



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월28일
(11) 등록번호 10-2138781
(24) 등록일자 2020년07월22일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7088 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-7013079(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2014년05월01일
심사청구일자 2019년05월02일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2018년05월08일</p> <p>(65) 공개번호 10-2018-0051678</p> <p>(43) 공개일자 2018년05월16일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2015-7033027
원출원일자(국제) 2014년05월01일
심사청구일자 2016년03월14일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2014/036462</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2014/179626
국제공개일자 2014년11월06일</p> <p>(30) 우선권주장
61/818,442 2013년05월01일 미국(US)
(뒷면에 계속)</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
Rajeev Kallanthottathil, 8th Annunal Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, "Conjugation Strategies for In Vivo siRNA Delivery" (2012.10.29.)*
KR1020080068019 A
KR1020100081994 A
US07598227 B2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌</p> | <p>(73) 특허권자
아이오니스 파마수티컬즈, 인코포레이티드
미합중국 캘리포니아주 92010 칼스바드 2855 가젤 코트</p> <p>(72) 발명자
프라카쉬, 타즈하, 피.
미국 92010 캘리포니아주 칼스바드 가젤 코트 2855
세쓰, 피넛, 피.
미국 92010 캘리포니아주 칼스바드 가젤 코트 2855
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
양영준, 김영</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 **아포지질단백질 C-III 발현을 조절하는 조성물 및 방법**

(57) 요약

아포지질단백질 C-III (ApoCIII)을 표적으로 하는, 콘주게이트 그룹을 갖는 올리고머 화합물이 본원에서 기재된다. 어떤 구현예에서, ApoCIII을 표적으로 하는 올리고머 화합물은 N-아세틸갈락토사민에 접합된다. ApoCIII과 관련된 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위해 ApoCIII를 감소시키는데 사용하기 위한 ApoCIII를 표적으로 하는 접합된 올리고머 화합물이 또한 본원에서 개시된다. 어떤 ApoCIII과 관련된 질환, 장애 또는 병태는 염증성, 심혈관 및/또는 대사성 질환, 장애 또는 병태를 포함한다. 본원에서 개시된 접합된 올리고머 화합물은 그것이 필요한 개체에서 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 2310/11 (2013.01)
 C12N 2310/315 (2013.01)
 C12N 2310/321 (2013.01)
 C12N 2310/322 (2013.01)
 C12N 2310/3341 (2013.01)
 C12N 2310/341 (2013.01)
 C12N 2310/346 (2013.01)
 C12N 2310/35 (2013.01)
 C12N 2310/353 (2013.01)

(72) 발명자

스웨이즈, 에릭, 이.

미국 92010 캘리포니아주 칼즈배드 가젤 코트 2855

그레이엄, 마크, 제이.

미국 92010 캘리포니아주 칼즈배드 가젤 코트 2855

(30) 우선권주장

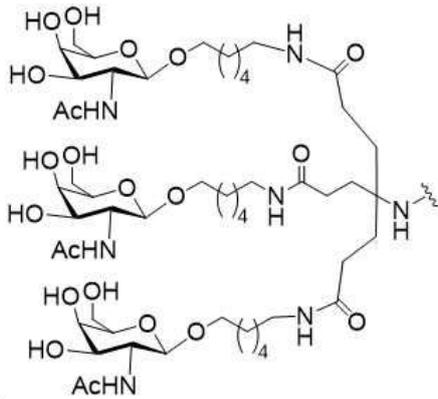
61/823,826	2013년05월15일	미국(US)
61/843,887	2013년07월08일	미국(US)
61/871,673	2013년08월29일	미국(US)
61/880,790	2013년09월20일	미국(US)
61/976,991	2014년04월08일	미국(US)
61/986,867	2014년04월30일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 기를 포함하는 화합물로서, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지며 서열번호 3의 핵염기 3533 내지 3552의 동등 길이 부분에 대해 적어도 80% 상보적인 20개의 인접 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖고, 콘주게이트 기는 콘주게이트 링커에 의해 변형된 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 연결된 것으로서 하기 세포-표적화 모이어티:



를 포함하는 것인 화합물.

청구항 2

제1항에 있어서, 하기 특징 중 하나 이상을 갖는 것인 화합물:

- (i) 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열이 서열번호 3의 핵염기 3533 내지 3552의 동등 길이 부분에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100% 상보적이고;
- (ii) 변형된 올리고뉴클레오타이드가 적어도 1개의 변형된 당을 포함하고;
- (iii) 적어도 1개의 뉴클레오사이드가 변형된 핵염기를 포함하고;
- (iv) 변형된 올리고뉴클레오타이드가 적어도 1개의 변형된 뉴클레오사이드간 연결을 포함함.

청구항 3

제2항에 있어서, 하기 특징 중 하나 이상을 갖는 것인 화합물:

- (i) (a) 적어도 1개의 변형된 당이 바이사이클릭 당이거나, 임의로 구속된 에틸 또는 4'-(CH₂)_n-O-2' 브릿지(여기서 n은 1 또는 2임)를 갖는 바이사이클릭 당이거나, (b) 적어도 1개의 변형된 당이 2'-O-메톡시에틸을 포함하거나, 또는 (c) 변형된 올리고뉴클레오타이드의 적어도 1개의 뉴클레오사이드가 3'-플루오로-HNA이고;
- (ii) 변형된 핵염기가 5-메틸시토신이고;
- (iii) 변형된 뉴클레오사이드간 연결이 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결이고;
- (iv) 변형된 올리고뉴클레오타이드의 각각의 뉴클레오사이드간 연결이 포스포로티오에이트 연결임.

청구항 4

제1에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드가 단일가닥인 화합물.

청구항 5

제2항에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드가 단일가닥인 화합물.

청구항 6

제3항에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드가 단일가닥인 화합물.

청구항 7

제1항에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드가

연결된 테옥시뉴클레오사이드로 이루어진 겹 분절;

연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 윙 분절;

연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 윙 분절을 포함하고;

여기서 겹 분절은 5' 윙 분절과 3' 윙 분절 사이에 배치되고, 각각의 윙 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 변형된 당을 포함하는 것인 화합물.

청구항 8

제1항에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드가

10개의 연결된 테옥시뉴클레오사이드로 이루어진 겹 분절;

5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 윙 분절;

5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 윙 분절을 포함하고;

여기서 겹 분절은 5' 윙 분절과 3' 윙 분절 사이에 배치되고, 각각의 윙 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고, 각각의 시토신 잔기는 5-메틸시토신인 화합물.

청구항 9

제8항에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드의 각각의 뉴클레오사이드간 연결이 포스포로티오에이트 연결인 화합물.

청구항 10

제1항에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드가 서열번호 87의 핵염기 서열을 갖는 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는

10개의 연결된 테옥시뉴클레오사이드로 이루어진 겹 분절;

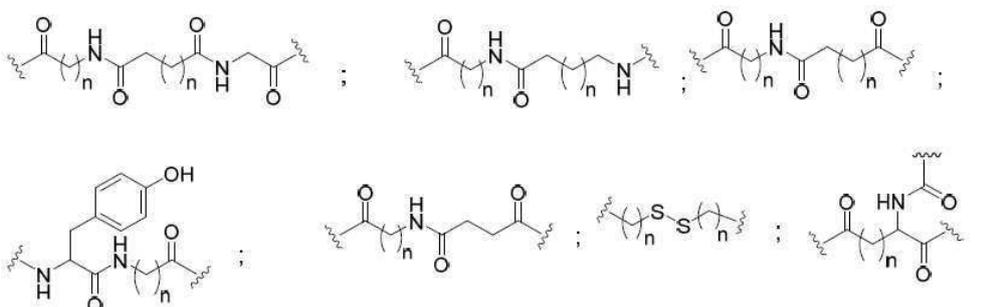
5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 윙 분절;

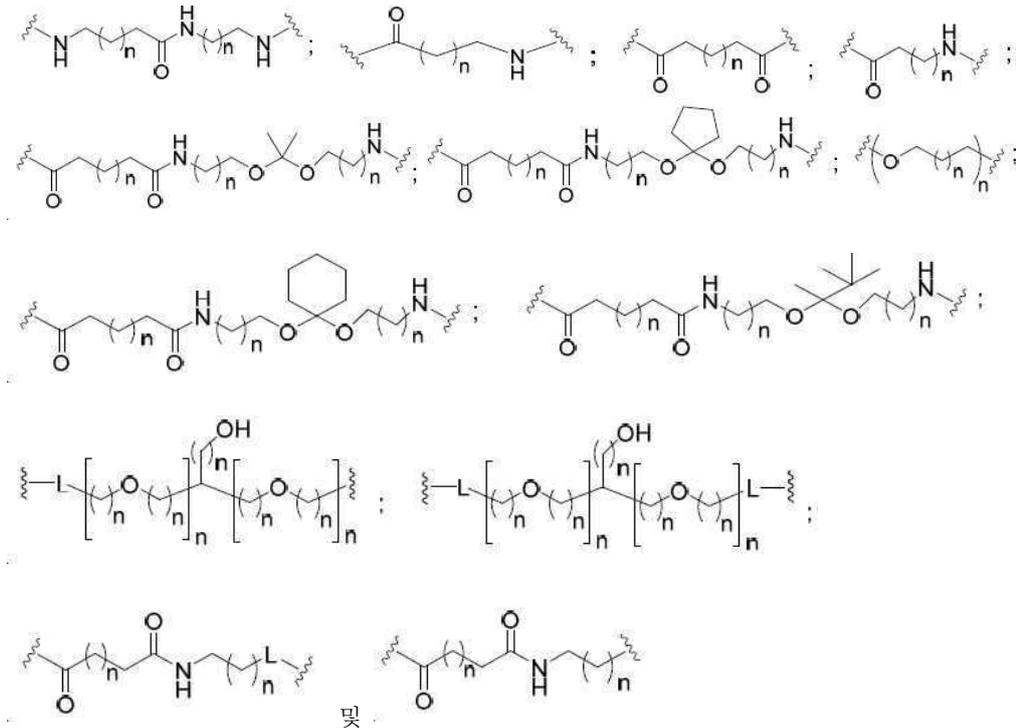
5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 윙 분절을 포함하고;

여기서 겹 분절은 5' 윙 분절과 3' 윙 분절 사이에 배치되고, 각각의 윙 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고, 각각의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이고, 각각의 시토신 잔기는 5-메틸시토신인 화합물.

청구항 11

제1항에 있어서, 콘주게이트 기가



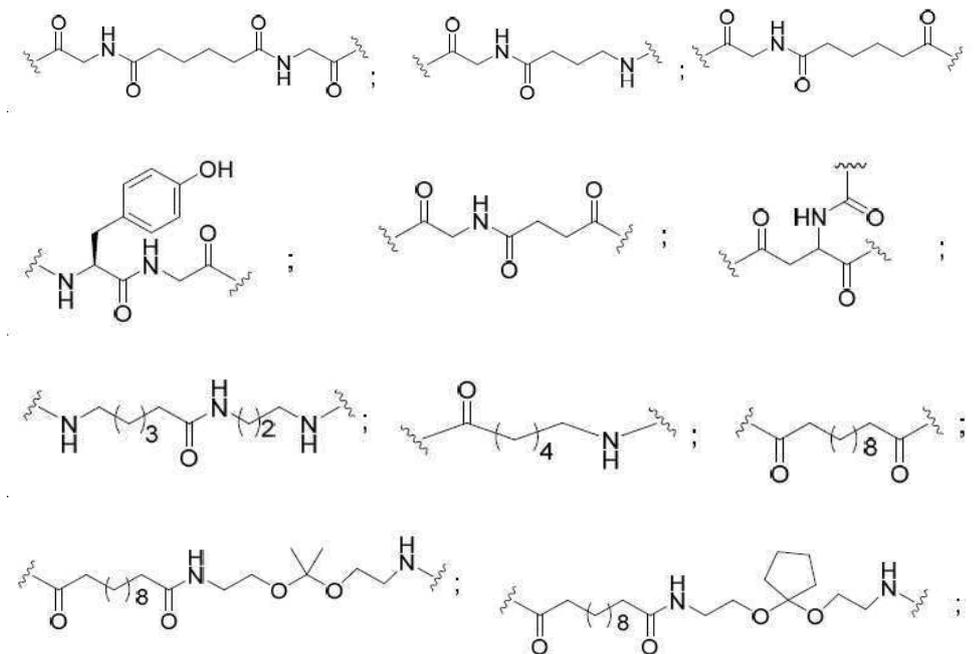


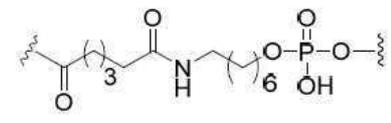
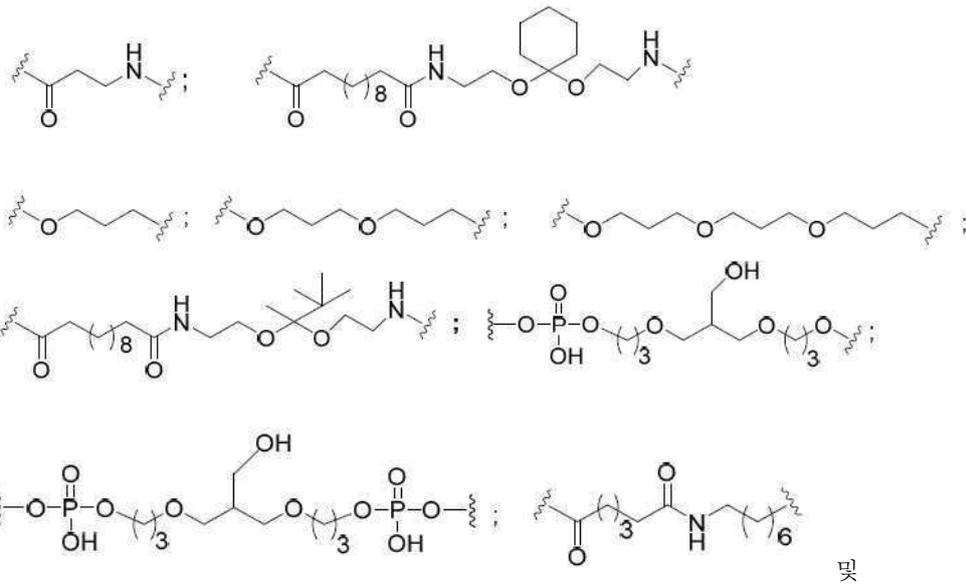
로부터 선택되는 구조를 갖는 콘주게이트 링커를 포함하고,
 여기서 각각의 L은 독립적으로 인 연결 그룹 또는 중성 연결 그룹이고;
 각각의 n은 독립적으로 1 내지 20인 화합물.

청구항 12

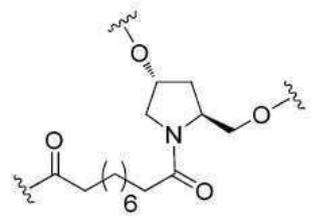
제1항에 있어서, 콘주게이트 기가

(a)

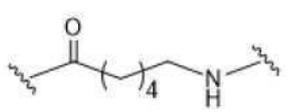




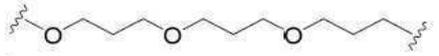
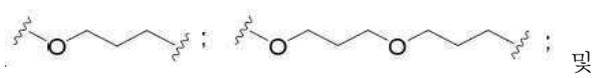
(b)



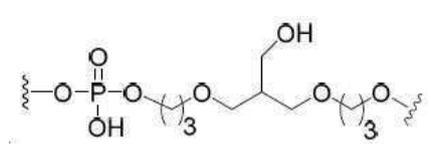
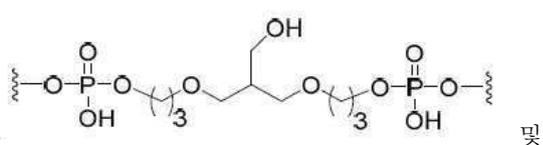
(c)



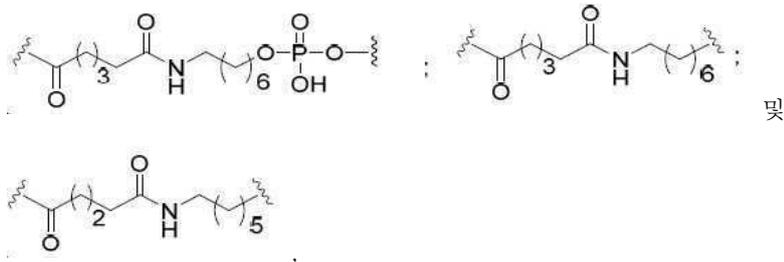
(d)



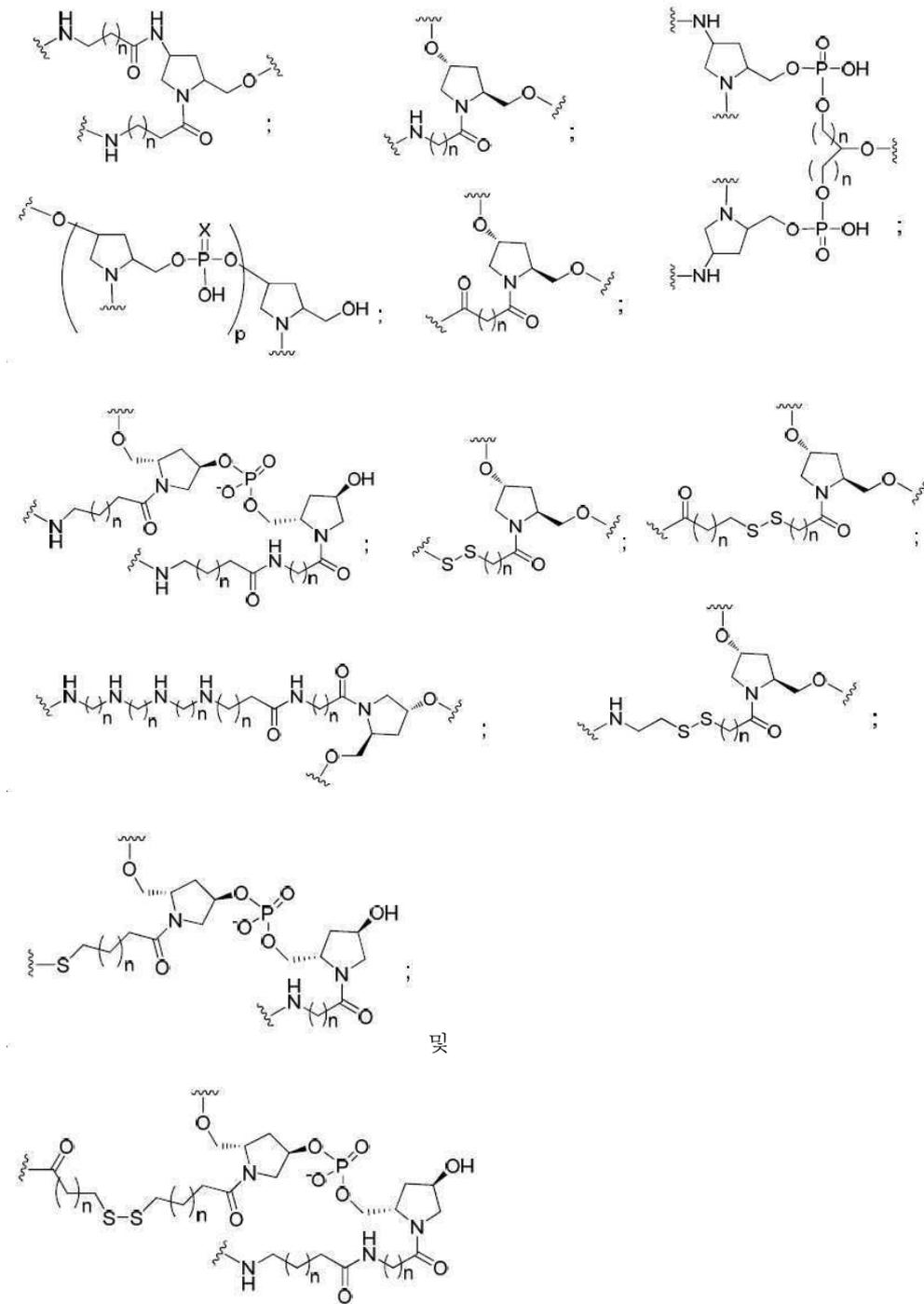
(e)



(f)

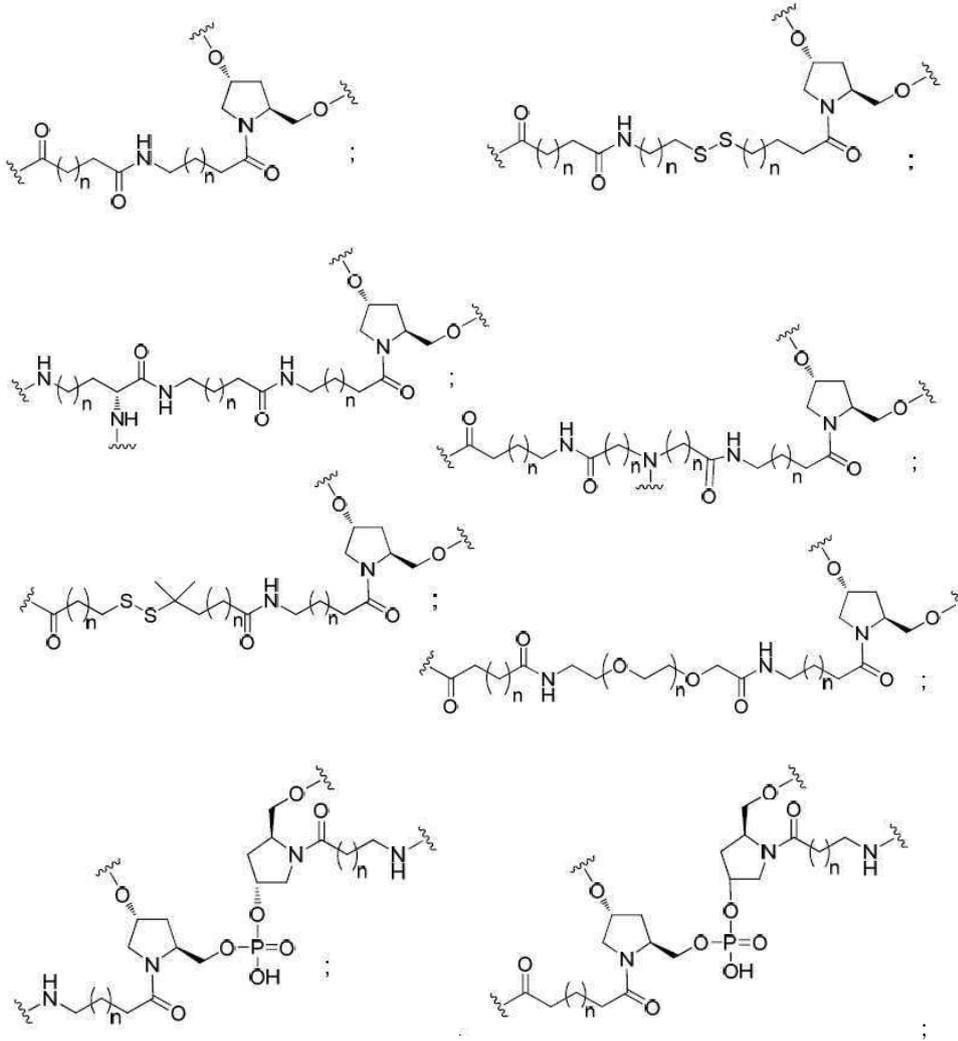


(g)

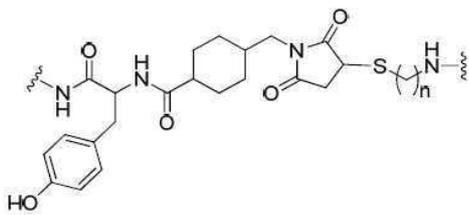


(여기서, 각각의 n은 독립적으로 1 내지 20이고, p는 1 내지 6임),

(h)

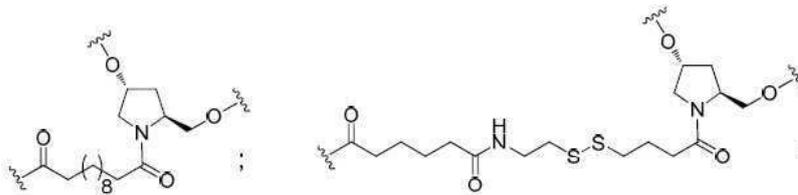


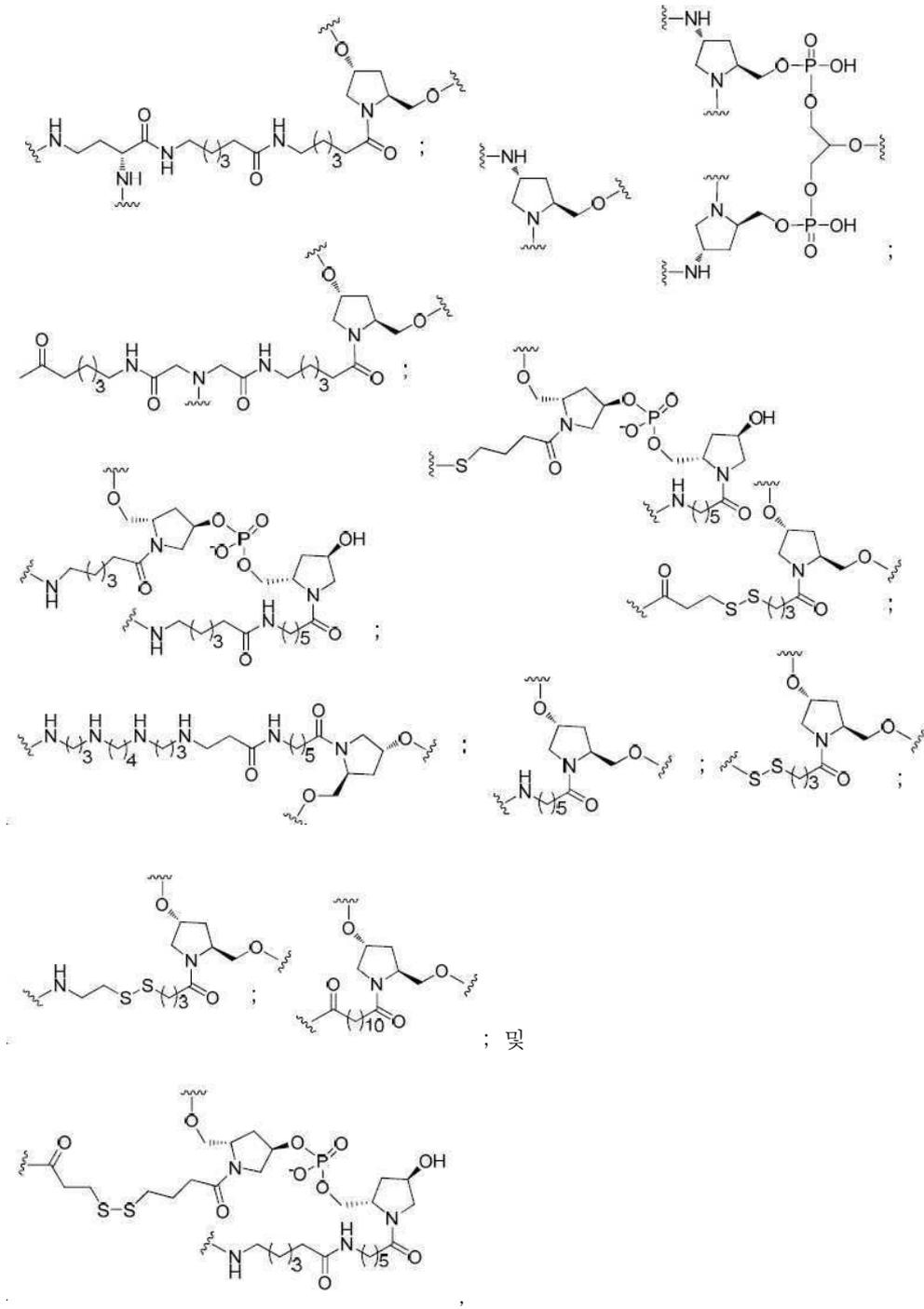
및



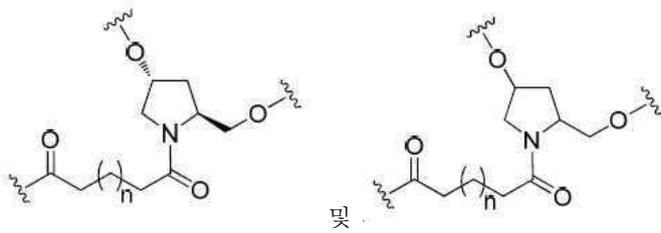
(여기서, 각각의 n은 독립적으로 1 내지 20임),

(i)



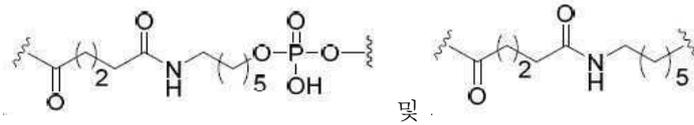


(j)

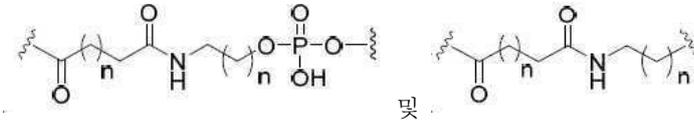


(여기서, n 은 1 내지 20임),

(k)

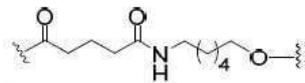


(1)



(여기서, 각각의 n은 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7임), 및

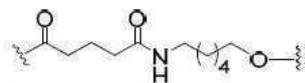
(m)



로부터 선택되는 구조를 갖는 콘주게이트 링커를 포함하는 것인 화합물.

청구항 13

제1항에 있어서, 콘주게이트 기가 콘주게이트 링커를 추가로 포함하고, 콘주게이트 링커가 하기 구조



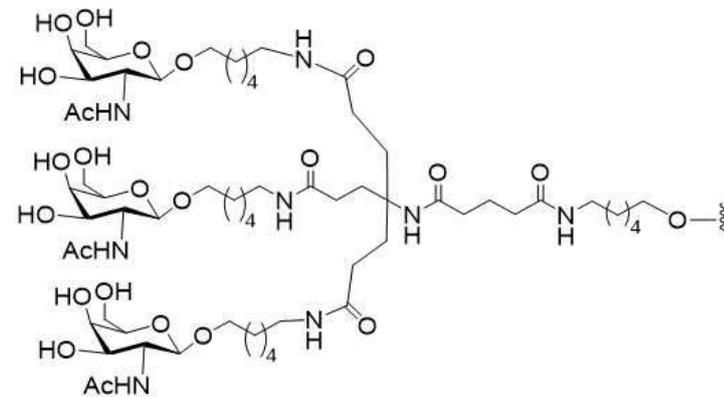
를 갖는 것인 화합물.

청구항 14

제1항에 있어서, 콘주게이트 기가 포스포디에스테르, 아마이드 또는 에스테르로부터 선택되는 절단가능 모이어티를 포함하는 것인 화합물.

청구항 15

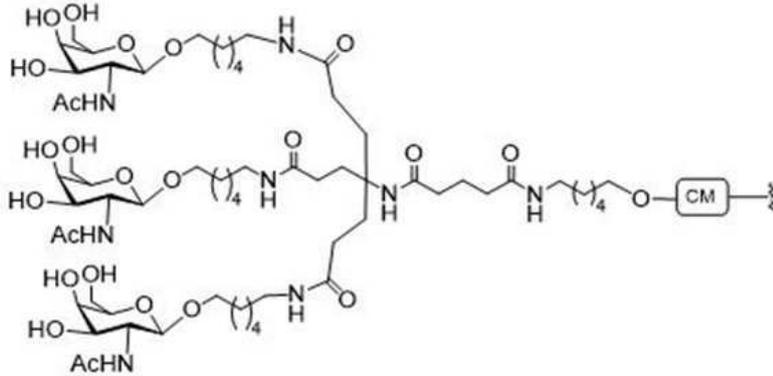
제1항에 있어서, 콘주게이트 기가



를 포함하는 것인 화합물.

청구항 16

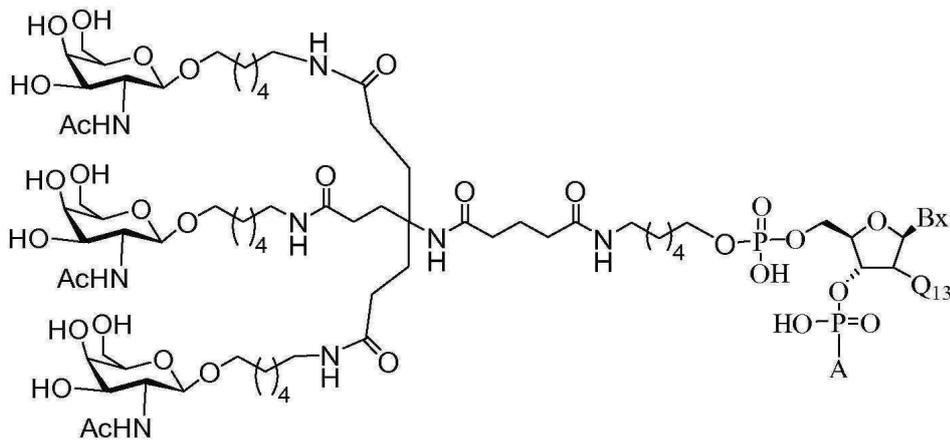
제1항에 있어서, 콘주게이트 기가



를 포함하고, 여기서 CM은 절단가능 모이어티인 화합물.

청구항 17

제1항에 있어서, 콘주게이트 기가



를 포함하고,

여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이며;

Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티인 화합물.

청구항 18

제17항에 있어서, Bx가 아데닌인 화합물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 화합물 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는,

- a) 동물에서 심혈관, 대사성 또는 염증성 질환, 장애 또는 병태를 예방하거나, 치료하거나, 개선하거나, 또는 그의 진행을 느리게 하거나;
- b) 동물에서 트리글리세라이드 수준을 감소시키거나;
- c) 동물에서 HDL 수준을 증가시키거나;
- d) 동물에서 카일로마이크론 청소능을 증가시킴으로써, 카일로마이크론 청소능 증가가 동물에서 췌장염을 치료

하거나, 예방하거나, 지연시키거나, 또는 개선하도록 하기 위한 제약 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 희석제가 포스페이트-완충된 염수 (PBS)인 제약 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서, 화합물의 변형된 올리고뉴클레오타이드가 나트륨 염인 제약 조성물.

청구항 22

제20항에 있어서, 화합물의 변형된 올리고뉴클레오타이드가 나트륨 염인 제약 조성물.

청구항 23

제19항에 있어서, 동물이 파트리글리세라이드혈증, 프레드릭슨(Fredrickson) 제I형 이상지질혈증, FCS, LPLD, 췌장염, 당뇨병, 인슐린 무감각, 카일로마이크론혈증 및 이상지질혈증 중 어느 하나 이상을 앓고 있거나 앓을 위험이 있는 것인 제약 조성물.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 서열목록

[0002] 본원은 전자 형태의 서열목록과 함께 출원되었다. 서열목록은 그 크기가 68 Kb인 파일명 BIOL0249WOSEQ_ST25.txt (2014년 5월 1일에 만들어짐)로서 제공되어 있다. 서열목록의 전자 형태의 정보는 본원에 그 전체가 참고로 편입되어 있다.

배경 기술

[0003] 안티센스 기술 배후에 있는 원리는 안티센스 화합물이 표적 핵산에 혼성화하고 표적 핵산의 양, 활성, 및/또는 기능을 조절한다는 것이다. 예를 들면 어떤 예에서, 안티센스 화합물은 표적의 변경된 전사 또는 번역을 야기한다. 그와 같은 발현의 조절은, 예를 들면, 표적 mRNA 분해 또는 점유-기반 억제에 의해 달성될 수 있다. 분해에 의한 RNA 표적 기능의 조절의 예는 DNA-유사 안티센스 화합물과 혼성화시 RNase H-기반의 표적 RNA의 분해이다. 표적 분해에 의한 유전자 발현의 조절의 또 하나의 예는 RNA 간섭 (RNAi)이다. RNAi는 RNA-유도된 사일런싱 복합체 (RISC)를 이용하는 기전을 통한 안티센스-매개된 유전자 침묵을 지칭한다. RNA 표적 기능의 조절의 추가의 예는 microRNA에 의해 친연적으로 이용되는 것과 같은 점유-기반의 기전에 의한다. microRNA는 단백질-코딩 RNA의 발현을 조절하는 작은 비-코딩 RNA이다. microRNA에 대한 안티센스 화합물의 결합은 microRNA가 그것의 메신저 RNA 표적에 결합하는 것을 막음으로써 microRNA의 기능을 방해한다. microRNA 모사체는 원상태 microRNA 기능을 향상시킬 수 있다. 어떤 안티센스 화합물은 전-mRNA의 스플라이싱을 변경한다. 특정 기전과 무관하게, 서열-특이성은 표적 검증 및 유전자 관능화를 위한 도구로서 뿐만 아니라 질환의 병인에 연루된 유전자의 발현을 선택적으로 조절하는 치료제로서 안티센스 화합물을 매력적하게 한다.

[0004] 안티센스 기술은 하나 이상의 특정 유전자 생성물의 발현을 조절하는 효과적인 방법이며 따라서 수많은 치료, 진단, 및 연구 적용에서 독특하게 유용한 것으로 입증될 수 있다. 화학적으로 변형된 뉴클레오사이드는 하나 이상의 특성, 예컨대 뉴클레아제 저항성, 약동학 또는 표적 핵산에 대한 친화성을 향상시키기 위해 안티센스 화합물 내로 혼입될 수 있다. 1998에, 안티센스 화합물, Vitravene® (포미비르센; Isis Pharmaceuticals Inc., Carlsbad, CA에 의해 개발됨)은 U.S. 식품의약품안전청 (FDA)으로부터 시판 승인을 받은 첫 번째 안티센스 약물이고, 현재 AIDS 환자에서 사이토메갈로바이러스 (CMV)-유도된 망막염의 치료에 사용된다.

[0005] 새로운 화학적 변형이 안티센스 화합물의 효력 및 효능을 개선하여, 경구 전달에 대한 잠재성을 드러낼 뿐만 아니라 피하 투여를 향상시키고, 부작용에 대한 잠재성을 낮추고, 환자 편의성을 개선해왔다. 안티센스 화합물의 효능을 증가시키는 화학적 변형은 더 낮은 용량의 투여를 허용하며, 이는 독성에 대한 잠재성을 낮출 뿐만 아니라 요법의 전체 비용을 감소시킨다. 분해에 대한 저항성을 증가시키는 변형은 신체로부터 더 느린 소거능을 야기하여, 덜 빈번한 복용을 허용한다. 화합물의 효능을 더 최적화하기 위해 하나의 화합물 내에서 상이한 유형의 화학적 변형들이 조합될 수 있다.

[0006] 아포지질단백질 C-III (또한 소위 APOC3, APOC-III, ApoCIII, 및 APO C-III)은 HDL 및 트리글리세라이드 (TG)-풍부 지질단백질의 구성요소이다. 상승된 ApoCIII 수준은 상승된 TG 수준 및 질환 예컨대 심혈관 질환, 대사성 증후군, 비만 및 당뇨병과 연관되어 있다 (Chan 등, Int J Clin Pract, 2008, 62:799-809; Onat et al., Atherosclerosis, 2003, 168:81-89; Mendivil 등, Circulation, 2011, 124:2065-2072; Mauger 등, J. Lipid Res, 2006, 47: 1212-1218; Chan 등, Clin. Chem, 2002, 278-283; Ooi 등, Clin. Sci, 2008, 114: 611-624; Davidsson 등, J. Lipid Res. 2005, 46: 1999-2006; Sacks 등, Circulation, 2000, 102: 1886-1892; Lee 등, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23: 853-858). ApoCIII는 지질단백질 리파제 (LPL)의 억제를 통해 그리고 세포-표면 글리코사미노글리칸 매트릭스에 결합하는 지질단백질과의 개제를 통해 지방분해를 억제하여 TG-풍부 지질단백질의 청소능을 보여준다 (Shachter, Curr. Opin. Lipidol, 2001, 12, 297-304).

