



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년01월30일

(11) 등록번호 10-1944119

(24) 등록일자 2019년01월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7012978

(22) 출원일자(국제) 2010년11월12일
 심사청구일자 2015년11월05일

(85) 번역문제출일자 2012년05월18일

(65) 공개번호 10-2012-0104551

(43) 공개일자 2012년09월21일

(86) 국제출원번호 PCT/US2010/056613

(87) 국제공개번호 WO 2011/060320
 국제공개일자 2011년05월19일

(30) 우선권주장
 61/261,278 2009년11월13일 미국(US)
 (뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌
 WO2006047683 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 사렙타 씨리퓨티스 인코퍼레이티드
 미국 매사추세츠 02142, 캠브리지, 215 퍼스트 스트리트

(72) 발명자
 이베르센, 패트릭, 엘.
 미국 오리건 97330, 콜발리스, 5902 노스웨스트 페어 오크스 플레이스

(74) 대리인
 손민

전체 청구항 수 : 총 56 항

심사관 : 김정태

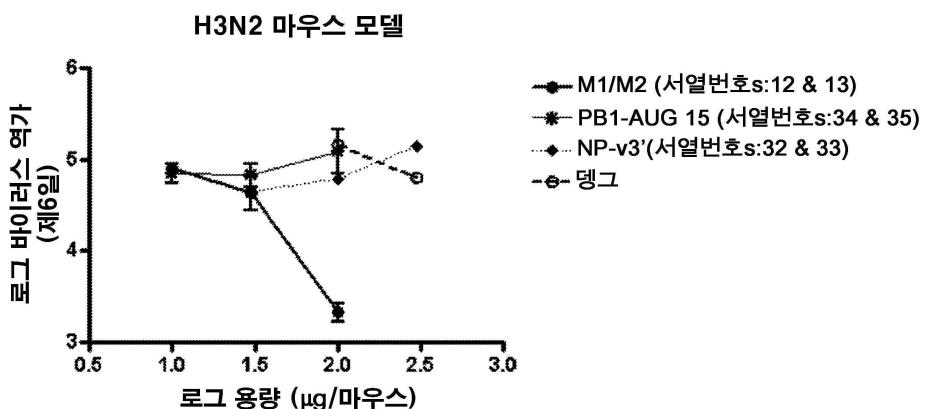
(54) 발명의 명칭 안티센스 항바이러스 화합물 및 인플루엔자 바이러스 감염을 치료하는 방법

(57) 요 약

본 발명은 안티센스 항바이러스 화합물, 및 오르토믹소비리다에 과의 바이러스의 성장의 억제 및 바이러스 감염의 치료에 있어서의 이들의 사용 및 생산 방법에 관한 것이다. 상기 화합물은 포유동물에서 인플루엔자 바이러스 감염의 치료에 특히 유용하다. 예시적인 안티센스 항바이러스 화합물은 1) 뉴클레아제-저항성 골격, 2) 12-
 (뒷면에 계속)

대 표 도

바이러스 역가에 있어서의 M1/M2 용량-의존적 감소



40개의 뉴클레오타이드 염기, 및 3) a) 인플루엔자바이러스 A, 인플루엔자바이러스 B 및 인플루엔자바이러스 C의 네거티브 센스 바이러스 RNA 분절의 5' 또는 3' 말단 25개의 염기; b) 포지티브 센스 vcRNA의 5' 또는 3' 말단의 말단 30개의 염기; c) 인플루엔자 바이러스 mRNA의 AUG 개시 코돈 주변의 45개의 염기; 및 d) 선택적 스플라이싱의 대상인 인플루엔자 mRNAs의 스플라이스 공여체 또는 수용체 부위 주변의 50개의 염기로부터 선택된 표적 부분에 대해서 하이브리드화하는 길이가 적어도 12개의 염기인 표적화 서열을 갖는, 실질적으로 비하전되거나 부분적으로 양으로 하전된 모르폴리노 롤리고뉴클레오타이드이다.

(30) 우선권주장

61/292,056 2010년01월04일 미국(US)

61/377,382 2010년08월26일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

인플루엔자 M1 또는 M2 mRNA의 AUG 개시 코돈 주변의 45개의 염기인 바이러스 표적 부분의 적어도 10개의 연속적인 염기에 상보적인 염기 서열을 포함하는 12 내지 40개 염기의 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로서,

상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체는 (i) 모르풀리노 안티센스 올리고뉴클레오타이드이거나, (ii) 하나 이상의 LNA (Locked Nucleic Acid) 서브유니트를 포함하거나, (iii) 2'-O-Me 변형된 서브유니트를 포함하거나, (iv) PNA (Peptide Nucleic Acid)이며,

상기 염기 서열은 서열번호 12 내지 16, 19 내지 22, 34 내지 37, 39 내지 41, 43 내지 47, 48 내지 53, 63 내지 70, 및 74 내지 114 중 어느 하나를 포함하는 것인,

항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체가 바이러스 표적 부분과 헤테로듀플렉스 구조를 형성할 수 있고, 상기 헤�테로듀플렉스 구조가

- a) 바이러스의 포지티브 센스 RNA 가닥 및 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체로 구성되고,
- b) 적어도 45°C의 해리의 T_m 을 특징으로 하는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체가 15 내지 25개 염기를 갖는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체가 바이러스 표적 부분의 적어도 15개의 연속적인 염기에 상보적인 염기 서열을 포함하는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체가 바이러스 표적 부분의 적어도 18개 또는 20개의 연속적인 염기에 상보적인 염기 서열을 포함하는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체가 바이러스 표적 부분의 연속적인 염기에 100% 상보적인 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 7

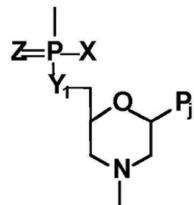
제1항에 있어서, 상기 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체가 모르풀리노 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체가 포스포로디아미데이트 서브유니트간 결합을 포함하는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드가 하기의 구조에 따르는 인-함유 서브유니트간 결합을 포함하는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염:



상기에서 Y_i 는 0이고, Z 는 0이며, P_j 는 염기-특이적 수소 결합에 의해서 폴리뉴클레오타이드 내의 염기에 결합하는데 효과적인 퓨린 또는 피리미딘 염기-대합 부분 (base-pairing moiety)이고, X 는 알킬, 알콕시, 티오알콕시, 아미노, 알킬아미노, 디알킬아미노 또는 1-페페라진이다.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 X 가 NR_2 이고, 여기서 각각의 R 이 독립적으로 수소 또는 메틸인 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 서브유니트간 결합의 적어도 2 개 및 그의 총 개수의 절반 이하가 양으로 하전된 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 12

제11항에 있어서, 양으로 하전된 서브유니트간 결합의 경우에 상기 X 가 1-페페라진인 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드가 서열번호 13의 염기 서열을 포함하고 서열번호 13에 나타낸 바와 같은 3개의 페페라진 함유 서브유니트간 결합을 갖는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 14

제1항 또는 제9항에 있어서, 상기 바이러스 표적 부분이 서열번호 1, 2, 및 5 내지 8중 어느 하나 이상을 포함하는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 15

제1항 또는 제9항에 있어서, 상기 바이러스 표적 부분이 서열번호 2를 포함하는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 16

제1항 또는 제9항에 있어서, 상기 염기 서열이 서열번호 12 내지 16, 19 내지 22, 34 내지 37, 39 내지 41, 및 43 내지 47 중 어느 하나를 포함하는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 17

제1항 또는 제9항에 있어서, 상기 염기 서열이 서열번호 12 내지 16, 19 내지 22, 34 내지 37, 39 내지 41, 및 43 내지 47 중 어느 하나로 구성되는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체가 PNA (Peptide Nucleic Acid)인 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 염기 서열이 서열번호 48 내지 53 중 어느 하나를 포함하는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 염기 서열이 서열번호 48 내지 53 중 어느 하나로 구성되는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 21

제1항에 있어서, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이 하나 이상의 LNA (Locked Nucleic Acid) 서브유니트를 포함하는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 22

제21항에 있어서, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이 LNA 서브유니트로 전적으로 구성되는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 염기 서열이 서열번호 63 내지 70 및 74 내지 114 중 어느 하나를 포함하는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 24

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 염기 서열이 서열번호 63 내지 70 및 74 내지 114 중 어느 하나로 구성되는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 25

제1항에 있어서, 상기 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 2'-O-Me 변형 서브유니트를 포함하는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 염기 서열이 서열번호 12 또는 20을 포함하는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 27

제1항에 있어서, 상기 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체가 아르기닌-풍부 펩타이드에 친수계이트되는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 아르기닌-풍부 펩타이드가 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체의 3' 말단에

컨주케이트되는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오티드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 상기 아르기닌-풍부 웨타이드가 서열번호 115 내지 128로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오티드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 아르기닌-풍부 웨타이드가 서열번호 124인 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오티드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 31

제1항 또는 제9항의 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오티드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 세포에서 인플루엔자 바이러스의 복제를 감소시키기 위한 약제학적 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 세포가 대상체 내의 것이고, 상기 조성물이 대상체에게 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 대상체가 이차 박테리아 감염을 가지고, 상기 조성물이 박테리아 항생제와 별도로 또는 이와 동시에 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 이차 박테리아 감염이 연쇄상구균 폐렴 감염인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 35

제33항에 있어서, 상기 항생제가 베타-락탐인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 36

제33항에 있어서, 상기 항생제가 폐니실린, 아목시실린, 세팔로스포린, 클로람페니콜 및 클린다마이신으로부터 선택되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 37

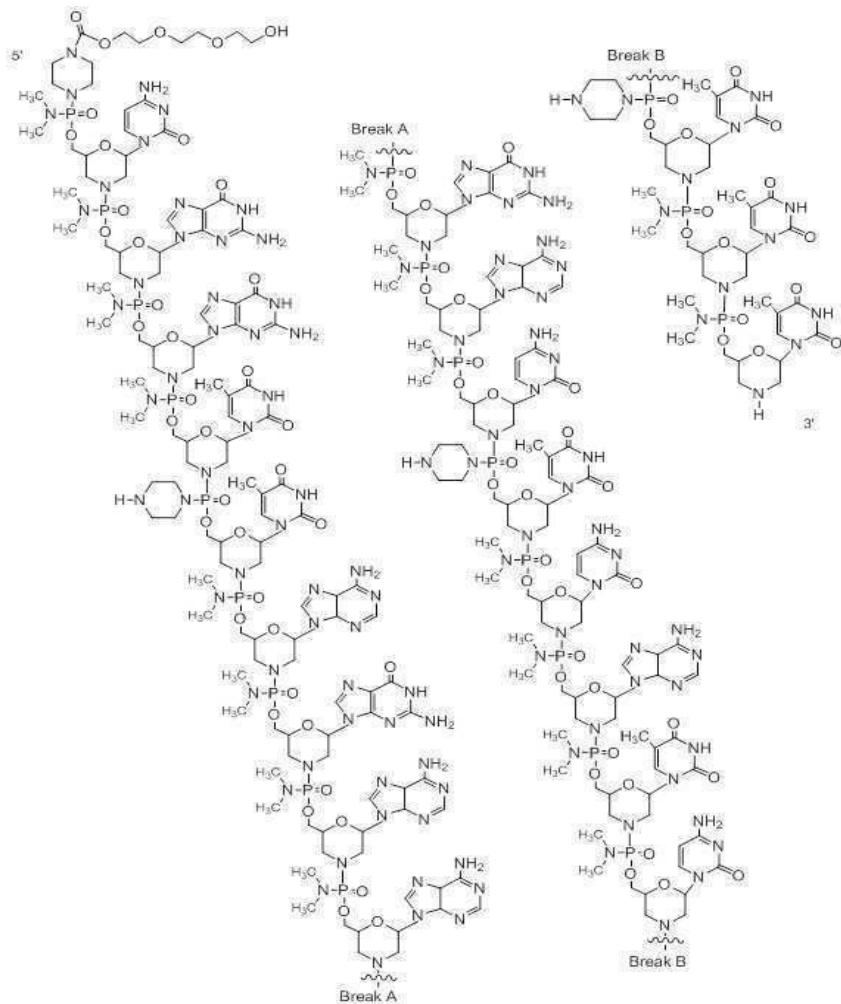
제33항에 있어서, 상기 조성물이 CD200 또는 CD200 수용체를 코딩하는 RNA 분자에 상보적인 염기 서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드와 별도로 또는 이와 동시에 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 38

제1항에 있어서, 상기 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오티드 유사체가 폴리에틸렌 글리콜 부분 (moiety)에 컨주케이트되는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오티드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 39

제1항에 있어서, 상기 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오티드 유사체가하기 구조로 구성된 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오티드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.



청구항 40

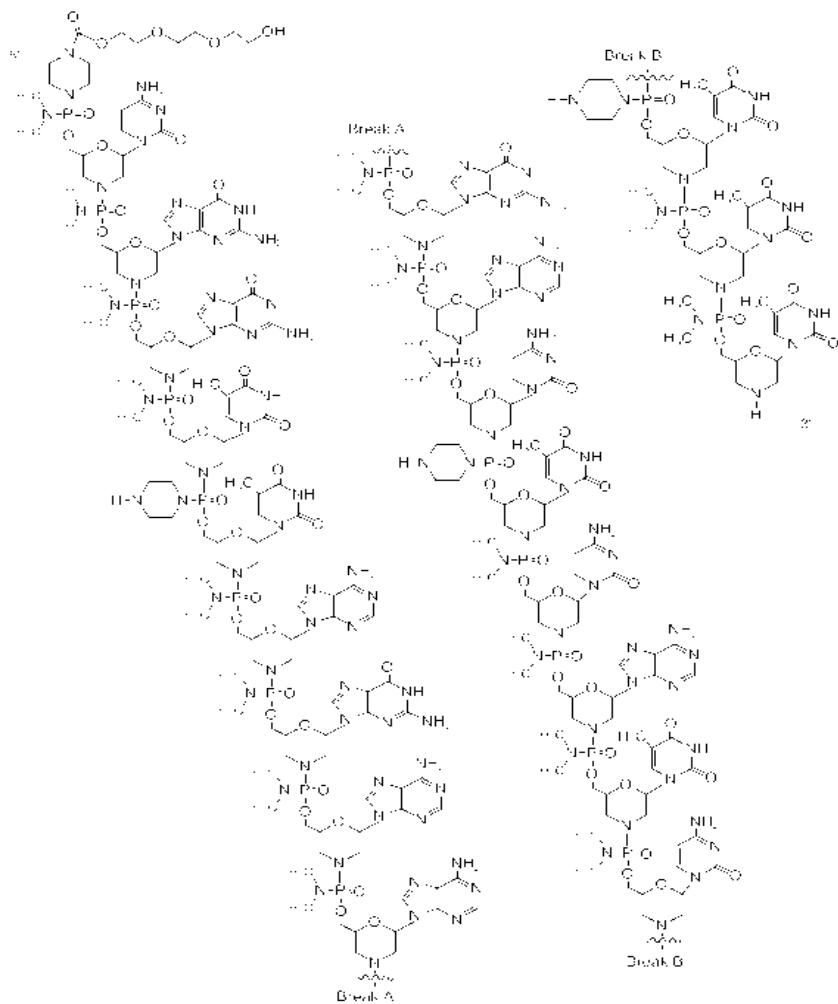
제39항에 있어서, 상기 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체가 아르기닌-풍부 펩타이드에 컨주게 이트되는 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 아르기닌-풍부 펩타이드가 서열번호 115 내지 128 중 어느 하나인 것인, 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 42

제1항의 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염을 치료하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체가 하기 구조로 구성된 것인 약제학적 조성물:



청구항 43

제42항에 있어서, 상기 조성물이 이차 박테리아 감염을 치료하기 위한 항생제와 별도로 또는 이와 동시에 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 조성물이 항생제와 별도로 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 45

제43항에 있어서, 상기 항생제가 정균성 또는 살균성인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 46

제43항에 있어서, 상기 항생제가 베타-락탐인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 47

제43에 있어서, 상기 항생제가 베타-락탐인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 48

제43항에 있어서, 상기 항생제가 페니실린, 아목시실린, 세팔로스포린, 클로람페니콜 및 클린다마이신으로부터 선택되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 49

제43항에 있어서, 상기 이차 박테리아 감염이 연쇄상구균 감염인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 연쇄상구균 감염이 연쇄상구균 폐렴 감염인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 51

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 조성물이 CD200 또는 CD200 수용체를 코딩하는 RNA 분자에 상보적인 염기 서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 함께 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 조성물이 CD200 또는 CD200 수용체를 코딩하는 RNA 분자에 상보적인 염기 서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 별도로 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 53

제51항에 있어서, 상기 조성물이 CD200 또는 CD200 수용체를 코딩하는 RNA 분자에 상보적인 염기 서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 동시에 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 54

제42항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 55

제42항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 아르기닌-풍부 펩타이드에 컨쥬게이트되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 아르기닌-풍부 펩타이드가 서열번호 115 내지 128 중 어느 하나인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 57

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련된 출원에 대한 상호 참조

본 출원은 35 U.S.C § 119(e) 하에서, 각각 온전히 참고로 포함된 2009년 11월 13일에 출원된 미국 임시 특허출원 제61/261,278호; 2010년 1월 4일에 출원된 미국 임시 특허출원 제61/292,056호; 및 2010년 8월 26일에 출원된 미국 임시 특허출원 제61/377,382호의 권리를 주장한다.

[0003] 서열 목록에 관한 설명

본 출원과 관련된 서열 목록은 종이 복사물 (paper copy) 대신에 텍스트 형식 (text format)으로 제공되며, 이의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다. 서열 목록을 함유하는 텍스트 파일의 명칭은 120178_456PC_SEQUENCE_LISTING.txt이다. 텍스트 파일은 33 KB이며, 2010년 11월 11일에 작성되고 EFS-web을 통해서 전자 제출된다.

발명의 분야

본 발명은 인플루엔자 바이러스 감염을 치료하는데 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 상기 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 항바이러스 치료방법에 관한 것이다.

배경기술

[0007]

인플루엔자 바이러스는 기록된 역사를 통해서 인간 사망률 및 질병률의 주요 원인이었다. 인플루엔자 A 바이러스 감염은 세계적으로 매년 수백만 중례의 중증 질병 및 500,000이나 되는 사망을 야기한다. 유행성은 중증도에 있어서 크게 다르지만, 규칙적인 간격으로 발생하고, 항상 가장 빈번하게는 노인 집단에서 상당한 사망률 및 질병률을 야기한다. 부합되는 (matched) 인플루엔자 스트레인에 대한 백신이 건강한 성인의 60-80%에게서 질병을 예방할 수 있지만, 예방률은 고위험 그룹에서 훨씬 더 낮다. 또한, 백신 접종은 1997년에 홍콩에서 및 2003년 2004년에 유럽과 동남아시아에서의 H5 및 H7 조류 인플루엔자의 발발과 같이 예기치 않은 스트레인에 대한 예방을 제공하지 않는다. 현재 통용되는 항-인플루엔자 약물은 예방 및 치료 효과를 제공하는 그들의 능력이 제한되어 있다 [Cox and Subbarao 1999; Cox and Subbarao 2000].

[0008]

인플루엔자 A는 음-극성의 분절화된 RNA 바이러스이다. 게놈 분절은 4 개의 단백질, 즉 3 개의 폴리머라제 폴리펩타이드 (PA, PB1 및 PB2) 및 NP (핵단백질)의 콤플렉스에 의해서 복제된다. 모두 8 개의 게놈 분절의 5' 및 3' 말단 서열 부분이 유전자형 내에서 고도로 보존된다 [Strauss and Strauss 2002].

[0009]

인플루엔자 A 바이러스는 그들의 표면 당단백질의 항원성 및 유전적 성질에 따라서 서브타입으로 분류될 수 있다; 15 개의 해마글루티닌 (HA) 및 9 개의 뉴라미니다제 (NA) 서브타입이 현재까지 확인되었다. 공지된 HA 및 NA 서브타입을 모두 보유하는 바이러스는 조류 숙주로부터 분리되었지만, 단지 H1N1 (1918), H2N2 (1957/58), 및 H3N2 (1968) 서브타입의 바이러스만이 인간에게서의 광범한 유행성과 연관되었다 [Strauss and Strauss 2002].

[0010]

H5N1 인플루엔자 바이러스가 인간에게 전염되어 18 명의 감염된 사람 중에서 6 명이 사망한 1997년 이래, 조류 인플루엔자 바이러스의 포유동물에 대한 다발적인 전염이 있었다. 전체 바이러스가 직접 전염되거나, 조류 인플루엔자 바이러스로부터의 유전자 분절이 포유동물 스트레인에 의해서 획득된다. 아시아에서 H5N1 바이러스에 의한 가금류의 광범한 감염은 이 서브타입이 인간-대-인간 전파를 달성하고, 중간 전염을 정착시킬 수 있다는 관심의 증가를 야기하였다. 종을 어떤 상이한 타입의 인플루엔자 바이러스가 감염시킬 수 있는지는 바이러스 당단백질 (HA, NA)의 상이한 형태에 의해서 결정된다. 이것은 쉽게 극복되지 않는 새와 인간 사이의 상당한 종의 장벽을 제공한다. 그러나, 돼지는 바이러스의 두 가지 타입 모두에 의해서 감염될 수 있고, 이에 의해서 조류 바이러스의 인간에 대한 전이를 가능하게 하는 "믹싱 포트 (mixing pot)"를 제공한다. 개개 돼지 세포가 조류 및 인간 인플루엔자 바이러스 둘 다에 의해서 공동-감염되는 경우에는, 조류 HA 유전자형을 갖지만 인간을 쉽게 감염시키는 재조합체 형태가 출현할 수 있다. 조류 HA는 돼지를 감염시킬 수 있지만, 인간을 감염시킬 수 없다. 돼지에게서, 게놈 분절 패키징 (packaging) 중에 몇 개의 조류 분절 및 인간 HA 및/또는 NA 분절을 갖는 바이러스가 발생할 수 있다 [Cox and Subbarao 2000].

[0011]

인플루엔자 바이러스는 인간 및 동물 (예를 들어, 돼지, 새, 말)을 감염시키며, 급성 호흡기 질환을 야기할 수 있다. 인플루엔자 바이러스에 대해서 효과적인 백신을 생산하기 위한 다수의 시도가 있어왔다. 그러나, 어떤 것도 특히 장기간 기준으로, 완전히 성공적이지 않았다. 이것은 적어도 부분적으로는, 분절의 재-배열을 통해서 다수의 형태가 존재하도록 만들 수 있는 인플루엔자 바이러스 게놈의 분절화된 특징에 기인할 수 있다. 예를 들어, 두 개의 집단 모두 내에 새로운 항원성 서브타입의 도입을 야기할 수 있는 동물과 인간 인플루엔자 바이러스 사이의 RNA 분절의 교환이 있을 수 있는 것으로 시사되었다. 따라서, 장기간의 백신접종 방법은 새로운 서브타입의 출현 (항원 "대변이 (shift)")으로 인하여 실패하였다. 또한, 바이러스의 표면 단백질인 해마글루티닌 및 뉴라미니다제는 끊임없이 미미한 항원성 변화 (항원 "소변이 (draft)")를 겪는다. 이러한 고도의 변이는 특별한 인플루엔자 바이러스에 대해서 발현된 특이적 면역성이 왜 새로운 변이체에 대한 예방을 정착시키지 못하는지를 설명한다. 따라서, 대체 항바이러스 전략이 필요하다. 인플루엔자 B 및 C 바이러스는 A 타입보다 임상적 질환을 덜 야기하지만, 새로운 항바이러스 약물은 또한, 이들 병원체에 의해서 야기된 감염을 억제하는데에도 도움이 되어야 한다.

[0012]

새들 사이에서 천연적으로 나타나는 인플루엔자 바이러스는 조류 인플루엔자 (조류 독감)라 불린다. 새는 그들의 장 내에 바이러스를 갖지만, 일반적으로 감염으로 인한 병에 걸리지 않는다. 그러나, 철새는 조류 독감을 집 닦 및 칠면조를 감염시켜서 질병 및 사망까지 야기할 수 있다. 조류 독감은 인간을 쉽게 감염시키지 않지만, 집 새와의 접촉과 같은 인간 노출이 더 빈번한 경우에는 인간 감염이 일어난다. 위험한 조류 독감 (H5N1)은 1961년에 남아프리카에서 제비갈매기 (tern)에게서 최초로 확인되었으며, 독감의 잠재적으로 치명적인 형태로 확인되었다. H5N1의 발생은 후기 2003년 및 2004년에 8 개의 아시아 국가에서 나타났다. 그 당시에, 이들 국가에서는 10000만 마리 이상의 새가 사망하였거나, 발생을 제어하기 위해서 살해되었다. 2004년 6월에

시작하여 H5N1의 새로운 치명적인 발생이 아시아에서 보고되었으며, 이것은 현재 진행 중이다. H5N1의 인간 감염은 태국, 베트남 및 캄보디아에서 약 50%의 치사율로 관찰되었다. 이를 감염은 대부분 감염된 가금과의 인간 접촉으로부터 나타났지만, H5N1의 인간-대-인간 전파의 몇 증례로 나타났다.

[0013] 삼중-재배열 인플루엔자 A (H1) 바이러스는 돼지 (HA, NP, NA, M 및 NS), 인간 (PB1), 및 새 (PB2 및 PA)로부터의 분절을 갖고 1998년 이래로 순환되고 있다. 진행 중인 국제적 질병 발발의 책임이 되는 새롭게 기술된 신규의 돼지-기원의 인플루엔자 A (2009H1N1) 바이러스 (S-OIV)는 유라시아 돼지 바이러스의 뉴라미니다제 (NA) 및 매트릭스 (M) 분절과 재배열된 기존의 바이러스의 유전자 요소를 포함하는 삼중 재배열 바이러스이다 [S-OIV Investigation Team, 2009]. 이전의 인플루엔자 A (H1) 삼중-재배열 바이러스는 때때로 인간에게 전염되었지만, 인간으로부터 인간에게 효율적으로 전파되지 않았지만, 새로운 S-OIV는 인간-대-인간 전염에 매우 효율적이다. 최근에, S-OIV 감염의 실험실에서 확인된 3440 증례는 29 개의 국가로부터 보고되었다. 상기의 발발은 멕시코에서 시작하였으며, 여기에서는 총 1364 증례가 기록되었고 45 사망을 야기하였다 (3.3%의 증례-치명률). 멕시코 외에서는 단지 3 개의 보고된 사망이 있었다 (0.1%의 증례-치명률). 치사율에서의 이러한 기하학적 불균형의 이유는 현재 분명하지 않다.

[0014] S-OIV는 현재 뉴라미니다제 억제제인 오셀타미비 (oseltamivir) 및 자나미비 (zanamivir)에 대해서 민감하지만, 계절성 인플루엔자는 뉴라미니다제 억제제 저항성을 부여하는 돌연변이를 전개하는 것으로 이전에 증명되었다. S-OIV가 계절성 인플루엔자 바이러스로서 인간 H1을 대체할 것인지, 또는 S-OIV가 인플루엔자의 또 다른 스트레인과 재배열하여 또 다른 새로운 변이주를 생성시킬 것인지? 이것이 더 치명적이 되도록 변화될 것인지? 이를 불확실성은 새로운 바이러스를 확인으로부터 새로운 백신의 제조 및 배포까지의 시간 간격에 의해서 악화된다. 또한, 충분하게 새로운 바이러스성 헤마글루터닌 항원은 빠르게 예방적 면역성을 유발하여야 하는 대량 백신 접종 캠페인을 위한 실제적인 어려움에 처하게 하는 대용량이 면역원 및 프라임 부스트 스케줄 (prime boost schedule)의 사용을 필요로 할 수 있다. 이를 고려사항에 비추어, 이상적으로는 다양한 인플루엔자 바이러스 스트레인, 서브타입 및 타입에 대해서 광범한 활성을 갖는, 특히 S-OIV에 대한 새로운 형태의 예방 및 치료를 제공하기 위한 절실한 필요성이 있다.

[0015] (a) 유행성 질병을 초래하는 연속적인 저-레벨 항원 소변이 및 덜 빈번하지만 예측할 수 없는 주된 항원 대변이 둘 다를 일으키는 이 바이러스의 공지된 경향, (b) 스트레인이 합리적으로 부합된 경우에도, 백신 수용주의 상당한 비율에서 인플루엔자-관련된 질병을 예방하기 위한 백신접종의 분명한 실패, 및 (c) 인플루엔자에 대한 치료의 인증된 형태 (예를 들어, 아다만탄 유도체, 및 더욱 최근에는 뉴라미니다제 억제제인 오셀타미비)에 대한 저항성의 증가된 빈도를 기초로 하여 인플루엔자 A에 대한 치료의 새로운 형태에 대한 절실한 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 인플루엔자 바이러스에 대해서 야기된 질병의 중등도에 비추어서, 인플루엔자 감염을 치료하기 위한 새로운 치료법에 대한 즉각적인 필요성이 있다. 효과적인 예방 또는 치료의 결여를 감안하여, 따라서 본 발명의 목적은 인플루엔자 바이러스에 대해서 감염된 숙주를 치료하는 치료학적 화합물 및 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 구체예는 한가지 관점에서 단일-가닥 네거티브 센스 게놈을 가지며, 인플루엔자바이러스 (Influenzavirus) A, 인플루엔자바이러스 B 및 인플루엔자바이러스 C 속을 포함하는 오르토믹소비리다에 (Orthomyxoviridae) 과로부터 선택된 RNA 바이러스의 숙주 세포 내에서의 복제를 억제하는데 효과적인 항-바이러스 화합물을 포함한다. 상기 화합물은 1) 네거티브 센스 바이러스 RNA 분절의 5' 또는 3' 말단 25개의 염기; 2) 포지티브 센스 cRNA의 5' 또는 3' 말단의 말단 25개의 염기; 3) 인플루엔자 바이러스 mRNAs의 AUG 개시 코돈 주변의 45개의 염기; 및 4) 선택적 스플라이싱 (alternative splicing)의 대상인 인플루엔자 mRNAs의 스플라이스 공여체 또는 수용체 부위 주변의 50개의 염기로부터 선택된 부분 내의 바이러스 RNA 서열을 표적으로 할 수 있다.

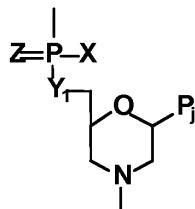
[0018] 특정의 구체예에서, 항바이러스 화합물은 i) M1 또는 M2를 포함하는 분절과 같은 인플루엔자바이러스 A, 인플루엔자바이러스 B 및 인플루엔자바이러스 C의 네거티브 센스 바이러스성 RNA 분절의 5' 또는 3' 말단 25개의 염기, ii) 인플루엔자바이러스 A, 인플루엔자바이러스 B 및 인플루엔자바이러스 C의 포지티브 센스 cRNA의 5' 또는 3' 말단의 말단 25개의 염기, iii) M1 또는 M2 mRNA와 같은 인플루엔자 바이러스성 mRNA의 AUG 개시 코돈

주변의 45개의 염기, 및 iv) M1 또는 M2 mRNA와 같은 선택적 스플라이싱의 대상인 인플루엔자바이러스 A, 인플루엔자바이러스 B 및 인플루엔자바이러스 C mRNAs의 스플라이스 공여체 또는 수용체 부위 주변의 50 염기로부터 선택된 표적 부분에 하이브리드화하는, a) 뉴클레아제-저항성 골격, b) 12-40개의 뉴클레오타이드 염기, 및 c) 길이가 적어도 10개의 염기인 표적화 서열을 특징으로 하는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0019] 올리고뉴클레오타이드는 또한, a) 포유동물 숙주 세포에 의해서 능동적으로 흡수되는 능력, 및/또는 b) 바이러스성 표적 부분을 갖는 혜테로듀플렉스 구조를 형성하는 능력을 특징으로 할 수도 있으며, 여기에서 상기의 혜테로듀플렉스 구조는 i) 바이러스의 포지티브 또는 네거티브 센스 가닥 및 올리고뉴클레오타이드 화합물로 구성되며, ii) 적어도 45°C의 해리의 T_m 을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명의 구체예에는 또 다른 관점에서, 단일-가닥의 분절화된 네거티브-센스 게놈을 가지며, 오르토믹소비리다에 과로부터 선택된 감염성 인플루엔자 바이러스의 포유동물 숙주 세포 내에서의 복제를 억제하는 항바이러스 화합물을 포함한다. 상기 화합물은 상술한 요소를 특징으로 하는 올리고뉴클레오타이드로서 감염된 숙주 세포에게 투여될 수 있다. 상기 화합물은 인플루엔자 바이러스에 의해서 감염되거나, 인플루엔자 바이러스에 의한 감염의 위험이 있는 포유동물 대상체에게 투여될 수 있다.

[0021] 상기 화합물은 하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클리 탄소에 결합시키는 비하전된 인-함유 서브유니트간 결합에 의해서 연결된 모르폴리노 서브유니트로 구성될 수 있다. 한가지 구체예에서, 서브유니트간 결합은 하기의 구조를 갖는 것과 같은 포스포로디아미네이트 결합이다:



[0022]

[0023] 여기에서 Y_i 는 0이고, Z 는 0이며, P_j 는 퓨린 또는 피리미딘, 또는 염기-특이적 수소 결합에 의해서 폴리뉴클레오타이드 내의 염기에 결합하는데 효과적인 동등한 염기-대합(base-pairing) 부분이고, X 는 알킬, 알콕시, 티오알콕시, 또는 알킬 아미노이며, 예를 들어, 여기에서 X 는 NR_2 이고, 여기에서 각각의 R 은 독립적으로 수소 또는 메틸이다.

[0024] 상기 화합물은 양으로 하전된 결합이 산재된 상술한 비하전된 결합에 의해서 연결된 모르폴리노 서브유니트로 구성될 수 있다. 양으로 하전된 결합의 총수는 2 내지 결합의 총수의 절반 이하이다. 양으로 하전된 결합은 상기의 구조를 가지며, 여기에서 X 는 1-페페라진이다.

[0025] 상기의 화합물은 바이러스의 포지티브 또는 네거티브 센스 RNA 가닥을 갖는 이러한 혜테로듀플렉스 구조를 형성 할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 유사체 부분, 및 상기 화합물의 숙주 세포 내로의 흡수를 증진시키는데 효과적인 아르기닌-풍부 폴리펩타이드의 공유결합 컨주케이트를 포함할 수 있다. 예시적인 폴리펩타이드는 서열번호 115-128로 확인된 서열 중의 하나를 포함한다.

[0026] 관련된 관점에서, 본 발명의 구체예는

[0027] (a) 네거티브 센스 바이러스성 RNA의 5' 또는 3' 말단 25개의 염기; 및/또는

[0028] (b) 포지티브 센스 mRNA의 5' 또는 3' 말단의 말단 25개의 염기; 및/또는

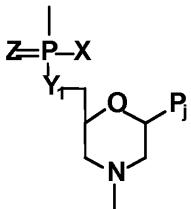
[0029] (c) 바이러스성 mRNA의 AUG 개시 코돈 주변의 45개의 염기; 및/또는

[0030] (d) 선택적 스플라이싱의 대상인 인플루엔자 mRNAs의 스플라이스 공여체 또는 수용체 부위 주변의 50개의 염기; 및

[0031] (e) (i) 뉴클레아제-저항성 골격을 갖고, (ii) 포유동물 숙주 세포에 의해서 흡수될 수 있으며, (iii) 12-40개의 뉴클레오타이드 염기를 함유하는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오타이드 사이에서 형성된 혜테로듀플렉스 커플렉스를 포함하며, 여기에서 상기의 혜테로듀플렉스 커플렉스는 적어도 45°C의 해리의 T_m 을 갖는다.

[0032] 특정의 구체예에서, 예시적인 올리고뉴클레오타이드는 하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니

트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 결합시키는 비하전된 인-함유 서브유니트간 결합에 의해서 연결된 모르폴리노 서브유니트로 구성될 수 있다. 상기 화합물은 하기의 구조에서와 같은 포스포로디아미데이트 결합을 가질 수 있다:



[0033]

여기에서 Y_i 는 0이고, Z 는 0이며, P_j 는 염기-특이적 수소 결합에 의해서 폴리뉴클레오타이드 내의 염기에 결합하는데 효과적인 퓨린 또는 피리미딘 염기-대합 부분이고, X 는 알킬, 알콕시, 티오알콕시, 또는 알킬 아미노이다. 바람직한 화합물에서, X 는 NR_2 이고, 여기에서 각각의 R 은 독립적으로 수소 또는 메틸이다. 상기 화합물은 또한, 양으로 하전된 결합이 산재된 상술한 비하전된 결합에 의해서 연결된 모르폴리노 서브유니트로 구성될 수 있다. 양으로 하전된 결합의 총수는 2 내지 결합의 총수의 절반 이하이다. 양으로 하전된 결합은 상기의 구조를 가지며, 여기에서 X 는 1-피페라진이다.

[0035]

상기의 화합물은 올리고뉴클레오타이드 단독이거나, 올리고뉴클레오타이드와 상기 화합물의 숙주 세포 내로의 흡수를 증진시킬 수 있는 아르기닌-풍부 폴리펩타이드의 전주케이트일 수 있다. 예시적인 폴리펩타이드는 서열 번호 115-128로 확인된 서열 중의 하나를 갖는다.

[0036]

또 다른 관점에서, 본 발명의 구체예는 단일-가닥의 분절화된 네거티브-센스 RNA 게놈을 가지며, 오르토믹소비리다에 과로부터 선택된 인플루엔자 바이러스의 포유동물 숙주 세포 내에서의 복제를 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 관련된 방법을 포함한다. 상기 화합물은 본 발명에 기술된 바이러스성 RNA 요소를 특징으로 할 수 있다. 특정의 구체예에서, 세포는 대상체, 전형적으로는 인플루엔자 바이러스 감염이 있는 대상체 내의 세포이다.

[0037]

일부의 구체예에서, 상기 대상체는 이차적인 박테리아 감염을 가지며, 상기의 방법은 추가로 박테리아성 항생제를 별도로, 또는 항바이러스성 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 동시에 투여하는 것을 포함한다. 특정의 구체예에서, 이차적인 박테리아 감염은 연쇄상구균 폐렴 감염 (예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니아에 (*Streptococcus pneumoniae*))이다. 특정의 구체예에서, 항생제는 베타-락탐이다. 특정의 구체예에서, 항생제는 페니실린, 아목시실린, 세팔로스포린, 클로람페니콜, 및 클린다마이신으로부터 선택된다.

[0038]

또한, 본 발명에는 CD200 또는 CD200 수용체를 코딩하는 RNA 분자에 대해서 표적화된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 별도로, 또는 본 발명에 기술된 하나 또는 그 이상의 항바이러스성 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 동시에 투여하는 것을 포함하여 인플루엔자 바이러스의 복제를 감소시키는 방법이 포함된다.

[0039]

본 발명에 기술된 항바이러스성 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 일부의 구체예에서, 약제학적 조성물을 추가로 페니실린, 아목시실린, 세팔로스포린, 클로람페니콜 또는 클린다마이신과 같은 박테리아성 항생제를 더 포함한다. 바람직한 구체예에서, 박테리아성 항생제는 정균성이다. 일부의 구체예에서, 약제학적 조성물은 CD200 또는 CD200 수용체를 코딩하는 RNA 분자에 대해서 표적화된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 더 포함한다.

[0040]

인플루엔자 A 바이러스와 같은 인플루엔자 바이러스의 치료를 위해서, 표적화 서열은 서열번호 1-11로 확인된 서열의 그룹 중의 하나와 연관된 부분에 하이브리드화할 수 있다. 바람직한 표적화 서열은 서열번호 4의 마이너스 (minus) 가닥 표적 또는 서열번호 2의 포지티브-가닥 표적에 대해서 상보적인 것이다. 이들 2 개의 부분을 표적으로 하는 예시적인 안티센스 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머 ("PMOs")는 각각 서열번호 23 및 12로 열거된다.

도면의 간단한 설명

[0041]

도 1a는 포스포로디아미데이트 결합을 갖는 예시적인 모르폴리노 올리고머 구조를 나타낸다.

도 1b는 도 1a에서와 같은 모르폴리노 올리고머를 나타내지만, 여기에서 골격 결합은 (피페라진) 포스포로디

아미데이트 결합의 형태로 한 개의 양으로 하전된 그룹을 함유한다.

도 1c는 본 발명의 한가지 구체예에 따르는 아르기닌-풍부 펩타이드와 안티센스 올리고머의 컨주케이트를 나타낸다.

도 1d-g는 d 내지 g로 지정된 예시적인 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드의 반복 서브유니트 분절을 나타낸다.

도 2a-2b는 PMOplus™ 형태 (M1/M2-AUGplus; 서열번호 13)인 본 발명의 바람직한 예시적인 안티센스 화합물의 구조를 나타낸다. 3 개의 (피페라지노) 포스포로디아미데이트 (pip-PDA) 결합은 순수한 양전하를 부여하며, 따라서 PMOplus™이라 칭한다.

도 3은 감염된 세포 내에 존재하는 인플루엔자 바이러스 RNA의 3 가지 상이한 종, vRNA, mRNA 및 vcRNA, 및 본 발명에 기술된 표적화 PMO의 표적 위치를 나타낸다.

도 4a는 인플루엔자의 중요한 혈청형인 H1N1, H1N1 (S-OIV), H5N1, H3N2, H9N2 및 H7N7로부터의 M1/M2 분절의 5' 말단 60개의 뉴클레오타이드의 서열 보존을 나타낸다.

도 4b는 M1/M2-AUG 표적 (서열번호 12)에 대한 각각의 염기 다음에 아래첨자로 나타낸 숫자로 표시된 염기를 갖는 분리체의 백분율을 나타낸다.

도 5a-5b는 각각 vcRNA의 AUG 개시 코돈 및 5' 말단에 대비한 본 발명의 표적화 서열의 위치를 나타낸다.

도 6은 H3N2 쥐 모델 시스템에서 본 발명의 M1/M2-AUG 표적화 화합물 (서열번호 12 및 13)을 사용한 바이러스 역가의 용량 의존적 감소를 나타낸다.

도 7a-7d는 M1/M2-AUG-처리된 페럿 (ferrets) (서열번호 12 및 13)이 2009H1N1 (S-OIV) 유행성 돼지 독감 분리체로 감염시킨 후에 독감의 생존-중 감소된 임상적 징후를 가짐을 나타낸다.

도 7e는 S-OIV로 감염되고 본 발명의 M1/M2-AUG 화합물 (서열번호 12 및 13)로 처리된 페럿이 바이러스 역가의 2.3 로그 억제를 유도함을 나타낸다.

도 8a-c는 각각 바이러스성 HA RNA, M1 단백질 및 M2 단백질 발현에 대한 스플라이스 수용체 부위에 대해 표적화된 PPMO의 효과를 나타낸다.

도 9a-b는 바이러스성 HA RNA 및 M2 발현에 대한 M1/M2 AUG 개시 코돈에 대해 표적화된 안티센스 LNA 올리고머의 효과를 나타낸다.

도 10a-b는 바이러스성 HA RNA 및 M2 단백질 발현에 대한 M1/M2 AUG 개시 코돈 및 스플라이스 수용체 부위에 대해 표적화된 안티센스 2'OMe 올리고머의 효과를 나타낸다.

도 11은 M1/M2 AUG 개시 코돈에 대해 표적화된 PPMO로 처리된 H1N1 PR8-감염된 MDCK 세포에서의 M1 및 M2 단백질 발현의 억제를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042]

정의

[0043] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 발명에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다. 본 발명에 기술된 것과 유사하거나 동등한 어떤 방법 및 물질이라도 본 발명을 실시하거나 시험하는데 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 기술된다. 본 발명의 목적에 따라 다음의 용어들은 이하에 정의된다.

[0044] 관사 "a" 및 "an"은 본 발명에서 관사의 문법적 대상의 하나 또는 하나 이상 (즉, 적어도 하나)을 나타내기 위해서 사용된다. 예를 들어, "한 요소 (an element)"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

[0045] "약"은 기준 양, 레벨, 핵, 수, 빈도, 백분율, 디멘션, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해서 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1%만큼 변화하는 양, 레벨, 핵, 수, 빈도, 백분율, 디멘션, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[0046] "코드화 서열"은 유전자의 폴리펩타이드 생성물에 대한 코드에 기여하는 모든 핵산 서열을 의미한다. 대조적으로, 용어 "비-코드화 서열"은 유전자의 폴리펩타이드 생성물에 대한 코드에 기여하지 않는 모든 핵산 서열을 나타낸다.

[0047] 이 명세서 전체에 걸쳐서, 문맥이 다른 식으로 요구하지 않는 한, 단어 "~들을 포함한다 (comprise)", "~를 포함한다 (comprises)", 및 "~포함하는 (comprising)"은 언급된 단계 또는 요소 또는 단계 또는 요소의 그룹을 포함하지만, 어떤 다른 단계 또는 요소 또는 단계 또는 요소의 그룹을 배제하지는 않는 것을 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0048] "~로 구성된"은 문구 "~로 구성된" 다음에 오는 것은 무엇이든지 포함하며, 그것으로 제한되는 것을 의미한다. 따라서, 문구 "~로 구성된"은 열거된 요소가 필요하거나 필수적이며, 다른 요소는 존재할 수 없음을 나타낸다. "본질적으로 ~로 구성되는"은 상기의 문구 다음에 열거된 모든 요소를 포함하는 것을 의미하며, 열거된 요소에 대한 설명에 명시된 활성 또는 작용을 저해하지 않거나 기여하는 다른 요소로 한정된다. 따라서, 문구 "본질적으로 ~로 구성된"은 열거된 요소가 필요하거나 필수적이지만, 다른 요소는 임의적이며, 이들이 열거된 요소의 활성 또는 작용에 실질적으로 영향을 미치는지 안 미치는지에 따라서 존재하거나 존재할 수 없음을 나타낸다.

[0049] 용어 "상보적" 및 "상보성"은 염기-대합 규칙에 의해서 연관된 폴리뉴클레오타이드 (즉, 뉴클레오타이드의 서열)를 나타낸다. 예를 들어, 서열 "A-G-T"는 서열 "T-C-A"에 대해서 상보적이다. 상보성은 "부분적"일 수 있으며, 이 경우에는 핵산의 염기의 단지 일부분만이 염기 대합 규칙에 따라 부합된다. 또는, 여기에서 핵산들 사이에는 "완전"하거나 "전체적"인 상보성이 있을 수 있다. 핵산 가닥 사이의 상보성의 정도는 핵산 가닥들 사이의 하이브리드화의 효율 및 강도에 상당한 영향을 미친다. 완전한 상보성이 종종 바람직하지만, 일부의 구체 예는 표적 RNA에 관해서 하나 또는 그 이상, 바람직하게는 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 미스매치 (mismatches)를 포함할 수 있다. 올리고머 내의 모든 위치에서의 변이가 포함된다. 특정의 구체예에서, 올리고머의 말단에 인접한 서열에서의 변이가 내부에서의 변이보다 일반적으로 바람직하며, 존재한다면 전형적으로는 5' 및/또는 3' 말단의 약 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 뉴클레오타이드 내에 존재한다.

[0050] 용어 "세포 투과성 웨타이드" 또는 "CPP"는 상호교환하여 사용되며, 또한 수송 웨타이드, 담체 웨타이드, 또는 웨타이드 형질도입 영역으로도 불리는 양이온성 세포 투과성 웨타이드를 나타낸다. 본 발명에서 나타낸 바와 같은 웨타이드는 소정의 세포 배양 집단의 세포의 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% (이들 사이의 모든 정수 포함)에서 세포 투과를 유도하는 능력을 가지며, 전신 투여하면 생체내에서 다수의 조직 내에서의 거대분자 전위를 허용한다.

