



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0136644  
(43) 공개일자 2023년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**C12N 15/113** (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
**C12N 15/113** (2013.01)  
**C12N 2310/14** (2013.01)  
(21) 출원번호 **10-2023-7029336**  
(22) 출원일자(국제) **2022년01월28일**  
심사청구일자 **없음**  
(85) 번역문제출일자 **2023년08월29일**  
(86) 국제출원번호 **PCT/EP2022/052070**  
(87) 국제공개번호 **WO 2022/162155**  
국제공개일자 **2022년08월04일**  
(30) 우선권주장  
63/143,805 2021년01월30일 미국(US)  
(뒷면에 계속)

(71) 출원인  
**이-테라퓨틱스 피엘씨**  
영국, 런던 더블유2 6비디, 4 킹덤 스트리트, 레벨 4, 유닛 4비  
(72) 발명자  
**모르타자비, 아마드 알리**  
영국, 런던 더블유2 6비디, 4 킹덤 스트리트, 레벨 4, 유닛 4비, 이-테라퓨틱스 피엘씨 내  
**만넬라, 비비아나**  
영국, 런던 더블유2 6비디, 4 킹덤 스트리트, 레벨 4, 유닛 4비, 이-테라퓨틱스 피엘씨 내  
**자야라만, 무투삼미**  
영국, 런던 더블유2 6비디, 4 킹덤 스트리트, 레벨 4, 유닛 4비, 이-테라퓨틱스 피엘씨 내  
(74) 대리인  
**특허법인더웨이브**

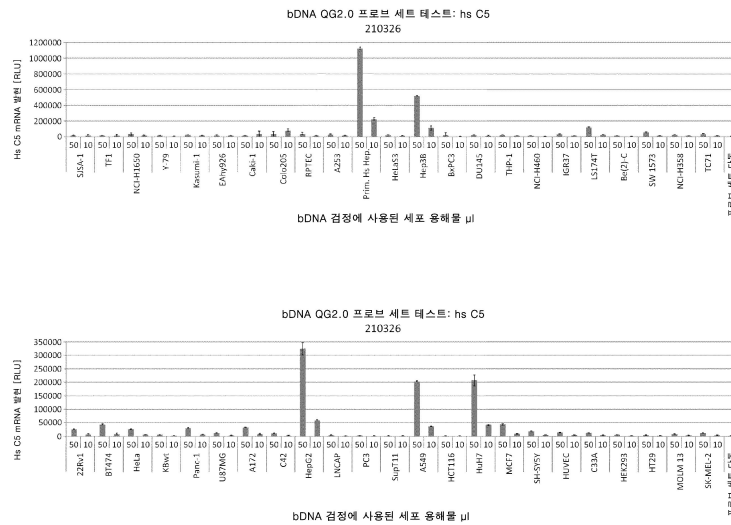
전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) 발명의 명칭 **무염기 뉴클레오타이드를 함유하는 핵산**

(57) 요약

본 발명은 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 핵산 분자에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

*C12N 2310/315* (2013.01)

*C12N 2310/317* (2013.01)

*C12N 2310/332* (2013.01)

*C12N 2310/343* (2013.01)

*C12N 2310/344* (2013.01)

*C12N 2310/351* (2013.01)

(30) 우선권주장

63/262,316 2021년10월08일 미국(US)

63/271,684 2021년10월25일 미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

제1 가닥의 적어도 일부와 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적인 제2 가닥의 적어도 일부를 포함하는 적어도 하나의 듀플렉스 영역(duplex region)을 포함하는, 세포에서 표적 유전자의 발현을 억제하기 위한, 선택적으로 RNA인, 핵산으로서,

상기 제1 가닥은 억제될 상기 표적 유전자로부터 전사된 RNA의 적어도 일부에 적어도 부분적으로 상보적이며,

제2 가닥은 제2 가닥의 말단 영역에서 하나 이상의 무염기 뉴클레오티드(abasic nucleotide)를 포함하고, 상기 무염기 뉴클레오티드(들)는 역방향 뉴클레오티드간 연결(reversed internucleotide linkage)을 통해 인접한 뉴클레오티드에 연결되는 핵산.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 제2 가닥이 다음을 포함하는 핵산:

- i 제2 가닥의 말단 영역에 있는 2개 또는 2개 초과 무염기 뉴클레오티드; 및/또는
  - ii 제2 가닥의 5' 또는 3' 말단 영역에 있는 2개 또는 2개 초과 무염기 뉴클레오티드; 및/또는
  - iii 제2 가닥의 5' 또는 3' 말단 영역에 있는 2개 또는 2개 초과 무염기 뉴클레오티드로서, 무염기 뉴클레오티드는 본원에 기술된 바와 같은 오버행(overhang)으로 존재함; 및/또는
  - iv 제2 가닥의 말단 영역에 있는 2개 또는 2개 초과 연속 무염기 뉴클레오티드로서, 바람직하게는 이러한 무염기 뉴클레오티드 중 하나는 말단 뉴클레오티드임; 및/또는
  - v 제2 가닥의 5' 또는 3' 말단 영역에 있는 2개 또는 2개 초과 연속 무염기 뉴클레오티드로서, 바람직하게는 이러한 무염기 뉴클레오티드 중 하나는 제2 가닥의 5' 또는 3' 말단 영역의 말단 뉴클레오티드임; 및/또는
  - vi 역방향 뉴클레오티드간 연결은 적어도 하나의 무염기 뉴클레오티드를 제2 가닥의 말단 영역에서 인접한 염기 뉴클레오티드에 연결함; 및/또는
  - vii 역방향 뉴클레오티드간 연결은 적어도 하나의 무염기 뉴클레오티드를 제2 가닥의 5' 또는 3' 말단 영역에서 인접한 염기 뉴클레오티드에 연결함; 및/또는
  - viii 말단 뉴클레오티드가 아닌 뉴클레오티드에 역방향 연결을 통해 연결된 끝에서 두 번째(penultimate) 뉴클레오티드로서의 무염기 뉴클레오티드(본원에서 끝에서 세 번째(antepenultimate) 뉴클레오티드라고 함); 및/또는
  - ix 말단 뉴클레오티드를 포함하는 말단을 향하는 방향으로 가닥을 읽을 때 5'-3' 연결을 통해 연결된 2개의 말단 뉴클레오티드로서의 무염기 뉴클레오티드;
  - x 말단 뉴클레오티드를 포함하는 말단을 향하는 방향으로 가닥을 읽을 때 3'-5' 연결을 통해 연결된 2개의 말단 뉴클레오티드로서의 무염기 뉴클레오티드;
  - x i 말단 2개의 위치로서의 무염기 뉴클레오티드로서, 끝에서 두 번째 뉴클레오티드는 역방향 연결을 통해 끝에서 세 번째 뉴클레오티드에 연결되고, 역방향 연결은 5-5' 역방향 연결 또는 3'-3' 역방향 연결임;
  - x ii 말단 2개의 위치로서의 무염기 뉴클레오티드로서, 끝에서 두 번째 뉴클레오티드는 역방향 연결을 통해 끝에서 세 번째 뉴클레오티드에 연결되고, 여기서
- (1) 역방향 연결은 5-5' 역방향 연결이고, 말단 및 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오티드를 포함하는 말단을 향해 읽을 때 말단 무염기 뉴클레오티드와 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오티드 사이의 연결은 3'5'임; 또는
- (2) 역방향 연결은 3-3' 역방향 연결이고, 말단 및 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오티드를 포함하는 말단을 향해 읽을 때 말단 무염기 뉴클레오티드와 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오티드 사이의 연결은 5'3'임.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 역방향 뉴클레오티드간 연결이 3'3 역방향 연결인 핵산.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 역방향 뉴클레오티드간 연결이 제2 가닥의 5' 말단 영역에서 먼 말단 영역에 있거나, 제2 가닥의 3' 말단 영역에서 먼 말단 영역에 있는 핵산.

### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 역방향 뉴클레오티드간 연결이 5'5 역방향 연결인 핵산.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 역방향 뉴클레오티드간 연결이 제2 가닥의 5' 말단 영역에서 먼 말단 영역에 있거나, 제2 가닥의 3' 말단 영역에서 먼 말단 영역에 있는 핵산.

### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

- i) 핵산의 제1 가닥이 15 내지 30개의 뉴클레오티드 범위, 바람직하게는 19 내지 25개의 뉴클레오티드 범위, 더욱 바람직하게는 23개 또는 25개의 뉴클레오티드의 길이이고/이거나;
- ii) 핵산의 제2 가닥이 15 내지 30개의 뉴클레오티드 범위, 바람직하게는 19 내지 25개의 뉴클레오티드 범위, 더욱 바람직하게는 23개의 뉴클레오티드의 길이인 핵산.

### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 가닥 및/또는 제2 가닥 상의 하나 이상의 뉴클레오티드가 변형되어 변형된 뉴클레오티드를 형성하는 핵산.

### 청구항 9

제8항에 있어서, 변형이 2'-Me 또는 2'-F 변형으로부터 선택적으로 선택되는, 리보스 당(ribose sugar)의 2'-OH 그룹에서의 변형인 핵산.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 제1 가닥이 상기 제2 가닥의 위치 1로부터 세어서 위치 14, 위치 2, 위치 6 또는 이들의 임의의 조합 중 임의의 위치에 2'-F를 포함하는 핵산.

### 청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 제2 가닥이 상기 제2 가닥의 위치 1로부터 세어서 위치 7 및/또는 위치 9, 및/또는 위치 11 및/또는 위치 13에 2'-F 변형을 포함하는 핵산.

### 청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 가닥 각각이 2'-Me 및 2'-F 변형을 포함하는 핵산.

### 청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 적합하게는 제1 가닥의 위치 1 내지 9 중 하나 이상에서, 및/또는 제1 가닥의 위치 1 내지 9와 정렬된 제2 가닥 상의 하나 이상의 위치에서 적어도 하나의 열적 불안정화 변형(thermally destabilizing modification)을 포함하고, 불안정화 변형은 변형된 잠금해제 핵산(IMUNA) 및 글리콜 핵산(GNA)으로부터 선택되는, 바람직하게는 글리콜 핵산인 핵산.

### 청구항 14



제13항에 있어서, 용융 온도가 약 40 내지 80℃ 범위인 이중 가닥 분자, 바람직하게는 이중 가닥 RNA인 핵산.

#### 청구항 15

제14항 또는 제15항에 있어서, 제1 가닥의 위치 7에 적어도 하나의 열적 불안정화 변형을 포함하는 핵산.

#### 청구항 16

제9항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 상기 제2 가닥의 위치 1로부터 세어서 제2 가닥의 위치 7 내지 13에 3개 이상의 2'-F 변형을 포함하는, 예컨대 제2 가닥의 위치 7 내지 13에 4, 5, 6 또는 7개의 2'-F 변형을 포함하는 핵산.

#### 청구항 17

제9항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 가닥이 상기 제2 가닥의 위치 1로부터 세어서 제2 가닥의 위치 1 내지 6에 적어도 3개, 예컨대 4, 5 또는 6개의 2'-Me 변형을 포함하는 핵산.

#### 청구항 18

제9항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 가닥이 3' 말단 영역에서 적어도 5개의 2'-Me 연속 변형을 포함하고, 바람직하게는 3' 말단 영역에서 말단 뉴클레오타이드를 포함하거나, 3' 말단 영역에서 말단 뉴클레오타이드로부터 적어도 1개 또는 2개 이내의 뉴클레오타이드를 포함되는 핵산.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 제1 가닥이 3' 말단 영역에서 7개의 2'-Me 연속 변형을 포함하고, 바람직하게는 3' 말단 영역에서 말단 뉴클레오타이드를 포함하는 핵산.

#### 청구항 20

제9항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:

$$N^A - (N)_{3-5} - N^B$$

여기서 N은 제1 변형을 갖는 뉴클레오타이드를 나타내고;

$N^A$ 는 N의 제1 변형과 상이한 제2 변형을 갖는 뉴클레오타이드를 나타내고;

$N^B$ 는 N의 제1 변형과 상이하지만  $N^A$ 의 제2 변형과 동일하거나 상이한 제3 변형을 갖는 뉴클레오타이드를 나타내고;

여기서 상기 패턴은 제2 가닥을 따라 5'에서 3' 방향성을 갖는다.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 제2 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:

$$N^A - (N)_3 - N^B.$$

#### 청구항 22

제20항에 있어서, 제2 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:

$$N^A - (N)_5 - N^B.$$

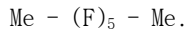
#### 청구항 23

제21항에 있어서, 제2 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:

$$Me - (F)_3 - Me.$$

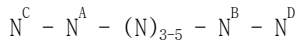
## 청구항 24

제22항에 있어서, 제2 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:



## 청구항 25

제20항에 있어서, 제2 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:



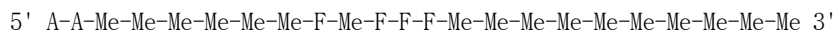
여기서 동일하거나 상이할 수 있는  $N^C$  및  $N^D$ 는 각각 복수의 5' 및 3' 말단 영역 화학적 변형 뉴클레오타이드를 나타내며, 여기서 적어도  $N^C$ 는 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.

## 청구항 26

제25항에 있어서, N<sup>D</sup>가 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오티드, 또는 각각 동일한 변형, 바람직하게는 2'-Me 연속 변형을 갖는 복수의 뉴클레오티드를 포함하는 핵산.

## 청구항 27

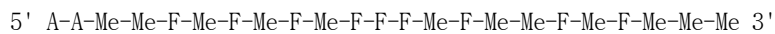
제26항에 있어서, 제2 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:



여기서  $A$ 는 무염기 변형을 나타낸다.

## 청구항 28

제26항에 있어서, 제2 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:



여기서  $A$ 는 무염기 변형을 나타낸다.

## 청구항 29

제26항에 있어서, 제2 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:



여기서  $A$ 는 무염기 변형을 나타낸다.

## 청구항 30

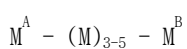
제26항에 있어서, 제2 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:



여기서  $A$ 는 무염기 변형을 나타낸다.

## 청구항 31

제9항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:



여기서 M은 제1 변형을 갖는 뉴클레오티드를 나타내고, 전형적으로 (M)<sub>3-5</sub>는 제20항에 정의된 바와 같은 상기 제 2 가닥의 (N)<sub>3-5</sub>와 실질적으로 정렬되고;

$M^A$ 는 M의 제1 변형과 상이한 제2 변형을 갖는 뉴클레오티드를 나타내고;

$M^B$ 는 M의 제1 변형과 상이하지만  $M^A$ 의 제2 변형과 동일하거나 상이한 제3 변형을 갖는 뉴클레오티드를 나타낸다.

### 청구항 32

제31항에 있어서, 제1 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:

$$M^A - (M)_3 - M^B.$$

### 청구항 33

제31항에 있어서, 제1 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:

$$M^A - (M)_4 - M^B.$$

### 청구항 34

제31항에 있어서, 제1 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:

$$M^A - (M)_5 - M^B.$$

### 청구항 35

제32항에 있어서, 제1 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:

$$F - (Me)_3 - F.$$

### 청구항 36

제33항에 있어서, 제1 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:

$$F - (Me)_4 - F.$$

### 청구항 37

제34항에 있어서, 제1 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:

$$F - (Me)_5 - F.$$

### 청구항 38

제31항에 있어서, 제1 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:

$$M^C - M^A - (M)_{3-5} - M^B - M^D$$

여기서 동일하거나 상이할 수 있는  $M^C$  및  $M^D$ 는 각각 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오티드를 각각 포함하는 복수의 5' 및 3' 말단 영역 화학적 변형 뉴클레오티드를 나타낸다.

### 청구항 39

제38항에 있어서, 제1 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:

$$3' \text{ Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-Me-Me-Me-F-Me } 5'.$$

### 청구항 40

제38항에 있어서, 제1 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:

$$3' \text{ H-H-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-F-Me-F-F-Me } 5'.$$

**청구항 41**

제38항에 있어서, 제1 가닥이 하기 변형 패턴을 포함하는 핵산:

3' Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-F-Me 5'.

**청구항 42**

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 가닥의 5' 또는 3' 말단 근처 영역에서 적어도 3개의 연속 위치 사이에 각각 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결을 추가로 포함하고, 이에 의해 상기 말단 근처 영역은 바람직하게는 상기 제2 가닥의 상기 하나 이상의 무염기 뉴클레오티드가 위치하는 인접한 상기 말단 영역인 핵산.

**청구항 43**

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 가닥의 5' 및/또는 3' 말단 영역에서 적어도 3개의 연속 위치 사이에 각각 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결을 추가로 포함하고, 이에 의해 바람직하게는 상기 제1 가닥의 5' 및/또는 3' 말단 영역은 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결에 의해 인접한 위치에 부착되는 핵산.

**청구항 44**

세포에서 표적 유전자의 발현을 억제하기 위한 접합체로서, 제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 따른 핵산을 포함하는 핵산 부분 및 하나 이상의 리간드 모이어터를 포함하는 접합체.

**청구항 45**

제44항에 있어서, 핵산의 제2 가닥이 하나 이상의 리간드 부분(들)에 직접적으로 또는 간접적으로 접합되고, 상기 리간드 모이어터는 전형적으로 제2 가닥의 말단 영역, 바람직하게는 이의 3' 말단 영역에 존재하는 접합체.

**청구항 46**

제44항 또는 제45항에 있어서, 리간드 모이어터가

- i) 하나 이상의 GalNAc 리간드; 및/또는
- ii) 하나 이상의 GalNAc 리간드 유도체; 및/또는
- iii) 링커를 통해 상기 핵산에 접합된 하나 이상의 GalNAc 리간드를 포함하는 접합체.

**청구항 47**

제46항에 있어서, 상기 GalNAc 리간드가 핵산의 제2 가닥의 5' 또는 3' 말단 영역, 바람직하게는 이의 3' 말단 영역에 직접적으로 또는 간접적으로 접합되는 접합체.

**청구항 48**

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 따른 핵산 또는 제44항 내지 제47항 중 어느 한 항에 따른 접합체 및 생리학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

**발명의 설명****기술 분야**

[0001] 본 발명은 치료용으로 적합한 핵산 화합물인 신규 올리고뉴클레오티드 화합물을 제공한다. 추가로, 본 발명은 이러한 화합물을 제조하는 방법은 물론 다양한 질환 및 병태의 치료를 위해 이러한 화합물을 사용하는 방법을 제공한다.

**배경 기술**

[0002] 올리고뉴클레오티드 화합물은 의학에서 중요한 치료 용도를 갖는다. 올리고뉴클레오티드는 특정 질환의 원인이

되는 유전자를 침묵시키는 데 사용할 수 있다. 유전자 침묵(gene-silencing)은 번역을 억제하여 단백질의 형성을 방지한다. 중요한 것은 유전자 침묵제가 질환과 관련된 단백질의 기능을 억제하는 전통적인 작은 유기 화합물에 대한 유망한 대안이라는 것이다. siRNA, 안티센스(antisense) RNA 및 마이크로 RNA(micro-RNA)는 유전자 침묵으로 단백질의 형성을 방지하는 올리고뉴클레오타이드이다.

[0003] 중추 신경계 질환, 염증성 질환, 대사 장애, 종양학, 전염병 및 안과 질환을 포함하는 다양한 질환의 치료를 위한 siRNA/RNAi 치료제를 포함하여, 진단 및 치료 목적을 위해 특히 지난 20년 동안 다수의 변형된 siRNA 화합물이 개발되었다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 핵산 화합물인 이러한 올리고뉴클레오타이드 화합물에 관한 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0005] 제1 가닥의 적어도 일부와 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적인 제2 가닥의 적어도 일부를 포함하는 적어도 하나의 듀플렉스 영역(duplex region)을 포함하는, 세포에서 표적 유전자의 발현을 억제하기 위한, 선택적으로 RNA인, 핵산으로서, 상기 제1 가닥은 억제될 상기 표적 유전자로부터 전사된 RNA의 적어도 일부에 적어도 부분적으로 상보적이며, 제2 가닥은 제2 가닥의 말단 영역에서 하나 이상의 무염기 뉴클레오타이드(abasic nucleotide)를 포함하고, 상기 무염기 뉴클레오타이드(들)는 역방향 뉴클레오타이드간 연결(reversed internucleotide linkage)을 통해 인접한 뉴클레오타이드에 연결되는 핵산.

[0006] 세포에서 표적 유전자의 발현을 억제하기 위한 접합체로서, 본원에 개시된 바와 같은 핵산을 포함하는 핵산 부분 및 하나 이상의 리간드 모이어티를 포함하는 접합체.

[0007] 본원에 개시된 바와 같은 핵산 또는 본원에 개시된 바와 같은 접합체 및 생리학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

### 도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은 총 45개의 인간 유래 암세포 용해물 및 1차 인간 간세포(primary human hepatocyte, PHH)의 용해물에서의 hsC5 mRNA 발현 수준의 분석을 보여준다. mRNA 발현 수준이 상대 광 단위(relative light unit, RLU)로 표시되어 있다.

도 2는 총 45개의 인간 유래 암세포 용해물 및 1차 인간 간세포(PHH)의 용해물에서의 hsHAO1 mRNA 발현 수준의 분석을 보여준다. mRNA 발현 수준이 상대 광 단위(RLU)로 표시되어 있다.

도 3은 총 45개의 인간 유래 암세포 용해물 및 1차 인간 간세포(PHH)의 용해물에서의 hsTTR mRNA 발현 수준의 분석을 보여준다. mRNA 발현 수준이 상대 광 단위(RLU)로 표시되어 있다.

도 4a-b는 실시예 1의 HepG2 세포에서 hsTTR 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석 결과를 보여준다.

도 5a-b는 실시예 1의 HepG2 세포에서 hsC5 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석 결과를 보여준다.

도 6은 각각 배양 0시간, 24시간, 48시간 및 72시간 후 1차 인간 간세포의 세 배치 BHuf16087(왼쪽), CHF2101(중간) 및 CyHuf19009(오른쪽) 모두에서의 hsTTR(상단), hsC5(중간) 및 hsHAO1(하단) mRNA 발현 수준의 분석을 보여준다. mRNA 발현 수준이 상대 광 단위(RLU)로 표시되어 있다.

도 7은 각각 배양 0시간, 24시간, 48시간 및 72시간 후 1차 인간 간세포의 세 배치 BHuf16087(왼쪽), CHF2101(중간) 및 CyHuf19009(오른쪽) 모두에서의 hsGAPDH(상단) 및 hsAHS1(하단) mRNA 발현 수준의 분석을 보여준다. mRNA 발현 수준이 상대 광 단위(RLU)로 표시되어 있다.

도 8a-b는 실시예 1의 PHH에서 hsHAO1 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석 결과를 보여준다.

도 9a-b는 실시예 1의 PHH에서 hsC5 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석 결과를 보여준다.

도 10a-b는 실시예 1의 PHH에서 hsTTR 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석 결과를 보여준다.

도 11a-b는 실시예 3의 HepG2 세포에서 hsTTR 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석 결과를 보여준다.

도 12a-b는 실시예 3의 HepG2 세포에서 hsC5 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석 결과를 보여준다.

도 13a-b는 실시예 3의 PHH에서 hsHAO1 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석 결과를 보여준다.

도 14a-b는 실시예 3의 PHH에서 hsC5 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석 결과를 보여준다.

도 15a-b는 실시예 3의 PHH에서 hsTTR 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석 결과를 보여준다.

도 16. ETX005의 단일 용량 마우스 약리학. HAO1 mRNA 발현이 식염수 대조군 대비 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 마우스의 평균 및 표준편차를 나타낸다.

도 17. ETX005의 단일 용량 마우스 약리학. 혈청 글리콜레이트 농도가 표시되어 있다. 각 포인트는 5마리 마우스 그룹에서 파생된 기준선 글리콜레이트 농도(0일)를 제외하고 3마리 마우스의 평균 및 표준편차를 나타낸다.

도 18. ETX006의 단일 용량 마우스 약리학. HAO1 mRNA 발현이 식염수 대조군 대비 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 마우스의 평균 및 표준편차를 나타낸다.

도 19. ETX006의 단일 용량 마우스 약리학. 혈청 글리콜레이트 농도가 표시되어 있다. 각 포인트는 5마리 마우스 그룹에서 파생된 기준선 글리콜레이트 농도(0일)를 제외하고 3마리 마우스의 평균 및 표준편차를 나타낸다.

도 20. ETX014의 단일 용량 마우스 약리학. C5 mRNA 발현이 식염수 대조군 대비 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 마우스의 평균 및 표준편차를 나타낸다.

도 21. ETX0014의 단일 용량 마우스 약리학. 혈청 C5 농도가 식염수 대조군 대비 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 마우스의 평균 및 표준편차를 나타낸다.

도 22. ETX015의 단일 용량 마우스 약리학. C5 mRNA 발현이 식염수 대조군 대비 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 마우스의 평균 및 표준편차를 나타낸다.

도 23. ETX0015의 단일 용량 마우스 약리학. 혈청 C5 농도가 식염수 대조군 대비 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 마우스의 평균 및 표준편차를 나타낸다.

도 24. ETX023의 단일 용량 NHP 약리학. 혈청 TTR 농도가 연구 1일 대비 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다.

도 25. ETX024의 단일 용량 NHP 약리학. 혈청 TTR 농도가 연구 1일차 대비 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다.

도 26 ETX019의 단일 용량 NHP 약리학. 혈청 TTR 농도가 연구 1일차 및 투여 전 대비 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 최대 84일의 시점이 표시되어 있다.

도 27 ETX020의 단일 용량 NHP 약리학. 혈청 TTR 농도가 연구 1일차 및 투여 전 대비 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 최대 84일의 시점이 표시되어 있다.

도 28a. ETX023의 단일 용량 NHP 약리학. 혈청 TTR 농도가 연구 1일차 및 투여 전 대비 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 최대 84일의 시점이 표시되어 있다.

도 28b. ETX023의 단일 1mg/kg 용량 투여 후 간에서 TTR 유전자 발현의 지속적인 억제. TTR mRNA가 투여 전 측정된 기준선 수준 대비 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 최대 84일의 시점이 표시되어 있다.

도 28c. ETX023의 단일 1mg/kg 용량을 투여한 동물의 체중. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 최대 84일의 시점이 표시되어 있다.

도 28d ETX023의 단일 1mg/kg 용량으로 처리된 동물의 혈청 내 ALT 농도. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 점선은 이 종에 대해 정상으로 간주되는 값의 범위를 보여준다(Park 등, 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86.) 최대 84일의 시점이 표시되어 있다.

도 28e. ETX023의 단일 1mg/kg 용량으로 처리된 동물의 혈청 내 AST 농도. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 점선은 이 종에 대해 정상으로 간주되는 값의 범위를 보여준다(Park 등, 2016 Reference

values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86. 최대 84일의 시점이 표시되어 있다.

**도 29a.** ETX024의 단일 용량 NHP 약리학. 혈청 TTR 농도가 연구 1일차 및 투여 전 대비 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 최대 84일의 시점이 표시되어 있다.

**도 29b.** ETX024의 단일 1mg/kg 용량 투여 후 간에서 TTR 유전자 발현의 지속적인 억제. TTR mRNA가 투여 전 측정된 기준선 수준 대비 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 최대 84일의 시점이 표시되어 있다.

**도 29c.** ETX024의 단일 1mg/kg 용량을 투여한 동물의 체중. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 최대 84일의 시점이 표시되어 있다.

**도 29d** ETX024의 단일 1mg/kg 용량으로 처리된 동물의 혈청 내 ALT 농도. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 점선은 이 종에 대해 정상으로 간주되는 값의 범위를 보여준다(Park 등, 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86.) 최대 84일의 시점이 표시되어 있다.

**도 29e.** ETX024의 단일 1mg/kg 용량으로 처리된 동물의 혈청 내 AST 농도. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 점선은 이 종에 대해 정상으로 간주되는 값의 범위를 보여준다(Park 등, 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86. 최대 84일의 시점이 표시되어 있다.

#### **도 30** ETX005, 014, 023의 링커 및 리간드 부분

또한, 적절한 경우 제품으로서의 ETX005는 본원에도 묘사된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 모이어티에 부착된 도 30에 구체적으로 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분에 기초한 분자를 포함하지만, 이 ETX005 제품은 대안적으로 링커 및 리간드 부분이 본질적으로 올리고뉴클레오타이드 모이어티에 부착된 도 30에 묘사된 바와 같으나 사이클로-옥틸 고리 상의 도 30에 나타낸 바와 같은 F 치환기가 가수분해 치환의 결과로 발생하는 치환기, 예컨대 OH 치환기로 대체된 분자를 추가로 포함하거나 이로 본질적으로 이루어질 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 방식으로, (a) ETX005는 도 30에 구체적으로 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분을 갖고 사이클로-옥틸 고리 상에 F 치환기를 갖는 분자로 본질적으로 이루어질 수 있거나; (b) ETX005는 도 30에 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분을 본질적으로 갖지만 사이클로-옥틸 고리 상의 도 30에 나타낸 바와 같은 F 치환기가 가수분해 치환의 결과로 발생하는 치환기, 예컨대 OH 치환기로 대체된 분자로 본질적으로 이루어질 수 있거나, (c) ETX005는 (a) 및/또는 (b)에서 정의된 바와 같은 분자의 혼합물을 포함할 수 있다.

또한, 적절한 경우 제품으로서의 ETX014는 본원에도 묘사된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 모이어티에 부착된 도 30에 구체적으로 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분에 기초한 분자를 포함하지만, 이 ETX014 제품은 대안적으로 링커 및 리간드 부분이 본질적으로 올리고뉴클레오타이드 모이어티에 부착된 도 30에 묘사된 바와 같으나 사이클로-옥틸 고리 상의 도 30에 나타낸 바와 같은 F 치환기가 가수분해 치환의 결과로 발생하는 치환기, 예컨대 OH 치환기로 대체된 분자를 추가로 포함하거나 이로 본질적으로 이루어질 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 방식으로, (a) ETX014는 도 30에 구체적으로 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분을 갖고 사이클로-옥틸 고리 상에 F 치환기를 갖는 분자로 본질적으로 이루어질 수 있거나; (b) ETX014는 도 30에 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분을 본질적으로 갖지만 사이클로-옥틸 고리 상의 도 30에 나타낸 바와 같은 F 치환기가 가수분해 치환의 결과로 발생하는 치환기, 예컨대 OH 치환기로 대체된 분자로 본질적으로 이루어질 수 있거나, (c) ETX014는 (a) 및/또는 (b)에서 정의된 바와 같은 분자의 혼합물을 포함할 수 있다.

또한, 적절한 경우 제품으로서의 ETX023은 본원에도 묘사된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 모이어티에 부착된 도 30에 구체적으로 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분에 기초한 분자를 포함하지만, 이 ETX023 제품은 대안적으로 링커 및 리간드 부분이 본질적으로 올리고뉴클레오타이드 모이어티에 부착된 도 30에 묘사된 바와 같으나 사이클로-옥틸 고리 상의 도 30에 나타낸 바와 같은 F 치환기가 가수분해 치환의 결과로 발생하는 치환기, 예컨대 OH 치환기로 대체된 분자를 추가로 포함하거나 이로 본질적으로 이루어질 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 방식으로, (a) ETX023은 도 30에 구체적으로 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분을 갖고 사이클로-옥틸 고리 상에 F 치환기를 갖는 분자로 본질적으로 이루어질 수 있거나; (b) ETX023은 도 30에 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분을 본질적으로 갖지만 사이클로-옥틸 고리 상의 도 30에 나타낸 바와 같은 F 치환기가 가수분해 치환의 결과로 발생하는 치환기, 예컨대 OH 치환기로 대체된 분자로 본질적으로 이루어질 수 있거나, (c)

ETX023은 (a) 및/또는 (b)에서 정의된 바와 같은 분자의 혼합물을 포함할 수 있다.

### 도 31 ETX001, 010 및 019의 링커 및 리간드 부분

또한, 적절한 경우 제품으로서의 ETX001은 본원에도 묘사된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 모이어티에 부착된 도 31에 구체적으로 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분에 기초한 분자를 포함하지만, 이 ETX001 제품은 대안적으로 링커 및 리간드 부분이 본질적으로 올리고뉴클레오타이드 모이어티에 부착된 도 31에 묘사된 바와 같으나 사이클로-옥틸 고리 상의 도 31에 나타난 바와 같은 F 치환기가 가수분해 치환의 결과로 발생하는 치환기, 예컨대 OH 치환기로 대체된 분자를 추가로 포함하거나 이로 본질적으로 이루어질 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 방식으로, (a) ETX001은 도 31에 구체적으로 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분을 갖고 사이클로-옥틸 고리 상에 F 치환기를 갖는 분자로 본질적으로 이루어질 수 있거나; (b) ETX001은 도 31에 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분을 본질적으로 갖지만 사이클로-옥틸 고리 상의 도 31에 나타난 바와 같은 F 치환기가 가수분해 치환의 결과로 발생하는 치환기, 예컨대 OH 치환기로 대체된 분자로 본질적으로 이루어질 수 있거나, (c) ETX001은 (a) 및/또는 (b)에서 정의된 바와 같은 분자의 혼합물을 포함할 수 있다.

또한, 적절한 경우 제품으로서의 ETX010은 본원에도 묘사된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 모이어티에 부착된 도 31에 구체적으로 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분에 기초한 분자를 포함하지만, 이 ETX010 제품은 대안적으로 링커 및 리간드 부분이 본질적으로 올리고뉴클레오타이드 모이어티에 부착된 도 31에 묘사된 바와 같으나 사이클로-옥틸 고리 상의 도 31에 나타난 바와 같은 F 치환기가 가수분해 치환의 결과로 발생하는 치환기, 예컨대 OH 치환기로 대체된 분자를 추가로 포함하거나 이로 본질적으로 이루어질 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 방식으로, (a) ETX010은 도 31에 구체적으로 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분을 갖고 사이클로-옥틸 고리 상에 F 치환기를 갖는 분자로 본질적으로 이루어질 수 있거나; (b) ETX010은 도 31에 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분을 본질적으로 갖지만 사이클로-옥틸 고리 상의 도 31에 나타난 바와 같은 F 치환기가 가수분해 치환의 결과로 발생하는 치환기, 예컨대 OH 치환기로 대체된 분자로 본질적으로 이루어질 수 있거나, (c) ETX010은 (a) 및/또는 (b)에서 정의된 바와 같은 분자의 혼합물을 포함할 수 있다.

또한, 적절한 경우 제품으로서의 ETX019는 본원에도 묘사된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 모이어티에 부착된 도 31에 구체적으로 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분에 기초한 분자를 포함하지만, 이 ETX019 제품은 대안적으로 링커 및 리간드 부분이 본질적으로 올리고뉴클레오타이드 모이어티에 부착된 도 31에 묘사된 바와 같으나 사이클로-옥틸 고리 상의 도 31에 나타난 바와 같은 F 치환기가 가수분해 치환의 결과로 발생하는 치환기, 예컨대 OH 치환기로 대체된 분자를 추가로 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다. 이러한 방식으로, (a) ETX019는 도 31에 구체적으로 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분을 갖고 사이클로-옥틸 고리 상에 F 치환기를 갖는 분자로 본질적으로 이루어질 수 있거나; (b) ETX019는 도 31에 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분을 본질적으로 갖지만 사이클로-옥틸 고리 상의 도 31에 나타난 바와 같은 F 치환기가 가수분해 치환의 결과로 발생하는 치환기, 예컨대 OH 치환기로 대체된 분자로 본질적으로 이루어질 수 있거나, (c) ETX019는 (a) 및/또는 (b)에서 정의된 바와 같은 분자의 혼합물을 포함할 수 있다.

### 도 32 ETX006, 015 및 024의 링커 및 리간드 부분

### 도 33 ETX002, 011 및 020의 링커 및 리간드 부분.

**도 34** ETX023의 단일 1mg/kg 용량으로 처리된 동물의 혈청 내 총 빌리루빈 농도. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 점선은 이 종에 대해 정상으로 간주되는 값의 범위를 보여준다(Park 등, 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86.)

**도 35.** ETX023의 단일 1mg/kg 용량으로 처리된 동물의 혈액 요소 질소(blood urea nitrogen, BUN) 농도. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 점선은 이 종에 대해 정상으로 간주되는 값의 범위를 보여준다(Park 등, 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86.)

**도 36.** ETX023의 단일 1mg/kg 용량으로 처리된 동물의 크레아티닌(CREA) 농도. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 점선은 이 종에 대해 정상으로 간주되는 값의 범위를 보여준다(Park 등, 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86.)

**도 37.** ETX024의 단일 1mg/kg 용량으로 처리된 동물의 혈청 내 총 빌리루빈 농도. 각 포인트는 3마리 동물의 평



균 및 표준편차를 나타낸다. 음영은 연구에 사용된 시설에서 정상으로 간주되는 값의 범위를 보여준다. 점선은 이 종에 대해 정상으로 간주되는 값을 보여준다(Park 등, 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86.)

**도 38.** ETX024의 단일 1mg/kg 용량으로 처리된 동물의 혈액 요소 질소(BUN) 농도. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 음영은 연구에 사용된 시설에서 정상으로 간주되는 값의 범위를 보여준다. 점선은 이 종에 대해 정상으로 간주되는 값을 보여준다(Park 등, 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86.)

**도 39.** ETX024의 단일 1mg/kg 용량으로 처리된 동물의 크레아티닌(CREA) 농도. 각 포인트는 3마리 동물의 평균 및 표준편차를 나타낸다. 음영은 연구에 사용된 시설에서 정상으로 간주되는 값의 범위를 보여준다. 점선은 이 종에 대해 정상으로 간주되는 값을 보여준다(Park 등, 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86.)

**도 40 - 도 42**는 아래에 기술된다.

**도 43**은 본원에 개시된 문장(Sentence) 1-101에 기술된 화학식의 세부 사항을 보여준다.

**도 44**는 본원에 개시된 항목(Clause) 1-56에 기술된 화학식의 세부 사항을 보여준다.

**도 45a**는 본원에 기술된 바와 같은 작제물 ETX001, ETX002의 센스(SS) 및 안티센스(AS) 가닥에 대한 기본 뉴클레오타이드 서열을 보여준다. ETX001 및 ETX002 모두에 대해 galnac 링커는 사용 중인 센스 가닥의 5' 말단 영역에 부착된다(도 45a에 묘사되지 않음). ETX001의 경우 galnac 링커가 부착되어 있으며 도 31과 같다. ETX002의 경우 galnac 링커가 부착되어 있으며 도 33과 같다.

도 45a에서 센스 가닥의 3' 말단 영역에 나타난 바와 같은 iaia는 (i) 센스 가닥의 3' 말단 영역에서 끝에서 두 번째(penultimate) 및 말단 뉴클레오타이드로서 제공된 2개의 무염기 뉴클레오타이드를 나타내고, (ii) 여기서 3'-3' 역방향 연결은 끝에서 세 번째(antepenultimate) 뉴클레오타이드(즉, 센스 가닥의 위치 21에 있는 A로서, 여기서 위치 1은 센스 가닥의 말단 5' 뉴클레오타이드, 즉 센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 말단 G)와 센스 가닥의 인접한 끝에서 두 번째 무염기 잔기 사이에 제공되며, (iii) 말단 무염기 뉴클레오타이드와 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오타이드 사이의 연결은 말단 및 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 말단 영역을 향해 읽을 때 5'-3'이다.

도 45a의 센스 가닥의 경우, 센스 가닥의 위치 1(센스 가닥의 말단 5' 뉴클레오타이드, 즉 센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 말단 G)로부터 읽으면: (i) 위치 1 내지 6, 8 및 12 내지 21의 뉴클레오타이드에는 2' O-메틸 변형된 당이 있고, (ii) 위치 7 및 9 내지 11의 뉴클레오타이드에는 2' F 변형된 당이 있으며, (iii) 무염기 뉴클레오타이드에는 위치 1 및 2에 H가 있는 당이 있다.

도 45a의 안티센스 가닥의 경우, 안티센스 가닥의 위치 1(안티센스 가닥의 말단 5' 뉴클레오타이드, 즉 안티센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 말단 U)로부터 읽으면: (i) 위치 1, 3 내지 5, 7, 10 내지 13, 15, 17 내지 23의 뉴클레오타이드에는 2' O-메틸 변형된 당이 있고, (ii) 위치 2, 6, 8, 9, 14, 16의 뉴클레오타이드에는 2' F 변형된 당이 있다.

**도 45b**는 본원에 기술된 바와 같은 작제물 ETX005, ETX006의 센스(SS) 및 안티센스(AS) 가닥에 대한 기본 뉴클레오타이드 서열을 보여준다. ETX005 및 ETX006 모두에 대해 galnac 링커는 사용 중인 센스 가닥의 3' 말단 영역에 부착된다(도 45b에 묘사되지 않음). ETX005의 경우 galnac 링커가 부착되어 있으며 도 30과 같다. ETX006의 경우 galnac 링커가 부착되어 있으며 도 32와 같다.

도 45b에서 센스 가닥의 5' 말단 영역에 나타난 바와 같은 iaia는 (i) 센스 가닥의 5' 말단 영역에서 끝에서 두 번째 및 말단 뉴클레오타이드로서 제공된 2개의 무염기 뉴클레오타이드를 나타내고, (ii) 여기서 5'-5' 역방향 연결은 끝에서 세 번째 뉴클레오타이드(즉, 센스 가닥에서 넘버링된 뉴클레오타이드 위치에서 센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 iaia 모티프를 포함하지 않는, 센스 가닥의 위치 1에 있는 G)와 센스 가닥의 인접한 끝에서 두 번째 무염기 잔기 사이에 제공되며, (iii) 말단 무염기 뉴클레오타이드와 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오타이드 사이의 연결은 말단 및 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오타이드를 포함하는 5' 말단 영역을 향해 읽을 때 3'-5'이다.

도 45b의 센스 가닥의 경우, 센스 가닥의 위치 1(센스 가닥에서 넘버링된 뉴클레오타이드 위치에서 센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 iaia 모티프를 포함하지 않는, 센스 가닥의 말단 5' 뉴클레오타이드, 즉 센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 말단 G)로부터 읽으면: (i) 위치 1 내지 6, 8, 12 내지 21의 뉴클레오타이드에는 2' O-메틸 변형

된 당이 있고, (ii) 위치 7, 9 내지 11의 뉴클레오타이드에는 2' F 변형된 당이 있으며, (iii) 무염기 뉴클레오타이드에는 위치 1 및 2에 H가 있는 당이 있다.

도 45b의 안티센스 가닥의 경우, 안티센스 가닥의 위치 1(안티센스 가닥의 말단 5' 뉴클레오타이드, 즉 안티센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 말단 U)로부터 읽으면: (i) 위치 1, 3 내지 5, 7, 10 내지 13, 15, 17 내지 23의 뉴클레오타이드에는 2' O-메틸 변형된 당이 있고, (ii) 위치 2, 6, 8, 9, 14, 16의 뉴클레오타이드에는 2' F 변형된 당이 있다.

**도 46a**는 본원에 기술된 바와 같은 작제물 ETX010, ETX011의 센스(SS) 및 안티센스(AS) 가닥에 대한 기본 뉴클레오타이드 서열을 보여준다. ETX010 및 ETX011 모두에 대해 galnac 링커가 사용 중인 센스 가닥의 5' 말단 영역에 부착된다(도 46a에 묘사되지 않음). ETX010의 경우 galnac 링커가 부착되어 있으며 도 31과 같다. ETX011의 경우 galnac 링커가 부착되어 있으며 도 33과 같다.

도 46a에서 센스 가닥의 3' 말단 영역에 나타난 바와 같은 iaia는 (i) 센스 가닥의 3' 말단 영역에서 끝에서 두 번째 및 말단 뉴클레오타이드로서 제공된 2개의 무염기 뉴클레오타이드를 나타내고, (ii) 여기서 3'-3' 역방향 연결은 끝에서 세 번째 뉴클레오타이드(즉, 센스 가닥의 위치 21에 있는 A로서, 여기서 위치 1은 센스 가닥의 말단 5' 뉴클레오타이드, 즉 센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 말단 A)와 센스 가닥의 인접한 끝에서 두 번째 무염기 잔기 사이에 제공되며, (iii) 말단 무염기 뉴클레오타이드와 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오타이드 사이의 연결은 말단 및 두 번째 무염기 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 말단 영역을 향해 읽을 때 5'-3'이다.

도 46a의 센스 가닥의 경우, 센스 가닥의 위치 1(센스 가닥의 말단 5' 뉴클레오타이드, 즉 센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 말단 A)로부터 읽으면: (i) 위치 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 15, 17, 19 내지 21의 뉴클레오타이드에는 2' O-메틸 변형된 당이 있고, (ii) 위치 3, 5, 7, 9 내지 11, 13, 16, 18의 뉴클레오타이드에는 2' F 변형된 당이 있으며, (iii) 무염기 뉴클레오타이드에는 위치 1 및 2에 H가 있는 당이 있다.

도 46a의 안티센스 가닥의 경우, 안티센스 가닥의 위치 1(안티센스 가닥의 말단 5' 뉴클레오타이드, 즉 안티센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 말단 U)로부터 읽으면: (i) 위치 1, 4, 6, 7, 9, 11 내지 13, 15, 17, 19 내지 23의 뉴클레오타이드에는 2' O-메틸 변형된 당이 있고, (ii) 위치 2, 3, 5, 8, 10, 14, 16, 18의 뉴클레오타이드에는 2' F 변형된 당이 있으며, (iii) 안티센스 가닥의 3' 말단 영역에서 위치 24, 25에 있는 끝에서 두 번째 및 말단 T 뉴클레오타이드에는 위치 2에 H가 있는 당이 있다.

**도 46b**는 본원에 기술된 바와 같은 작제물 ETX014, ETX015의 센스(SS) 및 안티센스(AS) 가닥에 대한 기본 뉴클레오타이드 서열을 보여준다. ETX014 및 ETX015 모두에 대해 galnac 링커는 사용 중인 센스 가닥의 3' 말단 영역에 부착된다(도 46b에 묘사되지 않음). ETX014의 경우 galnac 링커가 부착되어 있으며 도 30과 같다. ETX015의 경우 galnac 링커가 부착되어 있으며 도 32와 같다.

도 46b에서 센스 가닥의 5' 말단 영역에 나타난 바와 같은 iaia는 (i) 센스 가닥의 5' 말단 영역에서 끝에서 두 번째 및 말단 뉴클레오타이드로서 제공된 2개의 무염기 뉴클레오타이드를 나타내고, (ii) 여기서 5'-5' 역방향 연결은 끝에서 세 번째 뉴클레오타이드(센스 가닥에서 넘버링된 뉴클레오타이드 위치에서 센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 iaia 모티프를 포함하지 않는, 센스 가닥의 위치 1에 있는 A)와 센스 가닥의 인접한 끝에서 두 번째 무염기 잔기 사이에 제공되고, (iii) 말단 무염기 뉴클레오타이드와 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오타이드 사이의 연결은 말단 및 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오타이드를 포함하는 5' 말단 영역을 향해 읽을 때 3'-5'이다.

도 46b의 센스 가닥에 대해, 센스 가닥의 위치 1(센스 가닥에서 넘버링된 뉴클레오타이드 위치에서 센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 iaia 모티프를 포함하지 않는, 센스 가닥의 말단 5' 뉴클레오타이드, 즉 센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 말단 A)로부터 읽으면: (i) 위치 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 15, 17, 19 내지 21의 뉴클레오타이드에는 2' O-메틸 변형된 당이 있고, (ii) 위치 3, 5, 7, 9 내지 11, 13, 16, 18의 뉴클레오타이드에는 2' F 변형된 당이 있으며, (iii) 무염기 뉴클레오타이드에는 위치 1 및 2에 H가 있는 당이 있다.

도 46b의 안티센스 가닥의 경우, 안티센스 가닥의 위치 1(안티센스 가닥의 말단 5' 뉴클레오타이드, 즉 안티센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 말단 U)에서 읽을 때: (i) 위치 1, 4, 6, 7, 9, 11 내지 13, 15, 17, 19 내지 23의 뉴클레오타이드에는 2' O-메틸 변형된 당이 있고, (ii) 위치 2, 3, 5, 8, 10, 14, 16, 18의 뉴클레오타이드에는 2' F 변형된 당이 있으며, (iii) 안티센스 가닥의 3' 말단 영역에서 위치 24, 25에 있는 끝에서 두 번째 및 말단 T 뉴클레오타이드에는 위치 2에 H가 있는 당이 있다.

**도 47a**는 본원에 기술된 바와 같은 작제물 ETX019, ETX020의 센스(SS) 및 안티센스(AS) 가닥에 대한 기본 뉴클레오타이드 서열을 보여준다. ETX019 및 ETX020 모두에 대해 galnac 링커는 사용 중인 센스 가닥의 5' 말단 영역

에 부착된다(도 47a에 묘사되지 않음). ETX019의 경우 galnac 링커가 부착되어 있으며 도 31과 같다. ETX020의 경우 galnac 링커가 부착되어 있으며 도 33과 같다.

도 47a에서 센스 가닥의 3' 말단 영역에 나타난 바와 같은 iaia는 (i) 센스 가닥의 3' 말단 영역에서 끝에서 두 번째 및 말단 뉴클레오타이드로서 제공된 2개의 무염기 뉴클레오타이드를 나타내고, (ii) 여기서 3'-3' 역방향 연결은 끝에서 세 번째 뉴클레오타이드(즉, 센스 가닥의 위치 21에 있는 A로서, 여기서 위치 1은 센스 가닥의 말단 5' 뉴클레오타이드, 즉 센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 말단 U)와 센스 가닥의 인접한 끝에서 두 번째 무염기 잔기 사이에 제공되고, (iii) 말단 무염기 뉴클레오타이드와 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오타이드 사이의 연결은 말단 및 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 말단 영역을 향해 읽을 때 5'-3'이다.

도 47a의 센스 가닥에 대해, 센스 가닥의 위치 1(센스 가닥의 말단 5' 뉴클레오타이드, 즉 센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 말단 U)로부터 읽을 때: (i) 위치 1 내지 6, 8 및 12 내지 21의 뉴클레오타이드에는 2' O-메틸 변형된 당이 있고, (ii) 위치 7 및 9 내지 11의 뉴클레오타이드에는 2' F 변형된 당이 있으며, (iii) 무염기 뉴클레오타이드에는 위치 1 및 2에 H가 있는 당이 있다.

도 47a의 안티센스 가닥의 경우, 안티센스 가닥의 위치 1(안티센스 가닥의 말단 5' 뉴클레오타이드, 즉 안티센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 말단 U)로부터 읽을 때: (i) 위치 1, 3 내지 5, 7, 8, 10 내지 13, 15, 17 내지 23의 뉴클레오타이드에는 2' O-메틸 변형된 당이 있고, (ii) 위치 2, 6, 9, 14, 16의 뉴클레오타이드에는 2' F 변형된 당이 있다.

**도 47b**는 본원에 기술된 바와 같은 작제물 ETX023, ETX024의 센스(SS) 및 안티센스(AS) 가닥에 대한 기본 뉴클레오타이드 서열을 보여준다. ETX023 및 ETX024 모두에 대해 galnac 링커는 사용 중인 센스 가닥의 3' 말단 영역에 부착된다(도 47b에 묘사되지 않음). ETX023의 경우 galnac 링커가 부착되어 있으며 도 30과 같다. ETX024의 경우 galnac 링커가 부착되어 있으며 도 32와 같다.

도 47b에서 센스 가닥의 5' 말단 영역에 나타난 바와 같은 iaia는 (i) 센스 가닥의 5' 말단 영역에서 끝에서 두 번째 및 말단 뉴클레오타이드로서 제공된 2개의 무염기 뉴클레오타이드를 나타내고, (ii) 여기서 5'-5' 역방향 연결은 끝에서 세 번째 뉴클레오타이드(즉, 센스 가닥에서 넘버링된 뉴클레오타이드 위치에서 센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 iaia 모티프를 포함하지 않는, 센스 가닥의 위치 1에 있는 U)와 센스 가닥의 인접한 끝에서 두 번째 무염기 잔기 사이에 제공되고, (iii) 말단 무염기 뉴클레오타이드와 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오타이드 사이의 결합은 말단 및 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오타이드를 포함하는 5' 말단 영역을 향해 읽을 때 3'-5'이다.

도 47b의 센스 가닥에 대해, 센스 가닥의 위치 1(센스 가닥에서 넘버링된 뉴클레오타이드 위치에서 센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 iaia 모티프를 포함하지 않는, 센스 가닥의 말단 5' 뉴클레오타이드, 즉 센스 가닥의 5' 말단 영역에서 말단 U)로부터 읽으면: (i) 위치 1 내지 6, 8, 12 내지 21의 뉴클레오타이드에는 2' O-메틸 변형된 당이 있고, (ii) 위치 7 및 9 내지 11의 뉴클레오타이드에는 2' F 변형된 당이 있으며, (iii) 무염기 뉴클레오타이드에는 위치 1 및 2에 H가 있는 당이 있다.

도 47b의 안티센스 가닥의 경우, 안티센스 가닥의 위치 1(안티센스 가닥의 말단 5' 뉴클레오타이드, 즉 안티센스 가닥의 5' 말단 영역에 있는 말단 U)로부터 읽을 때: (i) 위치 1, 3 내지 5, 7, 8, 10 내지 13, 15, 17 내지 23의 뉴클레오타이드에는 2' O-메틸 변형된 당이 있고, (ii) 위치 2, 6, 9, 14, 16의 뉴클레오타이드에는 2' F 변형된 당이 있다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 본 발명은 표적 유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있는 억제성 RNA 분자(iRNA로 지칭될 수 있음)와 같은 핵산 및 이를 포함하는 조성물을 제공한다. 유전자는 세포, 예를 들어, 인간과 같은 대상체 내의 세포 내에 있을 수 있다. 핵산은 표적 유전자의 발현과 관련된 의학적 상태를 예방 및/또는 치료하는 데 사용될 수 있다. 억제성 RNA(iRNA)가 본원에서 바람직한 핵산이다.

[0010] 본 발명은 제1 측면에서 제1 가닥의 적어도 일부와 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적인 제2 가닥의 적어도 일부를 포함하는 적어도 하나의 듀플렉스 영역을 포함하는, 세포에서 표적 유전자의 발현을 억제하기 위한, 선택적으로 RNA인, 핵산을 제공하며, 여기서 상기 제1 가닥은 억제될 상기 표적 유전자로부터 전사된 RNA의 적어도 일부에 적어도 부분적으로 상보적이며, 제2 가닥은 제2 가닥의 말단 영역에서 하나 이상의 무염기 뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 무염기 뉴클레오타이드(들)는 역방향 뉴클레오타이드간 연결을 통해 인접한 뉴클레오타이드에 연결된다.

- [0011] 본 발명은 특히 이중 가닥 RNA 분자(dsRNA)를 포함하는데, 이는 dsRNA가 사용될 조건 하에서 상보적이고 혼성화하여 듀플렉스 구조를 형성하는 2개의 RNA 가닥을 포함한다. dsRNA의 한 가닥(안티센스 가닥)은 표적 서열에 실질적으로 상보적인, 일반적으로 완전히 상보적인 상보성 영역을 포함한다. 표적 서열은 관심 유전자의 발현 동안 형성된 mRNA의 서열로부터 유래될 수 있다. 다른 가닥(센스 가닥)은 안티센스 가닥에 상보적인 영역을 포함하여 상기 두 가닥이 혼성화되어 적절한 조건에서 결합될 때 듀플렉스 구조를 형성한다. dsRNA의 상보적 서열은 또한 단일 핵산 분자의 자기 상보적 영역일 수 있다.
- [0012] **정의**
- [0013] 본원에서 안티센스 가닥 또는 가이드 가닥이라고도 불리고 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있는 "제1 가닥"은 핵산 가닥, 예를 들어, iRNA 가닥, 예를 들어, mRNA와 같은 표적 서열에 실질적으로 상보적인 영역을 포함하는 dsRNA를 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "상보성 영역"은 서열, 예를 들어, 표적 서열에 실질적으로 상보적인 안티센스 가닥 상의 영역을 지칭한다. 상보성 영역이 표적 서열에 완전히 상보적이지 않은 경우, 분자의 내부 또는 말단 영역에 불일치(mismatch)가 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중 가닥 핵산, 예를 들어, 본 발명의 RNAi 작용제는 안티센스 가닥에 뉴클레오타이드 불일치를 포함한다.
- [0014] 리간드 모이어티, 선택적으로 링커 모이어티도 제공된 핵산을 포함하는 분자의 맥락에서, 본 발명의 핵산은 올리고뉴클레오타이드 모이어티로 지칭될 수 있다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 이중 가닥 핵산, 예를 들어, 본 발명의 RNAi 작용제는 센스 가닥에 뉴클레오타이드 불일치를 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 불일치는, 예를 들어, iRNA와 같은 핵산의 3'-말단으로부터 5, 4, 3, 2 또는 1개의 뉴클레오타이드 내에 있다.
- [0016] 또 다른 실시양태에서, 뉴클레오타이드 불일치는, 예를 들어, iRNA와 같은 핵산의 3'-말단 뉴클레오타이드에 있다.
- [0017] "제2 가닥"(본원에서 센스 가닥 또는 패신저 가닥이라고도 불리고 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있음)은 핵산 가닥, 예를 들어, 해당 용어가 본원에 정의된 바와 같은 안티센스 가닥의 영역에 실질적으로 상보적인 영역을 포함하는 iRNA 가닥을 지칭한다.
- [0018] "표적 서열"(표적 RNA 또는 표적 mRNA로도 불릴 수 있음)은 유전자의 전사 동안 형성된 mRNA 분자의 뉴클레오타이드 서열의 인접 부분을 지칭하며, 1차 전사 산물의 RNA 가공 생성물인 mRNA를 포함한다.
- [0019] 표적 서열은 약 10-35개의 뉴클레오타이드 길이, 예를 들어, 약 15-30개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 예를 들어, 표적 서열은 약 15-30개의 뉴클레오타이드, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 또는 21-22개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 상기 인용된 범위 및 길이의 중간 범위 및 길이도 본 발명의 일부인 것으로 고려된다.
- [0020] "리보뉴클레오타이드" 또는 "뉴클레오타이드"라는 용어는 하기에 더 상세히 기술되는 바와 같이 변형된 뉴클레오타이드도 지칭할 수 있다.
- [0021] 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있고 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. RNA가 바람직한 핵산이다.
- [0022] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 "iRNA", "RNAi 작용제" 및 "iRNA 작용제", "RNA 간섭제"라는 용어는 RNA를 함유하는 작용제를 지칭하며, RNA 유도된 침묵 복합체(RISC) 경로를 통해 RNA 전사체의 표적화된 절단을 중재한다. iRNA는 RNA 간섭(RNAi)을 통해 mRNA의 서열 특이적 분해를 지시한다.
- [0023] 이중 가닥 RNA는 본원에서 "이중 가닥 RNAi 작용제", "이중 가닥 RNA(dsRNA) 분자", "dsRNA 작용제" 또는 "dsRNA"로 지칭되며, 이는 리보핵산 분자의 복합체를 지칭하고 표적 RNA에 대해 "센스" 및 "안티센스" 배향을 갖는 것으로 지칭되는 2개의 역평행 및 실질적으로 상보적인 핵산 가닥을 포함하는 듀플렉스 구조를 갖는다.
- [0024] 핵산, 예를 들어, dsRNA 분자의 각 가닥의 대부분의 뉴클레오타이드는 바람직하게는 리보뉴클레오타이드이지만, 이 경우 각각의 가닥 또는 두 가닥 모두 하나 이상의 비-리보뉴클레오타이드, 예를 들어, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 "iRNA"는 화학적 변형이 있는 리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0025] "변형된 뉴클레오타이드"라는 용어는 독립적으로 변형된 당 모이어티, 변형된 뉴클레오타이드간 결합, 또는 변형된

핵염기, 또는 이들의 임의의 조합을 갖는 뉴클레오티드를 지칭한다. 따라서, 변형된 뉴클레오티드라는 용어는 뉴클레오타이드간 연결, 당 모이어티 또는 핵염기에 대한, 예를 들어, 작용기 또는 원자의 치환, 부가 또는 제거를 포함한다. siRNA 유형 분자에서 사용되는 바와 같은 임의의 이러한 변형은 본 명세서 및 청구범위의 목적을 위해 "siRNA" 또는 "RNAi 작용제"에 포함된다.

[0026] 본 발명의 핵산, 예를 들어, dsRNA의 듀플렉스 영역은 길이가 약 9 내지 40개의 염기쌍, 예컨대 길이가 9 내지 36개의 염기쌍, 예를 들어, 길이가 약 15-30개의 염기쌍, 예를 들어, 길이가 약 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36개의 염기쌍, 예컨대 길이가 약 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 또는 21-22개의 염기쌍일 수 있다.

[0027] 듀플렉스 구조를 형성하는 2개의 가닥은 하나의 더 큰 분자의 상이한 부분일 수 있거나, 별도의 분자, 예를 들어, RNA 분자일 수 있다.

[0028] "뉴클레오티드 오버행(nucleotide overhang)"이라는 용어는 이중 가닥 핵산의 듀플렉스 구조로부터 연장되는 적어도 하나의 쌍을 이루지 않은 뉴클레오티드를 지칭한다. ds 핵산은 적어도 하나의 뉴클레오티드의 오버행을 포함할 수 있으며; 대안적으로 오버행은 적어도 2개의 뉴클레오티드, 적어도 3개의 뉴클레오티드, 적어도 4개의 뉴클레오티드, 적어도 5개의 뉴클레오티드 또는 그보다 많이 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 오버행은 데옥시뉴클레오티드/뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오티드/뉴클레오타이드 유사체를 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 오버행(들)은 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 이들의 조합 상에 있을 수 있다. 또한, 오버행의 뉴클레오티드(들)는 안티센스 또는 센스 가닥의 5'-말단, 3'-말단 또는 두 말단 상에 존재할 수 있다.

[0029] 특정 실시양태에서, 안티센스 가닥은 3'-말단 또는 5'-말단에 1-10개의 뉴클레오티드, 예를 들어, 0-3, 1-3, 2-4, 2-5, 4-10, 5-10, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 뉴클레오티드 오버행이 있다.

[0030] "블런트(blunt)" 또는 "블런트 말단(blunt end)"은 이중 가닥 핵산의 해당 말단에 쌍을 이루지 않은 뉴클레오티드가 없음을, 즉 뉴클레오티드 오버행이 없음을 의미한다. 본 발명의 핵산은 한쪽 말단에 뉴클레오티드 오버행이 없거나 양쪽 말단에 뉴클레오티드 오버행이 없는 것을 포함한다.

[0031] 달리 나타내지 않는 한, "상보적"이라는 용어는 제2 뉴클레오티드 서열과 관련하여 제1 뉴클레오티드 서열을 기술하는 데 사용될 때 당업자에 의해 이해되는 바와 같이 제1 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드가 특정 조건 하에서 제2 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드와 혼성화하여 듀플렉스 구조를 형성하는 능력을 지칭한다. 이러한 조건은, 예를 들어, 엄격한 조건일 수 있으며, 엄격한 조건은 다음을 포함할 수 있다: 400mM NaCl, 40mM PIPES pH 6.4, 1mM EDTA, 50°C 또는 70°C에서 12-16시간 후 세척(예를 들어, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, 등 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press 참조).

[0032] 본원에 기술된 핵산, 예를 들어, dsRNA 내의 상보적 서열은 제1 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드와 제2 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 하나 또는 둘 다의 뉴클레오티드 서열의 전체 길이에 걸친 염기쌍 형성을 포함한다. 이러한 서열은 본원에서 서로에 대해 "완전히 상보적인" 것으로 언급될 수 있다. 그러나 제1 서열이 본원에서 제2 서열과 관련하여 "실질적으로 상보적"이라고 언급되는 경우, 두 서열은 완전히 상보적일 수 있거나, 하나 이상의 불일치 염기쌍, 예컨대 2, 4 또는 5개, 바람직하게는 5개 이하의 불일치 염기쌍을 형성할 수 있는 반면 궁극적인 적용에 가장 관련된 조건 하에서 혼성화하는 능력, 예를 들어, RISC 경로를 통한 유전자 발현의 억제를 유지한다. 오버행은 상보성 결정과 관련하여 불일치로 간주되지 않는다. 예를 들어, 핵산, 예를 들어, 길이가 17개의 뉴클레오티드인 하나의 올리고뉴클레오티드 및 길이가 19개의 뉴클레오티드인 또 다른 올리고뉴클레오티드를 포함하며 더 긴 올리고뉴클레오티드는 더 짧은 올리고뉴클레오티드에 완전히 상보적인 17개의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 dsRNA는 여전히 "완전히 상보적인" 것으로 지칭될 수 있다.

[0033] 본원에서 사용되는 "상보적" 서열은 혼성화 능력과 관련하여 위의 요구 사항이 충족되는 한 비-왓슨-크릭 염기쌍(non-Watson-Crick base pair) 또는 비-천연 및 변형된 뉴클레오티드로부터 형성된 염기쌍을 포함하거나 그로부터 완전히 형성될 수 있다. 이러한 비-왓슨-크릭 염기쌍에는 G:U Wobble 또는 Hoogsteen 염기쌍이 포함되지만



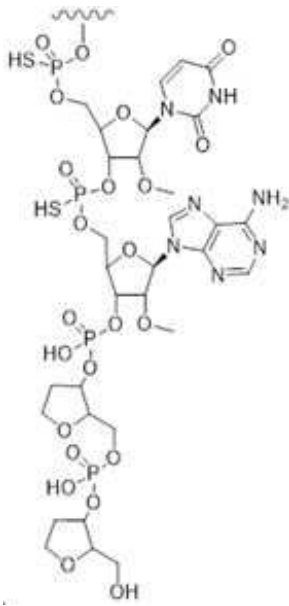
이에 제한되지 않는다.

- [0034] 본원에서 "상보적", "완전히 상보적" 및 "실질적으로 상보적"이라는 용어는 핵산, 예를 들어, dsRNA의 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이 또는 이중 가닥 핵산, 예를 들어, RNAi 작용제의 안티센스 가닥과 표적 서열 사이의 염기 일치(base matching)에 대해 사용될 수 있다.
- [0035] 본원에서 사용되는 바와 같이, 메신저 RNA(mRNA)의 적어도 일부에 "실질적으로 상보적인" 핵산 또는 폴리뉴클레오티드는 관심 mRNA(예를 들어, 유전자를 암호화하는 mRNA)의 연속 부분에 실질적으로 상보적인 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 관심 유전자를 암호화하는 mRNA의 중단되지 않은 부분에 대해 서열이 실질적으로 상보적인 경우 해당 유전자의 mRNA의 적어도 일부에 상보적이다.
- [0036] 따라서, 일부 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 센스 가닥 폴리뉴클레오티드 및 안티센스 폴리뉴클레오티드는 표적 유전자 서열에 완전히 상보적이다.
- [0037] 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 안티센스 폴리뉴클레오티드는 표적 RNA 서열에 실질적으로 상보적이며 전체 길이에 걸쳐 표적 RNA 서열의 등가 영역에 적어도 약 80% 상보적인, 예컨대 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상보적이거나 100% 상보적인 연속 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0038] 일부 실시양태에서, 핵산, 예를 들어, 본 발명의 iRNA는 안티센스 폴리뉴클레오티드에 실질적으로 상보적이어서 결국 표적 유전자 서열에 상보적이고 전체 길이에 걸쳐 안티센스 가닥의 뉴클레오티드 서열의 등가 영역에 적어도 약 80% 상보적인, 예컨대 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상보적이거나 100% 상보적인 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥을 포함한다.
- [0039] 일부 실시양태에서, 핵산, 예를 들어, 본 발명의 iRNA는 표적 서열에 실질적으로 상보적이고 전체 길이에 걸쳐 표적 서열에 대해 적어도 80% 상보적인, 예컨대 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상보적이거나 100% 상보적인 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다.
- [0040] 본원에서 사용되는 "대상체"는 동물, 예컨대 영장류(예컨대 인간, 인간이 아닌 영장류, 예를 들어, 원숭이 및 침팬지) 또는 비영장류를 포함하는 포유동물이거나, 표적 유전자 서열이 핵산, 예를 들어, iRNA 작용제에 대해 충분한 상보성이어서 표적 녹다운을 촉진하는 경우 내생적으로 또는 이종적으로 표적 유전자를 발현하는 새이다. 특정 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0041] 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 유전자 발현과 관련된 하나 이상의 증상의 경감 또는 개선을 포함하지만 이에 제한되지 않는 유익한 또는 원하는 결과를 지칭한다. 또한, "치료"는 치료가 없을 때 예상되는 생존과 비교하여 연장된 생존을 의미할 수 있다. 치료에는 동반이환(comorbidity)의 발달 예방, 예를 들어, 간 감염이 있는 대상체의 간 손상 감소가 포함될 수 있다.
- [0042] 본원에서 사용되는 "치료적 유효량"은 질환이 있는 대상체를 치료하기 위해 환자에게 투여되는 경우 (예를 들어, 기존 질환 또는 질환의 하나 이상의 증상 또는 이의 관련 동반이환을 감소, 개선 또는 유지함으로써) 질환의 치료를 수행하기에 충분한 핵산, 예를 들어, iRNA의 양을 포함하는 것으로 의도된다.
- [0043] 본원에서 "약제학적으로 허용되는"이라는 구는 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 합당한 이익/위험 비율에 상응하는 기타 문제 또는 합병증 없이 인간 대상체 및 동물 대상체의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 또는 투여형을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.
- [0044] 본원에서 사용되는 "약제학적으로 허용되는 담체"라는 구는 신체의 하나의 기관 또는 부분으로부터 대상 화합물을 신체의 다른 기관 또는 부분으로 운반 또는 수송하는 데 관여하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 제조 보조제 또는 용매 캡슐화 물질과 같은 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클을 의미한다. 각각의 담체는 제형의 다른 성분과 상용성이고 치료받는 대상체에 해를 끼치지 않는다는 의미에서 "허용가능"해야 한다.
- [0045] 파라미터의 값 또는 값의 범위가 인용되는 경우, 인용된 값의 중간 값 및 범위도 본 발명의 일부인 것으로 의도된다.
- [0046] 본원에서 관사 "a" 및 "an"은 관사의 문법적 대상 중 하나 또는 하나 초과(즉, 적어도 하나)를 지칭하는 데 사용된다.

- [0047] "포함하는"이라는 용어는 본원에서 "포함하지만 이에 제한되지 않는"이라는 구를 의미하고 상호교환적으로 사용된다.
- [0048] "또는"이라는 용어는 본원에서 문맥상 명백하게 달리 나타내지 않는 한 "및/또는"이라는 용어를 의미하고 상호교환적으로 사용된다. 예를 들어, "센스 가닥 또는 안티센스 가닥"은 "센스 가닥 또는 안티센스 가닥 또는 센스 가닥과 안티센스 가닥"으로 이해된다.
- [0049] "약"이라는 용어는 당업계에서 전형적인 허용 오차 범위 내를 의미하는 것으로 본원에서 사용된다. 예를 들어, "약"은 평균에서 약 2의 표준편차로 이해될 수 있다. 특정 실시양태에서, 약은 +10%를 의미한다. 특정 실시양태에서, 약은 +5%를 의미한다. 약이 일련의 숫자 또는 범위 앞에 있는 경우 "약"은 일련의 숫자 또는 범위의 각 숫자를 수식할 수 있는 것으로 이해된다.
- [0050] 숫자 또는 일련의 숫자 앞의 "적어도"라는 용어는 "적어도"라는 용어에 인접한 숫자 및 문맥에서 명백한, 논리적으로 포함될 수 있는 모든 후속 숫자 또는 정수를 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 핵산 분자의 뉴클레오타이드 수는 정수여야 한다. 예를 들어, "21개의 뉴클레오타이드 핵산 분자의 적어도 18개의 뉴클레오타이드"는 18, 19, 20 또는 21개의 뉴클레오타이드가 표시된 특성을 갖는다는 것을 의미한다. 적어도 일련의 숫자 또는 범위 앞에 있는 경우 "적어도"는 일련의 숫자 또는 범위의 각 숫자를 수식할 수 있는 것으로 이해된다.
- [0051] 본원에서 사용되는, "이하" 또는 "미만"은 해당 구에 인접한 값 및 문맥에서 논리적인, 0까지의 논리적 하위 값(logical lower value) 또는 정수로 이해된다. 예를 들어, "2개 이하의 뉴클레오타이드" 오버행이 있는 듀플렉스는 2개, 1개 또는 0개의 뉴클레오타이드 오버행을 갖는다. "이하"가 일련의 숫자 또는 범위 앞에 있는 경우 "이하"가 일련의 숫자 또는 범위의 각 숫자를 수식할 수 있는 것으로 이해된다.
- [0052] 가닥의 말단 영역은 5' 또는 3' 말단으로부터의 마지막 5개의 뉴클레오타이드이다.
- [0053] 본 발명의 다양한 실시양태는 당업자에 의해 적절하게 결정되는 바와 같이 조합될 수 있다.
- [0054] **무염기 뉴클레오타이드**
- [0055] 1개, 예를 들어 2개, 예를 들어 3개, 예를 들어 4개 이상의 무염기 뉴클레오타이드가 핵산에 존재한다. 무염기 뉴클레오타이드는 일반적으로 당 모이어티의 위치 1에서 볼 수 있는 염기가 없기 때문에 변형된 뉴클레오타이드이다. 전형적으로, 본 발명에 따른 핵산에 존재하는 무염기 뉴클레오타이드의 당 모이어티의 위치 1에 수소가 있을 것이다.
- [0056] 무염기 뉴클레오타이드는 제2 가닥의 말단 영역에 있고, 바람직하게는 상기 가닥 말단의 말단 5개의 뉴클레오타이드 내에 위치한다. 말단 영역은 무염기 뉴클레오타이드를 포함하는 말단 5개의 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0057] 제2 가닥은 바람직한 특징으로서 다음을 포함할 수 있다(상호 배타적이지 않는 한 모두 구체적으로 조합으로 고려됨):
- [0058] 제2 가닥의 말단 영역에 있는 2개 또는 2개 초과 무염기 뉴클레오타이드; 및/또는
- [0059] 제2 가닥의 5' 또는 3' 말단 영역에 있는 2개 또는 2개 초과 무염기 뉴클레오타이드; 및/또는
- [0060] 제2 가닥의 5' 또는 3' 말단 영역에 있는 2개 또는 2개 초과 무염기 뉴클레오타이드로서, 무염기 뉴클레오타이드는 본원에 기술된 바와 같은 오버행으로 존재함; 및/또는
- [0061] 제2 가닥의 말단 영역에 있는 2개 또는 2개 초과 연속 무염기 뉴클레오타이드로서, 바람직하게는 이러한 무염기 뉴클레오타이드 중 하나는 말단 뉴클레오타이드임; 및/또는
- [0062] 제2 가닥의 5' 또는 3' 말단 영역에 있는 2개 또는 2개 초과 연속 무염기 뉴클레오타이드로서, 바람직하게는 이러한 무염기 뉴클레오타이드 중 하나는 제2 가닥의 5' 또는 3' 말단 영역의 말단 뉴클레오타이드임; 및/또는
- [0063] 역방향 뉴클레오타이드간 연결은 적어도 하나의 무염기 뉴클레오타이드를 제2 가닥의 말단 영역에서 인접한 염기 뉴클레오타이드에 연결함; 및/또는
- [0064] 역방향 뉴클레오타이드간 연결은 적어도 하나의 무염기 뉴클레오타이드를 제2 가닥의 5' 또는 3' 말단 영역에서 인접한 염기 뉴클레오타이드에 연결함; 및/또는
- [0065] 말단 뉴클레오타이드가 아닌 뉴클레오타이드에 역방향 연결을 통해 연결된 끝에서 두 번째 뉴클레오타이드로서의 무염기 뉴클레오타이드(본원에서 끝에서 세 번째 뉴클레오타이드라고 함); 및/또는

- [0066] 말단 뉴클레오타이드를 포함하는 말단을 향하는 방향으로 가닥을 읽을 때 5'-3' 연결을 통해 연결된 2개의 말단 뉴클레오타이드로서의 무염기 뉴클레오타이드;
- [0067] 말단 뉴클레오타이드를 포함하는 말단을 향하는 방향으로 가닥을 읽을 때 3'-5' 연결을 통해 연결된 2개의 말단 뉴클레오타이드로서의 무염기 뉴클레오타이드;
- [0068] 말단 2개의 위치로서의 무염기 뉴클레오타이드로서, 끝에서 두 번째 뉴클레오타이드는 역방향 연결을 통해 끝에서 세 번째 뉴클레오타이드에 연결되고, 역방향 연결은 5-5' 역방향 연결 또는 3'-3' 역방향 연결임;
- [0069] 말단 2개의 위치로서의 무염기 뉴클레오타이드로서, 끝에서 두 번째 뉴클레오타이드는 역방향 연결을 통해 끝에서 세 번째 뉴클레오타이드에 연결되고, 여기서
- [0070] (1) 역방향 연결은 5-5' 역방향 연결이고, 말단 및 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오타이드를 포함하는 말단을 향해 읽을 때 말단 무염기 뉴클레오타이드와 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오타이드 사이의 연결은 3'5'임; 또는
- [0071] (2) 역방향 연결은 3-3' 역방향 연결이고, 말단 및 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오타이드를 포함하는 말단을 향해 읽을 때 말단 무염기 뉴클레오타이드와 끝에서 두 번째 무염기 뉴클레오타이드 사이의 연결은 5'3'임.
- [0072] 바람직하게는 제2 가닥의 말단에 무염기 뉴클레오타이드가 있다.
- [0073] 바람직하게는 제2 가닥의 말단 영역, 바람직하게는 말단 및 끝에서 두 번째 위치에 2개 또는 적어도 2개의 무염기 뉴클레오타이드가 있다.
- [0074] 바람직하게는 2개 이상의 무염기 뉴클레오타이드가 연속적이고, 예를 들어, 모든 무염기 뉴클레오타이드가 연속적일 수 있다. 예를 들어, 말단 1개 또는 말단 2개 또는 말단 3개 또는 말단 4개의 뉴클레오타이드가 무염기 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0075] 무염기 뉴클레오타이드는 말단에 1개의 무염기 뉴클레오타이드만 있지 않은 한 5'-3' 포스포디에스테르 연결 또는 역방향 연결을 통해 인접한 뉴클레오타이드에 연결될 수 있으며, 이 경우 인접한 뉴클레오타이드에 역방향 연결을 가질 것이다.
- [0076] 역방향 연결(이는 당염기에서 볼 수 있는 역 연결(inverted linkage)로도 지칭될 수 있음)은 뉴클레오타이드의 인접한 당 모이어티 사이의 5'-5', 3'3', 3'-2' 또는 2'-3' 포스포디에스테르 연결을 포함한다.
- [0077] 말단이 아닌 무염기 뉴클레오타이드는 2개의 포스포디에스테르 결합을 가질 것이고 이들 각각은 인접한 뉴클레오타이드에 결합할 것이며, 이들은 역방향 연결일 수 있거나 5'-3' 포스포디에스테르 결합일 수 있거나 각각 중 하나일 수 있다.
- [0078] 바람직한 실시양태는 제2 가닥의 말단 및 끝에서 두 번째 위치에 2개의 무염기 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 역방향 뉴클레오타이드간 연결은 끝에서 두 번째 (무염기) 뉴클레오타이드와 끝에서 세 번째 뉴클레오타이드 사이에 위치한다.
- [0079] 바람직하게는 제2 가닥의 말단 및 끝에서 두 번째 위치에 2개의 무염기 뉴클레오타이드가 있고, 끝에서 두 번째 뉴클레오타이드는 역방향 뉴클레오타이드간 연결을 통해 끝에서 세 번째 뉴클레오타이드에 연결되고 5'-3' 또는 3'-5' 포스포디에스테르 연결(분자의 말단 방향으로 읽음)을 통해 말단 뉴클레오타이드에 연결된다.
- [0080] 상이한 바람직한 특징은 다음과 같다:
- [0081] 역방향 뉴클레오타이드간 연결은 3'3' 역방향 연결이다. 역방향 뉴클레오타이드간 연결은 제2 가닥의 5' 말단 인산염(phosphate) 원위 말단 영역에 있다.
- [0082] 역방향 뉴클레오타이드간 연결은 5'5' 역방향 연결이다. 역방향 뉴클레오타이드간 연결은 제2 가닥의 3' 말단 하이드록사이드 원위 말단 영역에 있다.
- [0083] 구조의 예는 다음과 같다(나타낸 특정 RNA 뉴클레오타이드는 제한적이지 않으며 임의의 RNA 뉴클레오타이드일 수 있음):
- [0084] A 3'-3' 역방향 결합(분자의 말단을 향해 읽을 때 두 무염기 분자 사이의 마지막 포스포디에스테르 결합의 5'-3' 방향도 보여줌)

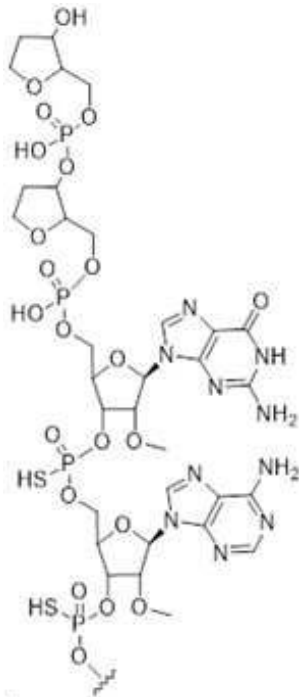




[0085]

[0086]

B 5'-5' 역방향 결합을 도시함(분자의 말단을 향해 읽을 때 두 무염기 분자 사이의 마지막 포스포디에스테르 결합의 3'-5' 방향도 보여줌)



[0087]

[0088]

핵산에 존재하는 무염기 뉴클레오타이드 또는 무염기 뉴클레오타이드들은 역방향 뉴클레오타이드간 연결 또는 연결들, 즉 5'-5' 또는 3'-3' 역방향 뉴클레오타이드간 연결의 존재 하에서 제공된다. 역방향 연결은 인접한 뉴클레오타이드 당의 방향 변화의 결과로 발생하여, 당은 (뉴클레오타이드 당의 고리 원자의 넘버링을 참조하여) 통상적인 5'-3' 방향과 반대로 3'-5' 방향을 갖게 된다. 본 발명의 핵산에 존재하는 무염기 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드들은 바람직하게는 이러한 역 뉴클레오타이드 당을 포함한다.

[0089]

역으로 배향된 말단 뉴클레오타이드의 경우, 이는 전체 핵산에 대해 "역" 말단 구성을 야기할 것이다. 본원에서 도시되고 언급된 특정 구조는 (뉴클레오타이드 당의 고리 원자의 넘버링을 참조하여) 통상적인 5'-3' 방향을 사용하여 나타내지만, 방향이 변화되고 근위 3'-3' 역방향 연결을 갖는 말단 뉴클레오타이드의 존재는 전체 5'-5' 말단 구조(즉, 통상적인 3' 말단 뉴클레오타이드가 5' 말단 뉴클레오타이드가 됨)를 갖는 핵산을 생성할 것임을 인지할 것이다. 대안적으로, 방향이 변화되고 근위 5'-5' 역방향 연결을 갖는 말단 뉴클레오타이드의 존재는 전체 3'-3' 말단 구조를 갖는 핵산을 생성할 것임을 인지할 것이다.

[0090] 본원에 기술된 근위 3'-3' 또는 5'-5' 역방향 연결은 역으로 배향된 단일 말단 뉴클레오티드와 같이 역으로 배향된 말단 뉴클레오티드에 직접 인접한/부착되는 역방향 연결을 포함할 수 있다. 대안적으로, 본원에 기술된 바와 같은 근위 3'-3' 또는 5'-5' 역방향 연결은 역으로 배향된 인접한 2개 또는 2개 초과 뉴클레오티드, 예컨대 말단 및 끝에서 두 번째 뉴클레오티드와 같이 역으로 배향된 2개 또는 2개 초과 말단 영역 뉴클레오티드인 역방향 연결을 포함할 수 있다. 이러한 방식으로, 역방향 연결은 역으로 배향된 끝에서 두 번째 뉴클레오티드에 부착될 수 있다. 당업자는 상술된 바와 같은 역 배향이 본원에 기술된 바와 같은 전체 3'-3' 또는 5'-5' 말단 구조를 갖는 핵산 분자를 생성할 수 있음을 인식할 것이지만, 하나 이상의 추가적인 역방향 연결 및/또는 역으로 배향된 뉴클레오티드의 존재로 전체 핵산이 통상적으로 위치된 5'/3' 말단에 상응하는 3'-5' 말단 구조를 가질 수 있음도 인지할 것이다.

[0091] 한 측면에서 핵산은 3'-3' 역방향 연결을 가질 수 있고, 말단 당 모이어티는 해당 말단 당의 5' 위치에서 5' 인산염 그룹보다는 5' OH를 포함할 수 있다.

[0092] 따라서 당업자는 본원에 도시된 (말단 뉴클레오티드 당의 고리 원자의 넘버링을 참조하여) 더 통상적인 5'-3' 구조의 5'-5', 3'-3' 및 3'-5' (해당 말단의 방향으로 읽음) 말단 변이체가 역방향 연결 또는 연결들이 존재하는 본 개시내용의 범위에 포함됨을 분명히 이해할 것이다.

[0093] 예를 들어, 역방향 뉴클레오티드간 연결 및/또는 역 말단을 생성하는 역으로 배향된 하나 이상의 뉴클레오티드의 상황에서, (예를 들어, 링커에 대한) 연결의 상대적 위치 또는 내부 피처의 위치(예컨대 변형된 뉴클레오티드)가 핵산의 5' 또는 3' 말단에 대해 규정된 경우 5' 또는 3' 말단은 역방향 연결이 적소에 없었더라면 존재했을 통상적인 5' 또는 3' 말단이며, 통상적인 5' 또는 3' 말단은 대부분의 내부 뉴클레오티드 연결의 방향성 및/또는 핵산 내 뉴클레오티드 배향을 고려하여 결정된다. 이러한 내부 결합 및/또는 뉴클레오티드 배향으로부터 핵산의 어느 말단이 역방향 연결이 없는 분자의 (뉴클레오티드 당의 말단에 있는 고리 원자의 numbering을 참조하여) 통상적인 5' 및 3' 말단을 구성하는지를 알 수 있다.

[0094] 예를 들어, 아래에 나타난 구조에서 "5'" 말단에 위치한 처음 2개 위치에는 무염기 잔기가 있다. 말단 뉴클레오타이드가 역으로 배향된 경우 일반적인 5' 말단인 아래 다이어그램에 표시된 "5'" 말단은 사실상 말단 위치에 역전된 뉴클레오타이드의 관점에서 3' OH를 포함할 수 있다. 그럼에도, 분자의 대부분은 (뉴클레오타이드 당의 고리 원자의 넘버링을 참조하여) 핵산 분자의 표준 5'[P04]에서 3'[OH] 방향으로 읽을 때 당의 3' OH에서 다음 당의 5' 인산염으로 이어지는 통상적인 뉴클레오타이드간 연결을 포함할 것인데, 이는 역 말단 구성이 없는 것으로 밝혀질 통상적인 5' 및 3' 말단을 결정하는 데 사용될 수 있다.

[0095] A 5' A-A-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me 3'

[0096] 역방향 결합은 바람직하게는 분자의 GalNAc 함유 부분과 같은 리간드 모이어티 원위 핵산, 예를 들어, RNA의 말단에 위치한다.

[0097] 센스 가닥에 5'-GalNAc가 있는 GalNAc-siRNA 작제물은 센스 가닥의 반대쪽 말단에 역방향 연결이 있을 수 있다.

[0098] 센스 가닥에 3'-GalNAc가 있는 GalNAc-siRNA 작제물은 센스 가닥의 반대쪽 말단에 역방향 연결이 있을 수 있다.

[0099]            **hexan glyci**

[0100] 하나의 측면에서 i) 핵산의 제1 가닥은 길이가 15 내지 30개의 뉴클레오티드 범위, 바람직하게는 19 내지 25개의 뉴클레오티드 범위, 더욱 바람직하게는 23개 또는 25개의 뉴클레오티드이고/이거나;

[0101] ii) 핵산의 제2 가닥은 길이가 15 내지 30개의 뉴클레오티드 범위, 바람직하게는 19 내지 25개의 뉴클레오티드 범위, 더욱 바람직하게는 23개의 뉴클레오티드이다.

[0102] 일반적으로, 핵산, 예를 들어, iRNA의 듀플렉스 구조는 길이가 약 15 내지 30개의 염기쌍, 예를 들어, 길이가 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 또는 21-22개의 염기쌍이다. 상기 인용된 범위 및 길이의 중간 범위 및 길이도 본 발명의 일부인 것으로 고려된다.

[0103] 유사하게, 표적 서열에 대한 안티센스 서열의 상보성 영역 및/또는 센스 서열에 대한 안티센스 서열의 상보성 영역은 길이가 약 15 내지 30개의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 길이가 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-

24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 또는 21-22개의 뉴클레오티드이다. 상기 인용된 범위 및 길이의 중간 범위 및 길이도 본 발명의 일부인 것으로 고려된다.

[0104] 특정 바람직한 실시양태에서, 표적 서열에 대한 안티센스 서열의 상보성 영역 및/또는 센스 서열에 대한 안티센스 서열의 상보성 영역은 길이가 적어도 17개의 뉴클레오티드이다. 예를 들어, 안티센스 가닥과 표적 사이의 상보성 영역은 길이가 19 내지 21개의 뉴클레오티드이고, 예를 들어, 상보성 영역은 길이가 21개의 뉴클레오티드이다.

[0105] 바람직한 실시양태에서, 각각의 가닥은 길이가 30개 이하의 뉴클레오티드이다.

[0106] 핵산, 예를 들어, 본원에 기술된 dsRNA는 하나 이상의 단일 가닥 뉴클레오티드 오버행, 예를 들어 1-4, 2-4, 1-3, 2-3, 1, 2, 3 또는 4개의 뉴클레오티드를 추가로 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 오버행은 데옥시뉴클레오티드/뉴클레오시드를 포함하는 뉴클레오티드/뉴클레오시드 유사체를 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 오버행(들)은 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 이들의 조합 상에 있을 수 있다. 또한, 오버행의 뉴클레오티드(들)는 핵산, 예를 들어, dsRNA의 안티센스 또는 센스 가닥의 5'-말단, 3'-말단 또는 두 말단 상에 존재할 수 있다.

[0107] 특정 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 가닥은 적어도 1개의 뉴클레오티드의 3' 오버행을 포함하는데, 예를 들어, 적어도 하나의 가닥은 적어도 2개의 뉴클레오티드의 3' 오버행을 포함한다. 오버행은 적절하게는 안티센스/가이드 가닥(antisense/guide strand) 및/또는 센스/패신저 가닥(sense/passenger strand) 상에 있다.

#### [0108] 핵산 변형

[0109] 특정 실시양태에서, 핵산, 예를 들어, 본 발명의 RNA, 예를 들어, dsRNA는 (필수 무염기 변형 이후) 추가 변형, 예를 들어, 당업계에 공지되고 본원에 기술된 화학적 변형 또는 접합을 포함하지 않는다.

[0110] 다른 바람직한 실시양태에서, 핵산, 예를 들어, 본 발명의 RNA, 예를 들어 dsRNA는 안정성 또는 다른 유익한 특성을 향상시키기 위해 (무염기 변형 이후) 추가로 화학적으로 변형된다.

[0111] 본 발명의 특정 실시양태에서, 실질적으로 모든 뉴클레오티드가 변형된다.

[0112] 본 발명의 특징적인 핵산은 본원에 참고로 포함된 "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. 등 (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA에 기술된 것과 같이 당업계에서 잘 확립된 방법에 의해 합성되거나 변형될 수 있다.

[0113] 변형은, 예를 들어, 말단 변형, 예를 들어 5'-말단 변형(인산화(phosphorylation), 접합, 역 연결) 또는 3'-말단 변형(접합, RNA 내의 DNA 뉴클레오티드, 또는 DNA 내의 RNA 뉴클레오티드, 역 연결 등); 염기 변형, 예를 들어, 안정화 염기, 불안정화 염기, 또는 파트너의 확장된 레퍼토리와 염기쌍을 이루는 염기, 접합된 염기로 대체; 당 변형(예를 들어, 2'-위치 또는 4'-위치에서) 또는 당의 대체; 또는 포스포디에스테르 연결의 변형 또는 대체를 포함하는 핵산 변형을 포함한다.

[0114] 본원에 기술된 실시양태에서 유용한 iRNA 화합물과 같은 핵산의 특정 예는 변형된 핵본을 함유하거나 천연 뉴클레오시드간 연결을 함유하지 않는 RNA를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 변형된 핵본을 갖는 RNA와 같은 핵산은 무엇보다도 핵본에 인 원자를 갖지 않는 것을 포함한다. 본 명세서를 위해, 그리고 당업계에서 때때로 언급되는 바와 같이, 뉴클레오시드간 핵본에 인 원자가 없는 변형된 핵산, 예를 들어, RNA가 또한 올리고뉴클레오시드로 간주될 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 핵산, 예를 들어, iRNA는 뉴클레오시드 핵본에 인 원자를 가질 것이다.

[0115] 변형된 핵산, 예를 들어, RNA 핵본은, 예를 들어, 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 3'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함하는 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 포스포네이트, 3'-아미노 포스포르아미데이트 및 아미노알킬포스포르아미데이트를 포함하는 포스포르아미데이트, 티오노포스포르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 및 통상의 3'-5' 연결을 갖는 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결된 유사체, 및 인접한 뉴클레오시드 단위 쌍이 5'-3' 또는 5'-2' 연결되는 역 극성을 갖는 것을 포함한다. 다양한 염, 혼합 염 및 유리산(free acid) 형태도 포함된다.

- [0116] 변형된 핵산, 예를 들어, RNA는 하나 이상의 치환된 당 모이어티도 함유할 수 있다. 본원의 특징적인 핵산, 예를 들어, iRNA, 예를 들어, dsRNA는 2'-위치에 다음 중 하나를 포함할 수 있다: OH; F; O-, S- 또는 N-알킬; O-, S- 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알킬닐; 또는 O-알킬-O-알킬, 여기서 알킬, 알케닐 및 알킬닐은 치환되거나 비치환될 수 있다. 2' O-메틸 및 2'-F가 바람직한 변형이다.
- [0117] 특정 바람직한 실시양태에서, 핵산은 적어도 하나의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0118] 본 발명의 핵산은 제1 가닥 및/또는 제2 가닥에 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0119] 일부 실시양태에서, 센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드 및 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오타이드는 변형을 포함한다.
- [0120] 일부 실시양태에서, 센스 가닥의 모든 뉴클레오타이드 및 안티센스 가닥의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드는 변형을 포함한다.
- [0121] 일부 실시양태에서, 센스 가닥의 모든 뉴클레오타이드 및 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오타이드는 변형을 포함한다.
- [0122] 한 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 데옥시-뉴클레오타이드, 3'-말단 데옥시-티민(dT) 뉴클레오타이드, 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드(본원에서 2'-Me로도 불리며, 여기서 Me는 메톡시임), 2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 2'-데옥시 변형된 뉴클레오타이드, 잠금 뉴클레오타이드(locked nucleotide), 잠금해제 뉴클레오타이드(unlocked nucleotide), 형태적으로 제한된 뉴클레오타이드, 컨스트레인 에틸 뉴클레오타이드(constrained ethyl nucleotide), 무염기 뉴클레오타이드, 2'-아미노 변형된 뉴클레오타이드, 2'-O-알릴 변형된 뉴클레오타이드, 2'-C-알킬 변형된 뉴클레오타이드, 2'-하이드록실 변형된 뉴클레오타이드, 2'-메톡시에틸 변형된 뉴클레오타이드, 2'-O-알킬 변형된 뉴클레오타이드, 모르폴리노 뉴클레오타이드, 포스포르아미데이트, 뉴클레오타이드를 포함하는 비천연 염기, 테트라하이드로피란 변형된 뉴클레오타이드, 1,5-안하이드로핵시톨 변형된 뉴클레오타이드, 사이클로핵세닐 변형된 뉴클레오타이드, 포스포리보에이트 그룹을 포함하는 뉴클레오타이드, 메틸포스포네이트 그룹을 포함하는 뉴클레오타이드, 5'-인산염을 포함하는 뉴클레오타이드 및 5'-인산염 모방체를 포함하는 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 3'-말단 데옥시-티민 뉴클레오타이드(dT)의 짧은 서열을 포함한다.
- [0123] 뉴클레오타이드에 대한 변형은 바람직하게는 LNA, HNA, CeNA, 2-메톡시에틸, 2'-O-알킬, 2-O-알릴, 2'-C-알릴, 2'-플루오로, 2'-데옥시, 2'-하이드록실 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 군으로부터 선택될 수 있다. 다른 실시양태에서, 뉴클레오타이드에 대한 변형은 2-O-메틸("2-Me") 또는 2'-플루오로 변형이다.
- [0124] 하나의 바람직한 변형은 선택적으로 2'-Me 또는 2'-F 변형으로부터 선택되는, 리보스 당(ribose sugar)의 2'-OH 그룹에서의 변형이다.
- [0125] 바람직한 핵산은 다음과 같이 변형된 뉴클레오타이드를 형성하기 위해 변형된 제1 가닥 및/또는 제2 가닥 상의 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함한다:
- [0126] 변형이 선택적으로 2'-Me 또는 2'-F 변형으로부터 선택되는, 리보스 당의 2'-OH 그룹에서의 변형인 핵산.
- [0127] 제1 가닥이 상기 제1 가닥의 위치 1부터 세어서 위치 14, 위치 2, 위치 6 또는 이들의 임의의 조합 중 임의의 위치에 2'-F를 포함하는 핵산.
- [0128] 제2 가닥이 상기 제2 가닥의 위치 1로부터 세어서 위치 7 및/또는 9, 및/또는 11, 및/또는 13에 2'-F 변형을 포함하는 핵산.
- [0129] 제2 가닥이 상기 제2 가닥의 위치 1로부터 세어서 위치 7, 9 및 11에 2'-F 변형을 포함하는 핵산.
- [0130] 제1 및 제2 가닥이 각각 2'-Me 및 2'-F 변형을 포함하는 핵산.
- [0131] 적합하게는 제1 가닥의 위치 1 내지 9 중 하나 이상에, 및/또는 제1 가닥의 위치 1 내지 9와 정렬된 제2 가닥 상의 하나 이상의 위치에 적어도 하나의 열적 불안정화 변형(thermally destabilizing modification)을 포함하는 핵산으로서, 불안정화 변형은 변형된 잠금해제 핵산(IMUNA) 및 글리콜 핵산(GNA)으로부터 선택되고, 바람직하게는 글리콜 핵산이다. 상기 핵산은 용융 온도가 약 40 내지 80°C 범위인 이중 가닥 분자, 바람직하게는 이중 가닥 RNA일 수 있다. 상기 핵산은 제1 가닥의 위치 7에 적어도 하나의 열적 불안정화 변형을 포함할 수 있다.
- [0132] 제2 가닥의 위치 1부터 세어서 상기 제2 가닥의 위치 7 내지 13에 3개 이상의 2'-F 변형을 포함하는, 예컨대 제2 가닥의 위치 7 내지 13에 4, 5, 6 또는 7개의 2'-F 변형을 포함하는 핵산.

