



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년11월11일

(11) 등록번호 10-2043422

(24) 등록일자 2019년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/113 (2010.01) A61K 48/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7034424

(22) 출원일자(국제) 2012년06월08일

심사청구일자 2017년05월26일

(85) 번역문제출일자 2013년12월26일

(65) 공개번호 10-2014-0033165

(43) 공개일자 2014년03월17일

(86) 국제출원번호 PCT/US2012/041484

(87) 국제공개번호 WO 2012/170771

국제공개일자 2012년12월13일

(30) 우선권주장

61/494,928 2011년06월09일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2007087113 A2\*

PLoS ONE, 제4권, 11호, e7914, 1-8면(2009.11.)\*

Science, 제309권, 1564-1566면(2005.09.)\*

JP2009521934 A

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

큐알엔에이, 인크.

미국, 플로리다 33137, 마이애미, 비스케인 보울  
레바르드 4400

(72) 발명자

콜라드, 조셉

미국, 플로리다 33483, 텔레이 비치, 브룩스 레인  
1004

크로코바 셔만, 올라

미국, 플로리다 33469, 테퀘스타, 에스이 헤리티지  
드라이브 18288

(74) 대리인

강명구, 이경민

전체 청구항 수 : 총 5 항

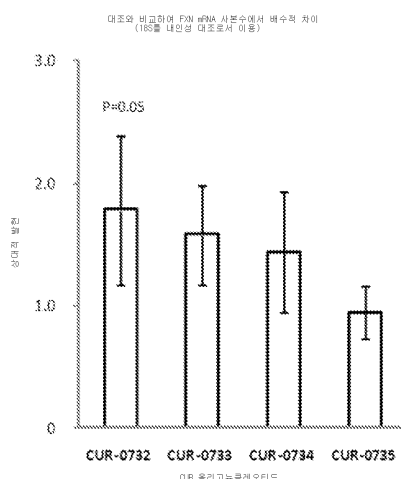
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 프라탁신 (FXN)에 대한 자연 안티센스 전사체의 저해에 의한 프라탁신 (FXN) 관련된 질환의 치료

## (57) 요약

본 발명은 특히, 프라탁신 (FXN)의 자연 안티센스 폴리뉴클레오티드를 표적으로 함으로써, 프라탁신 (FXN)의 발현 및/또는 기능을 조정하는 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관계한다. 본 발명은 또한, 이들 안티센스 올리고뉴클레오티드의 확인 및 프라탁신 (FXN)의 발현과 연관된 질환과 장애의 치료에서 그들의 용도에 관계한다.

## 대표도 - 도1



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열 번호: 2의 자연 안티센스 뉴클레오타이드 1 내지 454에 상보적이며 서열 번호: 3 내지 6에 제시된 서열 중 최소한 하나의 뉴클레오타이드 서열로 구성된 18 내지 28개 뉴클레오타이드 길이의 합성 올리고뉴클레오타이드로서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 프락탁신 (FXN) 폴리뉴클레오타이드의 기능 또는 발현 또는 기능 및 발현 모두를 상향 조정하는 안티센스 화합물인, 합성 올리고뉴클레오타이드.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 최소한 하나의 변형된 당 모이어티, 최소한 하나의 변형된 뉴클레오시드간 연쇄 (internucleoside linkage), 최소한 하나의 변형된 뉴클레오타이드, 그리고 이들의 조합에서 선택되는 하나 이상의 변형을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 올리고뉴클레오타이드.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 2'-O-메톡시에틸 변형된 당 모이어티, 2'-메톡시 변형된 당 모이어티, 2'-O-알킬 변형된 당 모이어티, 이중환상 당 모이어티, 그리고 이들의 조합에서 선택되는 최소한 하나의 변형된 당 모이어티를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 올리고뉴클레오타이드.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트, 2'-O-메톡시에틸 (MOE), 2'-플루오르, 알킬포스포네이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포노티오에이트, 포스포라미데이트, 카르바메이트, 카보네이트, 포스페이트 트리에스테르, 아세트아미데이트, 카르복시메틸 에스테르, 그리고 이들의 조합에서 선택되는 최소한 하나의 변형된 뉴클레오시드간 연쇄를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 올리고뉴클레오타이드.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 펩티드 핵산 (PNA), 잠금된 핵산 (LNA), 아라비노-핵산 (FANA), 그리고 이들의 조합에서 선택되는 최소한 하나의 변형된 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 올리고뉴클레오타이드.

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

**발명의 설명**

## 기술 분야

### 본 발명의 기술분야

본 출원은 2011년 6월 9일자 제출된 U.S. 특허가출원 No. 61/494,928에 우선권을 주장하고, 이의 내용은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

본 발명의 구체예는 프라탁신 (FXN) 및 연관된 분자의 발현 및/또는 기능을 조정하는 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

## 배경 기술

### 배경기술

DNA-RNA 및 RNA-RNA 혼성화는 DNA 복제, 전사, 그리고 번역을 비롯한 핵산 기능의 많은 측면에 중요하다. 혼성화 역시 특정 핵산을 검출하거나, 또는 이의 발현을 변경시키는 다양한 기술에 중심적이다. 안티센스 뉴클레오티드는 가령, 표적 RNA에 혼성화되어 RNA 절단접합, 전사, 번역, 그리고 복제를 간섭함으로써 유전자 발현을 교란시킨다. 안티센스 DNA는 DNA-RNA 하이브리드 (hybrid)가 대부분의 세포 유형에서 존재하는 활성인 리보뉴클레아제 H에 의한 절단을 위한 기질 (substrate)로서 기능하는 부가된 특징을 갖는다. 안티센스 분자는 올리고데옥시뉴클레오티드 (ODN)의 경우에서처럼 세포 내로 전달될 수 있고, 또는 이들은 내생적 유전자로부터 RNA 분자로서 발현될 수 있다. FDA는 최근에, 안티센스 약물, VITRAVENE™ (거대세포바이러스 망막염의 치료용)를 승인하였는데, 이는 안티센스가 치료 유용성 (therapeutic utility)을 갖는다는 것을 반영한다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

#### 요약

본 요약은 본 발명의 성격과 내용을 간단하게 나타내기 위한 본 발명의 요약을 제시하기 위하여 제공된다. 이것은 특허청구범위의 범위 또는 의미를 해석하거나 한정하는데 이용되지 않는 것으로 이해된다.

한 구체예에서, 본 발명에서는 상응하는 센스 유전자의 상향-조절을 유발하는 자연 안티센스 전사체의 임의의 영역에 표적화된 안티센스 올리고뉴클레오티드(들)를 이용함으로써, 자연 안티센스 전사체의 작용을 저해하는 방법을 제시한다. 또한, 자연 안티센스 전사체의 저해는 siRNA, 리보자임 및 소형 분자에 의해 달성될 수 있을 것으로 기대되고, 이들은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주된다.

한 구체예에서 생체내에서 또는 시험관내에서 환자 세포 또는 조직에서 프라탁신 (FXN) 폴리뉴클레오티드의 기능 및/또는 발현을 조정하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 상기 세포 또는 조직을 5개 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 올리고뉴클레오티드와 접촉시키는 단계, 여기서 상기 올리고뉴클레오티드는 서열 번호: 2의 뉴클레오티드 1 내지 454 내에 5개 내지 30개의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드의 역보체에 최소한 50% 서열 동일성을 갖고; 그리고 생체내에서 또는 시험관내에서 환자 세포 또는 조직에서 프라탁신 (FXN) 폴리뉴클레오티드의 기능 및/또는 발현을 조정하는 단계를 포함한다:

한 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 프라탁신 (FXN) 폴리뉴클레오티드의 자연 안티센스 서열, 예를 들면, 서열 번호: 2에 진술된 뉴클레오티드, 그리고 이들의 임의의 변이체, 대립유전자, 동족체, 돌연변이체, 유도체, 단편 및 상보성 서열을 표적으로 한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 실례는 서열 번호: 3 내지 6으로 진술된다.

다른 구체예에서 생체내에서 또는 시험관내에서 환자 세포 또는 조직에서 프라탁신 (FXN) 폴리뉴클레오티드의 기능 및/또는 발현을 조정하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 상기 세포 또는 조직을 5개 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 올리고뉴클레오티드와 접촉시키는 단계, 여기서 상기 올리고뉴클레오티드는 프라탁신 (FXN) 폴리뉴클레오티드의 안티센스의 역보체에 최소한 50% 서열 동일성을 갖고; 그리고 생체내에서 또는 시험관내에서 환자 세포 또는 조직에서 프라탁신 (FXN) 폴리뉴클레오티드의 기능 및/또는 발현을 조정하는 단계를 포함한다.

다른 구체예에서 생체내에서 또는 시험관내에서 환자 세포 또는 조직에서 프라탁신 (FXN) 폴리뉴클레오티드의 기능 및/또는 발현을 조정하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 상기 세포 또는 조직을 5개 내지 30개 뉴클레오티드

드 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계, 여기서 상기 올리고뉴클레오타이드는 프락탁신 (FXN) 폴리뉴클레오타이드에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 최소한 50% 서열 동일성을 갖고; 그리고 생체내에서 또는 시험관내에서 환자 세포 또는 조직에서 프락탁신 (FXN) 폴리뉴클레오타이드의 기능 및/또는 발현을 조정하는 단계를 포함한다.

[0013] 한 구체예에서, 조성물은 센스 및/또는 안티센스 프락탁신 (FXN) 폴리뉴클레오타이드에 결합하는 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0014] 한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 또는 치환된 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0015] 한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 결합을 포함한다.

[0016] 또 다른 구체예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 펩티드 핵산, 2'-O-메틸, 플루오르- 또는 탄소, 메틸렌 또는 다른 잠금된 핵산 (LNA) 분자를 보유하는 변형된 염기를 포함한다. 바람직하게는, 변형된 뉴클레오타이드는  $\alpha$ -L-LNA를 비롯한 잠금된 핵산 분자이다.

[0017] 한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 환자에 피하, 근육내, 정맥내 또는 복막내 투여된다.

[0018] 한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 제약학적 조성물에 담겨 투여된다. 치료 섭생 (treatment regimen)은 안티센스 화합물을 환자에게 최소한 1회 투여하는 것을 포함한다; 하지만, 이러한 치료는 일정한 기간 동안 복수 약액주입을 포함하도록 변형될 수 있다. 상기 치료는 한 가지 이상의 다른 유형의 요법과 복합될 수 있다.

[0019] 한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 리포솜 내에 캡슐화 (encapsulation)되거나, 또는 담체 분자 (가령, 콜레스테롤, TAT 펩티드)에 부착된다. 각 구체예 및 모든 구체예에서, 이들 방법과 조성물은 생물학적 시스템에 올리고뉴클레오타이드의 투여를 포함한다.

[0020] 다른 측면은 하기에 기술된다.

## 도면의 간단한 설명

[0021] 도면의 간단한 설명

도 1: FXN-특이적 자연 안티센스 전사체를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 HepG2 세포에 약액주입함으로써, FXN mRNA의 상향 조절. HepG2 간암 세포주는 FXN-특이적 자연 안티센스 전사체를 표적으로 하는 상이한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (CUR-0732, CUR-0733, CUR-0734, 그리고 CUR-0735)가 20 nM에서 약액주입되었다. 48시간 약액주입 후, FXN mRNA는 역전사 (RT) 실시간 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 정량되었다. FXN mRNA의 올리고뉴클레오타이드 처리에 기인한 상대적 발현 변화는 약액주입된 세포 (세포에 첨가된 CUR 올리고뉴클레오타이드) 및 모의 (세포에 첨가된 비-특이적 올리고뉴클레오타이드) 사이에 18S-표준화된 상이한 값에 기초하여 계산되었다. CUR-0732, CUR-0733, CUR-0734, 그리고 CUR-0735로 표시된 막대는 각각, 서열 번호: 3 내지 6으로 처리된 샘플에 상응한다.

도 2: FXN-특이적 자연 안티센스 전사체를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 CHP-212 세포에 약액주입함으로써, FXN mRNA의 상향 조절. CHP-212 신경아세포종 세포주는 FXN-특이적 자연 안티센스 전사체를 표적으로 하는 상이한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (CUR-0732, CUR-0733, CUR-0734, 그리고 CUR-0735)가 20 nM에서 약액주입되었다. 48시간 약액주입 후, FXN mRNA는 역전사 (RT) 실시간 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 정량되었다. FXN mRNA의 올리고뉴클레오타이드 처리에 기인한 상대적 발현 변화는 약액주입된 세포 (세포에 첨가된 CUR 올리고뉴클레오타이드) 및 모의 (세포에 첨가된 비-특이적 올리고뉴클레오타이드) 사이에 18S-표준화된 상이한 값에 기초하여 계산되었다. CUR-0732, CUR-0733, CUR-0734, 그리고 CUR-0735로 표시된 막대는 각각, 서열 번호: 3 내지 6으로 처리된 샘플에 상응한다.

도 3: FXN-특이적 자연 안티센스 전사체를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 GM03816 환자 섬유아세포 세포주에 약액주입함으로써, FXN mRNA의 상향 조절. GM03816 환자 섬유아세포 세포주는 FXN-특이적 자연 안티센스 전사체를 표적으로 하는 상이한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (CUR-0732, CUR-0733, CUR-0734, 그리고 CUR-0735)가 20 nM에서 약액주입되었다. 48시간 약액주입 후, FXN mRNA는 역전사 (RT) 실시간 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 정량되었다. FXN mRNA의 올리고뉴클레오타이드 처리에 기인한 상대적 발현 변화는 약액주입된 세포 (세포에 첨가된 CUR 올리고뉴클레오타이드) 및 모의 (세포에 첨가된 비-특이적 올리고뉴클레오타이드) 사이에 베타-악틴 표준화된 상이한 값에 기초하여 계산되었다. CUR-0732, CUR-0733, CUR-0734, 그리고 CUR-0735로 표시된 막대는 각각, 서열 번호: 3 내지 6으로 처리된 샘플에 상응한다.

도 4: FXN-특이적 자연 안티센스 전사체를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 GM15850 환자 림프아 세포 세포주에 약액주입함으로써, FXN mRNA의 상향 조절. GM15850 환자 림프아세포 세포주는 FXN-특이적 자연 안티센스 전사체를 표적으로 하는 상이한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (CUR-0732, CUR-0733, CUR-0734, 그리고 CUR-0735)가 20 nM에서 약액주입되었다. 48시간 약액주입 후, FXN mRNA는 역전사 (RT) 실시간 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 정량되었다. FXN mRNA의 올리고뉴클레오타이드 처리에 기인한 상대적 발현 변화는 약액주입된 세포 (세포에 첨가된 CUR 올리고뉴클레오타이드) 및 모의 (세포에 첨가된 비-특이적 올리고뉴클레오타이드) 사이에 18S-표준화된 상이한 값에 기초하여 계산되었다. CUR-0732, CUR-0733, CUR-0734, 그리고 CUR-0735로 표시된 막대는 각각, 서열 번호: 3 내지 6으로 처리된 샘플에 상응한다.

도 5: FXN-특이적 자연 안티센스 전사체를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 GM15850 환자 림프아 세포 세포주에 약액주입함으로써, FXN mRNA의 상향 조절. GM15850 환자 림프아세포 세포주는 FXN-특이적 자연 안티센스 전사체를 표적으로 하는 상이한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (CUR-0732, CUR-0734)가 20 nM에서 약액주입되었다. 48시간 약액주입 후, FXN mRNA는 역전사 (RT) 실시간 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 정량되었다. FXN mRNA의 올리고뉴클레오타이드 처리에 기인한 상대적 발현 변화는 약액주입된 세포 (세포에 첨가된 CUR 올리고뉴클레오타이드) 및 모의 (세포에 첨가된 비-특이적 올리고뉴클레오타이드) 사이에 베타-악틴 표준화된 상이한 값에 기초하여 계산되었다. CUR-0732, 그리고 CUR-0734로 표시된 막대는 각각, 서열 번호: 3과 5로 처리된 샘플에 상응한다. 18S와 베타 악틴은 실시간 PCR을 위한 표준 대조이다.

서열 목록 설명 - 서열 번호: 1: 호모 사피엔스 프라탁신 (FXN), 미토콘드리아 단백질을 인코딩하는 핵 유전자, 전사체 변이체 2, mRNA (NCBI 수탁 번호: NM\_181425); 서열 번호: 2: 자연 FXN 안티센스 서열 (AI951739); 서열 번호: 3 내지 6: 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### [0022] 상세한 설명

[0023] 본 발명의 여러 측면은 예시를 위한 실례 적용과 관련하여 하기에 기술된다. 다수의 특정한 상세, 상관관계, 그리고 방법은 본 발명의 완전한 이해를 제공하기 위하여 설명되는 것으로 이해되어야 한다. 하지만, 당업자가 의의 없이 인지하는 바와 같이, 본 발명은 하나 이상의 특정한 상세 없이, 또는 다른 방법으로 실시될 수 있다. 본 발명은 행위 또는 현상의 순서에 의해 한정되지 않는데, 그 이유는 일부 행위가 다른 행위 또는 현상과 상이한 순서로 및/또는 이들과 동시에 발생할 수 있기 때문이다. 게다가, 모든 예시된 행위 또는 현상이 본 발명에 따른 방법을 실행하는데 요구되지는 않는다.

[0024] 본 명세서에서 개시된 모든 유전자, 유전자 명칭, 그리고 유전자 산물은 본 명세서에서 개시된 조성물과 방법이 적용될 수 있는 임의의 종으로부터 동족체에 상응하는 것으로 의도된다. 따라서 상기 용어에는 인간 및 생쥐로부터 유전자와 유전자 산물이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 특정 종으로부터 유전자 또는 유전자 산물이 개시될 때, 이러한 개시는 단지 실례인 것으로 의도되고, 그리고 해당 문맥에서 달리 명시되지 않으면 한정으로서 해석되지 않는 것으로 이해된다. 따라서 예로써, 본 명세서에서 개시된 유전자의 경우에, 이들은 일부 구체예에서, 포유동물 핵산에 관계하고, 그리고 아미노산 서열은 다른 포유동물, 어류, 양서류, 파충류, 그리고 조류가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 다른 동물로부터 상동 (homologous) 및/또는 병렬상동 (orthologous) 유전자 및 유전자 산물을 포함하는 것으로 의도된다. 한 구체예에서, 이들 유전자 또는 핵산 서열은 인간 유래이다.

### [0025] 정의

[0026] 본 명세서에서 이용된 용어는 단지 특정 구체예를 설명하는 것을 목적으로 하고, 그리고 본 발명을 한정하는 것으로 의도되지 않는다. 본 명세서에서, 단수 형태는 해당 문맥에서 달리 명시되지 않으면, 복수 형태 역시 포괄하는 것으로 의도된다. 게다가, 용어 "내포하는", "내포한다", "보유하는", "보유한다", "갖는", 또는 이들의 변이체가 상세한 설명 및/또는 특허청구범위에 이용되는 한에는, 이들 용어는 용어 "포괄하는"과 유사한 방식으로 포괄적인 것으로 의도된다.

[0027] 용어 "약" 또는 "대략"은 당업자에 의해 결정되는, 특정 값에 대한 허용되는 오차 범위 이내를 의미하고, 이는 상기 값이 어떻게 측정되거나 결정되는 지, 다시 말하면, 측정 체계 (measurement system)의 한계에 부분적으로 좌우될 것이다. 가령, "대략"은 당분야에서 실시 (practice)에 대해 1 또는 1 이상의 표준 편차 이내를 의미할 수 있다. 대안으로, "대략"은 소정의 값의 최대 20%, 바람직하게는 최대 10%, 더욱 바람직하게는 최대 5%, 그리고 더욱 바람직하게는 최대 1%의 범위를 의미할 수 있다. 대안으로, 특히 생물학적 시스템 또는 공정에 대하여,



상기 용어는 소정의 값의 1 크기 자릿수 (order of magnitude) 이내, 바람직하게는 5-배 이내, 그리고 더욱 바람직하게는 2-배 이내를 의미할 수 있다. 특정 값이 명세서 및 특허청구범위에서 기술될 때, 달리 명시되지 않으면 특정 값에 대한 허용되는 오차 범위 이내를 의미하는 용어 "대략"이 가정되어야 한다.

[0028] 본 명세서에서, 용어 "mRNA"는 표적화된 유전자의 현재 공지된 mRNA 전사체(들), 그리고 석명될 수 있는 임의의 다른 전사체를 의미한다.

[0029] "안티센스 올리고뉴클레오타이드" 또는 "안티센스 화합물"은 다른 RNA 또는 DNA (표적 RNA, DNA)에 결합하는 RNA 또는 DNA 분자를 의미한다. 가령, RNA 올리고뉴클레오타이드이면, 이는 RNA-RNA 상호작용에 의해 다른 RNA 표적에 결합하고 표적 RNA의 활성을 변경시킨다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 특정 폴리뉴클레오타이드의 발현 및/또는 기능을 상향 조절 또는 하향 조절할 수 있다. 이러한 정의에는 치료적 관점, 진단적 관점, 또는 다른 관점에서 유용한 임의의 외래 RNA 또는 DNA 분자가 포함되는 것으로 의도된다. 이런 분자에는 예로써, 안티센스 RNA 또는 DNA 분자, 간섭 RNA (RNAi), 마이크로 RNA, 미끼 RNA 분자, siRNA, 효소 RNA, 치료 편집 RNA 및 작동약과 길항약 RNA, 안티센스 올리고머 화합물, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 외부 가이드 서열 (external guide sequence, EGS) 올리고뉴클레오타이드, 교대 접합기 (alternate splicer), 프라이머, 프로브, 그리고 표적 핵산의 최소한 일부분에 혼성화되는 다른 올리고머 화합물이 포함된다. 따라서 이들 화합물은 단일-가닥, 이중-가닥, 부분적으로 단일-가닥, 또는 원형 올리고머 화합물의 형태로 도입될 수 있다.

[0030] 본 발명의 맥락에서, 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 리보핵산 (RNA) 또는 데옥시리보핵산 (DNA)의 올리고머 또는 폴리머, 또는 이의 모방체를 지칭한다. 용어 "올리고뉴클레오타이드"에는 또한, 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 이들의 치환된 및 알파-아노머 (alpha-anomeric) 형태, 펩티드 핵산 (PNA), 잠금된 핵산 (LNA), 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트 등을 비롯한 자연 및/또는 변형된 단량체 또는 연쇄의 선형 또는 원형 올리고머가 포함된다. 올리고뉴클레오타이드는 단량체-단량체 상호작용의 규칙적인 패턴, 예를 들면, Watson-Crick 유형의 염기 대합 (base pairing), Hoogsteen 또는 역 Hoogsteen 유형의 염기 대합 등에 의해, 표적 폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0031] 올리고뉴클레오타이드는 "키메라"일 수 있다, 다시 말하면, 서로 다른 영역으로 구성될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, "키메라" 화합물은 2개 이상의 화학적 영역, 예를 들면, DNA 영역(들), RNA 영역(들), PNA 영역(들) 등을 보유하는 올리고뉴클레오타이드이다. 각각의 화학적 영역은 최소한 하나의 단량체 단위, 다시 말하면, 올리고뉴클레오타이드 화합물의 경우에 뉴클레오타이드로 구성된다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로, 최소한 하나의 영역을 포함하고, 여기서 올리고뉴클레오타이드는 한 가지 이상의 요망되는 특성을 나타내기 위하여 변형된다. 올리고뉴클레오타이드의 요망되는 특성에는 예로써, 뉴클레아제 분해에 증가된 내성, 증가된 세포 흡수, 및/또는 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화성 (binding affinity)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 이런 이유로, 상기 올리고뉴클레오타이드의 서로 다른 영역은 상이한 특성을 가질 수 있다. 본 발명의 키메라 올리고뉴클레오타이드는 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드, 변형된 올리고뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드 및/또는 앞서 기술된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 유사체의 혼성 구조로서 형성될 수 있다.

[0032] 올리고뉴클레오타이드는 "레지스터 (register)"에서, 다시 말하면, 단량체가 고유 DNA에서처럼 연속적으로 연결되거나, 또는 스페이서를 통해 연결될 때, 연결될 수 있는 영역으로 구성될 수 있다. 이들 스페이서는 이들 영역 간에 공유 "가교"를 구성하고 바람직한 경우에, 대략 100개의 탄소 원자를 초과하지 않는 길이를 갖도록 의도된다. 이들 스페이서는 예로써, 양 또는 음 전하를 보유하고, 특정한 핵산 결합 특성 (삽입물, 그루브 접합체 (groove binder), 독소, 형광단 등)을 갖고, 친유성이고, 예로써 알파-나선 (alpha-helix)을 유도하는 알라닌-보유 펩티드와 같은 특수한 이차 구조를 유도하는 상이한 기능기 (functionality)를 보유할 수 있다.

[0033] 본 명세서에서, "FXN" 또는 "프라탁신"에는 모든 집단 구성원, 돌연변이체, 대립유전자, 단편, 종, 코딩과 비-코딩 서열, 센스 및 안티센스 폴리뉴클레오타이드 가닥 등이 포함된다.

[0034] 본 명세서에서, 단어 '프라탁신', FXN, FA, CyaY, FARR, FRDA, MGC57199, X25는 기존 문헌에서와 동일한 것으로 간주되고, 그리고 본 출원에서 동의어로서 이용된다.

[0035] 본 명세서에서, 용어 "특이적인 올리고뉴클레오타이드" 또는 "표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드"는 (i) 표적화된 유전자의 일부와 안정된 복합체를 형성할 수 있거나, 또는 (ii) 표적화된 유전자의 mRNA 전사체의 일부와 안정된 이중나선을 형성할 수 있는 서열을 보유하는 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 이들 복합체 및 이중나선의 안정성은 이론적 계산 및/또는 시험관내 분석에 의해 결정될 수 있다. 혼성화 복합체 및 이중나선의 안정성을 결정하는 대표적인 분석법은 하기 실시예에서 기술된다. 용어 "비-특이적"은 표적 자연 안티센스 전사체 또는 표



적 핵산에 비-특이적인 모의 대조의 맥락에서 이용된다. 올리고뉴클레오타이드 대조는 또한, "무관련"으로 지칭될 수도 있다. "무관련" 올리고뉴클레오타이드는 스캐폴드된 서열을 가질 것이고, 그리고 비교 올리고뉴클레오타이드에 길이에 있어서 유사할 것이다. 실험은 또한, FXN에 대한 비-기능성 효과에 대한 음성 대조로서, 대조 올리고뉴클레오타이드 없이 수행될 수 있다. 이러한 후자 실험은 세포 기초된 실험에서 비-형질감염 또는 모의 형질감염으로 불린다.

[0036] 본 명세서에서, 용어 "표적 핵산"은 DNA, 이런 DNA로부터 전사된 RNA (premRNA 및 mRNA 포함), 그리고 비-코딩 서열, 센스 또는 안티센스 폴리뉴클레오타이드를 코딩하는, 이런 RNA로부터 유래된 cDNA를 포괄한다. 올리고머 화합물의 표적 핵산과의 특이적인 혼성화는 상기 핵산의 정상적인 기능을 간섭한다. 표적 핵산에 특이적으로 혼성화되는 화합물에 의한 상기 표적 핵산의 기능의 이러한 조정은 일반적으로, "안티센스"로 지칭된다. 간섭되는 DNA의 기능에는 예로써, 복제 및 전사가 포함된다. 간섭되는 RNA의 기능에는 예로써, RNA의 단백질 번역 부위로의 전좌, RNA로부터 단백질의 번역, 하나 이상의 mRNA 종을 산출하기 위한 RNA의 절단점합, 그리고 RNA에 관련되거나 RNA에 의해 촉진될 수 있는 촉매 활성화와 같은 생명 유지에 필요한 모든 기능이 포함된다. 표적 핵산 기능으로 이런 간섭의 전반적인 효과는 인코딩된 산물 또는 올리고뉴클레오타이드의 발현의 조정이다.

[0037] RNA 간섭 "RNAi"는 "표적" 핵산 서열에 서열-특이적 상동성 (homology)을 갖는 이중 가닥 RNA (dsRNA) 분자에 의해 매개된다. 본 발명의 일정한 구체예에서, 매개자 (mediator)는 5-25개 뉴클레오타이드 "작은 간섭" RNA 이중나선 (siRNA)이다. 이들 siRNA는 Dicer로 알려져 있는 RNase 효소에 의한 dsRNA의 가공으로부터 유래된다. siRNA 이중나선 산물은 RISC (RNA Induced Silencing Complex)로 명명된 다중-단백질 siRNA 복합체 내로 동원된다. 특정 이론에 한정됨 없이, RISC는 이후, 표적 핵산 (적절하게는 mRNA)로 안내되는 것으로 생각되고, 여기서 siRNA 이중나선은 서열-특이적 방식으로 상호작용하여 촉매 방식으로 절단을 매개한다. 본 발명에 따라서 이용될 수 있는 작은 간섭 RNA는 당분야에 널리 공지되고 당업자에게 익숙한 절차에 따라서 합성되고 이용될 수 있다. 본 발명의 방법에 이용되는 작은 간섭 RNA는 적절하게는, 대략 1개 내지 대략 50개의 뉴클레오타이드 (nt)를 포함한다. 무제한적 구체예의 실례에서, siRNA는 대략 5개 내지 대략 40개 nt, 대략 5개 내지 대략 30개 nt, 대략 10개 내지 대략 30개 nt, 대략 15개 내지 대략 25개 nt, 또는 대략 20-25개 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0038] 적절한 올리고뉴클레오타이드의 선별은 핵산 서열을 자동적으로 정렬하고 동일성 또는 상동성의 영역을 표시하는 컴퓨터 프로그램을 이용함으로써 조장된다. 이들 프로그램은 예로써, GenBank와 같은 데이터베이스를 검색하거나, 또는 PCR 산물을 서열화함으로써, 획득된 핵산 서열을 비교하는데 이용된다. 일정한 범위의 종으로부터 핵산 서열의 비교는 종 간에 적절한 정도의 동일성을 보이는 핵산 서열의 선별을 가능하게 한다. 서열화되지 않은 유전자의 경우에, 표적 종 및 다른 종에서 유전자 간에 동일성 정도를 결정하기 위하여 서던 블롯 (Southern blot)이 수행된다. 당분야에 널리 공지된 바와 같이, 다양한 정도의 엄격함 (stringency)에서 서던 블롯을 수행함으로써, 동일성의 근사 측정 (approximate measure)을 달성하는 것이 가능하다. 이들 절차는 통제되는 개체에서 표적 핵산 서열에 높은 정도의 상보성 (complementarity), 그리고 다른 종에서 상응하는 핵산 서열에 더욱 낮은 정도의 상보성을 나타내는 올리고뉴클레오타이드의 선별을 가능하게 한다. 당업자는 본 발명에서 이용을 위한 유전자의 적절한 영역을 선별하는데 상당한 허용 범위 (latitude)가 존재한다는 것을 인지할 것이다.

[0039] "효소 RNA"는 효소 활성을 갖는 RNA 분자를 의미한다 (Cech, (1988) *J. American. Med. Assoc.* 260, 3030-3035). 효소 핵산 (리보자임)은 먼저, 표적 RNA에 결합함으로써 작용한다. 이런 결합은 표적 RNA를 절단하는 작용을 하는 분자의 효소 부분에 매우 가깝게 유지되는 효소 핵산의 표적 결합 부분을 통하여 발생한다. 따라서 효소 핵산은 먼저, 표적 RNA를 인식하고, 이후 염기 대합을 통하여 표적 RNA에 결합하고, 그리고 일단 정확한 부위에 결합되면, 표적 RNA를 절단하는데 효소적으로 작용한다.