[0051] 용어 "안티센스 올리고머" 또는 "안티센스 화합물" 또는 "안티센스 올리고뉴클레오타이드" 또는 "올리고뉴클레오타이드"는 상호교환하여 사용되며, 염기-대합 부분이 왓슨-크릭 (Watson-Crick) 염기 대합에 의해서 핵산 (전형적으로 RNA) 내의 표적 서열에 하이브리드화하여 표적 서열 내에서 핵산:올리고머 혜포로듀플렉스를 형성하도록 허용하는 서브유니트간 결합에 의해서 연결되는 것으로, 각각 염기-대합 부분을 포함하는 사이클릭 서브유니트의 서열을 나타낸다. 사이클릭 서브유니트는 리보즈 또는 또 다른 펜토즈 당, 또는 특정의 구체예에서는 모르폴리노 그룹을 기초로 할 수 있다 (이하의 모르폴리노 올리고머의 설명을 참조). 또한, 웨타이드 핵산 (PNAs), 잠금 핵산 (locked nucleic acids; LNAs), 2'-0-메틸 올리고뉴클레오타이드 및 RNA 간섭제 (siRNA 작용제), 및 본 기술분야에서 공지된 그 밖의 다른 안티센스 항바이러스 작용제가 고려된다.

[0052] 이러한 안티센스 올리고머는 mRNA의 해독을 차단 또는 억제하거나, 천연적인 전-mRNA 스플라이스 과정을 억제하거나, 표적화된 mRNAs의 분해를 유도하도록 디자인될 수 있으며, 이것이 하이브리드화하는 표적 서열"에 대해서 "되거나, 그"에 대해서 표적화"된다고 말할 수 있다. 특정의 구체예에서, 표적 서열은 mRNA의 AUG 개시 코돈, 전-처리된 mRNA의 3' 또는 5' 스플라이스 부위, 분기점 (branch point)을 포함하는 부분을 포함한다. 표적 서열은 엑손 내에, 또는 인트론 내에 존재할 수 있다. 스플라이스 부위에 대한 표적 서열은 전처리된 mRNA에서 정상 스플라이스 수용체 접합부 하류의 그의 5' 말단 1 내지 25 개의 염기쌍을 갖는 mRNA 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 스플라이스 부위 표적 서열은 스플라이스 부위를 포함하거나, 온전히 엑손 코드화 서열 내에 함유되거나, 스플라이스 수용체 또는 공여체 부위에 걸쳐있는 전처리된 mRNA의 모든 부분이다. 올리고머는 더욱 일반적으로는, 이것이 상술한 방식으로 표적의 핵산에 대해서 표적화되는 경우에, 단백질, 바이러스 또는 박테리아와 같은 생물학적으로 적절한 표적에 대해서 표적화된다고 말한다.

[0053] 서열번호 12-114 중의 하나 또는 그 이상을 포함하거나, 이들로 본질적으로 구성되거나, 이들로 구성된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 포함된다. 또한, 서열번호 12-114 중의 어느 하나에 대해서 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 또는 99% (이들 사이의 모든 정수를 포함) 서열 동일성 또는 서열 상동성을 갖는 변이체 올리고머 및 /또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 개의 뉴클레오타이드까지 이들 서열과는 상이한 변이체, 바람직하게는 세포 내에서 인플루엔자 복제를 억제하는 이들 변이체를 포함하는 이들 안티센스 올리고머의 변이체가 포함된다. 또한, 본 발명에 기술된 바와 같은 하전된 결합의 적합한 수, 예를 들어, 매 10 개의 비하전된 결합

당 약 4-5 개와 같이 매 2-5 개의 비하전된 결합당 약 1 개까지를 포함하고/하거나 또한 본 발명에 기술된 바와 같이 여기에 부착된 Arg-풍부 웨타이드를 포함하는, 서열번호 12-114 중의 어느 하나 또는 그 이상의 올리고뉴클레오타이드가 포함된다.

[0054]

용어 "모르폴리노 올리고머" 또는 "PMO" (포스포로아미데이트- 또는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머)는 모르폴리노 서브유니트 구조로 구성된 올리고뉴클레오타이드 유사체를 나타내며, 여기에서 (i) 상기의 구조는 1 내지 3 원자 길이, 바람직하게는 2 원자 길이이며, 바람직하게는 비하전되거나 양이온성인 인-함유 결합에 의해서 함께 연결되어 하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 결합시키고, (ii) 각각의 모르폴리노 환은 퓨린 또는 피리미딘 또는 염기 특이적 수소 결합에 의해서 폴리뉴클레오타이드 내의 염기에 결합하는데 효과적인 동등한 염기-대합 부분을 갖는다. 예를 들어, 바람직한 포스포로디아미데이트 결합 타입을 나타내는 도 1a에서의 구조를 참조한다. 변이는 이들이 결합 또는 활성을 저해하지 않는 한 이 결합에 대해서 이루어질 수 있다. 예를 들어, 인에 부착된 산소는 황으로 치환될 수 있다 (티오포스포로디아미데이트). 5' 산소는 아미노 또는 저급 알킬 치환된 아미노에 의해서 치환될 수 있다. 인에 부착된 펜던트 질소는 (임의로 치환된) 저급 알킬에 의해서 비치환되거나, 일치환되거나 이치환될 수 있다. 이하의 양이온성 결합의 설명을 또한 참고로 한다. 퓨린 또는 피리미딘 염기 대합 부분은 전형적으로 아데닌, 시토신, 구아닌, 우라실, 티민 또는 이노신이다. 모르폴리노 올리고머의 합성, 구조 및 결합 특징은 모두 본 발명에 참고로 포함된 미국 특허 제5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,521,063, 및 5,506,337호, 및 PCT 출원 제PCT/US07/11435호 (양이온성 결합) 및 PCT 출원 제US2008/012804호 (개선된 합성)에 상세히 기술되어 있다.

[0055]

용어 "올리고뉴클레오타이드 유사체"는 (i) 변형된 골격 구조, 예를 들어, 천연 올리고- 및 폴리뉴클레오타이드에 존재하는 표준 포스포디에스테르 결합이 아닌 골격, 및 (ii) 임의로, 변형된 당 부분, 예를 들어, 리보즈 또는 데옥시리보즈 부분보다는 모르폴리노 부분을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 나타낸다. 올리고뉴클레오타이드 유사체는 표준 폴리뉴클레오타이드 염기에 대한 왓슨-클릭 염기 대합에 의한 수소 결합이 가능한 염기를 제공하며, 여기에서 유사체 골격은 이러한 수소-결합이 올리고뉴클레오타이드 유사체 분자와 표준 폴리뉴클레오타이드 (예를 들어, 단일-가닥 RNA 또는 단일-가닥 DA) 내의 염기 사이에서 서열-특이적 형식으로 이루어지도록 하는 방식으로 염기를 제시한다. 바람직한 유사체는 실질적으로 비하전된 인-함유 골격을 갖는 것이다.

[0056]

올리고뉴클레오타이드 유사체 내의 실질적으로 비하전된 인-함유 골격은 서브유니트 결합의 대부분, 예를 들어, 그의 결합의 50-100%, 전형적으로는 적어도 60% 내지 100% 또는 75% 또는 80%가 비하전되거나, 실질적으로 비하전되고, 단일의 인 원자를 함유하는 것이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드 유사체는 약 8 내지 40 개의 서브유니트, 전형적으로는 약 8-25 개의 서브유니트, 바람직하게는 약 12 내지 25 개의 서브유니트를 함유할 수 있다. 특정의 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 이하에 정의하는 바와 같이 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근접한 상보성을 가질 수 있다.

[0057]

올리고뉴클레오타이드의 "서브유니트"는 한 개의 뉴클레오타이드 (또는 뉴클레오타이드 유사체) 유니트를 나타낸다. 상기 용어는 부착된 서브유니트간 결합이 있거나 없는 뉴클레오타이드 유니트를 나타낼 수 있지만, "하전된 서브유니트"를 언급하는 경우에, 전하는 전형적으로 서브유니트간 결합 (예를 들어, 도 1b에 나타낸 바와 같은 포스페이트 또는 포스포로티오에이트 결합 또는 양이온성 결합) 내에 존재한다.

[0058]

퓨린 또는 피리미딘 염기 대합 부분은 전형적으로 아데닌, 시토신, 구아닌, 우라실, 티민 또는 이노신이다. 또한, 피리딘-4-온, 피리딘-2-온, 페닐, 슈도우라실, 2,4,6-트리메톡시 벤젠, 3-메틸 우라실, 디하이드로유리딘, 나프틸, 아미노페닐, 5-알킬시티딘 (예를 들어, 5-메틸시티딘), 5-알킬유리딘 (예를 들어, 리보티미딘), 5-할로유리딘 (예를 들어, 5-브로모유리딘) 또는 6-아자피리미딘 또는 6-알킬피리미딘 (예를 들어, 6-메틸유리딘), 프로핀, 퀘소신 (quesosine), 2-티오유리딘, 4-티오유리딘, 와이부토신 (wybutosine), 와이부톡소신, 4-아세틸티딘, 5-(카복시하이드록시메틸)유리딘, 5'-카복시메틸아미노메틸-2-티오유리딘, 5-카복시메틸아미노메틸유리딘, β -D-갈락토실퀘오신, 1-메틸아데노신, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아노신, 3-메틸시티딘, 2-메틸아데노신, 2-메틸구아노신, N6-메틸아데노신, 7-메틸구아노신, 5-메톡시아미노메틸-2-티오유리딘, 5-메틸아미노메틸유리딘, 5-메틸카보닐메틸유리딘, 5-메틸옥시유리딘, 5-메틸-2-티오유리딘, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데노신, β -D-만노실퀘오신, 유리딘-5-옥시아세트산, 2-티오시티딘, 트레오닌 유도체 등과 같은 염기도 포함된다 [Burgin et al., 1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman & Peyman, supra]. 이러한 관점에서 "변형된 염기"는 상기 설명된 바와 같은 아데닌 (A), 구아닌 (G), 시토신 (C), 티민 (T), 및 우라실 (U) 이외의 뉴클레오타이드 염기를 의미하며; 이러한 염기는 안티센스 분자 내의 어떤 위치에서라도 사용될 수 있다. 본 기술분야에서 숙련된 전문가는 올리고머의 용도에 따라서 Ts 및 Us는 상호교환될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, 더 RNA-유

사한 2'-0-메틸 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 다른 안티센스 화학의 경우에 T 염기는 U로 나타낼 수 있다 [참조: 예를 들어, 서열 목록].

[0059] "아미노산 서브유니트" 또는 "아미노산 잔기"는 α -아미노산 잔기 (-CO-CHR-NH-) 또는 β - 또는 다른 아미노산 잔기 (예를 들어, -CO-(CH₂)_nCHR-NH-)를 나타낼 수 있으며, 여기에서 R은 측쇄 (수소를 포함할 수 있음)이고, n은 1 내지 7, 바람직하게는 1 내지 4이다.

[0060] 용어 "천연적으로 존재하는 아미노산"은 단백질 생합성 중에 이용되는 20 (L)-아미노산뿐만 아니라 4-하이드록시프롤린, 하이드록시리신, 테스모신, 이소테스모신, 호모시스테인, 시트룰린 및 오르니틴과 같은 그 밖의 것과 같이 천연 상태에서 발견되는 단백질 내에 존재하는 아미노산을 나타낸다. 용어 "비-천연 아미노산"은 천연 상태에서 발견되는 단백질에 존재하지 않는 아미노산을 나타내며, 예로는 베타-알라닌 (β -Ala), 6-아미노헥사노산 (Ahx) 및 6-아미노펜타노산이 포함된다. "비-천연 아미노산"의 추가의 예로는 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 공지되어 있는 (D)-아미노산, 노르류신, 노르발린, p-플루오로페닐알라닌, 에티오닌 등이 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0061] "분리된"은 그의 천연 상태에서 정상적으로 동반되는 성분들로부터 실질적으로 또는 본질적으로 유리된 물질을 의미한다. 예를 들어, 본 발명에서 사용된 것으로서 "분리된 폴리뉴클레오타이드" 또는 "분리된 올리고뉴클레오타이드"는 천연적으로 존재하는 상태에서 그의 측면에 있는 서열로부터 정제되거나 분리된 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, 통상적으로는 단편에 인접해 있는 서열로부터 분리된 DNA 단편을 나타낼 수 있다.

[0062] "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 원하는 치료학적 효과를 제공하는데 효과적인 것으로서, 단일 용량으로 또는 일련의 용량의 일부분으로서 포유동물 대상체에게 투여된 안티센스 올리고머 또는 RNA 간섭체 (예를 들어, siRNA)와 같은 치료학적 화합물의 양을 나타낸다. 안티센스 올리고머의 경우에, 이 효과는 전형적으로 선택된 표적 서열의 해독 또는 천연적인 스플라이스-처리를 억제함으로써 유도된다. 감염성 인플루엔자 바이러스에 대해서 표적화된 "유효량"은 또한, 감염성 바이러스의 복제율 및/또는 바이러스 부하, 및/또는 바이러스 감염과 연관된 증상을 감소시키는데 효과적인 양에 관한 것이다.

[0063] "증진시키다" 또는 "증진시키는", 또는 "증가시키다" 또는 "증가시키는" 또는 "자극하다" 또는 "자극하는"은 일반적으로, 안티센스 화합물이 없거나 대조 화합물인 경우에 대해서 야기된 반응과 비교하여 세포 또는 대상체에서 더 큰 생리학적 반응 (즉, 하류 효과)을 제공하거나 야기하는 하나 또는 그 이상의 안티센스 또는 RNAi 화합물 또는 조성물의 능력을 나타낸다. "증가" 또는 "증진"된 양은 전형적으로 "통계학적으로 유의적인" 양이며, 안티센스 화합물이 없거나 대조 화합물인 경우에 대해서 제공된 양의 1.1, 1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 배 또는 그 이상 (예를 들어, 500, 1000 배) (이들 사이 및 1 이상의 모든 정수 및 소수점을 포함 (예를 들어, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등)인 증가를 포함할 수 있다.

[0064] 용어 "감소시키다" 또는 "억제하다"는 일반적으로 진단 분야에서의 일상적인 기술에 따라 측정된 것으로서, 본 발명에 기술된 질병 또는 상태의 증상과 같은 적절한 생리학적 또는 세포성 반응을 "감소"시키는 본 발명의 하나 또는 그 이상의 안티센스 또는 RNAi 화합물의 능력에 관련될 수 있다. 적절한 생리학적 또는 세포성 반응 (생체내 또는 시험관내)은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 명백할 것이며, 인플루엔자 감염의 증상 또는 병리학의 감소, 또는 바이러스 복제 또는 바이러스 부하의 감소를 포함할 수 있다. 반응의 "감소"는 안티센스 화합물이 없거나 대조 조성물인 경우에 대해서 제공된 반응과 비교하여 "통계학적으로 유의적"일 수 있으며, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 감소 (이들 사이의 모든 정수 포함)를 포함할 수 있다.

[0065] 용어 "표적 서열"은 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 작용제가 지시되는 표적 RNA의 일부분, 즉 올리고뉴클레오타이드가 상보적 서열의 왓슨-크릭 염기 대합에 대해서 하이브리드화할 수 있는 서열을 나타낸다. 특정의 구체예에서, 표적 서열은 바이러스성 네거티브-가닥 RNA 또는 바이러스 mRNA의 인접한 부분일 수 있거나, 바이러스 게놈 또는 바이러스 상보적 RNA의 5' 및 3' 말단 서열의 부분들로 구성될 수 있다.

[0066] 용어 "표적화 서열" 또는 "안티센스 표적화 서열"은 RNA 게놈 내의 표적 서열에 대해서 상보적 (또한, 실질적으로 상보적인 것을 의미함)인 올리고뉴클레오타이드 또는 다른 안티센스 작용제 내의 서열을 나타낸다. 안티센스 화합물의 전체 서열, 또는 단지 일부분이 표적 서열에 대해서 상보적일 수 있다. 예를 들어, 20-30개의 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드에서는 약 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29개의 염기가 표적 부분에 대해서 상보적인 표적화 서열일 수 있다. 전형적으

로, 표적화 서열은 인접한 염기들로 형성되지만, 대신으로는, 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드의 반대 말단으로부터 함께 배치되는 경우에 표적 서열에 걸친 서열을 구성하는 비-인접 서열로 형성될 수 있다.

[0067] 표적 및 표적화 서열은 안티센스 화합물의 결합이 1) 네거티브 센스 바이러스 RNA의 5' 또는 3' 말단 25개의 염기; 2) 포지티브 센스 mRNA의 5' 또는 3' 말단의 말단 30개의 염기; 3) 바이러스 mRNA의 AUG 개시 코돈 주변의 45개의 염기; 및/또는 4) 선택적 스플라이싱의 대상인 바이러스 mRNA의 스플라이스 공여체 또는 수용체 부위 주변의 50개의 염기 내의 부분에 대한 것이 되도록 선택될 수 있다. 특정의 구체예에서, 표적 부분은 1) 네거티브 센스 바이러스 RNA의 M1 또는 M2 부분의 5' 또는 3' 말단 25개의 염기; 2) 포지티브 센스 M1 또는 M2 mRNA의 5' 또는 3' 말단의 말단 30개의 염기; 3) M1 또는 M2 mRNA의 AUG 개시 코돈 주변의 45개의 염기; 및/또는 4) M1 또는 M2 바이러스 mRNA의 스플라이스 공여체 또는 수용체 부위 주변의 50개의 염기를 포함할 수 있다. 특정의 구체예에서, 표적 부분은 AUG 코돈, 및 폴리피리미딘 트랙트 (tract) 또는 라리아트 (lariat)-형성 서열과 같은 바이러스 RNA (예를 들어, M1 또는 M2 mRNA)의 스플라이스 공여체 부위를 둘러싸거나 제공하는 염기 둘 다를 포함할 수 있다. 특정의 구체예에서, AUG 개시 코돈 및 M1/M2 RNA의 근위 스플라이스 공여체 서열 (예를 들어, 폴리피리미딘 트랙트) 둘 다를 표적으로 하는 단일 안티센스 올리고머 또는 RNAi 작용제를 사용하는 것은 표적 단백질 발현을 감소시키거나, 바이러스 복제를 감소시키거나, 둘 다인 경우에 관해서 상승적 효과를 제공할 수 있다.

[0068] 표적 및 표적화 서열은, 하이브리드화가 역평행 (antiparallel) 배열로 일어나는 경우에 서로에 대해 "상보적"인 것으로 기술된다. 표적화 서열은 표적 서열 대해 "거의" 또는 "실질적인" 상보성을 가질 수 있으며, 여전히 본 발명의 목적에 따라 작용할 수 있으며, 즉 이것은 여전히 기능적으로 "상보적"일 수 있다. 특정의 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 10 개의 뉴클레오타이드 중에서 표적 서열과 기껏해야 한 개의 미스매치, 바람직한 구체예에서, 20 개 중에서 기껏해야 1개의 미스매치를 가질 수 있다. 대신으로, 올리고뉴클레오타이드는 본 발명에 기술된 예시적인 안티센스 표적화 서열과 적어도 90% 서열 상동성, 바람직한 구체예에서, 적어도 95% 서열 상동성을 가질 수 있다.

[0069] 올리고머가 생리학적 조건 하에서 표적에 대해 하이브리드화한다면 올리고뉴클레오타이드는 표적 폴리뉴클레오타이드에 대해서 "특이적으로 하이브리드화"하며, 여기에서 T_m 은 실질적으로 45°C 보다 크고, 바람직한 구체예에서, 적어도 50°C, 전형적으로는 60°C-80°C 또는 그 이상이다. 이러한 하이브리드화는 바람직하게는 엄격한 (stringent) 하이브리드화 조건에 상응한다. 소정의 이온 강도 및 pH에서, T_m 은 표적 서열의 50%가 상보적 폴리뉴클레오타이드에 대해 하이브리드화하는 온도이다. 또한, 이러한 하이브리드화는 정확한 상보성으로뿐만 아니라 표적 서열에 대한 안티센스 올리고머의 "거의" 또는 "실질적인" 상보성으로 일어날 수 있다.

[0070] "상동성"은 동일하거나 보존적 치환을 구성하는 아미노산의 백분율 수를 나타낸다. 상동성은 GAP와 같은 서열 비교 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다 [Devereaux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research* 12, 387-395]. 이러한 방식으로 여기에서 인용된 것과 유사하거나 실질적으로 상이한 길이의 서열은 정렬 내에 캡 (gaps)을 삽입함으로써 비교할 수 있으며, 여기에서 이러한 캡은 예를 들어, GAP에 의해서 사용된 비교 알고리즘에 의해서 결정된다.

[0071] 본 발명에서 사용된 것으로서 표현 "서열 동일성" 또는, 예를 들어, "~에 대해 50% 동일한 서열"을 포함하는 표현은 서열이 비교창에 걸쳐서 뉴클레오타이드-대-뉴클레오타이드 기준으로 또는 아미노산-대-아미노산 기준으로 동일한 정도를 나타낸다. 따라서, "서열 동일성의 백분율"은 2 개의 최적으로 정렬된 서열을 비교창에 걸쳐서 비교하고, 동일한 핵산 염기 (예를 들어, A, T, C, G, I) 또는 동일한 아미노산 잔기 (예를 들어, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)가 2 개의 서열 모두에서 나타나는 위치의 수를 측정하여 부합된 위치의 수를 수득하고, 부합된 위치의 수를 비교창 내의 위치의 총수 (즉, 창 크기)로 나누어주고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 수득함으로써 계산될 수 있다.

[0072] 2 개 또는 그 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 사이의 서열 관계를 기술하기 위해서 사용된 용어에는 "기준 서열", "비교창", "서열 동일성", "서열 동일성의 백분율", 및 "실질적인 동일성"이 포함된다. "기준 서열"은 뉴클레오타이드 및 아미노산 잔기를 포함하여 길이가 적어도 8 또는 10, 빈번하게는 15 내지 18, 종종 적어도 25 모노머 유니트이다. 2 개의 폴리뉴클레오타이드는 각각 (1) 2 개의 폴리뉴클레오타이드 사이에서 유사한 서열 (즉, 단지 완전한 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부분), 및 (2) 2 개의 폴리뉴클레오타이드 사이에서 상이한 서열을 포함할 수 있기 때문에, 2 개 (또는 그 이상)의 폴리뉴클레오타이드 사이의 서열 비교는 전형적으로 2 개의 폴리뉴클레오타이드의 서열을 "비교창"에 걸쳐서 비교하여 국소 부분의 서열 유사성을 확인하고

비교함으로써 수행된다. "비교창"은 2 개의 서열을 최적으로 정렬한 후에 하나의 서열을 인접한 위치의 동일한 수의 기준 서열과 비교하는 적어도 6 개의 인접한 위치, 통상적으로는 약 50 내지 약 100, 더욱 통상적으로는 약 100 내지 약 150 위치의 개념적 분절을 나타낸다. 비교창은 2개의 서열의 최적 정렬을 위해서 기준 서열 (부가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여 약 20% 또는 그 미만의 부가 또는 결실 (즉, 캡)을 포함할 수 있다. 비교창을 정렬하기 위한 서열의 최적 정렬은 알고리즘의 컴퓨터화된 실행에 의해서 (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0에서의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA), 또는 검사 및 선택된 다양한 방법 중의 어떤 것에 의해서 생성된 최상의 정렬 (즉, 비교창에 걸쳐서 최고의 상동성 백분율을 제공)에 의해서 수행될 수 있다. 기준은 또한, 예를 들어, 문헌 [Altschul *et al.*, 1997, *Nucl. Acids Res.* 25:3389]에 기술된 바와 같은 프로그램의 BLAST 패밀리에 대해서 만들어질 수 있다. 서열 분석의 상세한 설명은 문헌 [Unit 19.3 of Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15]에서 볼 수 있다.

[0073] "뉴클레아제-저항성" 올리고머 분자 (올리고머)는 그의 골격이 비-하이브리드화 또는 하이브리드화된 형태로 신체 내의 통상적인 세포의 및 세포내 뉴클레아제에 의한 뉴클레아제 분해에 대해서 실질적으로 저항성인 것을 나타내며; 즉, 올리고머는 올리고머가 노출되는 신체 내의 정상적인 뉴클레아제 조건 하에서 뉴클레아제 분해를 거의 또는 전혀 나타내지 않는다.

[0074] "헤테로듀플렉스"는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 표적 RNA의 상보적 부분 사이의 듀플렉스를 나타낸다. "뉴클레아제-저항성 헤테로듀플렉스"는 헤테로듀플렉스가 이중-가닥 RNA/RNA 또는 RNA/DNA 컴플렉스를 절단할 수 있는 RNaseH와 같은 세포내 및 세포외 뉴클레아제에 의한 생체내 분해에 대해서 실질적으로 저항성이 되도록, 안티센스 올리고머를 그의 상보적인 표적에 결합시킴으로써 형성된 헤테로듀플렉스를 나타낸다.

[0075] "표적 RNA를 수반하는 염기-특이적 세포내 결합 이벤트 (event)"는 세포 내부에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 표적 RNA 서열에 대한 특이적 결합을 나타낸다. 이러한 결합의 염기 특이성은 서열 의존적이다. 예를 들어, 단일-가닥 폴리뉴클레오타이드는 서열이 상보적인 단일-가닥 폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0076] 본 발명에서 사용된 것으로서 용어 "체액"은 소변, 타액, 혈장, 혈액, 척수액, 또는 피부 세포 또는 진피 파편과 같은 생물학적 기원의 다른 샘플을 포함하는, 대상체로부터 수득된 다양한 샘플 탑입을 포함하며, 그 안에 혼탁된 세포 또는 세포 단편, 또는 액체 매질 및 그의 용질을 나타낼 수도 있다.

[0077] 용어 "상대적 양"은 비교가 시험 측정 및 대조 측정 사이에서 이루어지는 경우에 사용된다. 반응에서 컴플렉스를 형성하는 시약의 상대적 양은 대조 검체와 반응하는 양과 비교한 시험 검체와 반응하는 양이다. 대조 검체는 동일한 시험에 별도로 처리될 수 있거나, 이것은 동일한 샘플의 일부분 (예를 들어, 조직 절편 내의 악성 영역 주변의 정상 조직)일 수도 있다.

[0078] 개체 또는 세포의 "치료"는 개체 또는 세포에서 질병 또는 병리학의 자연적인 과정을 변화시키는 수단으로서 제공된 모든 탑입의 개입이다. 치료는 예를 들어, 약제학적 조성물의 투여를 포함하나, 이것으로 제한되지는 않고, 예방적으로, 또는 병리학적 이벤트 또는 병인제와의 접촉이 개시된 이후에 수행될 수 있다. 치료는 인플루엔자 바이러스 감염과 연관된 질병 또는 상태의 증상 또는 병리학에 대한 모든 바람직한 효과를 포함한다. 특별한 바이러스에 의해서 감염된 것으로 진단된 환자에 대한 관련된 용어 "개선된 치료학적 결과"는 바이러스의 성장 또는 바이러스 부하, 또는 그 특별한 바이러스에 의한 감염과 연관된 검출가능한 증상의 둔화 또는 감소를 나타낼 수 있다.

[0079] 또한, 치료할 질병 또는 상태의 진행율을 감소시키거나, 그 질병 또는 상태의 발병을 지연시키거나, 그의 발병의 중증도를 감소시키는 것에 관한 것일 수 있는 "예방적" 치료가 포함된다. "치료" 또는 "예방"은 반드시 질병 또는 상태, 또는 그의 연관된 증상의 완전한 근절, 치유 또는 예방을 나타내지는 않는다.

[0080] 작용제는 작용제가 세포막을 가로지르는 수동 확산 이외의 기전에 의해서 세포에 들어갈 수 있는 경우에 "포유동물 세포에 의해서 능동적으로 흡수"된다. 작용제는 예를 들어, 작용제가 예를 들어, ATP-의존성 수송 기전에 의해서 포유동물 세포막을 가로질러서 수송되는 것을 나타내는 "능동 수송"에 의해서, 또는 후에 막을 가로지르는 결합된 작용제의 통과를 촉진시키는 수송 단백질에 작용제를 결합시키는 것이 필요한 수송 기전에 의해서 세포막을 가로질러서 안티센스 작용제를 수송하는 것을 나타내는 "촉진된 수송 (facilitated transport)"에 의해서 수송될 수 있다. 능동 및 촉진된 수송 둘 다의 경우에, 올리고뉴클레오타이드 유사체는 바람직하게는 이하에 정의되는 바와 같은 실질적으로 비하전된 골격을 갖는다.

[0081] 대신으로, 안티센스 화합물은 세포봉입 기전 (endocytic mechanism)에 의해서 세포 내로 흡수될 수 있는 양이온 성 지질 또는 리포좀과 컴플렉스화된 음이온성 골격을 갖는 작용제와 같이 컴플렉스화된 형태로 제제화될 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 또한, 예를 들어, 그의 5' 또는 3' 말단에서 HIV TAT 단백질의 일부분인 폴리아르기닌과 같은 아르기닌-풍부 펩타이드에, 또는 아르기닌과 비-천연 아미노산인 6-아미노헥사노산 (Ahx) 및 베타-알라닌 (β Ala)을 포함하는 다른 아미노산의 조합물에 컨주케이트될 수도 있다. 예시적인 아르기닌-풍부 송달 펩타이드는 서열번호 115-128로 열거된다. 이들 예시적인 아르기닌-풍부 송달 펩타이드는 기술된 바와 같이 표적 숙주 세포 내로의 수송을 촉진시킨다 [Moulton, Nelson *et al.* 2004].

[0082] 따라서, 필요한 대상체에게 하나 또는 그 이상의 본 발명의 안티센스 올리고머 (예를 들어, 서열번호 12-114, 및 그의 변이체)를 임의로 약제학적 제제 또는 투약형의 일부분으로 투여함으로써 인플루엔자 바이러스 감염을 치료하는 방법이 포함된다. 본 발명에서 사용된 것으로서 "대상체"는, 증상을 나타내거나 증상을 나타낼 위험이 있는 본 발명의 안티센스 화합물로 치료될 수 있는 모든 동물, 예를 들어, 인플루엔자 바이러스 감염을거나 인플루엔자 바이러스 감염에 걸릴 위험이 있는 대상체를 포함할 수 있다. 적합한 대상체 (환자)에는 실험실 동물 (예를 들어, 마우스, 랙트, 토끼 또는 기니아피그), 농장 동물, 및 집동물 또는 애완동물 (예를 들어, 고양이 또는 개)이 포함된다. 비-인간 영장류, 및 바람직하게는 인간 환자가 포함된다.

[0083] 또한, 이중 가닥 RNA-분자, 또는 dsRNA를 수반하는 것과 같은 RNA 간섭 (RNAi)의 대체방법이 고려된다. 용어 "이중-가닥"은 가닥의 적어도 일부분이 수소 결합에 대해서 충분하게 상보적이며 뉴클레오타이드 구조를 형성하는 부분을 포함하는 2 개의 별개의 핵산 가닥을 의미한다. 용어 "듀플렉스" 또는 "듀플렉스 구조"는 2 개의 별개의 가닥이 실질적으로 상보적이며, 따라서 서로 하이브리드화하는 이중 가닥 분자의 부분을 나타낸다.

[0084] "dsRNA"는 2 개의 상보적인 역평행 핵산 가닥 (즉, 센스 및 안티센스 가닥)를 포함하는 뉴클레오타이드 구조를 갖는 리보핵산 분자를 나타낸다. dsRNA의 모든 뉴클레오타이드가 반드시 왓슨-크릭 염기 대합을 나타내지는 않으며; 2 개의 RNA 가닥은 실질적으로 상보적일 수 있다. RNA 가닥은 동일하거나 상이한 수의 뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 용어 "dsRNA"는 또한, "siRNA" 또는 짧은 간섭성 RNA를 포함한다.

[0085] 용어 "리보뉴클레오타이드" 또는 "뉴클레오타이드"는 변형된 RNA 또는 뉴클레오타이드 대용품 (surrogate)의 경우에는 또한, 하나 또는 그 이상의 위치에서 변형된 뉴클레오타이드 또는 대용품 치환 부분을 나타내는 것으로 이해될 것이다. 따라서, dsRNA는 표적 RNA에 대해서 적어도 부분적으로 상보적인 부분이거나, 그러한 부분을 포함한다. 특정의 구체예에서, dsRNA는 표적 RNA에 대해서 완전히 상보적이다. dsRNA와 표적 사이에 완전한 상보성이 있을 필요는 없지만, 상응하는 것은 dsRNA, 또는 그의 분해 생성물이 표적 RNA의 RNAi 분해에 의한 것과 같은 서열 특이적 침묵 (silencing)을 지시할 수 있기에 충분하여야 한다. 상보성 또는 표적 가닥과의 상동성의 정도는 안티센스 가닥에서 가장 중요하다. 특히 안티센스 가닥에서의 완전한 상보성이 종종 바람직하지만, 일부의 구체예는 표적 RNA에 대해서 하나 또는 그 이상, 바람직하게는 6, 5, 4, 3, 2 개, 또는 그보다 적은 미스매치를 포함할 수 있다. 미스매치는 대부분 말단 부분에서 허용되며, 존재한다면, 바람직하게는 말단 부분 또는 부분들 내에, 예를 들어, 5' 및/또는 3' 말단의 6, 5, 4, 또는 3 개의 뉴클레오타이드 내에 존재한다. 센스 가닥은 분자의 전반적인 이중-가닥 특징을 유지하도록 단지 안티센스 가닥과 실질적으로 상보적인 것만이 필요하다.

[0086] 본 발명에서 사용된 것으로서 "변형된 dsRNA"는 dsRNA 분자가 동일한 표적 RNA를 인식하는 동일한 dsRNA 분자보다 뉴클레아제 (예를 들어, 단백질 키나제)에 대해서 더 저항성이 있도록 하는 적어도 하나 변화를 포함하는 dsRNA 분자를 나타낸다. 변형된 dsRNAs는 단일-가닥 뉴클레오타이드 오버hang (overhang) 및/또는 적어도 하나의 치환된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0087] 본 발명에서 사용된 것으로서 "뉴클레오타이드 오버hang(overhang)"은 하나의 RNA 가닥의 3'-말단이 다른 상보적 가닥의 5'-말단을 지나서 연장되거나, 또는 그 반대인 경우에 뉴클레오타이드 구조로부터 돌출하는 대합되지 않은 (unpaired) 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드들을 나타낸다. "평활 (blunt)" 또는 "평활 말단"은 dsRNA의 말단에 대합되지 않은 올리고뉴클레오타이드가 없는, 즉 뉴클레오타이드 오버hang이 없는 것을 의미한다. "평활 말단" dsRNA는 그의 전체 길이에 걸쳐서 이중 가닥화된, 즉 분자의 어느 한 말단에서 뉴클레오타이드 오버hang이 없는 dsRNA이다.

[0088] 본 발명에서 사용된 것으로서 용어 "말단 염기쌍"은 이중-가닥 분자의 뉴클레오타이드 부분의 하나의 말단 상의 마지막 뉴클레오타이드 염기쌍을 나타낸다. 예를 들어, dsRNA 또는 다른 분자가 평활 말단이라면 (즉, 뉴클레오타이드 오버hang을 갖지 않는다면), 분자의 양 말단에서의 마지막 뉴클레오타이드 염기쌍이 말단 염기쌍이다. dsRNA 또는 다른 분자가 뉴클레오타이드 구조의 하나 또는 양 말단에서 뉴클레오타이드 오버hang을 갖는 경우에는, 뉴클

레오타이드 오버행에 바로 인접한 마지막 뉴클레오타이드 염기쌍(들)이 분자의 그 말단(들)에서의 말단 염기쌍이다.

[0089] 또한, 본 발명에 기술된 것으로서 서열번호 12-114 중의 어느 하나 또는 그 이상 또는 그의 변이체를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 발현하거나, 서열번호 1-11의 표적 서열 중의 어느 하나 또는 그 이상에 대해서 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열을 발현하는 벡터와 같이 본 발명의 올리고머성 인플루엔자 바이러스-표적화 서열을 발현할 수 있는 벡터 송달 시스템이 포함된다. siRNA 또는 그 밖의 다른 듀플렉스-형성 RNA 간섭 분자를 발현하는 벡터가 포함된다.

[0090] "벡터" 또는 "핵산 구조물"은 예를 들어, 그 안에서 폴리뉴클레오타이드가 삽입되거나 클로닝될 수 있는 플라스미드, 박테리오파아지, 효모 또는 바이러스로부터 유도된 폴리뉴클레오타이드 분자, 바람직하게는 DNA 분자를 의미한다. 벡터는 바람직하게는 하나 또는 그 이상의 독특한 제한부위를 함유하며, 표적 세포 또는 조직 또는 선조세포 또는 그의 조직을 포함한 규정된 숙주 세포 내에서 자발적 증식할 수 있거나, 클로닝된 서열이 재현될 수 있도록 규정된 숙주의 계놈과 통합될 수 있다. 따라서, 벡터는 자발적으로 복제하는 벡터, 즉 그의 복제가 염색체 복제와는 무관한 염색체외 실체로서 존재하는 벡터, 예를 들어, 선형이거나 폐쇄된 원형 플라스미드, 염색체외 요소, 미니-염색체, 또는 인공 염색체일 수 있다. 벡터는 자체-복제를 보장하는 어떤 수단이라도 함유할 수 있다. 대신으로, 벡터는 숙주 세포 내에 도입되는 경우에 계놈 내로 통합되고, 이것이 통합된 염색체(들)와 함께 복제되는 것일 수 있다.

[0091] 벡터 또는 핵산 구조물 시스템은 단일 벡터 또는 플라스미드, 함께 숙주 세포의 계놈 내로 도입될 총 DNA를 함유하는 2 개 또는 그 이상의 벡터 또는 플라스미드, 또는 트랜스포손 (transposon)을 포함할 수 있다. 벡터의 선택은 전형적으로, 벡터가 도입될 숙주 세포와 벡터의 호환성 (compatibility)에 따라 좌우된다. 본 발명의 경우에, 벡터 또는 핵산 구조물은 바람직하게는 근육세포와 같은 포유동물 세포에서 작동가능하게 작용성인 것이다. 벡터는 또한, 적합한 형질전환체 또는 형질감염체 (transfector)를 선택 또는 확인하기 위해서 사용될 수 있는 리포터 (reporter) 유전자 (즉, 녹색 형광 단백질, 루시퍼라제), 또는 항생제 또는 약물 저항성 유전자와 같은 선택 마커를 포함할 수 있다. 예시적인 송달 시스템에는 본 기술분야에서 공지된 것들 중에서 특히 레트로바이러스 (예를 들어, 렌티바이러스) 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관된 바이러스 벡터, 및 헤르페스 바이러스 벡터를 포함하나, 이들로 제한되지 않는, 바이러스 벡터 시스템 (즉, 바이러스-매개된 형질도입)이 포함된다.

[0092] 본 발명에서 사용된 것으로서 용어 "작동가능하게 연결된"은 후에 올리고머의 전사를 제어하는 프로모터의 조절 성 제어 하에 올리고머-코드화 서열을 배치하는 것을 의미한다.

[0093] 야생형 유전자 또는 유전자 생성물은 집단에서 가장 빈번하게 관찰되는 것이며, 따라서 마음대로 유전자의 "정상" 또는 "야생형" 형태로 지정된다.

[0094] "알킬"은 분지되거나 선형이거나 사이클릭 (사이클로알킬)일 수 있는, 탄소 및 수소를 함유하는 완전히 포화된 일가 래디칼을 나타낸다. 알킬 그룹의 예는 메틸, 에틸, n-부틸, t-부틸, n-헵틸, 이소프로필, 사이클로프로필, 사이클로펜틸, 에틸사이클로펜틸, 및 사이클로헥실이다. 일반적으로 바람직한 것은 "저급 알킬"이라 불리는 것으로 1 내지 6 개의 탄소 원자를 갖는 알킬 그룹이며, 메틸, 에틸, n-부틸, i-부틸, t-부틸, 이소아밀, n-펜틸 및 이소펜틸로 예시된다. 한가지 구체예에서, 저급 알킬은 C_1 내지 C_4 알킬을 나타낸다.

[0095] "알케닐"은 분지되거나 선형이거나 사이클릭일 수 있는, 탄소 및 수소를 함유하는 불포화된 일가 래디칼을 나타낸다. 알케닐 그룹은 단일불포화되거나 다중불포화될 수 있다. 일반적으로 바람직한 것은 "저급 알케닐"로 불리는 것으로 1 내지 6 개의 탄소 원자를 갖는 알케닐 그룹이다.

[0096] "알키닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중결합을 포함하며 2 내지 18 개의 탄소를 함유하는 불포화된 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 래디칼을 나타낸다. 예로는 에티닐, 프로피닐, 이소-프로피닐, 부티닐, 이소-부티닐, tert-부티닐, 펜티닐, 및 헥시닐이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 용어 "저급 알키닐"은 2 내지 8 개의 탄소를 함유하는, 본 발명에서 정의된 바와 같은 알키닐 그룹을 나타낸다.

[0097] "사이클로알킬"은 모노- 또는 폴리-사이클릭 알킬 래디칼을 나타낸다. 예로는 제한이 없이 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸 및 사이클로옥틸이 포함된다.

[0098] "아릴"은 일반적으로 단일 환 (예를 들어, 페닐) 또는 2 개의 축합된 환 (예를 들어, 나프틸)을 갖는 치환되거나 비치환된 일가 방향족 래디칼을 나타낸다. 이 용어는 푸릴, 피롤릴, 피리딜 및 인돌릴과 같이 환 내에 하나

또는 그 이상의 질소, 산소 또는 황 원자를 갖는 방향족 환 그룹인 헤테로아릴 그룹을 포함한다. "치환된"은 아릴 그룹 내의 하나 또는 그 이상의 환 수소가 불소, 염소 또는 브롬과 같은 할라이드; 1 개 또는 2 개의 탄소 원자를 함유하는 저급 알킬 그룹; 니트로, 아미노, 메틸아미노, 디메틸아미노, 메톡시, 할로메톡시, 할로메틸 또는 할로에틸에 의해서 대체된 것을 의미한다. 바람직한 치환체에는 할로겐, 메틸, 에틸, 및 메톡시가 포함된다. 일반적으로 바람직한 것은 단일 환을 갖는 아릴 그룹이다.

[0099] "아르알킬"은 아릴 그룹에 의해서 더 치환된 알킬, 바람직하게는 저급 (C_1-C_4 , 더욱 바람직하게는 C_1-C_2) 알킬 치환체를 나타내며; 그의 예는 벤질 ($-CH_2C_6H_5$) 및 펜에틸 ($-CH_2CH_2C_6H_5$)이다.

[0100] "티오알콕시"는 화학식 $-SRC$ 의 래디칼을 나타내며, 여기에서 Rc 는 본 발명에서 정의한 바와 같은 알킬 래디칼이다. 용어 "저급 티오알콕시"는 1 내지 8 개의 탄소를 함유하는, 본 발명에서 정의한 바와 같은 알콕시 그룹을 나타낸다.

[0101] "알콕시"는 화학식 $-ORd$ 의 래디칼을 나타내며, 여기에서 Rd 는 본 발명에서 정의한 바와 같은 알킬 래디칼이다. 용어 "저급 알콕시"는 1 내지 8 개의 탄소를 함유하는 본 발명에서 정의한 바와 같은 알콕시 그룹을 나타낸다. 알콕시 그룹의 예로는 메톡시 및 에톡시가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다.

[0102] "알콕시알킬"은 알콕시 그룹에 의해서 치환된 알킬 그룹을 나타낸다.

[0103] "카보닐"은 $-C(=O)-$ 래디칼을 나타낸다.

[0104] "구아니디닐"은 $H_2N(C=NH_2)-NH-$ 래디칼을 나타낸다.

[0105] "아미디닐"은 $H_2N(C=NH_2)CH-$ 래디칼을 나타낸다.

[0106] "아미노"는 $-NH_2$ 래디칼을 나타낸다.

[0107] "알킬아미노"는 화학식 $-NHRd$ 또는 $-NRdRd$ 의 래디칼을 나타내며, 여기에서 각각의 Rd 는 독립적으로 본 발명에서 정의한 바와 같은 알킬 래디칼이다. 용어 "저급 알킬아미노"는 1 내지 8 개의 탄소를 함유하는 본 발명에서 정의한 바와 같은 알킬아미노 그룹을 나타낸다.

[0108] "헤테로사이클"은 포화되거나 불포화되거나 방향족이며, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4 개의 헤테로 원자를 함유하고, 여기에서 질소 및 황 헤테로 원자는 임의로 산화될 수 있고, 질소 헤테로 원자는 임의로 4급화될 수 있는 5- 내지 7-원 모노사이클릭 또는 7- 내지 10-원 비사이클릭 헤�테로사이클 환을 의미하며, 상기 헤�테로사이클 중의 어떤 것이 벤젠 환에 융합된 비사이클릭 환이 포함된다. 헤�테로사이클은 어떤 헤테로 원자 또는 탄소 원자를 통해서라도 부착될 수 있다. 바람직하게는, 환 원자는 3 내지 6 개의 탄소 원자를 포함한다. 이러한 헤�테로사이클은 예를 들어, 피롤리딘, 피페리딘, 피페라진 및 모르폴린을 포함한다.

[0109] 헤�테로사이클은 이하에 정의된 바와 같은 헤�테로아릴을 포함한다. 따라서, 이하에 열거된 헤�테로아릴 이외에도 헤�테로사이클은 또한 모르폴리닐, 피롤리디노닐, 피롤리디닐, 피페리디닐, 피페리지닐, 히단토이닐, 발레로락타밀, 옥시라닐, 옥세타닐, 테트라하이드로푸라닐, 테트라하이드로피리디닐, 테트라하이드로피리디드로티오페닐, 테트라하이드로티오피라닐, 테트라하이드로피리미디닐, 테트라하이드로티오피라닐 등을 포함한다.

[0110] "헤테로아릴"은 모노- 및 비사이클릭 환 시스템 둘 다를 포함하는 것으로서 질소, 산소 및 황으로부터 선택된 적어도 하나 헤�테로 원자를 갖고, 적어도 하나의 탄소 원자를 함유하는 5- 내지 10-원의 방향족 헤�테로사이클 환을 의미한다. 대표적인 헤�테로아릴은 피리딜, 푸릴, 벤조푸라닐, 티오페닐, 벤조티오페닐, 퀴놀리닐, 피롤릴, 인돌릴, 옥사졸릴, 벤즈옥사졸릴, 이미다졸릴, 벤즈이미다졸릴, 티아졸릴, 벤조티아졸릴, 이속사졸릴, 피라졸릴, 이소티아졸릴, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐, 트리아지닐, 신놀리닐, 프탈라지닐 및 퀴나졸리닐이다.

[0111] 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 아르알킬 또는 알크아릴 그룹에 관한 용어 "치환된"은 수소 원자가 예를 들어, 할로겐, 하이드록시, 알콕시, 티올, 알킬티오, 아미노, 알킬아미노, 이미노, 옥소 (케토), 니트로, 시아노, 또는 카복실산, 설폰산 또는 포스폰산과 같은 다양한 산 또는 에스테르와 같은 헤�테로 원자-함유 치환체에 의해서 대체된 것을 나타낸다.

[0112] 특히 알킬, 알콕시, 티오알콕시 또는 알킬아미노 그룹에 관한 용어 "치환된"은 탄소 상의 수소 원자가 예를 들어, 할로겐, 하이드록시, 알콕시, 티올, 알킬티오, 아미노, 알킬아미노, 이미노, 옥소 (케토), 니트로, 시아노, 또는 카복실산, 설폰산 또는 포스폰산과 같은 다양한 산 또는 에스테르와 같은 헤�테로 원자-함유 치환체에 의해

서 대체된 것을 나타낸다. 이것은 또한, 헤테로 원자 상의 수소 원자 (예를 들어, 아민 수소)가 알킬, 카보닐 또는 다른 탄소 함유 그룹으로 대체된 것을 나타낼 수도 있다.