[0007] 안티센스 기술은 어떤 유전자 생성물의 발현을 감소시키는 효과적인 수단으로서 알려져 있고 ApoCIII의 조절을 위한 수많은 치료, 진단, 및 연구 적용에서 독특하게 유용할 것으로 증명될 수 있다. ApoCIII를 표적으로 하는 안티센스 화합물 및 ApoCIII를 억제하는 연관된 방법은 이전에 개시되었다 (참고 예를 들면, U.S. 특허 7,598,227, U.S. 특허 7,750,141, PCT 공보 WO 2004/093783, PCT 공보 WO 2012/149495 및 PCT/US14/016546 (이들 모두는 참조로 본원에 편입되어 있다)). ApoCIII를 표적으로 하는 안티센스 화합물, ISIS-APOCIII_{RX}은, I 및 II 단계 임상시험에서 시험되었다. 그러나, ApoCIII를 표적으로 하는 안티센스 화합물은 상업적 용도로 승인되지 않았고, 따라서, 환자에게 추가의 및 더 강한 치료 선택을 제공할 필요가 여전히 있다.

발명의 내용

[0008] **발명의 요약**

[0009] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 접합된 안티센스 화합물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 핵산 전사체에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 접합된 안티센스 화합물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 세포를 핵산 전사체에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 접합된 안티센스 화합물과 접촉시키는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 세포를 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 접합된 안티센스 화합물과 접촉시키고 세포에서 핵산 전사체의 양 또는 활성을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0010] 아시알로당단백질 수용체 (ASGP-R)가 이전에 기재되었다. 예를 들면, Park 등, PNAS vol. 102, No. 47, pp 17125-17129 (2005). 그와 같은 수용체들은 간 세포, 특히 간세포(hepatocyte) 상에서 발현된다. 게다가, 3개의 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 리간드들의 클러스터를 포함하는 화합물은 ASGP-R에 결합하여, 세포 내로 상기 화합물의 흡수를 야기할 수 있는 것으로 나타났다. 예를 들면, 문헌[Khorev 등, Bioorganic 및 Medicinal Chemistry, 16, 9, pp 5216-5231 (May 2008)]을 참조한다. 따라서, 그와 같은 GalNAc 클러스터를 포함하는 콘주게이트들은 간 세포, 특히적으로 간세포 내로 어떤 화합물의 흡수를 촉진하는데 사용되어 왔다. 예를 들면 어떤 GalNAc-함유 콘주게이트들은 생체내에서 간 세포에서 듀플렉스 siRNA 화합물의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 그와 같은 경우에, GalNAc-함유 콘주게이트는 전형적으로 siRNA 듀플렉스의 센스 가닥에 부착된다. 센스 가닥은 안티센스 가닥이 결국 표적 핵산과 혼성화되기 전에 버려지므로, 상기 콘주게이트는 활성을 방해할 염려가 거의 없다. 전형적으로, 상기 콘주게이트는 siRNA의 센스 가닥의 3' 말단에 부착된다. 예를 들면, U.S. 특허 제8,106,022호를 참고한다. 본원에서 기재된 어떤 콘주게이트 그룹은 더 활성이고/거나 이전에 기재된 콘주게이트 그룹보다 합성하기 더 쉽다.

[0011] 본 발명의 어떤 구현예에서, 콘주게이트는 비제한적으로 RNase H 기반 안티센스 화합물 및 전-mRNA의 표적 핵산의 스플라이싱을 변경하는 안티센스 화합물을 포함하는, 단일가닥 안티센스 화합물에 부착된다. 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트는 이점 (세포 내로의 개선된 흡수)을 제공하기에 충분히 긴 안티센스 화합물에 계속 부착되어 있어야 하지만, 이후에 절단되거나, 또는 표적 핵산에 대한 혼성화 및 스플라이싱 또는 스플라이스 조절과 연관된 RNase H 또는 효소와의 상호작용과 같은, 활성에 필요한 차후 단계를 방해하지 않을 수 있다. 특성들의 이러한 균형이 siRNA 화합물에서보다 단일가닥 안티센스 화합물의 셋팅에서 더 중요하며, 상기 콘주게이트는 센스 가닥에 간편하게 부착될 수 있다. 콘주게이트가 결여된 동일한 안티센스 화합물과 비교하여 생체내에서 간 세포에서 개선된 효능을 갖는 접합된 단일가닥 안티센스 화합물이 본원에 개시된다. 이들 화합물에 대해 특성들의 요구되는 균형을 고려할 때, 그와 같은 개선된 효능은 놀랍다.

[0012] 어떤 구현예에서, 본원의 콘주게이트 그룹은 절단가능 모이어티를 포함한다. 언급한 바와 같이, 기전에 의해 염매이지 않으면서, 콘주게이트가 흡수 증진을 제공하기 위해 충분히 긴 화합물 상에 유지되어야 하는 것이 논리적이지만, 이후에, 상기 콘주게이트의 일부분 또는 이상적으로는 모두가 절단되어 그것의 가장 활성 형태의 모 화합물 (예를 들면, 안티센스 화합물)을 방출하는 것이 바람직하다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 절단가능 뉴클레오사이드이다. 그와 같은 구현예는하나 이상의 절단가능 결합, 예컨대 포스포디에스테르 연결을 통한 뉴클레오사이드를 통해 상기 콘주게이트 (클러스터)의 나머지를안티센스 올리고뉴클레오타이드에 부착시킴으로써 세포에서 내인성 뉴클레아제의 이점을 이용한다. 어떤 구현예에서, 클러스터는 포스포디에스테르 연결을 통해 절단가능 뉴클레오사이드에 결합된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 뉴클레오사이드는 포스포디에스테르 연결에 의해 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (안티센스 화합물)에 부착된다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 2 또는 3 개의 절단가능 뉴클레오사이드를 포함할 수 있다. 그와 같은 구현예에서, 그와 같은 절단가능 뉴클레오사이드는 서로 연결되고/거나, 안티센스 화합물에 연결되고/거나 절단가능 결합 (예컨대 포스포디에스테르 연결)을 통해 클러스터에 연결된다. 본원의 어떤 콘주게이트는 절단가능 뉴클레오사이드를 포함하지 않으며 대신에 절단가능 결합을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드로부터의 콘주게이트의 충분한 절단은 세포에서 절단에 취약한 적어도 하나의 결합 (절단가능 결합)에 의해 제공되는 것으로 나타난다.

[0013] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 전구약물이다. 그와 같은 전구약물은 동물에게 투여되고 결국 더 많은 활성 형태로 대사작용된다. 예를 들면, 접합된 안티센스 화합물은 콘주게이트의 모두 또는 일부를 제거하기 위해 절단되어 콘주게이트의 모두 또는 일부가 결여된 안티센스 화합물의 활성 (또는 더 많은 활성) 형태를 야기한다.

[0014] 어떤 구현예에서, 콘주게이트는 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서 부착된다. 어떤 그와 같은 5'-콘주게이트는 3' 말단에서 부착된 유사한 콘주게이트 그룹을 갖는 대응물보다 더 효율적으로 절단된다. 어떤 구현예에서,

개선된 활성은 개선된 절단과 관련될 수 있다. 어떤 구현예에서, 5' 말단에 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 3' 말단에 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드보다 더 큰 효능을 갖는다 (예를 들면, 실시예 56, 81, 83, 및 84 참고). 게다가, 5'-부착은 보다 간단한 올리고뉴클레오타이드 합성을 허용한다. 전형적으로, 올리고뉴클레오타이드는 3'에서 5' 방향으로 고체 지지체 상에서 합성된다. 3'-접합된 올리고뉴클레오타이드를 제조하기 위해, 전형적으로 전-접합된 3' 뉴클레오사이드를 고체 지지체에 부착시킨 다음 종래와 같이 올리고뉴클레오타이드를 만든다. 그러나, 상기 접합된 뉴클레오사이드를 고체 지지체에 부착하는 것은 합성에 문제가 된다. 게다가, 상기 접근법을 이용시, 이후 콘주게이트가 올리고뉴클레오타이드의 합성 내내 존재하고 이후 단계 동안 분해될 수 있거나 사용될 수 있는 반응 및 시약의 종류를 제한할 수 있다. 5'-접합된 올리고뉴클레오타이드에 대해 본원에 기재된 구조 및 기술을 이용하여, 당업자는 표준 자동화된 기술을 이용하여 올리고뉴클레오타이드를 합성하고 올리고뉴클레오타이드가 고체 지지체로부터 절단된 후 최종 (5'-최말단) 뉴클레오사이드를 갖는 콘주게이트를 도입할 수 있다.

[0015] 본 기술분야 및 본 개시내용에 비추어, 숙련가는 본원에서 임의 콘주게이트 및 접합된 올리고뉴클레오타이드를 쉽게 제조할 수 있다. 게다가, 본원에 개시된 어떤 그와 같은 콘주게이트 및 접합된 올리고뉴클레오타이드의 합성은 더 쉽고/거나 단계를 거의 필요로 하지 않으며, 따라서 이전에 개시된 콘주게이트보다 덜 비싸, 제조시 이점을 제공한다. 예를 들면, 어떤 콘주게이트 그룹의 합성은 더 적은 합성 단계로 구성되어, 이전에 기재된 콘주게이트 그룹과 비교하여 증가된 수율을 야기한다. 실시예 46에서의 GalNAc3-10 및 실시예 48에서의 GalNAc3-7과 같은 콘주게이트 그룹들은 더 많은 화학적 중간체들의 조립을 요구하는 U.S. 제8,106,022호 또는 U.S. 제7,262,177호에 기술된 것과 같은 이전에 기재된 콘주게이트보다 훨씬 더 단순하다. 따라서, 본원에 기재된 이들 및 다른 콘주게이트들은 단일가닥 올리고뉴클레오타이드 및 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드 중 어느 가닥 (예를 들면, siRNA)을 포함하는, 임의 올리고뉴클레오타이드를 이용하기 위해 이전에 기재된 화합물보다 이점을 갖는다.

[0016] 유사하게, 단지 1 또는 2개의 GalNAc 리간드를 갖는 콘주게이트 그룹들이 본원에서 개시된다. 나타난 바와 같이, 그러한 콘주게이트 그룹들은 안티센스 화합물의 활성을 개선한다. 그러한 화합물들은 3개의 GalNAc 리간드를 포함하는 콘주게이트보다 제조하기 훨씬 더 쉽다. 1 또는 2개의 GalNAc 리간드를 포함하는 콘주게이트 그룹들은 단일가닥 올리고뉴클레오타이드 및 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드 중 어느 하나 (예를 들면, siRNA)를 포함하는, 임의 안티센스 화합물에 부착될 수 있다.

[0017] 어떤 구현예에서, 본원의 콘주게이트들은 내성의 어떤 측정값을 실질적으로 변화시키지 않는다. 예를 들면, 접합된 안티센스 화합물들은 비접합된 모 화합물보다 더 면역원성이 아닌 것으로 본원에 나타나 있다. 효능이 개선되므로, 내성이 동일하게 유지되는 (또는 사실상 내성이 효능 증가와 비교하여 단지 약간 악화되긴 하지만) 구현예는 치료요법에 대해 개선된 특성을 갖는다.

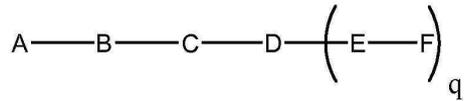
[0018] 어떤 구현예에서, 콘주게이션은 콘주게이션 부재시 덜 매력적인 결과를 갖는 방식으로 안티센스 화합물을 변경시키는 것을 허용한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 완전히 포스포로티오에이트 안티센스 화합물의 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포스포디에스테르 연결로 대체하는 것은 내성의 일부 측정에서 개선을 야기한다. 예를 들면, 어떤 예에서, 하나 이상의 포스포디에스테르를 갖는 그와 같은 안티센스 화합물은 각각의 연결이 포스포로티오에이트인 동일한 화합물보다 덜 면역원성이다. 그러나, 어떤 예에서, 실시예 26에서 나타난 바와 같이, 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결의 포스포디에스테르 연결로의 동일한 대체는 또한 감소된 세포성 흡수 및/또는 효능의 손실을 야기한다. 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 접합된 안티센스 화합물은 접합된 완전한-포스포로티오에이트 대응물과 비교하여 흡수 및 효능에서 손실이 거의 없거나 전혀 없이 연결에서 그와 같은 변화를 견딘다. 사실상, 어떤 구현예에서, 예를 들면, 실시예 44, 57, 59, 및 86에서, 콘주게이트 및 적어도 하나의 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드들은 실제로 또한 동일한 콘주게이트를 포함하는 완전한 포스포로티오에이트 대응물과 비교하여도 생체내에서 증가된 효능을 나타낸다. 게다가, 콘주게이션은 흡수/효능에서 실질적인 증가를 야기하므로, 상기 실질적인 증가에서의 작은 손실은 개선된 내성을 달성하기 위해 허용될 수 있다. 따라서, 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 적어도 하나의 포스포디에스테르 연결을 포함한다.

[0019] 어떤 구현예에서, 본원의 안티센스 화합물의 콘주게이션은 간세포에서 증가된 전달, 흡수 및 활성을 야기한다. 따라서, 더 많은 화합물은 간 조직에 전달된다. 그러나, 어떤 구현예에서, 상기 그러한 증가된 전달은 단독으로 활성의 전체 증가를 설명하지 못한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 더 많은 화합물은 간세포에 들어간다. 어떤 구현예에서, 심지어 증가된 간세포 흡수도 활성의 전체 증가를 설명하지 못한다. 그와 같은 구현예에서, 접합된 화합물의 생산적인 흡수는 증가된다. 예를 들면, 실시예 102에 나타난 바와 같이, GalNAc-함유 콘주게이트의 어

면 구현에는 비-실질 세포에 비해 간세포에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 농축을 증가시킨다. 이 농축은 간세포에서 발현된 유전자를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 대해 유익하다.

[0020] 어떤 구현예에서, 본원의 접합된 안티센스 화합물은 감소된 신장 노출을 야기한다. 예를 들면, 실시예 20에 나타난 바와 같이, GalNAc-함유 콘주게이트의 어떤 구현예를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 농도는 GalNAc-함유 콘주게이트가 없는 안티센스 올리고뉴클레오타이드보다 신장에서 더 낮다. 이것은 몇 개의 유익한 치료적 연루성을 갖는다. 신장에서의 활성이 추구되지 않는 치료적 징후에 대해, 신장에의 노출은 상응하는 이점 없이 신장 독성을 위태롭게 한다. 게다가, 신장의 고농도는 전형적으로 화합물의 소변으로 손실을 야기하고, 이로써 더 빠른 청소능을 얻는다. 따라서 비-신장 표적에 대해, 신장 축적은 바람직하지 않다.

[0021] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 하기 식으로 나타낸 접합된 안티센스 화합물을 제공한다:



[0022]

여기서

[0024] A는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고;

[0025] B는 절단가능 모이어티이고;

[0026] C은 콘주게이트 링커이고

[0027] D는 분지화 그룹이고;

[0028] 각각의 E는 테더(tether)이고;

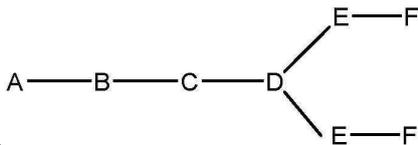
[0029] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[0030] q는 정수 1 내지 5이다.

[0031] 본원의 상기 도표 및 유사한 도표에서, 분지화 그룹 "D"는 "q"에 의해 명시되는 바와 같이 (E-F) 그룹의 수를 수용하기 위해 필요한 만큼 여러 번 분기된다. 따라서, q = 1인 경우, 식은 하기와 같다:

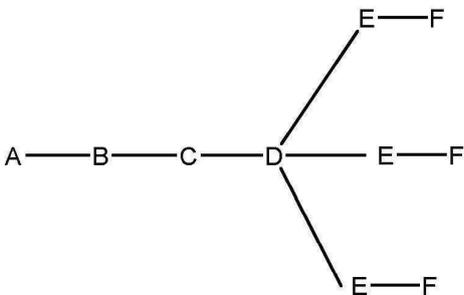


[0033] q = 2인 경우, 식은 하기와 같다:



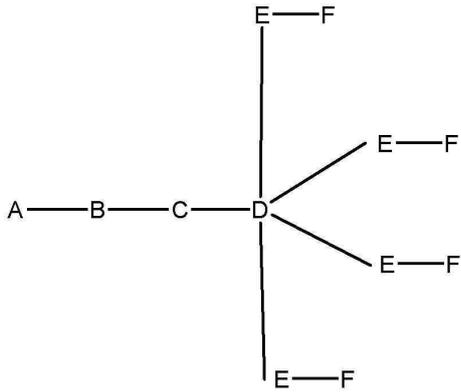
[0034]

[0035] q = 3인 경우, 식은 하기와 같다:



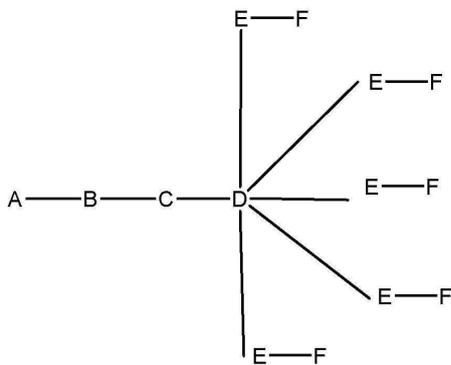
[0036]

[0037] q = 4인 경우, 식은 하기와 같다:



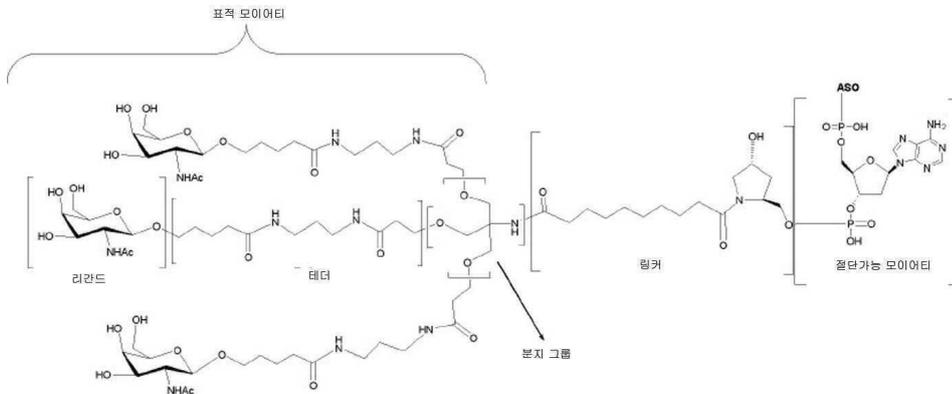
[0038]

[0039] q = 5인 경우, 식은 하기와 같다:



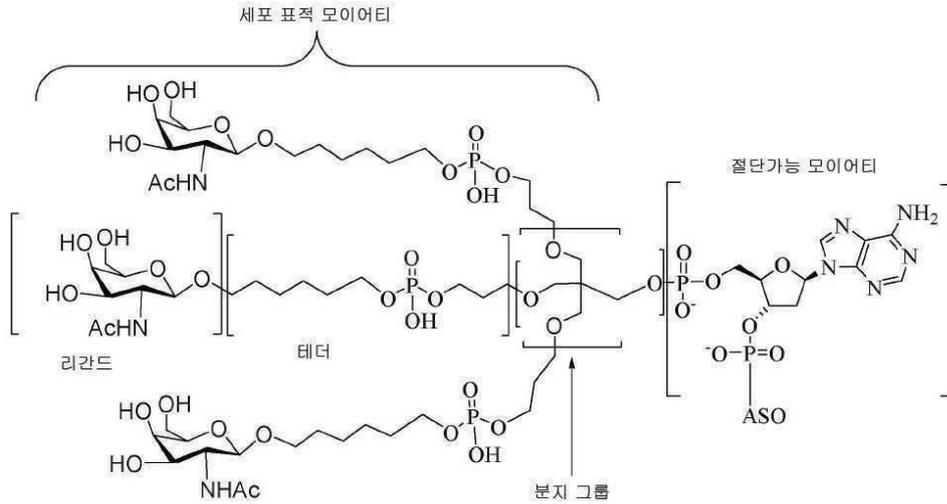
[0040]

[0041] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는 것으로 제공된다:



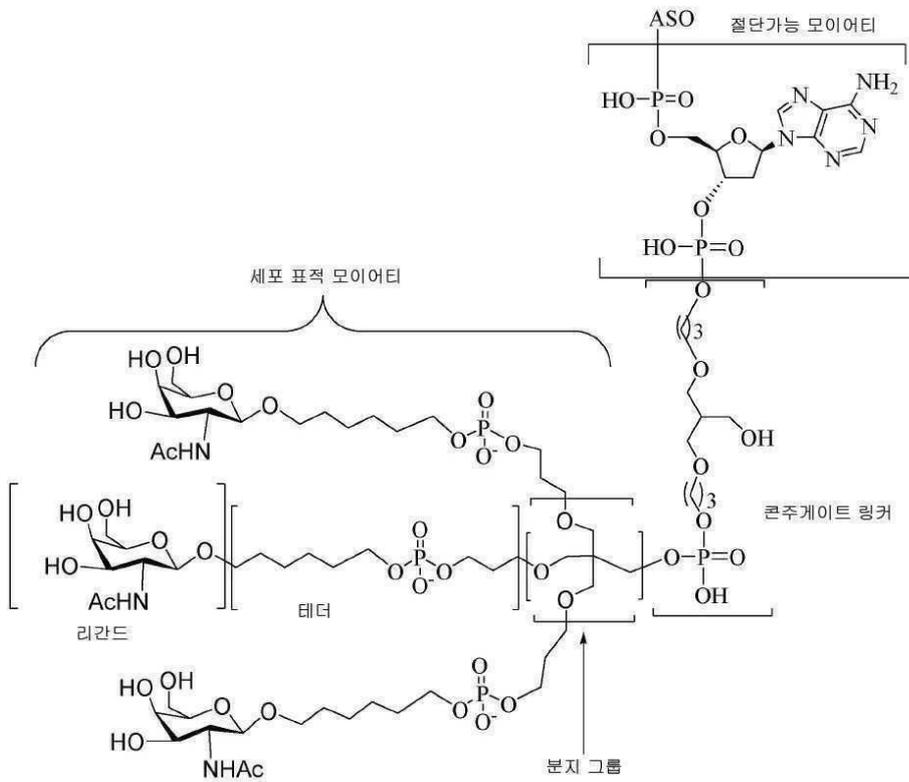
[0042]

[0043] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는 것으로 제공된다:



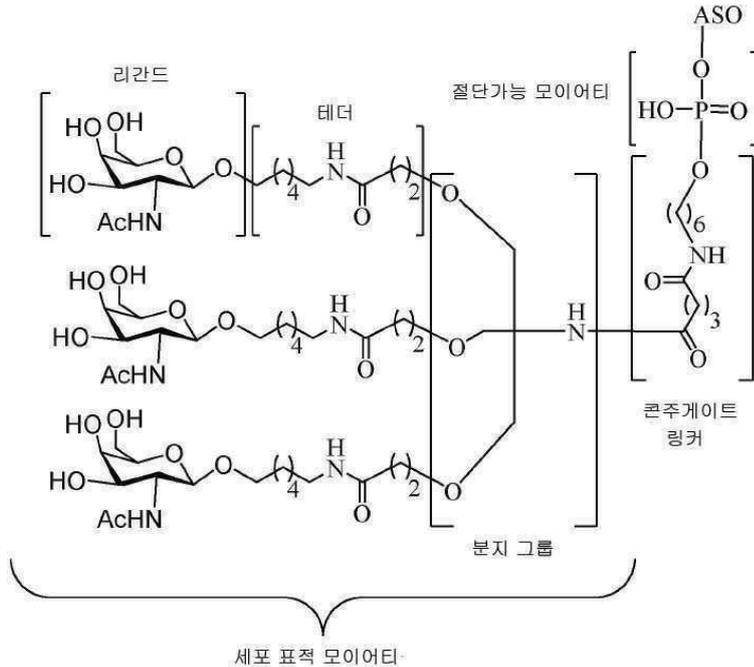
[0044]

[0045] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는 것으로 제공된다:



[0046]

[0047] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는 것으로 제공된다:



[0048]

본 개시내용은 하기의 비제한적인 구현예를 제공한다:

[0049]

[0050]

특정한 변수의 1 초과 (예를 들면, 1 초과 "m" 또는 "n")를 갖는 구현예에서, 달리 지적되지 않으면, 각각의 그와 같은 특정한 변수는 독립적으로 선택된다. 따라서, 1 초과 n을 갖는 구조에 대해, 각각의 n은 선택된 독립적으로 선택되고, 이로써, 서로 동일하거나 그렇지 않을 수 있다.

[0051]

어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 큰주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 30 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 큰주게이트 그룹을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 20 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다.

[0052]

어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 큰주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 30 개의 연결된 뉴클레오타이드로 이루어지고 서열번호: 3의 핵염기 3533 내지 3552의 동등 길이부에 대해 상보적인 핵염기 서열을 포함하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 서열번호: 3에 대해 적어도 80% 상보적이다.

[0053]

어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 큰주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 30 개의 연결된 뉴클레오타이드로 이루어지고 서열번호: 3의 핵염기 3514 내지 3558의 동등 길이부에 대해 상보적인 핵염기 서열을 포함하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 서열번호: 3에 대해 적어도 80% 상보적이다.

[0054]

어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 큰주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 30 개의 연결된 뉴클레오타이드로 이루어지고 서열번호: 19-96, 209-221의 임의 핵염기 서열 중 핵염기 서열을 갖는다. 어떤 구현예에서, 접합된 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 19-96, 209-221의 핵염기 서열 중 임의 하나의 적어도 8 개의 인접 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는다. 어떤 구현예에서, 상기 화합물은 서열번호: 19-96, 209-221 중 임의 하나 및 큰주게이트 그룹으로 이루어진다.

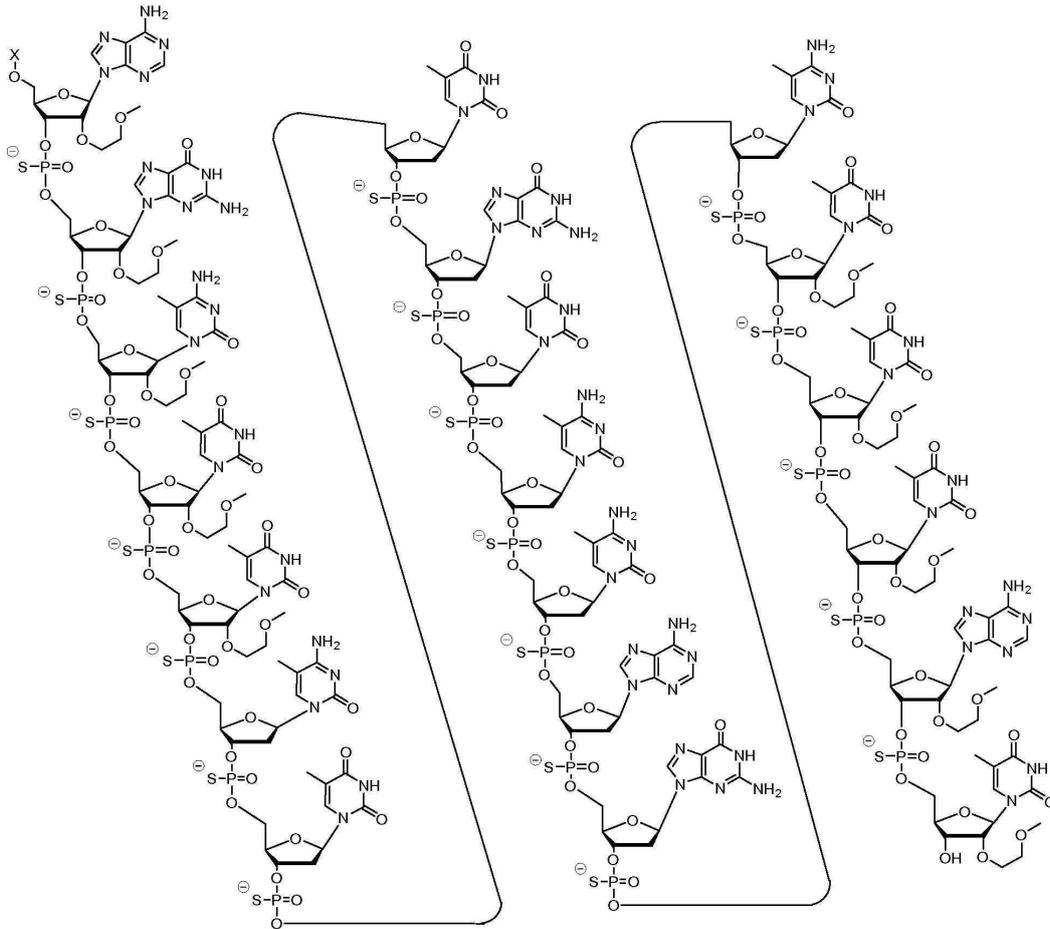
[0055]

어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 큰주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 30 개의 연결된 뉴클레오타이드로 이루어지고 서열번호: 87의 핵염기 서열을 갖는다. 어떤 구현예에서, 큰주게이트 그룹을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 87의 핵염기 서열 중 적어도 8 개의 인접 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는다. 어떤 구현예에서, 상기 화합물은 서열번호: 87 및 큰주게이트 그룹으로 이루어진다.

[0056]

어떤 구현예에서, 본 개시내용은 아래 구조로 나타낸 접합된 안티센스 화합물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 5'-X를 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 ISIS 304801를 포함하고, 여기서 X는 GalNAc를 포함

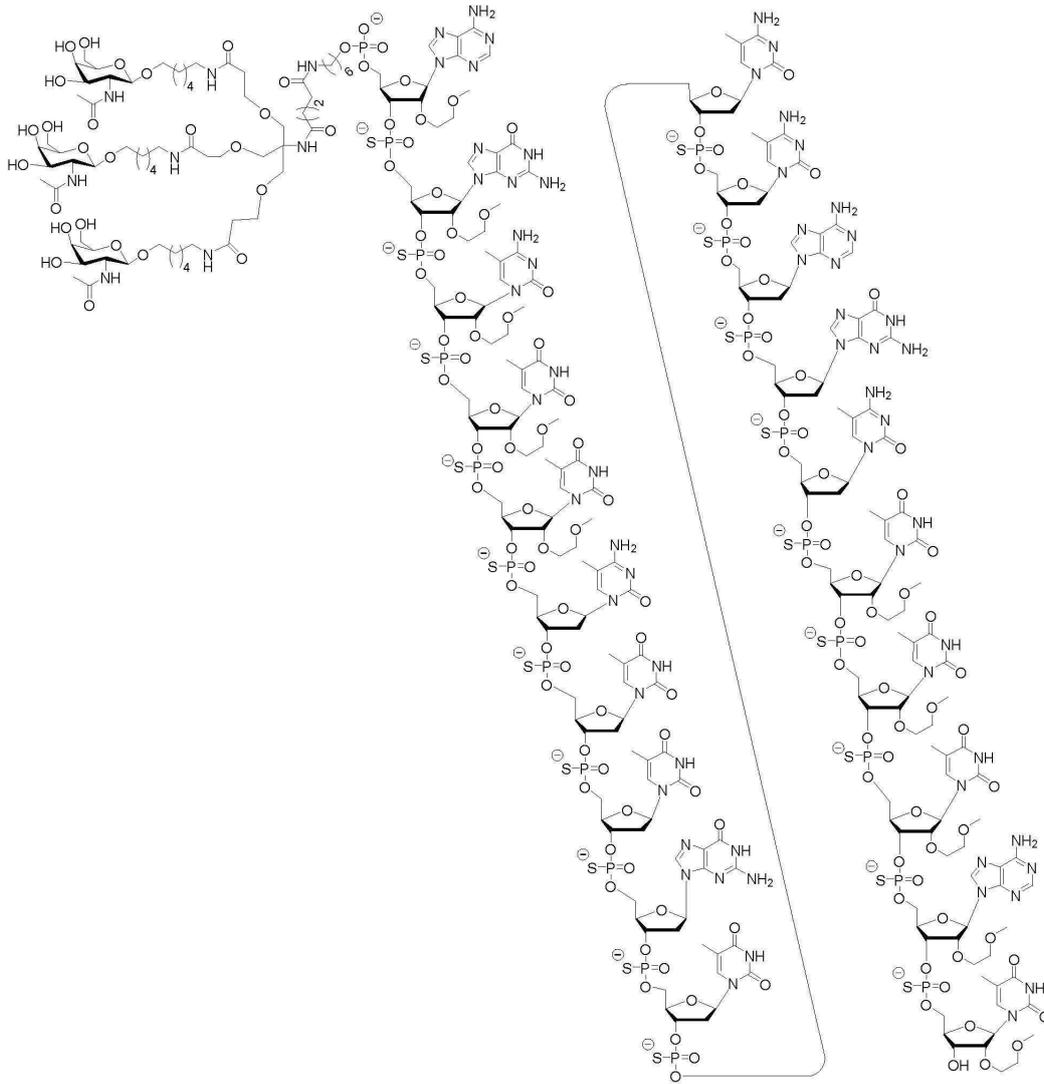
하는 콘주게이트 그룹이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 5'-X를 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 ISIS 304801을 이루어지고, 여기서 X는 GalNAc를 포함하는 콘주게이트 그룹이다.



[0057]

[0058]

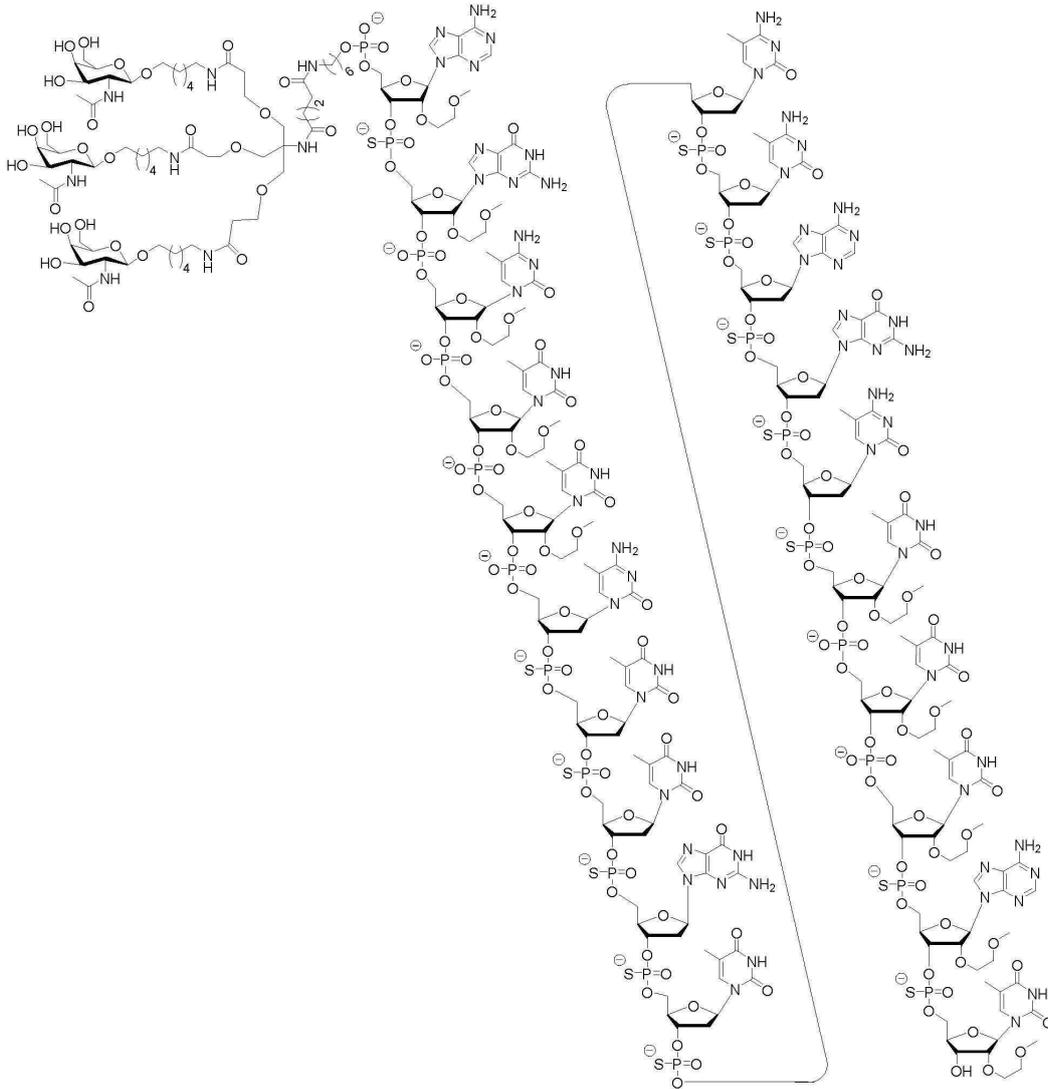
어떤 구현예에서, 본 개시내용은 아래 구조로 나타낸 접합된 안티센스 화합물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 접합된 변형된 올리고뉴클레오타이드 ISIS 678354을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 접합된 변형된 올리고뉴클레오타이드 ISIS 678354으로 이루어진다.



[0059]

[0060]

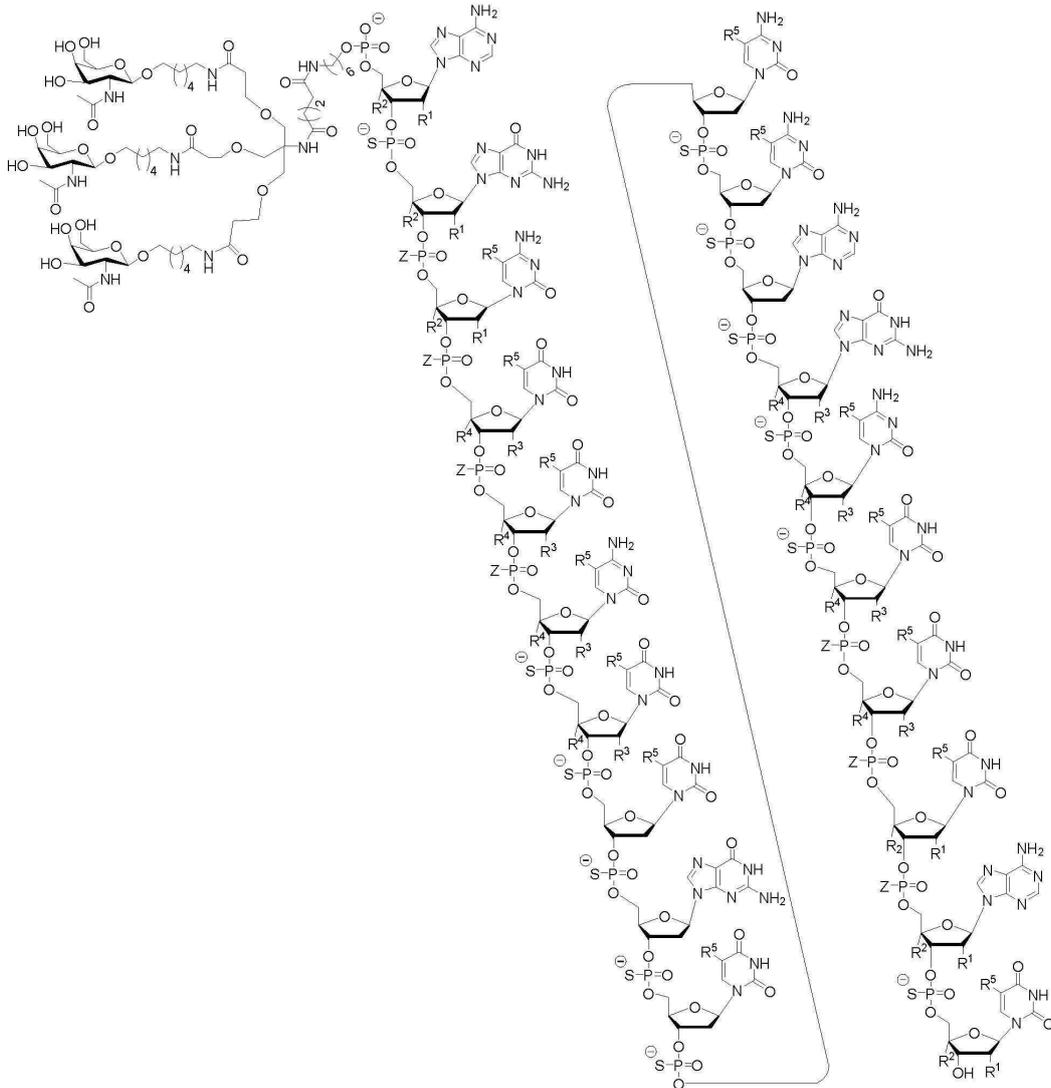
어떤 구현예에서, 본 개시내용은 아래 구조로 나타낸 접합된 안티센스 화합물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 접합된 변형된 올리고뉴클레오타이드 ISIS 678357을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 접합된 변형된 올리고뉴클레오타이드 ISIS 678357로 이루어진다.



