



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0016526
(43) 공개일자 2025년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 47/549 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2025-7002444(분할)

(22) 출원일자(국제) 2016년06월15일
심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2018-7001337
원출원일자(국제) 2016년06월15일
심사청구일자 2021년06월15일

(85) 번역문제출일자 2025년01월22일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/037685

(87) 국제공개번호 WO 2016/205410
국제공개일자 2016년12월22일

(30) 우선권주장
62/175,709 2015년06월15일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
엠佩 엘에이, 엘.엘.씨.
미국 메릴랜드 (우편번호 20815) 채비 체이스 위
스콘신 애비뉴 5425 스위트 801

(72) 발명자
해드위거 필립
독일 데-95326 쿨름바흐 프리츠-호른추크-슈트라
베 9 액솔립스 게엠베하
보르네로쉐 한스-피터
독일 데-95326 쿨름바흐 프리츠-호른추크-슈트라
베 9 액솔립스 게엠베하
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
기지회 기태호

(74) 대리인
김지희 김태호

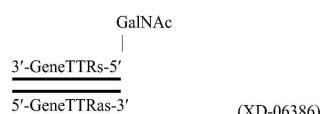
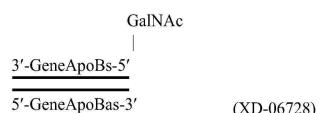
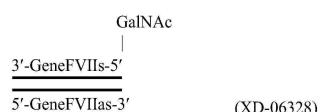
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드

(57) 요약

본 발명은 미리 결정된 크기 및 조성을 가질 수 있는 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. 예를 들면, 다양한 실시양태에서, 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드는 이로운 성질, 예를 들면 향상된 세포내 전달 및/또는 복수-유전자 억제 효과를 갖는 정의된 다중 접합체 siRNA의 형태로(즉, 2, 3개 또는 그보다 많은 siRNA 포함) 가질 수 있다. 다양한 실시양태에서, 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드는 신규한 합성 중간체 및 방법에 의하여 합성될 수 있다. 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드는 예를 들면 유전자 발현 감소, 생물학적 연구, 의학적 병태의 치료 또는 예방 또는 세포 또는 유기체에서 신규하거나 또는 변형된 표현형을 생성하기 위하여 사용될 수 있다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

A61K 47/6911 (2017.08)*A61K 9/127* (2025.01)*C12N 2310/14* (2013.01)*C12N 2310/315* (2013.01)*C12N 2310/317* (2013.01)*C12N 2310/346* (2013.01)*C12N 2310/351* (2013.01)*C12N 2310/51* (2013.01)

(72) 발명자

브라운 조나단 마일즈

미국 20815 메릴랜드주 체비 체이스 스윗 801 위스
콘신 아베뉴 5425 엠팩 엘에이 엘엘씨

달만 제임스 에버렛

미국 30306 조지아주 애틀란타 아파트먼트 403 이
스트 락 스프링스 로드 엔이 1295

노먼 크리스틴 케이.에이치.

미국 10538 뉴욕주 라치몬트 새킷 드라이브 10

(30) 우선권주장

62/175,714 2015년06월15일 미국(US)

62/175,718 2015년06월15일 미국(US)

62/203,243 2015년08월10일 미국(US)

62/216,314 2015년09월09일 미국(US)

62/216,317 2015년09월09일 미국(US)

62/216,318 2015년09월09일 미국(US)

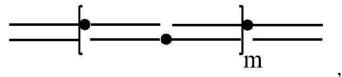
명세서

청구범위

청구항 1

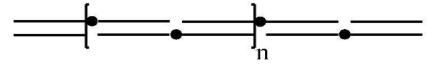
하기 구조식 중 하나에 따른 분리된 화합물:

<구조식 7>



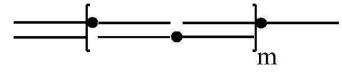
,

<구조식 8>



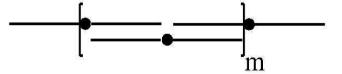
,

<구조식 12>



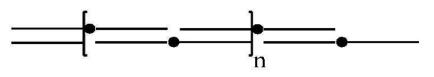
,

<구조식 13>



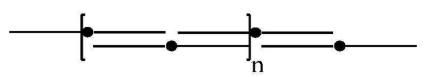
,

<구조식 14>



, 및

<구조식 15>



;

상기 식에서,

각각의 $\overline{\overline{\text{ }}}$ 는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며,

각각의 $\overline{\text{ }}$ 은 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며,

각각의 ●는 인접 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며;

m 은 1 이상의 정수이며, n 은 0 이상의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 각각의 공유 링커 ●는 동일하거나, 두 개 이상의 서로 다른 공유 링커 ●를 포함하는 것인, 분리된 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서, 분리된 화합물은

실질적으로 동일한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드의 호모-다합체를 포함하거나; 임의로, 실질적으로 동일한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드는 각각 생체 내에서 동일한 문자 표적을 표적으로 하는 siRNA를 포함하거나; 또

는

대안적으로, 2종 이상의 실질적으로 상이한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 —————의 해테로-다합체를 포함하는 것인, 분리된 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서, 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 ————— 중 적어도 하나는 siRNA를 포함하는 것인, 분리된 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서, 지질을 더 포함하는 것인, 분리된 화합물.

청구항 6

제1항에 있어서, 각각의 공유 링커 ●가 인접 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥 3'를 3'에 또는 5'를 5'에 연결하는 것인, 분리된 화합물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

- a. 공유 링커 ●는 티올 및 말레이미드, 티올 및 비닐술폰, 티올 및 피리딜디술피드, 티올 및 요오도아세트아미드, 티올 및 아크릴레이트, 아지드 및 알킨, 또는 아민 및 카르복실 기의 반응 생성물을 포함하거나;
- b. 공유 링커 ●가 DTME(디티오비스말레이미도에탄), BM(PEG)₂(1,8-비스(말레이미도)디에틸렌 글리콜), BM(PEG)₃(1,11-비스말레이미도-트리에틸렌글리콜), BMOE(비스말레이미도에탄), BMH(비스말레이미도헥산) 또는 BMB(1,4-비스말레이미도부탄) 또는 이들 중 어느 하나의 것의 숙신이민산 유도체를 포함하거나;
- c. 하나 이상의 공유 링커 ●는 절단 가능한 공유 링커를 포함하고; 임의로, 절단 가능한 공유 링커는 산 절단 가능한 에스테르 결합, 히드라진 결합, 아세탈 결합, 환원제 절단 가능한 결합, 바이오 절단 가능한 결합, 디술피드 결합 또는 효소 절단 가능한 결합을 포함하는 것인, 분리된 화합물.

청구항 8

(i) —————●———— 를 형성하는 단계로서,

(a) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ————— 및 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 —————R₁을 어닐링 시켜 —————R₁을 형성하고, —————R₁을 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 —————R₂와 반응시켜 —————●———— 를 형성하고, R₁ 및 R₂는 직접적 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 ●를 형성할 수 있는 화학적 모이어티인 단계; 또는

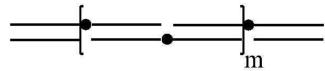
(b) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ————— 및 제1의 단일 가닥 이합체 —————●———— 를 어닐링 시켜 —————●———— 를 형성하는 단계;

(ii) —————●———— 및 제2의 단일 가닥 이합체 —————●———— 를 어닐링시켜 —————●————●———— 를 형성 하며, 임의로, 하나 이상의 추가의 단일 가닥 이합체 —————●———— 를 —————●————●———— 에 어닐링시켜 —————●————●————●————_m 또는 —————●————●————●————●————_n 를 형성하는 단계; 및

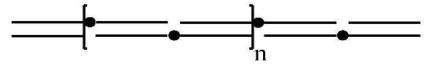
(iii) 제4의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ————— 를 단계 (ii)의 생성물에 어닐링시켜 구조식 7 또는 8을 형성하는 단계를 포함하는;

하기 구조식 7 또는 8에 따른 화합물의 합성 방법:

<구조식 7>



<구조식 8>



상기 식에서, 각각의 $\text{—}\text{—}$ 는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며, 각각의 ●는 인접하는 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며; m은 1 이상의 정수이며, n은 0 이상의 정수이다.

청구항 9

제8항에 있어서, $\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}$ 를 생성하는 단계를 더 포함하는 방법으로서, $\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}$ 를 생성하는 단계는

(i) 일치환된 생성물 $\text{—}\text{—}\circ$ 을 생성하는 조건 하에서 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}\text{R}_1$ 를 이작 용성 연결 모이어티 ○와 반응시키는 단계로서, R_1 은 ○와 반응할 수 있는 화학 기인 단계;

$\text{—}\text{—}\circ$ 를 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}\text{R}_2$ 와 반응시켜 $\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}$ 를 형성하는 단계로서, R_2 는 ○와 반응할 수 있는 화학 기인 단계를 포함하거나; 또는

(ii) 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}\text{R}_1$ 및 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}\text{R}_2$ 를 반응 시켜 $\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}$ 를 형성하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, n이 0인 구조식 8의 화합물을 합성하는 방법이고,

(i) $\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}$ 를 형성하는 단계로서;

(a) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}$ 및 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}\text{R}_1$ 를 어닐링 시켜 $\text{—}\text{—}\text{R}_1$ 을 형성하고, $\text{—}\text{—}\text{R}_1$ 을 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}\text{R}_2$ 와 반응시켜 $\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}$ 를 형성하고, R_1 및 R_2 는 직접적 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 ●를 형성할 수 있는 화학적 모이어티인 단계; 또는

(b) 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}\text{R}_1$ 및 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}\text{R}_2$ 를 반응시켜 $\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}$ 를 형성하고, 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}$ 및 $\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}$ 를 어닐링시켜 $\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}$ 를 형성함으로써

$\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}$ 를 형성하는 단계;

(ii) $\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}$ 및 $\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}$ 를 어닐링시켜 $\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}$ 를 형성하는 단계; 및

(iii) $\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}$ 및 제4의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}$ 를 어닐링시켜 $\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}$ 를 생성하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, m이 1인 구조식 7의 화합물을 합성하는 방법이고,

(i)  를 형성하는 단계로서;

(a) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  및 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  R_1 을 어닐링 시켜  R_1 을 형성하고,  R_1 을 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  R_2 와 반응시켜  를 형성하고, R_1 및 R_2 는 직접적 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 ●를 형성할 수 있는 화학적 모이어티인 단계; 또는

(b) 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  R_1 및 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  R_2 를 반응시켜  를 형성하고, 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  및  를 어닐링시켜  를 형성함으로써

 를 형성하는 단계;

(ii)  및 단일 가닥 이합체  를 어닐링시켜  를 형성하는 단계; 및

(iii)  및 단일 가닥 이합체  를 어닐링시켜  를 형성하는 단계; 및

(iv)  및 제4의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  를 어닐링시켜  를 형성하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 각각의 공유 링커 ●는 동일하거나, 두 개 이상의 서로 다른 공유 링커 ●를 포함하는 것인, 방법.

청구항 13

제8항에 있어서, 구조식 7 또는 8에 따른 화합물은

실질적으로 동일한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드의 호모-다합체를 포함하거나; 임의로, 실질적으로 동일한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드는 각각 생체 내에서 동일한 문자 표적을 표적으로 하는 siRNA를 포함하거나; 또는

대안적으로, 2종 이상의 실질적으로 상이한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드  의 헤테로-다합체를 포함하고; 임의로, 실질적으로 상이한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드  는 각각 상이한 유전자를 표적으로 하는 siRNA를 포함하는 것인, 방법.

청구항 14

제8항에 있어서, 각각의 공유 링커 ●가 인접 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥 3'를 3'에 또는 5'를 5'에 연결하는 것인, 방법.

청구항 15

제8항에 있어서,

a. 공유 링커 ●는 티올 및 말레이미드, 티올 및 비닐술폰, 티올 및 피리딜디술피드, 티올 및 요오도아세트아미드, 티올 및 아크릴레이트, 아지드 및 알킨, 또는 아민 및 카르복실 기의 반응 생성물을 포함하거나;

b. 공유 링커 ●가 DTME(디티오비스말레이미도에탄), BM(PEG)₂(1,8-비스(말레이미도)디에틸렌 글리콜),

BM(PEG)₃(1,11-비스말레이미도-트리에틸렌글리콜), BMOE(비스말레이미도에탄), BMH(비스말레이미도헥산) 또는 BMB(1,4-비스말레이미도부탄) 또는 이를 중 어느 하나의 것의 숙신이민산 유도체를 포함하는 것인, 방법.

청구항 16

제8항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 생성률은 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 순수한 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미리 결정된 크기 및 조성을 갖는 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. 예를 들면, 다양한 실시양태에서, 본 발명은 이로운 성질, 예를 들면 향상된 세포내 전달 및/또는 복수-유전자 억제 효과를 갖는 정의된 다중 접합체 siRNA의 형태로(즉, 2, 3개 또는 그보다 많은 siRNA 포함) 갖는 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. 다양한 실시양태에서, 본 발명은 신규한 합성 중간체 및, 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드의 합성 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 예를 들면 유전자 발현 감소, 생물학적 연구, 의학적 병태의 치료 또는 예방 또는 세포 또는 유기체에서 신규하거나 또는 변형된 표현형을 생성하기 위한 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드의 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 통상적으로, 몇가지 예를 들자면, 세포 내에서 생물학적 효과를 생성하는, 예컨대 siRNA 및 miRNA의 경우에서, 단백질 생성을 저해하는 세포막 및 세포벽을 가로질러 생물학적 활성 분자, 예컨대 작은 간접 RNA(siRNA) 및 마이크로RNA(miRNA)의 전달을 포함한 다수의 신규한 치료적 및 생명공학 양상이 존재한다. 기타 기술 및/또는 세포에 전달된 생물학적 활성 분자는 유전자 발현 및 단백질 생성을 향상시키는 효과를 갖는다.

[0003] 그러나, RNA 및 기타 올리고뉴클레오티드는 그의 천연 상태에서는 생체내에서 불안정하며, 단기간에 쉽게 분해된다. 게다가, RNA와 같이 그들 중 다수는 세포막 투과를 어렵게 하는 음이온성이어서 세포내 전달 효율이 낮게 된다.

[0004] 예로서 siRNA를 들면, 그의 전달 효율을 증가시키고자 하는 시도는 siRNA 및 다양한 양이온성 담체 물질, 예컨대 양이온성 중합체, 지질 또는 웨პ티드의 이온 결합을 통한 나노 크기의 이온성 착체의 생성을 포함한다. 문헌 [Jeong et al., Bioconjugate Chem, 20(1): 5-14 (2009)]. 그러나, 안정한 siRNA/양이온성 담체 착체의 제조와 관련된 도전이 존재한다.

[0005] 올리고뉴클레오티드, 예컨대 siRNA의 전달 효율을 증가시키고자 하는 기타 시도는 모이어티를 표적화하는 특정한 세포로의 올리고뉴클레오티드의 접합을 포함한다. 예를 들면 문헌[Nair et al., "Multivalent N-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing," J Am Chem Soc, 136 (49): 16958-16961 (2014)].

[0006] 그러나, 상기 및 기타 종래 기술의 접근법은 올리고뉴클레오티드 전달의 문제점을 해소하지 못한다. 따라서, 개선된 올리고뉴클레오티드 조성물에 대한 수요가 존재한다.

발명의 내용

[0007] 본 발명은 미리 결정된 크기 및 조성을 갖는 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드의 사용 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드뿐 아니라, 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드의 합성에 사용되는 신규한 중간체 화합물의 합성 방법에 관한 것이다.

[0008] 따라서, 본 발명은 미리 결정된 크기 및 조성, 개선된 하전 밀도, 개선된 전달 및/또는 개선된 효율을 갖는 (예, 그의 접합되지 않은 상태에서의 동일한 모이어티에 비하여) RNA 및/또는 DNA 다중 접합체를 제공한다. 다중 접합체가 적절한 담체와 착체를 형성하거나 및/또는 또 다른 화학적 또는 생물학적 모이어티, 예컨대 세포-표적 리간드에 접합될 경우, 이는 향상된 생물학적 또는 치료적 효과를 위한 세포막 또는 세포벽을 가로지른 더

큰 효율 및 안전성으로 전달될 수 있다.

[0009] 따라서, 본 발명의 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드의 잇점은 세포로의 올리고뉴클레오티드 전달(예, 세포 표적 리간드 결합 사례에 대하여 더 많은 올리고뉴클레오티드의 전달)의 증가, 상이한 올리고뉴클레오티드 대 세포의 미리 결정된 화학량론적 비(예, 3종의 상이한 올리고뉴클레오티드를 포함하는 삼합체 다중 접합체의 경우 1:1:1)의 전달 능력 및/또는 단일 화학적 실체로서 치료적 올리고뉴클레오티드의 조합(예, 3종의 상이한 올리고뉴클레오티드를 포함하는 삼합체 다중 접합체는 1종의 분자임)의 전달 능력을 포함할 수 있으며, 그리하여 그의 사용 및 조절 검토를 단순화시킨다.

[0010] 또한, 본 발명은 적어도 부분적으로 신규한 합성 방법 및 중간체의 개발시 미리 결정된 크기 및 조성을 갖는 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드의 제조를 허용하는 것에 기초한다.

[0011] 다양한 양태에서, 본 발명은 예를 들면 미리 결정된 크기 및 조성을 갖는 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드의 합성에 사용될 수 있는 공유 링커에 커플링된 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0012] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 1에 따른 화합물을 제공한다:

[0013] <구조식 1>



[0015] 상기 식에서,

[0016] X는 그의 3' 또는 5' 말단을 통하여 R1에 결합된 핵산이며;

[0017] R1은 포스포디에스테르, 티오포스포디에스테르, 슬레이트, 아미드, 글리콜이거나 또는 존재하지 않으며;

[0018] R2는 C2-C10 알킬, 알콕시 또는 아릴 기이거나 또는 존재하지 않으며;

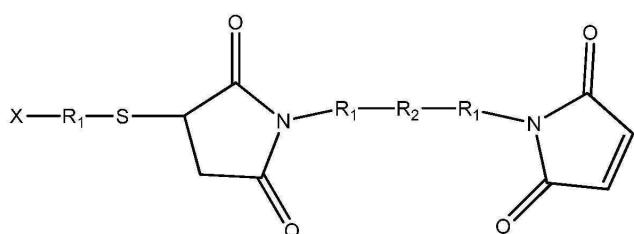
[0019] A는 친핵체 및 친전자체의 반응 생성물이며;

[0020] R3은 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오프로피오네이트 또는 디솔피드이며;

[0021] B는 친핵체 또는 친전자체이다.

[0022] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 2에 따른 화합물을 제공한다:

[0023] <구조식 2>



[0024]

[0025] 상기 식에서,

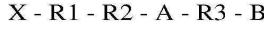
[0026] X는 포스페이트 또는 티오포스페이트를 경유하여 그의 3' 또는 5' 말단에서 R1에 결합된 핵산이며;

[0027] 각각의 R1은 독립적으로 C2-C10 알킬, 알콕시 또는 아릴 기이며;

[0028] R2는 티오프로피오네이트 또는 디솔피드 기이다.

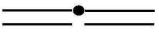
[0029] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 3에 따른 화합물을 제공한다:

[0030] <구조식 3>



[0032] 상기 식에서,

[0033] X는 그의 3' 또는 5' 말단을 통하여 R1에 결합된 핵산이며;

- [0034] R1은 포스페이트, 티오포스페이트, 슬페이트, 아미드, 글리콜이거나 또는 존재하지 않으며;
- [0035] R2는 C2-C10 알킬, 알콕시 또는 아릴 기이거나 또는 존재하지 않으며;
- [0036] A는 제1의 및 제2의 반응성 모이어티의 반응 생성물이며;
- [0037] R3은 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알콕시, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오프로피오네이트 또는 디솔피드이며;
- [0038] B는 제3의 반응성 모이어티이다.
- [0039] 다양한 양태에서, 본 발명은 공유 링커에 커플링된 올리고뉴클레오티드의 합성 방법을 제공한다.
- [0040] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 1에 따른 화합물의 합성 (또는 구조식 2 또는 3에 따른 화합물의 합성을 위하여 변형된) 방법을 제공하며, 그러한 방법은 작용화된 핵산 X-R1-R2-A' 및 공유 링커 A''-R3-B(여기서 A' 및 A''는 친핵체 및 친전자체를 포함함)를 X-R1-R2-A'의 끝은 용액 중에서 및 화학량론적 과량의 A''-R3-B와 반응시켜 하기 구조식 1의 화합물을 형성하는 것을 포함한다:
- [0041] <구조식 1>
- [0042]
$$X - R1 - R2 - A - R3 - B$$
- [0043] 상기 식에서,
- [0044] X는 그의 3' 또는 5' 말단을 통하여 R1에 결합된 핵산이며;
- [0045] R1은 포스포디에스테르, 티오포스포디에스테르, 슬페이트, 아미드, 글리콜이거나 또는 존재하지 않으며;
- [0046] R2는 C2-C10 알킬, 알콕시 또는 아릴 기이거나 또는 존재하지 않으며;
- [0047] A는 친핵체 및 친전자체의 반응 생성물이며;
- [0048] R3은 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오프로피오네이트 또는 디솔피드이며;
- [0049] B는 친핵체 또는 친전자체이다.
- [0050] 그러한 방법은 (i) 핵산의 고체 상 합성 중에 포스포르아미다이트 올리고머화 화학을 사용하여 티올을 도입하거나 또는 (ii) 고체 상 합성 중에 도입된 디솔피드를 환원시켜 작용화된 핵산 X-R1-R2-A'(여기서 A'는 티올(-SH)을 포함함)를 합성하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0051] 다양한 양태에서, 본 발명은 이합체 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0052] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 4에 의한 분리된 화합물을 제공한다:
- [0053] <구조식 4>
- [0054] 
- [0055] 상기 식에서,
- [0056] 각각의 는 동일한 분자 표적과 생체내에서 반응하도록 설계된 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며,
- [0057] ●는, 그의 3' 또는 5' 말단에서 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커로서, 구조식-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-을 가지며, 여기서
- [0058] 각각의 R1은 독립적으로 포스포디에스테르, 티오포스포디에스테르, 슬페이트, 아미드, 글리콜이거나 또는 존재하지 않으며;
- [0059] 각각의 R2는 독립적으로 C2-C10 알킬, 알콕시 또는 아릴 기이거나 또는 존재하지 않으며;
- [0060] 각각의 A는 독립적으로 친핵체 및 친전자체의 반응 생성물이며,
- [0061] R3은 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알콕시, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오프로피오네이트 또는 디솔피드이다.
- [0062] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 5에 따른 분리된 화합물을 제공한다:

[0063] <구조식 5>



[0065] 상기 식에서,

[0066] ──은 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며,

[0067] ~~~ 는 제1의 것과는 상이한 서열을 갖는 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며;

[0068] ●는, 그의 3' 또는 5' 말단에서 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커로서, 구조식-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-을 가지며, 여기서

[0069] 각각의 R1은 독립적으로 포스페이트, 술페이트, 아미드, 글리콜이거나 또는 존재하지 않으며;

[0070] 각각의 R2는 독립적으로 C2-C10 알킬, 알콕시 또는 아릴 기이거나 또는 존재하지 않으며;

[0071] 각각의 A는 독립적으로 티올 및 말레이미드, 티올 및 비닐술폰, 티올 및 피리딜디술피드, 티올 및 요오도아세트 아미드, 티올 및 아크릴레이트, 아지드 및 알킨 또는, 아민 및 카르복실 기의 반응 생성물이며,

[0072] R3은 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알콕시, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오프로피오네이트 또는 디술피드이다.

[0073] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 6에 따른 분리된 화합물을 제공한다:

[0074] <구조식 6>



[0076] 상기 식에서,

[0077] ──는 제1의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며;

[0078] ~~~ 는 제1의 것과는 상이한 서열을 갖는 제2의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며;

[0079] ●는, 그의 3' 또는 5' 말단에서 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커로서, 구조식-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-을 가지며, 여기서

[0080] 각각의 R1은 독립적으로 포스페이트, 술페이트, 아미드, 글리콜이거나 또는 존재하지 않으며;

[0081] 각각의 R2는 독립적으로 C2-C10 알킬, 알콕시 또는 아릴 기이거나 또는 존재하지 않으며;

[0082] 각각의 A는 독립적으로 티올 및 말레이미드, 티올 및 비닐술폰, 티올 및 피리딜디술피드, 티올 및 요오도아세트 아미드, 티올 및 아크릴레이트, 아지드 및 알킨 또는, 아민 및 카르복실 기의 반응 생성물이며,

[0083] R3은 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알콕시, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오프로피오네이트 또는 디술피드이다.

[0084] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 11에 따른 분리된 화합물을 제공한다:

[0085] <구조식 11>



[0087] 상기 식에서,

[0088] ──는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며,

[0089] ──는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며,

[0090] ●는 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이다.

[0091] 다양한 양태에서, 본 발명은 이합체 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드의 합성 방법을 제공한다.

[0092] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 5의 화합물의 합성 방법을 제공하며:

[0093] <구조식 5>



[0095] 상기 식에서,

[0096] —————은 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며,

[0097] ~~~~~ 는 제1의 것과는 상이한 서열을 갖는 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며;

[0098] ●는 그의 3' 또는 5' 말단에서 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며, 그러한 방법은

[0099] (i) 일치환된 생성물 —————○을 생성하는 조건 하에서 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 —————R를 이작용성 연결 모이어티 ○(여기서 R1은 ○와 반응할 수 있는 화학 기임)와 반응시키는 단계;

[0100] (ii) —————○를 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ~~~~~R₂ (여기서 R2는 ○와 반응할 수 있는 화학기임)와 반응시켜 —————~~~~~를 형성하는 단계를 포함한다.

[0101] 그러한 방법은 상보성 ————— 및 ~~~~~를 어닐링시켜 하기 구조식 6을 산출하는 단계를 더 포함할 수 있다:

[0102] <구조식 6>



[0104] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 4의 분리된 화합물의 합성 방법을 제공하며:

[0105] <구조식 4>



[0107] 상기 식에서, 각각의 ————— 는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며, ●는 그의 3' 또는 5' 말단에서 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며, 그러한 방법은

[0108] (i) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 —————R₁를 이작용성 연결 모이어티 ○(여기서 R1은 ○와 반응할 수 있는 화학 기임)와 반응시켜 일치환된 생성물 —————○를 형성하는 단계;

[0109] (ii) —————○를 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 —————R₂ (여기서 R2는 ○와 반응할 수 있는 화학기임)와 반응시켜 단일 가닥 이합체 —————●————를 형성하는 단계;

[0110] (iii) 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 동시에 또는 순차적으로 어닐링시켜 —————●————를 형성하는 단계를 포함한다.

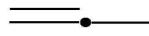
[0111] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 4의 분리된 화합물의 합성 방법을 제공하며:

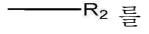
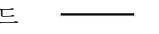
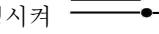
[0112] <구조식 4>

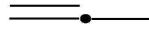


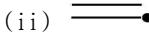
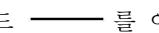
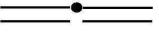
[0114] 상기 식에서, 각각의 ————— 는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며, ●는 그의 3' 또는 5' 말단에서 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며, 그러한 방법은

[0115] (i) (a) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ————— 및 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 —————R₂를 어닐링시켜 —————R₁를 형성하며, —————R₁를 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 —————R₃(여기서 R1 및 R2는 직접적 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 ●를 형성할 수 있는 화학적 모이어티임)와 반응시켜

 를 형성하거나; 또는

[0116] (b) 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  및 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  를 반응시켜  를 형성하고, 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  및  를 어닐링시켜  를 형성함으로써

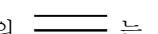
[0117]  를 형성하는 단계;

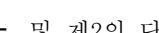
[0118] (ii)  및 제4의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  를 어닐링시켜  를 형성하는 단계를 포함한다.

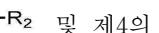
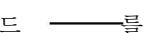
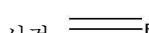
[0119] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 4의 분리된 화합물의 합성 방법을 제공하며:

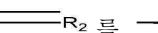
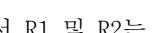
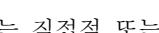
[0120] <구조식 4>

[0121] 

[0122] 상기 식에서, 각각의  는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며, ●는 그의 3' 또는 5' 말단에서 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며, 그러한 방법은

[0123] (a) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  및 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  를 어닐링시켜  를 형성하는 단계;

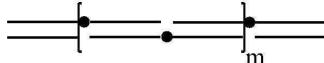
[0124] (b) 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  및 제4의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  를 어닐링시켜  를 형성하는 단계;

[0125] (b)  및  를  (여기서 R1 및 R2는 직접적 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 ●를 형성할 수 있는 화학적 모이어티임)와 반응시켜  를 형성하는 단계를 포함한다.

[0126] 다양한 양태에서, 본 발명은 정의된 삼중접합체 및 정의된 사중접합체를 포함한, 다합체($n > 2$) 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

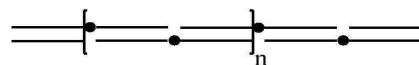
[0127] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 7 또는 8에 따른 화합물을 제공한다:

[0128] <구조식 7>



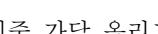
[0129]

[0130] <구조식 8>



[0131]

[0132] 상기 식에서,

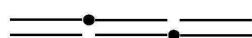
[0133] 각각의  는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며,

[0134] 각각의 ●는 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며;

[0135] m은 정수 ≥ 1 이며, n은 정수 ≥ 0 이다.

[0136] 한 양태에서, 본 발명은 $n=0$ 인 하기 구조식 9에 의한 화합물을 제공한다:

[0137] <구조식 9>



[0138]

[0139] 한 양태에서, 본 발명은 $m=1$ 인 하기 구조식 10에 의한 화합물을 제공한다:

[0140] <구조식 10>

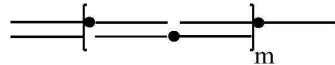


[0141]



[0142] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 12, 13, 14 또는 15에 의한 화합물을 제공한다:

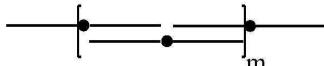
[0143] <구조식 12>



[0144]



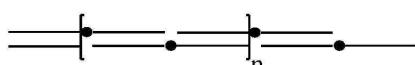
[0145] <구조식 13>



[0146]



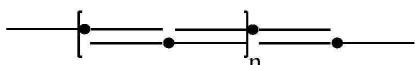
[0147] <구조식 14>



[0148]



[0149] <구조식 15>



[0150]



[0151] 상기 식에서,

[0152] 각각의 $\text{—}\text{—}\text{—}$ 는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며,

[0153] 각각의 $\text{—}\text{—}\text{—}$ 는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며,

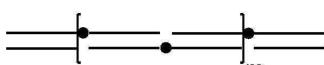
[0154] 각각의 ●는 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며;

[0155] m 은 정수 ≥ 1 이며, n 은 정수 ≥ 0 이다.

[0156] 다양한 양태에서, 본 발명은 정의된 삼중접합체 및 정의된 사중접합체를 비롯한 다합체($n>2$) 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드의 합성 방법을 제공한다.

[0157] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 7 또는 8에 따른 화합물의 합성 방법을 제공하며:

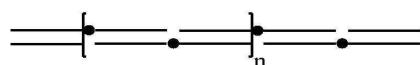
[0158] <구조식 7>



[0159]



[0160] <구조식 8>

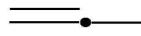


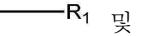
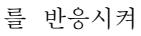
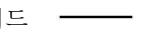
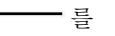
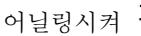
[0161]

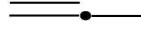


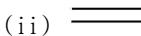
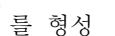
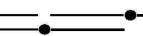
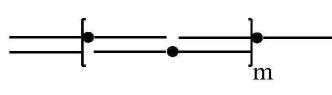
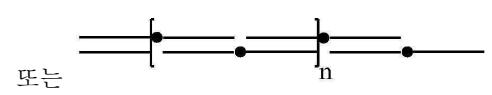
[0162] 상기 식에서, 각각의 $\text{—}\text{—}\text{—}$ 는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며, 각각의 ●는 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며; m 은 정수 ≥ 1 이며, n 은 정수 ≥ 0 이며, 그러한 방법은

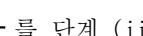
[0163] (i) (a) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}\text{—}$ 및 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}\text{—}R_2$ 를 어닐링시켜 $\text{—}\text{—}\text{—}R_1$ 를 형성하며, $\text{—}\text{—}\text{—}R_1$ 를 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}\text{—}R_3$ (여기서 R_1 및 R_2 는 직접적 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 ●를 형성할 수 있는 화학적 모이어티임)와 반응시켜

 를 형성하거나; 또는

[0164] (b) 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  및 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  를 반응시켜  를 형성하며, 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  및  를 어닐링시켜  를 형성함으로써

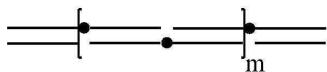
[0165]  를 형성하는 단계;

[0166] (ii)  및 제2의 단일 가닥 이합체  를 어닐링시켜  를 형성하며, 임의로, 하나 이상의 추가의 단일 가닥 이합체  를  에 어닐링시켜  또는  (여기서 m 은 정수 ≥ 1 이며, n 은 정수 ≥ 0 임)를 형성하는 단계; 및

[0167] (iii) 제4의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  를 단계 (ii)의 생성물에 어닐링시켜 구조식 7 또는 8을 형성하는 단계를 포함한다.

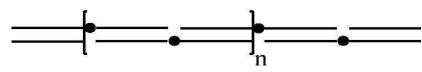
[0168] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 7 또는 8에 따른 화합물의 합성 방법을 제공하며:

[0169] <구조식 7>

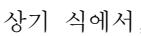


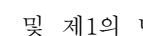
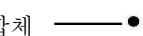
[0170]

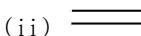
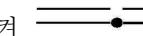
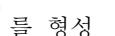
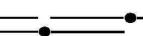
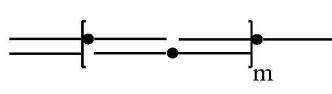
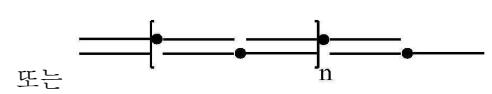
[0171] <구조식 8>

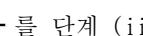


[0172]

[0173] 상기 식에서, 각각의  는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며, 각각의 ●은 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며; m 은 정수 ≥ 1 이며, n 은 정수 ≥ 0 이며, 그러한 방법은

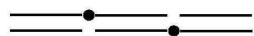
[0174] (i) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  및 제1의 단일 가닥 이합체  를 어닐링시켜  를 형성하는 단계;

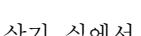
[0175] (ii)  및 제2의 단일 가닥 이합체  를 어닐링시켜  를 형성하며, 임의로, 하나 이상의 추가의 단일 가닥 이합체  를  에 어닐링시켜  또는  (여기서 m 은 정수 ≥ 1 이며, n 은 정수 ≥ 0 임)를 형성하는 단계;

[0176] (iii) 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  를 단계 (ii)의 생성물에 어닐링시켜 구조식 7 또는 8을 형성하는 단계를 포함한다.

[0177] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 9의 화합물의 합성 방법을 제공하며:

[0178] <구조식 9>



[0179] 상기 식에서, 각각의  는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며, 각각의 ●은 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며, 그러한 방법은

[0181] (i) (a) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 및 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{---}R_2$ 를 어닐링시켜 $\text{---}R_1$ 를 형성하며, $\text{---}R_1$ 를 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{---}R_3$ (여기서 R_1 및 R_2 는 직접적 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 ●를 형성할 수 있는 화학적 모이어티임)와 반응시켜 $\text{---} \bullet \text{---}$ 를 형성하거나; 또는

[0182] (b) 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{---}R_1$ 및 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{---}R_2$ 를 반응시켜 $\text{---} \bullet \text{---}$ 를 형성하고, 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 및 $\text{---} \bullet \text{---}$ 를 어닐링시켜 $\text{---} \bullet \text{---}$ 를 형성함으로써

[0183] $\text{---} \bullet \text{---}$ 를 형성하는 단계;

[0184] (ii) $\text{---} \bullet \text{---}$ 및 단일 가닥 이합체 $\text{---} \bullet \text{---}$ 를 어닐링시켜 $\text{---} \bullet \text{---} \bullet \text{---}$ 를 형성하는 단계; 및

[0185] (iii) $\text{---} \bullet \text{---} \bullet \text{---}$ 및 제4의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 를 어닐링시켜 $\text{---} \bullet \text{---} \bullet \text{---}$ 를 형성하는 단계를 포함한다.

[0186] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 10의 화합물의 합성 방법을 제공하며:

[0187] <구조식 10>



[0189] 상기 식에서, 각각의 --- 는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며, 각각의 ●는 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며, 그러한 방법은

[0190] (i) (a) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 및 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{---}R_2$ 를 어닐링시켜 $\text{---}R_1$ 를 형성하며, $\text{---}R_1$ 를 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{---}R_3$ (여기서 R_1 및 R_2 는 직접적 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 ●를 형성할 수 있는 화학적 모이어티임)와 반응시켜 $\text{---} \bullet \text{---}$ 를 형성하거나; 또는

[0191] (b) 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{---}R_1$ 및 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{---}R_2$ 를 반응시켜 $\text{---} \bullet \text{---}$ 를 형성하고, 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 및 $\text{---} \bullet \text{---}$ 를 어닐링시켜 $\text{---} \bullet \text{---}$ 를 형성시킴으로써

[0192] $\text{---} \bullet \text{---}$ 를 형성하는 단계;

[0193] (ii) $\text{---} \bullet \text{---}$ 및 단일 가닥 이합체 $\text{---} \bullet \text{---}$ 를 어닐링시켜 $\text{---} \bullet \text{---} \bullet \text{---}$ 를 형성하는 단계;

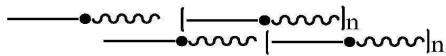
[0194] (iii) $\text{---} \bullet \text{---} \bullet \text{---}$ 및 제2의 단일 가닥 이합체 $\text{---} \bullet \text{---}$ 를 어닐링시켜 $\text{---} \bullet \text{---} \bullet \text{---}$ 를 형성하는 단계; 및

[0195] (iv) $\text{---} \bullet \text{---} \bullet \text{---} \bullet \text{---}$ 및 제4의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 를 어닐링시켜 $\text{---} \bullet \text{---} \bullet \text{---}$ 를 형성하는 단계를 포함한다.

[0196] 다양한 양태에서, 본 발명은 센스-안티센스 다중 접합체 올리고뉴클레오티드뿐 아니라, 그의 합성 방법을 제공한다.

[0197] 한 양태에서, 본 발명은 복수의 분자를 포함하는 조성물을 제공하며, 각각의 분자는 하기 구조식 16을 갖는다:

[0198] <구조식 16>

[0199] 상기 식에서, n은 정수 ≥ 1 이며;

[0200] 각각의 ————— 은 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며;

[0201] 각각의 ~~~~~ 는 ————— 로 하이브리드화된 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며;

[0202] [0203] ~~~~~ 은 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며;

[0204] 각각의 ●는 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이다.

[0205] 한 양태에서, 본 발명은 복수의 분자를 포함하는 조성물의 합성 방법을 제공하며, 각각의 분자는 구조식 16을 가지며, 그러한 방법은

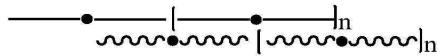
[0206] (i) 일치환된 생성물 —————○을 생성하는 조건 하에서 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 —————R₁를 이작 용성 연결 모이어티 ○(여기서 R₁은 ○와 반응할 수 있는 화학 기임)와 반응시키며;[0207] (ii) —————○를 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ~~~~~R₂ (여기서 R₂는 ○와 반응할 수 있는 화학기임)와 반응시켜 —————~~~~~를 형성하며;

[0208] (iii) 복수의 —————~~~~~를 어닐링시켜 복수의 분자를 포함하는 조성물을 형성하는 것을 포함하며, 각각의 분자는 구조식 16을 갖는다.

[0209] 다양한 양태에서, 본 발명은 다중 접합체 올리고뉴클레오티드의 합성 방법을 제공한다.

[0210] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 17을 포함하는 복수의 분자를 포함하는 조성물의 합성 방법을 제공하며:

[0211] <구조식 17>

[0212] [0213] 상기 식에서, n은 정수 ≥ 1 이며; 각각의 ————— 은 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며; 각각의 ~~~~~는 —————로 하이브리드화된 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며; ~~~~~ 은 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며; 각각의 ●는 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하여 —————●———— 및 ~~~~~●~~~~~를 형성하는 공유 링커이며, 그러한 방법은[0214] (i) —————●———— 및 ~~~~~●~~~~~의 경우 약 200-300 μ M의 총 올리고뉴클레오티드 농도,

[0215] (ii) 약 0.1-0.3x 포스페이트 완충 염수(PBS) 및

[0216] (iii) 약 70-80°C 내지 약 20-30°C의 온도에서 약 1.5-2.5 시간 동안 복수의 —————●———— 및 ~~~~~●~~~~~를 어닐링시키는 단계를 포함한다.

[0217] 다양한 양태에서, 본 발명은 다중 접합체 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0218] 한 양태에서, 본 발명은 (i) 본 발명에 의한 화합물 또는 조성물 및 (ii) 제약상 허용 가능한 부형제를 포함하는 조성물(예, 약학 조성물)을 제공한다.

[0219] 한 양태에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위하여 또는 의약의 제조에 사용하기 위한 본 발명에 의한 화합물 또는 조성물을 제공한다. 의약은 적어도 하나의 과발현된 유전자의 발현을 억제 또는 감소시키기 위하여, 예를 들면 2, 3, 4종 또는 그보다 많은 과발현된 유전자의 발현을 억제 또는 감소시키기 위하여 사용될 수 있다.

[0220] 한 양태에서, 본 발명은 지질 나노입자(LNP), 엑소좀, 미세소포 또는 바이러스 벡터 중에 제제화된, 본 발명에

의한 화합물 또는 조성물을 포함하는 조성물(예, 약학 조성물)을 제공한다.

[0221] 다양한 양태에서, 본 발명은 다중 접합체 올리고뉴클레오티드의 사용 방법을 제공한다.

[0222] 한 양태에서, 본 발명은 본 발명에 의한 화합물 또는 조성물의 유효량을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 유전자 발현의 감소 방법을 제공한다.

[0223] 한 양태에서, 본 발명은 본 발명에 의한 화합물 또는 조성물의 유효량을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 치료 방법을 제공한다.

[0224] 한 양태에서, 본 발명은 본 발명에 의한 화합물 또는 조성물의 유효량을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물 또는 조성물은 2종 이상의 유전자를 표적화하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 2종 이상의 유전자의 억제 방법을 제공한다. 상기 화합물 또는 조성물은 2, 3, 4종 또는 그보다 많은 유전자를 표적화하는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0225] 한 양태에서, 본 발명은 본 발명에 의한 화합물 또는 조성물의 유효량을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물 또는 조성물은 표적 리간드를 포함하는, 표적 리간드 결합 사례에 대하여 2종 이상의 올리고뉴클레오티드를 세포에게 전달하는 방법을 제공한다.

[0226] 한 양태에서, 본 발명은 본 발명에 의한 화합물 또는 조성물의 유효량을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물 또는 조성물은 미리 결정된 화학량론적 비의 2종 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 미리 결정된 화학량론적 비의 2종 이상의 올리고뉴클레오티드를 세포에게 전달하는 방법을 제공한다.

[0227] 다양한 양태에서, 본 발명은 특정한 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0228] 한 양태에서, 본 발명은 서열 번호 106을 갖는 siRNA를 제공한다.

[0229] 한 양태에서, 본 발명은 서열 번호 115를 갖는 siRNA를 제공한다.

[0230] 당업자는 상기 양태가 하기 기재된 하나 이상의 적절한 특징과 조합될 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0231] 다양한 실시양태에서, 공유 링커(예, ● 중 하나 또는 전부)는 친핵체 및 친전자체의 반응 생성물을 포함할 수 있다. 예를 들면, 공유 링커(예, ● 중 하나 또는 전부)는 티올 및 말레이미드, 티올 및 비닐술폰, 티올 및 피리딜디술피드, 티올 및 요오도아세트아미드, 티올 및 아크릴레이트, 아지드 및 알킨 또는, 아민 및 카르복실 기의 반응 생성물을 포함할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 공유 링커는 올리고뉴클레오티드가 아니다.

[0232] 다양한 실시양태에서, 친핵체 및 친전자체(예, 구조식 1 또는 4-6에서의 A)는 티올 및 말레이미드, 티올 및 비닐술폰, 티올 및 피리딜디술피드, 티올 및 요오도아세트아미드, 티올 및 아크릴레이트, 아지드 및 알킨 또는, 아민 및 카르복실 기를 포함할 수 있다. 유사하게는, 구조식 3에서의 반응성 모이어터는 친핵체 및 친전자체, 예를 들면 티올 및 말레이미드, 티올 및 비닐술폰, 티올 및 피리딜디술피드, 티올 및 요오도아세트아미드, 티올 및 아크릴레이트, 아지드 및 알킨 또는, 아민 및 카르복실 기를 포함할 수 있다.

[0233] 다양한 실시양태에서, 친핵체 또는 친전자체(예, 구조식 1에서의 B)는 티올, 말레이미드, 비닐술폰, 피리딜디술피드, 요오도아세트아미드, 아크릴레이트, 아지드, 알킨, 아민 또는 카르복실 기를 포함할 수 있다.

[0234] 다양한 실시양태에서, 링커(예, 구조식 1-3에 제시된 ● 또는 링커)는 DTME(디티오비스말레이미도에탄), BM(PEG)2(1,8-비스(말레이미도)디에틸렌 글리콜), BM(PEG)3(1,11-비스말레이미도-트리에틸렌글리콜), BMOE(비스 말레이미도에탄), BMH(비스말레이미도헥산) 또는 BMB(1,4-비스말레이미도부탄)를 포함할 수 있다. 예를 들면, 링커 ●는 티올 및 DTME(디티오비스말레이미도에탄), BM(PEG)2(1,8-비스(말레이미도)디에틸렌 글리콜), BM(PEG)3(1,11-비스말레이미도-트리에틸렌글리콜), BMOE(비스말레이미도에탄), BMH(비스말레이미도헥산) 또는 BMB(1,4-비스말레이미도부탄)의 반응 생성물을 포함할 수 있다.

[0235] 2종 이상의 공유 링커 ●(예, 구조식 7-16에서)를 포함하는 다양한 실시양태에서, 링커는 모두 동일하다. 대안으로, 상기 화합물 또는 조성물은 2종 이상의 상이한 공유 링커 ●를 포함할 수 있다.