- [0133] 제2 가닥의 위치 1부터 세어서 상기 제2 가닥이 제2 가닥의 위치 1 내지 6에 적어도 3개, 예컨대 4, 5 또는 6개의 2'-Me 변형을 포함하는 핵산.
- [0134] 상기 제1 가닥이 3' 말단 영역에, 바람직하게는 말단 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 말단 영역에, 또는 3' 말단 영역의 말단 뉴클레오타이드로부터 적어도 1 또는 2개의 뉴클레오타이드 내에 적어도 5개의 2'-Me 연속 변형을 포함하는 핵산.
- [0135] 상기 제1 가닥이 3' 말단 영역에, 바람직하게는 말단 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 말단 영역에 7개의 2'-Me 연속 변형을 포함하는 핵산.
- [0136] 바람직한 변형 패턴은 다음을 포함한다:
- [0137] 제2 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0138]  $N^A - (N)_{3-5} - N^B$
- [0139] 여기서 (상하로) N은 제1 변형을 갖는 뉴클레오타이드를 나타내고;
- [0140]  $N^A$ 는 N의 제1 변형과 상이한 제2 변형을 갖는 뉴클레오타이드를 나타내고;
- [0141]  $N^B$ 는 N의 제1 변형과 상이하지만  $N^A$ 의 제2 변형과 동일하거나 상이한 제3 변형을 갖는 뉴클레오타이드를 나타내고;
- [0142] 상기 패턴은 제2 가닥을 따라 5'에서 3'로의 방향성을 갖는다.
- [0143] 제2 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0144]  $N^A - (N)_3 - N^B$ .
- [0145] 제2 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0146]  $N^A - (N)_5 - N^B$ .
- [0147] 제2 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0148]  $Me - (F)_3 - Me$ .
- [0149] 제2 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0150]  $Me - (F)_5 - Me$ .
- [0151] 제2 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0152]  $N^C - N^A - (N)_{3-5} - N^B - N^D$
- [0153] 여기서 동일하거나 상이할 수 있는  $N^C$  및  $N^D$ 는 각각 복수의 5' 및 3' 말단 영역 화학적 변형 뉴클레오타이드를 나타내며, 적어도  $N^C$ 는 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0154]  $N^D$ 가 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드, 또는 각각 동일한 변형, 바람직하게는 2'-Me 연속 변형을 갖는 복수의 뉴클레오타이드를 포함하는 핵산.
- [0155] 제2 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0156] 5' A-A-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me 3'
- [0157] 여기서 A는 무염기 변형을 나타낸다.
- [0158] 제2 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0159] 5' A-A-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me 3'
- [0160] 여기서 A는 무염기 변형을 나타낸다.

- [0161] 제2 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0162] 5' Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-A-A 3'
- [0163] 여기서 A는 무염기 변형을 나타낸다.
- [0164] 제2 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0165] 5' Me-Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-F-Me-F-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-A-A 3'
- [0166] 여기서 A는 무염기 변형을 나타낸다.
- [0167] 제1 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0168]  $M^A - (M)_{3-5} - M^B$
- [0169] 여기서 M은 제1 변형을 갖는 뉴클레오티드를 나타내며, 전형적으로  $(M)_{3-5}$ 는 상기 제2 가닥의  $(N)_{3-5}$ 와 실질적으로 정렬되고;
- [0170]  $M^A$ 는 M의 제1 변형과 상이한 제2 변형을 갖는 뉴클레오티드를 나타내고;
- [0171]  $M^B$ 는 M의 제1 변형과 상이하지만  $M^A$ 의 제2 변형과 동일하거나 상이한 제3 변형을 갖는 뉴클레오티드를 나타낸다.
- [0172] 제1 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0173]  $M^A - (M)_3 - M^B$ .
- [0174] 제1 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0175]  $M^A - (M)_4 - M^B$ .
- [0176] 제1 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0177]  $M^A - (M)_5 - M^B$ .
- [0178] 제1 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0179]  $F - (Me)_3 - F$ .
- [0180] 제1 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0181]  $F - (Me)_4 - F$ .
- [0182] 제1 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0183]  $F - (Me)_5 - F$ .
- [0184] 제1 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0185]  $M^C - M^A - (M)_{3-5} - M^B - M^D$
- [0186] 여기서 동일하거나 상이할 수 있는  $M^C$  및  $M^D$ 는 각각 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 복수의 5' 및 3' 말단 영역 화학적 변형 뉴클레오티드를 나타낸다.
- [0187] 제1 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0188] 3' Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-F-Me 5'.
- [0189] 제1 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0190] 3' H-H-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-F-Me-F-Me 5'.



- [0191] 제1 가닥이 다음 변형 패턴을 포함하는 핵산:
- [0192] 3' Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-F-Me 5'.
- [0193] 제1 또는 제2 가닥의 위치 1은 핵산의 말단에 가장 가까운 뉴클레오타이드(임의의 무염기 뉴클레오타이드 무시)이며 백분의 당 모이어티 사이의 결합을 참조하여 분자의 해당 말단에서 멀어지는 방향으로 읽을 때 3'-5' 내부 결합을 통해 인접한 뉴클레오타이드(위치 2)에 연결된다.
- [0194] 따라서 "센스 가닥의 위치 1"은 센스 가닥의 통상적인 5' 말단에서 가장 많은 5' 뉴클레오타이드(무염기 뉴클레오타이드를 포함하지 않음)임을 알 수 있다. 전형적으로, 센스 가닥의 이 위치 1에 있는 뉴클레오타이드는 선택된 표적 핵산 서열의 5' 뉴클레오타이드와 동등할 것이고, 더욱 일반적으로 센스 가닥은 센스 가닥의 이 위치 1에서 시작하는 표적 핵산 서열의 것과 동등한 뉴클레오타이드를 가질 것이며 동시에 서열들 사이에 허용 가능한 불일치가 가능하다.
- [0195] 본원에서 사용되는 "안티센스 가닥의 위치 1"은 안티센스 가닥의 통상적인 5' 말단에서 가장 많은 5' 뉴클레오타이드(무염기 뉴클레오타이드를 포함하지 않음)이다. 전술한 바와 같이, 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에 상보성 영역이 있을 것이며, 이러한 방식으로 안티센스 가닥은 상기 언급된 표적 핵산 서열에 대한 상보성 영역도 가질 것이다.
- [0196] 특정 실시양태에서, 핵산, 예를 들어, RNAi 작용제는 적어도 하나의 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결을 추가로 포함한다. 예를 들어, 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결은 하나의 가닥, 즉 센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 3'-말단 또는 말단 영역에 있을 수 있거나; 두 가닥, 즉 센스 가닥과 안티센스 가닥의 말단에 있을 수 있다.
- [0197] 특정 실시양태에서, 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결은 하나의 가닥, 즉 센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 5' 말단 또는 말단 영역에 있거나; 두 가닥, 즉 센스 가닥과 안티센스 가닥의 말단에 있다.
- [0198] 특정 실시양태에서, 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결은 하나의 가닥, 즉 센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 5'- 및 3'-말단 모두에 또는 말단 영역에 있거나; 두 가닥, 즉 센스 가닥과 안티센스 가닥의 말단에 있다.
- [0199] 임의의 핵산은 핵산 내에 하나 이상의 포스포로티오에이트(PS) 변형, 예컨대 가닥의 말단에 적어도 2개의 PS 뉴클레오타이드간 결합을 포함할 수 있다.
- [0200] 올리고리보뉴클레오타이드 가닥 중 적어도 하나는 바람직하게는 올리고뉴클레오타이드의 마지막 3개의 뉴클레오타이드에 적어도 2개의 연속적인 포스포로티오에이트 변형을 포함한다.
- [0201] 따라서 본 발명은 또한 다음에 관한 것이다: 제2 가닥의 5' 및/또는 3' 말단 영역 및/또는 말단 근처 영역에서와 같이 적어도 2개 또는 3개의 연속 위치 사이에 각각 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함하여 상기 근처 말단 영역이 바람직하게는 상기 제2 가닥의 상기 하나 이상의 무염기 뉴클레오타이드가 위치하는 상기 말단 영역에 인접하게 되는 본원에 개시된 핵산.
- [0202] 제1 가닥의 5' 및/또는 3' 말단 영역에 적어도 2개 또는 3개의 연속 위치 사이에 각각 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함하여 바람직하게는 상기 제1 가닥의 5' 및/또는 3' 말단 영역이 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결에 의해 인접 위치에 부착되는 본원에 개시된 핵산.
- [0203] 핵산 가닥은 2개의 말단에 위치한 무염기 뉴클레오타이드와 근접한 3개의 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 RNA일 수 있다.
- [0204] 바람직한 핵산은 제2 가닥의 5' 말단에 2개의 인접한 무염기 뉴클레오타이드 및 제2 가닥의 반대편 3' 말단에 하나 이상의 GalNAc 리간드 모이어티를 포함하는 리간드 모이어티를 포함하는 이중 가닥 RNA이다. 추가로 바람직하게는, 동일한 핵산은 제2 가닥의 위치 1로부터 읽을 때 제2 가닥의 위치 3-4 및 4-5의 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트 결합도 포함할 수 있다. 추가로 바람직하게는, 동일한 핵산은 제2 가닥의 위치 7, 9 및 11에 2' F 변형도 포함할 수 있다.
- [0205] **접합체**
- [0206] 본 발명의 핵산, 예를 들어 RNA, 예를 들어, iRNA의 또 다른 변형은 핵산, 예를 들어 iRNA를, 예를 들어, 핵산,



예를 들어 iRNA의 활성, 세포 분포 또는, 예를 들어 세포로의 세포 흡수를 향상시키기 위해 하나 이상의 리간드 모이어티에 연결하는 것을 포함한다.

[0207] 일부 실시양태에서, 기술된 리간드 모이어티는 절단 가능하거나 절단 불가능할 수 있는 링커를 통해 핵산, 예를 들어, iRNA 올리고뉴클레오타이드에 부착될 수 있다. "링커" 또는 "연결 그룹"이라는 용어는 화합물의 두 부분을 연결하는, 예를 들어, 화합물의 두 부분을 공유적으로 부착시키는 유기 모이어티를 의미한다.

[0208] 리간드는 센스 가닥의 3' 또는 5' 말단에 부착될 수 있다.

[0209] 리간드는 바람직하게는, 예를 들어, 핵산, 예를 들어, RNAi 작용제의 센스 가닥의 3' 말단에 접합된다.

[0210] 따라서 본 발명은 추가 측면에서 세포에서 표적 유전자의 발현을 억제하기 위한 접합체에 관한 것이며, 상기 접합체는 본원에 개시된 바와 같은 핵산을 포함하는 핵산 부분 및 하나 이상의 리간드 모이어티를 포함한다.

[0211] 한 측면에서, 핵산의 제2 가닥은 하나 이상의 리간드 모이어티(들)에 직접적으로 또는 간접적으로(예를 들어, 링커를 통해) 접합되며, 상기 리간드 모이어티는 전형적으로 제2 가닥의 말단 영역, 바람직하게는 3' 말단 영역에 존재한다.

[0212] 특정 실시양태에서, 리간드 모이어티는 링커를 통해 핵산, 예를 들어, dsRNA에 부착된 GalNAc 또는 GalNAc 유도체를 포함한다.

[0213] 따라서 본 발명은 리간드 모이어티가 다음을 포함하는 접합체에 관한 것이다:

[0214] i) 하나 이상의 GalNAc 리간드; 및/또는

[0215] ii) 하나 이상의 GalNAc 리간드 유도체; 및/또는

[0216] iii) 링커를 통해 상기 핵산에 접합된 하나 이상의 GalNAc 리간드.

[0217] 상기 GalNAc 리간드는 핵산의 제2 가닥의 5' 또는 3' 말단 영역, 바람직하게는 3' 말단 영역에 직접적으로 또는 간접적으로 접합될 수 있다.

[0218] GalNAc 리간드는 당업계에서 잘 알려져 있고 특히 EP3775207A1에 기술되어 있다.

## [0219] 벡터 및 세포

[0220] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 억제성 RNA[RNAi]와 같은 핵산을 함유하는 세포를 제공한다.

[0221] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

## [0222] 약제학적으로 허용되는 조성물

[0223] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 핵산을 포함하는, 표적 유전자의 발현을 억제하기 위한 약제학적 조성물을 제공한다.

[0224] 약제학적으로 허용되는 조성물은 부형제 및/또는 담체를 포함할 수 있다.

[0225] 약제학적으로 허용되는 담체로 작용할 수 있는 물질의 일부 예는 다음을 포함한다: (1) 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; (2) 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; (3) 셀룰로오스 및 이의 유도체, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스 및 셀룰로오스 아세테이트; (4) 분말화된 트라가칸트(powdered tragacanth); (5) 맥아(malt); (6) 젤라틴; (7) 윤활제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 라우릴 설페이트 및 활석; (8) 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌약 왁스; (9) 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; (10) 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; (11) 폴리올, 예컨대 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; (12) 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; (13) 한천; (14) 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; (15) 알긴산; (16) 발열원 제거수(pyrogen-free water); (17) 등장성 식염수; (18) 링거액; (19) 에틸 알코올; (20) pH 완충 용액; (21) 폴리에스테르, 폴리카보네이트 및/또는 폴리 무수물; (22) 증량제(bulking agent), 예컨대 폴리펩티드 및 아미노산, (23) 혈청 성분, 예컨대 혈청 알부민, HDL 및 LDL; 및 (22) 약제학적 제형에 사용되는 기타 무독성 상용성 물질.

[0226] 전형적인 약제학적 담체는 결합제(예를 들어, 전호화(pregelatinized) 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스 등); 충전제(예를 들어, 락토스 및 기타 당, 미정질 셀룰로오스, 펙틴, 젤라틴, 황산칼슘, 에틸 셀룰로오스, 폴리아크릴레이트 또는 인산수소칼슘 등); 윤활제(예를 들어, 마그네슘 스테아레이

트, 활석, 실리카, 콜로이드성 이산화규소, 스테아르산, 금속 스테아레이트, 식물성 경화유, 옥수수 전분, 폴리 에틸렌 글리콜, 나트륨 벤조에이트, 나트륨 아세테이트 등); 봉해제(예를 들어, 전분, 나트륨 전분 글리콜레이 트 등); 및 습윤제(예를 들어, 나트륨 라우릴 설페이트 등)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0227] 핵산과 유해하게 반응하지 않는 비경구 이외의 투여(non-parenteral administration)에 적합한 약제학적으로 허용되는 유기 또는 무기 부형제를 사용하여 본 발명의 조성물을 제형화할 수도 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 부형제는 물, 염 용액, 알콜, 폴리에틸렌 글리콜, 젤라틴, 락토스, 아밀로스, 마그네슘 스테아레이트, 활 석, 규산, 점성 파라핀, 하이드록시메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0228] 핵산의 국소 투여용 제형은 멸균 및 비멸균 수용액, 알코올과 같은 통상의 용매 중 비수성 용액, 또는 액체 또 는 고체 오일 베이스 중 핵산 용액을 포함할 수 있다. 용액은 또한 완충제, 희석제 및 기타 적절한 첨가제를 포 함할 수 있다. 핵산과 유해하게 반응하지 않는 비경구 이외의 투여에 적합한 약제학적으로 허용되는 유기 또는 무기 부형제가 사용될 수 있다.

[0229] 한 실시양태에서, 핵산 또는 조성물은 완충되지 않은 용액으로 투여된다. 특정 실시양태에서, 완충되지 않은 용 액은 식염수 또는 물이다. 다른 실시양태에서, 핵산, 예를 들어, RNAi 작용제는 완충 용액으로 투여된다. 이러 한 실시양태에서, 완충 용액은 아세테이트, 시트레이트, 프롤라민(prolamine), 탄산염(carbonate) 또는 인산염, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 완충 용액은 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)일 수 있다.

## [0230] 투여량

[0231] 본 발명의 약제학적 조성물은 유전자의 발현을 억제하기에 충분한 투여량으로 투여될 수 있다. 일반적으로, 핵 산, 예를 들어, 본 발명의 iRNA의 적절한 투여량은 1일 수용자의 체중 1kg당 약 0.001 내지 약 200.0mg의 범위, 일반적으로 1일 체중 1kg당 약 1 내지 50mg의 범위일 것이다. 전형적으로, 핵산, 예를 들어, 본 발명의 iRNA의 적합한 투여량은 약 0.1mg/kg 내지 약 5.0mg/kg, 예를 들어, 약 0.3mg/kg 및 약 3.0 mg/kg의 범위일 것이다.

[0232] 반복 투여 요법은 핵산, 예를 들어, iRNA의 치료량을 격일 또는 1년에 한 번과 같이 정기적으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 핵산, 예를 들어, iRNA는 월 약 1회 내지 분기당 약 1회(즉, 3개월마다 약 1회) 투여된다.

[0233] 다양한 실시양태에서, 핵산, 예를 들어, RNAi 작용제는 약 0.01mg/kg 내지 약 10mg/kg 또는 약 0.5mg/kg 내지 약 50mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 핵산, 예를 들어, RNAi 작용제는 약 10mg/kg 내지 약 30mg/kg의 용량으로 투여된다. 특정 실시양태에서, 핵산, 예를 들어, RNAi 작용제는 약 0.5mg/kg, 1mg/kg, 1.5mg/kg, 3mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg 및 30mg/kg으로부터 선택된 용량으로 투여된다. 특정 실시양태에서, 핵산, 예를 들어, RNAi 작용제는 약 0.1mg/kg 내지 약 5.0mg/kg의 용량으로 주당 약 1회, 월 1회, 격월로 1회, 또는 분기당 1회(즉, 3개월마다 1회) 투여된다. 특정 실시양태에서, 핵산, 예를 들어, RNAi 작용제는 주 1회 대상체 에게 투여된다. 특정 실시양태에서, 핵산, 예를 들어, RNAi 작용제는 월 1회 대상체에게 투여된다. 특정 실시양 태에서, 핵산, 예를 들어, RNAi 작용제는 분기당(즉, 3개월마다) 1회 투여된다.

[0234] 초기 치료 섭생 후, 치료는 덜 빈번하게 시행될 수 있다. 예를 들어, 3개월 동안 매주 또는 격주로 투여한 후, 투여를 월 1회로 6개월 또는 1년 동안 또는 그보다 더 오래 반복할 수 있다.

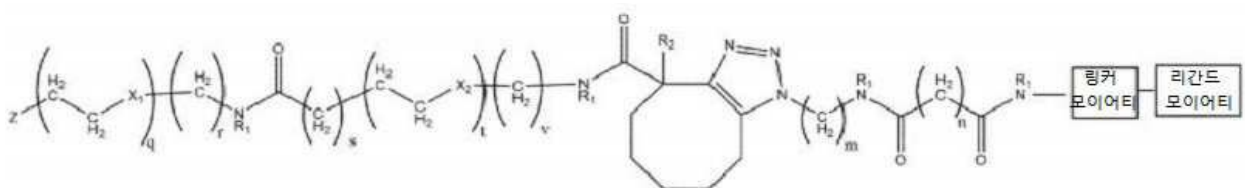
[0235] 약제학적 조성물은 매일 1회 투여될 수 있거나, 하루 종일 적절한 간격으로 2회, 3회 또는 그보다 많이 하위용 량으로 투여될 수 있거나 심지어 제어 방출 제형을 통한 연속 주입 또는 전달을 사용하여 투여될 수 있다. 이 경우, 각 하위용량에 함유된 핵산, 예를 들어, iRNA는 총 일일 용량을 달성하기 위해 상응하게 더 적어야 한다. 투여 단위는 또한, 예를 들어 수일에 걸쳐 iRNA와 같은 핵산의 서방출(sustained release)을 제공하는 통상적인 서방형 제형을 사용하여, 수일에 걸쳐 전달하기 위해 합성될 수 있다. 서방형 제형은 당업계에 잘 알려져 있으 며, 특정 부위에서 작용제의 전달에 특히 유용하고, 예컨대 본 발명의 작용제와 함께 사용될 수 있다. 이 실시 양태에서, 투여 단위는 상응하는 일일 투여량의 배수를 포함한다.

[0236] 다른 실시양태에서, 약제학적 조성물의 단일 용량은 후속 용량이 3일, 4일 또는 5일 이하의 간격으로, 또는 1일, 2일, 3일, 또는 4주 이하의 간격으로 투여되도록 오래 지속될 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물의 단일 용량은 주 1회 투여된다. 본 발명의 다른 실시양태에서, 본 발명의 약제학적 조 성물의 단일 용량은 격월로 투여된다. 특정 실시양태에서, iRNA는 월당 약 1회에서 분기당 약 1회(즉, 3개월마 다 약 1회), 또는 심지어 6개월 마다 또는 12개월마다 투여된다.

- [0237] 본 발명에 포함되는 개별 핵산, 예를 들어, iRNA에 대한 유효 투여량 및 생체 내 반감기의 추정치는 당업계에 공지된 바와 같이 통상적인 방법론을 사용하거나 적절한 동물 모델을 사용하는 생체 내 시험에 기초하여 만들 수 있다.
- [0238] 본 발명의 약제학적 조성물은 국소 또는 전신 치료가 바람직한지 여부 및 치료될 영역에 따라 다양한 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 국소적(예를 들어, 경피 패치에 의해), 예를 들어, 네블라이저를 사용하는 것을 포함하여 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 취입(insufflation)에 의한 폐; 기관 내, 비강 내, 표피 및 경피, 경구 또는 비경구일 수 있다. 비경구 투여는 정맥 내, 동맥 내, 피하, 복강 내 또는 근육 내 주사 또는 주입; 예를 들어, 이식된 장치를 통한 피하; 또는, 예를 들어, 실질 내(intraparenchymal), 척수강 내(intrathecal) 또는 뇌실 내(intraventricular) 투여에 의한 두개 내(intracranial)를 포함한다. 특정 바람직한 실시양태에서, 조성물은 정맥 내 주입 또는 주사에 의해 투여된다. 특정 실시양태에서, 조성물은 피하 주사에 의해 투여된다.
- [0239] 한 실시양태에서, 핵산, 예를 들어, RNAi 작용제는 대상체에게 피하로 투여된다.
- [0240] 핵산, 예를 들어, iRNA는 특정 조직(예를 들어, 특히 간 세포)을 표적으로 하는 방식으로 전달될 수 있다.
- [0241] **유전자 발현을 억제하는 방법**
- [0242] 본 발명은 또한 세포에서 유전자의 발현을 억제하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 세포를 세포 내 유전자의 발현을 억제하기에 효과적인 양의 본 발명의 핵산, 예를 들어, RNAi 작용제, 예컨대 이중 가닥 RNAi 작용제와 접촉시킴으로써 세포 내 유전자의 발현을 억제하는 것을 포함한다.
- [0243] 세포와 핵산, 예를 들어, iRNA, 예컨대 이중 가닥 RNAi 작용제의 접촉은 시험관 내 또는 생체 내에서 수행될 수 있다. 핵산, 예를 들어, iRNA와 세포의 접촉은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체 내의 세포 또는 세포 군을 핵산, 예를 들어, iRNA와 접촉시키는 것을 포함한다. 세포를 접촉시키는 시험관 내 및 생체 내 방법의 조합도 가능하다. 위에서 논의한 바와 같이 세포 접촉은 직접적이거나 간접적일 수 있다. 또한, 세포 접촉은 본원에 기술되거나 당업계에 공지된 임의의 리간드 모이어티를 포함하는 표적화 리간드 모이어티를 통해 달성될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 표적화 리간드 모이어티는 탄수화물 모이어티, 예를 들어, GalNAc3 리간드, 또는 RNAi 작용제를 관심 부위로 향하게 하는 임의의 다른 리간드 모이어티이다.
- [0244] 본원에서 사용되는 "억제하는"이라는 용어는 "감소시키는", "침묵시키는", "하향조절하는", "진정시키는" 및 기타 유사한 용어와 상호교환적으로 사용되며, 임의의 억제 수준을 포함한다.
- [0245] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, 유전자의 발현은 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%, 또는 검정의 검출 수준 아래로 억제된다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은, 예를 들어, 유전자 발현을 감소시키는 작용제로 대상체를 치료한 후 임상적으로 관련된 결과에 의해 입증되는 바와 같이 표적 유전자 발현의 임상적으로 관련된 억제를 포함한다.
- [0246] 유전자 발현의 억제는 적합한 대조군과 비교하여 관심 표적 유전자의 mRNA 양의 감소에 의해 명백해질 수 있다.
- [0247] 다른 실시양태에서, 유전자 발현의 억제는 유전자 발현에 기능적으로 연결된 파라미터, 예를 들어, 단백질 발현 또는 신호전달 경로의 감소 측면에서 평가될 수 있다.
- [0248] **유전자 발현과 관련된 질환의 치료 또는 예방 방법**
- [0249] 본 발명은 핵산, 예를 들어, 본 발명의 iRNA, 또는 핵산, 예를 들어, 본 발명의 iRNA를 함유하는 조성물을 세포에서 유전자 발현을 감소시키거나 억제하기 위해 사용하는 방법도 제공한다. 상기 방법은 세포를 핵산, 예를 들어, 본 발명의 dsRNA와 접촉시키고 유전자의 mRNA 전사체의 분해를 얻기에 충분한 시간 동안 상기 세포를 유지함으로써 상기 세포에서 유전자의 발현을 억제하는 것을 포함한다. 유전자 발현의 감소는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 평가될 수 있다.
- [0250] 본 발명의 방법에서 세포는 시험관 내 또는 생체 내에서 접촉될 수 있으며, 즉 세포는 대상체 내에 있을 수 있다.
- [0251] 본 발명의 방법을 사용한 치료에 적합한 세포는 질환과 관련된 관심 유전자를 발현하는 임의의 세포일 수 있다.
- [0252] 본 발명의 생체 내 방법은 본 발명의 핵산, 예를 들어, iRNA를 함유하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함할 수 있고, 상기 핵산, 예를 들어, iRNA는 치료될 포유동물 유전자의 RNA 전사체의 적어도 일부에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

- [0253] 본 발명은 치료가 필요한 대상체의 치료 방법을 추가로 제공한다. 본 발명의 치료 방법은 본 발명의 iRNA와 같은 핵산을 대상체, 예를 들어, 유전자 발현의 감소 또는 억제로부터 이익을 얻을 대상체에게, 예를 들어, 유전자를 표적으로 하는 iRNA와 같은 핵산 또는 유전자를 표적으로 하는 핵산을 포함하는 억제학적 조성물의 치료적 유효량으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0254] 억제학적 조성물의 부재 하에서 투여되는 핵산, 예를 들어, 본 발명의 iRNA는 "유리(free)" 핵산 또는 "유리 iRNA"로서 투여될 수 있다. 네이키드(naked) 핵산은 적합한 완충 용액에 있을 수 있다. 완충 용액은 아세트이트, 시트레이트, 프롤라민, 탄산염 또는 인산염, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 완충 용액은 인산완충생리식염수(PBS)이다. 완충 용액의 pH 및 삼투질농도(osmolarity)는 대상체에게 투여하기에 적합하도록 조절될 수 있다.
- [0255] 대안적으로, 핵산, 예를 들어, 본 발명의 iRNA는 dsRNA 리포좀 제형과 같은 억제학적 조성물로서 투여될 수 있다.
- [0256] 한 실시양태에서, 상기 방법은 표적 유전자의 발현이 감소되도록, 예컨대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24시간, 28, 32 또는 약 36시간 동안 본원의 특징적인 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 표적 유전자의 발현은 연장된 기간 동안, 예를 들어, 적어도 약 2, 3, 4일 이상, 예를 들어, 약 1주, 2주, 3주 또는 4주 이상, 예를 들어, 약 1개월, 2개월 또는 3개월 동안 감소된다.
- [0257] 대상체는 핵산, 예를 들어, iRNA의 치료량, 예컨대 약 0.01mg/kg 내지 약 200mg/kg을 투여받을 수 있다.
- [0258] 핵산, 예를 들어, iRNA는 일정 기간 동안 정기적으로 정맥 내 주입으로 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 초기 치료 섭생 후, 치료는 덜 빈번하게 투여될 수 있다. iRNA의 투여는, 예를 들어, 환자의 세포 또는 조직에서 표적 유전자의 유전자 생성물 수준을 적어도 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%, 또는 사용된 검정 방법의 검출 수준 아래로 감소시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 투여는 유전자 관련 장애의 적어도 하나의 징후 또는 증상의 임상적 안정화 또는 바람직하게는 임상적으로 관련된 감소를 초래한다.
- [0259] 대안적으로, 핵산, 예를 들어, iRNA는 피하, 즉 피하 주사에 의해 투여될 수 있다. 하나 이상의 주사를 사용하여 원하는 일일 용량의 핵산, 예를 들어, iRNA를 대상체에게 전달할 수 있다. 주사는 일정 기간에 걸쳐 반복될 수 있다. 투여는 정기적으로 반복될 수 있다. 특정 실시양태에서, 초기 치료 섭생 후, 치료는 덜 빈번하게 투여될 수 있다. 반복-용량 요법은 격일로 또는 1년에 한 번과 같이 정기적으로 치료량의 핵산을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 핵산은 월당 약 1회 내지 분기당 약 1회(즉, 약 3개월마다 1회) 투여된다.
- [0260] 한 측면에서 본 발명은 1-101로 넘버링된 다음 문장의 화합물, 공정, 조성물 또는 용도에 적용될 수 있다(여기서 문장 1-101에서 임의의 화학식에 대한 언급은 문장 1-101 내에 정의된 화학식만을 지칭한다. 이러한 화학식은 도 43에 재현되어 있다).

- [0261] 1. 하기 구조를 포함하는 화합물:



[0262]

[0263] [화학식 I]

[0264] 여기서:

[0265] R<sub>1</sub>은 각 경우에 수소, 메틸 및 에틸로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0266] R<sub>2</sub>는 수소, 하이드록시, -OC<sub>1-3</sub>알킬, -C(=O)OC<sub>1-3</sub>알킬, 할로 및 니트로로 이루어진 군으로부터 선택되고;

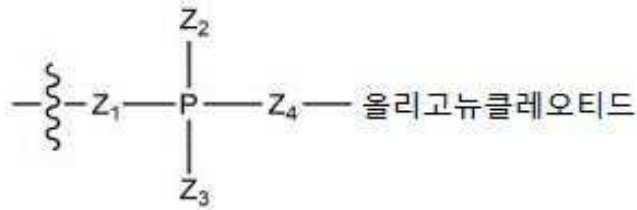
[0267] X<sub>1</sub> 및 X<sub>2</sub>는 각 경우에 메틸렌, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0268] m은 1 내지 6의 정수이고;

- [0269]  $n$ 은 1 내지 10의 정수이고;
- [0270]  $q, r, s, t, v$ 는 독립적으로 0 내지 4의 정수이고, 단:
- [0271] (i)  $q$ 와  $r$ 은 동시에 0이 될 수 없고;
- [0272] (ii)  $s, t$  및  $v$ 는 모두 동시에 0이 될 수 없고;
- [0273]  $Z$ 는 올리고뉴클레오타이드 모이어티이다.
- [0274] 2. 문장 1에 있어서,  $R_1$ 이 각 경우에 수소인 화합물.
- [0275] 3. 문장 1에 있어서,  $R_1$ 이 메틸인 화합물.
- [0276] 4. 문장 1에 있어서,  $R_1$ 이 에틸인 화합물.
- [0277] 5. 문장 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서,  $R_2$ 가 하이드록시인 화합물.
- [0278] 6. 문장 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서,  $R_2$ 가 할로인 화합물.
- [0279] 7. 문장 6에 있어서,  $R_2$ 가 플루오로인 화합물.
- [0280] 8. 문장 6에 있어서,  $R_2$ 가 클로로인 화합물.
- [0281] 9. 문장 6에 있어서,  $R_2$ 가 브로모인 화합물.
- [0282] 10. 문장 6에 있어서,  $R_2$ 가 요오도인 화합물.
- [0283] 11. 문장 6에 있어서,  $R_2$ 가 니트로인 화합물.
- [0284] 12. 문장 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서,  $X_1$ 이 메틸렌인 화합물.
- [0285] 13. 문장 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서,  $X_1$ 이 산소인 화합물.
- [0286] 14. 문장 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서,  $X_1$ 이 황인 화합물.
- [0287] 15. 문장 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서,  $X_2$ 가 메틸렌인 화합물.
- [0288] 16. 문장 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서,  $X_2$ 가 산소인 화합물.
- [0289] 17. 문장 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서,  $X_2$ 가 황인 화합물.
- [0290] 18. 문장 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서,  $m = 3$ 인 화합물.
- [0291] 19. 문장 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서,  $n = 6$ 인 화합물.
- [0292] 20. 문장 13 및 15에 있어서,  $X_1$ 이 산소이고  $X_2$ 가 메틸렌이고, 바람직하게는
- [0293]  $q = 1$ ,
- [0294]  $r = 2$ ,
- [0295]  $s = 1$ ,
- [0296]  $t = 1$ ,
- [0297]  $v = 1$ 인 화합물.
- [0298] 21. 문장 12 및 15에 있어서,  $X_1$  및  $X_2$ 가 모두 메틸렌이고, 바람직하게는
- [0299]  $q = 1$ ,
- [0300]  $r = 3$ ,
- [0301]  $s = 1$ ,
- [0302]  $t = 1$ ,
- [0303]  $v = 1$ 인 화합물.



[0304] 22. 문장 1 내지 21 중 어느 하나에 있어서, Z가 다음인 화합물:



[0305]

[0306] 여기서:

[0307] Z1, Z2, Z3, Z4는 각 경우에 독립적으로 산소 또는 황이고;

[0308] P와 Z2 사이의 결합 및 P와 Z3 사이의 결합 중 하나는 단일 결합이고 다른 결합은 이중 결합이다.

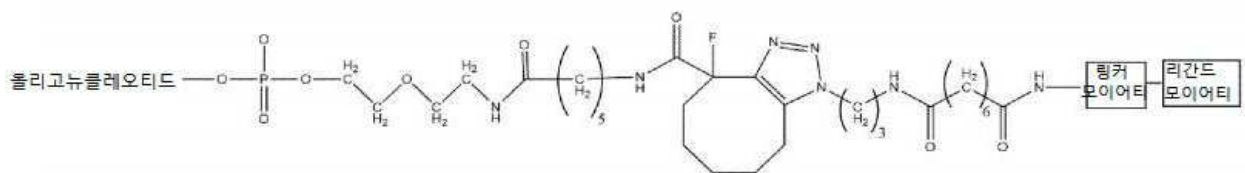
[0309] 23. 문장 22에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드가 표적 유전자의 발현을 조절할 수 있는, 바람직하게는 억제할 수 있는 RNA 화합물인 화합물.

[0310] 24. 문장 23에 있어서, 상기 RNA 화합물이 제1 및 제2 가닥을 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하고, 제1 가닥은 표적 유전자의 RNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제2 가닥은 상기 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제1 및 제2 가닥 각각은 5' 및 3' 말단을 갖는 화합물.

[0311] 25. 문장 24에 있어서, RNA 화합물이 이의 제2 가닥의 5' 말단에서 인접한 인산염에 부착되어 있는 화합물.

[0312] 26. 문장 24에 있어서, RNA 화합물이 이의 제2 가닥의 3' 말단에서 인접한 인산염에 부착되어 있는 화합물.

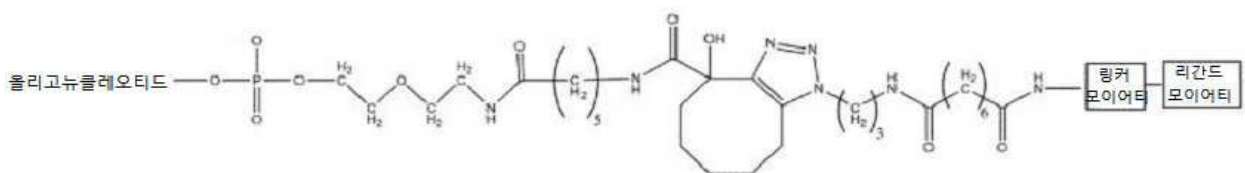
[0313] 27. 화학식 II의 화합물:



[0314]

[0315] [화학식 II]

[0316] 28. 화학식 III의 화합물:



[0317]

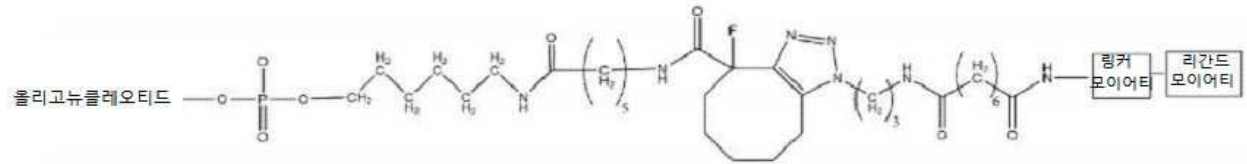
[0318] [화학식 III]

[0319] 29. 문장 27 또는 28에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 제1 및 제2 가닥을 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하고, 제1 가닥은 표적 유전자의 RNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제2 가닥은 상기 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제1 및 제2 가닥 각각은 5' 및 3' 말단을 갖고, 상기 RNA 듀플렉스는 이의 제2 가닥의 5' 말단에서 인접한 인산염에 부착되어 있는 화합물.

[0320] 30. 선택적으로 문장 29에 종속되는, 문장 27에 정의된 바와 같은 화학식 II의 화합물 및 문장 28에 정의된 바와 같은 화학식 III의 화합물을 포함하는 조성물.

[0321] 31. 문장 30에 있어서, 문장 28에 정의된 바와 같은 상기 화학식 III의 화합물이 상기 조성물의 10 내지 15중량% 범위의 양으로 존재하는 조성물.

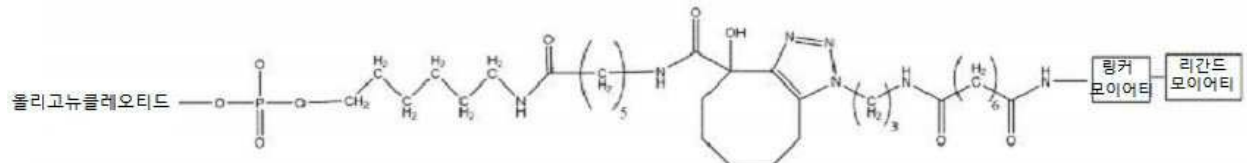
[0322] 32. 화학식 IV의 화합물:



[0323]

[0324] [화학식 IV]

[0325] 33. 화학식 V의 화합물:



[0326]

[0327] [화학식 V]

[0328] 34. 문장 32 또는 33에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 제1 및 제2 가닥을 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하고, 제1 가닥은 표적 유전자의 RNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제2 가닥은 상기 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제1 및 제2 가닥 각각은 5' 및 3' 말단을 갖고, 상기 RNA 듀플렉스는 이의 제2 가닥의 3' 말단에서 인접한 인산염에 부착되어 있는 화합물.

[0329] 35. 선택적으로 문장 34에 종속되는, 문장 32에 정의된 바와 같은 화학식 IV의 화합물 및 문장 33에 정의된 바와 같은 화학식 V의 화합물을 포함하는 조성물.

[0330] 36. 문장 35에 있어서, 문장 33에 정의된 바와 같은 상기 화학식 V의 화합물이 상기 조성물의 10 내지 15중량% 범위의 양으로 존재하는 조성물.

[0331] 37. 문장 1 내지 29 또는 32 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 2' 위치에 하나 이상의 변형된 리보스, 바람직하게는 2' 위치에 복수의 변형된 리보스를 추가로 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하는 화합물.

[0332] 38. 문장 37에 있어서, 변형이 2'-O-메틸, 2'-데옥시-플루오로 및 2'-데옥시로부터 선택되는 화합물.

[0333] 39. 문장 1 내지 29, 또는 32 내지 34, 또는 37 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 하나 이상의 말단에 하나 이상의 분해 보호 모이어티를 추가로 포함하는 화합물.

[0334] 40. 문장 39에 있어서, 상기 하나 이상의 분해 보호 모이어티가 리간드 모이어티를 운반하는 올리고뉴클레오타이드 가닥의 말단에 존재하지 않고/않거나 상기 하나 이상의 분해 보호 모이어티가 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결, 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 및 역 무염기 뉴클레오타이드로부터 선택되고, 상기 역 무염기 뉴클레오타이드는 리간드 모이어티를 운반하는 가닥의 원위 말단에 존재하는 화합물.

[0335] 41. 문장 1 내지 29, 또는 32 내지 34, 또는 37 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 문장 1에서 화학식 I에 묘사된 바와 같은 상기 리간드 모이어티가 하나 이상의 리간드를 포함하는 화합물.

[0336] 42. 문장 41에 있어서, 문장 1에서 화학식 I에 묘사된 바와 같은 상기 리간드 모이어티가 하나 이상의 탄수화물 리간드를 포함하는 화합물.

[0337] 43. 문장 42에 있어서, 상기 하나 이상의 탄수화물이 단당류, 이당류, 삼당류, 사당류, 올리고당류 또는 다당류일 수 있는 화합물.

[0338] 44. 문장 43에 있어서, 상기 하나 이상의 탄수화물이 하나 이상의 갈락토스 모이어티, 하나 이상의 락토스 모이어티, 하나 이상의 N-아세틸갈락토사민 모이어티 및/또는 하나 이상의 만노스 모이어티를 포함하는 화합물.

[0339] 45. 문장 44에 있어서, 상기 하나 이상의 탄수화물이 하나 이상의 N-아세틸-갈락토사민 모이어티를 포함하는 화



합물.

46. 문장 45에 있어서, 2개 또는 3개의 N-아세틸갈락토사민 모이어티를 포함하는 화합물.

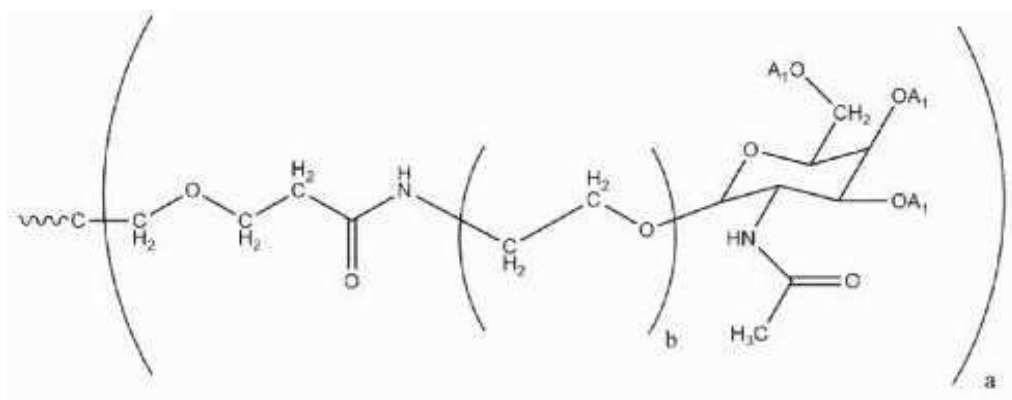
47. 문장 41 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 리간드가 선형 구성 또는 분지형 구성으로 부착되어 있는 화합물.

48. 문장 47에 있어서, 상기 하나 이상의 리간드가 바이안테너리(biantennary) 또는 트리안테너리(triantennary) 분지형 구성으로 부착되어 있는 화합물.

49. 문장 46 내지 48에 있어서, 문장 1에서 화학식 I에 묘사된 바와 같은 상기 모이어티:



가 화학식 VIa, VIb 또는 VIc 중 임의의 것, 바람직하게는 화학식 VIa 또는 화학식 VIb 또는 화학식 VIc인 화합물:



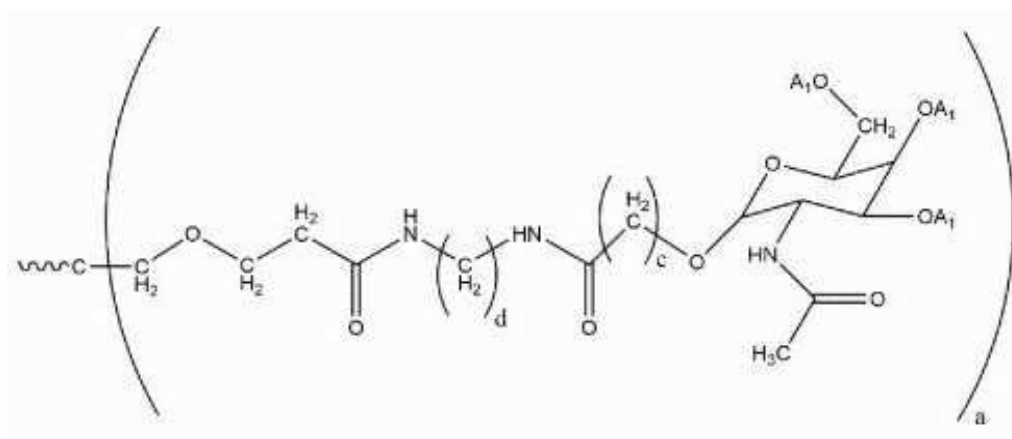
[화학식 VIa]

여기서:

A<sub>1</sub>는 수소 또는 적합한 하이드록시 보호 그룹이고;

$a$ 는 2 또는 3의 정수이고;

b는 2 내지 5의 정수이다;



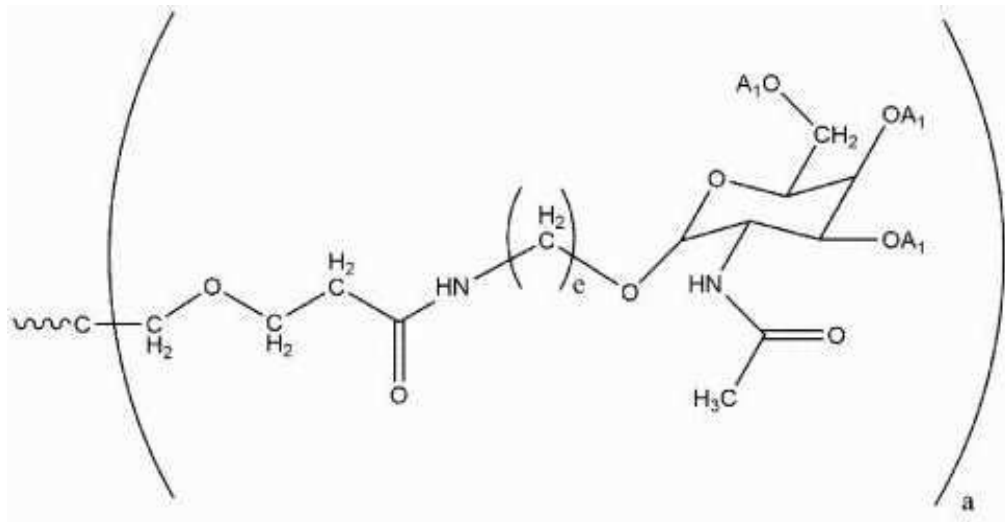
[화학식 VIb]

여기서:

A<sub>1</sub>는 수소 또는 적합한 하이드록시 보호 그룹이고;

[0355] a는 2 또는 3의 정수이고;

[0356] c 및 d는 독립적으로 1 내지 6의 정수이다;



[0357]

[0358] [화학식 VIc]

[0359] 여기서:

[0360] A<sub>1</sub>는 수소 또는 적합한 하이드록시 보호 그룹이고;

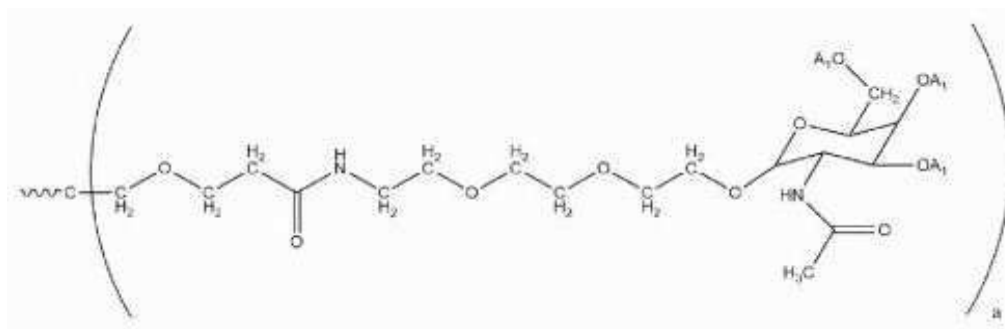
[0361] a는 2 또는 3의 정수이고;

[0362] e는 2 내지 10의 정수이다.

[0363] 50. 문장 46 내지 48에 있어서, 문장 1에서 화학식 I에 묘사된 바와 같은 상기 모이어티:



[0364] 가 화학식 VII인 화합물:



[0365]

[0366] [화학식 VII]

[0367] 여기서:

[0368] A<sub>1</sub>는 수소이고;

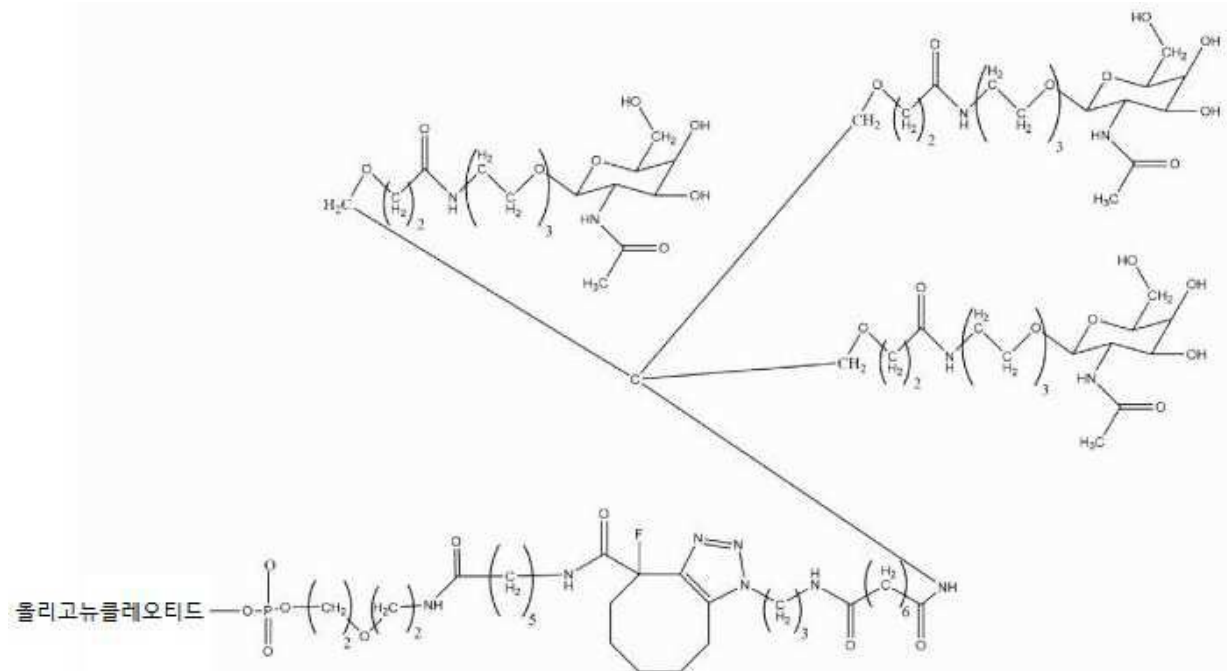
[0369] a는 2 또는 3의 정수이다.

[0370] 51. 문장 49 또는 50에 있어서, a = 2인 화합물.

[0371] 52. 문장 49 또는 50에 있어서, a = 3인 화합물.

[0372] 53. 문장 49에 있어서, b = 3인 화합물.

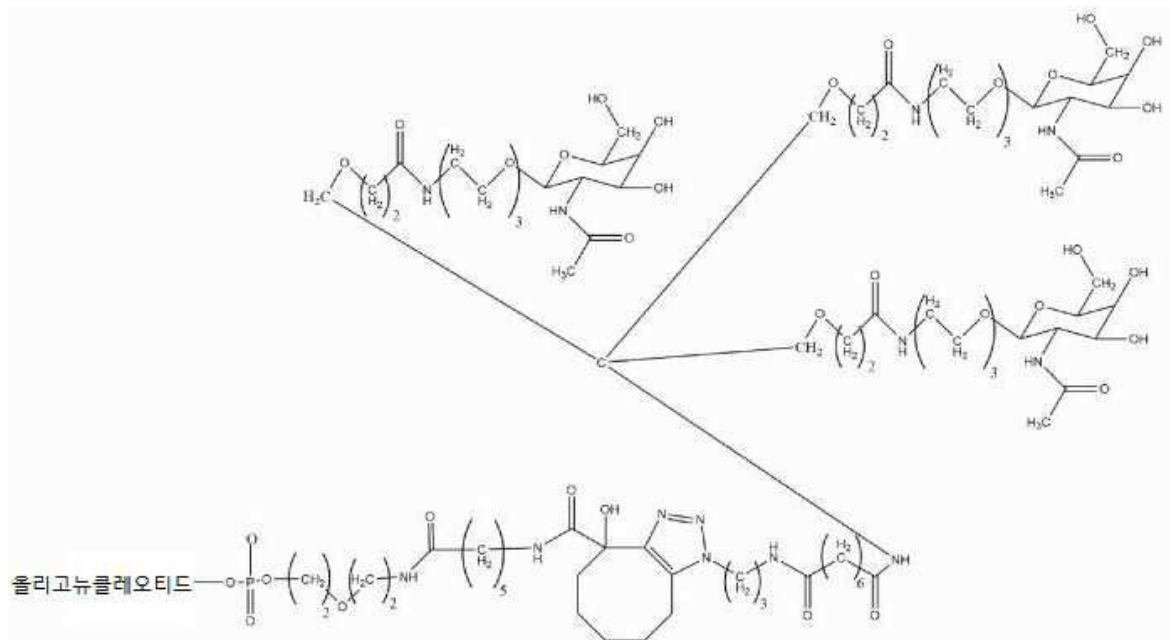
[0373] 54. 화학식 VIII의 화합물:



[0374]

[0375] [화학식 VIII]

[0376] 55. 화학식 IX의 화합물:



[0377]

[0378] [화학식 IX]

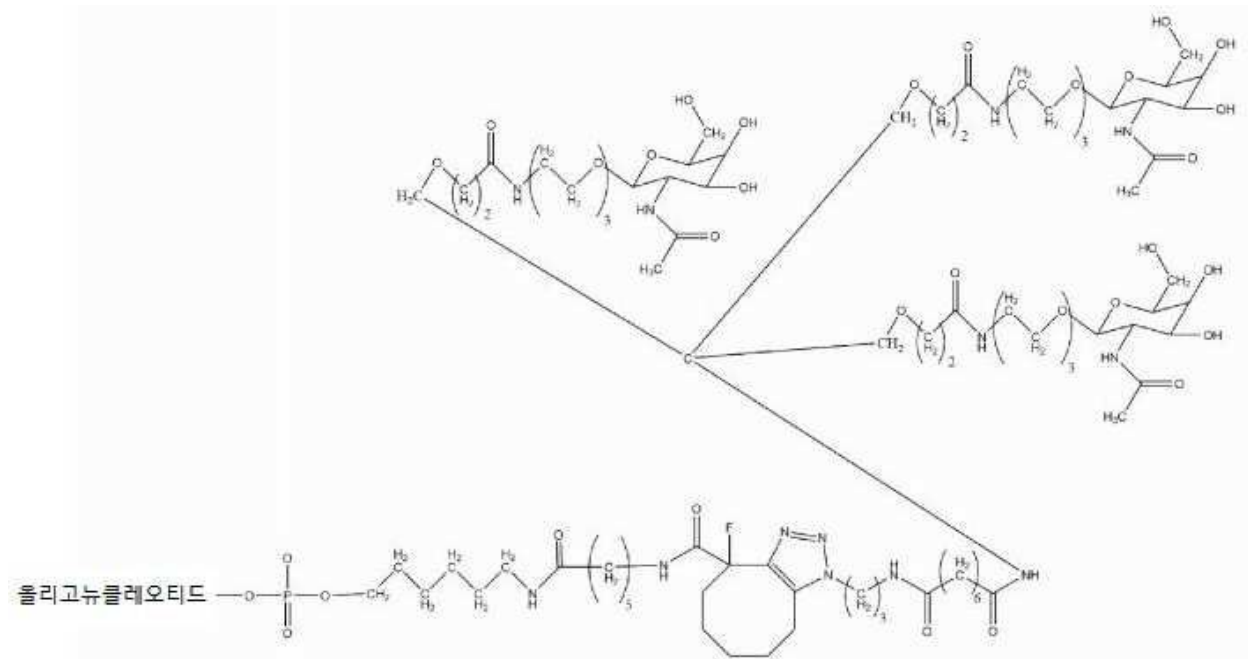
[0379] 56. 문장 54 또는 55에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 제1 및 제2 가닥을 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하고, 제1 가닥은 표적 유전자의 RNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제2 가닥은 상기 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제1 및 제2 가닥 각각은 5' 및 3' 말단을 갖고, 상기 RNA 듀플렉스는 이의 제2 가닥의 5' 말단에서 인접한 인산염에 부착되어 있는 화합물.

[0380] 57. 선택적으로 문장 56에 종속되는, 문장 54에 정의된 바와 같은 화학식 VIII의 화합물 및 문장 55에 정의된 바와 같은 화학식 IX의 화합물을 포함하는 조성물.

[0381] 58. 문장 57에 있어서, 문장 55에 정의된 바와 같은 상기 화학식 IX의 화합물이 상기 조성물의 10 내지 15중량%

범위의 양으로 존재하는 조성물.

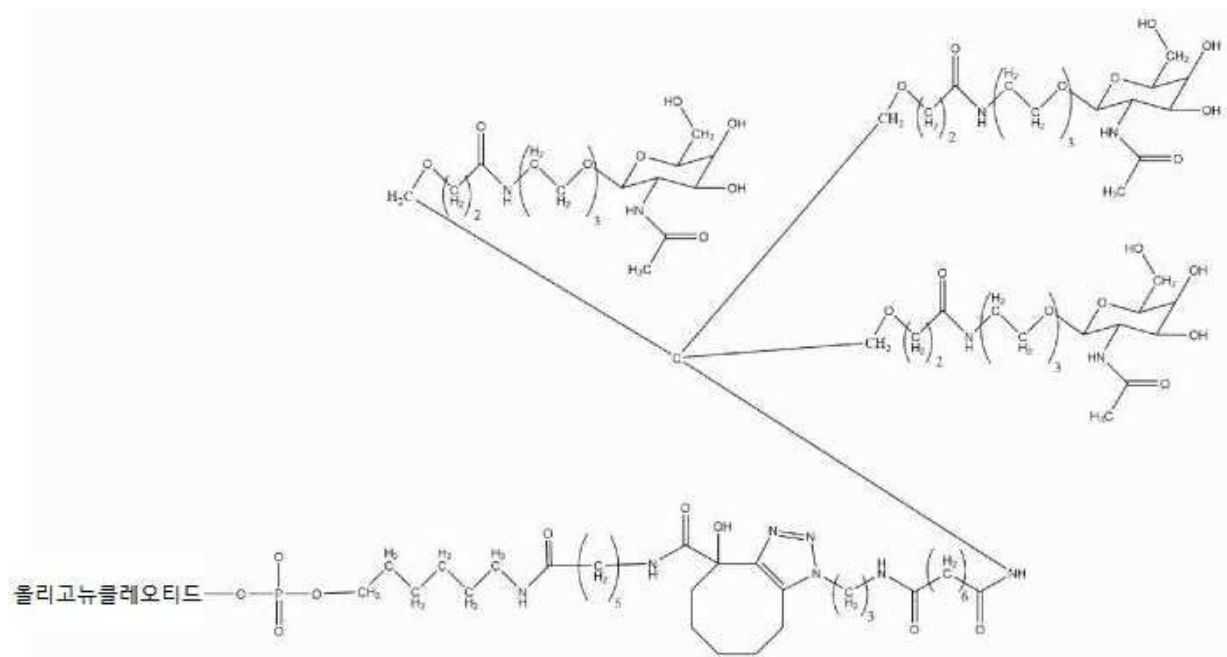
[0382] 59. 화학식 X의 화합물:



[0383]

[0384] [화학식 X]

[0385] 60. 화학식 X I의 화합물:



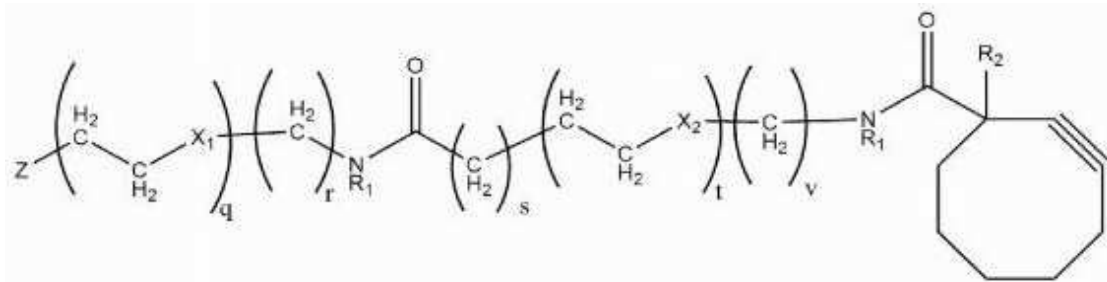
[0386]

[0387] [화학식 X I]

[0388] 61. 문장 59 또는 60에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 제1 및 제2 가닥을 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하고, 제1 가닥은 표적 유전자의 RNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제2 가닥은 상기 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제1 및 제2 가닥 각각은 5' 및 3' 말단을 갖고, 상기 RNA 듀플렉스는 이의 제2 가닥의 3' 말단에서 인접한 인산염에 부착되어 있는 화합물.

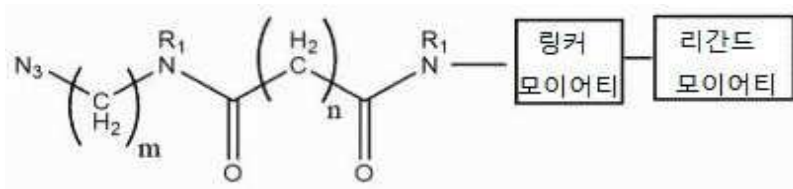
[0389] 62. 선택적으로 문장 61에 종속되는, 문장 59에 정의된 바와 같은 화학식 X의 화합물 및 문장 60에 정의된 바와 같은 화학식 X I의 화합물을 포함하는 조성물.

- [0390] 63. 문장 62에 있어서, 문장 60에 정의된 바와 같은 상기 화학식 X I의 화합물이 상기 조성물의 10 내지 15중량% 범위의 양으로 존재하는 조성물.
- [0391] 64. 문장 54 내지 63 중 어느 하나에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 2' 위치에 하나 이상의 변형된 리보스, 바람직하게는 2' 위치에 복수의 변형된 리보스를 추가로 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하는 화합물.
- [0392] 65. 문장 64에 있어서, 변형이 2'-O-메틸, 2'-데옥시-플루오로 및 2'-데옥시로부터 선택되는 화합물.
- [0393] 66. 문장 54 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 하나 이상의 말단에 하나 이상의 분해 보호 모이어티를 추가로 포함하는 화합물.
- [0394] 67. 문장 66에 있어서, 상기 하나 이상의 분해 보호 모이어티가 리간드 모이어티를 운반하는 올리고뉴클레오타이드 가닥의 말단에 존재하지 않고/않거나 상기 하나 이상의 분해 보호 모이어티가 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결, 포스포로디티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 및 역 무염기 뉴클레오타이드로부터 선택되고, 상기 역 무염기 뉴클레오타이드는 문장 54, 55, 59 또는 60 중 어느 하나에서 화학식 VIII, IX, X 또는 X I 중 어느 하나로 나타낸 바와 같이 리간드 모이어티를 운반하는 가닥의 원위 말단에 존재하는 화합물.
- [0395] 68. 문장 1 내지 29, 32 내지 34, 37 내지 56, 59 내지 61, 및 64 내지 67 중 어느 하나에 따른 화합물 및/또는 문장 30, 31, 35, 36, 57, 58, 62, 63 중 어느 하나에 따른 조성물의 제조 방법으로서, 화학식 X II의 화합물과 화학식 X III의 화합물을 반응시키고 적절한 경우 리간드의 탈보호 및/또는 올리고뉴클레오타이드 모이어티에 대한 제2 가닥의 어닐링을 수행하는 것을 포함하는 방법:



[0396]

[0397] [화학식 X II]



[0398]

[0399] [화학식 X III]

[0400] 여기서:

[0401] R<sub>1</sub>은 각 경우에 수소, 메틸 및 에틸로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0402] R<sub>2</sub>는 수소, 하이드록시, -OC<sub>1-3</sub>알킬, -C(=O)OC<sub>1-3</sub>알킬, 할로 및 니트로로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0403] X<sub>1</sub> 및 X<sub>2</sub>는 각 경우에 메틸렌, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0404] m은 1 내지 6의 정수이고;

[0405] n은 1 내지 10의 정수이고;

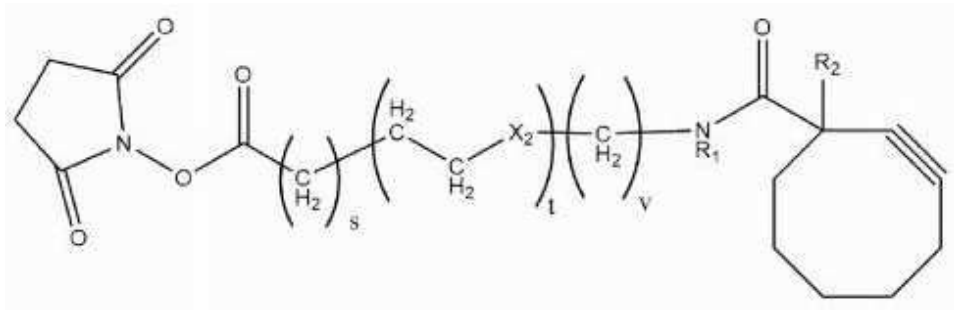
[0406] q, r, s, t, v는 독립적으로 0 내지 4의 정수이고, 단:

[0407] (i) q와 r은 동시에 0이 될 수 없고;

[0408] (ii) s, t 및 v는 모두 동시에 0이 될 수 없고;

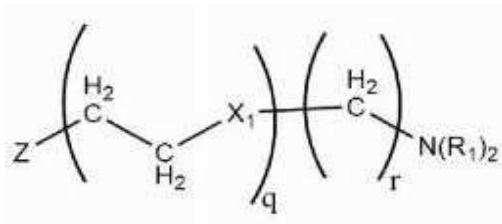
[0409] Z는 올리고뉴클레오타이드 모이어티이다.

[0410] 69. 문장 68에 있어서, 화학식 X II의 화합물이 화학식 X IV의 화합물과 화학식 X V의 화합물을 반응시켜 제조되는 방법:



[0411]

[0412] [화학식 X IV]



[0413]

[0414] [화학식 X V]

[0415] R<sub>1</sub>은 각 경우에 수소, 메틸 및 에틸로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0416] R<sub>2</sub>는 수소, 하이드록시, -OC<sub>1-3</sub>알킬, -C(=O)OC<sub>1-3</sub>알킬, 할로 및 니트로로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0417] X<sub>1</sub> 및 X<sub>2</sub>는 각 경우에 메틸렌, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0418] q, r, s, t, v는 독립적으로 0 내지 4의 정수이고, 단:

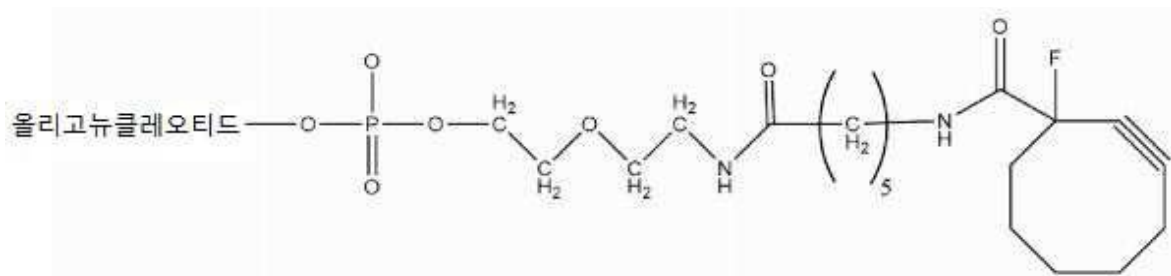
[0419] (i) q와 r은 동시에 0이 될 수 없고;

[0420] (ii) s, t 및 v는 모두 동시에 0이 될 수 없고;

[0421] Z는 올리고뉴클레오타이드 모이어티이다.

[0422] 70. 문장 68에 있어서, 문장 20, 25, 27, 29, 54, 56 중 어느 하나에 따른 화합물 및/또는 문장 30, 31, 57, 58 중 어느 하나에 따른 조성물의 제조 방법으로서,

[0423] 화학식 X II의 화합물이 화학식 X IIa이고:

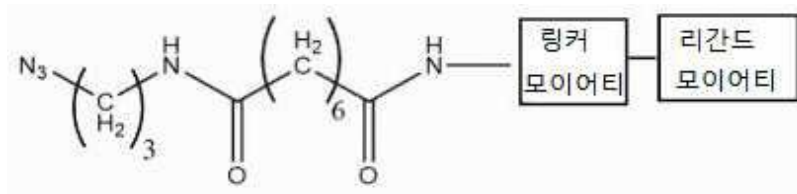


[0424]

[0425] [화학식 X IIa]

[0426] 화학식 X III의 화합물이 화학식 X IIIa이고:





[0427]

[0428]

[화학식 XⅢa]

[0429]

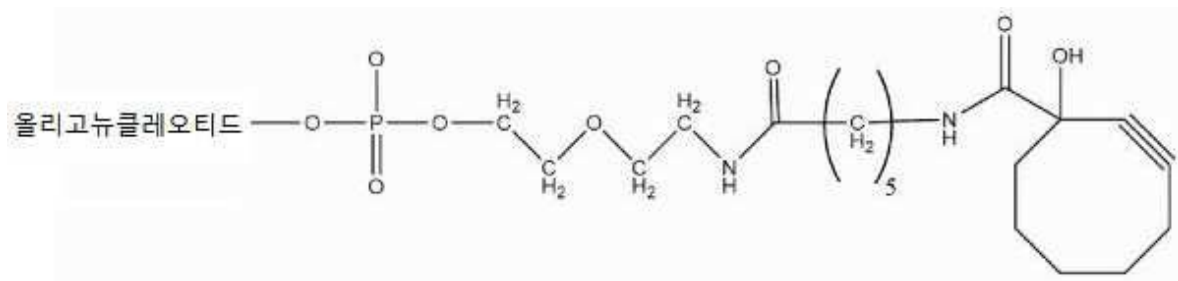
여기서 올리고뉴클레오타이드는 제1 및 제2 가닥을 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하고, 제1 가닥은 표적 유전자의 RNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제2 가닥은 상기 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제1 및 제2 가닥 각각은 5' 및 3' 말단을 갖고, 상기 RNA 듀플렉스는 이의 제2 가닥의 5' 말단에서 인접한 인산염에 부착되어 있는 방법.

[0430]

71. 문장 68에 있어서, 문장 20, 25, 28, 29, 55, 56 중 어느 하나에 따른 화합물 및/또는 문장 30, 31, 57, 58 중 어느 하나에 따른 조성물의 제조 방법으로서,

[0431]

화학식 XⅡ의 화합물이 화학식 XⅡb이고:



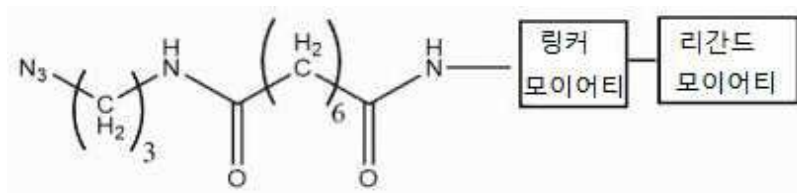
[0432]

[0433]

[화학식 XⅡb]

[0434]

화학식 XⅢ의 화합물이 화학식 XⅢa이고:



[0435]

[0436]

[화학식 XⅢa]

[0437]

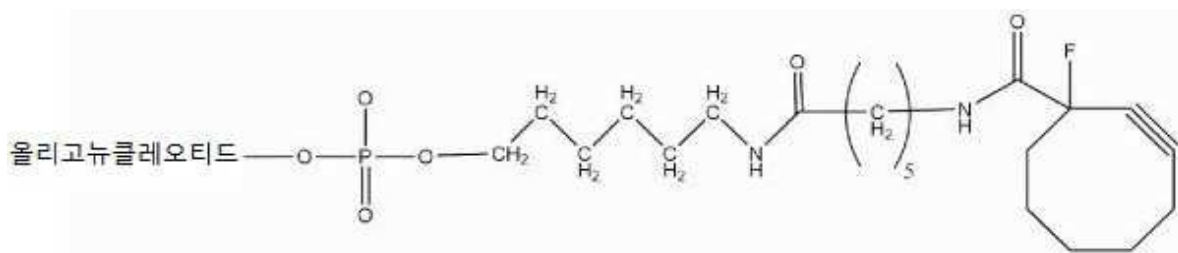
여기서 올리고뉴클레오타이드는 제1 및 제2 가닥을 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하고, 제1 가닥은 표적 유전자의 RNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제2 가닥은 상기 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제1 및 제2 가닥 각각은 5' 및 3' 말단을 갖고, 상기 RNA 듀플렉스는 이의 제2 가닥의 5' 말단에서 인접한 인산염에 부착되어 있는 방법.

[0438]

72. 문장 68에 있어서, 문장 21, 26, 32, 34, 59, 61 중 어느 하나에 따른 화합물 및/또는 문장 35, 36, 62, 63 중 어느 하나에 따른 조성물의 제조 방법으로서,

[0439]

화학식 XⅡ의 화합물이 화학식 XⅡc이고:

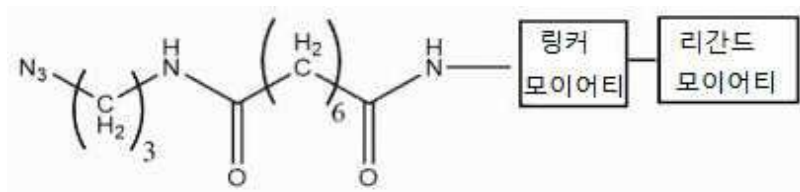


[0440]

[0441]

[화학식 XⅡc]

[0442] 화학식 XⅢ의 화합물이 화학식 XⅢa이고:



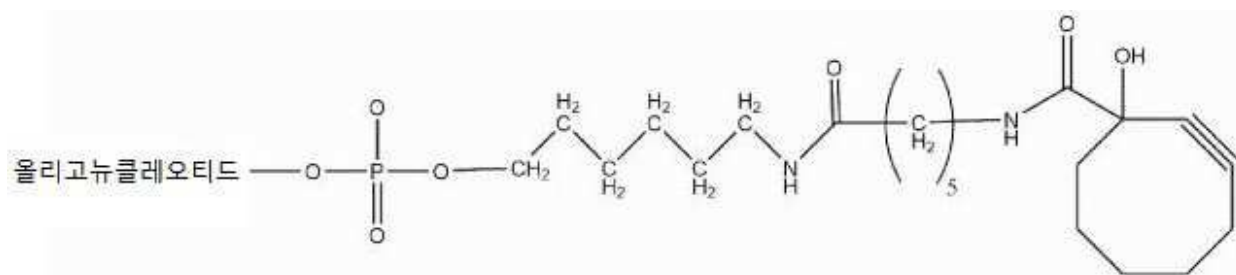
[0443]

[0444] [화학식 XⅢa]

[0445] 여기서 올리고뉴클레오타이드는 제1 및 제2 가닥을 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하고, 제1 가닥은 표적 유전자의 RNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제2 가닥은 상기 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제1 및 제2 가닥 각각은 5' 및 3' 말단을 갖고, 상기 RNA 듀플렉스는 이의 제2 가닥의 3' 말단에서 인접한 인산염에 부착되어 있는 방법.

[0446] 73. 문장 68에 있어서, 문장 21, 26, 33, 34, 60, 61 중 어느 하나에 따른 화합물 및/또는 문장 35, 36, 62, 63 중 어느 하나에 따른 조성물의 제조 방법으로서,

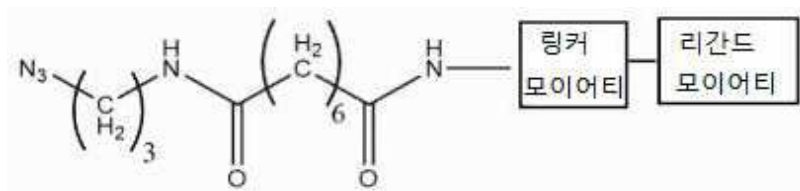
[0447] 화학식 XⅡ의 화합물이 화학식 XⅡd이고:



[0448]

[0449] [화학식 XⅡd]

[0450] 화학식 XⅢ의 화합물이 화학식 XⅢa이고:



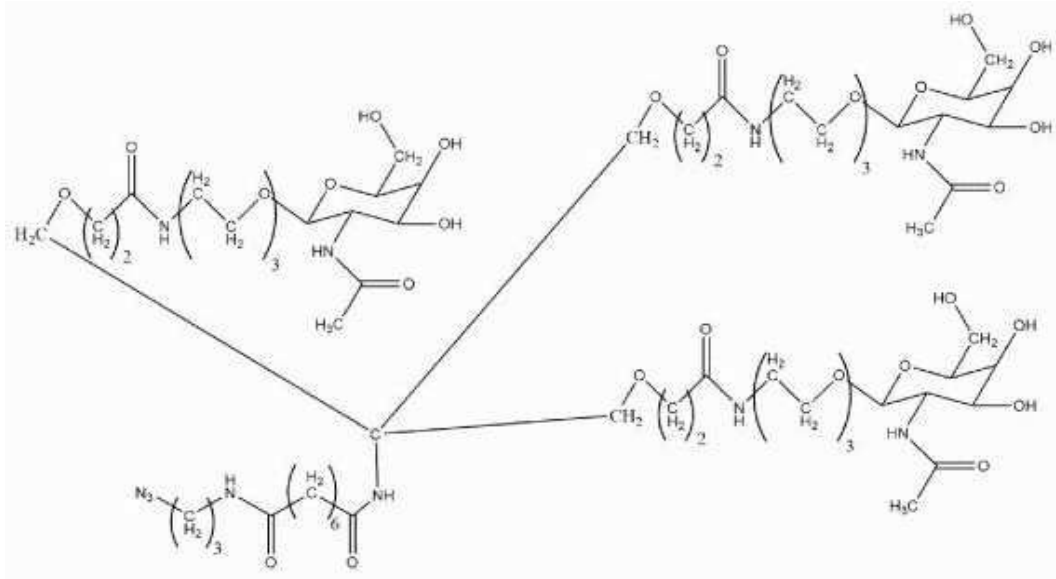
[0451]

[0452] [화학식 XⅢa]

[0453] 여기서 올리고뉴클레오타이드는 제1 및 제2 가닥을 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하고, 제1 가닥은 표적 유전자의 RNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제2 가닥은 상기 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제1 및 제2 가닥 각각은 5' 및 3' 말단을 갖고, 상기 RNA 듀플렉스는 이의 제2 가닥의 3' 말단에서 인접한 인산염에 부착되어 있는 방법.

[0454] 74. 문장 70 내지 73 중 어느 하나에 있어서,

[0455] 화학식 XⅢa의 화합물이 화학식 XⅢb인 방법:



[0456]

[0457]

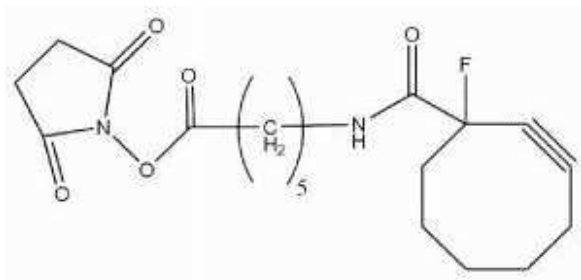
[0458]

[0459]

[화학식 XⅢb]

75. 문장 70 내지 73에 종속되는 문장 69에 있어서,

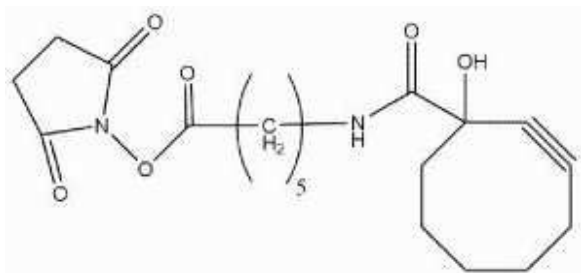
화학식 XⅣ의 화합물이 화학식 XⅣa 또는 화학식 XⅣb이고:



[0460]

[0461]

[화학식 XⅣa]



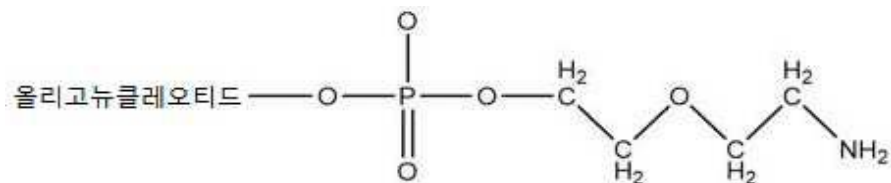
[0462]

[0463]

[0464]

[화학식 XⅣb]

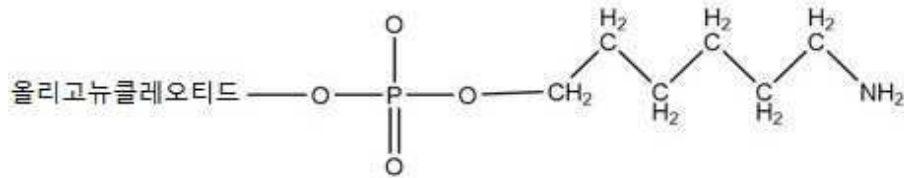
화학식 XⅤ의 화합물이 화학식 XⅤa 또는 화학식 XⅣb이고:



[0465]

[0466]

[화학식 XⅤa]



[0467]

[0468]

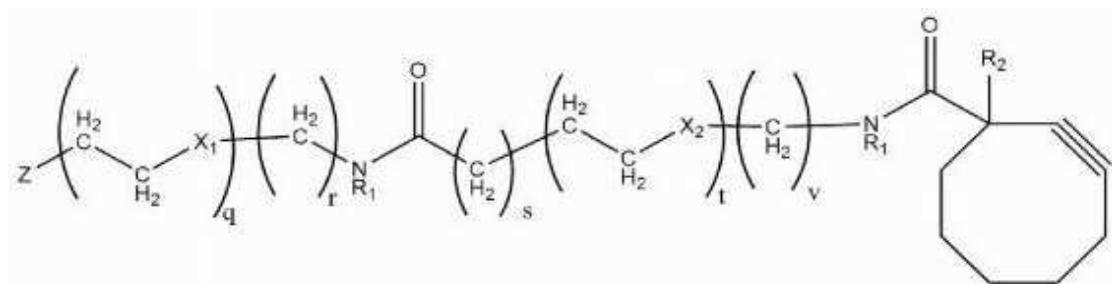
[화학식 X Vb]

[0469]

여기서 올리고뉴클레오타이드는 제1 및 제2 가닥을 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하고, 제1 가닥은 표적 유전자의 RNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제2 가닥은 상기 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제1 및 제2 가닥 각각은 5' 및 3' 말단을 가지며, (i) 상기 RNA 듀플렉스는 이의 제2 가닥의 5' 말단에서 화학식 X V a의 인접한 인산염에 부착되거나, (ii) 상기 RNA 듀플렉스는 이의 제2 가닥의 3' 말단에서 화학식 X Vb의 인접한 인산염에 부착되는 방법.

[0470]

76. 화학식 X II의 화합물:



[0471]

[0472]

[화학식 X II]

[0473]

여기서:

[0474]

R<sub>1</sub>은 각 경우에 수소, 메틸 및 에틸로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0475]

R<sub>2</sub>는 수소, 하이드록시, -OC<sub>1-3</sub>알킬, -C(=O)OC<sub>1-3</sub>알킬, 할로 및 니트로로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0476]

X<sub>1</sub> 및 X<sub>2</sub>는 각 경우에 메틸렌, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0477]

q, r, s, t, v는 독립적으로 0 내지 4의 정수이고, 단:

[0478]

(i) q와 r은 동시에 0이 될 수 없고;

[0479]

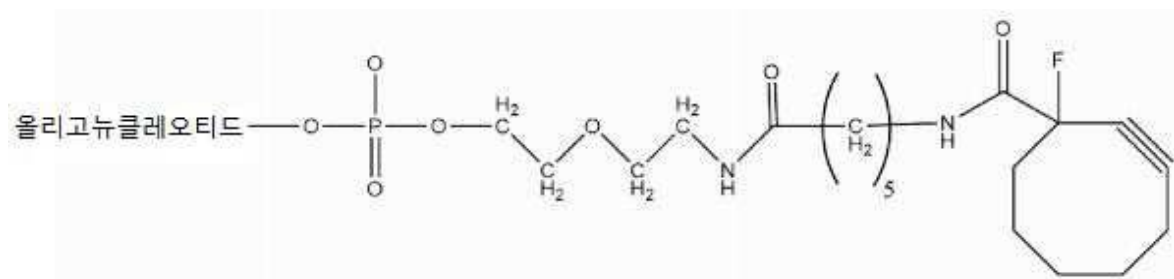
(ii) s, t 및 v는 모두 동시에 0이 될 수 없고;

[0480]

Z는 올리고뉴클레오타이드 모이어티이다.

[0481]

77. 화학식 X IIa의 화합물:



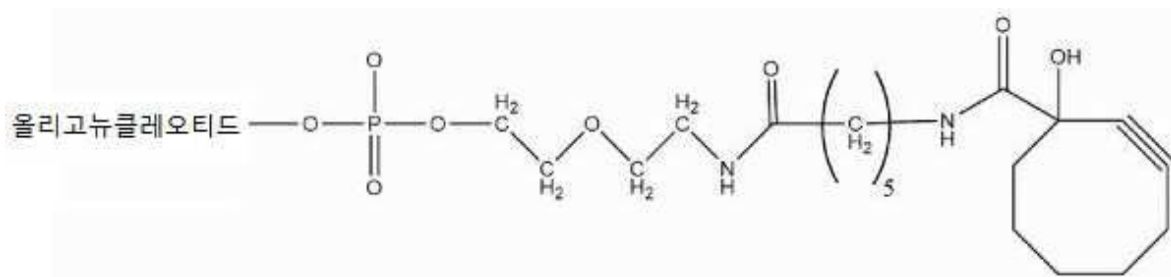
[0482]

[0483]

[화학식 X IIa]

[0484]

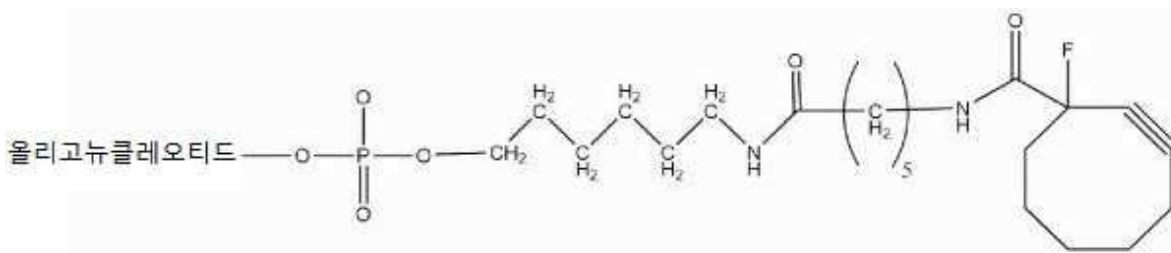
78. 화학식 X IIb의 화합물:



[0485]

[0486] [화학식 X IIb]

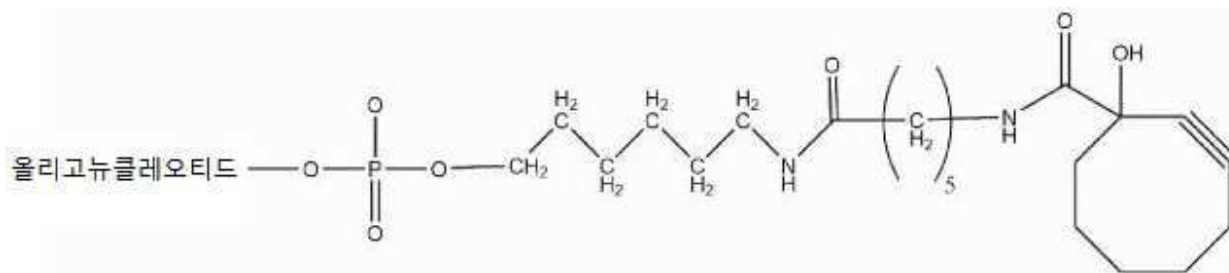
[0487] 79. 화학식 X IIc의 화합물:



[0488]

[0489] [화학식 X IIc]

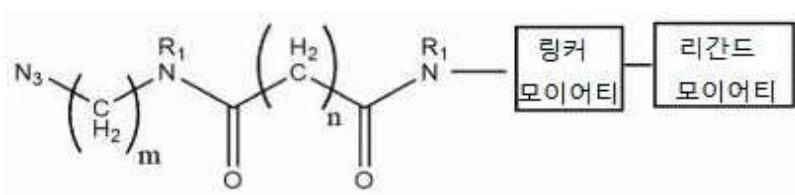
[0490] 80. 화학식 X IId의 화합물:



[0491]

[0492] [화학식 X II d]

[0493] 81. 화학식 X III의 화합물:



[0494]

[0495] [화학식 X III]

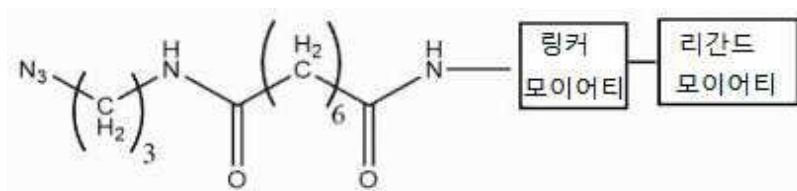
[0496] 여기서:

[0497]  $\text{R}_1$ 은 각 경우에 수소, 메틸 및 에틸로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0498]  $m$ 은 1 내지 6의 정수이고;

[0499]  $n$ 은 1 내지 10의 정수이다.

[0500] 82. 화학식 X IIIa의 화합물:



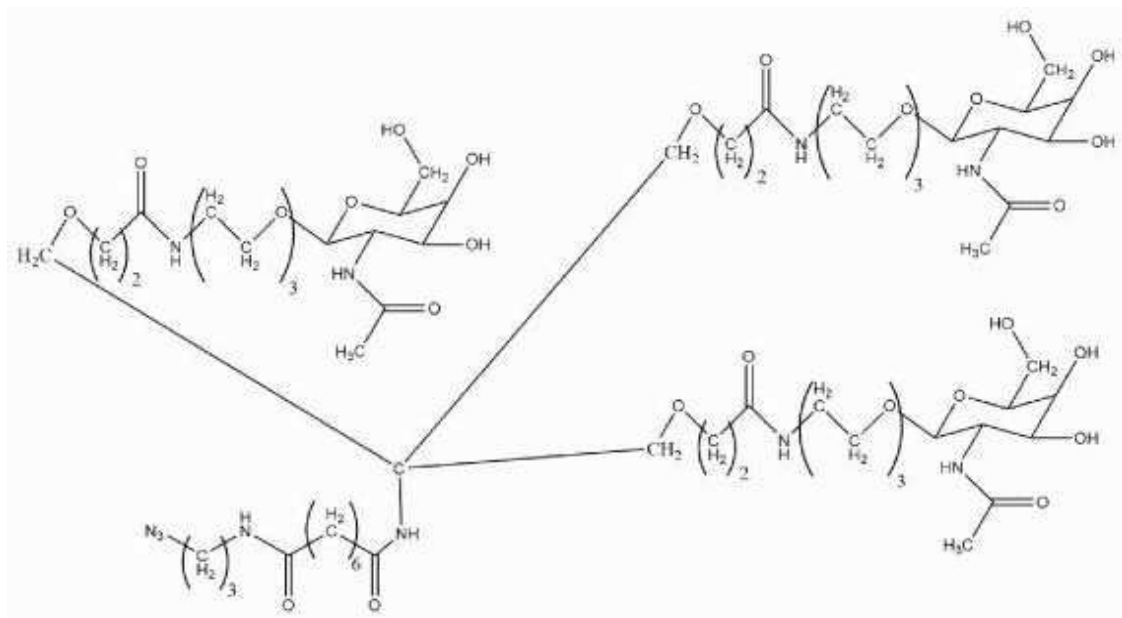
[0501]

[0502]

[화학식 X IIIa]

[0503]

83. 화학식 X IIIb의 화합물:



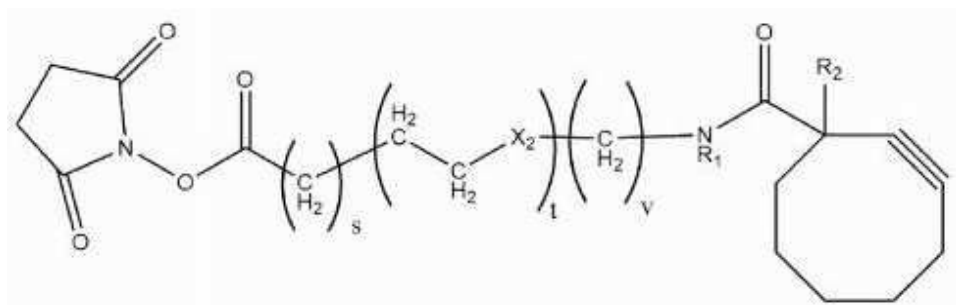
[0504]

[0505]

[화학식 X IIIb]

[0506]

84. 화학식 X IV의 화합물:



[0507]

[0508]

[화학식 X IV]

[0509]

여기서:

[0510]

R<sub>1</sub>은 수소, 메틸 및 에틸로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0511]

R<sub>2</sub>는 수소, 하이드록시, -OC<sub>1-3</sub>알킬, -C(=O)OC<sub>1-3</sub>알킬, 할로 및 니트로로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0512]

X<sub>2</sub>는 메틸렌, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

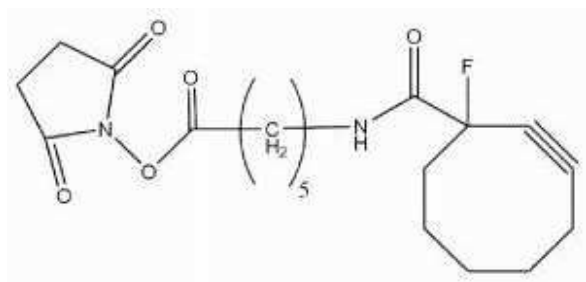
[0513]

s, t, v는 독립적으로 0 내지 4의 정수이고, 단 s, t 및 v는 모두 동시에 0이 될 수 없다.

[0514]

85. 화학식 X IVa의 화합물:

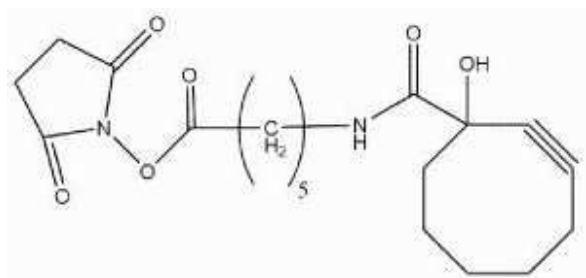




[0515]

[0516] [화학식 XIVa]

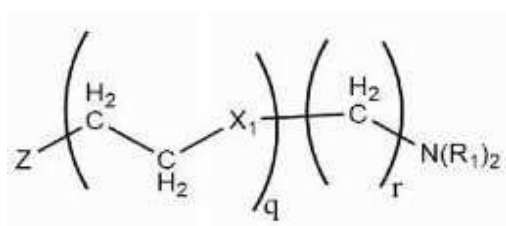
[0517] 86. 화학식 XIVb의 화합물:



[0518]

[0519] [화학식 XIVb]

[0520] 87. 화학식 XV의 화합물:



[0521]

[0522] [화학식 XV]

[0523] 여기서:

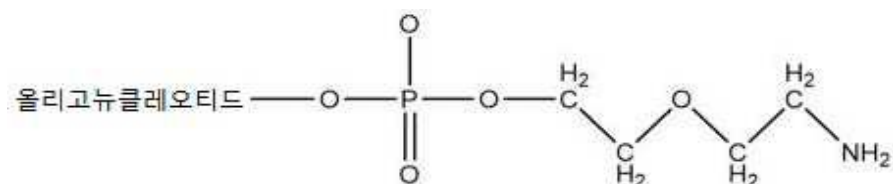
[0524] R1은 각 경우에 수소, 메틸 및 에틸로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0525] X1은 메틸렌, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0526] q 및 r은 독립적으로 0 내지 4의 정수이고, 단 q 및 r은 둘 다 동시에 0이 될 수 없고;

[0527] Z는 올리고뉴클레오타이드 모이어티이다.