[0061]

[0062]

어떤 구현예에서, 본 개시내용은 아래 구조로 나타낸 접합된 안티센스 화합물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 W의 당 모델에서 가변성을 갖는 5'-GalNAc을 갖는 서열번호: 87의 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 W의 당 모델에서 가변성을 갖는 5'-GalNAc을 갖는 서열번호: 87의 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드로 이루어진다.



[0063]

[0064] 여기서 둘 중 하나의 R^1 은 $-OCH_2CH_2OCH_3$ (MOE)이고 R^2 는 H이거나; 또는 R^1 및 R^2 는 함께 브릿지를 형성하고, 여기서 R^1 은 $-O-$ 이고 R^2 는 $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, 또는 $-CH_2CH_2-$ 이고, 그리고 R^1 및 R^2 는 직접적으로 연결되고, 이로써 수득한 브릿지는 아래로부터 선택되고: $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$, 및 $-O-CH_2CH_2-$;

[0065] 그리고 동일한 고리 상의 R^3 및 R^4 의 각각의 쌍에 대해, 독립적으로 각각의 고리에 대해: 둘 중 하나의 R^3 은 H 및 $-OCH_2CH_2OCH_3$ 로부터 선택되고 R^4 는 H이거나; 또는 R^3 및 R^4 는 함께 브릿지를 형성하고, 여기서 R^3 은 $-O-$ 이고, 그리고 R^4 는 $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, 또는 $-CH_2CH_2-$ 이고 R^3 및 R^4 는 직접적으로 연결되고, 이로써 수득한 브릿지는 아래로부터 선택되고: $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$, 및 $-O-CH_2CH_2-$;

[0066] 그리고 R_5 는 H 및 $-CH_3$ 로부터 선택되고;

[0067] 그리고 Z는 S- 및 O-로부터 선택된다.

[0068] 본 개시내용은 아래의 비제한적인 넘버링된 구현예를 제공한다:

[0069] **상세한 설명**

[0070] 전술된 일반적인 설명 및 하기 상세한 설명은 단지 예시적이고 설명적인 것이고 개시내용을 제한하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 여기서, 단수의 사용은 달리 구체적으로 언급되지 않으면 복수를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "또는"의 사용은 달리 언급되지 않으면 "및/또는"를 의미한다. 더욱이, 용어 "포함하는" 뿐만 아

나라 다른 형태, 예컨대 "포함한다" 및 "포함된"의 사용은 제한적인 것이 아니다. 또한, 용어들 예컨대 "요소" 또는 "구성성분"은, 달리 구체적으로 언급되지 않으면 하나의 유닛을 포함하는 요소 및 구성성분 둘 모두 및 1 초과의 서브유닛을 포함하는 요소 및 구성성분을 포함한다.

[0071] 본원에서 사용된 섹션 제목은 단지 조직상의 목적을 위한 것이고, 기재된 요지를 제한하는 것으로 해석되서는 안 된다. 특허들, 특허 출원, 규약, 서적, 및 논문을 비제한적으로 포함하는 본원에서 인용된 모든 문서, 또는 문서의 일부는, 임의 목적을 위해 그 전체가 참고로 명확히 본원에 편입되어 있다.

[0072] **A. 정의**

[0073] 달리 구체적인 정의가 제공되지 않으면, 본원에서 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 약효 및 약제학적 화학과 관련하여 사용된 명명법 및 그것들의 절차 및 기술은 잘 알려져 있고 당해기술에서 통상적으로 사용된 것들이다. 표준 기술 화학적 합성, 및 화학적 분석을 위해 사용될 수 있다. 어떤 그와 같은 기술 및 절차는 예를 들면 하기에서 발견될 수 있다: "Carbohydrate Modifications in Antisense Research" Edited by Sangvi and Cook, American Chemical Society, Washington D.C., 1994; "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., 21st edition, 2005; and "Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications" Edited by Stanley T. Crooke, CRC Press, Boca Raton, Florida; and Sambrook 등, "Molecular Cloning, A laboratory Manual," 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 이들은 임의 목적을 위해 참고로 본원에 편입되어 있다. 허용되는 경우, 본 개시내용에서 명세서에서 언급된 모든 특허들, 적용, 공개 출원 및 다른 공보 및 다른 데이터는 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있다.

[0074] 달리 지적되지 않으면, 하기 용어들은 하기 의미를 갖는다:

[0075] 본원에서 사용된 바와 같이, "뉴클레오사이드"는 핵염기 모이어티 및 당 모이어티를 포함하는 화합물을 의미한다. 뉴클레오사이드는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 자연 발생 뉴클레오사이드 (DNA 및 RNA에서 발견됨) 및 변형된 뉴클레오사이드. 뉴클레오사이드는 포스페이트 모이어티에 연결될 수 있다.

[0076] 본원에서 사용된 바와 같이, "화학적 변형"은 자연 발생 대응물과 비교할 때 화합물에서 화학적 차이를 의미한다. 올리고뉴클레오타이드의 화학적 변형은 뉴클레오사이드 변형 (당 모이어티 변형 및 핵염기 변형 포함) 및 뉴클레오사이드간 연결 변형을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드에 관하여, 화학적 변형은 핵염기 서열에서 단지 차이를 포함하지 않는다.

[0077] 본원에서 사용된 바와 같이, "푸라노실"은 4 탄소 원자 및 하나의 산소 원자를 포함하는 5-원 고리를 포함하는 구조를 의미한다.

[0078] 본원에서 사용된 바와 같이, "자연 발생 당 모이어티"는 자연 발생 RNA에서 발견된 리보푸라노실 또는 자연 발생 DNA로서 발견된 데옥시리보푸라노실을 의미한다.

[0079] 본원에서 사용된 바와 같이, "당 모이어티"는 뉴클레오사이드의 자연 발생 당 모이어티 또는 변형된 당 모이어티를 의미한다.

[0080] 본원에서 사용된 바와 같이, "변형된 당 모이어티"는 치환된 당 모이어티 또는 당 대응물을 의미한다.

[0081] 본원에서 사용된 바와 같이, "치환된 당 모이어티"는 자연 발생 당 모이어티가 아닌 푸라노실을 의미한다. 치환된 당 모이어티는 2'-위치, 3'-위치, 5'-위치 및/또는 4'-위치에서 치환기를 포함하는 푸라노실을 비제한적으로 포함한다. 어떤 치환된 당 모이어티는 바이사이클릭 당 모이어티이다.

[0082] 본원에서 사용된 바와 같이, "2'-치환된 당 모이어티"는 H 또는 OH 이외의 2'-위치에서 치환기를 포함하는 푸라노실을 의미한다. 달리 지적되지 않으면, 2'-치환된 당 모이어티는 바이사이클릭 당 모이어티가 아니다 (즉, 2'-치환된 당 모이어티의 2'-치환기는 푸라노실 고리의 또 하나의 원자에 대해 프릿지를 형성하지 않는다).

[0083] 본원에서 사용된 바와 같이, "MOE"는 -OCH₂CH₂OCH₃을 의미한다.

[0084] 본원에서 사용된 바와 같이, "2'-F 뉴클레오사이드"는 2' 위치에서 불소를 포함하는 당을 포함하는 뉴클레오사이드를 의미한다. 달리 지적되지 않으면, 2'-F 뉴클레오사이드 중 불소는 (천연 리보오스의 OH를 대체하는) 리보 위치에 있다.

- [0085] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "당 대응물"은 푸라노실을 포함하지 않고 뉴클레오사이드의 자연 발생 당 모이어티를 대체할 수 있는 구조를 의미하고, 이로써 수득한 뉴클레오사이드 서브-유닛은 함께 연결될 수 있고/거나 다른 뉴클레오사이드에 연결되어 상보적 올리고머 화합물을 혼성화할 수 있는 올리고머 화합물을 형성할 수 있다. 그와 같은 구조는 푸라노실보다 상이한 원자를 포함하는 고리 (예를 들면, 4, 6, 또는 7-원 고리); 비-산소 원자 (예를 들면, 탄소, 황, 또는 질소)에 의한 푸라노실의 산소의 대체; 또는 원자의 수의 변화 및 산소의 대체 둘 모두를 포함한다. 그와 같은 구조는 치환된 당 모이어티를 대신하는 것 (예를 들면, 추가의 치환기를 임의로 포함하는 6-원 카보사이클릭 바이사이클릭 당 대응물)에 상응하는 치환을 또한 포함할 수 있다. 당 대응물은 또한 더 많은 복합 당 대체물질 (예를 들면, 펩타이드 핵산의 비-고리계)를 포함한다. 당 대응물은 비제한적으로 모폴리노, 사이클로헥세닐 및 사이클로헥시톨을 포함한다.
- [0086] 본원에서 사용된 바와 같이, "바이사이클릭 당 모이어티"는 바이사이클릭 구조가 되는, 제 2 고리를 형성하기 위해 4 내지 7 원 고리의 2 개의 원자를 연결하는 브릿지를 포함하는 (비제한적으로 푸라노실을 포함하는) 4 내지 7 원 고리를 포함하는 변형된 당 모이어티를 의미한다. 어떤 구현예에서, 4 내지 7 원 고리는 당 고리이다. 어떤 구현예에서 4 내지 7 원 고리는 푸라노실이다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 브릿지는 푸라노실의 2'-탄소 및 4'-탄소를 연결한다.
- [0087] 본원에서 사용된 바와 같이, "뉴클레오타이드"는 포스페이트 연결 그룹을 추가로 포함하는 뉴클레오사이드를 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "연결된 뉴클레오사이드"는 포스페이트 연결에 의해 연결되거나 그렇지 않을 수 있고 따라서, 비제한적으로 "연결된 뉴클레오타이드"를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "연결된 뉴클레오사이드"는 연속적 서열로 연결된 뉴클레오사이드이다 (즉 추가의 뉴클레오사이드는 연결된 것들 사이에 존재하지 않는다).
- [0088] 본원에서 사용된 바와 같이, "핵산"은 모노머 뉴클레오타이드로 구성된 분자를 의미한다. 핵산은 리보핵산 (RNA), 데옥시리보핵산 (DNA), 단일가닥 핵산 (ssDNA), 이중-가닥 핵산 (dsDNA), 작은 개재 리보핵산 (siRNA), 및 microRNAs (miRNA)을 포함한다. 핵산은 단일 분자에 이들 요소의 임의 조합을 또한 포함할 수 있다.
- [0089] 본원에서 사용된 바와 같이, "뉴클레오타이드"는 포스페이트 연결 그룹을 추가로 포함하는 뉴클레오사이드를 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "연결된 뉴클레오사이드"는 포스페이트 연결에 의해 연결되거나 그렇지 않을 수 있고 따라서 비제한적으로 "연결된 뉴클레오타이드"를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "연결된 뉴클레오사이드"는 연속적 서열로 연결된 뉴클레오사이드이다 (즉 추가의 뉴클레오사이드는 연결된 것들 사이에 존재하지 않는다).
- [0090] 본원에서 사용된 바와 같이, "핵염기"는 올리고뉴클레오타이드에 편입될 수 있는 뉴클레오타이드를 만들기 위해 당 모이어티에 연결될 수 있는 원자의 그룹을 의미하고, 상기 원자의 그룹은 또 하나의 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산의 상보적 자연 발생 핵염기와 결합할 수 있다. 핵염기는 자연 발생일 수 있거나 변형될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "핵염기 서열"은 임의 당, 연결, 또는 핵염기 변형에 독립적인 인접 핵염기의 순서를 의미한다.
- [0091] 본원에서 사용된 바와 같이 용어들, "비변형된 핵염기" 또는 "자연 발생 핵염기"는 RNA 또는 DNA의 자연 발생 헤테로사이클릭 핵염기: 퓨린계 아데닌 (A) 및 구아닌 (G), 및 피리미딘계 티민 (T), 시토신 (C) (5-메틸 C 포함), 및 우라실 (U)을 의미한다.
- [0092] 본원에서 사용된 바와 같이, "변형된 핵염기"는 자연 발생 핵염기가 아닌 임의 핵염기를 의미한다.
- [0093] 본원에서 사용된 바와 같이, "변형된 뉴클레오사이드"는 자연 발생 RNA 또는 DNA 뉴클레오사이드와 비교하여 적어도 하나의 화학적 변형을 포함하는 뉴클레오사이드를 의미한다. 변형된 뉴클레오사이드는 변형된 당 모이어티 및/또는 변형된 핵염기를 포함한다.
- [0094] 본원에서 사용된 바와 같이, "바이사이클릭 뉴클레오사이드" 또는 "BNA"는 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오사이드를 의미한다.
- [0095] 본원에서 사용된 바와 같이, "구속된 에틸 뉴클레오사이드" 또는 "cEt"는 4'-CH(CH₃)-O-2' 브릿지를 포함하는 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오사이드를 의미한다.
- [0096] 본원에서 사용된 바와 같이, "잠겨진 핵산 뉴클레오사이드" 또는 "LNA"는 4'-CH₂-O-2' 브릿지를 포함하는 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오사이드를 의미한다.

[0097] 본원에서 사용된 바와 같이, "2'-치환된 뉴클레오사이드"는 H 또는 OH 외에 2'-위치에서 치환기를 포함하는 뉴클레오사이드 의미한다. 달리 지적되지 않으면, 2'-치환된 뉴클레오사이드는 바이사이클릭 뉴클레오사이드가 아니다.

[0098] 본원에서 사용된 바와 같이, "데옥시뉴클레오사이드"는 자연 발생 데옥시리보뉴클레오사이드 (DNA)에서 발견되는 바와 같이, 2'-H 푸라노실 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오사이드를 의미한다. 어떤 구현예에서, 2'-데옥시뉴클레오사이드는 변형된 핵염기를 포함할 수 있거나 RNA 핵염기 (예를 들면, 우라실)를 포함할 수 있다.

[0099] 본원에서 사용된 바와 같이, "올리고뉴클레오타이드"는 복수의 연결된 뉴클레오사이드를 포함하는 화합물을 의미한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 1 이상의 비변형된 리보뉴클레오사이드 (RNA) 및/또는 비변형된 데옥시리보뉴클레오사이드 (DNA) 및/또는 1 이상의 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다.

[0100] 본원에서 사용된 바와 같이 "올리고뉴클레오사이드"는, 뉴클레오사이드간 연결의 어떤 것도 인 원자를 함유하지 않는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오사이드를 포함한다.

[0101] 본원에서 사용된 바와 같이, "변형된 올리고뉴클레오타이드"는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오사이드 및/또는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.

[0102] 본원에서 사용된 바와 같이, "연결" 또는 "연결 그룹"은 원자의 2 이상의 다른 그룹과 함께 연결되는 원자의 그룹을 의미한다.

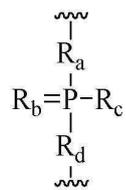
[0103] 본원에서 사용된 바와 같이 "뉴클레오사이드간 연결"은 올리고뉴클레오타이드에서 인접한 뉴클레오사이드 사이의 공유 결합을 의미한다.

[0104] 본원에서 사용된 바와 같이 "자연 발생 뉴클레오사이드간 연결"은 3' 내지 5' 포스포디에스테르 연결을 의미한다.

[0105] 본원에서 사용된 바와 같이, "변형된 뉴클레오사이드간 연결"은 자연 발생 뉴클레오사이드간 연결 이외의 임의의 뉴클레오사이드간 연결을 의미한다.

[0106] 본원에서 사용된 바와 같이, "말단 뉴클레오사이드간 연결"은 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 규정된 영역의 마지막 2 개의 뉴클레오사이드의 사이의 연결을 의미한다.

[0107] 본원에서 사용된 바와 같이, "인 연결 그룹"은 인 원자를 포함하는 연결 그룹을 의미한다. 인 연결 그룹은 하기식을 갖는 그룹을 비제한적으로 포함한다:



[0108] .
[0109] 여기서:

[0110] R_a 및 R_d 각각은, 독립적으로, O, S, CH₂, NH, 또는 NJ₁이고 여기서 J₁은 C₁-C₆ 알킬 또는 치환된 C₁-C₆ 알킬이고;

[0111] R_b은 O 또는 S이고;

[0112] R_c은 OH, SH, C₁-C₆ 알킬, 치환된 C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알콕시, 치환된 C₁-C₆ 알콕시, 아미노 또는 치환된 아미노이고; 그리고

[0113] J₁은 R_b은 O 또는 S이다.

[0114] 인 연결 그룹은 비제한적으로, 하기를 포함한다: 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포네이트, 포스포르아미데이트, 포스포로티오아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 포스포트리에스테르, 티오노알킬포스포트리에스테르 및 보라노포스페이트.

[0115] 본원에서 사용된 바와 같이, "뉴클레오사이드간 인 연결 그룹"은 2 개의 뉴클레오사이드를 직접적으로 연결하는

인 연결 그룹을 의미한다.

- [0116] 본원에서 사용된 바와 같이, "비-뉴클레오사이드간 인 연결 그룹"은 2 개의 뉴클레오사이드를 직접적으로 연결하지 않는 인 연결 그룹을 의미한다. 어떤 구현예에서, 비-뉴클레오사이드간 인 연결 그룹은 뉴클레오사이드 뉴클레오사이드 이외의 그룹에 연결한다. 어떤 구현예에서, 비-뉴클레오사이드간 인 연결 그룹은 2 개의 그룹을 연결하고, 이것 중 어떤 것도 뉴클레오사이드가 아니다.
- [0117] 본원에서 사용된 바와 같이, "중성 연결 그룹"은 충전되지 않은 연결 그룹을 의미한다. 중성 연결 그룹은 비제한적으로 하기를 포함한다: 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, MMI (-CH₂-N(CH₃)-O-), 아마이드-3 (-CH₂-C(=O)-N(H)-), 아마이드-4 (-CH₂-N(H)-C(=O)-), 포름아세탈 (-O-CH₂-O-), 및 티오포름아세탈 (-S-CH₂-O-). 추가의 중성 연결 그룹은 실록산 (디알킬실록산), 카복실레이트 에스테르, 카복사마이드, 설파이드, 설포네이트 에스테르 및 아마이드를 포함하는 비이온성 연결을 포함한다 (참고 예를 들면: Carbohydrate Modifications in Antisense Research; Y.S. Sanghvi 및 P.D. Cook Eds. ACS Symposium 시리즈 580; Chapters 3 및 4, (pp. 40-65)). 추가의 중성 연결 그룹은 혼합된 N, O, S 및 CH₂ 성분 부분을 포함하는 비이온성 연결을 포함한다.
- [0118] 본원에서 사용된 바와 같이, "뉴클레오사이드간 중성 연결 그룹"은 2 개의 뉴클레오사이드를 직접적으로 연결하는 중성 연결 그룹을 의미한다.
- [0119] 본원에서 사용된 바와 같이, "비-뉴클레오사이드간 중성 연결 그룹"은 2 개의 뉴클레오사이드를 직접적으로 연결하지 않는 중성 연결 그룹을 의미한다. 어떤 구현예에서, 비-뉴클레오사이드간 중성 연결 그룹은 뉴클레오사이드를 뉴클레오사이드 이외의 그룹에 연결한다. 어떤 구현예에서, 비-뉴클레오사이드간 중성 연결 그룹은 2 개의 그룹을 연결하고, 이것 중 어떤 것도 뉴클레오사이드가 아니다.
- [0120] 본원에서 사용된 바와 같이, "올리고머 화합물"은 2 이상의 하부구조를 포함하는 폴리머 구조를 의미한다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 1 이상의 콘주게이트 그룹 및/또는 말단기를 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 올리고뉴클레오타이드로 구성된다. 올리고머 화합물은 또한 자연 발생 핵산을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 1 이상의 연결된 모노머 서브유닛의 골격을 포함하고, 여기서 각각의 연결된 모노머 서브유닛은 헤테로사이클릭 염기 모이어티에 직접적으로 또는 간접적으로 부착된다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 헤테로사이클릭 염기 모이어티에 연결되지 않는 모노머 서브유닛을 또한 포함할 수 있고, 그렇게 함으로써 무염기성 부위를 제공한다. 어떤 구현예에서, 모노머 서브유닛, 당 모이어티 또는 대응물 및 헤테로사이클릭 염기 모이어티를 있는 연결은 독립적으로 변형될 수 있다. 어떤 구현예에서, 헤테로사이클릭 염기를 포함할 수 있거나 그렇지 않는 연결-당 단위는, 모방체 예컨대 펩타이드 핵산 중 모노머로 치환될 수 있다.
- [0121] 본원에서 사용된 바와 같이, "말단기"는 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단 또는 5' 말단 중 하나 또는 둘 모두에 부착된 1 이상의 원자를 의미한다. 어떤 구현예에서 말단기는 콘주게이트 그룹이다. 어떤 구현예에서, 말단기는 1 이상의 말단기 뉴클레오사이드를 포함한다.
- [0122] 본원에서 사용된 바와 같이, "콘주게이트" 또는 "콘주게이트 그룹"은 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고머 화합물에 결합된 원자 또는 원자의 그룹을 의미한다. 일반적으로, 콘주게이트 그룹은 약동학적, 약력학적, 결합, 흡수, 세포성 분포, 세포성 흡수, 전하 및/또는 청소능 특성을 비제한적으로 포함하는, 부착된 화합물의 1 이상의 특성을 변형시킨다.
- [0123] 본원에서 사용된 바와 같이, 콘주게이트 그룹의 문맥 중 "콘주게이트 링커" 또는 "링커"는 임의 원자 또는 원자의 그룹을 포함하고 (1) 올리고뉴클레오타이드를 콘주게이트 그룹의 또 하나의 부분 또는 (2) 콘주게이트 그룹의 2 이상의 부분에 공유 결합하는 콘주게이트 그룹의 구분을 의미한다.
- [0124] 콘주게이트 그룹은 올리고머 화합물 예컨대 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 대한 공유 결합을 형성하는 결합을 제공하는 라디칼로서 본원에서 보여진다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물 상의 부착점은 올리고머 화합물의 3' 말단 뉴클레오사이드의 3'-하이드록실 그룹의 3'-산소 원자이다. 어떤 구현예에서 올리고머 화합물 상의 부착점은 올리고머 화합물의 5' 말단 뉴클레오사이드의 5'-하이드록실 그룹의 5'-산소 원자이다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물에 대한 부착을 형성하는 결합은 절단가능 결합이다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 그와 같은 절단가능 결합은 절단가능 모이어티의 모두 또는 일부를 구성한다.
- [0125] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 절단가능 모이어티 (예를 들면, 절단가능 결합 또는 절단가능 뉴클레오사이드) 및 탄수화물 클러스터 부분, 예컨대 GalNAc 클러스터 부분을 포함한다. 그와 같은 탄수화물 클러스터 부

본은 하기를 포함한다: 표적 모이어티, 및 임의로, 콘주게이트 링커. 어떤 구현예에서, 탄수화물 클러스터 부분은 리간드의 수 및 동일성에 의해 확인된다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 탄수화물 클러스터 부분은 3 개의 GalNAc 그룹을 포함하고 "GalNAc₃"로 칭한다. 어떤 구현예에서, 탄수화물 클러스터 부분은 4 개의 GalNAc 그룹을 포함하고 "GalNAc₄"로 칭한다. (구체적인 테더, 분지화 및 콘주게이트 링커 그룹을 갖는) 구체적인 탄수화물 클러스터 부분은 본원에서 기재되어 있고, 로마 숫자 그 다음 하첨자 "a"로 지정된다. 따라서 "GalNac3-1_a"는 3 개의 GalNAc 그룹을 갖는 콘주게이트 그룹 및 구체적으로 확인된 테더, 분지화 및 연결 그룹의 구체적인 탄수화물 클러스터 부분을 의미한다. 그와 같은 탄수화물 클러스터 단편은 절단가능 모이어티, 예컨대 절단가능 결합 또는 절단가능 뉴클레오사이드를 통해 올리고머 화합물에 부착된다.

- [0126] 본원에서 사용된 바와 같이, "절단가능 모이어티"는 생리적 조건 하에서 나누어질 수 결합 또는 그룹을 의미한다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 세포 또는 아-세포성 구획, 예컨대 용해소체 내에서 절단된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 내인성 효소, 예컨대 뉴클레아제에 의해 절단된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 1, 2, 3, 4, 또는 그 초과 4 개의 절단가능 결합을 갖는 원자의 그룹을 포함한다.
- [0127] 본원에서 사용된 바와 같이, "절단가능 결합"은 나누어질 수 있는 임의 화학 결합을 의미한다. 어떤 구현예에서, 절단가능 결합은 하기 중으로부터 선택된다: 아미드, 폴리아미드, 에스테르, 에테르, 포스포디에스테르의 에스테르 하나 또는 둘 모두, 포스페이트 에스테르, 카바메이트, 디-설파이드, 또는 펩타이드.
- [0128] 본원에서 사용된 바와 같이, "탄수화물 클러스터"는 스캐폴드 또는 링커 그룹에 부착된 1 이상의 탄수화물 잔기를 갖는 화합물을 의미한다. 예를 들면 하기 (참고: Maier 등, "Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting," *Bioconjugate Chemistry*, 2003, (14): 18-29, 이것은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있음, 또는 Rensen 등, "Design and Synthesis of Novel *N*-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor," *J. Med. Chem.* 2004, (47): 5798-5808, 탄수화물 콘주게이트 클러스터의 예에 대해).
- [0129] 본원에서 사용된 바와 같이, "변형된 탄수화물"은 자연 발생 탄수화물에 대해 1 이상의 화학적 변형을 갖는 임의 탄수화합물을 의미한다.
- [0130] 본원에서 사용된 바와 같이, "탄수화물 유도체"는 탄수화물을 개시 물질 또는 중간체로서 사용하여 합성될 수 있는 임의 화합물을 의미한다.
- [0131] 본원에서 사용된 바와 같이, "탄수화물"은 자연 발생 탄수화물, 변형된 탄수화물, 또는 탄수화물 유도체를 의미한다.
- [0132] 본원에서 사용된 바와 같이 "보호 그룹"은 당해분야의 숙련자에게 공지된 임의 화합물 또는 보호 그룹을 의미한다. 보호 그룹의 비-제한적인 예는 하기에서 발견될 수 있다: "Protective Groups in Organic Chemistry", T. W. 그린, P. G. M. Wuts, ISBN 0-471-62301-6, John Wiley & Sons, Inc, New York, 이것은 본원에 그 전체가 참고로 편입되어 있다.
- [0133] 본원에서 사용된 바와 같이, "단일가닥"은 그것의 보체에 대해 혼성화되지 않고 안정한 자가-듀플렉스를 형성하기 위한 충분한 자가-상보성이 없는 올리고머 화합물을 의미한다.
- [0134] 본원에서 사용된 바와 같이, "이중가닥"은 서로 혼성화된 한 쌍의 올리고머 화합물 또는 헤어핀 구조를 형성하는 단일 자가-상보적 올리고머 화합물을 의미한다. 어떤 구현예에서, 이중-가닥 올리고머 화합물은 제 1 및 제 2 올리고머 화합물을 포함한다.
- [0135] 본원에서 사용된 바와 같이, "안티센스 화합물"은, 적어도 하나의 안티센스 활성이 생기는, 혼성화할 수 있는 표적 핵산에 대해 상보적인 올리고뉴클레오타이드의 적어도 부분을 포함하거나 그것으로 구성된 화합물을 의미한다.
- [0136] 본원에서 사용된 바와 같이, "안티센스 활성"은 그것의 표적 핵산에 대한 안티센스 화합물의 혼성화가 그 원인인 임의 검출가능한 및/또는 측정가능한 변화를 의미한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 활성은 표적 핵산 전사체 (예를 들면 mRNA)의 양 또는 활성의 조절을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 활성은 전-mRNA의 스플라이싱의 조절을 포함한다.
- [0137] 본원에서 사용된 바와 같이, "RNase H 기반 안티센스 화합물"이란, 안티센스 화합물을 의미하고, 여기서 안티센

스 화합물의 안티센스 활성의 적어도 일부는 표적 핵산에 대한 안티센스 화합물의 혼성화 및 RNase H에 의한 표적 핵산의 차후의 절단이 그 원인이다.

- [0138] 본원에서 사용된 바와 같이, "RISC 기반 안티센스 화합물"은 안티센스 화합물을 의미하고, 여기서 안티센스 화합물의 안티센스 활성의 적어도 일부는 RNA 유도된 사일런싱 복합체 (RISC)가 그 원인이다.
- [0139] 본원에서 사용된 바와 같이, "검출" 또는 "측정"이란, 검출 또는 측정을 위한 시험 또는 검정이 수행된다는 것을 의미한다. 그와 같은 검출 및/또는 측정으로 값이 제로일 수 있다. 따라서, 검출 또는 측정용 시험으로 활성 없음 (활성 제로)을 발현하면, 그럼에도 불구하고 상기 활성을 검출 또는 측정하는 단계가 수행되었다.
- [0140] 본원에서 사용된 바와 같이, "검출가능한 및/또는 측정가능한 활성"이란, 제로가 아닌 통계적으로 유의미한 활성을 의미한다.
- [0141] 본원에서 사용된 바와 같이, "본질적으로 변하지 않는다"란, 특히 훨씬 더 변하는 또 하나의 파라미터에 대해 특정한 파라미터의 변화가 거의 없거나 없다는 것을 의미한다. 어떤 구현예에서, 파라미터는, 5% 미만 변할 때 본질적으로 변하지 않는다. 어떤 구현예에서, 파라미터는, 2-배 미만 변하지만 또 하나의 파라미터가 적어도 10-배 변한다면 본질적으로 변하지 않는다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 안티센스 활성은 표적 핵산의 양의 변화이다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 비-표적 핵산의 양은, 그것이 표적 핵산보다 훨씬 더 적게 변하지만 그 변화가 제로일 필요는 없다면, 본질적으로 변하지 않는다.
- [0142] 본원에서 사용된 바와 같이, "발현"은, 유전자가 결국 단백질로 되는 과정을 의미한다. 발현은, 비제한적으로, 전사, 후-전사 변형 (예를 들면, 5'-캡의 스플라이싱, 폴리아데닐화, 부가), 및 번역을 포함한다.
- [0143] 본원에서 사용된 바와 같이, "표적 핵산"은, 안티센스 화합물이 원하는 안티센스 활성이 생기도록 혼성화하는 것으로 의도된 핵산 분자를 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 생리적 조건 하에서 혼성화를 허용하기 위해 그것의 표적 핵산에 대해 충분한 상보성을 갖는다.
- [0144] 본원에서 사용된 바와 같이, "핵염기 상보성" 또는 "상보성"은, 핵염기를 참조할 때, 또 하나의 핵염기와 염기 짝짓기할 수 있는 핵염기를 의미한다. 예를 들면, DNA에서, 아데닌 (A)은 티민 (T)에 대해 상보적이다. 예를 들면, RNA에서, 아데닌 (A)은 우라실 (U)에 대해 상보적이다. 어떤 구현예에서, 상보적 핵염기는 그것의 표적 핵산의 핵염기와 염기 짝짓기할 수 있는 안티센스 화합물의 핵염기를 의미한다. 예를 들면, 안티센스 화합물의 어떤 위치에 있는 핵염기가 표적 핵산의 어떤 위치에서 핵염기와 수소 결합할 수 있다면, 이때 올리고뉴클레오타이드와 표적 핵산 사아의 수소 결합의 위치는 핵염기쌍에서 상보적인 것으로 간주된다. 어떤 변형을 포함하는 핵염기는 대응물 핵염기와 쌍을 이루는 능력을 유지할 수 있고 따라서, 여전히 핵염기 상보성을 유지할 수 있다.
- [0145] 본원에서 사용된 바와 같이, 핵염기에 관한 "비-상보적"이란, 수소 결합을 서로 형성하지 않는 한 쌍의 핵염기를 의미한다.
- [0146] 본원에서 사용된 바와 같이, 올리고머 화합물 (예를 들면, 연결된 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 또는 핵산)에 관한 "상보적"이란, 핵염기 상보성을 통해 또 하나의 올리고머 화합물 또는 그것의 영역과 혼성화하기 위한 그와 같은 올리고머 화합물 또는 그것의 영역의 용량을 의미한다. 상보적 올리고머 화합물은 각각의 뉴클레오타이드에서 핵염기 상보성을 가질 필요는 없다. 오히려, 일부 미스매치가 용인된다. 어떤 구현예에서, 상보적 올리고머 화합물 또는 영역은 핵염기의 70%에서 상보적이다 (70% 상보적). 어떤 구현예에서, 상보적 올리고머 화합물 또는 영역은 80% 상보적이다. 어떤 구현예에서, 상보적 올리고머 화합물 또는 영역은 90% 상보적이다. 어떤 구현예에서, 상보적 올리고머 화합물 또는 영역은 95% 상보적이다. 어떤 구현예에서, 상보적 올리고머 화합물 또는 영역은 100% 상보적이다.
- [0147] 본원에서 사용된 바와 같이, "미스매치"는, 제 1 및 제 2 올리고머 화합물이 정렬될 때 제 2 올리고머 화합물의 상응하는 위치에서 핵염기와 짝짓기할 수 없는 제 1 올리고머 화합물의 핵염기를 의미한다. 제 1 및 제 2 올리고머 화합물 중 하나 또는 둘 모두는 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0148] 본원에서 사용된 바와 같이, "혼성화"는 상보적 올리고머 화합물 (예를 들면, 안티센스 화합물 및 그것의 표적 핵산)의 짝짓기를 의미한다. 특정한 기전에 제한되지 않으면서, 짝짓기의 가장 공통의 기전은 상보적 핵염기 사이의 왓슨-크릭, 휴그스틴 또는 역전된 휴그스틴 수소 결합일 수 있는 수소 결합을 수반한다.
- [0149] 본원에서 사용된 바와 같이, "특이적으로 혼성화하는"이란, 또 하나의 핵산 부위에 혼성화하는 것보다 더 큰 친

화성으로 하나의 핵산 부위에 혼성화하기 위한 올리고머 화합물의 능력을 의미한다.

- [0150] 본원에서 사용된 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 부분에 대한 "완전히 상보적"이란, 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 부분의 각각의 핵염기가 상보적 핵산 또는 그것의 인접부의 핵염기와 짝짓기할 수 있다는 것을 의미한다. 따라서, 완전히 상보적 영역은 하나의 가닥에서 미스매치 또는 비혼성화된 핵염기를 포함하지 않는다.
- [0151] 본원에서 사용된 바와 같이, "퍼센트 상보성"은 표적 핵산의 동등-길이부에 대해 상보적인 올리고머 화합물의 핵염기의 백분율을 의미한다. 퍼센트 상보성은 올리고머 화합물의 총 길이로, 표적 핵산에서 상응하는 위치에서 핵염기에 대해 상보적인 올리고머 화합물의 핵염기의 수를 나누어서 계산된다.
- [0152] 본원에서 사용된 바와 같이, "퍼센트 동일성"은 제 1 핵산에서 핵염기의 총수에 의해 분할된, 제 2 핵산에서의 상응하는 위치에서 핵염기와 동일한 (화학적 변형에 독립적인) 유형인 제 1 핵산에서 핵염기의 수를 의미한다.
- [0153] 본원에서 사용된 바와 같이, "조절"은 조절 전의 분자, 기능, 또는 활성의 양 또는 품질과 비교할 때, 분자, 기능, 또는 활성의 양 또는 품질의 변화를 의미한다. 예를 들면, 조절은 유전자 발현에서 변화, 증가 (자극 또는 유도) 또는 축소감소 (억제 또는 축소)를 포함한다. 추가 예로서, 발현의 조절은 전-mRNA 처리의 스플라이스 부위 선택의 변화를 포함할 수 있고, 조절의 부재에서의 양과 비교하여 특정한 스플라이스 -변이체의 절대적인 또는 상대적인 양이 변한다.
- [0154] 본원에서 사용된 바와 같이, "화학적 모티프"는 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 영역에서 화학적 변형의 패턴을 의미한다. 모티프는 어떤 뉴클레오사이드 및/또는 올리고뉴클레오타이드의 어떤 연결 그룹에서의 변형에 의해 규정될 수 있다.
- [0155] 본원에서 사용된 바와 같이, "뉴클레오사이드 모티프"는 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 영역에서 뉴클레오사이드 변형의 패턴을 의미한다. 그와 같은 올리고뉴클레오타이드의 연결은 변형 또는 비변형될 수 있다. 달리 지적되지 않으면, 뉴클레오사이드를 단지 기재하는 본원의 모티프는 뉴클레오사이드 모티프인 것으로 의도된다. 따라서, 그와 같은 경우에, 연결은 제한되지 않는다.
- [0156] 본원에서 사용된 바와 같이, "당 모티프"는 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 영역에서 당 변형의 패턴을 의미한다.
- [0157] 본원에서 사용된 바와 같이, "연결 모티프"는 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 영역에서 연결 변형의 패턴을 의미한다. 그와 같은 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오사이드는 변형 또는 비변형될 수 있다. 달리 지적되지 않으면, 연결을 단지 기재하는 본원의 모티프는 연결 모티프인 것으로 의도된다. 따라서, 그와 같은 경우에, 뉴클레오사이드는 제한되지 않는다.
- [0158] 본원에서 사용된 바와 같이, "핵염기 변형 모티프"는 올리고뉴클레오타이드에 따른 핵염기에 대한 변형의 패턴을 의미한다. 달리 지적되지 않으면, 핵염기 변형 모티프는 핵염기 서열에 독립적이다.
- [0159] 본원에서 사용된 바와 같이, "서열 모티프"는 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 부분을 따라 배열된 핵염기의 패턴을 의미한다. 달리 지적되지 않으면, 서열 모티프는 화학적 변형에 독립적이고 따라서 화학적 변형을 포함하지 않으면서 화학적 변형의 임의 조합을 가질 수 있다.
- [0160] 본원에서 사용된 바와 같이, "유형"의 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오사이드에 관한 "변형의 유형"은 뉴클레오사이드의 화학적 변형을 의미하고 변형된 및 비변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 따라서, 달리 지적되지 않으면, "제 1 유형의 변형을 갖는 뉴클레오사이드"는 비변형된 뉴클레오사이드일 수 있다.
- [0161] 본원에서 사용된 바와 같이, "상이하게 변형된"은 변형의 부재를 포함하여, 서로 상이한 화학적 변형 또는 화학적 치환기를 의미한다. 따라서, 예를 들면, MOE 뉴클레오사이드 및 비변형된 DNA 뉴클레오사이드는, DNA 뉴클레오사이드는 비변형될지라도 "상이하게 변형"된다. 마찬가지로, DNA 및 RNA는, 둘 모두가 자연 발생 비변형된 뉴클레오사이드일지라도, "상이하게 변형"된다. 동일한하지만 상이한 핵염기를 포함하는 뉴클레오사이드는 상이하게 변형되지 않는다. 예를 들면, 2'-OMe 변형된 당 및 비변형된 아데닌 핵염기를 포함하는 뉴클레오사이드 및 2'-OMe 변형된 당 및 비변형된 티민 핵염기를 포함하는 뉴클레오사이드는 상이하게 변형되지 않는다.
- [0162] 본원에서 사용된 바와 같이, "동일한 유형의 변형"은 변형의 부재를 포함하여 서로 동일한 변형을 의미한다. 따라서, 예를 들면, 2 개의 비변형된 DNA 뉴클레오사이드는, DNA 뉴클레오사이드가 비변형될지라도 "동일한 유형의 변형"를 갖는다. 동일한 유형 변형을 갖는 그와 같은 뉴클레오사이드는 상이한 핵염기를 포함할 수 있다.