[0040] "미끼 RNA"는 리간드에 대한 자연 결합 도메인을 모방하는 RNA 분자를 의미한다. 이런 이유로, 미끼 RNA는 특정 리간드의 결합에 대하여 자연 결합 표적과 경쟁한다. 가령, HIV 횡단-활성화 반응 (trans-activation response, TAR) RNA의 과다-발현은 "미끼"로서 작용할 수 있고 HIV tat 단백질에 효율적으로 결합하고, 따라서 상기 단백질이 HIV RNA에 인코딩된 TAR 서열에 결합하는 것을 예방하는 것으로 밝혀졌다. 이는 특정한 실례인 것으로 의도된다. 당업자는 이것이 단지 하나의 실례이고, 그리고 다른 구체예가 당분야에 널리 공지된 기술을 이용하여 쉽게 산출될 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0041] 본 명세서에서, 용어 "단량체"는 전형적으로, 포스포디에스테르 결합 또는 이들의 유사체에 의해 연결되어 수개의 단량체 단위, 예를 들면, 대략 3-4개 내지 대략 수백 개의 단량체 단위 범위의 크기를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 형성하는 단량체를 지시한다. 포스포디에스테르 연쇄의 유사체에는 하기에 더욱 상세하게 기술된 바와

같이, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포라미데이트 등이 포함된다.

[0042] 용어 "뉴클레오티드"에는 자연 발생 뉴클레오티드 및 비-자연 발생 뉴클레오티드가 포함된다. 이전에 "비-자연 발생" 인 것으로 간주되었던 다양한 뉴클레오티드가 차후에, 자연에서 발견되고 있음은 당업자에게 명백할 것이다. 따라서 "뉴클레오티드"에는 공지된 퓨린과 피리미딘 헤테로환-보유 분자뿐만 아니라 이들의 헤테로환상 유사체 및 호변체 (tautomer) 역시 포함된다. 다른 유형의 뉴클레오티드의 예시적인 실례는 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 우라실, 퓨린, 잔틴, 디아미노퓨린, 8-옥소-N6-메틸아데닌, 7-테아자잔틴, 7-테아자구아닌, N4,N4-에타노시토신, N6,N6-에타노-2,6-디아미노퓨린, 5-메틸시토신, 5-(C3-C6)-알킬닐시토신, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 슈도이소시토신, 2-히드록시-5-메틸-4-트리아졸로피리딘, 이소시토신, 이소구아닌, 이노신, 그리고 Benner *et al.*, U.S. Pat No. 5,432,272에서 설명된 "비-자연 발생" 뉴클레오티드를 보유하는 분자이다. 용어 "뉴클레오티드"에는 이들 실시예 모두, 그리고 이들의 유사체 및 호변체가 포함되는 것으로 의도된다. 특히 흥미로운 뉴클레오티드는 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 그리고 우라실을 보유하는 것들인데, 이들은 인간에서 치료적 및 진단적 적용에 관하여 자연 발생 뉴클레오티드로서 간주된다. 뉴클레오티드는 예로써, Kornberg and Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992)에서 설명된 바와 같은 자연 2'-데옥시 및 2'-히드록실 당, 그리고 이들의 유사체를 포함한다.

[0043] 뉴클레오티드와 관련하여 "유사체"에는 변형된 염기 모이어티 및/또는 변형된 당 모이어티를 보유하는 합성 뉴클레오티드가 포함된다 (예로써, Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, (1997) *Nucl. Acid. Res.*, 25(22), 4429-4443, Toulme J.J., (2001) *Nature Biotechnology* 19:17-18; Manoharan M., (1999) *Biochemica et Biophysica Acta* 1489:117-139; Freier S. M., (1997) *Nucleic Acid Research*, 25:4429-4443, Uhlman, E., (2000) *Drug Discovery & Development*, 3: 203-213, Herdewin P., (2000) *Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.*, 10:297-310); 2'-O, 3'-C-linked [3.2.0] bicycloarabinonucleosides에 의해 전반적으로 기술됨). 이런 유사체에는 결합 특성, 예를 들면, 이중나선 또는 삼중나선 안정성, 특이성 등을 증강시키도록 설계된 합성 뉴클레오티드가 포함된다.

[0044] 본 명세서에서, "혼성화"는 올리고머 화합물의 실질적으로 상보성 가닥의 대합을 의미한다. 대합의 한 가지 기전은 수소 결합을 수반하고, 이는 올리고머 화합물의 가닥의 상보성 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 염기 (뉴클레오티드) 간에 Watson-Crick, Hoogsteen 또는 역 Hoogsteen 수소 결합일 수 있다. 가령, 아데닌 및 티민은 수소 결합의 형성을 통하여 대합하는 상보성 뉴클레오티드이다. 혼성화는 다양한 조건 하에 발생할 수 있다.

[0045] 안티센스 화합물은 표적 핵산에 상기 화합물의 결합이 표적 핵산의 정상적인 기능을 간섭하여 기능 및/또는 활성의 조절을 유발하고, 그리고 특정한 결합이 요망되는 조건 하에, 다시 말하면, 생체내 분석 또는 치료적 처리의 경우에 생리학적인 조건 하에, 그리고 시험관내 분석의 경우에 이들 분석이 수행되는 조건 하에 비-표적 핵산 서열에 안티센스 화합물의 비-특이적 결합을 회피할 수 있을 만큼 충분한 정도의 상보성이 존재할 때, "특이적으로 혼성화가능"하다.

[0046] 본 명세서에서, 구(句) "엄격한 혼성화 조건" 또는 "엄격한 조건"은 본 발명의 화합물이 표적 서열에 혼성화되지만, 최소 숫자의 다른 서열에 혼성화되는 조건을 지칭한다. 엄격한 조건은 서열-의존성이므로 서로 다른 환경에서 상이할 것이고, 그리고 본 발명의 맥락에서, 올리고머 화합물이 표적 서열에 혼성화되는 "엄격한 조건"은 이들 올리고머 화합물의 본성과 조성 및 이들이 조사되는 분석법에 의해 결정된다. 일반적으로, 엄격한 혼성화 조건은 무기 양이온, 예를 들면, Na<sup>++</sup> 또는 K<sup>++</sup>를 갖는 낮은 농도 (<0.15M)의 염 (즉, 낮은 이온 강도), 올리고머 화합물:표적 서열 복합체의 T<sub>m</sub> 미만에서 20°C - 25°C보다 높은 온도, 그리고 변성제, 예를 들면, 포름아미드, 디메틸포름아미드, 디메틸 설폭시드, 또는 세정제 나트륨 도데실 설페이트 (SDS)의 존재를 포함한다. 가령, 혼성화 속도는 각 1% 포름아미드에 대하여 1.1% 감소한다. 높은 엄격한 혼성화 조건의 실례는 60°C에서 30분 동안 0.1X 염화나트륨-구연산나트륨 완충액 (SSC)/0.1% (w/v) SDS이다.

[0047] 본 명세서에서, "상보성"은 1개 또는 2개의 올리고머 가닥에서 2개의 뉴클레오티드 간에 정확한 대합의 능력을 지칭한다. 가령, 안티센스 화합물의 일정한 위치에서 핵염기 (nucleobase)가 표적 핵산의 일정한 위치에서 핵염기와 수소 결합을 형성할 수 있고, 상기 표적 핵산이 DNA, RNA, 또는 올리고뉴클레오티드 분자이면, 상기 올리고뉴클레오티드 및 표적 핵산 사이에 수소 결합의 위치는 상보성 위치인 것으로 간주된다. 올리고머 화합물 및 추가의 DNA, RNA, 또는 올리고뉴클레오티드 분자는 각 분자 내에서 충분한 숫자의 상보성 위치가 서로에 수소 결합될 수 있는 뉴클레오티드에 의해 점유될 때, 서로에 상보성이다. 따라서 "특이적으로 혼성화가능" 및 "상보성"은 올리고머 화합물 및 표적 핵산 사이에 안정되고 특정한 결합이 발생할 만큼 충분한 숫자의 뉴클레오티드

에 걸쳐 충분한 정도의 정확한 대합 또는 상보성을 지시하는데 이용되는 용어이다.

- [0048] 당분야에서, 올리고머 화합물의 서열은 특이적으로 혼성화되기 위하여, 표적 핵산의 서열에 100% 상보성일 필요가 없는 것으로 이해된다. 게다가, 올리고뉴클레오타이드는 개재성 또는 인접 분절 (segment)이 혼성화 현상에 관련되지 않도록 하나 이상의 분절에 걸쳐 혼성화될 수 있다 (가령, 루프 (loop) 구조, 미스매치 (mismatch) 또는 헤어핀 (hairpin) 구조). 본 발명의 올리고머 화합물은 그들이 표적화되는 표적 핵산 서열 내에 표적 영역에 최소한 대략 70%, 또는 최소한 대략 75%, 또는 최소한 대략 80%, 또는 최소한 대략 85%, 또는 최소한 대략 90%, 또는 최소한 대략 95%, 또는 최소한 대략 99% 서열 상보성을 포함한다. 가령, 안티센스 화합물의 20개 뉴클레오타이드 중에서 18개가 표적 영역에 상보성이고, 따라서 특이적으로 혼성화되는 안티센스 화합물은 90% 상보성을 나타낼 것이다. 이러한 실례에서, 나머지 비-상보성 뉴클레오타이드는 상보성 뉴클레오타이드와 함께 군집되거나, 또는 상보성 뉴클레오타이드가 군데군데 산재될 수 있고, 그리고 서로에 또는 상보성 뉴클레오타이드에 인접할 필요가 없다. 따라서 표적 핵산과 완전 상보성의 두 영역이 측면에서 접하는 4개의 비-상보성 뉴클레오타이드를 보유하는 18개 뉴클레오타이드 길이를 갖는 안티센스 화합물은 표적 핵산과 77.8% 전체 상보성을 가질 것이고, 따라서 본 발명의 범위 내에 속할 것이다. 안티센스 화합물의 표적 핵산의 영역과의 상보성 비율은 당분야에 공지된 BLAST (basic local alignment search tools) 프로그램 및 PowerBLAST 프로그램을 이용하여 일과적으로 결정될 수 있다. 상동성, 서열 동일성 또는 상보성 비율은 예로써, 디폴트 설정을 이용한 Gap 프로그램 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)에 의해 결정될 수 있고, Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, (1981) 2, 482-489의 알고리즘을 이용한다.
- [0049] 본 명세서에서, 용어 "열 융점 (Tm)"은 표적 서열에 상보성인 올리고뉴클레오타이드 중에서 50%가 평형에서 표적 서열에 혼성화되는 규정된 이온 강도, pH, 그리고 핵산 농도 하에 온도를 지칭한다. 전형적으로, 엄격한 조건은 염 농도가 pH 7.0 내지 8.3에서 최소한 대략 0.01 내지 1.0 M Na 이온 농도 (또는 다른 염)이고, 그리고 온도가 짧은 올리고뉴클레오타이드 (가령, 10개 내지 50개 뉴클레오타이드)의 경우에 최소한 대략 30°C인 조건일 것이다. 엄격한 조건은 또한, 불안정화제 (destabilizing agent), 예를 들면, 포름아미드의 첨가로 달성될 수도 있다.
- [0050] 본 명세서에서, "조정"은 유전자의 발현에서 증가 (촉진) 또는 감소 (저해)를 의미한다.
- [0051] 폴리뉴클레오타이드 서열의 맥락에서 이용될 때, 용어 "변이체"에는 야생형 유전자에 관련된 폴리뉴클레오타이드 서열이 포함될 수 있다. 이러한 정의에는 또한, 예로써 "대립유전자", "절단점합", "종", 또는 "다형성" 변이체가 포함될 수 있다. 절단점합 변이체는 참고 분자에 현저한 동일성을 가질 수도 있지만, 일반적으로 mRNA 가공 동안 엑손의 교대성 절단점합 (alternate splicing)으로 인하여 더욱 많은 또는 더욱 적은 숫자의 폴리뉴클레오타이드를 보유할 것이다. 상응하는 폴리펩티드는 추가의 기능적 도메인을 보유하거나, 또는 도메인이 부재할 수 있다. 종 변이체는 종에 따라 달라지는 폴리뉴클레오타이드 서열이다. 야생형 유전자 산물의 변이체가 본 발명에 특히 유용하다. 변이체는 핵산 서열 내에서 최소한 하나의 돌연변이로부터 유래할 수 있고, 그리고 변경된 mRNA, 또는 구조 또는 기능이 변경되거나 변경되지 않은 폴리펩티드를 결과할 수 있다. 임의의 소정의 자연 또는 재조합 유전자는 대립유전자 형태를 보유하지 않거나, 또는 1개 또는 다수의 대립유전자 형태를 보유할 수 있다. 변이체를 발생시키는 공통의 돌연변이 변화는 일반적으로, 뉴클레오타이드의 자연적인 결실, 부가, 또는 치환에 기인하는 것으로 생각된다. 이들 유형의 변화는 각각, 소정의 서열 내에서 단독으로, 또는 다른 것들과 공동으로, 1회 이상 발생할 수 있다.
- [0052] 결과의 폴리펩티드는 일반적으로, 서로에 대하여 현저한 아미노산 동일성을 가질 것이다. 다형성 변이체는 소정의 종의 개체 간에 특정 유전자의 폴리뉴클레오타이드 서열에서 변형물이다. 다형성 변이체에는 또한, "단일 뉴클레오타이드 다형성" (single nucleotide polymorphism, SNP), 또는 폴리뉴클레오타이드 서열이 1개 염기에 의해 달라지는 단일 염기 돌연변이 (single base mutation)가 포함될 수 있다. SNP의 존재는 예로써, 질환 상태에 대한 경향, 다시 말하면, 내성 (resistance)과 대비하여 감수성 (susceptibility)을 갖는 일정한 개체군을 지시할 수 있다.
- [0053] 유도체 폴리뉴클레오타이드는 화학적 변형, 예를 들면, 알킬, 아실, 또는 아미노 기에 의한 수소의 대체에 종속되는 핵산을 포함한다. 유도체, 예를 들면, 유도체 올리고뉴클레오타이드는 비-자연-발생 부분, 예를 들면, 변경된 당 모이어티 또는 당내 (inter-sugar) 연쇄를 포함할 수 있다. 포스포로티오에이트 및 당분야에 공지되어 있는 다른 황-보유 종이 이들 중에서 대표적이다. 유도체 핵산은 또한, 방사성뉴클레오타이드, 효소, 형광제, 화학발광제, 발색제 (chromogenic agent), 기질, 보조인자, 저해물질, 자기 입자 등을 비롯한 라벨을 보유할 수 있다.
- [0054] "유도체" 폴리펩티드 또는 펩티드는 예로써, 당화 (glycosylation), 폐길화 (pegylation), 인산화



(phosphorylation), 설패화 (sulfation), 환원 (reduction)/알킬화 (alkylation), 아실화 (acylation), 화학적 커플링, 또는 순한 포르말린 처리에 의해 변형된 것이다. 유도체는 또한, 방사성동위원소, 형광, 그리고 효소 라벨이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 검출가능 라벨을 직접적으로 또는 간접적으로 보유하도록 변형될 수 있다.

[0055] 본 명세서에서, 용어 "동물" 또는 "환자"에는 예로써, 인간, 양, 엘크, 사슴, 물 사슴, 밍크, 포유동물, 원숭이, 말, 소, 돼지, 염소, 개, 고양이, 쥐, 생쥐, 조류, 닭, 파충류, 어류, 곤충 및 거미류 동물이 포함되는 것으로 의도된다.

[0056] "포유동물"에는 전형적으로, 건강 관리를 받고 있는 온혈 포유동물 (가령, 인간 및 가축)이 포함된다. 실례에는 인간뿐만 아니라 고양이, 개, 말, 소 등이 포함된다.

[0057] "치료하는" 또는 "치료"는 포유동물에서 질환-상태의 치료를 커버하고, 그리고 (a) 포유동물에서, 특히 이런 포유동물이 질환-상태의 성향이 있지만 아직 발병된 것으로 진단되지 않았을 때 질환-상태가 발생하는 것을 예방하고; (b) 질환-상태를 저해하고, 예를 들면, 이의 발생을 중지시키고; 및/또는 (c) 질환-상태를 완화하는, 예를 들면, 원하는 중점에 도달될 때까지 질환 상태의 퇴보를 유발하는 것을 포함한다. 치료는 또한, 질환의 증상의 개선 (가령, 통증 또는 불쾌감 경감)을 포함하고, 여기서 이런 개선은 질환 (가령, 원인, 전염, 표현 등)에 직접적으로 영향을 주거나 주지 않을 수 있다.

[0058] 본 명세서에서, 용어 "암"은 백혈병, 림프종, 흑색종, 암종 및 육종이 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 포유동물에서 관찰되는 모든 유형의 암 또는 신생물 또는 악성 종양을 지칭한다. 암은 "종양" 또는 암의 악성 세포를 포함하는 조직으로서 그 자신을 드러낸다. 종양의 실례에는 육종 (sarcoma) 및 암종 (carcinoma), 예를 들면, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장 암, 유방 암, 난소 암, 전립선 암, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 선암종, 낭선종, 속질 암종, 기관지원성 암종, 신장 세포 암종, 간암, 담관 암종, 용모막 암종, 정상피종, 배아 암종, 월름종양, 자궁경부암, 고환 종양, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 별아교세포종, 속질모세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경초종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 흑색종, 신경아세포종, 그리고 망막모세포종이 포함된다. 본 발명에 따른 공개된 조성물에 의해 치료될 수 있는 추가적인 암에는 호지킨 질환, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 신경아세포종, 유방암, 난소암, 폐암, 횡문근육종, 일차성 혈소판증가증, 일차성 마크로글로불린혈증, 소-세포 폐 종양, 일차성 뇌종양, 위암, 결장암, 악성 췌장 일출린종, 악성 암양종, 비뇨기 방광암, 위암, 전악성 피부 병소, 고환암, 림프종, 갑상선 암, 신경아세포종, 식도 암, 비뇨생식기관 암, 악성 고칼슘혈증, 자궁경부암, 자궁내막암, 부신 피질암, 그리고 전립선 암이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0059] 본 명세서에서, "신경 질환이나 장애"는 신경계 및/또는 시계의 임의의 질환이나 장애를 지칭한다. "신경 질환이나 장애"는 중추 신경계 (뇌, 뇌간 및 소뇌), 말초 신경계 (뇌신경 포함), 그리고 자율 신경계 (중추신경계 및 말초 신경계 둘 모두에 위치하는 부분)가 관련된 질환이나 장애를 포함한다. 신경 질환이나 장애에는 후천성 간질 실어; 급성 파종성 뇌척수염; 부신백질이영양증; 노인성 황반 변성; 뇌량의 발육부진; 인지불능; Aicardi 증후군; Alexander 질환; Alpers 질환; 교대성 반신마비; 알츠하이머병; 혈관성 치매; 근위축성 측삭 경화증; 무뇌증; Angelman 증후군; 혈관종(angiomatosis); 산소결핍; 실어증; 운동불능; 거미집모양의 낭종; 거미집모양의 염증(arachnoiditis); Anronl-Chiari 변형; 동정맥 기형; Asperger 증후군; 기능장애 운동실조; 주의력 결핍 과다행동 장애; 자폐증; 자율 장애; 등 통증; Batten 질환; Behcet 질환; Bell 마비; 양성 필수 안검경련; 양성 병소; 근위축증; 양성 두개내 고혈압; Binswanger 질환; 안검경련; Bloch Sulzberger 증후군; 상완 신경 열기 부상; 뇌 종기; 뇌 손상; 뇌 종양(교아종 다형 포함); 척추 종양; Brown-Sequard 증후군; Canavan 질환; 손목관절 터널 증후군; 작열통; 중앙 통증 증후군; 중심성교뇌수초용해; 두부 장애; 대뇌 동맥류; 대뇌 동맥경화증; 대뇌 위축; 대뇌 거대증; 대뇌 마비; Charcot-Marie-Tooth 질환; 화학요법-유도된 신경병증 및 신경병증 통증; Chiari 기형; 무도병; 만성 염증성 탈수초화 다발신경병증; 만성통증; 만성 국부 통증 증후군; Coffin Lowry 증후군; 지속적인 발육 상태를 비롯한 혼수; 선천적 안면 양측마비; 피질기저 퇴화; 두개 동맥염; 두개골 유합증; Creutzfeldt-Jakob 질환; 누적성 외상 장애; Cushing 증후군; 세포 거대 봉입체 질환; 사이토메갈로바이러스 감염; 춤추는 눈-춤추는 발 증후군; DandyWalker 증후군; Dawson 질환; De Morsier 증후군; Dejerine-Klumke 마비; 치매; 피부근염; 당뇨병성 신경병증; 미만성 경화증; 자율신경실조증; 난서증; 난독증; 긴장이상; 조기 유아 간질 뇌증; 빈 Sella 증후군; 뇌염; 뇌류(encephaloceles); 뇌삼차 신경성 혈관종증; 간질; Erb 마비; 본태성 진전증; Fabry 질환; Fahr 증후군; 기절; 가족성 강직성 마비; 열병 발작; Fisher 증후군;

Friedreich 운동실조; 전두측엽 치매 및 기타 "타우병증"; Gaucher 질환; Gerstmann 증후군; 거대 세포 동맥염; 거대 세포 함유 질환; 구상세포 대뇌피질이영양증; Guillain-Barre 증후군; HTLV-1-관련된 골수증; Hallervorden-Spatz 질환; 두부 손상; 두통; 반측안면 경련증; 유전성 강직성 대마비; 유전성 다발성 신경염증 실조; 이성대상포진; 대상포진; Hirayama 증후군; HIV-관련된 치매 및 신경병증 (또한 AIDS의 신경성 현시); 전 전뇌증; Huntington 질환 및 기타 폴리글루타민 반복 질환; 수두무뇌증; 물뇌증; 파골리줄혈증; 혈중산소감소증; 면역-중재된 뇌척수염; 봉입체 근염; 색소 실조증; 영아 피틴산 축적 질환; 영아 레프슈 질환; 영아 경련; 염증성 근질환; 두개내 낭종; 두개내 고혈압; Joubert 증후군; Keams-Sayre 증후군; Kennedy 질환 Kinsbourne 증후군; Klippel Feil 증후군; Krabbe 질환; Kugelberg-Welander 질환; 쿠루병; Lafora 질환; Lambert-Eaton 근무력 증후군; Landau-Kleffner 증후군; 측면 수질 (Wallenberg) 증후군; 학습 장애; Leigh 질환; Lennox-Gustaut 증후군; Lesch-Nyhan 증후군; 백질이영양증; 루이 소체 치매; 뇌회결손; 감금 증후군; 루게릭병 (가령, 운동 신경 질환 또는 근위축성 측삭 경화증); 요추간반 질환; 라임병--신경 후유증; Machado-Joseph 질환; 큰뇌증; 거대뇌증; Melkersson-Rosenthal 증후군; Menieres 질환; 뇌막염; Menkes 질환; 이염백질이영양증; 소두증; 편두통; Miller Fisher 증후군; 미니-뇌졸중; 미토콘드리아 근병증; Mobius 증후군; 일지성 근위축증; 운동 신경 질환; Moyamoya 질환; 뮤코다당증; 다발경색 치매; 다병소성 운동 신경병증; 다발성 경화증 및 기타 탈수초화 장애; 체위성 저혈압을 동반하는 다계통 위축증; 근육 영양실조; 중증근무기증; 말이집 탈락성 미만성 경화증; 유아의 근간대성 뇌병증; 근질환; 본태성 근긴장; 기면발작; 신경섬유종증; 신경이완성 악성 증후군; AIDS의 신경성 현시; 낭창의 신경 후유증; 신경근육긴장증; 신경 세로이드 리포푸신증; 신경이동 장애; Niemann-Pick 질환; O'Sullivan-McLeod 증후군; 후두 신경통; 구속성 척추 증후군; Ohtahara 증후군; 올리브교 소뇌 위축증; 안구간대경련-근간대경련; 시신경염; 기립성 저혈압; 과사용 증후군; 이상 감각; 신경퇴행성 질환이나 장애 (파킨슨씨병, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 치매, 다발성 경화증 그리고 신경 세포 사멸과 관련된 기타 질환 및 장애); 선천 이상근육근긴장; 종양연관 질환; 돌발 발작; Parry Romberg 증후군; Pelizaeus-Merzbacher 질환; 주기적 마비; 말초 신경병증; 통증 있는 신경병증 및 신경병증 통증; 지속적인 성장 상태; 전반적 발달 장애; 빛 재채기 반사; 피탄산 축적 질환; Pick 질환; 신경 압박; 뇌하수체 종양; 다발성근염; 공뇌증; 소아마비 증후군; 대상포진후 신경통; 감염후 뇌척수염; 체위성 저혈압; Prader-Willi 증후군; 원발성 측삭 경화증; 프리온 질환; 진행성 반얼굴 위축; 진행성 다초점 백색질뇌증; 진행성 경화회백질위축증; 진행성 핵상 마비; 가성뇌종양; Ramsay-Hunt 증후군 (유형 I 및 II); Rasmussen 뇌염; 반사성 교감신경 이영양증 증후군; Refsum 질환; 반복성 운동 장애; 반복성 스트레스 손상; 하지 불안 증후군; 레트로바이러스-연관 골수증; Rett 증후군; Reye 증후군; Saint Vitus 댄스; Sandhoff 질환; Schilder 질환; 뇌갈림증; 중격-시신경 형성장애; 흔들린 아이 증후군; 대상포진; Shy-Drager 증후군; Sjogren 증후군; 수면 무호흡; Soto 증후군; 경련성 마비; 척추 파열; 척수 손상; 척수 종양; 척추 근위축; Stiff-Person 증후군; 발작; Sturge-Weber 증후군; 아급성 경화성 범뇌염; 피질하부 동맥경화성 뇌병; Sydenham 무도병; 실신; 척수공동증; 지연성 운동장애; Tay-Sachs 질환; 일시적 동맥염; 계류 척추 증후군; Thomsen 질환; 흉곽 출구 증후군; 동통성 틱; Todd 마비; Tourette 증후군; 일과성 허혈 발작; 전염성 해면상뇌증; 횡단성 척추염; 외상성 뇌 손상; 진전; 삼차 신경통; 열대 경직 하반신 마비; 결절성 경화증; 혈관성 치매 (다발-경색 치매); 일시적 동맥염을 비롯한 혈관염; Von Hippel-Lindau 질환; Wallenberg 증후군; Werdnig-Hoffman 질환; West 증후군; 편달; Williams 증후군; Wildon 질환; 그리고 Zellweger 증후군이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 프리드리히 실조증은 본 발명의 올리고뉴클레오티드로 치료되는 선호되는 질환이다.

[0060] "증식성 질환이나 장애"에는 골수성 (myeloid), 림프구성 (lymphoid) 또는 적혈구성 (erythroid) 계통, 또는 이들의 전구 세포로부터 발생하는 조혈 기원의 과형성/신생물성 세포와 관련된 조혈 신생물성 장애가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 이들에는 적혈모구성 백혈병; 급성 전골수구성 백혈병 (APML); 만성 골수성 백혈병 (CML); B-계통 ALL과 T-계통 ALL을 포함하는 급성 림프성모구성 백혈병 (ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 전 림프구성 백혈병 (PLL), 모발상 세포 백혈병 (HLL) 및 발렌스트롬 마크로글로불린혈증 (WM)을 비롯한 림프구성 악성이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 추가 형태의 악성 림프종에는 비-호지킨 림프종과 이의 변이체, 말초 T 세포 림프종, 성체 T 세포 백혈병/림프종 (ATL), 피부 T-세포 림프종 (CTCL), 거대 과립 림프구성 백혈병 (LGF), 호지킨병 및 Reed-Sternberg 질환이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0061] 폴리뉴클레오티드와 올리고뉴클레오티드 조성물 및 분자

[0062] 표적: 한 구체예에서, 이들 표적은 제한 없이 프라탁신 (FXN)과 연관된 센스 및/또는 안티센스 비-코딩 및/또는 코딩 서열을 비롯하여, 프라탁신 (FXN)의 핵산 서열을 포함한다.

- [0063] FXN 프라탁신은 프라탁신 집단에 속하는 미토콘드리아 단백질을 인코딩하는 핵 유전자이다. 상기 단백질은 미토콘드리아 철 수송과 호흡을 조절하는데 있어서 기능한다. 인트론성 트리뉴클레오타이드 반복 GAA의 확장은 프리드리히 실조증을 유발한다. 대안적 스플라이싱 (alternative splicing)이 이러한 좌위에서 일어나고, 그리고 별개의 동종형을 인코딩하는 2개의 전사체 변이체가 확인되었다.
- [0064] 프라탁신에서 결함은 프리드리히 실조증 (FRDA)의 원인이다. FRDA는 신경퇴화와 심근증에 의해 특징되는 상염색체 열성, 진행성 퇴행성 질환이고, 가장 흔한 유전성 실조증이다. 상기 질환은 통상적으로, 사춘기 이전에 나타나고, 그리고 일반적으로, 팔다리 운동의 운동 실조증, 구음 장애, 안진증, 소멸되거나 또는 부재하는 힘줄 반사, 바빈스키 징후, 위치와 진동 감각의 장애, 척추 측만증, 오목발, 그리고 망치족지에 의해 특징된다. 대부분의 환자에서, FRDA는 프라탁신 유전자의 첫 번째 인트론에서 GAA 삼중항 반복 확장에 기인하지만, 일부 경우에 코딩 영역에서 돌연변이에 기인한다.
- [0065] 프리드리히 실조증 (FRDA)은 1:50,000의 발생률을 갖는, 가장 흔한 상염색체 열성 실조증이다. 상염색체 우성 척수소뇌 실조증과 유사하게, 상기 질환의 주요 임상적 징후는 조정의 상실 및 보행의 불안정이다. 하지만, 비후형 심장근육병증 및 인슐린 저항 역시 FRDA에서 흔히 나타난다.
- [0066] FRDA는 통상적으로, 프라탁신 유전자의 첫 번째 인트론에서 (GAA)<sub>n</sub> 삼중항 반복의 2개의 확장된 대립유전자의 유전에 의해 발생된다. 확장은 전사 신장을 부분적으로 저해하거나, 또는 염색질 구조를 압축하고, 따라서 프라탁신 단백질 발현을 감소시키는 것으로 생각된다. FRDA의 심각도와 발생 연령 둘 모두 더욱 작은 GAA 확장의 크기에 직접적으로 관련된다.
- [0067] 프라탁신은 철-황 클러스터의 생물발생을 뒷받침하는 것으로 생각되는데, 그 이유는 이의 결여가 철-황 클러스터 효소에 특이적으로 영향을 주기 때문이고, 그리고 이것이 철-황 클러스터 구축되는 주요 골격인 것으로 생각되는 ISCU와 상호작용하기 때문이다. 시험관내 연구는 프라탁신이 철-황 클러스터 내포 효소 미토콘드리아 아코니타제 (aconitase)와 페로켈라타제 (ferrochelatase) (포유동물에서 ISC 단백질)와 상호작용하는 반면, 효모와 예쁜꼬마선충 (*Caenorhabditis elegans*)에서 숙신산 탈수소효소와 상호작용한다는 것을 증명하였다. 프라탁신 메시지의 녹다운은 철-황 클러스터 단백질의 성숙에서 감소를 유발한다. 인간 세포의 마이크로레이 분석은 프라탁신 고갈이 철-황 클러스터-관련된 전사체에 우선적으로 영향을 준다는 것을 증명하였다.
- [0068] 표 1에서는 인간 프라탁신과 연관된 미토콘드리아 단백질의 실례를 보여준다.