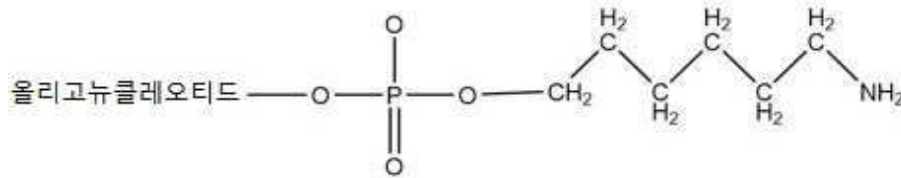
[0528] 88. 화학식 XVa의 화합물:



[0529]

[0530] [화학식 XVa]

[0531] 89. 화학식 XVb의 화합물:



[0532]

[0533] [화학식 X Vb]

[0534] 90. 문장 1 내지 29, 32 내지 34, 37 내지 56, 59 내지 61 및 64 내지 67 중 어느 하나에 따른 화합물 및/또는 문장 30, 31, 35, 36, 57, 58, 62 및 63 중 어느 하나에 따른 조성물의 제조를 위한, 문장 76, 81 내지 84, 87 중 어느 하나에 따른 화합물의 용도.

[0535] 91. R2 = F인, 문장 1 내지 29, 32 내지 34, 37 내지 56, 59 내지 61 및 64 내지 67 중 어느 하나에 따른 화합물 및/또는 문장 30, 31, 35, 36, 57, 58, 62 및 63 중 어느 하나에 따른 조성물의 제조를 위한, 문장 85에 따른 화합물의 용도.

[0536] 92. R2 = OH인, 문장 1 내지 29, 32 내지 34, 37 내지 56, 59 내지 61 및 64 내지 67 중 어느 하나에 따른 화합물 및/또는 문장 30, 31, 35, 36, 57, 58, 62 및 63 중 어느 하나에 따른 조성물의 제조를 위한, 문장 86에 따른 화합물의 용도.

[0537] 93. 문장 20, 25, 27, 29, 54, 56 중 어느 하나에 따른 화합물 및/또는 문장 30, 31, 57, 58 중 어느 하나에 따른 조성물의 제조를 위한, 문장 77에 따른 화합물의 용도.

[0538] 94. 문장 20, 25, 28, 29, 55, 56 중 어느 하나에 따른 화합물 및/또는 문장 30, 31, 57, 58 중 어느 하나에 따른 조성물의 제조를 위한, 문장 78에 따른 화합물의 용도.

[0539] 95. 문장 21, 26, 32, 34, 59, 61 중 어느 하나에 따른 화합물 및/또는 문장 35, 36, 62, 63 중 어느 하나에 따른 조성물의 제조를 위한, 문장 79에 따른 화합물의 용도.

[0540] 96. 문장 21, 26, 33, 34, 60, 61 중 어느 하나에 따른 화합물 및/또는 문장 35, 36, 62, 63 중 어느 하나에 따른 조성물의 제조를 위한, 문장 80에 따른 화합물의 용도.

[0541] 97. 문장 20, 25, 27 내지 29, 54 내지 56 중 어느 하나에 따른 화합물 및/또는 문장 30, 31, 57, 58 중 어느 하나에 따른 조성물의 제조를 위한, 문장 88에 따른 화합물의 용도.

[0542] 98. 문장 21, 26, 32 내지 34, 59 내지 61 중 어느 하나에 따른 화합물 및/또는 문장 35, 36, 62, 63 중 어느 하나에 따른 조성물의 제조를 위한, 문장 89에 따른 화합물의 용도.

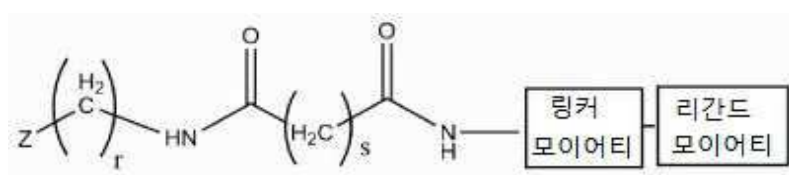
[0543] 99. 문장 68 내지 75 중 어느 하나에 따른 방법에 의해 얻는 또는 얻을 수 있는 화합물 또는 조성물.

[0544] 100. 문장 1 내지 29, 32 내지 34, 37 내지 56, 59 내지 61 및 64 내지 67 중 어느 하나에 따른 화합물 및/또는 문장 30, 31, 35, 36, 57, 58, 62 및 63 중 어느 하나에 따른 조성물을 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 포함하는 약제학적 조성물.

[0545] 101. 치료에 사용하기 위한, 문장 1 내지 29, 32 내지 34, 37 내지 56, 59 내지 61 및 64 내지 67 중 어느 하나에 따른 화합물 및/또는 문장 30, 31, 35, 36, 57, 58, 62 및 63 중 어느 하나에 따른 조성물.

[0546] 또 다른 측면에서, 본 발명은 1-56으로 넘버링된 다음 항목의 화합물, 공정, 조성물 또는 용도에 적용될 수 있다(여기서 상기 항목에서 임의의 화학식에 대한 언급은 항목 1-56 내에 정의된 화학식만을 지칭한다. 이러한 화학식은 도 44에 재현되어 있다):

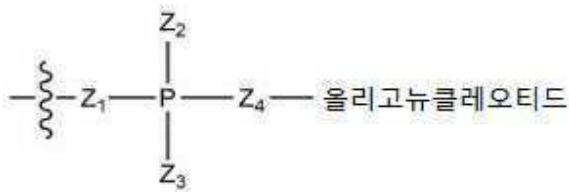
[0547] 1. 하기 구조를 포함하는 화합물:



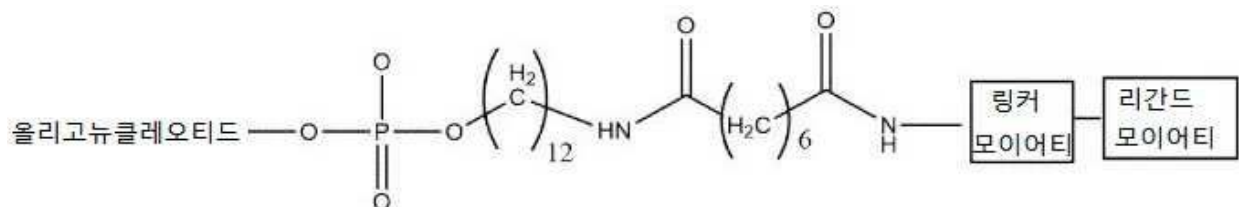
[0548]

[0549] [화학식 I]

- [0550] 여기서:
- [0551]  $r$  및  $s$ 는 1 내지 16으로부터 독립적으로 선택된 정수이고;
- [0552]  $Z$ 는 올리고뉴클레오타이드 모이어티이다.
- [0553] 2. 항목 1에 있어서,  $s$ 가 4 내지 12로부터 선택된 정수인 화합물.
- [0554] 3. 항목 2에 있어서,  $s$ 가 6인 화합물.
- [0555] 4. 항목 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서,  $r$ 이 4 내지 14로부터 선택된 정수인 화합물.
- [0556] 5. 항목 4에 있어서,  $r$ 이 6인 화합물.
- [0557] 6. 항목 4에 있어서,  $r$ 이 12인 화합물.
- [0558] 7. 항목 5에 있어서, 항목 3에 종속되는 화합물.
- [0559] 8. 항목 6에 있어서, 항목 3에 종속되는 화합물.
- [0560] 9. 항목 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서,  $Z$ 가 다음인 화합물:

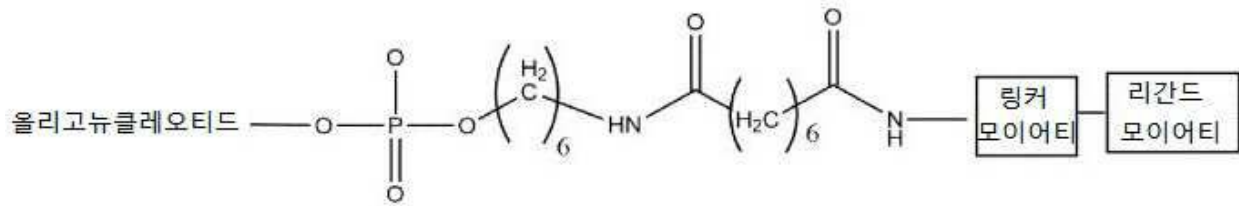


- [0561] 여기서:
- [0562]  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$ ,  $Z_4$ 는 각 경우에 독립적으로 산소 또는 황이고;
- [0564] P와  $Z_2$  사이의 결합 및 P와  $Z_3$  사이의 결합 중 하나는 단일 결합이고 다른 결합은 이중 결합이다.
- [0565] 10. 항목 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드가 표적 유전자의 발현을 조절할 수 있는, 바람직하게는 억제할 수 있는 RNA 화합물인 화합물.
- [0566] 11. 항목 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 RNA 화합물이 제1 및 제2 가닥을 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하고, 제1 가닥은 표적 유전자의 RNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제2 가닥은 상기 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제1 및 제2 가닥 각각은 5' 및 3' 말단을 갖는 화합물.
- [0567] 12. 바람직하게는 또한 항목 3 및 6에 종속되는 항목 11에 있어서, RNA 화합물이 이의 제2 가닥의 5' 말단에서 인접한 인산염에 부착되어 있는 화합물.
- [0568] 13. 바람직하게는 또한 항목 3 및 5에 종속되는 항목 11에 있어서, RNA 화합물이 이의 제2 가닥의 3' 말단에서 인접한 인산염에 부착되어 있는 화합물.
- [0569] 14. 바람직하게는 항목 12에 종속되는 화학식 II의 화합물:



- [0570] .
- [0571] [화학식 II]

[0572] 15. 바람직하게는 항목 13에 종속되는 화학식 III의 화합물:



[0573]

[0574] [화학식 III]

[0575] 16. 항목 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 2' 위치에 하나 이상의 변형된 리보스, 바람직하게는 2' 위치에 복수의 변형된 리보스를 추가로 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하는 화합물.

[0576] 17. 항목 16에 있어서, 변형이 2'-O-메틸, 2'-데옥시-플루오로 및 2'-데옥시로부터 선택되는 화합물.

[0577] 18. 항목 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 하나 이상의 말단에 하나 이상의 분해 보호 모이어티를 추가로 포함하는 화합물.

[0578] 19. 항목 18에 있어서, 상기 하나 이상의 분해 보호 모이어티가 링커/리간드 모이어티를 운반하는 올리고뉴클레오타이드 가닥의 말단에 존재하지 않고/않거나 상기 하나 이상의 분해 보호 모이어티가 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결, 포스포로디티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 및 역 무염기 뉴클레오타이드로부터 선택되고, 상기 역 무염기 뉴클레오타이드는 링커/리간드 모이어티를 운반하는 말단에 대해 동일한 가닥의 원위 말단에 존재하는 화합물.

[0579] 20. 항목 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 항목 1에서 화학식 I에 묘사된 바와 같은 상기 리간드 모이어티가 하나 이상의 리간드를 포함하는 화합물.

[0580] 21. 항목 20에 있어서, 항목 1에서 화학식 I에 묘사된 바와 같은 상기 리간드 모이어티가 하나 이상의 탄수화물 리간드를 포함하는 화합물.

[0581] 22. 항목 21에 있어서, 상기 하나 이상의 탄수화물이 단당류, 이당류, 삼당류, 사당류, 올리고당류 또는 다당류일 수 있는 화합물.

[0582] 23. 항목 22에 있어서, 상기 하나 이상의 탄수화물이 하나 이상의 갈락토스 모이어티, 하나 이상의 락토스 모이어티, 하나 이상의 N-아세틸갈락토사민 모이어티 및/또는 하나 이상의 만노스 모이어티를 포함하는 화합물.

[0583] 24. 항목 23에 있어서, 상기 하나 이상의 탄수화물이 하나 이상의 N-아세틸-갈락토사민 모이어티를 포함하는 화합물.

[0584] 25. 항목 24에 있어서, 2개 또는 3개의 N-아세틸갈락토사민 모이어티를 포함하는 화합물.

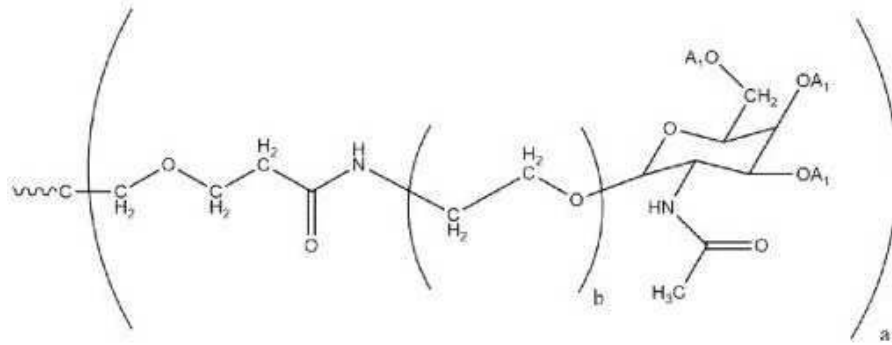
[0585] 26. 항목 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 리간드가 선형 구성 또는 분지형 구성으로 부착되어 있는 화합물.

[0586] 27. 항목 26에 있어서, 상기 하나 이상의 리간드가 바이안테너리 또는 트리안테너리 분지형 구성으로 부착된 화합물.

[0587] 28. 항목 20 내지 27에 있어서, 항목 1에서 화학식 I에 묘사된 바와 같은 상기 모이어티:



[0588] 가 화학식 IV, V 또는 VI 중 임의의 것, 바람직하게는 화학식 IV 또는 화학식 V 또는 화학식 VI인 화합물:



[0589]

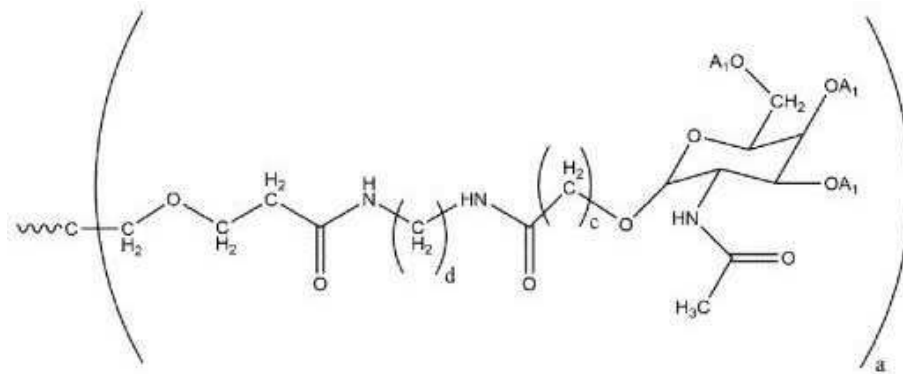
[0590] [화학식 IV]

[0591] 여기서:

[0592] A<sub>1</sub>는 수소 또는 적합한 하이드록시 보호 그룹이고;

[0593] a는 2 또는 3의 정수이고;

[0594] b는 2 내지 5의 정수이다;



[0595]

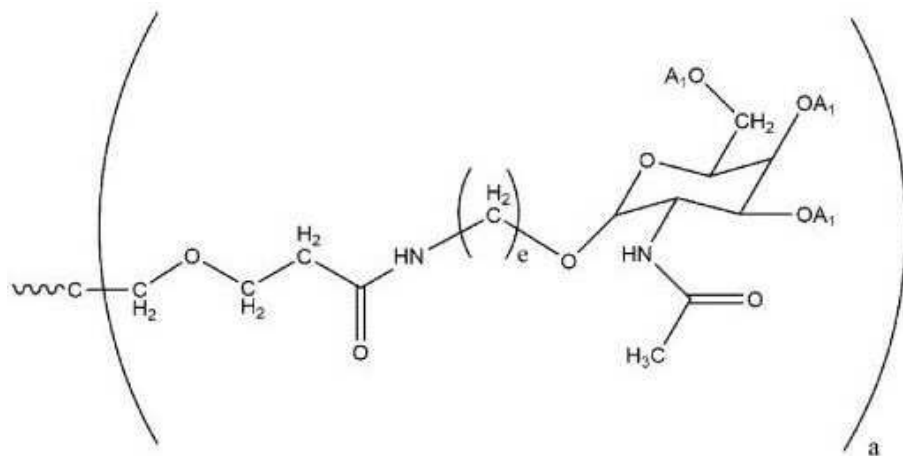
[0596] [화학식 V]

[0597] 여기서:

[0598] A<sub>1</sub>는 수소 또는 적합한 하이드록시 보호 그룹이고;

[0599] a는 2 또는 3의 정수이고;

[0600] c 및 d는 독립적으로 1 내지 6의 정수이다;



[0601]

[0602] [화학식 VI]

[0603] 여기서:

[0604]  $A_1$ 는 수소 또는 적합한 하이드록시 보호 그룹이고;

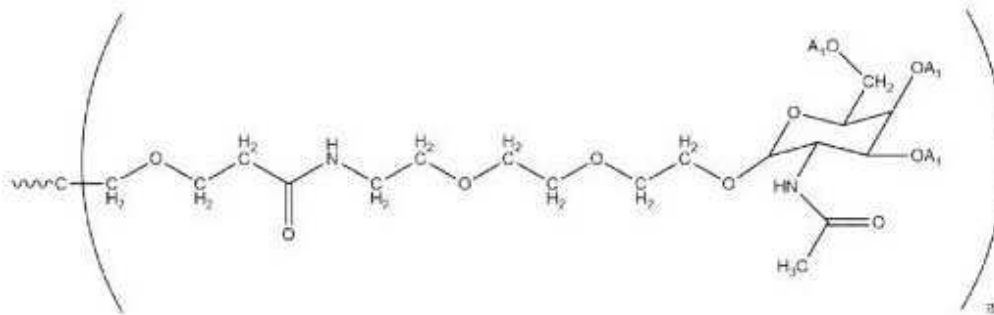
[0605]  $a$ 는 2 또는 3의 정수이고;

[0606]  $e$ 는 2 내지 10의 정수이다.

[0607] 29. 항목 1 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 항목 1에서 화학식 I에 묘사된 바와 같은 상기 모이어티:



[0608] 가 화학식 VII인 화합물:



[0609]

[0610] [화학식 VII]

[0611] 여기서:

[0612]  $A_1$ 는 수소이고;

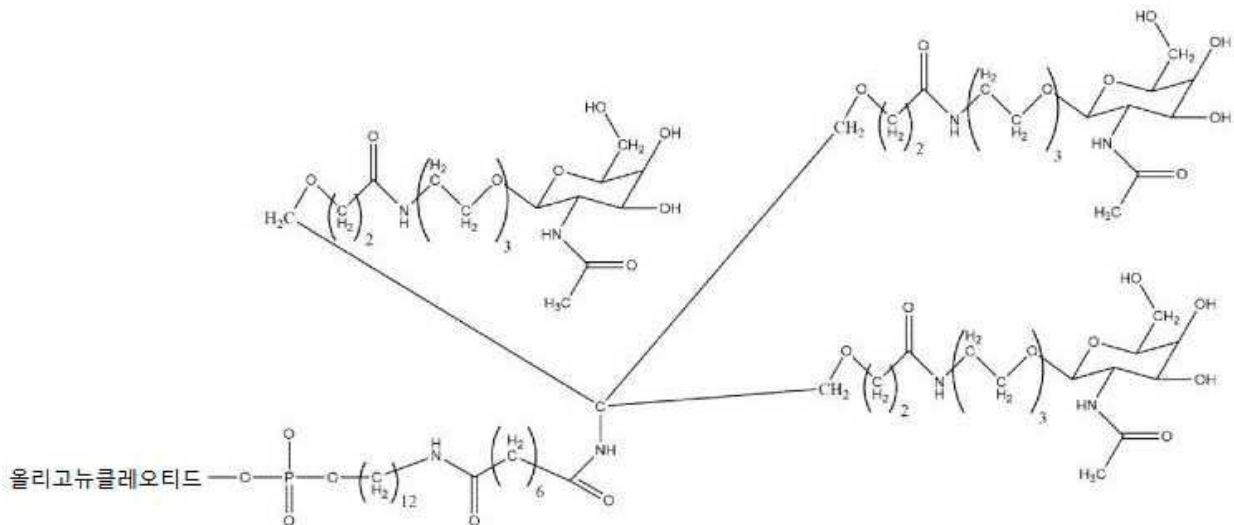
[0613]  $a$ 는 2 또는 3의 정수이다.

[0614] 30. 항목 28 또는 29에 있어서,  $a = 2$ 인 화합물.

[0615] 31. 항목 28 또는 29에 있어서,  $a = 3$ 인 화합물.

[0616] 32. 항목 28에 있어서,  $b = 3$ 인 화합물.

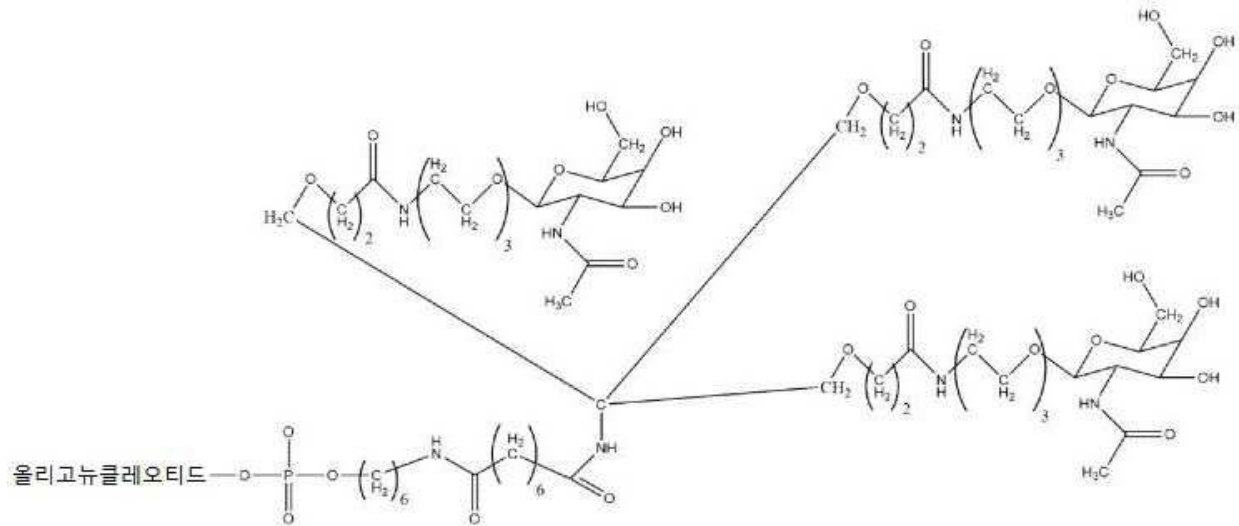
[0617] 33. 화학식 VIII의 화합물:



[0618]

[0619] [화학식 VIII]

[0620] 34. 화학식 IX의 화합물:



[0621]

[0622] [화학식 IX]

[0623] 35. 항목 33 또는 34에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 2' 위치에 하나 이상의 변형된 리보스, 바람직하게는 2' 위치에 복수의 변형된 리보스를 추가로 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하는 화합물.

[0624] 36. 항목 35에 있어서, 변형이 2'-O-메틸, 2'-데옥시-플루오로 및 2'-데옥시로부터 선택되는 화합물.

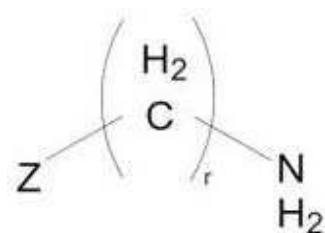
[0625] 37. 항목 33 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 하나 이상의 말단에 하나 이상의 분해 보호 모이어티를 추가로 포함하는 화합물.

[0626] 38. 항목 37에 있어서, 상기 하나 이상의 분해 보호 모이어티가 링커/리간드 모이어티를 운반하는 올리고뉴클레오타이드 가닥의 말단에 존재하지 않고/않거나 상기 하나 이상의 분해 보호 모이어티가 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결, 포스포로디티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 및 역 무염기 뉴클레오타이드로부터 선택되고, 상기 역 무염기 뉴클레오타이드는 링커/리간드 모이어티를 운반하는 말단에 대해 동일한 가닥의 원위 말단에 존재하는 화합물.

[0627] 39. 항목 33에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 제1 및 제2 가닥을 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하고, 제1 가닥은 표적 유전자의 RNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제2 가닥은 상기 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제1 및 제2 가닥 각각은 5' 및 3' 말단을 갖고, 상기 RNA 듀플렉스는 이의 제2 가닥의 5' 말단에서 인접한 인산염에 부착되어 있는 화합물.

[0628] 40. 항목 34에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 제1 및 제2 가닥을 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하고, 제1 가닥은 표적 유전자의 RNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제2 가닥은 상기 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제1 및 제2 가닥 각각은 5' 및 3' 말단을 갖고, 상기 RNA 듀플렉스는 이의 제2 가닥의 3' 말단에서 인접한 인산염에 부착되어 있는 화합물.

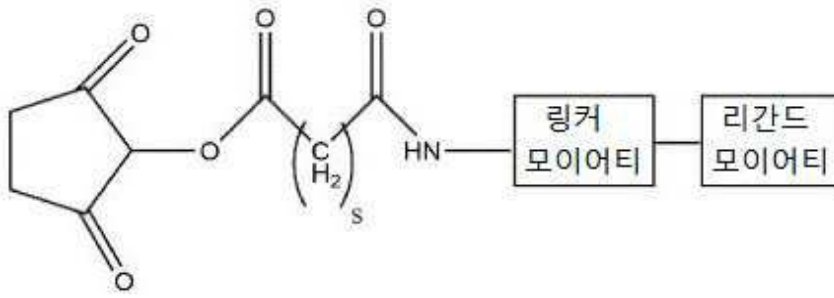
[0629] 41. 화학식 X의 화합물과 화학식 XI의 화합물을 반응시키고 적절한 경우 리간드의 탈보호 및/또는 올리고뉴클레오타이드에 대한 제2 가닥의 어닐링을 수행하는 것을 포함하는, 항목 1 내지 40 중 어느 하나에 따른 화합물의 제조 방법:



[0630]

[0631] [화학식 X]





[0632]

[0633] [화학식 X I]

[0634] 여기서:

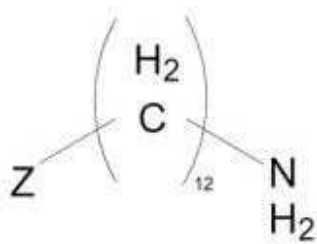
[0635] r 및 s는 1 내지 16에서 독립적으로 선택된 정수이고;

[0636] Z는 올리고뉴클레오타이드 모이어티이다.

[0637] 42. 항목 41에 있어서, 항목 6, 8 내지 14, 16 내지 33 및 35 내지 40 중 어느 하나에 따른 화합물의 제조 방법으로서,

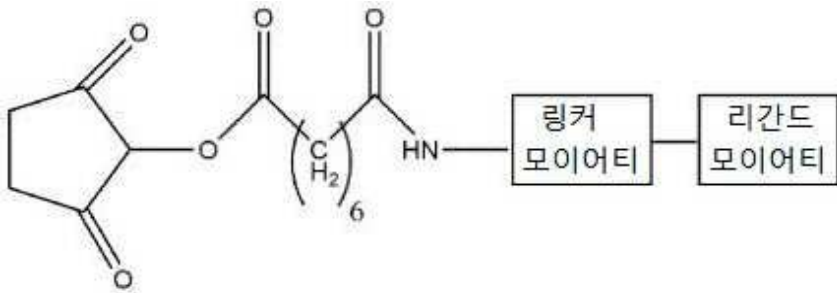
[0638] 화학식 X의 화합물이 화학식 Xa이고:

[0639] [화학식 Xa]



[0640]

[0641] 화학식 X I의 화합물이 화학식 X Ia이고:



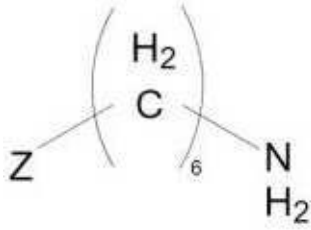
[0642]

[0643] [화학식 X Ia]

[0644] 여기서 올리고뉴클레오타이드는 제1 및 제2 가닥을 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하고, 제1 가닥은 표적 유전자의 RNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제2 가닥은 상기 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제1 및 제2 가닥 각각은 5' 및 3' 말단을 갖고, 상기 RNA 듀플렉스는 제2 가닥의 5' 말단에서 인접한 인산염에 부착되어 있는 방법.

[0645] 43. 항목 41에 있어서, 항목 5, 7, 9 내지 13, 15 내지 32 및 34 내지 40 중 어느 하나에 따른 화합물의 제조 방법으로서,

[0646] 화학식 X의 화합물이 화학식 Xb이고:



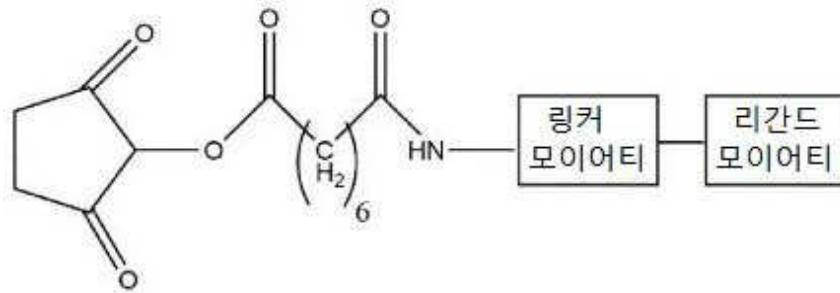
[0647]

[0648]

[0649]

[화학식 Xb]

화학식 X I 의 화합물이 화학식 X I a이고:



[0650]

[0651]

[0652]

[화학식 X I a]

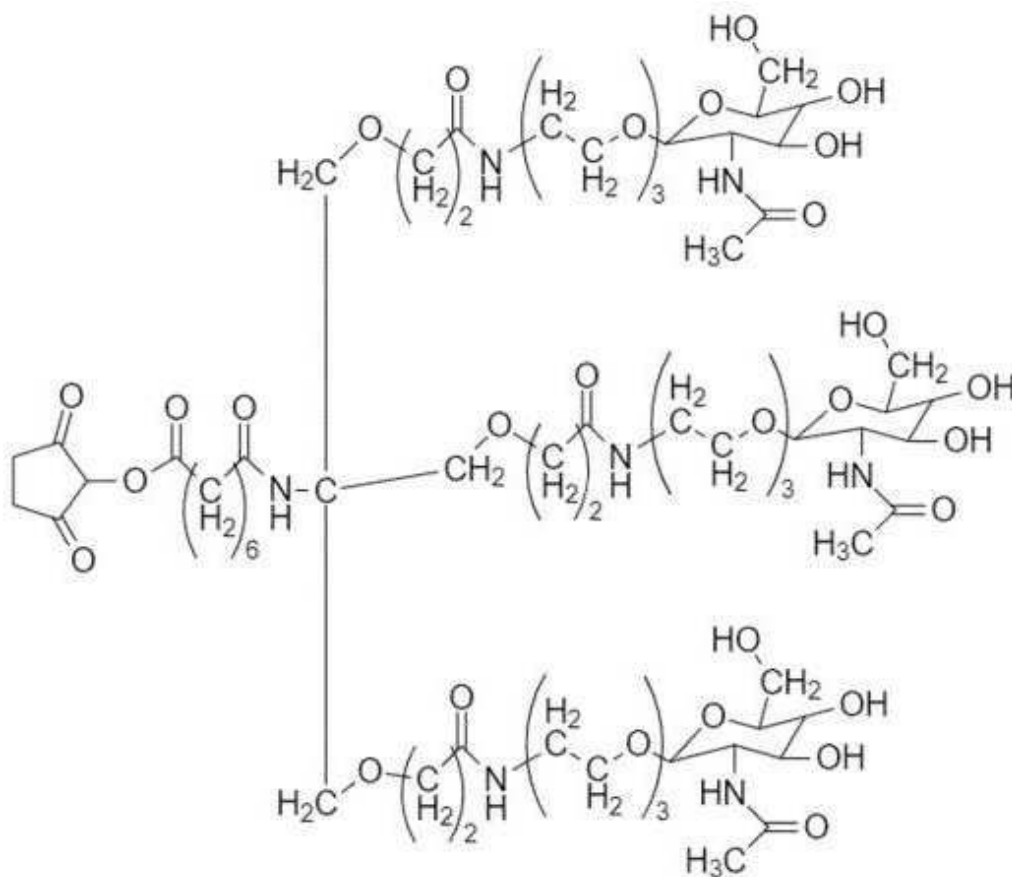
여기서 올리고뉴클레오타이드는 제1 및 제2 가닥을 포함하는 RNA 듀플렉스를 포함하고, 제1 가닥은 표적 유전자의 RNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제2 가닥은 상기 제1 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이고, 제1 및 제2 가닥 각각은 5' 및 3' 말단을 갖고, 상기 RNA 듀플렉스는 제2 가닥의 3' 말단에서 인접한 인산염에 부착되어 있는 방법.

[0653]

44. 항목 42 또는 43에 있어서,

[0654]

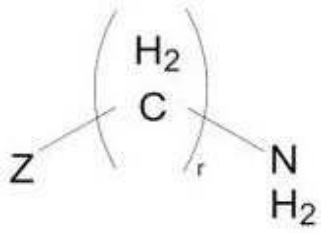
화학식 X I a의 화합물이 화학식 X I b인 방법:



[0655]

[0656] [화학식 X I b]

[0657] 45. 화학식 X의 화합물:



[0658]

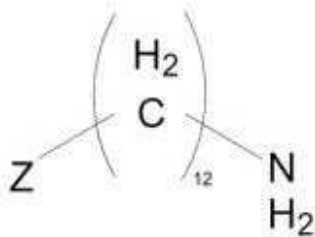
[0659] [화학식 X]

[0660] 여기서:

[0661] r은 1 내지 16으로부터 독립적으로 선택된 정수이고;

[0662] Z는 올리고뉴클레오타이드 모이어티이다.

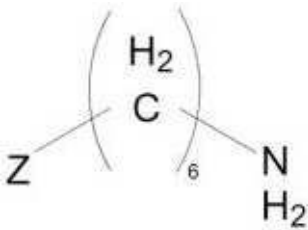
[0663] 46. 화학식 Xa의 화합물:



[0664]

[0665] [화학식 Xa]

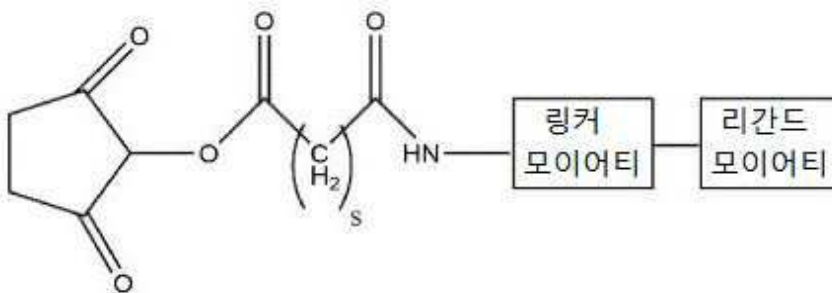
[0666] 47. 화학식 Xb의 화합물:



[0667]

[0668] [화학식 Xb]

[0669] 48. 화학식 X I의 화합물:



[0670]

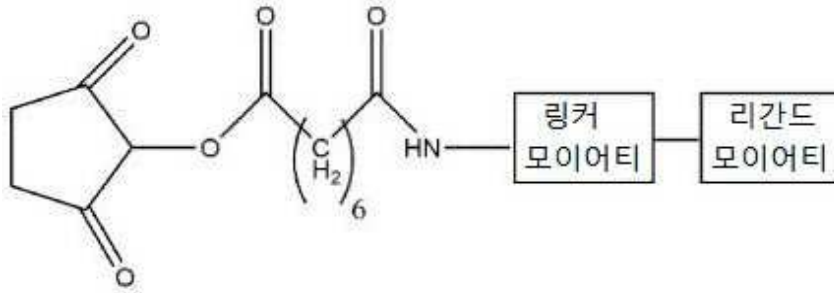
[0671] [화학식 X I]

[0672] 여기서:

[0673] s는 1 내지 16으로부터 독립적으로 선택된 정수이고;

[0674] Z는 올리고뉴클레오타이드 모이어티이다.

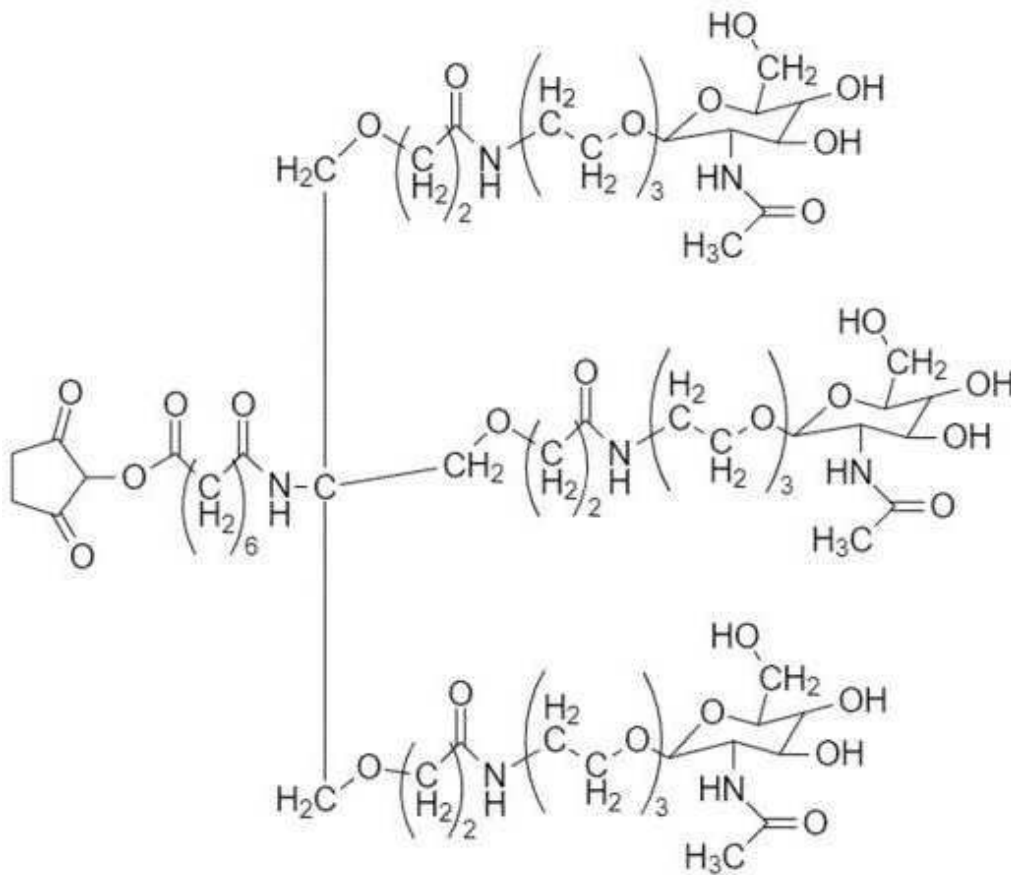
[0675] 49. 화학식 X Ia의 화합물:



[0676]

[0677] [화학식 X Ia]

[0678] 50. 화학식 X Ib의 화합물:



[0679]

[0680] [화학식 X Ib]

[0681] 51. 항목 1 내지 40 중 어느 하나에 따른 화합물의 제조를 위한, 항목 45 및 48 내지 50 중 어느 하나에 따른 화합물의 용도.

[0682] 52. 항목 6, 8 내지 14, 16 내지 33 및 35 내지 40 중 어느 하나에 따른 화합물의 제조를 위한, 항목 46에 따른 화합물의 용도.

[0683] 53. 항목 5, 7, 9 내지 13, 15 내지 32 및 34 내지 40 중 어느 하나에 따른 화합물의 제조를 위한, 항목 47에 따른 화합물의 용도.

[0684] 54. 항목 41 내지 44 중 어느 하나에 따른 공정에 의해 얻는 또는 얻을 수 있는 화합물 또는 조성물.

[0685] 55. 항목 1 내지 40 중 어느 하나에 따른 화합물을 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 포

함하는 약제학적 조성물.

[0686] 56. 치료에 사용하기 위한, 항목 1 내지 40 중 어느 하나에 따른 화합물.

[0687] 실시예

[0688] 본 발명은 하기 실시예를 참조하여 더욱 완전히 이해될 것이다. 그러나 이들은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원에 기술된 실시예 및 실시양태는 단지 예시를 위한 것이고, 이에 비추어 다양한 수정 또는 변경이 당업자에게 제안될 것이며 본 출원의 사상 및 범주와 첨부된 항목의 범위 내에 포함되는 것으로 이해된다.

[0689] 다음 작제물이 실시예에서 사용된다.

[0690]

[ 丑 1 ]

| 표적         | ID         | 센스 서열 5' → 3'                                                                       | 안티센스 서열 5' → 3'                           |
|------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| hsHAO<br>1 | ETX00<br>5 | (invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfcCfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)(ET-GalNAc-T1N3)      | usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa         |
| hsHAO<br>1 | ETX00<br>1 | (ET-GalNAc-T1N3)(MFCO)(NH-DEG)gacuuuCfaUfcCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)      | usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa         |
| hsC5       | ETX01<br>4 | (invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfaUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(MFCO)(ET-GalNAc-T1N3)   | usAfsUfuAfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuusudT<br>dT |
| hsC5       | ETX01<br>0 | (ET-GalNAc-T1N3)(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfaUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic) | usAfsUfuAfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuusudT<br>dT |
| hsTTR      | ETX01<br>9 | (ET-GalNAc-T1N3)(MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfaUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)      | usCfsuugGfuUfaAfaUfcUfuGfuucccasusc       |
| hsTTR      | ETX02<br>3 | (invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfaUfguaaccaaga(NHC6)(MFCO)(ET-GalNAc-T1N3)        | usCfsuugGfuUfaAfaUfcUfuGfuucccasusc       |

[0691]

[0692] 표 1에서 다음 명명법 (ET-GalNAc-T1N3), (MFCO) 및 (NH-DEG)를 갖는 팔호 안의 성분은 링커 요소의 기술어(descriptor)이고, 완전 상응하는 링커 구조가 본원에서 도 30 및 도 31에 도시되어 있다. 실제 링커 구조에 대한 이러한 약어의 대응은 본원에서 상기 약어의 다른 모든 언급에 유사하게 적용된다.

[0693] (invabasic)(invabasic)에 대한 언급은 (i) 무염기 및 (ii) 역 구성인 당 모이어티를 가짐으로써 끝에서 두 번째 뉴클레오타이드와 끝에서 세 번째 뉴클레오타이드 사이의 결합이 역방향 연결, 즉 5-5 또는 3-3 연결을 갖는 말단 2개의 뉴클레오타이드인, 전체 폴리뉴클레오타이드 내의 뉴클레오타이드를 지칭한다. 다시, 이것은 본원에서 (invabasic)(invabasic)에 대한 다른 모든 언급에 유사하게 적용된다.

[0694] [표 1A]

| 표적     | ID     | 짧은 기술어              | 링커 + 리간드             |
|--------|--------|---------------------|----------------------|
|        |        |                     | <b>표 1과 같은 siRNA</b> |
| hsHAO1 | ETX005 | 3'-GalNAc T1a 역 무염기 | 도 30과 같은 링커 + 리간드    |
| hsHAO1 | ETX001 | 5'-GalNAc T1b 역 무염기 | 도 31과 같은 링커 + 리간드    |
| hsC5   | ETX014 | 3'-GalNAc T1a 역 무염기 | 도 30과 같은 링커 + 리간드    |
| hsC5   | ETX010 | 5'-GalNAc T1b 역 무염기 | 도 31과 같은 링커 + 리간드    |
| hsTTR  | ETX019 | 5'-GalNAc T1b 역 무염기 | 도 31과 같은 링커 + 리간드    |
| hsTTR  | ETX023 | 3'-GalNAc T1a 역 무염기 | 도 30과 같은 링커 + 리간드    |

[0695]

[0696] 또한, 도 30/도 31을 참조하여 본원에서 이미 설명된 바와 같이, 본 발명에 따른 제품 ETX001, ETX005, ETX010, ETX014, ETX019, ETX023 중 임의의 것에 존재할 수 있는 도 30/도 31에 나타난 바와 같은 링커 부분에 대해 적절한 경우 이러한 제품이 본원에도 묘사된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 모이어티에 부착된 도 30/도 31에 구체적으로 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분에 기초한 분자를 포함할 수 있지만, 이러한 제품은 대안적으로 링커 및 리간드 부분이 본질적으로 올리고뉴클레오타이드 모이어티에 부착된 도 30/도 31에 묘사된 바와 같으나 사이클로-옥틸 고리 상의 도 30/도 31에 나타난 바와 같은 F 치환기가 가수분해 치환의 결과로 발생하는 치환기, 예컨대 OH 치환기로 대체된 분자를 추가로 포함하거나 이로 본질적으로 이루어질 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 방식으로, (a) 이러한 제품은 도 30/도 31에 구체적으로 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분을 갖고 사이클로-옥틸 고리 상에 F 치환기를 갖는 분자로 본질적으로 이루어질 수 있거나; (b) 이러한 제품은 도 30/도 31에 묘사된 바와 같은 링커 및 리간드 부분을 본질적으로 갖지만 사이클로-옥틸 고리 상의 도 30/도 31에 나타난 바와 같은 F 치환기가 가수분해 치환의 결과로 발생하는 치환기, 예컨대 OH 치환기로 대체된 분자로 본질적으로 이루어질 수 있거나, (c) 이러한 제품은 (a) 또는 (b)에서 정의된 바와 같은 분자의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0697] 다음 대조군 작제물도 실시예에서 사용된다:



[0698] [표 2]

| 표적      | ID       | 센스 서열 5' → 3'                         | 안티센스 서열 5' → 3'                     |
|---------|----------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| F-Luc   | XD-00914 | cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT              | UCGAAAGuACUcAGCGGuAAGdTsdT          |
| hsFVII  | XD-03999 | AGAuAuGcAcAcAcAcGGAdTsdT              | UCCGUGUGUGUGcAuAUCUdTsdT            |
| hsAHSAT | XD-15421 | uscsUfcGfuGfgCfcUfuAfaUfgAfaAf(invdT) | UfsUfsuCfaUfuAfaGfgCfcAfcGfaGfasusu |

[0699]  
[0700] 약어:

|        |                |                                  |
|--------|----------------|----------------------------------|
| [0701] | AHSA1          | 열 충격 단백질 ATPase1의 활성제            |
| [0702] | ASGR1          | 아시알로당단백질 수용체 1                   |
| [0703] | ASO            | 안티센스 올리고뉴클레오티드                   |
| [0704] | bDNA           | 분지형 DNA                          |
| [0705] | bp             | 염기쌍                              |
| [0706] | C5             | 보체 C5                            |
| [0707] | conc.          | 농도                               |
| [0708] | ctrl.          | 대조군                              |
| [0709] | CV             | 변동 계수                            |
| [0710] | dG, dC, dA, dT | DNA 잔기                           |
| [0711] | F              | 플루오로                             |
| [0712] | FCS            | 소 태아 혈청                          |
| [0713] | GalNAc         | N-아세틸갈락토사민                       |
| [0714] | GAPDH          | 글리세르알데히드 3-포스페이트 탈수소효소           |
| [0715] | G, C, A, U     | RNA 잔기                           |
| [0716] | g, c, a, u     | 2'-O-메틸 변형된 잔기                   |
| [0717] | Gf, Cf, Af, Uf | 2'-플루오로 변형된 잔기                   |
| [0718] | h              | 시간                               |
| [0719] | HA01           | 하이드록시산 옥시다제 1                    |
| [0720] | HPLC           | 고성능 액체 크로마토그래피                   |
| [0721] | Hs             | 호모 사피엔스                          |
| [0722] | IC50           | 반응이 50% 감소하는 억제제의 농도             |
| [0723] | ID             | 식별자                              |
| [0724] | KD             | 녹다운                              |
| [0725] | LF2000         | 리포펙타민2000                        |
| [0726] | M              | 몰 농도                             |
| [0727] | Mf             | 마카카 파스치쿨라리스(Macaca fascicularis) |
| [0728] | min            | 분                                |
| [0729] | MV             | 평균값                              |
| [0730] | n.a. 또는 N/A    | 해당 없음                            |
| [0731] | NEAA           | 비필수 아미노산                         |
| [0732] | nt             | 뉴클레오티드                           |
| [0733] | QC             | 품질 관리(Quality control)           |
| [0734] | QG2.0          | QuantiGene 2.0                   |
| [0735] | RLU            | 상대 광 단위                          |
| [0736] | RNAi           | RNA 간섭                           |

- [0737] RT 실온
- [0738] s 포스포로티오에이트 백본 변형
- [0739] SAR 구조-활성 상관관계
- [0740] SD 표준편차
- [0741] siRNA 작은 간섭 RNA
- [0742] TTR 트랜스티레틴(Transthyretin)
- [0743] **실시예 1**
- [0744] **- 요약**
- [0745] hsHAO1, hsC5 또는 hsTTR mRNA를 표적으로 하는 GalNAc-siRNA를 합성하고 QC 처리하였다. 전체 siRNA 세트 (HAO1을 표적으로 하는 siRNA 제외)를 먼저 RNAiMAX를 사용한 형질감염에 의한 HepG2 세포의 용량-반응 설정에서 연구한 후 1차 인간 간세포에서 짐노틱 자유 흡수 설정(gymnotic free uptake setup)에서 용량-반응 분석을 하였다.
- [0746] hsHAO1, hsC5 또는 hsTTR mRNA를 표적으로 하는 GalNAc-siRNA와 1차 인간 간세포를 직접 인큐베이션하여 다양한 정도로 용량-의존적 대상 표적(on-target) mRNA 침묵을 조래하였다.
- [0747] **연구의 목적**
- [0748] 이 일련의 실험의 목적은 3개의 상이한 대상 표적, 즉 hsHAO1, hsC5 또는 hsTTR mRNA를 표적으로 하는 siRNA의 맥락에서 상이한 GalNAc-리간드의 시험관 내 활성을 분석하는 것이었다.
- [0749] 이 연구의 작업 패키지는 (i) 관심 있는 각각의 모든 개별 대상 표적에 특이적인 bDNA 프로브 세트를 설계, 합성 및 테스트하기 위한 검정 개발, (ii) 후속 스크리닝 실험에 적합한 세포주를 식별하는 것, (iii) 하나 이상의 인간 암 세포주에서 (형질감염에 의한) 잠재적으로 모든 siRNA의 용량-반응 분석, 및 (iv) 짐노틱 자유 흡수 설정에서 1차 인간 간세포에서의 siRNA의 용량-반응 분석이 포함되었다. 두 설정 모두에서 IC50 값과 최대 억제 값을 계산한 다음 효능에 따라 siRNA 연구 세트의 순위를 매겨야 한다.
- [0750] **재료 및 방법**
- [0751] **올리고뉴클레오타이드 합성**
- [0752] 표준 고상 합성 방법을 사용하여 관심 siRNA(표 1 참조) 및 대조군(표 2 참조)을 화학적으로 합성하였다.
- [0753] **세포 배양 및 시험관 내 형질감염 실험**
- [0754] 세포 배양, 형질감염 및 QuantiGene2.0 분지형 DNA 검정이 아래에 기술되어 있으며, siRNA 서열은 표 1 및 2에 나열되어 있다. HepG2 세포는 ATCC(American Tissue Culture Collection)(HB-8065, Lot #: 63176294)에서 공급 받았고 10% 소 태아 혈청(FCS)을 함유하도록 보충된 ATCC 공식화 이글 최소 필수 배지(Eagle's Minimum Essential Medium)에서 배양하였다. 1차 인간 간세포(PHH)는 Primacyt(Schwerin, Germany)(Lot#: CyHuf19009HEc)에서 공급받았다. 세포는 외식(explant) 기술에 의해 악성 교모세포종 종양에서 유래된 것이다. 본 연구에 사용된 모든 세포는 가습 인큐베이터에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 분위기에서 배양되었다.
- [0755] hsC5 또는 hsTTR 표적화 siRNA(및 대조군)를 사용한 HepG2 세포의 형질감염을 위해, 세포를 일반 96-웰 조직 배양 플레이트에 20,000개의 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. 상업적으로 이용 가능한 형질감염 시약 RNAiMAX(Invitrogen/Life Technologies)를 제조업체의 지침에 따라 사용하여 siRNA로 세포를 형질감염시켰다. 최종 siRNA 농도가 각각 24, 6, 1.5, 0.4, 0.1, 0.03, 0.008, 0.002, 0.0005 및 0.0001nM인 HepG2 세포에서 20 개의 후보(11x hsC5, 9x hsTTR)의 10점 용량-반응 실험을 수행하였다.
- [0756] PHH에서 용량 반응 분석은 가장 높은 최종 siRNA 농도인 1.5 μM에서 시작하여 그 다음은 500nM, 이로부터 2배 희석 단계로 연속적으로 내려가는 짐노틱 자유 흡수 설정에서 세포를 직접 인큐베이션하여 수행하였다.
- [0757] 대조군 웰을 HepG2 세포로 형질감염시키거나 상응하는 플레이트에서 연구된 가장 높은 테스트 siRNA 농도에서 1차 인간 간세포와 직접 인큐베이션하였다. 세포의 모의(mock) 처리 다음의 상이한 프로젝트 단계에 포함된 모든 대조군 siRNA가 표 2에 요약 및 나열되어 있다. 각각의 siRNA 및 대조군에 대해 적어도 4개의 웰을 동시에 형질

감염/직접 인큐베이션하고 각각의 웰에서 개별 데이터 포인트를 수집하였다.

[0758] 형질감염 후 siRNA와 함께 24시간 인큐베이션한 후, 배지를 제거하고 HepG2 세포를 용해 혼합물(1 부피의 용해 버퍼 + 2 부피의 뉴클레아제 비함유 물)에 용해시킨 다음 53℃에서 적어도 45분 동안 인큐베이션하였다. PHH의 경우, 세포 처리 5시간 후 플레이트 배지를 제거한 후 웰당 50  $\mu$ l의 완전 유지 배지를 첨가하였다. 배지는 총 72시간의 인큐베이션까지 매 24시간마다 이런 식으로 교환하였다. 4시간 또는 72시간 시점에서 세포 배양 상층액을 제거한 후 1:1000 v/v의 Proteinase K가 보충된 200  $\mu$ l의 용해 혼합물을 첨가하였다.

[0759] 분지형 DNA(bDNA) 검정을 제조업체의 지침에 따라 수행하였다. 암실에서 기질의 존재하에 30분 인큐베이션한 후 발광을 1420 발광 카운터(Luminescence Counter)(WALLAC VICTOR Light, Perkin Elmer,

### Rodgau-Jügesheim,

Germany)를 사용하여 판독하였다. 각각의 웰에 대해 대상 표적 mRNA 수준을 hsGAPDH mRNA 수준으로 정규화하였다. 임의의 siRNA의 활성은 대조군 웰에 걸친 평균 대상 표적 mRNA 농도(hsGAPDH mRNA로 정규화됨)와 비교하여, 처리된 세포에서 대상 표적 mRNA 농도(hsGAPDH mRNA로 정규화됨)의 퍼센트로 표현되었다.

[0760] **검정 개발**

[0761] QuantiGene2.0 분지형 DNA(bDNA) 프로브 세트를 호모 사피엔스 GAPDH, AHS1, hsHA01, hsC5 및 hsTTR에 특이적으로 설계하고 합성하였다. bDNA 프로브 세트를 제조업체의 지침에 따라 bDNA 분석에 의해 초기에 테스트하여 1차 인간 간세포 다음으로 다음 인간 및 원숭이 암 세포주의 두 가지 상이한 용해물 양, 즉 10  $\mu$ l 및 50  $\mu$ l에서 관심 mRNA 수준을 평가하였다: SJSA-1, TF1, NCI-H1650, Y-79, Kasumi-1, EAhy926, Caki-1, Colo205, RPTC, A253, HeLaS3, Hep3B, BxPC3, DU145, THP-1, NCI-H460, IGR37, LS174T, Be(2)-C, SW 1573, NCI-H358, TC71, 22Rv1, BT474, HeLa, KBwt, Panc-1, U87MG, A172, C42, HepG2, LNCaP, PC3, SupT11, A549, HCT116, HuH7, MCF7, SH-SY5Y, HUVEC, C33A, HEK293, HT29, MOLM 13 및 SK-MEL-2. 세포 용해물을 첨가하지 않고 bDNA 프로브 세트만 함유하는 웰을 사용하여 기술적 배경 및 노이즈 신호를 모니터링하였다.

[0762] **결과**

[0763] **GalNAc-siRNA의 스크리닝에 적합한 세포 유형 식별**

[0764] 도 1 내지 도 3은 다양한 인간 암 세포주 + 1차 인간 간세포 세트의 용해물에서 3개의 관심 대상 표적, 즉 hsC5, hsHA01 및 hsTTR에 대한 mRNA 발현 데이터를 보여준다. 용해물 부피당 세포 수는 테스트된 각 세포주와 동일하며, 이는 서로 상이한 세포 유형 간의 발현 수준을 비교할 수 있도록 하는 데 필요하다. 도 1은 테스트된 모든 세포 유형에 대한 hsC5 mRNA 발현 데이터를 보여준다.

[0765] 동일한 유형의 세포가 또한 hsHA01 mRNA의 발현에 대해 스크리닝되었고, 결과는 도 2의 일부로서 막대 다이어그램으로 제시되어 있다.

[0766] 마지막으로, hsTTR을 표적으로 하는 GalNAc-siRNA의 스크리닝을 가능하게 하는 적합한 세포 유형이 확인되었고, 각각의 데이터는 도 3의 일부이다.

[0767] 요약하면, 3개의 관심 대상 표적 모두에 대한 mRNA 발현 수준은 1차 인간 간세포(PHH)에서 충분히 높다. 또한, HepG2 세포는 hsC5 및 hsTTR mRNA를 표적으로 하는 GalNAc-siRNA를 스크리닝하는 데 사용될 수 있는 반면, hsHA01 mRNA에 특이적인 siRNA를 테스트하는 데 적합한 암 세포주는 식별할 수 없다.

[0768] **HepG2 세포에서 hsTTR 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석**

[0769] 형질감염 최적화 후, RNAiMAX를 사용하는 용량-반응 설정에서 hsTTR 표적화 GalNAc-siRNA(표 1 참조)의 전체 세트로 HepG2 세포를 형질감염시켰다. 가장 높은 최종 siRNA 테스트 농도는 24nM이었고, 9개의 4배 희석 단계로 내려간다. 실험은 HepG2 세포의 형질감염 후 4시간 및 24시간에 종료되었다. 표 3은 연구된 모든 hsTTR 표적화 GalNAc-siRNA에 대한 활성 데이터를 나열한다.

[0770] [표 3]

*HepG2 세포에서 hsTTR 표적화 siRNA의 표적, 인큐베이션 시간, 외부 ID, IC20/IC50/IC80 값 및 최대 억제. 목록은 외부 ID에 따라 정렬되며, 상단에는 4시간 인큐베이션이, 하단에는 24시간 인큐베이션이 나열되어 있다.*

| 표적    | 인큐베이션<br>[시간] | 외부 ID  | IC20 [nM] | IC50 [nM] | IC80 [nM] | 최대 억제<br>[%] |
|-------|---------------|--------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| hsTTR | 4             | ETX019 | 0,206     | 3,769     | #N/A      | 58,4         |
| hsTTR | 4             | ETX023 | 1,338     | #N/A      | #N/A      | 45,9         |
| hsTTR | 24            | ETX019 | 0,002     | 0,016     | 0,143     | 96,0         |
| hsTTR | 24            | ETX023 | 0,005     | 0,019     | 0,081     | 96,2         |

[0771]

[0772] 또한, 24시간 인큐베이션에 대한 결과는 도 4a-b에 나와 있다.

[0773]

일반적으로, hsTTR 표적화 siRNA로 HepG2 세포를 형질감염시키면 일반적으로 0% 침묵에서 최대 억제까지의 전체 활성 범위에 걸친 대상 표적 mRNA 침묵이 발생한다. 형질감염 24시간 후 생성된 데이터는 형질감염 4시간 후 생성된 데이터와 비교하여 더 낮은 표준 분산으로 더 강력하다. 또한, 대상 표적 녹다운 정도는 일반적으로 4시간에서 최대 24시간까지 인큐베이션 시간에 걸쳐 증가한다. hsTTR GalNAc-siRNA는 낮은 두 자릿수 pM 범위의 IC50 값으로 대상 표적 mRNA를 95% 초과로 침묵시키는 것으로 확인되었다.

[0774]

***HepG2 세포에서 hsC5 표적화 GalNAc-siRNA의 용량 반응 분석***

[0775]

두 번째 관심 표적인 hsC5 mRNA를 동일한 용량-반응 설정(최소한 상이한 최종 siRNA 테스트 농도를 가짐)에서 RNAiMAX를 사용하여 hsTTR siRNA와 같은 링커/위치/GalNAc-리간드 변이이지만 대상 표적 hsC5 mRNA에 특이적인 서열을 공유하는 GalNAc-siRNA로 HepG2 세포를 형질감염시켜 테스트하였다.

[0776]

[표 4]

*HepG2 세포에서 hsC5 표적화 siRNA의 표적, 인큐베이션 시간, 외부 ID, IC20/IC50/IC80 값 및 최대 억제. 목록은 외부 ID에 따라 정렬되며, 상단에는 4시간 인큐베이션이, 하단에는 24시간 인큐베이션이 나열되어 있다.*

| 표적 | 인큐베이션<br>[시간] | 외부 ID  | IC20 [nM] | IC50 [nM] | IC80 [nM] | 최대 억제<br>[%] |
|----|---------------|--------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| C5 | 4             | ETX010 | 0,125     | 0,445     | #N/A      | 71,1         |
| C5 | 4             | ETX014 | 0,595     | 2,554     | #N/A      | 52,7         |
| C5 | 24            | ETX010 | 0,003     | 0,011     | 0,064     | 88,3         |
| C5 | 24            | ETX014 | 0,003     | 0,014     | 0,130     | 88,3         |

[0777]

[0778] 또한, 24시간 인큐베이션에 대한 결과는 도 5a-b에 나와 있다.

[0779]

hsC5에 특이적인 GalNAc-siRNA 세트는 HepG2 세포를 형질감염시킬 때 용량 의존적 대상 표적 hsC5 mRNA 침묵이 있다. 일부 녹다운은 세포의 형질감염 4시간 후 이미 감지될 수 있으며, 더 긴 인큐베이션 기간, 즉 24시간 후에 더 높은 표적 침묵이 관찰된다. hsC5 GalNAc-siRNA는 낮은 한 자릿수 pM 범위의 IC50 값으로 표적 mRNA를 거의 90% 침묵시키는 것으로 확인되었다.

[0780]

***모든 GalNAc-siRNA의 테스트에 적합한 1차 인간 간세포 배치 식별***

[0781]

인간 암 세포주 HepG2에서 2개의 GalNAc-siRNA 세트의 용량-반응 분석은 모든 새로운 GalNAc-/링커/위치/캡(cap) 변이체가 실제로 AGO2에 효율적으로 결합하고 RISC에 로딩하며 또한 표적 mRNA의 RNAi 매개된 절단에서



기능할 수 있는 기재인 것을 나타낸다(보장한다). 그러나 표적화 GalNAc-리간드 유도체가 간세포로의 효율적인 흡수를 허용하는지를 테스트하기 위해 짐노틱 자유 흡수 설정으로 1차 인간 간세포에서 용량-반응 분석 실험을 수행해야 한다. 간세포는 아시알로당단백질 수용체(ASGR1)를 높은 수준으로 독점적으로 발현하며, 이 수용체는 일반적으로 순환으로부터 표적 당단백질을 제거하기 위해 간에 의해 사용된다. 특정 유형의 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어, GalNAc-리간드에 접합된 siRNA 또는 ASO는 이 높은 턴오버(turnover) 수용체에 의해 인식되고 클라트린(clathrin) 코팅된 소낭(vesicle)을 통해 세포질로 효율적으로 흡수되고 엔도솜 구획으로 이동한다. 엔도솜 배출(endosomal escape)은 올리고뉴클레오타이드 전달을 위한 속도 제한 단계로 생각된다.

[0782] 관심 관련 유전자, 즉 hsC5, hsTTR, hsHAO1, hsGAPDH 및 hsAHS1의 발현 수준에 대해 1차 인간 간세포의 상이한 배치를 테스트하는 중간 검정 개발 실험을 수행하였다. Primacyt(Schwerin, Germany)는 테스트를 위해 상이한 1차 인간 간세포 배치, 즉 BHuf16087, CHF2101 및 CyHuf19009의 3개 바이알을 제공하였다. 세포를 콜라겐 코팅된 96-웰 조직 배양 플레이트에 시딩한 다음, 관심 mRNA 수준을 모니터링하기 위해 세포 용해 및 bDNA 분석 전에 0시간, 24시간, 48시간 및 72시간 동안 세포를 인큐베이션하였다. 도 6은 1차 인간 간세포 배치 BHuf16087, CHF2101 및 CyHuf19009에서 3개의 모든 관심 대상 표적 hsTTR, hsC5 및 hsHAO1에 대한 절대 mRNA 발현 데이터를 보여준다. hsGAPDH 및 hsAHS1의 mRNA 발현 수준은 도 7에 나와 있다.

[0783] 도 6 및 7에서 각각의 3개의 데이터 세트의 왼쪽 열은 BHuf16087이고, 중간 열은 CHF2101이고 오른쪽 열은 CyHuf19009이다.

[0784] 전반적으로, 1차 인간 간세포 배치 BHuf16087 및 CyHuf19009에서 모든 3개의 관심 대상 표적의 mRNA 발현은 bDNA 검정을 계속하기에 72시간 후에 충분히 높다. 추가 실험에 사용할 수 있는 바이알의 총량으로 인해 배치 CyHuf19009로 실험을 계속하였다.

[0785] **PHH에서 hsHAO1 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석**

[0786] 1차 인간 간세포(PHH)의 적합한 배치(CyHuf19009)를 식별한 후, 표 1에 나열된 hsHAO1 표적화 GalNAc-siRNA에 대한 짐노틱 자유 흡수 분석을 수행하였다. 테스트된 가장 높은 최종 siRNA 농도는 1.5  $\mu$ M, 그 다음은 500nM이었고, 8개의 2배 연속 희석 단계로 내려가 가장 낮은 최종 siRNA 농도인 1.95nM까지 내려간다. 실험은 PHH 세포의 직접 인큐베이션 4시간 및 72시간 후 종료되었다. 표 5는 연구된 모든 hsHAO1 표적화 GalNAc-siRNA에 대한 활성 데이터를 나열한다. 이 실험에 포함된 모든 대조군 siRNA는 표 2에 요약 및 나열되어 있다.

[0787] [표 5]

1차 인간 간세포(PHH)에 hsHAO1 표적화 GalNAc-siRNA의 표적, 인큐베이션 시간, 외부 ID, IC20/IC50/IC80 값 및 최대 억제. 목록은 외부 ID에 따라 정렬되며, 각각 상단과 하단에 4시간 및 72시간 인큐베이션이 나열되어 있다.

| 표적                | 인큐베이션<br>[시간] | 외부 ID  | IC20 [nM] | IC50 [nM] | IC80 [nM] | 최대 억제<br>[%] |
|-------------------|---------------|--------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| hsHAO1<br>(hsGO1) | 4             | ETX001 | #N/A      | #N/A      | #N/A      | 3,5          |
| hsHAO1<br>(hsGO1) | 4             | ETX005 | #N/A      | #N/A      | #N/A      | 0,7          |
| hsHAO1<br>(hsGO1) | 72            | ETX001 | 7,1       | 514,2     | #N/A      | 54,3         |
| hsHAO1<br>(hsGO1) | 72            | ETX005 | 1,5       | 127,2     | #N/A      | 53,8         |

[0788] 또한, 72시간 인큐베이션에 대한 결과는 도 8a-b에 나와 있다.

[0790] hsHAO1을 표적화하는 GalNAc-siRNA의 짐노틱 자유 흡수는 4시간 내에 유의한 대상 표적 침묵을 초래하지 않았지만, 72시간 인큐베이션 후에 대상 표적 침묵은 최대 억제가 35.5 내지 58.1% 범위로 가시적이었다.

[0791] PHH에서 hsC5 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석

[0792] 두 번째 관심 표적인 hsC5 mRNA를 동일한 용량-반응 설정에서 이전 검정에서 테스트된 hsTTR 및 hsHA01과 동일한 링커/위치/GalNAc-리간드 변이이지만 대상 표적 hsC5 mRNA에 특이적인 서열을 공유하는 GalNAc-siRNA로 PHH에서 침노틱 자유 흡수로 테스트하였다. hsC5를 표적으로 하는 GalNAc-siRNA의 서열과 대조군 siRNA에 대한 모든 서열 및 정보는 각각 표 1과 표 2에 나열되어 있다. 실험은 PHH의 직접 인큐베이션 4시간 및 72시간 후 종료되었다. 표 6은 연구된 모든 hsC5 표적화 GalNAc-siRNA에 대한 활성 데이터를 나열한다.

[0793] [표 6]

PHH에서 hsC5 표적화 GalNAc-siRNA의 표적, 인큐베이션 시간, 외부 ID, IC20/IC50/IC80 값 및 최대 억제. 목록은 외부 ID에 따라 정렬되며, 각각 상단과 하단에 4시간 및 72시간 인큐베이션이 나열되어 있다.

| 표적 | 인큐베이션<br>[시간] | 외부 ID  | IC20 [nM] | IC50 [nM] | IC80 [nM] | 최대 억제<br>[%] |
|----|---------------|--------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| C5 | 4             | ETX010 | #N/A      | #N/A      | #N/A      | -1,3         |
| C5 | 4             | ETX014 | 51,8      | #N/A      | #N/A      | 23,7         |
| C5 | 72            | ETX010 | 4,3       | 72,1      | #N/A      | 64,9         |
| C5 | 72            | ETX014 | 2,2       | 63,7      | #N/A      | 65,6         |

[0794]

[0795] 또한, 72시간 인큐베이션에 대한 결과는 도 9a-b에 나와 있다.

[0796] 4시간 인큐베이션 후에 GalNAc-siRNA의 유의한 대상 표적 침묵이 보이지 않는다. 72시간 인큐베이션 후에 생성된 데이터는 최대 억제가 65.5%인 더욱 강력한 대상 표적 침묵을 보였다.

[0797] PHH에서 hsTTR 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석

[0798] 마지막 관심 표적인 hsTTR mRNA를 표적 hsHA01 및 hsC5에 대한 것과 동일한 용량-반응 설정으로 PHH에서 침노틱 자유 흡수를 다시 테스트하였으며, 유일한 차이점으로 대상 표적 hsTTR mRNA에 대한 특정 siRNA 서열을 사용하였다(표 1 참조).

[0799] 실험은 PHH의 직접 인큐베이션 72시간 후에 종료되었다. 표 7은 연구된 모든 hsTTR 표적화 GalNAc-siRNA에 대한 활성 데이터를 나열한다.

[0800] [표 7]

1차 인간 간세포(PHH)에서 hsTTR 표적화 GalNAc-siRNA의 표적, 인큐베이션 시간, 외부 ID, IC20/IC50/IC80 값 및 최대 억제. 목록은 외부 ID에 따라 정렬되어 있다.

| 표적    | 인큐베이션<br>[시간] | 외부 ID  | IC20 [nM] | IC50 [nM] | IC80 [nM] | 최대 억제<br>[%] |
|-------|---------------|--------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| hsTTR | 72            | ETX019 | 3,9       | 29,8      | 1536,8    | 82,5         |
| hsTTR | 72            | ETX023 | 6,7       | 377,5     | #N/A      | 54,8         |

[0801]

[0802] 또한, 결과는 도 10a-b에 나와 있다.

[0803] hsTTR을 표적으로 하는 GalNAc-siRNA의 침노틱 자유 흡수는 72시간 이내에 최대 억제가 46 내지 82.5% 범위의 유의한 대상 표적 침묵을 초래하였다. hsTTR GalNAc-siRNA는 낮은 두 자릿수 nM 범위의 IC50 값으로 대상 표적 mRNA를 침묵시키는 것으로 확인되었다.

[0804] - 결론 및 논의

[0805] 본 연구의 범위는 3개의 상이한 대상 표적, 즉 hsHA01, hsC5 및 hsTTR mRNA를 표적으로 하는 siRNA의 맥락에서



사용될 때 본 발명에 따른 GalNAc-리간드의 시험관 내 활성을 분석하는 것이었다. 각 표적에 특이적인 siRNA 세트는 각각 2개의 상이한 안티센스 가닥과 관련하여 상이한 링커/캡/변형/GalNAc-리간드 화학을 갖는 siRNA로 구성되었다.

모든 표적에 대해, 표 1의 GalNAc-siRNA가 전체 효능이 높고 IC50 값이 작은 것으로 확인되었다.

## 1.1 실시예 2

### 합성 경로

#### i) 접합 빌딩 블록 TriGalNAc의 합성

Macherey-Nagel의 형광 표시자(fluorescence indicator) 254nm를 사용하여 실리카 코팅된 알루미늄 플레이트에서 박층 크로마토그래피(TLC)를 수행하였다. UV 광(254nm) 하에서 또는 Stahl(Sigma-Aldrich)에 따라 메탄올(MeOH) 또는 닐하이드린(ninhydrin) 시약 중 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 분무한 다음 가열한 후 화합물을 가시화하였다.

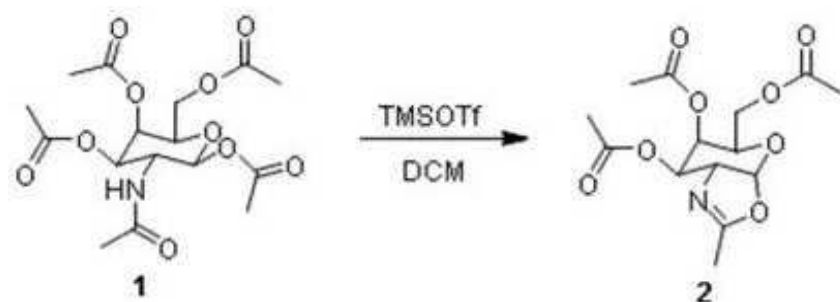
**Biotage Sfar Silica** 10, 25, 50 또는 100g 컬럼(Uppsala, Sweden)을 사용하여 이중 가변 UV 파장 검출기(200-400nm)가 장착된 Biotage Isolera One 플래시 크로마토그래피 기기로 플래시 크로마토그래피를 수행하였다.

모든 수분 민감성 반응은 건조 유리 제품, 무수 용매 및 아르곤 대기를 사용하는 무수 조건 하에서 수행하였다. 상업적으로 이용 가능한 모든 시약은 Sigma-Aldrich에서, 용매는 Carl Roth GmbH + Co. KG에서 구입하였다. D-갈락토사민 펜타아세테이트는 AK Scientific에서 구입하였다.

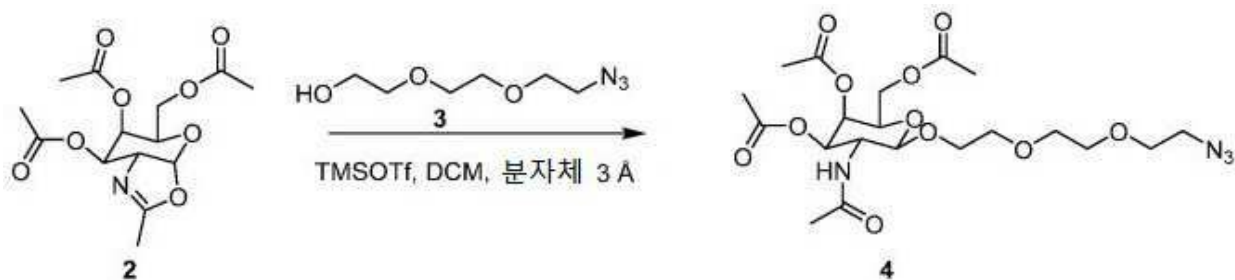
60°C에서 Waters의 Acquity UPLC Protein BEH C4 컬럼(300Å, 1.7µm, 2.1 × 100mm)을 사용하여 Dionex UltiMate 3000 RS UHPLC 시스템 및 Thermo Scientific MSQ Plus 질량 분석기로 HPLC/ESI-MS를 수행하였다. 용매 시스템은 0.1% 포름산을 함유한 H<sub>2</sub>O를 함유하는 용매 A 및 0.1% 포름산을 함유한 아세토니트릴(ACN)을 함유하는 용매 B로 이루어졌다. 0.4mL/분의 유속으로 15분에 걸쳐 5-100% B 구배를 사용하였다. 검출기 및 조건: 코로나 초하전 에어로졸 검출(Corona ultra-charged aerosol detection)(esa). 네블라이저 온도: 25°C. N<sub>2</sub> 압력: 35.1psi. 필터: 코로나.

<sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼은 실온에서 500MHz(<sup>1</sup>H NMR) 및 125MHz(<sup>13</sup>C NMR)에서 Varian 분광계로 기록하였다. 화학적 이동은 용매 잔류 피크를 참조하여 ppm으로 제공된다(CDCI<sub>3</sub> - <sup>1</sup>H NMR: 7.26ppm에서의 δ 및 <sup>13</sup>C NMR 77.2ppm에서의 δ; DMSO-d<sub>6</sub> - <sup>1</sup>H NMR: 2.50ppm에서의 δ 및 <sup>13</sup>C NMR 39.5ppm에서의 δ). 커플링 상수는 Hertz로 표시된다. 신호 분할 패턴은 단일선(s), 이중선(d), 삼중선(t) 또는 다중선(m)으로 기술된다.

#### ii) 접합 빌딩 블록 TriGalNAc의 합성 경로



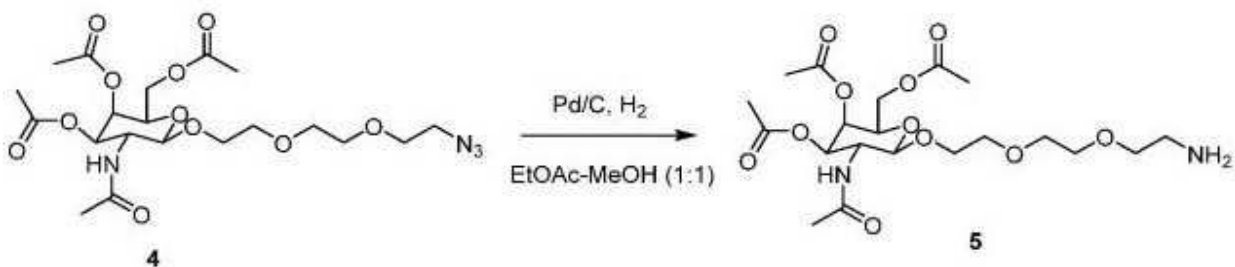
화합물 2의 제조: D-갈락토사민 펜타아세테이트(3.00g, 7.71mmol, 1.0당량)를 아르곤 하에서 무수 디클로로메탄(DCM)(30mL)에 용해시키고 트리메틸실릴 트리플루오로메탄설포네이트(TMSOTf, 4.28g, 19.27mmol, 2.5당량)를 첨가하였다. 반응물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 DCM(50mL)으로 희석하고 차가운 포화 수성 NaHCO<sub>3</sub>(100mL) 및 물(100mL)로 세척하였다. 유기층을 분리하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고 농축시켜 표제 화합물을 황색 오일로 얻었고, 이를 플래시 크로마토그래피(구배 용리: 10CV의 DCM 중 0-10% MeOH)로 정제하였다. 생성물을 무색 오일로 얻었다(2.5g, 98%, rf= 0.45(DCM 중 2% MeOH)).



[0817]

[0818]

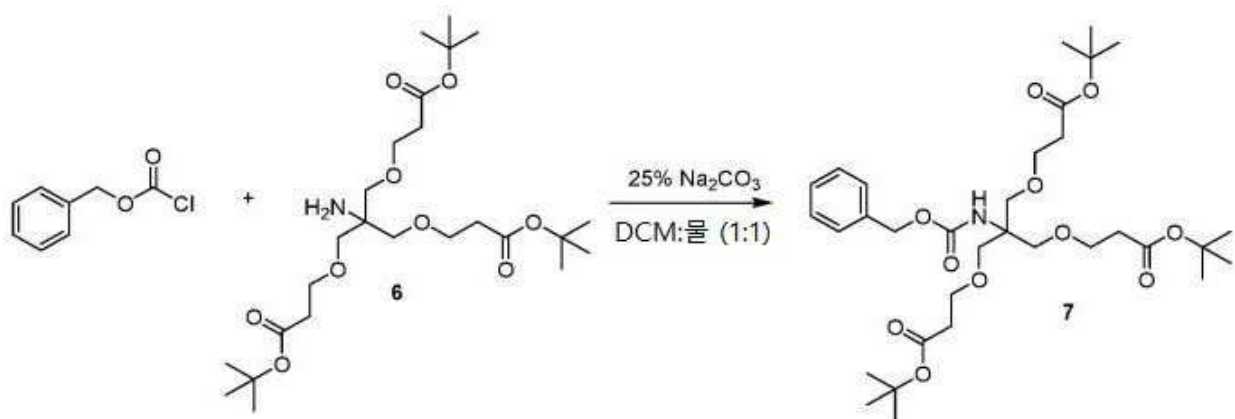
화합물 4의 제조: 화합물 2(2.30g, 6.98mmol, 1.0당량) 및 아지도-PEG3-OH(1.83g, 10.5mmol, 1.5당량)를 아르곤 하에서 무수 DCM(40mL)에 용해시키고 분자체 3Å(5g)를 상기 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 TMSOTf(0.77g, 3.49mmol, 0.5당량)를 상기 혼합물에 첨가하고 반응물을 밤새 교반하였다. 분자체를 여과하고, 여액을 DCM(100mL)으로 희석하고 차가운 포화 수성 NaHCO<sub>3</sub>(100mL) 및 물(100mL)로 세척하였다. 유기층을 분리하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고 용매를 감압 하에서 제거하였다. 조 물질을 플래시 크로마토그래피(구배 용리: 10CV의 DCM 중 0-3% MeOH)로 정제하여 표제 생성물을 연황색 오일로 얻었다(3.10g, 88%, rf = 0.25(DCM 중 2% MeOH)). MS: C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>에 대한 계산치 504.21. 실측치 505.4. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.21-6.14 (m, 1H), 5.30 (dd, *J* = 3.4, 1.1 Hz, 1H), 5.04 (dd, *J* = 11.2, 3.4 Hz, 1H), 4.76 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.23-4.08 (m, 3H), 3.91-3.80 (m, 3H), 3.74-3.59 (m, 9H), 3.49-3.41 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.97 (d, *J* = 4.2 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.6 (C), 170.5 (C), 170.4 (C), 170.3 (C), 102.1 (CH), 71.6 (CH), 70.8 (CH), 70.6 (CH), 70.5 (CH), 70.3 (CH<sub>2</sub>), 69.7 (CH<sub>2</sub>), 68.5 (CH<sub>2</sub>), 66.6 (CH<sub>2</sub>), 61.5 (CH<sub>2</sub>), 23.1 (CH<sub>3</sub>), 20.7 (3xCH<sub>3</sub>).



[0819]

[0820]

화합물 5의 제조: 화합물 4(1.00g, 1.98mmol, 1.0당량)를 에틸 아세테이트(EtOAc)와 MeOH(30mL 1:1 v/v)의 혼합물에 용해시키고 Pd/C(100mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 진공/아르곤 사이클(3x)을 사용하여 탈기하고 벌룬 압력 하에서 밤새 수소화하였다. 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고 EtOAc(30mL)로 세척하였다. 용매를 감압 하에서 제거하여 표제 화합물을 무색 오일로 얻었다(0.95g, 정량적 수율, rf = 0.25(DCM 중 10% MeOH)). 화합물을 추가 정제 없이 사용하였다. MS: C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>에 대한 계산치 478.2. 실측치 479.4.

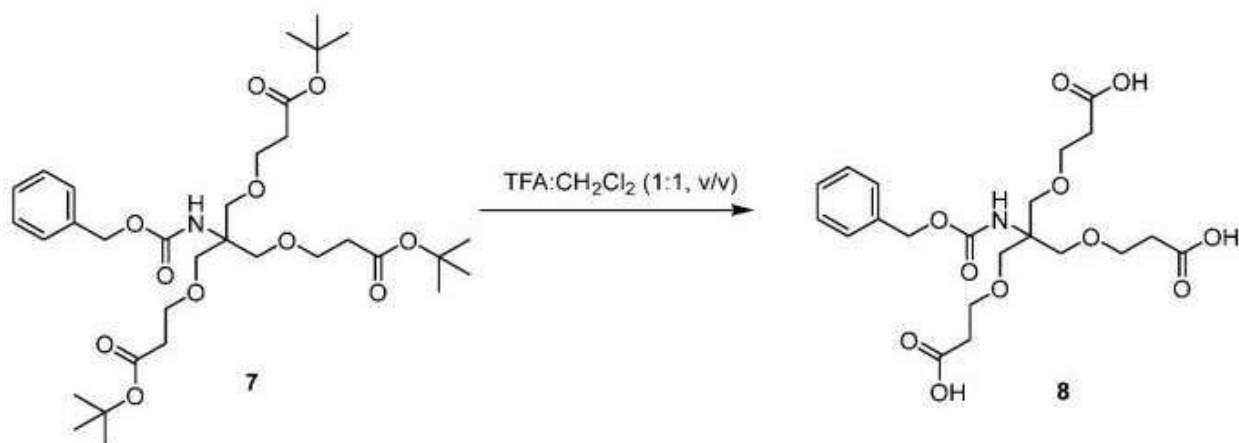


[0821]

[0822]

화합물 7의 제조: 트리스{[2-(tert-부톡시카보닐)에톡시]메틸}-메틸아민 6(3.37g, 6.67mmol, 1.0당량)을 DCM/

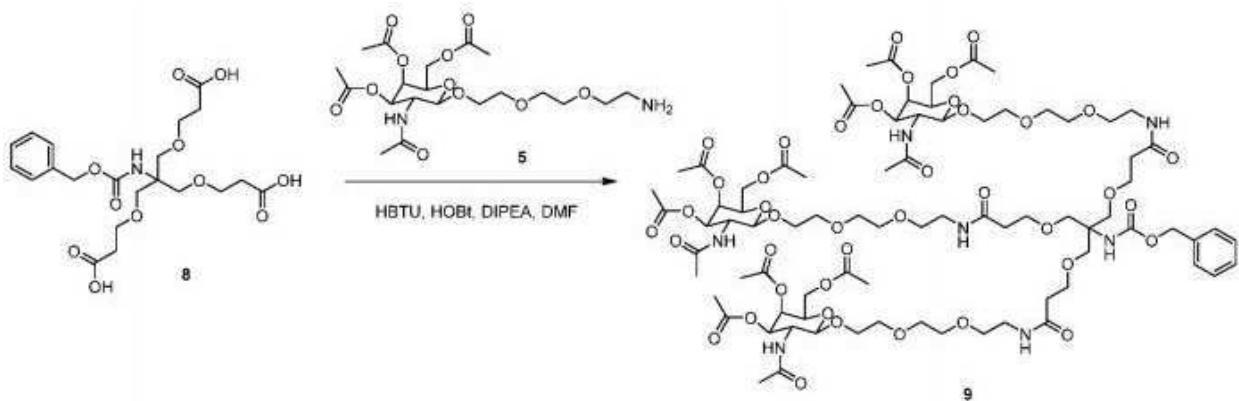
물의 혼합물(40mL 1:1 v/v)에 용해시키고  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (0.18g, 1.7mmol, 0.25당량)를 격렬하게 교반하면서 첨가하였다. 벤질 클로로포르메이트(2.94mL, 20.7mmol, 3.10당량)를 앞의 혼합물에 적가하고 반응물을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (100mL)로 희석하고 물(100mL)로 세척하였다. 유기층을 분리하고  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시켰다. 용매를 감압 하에서 제거하고 생성된 조 물질을 플래시 크로마토그래피(구배 용리: 12CV의 사이클로헥산 중 0-10% EtOAc)로 정제하여 표제 화합물을 연황색 오일로 얻었다(3.9g, 91%, rf = 0.56 (사이클로헥산 중 10% EtOAc)). MS:  $\text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{NO}_{11}$ 에 대한 계산치 639.3. 실측치 640.9.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7.38-7.26 (m, 5H), 4.97 (s, 2H), 3.54 (t, 6H), 3.50 (s, 6H), 2.38 (t, 6H), 1.39 (s, 27H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  170.3 (3xC), 154.5 (C), 137.1 (C), 128.2 (2xCH), 127.7 (CH), 127.6 (2xCH), 79.7 (3xC), 68.4 (3xCH<sub>2</sub>), 66.8 (3xCH<sub>2</sub>), 64.9 (C), 58.7 (CH<sub>2</sub>), 35.8 (3xCH<sub>2</sub>), 27.7 (9xCH<sub>3</sub>).



[0823]

[0824]

화합물 8의 제조: Cbz-NH-트리스-Boc-에스테르 7(0.20g, 0.39mmol, 1.0당량)을 아르곤 하에서  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1mL)에 용해시키고, 트리플루오로아세트산(TFA, 1mL)을 첨가하고 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하고, 잔류물을 톨루엔(5mL)과 함께 3회 공증발시키고 고진공 하에서 건조시켜 화합물을 이의 TFA 염으로 얻었다(0.183g, 98%). 화합물을 추가 정제 없이 사용하였다. MS:  $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{NO}_{11}$ 에 대한 계산치 471.6. 실측치 472.4.

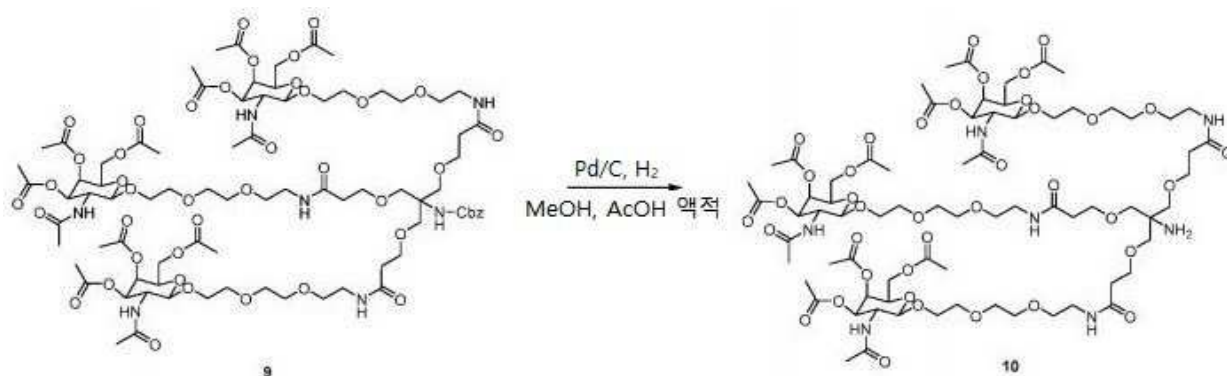


[0825]

[0826]

화합물 9의 제조: CbzNH-트리스-COOH 8(0.72g, 1.49mmol, 1.0당량) 및 GalNAc-PEG3-NH<sub>2</sub> 5(3.56g, 7.44mmol, 5.0당량)를 *N,N*-디메틸포름아미드(DMF)(25mL)에 용해시켰다. 이어서 *N,N,N',N'*-테트라메틸-0-(1H-벤조트리아졸-1-일)우로늄 헥사플루오로포스페이트(HBTU)(2.78g, 7.44mmol, 5.0당량), 1-하이드록시벤조트리아졸 수화물(HOBt)(1.05g, 7.44mmol, 5.0당량) 및 *N,N*-디이소프로필에틸아민(DIPEA)(2.07mL, 11.9mmol, 8.0당량)을 상기 용액에 첨가하고 반응물을 72시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하고, 잔류물을 DCM(100mL)에 용해시키고 포화 수성  $\text{NaHCO}_3$ (100mL)로 세척하였다. 유기층을  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시키고, 용매를 증발시키고 조 물질을 플래시 크로마토그래피로 정제하였다(구배 용리: 14CV의 DCM 중 0-5% MeOH). 생성물을 연황색 오일로 얻었다

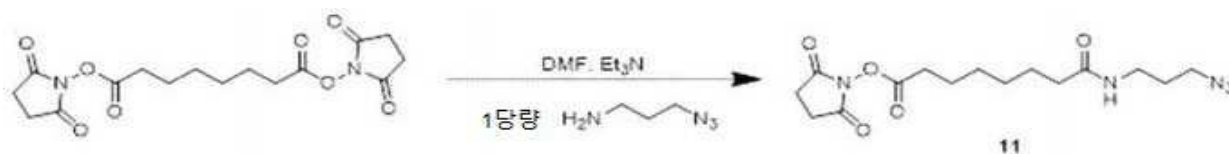
(1.2g, 43%, rf = 0.20(DCM 중 5% MeOH)). MS:  $C_{81}H_{125}N_7O_{41}$ 에 대한 계산치 1852.9. 실측치 1854.7.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.90-7.80 (m, 10H), 7.65-7.62 (m, 4H), 7.47-7.43 (m, 3H), 7.38-7.32 (m, 8H), 5.24-5.22 (m, 3H), 5.02-4.97 (m, 4H), 4.60-4.57 (m, 3 H), 4.07-3.90 (m 10H), 3.67-3.36 (m, 70H), 3.23-3.07 (m, 25H), 2.18 (s, 10H), 2.00 (s, 13H), 1.89 (s, 11H), 1.80-1.78 (m, 17H).  $^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  170.1 (C), 169.8 (C), 169.7 (C), 169.4 (C), 169.2 (C), 169.1 (C), 142.7 (C), 126.3 (CH), 123.9 (CH), 118.7 (CH), 109.7 (CH), 100.8 (CH), 70.5 (CH), 69.8 (CH), 69.6 (CH), 69.5 (CH), 69.3 (CH<sub>2</sub>), 69.0 (CH<sub>2</sub>), 68.2 (CH<sub>2</sub>), 67.2 (CH<sub>2</sub>), 66.7 (CH<sub>2</sub>), 61.4 (CH<sub>2</sub>), 22.6 (CH<sub>2</sub>), 22.4 (3xCH<sub>3</sub>), 20.7 (9xCH<sub>3</sub>).



[0827]

[0828]

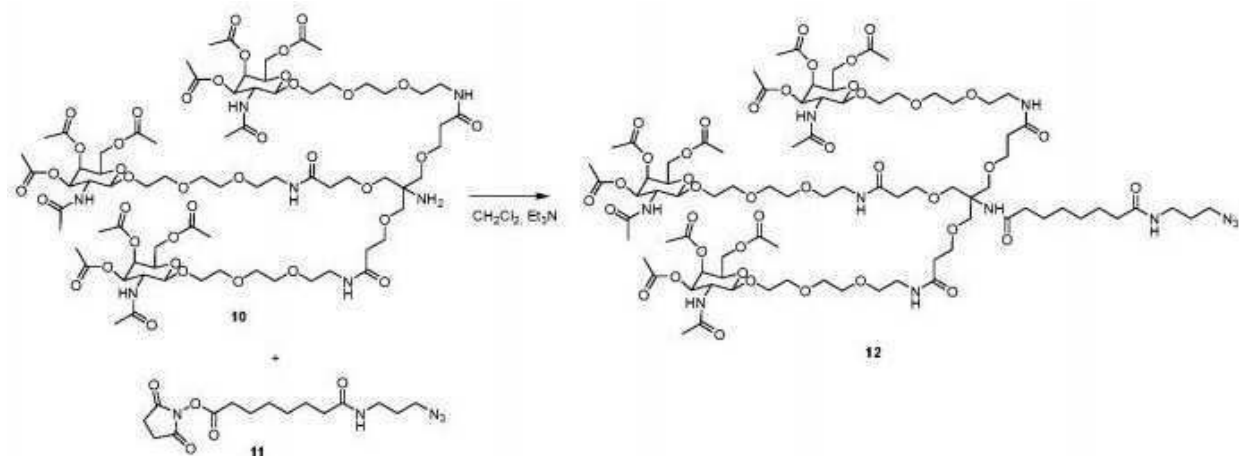
화합물 10의 제조: 트리안테너리 GalNAc 화합물 9(0.27g, 0.14mmol, 1.0당량)를 MeOH(15mL)에 용해시키고, 아세트산(AcOH) 3방울 및 Pd/C(30mg)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 진공/아르곤 사이클(3x)을 사용하여 탈기하고 벌룬 압력 하에서 밤새 수소화하였다. 반응이 완결된 후 질량분석법을 수행하고 생성된 혼합물을 얇은 셀라이트 패드를 통해 여과하였다. 용매를 증발시키고 얻은 잔류물을 고진공 하에서 건조시키고 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다. 생성물을 연황색 오일로 얻었다(0.24g, 정량적 수율). MS:  $C_{73}H_{119}N_7O_{39}$ 에 대한 계산치 1718.8. 실측치 1719.3.



[0829]

[0830]

화합물 11의 제조: 상업적으로 이용 가능한 수베르산 비스(*N*-하이드록시석신이미드 에스테르)(3.67g, 9.9mmol, 1.0당량)를 DMF(5mL)에 용해시키고 트리에틸아민(1.2mL)을 첨가하였다. 이 용액에 DMF(5mL) 중 3-아지도-1-프로필아민(1.0g, 9.9mmol, 1.0당량)의 용액을 적가하였다. 반응물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc(100mL)로 희석하고 물(50mL)로 세척하였다. 유기층을 분리하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고 용매를 감압 하에서 제거하였다. 조 물질을 플래시 크로마토그래피(구배 용리: 16CV의 DCM 중 0-5% MeOH)로 정제하였다. 생성물을 백색 고체로 얻었다(1.54g, 43%, rf = 0.71(DCM 중 5% MeOH)). MS:  $C_{15}H_{23}N_5O_5$ 에 대한 계산치 353.4. 실측치 354.3.



[0831]

[0832]

TriGalNAc(**12**)의 제조: 트리안테너리 GalNAc 화합물 **10**(0.35g, 0.24mmol, 1.0당량) 및 화합물 **11**(0.11g, 0.31mmol, 1.5당량)을 아르콘 하에서 DCM(5mL)에 용해시키고 트리에틸아민(0.1mL, 0.61mmol, 3.0당량)을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 밤새 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하고, 잔류물을 EtOAc(100mL)에 용해시키고 물(100mL)로 세척하였다. 유기층을 분리하고 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시켰다. 용매를 증발시키고 생성된 조 물질을 플래시 크로마토그래피(용리 구배: 20CV의 DCM 중 0-10% MeOH)로 정제하여 표제 화합물을 백색 플러피 고체(fluffy solid)로 얻었다(0.27g, 67%, rf = 0.5(DCM 중 10% MeOH)). MS: C<sub>84</sub>H<sub>137</sub>N<sub>11</sub>O<sub>41</sub>에 대해 계산치 1957.1. 실측치 1959.6.