[0113] 특정의 구체예에서, 용어 "임의로 치환된 알킬", "임의로 치환된 알케닐", "임의로 치환된 알콕시", "임의로 치환된 티오알콕시", "임의로 치환된 알킬 아미노", "임의로 치환된 저급 알킬", "임의로 치환된 저급 알케닐", "임의로 치환된 저급 알콕시", "임의로 치환된 저급 티오알콕시", "임의로 치환된 저급 알킬 아미노" 및 "임의로 치환된 헤테로사이클릴"은 치환된 경우에, 적어도 하나 수소 원자가 치환체에 의해서 대체된 것을 의미한다. 옥소 치환체 (=0)의 경우에는 2 개의 수소 원자가 대체된다. 이에 관해서 치환체는 중수소, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헤�테로사이클, 임의로 치환된 사이클로알킬, 옥소, 할로겐, -CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=0)Ry, NRxS02Ry, -NRxC(=0)NRxRy, C(=0)Rx, C(=0)ORx, C(=0)NRxRy, -S0mRx 및 -S0mNRxRy를 포함하며, 여기에서 m은 0, 1 또는 2이고, Rx 및 Ry는 동일하거나 상이하며, 독립적으로 수소, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헤�테로사이클 또는 임의로 치환된 사이클로알킬이고, 상기의 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헤�테로사이클 및 임의로 치환된 사이클로알킬 치환체는 각각 옥소, 할로겐, -CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=0)Ry, NRxS02Ry, -NRxC(=0)NRxRy, C(=0)Rx, C(=0)ORx, C(=0)NRxRy, -S0mRx 및 -S0mNRxRy 중의 하나 또는 그 이상에 의해서 더 치환될 수 있다.

[0114] 인플루엔자 바이러스 계놈의 복제를 억제할 수 있는 표적화 서열의 선택은 이하에 거론된다.

표적화된 바이러스

[0116] 본 발명의 구체예는 부분적으로, 단일-가닥의 분절화된 네거티브-센스 RNA 바이러스의 효과적인 억제가 인플루엔자 바이러스에 의해서 감염된 동물을 (i) 1) 네거티브 센스 바이러스 RNA의 5' 또는 3' 말단 25개의 염기; 2) 포지티브 센스 mRNA의 5' 또는 3' 말단 30개의 염기; 3) 바이러스 mRNA의 AUG 개시 코돈 주변의 45개의 염기; 및/또는 4) 선택적 스플라이싱의 대상인 인플루엔자 mRNAs의 스플라이스 공여체 또는 수용체 부위 주변의 50개의 염기를 표적으로 하고, (ii) 숙주 세포 내에서 안티센스 화합물과 바이러스 사이의 효과적인 상호작용이 이루어지도록 하는 물리적 및 약력학적 특징을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 화합물에 노출시킴으로써 달성될 수 있다는 발견을 기초로 한다.

[0117] 특정의 구체예는 (i) 단일 가닥화되고, (ii) 분절화되며, (iii) 음극성인 계놈을 갖는 RNA 바이러스를 표적으로 한다. 표적화된 바이러스는 또한 양극성을 갖는 네거티브 센스 비리온 RNA (vRNA)의 계놈 보체의 2 가지 상이한 버전을 합성한다: 1) 네거티브 센스 비리온 RNA의 복제를 위한 주형으로 사용되는 cRNA, 및 2) 바이러스 단백질의 해독을 위해서 사용되는 상보적 포지티브 센스 RNA (mRNA). 도 3은 이들 상이한 RNA 종 및 본 발명에 기술된 안티센스 PMO의 표적 위치를 나타내는 예시적인 도식이다.

[0118] 표적화된 바이러스 패밀리는 인플루엔자바이러스 (*Influenzavirus*) A, 인플루엔자바이러스 B 및 인플루엔자바이러스 C 속을 포함하는 오르토믹소비리다에 (Orthomyxoviridae) 과의 구성원을 포함한다. 오르토믹소비리다에 과의 구성원의 다양한 물리적, 형태학적 및 생물학적 특징은 예를 들어, 문헌 [Textbook of Human Virology, R. Belshe, ed., 2nd Edition, Mosby, 1991, at the Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm)] 및 인간 바이러스학 교과서 [참조: 예를 들어, Strauss and Strauss 2002]에서 찾을 수 있다. 바이러스의 오르토믹소비리다에 과의 주요 생물학적 특징 중의 일부는 이하에 기술된다.

[0119] 인플루엔자 A, 인플루엔자 B 및 인플루엔자 C 바이러스는 각각 인플루엔자바이러스 A, 인플루엔자바이러스 B 및 인플루엔자바이러스 C 속의 유일한 구성원이다. 이들 바이러스는 그의 계놈이 RNA의 분절화된 네거티브-센스 (즉, 마이너스) 가닥 ((-)RNA)인 막-봉입된 바이러스이다. 10 개의 인플루엔자 바이러스 유전자는 스트레인 A 및 B의 단일-가닥 RNA의 8 개의 분절 및 스트레인 C의 7 개의 분절 상에 존재한다. 분절은 크기가 다양하며 (길이가 890 내지 2341 뉴클레오타이드), 각각은 다양한 mRNAs의 합성을 위한 주형이다. 인플루엔자 바이러스 비리온은 이들 주형으로부터 mRNA 합성에 필요한 바이러스-특이적 RNA 폴리머라제를 함유하며, 이러한 특이적 폴리머라제의 부재 하에서 인플루엔자 바이러스 RNA의 마이너스 가닥은 감염성이 아니다. mRNAs의 전사의 개시는 인플루엔자 바이러스 mRNA 폴리머라제가 세포성 mRNA 또는 mRNA 전구체로부터의 12 내지 15 개의 뉴클레오타이드를 채택하고, 차용한 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 사용하는 경우에 일어난다. 이 과정은 "캡-탈취 (cap-snatching)"라 부르는데, 이는 이것이 바이러스 mRNA 상에 5' 캡 구조를 배치하기 때문이다. 일반적으로, 이 과정을 통해서 만들어진 mRNAs는 단지 하나의 단백질을 코딩한다. M 유전자 및 NS 유전자 바이러스 RNA 분절은 또한 스플라이스된 mRNAs에 대해서 코드화하여, 이들 2 개의 분절에 대한 2 개의 상이한 단백질의 생산을

제공한다.

[0120] 인플루엔자 바이러스 RNA의 복제는 핵에서 일어나며, 3 가지 상이한 종의 RNA의 합성을 수반한다. 이 과정의 도식은 도 3에 나타낸다. 순수한 세포의 감염 후에, 마이너스 스트랜드 비리온 RNA (vRNA)는 핵으로 수송되고, 여기에서 해독을 위해서 예정된 RNA (mRNA)는 캡핑된 세포성 전-mRNA 분자로부터 바이러스-코드화된 효소에 의해서 분해된 5' 말단 10-13 개의 뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 합성된다 (즉, 캡-탈취). 각각의 mRNA의 합성은 올리고(U) 스트레치 (stretch)와 만나고, 폴리(A) 꼬리가 부가되는 계단 분절의 말단에 근접하도록 계속된다. 제공된 바이러스 mRNAs는 해독을 위해서 세포질로 수송되며, 충분한 바이러스 단백질이 핵 내로 역수송된 후에 발생기 비리온을 위해서 예정된 vRNA의 합성이 개시된다. 계단 vRNA의 완벽한 보체이며, 새로운 vRNA의 생산을 위한 주형으로 작용하는 vRNA의 정확한 항계단 카피가 합성된다 (cRNA로 불림). 인플루엔자 바이러스 복제 중에 합성된 다양한 RNAs는 도 3에 도식적으로 나타내었다.

[0121] 인플루엔자 A 계단 분절을 표시하는 예시적인 바이러스 핵산 표적 서열에 대한 진뱅크 (GenBank) 표준물은 이하의 표 1에 열거된다. 표 1에서 뉴클레오타이드 서열 번호는 포지티브-가닥 RNA에 대한 진뱅크 표준으로부터 유도된다. 이를 서열은 문헌 또는 특허 자원의 이용 가능한 유전자-서열 데이터베이스로부터 이용할 수 있는 바와 같은 오르토믹소비리다에 과의 다른 서열의 예이다. 서열번호 1-11로 확인된 이하의 서열은 또한, 명세서 말미의 서열 목록에 열거된다.

[0122] 표 1은 계단 분절 7에 의해서 코드화된 인플루엔자 A 바이러스 유전자 M1 및 M2에 대한 표적을 열거한다. 표 1에서의 표적 서열은 1) 네거티브 센스 바이러스 RNA의 3' 말단 25개의 염기 (서열번호 4); 2) 포지티브 센스 mRNA의 5' 말단의 말단 25개의 염기 (서열번호 3); 3) 표시된 인플루엔자 바이러스 유전자의 AUG 개시 코돈 주변의 45개의 염기 (서열번호 2)를 나타낸다. 나타낸 서열은 마이너스-가닥 (즉, 계단 또는 비리온 RNA)의 서열인 서열번호 4를 제외하고 5'에서 3' 배향의 포지티브-가닥 (즉, 항계단 또는 mRNA) 서열이다. 표적이 마이너스-가닥 vRNA인 경우에, 표적화된 서열이 다른 식으로 나타내지 않는 한 표 1에 열거된 서열의 보체, 예를 들어, 서열번호 4라는 것은 명백할 것이다.

[0123] M1 및 M2 단백질은 각각 바이러스 매트릭스 단백질 및 이온 채널 활성의 성분이다. 2 개의 단백질은 동일한 AUG 개시 부위를 이용하는 분절 7 vcRNA의 선택적 스플라이스 형태로부터 생산된다. M2 단백질은 2 개의 통용되는 항-인플루엔자 치료제인 아만타딘 및 리만타딘의 표적이다. M1/M2 유전자의 AUG 개시 코돈 부분에 대한 예시적인 표적 서열 (AUG 개시 코돈에 대해서 -20 내지 +25)은 서열번호 1로 열거된 말단 60 개의 뉴클레오타이드 부분의 서열은 서열번호 2로 표시된다. M1/M2 분절의 3' 말단 표적 서열 (25 개의 뉴클레오타이드)은 또한 말단 60 개의 뉴클레오타이드 부분의 하위서열 (subsequence)이며, 분절의 포지티브 가닥 (vcRNA) 및 네거티브 가닥 (vRNA) 둘 다에 대해서 표적화될 수 있는 서열번호 3으로 표시된다. 5' 말단 서열 (서열번호 3)은 서열번호 4로 이하에 나타낸 마이너스 가닥에 대해서 성공적으로 표적화될 수 있다. 서열번호 1-4는 2009H1N1 바이러스 (S-OIV)로부터 유래하며, 진뱅크 데이터베이스에서 수탁번호 GQ332646으로 발견되는 바이러스의 예시적인 분리체로부터 유도된다. 그 밖의 다른 표준 인플루엔자 A 서브타입의 5' 말단 60 개의 뉴클레오타이드 부분은 표 1에서 H1N1, H5N1, H3N2 및 H2N2에 대해서 각각 서열번호 5, 6, 7, 8로 열거된다. 상응하는 AUG 및 말단 표적 부분은 상술한 지시를 사용하여 이를 바이러스 서열로부터 유도될 수 있다.

[0124] 또한, M1/M2 분절의 스플라이스 공여체 및 수용체 부분을 표적으로 할 수도 있다. 스플라이스 공여체 및 수용체 부위는 각각 뉴클레오타이드 51 및 740에 존재한다. 본 발명의 안티센스 화합물을 사용하여 어느 하나의 스플라이스 접합부를 표적화하는 것이 고려된다. 또한, 적절하게 디자인된 안티센스 화합물을 사용하여 AUG 개시 부위 및 스플라이스 공여체 부위 둘 다를 차단할 수도 있다 (예를 들어, 서열번호 12-16 및 19-22). 스플라이스 수용체 표적 부분은 이하에 2009H1N1 (S-OIV) 서브타입에 대해서 서열번호 10으로 나타낸다. H5N1 서브타입에 대한 상응하는 부분은 표 1에서 서열번호 9로 열거된다.

[0125] 또한, M1/M2 분절의 어떤 해독-민감성, 스플라이스-민감성 또는 복제-민감성 부분이라도 본 발명의 화합물을 사용하여 표적화될 수 있는 것으로 생각된다. 원형 H1N1 서브타입 (Puerto Rico/8/34)에 대한 표준 M1/M2 (분절 7) 서열은 표 1에서 서열번호 11로 나타내며, 진뱅크 표준 서열 데이터베이스 (GenBank Reference Sequence database)에서 NC_002016으로 확인될 수 있다. 상응하는 M1/M2 분절 서열은 공개적으로 이용할 수 있는 서열 데이터베이스로부터 수득될 수 있다. 본 발명의 안티센스 화합물은 추가의 해독-, 스플라이스- 및/또는 복제-민감성 표적 부분이 확인될 수 있다는 것을 예상하여 이 분절의 다른 부분에 대해서 표적화될 수 있는 것으로 생각된다.

[0126] [표 1]

[0127]

예시적인 인플루엔자 바이러스 핵산 표적 서열

| 명칭 | NCBI 번호 | Nct 부분 | 서열 (5'에서 3'로) | 서열 번호 |
|------------------------|---------------|---------------|--|----------|
| M1/M2-trgt 2009H1N1 | GQ332 646 | 1-60 | AGCAAAAGCAGGUAGAUUUAAAAGAUGAGU CUUCUAACCGAGGUCGAAAC/GUACGUUCU | 1 |
| M1/M2-AUG | GQ332 646 | 6-50 | AAGCAGGUAGAUUUAAAAGAUGAGUCUUC UAACCGAGGUCGAAA | 2 |
| M1/M2- vc5'trm | GQ332 646 | 1-25 | AGCAAAAGCAGGUAGAUUUAAAAG | 3 |
| M1/M2- v3'trm | GQ332 646 | 1072- 1097 | CUUUAAAUAUCUACCUUGCUUUUGCU | 4 |
| M1/M2-trgt H1N1con | NC_00 2016 | 1-60 | AGCGAAAGCAGGUAGAUUUUGAAAAGAUGAGU CUUCUAACCGAGGUCGAAAC/GUACGUUCU | 5 |
| M1/M2-trgt H5N1con | NC_00 7363 | 1-60 | AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUGAAAAGAUGAGU CUUCUAACCGAGGUCGAAAC/GUACGUUCU | 6 |
| M1/M2-trgt H3N2con | NC_00 7367 | 1-60 | AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUGAAAAGAUGAGC CUUCUAACCGAGGUCGAAAC/GUAUGUUCU | 7 |
| M1/M2-trgt H2N2con | NC_00 7377 | 1-60 | AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUGAAAAGAUGAGU CUUCUAACCGAGGUCGAAAC/GUACGUUCU | 8 |
| M1/M2-SA H5N1 | NC_00 7363 | 730- 780 | AAAUUUGCAG/GCCUACCAGAACGAAUGGG AGUGCAGAUGCAGCGAUUCAA | 9 |
| M1/M2-SA 2009H1N1 | GQ332 646 | 730- 780 | AAAUUUGCAG/GCCUACCAGAACGAAUGGG AGUGCAGAUGCAGCGAUUCAA | 10 |

[0128]

| | | | | | |
|--------|-----------------------|---------------|--------|--|----|
| [0129] | M1/M2 H1N1 분절 7 | NC_00 2016 | 1-1027 | AGCGAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGT CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTCT CTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGA GATCGCACAGAGACTTGAAGATGTCTTGCA GGGAAGAACACCGATCTTGAGGTTCTCATGG AATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTCACC TCTGACTAAGGGGATTTAGGATTGTGTT ACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGC AGCGTAGACGCTTGTCCAAAATGCCCTAA TGGGAACGGGGATCCAATAACATGGACAAA GCAGTTAAACTGTATAGGAAGCTCAAGAGGG AGATAACATTCATGGGCCAAGAAATCTC ACTCAGTTATTCTGCTGGTGCACGGCCAGT TGTATGGGCCTCATATAACAGGATGGGG CTGTGACCACTGAAGTGGCATTGGCCTGGT ATGTGCAACCTGTGAACAGATTGCTGACTCC CAGCATCGGTCTCATAGGCAAATGGTGACAA CAACCAACCCACTAATCAGACATGAGAACAG AATGGTTTAGGCCAGCACTACAGCTAAGGCT ATGGAGCAAATGGCTGGATCGAGTGAGCAAG CAGCAGAGGCCATGGAGGTTGCTAGTCAGGC TAGGCAAATGGTGCAGCGATGAGAACCAT GGGACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGA AAAATGATCTTCTGAAAATTGCAAGGCCTA TCAGAAACGAATGGGGTGCAGATGCAACGG TTCAAGTGATCCTCTCGCTATTGCCGCAAAT ATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGGA TTCTTGATCGTCTTTTTTCAATGCATT CCGTCGCTTTAAATACGGACTGAAAGGAGGG CCTTCTACGGAAGGAGTGCCAAAGTCTATGA GGGAAGAAATATCGAAAGGAACAGCAGAGTGC TGTGGATGCTGACGATGGTCATTGTGTCAGC ATAGAGCTGGAGTAAAAACTACCTTGTTC TACT | 11 |
|--------|-----------------------|---------------|--------|--|----|

[0130] 도 4a는 인플루엔자 A의 중요한 서브타입인 H1N1, H1N1(S-OIV), H5N1, H3N2, H9N2 및 H7N7로부터의 M1/M2 분절의 5' 말단 60 개의 뉴클레오타이드의 보존을 나타낸다. 도 4b는 게놈 서열의 NCBI 인플루엔자 데이터베이스 [Bao Y., P. Bolotov, D. Dernovoy, B. Kiryutin, L. Zaslavsky, T. Tatusova, J. Ostell, and D. Lipman. The Influenza Virus Resource at the National Center for Biotechnology Information. J. Virol. 2008 Jan;82(2):596-601]를 기초로 하여 바람직한 PMO (M1/M2-AUG; 서열번호 12)의 각각의 염기에 대한, 돼지-기원 인플루엔자 A (S-OIV)로도 또한 공지된 인플루엔자의 한 가지 중요한 혈청형인 H1N1(2009)에서의 표적 서열의 보존을 나타낸다. 대문자는 표적 염기를 나타내고, 염기 다음에 아래 첨자로 기입한 숫자는 상기 나타낸 서열의 데이터베이스에서 H1N1(2009) 분리체에 대해 그 염기에 관한 보존율을 나타낸다. 이들 데이터는 어떤 염기 위치도 H1N1(2009)에 대한 M1/M2-AUG 표적에 관해서 어떤 유의적인 변이도 나타내지 않음을 나타낸다.

[0131] 특정의 구체예에서, 안티센스 표적화 서열은 표 1에 열거된 표적 서열 중의 하나 또는 그 이상의 부분에 대해서 하이브리드화하도록 디자인된다. 선택된 안티센스 표적화 서열은 더 짧게, 예를 들어, 약 12 염기로, 또는 더 길게, 예를 들어, 약 40 개의 염기로 만들어질 수 있으며, 서열이 표적과 하이브리드화하는 경우에 해독, 스플라이스 및/또는 복제 억제를 일으키는데 충분하게 상보적이고 바이러스 RNA와 45°C 또는 그 이상의 T_m을 갖는 헤테로듀플렉스를 형성하는 한은 소수의 미스매치를 포함한다.

[0132] 특정의 구체예에서, 표적과 안티센스 표적화 서열 사이의 상보성의 정도는 안정한 듀플렉스를 형성하는데 충분하다. 안티센스 올리고머와 표적 RNA 서열 사이의 상보성의 부분은 8-11 개의 염기 정도로 짧을 수 있으나, 바람직하게는 12-15 개의 염기 또는 그 이상, 예를 들어, 12-20 개의 염기 또는 12-25 개의 염기 (이들 범위 사이의 모든 정수 포함)이다. 약 14-15 개의 염기의 안티센스 올리고머는 바이러스 게놈 내에서 독특한 상보적 서열을 갖도록 하는데 충분히 길다. 특정의 구체예에서, 상보적 염기의 최소 길이는 이하에 거론하는 바와 같이 필요한 결합 T_m을 달성하는데 필요할 수 있다.

[0133] 특정의 구체예에서, 40 개의 염기 정도의 길이의 올리고머가 적합할 수 있으며, 여기에서는 염기의 최소 수, 예를 들어, 10-12 개의 염기가 표적 서열에 대해서 상보적이다. 그러나, 일반적으로 세포에서의 촉진되거나 능동

적인 흡수는 약 30 미만의 올리고머 길이에서 최적화된다. PMO 올리고머의 경우에, 이하에 더 기술된 바와 같은 결합 안정성과 흡수의 최적 평형은 일반적으로 18-25 개의 염기의 길이에서 일어난다. 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 또는 40 개의 염기로 구성되고, 여기에서 적어도 약 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 또는 40 개의 인접 또는 비-인접 염기가 서열번호 1-11의 표적 서열 또는 그의 변이체인 안티센스 올리고머 (예를 들어, PNAs, LNAs, 2'-OMe) 및 PMO 올리고머가 포함된다.

[0134] 특정의 구체예에서, 안티센스 올리고머는 바이러스 핵산 표적 서열에 대해서 100% 상보적일 수 있거나, 이것은 올리고머와 바이러스 핵산 표적 서열 사이에서 형성된 헤테로듀플렉스가 세포성 뉴클레아제의 작용 및 생체 내에서 일어날 수 있는 그 밖의 다른 분해 모드를 견뎌내기에 충분히 안정한 한, 예를 들어, 변이체를 수용하도록 미스매치를 포함할 수도 있다. 뉴클레아제에 의한 분해에 덜 민감한 올리고머 골격은 이하에 거론된다. 미스매치가 존재하는 경우에, 이것은 중앙에서보다 하이브리드 듀플렉스의 말단 부분 쪽으로 덜 불안정화한다. 허용된 미스매치의 수는 듀플렉스 안정성의 잘 이해된 원리에 따라서 올리고머의 길이, 듀플렉스 내의 G:C 염기쌍의 백분율, 및 듀플렉스 내의 미스매치(들)의 위치에 따라 좌우될 것이다. 이러한 안티센스 올리고머는 바이러스 핵산 표적 서열에 대해서 반드시 100% 상보적이지 않지만, 이것은 핵산 표적의 생물학적 활성, 예를 들어, 바이러스 단백질(들)의 발현이 변조되도록 표적 서열에 안정하게 특이적으로 결합하는데 효과적이다.

[0135] 올리고머와 표적 서열 사이에서 형성된 듀플렉스의 안정성은 결합 T_m 및 세포성 효소 분해에 대한 듀플렉스의 민감성과 상관관계가 있다. 상보적-서열 RNA에 관한 안티센스 화합물의 T_m 은 문헌 [Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, pp.107-108] 또는 문헌 [Miyada C.G. and Wallace R.B., 1987, Oligonucleotide Hybridization Techniques, *Methods Enzymol.* Vol. 154 pp. 94-107]에 기술된 것과 같은 통상적인 방법에 의해서 측정될 수 있다. 특정의 구체예에서, 안티센스 올리고머는 상보적-서열 RNA에 관하여 체온 이상의, 바람직하게는 약 45°C 또는 50°C 이상의 결합 T_m 을 가질 수 있다. 60-80°C 또는 그 이상의 T_m 이 바람직하다. 잘 알려진 원리에 따라서, 상보성-기본 RNA 하이브리드에 관한 올리고머 화합물의 T_m 은 듀플렉스 내의 C:G 대합된 염기의 비를 증가시키고/시키거나, 헤�테로듀플렉스의 길이 (염기쌍의)를 증가시킴으로써 증가시킬 수 있다. 동시에, 세포성 흡수를 최적화할 목적으로는 올리고머의 크기를 제한하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 이유로, 25 염기 또는 그 미만의 길이에서 높은 T_m (45-50°C 또는 그 이상)을 나타내는 화합물이 높은 T_m 값을 위해서 25 염기 이상을 필요로 하는 것보다 일반적으로 바람직하다.

[0136] PMO 올리고머와 같은 특정의 구체예에서, 올리고머의 안티센스 활성은 도 1b에 예시된 바와 같이 비하전 및 양이온성 포스포로디아미데이트 결합의 혼합물을 사용함으로써 증진될 수 있다. 올리고머 내의 양이온성 결합의 총수는 1 내지 10 (이들 사이의 모든 정수 포함)일 수 있으며, 올리고머 전체에 걸쳐서 산재될 수 있다. 바람직하게는, 하전된 결합의 수는 적어도 2 및 종 골격 결합의 절반 이하, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 개의 양으로 하전된 결합이며, 바람직하게는 각각의 하전된 결합은 골격을 따라서 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5 개의 비하전된 결합에 의해 분리된다. 다양한 올리고머의 안티센스 활성은 올리고머 표적 부분을 리포터 유전자 (예를 들어, 개똥벌레 루시퍼라제)의 5' 말단에 융합시킨 다음에 무세포 해독 시험에서 융합 유전자 mRNA 전사물의 해독의 억제를 측정함으로써 시험관내에서 측정될 수 있다. 비하전 및 양이온성 결합의 혼합물을 함유하는 올리고머의 억제특성은 무세포 해독시험에서 약 5 내지 100 배 증진될 수 있다. 도 1b 및 도 2a-2b에 설명된 바와 같이 올리고머 전체에 걸쳐서 산재된 3 개의 양이온성 결합을 함유하는 형태의 본 발명의 바람직한 안티센스 올리고머 (M1/M2-AUG)는 이하의 표 2에서 서열번호 13으로 나타낸다. M1/M2 AUG를 표적으로 하며, 3 개의 산재된 양이온성 결합을 함유하는 일련의 예시적인 안티센스 올리고머는 서열번호 34-47로 나타낸다.

[0137] 이하의 표 2는 인플루엔자 A 바이러스에 대해서 상보적인 예시적인 표적화 서열을 5'에서 3'쪽으로의 배향으로 나타낸다. 열거된 서열은 상기 거론된 일반적 클래스 규칙에 따라, 표적화 서열이 선택될 수 있는 표적화 서열의 콜렉션 (collection)을 제공한다. 열거된 표적화 서열이 어떤 안티센스 유사체 올리고뉴클레오타이드 화학 (예를 들어, PNA, LNA 또는 2'-OMe)에 대해서라도 사용될 수 있지만, 표 2의 서열이 PMO 안티센스 올리고머로 사용하는데 바람직하다. 서열번호 12-22, 25-29 및 34-47은 바이러스의 포지티브 가닥 (mRNA 또는 vcRNA)에 대해서 안티센스인 반면에 서열번호 23 및 24는 마이너스 가닥 (vRNA)에 대해서 안티센스이다. 따라서, 예를 들어, M1/M2 코드화 분절 (인플루엔자 A의 분절 7)의 마이너스 가닥의 3' 말단에 대한 표적을 선택하는 경우에는 서열번호 4, 또는 마이너스 가닥의 3' 말단의 기능을 차단하는데 효과적인 서열의 일부분이 선택될 수 있다. 서열번호 12-29 및 34-47는 인플루엔자 A 서브타입 H1N1 (S-OIV)의 M1/M2 분절을 표적으로 하는 반면에 서열번호 30-33은 지시된 바와 같이 PB1 또는 NP 분절을 표적으로 한다.

[0138]

[표 2]

[0139]

예시적인 안티센스 표적화 서열

| PMO 명칭 | 표적 Ncts. | 안티센스 올리고머 (5'에서 3'로) | 서열 번호 |
|-----------------------|---------------|---------------------------|----------|
| M1/M2-AUG | 22-41 | CGGTTAGAAGACTCATCTT | 12 |
| M1/M2-AUGplus | 22-41 | CGGT+TAGAAGAC+TCATC+TTT | 13 |
| M1/M2-AUG.20.17 | 17-36 | AGAAGACTCATCTTCAATA | 14 |
| M1/M2-AUG.20.19 | 19-38 | TTAGAAGACTCATCTTCAA | 15 |
| M1/M2-AUG.20.24 | 24-43 | CTCGGTTAGAAGACTCATCT | 16 |
| M1/M2-vcTerm.25.3 | 3-27 | ATCTTCAATATCTACCTGCTTTG | 17 |
| M1/M2-vcTerm.25.6 | 6-30 | CTCATCTTCAATATCTACCTGCTT | 18 |
| M1/M2-AUG.25.19 | 19-43 | CTCGGTTAGAAGACTCATCTTCAA | 19 |
| M1/M2-AUG.25.21 | 21-45 | ACCTCGGTTAGAAGACTCATCTTTC | 20 |
| M1/M2-AUG.25.24 | 24-48 | TCGACCTCGGTTAGAAGACTCATCT | 21 |
| M1/M2-AUG.25.26 | 26-50 | TTTCGACCTCGGTTAGAAGACTCAT | 22 |
| M1/M2-3'vTerm.25.1003 | 1003- 1027 | AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAA | 23 |
| M1/M2-3'vTerm.25.997 | 997- | AGCAGGTAGATATTGAAAAATGAGT | 24 |

[0140]

| | | | |
|------------------|---------|---------------------------|----|
| | 1021 | | |
| M1/M2-SA.24.738 | 738-761 | CTCCCATTGCTTCTGGTAGGCCT | 25 |
| M1/M2-SA.24.740 | 740-762 | CACTCCCATTGCTTCTGGTAGGC | 26 |
| M1/M2-SA.24.742 | 742-764 | TGCACTCCCATTGCTTCTGGTAG | 27 |
| M1/M2-SA.24.744 | 744-766 | TCTGCACTCCCATTGCTTCTGGT | 28 |
| M1/M2-SA.24.746 | 746-768 | CATCTGCACTCCCATTGCTTCTG | 29 |
| NP-v3' | | AGCAAAAGCAGIGTAGATAATC | 30 |
| NP-v3'plus | | AGCAAAAGCAGIG+TAGA+TAA+TC | 31 |
| PB1-AUG+15 | | CGGATTGACATCCATTCAAATG | 32 |
| PB1-AUG+15plus | | CGGAT+TGACA+TCCAT+TCAAATG | 33 |
| M1/M2-AUG.20.6+ | 6-25 | CTT+TCAA+TATCTACC+TGCTT | 34 |
| M1/M2-AUG.20.11+ | 11-30 | C+TCA+TCTTTCAA+TATCTACC | 35 |
| M1/M2-AUG.20.12+ | 12-31 | AC+TCA+TCTTTCAA+TATCTAC | 36 |
| M1/M2-AUG.20.13+ | 13-32 | GAC+TCA+TCTTTCAA+TATCTA | 37 |
| M1/M2-AUG.20.14+ | 14-33 | AGAC+TCA+TCTTTCAA+TATCT | 38 |
| M1/M2-AUG.20.15+ | 15-34 | AAGAC+TCA+TCTTTCAA+TATC | 39 |
| M1/M2-AUG.20.16+ | 16-35 | GAAGAC+TCA+TCTTTCAA+TAT | 40 |
| M1/M2-AUG.20.17+ | 17-36 | AGAAGAC+TCA+TCTTTCAA+TA | 41 |
| M1/M2-AUG.20.18+ | 18-37 | TAGAAGAC+TCA+TCTTTCAA+T | 42 |
| M1/M2-AUG.20.19+ | 19-38 | T+TAGAAGAC+TCA+TCTTTCAA | 43 |
| M1/M2-AUG.20.20+ | 20-39 | GT+TAGAAGAC+TCA+TCTTTCA | 44 |
| M1/M2-AUG.20.23+ | 23-42 | TCGGT+TAGAAGAC+TCA+TCTT | 45 |
| M1/M2-AUG.20.25+ | 25-44 | CCTCGGT+TAGAAGAC+TCA+TC | 46 |
| M1/M2-AUG.20.27+ | 27-46 | GACC+TCGGT+TAGAAGAC+TCA | 47 |

[0141]

안티센스 올리고뉴클레오타이드 화합물

[0142]

상기에서 상세히 설명한 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (용어 "안티센스"는 화합물이 바이러스의 포지티브-센스 가닥 RNA 또는 네거티브-센스 또는 마이너스-가닥에 대해서 표적화된 것을 나타낸다)는 전형적으로 1) 네거티브 센스 바이러스 RNA의 5' 또는 3' 말단 25 염기; 2) 포지티브 센스 vcRNA의 5' 또는 3' 말단의 말단 30개의 염기; 3) 바이러스 mRNA의 AUG 개시 코돈 주변의 45개의 염기; 및/또는 4) 선택적 스플라이싱의 대상인 인플루엔자 mRNAs의 스플라이스 공여체 또는 수용체 부위 주변의 50개의 염기 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 부분을 표적으로 하는 염기 서열을 포함한다. 또한, 올리고머는 숙주 세포에게 투여하는 경우에, 예를 들어, 감염된 포유동물 대상체에서 표적 단백질 발현 (예를 들어, M1 또는 M2 또는 둘 다)을 감소시키거나, 바이러스 복제를 감소시키거나 둘 다에 의해서와 같이 감염성 바이러스를 효과적으로 표적화할 수 있다. 이러한 필요조건은 전형적으로 올리고머 화합물이 (a) 포유동물 세포에 의해서 능동적으로 흡수되는 능력을 갖고, (b) 일단 흡수되면 약 45°C 이상의 T_m을 갖는 표적 RNA와의 듀플렉스를 형성하는 경우에 충족된다.

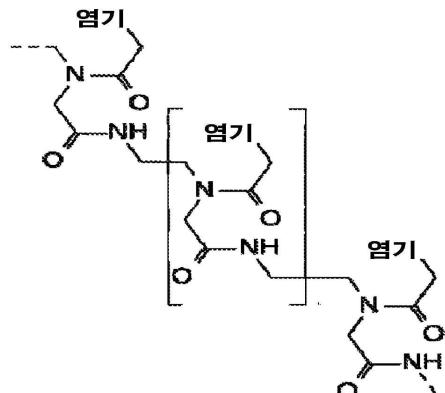
[0144]

특정의 구체예에서, 올리고머 골격은 실질적으로 비하전될 수 있으며, 바람직하게는 세포막을 가로지르는 능동적 또는 촉진된 수송을 위한 기질로서 인식될 수 있다. 표적 RNA와 안정한 듀플렉스를 형성하는 올리고머의 능

력은 또한, 표적에 관한 안티센스 올리고머의 상보성의 정도 및 길이, G:C 대 A:T 염기 부합의 비율, 및 모든 미스매치된 염기의 위치를 포함한 올리고머 골격의 다른 특징과 연관될 수도 있다. 세포성 뉴클레아제에 저항하는 안티센스 올리고머의 능력은 생존 및 세포 세포질에 대한 작용제의 궁극적인 송달을 촉진시킬 수 있다. PMO 골격 화학을 사용한 본 발명의 예시적인 안티센스 올리고머 표적화 서열은 표 2에 열거되어 있다. 선택적 화학을 사용하는 표적화 서열은 PNA 및 LNA 화학에 대해서 각각 이하의 표 3 및 4에 열거된다. 일반적으로, PNA 및 LNA 화학은 PMO 및 2'-O-Me 올리고머에 비해서 이들의 비교적 큰 표적 결합 강도로 인하여 더 짧은 표적화 올리고머를 이용한다.

[0145] 펩타이드 핵산 (PNAs)은 골격이 테옥시리보즈 골격과 구조적으로 이체동형 (homomorphous)이며, 피리미딘 또는 퓨린 염기가 부착된 N-(2-아미노에틸) 글리신 유니트로 구성된 DNA의 유사체이다. 천연 피리미딘 및 퓨린 염기를 함유하는 PNAs는 왓슨-크릭 염기-대합 규칙에 따르며, 염기쌍 인식의 관점에서 DNA를 모사하는 상보적 올리고뉴클레오타이드에 대해 하이브리드화한다 [Egholm, Buchardt *et al.*, 1993]. PNAs의 골격은 포스포디에스테르 결합보다는 이들을 안티센스 적용에 적절하게 만드는 펩타이드 결합에 의해서 형성된다 (이하의 구조 참조). 상기 골격은 비하전되어 정상보다 더 큰 열안정성을 나타내는 PNA/DNA 또는 PNA/RNA 듀플렉스를 제공한다. PNAs는 뉴클레아제 또는 프로테아제에 의해서 인식되지 않는다.

[0146] PNAs는 본 기술분야에서 공지된 어떤 기술을 사용하여서라도 합성적으로 생산될 수 있다. PNA는 폴리아미드 골격이 이하에 예시된 바와 같이 DNA의 전통적인 포스페이트 리보즈 환을 대체한 DNA 유사체이다.



[0147] 천연 구조로의 래디칼 구조적 변화에도 불구하고, PNAs는 DNA 또는 RNA에 대한 헬릭스 (helix) 형태의 서열-특이적 결합을 할 수 있다. PNAs의 특징은 상보적 DNA 또는 RNA에 대한 높은 결합 친화성, 단일-염기 미스매치에 의해서 야기된 불안정화 효과, 뉴클레아제 및 프로테아제에 대한 저항성, 염 농도와는 무관한 DNA 또는 RNA와의 하이브리드화, 및 호모퓨린 DNA와의 트리플렉스 (triplex) 형성을 포함한다. 파나젠 (PANAGENE™)은 그의 독점적인 Bts PNA 모노머 (Bts; 벤조티아졸-2-설포닐 그룹) 및 독점적인 올리고머화 과정을 나타내었다. Bts PNA 모노머를 사용한 PNA 올리고머화는 탈보호, 커플링 및 캡핑의 반복적인 사이클로 구성된다. 이 기술에 대한 예시적인 특허에는 미국 특허 제6,969,766, 7,211,668, 7,022,851, 7,125,994, 7,145,006 및 7,179,896호가 포함된다. PNA 화합물의 제조를 교시한 대표적인 미국 특허에는 각각 본 발명에 참고로 포함된 미국 특허 제 5,539,082; 5,714,331; 및 5,719,262가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. PNA 화합물의 추가의 교시내용은 문헌 [Nielsen *et al.*, *Science*, 254:1497-1500, 1991]에서 볼 수 있다.

[0149] 본 발명을 실시하기 위한 예시적인 PNA 화합물은 이하의 표 3에 열거된다. 이를 올리고뉴클레오타이드는 본질적으로 본 발명에 인용된 문헌에 기술된 절차에 따라 제조될 수 있다.

[0150] [표 3]

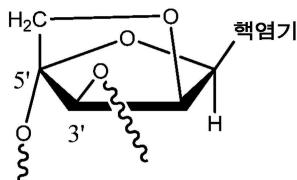
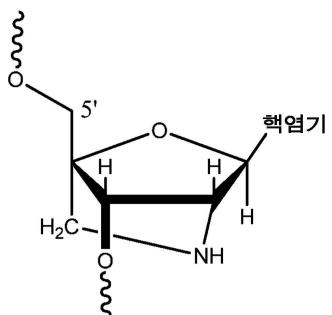
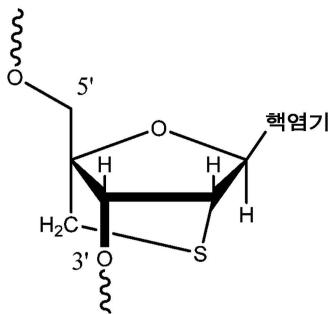
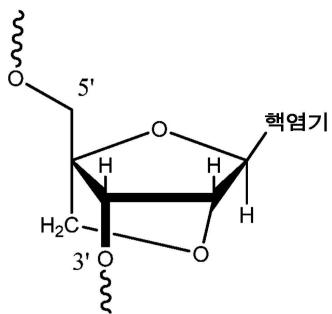
[0151]

예시적인 PNA 안티센스 표적화 서열

| PNA 명칭 | 표적 Ncts. | 안티센스 올리고머 (5'에서 3'로) | 서열 번호 |
|-----------------------|---------------|-----------------------|----------|
| PNA-M1-AUG.20.22 | 22-41 | CGGTTAGAAGACTCATCTTT | 48 |
| PNA-M1-AUG.18.24 | 24-41 | CGGTTAGAAGACTCATCT | 49 |
| PNA-M1-AUG.16.26 | 16-41 | CGGTTAGAAGACTCAT | 50 |
| PNA-M1-AUG.20.17 | 17-36 | AGAAGACTCATCTTCAATA | 51 |
| PNA-M1-AUG.20.19 | 19-38 | TTAGAAGACTCATCTTCAA | 52 |
| PNA-M1-AUG.20.24 | 24-43 | CTCGGTTAGAAGACTCATCT | 53 |
| PNA-M1-vcTerm.20.3 | 3-22 | TCAATATCTACCTGCTTTG | 54 |
| PNA-M1-vcTerm.20.6 | 6-25 | CTTTCAATATCTACCTGCTT | 55 |
| PNA-M1-3'vTrm.20.1008 | 1003- 1027 | AGCAAAAGCAGGTAGATATT | 56 |
| PNA-M1-3'vTrm.20.1002 | 1002- 1021 | AGCAGGTAGATATTGAAAAAA | 57 |
| M1-SA.20.738 | 738-757 | CATTCGCTTCTGGTAGGCCT | 58 |
| M1/M2-SA.24.740 | 740-759 | CCCATTGCTTCTGGTAGGC | 59 |
| M1/M2-SA.24.742 | 742-761 | CTCCCATTGCTTCTGGTAG | 60 |
| M1/M2-SA.24.744 | 744-763 | CACTCCCATTGCTTCTGGT | 61 |
| M1/M2-SA.24.746 | 746-765 | TGCACTCCCATTGCTCTG | 62 |

[0152]

[0153] 본 발명의 올리고뉴클레오파이드 화합물은 또한, "잠금 핵산" 서브유니트 (LNAs)를 함유할 수 있다. LNAs의 구조는 예를 들어, 문헌 [Wengel, et al., Chemical Communications (1998) 455; Tetrahedron (1998) 54:3607, 및 Accounts of Chem. Research (1999) 32:301; Obika, et al., Tetrahedron Letters (1997) 38:8735; (1998) 39:5401, 및 Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16:9230]에서 볼 수 있다. 비-제한적인 예시적 LNA 구조는 이하에 설명된다:



[0154]

[0155]

본 발명의 화합물은 하나 또는 그 이상의 LNAs를 통합시킬 수 있으며; 일부의 경우에 화합물은 온전히 LNAs로 구성될 수 있다. 개개 LNA 뉴클레오사이드 서브유니트의 합성을 위한 방법 및 이들의 올리고뉴클레오타이드 내로의 통합은 본 기술분야에서 잘 알려져 있다: 미국 특허 제7,572,582, 7,569,575, 7,084,125, 7,060,809, 7,053,207, 7,034,133, 6,794,499, 및 6,670,461호. 전형적인 서브유니트간 링커에는 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 부분이 포함되며; 대신으로 비-인 함유 링커가 사용될 수 있다. 바람직한 구체예는 각각의 LNA 서브유니트가 DNA 서브유니트에 의해서 분리되는 LNA 함유 화합물이다. 추가의 바람직한 화합물은 서브유니트간 링커가 포스포로티오에이트인 교대하는 LNA 및 DNA 서브유니트로 구성된다.

[0156]

이하의 화합물은 본질적으로 상기 인용된 문헌에 기술된 절차에 따라 제조된다. LNA 서브유니트를 함유하는 예시적인 화합물 (LNAs는 대문자로 표시되고, DNAs는 소문자로 표시되고, 서열은 5'로부터 3'로 읽는다)은 이하의 표 4에 나타낸다.

[표 4]

[0158]

예시적인 LNA 안티센스 표적화 서열

| LNA 명칭 | 서열 (5'에서 3'로) | 서열번호 |
|-----------|----------------------|------|
| LNA-AUG1 | CgGtTaGaAgAcTcAtCtTt | 63 |
| LNA-AUG2 | GaAgAcTcAt | 64 |
| LNA-AUG3 | GAaGaCtCAT | 65 |
| LNA-AUG4 | GAAGACTCAT | 66 |
| LNA-AUG5 | AGAAGACTCA | 67 |
| LNA-AUG6 | TAGAAGACTC | 68 |
| LNA-AUG7 | TTAGAAGACT | 69 |
| LNA-AUG8 | AAGACTCATC | 70 |
| LNA-AUG9 | AGACTCATCT | 71 |
| LNA-AUG10 | gAcTcAtCtT | 72 |
| LNA-AUG11 | ACTCATCTTT | 73 |
| LNA-AUG12 | CgGtTaGaAgAcTcAt | 74 |
| LNA-AUG13 | GtTaGaAgAcTcAt | 75 |
| LNA-AUG14 | GTTAGAAGACT | 76 |
| LNA-AUG15 | CATCTTAAAT | 77 |
| LNA-AUG16 | CaTcTtTaAaTaTcTaC | 78 |
| LNA-AUG17 | CGGTTAGAAGACTCAT | 79 |
| LNA-AUG18 | GGTTAGAAGACTCATC | 80 |

[0159]

| | | |
|-----------|------------------|-----|
| LNA-AUG19 | GTTAGAAGACTCATCT | 81 |
| LNA-AUG20 | TTAGAAGACTCATCTT | 82 |
| LNA-AUG21 | TAGAAGACTCATCTTT | 83 |
| LNA-AUG22 | AGAAGACTCATCTTTA | 84 |
| LNA-AUG23 | GAAGACTCATCTTTAA | 85 |
| LNA-AUG24 | AAGACTCATCTTTAAA | 86 |
| LNA-AUG25 | AGACTCATCTTTAAAT | 87 |
| LNA-AUG26 | GACTCATCTTTAAATA | 88 |
| LNA-AUG27 | ACTCATCTTTAAATAT | 89 |
| LNA-AUG28 | CTCATCTTTAAATATC | 90 |
| LNA-AUG29 | TCATCTTTAAATATCT | 91 |
| LNA-AUG30 | CATCTTTAAATATCTA | 92 |
| LNA-AUG31 | ATCTTTAAATATCTAC | 93 |
| LNA-AUG32 | TCTTTAAATATCTACC | 94 |
| LNA-AUG33 | CTTTAAATATCTACCA | 95 |
| LNA-AUG34 | TTTAAATATCTACCAG | 96 |
| LNA-AUG35 | CgGgTaGaAgAcTcAt | 97 |
| LNA-AUG36 | GgTtAgAaGaCtCaTc | 98 |
| LNA-AUG37 | GtTaGaAgAcTcAtCt | 99 |
| LNA-AUG38 | TtAgAaGaCtCaTcTt | 100 |
| LNA-AUG39 | TaGaAgAcTcAtCtTt | 101 |
| LNA-AUG40 | AgAaGaCtCaTcTtTa | 102 |
| LNA-AUG41 | GaAgAcTcAtCtTtAa | 103 |
| LNA-AUG42 | AaGaCtCaTcTtTaAa | 104 |
| LNA-AUG43 | AgAcTcAtCtTtAaAt | 105 |

[0160]

| | | |
|-----------|------------------|-----|
| LNA-AUG44 | GaCtCaTcTtTaAaTa | 106 |
| LNA-AUG45 | AcTcAtCtTtAaAtAt | 107 |
| LNA-AUG46 | CtCaTcTaTaAaTaTc | 108 |
| LNA-AUG47 | TcAtCtTtAaAtAtCt | 109 |
| LNA-AUG48 | CaTcTtTaAaTaTcTa | 110 |
| LNA-AUG49 | AtCtTtAaAtAtCtAc | 111 |
| LNA-AUG50 | TcTtTaAaTaTcTaCc | 112 |
| LNA-AUG51 | CtTtAaAtAtCtAcCa | 113 |
| LNA-AUG52 | TtTaAaTaTcTaCcAg | 114 |

[0161]

[0162] 바람직한 올리고머 구조는 상술한 바와 같이 비하전된 결합에 의해서 결합된 염기-대합 부분을 보유하는 모르풀

리노-기본 서브유니트를 이용한다. 특히 바람직한 것은 실질적으로 비하전된 포스포로디아미데이트-연결된 올리고머이다. 안티센스 올리고머를 포함하는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어, 공동-소유된 미국 특히 제5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,185,444, 5,521,063, 및 5,506,337호, 및 PCT 출원 제US2008/012804호 (이들은 모두 명백히 참고로 포함된다)에 상세히 기술되어 있다.

[0163] 모르폴리노-기본 서브유니트의 특정한 특성에는 다음이 포함된다: 안정한 비하전 골격 결합에 의해서 올리고머 형태로 연결되는 능력; 형성된 폴리머가 10-14 개의 염기 정도로 짧은 올리고머의 경우에도 높은 T_m 을 갖는 표적 RNA를 포함하는 상보성-염기 표적 핵산과 하이브리드화할 수 있도록 뉴클레오타이드 염기 (예를 들어, 아데닌, 시토신, 구아닌 또는 우라실)를 유지하는 능력; 포유동물 세포 내로 능동적으로 수송되는 올리고머의 능력; 및 RNase 분해에 저항하는 올리고머:RNA 혼합체의 능력.