표 1

[0069]

확인된 단백질	약어	총합	MW	수탁 #
모르탈린, GRP75, hsp70 9B	HSPA9B/GRP75	12	73.6	24234688
isd11/염색체 6 orf 149	C6orf149/ISD11	1	10.8	38570053
ATP 신타아제, FO 아단위 G	ATP5L	1	11.4	51479156
hsp 60, GroEL, SPG13	HSPD1	5	61.2	77702086
ATPase 집단, AAA 도메인	ATAD3A	3	72.5	42476028
프라탁신 동종형 1 프리프로단백질	프라탁신	1	23.1	31077081
숙신산 탈수소효소 A	SDHA	1	70.9	4759808
AFG3 ATPase 집단 유전자 3-유사 2	AFG3L1	1	88.5	5802970

[0070]

이들 구체예 중에서 한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 비정상적 프라탁신 발현 및/또는 기능과 연관된 질환이나 장애를 예방하거나 치료하는데 이용된다. 이것은 정상 또는 비정상 프라탁신 분자의 돌연변이체와 이상형 발현 또는 기능을 비롯한 모든 형태의 프라탁신 분자를 포함한다.

[0071]

광범위한 질환이나 장애가 프라탁신의 비정상적 발현 또는 기능에 기인할 수 있는데, 그 이유는 프라탁신이 예로써, 철-황 클러스터 생물발생과 수복, 철 수송과 대사, 그리고 항-산화 작용을 위해 복수의 미토콘드리아 단백질 및 기타 생리학적으로 중요한 분자와 결합하기 때문이다. 프라탁신은 또한, 미토콘드리아 샤프론 GRP75/모르탈린; 미토콘드리아 샤프론 HSP60과 상호작용한다. HSP60은 GRP75의 공지된 상호작용인자이고, 그리고 HSP10과 합쳐, 미토콘드리아 샤프론 복합체를 형성한다.

[0072]

프라탁신은 또한, 미토콘드리아 내부 막 내에 묻혀있고, 매트릭스와 상호작용하지만 막간 공간과 상호작용하지 않는 효소 복합체인 숙신산 탈수소효소 (succinate dehydrogenase)와 상호작용한다.

[0073]

프라탁신은 진핵성 Nfs IISeD 철-황 생물발생 복합체의 한 성분인 것으로 증명된 ISD11 오르토로그 (ortholo



g)와 상호작용한다. 따라서 프락탁신의 결여 (가령, 발현, 기능)는 다수의 세포내 과정에 영향을 줄 것이다.

- [0074] 안티센스의 특이성 및 민감성 역시 치료 용도를 위하여 당업자에 의해 이용된다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 동물 및 인간에서 질환 상태의 치료에서 치료 모이머티로서 이용되고 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 인간에 안전하고 효과적으로 투여되고 있고, 그리고 다수의 임상 시험이 현재 진행 중에 있다. 따라서 올리고뉴클레오타이드는 세포, 조직 및 동물, 특히 인간의 치료를 위한 치료 섭생에서 유용하도록 형성될 수 있는 유용한 치료 양식 (therapeutic modality)일 수 있는 것으로 확립된다.
- [0075] 한 구체예에서, FXN 집단 구성원과 연관된 질환이나 장애를 치료하거나 예방하기 위하여 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 이용된다. 이들 안티센스 화합물을 이용하여 획득된 줄기 세포로부터 재생된 세포/조직으로 치료될 수 있는 예시적인 프락탁신 (FXN) 매개된 질환과 장애에는 FXN의 비정상적 기능 및/또는 발현과 연관된 질환이나 장애, 프리드리히 실조증, 라이 증후군, 암, 증식성 질환이나 장애, 비정상적 세포 증식, 신경학적 질환이나 장애, 손상된 미토콘드리아 기능과 연관된 질환이나 장애, 후천성 미토콘드리아 기능장애에 의해 유발된 신경퇴행성 질환이나 장애, 산화 스트레스와 연관된 질환이나 장애, 염증 및 자가면역 질환이나 장애가 포함된다.
- [0076] 한 구체예에서, 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 FXN의 조절은 정상 대조와 비교하여 FXN 비정상 발현, 기능, 활성에 관련된 임의의 질환이나 장애를 예방하거나 치료하기 위하여, 필요 환자에 제공된다.
- [0077] 한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 프락탁신 (FXN)의 폴리뉴클레오타이드에 특이적이고, 여기에는 제한 없이 비-코딩 영역이 포함된다. 프락탁신 (FXN) 표적은 프락탁신 (FXN)의 변이체; SNP를 비롯한 프락탁신 (FXN)의 돌연변이체; 프락탁신 (FXN)의 비-코딩 서열; 대립유전자, 단편 등을 포함한다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 RNA 분자이다.
- [0078] 본 발명의 구체예에 따라서, 표적 핵산 분자는 프락탁신 (FXN) 폴리뉴클레오타이드 단독에 한정되지 않고 프락탁신 (FXN)의 임의의 동종형, 수용체, 동족체, 비-코딩 영역 등으로 확장된다.
- [0079] 한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 제한 없이 프락탁신 (FXN) 표적의 변이체, 대립유전자, 동족체, 돌연변이체, 유도체, 단편 및 상보성 서열을 비롯하여, 이들 표적의 자연 안티센스 서열 (코딩과 비-코딩 영역에 자연 안티센스)을 표적으로 한다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 RNA 또는 DNA 분자이다. 표적 핵산 분자는 "생물학적 시스템" 내에서 그 차례로 발견되고, 그리고 본 발명은 본 발명의 올리고뉴클레오타이드로 이런 생물학적 시스템의 치료를 포함한다. 용어 "생물학적 시스템 또는 시스템들"은 환자 및/또는 기타 살아있는 유기체뿐만 아니라 표적 단백질의 발현을 모니터링하는데 이용되는 세포 및/또는 세포 모델을 폭넓게 포함한다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 생체내 및 시험관내에서 유용하다.
- [0080] 한 구체예에서, 본 발명의 올리고머 화합물에는 상기 화합물 내에서 하나 이상의 뉴클레오타이드 위치에 상이한 염기가 존재하는 변이체 역시 포함된다. 가령, 첫 번째 뉴클레오타이드가 아데닌이면, 상기 위치에서 티미딘, 구아노신, 시티딘 또는 다른 자연 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 보유하는 변이체가 생산될 수 있다. 이는 안티센스 화합물의 임의의 위치에서 수행될 수 있다. 이들 화합물은 이후, 표적 핵산의 발현을 저해하는 그들의 능력을 결정하기 위하여 본 명세서에서 기술된 방법을 이용하여 조사된다.
- [0081] 일부 구체예에서, 안티센스 화합물 및 표적 사이에 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 대략 50% 내지 대략 60%이다. 일부 구체예에서, 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 대략 60% 내지 대략 70%이다. 일부 구체예에서, 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 대략 70% 내지 대략 80%이다. 일부 구체예에서, 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 대략 80% 내지 대략 90%이다. 일부 구체예에서, 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 대략 90%, 대략 92%, 대략 94%, 대략 95%, 대략 96%, 대략 97%, 대략 98%, 대략 99% 또는 대략 100%이다.
- [0082] 안티센스 화합물은 표적 핵산에 상기 화합물의 결합이 표적 핵산의 정상적인 기능을 간섭하여 활성의 상실을 유발하고, 그리고 특정한 결합이 요망되는 조건 하에, 비-표적 핵산 서열에 안티센스 화합물의 비-특이적 결합을 회피할 수 있을 만큼 충분한 정도의 상보성이 존재할 때, 특이적으로 혼성화가능하다. 이런 조건에는 예로써, 생체내 분석 또는 치료적 처리의 경우에 생리학적 조건, 그리고 시험관내 분석의 경우에 이들 분석이 수행되는 조건이 포함된다.
- [0083] 안티센스 화합물은 DNA, RNA, 키메라, 치환된 등인 지에 상관없이, 표적 DNA 또는 RNA 분자에 상기 화합물의 결합이 표적 DNA 또는 RNA의 정상적인 기능을 간섭하여 유용성의 상실을 유발하고, 그리고 특정한 결합이 요망되는 조건, 다시 말하면, 생체내 분석 또는 치료적 처리의 경우에 생리학적 조건, 그리고 시험관내 분석의 경우에 이들 분석이 수행되는 조건 하에, 비-표적 서열에 안티센스 화합물의 비-특이적 결합을 회피할 수 있을 만큼 충

분한 정도의 상보성이 존재할 때, 특이적으로 혼성화가능하다.

- [0084] 한 구체예에서, 제한 없이, 예로써 PCR, 혼성화 등을 이용하여 확인되고 확장되는 안티센스 서열, 서열 번호: 2로서 진술된 하나 이상의 서열 등을 비롯한 프라탁신 (FXN)의 표적화는 프라탁신 (FXN)의 발현 또는 기능을 조정한다. 한 구체예에서, 발현 또는 기능은 대조와 비교하여 상향 조절된다. 한 구체예에서, 발현 또는 기능은 대조와 비교하여 하향 조절된다.
- [0085] 한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 예로써 PCR, 혼성화 등을 이용하여 확인되고 확장되는 안티센스 서열을 비롯하여, 서열 번호: 3 내지 6으로서 진술된 핵산 서열을 포함한다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드, 더욱 짧은 또는 더욱 긴 단편, 변형된 결합 등을 포함할 수 있다. 변형된 결합 또는 뉴클레오타이드간 연쇄의 실례에는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등이 포함된다. 한 구체예에서, 뉴클레오타이드는 인 유도체를 포함한다. 본 발명의 변형된 올리고뉴클레오타이드 내에서 당 또는 당 유사체 모이어티에 부착될 수 있는 인 유도체 (또는 변형된 포스페이트 기)는 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 알킬포스페이트, 알칸포스페이트, 포스포로티오에이트 등일 수 있다. 앞서 언급된 포스페이트 유사체의 제조, 그리고 뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드 내로 그들의 통합은 그 자체로, 공지되어 있고 본 명세서에서 기술될 필요가 없다.
- [0086] 안티센스의 특이성 및 민감성 역시 치료 용도를 위하여 당업자에 의해 이용된다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 동물 및 인간에서 질환 상태의 치료에서 치료 모이어티로서 이용되고 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 인간에 안전하고 효과적으로 투여되고 있고, 그리고 다수의 임상 시험이 현재 진행 중에 있다. 따라서 올리고뉴클레오타이드는 세포, 조직 및 동물, 특히 인간의 치료를 위한 치료 섭생에서 유용하도록 형성될 수 있는 유용한 치료 양식 (therapeutic modality)일 수 있는 것으로 확립된다.
- [0087] 본 발명의 구체예에서, 올리고머 안티센스 화합물, 특히 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산 분자에 결합하고 표적 유전자에 의해 인코딩된 분자의 발현 및/또는 기능을 조정한다. 간섭되는 DNA의 기능에는 예로써, 복제 및 전사가 포함된다. 간섭되는 RNA의 기능에는 예로써, RNA의 단백질 번역 부위로의 전좌, RNA로부터 단백질의 번역, 하나 이상의 mRNA 종을 산출하기 위한 RNA의 절단접합, 그리고 RNA에 관련되거나 RNA에 의해 촉진될 수 있는 촉매 활성과 같은 생명 유지에 필요한 모든 기능이 포함된다. 이들 기능은 요망되는 기능에 따라서, 상향 조절되거나 저해될 수 있다.
- [0088] 안티센스 화합물에는 안티센스 올리고머 화합물, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 외부 가이드 서열 (external guide sequence, EGS) 올리고뉴클레오타이드, 교대 접합기 (alternate splicer), 프라이머, 프로브, 그리고 표적 핵산의 최소한 일부분에 혼성화되는 다른 올리고머 화합물이 포함된다. 따라서 이들 화합물은 단일-가닥, 이중-가닥, 부분적으로 단일-가닥, 또는 원형 올리고머 화합물의 형태로 도입될 수 있다.
- [0089] 본 발명의 맥락에서, 특정 핵산 분자에 안티센스 화합물의 표적화는 다단계 과정일 수 있다. 이러한 과정은 통상적으로, 기능이 조절되어야 하는 표적 핵산의 확인으로 시작된다. 표적 핵산은 예로써, 발현이 특정 장애 또는 질환 상태, 또는 감염성 병원체로부터 핵산 분자와 연관되는 세포 유전자 (또는 상기 유전자로부터 전사된 mRNA)일 수 있다. 본 발명에서, 표적 핵산은 프라탁신 (FXN)를 인코딩한다.
- [0090] 표적화 과정은 통상적으로, 요망되는 효과, 예를 들면, 발현의 조정이 결과되도록 안티센스 상호작용이 발생하는 표적 핵산 내에서 최소한 하나의 표적 영역, 분절, 또는 부위의 결정 역시 포함한다. 본 발명의 맥락에서, 용어 "영역"은 최소한 하나의 확인가능 구조, 기능, 또는 특징을 갖는 표적 핵산의 부분으로서 정의된다. 분절은 표적 핵산의 영역 내에 있다. "분절"은 표적 핵산 내에 영역의 더욱 작은 또는 하위 부분으로서 정의된다. 본 발명에서, "부위"는 표적 핵산 내에 위치로서 정의된다.
- [0091] 한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 프라탁신 (FXN)의 자연 안티센스 서열 (서열 번호: 2)에 결합하고 프라탁신 (FXN) (서열 번호: 1)의 발현 및/또는 기능을 조정한다. 안티센스 서열의 실례에는 서열 번호: 3 내지 6이 포함된다.
- [0092] 한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 프라탁신 (FXN) 폴리뉴클레오타이드의 하나 이상의 분절에 결합하고 프라탁신 (FXN)의 발현 및/또는 기능을 조정한다. 이들 분절은 프라탁신 (FXN) 센스 또는 안티센스 폴리뉴클레오타이드의 최소한 5개의 연속 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0093] 한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 프라탁신 (FXN)의 자연 안티센스 서열에 특이적이고, 여기서 프라탁신 (FXN)의 자연 안티센스 서열에 이들 올리고뉴클레오타이드의 결합은 프라탁신 (FXN)의 발현 및/또는 기능

을 조정한다.

- [0094] 한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드 화합물은 예로써, PCR, 혼성화 등을 이용하여 확인되고 확장되는 안티센스 서열, 서열 번호: 3 내지 6으로서 진술된 서열을 포함한다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드, 더욱 짧은 또는 더욱 긴 단편, 변형된 결합 등을 포함할 수 있다. 변형된 결합 또는 뉴클레오타이드 간 연쇄의 실례에는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등이 포함된다. 한 구체예에서, 뉴클레오타이드는 인 유도체를 포함한다. 본 발명의 변형된 올리고뉴클레오타이드 내에서 당 또는 당 유사체 모이어티에 부착될 수 있는 인 유도체 (또는 변형된 포스페이트 기)는 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 알킬포스페이트, 알칸포스페이트, 포스포로티오에이트 등일 수 있다. 앞서 언급된 포스페이트 유사체의 제조, 그리고 뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드 내로 그들의 통합은 그 자체로, 공지되어 있고 본 명세서에서 기술될 필요가 없다.
- [0095] 당분야에 공지된 바와 같이, 번역 개시 코돈이 전형적으로, 5'-AUG (전사된 mRNA 분자에서; 상응하는 DNA 분자에서 5'-ATG)이기 때문에, 상기 번역 개시 코돈은 "AUG 코돈", "시작 코돈", 또는 "AUG 시작 코돈"으로도 지칭된다. 소수의 유전자는 RNA 서열 5'-GUG, 5'-UUG 또는 5'-CUG를 갖는 번역 개시 코돈을 보유한다; 그리고 5'-AUA, 5'-ACG 및 5'-CUG는 생체내에서 기능하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 용어 "번역 개시 코돈" 및 "시작 코돈"은 각 경우에 개시자 아미노산이 전형적으로, 메티오닌 (진핵생물에서) 또는 포르밀메티오닌 (원핵생물에서)이긴 하지만, 많은 코돈 서열을 포함할 수 있다. 진핵 및 원핵 유전자는 2개 이상의 대안적 시작 코돈을 보유할 수도 있는데, 이들 중에서 임의의 하나가 특정 세포 유형 또는 조직에서, 또는 특정한 일단의 조건 하에 번역 개시에 우선적으로 이용될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, "시작 코돈" 및 "번역 개시 코돈"은 이런 코돈의 서열(들)에 상관없이, 프락틴 (FXN)를 인코딩하는 유전자로부터 전사된 mRNA의 번역을 개시하기 위하여 생체 내에서 이용되는 코돈(들)을 지칭한다. 유전자의 번역 종결 코돈 (또는 "종결 코돈")은 3가지 서열, 다시 말하면, 5'-UAA, 5'-UAG 및 5'-UGA (상응하는 DNA 서열은 각각, 5'-TAA, 5'-TAG 및 5'-TGA이다) 중에서 하나를 가질 수 있다.
- [0096] 용어 "시작 코돈 영역" 및 "번역 개시 코돈 영역"은 번역 개시 코돈으로부터 어느 한쪽 방향 (즉, 5' 또는 3')으로 대략 25개 내지 대략 50개 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 이런 mRNA 또는 유전자의 일부분을 지칭한다. 유사하게, 용어 "종결 코돈 영역" 및 "번역 종결 코돈 영역"은 번역 종결 코돈으로부터 어느 한쪽 방향 (즉, 5' 또는 3')으로 대략 25개 내지 대략 50개 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 이런 mRNA 또는 유전자의 일부분을 지칭한다. 결과적으로, "시작 코돈 영역" (또는 "번역 개시 코돈 영역") 및 "종결 코돈 영역" (또는 "번역 종결 코돈 영역")은 본 발명의 안티센스 화합물로 효과적으로 표적화될 수 있는 최대 영역이다.
- [0097] 당분야에서 번역 개시 코돈 및 번역 종결 코돈 사이에 영역을 지칭하는 것으로 알려져 있는 개방 해독틀 (ORF) 또는 "코딩 영역" 역시 효과적으로 표적화될 수 있는 영역이다. 본 발명의 맥락에서, 표적화된 영역은 유전자의 개방 해독틀 (ORF)의 번역 개시 또는 종결 코돈을 포함하는 유전자내 (intragenic) 영역이다.
- [0098] 다른 표적 영역에는 당분야에서 번역 개시 코돈으로부터 5' 방향으로 mRNA의 일부분을 지칭하는 것으로 알려져 있고, 따라서 mRNA (또는 유전자 상에서 상응하는 뉴클레오타이드)의 5' 캡 부위 및 번역 개시 코돈 사이에 뉴클레오타이드를 포함하는 5' 비번역 영역 (5'UTR)이 포함된다. 또 다른 표적 영역에는 당분야에서 번역 종결 코돈으로부터 3' 방향으로 mRNA의 일부분을 지칭하는 것으로 알려져 있고, 따라서 mRNA (또는 유전자 상에서 상응하는 뉴클레오타이드)의 번역 종결 코돈 및 3' 말단 사이에 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 비번역 영역 (3'UTR)이 포함된다. mRNA의 5' 캡 부위는 5'-5' 트리포스페이트 연쇄를 통하여 상기 mRNA의 5'-최말단 잔기에 결합된 N7-메틸화된 구아노신 잔기를 포함한다. mRNA의 5' 캡 영역은 캡 부위에 인접한 첫 50개의 뉴클레오타이드뿐만 아니라 5' 캡 구조 자체를 포함하는 것으로 간주된다. 본 발명을 위한 다른 표적 영역은 5' 캡 영역이다.
- [0099] 일부 진핵 mRNA 전사체는 직접적으로 번역되지만, 대부분은 "인트론"으로 알려져 있는 하나 이상의 영역을 포함하는데, 이들은 번역되기 전에 전사체로부터 잘려나간다. 나머지 (따라서 번역된) 영역은 "엑손"으로 알려져 있으며, 함께 절단접합되어 연속 mRNA를 형성한다. 한 구체예에서, 절단접합 부위, 다시 말하면, 인트론-엑손 접합 또는 엑손-인트론 접합 부위를 표적으로 하는 것은 이상 절단접합이 질환에 연관되거나, 또는 특정 절단접합 산물의 과다 생산이 질환과 연관되는 상황에서 특히 유용하다. 재배열 또는 결실로 인한 이상 융합 접합은 표적 부위의 다른 구체예이다. 상이한 유전자 소스로부터 2개 (또는 그 이상)의 mRNA의 절단접합 과정을 통하여 생산된 mRNA 전사체는 "융합 전사체"로 알려져 있다. 인트론은 예로써, DNA 또는 pre-mRNA를 표적으로 하는 안티센스 화합물을 이용하여 효과적으로 표적화될 수 있다.
- [0100] 한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 표적 폴리뉴클레오타이드의 코딩 및/또는 비-코딩 영역에 결합하

고 표적 분자의 발현 및/또는 기능을 조정한다.

- [0101] 한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 자연 안티센스 폴리뉴클레오타이드에 결합하고 표적 분자의 발현 및/또는 기능을 조정한다.
- [0102] 한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 센스 폴리뉴클레오타이드에 결합하고 표적 분자의 발현 및/또는 기능을 조정한다.
- [0103] 대안적 RNA 전사체는 DNA의 동일한 게놈 영역으로부터 만들어질 수 있다. 이들 대안적 전사체는 일반적으로 "변이체"로 알려져 있다. 더욱 특이적으로, "pre-mRNA 변이체"는 그들의 시작 또는 종결 위치에서 동일한 게놈 DNA로부터 만들어진 다른 전사체와 상이하며 인트론 및 엑손 서열을 모두 포함하는 동일한 게놈 DNA로부터 생산된 전사체이다.
- [0104] 절단접합 동안 하나 이상의 엑손 또는 인트론 영역, 또는 이들의 일부분을 잘라낼 때, pre-mRNA 변이체는 더욱 작은 "mRNA 변이체"를 만든다. 결과적으로, mRNA 변이체는 가공된 pre-mRNA 변이체이고, 각 독특한 pre-mRNA 변이체는 절단접합의 결과로 독특한 mRNA 변이체를 항상 만들어낸다. 이와 같은 mRNA 변이체는 또한 "대안적 절단 접합 변이체들"로 알려져 있다. pre-mRNA 변이체의 절단접합이 발생되지 않으면, pre-mRNA 변이체는 mRNA 변이체와 동일하게 된다.
- [0105] 변이체는 전사의 시작 또는 종결에 대한 대안적 신호를 이용하여 만들어질 수 있다. Pre-mRNA 및 mRNA는 하나 이상의 시작 코돈 또는 종결 코돈을 보유할 수 있다. 대안적 시작 코돈을 이용하는 pre-mRNA 또는 mRNA로부터 기원하는 변이체는 pre-mRNA 또는 mRNA의 "대안적 시작 변이체"로 알려져 있다. 대안적 종결 코돈을 이용하는 이들 전사체는 pre-mRNA 또는 mRNA의 "대안적 종결 변이체"로 알려져 있다. 대안적 종결 변이체중 한 가지 특정 유형은 "폴리A 변이체"이며, 여기서 만들어진 다중 전사체는 전사 기전에 의해 "폴리A 종결 신호"중 하나의 대안적 선별에 기인하고, 따라서 독특한 폴리A 부위에서 종결되는 전사체가 만들어진다. 본 발명의 맥락에서, 본 명세서에서 기술된 변이체의 이들 유형 역시 표적 핵산의 구체예이다.
- [0106] 안티센스 화합물이 혼성화되는 표적 핵산 상의 위치는 활성 안티센스 화합물이 표적화되는 표적 영역의 최소한 5개 뉴클레오타이드 길이 부분으로 정의된다.
- [0107] 일정한 예시적인 표적 분질의 특정한 서열이 본 명세서에서 제시되긴 하지만, 당업자는 이들이 본 발명의 범위 내에서 특정 구체예를 예시하고 기술한다는 것을 인지할 것이다. 추가적인 표적 단편은 본 내용을 근거하여 당업자에 의해 용이하게 인지될 수 있다.
- [0108] 예시된 바람직한 표적 분질로부터 선택된 최소한 5개의 연속 뉴클레오타이드 스트레치를 포함하는 5-100개 뉴클레오타이드 길이의 표적 분질은 표적화에도 적합한 것으로 간주된다.
- [0109] 표적 분질은 예시된 바람직한 표적 분질 중에서 하나의 5'-말단으로부터 최소한 5개 연속 뉴클레오타이드 (나머지 뉴클레오타이드는 표적 분질의 5' 말단의 직상류에서 시작하고, DNA 또는 RNA가 대략 5 내지 대략 100개 뉴클레오타이드를 포함할 때까지 연속되는 동일한 DNA 또는 RNA의 연속 스트레치이다)를 포함하는 DNA 또는 RNA 서열을 포함할 수 있다. 유사하게, 바람직한 표적 분질은 예시된 바람직한 표적 분질 중에서 하나의 3'-말단으로부터 최소한 5개 연속 뉴클레오타이드 (나머지 뉴클레오타이드는 표적 분질의 3' 말단의 직하류에서 시작하고, DNA 또는 RNA가 대략 5 내지 대략 100개 뉴클레오타이드를 포함할 때까지 연속되는 동일한 DNA 또는 RNA의 연속 스트레치이다)를 포함하는 DNA 또는 RNA 서열로 대표된다. 본 명세서에 예시된 표적 분질로 무장된 당업자는 과도한 실험 없이, 더욱 바람직한 표적 분질을 확인할 수 있을 것이다.
- [0110] 일단 하나 이상의 표적 영역, 분질 또는 부위가 확인되면, 표적에 충분한 상보성을 가진, 다시 말하면, 원하는 효과를 제공할 만큼 충분히 잘 혼성화되고 충분한 특이성을 갖는 안티센스 화합물이 선택된다.
- [0111] 본 발명의 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 특정 표적의 안티센스 가닥에 결합한다. 올리고뉴클레오타이드는 길이가 최소한 5개 뉴클레오타이드이고, 그리고 전체 길이의 표적 뉴클레오타이드를 수용하는 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 위하여, 각 올리고뉴클레오타이드가 중복 서열을 표적으로 하도록 합성될 수 있다. 표적은 또한 코딩 뿐만 아니라 비-코딩 영역을 포함한다.
- [0112] 한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 특정 핵산을 표적으로 하는 것이 바람직하다. 특정 핵산에 안티센스 화합물의 표적화는 다단계 과정이다. 이러한 과정은 통상적으로, 기능이 조정되는 핵산 서열의 확인으로 시작된다. 이는 예로써, 발현이 특정 질환 또는 질환 상태와 연관되는 세포 유전자 (또는 상기 유전자로부터 전



사된 mRNA), 또는 비-코딩 RNA (ncRNA)와 같은 비-코딩 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

[0113] RNA는 (1) 메신저 RNA (mRNA), 이는 단백질로 번역되고, 그리고 (2) 비-단백질-코딩 RNA (ncRNA)로 분류될 수 있다. ncRNA는 마이크로 RNA, 안티센스 전사체 및 고밀도의 종결 코돈을 포함하고 임의의 광범위한 "개방 해독 틀"이 부족한 다른 전사 단위 (TU)를 포함한다. 많은 ncRNA는 단백질-코딩 좌위의 3' 비번역 영역 (3'UTR)에서 개시 부위로부터 시작되는 것으로 보인다. ncRNA는 아주 드물고, 그리고 FANTOM 협회에 의해 서열화된 ncRNA의 최소한 절반은 폴리아데닐화되지 않는 것으로 보인다. 대부분의 조사자들은 분명한 이유로, 가공되고 세포질로 배출되는 폴리아데닐화된 mRNA에 초점을 맞추었다. 최근에, 비-폴리아데닐화된 핵 RNA 세트는 매우 크고, 그리고 이와 같은 많은 전사체가 소위 유전자내 영역 (intergenic region)에서 생성되는 것으로 밝혀졌다. ncRNA가 유전자 발현을 조절할 수 있는 기전은 표적 전사체와의 염기 대합에 의한 것이다. 염기 대합에 의해 기능하는 RNA는 (1) 동일한 유전적 위치에서, 그러나 그들이 작용하는 RNA에 반대 가닥 상에 인코딩되고, 따라서 그들의 표적에 대해 완벽한 상보성을 나타내는 *cis*-인코딩된 RNA, 그리고 (2) 그들이 작용하는 RNA와는 별개의 염색체 위치에서 인코딩되며, 일반적으로 그들의 표적과 완벽한 염기-대합 잠재력을 나타내지 않는 *trans*-인코딩된 RNA로 분류될 수 있다.

[0114] 이론에 한정됨 없이, 본 명세서에서 기술된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 안티센스 폴리뉴클레오타이드의 혼란은 상응하는 센스 메신저 RNA의 발현을 변경시킬 수 있다. 하지만, 이와 같은 조절은 부조화적(discordant) (안티센스 녹다운은 메신저 RNA 상승을 결과한다) 또는 조화적(concordant) (안티센스 녹다운은 수반되는 메신저 RNA 감소를 결과한다)일 수 있다. 이들 경우에, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 전사체의 중복 또는 비-중복 부위로 표적화되어, 이의 녹다운 또는 제거를 초래할 수 있다. 코딩뿐만 아니라 비-코딩 안티센스는 동일한 방식으로 표적화될 수 있고, 그리고 어느 종류든 조화 또는 비조화 방식으로 상응하는 센스 전사체를 조절할 수 있다. 표적에 대항하여 이용되는 새로운 올리고뉴클레오타이드를 확인하는데 사용되는 전략은 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 안티센스 RNA 전사체의 녹다운 또는 원하는 표적을 조정하는 임의의 다른 수단에 기초될 수 있다.

[0115] 전략 1: 부조화적 조절의 경우, 안티센스 전사체의 녹다운은 통상적(센스) 유전자의 발현을 상승시킨다. 후자 유전자가 공지의 또는 가상 약물 표적을 인코딩하면, 이의 안티센스 대응물의 녹다운은 수용체 작동약 또는 효소 자극물질의 작용을 의식적으로 모방할 수 있다.

[0116] 전략 2: 조화적 조절의 경우, 안티센스 및 센스 전사체 둘 모두를 동시에 녹다운시킬 수 있고, 따라서 통상의 (센스) 유전자 발현의 상승적 감소를 얻을 수 있다. 가령, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 녹다운을 달성하는데 이용되면, 이러한 전략은 센스 전사체를 표적으로 하는 하나의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 상응하는 안티센스 전사체를 표적으로 하는 다른 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 또는 중복 센스 및 안티센스를 동시에 표적으로 하는 단일 대칭적 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 적용하는데 이용될 수 있다.

[0117] 본 발명에 따르면, 안티센스 화합물들에는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, 외부 가이드 서열 (EGS) 올리고뉴클레오타이드, siRNA 화합물, 단일 또는 이중-가닥 RNA 간섭 (RNAi) 화합물, 예를 들면, siRNA 화합물, 그리고 표적 핵산의 최소한 일부분에 혼성화되고 이의 기능을 조정하는 기타 올리고머 화합물이 포함된다. 따라서 안티센스 화합물들은 DNA, RNA, DNA-유사, RNA-유사, 또는 이들의 혼합물이거나, 또는 이들 중에서 하나 이상의 모방체일 수 있다. 이들 화합물은 단일-가닥, 이중-가닥, 원형 또는 헤어핀 올리고머 화합물일 수 있고, 그리고 내부 또는 말단 중배 (bulge), 미스매치 또는 루프와 같은 구조적 요소를 포함할 수 있다. 안티센스 화합물은 일과적으로 선형으로 제조되지만, 결합되거나, 또는 원형 및/또는 분지형으로 제조될 수 있다. 안티센스 화합물은 혼성화되면 전체적으로 또는 부분적으로 이중-가닥 화합물을 형성하는 2개의 가닥, 또는 혼성화 및 전체적으로 또는 부분적으로 이중-가닥 화합물의 형성을 가능하게 할 만큼 충분한 자가-상보성을 갖는 단일 가닥과 같은 구조체를 포함할 수 있다. 2개 가닥은 내부에서 연결되어 3' 또는 5' 말단이 자유로운 상태로 남아 있거나, 또는 연결되어 연속적인 헤어핀 구조 또는 루프를 형성할 수 있다. 헤어핀 구조는 단일 가닥 특성의 연장부를 발생시키는 5' 또는 3' 말단 상에 오버행(overhang)을 포함할 수 있다. 이중 가닥 화합물은 선택적으로 이들 말단에 오버행 (overhang)을 포함할 수 있다. 추가 변형에는 말단 중의 한쪽, 선택된 뉴클레오타이드 위치, 당 위치, 또는 뉴클레오타이드간 연쇄 중의 하나에 부착된 접합체 (conjugate) 군을 포함할 수 있다. 대안으로, 2개 가닥은 비-핵산 모이어티 또는 링커 기를 통하여 연결될 수 있다. 한 개 가닥으로부터만 형성될 때, dsRNA는 이중나선을 형성하기 위하여 자체적으로 둘로 접히는 자가-상보성 헤어핀 유형 분자의 형태를 취할 수 있다. 따라서 이들 dsRNA는 완전히 또는 부분적으로 이중 가닥이 될 수 있다. 유전자 발현의 특이적 조절은 유전자도입 세포주에서 dsRNA 헤어핀의 안정된 발현에 의해 달성될 수 있지만, 일부 구체예에서, 유전자 발현 또는 기능은 상향 조정된다. 2개 가닥, 또는 이중나선을 형성하기 위하여 자체적으로 둘로 접히는 자가-상보성 헤어핀 유형 분자

의 형태를 취하는 단일 가닥으로부터 형성될 때, 이들 2개 가닥 (또는 단일 가닥의 이중나선 형성 영역)은 Watson-Crick 방식으로 염기쌍을 이루는 상보성 RNA 가닥이다.