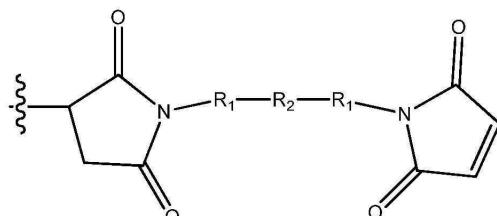
[0236] 다양한 실시양태에서, 구조식 1에서,

[0237] R1은 포스포디에스테르 또는 티오포스포디에스테르이며;

[0238] R2는 C2-C10 알킬이며;

[0239] A는 티올 및 말레이미드의 반응 생성물이며;

- [0240] R3은 디슬피드이며;
- [0241] B는 티올 또는 말레이미드이다.
- [0242] 다양한 실시양태에서, 핵산(예, X) 또는 올리고뉴클레오티드(예, ——, ~~~, ==, ≈ 또는 ≈≈)는 RNA, DNA이거나 또는 인공 또는 비-천연 핵산 유사체를 포함한다.
- [0243] 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 DNA, 예를 들면 안티센스 DNA(aDNA) 또는 안티센스 캡머이다.
- [0244] 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 RNA, 예를 들면 안티센스 RNA(aRNA), CRISPR RNA(crRNA), 긴 비코딩 RNA(lncRNA), 마이크로RNA(miRNA), 피위-상호작용 RNA(piRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA), 메신저 RNA(mRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 작은 활성화(saRNA), 안타고미르 또는 리보자임이다. 한 실시양태에서, RNA는 siRNA이다.
- [0245] 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 앱타머이다.
- [0246] 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 화학적 변형을 추가로 포함한다. 화학적 변형은 변형된 뉴클레오시드, 변형된 백본, 변형된 당 또는 변형된 말단을 포함할 수 있다.
- [0247] 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 표적 리간드를 추가로 포함한다. 표적 리간드는 핵산에 예를 들면 그의 3' 또는 5' 말단을 통하여 (예, 직접) 결합될 수 있다. 한 실시양태에서, 표적 리간드는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc), 콜레스테롤, 토코페롤, 폴레이트, 2-[3-(1,3-디카르복시프로필)-우레이도]펜탄2산(DUPA) 또는 아나사미드를 포함한다.
- [0248] 다양한 실시양태에서, 상기 방법은 표적 리간드를 분자에 커플링시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0249] 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥이다.
- [0250] 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 이중 가닥이다.
- [0251] 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 15-30, 17-27, 19-26, 20-25, 40-50, 40-150, 100-300, 1,000-2,000 또는, 10,000개까지의 뉴클레오티드의 길이이다.
- [0252] 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 또는 티오포스포디에스테르를 경유하여 링커에 연결된다(예, 구조식 1에서의 R1은 포스포디에스테르 또는 티오포스포디에스테르이다).
- [0253] 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 C2-C10, C3-C6 또는 C6 알킬(예, 구조식 1에서의 R2는 C2-C10, C3-C6 또는 C6 알킬임)을 경유하여 링커에 연결된다.
- [0254] 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 티올 및 말레이미드 기의 반응 생성물을 경유하여 링커에 연결된다(예, 구조식 1에서의 A는 티올 및 말레이미드 기의 반응 생성물이다).
- [0255] 다양한 실시양태에서, 링커(예, ●, 구조식 1에서의 R3, 구조식 2에서의 R1-R2-R1 또는 구조식 3에서의 A-R3-B)는 절단 가능하다. 한 실시양태에서, 절단 가능한 공유 링커는 산 절단 가능한 에스테르 결합, 히드라진 결합 또는 아세탈 결합을 포함한다. 한 실시양태에서, 절단 가능한 공유 링커는 환원제 절단 가능한 결합을 포함한다. 한 실시양태에서, 환원제 절단 가능한 결합은 디슬피드 결합이다. 한 실시양태에서, 절단 가능한 공유 링커는 세포내 조건 하에서 절단 가능하다. 한 실시양태에서, 절단 가능한 공유 링커는 생절단 가능한 결합을 포함한다. 한 실시양태에서, 절단 가능한 공유 링커는 효소 절단 가능한 결합을 포함한다.
- [0256] 다양한 실시양태에서, 링커는 절단 가능하지 않다. 한 실시양태에서, ● 중 하나 이상은 절단 불가한 공유 링커를 포함한다. 한 실시양태에서, 절단 불가한 공유 링커는 아미드 결합 또는 우레탄 결합을 포함한다. 절단 불가한 공유 링커는 알킬, 아릴 또는 유사한 탄화수소 기일 수 있다.
- [0257] 다양한 실시양태에서, 링커는 티오포로피오네이트 또는 디슬피드를 포함한다(예, R3은 티오포로피오네이트 또는 디슬피드이다).



[0258] 다양한 실시양태에서, 구조식 2에서의 모이어티

스말레이미도에탄), BM(PEG)2(1,8-비스(말레이미도)디에틸렌 글리콜), BM(PEG)3(1,11-비스말레이미도-트리에틸렌글리콜), BMOE(비스말레이미도에탄), BMH(비스말레이미도헥산) 또는 BMB(1,4-비스말레이미도부탄)의 반응 생성물을 포함한다.

[0259] 다양한 실시양태에서, 링커는 호모 이작용성 링커이다. 예를 들면, 한 실시양태에서, B는 구조식 1 또는 구조식 3에서 A와 동일한 기 중 하나를 포함한다.

[0260] 다양한 실시양태에서, 링커는 헤테로 이작용성 링커이다. 예를 들면, 한 실시양태에서, B는 구조식 1 또는 구조식 3에서의 A와는 상이한 기를 포함한다.

[0261] 다양한 실시양태에서, 화합물은 분리되거나 또는 실질적으로 순수하다. 예를 들면, 화합물은 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 순수할 수 있다. 한 실시양태에서, 화합물은 약 85-95% 순수하다. 마찬가지로, 본 발명에 의한 화합물 및 조성물의 합성 방법은 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 순수한 생성물을 생성할 수 있다. 한 실시양태에서, 생성물은 약 85-95% 순수하다.

[0262] 다양한 실시양태에서, 각각의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드는 siRNA이며 및/또는 15-30개의 염기쌍의 길이를 갖는다.

[0263] 다양한 실시양태에서, 각각의 ——●——는 2개의 센스 또는 2개의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 독립적으로 포함할 수 있다.

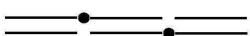
[0264] 다양한 실시양태에서, 각각의 ——●——는 1개의 센스 및 1개의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 독립적으로 포함할 수 있다.

[0265] 다양한 실시양태에서, 상기 화합물 또는 조성물은 실질적으로 동일한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드의 호모-다합체를 포함할 수 있다. 실질적으로 동일한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 각각은 생체내에서 동일한 문자 표적을 표적화하는 siRNA를 포함할 수 있다.

[0266] 다양한 실시양태에서, 상기 화합물 또는 조성물은 2종 이상의 실질적으로 상이한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드의 헤테로-다합체를 포함한다. 실질적으로 상이한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 각각은 상이한 유전자를 표적화하는 siRNA를 포함할 수 있다.

[0267] 다양한 실시양태에서, 화합물은 n=0인 하기 구조식 9를 포함한다:

[0268] <구조식 9>



[0269] 화합물은 표적 리간드를 추가로 포함할 수 있다. 화합물은 생체내에서 상이한 문자 표적을 표적화하는 siRNA를 각각 포함하는 2 또는 3개의 실질적으로 상이한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 ——를 추가로 포함할 수 있다. 화합물은 표적 리간드, 인자 VII을 표적화하는 제1의 siRNA 가이드 가닥 및 가이드 가닥에 하이브리드화된 제1의 패신저 가닥을 포함하는 1개의 ——, 아포지질단백질 B를 표적화하는 제2의 siRNA 가이드 가닥 및 제2의 가이드 가닥에 하이브리드화된 제2의 패신저 가닥을 포함하는 1개의 —— 및, TTR을 표적화하는 제3의 siRNA 가이드 가닥 및 제3의 가이드 가닥에 하이브리드화된 제3의 패신저 가닥을 포함하는 1개의 ——를 추가로 포함할 수 있다. 표적 리간드는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)을 포함할 수 있다.

[0270] 다양한 실시양태에서, 화합물은 m=1인 하기 구조식 10을 포함한다:

[0272] <구조식 10>



[0273]

화합물은 표적 리간드를 추가로 포함할 수 있다. 화합물은 상이한 분자 표적을 생체내에서 표적화하는 siRNA를 각각 포함하는 2, 3 또는 4개의 실질적으로 상이한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 를 추가로 포함할 수 있다. 화합물은 표적 리간드, 인자 VII을 표적화하는 제1의 siRNA 가이드 가닥 및 가이드 가닥에 하이브리드화된 제1의 패신저 가닥을 포함하는 1개의 , 아포지질단백질 B를 표적화하는 제2의 siRNA 가이드 가닥 및 제2의 가이드 가닥에 하이브리드화된 제2의 패신저 가닥을 포함하는 1개의 , TTR을 표적화하는 제3의 siRNA 가이드 가닥 및 제3의 가이드 가닥에 하이브리드화된 제3의 패신저 가닥을 포함하는 1개의 를 추가로 포함할 수 있다. 표적 리간드는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)을 포함할 수 있다.

[0275] 구조식 16에 관한 다양한 실시양태에서, 각각의 는 15-30개의 염기쌍의 길이를 가지며, 각각의 는 siRNA이며; 및/또는 n은 1 내지 100의 정수이다.

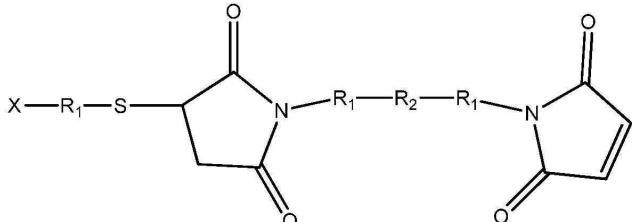
[0276] 다양한 실시양태에서, 각각의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드(예를 들면 구조식 4에서)는 인자 VII을 표적하는 siRNA 가이드 가닥 및 가이드 가닥에 하이브리드화된 패신저 가닥을 포함한다.

[0277] 다양한 실시양태에서(예, 구조식 4에서), 화합물은 표적 리간드를 추가로 포함하며, 각각의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드(예,)는 siRNA 가이드 가닥 및 가이드 가닥에 하이브리드화된 패신저 가닥을 포함하며, 화합물은 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 순수하다.

[0278] 다양한 실시양태에서, 적어도 하나의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드(예를 들면 구조식 6에서)는 인자 VII을 표적화하는 제1의 siRNA 가이드 가닥 및 가이드 가닥에 하이브리드화된 제1의 패신저 가닥을 포함하며, 적어도 하나의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드(예를 들면 구조식 6에서)는 아포지질단백질 B를 표적화하는 제2의 siRNA 가이드 가닥 및 제2의 가이드 가닥에 하이브리드화된 제2의 패신저 가닥을 포함한다.

[0279] 다양한 실시양태에서, 구조식 1의 화합물의 합성 방법은 하기 구조식 2의 화합물을 합성하는 것을 추가로 포함한다:

[0280] <구조식 2>



[0281]

[0282] 다양한 실시양태에서, 구조식 1 또는 2의 화합물의 합성 방법은 구조식 1 또는 2의 형성을 실질적으로 촉진하며, X의 이합체화를 실질적으로 방지하는 조건 하에서 실시된다. 상기 조건은 반응의 수율을 개선시킬 수 있다(예, 생성물의 순도를 개선시킬 수 있다).

[0283]

다양한 실시양태에서, 구조식 1 또는 2의 화합물의 합성 방법에서 작용화된 핵산 X-R1-R2-A' 및 공유 링커 A''-R3-B를 반응시키는 단계는 약 1 mM, 500 μM, 250 μM, 100 μM 또는 50 μM 미만의 X-R1-R2-A' 농도에서 실시된다. 대안으로, X-R1-R2-A' 농도는 약 1 mM, 500 μM, 250 μM, 100 μM 또는 50 μM일 수 있다.

[0284]

다양한 실시양태에서, 구조식 1 또는 2의 화합물의 합성 방법에서, 작용화된 핵산 X-R1-R2-A' 및 공유 링커 A''-R3-B를 반응시키는 단계는 적어도 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 또는 100의 몰 과량의 A''-R3-B를 사용하여 실시된다. 대안으로, 몰 과량의 A''-R3-B는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 또는 100일 수 있다.

[0285]

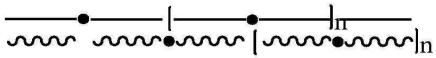
다양한 실시양태에서, 구조식 1 또는 2의 화합물의 합성 방법에서, 작용화된 핵산 X-R1-R2-A' 및 공유 링커 A''-R3-B를 반응시키는 단계는 약 7, 6, 5 또는 4 미만의 pH에서 실시된다. 대안으로, pH는 약 7, 6, 5 또는 4

일 수 있다.

[0286] 다양한 실시양태에서, 구조식 1 또는 2의 화합물의 합성 방법에서, 작용화된 핵산 X-R1-R2-A' 및 공유 링커 A''-R3-B를 반응시키는 단계는 물 및 수흔화성 유기 공용매를 포함하는 용액 중에서 실시된다. 수흔화성 유기 공용매는 DMF, NMP, DMSO 또는 아세토니트릴을 포함할 수 있다. 수흔화성 유기 공용매는 약 10, 15, 20, 25, 30, 40 또는 50% V (v/v)의 용액을 포함할 수 있다.

[0287] 다양한 실시양태(예, 구조식 17의 합성을 위한)에서, 상기 방법은 복수의 ————— 및/또는 ~~~~~를 어닐링시켜 하기 구조식 18, 19 및/또는 20을 포함하는 복수의 분자를 형성하는 단계를 추가로 포함한다:

[0288] <구조식 18>



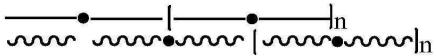
[0289]

[0290] <구조식 19>



[0291]

[0292] <구조식 20>



[0293]

[0294] 다양한 실시양태(예, 구조식 17의 합성을 위한)에서, 상기 방법은 —————를 복수의 —————●———— 및 ~~~~~●~~~~~로 어닐링시키는 것을 추가로 포함한다.

[0295] 다양한 실시양태(예, 구조식 17의 합성을 위한)에서, ————— 대 ~~~~~●~~~~~의 몰비는 약 5:100, 10:100, 20:100, 30:100, 40:100 또는 50:100이다.

[0296] 다양한 실시양태(예, 구조식 17의 합성을 위한)에서, 상기 방법은 ~~~~~를 복수의 —————●———— 및 ~~~~~●~~~~~로 어닐링시키는 것을 추가로 포함한다.

[0297] 다양한 실시양태(예, 구조식 17의 합성을 위한)에서, ~~~~~ 대 —————●————의 몰비는 약 5:100, 10:100, 20:100, 30:100, 40:100 또는 50:100이다.

[0298] 다양한 실시양태(예, 구조식 17의 합성을 위한)에서, —————●———— 및 ~~~~~●~~~~~의 몰비는 약 1:1이다.

[0299] 다양한 실시양태(예, 구조식 17의 합성을 위한)에서, —————●———— 대 ~~~~~●~~~~~의 몰비 또는 ~~~~~●~~~~~ 대 —————●————의 몰비는 약 100:90, 100:80, 100:75, 100:70 또는 100:60이다.

[0300] 다양한 실시양태(예, 구조식 17의 합성을 위한)에서, 각각의 ————— 는 15-30개의 염기쌍의 길이를 갖는다.

[0301] 다양한 실시양태(예, 구조식 17의 합성을 위한)에서, 각각의 ————— 는 siRNA이다.

[0302] 다양한 실시양태(예, 구조식 17의 합성을 위한)에서, 각각의 ————— 는 인자 VII를 표적화하는 siRNA 가이드 가닥 및 가이드 가닥에 하이브리드화된 패신저 가닥을 포함한다.

[0303] 다양한 실시양태(예, 구조식 17의 합성을 위한)에서, n은 1 내지 100의 정수이다.

[0304] 다양한 실시양태(예, 구조식 17의 합성을 위한)에서, ●는 절단 가능한 또는 절단 불가한 링커이다.

[0305] 다양한 실시양태에서, 상기 방법은 임의의 화합물 또는 조성물을 나노입자 중에 제제화시키는 것을 추가로 포함한다.

[0306] 다양한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 특정한 서열, 예를 들면 본원에 개시된 서열 중 임의의 하나를 갖

는다. 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 106을 갖는 siRNA이다. 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 115를 갖는 siRNA이다.

[0307] 다양한 실시양태에서, 대상체는 세포, 포유동물 또는 인간이다.

[0308] 본 기술의 상기 및 기타 잇점은 첨부하는 도면 및 하기 설명을 참조하면 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0309] 도 1은 3-가지형(antennary) N-아세틸갈락토사민 리간드의 화학적 구조를 도시한다.

도 2는 실시예 9와 관련하여 논의되는 FVII-ApoB 혼합체(XD-05311)의 합성 개략도를 도시한다.

도 3은 실시예 10과 관련하여 논의되는 마우스 혈청으로부터의 생체내 FVII 활성을 나타내는 데이터를 도시한다.

도 4는 실시예 10과 관련하여 논의되는 동물 실험 MausRNAi-TV30에서 간 조직으로부터 FVII 및 ApoB mRNA 레벨을 나타내는 데이터를 도시한다.

도 5는 실시예 11과 관련하여 논의되는 5'-GalNAc-FVII 정규 대조군을 도시한다.

도 6은 실시예 12와 관련하여 논의되는 GalNAc-호모이합체 접합체(XD-06330)를 도시한다.

도 7은 실시예 13과 관련하여 논의되는 GalNAc-호모이합체 접합체(XD-06360)의 합성 개략도를 도시한다.

도 8은 실시예 14와 관련하여 논의되는 GalNAc-호모이합체 접합체(XD-06329)의 합성 개략도를 도시한다.

도 9는 실시예 15와 관련하여 논의되는 마우스 혈청 중의 FVII 활성(FVII 호모이합체 GalNAc 접합체에 의한 녹다운)을 나타내는 데이터를 도시한다.

도 10A 및 10B 및 10C는 실시예 15와 관련하여 논의되는 마우스 혈청 중의 FVII 활성(GalNAc 함유량에 대하여 정규화된 FVII 호모이합체 GalNAc 접합체에 의한 녹다운)을 나타내는 데이터를 도시한다.

도 11은 실시예 16과 관련하여 논의되는 FVII, ApoB 및 TTR을 독립적으로 표적화하는 정규 GalNAc-siRNA를 도시한다.

도 12는 실시예 17과 관련하여 논의되는 GalNAc-혜테로삼합체 접합체(XD06726)를 도시한다. 그러한 예에서, "GeneA"는 siFVII이며; "GeneB"는 siApoB이며; "GeneC"는 siTTR이다.

도 13은 실시예 17과 관련하여 논의되는 GalNAc-접합된 혜테로삼합체(XD06726)에 대한 합성 전략의 개략도를 도시한다. 범례: 그러한 예에서, "GeneA"는 siFVII이며; "GeneB"는 siApoB이며; "GeneC"는 siTTR이다.

도 14는 실시예 18과 관련하여 논의되는 GalNAc-혜테로삼합체 접합체(XD06727)를 도시한다. 범례: 그러한 예에서, "GeneA"는 siFVII이며; "GeneB"는 siApoB이며; "GeneC"는 siTTR이다.

도 15는 실시예 18과 관련하여 논의되는 GalNAc-접합된 혜테로삼합체(XD06727)에 대한 합성 전략의 개략도를 도시한다. 범례: 그러한 예에서, "GeneA"는 siFVII이며; "GeneB"는 siApoB이며; "GeneC"는 siTTR이다.

도 16은 실시예 18과 관련하여 논의되는 X20366에 대한 X20336의 작용 반응의 HPLC 분석에 대한 데이터를 도시한다.

도 17은 실시예 18과 관련하여 논의되는 반응에 대한 X19580의 첨가의 HPLC 분석에 대한 데이터를 도시한다.

도 18은 실시예 18과 관련하여 논의되는 X18795(5'-siFVII안티센스-3')의 반응 혼합물로의 첨가로 XD-06727을 산출하는 HPLC 분석에 대한 데이터를 도시한다.

도 19A 및 19B는 실시예 20과 관련하여 논의되는 혈청 샘플 중의 TTR 단백질 레벨에 대한 데이터(ELISA에 의하여 측정함)를 도시한다.

도 20A 및 20B는 실시예 20과 관련하여 논의되는 혈청 샘플 중의 FVII 효소 활성에 대한 데이터를 도시한다.

도 21A 및 21B는 실시예 20과 관련하여 논의되는 혈청 샘플 중의 ApoB 단백질 레벨에 대한 데이터(ELISA에 의하여 측정함)를 도시한다.

도 22A 및 22B는 실시예 20과 관련하여 논의되는 간 데이터에서의 표적 녹다운을 도시한다.

도 23은 실시예 21과 관련하여 논의되는 GalNAc-헤테로사합체 접합체(XD-07140)를 도시한다. 범례: 그러한 예에서, "GeneA"는 siFVII이며; "GeneB"는 siApoB이며; "GeneC"는 siTTR이다.

도 24는 실시예 21과 관련하여 논의되는 GalNAc-헤테로사합체 접합체(XD-07140)의 합성의 개략도를 도시한다. 범례: 그러한 예에서, "GeneA"는 siFVII이며; "GeneB"는 siApoB이며; "GeneC"는 siTTR이다.

도 25는 실시예 21과 관련하여 논의되는 GalNAc-siFVII-siApoB-siTTR-siFVII 사합체(XD-07140)의 HPLC 분석을 도시한다.

도 26은 실시예 22와 관련하여 논의되는 호모이합체의 합성을 도시한다.

도 27은 실시예 22와 관련하여 논의되는 XD-05305의 SEC HPLC 분석을 도시한다.

도 28은 실시예 22와 관련하여 논의되는 XD-05305의 SEC HPLC 분석을 도시한다.

도 29는 실시예 22와 관련하여 논의되는 XD-05305의 IEX HPLC 분석을 도시한다.

도 30은 실시예 22와 관련하여 논의되는 XD-05305의 SEC HPLC 분석을 도시한다. 다합체 siRNA는 좌측 피크이며; 이합체 siRNA는 중앙의 피크이며; 정규 siRNA는 우측 피크이다.

도 31은 실시예 22와 관련하여 논의되는 다합체 siRNA 혼합물에 대한 염 농도 및 반응 온도의 효과를 도시한다.

도 32는 종결 가닥의 농도가 높을수록(이 경우, 안티센스 가닥은 종결자로서 사용됨), 다합체화된 siRNA 분율은 작다는 것을 나타내는 데이터를 도시한다. 데이터는 실시예 22와 관련하여 논의된다.

도 33은 센스 호모이합체의 농도가 작을수록 다합체화된 siRNA 분율이 작다는 것을 나타내는 데이터를 도시한다. 데이터는 실시예 22와 관련하여 논의된다.

도 34A는 실시예 22와 관련하여 논의되는 샘플 번호 1-15에 대한 젤을 도시한다.

도 34B는 실시예 22와 관련하여 논의되는 샘플 번호 1'-10'에 대한 젤을 도시한다.

도 35는 실시예 23과 관련하여 논의되는 동물 실험 MausRNAi-TV29에서 마우스 혈청으로부터 측정된 FVII 활성을 나타내는 데이터를 도시한다.

도 36은 실시예 23과 관련하여 논의되는 동물 실험 MausRNAi-TV30에서 마우스 혈청으로부터 측정된 FVII 활성을 나타내는 데이터를 도시한다.

도 37은 실시예 24와 관련하여 논의되는 FVIIIs-FVIIas 혼합체(X12714)를 도시한다.

도 38은 실시예 24와 관련하여 논의되는 혼합체 X12714(례인 12)의 젤 분석을 도시한다.

도 39는 실시예 26과 관련하여 논의되는 ApoB 스크리닝 NMuLi 세포에 대한 투여량-반응을 도시한다.

본 발명이 다수의 각종 형태의 실시양태를 포함하지만, 이들은 도면에 도시되어 있으며, 본원에서는 본 개시내용이 기술의 원리의 예시로서 간주하도록 하며, 본 발명을 예시된 실시양태로 제한하지 않는다는 이해로 수개의 구체적인 실시양태를 상세하게 기재할 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0310]

본 발명의 다양한 양태는 올리고뉴클레오티드를 함유하는 다중 접합체의 제조 및 용도를 공동으로 갖는다. 다중 접합체는 RNA 및/또는 DNA를 함유할 수 있다. RNA는 본원에 제공된 다중-접합 반응 조건으로 처리할 수 있는 생체활성 RNA, 예컨대 siRNA, miRNA 및 작은 활성화 RNA(saRNA)의 임의의 형태가 될 수 있다.

[0311]

본 발명의 다양한 양태에 사용된 올리고뉴클레오티드는 (A) 의약 분야에서, 예를 들면 대상체에서 또는 표적 유전자 또는 단백질의 발현의 저해 또는 향상으로부터 잇점을 얻은 임의의 질환의 치료 또는 예방에서 표적 유전자 또는 단백질의 발현을 저해 또는 향상시키기 위하여; (B) 생물학적 연구의 수행에서; 및 (C) 동물 및 식물에서 새로운 또는 변형된 표현형을 생성하기 위하여 중요하거나 또는 사용되는 임의의 것일 수 있다. 비제한적인 예로서, 올리고뉴클레오티드는 RNA 간섭, RNA 활성화 또는 유전자 요법에 사용되거나 또는 가까운 장래에 사용될 것으로 예상되는 임의의 RNA, 예컨대 c-myc, c-myb, c-fos, c-jun, bcl-2 또는 VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D 또는 PIGF와 관련하여 활성인 것으로 설계되는 RNA일 수 있다.

[0312]

본원에 기재된 제조 방법은 당업계에 이미 기재된 것보다 더 높은 수준의 순도에서 각종 다중 접합체를 생성한

다. 본 발명의 특징은 다중 접합체의 치료적 적용예에 대하여 특히 이로우며, 연구와 같은 기타 적용예에서 다중 접합체의 제조 및 사용에 대한 잇점을 생성할 것 같다.

[0313] 본 발명의 한 양태는 미리 결정된 크기 및 조성을 갖는 올리고뉴클레오티드-함유 다중 접합체 및 그러한 다중 접합체의 제조 방법이다. 그러한 방법은 다중 접합체를 종래 기술에 이미 기재된 것보다 더 높은 수준의 순도로 생성할 수 있다.

[0314] 본 발명의 다양한 특징은 하기에서 차례로 논의한다.

핵산

[0316] 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 RNA, DNA이거나 또는 인공 또는 비-천연 핵산 유사체를 포함한다. 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥이다. 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 이중 가닥(예, 역평행 이중 가닥)이다.

[0317] 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 RNA, 예를 들면 안티센스 RNA(aRNA), CRISPR RNA(crRNA), 긴 비코딩 RNA(lncRNA), 마이크로RNA(miRNA), 피위-상호작용 RNA(piRNA), 작은 간접 RNA(siRNA), 메신저 RNA(mRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 작은 활성화(saRNA) 또는 리보자임이다.

[0318] 한 실시양태에서, RNA는 siRNA이다. 예를 들면, 각각의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드는 siRNA이며 및/또는 15-30개의 염기쌍의 길이를 갖는다.

[0319] 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 앱타머이다.

[0320] siRNA(작은 간접 RNA)는 표적 유전자를 분해하여 유전자의 발현을 저해하기 위하여 그의 센스 가닥과 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자의 mRNA(메신저 RNA)를 표적화하는 19-22개의 핵산으로 이루어진 짧은 이중 가닥 RNA이다 (Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-8).

[0321] 본 발명의 방법에 유용한 핵산의 또 다른 부류는 miRNAs이다. MiRNAs는 후-전사 유전자 조절에서 중요한 역할을 하는 비코딩 RNAs이다. miRNA는 모든 포유동물 단백질-코딩 유전자의 30%의 발현을 조절할 수 있다. 이중 가닥 RNA(RNAi)에 의하여 억제시키는 특이적이고 유효한 유전자가 추가의 작은 비코딩 RNA와 함께 발견되었다 (Canver, M.C. et al., *Nature* (2015)). Pre-miRNAs는 성숙한 19-25개의 뉴클레오티드 두가닥(duplex)으로 외수송되는 2-뉴클레오티드 3'-오버hang(overhang)를 갖는 짧은 줄기 루프 ~70 뉴클레오티드의 길이이다. 낮은 염기쌍 안정도를 갖는 miRNA 가닥(가이드 가닥)은 RNA-유도된 억제 복합체(RISC) 상에 로딩될 수 있다. 운반자 가이드 가닥은 작용성일 수 있으나, 일반적으로 분해된다. 성숙한 miRNA는 3' 미번역된 부위(UTRs) 내에서 주로 발견되는 표적 mRNAs에서 부분적으로 상보성 서열 모티브에 RISC를 테터링시키며, 후전사 유전자 억제를 유발한다 (Bartel, D.P. *Cell*, 136: 215-233 (2009); Saj, A. & Lai, E.C. *Curr Opin Genet Dev*, 21: 504-510 (2011)). MiRNAs 모사체는 예를 들면 미국 특허 제8,765,709호에 기재되어 있다.

[0322] 몇몇 실시양태에서, RNA는 예를 들면 미국 특허 제8,202,846호 및 제8,383,599호에 기재된 바와 같이 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)일 수 있다.

[0323] 몇몇 실시양태에서, RNA는 CRISPR RNA(crRNA)일 수 있으며, 예를 들면 타입 V의 CRISPR 어레이에는 직접 반복부의 19개의 뉴클레오티드로부터 시작하여 스페이서 서열의 23-25개의 뉴클레오티드로 이어지는 각각의 성숙한 crRNA를 갖는 42-44개의 뉴클레오티드의 길이의 짧은 성숙 crRNAs로 가공될 수 있다. 대안으로, 타입 II 계에서 성숙한 crRNAs는 스페이서 서열의 20-24개의 뉴클레오티드에 이어서 직접 반복부의 약 22개의 뉴클레오티드로 출발할 수 있다. CRISPR 계는 예를 들면 미국 특허 제8,771,945호, 문헌[Jinek et al., *Science*, 337(6096): 816-821 (2012)] 및 국제 특허 공개 번호 WO 2013/176772에 기재되어 있다.

[0324] 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 15-30, 17-27, 19-26, 20-25, 40-50, 40-150, 100-300, 1,000-2,000 또는, 10,000개까지의 뉴클레오티드의 길이를 갖는다.

[0325] 다양한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 이중 가닥 및 상보성이다. 상보성은 100% 상보성 또는 100% 미만의 상보성일 수 있으며, 여기서 올리고뉴클레오티드는 그럼에도 불구하고 하이브리드화되며, 관련 조건(예, 생리적 관련 조건) 하에서 이중 가닥을 남긴다. 예를 들면, 이중 가닥 올리고뉴클레오티드는 적어도 약 80, 85, 90 또는 95% 상보성일 수 있다.

- [0326] 몇몇 실시양태에서, RNA는 긴 비코딩 RNA(lncRNA)이며, lncRNAs는 단백질을 코딩시키지 않는(또는 >100개의 아미노산 개방 판독 프레임이 결핍된) 200개 초과의 뉴클레오티드의 길이를 갖는 전사된 RNA 분자의 커다란 다양한 부류이다. lncRNA 전사물은 비코딩 전사체의 주요 부분에 해당하므로 lncRNAs는 인간에서 거의 30,000개의 상이한 전사물을 포함하는 것으로 생각된다. (예를 들면 문헌[Derrien et al., The Gencode v7 catalog of human long non-coding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*, 22(9): 1775-89 (2012)] 참조).
- [0327] 기타 실시양태에서, RNA는 메신저 RNA(mRNA)이다. mRNA 및, 단백질의 생체내 생성을 위한 전달 방법으로서의 그의 적용은 예를 들면 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2013/151736에 기재되어 있다.
- [0328] 기타 실시양태에서, RNA는 작은 활성화(saRNA)(예, 문헌[Chappell et al., *Nature Chemical Biology*, 11: 214-220 (2015)]에 기재된 바와 같음) 또는 리보자임(Doherty et al., *Ann Rev Biophys Biomol Struct*, 30: 457-475 (2001))일 수 있다.
- [0329] 몇몇 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 DNA, 예를 들면 안티센스 DNA(aDNA)(예, 안타고미르) 또는 안티센스 캡머이다. 캡머 및 다합체를 포함한 aDNA의 예는 예를 들면 문헌[Subramanian et al., *Nucleic Acids Res*, 43(19): 9123-9132 (2015)] 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2013/040429에 기재되어 있다. 안타가미르의 예는 예를 들면 미국 특허 제7,232,806호에 기재되어 있다.
- [0330] 다양한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 특정한 서열, 예를 들면 본원에 개시된 서열 중 임의의 하나를 갖는다. 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 106을 갖는 siRNA이다. 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 115를 갖는 siRNA이다.
- [0331] 올리고뉴클레오티드 합성에 대한 일반적인 절차는 하기 실시예에 제공된다. 본 발명과 함께 사용하도록 변형될 수 있는 기타 방법은 당업계에 공지되어 있다.
- [0332] 핵산으로의 변형
- [0333] 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 화학적 변형을 추가로 포함한다. 화학적 변형은 변형된 뉴클레오시드, 변형된 백본, 변형된 당 또는 변형된 말단을 포함할 수 있다.
- [0334] 인-함유 결합은 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 3'알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함한 메틸 및 기타 알킬 포스포네이트, 포스피네이트, 3'-아미노 포스포라미데이트 및 아미노알킬포스포라미데이트를 포함한 포스포라미데이트, 티오노포스포라미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르 및, 노르말 3'-5' 결합을 갖는 보라노포스페이트, 그의 2'-5' 결합된 유사체 및, 뉴클레오시드 단위의 인접하는 쌍이 3'-5'에서 5'-3'로 또는 2'-5'에서 5'-2'로 연결된 역전된 극성을 갖는 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0335] 본 발명의 다중 접합체에 함유된 올리고뉴클레오티드는 예를 들면 시험관내 및 생체내 개선된 효력 및 안정성을 포함한 각종 효과를 생성하는 것으로 당업계에 공지된 다양한 전략을 사용하여 변형될 수 있다. 그러한 전략 중에서 인공 핵산, 예를 들면 2'-0-메틸-치환된 RNA; 2'-플루오로-2'데옥시 RNA, 웨티드 핵산(PNA); 모르폴리노; 로킹된 핵산(LNA); 비로킹된 핵산(UNA); 가교된 핵산(BNA); 글리콜 핵산(GNA); 및 트레오스 핵산(TNA); 보다 일반적으로 핵산 유사체, 예를 들면 비시클릭 및 트리시클릭 뉴클레오시드 유사체이며, 이는 천연 발생 RNA 및 DNA와 구조적으로 유사하지만, 천연 발생 분자의 포스페이트 백본, 당 또는 핵염기 부분 중 하나 이상에서의 변형을 갖는다. 통상적으로, 유사체 핵염기는 무엇보다도 상이한 염기쌍형성 및 염기 적층 성질을 부여한다. 그의 예는 4종의 캐논(canon) 염기와 쌍을 형성할 수 있는 보편적인 염기를 포함한다. 포스페이트-당 백본 유사체의 예는 PNA를 포함한다. 모르폴리노계 올리고머 화합물은 문헌[Braasch et al., *Biochemistry*, 41(14): 4503-4510 (2002)] 및 미국 특허 제5,539,082호, 제5,714,331호, 제5,719,262호 및 제5,034,506호에 기재되어 있다.
- [0336] 본원에 기재된 제조 방법에서, 몇몇 올리고뉴클레오티드는 말단 단부에서 화학적 작용성 기로의 치환에 의하여 변형된다. 치환은 올리고뉴클레오티드의 3' 또는 5' 단부에서 수행될 수 있으며, 단량체의 센스 및 안티센스 가닥 둘다의 3' 단부에서 수행되는 것이 바람직하지만, 항상 이에 제한되는 것은 아니다. 화학적 작용기는 예를 들면 술프히드릴 기(-SH), 카르복실 기(-COOH), 아민 기(-NH₂), 히드록시 기(-OH), 포르밀 기(-CHO), 카르보닐 기(-CO-), 에테르 기(-O-), 에스테르 기(-COO-), 니트로 기(-NO₂), 아지드 기(-N₃) 또는 술플산 기(-SO₃H)를 포함할 수 있다.

[0337]

본 발명의 다중 접합체 중에 함유된 올리고뉴클레오티드는 변형될 수 있으며, 또한 추가로 또는 대안으로 핵염기(종종 종래 기술에서 단순히 "염기"로 지칭함) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 변형된 핵염기는 천연 핵산, 예를 들면 하이포크산틴, 6-메틸아데닌, 5-Me 피리미딘, 특히 5-메틸시토신(또한 5-메틸-2' 데옥시시토신으로 지칭되며, 종종 종래 기술에서 5-Me-C로서 지칭됨), 5-히드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC 및 젠토비오실 HMC뿐 아니라, 합성 핵염기, 예를 들면 2-아미노아데닌, 2-(메틸아미노)아데닌, 2-(이미다졸릴알킬)아데닌, 2-(아미노알킬아미노)아데닌 또는 기타 헤테로치환된 알킬아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-히드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6(6-아미노핵실)아데닌 및 2,6-디아미노푸린에서 드물게 또는 일시적으로만 발견되는 핵염기를 포함한다. 문헌[Kornberg, A., DNA Replication, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp 75-77 (1980); Gebeyehu et al., *Nucl. Acids Res.*, 15: 4513 (1997)]. 종래 기술에서 공지된 "보편" 염기, 예를 들면 이노신도 또한 포함될 수 있다. 5-Me-C 치환은 0.6-1.2°C에 의하여 핵산 두가닥 안정성을 증가시키는 것으로 나타났으며[Sanghvi, Y. S., in Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, pp 276-278 (1993)], 이는 염기 치환의 양태가 된다. 변형된 핵염기는 기타 합성 및 천연 핵염기, 예컨대 5-메틸시토신(5-me-C), 5-히드록시메틸 시토신, 크산틴, 하이포크산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌과 구아닌의 6-메틸 및 기타 알킬 유도체, 아데닌과 구아닌의 2-프로필 및 기타 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로파닐 우라실 및 시토신, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실(슈도-우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-히드록실 및 기타 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 기타 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸쿠아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌을 포함할 수 있다. 핵산의 말단에서의 히드록시 기(-OH)는 작용기, 예컨대 술프히드릴 기(-SH), 카르복실 기(-COOH) 또는 아민 기(-NH₂)로 치환될 수 있다. 치환은 3' 단부 또는 5' 단부에서 수행될 수 있으며, 센스 및 암티센스 둘다의 3' 단부에서 상기 작용기로 치환되는 것이 바람직하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0338]

링커

[0339]

본 발명의 다양한 양태 및 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 공유 연결될 수 있다. 링커는 절단 가능하거나 (예, 세포내 조건 하에서, 올리고뉴클레오티드 전달 및/또는 작용을 촉진시키기 위하여) 또는 절단 불가할 수 있다. 하기 및 실시예에서 친핵체-친전자체 화학을 사용하는 링커의 문맥에서 일반적으로 기재되기는 하나, 기타 화학 및 입체형상이 가능하다. 그리고, 당업자가 이해하는 바와 같이, 그의 조성, 합성 및 용도를 포함한 다양한 링커는 당업계에 공지되어 있으며, 본 발명에 사용하기 위하여 변형될 수 있다.

[0340]

다양한 실시양태에서, 공유 링커는 친핵성 및 친전자성 기의 반응 생성물을 포함할 수 있다. 예를 들면, 공유 링커는 티올 및 말레이미드, 티올 및 비닐술폰, 티올 및 피리딜리술피드, 티올 및 요오도아세트아미드, 티올 및 아크릴레이트, 아지드 및 알킨 또는, 아민 및 카르복실 기의 반응 생성물을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 이들 기 중 하나는 올리고뉴클레오티드에 연결되며(예, 3' 또는 5' 단부에서의 티올(-SH) 작용화), 기타 기는 궁극적으로 2개의 올리고뉴클레오티드를 연결하는 제2의 분자(예, 연결제)(예, DTME에서의 말레이미드)에 의하여 포함된다.

[0341]

다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 또는 티오포스포디에스테르를 경유하여 링커에 연결된다(예, 구조식 1에서의 R1은 포스포디에스테르 또는 티오포스포디에스테르이다). 다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 C2-C10, C3-C6 또는 C6 알킬을 경유하여 링커에 연결된다(예, 구조식 1에서의 R2는 C2-C10, C3-C6 또는 C6 알킬이다). 대안으로, 그러한 모이어티(예, 구조식 1에서의 R1 및/또는 R2)는 임의적이며, 직접 연결이 가능하다.

[0342]

다양한 실시양태에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 티올 및 말레이미드 기의 반응 생성물을 경유하여 링커에 연결된다(예, 구조식 1에서의 A는 티올 및 말레이미드 기의 반응 생성물이다). 상기 화학을 이용하는 바람직한 연결제는 DTME(디티오비스말레이미도에탄), BM(PEG)2(1,8-비스(말레이미도)디에틸렌 글리콜), BM(PEG)3(1,11-비스말레이미도-트리에틸렌글리콜), BMOE(비스말레이미도에탄), BMH(비스말레이미도핵산) 또는 BMB(1,4-비스말레이미도부탄)를 포함한다.

[0343]

다시, 상기 예는 예시를 위한 것이며, 제한하지 않는다. 다양한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 함께 직접, 작용성 단부-치환을 경유하여 또는 연결제에 의하여 간접적으로 연결될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 링커에 직접 결합될 수 있다(예, 구조식 1의 R1 및 R2는 존재하지 않음). 그러한 결합은 예를 들면 당업자에 의하여 생성될 수 있는 3'-티오뉴클레오시드의 사용에 의하여 달성될 수 있다. 예를 들면,

문현 [Sun et al., "Sthioribonucleosides and their incorporation into oligoribonucleotides via phosphoramidite chemistry" *RNA*. 1997 Nov; 3(11):1352-63]. 다양한 실시양태에서, 연결체는 비이온성 친수성 중합체, 예컨대 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리비닐파롤리돈 및 폴리옥사졸린 또는 소수성 중합체, 예컨대 PLGA 및 PLA일 수 있다.

[0344] 공유 결합을 위한 조정제로서 사용되는 중합체 연결체는 PEG, 플루로닉(Pluronic), 폴리비닐파롤리돈, 폴리옥사졸린 또는 그의 공중합체를 포함한 비이온성 친수성 중합체; 또는 폴리-L-락트산, 폴리-D-락트산, 폴리-D,L-락트산, 폴리-글리콜산, 폴리-D-락트-*c*-*co*-글리콜산, 폴리-L-락트-*c*-*co*-글리콜산, 폴리-D,L-락트-*c*-*co*-글리콜산, 폴리카프롤락톤, 폴리발레로락톤, 폴리히드록시부티레이트, 폴리히드록시발레레이트 또는 그의 공중합체를 포함한 하나 이상의 생절단 가능한 폴리에스테르 중합체일 수 있으나, 항상 이에 제한되는 것은 아니다.

[0345] 연결체는 100-10,000 달톤의 분자량을 가질 수 있다. 상기 연결체의 예는 디티오-비스-말레이미도에탄(DIME), 1,8-비스-말레이미도디에틸렌글리콜(BM(PEG)2), 트리스-(2-말레이미도에틸)-아민(TMEA), 트리-숙신이미딜 아미노트리아세테이트(TSAT), 3-아암-폴리(에틸렌 글리콜)(3-아암 PEG), 말레이미드, N-히드록시숙신이미드(NHS), 비닐술폰, 요오도아세틸, 니트로페닐 아지드, 이소시아네이트, 피리딜디솔피드, 히드라지드 및 히드록시페닐 아지드를 포함한다.

[0346] 절단 가능한 결합을 갖는 연결체(예컨대 시토졸의 화학적 환경에 의하여 절단되는 환원체 결합) 또는 절단 불가한 결합을 갖는 연결체는 본원에 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 상기 양태의 연결체는 절단 불가한 결합, 예컨대 아미드 결합 또는 우레탄 결합을 가질 수 있다. 대안으로, 본 발명의 상기 양태의 연결체는 절단 가능한 결합, 예컨대 산 절단 가능한 결합(예, 에스테르, 히드라존 또는 아세탈의 공유 결합), 환원체 절단 가능한 결합(예, 디솔피드 결합), 생-절단 가능한 결합 또는 효소 절단 가능한 결합을 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 절단 가능한 공유 링커는 세포내 조건 하에서 절단 가능하다. 추가로, 약물 변형에 대하여 이용 가능한 임의의 연결체는 본 발명의 상기 양태에서 제한 없이 사용될 수 있다.

[0347] 추가로, 작용기 및 연결체의 조합은 (a) 작용기가 아미노 및 티올인 경우, 연결체는 숙신이미딜 3-(2-페리딜디티오)프로피오네이트 또는 숙신이미딜 6-([3(2-페리딜디티오)프로피오아미도]헥사노에이트일 수 있으며; (b) 작용기가 아미노인 경우, 연결체는 3,3'디티오디프로파온산 디-(N-숙신이미딜 에스테르), 디티오-비스(에틸 1H-이미다졸-1-카르복실레이트) 또는 디티오-비스(에틸 1H-이미다졸-1-카르복실레이트)일 수 있으며; (c) 작용기가 아미노 및 알킬인 경우, 연결체는 술포-N-숙신이미딜3-[[2-(p-아지도살리실아미도)에틸]-1,3'-디티오]프로피오네이트일 수 있으며; (d) 작용기가 티올인 경우, 연결체는 디티오-비스-말레이미도에탄(DTME); 1,8-비스-말레이미도디에틸렌글리콜(BM(PEG)2); 또는 디티오비스(술포숙신이미딜 프로피오네이트)(DTSSP)인 것을 포함할 수 있다.