[0164] 인-함유 골격 결합을 갖는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드의 예는 도 1a-1c에 설명된다. 특히 바람직한 것은 그의 골격 결합의 바람직하게는 10%-50%로 양으로 하전된 그룹을 함유하도록 본 발명의 한가지 관점에 따라 변형된 도 1b에 나타낸 바와 같은 포스포로디아미데이트-연결된 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 비하전된 골격 결합을 갖는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어, 모두 참고로 포함된 문헌 [Summerton 및 Weller, 1997] 및 공동-소유된 미국 특히 제5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,185,444, 5,521,063, 및 5,506,337호, 및 PCT 출원 제US2008/012804호에 상세히 기술되어 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함한, 하전된 골격 결합 및/또는 변형된 말단 그룹을 갖는 예시적인 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 각각 온전히 참고로 포함된 PCT 출원 제US2007/011435호; 공동-계류 중인 미국 임시출원 제61/349,783호; 및 공동-계류 중인 미국 임시출원 제61/361,878호에 상세히 기술되어 있다.

[0165] 모르폴리노-기본 서브유니트의 특성에는 다음이 포함된다: 1) 안정한 비하전 또는 양으로 하전된 골격 결합에 의해서 올리고머 형태로 연결되는 능력; 2) 형성된 폴리머가 비교적 짧은 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 10-15 개의 염기)에서 약 45°C 이상의 T_m 을 갖는, 표적 RNA를 포함한 상보성-기본 표적 핵산과 하이브리드화할 수 있도록 뉴클레오타이드 염기 (예를 들어, 아데닌, 시토신, 구아닌, 티미딘, 우라실 및 하이포크산틴)를 유지하는 능력; 3) 포유동물 세포 내로 능동적으로 또는 수동적으로 수송되는 올리고머의 능력; 및 4) 각각 RNase 및 RNaseH 분해에 저항하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드:RNA 혼합체의 능력.

[0166] 청구된 대상의 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 대한 예시적인 골격 구조는 각각 비하전되거나 양으로 하전된 인-함유 서브유니트 결합에 의해서 연결된, 도 1d-1g에 나타낸 모르폴리노 서브유니트 타입을 포함한다. 도 1d는 5 원자 반복-유니트 골격을 형성하는 인-함유 결합을 나타내며, 여기에서 모르폴리노 환은 1-원자 포스포아미드 결합에 의해서 연결된다. 도 1e는 6-원자 반복-유니트 골격을 제공하는 결합을 나타낸다. 이 구조에서, 5' 모르폴리노 탄소를 인 그룹에 연결하는 원자 Y는 황, 질소, 탄소, 또는 바람직하게는 산소일 수 있다. 인으로부터 펜던트하는 X 부분은 불소, 알킬 또는 치환된 알킬, 알콕시 또는 치환된 알콕시, 티오알콕시 또는 치환된 티오알콕시, 또는 모르폴린 또는 피페리딘과 같이 사이클릭 구조를 포함하는 비치환, 일치환 또는 이치환된 질소일 수 있다. 알킬, 알콕시 및 티오알콕시는 바람직하게는 1-6 개의 탄소 원자를 포함한다. Z 부분은 황 또는 산소이며, 바람직하게는 산소이다.

[0167] 도 1f 및 1g에 나타낸 결합은 7-원자 유니트-길이 골격을 위해서 디자인된다. 구조 1f에서, X 부분은 1e에서와 같으며, Y 부분은 메틸렌, 황, 또는 바람직하게 산소일 수 있다. 구조 1g에서, X 및 Y 부분은 구조 1e에서와 같다. 특히 바람직한 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 도 1e에 나타낸 형태의 모르폴리노 서브유니트 구조로 구성된 것을 포함하며, 여기에서 X는 NH_2 , $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 또는 1-피페라진 또는 그 밖의 다른 하전된 그룹이고, Y는 0이며, Z는 0이다.

[0168] 상기 언급한 바와 같이, 실질적으로 비하전된 올리고뉴클레오타이드는 본 발명의 관점에 따라 하전된 결합, 예를 들어, 매 10 개의 비하전된 결합당 약 4-5 개와 같은 매 2-5 개의 비하전된 결합당 약 1 개까지의 하전된 결합을 포함하도록 변형될 수 있다. 특정의 구체예에서, 안티센스 활성의 최적 개선은 골격 결합의 약 25%가 양이온성인 경우에 볼 수 있다. 특정의 구체예에서, 증진은 소수, 예를 들어, 10-20%의 양이온성 결합에 의해서, 또는 양이온성 결합의 수가 약 60%와 같이 50-80%의 범위에 있는 경우에 나타날 수 있다.

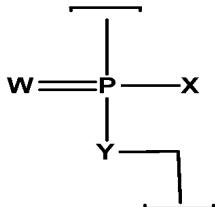
[0169] 본 발명을 지지하여 수행된 추가의 실험은 첨가된 양이온성 골격 전하에 의해서 나타나는 증진은 일부의 경우에, 전하의 벌크 (bulk)를 예를 들어, 8 개의 양이온성 골격 결합을 갖는 20-mer 올리고뉴클레오타이드에서, 10 개의 정중앙 결합에 국재화된 이들 하전된 결합의 적어도 70%를 갖는 안티센스

올리고뉴클레오파이드의 "중앙-부분" 골격 결합에 근접하게 분포시킴으로써 더 증진될 수 있음을 나타낸다.

[0170] 특정의 구체예에서, 안티센스 화합물은 상기에서, 및 혼합물 또는 비하전 및 양이온성 골격 결합을 갖는 올리고뉴클레오파이드의 합성에 관하여 이하에서 인용된 문헌에 상세히 설명된 방법을 사용하여 단계적 고체상 합성에 의해서 제조될 수 있다. 일부의 경우에, 예를 들어, 약력학을 증진시키거나 화합물의 포획 또는 검출을 용이하게 하기 위해서 안티센스 화합물에 추가의 화학적 부분을 첨가하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 부분은 표준 합성방법에 따라, 전형적으로는 올리고머의 말단에 공유적으로 부착될 수 있다. 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜 부분 또는 그 밖의 다른 친수성 폴리머, 예를 들어, 10-100 개의 모노머 서브유니트를 갖는 것의 첨가는 용해도를 증진시키는데 유용할 수 있다. 하나 또는 그 이상의 하전된 그룹, 예를 들어, 유기산과 같은 음이온성으로 하전된 그룹은 세포 흡수를 증진시킬 수 있다.

[0171] 플루오레세인 또는 방사성표지된 그룹과 같은 리포터 부분은 검출을 목적으로 부착될 수 있다. 대신으로, 올리고머에 부착된 리포터 라벨은 표지된 항체 또는 스트렙타비딘을 결합시킬 수 있는 항원 또는 비오틴과 같은 리간드일 수 있다. 안티센스 화합물의 부착 또는 변형을 위한 부분을 선택하는 경우에는, 물론 생체적합성이며 바람직하지 않는 부작용이 없이 대상체에 의해서 견딜 수 있을 것 같은 그룹의 화학적 화합물을 선택하는 것이 일반적으로 바람직하다.

[0172] 상기 언급한 바와 같이, 특정의 안티센스 화합물은 상술한 타입의 비하전된 결합이 산재된 선택된 수의 양이온성 결합을 함유하도록 구성될 수 있다. 비하전 및 양이온성 둘 다인 서브유니트간 결합은 바람직하게는 하기 구조를 갖는 인-함유 결합이다:



[0173]

[0174] 여기에서

[0175] W는 S 또는 O이고, 바람직하게는 O이며,

[0176] X는 NR^1R^2 또는 OR^6 이고,

[0177] Y는 O 또는 NR^7 이며,

[0178] 올리고머 내의 각각의 상기 결합은

[0179] (a) 비하전된 결합 (a), 여기에서, R^1 , R^2 , R^6 및 R^7 은 독립적으로 수소 및 저급 알킬로부터 선택된다;

[0180] (b1) 양이온성 결합 (b1), 여기에서, X는 NR^1R^2 이고, Y는 O이며, NR^1R^2 는 R^1R^2 가 $-CHRCHRN(R^3)(R^4)CHRCHR-$ 이 되도록 임의로 치환된 피페라지노 그룹을 나타내고, 여기에서 각각의 R은 독립적으로 H 또는 CH_3 이며, R^4 는 H, CH_3 , 또는 전자쌍이고, R^3 는 H, 저급 알킬, 예를 들어, CH_3 , $C(=NH)NH_2$, Z-L-NHC(=NH)NH₂, 및 $[C(O)CHR'NH]mH$ 로부터 선택되며, 여기에서 Z는 C(O) 또는 직접 결합이고, L은 알킬, 알콕시 및 알킬아미노로부터 선택된 결합을 갖고 길이가 18 개까지의 원자, 바람직하게는 12 개까지의 원자, 더욱 바람직하게는 8 개까지의 원자인 임의의 링커이며, R' 는 천연적으로 존재하는 아미노산 또는 그의 1- 또는 2-탄소 동족체의 측쇄이고, m은 1 내지 6, 바람직하게는 1 내지 4이다;

[0181] (b2) 양이온성 결합 (b2), 여기에서, X는 NR^1R^2 이고, Y는 O이며, R^1 은 H 또는 CH_3 이고, R^2 는 $LNR^3R^4R^5$ 이며, 여기에서 L, R^3 , 및 R^4 는 상기 정의한 바와 같고, R^5 는 H, 저급 알킬, 또는 저급 (알콕시) 알킬이다; 및

[0182] (b3) 양이온성 결합 (b3), 여기에서, Y는 NR^7 이고, X는 OR^6 이며, R^7 은 $LNR^3R^4R^5$ 이고, 여기에서 L, R^3 , R^4 및 R^5 는

상기 정의한 바와 같으며, R^6 은 H 또는 저급 알킬로부터 선택되고;

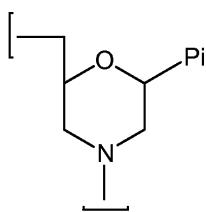
[0183] 적어도 하나의 상기 결합은 양이온성 결합 (b1), (b2), 및 (b3)로부터 선택된다.

[0184] 특정의 구체예에서, 올리고머는 타입 (a) (즉, 비하전된 결합)의 적어도 2 개의 연속적 결합을 포함할 수 있다. 추가의 구체예에서, 올리고머 내의 결합의 적어도 5%는 양이온성 결합 (즉, 타입 (b1), (b2), 또는 (b3))이며; 예를 들어, 10% 내지 60%, 바람직하게는 20-50%의 결합은 양이온성 결합일 수 있다.

[0185] 한가지 구체예에서, 적어도 하나의 결합은 타입 (b1)의 결합이며, 여기에서 바람직하게는 각각의 R은 H이고, R^4 는 H, CH_3 , 또는 전자쌍이며, R^3 은 H, 저급 알킬, 예를 들어, CH_3 , $C(=NH)NH_2$, 및 $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$ 로부터 선택된다. R^3 의 후자의 2 가지 구체예는 각각 피페라진 환에 직접 부착되거나 링커 그룹 L에 펜던트된 구아니디노 부분을 제공한다. 합성의 용이성을 위해서 R^3 에서의 변수 Z는 바람직하게는 나타낸 바와 같이 $C(O)$ (카보닐)이다.

[0186] 상기 언급한 바와 같이 링커 그룹 L은 그의 골격 내에 알킬 (예를 들어, $-CH_2-CH_2-$), 알콕시 ($-C-O-$), 및 디알킬아미노 (예를 들어, $-CH_2-NH-$)로부터 선택된 결합을 함유하며, 단 L에서의 말단 원자 (예를 들어, 카보닐 또는 질소에 인접한 것)는 탄소 원자이다. 분지된 결합 (예를 들어, $-CH_2-CH(CH_3)-$)이 있을 수 있지만, 링커는 바람직하게는 분지되지 않는다. 한가지 구체예에서, 링커는 탄화수소 링커이다. 이러한 링커는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기에서 n은 1-12, 바람직하게는 2-8, 더욱 바람직하게는 2-6이다.

[0187] 모르폴리노 서브유니트는 다음의 구조를 갖는다:



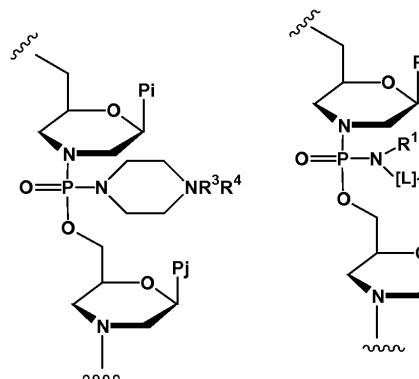
(i)

[0188]

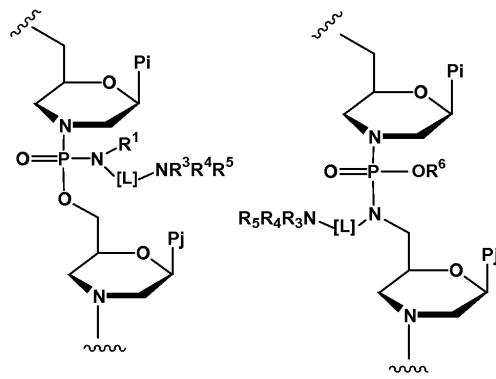
[0189] 여기에서 Pi는 염기-대합 부분이고, 상기 도시된 결합은 (i)의 질소 원자를 인접한 서브유니트의 5' 탄소에 연결한다. 염기-대합 부분 Pi는 동일하거나 상이할 수 있으며, 일반적으로는 표적 핵산에 결합하는 서열을 제공하도록 디자인된다.

[0190]

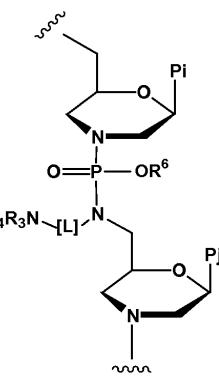
모르폴리노 서브유니트를 연결하기 위한 상기 결합 타입 (b1), (b2) 및 (b3)의 구체예의 사용은 다음과 같이 도식적으로 설명될 수 있다:



(b1)



(b2)



(b3)

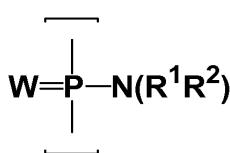
[0191]

[0192] 바람직하게는, 올리고머 내의 모든 양이온성 결합은 동일한 타입, 즉 모두 타입 (b1), 모두 타입 (b2), 또는 모

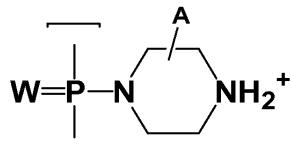
두 타입 (b3)의 것이다.

[0193]

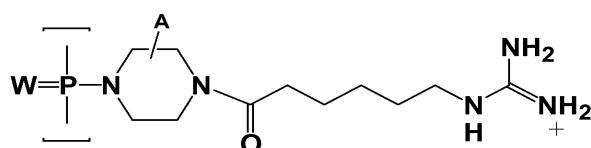
추가의 구체예에서, 양이온성 결합은 이하에 나타낸 바와 같은 결합 (b1') 및 (b1'')로부터 선택되며, 여기에서 (b1'')는 본 명세서에서 "Pip" 결합이라 칭하고, (b1'')는 본 명세서에서 "GuX" 결합이라 칭한다:



(a)



(b1')



(b1'')

[0194]

[0195]

상기 구조에서, W 는 S 또는 O이고, 바람직하게는 O이며; R^1 및 R^2 각각은 독립적으로 수소 및 저급 알킬로부터 선택되고, 바람직하게는 메틸이며; A는 (b1') 및 (b1'') 내의 하나 또는 그 이상의 탄소 원자 상에서 수소 또는 비-간접성 치환체를 나타낸다. 바람직하게는, 피페라진 환 내의 환 탄소는 비치환되지만, 이들은 메틸 또는 불소와 같은 비-간접성 치환체를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 기껏해야 1 또는 2 개의 탄소 원자가 이렇게 치환된다. 추가의 구체예에서, 결합의 적어도 10%는 타입 (b1') 또는 (b1'')이며; 예를 들어, 결합의 10%~60%, 바람직하게는 20% 내지 50%가 타입 (b1') 또는 (b1'')일 수 있다.

[0197]

특정의 구체예에서, 올리고머는 상기의 타입 (b1')의 결합을 함유하지 않는다. 대신으로, 올리고머는 각각의 R 이 H이고, R^3 이 H 또는 CH_3 이며, R^4 가 H, CH_3 또는 전자쌍인 타입 (b1)의 결합을 함유하지 않는다.

[0198]

모르폴리노 서브유니트는 또한, 이하에 더 기술되는 바와 같은 비-인-기본 서브유니트간 결합에 의해서 연결될 수 있으며, 여기에서 적어도 하나의 결합은 상술한 바와 같은 펜던트 양이온성 그룹에 의해서 변형된다.

[0199]

그들의 비변형된 상태에서 비하전되지만, 또한 펜던트 아민 치환체를 보유할 수도 있는 그 밖의 다른 올리고뉴클레오타이드 유사체 결합이 사용될 수 있다. 예를 들어, 모르폴리노 환 상의 5' 질소 원자가 세파미드 결합 또는 우레아 결합 (여기에서 인은 각각 탄소 또는 황으로 대체된다)에서 사용될 수 있으며, 상기 구조 (b3)에서의 5'-질소 원자와 유사한 방식으로 변형될 수 있다.

[0200]

완전히 양이온성-연결된 올리고머를 포함한, 어떤 수의 양이온성 결합이라도 갖는 올리고머가 제공된다. 그러나, 바람직하게는 올리고머는 부분적으로, 예를 들어, 10%~80%가 하전된다. 바람직한 구체예에서는, 약 10% 내지 60%, 바람직하게는 20% 내지 50%의 결합이 양이온성이다.

[0201]

한가지 구체예에서, 양이온성 결합은 골격을 따라서 산재된다. 부분적으로 하전된 올리고머는 바람직하게는 적어도 2 개의 연속적인 비하전된 결합을 함유하며; 즉 올리고머는 바람직하게는 그의 전체 길이를 따라서 염격하게 교대하는 패턴을 갖지 않는다.

[0202]

또한, 양이온성 결합의 블록 (blocks) 및 비하전된 결합의 블록을 갖는 올리고머가 고려된다; 예를 들어, 비하전된 결합의 중앙 블록은 양이온성 결합의 블록의 측면에 위치할 수 있거나 반대일 수도 있다. 한가지 구체예에서, 올리고머는 대략 동등한 길이의 5', 3' 및 중앙 부분을 가지며, 중앙 부분 내의 양이온성 결합의 백분율은 약 50% 이상, 바람직하게는 약 70% 이상이다.

[0203]

안티센스 적용에서 사용하기 위한 올리고머는 일반적으로 길이가 약 10 내지 약 40 서브유니트, 더욱 바람직하게는 약 10 내지 30 서브유니트, 전형적으로는 15~25 염기의 범위이다. 예를 들어, 안티센스 화합물을 위한 유용한 길이인 19~20 서브유니트를 갖는 본 발명의 올리고머는 이상적으로 2 내지 10 개, 예를 들어, 4 내지 8 개의 양이온성 결합 및 나머지로 비하전된 결합을 가질 수 있다. 14~15 서브유니트를 갖는 올리고머는 이상적으

로 2 내지 7 개, 예를 들어, 3, 4, 또는 5 개의 양이온성 결합 및 나머지로 비하전된 결합을 가질 수 있다.

[0204] 각각의 모르폴리노 환 구조는 전형적으로 세포 또는 치료될 대상체에서 선택된 안티센스 표적에 하이브리드화하도록 디자인된 염기 대합 부분의 서열을 형성하도록 염기 대합 부분을 유지한다. 염기 대합 부분은 천연 DNA 또는 RNA에서 발견되는 퓨린 또는 피리미딘 (예를 들어, A, G, C, T 또는 U), 또는 유사체, 예를 들어, 하이포크산딘 (뉴클레오사이드 이노신의 염기 성분) 또는 5-메틸 시토신일 수 있다.

펩타이드 수송체

[0205] 특정의 구체예에서, 본 발명의 안티센스 화합물은 세포 내로 화합물의 수송을 증진시키는데 효과적인 아르기닌-풍부 펩타이드 수송체 부분에 컨주케이트된 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함할 수 있다. 수송체 부분은 예를 들어, 도 1C에 나타낸 바와 같이 올리고머의 말단에 부착될 수 있다. 펩타이드 수송체 부분은 바람직하게는 X' 서브유니트, Y' 서브유니트, 및 Z' 서브유니트로부터 선택된 6 내지 16 개의 서브유니트를 포함하며, 여기에서

[0206] (a) 각각의 X' 서브유니트는 독립적으로 리신, 아르기닌 또는 아르기닌 유사체를 나타내고, 여기에서 상기의 유사체는 구조 $R^1N=C(NH_2)R^2$ 의 측쇄 (여기에서 R^1 은 H 또는 R이고; R^2 는 R, NH₂, NHR, 또는 NR₂이며, 여기에서 R은 저급 알킬 또는 저급 알케닐이고, 산소 또는 질소를 더 포함할 수 있으며; R^1 및 R^2 는 함께 환을 형성할 수 있고; 상기 측쇄는 R^1 또는 R^2 를 통해서 아미노산에 연결된다)를 포함하는 양이온성 α -아미노산이며;

[0207] (b) 각각의 Y' 서브유니트는 독립적으로 중성 아미노산 -C(0)-(CHR)n-NH- (여기에서 n은 2 내지 7이고, 각각의 R은 독립적으로 H 또는 메틸이다)를 나타내고;

[0208] (c) 각각의 Z' 서브유니트는 독립적으로 중성 아르알킬 측쇄를 갖는 α -아미노산을 나타내며;

[0209] 여기에서 상기 펩타이드는 (X'Y'X')_p, (X'Y')_m, (X')_m, 및 (X'Z'Z')_p 중의 하나로 표시되는 서열을 포함하고, 여기에서 p는 2 내지 5이며, m은 2 내지 9이다. 특정의 구체예는 예를 들어, 서열 (X'Y'X')(X'Z'Z')(X'Y'X')(X'Z'Z') (서열번호 129)를 갖는 펩타이드를 포함하는, (X'Y'X')_p, (X'Y')_m, (X')_m, 및/또는 (X'Z'Z')_p로부터 독립적으로 선택된 다양한 조합을 포함한다.

[0210] 선택된 구체예에서, 각각의 X'의 경우에 측쇄 부분은 아미노산 서브유니트 아르기닌 (Arg)에서와 같이 구아니딜이다. 추가의 구체예에서, 각각의 Y'는 -CO-(CH₂)_n-CHR-NH-이며, 여기에서 n은 2 내지 7이고, R은 H이다. 예를 들어, n이 5이고, R이 H인 경우에 Y'는 본 명세서에서 Ahx로 약칭되는 6-아미노헥사노산 서브유니트이고; n이 2이며, R이 H인 경우에 Y'는 본 명세서에서 B로 약칭되는 β -알라닌 서브유니트이다. 특정의 구체예는 β -알라닌 및 6-아미노헥사노산 둘 다를 함유하는, 예를 들어, 서열 -RAhxRRBRAhxAhxB- (서열번호 124)을 포함하는 펩타이드를 포함한 상이한 중성 아미노산의 조합을 갖는 담체 펩타이드에 관한 것이다.

[0211] 이러한 타입의 바람직한 펩타이드에는 단일 Y' 서브유니트와 교대하는 아르기닌 다이머를 포함하는 것이 포함되며, 여기에서 Y'는 바람직하게는 Ahx이다. 예로는 화학식 (RY'R)_p 또는 화학식 (RRY')_p를 갖는 펩타이드가 포함되며, 여기에서 Y'는 바람직하게는 Ahx이다. 한가지 구체예에서, Y'는 6-아미노헥사노산 서브유니트이며, R은 아르기닌이고, p는 4이다.

[0212] 특정의 구체예에는 예를 들어, 서열 (RY'R)(RRY')(RY'R)(RRY') (서열번호 130), 또는 (RRY')(RY'R)(RRY') (서열번호 131)를 갖는 예시적인 펩타이드를 포함하는, (RY'R)_p 및 (RRY')_p 중의 적어도 2 개의 다양한 선형 조합이 포함된다. 그 밖의 다른 조합이 고려된다. 추가의 예시적인 구체예에서, 각각의 Z'는 페닐알라닌이고, m은 3 또는 4이다.

[0213] 컨주케이트된 펩타이드는 바람직하게는, 예를 들어, 도 1c에 나타낸 바와 같이 링커 Ahx-B를 통해서 올리고머의 말단에 연결되며, 여기에서 Ahx는 6-아미노헥사노산 서브유니트이고, B는 β -알라닌 서브유니트이다. 펩타이드와 올리고머 사이의 대체 링커에는 글리신 및 시스테인이 포함된다. 이들 및 연관된 링커는 아미드 또는 디설파이드 결합을 통해서 컨주케이트될 수 있다.

[0214] 선택된 구체예에서, 각각의 X'의 경우에 측쇄 부분은 구아니딜 (HN=C(NH₂)NH-), 아미디닐 (HN=C(NH₂)C<), 2-아미노디하이드로피리미딜, 2-아미노테트라하이드로피리미딜, 2-아미노피리디닐, 및 2-아미노피리미도닐로 구성된 그룹으로부터 독립적으로 선택되며, 이것은 바람직하게는 구아니딜 및 아미디닐로부터 선택된다. 한가지 구체예에서, 측쇄 부분은 아미노산 서브유니트 아르기닌 (Arg)에서와 같이 구아니딜이다.

[0216] 특정의 구체예에서, Y' 서브유니트는 X' 서브유니트가 Y' 서브유니트 사이에 개입하지 않는 것으로 연속적이거나, 하나씩 X' 서브유니트 사이에 산재될 수 있다. 특정의 구체예에서, 연결 서브유니트는 Y' 서브유니트 사이에 있을 수 있다. 한가지 구체예에서, Y' 서브유니트는 수송체의 말단에 존재하고; 다른 구체예에서, 이들은 X' 서브유니트의 측면에 존재한다. 추가의 바람직한 구체예에서, 각각의 Y'는 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{CHR}-\text{NH}-$ 이며, 여기에서 n은 2 내지 7이고, R은 H이다. 예를 들어, n이 5이고, R이 H인 경우에 Y'는 본 명세서에서 Ahx로 약칭되는 6-아미노헥사노산 서브유니트이다.

[0217] 이 그룹의 선택된 구체예에서, 각각의 X'는 아르기닌 서브유니트에서와 같이 구아니딜 측쇄 부분을 포함한다. 이 탑입의 바람직한 웨타이드에는 단일 Y' 서브유니트와 교대하는 아르기닌 다이머를 포함하는 것이 포함되며, 여기에서 Y'는 바람직하게는 Ahx이다. 예로는 화학식 $(\text{RY}'\text{R})_4$ (서열번호 132) 또는 화학식 $(\text{RRY}')_4$ (서열번호 133)를 갖는 웨타이드가 포함되며, 여기에서 Y'는 바람직하게는 Ahx이다. 후자의 경우에, 핵산 유사체는 바람직하게는 예를 들어, 도 1c에 나타낸 바와 같이 바람직하게는 C-말단에서, 말단 Y' 서브유니트에 연결된다. 한가지 예시적인 링커는 구조 AhxB의 링커이며, 여기에서 Ahx는 6-아미노헥사노산 서브유니트이고, B는 β -알라닌 서브유니트이다. 대체 링커에는 시스테인 및 글리신이 포함된다.

[0218] 본 명세서에 기술된 바와 같은 수송 부분은 부착된 수송 부분의 부재 하에서의 올리고머의 흡수에 비해서, 및 소수성 서브유니트 Y'가 결여된 부착된 수송 부분에 의한 흡수에 비해서 부착된 올리고머의 세포 도입을 크게 증진시키는 것으로 나타났다. 이러한 증진된 흡수는 바람직하게는 소수성 서브유니트 Y'가 결여된 부착된 수송 부분에 의한 작용제의 흡수에 비해 포유동물 세포 내로의 화합물의 흡수의 적어도 2-배 증가, 바람직하게는 4-배 증가에 의해서 입증된다. 흡수는 바람직하게는 비전주제이트 화합물에 비해서 적어도 20 배, 더욱 바람직하게는 40 배 증가된다.

[0219] 수송 부분의 추가의 이점은 아마도 양으로 하전된 수송 부분과 음으로 하전된 핵산 사이의 정전기적 상호작용에 의한, 안티센스 화합물과 그의 표적 핵산 서열 사이의 듀플렉스를 안정화시키는 그의 예상된 능력이다. 수송체 내의 하전된 서브유니트의 수는 상기 언급한 바와 같이 14 미만이며, 바람직하게는 8 내지 11이다.

[0220] 아르기닌-풍부 웨타이드 수송체 (즉, 세포-투과성 웨타이드)의 사용이 본 발명의 특정한 구체예를 실행하는데 특히 유용하다. 특정의 웨타이드 수송체는 안티센스 화합물의 조혈 및 근육 세포를 포함한 일차 세포 내로 송달하는데 있어서 매우 효과적인 것으로 나타났다 [Marshall, Oda *et al.*, 2007; Jearawiriyapaisarn, Moulton *et al.*, 2008; Wu, Moulton *et al.*, 2008]. 또한, 페네트라틴 (Penetratin) 및 Tat 웨타이드와 같은 그 밖의 다른 공지의 웨타이드 수송체와 비교하여 본 발명에 기술된 웨타이드 수송체는 안티센스 PMO와 컨주제이트되는 경우에, 7 개의 유전자 전사물의 스플라이싱을 변화시키는 증진된 능력을 나타낸다 [Marshall, Oda *et al.*, 2007]. 이들 연구에서의 예시적인 웨타이드에는 P007 (서열번호 118), CP04057 (서열번호 123), 및 CP06062 (서열번호 124)가 포함된다.

[0221] 링커 (B, AhxB, C, 또는 G)를 포함한 예시적인 웨타이드 수송체는 이하의 표 5에 제시된다. 특정의 구체예에서, 표 5에 열거된 예시적인 웨타이드 수송체는 디설파이드 또는 아미드 결합을 통해서 PMO에 컨주제이트될 수 있다.

[0222] [표 5]

[0223]

예시적인 펩타이드 수송체

| 펩타이드 | 서열 (N-말단에서 C-말단 쪽으로) | 서열번호: |
|--|-------------------------------|-------|
| rTAT | RRRQRRKKRC | 115 |
| R ₉ F ₂ C | RRRRRRRRRFFC | 116 |
| R ₅ F ₂ R ₄ C | RRRRRFFRRRRC | 117 |
| (RAhxR) ₄ AhxB; (P007) | RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhxB | 118 |
| R ₈ C | RRRRRRRRRC | 119 |
| R ₉ C | RRRRRRRRRC | 120 |
| R ₈ G | RRRRRRRRRG | 121 |
| R ₉ G | RRRRRRRRRG | 122 |
| (RAhxR) ₅ AhxB (CP04057) | RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhxB | 123 |
| (RAhxRRBR) ₂ AhxB; (CP06062) | RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB | 124 |
| (RAR) ₄ F ₂ C | RARRARRARRARFFC | 125 |
| (RGR) ₄ F ₂ C | RGRRGRRGRRGRFFC | 126 |
| R ₉ F ₂ G | RRRRRRRRRFFG | 127 |
| R ₉ F ₂ XB | RRRRRRRRRFFAhxB | 128 |

[0224]

RNA 간섭제

[0225]

본 발명에 기술된 인플루엔자 표적 부분 (예를 들어, M1, M2; 서열번호 1-11)은 또한 다양한 RNA 간섭-기본 방법에 의해서 표적화될 수 있다. RNA 간섭 (RNAi)은 선충인 시노랩디티스 엘레간스 (*Caenorhabditis elegans*)의 연구에서 최초로 발견된 진화적으로 보존된 유전자-침묵 기전이다 [Lee *et al.*, *Cell* 75:843, 1993; Reinhardt *et al.*, *Nature* 403:901, 2000]. 이것은 후에 상응하는 내인성 mRNA를 분해시키는 적절한 분자 기구를 발현하는 세포 내로 dsRNA를 도입시킴으로써 유발될 수 있다. 상기의 기전은 dsRNA를, 리보뉴클레아제를 상동성 mRNA 표적으로 유도하는 짧은 RNAs로 전환시키는 것을 수반한다 (예를 들어, 문헌 [Ruvkun, *Science* 2294:797, 2001]에 의해서 요약됨).

[0226]

특정의 구체예에서, 본 발명에 제공된 상기의 방법은 예를 들어, M1 또는 M2 단백질 발현을 저해함으로써 인플루엔자 바이러스 복제를 감소시키기 위한 변조제로서 이중-가닥 리보핵산 (dsRNA) 분자를 이용할 수 있다. dsRNAs는 일반적으로 2 개의 단일 가닥을 포함한다. dsRNA의 하나의 가닥은 표적 유전자 또는 표적 부분의 일부분과 실질적으로 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하며 ("센스" 가닥), 다른 가닥 ("상보적" 또는 "안티센스" 가닥)은 표적 부분의 일부분에 대해서 실질적으로 상보적인 서열을 포함한다. 상기 가닥은 하이브리드화하여 듀플렉스 구조를 형성하도록 충분히 상보적이다. 특정의 구체예에서, 상보적 RNA 가닥은 길이가 30 뉴클레오타이드 미만, 25 뉴클레오타이드 미만, 또는 길이가 19 내지 24 뉴클레오타이드일 수도 있다. 특정의 구체예에서, 상보적 뉴클레오타이드 서열은 길이가 20-23 뉴클레오타이드, 또는 길이가 22 뉴클레오타이드일 수 있다.

[0227]

특정의 구체예에서, RNA 가닥 중의 적어도 하나는 길이가 1 내지 4 뉴클레오타이드인 뉴클레오타이드 오버행을 포함한다. 다른 구체예에서, dsRNA는 적어도 하나의 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 더 포함할 수 있다. 특정의 관점에서, 1 내지 4 뉴클레오타이드의 단일-가닥 오버행을 포함하는 dsRNA는 말단 뉴클레오타이드 쌍에 바로 인접한 단일-가닥 오버행의 대합되지 않은 뉴클레오타이드가 퓨린 염기를 함유하는 분자를 포함할 수

있다. 다른 관점에서, dsRNA의 양 말단 상의 마지막 상보적 뉴클레오타이드 쌍은 G-C 쌍이거나, 마지막 4 개의 말단 뉴클레오타이드 쌍 중의 적어도 2 개는 G-C 쌍이다.

[0229] 본 발명의 특정의 구체예는 마이크로RNAs를 포함할 수 있다. 마이크로-RNAs는 유기체 내에서 천연적으로 생산되는 작은 RNAs의 큰 그룹을 나타내며, 이들 중의 일부는 표적 유전자의 발현을 조절한다. 마이크로-RNAs는 약 70 뉴클레오타이드 단일-가닥 헤어핀 전구체 전사물로부터 다이서 (Dicer)에 의해서 형성된다 [V. Ambros *et al.*, *Current Biology* 13:807, 2003]. 마이크로-RNAs는 단백질로 해독되지 않지만, 대신에 특이적 메신저 RNAs에 결합함으로써 해독을 차단한다. 마이크로-RNAs는 그들의 표적과 부정확하게 염기-대합하여 해독을 억제한다. 특정의 마이크로-RNAs는 헤어핀 RNA 전구체로 전사될 수 있으며, 이것은 다음에 다이서 효소에 의해서 그들의 성숙한 형태로 가공될 수 있다.

[0230] 특정의 구체예에서, 변조제 또는 RNAi 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥화된다. 다른 구체예에서, 변조제 또는 RNAi 올리고뉴클레오타이드는 이중 가닥화된다. 특정의 구체예는 또한, 짧은 간섭성 RNAs (siRNA)를 이용할 수도 있다. 특정의 구체예에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드의 제1 가닥은 제2 가닥보다 2 개 더 많은 뉴클레오사이드 잔기를 함유한다. 다른 구체예에서, 제1 가닥 및 제2 가닥은 동일한 수의 뉴클레오사이드를 갖지만, 제1 및 2 가닥은 제1 및 2 가닥상의 2 개의 말단 뉴클레오사이드가 상보적 가닥 상의 잔기와 대합되지 않도록 상쇄된다. 특정의 경우에, 대합되지 않은 2 개의 뉴클레오사이드는 티미딘 잔기이다.

[0231] 변조제가 siRNA를 포함하는 경우에, 작용제는 siRNA 작용제 또는 그의 단편이 표적 RNA의 하향 조절을 매개할 수 있도록 표적 부분에 대해 충분히 상동성이며, 뉴클레오타이드의 관점에서 충분한 길이를 갖는 부분을 포함하여야 한다. 용어 "리보뉴클레오타이드" 또는 "뉴클레오타이드"는 변형된 RNA 또는 뉴클레오타이드 대용품의 경우에, 또한 변형된 뉴클레오타이드 또는 하나 또는 그 이상의 위치에서의 대용품 대체 부분을 나타내는 것으로 이해될 수 있다. 따라서, siRNA 작용제는 표적 RNA에 대해서 적어도 부분적으로 상보적인 부분이거나 그러한 부분을 포함한다. siRNA 작용제와 표적 사이에 완벽한 상보성이 있는 것이 필요하지는 않지만, 해당하는 것은 siRNA 작용제 또는 그의 분해 생성물이 표적 RNA의 RNAi 분해에 의한 것과 같은 서열 특이적 침목을 유도할 수 있기에 충분하여야 한다. 표적 가닥과의 상보성 또는 상동성의 정도가 안티센스 가닥에서 가장 중요하다. 완벽한 상보성은 특히 안티센스 가닥에서 종종 바람직하지만, 일부의 구체예는 표적 RNA에 관해서 하나 또는 그 이상, 바람직하게는 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 그보다 적은 미스매치를 포함한다. 이 미스매치는 말단 부분에서 가장 잘 허용되며, 존재하는 경우에 이것은 바람직하게는 말단 부분 또는 부분들, 예를 들어, 5' 및/또는 3' 말단의 6, 5, 4, 또는 3 뉴클레오타이드 내에 존재한다. 센스 가닥은 문자의 전반적인 이중-가닥 특징을 유지하도록 단지 안티센스 가닥과 충분히 상보적인 것만이 필요하다.

[0232] 또한, siRNA 변조제는 변형되거나 뉴클레오사이드 대용품을 포함할 수 있다. siRNA 작용제의 단일 가닥 부분은 변형되거나 뉴클레오사이드 대용품, 예를 들어, 헤어핀 구조의 비대합 부분 또는 부분들을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 2 개의 상보적 부분을 연결하는 부분은 변형 또는 뉴클레오사이드 대용품을 가질 수 있다. siRNA 작용제의 하나 또는 그 이상의 3'- 또는 5'-말단을, 예를 들어, 엑소뉴클레아제에 대해서 안정화시키거나, 안티센스 siRNA 작용제를 RISC 내로의 도입에 유리하게 하는 변형이 또한 유용하다. 변형은 C3 (또는 C6, C7, C12) 아미노 링커, 티올 링커, 카복실 링커, 비-뉴클레오타이드 스페이서 (C3, C6, C9, C12, 비염기성 (abasic), 트리에틸렌 글리콜, 헥사에틸렌 글리콜), 포스포르아미다이트로서 제공되며, 또 다른 DMT-보호된 하이드록실 그룹을 갖는 특별한 비오틴 또는 플루오레세인 시약을 포함하여, RNA 합성 중에 다수의 커플링이 가능하도록 할 수 있다.

[0233] siRNA 작용제는 예를 들어, 이들이 인터페론 반응을 유발하지 않도록 충분히 짧은 문자 (이 문자는 또한 다이서에 의해서 분해되고/되거나 RISC 내로 도입될 수 있다), 예를 들어, RISC 내로의 도입을 허용하는 크기의 문자, 예를 들어, 다이서-분해 생성물과 유사한 문자 이외에도, 인터페론 반응을 유발하기에 충분히 긴 문자 (다이서에 의해서 분해되고 [Bernstein *et al.*, *Nature*, 409:363-366, 2001] RISC (RNAi-유도된 침목 컴플렉스)에 도입될 수 있다)를 포함할 수 있다. 이들이 인터페론 반응을 유발하지 않도록 충분히 짧은 문자는 본 명세서에서 siRNA 작용제 또는 더 짧은 RNAi 작용제라 불린다. 본 발명에서 사용된 것으로서 "siRNA 작용제 또는 더 짧은 RNAi 작용제"는 이것이 인간 세포에서 유해한 인터페론 반응을 유발하지 않게 충분히 짧은 siRNA 작용제를 나타내며, 예를 들어, 이것은 60 개 미만, 바람직하게는 50, 40, 또는 30 개 미만의 뉴클레오타이드 쌍의 듀플렉스화된 부분을 갖는다. siRNA 변조제 또는 그의 분해 생성물은 예를 들어, 표적 RNA, 바람직하게는 M1 또는 M2와 같은 인플루엔자 표적 RNA에 관해서 RNAi를 유도함으로써 표적 유전자를 하향 조절할 수 있다.

[0234] siRNA 변조제의 각각의 가닥은 길이가 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 또는 20 뉴클레오타이드 또는 그 미만일

수 있다. 상기 가닥은 바람직하게는 길이가 적어도 19 뉴클레오타이드이다. 예를 들어, 각각의 가닥은 길이가 21 내지 25 뉴클레오타이드 사이일 수 있다. 바람직한 siRNA 작용체는 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24, 또는 25 뉴클레오타이드 쌍의 듀플렉스 부분 및 2-3 뉴클레오타이드의 하나 또는 그 이상의 오버행, 바람직하게는 1 또는 2 개의 3' 오버행을 갖는다.

[0235] 표적 RNA에 대한 상동성 및 표적 유전자를 하향 조절하는 능력 이외에도 siRNA 변조체는 다음의 특장들 중의 하나 또는 그 이상을 가질 수 있다: 이것은 뉴클레오사이드의 매우 큰 수까지의 또는 모두의 변형에도 불구하고, 정확한 염기 대합을 형성하고, 예를 들어, 표적 RNA의 분해에 의해서 표적의 하향 조절이 이루어지도록 하는데 충분한 상동성 표적 RNA와의 듀플렉스 구조를 형성할 수 있도록 적절한 삼차원 골격구조로 염기 (또는 변형된 염기)가 존재할 수 있는 안티센스 가닥을 가질 수 있으며; 이것은 뉴클레오사이드의 매우 큰 수까지의 또는 모두의 변형에도 불구하고, 여전히 "RNA-유사" 특성을 가질 수 있고, 즉 이것은 비록 독점적이지 않거나 부분적이 기까지 한 리보뉴클레오타이드-기본 함량의 RNA 분자의 전반적인 구조적, 화학적 및 물리적 특성을 가질 수 있다. 예를 들어, siRNA 작용체는 예를 들어, 모든 뉴클레오타이드 당이 2' 하이드록실 대신에 2' 플루오로를 함유하는 센스 및/또는 안티센스 가닥을 함유할 수 있다. 이러한 데옥시리보뉴클레오타이드-함유 작용체는 여전히 RNA-유사 특성을 나타내는 것으로 예상될 수 있다. 이론에 의해서 얹매이는 것을 원하지는 않지만, 전기음성 불소는 리보즈의 C2' 위치에 부착되는 경우에 축 배향을 선호한다. 불소의 이러한 공간적 선호도는 또한, 어쩔 수 없이 당이 C3'-엔도 푸커 (pucker)를 채택하도록 할 수 있다. 이것은 RNA 분자에서 관찰되는 것과 동일한 푸커링 (puckering) 모드이며, RNA-특징적 A-페밀리-타입 헬리스를 초래한다. 또한, 불소는 우수한 수소 결합 수용체이기 때문에, 이것은 RNA 구조를 안정화시키는 것으로 알려진 물 분자와의 동일한 수소 결합 상호작용에 참여할 수 있다. 일반적으로, 2' 당 위치에서의 변형된 부분은 데옥시리보뉴클레오타이드의 H 부분보다는 오히려 리보뉴클레오타이드의 OH 부분의 특징인 H-결합 내로 도입될 수 있는 것이 바람직하다.

[0236] 본 발명에서 사용된 것으로서 "단일 가닥 RNAi 작용체"는 단일 분자로 구성되는 RNAi 작용체이다. 이것은 가닥-내 대합에 의해서 형성된 듀플렉스화 부분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 이것은 헤어핀 또는 팬-핸들 (pan-handle) 구조일 수 있거나 이러한 구조를 포함할 수 있다. 단일 가닥 RNAi 변조체는 바람직하게는 표적 분자에 관하여 안티센스이다. 단일 가닥 RNAi 작용체는 이것이 RISC에 도입될 수 있고, 표적 mRNA의 RISC 매개된 분해에 참여할 수 있도록 충분히 길어야 한다. 단일 가닥 RNAi 작용체는 길이가 적어도 14 개, 더욱 바람직하게는 적어도 15, 20, 25, 29, 35, 40, 또는 50 개의 뉴클레오타이드이다. 이것은 바람직하게는 길이가 200, 100, 또는 60 개의 뉴클레오타이드 미만이다.

[0237] 헤어핀 RNAi 변조체는 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24, 또는 25 개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드 쌍의 듀플렉스 부분을 가질 수 있다. 듀플렉스 부분은 바람직하게는 길이가 200, 100, 또는 50 개이거나, 그 미만이다. 듀플렉스 부분에 대한 특정한 범위는 길이가 15-30개, 17개 내지 23개, 19개 내지 23개, 및 19개 내지 21개의 뉴클레오타이드 쌍이다. 헤어핀은 바람직하게는 헤어핀의 안티센스 측면의, 바람직하게는 3'에 단일 가닥 오버행 또는 말단 비대합 부분을 가질 수 있다. 특정의 구체예에서, 오버행은 길이가 2-3개의 뉴클레오타이드이다.

[0238] 본 발명에 제공된 방법에 따라 이용된 특정한 변조체는 각각 적어도 하나의 모노머 유니트, 즉 올리고뉴클레오타이드 화합물의 경우에는 뉴클레오타이드로 구성된 2 개 또는 그 이상의 화학적으로 별개의 부분을 함유하는 키메릭 올리고뉴클레오타이드 또는 "키메라 (chimeras)"와 같은 RNAi 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 올리고뉴클레오타이드에 대해서 뉴클레아제 분해에 대해 증가된 저항성, 증가된 세포성 흡수 및/또는 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화성을 부여하도록 올리고뉴클레오타이드가 변형된 적어도 하나의 부분을 함유한다. 따라서, 동등한 결과는 포스포로티오에이트 올리고데옥시뉴클레오타이드에 비해서 키메릭 올리고뉴클레오타이드가 사용되는 경우에 종종 더 짧은 올리고뉴클레오타이드에 의해서 수득될 수 있다. 키메릭 올리고뉴클레오타이드는 상술한 바와 같은 2 개 또는 그 이상의 올리고뉴클레오타이드, 변형된 올리고뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드 및/또는 올리고뉴클레오타이드 모사체의 복합 구조로 형성될 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 또한 본 기술분야에서 하이브리드 또는 갭머 (gapmers)로 불린다. 이러한 하이브리드 구조의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허에는 각각 본 발명에 참고로 포함된 미국 특허 제5,013,830, 5,149,797, 5,220,007, 5,256,775, 5,366,878, 5,403,711, 5,491,133, 5,565,350, 5,623,065, 5,652,355, 5,652,356, 5,700,922, 및 5,955,589호가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 특정의 구체예에서, 키메릭 올리고뉴클레오타이드는 RNA-DNA, DNA-RNA, RNA-DNA-RNA, DNA-RNA-DNA, 또는 RNA-DNA-RNA-DNA이며, 여기에서 올리고뉴클레오타이드는 길이가 5 내지 60개의 뉴클레오타이드이다.