[0118] 일단 시스템내로 도입되면, 본 발명의 화합물은 표적 핵산의 절단 또는 다른 변형을 달성하기 위하여 하나 이상의 효소 또는 구조적 단백질의 작용을 유도하거나, 또는 점유-기반 기전 (occupancy-based mechanisms)을 통하여 작용할 수 있다. 일반적으로, 핵산 (올리고뉴클레오타이드 포함)은 "DNA-유사" (즉, 일반적으로, 하나 이상의 2'-데옥시 당, 그리고 U 염기 대신 T를 보유함) 또는 "RNA-유사" (즉, 일반적으로, 하나 이상의 2'-히드록실 또는 2'-변형된 당, 그리고 T 염기 대신 U 염기를 보유함)로 기술될 수 있다. 핵산 나선은 한 가지 이상의 구조 유형을 채택할 수 있지만, 가장 일반적으로 A- 및 B-형이다. 일반적으로, B-형-유사 구조를 가지는 올리고뉴클레오타이드는 "DNA-유사"이며, 그리고 A-형-유사 구조를 가지는 올리고뉴클레오타이드는 "RNA-유사"이다. 일부 (키메라) 구체예에서, 안티센스 화합물은 A- 및 B-형 영역을 모두 포함할 수 있다.

[0119] 한 구체예에서, 바람직한 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 화합물은 안티센스 RNA, 안티센스 DNA, 키메라 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 변형된 연쇄를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 간섭 RNA (RNAi), 짧은 간섭 RNA (siRNA); 마이크로 간섭 RNA (miRNA); 작은, 일시적 RNA (stRNA); 또는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA); 작은 RNA-유도된 유전자 활성화 (RNAa); 작은 활성화 RNA (saRNA), 또는 이들의 조합 중에서 최소한 하나를 포함한다.

[0120] dsRNA는 또한 "작은 RNA-유도된 유전자 활성화" 또는 RNAa로 명명된 기전인 유전자 발현을 활성화시킬 수 있다. dsRNA 표적화 유전자 프로모터는 관련 유전자의 강력한 전사 활성화를 유도한다. RNAa는 "작은 활성화 RNA (saRNA)"로 불리는 합성 dsRNA를 이용하여 인간 세포에서 설명되었다. 현재, RNAa가 다른 생물체에서 보존되는지는 알려져 있지 않다.

[0121] 작은 이중-가닥 RNA (dsRNA), 예를 들면, 작은 간섭 RNA (siRNA) 및 마이크로RNA (miRNA)는 RNA 간섭 (RNAi)으로 알려져 있는 진화론적으로 보존된 기전의 촉발자인 것으로 밝혀졌다. RNAi는 염색질을 재형성하여 전사를 억제하거나, 상보성 mRNA를 분해시키거나, 또는 단백질 번역을 차단함으로써 유전자 침묵을 일관되게 유도한다. 하지만, 하기 실시예 부분에서 상세하게 설명된 경우에서, 올리고뉴클레오타이드는 프락틴 (FXN) 폴리뉴클레오타이드 및 이들의 인코딩된 산물의 발현 및/또는 기능을 증가시키는 것으로 보인다. dsRNA는 또한, 작은 활성화 RNA (saRNA)로 작용할 수 있다. 이론에 한정됨 없이, 유전자 프로모터 내에 서열을 표적으로 함으로써, saRNA는 dsRNA-유도된 전사 활성화 (RNAa)로 지칭되는 현상에서 표적 유전자 발현을 유도할 것이다.

[0122] 추가 구체예에서, 본 발명에서 확인된 "바람직한 표적 분절"은 프락틴 (FXN) 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조정하는 추가 화합물을 스크리닝하는데 이용될 수 있다. "조정물질 (modulator)"은 프락틴 (FXN)을 인코딩하는 핵산 분자의 발현을 감소 또는 증가시키는 화합물이며, 바람직한 표적 분절에 상보성인 최소한 5개-뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 스크리닝 방법은 프락틴 (FXN)의 센스 또는 자연 안티센스 폴리뉴클레오타이드를 인코딩하는 핵산 분자의 바람직한 표적 분절을 하나 이상의 후보 조정물질과 접촉시키는 단계, 그리고 프락틴 (FXN) 폴리뉴클레오타이드, 예를 들면, 서열 번호: 3 내지 6을 인코딩하는 핵산 분자의 발현을 감소 또는 증가시키는 하나 이상의 후보 조정물질을 선별하는 단계를 포함한다. 일단 프락틴 (FXN) 폴리뉴클레오타이드를 인코딩하는 핵산 분자의 발현을 조정 (가량, 감소 또는 증가)시킬 수 있는 것으로 확인되면, 후보 조정물질(들)은 이후, 프락틴 (FXN) 폴리뉴클레오타이드의 기능의 추가 연구, 또는 본 발명에 따른 연구, 진단 또는 치료 물질로서 용도에 이용될 수 있다.

[0123] 자연 안티센스 서열의 표적화는 바람직하게는, 표적 유전자, 예를 들면, 프락틴 (FXN) 유전자 (가령, 수탁번호 NM\_181425)의 기능을 조정한다. 한 구체예에서, 표적은 프락틴 (FXN) 유전자의 안티센스 폴리뉴클레오타이드이다. 한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 프락틴 (FXN) 폴리뉴클레오타이드의 센스 및/또는 자연 안티센스 서열 (가령, 수탁번호 NM\_181425), 변이체, 대립유전자, 동종형, 동족체, 돌연변이체, 유도체, 단편 및 이들의 상보성 서열을 표적으로 한다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 분자이고, 그리고 표적은 안티센스 및/또는 센스 프락틴 (FXN) 폴리뉴클레오타이드의 코딩 및 비-코딩 영역을 포함한다.

[0124] 본 발명의 바람직한 표적 분절은 본 발명의 개별 상보성 안티센스 화합물과 복합되어 안정화된 이중-가닥 (duplexed) 올리고뉴클레오타이드를 형성할 수도 있다.

[0125] 이와 같은 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 모이어티는 당분야에서 표적 발현을 조정하고, 그리고 안티센스 기전을 통하여 번역뿐만 아니라 RNA 가공을 조절하는 것으로 알려져 있다. 게다가, 이들 이중-가닥 모이어티는 화학적 변형을 받을 수도 있다. 가령, 이와 같은 이중-가닥 모이어티는 표적에 대한 이중나선의 안티센스 가닥의 고



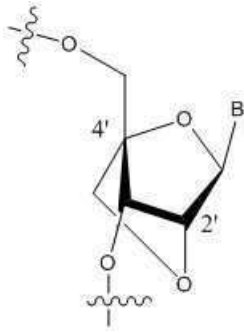
전적인 혼성화에 의해 표적을 저해하여, 표적의 효소적 분해를 촉발시키는 것으로 밝혀졌다.

- [0126] 한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 프라탁신 (FXN) 폴리뉴클레오타이드 (가령, 수탁번호 NM\_181425), 변이체, 대립유전자, 동종형, 동족체, 돌연변이체, 유도체, 단편 및 이들의 상보성 서열을 표적으로 한다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 분자이다.
- [0127] 본 발명의 구체예에 따르면, 표적 핵산 분자는 프라탁신 (FXN)에만 국한되지 않으며, 프라탁신 (FXN) 분자의 임의의 동종형, 수용체, 동족체 등까지 확장된다.
- [0128] 한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 프라탁신 (FXN) 폴리뉴클레오타이드의 자연 안티센스 서열, 예를 들면, 서열 번호: 2로서 진술된 폴리뉴클레오타이드 및 임의의 변이체, 대립유전자, 동족체, 돌연변이체, 유도체, 단편 및 이들의 상보성 서열을 표적으로 한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 실례는 서열 번호: 3 내지 6으로서 진술된다.
- [0129] 한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 제한 없이, 프라탁신 (FXN) 폴리뉴클레오타이드와 연합된 비-코딩 센스 및/또는 안티센스 서열이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 프라탁신 (FXN) 안티센스의 핵산 서열에 상보성이거나 또는 이들에 결합하고, 그리고 프라탁신 (FXN) 분자의 발현 및/또는 기능을 조정한다.
- [0130] 한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호: 2로서 진술된 프라탁신 (FXN) 자연 안티센스의 핵산 서열에 상보성이거나 또는 이들에 결합하고, 그리고 프라탁신 (FXN) 분자의 발현 및/또는 기능을 조정한다.
- [0131] 한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호: 3 내지 6의 최소한 5개의 연속 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 프라탁신 (FXN) 분자의 발현 및/또는 기능을 조정한다.
- [0132] 폴리뉴클레오타이드 표적은 프라탁신 (FXN)의 집단 구성원, 프라탁신 (FXN)의 변이체; SNP를 비롯한 프라탁신 (FXN)의 돌연변이체; 프라탁신 (FXN)의 비-코딩 서열; 프라탁신 (FXN)의 대립유전자; 중 변이체, 단편 등을 비롯한 프라탁신 (FXN)를 포함한다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 분자이다.
- [0133] 한 구체예에서, 프라탁신 (FXN) 폴리뉴클레오타이드를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 RNA, 간섭 RNA (RNAi), 짧은 간섭 RNA (siRNA); 마이크로 간섭 RNA (miRNA); 작은, 일시적 RNA (stRNA); 또는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA); 작은 RNA-유도된 유전자 활성화 (RNAa); 또는 작은 활성화 RNA (saRNA)를 포함한다.
- [0134] 한 구체예에서, 프라탁신 (FXN) 자연 안티센스 전사체, 예를 들면, 서열 번호: 2 및/또는 프라탁신 (FXN)의 다른 자연 안티센스 전사체의 표적화는 이들 표적에 결합하고 이들의 발현 또는 기능을 조정하는 올리고뉴클레오타이드를 투여함으로써 달성된다. 한 구체예에서, 발현 또는 기능은 대조와 비교하여 상향 조절된다. 다른 구체예에서, 발현 또는 기능은 대조와 비교하여 하향 조절된다.
- [0135] 한 구체예에서, 안티센스 화합물은 서열 번호: 3 내지 6으로서 진술된 서열을 포함한다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드, 더욱 짧은 또는 더욱 긴 단편, 변형된 결합 등을 포함할 수 있다.
- [0136] 한 구체예에서, 서열 번호: 3 내지 6은 하나 이상의 LNA 뉴클레오타이드를 포함한다. 표 2에서는 본 발명의 방법에 유용한 대표적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 도시한다.

표 2

서열 번호	안티센스 서열 명칭	서열
서열 번호:3	CUR-0732	G*C*T*C*C*A*A*G*T*T*C*T*C*C*T*G*T*T
서열 번호:4	CUR-0733	C*G*G*A*G*C*A*G*C*A*T*G*T*G*G*A*C*T*C*T
서열 번호:5	CUR-0734	G*G*A*G*C*A*G*C*A*T*G*T*G*G*A*C*T*C*T
서열 번호:6	CUR-0735	G*T*C*T*A*A*C*C*T*C*T*A*G*C*T*G*C*T*C*C

- [0138] \*는 포스포티오에이트 결합을 지시한다. +는 지정된 리보핵산의 리보오스 부분 상에서 2'-0-4'-메틸렌 연쇄를 갖는 LNA를 지시한다. 불명료함을 피하기 위해, 상기 LNA는 하기 화학식을 갖는다:



[0139]

[0140]

여기서 B는 특정한 지정된 염기이다.

[0141]

원하는 표적 핵산, 예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA 등의 조정은 당분야에 공지된 몇 가지 방식으로 실행될 수 있다. 효소적 핵산 분자 (가령, 리보자임)는 뉴클레오타이드 염기 서열-특이적 방식으로 다른 별도의 핵산 분자를 반복적으로 절단하는 능력을 비롯하여, 다양한 반응 중에서 하나 이상을 촉매할 수 있는 핵산 분자이다. 이러한 효소적 핵산 분자는 예로써, 실질적으로 임의의 RNA 전사체를 표적으로 하는데 이용될 수 있다.

[0142]

서열-특이성 때문에, trans-절단 효소적 핵산 분자는 인간 질환에 대한 치료 물질로서 가능성을 보여준다. 효소적 핵산 분자는 세포성 RNA의 배경 내에 특이적 RNA 표적을 절단하도록 설계될 수 있다. 이러한 절단 이벤트는 mRNA를 비-기능성으로 만들고, 상기 RNA로부터 단백질 발현을 폐기시킨다. 이러한 방식에서, 질환 상태와 연관된 단백질의 합성이 선택적으로 억제될 수 있다.

[0143]

일반적으로, RNA 절단 활성을 가진 효소적 핵산은 먼저, 표적 RNA에 결합함으로써 작용한다. 이와 같은 결합은 표적 RNA를 절단하는 작용을 하는 분자의 효소적 부분에 근접하게 유지되는 효소적 핵산의 표적 결합 부분을 통하여 일어난다. 따라서 효소적 핵산은 먼저 표적 RNA를 인지하고, 그 다음 상보성 염기 대합을 통하여 표적 RNA에 결합하고, 그리고 정확한 부위에 일단 결합되면, 효소적으로 작용하여 표적 RNA를 절단한다. 이러한 표적 RNA의 전략적 절단은 인코딩된 단백질의 합성을 지시하는 능력을 파괴시킬 것이다. 효소적 핵산은 RNA 표적에 결합하여 이를 절단시킨 후, 다른 표적을 찾기 위하여 RNA로부터 방출되고, 그리고 새로운 표적에 반복적으로 결합하여 이들을 절단할 수 있다.

[0144]

시험관내 선별 (진진) 전략과 같은 여러 전략 (Orgel, (1979) Proc. R. Soc. London, B 205, 435)이 포스포디에스테르 연쇄와 아마이드 연쇄의 절단 및 결합과 같은 다양한 반응을 촉매할 수 있는 새로운 핵산 촉매를 개발하는데 이용되고 있다.

[0145]

촉매 활성에 최적인 리보자임의 개발은 유전자 발현을 조절하기 위한 목적으로 RNA-절단 리보자임을 이용하는 임의의 전략에 상당히 기여할 것이다. 가령, 해머머리 (hammerhead) 리보자임은  $Mg^{2+}$  보조인자의 포화 농도 (10mM)의 존재에서 대략  $1min^{-1}$ 의 촉매 속도( $k_{cat}$ )로 기능한다. 인공 "RNA 리가아제" 리보자임은 대략  $100 min^{-1}$ 의 속도로 상응하는 자가-변형 반응을 촉매하는 것으로 나타났다. 또한, DNA로 구성된 기질 결합 팔(arm)을 가지고 있는 일정한 변형된 해머머리 리보자임은  $100 min^{-1}$ 에 근접하는 다중 턴-오버 속도로 RNA 절단을 촉매한다. 최종적으로, 일정한 뉴클레오타이드 유사체로 해머머리의 촉매 코어 내에 특이적 잔기의 대체는 촉매 속도에서 많게는 10배 향상을 보이는 변형된 리보자임을 제공한다. 이들 발견은 리보자임이 대부분의 자연 자가-절단 리보자임에 의해 시험관내에서 나타나는 것보다 훨씬 큰 촉매 속도로 화학적 변형을 촉진할 수 있다는 것을 설명한다. 그 다음, 최대 촉매 활성을 제공하기 위하여 일정한 자가-절단 리보자임의 구조를 최적화하거나, 또는 RNA 포스포디에스테르 절단에 대해 훨씬 빠른 속도를 보여주는 완전히 새로운 RNA 모티프를 만드는 것이 가능하다.

[0146]

"해머머리" 모델에 적합한 RNA 촉매에 의한 RNA 기질의 분자내 절단은 1987년에 처음 밝혀졌다. RNA 촉매가 회수되고 다중 RNA 분자와 반응되었는데, 이는 상기 촉매가 진정한 촉매성임을 증명하였다.

[0147]

"해머머리" 모티프에 기초하여 설계된 촉매 RNA는 표적 서열과의 필수적인 염기 대합을 유지하기 위하여 촉매 RNA 내에 적절한 염기 변화를 만듦으로써 특이적 표적 서열을 절단하는데 이용되고 있다. 이것은 특이적 표적 서열을 절단하기 위하여 촉매 RNA의 사용을 가능하게 하고, 그리고 "해머머리" 모델에 따라 설계된 촉매 RNA가

생체내에서 특이적 기질 RNA를 절단하는 것이 가능하다는 것을 나타낸다.

- [0148] RNA 간섭 (RNAi)은 포유류 및 포유류 세포에서 유전자 발현을 조정하는 강력한 도구가 되고 있다. 이와 같은 방식은 발현 플라스미드 또는 바이러스, 그리고 siRNA로 가공되는 작은 헤어핀 RNA에 대한 코딩 서열을 이용하여 RNA 자체로 또는 DNA로서 작은 간섭 RNA (siRNA) 운반을 요구한다. 이 시스템은 pre-siRNA를 세포질로 효과적으로 운반할 수 있는데, 세포질에서 이들 RNA는 활동적이고 유전자 발현을 위한 조절된 조직 특이적인 프로모터의 사용을 허용한다.
- [0149] 한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 화합물은 리보핵산 (RNA) 및/또는 데옥시리보핵산 (DNA)의 올리고머 또는 폴리머, 또는 이의 모방체, 키메라, 유사체 또는 동족체를 포함한다. 상기 용어는 자연 발생 뉴클레오타이드, 당 및 공유적 뉴클레오시드간 (골격) 연쇄로 구성된 올리고뉴클레오타이드 뿐만 아니라 유사하게 기능하는 비-자연 발생 부분을 보유하는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 이와 같은 변형된 또는 치환된 올리고뉴클레오타이드는 예로써, 증강된 세포 취입, 표적 핵산에 대한 증강된 친화력 및 뉴클레아제의 존재에서 증가된 안정성과 같은 바람직한 성질로 인하여, 고유 형태 비하여 종종 요망된다.
- [0150] 본 발명에 따르면, 올리고뉴클레오타이드 또는 "안티센스 화합물"에는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (가령 RNA, DNA, 이의 모방체, 키메라, 유사체 또는 동족체), 리보자임, 외부 가이드 서열 (EGS) 올리고뉴클레오타이드, siRNA 화합물, 단일- 또는 이중-가닥 RNA 간섭 (RNAi) 화합물, 예를 들면, siRNA 화합물, saRNA, aRNA, 그리고 표적 핵산의 최소한 일부분에 혼성화되어 이의 기능을 조정하는 기타 올리고머 화합물이 포함된다. 따라서 이들은 DNA, RNA, DNA-유사, RNA-유사, 또는 이들의 혼합물이거나, 또는 이들 중에서 하나 이상의 모방체일 수 있다. 이들 화합물은 단일-가닥, 이중-가닥, 원형 또는 헤어핀 올리고머 화합물일 수 있고, 그리고 내부 또는 말단 중배 (bulge), 미스매치 또는 루프와 같은 구조적 요소를 포함할 수 있다. 안티센스 화합물은 일과적으로 선형으로 제조되지만, 결합되거나, 또는 원형 및/또는 분지형으로 제조될 수 있다. 안티센스 화합물은 혼성화되면 전체적으로 또는 부분적으로 이중-가닥 화합물을 형성하는 2개의 가닥, 또는 혼성화 및 전체적으로 또는 부분적으로 이중-가닥 화합물의 형성을 가능하게 할 만큼 충분한 자가-상보성을 갖는 단일 가닥과 같은 구조체를 포함할 수 있다. 2개 가닥은 내부에서 연결되어 3' 또는 5' 말단이 자유로운 상태로 남아 있거나, 또는 연결되어 연속적인 헤어핀 구조 또는 루프를 형성할 수 있다. 헤어핀 구조는 단일 가닥 특성의 연장부를 발생시키는 5' 또는 3' 말단 상에 오버행(overhang)을 포함할 수 있다. 이중 가닥 화합물은 선택적으로 이들 말단에 오버행(overhang)을 포함할 수 있다. 추가 변형에는 말단 중의 한쪽, 선택된 뉴클레오타이드 위치, 당 위치, 또는 뉴클레오타이드간 연쇄 중의 하나에 부착된 접합체 (conjugate) 군을 포함할 수 있다. 대안으로, 2개 가닥은 비-핵산 모이어티 또는 링커 기를 통하여 연결될 수 있다. 한 개 가닥으로부터만 형성될 때, dsRNA는 이중나선을 형성하기 위하여 자체적으로 둘로 접히는 자가-상보성 헤어핀 유형 분자의 형태를 취할 수 있다. 따라서 이들 dsRNA는 완전히 또는 부분적으로 이중 가닥이 될 수 있다. 유전자 발현의 특이적 조정은 유전자도입 세포주에서 dsRNA 헤어핀의 안정된 발현에 의해 달성될 수 있다. 2개 가닥, 또는 이중나선을 형성하기 위하여 자체적으로 둘로 접히는 자가-상보성 헤어핀 유형 분자의 형태를 취하는 단일 가닥으로부터 형성될 때, 이들 2개 가닥 (또는 단일 가닥의 이중나선 형성 영역)은 Watson-Crick 방식으로 염기쌍을 이루는 상보성 RNA 가닥이다.
- [0151] 일단 시스템내로 도입되면, 본 발명의 화합물은 표적 핵산의 절단 또는 다른 변형을 달성하기 위하여 하나 이상의 효소 또는 구조적 단백질의 작용을 유도하거나, 또는 점유-기반 기전 (occupancy-based mechanisms)을 통하여 작용할 수 있다. 일반적으로, 핵산 (올리고뉴클레오타이드 포함)은 "DNA-유사" (즉, 일반적으로, 하나 이상의 2'-데옥시 당, 그리고 U 염기 대신 T를 보유함) 또는 "RNA-유사" (즉, 일반적으로, 하나 이상의 2'-히드록실 또는 2'-변형된 당, 그리고 T 염기 대신 U 염기를 보유함)로 기술될 수 있다. 핵산 나선은 한 가지 이상의 구조 유형을 채택할 수 있지만, 가장 일반적으로 A- 및 B-형이다. 일반적으로, B-형-유사 구조를 가지는 올리고뉴클레오타이드는 "DNA-유사"이며, 그리고 A-형-유사 구조를 가지는 올리고뉴클레오타이드는 "RNA-유사"이다. 일부 (키메라) 구체예에서, 안티센스 화합물은 A- 및 B-형 영역을 모두 포함할 수 있다.
- [0152] 본 발명에 따른 안티센스 화합물은 길이가 대략 5개 내지 대략 80개 뉴클레오타이드 (즉, 대략 5개 내지 대략 80개의 연결된 뉴클레오시드)의 안티센스 부분을 포함할 수 있다. 이는 안티센스 화합물의 안티센스 가닥 또는 부분의 길이를 지칭한다. 환언하면, 본 발명의 단일-가닥 안티센스 화합물은 5개 내지 대략 80개 뉴클레오타이드를 포함하고, 그리고 본 발명의 이중-가닥 안티센스 화합물 (가령, dsRNA)은 길이가 5개 내지 대략 80개 뉴클레오타이드인 센스 및 안티센스 가닥 또는 부분을 포함한다. 이것은 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 40개, 41개, 42개, 43개, 44개, 45개, 46개, 47개, 48개, 49개, 50개, 51개, 52개, 53개, 54개, 55개, 56개, 57개, 58개, 59개, 60개, 61개, 62개, 63개, 64

개, 65개, 66개, 67개, 68개, 69개, 70개, 71개, 72개, 73개, 74개, 75개, 76개, 77개, 78개, 79개, 또는 80개 뉴클레오타이드 길이, 또는 그 내에 임의의 범위의 안티센스 부분을 포함한다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0153] 한 구체예에서, 본 발명의 안티센스 화합물은 10개 내지 50개 뉴클레오타이드 길이의 안티센스 부분을 보유한다. 이것은 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 40개, 41개, 42개, 43개, 44개, 45개, 46개, 47개, 48개, 49개, 또는 50개 뉴클레오타이드 길이, 또는 그 내에 임의의 범위의 안티센스 부분을 보유하는 올리고뉴클레오타이드를 구현한다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0154] 한 구체예에서, 본 발명의 안티센스 또는 올리고뉴클레오타이드 화합물은 12개 또는 13개 내지 30개 뉴클레오타이드 길이의 안티센스 부분을 보유한다. 이것은 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 또는 30개 뉴클레오타이드 길이, 또는 그 내에 임의의 범위의 안티센스 부분을 보유하는 안티센스 화합물을 구현한다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0155] 한 구체예에서, 본 발명의 올리고머 화합물은 화합물 내에 하나 이상의 뉴클레오타이드 위치에 상이한 염기가 존재하는 변이체를 포함한다. 가령, 첫 번째 뉴클레오타이드가 아데노신이면, 이 위치에 티미딘, 구아노신 또는 시티딘을 포함하는 변이체가 만들어질 수 있다. 이것은 안티센스 또는 dsRNA 화합물의 임의의 위치에서 일어날 수 있다. 이들 화합물은 표적 핵산의 발현을 저해하는 능력을 측정하기 위하여 본 명세서에서 기술된 방법을 이용하여 조사된다.

[0156] 일부 구체예에서, 안티센스 화합물과 표적 사이에 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 대략 40% 내지 대략 60%이다. 일부 구체예에서, 안티센스 화합물과 표적 사이에 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 대략 60% 내지 대략 70%이다. 일부 구체예에서, 안티센스 화합물과 표적 사이에 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 대략 70% 내지 대략 80%이다. 일부 구체예에서, 안티센스 화합물과 표적 사이에 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 대략 80% 내지 대략 90%이다. 일부 구체예에서, 안티센스 화합물과 표적 사이에 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 대략 90%, 대략 92%, 대략 94%, 대략 95%, 대략 96%, 대략 97%, 대략 98%, 대략 99% 또는 대략 100%이다.

[0157] 한 구체예에서, 서열 번호: 3 내지 6에서 진술된 핵산 분자와 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 치환 또는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 뉴클레오타이드는 잠금 핵산 (LNA)으로 치환된다.

[0158] 한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 프락틴 (FXN) 및 서열 번호: 1과 2로서 진술된 서열과 연관된 코딩 및/또는 비-코딩 서열의 핵산 분자 센스 및/또는 안티센스의 하나 이상의 영역을 표적으로 한다. 올리고뉴클레오타이드는 또한, 서열 번호: 1과 2의 중복 영역을 표적으로 한다.

[0159] 본 발명의 일정한 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 키메라 올리고뉴클레오타이드이다. 본 발명의 맥락에서, "키메라 올리고뉴클레오타이드" 또는 "키메라"는 2개 이상의 화학적으로 별개의 영역을 포함하는 올리고뉴클레오타이드이며, 각 영역은 최소 한 개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 이와 같은 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로, 하나 이상의 유익한 성질 (가령, 증가된 뉴클레아제 내성, 세포내로의 증가된 취입, 표적에 대한 증가된 결합 친화성)을 부여하는 변형된 뉴클레오타이드의 최소한 하나의 영역 및 RNA:DNA 또는 RNA:RNA 하이브리드를 절단할 수 있는 효소에 대한 기질이 되는 영역을 포함한다. 가령, RNase H는 RNA:DNA 이중나선의 RNA 가닥을 절단하는 세포성 엔도뉴클레아제이다. 따라서 RNase H의 활성화는 RNA 표적의 절단을 유발하여, 유전자 발현의 안티센스 조정의 효과를 강화시킨다. 결과적으로, 동일한 표적 영역에 혼성화되는 포스포로티오에이트 테옥시올리고뉴클레오타이드와 비교하여, 키메라 올리고뉴클레오타이드가 사용될 때 더욱 짧은 올리고뉴클레오타이드로 필적하는 결과가 종종 획득될 수 있다. RNA 표적의 절단은 겔 전기영동에 의해, 그리고 필요하다면, 당분야에 공지된 연관된 핵산 혼성화 기술에 의해 일과적으로 검출될 수 있다. 한 구체예에서, 키메라 올리고뉴클레오타이드는 표적 결합 친화력을 증가시키도록 변형된 최소한 하나의 영역, 그리고 통상적으로, RNase H에 대한 기질로서 기능하는 영역을 포함한다. 표적 (본 발명의 경우에, ras를 인코딩하는 핵산)에 대한 올리고뉴클레오타이드 친화성은 올리고뉴클레오타이드/표적 쌍의 Tm을 측정함으로써 일과적으로 결정되는데, 이는 상기 올리고뉴클레오타이드와 표적이 해리되는 온도이다; 해리는 분광광도법으로 검출된다. Tm이 높을수록, 표적에 대한 올리고뉴클레오타이드의 친화성이 커진다.

[0160] 본 발명의 키메라 안티센스 화합물은 상기에서 설명된 것과 같이 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드, 변형된 올리고뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드 및/또는 올리고뉴클레오타이드 모방체의 혼성 구조로 형성될 수 있다. 이와 같은 화합물은 또한, 당분야에서 하이브리드 (hybrid) 또는 갭머 (gapmer)로 지칭된다. 이와 같은 하이브리드 구조의 제조에 대해 교시하는 대표적인 U.S. 특허에는 US 특허 제5,013,830호; 제5,149,797호; 제5,220,007호; 제5,256,775호; 제5,366,878호; 제5,403,711호; 제5,491,133호; 제5,565,350호; 제5,623,065호;



제5,652,355호; 제5,652,356호; 및 제5,700,922호가 포함되지만 이들에 국한되지 않고, 이들 각각은 참조로서 편입된다.