[0348] 상기 화합물의 제조 방법에서, 작용기를 활성화시키는 추가의 단계를 포함할 수 있다. 작용기의 활성화에 사용될 수 있는 화합물은 1-에틸-3,3-디메틸아미노프로필 카르보디이미드, 이미다졸, N-히드록시숙신이미드, 디클로로헥실카르보디이미드, N-베타-말레이미도프로파온산, N-베타-말레이미도프로필 숙신이미드 에스테르 또는 N-숙신이미딜 3-(2-페리딜디티오)프로피오네이트를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

단량체 중간체 화합물

[0350] 다양한 양태에서, 본 발명은 예를 들면 미리 결정된 크기 및 조성을 갖는 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드의 합성에서 사용될 수 있는, 공유 링커에 커플링된 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0351] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 1에 따른 화합물을 제공한다:

[0352] <구조식 1>

[0353] X - R1 - R2 - A - R3 - B

[0354] 상기 식에서,

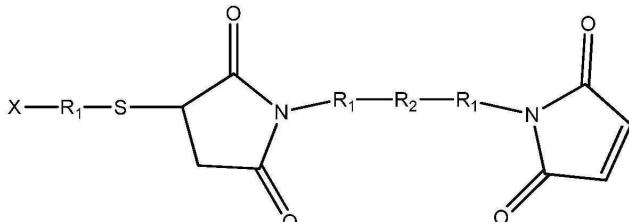
[0355] X는 그의 3' 또는 5' 말단을 통하여 R1에 결합된 핵산이며;

[0356] R1은 포스포디에스테르, 티오포스포디에스테르, 술페이트, 아미드, 글리콜이거나 또는 존재하지 않으며;

[0357] R2는 C2-C10 알킬, 알콕시 또는 아릴 기이거나 또는 존재하지 않으며;

[0358] A는 친핵체 및 친전자체의 반응 생성물이며;

- [0359] R3은 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오프로피오네이트 또는 디술피드이며;
- [0360] B는 친핵체 또는 친전자체(예, 티올, 말레이미드, 비닐슬픈, 피리딜디술피드, 요오도아세트아미드, 아크릴레이트, 아지드, 알킨, 아민 또는 카르복실 기)이다.
- [0361] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 2에 따른 화합물을 제공한다:
- [0362] <구조식 2>



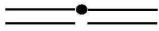
- [0363]
- [0364] 상기 식에서,
- [0365] X는 포스페이트 또는 티오포스페이트를 경유하여 그의 3' 또는 5' 말단에서 R1에 결합된 핵산이며;
- [0366] 각각의 R1은 독립적으로 C2-C10 알킬, 알콕시 또는 아릴 기이며;
- [0367] R2는 티오프로피오네이트 또는 디술피드 기이다.
- [0368] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 3에 따른 화합물을 제공한다:
- [0369] <구조식 3>
- [0370] $X - R1 - R2 - A - R3 - B$
- [0371] 상기 식에서,
- [0372] X는 그의 3' 또는 5' 말단을 통하여 R1에 결합된 핵산이며;
- [0373] R1은 포스페이트, 티오포스페이트, 술페이트, 아미드, 글리콜이거나 또는 존재하지 않으며;
- [0374] R2는 C2-C10 알킬, 알콕시 또는 아릴 기이거나 또는 존재하지 않으며;
- [0375] A는 제1의 및 제2의 반응성 모이어티의 반응 생성물이며;
- [0376] R3은 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알콕시, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오프로피오네이트 또는 디술피드이며;
- [0377] B는 제3의 반응성 모이어티이다.
- [0378] 다양한 양태에서, 또한 본 발명은 공유 링커에 커플링된 올리고뉴클레오티드의 합성 방법을 제공한다.
- [0379] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 1에 따른 화합물의 합성(또는 구조식 2 또는 3에 따른 화합물의 합성을 위하여 변형된) 방법을 제공하며, 그러한 방법은 작용화된 핵산 $X-R1-R2-A'$ 및 공유 링커 $A''-R3-B$ (여기서 A' 및 A'' 는 친핵체 및 친전자체를 포함함)를 $X-R1-R2-A'$ 의 둑은 용액 중에서 및 화학량론적 과량의 $A''-R3-B$ 와 반응하여 하기 구조식 1의 화합물을 형성하는 단계를 포함한다:
- [0380] <구조식 1>
- [0381] $X - R1 - R2 - A - R3 - B$
- [0382] 상기 식에서,
- [0383] X는 그의 3' 또는 5' 말단을 통하여 R1에 결합된 핵산이며;
- [0384] R1은 포스포디에스테르, 티오포스포디에스테르, 술페이트, 아미드, 글리콜이거나 또는 존재하지 않으며;
- [0385] R2는 C2-C10 알킬, 알콕시 또는 아릴 기이거나 또는 존재하지 않으며;
- [0386] A는 친핵체 및 친전자체의 반응 생성물이며;

- [0387] R3은 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오프로파오네이트 또는 디솔피드이며;
- [0388] B는 친핵체 또는 친전자체(예, 티올, 말레이미드, 비닐슬픈, 피리딜디솔피드, 요오도아세트아미드, 아크릴레이트, 아지드, 알킨, 아민 또는 카르복실 기)이다.
- [0389] 그러한 방법은 (i) 티올을 핵산의 고체 상 합성 중에 포스포르아미다이트 올리고머화 화학을 사용하여 도입하거나 또는 (ii) 고체 상 합성 중에 도입된 디솔피드의 환원에 의하여 작용화된 핵산 X-R1-R2-A'(여기서 A'는 티올(-SH)을 포함함)를 합성하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0390] 다양한 실시양태에서, 구조식 1의 화합물의 합성 방법은 구조식 2의 화합물을 합성하는 것을 추가로 포함한다.
- [0391] 공유 링커에 커플링된 올리고뉴클레오티드는 실시예를 포함한 본원에 기재된 특징 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들면, 화합물은 핵산(변형되거나 또는 변형되지 않음), 상기 기재된 표적 리간드 및/또는 링커 또는 발명의 내용 또는 실시예에 제시된 특정한 임의의 구조식 또는 화학 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다. 실시예 1은 티올 종결된 올리고뉴클레오티드를 생성하기 위한 예시의 방법을 제공한다. 실시예 2는 링커에 커플링된 올리고뉴클레오티드를 생성하기 위한 예시의 방법을 제공한다.
- [0392] 다양한 실시양태에서, 구조식 1 또는 2의 화합물의 합성 방법은 구조식 1 또는 2의 형성을 실질적으로 촉진하며, X의 이합체화를 실질적으로 방지하는 조건 하에서 실시된다. 그러한 조건은 반응의 수율을 개선시킬 수 있다(예, 생성물의 순도를 개선시킬 수 있다).
- [0393] 다양한 실시양태에서, 구조식 1 또는 2의 화합물의 합성 방법에서, 작용화된 핵산 X-R1-R2-A' 및 공유 링커 A''-R3-B를 반응시키는 단계는 약 1 mM, 500 μM, 250 μM, 100 μM 또는 50 μM 미만의 X-R1-R2-A' 농도에서 실시된다. 대안으로, X-R1-R2-A' 농도는 약 1 mM, 500 μM, 250 μM, 100 μM 또는 50 μM일 수 있다.
- [0394] 다양한 실시양태에서, 구조식 1 또는 2의 화합물의 합성 방법에서, 작용화된 핵산 X-R1-R2-A' 및 공유 링커 A''-R3-B를 반응시키는 단계는 적어도 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 또는 100의 몰 과량의 A''-R3-B로 실시된다. 대안으로, A''-R3-B의 몰 과량은 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 또는 100일 수 있다.
- [0395] 다양한 실시양태에서, 구조식 1 또는 2의 화합물의 합성 방법에서, 작용화된 핵산 X-R1-R2-A' 및 공유 링커 A''-R3-B를 반응시키는 단계는 약 7, 6, 5 또는 4 미만의 pH에서 실시된다. 대안으로, pH는 약 7, 6, 5 또는 4 일 수 있다.
- [0396] 다양한 실시양태에서, 구조식 1 또는 2의 화합물의 합성 방법에서, 작용화된 핵산 X-R1-R2-A' 및 공유 링커 A''-R3-B를 반응시키는 단계는 물 및 수흔화성 유기 공용매를 포함하는 용액 중에서 실시된다. 수흔화성 유기 공용매는 DMF(디메틸포름아미드), NMP(N-메틸-2-피롤리돈), DMSO(디메틸 솔록시드) 또는 아세토니트릴을 포함할 수 있다. 수흔화성 유기 공용매는 약 10, 15, 20, 25, 30, 40 또는 50% (v/v)의 용액을 포함한다.
- [0397] 다양한 실시양태에서, 화합물은 분리되거나 또는 실질적으로 순수하다. 예를 들면, 화합물은 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 순수할 수 있다. 한 실시양태에서, 화합물은 약 85-95% 순수하다. 마찬가지로, 본 발명에 의한 화합물 및 조성물의 합성 방법은 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 순수한 생성물을 생성할 수 있다. 한 실시양태에서, 생성물은 약 85-95% 순수하다. 제조는 50% 이상 순수할 수 있으며; 바람직하게는 75% 이상 순수할 수 있으며; 더욱 바람직하게는 85% 이상 순수할 수 있으며; 더 더욱 바람직하게는 95% 이상 순수할 수 있다.
- [0398] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 '약은 대략의 분명하며 일상적인 의미를 따라 사용된다. 예를 들면, "약 X"는 X의 값에 대한 측정 오차 이내의 유사한 양 또는 X와 대략적으로 동일하며, X와 동일한 성질을 본질적으로 갖는 양을 포함한, 명시된 바와 같은 대략 값 X를 포함한다.
- [0399] 본원에 사용된 바와 같이, 분리된 기타 원치 않는 물질로부터 분리되는 화합물을 포함한다. 분리된 화합물은 실질적으로 순수한 상태로 합성될 수 있거나 또는 미정제 반응 혼합물의 기타 성분의 잔량을 포함한 불순물의 일부량이 잔존할 수 있는 것을 제외하고, 미정제 반응 혼합물의 기타 성분으로부터 분리될 수 있다. 유사하게는, 순수하거나 또는 실질적으로 순수한은 (예, 약학적 제제 중에서 또는 차후의 화학적 반응을 위한 물질로서) 그의 의도한 용도를 허용하도록 불순물이 충분히 없다는 것을 의미한다. X% 순수한은 화합물이 예를 들면 HPLC와 같은 분석 방법에 의하여 일 수 있는 관련 측정에 의하여 전체 조성의 X%이라는 것을 의미한다.
- [0400] 이합체 화합물 및 중간체

[0401] 다양한 양태에서, 본 발명은 이합체 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 그러한 화합물은 호모 이합체(예, 실질적으로 동일한, 예를 들면 동일한 유전자를 생체내에서 표적화하는 2종의 올리고뉴클레오티드) 및 헤테로이합체(예, 실질적으로 상이한, 예를 들면 상이한 서열이거나 또는 상이한 유전자를 생체내에서 표적화하는 2종의 올리고뉴클레오티드)를 포함한다.

[0402] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 4에 의한 분리된 화합물을 제공한다:

[0403] <구조식 4>



[0405] 상기 식에서,

[0406] 각각의 ——— 는 동일한 분자 표적과 생체내에서 반응하도록 설계된 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며,

[0407] ●는, 그의 3' 또는 5' 말단에서 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커로서, 구조식-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-을 가지며, 여기서

[0408] 각각의 R1은 독립적으로 포스포디에스테르, 티오포스포디에스테르, 술페이트, 아미드, 글리콜이거나 또는 존재하지 않으며;

[0409] 각각의 R2는 독립적으로 C2-C10 알킬, 알콕시 또는 아릴 기이거나 또는 존재하지 않으며;

[0410] 각각의 A는 독립적으로 친핵체 및 친전자체의 반응 생성물이며,

[0411] R3은 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알콕시, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오프로피오네이트 또는 디솔피드이다.

[0412] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 5에 의한 분리된 화합물을 제공한다:

[0413] <구조식 5>



[0415] 상기 식에서,

[0416] ——— 은 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며;

[0417] ~~~ 는 제1의 것과는 상이한 서열을 갖는 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며;

[0418] ●는, 그의 3' 또는 5' 말단에서 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커로서, 구조식-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-을 가지며, 여기서

[0419] 각각의 R1은 독립적으로 포스페이트, 술페이트, 아미드, 글리콜이거나 또는 존재하지 않으며;

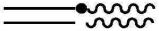
[0420] 각각의 R2는 독립적으로 C2-C10 알킬, 알콕시 또는 아릴 기이거나 또는 존재하지 않으며;

[0421] 각각의 A는 독립적으로 티올 및 말레이이미드, 티올 및 비닐술폰, 티올 및 피리딜디솔피드, 티올 및 요오도아세트 아미드, 티올 및 아크릴레이트, 아지드 및 알킨 또는, 아민 및 카르복실 기의 반응 생성물이며,

[0422] R3은 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알콕시, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오프로피오네이트 또는 디솔피드이다.

[0423] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 6에 의한 분리된 화합물을 제공한다:

[0424] <구조식 6>

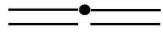


[0426] 상기 식에서,

[0427] ——— 는 제1의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며;

- [0428]  은 제1의 것과는 상이한 서열을 갖는 제2의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며;
- [0429] ●는, 그의 3' 또는 5' 말단에서 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커로서, 구조식-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-을 가지며, 여기서
- [0430] 각각의 R1은 독립적으로 포스페이트, 술페이트, 아미드, 글리콜이거나 또는 존재하지 않으며;
- [0431] 각각의 R2는 독립적으로 C2-C10 알킬, 알콕시 또는 아릴 기이거나 또는 존재하지 않으며;
- [0432] 각각의 A는 독립적으로 티올 및 말레이미드, 티올 및 비닐슬픈, 티올 및 피리딜디슬피드, 티올 및 요오도아세트 아미드, 티올 및 아크릴레이트, 아지드 및 알킨 또는, 아민 및 카르복실 기의 반응 생성물이며,
- [0433] R3은 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알콕시, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오프로피오네이트 또는 디슬피드이다.
- [0434] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 11에 따른 분리된 화합물을 제공한다:
- [0435] <구조식 11>
- [0436] 
- [0437] 상기 식에서,
- [0438]  는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며,
- [0439]  는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며,
- [0440] ●는 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이다.
- [0441] 다양한 양태에서, 본 발명은 이합체 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드의 합성 방법을 제공한다.
- [0442] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 5의 화합물의 합성 방법을 제공하며:
- [0443] <구조식 5>
- [0444] 
- [0445] 상기 식에서,  은 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며,  는 제1의 것과는 상이한 서열을 갖는 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며; ●는 그의 3' 또는 5' 말단에서 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며, 그러한 방법은
- [0446] (i) 일치환된 생성물  을 생성하는 조건 하에서 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  R 를 이작 용성 연결 모이어티 ○(여기서 R1은 ○와 반응할 수 있는 화학 기임)와 반응시키는 단계;
- [0447] (ii)  를 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드  R_2 (여기서 R2는 ○와 반응할 수 있는 화학기임)와 반응시켜   를 형성하는 단계를 포함한다.
- [0448] 그러한 방법은 상보성  및  를 어닐링시켜 하기 구조식 6을 산출하는 단계를 더 포함할 수 있다:
- [0449] <구조식 6>
- [0450] 
- [0451] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 4의 분리된 화합물의 합성 방법을 제공하며:
- [0452] <구조식 4>
- [0453] 
- [0454] 상기 식에서, 각각의  는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며, ●는 그의 3' 또는 5' 말단에서 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며, 그러한 방법은

- [0455] (i) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_1 를 이작용성 연결 모이어티 ○(여기서 R1은 ○와 반응할 수 있는 화학 기임)와 반응시켜 일치환된 생성물 ---O 를 형성하는 단계;
- [0456] (ii) ---O 를 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_2 (여기서 R2는 ○와 반응할 수 있는 화학기임)와 반응시켜 단일 가닥 이합체 ---\bullet--- 를 형성하는 단계;
- [0457] (iii) 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 동시에 또는 순차적으로 어닐링시켜 ---\bullet--- 를 형성하는 단계를 포함한다.
- [0458] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 4의 분리된 화합물의 합성 방법을 제공하며:
- [0459] <구조식 4>
- [0460] ---\bullet---
- [0461] 상기 식에서, 각각의 --- 는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며, ●는 그의 3' 또는 5' 말단에서 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며, 그러한 방법은
- [0462] (i) (a) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 및 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_1 를 어닐링시켜 ---R_1 를 형성하며, ---R_1 를 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_2 (여기서 R1 및 R2는 직접적 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 ●를 형성할 수 있는 화학적 모이어티임)와 반응시켜 ---\bullet--- 를 형성시키거나; 또는
- [0463] (b) 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_1 및 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_2 를 반응시켜 ---\bullet--- 를 형성하며, 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 및 ---\bullet--- 를 어닐링시켜 ---\bullet--- 를 형성함으로써
- [0464] ---\bullet--- 를 형성하는 단계;
- [0465] (ii) ---\bullet--- 및 제4의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 를 어닐링시켜 ---\bullet--- 를 형성하는 단계를 포함한다.
- [0466] 그러한 방법은 예를 들면 단계 (ii)을 생략하여 ---\bullet--- (구조식 11)에 의한 분리된 화합물의 합성을 위하여 변형될 수 있다.
- [0467] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 4의 분리된 화합물의 합성 방법을 제공하며:
- [0468] <구조식 4>
- [0469] ---\bullet---
- [0470] 상기 식에서, 각각의 --- 는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며, ●는 그의 3' 또는 5' 말단에서 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며, 그러한 방법은
- [0471] (a) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 및 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_1 를 어닐링 시켜 ---R_1 를 형성하는 단계;
- [0472] (b) 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_2 및 제4의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 를 어닐링 시켜 ---R_2 를 형성하는 단계;
- [0473] (c) ---R_1 및 ---R_2 (여기서 R1 및 R2는 직접적 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 ●를 형성할 수

있는 화학적 모이어티임)를 반응시켜  를 형성하는 단계를 포함한다.

[0474] 본 발명에 의한 기타 화합물 및 조성물에 관하여, 이합체 화합물 및 중간체는 실시예를 포함한 본원에 기재된 특징 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들면, 화합물은 상기 기재된 핵산 (변형되거나 또는 변형되지 않음), 표적 리간드 및/또는 링커 또는 발명의 내용 또는 실시예에 제시된 임의의 특정한 구조식 또는 화학 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0475] 실시예 4는 이합체화된 올리고뉴클레오티드를 생성하기 위한 예시의 방법을 제공하며, 실시예 5는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 어닐링시켜 이중 가닥 올리고뉴클레오티드를 형성하기 위한 예시의 방법을 제공한다. 실시예 7은 상기 합성에 유용한 다양한 올리고뉴클레오티드 전구체를 합성하기 위한 예시의 방법을 제공한다. 실시예 8은 또한 상기 합성에 유용한 다양한 올리고뉴클레오티드 다합체를 생성하기 위한 예시의 방법을 제공한다.

[0476] 혼테로이합체의 예는 실시예 9 및 10에서 제공된다.

[0477] 호모이합체의 예는 실시예 12-15에서 제공된다.

[0478] 다양한 실시양태에서, R1, R2 및 이작용성 연결 모이어티 ○는 본원에 기재 및 제시된 바와 같은 공유 링커 ●를 형성할 수 있다. 예를 들면, 다양한 실시양태에서, R1 및 R2는 각각 독립적으로 반응성 모이어티, 예를 들면 친전자체 또는 친핵체를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, R1 및 R2는 각각 독립적으로 티올, 말레이미드, 비닐슬픈, 피리딜디슬퍼드, 요오도아세트아미드, 아크릴레이트, 아지드, 알킨, 아민 및 카르복실 기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 이작용성 연결 모이어티 ○는 상기 단계 (i) 및 (ii)에 의하여 순차적으로 반응될 수 있는 2개의 반응성 모이어티, 예를 들면 R1 및 R2에서 친전자체/친핵체와 반응할 수 있는 제2의 친전자체/친핵체를 포함한다. 이작용성 연결 모이어티 ○의 예는 DTME, BM(PEG)2, BM(PEG)3, BMOE, BMH 또는 BMB를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

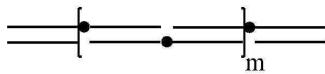
[0479] 본 발명의 상기뿐 아니라, 모든 기타 합성 방법은 표적 리간드를 분자에 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 실시예 6은 표적 리간드(예, GalNAc)를 첨가하는 예시의 방법을 제공한다. 표적 리간드의 첨가를 위한 첨가 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자에 의하여 본 발명을 위하여 변형될 수 있다.

[0480] 다합체(n>2) 화합물 및 중간체

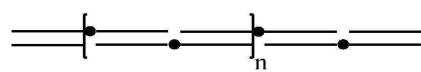
[0481] 다양한 양태에서, 본 발명은 정의된 삼중접합체 및 정의된 사중접합체를 포함한 다합체(n>2) 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0482] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 7 또는 8에 따른 화합물을 제공한다:

[0483] <구조식 7>



[0484]



[0485]

<구조식 8>

[0486]

상기 식에서,

[0487] 각각의  는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며,

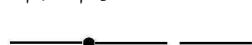
[0488] 각각의 ●는 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며;

[0489] m은 정수 ≥ 1 이며, n은 정수 ≥ 0 이다.

[0490] 한 양태에서, 본 발명은 n=0인 하기 구조식 9에 의한 화합물을 제공한다:

[0491]

<구조식 9>



[0492]

한 양태에서, 본 발명은 m=1인 하기 구조식 10에 의한 화합물을 제공한다:

[0493]

[0495] <구조식 10>

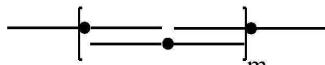


[0496] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 12, 13, 14 또는 15에 의한 화합물을 제공한다:

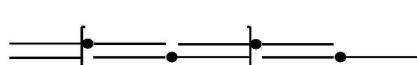
[0497] <구조식 12>



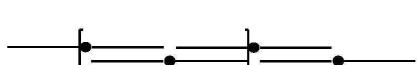
[0498] <구조식 13>



[0499] <구조식 14>



[0500] <구조식 15>



[0501] 상기 식에서,

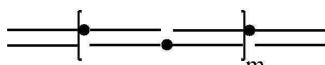
[0502] 각각의 $\text{—}\text{—}\text{—}$ 는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며,[0503] 각각의 $\text{—}\text{—}\text{—}$ 는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며,

[0504] 각각의 ●는 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며;

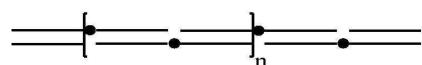
[0505] m 은 정수 ≥ 1 이며, n 은 정수 ≥ 0 이다.[0506] 다양한 양태에서, 본 발명은 정의된 삼중접합체 및 정의된 사중접합체를 포함한 다합체($n > 2$) 정의된 다중 접합체 올리고뉴클레오티드의 합성 방법을 제공한다.

[0507] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 7 또는 8에 따른 화합물의 합성 방법을 제공하며:

[0508] <구조식 7>



[0509] <구조식 8>

[0510] 상기 식에서, 각각의 $\text{—}\text{—}\text{—}$ 는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며, 각각의 ●는 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며; m 은 정수 ≥ 1 이며, n 은 정수 ≥ 0 이며, 그러한 방법은[0511] (i) (a) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}\text{—}$ 및 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}\text{—}R_2$ 를 어닐링시켜 $\text{—}\text{—}\text{—}R_1$ 를 형성하며, $\text{—}\text{—}\text{—}R_1$ 를 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 $\text{—}\text{—}\text{—}R_2$ (여기서 R_1 및 R_2 는 직접적 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 ●를 형성할 수 있는 화학적 모이어티임)와 반응시켜 $\text{—}\text{—}\text{—}\bullet\text{—}\text{—}\text{—}$ 를 형성하거나; 또는

[0519] (b) 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_1 및 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_2 를 반응시켜 ---●--- 를 형성하며, 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 및 ---●--- 를 어닐링시켜 ---●--- 를 형성함으로써

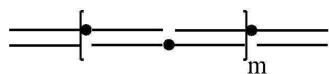
[0520] ---●--- 를 형성하는 단계;

[0521] (ii) ---●--- 및 제2의 단일 가닥 이합체 ---●--- 를 어닐링시켜 ---●---●--- 를 형성하며, 임의로, 하나 이상의 추가의 단일 가닥 이합체 ---●--- 를 ---●---●--- 에 어닐링시켜 $\text{---[●---●---]m---[●---●---]n---}$ (여기서 m 은 정수 ≥ 1 이며, n 은 정수 ≥ 0 임)를 형성하는 단계; 및

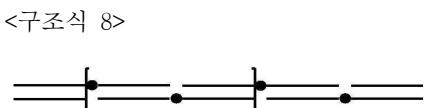
[0522] (iii) 제4의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 를 단계 (ii)의 생성물에 어닐링시켜 구조식 7 또는 8을 형성하는 단계를 포함한다.

[0523] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 7 또는 8에 따른 화합물의 합성 방법을 제공하며:

[0524] <구조식 7>



[0525]



[0526] <구조식 8>

[0528] 상기 식에서, 각각의 --- 는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며, 각각의 ●는 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며; m 은 정수 ≥ 1 이며, n 은 정수 ≥ 0 이며, 그러한 방법은

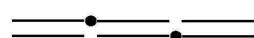
[0529] (i) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 및 제1의 단일 가닥 이합체 ---●--- 를 어닐링시켜 ---●--- 를 형성하는 단계;

[0530] (ii) ---●--- 및 제2의 단일 가닥 이합체 ---●--- 를 어닐링시켜 ---●---●--- 를 형성하며, 임의로, 하나 이상의 추가의 단일 가닥 이합체 ---●--- 를 ---●---●--- 에 어닐링시켜 $\text{---[●---●---]m---[●---●---]n---}$ (여기서 m 은 정수 ≥ 1 이며, n 은 정수 ≥ 0 임)를 형성하는 단계; 및

[0531] (iii) 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 를 단계 (ii)의 생성물에 어닐링시켜 구조식 7 또는 8을 형성하는 단계를 포함한다.

[0532] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 9의 화합물의 합성 방법을 제공하며:

[0533] <구조식 9>



[0535] 상기 식에서, 각각의 --- 는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며, 각각의 ●는 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며, 그러한 방법은

[0536] (i) (a) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 및 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_1

를 어닐링시켜 ---R_1 를 형성하고, ---R_1 를 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_2 (여기서 R_1 및 R_2 는 직접적 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 ●를 형성할 수 있는 화학적 모이어티임)와 반응시켜 ---\bullet--- 를 형성하거나; 또는

[0537] (b) 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_1 및 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_2 를 반응시켜 ---\bullet--- 를 형성하고, 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 및 ---\bullet--- 를 어닐링시켜 ---\bullet--- 를 형성함으로써

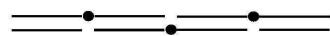
[0538] ---\bullet--- 를 형성하는 단계;

[0539] (ii) ---\bullet--- 및 단일 가닥 이합체 ---\bullet--- 를 어닐링시켜 $\text{---\bullet---\bullet---}$ 를 형성하는 단계; 및

[0540] (iii) $\text{---\bullet---\bullet---}$ 및 제4의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 를 어닐링시켜 $\text{---\bullet---\bullet---}$ 를 형성하는 단계를 포함한다.

[0541] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 10의 화합물의 합성 방법을 제공하며:

[0542] <구조식 10>



[0544] 상기 식에서, 각각의 --- 는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며, 각각의 ●는 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이며, 그러한 방법은

[0545] (i) (a) 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 및 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_1 를 어닐링시켜 ---R_1 를 형성하며, ---R_1 를 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_2 (여기서 R_1 및 R_2 는 직접적 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 ●를 형성할 수 있는 화학적 모이어티임)와 반응시켜 ---\bullet--- 를 형성하거나; 또는

[0546] (b) 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_1 및 제3의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---R_2 를 반응시켜 ---\bullet--- 를 형성하고, 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 및 ---\bullet--- 를 어닐링시켜 ---\bullet--- 를 형성함으로써

[0547] ---\bullet--- 를 형성하는 단계;

[0548] (ii) ---\bullet--- 및 단일 가닥 이합체 ---\bullet--- 를 어닐링시켜 $\text{---\bullet---\bullet---}$ 를 형성하는 단계;

[0549] (iii) $\text{---\bullet---\bullet---}$ 및 제2의 단일 가닥 이합체 ---\bullet--- 를 어닐링시켜 $\text{---\bullet---\bullet---\bullet---}$ 를 형성하는 단계; 및

[0550] (iv) $\text{---\bullet---\bullet---\bullet---}$ 및 제4의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 --- 를 어닐링시켜 $\text{---\bullet---\bullet---\bullet---}$ 를 형성하는 단계를 포함한다.

[0551] 본 발명에 의한 기타 화합물 및 조성물에 관하여, 이합체 화합물 및 중간체는 실시예를 포함한 본원에 기재된 특징 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들면, 화합물은 핵산(변형되거나 또는 변형되지 않음), 상기 기재된 표적 리간드 및/또는 링커 또는 발명의 내용 또는 실시예에 제시된 임의의 특정한 구조식 또는 화학 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다.

- [0552] 실시예 7은 상기 합성에서 유용한 각종 올리고뉴클레오티드 전구체를 제조하기 위한 예시의 방법을 제공한다. 실시예 8은 상기 합성에서 또한 유용한 각종 올리고뉴클레오티드 다합체를 제조하기 위한 예시의 방법을 제공한다.
- [0553] 다양한 실시양태에서, R1, R2 및 이작용성 연결 모이어티 ○는 본원에 기재 및 제시된 바와 같은 공유 링커 ●를 형성할 수 있다. 예를 들면, 다양한 실시양태에서, R1 및 R2는 각각 독립적으로 반응성 모이어티, 예를 들면 친전자체 또는 친핵체를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, R1 및 R2는 각각 독립적으로 티올, 말레이미드, 비닐술폰, 퍼리딜디술피드, 요오도아세트아미드, 아크릴레이트, 아지드, 알kin, 아민 및 카르복실 기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 이작용성 연결 모이어티 ○는 상기 단계 (i) 및 (ii)에 의하여 순차적으로 반응할 수 있는 2종의 반응성 모이어티, 예를 들면 R1 및 R2에서 친전자체/친핵체와 반응할 수 있는 제2의 친전자체/친핵체를 포함한다. 이작용성 연결 모이어티 ○의 예는 DTME, BM(PEG)2, BM(PEG)3, BMOE, BMH 또는 BMB를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0554] 2종 이상의 공유 링커 ●를 포함하는 다양한 실시양태에서(예, 구조식 7-16에서), 링커는 모두 동일하다. 대안으로, 상기 화합물 또는 조성물은 2종 이상의 상이한 공유 링커 ●를 포함할 수 있다.
- [0555] 다양한 실시양태에서, 각각의 —●— 는 2개의 센스 또는 2개의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 독립적으로 포함할 수 있다. 예를 들면, siRNA의 경우에서, —●— 는 2개의 활성 가닥 또는 2개의 패신저 가닥을 포함할 수 있다.
- [0556] 다양한 실시양태에서, 각각의 —●— 는 1개의 센스 및 1개의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 독립적으로 포함할 수 있다. 예를 들면, siRNA의 경우에서, —●— 는 1개의 활성 가닥 및 1개의 패신저 가닥을 포함할 수 있다.
- [0557] 다양한 실시양태에서, 상기 화합물 또는 조성물은 실질적으로 동일한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드의 호모-다합체를 포함한다. 실질적으로 동일한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 각각은 생체내에서 동일한 문자 표적을 표적화하는 siRNA를 포함할 수 있다.
- [0558] 다양한 실시양태에서, 상기 화합물 또는 조성물은 2종 이상의 실질적으로 상이한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드의 헤테로-다합체를 포함한다. 실질적으로 상이한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 각각은 상이한 유전자를 표적화하는 siRNA를 포함할 수 있다.
- [0559] 다양한 실시양태에서, 화합물은 n=0인 하기 구조식 9를 포함한다:
- [0560] <구조식 9>
- [0561]
- [0562] 화합물은 표적 리간드를 추가로 포함할 수 있다. 화합물은 상이한 문자 표적을 생체내에서 표적화하는 siRNA를 각각 포함하는 2 또는 3개의 실질적으로 상이한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 —●—를 추가로 포함할 수 있다. 화합물은 표적 리간드, 인자 VII을 표적화하는 제1의 siRNA 가이드 가닥 및 가이드 가닥에 하이브리드화된 제1의 패신저 가닥을 포함하는 1개의 —●—, 아포지질단백질 B를 표적화하는 제2의 siRNA 가이드 가닥 및 제2의 가이드 가닥에 하이브리드화된 제2의 패신저 가닥을 포함하는 1개의 —●— 및, TTR을 표적화하는 제3의 siRNA 가이드 가닥 및 제3의 가이드 가닥에 하이브리드화된 제3의 패신저 가닥을 포함하는 1개의 —●—를 추가로 포함할 수 있다. 표적 리간드는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)을 포함할 수 있다.
- [0563] 삼합체의 예는 실시예 17, 18 및 20에서 제공된다.
- [0564] 다양한 실시양태에서, 화합물은 m=1인 하기 구조식 10을 포함한다:
- [0565] <구조식 10>
- [0566]
- [0567] 화합물은 표적 리간드를 추가로 포함할 수 있다. 화합물은 상이한 문자 표적을 생체내에서 표적화하는 siRNA를 각각 포함하는 2, 3 또는 4개의 실질적으로 상이한 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 —●—를 추가로 포함할 수

있다. 화합물은 표적 리간드, 인자 VII을 표적화하는 제1의 siRNA 가이드 가닥 및 가이드 가닥에 하이브리드화된 제1의 패신저 가닥을 포함하는 1개의 --- , 아포지질단백질 B를 표적화하는 제2의 siRNA 가이드 가닥 및 제2의 가이드 가닥에 하이브리드화된 제2의 패신저 가닥을 포함하는 1개의 --- 및, TTR을 표적화하는 제3의 siRNA 가이드 가닥 및 제3의 가이드 가닥에 하이브리드화된 제3의 패신저 가닥을 포함하는 1개의 --- 를 추가로 포함할 수 있다. 표적 리간드는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)을 포함할 수 있다.

[0568]

사합체의 예는 실시예 21에서 제공된다.

[0569]

다양한 실시양태에서, 각각의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드(예를 들면 구조식 4에서의 ---)는 인자 VII을 표적하는 siRNA 가이드 가닥 및 가이드 가닥에 하이브리드화된 패신저 가닥을 포함한다.

[0570]

다양한 실시양태에서(예, 구조식 4에서), 화합물은 표적 리간드를 추가로 포함하며, 각각의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드(예, ---)는 siRNA 가이드 가닥 및 가이드 가닥에 하이브리드화된 패신저 가닥을 포함하며, 화합물은 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 순수하다.

[0571]

다양한 실시양태에서, 적어도 하나의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드(예를 들면 구조식 6에서의 ---)는 인자 VII을 표적화하는 제1의 siRNA 가이드 가닥 및 가이드 가닥에 하이브리드화된 제1의 패신저 가닥을 포함하며, 적어도 하나의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드(예를 들면 구조식 6에서의 ~~~~~)는 아포지질단백질 B를 표적화하는 제2의 siRNA 가이드 가닥 및 제2의 가이드 가닥에 하이브리드화된 제2의 패신저 가닥을 포함한다.

[0572]

센스-안티센스 다합체 화합물

[0573]

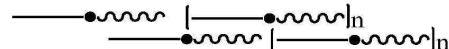
다양한 양태에서, 본 발명은 센스-안티센스 다중 접합체 올리고뉴클레오티드뿐 아니라, 그의 합성 방법을 제공한다.

[0574]

한 양태에서, 본 발명은 복수의 분자를 포함하며, 각각의 분자는 하기 구조식 16을 갖는 조성물을 제공한다:

[0575]

<구조식 16>



[0576]

상기 식에서, n은 정수 ≥ 1 이며;

[0578]

각각의 --- 은 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며;

[0579]

각각의 ~~~~~ 는 --- 로 하이브리드화된 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며;