[0833]

화합물 **12**는 "클릭 화학"을 사용하는 후속 올리고뉴클레오타이드 접합체 제조에 사용되었다.

[0834]

iii) 올리고뉴클레오타이드 합성



[0835] [표 8]

| 단일<br>가닥 ID | 서열 5' - 3'                                                                       | RP HPLC에<br>의한 순도 (%) |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X91382      | (NH <sub>2</sub> -<br>DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)      | 89.5                  |
| X91383      | (NH <sub>2</sub> -<br>DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic) | 91.6                  |
| X91384      | (NH <sub>2</sub> -<br>DEG)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)      | 94.0                  |
| X91403      | (NH <sub>2</sub> C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)           | 94.2                  |
| X91404      | (NH <sub>2</sub> C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)      | 96.5                  |
| X91405      | (NH <sub>2</sub> C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)           | 91.3                  |
| X91415      | (invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NH <sub>2</sub> C6)          | 96.4                  |
| X91416      | (invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NH <sub>2</sub> C6)       | 77.4                  |
| X91417      | (invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NH <sub>2</sub> C6)            | 96.7                  |
| X91379      | gsascuuuCfaUfCfCfuggaaaua(GalNAc)                                                | 92.8                  |
| X91380      | asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfa(GalNAc)                                           | 95.7                  |
| X91446      | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(GalNAc)                                              | 92.1                  |
| X38483      | usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa                                                | 91.0                  |
| X91381      | usAfsUfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT                                               | 90.0                  |
| X38104      | usCfsuugGfuUfcaugAfaAfucccasusc                                                  | 95.4                  |

*Af, Cf, Gf, Uf:* 2'-F RNA 뉴클레오타이드

*a, c, g, u:* 2'-O-Me RNA 뉴클레오타이드

*dT:* DNA 뉴클레오타이드

*s:* 포스포로티오에이트

*invabasic:* 1,2-디데옥시리보스

*NH<sub>2</sub>-DEG:* 아미노에톡시에틸 링커

*NH<sub>2</sub>C12:* 아미노도데실 링커

*NH<sub>2</sub>C6:* 아미노헥실 링커

[0836]

[0837] 올리고뉴클레오타이드는 포스포르아미다이트 접근법에 따라 고상에서 합성하였다. 규모에 따라 Mermade



## AKTA Oligopilot

12(BioAutomation Corporation) 또는 (GE Healthcare)를 사용하였다.

- [0838] 합성은 invabasic(CPG, 480 Å, 86 μmol/g의 로딩; LGC Biosearch 카탈로그 번호 BCG-1047-B) 또는 2'-F A (CPG, 520 Å, 90 μmol/g의 로딩; LGC Biosearch 카탈로그 번호 BCG-1039-B) 또는 NH2C6 (CPG, 520 Å, 85 μmol/g의 로딩; LGC Biosearch 카탈로그 번호 BCG-1397-B) 또는 GalNAc(CPG, 500 Å, 57 μmol/g의 로딩; Primetech) 또는 2'-O-메틸 C(CPG, 500 Å, 84 μmol/g의 로딩; LGC Biosearch 카탈로그 번호 BCG-10-B) 또는 2'-O-메틸 A(CPG, 497 Å, 85 μmol/g의 로딩, LGC Biosearch, 카탈로그 번호 BCG-1029-B) 또는 dT(CPG, 497 Å, 87 μmol/g의 로딩, LGC Biosearch, 카탈로그 번호 BCG-1055-B)로 로딩된 제어된 기공 유리로 만들어진 상업적으로 이용 가능한 고체 지지체에서 수행하였다.
- [0839] 2'-O-Me, 2'-F RNA 포스포르아미다이트 및 보조 시약은 SAFC Proligo(Hamburg, Germany)에서 구입하였다.
- [0840] 2'-O-메틸 포스포르아미다이트는 다음을 포함한다: 5'-(4,4'-디메톡시트리틸)-N-벤조일-아데노신 2'-O-메틸-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-(4,4'-디메톡시트리틸)-N-벤조일-시티딘 2'-O-메틸-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-(4,4'-디메톡시트리틸)-N-디메틸포름아미딘-구아노신 2'-O-메틸-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-(4,4'-디메톡시트리틸)-우리딘 2'-O-메틸-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트.
- [0841] 2'-F 포스포르아미다이트는 다음을 포함한다: 5'-디메톡시트리틸-N-벤조일-데옥시아데노신 2'-플루오로-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-디메톡시트리틸-N-아세틸-데옥시시티딘 2'-플루오로-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-디메톡시트리틸-N-이소부틸릴-데옥시구아노신 2'-플루오로-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 및 5'-디메톡시트리틸-데옥시우리딘 2'-플루오로-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트.
- [0842] 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 필요한 아미노 링커를 도입하기 위해 2-[2-(4-모노메톡시트리틸)아미노에톡시]에틸-(2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필]-포스포르아미다이트(Glen Research 카탈로그 번호 1905) 및 12-(트리플루오로아세틸아미노)도데실-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트(ChemGenes 카탈로그 번호 CLP-1575)를 사용하였다. invabasic 변형은 5-O-디메톡시트리틸-1,2-디데옥시리보스-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트(ChemGenes 카탈로그 번호 ANP-1422)를 사용하여 도입하였다.
- [0843] 모든 빌딩 블록은 무수 아세트오니트릴 중 50% 무수 DCM에 용해시킨 2'-O-메틸-우리딘 포스포르아미다이트를 제외하고 분자체(3 Å)를 함유하는 무수 아세트오니트릴(100mM(Merck) 또는 200mM(AKTA Oligopilot))에 용해시켰다. 요오드(피리딘/H<sub>2</sub>O 9:1 v/v 중 50mM)를 산화 시약으로 사용하였다. 5-에틸 티오테트라졸(ETT, 아세트오니트릴 중 500mM)을 활성화제 용액으로 사용하였다.
- [0844] 포스포리티오에이트 연결의 도입을 위한 티올화는 아세트오니트릴/피리딘 4:6 v/v에서 100mM 크산탄 수소화물(TCI, 카탈로그 번호 6846-35-1)을 사용하여 수행하였다.
- [0845] 달리 언급된 경우를 제외하고 커플링 시간은 5.4분이었다. 5' 아미노 변형은 각 커플링당 11분의 커플링 시간(총 커플링 시간 22분)으로 이중 커플링 단계를 사용하여 서열에 통합하였다. 산화제 접촉 시간은 1.2분으로 설정되었고 티올화 시간은 5.2분이었다.
- [0846] NH2DEG 서열로부터의 MMT 그룹은 제외하고 최종 DMT 그룹을 제거하여 서열을 합성하였다.
- [0847] 합성 종료 시, 6°C에서 16시간 동안 28-30% 수산화암모늄(Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호 221228) 및 40% 수성 메틸아민(Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호 8220911000)의 1:1 부피 용액을 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 고체 지지체로부터 절단하였다. 이어서 고체 지지체를 여과하고, 필터를 H<sub>2</sub>O로 완전히 세척하고, 합한 용액의 부피를 감압 하에서 증발시켜 감소시켰다. 생성된 용액의 pH를 10% AcOH(Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호 A6283)로 pH 7로 조정하였다.
- [0848] 조 물질을 역상(RP) HPLC 또는 음이온 교환(AEX) HPLC로 정제하였다.

[0849]

RP HPLC 정제는 **AKTA Pure** 기기(GE Healthcare)에서 XBridge C18 Prep 19 × 50mm 컬럼(Waters)을 사용하여 수행하였다. 버퍼 A는 100mM 트리에틸-암모늄 아세테이트(TEAAc, Biosolve) pH 7이었고 버퍼 B는 버퍼 A에 95% 아세토니트릴을 함유하였다. 10mL/분의 유속과 60℃의 온도를 사용하였다. 280nm에서 UV 트레이스를 기록하였다. 120 컬럼 부피 내에서 0% B에서 100% B까지의 구배를 사용하였다. 적절한 분획을 폴딩하고 3M 나트륨 아세테이트(NaOAc)(Sigma-Aldrich), pH 5.2 및 85% 에탄올(VWR)로 냉동고에서 침전시켰다. 펠렛을 원심분리로

분리하고, 물(50mL)에 재용해시키고, 5M NaCl(5mL)로 처리하고, **AKTA Pure** 기기에서 Sephadex G25-Fine 수지(GE Healthcare)로 채워진 50 × 165mm ECO 컬럼(YMC, Dinslaken, Germany)을 사용하여 크기 배제 HPLC로 탈염시켰다.

[0850]

**AKTA Pure** 기기(GE Healthcare)에서 TSK 겔 SuperQ-5PW 20 × 200mm(BISCHOFF Chromatography)를 사용하여 AEX HPLC 정제를 수행하였다. 버퍼 A는 20mM 인산나트륨(Sigma-Aldrich) pH 7.8이었고, 버퍼 B는 1.4M 브롬화나트륨(Sigma-Aldrich)을 첨가한 버퍼 A와 동일하였다. 10mL/분의 유속과 60℃의 온도를 사용하였다. 280nm에서 UV 트레이스를 기록하였다. 27 컬럼 부피 내에서 10% B에서 100% B까지의 구배를 사용하였다. 적절한 분획을 폴딩하고 3M NaOAc, pH 5.2 및 85% 에탄올로 냉동고에서 침전시켰다. 펠렛을 원심분리로 분리하고, 물(50mL)에 재용해시키고, 5M NaCl(5mL)로 처리하고, 크기 배제 크로마토그래피로 탈염시켰다.

[0851]

MMT 그룹을 물 중 25% 아세트산으로 제거하였다. 반응이 완료되면 용액을 중화시키고 샘플을 크기 배제 크로마토그래피로 탈염시켰다.

[0852]

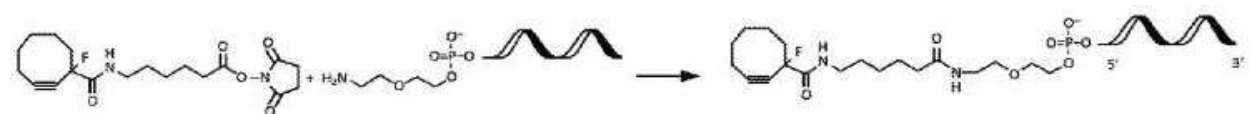
LCQ Deca XP-plus Q-ESI-TOF 질량 분석기(Thermo Finnigan) 또는 Compact ESI-Qq-TOF 질량 분석기(Bruker Daltonics)와 결합된 Dionex Ultimate 3000(Thermo Fisher Scientific) HPLC 시스템에서 2.1 × 50mm XBridge C18 컬럼(Waters)에서 분석적 LC-MS로 단일 가닥을 분석하였다. 버퍼 A는 H<sub>2</sub>O 중 16.3mM 트리에틸아민, 100mM 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(HFIP) 및 1% MeOH였으며, 버퍼 B는 95% MeOH 중 버퍼 A를 함유하였다. 250 μL/분의 유속과 60℃의 온도를 사용하였다. 260nm 및 280nm에서 UV 트레이스를 기록하였다. 0.5분 이내에 1-40% B에 이어서 13분 이내에 40에서 100% B의 구배를 사용하였다. 메탄올(LC-MS 등급), 물(LC-MS 등급), 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(puriss. p.a.) 및 트리에틸아민(puriss. p.a.)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

[0853]

iv) 5'- 또는 3'-말단에서 모노플루오로 사이클로옥틴(MFCO) 접합

[0854]

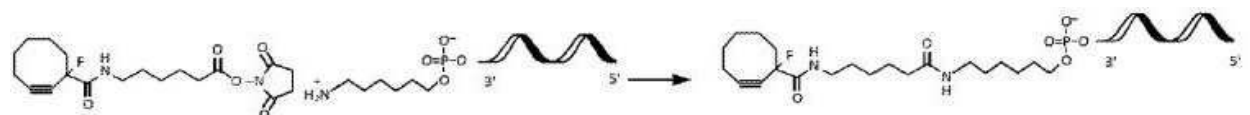
5'-말단 MFCO 접합



[0855]

[0856]

3'-말단 MFCO 접합



[0857]

[0858]

MFCO 접합을 위한 일반 조건: 아민 변형된 단일 가닥을 50mM 탄산염/중탄산염 버퍼 pH 9.6/디메틸 설폭사이드(DMSO) 4:6(v/v)에 700 OD/mL로 용해시키고 이 용액에 DMF 중 MFCO-C6-NHS 에스테르(Berry&Associates, 카탈로그 번호 LK 4300)의 35mM 용액 1몰 당량을 첨가하였다. 반응을 실온에서 수행하고 1시간 후 MFCO 용액의 또 다른 몰 당량을 첨가하였다. 반응을 추가 1시간 동안 진행시키고 LC/MS로 모니터링하였다. 출발 물질의 정량적 소비를 달성하기 위해서는 아미노 변형된 올리고뉴클레오타이드 대비 적어도 2몰 당량 초과 MFCO NHS 에스테르 시약이 필요하였다. 반응 혼합물을 물로 15배 희석하고, Sartorius의 1.2 μm 필터를 통해 여과한 다음

# AKTA Pure

기기(GE Healthcare)에서 예비 상(RP HPLC)으로 정제하였다.

[0859] Waters의 XBridge C18 Prep 19 × 50mm 컬럼을 사용하여 정제를 수행하였다. 버퍼 A는 100mM TEAAc pH 7이었고 버퍼 B는 버퍼 A에 95% 아세트니트릴을 함유하였다. 10mL/분의 유속과 60℃의 온도를 사용하였다. 280nm에서 UV 트레이스를 기록하였다. 60 컬럼 부피 내에서 0-100% B의 구배를 사용하였다.

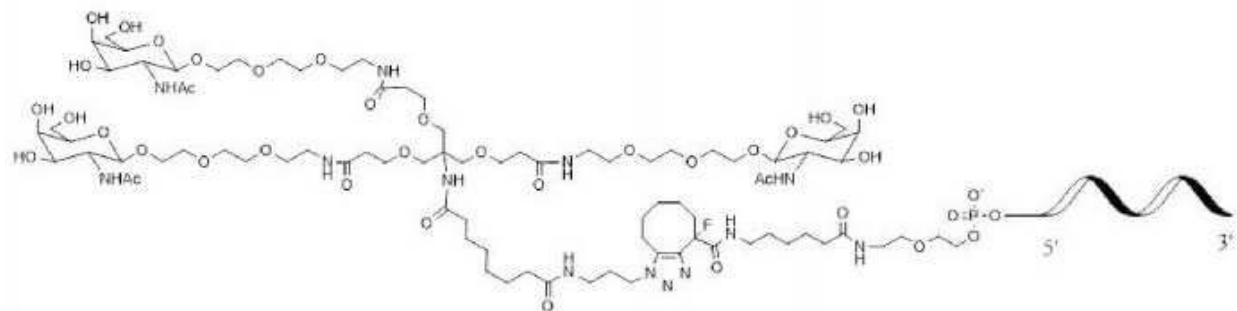
[0860] 전장(full length) 접합 올리고뉴클레오티드를 함유하는 분획을 폴링하고, 3M NaOAc, pH 5.2 및 85% 에탄올로 냉동고에서 침전시키고, 수집된 펠릿을 물에 용해시켰다. 샘플을 크기 배제 크로마토그래피로 탈염시키고 speed-vac 농축기를 사용하여 농축시켜 접합된 올리고뉴클레오티드를 40-80%의 분리 수율로 산출하였다.

[0861] [표 9]

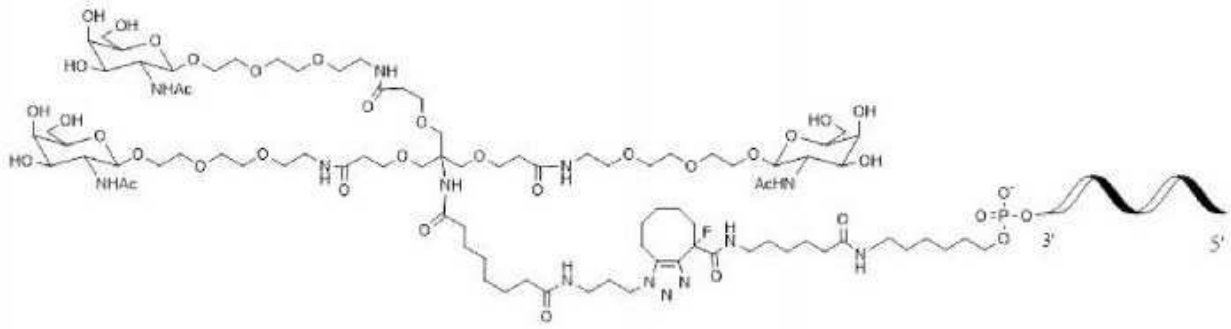
| 센스<br>가닥 ID | 센스 가닥 서열 5' - 3'                                                         | RP HPLC에<br>의한 순도 (%) |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X91388      | (MFCO)(NH-<br>DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)      | 89.0                  |
| X91389      | (MFCO)(NH-<br>DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic) | 91.0                  |
| X91390      | (MFCO)(NH-<br>DEG)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)      | 90.0                  |
| X91421      | (invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)<br>(MFCO)      | 94.0                  |
| X91422      | (invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NH<br>C6)(MFCO)   | 89.0                  |
| X91423      | (invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)<br>(MFCO)        | 89.0                  |

[0862] v) 5'- 또는 3'-말단에서의 TriGalNAc(GalNAc-T1) 접합

[0864] 5'-GalNAc-T1 접합체



[0865] 3'-GalNAc-T1 접합체



[0867]

[0868]

TriGalNAc 접합을 위한 일반 절차: MFCO 변형된 단일 가닥을 물에 2000 OD/mL로 용해시키고 이 용액에 DMF 중 화합물 12(10mM)의 1당량 용액을 첨가하였다. 반응을 실온에서 수행하고 3시간 후 0.7몰 당량의 화합물 12 용액을 첨가하였다. 반응을 밤새 진행시키고 완결을 LCMS로 모니터링하였다. 접합체를 물에 15배 희석하고

Sartorius의 1.2 $\mu$ m 필터를 통해 여과한 다음 **AKTA Pure** 기기(GE Healthcare)에서 RP HPLC로 정제하였다.

[0869]

Waters의 XBridge C18 Prep 19  $\times$  50mm 컬럼을 사용하여 RP HPLC 정제를 수행하였다. 버퍼 A는 100mM 트리에틸 암모늄 아세테이트 pH 7이었으며 버퍼 B는 버퍼 A에 95% 아세토니트릴을 함유하였다. 10mL/분의 유속과 60 $^{\circ}$ C의 온도를 사용하였다. 280nm에서 UV 트레이스를 기록하였다. 60 컬럼 부피 내에서 0-100% B의 구배를 사용하였다.

[0870]

전장 접합 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 분획을 풀링하고, 3M NaOAc, pH 5.2 및 85% 에탄올로 냉동고에서 침전시키고, 수집된 펠릿을 물에 용해시켜 약 1000 OD/mL의 올리고뉴클레오타이드 용액을 얻었다. 20% 수성 암모니아를 첨가하여 O-아세테이트를 제거하였다. 이러한 보호 그룹의 정량적 제거는 LC-MS로 검증하였다.

[0871]

접합체를 **AKTA Pure** (GE Healthcare) 기기에서 Sephadex G25 Fine 수지(GE Healthcare)를 사용하여 크기 배제 크로마토그래피로 탈염시켜 접합된 뉴클레오타이드를 50-70%의 분리 수율로 산출하였다.

[0872] [표 10]

| 센스<br>가닥 ID | 센스 가닥 서열 5' - 3'                                                                    | RP HPLC에<br>의한 순도<br>(%) |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| X91394      | (GalNAc-T1)(MFCO)(NH-<br>DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)      | 80.0                     |
| X91395      | (GalNAc-T1)(MFCO)(NH-<br>DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuaFasusa(invabasic)(invabasic) | 87.8                     |
| X91396      | (GalNAc-T1)(MFCO)(NH-<br>DEG)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)      | 87.9                     |
| X91427      | (invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(MF<br>CO)(GalNAc-T1)      | 88.0                     |
| X91428      | (invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuaFaua(NHC6)<br>(MFCO)(GalNAc-T1)   | 82.6                     |
| X91429      | (invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(MFC<br>O)(GalNAc-T1)        | 82.9                     |

[0873]

[0874] vi) 듀플렉스 어닐링(Duplex Annealing)

[0875] 원하는 siRNA 듀플렉스를 생성하기 위해, 2개의 상보적 가닥을 이의 등몰 수용액을 배합하여 어닐링하였다. 혼합물을 70℃의 수조에 5분 동안 두었고, 후속적으로 2시간 이내에 주위 온도로 냉각시켰다. 듀플렉스를 2일 동안 동결건조시키고 -20℃에서 보관하였다.

[0876] Dionex Ultimate 3000(Thermo Fisher Scientific) HPLC 시스템의 Superdex™ 75 Increase 5/150 GL 컬럼 5 × 153-158mm(Cytiva)에서 분석적 SEC HPLC로 듀플렉스를 분석하였다. 이동상은 10% 아세토니트릴을 함유하는 1x PBS로 이루어졌다. 실온에서 1.5mL/분의 유속으로 10분 동안 등용매 구배(isocratic gradient)를 실행하였다. 260nm 및 280nm에서 UV 트레이스를 기록하였다. 물(LC-MS 등급)은 Sigma-Aldrich에서 구입했고 인산염 완충 식염수(PBS; 10x, pH 7.4)는 GIBCO(Thermo Fisher Scientific)에서 구입하였다.

[0877] 제조된 GalNAc 접합체는 하기 표에 정리되어 있다. 이들은 3개의 상이한 표적 유전자에 대해 지시되었다. 상응하는 단일 가닥과 함께 siRNA 코딩, 서열 정보 및 듀플렉스의 순도가 포착된다.



[0878] [표 11]

| 표적  | 듀플렉스 ID | ssRN ID | ssRNA-서열 5'-3'                                                                  | HPLC에 의한 듀플렉스 순도 (%) |
|-----|---------|---------|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| GO  | ETX001  | X91394  | (GalNAc-T1)(MFCO)(NHDEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)       | 96.8                 |
|     |         | X38483  | usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa                                               |                      |
|     | ETX005  | X91427  | (invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)      | 92.8                 |
|     |         | X38483  | usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa                                               |                      |
| C5  | ETX010  | X91395  | (GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic) | 96.4                 |
|     |         | X91381  | usAfsUfuAfuaAfaAfaUfcUfuGfcuususudTdT                                           |                      |
|     | ETX014  | X91428  | (invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaU(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)    | 97.2                 |
|     |         | X91381  | usAfsUfuAfuaAfaAfaUfcUfuGfcuususudTdT                                           |                      |
| TTR | ETX019  | X91396  | (GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)      | 97.2                 |
|     |         | X38104  | usCfsuugGfuUfcaugAfaAfucccasusc                                                 |                      |
|     | ETX023  | X91429  | (invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)        | 96.3                 |
|     |         | X38104  | usCfsuugGfuUfcaugAfaAfucccasusc                                                 |                      |

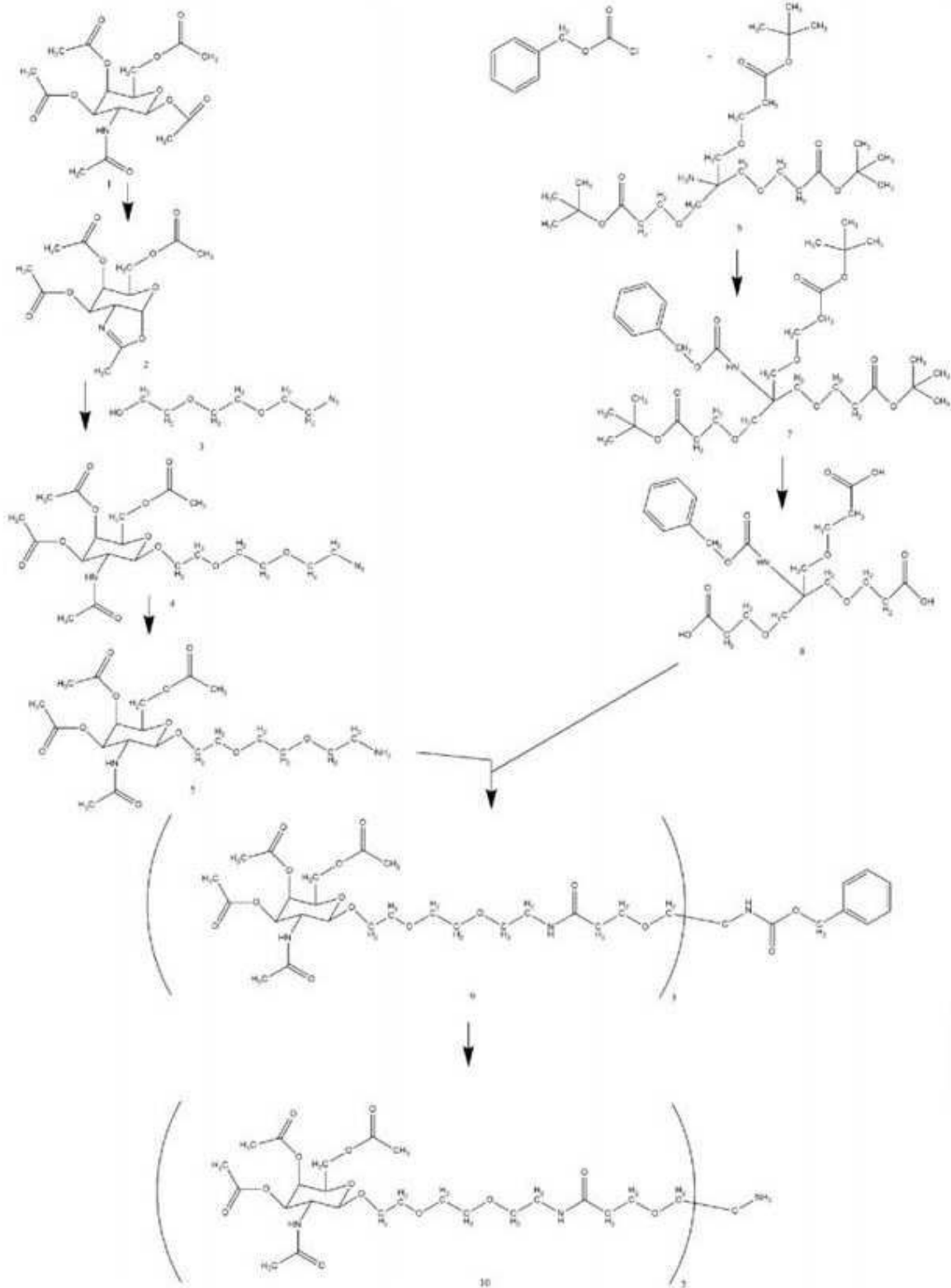
[0879]

[0880]

다음 반응식은 합성 경로를 추가로 설명한다:

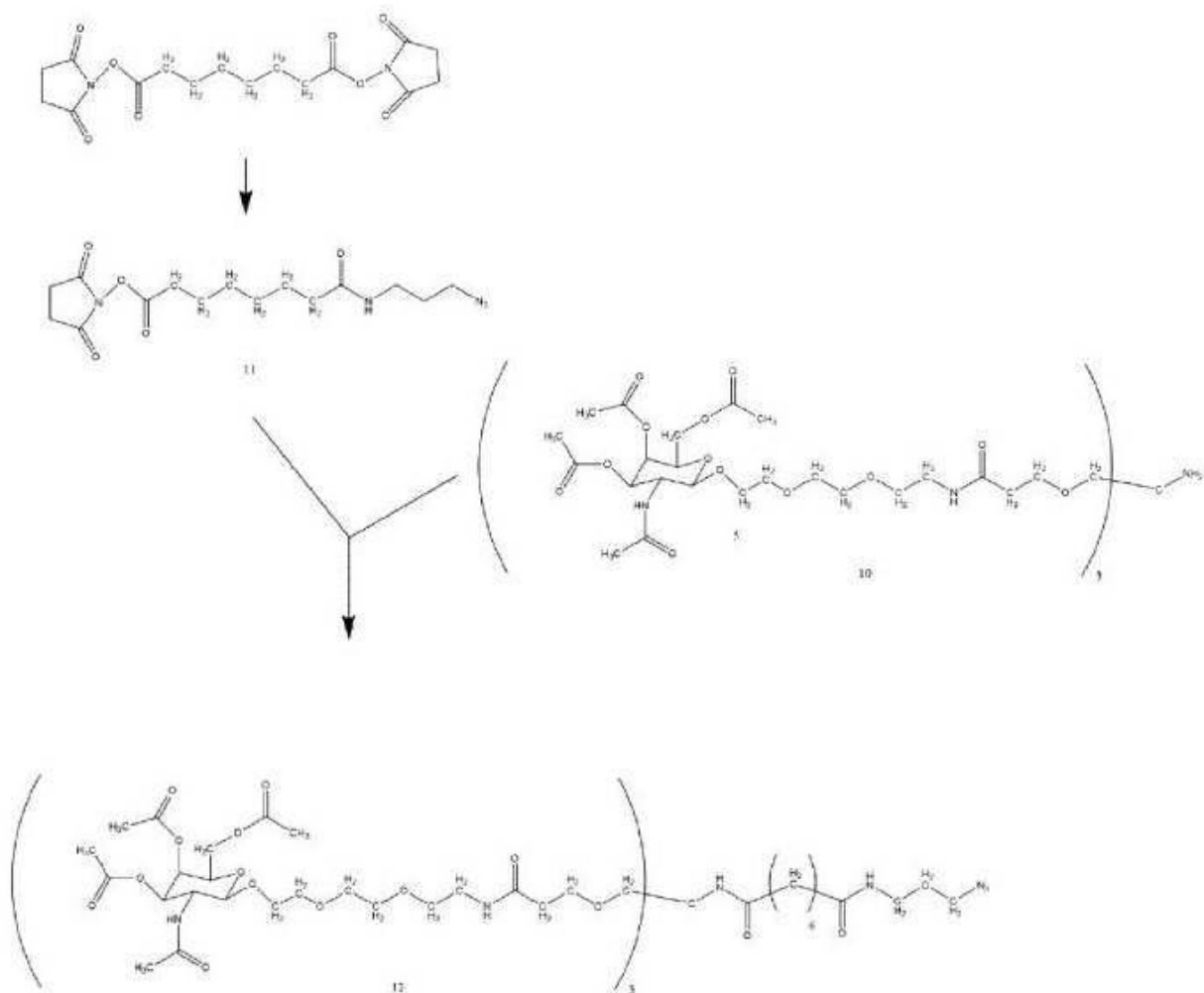


[0881] 반응식 1:



[0882]

[0883] 반응식 2:

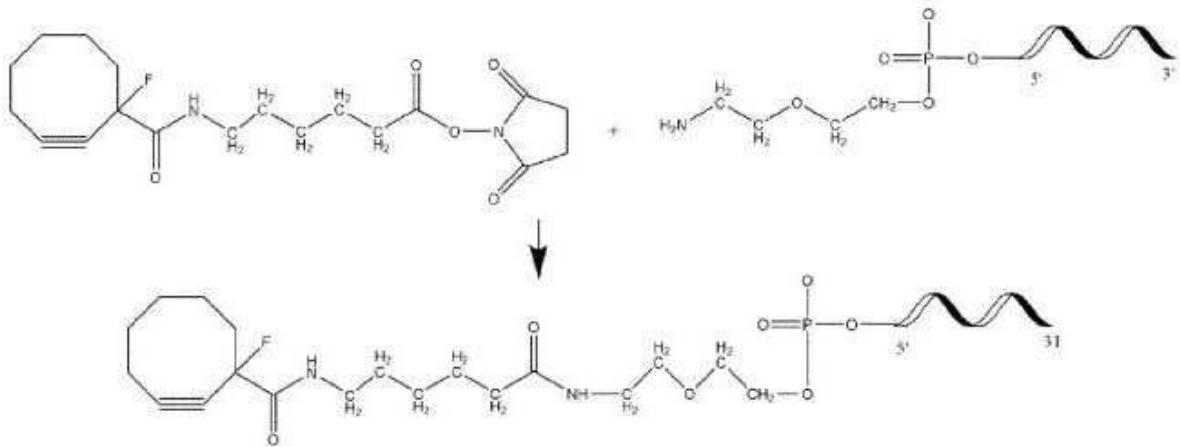


[0884]

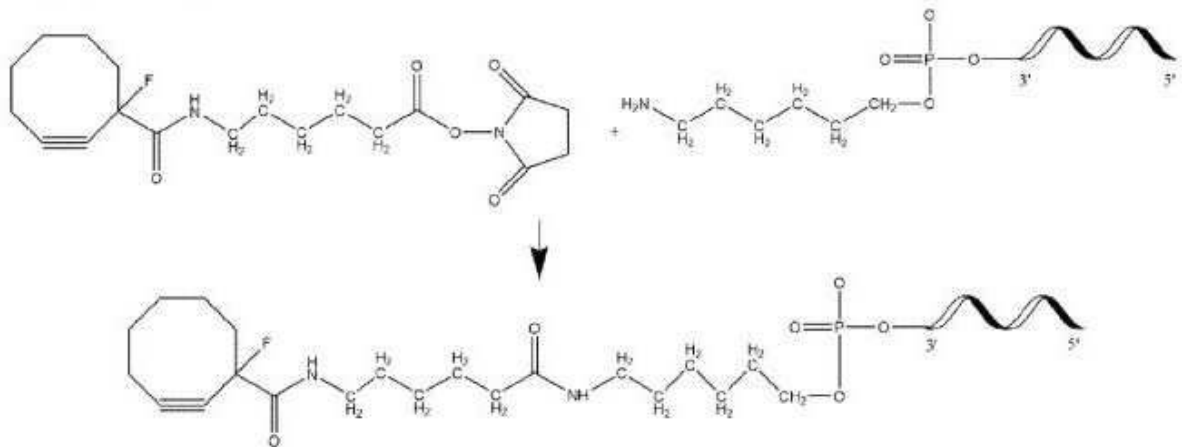
[0885]

반응식 3:

5' 말단 MFCO 접합

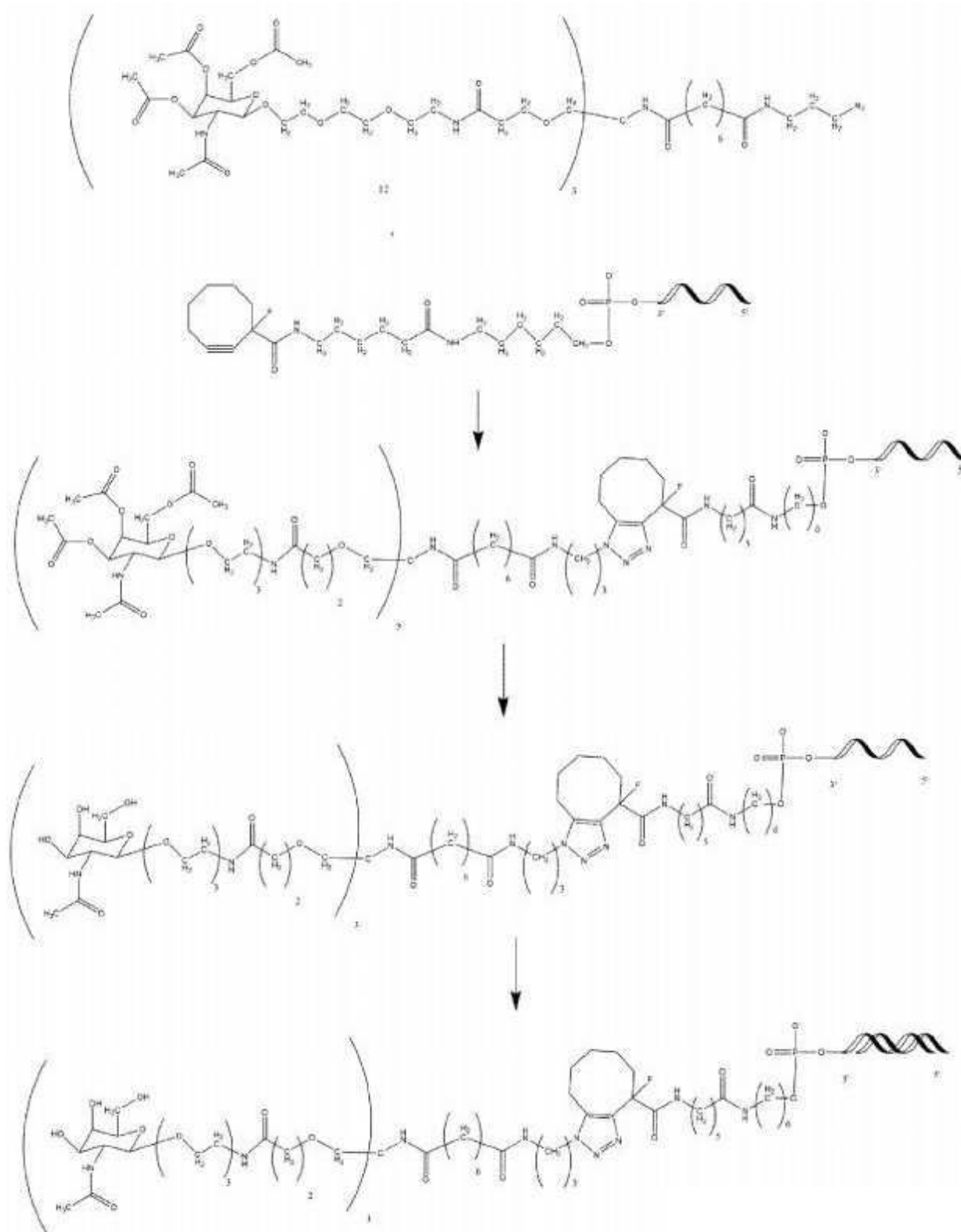


3' 말단 MFCO 접합



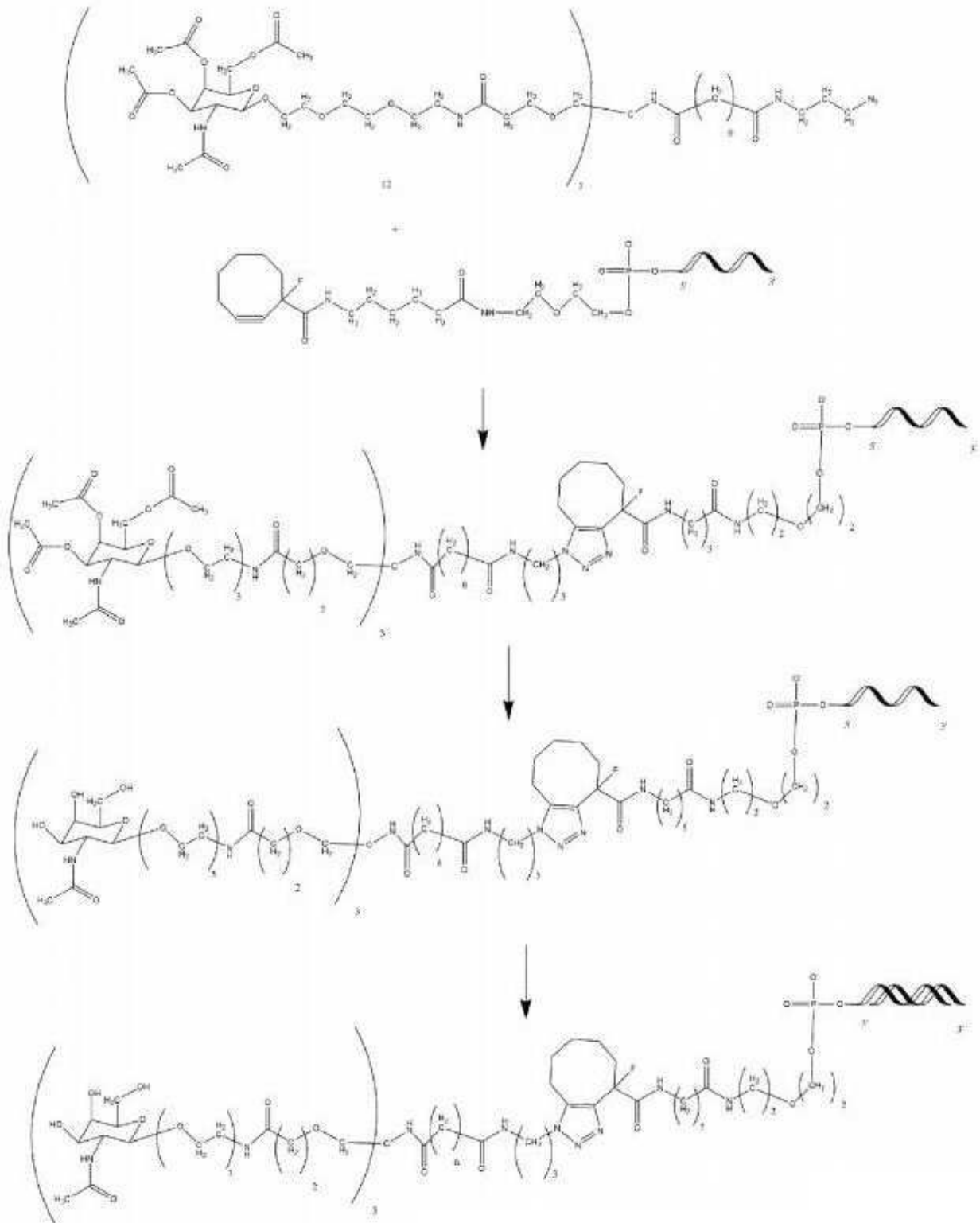
[0886]

[0887] 반응식 4:



[0888]

[0889] 반응식 5:



[0890]

[0891] 실시예 3

[0892] 다음 작제물이 실시예 3 및 4에서 사용된다:

[0893]

[표 12]

| 표적     | ID     | 센스 서열 5' → 3'                                                                  | 안티센스 서열 5' → 3'                       |
|--------|--------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| hsHAO1 | ETX006 | (invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUcCfcfuggaaauasusa(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)      | usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa     |
| hsHAO1 | ETX002 | (ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)gacuuuCfaUcCfcfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)      | usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa     |
| hsC5   | ETX011 | (ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic) | usAfsUfuAfuAfaAfaUfuUfcUfuGfcuusudTdT |
| hsC5   | ETX015 | (invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)   | usAfsUfuAfuAfaAfaUfuUfcUfuGfcuusudTdT |
| hsTTR  | ETX020 | (ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)      | usCfsuugGfuUfcaugAfaAfucccasusc       |
| hsTTR  | ETX024 | (invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)        | usCfsuugGfuUfcaugAfaAfucccasusc       |

[0894]

[0895]

표 12에서 다음 명명법 (NHC6), (NH2C12) 및 (ET-GalNAc-T2CO)의 괄호 안의 성분은 링커 요소의 기술어이고, 완전 상응하는 링커 구조가 본원의 도 32 및 도 33에 도시되어 있다. 실제 링커 구조에 대한 약어의 이러한 대응은 본원에서 상기 약어의 다른 모든 언급에 유사하게 적용된다.



[0896] [표 12a]

| 표적             | ID     | 짧은 기술어              | 링커 + 리간드          |
|----------------|--------|---------------------|-------------------|
| 표 12와 같은 siRNA |        |                     |                   |
| hsHAO1         | ETX006 | 3'-GalNAc T2a 역 무염기 | 도 32와 같은 링커 + 리간드 |
| hsHAO1         | ETX002 | 5'-GalNAc T2b 역 무염기 | 도 33과 같은 링커 + 리간드 |
| hsC5           | ETX011 | 5'-GalNAc T2b 역 무염기 | 도 33과 같은 링커 + 리간드 |
| hsC5           | ETX015 | 3'-GalNAc T2a 역 무염기 | 도 32와 같은 링커 + 리간드 |
| hsTTR          | ETX020 | 5'-GalNAc T2b 역 무염기 | 도 33과 같은 링커 + 리간드 |
| hsTTR          | ETX024 | 3'-GalNAc T2a 역 무염기 | 도 32와 같은 링커 + 리간드 |

[0897]

[0898] 다음 대조군 구조도 실시예에서 사용된다.

[0899] [표 13]

| 표적      | ID       | 센스 서열 5' → 3'                         | 안티센스 서열 5' → 3'                     |
|---------|----------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| F-Luc   | XD-00914 | cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT              | UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT            |
| hsFVII  | XD-03999 | AGAuAuGcAcAcAcGGAdTsdT                | UCCGUGUGUGGcAuAUCUdTsdT             |
| hsAHSA1 | XD-15421 | uscsUfcGfuGfgCfcUfuAfaUfgAfaAf(invdT) | UfsUfsuCfaUfuAfaGfgCfcAfcGfaGfasusu |

[0900]

|        |                |                        |
|--------|----------------|------------------------|
| [0901] | <b>약어:</b>     |                        |
| [0902] | AHSA1          | 열 충격 단백질 ATPase1의 활성제  |
| [0903] | ASGR1          | 아시알로당단백질 수용체 1         |
| [0904] | ASO            | 안티센스 올리고뉴클레오타이드        |
| [0905] | bDNA           | 분지형 DNA                |
| [0906] | bp             | 염기쌍                    |
| [0907] | C5             | 보체 C5                  |
| [0908] | conc.          | 농도                     |
| [0909] | ctrl.          | 대조군                    |
| [0910] | CV             | 변동 계수                  |
| [0911] | dG, dC, dA, dT | DNA 잔기                 |
| [0912] | F              | 플루오로                   |
| [0913] | FCS            | 소 태아 혈청                |
| [0914] | GalNAc         | N-아세틸갈락토사민             |
| [0915] | GAPDH          | 글리세르알데히드 3-포스페이트 탈수소효소 |
| [0916] | G, C, A, U     | RNA 잔기                 |
| [0917] | g, c, a, u     | 2'-O-메틸 변형된 잔기         |
| [0918] | Gf, Cf, Af, Uf | 2'-플루오로 변형된 잔기         |
| [0919] | h              | 시간                     |
| [0920] | HA01           | 하이드록시산 옥시다제 1          |
| [0921] | HPLC           | 고성능 액체 크로마토그래피         |
| [0922] | Hs             | 호모 사피엔스                |
| [0923] | IC50           | 반응이 50% 감소하는 억제제의 농도   |
| [0924] | ID             | 식별자                    |
| [0925] | KD             | 녹다운                    |
| [0926] | LF2000         | 리포펙타민2000              |
| [0927] | M              | 몰 농도                   |
| [0928] | Mf             | 마카카 파스치쿨라리스            |
| [0929] | min            | 분                      |
| [0930] | MV             | 평균값                    |
| [0931] | n.a. 또는 N/A    | 해당 없음                  |
| [0932] | NEAA           | 비필수 아미노산               |
| [0933] | nt             | 뉴클레오타이드                |
| [0934] | QC             | 품질 관리                  |
| [0935] | QG2.0          | QuantiGene 2.0         |
| [0936] | RLU            | 상대 광 단위                |

- [0937] RNAi RNA 간섭
- [0938] RT 실온
- [0939] s 포스포로티오에이트 백본 변형
- [0940] SAR 구조-활성 상관관계
- [0941] SD 표준편차
- [0942] siRNA 작은 간섭 RNA
- [0943] TTR 트랜스티레틴
- [0944] 실시예 3
- [0945] **- 요약**
- [0946] hsHAO1, hsC5 또는 hsTTR mRNA를 표적으로 하는 GalNAc-siRNA를 합성하고 QC 처리하였다. 전체 siRNA 세트 (HAO1을 표적으로 하는 siRNA 제외)를 먼저 RNAiMAX를 사용한 형질감염에 의한 HepG2 세포의 용량-반응 설정에서 연구한 후 1차 인간 간세포에서 짐노틱 자유 흡수 설정에서 용량-반응 분석을 하였다.
- [0947] hsHAO1, hsC5 또는 hsTTR mRNA를 표적으로 하는 GalNAc-siRNA와 1차 인간 간세포를 직접 인큐베이션하여 다양한 정도의 용량 의존적 대상 표적 mRNA 침묵을 초래하였다.
- [0948] **- 연구의 목적**
- [0949] 이 일련의 실험의 목적은 3개의 상이한 대상 표적, 즉 hsHAO1, hsC5 또는 hsTTR mRNA를 표적으로 하는 siRNA의 맥락에서 상이한 GalNAc-리간드의 시험관 내 활성을 분석하는 것이었다.
- [0950] 이 연구의 작업 패키지에는 (i) 관심 있는 각각의 모든 개별 대상 표적에 특이적인 bDNA 프로브 세트를 설계, 합성 및 테스트하기 위한 검정 개발, (ii) 후속 스크리닝 실험에 적합한 세포주를 식별하는 것, (iii) 하나 이상의 인간 암 세포주에서 (형질감염에 의한) 잠재적으로 모든 siRNA의 용량-반응 분석, 및 (iv) 짐노틱 자유 흡수 설정에서 1차 인간 간세포에서의 siRNA의 용량-반응 분석이 포함되었다. 두 설정 모두에서 IC50 값과 최대 억제 값을 계산한 다음 효능에 따라 siRNA 연구 세트의 순위를 매겨야 한다.
- [0951] **- 재료 및 방법**
- [0952] **올리고뉴클레오타이드 합성**
- [0953] 표준 고상 합성 방법을 사용하여 관심 siRNA(표 12 참조) 및 대조군(표 13 참조)을 화학적으로 합성하였다.
- [0954] **세포 배양 및 시험관 내 형질감염 실험**
- [0955] 세포 배양, 형질감염 및 QuantiGene2.0 분지형 DNA 검정이 아래에 기술되어 있으며, siRNA 서열은 표 12 및 13에 나열되어 있다. HepG2 세포는 ATCC(American Tissue Culture Collection)(HB-8065, Lot #: 63176294)에서 공급받았고 10% 소 태아 혈청(FCS)을 함유하도록 보충된 ATCC 공식 이글 최소 필수 배지에서 배양하였다. 1차 인간 간세포(PHH)는 Primacyt(Schwerin, Germany)(Lot#: CyHuf19009HEC)에서 공급받았다. 세포는 외식 기술에 의해 악성 교모세포종 종양에서 유래된 것이다. 본 연구에 사용된 모든 세포는 가습 인큐베이터 내 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 분위기에서 배양되었다.
- [0956] hsC5 또는 hsTTR 표적화 siRNA(및 대조군)를 사용한 HepG2 세포의 형질감염을 위해, 세포를 일반 96-웰 조직 배양 플레이트에 20,000개의 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. 상업적으로 이용 가능한 형질감염 시약 RNAiMAX(Invitrogen/Life Technologies)를 제조업체의 지침에 따라 사용하여 siRNA로 세포를 형질감염시켰다. 최종 siRNA 농도가 각각 24, 6, 1.5, 0.4, 0.1, 0.03, 0.008, 0.002, 0.0005 및 0.0001nM인 HepG2 세포에서 20개의 후보(11x hsC5, 9x hsTTR)의 10점 용량-반응 실험을 수행하였다.
- [0957] PHH에서 용량 반응 분석은 가장 높은 최종 siRNA 농도인 1.5 µM에서 시작하여 그 다음은 500nM, 이로부터 2배 희석 단계로 연속적으로 내려가는 짐노틱 자유 흡수 설정에서 세포를 직접 인큐베이션하여 수행하였다.
- [0958] 대조군 웰을 HepG2 세포로 형질감염시키거나 상응하는 플레이트에서 연구된 가장 높은 테스트 siRNA 농도에서 1차 인간 간세포와 직접 인큐베이션하였다. 세포의 모의 처리 다음의 상이한 프로젝트 단계에 포함된 모든 대조군 siRNA가 표 13에 요약 및 나열되어 있다. 각각의 siRNA 및 대조군에 대해 적어도 4개의 웰을 동시에 형질감

염/직접 인큐베이션하고 각각의 웰에서 개별 데이터 포인트를 수집하였다.

[0959] 형질감염 후 siRNA와 함께 24시간 인큐베이션한 후, 배지를 제거하고 HepG2 세포를 용해 혼합물(1 부피의 용해 버퍼 + 2 부피의 뉴클레아제가 없는 물)에서 용해시킨 다음 53℃에서 적어도 45분 동안 인큐베이션하였다. PHH의 경우, 세포 처리 5시간 후 플레이트 배지를 제거한 후 웰당 50 µl의 완전 유지 배지를 첨가하였다. 배지는 총 72시간의 인큐베이션까지 매 24시간마다 이런 식으로 교환하였다. 4시간 또는 72시간 시점에서 세포 배양 상청액을 제거한 후 1:1000 v/v의 Proteinase K가 보충된 200 µl의 용해 혼합물을 첨가하였다.

[0960] 분지형 DNA(bDNA) 검정을 제조업체의 지침에 따라 수행하였다. 암실에서 기질의 존재 하에서 30분 인큐베이션한

후 발광을 1420 발광 카운터(WALLAC VICTOR Light, Perkin Elmer, **Rodgau-Jügesheim, Germany**)를 사용하여 판독하였다. 각각의 웰에 대해 대상 표적 mRNA 수준을 hsGAPDH mRNA 수준으로 정규화하였다. 임의의 siRNA의 활성은 대조군 웰에 걸친 평균 대상 표적 mRNA 농도(hsGAPDH mRNA로 정규화됨)와 비교하여, 처리된 세포에서 대상 표적 mRNA 농도(hsGAPDH mRNA로 정규화됨)의 퍼센트로 표현되었다.

[0961] **검정 개발**

[0962] QuantiGene2.0 분지형 DNA(bDNA) 프로브 세트를 호모 사피엔스 GAPDH, AHS1, hsHA01, hsC5 및 hsTTR에 특이적으로 설계하고 합성하였다. bDNA 프로브 세트를 제조업체의 지침에 따라 bDNA 분석으로 초기에 테스트하여 1차 인간 간세포 다음으로 다음 인간 및 원숭이 암 세포주의 두 가지 상이한 용해물 양, 즉 10 µl 및 50 µl에서 관심 mRNA 수준을 평가하였다: SJSA-1, TF1, NCI-H1650, Y-79, Kasumi-1, EAhy926, Caki-1, Colo205, RPTEC, A253, HeLaS3, Hep3B, BxPC3, DU145, THP-1, NCI-H460, IGR37, LS174T, Be(2)-C, SW 1573, NCI-H358, TC71, 22Rv1, BT474, HeLa, KBwt, Panc-1, U87MG, A172, C42, HepG2, LNCaP, PC3, SupT11, A549, HCT116, HuH7, MCF7, SH-SY5Y, HUVEC, C33A, HEK293, HT29, MOLM 13 및 SK-MEL-2. 세포 용해물을 첨가하지 않고 bDNA 프로브 세트만 함유하는 웰을 사용하여 기술적 배경 및 노이즈 신호를 모니터링하였다.

[0963] **- 결과**

[0964] **GalNAc-siRNA 스크리닝에 적합한 세포 유형 식별**

[0965] 도 1 내지 도 3은 다양한 인간 암 세포주 + 1차 인간 간세포 세트의 용해물에서 3개의 관심 대상 표적, 즉 hsC5, hsHA01 및 hsTTR에 대한 mRNA 발현 데이터를 보여준다. 용해물 부피당 세포 수는 테스트된 각 세포주와 동일하며, 이는 서로 상이한 세포 유형 간의 발현 수준을 비교할 수 있도록 하는 데 필요하다. 도 1은 테스트된 모든 세포 유형에 대한 hsC5 mRNA 발현 데이터를 보여준다.

[0966] 동일한 유형의 세포를 또한 hsHA01 mRNA의 발현에 대해 스크리닝하였고, 결과는 도 2의 일부로서 막대 다이어그램으로 제시되어 있다.

[0967] 마지막으로, hsTTR을 표적으로 하는 GalNAc-siRNA의 스크리닝을 가능하게 하는 적합한 세포 유형이 확인되었고, 각각의 데이터는 도 3의 일부이다.

[0968] 요약하면, 3개의 관심 대상 표적 모두에 대한 mRNA 발현 수준은 1차 인간 간세포(PHH)에서 충분히 높다. 또한, HepG2 세포는 hsC5 및 hsTTR mRNA를 표적으로 하는 GalNAc-siRNA를 스크리닝하는 데 사용될 수 있는 반면, hsHA01 mRNA에 특이적인 siRNA를 테스트하는 데 적합한 암 세포주는 식별할 수 없다.

[0969] **HepG2 세포에서 hsTTR 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석**

[0970] 형질감염 최적화 후, HepG2 세포는 RNAiMAX를 사용하는 용량-반응 설정에서 hsTTR 표적화 GalNAc-siRNA(표 12 참조)의 전체 세트에 형질감염시켰다. 가장 높은 최종 siRNA 테스트 농도는 24nM이었고, 9셀로 내려간다. 표 14는 연구된 모든 hsTTR 표적화 GalNAc-siRNA에 대한 활성 데이터를 나열한다.

[0971] [표 14]

*HepG2 세포에서 hsTTR 표적화 siRNA의 표적, 인큐베이션 시간, 외부 ID, IC20/IC50/IC80 값 및 최대 억제. 목록은 외부 ID에 따라 정렬되며, 상단에는 4 시간 인큐베이션이, 하단에는 24시간 인큐베이션이 나열되어 있다.*

| 표적    | 인큐베이션<br>[시간] | 외부 ID  | IC20 [nM] | IC50 [nM] | IC80 [nM] | 최대 억제<br>[%] |
|-------|---------------|--------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| hsTTR | 4             | ETX020 | 1,953     | #N/A      | #N/A      | 37,9         |
| hsTTR | 4             | ETX024 | 1,952     | #N/A      | #N/A      | 48,2         |
| hsTTR | 24            | ETX020 | 0,005     | 0,025     | 0,133     | 95,5         |
| hsTTR | 24            | ETX024 | 0,008     | 0,029     | 0,134     | 95,5         |

[0972]

[0973] 또한, 24시간 인큐베이션에 대한 결과는 도 11a-b에 나와 있다.

[0974] 일반적으로, hsTTR 표적화 siRNA로 HepG2 세포를 형질감염시키면 일반적으로 0% 침묵에서 최대 억제까지의 전체 활성 범위에 걸친 대상 표적 mRNA 침묵이 발생한다. 형질감염 24시간 후 생성된 데이터는 형질감염 4시간 후 생성된 데이터와 비교하여 더 낮은 표준 분산으로 더 강력하다. 또한, 대상 표적 녹다운 정도는 일반적으로 4시간에서 최대 24시간까지 인큐베이션 시간에 걸쳐 증가한다. hsTTR GalNAc-siRNA는 낮은 두 자릿수 pM 범위의 IC50 값으로 대상 표적 mRNA를 95% 초과로 침묵시키는 것으로 확인되었다.

[0975] **HepG2 세포에서 hsC5 표적화 GalNAc-siRNA의 용량 반응 분석**

[0976] 두 번째 관심 표적인 hsC5 mRNA는 동일한 용량-반응 설정(최소한 상이한 최종 siRNA 테스트 농도를 가짐)에서 RNAiMAX를 사용하여 hsTTR siRNA와 같은 링커/위치/GalNAc-리간드 변이지만 대상 표적 hsC5 mRNA에 특이적인 서열을 공유하는 GalNAc-siRNA로 HepG2 세포를 형질감염시켜 테스트하였다.

[0977] [표 15]

*HepG2 세포에서 hsC5 표적화 siRNA의 표적, 인큐베이션 시간, 외부 ID, IC20/IC50/IC80 값 및 최대 억제. 목록은 외부 ID에 따라 정렬되며, 상단에는 4 시간 인큐베이션이, 하단에는 24시간 인큐베이션이 나열되어 있다.*

| 표적 | 인큐베이션<br>[시간] | 외부 ID  | IC20 [nM] | IC50 [nM] | IC80 [nM] | 최대 억제<br>[%] |
|----|---------------|--------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| C5 | 4             | ETX011 | 0,091     | 0,424     | #N/A      | 74,6         |
| C5 | 4             | ETX015 | 0,407     | 0,578     | #N/A      | 61,9         |
| C5 | 24            | ETX011 | 0,001     | 0,005     | 0,045     | 88,4         |
| C5 | 24            | ETX015 | 0,003     | 0,013     | 0,099     | 88,8         |

[0978]

[0979] 또한, 24시간 인큐베이션에 대한 결과는 도 12a-b에 나와 있다.

[0980] hsC5에 특이적인 GalNAc-siRNA 세트는 HepG2 세포를 형질감염시킬 때 용량 의존적 대상 표적 hsC5 mRNA 침묵이 있다. 일부 녹다운은 세포의 형질감염 4시간 후 이미 감지될 수 있으며, 더 긴 인큐베이션 기간, 즉 24시간 후에 더 높은 대상 표적 침묵이 관찰된다. hsC5 GalNAc-siRNA는 낮은 한 자릿수 pM 범위의 IC50 값으로 대상 표적 mRNA를 거의 90% 침묵시키는 것으로 확인되었다.

[0981] **모든 GalNAc-siRNA 테스트에 적합한 1차 인간 간세포 배치 식별**

[0982] 인간 암 세포주 HepG2에서 2개의 GalNAc-siRNA 세트의 용량-반응 분석은 모든 새로운 GalNAc-/링커/위치/캡 변이체가 실제로 AGO2에 효율적으로 결합하고 RISC에 로딩하며 또한 표적 mRNA의 RNAi 매개된 절단에서 기능할 수



있는 기재인 것을 나타내야(보장해야) 한다. 그러나 표적화 GalNAc-리간드 유도체가 간세포로의 효율적인 흡수를 허용하는지를 테스트하기 위해 짐노틱 자유 흡수 설정으로 1차 인간 간세포에서 용량-반응 분석 실험을 수행해야 한다. 간세포는 아시알로당단백질 수용체(ASGR1)를 높은 수준으로 독점적으로 발현하며, 이 수용체는 일반적으로 순환으로부터 표적 당단백질을 제거하기 위해 간에 의해 사용된다. GalNAc-리간드에 접합된 특정 유형의 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어, siRNA 또는 ASO는 이 높은 턴오버 수용체에 의해 인식되고 클라트린 코팅된 소낭을 통해 세포질로 효율적으로 흡수되고 엔도솜 구획으로 이동한다는 것이 지금까지는 상식이다. 엔도솜 배출은 올리고뉴클레오타이드 전달을 위한 속도 제한 단계로 생각된다.

[0983] 관심 관련 유전자, 즉 hsC5, hsTTR, hsHAO1, hsGAPDH 및 hsAHS1의 발현 수준에 대해 1차 인간 간세포의 상이한 배치를 테스트하는 중간 검정 개발 실험을 수행하였다. Primacyt(Schwerin, Germany)는 테스트를 위해 상이한 1차 인간 간세포 배치, 즉 BHuf16087, CHF2101 및 CyHuf19009의 3개 바이알을 제공하였다. 세포를 콜라겐 코팅된 96-웰 조직 배양 플레이트에 시딩한 다음, 관심 mRNA 수준을 모니터링하기 위해 세포 용해 및 bDNA 분석 전에 0시간, 24시간, 48시간 및 72시간 동안 세포를 인큐베이션하였다. 도 6은 1차 인간 간세포 배치 BHuf16087, CHF2101 및 CyHuf19009에서 3개의 모든 관심 대상 표적 hsTTR, hsC5 및 hsHAO1에 대한 절대 mRNA 발현 데이터를 보여준다. hsGAPDH 및 hsAHS1의 mRNA 발현 수준은 도 7에 나와 있다.

[0984] 전반적으로, 1차 인간 간세포 배치 BHuf16087 및 CyHuf19009에서 모든 3개의 관심 대상 표적의 mRNA 발현은 bDNA 검정을 계속하기에 72시간 후에 충분히 높다. 추가 실험에 사용할 수 있는 바이알의 총량으로 인해 배치 CyHuf19009로 실험을 계속하였다.

[0985] **PHH에서 hsHAO1 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석**

[0986] 1차 인간 간세포(PHH)의 적합한 배치(CyHuf19009)의 확인 후, 표 12에 나열된 hsHAO1 표적화 GalNAc-siRNA에 대한 짐노틱 자유 흡수 분석을 수행하였다. 테스트된 가장 높은 최종 siRNA 농도는 1.5  $\mu$ M, 그 다음은 500nM이었고, 8개의 2배 연속 희석 단계로 내려가 1.95nM의 가장 낮은 최종 siRNA 농도까지 내려간다. 실험은 PHH 세포의 직접 인큐베이션 4시간 및 72시간 후 종료되었다. 표 16은 연구된 모든 hsHAO1 표적화 GalNAc-siRNA에 대한 활성 데이터를 나열한다. 이 실험에 포함된 모든 대조군 siRNA는 표 13에 요약 및 나열되어 있다.

[0987] [표 16]

*1차 인간 간세포(PHH)에서 hsHAO1 표적화 GalNAc-siRNA의 표적, 인큐베이션 시간, 외부 ID, IC20/IC50/IC80 값 및 최대 억제. 목록은 외부 ID에 따라 정렬되며, 각각 상단과 하단에 4시간 및 72시간 인큐베이션이 나열되어 있다.*

| 표적                | 인큐베이션<br>[시간] | 외부 ID  | IC20 [nM] | IC50 [nM] | IC80 [nM] | 최대 억제<br>[%] |
|-------------------|---------------|--------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| hsHAO1<br>(hsGO1) | 4             | ETX002 | #N/A      | #N/A      | #N/A      | 7,2          |
| hsHAO1<br>(hsGO1) | 4             | ETX006 | #N/A      | #N/A      | #N/A      | 0,5          |
| hsHAO1<br>(hsGO1) | 72            | ETX002 | 23,9      | #N/A      | #N/A      | 44,3         |
| hsHAO1<br>(hsGO1) | 72            | ETX006 | 27,5      | 617,1     | #N/A      | 53,6         |

[0988] 또한, 72시간 인큐베이션에 대한 결과는 도 13a-b에 나와 있다.

[0990] hsHAO1을 표적으로 하는 GalNAc-siRNA의 짐노틱 자유 흡수는 4시간 내에 유의한 대상 표적 침투를 초래하지 않았지만, 72시간 인큐베이션 후에 대상 표적 침투가 35.5 내지 58.1% 최대 억제 범위로 가시적이었다.

[0991] PHH에서 hsC5 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석

[0992] 두 번째 관심 표적인 hsC5 mRNA를 동일한 용량-반응 설정에서 앞의 검정에서 테스트된 hsTTR 및 hsHA01과 동일한 링커/위치/GalNAc-리간드 변이이지만 대상 표적 hsC5 mRNA에 특이적인 서열을 공유하는 GalNAc-siRNA로 PHH에서 침노틱 자유 흡수로 테스트하였다. hsC5 표적화 GalNAc-siRNA의 서열 및 대조군 siRNA에 대한 모든 서열과 정보는 각각 표 12 및 표 13에 나열되어 있다. 실험은 PHH의 4시간 및 72시간 직접 인큐베이션 후에 종료되었다. 표 17은 연구된 모든 hsC5 표적화 GalNAc-siRNA에 대한 활성 데이터를 나열한다.

[0993] [표 17]

*PHH에서 hsC5 표적화 GalNAc-siRNA의 표적, 인큐베이션 시간, 외부 ID, IC20/IC50/IC80 값 및 최대 억제. 목록은 외부 ID에 따라 정렬되며, 각각 상단과 하단에 4시간 및 72시간 인큐베이션이 나열되어 있다.*

| 표적 | 인큐베이션<br>[시간] | 외부 ID  | IC20 [nM] | IC50 [nM] | IC80 [nM] | 최대 억제<br>[%] |
|----|---------------|--------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| C5 | 4             | ETX011 | #N/A      | #N/A      | #N/A      | -2,9         |
| C5 | 4             | ETX015 | #N/A      | #N/A      | #N/A      | 7,6          |
| C5 | 72            | ETX011 | 2,6       | 295,3     | #N/A      | 62,1         |
| C5 | 72            | ETX015 | 7,2       | 315,0     | #N/A      | 57,2         |

[0994] 또한, 72시간 인큐베이션에 대한 결과는 14a-b에 제시되어 있다.

[0996] 4시간 인큐베이션 후에 GalNAc-siRNA의 유의한 대상 표적 침묵이 보이지 않는다. 72시간 인큐베이션 후에 생성된 데이터는 최대 억제가 65.5%까지인 더욱 강력한 대상 표적 침묵을 보였다.

[0997] PHH에서 hsTTR 표적화 GalNAc-siRNA의 용량-반응 분석

[0998] 마지막 관심 표적인 hsTTR mRNA를 표적 hsHA01 및 hsC5에 대한 것과 동일한 용량-반응 설정으로 PHH에서 침노틱 자유 흡수를 다시 테스트하였으며, 유일한 차이점으로 대상 표적 hsTTR mRNA에 대한 특정 siRNA 서열을 사용하였다(표 12 참조).

[0999] 실험은 PHH의 직접 인큐베이션 72시간 후에 종료되었다. 표 18은 연구된 모든 hsTTR 표적화 GalNAc-siRNA에 대한 활성 데이터를 나열한다.

[1000] [표 18]

*1차 인간 간세포(PHH)에서 hsTTR 표적화 GalNAc-siRNA의 표적, 인큐베이션 시간, 외부 ID, IC20/IC50/IC80 값 및 최대 억제. 목록은 외부 ID에 따라 정렬되어 있다.*

| 표적    | 인큐베이션<br>[시간] | 외부 ID  | IC20 [nM] | IC50 [nM] | IC80 [nM] | 최대 억제<br>[%] |
|-------|---------------|--------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| hsTTR | 72            | ETX020 | 2,2       | 31,0      | #N/A      | 78,4         |
| hsTTR | 72            | ETX024 | 9,5       | 110,0     | #N/A      | 71,3         |

[1001] 또한, 결과는 도 15a-b에 나와 있다.

[1003] hsTTR을 표적으로 하는 GalNAc-siRNA의 침노틱 자유 흡수는 72시간 이내에 최대 억제가 46 내지 82.5% 범위인 유의한 대상 표적 침묵을 초래하였다.

[1004] - 결론 및 논의

[1005] 본 연구의 범위는 3개의 상이한 대상 표적, 즉 hsHA01, hsC5 및 hsTTR mRNA를 표적으로 하는 siRNA의 맥락에서 사용될 때 본 발명에 따른 GalNAc-리간드의 시험관 내 활성을 분석하는 것이었다. 각 표적에 특이적인 siRNA 세트는 각각 2개의 상이한 안티센스 가닥과 관련하여 상이한 링커/캡/변형/GalNAc-리간드 화학을 갖는 siRNA로 구성되었다.

[1006] 모든 표적에 대해, 표 12의 GalNAc-siRNA가 전체 효능이 높고 IC50 값이 작은 것으로 확인되었다.

[1007] 실시예 4

## [1008] 합성 경로

### [1009] vii) 접합 빌딩 블록 TriGalNAc의 합성

[1010] Macherey-Nagel의 형광 표시자 254nm를 사용하여 실리카 코팅된 알루미늄 플레이트에서 박층 크로마토그래피(TLC)를 수행하였다. UV 광(254nm) 하에서 또는 Stahl(Sigma-Aldrich)에 따라 메탄올(MeOH) 또는 닌하이드린

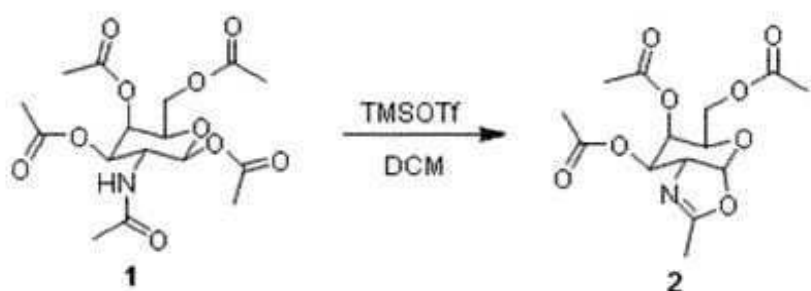
시약 중 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 분무한 다음 가열한 후 화합물을 가시화하였다. Biotage Sfar Silica 10, 25, 50 또는 100g 컬럼(Uppsala, Sweden)을 사용하여 이중 가변 UV 파장 검출기(200-400nm)가 장착된 Biotage Isolera One 플래시 크로마토그래피 기기로 플래시 크로마토그래피를 수행하였다.

[1011] 모든 수분 민감성 반응은 건조 유리 제품, 무수 용매 및 아르곤 대기를 사용하는 무수 조건 하에서 수행하였다. 상업적으로 이용 가능한 모든 시약은 Sigma-Aldrich에서, 용매는 Carl Roth GmbH + Co. KG에서 구입하였다. D-갈락토사민 펜타아세테이트는 AK Scientific에서 구입하였다.

[1012] 60°C에서 Waters의 Acquity UPLC Protein BEH C4 컬럼(300Å, 1.7µm, 2.1 × 100mm)을 사용하여 Dionex UltiMate 3000 RS UHPLC 시스템 및 Thermo Scientific MSQ Plus 질량 분석기로 HPLC/ESI-MS를 수행하였다. 용매 시스템은 0.1% 포름산을 함유한 H<sub>2</sub>O를 함유하는 용매 A 및 0.1% 포름산을 함유한 아세토니트릴(ACN)을 함유하는 용매 B로 이루어졌다. 0.4mL/분의 유속으로 15분에 걸쳐 5-100%의 B 구배를 사용하였다. 검출기 및 조건: 코로나 초하전 에어로졸 검출(esa). 네블라이저 온도: 25°C. N<sub>2</sub> 압력: 35.1psi. 필터: 코로나.

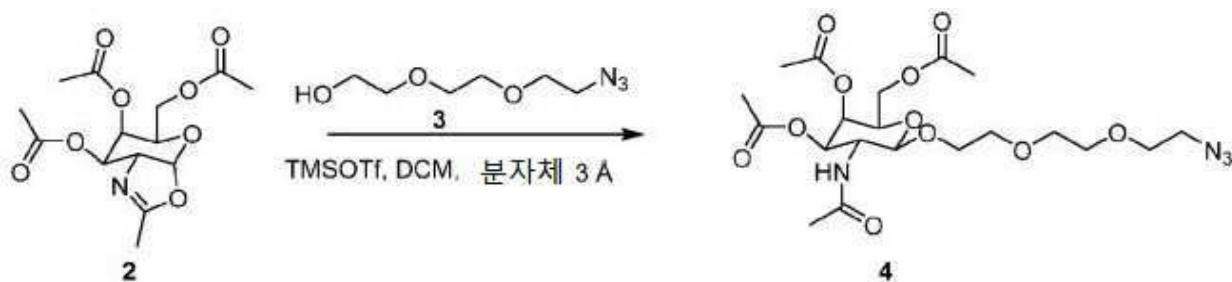
[1013] <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼은 실온에서 500MHz(<sup>1</sup>H NMR) 및 125MHz(<sup>13</sup>C NMR)에서 Varian 분광계로 기록하였다. 화학적 이동은 용매 잔류 피크를 참조하여 ppm으로 제공된다(CDCl<sub>3</sub> - <sup>1</sup>H NMR: 7.26ppm에서의 δ 및 <sup>13</sup>C NMR 77.2ppm에서의 δ; DMSO-d<sub>6</sub> - <sup>1</sup>H NMR: 2.50ppm에서의 δ 및 <sup>13</sup>C NMR 39.5ppm에서의 δ). 커플링 상수는 Hertz로 표시된다. 신호 분할 패턴은 단일선(s), 이중선(d), 삼중선(t) 또는 다중선(m)으로 기술된다.

### [1014] viii) 접합 빌딩 블록 TriGalNAc의 합성 경로



[1015]

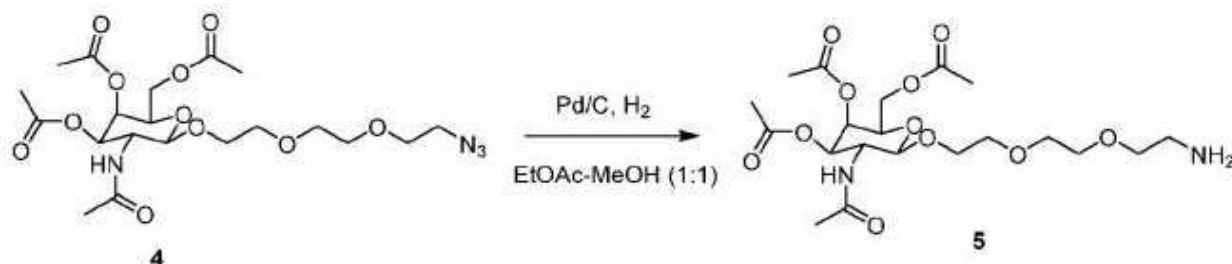
[1016] 화합물 2의 제조: D-갈락토사민 펜타아세테이트(3.00g, 7.71mmol, 1.0당량)를 아르곤 하에서 무수 디클로로메탄(DCM)(30mL)에 용해시키고 트리메틸실릴 트리플루오로메탄설포네이트(TMSOTf, 4.28g, 19.27mmol, 2.5당량)를 첨가하였다. 반응물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 DCM(50mL)으로 희석하고 차가운 포화 수성 NaHCO<sub>3</sub>(100mL) 및 물(100mL)로 세척하였다. 유기층을 분리하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고 농축시켜 표제 화합물을 황색 오일로 얻고, 이를 플래시 크로마토그래피(구배 용리: 10CV의 DCM 중 0-10% MeOH)로 정제하였다. 생성물을 무색 오일로 얻었다(2.5g, 98%, rf= 0.45(DCM 중 2% MeOH)).



[1017]

[1018]

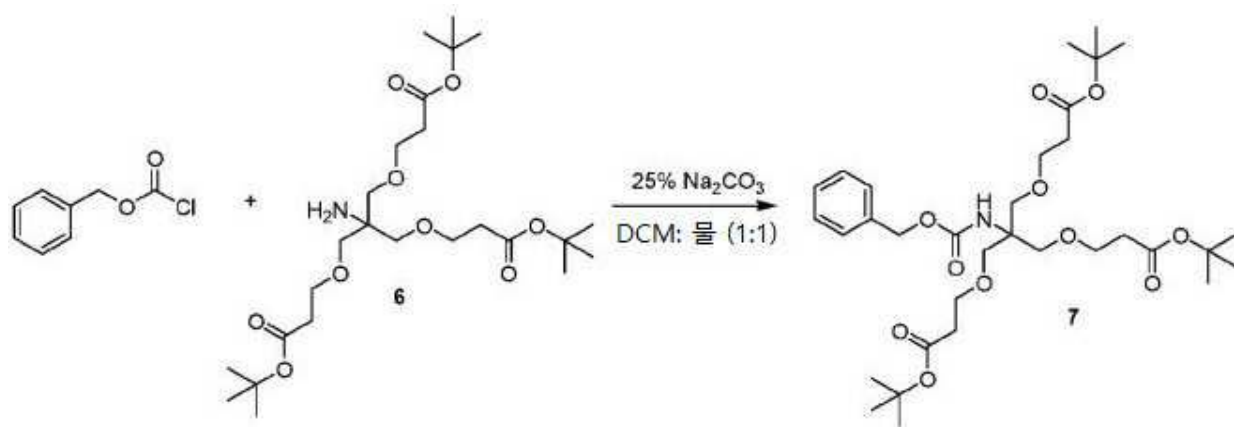
화합물 **4**의 제조: 화합물 **2**(2.30g, 6.98mmol, 1.0당량) 및 아지도-PEG3-OH(1.83g, 10.5mmol, 1.5당량)를 아르곤 하에서 무수 DCM(40mL)에 용해시키고 분자체 3Å(5g)를 상기 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 TMSOTf(0.77g, 3.49mmol, 0.5당량)를 상기 혼합물에 첨가하고 반응물을 밤새 교반하였다. 분자체를 여과하고, 여액을 DCM(100mL)으로 희석하고 차가운 포화 수성  $\text{NaHCO}_3$ (100mL) 및 물(100mL)로 세척하였다. 유기층을 분리하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시키고 용매를 감압 하에서 제거하였다. 조 물질을 플래시 크로마토그래피(구배 용리: 10CV의 DCM 중 0-3% MeOH)로 정제하여 표제 생성물을 연황색 오일로 얻었다(3.10g, 88%,  $r_f = 0.25$ (DCM 중 2% MeOH)). MS:  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{11}$ 에 대한 계산치 504.21. 실측치 505.4.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.21-6.14 (m, 1H), 5.30 (dd,  $J = 3.4, 1.1$  Hz, 1H), 5.04 (dd,  $J = 11.2, 3.4$  Hz, 1H), 4.76 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 4.23-4.08 (m, 3H), 3.91-3.80 (m, 3H), 3.74-3.59 (m, 9H), 3.49-3.41 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.97 (d,  $J = 4.2$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.6 (C), 170.5 (C), 170.4 (C), 170.3 (C), 102.1 (CH), 71.6 (CH), 70.8 (CH), 70.6 (CH), 70.5 (CH), 70.3 ( $\text{CH}_2$ ), 69.7 ( $\text{CH}_2$ ), 68.5 ( $\text{CH}_2$ ), 66.6 ( $\text{CH}_2$ ), 61.5 ( $\text{CH}_2$ ), 23.1 ( $\text{CH}_3$ ), 20.7 ( $3\times\text{CH}_3$ ).



[1019]

[1020]

화합물 **5**의 제조: 화합물 **4**(1.00g, 1.98mmol, 1.0당량)를 에틸 아세테이트(EtOAc)와 MeOH의 혼합물(30mL 1:1 v/v)에 용해시키고 Pd/C(100mg)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 진공/아르곤 사이클(3x)을 사용하여 탈기하고 별론 압력 하에서 밤새 수소화하였다. 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고 EtOAc(30mL)로 세척하였다. 용매를 감압 하에서 제거하여 표제 화합물을 무색 오일로 얻었다(0.95g, 정량적 수율,  $r_f = 0.25$ (DCM 중 10% MeOH)). 화합물을 추가 정제 없이 사용하였다. MS:  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{11}$ 에 대한 계산치 478.2. 실측치 479.4.



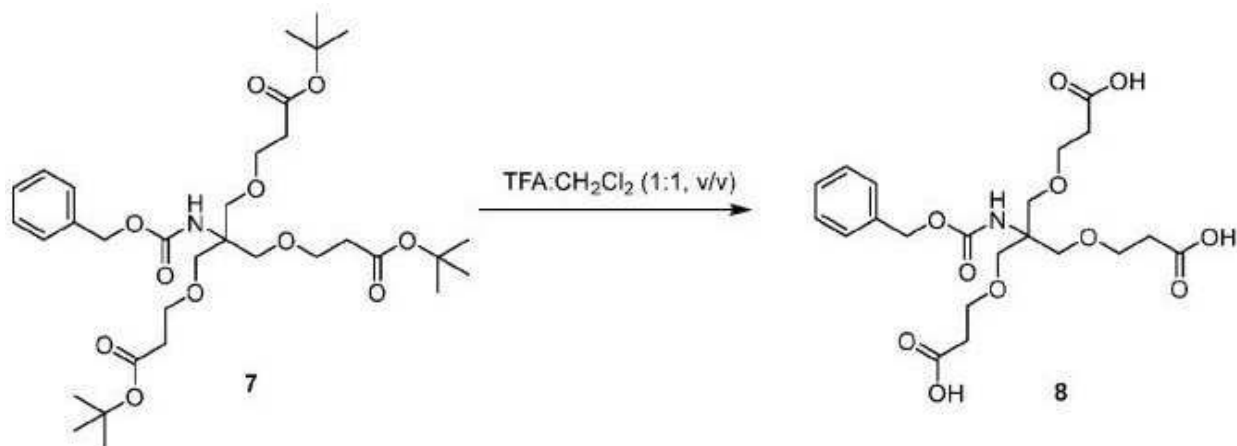
[1021]

[1022]

화합물 **7**의 제조: 트리스{[2-(tert-부톡시카보닐)에톡시]메틸}-메틸아민 **6**(3.37g, 6.67mmol, 1.0당량)을 DCM/



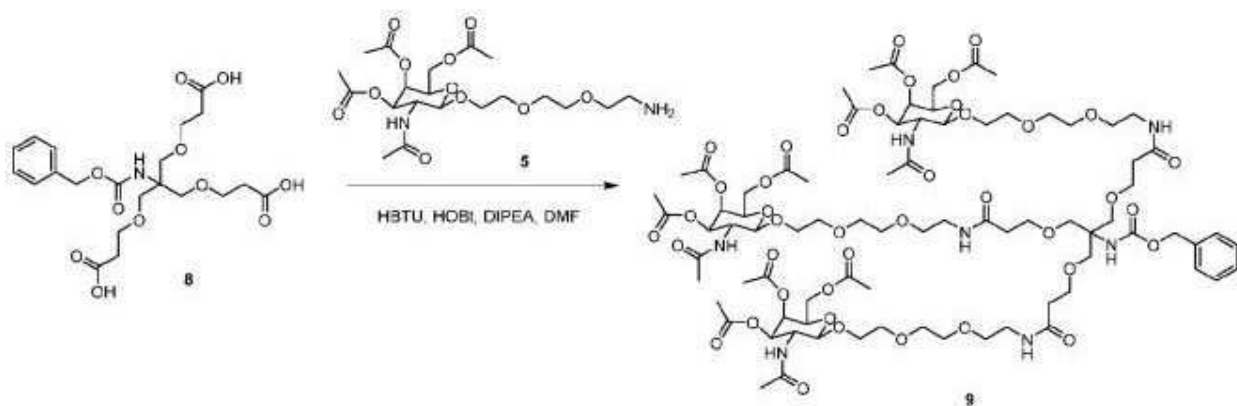
물의 혼합물(40mL 1:1 v/v)에 용해시키고  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (0.18g, 1.7mmol, 0.25당량)를 격렬하게 교반하면서 첨가하였다. 벤질 클로로포르메이트(2.94mL, 20.7mmol, 3.10당량)를 앞의 혼합물에 적가하고 반응물을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (100mL)로 희석하고 물(100mL)로 세척하였다. 유기층을 분리하고  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시켰다. 용매를 감압 하에서 제거하고 생성된 조 물질을 플래시 크로마토그래피(구배 용리: 12CV의 사이클로헥산 중 0-10% EtOAc)로 정제하여 표제 화합물을 연황색 오일로 얻었다(3.9g, 91%, rf = 0.56 (사이클로헥산 중 10% EtOAc)). MS:  $\text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{NO}_{11}$ 에 대한 계산치 639.3. 실측치 640.9.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7.38-7.26 (m, 5H), 4.97 (s, 2H), 3.54 (t, 6H), 3.50 (s, 6H), 2.38 (t, 6H), 1.39 (s, 27H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  170.3 (3xC), 154.5 (C), 137.1 (C), 128.2 (2xCH), 127.7 (CH), 127.6 (2xCH), 79.7 (3xC), 68.4 (3xCH<sub>2</sub>), 66.8 (3xCH<sub>2</sub>), 64.9 (C), 58.7 (CH<sub>2</sub>), 35.8 (3xCH<sub>2</sub>), 27.7 (9xCH<sub>3</sub>).



[1023]

[1024]

화합물 8의 제조: Cbz-NH-트리스-Boc-에스테르 7(0.20g, 0.39mmol, 1.0당량)을 아르곤 하에서  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1mL)에 용해시키고, 트리플루오로아세트산(TFA, 1mL)을 첨가하고 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하고, 잔류물을 톨루엔(5mL)과 함께 3회 공증발시키고 고진공 하에서 건조시켜 화합물을 TFA 염으로 얻었다(0.183g, 98%). 화합물을 추가 정제 없이 사용하였다. MS:  $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{NO}_{11}$ 에 대한 계산치 471.6. 실측치 472.4.



[1025]

[1026]

화합물 9의 제조: CbzNH-트리스-COOH 8(0.72g, 1.49mmol, 1.0당량) 및 GalNAc-PEG3-NH<sub>2</sub> 5(3.56g, 7.44mmol, 5.0당량)를 *N,N*-디메틸포름아미드(DMF)(25mL)에 용해시켰다. 이어서 *N,N,N',N'*-테트라메틸-0-(1H-벤조트리아졸-1-일)우로늄 헥사플루오로포스페이트(HBTU)(2.78g, 7.44mmol, 5.0당량), 1-하이드록시벤조트리아졸 수화물(HOBT)(1.05g, 7.44mmol, 5.0당량) 및 *N,N*-디이소프로필에틸아민(DIPEA)(2.07mL, 11.9mmol, 8.0당량)을 상기 용액에 첨가하고 반응물을 72시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하고, 잔류물을 DCM(100mL)에 용해시키고 포화 수성  $\text{NaHCO}_3$ (100mL)로 세척하였다. 유기층을  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시키고, 용매를 증발시키고 조 물질을 플래시 크로마토그래피로 정제하였다(구배 용리: 14CV의 DCM 중 0-5% MeOH). 생성물을 연황색 오일로 얻었다(1.2g, 43%, rf = 0.20(DCM 중 5% MeOH)). MS:  $\text{C}_{81}\text{H}_{125}\text{N}_7\text{O}_{41}$ 에 대한 계산치 1852.9. 실측치 1854.7.  $^1\text{H}$  NMR

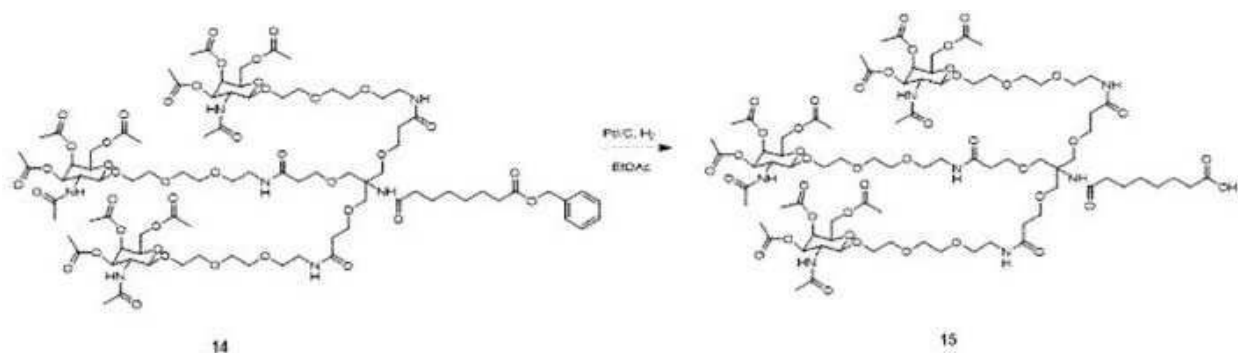


[1028]



[1030]





[1031]

[1032]

TriGalNAc(15)의 제조: 트리안테너리 GalNAc 화합물 14(0.31g, 0.15mmol, 1.0당량)를 EtOAc(15mL)에 용해시키고 Pd/C(40mg)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 진공/아르곤 사이클(3x)을 사용하여 탈기하고 벌룬 압력 하에서 밤새 수소화하였다. 반응의 완료를 질량 분석법으로 모니터링하고 생성된 혼합물을 얇은 셀라이트 패드를 통해 여과하였다. 용매를 감압 하에서 제거하고 생성된 잔류물을 고진공 하에서 밤새 건조시켰다. 잔류물을 추가 정제 없이 올리고뉴클레오타이드에 대한 접합에 사용하였다(0.28g, 정량적 수율). MS: C<sub>81</sub>H<sub>131</sub>N<sub>7</sub>O<sub>42</sub>에 대한 계산치 1874.9. 실측치 1875.3.

[1033]

ix) 올리고뉴클레오타이드 합성

[1034] [표 19]

| 단일 가닥 ID | 서열 5' - 3'                                                      | RP HPLC에 의한 순도 (%) |
|----------|-----------------------------------------------------------------|--------------------|
| X91382   | (NH2-DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)      | 89.5               |
| X91383   | (NH2-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic) | 91.6               |
| X91384   | (NH2-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)      | 94.0               |
| X91403   | (NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)       | 94.2               |
| X91404   | (NH2C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)  | 96.5               |
| X91405   | (NH2C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)       | 91.3               |
| X91415   | (invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NH2C6)      | 96.4               |
| X91416   | (invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NH2C6)   | 77.4               |
| X91417   | (invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NH2C6)        | 96.7               |
| X91379   | gsascuuuCfaUfCfCfuggaaaua(GalNAc)                               | 92.8               |
| X91380   | asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(GalNAc)                        | 95.7               |
| X91446   | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(GalNAc)                             | 92.1               |
| X38483   | usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa                               | 91.0               |
| X91381   | usAfsUfuAfuaAfaAfaUfcUfuGfcuususudTdT                           | 90.0               |
| X38104   | usCfsuugGfuUfcaugAfaAfucccasusc                                 | 95.4               |

Af, Cf, Gf, Uf: 2'-F RNA 뉴클레오타이드

a, c, g, u: 2'-O-Me RNA 뉴클레오타이드

dT: DNA 뉴클레오타이드

s: 포스포로티오에이트

invabasic: 1,2-디데옥시리보스

NH2-DEG: 아미노에톡시에틸 링커

NH2C12: 아미노도데실 링커

NH2C6: 아미노헥실 링커

[1035]

- [1036] 올리고뉴클레오타이드는 포스포르아미다이트 접근법에 따라 고상에서 합성하였다. 규모에 따라 Mermade 12(BioAutomation Corporation) 또는 AKTA Oligopilot (GE Healthcare)를 사용하였다.
- [1037] 합성은 invabasic(CPG, 480 Å, 86 µmol/g 로딩; LGC Biosearch 카탈로그 번호 BCG-1047-B) 또는 2'-F A(CPG, 520 Å, 90 µmol/g 로딩; LGC Biosearch 카탈로그 번호 BCG-1039-B) 또는 NH<sub>2</sub>C6(CPG, 520 Å, 85 µmol/g 로딩; LGC Biosearch 카탈로그 번호 BCG-1397-B) 또는 GalNAc(CPG, 500 Å, 57 µmol/g 로딩; Primetech) 또는 2'-O-메틸 C(CPG, 500 Å, 84 µmol/g 로딩; LGC Biosearch 카탈로그 번호 BCG-10-B) 또는 2'-O-메틸 A(CPG, 497 Å, 85 µmol/g 로딩, LGC Biosearch, 카탈로그 번호 BCG-1029-B) 또는 dT(CPG, 497 Å, 87 µmol/g 로딩, LGC Biosearch, 카탈로그 번호 BCG-1055-B)가 로딩된 제어된 기공 유리로 만들어진 상업적으로 이용 가능한 고체 지지체에서 수행하였다.
- [1038] 2'-O-Me, 2'-F RNA 포스포르아미다이트 및 보조 시약은 SAFC Proligo(Hamburg, Germany)에서 구입하였다.
- [1039] 2'-O-메틸 포스포르아미다이트는 다음을 포함한다: 5'-(4,4'-디메톡시트리틸)-N-벤조일-아데노신 2'-O-메틸-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-(4,4'-디메톡시트리틸)-N-벤조일-시티딘 2'-O-메틸-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-(4,4'-디메톡시트리틸)-N-디메틸포름아미딘-구아노신 2'-O-메틸-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-(4,4'-디메톡시트리틸)-우리딘 2'-O-메틸-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트.
- [1040] 2'-F 포스포르아미다이트는 다음을 포함한다: 5'-디메톡시트리틸-N-벤조일-데옥시아데노신 2'-플루오로-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-디메톡시트리틸-N-이소부틸-데옥시시티딘 2'-플루오로-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-디메톡시트리틸-N-이소부틸-데옥시구아노신 2'-플루오로-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 및 5'-디메톡시트리틸-데옥시우리딘 2'-플루오로-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트.
- [1041] 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 필요한 아미노 링커를 도입하기 위해 2-[2-(4-모노메톡시트리틸)아미노에톡시]에틸-(2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포르아미다이트(Glen Research 카탈로그 번호 1905) 및 12-(트리플루오로아세틸아미노)도데실-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트(ChemGenes 카탈로그 번호 CLP-1575)를 사용하였다. invabasic 변형은 5-O-디메톡시트리틸-1,2-디데옥시리보스-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트(ChemGenes 카탈로그 번호 ANP-1422)를 사용하여 도입하였다.
- [1042] 모든 빌딩 블록은 무수 아세트니트릴 중 50% 무수 DCM에 용해시킨 2'-O-메틸-우리딘 포스포르아미다이트를 제외하고 분자체(3 Å)를 함유하는 무수 아세트니트릴(100mM(Mermade12) 또는 200mM(AKTA Oligopilot))에 용해시켰다. 요오드(피리딘/H<sub>2</sub>O 9:1 v/v 중 50mM)를 산화 시약으로 사용하였다. 5-에틸 티오테트라졸(ETT, 아세트니트릴 중 500mM)을 활성화제 용액으로 사용하였다. 포스포르티오에이트 연결의 도입을 위한 티올화는 아세트니트릴/피리딘 4:6 v/v 중 100mM 크산탄 수소화물(TCI, 카탈로그 번호 6846-35-1)을 사용하여 수행하였다.
- [1043] 달리 언급된 경우를 제외하고 커플링 시간은 5.4분이었다. 5' 아미노 변형은 각 커플링당 11분의 커플링 시간(총 커플링 시간 22분)으로 이중 커플링 단계를 사용하여 서열에 통합하였다. 산화제 접촉 시간은 1.2분으로 설정되었고 티올화 시간은 5.2분이었다.
- [1044] NH<sub>2</sub>DEG 서열로부터의 MMT 그룹은 제외하고 최종 DMT 그룹을 제거하여 서열을 합성하였다.
- [1045] 합성 종료 시, 6°C에서 16시간 동안 28-30% 수산화암모늄(Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호 221228) 및 40% 수성 메틸아민(Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호 8220911000)의 1:1 부피 용액을 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 고체 지지체로부터 절단하였다. 이어서 고체 지지체를 여과하고, 필터를 H<sub>2</sub>O로 완전히 세척하고, 합한 용액의 부피를 감압 하에서 증발시켜 감소시켰다. 생성된 용액의 pH를 10% AcOH(Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호 A6283)로 pH 7로 조정하였다.
- [1046] 조 물질을 역상(RP) HPLC 또는 음이온 교환(AEX) HPLC로 정제하였다.