[0161] 한 구체예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드의 영역은 당의 2' 위치에서 변형된 최소한 하나의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 2'-O-알킬, 2'-O-알킬-O-알킬 또는 2'-플루오르-변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 구체예에서, RNA 변형은 피리미딘의 리보즈, 염기소실 잔기 (abasic residues) 또는 RNA의 3' 말단에서 역전된 염기 상에 2'-플루오르, 2'-아미노 및 2' O-메틸 변형을 포함한다. 이와 같은 변형은 올리고뉴클레오타이드에 일과적으로 통합되고, 그리고 이들 올리고뉴클레오타이드는 소정의 표적에 대해 2'-데옥시올리고뉴클레오타이드보다 높은 T<sub>m</sub> (즉, 더욱 높은 표적 결합 친화성)을 가지는 것으로 밝혀졌다. 이런 증가된 친화성의 효과는 유전자 발현의 RNAi 올리고뉴클레오타이드 저해를 상당히 증강시키는 것이다. RNAse H는 RNA:DNA 이중나선의 RNA 가닥을 절단하는 세포성 엔도뉴클레아제이다; 따라서 상기 효소의 활성화는 RNA 표적의 절단을 유발하여, RNAi 저해의 효과를 상당히 증강시킬 수 있다. RNA 표적의 절단은 겔 전기영동에 의해 일과적으로 증명될 수 있다. 한 구체예에서, 키메라 올리고뉴클레오타이드는 또한, 뉴클레아제 내성을 증강시키기 위하여 변형된다. 세포는 핵산을 분해시킬 수 있는 다양한 엑소- 및 엔도-뉴클레아제를 포함한다. 다수의 뉴클레오타이드 및 뉴클레오시드 변형은 그들이 통합된 올리고뉴클레오타이드가 고유한 올리고데옥시뉴클레오타이드보다 뉴클레아제 절단에 더욱 강한 내성을 갖도록 만드는 것으로 밝혀졌다. 뉴클레아제 내성은 올리고뉴클레오타이드를 세포 추출물 또는 분리된 뉴클레아제 용액과 함께 항온처리하고, 그리고 통상적으로 겔 전기영동에 의해 시간의 흐름 동안 남아있는 본래 올리고뉴클레오타이드의 수준을 측정함으로써 일과적으로 결정된다. 뉴클레아제 내성을 증강시키도록 변형된 올리고뉴클레오타이드는 변형되지 않은 올리고뉴클레오타이드보다 더욱 긴 시간 동안 본래 상태로 존재한다. 다양한 올리고뉴클레오타이드 변형이 뉴클레아제 내성을 증강시키거나 부여하는 것으로 증명되었다. 최소한 하나의 포스포로티오에이트 변형을 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 더욱 바람직하다. 일부 경우, 표적 결합 친화성이 증가된 올리고뉴클레오타이드 변형은 독립적으로 뉴클레아제 내성을 증강시킬 수 있다.

[0162] 본 발명에서 구상된 일부 바람직한 올리고뉴클레오타이드의 특정 실례에는 변형된 골격을 포함하는 것들, 예를 들면, 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 짧은 사슬 알킬 또는 사이클로알킬 당간 (intersugar) 연쇄 또는 짧은 사슬 헤테로원자 또는 헤테로환상 당간 연쇄가 포함된다. 가장 바람직한 것은 포스포로티오에이트 골격을 가진 올리고뉴클레오타이드 및 헤테로원자 골격, 특히, CH<sub>2</sub>--NH--O--CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--O--CH<sub>2</sub> [메틸렌(메틸이미노) 또는 MMI 골격으로 공지됨], CH<sub>2</sub>--O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub> 및 O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub> 골격을 가진 올리고뉴클레오타이드이고, 이때 고유 포스포디에스테르 골격은 O--P--O--CH로 표시된다. De Mesmaeker et al. (1995) Acc. Chem. Res. 28:366-374에서 설명된 아마이드 골격 역시 바람직하다. 모르폴리노 골격 구조를 가진 올리고뉴클레오타이드 역시 바람직하다 (Summerton and Weller, U.S. 특허 제 5,034,506호). 다른 구체예, 예를 들면, 펩티드 핵산 (PNA) 골격에서, 올리고뉴클레오타이드의 포스포디에스테르 골격은 폴리아미드 골격으로 대체되며, 뉴클레오타이드는 폴리아미드 골격의 아자 질소 원자에 직간접적으로 결합된다. 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 치환된 당 모이어티를 또한 포함할 수 있다. 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 2' 위치에 다음중 하나를 포함한다: OH, SH, SCH<sub>3</sub>, F, OCN, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub> O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> NH<sub>2</sub> 또는 O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, 이때 n은 1 내지 대략 10이다; C<sub>1</sub> 내지 C<sub>10</sub> 저급 알킬, 알콕시알콕시, 치환된 저급 알킬, 알크아릴 또는 아르알킬; Cl; Br; CN; CF<sub>3</sub>; OCF<sub>3</sub>; O--, S--, 또는 N-알킬; O--, S--, 또는 N-알케닐; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>; N<sub>3</sub>; NH<sub>2</sub>; 헤테로사이클로알킬; 헤테로사이클로알킬아릴; 아미노알킬아미노; 폴리알킬아미노; 치환된 실릴; RNA 절단기; 리포터 기; 삽입기 (intercalator); 올리고뉴클레오타이드의 약역학적 성질을 개선하는 기; 또는 올리고뉴클레오타이드 및 유사한 성질을 가진 다른 치환기의 약동학적 성질을 개선하는 기. 바람직한 변형은 2'-메톡시메톡시[2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, 또한 2'-O-(2-메톡시에틸)로 공지됨]을 포함한다. 다른 바람직한 변형은 2'-메톡시 (2'-O--CH<sub>3</sub>), 2'-프로폭시 (2'-OCH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 및 2'-플루오르 (2'-F)를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드 상에서 다른 위치, 특히 3' 말단 뉴클레오타이드 상에서 당의 3' 위치 및 5' 말단 뉴클레오타이드의 5' 위치에서 유사한 변형이 만들어 질 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 또한 펜토피라노실 기 대신에 사이클로부틸과 같은 당 모방체를 보유할 수 있다.

[0163] 올리고뉴클레오타이드는 또한 추가적으로 또는 대안으로, 핵염기 (당분야에서 종종 간단히 "염기"로 지칭됨) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 본 명세서에서, "변형되지 않은" 또는 "자연" 뉴클레오타이드는 아데닌 (A), 구아닌 (G), 티민 (T), 시토신 (C) 및 우라실 (U)을 포함한다. 변형된 뉴클레오타이드에는 자연 핵산에 드물게 또는 일시적으로 발견되는 뉴클레오타이드, 예를 들면, 하이포산틴, 6-메틸아데닌, 5-Me 피리미딘, 특히 5-메틸시토신 (또

한, 5-메틸-2' 데옥시시토신, 그리고 종종 당분야에서 5-Me-C로 지칭됨), 5-히드록시메틸시토신 (HMC), 글리코실 HMC 및 겐토바이오실 HMC, 그리고 합성 뉴클레오타이드, 예를 들면, 2-아미노아데닌, 2-(메틸아미노)아데닌, 2-(이미다졸일알킬)아데닌, 2-(아미노알킬아미노)아데닌 또는 다른 헤테로치환된 알킬아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-히드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N<sup>6</sup>(6-아미노헥실)아데닌 및 2,6-디아미노퓨린이 포함된다. 당분야에 공지된 "범용 (universal)" 염기, 예를 들면, 이노신이 포함될 수 있다. 5-Me-C 치환은 핵산 이중나선 안정성을 0.6-1.2°C 증가시키는 것으로 밝혀졌고, 그리고 현재 바람직한 염기 치환이다.

[0164] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 다른 변형은 올리고뉴클레오타이드의 활성 또는 세포 취입을 강화시키는 하나 이상의 모이어티 또는 접합체를 올리고뉴클레오타이드에 화학적으로 연결하는 것을 수반한다. 이러한 모이어티에는 지질 모이어티, 예를 들면, 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 알파 사슬, 예를 들면, 도데칸디올 또는 운데실 잔기, 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 또는 아다만탄 아세트산이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 친지성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드, 그리고 이와 같은 올리고뉴클레오타이드를 제조하는 방법은 당분야에서, 예를 들면, U.S. 특허 제5,138,045호, 제5,218,105호 및 제5,459,255호에서 공지되어 있다.

[0165] 소정의 올리고뉴클레오타이드 내에 모든 위치가 균일하게 변형될 필요는 없고, 그리고 실제로, 전술한 변형중 하나 이상이 단일 올리고뉴클레오타이드에 통합되거나, 또는 심지어 올리고뉴클레오타이드내 단일 뉴클레오타이드에 통합될 수 있다. 본 발명은 또한, 상기에서 정의된 바와 같은 키메라 올리고뉴클레오타이드인 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0166] 다른 구체예에서, 본 발명의 핵산 분자는 염기소실 (abasic) 뉴클레오타이드, 폴리에테르, 폴리아민, 폴리아미드, 펩티드, 탄수화물, 지질 또는 폴리하이드로카본 화합물이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 다른 모이어티와 결합된다. 이들 분자가 당, 염기 또는 인산염 기 상에서 여러 위치에서 핵산 분자를 포함하는 하나 이상의 임의의 뉴클레오타이드에 연결될 수 있다는 것을 당업자는 인지할 것이다.

[0167] 본 발명에 이용된 올리고뉴클레오타이드는 널리 공지된 고품상 합성 기술을 통하여 통상적으로 및 일괄적으로 만들어질 수 있다. 이와 같은 합성을 위한 장비는 Applied Biosystems를 비롯한 여러 업체에 의해 판매된다. 이와 같은 합성을 위하여 임의의 다른 수단 역시 이용될 수 있다; 올리고뉴클레오타이드의 실제 합성은 당업자의 능력 범위 내에 있다. 포스포로티오에이트 및 알킬화된 유도체와 같은 다른 올리고뉴클레오타이드를 제조하기 위하여 유사한 기술을 이용하는 것 역시 공지되어 있다. 형광 표지된, 바이오틴화된 또는 기타 변형된 올리고뉴클레오타이드, 예를 들면, 콜레스테롤-변형된 올리고뉴클레오타이드를 합성하기 위하여 유사한 기술 및 상업적으로 가용한 변형된 아미디트 (amidite) 및 조정된 포어 글라스 (CPG) 산물, 예를 들면, 바이오틴, 플루오레세인, 아크리딘 또는 프소랄렌 (psoralen)-변형된 아미디트 및/또는 CPG (Glen Research, Sterling VA)로부터 구입가능)을 이용하는 것 역시 공지되어 있다.

[0168] 본 발명에 따르면, 올리고뉴클레오타이드의 효능, 특이성 및 작용 기간을 증강시키고 투여 경로를 확장시키기 위한 LNA 단량체와 같은 변형의 이용은 MOE, ANA, FANA, PS 등과 같은 현재 화학물질로 구성되었다. 이것은 현재 올리고뉴클레오타이드에서 일부 단량체를 LNA 단량체로 치환함으로써 달성될 수 있다. LNA 변형된 올리고뉴클레오타이드는 부모 화합물과 유사한 크기를 갖거나, 또는 더욱 큰, 또는 바람직하게는 더욱 작은 크기를 가질 수 있다. 이와 같은 LNA-변형된 올리고뉴클레오타이드는 대략 70% 미만, 더욱 바람직하게는 대략 60% 미만, 가장 바람직하게는 대략 50% 미만의 LNA 단량체를 포함하고, 그리고 그들의 크기는 대략 5개 내지 25개 뉴클레오타이드, 더욱 바람직하게는 대략 12개 내지 20 개 뉴클레오타이드 사이이다.

[0169] 바람직한 변형된 올리고뉴클레오타이드 골격에는 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 메틸 및 3' 알킬렌 포스포네이트와 키랄 포스포네이트를 포함하는 기타 알킬 포스포네이트, 포스포네이트, 3'-아미노 포스포르아미데이트와 아미노알킬포스포르아미데이트를 포함하는 포스포르아미데이트, 티오노포스포르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 그리고 정상적인 3'-5' 연쇄를 가진 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결된 유사체, 그리고 역전된 극성을 가진 것들 (여기서, 뉴클레오타이드 단위의 인접 쌍은 3'-5'에서 5'-3'으로, 또는 2'-5'에서 5'-2'로 연결된다)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 다양한 염, 혼합된 염 및 유리 산 형태 역시 포함된다.

[0170] 상기 인-함유 연쇄의 제조를 교시하는 대표적인 U.S. 특허에는 US 특허 제3,687,808호; 제4,469,863호; 제4,476,301호; 제5,023,243호; 제5,177,196호; 제5,188,897호; 제5,264,423호; 제5,276,019호; 제5,278,302호; 제5,286,717호; 제5,321,131호; 제5,399,676호; 제5,405,939호; 제5,453,496호; 제5,455,233호;



제5,466,677호; 제5,476,925호; 제5,519,126호; 제5,536,821호; 제5,541,306호; 제5,550,111호; 제5,563,253호; 제5,571,799호; 제5,587,361호; 및 제5,625,050호가 포함되지만 이들에 국한되지 않고, 이들 각각은 참조로서 편입된다.

[0171] 인 원자를 포함하지 않는 바람직한 변형된 올리고뉴클레오타이드 골격은 짧은 사슬 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오시드간 연쇄, 혼성 헤테로원자 및 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오시드간 연쇄, 또는 하나 이상의 짧은 사슬 헤테로원자 또는 헤테로환상 뉴클레오시드간 연쇄에 의해 형성된 골격을 보유한다. 이들은 모르폴리노 연쇄 (뉴클레오시드의 당 부분으로부터 부분적으로 형성됨); 실록산 골격; 설파이드, 설파이드 및 설펜 골격; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 알켄 포함 골격; 설파메이트 골격; 메틸렌이미노 및 메틸렌히드라지노 골격; 설포네이트 및 설펜아미드 골격; 아미드 골격; 그리고 N, O, S 및 CH<sub>2</sub> 성분 부분이 혼합된 것을 보유하는 것들을 포함한다.

[0172] 상기 올리고뉴클레오시드의 제조를 교시하는 대표적인 U.S. 특허에는 U.S. 특허 제5,034,506호; 제5,166,315호; 제5,185,444호; 제5,214,134호; 제5,216,141호; 제5,235,033호; 제5,264,562호; 제5,264,564호; 제5,405,938호; 제5,434,257호; 제5,466,677호; 제5,470,967호; 제5,489,677호; 제5,541,307호; 제5,561,225호; 제5,596,086호; 제5,602,240호; 제5,610,289호; 제5,602,240호; 제5,608,046호; 제5,610,289호; 제5,618,704호; 제5,623,070호; 제5,663,312호; 제5,633,360호; 제5,677,437호; 및 제5,677,439호가 포함되지만 이들에 국한되지 않고, 이들 각각은 참조로서 편입된다.

[0173] 기타 바람직한 올리고뉴클레오타이드 모방체에서, 당 및 뉴클레오시드간 연쇄, 다시 말하면, 뉴클레오타이드 단위의 골격은 신규한 기로 대체된다. 염기 단위는 적합한 핵산 표적 화합물과의 혼성화를 위해 유지된다. 이와 같은 올리고머 화합물중 하나인, 우수한 혼성화 성질을 가진 것으로 확인된 올리고뉴클레오타이드 모방체는 펩티드 핵산 (PNA)으로 지칭된다. PNA 화합물에서, 올리고뉴클레오타이드의 당-골격은 아미드 포함 골격, 특히 아미도에틸 글리신 골격으로 치환된다. 핵염기는 보유되며, 골격의 아미드 부분의 아자 질소 원자에 직간접적으로 결합된다. PNA 화합물의 제조를 교시하는 대표적인 U.S. 특허에는 US 특허 제5,539,082호; 제5,714,331호; 및 제5,719,262호가 포함되지만 이들에 국한되지 않고, 이들 각각은 참조로서 편입된다. PNA 화합물의 추가 교시는 *Nielsen et al., (1991) Science, 254, 1497-1500*에서 찾아볼 수 있다.

[0174] 본 발명의 한 구체예에서, 포스포로티오에이트 골격을 가진 올리고뉴클레오타이드, 그리고 헤테로원자 골격, 특히, CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>- (메틸렌(메틸이미노) 또는 MMI 골격으로 공지됨), -CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>) CH<sub>2</sub>- 및 -O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-를 가진 올리고뉴클레오타이드이고, 이때 고유 포스포디에스테르 골격은 상기 언급된 US 특허 제5,489,677호의 -O-P-O-CH<sub>2</sub>-, 그리고 상기 언급된 US 특허 제5,602,240호의 아미드 골격으로서 표시된다. 또한, 상기 언급된 US 특허 제5,034,506호의 모르폴리노 골격 구조를 가진 올리고뉴클레오타이드가 바람직하다.

[0175] 변형된 올리고뉴클레오타이드는 또한, 하나 이상의 치환된 당 모이어티를 포함할 수 있다. 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 2' 위치에 다음중 하나를 포함한다: OH; F; O-, S-, 또는 N-알킬; O-, S-, 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알키닐; 또는 O 알킬-O-알킬, 이때, 알킬, 알케닐 및 알키닐은 치환되거나 치환되지 않은 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>10</sub> 알킬 또는 C<sub>2</sub> 내지 C<sub>10</sub> 알케닐 및 알키닐이다. 특히 바람직한 것은 O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, 그리고 O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>이며, 이때 n과 m은 1 내지 대략 10일 수 있다. 다른 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 2' 위치에 다음중 하나를 포함한다: C 내지 CO, (저급 알킬, 치환된 저급 알킬, 알크아릴, 아르알킬, O-알크아릴 또는 O-아르알킬, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알크아릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실릴, RNA 절단기, 리포터 기, 삽입기 (intercalator), 올리고뉴클레오타이드의 약역학적 성질을 개선하는 기, 또는 올리고뉴클레오타이드의 약동학적 성질을 개선하는 기, 그리고 유사한 성질을 가진 다른 치환기. 바람직한 변형은 2'-메톡시에톡시 (2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, 또한 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로 공지됨), 다시 말하면, 알콕시알콕시 기를 포함한다. 다른 바람직한 변형은 하기 실시예에서 설명된 바와 같은 2'-디메틸아미노옥시에톡시, 다시 말하면, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 기, 일명 2'-DMAOE, 그리고 2'-디메틸아미노에톡시에톡시 (당분야에서 2'-O-디메틸아미노에톡시에틸 또는 2'-DMAEOE), 다시 말하면, 2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>을 포함한다.

[0176] 다른 바람직한 변형은 2'-메톡시(2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-아미노프로폭시(2'-O CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) 및 2'-플루오르 (2'-F)을 포

함한다. 또한, 올리고뉴클레오타이드 상에서 다른 위치, 특히 3' 말단 뉴클레오타이드 상에서 또는 2'-5' 연결된 올리고뉴클레오타이드에서 당의 3' 위치, 그리고 5' 말단 뉴클레오타이드의 5' 위치에서 유사한 변형이 만들어질 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 또한 펜토푸라노실 당 대신에 사이클로부틸 모이어티와 같은 당 모방체를 보유할 수 있다. 이와 같은 변형된 당 구조의 제조를 교시하는 대표적인 U.S. 특허에는 US 특허 제4,981,957호; 제5,118,800호; 제5,319,080호; 제5,359,044호; 제5,393,878호; 제5,446,137호; 제5,466,786호; 제5,514,785호; 제5,519,134호; 제5,567,811호; 제5,576,427호; 제5,591,722호; 제5,597,909호; 제5,610,300호; 제5,627,053호; 제5,639,873호; 제5,646,265호; 제5,658,873호; 제5,670,633호; 및 제5,700,920호가 포함되지만 이들에 국한되지 않고, 이들 각각은 참조로서 편입된다.

[0177] 올리고뉴클레오타이드는 또한 핵염기 (당분야에서 종종 간단히 "염기"로 지칭됨) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 본 명세서에서, "변형되지 않은" 또는 "자연" 뉴클레오타이드는 퓨린 염기 아데닌 (A) 및 구아닌 (G), 그리고 피리미딘 염기 티민 (T), 시토신 (C) 및 우라실 (U)을 포함한다. 변형된 뉴클레오타이드에는 다른 합성 및 자연 뉴클레오타이드, 예를 들면, 5-메틸시토신 (5-me-C), 5-히드록시메틸 시토신, 산틴, 하이포산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌과 구아닌의 6-메틸 및 다른 알킬 유도체, 아데닌과 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로필 우라실 및 시토신, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실 (슈도-우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-히드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오르메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-테아자구아닌 및 7-테아자아데닌, 그리고 3-테아자구아닌 및 3-테아자아데닌이 포함된다.

[0178] 또한, 뉴클레오타이드에는 U.S. 특허 No. 3,687,808호, 'The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering', pages 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, Englisch et al., 'Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, page 613, 그리고 Sanghvi, Y.S., Chapter 15, 'Antisense Research and Applications', pages 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993에서 설명된 것들이 포함된다. 이와 같은 일정한 뉴클레오타이드는 본 발명의 올리고머 화합물의 결합 친화성을 증가시키는데 특히 유용하다. 이들에는 2-아미노프로필아데닌, 5-프로필우라실 및 5-프로필닐시토신을 포함하는 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6과 O-6 치환된 퓨린이 포함된다. 5-메틸시토신 치환은 핵산 이중나선 안정도를 0.6-1.2°C 증가시키는 것으로 밝혀졌고 (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds, 'Antisense Research and Applications', CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278), 그리고 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 복합될 때 특히 바람직한 염기 치환이다.

[0179] 상기 변형된 뉴클레오타이드 및 기타 변형된 뉴클레오타이드의 제조를 교시하는 대표적인 U.S. 특허에는 US 특허 제3,687,808호, 제4,845,205호; 제5,130,302호; 제5,134,066호; 제5,175,273호; 제5,367,066호; 제5,432,272호; 제5,457,187호; 제5,459,255호; 제5,484,908호; 제5,502,177호; 제5,525,711호; 제5,552,540호; 제5,587,469호; 제5,596,091호; 제5,614,617호; 제5,750,692호, 및 제5,681,941호가 포함되지만 이들에 국한되지 않고, 이들 각각은 참조로서 편입된다.

[0180] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 기타 변형은 하나 이상의 모이어티 또는 접합체를 올리고뉴클레오타이드에 화학적으로 연결하는 것을 수반하는데, 이는 올리고뉴클레오타이드의 활성, 세포 분포 또는 세포 취입을 증가시킨다.

[0181] 이와 같은 모이어티에는 지질 모이어티, 예를 들면, 콜레스테롤 모이어티, 담즙산, 티오에테르, 예를 들면, 헥실-S-트리틸을, 티오콜레스테롤, 지방족 사슬, 예를 들면, 도데칸디올 또는 운데실 잔기, 인지질, 예를 들면, 디-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸암모늄 1,2-디-O-헥사데실-rac-글리세로-3-H-포스포네이트, 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 또는 아다만탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 또는 옥타데실아민 또는 헥실아미노-카르보닐-t 옥시콜레스테롤 모이어티가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0182] 이와 같은 올리고뉴클레오타이드 접합체의 제조를 교시하는 대표적인 U.S. 특허에는 US 특허 제4,828,979호; 제4,948,882호; 제5,218,105호; 제5,525,465호; 제5,541,313호; 제5,545,730호; 제5,552,538호; 제5,578,717호, 제5,580,731호; 제5,580,731호; 제5,591,584호; 제5,109,124호; 제5,118,802호; 제5,138,045호; 제5,414,077호; 제5,486,603호; 제5,512,439호; 제5,578,718호; 제5,608,046호; 제4,587,044호; 제4,605,735호; 제4,667,025호; 제4,762,779호; 제4,789,737호; 제4,824,941호; 제4,835,263호; 제4,876,335호; 제4,904,582호; 제4,958,013호; 제5,082,830호; 제5,112,963호; 제5,214,136호; 제5,082,830호; 제5,112,963호; 제5,214,136호; 제5,245,022호; 제5,254,469호; 제5,258,506호; 제5,262,536호; 제5,272,250호; 제5,292,873호; 제5,317,098호; 제5,371,241호; 제5,391,723호;

제5,416,203호; 제5,451,463호; 제5,510,475호; 제5,512,667호; 제5,514,785호; 제5,565,552호; 제5,567,810호; 제5,574,142호; 제5,585,481호; 제5,587,371호; 제5,595,726호; 제5,597,696호; 제5,599,923호; 제5,599,928호 및 제5,688,941호가 포함되지만 이들에 국한되지 않고, 이들 각각은 참조로서 편입된다.

[0183] **약물 발견:** 본 발명의 화합물은 약물 발견 및 표적 검증 분야에도 적용될 수 있다. 본 발명은 프라탁신 (FXN) 폴리뉴클레오티드 및 질환 상태, 표현형 또는 장애 사이에 존재하는 상관관계를 식명하기 위한 약물 발견 노력에서, 본 발명에서 확인된 화합물 및 바람직한 표적 분질의 이용을 포함한다. 이들 방법은 프라탁신 (FXN) 폴리뉴클레오티드를 검출 또는 조정하는 것을 포함하며, 샘플, 조직, 세포 또는 생명체를 본 발명의 화합물과 접촉시키는 단계, 프라탁신 (FXN) 폴리뉴클레오티드의 핵산 또는 단백질 수준 및/또는 처리후 일정 시점에 관련된 표현형 또는 화학적 종점을 측정하는 단계, 그리고 선택적으로, 측정된 값을 처리되지 않은 샘플 또는 본 발명의 다른 화합물로 처리된 샘플에 비교하는 단계를 포함한다. 이들 방법은 표적 검증 과정을 위한 미지의 유전자 산물의 효능을 결정하기 위하여, 또는 특정 질환, 상태 또는 표현형의 치료 또는 예방을 위한 표적으로서 특정 유전자 산물의 효능을 결정하기 위하여 다른 실험과 병렬과 또는 공동으로 실행될 수 있다.

[0184]

[0185] **유전자 발현의 상황 조절 또는 저해의 평가:**

[0186] 외인성 핵산의 숙주 세포 또는 생명체 내로의 전달은 세포 또는 생명체내 핵산이 존재하는 것을 직접적으로 검출함으로써 평가될 수 있다. 이와 같은 검출은 당분야에 공지된 여러 방법에 의해 달성될 수 있다. 가령, 외인성 핵산의 존재는 서든 블롯에 의해, 또는 핵산과 연관된 뉴클레오티드 서열을 특이적으로 증폭시키는 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술에 의해 검출될 수 있다. 외인성 핵산의 발현은 유전자 발현 분석을 비롯한 통상적인 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 가령, 외인성 핵산으로부터 생성된 mRNA는 노던 블롯 및 역전사 PCR (RT-PCR)을 이용하여 검출되고 정량화될 수 있다.

[0187] 외인성 핵산으로부터의 RNA 발현 역시 효소적 활성 또는 리포터 단백질 활성을 측정함으로써 검출될 수 있다. 가령, 안티센스 조정 활성은 외인성 핵산이 효소물질 RNA를 생산하고 있다는 표시로서 표적 핵산 발현에서 증가 또는 감소로서 간접적으로 측정될 수 있다. 서열 보존에 근거하여, 프라이머가 설계되고 표적 유전자의 코딩 영역을 증폭하는데 이용될 수 있다. 초기에, 각 유전자로부터 가장 많이 발현된 코딩 영역은 비록 임의의 코딩 또는 비-코딩 영역이 이용될 수 있긴 하지만, 모델 기준 유전자를 구축하는데 이용될 수 있다. 각 기준 유전자는 리포터 코딩 영역 및 이의 폴리(A) 신호 사이에 각 코딩 영역을 삽입함으로써 어셈블리된다. 이와 같은 플라스미드는 유전자의 상류 부분에 리포터 유전자, 그리고 3' 비-코딩 영역에 잠재적인 RNAi 표적을 보유하는 mRNA를 생산할 것이다. 개별 안티센스 올리고뉴클레오티드의 효능은 리포터 유전자를 조정함으로써 평가될 것이다. 본 발명의 방법에 유용한 리포터 유전자에는 아세토히드록시산 합성효소 (AHAS), 알칼리 포스파타제 (AP), 베타 갈락토시다아제 (LacZ), 베타 글루코로니다제 (GUS), 클로람페니콜 아세틸전이효소 (CAT), 녹색 형광 단백질 (GFP), 적색 형광 단백질 (RFP), 황색 형광 단백질 (YFP), 청록색 형광 단백질 (CFP), 양고추냉이 과산화효소 (HRP), 루시페라제 (Luc), 노팔린 합성효소 (NOS), 옥토파인 합성효소 (OCS), 그리고 이들의 유도체가 포함된다. 암피실린, 블레오마이신, 클로람페니콜, 젠타마이신, 하이그로마이신, 카나마이신, 린코마이신, 메토틱세이트, 포스포노트리친, 퓨로마이신 및 테트라사이클린에 내성을 부여하는 다중 선택성 마커가 이용된다. 리포터 유전자의 조정을 결정하는 방법은 당분야에 공지되어 있으며, 이들 방법에는 형광 측정법 (가령, 형광 분광학, 형광 활성화된 세포 분류 (FACS), 형광 현미경), 항생제 내성 결정이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0188] FXN 단백질 및 mRNA 발현은 당업자에게 공지되고 본 명세서에서 설명된 방법을 이용하여 평가될 수 있다. 가령, 면역분석법, 예를 들면, ELISA가 단백질 수준을 측정하는데 이용될 수 있다. FXN ELISA 분석 키트는 예로써, R&D Systems (Minneapolis, MN)로부터 상업적으로 가용하다.

[0189] 구체예에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 이용하여 처리된 샘플 (가령, 생체내에서 또는 시험관내에서 세포 또는 조직)에서 프라탁신 (FXN) 발현 (가령, mRNA 또는 단백질)은 대조 샘플에서 프라탁신 (FXN) 발현과의 비교에 의해 평가된다. 가령, 단백질 또는 핵산의 발현은 당업자에게 공지된 방법을 이용하여, 모의-처리된 또는 처리되지 않은 샘플에서 발현과 비교될 수 있다. 대안으로, 대조 안티센스 올리고뉴클레오티드 (가령, 변경된 또는 상이한 서열을 보유하는 것)로 처리된 샘플과의 비교는 요망되는 정보에 따라 수행될 수 있

다. 다른 구체예에서, 처리된 샘플 대 처리되지 않은 샘플에서 프라탁신 (FXN) 단백질 또는 핵산의 발현에서 차이는 처리된 샘플 대 처리되지 않은 샘플에서 상이한 핵산 (연구자에 의해 적절한 것으로 간주되는 임의의 표준, 예를 들면, 가사 유전자 (housekeeping gene) 포함)의 발현에서 차이와 비교될 수 있다.

[0190] 관찰된 차이는 대조와의 비교에서 이용을 위하여, 원하는 대로, 예를 들면, 비율 (ratio) 또는 분율 (fraction)의 형태로 표시될 수 있다. 구체예에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리된 샘플에서 프라탁신 (FXN) mRNA 또는 단백질의 수준은 처리되지 않은 샘플, 또는 대조 핵산으로 처리된 샘플과 비교하여, 대략 1.25-배 내지 대략 10-배 또는 그 이상 증가되거나 감소된다. 구체예에서, 프라탁신 (FXN) mRNA 또는 단백질의 수준은 최소한 대략 1.25-배, 최소한 대략 1.3-배, 최소한 대략 1.4-배, 최소한 대략 1.5-배, 최소한 대략 1.6-배, 최소한 대략 1.7-배, 최소한 대략 1.8-배, 최소한 대략 2-배, 최소한 대략 2.5-배, 최소한 대략 3-배, 최소한 대략 3.5-배, 최소한 대략 4-배, 최소한 대략 4.5-배, 최소한 대략 5-배, 최소한 대략 5.5-배, 최소한 대략 6-배, 최소한 대략 6.5-배, 최소한 대략 7-배, 최소한 대략 7.5-배, 최소한 대략 8-배, 최소한 대략 8.5-배, 최소한 대략 9-배, 최소한 대략 9.5-배, 또는 최소한 대략 10-배 또는 그 이상 증가되거나 감소된다.

[0191] *키트, 연구 시약, 진단제 및 치료제*

[0192] 본 발명의 화합물은 진단, 치료 및 예방용으로 이용되거나, 또는 연구 시약 및 키트 성분으로 이용될 수 있다. 게다가, 정교한 특이성으로 유전자 발현을 저해할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 특정 유전자의 기능을 밝히거나, 또는 생물학적 경로의 다양한 구성원의 기능을 구별하기 위하여 당업자에 의해 종종 이용된다.

[0193] 키트 및 진단제에서, 그리고 다양한 생물학적 시스템에서 사용을 위하여, 본 발명의 화합물은 단독으로 또는 다른 화합물 또는 치료제와 공동으로, 세포 및 조직 내에서 발현되는 유전자의 일부 또는 전체 보체의 발현 패턴을 밝히기 위한 차등적 및/또는 복합적 분석에서 도구로서 유용하다.