[0580]

~~~~~ 은 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며;

[0581]

각각의 ●는 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이다.

[0582]

유사하게는, 본 발명은 복수의 분자를 포함하며, 각각의 분자는 구조식 16을 갖는 조성물의 합성 방법을 제공하며, 그러한 방법은

[0583]

(i) 일치환된 생성물 $\text{---}\bullet$ 을 생성하는 조건 하에서 제1의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ---^R 를 이작용성 연결 모이어티 ○(여기서 R1은 ○와 반응할 수 있는 화학 기임)와 반응시키며;

[0584]

(ii) $\text{---}\bullet$ 을 제2의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ~~~~~^R_2 (여기서 R2는 ○와 반응할 수 있는 화학기임)와 반응시켜 $\text{---}\bullet\text{~~~~~}$ 를 형성하며; 및

[0585]

(iii) 복수의 $\text{---}\bullet\text{~~~~~}$ 를 어닐링시켜 복수의 분자를 포함하며 각각의 분자가 구조식 16을 갖는 조성물을 형성하는 것을 포함한다.

[0586]

본 발명에 의한 기타 화합물 및 조성물에 관하여, 구조식 16에 의한 분자는 실시예를 포함한 본원에 기재된 특징 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들면, 화합물은 핵산(변형되거나 또는 변형되지 않음), 표적 리간드 및/또는 상기 기재된 링커 또는 발명의 내용 또는 실시예에 제시된 임의의 특정한 구조식 또는 화학 중

임의의 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0587] 예를 들면, 다양한 실시양태에서, 각각의  는 15-30개의 염기쌍의 길이를 가지며; 각각의  는 siRNA이며; 및/또는 n은 1 내지 100의 정수이다. 구조식 16의 양태가 siRNA로서 제시되기는 하였으나, 그 구조는 siRNA로 반드시 제한되는 것은 아니다.

[0588] 다양한 실시양태에서, R1, R2 및 이작용성 연결 모이어티 ○는 본원에 기재 및 제시된 바와 같은 공유 링커 ●를 형성할 수 있다. 예를 들면, 다양한 실시양태에서, R1 및 R2는 각각 독립적으로 반응성 모이어티, 예를 들면 친전자체 또는 친핵체를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, R1 및 R2는 각각 독립적으로 티올, 말레이미드, 비닐술폰, 피리딜디술피드, 요오도아세트아미드, 아크릴레이트, 아지드, 알킨, 아민 및 카르복실 기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 이작용성 연결 모이어티 ○는 상기 단계 (i) 및 (ii)에 의하여 순차적으로 반응될 수 있는 2개의 반응성 모이어티, 예를 들면 R1 및 R2에서 친전자체/친핵체와 반응할 수 있는 제2의 친전자체/친핵체를 포함한다. 이작용성 연결 모이어티 ○의 예는 DTME, BM(PEG)2, BM(PEG)3, BMOE, BMH 또는 BMB를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

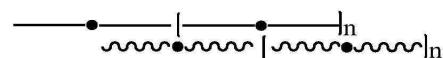
[0589] 한 실시양태에서, 각각의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드는 본질적으로 동일한 서열을 갖는다. 기타 실시양태에서, 이중 가닥 올리고뉴클레오티드는 변동될 수 있다. 예를 들면, 각각의  는 동일한 표적을 갖는 siRNA 활성 가닥일 수 있으며, 각각의  는  에 대하여 적어도 약 80, 85, 90 또는 95% 상보성인 siRNA 패신저 가닥일 수 있다( 의 서열은  로 하이브리드화된다면 변동될 수 있다).

다합체 화합물에 대한 어닐링 조건

[0591] 다양한 양태에서, 본 발명은 다중 접합체 올리고뉴클레오티드의 합성 방법을 제공한다.

[0592] 한 양태에서, 본 발명은 하기 구조식 17을 포함하는 복수의 분자를 포함하는 조성물의 합성 방법을 제공하며:

[0593] <구조식 17>



[0594] [0595] 상기 식에서, n은 정수 ≥ 1 이며; 각각의  은 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며; 각각의  는  로 하이브리드화된 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이며;  은 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이며; 각각의 ●는 인접하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하여  및  를 형성하는 공유 링커이며, 그러한 방법은

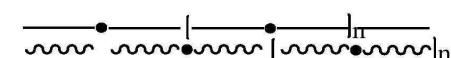
[0596] (i)  및  의 경우 약 200-300 μM 의 총 올리고뉴클레오티드 농도,

[0597] (ii) 약 0.1-0.3x 포스페이트 완충 염수(PBS) 및

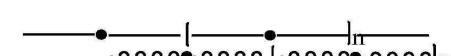
[0598] (iii) 약 70-80°C 내지 약 20-30°C의 온도에서 약 1.5-2.5 시간 동안 복수의  및  를 어닐링시키는 단계를 포함한다.

[0599] 다양한 실시양태에서, 상기 방법은 복수의  및/또는  를 어닐링시켜 하기 구조식 18, 19 및/또는 20을 포함하는 복수의 분자를 형성하는 단계를 추가로 포함한다:

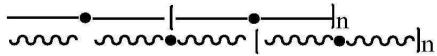
[0600] <구조식 18>



[0601] <구조식 19>



[0604] <구조식 20>



[0605]

[0606] 다양한 실시양태에서, 상기 방법은 ————— 를 복수의 —————●———— 및 ~~~~~ 로 어닐링시키는 것을 추가로 포함한다.

[0607] 다양한 실시양태에서, ————— 대 ~~~~~ 의 몰비는 약 5:100, 10:100, 20:100, 30:100, 40:100 또는 50:100이다.

[0608] 다양한 실시양태에서, 상기 방법은 ~~~~~ 를 복수의 —————●———— 및 ~~~~~ 로 어닐링시키는 것을 추가로 포함한다.

[0609] 다양한 실시양태에서, ~~~~~ 대 —————●———— 의 몰비는 약 5:100, 10:100, 20:100, 30:100, 40:100 또는 50:100이다.

[0610] 다양한 실시양태에서, —————●———— 및 ~~~~~ 의 몰비는 약 1:1이다.

[0611] 다양한 실시양태에서, —————●———— 대 ~~~~~ 의 몰비 또는 ~~~~~ 대 —————●———— 의 몰비는 약 100:90, 100:80, 100:75, 100:70 또는 100:60이다.

[0612] 다양한 실시양태에서, 각각의 ~~~~~ 는 15-30개의 염기쌍의 길이를 갖는다.

[0613] 다양한 실시양태에서, 각각의 ~~~~~ 는 siRNA이다.

[0614] 다양한 실시양태에서, 각각의 ~~~~~ 는 인자 VII을 표적화하는 siRNA 가이드 가닥 및 가이드 가닥에 하이브리드화된 패신저 가닥을 포함한다.

[0615] 다양한 실시양태에서, n은 1 내지 100의 정수이다.

[0616] 다양한 실시양태에서, ●는 절단 가능한 또는 절단 불가한 링커이다.

[0617] 다양한 실시양태에서, 상기 방법은 구조식 17, 18, 19 및/또는 20을 포함하는 복수의 분자를 나노입자 중에서 제제화시키는 것을 추가로 포함한다.

[0618] 본 발명에 의한 기타 화합물 및 조성물에 관하여, 다합체 화합물 및 중간체는 (방법 단계를 포함하며, 실시예에서 포함한) 본원에 기재된 특정 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들면, 화합물은 핵산(변형되거나 또는 변형되지 않음), 표적 리간드 및/또는 상기 기재된 링커 또는 발명의 내용 또는 실시예에 제시된 임의의 특정한 구조식 또는 화학 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다. 실시예 22-24는 다합체 올리고뉴클레오티드의 예시의 실시양태를 예시한다.

약학 조성물

[0620] 다양한 양태에서, 본 발명은 상기 기재된 화합물 또는 조성물 중 임의의 하나 이상을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본원에 사용된 바와 같이, 약학 조성물은 질환을 예방, 진단, 완화, 치료 또는 치유하는데 사용될 수 있는 식품을 제외한 물질의 조성물을 포함한다. 유사하게는, 본 발명에 의한 각종 화합물 또는 조성물은 의약으로서 사용하기 위한 및/또는 의약의 제조에 사용하기 위한 실시양태를 포함하는 것으로 이해하여야 한다.

[0621] 약학 조성물은 본 발명에 의한 화합물 또는 조성물 및 제약상 허용 가능한 부형제를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 부형제는 활성 성분과 함께 제제화되는 천연 또는 합성 물질일 수 있다. 부형제는 장기간 안정화, 부피 증가(예, 벌깅제, 충전제 또는 희석제) 또는 최종 투여 형태 중의 활성 성분에 치료적 향상, 예컨대 약물 흡수 촉진, 점도 감소 또는 용해도 향상을 부여하기 위하여 포함될 수 있다. 부형제는 또한 예를 들면 활성 성분의 취급을 돋기 위하여 및/또는 시험관내 안정성을 돋기 위하여(예, 변형 또는 응집을 방지하여) 유용한 제조 및 분포가 될 수 있다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 적절한 부형제 선택은 투여 경로, 투여 형태 및 활성 성분(들)을 포함한 각종 인자에 의존할 수 있다.

[0622]

올리고뉴클레오티드는 국소 또는 전신 전달될 수 있으며, 따라서 본 발명의 약학 조성물은 변동될 수 있다. 예를 들면, 투여는 임의의 특정한 전달계로 반드시 제한되지는 않으며, 비경구(폐하, 정맥내, 척수내, 관절내, 근육내 또는 복강내 주사), 직장, 국소, 경피 또는 경구를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 개체에게 투여는 단일 투여로 또는 반복 투여로 그리고 약학 조성물의 일부로서 임의의 각종 생리학적 허용 가능한 염 형태로 및/또는 허용 가능한 약학적 담체 및/또는 첨가제와 함께 발생될 수 있다. 생리학적 허용 가능한 제제 및 표준 약학적 제제 기술, 투여량 및 부형제는 당업자에게 널리 공지되어 있다(예를 들면 문헌[*Physicians' Desk Reference (PDR®)* 2005, 59th ed., Medical Economics Company, 2004]; 및 [*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, eds. Gennado et al., 21th ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2005])을 참조한다).

[0623]

약학 조성물은 본 발명에 의한 상기 화합물 또는 조성물의 유효량을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 유효량은 특정한 명시된 목적을 달성하게 되는 농도 또는 양일 수 있거나 또는 더 많은 양은 예를 들면 플라시보에 비하여 변화를 야기하기에 적절한 양을 의미한다. 유효량이 치료적 유효량인 경우, 예를 들면 치료적 용도에 적절한 양, 예를 들면 질환을 예방, 진단, 완화, 치료 또는 치유하기에 충분한 양일 수 있다. 유효량은 당업계에 공지된 방법에 의하여 결정될 수 있다. 또한, 유효량은 실험에 의하여, 예를 들면 인간 임상 시험에 의하여 결정될 수 있다. 유효량은 또한 당업계에 공지된 전환 인자를 사용하여 하나의 동물(예, 마우스, 래트, 원숭이, 돼지, 개)로부터 또 다른 동물(예, 인간)에 사용하기 위하여 외삽될 수 있다. 예를 들면 문헌[*Freireich et al., Cancer Chemother Reports* 50(4):219-244 (1966)]을 참조한다.

[0624]

전달 비히클 및 표적 리간드

[0625]

다양한 양태에서, 본 발명은 전달 비히클 중에서 제제화된 상기 기재된 화합물 또는 조성물 중 임의의 하나 이상을 제공한다. 예를 들면, 전달 비히클은 지질 나노입자(LNP), 엑소좀, 미세소포 또는 바이러스 벡터일 수 있다. 유사하게는, 다양한 양태에서, 본 발명은 표적 리간드를 추가로 포함하는 상기 기재된 화합물 또는 조성물 중 임의의 하나 이상을 제공한다. 예를 들면, 표적 리간드는 N-아세틸갈اكت오사민(GalNAc), 콜레스테롤, 토코페롤, 폴레이트, 2-[3-(1,3-디카르복시프로필)-우레이도]펜탄2산(DUPA) 또는 아니사미드를 포함한다. 표적 리간드는 핵산에, 예를 들면 그의 3' 또는 5' 말단을 통하여 (예, 직접) 결합될 수 있다. 본 발명에 사용하기 위하여 변형될 수 있는 추가의 예는 하기에 논의된다.

[0626]

당업자가 이해하는 바와 같이, 생물학적 표적 또는 작용의 기전에도 불구하고, 치료적 올리고뉴클레오티드는 유기체(예, 치료를 필요로 하는 동물, 예컨대 인간)에서 표적 세포에 접근하는 일련의 생리학적 장애를 극복하여야만 한다. 예를 들면, 치료적 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 모두 바람직하지 않은 면역 반응을 이끌어내지 않으면서 혈류 중에서의 청소를 피하고, 표적 세포 타입을 도입한 후, 세포질에 도입되는 것을 피하여야만 한다. 그러한 과정은 일반적으로 불충분한 것으로 간주되며, 예를 들면 엔도좀을 생체내에서 도입하는 siRNA의 95% 이상은 리소좀 내에서 분해될 수 있거나 또는 임의의 유전자 억제에 영향을 미치지 않으면서 세포로부터 밀어낼 수 있다.

[0627]

그러한 방해를 극복하기 위하여, 과학자들은 다수의 약물 전달 비히클을 설계하였다. 그러한 비히클은 소분자 약물, 단백질 약물 및 기타 치료적 분자 이외에 치료적 RNAs를 전달하는데 사용되어 왔다. 약물 전달 비히클은 당, 지질, 지질-유사 물질, 단백질, 중합체, 웹티드, 금속, 하이드로겔, 접합체 및 웹티드와 같은 다양한 물질로부터 생성되었다. 다수의 약물 전달 비히클은 그러한 기의 조합으로부터의 양상(aspect)을 도입하며, 예를 들면 일부 약물 전달 비히클은 당과 지질을 조합할 수 있다. 몇몇 기타 예에서, 약물은 모사 세포를 의미하는 "세포 유사" 물질 중에 직접 숨겨질 수 있으며, 기타 경우에서, 약물은 세포 그 자체에 또는 그 자체상에 둘 수 있다. 약물 전달 비히클은 pH 변화, 생체분자 농도, 자기장 및 열과 같은 자극에 반응하여 약물을 배출하도록 설계될 수 있다.

[0628]

많은 연구가 올리고뉴클레오티드, 예컨대 siRNA를 간에 전달하는데 촉점이 맞춰졌다. 생체내에서 간세포로의 유효한 siRNA 전달에 필요한 투여량은 지난 십년간 10,000 배 초과로 감소되는 반면, 2006년에 보고된 전달 비히클은 표적 단백질 생성에 10 mg/kg 초과의 siRNA를 필요로 하며, 신규한 전달 비히클 표적 단백질 생성은 이제 0.001 mg/kg siRNA의 전신 주사 후 감소될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 전달 효율에서의 증가는 적어도 부분적으로는 전달 비히클에서의 개발에 기인할 수 있다.

[0629]

또 다른 중요한 진전은 헬퍼 성분이 전달에 영향을 미치는 방식의 증가된 이해이다. 헬퍼 성분은 1차 약물 전달 계에 첨가된 화학적 구조식을 포함할 수 있다. 종종, 헬퍼 성분은 입자 안정성 또는 특정한 기관으로의 전달을 개선시킬 수 있다. 예를 들면, 나노입자는 지질로 생성될 수 있으나, 그러한 지질 나노입자에 의하여 매개되는

전달은 친수성 중합체 및/또는 소수성 분자의 존재에 의하여 영향받을 수 있다. 나노입자 전달에 영향을 미치는 중요한 친수성 중합체의 일례는 폴리(에틸렌 글리콜)이다. 기타 친수성 중합체는 비이온성 계면활성제를 포함한다. 나노입자 전달에 영향을 미치는 소수성 분자는 콜레스테롤, 1-2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC), 1-2-디-0-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판(DOTMA), 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP) 등을 포함한다.

[0630] 약물 전달계는 또한 표적 리간드 또는 접합계를 사용하여 설계되었다. 예를 들면, 올리고뉴클레오티드는 콜레스테롤, 당, 펩티드 및 기타 핵산에 접합되어 간세포 및/또는 기타 세포 타입으로의 전달을 도울 수 있다.

[0631] 당업자는 공지의 전달 비히를 및 표적 리간드가 일반적으로 본 발명에 의한 용도를 위하여 변형될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 전달 비히를 및 표적 리간드의 예뿐 아니라, 그의 용도는 하기 문헌에서 찾아볼 수 있다: Sahay, G., et al., Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nat Biotechnol*, 31: 653-658 (2013); Wittrup, A., et al., Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. *Nat Biotechnol* (2015); Whitehead, K.A., Langer, R. & Anderson, D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature reviews. Drug Discovery*, 8: 129-138 (2009); Kanasty, R., Dorkin, J.R., Vegas, A. & Anderson, D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature Materials*, 12: 967-977 (2013); Tibbitt, M.W., Dahlman, J.E. & Langer, R. Emerging Frontiers in Drug Delivery. *J Am Chem Soc*, 138: 704-717 (2016); Akinc, A., et al., Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 1357-1364 (2010); Nair, J.K., et al., Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc*, 136: 16958-16961 (2014); Ostergaard, M.E., et al., Efficient Synthesis and Biological Evaluation of 5'-GalNAc Conjugated Antisense Oligonucleotides. *Bioconjugate chemistry* (2015); Sehgal, A., et al., An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nature Medicine*, 21: 492-497 (2015); Semple, S.C., et al., Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol*, 28: 172-176 (2010); Maier, M.A., et al., Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21: 1570-1578 (2013); Love, K.T., et al., Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing. *Proc Nat Acad USA*, 107: 1864-1869 (2010); Akinc, A., et al., A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat Biotechnol*, 26: 561-569 (2008); Eguchi, A., et al., Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain-dsRNA binding domain fusion protein. *Nat Biotechnol*, 27: 567-571 (2009); Zuckerman, J.E., et al., Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. *Proc Nat Acad USA*, 111: 11449-11454 (2014); Zuckerman, J.E. & Davis, M.E. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14: 843-856 (2015); Hao, J., et al., Rapid Synthesis of a Lipocationic Polyester Library via Ring-Opening Polymerization of Functional Valerolactones for Efficacious siRNA Delivery. *J Am Chem Soc*, 29: 9206-9209 (2015); Siegwart, D.J., et al., Combinatorial synthesis of chemically diverse core-shell nanoparticles for intracellular delivery. *Proc Nat Acad USA*, 108: 12996-13001 (2011); Dahlman, J.E., et al., In vivo endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight. *Nat Nano* 9, 648-655 (2014); Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R. & Rudzinski, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 70, 1-20 (2001); Kim, H.J., et al., Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS Nano*, 8: 8979-8991 (2014); Krebs, M.D., Jeon, O. & Alsberg, E. Localized and sustained delivery of silencing RNA from macroscopic biopolymer hydrogels. *J Am Chem Soc* 131, 9204-9206 (2009); Zimmermann, T.S., et al., RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441: 111-114 (2006); Dong, Y., et al., Lipopeptide nanoparticles for potent and selective siRNA delivery in rodents and nonhuman primates. *Proc Nat Acad USA*, 111: 3955-3960 (2014); Zhang, Y., et al., Lipid-modified aminoglycoside derivatives for in vivo siRNA delivery. *Advanced Materials*, 25: 4641-4645 (2013); Molinaro, R., et al., Biomimetic proteolipid vesicles for targeting inflamed tissues. *Nat Mater* (2016); Hu, C.M., et al.,

al., Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking. *Nature*, 526: 118-121 (2015); Cheng, R., Meng, F., Deng, C., Klok, H.-A. & Zhong, Z. Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery. *Biomaterials*, 34: 3647-3657 (2013); Qiu, Y. & Park, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, Supplement, 49-60 (2012); Mui, B.L., et al., Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles. *Mol Ther Nucleic Acids* 2, e139 (2013); Draz, M.S., et al., Nanoparticle-Mediated Systemic Delivery of siRNA for Treatment of Cancers and Viral Infections. *Theranostics*, 4: 872-892 (2014); Otsuka, H., Nagasaki, Y. & Kataoka, K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55: 403-419 (2003); Kauffman, K.J., et al., Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Letters*, 15: 7300-7306 (2015); Zhang, S., Zhao, B., Jiang, H., Wang, B. & Ma, B. Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *Journal of Controlled Release* 123, 1-10 (2007); Illum, L. & Davis, S.S. The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (Poloxamer 338). *FEBS Letters*, 167: 79-82 (1984); Felgner, P.L., et al., Improved Cationic Lipid Formulations for In vivo Gene Therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 772: 126-139 (1995); Meade, B.R. & Dowdy, S.F. Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 134-140 (2007); Endoh, T. & Ohtsuki, T. Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptide modified for endosomal escape. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61: 704-709 (2009); and Lee, H., et al., Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery. *Nat Nano*, 7: 389-393 (2012).

[0632]

다양한 실시양태에서, 본 발명의 화합물 및 조성물은 예를 들면 생물학적 활성 모이어티를 포함한 기타 화학적 또는 생물학적 모이어티에 접합되거나 또는 이와 함께 전달될 수 있다. 생물학적 활성 모이어티는 생물학적 효과, 바람직하게는 측정 가능한 생물학적 효과를 갖는 임의의 분자 또는 물질이다. 화학적 또는 생물학적 모이어티는 예를 들면 단백질, 웨티드, 아미노산, 핵산(예를 들면 모든 유형의 DNA, RNA, RNA 및 DNA 앱타며, 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 안티센스 miRNA 저해제), 표적 리간드, 탄수화물, 다당류, 지질, 유기 화합물 및 무기 화학적 화합물을 포함한다.

[0633]

본원에 사용된 바와 같이, 용어 표적 리간드는 예를 들면 나노입자 또는 전달 접합체의 세포 수용체 부착을 가능케 하여 나노입자 또는 전달 접합체의 페이로드(payload)를 특정한 표적, 예컨대 특정한 체조직 또는 세포 타입에 전달하기 위하여 나노입자의 표면 상에서 또는 전달 접합체의 일부로서 접근 가능케 될 수 있는 모이어티를 포함할 수 있다. 적절한 표적 리간드의 예는 세포 특이성 웨티드 또는 단백질(예, 트랜스페린 및 모노클로날 항체), 앱타며, 세포 성장 인자, 비타민(예, 엽산), 단당류(예, 갈락토스 및 만노스), 다당류, 아르기닌-글리신-아스파르트산(RGD) 및, N-아세틸갈락토사민(GalNac)로부터 유도된 아시알로글리코단백질 수용체 리간드를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 리간드는 당업계에 공지된 각종 기술을 사용하여, 예컨대 공유 결합, 예컨대 디솔피드 결합, 아미드 결합 또는 에스테르 결합에 의하여 또는 비공유 결합, 예컨대 비오틴-스트렙타비딘을 경유하여 또는 금속-리간드 착체를 사용하여 본 발명의 상기 화합물에 혼입될 수 있다. 본 발명의 범주내의 추가의 생물학적 활성 모이어티는 예를 들면 CRISPR/Cas 시스템, 테일(Tales), 탈렌(Talens) 및 징크 핑거(zinc fingers)에 관련된 올리고뉴클레오티드, 폴리웨티드 및 단백질과 같은 물질을 포함한 임의의 공지의 유전자 편집 물질이다.

[0634]

다양한 실시양태에서, 본 발명의 화합물 및 조성물은 세포내 전달을 위한 나노입자를 형성하는 담체 물질 중에 캡슐화될 수 있다. 공지의 담체 물질은 양이온성 중합체, 지질 또는 웨티드 또는 그의 화학적 유사체를 포함한다. 문헌[Jeong et al., *BIOCONJUGATE CHEM.*, Vol. 20, No. 1, pp. 5-14 (2009)]. 양이온성 지질의 예는 디올레일 포스파티딜에탄올아민, 콜레스테롤 디올레일 포스파티딜콜린, N-[1-(2,3-디올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), 1,2-디올레오일옥시-3-(트리메틸암모니오)프로판(DOTAP), 1,2-디올레오일-3-(4'-트리메틸-암모니오)부타노일-sn-글리세롤(DOTB), 1,2-디아실-3-디메틸암모늄-프로판(DAP), 1,2-디아실-3-트리메틸암모늄-프로판(TAP), 1,2-디아실-sn-글리세롤-3-에틸포스포콜린, 3 베타-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일]콜레스테롤(DC-콜레스테롤), 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(DDAB) 및 그의 공중합체를 포함한다. 양이온성 중합체의 예는 폴리에틸렌이민, 폴리아민, 폴리비닐아민, 폴리(알킬아민 히드로클로라이드), 폴리아미도아민 텐드리며, 디에틸아미노에틸-헥스트란, 폴리비닐피롤리돈, 키틴, 키토산 및 폴리(2-디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트를 포함한다. 한 실시양태에서, 담체는 기타 공지의 담체 물질에 비하여 생체내에서 사용하기에

더 적절할 수 있는 성질을 갖는 하나 이상의 아실화 아민을 함유한다.

[0635] 한 실시양태에서, 담체는 양이온성 펩티드, 예를 들면 KALA(양이온성 융합생성 펩티드), 폴리리신, 폴리글루탐산 또는 프로타민을 포함한다. 한 실시양태에서, 담체는 양이온성 지질, 예를 들면 디올레일 포스파티딜에탄올아민 또는 콜레스테롤 디올레일 포스파티딜콜린이다. 한 실시양태에서, 담체는 양이온성 중합체, 예를 들면 폴리에틸렌아민, 폴리아민 또는 폴리비닐아민이다.

[0636] 다양한 실시양태에서, 본 발명의 화합물 및 조성물은 엑소좀 중에 캡슐화될 수 있다. 엑소좀은 혈액, 소변을 포함한 생물학적 유체 및 세포 배양액의 배양된 배지 중에 존재하는 30 및 100 nm 사이의 직경을 갖는 세포 유래 소포이다. 합성 엑소좀 및 엑소좀 모사체를 포함한 엑소좀은 당업자에 의하여 약물 전달에 사용을 위하여 변형될 수 있다. 예를 들면, 문헌["A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles - endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy" *Biochim Biophys Acta.* 1846(1):75-87 (2014); "Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges" *Acta Pharmaceutica Sinica B*, Available online 8 March 2016 (In Press); and "Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems" *International Journal of Nanomedicine*, 7: 1525-1541 (2012)]을 참조한다.

[0637] 다양한 실시양태에서, 본 발명의 화합물 및 조성물은 미세소포 중에 캡슐화될 수 있다. 미세소포(종종 순환 중인 미세소포 또는 마이크로입자로 지칭됨)는 거의 모든 세포 타입으로부터 탈락된 100 nm 내지 1,000 nm 범위내의 혈장 막의 조각이며, 엑소좀으로 공지된 더 작은 세포내적으로 생성된 세포외 소포와는 구별된다. 미세소포는 세포내 소통에서 역할을 하며, mRNA, miRNA 및 단백질을 세포 사이에서 수송할 수 있다. 합성 미세소포 및 미세소포 모사체를 포함한 미세소포는 당업자에 의하여 약물 전달에 사용하기 위하여 변형될 수 있다. 예를 들면, 문헌["Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells" *Journal of Controlled Release*, 220: 727-737 (2015); "Therapeutic Uses of Exosomes" *J Circ Biomark*, 1:0 (2013)]을 참조한다.

[0638] 다양한 실시양태에서, 본 발명의 화합물 및 조성물은 바이러스 벡터를 사용하여 전달될 수 있다. 바이러스 벡터는 유전 물질을 세포에 전달하기 위하여 분자 생물학자들이 통상적으로 사용하는 도구이다. 그러한 과정은 살아 있는 유기체(생체내에서) 또는 세포 배양액(시험판내) 내에서 수행될 수 있다. 바이러스 벡터는 당업자에 의하여 약물 전달에 사용하기 위하여 변형될 수 있다. 예를 들면 문헌["Viruses as nanomaterials for drug delivery" *Methods Mol Biol.*, 26: 207-21 (2011); "Viral and nonviral delivery systems for gene delivery" *Adv Biomed Res*, 1:27 (2012); and "Biological Gene Delivery Vehicles: Beyond Viral Vectors" *Molecular Therapy*, 17(5): 767-777 (2009)]을 참조한다.

[0639] LNP 제제화 및 특징화를 위한 일반적인 절차는 LNP 제제화 및 기타 시험판내 및 생체내 테스트의 작업에이므로 하기 실시예에 제공한다. 기타 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자에 의하여 본 발명으로 사용하기 위하여 변형될 수 있다.