[0239] 본 발명의 한가지 관점에서, RNAi 작용체와 같은 변조체는 변화되거나 비-천연 핵염기에 속박된 적어도 하나 리간드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드와 관련이 있다. 다수의 화합물은 변화된 염기로 작용할 수 있다. 변화

된 염기의 구조는 변화된 염기가 그의 표적, 예를 들어, mRNA에 대한 올리고뉴클레오타이드의 결합을 실질적으로 방지하지 않아야 한다는 점에서 중요하다. 특정의 구체예에서, 변화된 염기는 디플루오로톨릴, 니트로페롤릴, 니트로이미다졸릴, 니트로인돌릴, 나프탈레닐, 안트란세닐, 피리디닐, 퀴놀리닐, 피레닐, 또는 본 발명에 기술된 비-천연 핵염기 중의 어느 하나의 2가 래디칼이다. 특정의 구체예에서, 비-천연 핵염기는 디플루오로톨릴, 니트로페롤릴, 또는 니트로이미다졸릴이다. 특정의 구체예에서, 비-천연 핵염기는 디플루오로톨릴이다. 광범한 종류의 리간드가 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 본 발명에 적용할 수 있다. 예를 들어, 리간드는 스테로이드, 담즙산, 지질, 엽산, 피리독살, B12, 리보플라빈, 비오틴, 방향족 화합물, 폴리사이클릭 화합물, 크라운 에테르, 인터칼레이터 (intercalator), 클리버 (cleaver) 분자, 단백질-결합체, 또는 탄수화물일 수 있다. 특정의 구체예에서, 리간드는 스테로이드 또는 방향족 화합물이다. 특정의 경우에, 리간드는 콜레스테릴이다.

[0240] 다른 구체예에서, RNAi 작용제는 세포 표적화 및 흡수를 개선시킬 목적으로 리간드에 속박된 올리고뉴클레오타이드이다. 예를 들어, RNAi 작용제는 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 속박될 수 있다. 추가의 예로서 RNAi 작용제는 폴리펩타이드, 또는 특별한 세포-표면 수용체에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드 단편과 같은 특이적 리간드 결합 분자에 속박될 수 있다.

[0241] 다른 구체예에서, 변조제는 비-천연 핵염기를 포함한다. 특정의 구체예에서, 비-천연 핵염기는 디플루오로톨릴, 니트로이미다졸릴, 니트로인돌릴, 또는 니트로페롤릴이다. 특정의 구체예에서, 본 발명에서 제공된 변조제는 2 개의 가닥 중의 단지 하나만이 비-천연 핵염기를 함유하는 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드 서열과 관련이 있다. 특정의 구체예에서, 본 발명에서 사용된 것으로서 변조제는 가닥 둘 다가 독립적으로 적어도 하나의 비-천연 핵염기를 포함하는 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드 서열과 관련이 있다.

[0242] 특정의 경우에, 뉴클레오사이드 내에서 천연적으로 나타나는 리보즈 당 부분은 핵소즈 당으로 대체된다. 특정의 관점에서, 핵소즈 당은 알로즈, 알트로즈, 글루코즈, 만노즈, 굴로즈, 요도즈, 갈락토즈, 탈로즈, 또는 이들의 유도체이다. 바람직한 구체예에서, 핵소즈는 D-핵소즈이다. 특정의 경우에, 뉴클레오사이드 내에서 천연적으로 나타나는 리보즈 당 부분은 폴리사이클릭 헤테로알킬 환 또는 사이클로헥세닐 그룹으로 대체된다. 특정의 경우에, 폴리사이클릭 헤테로알킬 그룹은 환 내에 한 개의 산소 원자를 함유하는 비사이클릭 환이다. 특정의 경우에, 폴리사이클릭 헤테로알킬 그룹은 비사이클로[2.2.1]헵탄, 비사이클로[3.2.1]옥탄, 또는 비사이클로[3.3.1]노난이다. 특정의 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드의 골격은 올리고뉴클레오타이드 화합물의 치료학적 또는 진단적 특성을 개선시키도록 변형되었다. 특정의 구체예에서는, 올리고뉴클레오타이드의 적어도 하나의 염기 또는 적어도 하나의 당이 올리고뉴클레오타이드 화합물의 치료학적 또는 진단적 특성을 개선시키도록 변형되었다. 올리고뉴클레오타이드가 이중 가닥화된 경우에, 2 개의 가닥은 상보적, 부분적으로 상보적, 또는 키메릭 올리고뉴클레오타이드이다.

[0243] 본 발명의 방법에서의 사용을 위해서 고려되는 변형된 RNAi 작용제의 예로는 변형된 골격 또는 비-천연 뉴클레오사이드간 결합을 함유하는 올리고뉴클레오타이드가 포함된다. 여기에서 정의하는 바와 같이, 변형된 골격 또는 뉴클레오사이드간 결합을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 골격 내에 인 원자를 유지하는 것 및 골격 내에 인 원자를 갖지 않는 것을 포함한다. 그들의 당간 골격 내에 인 원자를 갖지 않는 변형된 올리고뉴클레오타이드도 또한 올리고뉴클레오타이드인 것으로 생각될 수 있다. 특이적인 올리고뉴클레오타이드 화학적 변형은 이하에 기술된다. 소정의 화합물 내의 모든 위치에 대해서 균일하게 변형되는 것이 필요하지는 않으며, 실제로 하나 이상의 다음의 변형이 단일 올리고뉴클레오타이드 화합물 내에 또는 그의 단일 뉴클레오사이드 내에도 혼입될 수 있다.

[0244] 변형된 뉴클레오사이드간 결합 또는 골격의 예로는 예를 들어, 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 3'-알킬렌 포스포네이트를 포함한 메틸 및 그 밖의 다른 알킬 포스포네이트, 및 3'-아미노 포스포로아미데이트 및 아미노알킬포스포로아미데이트를 포함한 키랄 포스포네이트, 포스피네이트, 포스포로아미데이트, 티오노포스포로아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 및 표준 3'-5' 결합을 갖는 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결된 유사체, 및 뉴클레오사이드 유니트의 인접한 쌍이 3'-5'에서 5'-3'로 또는 2'-5'에서 5'-2'로 연결된 전도된 극성을 갖는 것이 포함된다. 다양한 염, 혼합된 염 및 유리산 형태가 또한 포함된다.

[0245] 상기의 인 원자-함유 골격의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허에는 각각 본 발명에 참고로 포함된 미국 특허 제3,687,808, 4,469,863, 4,476,301, 5,023,243, 5,177,196, 5,188,897, 5,264,423, 5,276,019, 5,278,302, 5,286,717, 5,321,131, 5,399,676, 5,405,939, 5,453,496, 5,455,233, 5,466,677, 5,476,925, 5,519,126,

5,536,821, 5,541,306, 5,550,111, 5,563,253, 5,571,799, 5,587,361, 5,625,050, 및 5,697,248호가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다.

[0246] 그 안 (올리고뉴클레오타이드)에 인 원자를 포함하지 않는 변형된 뉴클레오사이드간 결합 또는 골격의 예는 단쇄 알킬 또는 사이클로알킬 당간 결합, 혼합된 헤테로 원자 및 알킬 또는 사이클로알킬 당간 결합, 또는 하나 또는 그 이상의 단쇄 헤테로 원자성 또는 헤테로사이클릭 당간 결합에 의해서 형성된 골격을 갖는다. 이들에는 모르풀리노 결합을 갖는 것 (부분적으로 뉴클레오사이드의 당 부분으로부터 형성됨); 실옥산 골격; 셀파이드, 셀폭사이드 및 셀폰 골격; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 알켄 함유 골격; 셀파메이트 골격; 메틸렌아미노 및 메틸렌하이드라지노 골격; 셀포네이트 및 셀폰아미드 골격; 아미드 골격; 및 혼합된 N, O, S 및 CH₂ 성분 부분을 갖는 그 밖의 다른 것이 포함된다.

[0247] 상기 올리고뉴클레오타이드의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허에는 각각 본 발명에 참고로 포함된 미국 특허 제5,034,506, 5,166,315, 5,185,444, 5,214,134, 5,216,141, 5,235,033, 5,264,562, 5,264,564, 5,405,938, 5,434,257, 5,466,677, 5,470,967, 5,489,677, 5,541,307, 5,561,225, 5,596,086, 5,602,240, 5,610,289, 5,602,240, 5,608,046, 5,610,289, 5,618,704, 5,623,070, 5,663,312, 5,633,360, 5,677,437, 및 5,677,439호가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다.

[0248] 올리고뉴클레오타이드 모사체의 다른 예에서, 뉴클레오사이드 유니트의 당 및 뉴클레오사이드간 결합, 즉 골격들 다는 신규의 그룹으로 대체될 수 있다. 핵염기 유니트는 적절한 핵산 표적 화합물과의 하이브리드화를 위해서 유지된다. 탁월한 하이브리드화 특성을 갖는 것으로 나타난 한가지의 이러한 올리고뉴클레오타이드인 올리고뉴클레오타이드 모사체는 웹타이드 핵산 (PNA)이라 칭한다. PNA 화합물에서, 올리고뉴클레오타이드의 당-골격은 아미드-함유 골격, 특히 아미노에틸글리신 골격으로 대체된다. 핵염기는 유지되며, 직접 또는 간접적으로 골격의 아미드 부분의 원자에 결합된다. PNA 화합물의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허에는 각각 본 발명에 참고로 포함된 미국 특허 제5,539,082, 5,714,331, 및 5,719,262호가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. PNA 화합물에 대한 추가의 교시내용은 문헌 [Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497]에서 볼 수 있다.

[0249] 본 발명은 추가로, 리보자임을 이용하는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 고도로 특이적인 엔도리보뉴클레아제 활성을 촉진시키는 합성 RNA 문자 및 그의 유도체가 리보자임으로 알려져 있다 [참조: 일반적으로 미국 특허 제5,543,508호 (Haseloff *et al.*) 및 미국 특허 제5,545,729호 (Goodchild *et al.*)]. 분해반응은 RNA 문자 그 자체에 대해서 촉진된다. 천연적으로 존재하는 RNA 문자에서, 자체-촉진된 분해의 부위는 RNA 이차 구조의 고도로 보존된 부분 내에 위치한다 [Buzayan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:8859-62, 1986; Forster *et al.*, *Cell*. 50:9-16, 1987]. 천연적으로 존재하는 자가촉매적 RNA 문자는 고도의 특이성으로 특별한 세포성 또는 병원성 RNA 문자에 대해 표적화될 수 있는 리보자임을 생성하도록 변형될 수 있다. 따라서, 리보자임은 앤티센스 올리고뉴클레오타이드와 동일한 일반적 목적 (즉, 특이적 유전자의 발현의 변조)으로 작용하며, 올리고뉴클레오타이드와 마찬가지로 단일-가닥화의 상당한 부분을 갖는 핵산이다.

[0250] 특정의 경우에, 본 발명에서 제공된 방법에 대해서 사용하기 위한 RNAi 작용체는 비-리간드 그룹에 대해서 변형될 수 있다. 다수의 비-리간드 문자가 올리고뉴클레오타이드의 활성, 세포 분포, 세포 표적화 또는 세포 흡수를 증진시키기 위해서 올리고뉴클레오타이드에 컨주케이트되었으며, 이러한 컨주케이션을 수행하는 절차는 과학 문헌에서 입수할 수 있다. 이러한 비-리간드 부분은 지질 부위, 예를 들어, 콜레스테롤 [Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:6553-56, 1989], 콜산 [Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:1053, 1994], 티오에테르, 예를 들어, 헥실-5-트리틸티올 [Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660:306, 1992; Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 3:2765, 1993], 티오콜레스테롤 [Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20:533, 1992], 지방족 쇄, 예를 들어, 도데칸디올 또는 운데실 잔기 [Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J.* 10:111, 1991; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.* 259:327, 1990; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*. 75:49, 1993], 인지질, 예를 들어, 디-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸암모늄 1,2-디-0-헥사데실-rac-글리세롤-3-H-포스페이트 [Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 36:3651, 1995; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 18:3777, 1990], 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 쇄 [Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*. 14:969, 1995], 또는 아다만탄 아세트산 [Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 36:3651, 1995], 팔미틸 부분 [Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*. 1264:229, 1995], 또는 옥타데실아민 또는 헥실아미노-카보닐-옥시콜레스테롤 부분 [Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277:923, 1996]을 포함하였다. 이러한 올리고뉴클레오타이드 컨주케이트의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 상기에 열거하였다. 전형적인 컨주케이션 프로토콜은 서열의 하나 또는 그 이상의 위치에서 아미노링커를 보유하는 올리고뉴클레오타이드

의 합성을 수반한다. 그 후, 아미노 그룹을 적절한 커플링 또는 활성화 시약을 사용하여 친주게이트될 분자와 반응시킨다. 친주게이트 반응은 여전히 고체 지지체에 결합된 올리고뉴클레오타이드에 의해서, 또는 용액상에서의 올리고뉴클레오타이드의 분해 후에 수행될 수 있다. HPLC에 의한 올리고뉴클레오타이드 친주게이트의 정제는 전형적으로 순수한 친주게이트를 제공한다.

[0251] RNAi 올리고뉴클레오타이드와 같은 변조제의 추가의 예는 참고로 포함되어 있는 미국 특허출원 공개 제 2007/0275465, 2007/0054279, 2006/0287260, 2006/0035254, 2006/0008822호에서 볼 수 있다.

인플루엔자 바이러스 복제의 억제

[0253] 상기에 상세히 기술된 안티센스 화합물은 오르토믹소비리다에 과의 단일-가닥화된 네거티브-센스의 분절화된 RNA 바이러스의 복제를 억제하는데 유용하다. 한가지 구체예에서, 이러한 억제는 이들 바이러스에 의한 숙주 동물의 감염을 치료하는데 효과적이다. 따라서, 방법은 한가지 구체예에서, 바이러스에 의해서 감염된 세포를 특이적 바이러스의 복제를 억제하는데 효과적인 안티센스 작용제와 접촉시키는 것을 포함한다. 이 구체예에서, 안티센스 작용제는 적합한 약제학적 담체 중에서 소정의 바이러스로 감염된 포유동물 대상체, 예를 들어, 인간 또는 가축에게 투여된다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 숙주 내에서 RNA 바이러스의 성장을 정지시키는 것으로 생각된다. RNA 바이러스는 숙주의 정상적인 성장 또는 발육에 거의 또는 전혀 유해한 영향이 없이 수가 감소되거나 제거될 수 있다.

[0254] 실시예에 기술된 바와 같이 본 발명에서는, 인플루엔자 A 바이러스의 M1/M2 유전자 분절 (즉, 분절 7)에 대해서 하이브리드화하도록 디자인된 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머 (PMOs)를 2 가지 동물 모델에서 인플루엔자 바이러스 생산을 억제하는 그들의 능력에 대해서 평가하였다. PMOs는 세포 내로의 도입을 촉진시키도록 짧은 아르기닌-풍부 펩타이드에 친주게이트되었거나, 양이온성 결합을 함유하는 PMOplus™ 화합물로 제조되었다. 상기 화합물은 둘 다 M1/M2 mRNA의 선택적 스플라이스 형태를 사용하여 동일한 AUG 개시 코돈으로부터 발현된 M1 매트릭스 단백질 (M1) 및 이온 채널 단백질 (M2)의 AUG 해독 개시-부위를 표적으로 하였다.

[0255] 본 발명의 M1/M2-AUG 표적화된 안티센스 화합물은 실시예 1에 기술된 바와 같이 H3N2의 마우스 모델에서 바이러스 역가의 억제를 유도하였다. 본 발명의 M1/M2-AUG 표적화된 화합물은 또한, 실시예 2에 기술된 바와 같이 2009H1N1 (S-OIV) 유행성 돼지 독감의 페릿 모델에서 독감 감염의 감소된 임상적 징후 및 코 세척액 내의 감소된 바이러스 역가를 나타내었다. 따라서, 본 발명에 예시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 RNAi 작용제는 바이러스 감염, 주로 오르토믹소비리다에 과의 단일-가닥화된 네거티브-센스의 분절화된 RNA 바이러스에 기인할 수 있는 것의 치료에 사용될 수 있다.

[0256] 본 발명의 구체예는 또한, 병용요법 및 관련된 조성물을 포함한다. 예를 들어, 본 발명에서 제공된 항바이러스 성 (즉, 바이러스-표적화된) 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 RNAi 작용제는 숙주 분자-표적화된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 RNAi 작용제와 함께 사용될 수 있다. 이러한 점에서, 숙주 면역반응 유전자 및/또는 그의 수용체의 안티센스 또는 RNAi 표적화를 사용하여 면역반응을 개선시키고, 이에 대해서 바이러스성이든 박테리아성이든 후속 감염 (예를 들어, 이차 박테리아 감염)을 방지하거나 감소시킬 수 있다. 한가지 예로서, CD200/R/- 마우스는 인플루엔자 감염 후에 패혈증을 발현하지 않는 것으로 나타났다. CD200은 일반적으로 선천적인 면역반응의 하향-조절을 야기하는 선천적인 면역반응의 네거티브 조절제이다. 따라서, 특정한 치료의 방법은 본 발명에 기술된 어느 하나 또는 그 이상의 인플루엔자-표적화된 안티센스 작용제의 투여와 함께 (동시에 또는 별도로) CD200 및/또는 CD200 수용체를 코딩하는 숙주 RNA 분자에 대해서 표적화된 안티센스 및/또는 RNAi 작용제 [참조: 예를 들어, Hatherly et al., *Eur J Immunol.* 34: 1688-94, 2004]를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 기술된 바와 같은 인플루엔자 바이러스에 대해서 표적화된 (예를 들어, 그의 AUG 개시 코돈 또는 스플라이스 부위를 표적으로 하는) 안티센스 또는 RNAi 작용제와 함께 CD200 및/또는 CD200 수용체에 대해서 표적화된 안티센스 또는 RNAi 작용제를 포함하는 조성물이 포함된다. 이들 방법 및 조성물은 독립적인 인플루엔자 바이러스 감염 및/또는 인플루엔자 바이러스 감염과 연관된 이차적인 박테리아 감염 (예를 들어, 연쇄상구균 패렴)을 치료하기 위해서 사용될 수 있다.

[0257] 본 발명의 구체예는 또한, 이차적인 박테리아 감염을 동반한 바이러스 감염 (예를 들어, 인플루엔자 감염)의 치료를 위한 병용요법을 포함한다. 1918-1919년의 인플루엔자 유행병에서 대부분의 사망은 스트렙토코커스 뉴모니아에 (*Streptococcus pneumoniae*)와 같은 통상적인 상기도 감염에 의해서 야기된 이차적인 박테리아성 패렴으로 인한 것이었으며, 2009년의 H1N1 유행병으로부터의 최근의 증거는 이차적인 박테리아 감염이 사망의 중요한 원인으로 존속함을 나타낸다 [참조: 예를 들어, Louie et al., *Clin Infect Disease.* 50:e59-62, 2010; Jain et al., *N Engl J Med.* 361: 1935-44, 2009; Jamieson et al., *Cell Host Microbe.* 7: 103-14, 2010].

연쇄상구균 폐렴에 대한 표준 치료에는 항생제가 포함된다. 일차 항생제에는 페니실린 및 아목시실린과 같은 살균성 베타-락탐 작용제가 포함되며, 제2선의 작용제에는 세팔로스포린이 포함되고, 제3선의 작용제에는 클로람페니콜 또는 클린다마이신이 포함된다. 따라서, 본 발명의 구체예는 주로 인플루엔자 바이러스 감염과 연관된 이차적인 박테리아 감염을 치료 또는 관리하기 위하여, 본 발명에 제공된 하나 또는 그 이상의 인플루엔자-표적화된 안티센스 또는 RNAi 작용제와 함께 하나 또는 그 이상의 정균성 또는 살균성 항생제 (예를 들어, 페니실린, 아목시실린, 세팔로스포린, 클로람페니콜, 클린다마이신)를 투여 (동시에 또는 별도로)하는데 관련된 방법 및 조성물을 포함한다.

[0258] 또 다른 예로서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 RNAi 작용제는 오셀타미비 포스페이트 (타미플루 (TAMIFLU®))와 같은 다른 인플루엔자 바이러스-표적화된 치료제와 함께 투여 (동시에 또는 별도로)될 수 있다. 특정의 관점에서, 하나 또는 그 이상의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, AVI-7100)와 오셀타미비의 조합은 오셀타미비를 단독으로, 또는 항바이러스성 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 단독으로 사용하는 경우에 비해, 인플루엔자 바이러스 역가 및/또는 인플루엔자 바이러스 감염의 그 밖의 다른 증상 (예를 들어, 폐포염, 침윤성 면역세포)을 감소시키는데 있어서 상승적 효과를 달성할 수 있다. 또한, 본 발명에 기술된 바와 같은 인플루엔자 바이러스에 대해서 표적화된 항바이러스성 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 RNAi 작용제와 함께 오셀타미비를 포함하는 조성물이 포함된다. 특정의 구체예에서, 이들 조성물 및 방법은 다른 식으로는 오셀타미비-저항성인 인플루엔자 바이러스 감염의 치료에 사용될 수 있다.

감염제의 확인

[0259] 감염을 야기하는 특이적 바이러스는 본 기술분야에서 공지된 방법, 예를 들어, 혈청학적 또는 배양 방법에 의해서 결정될 수 있다.

[0260] [0261] 혈청학적 확인은 대상체의 생물학적 검체, 예를 들어, 타액, 대변, 소변, 뇌척수액, 혈액 등으로부터 분리된 바이러스 샘플 또는 배양물을 이용한다. 바이러스의 검출을 위한 면역검정은 일반적으로, 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 일상적으로 사용되는 방법, 예를 들어, ELISA 또는 웨스턴 블릿 (Western blot)에 의해서 수행된다. 또한, 특별한 바이러스 스트레이인 또는 종에 대해 특이적인 모노클로날 항체는 종종 상업적으로 입수 할 수 있다.

[0262] 배양 방법은 다양한 배양조건 하에서 성장을 및 형태학과 같은 특징을 비교하는 것을 포함하나, 이들로 제한되지 않는, 기술을 사용함으로써 특별한 타입의 바이러스를 분리 및 확인하기 위해서 사용될 수 있다.

[0263] 감염된 대상체에서 바이러스성 감염제를 확인하기 위한 또 다른 방법은 생물학적 검체로부터 RNA를 분리한 다음에 의심되는 바이러스 작용제, 예를 들어, 계절성 H1N1 인플루엔자, 유행성 H1N1 S-OIV, H5N1 조류 인플루엔자 또는 H3N2 돼지 인플루엔자를 표적으로 하는 특이적 PCR 프라이머를 사용한 핵산 증폭을 이용한다.

제제화 및 투여

[0264] [0265] 특정의 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 기술된 바와 같은 안티센스 올리고머의 치료학적 송달에 적합한 제제 또는 조성물을 제공한다. 따라서, 특정의 구체예에서 본 발명은 하나 또는 그 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 (첨가제) 및/또는 희석제와 함께 제제화된, 본 발명에 기술된 하나 또는 그 이상의 올리고머의 치료학적 유효량을 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물을 제공한다. 본 발명의 올리고머는 단독으로 투여될 수도 있지만, 상기 화합물은 약제학적 제제 (조성물)로 투여하는 것이 바람직하다.

[0266] 핵산 분자를 송달하는 방법은 예를 들어, 문헌 [Akhtar *et al.*, 1992, *Trends Cell Bio.*, 2:139; 및 *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*, ed. Akhtar; Sullivan *et al.*, PCT WO 94/02595]에 기술되어 있다. 이들 및 그 밖의 다른 프로토콜은 본 발명의 분리된 올리고머를 포함한 거의 모든 핵산 분자의 송달에 이용될 수 있다.

[0267] 이하에 상세히 설명되는 바와 같이, 본 발명의 약제학적 조성물은 다음의 경우에 적합한 것을 포함한 고체 또는 액체 형태로 투여하기 위해서 특별하게 제제화될 수 있다: (1) 경구 투여, 예를 들어, 드렌치 (drenches) (수성 또는 비-수성 용액 또는 혼탁액), 정제, 예를 들어, 협측 (buccal), 설하 및 전신적 흡수를 위해서 표적화된 것, 볼루스 (boluses), 분말, 과립, 혀에 적용하기 위한 페이스트; (2) 예를 들어, 멸균 용액 또는 혼탁액 또는 서방성 제제로서 비경구 투여, 예를 들어, 피하, 근육내, 정맥내 또는 경막외 주사; (3) 예를 들어, 크림, 연고, 또는 조절-방출 패치 또는 피부에 적용되는 스프레이로서 국소 적용; (4) 예를 들어, 페사리 (pessary), 크림 또는 포움 (foam)으로서 질내 또는 직장내 투여; (5) 설하 투여; (6) 안내 투여; (7) 경피 투여; 또는 (8)

비내 투여.

[0268] 문구 "약제학적으로 허용되는"은 본 발명에서, 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 합리적인 유익/위험비와 균형이 잡힌, 과도한 독성, 자극, 알레르기반응 또는 그 밖의 다른 문제 또는 합병증이 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉시켜 사용하는데 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투약형을 나타내기 위해서 사용된다.

[0269] 본 발명에서 사용된 것으로서 문구 "약제학적으로 허용되는 담체"는 대상 화합물을 신체의 하나의 기관 또는 일부분으로부터 신체의 또 다른 기관 또는 일부분에 운반하거나 수송하는데 관여하는 액체 또는 고체 충진제, 희석제, 부형제, 제조 보조제 (예를 들어, 윤활제, 탈크, 마그네슘, 칼슘 또는 아연 스테아레이트 또는 스테아르산), 또는 용매 캡슐화 물질과 같은 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비허리를 의미한다. 각각의 담체는 제제의 다른 성분과 호환성이 있고 환자에게 해롭지 않아야 한다는 의미에서 반드시 "허용되어야" 한다.

[0270] 약제학적으로 허용되는 담체로 작용할 수 있는 물질의 일부의 예로는 (1) 락토즈, 글루코즈 및 슈크로즈와 같은 당류; (2) 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분; (3) 셀룰로즈, 및 나트륨 카복시메틸 셀룰로즈, 에틸 셀룰로즈 및 셀룰로즈 아세테이트와 같은 그의 유도체; (4) 분말상 트라가칸트; (5) 맥아; (6) 젤라틴; (7) 탈크; (8) 코코아 버터 및 콩제 왁스와 같은 부형제; (9) 낙화생유, 면실유, 잇꽃유, 호마유, 올리브유, 옥수수유 및 대두유와 같은 오일; (10) 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜; (11) 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리올; (12) 에틸 올리에이트 및 에틸 라우레이트와 같은 에스테르; (13) 한천; (14) 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄과 같은 완충제; (15) 알진산; (16) 발열성 물질이 없는 물; (17) 등장성 식염수; (18) 렇거용액; (19) 에틸 알콜; (20) pH 완충 용액; (21) 폴리에스테르, 폴리카보네이트 및/또는 폴리안하이드라이드; 및 (22) 약제학적 제제에서 사용되는 그 밖의 다른 비-독성 호환성 물질이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다.

[0271] 본 발명의 안티센스 올리고머를 사용하여 제제화하는데 적합한 물질의 비-제한적인 추가의 예로는 다음이 포함된다: 다양한 조직 내로의 약물의 도입을 증진시킬 수 있는 PEG 컨주케이트된 핵산, 인지질 컨주케이트된 핵산, 친유성 부분을 함유하는 핵산, 포스포로티오에이트, P-당단백질 억제제 (예를 들어, 플루로닉 (Pluronic) P85); 이식 후에 서방출성 송달을 위한 폴리 (DL-락티드-코글리콜리드) 미립구 [Emerich, DF *et al.*, *Cell Transplant.* 8:47-58, 1999; Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.]와 같은 생물분해성 폴리머; 및 약물을 혈뇌장벽을 가로질러서 송달할 수 있고, 뉴론 흡수 기전을 변화시킬 수 있는 폴리부틸시아노아크릴레이트로 만들어진 것과 같은 부하된 나노입자 [Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999].

[0272] 본 발명은 또한, 폴리 (에틸렌 글리콜) 지질을 함유하는 표면-변형된 리포좀 (PEG-변형된 분지되거나 분지되지 않거나, 그의 조합이거나, 장기-순환 리포좀 또는 스텔스 (stealth) 리포좀)의 사용을 특징으로 한다. 본 발명의 올리고머는 또한, 다양한 문자 중량의 공유적으로 부착된 PEG 문자를 포함할 수 있다. 이들 제제는 표적 조직에서 약물의 축적을 증가시키는 방법을 제공한다. 이러한 클래스의 약물 담체는 단핵성 식세포 시스템 (MPS 또는 RES)에 의한 읍소닌화 (opsonization) 및 제거에 저항함으로써 캡슐화된 약물의 더 긴 혈액 순환시간 및 증진된 조직 노출을 가능하게 한다 [Lasic *et al.*, *Chem. Rev.* 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43, 1005-1011]. 이러한 리포좀은 아마도 혈관신생된 표적 조직에서의 혈관외유출 및 포획에 의해 종양 내에 선택적으로 축적하는 것으로 나타났다 [Lasic *et al.*, *Science.* 267:1275-1276, 1995; Oku *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1238:86-90, 1995]. 장기-순환 리포좀은 특히 MPS의 조직 내에 축적하는 것으로 알려진 통상적인 양이온성 리포좀에 비해서 DNA 및 RNA의 약력학 및 약동학을 증진시킨다 [Liu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 42:24864-24870, 1995; Choi *et al.*, 국제 PCT 공개 제WO 96/10391호; Ansell *et al.*, 국제 PCT 공개 제WO 96/10390호; Holland *et al.*, 국제 PCT 공개 제WO 96/10392호]. 장기-순환 리포좀은 또한, 간 및 비장과 같은 대사적으로 공격성인 MPS 조직 내에서의 축적을 피하는 그들의 능력을 기초로 하여 양이온성 폴리머에 비해 더 큰 정도로 뉴클레아제 분해로부터 약물을 보호할 것 같다.

[0273] 추가의 구체예에서, 본 발명은 미국 특허 제6,692,911, 7,163,695 및 7,070,807호에 기술된 바와 같은 송달을 위해서 제조된 올리고머 조성물을 포함한다. 이에 관해서, 한가지 구체예에서 본 발명은 미국 특허 제7,163,695, 7,070,807, 및 6,692,911호에 기술된 바와 같이 리신과 히스티딘 (HK)의 코폴리머를 단독으로 또는 PEG (예를 들어, 분지되거나 분지되지 않은 PEG 또는 둘 다의 혼합물)와 함께, PEG 및 표적화 부분과 함께, 또는 전술한 것 중의 어떤 것을 교차결합제와 함께 포함하는 조성물 내의 본 발명의 올리고머를 제공한다. 특정의 구체예에서, 본 발명은 글루콘산-변형된 폴리히스티딘 또는 글루코닐화된-폴리히스티딘/트랜스페린-폴리리신을 포함하는 조성물 내의 안티센스 올리고머를 제공한다. 본 기술분야에서 숙련된 전문가는 또한, His 및 Lys와 유사한 특성을 갖는 아미노산이 조성물 내에서 치환될 수 있음을 인식할 것이다.

[0274] 본 발명에 기술된 올리고머의 특정의 구체예는 아미노 또는 알킬아미노와 같은 염기성 작용 그룹을 함유할 수

있으며, 따라서 약제학적으로 허용되는 산과의 약제학적으로 허용되는 염을 형성할 수 있다. 이에 관해서 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 본 발명의 화합물의 비교적 비-독성인 무기 및 유기 산부가염을 나타낸다. 이들 염은 투여 비히를 또는 투약형 제조공정 자체에서, 또는 별도로 그의 유리 염기 형태인 본 발명의 정제된 화합물을 적합한 유기 또는 무기 산과 반응시키고, 후속 정제 중에 이렇게 형성된 염을 분리시킴으로써 제조될 수 있다. 대표적인 염에는 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 셀페이트, 비설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 아세테이트, 발레레이트, 올리에이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 라우레이트, 벤조에이트, 락테이트, 포스페이트, 토실레이트, 시트레이트, 말리에이트, 푸마레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 나프틸레이트, 메실레이트, 글루코헵토네이트, 락토비오네이트 및 라우릴설포네이트 염 등이 포함된다 [참조: 예를 들어, Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 66:1-19, 1977].

[0275] 본 발명의 올리고머의 약제학적으로 허용되는 염에는 예를 들어, 비-독성 유기 또는 무기산으로부터의 화합물의 통상적인 비독성 염 또는 4급 암모늄염이 포함된다. 예를 들어, 이러한 통상적인 비독성 염에는 염산, 브롬화수소산, 황산, 설판산, 인산, 질산 등과 같은 무기산으로부터 유도된 것; 및 아세트산, 프로피온산, 석신산, 글리콜산, 스테아르산, 락트산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르브산, 팔미트산, 말레산, 하이드록시말레산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 설판산, 2-아세톡시벤조산, 푸마르산, 톨루엔설폰산, 메탄설폰산, 에탄디설폰산, 옥살산, 이소티온산 등과 같은 유기산으로부터 제조된 염이 포함된다.

[0276] 특정의 구체예에서, 본 발명의 올리고머는 하나 또는 그 이상의 산성 작용 그룹을 함유할 수 있으며, 따라서 약제학적으로 허용되는 염기와의 약제학적으로 허용되는 염을 형성할 수 있다. 이들 경우에 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 본 발명의 화합물의 비교적 비-독성인 무기 및 유기 염기 부가염을 나타낸다. 이들 염은 마찬가지로 투여 비히를 또는 투약형 제조공정 자체에서, 또는 별도로 그의 유리산 형태인 정제된 화합물을 약제학적으로 허용되는 금속 양이온의 하이드록사이드, 카보네이트 또는 비카보네이트, 암모니아, 또는 약제학적으로 허용되는 유기 일급, 이급 또는 삼급 아민과 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리토염에는 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 및 알루미늄 염 등이 포함된다. 염기 부가염의 형성에 유용한 대표적인 유기 아민에는 에틸아민, 디에틸아민, 에틸렌디아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페라진 등이 포함된다 [참조: 예를 들어, Berge *et al.*, *supra*].

[0277] 나트륨 라우릴 셀페이트 및 마그네슘 스테아레이트와 같은 습윤제, 유화제 및 윤활제뿐만 아니라 착색제, 이형제, 코팅제, 감미제, 방향제 및 향료, 보존제 및 항산화제가 또한 조성물 내에 존재할 수 있다.

[0278] 약제학적으로 허용되는 항산화제의 예로는 다음이 포함된다: (1) 아스코르빈산, 시스테인 하이드로클로라이드, 나트륨 비설페이트, 나트륨 메타비설판아이트, 나트륨 셀파이트 등과 같은 수용성 항산화제; (2) 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔 (BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등과 같은 유용성 항산화제; 및 (3) 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등과 같은 금속 칼레이트화제.

[0279] 본 발명의 제제에는 경구, 비내, 국소 (협측 및 설하 포함), 직장, 질내 및/또는 비경구 투여에 적합한 것이 포함된다. 제제들은 통상적으로 단위 투약형으로 제공될 수 있으며, 약제학의 분야에서 잘 알려진 어떤 방법에 의해서라도 제조될 수 있다. 단일 투약형을 생산하기 위해서 담체 물질과 조합될 수 있는 활성성분의 양은 치료될 숙주, 특별한 투여의 모드에 따라 달라질 수 있다. 단일 투약형을 생산하기 위해서 담체 물질과 조합될 수 있는 활성성분의 양은 일반적으로 치료학적 효과를 제공하는 화합물의 양일 것이다. 일반적으로, 100% 중에서 이 양은 약 0.1% 내지 약 99%의 활성성분, 바람직하게는 약 5% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 약 10% 내지 약 30%의 범위일 수 있다.

[0280] 특정의 구체예에서, 본 발명의 제제는 사이클로덱스트린, 셀룰로즈, 리포倨, 미셀 형성제, 예를 들어, 담즙산, 및 폴리머성 담체, 예를 들어, 폴리에스테르 및 폴리안하이드라이드로부터 선택된 부형제; 및 본 발명의 올리고머를 포함한다. 특정의 구체예에서, 전술한 제제는 본 발명의 올리고머를 경구적으로 생체이용가능하도록 만든다.

[0281] 이들 제제 또는 조성물을 제조하는 방법은 본 발명의 올리고머를 담체 및 임의로 하나 또는 그 이상의 보조 성분들과 회합하도록 하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제제는 본 발명의 화합물과 액체 담체 또는 미세하게 분할된 고체 담체, 또는 둘 다를 균일하고 긴밀하게 회합하도록 한 다음에, 필요한 경우에 생성물을 성형시킴으로써 제조된다.

[0282] 경구 투여에 적합한 본 발명의 제제는 각각 활성성분으로서 예정된 양의 본 발명의 화합물을 함유하는 캡슐제,

카세제 (cachets), 환제, 정제, 로젠지 (lozenges) (방향성 기제, 통상적으로 슈크로즈 및 아카시아 또는 트라가칸트를 사용), 분말, 과립의 형태로, 또는 수성 또는 비수성 액체 중의 용액 또는 혼탁액으로서, 또는 수중유 또는 유중수 에멀션으로서, 또는 엘릭서 또는 시럽제로서, 또는 파스틸 (pastilles) (젤라틴 및 글리세린, 또는 슈크로즈 및 아카시아과 같은 불활성 기제를 사용)로서, 및/또는 함수제 등으로 존재할 수 있다. 본 발명의 울리고머는 또한 블루스, 지제 (electuary) 또는 페이스트로 투여될 수도 있다.

[0283] 경구 투여를 위한 본 발명의 고체 투약형 (캡슐제, 정제, 환제, 당의정, 분말, 과립, 트로치 등)에서, 활성성분은 나트륨 시트레이트 또는 디칼슘 포스페이트와 같은 하나 또는 그 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 및/또는 다음 중의 어느 하나와 혼합될 수 있다: (1) 전분, 락토즈, 슈크로즈, 글루코즈, 만니톨 및/또는 규산과 같은 충진제 또는 증량제; (2) 예를 들어, 카복시메틸셀룰로즈, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 슈크로즈 및/또는 아카시아와 같은 결합제; (3) 글리세롤과 같은 보습제 (humectants); (4) 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정의 실리케이트 및 탄산나트륨과 같은 봉해제; (5) 파라핀과 같은 용해지연제; (6) 4급 암모늄 화합물과 같은 흡수 충진제 및 폴록사며 및 나트륨 라우릴 설페이트와 같은 계면활성제; (7) 예를 들어, 세틸 알콜, 글리세롤 모노스테아레이트 및 비-이온성 계면활성제와 같은 습윤제; (8) 카올린 및 벤토나이트 점토와 같은 흡수제; (9) 탈크, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 설페이트, 아연 스테아레이트, 나트륨 스테아레이트, 스테아르산, 및 이들의 혼합물과 같은 윤활제; (10) 착색제; 및 (11) 크로스포비돈 또는 에틸 셀룰로즈와 같은 조절 방출제. 캡슐제, 정제 및 환제의 경우에, 약제학적 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 타입의 고체 조성물은 또한 락토즈 또는 유당과 같은 부형제뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용한 연질 및 경질-외피 젤라틴 캡슐제 내의 충진제로서 이용될 수 있다.

[0284] 정제는 임의로 하나 또는 그 이상의 보조 성분과 함께 압축 또는 성형함으로써 제조될 수 있다. 압축된 정제는 결합제 (예를 들어, 젤라틴 또는 하이드록시프로필메틸 셀룰로즈), 윤활제, 불활성 희석제, 보존제, 봉해제 (예를 들어, 나트륨 전분 글리콜레이트 또는 교차결합된 나트륨 카복시메틸 셀룰로즈), 표면-활성 또는 분산제를 사용하여 제조될 수 있다. 성형된 정제는 불활성 액체 희석제로 습윤된 분말상 화합물의 혼합물을 적합한 기계 내에서 성형함으로써 제조될 수 있다.

[0285] 정제, 및 당의정, 캡슐제, 환제 및 과립제와 같은 본 발명의 약제학적 조성물의 그 밖의 다른 고체 투약형은 임의로 할선이 그어질 수 있거나, 장용성 코팅 및 약제학적-제제화 기술분야에서 잘 알려진 그 밖의 다른 코팅과 같은 코팅 및 외피를 사용하여 제조될 수 있다. 이들은 또한 예를 들어, 원하는 방출 프로필을 제공하는 다양한 비율의 하이드록시프로필메틸 셀룰로즈, 그 밖의 다른 폴리머 매트릭스, 리포좀 및/또는 미립구를 사용하여 그 안의 활성성분의 서방출 또는 조절방출을 제공하도록 제제화될 수도 있다. 이들은 속방출을 위해서 제제화될 수 있으며, 예를 들어, 동결건조될 수 있다. 이들은 예를 들어, 박테리아-보유 필터를 통해서 여과하거나, 사용하기 직전에 멸균수 또는 일부의 다른 멸균 주사용 매질에 용해될 수 있는 멸균 고체 조성물의 형태로 살균제를 혼입시킴으로써 살균시킬 수 있다. 이들 조성물은 또한, 임의로 불투명화제를 함유할 수 있으며, 이들이 활성성분(들)을 단지 또는 선택적으로 위장관의 특정 부분에서, 임의로 지연된 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 포매 조성물의 예로는 폴리머성 성분 및 왁스가 포함된다. 활성성분은 또한, 적절하다면 하나 또는 그 이상의 상술한 부형제와 함께 마이크로-캡슐화된 형태일 수도 있다.

[0286] 본 발명의 화합물의 경구 투여를 위한 액체 투약형에는 약제학적으로 허용되는 에멀션, 마이크로에멀션, 용액, 혼탁액, 시럽 및 엘릭서가 포함된다. 활성성분 이외에도 액체 투약형은 예를 들어, 물 또는 그 밖의 다른 용매와 같은 본 기술분야에서 통상적으로 사용되는 불활성 희석제, 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유 및 호마유), 글리세롤, 테트라하이드로푸릴 알콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르와 같은 가용화제 및 유화제, 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다.

[0287] 불활성 희석제 이외에도 경구용 조성물은 또한 습윤제, 유화 및 혼탁화제, 감미제, 방향제, 착색제, 향료 및 보존제와 같은 보조제를 포함할 수 있다.

[0288] 혼탁액은 활성 화합물 이외에도 예를 들어, 에톡실화 이소스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미세결정성 셀룰로즈, 미세결정성 셀룰로즈, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 한천-한천 및 트라가칸트 및 이들의 혼합물과 같은 혼탁화제를 함유할 수 있다.

[0289] 직장 또는 질내 투여를 위한 제제는 하나 또는 그 이상의 본 발명의 화합물과 예를 들어, 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌제 왁스 또는 살리실레이트를 포함하는 하나 또는 그 이상의 적합한 비자극성 부형제를 혼합시

김으로써 제조될 수 있으며, 실온에서는 고체이지만 체온에서 액체이며, 따라서 직장 또는 질강 내에서 용융하여 활성 화합물을 방출하는 좌제로 제공될 수 있다.

[0290] 본 발명에서 제공된 올리고머의 국소 또는 경피 투여를 위한 제제 또는 투약형에는 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제가 포함된다. 활성 올리고머를 멸균 조건 하에서 약제학적으로 허용되는 담체, 및 필요할 수 있는 모든 보존제, 완충제, 또는 추진제와 혼합시킬 수 있다. 연고, 페이스트, 크림 및 젤은 본 발명의 활성 화합물 이외에도 동물 및 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로즈 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 탈크 및 산화아연, 또는 이들의 혼합물과 같은 부형제를 함유할 수 있다.

[0291] 분말 및 스프레이는 본 발명의 올리고머 이외에도 락토즈, 탈크, 규산, 수산화알루미늄, 칼슘 실리케이트 및 폴리아미드 분말과 같은 부형제, 또는 이들 성분의 혼합물을 함유할 수 있다. 스프레이는 추가로, 클로로플루오로하이드로카본 및 부탄 및 프로판과 같은 휘발성의 비치환된 탄화수소와 같은 통상적인 추진제를 함유할 수 있다.

[0292] 경피용 패치는 신체에 대한 본 발명의 올리고머의 조절 방출을 제공하는 추가의 이점을 갖는다. 이러한 투약형은 올리고머를 적절한 매질에 용해 또는 분산시킴으로써 제조될 수 있다. 흡수 증진제는 또한, 피부를 가로지르는 약제의 유동 (flux)을 증가시키기 위해서 사용될 수 있다. 이러한 유동의 비율은 본 기술분야에서 공지된 다른 방법들 중에서도 특히, 속도 조절막을 제공하거나 약제를 폴리머 매트릭스 또는 젤에 분산시킴으로써 조절될 수 있다.

[0293] 비경구 투여에 적합한 약제학적 조성물은 본 발명의 올리고머를 당, 알콜, 항산화제, 완충제, 정균제, 목적하는 수용주의 혈액과 등장성인 제제를 제공하는 용질, 또는 혼탁화 또는 농조화제를 함유할 수 있는, 하나 또는 그 이상의 약제학적으로 허용되는 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 혼탁액 또는 에멀션, 또는 사용하기 직전에 멸균 주사용 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있는 멸균 분말과 함께 본 발명의 하나 또는 그 이상의 올리고머를 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예로는 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물, 올리브유와 같은 식물성 오일, 및 에틸 올리브에이트와 같은 주사용 유기 에스테르가 포함된다. 적절한 유도성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질의 사용, 분산액의 경우에 필요한 입자 크기의 유지, 및 계면활성제의 사용에 의해서 유지될 수 있다.

[0294] 이들 조성물은 또한, 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수도 있다. 대상 올리고머에 대한 미생물의 작용의 예방은 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르보산 등을 포함시킴으로써 보장될 수 있다. 또한 당류, 염화나트륨 등과 같은 등장성 성분을 조성물 내에 포함시키는 것이 바람직할 수도 있다. 또한, 주사용 약제학적 형태의 장시간 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같이 흡수를 지연시키는 성분을 포함시킴으로써 유도될 수 있다.

[0295] 일부의 경우에는, 약물의 효과를 연장시키기 위해서 피하 또는 근육내 주사로부터 약물의 흡수를 느리게 하는 것이 바람직하다. 이것은 본 기술분야에서 공지된 다른 방법들 중에서 열등한 수용성을 갖는 결정성 또는 무정형 물질의 액체 혼탁액을 사용함으로써 수행될 수 있다. 따라서, 약물의 흡수율은 그의 용해율에 따라 좌우되며, 이 용해율은 다시 결정 크기 및 결정성 형태에 따라 좌우될 수 있다. 대신으로, 비경구적으로 투여된 약물 형태의 지연된 흡수는 약물을 오일 비허를 내에 용해 또는 혼탁시킴으로써 성취된다.

[0296] 주사용 데포 (depot) 형태는 폴리락티드-폴리글리콜리드와 같은 생물분해성 폴리머 내의 본 발명의 올리고머의 마이크로캡슐화 매트릭스를 형성시킴으로써 제조될 수 있다. 폴리머에 대한 올리고머의 비율, 및 사용된 특별한 폴리머의 성질에 따라서, 올리고머 방출율이 조절될 수 있다. 그 밖의 다른 생물분해성 폴리머의 예로는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(안하이드라이드)가 포함된다. 데포 주사용 제제는 또한 약물을 체조직과 호환적인 리포좀 또는 마이크로에멀션 내에 포집 (entrapping)시킴으로써 제조될 수도 있다.

[0297] 본 발명의 올리고머가 인간 및 동물에게 약제로서 투여되는 경우에, 이들은 그 자체로, 또는 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 0.1 내지 99% (더욱 바람직하게는, 10 내지 30%)의 활성성분을 함유하는 약제학적 조성물로서 제공될 수 있다.

[0298] 상기 언급한 바와 같이, 본 발명의 제형 또는 제제는 경구, 비경구, 국소 또는 직장으로 제공될 수 있다. 이들은 전형적으로, 각각의 투여 경로에 적합한 형태로 제공된다. 예를 들어, 이들은 정제 또는 캡슐제로, 주사, 흡입, 안 로션, 연고, 좌제 등의 투여에 의해서, 주사, 주입 또는 흡입에 의해서, 로션 또는 연고에 의한 국소

투여; 및 좌제에 의한 직장 투여로 제공된다.

[0299] 본 발명에서 사용된 것으로서 문구 "비경구적 투여" 및 "비경구적으로 투여된"은 통상적으로 주사에 의한 것으로서, 장내 및 국소 투여 이외의 투여의 모드를 의미하며, 정맥내, 근육내, 동맥내, 초내, 낭내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내 및 흉골내 주사 및 주입이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다.