[1047]

RP HPLC 정제는 **AKTA Pure** 기기(GE Healthcare)에서 XBridge C18 Prep 19 × 50mm 컬럼(Waters)을 사용하여 수행하였다. 버퍼 A는 100mM 트리에틸-암모늄 아세테이트(TEAAc, Biosolve) pH 7이었고 버퍼 B는 버퍼 A에 95% 아세토니트릴을 함유하였다. 10mL/분의 유속과 60℃의 온도를 사용하였다. 280nm에서 UV 트레이스를 기록하였다. 120 컬럼 부피 내에서 0% B에서 100% B까지의 구배를 사용하였다. 적절한 분획을 폴딩하고 3M 나트륨 아세테이트(NaOAc)(Sigma-Aldrich), pH 5.2 및 85% 에탄올(VWR)로 냉동고에서 침전시켰다. 펠렛을 원심분리로

분리하고, 물(50mL)에 재용해시키고, 5M NaCl(5mL)로 처리하고, **AKTA Pure** 기기에서 Sephadex G25-Fine 수지(GE Healthcare)로 채워진 50 × 165mm ECO 컬럼(YMC, Dinslaken, Germany)을 사용하여 크기 배제 HPLC로 탈염시켰다.

[1048]

**AKTA Pure** 기기(GE Healthcare)에서 TSK 겔 SuperQ-5PW 20 × 200mm(BISCHOFF Chromatography)를 사용하여 AEX HPLC 정제를 수행하였다. 버퍼 A는 20mM 인산나트륨(Sigma-Aldrich) pH 7.8이었고, 버퍼 B는 1.4M 브롬화나트륨(Sigma-Aldrich)을 첨가한 버퍼 A와 동일하였다. 10mL/분의 유속과 60℃의 온도를 사용하였다. 280nm에서 UV 트레이스를 기록하였다. 27 컬럼 부피 내에서 10% B에서 100% B까지의 구배를 사용하였다. 적절한 분획을 폴딩하고 3M NaOAc, pH 5.2 및 85% 에탄올로 냉동고에서 침전시켰다. 펠렛을 원심분리로 분리하고, 물(50mL)에 재용해시키고, 5M NaCl(5mL)로 처리하고 크기 배제 크로마토그래피로 탈염시켰다.

[1049]

MMT 그룹을 물 중 25% 아세트산으로 제거하였다. 반응이 완료되면 용액을 중화시키고 샘플을 크기 배제 크로마토그래피로 탈염시켰다.

[1050]

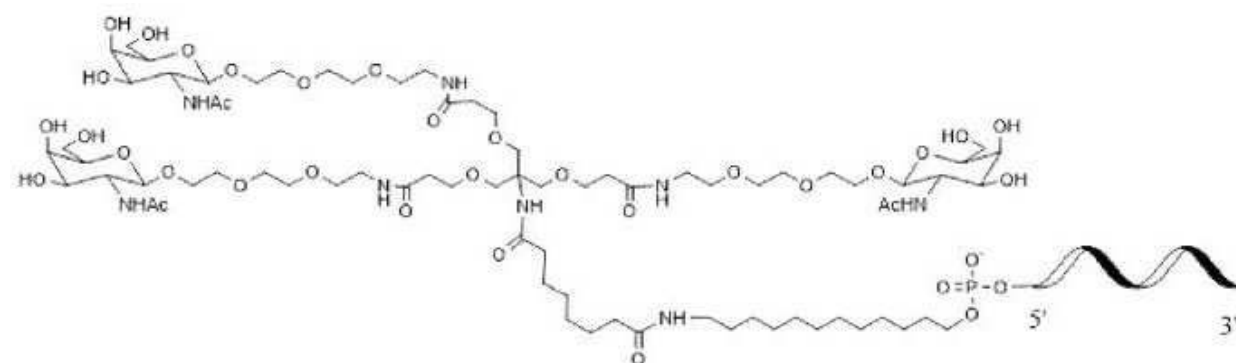
LCQ Deca XP-plus Q-ESI-TOF 질량 분석기(Thermo Finnigan) 또는 Compact ESI-Qq-TOF 질량 분석기(Bruker Daltonics)와 결합된 Dionex Ultimate 3000(Thermo Fisher Scientific) HPLC 시스템에서 2.1 × 50mm XBridge C18 컬럼(Waters)에서 분석적 LC-MS로 단일 가닥을 분석하였다. 버퍼 A는 H<sub>2</sub>O 중 16.3mM 트리에틸아민, 100mM 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(HFIP) 및 1% MeOH였으며, 버퍼 B는 95% MeOH 중 버퍼 A를 함유하였다. 250 μL/분의 유속과 60℃의 온도를 사용하였다. 260nm 및 280nm에서 UV 트레이스를 기록하였다. 0.5분 이내에 1-40% B에 이어서 13분 이내에 40에서 100% B의 구배를 사용하였다. 메탄올(LC-MS 등급), 물(LC-MS 등급), 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(puriss. p.a.) 및 트리에틸아민(puriss. p.a.)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

[1051]

x) 5'-말단 또는 3'-말단에서의 TriGalNAc 테더(tether) 2(GalNAc-T2) 접합

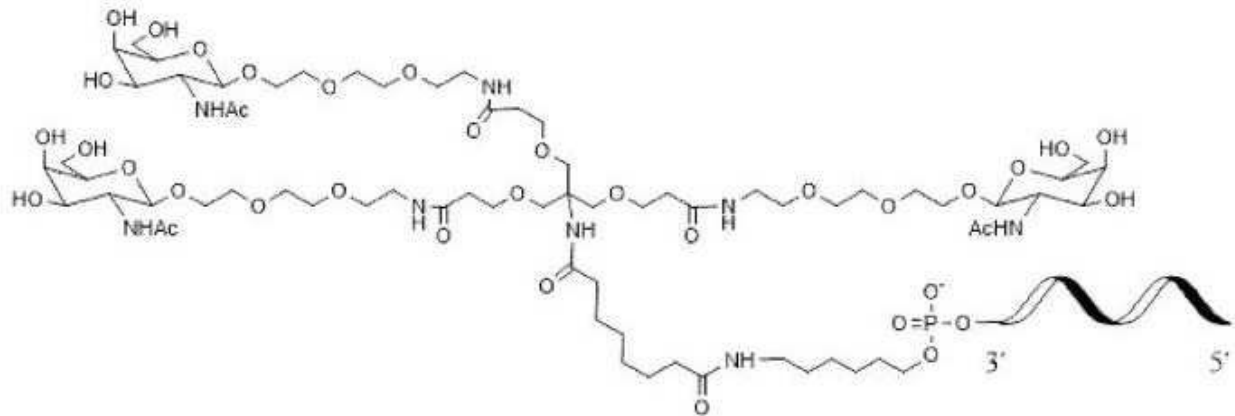
[1052]

5'-GalNAc-T2 접합체



[1053]

[1054] 3'-GalNAc-T2 접합체



[1055]

[1056] TriGalNAc 테더 2 NHS 에스테르의 제조: DMF(2.1mL) 중의 카복실산 테더 2(화합물 15, 227mg, 121  $\mu$ mol)의 용액에 N-하이드록시석신이미드(NHS)(15.3mg, 133  $\mu$ mol) 및 N,N'-디이소프로필카보디이미드(DIC)(19.7  $\mu$ L, 127  $\mu$ mol)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 18시간 동안 교반하고 후속 접합 반응을 위해 정제 없이 사용하였다.

[1057] triGalNAc 테더 2 접합을 위한 일반 절차: 아민 변형된 단일 가닥을 50mM 탄산염/중탄산염 버퍼 pH 9.6/DMSO 4:6(v/v)에 700 OD/mL로 용해시키고, 이 용액에 DMF 중의 테더 2 NHS 에스테르(57mM) 용액 1몰 당량을 첨가하였다. 반응을 실온에서 수행하고 1시간 후 NHS 에스테르 용액의 또 다른 몰 당량을 첨가하였다. 반응을 1시간 더 진행시키고 반응 진행을 LCMS로 모니터링하였다. 출발 물질의 정량적 소비를 달성하기 위해서는 아미노 변형된 올리고뉴클레오타이드 대비 적어도 2몰 당량 초과인 NHS 에스테르 시약이 필요하였다. 반응 혼합물을 물로 15배 희석하고, Sartorius의 1.2  $\mu$ m 필터를 통해 한 번 여과한 다음 Äkta Pure (GE Healthcare) 기기에서 예비 상(RP HPLC)으로 정제하였다.

[1058] Waters의 XBridge C18 Prep 19  $\times$  50mm 컬럼을 사용하여 정제를 수행하였다. 버퍼 A는 100mM TEEAc pH 7이었고 버퍼 B는 버퍼 A에 95% 아세토니트릴을 함유하였다. 10mL/분의 유속과 60°C의 온도를 사용하였다. 280nm에서 UV 트레이스를 기록하였다. 60 컬럼 부피 내에서 0-100% B의 구배를 사용하였다.

[1059] 전장 접합 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 분획을 함께 폴링하고, 3M NaOAc, pH 5.2 및 85% 에탄올로 냉동고에서 침전시킨 다음, 물에 1000 OD/mL로 용해시켰다. 완료될 때까지 0-아세테이트를 물 중 20% 수산화암모늄으로 제거하였다(LC-MS로 모니터링함).

[1060] 접합체는 Äkta Pure (GE Healthcare) 기기에서 Sephadex G25 Fine 수지(GE Healthcare)를 사용하여 크기 배제 크로마토그래피로 탈염시켜 접합된 올리고뉴클레오타이드를 60-80%의 분리 수율로 산출하였다.



[1061] [표 20]

| 센스 가닥 ID | 센스 가닥 서열 5' - 3'                                                                       | RP HPLC에 의한 순도 (%) |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| X91409   | (GalNAc-T2)(NH <sub>2</sub> C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)      | 85.0               |
| X91410   | (GalNAc-T2)(NH <sub>2</sub> C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic) | 92.3               |
| X91411   | (GalNAc-T2)(NH <sub>2</sub> C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)      | 92.7               |
| X91433   | (invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(GalNAc-T2)                   | 85.3               |
| X91434   | (invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(GalNAc-T2)                | 85.8               |
| X91435   | (invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(GalNAc-T2)                     | 84.0               |

[1062]

[1063] 접합체는 Compact ESI-Qq-TOF 질량 분석기(Bruker Daltonics)가 장착된 Dionex Ultimate 3000(Thermo Fisher Scientific) HPLC 시스템에서 2.1 × 50mm XBridge C18 컬럼(Waters)을 사용한 HPLC-MS 분석으로 특성화하였다. 버퍼 A는 16.3mM 트리에틸아민, H<sub>2</sub>O 중 1% MeOH 중 100mM HFIP였으며 버퍼 B는 버퍼 A에 95% MeOH를 함유하였다. 250 μL/분의 유속과 60℃의 온도를 사용하였다. 260nm 및 280nm에서 UV 트레이스를 기록하였다. 31분 이내에 1-100% B의 구배를 사용하였다.

[1064]

#### x i) 듀플렉스 어닐링

[1065]

원하는 siRNA 듀플렉스를 생성하기 위해, 2개의 상보적 가닥을 이의 등몰 수용액을 배합하여 어닐링하였다. 혼합물을 70℃의 수조에 5분 동안 두었고, 후속적으로 2시간 이내에 주위 온도로 냉각시켰다. 듀플렉스를 2일 동안 동결건조시키고 -20℃에서 보관하였다.

[1066]

Dionex Ultimate 3000(Thermo Fisher Scientific) HPLC 시스템의 Superdex™ 75 Increase 5/150 GL 컬럼 5 × 153-158mm(Cytiva)에서 분석적 SEC HPLC로 듀플렉스를 분석하였다. 이동상은 10% 아세토니트릴을 함유하는 1x PBS로 이루어졌다. 실온에서 1.5mL/분의 유속으로 10분 동안 등용매 구배를 실행하였다. 260nm 및 280nm에서 UV 트레이스를 기록하였다. 물(LC-MS 등급)은 Sigma-Aldrich에서 구입했고 인산염 완충 식염수(PBS; 10x, pH 7.4)는 GIBCO(Thermo Fisher Scientific)에서 구입하였다.

[1067]

제조된 GalNAc 접합체는 하기 표에 정리되어 있다. 이들은 3개의 상이한 표적 유전자에 대해 지시되었다. 상응하는 단일 가닥과 함께 siRNA 코딩, 서열 정보 및 듀플렉스의 순도가 포착된다.



[1068] [표 21]

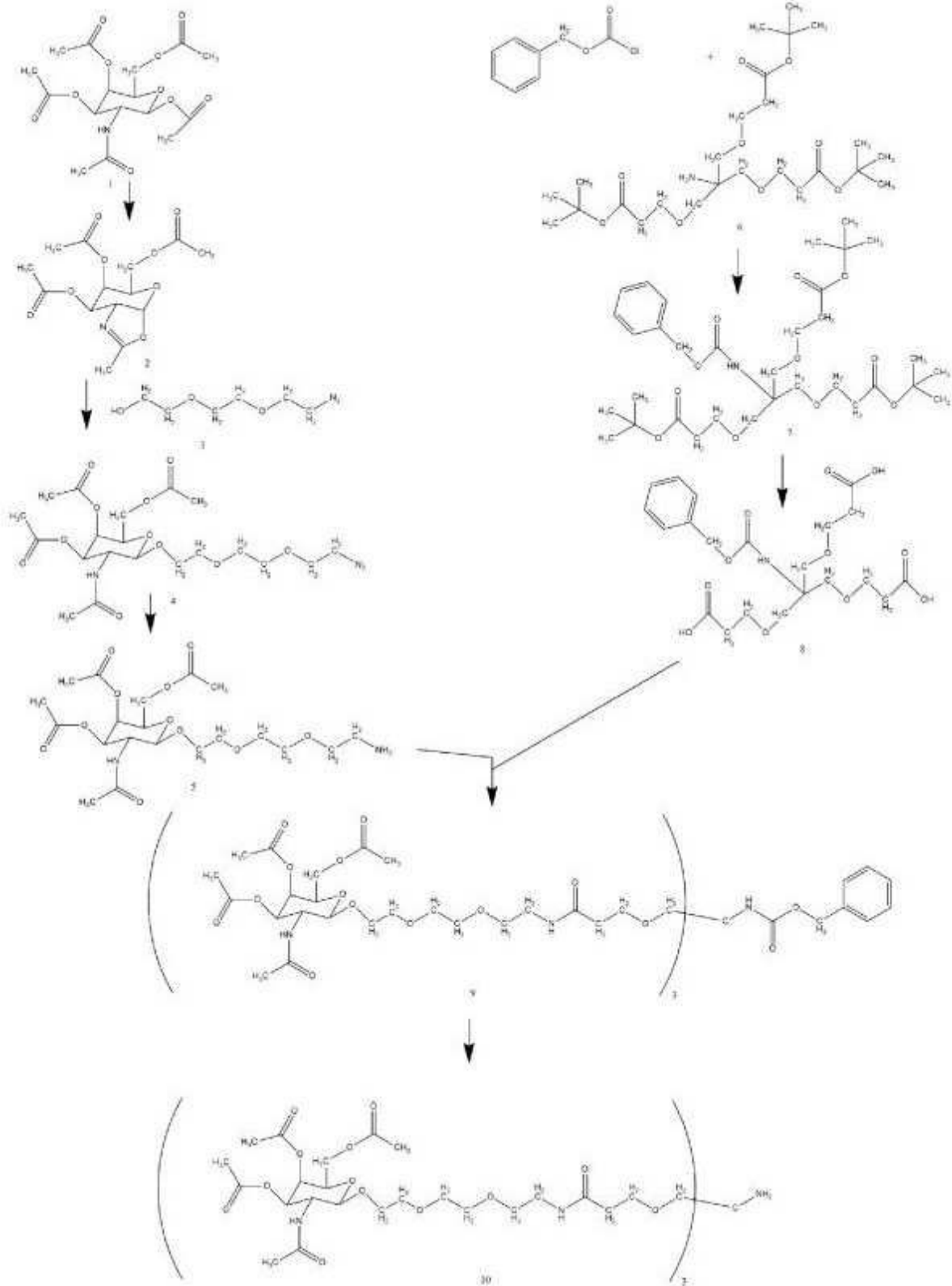
| 표적  | 듀플렉스 ID | ssRN ID | ssRNA-서열 5'-3'                                                                         | HPLC에 의한 듀플렉스 순도 (%) |
|-----|---------|---------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| GO  | ETX002  | X91409  | (GalNAc-T2)(NH <sub>2</sub> C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)      | 94.1                 |
|     |         | X38483  | usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa                                                      |                      |
|     | ETX006  | X91433  | (invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(GalNAc-T2)                   | 94.1                 |
|     |         | X38483  | usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa                                                      |                      |
| C5  | ETX011  | X91410  | (GalNAc-T2)(NH <sub>2</sub> C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic) | 93.5                 |
|     |         | X91381  | usAfsUfuAfuaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT                                                    |                      |
|     | ETX015  | X91434  | (invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaUa(NHC6)(GalNAc-T2)                | 95.3                 |
|     |         | X91381  | usAfsUfuAfuaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT                                                    |                      |
| TTR | ETX020  | X91411  | (GalNAc-T2)(NH <sub>2</sub> C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)      | 97.5                 |
|     |         | X38104  | usCfsuugGfuUfcaugAfaAfucccasusc                                                        |                      |
|     | ETX024  | X91435  | (invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(GalNAc-T2)                     | 95.3                 |
|     |         | X38104  | usCfsuugGfuUfcaugAfaAfucccasusc                                                        |                      |

[1069]

[1070]

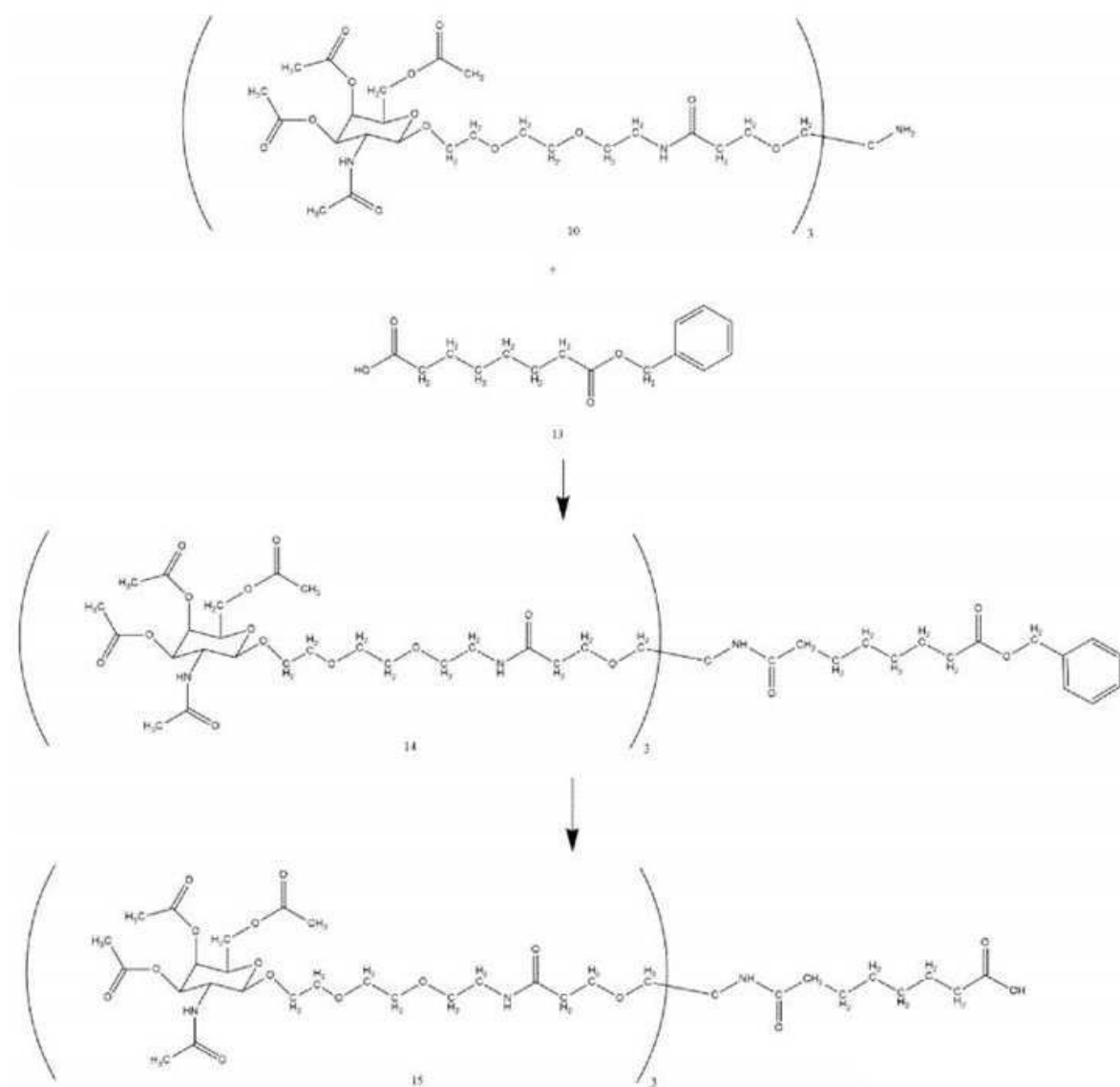
하기 반응식은 합성 경로를 추가로 설명한다:

[1071] 반응식 6:



[1072]

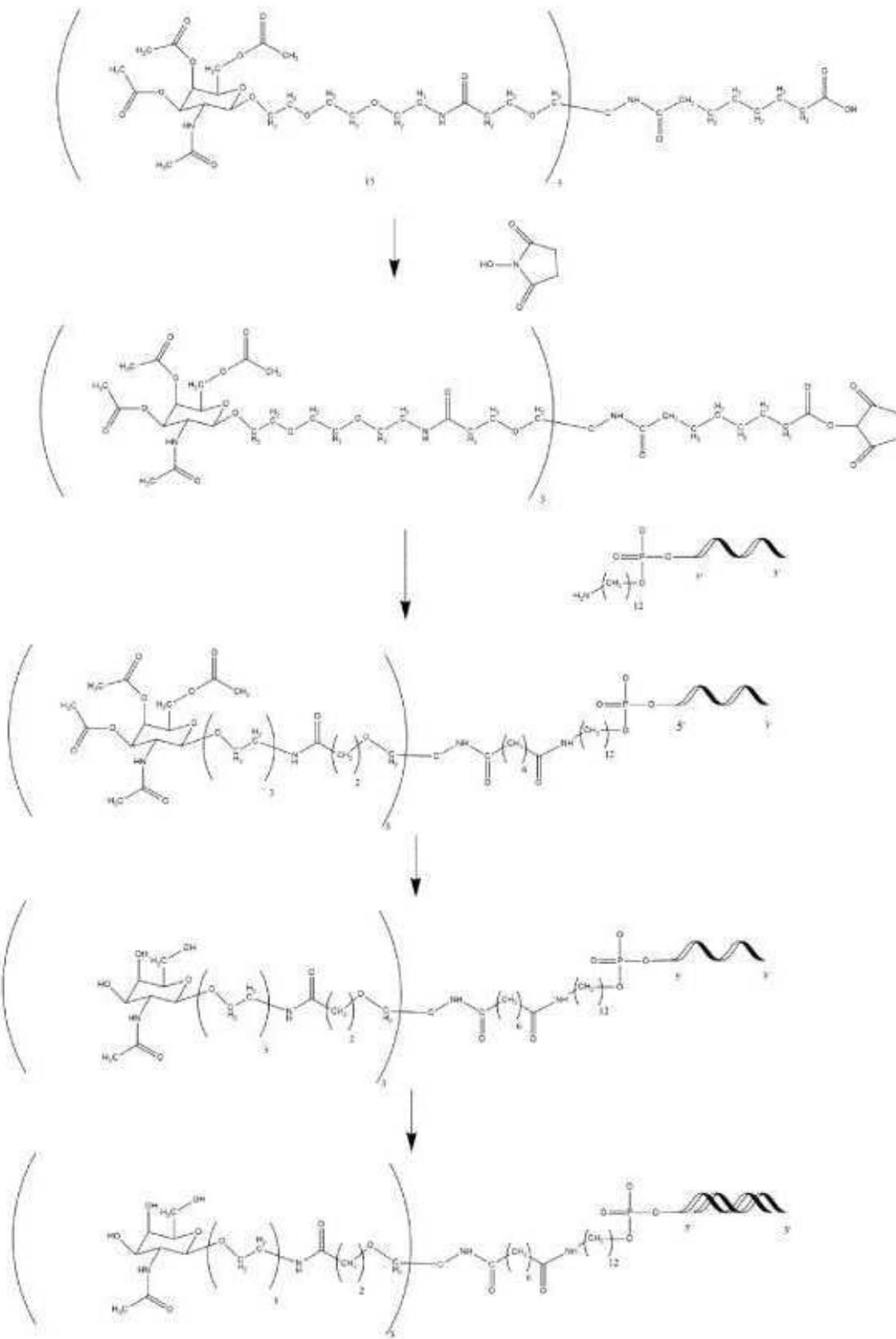
[1073] 반응식 7:



[1074]



[1077] 반응식 9:



[1078]

[1079] 본 발명은, 예를 들어, 본 발명의 다양한 측면을 설명하기 위해 제공되는 특정한 개시된 실시양태로 범위를 제한하려는 것이 아니다. 기술된 조성물 및 방법에 대한 다양한 변형은 본원의 설명 및 교시로부터 명백해질 것이다. 이러한 변형은 본 개시내용의 진정한 범위 및 사상을 벗어나지 않고 실시될 수 있으며 본 개시내용의 범위

내에 속하는 것으로 의도된다.

[1080] 실시예 5

[1081] GalNAc-siRNA 작제물 ETX005, ETX006, ETX014 및 ETX015에 대한 마우스 데이터

[1082] ETX005(HA01 mRNA 표적화) T1a 역 무염기

[1083] GalNAc 접합 변형된 siRNA ETX005의 최대 3mg/kg의 단일 피하 용량 이후 혈청 글리콜레이트 수준의 연관된 증가와 함께 간 조직에서 HA01 mRNA의 녹다운을 보여주는 생체 내 마우스 약리학 연구를 수행하였다.

[1084] 약 8주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 무작위로 21마리의 마우스 그룹으로 배정하였다. 연구 0일차에, 동물에게 식염수(평균 0.9% 염화나트륨)에 용해된 0.3 또는 3mg/kg GalNAc-siRNA의 단일 피하 용량 또는 대조군으로서 식염수만을 투여하였다. 연구 1일, 2일, 4일, 7일, 14일, 21일 및 28일에 각 그룹에서 3마리의 마우스를 안락사시키고 혈청 및 간 샘플을 채취하였다.

[1085] 글리콜레이트 농도의 기준선 측정을 제공하기 위해 0일에 5마리의 처리되지 않은 마우스 그룹으로부터 혈청을 채취하였다.

[1086] 추가 분석이 이루어질 때까지 혈청을 -80℃에 보관하였다. 간 샘플(약 50mg)을 RNAlater로 처리하고 4℃에서 밤새 보관한 후 -80℃에 보관하였다.

[1087] HA01 mRNA(Thermo 검정 ID Mm00439249\_m1) 및 하우스키핑 유전자 GAPDH mRNA(Thermo 검정 ID Mm99999915\_g1)에 대한 정량적 실시간 PCR을 사용하여 간 샘플을 분석하였다. GAPDH로 정규화하고 식염수 대조군 대비 HA01 발현의 변화를 계산하는데 델타 델타 Ct 방법을 사용하였다.

[1088] 단일 3mg/kg 용량의 ETX005는 7일 후 HA01 mRNA 발현을 80% 초과하여 억제하였다(도 16). HA01 발현의 억제는 지속되었으며, ETX005의 단일 3mg/kg 용량은 28일차 연구 종료 시 HA01 mRNA의 60% 초과 억제를 유지하였다. 0.3mg/kg의 단일 용량의 ETX005도 식염수 대조군과 비교할 때 HA01 발현을 억제하였고 HA01 발현 수준은 연구 28일차에만 정상 수준에 도달하였다.

[1089] HA01 mRNA 발현의 억제는 혈청 글리콜레이트 수준의 증가를 야기할 것으로 예상된다. LC-MS/MS를 사용하여 혈청 글리콜레이트 농도를 측정하였다(도 17). ETX005의 단일 3mg/kg 용량은 혈청 글리콜레이트 농도의 현저한 증가를 유발하여 투여 후 14일에 최고 수준에 도달하고 기준선 수준(0일)과 식염수 대조군보다 높은 상태를 28일차인 연구 종료까지 유지하였다. ETX005의 단일 0.3mg/kg 용량은 기준선 및 식염수 대조군에서 볼 수 있는 수준을 초과하여 혈청 글리콜레이트 농도가 더 작고 더 일시적으로 증가하는 것을 보였으며, 이는 매우 적은 용량이 HA01 mRNA를 혈청 내 대사 바이오마커의 농도에 영향을 미치기에 충분한 규모로 억제할 수 있음을 입증한다.

[1090] 도 16. ETX005의 단일 용량 마우스 약리학. HA01 mRNA 발현이 식염수 대조군과 비교하여 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 마우스의 평균 및 표준편차를 나타낸다.

[1091] 도 17. ETX005의 단일 용량 마우스 약리학. 혈청 글리콜레이트 농도가 표시되어 있다. 각 포인트는 5마리 마우스 그룹에서 파생된 기준선 글리콜레이트 농도(0일)를 제외하고 3마리 마우스의 평균 및 표준편차를 나타낸다.

[1092] ETX006(HA01 mRNA 표적화) T2a 역 무염기

[1093] GalNAc 접합 변형된 siRNA ETX006의 최대 3mg/kg의 단일 피하 용량 이후 간 조직에서 HA01 mRNA의 녹다운 및 수반되는 혈청 글리콜레이트 수준의 증가를 보여주는 생체 내 마우스 약리학 연구를 수행하였다.

[1094] 약 8주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 무작위로 21마리의 마우스 그룹으로 할당하였다. 연구 0일차에, 동물에게 식염수(평균 0.9% 염화나트륨)에 용해된 0.3 또는 3mg/kg GalNAc-siRNA의 단일 피하 용량 또는 대조군으로서 식염수만을 투여하였다. 연구 1일, 2일, 4일, 7일, 14일, 21일 및 28일에 각 그룹에서 3마리의 마우스를 안락사시키고 혈청 및 간 샘플을 채취하였다.

[1095] 글리콜레이트 농도의 기준선 측정을 제공하기 위해 0일에 5마리의 처리되지 않은 마우스 그룹으로부터 혈청을 채취하였다.

[1096] 추가 분석이 이루어질 때까지 혈청을 -80℃에 보관하였다. 간 샘플(약 50mg)을 RNAlater로 처리하고 4℃에서 밤새 보관한 후 -80℃에 보관하였다.

[1097] HA01 mRNA(Thermo 검정 ID Mm00439249\_m1) 및 하우스키핑 유전자 GAPDH mRNA(Thermo 검정 ID Mm99999915\_g1)에



대한 정량적 실시간 PCR을 사용하여 간 샘플을 분석하였다. GAPDH로 정규화하고 식염수 대조군 대비 HA01 발현의 변화를 계산하는데 델타 델타 Ct 방법을 사용하였다.

[1098] 단일 3mg/kg 용량의 ETX006은 7일 후 HA01 mRNA 발현을 80% 초과하여 억제하였다(도 18). HA01 발현 억제는 지속적이고 연구 종료까지 계속되었으며, ETX006은 28일차에 HA01 mRNA의 60% 초과 억제를 유지하였다. 0.3mg/kg의 단일 용량도 식염수 대조군과 비교할 때 HA01 발현을 억제하였고 HA01 발현 수준은 연구 28일차에만 정상 수준에 도달하였다.

[1099] HA01 mRNA 발현의 억제는 혈청 글리콜레이트 수준의 증가를 야기할 것으로 예상된다. LC-MS/MS를 사용하여 혈청 글리콜레이트 농도를 측정하였다(도 19). ETX006의 단일 3mg/kg 용량은 혈청 글리콜레이트 농도의 현저한 증가를 유발하여 투여 후 14일에 최고 수준에 도달하고 28일차인 연구 종료까지 기준선 수준(0일) 및 식염수 대조군보다 높은 상태를 유지하였다. ETX006의 단일 0.3mg/kg 용량은 기준선 및 식염수 대조군에서 볼 수 있는 수준을 초과하여 혈청 글리콜레이트 농도가 더 작고 더 일시적으로 증가하는 것을 보였으며, 이는 매우 적은 용량이 혈청 내 대사 바이오마커의 농도에도 영향을 미칠 수 있음을 보여준다.

[1100] 도 18. ETX006의 단일 용량 마우스 약리학. HA01 mRNA 발현이 식염수 대조군과 비교하여 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 마우스의 평균 및 표준편차를 나타낸다.

[1101] 도 19. ETX006의 단일 용량 마우스 약리학. 혈청 글리콜레이트 농도가 표시되어 있다. 각 포인트는 5마리 마우스 그룹에서 파생된 기준선 글리콜레이트 농도(0일)를 제외하고 3마리 마우스의 평균 및 표준편차를 나타낸다.

#### [1102] ETX014(C5 mRNA 표적화) T1a 역 무염기

[1103] GalNAc 접합 변형된 siRNA ETX014의 최대 3mg/kg의 단일 피하 용량 이후 간 조직에서 C5 mRNA의 녹다운 및 결과적인 혈청 C5 단백질 농도의 감소를 보여주는 생체 내 마우스 약리학 연구를 수행하였다.

[1104] 약 8주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 무작위로 21마리의 마우스 그룹으로 할당하였다. 연구 0일차에, 동물에게 식염수(평균 0.9% 염화나트륨)에 용해된 0.3, 1 또는 3mg/kg GalNAc-siRNA의 단일 피하 용량 또는 대조군으로서 식염수만을 투여하였다. 연구 1일, 2일, 4일, 7일, 14일, 21일 및 28일에 각 그룹에서 3마리의 마우스를 안락사시키고 혈청 및 간 샘플을 채취하였다.

[1105] 추가 분석이 이루어질 때까지 혈청을 -80℃에 보관하였다. 간 샘플(약 50mg)을 RNAlater로 처리하고 4℃에서 밤새 보관한 후 -80℃에 보관하였다.

[1106] C5 mRNA(Thermo 검정 ID Mm00439275\_m1) 및 하우스키퍼 유전자 GAPDH mRNA(Thermo 검정 ID Mm99999915\_g1)에 대한 정량적 실시간 PCR을 사용하여 간 샘플을 분석하였다. GAPDH로 정규화하고 식염수 대조군 대비 C5 발현의 변화를 계산하는데 델타 델타 Ct 방법을 사용하였다.

[1107] ETX014는 14일차에 C5 mRNA의 90% 초과 감소를 달성하는 3mg/kg 용량으로 용량 의존적 방식으로 C5 mRNA 발현을 억제하였다(도 20). ETX014에 의한 C5 발현의 억제는 지속적이었고, 각 분자의 3mg/kg 용량은 28일차인 연구 종료까지 C5 mRNA의 명확한 녹다운을 보였다.

[1108] C5 단백질 수준 분석을 위해, 상업적으로 이용 가능한 C5 ELISA 키트(Abcam ab264609)를 사용하여 혈청 샘플을 측정하였다. 혈청 C5 수준을 일치하는 시점에서 식염수 그룹 평균과 비교하여 계산하였다.

[1109] 혈청 단백질 데이터는 mRNA 분석을 뒷받침한다(도 21). ETX014로 처리하면 혈청 C5 단백질 농도가 용량 의존적으로 감소하였다. ETX014의 모든 용량은 C5 단백질 수준을 70% 초과하여 감소시켰으며, 3mg/kg 용량은 연구 7일차에 C5 수준을 거의 검출할 수 없는 수준으로 감소시켰다. 혈청 C5의 감소는 연구 종료까지 모든 용량에서 지속되었으며, 가장 낮은 용량인 0.3mg/kg도 28일차에 여전히 약 40%의 억제를 보였다.

[1110] 도 20. ETX014의 단일 용량 마우스 약리학. C5 mRNA 발현이 식염수 대조군과 비교하여 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 마우스의 평균 및 표준편차를 나타낸다.

[1111] 도 21. ETX0014의 단일 용량 마우스 약리학. 혈청 C5 농도가 식염수 대조군과 비교하여 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 마우스의 평균 및 표준편차를 나타낸다.

#### [1112] ETX015(C5 mRNA 표적화) T2a 역 무염기

[1113] GalNAc 접합 변형된 siRNA ETX015의 최대 3mg/kg의 단일 피하 용량 이후 간 조직에서 C5 mRNA의 녹다운 및 결과적인 혈청 C5 단백질 농도의 감소를 보여주는 생체 내 마우스 약리학 연구를 수행하였다.

- [1114] 약 8주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 무작위로 21마리의 마우스 그룹으로 할당하였다. 연구 0일차에, 동물에게 식염수(멸균 0.9% 염화나트륨)에 용해된 0.3, 1 또는 3mg/kg GalNAc-siRNA의 단일 피하 용량 또는 대조군으로서 식염수만 투여하였다. 연구 1일, 2일, 4일, 7일, 14일, 21일 및 28일에 각 그룹에서 3마리의 마우스를 안락사시키고 혈청 및 간 샘플을 채취하였다.
- [1115] 추가 분석이 이루어질 때까지 혈청을 -80℃에 보관하였다. 간 샘플(약 50mg)을 RNeasy로 처리하고 4℃에서 밤새 보관한 후 -80℃에 보관하였다.
- [1116] C5 mRNA(Thermo 검정 ID Mm00439275\_m1) 및 하우스키핑 유전자 GAPDH mRNA(Thermo 검정 ID Mm99999915\_g1)에 대한 정량적 실시간 PCR을 사용하여 간 샘플을 분석하였다. GAPDH로 정규화하고 식염수 대조군 대비 C5 발현의 변화를 계산하는데 델타 델타 Ct 방법을 사용하였다.
- [1117] ETX015는 3mg/kg 용량으로 용량 의존적 방식으로 C5 mRNA 발현을 억제하여 C5 mRNA의 85% 초과 감소를 달성하였다(도 22). C5 발현의 억제는 지속되었으며, 각 분자의 3mg/kg 용량은 28일차인 연구 종료까지 C5 mRNA의 명확한 녹다운을 보였다. 3mg/kg ETX015를 투여받은 마우스는 여전히 투여 후 28일차 정상 간 C5 mRNA 수준의 50% 미만을 나타냈다.
- [1118] C5 단백질 수준 분석을 위해, 상업적으로 이용되는 C5 ELISA 키트(Abcam ab264609)를 사용하여 혈청 샘플을 측정하였다. 혈청 C5 수준은 일치하는 시점에서 식염수 그룹 평균과 비교하여 계산하였다.
- [1119] 혈청 단백질 데이터는 mRNA 분석을 뒷받침한다(도 23). ETX015는 혈청 C5 단백질 농도의 용량 의존적 감소를 일으켰다. ETX015의 3mg/kg 및 1mg/kg 용량은 혈청 C5 단백질 수준의 90% 초과 감소를 달성하였다. 가장 높은 용량은 식염수 대조군과 비교하여 연구 28일차에 C5의 70% 초과 감소와 함께 C5 단백질 발현의 지속적인 억제를 나타냈다.
- [1120] 도 22. ETX015의 단일 용량 마우스 약리학. C5 mRNA 발현이 식염수 대조군과 비교하여 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 마우스의 평균 및 표준편차를 나타낸다.
- [1121] 도 23. ETX0014의 단일 용량 마우스 약리학. 혈청 C5 농도가 식염수 대조군과 비교하여 표시되어 있다. 각 포인트는 3마리 마우스의 평균 및 표준편차를 나타낸다.
- [1122] **실시예 6**
- [1123] **GalNAc-siRNA 작제물 ETX023 및 ETX024에 대한 NHP 데이터**
- [1124] **ETX023(TTR mRNA 표적화) T1a 역 무염기**
- [1125] 혈청 트랜스티레틴(TTR) 단백질 수준을 정량화함으로써 비-인간 영장류(NHP)에서 ETX023 약리학을 평가하였다. GalNAc 접합 변형된 siRNA ETX023의 1mg/kg의 단일 피하 용량은 TTR 단백질 발현의 지속적인 억제를 입증하였다.
- [1126] 수컷 사이노물구스 원숭이(3-5세, 2-3kg)를 3마리 동물의 그룹으로 배정하였다. 동물을 2주 동안 적응시켰고, 기준선 TTR 농도를 제공하기 위해 투여 14일 전에 혈액을 채취하였다. 기준선 mRNA 수준을 제공하기 위해 투여 18일 또는 38일 전에 간 생검을 수행하였다. 연구 0일차에, 동물에게 식염수(멸균 0.9% 염화나트륨)에 용해된 GalNAc-siRNA ETX023의 1mg/kg의 단일 피하 용량을 투여하였다. 연구 3일, 14일, 28일, 42일, 56일, 70일 및 84일에 간 생검을 실시하고 TTR mRNA 측정을 위해 RNA를 추출하였다. 연구 1일, 3일, 7일, 14일, 28일, 42일, 56일, 70일 및 84일에 혈청 TTR 농도 측정 및 임상 혈액 화학 분석을 위해 혈액 샘플을 채취하였다.
- [1127] TTR mRNA 발현의 억제는 혈청 TTR 단백질 수준의 감소를 야기할 것으로 예상된다. 혈청 TTR 단백질 농도는 상업적으로 이용 가능한 ELISA 키트(Abcam ab231920)로 측정하였다. 각각의 개별 동물에 대해 1일분의 TTR 농도를 계산하고 이를 3마리 동물의 그룹에 대한 평균 및 표준편차로 플롯팅하였다(도 24).
- [1128] ETX023의 단일 1mg/kg 용량은 혈청 TTR 농도의 신속하고 상당한 감소를 야기하여, 투여 후 28일에 최저점에 도달하고 70일까지 억제된 상태를 유지하였다.
- [1129] 84일까지 데이터를 추가로 얻었다. ETX019를 사용하여 동일한 실험을 수행하였다. ETX0019의 경우 도 26에, ETX0023의 경우 도 28a에 84일 동안의 데이터가 제공된다.
- [1130] TaqMan 유전자 발현 키트 TTR(Thermo, 검정 ID Mf02799963\_m1)을 사용하여 실시간 정량적 PCR로 TTR mRNA를 측정하였다. GAPDH 발현도 측정하여(Thermo, 검정 ID Mf04392546\_g1) 기준을 제공하였다. 각 동물에 대한 상대적

TTR 발현을 GAPDH로 정규화하고 투여 전 수준 대비  $\Delta \Delta Ct$  방법으로 계산하였다. ETX023의 단일 1mg/kg 용량은 또한 간 TTR mRNA의 신속하고 상당한 감소를 야기하여 투여 후 14일에 최저점에 도달하고 84일까지 억제된 상태를 유지하였다(도 28b).

- [1131] 동물 체중은 연구 동안 일주일에 한 번 측정하였다. 체중의 변동이나 감소는 ETX023 투여와 연관되지 않았으며 동물은 연구 내내 계속해서 체중이 증가하였다(도 28c).
- [1132] 자동 생화학 분석기를 사용하여 2시간 이내에 혈청을 분석하였다. ALT(알라닌 트랜스아미나제) 및 AST(아스파르테이트 트랜스아미나제)의 상당한 증가는 일반적으로 간 독성을 입증하는 데 사용된다. ALT(도 28d) 또는 ALT(도 28e)의 증가는 ETX023의 투여와 연관되지 않았다.
- [1133] **ETX024(TTR mRNA 표적화) T2a 역 무염기**
- [1134] 혈청 트랜스티레틴(TTR) 단백질 수준을 정량화함으로써 비-인간 영장류(NHP)에서 ETX024 약리학을 평가하였다. GalNAc 접합 변형된 siRNA ETX024의 1mg/kg의 단일 피하 용량은 TTR 단백질 발현의 지속적인 억제를 입증하였다.
- [1135] 수컷 사이노물구스 원숭이(3-5세, 2-3kg)를 3마리 동물의 그룹으로 배정하였다. 동물을 2주 동안 적응시켰고, 기준선 TTR 농도를 제공하기 위해 투여 14일 전에 혈액을 채취하였다. 기준선 mRNA 수준을 제공하기 위해 투여 18일 또는 38일 전에 간 생검을 수행하였다. 연구 0일차에, 동물에게 식염수(멸균 0.9% 염화나트륨)에 용해된 GalNAc-siRNA ETX024의 1mg/kg의 단일 피하 용량을 투여하였다. 연구 3일, 14일, 28일, 42일, 56일, 70일 및 84일에 간 생검을 실시하고 TTR mRNA 측정을 위해 RNA를 추출하였다. 연구 1일, 3일, 7일, 14일, 28일, 42일, 56일, 70일 및 84일에 혈청 TTR 농도 측정 및 임상 혈액 화학 분석을 위해 혈액 샘플을 채취하였다.
- [1136] TTR mRNA 발현의 억제는 혈청 TTR 단백질 수준의 감소를 야기할 것으로 예상된다. 혈청 TTR 단백질 농도는 상업적으로 이용 가능한 ELISA 키트(Abcam ab231920)로 측정하였다. 각각의 개별 동물에 대해 1일분의 TTR 농도를 계산하고 이를 3마리 동물의 그룹에 대한 평균 및 표준편차로 표시하였다(도 25).
- [1137] ETX024의 단일 1mg/kg 용량은 혈청 TTR 농도의 신속하고 상당한 감소를 야기하여, 투여 후 28일에 최저점에 도달하고 70일까지 억제된 상태를 유지하였다.
- [1138] 84일까지 ETX024를 사용하여 데이터를 추가로 얻었다. ETX020을 사용하여 동일한 실험을 수행하였다. ETX0020의 경우 도 27에, ETX0024의 경우 도 29a에 84일 동안의 데이터가 제공된다.
- [1139] TaqMan 유전자 발현 키트 TTR(Thermo, 검정 ID Mf02799963\_m1)을 사용하여 실시간 정량적 PCR로 TTR mRNA를 측정하였다. GAPDH 발현도 측정하여(Thermo, 검정 ID Mf04392546\_g1) 기준을 제공하였다. 각 동물에 대한 상대적 TTR 발현을 GAPDH로 정규화하고 투여 전 수준 대비  $\Delta \Delta Ct$  방법으로 계산하였다. ETX024의 단일 1mg/kg 용량은 간 TTR mRNA의 신속하고 상당한 감소를 야기하여 투여 후 14일에 최저점에 도달하고 84일까지 억제된 상태를 유지하였다(도 29b).
- [1140] 동물 체중은 연구 동안 일주일에 한 번 측정하였다. 체중의 변동 또는 감소는 ETX024 투여와 연관되지 않았으며 동물은 연구 내내 계속해서 체중이 증가하였다(도 29c).
- [1141] 자동 생화학 분석기를 사용하여 2시간 이내에 혈청을 분석하였다. ALT(알라닌 트랜스아미나제) 및 AST(아스파르테이트 트랜스아미나제)의 상당한 증가는 일반적으로 간 독성을 입증하는 데 사용된다. ALT(도 29d) 또는 ALT(도 29e)의 증가는 ETX024의 투여와 연관되지 않았다.
- [1142] 바람직한 측면에서, 본 발명의 화합물은 이하 "투여 기간"으로 언급되는 0일 이후 적어도 약 14일, 0일 이후 적어도 약 21일, 0일 이후 적어도 약 28일, 0일 이후 적어도 약 35일, 0일 이후 적어도 약 42일, 0일 이후 적어도 약 49일, 0일 이후 적어도 약 56일, 0일 이후 적어도 약 63일, 0일 이후 적어도 약 70일, 0일 이후 적어도 약 77일 또는 0일 이후 적어도 약 84일의 기간에 걸쳐 표적 단백질의 혈청 단백질 수준을 0일의 초기(시작) 농도 미만의 값으로 저하시킬 수 있다. 본원에 언급된 "0일"은 본 발명의 화합물을 환자에게 투여하기 시작한 날, 즉 투여 기간의 시작 또는 투여 후 시간이다.
- [1143] 바람직한 측면에서, 본 발명의 화합물은 표적 단백질의 혈청 단백질 수준을 0일의 초기(시작) 농도의 적어도 약 90% 이하, 예컨대 0일의 초기(시작) 농도의 적어도 약 85% 이하, 적어도 약 80% 이하, 적어도 약 75% 이하, 적어도 약 70% 이하, 적어도 약 65% 이하, 적어도 약 60% 이하, 적어도 약 55% 이하, 적어도 약 50% 이하, 적어도 약 45% 이하, 적어도 약 40% 이하, 적어도 약 35% 이하, 적어도 약 30% 이하, 적어도 약 25% 이하, 적어도 약

20% 이하, 적어도 약 15% 이하, 적어도 약 10% 이하, 적어도 약 5% 이하의 값으로 저하시킬 수 있다. 전형적으로 혈청 단백질의 이러한 저하는 0일 이후 적어도 약 14일, 0일 이후 적어도 약 21일, 0일 이후 적어도 약 28일, 0일 이후 적어도 약 35일, 0일 이후 적어도 약 42일, 0일 이후 적어도 약 49일, 0일 이후 적어도 약 56일, 0일 이후 적어도 약 63일, 0일 이후 적어도 약 70일, 0일 이후 적어도 약 77일 또는 0일 이후 적어도 약 84일의 기간에 걸쳐 유지될 수 있다. 더욱 바람직하게는, 0일 이후 적어도 약 84일의 기간 동안, 혈청 단백질은 0일의 초기(시작) 농도의 적어도 약 90% 이하, 예컨대 0일의 초기(시작) 농도의 적어도 약 85% 이하, 적어도 약 80% 이하, 적어도 약 75% 이하, 적어도 약 70% 이하, 적어도 약 65% 이하, 적어도 약 60% 이하, 적어도 약 55% 이하, 적어도 약 50% 이하, 적어도 약 45% 이하, 적어도 약 40% 이하의 값으로 저하될 수 있다.

[1144] 바람직한 측면에서, 본 발명의 화합물은 표적 단백질의 혈청 단백질 수준의 최대 저하를 0일의 초기(시작) 농도의 적어도 약 50% 이하의 값, 예컨대 0일의 초기(시작) 농도의 적어도 약 45% 이하, 적어도 약 40% 이하, 적어도 약 35% 이하, 적어도 약 30% 이하, 적어도 약 25% 이하, 적어도 약 20% 이하, 적어도 약 15% 이하, 적어도 약 10% 이하, 적어도 약 5% 이하의 값으로 달성할 수 있다. 전형적으로 혈청 단백질의 이러한 최대 저하는 0일 이후 약 14일, 0일 이후 약 21일, 0일 이후 약 28일, 0일 이후 약 35일 또는 0일 이후 약 42일에 일어난다. 더욱 전형적으로, 혈청 단백질의 이러한 최대 저하는 0일 이후 약 14일, 0일 이후 약 21일 또는 0일 후 약 28일에 일어난다.

[1145] 본 발명의 특정 화합물은 전형적으로 다음과 같이 표적 단백질의 혈청 단백질 수준의 최대 저하 % 및/또는 적어도 약 84일의 기간에 걸친 저하 %를 달성할 수 있다:

[1146] ETX019는 전형적으로 0일 이후 약 7 내지 21일, 특히 0일 이후 약 14일에 표적 단백질, 전형적으로 TTR의 혈청 단백질 수준의 적어도 50% 저하를 전형적으로 달성할 수 있고/있거나, 전형적으로 0일 이후 적어도 약 84일까지의 기간에 걸쳐 표적 단백질, 전형적으로 TTR의 혈청 단백질 수준의 적어도 90% 저하를 유지할 수 있다(전술한 바와 같이, 본원에 언급된 "0일"은 본 발명의 화합물을 환자에게 투여하기 시작한 날을 지칭하고 따라서 투여 후 시간을 나타냄);

[1147] ETX020은 전형적으로 0일 이후 약 7 내지 21일, 특히 0일 이후 약 14일에 표적 단백질, 전형적으로 TTR의 혈청 단백질 수준의 적어도 30% 저하를 전형적으로 달성할 수 있고/있거나, 전형적으로 0일 이후 적어도 약 84일까지의 기간에 걸쳐 표적 단백질, 전형적으로 TTR의 혈청 단백질 수준의 적어도 80% 저하를 유지할 수 있다(전술한 바와 같이, 본원에 언급된 "0일"은 본 발명의 화합물을 환자에게 투여하기 시작한 날을 지칭하고 따라서 투여 후 시간을 나타냄);

[1148] ETX023은 전형적으로 0일 이후 7 내지 21일, 특히 0일 이후 약 14일에 표적 단백질, 전형적으로 TTR의 혈청 단백질 수준의 적어도 20% 저하를 전형적으로 달성할 수 있고/있거나, 전형적으로 0일 이후 적어도 약 84일까지의 기간에 걸쳐 표적 단백질, 전형적으로 TTR의 혈청 단백질 수준의 적어도 50% 저하를 유지할 수 있다(전술한 바와 같이, 본원에 언급된 "0일"은 본 발명의 화합물을 환자에게 투여하기 시작한 날을 지칭하고 따라서 투여 후 시간을 나타냄);

[1149] ETX024는 전형적으로 0일 이후 약 7 내지 21일, 특히 0일 이후 약 14일에 표적 단백질, 전형적으로 TTR의 혈청 단백질 수준의 적어도 20% 저하를 전형적으로 달성할 수 있고/있거나, 전형적으로 0일 이후 적어도 약 84일까지의 기간에 걸쳐 표적 단백질, 전형적으로 TTR의 혈청 단백질 수준의 적어도 60% 저하를 유지할 수 있다(전술한 바와 같이, 본원에 언급된 "0일"은 본 발명의 화합물을 환자에게 투여하기 시작한 날을 지칭하고 따라서 투여 후 시간을 나타냄).

[1150] 적절하게는 혈청 수준의 저하를 식염수(평균 0.9% 염화나트륨)에 용해된 관련 활성제, 예를 들어, ETX0023 또는 ETX0024의 1mg/kg의 단일 피하 용량을 전달함으로써 비-인간 영장류에서 측정한다. 적합한 방법이 본원에 기술되어 있다. 이는 제한적이지 않으며 적절한 대조군을 이용한 다른 적절한 방법이 사용될 수 있음을 이해할 것이다.

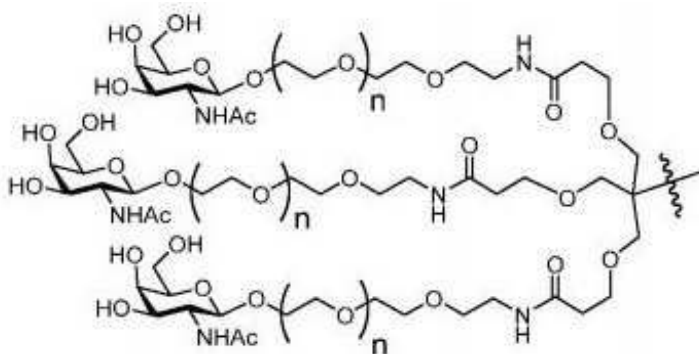
[1151] **실시예 7 ETX023(TTR mRNA 표적화) T1a 역 무염기**

[1152] 총 빌리루빈 수치는 연구 내내 안정적으로 유지되었다(도 34).

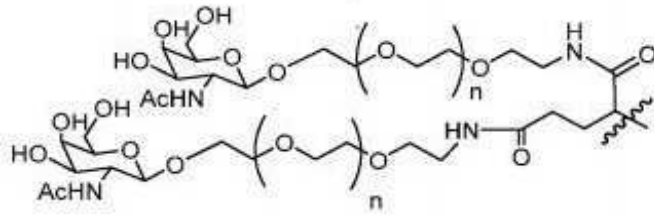
[1153] 연구 전반에 걸쳐 요소(혈액 요소 질소, BUN) 및 크레아티닌 농도를 평가하여 신장 건강을 모니터링하였다. 혈액 요소 질소(BUN) 및 크레아티닌 수준은 ETX023의 단일 1mg/kg 용량 이후 안정적이고 예상 범위 내로 유지되었다(도 35 및 36).



- [1154] 실시예 8 ETX024(TTR mRNA 표적화) T2a 역 무염기
- [1155] 총 빌리루빈 수치는 연구 내내 안정적으로 유지되었다(도 37).
- [1156] 연구 전반에 걸쳐 요소(혈액 요소 질소, BUN) 및 크레아티닌 농도를 평가하여 신장 건강을 모니터링하였다. 혈액 요소 질소(BUN) 및 크레아티닌 수준은 ETX024의 단일 1mg/kg 용량 이후 안정적이고 예상 범위 내로 유지되었다(도 38 및 39).
- [1157] 본 발명의 추가 측면은 하기 도 40-42 및 실시예 9-18에 기술된 비제한적 예와 함께 하기에 기술된다. 하기 기술된 화합물은, 예를 들어, 본 개시내용으로부터 달리 명백하지 않은 한 용도, 핵산 길이, 정의, 약제학적으로 허용되는 조성물, 투여량, 유전자 발현 억제 방법, 및 유전자 발현과 관련된 질환의 치료 또는 예방 방법과 관련하여 상기 개시된 임의의 측면 및 실시양태에서 사용하기에 적합하다.
- [1158] 도 40a는 트리안테너리 GalNAc(*N*-아세틸갈락토사민) 단위를 묘사한다.
- [1159] 도 40b는 본 발명의 한 실시양태에 따른 대체 트리안테너리 GalNAc를 묘사하며, 연결 그룹의 변화를 보여준다.
- [1160] 도 41a는 본 발명에 따른 트리안테너리 GalNAc 접합된 siRNA를 묘사하며, 연결 그룹의 변화를 보여준다.
- [1161] 도 41b는 본 발명의 한 실시양태에 따른 트리안테너리 GalNAc 접합된 siRNA의 속을 묘사한다.
- [1162] 도 41c는 본 발명의 한 실시양태에 따른 바이안테너리 GalNAc 접합된 siRNA의 속을 묘사하며, 연결 그룹의 변화를 보여준다.
- [1163] 도 41d는 본 발명의 또 다른 실시양태에 따른 바이안테너리 GalNAc 접합된 siRNA의 속을 묘사하며, 연결 그룹의 변화를 보여준다.
- [1164] 도 42a는 본 발명의 한 실시양태에 따른 트리안테너리 GalNAc 접합된 siRNA의 또 다른 실시양태를 묘사한다.
- [1165] 도 42b는 대체 분지화 GalNAc 접합체를 갖는, 도 27a에 나타낸 변이체를 묘사한다.
- [1166] 도 42c는 본 발명의 한 실시양태에 따른 트리안테너리 GalNAc 접합된 siRNA의 속을 묘사하며, 연결 그룹의 변화를 보여준다.
- [1167] 도 42d는 본 발명의 한 실시양태에 따른 바이안테너리 GalNAc 접합된 siRNA의 속을 묘사하며, 연결 그룹의 변화를 보여준다.
- [1168] 추가 측면은 ASGP-R 리간드 접합된, 화학적으로 변형된 RNAi 작용제의 형태, 및 이러한 접합된 분자의 제조 방법과 용도를 개시한다.
- [1169] 특정 실시양태에서, ASGP-R 리간드는 *N*-아세틸갈락토사민(GalNAc)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 하기 화학식 I의 GalNAc의 트리안테너리 또는 바이안테너리 단위에 접합된 siRNA를 제공한다:



- [1170]
- [1171] [화학식 I\*]
- [1172] 화학식 I\*에서, n은 0, 1, 2, 3 또는 4이다. 일부 실시양태에서, 에틸렌-글리콜 단위의 수는 상이한 분지에서 서로 독립적으로 변할 수 있다. 예를 들어, 중간 분지는 n=4일 수 있는 반면, 사이드 분지는 n=3일 수 있다. 다른 실시양태는 화학식 II-a로 묘사된 바와 같이 2개의 분지만 함유할 수 있다:



[1173]

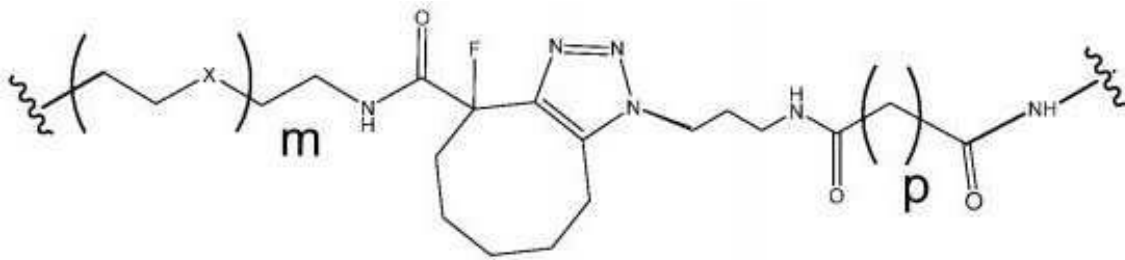
[1174] [화학식 II<sup>\*</sup>-a]

[1175] 화학식 II<sup>\*</sup> 및 II<sup>\*</sup>-a에서, n은 0, 1, 2, 3 또는 4로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 에틸렌-글리콜 단위의 수는 상이한 분지에서 서로 독립적으로 변할 수 있다. 예를 들어, 하나의 분지는 n=4 또는 3일 수 있고 다른 분지(들)는 n=3 또는 2 등일 수 있다.

[1176] 추가의 GalNAc 분지도 부가될 수 있으며, 예를 들어, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-분지형 GalNAc 단위가 사용될 수 있다.

[1177] 관련된 실시양태에서, 분지형 GalNAc는 또 다른 표적화 모이어티, 예를 들어, 지질, 콜레스테롤, 스테로이드, 담즙산, 폴리펩티드 및 단백질을 포함하는 표적화 (폴리)펩티드(예를 들어, RGD 펩티드, 트랜스페린, 폴리글루타메이트, 폴리아스파르테이트, 글리코실화 펩티드, 비오틴, 아시알로당단백질 인슐린 및 EGF의 부가에 의해 화학적으로 변형될 수 있다.

[1178] **옵션 1.** 추가 실시양태에서, GalNAc 단위는 테더, 예컨대 화학식 III<sup>\*</sup>에 나타낸 것을 통해 RNAi 작용제에 부착될 수 있다:

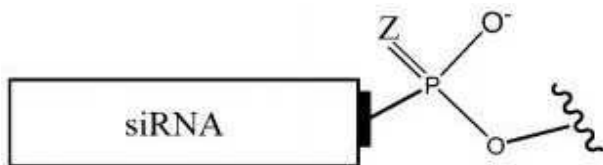


[1179]

[1180] [화학식 III<sup>\*</sup>]

[1181] 화학식 III<sup>\*</sup>에서, m은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5로부터 선택되고, p는 m과 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14로부터 선택되고, X는 CH<sub>2</sub> 또는 O이다.

[1182] 또 다른 실시양태에서, 테더는 화학식 IV<sup>\*</sup>에 나타낸 바와 같이 인산염(Z=O) 또는 포스포로티오에이트 그룹(Z=S)을 통해 올리고에 부착될 수 있다:



[1183]

[1184] [화학식 IV<sup>\*</sup>]

[1185] 특정 테더를 통한 GalNAc 분지형 단위의 이러한 부착은 바람직하게는 RNAi 작용제의 센스 가닥의 3' 또는 5' 말단에 있다. 한 실시양태에서, RNAi 작용제의 3'에 대한 부착은 화학식 V<sup>\*</sup>에 나타낸 바와 같은 C6 아미노 링커를 통해 이루어진다:



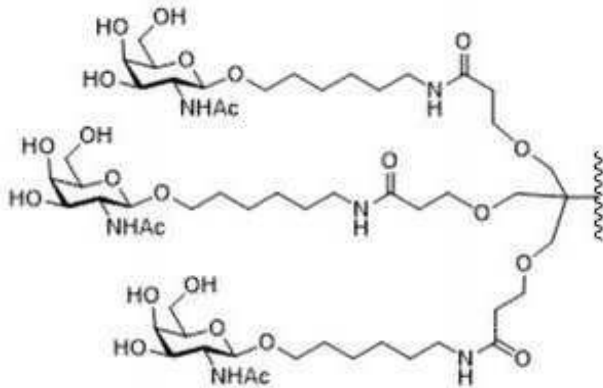


[1186]

[1187] [화학식 V<sup>\*</sup>]

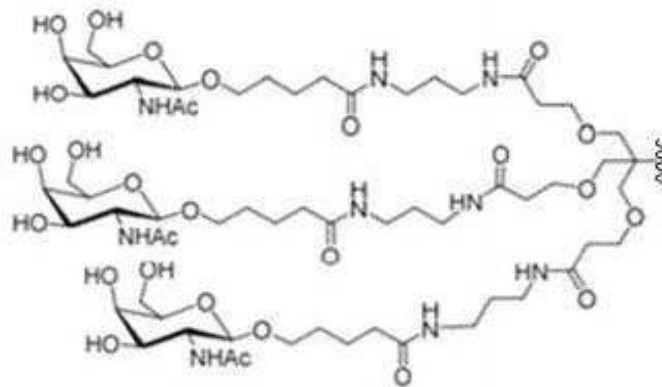
[1188] 이 링커는 실시예 15에 나타낸 바와 같이 합성의 시작점이다.

[1189] 상술된 바와 같은 동일한 링커 및 테더가 화학식 VI<sup>\*</sup> 및 VII<sup>\*</sup>에 나타낸 바와 같은 대체 분지형 GalNAc 구조와 함께 사용될 수 있다:



[1190]

[1191] [화학식 VI<sup>\*</sup>]

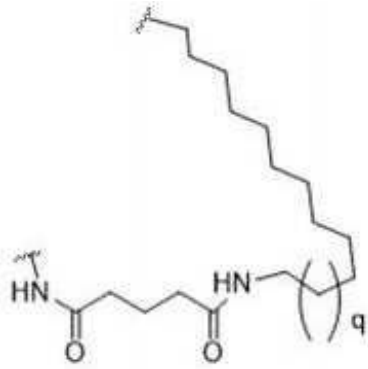


[1192]

[1193] [화학식 VII<sup>\*</sup>]

[1194] 화학식 II<sup>\*</sup>-a와 유사하게, 화학식 VI<sup>\*</sup> 및 VII<sup>\*</sup>에 기초한 바이안테너지 형태의 리간드가 본 발명의 조성물에 사용될 수 있다.

[1195] **옵션 2.** 추가 실시양태에서, GalNAc 단위는 테더, 예컨대 화학식 III<sup>\*</sup>-2에 나타낸 것을 통해 RNAi 작용제에 부착될 수 있다:

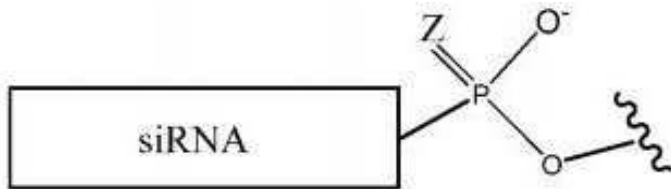


[1196]

[1197] [화학식 III<sup>\*</sup>-2]

[1198] 화학식 III<sup>\*</sup>-2에서, q는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8로부터 선택된다.

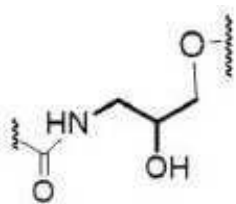
[1199] 또 다른 실시양태에서, 테더는 화학식 IV<sup>\*</sup>에 나타난 바와 같이 인산염( $Z=O$ ) 또는 포스포로티오에이트 그룹( $Z=S$ )을 통해 올리고에 부착될 수 있다:



[1200]

[1201] [화학식 IV<sup>\*</sup>]

[1202] 바람직하게는 이중 가닥 RNAi 작용제의 센스 가닥의 3' 또는 5' 말단에서 특정 테더를 통한 GalNAc 분지형 단위의 이러한 부착. 한 실시양태에서, RNAi 작용제의 3'에 대한 부착은 실시예 17에 나타난 바와 같다. 한 실시양태에서, GalNAc 테더가 3' 부위에 부착될 때, 테더와 올리고의 3' 말단 사이의 일시적 링커는 화학식 (V<sup>\*</sup>-a; 또한 도 42c 참조)의 구조를 포함하거나 다른 적합한 링커, 예를 들어, 화학식 V<sup>\*</sup>-b에 나타난 C6 아미노 링커가 사용될 수 있다:



[1203]

[1204] [화학식 V<sup>\*</sup>-a]

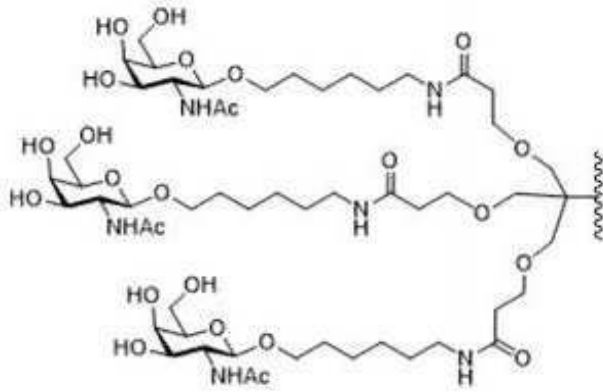


[1205]

[1206] [화학식 V<sup>\*</sup>-b]

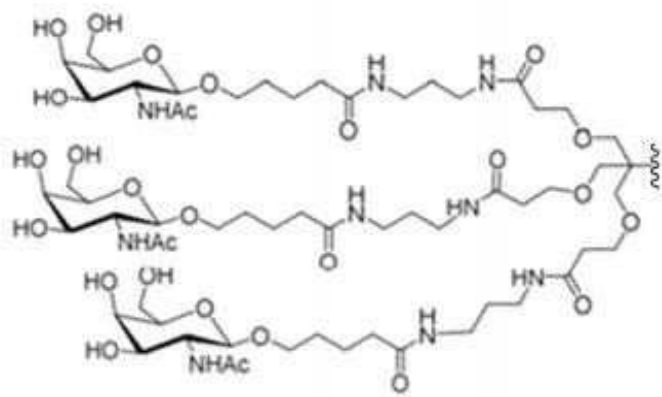
[1207] 추가 및/또는 대체 접합 부위는 당 잔기, 인산염 그룹 또는 핵산 염기를 포함하는 임의의 비-말단 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[1208] 동일한 링커 및 테더가 화학식 VI<sup>\*</sup>-2 및 VII<sup>\*</sup>-2에 나타난 바와 같이 대체 분지형 GalNAc 구조와 함께 사용될 수 있다:



[1209]

[1210] [화학식 VI<sup>\*</sup>-2]



[1211]

[1212] [화학식 VII<sup>\*</sup>-2]

[1213] 본 발명의 RNAi 작용제의 특징 및 이의 화학적 변형

[1214] 특정 실시양태에서, 접합된 올리고머 화합물(본원에서 RNA 간섭 화합물(RNAi 화합물)로 지칭됨)은 2개의 가닥을 포함하고, 각각의 가닥은 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에 8 내지 55개의 연결된 뉴클레오타이드 단량체 하위단위(역 무염기(ia) 뉴클레오타이드(들) 포함)의 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 접합된 올리고머 화합물 가닥은, 예를 들어, 16 내지 55, 53, 49, 40, 25, 24, 23, 21, 20, 19, 18, 17개 또는 최대(약) 18-25, 18-23, 21-23개의 연결된 뉴클레오타이드 단량체 하위단위의 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 RNAi 작용제는 상술된 바와 같은 두 가닥을 합한 길이의 단일 가닥을 갖는 헤어핀 구조를 가질 수 있다. (전체적으로 사용되는 용어 "뉴클레오타이드"는 문맥에서 요구하는 경우 뉴클레오시드(즉, 인산염/포스포노티오에이트 그룹이 없는 뉴클레오타이드)를 지칭할 수도 있다.)

[1215] 특정 실시양태에서, 이중 가닥 RNAi 작용제는 블런트 말단(blunt-ended)이거나 한쪽 또는 양쪽 말단에 오버행을 갖는다. 일부 실시양태에서, 오버행은 안티센스 가닥의 (3' 말단 또는 5' 말단에서의) 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 2-4, 4, 3, 2 또는 1개의 뉴클레오타이드(들)일 뿐만 아니라 센스 가닥의 (3' 말단 또는 5' 말단에서의) 2-4, 3, 2 또는 1개의 뉴클레오타이드(들)이다. 특정 예시적 실시양태에서, 실시예 9의 작제물 9.1, 9.2 및 9.3을 참조하면, RNAi 작용제는 안티센스 가닥의 3' 말단에 2개의 뉴클레오타이드 오버행을 포함하고 센스 가닥의 3' 말단에 2개의 뉴클레오타이드 오버행을 포함한다. 특정한 다른 예시적인 실시양태에서, 실시예 10의 작제물 10.1 및 10.3, 실시예 11의 작제물 11.1 및 11.3; 및 실시예 12의 작제물 12.1 및 12.3을 참조하면, RNAi 작용제는 안티센스 가닥의 3' 말단에 2개의 뉴클레오타이드 오버행을 포함하고 다른 쪽 말단은 블런트 말단이다. 특정한 다른 예시적인 실시양태에서, 실시예 10의 작제물 10.3을 참조하면, 작제물은 양쪽 말단이 블런트 말단이다. 또 다른 예시적인 실시양태에서, 실시예 12의 작제물 12.2를 참조하면, RNAi 작용제는 안티센스 가닥의 3' 말단에 4개의 뉴클레오타이드 오버행을 포함하고 다른 쪽 말단은 블런트 말단이다.

[1216] 특정 실시양태에서, 작제물은 말단 캡, 하나 이상의 역 무염기 뉴클레오타이드, 하나 이상의 포스포노티오에이트

연결, 하나 이상의 데옥시뉴클레오타이드(예를 들어, D-리보뉴클레오타이드, D-2'-데옥시리보뉴클레오타이드 또는 다른 변형된 뉴클레오타이드), 또는 이들의 조합을 사용하여 뉴클레아제 절단을 방지하거나 억제하는 분해 보호 모이어티로 변형된다. 이러한 분해 보호 모이어티는 ASGP-R 리간드에 접합되지 않은 말단 중 어느 하나 또는 모든 말단에 존재할 수 있다. 특정 실시양태에서, 분해 보호 모이어티는 단독으로 또는 1-4, 1-3, 1-2 또는 1개의 포스포로티오에이트 연결, 1-4, 1-3, 1-2 또는 1개의 데옥시뉴클레오타이드, 및 1-4, 1-3, 1-2 또는 1개의 역 무염기 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터의 임의의 조합으로서 선택된다. 특정 예시적인 실시양태에서, 분해 보호 모이어티는 실시예 9-18에 나타난 바와 같이, 작제물 9.1, 9.2, 9.3, 10.1, 10.2, 10.3, 11.1, 11.2, 11.3, 12.1, 12.2 및 12.3 중 하나에서와 같이 구성된다. 이러한 예시적인 보호 모이어티의 구성은 본 발명의 임의의 RNAi 작용제와 함께 사용될 수 있다.

- [1217] 특정 실시양태에서, 센스 및/또는 안티센스 가닥(들)에서 뉴클레오타이드의 전부 또는 일부 리보스가 변형된다. 특정 실시양태에서, RNAi 작용제에서 리보스의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상(예를 들어, 100%)이 변형된다. 특정 실시양태에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 리보스가 변형되지 않는다.
- [1218] 바람직한 실시양태에서, 리보스 변형은 2'-O-메틸 및 2'-데옥시플루오로를 포함하는, 2'-O-알킬 변형과 같은 2' 치환체 그룹을 포함한다. 2'-데옥시, LNA(예를 들어, 2'-O, 4'-C 메틸렌 브리지 또는 2'-O, 4'-C 에틸렌 브리지), 2'-메톡시톡시(MOE), 2'-O-(CH<sub>2</sub>)OCH<sub>3</sub> 등을 포함하는 추가적인 변형이 당업계에 공지되어 있다.
- [1219] 특정 실시양태에서, 다수의 변형은, 예를 들어, 실시예 9-18의 작제물에 나타난 바와 같이, 또는 모두 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제7,452,987호; 제7,528,188호; 제8,273,866호; 제9,150,606호; 및 제10,266,825호에 기술된 바와 같이 뚜렷한 변형 패턴을 제공한다.
- [1220] 일부 실시양태에서, siRNA는, 예를 들어, 안티센스 가닥의 위치 11(바람직함), 12, 13 및/또는 센스 가닥의 위치 9 및 10(바람직함)에서 하나 이상의 열적 불안정화 뉴클레오타이드, 예를 들어, GNA, ENA 등을 포함한다.
- [1221] 추가로, 핵산 염기는, 예를 들어, 미국 특허 제10,119,136호에 기술된 바와 같이 C4 위치에서 변형될 수 있다.
- [1222] 일반적으로, 본 발명의 RNAi 작용제는 치료 표적에 대해 지시되는 것으로, 이의 억제는 바람직하지 않은 또는 병리학적 상태를 포함하는 질환의 예방, 완화 또는 치료를 초래할 것이다. 다수의 이러한 표적이 당업계에 알려져 있다. 이러한 표적의 비제한적 예는 다음을 포함한다: ApoC, ApoB, ALAS1, TTR, GO, C5(실시예 참조) 등. 일반적으로, 간세포 표면에서 ASGP-R의 풍부한 발현으로 인해, 이러한 표적은 바람직하게는 간에서 발현되지만 다른 조직이나 기관에서도 발현될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 표적은 인간이고, RNAi 작용제는 이러한 표적에 완전히 또는 부분적으로 상보적인 안티센스 가닥을 포함한다. 특정 실시양태에서, RNAi 작용제는 동일하거나 상이한 표적에 대해 지시된 2개 이상의 화학적으로 연결된 RNAi 작용제를 포함할 수 있다.

## [1223] 실시예

### [1224] 실시예 9: 5'-GalNAc를 사용한 역 무염기 화학

[1225] 실시예에 기술된 모든 RNAi 작용제에서, 다음과 같은 관례가 사용된다:

[1226] ia = 역 무염기 뉴클레오타이드;

[1227] m = 2'-O-메틸 뉴클레오타이드;

[1228] f = 2'-데옥시-2'-플루오로 뉴클레오타이드;

[1229] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결;

[1230] Xd = 2'-데옥시-뉴클레오타이드;

[1231] ~ = 테더.

[1232] 표준 합성 기술을 사용하여, 상술되거나 도 41a-42b에 묘사된 바와 같이, 테더 1 및 2, 및 본 발명에 따른 다양한 트리안테너리 GalNAc 단위를 갖는 다양한 버전으로 다음 작제물을 합성한다.

[1233] 9.1.

[1234] (상단 가닥(센스(ss)): 서열번호 1; 하단 가닥(안티센스) 서열번호 2)

```

1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
5' GalNAc~Gm-Am-Cm-Um-Um-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Gm-Am-Am-Am-Um-AmsUmsAm-ia-ia 3'
3' AmsCms-Cm-Um-Gm-Am-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gm-Gm-Am-Cf-Cf-Um-Uf-Um-Am-UmsAfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9  8  7  6  5  4  3  2  1

```

[1235]

[1236] 9.2.

[1237] (상단 가닥(센스(ss)): 서열번호 3; 하단 가닥(안티센스) 서열번호 4)

```

1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
5' GalNAc~Am-Am-Gf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Af-Uf-Um-Uf-Um-Um-Af-Um-Af-AmsUmsAm-ia-ia 3'
3' Td-Td-UmsUmsUm-Um-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Um-Am-Af-Am-Af-Am-Um-Af-Um-UfsAfsUm 5'

25 25 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9  8  7  6  5  4  3  2  1

```

[1238]

[1239] 9.3.

[1240] (상단 가닥(센스(ss)): 서열번호 5; 하단 가닥(안티센스) 서열번호 6)

```

1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
5' GalNAc~Um-Gm-Gm-Gm-Am-Um-Uf-Um-Cf-Af-Uf-Gm-Um-Am-Am-Cm-Cm-Am-AmsGmsAm-ia-ia 3'
3' CmsUmsAm-Cm-Cm-Cm-Um-Af-Am-Af-Gm-Um-Am-Cm-Af-Um-Um-Gf-Gm-Um-UmsCfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9  8  7  6  5  4  3  2  1

```

[1241]

[1242] 실시예 10: 3'-GalNAc를 사용한 역 무염기 화학

[1243] 표준 합성 기술을 사용하여, 상술되거나 도 41a-42b에 묘사된 바와 같이, 본 발명에 따른 테더 1 및 2, 및 본 발명에 따른 다양한 트리안테너리 GalNAc 단위를 갖는 다양한 버전으로 다음 작제물을 합성한다. 일관성을 위해 실시예 9에서와 동일한 순서가 표시된다.

[1244] 10.1

[1245] (상단 가닥(센스(ss)): 서열번호 7; 하단 가닥(안티센스) 서열번호 8)

```

1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
5' ia-ia-GmsAmsCm-Um-Um-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Gm-Am-Am-Am-Um-Am-Um-Am~GalNAc 3'
3' AmsCmsCm-Um-Gm-Am-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gm-Gm-Am-Cf-Cf-Um-Uf-Um-Am-UmsAfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9  8  7  6  5  4  3  2  1

```

[1246]

[1247] 10.2

[1248] (상단 가닥(센스(ss)): 서열번호 9; 하단 가닥(안티센스) 서열번호 10)

```

1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
5'  ia-ia-AmsAmsGf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Af-Uf-Um-Uf-Um-Um-Af-Um-Af-Am-Um-Am-GalNAc 3'

3'  Td-Td-UmsUmsUm-Um-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Um-Am-Af-Am-Af-Am-Um-Af-Um-UfsAfsUm 5'

25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9  8  7  6  5  4  3  2  1

```

[1249]

[1250] 10.3.

[1251] (상단 가닥(센스(ss)): 서열번호 11; 하단 가닥(안티센스) 서열번호 12)

```

1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
5'  ia-ia-UmsGmsGm-Gm-Am-Um-Uf-Um-Cf-Af-Uf-Gm-Um-Am-Am-Cm-Cm-Am-Am-Gm-Am-GalNAc 3'

3'  CmsUmsAm-Cm-Cm-Cm-Um-Af-Am-Af-Gm-Um-Am-Cm-Af-Um-Um-Gf-Gm-Um-UmsCfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9  8  7  6  5  4  3  2  1

```

[1252]

[1253] 실시예 11: 대체 변형 패턴을 갖는 5'-GalNAc를 사용한 역 무염기 화학

[1254] 표준 합성 기술을 사용하여, 상술되거나 도 41a-42b에 묘사된 바와 같이, 본 발명에 따른 테더 1 및 2, 및 본 발명에 따른 다양한 트리안테너리 GalNAc 단위를 갖는 다양한 버전으로 다음 작제물을 합성한다. 일관성을 위해 실시예 9에서와 동일한 순서가 표시된다.

[1255] 11.1.

[1256] (상단 가닥(센스(ss)): 서열번호 13; 하단 가닥(안티센스) 서열번호 14)

```

1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
5'  GalNAc~Gf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af-Um-AfsUmsAf 3'

3'  AmsCfsCm-Uf-Gm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Af-UmsAfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9  8  7  6  5  4  3  2  1

```

[1257]

[1258] 11.2

[1259] (상단 가닥(센스(ss)): 서열번호 15; 하단 가닥(안티센스) 서열번호 16)

```

1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
5'  GalNAc~Af-Am-Gf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Am-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Am-Uf-Am-AfsUmsAf 3'

3'  Td-Td-UmsUfsUm-Uf-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Uf-Am-Af-Am-Af-Am-Uf-Am-Uf-UmsAfsUm 5'

25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9  8  7  6  5  4  3  2  1

```

[1260]

[1261] 11.3.



[1262] (상단 가닥(센스(ss)): 서열번호 17; 하단 가닥(안티센스) 서열번호 18)

```

1  2  3  4  5  6  7  8  9  10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

5'  GalNAc~Uf-Gm-Gf-Gm-Af-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Cf-Am-AfsGmsAf 3'

3'  CmsUfsAm-Cf-Cm-Cf-Um-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Cf-Am-Uf-Um-Gf-Gm-Uf-UmsCfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9  8  7  6  5  4  3  2  1

```

[1263]

[1264] 실시예 12: 대체 변형 패턴을 갖는 5'-GalNAc를 사용한 역 무염기 화학

[1265] 표준 합성 기술을 사용하여, 상술되거나 도 41a-42b에 묘사된 바와 같이, 본 발명에 따른 테더 1 및 2, 및 본 발명에 따른 다양한 트리안테너리 GalNAc 단위를 갖는 다음 작제물을 다양한 버전으로 합성한다. 일관성을 위해 실시예 9에서와 동일한 순서가 표시된다.

[1266] 12.1.

[1267] (상단 가닥(센스(ss)): 서열번호 19; 하단 가닥(안티센스) 서열번호 20)

```

1  2  3  4  5  6  7  8  9  10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

5'  GfsAmsCf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af-Um-Af-Um-Af~GalNAc 3'

3'  AmsCfsCm-Uf-Gm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Af-UmsAfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9  8  7  6  5  4  3  2  1

```

[1268]

[1269] 12.2

[1270] (상단 가닥(센스(ss)): 서열번호 21; 하단 가닥(안티센스) 서열번호 22)

```

1  2  3  4  5  6  7  8  9  10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

5'  AfsAmsGf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Am-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Am-Uf-Am-Af-Um-Af~GalNAc 3'

3'  Td-Td-UmsUfsUm-Uf-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Uf-Am-Af-Am-Af-Am-Uf-Am-Uf-UmsAfsUm 5'

25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9  8  7  6  5  4  3  2  1

```

[1271]

[1272] 12.3

[1273] (상단 가닥(센스(ss)): 서열번호 23; 하단 가닥(안티센스) 서열번호 24)

```

1  2  3  4  5  6  7  8  9  10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

5'  UfsGmsGf-Gm-Af-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Cf-Am-Af-Gm-Af~GalNAc 3'

3'  CmsUfsAm-Cf-Cm-Cf-Um-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Cf-Am-Uf-Um-Gf-Gm-Uf-UmsCfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9  8  7  6  5  4  3  2  1

```

[1274]

[1275] 실시예 13: siRNA-GalNAc 접합체의 벤치마킹

[1276] 실시예 9-18에서 사용된 작제물은 번호로 지칭되며 표 22에 나열되어 있다. 테더 1 및 테더 2는 각각 도 41 및 42에 나와 있다.

[1277] [표 22]

| 작제물                                | 표적 A (GO) | 표적 B (C5) | 표적 C (TTR) |
|------------------------------------|-----------|-----------|------------|
| 테더 1                               | 6.1       | 6.2       | 6.3        |
| 테더 2                               | 6.1       | 6.2       | 6.3        |
| 테더 1                               | 8.1       | 8.2       | 8.3        |
| 테더 2                               | 8.1       | 8.2       | 8.3        |
| 테더 1                               | 7.1       | 7.2       | 7.3        |
| 테더 2                               | 7.1       | 7.2       | 7.3        |
| 테더 1                               | 9.1       | 9.2       | 9.3        |
| 테더 2                               | 9.1       | 9.2       | 9.3        |
| 3'-GalNAc 대조군<br>(예를 들어, 도 25a 참조) |           |           |            |

[1278]

[1279] 다음 표 23은 본 발명의 다양한 선택 작제물로 수행될 벤치마킹을 반영한다.

[1280] [표 23]

siRNA-GaINAc 벤치마킹을 위한 시험관 내 실험

| 표적<br>시험관<br>내<br>siRNA<br>그룹 | A                     |                    | B               |                    | C               |                    |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|
|                               | 인간 1차<br>간세포 흡수       | ASPGR 인간<br>간세포 결합 | 인간 1차<br>간세포 흡수 | ASPGR 인간<br>간세포 결합 | 인간 1차<br>간세포 흡수 | ASPGR 인간<br>간세포 결합 |
| 1                             | 벤치마크 RNAi 작용제         |                    |                 |                    |                 |                    |
| 1                             |                       |                    |                 |                    |                 |                    |
| 2                             | 센스 가닥의 5'-말단에서의 테더 옵션 |                    |                 |                    |                 |                    |
| 1                             |                       |                    |                 |                    |                 |                    |
|                               | 역 무염기 화학              |                    |                 |                    |                 |                    |
| 2                             | 센스 가닥의 5'-말단에서의 테더 옵션 |                    |                 |                    |                 |                    |
| 2                             |                       |                    |                 |                    |                 |                    |
|                               | 역 무염기 화학              |                    |                 |                    |                 |                    |
| 3                             | 센스 가닥의 5'-말단에서의 테더 옵션 |                    |                 |                    |                 |                    |
| 1                             |                       |                    |                 |                    |                 |                    |
|                               | 교대 화학                 |                    |                 |                    |                 |                    |
| 4                             | 센스 가닥의 5'-말단에서의 테더 옵션 |                    |                 |                    |                 |                    |
| 2                             |                       |                    |                 |                    |                 |                    |
|                               | 교대 화학                 |                    |                 |                    |                 |                    |
| 5                             | 센스 가닥의 3'-말단에서의 테더 옵션 |                    |                 |                    |                 |                    |
| 1                             |                       |                    |                 |                    |                 |                    |
|                               | 역 무염기 화학              |                    |                 |                    |                 |                    |

[1281]

|   |                                 |  |
|---|---------------------------------|--|
| 6 | 센스 가닥의 3'-말단에서의 테더 옵션<br>2      |  |
|   | 역 무염기 화학                        |  |
| 7 | 센스 가닥의 3'-말단에서의 테더 옵션<br>1      |  |
|   | 고대 화학                           |  |
| 8 | 센스 가닥의 3'-말단에서의 테더 옵션<br>2      |  |
|   | 대체 화학                           |  |
| 9 | 3'-GalNAc 대조군 (예를 들어, 도 25a 참조) |  |

[1282]

[1283]

시험관 내 약력학적 특성화

[1284]

표 1(G01 siRNA-GalNAc, C5 siRNA-GalNAc 및 TTR siRNA-GalNAc 유사체)에 열거된 8개의 작제물에 대한 시험관

내 약력학 활성, 결합 친화도 및 간 흡수는 이들 분자의 임상적으로 검증된 버전에 대해 벤치마킹된다.

[1285] 인간 간 세포주(*HepG2* 또는 *Hep3B*) 형질감염 검정 - G01 siRNA-GalNAc, C5 siRNA-GalNAc 및 TTR siRNA-GalNAc 유사체 분자 각각을 형질감염 시약(예를 들어, RNAiMAX)의 존재하에 인간 간 세포주에서 10가지 상이한 농도로 37°C에서 0시간 및 24시간 동안 인큐베이션한다. 각 농도에서 모든 인큐베이션은 4중으로 실행한다. 인큐베이션 후, 각 샘플을 용해시키고 HA01 C5, TTR 및 하우스키핑 유전자(예컨대 GAPDH) mRNA 농도를 bDNA 또는 RT-qPCR 검정으로 분석한다. 얻은 mRNA 농도 데이터는 G01 siRNA-GalNAc, C5 siRNA-GalNAc 및 TTR siRNA-GalNAc 분자 각각에 대한 침묵 활성 및 IC<sub>50</sub>을 결정하기 위한 분석에 사용된다.

[1286] 1차 인간 간세포 흡수 검정 - G01 siRNA-GalNAc, C5 siRNA-GalNAc 및 TTR siRNA-GalNAc 분자 각각에 대한 간 흡수 및 침묵 활성을 1차 인간 간세포에서 평가한다. G01 siRNA-GalNAc, C5 siRNA-GalNAc 및 TTR siRNA-GalNAc 유사체 분자 각각을 1차 인간 간세포에서 10가지 상이한 농도로 37°C에서 0, 4 및 72시간 동안 인큐베이션한다. 각 농도에서 모든 인큐베이션은 4중으로 실행한다. 인큐베이션 후, 각 샘플을 용해시키고 HA01, C5, TTR 및 하우스키핑 유전자(예컨대 GAPDH) mRNA 농도를 bDNA 또는 RT-qPCR 검정으로 분석한다. 얻은 mRNA 농도 데이터는 G01 siRNA-GalNAc, C5 siRNA-GalNAc 및 TTR siRNA-GalNAc 분자 각각에 대한 침묵 활성, 흡수 및 IC<sub>50</sub>을 결정하기 위한 분석에 사용된다.

[1287] 생체 내 약력학적 특성화

[1288] G01 siRNA-GalNAc, C5 siRNA-GalNAc 및 TTR siRNA-GalNAc 유사체 각각에 대한 8개의 작제물에 대한 생체 내 약력학 활성을 수컷 마우스 또는 사이노물구스 원숭이에게 단일 피하 투여 후 G01siRNA-GalNAc, C5 siRNA-GalNAc 및 TTR siRNA-GalNAc 분자 각각의 임상적으로 검증된 생체 내 약력학 활성과 비교하였다.

[1289] 생체 내 마우스의 경우, 유사체 각각의 G01 siRNA-GalNAc의 약리학은 하기 표 24에 제공된 바와 같이 0.3 또는 3mg/kg의 단일 피하 용량 이후에 평가된다. G01 siRNA-GalNAc 유사체 각각을 0.3 또는 1mg/kg으로 C57BL/6 수컷 마우스(n=3/시점/그룹)에 피하 투여하는 2개의 용량 그룹이 있다. 혈청 샘플 및 간 생검 샘플을 얻기 위한 혈액 샘플은 LCMS로 혈청 글리콜레이트의 농도를 결정하고 RT-qPCR 또는 bDNA 검정으로 HA01 mRNA의 농도를 결정하기 위해 다양한 시점에서 얻는다. 지정된 각 시점에서 각 그룹의 동물을 희생시키고 혈액(약 0.5mL/동물)과 간(약 100mg)을 수집한다. 그룹 1 내지 9의 경우, 투여 후 24, 48, 96, 168, 336, 504 및 672시간에 3마리의 동물/시점/그룹으로부터 혈액(약 0.5mL/동물) 및 간(약 100mg)을 수집한다. 그룹 10(n=3)은 혈청 글리콜레이트 및 mRNA HA01 농도에 대한 기준선 값을 제공하기 위해 투여되지 않은 대조군 그룹이다. 투여 후 다양한 시점에서 간에서 혈청 글리콜레이트의 증가 및 HA01 mRNA의 침묵의 약력학적 효과를 그룹 10 대조군 혈청 및 간 샘플과 비교한다.

[1290] [표 24]

GO1 siRNA-GalNAc 유사체 마우스 약리학 연구 설계

| 그룹              | 동물 수 | 투여<br>경로 | 용량/동물<br>횟수 | 표적 용량<br>수준<br>(mg/kg) | 표적 용량<br>농도<br>(mg/mL) | 표적<br>용량<br>부피<br>(mL/kg) |
|-----------------|------|----------|-------------|------------------------|------------------------|---------------------------|
|                 | 수컷   |          |             |                        |                        |                           |
| 1               | 21   | SC       | 1           | 0.3 또는 3               | 3                      | 1.5                       |
| 2               | 21   | SC       | 1           | 0.3 또는 3               | 3                      | 1.5                       |
| 3               | 21   | SC       | 1           | 0.3 또는 3               | 3                      | 1.5                       |
| 4               | 21   | SC       | 1           | 0.3 또는 3               | 3                      | 1.5                       |
| 5               | 21   | SC       | 1           | 0.3 또는 3               | 3                      | 1.5                       |
| 6               | 21   | SC       | 1           | 0.3 또는 3               | 3                      | 1.5                       |
| 7               | 21   | SC       | 1           | 0.3 또는 3               | 3                      | 1.5                       |
| 8               | 21   | SC       | 1           | 0.3 또는 3               | 3                      | 1.5                       |
| 9               | 21   | SC       | 1           | 0.3 또는 3               | 3                      | 1.5                       |
| 10 <sup>a</sup> | 5    | NA       | NA          | NA                     | NA                     | NA                        |

표 범례:

SC 피하

NA 해당 없음

a 그룹 10 동물은 대조군 동물이며 투여되지 않음

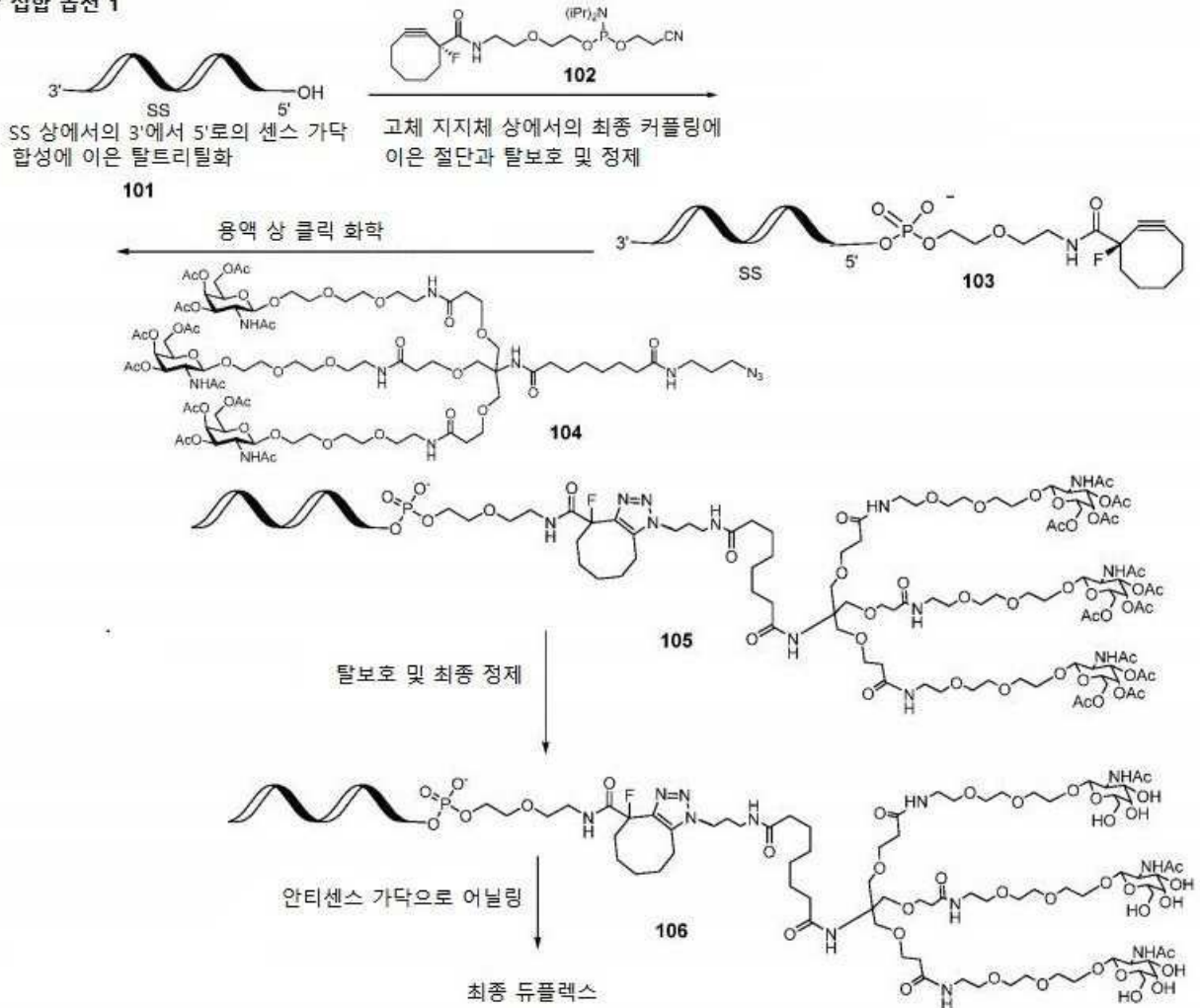
c 그룹 1 내지 9의 동물은 1일에 투여됨

[1291]



[1292] 실시예 14: 클릭-화학을 사용한 5' 접합(옵션 1)

5' 접합 옵션 1

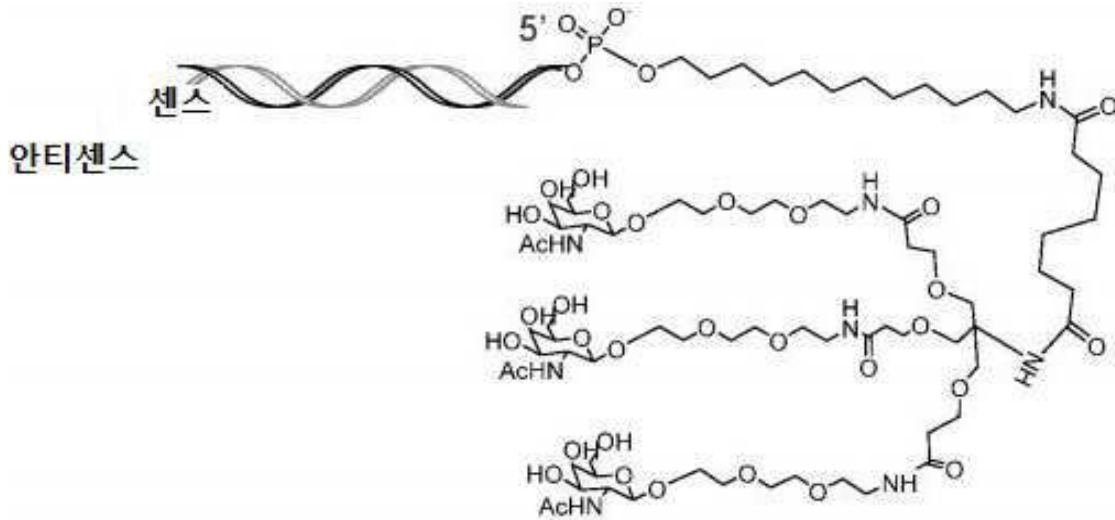


[1293]

[1294]

이 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드(101)의 센스 가닥을 고체 지지체 상에서 합성하고 상업적으로 이용 가능한 옥틴 아미다이트(102)와 결합시켜 고체 지지체 상에 클릭 화학 전구체를 갖는 필요한 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 이것은 표준 절단 및 탈보호 후에 순수한 올리고 뉴클레오타이드(103)를 제공한다. 아지드(104)를 DMSO(150  $\mu$ L/mg)에 용해시키고 이 용액을 100  $\mu$ L의 물 중의 10 OD의 올리고(103)에 첨가한다. 이어서 반응 혼합물을 실온에서 밤새 인큐베이션한다. 접합된 올리고(105)는 Glen Gel-Pak™에서 탈염시켜 유기물을 제거하고 아세톡시 보호 그룹을 메틸아민으로 처리하여 제거한 후 분취 HPLC로 순수한 올리고(106)를 얻었고 이를 등몰량의 센스 가닥으로 어닐링하여 최종 듀플렉스를 얻었다.