치료 및 유전자 발현 감소의 방법

[0641] 다양한 양태에서, 본 발명은 예를 들면 의학적 처치, 연구를 위하여 또는 동물 및 식물에서 신규한 또는 변형된 표현형의 생성을 위하여 다중 접합체 올리고뉴클레오티드의 사용 방법을 제공한다.

[0642] 한 양태에서, 본 발명은 본 발명에 의한 화합물 또는 조성물의 유효량을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 그러한 치료 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 치료적 올리고뉴클레오티드, 예를 들면 siRNA 또는 miRNA가 될 것이다.

[0643] 상기 및 기타 실시양태에서, 본 발명의 조성물 및 화합물은 전달 비히를 중의 또는 표적 리간드에 커플링된 약학 조성물의 형태로 투여될 수 있다.

[0644] 한 양태에서, 본 발명은 본 발명에 의한 화합물 또는 조성물의 유효량을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 유전자 발현의 억제 또는 감소 방법을 제공한다. 그러한 치료적 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 유전자 발현, 예를 들면 siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 억제 또는 감소시키는 올리고뉴클레오티드가 될 것이다.

[0645] 유사하게는, 본 발명은 본 발명에 의한 화합물 또는 조성물의 유효량을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물 또는 조성물은 2종 이상의 유전자를 표적화하는 올리고뉴클레오티드를

포함하는, 2종 이상의 유전자의 발현의 억제 또는 감소 방법을 제공한다. 화합물 또는 조성물은 2, 3, 4종 또는 그보다 많은 유전자를 표적화하는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0646] 한 양태에서, 본 발명은 본 발명에 의한 화합물 또는 조성물의 유효량을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물 또는 조성물은 표적 리간드를 포함하는, 표적 리간드 결합 사례당 2종 이상의 올리고뉴클레오티드를 세포에 전달하는 방법을 제공한다.

[0647] 한 양태에서, 본 발명은 본 발명에 의한 화합물 또는 조성물의 유효량을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물 또는 조성물은 미리 결정된 화학량론적 비의 2종 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 미리 결정된 화학량론적 비의 2종 이상의 올리고뉴클레오티드를 세포에게 전달하는 방법을 제공한다.

[0648] 본원에 사용된 바와 같이, 대상체는 치료 또는 투여되는 세포 또는 유기체 대상체를 포함한다. 대상체는 동물, 예를 들면 포유동물, 예컨대 실험실 동물(마우스, 원숭이) 또는 수의학적 환자 또는 영장류, 예컨대 인간일 수 있다. 제한되는 것은 아니나, 치료 또는 투여를 필요로 하는 대상체는 (예, 본 발명의 화합물 및 조성물을 사용하여 치료될 수 있는) 질환을 갖는 대상체 또는, 병태(예, 본 발명의 화합물 및 조성물을 사용하여 어드레스될 수 있는, 예를 들면 억제시키거나 또는 감소된 발현을 갖는 하나 이상의 유전자)를 갖는 대상체를 포함할 수 있다.

[0649] 유전자 뉴다운 및 동물 실험의 측정을 위한 일반적인 절차는 기타 시험관내 및 생체내 테스트의 작업에 이므로 하기 실시예에 제공된다. 기타 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자에 의하여 본 발명과 함께 사용하기 위하여 변형될 수 있다.

[0650] 하기 실시예는 예시를 위한 것이며, 제한하지 않는다. 기술의 다수의 변형은 본 개시내용을 참고시 당업자에게 자명할 것이다. 그러므로, 기술의 범주는 실시예를 참조하지 않고 결정되어야 하며, 그 대신 등가예의 모든 범주와 함께 첨부되는 청구범위를 참조하여 결정되어야 한다.

실시예

일반적인 절차: 단쇄 올리고뉴클레오티드 합성

[0653] 올리고리보뉴클레오티드는 ABI 394 및 3900 합성기(어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)) 상에서 10 μmol 규모에서 또는 올리고파일롯(Oligopilot) 10 합성기 상에서 28 μmol 규모로 포스포르아미다이트 화학을 사용하여 어셈블리하였다. 고체 지지체는 2'-데옥시티미딘(글렌 리서치(Glen Research), 미국 버지니아주 스톤링 소재) 또는 제어된 공극 유리(CPG, 520 Å, 75 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 의 로딩, 미국 펜실베이니아주 아스톤에 소재하는 프라임 신세시즈(Prime Synthesis)로부터 얻음)를 로딩한 폴리스티렌이었다. 보조 합성 시약, DNA-, 2'-0-메틸 RNA- 및 2'-데옥시-2'-플루오로-RNA 포스포르아미다이트는 에스에이에프씨 프롤리고(SAFC Proligo)(독일 함부르크 소재)로부터 입수하였다. 구체적으로, 2'-0-메틸-우리딘(2'-OMe-U), 4-N-아세틸-2'-0-메틸-시티딘(2'-OMe-C^{Ac}), 6-N-벤조일-2'-0-메틸-아데노신(2'-OMe-A^{bz}) 및 2-N-이소부티릴구아노신(2'-OMe-G^{iBu})의 5'-0-(4,4'-디메톡시트리틸)-3'-0-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)포스포르아미다이트 단량체를 사용하여 올리고머 서열을 구축하였다. 동일한 핵염기 보호기를 2'-OMe RNA 빌딩 블록으로서 지니는 해당 포스포르아미다이트를 사용하여 2'-플루오로 변형을 도입하였다. 모든 포스포르아미다이트(아세토니트릴 중의 70 mM)에 대한 커플링 시간은 5-에틸티오-1H-테트라졸(ETT, 아세토니트릴 중의 0.5 M)을 활성화제로서 사용하여 3 분이었다. 포스포로티오에이트 결합은 피리딘 및 아세토니트릴의 1:1 (v/v) 혼합물 중의 50 mM 3-((디메틸아미노메틸리덴)아미노)-3H-1,2,4-디티아졸-3-티온(DDTT, 에이엠 케미칼즈(AM Chemicals), 미국 캘리포니아주 오션사이드 소재)을 사용하여 도입하였다. DMT 기("DMT 오프(off) 합성")의 제거를 포함한 고체 상 합성의 완료시 고체 상으로부터 올리고뉴클레오티드를 절단시키고, 수성 메틸아민(41%) 및 전한 수성 암모니아(32%)로 이루어진 1:1 혼합물을 사용하여 3 시간 동안 25°C에서 공개된 방법[Wincott, F. et al., Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes. *Nucleic Acids Res.*, 23: 2677-2684 (1995)]에 따라 탈보호하였다.

[0654] 그 후, 미정제 올리고머를 소스(Source) Q15(지이 헬쓰케어((GE Healthcare)) 및 AKTA 익스플로러(Explorer) 시스템(지이 헬쓰케어)가 패킹된 컬럼을 사용하는 음이온 교환 HPLC에 의하여 정제하였다. 완충제 A는 20% 수성 아세토니트릴 중의 10 mM 과염소산나트륨, 20 mM 트리스(Tris), 1 mM EDTA, pH 7.4(플루카(Fluka), 스위스 부호 소재)이었으며, 완충제 B는 500 mM 과염소산나트륨을 갖는 완충제 A와 동일하였다. 32 컬럼 부피(CV) 내에서의 22% B로부터 42% B로의 구배를 사용하였다. 280 nm에서의 UV 트레이스를 기록하였다. 적절한 분획을 푸울링하고, 3M NaOAc, pH=5.2 및 70% 에탄올로 침전시켰다. 펠릿을 원심분리에 의하여 수집하였다. 대안으로, 세파택

스 하이프렙(Sephadex HiPrep) 컬럼(지이 헬쓰케어)을 제조업자의 추천에 따라 사용하여 탈염을 실시하였다.

[0655] 올리고뉴클레오티드를 물 중에서 재구성하고, 올리고뉴클레오티드의 정체는 전기분무 이온화 질량 스펙트럼(ESI-MS)에 의하여 확인하였다. 순도는 분석용 음이온-교환 HPLC에 의하여 평가하였다.

[0656] 일반적인 절차: 지질 나노입자 제제

[0657] 1,2-디스테아로일-3-포스파티딜콜린(DSPC)은 아반티 폴리 리피즈(Avanti Polar Lipids)(미국 앤라바마주 알라바스터 소재)로부터 구입하였다. α -[3'-(1,2-디미리스토일-3-프로파녹시)-카르복스아미드-프로필]- ω -메톡시-폴리옥시에틸렌(PEG-c-DOMG)은 노프(NOF)(벨기에 블벨벤 소재)로부터 입수하였다. 콜레스테롤은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)(독일 타우프키르헨 소재)로부터 구입하였다.

[0658] 독점 아미노지질 KL22 및 KL52는 특히 문헌(Constien et al., "Novel Lipids and Compositions for Intracellular Delivery of Biologically Active Compounds" US 2012/0295832 A1)에 개시되어 있다. KL52 및 KL22 지질, DSPC, 콜레스테롤 및 PEG-c-DOMG의 스톡 용액은 에탄올 중의 50 mM의 농도에서 생성하고, -20°C에서 보관하였다. 지질을 합하여 다양한 몰비를 산출하고(하기 각각의 실시예 참조), 에탄올로 25 mM의 최종 지질 농도로 희석하였다. H₂O 중의 10 mg/ml의 농도의 siRNA 스톡 용액을 50 mM 시트르산나트륨 완충제, pH 3 중에 희석하였다. KL22 및 KL52는 종종 하기 실시예에서 각각 XL 7 및 XL 10으로 지칭한다.

[0659] 지질 나노입자(LNP) 제제는 지질 용액을 siRNA 용액과 7:1의 전체 지질 대 siRNA 중량비로 합하여 생성하였다. 지질 에탄올성 용액을 siRNA 수용액에 신속하게 주입하여 33% 에탄올을 함유하는 혼탁액을 얻었다. 용액을 주사기 펌프(하버드 펌프(Harvard Pump) 33 듀얼 시린지 펌프 하버드 애퍼래터스(Dual Syringe Pump Harvard Apparatus), 미국 매사추세츠주 홀리스톤 소재)의 도움으로 주입하였다.

[0660] 그 후, 10 kD의 MWCO(RC 막)를 갖는 슬라이드-에이-라이저(Slide-A-Lyzer) 카세트(씨모 피셔 사이언티픽 인코포레이티드(Thermo Fisher Scientific Inc.), 미국 일리노이주 락포드 소재)를 사용하는 1차 생성물의 200 배 부피로 포스페이트 완충 염수(PBS), pH 7.4에 대하여 제제를 2배 투석하여 에탄올을 제거하고, 완충제 교환을 달성하였다. 제1의 투석은 실온에서 3 시간 동안 실시한 후, 제제를 밤새 4°C에서 투석하였다. 생성된 나노입자 혼탁액을 0.2 μ m 멸균 필터(사르스테드(Sarstedt), 독일 뉴브레트 소재)를 통하여 유리 바이알에 여과하고, 크림프 폐구로 밀봉시켰다.

[0661] 일반적인 절차: LNP 특징화

[0662] 제제의 입자 크기 및 제타 전위는 제타사이저 나노(Zetasizer Nano) ZS(말번 인스트루먼츠 리미티드(Malvern Instruments Ltd), 말번(Malvern), 영국 워스터셔 소재)를 사용하여 1X PBS 및 15 mM PBS 중에서 각각 측정하였다.

[0663] 리포좀 제제 중의 siRNA 농도는 UV-vis에 의하여 측정하였다. 간단히, 1X PBS 중의 100 μ l의 희석된 제제를 메탄올 및 클로로포름의 4:1 (v/v) 혼합물 900 μ l에 첨가하였다. 혼합 후, 용액의 흡광도 스펙트럼은 DU 800 분광광도계(벡맨 쿨터(Beckman Coulter), 벡맨 쿨터, 인코포레이티드(Beckman Coulter, Inc.), 미국 캘리포니아주 브레이아 소재) 상에서 230 nm 및 330 nm 사이에서 기록하였다. 리포좀 제제 중의 siRNA 농도는 제제 중에 사용된 siRNA의 흡광 계수 및, 260 nm의 파장에서의 흡광도와 330 nm의 파장에서의 기준선 값 사이의 차이에 기초하여 계산하였다.

[0664] 나노입자에 의한 siRNA의 캡슐화는 Quant-iTTM 리보그린(RiboGreen)[®] RNA 검정(인비트로겐 코포레이션(Invitrogen Corporation), 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)에 의하여 평가하였다. 간단히, 샘플을 TE 완충제 (10 mM 트리스-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) 중에서 약 5 μ g/ml의 농도로 희석하였다. 50 μ l의 희석된 샘플을 폴리스티렌 96 웰 평판에 전달한 후, 50 μ l의 TE 완충제 또는 50 μ l의 2% 트리톤(Triton) X-100 용액을 첨가하였다. 평판을 37°C의 온도에서 15 분 동안 인큐베이션하였다. 리보그린 시약을 TE 완충제 중에 1:100으로 희석하고, 100 μ l의 상기 용액을 각각의 웰에 첨가하였다. 형광 강도는 형광 플레이트 판독기(월락 빅터(Wallac Victor) 1420 멀티라벨 카운터(Multilabel Counter); 퍼킨 엘머(Perkin Elmer), 미국 매사추세츠주 월탐 소재)를 사용하여 ~480 nm의 여기 파장 및 ~520 nm의 방출 파장에서 측정하였다. 시약 공시험의 형광값은 각각의 샘플로부터 뺏으며, 유리 siRNA의 비율은 무상해 샘플(트리톤 X-100을 첨가하지 않음)의 형광 강도를 (트리톤 X-100의 첨가에 의하여 야기된) 파열된 샘플의 형광값으로 나누어 구하였다.

[0665] 일반적인 절차: 동물 실험

- [0666] 마우스 균주 C57BL/6N은 모든 생체내 실험에 사용하였다. 동물은 찰스 리버(Charles River)(독일 줄츠펠트 소재)로부터 입수하였으며, 실험시 6 내지 8 주령이었다. 정맥내 투여한 LNP 제제를 꼬리 정맥에 200 μl 의 주입에 의하여 주사하였다. 피하 투여된 화합물을 100-200 μl 의 부피로 주사하였다. 혈액을 하악하 정맥 출혈에 의하여 주사전("출혈전") 및 제시된 시간에서의 실험 주사후 중의 일자에 수집하였다. 혈청을 혈청 분리 시험관(그라이너 바이오-원(Greiner Bio-One), 독일 프리켄하우젠 소재)으로 분리하고, 분석 때까지 냉동시켰다. 화합물 투여 후 7일에, 마우스를 CO_2 흡입에 의하여 마취시키고, 경추 탈구에 의하여 죽였다. 혈액을 심장 천자에 의하여 수집하고, 혈청을 상기 기재된 바와 같이 분리하였다. mRNA 정량화를 위한 조직을 수거하고, 액체 질소 중에 즉시 동결 보존시켰다.
- [0667] 일반적인 절차: 유전자 농다운의 측정
- [0668] 혈청 단백질 레벨의 측정은 하기를 사용하여 달성하였다: 인자 VII은 색소 효소 활성 검정 바이오펜(BIOPHEN) FVII(#221304, 하이픈 바이오메드(Hyphen BioMed), 오스트리아 마리아엔제르도르프 소재)를 사용하여 제조업자의 추천에 따라 분석하였다. 마우스 혈청을 분석전 1:3,000으로 희석하였다. 405 nm에서의 비색 현상의 흡광도는 빅터(Victor) 3 멀티라벨 계수기(퍼킨 엘머, 독일 비스바덴 소재)를 사용하여 측정하였다.
- [0669] 혈청 중 ApoB 단백질은 ELISA(클라우드클론 코포레이션(CloudClone Corp.)/훨젤 다이애그노스틱스(Hoelzel Diagnostics), 독일 훨젤 소재, #SEC003Mu)에 의하여 측정하였다. 마우스 혈청의 1:5,000 희석은 제조업자의 지시사항에 따라 처리하였으며, 450 nm에서의 흡광도는 빅터 3 멀티라벨 계수기(퍼킨 엘머, 독일 비스바덴 소재)를 사용하여 측정하였다.
- [0670] 혈청 중의 트랜스티레틴(TTR, 또한 프레알부민으로 공지됨) 단백질은 ELISA(#KA2070, 노부스 바이올로지칼즈(Novus Biologicals)/바이오테크(Biotecne), 독일 비스바덴 소재)에 의하여 측정하였다. 마우스 혈청의 1:4,000 희석은 제조업자의 지시사항에 따라 처리하였으며, 450 nm에서의 흡광도는 빅터 3 멀티라벨 계수기(퍼킨 엘머, 독일 비스바덴 소재)를 사용하여 측정하였다.
- [0671] mRNA 레벨의 정량화의 경우, 냉동된 조직 조각(30-50 mg)을 냉각된 1.5 ml 반응 시험관에 전달하였다. 3.3 μl /ml 프로테이나제 K(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)(에피센터 바이오테크놀로지즈(Epicenter Biotechnologies), 미국 매디슨 소재)를 함유하는 1 ml 용해 혼합물(에피센터 바이오테크놀로지즈, 미국 매디슨 소재)을 첨가하고, 조직을 음파 처리에 의하여 수초 동안 초음파 발생기(HD2070, 반델린(Bandelin), 독일 베를린 소재)를 사용하여 용해시키고, 프로테이나제 K를 사용하여 30 분 동안 65°C에서 열혼합기(씨모믹서(Thermomixer) 컴포트, 에펜도르프(Eppendorf), 독일 함부르크 소재) 내에서 소화시켰다. 용해물을 분석할 때까지 -80°C에서 저장하였다. mRNA 분석의 경우, 용해물을 해동시키고, mRNA 레벨을 쿼ン티진(Quant iGene) 1.0(FVII, ApoB 및 GAPDH) 또는 쿼ン티진 2.0(TTR) 분지된 DNA(bDNA) 검정 키트(파노믹스(Panomics), 미국 캘리포니아주 프레몬트 소재, Cat-No: QG0004)를 사용하여 제조업자의 추천에 따라 정량화하였다. 검정 판독으로서, 화학발광 신호는 빅터 2 광 발광 계수기(퍼킨 엘머, 독일 비스바덴 소재)로 상대적 광 단위(RLU)로서 측정하였다. 해당 mRNA에 대한 신호는 동일한 용해물로부터 GAPDH mRNA에 대한 신호에 의하여 나누었다. 그 값은 GAPDH에 대하여 정규화된 mRNA 발현으로서 보고한다.
- [0672] 실시예 1: 티올-종결된 siRNA의 생성
- [0673] 필요할 경우 3'- 또는 5'-말단 티올 기는 1-O-디메톡시트리틸-헥실-디솔피드, 1'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 링커(뉴클레오신(NucleoSyn), 프랑스 올리베 세데 소재)를 경유하여 도입하였다. 고체 상 합성 및 DMT 기의 최종 제거("DMT 오프 합성")의 완료시 올리고뉴클레오티드를 고체 지지체로부터 절단하고, 수성 메틸아민(41%) 및 진한 수성 암모니아(32%)로 이루어진 1:1 혼합물을 사용하여 6 시간 동안 10°C에서 탈보호하였다. 그 후, 미정제 올리고뉴클레오티드를 AKTA 익스플로러 시스템(Explorer System)(지이 헬쓰케어, 독일 프라이부르크 소재) 상에서 음이온-교환 고 성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의하여 정제하였다. 정제된 (C_6SSC_6)-올리고뉴클레오티드를 에탄올의 첨가에 의하여 침전시키고, 냉동기 내에서 밤새 저장하였다. 펠릿을 원심분리에 의하여 수집하였다. 올리고뉴클레오티드를 물 중에서 재구성하고, 올리고뉴클레오티드의 정체는 전기분무 이온화 질량 스펙트럼(ESI-MS)에 의하여 확인하였다. 순도는 분석용 음이온-교환 및 RP HPLC에 의하여 평가하였다.
- [0674] 그 후, 올리고머를 함유하는 각각의 디솔피드는 100 mM DL-디티오티레이톨(DTT) 용액을 사용하여 환원시켰다. 1.0 M DTT 스톡 용액(시그마-알드리치 케미 게엠베하(Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 독일 뮌헨 소재, #646563)을 트리에틸암모늄 비카르보네이트 완충제(TEABc, 1M, pH 8.5, 시그마, #90360) 및 물로 희석하여 DTT 및 TEABc 중의 100 mM 각각의 용액을 얻었다. 올리고뉴클레오티드를 TEABc 완충제(100 mM, pH 8.5) 중에 용해시켜

1 mM 용액을 산출하였다. 디슬피드 환원을 달성하기 위하여, 50-100 배 몰 DTT 과량을 올리고뉴클레오티드 용액에 첨가하였다. 환원의 진행은 써모 피셔로부터 입수한 디오넥스(Dionex) DNA Pac 200 컬럼($4 \times 250 \text{ mm}$) 상의 분석 AEX HPLC에 의하여 모니터링하였다. 환원된 물질, 즉 해당 티올(C6SH)은 출발 물질 이전에 용출된다. 반응의 완료 후, 과잉의 시약은 지이 헬쓰케어로부터의 하이프렙 컬럼을 사용하며, 물을 용출제로서 사용하는 크기 배제 크로마토그래피에 의하여 제거한다. 그 후, 올리고뉴클레오티드는 3 M NaOAc(pH 5.2) 및 에탄올을 사용하여 침전시키고, -20°C에서 저장하였다.

[0675] 실시예 2: 모노-DTME 올리고머의 제조를 위한 일반적인 절차

티올 변형된 올리고뉴클레오티드는 25% 아세토니트릴을 함유하는 300 mM NaOAc(pH 5.2) 중에 용해시켜 20 OD/mL 용액을 얻었다. 40 당량 디티오비스말레이미도에탄(DTME, 써모 피셔, #22335)을 아세토니트릴 중에 용해시켜 15.6 mM 용액을 얻었다. DTME 용액을 올리고뉴클레오티드-함유 용액에 첨가하고, 25°C에서 써모믹서(에펜도르프, 독일 함부르크 소재) 상에서 진탕시켰다. 반응의 진행은 분석 AEX HPLC에 의하여 디오넥스 DNA Pac200 컬럼($4 \times 250 \text{ mm}$)을 사용하여 모니터링하였다. 요구되는 순도 레벨에 의존하여 과잉의 DTME는 하이프렙 컬럼(지이 헬쓰케어)을 사용하는 크기 배제 HPLC에 의하여 제거하거나 또는 미정제 반응 혼합물을 지이 헬쓰케어가 시판하는 소스 15 Q 수지가 패킹된 컬럼을 사용하는 정제용 AEX HPLC에 의하여 정제하였다.

[0677] 실시예 3: DTME 작용기를 경유한 이합체의 제조를 위한 일반적인 절차

실시예 2에서의 절차에 따라 생성된 DTME 변형된 올리고뉴클레오티드는 티올 링커를 갖는 또 다른 올리고뉴클레오티드와 반응시켰다. 그러한 반응은 단일 가닥 서열 상에서 또는 반응 파트너 중 하나의 상보성 올리고뉴클레오티드의 어닐링 이후에 또는 이전에 실시할 수 있다. 그 후, 필요할 경우, DTME 변형된 올리고뉴클레오티드를 티올 변형된 올리고뉴클레오티드와 직접 반응시키거나 또는 그의 상보성 가닥으로 어닐링시키고, 생성된 두가닥을 티올 변형된 올리고뉴클레오티드와 반응시켰다. 대안으로, 티올 변형된 올리고뉴클레오티드는 그의 상보성 가닥으로 어닐링시키고, 그러한 두가닥을 DTME 변형된 단일 가닥과 반응시켰다. 모든 경우에서, 반응은 300 mM NaOAc(pH 5.2)의 존재 하에서 수용액 중에서 실시하였다.

[0679] 실시예 4: 단일 가닥 RNAs(ssRNAs)를 어닐링시켜 이중 가닥 RNA(dsRNA)을 형성하는 일반적인 절차

dsRNAs는 등몰량의 상보성 센스 및 안티센스 가닥을 혼합하고, 20 mM NaCl/4 mM 인산나트륨 pH 6.8 완충제 중에서 어닐링시켜 RNA 단일 가닥으로부터 생성하였다. 성공적인 두가닥 형성은 지이 헬쓰케어로부터의 슈퍼덱스(Superdex) 75 컬럼($10 \times 300 \text{ mm}$)을 사용하는 천연 크기 배제 HPLC에 의하여 확인하였다. 샘플을 사용할 때까지 냉동 보관하였다.

[0681] 실시예 5: 3'- 또는 5'- NH₂ 유도체화된 올리고뉴클레오티드의 제조를 위한 일반적인 절차

센스 가닥의 5'-말단에서 C-6-아미노링커를 갖는 RNA는 표준 포스포르아미다이트 화학에 의하여 고체 상에서 140 μmol 의 규모로 AKTA 올리고파일롯 100(지이 헬쓰케어, 독일 프라이부르크 소재) 및 제어된 공극 유리(CPG)를 고체 지지체(프라임 신쎄이션, 미국 펜실베이니아주 아스 소재)로서 사용하여 생성하였다. 2'-O-메틸 및 2'-F 뉴클레오티드를 함유하는 올리고머는 해당 2'-OMe-포스포르아미다이트, 2'-F-메틸 포스포르아미다이트를 사용하여 생성하였다. 센스 가닥의 5'-단부에서의 5'-아미노헥실 링커는 TFA-보호된 헥실아미노링커 포스포르아미다이트(시그마-알드리치, SAFC, 독일 함부르크 소재)를 사용하여 도입하였다. 헥실아미노-링커가 3'-위치에서 필요할 경우, CPG(프라임 신쎄이션, 미국 펜실베이니아주 아스 소재) 상에 부동화된 프탈이미도 보호된 헥실아미노-링커를 사용하였다. 절단 및 탈보호는 물 및 진한 수성 암모니아(1:1 v/v) 중의 41% 메틸아민의 혼합물을 사용하여 달성하였다. 미정제 올리고뉴클레오티드는 지이 헬쓰케어로부터 입수한 소스 15Q 수지가 패킹된 음이온 교환 HPLC 및 컬럼($2.5 \times 18 \text{ cm}$)을 사용하여 정제하였다.

[0683] 실시예 6: GalNAc 리간드 접합을 위한 일반적인 방법

[0684] 3가 GalNAc 리간드는 특히 출원 US2012/0157509 A1(Hadwiger et al.)에 상술된 바와 같이 생성하였다. 해당 카르복실산 유도체는 하기 절차에 따른 NHS 화학을 사용하여 활성화시켰다.

[0685] 3GalNAc-COOH($90 \mu\text{mol}$, 206 mg)를 2.06 mL DMF 중에 용해시켰다. 그 용액에 N-히드록시숙신이미드(NHS, 14.3 mg, 99 μmol , 1.1 eq.) 및 디이소프로필카르보디이미드(DIC, 18.29 μl , 1.05 eq., 94 μmol)를 0°C에서 첨가하였다. 그 용액을 밤새 상온에서 교반하였다. 반응의 완료는 TLC(DCM:MeOH=9:1)에 의하여 모니터링하였다.

[0686] 아미노헥실 링커가 있는 전구체 올리고뉴클레오티드를 탄산나트륨 완충제(pH 9.6):DMSO 2:3 v/v 중에 용해시켜

4.4 mM 용액을 얻었다. 그 용액에 NHS 활성화된 GalNAc 용액(1.25 eq, 116 μl)의 분액을 첨가하였다. 1 시간 동안 25°C에서 흔든 후, NHS 활성화된 GalNAc의 또 다른 분액(116 μl)을 첨가하였다. RP HPLC 분석이 적어도 85% 초과로 접합된 물질을 나타내면, 미정제 접합체는 에탄올의 첨가에 의하여 침전시키고, 냉동기 내에서 밤새 저장하였다. 펠릿을 원심분리에 의하여 수집하였다. 펠릿을 1 mL 진한 수성 암모니아 중에 용해시키고, 4 시간 동안 실온에서 진탕시켜 GalNAc 당 잔기로부터의 O-아세테이트를 제거하였다. RP HPLC ESI MS에 의한 O-아세테이트의 정량적 제거의 확인 후, 물질을 100 mM 트리에틸 암모늄 아세테이트(TEAA)로 희석하고, 미정제 반응 혼합물을 RP HPLC에 의하여 엑스브릿지(XBridge) 프렙(Prep) C18(5 μm , 10 \times 50 mm, 워터스(Waters)) 컬럼을 사용하여 60°C에서 AKTA 익스플로러 HPLC 시스템 상에서 정제하였다. 용매 A는 100 mM 수성 TEAA이었으며, 용매 B는 95% CAN 중의 100 mM TEAA이었으며, 이들 둘다는 완충제 예열기에 의하여 60°C로 가열하였다. 60 분 이내에 3.5 mL/min의 유속으로 5%로부터 25% B로의 구배를 사용하였다. 화합물의 용출은 260 및 280 nm에서 관찰되었다. 1.0 mL의 부피를 갖는 분획을 수집하고, 분석 RP HPLC/ESI-MS에 의하여 분석하였다. 85% 초과의 순도를 갖는 표적 접합체를 함유하는 분획을 합하였다. 정확한 분자량은 ESI/MS에 의하여 확인하였다.

[0687] 실시예 7: 올리고뉴클레오티드 전구체

[0688] 상기 실시예에 기재된 방법을 사용하여 하기 단일 가닥 단량체, 이합체 및 GalNAc 태그부착된 단량체 및 이합체를 생성하였다:

<표 1> 올리고뉴클레오티드 전구체 – 단일 가닥 (“X”)

SEQ ID	FVIII 센스 가닥 (5'-3')
1 X18791	(C ₆ SSC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT) (C ₆ NH ₂)
2 X18792	(C ₆ SSC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT) (C ₆ NH) (GalNAc ₃)
3 X18793	(SHC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT) (C ₆ NH) (GalNAc ₃)
4 X18794	(C ₆ SSC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)
5 X19569	(SHC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)
6 X19574	(DTME) (SHC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)
ID	FVIII 안티센스 가닥 (5'-3')
7 X18796	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu (C ₆ SSC ₆) dT
8 X18797	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu (C ₆ SH)
9 X18798	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu (C ₆ SH) (DTME)
ID	ApoB 센스 가닥 (5'-3')
10 X19577	(C ₆ SSC ₆) cuAfuUfuGfgAfgAfaAfuCfgAf (invdT)
11 X19578	(SHC ₆) cuAfuUfuGfgAfgAfaAfuCfgAf (invdT)
12 X19579	(DTME) (SHC ₆) cuAfuUfuGfgAfgAfaAfuCfgAf (invdT)

[0689]

<표 2> 올리고뉴클레오티드 단일 가닥 센스 및 안티센스 쌍; 및 어닐링 후 생성된 두가닥 (“XD”)

SEQ ID	두가닥 ID	SEQ ID	단일 가닥 ID	서열 (5'-3')	표적/가닥
15	XD-00376	13	X01162	GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdT	FVIIIs
		14	X00549	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT	FVIIAs
18	XD-00030	16	X00116	GcAAAGGcGuGccAAcucAdTsdT	FVIIIs
		17	X00117	UGAGUUGGcACGCCUUUGCdTsdT	FVIIAs
21	XD-01078	19	X02943	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	ApoBs
		20	X02944	uuGGAUcAAuAuAAGAUUCcscsU	Apoas
24	XD-00194	22	X00539	cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT	LUCs
		23	X00540	UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT	LUCas

[0690]

<표 3> 유도체화된 올리고뉴클레오티드 단일 가닥 센스 및 안티센스 쌍; 및 어닐링후 생성된 두가닥

SEQ ID	두가닥 ID	SEQ ID	단일 가닥 ID	서열 (5'-3')	표적
27	XD-06328	25	X18790	(GalNAc3) (NHC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAf cUfcAf(invdT)	FVII
		26	X18795	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	
30	XD-06728	28	X20124	(GalNAc3) (NHC ₆) cuAfuUfuGfgAfgAfgAfaAf uCfgAf(invdT)	ApoB
		29	X19583	UfsCfgAfuUfuCfuCfuCfcAfaAfuAfgusu	
33	XD-06386	31	X20216	(GalNAc3) (NHC ₆) sAfsasCfaGfuGfuUfcUfu GfcUfcUfaUfaAf(invdT)	TTR
		32	X19584	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	
		34	X19571	gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT) (C ₆ NH) (GalNAc3)	FVII
36	XD-05961	35	X18788	gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	FVII
		26	X18795	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	

[0691]

<표 4> DTME에 의하여 연결된 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 이합체

SEQ ID	ID	서열 (5'-3')	표적/가닥
37	X15049	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA (SHC ₆) (DTME) GGAUfCfAUfCfUfCfAAG	ApoBs/F7a
		UfCfUfUfACfdTsdT (SHC ₆)	s
38	X12714	GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdT (SHC ₆) (DTME) GUfAAG ACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT (SHC ₆)	F7s/F7as
39	X19575	(SHC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT) (C ₆ NH) (GalNA c ₃) (DTME) (SHC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	F7s/F7s
40	X19819	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu (C ₆ SH) (DTME) UfsGfaGf uUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu (C ₆ SH)	F7as/F7as
41	X20336	(SHC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT) (C ₆ NH) (GalNA c ₃) (DTME) (SHC ₆) cuAfuUfuGfgAfgAfaAfuCfgAf(invdT)	F7s/ApoBs

[0692]

<표 5> 단일 가닥 DTME 이합체 및 해당 단량체; 및 어닐링후 생성된 두가닥

SEQ ID	두가닥 ID	SEQ ID	단일 가닥 ID	서열 (5'-3')	표적/가닥
42	XD-05311	37	X15049	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA (SHC ₆) (DTME) GGAUfC fAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdT (SHC ₆)	ApoBs-- FVIIIs
		14	X00549	5'-GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT-3' +	FVIIAs
		20	X02944	5'-uuGGAUcAAuAuAAGAuUCCscsU-3'	ApoBas
43	XD-05312	38	X12714	GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdT (SHC ₆) (DTME) GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT (SHC ₆)	FVIIIs-- FVIIAs