[0300] 본 발명에서 사용된 것으로서 문구 "전신 투여", "전신적으로 투여된", "말초 투여" 및 "말초적으로 투여된"은 화합물, 약물 또는 그 밖의 다른 물질을 중추신경계에 직접 투여하는 것이 아니라 이것이 환자의 시스템 내로 도입되고, 따라서 대사 및 그 밖의 다른 유사한 과정의 대상이 되도록 투여하는 것, 예를 들어, 피하 투여를 의미한다.

[0301] 선택된 투여의 경로와는 무관하게, 적합한 수화된 형태 및/또는 본 발명의 약제학적 조성물로 사용될 수 있는 본 발명의 올리고머는 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 공지된 통상적인 방법에 의해서 약제학적으로 허용되는 형태로 제제화될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물 내의 활성성분의 실제 투약량 레벨은 환자에 대한 허용할 수 없는 독성이 없이 특별한 환자, 조성물 및 투여의 모드에 대한 바람직한 치료학적 반응을 달성하는데 효과적인 활성성분의 양을 수득하도록 변화될 수 있다.

[0302] 선택된 투약량 레벨은 사용된 본 발명의 특별한 올리고머, 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여의 경로, 투여의 시간, 사용된 특별한 올리고머의 배설 또는 대사의 속도, 흡수의 속도 및 정도, 치료의 지속기간, 사용된 특별한 올리고머와 함께 사용되는 그 밖의 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료될 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 이전의 병력, 및 의학분야에서 잘 알려진 유사한 인자를 포함하는 다양한 인자에 따라 좌우될 것이다.

[0303] 본 기술분야에서 통상적으로 숙련된 의사 또는 수의사는 필요한 약제학적 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 원하는 치료학적 효과를 달성하기 위해서 필요한 것보다 더 낮은 레벨로 약제학적 조성물에서 사용된 본 발명의 화합물의 용량으로 시작하고, 원하는 효과가 달성될 때까지 투약량을 점진적으로 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 화합물의 적합한 1일 용량은 치료학적 효과를 제공하는데 효과적인 최저 용량인 화합물의 양일 것이다. 이러한 유효 용량은 일반적으로 상술한 인자들에 따라 좌우될 것이다. 일반적으로, 지시된 효과를 위해서 사용되는 경우에 환자에 대한 본 발명의 화합물의 경구, 정맥내, 뇌실내 및 피하 용량은 1일에 체중 킬로그램당 약 0.0001 내지 약 100 mg의 범위일 것이다.

[0304] 바람직하다면, 활성 화합물의 효과적인 1일 용량은 1일 전체에 걸쳐서 적절한 간격을 두고 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 분할-용량 (sub-dose)으로 개별적으로, 임의로 단위 투약형으로 투여될 수 있다. 특정한 상황에서, 투약은 1일에 1 회 투여이다. 특정의 구체예에서, 투약은 인플루엔자 바이러스 복제를 감소시키기 위해서 필요에 따라 매 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 일, 또는 매 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 주일, 또는 매 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 개월당 1 회 또는 그 이상의 투여이다.

[0305] 핵산 분자는 본 발명에 기술되고 본 기술분야에서 공지된 바와 같이, 리포좀 내에 캡셀화, 이온포레시스 (iontophoresis), 또는 하이드로겔, 사이클로텍스트린, 생물분해성 나노캡셀 및 생체부착성 미립구와 같은 그 밖의 다른 비히를 내로의 혼입을 포함하는 본 기술분야에서 친숙한 전문가에게 공지된 다양한 방법에 의해서 세포에 투여될 수 있다. 특정의 구체예에서, 마이크로에멀션화 기술을 사용하여 친유성 (수불용성) 약제학적 작용제의 생체이용율을 개선시킬 수 있다. 예로는 트리메트린 [Dordunoo, S. K., et al., *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17:1685-1713, 1991] 및 REV 5901 [Sheen, P. C., et al., *J Pharm Sci.* 80:712-714, 1991]가 포함된다. 다른 이점들 중에서도 마이크로에멀션화는 순환계 대신에 림프계에 대한 흡수를 선택적으로 유도하고, 이에 의해서 간을 우회하고, 간담도 순환에서 화합물의 파괴를 방지함으로써 증진된 생체이용율을 제공한다.

[0306] 본 발명의 한가지 관점에서, 제제는 본 발명에서 제공된 올리고머 및 적어도 하나 양친매성 담체로부터 형성된 미셀을 함유하며, 여기에서 상기 미셀은 약 100 nm 미만의 평균 직경을 갖는다. 더욱 바람직한 구체예는 약 50 nm 미만의 평균 직경을 갖는 미셀을 제공하며, 더 더욱 바람직한 구체예는 약 30 nm 미만, 또는 약 20 nm 미만 까지의 평균 직경을 갖는 미셀을 제공한다.

[0307] 모든 적합한 양친매성 담체가 고려되지만, 현재 바람직한 담체는 일반적으로 GRAS (Generally-Recognized-as-Safe) 상태를 갖는 것, 및 본 발명의 화합물을 가용화시킬 뿐만 아니라 용액이 캠플렉스 수성상 (예를 들어, 인간 위장관 내에 존재하는 것)과 접촉하는 경우에 이것을 후속 단계에서 마이크로에멀션화시키는 것이다. 통상

적으로, 이들 필요조건을 충족하는 양친매성 성분은 2-20의 HLB (친수성 대 친유성 평형) 값을 가지며, 이들의 구조는 C-6 내지 C-20 범위의 직쇄 지방족 래디칼을 함유한다. 그의 예는 폴리에틸렌-글리콜화된 지방 글리세라이드 및 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0308] 양친매성 담체의 예로는 완전히 또는 부분적으로 수소화된 다양한 식물성 오일로부터 수득된 것과 같은 포화 및 단일불포화된 폴리에틸렌글리콜화 지방산 글리세라이드가 포함된다. 이러한 오일은 유리하게는 트리-, 디-, 및 모노-지방산 글리세라이드 및 상응하는 지방산의 디- 및 모노-폴리에틸렌글리콜 에스테르로 구성될 수 있으며, 여기에서 특히 바람직한 지방산 조성은 카프르산 4-10%, 카프르산 3-9%, 라우르산 40-50%, 미리스트산 14-24%, 팔미트산 4-14% 및 스테아르산 5-15%를 포함한다. 또 다른 유용한 클래스의 양친매성 담체에는 포화 또는 단일-불포화된 지방산 (SPAN-계열) 또는 상응하는 에톡실화 유사체 (TWEEN-계열)에 의한 부분적으로 에스테르화된 소르비탄 및/또는 소르비톨이 포함된다.

[0309] 겔루서 (Gelucire)-계열, 라브라필 (Labrafil), 라브라솔 (Labrasol), 또는 라우로글리콜 (Lauroglycol) (이들은 모두 Gattefosse Corporation, Saint Priest, France에 의해서 제조 및 배포됨), PEG-모노-올리에이트, PEG-디-올리에이트, PEG-모노-라우레이트 및 디-라우레이트, 레시틴, 폴리소르베이트 80 등 (미국 및 세계적으로 다수의 회사에 의해서 생산 및 배포됨)을 포함하는 상업적으로 입수할 수 있는 양친매성 담체가 특히 유용할 수 있다.

[0310] 특정의 구체예에서, 송달은 적합한 숙주 세포 내로 본 발명의 조성물을 도입시키기 위해서 리포좀, 나노캡셀, 미립자, 미립구, 지질 입자, 소포체 등을 사용하여 일어날 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 지질 입자, 리포좀, 소포체, 나노구, 나노입자 등에 캡슐화되는 등으로 송달을 위해서 제제화될 수 있다. 이러한 송달 비히클의 제제화 사용은 공지되고 통상적인 기술을 사용하여 수행될 수 있다.

[0311] 본 발명에서 사용하기에 적합한 친수성 폴리머는 쉽게 수용성이며, 소포-형성 지질에 공유적으로 부착될 수 있으며, 독성 효과가 없이 생체내에서 허용되는 (즉, 생체적합성인) 곳이다. 적합한 폴리머에는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리락트산 (또한 폴리락티드로 칭함), 폴리글리콜산 (또한 폴리글리콜라이드라 칭함), 폴리락트산-폴리글리콜산 코폴리머, 및 폴리비닐 알콜이 포함된다. 특정의 구체예에서, 폴리머는 약 100 또는 120 달톤, 약 5,000 또는 10,000 달톤까지, 또는 약 300 달톤 내지 약 5,000 달톤의 분자량을 갖는다. 다른 구체예에서, 폴리머는 약 100 내지 약 5,000 달톤의 분자량을 갖거나 약 300 내지 약 5,000 달톤의 분자량을 갖는 폴리에틸렌글리콜이다. 특정의 구체예에서, 폴리머는 750 달톤의 폴리에틸렌글리콜 (PEG(750))이다. 폴리머는 또한, 그 안의 모노머의 수에 의해서 규정될 수 있다; 본 발명의 바람직한 구체에는 3 개의 모노머로 구성된 PEG 폴리머 (약 150 달톤)와 같은 적어도 약 3 개의 모노머의 폴리머를 이용한다.

[0312] 본 발명에서 사용하기에 적합할 수 있는 그 밖의 다른 친수성 폴리머에는 폴리비닐피롤리돈, 폴리메톡사졸린, 폴리에틸옥사졸린, 폴리하이드록시프로필 메타크릴아미드, 폴리메타크릴아미드, 폴리디메틸아크릴아미드, 및 하이드록시메틸셀룰로즈 또는 하이드록시에틸셀룰로즈와 같은 유도체화된 셀룰로즈가 포함된다.

[0313] 특정의 구체예에서, 본 발명의 제제는 폴리아미드, 폴리카보네이트, 폴리알킬렌, 아크릴 및 메타크릴 에스테르의 폴리머, 폴리비닐 폴리머, 폴리글리콜라이드, 폴리실옥산, 폴리우레탄 및 그의 코폴리머, 셀룰로즈, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리스티렌, 락트산 및 글리콜산의 폴리머, 폴리안하이드라이드, 폴리(오르토)에스테르, 폴리(부티르산), 폴리(발레르산), 폴리(락티드-코-카프로락톤), 폴리사카라이드, 단백질, 폴리히알우론산, 폴리시아노아크릴레이트, 및 이들의 블렌드, 혼합물 또는 코폴리머로 구성된 그룹으로부터 선택된 생체적합성 폴리머를 포함한다.

[0314] 사이클로텍스트린은 각각 그리스 문자 α , β 또는 γ 로 지정되는 6, 7 또는 8 개의 글루코즈 유니트로 구성된 사이클릭 올리고사카라이드이다. 글루코즈 유니트는 α -1,4-글루코시드 결합에 의해서 연결된다. 당 유니트의 의자 형태로 인하여 모든 이차 하이드록실 그룹 (C-2, C-3에서)은 환의 한쪽 측면 상에 위치하는 반면에, C-6에서의 모든 일차 하이드록실 그룹은 다른 측면에 위치한다. 결과적으로, 외부 면은 친수성이어서 사이클로텍스트린을 수용성으로 만든다. 대조적으로, 사이클로텍스트린의 공동은 이들이 원자 C-3 및 C-5의 수소에 의해서 및 에테르-유사 산소에 의해서 정렬되기 때문에 소수성이다. 이들 매트릭스는 예를 들어, 17 α -에스트라디올과 같은 스테로이드 화합물을 포함하는 다양한 종류의 비교적 소수성인 화합물과의 캠플렉스 형성을 허용한다. 캠플렉스 형성은 반데어발스 (Van der Waals) 상호작용에 의해서, 및 수소 결합 형성에 의해서 일어난다. 사이클로텍스트린의 화학에 대한 일반적인 검토는 문헌 [Wenz, Agnew, *Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:803-822, 1994]을 참고로 한다.

[0315] 사이클로덱스트린 유도체의 물리-화학적 특성은 치환의 종류 및 치환의 정도에 따라 크게 좌우된다. 예를 들어, 물 중에서의 이들의 용해도는 불용성 (예를 들어, 트리아세틸-베타-사이클로덱스트린) 내지 147% 가용성 (w/v) (G-2-베타-사이클로덱스트린)의 범위이다. 또한, 이들은 다수의 유기용매 중에서 가용성이다. 사이클로덱스트린의 특성은 이들의 용해도를 증가 또는 감소시킴으로써 다양한 제제의 용해도에 대한 조절을 가능하게 한다.

[0316] 다수의 사이클로덱스트린 및 이들의 제조방법은 설명되어 있다. 예를 들어, 파르메터 (Parmeter) (I) 등 [미국 특허 제3,453,259호] 및 그라메라 (Gramera) 등 [미국 특허 제3,459,731호]은 전기중성적 사이클로덱스트린을 기술하였다. 그 밖의 다른 유도체에는 양이온성 특성을 갖는 사이클로덱스트린 [Parmeter (II), 미국 특허 제3,453,257호], 불용성 교차결합된 사이클로덱스트린 [Solms, 미국 특허 제3,420,788호], 및 음이온성 특성을 갖는 사이클로덱스트린 [Parmeter (III), 미국 특허 제3,426,011호]이 포함된다. 음이온성 특성을 갖는 사이클로덱스트린 유도체 중에는 카복실산, 아인산, 포스핀산, 포스폰산, 인산, 티오포스폰산, 티오설핀산, 및 세론판산이 모 사이클로덱스트린에 부착되었다 [참조: Parmeter (III), *supra*]. 또한, 설포알킬 에테르 사이클로덱스트린 유도체는 스텔라 (Stella) 등 [미국 특허 제5,134,127호]에 의해서 기술되었다.

[0317] 리포좀은 수성 내부 구획을 포함하는 적어도 하나의 지질 이중층 막으로 구성된다. 리포좀은 막의 타입 및 크기에 의해서 특정화될 수 있다. 작은 단일층 소포체 (small unilamellar vesicles; SUVs)는 단일 막을 가지며, 전형적으로 직경이 0.02 내지 0.05 μm 의 범위이고; 큰 단일층 소포체 (LUVs)는 전형적으로 0.05 μm 보다 크다. 큰 올리고라멜라 소포체 및 멀티라멜라 소포체는 다수의 통상적인 동심원성인 막 층을 가지며, 전형적으로는 0.1 μm 보다 크다. 몇 개의 비동심원성인 막을 갖는 리포좀, 즉 더 큰 소포체 내에 함유된 몇 개의 더 작은 소포체는 다중소포성 (multivesicular) 소포체로 불린다.

[0318] 본 발명의 한가지 관점은 본 발명의 올리고머를 함유하는 리포좀을 포함하는 제제에 관한 것이며, 여기에서 리포좀 막은 증가된 운반능을 갖는 리포좀을 제공하기 위해서 제제화된다. 대신으로 또는 추가로, 본 발명의 화합물은 리포좀의 리포좀 이중층 내에 함유되거나, 리포좀 이중층 상에 흡착될 수 있다. 본 발명의 올리고머는 지질 계면활성제에 의해서 응집될 수 있으며, 리포좀 내부 공간 내에 포함될 수 있고; 이들 경우에 리포좀 막은 활성 약제-계면활성제 응집체의 봉괴효과에 저항하도록 제제화된다.

[0319] 본 발명의 한가지 구체예에 따르면, 리포좀의 지질 이중층은, PEG 쇄가 지질 이중층의 내부 표면으로부터 리포좀에 의해서 캡슐화된 내부 공간 내로 연장되고, 지질 이중층의 외부로부터 주변 환경 내로 연장되도록 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)에 의해서 유도체화된 지질을 함유한다.

[0320] 본 발명의 리포좀 내에 함유된 활성 작용제는 가용화된 형태이다. 계면활성제와 활성 작용제 (예를 들어, 관심이 있는 활성 작용제를 함유하는 에멀션 또는 미셀)의 응집체는 본 발명에 따르는 리포좀의 내부 공간 내에 될 수 있다. 계면활성제는 활성 작용제를 분산 및 가용화시키는 작용을 하며, 다양한 쇄 길이 (예를 들어, 약 C14 내지 약 C20)의 생체적합성 리소포스파티딜콜린 (LPCs)을 포함하나, 이들로 제한되지 않는, 모든 적합한 지방족, 사이클로지방족 또는 방향족 계면활성제로부터 선택될 수 있다. PEG-지질과 같은 폴리머-유도체화된 지질은 미셀/막 융합을 억제하는 작용을 할 것이고, 계면활성제 분자에 대한 폴리머의 부가는 계면활성제의 CMC를 감소시키고, 미셀 형성을 도와주기 때문에, 이들은 또한 미셀 형성을 위해서 이용될 수 있다. 바람직한 것은 마이크로볼 범위의 CMCs를 갖는 계면활성제이며; 더 큰 CMC 계면활성제를 이용하여 본 발명의 리포좀 내에 포집된 미셀을 제조할 수 있다.

[0321] 본 발명에 따르는 리포좀은 본 기술분야에서 공지된 다양한 기술 중의 어떤 것에 의해서라도 제조될 수 있다 [참조: 예를 들어, 미국 특허 제4,235,871호; 공개된 PCT 출원 제WO 96/14057호; New RRC, *Liposomes: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford (1990), pages 33-104; Lasic DD, *Liposomes from physics to applications*, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993]. 예를 들어, 본 발명의 리포좀은 예를 들어, 리포좀을 리포좀 내에서 바람직한 유도체화된 지질의 최종 몰 퍼센트에 상응하는 지질 농도로 지질-이식된 폴리머로 구성된 미셀에 노출시키는 것과 같이 친수성 폴리머에 의해서 유도체화된 지질을 전형성된 리포좀 내로 확산시킴으로써 제조될 수 있다. 친수성 폴리머를 함유하는 리포좀은 또한 본 기술분야에서 공지된 바와 같이 균질화, 지질-장 가수분해 (lipid-field hydration), 또는 압출 기술에 의해서 형성될 수 있다.

[0322] 또 다른 예시적인 제제화 절차에서는, 활성 작용제를 우선 소수성 분자를 쉽게 가용화시키는 리소포스파티딜콜린 또는 그 밖의 다른 저 CMC 계면활성제 (폴리머 이식된 지질을 포함) 내에 초음파처리함으로써 분산시킨다. 그 후, 활성 작용제의 생성된 미셀 혼탁액을 사용하여 적합한 몰 퍼센트의 폴리머-이식된 지질 또는 콜레스테롤을 함유하는 건조된 지질 샘플을 재수화시킨다. 그 후, 지질 및 활성 작용제 혼탁액을 본 기술분야에서 공지된

바와 같은 압출기술을 사용하여 리포좀으로 성형하고, 생성된 리포좀을 표준 칼럼 분리에 의해서 캡슐화되지 않은 용액으로부터 분리시킨다.

[0323] 본 발명의 한가지 관점에서, 리포좀은 선택된 크기 범위에서 실질적으로 균일한 크기를 갖도록 제조된다. 한가지 효과적인 사이징 (sizing) 방법은 리포좀의 수성 혼탁액을 선택된 균일한 공극 크기를 갖는 일련의 폴리카보네이트 막을 통해서 압축시키는 것을 포함하며; 막의 공극 크기는 대략 그 막을 통한 압출에 의해서 생산된 리포좀의 최대 크기에 상응할 것이다 [참조: 예를 들어, 미국 특히 제4,737,323호]. 특정의 구체예에서는, 다르마펙트 (DharmaFECT®) 및 리포펙타민 (Lipofectamine®)과 같은 시약을 이용하여 폴리뉴클레오타이드 또는 단백질을 세포 내로 도입시킬 수 있다.

[0324] 본 발명의 제제의 방출 특징은 캡슐화 물질, 캡슐화된 약물의 농도, 및 방출 변형제의 존재에 따라 좌우된다. 예를 들어, 방출은 예를 들어, 단지 위 내에서와 같은 낮은 pH에서, 또는 장에서와 같은 높은 pH에서만 방출하는 pH 민감성 코팅을 사용하여, pH 의존성이 되도록 조작될 수 있다. 장용성 코팅을 사용하여 위를 통한 통과 후까지 방출이 일어나는 것을 방지할 수 있다. 다수의 코팅 또는 상이한 물질 내에 캡슐화된 시아나미드의 혼합물을 사용하여 위 내에서의 초기 방출에 이어서 장 내에서 후속 방출을 수득할 수 있다. 방출은 또한, 캡슐로부터의 확산에 의한 약물 방출 또는 수분 흡수를 증가시킬 수 있는 공극 형성제 또는 염을 포함시켜 조작할 수도 있다. 약물의 용해도를 변형시키는 부형제를 사용하여 방출율을 제어할 수도 있다. 매트릭스의 분해 또는 매트릭스로부터의 방출을 증진시키는 작용제가 또한 혼입될 수 있다. 이들은 약물에 첨가되거나, 별도의 상(즉, 미립체로서)으로 첨가될 수 있거나, 화합물에 따라 폴리머 상 내에 공동-용해시킬 수 있다. 대부분의 경우에, 그 양은 0.1 내지 30% (w/w 폴리머) 사이여야 한다. 분해 증진제의 타입에는 황산암모늄 및 염화암모늄과 같은 무기 염류, 시트르산, 벤조산, 및 아스코르브산과 같은 유기산, 탄산나트륨, 탄산칼륨, 탄산칼슘, 탄산아연 및 수산화아연과 같은 무기 염기, 및 프로타민 설페이트, 스페르민, 콜린, 에탄올아민, 디에탄올아민 및 트리에탄올아민과 같은 유기 염기, 및 트윈 (Tween®) 및 플루로닉 (Pluronic®)과 같은 계면활성제가 포함된다. 매트릭스에 미세구조를 부가하는 공극 형성제 (즉, 무기 염류 및 당류와 같은 수용성 화합물)는 미립체로서 첨가된다. 그 범위는 전형적으로 1 내지 30% (w/w 폴리머) 사이이다.

[0325] 흡수는 또한 입자의 장 내에서의 체류시간을 변화시킴으로써 조작될 수 있다. 이것은 예를 들어, 입자를 점막 접착성 폴리머로 코팅하거나, 이러한 폴리머를 캡슐화 물질로 선택함으로써 달성될 수 있다. 예로는 키토산, 셀룰로즈, 및 특히 폴리아크릴레이트 (본 발명에서 사용된 것으로서, 폴리아크릴레이트는 아크릴레이트 그룹 및 시아노아크릴레이트 및 메타크릴레이트와 같은 변형된 아크릴레이트 그룹을 포함하는 폴리머를 나타낸다)와 같은 유리 카복실 그룹을 갖는 대부분의 폴리머가 포함된다.

[0326] 올리고머는 수술용 또는 의학적 장치 또는 이식물 내에 함유되거나 그에 의한 방출에 적합하도록 제제화될 수 있다. 특정의 관점에서, 이식물은 올리고머에 의해서 코팅되거나 다른 식으로 처리될 수 있다. 예를 들어, 하이드로겔, 또는 생체적합성 및/또는 생물분해성 폴리머와 같은 그 밖의 다른 폴리머는 이식물을 본 발명의 조성물로 코팅하기 위해서 사용될 수 있다 (즉, 조성물은 하이드로겔 또는 그 밖의 다른 폴리머를 사용함으로써 의학적 장치와 함께 사용하는데 적합할 수 있다). 작용제로 의학적 장치를 코팅하기 위한 폴리머 및 코폴리머는 본 기술분야에서 잘 알려져 있다. 이식물의 예로는 스텐트 (stents), 약물-용출 스텐트, 봉합체, 인공보철, 혈관 카테터, 투석 카테터, 혈관 이식물, 인공보출 심장 밸브, 심장 페이스메이커 (pacemakers), 이식가능한 제세동기, IV 니들, 핀, 스크류, 플레이트 및 그 밖의 다른 장치와 같은 접골 또는 골 형성을 위한 장치, 및 치유를 위한 인공 조직 매트릭스가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다.

[0327] 본 발명에 제공된 방법 이외에도, 본 발명에 따라 사용하기 위한 올리고머는 다른 약제와 유사하게 인간 또는 수의과 의약에서 사용하기 위한 모든 편리한 방식으로 투여하기 위해서 제제화될 수 있다. 안티센스 올리고머 및 그들의 상응하는 제제는 단독으로, 또는 인플루엔자 바이러스 감염의 치료에 있어서의 다른 치료학적 전략 (예를 들어, 상품명 타미플루 (TAMIFLU®)로 판매되는 오셀타미비)과 함께 투여될 수 있다.

[0328] 본 발명에 따르면, 안티센스 올리고머 송달의 경로에는 경구 및 비경구 경로, 예를 들어, 정맥내, 피하, 복강내 및 근육내뿐만 아니라 흡입, 경피, 폐 및 국소 송달을 포함한 다양한 전신적 경로가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 적절한 경로는 치료받는 대상체의 조건에 적절한 것으로서 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 결정될 수 있다. 예를 들어, 피부의 바이러스 감염의 치료에 있어서 안티센스 올리고머의 송달에 적절한 경로는 국소 송달인 반면에, 바이러스 호흡기 감염 (예를 들어, 인플루엔자 A)의 치료를 위한 안티센스 올리고머의 송달은 흡입, 비내 또는 폐 송달에 의한다. 올리고머는 또한 바이러스 감염의 부위에, 또는 혈류에 직접 송달될 수 있다.

[0329] 안티센스 올리고머는 생리학적으로 허용되는 어떤 편리한 비히를 중에서나 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 본 기술분야에서 통상적으로 숙련된 전문가에 의해서 이용되는 표준 약제학적으로 허용되는 담체 중의 어떤 것이라도 포함할 수 있다. 예로는 식염수, 포스페이트 완충된 식염수 (PBS), 물, 수성 에탄올, 오일/물 에멀션 또는 트리글리세라이드 에멀션과 같은 에멀션, 정제 및 캡슐제가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 적합한 생리학적으로 허용되는 담체의 선택은 선택된 투여의 모드에 따라 달라질 것이다.

[0330] 일부의 경우에, 상기 언급한 바와 같이 리포좀은 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 세포 내로의 흡수를 촉진시키기 위해서 사용될 수 있다 [참조: 예를 들어, Williams, S.A., *Leukemia*. 10 (12): 1980-1989, 1996; Lappalainen *et al.*, *Antiviral Res.* 23:119, 1994; Uhlmann *et al.*, *Antisense Oligonucleotides: A New Therapeutic Principle*, *Chemical Reviews*, Volume 90, No. 4, pages 544-584, 1990; Gregoriadis, G., Chapter 14, *Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine*, pp. 287-341, Academic Press, 1979]. 하이드로겔은 또한, 예를 들어, WO 93/01286 또는 PCT 출원 제US1992/005305호에 기술된 바와 같이 안티센스 올리고머 투여를 위한 비히를 사용될 수 있다. 대신으로, 올리고뉴클레오타이드는 미립구 또는 미립자로 투여될 수 있다 [참조: 예를 들어, Wu, G.Y. and Wu, C.H., *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432, 1987]. 대신으로, 안티센스 올리고머와 캠플렉스화된 가스-충진된 마이크로버블 (microbubbles)의 사용은 미국 특허 제6,245,747호에 기술된 바와 같이 표적 조직에 대한 송달을 증진시킬 수 있다.

[0331] 서방성 조성물이 또한 사용될 수 있다. 이들은 필름 또는 마이크로캡슐과 같은 성형된 제품의 형태로 반투파성 폴리머 매트릭스를 포함할 수 있다.

[0332] 방법의 한가지 관점에서, 대상체는 인간 대상체, 예를 들어, 국재화되거나 전신적인 바이러스 감염을 갖는 것으로 진단된 환자이다. 환자의 상태는 또한, (1) 면역타협되거나; (2) 화상이 있거나; (3) 내재하는 카테터를 갖거나; (4) 수술을 받으려 하거나 최근에 수술을 받은 환자의 경우에, 본 발명의 안티센스 올리고머의 예방적 투여를 지시할 수도 있다. 한가지 바람직한 구체예에서, 올리고머는 약제학적으로 허용되는 담체 내에 함유된 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고미이며, 경구적으로 송달된다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 올리고머는 약제학적으로 허용되는 담체 내에 함유된 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고미이며, 정맥내 (i.v.)로 송달된다.

[0333] 안티센스 화합물은 적어도 200-400 nM 안티센스 올리고머의 최고 혈중 농도를 제공하는데 효과적인 양 및 방식으로 투여될 수 있다. 전형적으로, 안티센스 올리고머의 하나 또는 그 이상의 용량은 일반적으로 약 1 내지 2 주일의 기간 동안 규칙적인 간격으로 투여된다. 경구 투여를 위한 바람직한 용량은 70 kg당 약 1-100 mg의 올리고미이다. 일부의 경우에, 100 mg 올리고머/환자보다 큰 용량이 필요할 수 있다. i.v. 투여를 위해서 바람직한 용량은 70 kg당 약 1 mg 내지 500 mg의 올리고미이다. 안티센스 올리고머는 짧은 기간 동안에 규칙적인 간격으로, 예를 들어, 2 주일 또는 그 미만 동안에 매일 투여될 수 있다. 그러나, 일부의 경우에 올리고머는 더 장기간에 걸쳐서 간헐적으로 투여된다. 투여는 항생제의 투여 또는 그 밖의 다른 치료학적 치료가 뒤따르거나 이와 동시에 이루어질 수 있다. 치료 레지멘은 치료 중인 대상체의 면역검정, 그 밖의 다른 생화학적 시험 및 생리학적 검사의 결과를 기초로 하여 지시된 바와 같이 조정될 수 있다 (용량, 빈도, 경로 등).

[0334] 치료의 모니터링

[0335] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용한 효과적인 생체내 치료 레지멘은 투여의 지속기간, 용량, 빈도 및 경로뿐만 아니라 치료 중인 대상체의 상태에 따라 달라질 수 있다 (즉, 예방적 투여 대 국재화되거나 전신적인 감염에 대해 대응하는 투여). 따라서, 이러한 생체내 치료법은 종종, 치료 중인 바이러스 감염의 특별한 타입에 적절한 시험에 의한 모니터링, 및 최적의 치료학적 결과를 달성하기 위하여 용량 또는 치료 레지멘에 있어서의 상응하는 조정이 필요할 것이다. 치료는 예를 들어, 전혈구 계산 (CBC), 혁산 검출방법, 면역진단적 시험, 바이러스 배양, 또는 헤테로듀플렉스의 검출과 같은 감염의 일반적 지표에 의해서 모니터링될 수 있다.

[0336] RNA 바이러스의 하나 또는 그 이상의 타입의 성장을 억제 또는 제거하는데 있어서의 본 발명의 생체내 투여된 안티센스 올리고머의 효능은 안티센스 올리고머의 투여 전, 중 및 후에 대상체로부터 채취한 생물학적 샘플 (조직, 혈액, 소변 등)로부터 결정될 수 있다. 이러한 샘플의 분석은 (1) 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 공지된 절차, 예를 들어, 전기영동 겔 이동성 시험을 사용하여 표적 및 비-표적 서열과의 헤테로듀플렉스 형성의 존재 또는 부재를 모니터링하거나; (2) ELISA 또는 웨스턴 븍터팅과 같은 표준 기술에 의해서 측정되는 바와 같은 바이러스 단백질 생산량을 모니터링하거나, (3) 예를 들어, 스피어맨-카버 (Spearman-Karber)의 방법에 의해서 바이러스 역가에 대한 효과를 측정하는 것을 포함한다 [참조: 예를 들어, Pari, G.S. *et al.*, *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*. 39(5):1157-1161, 1995; Anderson, K.P. *et al.*, *Antimicrob. Agents and*

Chemotherapy. 40:2004-2011, 1996; Cottral, G.E. (ed) in: *Manual of Standard Methods for Veterinary Microbiology*, pp. 60-93, 1978].

[0337] 참고문헌

[0338] Abes, R., H. M. Moulton, *et al.* (2008). "Delivery of steric block morpholino oligomers by (R-X-R)4 peptides: structure-activity studies". *Nucleic Acids Res.*

[0339] Cox, N. J. and K. Subbarao (1999). "Influenza". *Lancet* 354(9186): 1277-82.

[0340] Cox, N. J. and K. Subbarao (2000). "Global epidemiology of influenza: past and present". *Annu Rev Med* 51: 407-21.

[0341] Egholm, M., O. Buchardt, *et al.* (1993). "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules". *Nature* 365(6446) : 566-8.

[0342] Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, *et al.* (2008). "Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice". *Mol Ther.*

[0343] Marshall, N. B., S. K. Oda, *et al.* (2007). "Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing". *Journal of Immunological Methods* 325(1-2): 114-126.

[0344] Moulton, H. M., M. H. Nelson, *et al.* (2004). "Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to arginine-rich peptides". *Bioconjug Chem* 15(2): 290-9.

[0345] Munster, V. J., E. de Wit, *et al.* (2009). "Pathogenesis and Transmission of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Virus in Ferrets". *Science*.

[0346] Stein, C. A., J. B. Hansen, *et al.* (2010). "Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents". *Nucleic Acids Res* 38(1): e3.

[0347] Strauss, J. H. and E. G. Strauss (2002). *Viruses and Human Disease*. San Diego, Academic Press.

[0348] Summerton, J. and D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties". *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(3): 187-95.

[0349] Wu, B., H. M. Moulton, *et al.* (2008). "Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer". *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39): 14814-9.

[0350] 본 명세서에서 인용된 모든 문헌 및 특허출원은, 각각의 개별적인 문헌 또는 특허출원이 참고로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 명시되어 있는 것처럼, 본 발명에 참고로 포함된다.

[0351] 비록 전술한 발명은 이해를 명백하게 할 목적으로 설명 및 예시를 위해서 어느 정도 상세히 기술되었지만, 첨부된 특허청구범위의 정신 또는 범위를 벗어남이 없이 이들에 대한 특정한 변화 및 변형이 이루어질 수 있다는 것은 본 발명의 교시내용에 비추어서 본 기술분야에서 통상적으로 숙련된 전문가에게 쉽게 명백할 것이다. 이하의 실시예는 제한하기 위해서가 아니라 단지 설명을 위해서 제공된다. 본 기술분야에서 숙련된 전문가는 본질적으로 유사한 결과를 수득하도록 변화 또는 변형될 수 있는 중요하지 않은 다수의 파라메터를 쉽게 인식할 것이다.

[0352] 실시예

[0353] A. 재료 및 방법

[0354] 모든 웹타이드는 Global Peptide Services (Ft. Collins, CO)에 의해서, 또는 AVI BioPharma (Corvallis, OR)에서 맞춤으로 하이브리드화하여, >90% 순도로 정제되었다 (참조: 이하의 실시예 2). PMOs는 예를 들어, 문헌 [Summerton and Weller 1997] 및 미국 특허 제5,185,444호에 기술되고, 또한 PCT 출원 제US08/012804호에 기술된 바와 같은 공지된 방법에 따라 AVI BioPharma에서 합성되었다. PMO의 예시적인 구조는 도 1a-c에 나타낸 바와 같다. 2'-OMe 올리고머는 Integrated DNA Technologies Inc. (Skokie, IL.)에 의해서 합성되었다. LNA 올

리고머는 Biosynthesis, Inc. (Lewisville, TX.)에 의해서 생산되었다.

[0355] 일부의 PMO 올리고머는, 기술된 바와 같이 [미국 특허 제7,468,418호, PCT 출원 제US08/008168호 및 문현 (Marshall, Oda *et al.* 2007; Abes, Moulton *et al.* 2008)] 세포성 흡수를 증진시키기 위해서 아르기닌-풍부 펩타이드 ((RAhxRRBR)₂AhxB 또는 (RAhxR)₄AhxB; 각각 서열번호 124 및 118)와 3' 말단에서 칸주게이트되어 펩타이드-칸주게이트된 PMOs (PPMOs)를 형성하였다.

[0356] (1-피페라지노) 포스피닐리덴옥시 결합을 함유하는 모르폴리노 서브유니트를 제조하기 위해서 사용될 수 있는 합성경로는 PCT 출원 제US07/011435호에 기술되어 있으며, 대표적인 합성에 대한 추가의 실험적인 상세한 내용은 이하에 제시된다. 피페라진과 트리틸 클로라이드의 반응은 트리틸 피페라진을 제공하였으며, 이것은 석시네이트 염으로서 분리되었다. 약 염기 (예를 들어, 디이소프로필에틸아민 또는 DIEA)의 존재 하에서 에틸 트리플루오로아세테이트와의 반응은 1-트리플루오로아세틸-4-트리틸 피페라진을 제공하였으며, 이것을 즉시 HCl과 반응시켜 우수한 수율로 염을 제공하였다. 디클로로포스포릴 부분의 도입은 툴루엔 중의 옥시염화인을 사용하여 수행되었다.

[0357] 산 클로라이드를 미국 특허 제5,185,444호 또는 문현 [Summerton and Weller, 1997 (상기 인용됨)]에 기술되고, PCT 출원 제US08/012804호에 더 기술된 바와 같이 제조될 수 있는 모르폴리노 서브유니트와 반응시켜 활성화된 서브유니트를 제공한다. 적합한 보호그룹이 필요에 따라 뉴클레오사이드 염기를 위해서 사용되며; 예를 들어, 아데닌 및 시토신을 위해서는 벤조일, 구아닌을 위해서는 페닐아세틸, 및 이노신을 위해서는 피발로일메틸이 사용된다. (1-피페라지노) 포스피닐리덴옥시 결합을 함유하는 서브유니트는 예를 들어, 문현 [Summerton and Weller (1997)]에 기술된 바와 같은 기존의 PMO 합성 프로토콜에 변형이 없이 포함될 수 있다.

[0358] 실시예 1

[0359] 쥐 모델 시스템에서 인플루엔자 A 바이러스의 억제

[0360] 인플루엔자 A 바이러스 감염의 쥐 모델을 사용하여 감염에 대한 대표적인 안티센스 올리고머의 생체내 효능을 결정하였다. 인플루엔자 A 서브타입 H2N3 (Port Chalmers/1/73)을 사용하여 50 마이크로리터 용적으로 약 4×10^4 플라크-형성 유니트를 비내 투여함으로써 Balb/c 암컷 마우스를 감염시켰다. 상기의 시험은 그룹당 12 마리의 마우스를 사용하였으며, 6 마리는 바이러스 역가의 결정을 위해서 제2일에 분리시키고, 6 마리는 바이러스 역가의 결정을 위해서 제6일에 분리시켰다. 이차 종말점은 체중 감소의 방지 및 생존을 포함하였다.

[0361] 표 1 및 이하의 표 6에 열거된 바와 같은 3 가지 시험 안티센스 올리고머 화합물인 PB1-AUG+15, M1/M2-AUG 및 NP-v3' (서열번호 12, 13 및 30-33)를 펩타이드 칸주게이트 (PPMO) 및 양전하 결합 화학 (PMOplusTM) 둘 다로 평가하였다. PPMOs는 PMO의 3' 말단에 칸주게이트된 CP06062 펩타이드 (서열번호 124)를 사용하여 합성하였다. 각각의 시험 작용제는 3 가지 용량 레벨 (10, 30 및 100 마이크로그램)에서 평가하여 용량-의존적 관계를 평가하였다. 투약은 비내 경로를 통해서, 총 5 회 용량으로 제0일에는 감염시키기 4 시간 전에, 및 그 다음에 제4 일까지는 매일 이루어졌다. 시험의 일차 종말점은 폐 조직의 그램당 플라크-형성 유니트로 측정되는 폐에서의 바이러스 역가 감소였다.

[0362] [표 6]

[0363]

H3N2 쥐 모델에서 사용된 안티센스 올리고머

| 명칭 | 서열 | 3'말단 | 서열번호 |
|-----------------------------|----------------------------------|---------|------|
| NP-v3' | AGC AAA AGC AGI GTA GAT AAT C | CP06062 | 30 |
| NP-v3'plus | AGC AAA AGC AGI G+TA GA+T AA+T C | H | 31 |
| M1/M2-AUG | CGG TTA GAA GAC TCA TCT TT | CP06062 | 12 |
| M1/M2-AUGplus (AVI-7100) | CGG T+TA GAA GAC +TCA TC+T TT | H | 13 |
| PB1-AUG+15 | CGG ATT GAC ATC CAT TCA AAT G | CP06062 | 32 |
| PB1-AUG+15plus | CGG AT+T GAC A+TC CAT +TCA AAT G | H | 33 |

[0364]

도 6은 감염-후 제6일의 바이러스 역가에 대한 효과를 나타낸다. 각각의 바이러스 역가는 6 마리의 PPMO 및 6 마리의 PMOplus™ 처리된 동물의 평균이다. M1/M2-AUG 표적화된 화합물 (서열번호 12 및 13)은 시험한 다른 화합물에 비해서 실질적으로 더 큰 활성을 나타내었다. 도 6에 나타낸 음성 대조군 뎅그 (Dengue) 처리로부터의 바이러스 역가는 뎅그 바이러스를 표적으로 하는 부적절한 PPMO 및 PMOplus™ 서열을 사용하여 수득하였다.

[0366]

실시예 2

[0367]

페럿 모델 시스템에서 인플루엔자 A 바이러스의 억제

[0368]

본 발명을 뒷받침하는 한가지 관찰은 신규의 H1N12009 (S-OIV) 바이러스를 사용한 집페럿 (domestic ferret) (*Mustela putorius furo*) 동물 모델 시스템에서의 본 발명의 화합물의 항바이러스 효능의 입증이었다. 페럿 모델의 이점에는 마우스-적응 스트레인과 대조적인 것으로서 인플루엔자 바이러스의 천연 인간 분리물을 사용하는 능력, 및 열 및 콧물과 같이 인간에게서 관찰되는 대부분의 임상적 징후의 발현이 포함된다 [Munster, de Wit *et al.* 2009].

[0369]

6 마리의 페럿을 질병통제센터 (Centers for Disease Control)로부터 수득된 2009년의 타미플루-저항성 H1N1 스트레인 (유행성 돼지 독감)에 의해서 감염시켰다. 바이러스 감염의 경로는 제1일에 비내로 이루어졌으며 (4×10^4 플라크-형성 유니트), 투약은 PMOplus™ 화합물의 경우에는 복강내 (ip) 주사에 의해서, 또는 PMO 화합물의 경우에는 비내 (in)로 이루어졌다. 뎅그-표적화된 음성 대조군 PMOplus™ (30 mg/kg ip 용량) 및 PPMO (1.5 mg/kg in 용량) 화합물은 상기 실시예 1에 기술된 바와 같이 투여하였다. PMOplus™ 화합물에 대한 투약량은 M1/M2-AUGplus (서열번호 13; AVI-7100)의 경우에는 10 및 30 mg/kg이고, 서열번호 124의 3' 말단에 컨주케이트된 M1/M2-AUG PPMO (서열번호 12)의 경우에는 0.5 및 1.5 mg/kg이었다. 투약은 감염시키기 4 시간 전 및 제1, 3 및 5일에 수행되었다. 타미플루 (오셀타미비)는 안티센스 화합물과 병행하여 양성 항바이러스 대조군으로 투여되었다 (10 mg/kg 용량). 식염수가 또한 음성 대조군으로 포함되었다.

[0370]

생존중의 관찰소견에는 체중 증가 (도 7a), 재채기 (도 7b), 콧물 (도 7c) 및 호흡곤란 (도 7d)이 포함된다. M1/M2-AUG 표적화된 화합물은 체중 감소를 방지하였으며, 재채기, 콧물 및 호흡곤란을 감소시켰다. 감염-후 제1일 내지 제5일 동안의 코 세척액으로부터의 바이러스 역가는 도 7e에 곡선화 면적 (AUC) 조작배양 감염성 용량 (TCID)로서 나타내었다. M1/M2-AUG PPMO 작용제는 식염수에 대비해서 2.3 로그 감소 (99.6% 감소) 및 타미플루 보다 더 큰 1.1 로그 감소 (94.4% 더 크다)를 나타내었다.

[0371]

AVI-7100 (서열번호 13)의 효능을 더 평가하기 위해서, 인플루엔자 M1/M2 분절 해독 개시 부위에 표적화된 PMOplus를 비-적응 오셀타미비-저항성 H1N1 (SOIV) 유행성 인플루엔자 바이러스에 의해서 감염된 페럿에서 시험하였다. 총 36 마리의 수컷 페럿을 이 시험에서 이용하였다. 시험의 개시 시점에 약 700 g의 부합된 체중을 갖는 수컷 페럿을 5 개의 처리그룹 (이하의 표 7에 나타냄) 중의 하나에 무작위로 배치하고, Hepa 여과된 캐

이지 내에 수용하여 (케이지당 4 마리) 바이러스가 케이지에서 케이지로 전파되는 것을 최소화하였다. 케이지는 툴란 대학 의료센터 (Tulane University Medical Center) BSL-2 실험실 내에 유지시켰다.

[0372] [표 7]

[0373] 폐럿 시험 디자인

| 그룹 | 작용제 | 화학 | 용량 (mg/kg) | 경로 | 스케줄 | 제7일의 희생 |
|----|--------------|---------|------------|------|--|---------|
| 1 | 타미플루 | - | 5 | p.o. | -4H, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120H | 8 |
| 2 | M1/M2 | PMOplus | 30 | i.p. | -4H, 1, 2, 3, 4, 5D | 8 |
| 3 | M1/M2 | PMOplus | 10 | i.p. | -4H, 1, 2, 3, 4, 5D | 8 |
| 4 | 식염수 | - | 0.5 | i.n. | -4H, 1, 2, 3, 4, 5D | 6 |
| 5 | M1/M2 및 타미플루 | PMOplus | 10 | i.p. | -4H, 1, 2, 3, 4, 5D | 6 |
| | 총수 | | | | | 36 |

[0374] [0375] 폐럿을 바이러스 공격하기 1-4 시간 전에 AVI-7100으로 처리하였다. 투여의 경로는 그룹 2, 3 및 5에 대해서는 복강내였으며; 그룹 1에 대해서는 경구였다. 투약 간격은 -4 시간, 바이러스 공격 후 24, 48, 72, 96 및 120 시간이었다. 5 개의 그룹을 다음과 같이 처리하였다: 그룹 1은 경구 경로에 의해서 오셀타미비를 매 12 시간마다 5 mg/kg으로 제공하였으며, 그룹 2는 i.p. 경로에 의해서 AVI-7100 (PMOplus 화합물; 5'-CGG T+TA GAA GAC+TCA TC+T TT-3')을 10 mg/kg으로 제공하였고, 그룹 3은 i.p. 경로에 의해서 AVI-7100 (PMOplus 화합물)을 30 mg/kg으로 제공하였으며, 그룹 4는 i.p. 경로에 의해서 멀균 식염수 대조군을 제공하였고, 그룹 5는 i.p. 경로에 의해서 AVI-7100을 10 mg/kg으로 및 1일에 2 회 오셀타미비를 5 mg/kg으로 제공하였다. 그룹 1-2 (각각 8 마리의 폐럿)와 그룹 4-5 (각각 6 마리의 폐럿) 사이의 그룹 크기에 있어서의 차이가 있는 이유는 시험의 개시 시점에 인플루엔자 A 혈청음성 폐럿의 제한된 이용가능성에 기인하였다.

[0376] 이 시험에 포함된 모든 폐럿은 감염 후 제8일인 시험의 종료시까지 생존하였으며, 이것은 이들 동물이 매우 건강하였거나, 이 특별한 바이러스가 이 모델에서 병원성이 상당하지 않았음을 시사한다. 그럼에도 불구하고, 이하에 나타낸 바와 같이 이들 결과는 AVI-7100에 의한 처리가 비처리 또는 오셀타미비-처리된 대조군에 비해서 인플루엔자 바이러스 감염의 증상을 상당히 감소시키는 것을 나타낼 뿐만 아니라, AVI-7100과 오셀타미비의 병용에 의해서 달성될 수 있는 상승적 효과를 설명한다. 임상적 관찰의 요약은 이하의 표 8에 나타내었다.

