misc_feature

<222> (15)

<223> thienoguanosine

<220><221> misc_feature

<222> (15)

<223> 7-methylguanosine

<220><221> misc_feature

<222> (15)

<223> 7-deazaguanosine

<220><221> misc_feature

<222> (15)

<223> 8-aza-7-deazaguanosine

<220><221> misc_feature

<222> (15)

<223> 7-aminomethyl-7-deazaguanosine

<400> 22

ucagucccuu ucucgucgau ggucagcaca g 31

<210> 23

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ADAR68

<220><221> misc_feature

<222> (17)

<223> 5-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (18)

<223> 5-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (19)

<223> 7-methyladenosine

<220><221> misc_feature

<222> (19)

<223> 8-methyladenosine

<220><221> misc_feature

<222> (19)

<223> 3-deazaadenosine

<220><221> misc_feature

<222> (19)

<223> 7-deazaadenosine

<220><221> misc_feature

<222> (19)

<223> 8-azidoadenosine

<220><221> modified_base

<222> (19)

<223> i

<400> 23

ccugcgacac uucggcccag agcugcuccu cau 33

<210> 24

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ADAR59

<220><221> misc_feature

<222> (41)

<223> 2-aminopurine

<400> 24

cauugaagaa gauaagagaa aguacugaga aguguuggcc auggaacagg uag 53

<210> 25

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ADAR94-1

<400> 25

gacugaggua cuccuuagag aaaggugcca cuucuuggca aagga 45

<210> 26

<211> 15

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SON2

<400> 26

aagaaguggc accuu 15

<210> 27

<

211> 40

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ADAR87-1

<400> 27

guaggcaugg gaggaaaagg ugccacuucu uggcaaagga 40

<210> 28

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ADAR65

<220><221> misc_feature

<222> (36)

<223> 5-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (38)

<223> deoxy 2-aminopurine

<400> 28

cuguccaaca cagccccagc cuuugagacc ucugcccaga guuguucucc 50

<210> 29

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ADAR65-18

<400> 29

cuguccaaca cagccccagc cuuugagacc ucuguccaga auuguucucc 50

<210> 30

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ADAR93-2

<400> 30

acacagcucc agccuuugag accucugccc agaguuguuc ucc 43

<210> 31

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ADAR93-6

<400> 31

cacagcccca gccuuugaga ccucugucca gaguuguucu cc 42

<210> 32

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ADAR93-8

<400> 32

cacagcccca gccuuugaga ccucugucca gaguuguucu cc 42

<210> 33

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ADAR93-9

<400> 33

cacagcccca gccuuugaga ccucugccca gaauuguucu cc 42

<210> 34

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ADAR89

<400> 34

gacugaggua cuccauaggg aaaggcacca cuucuuggca aagga 45

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

accatcgaca agaaagggac tg 22

<210> 36

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant GFP

<400> 36

tgttccatag ccaacac 17

<210> 37

<211> 29

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 37

ttttgccaag aagtagcgcc tttccctat 29

<210> 38

<211> 13

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 38

agaagtagcg cct 13