- [0163] 본원에서 사용된 바와 같이, "별개의 영역"은 올리고뉴클레오타이드의 부분을 의미하고, 상기 화학적 변형 또는 임의 인접하는 구분의 화학적 변형의 모티프는 별개의 영역이 서로 구별되도록 하는 적어도 하나의 차이를 포함한다.
- [0164] 본원에서 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용가능한 보균자 또는 희석제"는 동물에게 투여하는데 사용하기에 적당한 임의 물질을 의미한다. 어떤 구현예에서, 약제학적으로 허용가능한 보균자 또는 희석제는 멸균한 염수이다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 멸균한 염수는 약품 등급 염수이다.
- [0165] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "대사성 장애"는 대사의 조절 장애 - 에너지를 생산하기 위해 음식의 분해와 연관된 화학 반응의 복합 세트를 주로 특징으로 하는 질환 또는 병태를 의미한다.
- [0166] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "심혈관 장애"는 심장 또는 혈관의 손상된 기능을 주요하게 특징으로 하는 질환 또는 병태를 의미한다.
- [0167] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "모노 또는 폴리사이클릭 고리계"는 단일 또는 폴리사이클릭 라디칼 고리계로부터 선택된 모든 고리계를 포함하는 것을 의미하고, 상기 고리는 융합 또는 연결되고, 지방족, 지환족, 아릴, 헤테로아릴, 아랄킬, 아릴알킬, 헤테로사이클릭, 헤테로아릴, 헤테로방향족 및 헤테로아릴알킬로부터 개별적으로 선택된 단일 및 혼합된 고리계를 포함하는 것을 의미한다. 그와 같은 모노 및 폴리 고리형 구조는, 각각이 동일한 수준의 포화를 갖거나, 각각이, 독립적으로, 완전 포화된, 부분적으로 포화된 또는 완전 불포화된을 포함하는 가변 포화도를 갖는 고리를 함유할 수 있다. 각각의 고리는 C, N, O 및 S로부터 선택된 고리 원자를 포함하여 헤테로사이클릭 고리 뿐만 아니라 혼합된 모티프 예컨대 벤즈이미다졸에서 존재할 수 있는 C 고리 원자만을 포함하는 고리를 얻을 수 있고, 여기서 하나의 고리는 유일한 탄소 고리 원자를 가지며 융합 고리는 2 개의 질소 원자를 갖는다. 모노 또는 폴리사이클릭 고리계는 치환기 그룹 예컨대 고리 중의 하나에 부착된 2 =O 그룹을 갖는 프탈이미드로 추가로 치환될 수 있다. 모노 또는 폴리사이클릭 고리계는 다양한 전략을 사용하여 예컨대 직접적으로 고리 원자를 통해 모 분자에 부착될 수 있고, 다중 고리 원자를 통해, 치환기 그룹을 통해 또는 이작용성 연결 모이어티를 통해 융합될 수 있다.
- [0168] 본원에서 사용된 바와 같이, "전구약물"은 불활성 이하 활성 형태의 화합물을 의미하고, 이 화합물은, 대상체에 투여될 때, 대사작용되어 활성, 또는 더 많은 활성, 화합물 (예를 들면, 약물)을 형성한다.
- [0169] 본원에서 사용된 바와 같이, "치환기" 및 "치환기 그룹"은, 명명된 모 화합물의 원자 또는 그룹을 대체하는 원자 또는 그룹을 의미한다. 예를 들면 변형된 뉴클레오사이드의 치환기는 자연 발생 뉴클레오사이드에서 발견된 원자 또는 그룹과 상이한 임의 원자 또는 그룹이다 (예를 들면, 변형된 2'-치환기는 H 또는 OH 이외의 뉴클레오사이드의 2'-위치에 있는 임의 원자 또는 그룹이다). 치환기 그룹은 보호 또는 비보호될 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 개시내용의 화합물은 모 화합물의 하나 또는 하나 초과와 위치에서 치환기를 갖는다. 치환기는 또한, 다른 치환기 그룹으로 추가로 치환될 수 있고 직접적으로 또는 연결 그룹 예컨대 알킬 또는 하이드로카르빌 그룹을 통해 모 화합물에 부착될 수 있다.
- [0170] 마찬가지로, 본원에서 사용된 바와 같이, 화학적 관능 그룹에 관한 "치환기"는 명명된 관능 그룹에 통상적으로 존재하는 원자 또는 원자의 그룹과 상이한 원자 또는 원자의 그룹을 의미한다. 어떤 구현예에서, 치환기는 관능 그룹의 수소 원자를 대체한다 (예를 들면, 어떤 구현예에서, 치환된 메틸 그룹의 치환기는 비치환된 메틸 그룹의 수소 원자 중의 하나는 대체하는 수소 이외의 원자 또는 그룹이다). 달리 지적되지 않으면, 치환기로서 잘 받아들이는 그룹은 비제한적으로, 하기를 포함한다: 할로젠, 하이드록실, 알킬, 알케닐, 알킬닐, 아실 (-C(O)R_{aa}), 카복실 (-C(O)OR_{aa}), 지방족 그룹, 지환족 그룹, 알콕시, 치환된 옥시 (-O-R_{aa}), 아릴, 아랄킬, 헤테로사이클릭 라디칼, 헤테로아릴, 헤테로아릴알킬, 아미노 (-N(R_{bb})(R_{cc})), 이미노(=NR_{bb}), 아미도 (-C(O)N(R_{bb})(R_{cc}) 또는 -N(R_{bb})C(O)R_{aa}), 아지도 (-N₃), 니트로 (-NO₂), 시아노 (-CN), 카바미도 (-OC(O)N(R_{bb})(R_{cc}) 또는 -N(R_{bb})C(O)OR_{aa}), 우레이도 (-N(R_{bb})C(O)N(R_{bb})(R_{cc})), 티오우레이도 (-N(R_{bb})C(S)N(R_{bb})(R_{cc})), 구아니디닐 (-N(R_{bb})C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})), 아미디닐 (-C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc}) 또는 -N(R_{bb})C(=NR_{bb})(R_{aa})), 티올 (-SR_{bb}), 설퍼닐 (-S(O)R_{bb}), 설포닐 (-S(O)₂R_{bb}) 및 설포아미딜 (-S(O)₂N(R_{bb})(R_{cc})-또는 -N(R_{bb})S(O)₂R_{bb}). 여기서 각각의 R_{aa}, R_{bb} 및 R_{cc}는, 독립적으로, H, 임의로 연결된 화학적 관능 그룹 또는 추가 치환기 그룹이고, 바람직한 목록은 비제한적으로, 알킬, 알케닐, 알킬닐, 지방족, 알콕시, 아실, 아릴, 아랄킬, 헤테로아릴, 지환족, 헤테로사이클릭 및 헤테로아릴알킬을 포함한다. 본원에서 기재된 화합물 내의 선택된 치환기는 반복되는 정도로 존재한다.

- [0171] 본원에서 사용된 바와 같이, "알킬"은, 본원에서 사용된 바와 같이, 최대 24 개의 탄소 원자를 함유하는 포화된 곧은 또는 분지된 탄화수소 라디칼을 의미한다. 알킬 그룹의 예는 비제한적으로, 하기를 포함한다: 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 이소프로필, n-헥실, 옥틸, 데실, 도데실 등. 알킬 그룹은 전형적으로 1 내지 약 24 개의 탄소 원자, 더욱 전형적으로 1 내지 약 12의 탄소 원자 (C₁-C₁₂ 알킬)를 포함하고, 1 내지 약 6 개의 탄소 원자가 더 바람직하다.
- [0172] 본원에서 사용된 바와 같이, "알케닐"은, 최대 24 개의 탄소 원자를 함유하고 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는, 곧은 또는 분지된 탄화수소 사슬 라디칼을 의미한다. 알케닐 그룹의 예는 비제한적으로, 하기를 포함한다: 에틸렌, 프로펜, 부텐, 1-메틸-2-부텐-1-일, 디엔 예컨대 1,3-부타디엔 등. 알케닐 그룹은 전형적으로 2 내지 약 24 개의 탄소 원자, 더욱 전형적으로 2 내지 약 12의 탄소 원자를 포함하고 2 내지 약 6 개의 탄소 원자가 더 바람직하다. 알케닐 그룹은, 본원에서 사용된 바와 같이, 1 이상의 추가 치환기 그룹을 임의로 포함할 수 있다.
- [0173] 본원에서 사용된 바와 같이, "알킬닐"은, 최대 24 개의 탄소 원자를 함유하고 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 곧은 또는 분지된 탄화수소 라디칼을 의미한다. 알킬닐 그룹의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 에틸닐, 1-프로피닐, 1-부티닐, 등. 알킬닐 그룹은 전형적으로 2 내지 약 24 개의 탄소 원자, 더욱 전형적으로 2 내지 약 12의 탄소 원자를 포함하고 2 내지 약 6 개의 탄소 원자가 더 바람직하다. 알킬닐 그룹은, 본원에서 사용된 바와 같이, 1 이상의 추가 치환기 그룹을 임의로 포함할 수 있다.
- [0174] 본원에서 사용된 바와 같이, "아실"은, 유기산으로부터 하이드록실 그룹의 제거에 의해 형성될 라디칼을 의미하고 일반식 -C(O)-X (여기서 X은 전형적으로 지방족, 지환족 또는 방향족임)을 갖는다. 예들은 지방족 카보닐, 방향족 카보닐, 지방족 설퍼닐, 방향족 설퍼닐, 지방족 설퍼닐, 방향족 포스페이트, 지방족 포스페이트 등을 포함한다. 아실 그룹은, 본원에서 사용된 바와 같이, 임의로 추가 치환기 그룹을 포함할 수 있다.
- [0175] 본원에서 사용된 바와 같이, "지환족"은 고리형 고리계를 의미하고, 상기 고리는 지방족이다. 고리계는 1 이상의 고리를 포함할 수 있고, 여기서 적어도 하나의 고리는 지방족이다. 바람직한 지환족은 고리 중 약 5 내지 약 9 개의 탄소 원자를 갖는 고리를 포함한다. 지환족은, 본원에서 사용된 바와 같이, 임의로 추가 치환기 그룹을 포함할 수 있다.
- [0176] 본원에서 사용된 바와 같이, "지방족"은 최대 24 개의 탄소 원자를 함유하는 곧은 또는 분지된 탄화수소 라디칼을 의미하고, 상기 임의 2 개의 탄소 원자 사이의 포화는 단일, 이중 또는 삼중결합이다. 지방족 그룹은 바람직하게는 1 내지 약 24 개의 탄소 원자, 더욱 전형적으로 1 내지 약 12의 탄소 원자를 함유하고, 1 내지 약 6 개의 탄소 원자가 더 바람직하다. 지방족 그룹의 곧은 또는 분지된 사슬은 질소, 산소, 황 및 인을 포함하는 1 이상의 헤테로원자로 방해될 수 있다. 헤테로원자에 의해 방해된 그와 같은 지방족 그룹은 비제한적으로, 폴리알콕시, 예컨대 폴리알킬렌 글리콜, 폴리아민, 및 폴리이민을 포함한다. 지방족 그룹은, 본원에서 사용된 바와 같이, 임의로 추가 치환기 그룹을 포함할 수 있다.
- [0177] 본원에서 사용된 바와 같이, "알콕시"는 알킬 그룹과 산소 원자 사이에 형성된 라디칼을 의미하고, 상기 산소 원자는 알콕시 그룹을 모 분자에 부착하도록 사용된다. 알콕시 그룹의 예는 비제한적으로, 하기를 포함한다: 메톡시, 에톡시, 프로톡시, 이소프로톡시, n-부톡시, sec-부톡시, tert-부톡시, n-펜톡시, 네오펜톡시, n-헥소시 등. 알콕시 그룹은, 본원에서 사용된 바와 같이, 임의로 추가 치환기 그룹을 포함할 수 있다.
- [0178] 본원에서 사용된 바와 같이, "아미노알킬"은 아미노 치환된 C₁-C₁₂ 알킬 라디칼을 의미한다. 라디칼의 알킬부는 모 분자와 공유 결합을 형성한다. 아미노 그룹은 임의 위치에 있을 수 있고 아미노알킬 그룹은 알킬 및/또는 아미노 부분에서 추가 치환기 그룹으로 치환될 수 있다.
- [0179] 본원에서 사용된 바와 같이, "아랄킬" 및 "아릴알킬"은 C₁-C₁₂ 알킬 라디칼에 공유 결합된 방향족 구름을 의미한다. 수득한 아랄킬 (또는 아릴알킬) 그룹의 알킬 라디칼 부는 모 분자와 공유 결합을 형성한다. 예들은 비제한적으로, 벤질, 페닐 등을 포함한다. 아랄킬 그룹은, 본원에서 사용된 바와 같이, 아릴, 또는 라디칼 그룹을 형성하는 둘 모두 그룹에 부착된 추가 치환기 그룹을 임의로 포함한다.
- [0180] 본원에서 사용된 바와 같이, "아릴" 및 "방향족"은 1 이상의 방향족 고리를 갖는,모노- 또는 폴리사이클릭 카보사이클릭 고리계 라디칼을 의미한다. 아릴 그룹의 예는 비제한적으로, 하기를 포함한다: 페닐, 나프틸, 테트라하이드로나프틸, 인다닐, 이데닐 등. 바람직한 아릴 고리계는 1 이상의 고리 중 약 5 내지 약 20 개의 탄소 원자를 갖는다. 아릴 그룹은, 본원에서 사용된 바와 같이, 임의로 추가 치환기 그룹을 포함할 수 있다.

- [0181] 본원에서 사용된 바와 같이, "할로" 및 "할로겐"은, 불소, 염소, 브롬 및 요오드로부터 선택된 원자를 의미한다.
- [0182] 본원에서 사용된 바와 같이, "헤테로아릴," 및 "헤테로방향족"은, 모노- 또는 폴리-고리형 방향족 고리, 고리계 또는 융합 고리계를 포함하는 라디칼을 의미하고, 여기서 고리 중 적어도 하나는 방향족이고 1 이상의 헤테로원자를 포함한다. 헤테로아릴은 또한, 융합 고리 중 1 이상이 헤테로원자를 함유하지 않는 시스템을 포함하는 융합 고리계를 포함하는 것을 의미한다. 헤테로아릴 그룹은 전형적으로, 황, 질소 또는 산소로부터 선택된 하나 이상의 고리 원자를 포함한다. 헤테로아릴 그룹의 예는 비제한적으로, 하기를 포함한다: 피리디닐, 피라지닐, 피리미디닐, 피롤릴, 피라졸릴, 이미다졸릴, 티아졸릴, 옥사졸릴, 이속사졸릴, 티아디아졸릴, 옥사디아졸릴, 티오펜닐, 푸라닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 벤즈이미다졸릴, 벤조옥사졸릴, 퀴놀살리닐 등. 헤테로아릴 라디칼은 연결 모이어티 예컨대 지방족 그룹 또는 헤테로 원자를 통해 모 분자에 부착될 수 있다. 헤테로아릴 그룹은, 본원에서 사용된 바와 같이, 임의로 추가 치환기 그룹을 포함할 수 있다.
- [0183] 본원에서 사용된 바와 같이, "콘주게이트 화합물"은 임의 원자, 원자의 그룹, 또는 콘주게이트 그룹으로서 사용하기에 적당한 연결된 원자의 그룹을 의미한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 화합물은 약동학적, 약력학적, 결합, 흡수, 세포성 분포, 세포성 흡수, 전하 및/또는 청소능 특성을 비제한적으로 포함하는 1 이상의 특성을 보유하거나 부여할 수 있다.
- [0184] 본원에서 사용된 바와 같이, 달리 지적되지 않으면 또는 변형된, 용어 "이중-가닥"은 서로 혼성화된 2 개의 별개의 올리고머 화합물을 의미한다. 그와 같은 이중가닥 화합물은 하나 또는 둘 모두 가닥 (오버행)의 하나 또는 둘 모두 말단에서 1 이상의 또는 비-혼성화 뉴클레오사이드 및/또는 1 이상의 내부 비-혼성화 뉴클레오사이드 (미스매치)를 가질 수 있고, 단, 생리적으로 관련된 조건 하에서 혼성화를 유지하기 위한 충분한 상보성이 있다.
- [0185] 본원에서 사용된 바와 같이, "5' 표적 부위"는 표적 핵산의 뉴클레오타이드를 의미하고, 이것은 특정한 안티센스 화합물의 5'-최말단 뉴클레오타이드에 대해 상보적이다.
- [0186] 본원에서 사용된 바와 같이, "약"은 값의 $\pm 10\%$ 내인 것을 의미한다. 예를 들면, 언급된다면, "마커는 약 50%까지 증가될 수 있다", 마커가 45% 내지 55%로 증가될 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0187] 본원에서 사용된 바와 같이, "동시에 투여된"은 둘 모두의 약리적 효과가 동시에 환자에서 나타나는 임의 방식으로 2 종의 제제의 공-투여를 의미한다. 수반되는 투여는, 둘 제제가 단일 약제학적 조성물에서, 동일한 복용 형태로, 또는 동일한 투여 경로에 의해 투여되는 것을 요구하지는 않는다. 둘 제제 모두의 효과는 동시에 자체로 나타날 필요는 없다. 효과는 일정 기간 동안 단지 중첩될 필요는 있고 동일한 시(공)간에 걸칠 필요는 없다.
- [0188] 본원에서 사용된 바와 같이, "투여하는" 또는 "투여"는 약제를 개체에게 제공하는 것을 의미하고 의료 전문가에 의한 투여 및 자가-투여를 비제한적으로 포함한다. 약제의 개체에의 투여는 연속적, 만성적, 짧은 또는 간헐적일 수 있다. 투여는 비경구 또는 비-비경구일 수 있다.
- [0189] 본원에서 사용된 바와 같이, "제제"는 포유동물에게 투여될 때 치료적 이점을 제공할 수 있는 활성 물질을 의미한다. "제 1 제제"는 본 발명의 치료적 화합물을 의미한다. 예를 들면, 제 1 제제는 ApoCIII를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. "제 2 제제"는 본 발명의 제 2 치료적 화합물 (예를 들면 ApoCIII를 표적으로 하는 제 2 안티센스 올리고뉴클레오타이드) 및/또는 비-apoCIII 치료적 화합물을 의미한다.
- [0190] 본원에서 사용된 바와 같이, "개선" 또는 "개선한다" 또는 "개선하는"은 연관된 질환, 장애, 또는 병태의 적어도 하나의 인디케이터, 징후, 또는 증상의 완화를 의미한다. 인디케이터의 중증도는 당해분야의 숙련가에게 공지된 주관적 또는 객관적인 방안에 의해 결정될 수 있다.
- [0191] 본원에서 사용된 바와 같이, "동물"은 인간 또는 비-인간 동물을 의미하고, 이 동물은, 비제한적으로, 마우스, 랫트, 토끼, 개, 고양이, 돼지, 및 원숭이 및 침팬지를 비제한적으로 포함하는 비-인간 영장류를 포함한다.
- [0192] 본원에서 사용된 바와 같이, "ApoCIII", "아포지질단백질 C-III" 또는 "ApoC3"는 ApoCIII를 인코딩하는 임의 핵산 또는 단백질 서열을 의미한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, ApoCIII는 ApoCIII를 인코딩하는 DNA 서열, ApoCIII를 인코딩하는 DNA로부터 전사된 RNA 서열 (인트론 및 엑손을 포함하는 게놈 DNA를 포함함), ApoCIII를 인코딩하는 mRNA 서열, 또는 ApoCIII를 인코딩하는 펩타이드 서열을 포함한다.
- [0193] 본원에서 사용된 바와 같이, "ApoCIII 핵산"은 ApoCIII를 인코딩하는 임의 핵산을 의미한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, ApoCIII 핵산은 ApoCIII를 인코딩하는 DNA 서열, ApoCIII를 인코딩하는 DNA로부터 전사된 RNA 서열

(인트론 및 엑손을 포함하는 게놈 DNA를 포함함), 및 ApoCIII를 인코딩하는 mRNA 서열을 포함한다.

- [0194] 본원에서 사용된 바와 같이, "ApoCIII 특이적 억제제"는 분자 수준에서 ApoCIII mRNA의 발현 및/또는 ApoCIII 단백질의 발현 또는 활성을 특이적으로 억제할 수 있는 임의의 제제를 의미한다. 예를 들면, ApoCIII 특이적 억제제는 핵산 (안티센스 화합물 포함), 펩타이드, 항체, 소분자, 및 다른 제제를 포함하고, 이들은 ApoCIII mRNA 및/또는 ApoCIII 단백질의 발현을 억제할 수 있다. 어떤 구현예에서, 핵산은 안티센스 화합물이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 ApoCIII를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드. 어떤 구현예에서, ApoCIII를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다. 어떤 구현예에서, ApoCIII를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드는 콘주게이트 그룹을 갖는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다. 어떤 구현예에서, ApoCIII를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드는 서열번호:19-96, 209-221 또는 또 하나의 서열에서 보여진 서열을 갖는다 (예를 들면, 예컨대 아래에서 개시된 것들: PCT 공보 WO 2004/093783 또는 PCT 공보 WO 2012/149495 (이들 모두는 참조로 본원에 편입되어 있다)). 어떤 구현예에서, ApoCIII mRNA 수준 및/또는 ApoCIII 단백질 발현을 특이적으로 조절하여, ApoCIII 특이적 억제제는 지방생성 또는 당생성 경로의 구성성분에 영향을 줄 수 있다. 유사하게, 어떤 구현예에서, ApoCIII 특이적 억제제는 동물에서 다른 분자적 과정에 영향을 줄 수 있다.
- [0195] 본원에서 사용된 바와 같이, "ApoCIII mRNA"는 ApoCIII 단백질을 인코딩하는 mRNA를 의미한다.
- [0196] 본원에서 사용된 바와 같이, "ApoCIII 단백질"은 ApoCIII를 인코딩하는 임의의 단백질 서열을 의미한다.
- [0197] 본원에서 사용된 바와 같이, "죽상동맥경화증"은, 큰 및 중간-크기의 동맥에 영향을 미치는 동맥의 경화가 지방 축적의 존재를 특징으로 한다는 것을 의미한다. 지방 축적은 "죽종" 또는 "플라크"로 불리고, 이것은 콜레스테롤 및 다른 지방, 칼슘 및 반흔 조직으로 주로 구성되고, 동맥의 라이닝을 손상시킨다.
- [0198] 본원에서 사용된 바와 같이, "관상동맥 심장병 (CHD)"는, 종종 죽상동맥경화증의 결과인, 혈액 및 산소를 심장에 공급하는 작은 혈관의 협소화를 의미한다.
- [0199] 본원에서 사용된 바와 같이, "진성 당뇨병" 또는 "당뇨병"은 무질서한 대사 및 불충분한 수준의 인슐린 또는 감소된 인슐린 민감도로부터 야기된 비정상적인 고혈당 (고혈당증)을 특징으로 하는 증후군을 의미한다. 특징적인 증상은 고혈당 수준으로 인한 과도한 소변 생산 (다뇨증), 증가된 배뇨를 보충하려고 하는 과도한 갈증 및 증가된 수분 섭취 (조갈증), 눈의 광학에 대한 고혈당 영향으로 인한 흐릿한 시력, 원인불명 체중 감소, 및 무기력이다.
- [0200] 본원에서 사용된 바와 같이, "당뇨병성 이상지질혈증" 또는 "이상지질혈증을 갖는 2형 당뇨병"은 2형 당뇨병, 감소된 HDL-C, 상승된 트리글리세라이드 (TG), 및 상승된 작은, 조밀한 LDL 입자를 특징으로 하는 병태를 의미한다.
- [0201] 본원에서 사용된 바와 같이, "희석제"는 약리적 활성은 없지만 약제학적으로 필요한 또는 바람직한 조성물 중성분을 의미한다. 예를 들면, 주입된 조성물 중 희석제는 액체, 예를 들면 염수 용액일 수 있다.
- [0202] 본원에서 사용된 바와 같이, "이상지질혈증"은 지질 및/또는 지질단백질 과잉생산 또는 결핍을 포함하는, 지질 및/또는 지질단백질 대사의 장애를 의미한다. 이상지질혈증은 지질 예컨대 카일로마이크론, 콜레스테롤 및 트리글리세라이드 뿐만 아니라 지질단백질 예컨대 저-밀도 지질단백질 (LDL) 콜레스테롤의 상승에 의해 명시될 수 있다.
- [0203] 본원에서 사용된 바와 같이, "복용량 단위"는 약제가 제공된 형태, 예를 들면 알약, 정제, 또는 당해기술에서 공지된 다른 복용량 단위를 의미한다. 어떤 구현예에서, 복용량 단위는 동결건조된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 바이알이다. 어떤 구현예에서, 복용량 단위는 재구성된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 바이알이다.
- [0204] 본원에서 사용된 바와 같이, "용량"은 단일 투여로, 또는 명시된 기간 내에 제공된 약제의 명시된 양을 의미한다. 어떤 구현예에서, 용량은 1, 2, 또는 초과회 볼러스, 정제, 또는 주사로 투여될 수 있다. 예를 들면, 어떤 구현예에서 피하 투여를 원하면, 원하는 용량은 단일 주사에 의해 쉽게 수용되지 않는 용적을 필요로 하고, 따라서, 2 이상의 주사가 사용되어 원하는 용량을 달성할 수 있다. 어떤 구현예에서, 약제는 장시간에 걸쳐 또는 연속적으로 주입에 의해 투여된다. 용량은 시간, 일, 주, 또는 개월 당 약제의 양으로서 언급될 수 있다. 용량은 mg/kg 또는 g/kg로서 또한 언급될 수 있다.
- [0205] 본원에서 사용된 바와 같이, "효과적인 양" 또는 "치료적으로 효과적인 양"은 제제가 필요한 개체에서 원하는

생리적 결과를 유발하는데 충분한 활성 약제의 양을 의미한다. 효과적인 양은 치료될 개체의 건강 및 신체 조건, 치료될 개체의 분류학적 그룹, 조성물의 제형, 개체의 질병의 평가, 및 다른 관련된 인자에 따라 개체 중에서 변할 수 있다.

[0206] 본원에서 사용된 바와 같이, "프레드릭슨 I형"은 "지질단백질 리파제 결핍", "LPLD", "가족성 카일로마이크론 혈증 증후군" 또는 "FCS"로도 알려져 있으며 몇 가지 형태로 존재한다: 1a형(버거-그루에즈 증후군으로도 공지됨)는 통상적으로 LPL의 결핍 또는 변경된 ApoC-II로 인한 지질단백질 리파제 결핍이고; 1b형(가족성 아포단백질 CII 결핍으로도 공지됨)는 지질단백질 리파제 활성제 아포단백질 C-II의 결핍에 의해 야기되는 병태이며; 1c형은 지질단백질 리파제의 순환하는 억제제로 인한 카일로마이크론혈증이다. I형은 보통 유년기에 나타나는 희귀 장애이다. 그것은 복통, 재발하는 급성 췌장염, 분출성의 피부 황색종, 및 간비장비대증의 에피소드와 함께 카일로마이크론에서의 심한 상승 및 극도로 상승된 TG 수준(항상 1000 mg/dL 넘게 도달하고 종종 10,000 mg/dL 이상 증가함)을 특징으로 한다. 환자는 좀처럼 죽상동맥경화증이 생기지 않는데, 아마도 그들의 혈장 지질단백질 입자가 너무 커서 동맥 내막 안으로 들어가지 못하기 때문이다(Nordestgaard 등, J Lipid Res, 1988, 29:1491-1500; Nordestgaard 등, Arteriosclerosis, 1988, 8:421-428). I형은 보통 LPL 유전자의 돌연변이, 또는 상기 유전자의 보조인자 ApoC-II의 돌연변이에 의해 유발되어, 영향받은 개인이 충분한 기능적 활성인 LPL을 생산하지 못하게 한다. 환자들은 그런 돌연변이에 대해 동형이거나 화합물 이형이다. 프레드릭슨 I형은 또한 GPIIIBP1, APOA5, LMF1 또는 기능장애 LPL을 야기하는 다른 유전자들에서의 돌연변이 때문일 수 있다. Brunzell, In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Stephens K, editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013.1999 Oct 12 [2011년 12월 15일 업데이트됨]. 또한, 일부 경우, 프레드릭슨 I형은 개체 기능장애 LPL를 일으키는 개체에서 LPL 억제제(예를 들면, 항-LPL 항체)의 존재로 인할 수도 있다. 프레드릭슨 제I형의 유형은 일반 인구에서 1,000,000분의 1이고 창시자 효과의 결과로서 남아프리카 및 동퀘벡에서 훨씬 더 높다. 환자들은 TG-저하 약물에 최소로 반응하거나 전혀 반응하지 않으므로(Tremblay 등, J Clin Lipidol, 2011, 5:37-44; Brisson 등, Pharmacogenet Genom, 2010, 20:742-747), 이러한 희귀 장애의 증상을 관리하기 위해 20 그램/일 이하로의 식이 지방의 제한이 사용된다.

[0207] 본원에서 사용된 바와 같이, "완전히 상보적" 또는 "100% 상보적"이란, 제 1 핵산의 핵염기 서열의 각각의 핵염기가 제 2 핵산의 제 2 핵염기 서열에서 상보적 핵염기를 갖는다는 것을 의미한다. 어떤 구현예에서, 제 1 핵산은 안티센스 화합물이고 제 2 핵산은 표적 핵산이다.

[0208] 본원에서 사용된 바와 같이, "글루코오스"는 에너지의 공급원 및 염증성 중간체로서 세포에 의해 사용된 모노사카라이드이다. "혈장 글루코오스"는 혈장에 존재하는 글루코오스를 의미한다.

[0209] 본원에서 사용된 바와 같이, "고밀도 지질단백질-C" 또는 "HDL-C"는 고밀도 지질단백질 입자와 연관된 콜레스테롤을 의미한다. 혈청 (또는 혈장) 중 HDL-C의 농도는 전형적으로 mg/dL 또는 nmol/L로 정량화된다. "혈청 HDL-C" 및 "혈장 HDL-C"는 혈청 및 혈장 각각에서 HDL-C를 의미한다.

[0210] 본원에서 사용된 바와 같이, "HMG-CoA 환원효소 억제제"는 효소 HMG-CoA 환원효소의 억제를 통해 작용하는 제제, 예컨대 아토르바스타틴, 로수바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 프라바스타틴, 및 심바스타틴을 의미한다.

[0211] 본원에서 사용된 바와 같이, "고콜레스테롤혈증"은 하기의 지침에 따라, 상승된 콜레스테롤 또는 순환 (혈장) 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 VLDL-콜레스테롤을 특징으로 하는 병태를 의미한다: Expert Panel Report of National Cholesterol Educational Program (NCEP) of Detection, Evaluation of Treatment of high cholesterol in adults (참고, Arch. Int. Med. (1988) 148, 36-39).

[0212] 본원에서 사용된 바와 같이, "고지혈증" 또는 "고지방혈증"은 상승된 혈청 지질 또는 순환 (혈장) 지질을 특징으로 하는 병태이다. 이러한 병태는 비정상적으로 고농도인 지방을 나타낸다. 순환 혈액 중 지질 분획은 콜레스테롤, 저밀도 지질단백질, 초저밀도 지질단백질, 카일로마이크론 및 트리글리세라이드이다. 고지혈증의 프레드릭슨 분류는 전기영동 또는 초원심분리에 의해 측정된 바와 같이 TG 및 콜레스테롤-풍부 지질단백질 입자의 패턴을 기반으로 하고, 고지혈증 예컨대 파트리글리세라이드혈증(hypertriglyceridemia)의 일차 원인을 특성화하기 위해 통상적으로 사용된다 (Fredrickson 및 Lee, Circulation, 1965, 31:321-327; Fredrickson 등, New Eng J Med, 1967, 276 (1): 34-42).

[0213] 본원에서 사용된 바와 같이, "파트리글리세라이드혈증"은 상승된 트리글리세라이드 수준을 특징으로 하는 병태를 의미한다. 파트리글리세라이드혈증은 트리글리세라이드 (TG)-풍부 지질단백질: VLDL, 및 보다 적게는, 카일

로마이크론 (CM)의 증가된 생산 및/또는 감소된 또는 지연된 이화의 결과이다. 그것의 병인은 하기를 포함한다: 일차 (즉 유전적 원인) 및 2차 (다른 근본적인 원인 예컨대 당뇨병, 대사성 증후군/인슐린 저항성, 비만, 신체적 불활성, 담배 흡연, 과잉의 알코올 및 탄수화물이 매우 높은 다이어트) 인자, 또는 가장 자주, 둘 모두의 조합 (Yuan 등 CMAJ, 2007, 176:1113-1120). 파트리글리세라이드혈증은 심대사성 질환 (Hegele 등 2009, Hum Mol Genet, 18: 4189-4194; Hegele 및 Pollex 2009, Mol Cell Biochem, 326: 35-43) 뿐만 아니라 가장 심각한 형태의 급성 췌장염의 발생 (Toskes 1990, Gastroenterol Clin North Am, 19: 783-791; Gaudet 등 2010, Atherosclerosis Supplements, 11: 55-60; Catapano 등 2011, Atherosclerosis, 217S: S1-S44; Tremblay 등 2011, J Clin Lipidol, 5: 37-44)의 증가된 위험과 연관된 공통의 임상 특성이다. 심대사성 질환의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 당뇨병, 대사성 증후군/인슐린 저항성, 및 유전 장애 예컨대 가족성 카일로마이크론혈증 증후군 (FCS), 가족성 결합성 고지혈증 및 가족성 파트리글리세라이드혈증. 경계선 높은 TG 수준 (150-199 mg/dL)은 통상적으로 일반적인 모집단에서 발견되고 대사성 증후군/인슐린 저항성 상태의 공통의 구성성분이다. 동일한 것은 높은 TG 수준 (200-499 mg/dL)에 대해 사실이고, 단, 혈장 TG 수준이 증가하는 바와 같이, 기저를 이루는 유전적 인자는 점점 더 중요한 병인적 역할을 한다. 매우 높은 TG 수준 (≥ 500 mg/dL)은 또한 상승된 CM 수준과 가장 자주 연관되고, 급성 췌장염의 위험 증가에 의해 동반된다. 췌장염의 위험은, TG 수준이 880 mg/dL (>10 mmol)를 초과하면 임상적으로 유의미한 것으로 간주되고 European Atherosclerosis Society/European Society of Cardiology (EAS/ESC) 2011 지침은, 급성 췌장염을 예방하기 위한 해동은 의무적이라는 것을 언급한다 (Catapano 등 2011, Atherosclerosis, 217S: S1-S44). EAS/ESC 2011 지침에 따르면, 파트리글리세라이드혈증은 모든 사례의 췌장염의 대략 10%의 원인이고, 췌장염의 발달은 440 내지 880 mg/dL의 TG 수준에서 일어날 수 있다. 상승된 TG 수준이 죽상경화성 CVD에 대한 독립적인 위험 인자라는 것을 설명하는 임상 연구로부터의 증거를 기반으로, National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP 2002, Circulation, 106: 3143-421) 및 American Diabetes Association (ADA 2008, Diabetes Care, 31: S12-S54.) 둘 모두로부터의 지침은 심혈관 위험을 감소시키기 위해 150 mg/dL 미만의 표적 TG 수준을 추천했다.

- [0214] 본원에서 사용된 바와 같이, "확인하는" 또는 "대사성 또는 심혈관 질환이 있는 동물을 선택하는"은 대사성 질환, 심혈관 질환, 또는 대사성 증후군에 걸리기 쉽거나 그것으로 진단된 대상체를 확인 또는 선택하고 또는, 하기를 비제한적으로 포함하는 대사성 질환, 심혈관 질환, 또는 대사성 증후군 중 임의 증상을 갖는 대상체를 확인 또는 선택하는 것을 의미한다: 고콜레스테롤혈증, 고혈당증, 고지혈증, 파트리글리세라이드혈증, 고혈압 증가된 인슐린 저항성, 줄어든 인슐린 민감도, 정상 체중 초과, 및/또는 정상 체지방 함량 초과 또는 이들의 임의 조합. 그와 같은 확인은 하기를 비제한적으로 포함하는 임의 방법에 의해 달성될 수 있다: 표준 임상 시험 또는 평가, 예컨대 혈청 또는 순환 (혈장) 콜레스테롤의 측정, 혈청 또는 순환 (혈장) 혈액-글루코오스의 측정, 혈청 또는 순환 (혈장) 트리글리세라이드의 측정, 혈압의 측정, 체지방 함량의 측정, 체중의 측정, 등.
- [0215] 본원에서 사용된 바와 같이, "개선된 심혈관 결과"는 부정적인 심혈관 사건의 발생, 또는 그것의 위험의 감소를 의미한다. 부정적인 심혈관 사건의 예는, 비제한적으로, 사망, 재경색, 뇌졸중, 심장성 충격, 폐 부종, 심장정지, 및 심방 율동부정을 포함한다.
- [0216] 본원에서 사용된 바와 같이, "바로 인접한"은, 바로 인접한 요소 사이, 예를 들면, 영역, 분절, 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오사이드 사이에 개재 요소가 없다는 것을 의미한다.
- [0217] 본원에서 사용된 바와 같이, "HDL 증가" 또는 "HDL 상승"은 임의 화합물이 투여되지 않은 동물에서 HDL 수준과 비교하여, 본 발명의 적어도 하나의 화합물의 투여 후 동물에서 HDL의 수준의 증가를 의미한다.
- [0218] 본원에서 사용된 바와 같이, "개체" 또는 "대상체" 또는 "동물"은 치료 또는 요법에 대해 선택된 인간 또는 비-인간 동물을 의미한다.
- [0219] 본원에서 사용된 바와 같이, "그것이 필요한 개체"는 그와 같은 치료 또는 요법이 필요한, 치료 또는 요법에 대해 선택된 인간 또는 비-인간 동물을 의미한다.
- [0220] 본원에서 사용된 바와 같이, "유도하다", "억제하다", "강력하게 하다", "상승시키다", "증가시키다", "줄이다", "감소시키다" 등은 2 개의 상태 사이의 정량적 차이를 나타낸다. 예를 들면, "apoCIII의 활성 또는 발현을 억제하는데 효과적인 양"은 처리된 샘플 중 apoCIII의 활성 또는 발현의 수준이 미처리된 샘플 중 apoCIII의 활성 또는 발현의 수준과 상이할 것이라는 것을 의미한다. 그와 같은 용어들은, 예를 들면, 발현의 수준, 및 활성의 수준에 적용된다.
- [0221] 본원에서 사용된 바와 같이, "염증성 병태"는 질환, 질환 상태, 증후군, 또는 염증을 야기하는 다른 병태를 의

미한다. 예를 들면, 류마티스성 관절염 및 간 섬유증은 염증성 병태이다. 염증성 병태의 다른 예는 패혈증, 심근 허혈/계관류 손상, 성인 호흡기 곤란 증후군, 신염, 이식 거부, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 동맥경화증, 죽상동맥경화증 및 혈관염을 포함한다.