[0377] [표 8]

[0378]

임상적 관찰결과

| 그룹 | 임상 스코어 | 체중 변화 (g/일) | | | 최고 체온 (°F) | | |
|---------|-----------|-------------|----------|------|------------|-------|------|
| | | 전 | 후 | 차이 | 전 | 후 | 차이 |
| 타미플루 | 1.17±0.25 | 15.1±0.4 | 8.5±3.2 | -6.1 | 104.4 | 105.7 | +1.3 |
| M1-30 | 1.00±0.00 | 11.8±0.8 | 12.6±2.0 | +0.8 | 104.7 | 104.2 | -0.5 |
| M1-10 | 1.11±0.21 | 16.6±0.8 | 10.9±1.5 | -5.7 | 105.4 | 106.1 | +0.7 |
| 식염수 | 1.19±0.25 | 14.3±0.6 | 11.4±2.1 | -2.9 | 105.9 | 106.2 | +0.3 |
| M1+타미플루 | 1.06±0.06 | 14.4±0.6 | 14.9±1.0 | +0.5 | 105.0 | 104.9 | -0.1 |

[0379]

추가의 지표로서, 상기도 내로 침윤하는 세포의 관찰결과는 감염의 중증도의 척도이다. 코 세척액에서 대식세포 세포충실성 (cellularity)의 요약은 이하의 표 9에 포함된다. 또한, 비처리 및 오셀타미비-단독 처리된 폐 레트은 뚜렷한 폐포염 (폐의 염증), 림프구 및 호중구를 포함한 풍부한 침윤성 세포, 및 폐의 중등도의 폐포벽 비후화와 함께 폐 내의 상당한 울혈을 나타내었다. 대조적으로, AVI-7100 처리된 폐 레트 (오셀타미비가 있거나 없이)은 폐 내의 울혈이 없었고, 단지 미미한 폐포염 및 소수의 침윤성 세포를 나타내었다.

[0380]

[표 9]

[0382]

상기도 내의 대식세포 세포충실성

| 그룹 | 평균±표준편차 | 제3일 최고치 |
|---------|-------------|-------------|
| 타미플루 | 2.98 ± 2.71 | 7.91 ± 7.28 |
| M1-30 | 2.78 ± 2.97 | 1.59 ± 1.28 |
| M1-10 | 4.34 ± 3.82 | 3.88 ± 4.73 |
| 식염수 | 5.02 ± 3.77 | 2.41 ± 3.24 |
| M1+타미플루 | 4.27 ± 3.10 | 0.91 ± 1.25 |

[0383]

[0384]

이하의 표 10에 나타낸 바와 같이, 코 세척액 내의 최고 바이러스혈증 (peak viremia)은 제1일에 관찰되었다. 바이러스 감염의 진행에 대한 코 세척액 수집의 부적절한 영향을 최소화하기 위해서 제2, 4, 6 및 7일에는 코 세척액을 수집하지 않았다. AVI-7100 처리된 그룹에서는 식염수 또는 오셀타미비에 비해서 상당한 이점이 관찰되었다. 또한, 상승적 효과가 AVI-7100-단독 (10 mg/kg) 및 오셀타미비-단독 처리에 비해서 AVI-7100 (10 mg/kg)과 오셀타미비의 조합물에 의해서 관찰되었다. 여기에서, 조합물 (AVI-7100 및 오셀타미비)의 경우의 코 세척액 내에서 바이러스 역가에 대한 AUC는 타미플루-단독 그룹에 비해 4 로그 감소보다 더 크고, 식염수 그룹에 비해서는 3 로그 감소보다 더 큰 것을 나타낸다. 상기 조합물은 또한 동등한 양의 AVI-7100 단독인 경우에 비해 바이러스 역가에 있어서 훨씬 더 큰 감소를 나타내며 (5.515의 AUC에서 2.999의 AUC로), 이것은 AVI-7100이 오셀타미비의 항바이러스 효과를 증진시킬 수 있음을 시사한다. 이 결과는 이 시험에서 사용된 바이러스가 다른 식으로는 오셀타미비에 대해서 저항성이기 때문에 놀라운 것이다.

[0385]

[표 10]

[0386]

바이러스 억제

| 일 | 오셀타미비 (n=8) | AVI-7100 30mg/kg (n=8) | AVI-7100 10mg/kg (n=8) | 식염수 (n=6) | 오셀타미비 + AVI-7100 10mg/kg (n=6) |
|------------|----------------|------------------------------|------------------------------|--------------|--------------------------------------|
| 1 | 2.42±0.58 | 0.57±0.49 | 1.10±1.11 | 2.42±0.49 | 0.82±0.79 |
| 3 | 0.77±0.73 | 0.81±0.25 | 1.19±0.80 | 0.75±0.27 | 0.69±0.65 |
| 5 | 0.67±0.67 | 1.13±0.58 | 0.25±0.38 | 0.67±0.41 | 0.13±0.25 |
| 8 | 0.92±0.37 | 0.44±0.42 | 0.94±0.82 | 0.33±0.61 | 0.31±0.37 |
| AUC | 7.015 | 5.675 | 5.515 | 6.090 | 2.990 |

[0387]

실시예 3

스플라이스 부위-표적화된 안티센스 올리고머를 사용한 조직 배양에서 인플루엔자 A 바이러스의 억제

[0389]

본 발명의 관점은 M1/M2 분절 내의 다수의 부위를 표적으로 하는 안티센스에 의한 인플루엔자 A 바이러스 복제의 억제이다. 공통 M1/M2 AUG 개시 부위를 표적화함으로써 해독을 억제하는 이외에도, 스플라이스 공여체 및 스플라이스 수용체 부위는 또한 본 발명의 화합물을 사용하여 표적화될 수 있다. 위치 740에서 스플라이스 수용체 부위를 표적으로 하는 2 개의 PMO를 켭타이드 컨주케이트된 PPMO인 SA740 및 SA746 (각각 서열번호 26 및 29)으로 합성하고, H1N1 스트레인 PR8을 위한 시험관내 조직 배양 복제 시스템 내에 배치하였다. P007 세포 투과성 켭타이드 (서열번호 118)를 PMO의 3' 말단에 컨주케이트시켰다.

[0391]

폐포성 쥐 대식세포 세포주 (ATCC; AMJ2-C11)를 H1N1 (스트레인 PR8)에 의해서 0.1 MOI로 감염시키고, 감염 1 시간 후에 PPMOs를 첨가하였다. 세포를 35°C에서 밤새 배양하였다. 그 후, 바이러스 상등액을 취하여 VNAR 프로테아제와 함께 배양하여 바이러스 RNA를 방출시켰다. HA RNA는 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR)에 의해서 정량하였다. 세포를 세척하고, 고정시키고, 투과화시켰다. 그 후, M1 및 M2 단백질을 37°C에서 30 분 동안 모노클로날 항체로 프로브화하였다. 세포를 세척하고, 알렉사 (Alexa) 646에 컨주케이트된 안티-마우스 IgG를 실온에서 15 분 동안 첨가하였다. 그 후, M1 및 M2를 유동 세포분석에 의해서 결정하였다. M1 및 M2 단백질 레벨을 결정하기 위해서, M1 또는 M2 양성 세포의 퍼센트를 M1 또는 M2의 평균 형광광도와 곱하였다. 그 후, 각각의 샘플을 비처리 대조군으로 나누어서 비처리 스크램블 (scramble) 대조군과 비교한 M1 또는 M2의 퍼센트를 생성시켰다.

[0392]

도 8a는 바이러스 HA RNA 레벨 (qRT-PCR을 사용하여 측정)의 감소를 나타낸다. SA740 및 SA746은 둘 다 HA RNA 생산을 억제하였으며, 이것은 스크램블 대조군에 비해서 바이러스 복제의 억제를 나타낸다. 가장 충분한 효과는 10 마이크로몰에서 SA746을 사용한 대략 2-로그 감소 및 SA740에 의한 1-로그 감소로 관찰되었다. 도 8b 및 8c는 각각 M1 및 M2 단백질에 대한 SA740 및 SA746의 효과를 나타낸다. 상술한 유동 세포분석 방법을 사용하여 상대적 단백질 레벨을 결정하였다. 두 개의 올리고머는 모두 M2 단백질의 생산을 억제한 반면에 M1 단백질 레벨은 SA740에 의해서 감소되었다.

[0393]

실시예 4

잠금 핵산 올리고머를 사용한 조직 배양에서 인플루엔자 A 바이러스의 억제

[0395]

본 발명의 화합물은 PMO와는 다른 화학적 실체로 이루어진 올리고뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. M1/M2 분절 AUG 개시 부위를 표적으로 하는 일련의 잠금 핵산을 합성하고 (LNA-AUG1, LNA-AUG12, LNA-AUG13 및 LNA-AUG10; 각각 서열번호 63, 74, 75 및 72), 상기 실시예 3에 기술된 바와 같이 바이러스 RNA 및 M2 단백질 발현

에 대한 동일한 검정에서 시험하였다. LNA 올리고머의 세포내 송달은 짐노틱 (gymnotic) 송달을 이용하였다 [Stein, Hansen *et al.* 2010]. AMJ2-C11 세포를 1 시간 동안 PR8로 감염시킨 다음에 세척하였다. 그 후, 세포를 LNA 또는 2'OMe 화합물과 함께 96 웰 플레이트 내에 플레이팅하고, 35°C에서 밤새 배양하도록 하였다. 바이러스 RNA 레벨 및 M2 단백질 발현은 이 시점에 평가하였다 (대략 18 시간의 총 배양시간). 도 9a는 바이러스 RNA 레벨 (HA 분절)에 대한 4 가지의 상이한 LNAs의 효과를 나타낸다. 7.5 마이크로몰에서는 LNA-AUG1 올리고머의 경우에 바이러스 HA RNA 레벨의 대략 3-로그 감소가 있는데 비해 LNA-AUG12 화합물의 경우에는 약 1.5 로그 감소가 있었다 (각각 서열번호 63 및 74). LNA-AUG1은 20mer인 반면에 LNA-AUG12는 16mer이다. 모두 4 개의 LNA 올리고머의 경우에 길이에 따른 유효성의 등급 순서가 있으며, 이것은 더 긴 LNAs가 본 발명의 바람직한 구체예임을 시사한다. 이러한 관계는 또한 도 9b에 나타낸 M2 단백질 발현의 측정에서 관찰되며, 여기에서는 LNA-AUG1 올리고가 7.5 마이크로몰에서 LNA-AUG10 화합물에 비해 가장 효과적이었다 (각각 서열번호 63 및 72). 10 개의 염기 표적화 서열로 구성된 비교적 짧은 LNA-AUG10 화합물은 바이러스 HA RNA 및 M2 단백질 발현 검정 둘 다에서 최소로 효과적이었다.

[0396] 실시예 5

2'OMe 올리고머를 사용한 조직 배양에서 인플루엔자 A 바이러스의 억제

[0398] 본 발명의 화합물은 또한, 포스포로티오에이트 결합에 의해서 연결된 2'OMe 잔기로 구성된 안티센스 유사체 올리고머를 포함한다. 3 개의 2'OMe 올리고는 IDT, 2'OMe-AUG1, 2'OMe-AUG2 및 2'OMe-SA1에 의해서 생산되었다; 각각 서열번호 12, 20 및 26. 이들 올리고머는 M1/M2 분절의 AUG 개시 코돈 또는 뉴클레오타이드 740에 위치하는 스플라이스 수용체 부위를 표적으로 하도록 디자인되었다. 2'OMe-SA1 서열 (서열번호 26)은 SA740으로 상기 실시예 3에 기술된 PPMO 화합물의 것과 부합한다. 2'OMe 화합물은 상기 실시예 3 및 4에 기술된 바와 같은 바이러스 HA RNA 레벨 및 M2 단백질 발현을 억제하는 이들의 능력에 대한 동일한 검정에서 시험하였다. 세포내 송달은 실시예 4에서 LNAs에 대해 기술된 바와 같이 짐노시스 (gymnosis)를 통해 달성되었다.

[0399] 3 개의 2'OMe 화합물은 모두 도 10a에 나타낸 바와 같이 7.5 마이크로몰에서 2.5 내지 4.5 로그로부터 바이러스 HA RNA 레벨을 감소시키는데 효과적이었다. 3 개의 화합물의 상대적 유효성은 또한 도 10b에 나타낸 바와 같이 M2 단백질 측정시험에서 관찰되었다. 가장 효과적인 화합물은 AUG 개시 부위 부분 (서열번호 20)을 표적으로 하는 2'OMe-AUG2 24mer였다. 유사하게 효과적인 것은 하류 M1/M2 스플라이스 수용체 부위를 표적으로 하는 2'OMe-SA1 올리고머 (서열번호 26)였다.

[0400] 실시예 6

시험관내에서 M1 및 M2 단백질 발현의 억제

[0402] M1 및 M2 단백질 발현에 대한 본 발명의 예시적인 화합물의 효과는 처리 및 감염된 AMJ2-C11 세포의 웨스턴 블로팅 분석을 사용하여 평가하였다. 본 발명의 예시적인 PPMO 화합물 (M1/M2 PPMO; P007-M1/M2-AUG; 3' 말단에서 서열번호 118에 컨주케이트된 서열번호 12)을 사용하여 3 마이크로몰로 밤새 MDCK 세포를 처리하였다. 그 후, 세포를 이어서 1 시간 동안 0.01 MOI로 H1N1-PR8에 의해서 감염시키고, 세척하였다. 감염시킨 지 18 시간 후에 세포를 용해시키고, 단백질 추출하였다. M1, M2 및 액틴 단백질과 반응하는 모노클로날 항체를 사용한 표준 면역블로팅 (웨스턴) 검정에 의한 후속 분석을 위해서 동등한 양의 단백질을 겔 상에 부하시켰다. 도 11에 나타낸 바와 같이, M1 및 M2 단백질 둘 다의 발현은 비처리 대조군 및 부적절한 대조 PPMO (렌그)에 비해서 감소되었다. 시그널 강도의 분석은 도 11에 나타낸 바와 같이 M2 단백질 발현이 M1 단백질 발현보다 더 큰 정도로 M1/M2 PPMO에 의해서 억제 (즉, M2의 경우에 9% 대 M1의 경우에 27%)되었음을 나타내었다. M1 및 M2에 대한 시그널 비교는 액틴 대조군에 대해서 표준화되었다.

[0403]

서열 목록

| 표적 서열 (5'에서 3'로) | 서열번호 |
|--|------|
| AGCAAAAGCAGGUAGAUUUAAAAGAUGAGUCUUCUAACCGAGGUCGAAACGUACGUUCU | 1 |
| AAGCAGGUAGAUUUAAAAGAUGAGUCUUCUAACCGAGGUCGAAACGUACGUUCU | 2 |
| AGCAAAAGCAGGUAGAUUUAAAAG | 3 |
| CUUAAAUAUCUACCUGCUUUGCU | 4 |
| AGCGAAAGCAGGUAGAUUUUGAAAAGAUGAGUCUUCUAACCGAGGUCGAAACGUACGUUCU | 5 |
| AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUGAAAAGAUGAGUCUUCUAACCGAGGUCGAAACGUACGUUCU | 6 |
| AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUGAAAAGAUGAGCCUUCUAACCGAGGUCGAAACGUACGUUCU | 7 |
| AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUGAAAAGAUGAGUCUUCUAACCGAGGUCGAAACGUACGUUCU | 8 |
| AAAUGUGCCUACCAGAACGAAUGGGAGUGCAGAUGCAGCGAUUCAA | 9 |
| AAAUGUGCCUACCAGAACGAAUGGGAGUGCAGAUGCAGCGAUUCAA | 10 |
| AGCGAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTGCAAACGTACGTTCTCTCTATCATCCCGTCAGGCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGACTTGAAGATGCTTTGCAGGAAAGAACCGATCTTGAGGTTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTCACCTGACTAAGGGGATTTAGGATTTGTTCACCGCTCACCGTCCCCAGTGAGCGAGGA | 11 |
| TGAGAACAGAACGGCTTGTCCAAAATGCCCTTAATGGGAACGGGGATCCAATAACATGGACAAAGCAGTTAAACTGTATAGGAAGCTCAAGAGGGAGATAACATTCCATGGGGCCAAAGAAATCTCACTCAAGTTATTCTGCTGGTCACTTGCCAGTTGATGGGCTCTATATAAACACAGGATGGGGCTGTGACCACTGAAGTGGCATTTGGCTGGTATGTGCAACCTGTGAACAGATTGCTGACTCCCAGCATCGGTCATAGGCAAATGGTGACAACAACCAACCCACTAATCAGACATGAGAACAGAACGGTTTAGGCAGCACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAAATGGCTGGATCGAGTGAGCAAGCAGAGGCCATGGAGGTGCTAGTCAGGCTAGGCAAATGGTGCAAGCGATGAGAACATTGGGACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAAATGATCTTCTTGAAAA | |
| TGAGAACAGAACGGCTTGTCCAAAATGCCCTTAATGGGAACGGGGATCCAAGTGATCCTCTCGCTATTGCGCAAATATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTTGATCTTGATCGCTTTTTTGCAAGTCAATGAGGAAGAATACGGACTGAAAGGAGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCAAAGTCATGAGGAAGAACAGCAAGGTGCTGTGGATGCTGACGATGGTCATTTGTCAGCATAGAGCTGGAGTAAAAAAACTACCTTGTCTACT | |
| 올리고머 표적화 서열 (5'에서 3'로) | |
| CGGTTAGAAGACTCATCTT | 12 |
| CGGT+TAGAAGAC+TCATC+TTT | 13 |
| AGAAGACTCATTTCAATA | 14 |

[0404]

| | |
|----------------------------|----|
| TTAGAAGACTCATCTTCAA | 15 |
| CTCGGTTAGAAGACTCATCT | 16 |
| ATCTTCAATATCTACCTGCTTTG | 17 |
| CTCATCTTCAATATCTACCTGCTT | 18 |
| CTCGGTTAGAAGACTCATCTTCAA | 19 |
| ACCTCGGTTAGAAGACTCATCTTC | 20 |
| TCGACCTCGGTTAGAAGACTCATCT | 21 |
| TTTCGACCTCGGTTAGAAGACTCAT | 22 |
| AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAAA | 23 |
| AGCAGGTAGATATTGAAAAATGAGT | 24 |
| CTCCCATTCGCTTCTGGTAGGCCT | 25 |
| CACTCCCATTGCTTCTGGTAGGC | 26 |
| TGCACTCCCATTGCTTCTGGTAG | 27 |
| TCTGCACTCCCATTGCTTCTGGT | 28 |
| CATCTGCACTCCCATTGCTTCTG | 29 |
| AGCAAAAGCAGIGTAGATAATC | 30 |
| AGCAAAAGCAGIG+TAGA+TAA+TC | 31 |
| CGGATTGACATCCATTCAAATG | 32 |
| CGGAT+TGACA+TCCAT+TCAAATG | 33 |
| CTT+TCAA+TATCTACC+TGCTT | 34 |
| C+TCA+TCTTCAA+TATCTACC | 35 |
| AC+TCA+TCTTCAA+TATCTAC | 36 |
| GAC+TCA+TCTTCAA+TATCTA | 37 |
| AGAC+TCA+TCTTCAA+TATCT | 38 |
| AAGAC+TCA+TCTTCAA+TATC | 39 |
| GAAGAC+TCA+TCTTCAA+TAT | 40 |
| AGAAGAC+TCA+TCTTCAA+TA | 41 |

[0405]

| | |
|-------------------------|----|
| TAGAAGAC+TCA+TCTTCAA+T | 42 |
| T+TAGAAGAC+TCA+TCTTCAA | 43 |
| GT+TAGAAGAC+TCA+TCTTCA | 44 |
| TCGGT+TAGAAGAC+TCA+TCCT | 45 |
| CCTCGGT+TAGAAGAC+TCA+TC | 46 |
| GACC+TCGGT+TAGAAGAC+TCA | 47 |
| PNA 표적화 서열 | |
| CGGTTAGAAGACTCATCTT | 48 |
| CGGTTAGAAGACTCATCT | 49 |
| CGGTTAGAAGACTCAT | 50 |
| AGAAGACTCATCTTCAATA | 51 |
| TTAGAAGACTCATCTTCAA | 52 |
| CTCGGTTAGAAGACTCATCT | 53 |
| TCAATATCTACCTGCTTTG | 54 |
| CTTCAATATCTACCTGCTT | 55 |
| AGCAAAAGCAGGTAGATATT | 56 |
| AGCAGGTAGATATTGAAAAA | 57 |
| CATTCGCTTCTGGTAGGCCT | 58 |
| CCCATTGCTTCTGGTAGGC | 59 |
| CTCCCATTGCTTCTGGTAG | 60 |
| CACTCCCATTGCTTCTGGT | 61 |
| TGCACTCCCATTGCTTCTG | 62 |
| LNA 표적화 서열 | |
| CgGtTaGaAgAcTcAtCtTt | 63 |
| GaAgAcTcAt | 64 |

| | |
|-------------------|----|
| GAaGaCtCAT | 65 |
| GAAGACTCAT | 66 |
| AGAAGACTCA | 67 |
| TAGAAGACTC | 68 |
| TTAGAAGACT | 69 |
| AAGACTCATC | 70 |
| AGACTCATCT | 71 |
| GACTCATCTT | 72 |
| ACTCATCTTT | 73 |
| CgGtTaGaAgAcTcAt | 74 |
| GtTaGaAgAcTcAt | 75 |
| GTTAGAAGACT | 76 |
| CATCTTTAAAT | 77 |
| CaTcTtTaAaTaTcTaC | 78 |
| CGGTTAGAAGACTCAT | 79 |
| GGTTAGAAGACTCATC | 80 |
| GTTAGAAGACTCATCT | 81 |
| TTAGAAGACTCATCTT | 82 |
| TAGAAGACTCATCTTT | 83 |
| AGAAGACTCATCTTTA | 84 |
| GAAGACTCATCTTTAA | 85 |
| AAGACTCATCTTTAAA | 86 |

[0407]

| | |
|------------------|-----|
| AGACTCATCTTAAAT | 87 |
| GACTCATCTTAAATA | 88 |
| ACTCATCTTAAATAT | 89 |
| CTCATCTTAAATATC | 90 |
| TCATCTTAAATATCT | 91 |
| CATCTTAAATATCTA | 92 |
| ATCTTAAATATCTAC | 93 |
| TCTTTAAATATCTACC | 94 |
| CTTTAAATATCTACCA | 95 |
| TTTAAATATCTACCAG | 96 |
| CgGgTaGaAgAcTcAt | 97 |
| GgTtAgAaGaCtCaTc | 98 |
| GtTaGaAgAcTcAtCt | 99 |
| TtAgAaGaCtCaTcTt | 100 |
| TaGaAgAcTcAtCtTt | 101 |
| AgAaGaCtCaTcTtTa | 102 |
| GaAgAcTcAtCtTtAa | 103 |
| AaGaCtCaTcTtTaAa | 104 |
| AgAcTcAtCtTtAaAt | 105 |
| GaCtCaTcTtTaAaTa | 106 |
| AcTcAtCtTtAaAtAt | 107 |
| CtCaTcTaTaAaTaTc | 108 |

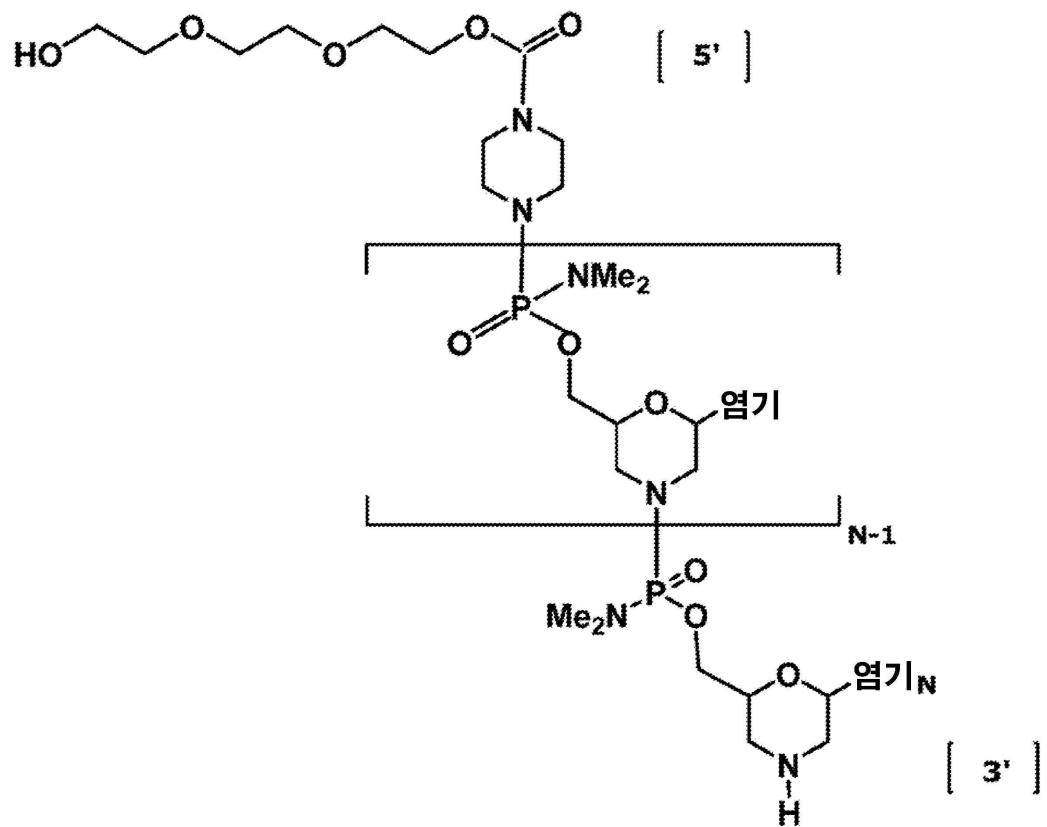
[0408]

| | |
|-------------------------------|-----|
| TcAtCtTtAaAtAtCt | 109 |
| CaTcTtTaAaTaTcTa | 110 |
| AtCtTtAaAtAtCtAc | 111 |
| TcTtTaAaTaTcTaCc | 112 |
| CtTtAaAtAtCtAcCa | 113 |
| TtTaAaTaTcTaCcAg | 114 |
| | |
| | |
| 펩타이드 서열 | |
| RRRQRRKKRC | 115 |
| RRRRRRRRFFC | 116 |
| RRRRFFRRRC | 117 |
| RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhxB | 118 |
| RRRRRRRRC | 119 |
| RRRRRRRRRC | 120 |
| RRRRRRRRG | 121 |
| RRRRRRRRRG | 122 |
| RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhxB | 123 |
| RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB | 124 |
| RARRARRARRARFFC | 125 |
| RGRGRGRGRRGRFFC | 126 |
| RRRRRRRRFFG | 127 |
| RRRRRRRRFFAhxB | 128 |

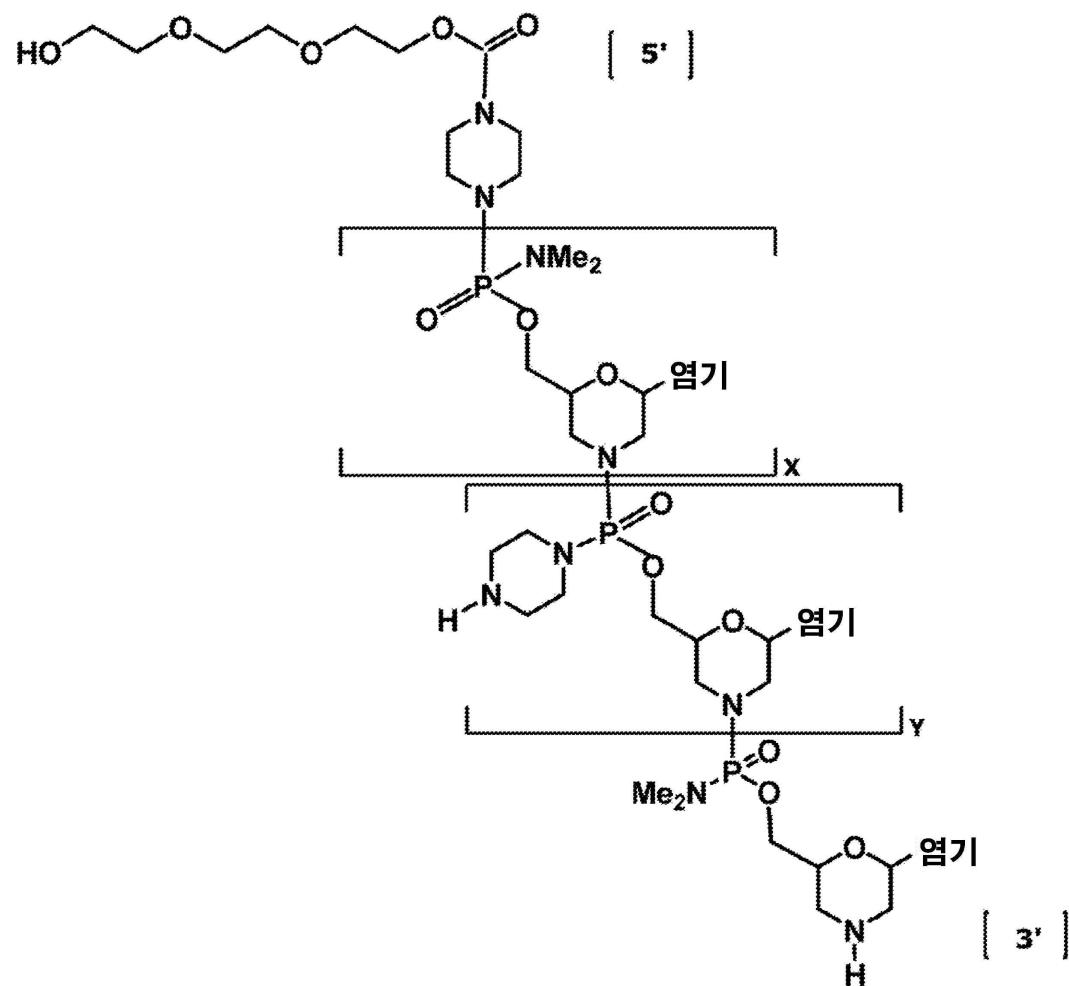
[0409]