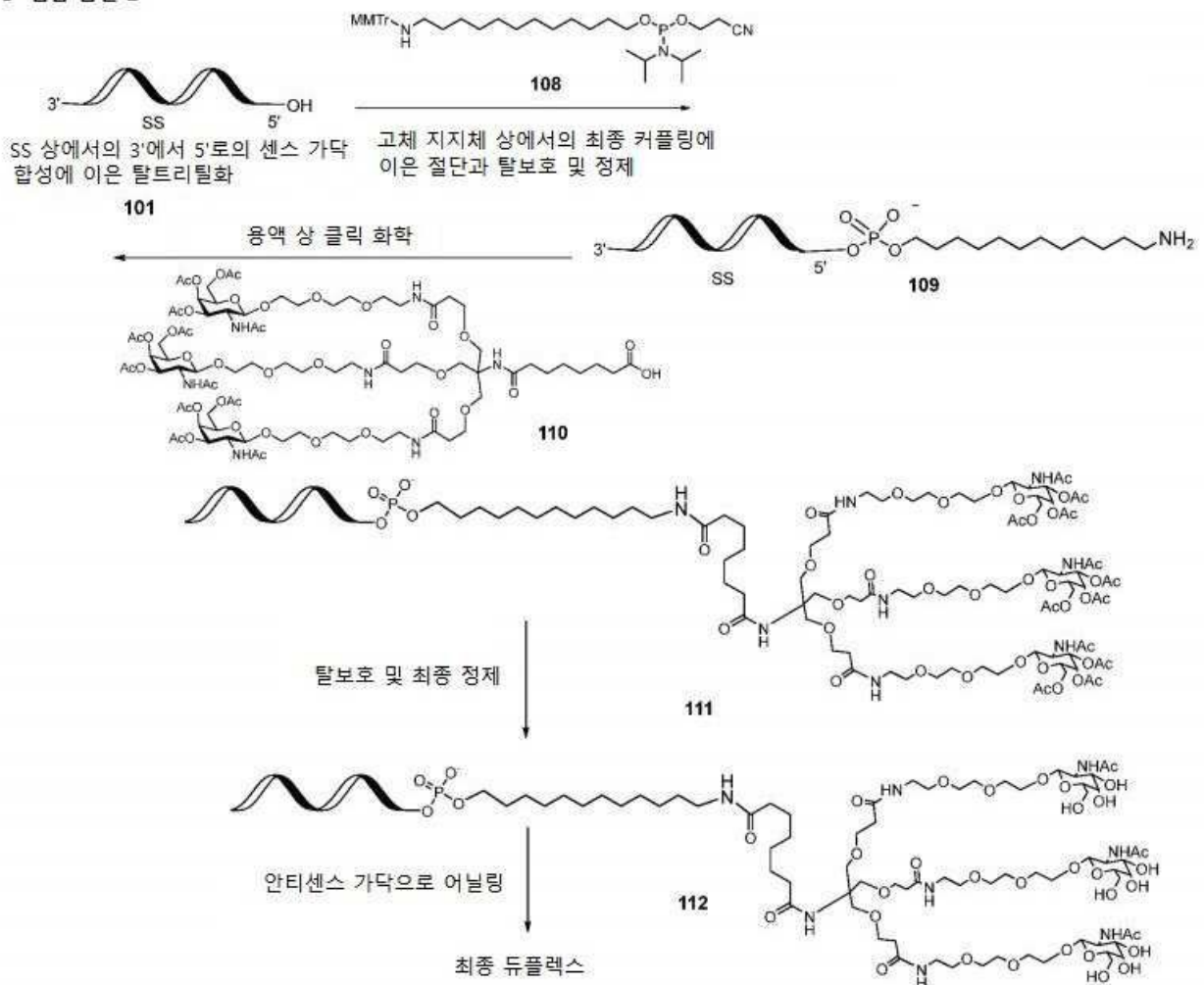
[1295] 실시예 15: 5' 접합(옵션 2)



[1296]

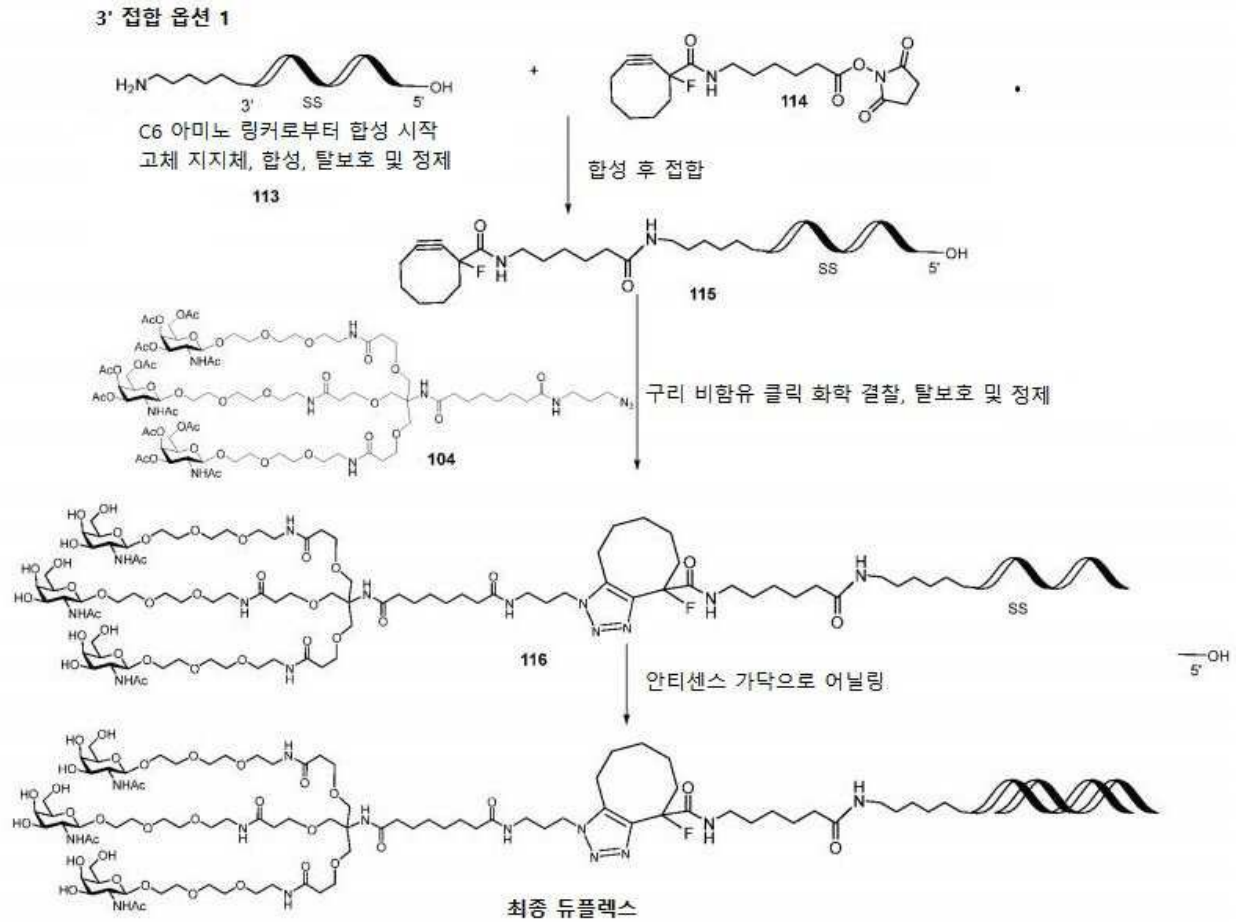
[1297] 이 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드(101)의 센스 가닥을 고체 지지체 상에서 합성하고 상업적으로 이용 가능한 아미다이트(108)와 결합시켜 고체 지지체 상에 필요한 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 이것은 표준 절단 및 탈보호 후에 순수한 올리고 뉴클레오타이드(109)를 제공한다. 아민(109)을 물(15 μL/OD)에 용해시키고 이 용액을 DMSO(100mL/mg) 중의 산(110) 용액에 첨가한 다음 10몰 당량의 EDC 및 10당량의 HOBT를 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 밤새 인큐베이션한다. 접합된 올리고(111)를 Glen Gel-Pak™에서 탈염시켜 유기물을 제거하고, 아세트산 시 보호 그룹을 메틸아민으로 처리하여 제거한 후 분취 HPLC로 순수한 올리고(112)를 얻었고 이를 등몰량의 센스 가닥으로 어닐링하여 최종 듀플렉스를 얻었다.

#### 5' 접합 옵션 2



[1298]

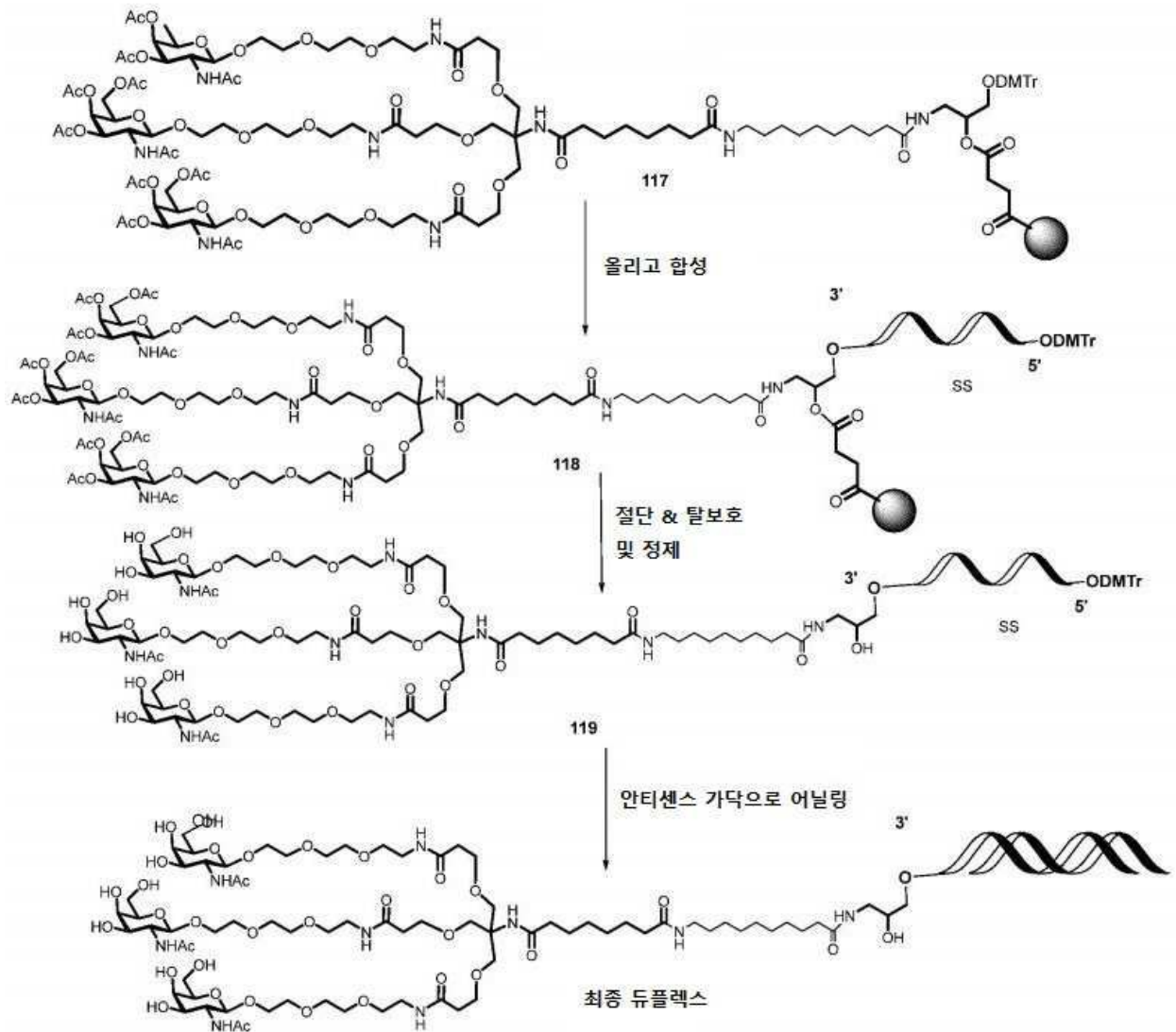
[1299] 실시예 16: 클릭-화학을 사용한 5' 접합(옵션 1)



[1300]

[1301] 올리고 작제물(119)의 합성을 위해, 트리안테너리 GalNAc 접합체를 고체 지지체(118)(CPG)에 로딩하고 올리고 합성을 수행하는 유사한 접근법을 적용한다. 절단 및 탈보호 후 정제하여 순수한 올리고(119)를 제공하고 이를 안티센스 가닥으로 어닐링하여 순수한 형태의 필요한 최종 듀플렉스를 제공한다. 또 다른 접근법에서, 3' 접합체를 또한 아미노 연결된 올리고(113)로부터 시작하여 GalNAc 카복실산을 합성 후 접합하는 (116)의 합성과 유사하게 합성하여 접합된 올리고(119)를 제공한다.

[1302] 실시예 17: 3' 접합(옵션 2)



[1303]

[1304] 올리고 작제물(119)의 합성을 위해, 트리안테너리 GalNAc 접합체를 고체 지지체(118)(CPG)에 로딩하고 올리고 합성을 수행하는 유사한 접근법을 적용한다. 절단 및 탈보호 후 정제하여 순수한 올리고(119)를 제공하고 이를 안티센스 가닥으로 어닐링하여 순수한 형태의 필요한 최종 듀플렉스를 제공한다. 또 다른 접근법에서, 3' 접합체를 또한 아미노 연결된 올리고(113)에서 시작하여 GalNAc 카복실산을 합성 후 접합하는 (116)의 합성과 유사하게 합성하여 접합된 올리고(119)를 제공한다.





11, 12, 13 또는 14로부터 선택되고; X는 O 및 CH<sub>2</sub>로부터 선택된다.

[1314] 2. 진술 1에 있어서, m=1인 변형된 RNAi 작용제.

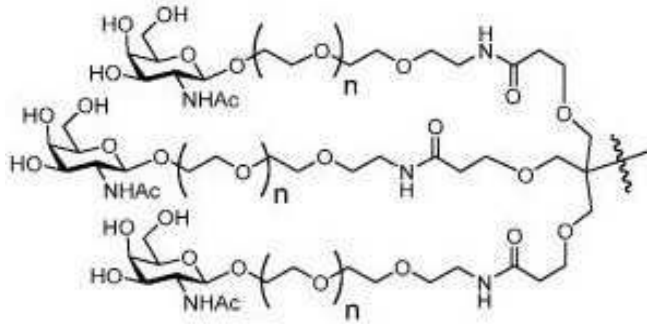
[1315] 3. 진술 1에 있어서, x가 0인 변형된 RNAi 작용제.

[1316] 4. 진술 1에 있어서, p=6인 변형된 RNAi 작용제.

[1317] 5. 진술 1에 있어서, m=1이고, p=6이고, x가 0인 변형된 RNAi 작용제.

[1318] 6. 진술 1에 있어서, ASGP-R 리간드가 분지형 GaINac를 포함하는 변형된 RNAi 작용제.

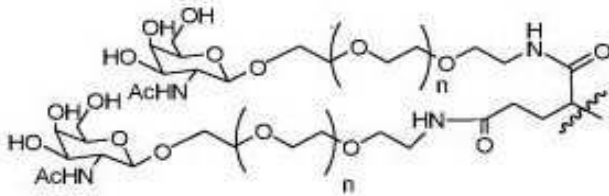
[1319] 7. 진술 6에 있어서, 분지형 GaINac가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형된 RNAi 작용제:



[1320]

[1321] [화학식 I<sup>\*</sup>]

[1322] 및



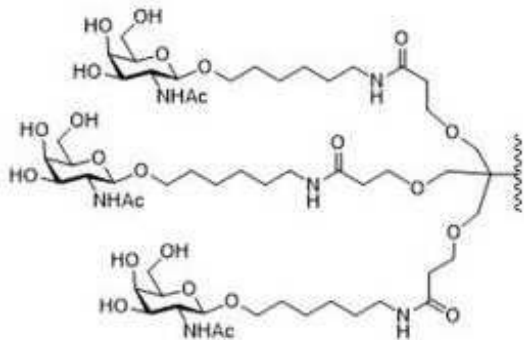
[1323]

[1324] [화학식 II<sup>\*</sup>-a]

[1325] 여기서 n은 0, 1, 2, 3 또는 4이다.

[1326] 8. 진술 7에 있어서, n=1인 변형된 RNAi 작용제.

[1327] 9. 진술 6에 있어서, 분지형 GaINac가 하기를 포함하거나 이의 바이안테너리 형태를 포함하는 변형된 RNAi 작용제:

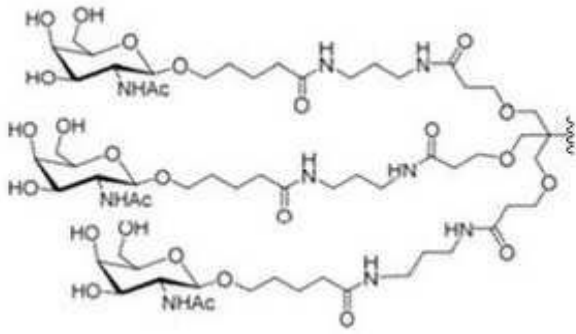


[1328]

[1329] [화학식 VI<sup>\*</sup>]

[1330] 10. 진술 6에 있어서, 분지형 GaINac가 포함하거나 이의 바이안테너리 형태 또는 이의 바이안테너리 형태를 포함하는 변형된 RNAi 작용제:





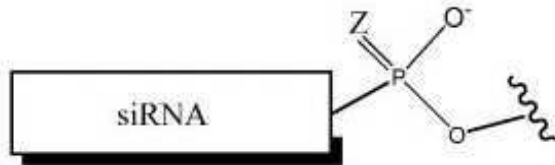
[1331]

[1332] [화학식 VII\*]

[1333] 또는 이의 바이안테너리 형태.

[1334] 11. 진술 1에 있어서, 테더가 센스 가닥의 5' 말단에 부착되는 변형된 RNAi 작용제.

[1335] 12. 진술 11에 있어서, 테더가 화학식 IV\*에 나타난 바와 같이 부착되는 변형된 RNAi 작용제:



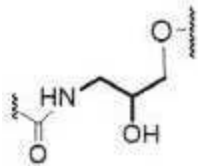
[1336]

[1337] [화학식 IV\*]

[1338] 여기서 Z는 P 또는 S이다.

[1339] 13. 진술 11에 있어서, 테더가 센스 가닥의 3' 말단에 부착되는 변형된 RNAi 작용제.

[1340] 14. 진술 13에 있어서, 테더가 화학식 V\*-a 또는 V\*-b에 나타난 바와 같이 부착되는 변형된 RNAi 작용제:



[1341]

[1342] [화학식 V\*-a]



[1343]

[1344] [화학식 V\*-b]

[1345] 15. 진술 1에 있어서, 도 41a, 41b, 41c 또는 41d에 나타난 바와 같은 변형된 RNAi 작용제.

[1346] 16. 진술 15에 있어서, RNAi 화합물이 2' 위치에서 변형되는 변형된 리보스를 포함하는 변형된 RNAi 작용제.

[1347] 17. 진술 16에 있어서, 변형이 2'-O-메틸, 2'-데옥시-플루오로 및 2'-데옥시로부터 선택되는 변형된 RNAi 작용제.

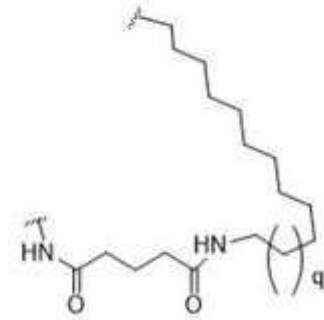
[1348] 18. 진술 1에 있어서, RNAI 화합물이 ASGP-R 리간드에 접합되지 않은 임의의 또는 모든 말단에서 하나 이상의 분해 보호 모이어티를 함유하는 변형된 RNAi 작용제.

[1349] 19. 진술 18에 있어서, 분해 보호 모이어티가 단독으로 또는 1-4개의 포스포로티오에이트 연결, 1-4개의 데옥시 뉴클레오타이드 및 1-4개의 역 무염기 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터의 임의의 조합으로서 선택되는 변형된

RNAi 작용제.

20. 진술 19에 있어서, 분해 보호 모이어티가 다음 작제물 9.1, 9.2, 9.3, 10.1, 10.2, 10.3, 11.1, 11.2, 11.3, 12.1, 12.2 및 12.3 중 하나에 존재하는 구성으로부터 선택되는 변형된 RNAi 작용제.

21. 테더를 통해 ASGP-R 리간드에 접합된 RNA 간섭 화합물(RNAi 화합물)을 포함하는 변형된 RNAi 작용제로서, 테더가 하기를 포함하는 변형된 RNAi 작용제:



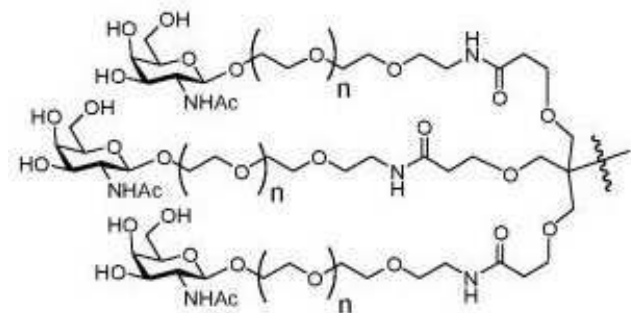
[화학식 III\*-2]

여기서 q는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8로부터 선택된다.

22. 진술 21에 있어서, q=1인 변형된 RNAi 작용제.

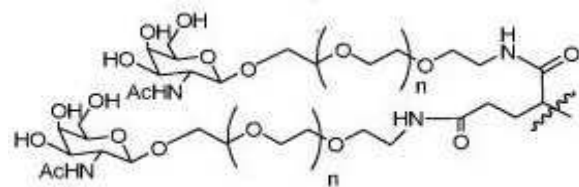
23. 진술 21에 있어서, ASGP-R 리간드가 분지형 GalNAc를 포함하는 변형된 RNAi 작용제.

24. 진술 23에 있어서, 분지형 GalNAc가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형된 RNAi 작용제:



[화학식 I\*]

및

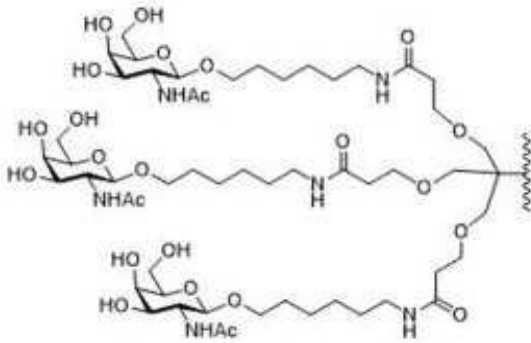


[화학식 II\*-a]

여기서 n은 0, 1, 2, 3 또는 4이다.

25. 진술 24에 있어서, n=1인 변형된 RNAi 작용제.

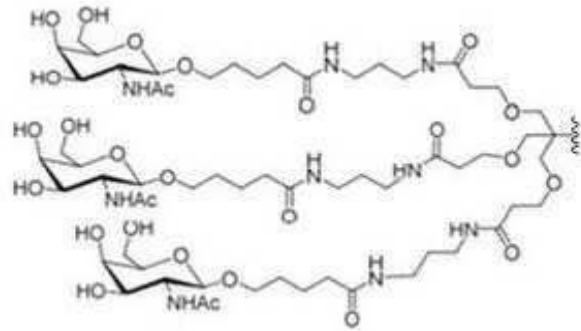
26. 진술 23에 있어서, 분지형 GalNAc가 하기를 포함하거나 이의 바이안테너리 형태를 포함하는 변형된 RNAi 작용제:



[1366]

[1367] [화학식 VI\*]

[1368] 27. 진술 23에 있어서, 분지형 GalNAc가 포함하거나 이의 바이안테너리 형태 또는 이의 바이안테너리 형태를 포함하는 변형된 RNAi 작용제:



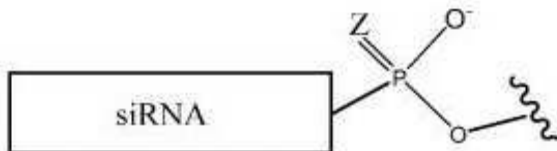
[1369]

[1370] [화학식 VII\*]

[1371] 또는 이의 바이안테너리 형태.

[1372] 28. 진술 21에 있어서, 테더가 센스 가닥의 5' 말단에 부착되는 변형된 RNAi 작용제.

[1373] 29. 진술 28에 있어서, 테더가 화학식 IV\*에 나타난 바와 같이 부착되는 변형된 RNAi 작용제:



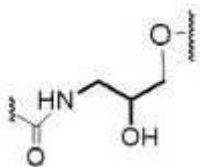
[1374]

[1375] [화학식 IV\*]

[1376] 여기서 Z는 P 또는 S이다.

[1377] 30. 진술 28에 있어서, 테더가 센스 가닥의 3' 말단에 부착되는 변형된 RNAi 작용제.

[1378] 31. 진술 30에 있어서, 테더가 화학식 V\*-a 또는 V\*-b에 나타난 바와 같이 부착되는 변형된 RNAi 작용제:



[1379]

[1380] [화학식 V<sup>\*</sup>-a]



[1381]

[1382] [화학식 V<sup>\*</sup>-b]

[1383] 32. 진술 31에 있어서, 도 42a, 42b, 42c 또는 42d에 나타낸 바와 같은 변형된 RNAi 작용제.

[1384] 33. 진술 21에 있어서, RNAi 화합물이 2' 위치에서 변형되는 변형된 리보스를 포함하는 변형된 RNAi 작용제.

[1385] 34. 진술 33에 있어서, 변형이 2'-O-메틸, 2' 테옥시-플루오로 및 2'-테옥시로부터 선택되는 변형된 RNAi 작용제.

[1386] 35. 진술 21에 있어서, siRNA가 ASGP-R 리간드에 접합되지 않은 임의의 또는 모든 말단에서 하나 이상의 분해 보호 모이어티를 함유하는 변형된 RNAi 작용제.

[1387] 36. 진술 35에 있어서, 분해 보호 모이어티가 단독으로 또는 1-4개의 포스포로티오에이트 연결, 1-4개의 테옥시 뉴클레오티드 및 1-4개의 역 무염기 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터의 임의의 조합으로서 선택되는 변형된 RNAi 작용제.

[1388] 37. 진술 36에 있어서, 분해 보호 모이어티가 다음 작제물 9.1, 9.2, 9.3, 10.1, 10.2, 10.3, 11.1, 11.2, 11.3, 12.1, 12.2 및 12.3 중 하나에 존재하는 구성으로부터 선택되는 변형된 RNAi 작용제.

[1389] 38. 실시예 11-15에 나타낸, 진술 1 또는 2의 RNAi 작용제를 제조하는 방법.

[1390] 39. 대상체에게 진술 1 또는 2의 RNAi 작용제를 질환을 예방, 완화 또는 치료하기에 효과적인 치료적 양으로 투여함으로써 질환을 예방, 완화 또는 치료하는 것을 포함하는, 대상체에서 질환을 예방, 완화 또는 치료하는 방법.

[1391] 40. 진술 40에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

서열 요약

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID | 센스 서열                                                                             | 안티센스 서열                                                                      | 클린 서열                  |
|-------|---------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1.    |         |         | 5' GalNAc~Gm-Am-Cm-Um-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Gm-Am-Am-Um-AmsUmsAm-ia-ia 3'       |                                                                              | gacuuuauccuggaaaauua   |
| 2.    |         |         |                                                                                   | 3' AmsCms-Cm-Um-Gm-Am-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gm-Gm-Am-Cf-Cf-Um-Uf-Um-Am-Ums AfsUm 5' | accugaaguaggaccuuuuauu |
| 3.    |         |         | 5' GalNAc~Am-Am-Gf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Af-Uf-Um-Uf-Um-Um-Af-Um-Af-AmsUmsAm-ia-ia 3' |                                                                              | aagcaagauuuuuuuuaaua   |
| 4.    |         |         |                                                                                   | 3' Td-Td-UmsUmsUm-Um-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Um-Am-Af-Am-Af-Am-Um-Af-Um         | uuuucguucuaaaaaauuuu   |

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID | 센스 서열                                                                          | 안티센스 서열                                                                    | 클린 서열                   |
|-------|---------|---------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
|       |         |         |                                                                                | -UfsAfsUm 5'                                                               |                         |
| 5.    |         |         | 5'GalNAc~Um-Gm-Gm-Gm-Am-Um-Uf-Um-Cf-Af-Uf-Gm-Um-Am-Cm-Cm-Am-AmsGmsAm-ia-ia 3'  |                                                                            | ugggauuucauguuacccaaga  |
| 6.    |         |         |                                                                                | 3' CmsUmsAm-Cm-Cm-Cm-Um-Af-Am-Af-Gm-Um-Am-Cm-Af-Um-Um-Gf-Gm-Um-UmsCfsUm 5' | cuaccuuaaaguacauugguucu |
| 7.    |         |         | 5' ia-ia-GmsAmsCm-Um-Um-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Um-Gm-Gm-Am-Am-Um-Um-Am-Um-Am~GalNAc 3' |                                                                            | gacuuucauccuggaaaauua   |
| 8.    |         |         |                                                                                | 3' AmsCmsCm-Um-Gm-Am-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gm-Gm-Am-Cf-Cf-Um-Uf-Um-Am-Ums         | accugaaaguaggaccuuuuauu |

[1394]



| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID | 센스 서열                                                                             | 안티센스 서열                                                                          | 클린 서열                  |
|-------|---------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|       |         |         |                                                                                   | AfsUm 5'                                                                         |                        |
| 9.    |         |         | 5' ia-ia-AmsAmsGf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Af-Uf-Um-Uf-Um-Um-Af-Um-Af-Am-Um-Am~GalNAc 3' |                                                                                  | aagcaagauuuuuuuuaaaua  |
| 10.   |         |         |                                                                                   | 3'Td-Td-UmsUmsUm-Um-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Um-A-m-Af-Am-Af-Am-Um-Af-Um-UfsAfsUm 5' | uuuucguucuaaaaaauuuau  |
| 11.   |         |         | 5' ia-ia-UmsGmsGm-Gm-Am-Um-Uf-Um-Cf-Af-Uf-Gm-Um-Am-Am-Cm-Cm-Am-Am-Gm-Am~GalNAc 3' |                                                                                  | ugggauuuuauaauaaccaga  |
| 12.   |         |         |                                                                                   | 3' CmsUmsAm-Cm-Cm-Cm-Um-Af-Am-Af-Gm-Um-Am-Cm-Af-Um-Um-Gf-Gm-Um-Ums               | cuaccuaaaguacauugguucu |

[1395]

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID | 센스 서열                                                                        | 안티센스 서열                                                                    | 클린 서열                 |
|-------|---------|---------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
|       |         |         |                                                                              | CfsUm 5'                                                                   |                       |
| 13.   |         |         | 5'GalNAc~Gf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af-Um-AfsUmsAf 3'   |                                                                            | gacuuucauccuggaaauua  |
| 14.   |         |         |                                                                              | 3' AmsCfsCm-Uf-Gm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Af-UmsAfsUm 5' | accugaagaaggaccuuuuuu |
| 15.   |         |         | 5' GalNAc~Af-Am-Gf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-A m-Uf-Um-Uf-Um-Af-Am-Uf-Am-AfsUmsAf 3' |                                                                            | aagcaagaauuuuuuuuaa   |
| 16.   |         |         |                                                                              | 3' Td-UmsUfsUm-Uf-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Uf-Am-Af-Am-Uf-UmsAfsUm 5'          | uuuucguucuuaaaaauuuu  |

[1396]

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID | 센스 서열                                                                       | 안티센스 서열                                                                    | 클린 서열                  |
|-------|---------|---------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 17.   |         |         | 5' GalNAc~Uf-Gm-Gf-Gm-Af-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Cf-Am-AfsGmsAf 3' |                                                                            | uggauuucauguaccaaga    |
| 18.   |         |         |                                                                             | 3' CmsUfsAm-Cf-Cm-Cf-Um-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Cf-Am-Uf-Um-Gf-Gm-Uf-UmsCfsUm 5' | cuaccuaaaguacuugguucu  |
| 19.   |         |         | 5' GfsAmsCf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af-Um-Af-Um-Af~GalNAc 3' |                                                                            | gacuuucauccuggaaaaua   |
| 20.   |         |         |                                                                             | 3' AmsCfsCm-Uf-Gm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Af-UmsAfsUm 5' | accugaaguaggaccuuuuauu |
| 21.   |         |         | 5' AfsAmsGf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Af-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Am-Uf-Am-Af-Um-Af~GalNAc    |                                                                            | aagcaagauuuuuuuuuaua   |

[1397]

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID | 센스 서열                                                                       | 안티센스 서열                                                                    | 클린 서열                   |
|-------|---------|---------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
|       |         |         | 3'                                                                          |                                                                            |                         |
| 22.   |         |         |                                                                             | 3' Td-UmsUfsUm-Uf-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Uf-Am-Af-Am-Uf-Am-Uf-UmsAfsUm 5'    | uuuucguucuaauaaaaauuuau |
| 23.   |         |         | 5' UfsGmsGf-Gm-Af-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Cf-Am-Af-Gm-Af-GalNac 3' |                                                                            | ugggauuuucauguaaccaaga  |
| 24.   |         |         |                                                                             | 3' CmsUfsAm-Cf-Cm-Cf-Um-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Cf-Am-Uf-Um-Gf-Gm-Uf-UmsCfsUm 5' | cuaccuuaaguaauugguucu   |

[1398]

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID | 센스 서열 5' → 3'                                                                           | 안티센스 서열 5' → 3'                  | 클린 서열                    |
|-------|---------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| 25.   | ETX005  |         | (invabasic)(invabasic)gsascuu<br>uCfaUfCfCfuggaaauasusa(NH<br>C6)(MFCO)(ET-GalNac-T1N3) |                                  | gacuuuuccuggaaauaua      |
| 26.   | ETX005  |         |                                                                                         | usAfsuuUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa | uuuuuuuccaggauagaaagucca |
| 27.   | ETX001  |         | (ET-GalNac-T1N3)(MFCO)(NH<br>-DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaa<br>auasusa(invabasic)(invabasic) |                                  | gacuuuuccuggaaauaua      |
| 28.   | ETX001  |         |                                                                                         | usAfsuuUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa | uuuuuuuccaggauagaaagucca |
| 29.   | ETX014  |         | (invabasic)(invabasic)asasGfcA<br>faGfaUfAfufuUfuuAfua(N<br>HC6)(MFCO)(ET-GalNac-T1N    |                                  | aagcaagauuuuuuuaua       |

[1399]

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID | 센스 서열 5' → 3'                                                                      | 안티센스 서열 5' → 3'                          | 클린 서열                   |
|-------|---------|---------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|
|       |         |         | 3)                                                                                 |                                          |                         |
| 30.   | ETX014  |         |                                                                                    | usAfsUfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuususu<br>dTdT | uauuauaaaaauauucucuuuuu |
| 31.   | ETX010  |         | (ET-GalNAc-T1N3)(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfuAfasusa(invabasic)(invabasic) |                                          | aagcaagauuuuuuuuauaua   |
| 32.   | ETX010  |         |                                                                                    | usAfsUfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuususu<br>dTdT | uauuauaaaaauauucucuuuuu |
| 33.   | ETX019  |         | (ET-GalNAc-T1N3)(MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfaUfguaacaagsa(invabasic)(invabasic)       |                                          | ugggauuuucauguaaccaaga  |

[1400]



| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID  | 센스 서열 5' → 3'                                                                         | 안티센스 서열 5' → 3'                 | 클린 서열                  |
|-------|---------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| 34.   | ETX019  |          |                                                                                       | usCfsuugGfuuAfaugAfaAfuuccasusc | ucuugguuacaugaauuccauc |
| 35.   | ETX023  |          | (invabasic)(invabasic)usgsgga<br>uUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC<br>6)(MFCO)(ET-GalNAc-T1N3) |                                 | ugggaauucauguuaaccaaga |
| 36.   | ETX023  |          |                                                                                       | usCfsuugGfuuAfaugAfaAfuuccasusc | ucuugguuacaugaauuccauc |
| 37.   |         | XD-00914 | cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsd<br>T                                                          |                                 | cuuacgcugaguacuucga    |
| 38.   |         | XD-00914 |                                                                                       | UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdt        | ucgaaguacucagcguuag    |
| 39.   |         | XD-03999 | AGAuAuGcAcAcAcAcGGAdTs<br>dT                                                          |                                 | agauaugcacacacgga      |

[1401]

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID      | 센스 서열 5' → 3'                                                     | 안티센스 서열 5' → 3'                     | 클린 서열                |
|-------|---------|--------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| 40.   |         | XD-03<br>999 |                                                                   | UCCGUGUGUGGcAuAUCUdTsdT             | uccgugugugcuaucuu    |
| 41.   |         | XD-15<br>421 | uscsUfcGfuGfgCfcUfuAfaUfgA<br>faAf(invdT)                         |                                     | ucucguggccuuuaugaaa  |
| 42.   |         | XD-15<br>421 |                                                                   | UfsUfsuCfaUfuAfaGfgCfcAfcGfaGfasusu | uuucauuaggccacgagauu |
| 43.   |         | X9138<br>2   | (NH2-DEG)gacuuuCfaUfcCfu<br>ggaaauasusa(invabasic)(invabasic)     |                                     | gacuucauccuggaaauua  |
| 44.   |         | X9138<br>3   | (NH2-DEG)aaGfcAfaGfaUfaU<br>fuUfuUfaUfasusa(invabasic)(invabasic) |                                     | aagcaagauuuuuuuuaaua |

[1402]

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID    | 센스 서열 5' → 3'                                                         | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                  |
|-------|---------|------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------|
| 45.   |         | X9138<br>4 | (NH2-DEG)ugggauUfuCfAfuf<br>guaaccaasgsa(invabasic)(inva<br>basic)    |                 | ugggauuucauguuaaccaaga |
| 46.   |         | X9140<br>3 | (NH2C12)gacuuuCfaUfcCfug<br>gaaauasusa(invabasic)(invaba<br>sic)      |                 | gacuuucauccuggaaaauua  |
| 47.   |         | X9140<br>4 | (NH2C12)aaGfcAfaGfaUfAfuf<br>uUfuAfuaFasusa(invabasic)(i<br>nvabasic) |                 | aagcaagauuuuuuuuaaua   |
| 48.   |         | X9140<br>5 | (NH2C12)ugggauUfuCfAfufg<br>uaaccaasgsa(invabasic)(invab<br>asic)     |                 | ugggauuucauguuaaccaaga |
| 49.   |         | X9141<br>5 | (invabasic)(invabasic)gsascuu<br>uCfaUfcCfugaaaauasusa(NH             |                 | gacuuucauccuggaaaauua  |

[1403]

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID | 센스 서열 5' → 3'                                            | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                  |
|-------|---------|---------|----------------------------------------------------------|-----------------|------------------------|
|       |         |         | 2C6)                                                     |                 |                        |
| 50.   |         | X91416  | (invabasic)(invabasic)asasGfCfaGfaUfAfUfuUfuuAfua(NH2C6) |                 | aagcaagauuuuuuuuaaua   |
| 51.   |         | X91417  | (invabasic)(invabasic)usgsggaUfuCfAfUfguaaccaaga(NH2C6)  |                 | ugggauuuucauguaaccaaga |
| 52.   |         | X91379  | gsascuuuCfaUfCfCfuggaaua(GalNAc)                         |                 | gacuuucauccuggaaua     |
| 53.   |         | X91380  | asasGfCfaGfaUfAfUfuUfuuAfua(GalNAc)                      |                 | aagcaagauuuuuuuuaaua   |
| 54.   |         | X91446  | usgsggaUfuCfAfUfguaacca(GalNAc)                          |                 | ugggauuuucauguaaccaaga |

[1404]

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID    | 센스 서열 5' → 3'                                                             | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                     |
|-------|---------|------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------|
| 55.   |         | X3848<br>3 | usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaa<br>gucscsa                                     |                 | uaauuuucccaggaaagucca     |
| 56.   |         | X9138<br>1 | usAfsUfuAfuAfaAfaUfuUfu<br>GfcuusudTdT                                    |                 | uaauuaaaaaauucucugcuuuu   |
| 57.   |         | X3810<br>4 | usCfsuugGfuUfcaugAfaAfucc<br>casusc                                       |                 | uccuugguuacauagaaaucccauc |
| 58.   |         | X9138<br>8 | (MFCO)(NH-DEG)gacuuUcfaU<br>fCfCfuggaaaasusa(invabasic)<br>(invabasic)    |                 | gacuuucaucccuggaaaauua    |
| 59.   |         | X9138<br>9 | (MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfa<br>UfAfUfuUfuUfAfuAfasusa(invabasic)(invabasic) |                 | aagcaagauuuuuuuuaaua      |

[1405]

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID | 센스 서열 5' → 3'                                                     | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                  |
|-------|---------|---------|-------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------|
| 60.   |         | X91390  | (MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfaUfguaaccaagsa(invabasic)(invabasic)     |                 | ugggauuucauguuaaccaaga |
| 61.   |         | X91421  | (invabasic)(invabasic)gsascuuCfaUfCfCfuggaaaauasusa(NH C6) (MFCO) |                 | gacuuuauccuggaaaauua   |
| 62.   |         | X91422  | (invabasic)(invabasic)asasGfcafaGfaUfaUfuUfuUfaUfaUa(NHC6)(MFCO)  |                 | aagcaagaauuuuuuaaua    |
| 63.   |         | X91423  | (invabasic)(invabasic)usgsngaUfuCfaUfguaaccaaga(NHC6) (MFCO)      |                 | ugggauuucauguuaaccaaga |
| 64.   |         | X91394  | (GalNAC-T1)(MFCO)(NH-DEG)gacuuuUfaUfCfCfuggaaaauasu               |                 | gacuuuauccuggaaaauua   |

[1406]



| 서열 ID | 튜플<br>렉스<br>ID | ssRN<br>ID | 센스 서열 5' → 3'                                                                           | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                   |
|-------|----------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------|
|       |                |            | sa(invabasic)(invabasic)                                                                |                 |                         |
| 65.   |                | X9139<br>5 | (GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)<br>aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUafu<br>Afasusa(invabasic)(invabasic) |                 | aagcaagauuuuuuuuuaaua   |
| 66.   |                | X9139<br>6 | (GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)<br>ugggauUfuCfaUfguaaccaasg<br>sa(invabasic)(invabasic)       |                 | ugggauuuucauguuaaccaaga |
| 67.   |                | X9142<br>7 | (invabasic)(invabasic)gsascuu<br>uCfaUfCfcfuggaaaasusa(NH<br>C6)(MFCO)(GalNAc-T1)       |                 | gacuuucaucccggaauua     |
| 68.   |                | X9142<br>8 | (invabasic)(invabasic)asasGfcA<br>faGfaUfAfUfuUfuUafuAfaua(N<br>HC6)(MFCO)(GalNAc-T1)   |                 | aagcaagauuuuuuuuuaaua   |

[1407]

| 서열 ID | 튜플<br>렉스<br>ID | ssRN<br>ID | 센스 서열 5' → 3'                                                                    | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                   |
|-------|----------------|------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------|
| 69.   |                | X9142<br>9 | (invabasic)(invabasic)usgsgga<br>uUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC<br>6)(MFCO)(GalNAc-T1) |                 | ugggauuuucauguaccaaga   |
| 70.   | ETX0<br>01     | X9139<br>4 | (GalNAc-T1)(MFCO)(NHDEG)<br>gacuuuCfaUfCfuggaaauasu<br>sa(invabasic)(invabasic)  |                 | gacuuuuccuggaaauua      |
| 71.   |                | X3848<br>3 | usAfsuauUfuCfCfaggauUfgAfaa<br>gucscsa                                           |                 | uaauuuuccaggauaaaagucca |
| 72.   | ETX0<br>05     | X9142<br>7 | (invabasic)(invabasic)gsascuu<br>uCfaUfCfuggaaauasusa(NH<br>C6)(MFCO)(GalNAc-T1) |                 | gacuuuuccuggaaauua      |
| 73.   |                | X3848<br>3 | usAfsuauUfuCfCfaggauUfgAfaa<br>gucscsa                                           |                 | uaauuuuccaggauaaaagucca |

[1408]

| 서열 ID | 류플<br>렉스<br>ID | ssRN<br>ID | 센스 서열 5' → 3'                                                                           | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                   |
|-------|----------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------|
| 74.   | ETX0<br>10     | X9139<br>5 | (GalNac-T1)(MFCO)(NH-DEG)<br>aaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfuAfu<br>Afasua(invabasic)(invabasic) |                 | aagcaagauuuuuuuuaaaua   |
| 75.   |                | X9138<br>1 | usAfsUfuAfuAfaAfaUfcUfu<br>GfcuusudTdT                                                  |                 | uuuuuaaaaaauucucugcuuuu |
| 76.   | ETX0<br>14     | X9142<br>8 | (invabasic)(invabasic)asasGfcA<br>faGfaUfaUfuUfuUfuAfuAfaUa(N<br>HC6)(MFCO)(GalNac-T1)  |                 | aagcaagauuuuuuuuaaaua   |
| 77.   |                | X9138<br>1 | usAfsUfuAfuAfaAfaUfcUfu<br>GfcuusudTdT                                                  |                 | uuuuuaaaaaauucucugcuuuu |
| 78.   | ETX0<br>19     | X9139<br>6 | (GalNac-T1)(MFCO)(NH-DEG)<br>ugggauUfuCfAfuAfaaaccasg<br>sa(invabasic)(invabasic)       |                 | ugggauuuucauguaaccaaga  |

| 서열 ID | 듀플렉스 ID    | ssRN ID    | 센스 서열 5' → 3'                                                                     | 안티센스 서열 5' → 3'                 | 클린 서열                     |
|-------|------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| 79.   |            | X3810<br>4 | usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucc<br>casusc                                              |                                 | ucuugguuacaucaaaaucuccauc |
| 80.   | ETX0<br>23 | X9142<br>9 | (invabasic)(invabasic)usgsgga<br>uUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC<br>6)(MFCO)(GalNAc-T1)  |                                 | ugggaaauucauguaaccaaga    |
| 81.   |            | X3810<br>4 | usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucc<br>casusc                                              |                                 | ucuugguuacaucaaaaucuccauc |
| 82.   | ETX0<br>06 |            | (invabasic)(invabasic)gsascuu<br>uCfaUfCfCfuggaaauasusa(NH<br>C6)(ET-GalNAc-T2CO) |                                 | gacuuucauccuggaaauaia     |
| 83.   | ETX0<br>06 |            |                                                                                   | usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucsa | uaauuuuccagggaagaagucca   |

[1410]

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID | 센스 서열 5' → 3'                                                                   | 안티센스 서열 5' → 3'                             | 클린 서열                   |
|-------|---------|---------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------|
| 84.   | ETX002  |         | (ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)g<br>acuuuCfaUfCfCfuggaaauas<br>a(invabasic)(invabasic) |                                             | gacuuuauccuccuggaaaauua |
| 85.   | ETX002  |         |                                                                                 | usAfsuuUfuCfCfaggaUfgAfaagucsa              | uauuuuccagggaagaagucca  |
| 86.   | ETX004  |         | (ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)G<br>faCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfu<br>AfsusAf              |                                             | gacuuuauccuccuggaaaauua |
| 87.   | ETX004  |         |                                                                                 | usAfsuAfuUfuCfCfAfgGfaUfgAfaAfgUfcsC<br>fsa | uauuuuccagggaagaagucca  |
| 88.   | ETX008  |         | GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfa<br>AfuAfuAf(NHHC6)(ET-GalNAc-T<br>2CO)               |                                             | gacuuuauccuccuggaaaauua |

[1411]

| 서열 ID | 듀플렉스 ID           | ssRN ID | 센스 서열 5' → 3'                                                                       | 안티센스 서열 5' → 3'                            | 클린 서열                  |
|-------|-------------------|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------|
| 89.   | ETX008            |         |                                                                                     | usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfcsC<br>fsa | uauuuuccaggagaaagucca  |
| 90.   | ECX008<br>(낮은 순도) |         | GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuA(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)                             |                                            | gacuuucauccuggaaaauua  |
| 91.   | ECX008<br>(낮은 순도) |         |                                                                                     | usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfcsC<br>fsa | uauuuuccaggagaaagucca  |
| 92.   | ETX011            |         | (ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)a<br>aGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic) |                                            | aagcaagauuuuuuuuuuuuaa |

[1412]



[illegible]

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID | 센스 서열 5' → 3'                                                                    | 안티센스 서열 5' → 3'                            | 클린 서열                     |
|-------|---------|---------|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|
| 98.   | ETX017  |         | AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfaUfaAfuAf(NHC6)(ET-GalNAC-T2CO)                            |                                            | aagcaagauuuuuuuuaaaua     |
| 99.   | ETX017  |         |                                                                                  | usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT | uaauuaaaaaauauucuuugcuuuu |
| 100.  | ETX020  |         | (ET-GalNAC-T2CO)(NH2C12)u<br>gggauUfuCfaUfguaaccaasgs<br>a(invabasic)(invabasic) |                                            | ugggauuuucauguaaccaaga    |
| 101.  | ETX020  |         |                                                                                  | usCfsuugGfuUfcaugAfaAfucccasusc            | ucuuugguuacaugaaaauccauc  |
| 102.  | ETX022  |         | (ET-GalNAC-T2CO)(NH2C12)U<br>fgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfa<br>AfsGsAf               |                                            | ugggauuuucauguaaccaaga    |

[1414]

| 서열 ID | 듀플렉스 ID    | ssRN ID | 센스 서열 5' → 3'                                                                  | 안티센스 서열 5' → 3'                            | 클린 서열                   |
|-------|------------|---------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------|
| 103.  | ETX0<br>22 |         |                                                                                | usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasU<br>fsc | ucuugguuacaugaaaauccauc |
| 104.  | ETX0<br>24 |         | (invabasic)(invabasic)usgsgga<br>uUfuCfaUfguaaccaaga(NHC<br>6)(ET-GalNac-T2CO) |                                            | ugggauucauguaaccaaga    |
| 105.  | ETX0<br>24 |         |                                                                                | usCfsuugGfuUfaCfaUfgAfaAfuuccasuc          | ucuugguuacaugaaaauccauc |
| 106.  | ETX0<br>26 |         | UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfc<br>CfaAfgAf(NHC6)(ET-GalNac-T<br>2CO)               |                                            | ugggauucauguaaccaaga    |
| 107.  | ETX0<br>26 |         |                                                                                | usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasU<br>fsc | ucuugguuacaugaaaauccauc |

[1415]

| 서열 ID | 클러스터 ID      | ssRN ID | 센스 서열 5' → 3'                             | 안티센스 서열 5' → 3'                     | 클린 서열                 |
|-------|--------------|---------|-------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| 108.  | XD-0<br>0914 |         | cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsd<br>T              |                                     | cuuacgcugaguacuucga   |
| 109.  | XD-0<br>0914 |         |                                           | UCGAAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT           | ucgaaguacucagcguaag   |
| 110.  | XD-0<br>3999 |         | AGAUuGcAcAcAcAcGGAdTs<br>dT               |                                     | agauaugcacacacgga     |
| 111.  | XD-0<br>3999 |         |                                           | UCCGUGUGUGGcAuAUCUdTsdT             | uccgugugugcuaucuu     |
| 112.  | XD-1<br>5421 |         | uscsUfcGfuGfgCfcUfuAfaUfgA<br>faAf(invdT) |                                     | ucucguggccuuauugaaa   |
| 113.  | XD-1<br>5421 |         |                                           | UfsUfsuCfaUfuAfaGfgCfcAfcGfaGfasusu | uuucauuuaggccacgagauu |

[1416]

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID    | 센스 서열 5' → 3'                                                 | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                  |
|-------|---------|------------|---------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------|
| 114.  |         | X9138<br>2 | (NH2-DEG)gacuuuCfaUfCfcfu<br>ggaauasusa(invabasic)(invabasic) |                 | gacuuucauccuggaaaauua  |
| 115.  |         | X9138<br>3 | (NH2-DEG)aaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfasusa(invabasic)(invabasic) |                 | aagcaagauuuuuuuuuuaaua |
| 116.  |         | X9138<br>4 | (NH2-DEG)ugggauUfuCfaUfuguaccaasgsa(invabasic)(invabasic)     |                 | ugggauuuucauguaaccaaga |
| 117.  |         | X9138<br>5 | (NH2-DEG)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf                   |                 | gacuuucauccuggaaaauua  |
| 118.  |         | X9138<br>6 | (NH2-DEG)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsusAf                   |                 | aagcaagauuuuuuuuuuaaua |

[1417]

| 서열 ID | 튜플<br>레스<br>ID | ssRN<br>ID | 센스 서열 5' → 3'                                                        | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                |
|-------|----------------|------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------------|
| 119.  |                | X9138<br>7 | (NH2-DEG)UfgGfgAfuUfuCfa<br>UfgUfaAfcCfaAfsGsAf                      |                 | ugggauuucauguaccaaga |
| 120.  |                | X9140<br>3 | (NH2C12)gacuuuCfaUfcCfug<br>gaauasusa(invabasic)(invaba<br>sic)      |                 | gacuucauccuggaaaaua  |
| 121.  |                | X9140<br>4 | (NH2C12)aaGfcAfaGfaUfaUf<br>uUfuAfuAfasusa(invabasic)(i<br>nvabasic) |                 | aagcaagauuuuuuuuaaua |
| 122.  |                | X9140<br>5 | (NH2C12)ugggauUfuCfaUfg<br>uaaccaasgsa(invabasic)(invab<br>asic)     |                 | ugggauuucauguaccaaga |
| 123.  |                | X9140<br>6 | (NH2C12)GfaCfuUfuCfaUfcCf<br>uGfgAfaAfuAfsusAf                       |                 | gacuucauccuggaaaaua  |



| 서열 ID | 뉴클레오타이드 ID | ssRN ID    | 센스 서열 5' → 3'                                                       | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                 |
|-------|------------|------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------------|
| 124.  |            | X9140<br>7 | (NH2C12)AfaGfcAfaGfaUfaUf<br>uUfuUfaUfaAfsusAf                      |                 | aagcaagauuuuuuuuaaaua |
| 125.  |            | X9140<br>8 | (NH2C12)UfgGfgAfuUfuCfaUf<br>gUfaAfcCfaAfsGsAf                      |                 | ugggauuucauguaaccaaga |
| 126.  |            | X9141<br>5 | (invabasic)(invabasic)gsascuu<br>uCfaUfCfCfuggaaaasusa(NH<br>2C6)   |                 | gacuucauccuggaaaua    |
| 127.  |            | X9141<br>6 | (invabasic)(invabasic)asasGfcA<br>faGfaUfaUfuUfuUfaUfaUa(N<br>H2C6) |                 | aagcaagauuuuuuuuaaaua |
| 128.  |            | X9141<br>7 | (invabasic)(invabasic)usgsgga<br>uUfuCfaUfUfguaaccaaga(NH2C<br>6)   |                 | ugggauuucauguaaccaaga |

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID    | 센스 서열 5' → 3'                                 | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                  |
|-------|---------|------------|-----------------------------------------------|-----------------|------------------------|
| 129.  |         | X9141<br>8 | GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfa<br>AfuAfuAf(NH2C6) |                 | gacuuucauccugaaaauua   |
| 130.  |         | X9141<br>9 | AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfa<br>UfaAfuAf(NH2C6) |                 | aagcaagauuuuuuuuuuaa   |
| 131.  |         | X9142<br>0 | UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfc<br>CfaAfgAf(NH2C6) |                 | ugggauuuucauguaaccaaga |
| 132.  |         | X9137<br>9 | gsascuuuCfaUfcCfcugaaaaua<br>ua(GalNAc)       |                 | gacuuucauccugaaaauua   |
| 133.  |         | X9138<br>0 | asasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfa<br>uAfaua(GalNAc)   |                 | aagcaagauuuuuuuuuuaa   |
| 134.  |         | X9144<br>6 | usgggauUfuCfaUfguaacaa<br>ga(GalNAc)          |                 | ugggauuuucauguaaccaaga |

[1420]

| 서열 ID | 뉴클레오타이드 ID | ssRNA ID   | 센스 서열 5' → 3'                                  | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                     |
|-------|------------|------------|------------------------------------------------|-----------------|---------------------------|
| 135.  |            | X3848<br>3 | usAfsuauUfuCfcfaggaUfgAfaa<br>gucscsa          |                 | uaauuuuccagggaugaaaagucca |
| 136.  |            | X9138<br>1 | usAfsUfuAfaaAfaAfaUfuUfu<br>GfcuusudTdT        |                 | uaauuaaaaaauaucuugcuuuu   |
| 137.  |            | X3810<br>4 | usCfsuugGfuuaAfaugAfaAfucc<br>casusc           |                 | ucuuuguuacaugaaaaucccauc  |
| 138.  |            | X9139<br>8 | usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAf<br>aAfgUfcsCfsa     |                 | uaauuuuccagggaugaaaagucca |
| 139.  |            | X9140<br>0 | usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUf<br>uGfcUfusUfsudTdT |                 | uaauuaaaaaauaucuugcuuuu   |
| 140.  |            | X9140<br>2 | usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAf<br>uCfcCfasUfsc     |                 | ucuuuguuacaugaaaaucccauc  |

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID | 센스 서열 5' → 3'                                                            | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                  |
|-------|---------|---------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------|
| 141.  |         | X91409  | (GalNAc-T2)(NH2C12)gacuuu<br>CfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic) |                 | gacuuucauccuggaaaauua  |
| 142.  |         | X91410  | (GalNAc-T2)(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfasusa(invabasic)(invabasic)  |                 | aagcaagauuuuuuuuuuaaua |
| 143.  |         | X91411  | (GalNAc-T2)(NH2C12)ugggauUfuCfaUfuUguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)    |                 | ugggauuucauguaaccaaga  |
| 144.  |         | X91412  | (GalNAc-T2)(NH2C12)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaUfaUfasusAf                   |                 | gacuuucauccuggaaaauua  |
| 145.  |         | X91413  | (GalNAc-T2)(NH2C12)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfasusA                       |                 | aagcaagauuuuuuuuuuaaua |

| 서열 ID | 듀플렉스 ID | ssRN ID            | 센스 서열 5' → 3'                                                                 | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                |
|-------|---------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------------|
|       |         |                    | f                                                                             |                 |                      |
| 146.  |         | X9141 <sub>4</sub> | (GalNAc-T2)(NH <sub>2</sub> C12)UfgGfg<br>AfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsGs<br>Af    |                 | uggauuucauguaaccaaga |
| 147.  |         | X9143 <sub>3</sub> | (invabasic)(invabasic)gsascuu<br>uCfaUfCfCfuggaaaasusa(NH<br>C6)(GalNAc-T2)   |                 | gacuucauccuggaaaaua  |
| 148.  |         | X9143 <sub>4</sub> | (invabasic)(invabasic)asasGfca<br>faGfaUfaUfuUfuUfaAfaUa(N<br>HC6)(GalNAc-T2) |                 | aagcaagauuuuuuuuaua  |
| 149.  |         | X9143 <sub>5</sub> | (invabasic)(invabasic)usgsgga<br>uUfuCfaUfguaaccaaga(NHC<br>6)(GalNAc-T2)     |                 | uggauuucauguaaccaaga |

[1423]

| 서열 ID | 듀플렉스 ID    | ssRN ID    | 센스 서열 5' → 3'                                                               | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                    |
|-------|------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 150.  |            | X9143<br>6 | GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfa<br>AfuAfuAf(NHC6)(GalNAc-T2)                     |                 | gacuuucauccuggaaaauaa    |
| 151.  |            | X9143<br>7 | AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfa<br>UfaAfuAf(NHC6)(GalNAc-T2)                     |                 | aagcaagauuuuuuuuaauaa    |
| 152.  |            | X9143<br>8 | UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfc<br>CfaAfgAf(NHC6)(GalNAc-T2)                     |                 | uggauuuucauguaaccaaga    |
| 153.  | ETX0<br>02 | X9140<br>9 | (GalNAc-T2)(NH2C12)gacuuu<br>CfaUfcCfcuggaaauasusa(inv<br>basic)(invabasic) |                 | gacuuucauccuggaaaauaa    |
| 154.  |            | X3848<br>3 | usAfsuauUfuCfcfaggaUfgAfaa<br>gucscsa                                       |                 | uaauuuuccagggaagaaagucca |
| 155.  | ETX0<br>04 | X9141<br>2 | (ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)G<br>faCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfu                     |                 | gacuuucauccuggaaaauaa    |



| 서열 ID | 듀플렉스 ID    | ssRN ID    | 센스 서열 5' → 3'                                                                | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                   |
|-------|------------|------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------|
|       |            |            | AfsusAf                                                                      |                 |                         |
| 156.  |            | X9139<br>8 | usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAf<br>aAfgUfcsCfsa                                   |                 | uauuuuccagggaagaaagucca |
| 157.  | ETX0<br>06 | X9143<br>3 | (invabasic)(invabasic)gsascuu<br>uCfaUfCfCfuggaaauasusa(NH<br>C6)(GalNAc-T2) |                 | gacuuucauccuggaaauua    |
| 158.  |            | X3848<br>3 | usAfsuauUfuCfcfaggalUfgAfaa<br>gucscsa                                       |                 | uauuuuccagggaagaaagucca |
| 159.  | ETX0<br>08 | X9143<br>6 | GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfa<br>AfuAfuAf(NHC6)(GalNAc-T2)                      |                 | gacuuucauccuggaaauua    |
| 160.  |            | X9139<br>8 | usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAf<br>aAfgUfcsCfsa                                   |                 | uauuuuccagggaagaaagucca |

[1425]

| 서열 ID | 튜플<br>렉스<br>ID | ssRN<br>ID | 센스 서열 5' → 3'                                                                        | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                   |
|-------|----------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------|
| 161.  | ETX0<br>11     | X9141<br>0 | (GalNAc-T2)(NH <sub>2</sub> C12)aaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaAfasusa(invabasic)(invabasic) |                 | aagcaagaauuuuuuaaaua    |
| 162.  |                | X9138<br>1 | usAfsUfaUfaAfaAfaUfUfuGfcuusudTdT                                                    |                 | uaauuaaaaaauucucugcuuuu |
| 163.  | ETX0<br>13     | X9141<br>3 | (GalNAc-T2)(NH <sub>2</sub> C12)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsuAf                    |                 | aagcaagaauuuuuuaaaua    |
| 164.  |                | X9140<br>0 | usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT                                           |                 | uaauuaaaaaauucucugcuuuu |
| 165.  | ETX0<br>15     | X9143<br>4 | (invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaAfaUa(NHC6)(GalNAc-T2)                |                 | aagcaagaauuuuuuaaaua    |



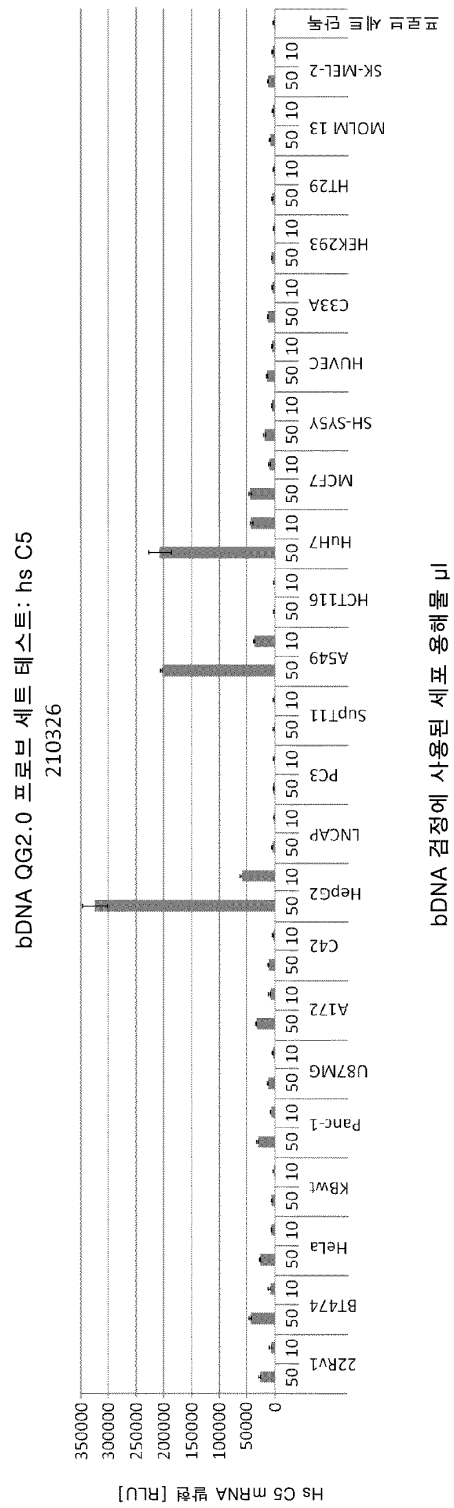
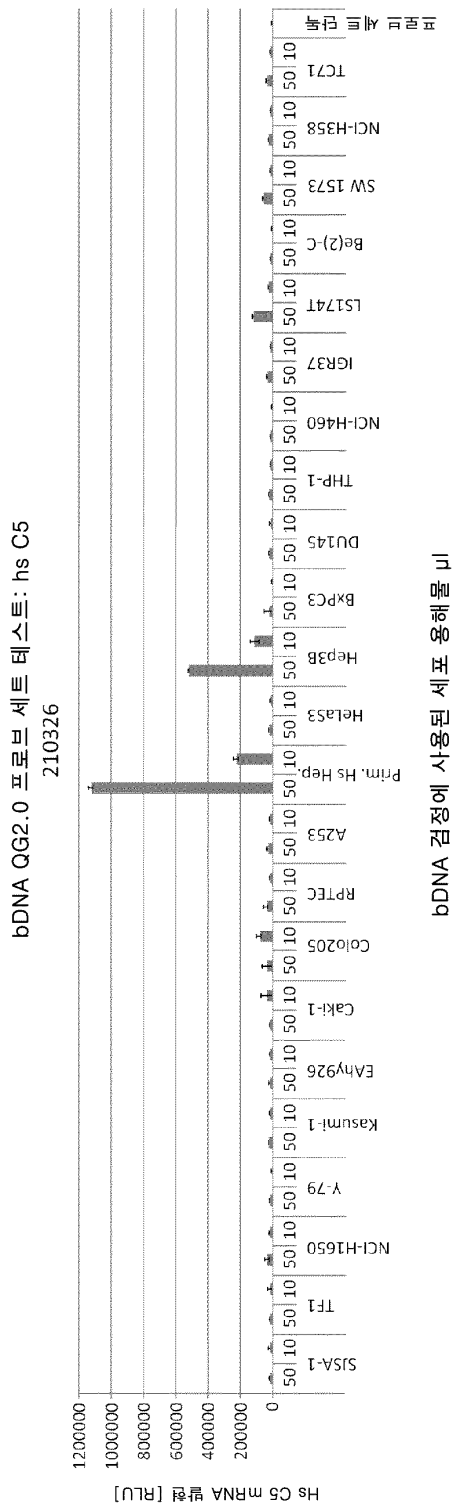
| 서열 ID | 듀플렉스 ID    | ssRN ID    | 센스 서열 5' → 3'                                                              | 안티센스 서열 5' → 3' | 클린 서열                   |
|-------|------------|------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------|
|       |            |            | Af                                                                         |                 |                         |
| 172.  |            | X9140<br>2 | usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAf<br>uCfcCfasUfsc                                 |                 | ucuugguuacaugaaaucccauc |
| 173.  | ETX0<br>24 | X9143<br>5 | (invabasic)(invabasic)usgsgga<br>uUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC<br>6)(GalNAc-T2) |                 | ugggauuucauguaaccaaga   |
| 174.  |            | X3810<br>4 | usCfsuugGfuUfaCfaUfgAfaAfucc<br>casusc                                     |                 | ucuugguuacaugaaaucccauc |
| 175.  | ETX0<br>26 | X9143<br>8 | UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfc<br>CfaAfgAf(NHC6)(GalNAc-T2)                    |                 | ugggauuucauguaaccaaga   |
| 176.  |            | X9140<br>2 | usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAf<br>uCfcCfasUfsc                                 |                 | ucuugguuacaugaaaucccauc |

키(Key):

|        |                                                                                                                                                                                                                       |                                        |   |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|---|
| [1430] | 서열번호 1-24에 대한 키:                                                                                                                                                                                                      |                                        |   |
| [1431] | ia                                                                                                                                                                                                                    | 역 무염기 뉴클레오타이드(1,2-디데옥시리보스)             |   |
| [1432] | m                                                                                                                                                                                                                     | 2'-O-메틸 뉴클레오타이드                        |   |
| [1433] | f                                                                                                                                                                                                                     | 2'-데옥시-2'-플루오로 뉴클레오타이드                 |   |
| [1434] | s                                                                                                                                                                                                                     | 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결(포스포로티오에이트 백본 변형) | 오 |
| [1435] | ~                                                                                                                                                                                                                     | 테더                                     |   |
| [1436] | Td                                                                                                                                                                                                                    | 데옥시티미딘                                 |   |
| [1437] | 서열번호 25-176에 대한 키:                                                                                                                                                                                                    |                                        |   |
| [1438] | dG, dC, dA, dT                                                                                                                                                                                                        | DNA 잔기(                                |   |
| [1439] | GalNAc                                                                                                                                                                                                                | N-아세틸갈락토사민                             |   |
| [1440] | G, C, A, U                                                                                                                                                                                                            | RNA 잔기                                 |   |
| [1441] | g, c, a, u                                                                                                                                                                                                            | 2'-O-메틸 변형된 잔기                         |   |
| [1442] | Gf, Cf, Af, Uf                                                                                                                                                                                                        | 2'-플루오로 변형된 잔기                         |   |
| [1443] | s                                                                                                                                                                                                                     | 포스포로티오에이트 백본 변형                        |   |
| [1444] | siRNA                                                                                                                                                                                                                 | 작은 간섭 RNA                              |   |
| [1445] | MFCO                                                                                                                                                                                                                  | 모노플루오로 사이클로옥틴                          |   |
| [1446] | invabasic                                                                                                                                                                                                             | 1,2-디데옥시리보스                            |   |
| [1447] | (invabasic)(invabasic) (i) 무염기이고 (ii) 역 구성(inverted configuration)인 당 모이어티를 갖는 말단 2개의 뉴클레오타이드인, 전체 폴리 뉴클레오타이드에서의 뉴클레오타이드로서, 이에 따라 끝에서 두 번째 뉴클레오타이드와 끝에서 세 번째 뉴클레오타이드 사이의 결합은 역 연결(reversed linkage), 즉 5-5 또는 3-3 연결임 |                                        |   |
| [1448] | NH2-DEG/NHDEG                                                                                                                                                                                                         | 아미노에톡시에틸 링커                            |   |
| [1449] | NH2C12                                                                                                                                                                                                                | 아미노도데실 링커                              |   |
| [1450] | NH2C6/NHC6                                                                                                                                                                                                            | 아미노헥실 링커                               |   |
| [1451] | ET                                                                                                                                                                                                                    | (E-therapeutics사 레퍼런스)                 |   |
| [1452] | (ET-GalNAc-T1N3)(MFCO)(NH-DEG)                                                                                                                                                                                        | 테더 T1b                                 |   |
| [1453] | (ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)                                                                                                                                                                                              | 테더 T2b                                 |   |
| [1454] | (NHC6)(MFCO)(ET-GalNAc-T1N3)                                                                                                                                                                                          | 테더 T1a                                 |   |
| [1455] | (NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)                                                                                                                                                                                                | 테더 T2a                                 |   |
| [1456] | T1N3                                                                                                                                                                                                                  | T1 테더                                  |   |
| [1457] | T2Co                                                                                                                                                                                                                  | T2 테더                                  |   |
| [1458] | (GalNAc-)T1                                                                                                                                                                                                           | GalNAc T1 테더                           |   |
| [1459] | (GalNAc-)T2                                                                                                                                                                                                           | GalNAc T2 테더                           |   |
| [1460] | 참고: 상기 키는 센스 및 안티센스 서열을 지칭하는 반면 클린 서열은 기본 RNA 뉴클레오타이드만 함유한다.                                                                                                                                                          |                                        |   |

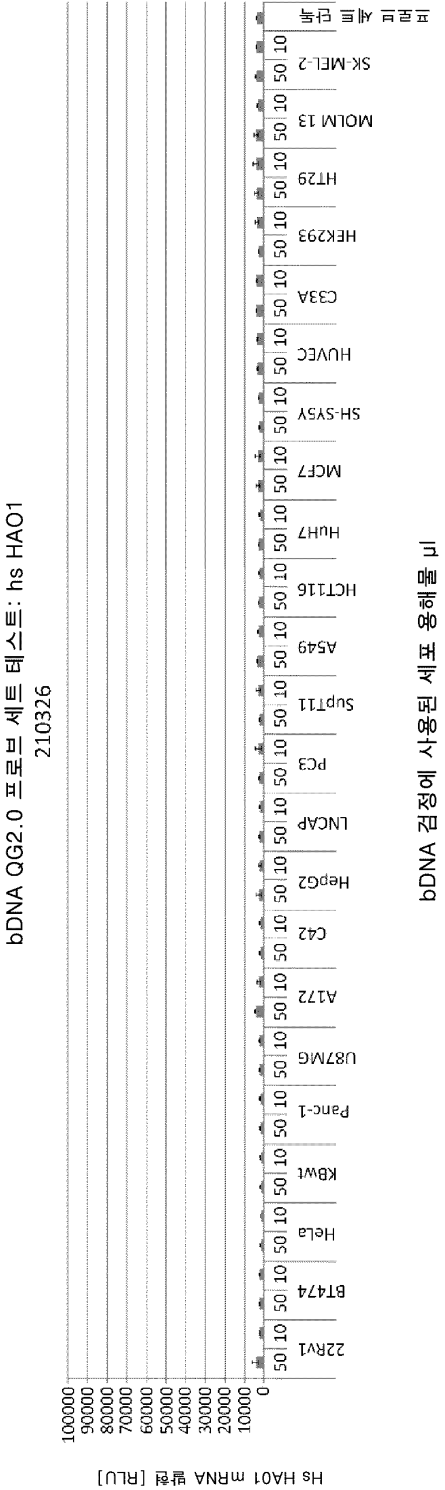
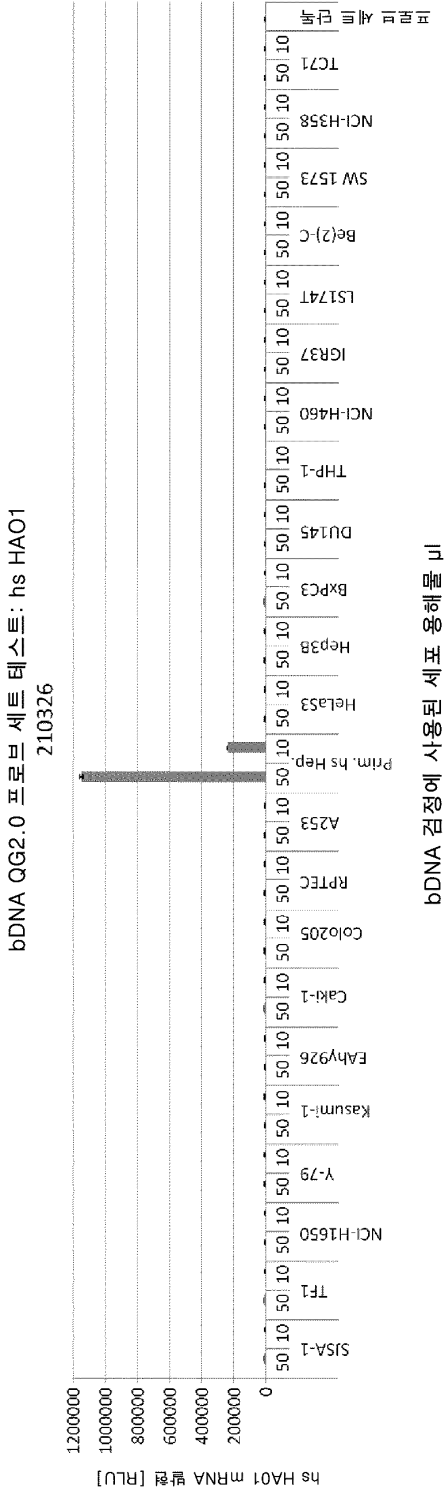
도면

도면1

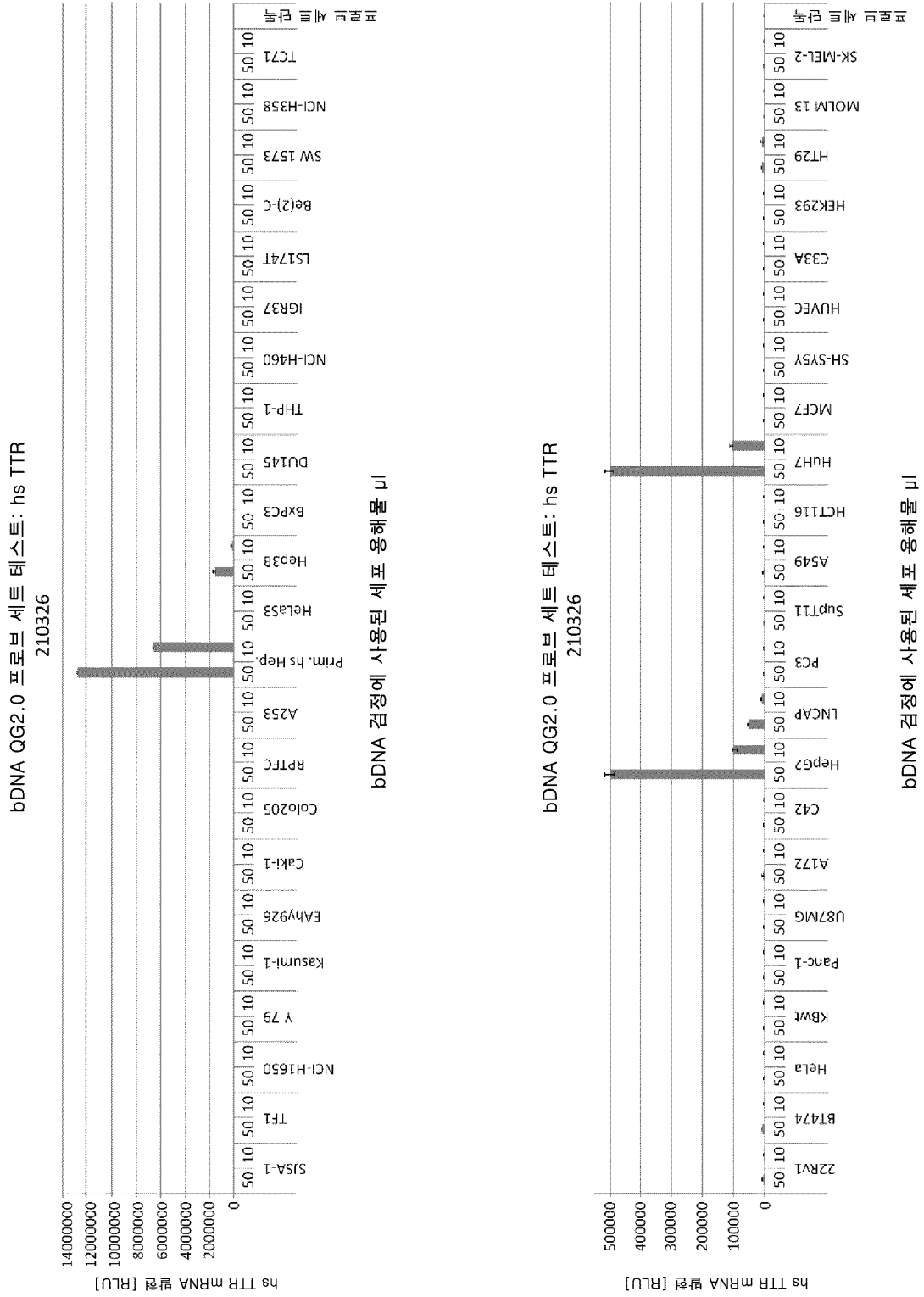




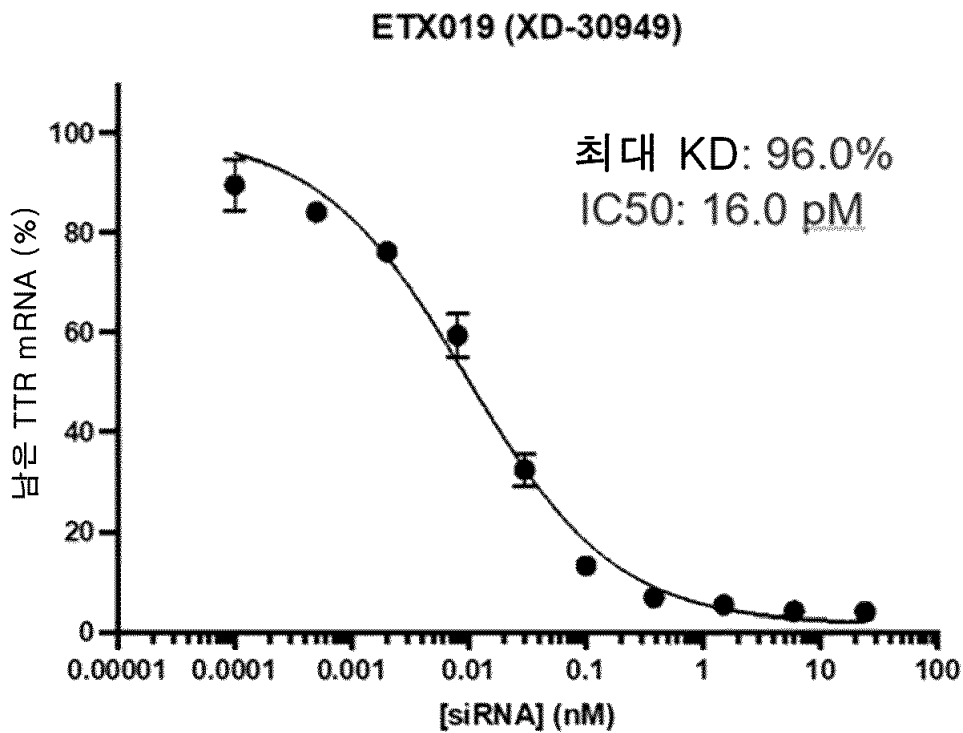
도면2



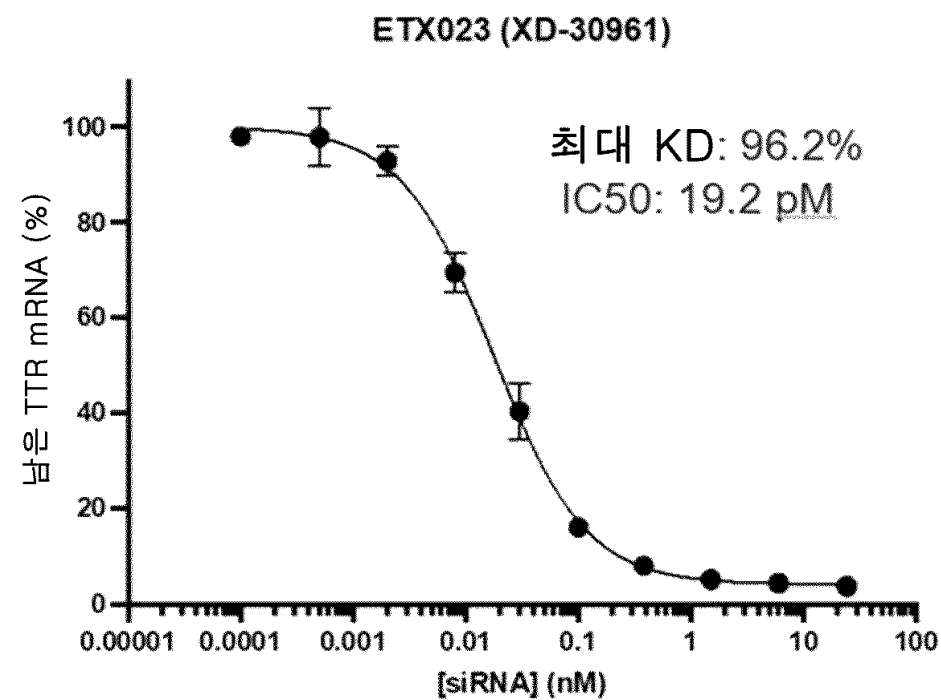
도면3



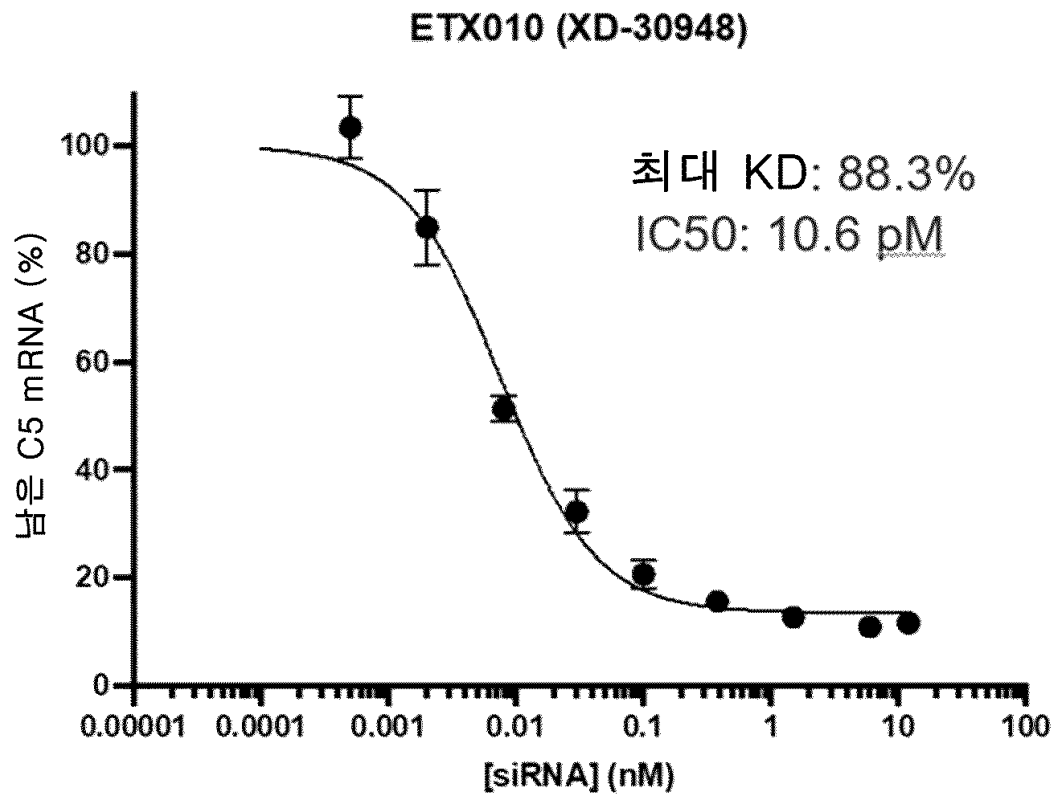
도면4a



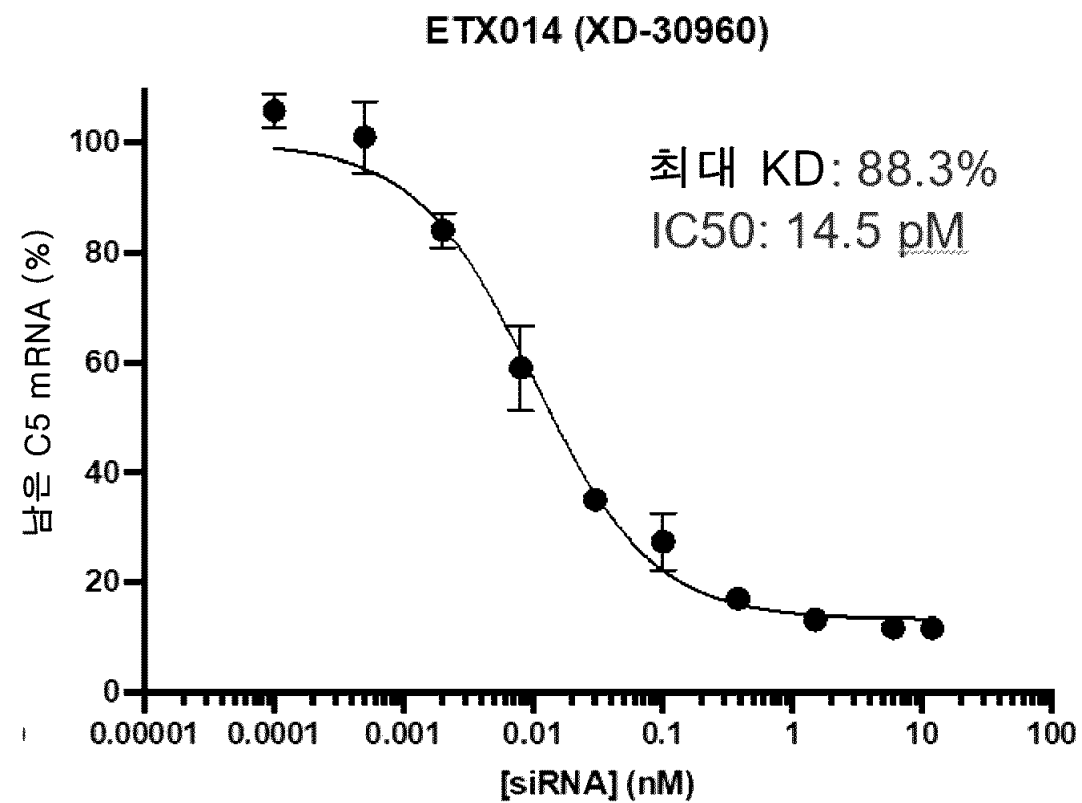
도면4b



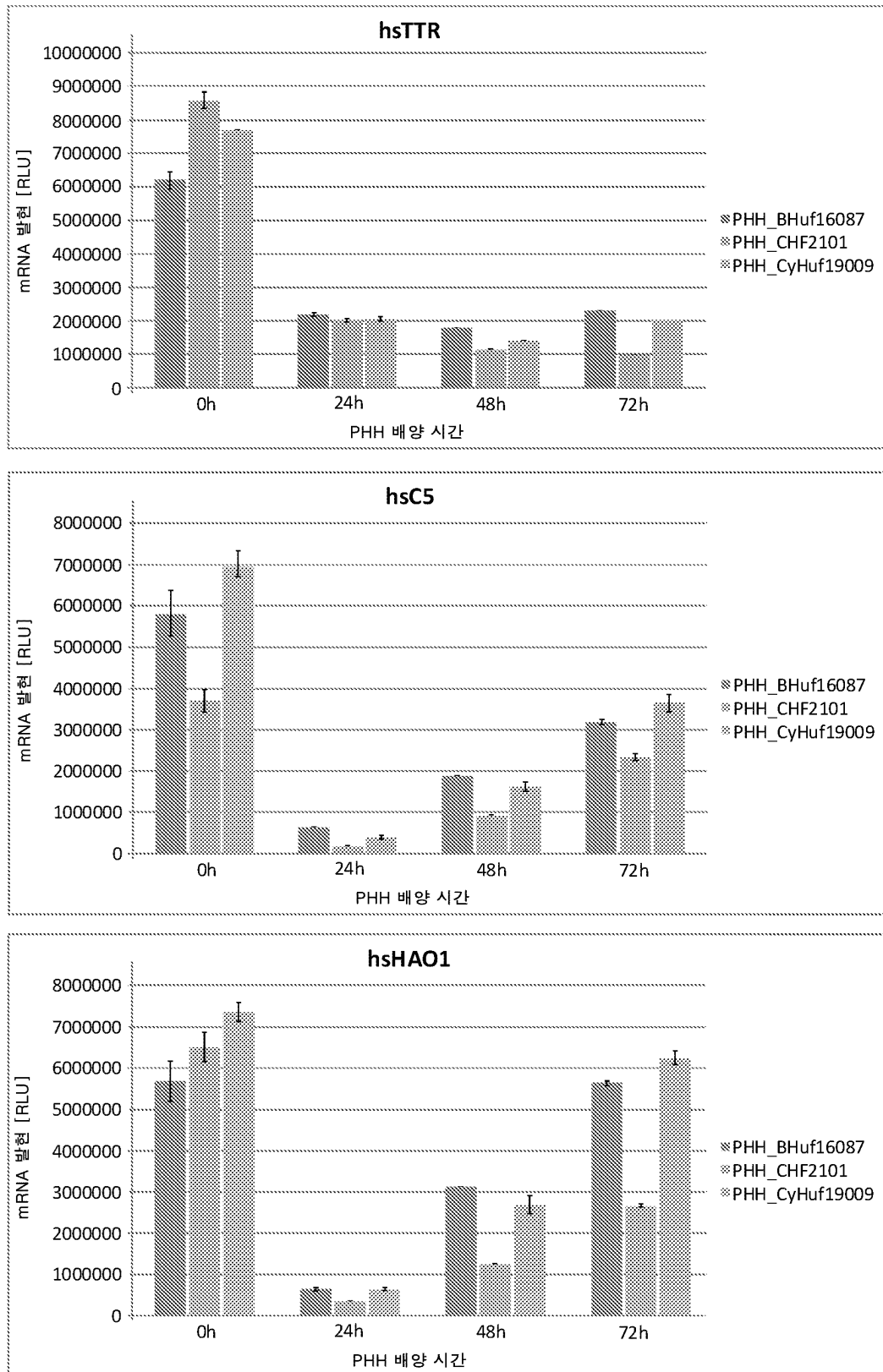
도면5a



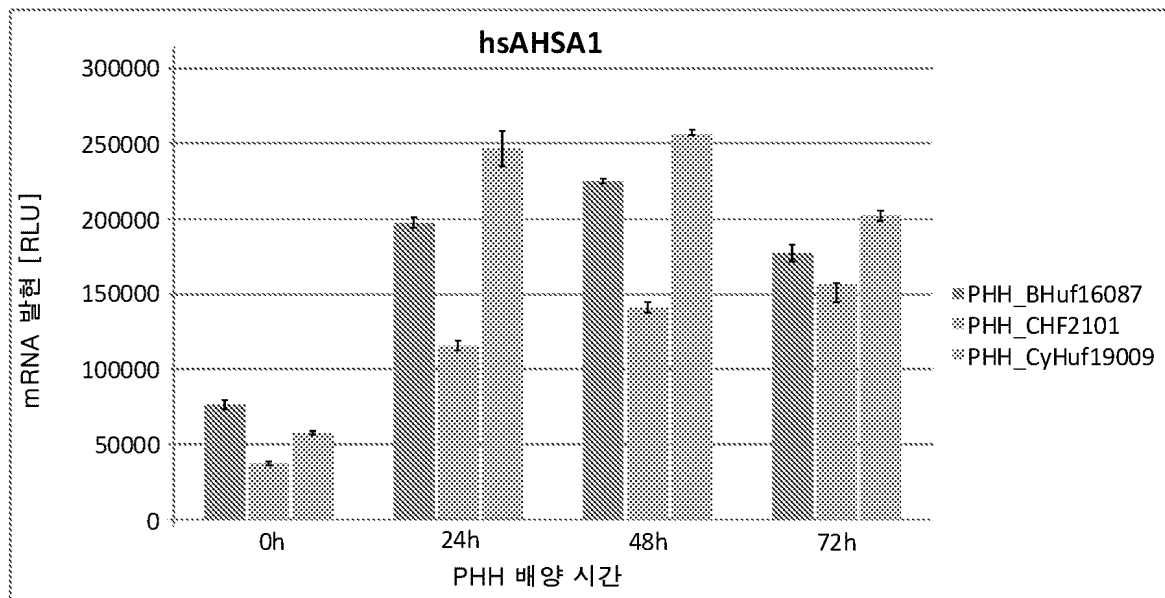
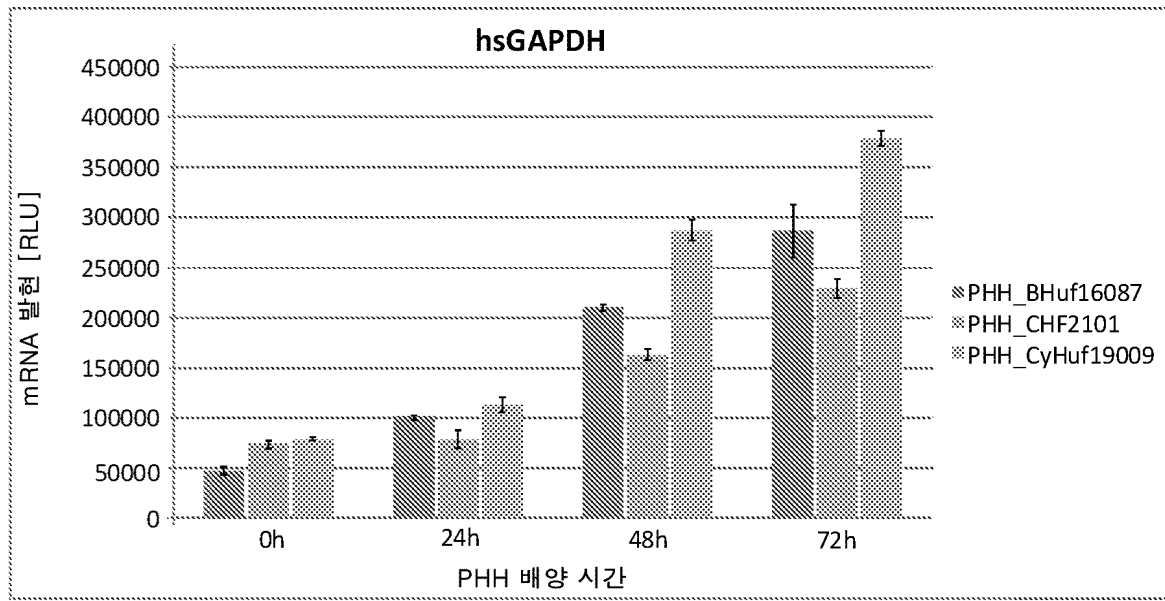
도면5b