- [0222] 본원에서 사용된 바와 같이, "발현 또는 활성을 억제하는"은 RNA 또는 단백질의 발현 또는 활성의 감소 또는 봉쇄를 의미하고 반드시 발현 또는 활성의 전체 제거를 나타내는 것은 아니다.
- [0223] 본원에서 사용된 바와 같이, "인슐린 저항성"은 정상적인 양의 인슐린이 지방, 근육 및 간 세포로부터 정상 인슐린 반응을 생산하는데 부적절한 상태로서 규정된다. 지장 세포에서의 인슐린 저항성은 보관된 트리글리세라이드의 가수분해를 야기하고, 이것은 혈당에서 유리 지방산을 상승시킨다. 근육 중 인슐린 저항성은 글루코오스 흡수를 감소시키고, 반면에 간에서의 인슐린 저항성은 글루코오스 저장을 감소시키고, 이들 둘 모두의 효과는 혈당을 상승시키는데 기여한다. 인슐린 저항성으로 인한 높은 혈장 수준의 인슐린 및 글루코오스는 종종 대사성 증후군 및 2형 당뇨병을 초래한다.
- [0224] 본원에서 사용된 바와 같이, "인슐린 민감도"는 개체가 어떻게 글루코오스를 효과적으로 처리하는 지에 대한 측정이다. 높은 인슐린 민감도를 갖는 개체는 효과적으로 글루코오스를 처리하고 반면에 낮은 인슐린 민감도를 갖는 개체는 효과적으로 글루코오스를 처리하지 못한다.
- [0225] 본원에서 사용된 바와 같이, "지질-저하"는 대상체에서 1 이상의 지질 (예를 들면, LDL, VLDL)의 감소를 의미한다. "지질-상승"은 대상체에서 지질 (예를 들면, HDL)의 상승을 의미한다. 지질-저하 또는 지질-상승은 1 이상의 용량으로 경시적으로 일어날 수 있다.
- [0226] 본원에서 사용된 바와 같이, "지질-저하 치료" 또는 "지질 저하제"는 대상체에서 1 이상의 지질을 감소시키기 위해 대상체에게 제공된 치료적 레지멘을 의미한다. 어떤 구현예에서, 지질-저하 치료가 제공되어 대상체에서 apo(a), apoCIII, CETP, apoB, 총 콜레스테롤, LDL-C, VLDL-C, IDL-C, 비-HDL-C, 트리글리세라이드, 작은 조밀한 LDL 입자, 및 Lp(a) 중 하나 이상을 감소시킨다. 지질-저하 치료제의 예는, 비제한적으로, apoB 억제제, 스타틴, 피브레이트 및 MTP 억제제를 포함한다.
- [0227] 본원에서 사용된 바와 같이, "지질단백질", 예컨대 VLDL, LDL 및 HDL은, 혈청, 혈장 및 림프에서 발견되는 단백질의 그룹을 의미하고 지질 수송을 위해 중요하다. 각각의 지질단백질의 화학 조성은, 예를 들면, HDL은 높은 비율의 단백질 대 지질을 가지며, 반면에 VLDL은 낮은 비율의 단백질 대 지질을 갖는다는 점에서 상이하다.
- [0228] 본원에서 사용된 바와 같이, "지질단백질 리파제" 또는 "LPL"은 CM 또는 VLDL과 같은 지질단백질에서 발견되는 TG를 유리 지방산 및 모노아실글리세롤로 가수분해하는 효소를 지칭한다. LPL은 TG를 가수분해하는 기능을 하는 보조인자로서 apo C-II를 필요로 한다. LPL은 골격 근육, 지방 조직, 및 심장 근육에서 주로 생산된다. CM 및 VLDL로부터 TG의 가수분해 및 제거는 일반적으로 CM 덩어리 및 TG에서의 과도한 식후의 상승을 막는다.
- [0229] 본원에서 사용된 바와 같이, "지질단백질 리파제 결핍증", "지질단백질 리파제 결핍", "LPL 결핍" 또는 "LPLD"는 "프레드릭슨 I형 이상지질혈증", "카일로마이크론혈증", "가족성 카일로마이크론혈증 증후군" 또는 "FCS"로도 알려져 있다. LPLD를 갖는 대상은 일반적으로 TG와 같은 지방산의 효과적인 분해에 필요한 LPL 또는 LPL 활성이 결여되어 있음에도 불구하고, 이들 대상은 여전히 최소 LPL 활성을 가질 수 있거나 최소 수준의 LPL을 발현할 수 있다. 일부 경우, LPLD 대상은 최대 약 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 또는 그 이내의 LPL을 발현하거나 LPL 활성을 가질 수 있다. 다른 경우, LPLD 대상은 측정될 수 있는 LPL 또는 LPL 활성을 갖지 않는다. LPLD의 하나의 구현예는 "고지질단백혈증 Ia형"("프레드릭슨 Ia형"으로도 알려짐)을 갖는 대상을 포함하며, 이는 TG와 같은 지방산의 효과적인 분해에 필요한 충분한 기능성 지질단백질 리파제 효소를 생산하는 데에 있어서의 대상의 무능을 지칭한다. TG를 분해하는데 있어서의 무능은 대상에서 파트리글리세라이드혈증을 야기하고, 종종 식사 후 12시간 이상, 초고TG 및 카일로마이크론혈증이 여전히 존재하며 지방혈증으로서 보인다. Ia형은 통상적으로 LPL 유전자에서의 하나 이상의 돌연변이에 의해 야기된다. 본원에 개시된 바와 같이, LPLD는 또한 고지질단백혈증 Ib형("프레드릭슨 Ib형"으로도 공지됨) 및 "고지질단백혈증 Ic형"("프레드릭슨 Ic"형으로도 공지됨)을 갖는 대상과 같은 기능장애 지질단백질 리파제를 갖는 대상을 포함한다. Ib형은 지질단백질 리파제 활성제 아포단백질 C-II의 결핍에 의해 야기된다. Ic형은 지질단백질 리파제의 순환하는 억제제 때문이다. Ia형과 마찬가지로, 1b/1c형 대상은 파트리글리세라이드혈증 및 초고TG를 야기하는 TG를 분해하는데 있어서의 무능으로부터 고통받으며, 카일로마이크론혈증은 여전히 존재하고 종종 식사 후 12시간 이상 보인다. 어떤 구현예에서, LPLD는 P207L, G188L 또는 D9N과 같은 LPL 유전자에서의 적어도 하나의 돌연변이 또는 LPL에 영향을 미치는 다른 돌연변이와 관련된다(Brunzell, In: Pagon

RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Stephens K, editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013.1999 Oct 12 [updated 2011 Dec 15]).

- [0230] 본원에서 사용된 바와 같이, "저밀도 지질단백질-콜레스테롤 (LDL-C)"는 저밀도 지질단백질 입자에서 운반된 콜레스테롤을 의미한다. 혈청 (또는 혈장)에서의 LDL-C의 농도는 전형적으로 mg/dL 또는 nmol/L로 정량화된다. "혈청 LDL-C" 및 "혈장 LDL-C"는 혈청 및 혈장 각각에서 LDL-C를 의미한다.
- [0231] 본원에서 사용된 바와 같이, "주요 위험 인자"는 특정한 질환 또는 병태에 대한 고위험에 기여하는 인자를 의미한다. 어떤 구현예에서, 관상동맥 심장병에 대한 주요 위험 인자는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 담배 흡연, 고혈압, 높은 LDL, 낮은 HDL-C, 관상동맥 심장병의 가족력, 연령, 및 본원에서 개시된 다른 인자.
- [0232] 본원에서 사용된 바와 같이, "대사성 장애" 또는 "대사성 질환"은 대사성 기능의 변경 또는 방해를 특징으로 하는 병태를 의미한다. "대사성" 및 "대사"는 당해기술에서 잘 알려진 용어들이고 일반적으로 살아있는 유기체 내에서 일어나는 생화학적 과정의 전체 범위를 포함한다. 대사성 장애는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 고혈당증, 전당뇨병, 당뇨병 (유형 1 및 2형), 비만, 인슐린 저항성, 대사성 증후군 및 2형 당뇨병으로 인한 이상지질혈증.
- [0233] 본원에서 사용된 바와 같이, "대사성 증후군"은 대상 기원의 지질 및 비-지질 심혈관 위험 인자의 군집화를 특징으로 하는 병태를 의미한다. 어떤 구현예에서, 대사성 증후군은 아래 인자 중 임의 3 개에 의해 확인된다: 남성 102 cm 초과 또는 여성 88 cm 초과의 허리 둘레; 적어도 150 mg/dL의 혈청 트리글리세라이드; 남성에서는 40 mg/dL 또는 여성에서는 50 mg/dL 미만의 HDL-C; 적어도 130/85 mmHg의 혈압; 및 적어도 110 mg/dL의 공복 혈당. 이들 결정요인은 임상 실시에서 쉽게 측정될 수 있다 (JAMA, 2001, 285: 2486-2497).
- [0234] "비경구 투여"는 주사 또는 주입을 통한 투여를 의미한다. 비경구 투여는 피하 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 동맥내 투여, 복강내 투여, 또는 두개내 투여, 예를 들면 척추강내 또는 뇌실질내 투여를 포함한다. 투여는 연속적, 만성적, 짧은 또는 간헐적일 수 있다.
- [0235] 본원에서 사용된 바와 같이, "펩타이드"는 아미드 결합에 의해 적어도 2 개의 아미노산을 연결하여 형성된 분자를 의미한다. 펩타이드는 폴리펩타이드 및 단백질을 의미한다.
- [0236] 본원에서 사용된 바와 같이, "약제"는 개체에게 투여될 때 치료적 이점을 제공하는 물질을 의미한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, apoCIII에 대해 표적화된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약제이다.
- [0237] 본원에서 사용된 바와 같이, "약제학적 조성물" 또는 "조성물"은 개체에게 투여하기에 적합한 물질의 혼합물을 의미한다. 예를 들면, 약제학적 조성물은 1 이상의 활성제 및 약제학적 담체 예를 들면, 멸균한 수용액을 포함할 수 있다.
- [0238] 본원에서 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용가능한 유도체"는 본원에서 기재된 화합물의 유도체 예컨대 용매화물, 수화물, 에스테르, 전구약물, 다형체, 이성질체, 동위원소로 라벨링된 변이체, 약제학적으로 허용가능한 염 및 당해기술에서 공지된 다른 유도체를 포함한다.
- [0239] 본원에서 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용가능한 염"은 안티센스 화합물의 생리적으로 및 약제학적으로 허용가능한 염, 즉, 모 화합물의 원하는 생물학적 활성을 유지하고 원하지 않는 독물학적 효과를 그것에 부여하지 않는 염을 의미한다. 용어 "약제학적으로 허용가능한 염" 또는 "염"은 무기 또는 유기 산 및 염기를 포함하는, 약제학적으로 허용가능한 비독성 산 또는 염기로부터 제조된 염을 포함한다. 본원에서 기재된 화합물의 "약제학적으로 허용가능한 염"은 당해기술에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 염의 검토에 대해, 참고 Stahl and Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002). 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 나트륨 염은 유용하고 인간에 대한 치료적 투여를 위해 잘 허용된다. 따라서, 일 구현예에서 본원에서 기재된 화합물은 나트륨 염의 형태이다.
- [0240] 본원에서 사용된 바와 같이, "부분"은 핵산의 인접 (즉 연결된) 핵염기의 규정된 수를 의미한다. 어떤 구현예에서, 구분은 표적 핵산의 인접 핵염기의 규정된 수이다. 어떤 구현예에서, 부분은 안티센스 화합물의 인접 핵염기의 규정된 수를 의미한다.
- [0241] 본원에서 사용된 바와 같이, "예방한다" 또는 "예방하는"은 극히 작은 시간으로부터 규정되지 않은 시간 동안 질환, 장애, 또는 병태의 개시 또는 발달을 지연 또는 예방하는 것을 의미한다. 예방한다란 또한 질환, 장애, 또는 병태를 발달시킬 위험을 감소시킨다는 것을 의미한다.

- [0242] 본원에서 사용된 바와 같이, "상승"은 양의 증가를 의미한다. 예를 들면, 혈장 HDL 수준의 상승은 혈장 중 HDL 양의 증가를 의미한다.
- [0243] 본원에서 사용된 바와 같이, "감소"는 더 작은 정도로, 크기, 양 또는 수를 낮추는 것을 의미한다. 예를 들면, 혈장 트리글리세라이드 수준의 감소는 혈장 중 트리글리세라이드의 양을 낮추는 것을 의미한다.
- [0244] 본원에서 사용된 바와 같이, "영역" 또는 "표적 영역"은 적어도 하나의 확인가능한 구조, 기능, 또는 특징을 갖는 표적 핵산의 부분으로서 규정된다. 예를 들면, 표적 영역은 3' UTR, 5' UTR, 엑손, 인트론, 엑손/인트론 접합, 코딩 영역, 번역 개시 영역, 번역 종료 영역, 또는 다른 규정된 핵산 영역을 포함할 수 있다. apoCIII에 대한 구조적으로 규정된 영역은 서열 데이터베이스 예컨대 NCBI로부터 수납 번호에 의해 취득될 수 있고 그와 같은 정보는 본원에 참고로 편입되어 있다. 어떤 구현예에서, 표적 영역은 표적 영역 내의 하나의 표적 분절의 5' 표적 부위로부터 표적 영역 내의 또 하나의 표적 분절의 3' 표적 부위로의 서열을 포함할 수 있다.
- [0245] 본원에서 사용된 바와 같이, "제 2 제제" 또는 "제 2 치료제"는 "제 1 제제"와 함께 사용될 수 있는 제제를 의미한다. 제 2 치료제는 비제한적으로, ApoCIII를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 제 2 제제는 또한 항- apoCIII 항체, apoCIII 펩타이드 억제제, 콜레스테롤 저하제, 지질 저하제, 글루코오스 저하제 및 항-염증제를 포함할 수 있다.
- [0246] 본원에서 사용된 바와 같이, "분절"은 핵산 내의 영역의 더 작은, 하위-부분으로서 규정된다. 예를 들면, "표적 분절"은, 1 이상의 안티센스 화합물이 표적화된 표적 핵산의 뉴클레오타이드의 서열을 의미한다. "5' 표적 부위"는 표적 분절의 5'-최말단 뉴클레오타이드를 의미한다. "3' 표적 부위"는 표적 분절의 3'-최말단 뉴클레오타이드를 의미한다. 대안적으로, "개시 부위"는 표적 분절의 5'-최말단 뉴클레오타이드를 의미할 수 있고 "중단 부위"는 표적 분절의 3'-최말단 뉴클레오타이드를 의미한다. 표적 분절은 또한, 하나의 서열의 "개시 부위"에서 시작하고 또 하나의 서열의 "중단 부위"에서 종료될 수 있다.
- [0247] 본원에서 사용된 바와 같이, "스타틴"은 HMG-CoA 환원효소의 활성을 억제하는 제제를 의미한다.
- [0248] 본원에서 사용된 바와 같이, "피하 투여"는 피부 바로 아래의 투여를 의미한다.
- [0249] 본원에서 사용된 바와 같이, "대상체"는 치료 또는 요법에 대해 선택된 인간 또는 비-인간 동물을 의미한다.
- [0250] 본원에서 사용된 바와 같이, "심혈관 질환 또는 장애의 증상"은 심혈관 질환 또는 장애로부터 생기고 그것을 수반하며 그것의 조짐으로서 쓰이는 현상을 의미한다. 예를 들면, 협심증; 가슴 통증; 숨가쁨; 심계항진; 약화; 현기증; 메스꺼움; 땀흘리기; 빈맥; 서맥; 부정맥; 심방세동; 하지의 팽윤; 청색증; 피로; 실신; 얼굴의 저림; 팔다리의 저림; 근육의 파행 또는 경련; 복부 팽만; 또는 열병은 심혈관 질환 또는 장애의 증상이다.
- [0251] 본원에서 사용된 바와 같이, "표적으로 하는" 또는 "표적화된"은 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하고 원하는 효과를 유도하는 안티센스 화합물의 설계 및 선택의 과정을 의미한다.
- [0252] 본원에서 사용된 바와 같이, "치료적으로 효과적인 양"은 치료적 이점을 개체에게 제공하는 약제의 양을 의미한다.
- [0253] 본원에서 사용된 바와 같이, "치료적 생활방식 변화"는 낮은 지방/지방 조직 질량 및/또는 콜레스테롤에 대해 의도된 식이 및 생활방식 변화를 의미한다. 그와 같은 변화는 심장병을 발달시킬 위험을 감소시킬 수 있고, 총 매일 칼로리, 총 지방, 포화된 지방, 다중불포화된 지방, 모노불포화된 지방, 탄수화물, 단백질, 콜레스테롤, 불용성 섬유질의 식이 섭취에 대한 권고, 뿐만 아니라 신체 활동에 대한 권고를 포함할 수 있다.
- [0254] 본원에서 사용된 바와 같이, "치료하다" 또는 "치료하는"은 본원에서 기재된 화합물을 투여하여 질환, 장애, 또는 병태의 변경 또는 개선에 영향을 주는 것을 의미한다.
- [0255] 본원에서 사용된 바와 같이, "트리글리세라이드" 또는 "TG"는 3 개의 지방산 분자와 조합된 글리세롤로 이루어진 지질 또는 중성 지방을 의미한다.
- [0256] 본원에서 사용된 바와 같이, "2형 당뇨병," ("2형 진성 당뇨병", "진성 당뇨병, 2형", "비-인슐린-의존적 당뇨병", "NIDDM", "비만 관련된 당뇨병", 또는 "성인형 당뇨병"로도 공지됨)는 인슐린 저항성, 상대적 인슐린 결핍, 및 고혈당증을 주로 특징으로 하는 대사성 장애이다.
- [0257] 어떤 구현예
- [0258] 어떤 구현예는 ApoCIII mRNA 및 단백질 발현을 감소시키는 화합물을 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 본 화

합물은 ApoCIII 연관된 질환을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 ApoCIII 특이적 억제제이다. 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ApoCIII를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹이다.

[0259] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 당해기술에서 공지된 아포지질단백질 C-III (ApoC-III)에 대해 표적화된 siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 본원에서 기재된 콘주게이트 그룹을 포함한다. 콘주게이션에 적합한 ApoC-III에 대해 표적화된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 예는 하기에서 개시된 것들을 비제한적으로 포함한다: US 특허 출원 공보 번호 US 2013/0317085 (이것은 그 전체가 본원에 참고로 편입되어 있다). 어떤 구현예에서, 본 화합물은 US 2013/0317085에서 개시된 서열번호 19-96 및 209-221 중 임의 것의 핵염기 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 본원에서 기재된 콘주게이트 그룹을 포함한다. 모든 상기 언급된 참조된 서열 번호의 핵염기 서열은 본원에 참고로 편입되어 있다.

[0260] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 하기에서 개시된 임의 서열로부터 선택된 서열의 적어도 8 개의 인접 핵염기로 이루어진 핵염기 서열을 갖는다: U.S. 특허 7,598,227, U.S. 특허 7,750,141, PCT 공보 WO 2004/093783 또는 PCT 공보 WO 2012/149495 (이들 모두는 참조로 본원에 편입되어 있다). 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하기에서 개시된 임의 서열로부터 선택된 서열을 갖는다: U.S. 특허 7,598,227, U.S. 특허 7,750,141, PCT 공보 WO 2004/093783 또는 PCT 공보 WO 2012/149495 (이들 모두는 참조로 본원에 편입되어 있다).

[0261] 어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 30 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 15 내지 30, 18 내지 24, 19 내지 22, 13 내지 25, 14 내지 25, 15 내지 25 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25, 적어도 26, 적어도 27, 적어도 28, 적어도 29 또는 30 개의 연결된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드는 20 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진다.

[0262] 어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 콘주게이트 그룹을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 제공하고 (서열번호: 1로서 편입된) 유전자은행 수납 번호 NM_000040.1에서 제시된 서열, (서열번호: 2로서 편입된) 뉴클레오타이드 20262640 내지 20266603로부터 끝이 잘린 유전자은행 수납 번호 NT_033899.8, 및/또는 (서열번호: 3으로서 편입된) 뉴클레오타이드 6238608 내지 6242565로부터 끝이 잘린 유전자은행 수납 번호 NT_035088.1 중 임의적인 것에 대해 상보적인 서열을 갖는다. 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 1-3 중 임의 것에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 100% 상보적이다. 어떤 구현예에서, 상기 화합물은 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 1-3 중 임의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 또는 20 개의 인접 핵염기를 포함한다. 어떤 구현예에서, 상기 화합물은 ApoCIII 분절을 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 표 121 및 124에서 보여진 표적 분절의 임의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 또는 20 개의 인접 핵염기를 포함한다. 표에서, "개시 부위"는 표적 분절의 5'-최말단 뉴클레오타이드를 의미하고 "중단 부위"는 표적 분절의 3'-최말단 뉴클레오타이드를 의미한다. 표적 분절은 표에서 열거된 각각의 서열의 개시 부위로부터 중단 부위의 범위일 수 있다. 대안적으로, 표적 분절은 하나의 서열의 개시 부위 범위로부터 또 하나의 서열의 중단 부위에서 종료할 수 있다. 예를 들면, 표에서 보여진 바와 같이, 표적 분절은 3533 내지 3552, 개시 부위로부터 서열번호: 87의 중단 부위의 범위일 수 있다. 또 하나의 예에서, 표에서 보여진 바와 같이, 표적 분절은 3514 내지 3558, 서열번호: 83의 개시 부위로부터 서열번호: 88의 중단 부위의 범위일 수 있다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 서열번호: 87의 서열의 적어도 8 개의 핵염기를 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 서열번호: 87의 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 서열번호: 87의 서열로 이루어진다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 ISIS 304801이다.

[0263] 어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 서열번호: 1-3 중 임의 것에 대해 적어도

80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 상보적이다. 어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 본원에서 개시된 임의 표적 분절에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 상보적이다.

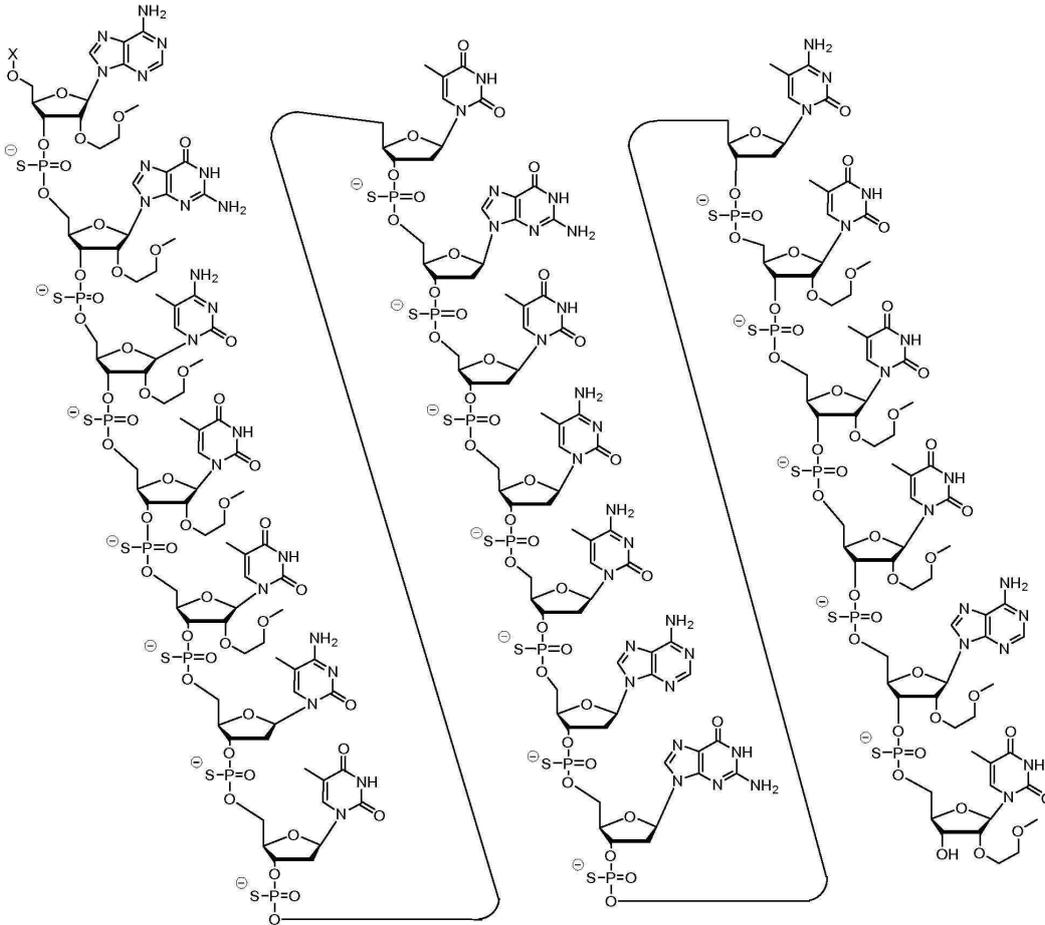
[0264] 어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 30 개의 연결된 뉴클레오타이드로 이루어지고 서열번호: 3의 핵염기 3533 내지 3552의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 또는 20 개의 인접 핵염기의 부분을 포함하는 핵염기 서열을 포함하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 서열번호: 3에 대해 적어도 80% 상보적이다.

[0265] 어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 30 개의 연결된 뉴클레오타이드로 이루어지고 서열번호: 3의 핵염기 3514 내지 3558의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25, 적어도 26, 적어도 27, 적어도 28, 적어도 29 또는 30 개의 인접 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 포함하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 서열번호: 3에 대해 적어도 80% 상보적이다.

[0266] 어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 30 개의 연결된 뉴클레오타이드로 이루어지고 서열번호: 19-96, 209-221의 임의 핵염기 서열의 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 또는 20 개의 인접 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는다. 어떤 구현예에서, 접합된 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 19-96, 209-221의 핵염기 서열 중 임의 하나의 적어도 8 개의 인접 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는다. 어떤 구현예에서, 상기 화합물은 서열번호: 19-96, 209-221 중 임의 하나 및 콘주게이트 그룹으로 이루어진다.

[0267] 어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 30 개의 연결된 뉴클레오타이드로 이루어지고 서열번호: 87의 핵염기 서열의 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 또는 20 개의 인접 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 87의 핵염기 서열 중 적어도 8 개의 인접 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는다. 어떤 구현예에서, 상기 화합물은 서열번호: 87 및 콘주게이트 그룹으로 이루어진다.

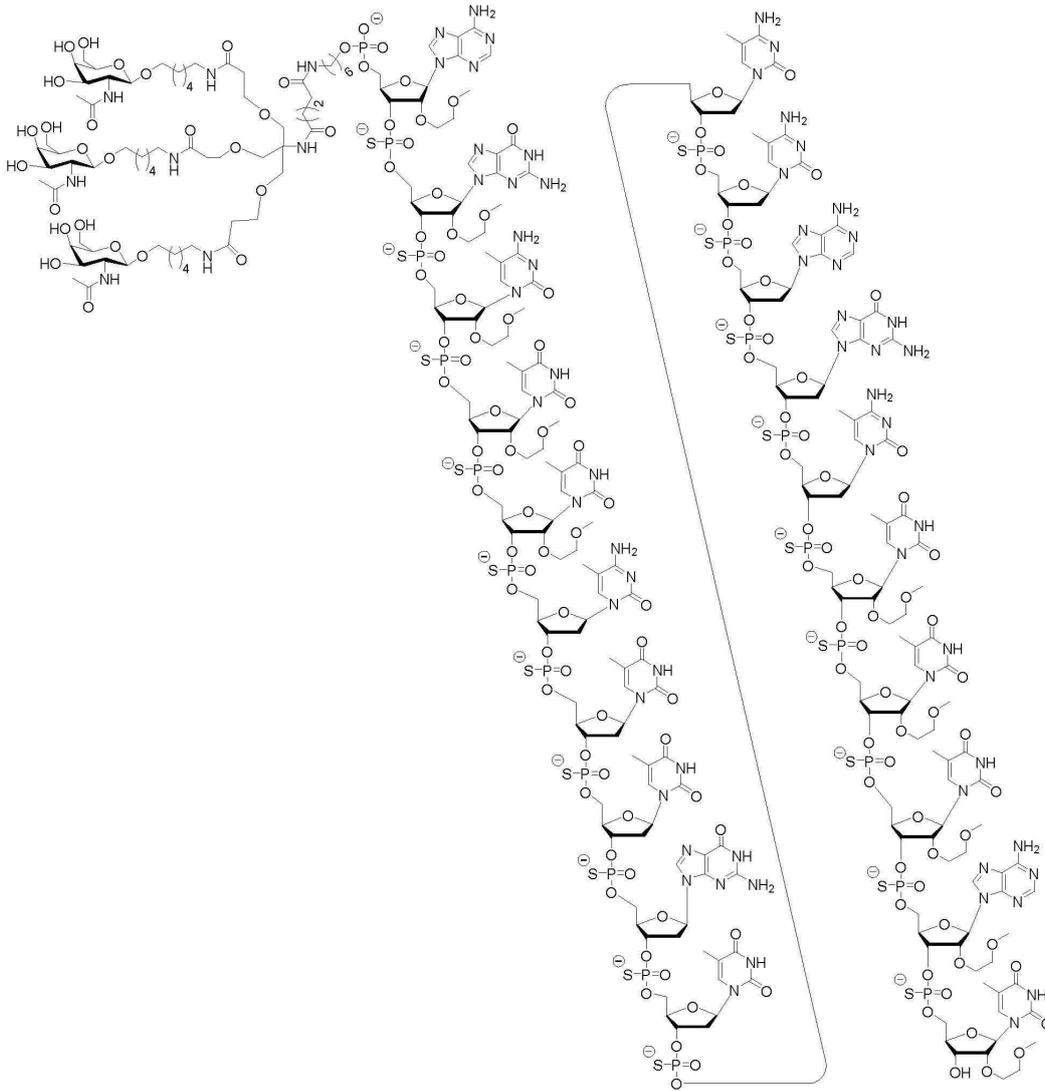
[0268] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 아래 구조로 나타낸 접합된 안티센스 화합물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 5'-X를 갖는 ISIS 304801을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 X는 GalNAc를 포함하는 콘주게이트 그룹이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 5'-X를 갖는 ISIS 304801을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 X는 GalNAc를 포함하는 콘주게이트 그룹이다.



[0269]

[0270]

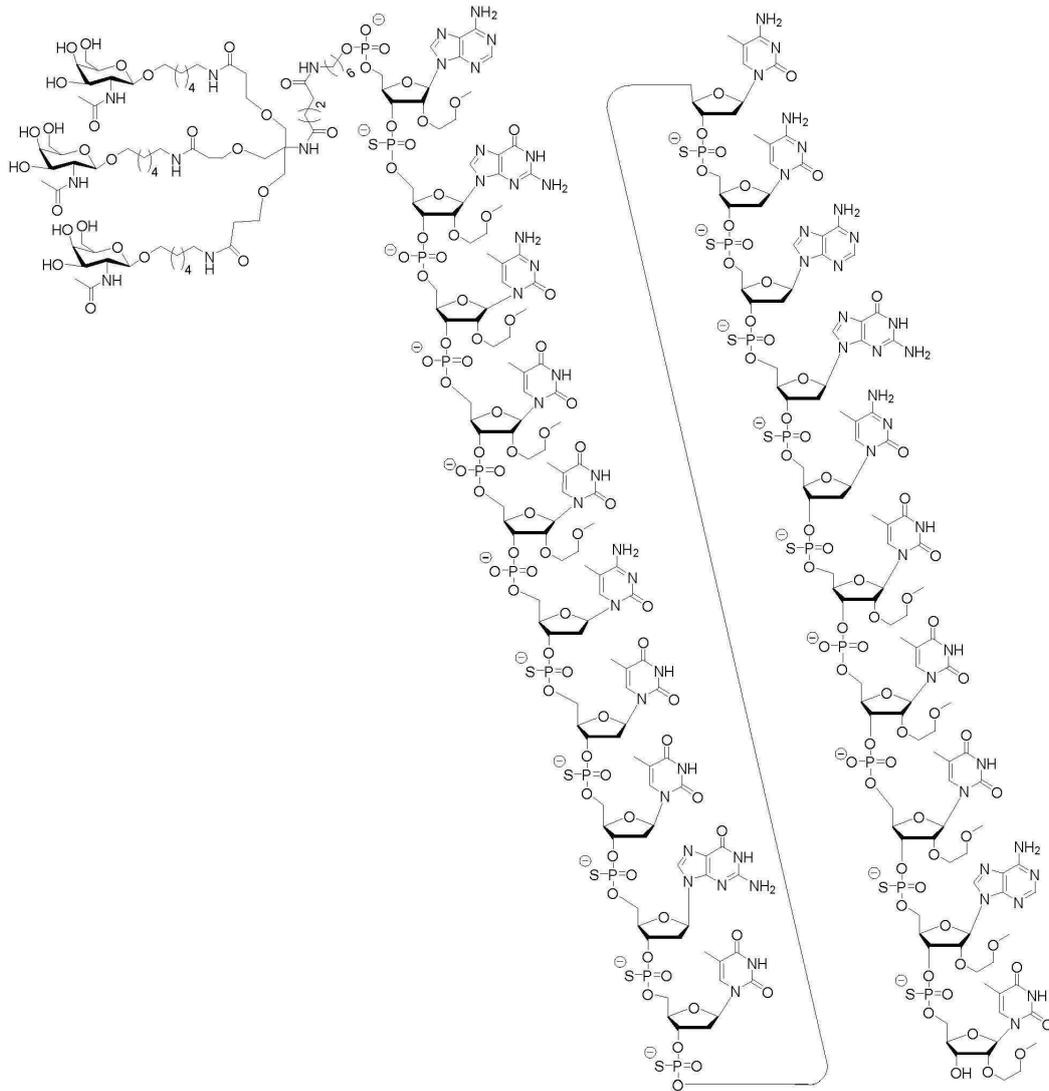
어떤 구현예에서, 본 개시내용은 아래 구조로 나타낸 접합된 안티센스 화합물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 접합된 변형된 올리고뉴클레오타이드 ISIS 678354를 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 접합된 변형된 올리고뉴클레오타이드 ISIS 678354로 이루어진다.



[0271]

[0272]

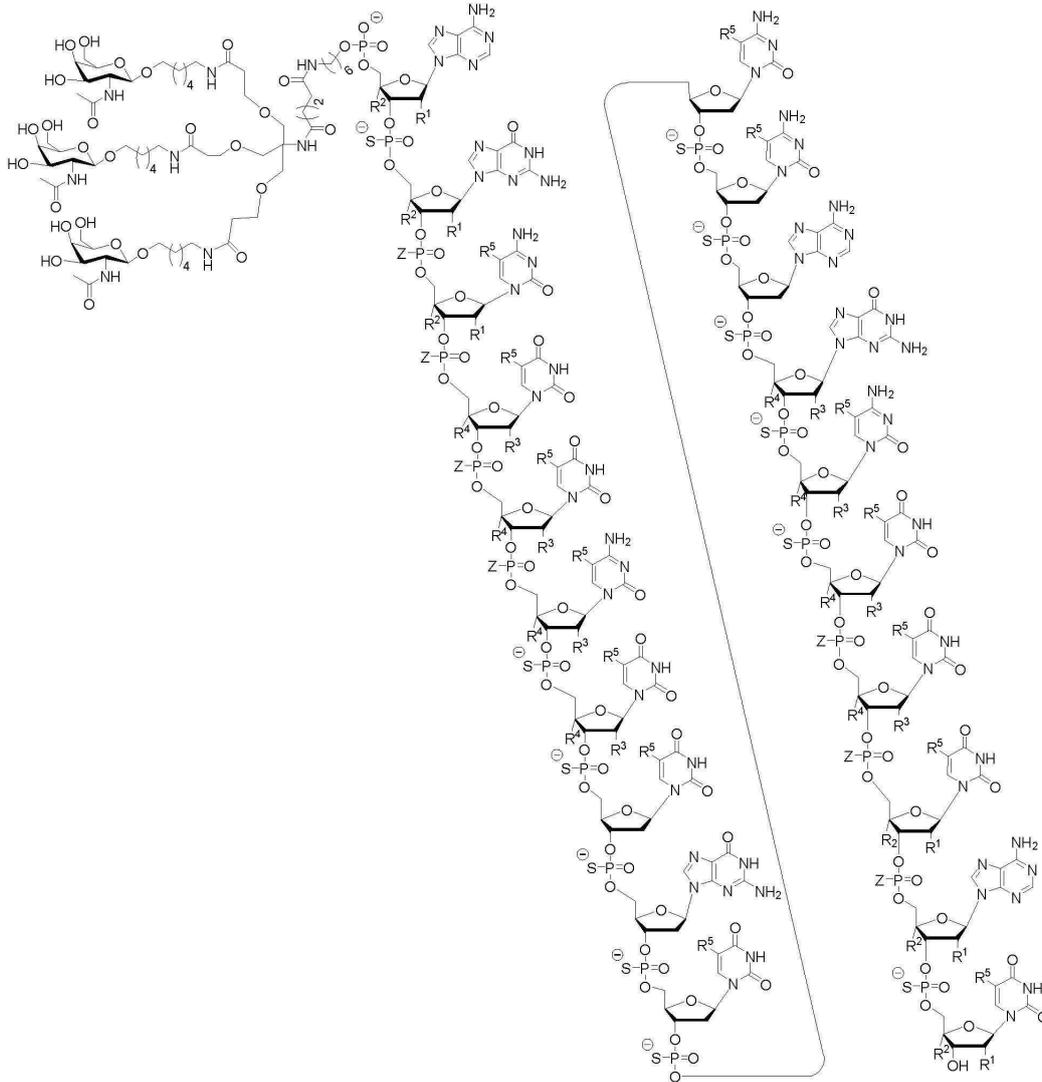
어떤 구현예에서, 본 개시내용은 아래 구조로 나타낸 접합된 안티센스 화합물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 접합된 변형된 올리고뉴클레오타이드 ISIS 678357을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 접합된 변형된 올리고뉴클레오타이드 ISIS 678357로 이루어진다.



[0273]

[0274]

어떤 구현예에서, 본 개시내용은 아래 구조로 나타낸 접합된 안티센스 화합물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 링의 당 모델에서 가변성을 갖는 5'-GalNAc와 함께 서열번호: 87의 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 링의 당 모델에서 가변성을 갖는 5'-GalNAc와 함께 서열번호: 87의 핵염기 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드로 이루어진다.



[0275]

[0276] 여기서 둘 중 하나의 R^1 은 $-OCH_2CH_2OCH_3$ (MOE)이고 R^2 는 H이거나; 또는 R^1 및 R^2 는 함께 브릿지를 형성하고, 여기서 R^1 은 $-O-$ 이고 R^2 는 $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, 또는 $-CH_2CH_2-$ 이고, 그리고 R^1 및 R^2 는 직접적으로 연결되고, 이로써 수득한 브릿지는 아래로부터 선택되고: $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$, 및 $-O-CH_2CH_2-$;

[0277] 그리고 동일한 고리 상의 R^3 및 R^4 각각의 쌍에 대해, 독립적으로 각각의 고리에 대해: 둘 중 하나의 R^3 은 H 및 $-OCH_2CH_2OCH_3$ 로부터 선택되고 R^4 는 H이거나; 또는 R^3 및 R^4 는 함께 브릿지를 형성하고, 여기서 R^3 은 $-O-$ 이고, 그리고 R^4 는 $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, 또는 $-CH_2CH_2-$ 이고 R^3 및 R^4 는 직접적으로 연결되고, 이로써 수득한 브릿지는 아래로부터 선택되고: $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$, 및 $-O-CH_2CH_2-$;

[0278] 그리고 R^5 는 H 및 $-CH_3$ 로부터 선택되고;

[0279] 그리고 Z는 S^- 및 O^- 로부터 선택된다.

[0280] 어떤 구현에는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 단일가닥이다.

[0281] 어떤 구현에는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 여기서 적어도 하나의 뉴클레오사이드간 연결은 변형된 뉴클레오사이드간 연결이다. 어떤 구현예에서, 변형된 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결이다. 어떤

구현예에서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9 또는 적어도 10 개의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결이다. 어떤 구현예에서, 각각의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결이다. 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9 또는 적어도 10 개의 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 각각의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 및 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결로부터 선택된다.

[0282] 어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 여기서 적어도 하나의 뉴클레오사이드는 변형된 핵염기를 포함한다. 어떤 구현예에서, 변형된 핵염기는 5-메틸시토신이다.

[0283] 어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 변형된 당을 포함한다. 어떤 구현예에서, 변형된 당은 바이사이클릭 당이다. 어떤 구현예에서, 변형된 당은 2'-O-메톡시에틸, 구속된 에틸, 3'-플루오로-HNA 또는 4' (CH₂)_n-O-2' 브릿지를 포함하고, 여기서 n은 1 또는 2이다.

[0284] 어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 30 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 아래를 포함한다: (a) 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 갭 분절; (b) 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 윙 분절; (c) 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 윙 분절; 및 상기 갭 분절은 상기 5' 윙 분절과 상기 3' 윙 분절 사이에 배치되고 여기서 각각의 윙 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 변형된 당을 포함한다.

[0285] 어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 20 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고는 아래를 포함한다: (a) 10 개의 연결된 뉴 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 갭 분절; (b) 5 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 윙 분절; (c) 5 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 윙 분절; 및 상기 갭 분절은 상기 5' 윙 분절과 상기 3' 윙 분절 사이에 배치되고, 여기서 각각의 윙 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고, 여기서 적어도 하나의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이고 여기서 각각의 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다.

[0286] 어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 20 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 19-96, 209-221 중 임의 것의 적어도 8 개의 인접 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 가지며, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 아래를 포함한다: (a) 10 개의 연결된 뉴 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 갭 분절; (b) 5 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 윙 분절; (c) 5 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 윙 분절; 및 상기 갭 분절은 상기 5' 윙 분절과 상기 3' 윙 분절 사이에 배치되고, 여기서 각각의 윙 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고, 여기서 적어도 하나의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이고 여기서 각각의 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다.

[0287] 어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 20 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 적어도 8 개의 인접 핵염기를 포함하는 서열번호: 87의 핵염기 서열을 가지며, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 아래를 포함한다: (a) 10 개의 연결된 뉴 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 갭 분절; (b) 5 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 윙 분절; (c) 5 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 윙 분절; 및 상기 갭 분절은 상기 5' 윙 분절과 상기 3' 윙 분절 사이에 배치되고, 여기서 각각의 윙 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고, 여기서 적어도 하나의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이고 여기서 각각의 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다.

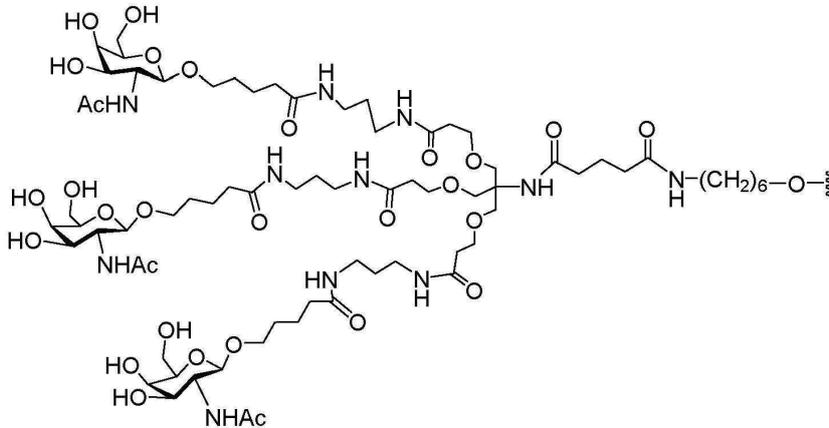
[0288] 어떤 구현예는 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹을 제공하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 87의 핵염기 서열을 갖는 20 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 아래를 포함한다: (a) 10 개의 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 갭 분절; (b) 5 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 윙 분절; (c) 5 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 윙 분절; 및 상기 갭 분절은 상기 5' 윙 분절과 상기 3' 윙 분절 사이에 배치되고, 여기서 각각의 윙 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고, 여기서 적어도 하나의 뉴클레오사

이드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이고 여기서 각각의 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다.