		13	X01162	5'-GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdT- 3'	FVIIIs
		14	X00549	5'-GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT-3'	FVIIAs

[0693]

<표 6> 화학적 합성된 디슬피드-연결된 이합체 및 삼합체

SEQ ID	단일 가닥 ID	서열 (5'-3')	표적/가닥
44	X20366	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu (C6SSC6) UfsCf gAfuUfuCfuCfuCfcAfaAfuAfgusu	TTRas/ApoB as
45	X22413	AfsasCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaAfaAf (invdT) (C6SSC6) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)	FVIIIs/TTRs
46	X20256	(SHC6) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT) (C6NH) (G alNAC3) (SPDP) (NHC6) cuAfuUfuGfgAfgAfaAfuCfgAf (i nvdT) (C6SSC6) AfsasCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaAfaAf (i nvdT)	FVII/ApoB/ TTr
47	X20366	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu (C6SSC6) UfsCf gAfuUfuCfuCfuCfcAfaAfuAfgusu	TTRas/ApoB as
48	X22413	AfsasCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaAfaAf (invdT) (C6SSC6) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)	FVIIIs/TTRs

[0694]

[0695]

범례: 상기 표 1-6(및 하기의 것)의 서열 부분에서: 대문자 "A", "C", "G" 및 "U"는 RNA 뉴클레오티드를 나타낸다. 소문자 "c", "g", "a" 및 "u"는 2'-0-메틸-변형된 뉴클레오티드를 나타내며; "s"는 포스포로티오에이트를 나타내며; 및 "dT"는 테옥시티미딘 잔기를 나타낸다. 대문자 A, C, G, U 다음의 "f"는 2'-플루오로 뉴클레오티드를 나타낸다. "(SHC6)"는 티오헥실 링커를 나타낸다. "(DTME)"는 절단 가능한 호모이작용성 크로스링커 디티오비스말레이미도에탄을 나타낸다. "(BMPEG2)"는 절단 불가한 호모이작용성 크로스링커 1,8-비스말레이미도-디에틸렌글리콜을 나타낸다. "C6NH2" 및 "C6NH"는 아미노헥실 링커를 나타내는데 번갈아 사용된다. "C6SSC6"는 디헥실디슬피드 링커를 나타낸다. "GalNAc3" 및 "GalNAc"는 도 1에 도시된 화학적 구조를 갖는 트리-가지형 N-아세틸갈اكت오스마이도를 나타낸다. "SPDP"는 숙신이미딜 3-(2-페리딜디티오)프로파이오네이트와 RNA가 있는 아미노링커의 반응의 반응 생성물을 나타낸다. "InvdT"는 역전된 티미딘을 의미한다. 일반적으로, 서열은 5'-로부터 3'-말단으로 좌측으로부터 우측으로 기재하지만, DTME 또는 BMPEG2 크로스링커를 포함하는 서열은 3'-말단을 경유하여 연결되며, 그러한 서열에서, 후반부는 (5'-로부터 3'으로의 방향을 유지하기 위하여) 우측으로부터 좌측으로 읽어야만 하거나; 또는 후반부가 좌측으로부터 우측으로 읽으면 방향은 3'-으로부터 5'가 된다.

[0696]

차트의 표적/가닥 부분에서: "F7" 또는 "FVII"는 인자 VII 전사물을 표적화하는 siRNA 서열(또는 mRNA)을 지정한다(또한 인자 VII로서 공지됨). "ApoB"는 아포지질단백질 B 전사물을 표적화하는 siRNA 서열을 지정한다. "TTR"은 트랜스트레틴 전사물을 표적화하는 siRNA 서열을 지정한다. 센스 가닥은 "s"로 지정하며; 안티센스 가닥은 "as"로 지정한다.

[0697]

실시예 8: 순차적 어닐링에 의하여 이합체, 삼합체 및 사합체 siRNAs를 생성하는 일반적인 절차

[0698]

이합체, 삼합체 및 사합체 siRNAs의 제조의 경우, 단계적 어닐링 절차를 수행하였다. 어닐링은 물 중에서 수행하였으며, 상보성 가닥의 단계적 첨가를 사용하였다. 용액의 가열/냉각은 필요하지 않았다. 각각의 첨가 후, 어닐링 용액의 분액을 제거하고, 천연 조건(20°C) 하에서 분석 RP HPLC를 사용하는 두가닥 형성에 대하여 모니터링하였다. 등물량의 상보성 단일 가닥을 합하는데 필요한 양은 가장 근접한 이웃 방법에 의하여 계산한 개개의 단일 가닥에 대한 흡광 계수에 기초하여 계산하였다. 분석 RP HPLC 트레이스가 과잉의 단일 가닥을 나타낼 경우, 추가량의 해당 상보성 가닥을 첨가하여 두가닥 형성을 강제하였다("두가닥 적정").

[0699]

두가닥 적정은 20°C로 평형화된 엑스브라이드(XBride) C18 올리고 BEH(2.5 μm; 2.1×50 mm, 워터스) 컬럼이 장착된 디오넥스 얼티메이트(Ultimate) 3000 HPLC 시스템을 사용하여 모니터링하였다. 진단 파장은 260 nm이었다. 완충제 A는 100 mM 헥사플루오로-이소프로판올(HFIP), 1% 메탄올을 함유하는 16.3 mM 트리에틸아민(TEA)이었으며, 완충제 B는 MeOH가 95%인 것을 제외하고, 동일한 조성을 가졌다. 30 분 이내에 5%로부터 70% 완충제 B의 구배를 250 μl/min의 유속에서 적용하였다. 2개의 상보성 가닥은 체류 시간을 설정하기 위하여 독립적으로 실시하였다. 그 후, 두가닥 용액을 함유하는 분액을 분석하고, 성분 단일 가닥의 체류 시간과 비교하였다. 두가닥 용액이 상당량의 단일 가닥을 나타내는 경우, 해당 상보성 가닥을 두가닥 용액에 첨가하였다.

[0700]

실시예 9: FVII-DTME-ApoB 혼합물이합체(XD-05311)의 제조

[0701]

FVII-ApoB 혼합물이합체(XD-05311)는 실시예 8에 기재되며, 도 2에 도시한 방법을 사용하여 하기 단일 가닥의

순차적 조합에 의하여 고 순도로 생성하였다.

[0702] 단일 가닥 헤테로이합체 X15049를 지이 헬쓰케어로부터 입수한 리소스큐(ResourceQ) 컬럼이 장착된 AKTA 익스플로러 100(지이 헬쓰케어) 상에서 정제하였다. 완충제 A는 20% 수성 아세토니트릴 중의 10 mM 과염소산나트륨, 20 mM 트리스, 1 mM EDTA, pH 7.4(플루카, 스위스 부흐 소재)이었으며, 완충제 B는 500 mM 과염소산나트륨을 함유한 것을 제외하고, 완충제 A와 동일하였다. 컬럼은 60°C에서 컬럼 오븐을 사용하여 유지하였다. 유속은 4 mL/min이었다. 미정제 물질을 기기의 샘플 펌프를 사용하여 컬럼에 로딩하였다. 용출은 280 nm에서 기록하고, 45 분 이내에 15% B로부터 45% B로의 구배를 사용하였다. 적절한 분획을 푸울링하고, 3M 아세트산나트륨(NaOAc, pH5.2)/에탄올 1/32 (v/v)의 첨가에 의하여 침전시키고, -20°C에서 밤새 저장하였다. 펠릿을 원심분리에 의하여 수집하고, 물질을 물 중에 재구성하였다. 물질을 분석 AEX HPLC를 사용하여 순도에 대하여 분석하였다. 디오넥스 DNA Pac 200 컬럼(4×250 mm)을 사용하여 물질은 92.8% 면적의 순도를 가졌다. 게다가, 물질은 워터스로부터의 엑스브릿지 C18 올리고 BEH 컬럼(2.5 μm; 2.1×50 mm) 상의 RP HPLC에 의하여 분석하였다. 그러한 기술을 사용하여 물질은 96.5% 면적을 가졌다.

[0703] 실시예 10: LNP-제제화된 FVII-ApoB 헤테로이합체(XD-05311)의 생체내 분석(동물 실험 MausRNAi-TV30)

[0704] 헤테로이합체 siRNA 표적 인자 VII 및 ApoB(XD-05311)를 일반적인 절차: 지질 나노입자 제제(상기)에 따라, KL52/DSPC/콜레스테롤/PEG-c-DMOG 50:10:38.5/1.5 몰%로 이루어진 표준 KL52(XL10) 제제를 사용하여 LNP로 제제화하였다. ApoB(XD-01078)에 대한 정규 siRNA 및 FVII(XD-00030)에 대한 정규 siRNA는 동일한 LNP(XL10) 중에 각각 제제화시키고, FVII(XD-00030)에 대한 추가의 정규 siRNA는 KL22/DSPC/콜레스테롤/PEG-c-DMOG 50:10:38.5/1.5 몰%로 이루어진 표준 KL22 (XL7) 제제 중에서 제제화하였다. 하기 표 7에 요약한 LNP 제제는 일반적인 절차: LNP 특징화(상기)에 따라 특징화하고, 일반적인 절차: 동물 실험(상기)에 기재된 바와 같이 동물 실험에서 생체내 효율에 대하여 테스트하였다. 군 크기는 처치군의 경우 n=3 마우스이며, 염수 대조군의 경우 n=6이었다. 모든 화합물을 0.35 mg/kg의 투여량으로 정맥내 주사하였다. 혈액을 주사전 및, 상기 기재된 시점에서 24 시간, 69 시간 및 7 일 주사후 수집하고, 일반적인 절차: 유전자 뉴다운의 측정(상기)에 의하여 FVII 효소 활성에 대하여 분석하였다. 결과를 도 3에 제시한다. 간 용해물 중의 FVII 및 ApoB의 mRNA 레벨은 주사후 7 일차에 측정하고, 도 4에 제시한다.

<표 7> 동물 실험 MausRNAi-TV30에 사용된 LNP-제제

제제 ID	siRNA	지질
NPA-640-1	헤테로이합체 FVII-ApoB (XD-05311)	XL10 Std
NPA-641-1	ApoB (XD-01078)	XL10 Std
NPA-194-3	FVII (XD-00030)	XL10 Std
NPA-624-1	FVII (XD-00030)	XL7 Std

[0705]

[0706] 실시예 11: 5'-GalNAc-FVII 정규 대조군(XD-06328)의 제조

[0707] 5'-GalNAc-FVII 정규 대조군(XD-06328)(도 5 참조)은 ssRNA 가닥 X18790 및 X18795를 실시예 4에 기재된 방법에 의하여 어닐링하여 생성하였다. 생성물은 HPLC 분석에 의하여 측정시 91.6% 순도로 얻었다.

[0708] 실시예 12: 3' 안티센스 가닥을 연결하는 절단 가능한 링커 및 센스 가닥의 외부 3' 말단에 접합된 GalNAc를 갖는 3'-GalNAc-FVII-DTME-FVII 호모이합체(XD-06330)의 제조

[0709] FVII를 표적화하는 GalNAc-접합된 호모이합체 siRNA XD-06330(도 6)은 실시예 8에 기재된 두가닥 적정 방법에 따라 단일 가닥 이합체 X19819를 단계적으로 X18788 및 X19571과 합하여 생성하였다(10 mg, 323 nmol). 분리된 물질은 HPLC 분석에 의하여 본질적으로 순수하였다.

<표 8> GalNAc-FVII-DTME-FVII 호모이합체 (XD-06330)의 합성에 사용된 올리고머의 화학량론

SEQ ID	ID	표적	E (L/mol*cm)	Nmol/ OD	MW (유리 산)	MW Na 염	Req OD
40	X19819	FVIIas-FVIIas	389000	2.57	14405.6	15372.9	174
36	X18788	FVIIas	193000	5.18	6545.3	6962.9	62.3
34	X19571	FVIIas	193000	5.18	8161.0	8600.6	62.3
49	XD-06330				29111.9	30936.4	

[0710]

[0711] 실시예 13: 5' 센스 가닥을 연결하는 절단 가능한 링커 및 센스 가닥의 외부 3' 단부에 접합된 GalNAc를 갖는 3'-GalNAc-FVII-DTME-FVII 호모이합체(XD-06360)의 제조

[0712]

FVII를 표적화하는 GalNAc-접합된 호모이합체 siRNA XD-06360은 도 7에 기재된 합성 전략 및 실시예 8에 기재된 방법을 사용하여 단일 가닥을 단계적으로 합하여 생성하였다(11 mg, 323 nmol).

[0713]

모든 반응성 단계는 고 품질 물질을 생성하였으며, 올리고머 X19575는 이온 교환 및 역상 크로마토그래피 각각에 의하여 91.7 및 93.4% 순수한 것으로 측정되었으며, 올리고머 XD-06360은 비변성 역상 HPLC에 의하여 측정시 86.8% 순도로 분리되었다. 합성에 사용된 각종 올리고머의 화학량론은 하기 표 9에 제시한다.

<표 9> GalNAc-FVII-FVII 호모이합체 (XD-06360)의 합성에 사용된 올리고머의 화학량론

SEQ ID	ID	표적	E (L/mol*cm)	Nmol/OD	MW (유리 산)	MW Na 염	Req OD
39	X19575	FVIIas-FVIIas	384800	2.60	15413.1	16314.4	137
26	X18795	FVIIas	194800	5.13	6849.4 x2	7289.1 x2	139
50	XD06360				29111.9	30892.6	

[0714]

[0715] 실시예 14: 3' 안티센스 가닥을 연결하는 절단 가능한 링커 및 센스 가닥의 내부 5' 단부에 접합된 GalNAc를 갖는 5'-GalNAc-FVII-DTME-FVII 호모이합체(XD-06329)의 제조

[0716]

FVII를 표적화하는 GalNAc-접합된 호모이합체 siRNA XD-06329[서열 번호 51]는 도 8에 도시한 바와 같이 1,150 nmol의 X18788 및 1,150 nmol X18798을 어닐링시켜 생성하였다. 개개의 가닥의 OD의 합은 450 OD이며, 합한 용액, 즉 두가닥은 흡광증가성으로 인하여 394 OD를 가졌다(394 ODs=1,150 nmol 두가닥). 그러한 DTME 변형된 두가닥은 1,150 nmol X18797(3'-SH 변형된 FVII 안티센스)(224 OD)와 반응하였다. HPLC 정제 후, 364 OD "반-이 합체" siRNA를 분리하였다. 그 후, "반-이 합체" FVII siRNA(10 mg, 323 nmol, 174 OD)를 5'GalNAc-FVII 센스(X18790)(323 nmol, 62.3 OD)로 어닐링시켜 최종 생성물 XD-06329를 산출하였다.

[0717]

[0717] 실시예 15: FVII 호모이합체 GalNAc 접합체(XD-06329, XD-06330 및 XD-06360)에 의한 생체내 FVII 유전자 녹다운의 측정

[0718]

인자 VII에 대하여 표적화된 호모이합체, GalNAc-접합된 siRNAs의 3종의 상이한 변이체(XD-06329, XD-06330 및 XD-06360) 및 단량체 GalNAc-접합된 FVII-siRNA(XD-06328)를 상기(일반적인 절차: 동물 실험)에 기재된 바와 같이 동물 실험에서 생체내 효율에 대하여 테스트하였다. 군 크기는 처치군의 경우 n=4 마우스이었으며, 염수 대조군의 경우 n=5이었다. 모든 화합물을 상이한 투여량(2.5mg/kg 또는 50 mg/kg)으로 0.2 ml의 부피로 피하 주사하였다. 혈액을 처치전 1일차 및 처치후 1, 3 및 7일차에 수집하고, FVII 효소 활성에 대하여 분석하였다. 결과를 도 9에 도시한다.

[0719]

호모이합체 GalNAc-접합체(XD-06329, XD-06330 및 XD-06360)의 억제 활성, 작용의 개시 및 효력은 단위 중량 기준당 녹다운에 대하여 단량체, 정규 대조군(XD-06328)에 필적하였다. 독성의 징후(예, 중량 손실, 비정상적인 행동)는 관찰되지 않았다.

[0720]

그러나, GalNAc 함유량에 대한 정규화시, 호모이합체 GalNAc 접합체는 GalNAc 단량체보다 FVII 녹다운에서 모두 더욱 효과적이어서 리간드/수용체 결합 사례당 더욱 효율적인 siRNA 흡수를 입증한다. 그러한 결과를 도 10A 및 10B 및 10C에 도시한다.

[0721] 도 10A. GalNAc 접합체 또는 PBS의 피하 투여후 인자 VII 혈청 활성. 각각의 시점에서의 인자 VII 혈청 값은 1X PBS를 주사한 대조군 마우스에 대하여 정규화하였다. 그러한 경우에서, 동물에게 주사한 GalNAc의 양은 거의 일정하게 유지되었다. 인자 VII 혈청 활성은 주사 3일전(-3) 또는 주사후 1, 3 또는 7일차에 측정하였다. 데이터를 평균+/-S.E.M. 및 N=3 마우스/군으로서 플롯하였다. 각각의 측정점(-3, 1, 3 및 7일차)에서의 막대는 좌측으로부터 우측으로 X06328, X06329, X06330 및 X06360 각각에 해당한다.

[0722] 도 10B. GalNAc 접합체 또는 PBS의 피하 투여후 인자 VII 혈청 활성. 각각의 시점에서의 인자 VII 혈청 값은 주사 3일전에 취한 대조군 인자 VII 값에 대하여 정규화하였다. 그러한 경우에서, 동물에게 주사한 GalNAc의 양은 거의 일정하게 유지되었다. 인자 VII 혈청 활성은 주사 3일전(-3) 또는 주사후 1, 3 또는 7일차에 측정하였다. 데이터를 평균+/-S.E.M. 및 N=3 마우스/군으로서 플롯한다. 각각의 측정점(-3, 1, 3 및 7일차)에서의 막대는 좌측으로부터 우측으로 X06328, X06329, X06330 및 X06360 각각에 해당한다.

[0723] 실시예 16: FVII(XD-06328), ApoB(XD-06728) 및 TTR(XD-06386)를 독립적으로 표적화하는 정규 GalNAc-siRNAs의 제조

[0724] FVII(XD-06328), ApoB(XD-06728) 및 TTR(XD-06386)를 독립적으로 표적화하는 3개의 정규 siRNAs(도 11 참조)는 고체 상 합성에 의하여 독립적으로 생성하였다. 3개의 센스 가닥(X18790, X20124, X20216 각각)은 5'-헥실아민 링커로 별도로 생성하였다. 올리고뉴클레오티드의 절단 및 탈보호 및, 페아세틸화된 GalNAc 클러스터의 각각의 올리고로의 미정제 물질 접합의 HPLC 정제에 이어서 NHS 화학을 사용하여 달성하였다. 비누화에 의한 0-아세테이트의 제거는 수성 암모니아에 의하여 조정하였다. 상보성 앤티센스 가닥(X18795, X19583 및 X19584 각각)은 상기 제공된 표준 절차에 의하여 합성한 후, GalNAc 접합된 단일 가닥에 어닐링시켜 FVII(XD-06328), ApoB(XD-06728) 및 TTR(XD-06386)를 표적하는 siRNAs를 99.7, 93.1 및 93.8% 순도 각각으로 산출하였다.

<표 10> GalNAc-siRNA 접합체

SEQ ID	두가닥 ID	ssRNA	서열 5'---3'	
27	XD-06328	X18790	(GalNAc3) (NHC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)	FVII
		X18795	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	
30	XD-06728	X20124	(GalNAc3) (NHC ₆) cuAfuUfuGfgAfgAfgAfaAfuCfgAf (invdT)	ApoB
		X19583	UfsCfgAfuUfuCfuCfuCfcAfaAfuAfgusu	
33	XD-06386	X20216	(GalNAc3) (NHC ₆) sAfsasCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaAf (invdT)	TTR
		X19584	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	

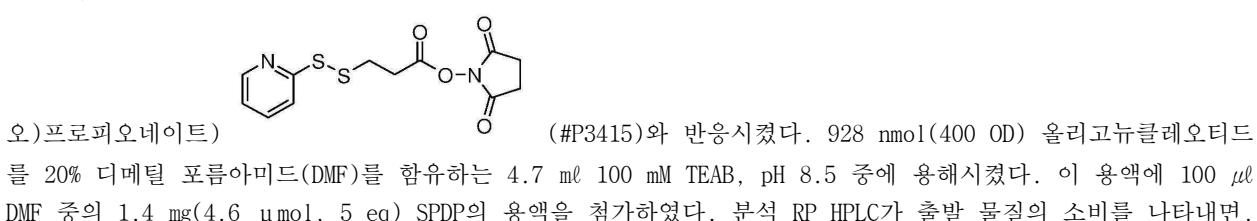
[0725]

[0726] 실시예 17: 센스 가닥 상의 절단 가능한 결합을 갖는 GalNAc-FVII-ApoB-TTR 삼합체(XD06726)의 제조

[0727] GalNAc에 접합된 FVII, ApoB 및 TTR을 표적화시키는 해테로삼합체(도 12 참조)는 도 13에 도시한 바와 같이 고체 상 및 용액 상의 하이브리드 전략을 사용하여 합성하였다.

[0728] 도 13: GalNAc-접합된 해테로삼합체(XD06726)에 대한 합성 전략

[0729] 이합체 X19581은 해당 시판 중인 TFA 보호된 포스포르아미다이트(SAFC 프롤리고(Proligo), 독일 함부르크 소재)를 사용하여 5'-말단 상의 아미노헥실 링커를 사용한 고체 상 화학을 사용하여 생성하였다. 서열은 상술된 조건에 따라 고체 지지체로부터 절단시키고, 탈보호하고, 정제하였다. 추가의 디술피드 링커를 설치하기 위하여, 올리고뉴클레오티드의 5'-아미노헥실링커를 시그마로부터 시판 중인 SPDP(숙신이미딜 3-(2-피리딜디티



미정제 반응 혼합물을 워터스로부터 구입한 C18 엑스브릿지 컬럼($10 \times 50 \text{ mm}$) 상에서 정제하였다. RP 정제는 AKTA 익스플로러 HPLC 시스템 상에서 수행하였다. 용매 A는 100 mM 수성 TEAA이었으며, 용매 B는 95% ACN 중의 100 mM TEAA이었다. 용매를 완충제 예열기에 의하여 60°C로 가열하고, 컬럼을 오븐 내에서 동일한 온도에서 유지하였다. 4 mL/min의 유속으로 45 분 이내에 0%로부터 35% B로의 구배를 사용하였다. 화합물의 용출은 260 및 280 nm에서 관찰되었다. 1.5 mL의 부피를 갖는 분획을 수집하고, 분석 RP HPLC/ESI-MS에 의하여 분석하였다. 적절한 분획을 합하고, 올리고뉴클레오티드 X19582는 에탄올 및 3M NaOAc(pH 5.2)의 첨가 후 -20°C에서 침전되었다. 정체는 RP-HPLC ESI-MS에 의하여 확인하였다.

[0730] 단일 가닥 삼합체를 생성하기 위하여, 상기 올리고뉴클레오티드 X19582(255 nmol)을 1.3 mL 물 중에 용해시켰다. 그 용액에 306 nmol(1.2 eq)의 티올 변형된 올리고뉴클레오티드 X18793을 첨가하였다. 반응 혼합물은 200 mM TEAA 및 20% 아세토니트릴을 함유하였다. 반응의 진행은 RP HPLC에 의하여 수행하였다. 출발 물질이 소비되면, 구배가 45 분 이내에 0% B로부터 30% B로 실시한 것을 제외하고, 반응 혼합물을 상기 단락에 기재된 바와 동일한 조건을 사용하여 정제하였다.

[0731] 단일 가닥 헤테로삼합체 X20256(siFVII, siApoB 및 siTTR의 연결된 센스 가닥 함유)을 고 순도로 얻었다. X20256의 서열을 하기 표 11에 제시한다.

<표 11>

SEQ ID	ID	서열	표적/가닥
52	X20256	(SHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT) (C ₆ NH) (Ga1NAC ₃) (SPDP) (NHC ₆)cuAfuUfuGfgAfgAfgAfaAfuCfqAf(invdT) (C ₆ SSC ₆)AfsasCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaAf(invdT)	FVIIIs/ApoBs/TTRs

[0732]

[0733] 주: 원칙적으로, 상기 서열은 단일 고체 상 합성을 통하여 접근 가능하다. 그러한 경우에서, SPDP 및 C₆NH₂는 C₆SSC₆ 포스포르아미다이트에 의하여 대체된다. 그러나, 전체 구축물의 서열 길이로 인하여 합성은 도전적이다.

[0734] 그 후, FVII, ApoB 및 TTR을 동시에 표적화하는 헤�테로삼합체 두가닥 구축물(XD-06726), 7 mg(150 nmol)은 안티센스 단일 가닥을 단계적으로 실시해 8에 기재된 두가닥 적정 방법에 따라 센스-가닥 헤�테로삼합체 중간체(X20256)에 순차적으로 첨가하여 생성하였다. 7 mg의 물질을 얻었으며, 이는 HPLC에 의하여 본질적으로 순수하였다.

<표 12> GalNAc-FVII-ApoB-TTR 삼합체 (XD-06726)의 합성에 사용된 올리고머의

화학량론

SEQ ID	ID	표적	E (L/mol*cm)	Nmol/OD	MW (유리 산)	MW Na 염	Req OD
52	X20256	FVIIIs-ApoBs-TTRs	623900	1.60	22690.8	24075.7	94
29	X19583	ApoBas	206500	4.84	6762.4	7202.1	31
32	X19584	TTRas	240400	4.16	7596.1	8079.7	36
26	X18795	FVIIas	194800	5.13	6849.4	7289.1	29
53	XD-06726				43898.7	46646.6	

[0735]

[0736] 실시예 18: 교호 센스 및 안티센스 가닥 상에서 절단 가능한 결합을 갖는 GalNAc-FVII-ApoB-TTR 삼합체 (XD-06727)의 제조

[0737] FVII, ApoB 및 TTR을 동시에 표적화하는 9 mg(192 nmol)의 삼합체 siRNA XD-06727(도 14 참조)은 도 15에 도시한 바와 같이 실시해 8에 기재된 방법을 사용하여 단일 가닥을 단계적으로 합하여 고 순도로 생성하였다.

<표 13> GalNAc-siFVII-siApoB-siTTR 삼합체 (XD-06727) 의 합성에 사용된

올리고머의 화학량론

SEQ ID	ID	표적	E (L/mol*cm)	1 OD	MW (유리 산)	MW Na 염	Req OD
42	X20336	FVIIIs- ApoBs	404300	2.47 nmol	15440.1	16341.4	78
49	X20366	ApoBas- TTRas	446700	2.24 nmol	14748.9	15716.1	86
	X19580	TTRs	220300	4.54 nmol	7105.6	7567.2	42
26	X18795	FVIIas	194800	5.13 nmol	6849.4	7289.1	37
54	XD- 06727				44144	46913.8	

[0738]

헤테로삼합체(XD-06727)를 생성하는 합성은 매우 효율적이다. 그러한 예에서, 반응물의 거의 100% 전환이 각각의 단계에서 달성되었다. 도 16, 17 및 18 참조.

[0740]

실시예 19: FVII, ApoB 및 TTR을 개별적으로 표적화하는 푸울링된 siRNAs의 LNP 제제의 제조

[0741]

FVII(XD-00030), ApoB(XD-01078) 및 TTR(XD-06729)를 표적화하는 단량체 siRNAs는 지질 나노입자 중에서 제제화하고, 일반적인 절차: 지질 나노입자 제제 및 일반적인 절차: LNP 특징화에 기재된 방법을 사용하여 특징화하였다. 지질 조성은 XL10:DSPC:콜레스테롤:PEG-DOMG/50:10:38.5:1.5 몰%이었다. 88% 캡슐화가 달성되었으며, 생성된 입자는 2.2 mV의 제타 전위 및 0.04의 PDI와 함께 83 nm의 크기를 갖는다.

[0742]

실시예 20: GalNAc-접합된 헤테로삼합체 SiRNAs에 의한 mRNA 녹다운의 평가

[0743]

헤테로삼합체 GalNAc-접합된 siRNAs(FVII, ApoB 및 TTR에 표적화된)의 생체내 효율을 측정하기 위하여, 동물 실험은 상기(일반적인 절차: 동물 실험) 기재된 바와 같이 처치군의 경우 n=4 마우스 및 염수 대조군의 경우 n=5의 군 크기를 사용하여 수행하였다. 헤테로삼합체 XD-06726 및 XD-06727뿐 아니라, 3종의 단량체 GalNAc-접합된 siRNAs(FVII를 표적화하는 XD-06328, TTR을 표적화하는 XD-06386 및 ApoB를 표적화하는 XD-06728)의 푸울을 삼합체의 경우 50 mg/kg 총 RNA 및 각각의 단량체 접합체의 경우 17 mg/kg의 농도로 피하 주사하였다(0.1 mL 부피). 비교를 위하여, 동일한 표적(FVII(XD-00030), ApoB(XD-01078) 및 TTR(XD-06729))에 대한 LNP-제제화된 siRNAs(NPA-741-1)의 푸울을 siRNA당 0.5 mg/kg에서 정맥내 주사하였다. 처치전 1일차에 및 처치후 1, 3 및 7 일차에 상기 (일반적인 절차: 동물 실험) 기재된 바와 같이 혈액을 수집하고, FVII, ApoB 및 TTR의 혈청 레벨은 일반적인 절차: 유전자 녹다운의 측정에 의하여 측정하였다. 결과는 도 19A와 19B, 20A와 20B 및 21A와 21B에 제시한다. 간 용해물 중의 mRNA 레벨은 주사후 7일차에 측정하였다(도 22A 및 22B).

[0744]

군 A(XD-06726)에서의 1마리 동물은 TTR 혈청 레벨에 대한 어떠한 효과도 나타내지 않았다. 2개의 TTR 단백질 그래프 중 두번째의 것은 무반응 동물에 대하여 생략한 값의 데이터를 제시한다.

[0745]

비교를 위하여, 불량한 TTR 반응을 나타내는 동물로부터의 값은 두번째 FVII 그래프로부터 생략하였다.

[0746]

ApoB 혈청 레벨은 하나의 군의 동물 내에서 및 염수 대조군의 상이한 시점 사이에서 모두 높은 변화를 나타낸다.

[0747]

3종 모두의 유전자의 녹다운은 또한 상기 일반적인 절차: 유전자 녹다운의 측정에 따라 간 조직으로부터 mRNA에 대한 bDNA 검정을 사용하여 측정하였다. 표적 유전자 레벨은 하우스키퍼 GAPDH에 대하여 정규화하였다.

[0748]

실시예 21: GalNAc-FVII-ApoB-TTR-FVII 사합체(XD-07140)의 제조

[0749]

FVII, ApoB 및 TTR을 동시에 표적화하는 12.4 nmol의 사합체 siRNA XD-07140(도 23 참조)은 도 24에 도시한 바와 같이 및 실시예 8에 기재된 두가닥 적정 방법에 따라 단일 가닥을 단계적으로 합하여 생성하였다. HPLC 분석은 생성물을 고 순도로 얻었다는 것을 나타냈다.

<표 14> GalNAc-FVII-ApoB-TTR-FVII 사합체 (XD-07140)의 합성에 사용된
올리고머의 화학량론

SEQ ID	ID	효적	E (L/mol*cm)	1 OD	MW (유리 산)	MW Na 염	Req OD
42	X20336	FVIIIs- ApoBs	404300	2.47 nmol	15440.1	16341.4	5
49	X20366	ApoBas- TTRas	446700	2.24 nmol	14748.9	15716.1	5.5
45	X22413	TTRs- FVIIIs	412100	2.52 nmol	14041.3	14964.5	4.9
26	X18795	FVIIIs	194800	5.13 nmol	6849.4 x2	7289.1 x2	4.8
55	XD-07140				57929.1	61600.2	

[0750]

0751] 실시예 22: 다합체 siRNAs의 혼합물의 생성

동적 평형 상태의 다합체 siRNAs의 혼합물 및 그의 제조 방법은 문헌[Mok et al., "Multimeric small interfering ribonucleic acid for highly efficient sequence-specific gene silencing," *Nature Materials*, Vol. 9, March 2010]에 기재되어 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 혼합물은 화학적으로 연결된 siRNAs의 선형 쇄를 포함하며, 그러한 쇄는 다양한 길이를 갖는다. 그러한 예에서, Mok et al.의 효율에 대한 상이한 어닐링 조건의 효과, 합성 반응 및 최종 생성물의 특징을 조사하기 위하여 실시한 일련의 실험이 따른다.

<표 15> 다합체 siRNA 혼합물에 대한 출발 물질

SEQ ID	설명	Axo ID	서열 (5'--3')
13	F7 센스 (s)	X01162	GGAUFCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdt
56	3'-디올-F7s	X12006	GGAUFCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdt (SHC6)
14	F7 안티센스 (as)	X00549	GUfAAGACfUfUfGAGAUFGAUfCfcfdTsdt
57	3'-디올-F7as	X12007	GUfAAGACfUfUfGAGAUFGAUfCfcfdTsdt (SHC6)
58	F7 호모이합체 (s-c-s)	X12710	GGAUFCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdt (SHC6) (DTME) GGAUFCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdt (SHC6)
59	F7 호모이합체 (as-c-as)	X12711	GUfAAGACfUfUfGAGAUFGAUfCfcfdTsdt (SHC6) (DTME) G UfAAGACfUfUfGAGAUFGAUfCfcfdTsdt (SHC6)
60	호모이합체 (s- nc-s)	X12712	GGAUFCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdt (SHC6) (BMP EG2) GGAUFCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdt (SHC6)
61	호모이합체 (as- nc-as)	X12713	GUfAAGACfUfUfGAGAUFGAUfCfcfdTsdt (SHC6) (BMPEG2) GUfAAGACfUfUfGAGAUFGAUfCfcfdTsdt (SHC6)

[0753]

범례: 차트의 설명 부분에서, "F7"은 인자 VII 유전자(또한 인자 VII로 공지됨)를 표적화하는 siRNA 서열을 의미한다. 센스 가닥은 "s"로 지정하며; 안티센스 가닥은 "as"로 지정하였다. 가닥을 연결하는 화학적 링커는 절단 가능한 경우 "c" 및 절단 불가의 경우 "nc"로 지정하였다.

[0755]

차트의 서열 부분(및 그에 따르는 것)에서: 대문자 "A", "C", "G" 및 "U"는 RNA 뉴클레오티드를 나타낸다. 소문자 "s"는 포스포로티오에이트를 나타내며, "dT"는 데옥시티미딘 잔기를 나타낸다. 대문자 A, C, G, U 다음의 "f"는 2'-플루오로 뉴클레오티드를 나타낸다. "(SHC6)"은 티오헥실 링커를 나타낸다. "(DTME)"는 절단 가능한 호모이작용성 크로스링커 디티오비스말레이미도에탄을 나타낸다. "(BMPEG2)"는 절단 불가한 호모이작용성 크로스링커 1,8-비스말레이미도-디에틸렌글리콜을 나타낸다. 일반적으로, 서열은 5'-로부터 3'-말단으로 기재하지만; DTME 또는 BMPEG2 크로스링커를 포함하는 서열은 3'-단부를 경유하여 연결되며, 그러한 서열에서, 후반부는 우측으로부터 좌측으로, 즉 3'-으로부터 5'로 읽어야만 한다.

[0756]

표 15에 제시된 서열은 상기 일반적인 절차: 단쇄 올리고뉴클레오티드 합성에 기재된 합성 방법에 따라 생성하

였다.

[0757] 서열의 고체 상 어셈블리, 센스 및 안티센스 올리고뉴클레오티드의 탈보호 및 정제용 AEX HPLC 정제에 이어서, 단일 가닥 호모이합체는 3'-티올 변형된 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 및 각각의 호모이작용성 크로스링커(DTME 또는 BMPEG2, 둘다 피어스(Pierce)로부터 구입함)를 합하여 형성하였다. 이를 위하여, 올리고뉴클레오티드를 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트, pH 7 중에 용해시켜 1.4 mM 용액을 얻었다. 아세토니트릴 중의 호모이작용성 크로스링커(5 mg/ml)의 새로이 생성된 용액을 올리고뉴클레오티드를 함유하는 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 25°C에서 열진탕기 상에서 진탕시켰다. 반응은 분석 AEX HPLC에 의하여 디오넥스 DNA Pac 200 컬럼(4 × 250 mm)을 사용하여 모니터링하였다. 출발 물질이 소비되면, 아세트산나트륨(3M, pH 5.2) 및 에탄올 1:32 (v/v)의 혼합물을 첨가하여 반응을 켄칭시켰다. 미정제 물질을 밤새 냉동기 내에서 침전시켰다. 펠릿을 물 중에 용해시키고, 소스 15 Q 수지(지이 헬쓰케어)가 충전된 컬럼을 사용하는 AEX HPLC에 의하여 정제하였다. 적절한 순도의 분획을 합하고, 다시 침전시켰다. 펠릿을 물 중에 용해시키고, 260 nm에서의 흡수를 측정하여 정량화하였다. BMPEG2를 링커로서 사용하는 호모이합체의 합성의 일반적인 도시는 도 26에 제시한다.