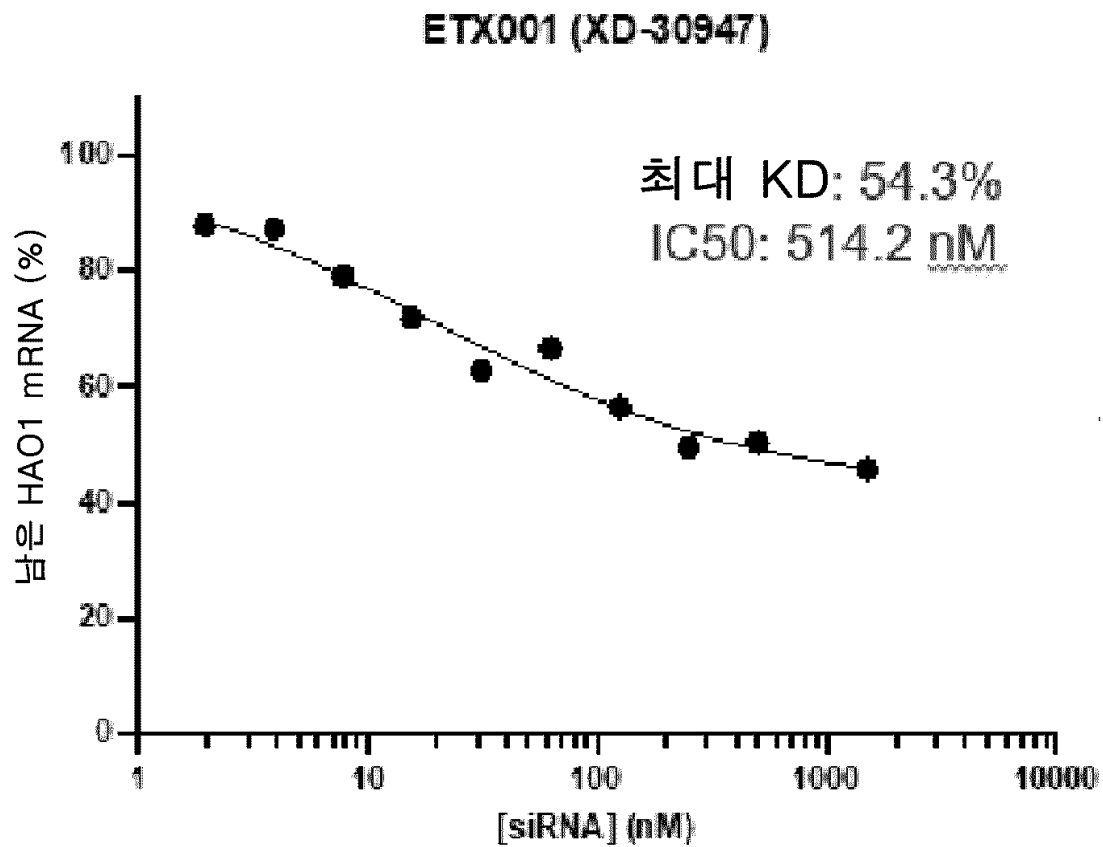
도면6



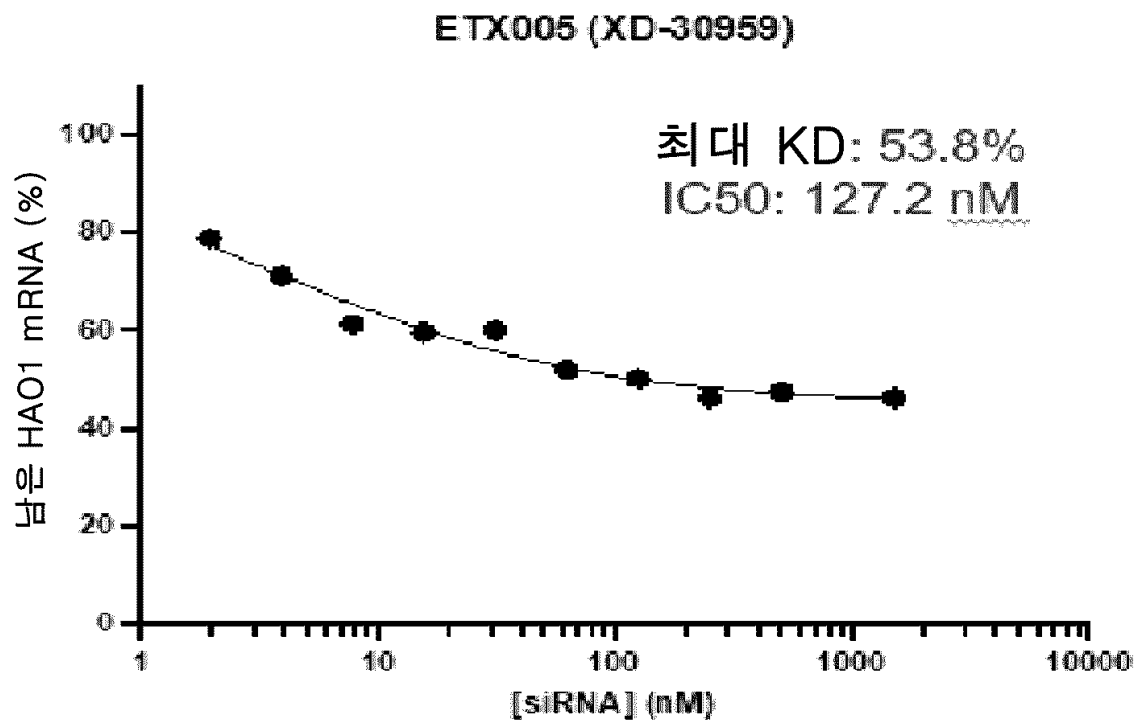
도면7



도면8a

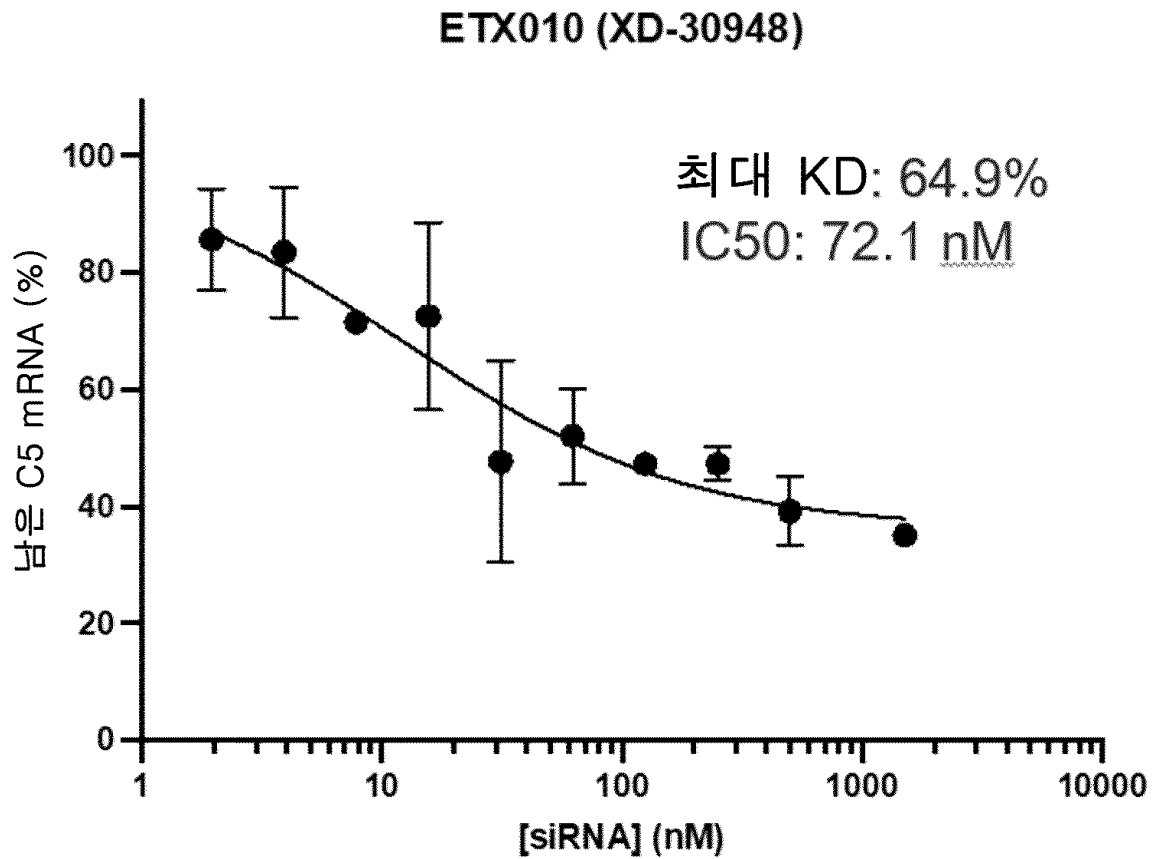


도면8b

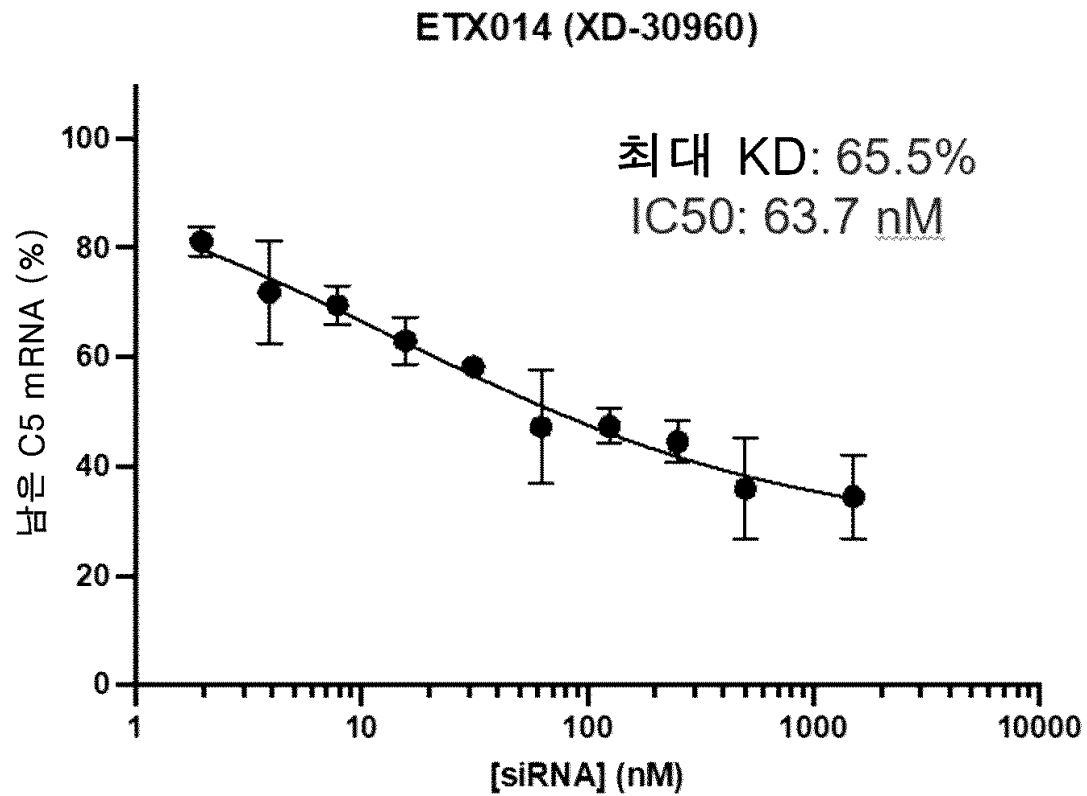




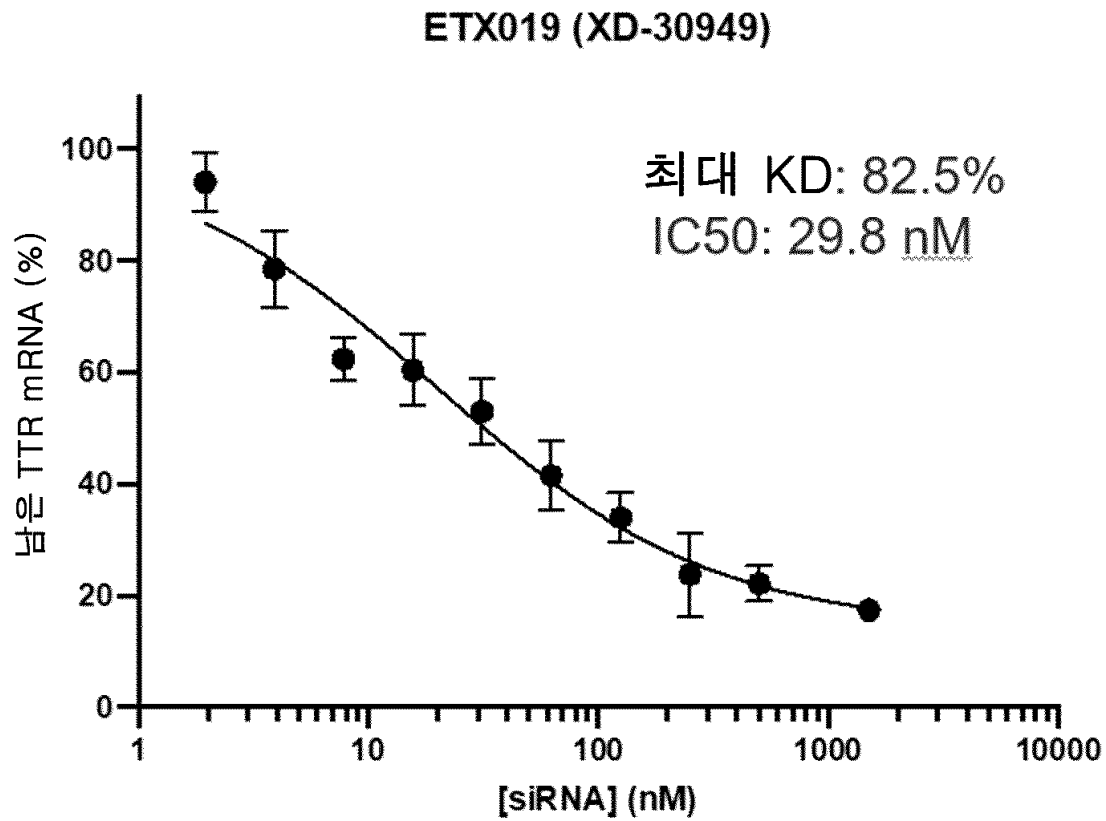
도면9a



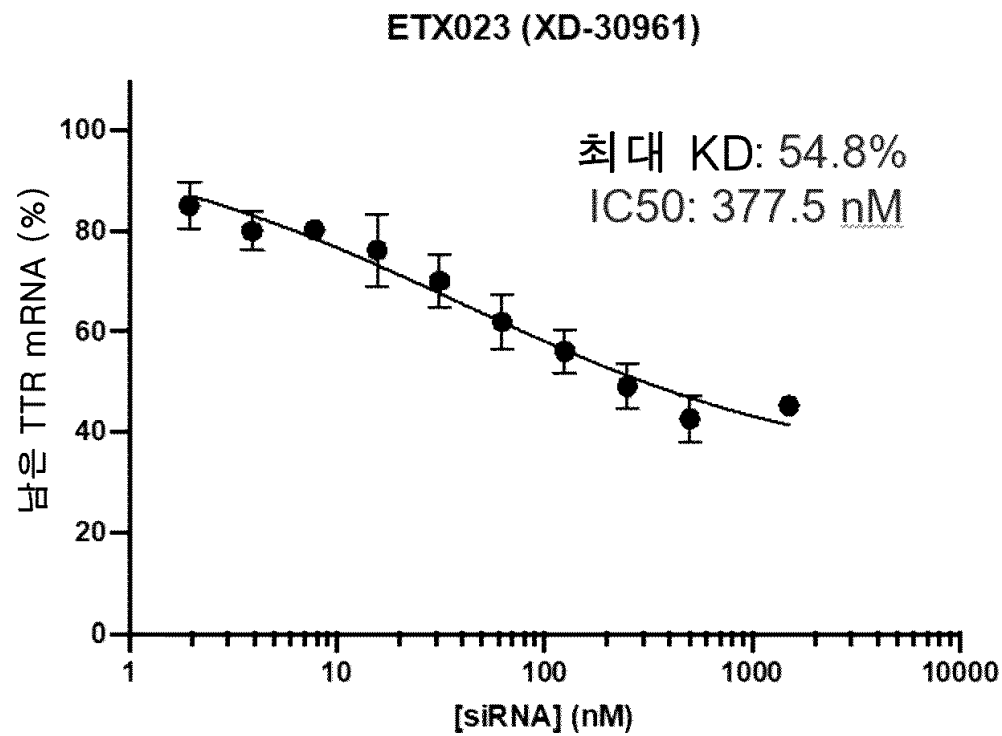
도면9b



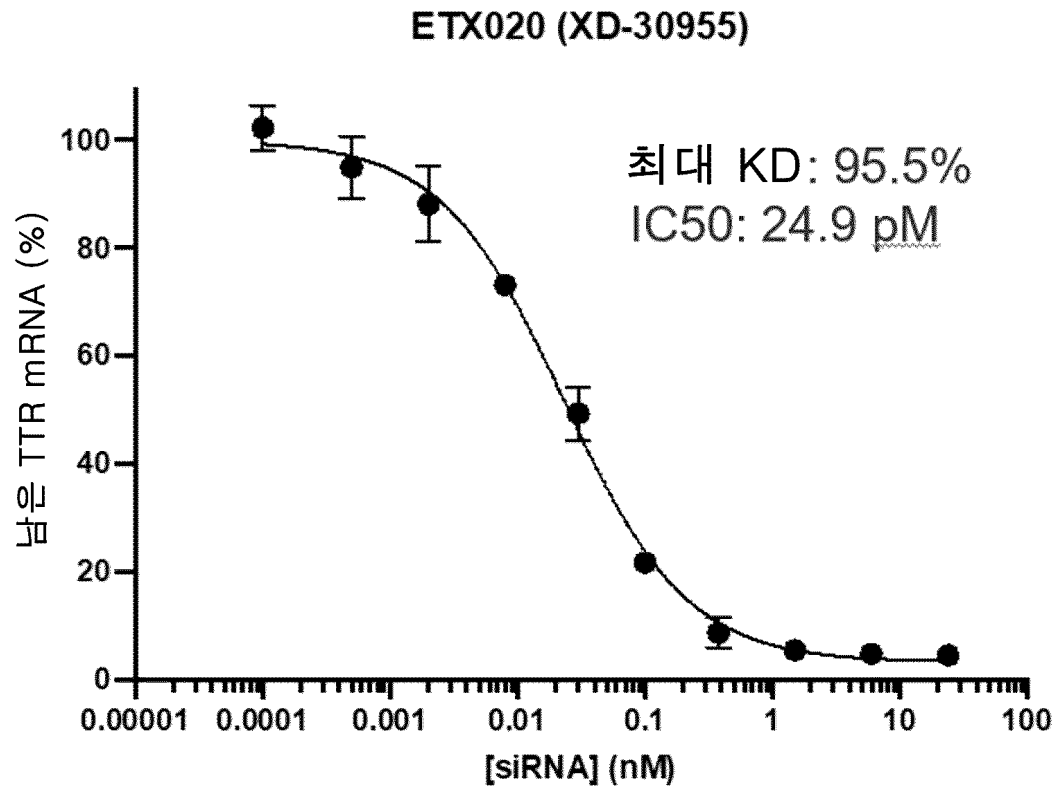
도면10a



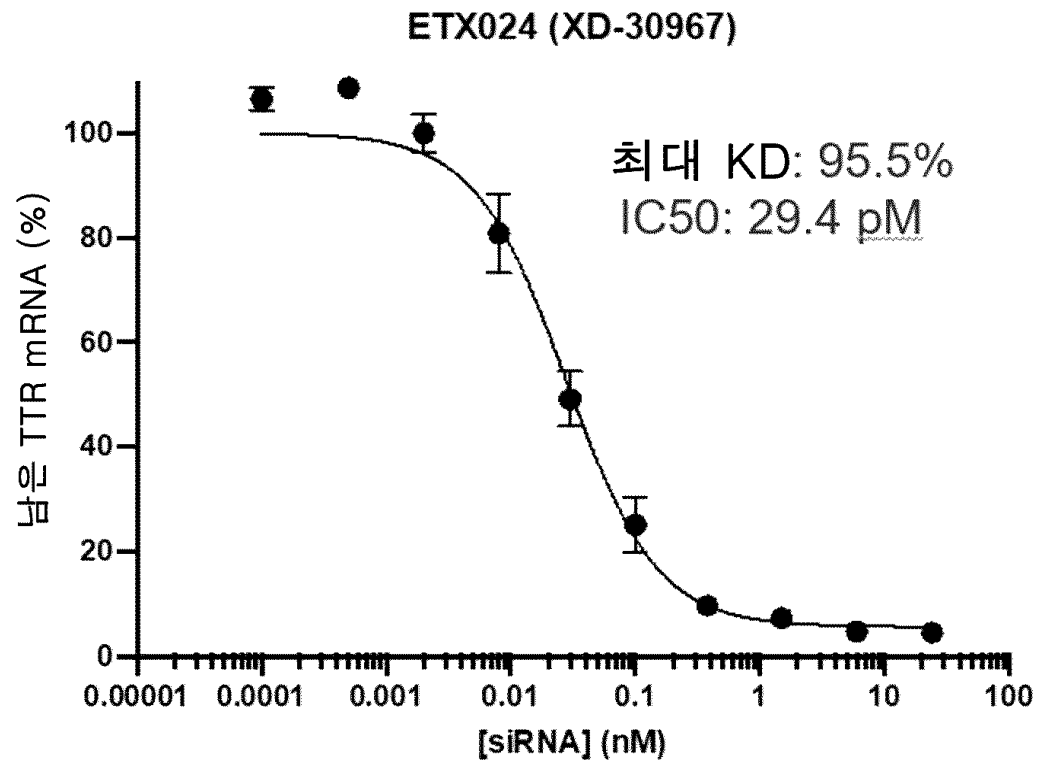
도면10b



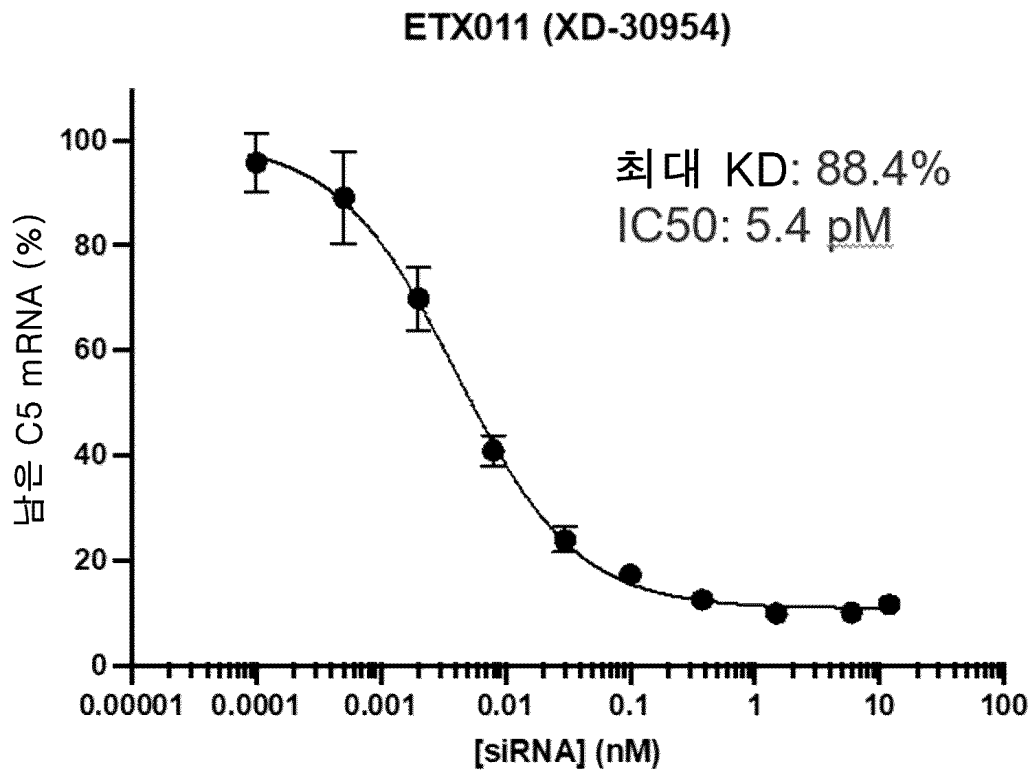
도면11a



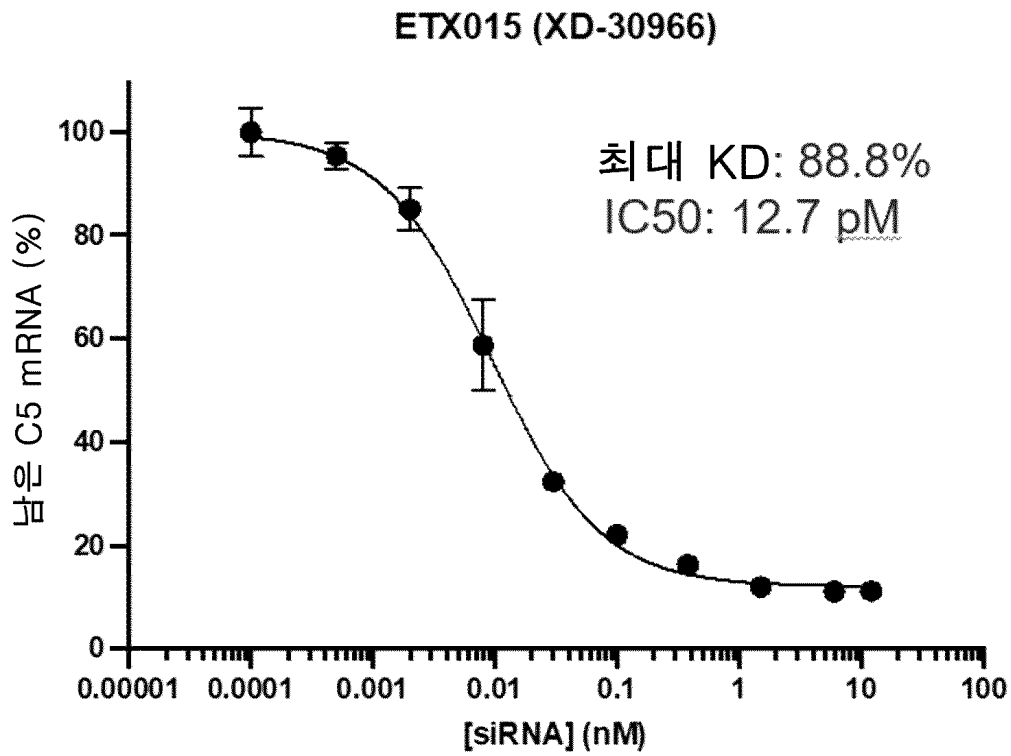
도면11b



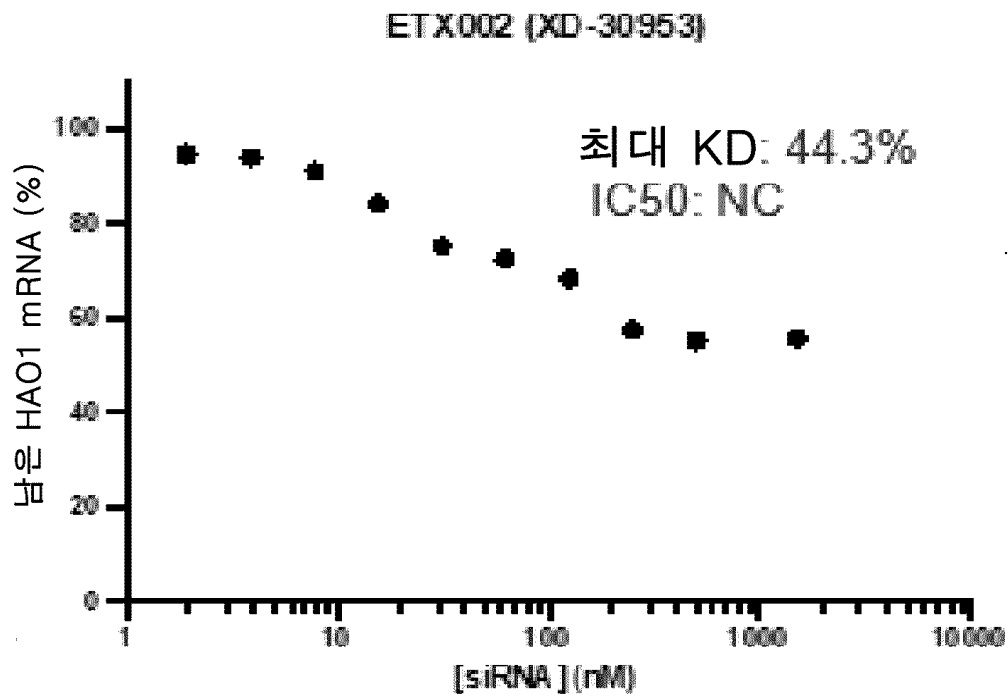
도면12a



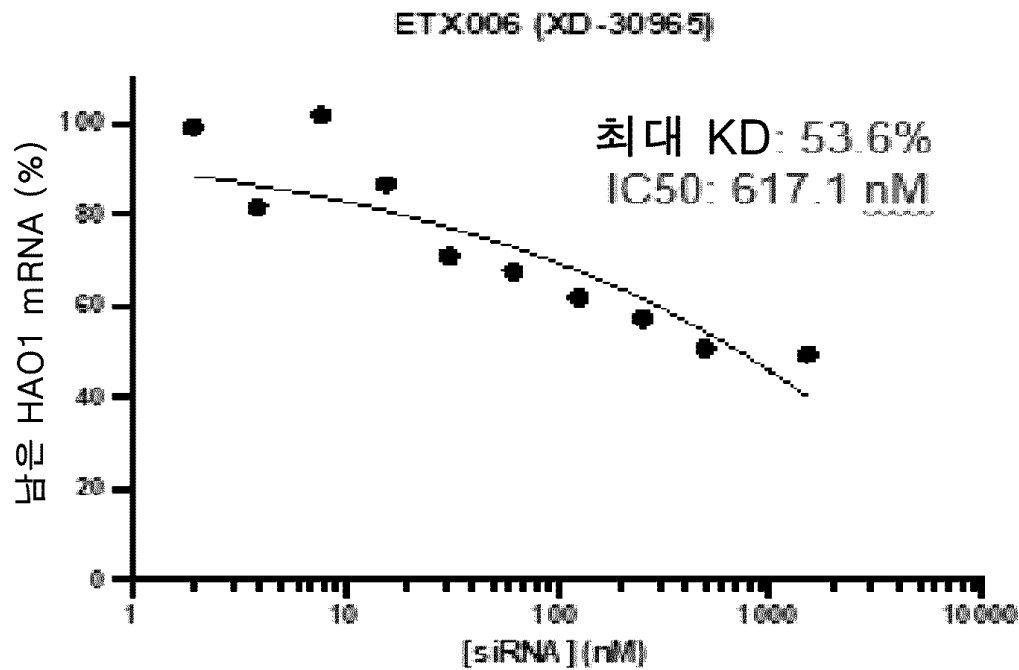
도면12b



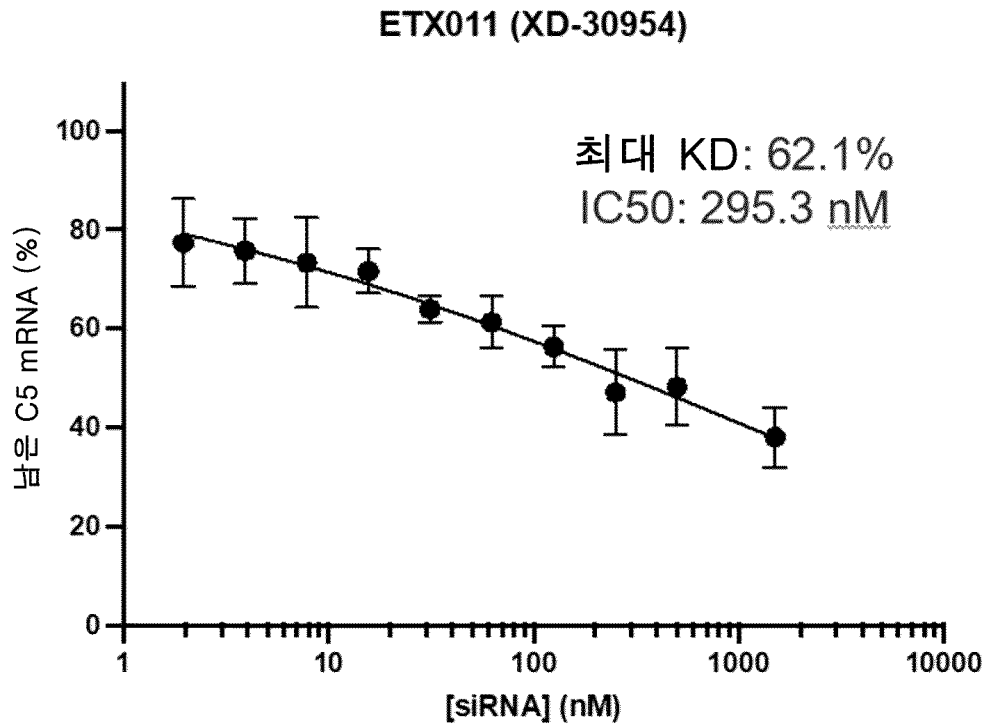
도면13a



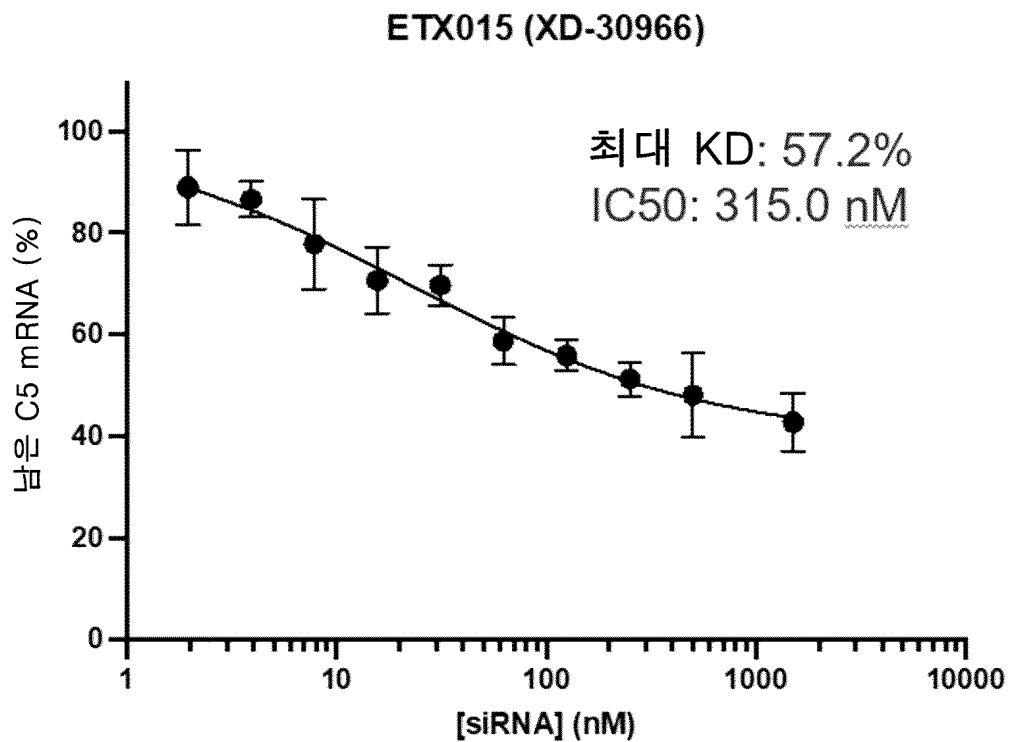
도면13b



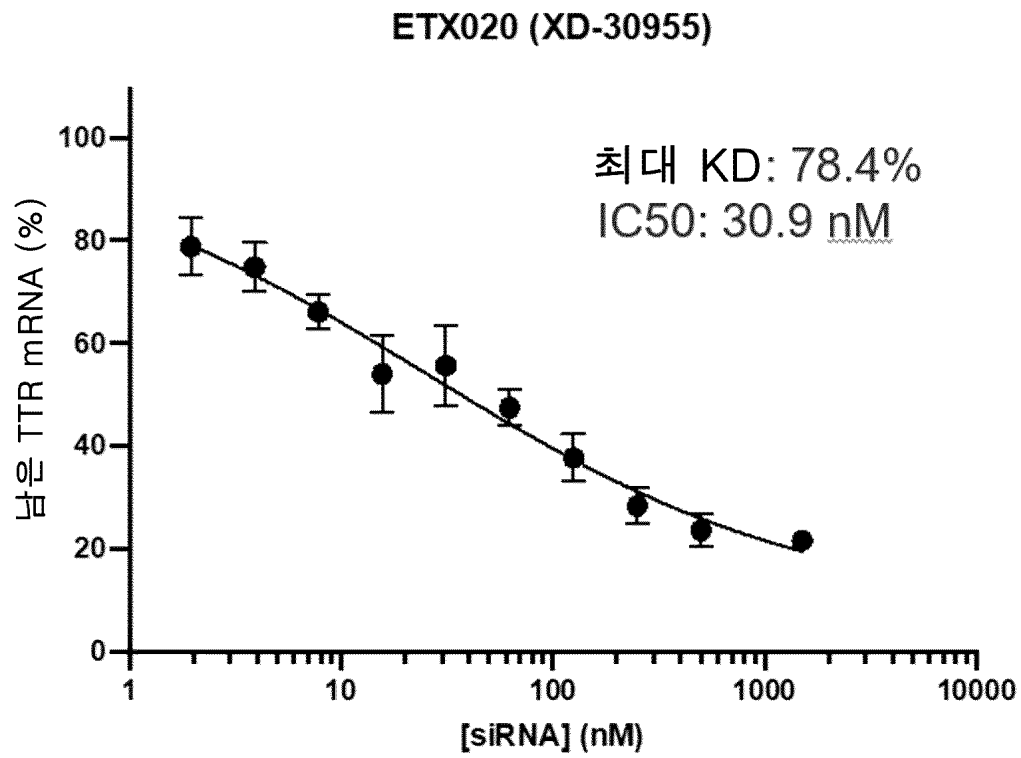
도면14a



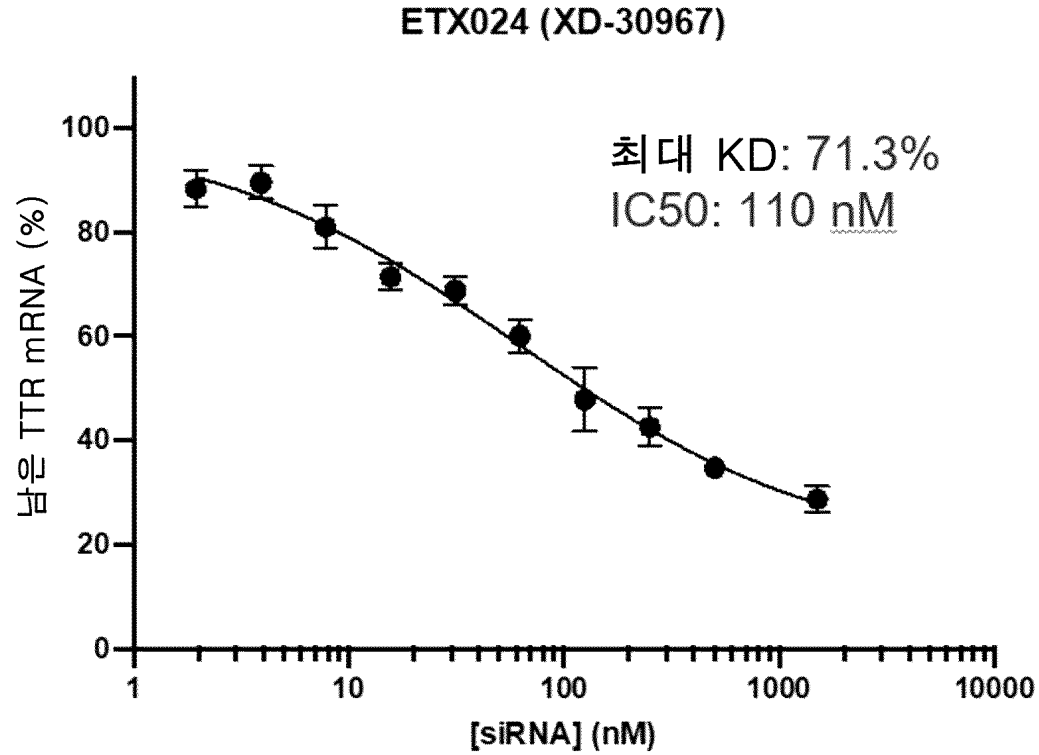
도면14b



도면15a

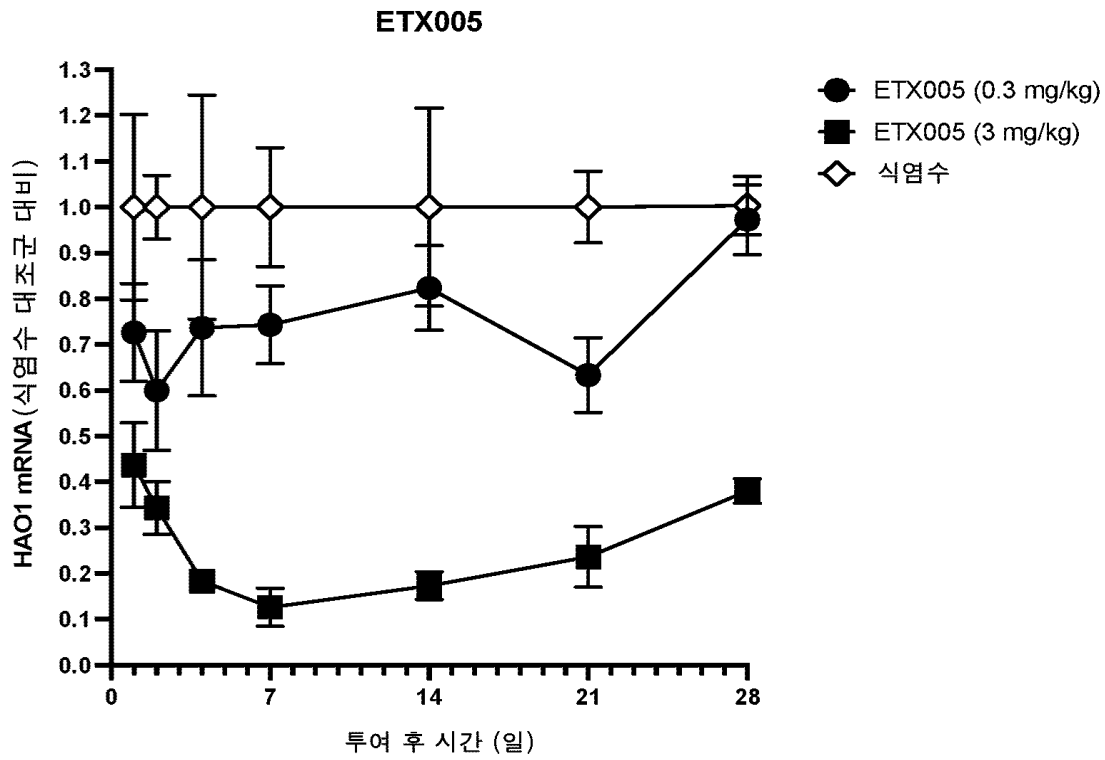


도면15b

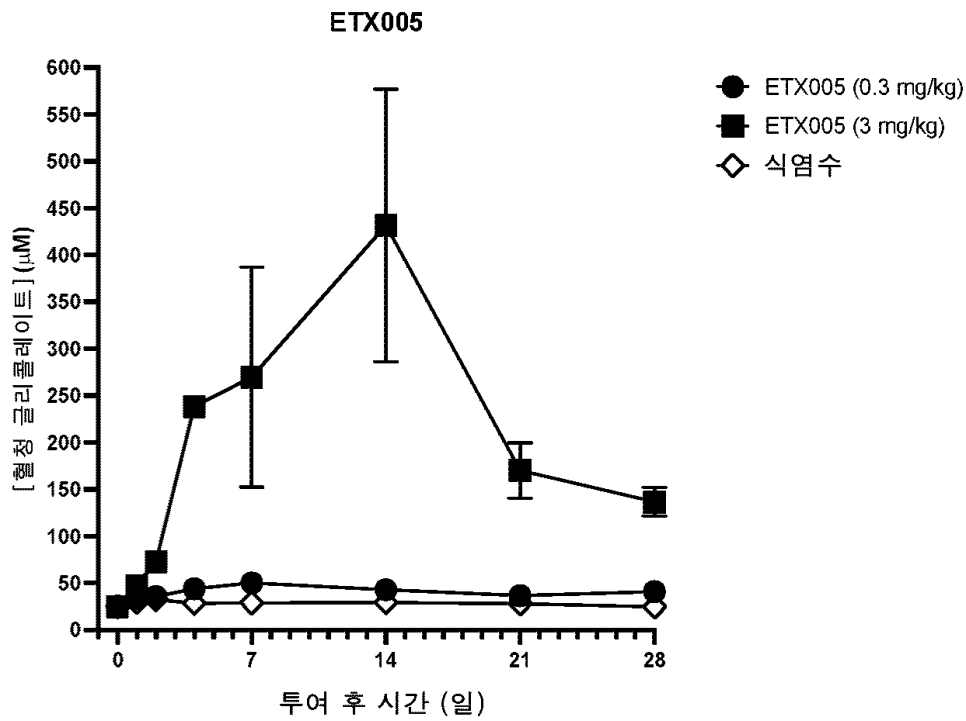




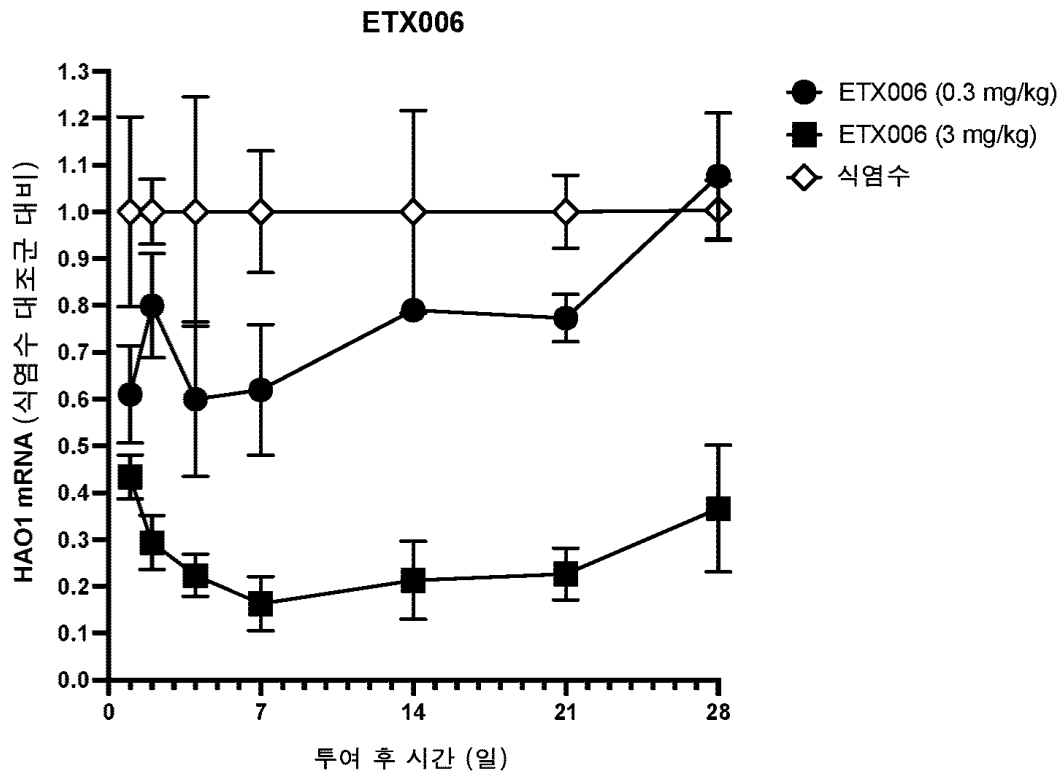
도면16



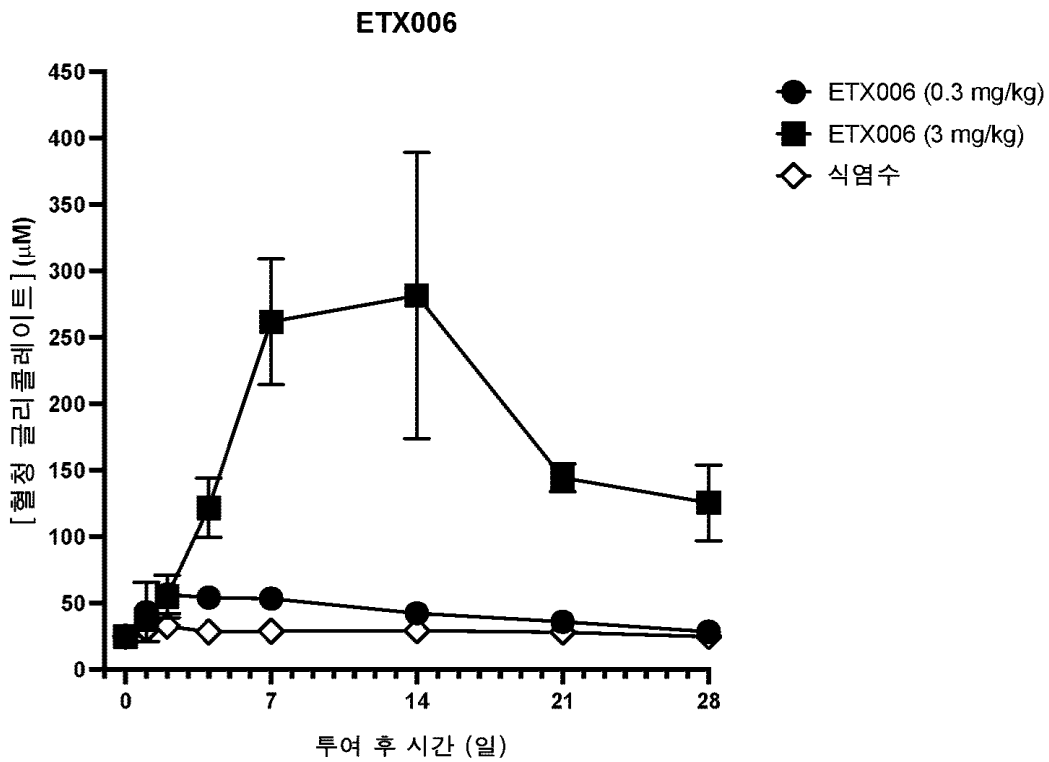
도면17



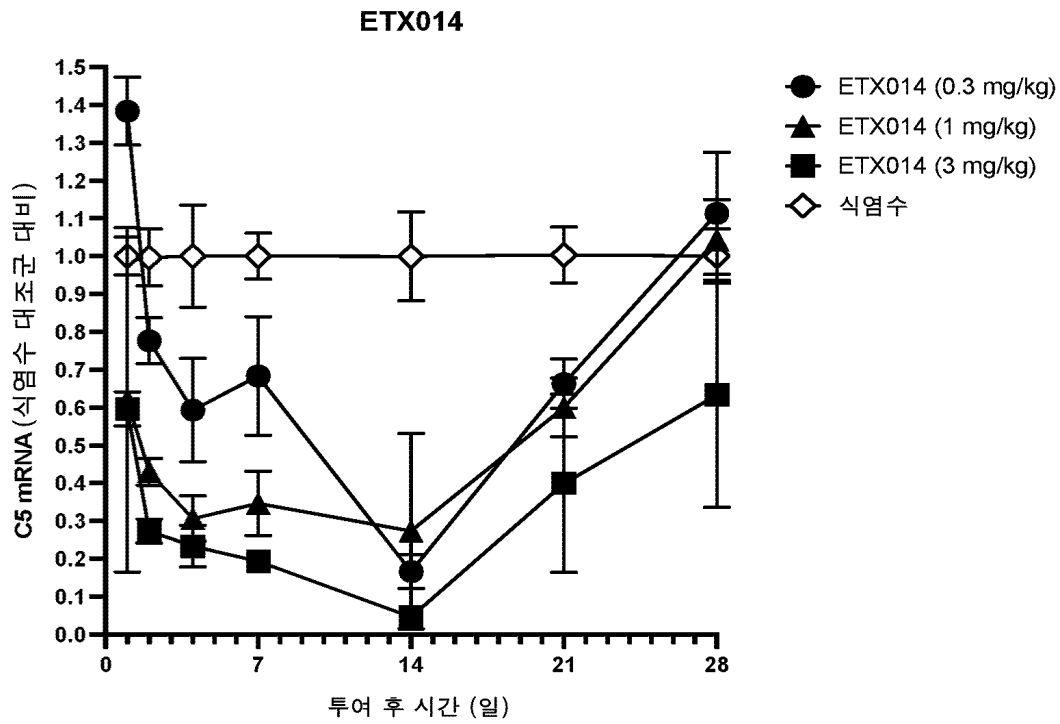
도면18



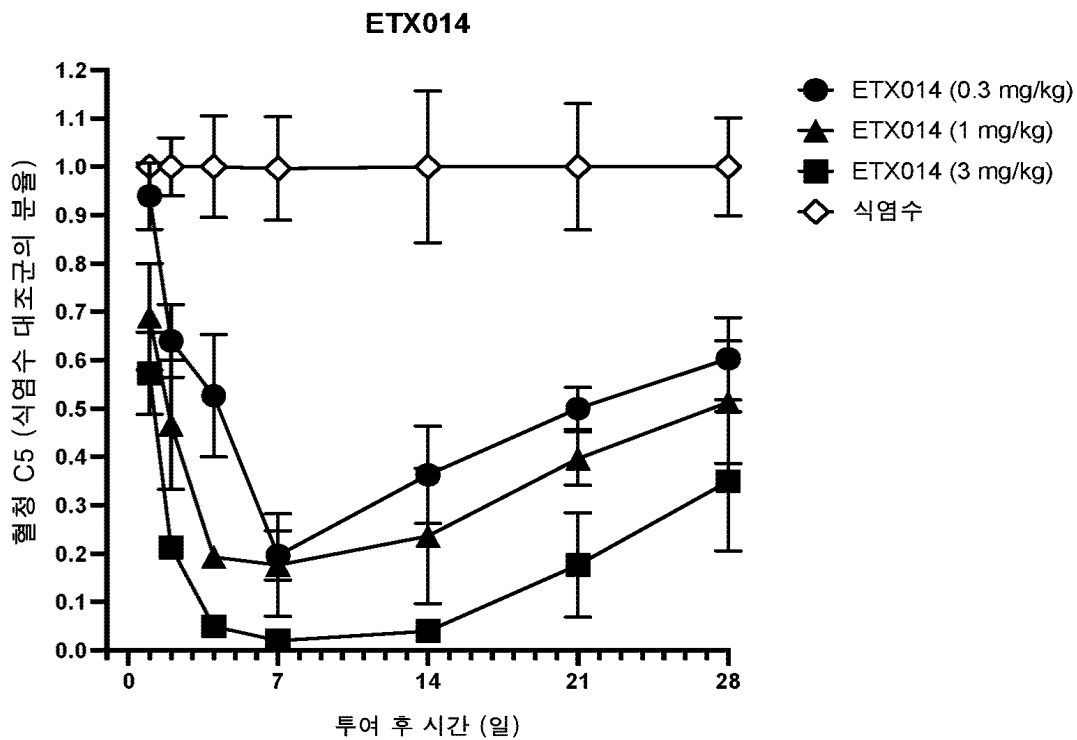
도면19



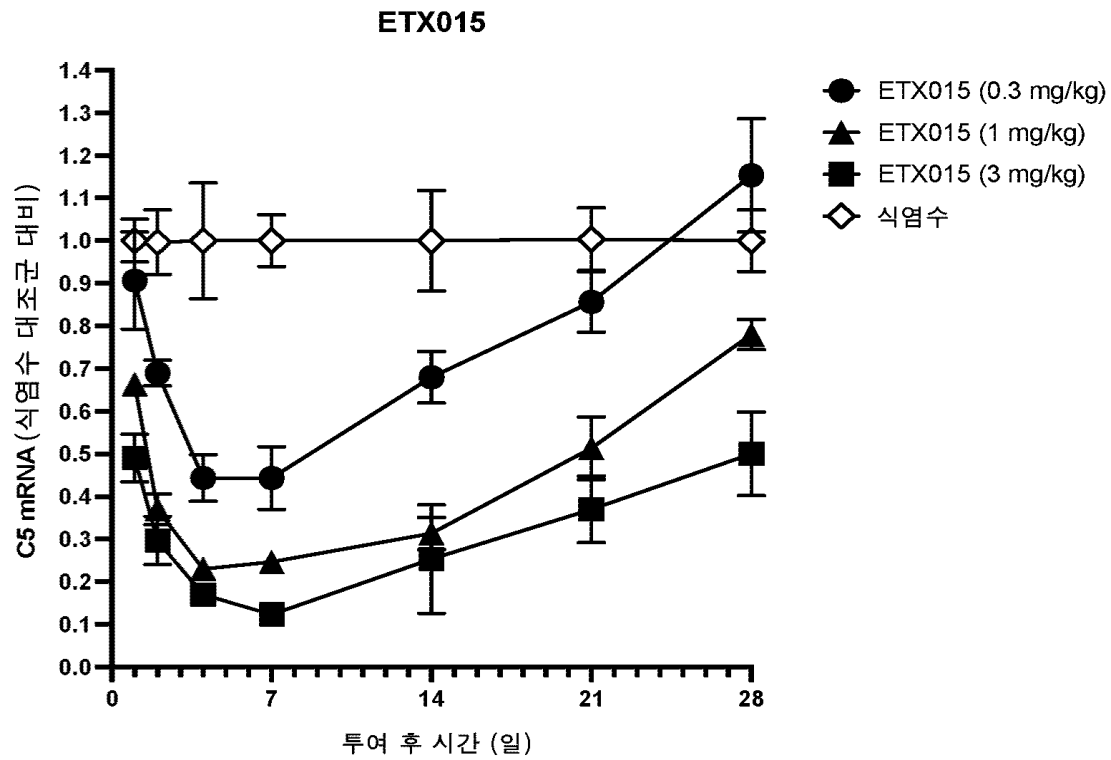
도면20



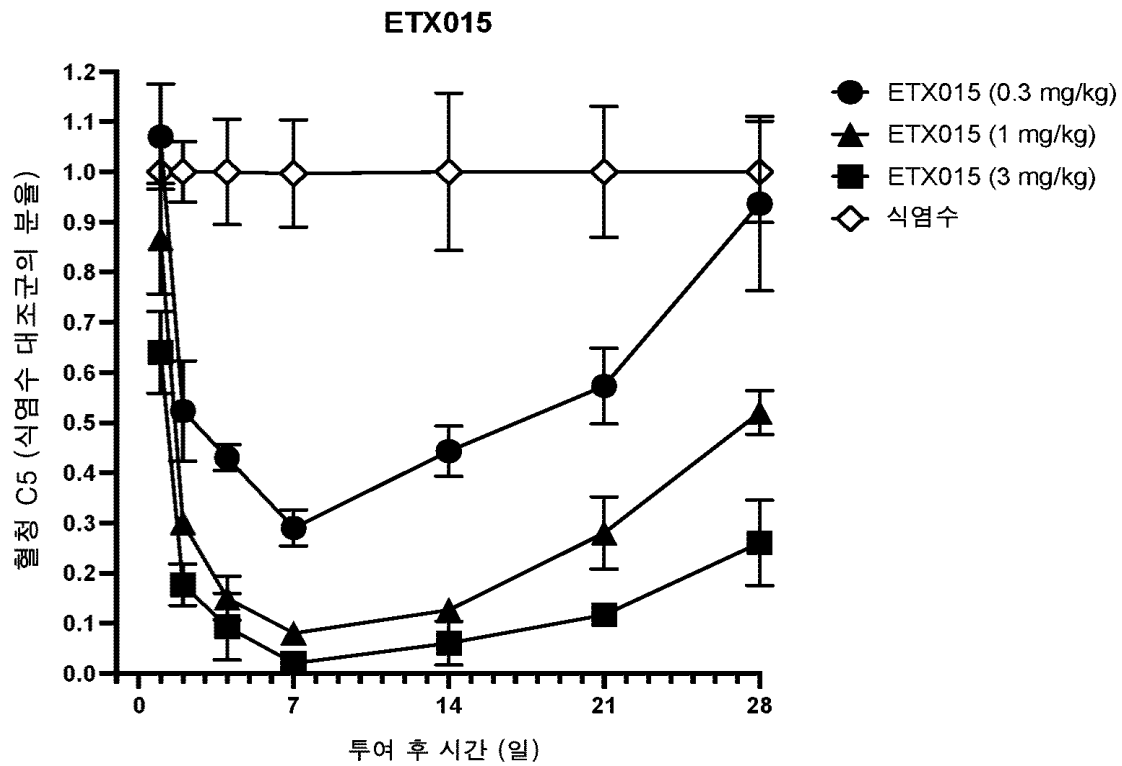
도면21



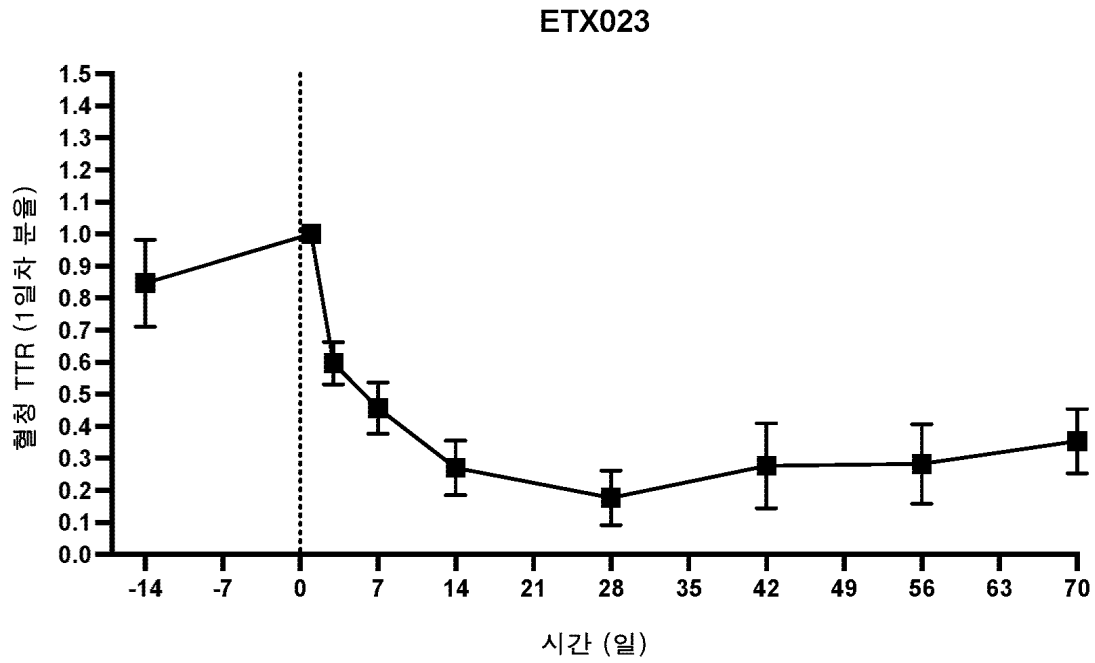
도면22



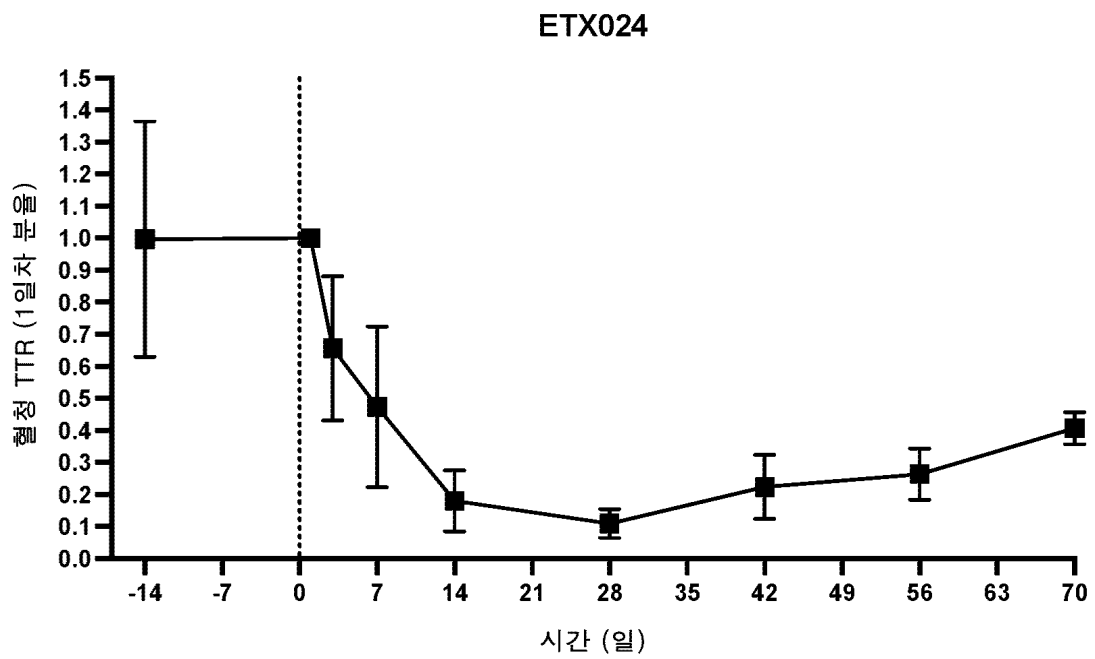
도면23



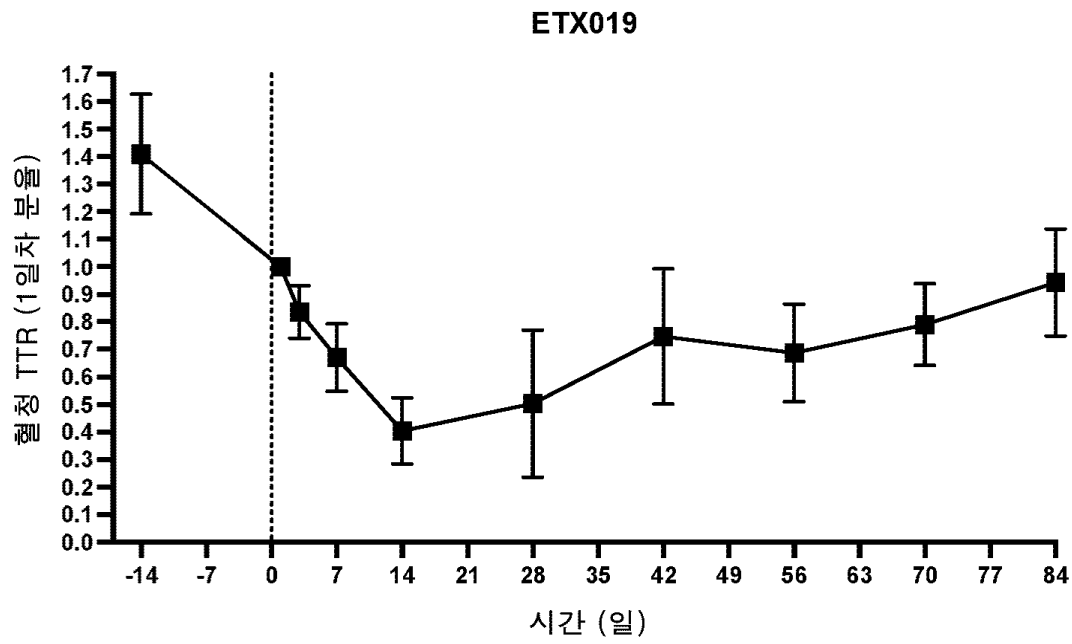
도면24



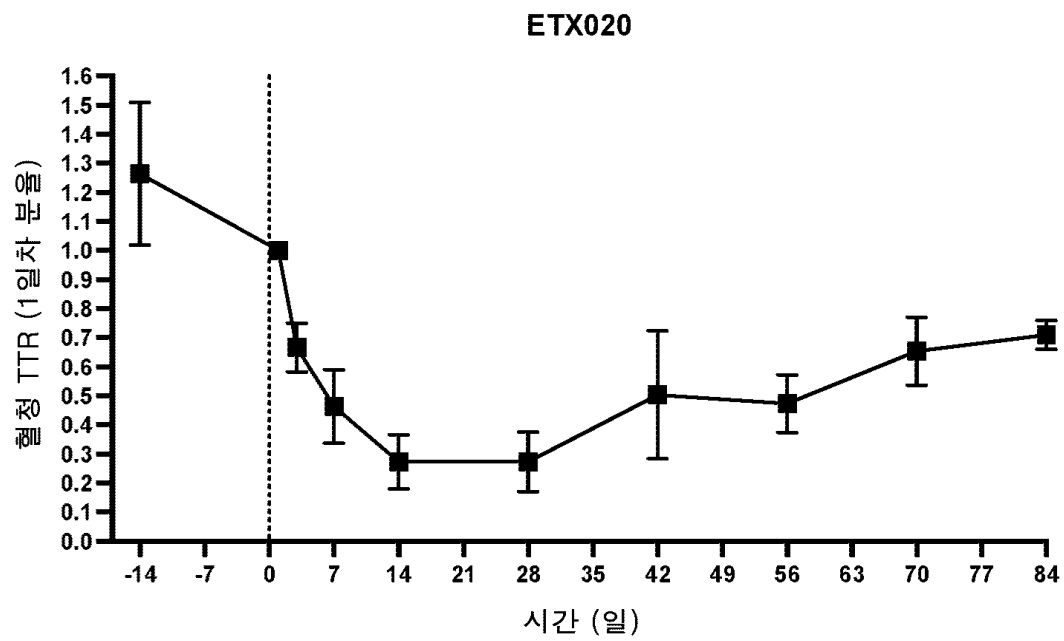
도면25



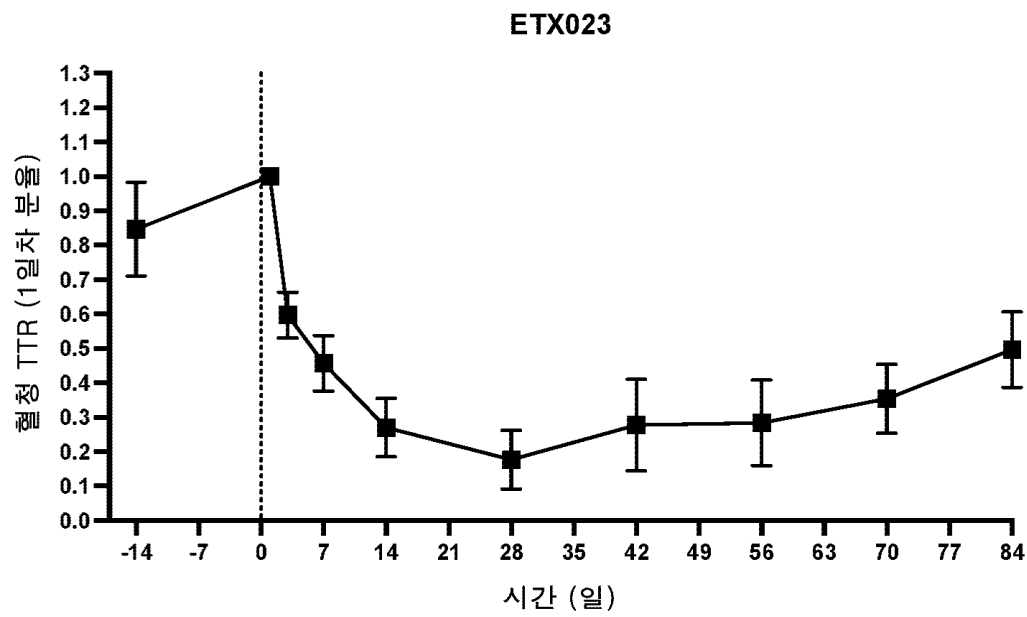
도면26



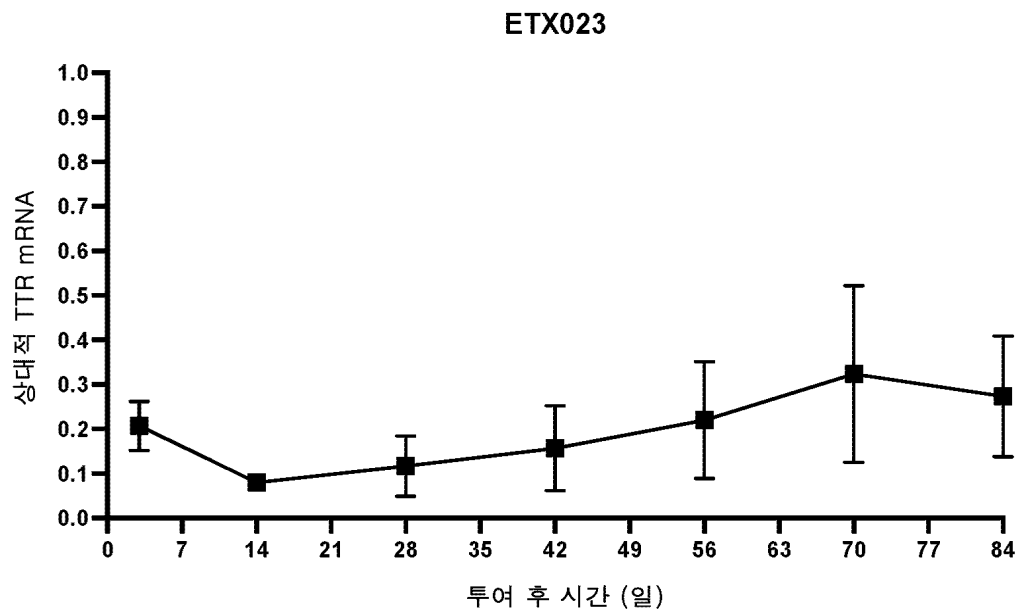
도면27



도면28a

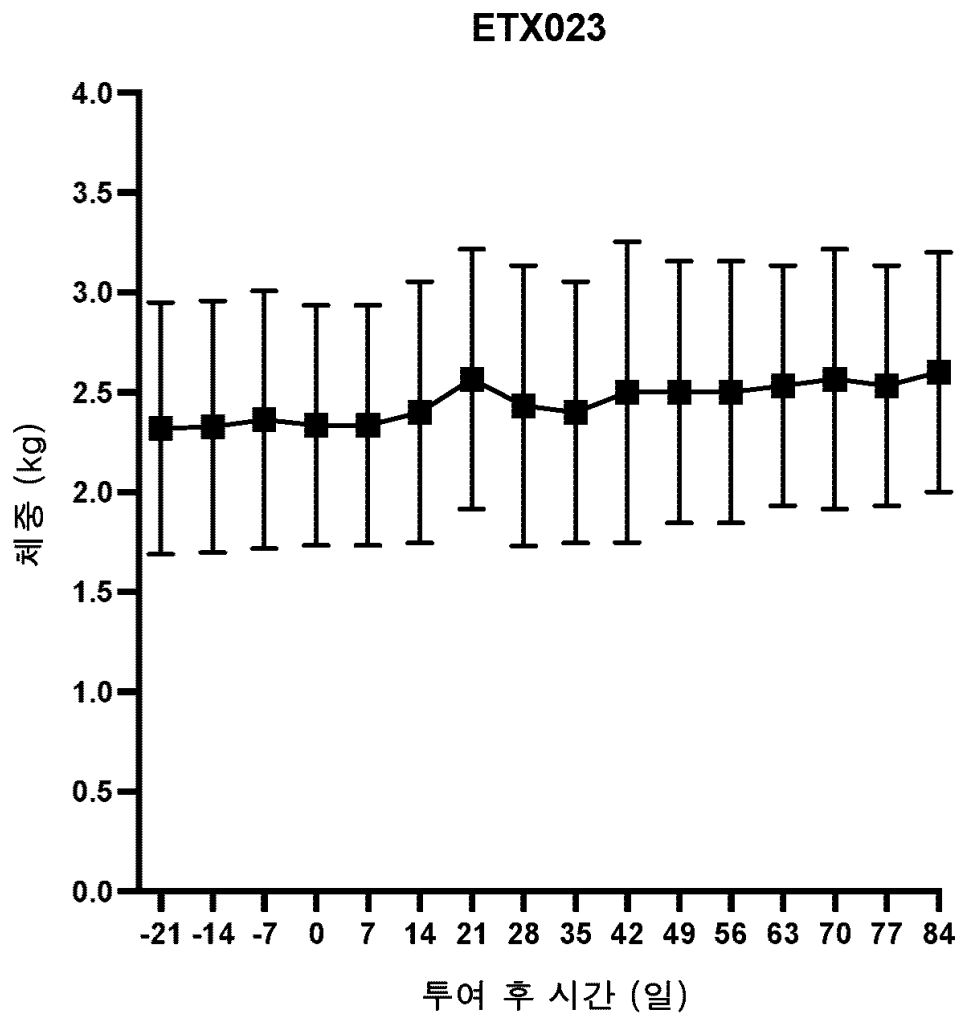


도면28b

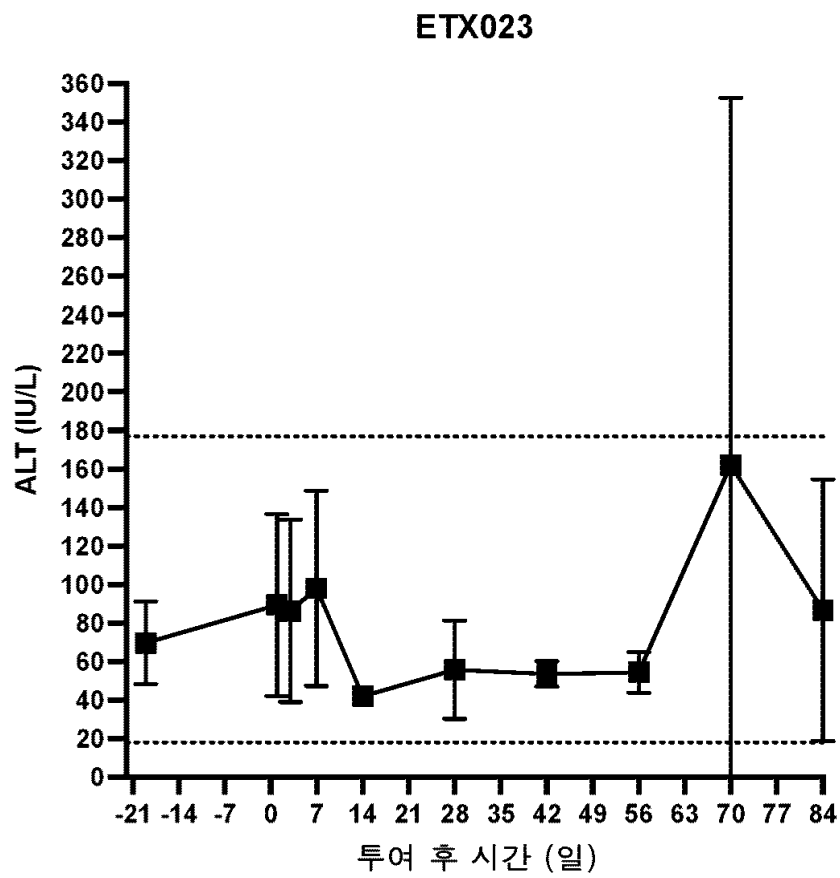




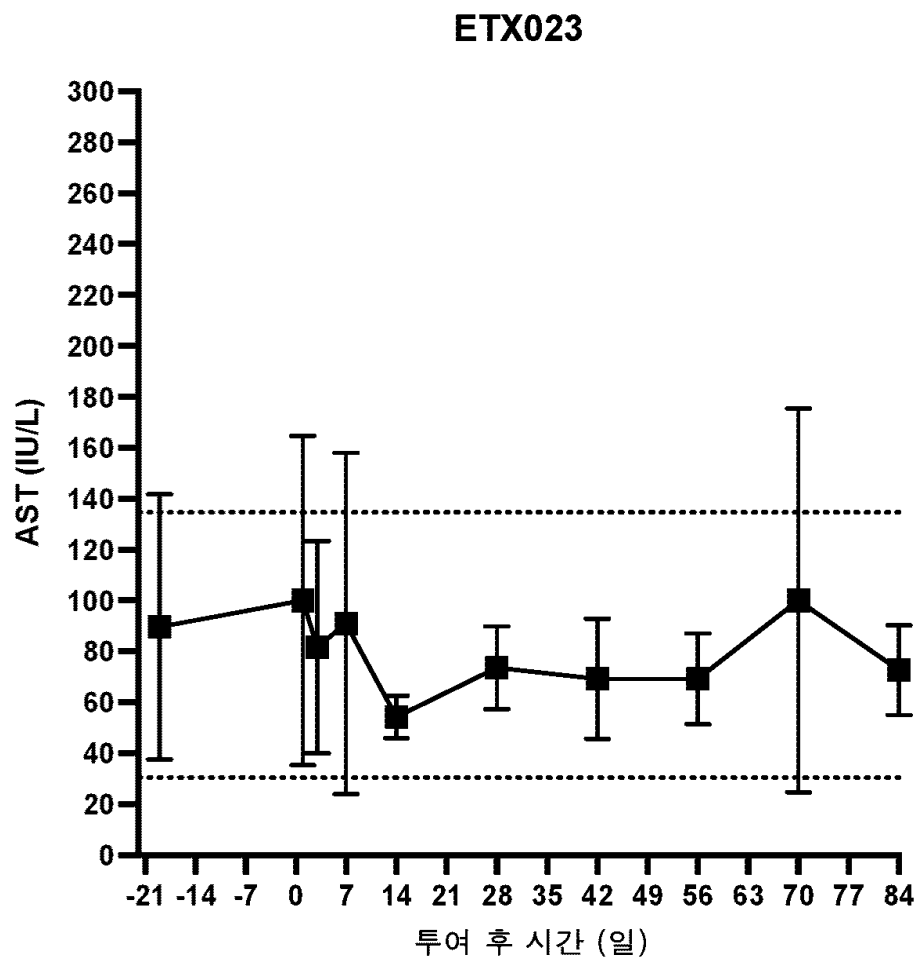
도면28c



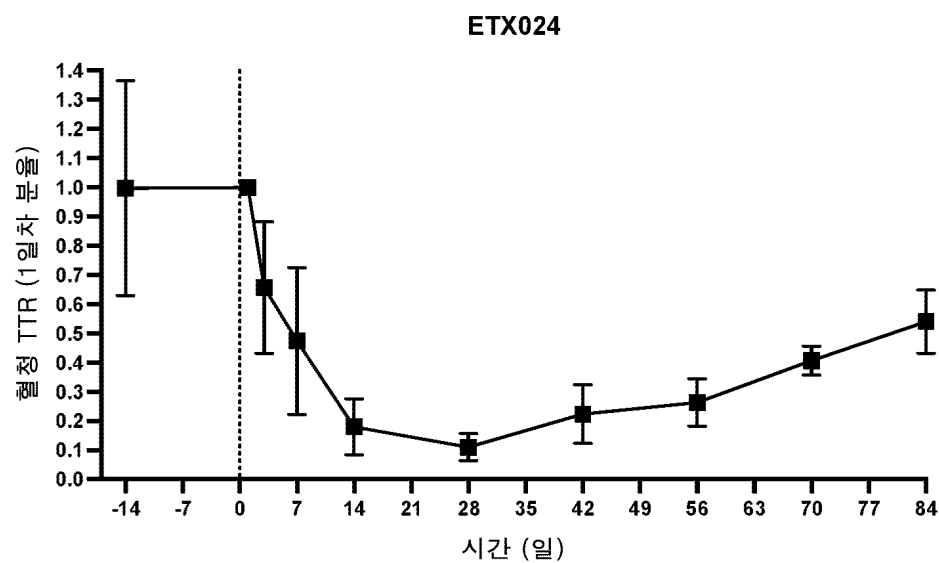
도면28d



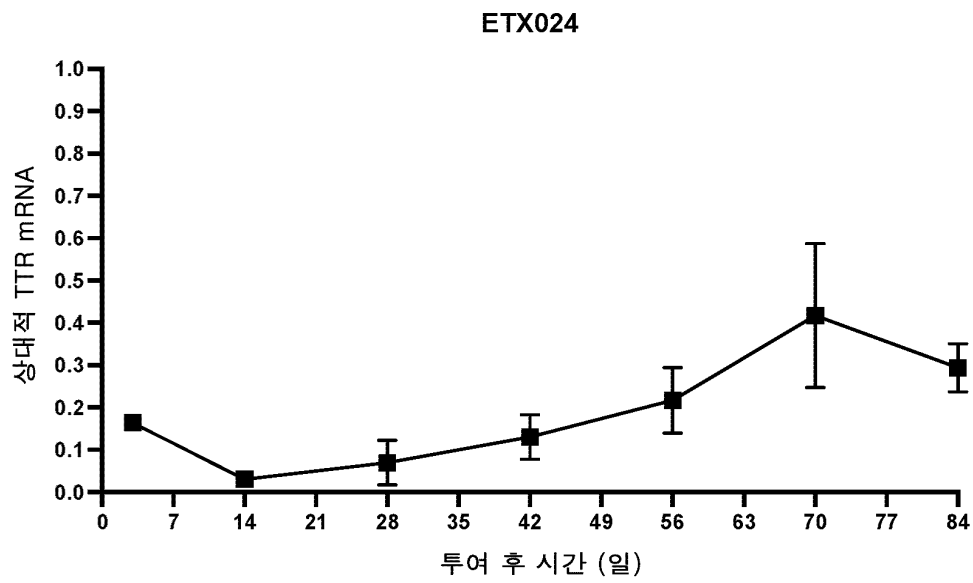
도면28e



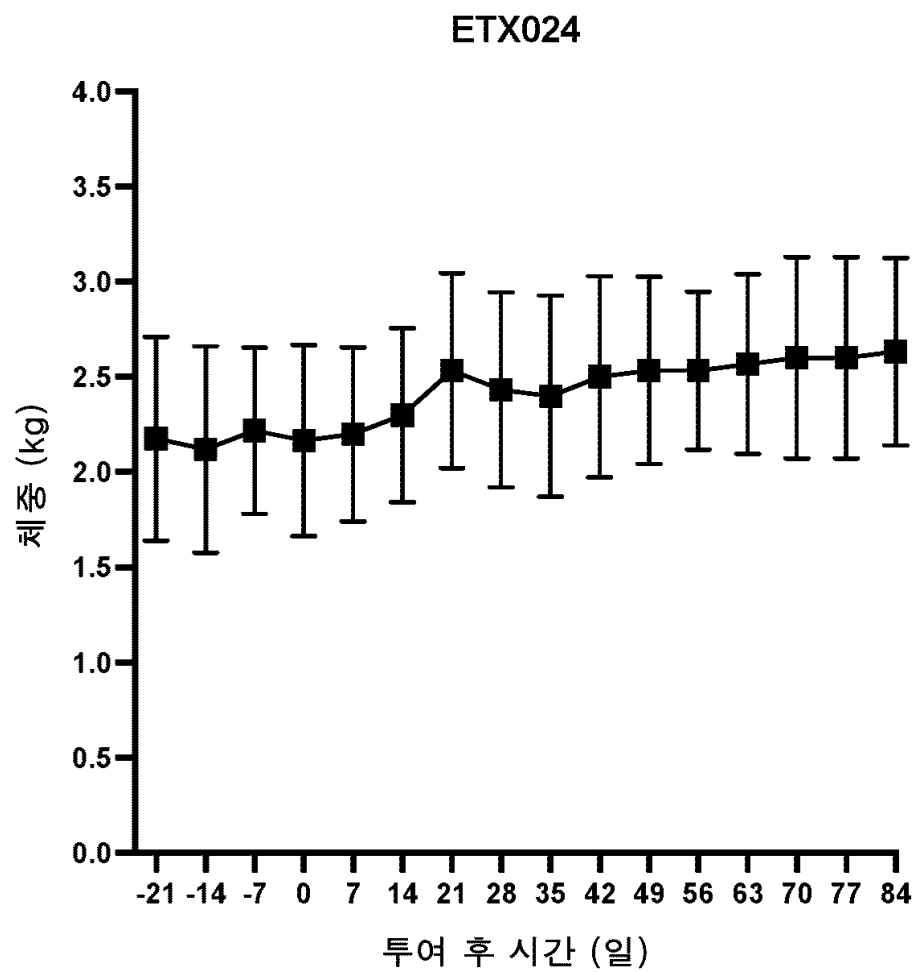
도면29a



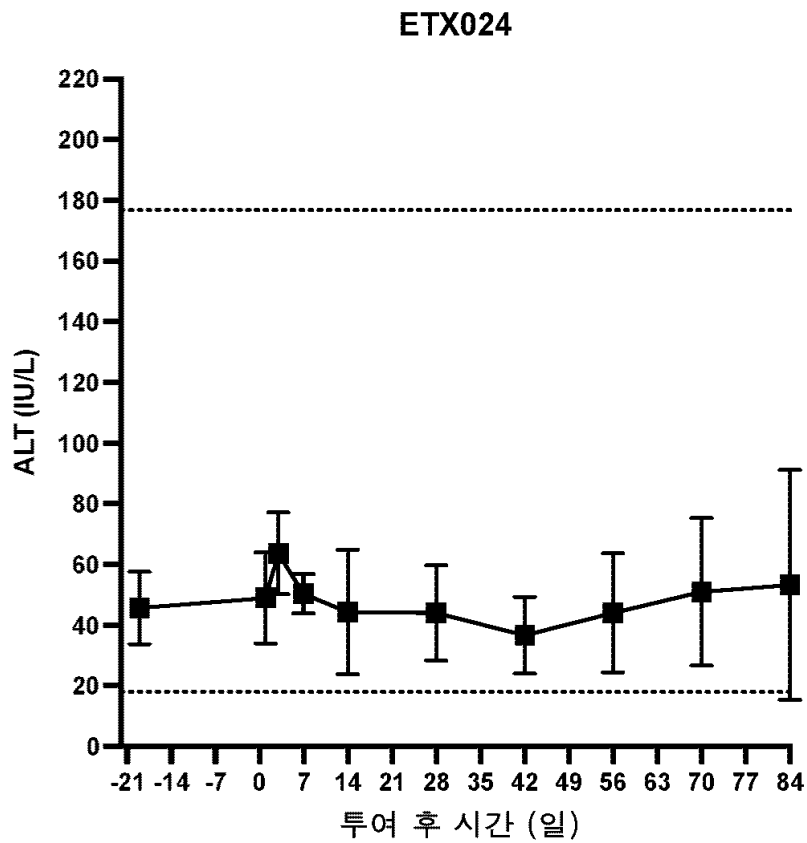
도면29b



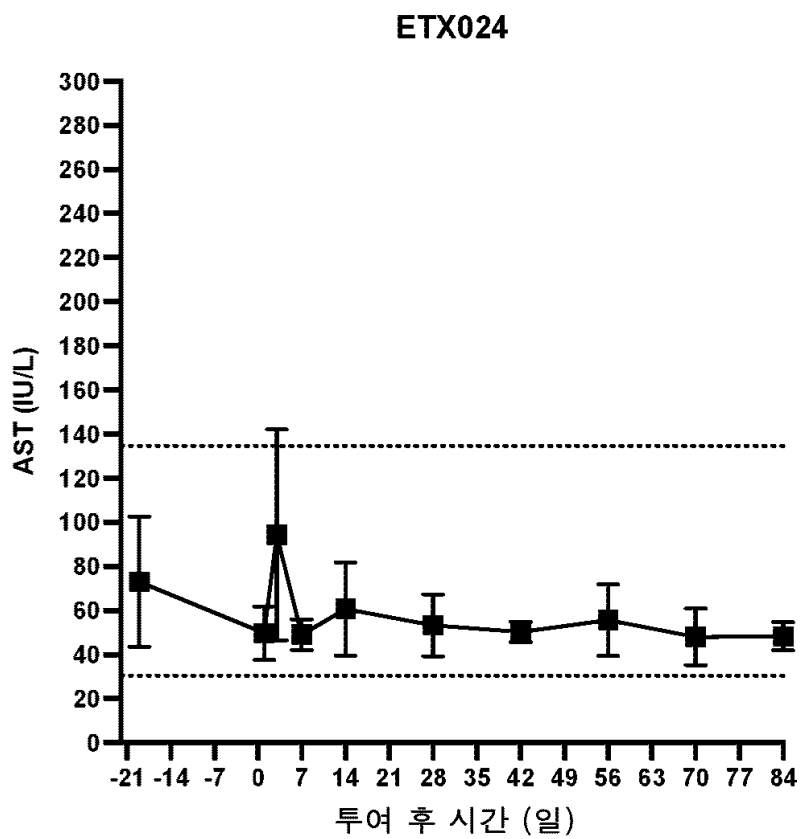
도면29c



도면29d

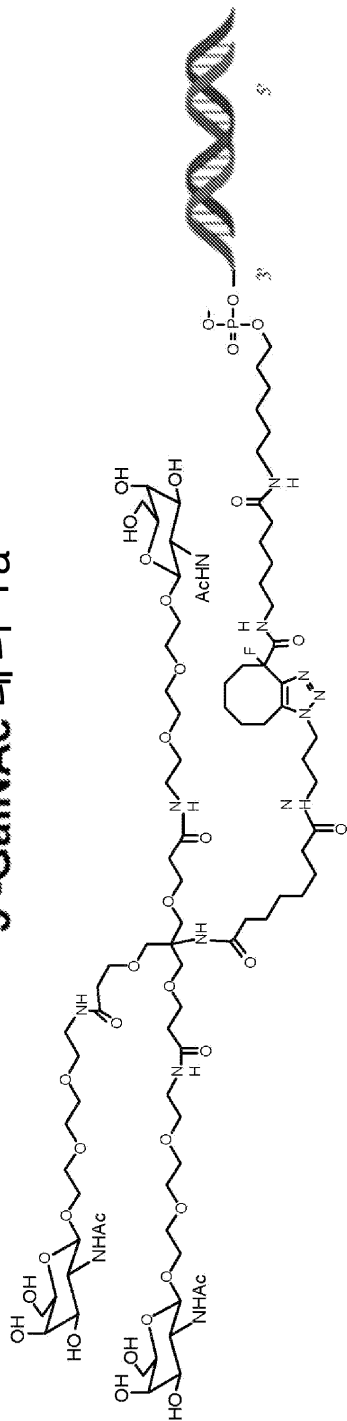


도면29e



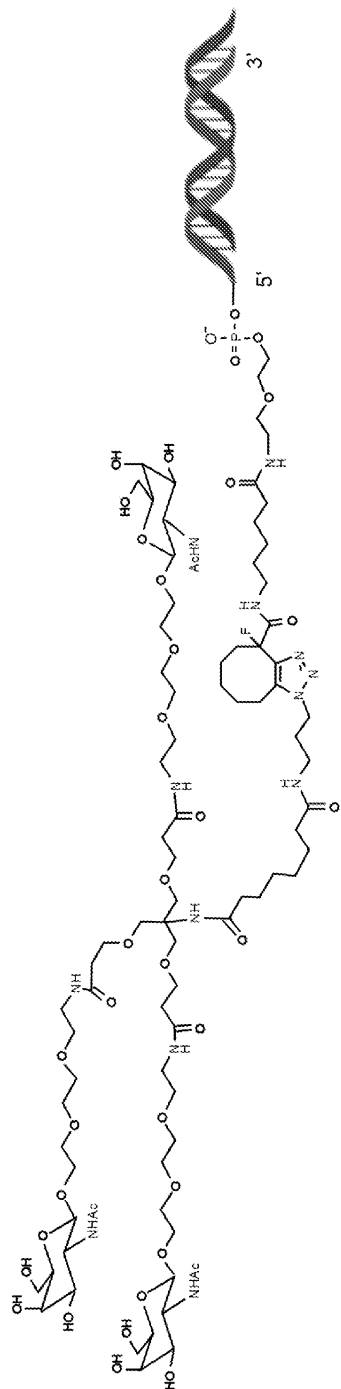
도면30

3'-GaiNac 테더 1a



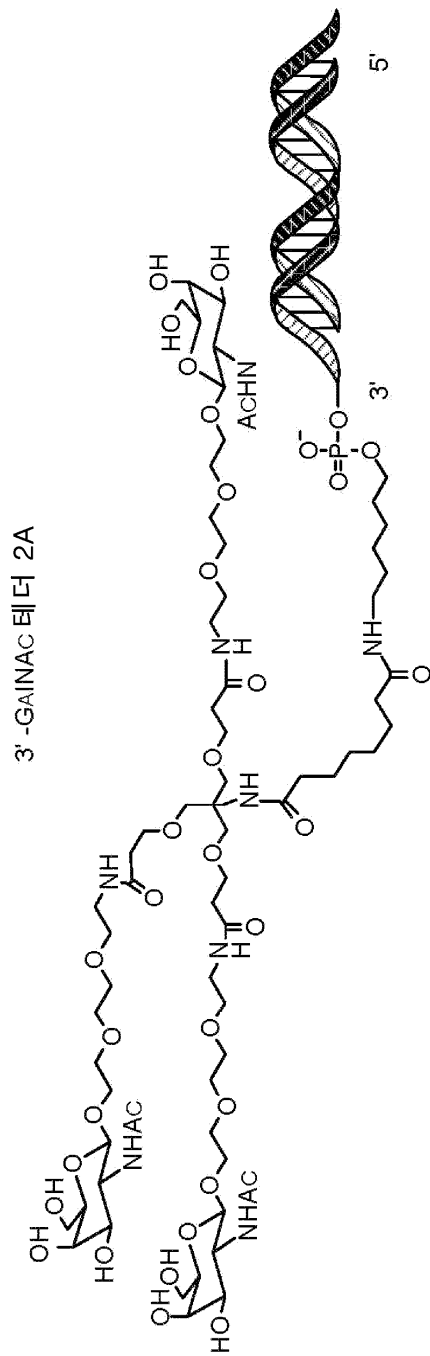
도면31

# 5'-GAINAc 테더 1b

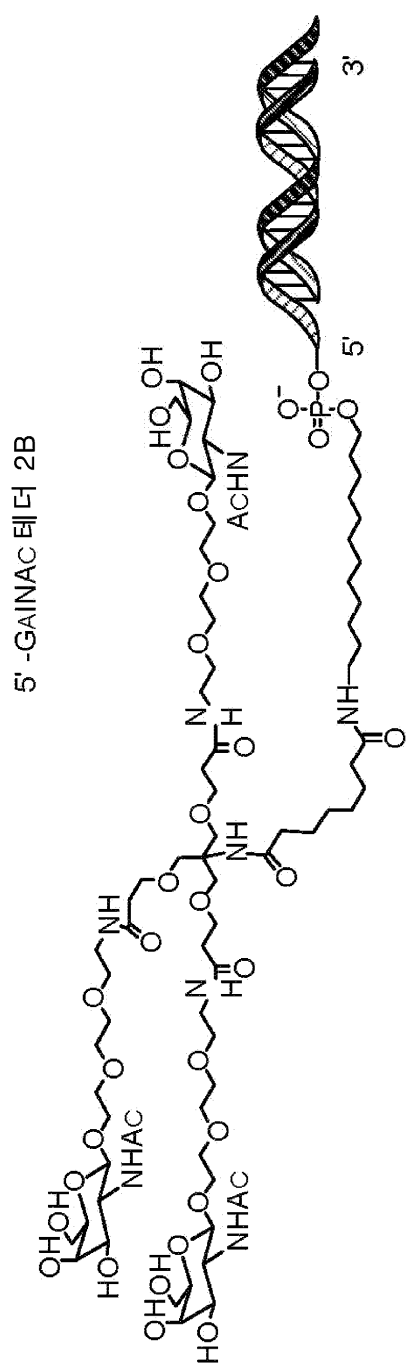




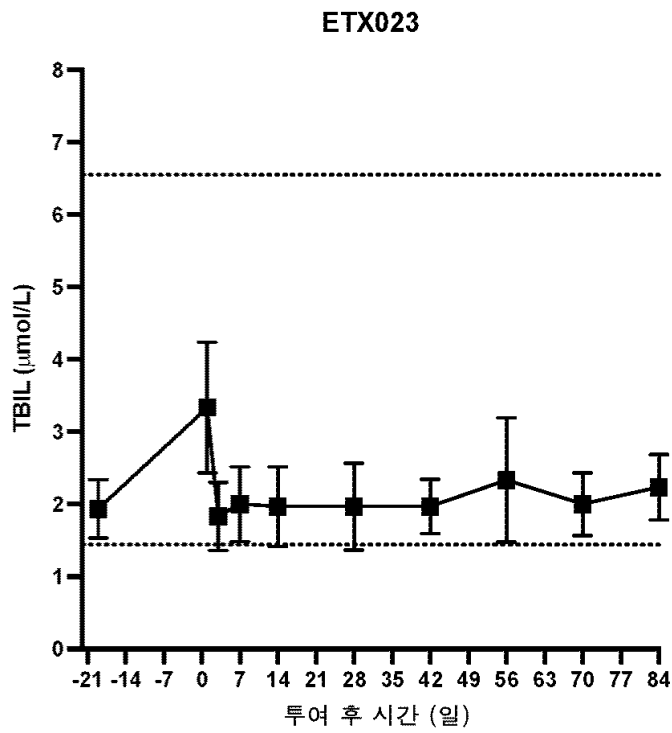
도면32



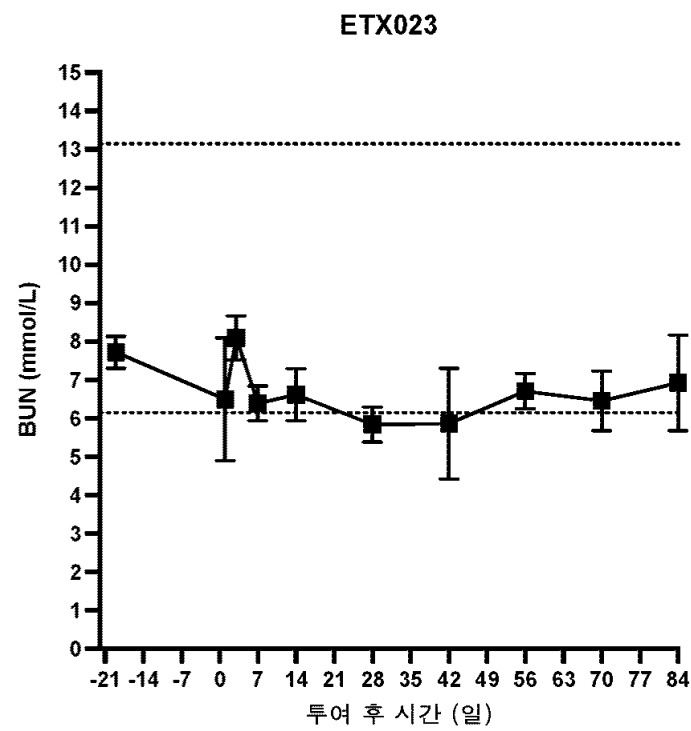
도면33



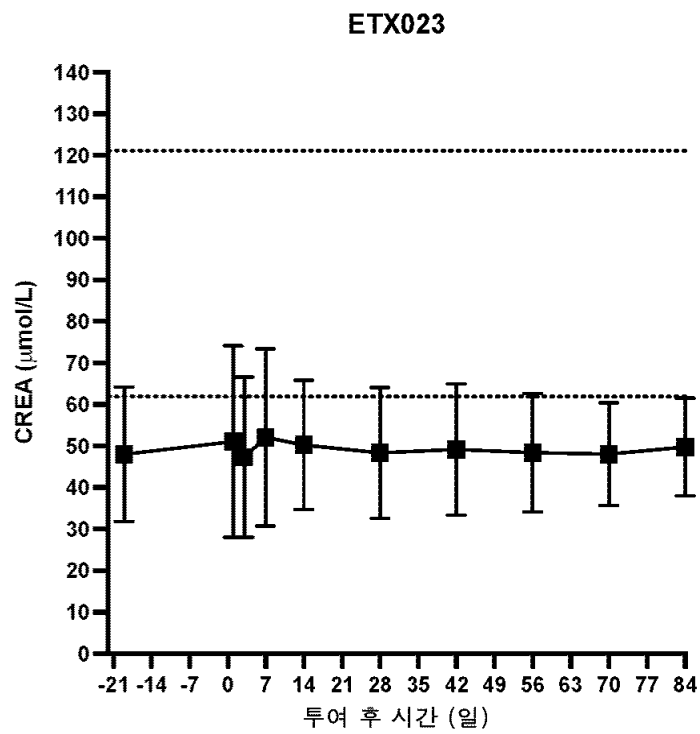
도면34



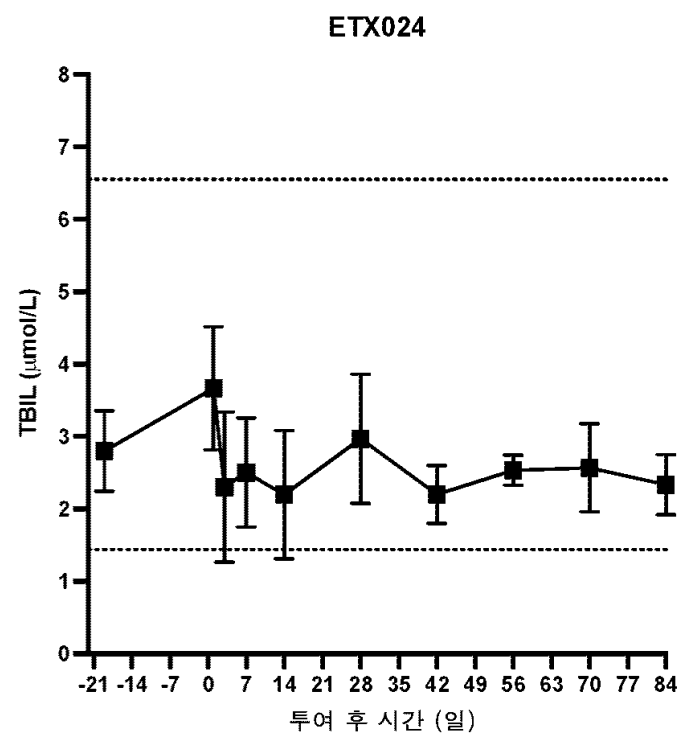
도면35



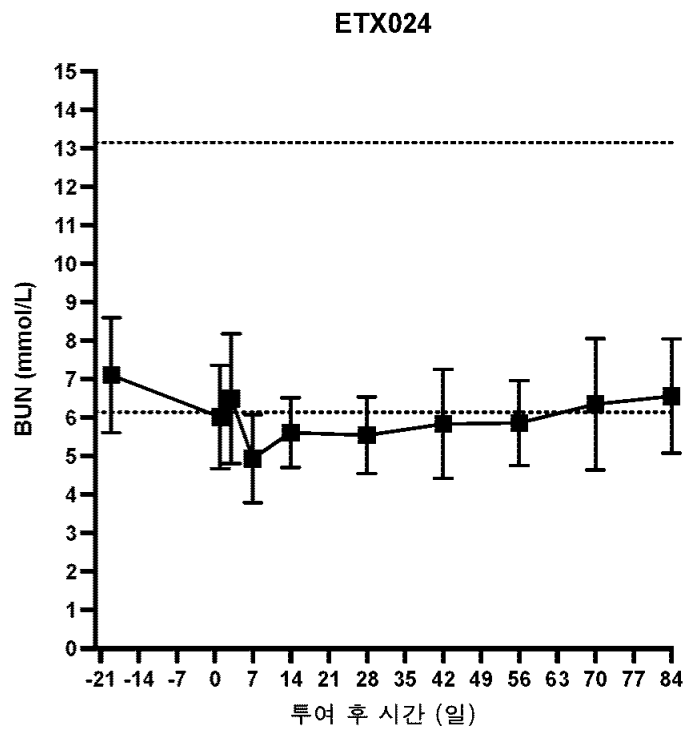
도면36



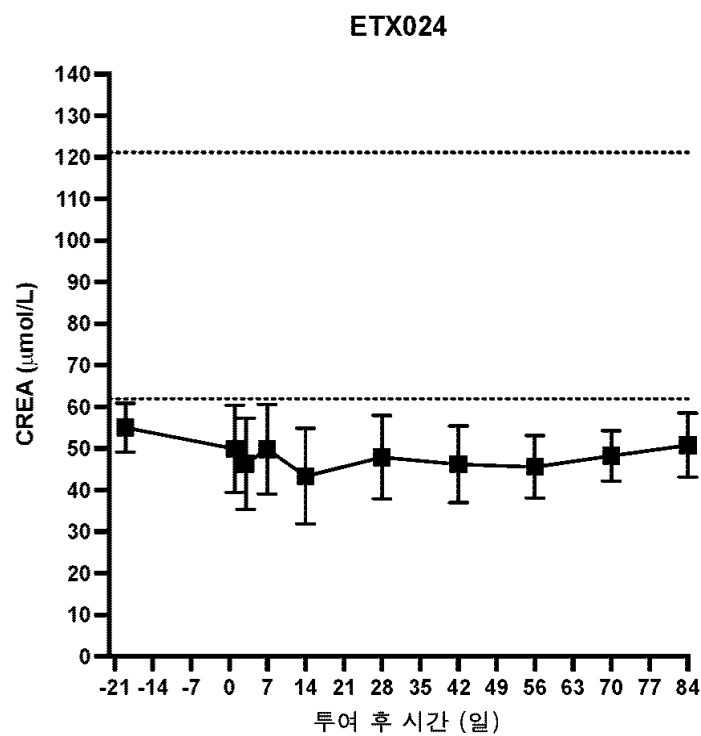
도면37



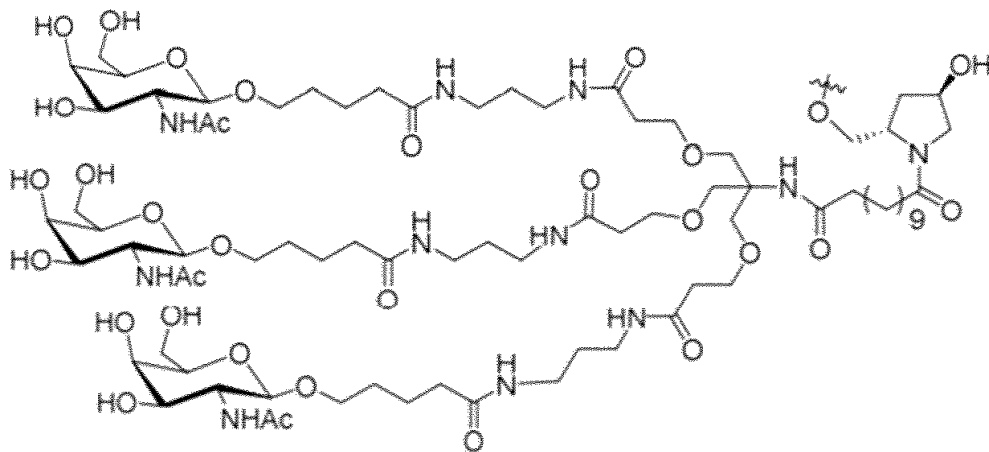
도면38



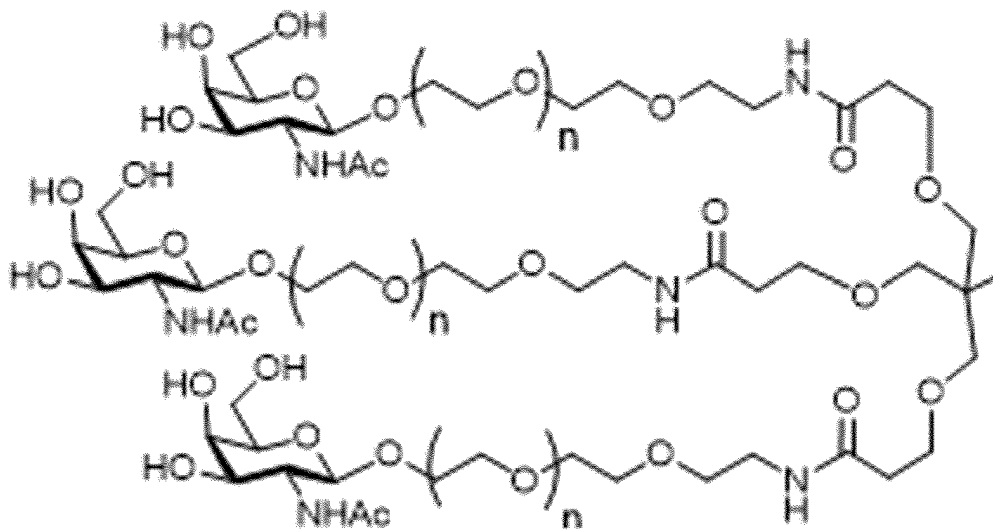
도면39



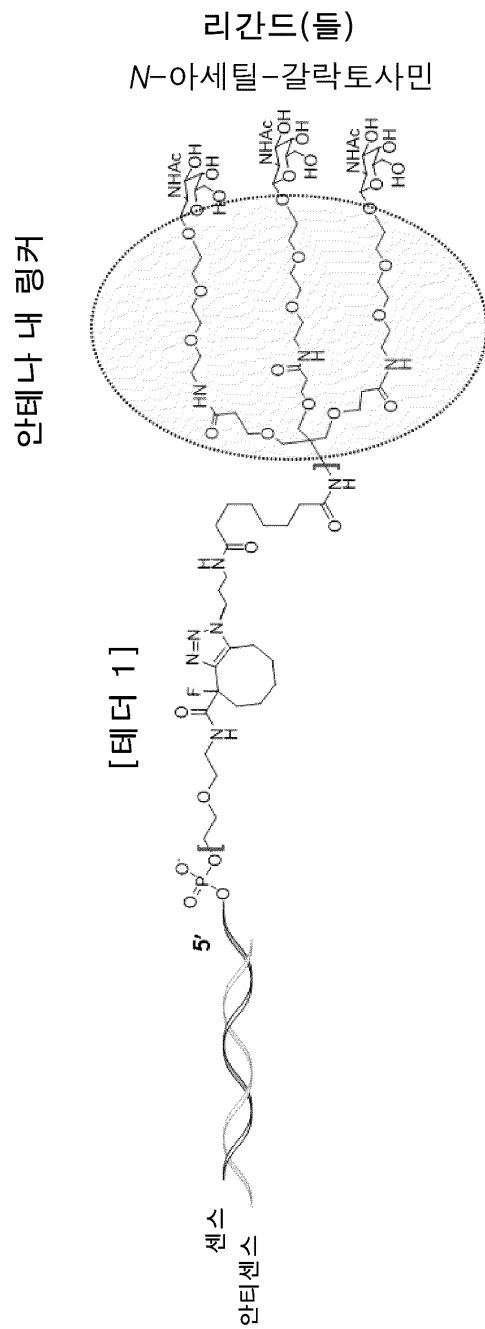
도면40a



도면40b

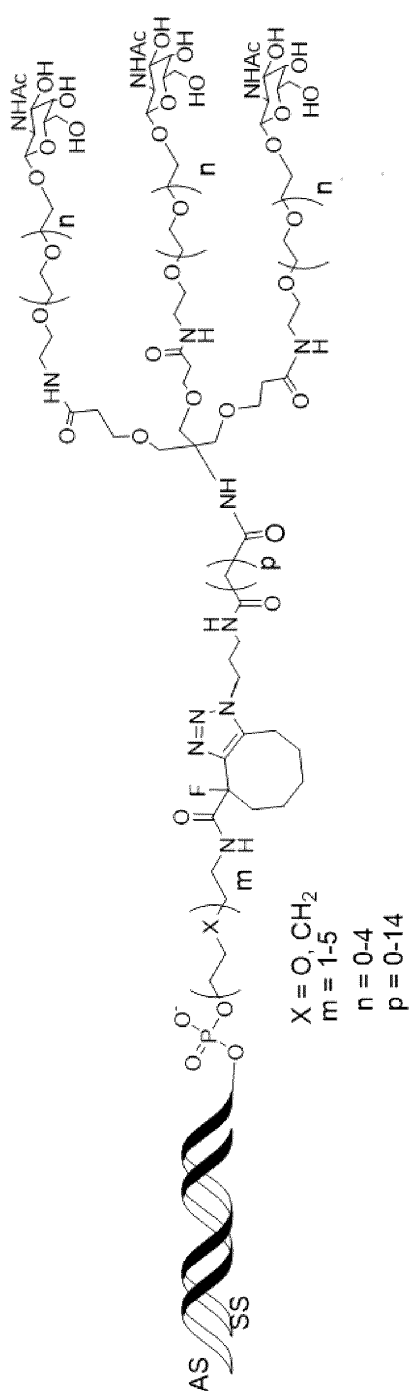


도면41a

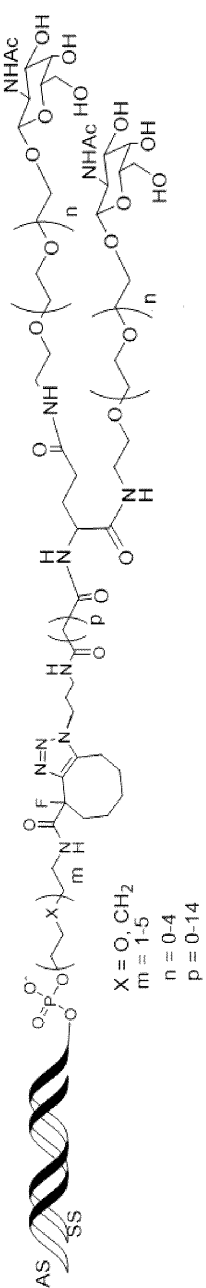




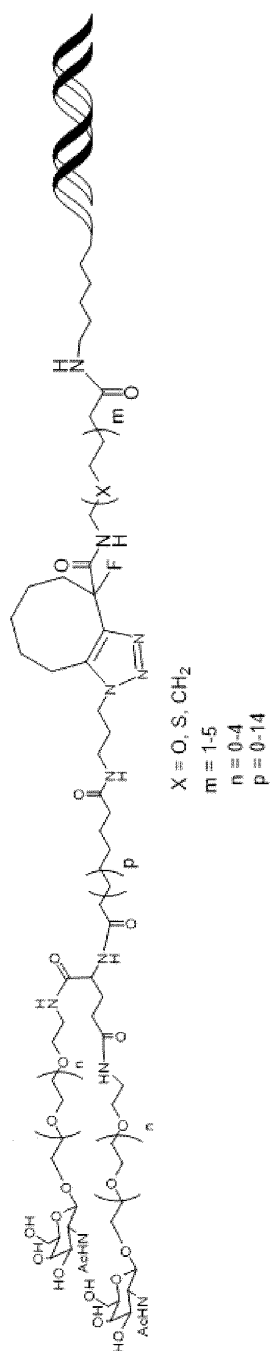
도면41b



도면41c

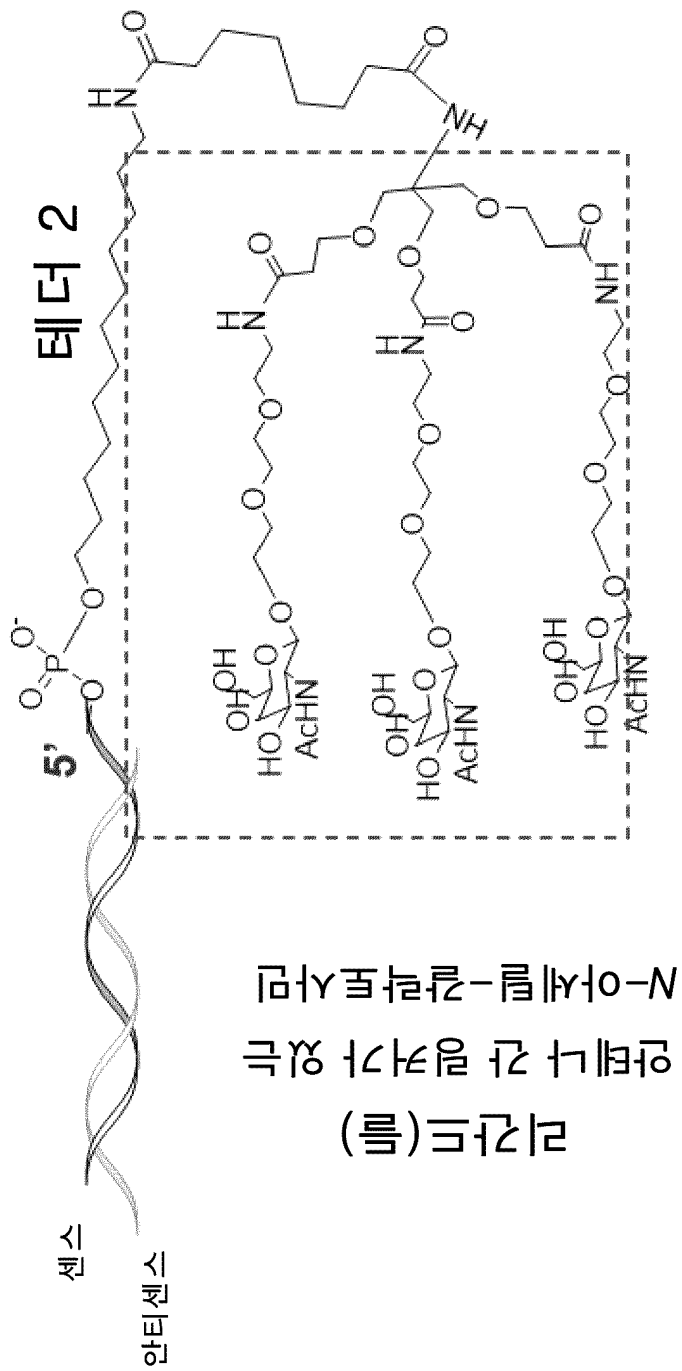


도면41d



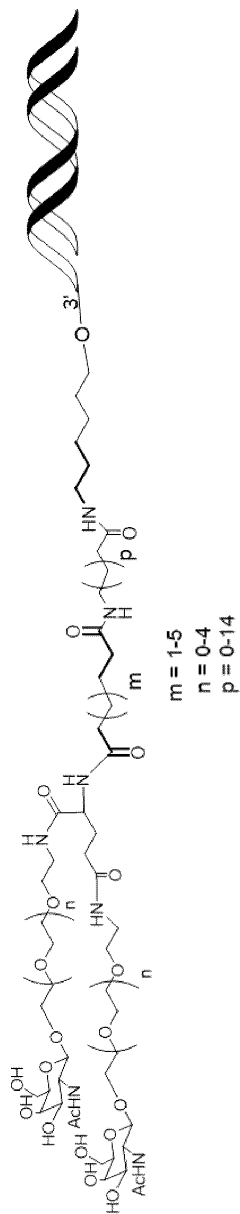


도면42b





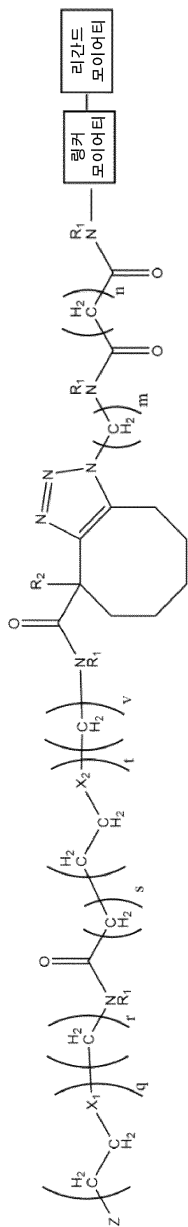
도면42d





도면43a

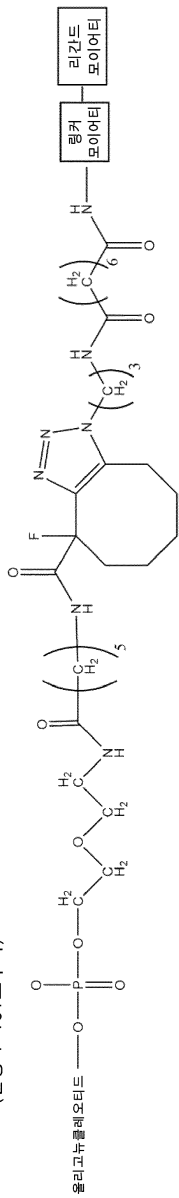
(문장 1-101로부터)



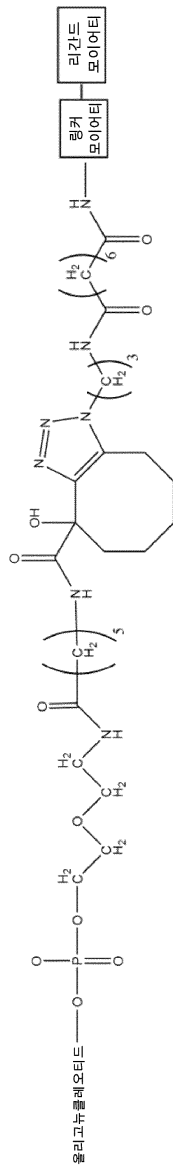
화학식 (I)

도면43b

(문장 1-101로부터)



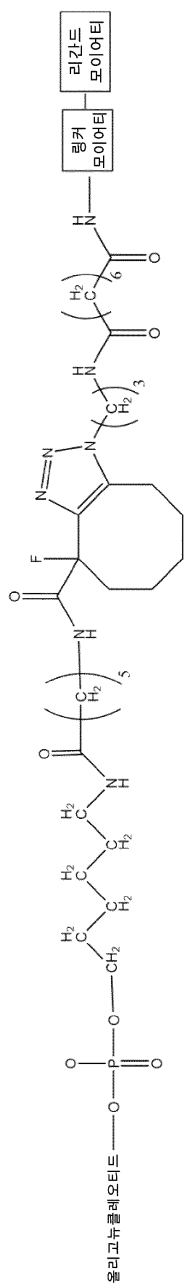
화합식 (II)



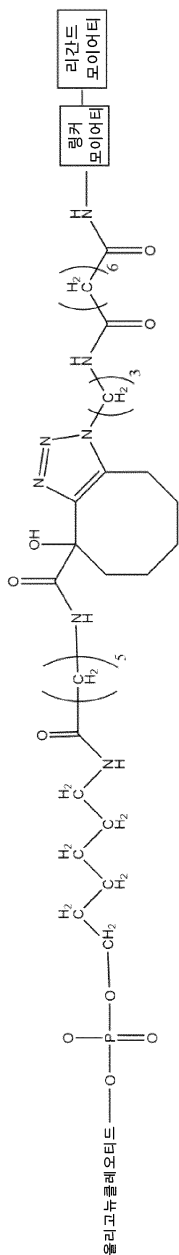
화합식 (III)

도면43c

(문장 1-101로부터)

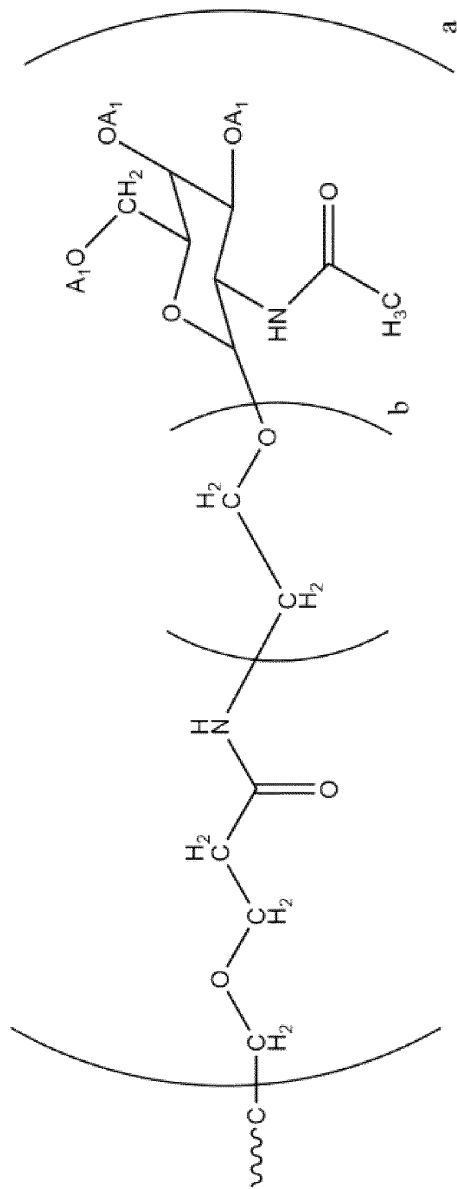


화학식 (IV)



화학식 (V)

도면43d

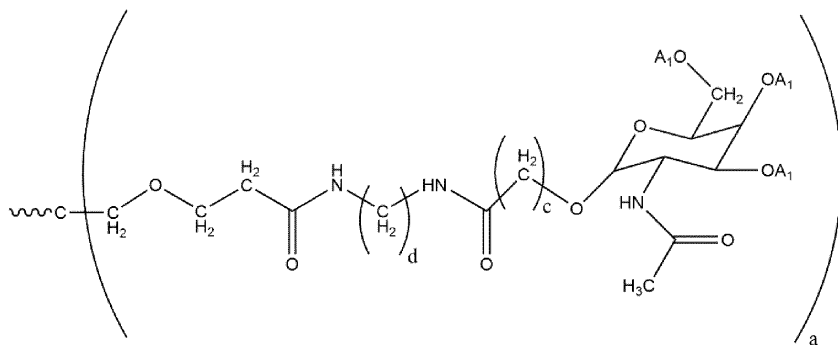


화학식 (VIa)

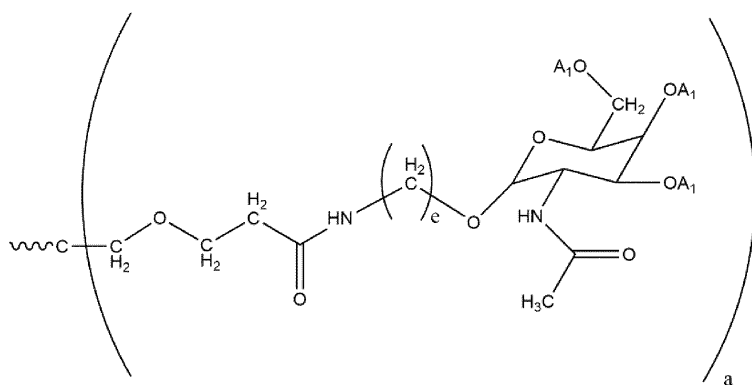
(문장 1-101로부터)

도면43e

(문장 1-101로부터)



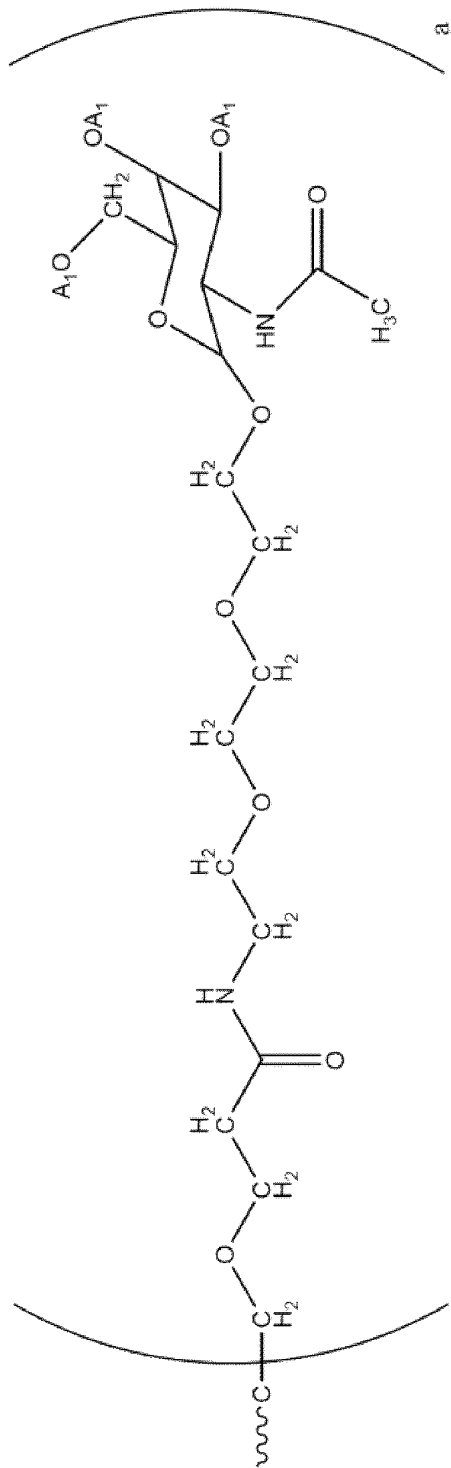
화학식 (VIb)



화학식 (VIc)

도면43f

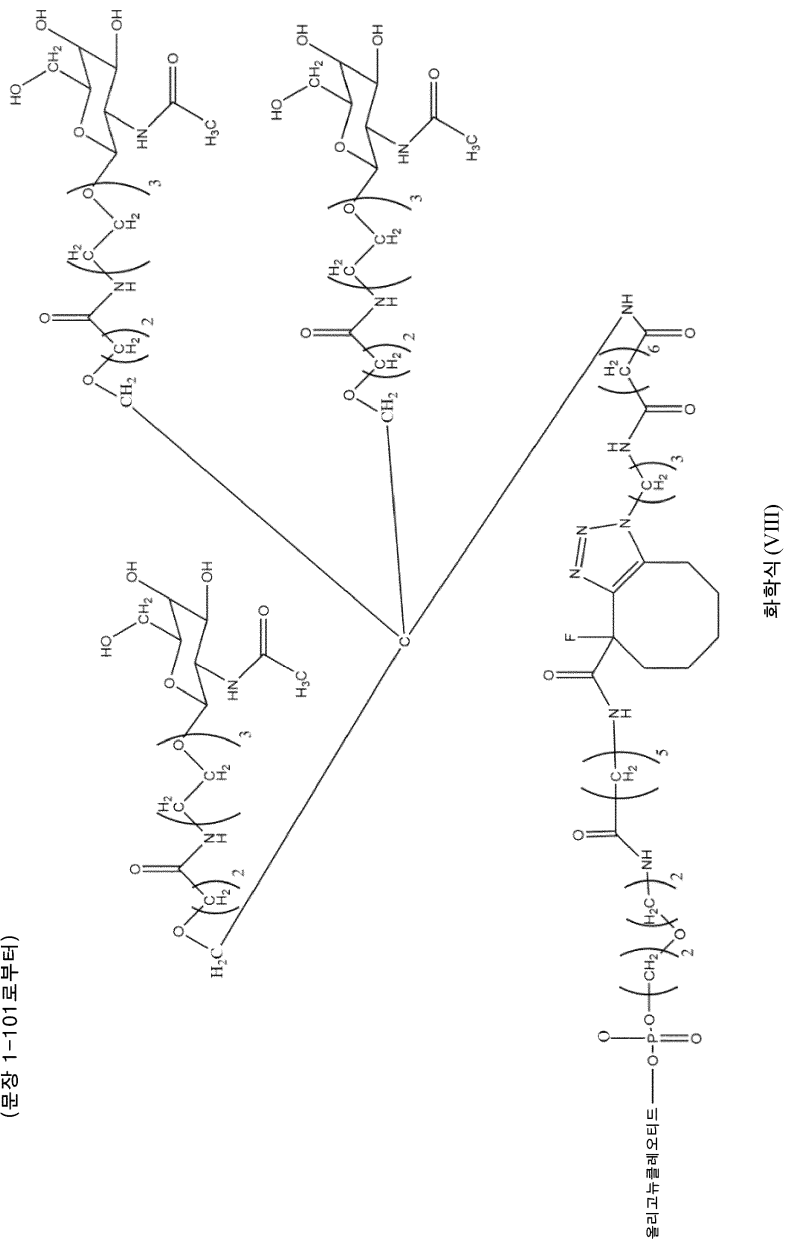
(문장 1-101로부터)



화학식 (VII)

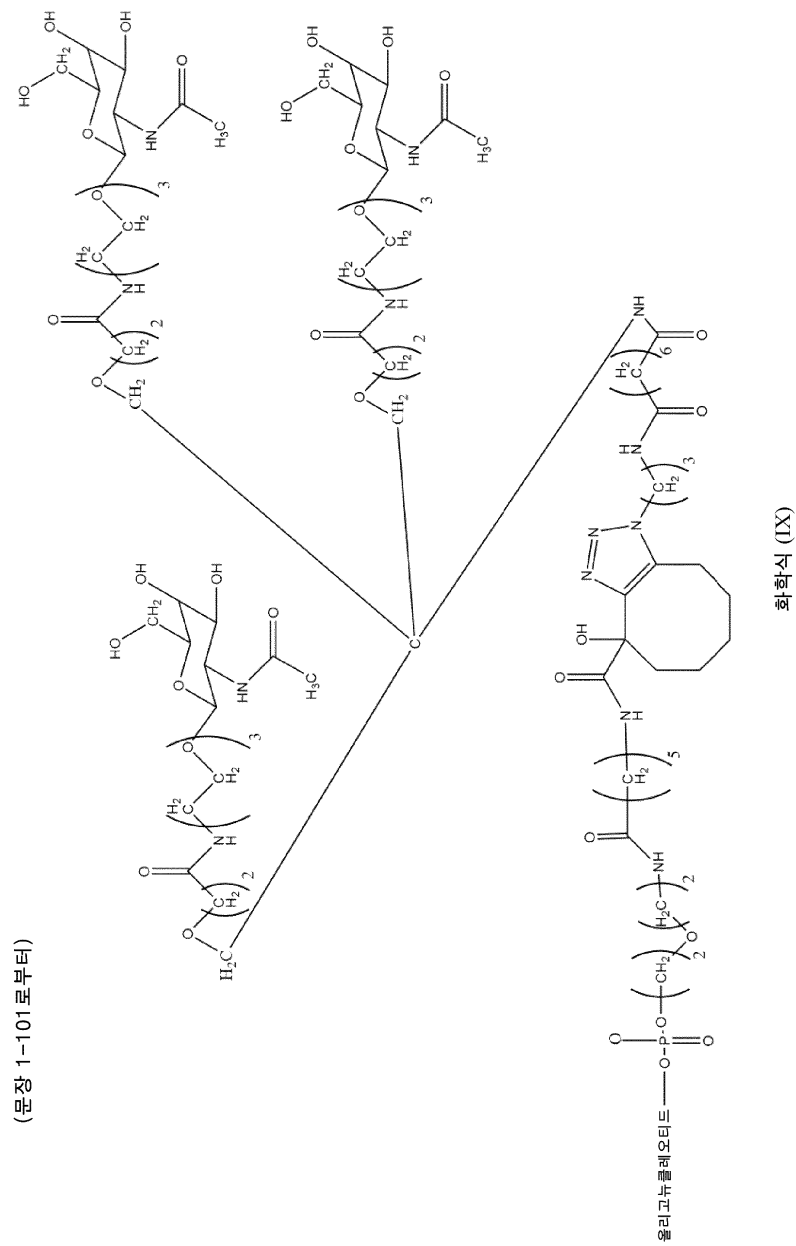
도면43g

(문장 1-101로부터)

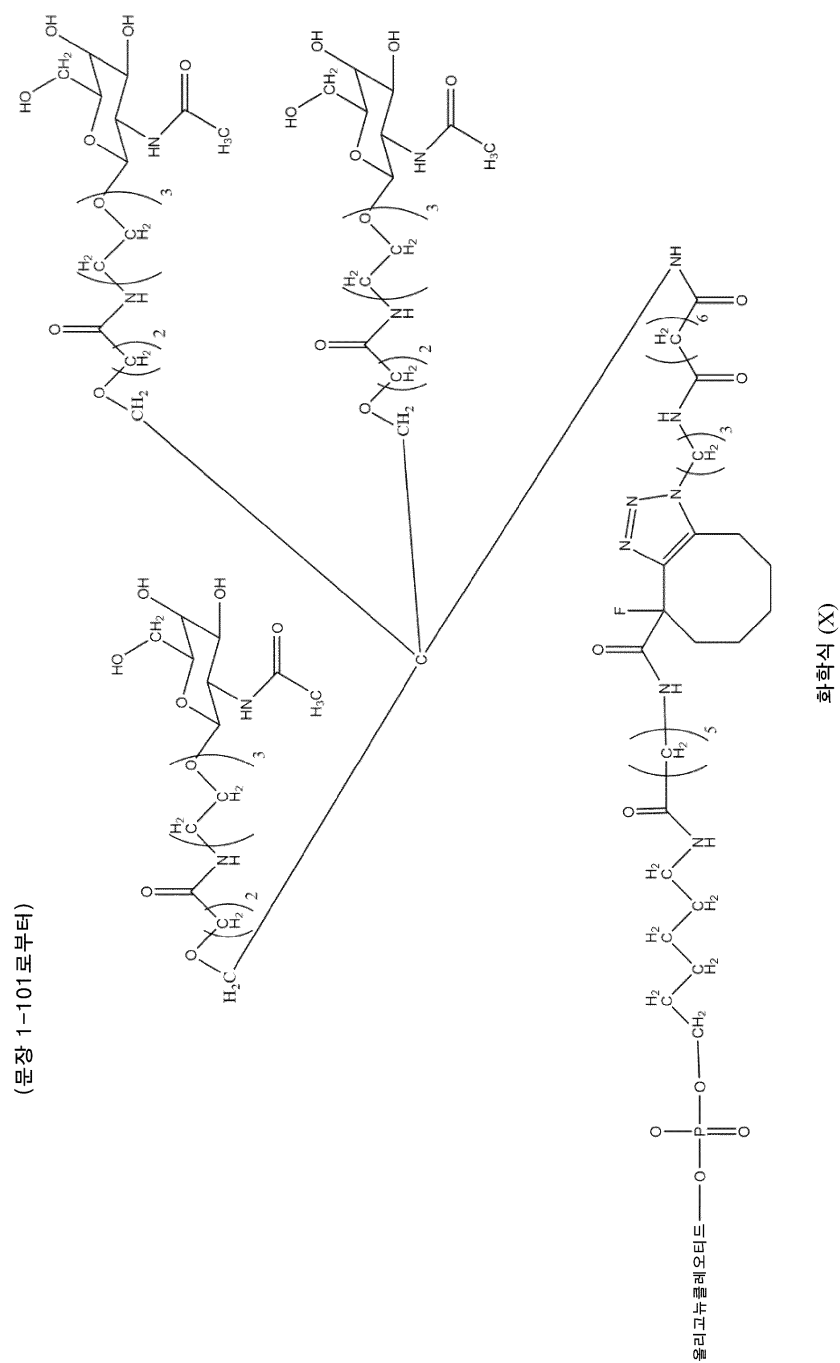




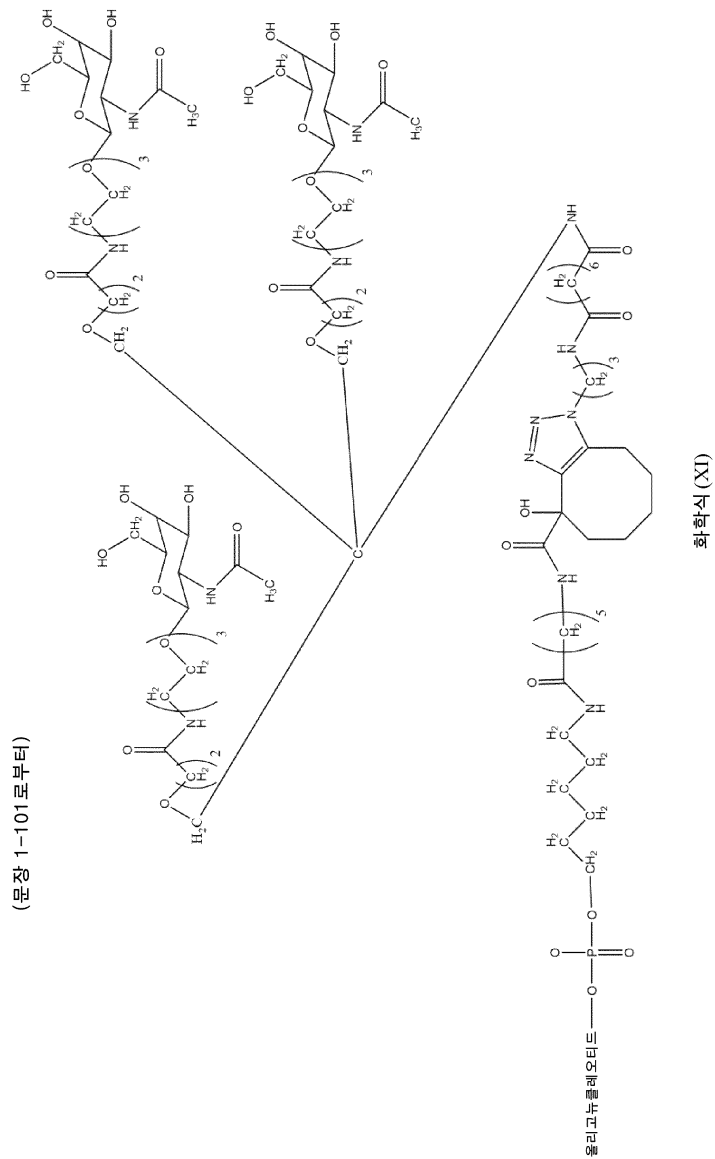
도면 43h



도면43i

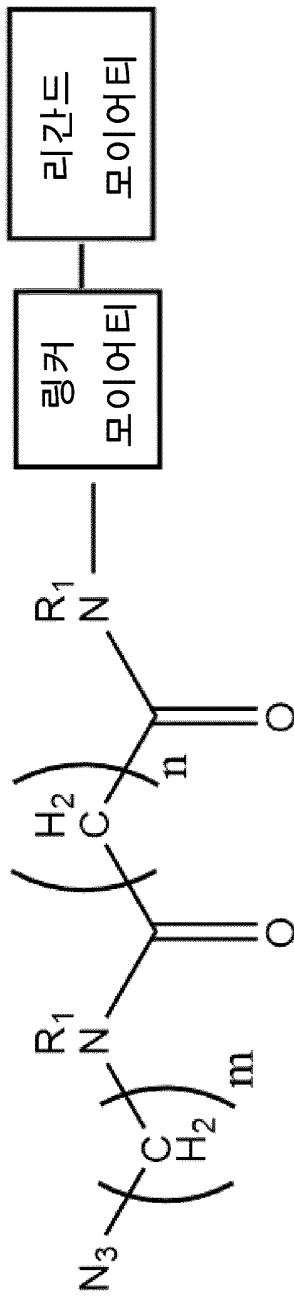


도면43j



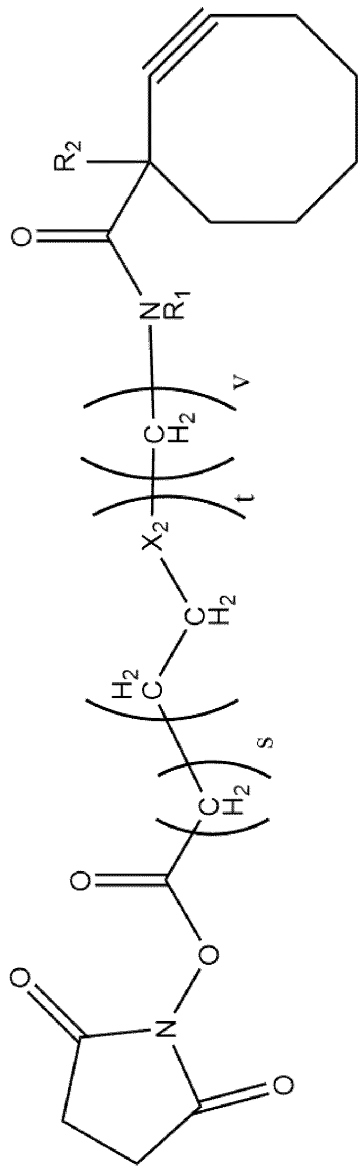
도면43k

(문장 1-101로부터)

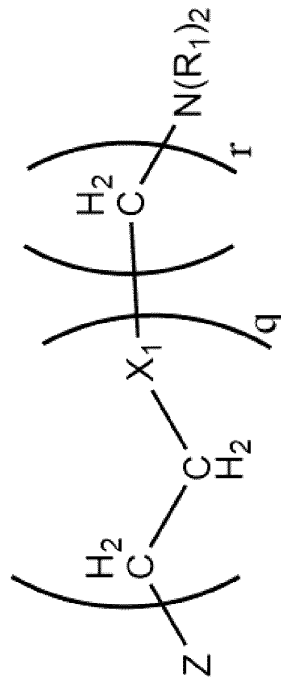


화학식 (XIII)

도면431



화합식 (XIV)

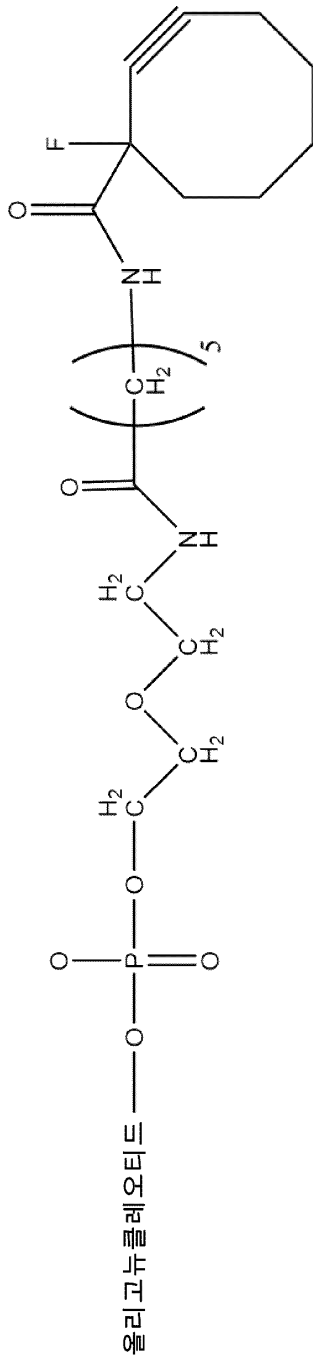


화합식 (XV)

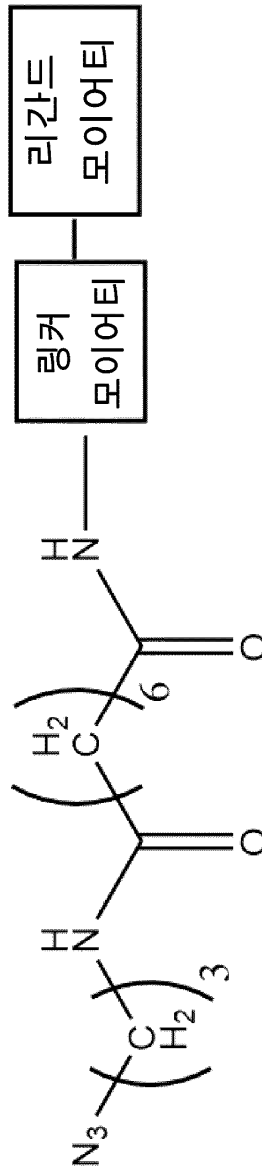
(문장 1-101로부터)

도면43m

(문장 1-101로부터)

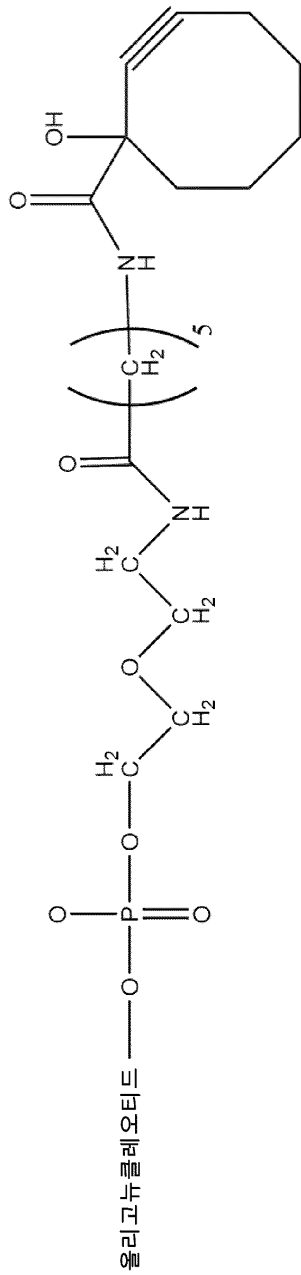


화합식 (XIIa)

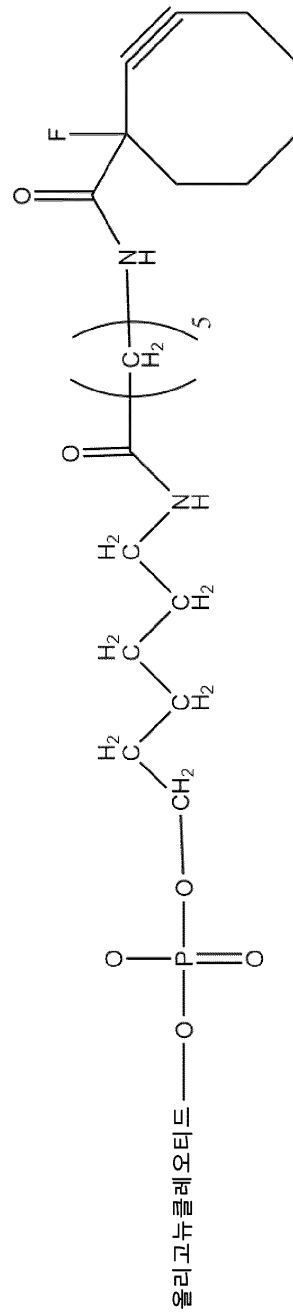


화합식 (XIIIa)

도면43n



화합식 (XIIb)

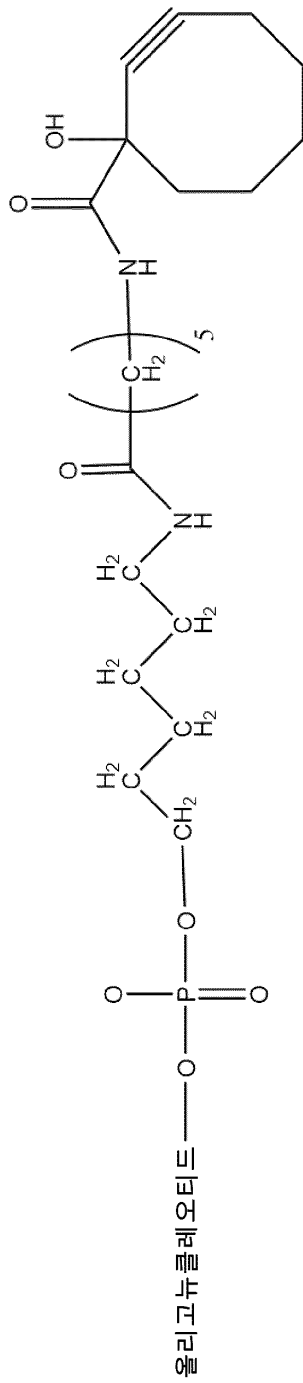


화합식 (XIIc)

(문장 1-101로부터)

도면43o

(문장 1-101로부터)

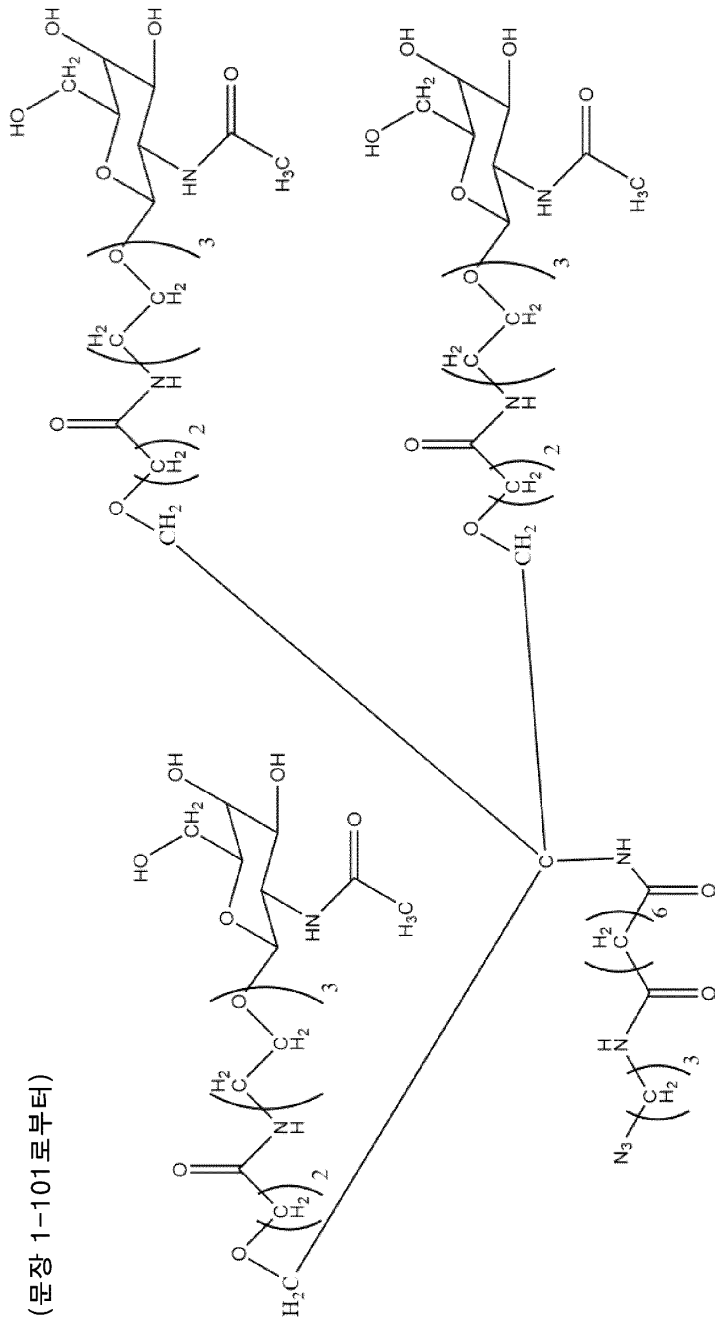


화합식 (XIIId)



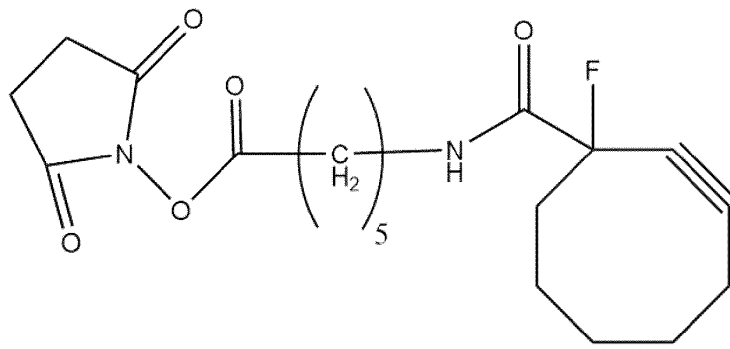
도면43p

(문장 1-101로부터)

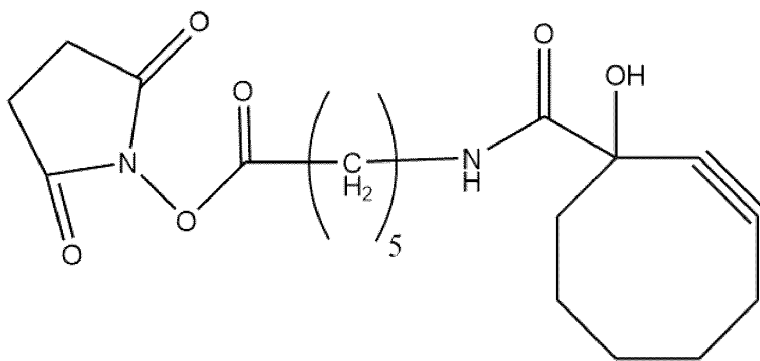


화합식 (XIIIb)

도면43q



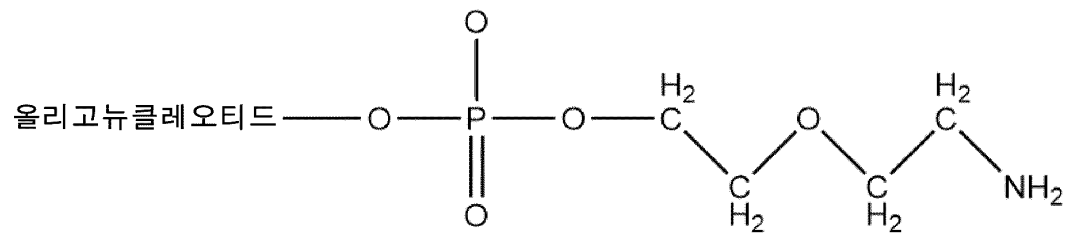
화학식 (XIVa)



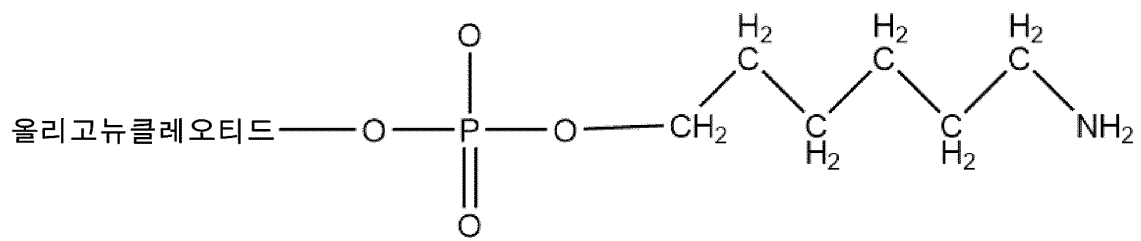
화학식 (XIVb)

(문장 1-101로부터)

도면43r



화학식 (XVa)

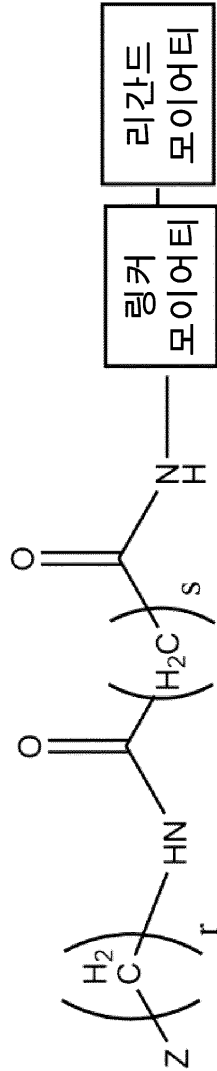


화학식 (XVb)

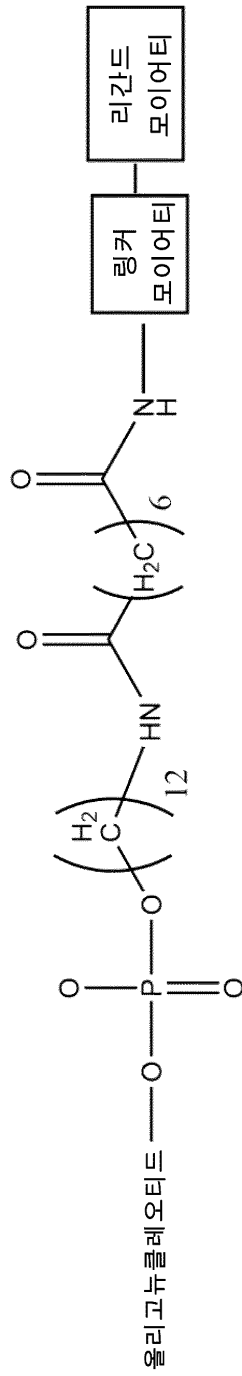
(문장 1-101로부터)

도면44a

(항목 1-56으로부터의 화학식)

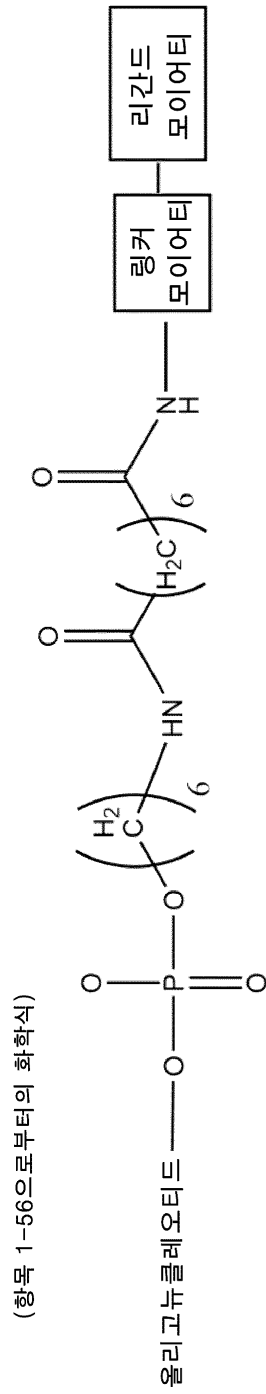


화학식 (I)

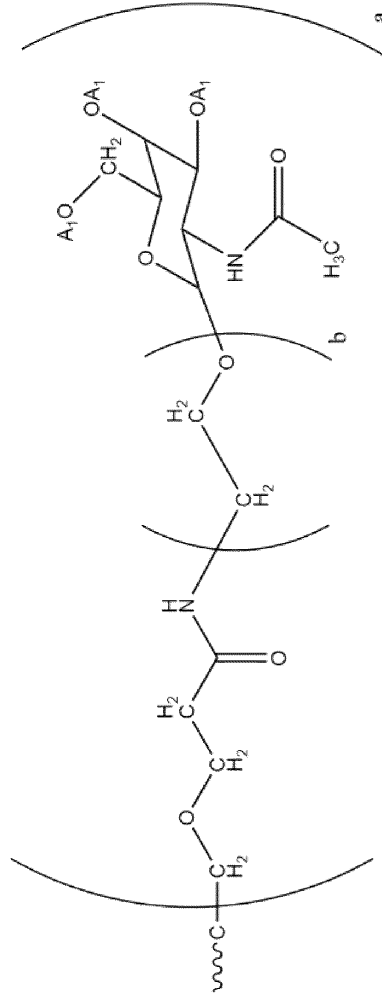


화학식 (II)

도면44b

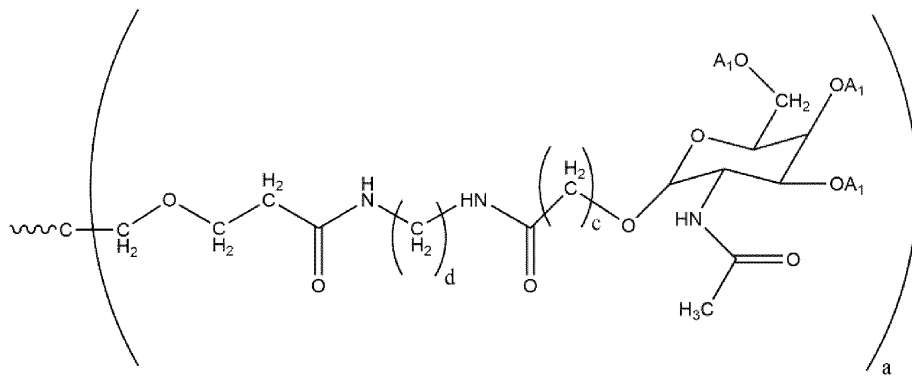


화학식 (III)

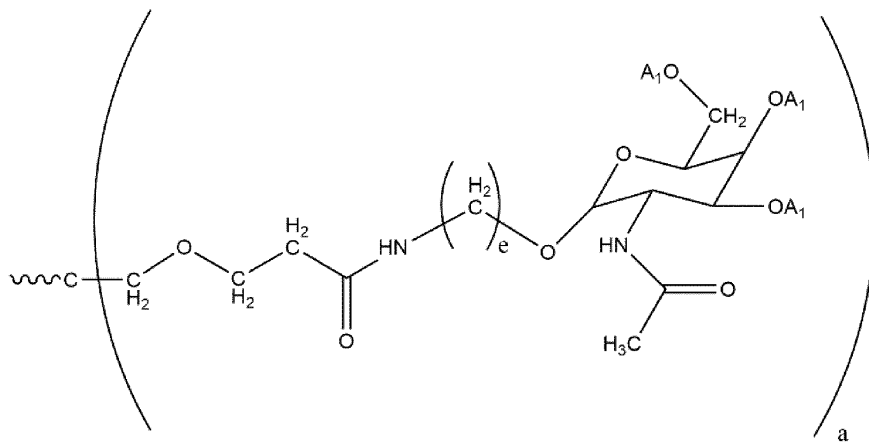


화학식 (IV)

도면44c



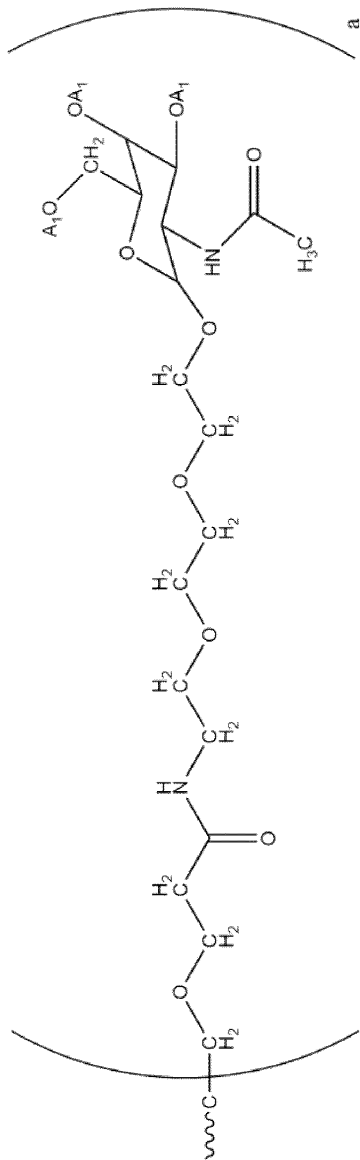
화학식 (V)



(항목 1-56으로부터의 화학식)

화학식 (VI)

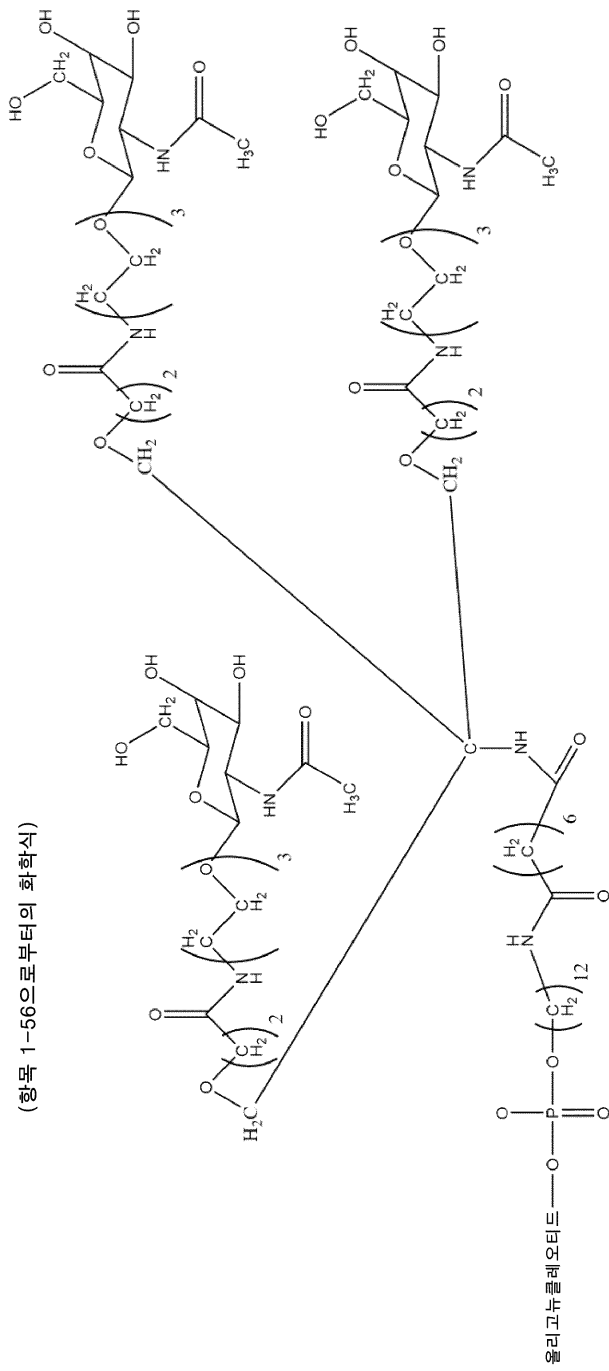
도면 44d



화학식 (VII)

(호명) 1-56의 컴퓨터이화하하시

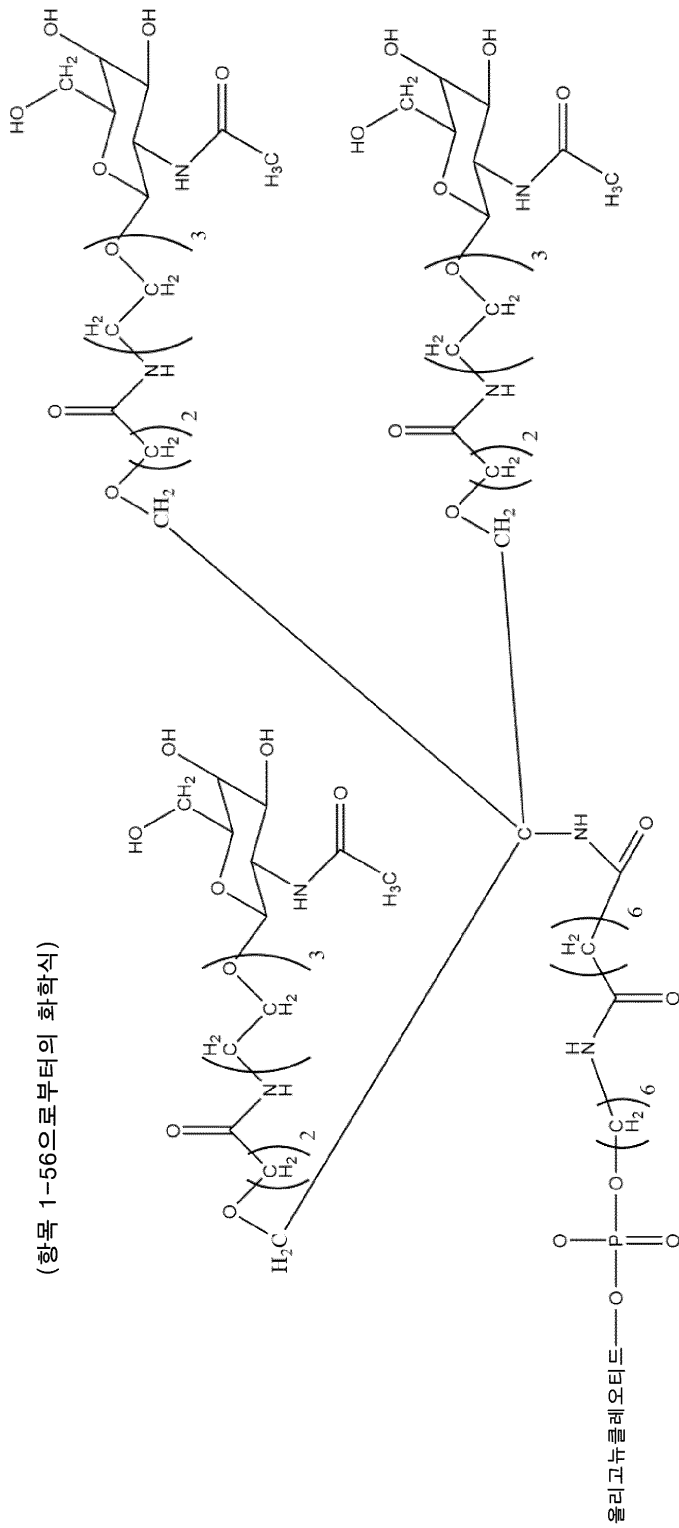
도면44e



화학식 (VIII)

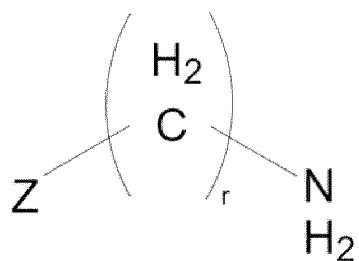


도면44f

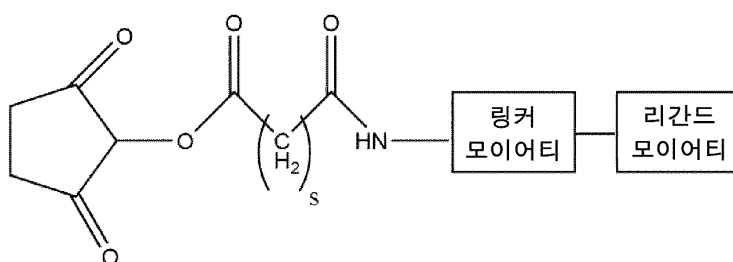


도면 44g

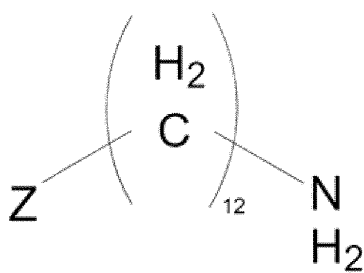
(항목 1-56으로부터의 화학식)



화학식 (X)



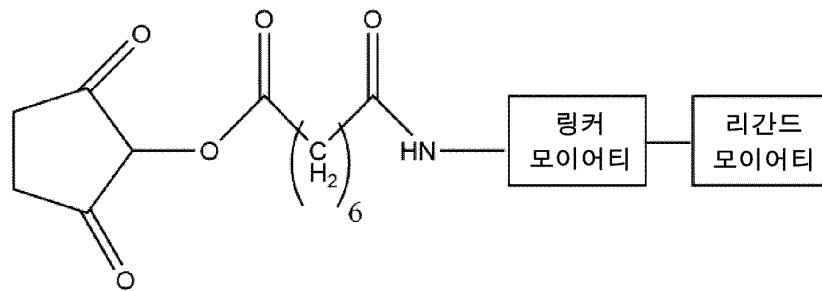
화학식 (XI)



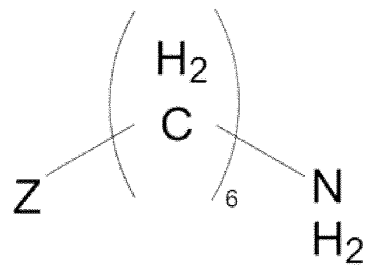
화학식 (Xa)

도면44h

(항목 1-56으로부터의 화학식)



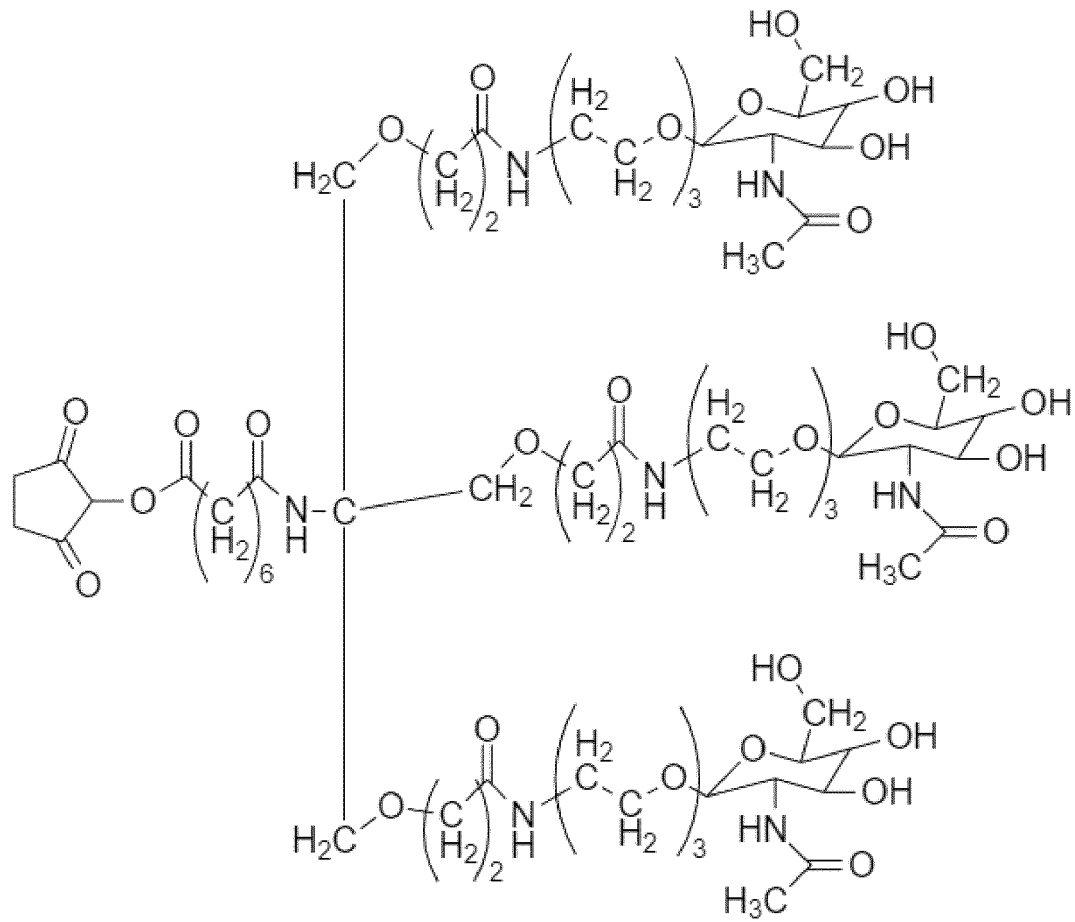
화학식 (XIa)



화학식 (Xb)

도면44i

(항목 1-56으로부터의 화학식)



화학식 (XIb)

도면45a

HAO1 표적화 작제물



도면45b

HAO1 표적화 작제물



### 도면46a

C5 표적화 작제물



### 도면46b

C5 표적화 작제물



### 도면47a

TTR 표적화 작제물



### 도면47b

TTR 표적화 작제물



### 서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> e-therapeutics plc

<120> NUCLEIC ACIDS CONTAINING ABASIC NUCLEOTIDES

<130> 169692.00050

<150> US63/271,684

<151> 2021-10-25

<150> US63/262,316

<151> 2021-10-08  
 <150> US63/143,805  
 <151> 2021-01-30  
 <160> 176  
 <170> BiSSAP 1.3.6  
 <210> 1  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> siRNA  
 <220>  
 <223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
 the end of the description  
 <400> 1  
 gacuuucauc cuggaaaaua a 21  
  
 <210> 2  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> siRNA  
 <220>  
 <223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
 the end of the description  
 <400> 2  
 accugaaagu aggaccuuua uau 23  
  
 <210> 3  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> siRNA  
 <220>  
 <223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at

the end of the description

<400> 3

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 4

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at

the end of the description

<400> 4

uuuucguucu auaaaaauau uau 23

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at

the end of the description

<400> 5

ugggauuua uguaaccaag a 21

<210> 6

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at

the end of the description

<400> 6

cuaccuaaa guacauuggu ucu 23

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at

the end of the description

<400> 7

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 8

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at

the end of the description

<400> 8

accugaaagu aggaccuuua uau 23

<210> 9

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at

the end of the description



<400> 9

aagcaagaua uuuuuauau a

21

<210> 10

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 10

uuuucguucu auaaaaauau uau

23

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 11

ugggauuua uguaaccaag a

21

<210> 12

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 12

cuaccuuaa guacauuggu ucu 23

<210> 13

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 13

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 14

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 14

accugaaagu aggaccuuua uau 23

<210> 15

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 15

aagcaagaua uuuuuauaau a 21

<210> 16

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 16

uuuucguucu auaaaaauau uau 23

<210> 17

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 17

ugggauuua uguaaccaag a 21

<210> 18

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 18

cuaccuuaaa guacauuggu ucu 23

<210> 19

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 19

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 20

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 20

accugaaagu aggaccuuua uau 23

<210> 21

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 21

aagcaagaua uuuuuauaau a 21

<210> 22

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 22

uuuucguucu auaaaaauau uau 23

<210> 23

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 23

ugggauuua uguaaccaag a 21

<210> 24

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 24

cuaccuuaa guacauuggu ucu 23

<210> 25

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 25

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 26

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 26

uauauuucca ggaugaaagu cca 23

<210> 27

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 27

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 28

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 28

uauauuucca ggaugaaagu cca 23

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 29

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 30

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 30

uauuauaaaa auaucuugcu uu 23

<210> 31

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 31

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 32

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 32

uauuauaaaa auaucuugcu uu 23

<210> 33

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 33



ugggauuua uuaaccaag a 21

<210> 34

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 34

ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 35

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 35

ugggauuua uuaaccaag a 21

<210> 36

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 36

ucuugguuac augaaaucac auc 23

<210> 37

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 37

cuuacgcuga guacuucga 19

<210> 38

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 38

ucgaaguacu cagcguaag 19

<210> 39

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 39

agauaugcac acacacgga 19

<210> 40

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 40

uccgugugug ugcauauca 19

<210> 41

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 41

ucucguggcc uuaaugaaa 19

<210> 42

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 42

uuucauuuag gccacgagau u 21

<210> 43

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 43

gacuuucauc cuggaaauau a 21

<210> 44

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 44

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 45

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 45

ugggauuuca uguaaccaag a 21

<210> 46

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 46

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 47

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 47

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 48

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 48

ugggauuuc a uguaaccaag a 21

<210> 49

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 49

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 50

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 50

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 51

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 51

ugggauuuca uguaaccaag a 21

<210> 52

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 52

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 53

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 53

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 54

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 54

ugggauuuca uguaaccaag a 21

<210> 55

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 55

uauauuucca ggaugaaagu cca 23

<210> 56

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 56

uauuauaaaa auaucuugcu uuu 23

<210> 57

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 57



ucuugguuac augaaaucac auc 23

<210> 58

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 58

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 59