[0289] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 변형된 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서 변형된 올리고뉴클레오타이드에 연결된다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 변형된 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에서 변형된 올리고뉴클레오타이드에 연결된다.

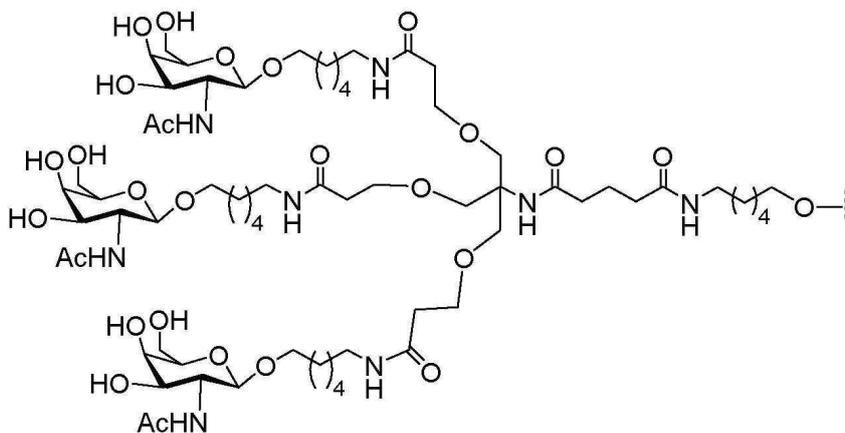
[0290] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 정확하게 하나의 리간드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 1 이상의 리간드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 정확하게 2 개의 리간드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 2 이상의 리간드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 3 개 이상의 리간드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 정확하게 3 개의 리간드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 각각의 리간드는 아래 중으로부터 선택된다: 다당류, 변형된 다당류, 만노스, 갈락토오스, 만노스 유도체, 갈락토오스 유도체, D-만노피라노스, L-만노피라노스, D-아라비노오스, L-갈락토오스, D-자일로푸라노스, L-자일로푸라노스, D-글루코오스, L-글루코오스, D-갈락토오스, L-갈락토오스, α-D-만노푸라노스, β-D-만노푸라노스, α-D-만노피라노스, β-D-만노피라노스, α-D-글루코피라노스, β-D-글루코피라노스, α-D-글루코푸라노스, β-D-글루코푸라노스, α-D-프룩토푸라노스, α-D-프룩토피라노스, α-D-갈락토피라노스, β-D-갈락토피라노스, α-D-갈락토푸라노스, β-D-갈락토푸라노스, 글루코사민, 시알산, α-D-갈락토사민, N-아세틸갈락토사민, 2-아미노-3-O-[(R)-1-카복시에틸]-2-데옥시-β-D-글루코피라노스, 2-데옥시-2-메틸아미노-L-글루코피라노스, 4,6-디데옥시-4-포름아미도-2,3-디-O-메틸-D-만노피라노스, 2-데옥시-2-설포아미노-D-글루코피라노스, N-글라이콜로일-α-뉴라민산, 5-티오-β-D-글루코피라노스, 메틸 2,3,4-트리-O-아세틸-1-티오-6-O-트리틸-α-D-글루코피라노사이드, 4-티오-β-D-갈락토피라노스, 에틸 3,4,6,7-테트라-O-아세틸-2-데옥시-1,5-디티오-α-D-글루코-헥토피라노사이드, 2,5-안하이드로-D-알로노니트릴, 리보오스, D-리보오스, D-4-티오리보오스, L-리보오스, L-4-티오리보오스. 어떤 구현예에서, 각각의 리간드는 N-아세틸 갈락토사민이다.

[0291] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래를 포함한다:



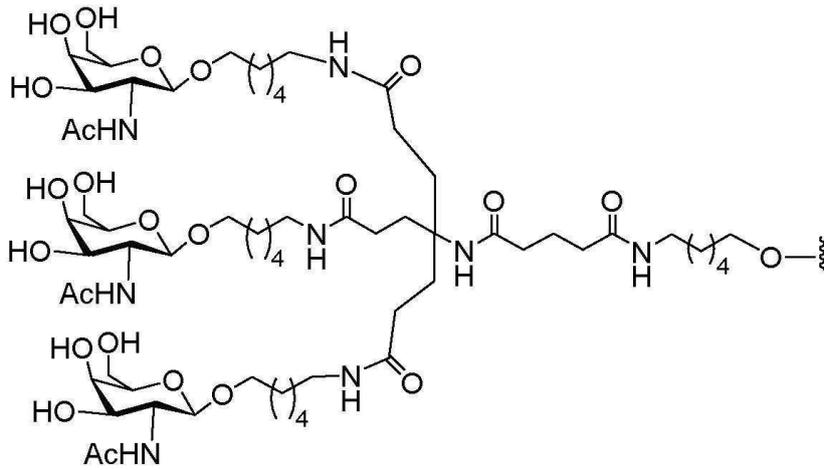
[0292]

[0293] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래를 포함한다:



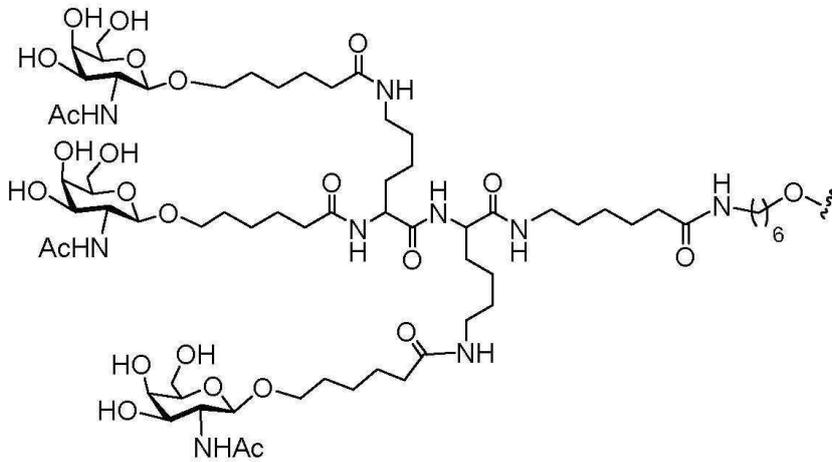
[0294]

[0295] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래를 포함한다:



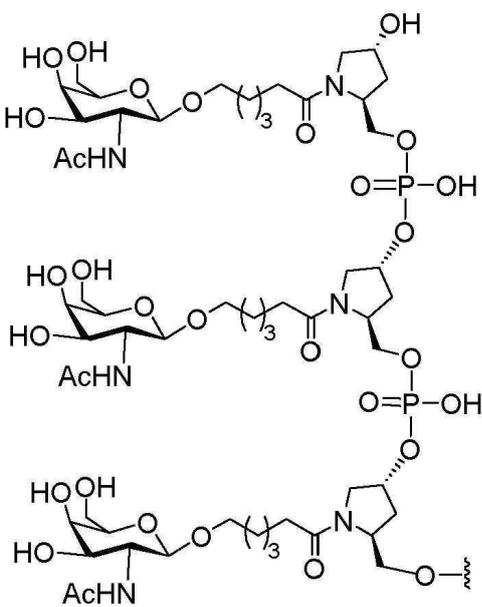
[0296]

[0297] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래를 포함한다:



[0298]

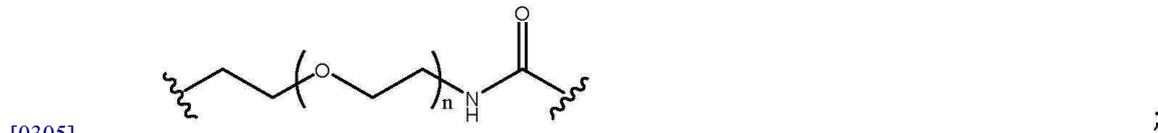
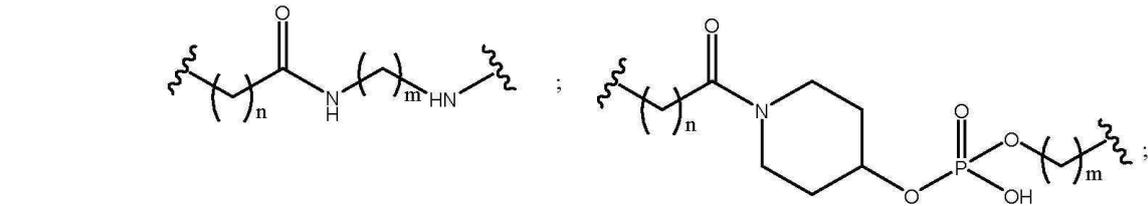
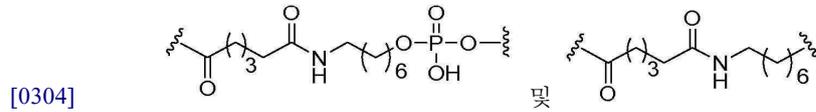
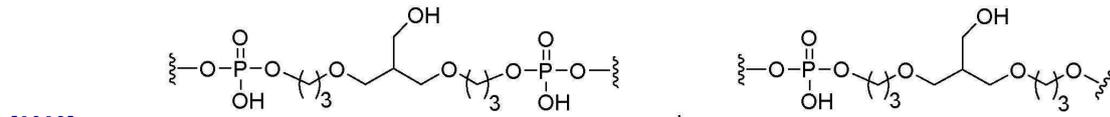
[0299] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래를 포함한다:



[0300]

[0301] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 적어도 하나의 인 열결 그룹 또는 중성 연결 그룹을 포함한다.

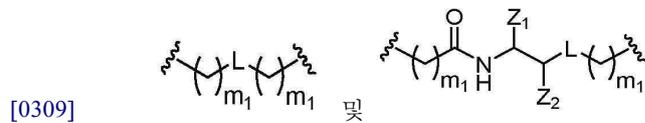
[0302] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 중으로부터 선택된 구조를 포함한다:



[0306] 여기서 n은 1 내지 12이고; 그리고

[0307] 여기서 m은 1 내지 12이다.

[0308] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래 중으로부터 선택된 구조를 갖는 테더를 갖는다:



[0310] 여기서 L은 인 연결 그룹 또는 중성 연결 그룹이고;

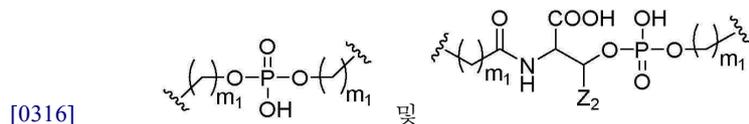
[0311] Z₁은 C(=O)O-R₂이고;

[0312] Z₂는 H, C₁-C₆ 알킬 또는 치환된 C₁-C₆ 알킬이고;

[0313] R₂는 H, C₁-C₆ 알킬 또는 치환된 C₁-C₆ 알킬이고; 그리고

[0314] 각각의 m₁은, 독립적으로, 0 내지 20이고, 여기서 적어도 하나의 m₁은 각각의 테더에 대해 0 초과이다.

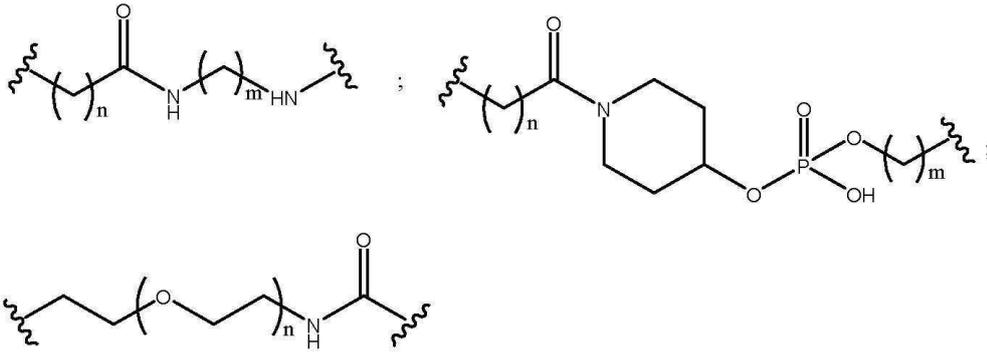
[0315] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래 중으로부터 선택된 구조를 갖는 테더를 갖는다:



[0317] 여기서 Z₂는 H 또는 CH₃이고; 그리고

[0318] 각각의 m₁은, 독립적으로, 0 내지 20이고, 여기서 적어도 하나의 m₁은 각각의 테더에 대해 0 초과이다.

[0319] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래 중으로부터 선택된 구조를 갖는 테더를 갖는다:



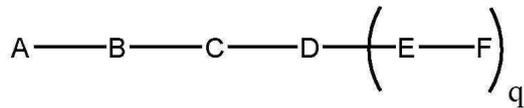
[0320]

[0321] 여기서 n은 1 내지 12이고; 그리고

[0322] 여기서 m은 1 내지 12이다.

[0323] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 변형된 올리고뉴클레오타이드에 공유결합된다.

[0324] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 식으로 나타낸 구조를 갖는다:



[0325]

[0326] 여기서

[0327] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[0328] B는 절단가능 모이어티이고

[0329] C는 콘주게이트 링커가고

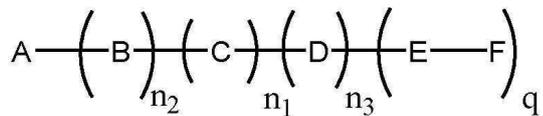
[0330] D는 분지화 그룹이고

[0331] 각각의 E는 테더이고;

[0332] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[0333] q는 정수 1 내지 5이다.

[0334] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 식으로 나타낸 구조를 갖는다:



[0335]

[0336] 여기서:

[0337] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[0338] B는 절단가능 모이어티이고

[0339] C는 콘주게이트 링커가고

[0340] D는 분지화 그룹이고

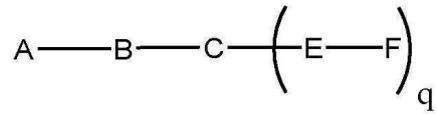
[0341] 각각의 E는 테더이고;

[0342] 각각의 F는 리간드이고;

[0343] 각각의 n은 독립적으로 0 또는 1이고; 그리고

[0344] q는 정수 1 내지 5이다.

[0345] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 식으로 나타낸 구조를 갖는다:



[0346]

[0347] 여기서

[0348] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[0349] B는 절단가능 모이어티이고;

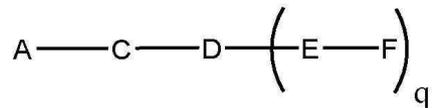
[0350] C는 콘주게이트 링커가고;

[0351] 각각의 E는 테더이고;

[0352] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[0353] q는 정수 1 내지 5이다.

[0354] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 식으로 나타낸 구조를 갖는다:



[0355]

[0356] 여기서

[0357] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[0358] C는 콘주게이트 링커이고;

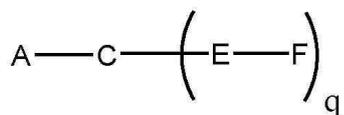
[0359] D는 분지화 그룹이고;

[0360] 각각의 E는 테더이고;

[0361] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[0362] q는 정수 1 내지 5이다.

[0363] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 식으로 나타낸 구조를 갖는다:



[0364]

[0365] 여기서

[0366] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

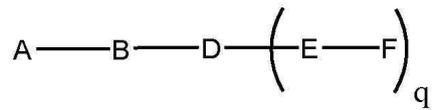
[0367] C는 콘주게이트 링커이고;

[0368] 각각의 E는 테더이고;

[0369] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[0370] q는 정수 1 내지 5이다.

[0371] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 식으로 나타낸 구조를 갖는다:



[0372]

[0373] 여기서

[0374] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[0375] B는 절단가능 모이어티이고;

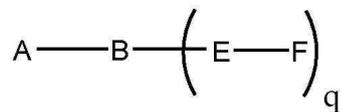
[0376] D는 분지화 그룹이고;

[0377] 각각의 E는 테터이고;

[0378] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[0379] q는 정수 1 내지 5이다.

[0380] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 식으로 나타낸 구조를 갖는다:



[0381]

[0382] 여기서

[0383] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

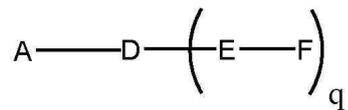
[0384] B는 절단가능 모이어티이고;

[0385] 각각의 E는 테터이고;

[0386] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[0387] q는 정수 1 내지 5이다.

[0388] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 식으로 나타낸 구조를 갖는다:



[0389]

[0390] 여기서

[0391] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

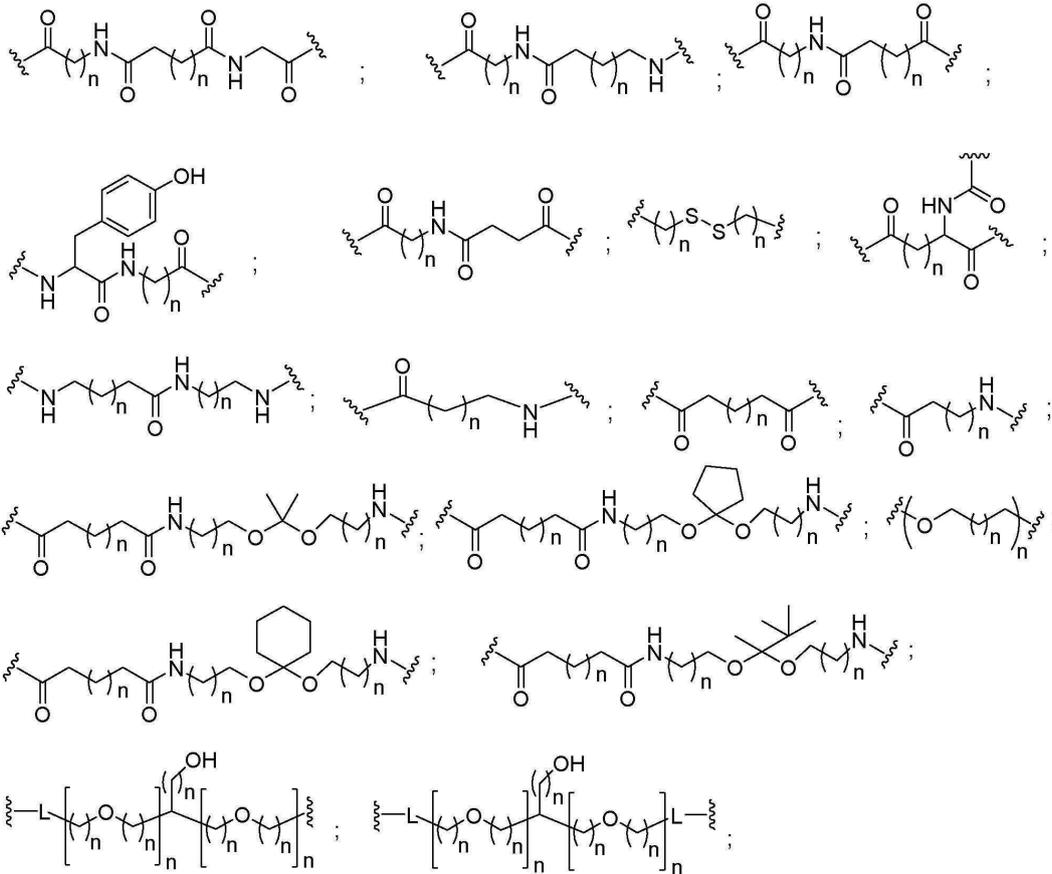
[0392] D는 분지화 그룹이고;

[0393] 각각의 E는 테터이고;

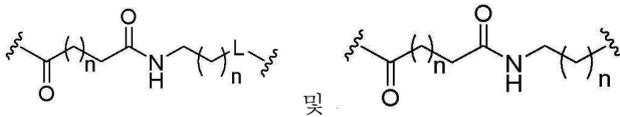
[0394] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[0395] q는 정수 1 내지 5이다.

[0396] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 아래 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



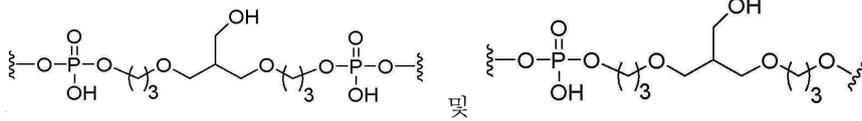
[0397]



[0398]

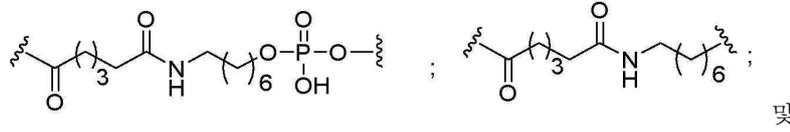
[0399] 여기서 각각의 L은, 독립적으로, 인 연결 그룹 또는 중성 연결 그룹이고; 그리고

[0400] 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

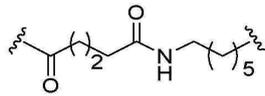


[0410]

[0411] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 아래 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0412]



[0413]

[0414] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 피롤리딘을 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 피롤리딘을 포함하지 않는다.

[0415] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 PEG를 포함한다.

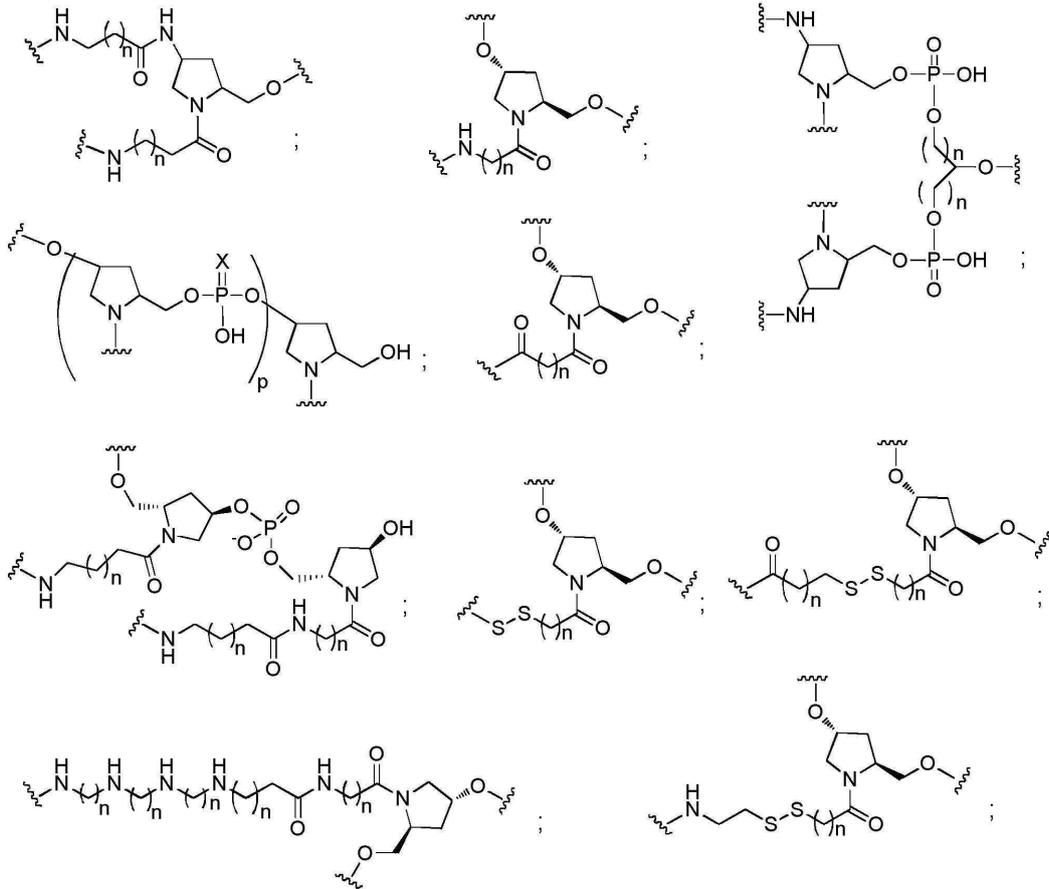
[0416] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 아마이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 적어도 2 개의 아마이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 아마이드를 포함하지 않는다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 폴리아미드를 포함한다.

[0417] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 아민을 포함한다.

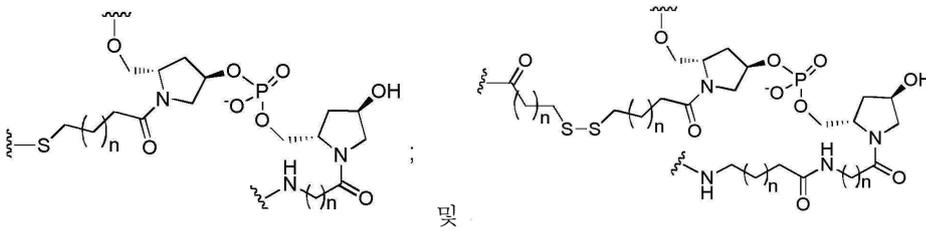
[0418] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 1 이상의 디설파이드 결합을 포함한다.

[0419] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 단백질 결합 모이어티를 포함한다. 어떤 구현예에서, 단백질 결합 모이어티는 지질을 포함한다. 어떤 구현예에서, 단백질 결합 모이어티는 아래 중으로부터 선택된다: 콜레스테롤, 콜산, 아다만탄 아세트산, 1-피렌 부티르산, 디하이드로테스토스테론, 1,3-비스-0(헥사데실)글리세롤, 제라닐옥시헥실 그룹, 헥사데실글리세롤, 보르네올, 멘톨, 1,3-프로판디올, 헵타데실 그룹, 팔미트산, 미리스트산, 03-(올레오일)리토콜산, 03-(올레오일)콜렌산, 디메톡시트리틸, 또는 펜옥사진, 비타민 (예를 들면, 폴레이트, 비타민 A, 비타민 E, 바이오틴, 피리독살), 펩타이드, 탄수화물 (예를 들면, 모노사카라이드, 디사카라이드, 트리스카라이드, 테트라사카라이드, 올리고당, 다당류), 엔도솜분해적 구성성분, 스테로이드 (예를 들면, 우바올, 헤시게닌, 디오스게닌), 테르펜 (예를 들면, 트리테르펜, 예를 들면, 사르사사포게닌, 프리델린, 에피프리에텔라놀 유도된 리토콜산), 또는 양이온성 지질. 어떤 구현예에서, 단백질 결합 모이어티는 아래 중으로부터 선택된다: C16 내지 C22 장쇄 포화된 또는 불포화된 지방산, 콜레스테롤, 콜산, 비타민 E, 아다만탄 또는 1-펜타플루오로프로필.

[0420] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 아래 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0421]

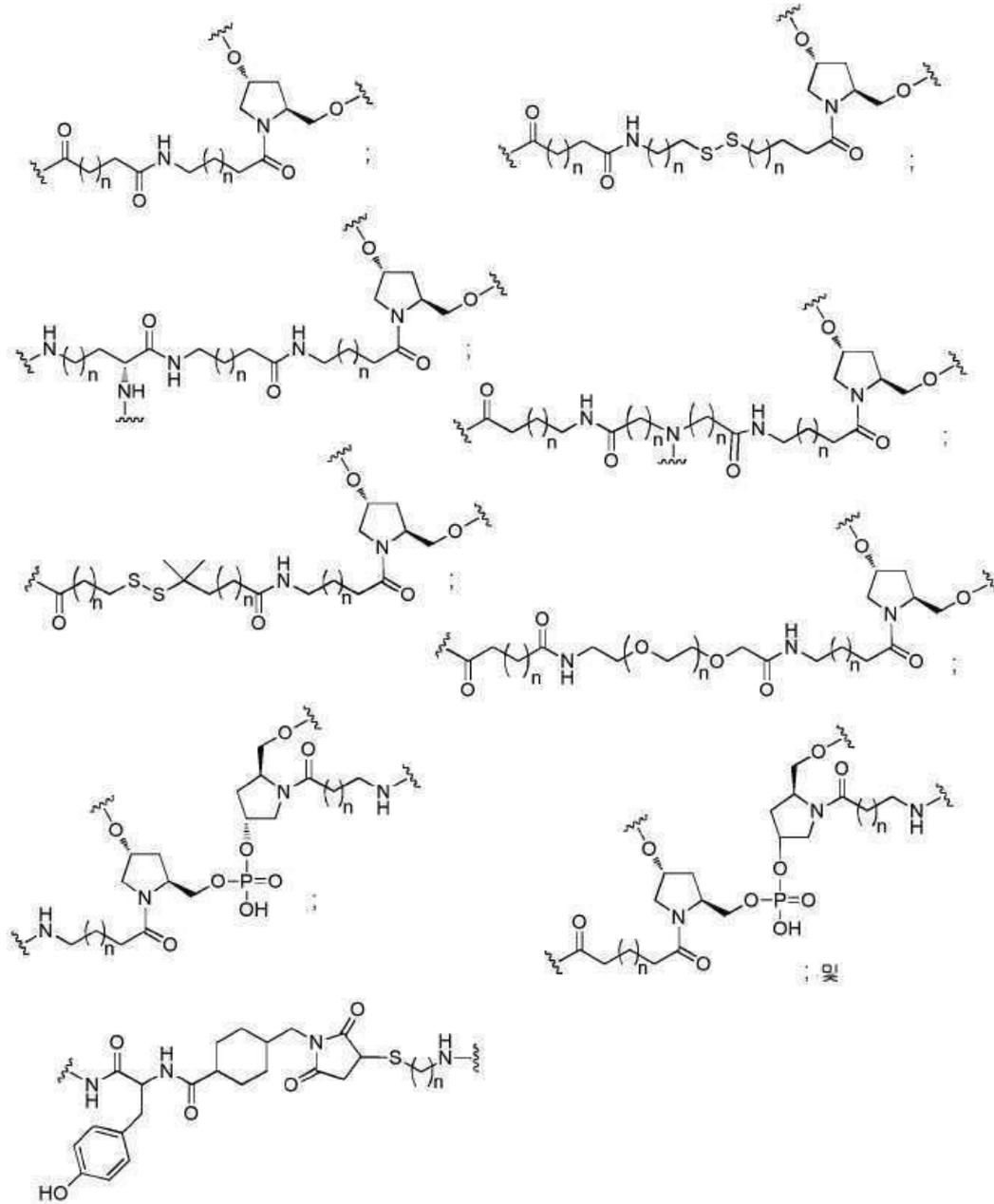


[0422]

및

[0423] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고; 그리고 p는 1 내지 6이다.

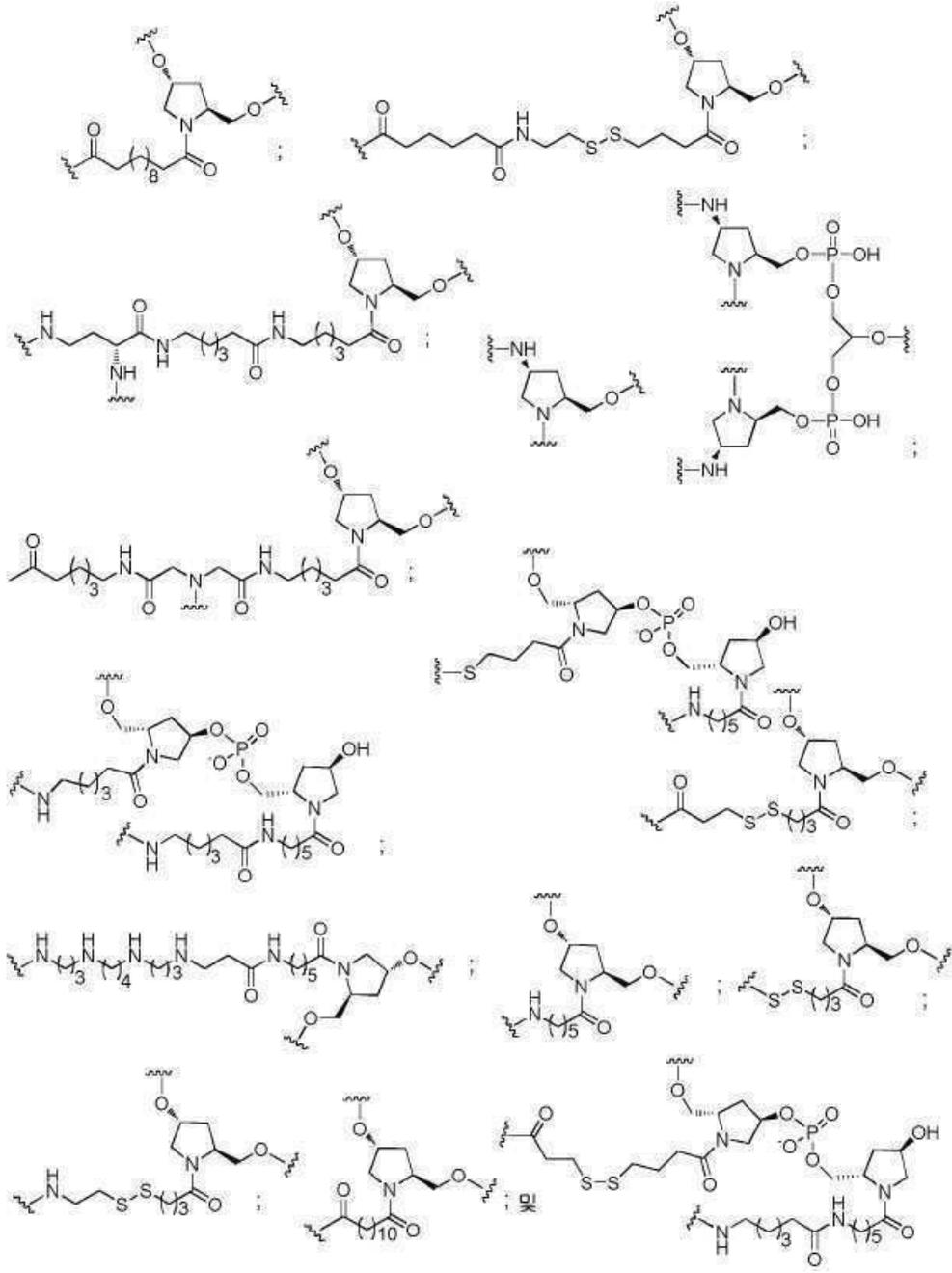
[0424] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 아래 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0425]

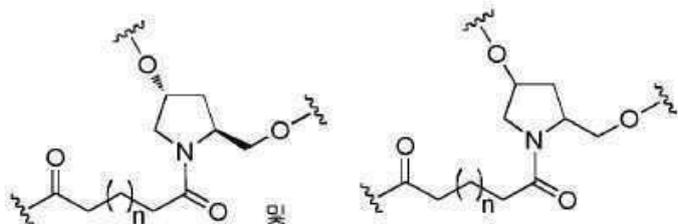
[0426] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[0427] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 아래 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0428]

[0429] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 아래 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:

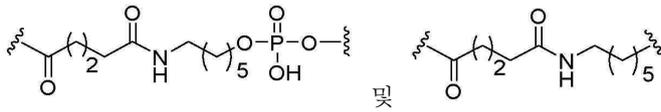


[0430]

[0431] 여기서 n은 1 내지 20이다.

[0432] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 아래 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:

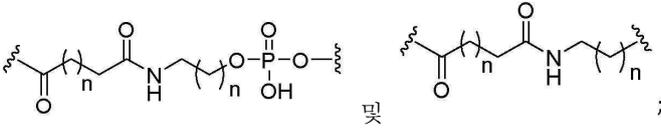
[0433]



[0434]

어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 아래 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:

[0435]



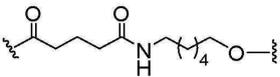
[0436]

여기서 각각의 n은 독립적으로, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7이다.

[0437]

어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 아래 구조를 갖는다:

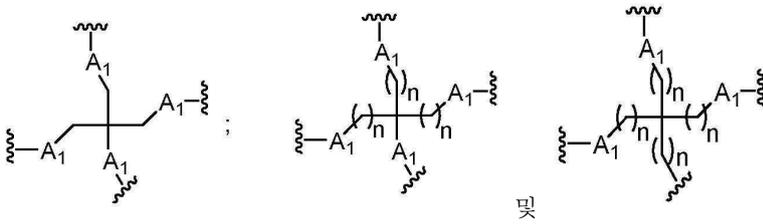
[0438]



[0439]

어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 아래 구조 중 하나를 갖는다:

[0440]



[0441]

여기서 각각의 A₁은 독립적으로, 0, S, C=O 또는 NH이고; 그리고

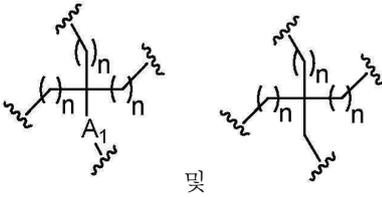
[0442]

각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[0443]

어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 아래 구조 중 하나를 갖는다:

[0444]



[0445]

여기서 각각의 A₁은 독립적으로, 0, S, C=O 또는 NH이고; 그리고

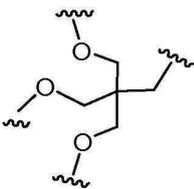
[0446]

각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

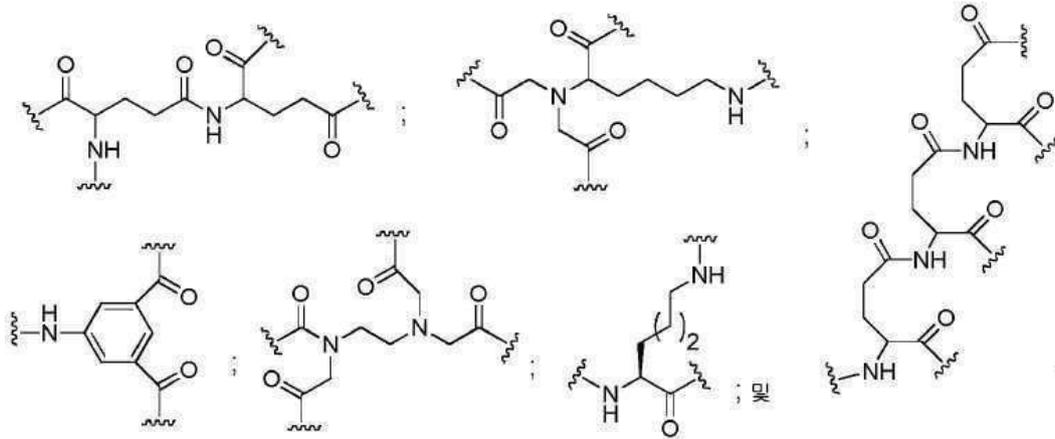
[0447]

어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 아래 구조를 갖는다:

[0448]

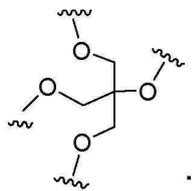


[0460] 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 아래 구조를 갖는다:



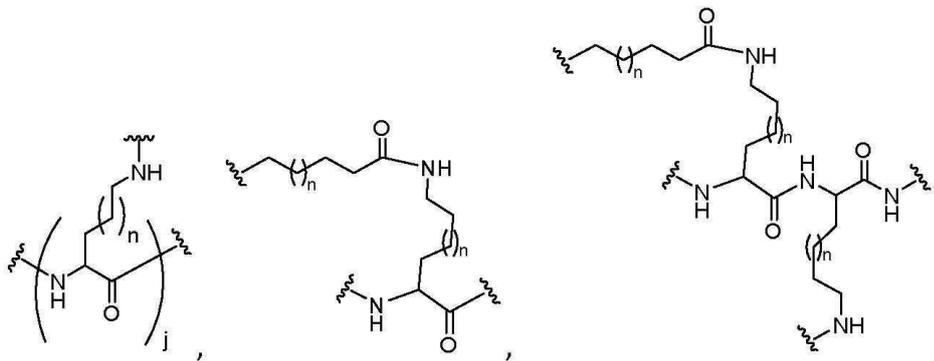
[0461]

[0462] 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 아래 구조를 갖는다:

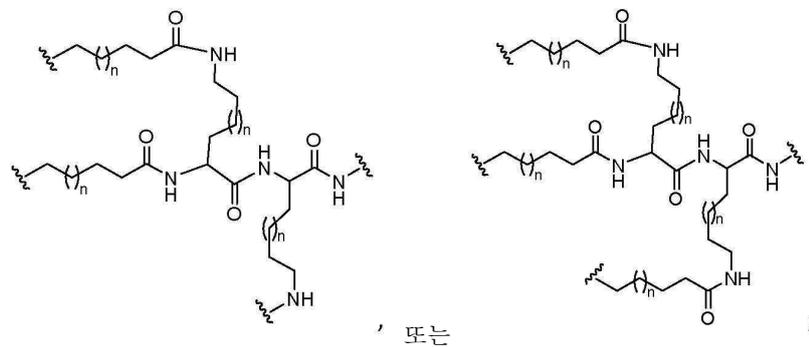


[0463]

[0464] 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 아래를 포함한다:



[0465]

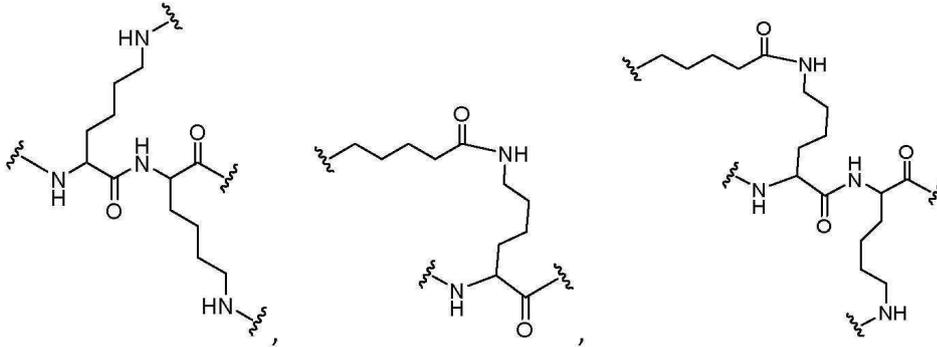


[0466]

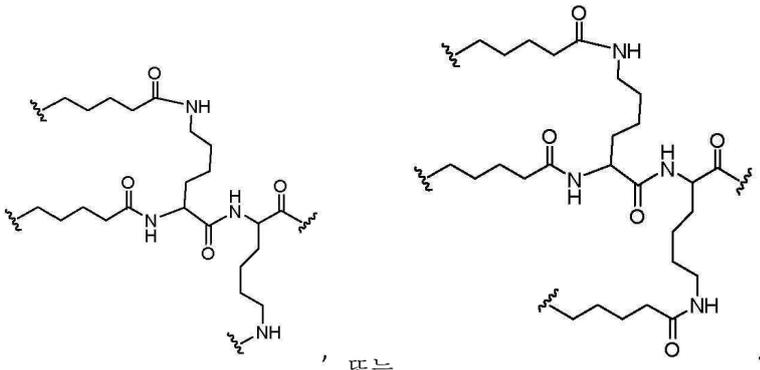
[0467] 여기서 각각의 j 는 정수 1 내지 3이고; 그리고

[0468] 여기서 각각의 n 은 정수 1 내지 20이다.