[0758] 표 15에 제시된 서열에 대한 분석 데이터는 하기 표 16에 제시한다.

<표 16> 출발 물질에 대한 분석 데이터

설명	ID	순도 (IEC HPLC, %)	분자량 (이론치)	분자량 (측정치)
F7 센스 (s)	X01162	93.5	6629.1	6629.4
3'-티올-s	X12006	93.4	6826.4	6825.3
F7 안티센스 (as)	X00549	94.2	6726.2	6726.0
3'-티올-as	X12007	94.2	6923.4	6922.1
호모이합체 (s-c-s)	X12710	84.9	13967.2	13969.3
호모이합체 (as-c-as)	X12711	87.2	14159.2	14157.7
호모이합체 (s-nc-s)	X12712	89.9	13961.1	13959.7
호모이합체 (as-nc-as)	X12713	87.2	14155.1	14153.1

[0759]

[0760] 표 17은 어닐링하여 두가닥 다합체 siRNA 혼합물, XD-05305(절단 불가한 결합을 지님) 및 XD-05306(절단 가능한 결합을 지님)을 생성하는 단일 가닥 호모이합체를 제시한다. 초기에, 일반적인 어닐링 조건을 사용하였다: 상보성 단일 가닥을 1x PBS 중에서 합하고, 70°C에서 유지되는 수조에 10 분 동안 두었다. 그 후, 수조를 25°C로 3시간의 기간에 걸쳐 냉각시켰다.

<표 17> 두가닥 다합체 siRNA 혼합물의 제조에 사용된 서열

두가닥-ID	설명	Axo ssRNA ID	서열 (5'--3')
XD-05305	(s-nc-s)	X12712	GGAUFCfAUFCfUFCfAAGUfCfUfUfACfdTsdt (SHC6) (BMPEG2) G GAUFCfAUFCfUFCfAAGUfCfUfUfACfdTsdt (SHC6)
	(as-nc-as)	X12713	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdt (SHC6) (BMPEG2) GUfA AGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdt (SHC6)
XD-05306	(s-c-s)	X12710	GGAUFCfAUFCfUFCfAAGUfCfUfUfACfdTsdt (SHC6) (DTME) GGA UfCfAUFCfUFCfAAGUfCfUfUfACfdTsdt (SHC6)
	(as-c-as)	X12711	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdt (SHC6) (DTME) GUfAAG ACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdt (SHC6)

[0761]

[0762] 종래 기술(Mok et al, *Nature Materials*, Vol. 9, March 2010)에 제시된 것보다 잠재적으로 개선된 어닐링 조건에 대한 기준선을 설정하기 위하여, 절단 불가한 호모이합체 X12712 및 X12713을 사용하였다. Mok et al.에 의하여 공개된 어닐링 조건(이하 "팍(Park)") 및 표준 어닐링 조건의 독점 세트(이하 "액소랩스(Axolabs)" 조건)의 비교를 실시하였다. 팍 조건은 1x PBS, 1 시간, 37°C이었다. 액소랩스 조건은 1x PBS, 70°C에서 10 분, 3 시간의 기간에 걸쳐 25°C로 냉각이었다. 도 27은 SEC HPLC가 단일 가닥 이합체를 다합체 siRNA로부터 분리하

는 것을 입증한다. NC-센스-이합체는 중앙 피크에 해당하며, NC-안티센스-이합체는 우측 피크에 해당하며, 다합체 siRNA는 좌측 피크에 해당한다.

[0763] 추가로, 도 28은 다합체 siRNA의 적분이 어닐링 조건과는 독립적인 반면, 짧은 dsRNA의 분율은 그렇지 않다는 것을 입증한다. 약 $t=15.0$ min에서의 원 안의 부위에서의 높은 피크는 "꽉 조건"에 해당하며, 원 안의 부위에서의 낮은 피크는 "액소랩스 조건"에 해당한다.

[0764] 액소랩스 어닐링 조건은 더 많은 물질이 다합체 siRNA 분율로 이동시킨다.

[0765] 일련의 상이한 천연 HPLC 조건(완충제, 온도, 아세토니트릴의 함유량)의 스카우팅은 도 29에서 입증된 바와 같이 다합체 siRNAs를 부분적으로 분리하는 능력을 초래한다. 최고 피크는 NC-센스-이합체에 해당하며, 제일 왼쪽의 피크는 NC-안티센스 이합체에 해당하며, 약 $t=9-11$ 분에서의 "다합체 siRNA" 부위에서의 최고 피크는 "액소랩스 어닐링 조건"에 해당하며, "다합체 siRNA" 부위에서의 두번째 최고의 피크는 "꽉 어닐링 조건"에 해당한다.

[0766] 추가로, 그러한 분석은 더 높은 온도에서의 어닐링이 더 짧은 다합체를 최소화하며, 더 긴 것을 선호한다는 것을 확인하였다. 추가로, 본 출원인은 SEC 및 IEX HPLC 분석을 사용하면 분석되는 혼합물 중의 X-mer siRNAs의 분포를 할당할 수 없다는 것을 발견하였다.

[0767] 다합체 siRNA 혼합물의 다양한 siRNA 성분의 기준선 분리는 도 30에 도시한 바와 같이 SEC HPLC 분석에 의하여 달성하였다. 다합체 siRNA는 좌측 피크이며; 이합체 siRNA는 중앙의 피크이며; 정규 siRNA는 우측 피크이다.

[0768] HPLC계 방법 및 슈퍼텍스 200 10/300 GL 컬럼을 사용하면, 추가의 어닐링 조건은 거의 올리고머화되지 않는 물질의 분율을 최소화하고자 하는 목적으로 조사되었다. 구체적으로, 하기 표 18은 분석되는 파라미터 및 절단 불가한 F7 호모이합체를 사용하여 얻은 결과를 제시한다.

<표 18> 어닐링 조건 및 결과

어닐링 조건	결과
온도 대 냉각율: 1x PBS, 250 μ M, 70°C, 80°C 및 90°C에서 (각각의 시점에서 10 분 동안), 차후에 실온으로의 느린 냉각(2h) 대 샘플을 냉수조에 넣은 신속한 냉각	상당한 변화가 관찰되지 않음. 신속한 동결 보존은 어떠한 잊점도 제공하지 않음. 증가된 온도로부터의 상당한 이득 없음.
온도 대 높은 염 농도: 10x PBS, 250 μ M, 70°C, 80°C 및 90°C에서 (각각의 시점에서 10 분 동안), 차후에 실온으로의 느린 냉각(2h)	더 높은 염 농도는 더 작은 다합체 siRNA 종의 비율을 증가시킴
온도 대 낮은 염 농도: 0.2x PBS, 250 μ M, 70°C, 80°C 및 90°C에서 (각각의 시점에서 10 분 동안), 차후에 실온으로의 느린 냉각(2h)	더 낮은 염 농도는 다합체 siRNAs의 형성에 대하여 최적인 것으로 보임. 다시, 온도는 영향이 적음.
온도, 희석된 어닐링, 기준선 염: 1x PBS, 25 μ M (1:10), 70°C, 80°C 및 90°C에서 (각각의 시점에서 10 분 동안), 차후에 실온으로의 느린 냉각(2h)	더 높은 온도는 다합체 siRNA의 형성을 방해함.
온도, 희석된 어닐링, 더 높은 염: 10x PBS, 25 μ M (1:10), 70°C, 80°C 및 90°C에서 (각각의 시점에서 10 분 동안), 차후에 실온으로의 느린 냉각(2h)	염 농도의 증가는 적어도 부분적으로 90°C에서가 아니라 80°C에서 다합체 siRNAs의 형성을 회복함
온도, 희석된 어닐링, 더 낮은 염: 0.2x PBS, 25 μ M (1:10), 70°C, 80°C 및 90°C에서 (각각의 시점에서 10 분 동안), 차후에 실온으로의 느린 냉각(2h)	250 μ M에서의 어닐링으로 관찰되는 것과 일치함

[0769]

[0770]

상기 결과에 기초하여, 최적화된 어닐링 조건은 높은 RNA 농도($\geq 250 \mu$ M), 낮은 염 농도(~0.2x PBS), 약 70-80 °C에서의 반응 온도(약 10 분 동안) 및 실온으로의 느린 냉각(2h)을 포함하는 것으로 결정되었다.

[0771]

도 31은 다합체 siRNA 혼합물에 대한 염 농도 및 반응 온도의 효과를 예시한다.

[0772]

그 다음, 최적화된 어닐링 조건을 선택하였으며, 최종 혼합물 종의 매우 높은 분자량 다합체 종의 양을 최소로 하도록 반응을 제어할 수 있는지를 결정하기 위하여 2종의 추가의 실험을 실시하였다(LNP가 전달 비히클로서 사용될 경우 더 낮은 분자량의 종은 생체내에서 활성이 더 빨라질 것이며, 잠재적으로 LNP로 더 용이하게 제제화될 것이라는 논리에 기초한다).

[0773]

제1의 실험에서, 최적화된 어닐링 조건은 종결 가닥으로서 작용하는 단일 가닥 단량체 0.1, 0.3 및 0.9 당량의 존재하에서(임의의 링커 부족) 반복하였다. 도 32(하기)에 도시한 결과는 종결 가닥의 농도가 높을수록(이 경우, 안티센스 가닥은 종결자로서 사용됨), 다합체화된 siRNA 분율은 작다.

[0774]

제2의 실험에서, 최적화된 어닐링 조건은 화학량론 이하의 양의 절단 불가한 센스 호모이합체 X12712로 수행하였으며; 구체적으로 90 몰%, 75 몰% 및 60 몰%의 센스 호모이합체 대 100 몰%의 안티센스 호모이합체 X12711을 어닐링 반응에 사용하였다. 도 33에 도시한 결과는 센스 호모이합체의 농도가 낮을수록 다합체화된 siRNA 분율이 낮다는 것을 나타낸다.

[0775]

어닐링 후, 각종 "종결자" 샘플 및 "화학량론 이하의" 샘플은 140 mA를 2 시간 동안 사용하여 TAE 완충제 중의 2% 아가로스 겔 상에서 분석하였다. 겔레드(GelRed) 염색을 사용하면 밴드가 보이게 되었다. 도 34A는 샘플 번

호 1-15에 대한 젤을 나타낸다. 도 34B는 샘플 번호 1'-10'에 대한 젤을 나타낸다.

<표 19> 젤 중에 존재하는 샘플 및 그의 특징의 리스트

물비	반응 조건	샘플 #
+0.5x_unlinkered_as	70C_250μM_0.2xPBS	1
+1.5x_unlinkered_as	70C_250μM_0.2xPBS	2
+4.5x_unlinkered_as	70C_250μM_0.2xPBS	3
4.5_s + 5_as	70C_250μM_0.2xPBS	4
3.75_s + 5_as	70C_250μM_0.2xPBS	5
3.0_s + 5_as	70C_250μM_0.2xPBS	6
5_s + 5_as	70C_250μM_1xPBS	7
5_s + 5_as	80C_250μM_1xPBS	8
5_s + 5_as	90C_250μM_1xPBS	9
5_s + 5_as	70C_250μM_10xPBS	10
5_s + 5_as	80C_250μM_10xPBS	11
5_s + 5_as	90C_250μM_10xPBS	12
5_s + 5_as	70C_250μM_0.2xPBS	13
5_s + 5_as	80C_250μM_0.2xPBS	14
5_s + 5_as	90C_250μM_0.2xPBS	15
5_s + 5_as	70C_25μM_1xPBS	1'
5_s + 5_as	80C_25μM_1xPBS	2'
5_s + 5_as	90C_25μM_1xPBS	3'
5_s + 5_as	70C_25μM_10xPBS	4'
5_s + 5_as	80C_25μM_10xPBS	5'
5_s + 5_as	90C_25μM_10xPBS	6'
5_s + 5_as	70C_25μM_0.2xPBS	7'
5_s + 5_as	80C_25μM_0.2xPBS	8'
5_s + 5_as	90C_25μM_0.2xPBS	9'
5_s + 5_as	37C_250μM_1xPBS	10'

[0776]

[0777]

범례: 좌측 열: "+0.5x_unlink_as"는 샘플 (#1)이 10% 과잉의 연결되지 않은 안티센스 가닥 X00549(종결자로서)를 사용하여 생성하였다는 것을 의미하며; "+1.5x_unlinkered_as"는 샘플 (#2)이 30% 과잉의 연결되지 않은 안티센스 가닥 X00549(종결자로서)를 사용하여 생성하였다는 것을 의미하며; "+4.5x_unlinkered_as"는 샘플 (#3)이 90% 과잉의 연결되지 않은 안티센스 가닥 X00549(종결자로서)를 사용하여 생성하였다는 것을 의미하며; 나머지 샘플 #4-10'의 경우, X_s + Y_as는 샘플이 X nmol 센스 연결된 호모이합체 및 Y nmol 연결된 안티센스 호모이합체로 생성되었다는 것을 의미한다(예, 샘플 #4는 4.5 nmol의 연결된 센스 호모이합체 및 5 nmol의 연결된 안티센스 호모이합체로 생성되었다). 서열 X00549: 5'-GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT-3'. 중앙 열: 반응 조건은 온도(°C), RNA 농도(μM) 및 염 농도(PBS로서)에 관하여 제공된다.

[0778]

요컨대, 상기 실험은 다합체 siRNA 혼합물의 분석이 혼합물 중의 다합체화된 siRNA 단위의 커다란 크기로 인하여 도전적이라는 것을 입증한다. SEC HPLC 분석은 다합체화된 (5- 또는 6-mer까지) 대 이합체화된 siRNA 단위의 비를 설정하기에 적절하지만, 주어진 샘플에서의 다량체화 정도에 관한 이해를 제공하지는 못하였다. 천연 아가로스 젤은 다량체화 정도를 가시화하는 것을 돋는다. 추가로, 어닐링 조건은 최종 혼합물에서의 다량체화의 정도에 심오한 영향을 미친다. 예를 들면, 등물 어닐링을 수행할 때, 매우 높은 분자량의 다합체 siRNA 제제화가 관찰될 수 있다(예, 6,000 bp 당량 초과). 일반적으로, 어닐링은 높은 RNA 농도($\geq 250 \mu\text{M}$), 낮은 염 농도(예, ~0.2x PBS) 및 반응 온도 약 70-80°C에서 수행되어야 한다. 다량체화의 정도는 비-등물 어닐링을 수행하여 감소될 수 있다. 200-500 DNA bp 당량 범위(예, 도 34A에서 젤 레인 3 및 6)에서 놓축된 다량체화는 종결자 단일 가

닥의 첨가에 의하여 또는 하나의 가닥의 양을 크게 감소시켜 이루어질 수 있다.

[0779] 도 34A의 겔 레인 6 및 도 34B의 겔 레인 10'로부터의 샘플은 LNP로의 제제화후 마우스에서 테스트하기 위하여 선택하였다. 샘플 #10'는 동일부의 센스 호모이합체 및 안티센스 호모이합체로 이루어진 250 μ M의 RNA 농도를 가지며, 1 시간 동안 37°C에서 1x PBS 중에서 어닐링하였다. 3(센스 호모이합체) 대 5(안티센스 호모이합체)의 물비로 이루어진 250 μ M의 RNA 농도 및 0.2x PBS에서의 샘플 #6은 수조에 70°C에서 넣고, 3 시간의 기간에 걸쳐 냉각시켰다. 생성된 다합체 siRNA 혼합물을 일반적인 절차: 지질 나노입자 제제에 따라 LNP로 제제화하고, 일반적인 절차: LNP 특징화에 따라 분석하였다. LNP 실험에 대한 조성 및 분석 데이터는 하기 표 20, 21 및 22에 제시된다.

〈표 20〉

제제 ID	ssRNA	제제 조성 물%	크기 (nm)	PSI	제타 (mV)	Core (ng/mg)	Entrap %
NPA-624-1	FVII (XD-00030)	KL22/DSPO/풀레스테롤/PEG-c-DOMG 50:10:38.5:1.5	69.73	0.05	-0.4	0.71	63%
NPA-194-3	FVII (XD-00030)	KL52/DSPO/풀레스테롤/PEG-c-DOMG 50:10:38.5:1.5	91.02	0.07	-2.6	0.51	83%
NPA-625-1	다합체 레인 6 (XD-05305) (X12712K1 + X12713K1)	KL52/DOPE/풀레스테롤/PEG-c-DOMG 40:10:48.5:1.5	113.2	0.10	-4.4	0.11	76%
NPA-626-1	다합체 레인 6 (XD-05305) (X12712K1 + X12713K1)	KL52/DOPE/풀레스테롤/PEG-c-DOMG 40:30:28.5:1.5	106.2	0.05	-4.6	0.14	75%
NPA-627-1	다합체 절단 가능 (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	KL52/DOPE/풀레스테롤/PEG-c-DOMG 40:10:48.5:1.5	129.6	0.10	0.0	0.13	92%
NPA-628-1	다합체 절단 가능 (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	KL52/DOPE/풀레스테롤/PEG-c-DOMG 40:15:43.5:1.5	116.4	0.07	-5.3	0.14	89%
NPA-629-2	다합체 절단 가능 (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	KL52/DOPE/풀레스테롤/PEG-c-DOMG 40:20:38.5:1.5	142.2	0.09	-6.7	0.15	99%
NPA-630-1	다합체 절단 가능 (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	KL52/DOPE/풀레스테롤/PEG-c-DOMG 40:25:33.5:1.5	118.9	0.04	-5.6	0.15	86%
NPA-631-1	다합체 절단 가능 (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	KL52/DOPE/풀레스테롤/PEG-c-DOMG 40:30:28.5:1.5	102.8	0.03	-3.7	0.16	90%
NPA-632-1	다합체 절단 가능 (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	KL52/DOPE/풀레스테롤/PEG-c-DOMG 40:40:18.5:1.5	90.88	0.06	-1.8	0.16	83%
NPA-623-2	다합체 레인 6 (XD-05305) (X12712K1 + X12713K1)	KL52/DOPE/풀레스테롤/PEG-c-DOMG 40:20:38.5:1.5	129.1	0.06	-4.9	0.15	95%

[0780]

〈표 21〉

제제 ID	ssRNA	제제 조성 물%	크기 (nm)	PSI	제타 (mV)	Core (ng/mg)	Entrap %
NPA-642-1	다합체 절단 가능한 레인 6 (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	KL22/DOPE/풀레스테롤/PEG-c-DOMG 40:20:38.5:1.5	62.45	0.07	-2.4	0.19	93%
NPA-643-1	다합체 절단 가능한 레인 10' (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	KL22/DOPE/풀레스테롤/PEG-c-DOMG 40:20:38.5:1.5	61.67	0.08	-2.5	0.19	92%
NPA-644-1	다합체 절단 가능한 레인 6 (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	인비보펙타민 2.0	69.52	0.02	1.2	0.42	97%
NPA-645-1	다합체 절단 가능한 레인 10' (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	인비보펙타민 2.0	87.71	0.11	1.2	0.44	100%
NPA-646-1	FVII (XD-00376)	인비보펙타민 2.0	67.04	0.07	2.2	0.46	100%

[0781]

〈표 22〉 정의된 길이의 이합체 (2-mer) siRNA 두가닥. 정의된 이합체 siRNA:

두가닥 ID	설명	ssRNA ID	서열 (5'---3')
XD-04600	F (s-c-s)	X12710	GGAUFCFAUFCFUFCFAAGUFCFUUFACFdTsdt (SHC6) (DTME) GGAUFCFAUFCFUFCFAAGUFCFUUFACFdTsdt (SHC6)
		X00549	GUFAAGACFUUFUFGAGAUFGAUFCFCFdTsdt
XD-04601	H (s-nc-s)	X12712	GGAUFCFAUFCFUFCFAAGUFCFUUFACFdTsdt (SHC6) (BMPEG) 2) GGAUFCFAUFCFUFCFAAGUFCFUUFACFdTsdt (SHC6)
		X00549	GUFAAGACFUUFUFGAGAUFGAUFCFCFdTsdt

[0782]

[0783] 실시예 23: FVII 다합체 siRNA의 LNP-제제화된 혼합물의 분석(동물 실험 MausRNAi-TV29/30)

[0784]

상이한 지질 조성(표 23에 제시됨)의 LNP로 제제화된 다합체 siRNAs(FVII로 표적화됨)의 혼합물의 생체내 효율을 측정하기 위하여, 동물 실험은 상기(일반적인 절차: 동물 실험)에 기재된 바와 같이 수행하였다. 화합물을 0.35 mg/kg siRNA의 투여량으로 정맥내 주사하였다. 인비보펙타민(Invivofectamine) 2.0을 사용하여 제제화된 다합체 siRNAs를 1 mg/kg 및 3 mg/kg의 투여량으로 주사하였다. LNP-제제화된 정규 FVII siRNA(XD-00030)는 양성 대조군으로서 포함되었다. 군 크기는 처치군의 경우 n=3 마우스이었으며, 염수 대조군의 경우 n=6이었다. 혈액을 하기 그래프에 제시된 시점에서 수집하고, FVII 효소 활성에 대하여 분석하였다. 결과를 도 35에 제시한다.

〈표 23〉 동물 실험 MausRNAi-TV29에 사용된 LNP-제제

제제-ID	지질	siRNA
NPA-625-1	XL10 DOPE 10	다합체 레인 6 (XD-05305) (X12712K1 +X12713K1)
NPA-626-1	XL10 DOPE 30	다합체 레인 6 (XD-05305) (X12712K1 +X12713K1)
NPA-627-1	XL10 DOPE 10	다합체 절단 가능 (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)
NPA-628-1	XL10 DOPE 15	다합체 절단 가능 (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)
NPA-630-1	XL10 DOPE 25	다합체 절단 가능 (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)
NPA-631-1	XL10 DOPE 30	다합체 절단 가능 (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)
NPA-632-1	XL10 DOPE 40	다합체 절단 가능 (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)
NPA-623-2	XL10 DOPE 20	다합체 레인 6 (XD-05305) (X12712K1 +X12713K1)
NPA-629-2	XL10 DOPE 20	다합체 절단 가능 (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)
NPA-194-3	XL10 std	XD-00030 (FVII 단량체)
NPA-624-1	XL7 std	XD-00030 (FVII 단량체)

[0785]

동일한 제제 중의 상이한 페이로드(절단 가능한 대 절단 불가한 링커를 갖는 페이로드)의 비교시, 본 출원인은 절단 가능한 페이로드가 절단 불가한 페이로드(예, NPA-625-1 대 NPA-62701; NPA-626-1 대 NPA-631-1; 및 NPA-629-1 대 NPA-623)보다 더 우수하게 수행되었다는 것을 관찰하였다.

〈표 24〉 동물 실험 MausRNAi-TV30에 사용된 LNP-제제

제제-ID	siRNA	지질
NPA-642-1	다합체 절단가능한 레인 6 (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)	XL7 DOPE 20
NPA-643-1	다합체 절단가능한 레인 10' (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)	XL7 DOPE 20
NPA-644-1	다합체 절단가능한 레인 6 (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)	인비보페타민 2.0
NPA-645-1	다합체 절단가능한 레인 10' (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)	인비보페타민 2.0
NPA-646-1	FVII (XD-00376)	인비보페타민 2.0

[0787]

실시예 24: FVII 센스:FVII 앤티센스의 FVII 혜테로이합체(X12714) 및 다합체(XD-05312)의 생성된 혼합물의 제조

[0789]

실시예 9의 F7-ApoB 혜테로이합체에 대한 변형은 도 37에 도시된 바와 같이 siF7 센스 가닥을 siF7 앤티센스 가닥으로 화학적으로 연결하여 F7을 표적화하는 단일 가닥 혜테로이합체를 형성하였다.

[0790]

혜테로이합체 X12714는 도 38에 도시된 젤에서 레인 12에 나타난다. 젤 분석 조건은 1.5 μ g/레인; 1xTAE 중의 2% 아가로스 젤; 140 mA; 130 분; 젤 레드 염색(1:10000)이었다.

[0791]

실시예 25: ApoB 스크린에 대한 서열 선택

[0792]

쥐과 ApoB에 대한 적절한 siRNA는 본 발명 이전에는 알려져 있지 않았다. 따라서, dsRNA 설계는 마우스 ApoB를 표적화하는 특이성 dsRNAs를 확인하기 위하여 실시하였다. 우선, 마우스(무스 무수콜루스(Mus musculus)) ApoB의 공지의 mRNA 서열(서열 번호 62로서 제시된 NM_009693.2 및 서열 번호 63으로서 제시된 XM_006515078.1은 NCBI 참조 서열 데이터베이스, 출시 73으로부터 다운로드하였다.

[0793]

이와 같은 서열의 초기 세트로부터, NCBI dbSNP(빌드 146)에 의하여 나타낸 바와 같은 마우스 ApoB mRNA에서 그의 해당 표적 부위 서열(19mer의 위치 2-18)(서열 번호 64)에서 SNP(단일 뉴클레오티드 다형태)를 품는 것은 배제하였다.

[0794]

RNAi 물질의 확인에서, 선택은 적어도 1 또는 2 불일치 각각을 갖는 19mer 센스 및 앤티센스 서열, 마우스 NCBI Ref Seq 데이터베이스(출시 73)에서의 임의의 기타 서열로 제한되며, 본 출원인은 포괄적인 마우스 전사체를 나타내는 것으로 추정하였다.

[0795]

후보자의 선택은 miRBase(맨체스터 대학, 출시 21)에 제시된 바와 같이 공지의 마우스 miRNA 씨드 서열(5' 말단의 뉴클레오티드 2-7)과 동일한 씨드 서열 (5' 말단의 뉴클레오티드 2-7)을 품는 19mer 센스 및 앤티센스 가닥의 제거에 의하여 추가로 제한된다.

[0796]

게다가, 5개 이상의 연속 G'를 함유하는 모든 센스 및 앤티센스 서열(폴리-G 서열)은 선택으로부터 제외하였다. 확인된 서열은 하기 표 25에 제시한다.

<표 25> 마우스 ApoB mRNA 를 표적화하는 이중 가닥 RNA (dsRNA) 의 코어 서열

SEQ ID NO	센스 가닥 코어 서열 (5'-3')	SEQ ID NO	안티센스 가닥 코어 서열 (5'-3')
65	CAACCAGUGUACCCUUAAA	77	UUUAAGGUACACUGGUUG
66	CUGUGUACGAAGUACAAAA	78	UUUUGUACUUCGUACACAG
67	CAACCUAUGAACCUUAAA	79	UUUAGGAGUUCAUAGGUUG
68	GCUUACGGCUAACAAUUU	80	AAAUUGUUGAGCCGUAGC
69	GCACGUGAUGGACUAUCAA	81	UUGAUAGUCCAUCACGUGC
70	CUAUUUGGAGAGAAUCGA	82	UCGAUUUCUCUCCAAAUAG
71	GAGAUUAUUGAUCGAAUCA	83	UGAUUCGAUCAUAAUCUC
72	CCGUGUAAUUCUAGCAAA	84	UUUUGCUAGAUUUACACGG
73	GCAUUUAGAUCAUUGAGA	85	UCUCAAUUGAUCUAAAUGC
74	GGUUUUAUUGGAUAAAUC	86	UGAUUUUAUCCAUUAAAACC
75	GACUUUGCAGAGCAAUUU	87	AAUAUUGCUCUGCAAAGUC
76	CUUACGGGUCAUCCAAAAA	88	UUUUGGAUGACCCGUAG

[0797]

표 25로부터 선택된 서열은 하기 표 26A 및 26B에 제시된 바와 같은 화학적 변형으로 합성하였다.

<표 26A>

SEQ ID	두가닥-ID	SEQ ID	ss-ID	서열 (5'--3')
91	XD-05962	89	X18815	caAfcCfaGfuGfuAfcCfcUfuAfaAfdTsdT
94	XD-05963	92	X18817	cuGfuGfuAfcGfaAfgUfaCfaAfaAfdTsdT
97	XD-05964	95	X18819	caAfcCfuAfuGfaAfcUfcCfuAfaAfdTsdT
100	XD-05965	98	X18821	gcUfuAfcGfgCfuCfaAfcAfaUfuUfdTsdT
103	XD-05966	101	X18823	gcAfcGfuGfaUfgGfaCfuAfuCfaAfdTsdT
106	XD-05967	104	X18825	cuAfuUfuGfgAfgAfgAfaAfuCfgAfdTsdT
109	XD-05968	107	X18827	gaGfaUfuAfuUfgAfuCfgAfaUfcAfdTsdT
112	XD-05969	110	X18829	ccGfuGfuAfaAfuCfuAfgCfaAfaAfdTsdT
115	XD-05970	113	X18831	gcAfuUfuAfgAfuCfaAfuUfgAfgAfdTsdT
118	XD-05971	116	X18833	ggUfuUfuAfaUfgGfaUfaAfaUfcAfdTsdT
121	XD-05972	119	X18835	gaCfuUfuGfcAfgAfgCfaAfaAfuUfdTsdT
124	XD-05973	122	X18837	cuUfaCfgGfgUfcAfuCfcAfaAfaAfdTsdT

[0799]

<표 26B>

SEQ ID	두가닥-ID	SEQ ID	as-ID	서열 (5'--3')
91	XD-05962	90	X18816	UFUfuAfaGfgGfuAfcAfcUfgGfuUfgdTsdT
94	XD-05963	93	X18818	UFUfuUfgUfaCfuUfcGfuAfcAfcAfgdTsdT
97	XD-05964	96	X18820	UFUfuAfgGfaGfuUfcAfuAfgGfuUfgdTsdT
100	XD-05965	99	X18822	AfAfaUfuGfuUfgAfgCfcGfuAfaGfcdTsdT
103	XD-05966	102	X18824	UFUfgAfuAfgUfcCfaUfcAfcGfuGfcdTsdT
106	XD-05967	105	X18826	UfcfgAfuUfuCfuCfcAfaAfuAfgdTsdT
109	XD-05968	108	X18828	UfGfaUfuCfgAfuCfaAfuAfaUfcUfcdTsdT
112	XD-05969	111	X18830	UfUfuUfgCfuAfgAfuUfuAfcAfcGfgdTsdT
115	XD-05970	114	X18832	UfcfuCfaAfuUfgAfuCfuAfaAfuGfcdTsdT
118	XD-05971	117	X18834	UfGfaUfuUfaUfcCfaUfuAfaAfaCfcdTsdT
121	XD-05972	120	X18836	AfAfuAfuUfgCfuCfuGfcAfaAfgUfcdTsdT
124	XD-05973	123	X18838	UfUfuUfuGfgAfuGfaCfcCfgUfaAfgdTsdT

[0800]

여기서 소문자 "c", "g", "a" 및 "u"는 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 나타내며, "s"는 포스포로티오에이트를 나타내며, "dT"는 테옥시티미딘 잔기를 나타낸다. 대문자 A, C, G, U 다음의 "f"는 2'-플루오로 뉴클레오티

드를 나타낸다. 표 26A 및 26B에 제시된 변형된 dsRNAs는 하기와 같이 표 25에 제시된 비변형된 dsRNAs에 해당한다: 서열 번호 89-124는 서열 번호 65-88로서 제시된 비변형된 서열에 해당하는 변형된 서열이다.

[0802] 실시예 26: ApoB를 표적화하는 siRNAs의 시험관내 평가

마우스 ApoB mRNA에 대하여 지시된 표 X에서의 siRNAs의 활성을 쥐과 간 세포주 NMuLi에서 테스트하였다.

ApoB mRNA 함유량은 ApoB 특이성 siRNAs로 인큐베이션 처리한 세포로부터 단리된 총 mRNA 중의 분자된 DNA에 의하여 정량화하였다. 세포는 미국 미생물보존센터(American Type Culture Collection)(미국 매릴랜드 락빌 소재, Cat. No. CCL-1638)로부터 얻었다. NMuLi 세포를 10% 태아 소 혈청(FCS, 바이오크롬 아게(Biochrom AG), 독일 베를린 소재, cat. No. S0115) 및 폐니실린 100 U/ml, 스트렙토마이신 100 mg/ml(바이오크롬 아게, 독일 베를린 소재, Cat. No. A2213)가 보충된 둘베코 변형된 이글 배지(DMEM, 바이오크롬 #F0435) 중에서 배양하였다.

siRNAs의 트랜스펙션은 96-웰 평판 상에서 15,000 NMuLi 세포/웰로 파종한 후 직접 수행하고, 제조업자에 의하여 기재된 바와 같이 트랜스펙션 시약 RNAiMax(인비트로겐 게엠베하(Invitrogen GmbH), 독일 카를스루에 소재, Cat. No. 13778-150)로 실시하였다. 4회 실시한 투여량 반응 실험에서, siRNA 농도는 50 nM에서 출발하였으며, 5-배 희석 단계로 16 pM로 감소되었다. 그 후, 트랜스펙션 세포를 24 시간 동안 37°C 및 5% CO₂에서 가습 인큐베이터(헤라우스 게엠베하(Heraeus GmbH), 독일 하나우 소재) 내에서 인큐베이션 처리하였다. 트랜스펙션 시약 단독 ("모의")-처치한 세포는 음성 대조군으로 작용하였다. ApoB mRNA 레벨은 퀀티젠 익스플로러 키트(Quantigene Explore Kit) QG1.0(파노믹스(Panomics), 미국 캘리포니아주 프레몬트 소재, cat. No. QG0004)을 사용하여 정량화하였다. 제조업자가 추천한 절차에 이어서 세포를 수거하고, 53°C에서 용해시켰다. 인큐베이션 및 용해 후, 세포 용해물을 마우스 ApoB 및 마우스 GAPDH(정규화를 위한 하우스키퍼로서)에 대한 특이성인 프로브-세트와 함께 인큐베이션 처리하였다. 검정은 제조업자의 프로토콜에 따라 가공하였다. 화학발광은 빅터2-라이트(퍼킨 엘머, 독일 비스바덴 소재)에서 RLU(상대적 광 단위)로서 측정하였으며, ApoB 프로브-세트로 얻은 값을 각각의 웰에 대한 각각의 GAPDH 값에 대하여 정규화하였다. 그래프 표현의 경우, 10 nM 및 0.4 nM에서의 ApoB mRNA 레벨은 모의-처치된 세포 세트의 레벨에 대하여 1로서 제시한다(도 39). IC₅₀(50% 감소된 표적 mRNA) 및 IC₈₀(80% 감소된 표적 mRNA) 값은 엑스리프트(XLfit) 소프트웨어(IDBS, 영국 길퍼드 소재)를 사용하여 구하고, 하기 표 27에 제시한다. siRNA XD-05967은 최저 IC₈₀ 값을 가지므로, 다합체 실험에 대한 최선의 후보자로서 선택되었으며, XD-05970은 최선의 IC₅₀ 값으로 인하여 백업 후보자로서 선택되었다.

〈표 27〉

ApoB 표적화된 siRNAs의

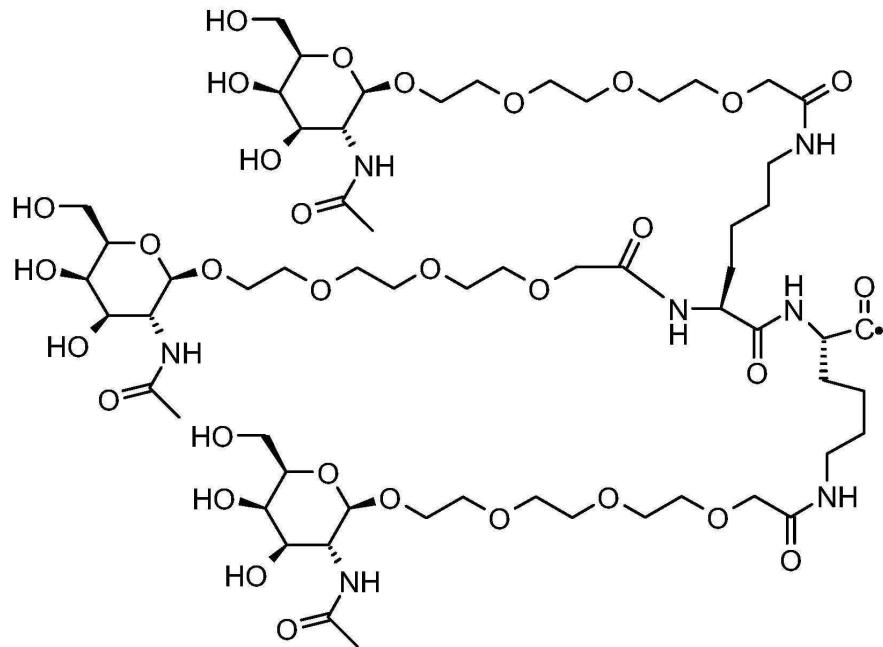
IC₅₀ 및 IC₈₀ 값

siRNA	IC ₅₀ (nM)	IC ₈₀ (nM)
XD-05962	1.77	n.a.
XD-05963	n.a.	n.a.
XD-05964	n.a.	n.a.
XD-05965	1.34	n.a.
XD-05966	1.84	n.a.
XD-05967	0.29	9.12
XD-05968	n.a.	n.a.
XD-05969	0.54	n.a.
XD-05970	0.17	44.63
XD-05971	n.a.	n.a.
XD-05972	n.a.	n.a.
XD-05973	n.a.	n.a.

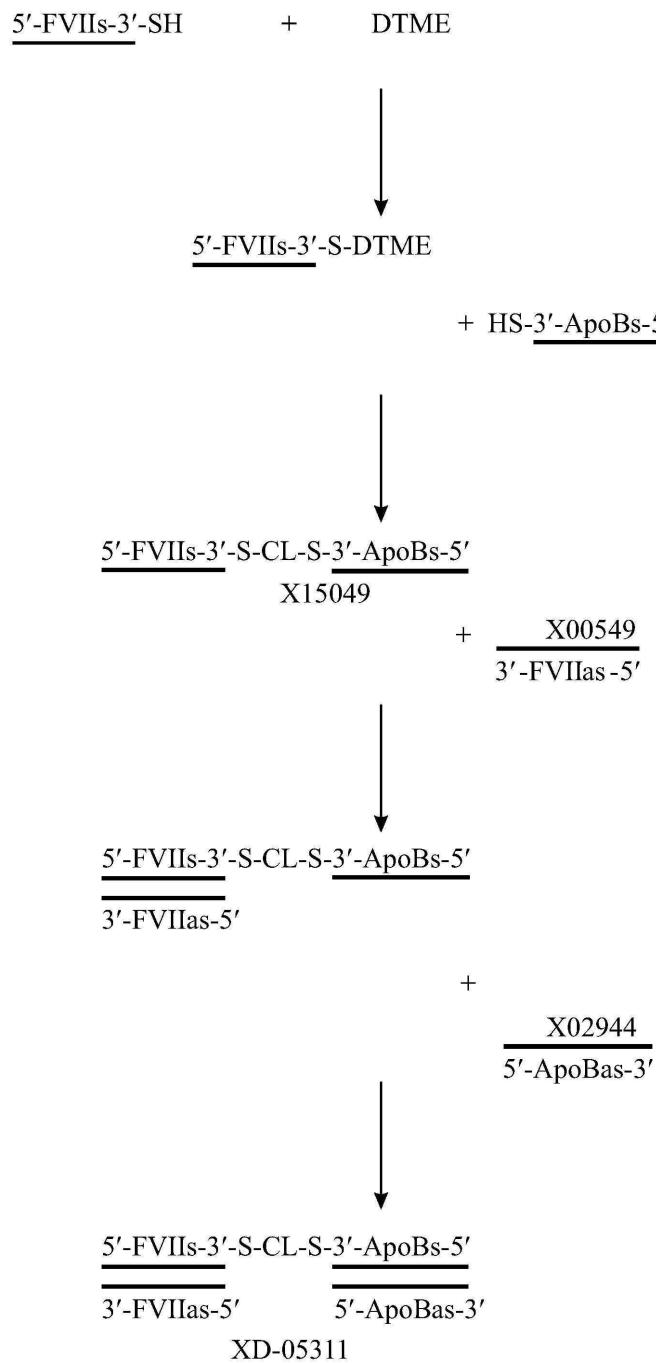
[0806]

도면