도면

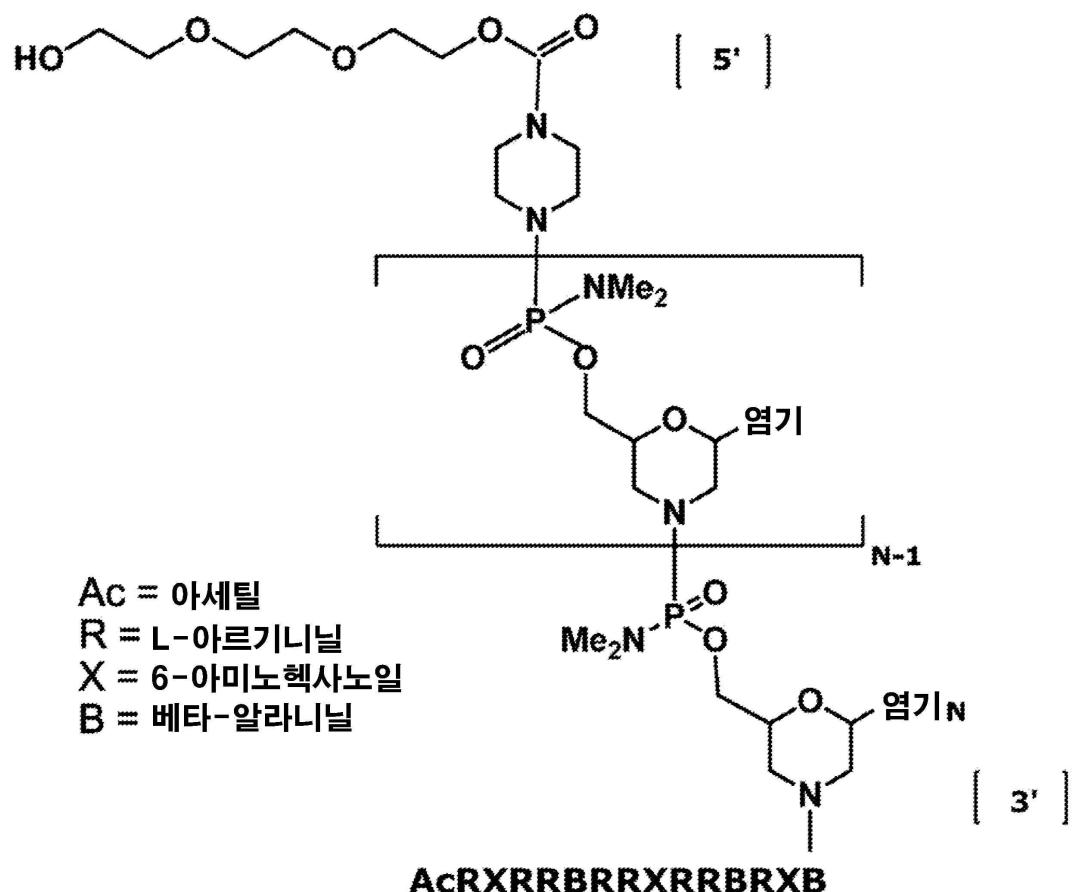
도면1a



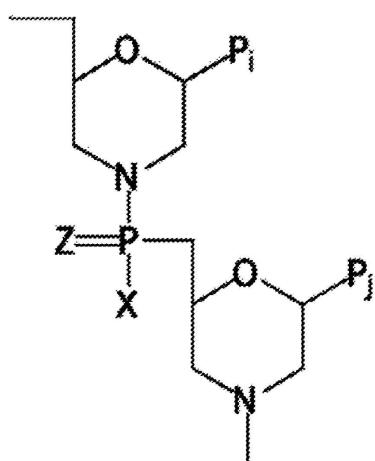
도면 1b



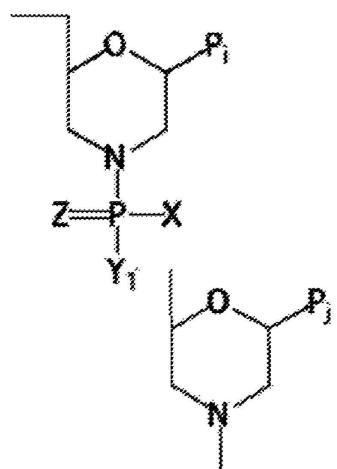
도면1c



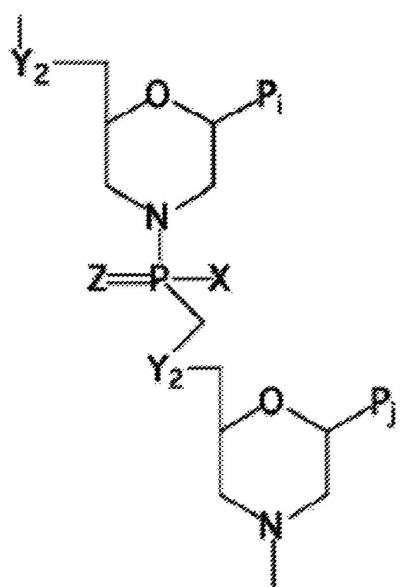
도면1d



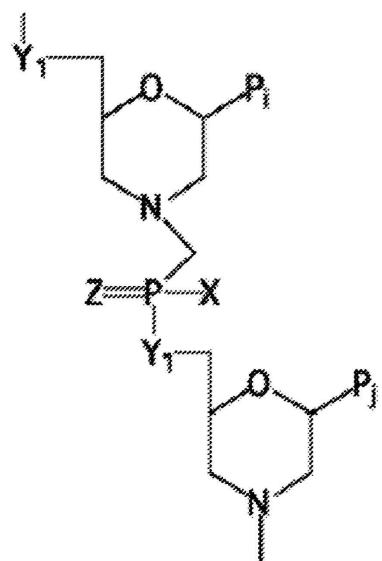
도면 1e



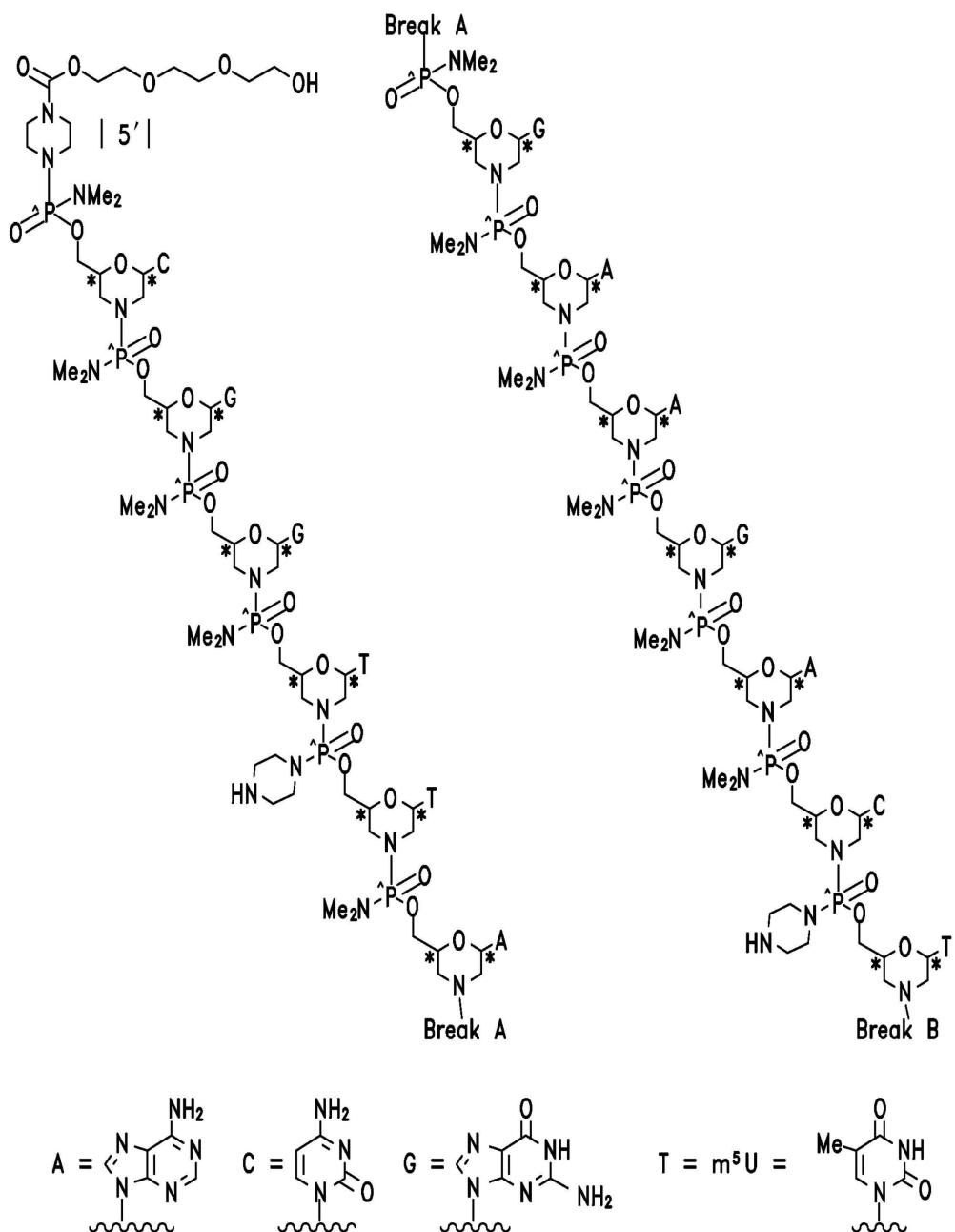
도면 1f



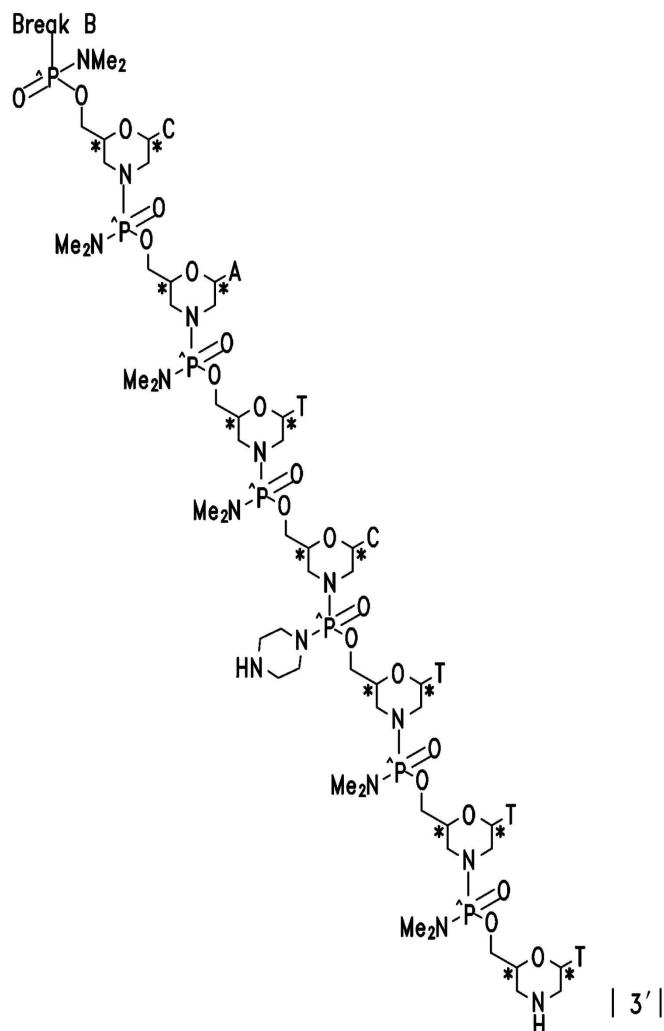
도면 1g



도면2a

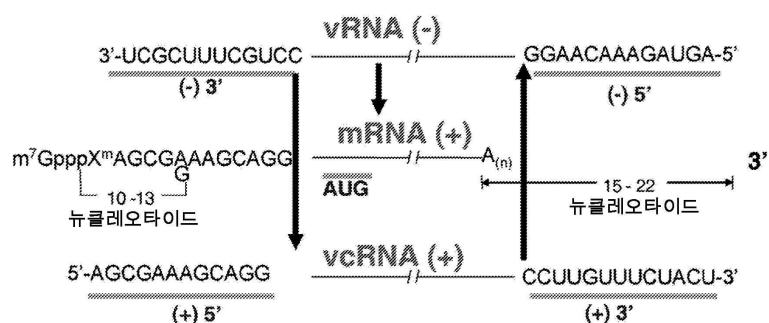


도면2b

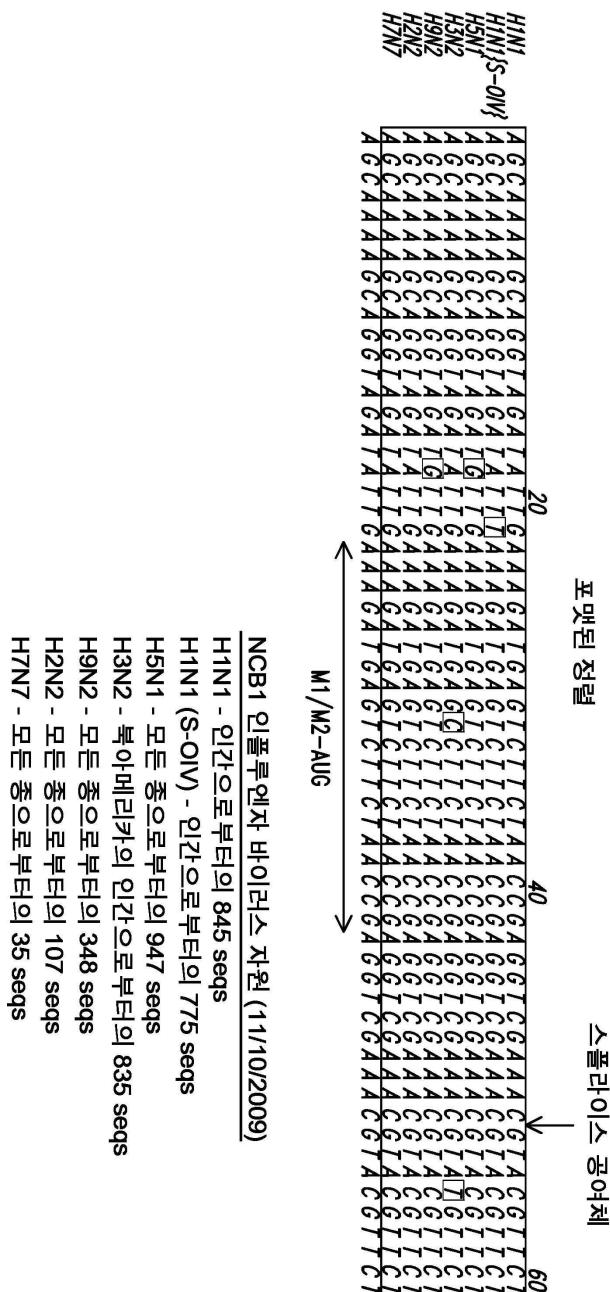


도면3

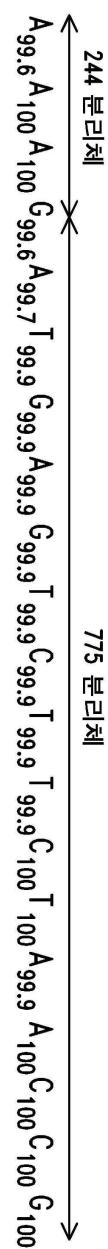
인플루엔자 RNA 복제 및 표적화 PMOs



도면4a

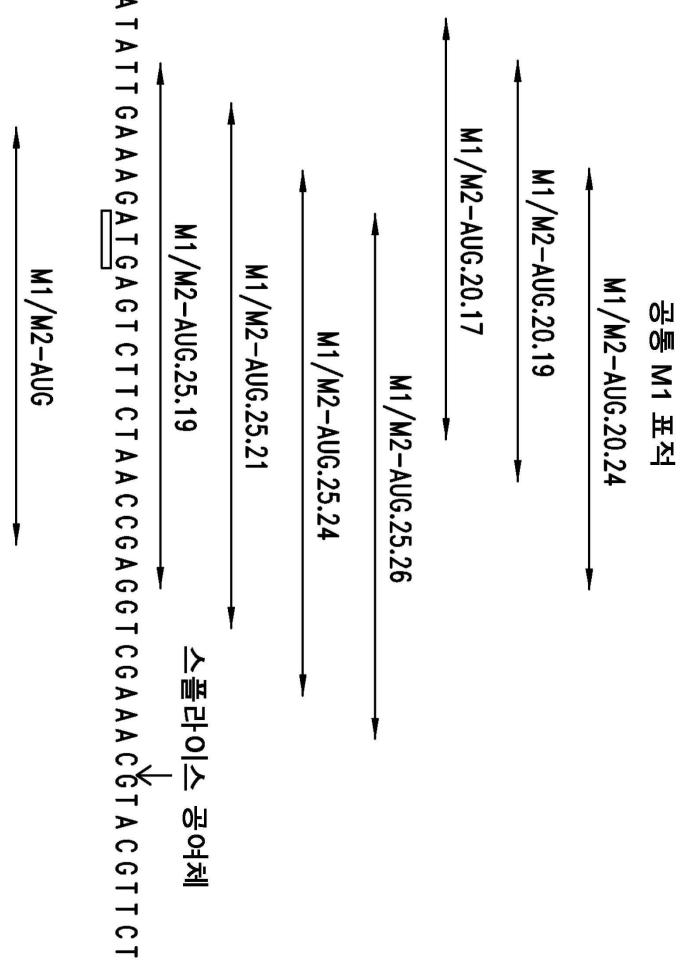


도면4b



도면5a

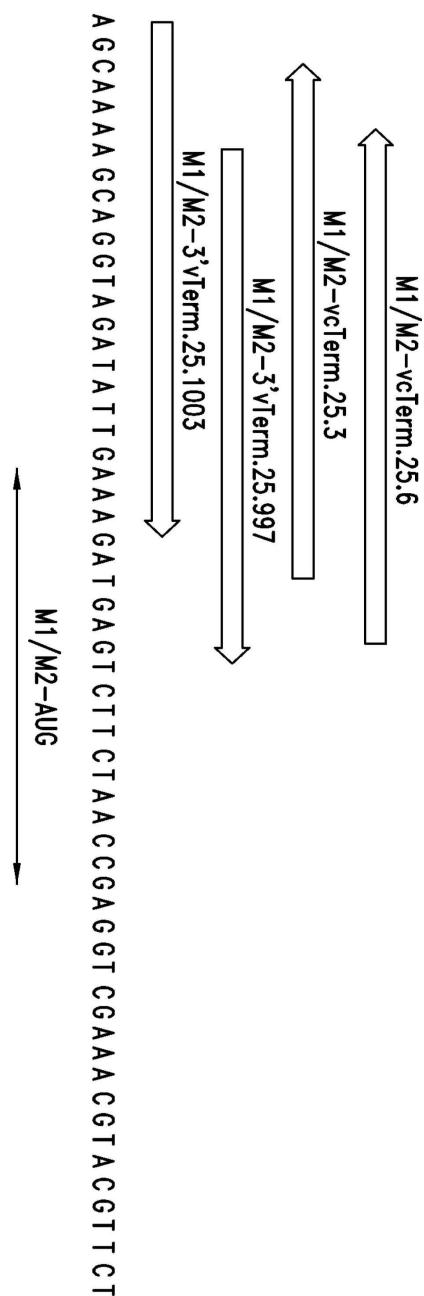
특허 서열 -AUG 표적



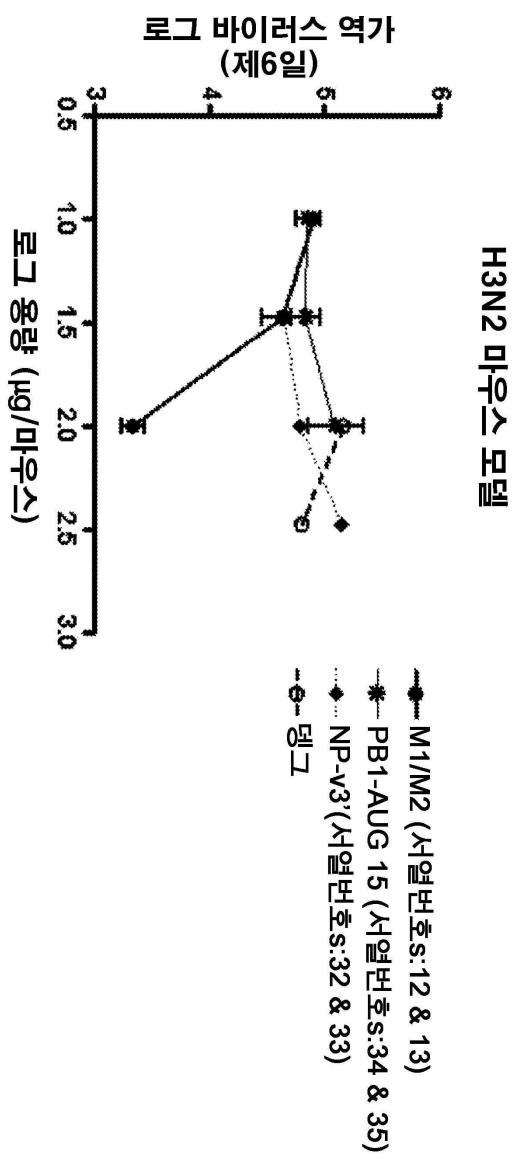
도면5b

특허 서열 - 말단 표적

공통 M1 표적

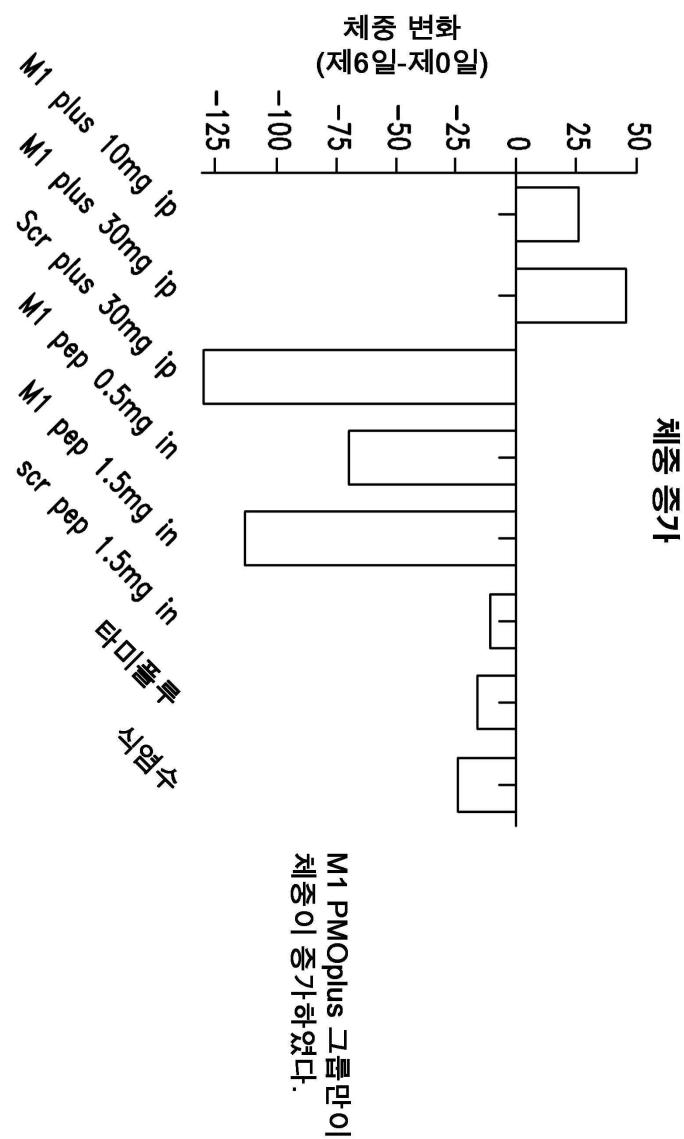


도면6

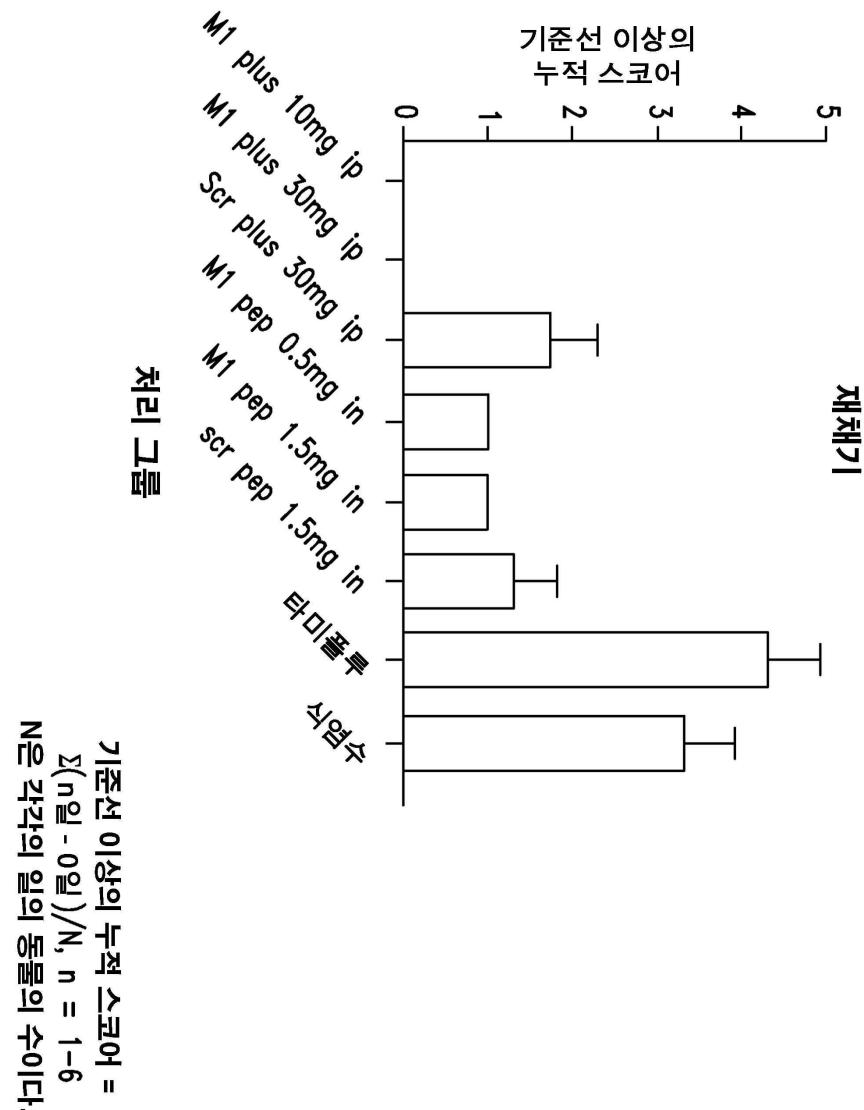


바이러스 역가에 있어서의 M1/M2 용량-의존적 감소

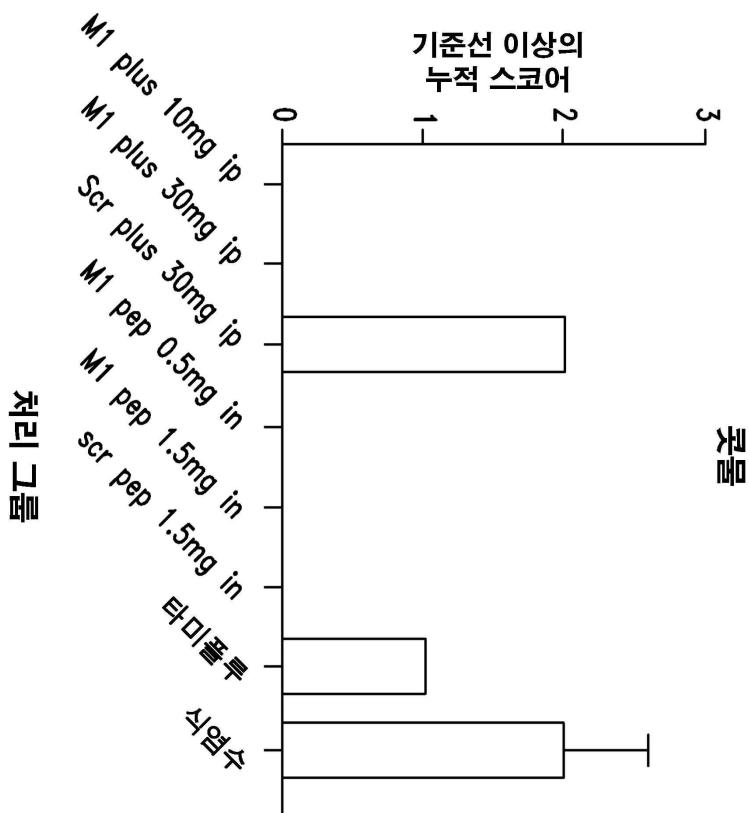
도면7a



도면7b



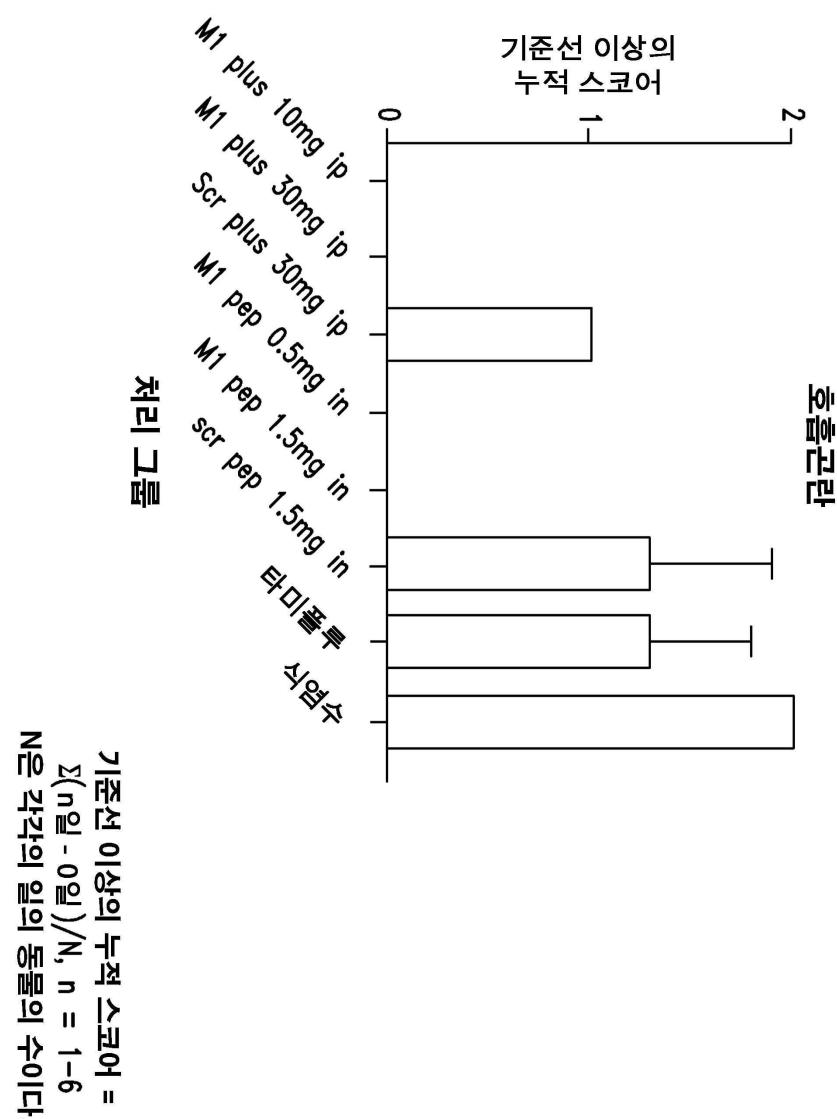
도면7c



처리 그룹

기준선 이상의 누적 스코어 =
 $\sum(n\text{일} - 0\text{일})/N, n = 1-6$
 N은 각각의 일의 동물의 수이다.

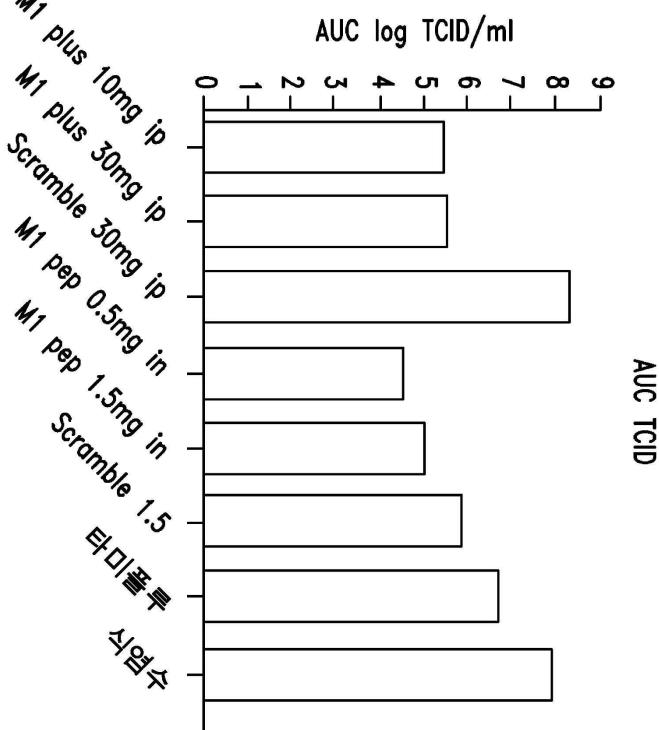
도면7d



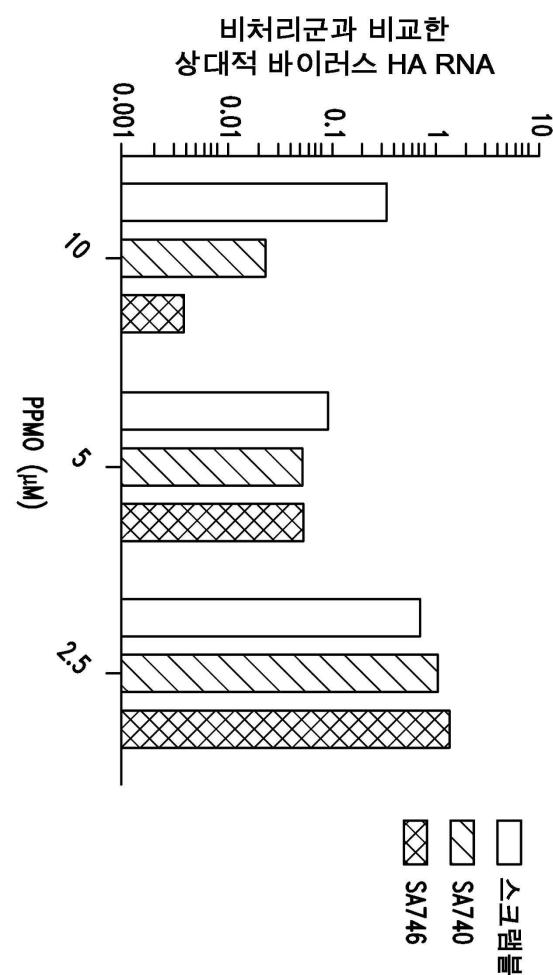
도면7e

제1일에서 제5일
식염수에 비해서 2.3 내지 2.4 로그 감소
타미플루에 비해서 1.2 내지 1.3 로그 감소

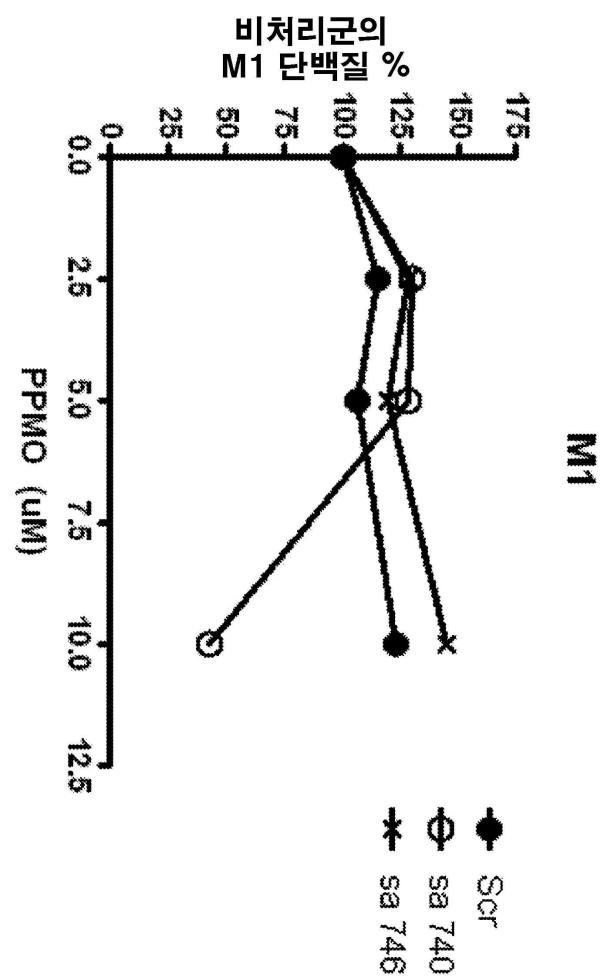
처리 그룹



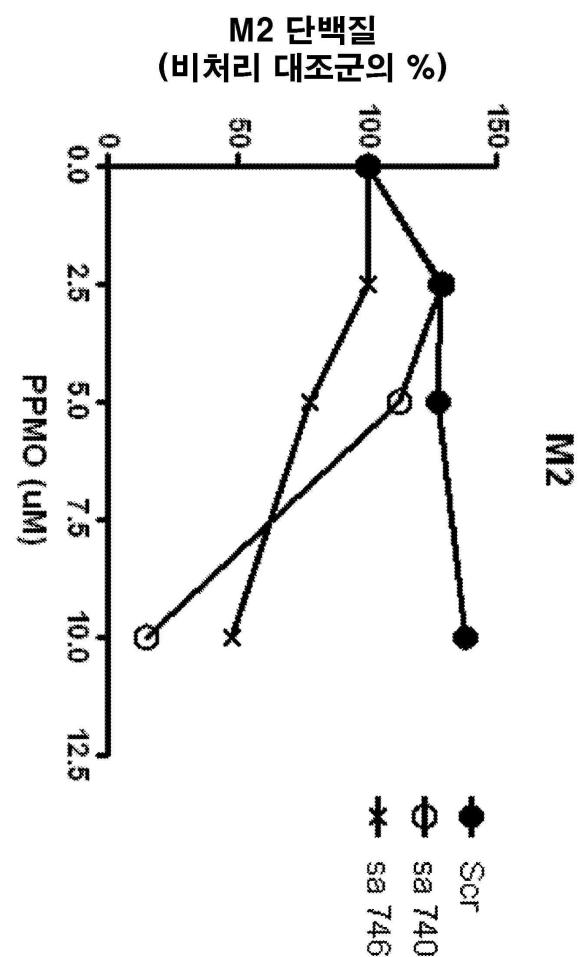
도면8a



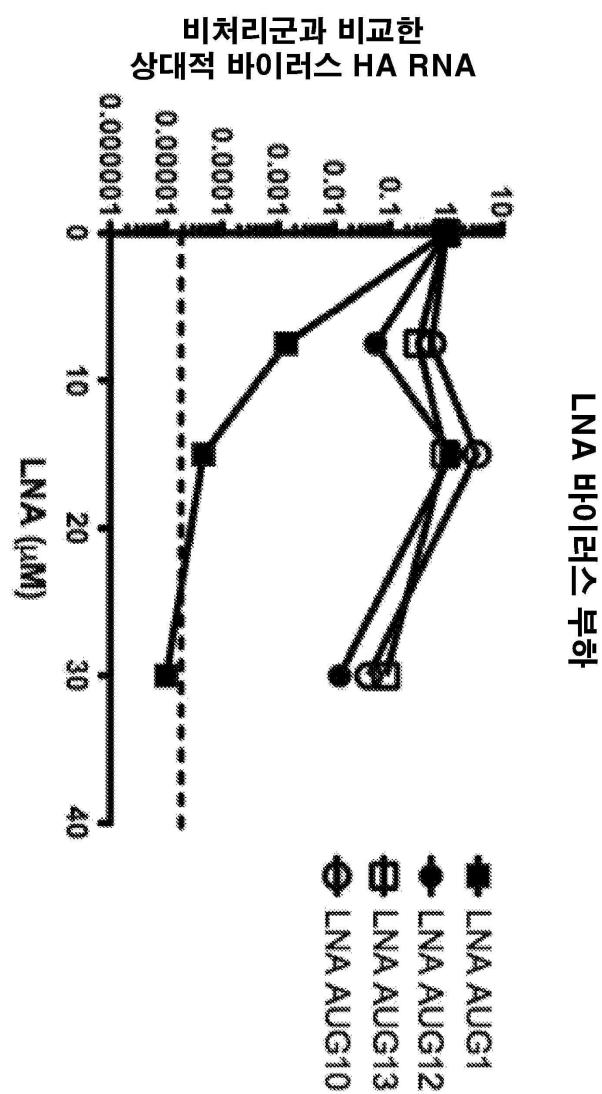
도면8b



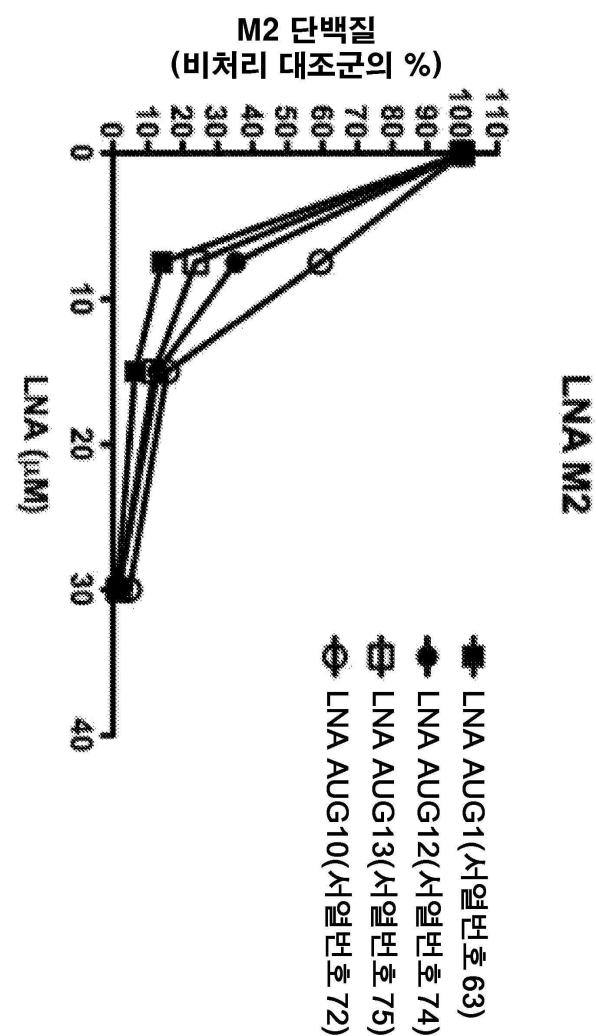
도면8c



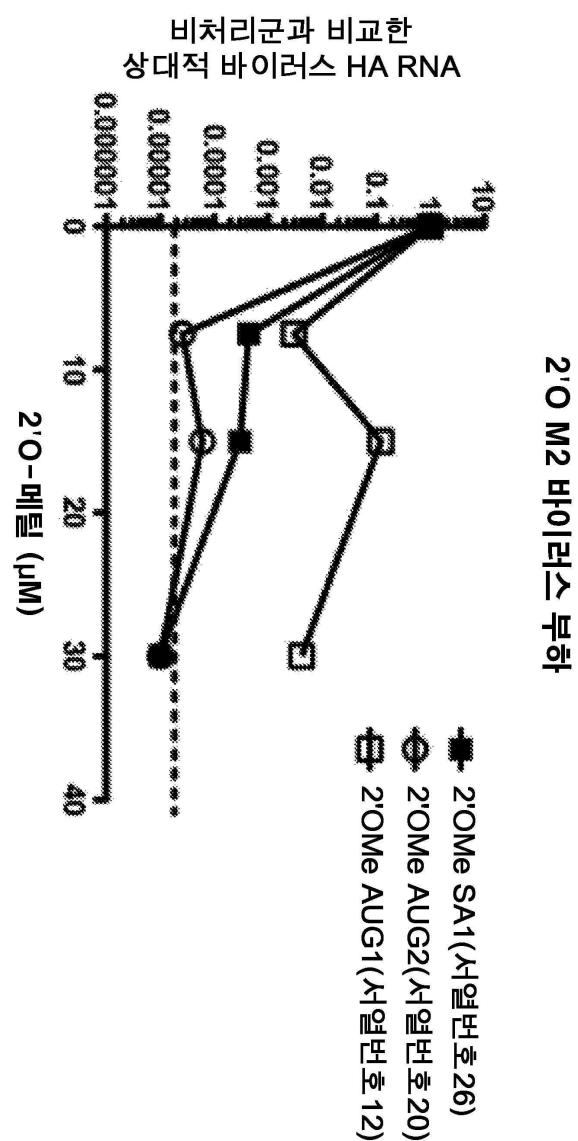
도면9a



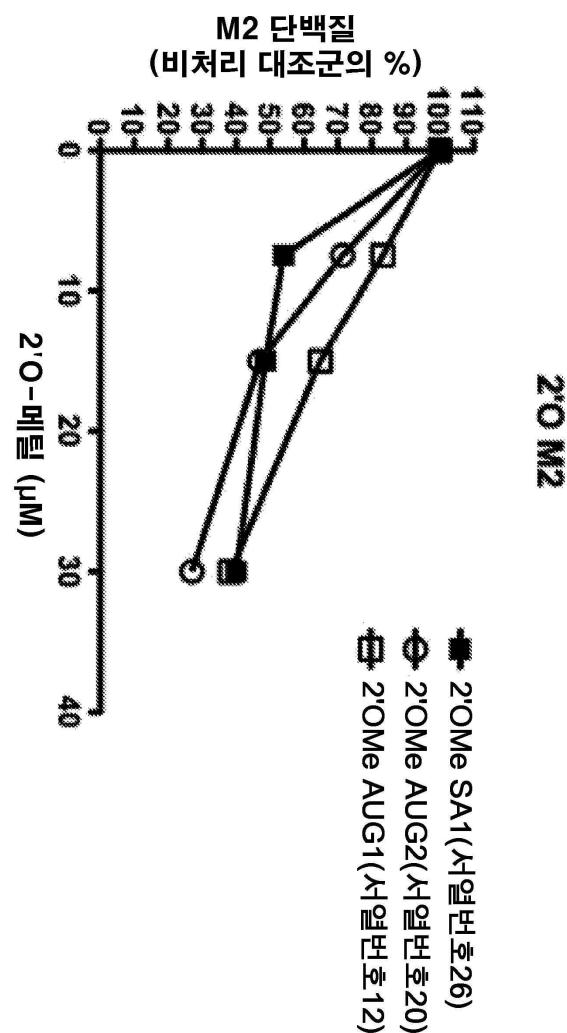
도면9b



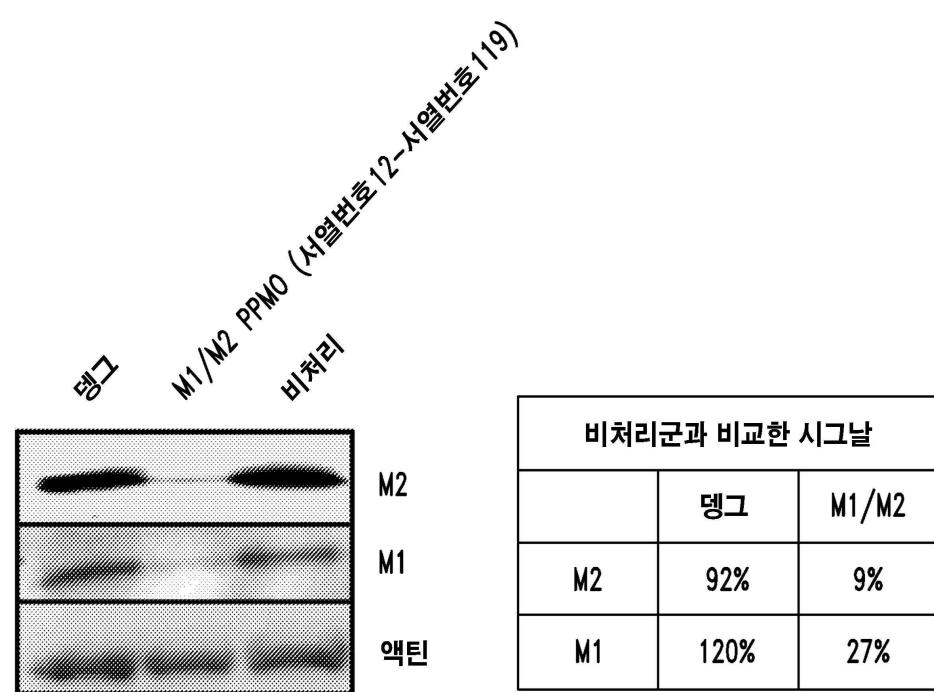
도면 10a



도면10b



도면11



서 열 목 록

<110> AVI BIOPHARMA, INC.
 <120> ANTISENSE ANTIVIRAL COMPOUND AND METHOD FOR TREATING INFLUENZA
 VIRAL INFECTION
 <130> IPA120387
 <150> US 61/261,278
 <151> 2009-11-13
 <150> US 61/292,056
 <151> 2010-01-04
 <150> US 61/377,382
 <151> 2010-08-26
 <160> 133
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 60
 <212> RNA
 <213>
 <400> 1

agcaaaagca gguagauauu uaaagaugag ucuucuaacc gaggucgaaa cguacguucu 60

<210> 2
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> Influenza A virus

<400> 2
 aagcagguag auuuuuaag augagucuuc uaaccgaggu cggaaa 45
 61/377,382

<210> 3
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Influenza A virus
 <400> 3

agcaaaagca gguagauauu uaaag 25
 <210> 4
 <211> 25

<212> RNA

<213> Influenza A virus

<400> 4

cuuuuaauau cuaccugcui uugcu 25

<210> 5

<211> 60

<212> RNA

<213> Influenza A virus

<400> 5

agcgaagca gguagauauu gaaagaugag ucuucuaacc gaggucgaaa cguacguucu 60

<210> 6

<211> 60

<212> RNA

<213> Influenza A virus

<400> 6

agcaaaagca gguagauauu gaaagaugag ucuucuaacc gaggucgaaa cguacguucu 60

<210> 7

<211> 60

<212> RNA

<213> Influenza A virus

<400> 7

agcaaaagca gguagauauu gaaagaugag cciucuaacc gaggucgaaa cguauguucu 60

<210> 8

<211> 60

<212> RNA

<213> Influenza A virus

<400> 8

agcaaaagca gguagauauu gaaagaugag ucuucuaacc gaggucgaaa cguacguucu 60

<210> 9

<211> 51

<212> RNA

<213> Influenza A virus

<400> 9

aaauuugcag gccuaccaga aacgaauggg agugcagaug cagcgauuca a 51

<210> 10

<211> 51

<212> RNA

<213> Influeza A virus

<400> 10

aaauuugcag gccuaccaga agcgaauuggg agugcagaug cagcgauuca a 51

<210> 11

<211> 1027

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 11

agcgaagca ggtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgttct 60

ctctatcatc ccgtcaggcc ccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt 120

tgcagggaaag aacaccgatc ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatct 180

gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tggttcacg ctcaccgtgc ccagtggcg 240

aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaaa tgcccttaat gggAACGGG atccaaataa 300

catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatgggc 360

caaagaaatc tcactcagtt attctgctgg tgcacttgcc agttgtatgg gcctcatata 420

caacaggatg gggctgtga ccactgaatg ggcatttgc ctggatgtg caacctgtga 480

acagattgt gactcccagc atcggctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaacccact 540

aatcagacat gagaacagaa tggtttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaa 600

ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggaggtt gctagtcagg ctaggcaaat 660

gggtgcaagcg atgagaacca ttggactca tcctagctcc agtgctggc tgaaaaatga 720

tcttcttcaa aattgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa 780

gtgatcctct cgctattgcc gcaaataatca ttggatctt gcacttgata ttgtggattc 840

ttgatcgct tttttcaaa tgcatttacc gtcgctttaa atacggactg aaaggaggc 900

cttctacgga aggagtgcua aagtctatga gggagaata tcgaaaggaa cagcagatg 960

ctgtggatgc tgacgatggt cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa actaccttgt 1020

ttctact 1027

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<400> 12

cggttagaag actcatctt

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)...(5)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)...(13)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)...(18)

<223> Cationic linkage between bases

<400> 13

cggttagaag actcatctt

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<400> 14

| | |
|--|----|
| agaagactca tcttcaata | 20 |
| <210> 15 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> PMO antisense targeting sequence | |
| <400> 15 | |
| ttagaagact catttcaa | 20 |
| <210> 16 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> PMO antisense targeting sequence | |
| <400> 16 | |
| ctcggttaga agactcatct | 20 |
| <210> 17 | |
| <211> 25 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> PMO antisense targeting sequence | |
| <400> 17 | |
| atcttcaat atctacctgc ttttg | 25 |
| <210> 18 | |
| <211> 25 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> PMO antisense targeting sequence | |
| <400> 18 | |
| ctcatttc aatatctacc tgctt | 25 |
| <210> 19 | |

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<400> 19

ctcggttaga agactcatct ttcaa

25

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<400> 20

acctcggtta gaagactcat ctttc

25

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<400> 21

tcgacctcggttagaagact catct

25

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<400> 22

tttcgacctcggttagaaga ctcata

25

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<400> 23

agcaaagca ggttagatatt gaaaa 25

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<400> 24

agcaggtaga tattaaaaa tgagt 25

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<400> 25

ctcccatcg ctctggtag gcct 24

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<400> 26

cactcccatt cgcttctggc aggc 24

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<400> 27

tgcactccca ttcgcttctg gtag 24

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<400> 28

tctgcactcc cattcgcttc tggt 24

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<400> 29

catctgcact cccattcgct tctg 24

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<220>

<221> modified_base

<222> 12

<223> I

<400> 30

agcaaaagca gngtagataa tc 22

<210> 31

<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> 12
 <223> I

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)...(4)

<223> Cationic linkage between bases

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)...(18)

<223> Cationic linkage between bases

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)...(21)

<223> Cationic linkage between bases

<400> 31

agcaaaagca gngtagataa tc 22

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<400> 32

cggattgaca tccattcaaa tg 22

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PMO antisense targeting sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (5)...(6)
<223> Cationic linkage between bases
<220>
<221> misc_feature
<222> (10)...(11)
<223> Cationic linkage between bases
<220>
<221> misc_feature
<222> (15)...(16)
<223> Cationic linkage between bases

<400> 33

cggttttgcata tccattcaaa tg 22

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)...(4)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)...(8)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)...(16)

<223> Cationic linkage between bases

<400> 34

ctttcaatat ctacctgctt

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(2)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)...(5)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)...(13)

<223> Cationic linkage between bases

<400> 35

ctcatttc aatatctacc

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)...(3)

<223> Cationic linkage between bases

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)...(6)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature
 <222> (13)...(14)

<223> Cationic linkage between bases

<400> 36

actcatctt caatatctac 20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)...(4)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)...(7)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)...(15)

<223> Cationic linkage between bases

<400> 37

gactcattt tcaatatcta 20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)...(5)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)...(8)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)...(16)

<223> Cationic linkage between bases

<400> 38

agactcatct ttcaatatct

20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)...(6)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)...(8)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)...(17)

<223> Cationic linkage between bases

<400> 39

aagactcatc tttaatatac 20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)...(7)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)...(10)

<223

> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)...(18)

<223> Cationic linkage between bases

<400> 40

gaagactcat ctttaatatac 20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)...(8)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)...(11)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<

221> misc_feature

<222> (18)...(19)

<223> Cationic linkage between bases

<400> 41

agaagactca tcittcaata 20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)...(9)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)...(12)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)...(20)

<223>

> Cationic linkage between bases

<400> 42

tagaagactc atcttcaat 20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(2)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)...(10)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)...(13)

<223> Cationic linkage between bases

<400> 43

ttagaagact catttcaa 20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)...(3)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)...(11)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)...(14)

<223> Cationic linkage between bases

<400> 44

gttagaagac tcatcttca

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)...(6)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)...(14)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)...(17)

<223> Cationic linkage between bases

<400> 45

tcggtagaa gactcattt

20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PMO antisense targeting sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)...(8)

<223> Cationic linkage between bases

<220>

<221> misc_feature
 <222> (15)...(16)
 <223> Cationic linkage between bases
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)...(19)
 <223> Cationic linkage between bases
 <400> 46
 cctcggttag aagactcatc 20
 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PMO antisense targeting sequence
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)...(5)
 <223> Cationic linkage between bases
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)...(10)
 <223> Cationic linkage between bases
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)...(18)
 <223> Cationic linkage between bases
 <400> 47
 gacctcggtt agaagactca 20
 <210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> PNA antisense targeting sequence
<400> 48
cggttagaag actcatctt 20

<210> 49
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PNA antisense targeting sequence
<400> 49
cggttagaag actcatct 18
<210> 50
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PNA antisense targeting sequence
<400> 50
cggttagaag actcat 16
<210> 51
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PNA antisense targeting sequence
<400> 51
agaagactca tcttcaata 20

<210> 52
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PNA antisense targeting sequence

<400> 52

ttagaagact catcttcaa 20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PNA antisense targeting sequence

<400> 53

ctcggttaga agactcatct 20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PNA antisense targeting sequence

<400> 54

tcaatatcta cctgctttg 20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PNA antisense targeting sequence

<400> 55

cttcaatat ctacctgctt 20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PNA antisense targeting sequence

<400> 56

agcaaaagca ggtagatatt 20

<210> 57
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PNA antisense targeting sequence
 <400> 57
 agcaggtaga tattaaaaaa 20

<210> 58
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PNA antisense targeting sequence
 <400> 58
 cattcgcttc tggtggcct 20
 <210> 59
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PNA antisense targeting sequence
 <400> 59
 cccattcgct tctggtaggc 20
 <210> 60
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PNA antisense targeting sequence
 <400> 60
 ctcccatcg ctctggtag 20

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PNA antisense targeting sequence

<400> 61

cactcccatt cgttctgg

20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PNA antisense targeting sequence

<400> 62

tgcaactcca ttcgcttctg

20

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 63

cggttagaag actcatctt

20

<210> 64

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 64

gaagactcat

10

<210> 65

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 65

gaagactcat

10

<210> 66

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 66

gaagactcat

10

<210> 67

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 67

agaagactca

10

<210> 68

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 68

tagaagactc

10

<210> 69

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 69

ttagaagact

10

<210> 70

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 70

aagactcatc

10

<210> 71

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 71

agactcatct

10

<210> 72

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 72

gactcatctt

10

<210> 73

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

| | |
|--|----|
| <400> 73 | |
| actcatctt | 10 |
| <210> 74 | |
| <211> 16 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> LNA antisense targeting sequence | |
| <400> 74 | |
| cggttagaag actcat | 16 |
| <210> 75 | |
| <211> 14 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> LNA antisense targeting sequence | |
| <400> 75 | |
| gttagaagac tcat | 14 |
| <210> 76 | |
| <211> 11 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> LNA antisense targeting sequence | |
| <400> 76 | |
| gttagaagac t | 11 |
| <210> 77 | |
| <211> 11 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> LNA antisense targeting sequence | |
| <400> 77 | |
| catcttaaaa t | 11 |

| | |
|--|----|
| <210> 78 | |
| <211> 17 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> LNA antisense targeting sequence | |
| <400> 78 | |
| cattttaaa tatctac | 17 |
| | |
| <210> 79 | |
| <211> 16 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> LNA antisense targeting sequence | |
| <400> 79 | |
| cggtagaag actcat | 16 |
| <210> 80 | |
| <211> 16 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> LNA antisense targeting sequence | |
| <400> 80 | |
| ggtagaaga ctcata | 16 |
| <210> 81 | |
| <211> 16 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> LNA antisense targeting sequence | |
| <400> 81 | |
| gttagaagac tcatac | 16 |
| | |
| <210> 82 | |

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 82

ttagaagact catctt

16

<210> 83

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 83

tagaagactc atcttt

16

<210> 84

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 84

agaagactca tcttta

16

<210> 85

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 85

gaagactcat cttaa

16

<210> 86

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 86

aagactcatc tttaaa

16

<210> 87

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 87

agactcatct ttaaat

16

<210> 88

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 88

gactcatctt taaata

16

<210> 89

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 89

actcatctt aaatat

16

<210> 90

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 90

ctcatcttta aatatc

16

<210> 91

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 91

tcatctttaa atatct

16

<210> 92

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 92

catcttaaa tatcta

16

<210> 93

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 93

atcttaaat atctac

16

<210> 94

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 94

tcttaataaataa tctacc 16

<210> 95

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 95

ctttaaatat ctaacc 16

<210> 96

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 96

tttaatatac taccag 16

<210> 97

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 97

cggttagaag actcat 16

<210> 98

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 98

ggtttagaaga ctcatac 16

| | |
|--|----|
| <210> 99 | |
| <211> 16 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> LNA antisense targeting sequence | |
| <400> 99 | |
| gttagaagac tcatct | 16 |
| | |
| <210> 100 | |
| <211> 16 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> LNA antisense targeting sequence | |
| <400> 100 | |
| ttagaagact catctt | 16 |
| | |
| <210> 101 | |
| <211> 16 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> LNA antisense targeting sequence | |
| <400> 101 | |
| tagaagactc atcttt | 16 |
| | |
| <210> 102 | |
| <211> 16 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> LNA antisense targeting sequence | |
| <400> 102 | |
| | |
| agaagactca tcttta | 16 |
| <210> 103 | |

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 103

gaagactcat cttaa

16

<210> 104

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 104

aagactcatc tttaaa

16

<210> 105

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 105

agactcatct tttaaat

16

<210> 106

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 106

gactcatctt taaata

16

<210> 107

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 107

actcatctt aaatat

16

<210> 108

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 108

ctcatctata aatatac

16

<210> 109

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 109

tcatcttaa atatct

16

<210> 110

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 110

catcttaaa tatcta

16

<210> 111

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 111

atcttaaat atctac 16

<210> 112

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 112

tcttaataa tctacc 16

<210> 113

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 113

ctttaaatat ctacca 16

<210> 114

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LNA antisense targeting sequence

<400> 114

tttaatatac taccag 16

<210> 115

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arginine-rich cell penetrating peptide

<400> 115

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Cys
 1 5 10

<210> 116

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arginine-rich cell penetrating peptide

<400> 116

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Cys
 1 5 10

<210> 117

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arginine-rich cell penetrating peptide

<400> 117

Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Arg Arg Arg Cys
 1 5 10

<210> 118

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arginine-rich cell penetrating peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2, 5, 8, 11, 13

<223> Acp

<220>

<221> MOD_RES

<222> 14

<223> bAla

<400> 118

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa

1 5 10

<210> 119

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arginine-rich cell penetrating peptide

<400> 119

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Cys

1 5

<210> 120

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arginine-rich cell penetrating peptide

<400> 120

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Cys

1 5 10

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arginine-rich cell penetrating peptide

<400> 121

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly

1 5

<210> 122

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arginine-rich cell penetrating peptide

<400> 122

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly

1 5 10

<210> 123

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arginine-rich cell penetrating peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2, 5, 8, 11, 14, 16

<223> Acp

<220>

<221> MOD_RES

<222> 17

<223> bAla

<400> 123

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 124

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arginine-rich cell penetrating peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2, 8, 13

<223> Acp

<220>

<221> MOD_RES

<222> 5, 11, 14

<223> bAla

<400> 124

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa

1 5 10

<210> 125

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arginine-rich cell penetrating peptide

<400> 125

Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Phe Phe Cys

1 5 10 15

<210> 126

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arginine-rich cell penetrating peptide

<400> 126

Arg Gly Arg Arg Gly Arg Arg Gly Arg Arg Phe Phe Cys

1 5 10 15

<210> 127

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arginine-rich cell penetrating peptide

<400> 127

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Gly

1

5

10

<210> 128

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arginine-rich cell penetrating peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> 12

<223> Acp

<220>

<221> MOD_RES

<222> 13

<223> bAla

<400> 128

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Xaa Xaa

1

5

10

<210> 129

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cell penetrating peptide motif

<220>

<221> VARIANT

<222> 1, 3, 4, 7, 9, 10

<223> Xaa = Lysine, Arginine or Arginine analog

<220>

<221> VARIANT

<222> 2, 8

<223> Xaa = a neutral amino acid, -C(O)-(CHR)n-NH-,
where n is 2 to 7 and R is H or methyl.

<220>

<221> VARIANT

<222> 5, 6, 11, 12

<223> Xaa = alpha-amino acid having a neutral aralkyl
side chain

<400> 129

Xaa Xaa

1 5 10

<210> 130

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<

223> Cell penetrating peptide motif

<220>

<221> VARIANT

<222> 2, 6, 8, 12

<223> Xaa = a neutral amino acid, -C(O)-(CHR)n-NH-,
where n is 2 to 7 and R is H or methyl.

Preferably Acp

<400> 130

Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa

1 5 10

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cell penetrating peptide motif

<220>

<221> VARIANT

<222> 3, 5, 9

<223> Xaa = a neutral amino acid, -C(O)-(CHR)n-NH-,

where n is 2 to 7 and R is H or methyl.

Preferably Acp

<400> 131

Arg Arg Xaa Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa

1 5

<210> 132

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arginine-rich cell penetrating peptide motif

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2, 5, 8, 11

<223> Acp

<400> 132

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg

1 5 10

<210> 133

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arginine-rich cell penetrating peptide motif

<220>

<221> MOD_RES

<222> 3, 6, 9, 12

<223> Acp

<400> 133

Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa

1 5 10