[0194] 본 명세서에서, 용어 "생물학적 시스템" 또는 "시스템"은 프라탁신 (FXN) 유전자의 산물을 발현하는, 또는 이들을 발현하는데 적절한 임의의 생명체, 세포, 세포 배양액 또는 조직으로 정의된다. 이들에는 인간, 유전자도입 동물, 세포, 세포 배양액, 조직, 이종이식편, 이식물 및 이들의 조합이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0195] 무제한적 실례로써, 하나 이상의 안티센스 화합물로 처리된 세포 또는 조직 내에서 발현 패턴은 안티센스 화합물로 처리되지 않은 대조 세포 또는 조직과 비교되고, 그리고 생성된 패턴은 검사되는 유전자의 질환 연관성, 신호전달 경로, 세포 국부화, 발현 수준, 크기, 구조 또는 기능에 관련되기 때문에 차등적인 유전자 발현 수준에 대해 분석된다. 이들 분석은 자극된 또는 자극되지 않은 세포 상에서, 그리고 발현 패턴에 영향을 주는 다른 화합물의 존재하에 실행될 수 있다.

[0196] 당분야에 공지된 유전자 발현 분석 방법의 실례에는 DNA 어레이 또는 마이크로어레이, SAGE (유전자 발현의 일련의 분석), READS (절단된 cDNA의 제한 효소 증폭), TOGA (전체 유전자 발현 분석), 단백질 어레이 및 단백질체학 (proteomics), 발현된 서열 tag (EST) 염기서열분석, 차감성 RNA 핑거프린팅 (SuRF), 차감성 클로닝, 차등적 디스플레이(DD), 비교 게놈 혼성화, FISH (형광 원위치 혼성화) 기술 (*Going and Gusterson, (1999) Eur. J. Cancer, 35, 1895-904*) 및 질량 분석 방법이 포함된다.

[0197] 본 발명의 화합물은 이들 화합물이 프라탁신 (FXN)를 인코딩하는 핵산에 혼성화되기 때문에, 연구 및 진단에 유용하다. 가령, 효과적인 프라탁신 (FXN) 조정물질이 될 수 있을 만큼, 본 명세서에서 기술된 조건 하에 충분한 효율로 혼성화되는 올리고뉴클레오타이드는 각각, 유전자 증폭 또는 검출에 유리한 조건하에 효과적인 프라이머 또는 프로브이다. 이들 프라이머 및 프로브는 프라탁신 (FXN)를 인코딩하는 핵산 분자의 특이적 검출을 요구하는 방법에서, 그리고 프라탁신 (FXN)의 검출 또는 추가 연구에 이용을 위한 이들 핵산 분자의 증폭에서 유용하다. 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 특히, 프라이머 및 프로브와 프라탁신 (FXN)를 인코딩하는 핵산의 혼성화는 당분야에 공지된 방법에 의해 검출될 수 있다. 이와 같은 수단에는 올리고뉴클레오타이드에 효소의 접합 (conjugation), 올리고뉴클레오타이드의 방사성라벨링, 또는 임의의 다른 적합한 검출 수단이 포함될 수 있다. 샘플에서 프라탁신 (FXN)의 수준을 검출하기 위하여 이와 같은 검출 수단을 이용하는 키트 역시 만들어질 수 있다.

[0198] 안티센스의 특이성 및 민감성 역시 치료요법적 용도를 위하여 당업자에 의해 이용된다. 인간을 비롯한 동물의 질환 상태의 치료에서 치료요법적 모이어티로서 안티센스 화합물이 이용되고 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 약물은 인간에게 안전하고 효과적으로 투여되고 있고, 그리고 다수의 임상 시험이 현재 진행중이다. 따라서 안티센스 화합물은 세포, 조직 및 동물, 특히 인간의 치료를 위한 치료 섭생에서 유용하도록 설정되는 유용한



치료 양식이 될 수 있는 것으로 확립된다.

- [0199] 치료를 위하여, 프라탁신 (FXN) 폴리뉴클레오티드의 발현을 조정함으로써 치료될 수 있는 질환이나 장애를 앓는 것으로 의심되는 동물, 바람직하게는 인간은 본 발명에 따른 안티센스 화합물을 투여함으로써 치료된다. 가령, 한 가지 무제한적인 구체예에서, 이들 방법은 치료를 요하는 동물에 프라탁신 (FXN) 조정물질의 치료 효과량을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 프라탁신 (FXN) 조정물질은 프라탁신 (FXN)의 활성을 효과적으로 조정하거나, 또는 프라탁신 (FXN) 단백질의 발현을 효과적으로 조정한다. 한 구체예에서, 동물에서 프라탁신 (FXN)의 활성 또는 발현은 대조와 비교하여 대략 10% 저해된다. 바람직하게는, 동물에서 프라탁신 (FXN)의 활성 또는 발현은 대략 30% 저해된다. 더욱 바람직하게는, 동물에서 프라탁신 (FXN)의 활성 또는 발현은 대략 50% 또는 그 이상 저해된다. 따라서 이들 올리고머 화합물은 프라탁신 (FXN) mRNA의 발현을 대조와 비교하여, 최소한 10%, 최소한 50%, 최소한 25%, 최소한 30%, 최소한 40%, 최소한 50%, 최소한 60%, 최소한 70%, 최소한 75%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 98%, 최소한 99%, 또는 100% 조정한다.
- [0200] 한 구체예에서, 동물에서 프라탁신 (FXN)의 활성 또는 발현은 대조와 비교하여 대략 10% 증가된다. 바람직하게는, 동물에서 프라탁신 (FXN)의 활성 또는 발현은 대략 30% 증가된다. 더욱 바람직하게는, 동물에서 프라탁신 (FXN)의 활성 또는 발현은 50% 또는 그 이상 증가된다. 따라서 올리고머 화합물은 프라탁신 (FXN) mRNA의 발현을 대조와 비교하여, 최소한 10%, 최소한 50%, 최소한 25%, 최소한 30%, 최소한 40%, 최소한 50%, 최소한 60%, 최소한 70%, 최소한 75%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 98%, 최소한 99%, 또는 100% 조정한다.
- [0201] 가령, 프라탁신 (FXN)의 발현 감소는 동물의 혈청, 혈액, 지방 조직, 간 또는 임의의 기타 체액, 조직 또는 기관에서 측정될 수 있다. 바람직하게는, 분석되는 체액, 조직 또는 기관 내에 포함된 세포는 프라탁신 (FXN) 펩티드를 인코딩하는 핵산 분자 및/또는 프라탁신 (FXN) 단백질 자체를 포함한다.
- [0202] 본 발명의 화합물은 적절한 제약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체에 효과량의 화합물을 첨가함으로써 제약학적 조성물에 이용될 수 있다. 본 발명의 화합물 및 방법의 이용은 또한, 예방학적으로 유용하다.
- [0203] *접합체 (conjugate)*
- [0204] 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 다른 변형은 올리고뉴클레오티드의 활성, 세포 분포 또는 세포 취입을 증강시키는 하나 이상의 모이어티 또는 접합체를 올리고뉴클레오티드에 화학적으로 연결시키는 것을 수반한다. 이들 모이어티 또는 접합체는 1차 또는 2차 히드록실기와 같은 기능기에 공유 결합된 접합체 기를 포함할 수 있다. 본 발명의 접합체 기에는 삽입기, 리포터 분자, 폴리아민, 폴리아미드, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에테르, 올리고머의 약역학적 성질을 강화시키는 기, 그리고 올리고머의 약동학적 성질을 강화시키는 기가 포함된다. 전형적인 접합체 기에는 콜레스테롤, 지질, 인지질, 바이오틴, 페나진, 폴레이트, 페난트리딘, 안트라퀴논, 아크리딘, 플루오레세인, 로다민, 쿠마린 및 염료가 포함된다. 본 발명의 맥락에서, 약역학적 성질을 강화시키는 기에는 취입을 개선하고, 분해에 대한 내성을 강화시키고, 및/또는 표적 핵산과의 서열 특이적 혼성화를 강화시키는 기가 포함된다. 본 발명의 맥락에서, 약동학적 성질을 강화시키는 기에는 본 발명의 화합물의 취입, 분포, 대사 또는 배출을 개선하는 기가 포함된다. 대표적인 접합체 기는 국제 특허 출원 PCT/US92/09196 (1992년 10월 23일 출원) 및 U.S. 특허 제6,287,860호에서 설명되고, 이들은 본 발명에 참조로서 편입된다. 접합체 모이어티에는 지질 모이어티, 예를 들면, 콜레스테롤 모이어티, 콜린산, 티오에테르, 예를 들면, 헥실-5-트리틸티올, 티오펜테롤, 지방족 사슬, 예를 들면, 도데칸디올 또는 운데실 잔기, 인지질, 예를 들면, 디-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸암모늄 1,2-디-O-헥사데실-rac-글리세로-3-H포스포네이트, 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 또는 마다만탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 또는 옥타데실아민 또는 헥실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 활성 약물 물질, 예를 들면, 아스피린, 와파린, 페닐부타존, 이부프로펜, 수프로펜, 펜부펜, 케토프로펜, (S)-(+)-프라노프로펜, 카르프로펜, 단실사르코신, 2,3,5-트리요오드벤조산, 플루페남산, 폴린산, 벤조티아디아지드, 클로로티아지드, 디아제핀, 인도메티신, 바르비투레이트, 세팔로스포린, 설파 약물, 당뇨병치료제, 항균제 또는 항생제에 접합될 수도 있다.
- [0205] 이와 같은 올리고뉴클레오티드 접합체의 제조를 교시하는 대표적인 U.S. 특허에는 U.S. 특허 제4,828,979호; 제4,948,882호; 제5,218,105호; 제5,525,465호; 제5,541,313호; 제5,545,730호; 제5,552,538호; 제5,578,717호; 제5,580,731호; 제5,580,731호; 제5,591,584호; 제5,109,124호; 제5,118,802호; 제5,138,045호;

제5,414,077호; 제5,486,603호; 제5,512,439호; 제5,578,718호; 제5,608,046호; 제4,587,044호;  
제4,605,735호; 제4,667,025호; 제4,762,779호; 제4,789,737호; 제4,824,941호; 제4,835,263호;  
제4,876,335호; 제4,904,582호; 제4,958,013호; 제5,082,830호; 제5,112,963호; 제5,214,136호;  
제5,082,830호; 제5,112,963호; 제5,214,136호; 제5,245,022호; 제5,254,469호; 제5,258,506호;  
제5,262,536호; 제5,272,250호; 제5,292,873호; 제5,317,098호; 제5,371,241호; 제5,391,723호;  
제5,416,203호; 제5,451,463호; 제5,510,475호; 제5,512,667호; 제5,514,785호; 제5,565,552호;  
제5,567,810호; 제5,574,142호; 제5,585,481호; 제5,587,371호; 제5,595,726호; 제5,597,696호;  
제5,599,923호; 제5,599,928호 및 제5,688,941호가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0206] 제제 (*formulations*)

[0207] 본 발명의 화합물은 취입, 분포 및/또는 흡수를 지원하기 위한 화합물의 다른 분자, 분자 구조 또는 혼합물, 예를 들면, 리포솜, 수용체-표적화된 분자, 경구, 직장, 국소 또는 기타 제제와 혼합되거나, 포집되거나, 접합되거나 또는 연합될 수 있다. 이와 같은 취입, 분포 및/또는 흡수-지원 제제의 제조를 교시하는 대표적인 U.S. 특허에는 U.S. 특허 제5,108,921호; 제5,354,844호; 제5,416,016호; 제5,459,127호; 제5,521,291호; 제5,543,165호; 제5,547,932호; 제5,583,020호; 제5,591,721호; 제4,426,330호; 제4,534,899호; 제5,013,556호; 제5,108,921호; 제5,213,804호; 제5,227,170호; 제5,264,221호; 제5,356,633호; 제5,395,619호; 제5,416,016호; 제5,417,978호; 제5,462,854호; 제5,469,854호; 제5,512,295호; 제5,527,528호; 제5,534,259호; 제5,543,152호; 제5,556,948호; 제5,580,575호; 및 제5,595,756호가 포함되지만 이들에 국한되지 않고, 이들 각각은 참조로서 편입된다.

[0208] 비록 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 표적 발현 및/또는 기능을 조정하기 위하여 벡터로 투여될 필요는 없지만, 본 발명의 구체예는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 발현을 위한 발현 벡터 구조체에 관계하고, 이들 벡터 구조체는 프로모터, 하이브리드 프로모터 유전자 서열을 포함하고, 그리고 강한 구조성 프로모터 활성, 또는 원하는 경우 유도될 수 있는 프로모터 활성을 갖는다.

[0209] 한 구체예에서, 본 발명의 실시는 적절한 핵산 운반 시스템으로 전술한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 중에서 최소한 하나를 투여하는 것을 수반한다. 한 구체예에서, 상기 시스템은 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 비-바이러스 벡터를 포함한다. 이와 같은 비-바이러스 벡터의 실례는 단독으로, 또는 적합한 단백질, 폴리사카라이드 또는 지질 제제와 공동으로 올리고뉴클레오타이드 (가령 서열 번호: 3 내지 6 중에서 임의의 하나 이상)를 포함한다.

[0210] 추가로 적합한 핵산 운반 시스템에는 바이러스 벡터, 전형적으로 아데노바이러스, 아데노바이러스-연합된 바이러스 (AAV), 헬퍼-의존성 아데노바이러스, 레트로바이러스 또는 Japan-리포솜의 헤마글루티닌 바이러스 (HVJ) 복합체 중에서 최소한 하나로부터 서열이 포함된다. 바람직하게는, 바이러스 벡터는 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 강한 진핵 프로모터, 예를 들면, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터가 포함된다.

[0211] 추가적으로 바람직한 벡터에는 바이러스 벡터, 융합 단백질 및 화학적 접합체가 포함된다. 레트로바이러스 벡터에는 Moloney 뮤린 백혈병 바이러스 및 HIV-계 바이러스가 포함된다. 한 가지 바람직한 HIV-계 바이러스 벡터는 최소한 2개 벡터를 포함하고, 여기서 *gag* 및 *pol* 유전자는 HIV 게놈으로부터 유래되고, *env* 유전자는 다른 바이러스로부터 유래된다. DNA 바이러스 벡터가 바람직하다. 이들 벡터에는 폭스 벡터, 예를 들면, 오르토폭스 (orthopox) 또는 아비폭스 (avipox) 벡터, 헤르페스바이러스 벡터, 예를 들면, 헤르페스 심플렉스 I 바이러스 (HSV) 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 아데노-연합된 바이러스 벡터가 포함된다.

[0212] 본 발명의 안티센스 화합물은 임의의 제약학적으로 허용되는 염, 에스테르 또는 이와 같은 에스테르의 염, 또는 인간을 비롯한 동물에 투여시 생물학적 활성 대사물질 또는 이의 잔기를 직간접적으로 제공할 수 있는 임의의 다른 화합물을 포함한다.

[0213] 용어 "약리학적으로 허용되는 염"은 본 발명의 화합물의 생리학적으로 및 제약학적으로 허용되는 염, 다시 말하면, 부모 화합물의 바람직한 생물학적 활성을 유지하지만 여기에 바람직하지 않은 독성 효과를 부여하지 않는 염을 지칭한다. 올리고뉴클레오타이드의 경우, 제약학적으로 허용되는 염의 바람직한 실례 및 이들의 용도는 U.S. 특허 제6,287,860호에서 더욱 설명되고, 이는 참조로서 편입된다.

[0214] 본 발명은 또한, 본 발명의 안티센스 화합물을 포함하는 제약학적 조성물 및 제제를 포함한다. 본 발명의 제약학적 조성물은 국소 또는 전신 치료가 바람직한지 그리고 치료되는 부위에 따라 여러 방법으로 투여될 수 있다.



투여는 국소 (눈, 그리고 질 및 직장 운반을 비롯한 점막 포함), 예로써 분무기를 비롯하여 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 통기에 의해 폐; 기관내 (intratracheal), 비내, 상피 또는 경피, 구강 또는 비경구일 수 있다. 비경구 (parenteral) 투여에는 정맥내, 동맥내, 피하, 복막내 또는 근육내 주사 또는 주입; 또는 두개내 (intracranial), 예를 들면, 수막강내 또는 뇌실내 투여가 포함된다.

[0215] 중추신경계 내에 조직을 치료하기 위하여, 투여는 예로써, 뇌척수액 (cerebrospinal fluid) 내로 주사 또는 주입에 의해 수행될 수 있다. 뇌척수액 내로 안티센스 RNA의 투여는 예로써, U.S. 특허 출원 공개 번호 제 2007/0117772호, "Methods for slowing familial ALS disease progression"에서 설명되고, 이는 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0216] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드가 중추신경계 내에 세포에 투여되는 것으로 의도될 때, 투여는 뇌-혈관 장벽 (blood-brain barrier)을 교차하여 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드의 침투를 촉진할 수 있는 하나 이상의 작용제로 수행될 수 있다. 주사는 예로써, 내후각뇌피질 (entorhinal cortex) 또는 해마(hippocampus)에서 수행될 수 있다. 근육 조직 내에 운동 뉴런 (motor neuron)에 아데노바이러스 벡터의 투여에 의한 신경영양성 인자의 운반은 예로써, U.S. 특허 제6,632,427호, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons"에서 설명되고, 이는 본 발명에 참조로서 편입된다. 뇌, 예를 들면, 선조체 (striatum), 시상 (thalamus), 해마 (hippocampus), 또는 흑색질 (substantia nigra)에 직접적으로 벡터의 전달은 당분야에 공지되어 있고, 그리고 예로써, 본 발명에서 참조로서 편입되는 U.S. 특허 제6,756,523호, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain"에서 설명된다. 투여는 주사와 같이 신속하게 수행되거나, 또는 느린 방출 제제 (slow release formulation)의 느린 주입 또는 투여와 같이 장기간 동안 수행될 수 있다.

[0217] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 또한, 바람직한 제약학적 또는 약역학적 성질을 제공하는 작용제와 연결되거나 접합될 수 있다. 가령, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 뇌-혈관 장벽을 교차하여 침투 또는 운반을 증진하는 당분야에 공지된 임의의 물질, 예를 들면, 트랜스페린 수용체에 대한 항체에 결합되고, 그리고 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있다. 안티센스 화합물은 바이러스 벡터, 예를 들면, 안티센스 화합물을 더욱 효과적으로 만들고 및/또는 뇌-혈관 장벽을 교차하여 안티센스 화합물의 운반을 증가시키기 위하여 바이러스 벡터와 연결될 수 있다. 또한, 삼투성 뇌-혈관 장벽 파괴는 예로써, 메소 에리트ρί톨 (meso erythritol), 자일리톨 (xylitol), D(+) 갈락토오스 (galactose), D(+) 락토오스 (lactose), D(+) 자일로오스 (xylose), 돌시톨 (dulcitol), 미오-이노시톨 (myo-inositol), L(-) 프럭토오스 (fructose), D(-) 만니톨 (mannitol), D(+) 글루코오스 (glucose), D(+) 아라비노스 (arabinose), D(-) 아라비노스, 셀로비오스 (cellobiose), D(+) 말토오스 (maltose), D(+) 라피노오스 (raffinose), L(+) 람노스 (rhamnose), D(+) 멜리비오스 (melibiose), D(-) 리보오스 (ribose), 아도니톨 (adonitol), D(+) 아라비톨 (arabitol), L(-) 아라비톨, D(+) 푸코오스 (fucose), L(-) 푸코오스, D(-) 릭소스 (lyxose), L(+) 릭소스, 그리고 L(-) 릭소스가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 당, 또는 글루타민 (glutamine), 리신 (lysine), 아르기닌 (arginine), 아스파라긴 (asparagine), 아스파르트산 (aspartic acid), 시스테인 (cysteine), 글루타민산 (glutamic acid), 글리신 (glycine), 히스티딘 (histidine), 류신 (leucine), 메티오닌 (methionine), 페닐알라닌 (phenylalanine), 프롤린 (proline), 세린 (serine), 트레오닌 (threonine), 티로신 (tyrosine), 발린 (valine), 그리고 타우린 (taurine)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 아미노산의 주입에 의해 달성될 수 있다. 뇌-혈관 장벽 침투를 증강시키기 위한 방법과 물질은 예로써, U.S. 특허 제4,866,042호, "Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier", 제6,294,520호, "Material for passage through the blood-brain barrier", 그리고 제 6,936,589호, "Parenteral delivery systems"에서 설명되고, 이들 모두 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0218] 본 발명의 안티센스 화합물은 취입, 분포 및/또는 흡수를 지원하기 위한 화합물의 다른 분자, 분자 구조 또는 혼합물, 예를 들면, 리포좀, 수용체-표적화된 분자, 경구, 직장, 국소 또는 기타 제제와 혼합되거나, 포집되거나, 접합되거나 또는 연합될 수 있다. 가령, 양이온성 지질이 올리고뉴클레오티드 취입을 용이하게 하기 위하여 제제 내에 포함될 수 있다. 취입을 용이하게 하는 것으로 밝혀진 이와 같은 한 가지 조성물은 LIPOFECTIN (GIBCO-BRL, Bethesda, MD)이다.

[0219] 최소한 하나의 2'-O-메톡시에틸 변형을 가진 올리고뉴클레오티드는 경구 투여용으로 특히 유용한 것으로 생각된다. 국소 투여를 위한 제약학적 조성물 및 제제에는 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 드롭, 좌약, 스프레이, 액상 및 분말이 포함된다. 통상적인 약리학적 담체, 수성, 분말 또는 오일 베이스, 농후제 등이 필수적이거나 바람직할 수 있다. 또한, 피복된 콘돔, 장갑 등이 유용할 수 있다.

- [0220] 본 발명의 제약학적 제제는 통상적으로 단위 약형 (unit dosage form)으로 제공될 수 있고, 그리고 제약 산업에서 공지된 전통적인 기술에 따라 제조될 수 있다. 이와 같은 기술은 활성 성분을 제약학적 담체 또는 부형제와 연합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제제는 활성 성분을 액상 담체 또는 미세하게 분할된 고형 담체 또는 둘 모두와 균일하게 및 친밀하게 연합시키고, 이후 필요에 따라 산물의 모양을 만듦으로써 제조된다.
- [0221] 본 발명의 조성물은 정제, 캡슐, 겔 캡슐, 액체 시럽, 연성 겔, 좌약 및 관장제가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 많은 가능한 약형으로 제조될 수 있다. 본 발명의 조성물은 수성, 비-수성 또는 혼성 매체에서 현탁액으로 조제될 수도 있다. 수성 현탁액은 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 소르비톨 및/또는 텍스트란을 포함하는 현탁액의 점성을 증가시키는 물질을 더욱 포함할 수 있다. 현탁액은 또한, 안정화제를 포함할 수 있다.
- [0222] 본 발명의 제약학적 조성물은 용액, 에멀전, 거품 및 리포솜-함유 조제물이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 발명의 제약학적 조성물 및 제제는 하나 이상의 침투 강화제, 담체, 부형제 또는 기타 활성 또는 비활성 성분을 포함할 수 있다.
- [0223] 에멀전은 전형적으로, 0.1  $\mu\text{m}$  직경을 초과하는 액적의 형태로 서로 분산된 하나의 액체의 이중 (heterogeneous) 시스템이다. 에멀전은 분산된 상에 추가하여 추가 성분, 그리고 수성 상, 오일상 또는 별도의 상으로서 그 자체 내에 용액으로서 존재하는 활성 성분을 포함할 수 있다. 본 발명의 구체예로서 마이크로에멀전이 포함된다. 에멀전 및 이들의 용도는 당분야에 공지되어 있으며, U.S. 특허 제6,287,860호에서 더욱 설명된다.
- [0224] 본 발명의 제제는 리포솜 제제를 포함한다. 본 발명에서, 용어 "리포솜"은 구형 이중층 또는 이중층에 배열된 양쪽성 지질로 구성된 소포를 의미한다. 리포솜은 단층라멜라 또는 다층라멜라 소포 (vesicle)이고, 이들은 친지성 물질로부터 형성된 막 및 운반되는 조성물을 포함하는 수성 내부를 가진다. 양이온성 리포솜은 안정된 복합체를 형성하기 위하여 음전하를 띤 DNA 분자와 상호작용하는 것으로 생각되는 양전하를 띤 리포솜이다. pH-민감성 또는 음전하를 띤 리포솜은 DNA와 복합체를 형성하기 보다는 DNA를 포집하는 것으로 생각된다. 양이온성 및 비-양이온성 리포솜은 DNA를 세포로 운반하는데 이용된다.
- [0225] 리포솜은 또한 "공간적으로 안정화된" 리포솜을 포함하는데, 본 명세서에서 상기 용어는 하나 이상의 특화된 지질을 포함하는 리포솜을 지칭한다. 리포솜에 통합될 때, 이와 같은 특화된 지질은 이들 특화된 지질이 없는 리포솜과 비교하여 순환 반감기가 강화된 리포솜을 발생시킨다. 공간적으로 안정화된 리포솜의 실례는 리포솜의 소포-형성 지질 부분의 일부가 하나 이상의 글리코리피드를 포함하거나, 또는 하나 이상의 친수성 폴리머, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티로 유도화된 것들이다. 리포솜 및 이들의 용도는 U.S. 특허 제6,287,860호에서 더욱 설명된다.
- [0226] 본 발명의 제약학적 제제 및 조성물은 계면활성제를 또한 포함할 수 있다. 약물 산물, 제제 및 에멀전에서 계면활성제의 이용은 당분야에 잘 공지되어 있다. 계면활성제 및 이들의 용도는 U.S. 특허 제6,287,860호에서 더욱 설명되고, 이는 참조로서 편입된다.
- [0227] 한 구체예에서, 본 발명은 핵산, 특히 올리고뉴클레오타이드의 효과적인 운반을 달성하기 위하여 다양한 침투 강화제를 이용한다. 세포 막을 교차하여 비-친지성 약물의 확산을 지원하는 것에 추가하여, 침투 강화제는 또한 친지성 약물의 침투성을 강화시킨다. 침투 강화제는 5가지 넓은 범주, 다시 말하면, 계면활성제, 지방산, 담즙산, 킬레이트화제 그리고 비-킬레이트화 비-계면활성제 중의 하나에 속하는 것으로 분류될 수 있다. 침투 강화제 및 이들의 용도는 U.S. 특허 제6,287,860호에서 더욱 설명되고, 이는 참조로서 편입된다.
- [0228] 당업자는 제제가 그들의 의도된 용도, 다시 말하면, 투여 경로에 따라 일과적으로 설계된다는 것을 인지할 것이다.
- [0229] 국소 투여에 바람직한 제제는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드가 국소 운반제, 예를 들면, 지질, 리포솜, 지방산, 지방산 에스테르, 스테로이드, 킬레이트화제 및 계면활성제와 혼합되는 것들이다. 바람직한 지질 및 리포솜에는 중성 (가령, 디올레일-포스파티딜 DOPE 에탄올아민, 디미리스토일포스파티딜 콜린 DMPC, 디스테아로일포스파티딜 콜린), 음성 (가령, 디미리스토일포스파티딜 글리세롤 DMPG) 및 양이온 (가령, 디올레일테트라메틸아미노프로필 DOTAP 및 디올레일-포스파티딜 에탄올아민 DOTMA)이 포함된다.
- [0230] 국소 또는 기타 투여를 위하여, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 리포솜 내에 포집되거나, 또는 특히 양이온 리포솜에 복합체를 형성할 수 있다. 대안으로, 올리고뉴클레오타이드는 지질, 특히 양이온 지질에 복합될 수 있다. 바람직한 지방산 및 에스테르, 이들의 제약학적으로 허용되는 염, 그리고 이들의 용도는 U.S. 특허 제6,287,860호에서 더욱 설명된다.

- [0231] 경구 투여용 조성물 및 제제에는 분말 또는 과립, 미립자, 나노입자, 물 또는 비-수성 매체에서 현탁액 또는 용액, 캡슐, 겔 캡슐, 향낭, 정제 또는 미니정제가 포함된다. 농후제, 향료, 희석제, 유화제, 분산 보조제 또는 결합제가 바람직할 수 있다. 바람직한 경구 제제는 본 발명의 올리고뉴클레오티드가 하나 이상의 침투 강화제, 계면활성제 및 킬레이터와 함께 투여되는 것들이다. 바람직한 계면활성제에는 지방산 및/또는 이들의 에스테르 또는 염, 담즙산 및/또는 이들의 염이 포함된다. 바람직한 담즙산/염 및 지방산, 그리고 이들의 용도는 U.S. 특허 제 6,287,860호에서 더욱 설명되고, 이는 참조로서 편입된다. 침투 강화제의 조합, 예를 들면, 담즙산/염과 공동으로 지방산/염 역시 바람직하다. 특히 바람직한 조합은 라우르산, 카프르산 및 UDCA의 나트륨염이다. 추가 침투 강화제에는 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-20-세틸 에테르가 포함된다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 분무된 건조 입자를 비롯한 과립형으로 경구 운반되거나, 또는 미립자 또는 나노입자를 형성하기 위하여 복합될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 착화제 및 이들의 용도는 U.S. 특허 제6,287,860호에서 더욱 설명되고, 이는 참조로서 편입된다.
- [0232] 비경구, 기관내 또는 심실내 투여를 위한 조성물 및 제제에는 완충액, 희석액 및 기타 적합한 첨가제 (침투 강화제, 담체 화합물 및 기타 제약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제가 포함되지만 이들에 국한되지 않음)를 포함하는 무균 수용액이 포함될 수 있다.
- [0233] 본 발명의 일정한 구체예는 하나 이상의 올리고머 화합물 및 비-안티센스 기전에 의해 기능하는 하나 이상의 다른 화학요법제를 포함하는 제약학적 조성물을 제시한다. 이와 같은 화학요법제의 실례에는 다우노루비신, 다우노마이신, 닥티노마이신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 에소루비신, 블레오마이신, 마포스파미드, 이포스파미드, 시토신 아라비노사이드, 비스클로로에틸-니트로소우레아, 부설판, 미토마이신 C, 악티노마이신 D, 미트라마이신, 프레드니손, 히드록시프로게스테론, 테스토스테론, 타목시펜, 다카르바진, 프로카르바진, 핵사메틸멜라민, 펜타메틸멜라민, 미톡산트론, 암사크린, 클로람부실, 메틸사이클로헥실니트로소우레아, 질소 겨자, 멜파란, 사이클로포스파미드, 6-멜캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-아자시티딘, 히드록시우레아, 데옥시코포르마이신, 4-히드록시페옥시사이클로-포스포라미드, 5-플루오르우라실 (5-FU), 5-플루오르데옥시우리딘 (5-FdUR), 메토트렉세이트(MTX), 콜히친, 탁솔, 빈크리스틴, 빈블라стин, 에토포시드 (VP-16), 트리메트렉세이트, 이리노테칸, 토포테칸, 젬시타빈, 테니포시드, 시스플라틴 및 디에틸stil베스트롤(DES)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 발명의 화합물과 함께 이용될 때, 이와 같은 화학요법제는 개별적으로 (가령, 5-FU 및 올리고뉴클레오티드), 순차적으로 (가령, 일정 기간 동안 5-FU 및 올리고뉴클레오티드, 그 이후에 MTX 및 올리고뉴클레오티드), 또는 하나 이상의 다른 화학요법제 (가령, 5-FU, MTX 및 올리고뉴클레오티드, 또는 5-FU, 방사능요법 및 올리고뉴클레오티드)와 함께 이용될 수 있다. 비-스테로이드성 소염제 및 코르티코스테로이드가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 소염제 약물, 그리고 리비비린, 비다라빈, 아시클로비르 및 강시클로비르가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 항바이러스 약물 역시 본 발명의 조성물에 복합될 수 있다. 안티센스 화합물 및 다른 비-안티센스 약물의 복합 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 2개 이상의 복합 화합물이 함께 또는 순차적으로 이용될 수 있다.
- [0234] 다른 관련된 구체예에서, 본 발명의 조성물은 제 1 핵산을 표적으로 하는 하나 이상의 안티센스 화합물, 특히 올리고뉴클레오티드, 그리고 제 2 핵산 표적을 표적으로 하는 하나 이상의 추가 안티센스 화합물을 포함한다. 가령, 제 1 표적은 프라탁신 (FXN)의 특정 안티센스 서열일 수 있고, 그리고 제 2 표적은 다른 뉴클레오티드 서열로부터 영역일 수 있다. 대안으로, 본 발명의 조성물은 동일한 프라탁신 (FXN) 핵산 표적의 상이한 영역을 표적으로 하는 2개 이상의 안티센스 화합물을 포함할 수 있다. 안티센스 화합물의 다양한 실례가 본 명세서에서 예시되고, 그리고 기타 화합물은 당분야에 공지된 적합한 화합물 중에서 선택될 수 있다. 2개 이상의 복합 화합물이 함께 또는 순차적으로 이용될 수 있다.
- [0235] 약액주입 (dosing):
- [0236] 치료 조성물의 조제 및 이들의 후속 투여 (약액주입)는 당분야의 기술에 속한다. 약액주입은 수 일 내지 수개월 간, 또는 치료 효과 또는 질환 상태의 감소가 달성될 때까지 지속되는 치료 과정과 함께, 치료되는 질환 상태의 중증도와 반응성에 좌우된다. 최적의 약액주입 일정은 환자의 신체에 약물 축적의 측량으로부터 계산될 수 있다. 당업자는 최적 용량, 약액주입 방법 및 반복률을 용이하게 결정할 수 있다. 최적 용량은 개별 올리고뉴클레오티드의 상대적 효능에 따라 달라질 수 있고, 그리고 일반적으로, 시험관내 및 생체내 동물 모델에서 효과적인 것으로 밝혀진  $EC_{50}$ 에 근거하여 예측될 수 있다. 일반적으로, 용량은 체중 kg당  $0.01\mu g$  내지  $100 g$ 이고, 일일, 매주, 매월 또는 매년 1회 이상, 또는 심지어 2 내지 20년 마다 1회 제공될 수 있다. 당업자는 측정된 잔

류 시간 및 체액 또는 조직 내에 약물의 농도에 근거하여 약액주입을 위한 반복물을 용이하게 예측할 수 있다. 성공적인 치료후, 질환 상태의 재발을 방지하기 위하여 환자가 유지요법을 받도록 하는 것이 바람직하며, 이때 올리고뉴클레오타이드는 체중 kg당 0.01  $\mu$ g 내지 100 g 범위의 유지 용량으로, 일일 1회 이상 내지 20년마다 1회 투여된다.