도면1

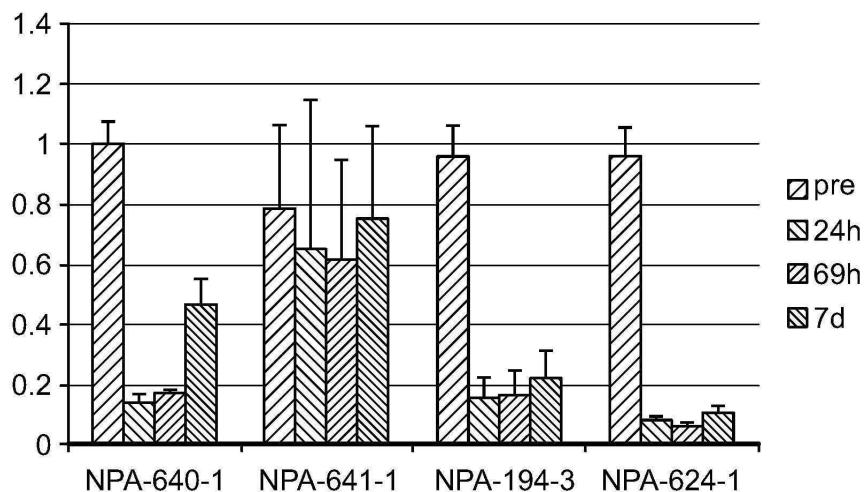


도면2



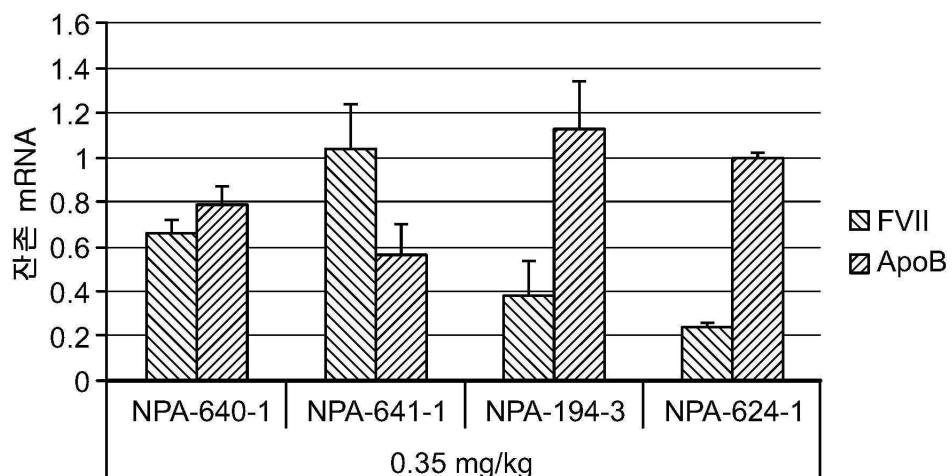
도면3

MausRNAi_TV30 – 혈청 중 FVII 활성
0.35 mg/kg, 염수 처치된 동물=1

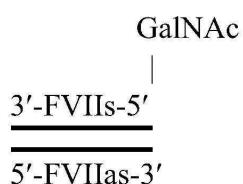


도면4

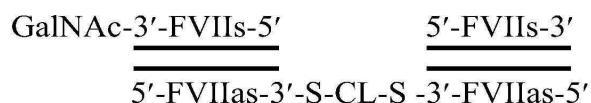
MausRNAi_TV30 – 간 조직 중 FVII 및 Apo B mRNA



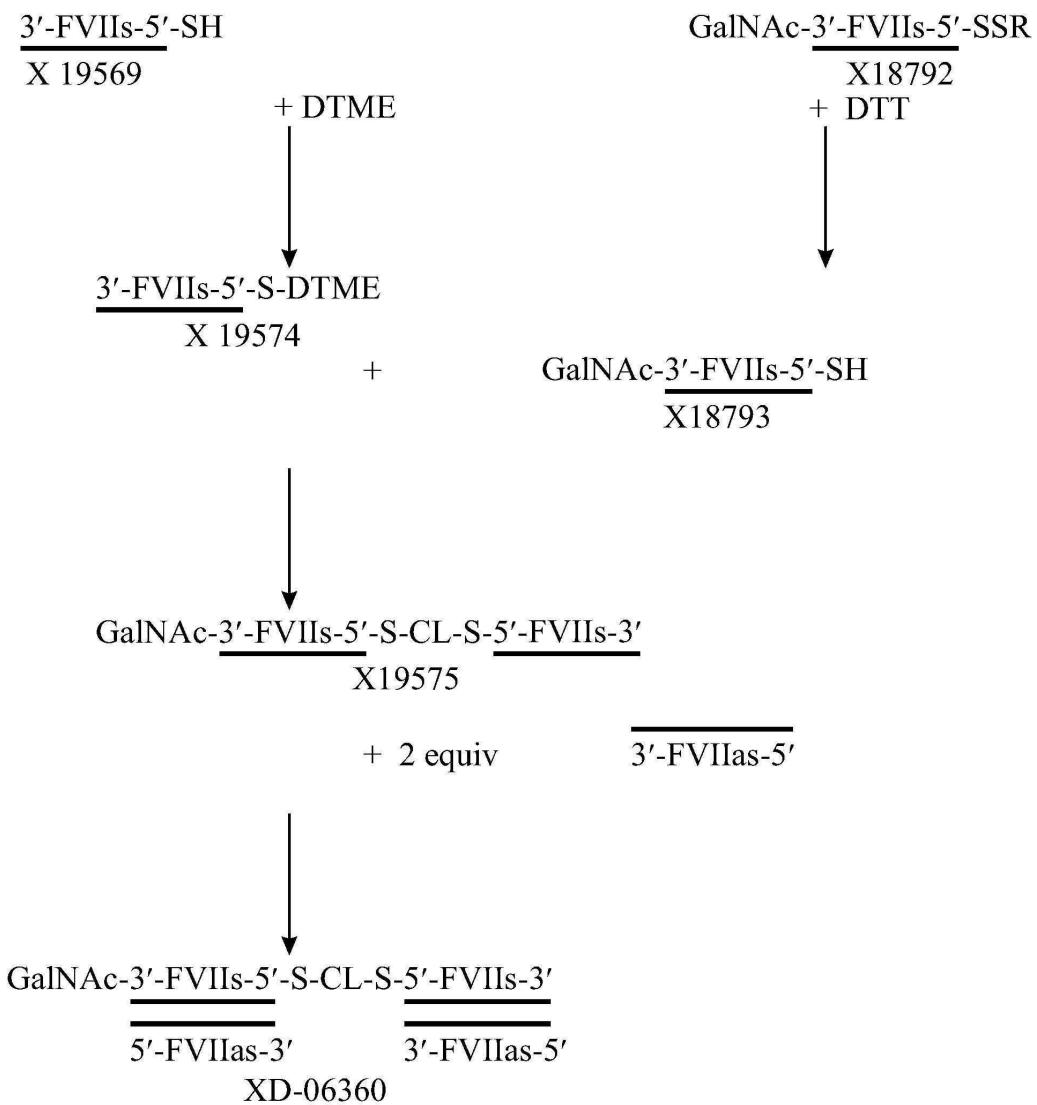
도면5



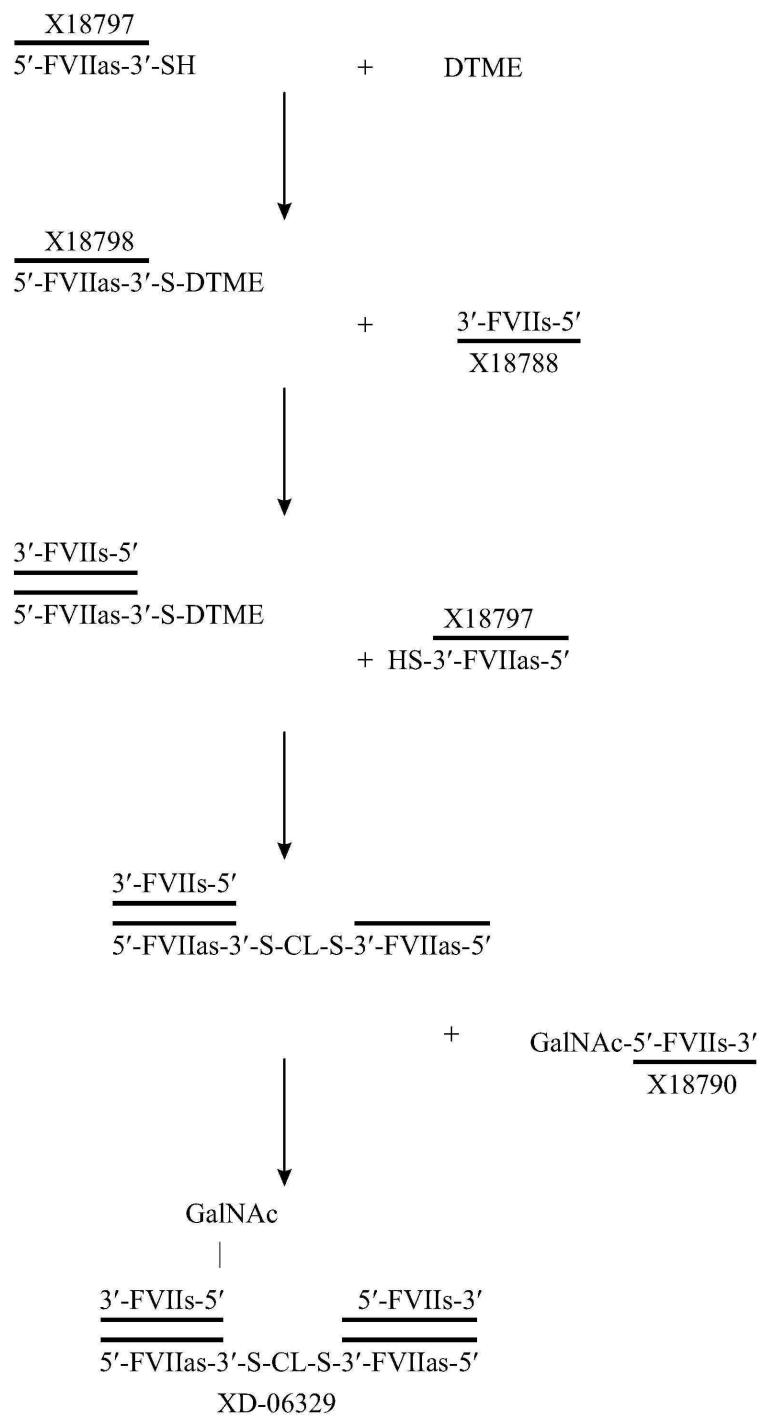
도면6



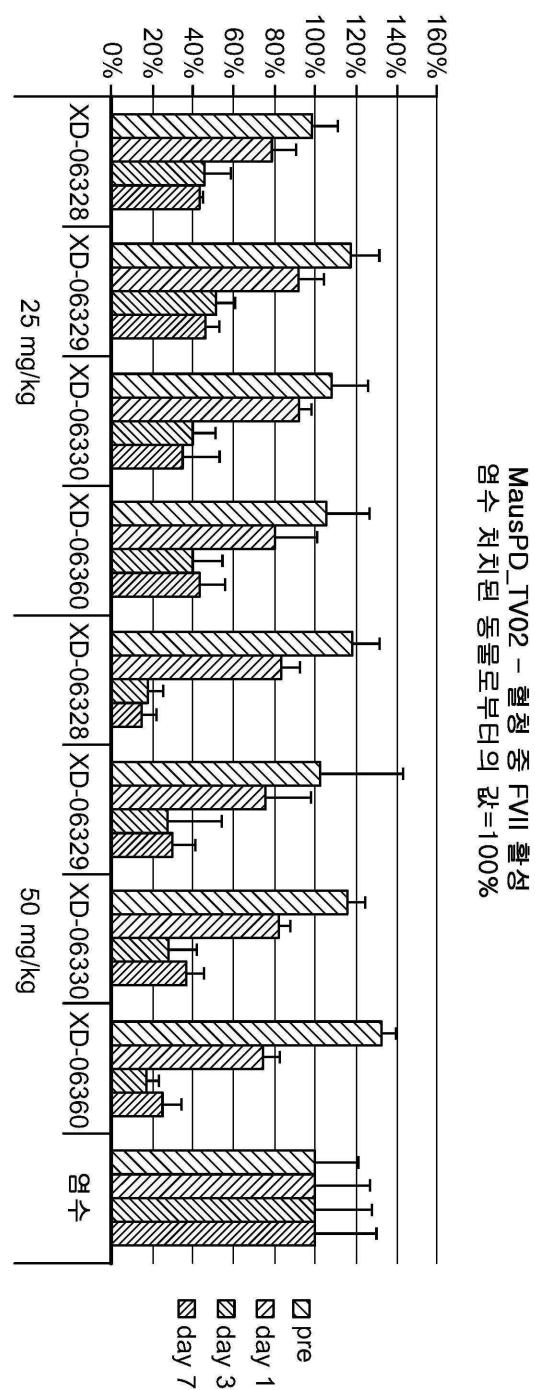
도면7



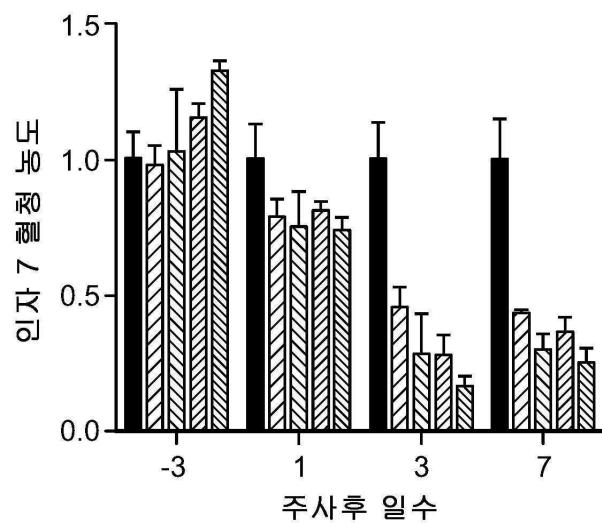
도면8



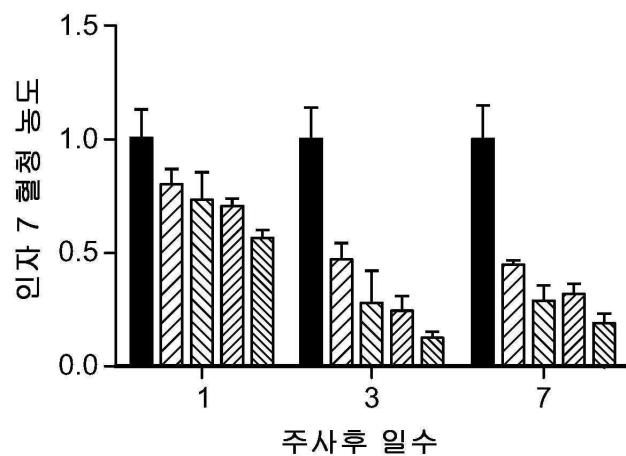
도면9



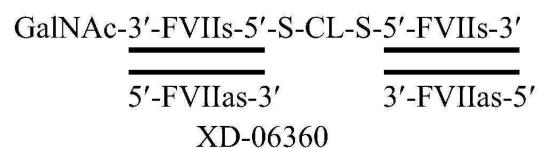
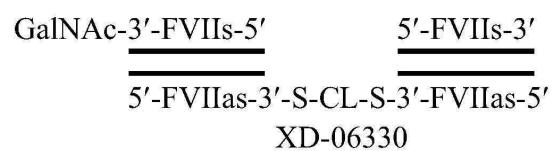
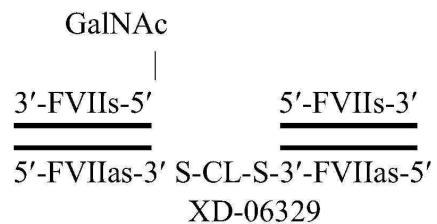
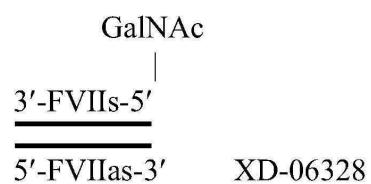
도면 10a



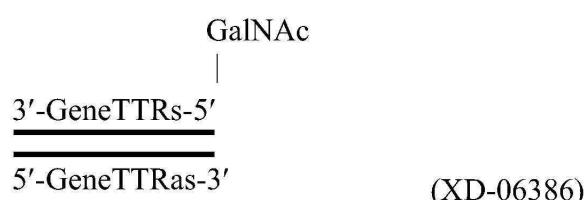
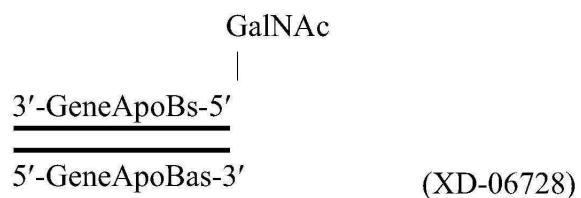
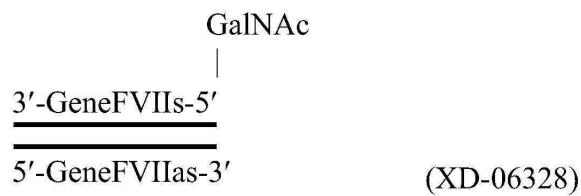
도면 10b



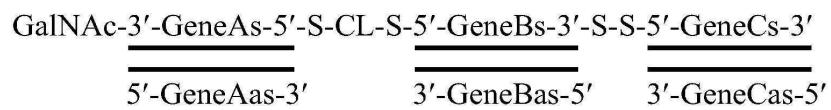
도면 10c



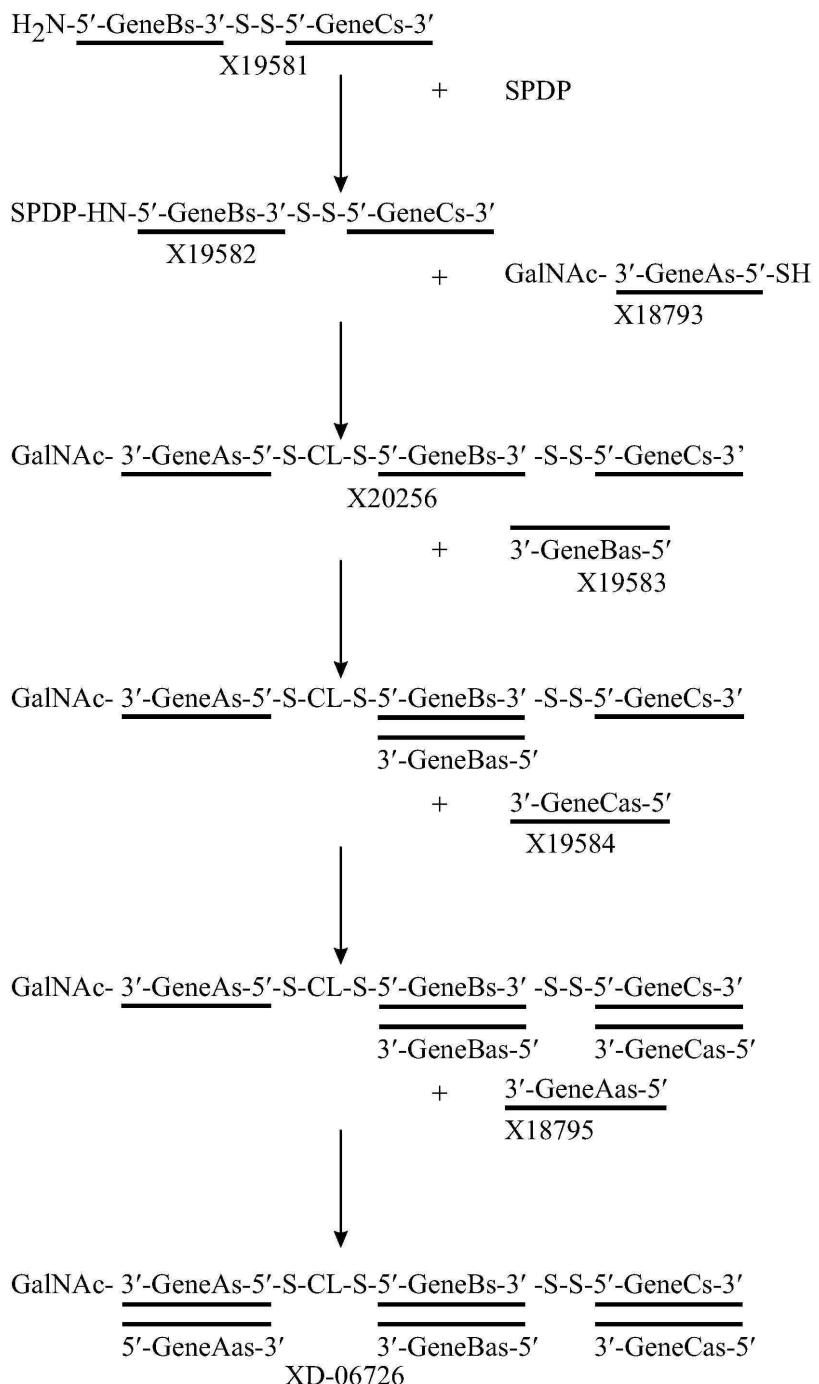
도면11



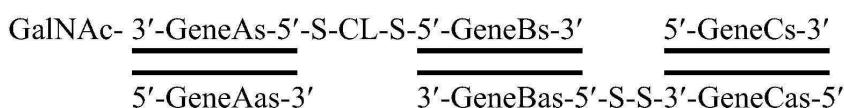
도면12



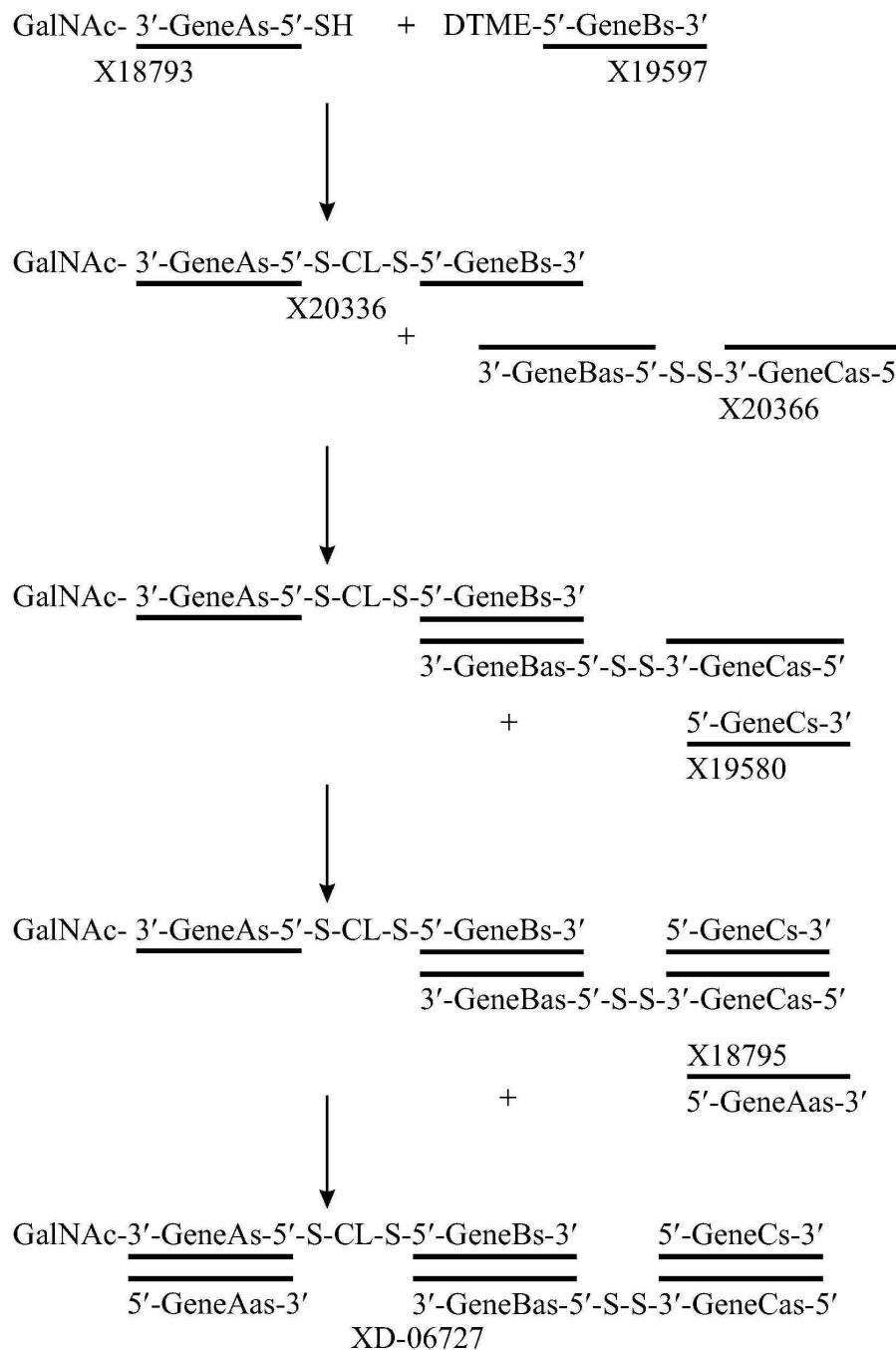
도면13



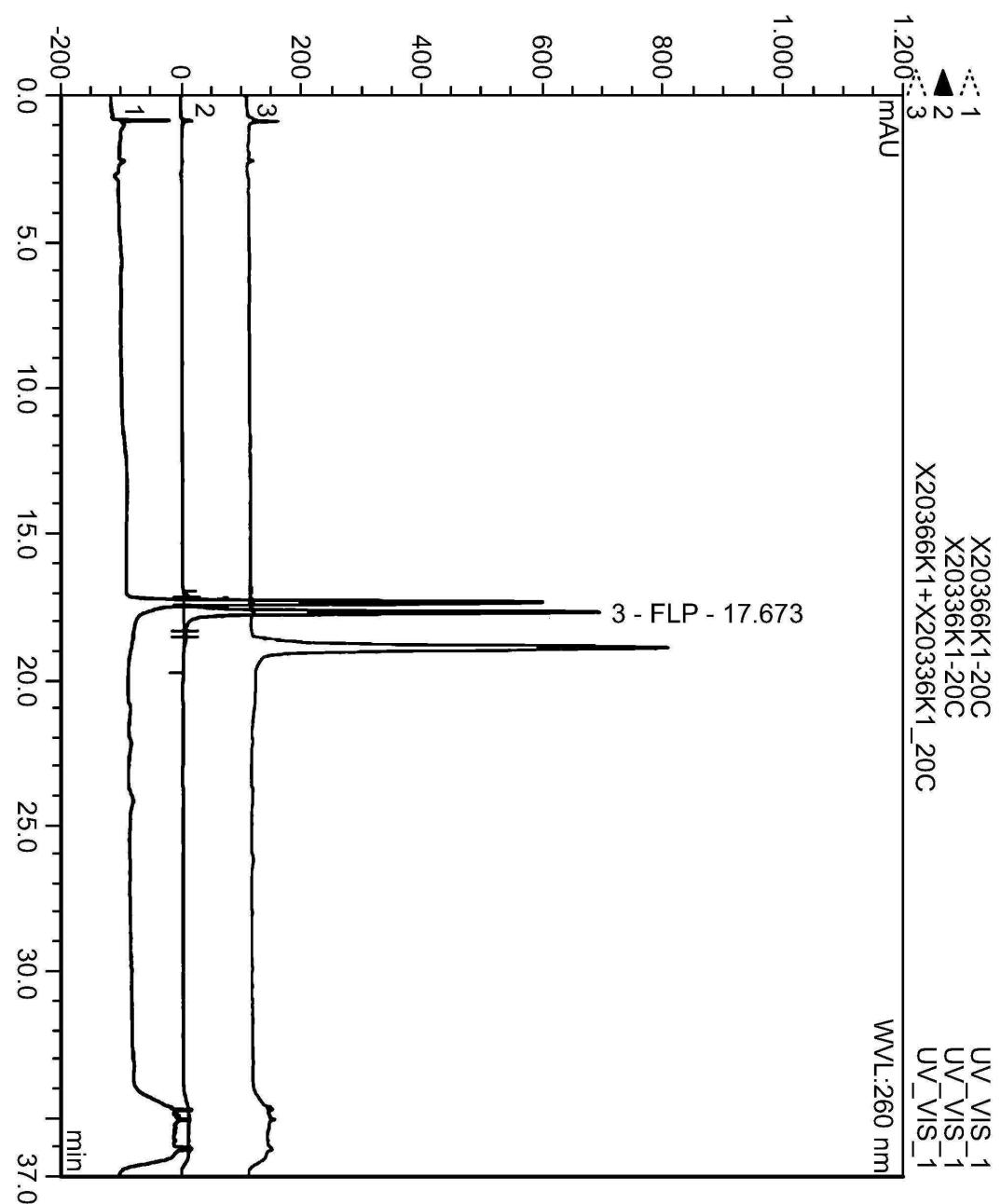
도면14



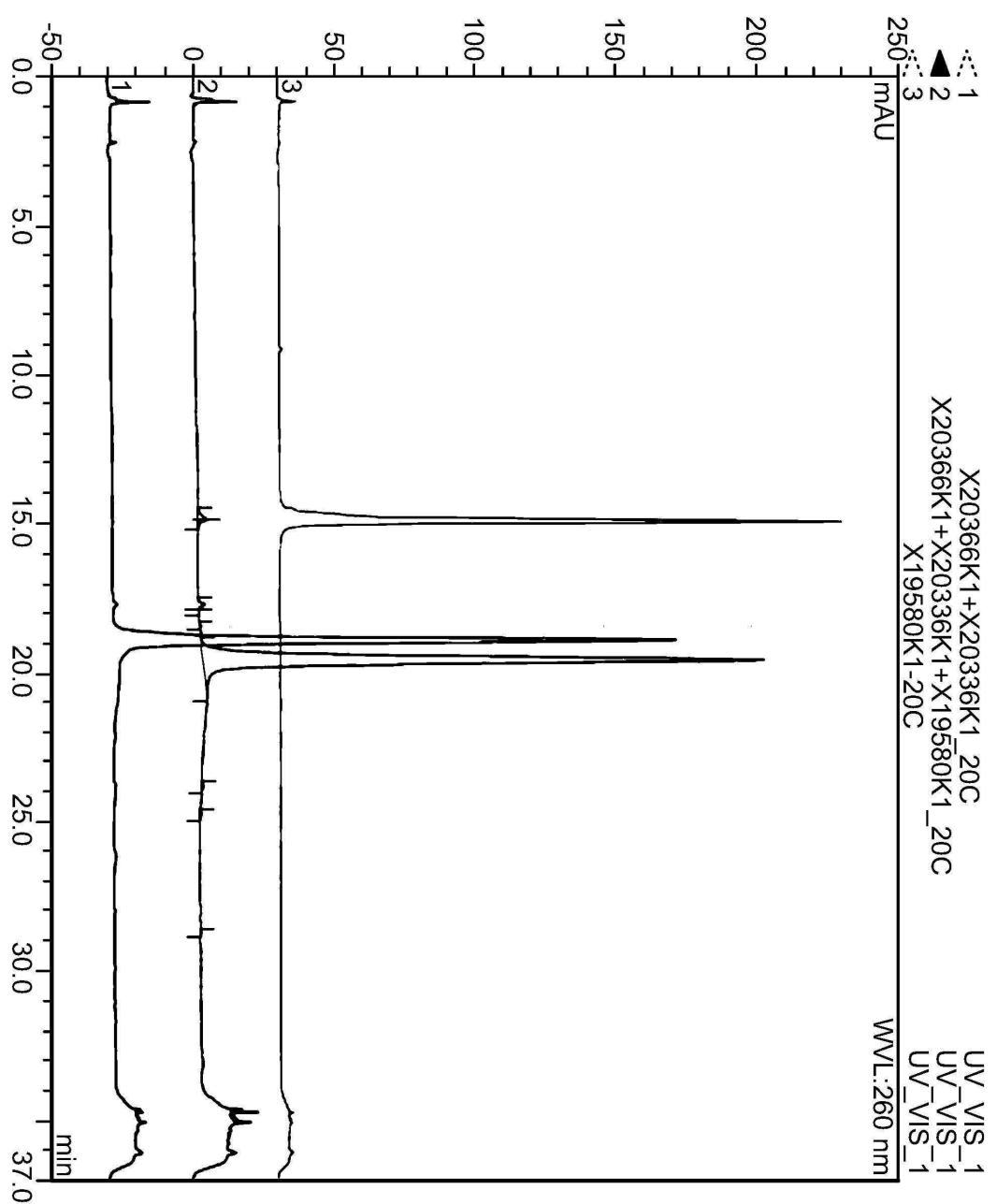
도면15



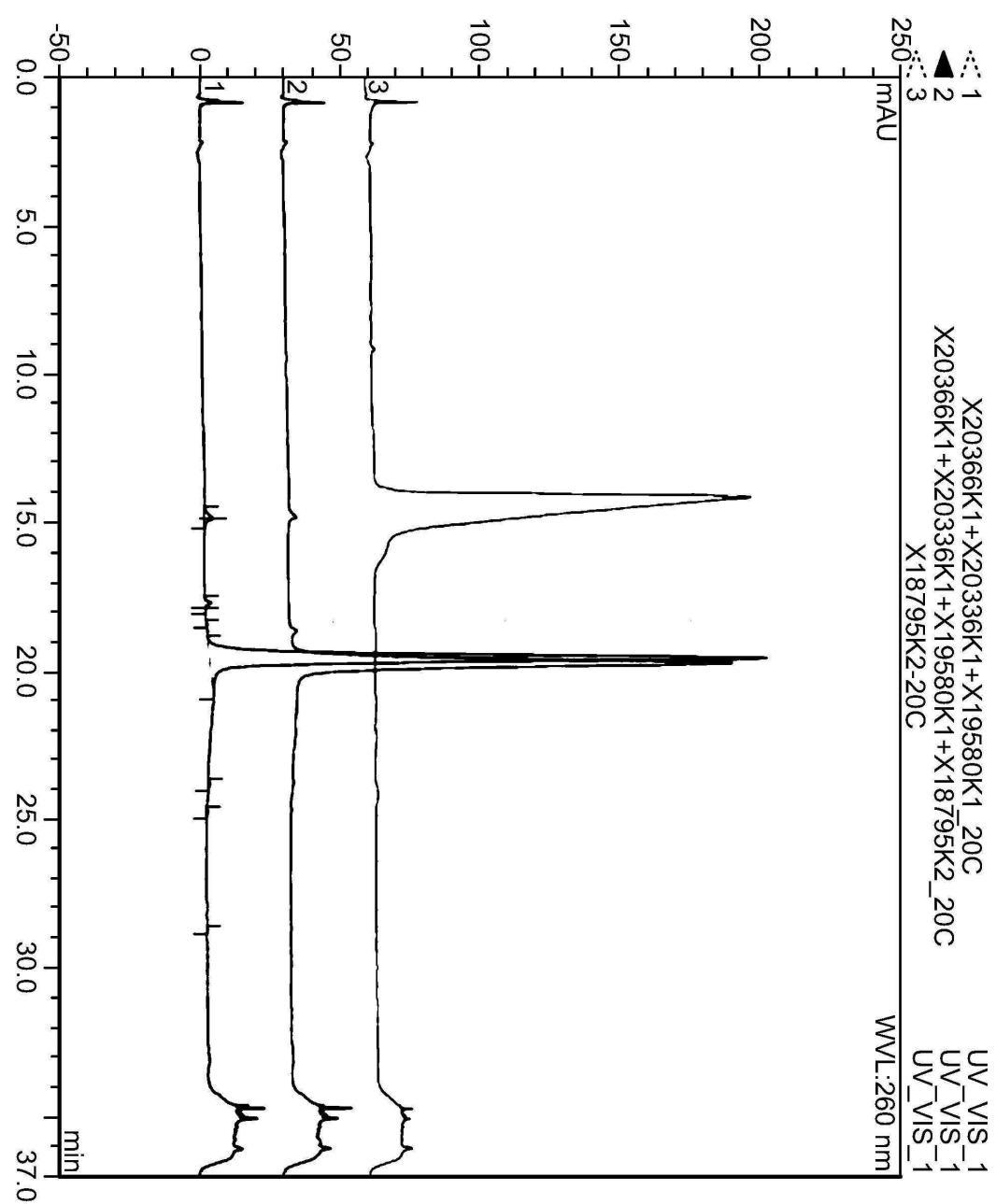
도면16



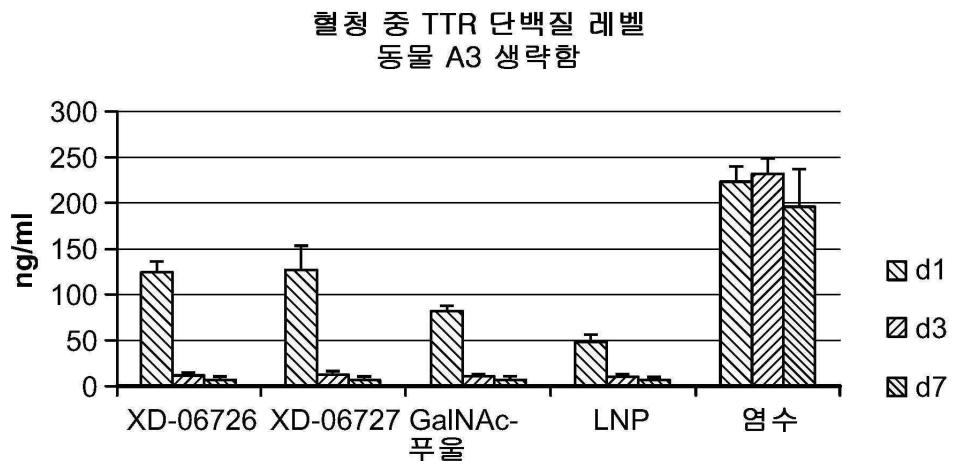
도면17



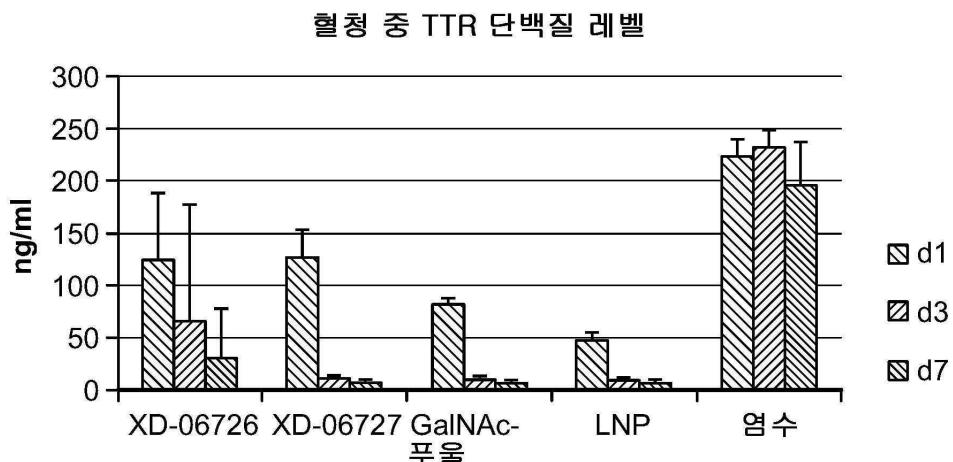
도면18



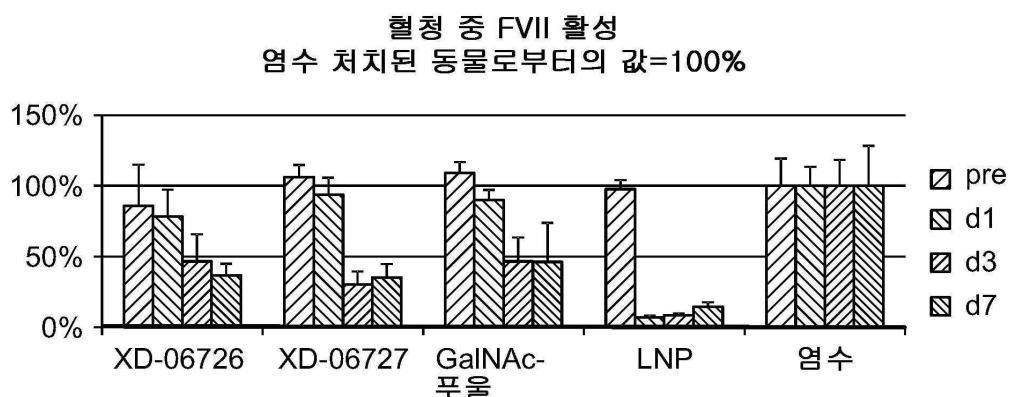
도면19a



도면19b

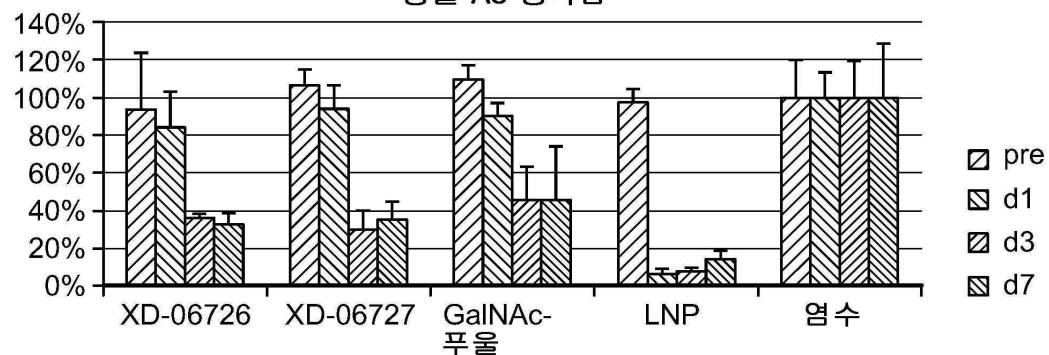


도면20a



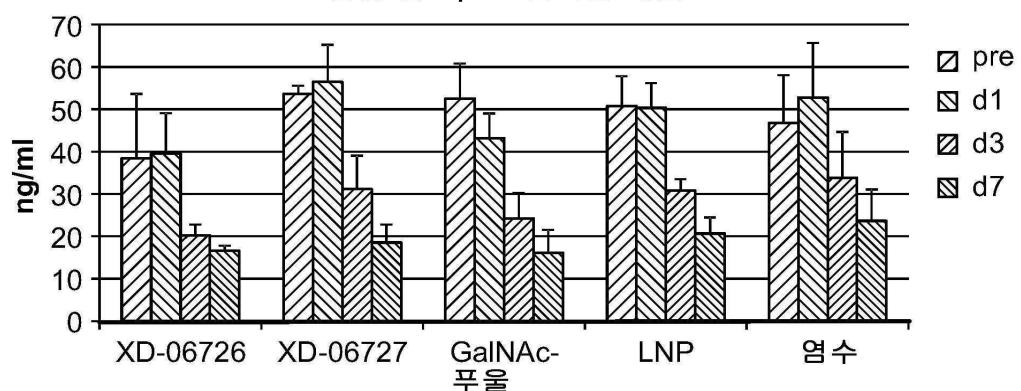
도면20b

혈청 중 FVII 활성
염수 처치된 동물로부터의 값=100%
동물 A3 생략함



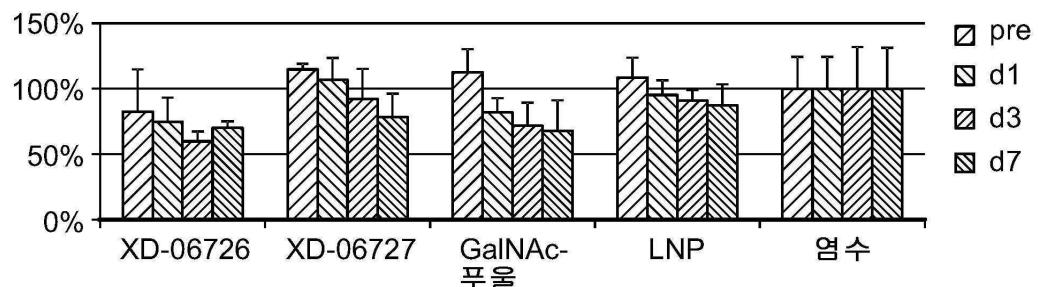
도면21a

혈청 중 ApoB 단백질 레벨

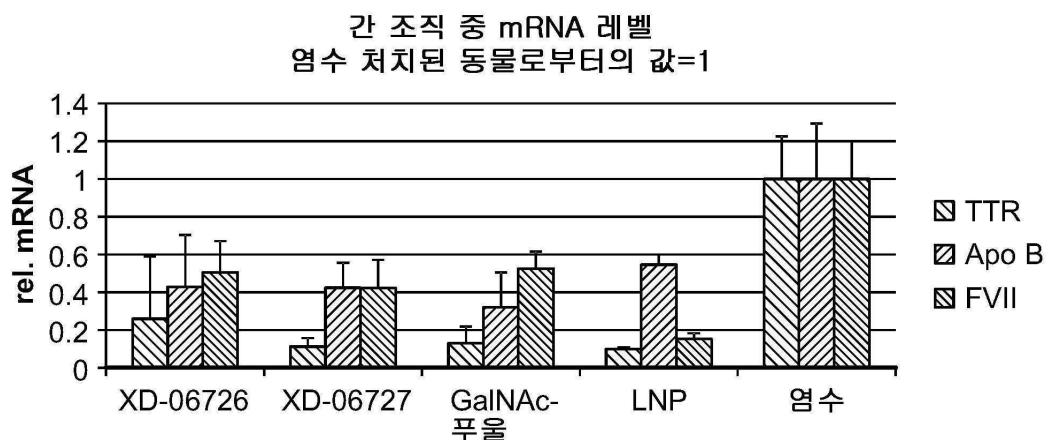


도면21b

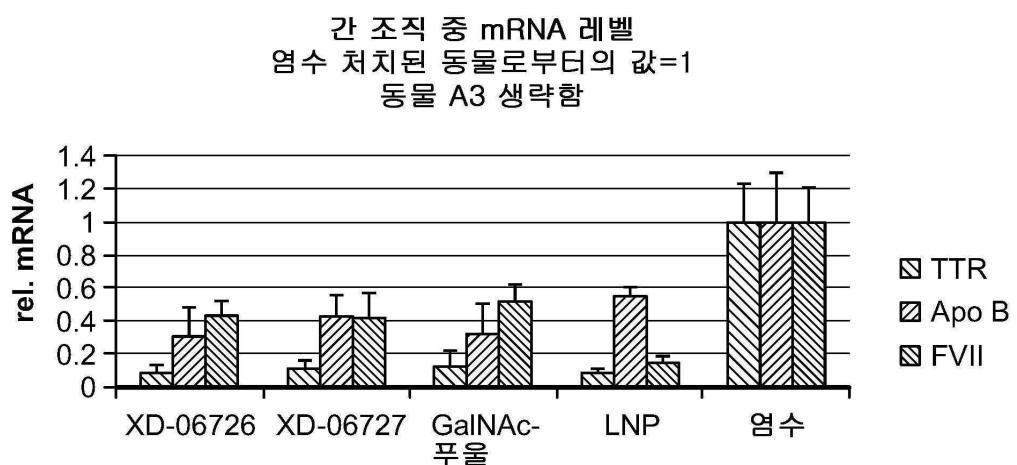
혈청 중 ApoB 단백질 레벨
염수 처치된 동물로부터의 값=100%



도면22a



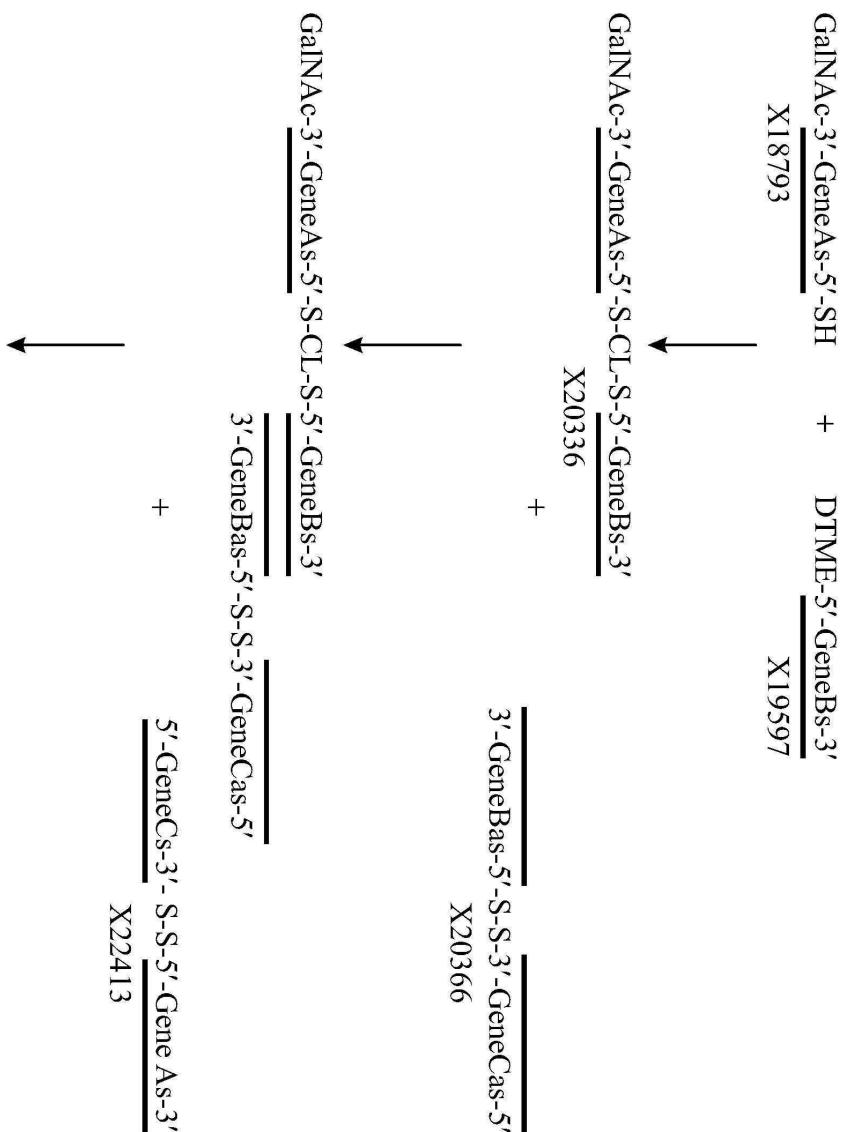
도면22b



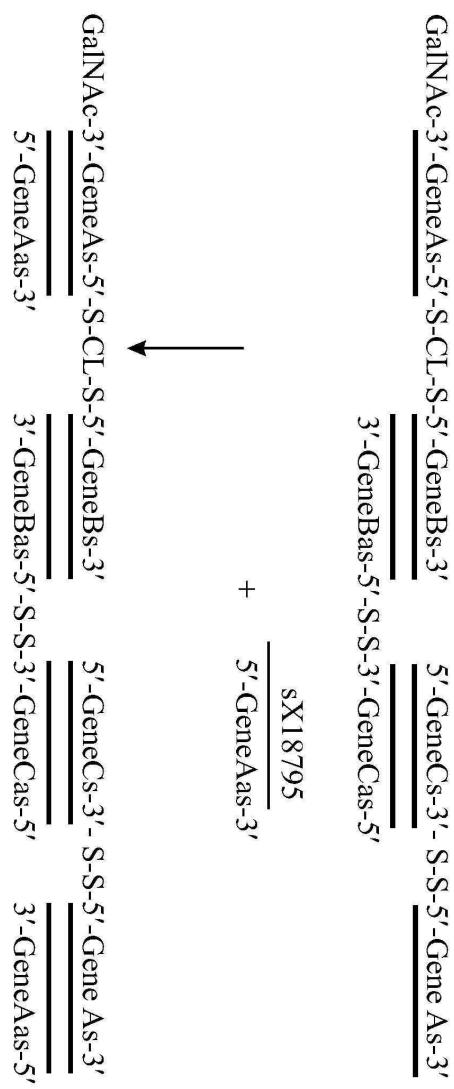
도면23

GalNAc-3'-GeneAs-5'-S-CL-S-5'-GeneBs-3'
5'-GeneAas-3'
3'-GeneBas-5'-S-S-3'-GeneCas-5'
3'-GeneAas-5'

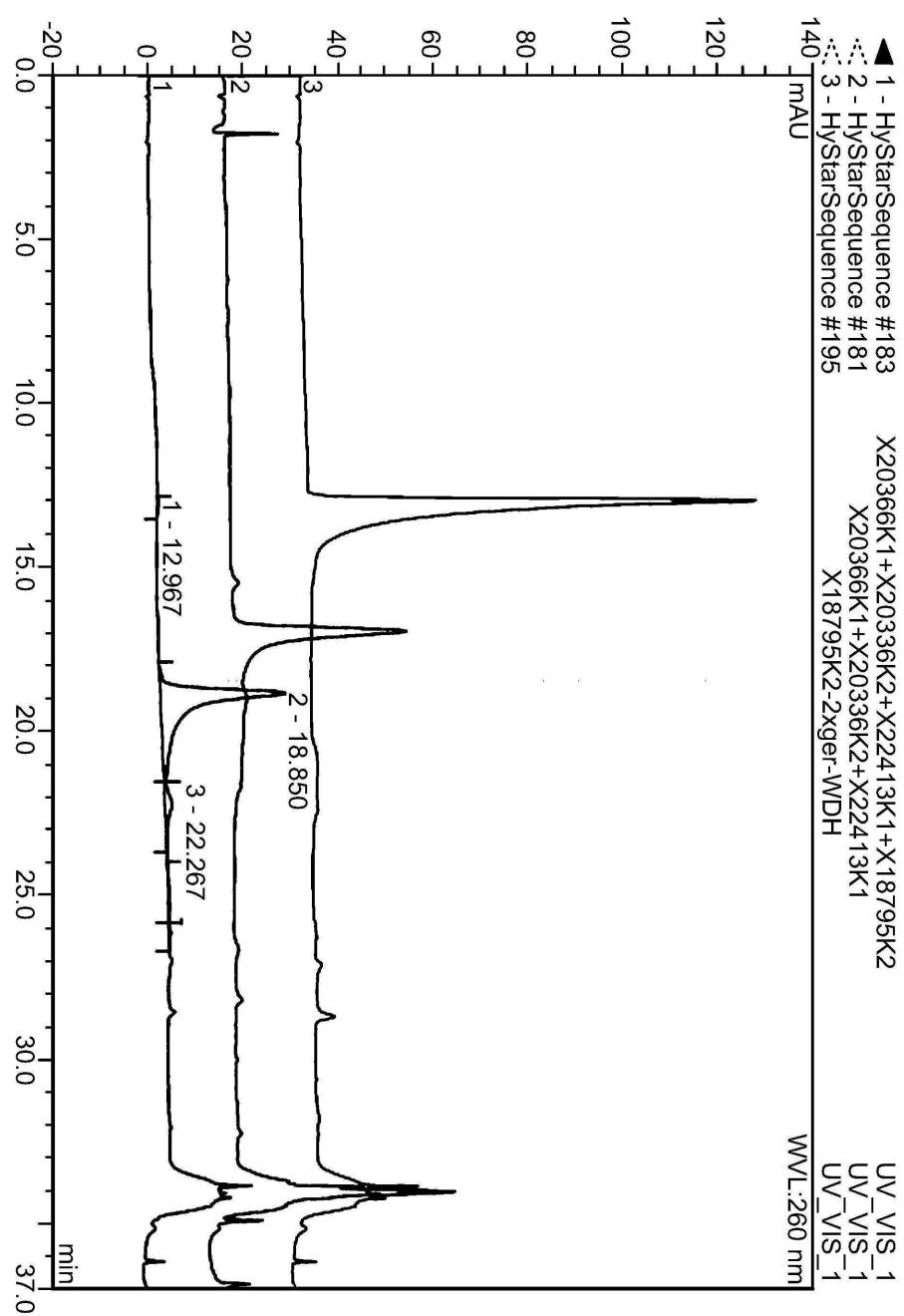
도면24a



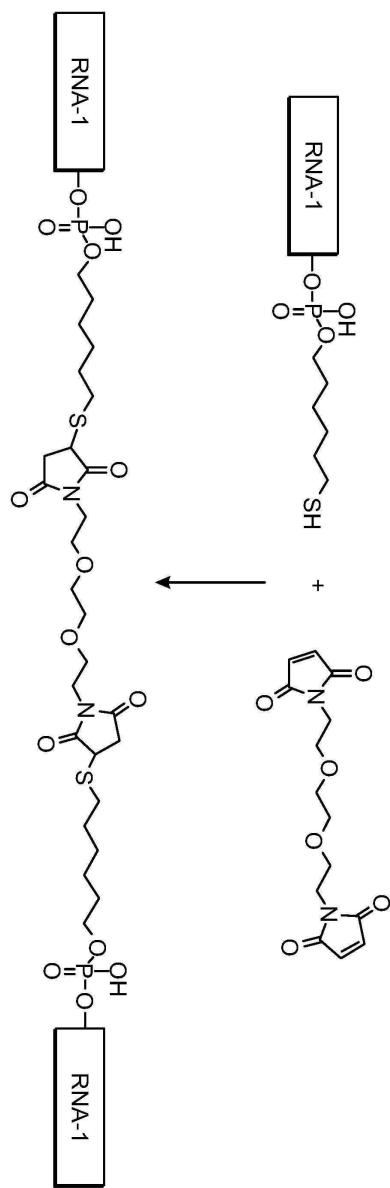
도면24b



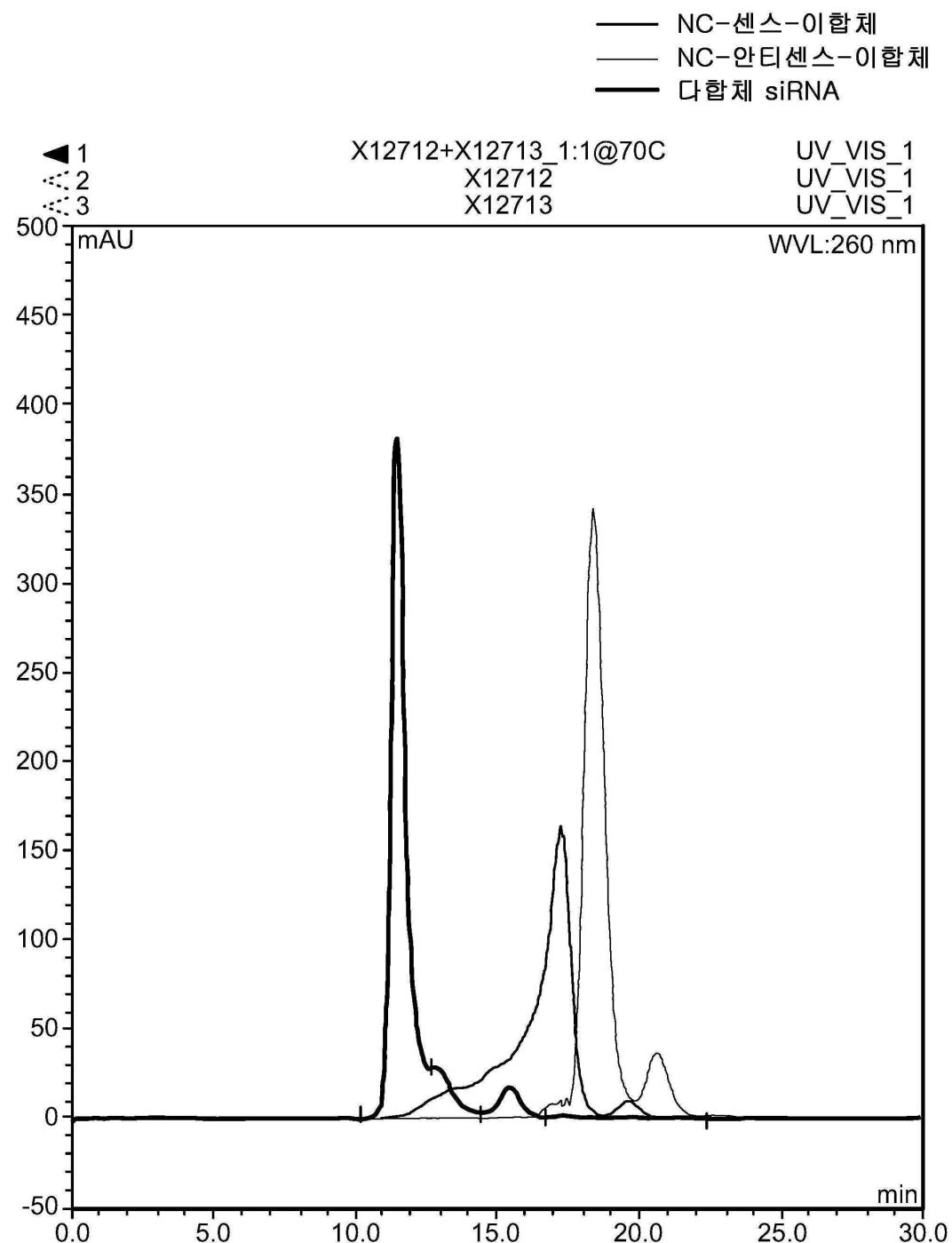
도면25



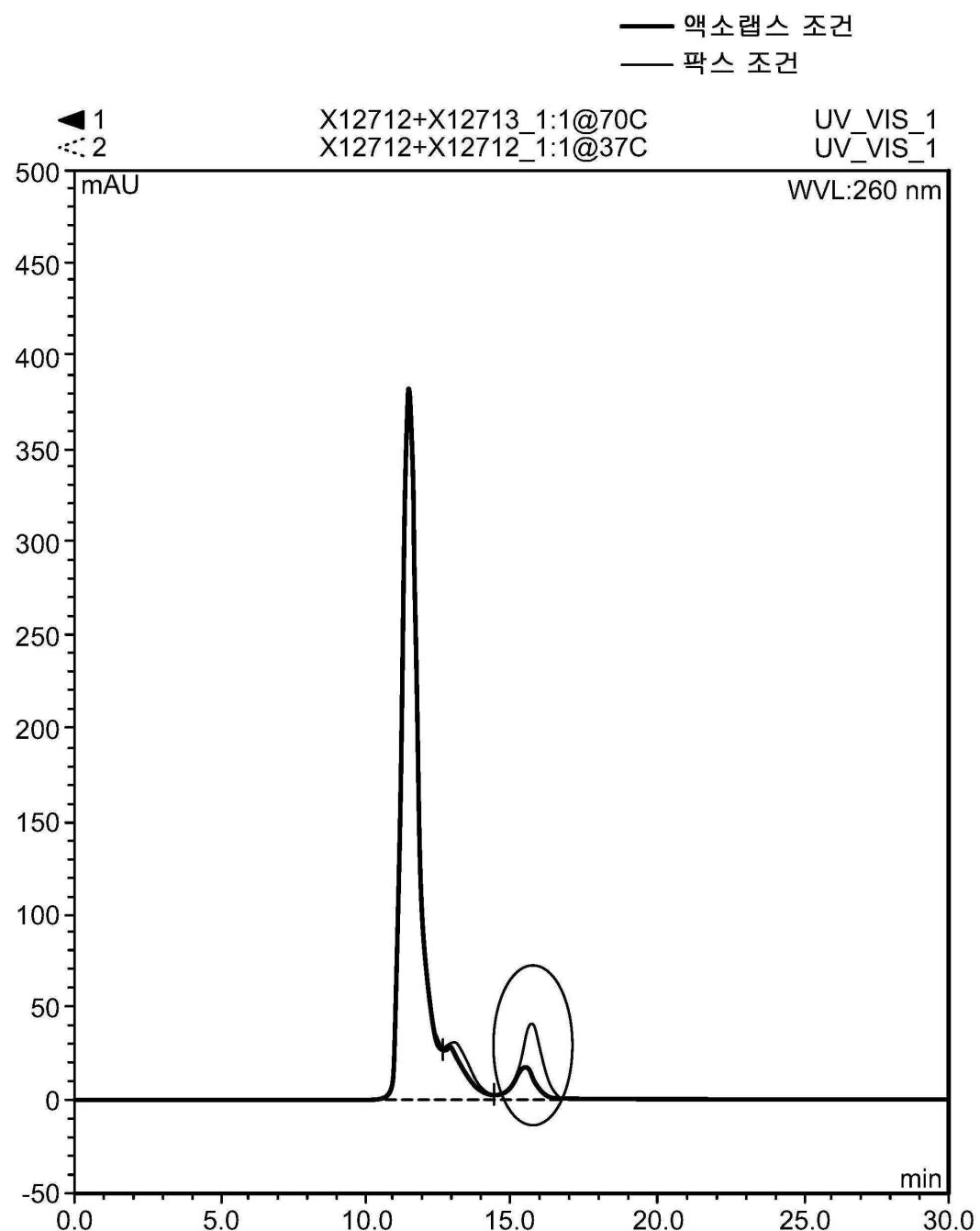
도면26



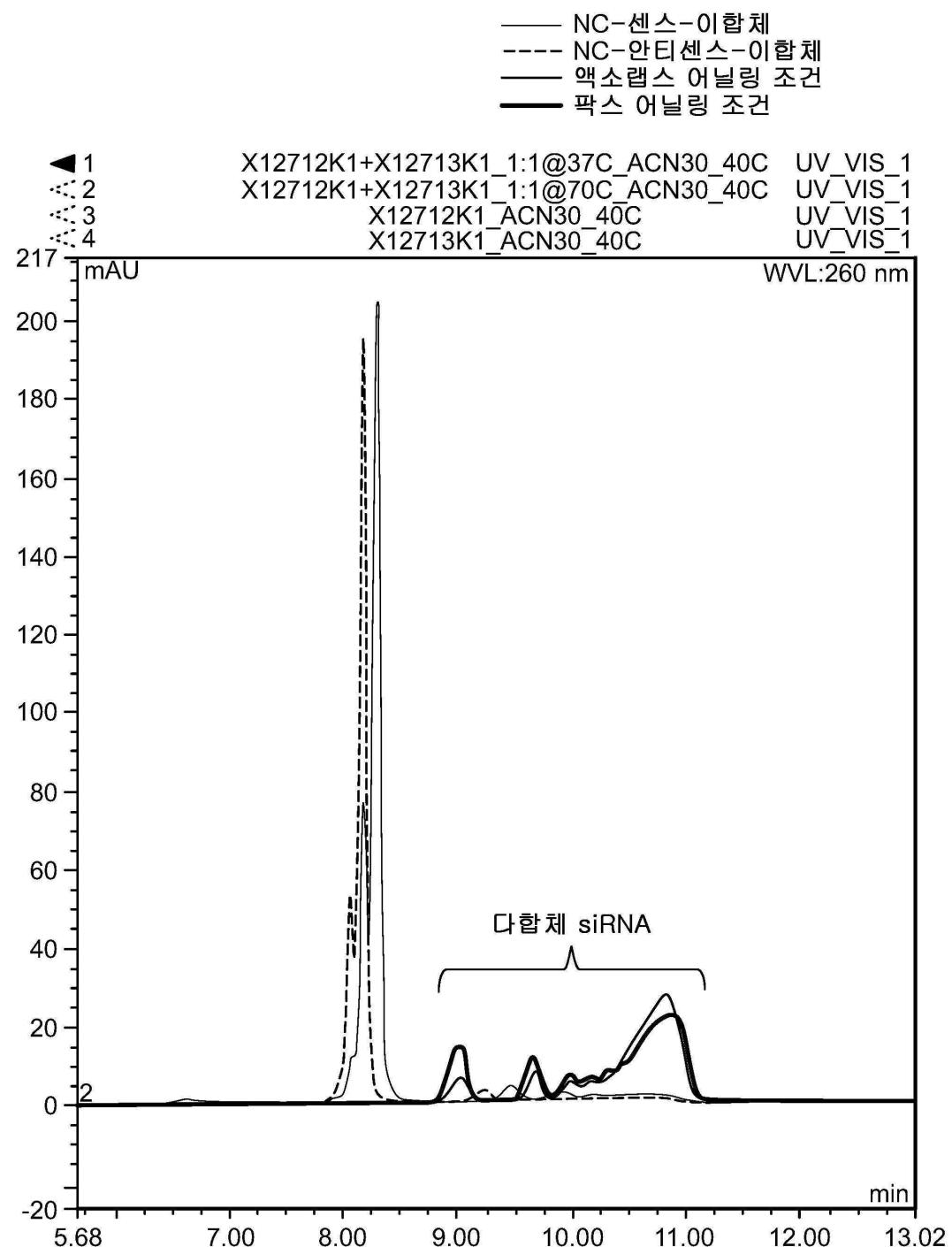
도면27



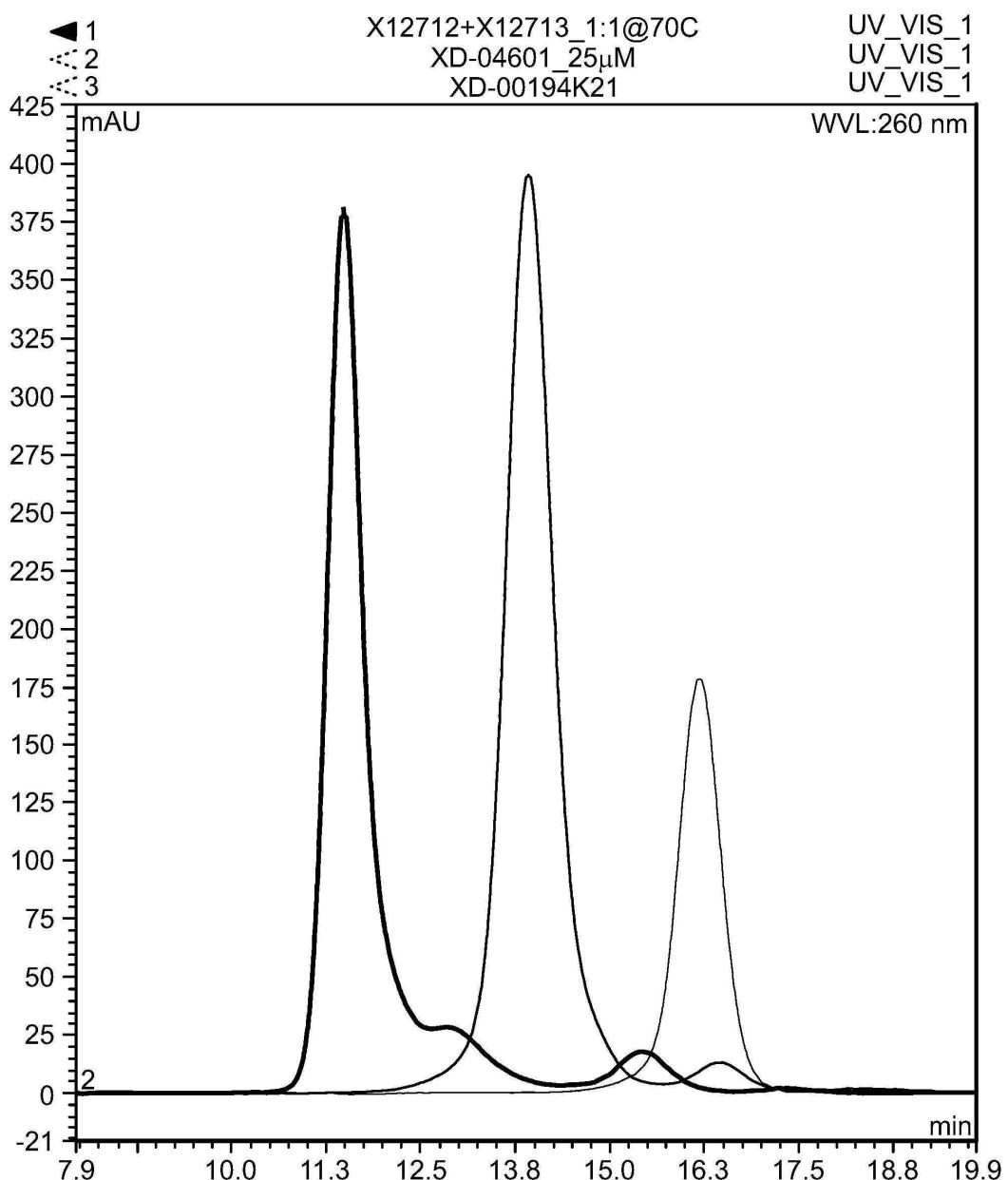
도면28



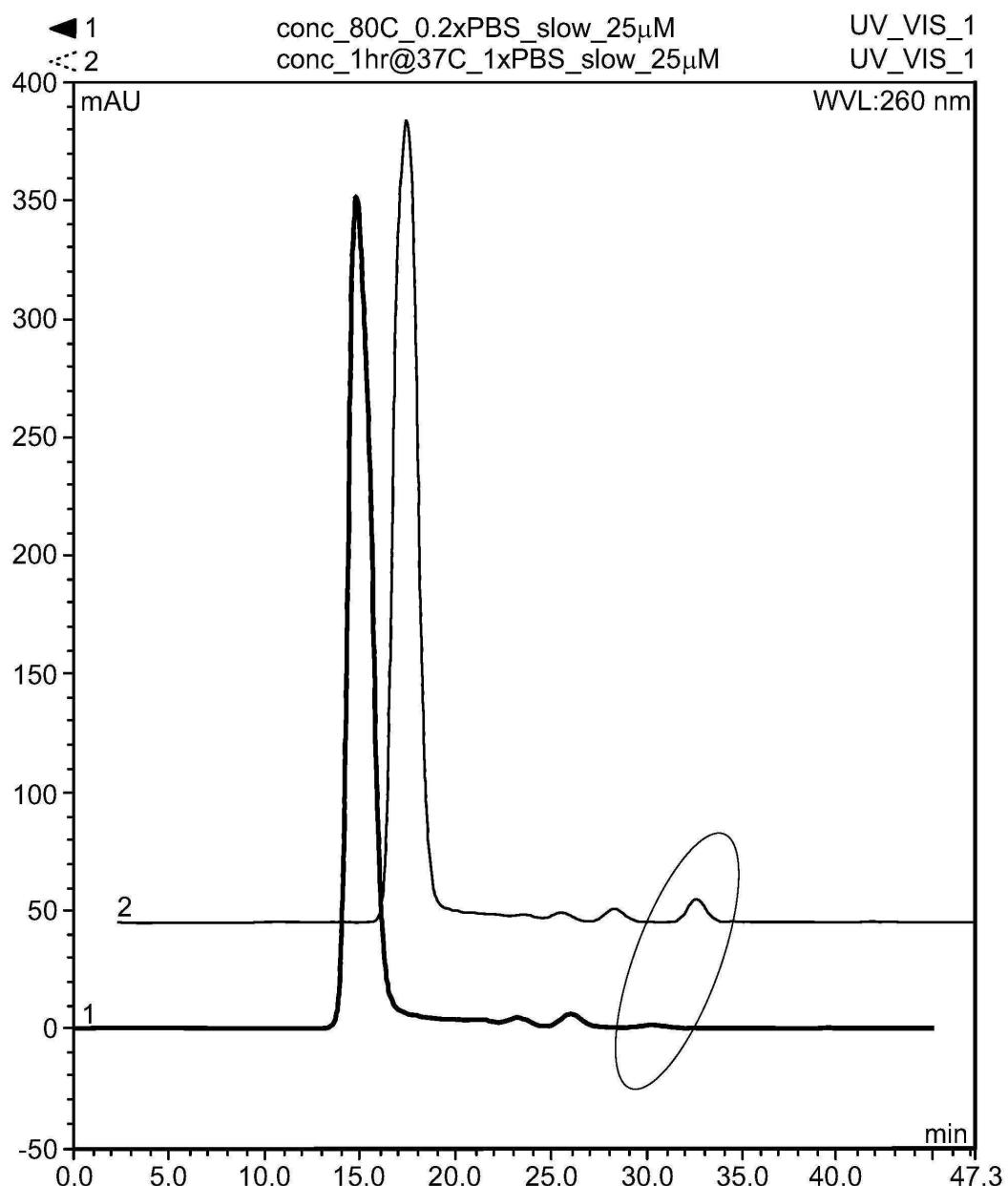
도면29



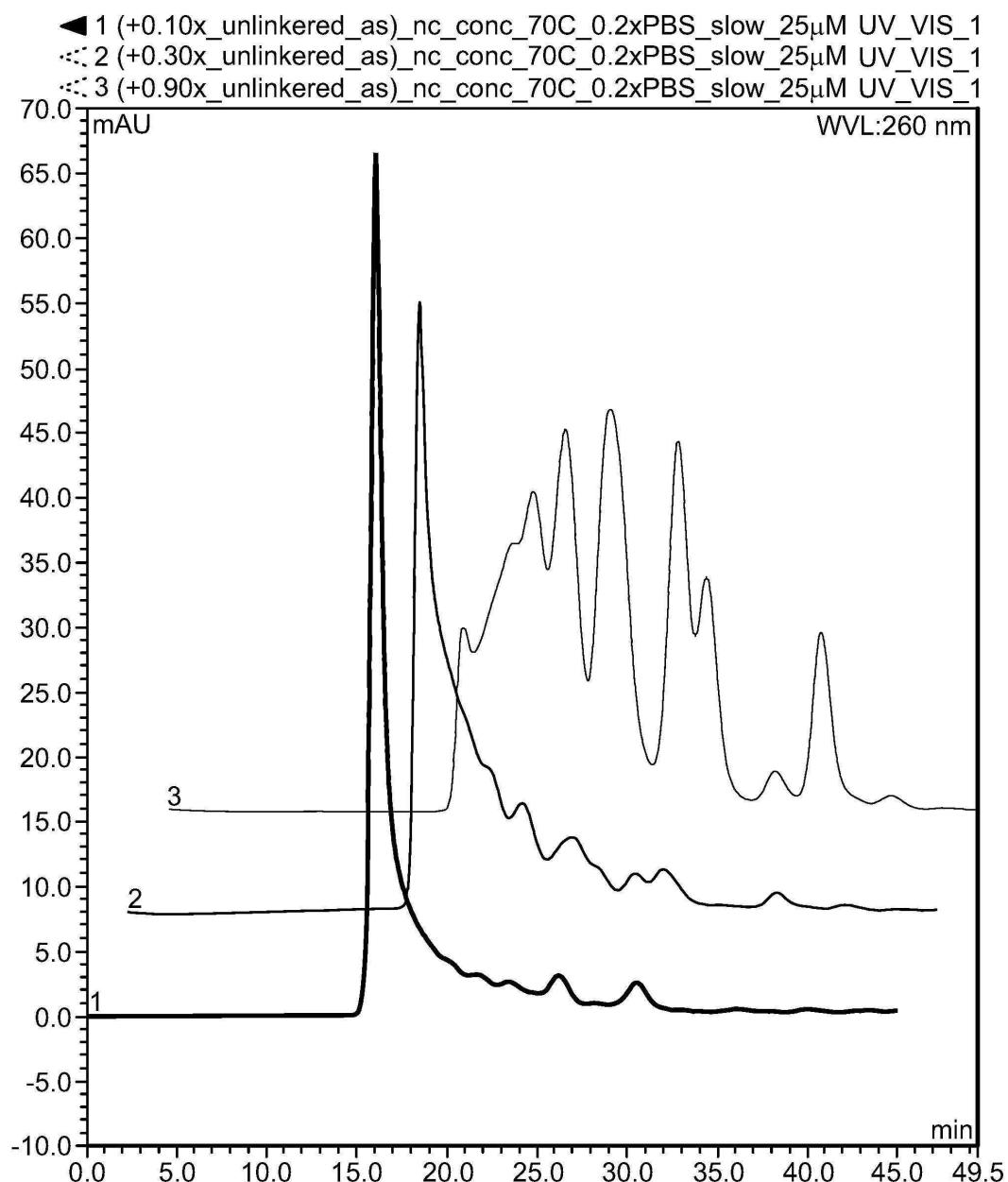
도면30



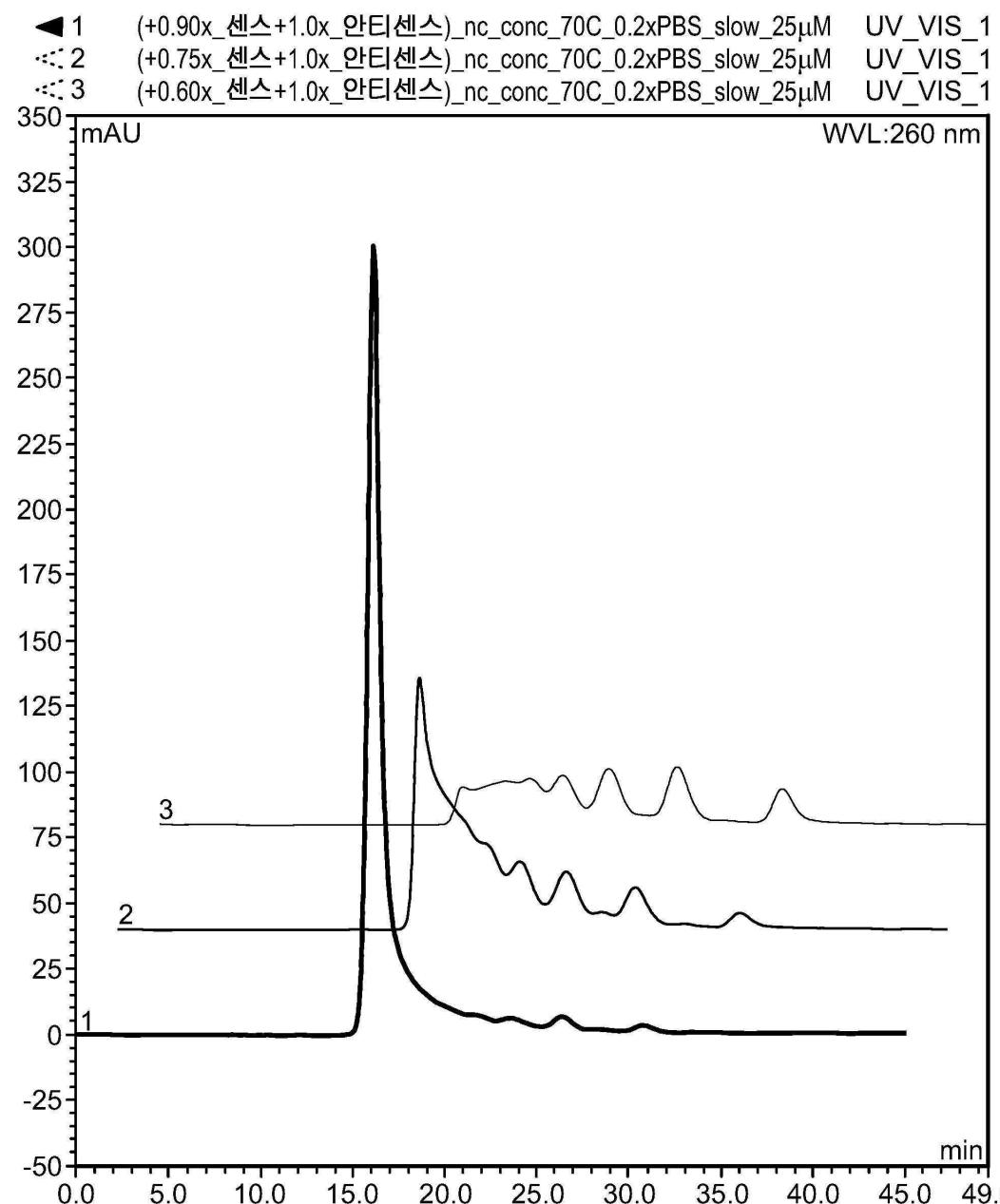
도면31



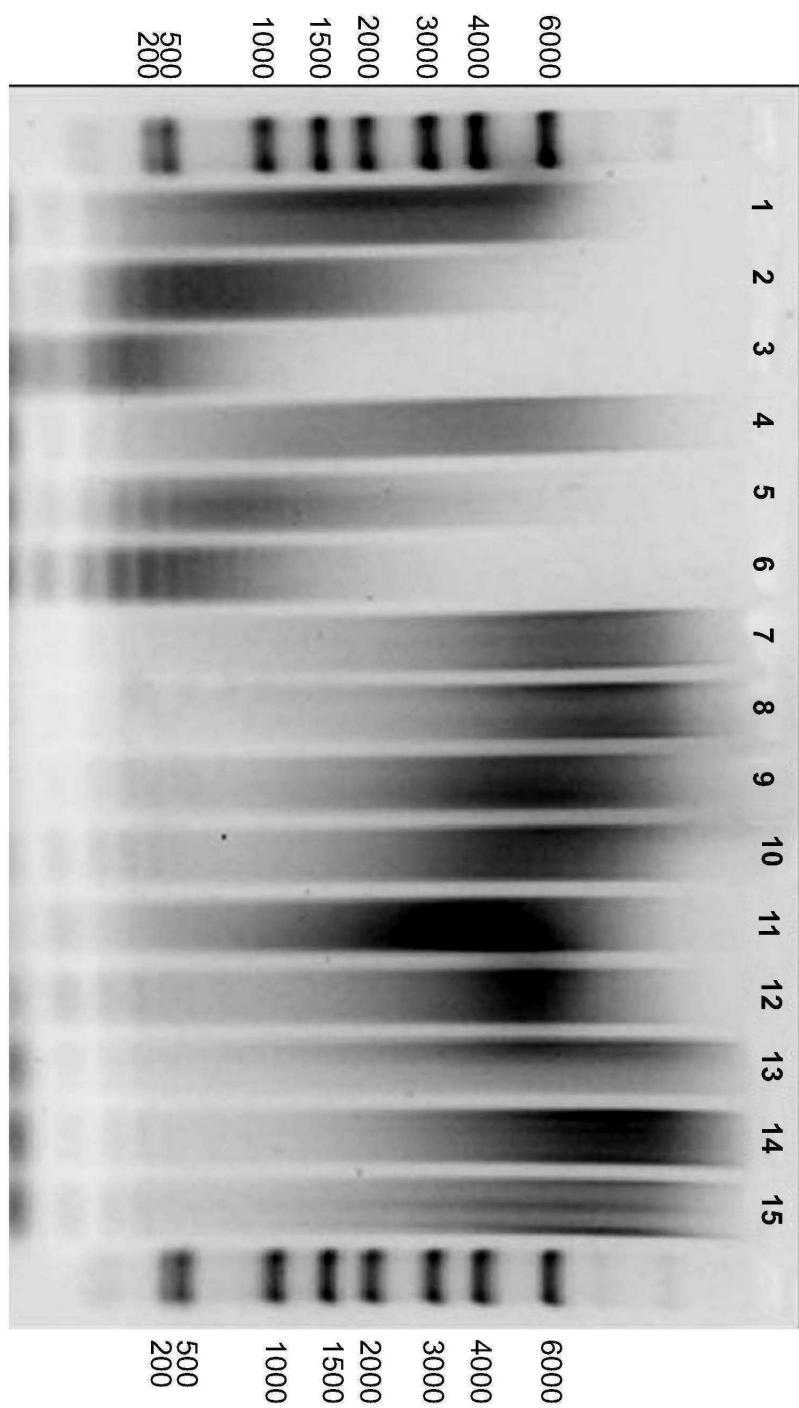
도면32



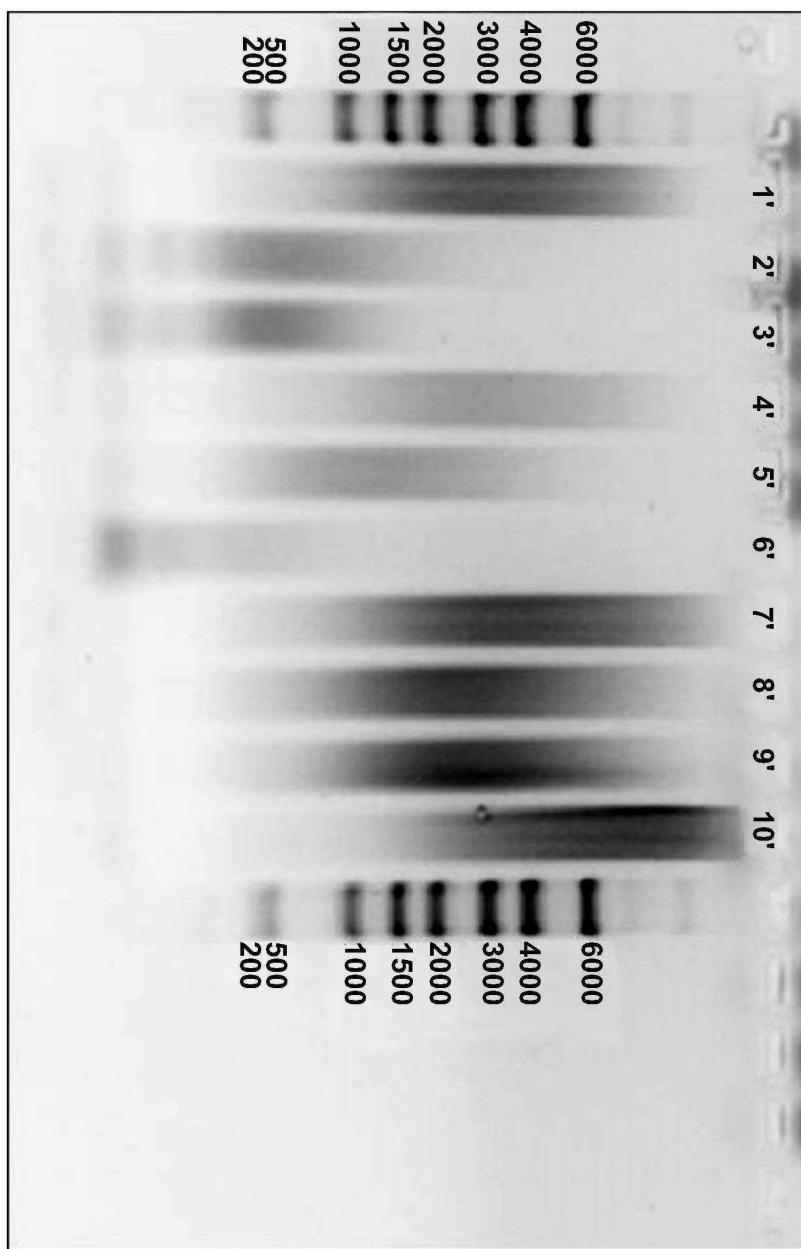
도면33



도면34a

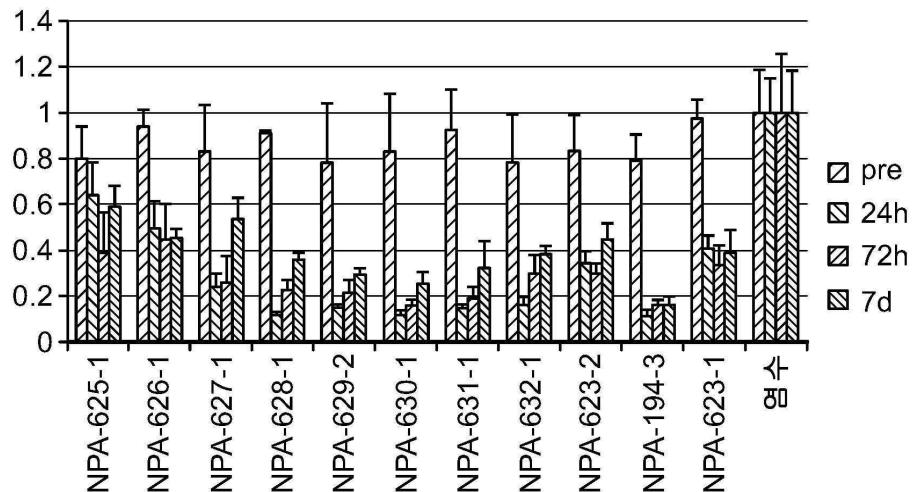


도면34b



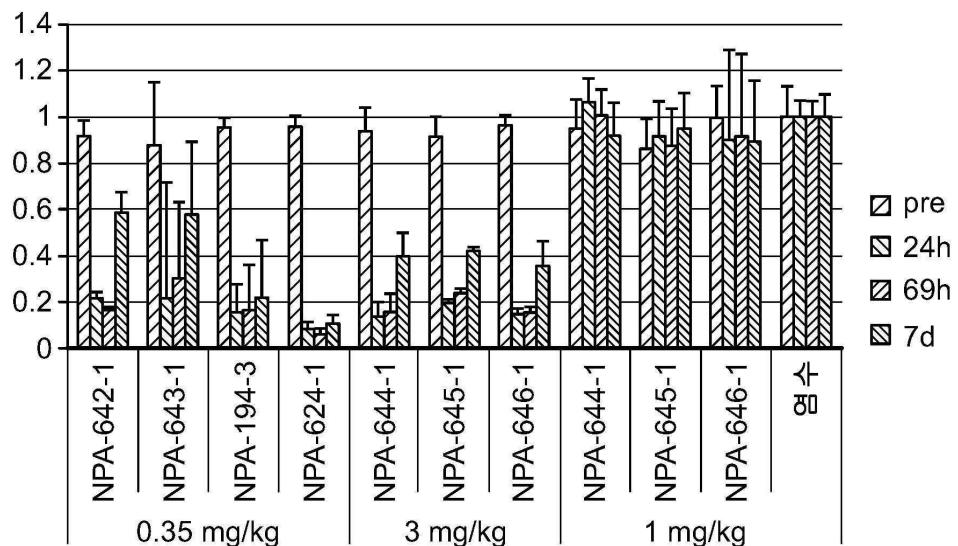
도면35

MausRNAi_TV29 – 혈청 중 FVII 활성
염수 처치된 동물=1

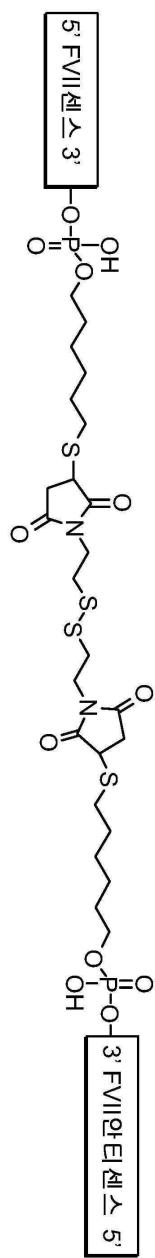


도면36

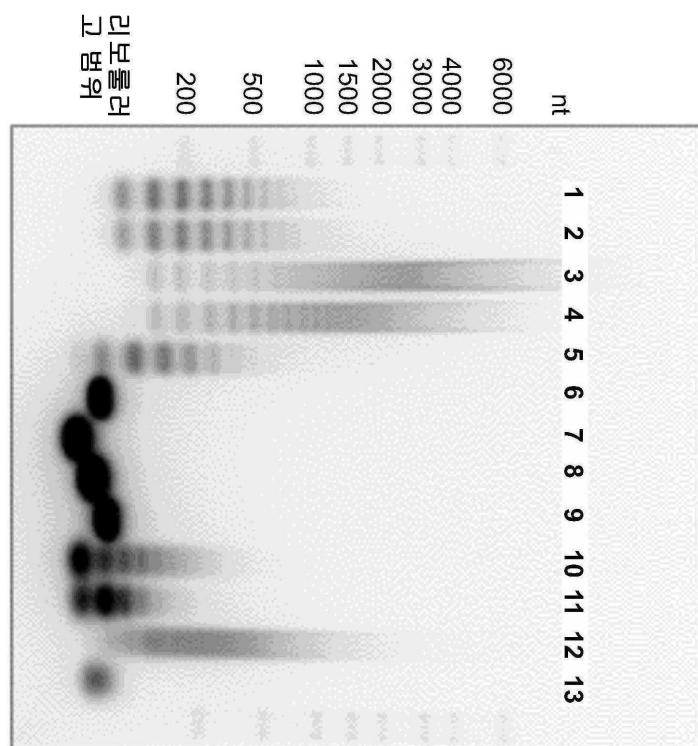
MausRNAi_TV30 – 혈청 중 FVII 활성
염수 처치된 동물=1



도면37



도면38

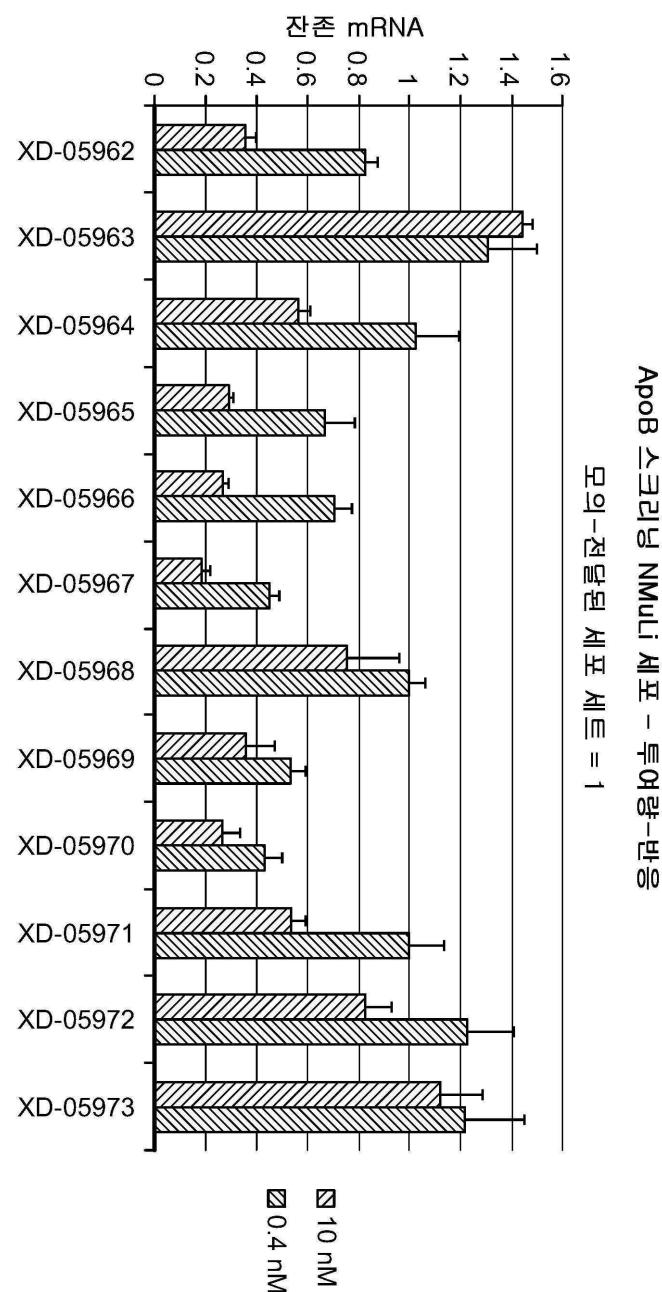


1. XD-05305 K1: “래인 6” 절단 불가능
2. XD-05306 K1: “래인 6” 절단 가능
3. XD-05307 K1: s-c-s + as-nc-as
4. XD-05308 K1: s-nc-s + as-c-as
5. XD-05309 K1: ⑤사합체 siRNA
6. XD-05310 K1: ⑥이합체 siRNA
7. XD-00376 K3: FVII 정규 siRNA
8. XD-00194 K24: F-LUC 정규 siRNA
9. XD-05311 K1: FVII-안티센스 및 ApoB-안티센스를 갖는 FVII-센스-c-ApoB-센스
10. XD-05312 K1: FVII-센스 및 FVII-안티센스를 갖는 FVII-센스-c-FVII 안티센스 (어닐링 @70°C)
11. XD-05312 K2: FVII-센스 및 FVII-안티센스를 갖는 FVII-센스-c-FVII 안티센스 (어닐링 @ 90°C)
12. X12714 K1: FVII 혜터로이합체
13. X15049 K1: FVII/ApoB 혜터로이합체

1.5 μg/레인
1xTAE 중의 2% 아가로스 겔
140 mA 130 min
질적색 염색 (1:10000)

리보를러
고 범위

도면39



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> MPEG LA, LLC

<120> DEFINED MULTI-CONJUGATE OLIGONUCLEOTIDES

<130> 116244-504

<140> PCT/US16/37685

<141> 2016-06-15

<150> 62/216,318

<151> 2015-09-09
<150> 62/216,317
<151> 2015-09-09
<150> 62/216,314
<151> 2015-09-09
<150> 62/203,243
<151> 2015-08-10
<150> 62/175,718
<151> 2015-06-15
<150> 62/175,714
<151> 2015-06-15
<150> 62/175,709
<151> 2015-06-15
<160> 164
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 1
gcaaaggcg u gccaacucat 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 2

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 3

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 4

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 5

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 6

gcaaaggcggu gccaacucat 20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 7

ugaguuggca cgccuuugcu ut 22

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 8

ugaguuggca cgccuuugcu u 21

<210> 9

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 9

ugaguuggca cgccuuugcu u
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 10

cuauuuggag agaaaaucgat 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 11

cuauuuggag agaaaaucgat 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 12

cuauuuggag agaaaaucgat 20

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 13

ggaucaucuc aagucuuact t

21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 14

guaagacuug agaaugaucct t

21

<210> 15

<400> 15

000

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 16

gcaaaggcgu gccaacucat t

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 17

ugaguuggca cgccuuugct t

21

<210> 18

<400> 18

000

<210> 19

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 19

ggaaucuuau auuugaucca a

21

<210> 20

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 20

uggaucaaa uauaagauuc ccu

23

<210> 21

<400> 21

000

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 22

cuuacgcuga guacuucgat t 21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 23

ucgaaguacu cagcguaagt t 21

<210> 24

<400> 24

000

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 25

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 26

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 26

ugaguuggca cgccuuugcu u 21

<210> 27

<400> 27

000

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 28

cuauuuggag agaaaucgat 20

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 29

ucgauuuucuc uccaaauagu u 21

<210> 30

<400> 30

000

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 31

aacaguguuc uugcucuaua at 22

<210> 32

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 32

uuauagagca agaacacugu uuu 23

<210> 33

<400> 33

000

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 34

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 35

gcaaaggcggu gccaacucat 20

<210> 36

<400> 36

000

<210> 37

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 37

ggaaucuuau auuugaucca a 21

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 38

ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 39

gcaaaggcg u gccaacucat 20

<210> 40

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 40

ugaguuggca cggccuuugcu u 21

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 41

gcaaaggcg u gccaacucat 20

<210> 42

<400> 42

000

<210> 43

<400> 43

000

<210> 44

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 44

uuauagagca agaacacugu uuu 23

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 45

aacaguguuc uugcucuaua at

22

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 46

gcaaaggcgu gccaacucat

20

<210> 47

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 47

uuauagagca agaacacugu uuu

23

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 48

aacaguguuc uugcucuaua at 22

<210> 49

<400> 49

000

<210> 50

<400> 50

000

<210> 51

<400> 51

000

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 52

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 53

<400> 53

000

<210> 54

<400> 54

000

<210> 55

<400> 55

000

<210> 56

<211> 21

<

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 56

ggaucaucuc aagcuaact t

21

<210> 57

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 57

guaagacuug agaugaucct t

21

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 58

ggaucaucuc aagcuaact t

21

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 59

guaagacuug agaugaucct t 21

<210> 60

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 60

ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 61

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 61

guaagacuug agaugaucct t 21

<210> 62

<400> 62

000

<210> 63

<400> 63

000

<210> 64

<400> 64
 000
 <210> 65
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 65
 caaccagugu acccuuaaa 19

<210> 66
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 66
 cuguguacga aguacaaaa 19

<210> 67
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 67
 caaccuauga acuccuaaa 19

<210> 68
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 68

gcuuacggcu caacaauuu	19
<210> 69	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 69	
gcacgugaaug gacuaaucaa	19
<210> 70	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 70	
cuauuuggag agaaaaucga	19
<210> 71	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 71	
gagauuauug aucgaaauca	19
<210> 72	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 72	
ccguguaau cuagcaaaa	19

<210> 73
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 73
 gcauuuagau caauugaga 19
 <210> 74
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 74
 gguuuuuaug gauaaauca 19
 <210> 75
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 75
 gacuuugcag agcaaauuu 19
 <210> 76
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 76
 cuuacggguc aucaaaaaa 19
 <210> 77
 <211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 77

uuuaaggua cacugguug 19

<210> 78

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 78

uuuuguacuu cguacacag 19

<210> 79

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 79

uuuaggaguu cauaggug 19

<210> 80

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 80

aaauuguuga gccguaagc 19

<210> 81

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 81

uugauagucc aucacgugc

19

<210> 82

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 82

ucgauuuucuc uccaaauag

19

<210> 83

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 83

ugauucgauc aaauaucuc

19

<210> 84

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 84

uuuugcuaga uuuacacgg

19

<210> 85

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 85

ucucaaugga ucuaaaugc 19

<210> 86

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 86

ugauuuaucc auuaaaacc 19

<210> 87

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 87

aaauauugcuc ugcaaaguc 19

<210> 88

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 88

uuuuuggaugg acccguaag 19

<210> 89

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 89

caaccagugu acccuuaat t

21

<210> 90

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 90

uuuaaggua cacugguugt t

21

<210> 91

<400> 91

000

<210> 92

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 92

cuguguacga aguacaaaat t

21

<210> 93

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 93

uuuuguacuu cguacacagt t 21

<210> 94

<400> 94

000

<210> 95

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 95

caaccuauga acuccuaat t 21

<210> 96

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 96

uuuaggaguu cauaggugt t 21

<210> 97

<400> 97

000

<210> 98

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 98

gcuuacggcu caacaauuut t

21

<210> 99

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 99

aaaauuguuga gccguaagct t

21

<210> 100

<400> 100

000

<210> 101

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 101

gcacgugaug gacuaauaat t

21

<210> 102

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 102

uugauagucc aucacgugct t

21

<210> 103

<400> 103

000

<210> 104

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 104

cuauuuggag agaaaaugat t

21

<210> 105

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 105

ucgauuucuc uccaaauagt t

21

<210> 106

<400> 106

000

<210> 107

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 107

gagauuuauug aucgaaucat t

21

<210> 108

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 108

ugauucgauc aaauaacuct t

21

<210> 109

<400> 109

000

<210> 110

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 110

ccguguaau cuagcaaaat t

21

<210> 111

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 111

uuuugcuaga uuuacacgg t

21

<210> 112

<400> 112

000

<210> 113

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 113

gcauuuagau caauugagat t

21

<210> 114

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 114

ucucaauuga ucuaaaugct t

21

<210> 115

<400> 115

000

<210> 116

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 116

gguuuuaaug gauaaucat t

21

<210> 117

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 117

ugauuuaucc auuaaaacct t

21

<210> 118

<400> 118

000

<210> 119

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 119

gacuuugcag agcaaauut t 21

<210> 120

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 120

aauauugcuc ugcaaaguct t 21

<210> 121

<400> 121

000

<210> 122

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 122

cuuacggguc auccaaaaat t 21

<210> 123

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 123
 uuuuuggaaug acccguaagt t 21

<210> 124
 <400> 124
 000
 <210> 125
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 125
 ggaucaucuc aagucuuact t 21
 <210> 126
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 126
 guaagacuug agaaugaucct t 21
 <210> 127
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 127

gcaaaggcg gu gccaaacucat 20

<210> 128

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 128

ugaguuggca cgc cuu uugcu u 21

<210> 129

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 129

cuauuuggag agaaaucgat 20

<210> 130

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 130

ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 131

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 131

guaagacuug agaaugaucct t

21

<210> 132

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 132

ucgauuuucuc uccaaauagu u

21

<210> 133

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 133

gcaaaggcggu gccaaacucat

20

<210> 134

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide
<400> 134
cuauuuggag agaaaucgat 20
<210> 135
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 135
aacaguguuc uugcucuaua at 22
<210> 136
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 136
ucgauuuucuc uccaaauagu u 21
<210> 137
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 137
gcaaaggcgu gccaaacucat 20
<210> 138
<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 138

gcaaaggcgu gccaacucat

20

<210> 139

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 139

ugaguuggca cgccuuugcu u

21

<210> 140

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 140

cuauuuggag agaaaaucgat

20

<210> 141

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 141

ucgauuuucuc	uccaaauagu	u	21	
<210> 142				
<211> 22				
<212> DNA				
<213> Artificial Sequence				
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic				
oligonucleotide				
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic				
oligonucleotide				
<400> 142				
aacaguguuc				
uugcucuaua				
at				22
<210> 143				
<211> 23				
<212> RNA				
<213> Artificial Sequence				
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic				
oligonucleotide				
<400> 143				
uuauagagca				
agaacacugu				
uuu				23
<210> 144				
<211> 20				
<212> DNA				
<213> Artificial Sequence				
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic				
oligonucleotide				
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic				
oligonucleotide				
<400> 144				
cuauuuggag				
agaaaaucgat				20
<210> 145				
<211> 22				
<212> DNA				
<213> Artificial Sequence				

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 145

aacaguguuc uugcucuaua at 22

<210> 146

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 146

ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 147

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 147

guaagacuug agaaugaucct t 21

<210> 148

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 148

ggaucaucuc aagucuuact t

21

<210> 149

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 149

guaagacuug agaugaucct t

21

<210> 150

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 150

ggaucaucuc aagucuuact t

21

<210> 151

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 151

ggaucaucuc aagucuuact t

21

<210> 152

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 152

guaagacuug agaaugaucct t

21

<210> 153

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 153

guaagacuug agaaugaucct t

21

<210> 154

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 154

ggaucaucuc aagucuuact t

21

<210> 155

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 155

ggaucaucuc aagucuuact t

21

<210> 156

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 156

guaagacuug agaugaucct t

21

<210> 157

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 157

guaagacuug agaugaucct t

21

<210> 158

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 158

guaagacuug agaaugaucct t 21

<210> 159

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 159

ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 160

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 160

ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 161

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 161

guaagacuug agaaugaucct t

21

<210> 162

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 162

ggaucaucuc aagucuuact t

21

<210> 163

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 163

ggaucaucuc aagucuuact t

21

<210> 164

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 164

guaagacuug agaaugaucct t

21