[0469] 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 아래를 포함한다:



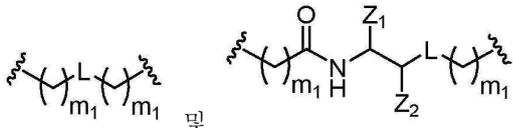
[0470]



[0471]

, 또는

[0472] 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 아래 중으로부터 선택된다:



[0473]

[0474] 여기서 L은 인 연결 그룹 및 중성 연결 그룹으로부터 선택되고;

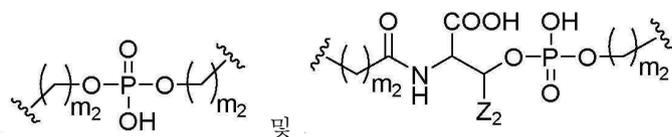
[0475] Z_1 은 C(=O)O-R₂이고;

[0476] Z_2 는 H, C₁-C₆ 알킬 또는 치환된 C₁-C₆ 알킬이고;

[0477] R₂는 H, C₁-C₆ 알킬 또는 치환된 C₁-C₆ 알킬이고; 그리고

[0478] 각각의 m_1 은, 독립적으로, 0 내지 20이고, 여기서 적어도 하나의 m_1 은 각각의 테더에 대해 0 초과이다.

[0479] 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 아래 중으로부터 선택된다:

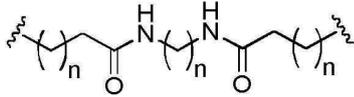


[0480]

[0481] 여기서 Z_2 는 H 또는 CH₃이고; 그리고

[0482] 각각의 m_2 은, 독립적으로, 0 내지 20이고, 여기서 적어도 하나의 m_2 은 각각의 테더에 대해 0 초과이다.

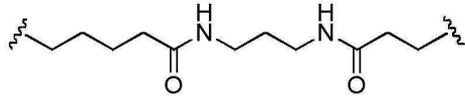
[0499] 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 아래 구조를 갖는다:



[0500]

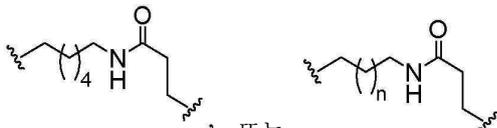
[0501] 여기서 각각의 n 은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[0502] 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 아래 구조를 갖는다:



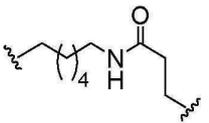
[0503]

[0504] 어떤 구현예에서, 테더는 아래 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0505] 여기서 각각의 n 은 독립적으로, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7이다.

[0506] 어떤 구현예에서, 테더는 아래 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:

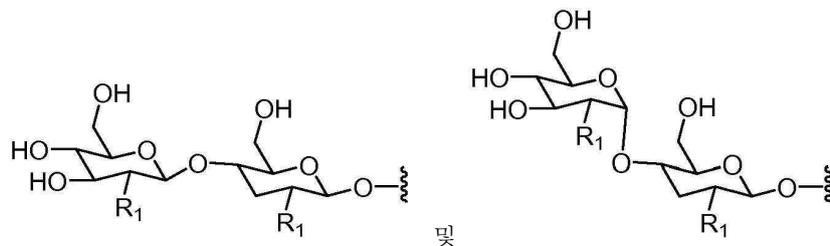


[0507]

[0508] 어떤 구현예에서, 리간드는 갈락토오스이다.

[0509] 어떤 구현예에서, 리간드는 만노스-6-포스페이트이다.

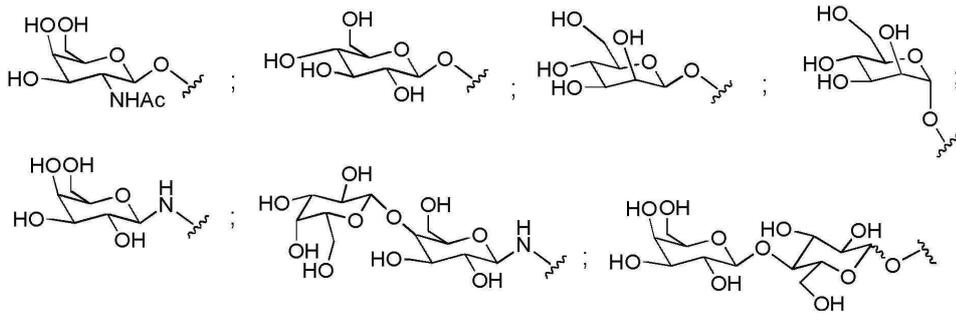
[0510] 어떤 구현예에서, 각각의 리간드는 아래 중으로부터 선택된다:



[0511]

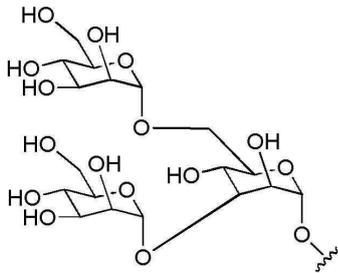
[0512] 여기서 각각의 R_1 은 OH 및 NHCOOH 로부터 선택된다.

[0513] 어떤 구현예에서, 각각의 리간드는 아래 중으로부터 선택된다:



[0514]

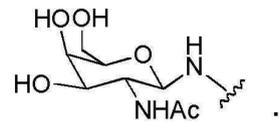
및



[0515]

[0516]

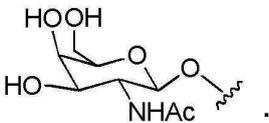
어떤 구현예에서, 각각의 리간드는 아래 구조를 갖는다:



[0517]

[0518]

어떤 구현예에서, 각각의 리간드는 아래 구조를 갖는다:



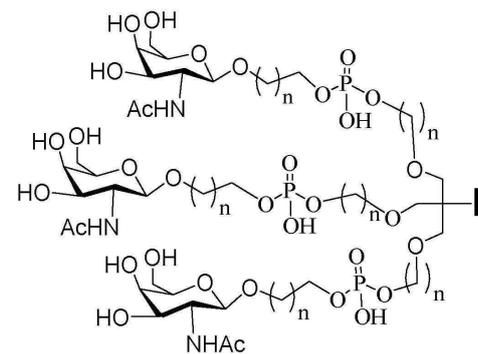
[0519]

[0520]

어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 세포-표적화 모이어티를 포함한다.

[0521]

어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래 구조를 갖는 세포-표적화 모이어티를 포함한다:

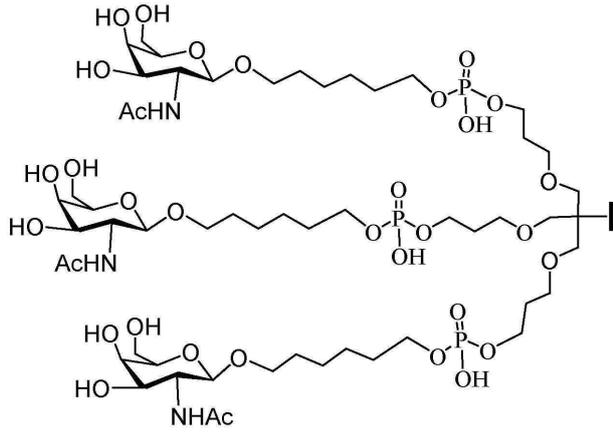


[0522]

[0523]

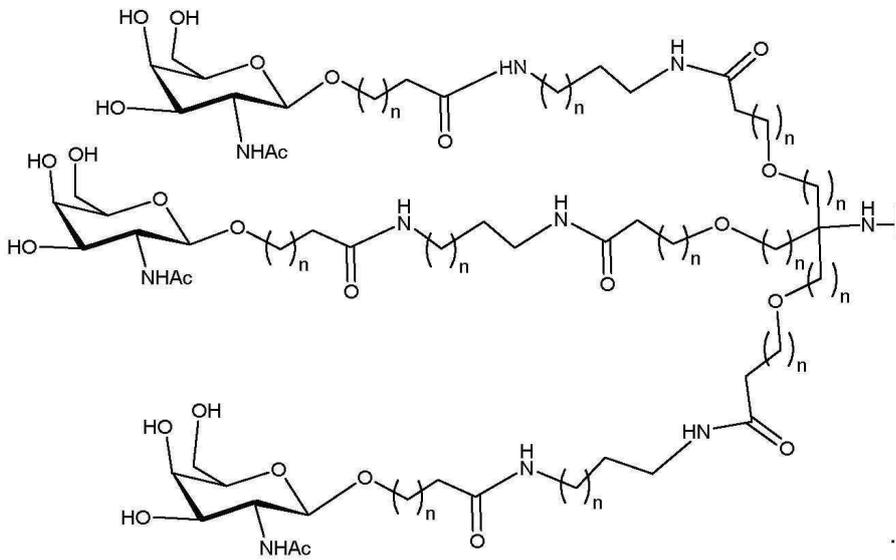
여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[0524] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래 구조를 갖는다:



[0525]

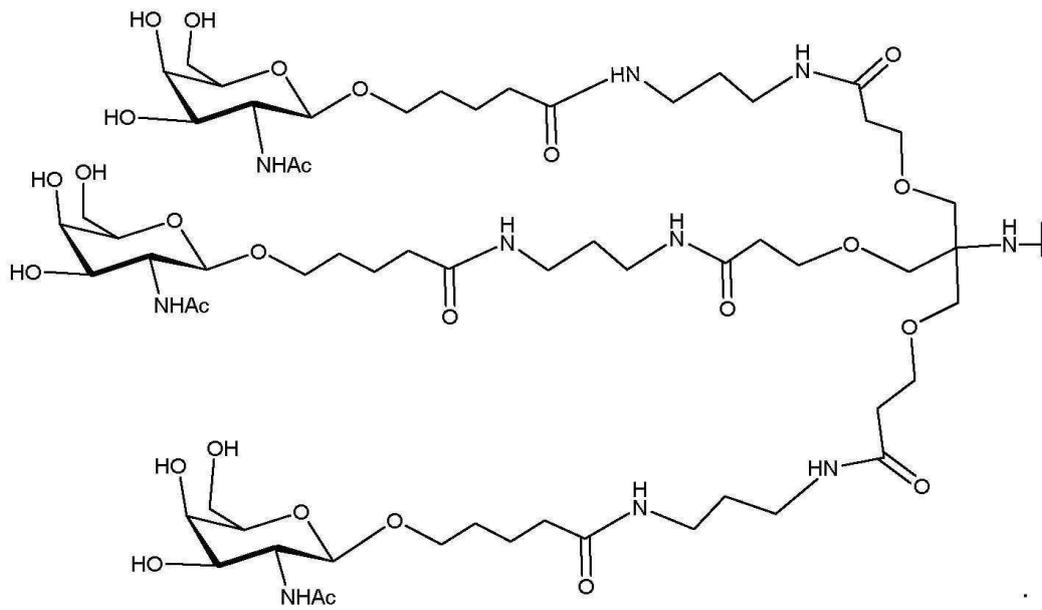
[0526] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래 구조를 갖는다:



[0527]

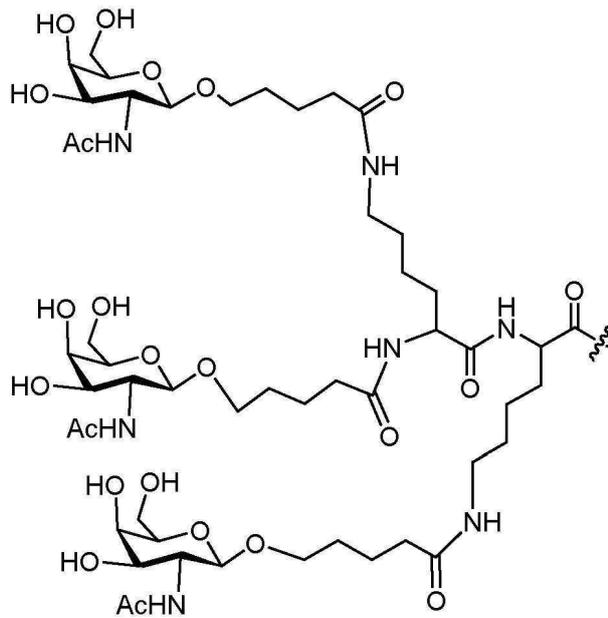
[0528] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[0529] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래 구조를 갖는다:



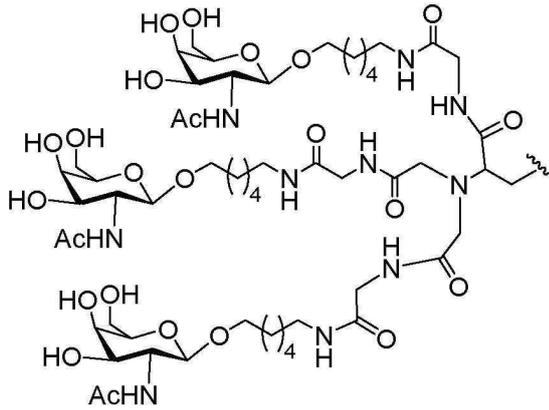
[0530]

[0531] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래를 포함한다:



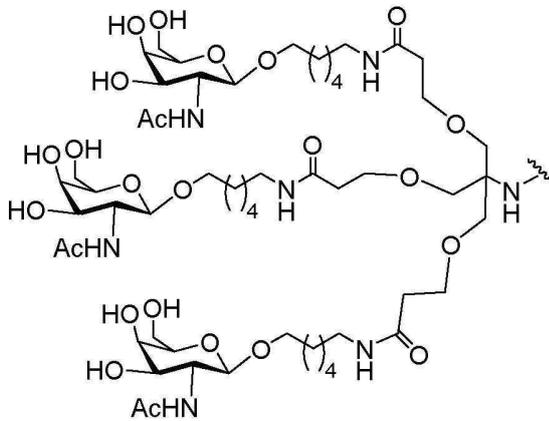
[0532]

[0533] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래를 포함한다:



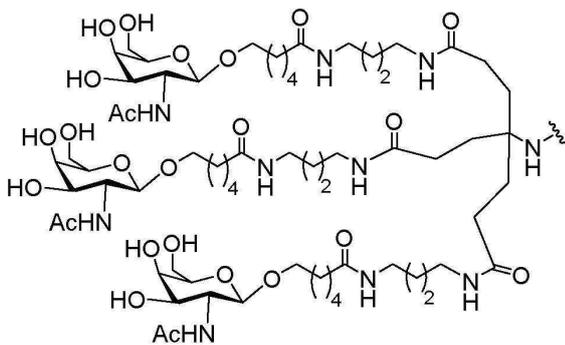
[0534]

[0535] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래 구조를 갖는다:



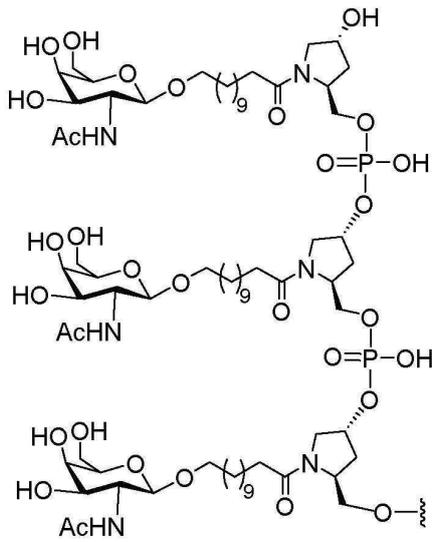
[0536]

[0537] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래 구조를 갖는다:



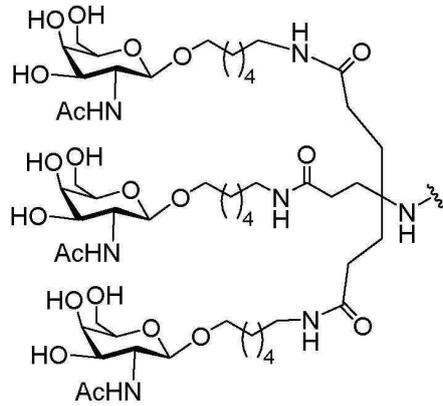
[0538]

[0539] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래를 포함한다:



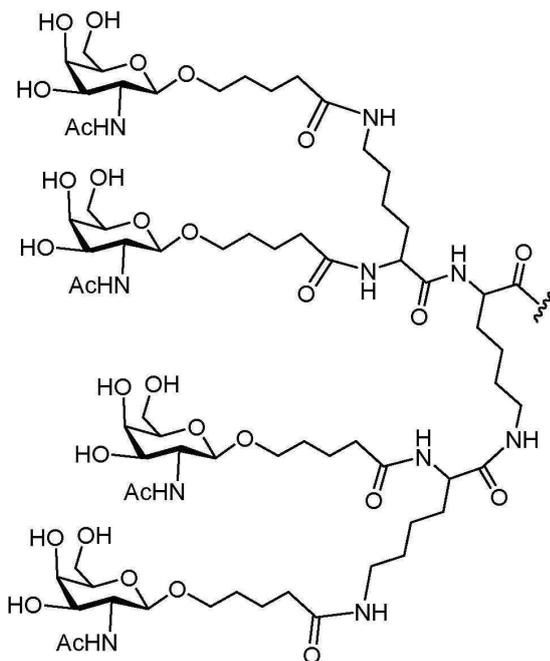
[0540]

[0541] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래 구조를 갖는다:



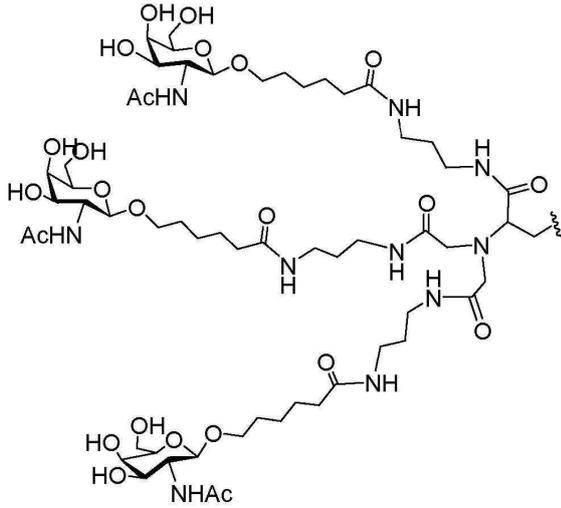
[0542]

[0543] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래를 포함한다:



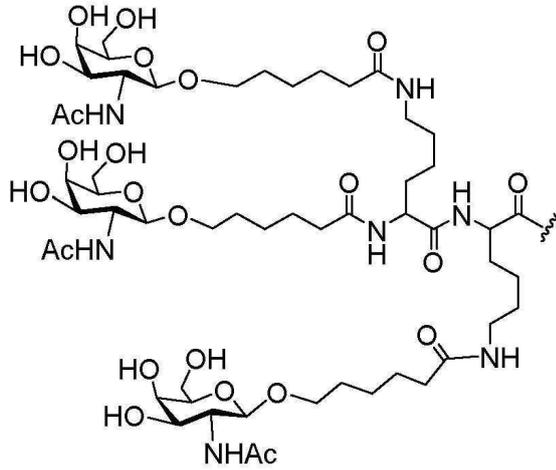
[0544]

[0545] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래를 포함한다:



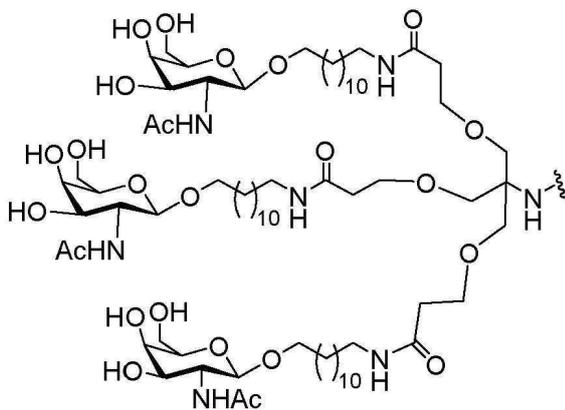
[0546]

[0547] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래를 포함한다:



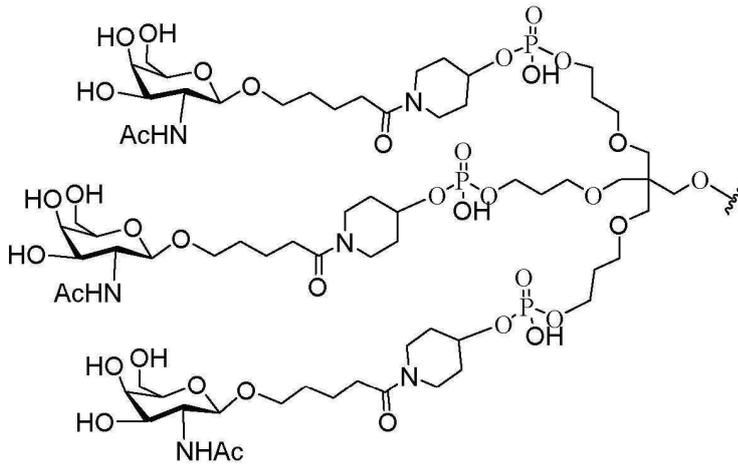
[0548]

[0549] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래 구조를 갖는다:



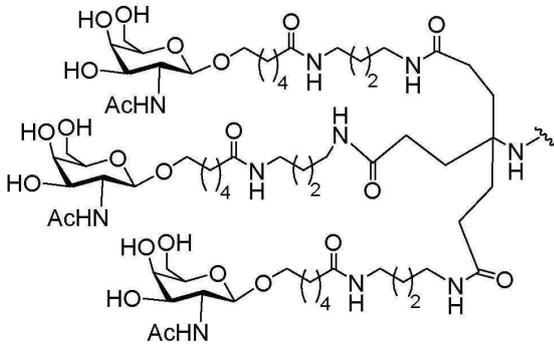
[0550]

[0551] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래 구조를 갖는다:



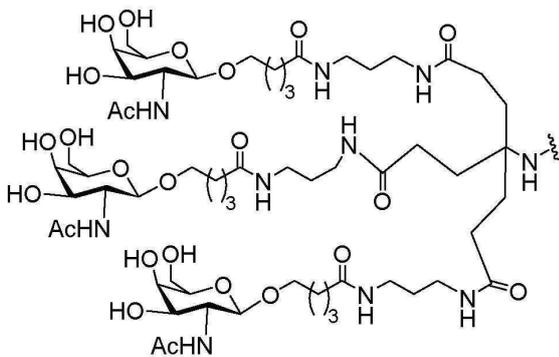
[0552]

[0553] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래 구조를 갖는다:



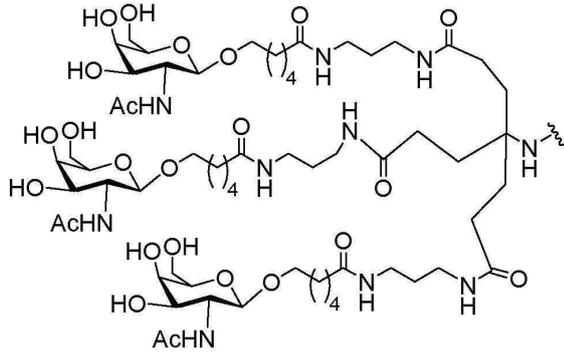
[0554]

[0555] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래 구조를 갖는다:



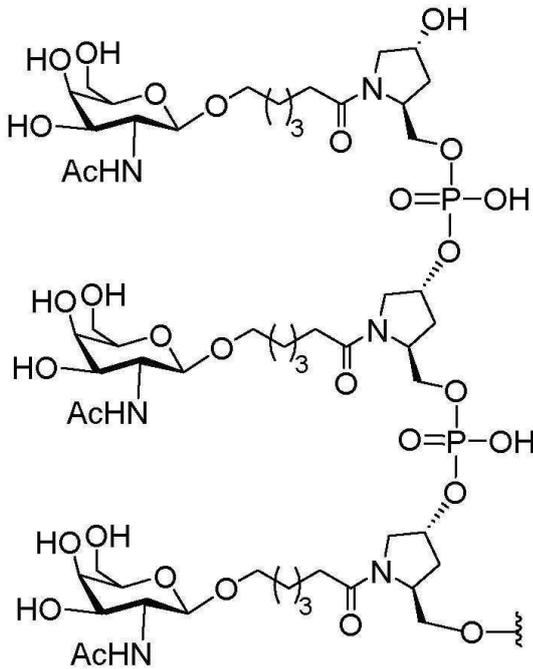
[0556]

[0557] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래 구조를 갖는다:



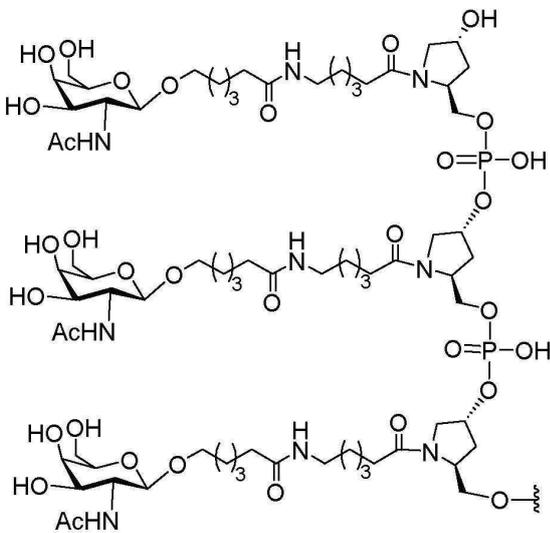
[0558]

[0559] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래를 포함한다:



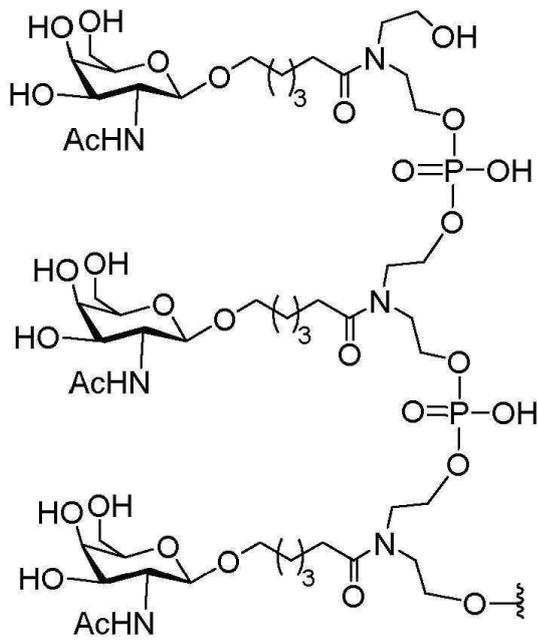
[0560]

[0561] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래를 포함한다:



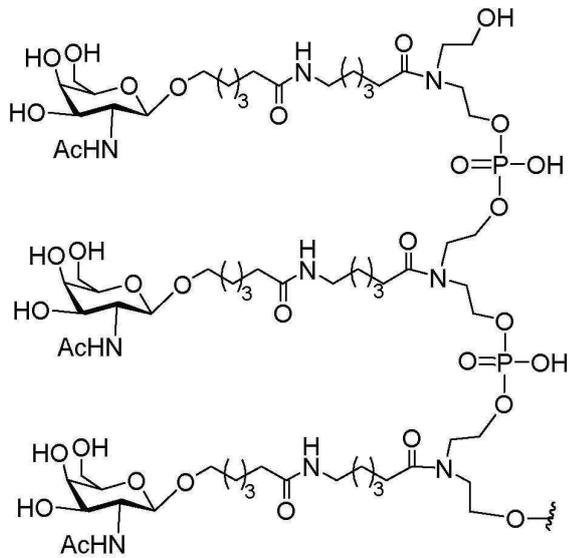
[0562]

[0563] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래를 포함한다:



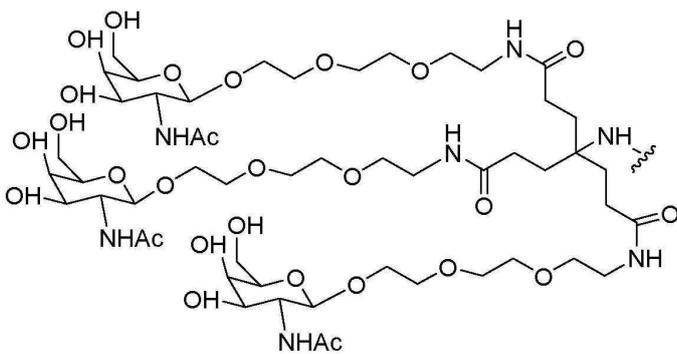
[0564]

[0565] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래를 포함한다:



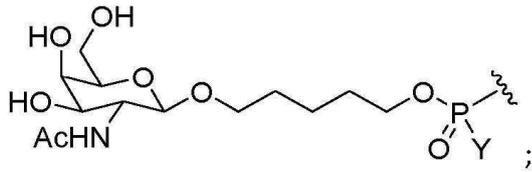
[0566]

[0567] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래 구조를 갖는다:



[0568]

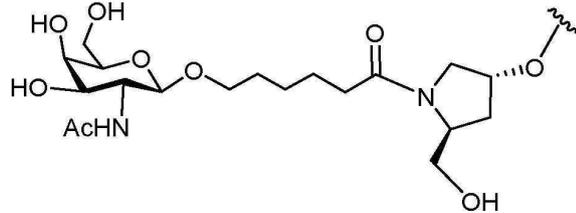
[0579] 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 아래 구조를 갖는다:



[0580]

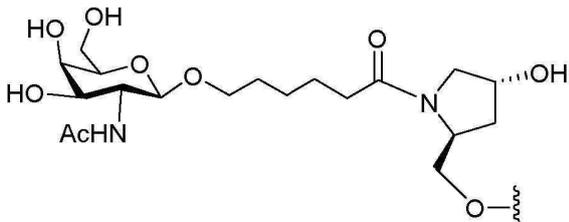
[0581] 여기서 각각의 Y는 O, S, 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 아미노, 치환된 아미노, 아지도, 알케닐 또는 알킬닐로부터 선택된다.

[0582] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래를 포함한다:



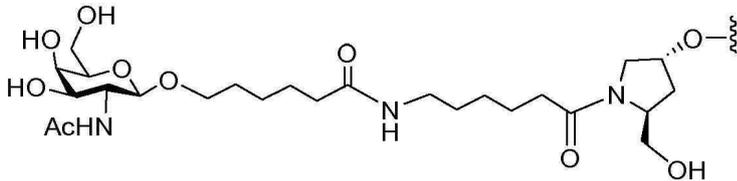
[0583]

[0584] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래를 포함한다:



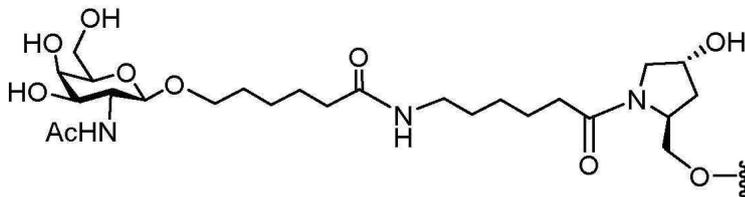
[0585]

[0586] T어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래를 포함한다:



[0587]

[0588] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래를 포함한다:



[0589]

[0590] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래 중으로부터 선택된 절단가능 모이어티를 포함한다: 포스포디에스테르, 아마이드, 또는 에스테르.

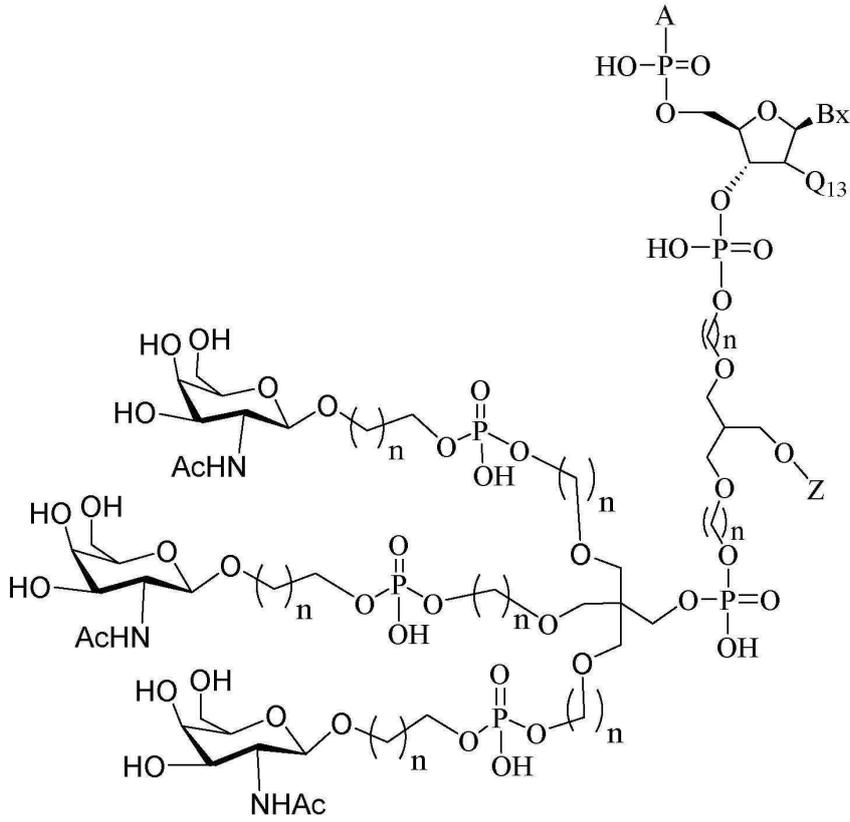
[0591] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 포스포디에스테르 절단가능 모이어티를 포함한다.

[0592] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 절단가능 모이어티를 포함하지 않고, 상기 콘주게이트 그룹은 콘주게이트 그룹과 올리고뉴클레오타이드 사이의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다.

[0593] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아마이드 절단가능 모이어티를 포함한다.

[0594] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 에스테르 절단가능 모이어티를 포함한다.