[0237] 구체예에서, 환자는 체중 kg당 최소한 대략 1, 최소한 대략 2, 최소한 대략 3, 최소한 대략 4, 최소한 대략 5, 최소한 대략 6, 최소한 대략 7, 최소한 대략 8, 최소한 대략 9, 최소한 대략 10, 최소한 대략 15, 최소한 대략 20, 최소한 대략 25, 최소한 대략 30, 최소한 대략 35, 최소한 대략 40, 최소한 대략 45, 최소한 대략 50, 최소한 대략 60, 최소한 대략 70, 최소한 대략 80, 최소한 대략 90, 또는 최소한 대략 100 mg인 약물의 용량으로 치료된다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 일정한 주사 용량은 예로써, U.S. 특허 제7,563,884호, "Antisense modulation of PTP1B expression"에서 설명되고, 이는 본 발명에 참조로서 편입된다.

[0238] 본 발명의 다양한 구체예들이 상기에서 설명되긴 했지만, 이들은 단지 예시으로써 제공되고 제한으로서 간주되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명의 범위 또는 사상을 벗어나지 않으면서, 본 발명의 개시에 따라서 이들 설명된 구체예에 대해 다양한 변화가 만들어질 수 있다. 따라서 본 발명의 범위는 상기 설명된 임의의 구체예에 의해 한정되지 않는다.

[0239] 본 명세서에서 언급된 모든 문헌은 본 발명에 참조로서 편입된다. 본 출원에서 인용된 모든 간행물 및 특허 문헌은 각 간행물 또는 특허 문헌이 개별적으로 그렇게 언급된 것처럼, 순전히 참조로서 편입된다. 본 문서에서 다양한 참고문헌의 인용에 의해, 임의의 특정한 참고문헌이 본 발명에 대한 "선행 기술"로 인정되지는 않는다. 본 발명의 조성물 및 방법의 구체예는 하기 실시예에서 예시된다.

## [0240] 실시예

[0241] 아래의 무제한적 실시예는 본 발명의 선택된 구체예를 예시하기 위한 것이다. 제시된 성분의 비율에서 변화 및 대안적 성분은 당업자에 자명하고 본 발명의 구체예의 범위 내에 있다.

[0242] *실시예 1: 프락타신 (FXN)에 대한 핵산 분자 안티센스 및/또는 프락타신 (FXN) 폴리뉴클레오타이드의 센스 가닥에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 설계*

[0243] 앞서 지시된 바와 같이, 용어 "특이적인 올리고뉴클레오타이드" 또는 "표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드"는 (i) 표적화된 유전자의 일부와 안정된 복합체를 형성할 수 있거나, 또는 (ii) 표적화된 유전자의 mRNA 전사체의 일부와 안정된 이중나선을 형성할 수 있는 서열을 보유하는 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0244] 적절한 올리고뉴클레오타이드의 선별은 원하는 용융 온도 (melting temperature) (일반적으로, 50-60°C)을 갖는 표적 폴리뉴클레오타이드 서열과 하이브리드를 형성하고 자가-이합체 (self-dimer) 또는 다른 복잡한 이차 구조를 형성하지 않는 19-25개 뉴클레오타이드의 하위서열을 각 소정의 서열에서 자동적으로 확인하는 컴퓨터 프로그램 (가령, IDT AntiSense Design, IDT OligoAnalyzer)을 이용함으로써 조장된다.

[0245] 적절한 올리고뉴클레오타이드의 선별은 핵산 서열을 자동적으로 정렬하고 동일성 또는 상동성의 영역을 표시하는 컴퓨터 프로그램을 이용함으로써 더욱 조장된다. 이들 프로그램은 예로써, GenBank와 같은 데이터베이스를 검색하거나, 또는 PCR 산물을 서열화함으로써, 획득된 핵산 서열을 비교하는데 이용된다. 소정의 게놈의 일정한 범위의 유전자와 유전자간 영역 (intergenic region)으로부터 핵산 서열의 비교는 목적되는 유전자에 적절한 정도의 특이성을 보이는 핵산 서열의 선별을 가능하게 한다. 이들 절차는 표적 핵산 서열에 높은 정도의 상보성 (complementarity), 그리고 소정의 게놈에서 다른 핵산 서열에 더욱 낮은 정도의 상보성을 나타내는 올리고뉴클레오타이드의 선별을 가능하게 한다. 당업자는 본 발명에서 이용을 위한 유전자의 적절한 영역을 선별하는데 상당한 허용 범위 (latitude)가 존재한다는 것을 인지할 것이다.

[0246] 안티센스 화합물은 표적 핵산에 상기 화합물의 결합이 표적 핵산의 정상적인 기능을 간섭하여 기능 및/또는 활성의 조절을 유발하고, 그리고 특정한 결합이 요망되는 조건 하에, 다시 말하면, 생체내 분석 또는 치료적 처리의 경우에 생리학적 조건 하에, 그리고 시험관내 분석의 경우에 이들 분석이 수행되는 조건 하에 비-표적 핵산 서열에 안티센스 화합물의 비-특이적 결합을 회피할 수 있을 만큼 충분한 정도의 상보성이 존재할 때, "특이적으로 혼성화가능"하다.



- [0247] 본 명세서에서 기술된 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 성질은 당분야에 공지된 하나 이상의 시험관내 분석에 의해 결정될 수 있다. 가령, 본 명세서에서 기술된 올리고뉴클레오타이드의 성질은 용융 곡선 분석 (melting curve assay)을 이용하여 표적 자연 안티센스와 잠재적인 약물 분자 사이에 결합 강도를 측정함으로써 획득될 수 있다.
- [0248] 표적 자연 안티센스와 잠재적인 약물 분자 (Molecule) 사이에 결합 강도는 용융 곡선 분석과 같은 분자간 상호작용의 강도를 측정하는 임의의 확립된 방법을 이용하여 예측될 수 있다.
- [0249] 용융 곡선 분석은 자연 안티센스/Molecule 복합체에서 이중 가닥으로부터 단일 가닥 형태로 신속한 전이가 일어나는 온도를 결정한다. 상기 온도는 이들 두 분자 사이에 상호작용 강도의 신뢰성 있는 척도로서 폭넓게 인정된다.
- [0250] 용융 곡선 분석은 실제 자연 안티센스 RNA 분자 또는 Molecule의 결합 부위에 상응하는 합성 DNA 또는 RNA 뉴클레오타이드의 cDNA 사본을 이용하여 실행될 수 있다. 이러한 분석을 실행하기 위하여 모든 필수 시약을 포함하는 다중 키트가 가용하다 (가령, *Applied Biosystems Inc. MeltDoctor kit*). 이들 키트는 이중 가닥 DNA (dsDNA) 결합 염료 (가령, ABI HRM 염료, SYBR Green, SYTO 등) 중에서 하나를 포함하는 적절한 완충액을 포함한다. dsDNA 염료의 성질은 그들이 자유 형태에서는 형광을 거의 방출하지 않지만, dsDNA에 결합될 때 상당한 형광성이다.
- [0251] 상기 분석을 실행하기 위하여, cDNA 또는 대응하는 올리고뉴클레오타이드는 특정 제조업체의 프로토콜에 의해 규정된 농도에서 Molecule와 혼합된다. 혼합물은 95℃로 가열되어 모든 미리-형성된 dsDNA 복합체가 해리되고, 이후 실온 또는 키트 제조업체에 의해 규정된 더욱 낮은 온도로 서서히 냉각되어 DNA 분자가 어닐링 (annealing) 되도록 한다. 이후, 새로 형성된 복합체는 95℃로 천천히 가열되고, 반응에 의해 생성된 형광의 양에 대한 데이터가 동시에 연속적으로 수집된다. 형광 강도는 반응물 내에 존재하는 dsDNA의 양에 반비례한다. 데이터는 키트에 적합한 실시간 PCR 장비 (가령 ABI의 StepOne Plus 실시간 PCR 시스템 또는 LightTyper 기구, Roche Diagnostics, Lewes, UK)를 이용하여 수집될 수 있다.
- [0252] 용융 피크는 적합한 소프트웨어 (가령, LightTyper (Roche) 또는 SDS Dissociation Curve, ABI)를 이용하여 온도 (x-축)에 대하여 온도에 관련된 형광의 네거티브 도함수 (negative derivative) (y축에서  $-d(\text{형광})/dT$ )를 플롯팅 (plotting)함으로써 구축된다. 획득된 데이터는 dsDNA 복합체에서 단일 가닥 분자로의 신속한 전이 온도를 확인하기 위하여 분석된다. 상기 온도는  $T_m$ 으로 불리고, 그리고 두 분자간의 상호작용 강도에 직접적으로 비례한다. 전형적으로,  $T_m$ 은 40℃를 초과할 것이다.
- [0253] 실시예 2: 프락탁신 (FXN) 폴리뉴클레오타이드의 조성
- [0254] 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 HEPG2 세포의 처리:
- [0255] 실시예 2에서 이용된 모든 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 실시예 1에서 기술된 바와 같이 설계되었다. 제조업체 (Coralville, IA의 IDT Inc.)는 설계된 포스포티오에이트 결합 올리고뉴클레오타이드를 제조하도록 지시를 받고 표 2에 도시된 설계된 포스포티오에이트 유사체를 제공하였다. 뉴클레오타이드 사이에 별표 지정은 포스포티오에이트 결합의 존재를 지시한다. 실시예 2에서 실험에 요구되는 올리고뉴클레오타이드는 임의의 적절한 최신 방법, 예를 들면, IDT에 의해 이용된 방법을 이용하여 합성될 수 있다: 고행 서포트, 예를 들면, 5 마이크로 제어된 구멍 유리 비드 (CPG) 상에서, 포스포라미디트 단량체 (모든 활성기가 보호기, 예를 들면, 당에서 트리틸기, A와 C에서 벤조일 및 G에서 N-2-이소부틸로 보호되는 정상적인 뉴클레오타이드)를 이용하여. 보호기는 올리고뉴클레오타이드 합성 동안 바람직하지 않은 반응을 예방한다. 보호기는 합성 과정의 종결 시점에서 제거된다. 최초 뉴클레오타이드는 3' 탄소를 통해 고행 서포트에 연결되고, 그리고 합성은 3'에서 5' 방향으로 진행된다. 성장하는 올리고뉴클레오타이드 사슬에 새로운 염기의 추가는 4 단계로 진행된다: 1) 보호기가 트리클로로아세트산을 이용하여 고정된 뉴클레오타이드의 5' 산소로부터 제거된다; 2) 고정된 뉴클레오타이드 및 차순 뉴클레오타이드는 테트라졸을 이용하여 서로 결합된다; 이러한 반응은 테트라졸릴 포스포라미디트 중간물질을 통하여 진행된다; 3) 반응되지 않은 유리 뉴클레오타이드 및 반응 부산물은 세척되고, 그리고 반응되지 않은 고정된 올리고뉴클레오타이드는 다음 라운드의 합성에 그들의 참여를 예방하기 위해 캡핑 (capping)된다; 캡핑은 아세트산 무수물 및 N-메틸 이미다졸을 이용하여 유리 5' 히드록실을 아세틸화시킴으로써 달성된다; 4) 뉴클레오타이드간에 결합을 안정화시키기 위해, 포스포디에스테르 결합이 발생해야 하는 경우에 요오드와 물, 또는 포스포티오에이트 결합이 요구되는 경우에 Beaucage 시약 (3H-1,2-벤조디티올-3-온-1,1-디옥시드)을 이용하여 인이 산화된

다. 이들 2가지 산화제를 교대시킴으로써, 키메라 골격이 작제될 수 있다. 앞서 기술된 4 단계 사이클은 서열 내에 모든 뉴클레오티드에 대해 반복된다. 완전한 서열이 합성될 때, 올리고뉴클레오티드는 고품 서포트로부터 절단되고, 그리고 높은 온도에서 수산화암모늄을 이용하여 탈보호된다. 보호 기는 탈염 (desalting)에 의해 세척되고, 그리고 나머지 올리고뉴클레오티드는 동결건조된다.

[0256] 실시예 2에서 설계된 실험을 수행하기 위해, ATCC로부터 HepG2 세포 (cat# HB-8065)를 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub>에서 성장 배지 (MEM/EBSS (Hyclone cat #SH30024, 또는 Mediatech cat # MT-10-010-CV) +10% FBS (Mediatech cat# MT35-011-CV)+ 페니실린/스트렙토마이신 (Mediatech cat# MT30-002-C1))에서 성장시켰다. 실험 하루전, 이들 세포를 0.5x10<sup>4</sup>/ml의 밀도로 6개 웰 평판에 재도말하고 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub>에서 하룻밤동안 배양하였다. 실험 당일, 6개 웰 평판에 있는 배지를 새로운 성장 배지로 교체하였다.

[0257] 동결건조된 형태로 제조업체에 의해 운반된 올리고뉴클레오티드를 탈이온화된 RNase/DNase-없는 물에서 20 μM의 농도로 희석하였다. 상기 용액 2 μl를 400 μl의 Opti-MEM 배지 (Gibco cat#31985-070) 및 4 μl의 Lipofectamine 2000 (Invitrogen cat# 11668019)과 함께 실온에서 20분간 배양하고, 이후 HepG2 세포가 있는 6개 웰 평판의 한 웰에 방울방울 제공하였다. 올리고뉴클레오티드 용액 대신에 물 2μl를 포함하는 유사한 혼합물은 모의-형질감염된 대조에 이용되었다. 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub>에서 3-18시간 배양후, 배지를 새로운 성장 배지로 교체하였다. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 첨가후 48시간 시점에, 배지를 제거하고, 그리고 SV Total RNA 분리 시스템 (Promega (cat # Z3105)) 또는 RNeasy Total RNA 분리 키트 (Qiagen (cat# 74181))를 이용하여 제조업체의 지시에 따라 세포로부터 RNA를 추출하였다. 600 ng의 추출된 RNA를 Verso cDNA 키트 (Thermo Scientific (cat#AB1453B)) 또는 High Capacity cDNA 역전사 키트 (cat# 4368813)를 이용하여, 제조업체의 프로토콜에 따라 실행된 역전사 반응에 첨가하였다. 이와 같은 역전사 반응으로부터 cDNA를 이용하여 ABI Taqman 유전자 발현 믹스 (cat#4369510) 및 ABI에 의해 설계된 프라이머/프로브 (Applied Biosystems Inc. (Foster City CA)에 의한 Applied Biosystems Taqman Gene Expression Assay: Hs00175940\_m1 (FXN))를 이용한 실시간 PCR에 의해 유전자 발현을 모니터링하였다. StepOne Plus Real Time PCR Machine (Applied Biosystems)을 이용하여, 아래의 PCR 주기가 이용되었다: 2분 동안 50℃, 10분 동안 95℃, 40회 사이클의 (15초 동안 95℃, 1분 동안 60℃). 처리된 샘플 및 모의-형질감염된 샘플 사이에 18S-표준화된 dCt 값에서 차이에 근거하여, 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리 후 유전자 발현에서 배수적 변화가 계산되었다.

[0258] **결과:** 실시간 PCR 결과는 HepG2 세포에서 FXN mRNA의 수준이 FXN 안티센스 AI951739에 대해 설계된 안티센스 올리고 중에서 2개로 처리 후 48시간 시점에 유의미하게 증가한다는 것을 증명한다 (도 1).

[0259] **실시예 3: FXN-특이적 자연 안티센스 전사체를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리에 의해 상이한 세포주에서 FXN mRNA의 상향 조절**

[0260] 실시예 3에서 FXN-특이적 자연 안티센스 전사체를 표적으로 하는 상이한 화학의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 20 nM의 최종 농도에서 다양한 세포주의 패널에서 스크리닝되었다. 이용된 세포는 상이한 유형과 장기로부터 기원한다. 하기 데이터는 FXN-특이적 자연 안티센스 전사체의 기능의 조절을 통한 FXN mRNA의 상향 조절이 단일 올리고뉴클레오티드, 세포 유형 또는 조직에 한정되지 않는다는 것을 확증하고, 따라서 본 발명의 올리고뉴클레오티드가 생물학적 시스템 내에서 FXN의 발현을 상향 조절한다는 것을 증명한다.

[0261] **재료와 방법**

[0262] **인간 GM03816A 섬유아세포 세포주:** 인간 GM03816A 섬유아세포 세포주는 프락타신 (FXN) 유전자 (대략 330과 380개 반복의 대립유전자)에서 동형접합성 GAA 확장을 보유하는 36세 여성 환자로부터 획득되었다. 이들 세포는 Dulbecco의 변형된 필수 배지 (Cellgrow cat#10-013-CV) +10% FBS (Cellgrow, cat# 35-011-CV) + 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Cellgrow, cat# 30-002-C1)에서 37℃와 5% CO<sub>2</sub>에서 성장되었다. 이들 세포는 하기 방법 중에서도 한 가지를 이용하여 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리되었다. 다음 날 방법의 경우에, 실험 하루전, 세포는 대략 2x10<sup>5</sup>/웰의 밀도에서 6 웰 평판 내로 성장 배지에서 재도말되고, 그리고 37℃와 5% CO<sub>2</sub>에서 하룻밤 동안 배양되었다. 다음 날, 6 웰 평판에서 배지가 새로운 성장 배지 (1.5 ml/웰)로 교체되고, 그리고 이들 세포는 안티센스 올리고뉴클레오티드가 약액주입되었다. 모든 안티센스 올리고뉴클레오티드는 IDT Inc. (Coralville, IA)에

의해 제조되었다. 모든 올리고뉴클레오타이드에 대한 서열은 표 2에 열거된다. 올리고뉴클레오타이드의 저장 용액은 DNase/RNase-없는 무균수에서 20 uM의 농도로 희석되었다. 한 웰을 약액주입하기 위해, 2 ul의 이러한 용액은 400 ul의 Opti-MEM 배지 (Gibco cat#31985-070) 및 4 ul의 Lipofectamine 2000 (Invitrogen cat# 11668019)과 함께 실온에서 20분 동안 배양되고, 그리고 세포를 갖는 6 웰 평판의 한 웰에 방울방울 적용되었다. 올리고뉴클레오타이드 용액 대신에 2 ul의 물을 포함하는 유사한 혼합물은 모의-형질감염된 대조에 이용되었다. 37℃와 5% CO<sub>2</sub>에서 대략 18시간의 배양 후, 배지는 새로운 성장 배지로 교체되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 첨가후 48시간 시점에, 배지는 제거되고, 그리고 RNA는 제조업체의 지시에 따라, Promega로부터 SV Total RNA 분리 시스템 (cat # Z3105)을 이용하여 세포로부터 추출되었다. 600 나노그램의 정제된 전체 RNA는 제조업체의 프로토콜에서 기술된 바와 같이 Invitrogen으로부터 SuperScript VILO cDNA 합성 키트 (cat#11754-250)를 이용하여 수행된 역전사 반응에 첨가되었다. 이러한 역전사 반응으로부터 cDNA를 이용하여 ABI Taqman 유전자 발현 믹스 (cat#4369510) 및 ABI에 의해 설계된 프라이머/프로브 (인간 FXN의 경우에 분석물 Hs00175940\_m1)를 이용한 실시간 PCR에 의해 유전자 발현을 모니터링하였다. 3가지 분석물 모두를 이용하여 획득된 결과는 매우 유사하였다. StepOne Plus Real Time PCR 시스템 (Applied Biosystems)을 이용하여, 아래의 PCR 주기가 이용되었다: 2분 동안 50℃, 10분 동안 95℃, 40회 사이클의 (15초 동안 95℃, 1분 동안 60℃). 18S에 대한 분석물은 ABI (cat# 4319413E)에 의해 제조되었다. 처리된 샘플 및 모의-형질감염된 샘플 사이에 18S-표준화된 dCt 값에서 차이에 근거하여, 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리 후 유전자 발현에서 배수적 변화가 계산되었다. 대안적인 동일자 방법의 경우에, 모든 절차가 유사하게 수행되지만, 세포가 첫날에, 그들이 6-웰 평판 내로 분배된 직후에, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 약액주입되었다.

[0263]

인간 GM15850D 림프구 세포: 인간 GM15850D 림프아세포 세포주. 인간 GM03816A 섬유아세포 세포주는 프락틴 (FXN) 유전자 (대략 650과 1030개 반복의 대립유전자)에서 동형접합성 GAA 확장을 보유하는 13세 남성 환자로 부터 획득되었다. 이들 세포는 2ml L-글루타민 (ATCC cat#30-2001) +5% FBS 비-열 불활화된 (Cellgrow, cat# 35-010 CV) + 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Cellgrow, cat# 30-002-C1)을 포함하는 RPMI 1640에서 37℃와 5% CO<sub>2</sub>에서 성장되었다. 이들 세포는 하기 방법을 이용하여 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리되었다. 세포는 대략  $3 \times 10^5$ /웰의 밀도에서 6 웰 평판 내로 성장 배지에서 도말되고, 37℃와 5% CO<sub>2</sub>에서 하룻밤 동안 배양되고, 그리고 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 즉시 약액주입되었다; 약액주입 후, 각 웰은 단지 1.5 ml를 내포한다. 올리고뉴클레오타이드의 저장 용액은 DNase/RNase-없는 무균수에서 20 uM의 농도로 희석되었다. 한 웰을 약액주입하기 위해, 2 ul의 이러한 용액은 400 ul의 Opti-MEM 배지 (Gibco cat#31985-070) 및 4 ul의 Lipofectamine 2000 (Invitrogen cat# 11668019)과 함께 실온에서 20분 동안 배양되고, 그리고 세포를 갖는 6 웰 평판의 한 웰에 방울방울 적용되었다. 올리고뉴클레오타이드 용액 대신에 2 ul의 물을 포함하는 유사한 혼합물은 모의-형질감염된 대조에 이용되었다. 모든 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 IDT Inc. (Coralville, IA)에 의해 제조되었다. 모든 올리고뉴클레오타이드에 대한 서열은 표 2에 열거된다. 다음 날, 1.5 ml의 새로운 배지가 6 웰 평판의 각 웰에 첨가되었다. 약액주입후 48시간 시점에, 동일한 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리된 세포는 15 ml 원뿔형 튜브에서 함께 모아졌다; 모의-형질감염된 세포는 15 ml 원뿔형 튜브에서 함께 모아졌다. 이 시점에서, 이들 세포는 120 g에서 6분 동안 원심분리되고, 그리고 배지가 폐기되었다. 세포 펠렛은 제조업체의 지시에 따라 Promega로부터 SV Total RNA 분리 시스템 (cat # Z3105)을 이용하여, 세포 RNA를 추출하기 위해 용해되었다. 600 나노그램의 정제된 전체 RNA는 제조업체의 프로토콜에서 기술된 바와 같이 Invitrogen으로부터 SuperScript VILO cDNA 합성 키트 (cat#11754-250)를 이용하여 수행된 역전사 반응에 첨가되었다. 이러한 역전사 반응으로부터 cDNA를 이용하여 ABI Taqman 유전자 발현 믹스 (cat#4369510) 및 ABI에 의해 설계된 프라이머/프로브 (인간 FXN의 경우에 분석물 Hs00175940\_m1)를 이용한 실시간 PCR에 의해 유전자 발현을 모니터링하였다. 3가지 분석물 모두를 이용하여 획득된 결과는 매우 유사하였다. StepOne Plus Real Time PCR 시스템 (Applied Biosystems)을 이용하여, 아래의 PCR 주기가 이용되었다: 2분 동안 50℃, 10분 동안 95℃, 40회 사이클의 (15초 동안 95℃, 1분 동안 60℃). 18S에 대한 분석물은 ABI (cat# 4319413E)에 의해 제조되었다. 처리된 샘플 및 모의-형질감염된 샘플 사이에 18S-표준화된 dCt 값에서 차이에 근거하여, 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리 후 유전자 발현에서 배수적 변화가 계산되었다. 대안적인 동일자 방법의 경우에, 모든 절차가 유사하게 수행되지만, 세포가 첫날에, 그들이 6-웰 평판 내로 분배된 직후에, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 약액주입되었다.

[0264]

CHP-212 세포주: ATCC로부터 CHP-212 인간 신경아세포종 세포 (cat# CRL-2273)는 성장 배지 (1: MEM과 F12 (각



각, ATCC cat # 30-2003과 Mediatech cat# 10-080-CV)의 혼합물 +10% FBS (Mediatech cat# MT35-011-CV) + 페니실린/스트렙토마이신 (Mediatech cat# MT30-002-CI))에서 37℃와 5% CO<sub>2</sub>에서 성장되었다. 이들 세포는 하기 방법 중에서 한 가지를 이용하여 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리되었다. 다음 날 방법의 경우에, 실험 하루전, 세포는 대략  $2 \times 10^5$ /웰의 밀도에서 6 웰 평판 내로 성장 배지에서 채도말되고, 그리고 37℃와 5% CO<sub>2</sub>에서 하룻밤 동안 배양되었다. 다음 날, 6 웰 평판에서 배지가 새로운 성장 배지 (1.5 ml/웰)로 교체되고, 그리고 이들 세포는 안티센스 올리고뉴클레오티드가 약액주입되었다. 모든 안티센스 올리고뉴클레오티드는 IDT Inc. (Coralville, IA)에 의해 제조되었다. 모든 올리고뉴클레오티드에 대한 서열은 표 2에 열거된다. 올리고뉴클레오티드의 저장 용액은 DNase/RNase-없는 무균수에서 20 uM의 농도로 희석되었다. 한 웰을 약액주입하기 위해, 2 ul의 이러한 용액은 400 ul의 Opti-MEM 배지 (Gibco cat#31985-070) 및 4 ul의 Lipofectamine 2000 (Invitrogen cat# 11668019)과 함께 실온에서 20분 동안 배양되고, 그리고 세포를 갖는 6 웰 평판의 한 웰에 방울방울 적용되었다. 올리고뉴클레오티드 용액 대신에 2 ul의 물을 포함하는 유사한 혼합물은 모의-형질감염된 대조에 이용되었다. 37℃와 5% CO<sub>2</sub>에서 대략 18시간의 배양 후, 배지는 새로운 성장 배지로 교체되었다. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 첨가후 48시간 시점에, 배지는 제거되고, 그리고 RNA는 제조업체의 지시에 따라, Promega로부터 SV Total RNA 분리 시스템 (cat # Z3105)을 이용하여 세포로부터 추출되었다. 600 나노그램의 정제된 전체 RNA는 제조업체의 프로토콜에서 기술된 바와 같이 Invitrogen으로부터 SuperScript VILO cDNA 합성 키트 (cat#11754-250)를 이용하여 수행된 역전사 반응에 첨가되었다. 이러한 역전사 반응으로부터 cDNA를 이용하여 ABI Taqman 유전자 발현 믹스 (cat#4369510) 및 ABI에 의해 설계된 프라이머/프로브 (인간 FXN의 경우에 분석물 Hs00175940\_m1)를 이용한 실시간 PCR에 의해 유전자 발현을 모니터링하였다. 3가지 분석물 모두를 이용하여 획득된 결과는 매우 유사하였다. StepOne Plus Real Time PCR 시스템 (Applied Biosystems)을 이용하여, 아래의 PCR 주기가 이용되었다: 2분 동안 50℃, 10분 동안 95℃, 40회 사이클의 (15초 동안 95℃, 1분 동안 60℃). 18S에 대한 분석물은 ABI (cat# 4319413E)에 의해 제조되었다. 처리된 샘플 및 모의-형질감염된 샘플 사이에 18S-표준화된 dCt 값에서 차이에 근거하여, 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리 후 유전자 발현에서 배수적 변화가 계산되었다. 대안적인 동일한 방법의 경우에, 모든 절차가 유사하게 수행되지만, 세포가 첫날에, 그들이 6-웰 평판 내로 분배된 직후에, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 약액주입되었다.