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 59

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 60

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 60

ugggauuuc a uguaaccaag a 21

<210> 61

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 61

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 62

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 62

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 63

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 63

ugggauuuca uguaaccaag a 21

<210> 64

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 64

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 65

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 65

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 66

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 66

ugggauuuca uguaaccaag a 21

<210> 67

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 67

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 68

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 68

aagcaagaua uuuuuauaau a 21

<210> 69

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 69

ugggauuuca uguaaccaag a 21

<210> 70

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 70

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 71

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 71

uauauuucca ggaugaaagu cca 23

<210> 72

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 72

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 73

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 73

uauauuucca ggaugaaagu cca 23

<210> 74

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 74

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 75

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 75

uauuauaaaa auaucuugcu uu 23

<210> 76

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 76

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 77

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 77

uauuauaaaa auaucuugcu uu 23

<210> 78

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 78

ugggauuuc a uuaaccaag a 21

<210> 79

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 79

ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 80

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 80

ugggauuuc a uuaaccaag a 21

<210> 81

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 81



ucuugguuac augaaaucac auc 23

<210> 82

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 82

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 83

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 83

uauauuucca ggaugaaagu cca 23

<210> 84

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 84

gacuuucauc cuggaaaaua a 21

<210> 85

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 85

uauauuucca ggaugaaagu cca 23

<210> 86

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 86

gacuuucauc cuggaaaaua a 21

<210> 87

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 87

uauauuucca ggaugaaagu cca 23

<210> 88

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 88

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 89

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 89

uauauuucca ggaugaaagu cca 23

<210> 90

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 90

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 91

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 91

uauauuucca ggaugaaagu cca 23

<210> 92

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 92

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 93

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 93

uauuauaaaa auaucuugcu uu 23

<210> 94

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 94

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 95

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 95

uauuauaaaa auaucuugcu uu 23

<210> 96

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 96

aagcaagaua uuuuuauaau a 21

<210> 97

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 97

uauuuauaaaa auaucuugcu uuu 23

<210> 98

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 98

aagcaagaua uuuuuauaau a 21

<210> 99

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 99

uauuauaaaa auaucuugcu uuu

23

<210> 100

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 100

ugggauuuca uguaaccaag a

21

<210> 101

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 101

ucuugguuac augaaaucucc auc

23

<210> 102

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 102

ugggauuua uuaaccaag a 21

<210> 103

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 103

ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 104

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 104

ugggauuua uuaaccaag a 21

<210> 105

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 105



ucuugguuac augaaaucucc auc 23

<210> 106

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 106

ugggauuuc a uuaaccaag a 21

<210> 107

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 107

ucuugguuac augaaaucucc auc 23

<210> 108

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 108

cuuacgcuga guacuucga 19

<210> 109

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 109

ucgaaguacu cagcguaag 19

<210> 110

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 110

agauaugcac acacacgga 19

<210> 111

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 111

uccgugugug ugcauauucu 19

<210> 112

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 112

ucucguggcc uuaaugaaa 19

<210> 113

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 113

uuucauuuag gccacgagau u 21

<210> 114

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 114

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 115

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 115

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 116

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 116

ugggauuua uguaaccaag a 21

<210> 117

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 117

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 118

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 118

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 119

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 119

ugggauuua uguaaccaag a 21

<210> 120

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 120

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 121

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 121

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 122

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 122

ugggauuca uguaaccaag a 21

<210> 123

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 123

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 124

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 124

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 125

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 125

ugggauuua uguaaccaag a 21

<210> 126

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 126

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 127

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 127

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 128

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 128

ugggauuua uguaaccaag a 21

<210> 129

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 129



gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 130

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 130

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 131

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 131

ugggauuua uguaaccaag a 21

<210> 132

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 132

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 133

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 133

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 134

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 134

ugggauuca uguaaccaag a 21

<210> 135

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 135

uauauuuucca ggaugaaagu cca 23

<210> 136

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 136

uauuauaaaa auaucuugcu uu 23

<210> 137

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 137

ucuugguuac augaaauc 23

<210> 138

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 138

uauauuuucca ggaugaaagu cca 23

<210> 139

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 139

uauuuauaaaa auaucuugcu uuu 23

<210> 140

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 140

ucuugguuac augaaaucucc auc 23

<210> 141

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 141

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 142

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 142

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 143

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 143

ugggauuua uguaaccaag a 21

<210> 144

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 144

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 145

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 145

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 146

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 146

ugggauuca uguaaccaag a 21

<210> 147

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 147

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 148

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 148

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 149

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 149

ugggauuua uguaaccaag a 21

<210> 150

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 150

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 151

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 151

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 152

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 152

ugggauuua uguaaccaag a 21

<210> 153

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 153



gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 154

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 154

uauauuucca ggaugaaagu cca 23

<210> 155

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 155

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 156

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 156

uauauuucca ggaugaaagu cca 23

<210> 157

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 157

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 158

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 158

uauauuucca ggaugaaagu cca 23

<210> 159

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 159

gacuuucauc cuggaaaau a 21

<210> 160

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 160

uauauuucca ggaugaaagu cca 23

<210> 161

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 161

aagcaagaua uuuuuauau a 21

<210> 162

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 162

uauuauaaaa auaucuugcu uu 23

<210> 163

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 163

aagcaagaua uuuuuauaa a 21

<210> 164

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 164

uauuauaaaa auaucuugcu uu 23

<210> 165

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 165

aagcaagaua uuuuuauaau a 21

<210> 166

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 166

uauuauaaaa auaucuugcu uuu 23

<210> 167

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 167

aagcaagaua uuuuuauaau a 21

<210> 168

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 168

uauuauaaaa auaucuugcu uuu 23

<210> 169

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 169

ugggauuuca uguaaccaag a 21

<210> 170

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 170

ucuugguuac augaaaucucc auc 23

<210> 171

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 171

ugggauuuca uguaaccaag a 21

<210> 172

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 172

ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 173

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 173

ugggauuuca uguaaccaag a 21

<210> 174

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 174

ucuugguuac augaaaucce auc 23

<210> 175

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 175

ugggauuua uuaaccaag a 21

<210> 176

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<220>

<223> modified\_base, modified as per Table A: Summary of Sequences at  
the end of the description

<400> 176

ucuugguuac augaaaucce auc 23