[0265]

*HepG2 세포주*: ATCC로부터 HepG2 인간 간세포 암종 세포 (cat# HB-8065)는 성장 배지 (MEM/EBSS (Hyclone cat #SH30024, 또는 Mediatech cat # MT-10-010-CV) +10% FBS (Mediatech cat# MT35-011-CV) + 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Mediatech cat# MT30-002-CI))에서 37℃와 5% CO<sub>2</sub>에서 성장되었다. 이들 세포는 하기 방법 중에서 한 가지를 이용하여 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리되었다. 다음 날 방법의 경우에, 실험 하루전, 세포는 대략  $2 \times 10^5$ /웰의 밀도에서 6 웰 평판 내로 성장 배지에서 채도말되고, 그리고 37℃와 5% CO<sub>2</sub>에서 하룻밤 동안 배양되었다. 다음 날, 6 웰 평판에서 배지가 새로운 성장 배지 (1.5 ml/웰)로 교체되고, 그리고 이들 세포는 안티센스 올리고뉴클레오티드가 약액주입되었다. 모든 안티센스 올리고뉴클레오티드는 IDT Inc. (Coralville, IA)에 의해 제조되었다. 모든 올리고뉴클레오티드에 대한 서열은 표 2에 열거된다. 올리고뉴클레오티드의 저장 용액은 DNase/RNase-없는 무균수에서 20 uM의 농도로 희석되었다. 한 웰을 약액주입하기 위해, 2 ul의 이러한 용액은 400 ul의 Opti-MEM 배지 (Gibco cat#31985-070) 및 4 ul의 Lipofectamine 2000 (Invitrogen cat# 11668019)과 함께 실온에서 20분 동안 배양되고, 그리고 세포를 갖는 6 웰 평판의 한 웰에 방울방울 적용되었다. 올리고뉴클레오티드 용액 대신에 2 ul의 물을 포함하는 유사한 혼합물은 모의-형질감염된 대조에 이용되었다. 37℃와 5% CO<sub>2</sub>에서 대략 18시간의 배양 후, 배지는 새로운 성장 배지로 교체되었다. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 첨가후 48시간 시점에, 배지는 제거되고, 그리고 RNA는 제조업체의 지시에 따라, Promega로부터 SV Total RNA 분리 시스템 (cat # Z3105)을 이용하여 세포로부터 추출되었다. 600 나노그램의 정제된 전체 RNA는 제조업체의 프로토콜에서 기술된 바와 같이 Invitrogen으로부터 SuperScript VILO cDNA 합성 키트 (cat#11754-250)를 이용하여 수행된 역전사 반응에 첨가되었다. 이러한 역전사 반응으로부터 cDNA를 이용하여 ABI Taqman 유전자 발현 믹스 (cat#4369510) 및 ABI에 의해 설계된 프라이머/프로브 (인간 FXN의 경우에 분석물 Hs00175940\_m1)를 이용한 실시간 PCR에 의해 유전자 발현을 모니터링하였다. 3가지 분석물 모두를 이용하여 획득된 결과는 매우 유사하였다. StepOne Plus Real Time PCR 시스템 (Applied Biosystems)을 이용하여, 아래의 PCR 주기가 이용되었다: 2분 동안 50℃, 10분 동안 95℃, 40회 사이클의 (15초 동안 95℃, 1분 동안 60℃). 18S에 대한 분석물은 ABI (cat# 4319413E)에 의해 제조되었다. 처리된 샘플 및 모의-형질감염된 샘플 사이에 18S-표준화된 dCt 값에서 차이에 근거하여, 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리 후 유전자 발현에서 배수적 변화가 계산되었다. 대안



적인 동일자 방법의 경우에, 모든 절차가 유사하게 수행되지만, 세포가 첫날에, 그들이 6-웰 평판 내로 분배된 직후에, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 약액주입되었다.

[0266] **결과:** 모의-형질감염된 대조와 비교하여 20 nM의 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리 후 상이한 세포주에서 FXN mRNA 수준은 표 3에 도시된다. 데이터에서 확인되는 바와 같이, 20 nM에서 적용될 때 이들 올리고뉴클레오티드 중에서 일부는 FXN mRNA의 수준을 상향 조절하는데 고도로 활성이었고, 그리고 인간 (본래와 세포주)에서 상이한 세포 유형/장기로부터 유래된 세포주 HepG2 간암 세포주 (간), GM15850D 환자 림프아세포 세포주 (혈액), CHP-212 신경아세포종 세포주 (뇌), GM03816A 환자 섬유아세포 세포주에서 일관되게, 상향 조절을 보였다. 자연 안티센스 서열에 대해 설계된 올리고뉴클레오티드 중에서 일부는 조사된 세포주의 전부 또는 일부에서 FXN mRNA 수준에 영향을 주지 않거나 또는 극히 미미한 영향을 주었다. 이들 차이는 올리고뉴클레오티드의 결합이 올리고뉴클레오티드의 표적 서열의 이차와 삼차 구조에 좌우될 수 있다는 것을 지시하는 기존 문헌의 데이터와 합치한다.

[0267] 표 3에서는 FXN-특이적 자연 안티센스 전사체를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리된 세포에서 FXN mRNA의 상대적인 발현을 보여준다. 하기 축약이 상이한 세포 유형과 장기 (간, 혈액, 섬유아세포, 뇌)에서 달성되었다. 여기에 제공된 세포에 관한 더욱 많은 정보를 위하여, 실시예 1과 2를 참조한다.

**표 3**

[0268]

	CUR-0732	CUR-0733	CUR-0734	CUR-0735
<b>HepG2 세포주 (18S에 표준화된 데이터)</b> 세포 유형: 인간 간세포 암종 세포주 조직: 간	1.8	1.6	1.4	0.9
<b>CHP-212 세포주 (18S에 표준화된 데이터)</b> 세포 유형: 인간 신경아세포종 세포주 조직: 뇌	2.5	1.9	1.9	1.6
<b>GM03816 세포주 (베타-악틴에 표준화된 데이터)</b> 세포 유형: 인간 림프아세포 세포주 조직: 혈액	0.9	0.9	1.8	2.4
<b>GM15850 세포주 (18S에 표준화된 데이터)</b> 세포 유형: 인간 섬유아세포 세포주	2.5	2.2	2.5	0.4
<b>GM15850 세포주 (베타-악틴에 표준화된 데이터)</b> 세포 유형: 인간 섬유아세포 세포주	8	가용하지 않음	2.8	가용하지 않음

[0269] 본 발명이 하나 이상의 실행에 관하여 예시되고 설명되었지만, 본 명세서 및 첨부된 도면을 읽고 이해하는 당업자에게 동등한 개변은 명백할 것이다. 이에 더하여, 본 발명의 특정한 특징이 여러 실행 중에서 단지 하나에 관하여 개시되고 있긴 하지만, 이와 같은 특징은 임의의 소정의 또는 특정한 적용을 위하여 바람직하고 유리한 경

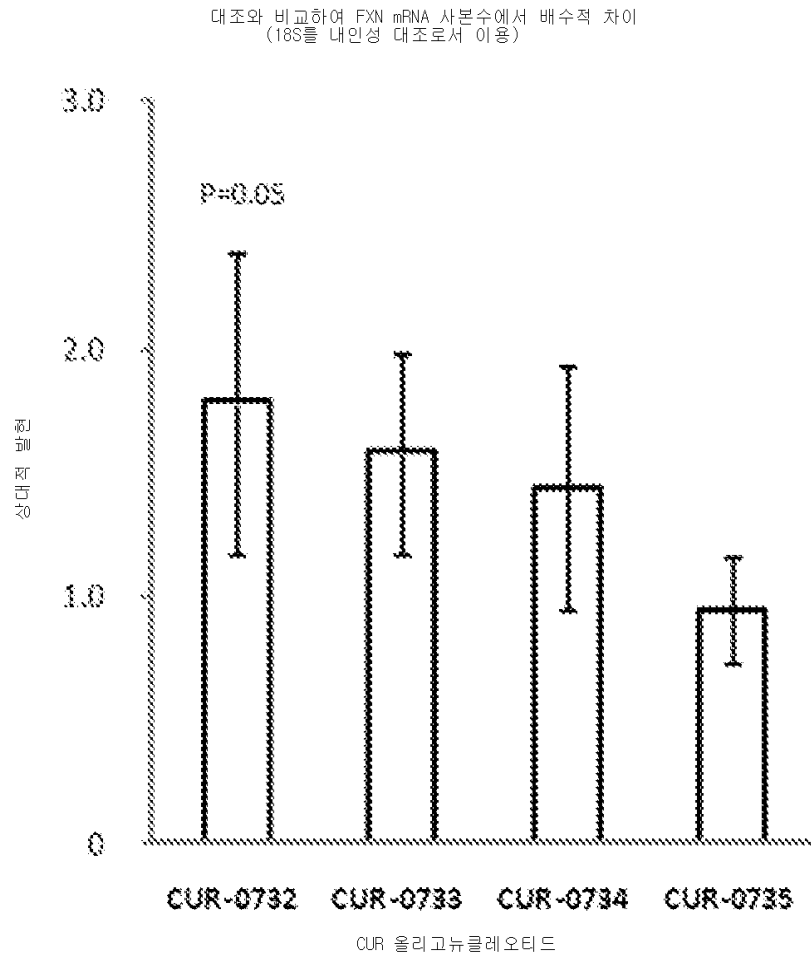
우에, 다른 실행의 하나 이상의 다른 특징과 복합될 수 있다.

[0270]

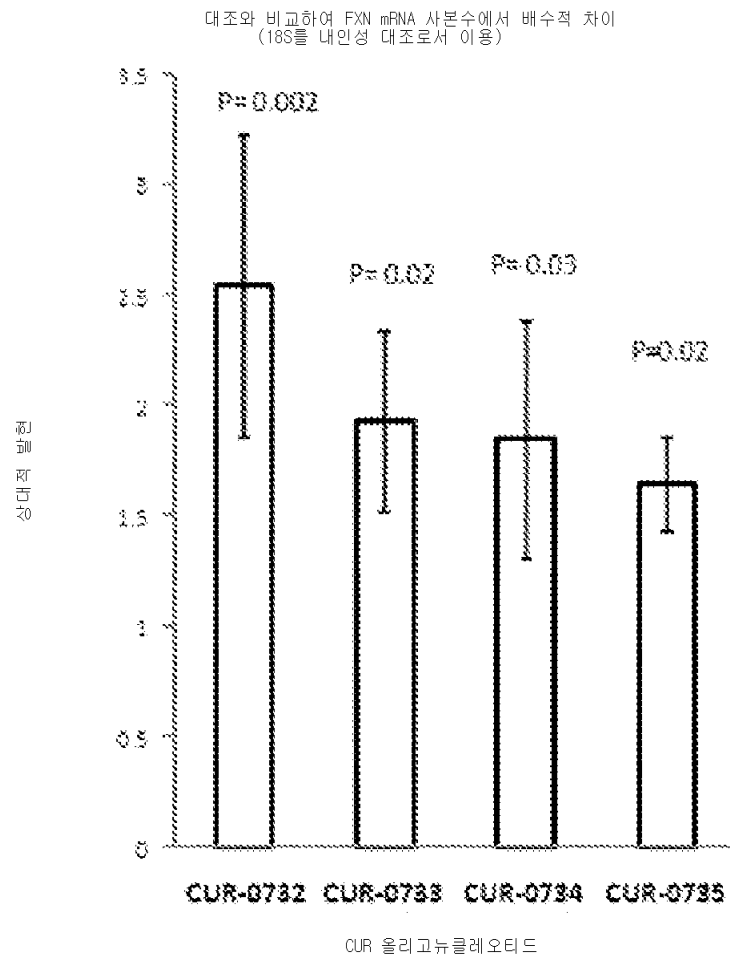
내용의 요약은 독자가 기술 내용의 성격을 신속하게 확인할 수 있도록 도와줄 것이다. 이는 아래의 특허청구범위의 범위 또는 의미를 해석하거나 제한하는데 이용되지 않는 것으로 이해되어야 한다.

## 도면

### 도면1

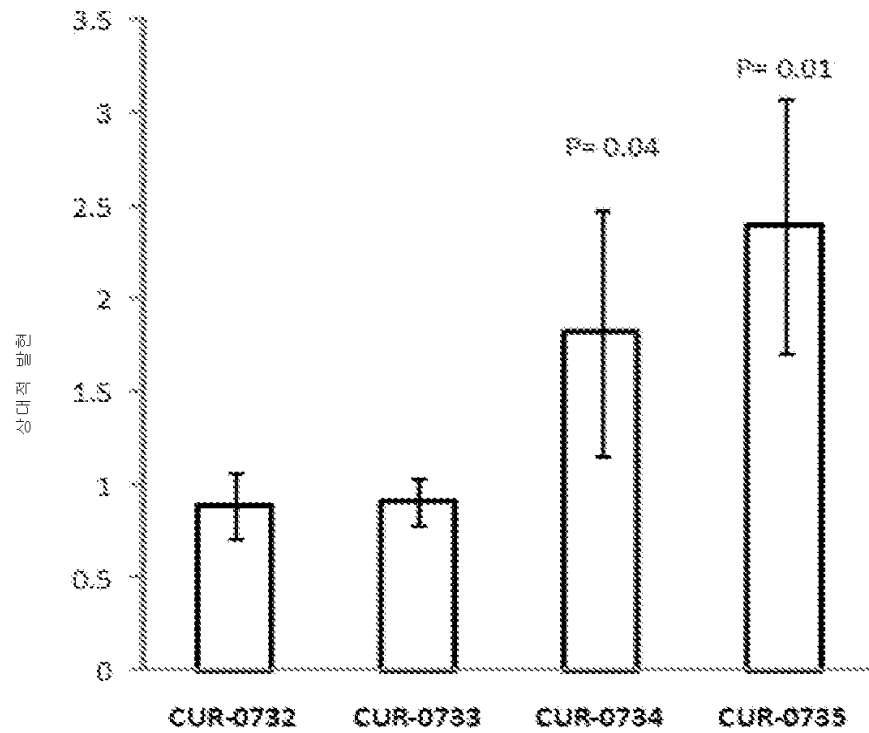


도면2



도면3

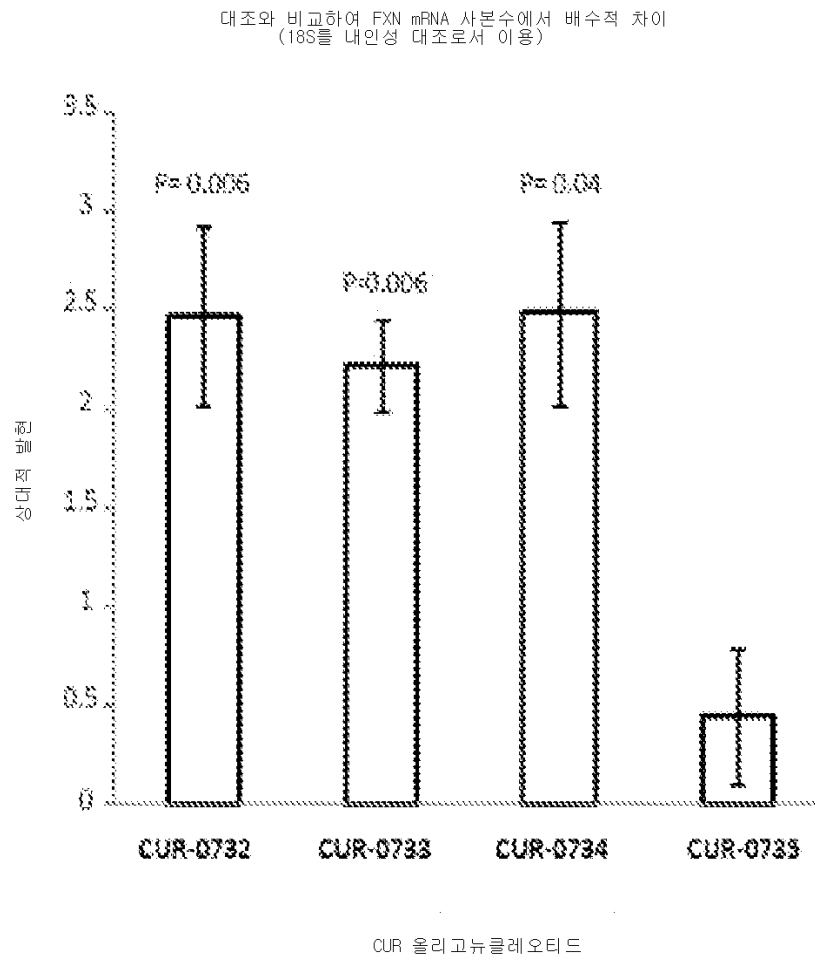
대조와 비교하여 FXN mRNA 사본수에서 배수적 차이  
(베타-악틴을 내인성 대조로서 이용)



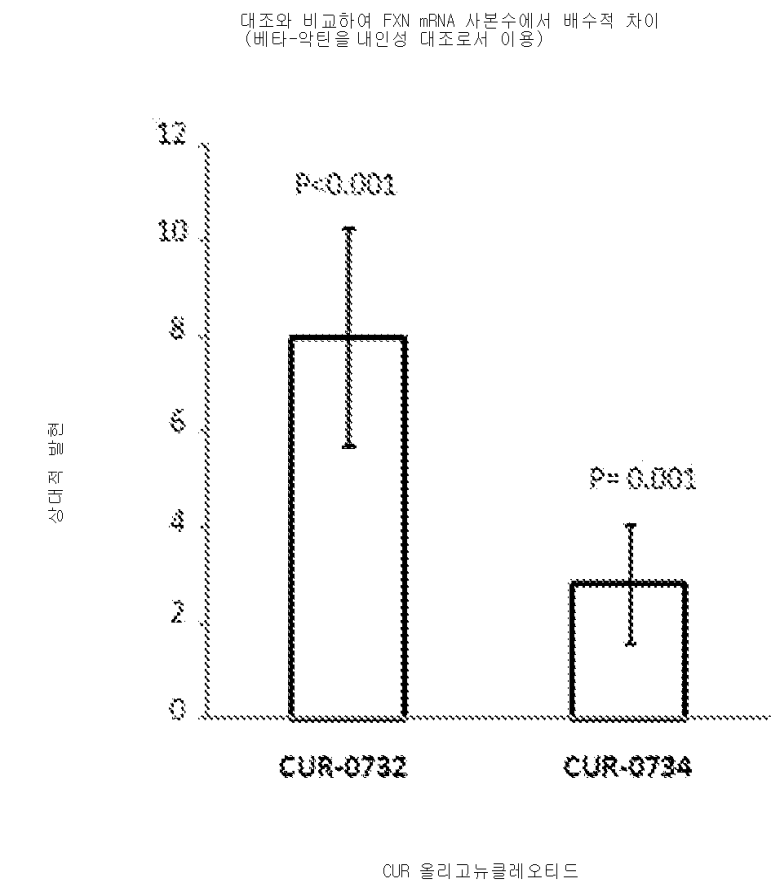
CUR 올리고뉴클레오타이드



도면4



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> OPKO CURNA LLC
- <120> TREATMENT OF FRATAXIN (FXN) RELATED DISEASES BY INHIBITION OF NATURAL ANTISENSE TRANSCRIPT TO FXN
- <130> FXN
- <140> US61/494928
- <141> 2011-06-09
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 7176
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

<400> 1

agtcctccctt gggcagggg tcctggttgc actccgtgct ttgcacaaag caggctctcc	60
atctttgtta aatgcacgaa tagtgctaag ctgggaagtt cttcctgagg tctaacctct	120
agctgtctcc ccacagaaga gtgcctgcgg ccagtggcca ccagggtcg ccgcagcacc	180
cagcgttggg gggcggagcg ggccgcagac ccggagcagc atgtggactc tcgggcgcgg	240
cgcatagacc ggctcctgg cgtcaccag cccagcccag gcccagacc tcaccgggt	300
cccgcggcgg gcagagttgg cccactctg cggccgccgt ggctgcgca ccgacatcga	360
tgcgacctgc acgccccgcc gcgcaagttc gaaccaacgt ggctcaacc agatttggaa	420
tgtcaaaaag cagagtgtct atttgatgaa tttaggaaa tctggaactt tgggccaccc	480
aggctctcta gatgagacca cctatgaaag actagcagag gaaacgctgg actctttagc	540
agagtttttt gaagaccttg cagacaagcc atacacgttt gaggactatg atgtctcctt	600
tgggagtggg gtcttaactg tcaactggg tggagatcta ggaacctatg tgatcaacaa	660
gcagacgcca aacaagcaaa tctggctatc ttctccatcc aggtatgtag tggacctaa	720
cgttatgact ggactgggaa aaactgggtg tactcccacg acggcgtgtc cctccatgag	780
ctgctggcgg cagagctcac taaagcctta aaaaccaaac tggacttgtc ttcttggcc	840
tattccggaa aagatgttg atgcccagcc ccgttttaag gacattaaaa gctatcaggc	900
caagacccca gcttcattat gcagctgagg tctgtttttt gttgttgttg ttgtttattt	960
tttttattcc tgcttttgag gacagtggg ctatgtgtca cagctctgta gaaagaatgt	1020
gttgctcctt accttgcccc caagtctga ttttaattt ctatggaaga ttttttgat	1080
tgtcggtatt cctccctcac atgatacccc ttatctttta taatgtctta tgcctatacc	1140
tgaatataac aacctttaaa aaagcaaat aataagaagg aaaaattcca ggagggaaaa	1200
tgaattgtct tcaactctta ttctttgaag gatttactgc aagaagtaca tgaagagcag	1260
ctggtcaacc tgctcactgt tctatctcca aatgagacac attaaagggt agcctacaaa	1320
tgttttcagg cttctttcaa agtgtaagca cttctgagct ctttagcatt gaagtgtcga	1380
aagcaactca cacgggaaga tcatttctta ttgtgtctt gtgactgcca aggtgtggcc	1440
tgactgggt gtgccaggga gacctagtgc tgtttctccc acatattcac atacgtgtct	1500
gtgtgtatat atattttttc aatttaaagg ttagtatgga atcagctgct acaagaatgc	1560
aaaaaatctt ccaaagacaa gaaaagagga aaaaaagccg tttcatgag ctgagtgatg	1620
tagcgtaaac aacaaaatca tggagctgag gaggtgcctt gtaaacatga aggggcagat	1680
aaaggaagga gatactcatg ttgataaaga gagccctggt cctagacata gttcagccac	1740

aaagtagttg tccctttgtg gacaagtttc ccaaattccc tggacctctg cttcccatc	1800
tgtaaataga gagaatagag tatggttgat tcccagcatt cagtggctct gtcaagcaac	1860
ctaacaggct agttctaatt ccctattggg tagatgaggg gatgacaaag aacagttttt	1920
aagctatata ggaacattg ttattgggtg tgcctatcg tgatttcagt tgaattcatg	1980
tgaataaat agccatcctt ggcctggcgc ggtggctcac acctgtaac ccagcacttt	2040
tggaggccaa ggtgggtgga tcacctgagg tcaggagttc aagaccagcc tggccaacat	2100
gatgaaacc cgctctact aaaaatacaa aaaattagcc gggcatgatg gcaggtcct	2160
gtaatccag ctacttggga ggctgaagcg gaagaatcg ttgaaccag aggtggaggt	2220
tgcagtgagc cgagatcgtg ccattgcact gtaacctggg tgactgagca aaactctgtc	2280
tcaaaataat aataacaata taataataat aatagccatc ctttattgta cccttactgg	2340
gttaatcgta ttataccaca ttacctcatt ttaattttta ctgacctgca ctttatacaa	2400
agcaacaagc ctccaggaca ttaaaattca tgcaaagtta tgctcatgtt atattatfff	2460
cttacttaaa gaaggattta ttagtggctg ggcatggtgg cgtgcacctg taatcccagg	2520
tactcaggag gctgagacgg gagaattgct tgaccccagg cggaggaggt tacagtgagt	2580
cgagatcgta ccgagcgac agagcgagac tccgtctcaa aaaaaaaaaa aaggagggtt	2640
tattaatgag aagtttgiat taatatgtag caaaggcttt tccaatgggt gaataaaaac	2700
acattccatt aagtcaagct gggagcagtg gcatatacct atagtcccag ctgcacagga	2760
ggctgagaca ggaggattgc ttgaagccag gaattggaga tcagcctggg caacacagca	2820
agatcctatc tcttaaaaaa agaaaaaaaa acctattaat aataaaacag tataaacaaa	2880
agctaaatag gtaaaatatt ttttctgaaa taaaattatt ttttagtct gatggaaatg	2940
tttaagtga gtaggccagt gccagtgaga aaataaataa catcatacat gtttgtatgt	3000
gtttgcatct tgcttctact gaaagtttca gtgcacccca cttacttaga actcggtgac	3060
atgatgtact ctttatctg ggacacagca caaaagaggt atgcagtggg gctgctctga	3120
catgaaagt gaagttaagg aatctgggct cttatggggt ccttgtgggc cagcccttca	3180
ggcctatfff actttcatff tacatatagc tctaattggg ttgattatct cgttccaag	3240
gcagtgggag atccccatff aaggaaagaa aaggggcctg gcacagtggc tcatgcctgt	3300
aatcccagca ctttgggagg ctgaggcaag tgtatcacct gaggtcagga gttcaagacc	3360
agcctggcca acatggcaaa atccgtctc tactaaaaat attaaaaat tggctgggcg	3420
tgggtggttcg tgcctataat ttcagctact caggaggctg aggcaggaga atcgctgtaa	3480



cctggggggt ggaggttgca gtgagacgag atcatgccac ttactccag cctggccaac 3540  
 agagccatac tccgtctcaa ataaataaat aaataaataa agggacttca aacacatgaa 3600  
 cagcagccag gggaagaatc aaaatcata tctgtcaagc aaactggaaa agtaccactg 3660  
 tgtgtaccaa tagcctcccc accacagacc ctgggagcat cgcctcattt atggtgtggt 3720  
 ccagtcatcc atgtgaagga tgagtttcca ggaaaagggt attaaatatt cactgtaaca 3780  
 tactggagga ggtgaggaat tgacataatac aatcttagaa aactttttt tcccccttct 3840  
 attttttgag acaggatctc actttggcac tcaggctgga ggacagtggg acaatcaaag 3900

ctcatggcag cctcgacctc cctgggcttg ggcaatcctc ccacaggtgt gcacctccat 3960  
 agctggctaa ttgtgtatt tttttagag atggggtttc accatgttgc ccaggtggt 4020  
 ctctaacct taggtcaag tgatccacct gcctcgtcct cccaagatgc tgggattaca 4080  
 ggtgtgtgcc acaggtgttc atcagaaagc tttttctatt atttttacct tcttgagtgg 4140  
 gtagaacctc agccacatag aaaataaaat gttctggcat gacttattta gctctctgga 4200  
 attacaaaga aggaatgagg tgtgtaaaag agaacctggg ttttgaatc acaaatttag 4260  
 aatttaacg aaactctgcc tcttacttgt ttgtagacac tgacagtggc ctcatgtttt 4320

ttttttttt aatctataaa atggagatat ctaacatgtt gagcctgggc ccacaggcaa 4380  
 agcacaatcc tgatgtgaga agtactcagt tcatgacaac tgttgttctc acatgcatag 4440  
 cataatttca tattcacatt ggaggacttc tccaaaata tggatgacgt tccctactca 4500  
 accttgaact taatcaaaa actcagttta cttaacttcg tattagattc tgattccctg 4560  
 gaaccattta tctgtgtcct taccatgctt atattttact tgatcttttg cataccttct 4620  
 aaaactattt tagccaattt aaaatttgac agtttgcatt aaattatagg ttacaatat 4680  
 gctttatcca gctatactg ccccaaattc tgacagatgc ttttgccacc tctaaaggaa 4740

gacccatgtt catagtgatg gagtttgtgt ggactaacca tgcaagggtg ccaaggaaaa 4800  
 atcgctttac gcttccaagg tacacactaa gatgaaagta attttagtcc gtgtccagtt 4860  
 ggattcttgg cacatagtta tcttctgcta gaacaaacta aaacagctac atgccagcaa 4920  
 gggagaaaagg ggaaggagg gcaaagtgtt gaaatttcat gtaaatttat gctgttcaaa 4980  
 acgacgagtt catgactttg tgtatagatg aagaaatgcc ttttctttt tgagacagag 5040  
 tcttgcctctg tcacccagcg tggagtgcag tggcacgacg tgggctcact acaacctccg 5100  
 cctcctgggt tcaagcaatt ctctgcctca gcctcccgag tagctgggat tacaggtgcc 5160

tgccaccaca cccggctaatt tttgtattt ttagtagaga cggggtttca ccatcatggc 5220  
 caggtgggtc ttgaactcct gacctagtaa tccacctgcc tccgcctccc aaagtgtgg 5280  
 gattacagcg gtgagccact gcaccagcc agaaatgcct tctaattctt ggtttatctt 5340

aattagccag gacacttga gtgcatccg aagtacctga tcagtggccc ctttggaatg	5400
tgtaaaactc agctcacit taccctgca tccgtacag agacagaatc caagtcata	5460
tgttccatct tctctggctg tatagtttaa ggaatggaag gcaccagaac agattttattg	5520
aaatgtttat tagctgaaga tttatttaga cagttgagga aaacatcagc acccagcagt	5580
aaaattggct ctcaaagatt ttcttctct gtggaaagtc agacctctga ggccccatcc	5640
aggtagaagt actagtcaa gaaggccctc tctgtccac ttgtgtttct gtgatctgtg	5700
ggaacattgt taacgccaca tcttgacctc aaattgttta gctcctggcc agacacggtg	5760
gctcacacct gtaatccag cactttgaga ggctgaggca ggtggatcac ctgaggttag	5820
gagttcgagg ccagcctggt caacatggta aaaccccgcc tctactaaaa atacaaaaat	5880
tagctggccg tagtggcgca cgcctgttat ccagctact cgggaggctg aggcaggaga	5940
attgcttgaa cctgggtggt ggaggttgca gtgagccgag attacaccac tgcactccag	6000
cctgggtgac aagagggaaa ctccattaaa aaaatgtaat tcccgtgtct gccatcttaa	6060
gtgtaaaggt ggctaaatta tatagaaaaa taagacaata tcatttccca attacattcc	6120
tttctaccg cactctatga tgctagctga gatttttcca aaagaaaatg gcttaaataa	6180
aaccctaaga gaaagaaaaa ctttaaatcc ctccaaagct caaaagtaat agaaacagat	6240
gagtttgag tcaggatttc tctgtaagat tgcctaggct gtgtactgca catctccagg	6300
tgccactgtt gacagagatt ataactaaa tgtgaagtga atggtgccac tgacagttat	6360
gcaaaccgct cagagcatag ccacctgac ctgctgggat tcctcttgcc agtccatcag	6420
cagttccct tgaaagttc accaaacatc ccttaaatct gccctctct gcccgcccc	6480
agtggaggtc ctcatcattt ttcacctgca tttttgcagg agctttctta tatccacctt	6540
cctccttttc tctcagccca tcatctagct acacagctc cagggtaaagc tttcagaaag	6600
gcaatctctt gtctgtaaaa cctaagcagg accaaggcca agtttcttag cctgaaaaat	6660
gtgcttttct gactgaactg ttcaggcact gactctacat ataattatgc ttttctaccc	6720
cctcacactc aacactttga ctccagcaat cccaaatccc cagatcccta agtgtgctgt	6780
gctattttca cgtggctctc agacttggcc agtgtgttt ccattttggt ctttattccc	6840
cacatctctg cctggggggt agattctacc ctgaaaaatg ttcttggcac agccttgcaa	6900
actctctctc cactcagct ctgctggat gcccttgatt gttccatgtc ctgagcatac	6960
catgtttgtc ttcccagca ctgacctacc atgtgtcacc cctgcttggc tgtaccttcc	7020
atgaggctag gactatgtgt ctctttgtt gactgctgtt gccctagcat cttgcacagt	7080
tccttgaca caattagagc tctataaatg tcaataaat gtgttataat tatatgttta	7140
agatagttgt tcaataaac tctaataac cccaac	7176

<210> 2

<211> 454

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

caactctgcc ggccgcggga cccgggtgag ggtctgggccc tgggctgggc tgggtgacgc	60
caggaggccg gctactgcgc ggcgcccag agtccacatg ctgctccggg tctgccgccc	120
gctccgccct ccagcgtgg gtgctgcggc gaccctggt ggccactggc cgcaggcact	180
cttctgtggg ggagcagcta gaggttagac ctcaggaaga acttcccagc ttagcactat	240
tcgtgcattt aacaaaaatg gagagcctgc tttgtgcaa gcacggagtg caaccaggac	300
ccctgaccca agggagactg cagcctggtg gcccgccgct tctaaaattc taaacaggag	360
gaacttgga gctgctgtct tgctgggaag tgggtgcatg cacaaattga ggctgcttgg	420

ccgccggtat gggtttacag cagttgggta tgtg	454
---------------------------------------	-----

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 3

gtccccaagt tcctcctgtt	20
-----------------------	----

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 4

cggagcagca tgtggactct	20
-----------------------	----

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 5  
ggagcagcat gtggactct 19  
<210> 6  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Antisense oligonucleotide  
<400> 6  
gtctaacctc tagctgtcc c 21