[0607] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 구조를 갖는다:



[0608]

[0609] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고;

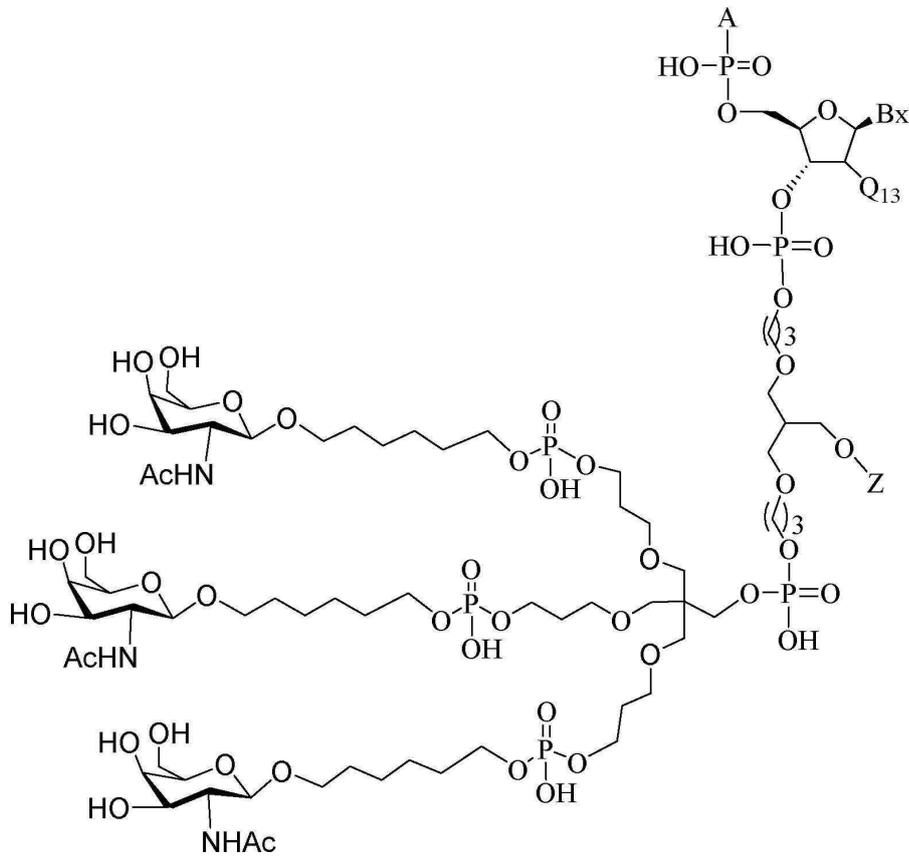
[0610] Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[0611] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[0612] Z는 H 또는 연결된 고형 지지체이고; 그리고

[0613] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0614] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 구조를 갖는다:



[0615]

[0616] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고;

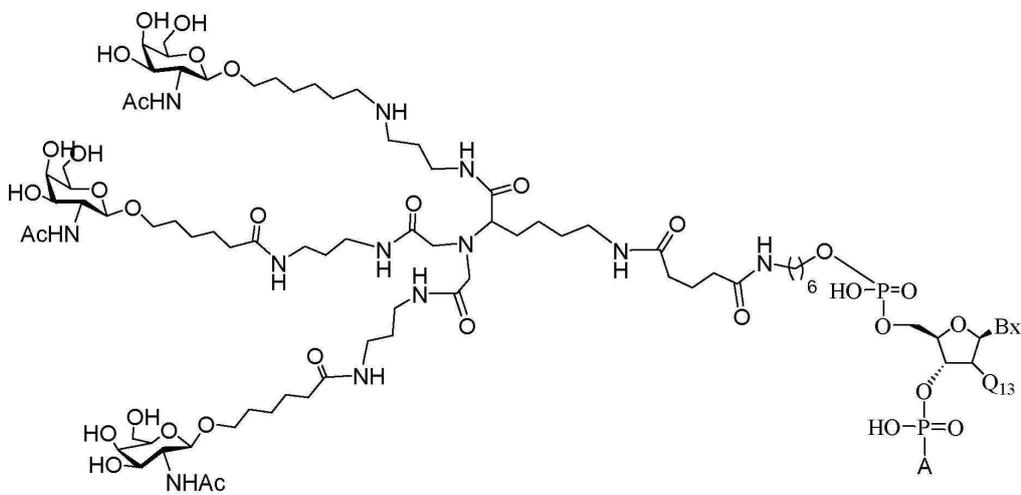
[0617] Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[0618] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[0619] Z는 H 또는 연결된 고형 지지체이고; 그리고

[0620] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0621] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 구조를 갖는다:



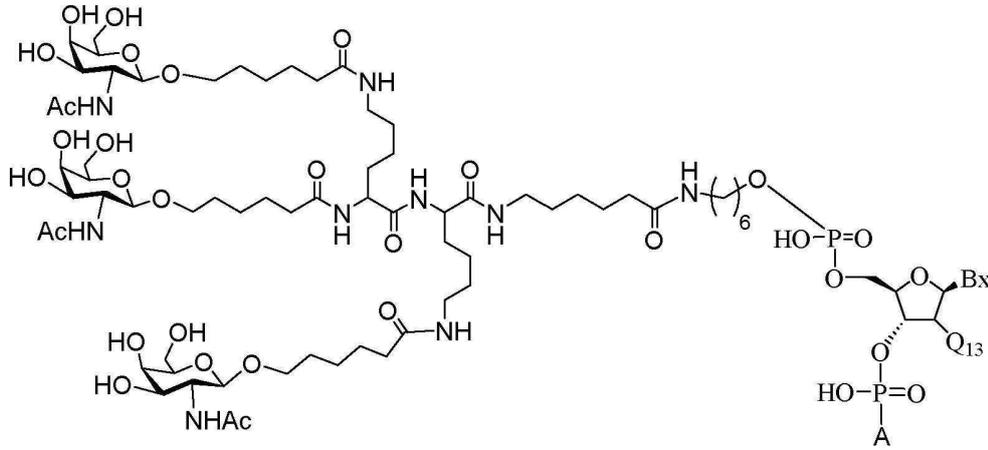
[0622]

[0623] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[0624] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[0625] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0626] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 구조를 갖는다:



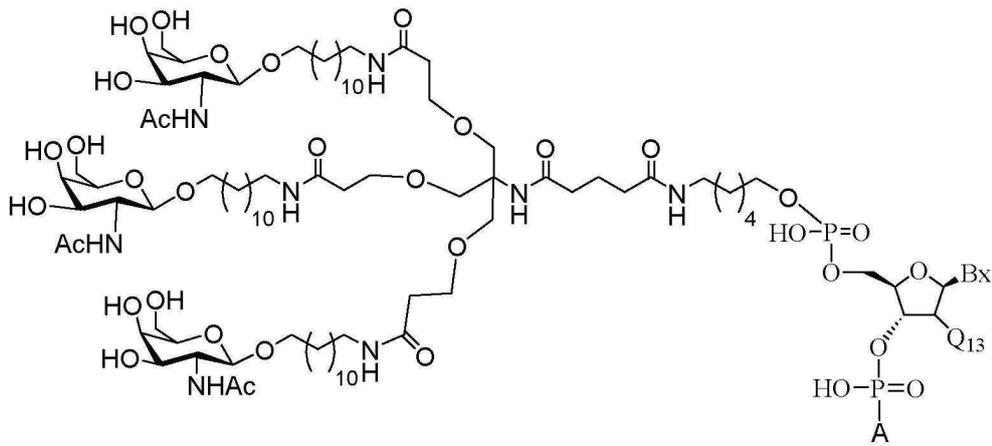
[0627]

[0628] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[0629] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[0630] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0631] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 구조를 갖는다:



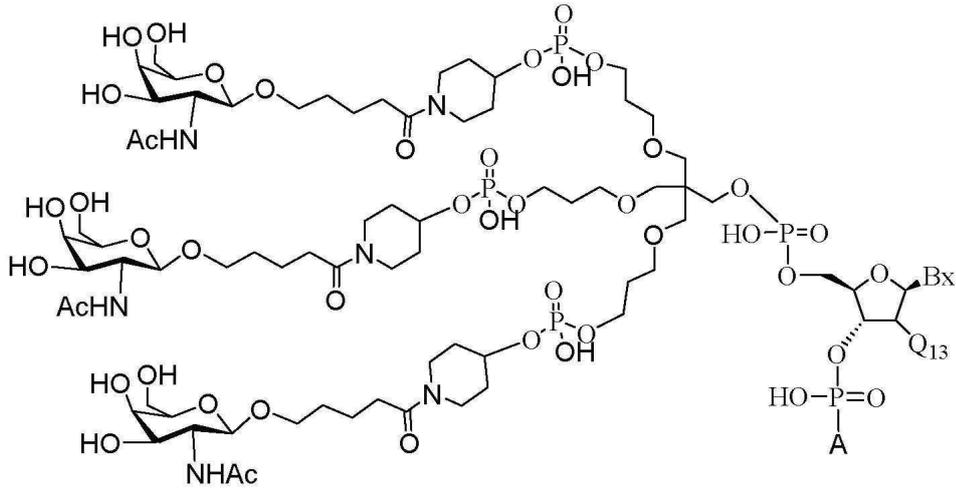
[0632]

[0633] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[0634] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[0635] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0636] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 구조를 갖는다:



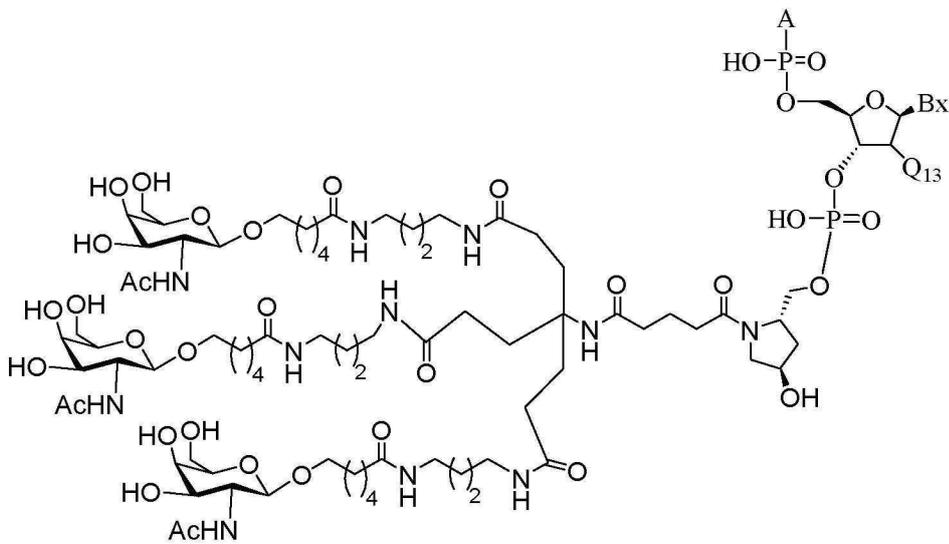
[0637]

[0638] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[0639] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[0640] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0641] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 구조를 갖는다:



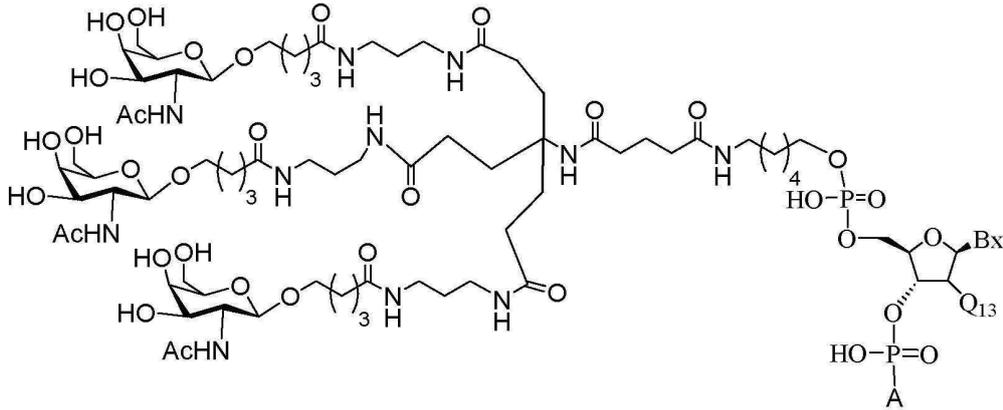
[0642]

[0643] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[0644] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[0645] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0646] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 구조를 갖는다:



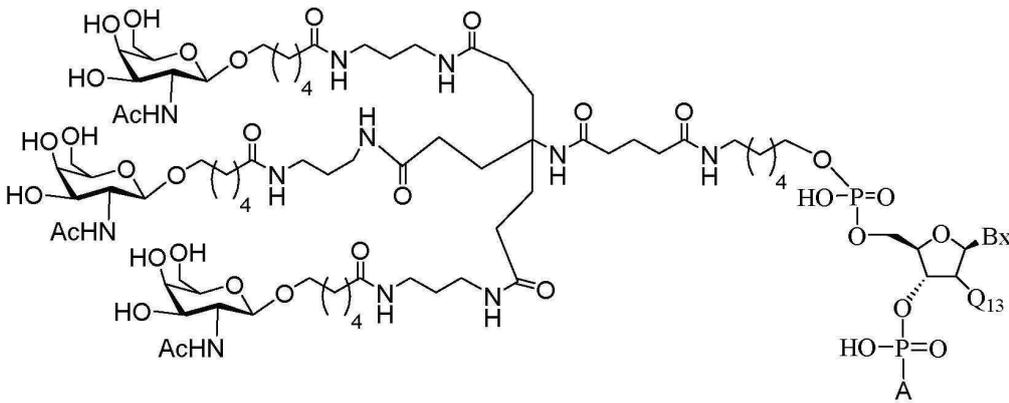
[0647]

[0648] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[0649] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[0650] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0651] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 구조를 갖는다:



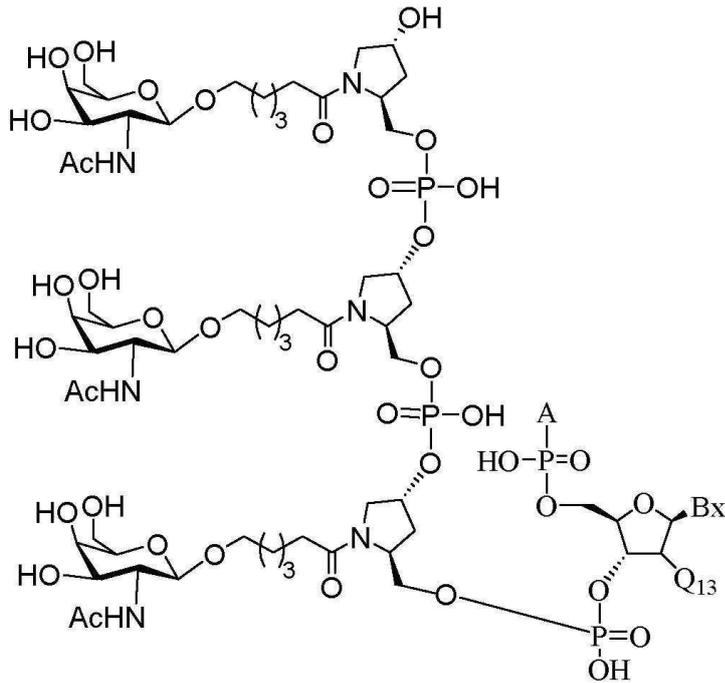
[0652]

[0653] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[0654] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[0655] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0656] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 구조를 갖는다:



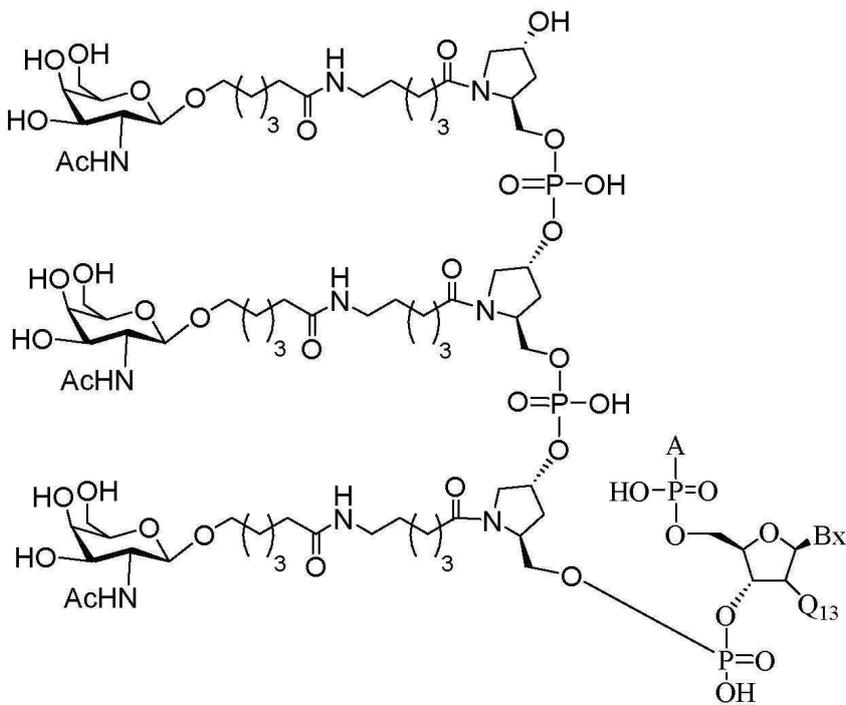
[0657]

[0658] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[0659] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[0660] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0661] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 구조를 갖는다:



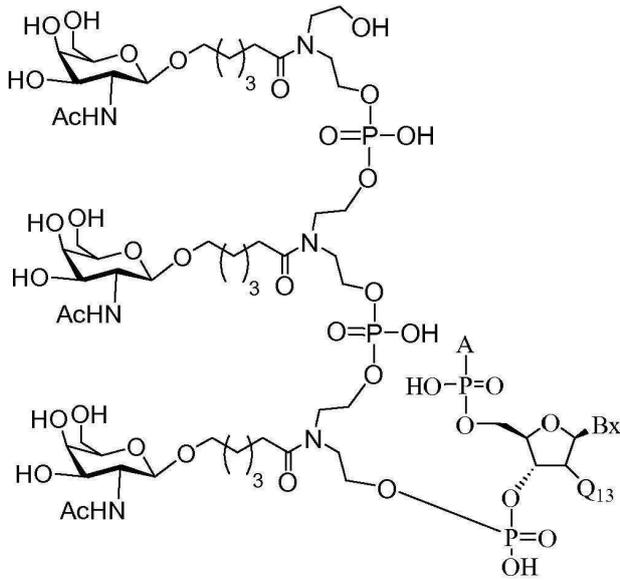
[0662]

[0663] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[0664] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[0665] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0666] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 구조를 갖는다:



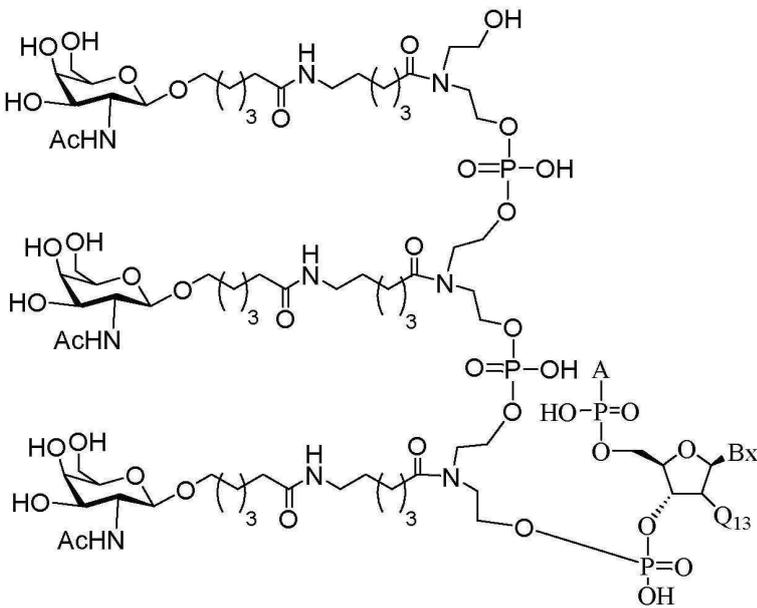
[0667]

[0668] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[0669] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[0670] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0671] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 구조를 갖는다:



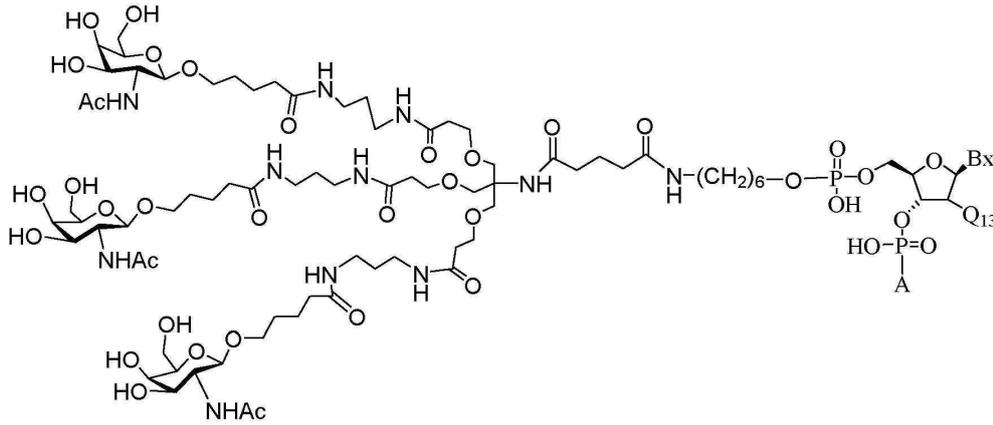
[0672]

[0673] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[0674] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[0675] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0676] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래를 포함한다:



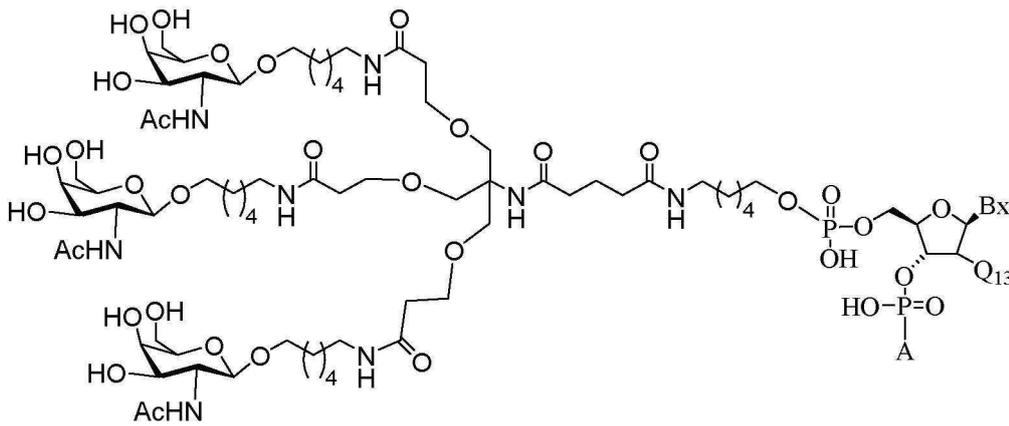
[0677]

[0678] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[0679] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[0680] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0681] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래를 포함한다:



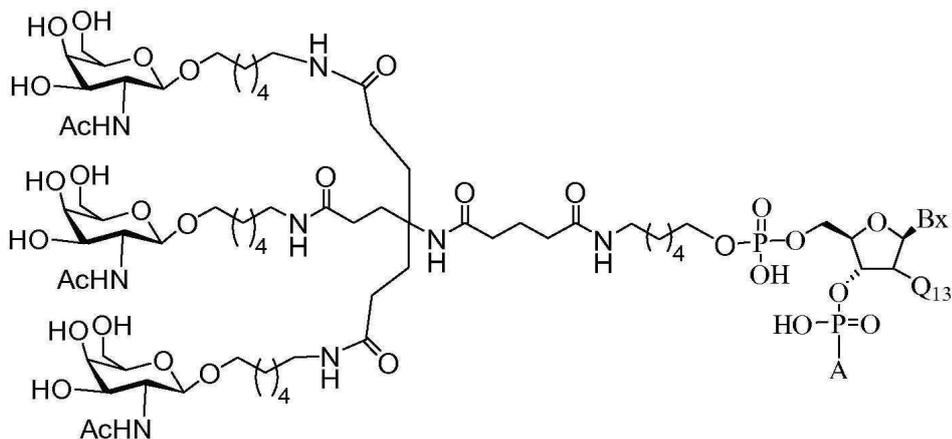
[0682]

[0683] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[0684] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[0685] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0686] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 아래를 포함한다:



[0687]

- [0688] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;
- [0689] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고
- [0690] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.
- [0691] 어떤 구현예에서, Bx는 아데닌, 구아닌, 티민, 우라실, 또는 시토신, 또는 5-메틸 시토신 중으로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, Bx는 아데닌이다. 어떤 구현예에서, Bx는 티민이다. 어떤 구현예에서, Q₁₃은 O(CH₂)₂-OCH₃이다. 어떤 구현예에서, Q₁₃은 H이다.
- [0692] 본 발명의 어떤 구현예는 본원에서 개시된 조성물 또는 화합물을 포함하는 전구약물을 제공한다.
- [0693] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 염 형태이다. 추가 구현예에서, 본 화합물은 추가로, 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다. 어떤 구현예에서, 상기 화합물은 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹, 또는 그것의 염, 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다.
- [0694] 어떤 구현예는 조성물 및 방법을 제공하고, 이 방법은 동물에게 본원에서 개시된 접합된 안티센스 화합물 또는 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 투여는 심혈관, 대사성 및/또는 염증성 질환을 예방, 치료, 개선하거나 그 진행을 느리게 한다.
- [0695] 어떤 구현예는 ApoCIII 관련된 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위해 치료에서 사용하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, ApoCIII 수준은 동물에서 상승된다. 어떤 구현예에서, 조성물은 ApoCIII 특이적 억제제를 포함하는 화합물이다. 어떤 구현예에서, ApoCIII 특이적 억제제는 핵산이다. 어떤 구현예에서, 핵산은 안티센스 화합물이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 ApoCIII를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트 그룹이다. 어떤 구현예에서, ApoCIII를 표적으로 하는 콘주게이트 그룹을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드는, 염증성, 심혈관 및/또는 대사성 질환, 장애 또는 병태를 치료, 예방, 그 진행을 느리게 하고, 그것을 개선하기 위해 사용된다. 어떤 구현예에서, 치료용 조성물 및 방법은 ApoCIII 특이적 억제제를 그것이 필요한 개체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0696] 어떤 구현예는 ApoCIII 수준을 감소시키기 위한 접합된 안티센스 화합물 및 조성물 및 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, ApoCIII 수준은 간, 지방 조직, 심장, 골격 근육 또는 작은 창자에서 감소된다.
- [0697] 어떤 구현예에서, 조직, 기관 또는 대상체에서의 ApoCIII 수준의 감소는 HDL 수준을 증가시킨다. 어떤 구현예에서, HDL 수준은 기준선 HDL 수준으로부터 적어도 90%, 적어도 80%, 적어도 70%, 적어도 60%, 적어도 50%, 적어도 45%, 적어도 40%, 적어도 35%, 적어도 30%, 적어도 25%, 적어도 20%, 적어도 15%, 적어도 10% 또는 적어도 5%까지 증가된다.
- [0698] 어떤 구현예에서, 조직, 기관 또는 대상체에서의 ApoCIII 수준의 감소는 TG 수준을 감소시킨다. 어떤 구현예에서, 대상체는 트리글리세라이드 수준 ≥ 100 mg/dL, ≥ 200 mg/dL, ≥ 300 mg/dL, ≥ 400 mg/dL, ≥ 440 mg/dL, ≥ 500 mg/dL, ≥ 600 mg/dL, ≥ 700 mg/dL, ≥ 800 mg/dL, ≥ 880 mg/dL, ≥ 900 mg/dL, ≥ 1000 mg/dL, ≥ 1100 mg/dL, ≥ 1200 mg/dL, ≥ 1300 mg/dL, ≥ 1400 mg/dL, ≥ 1500 mg/dL, ≥ 1600 mg/dL, ≥ 1700 mg/dL, ≥ 1800 mg/dL, ≥ 1900 mg/dL, ≥ 2000 mg/dL을 갖는다.
- [0699] 어떤 구현예에서, TG 수준 (식후의 또는 공복)은 기준선 TG 수준으로부터 적어도 90%, 적어도 80%, 적어도 70%, 적어도 60%, 적어도 50%, 적어도 45%, 적어도 40%, 적어도 35%, 적어도 30%, 적어도 25%, 적어도 20%, 적어도 15%, 적어도 10%, 적어도 5% 또는 적어도 1%까지 줄어든다. 어떤 구현예에서, TG (식후의 또는 공복) 수준은 ≤ 1900 mg/dL, ≤ 1800 mg/dL, ≤ 1700 mg/dL, ≤ 1600 mg/dL, ≤ 1500 mg/dL, ≤ 1400 mg/dL, ≤ 1300 mg/dL, ≤ 1200 mg/dL, ≤ 1100 mg/dL, ≤ 1000 mg/dL, ≤ 900 mg/dL, ≤ 800 mg/dL, ≤ 750 mg/dL, ≤ 700 mg/dL, ≤ 650 mg/dL, ≤ 600 mg/dL, ≤ 550 mg/dL, ≤ 500 mg/dL, ≤ 450 mg/dL, ≤ 400 mg/dL, ≤ 350 mg/dL, ≤ 300 mg/dL, ≤ 250 mg/dL, ≤ 200 mg/dL, ≤ 150 mg/dL 또는 ≤ 100 mg/dL로 줄어든다.
- [0700] 어떤 구현예에서, 조직, 기관 또는 대상체에서의 ApoCIII 수준의 감소는 LDL 대 HDL의 비 또는 TG 대 HDL의 비를 개선한다.
- [0701] 어떤 구현예에서, 조직, 기관 또는 대상체에서의 ApoCIII 수준의 감소는 인슐린 민감도를 개선한다.
- [0702] 어떤 구현예에서, 조직, 기관 또는 대상체에서의 ApoCIII 수준의 감소는 카일로마이크론 청소능을 증가시킨다.

- [0703] 어떤 구현에는 동물에서 ApoCIII mRNA 또는 단백질 발현을 감소시키기 위한 조성물 및 방법을 제공하고, 이 방법은 동물에서 ApoCIII mRNA 또는 단백질 발현을 감소시키기 위해 상기 동물에게 본원에서 개시된 접합된 안티센스 화합물 또는 조성물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0704] 어떤 구현에는 그것을 필요로 하는 대상체에서 ApoCIII 관련된 질환, 장애, 및 병태를 예방, 치료, 지연하거나, 그 진행을 느리게 하고/거나 그것을 개선하는 접합된 안티센스 화합물 및 조성물 및 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 질환, 장애, 및 병태는 염증성, 심혈관 및/또는 대사성 질환, 장애, 및 병태를 포함한다. 어떤 그와 같은 심혈관 질환, 장애 또는 병태는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 카일로마이크론혈증, 과트리글리세라이드혈증, 대동맥 협착증, 동맥류 (예를 들면, 복부 대동맥 동맥류), 협심증, 부정맥, 죽상동맥경화증, 뇌혈관 질환, 관상동맥 질환, 관상동맥 심장병, 이상지질혈증, 고콜레스테롤혈증, 고지혈증, 고혈압, 심근경색증, 말초혈관 질환 (예를 들면, 말초 동맥 질환, 말초 동맥 폐쇄성 질환), 프레드릭슨 제I형 이상지질혈증, FCS, LPL 결핍, 망막 혈관 폐색, 또는 뇌졸중. 어떤 그와 같은 대사성 질환, 장애 또는 병태는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 고혈당증, 전당뇨병, 당뇨병 (제I형 및 제II형), 비만, 인슐린 저항성, 대사성 증후군 및 당뇨병성 이상지질혈증. 어떤 그와 같은 염증성 질환, 장애 또는 병태는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 췌장염, 대동맥 협착증, 관상동맥 질환 (CAD), 알츠하이머병 및 혈전색전성 질환, 장애 또는 병태. 어떤 혈전색전성 질환, 장애 또는 병태는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 뇌졸중, 혈전증 (예를 들면, 정맥 혈전색전증), 심근경색증 및 말초혈관 질환. 어떤 구현에는 과트리글리세라이드혈증을 예방, 치료, 지연하거나, 그 진행을 느리게 하고/거나 그것을 개선하는 접합된 안티센스 화합물 및 조성물 및 방법을 제공한다. 어떤 구현에는 카일로마이크론혈증을 예방, 치료, 지연하거나, 그 진행을 느리게 하고/거나 그것을 개선하는 접합된 안티센스 화합물 및 조성물 및 방법을 제공한다. 어떤 구현에는 췌장염을 예방, 치료, 지연하거나, 그 진행을 느리게 하고/거나 그것을 개선하는 접합된 안티센스 화합물 및 조성물 및 방법을 제공한다.
- [0705] 어떤 구현에는 심혈관 질환, 장애 또는 병태 중 적어도 하나의 증상을 감소시키는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 증상은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 협심증, 가슴 통증, 숨가쁨, 심계항진, 약화, 현기증, 메스꺼움, 땀흘리기, 빈맥, 서맥, 부정맥, 심방세동, 하지의 팽윤, 청색증, 피로, 실신, 얼굴의 저림, 팔다리의 저림, 근육의 과행 또는 경련, 복부 팽만, 및 열. 어떤 구현예에서, 대사성 질환, 장애 또는 병태의 증상은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 빈번한 배뇨, 흔치않은 갈증, 극단적인 배고픔, 흔치않은 체중 감소, 극단적인 피로, i 자극감수성, 빈번한 감염, 흐릿한 시력, 치유가 더딘 자상/멍, 손/발의 따끔거림/저림 및 재발성 피부, 김, 또는 방광 감염. 어떤 구현에는 과트리글리세라이드혈증 중 적어도 하나의 증상을 감소시키는 방법을 제공한다. 어떤 구현에는 카일로마이크론혈증 중 적어도 하나의 증상을 감소시키는 방법을 제공한다. 어떤 구현에는 췌장염 중 적어도 하나의 증상을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0706] 어떤 구현예에서, ApoCIII의 조절 발현은 세포, 조직 또는 장기에서 일어난다. 어떤 구현예에서, 조절은 동물의 세포, 조직 또는 장기에서 일어난다. 어떤 구현예에서, 조절은 ApoCIII mRNA 수준의 감소이다. 어떤 구현예에서, 조절은 ApoCIII 단백질 수준의 감소이다. 어떤 구현예에서, ApoCIII mRNA 및 단백질 수준 둘 모두는 감소된다. 그와 같은 감소는 시간-의존적 방식 또는 용량-의존 방식으로 일어날 수 있다.
- [0707] 어떤 구현예에서, 대상체 또는 동물은 인간이다.
- [0708] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 비경구로 투여된다. 추가 구현예에서, 비경구 투여는 피하이다.
- [0709] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물 또는 조성물은 제 2 제제 또는 치료제와 공-투여된다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물 또는 조성물 및 제 2 제제는 함께 투여된다.
- [0710] 어떤 구현예에서, 제 2 제제는 글루코오스-저하제이다. 어떤 구현예에서, 제 2 제제는 LDL, TG 또는 콜레스테롤 저하제이다. 어떤 구현예에서, 제 2 제제는 항-염증제이다. 어떤 구현예에서, 제 2 제제는 알츠하이머 질환 약물이다. 어떤 구현예에서, 제 2 제제는, 비제한적으로, 하기일 수 있다: 비-스테로이드 항-염증성 약물 (NSAID 예를 들면, 아스피린), 니아신 (예를 들면, 니아스판), 니코틴산, apoB 억제제 (예를 들면, 미포메르센), CETP 억제제 (예를 들면, 아나세트라픽), apo(a) 억제제, 갑상선 호르몬 유사체 (예를 들면, 에프روت리움), HMG-CoA 환원효소 억제제 (예를 들면, 스타틴), 피브레이트 (예를 들면, 겐피프로질) 및 마이크로솜 트리글리세라이드 전이 단백질 억제제 (예를 들면, 로미타파이드). 제제 또는 치료제는 공-투여되거나 수반하여 투여될 수 있다. 제제 또는 치료제는 순차적으로 또는 차후에 투여될 수 있다.
- [0711] 어떤 구현에는 동물에서 ApoCIII 수준을 감소시키기 위한 ApoCIII에 대해 표적화된 본원에서 기재된 조성물 및 접합된 안티센스 화합물의 용도를 제공한다 for. 어떤 구현에는 동물에서 ApoCIII 수준을 감소시키기 위한

ApoCIII에 대해 표적화된 화합물의 용도를 제공한다. 어떤 구현예는 동물에서 HDL 수준을 증가시키기 위한 ApoCIII에 대해 표적화된 화합물의 용도를 제공한다. 어떤 구현예는 동물에서 HDL 카일로마이크론 청소능을 증가시키기 위한 ApoCIII에 대해 표적화된 화합물의 용도를 제공한다. 어떤 구현예는 ApoCIII과 연관된 질환, 장애, 또는 병태의 치료, 예방, 또는 개선을 위한 ApoCIII에 대해 표적화된 화합물의 용도를 제공한다. 어떤 구현예는 파트리글리세라이드혈증의 치료, 예방, 또는 개선을 위한 ApoCIII에 대해 표적화된 화합물의 용도를 제공한다. 어떤 구현예는 카일로마이크론혈증 (예를 들면, FCS 및/또는 LPLD)의 치료, 예방, 또는 개선을 위한 ApoCIII에 대해 표적화된 화합물의 용도를 제공한다. 어떤 구현예는 췌장염의 치료, 예방, 또는 개선을 위한 ApoCIII에 대해 표적화된 화합물의 용도를 제공한다.

[0712] 어떤 구현예는 동물에서 ApoCIII 수준을 감소시키는 약제의 제조에서의, ApoCIII에 대해 표적화된 본원에서 기재된 조성물 및 접합된 안티센스 화합물의 용도를 제공한다. 어떤 구현예는 ApoCIII과 연관된 질환, 장애, 또는 병태의 치료, 예방, 또는 개선용 약제의 제조를 위한 조성물 및 화합물의 용도를 제공한다.

[0713] 어떤 구현예는 ApoCIII와 관련된 질환 중 하나 이상을 치료, 개선, 지연 또는 예방하기 위한 약제의 제조에서의, 본원에서 기재된 조성물 및 접합된 안티센스 화합물의 용도를 제공한다.

[0714] 어떤 구현예는 본원에 기재된 바와 같은 질환, 장애 또는 병태를 치료, 예방 또는 개선하기 위한 키트를 제공하고, 상기 키트는 아래를 포함한다: (i) 본원에 기재된 바와 같은 ApoCIII 특이적 억제제; 및 임의로 (ii) 본원에 기재된 바와 같은 제 2 제제 또는 치료제.

[0715] 본 발명의 키트는 본원에 기재된 바와 같은 병용 치료에 의해 본원에 기재된 바와 같은 질환, 장애 또는 병태를 치료, 예방, 또는 개선하기 위해 키트를 사용하는 설명을 추가로 포함할 수 있다.

[0716] **B. 어떤 화합물**

[0717] 어떤 구현예에서, 본 발명은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트를 포함하는 접합된 안티센스 화합물을 제공한다.

[0718] **a. 어떤 안티센스 올리고뉴클레오타이드**

[0719] 어떤 구현예에서, 본 발명은 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 그와 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 연결된 뉴클레오사이드를 포함하고, 각각의 뉴클레오사이드는 당 모이어티 및 핵염기를 포함한다. 그와 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 구조는 화학적 특징에 관한 것으로 고려된다 (예를 들면, 변형 및 변형의 패턴) 및 핵염기 서열 (예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 서열, 표적 핵산의 동일성 및 서열).

[0720] **i. 어떤 화학 특징**

[0721] 어떤 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 1 이상의 변형을 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 1 이상의 변형된 뉴클레오사이드 및/또는 변형된 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 변형된 뉴클레오사이드는 변형된 당 모이어티 및/또는 변형된 핵염기를 포함한다.

[0722] **1. 어떤 당 모이어티**

[0723] 어떤 구현예에서, 개시내용의 화합물 변형된 당 모이어티를 포함하는 1 이상의 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 1 이상의 당-변형된 뉴클레오사이드를 포함하는 그와 같은 화합물은 자연 발생 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오사이드만을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 대해 바람직한 특성, 예컨대 증대된 뉴클레아제 안정성 또는 표적 핵산과의 증가된 결합 친화도를 가질 수 있다. 어떤 구현예에서, 변형된 당 모이어티는 치환된 당 모이어티이다. 어떤 구현예에서, 변형된 당 모이어티는 당 대응물이다. 그와 같은 당 대응물은 치환된 당 모이어티의 것에 상응하는 하나 이상의 치환을 포함할 수 있다.

[0724] 어떤 구현예에서, 변형된 당 모이어티는 2' 및/또는 5' 위치에서 치환기를 비제한적으로 포함하는, 1 이상의 비-브릿징 당 치환기를 포함하는 치환된 당 모이어티이다. 2'-위치에 적당한 당 치환기의 예는, 비제한적으로 하기를 포함한다: 2'-F, 2'-OCH₃ ("OMe" 또는 "O-메틸"), 및 2'-O(CH₂)₂OCH₃ ("MOE"). 어떤 구현예에서, 2'-위치에 있는 당 치환기는 알릴, 아미노, 아지도, 티오, O-알릴, O-C₁-C₁₀ 알킬, O-C₁-C₁₀ 치환된 알킬; OCF₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-O-N(Rm)(Rn), 및 O-CH₂-C(=O)-N(Rm)(Rn)로부터 선택되고, 여기서 각각의 Rm 및 Rn은, 독립적으로, H 또는 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬이다. 5'-위치에 있는 당 치환기의 예는, 비제한적으로 하기를 포함한다: 5'-메틸 (R 또는 S); 5'-비닐, 및 5'-메톡시. 어떤 구현예에서, 치환된 당류는 1 초과 비-브릿징 당

치환기, 예를 들면, 2'-F-5'-메틸 당 모이어티를 포함한다 (참고, 추가의 5', 2'-비스 치환된 당 모이어티 및 뉴클레오사이드에 대해 예를 들면, PCT 국제 출원 WO 2008/101157).

[0725] 2'-치환된 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오사이드는 2'-치환된 뉴클레오사이드로 불린다. 어떤 구현예에서, 2'- 치환된 뉴클레오사이드는 할로, 알릴, 아미노, 아지도, SH, CN, OCN, CF₃, OCF₃, O, S, 또는 N(R_m)-알킬; O, S, 또는 N(R_m)-알케닐; O, S 또는 N(R_m)-알킬닐; O-알킬레닐-O-알킬, 알킬닐, 알카릴, 아랄킬, O-알카릴, O-아랄킬, O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) 또는 O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n) 로부터 선택된 2'-치환기 그룹을 포함하고, 여기서 각각의 R_m 및 R_n은, 독립적으로, H, 아미노 보호 그룹 또는 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬이다. 이들 2'-치환기 그룹은 하이드록실, 아미노, 알콕시, 카복시, 벤질, 페닐, 니트로 (NO₂), 티올, 티오알콕시 (S-알킬), 할로젠, 알킬, 아릴, 알케닐 및 알킬닐로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환체 그룹으로 추가로 치환될 수 있다.

[0726] 어떤 구현예에서, 2'- 치환된 뉴클레오사이드는 F, NH₂, N₃, OCF₃, O-CH₃, O(CH₂)₃NH₂, CH₂-CH=CH₂, O-CH₂-CH=CH₂, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂, 및 N-치환된 아세트아미드 (O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n) 로부터 선택된 2'-치환기 그룹을 포함하고, 여기서 각각의 R_m 및 R_n은, 독립적으로, H, 아미노 보호 그룹 또는 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬이다.

[0727] 어떤 구현예에서, 2'- 치환된 뉴클레오사이드는 F, OCF₃, O-CH₃, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(CH₃)₂, -O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂, 및 O-CH₂-C(=O)-N(H)CH₃ 로부터 선택된 2'-치환기 그룹을 포함하는 당 모이어티를 포함한다.

[0728] 어떤 구현예에서, 2'- 치환된 뉴클레오사이드는 F, O-CH₃, 및 OCH₂CH₂OCH₃ 로부터 선택된 2'-치환기 그룹을 포함하는 당 모이어티를 포함한다.

[0729] 어떤 변형된 당 모이어티는 바이사이클릭 당 모이어티가 생기는 제 2 고리를 형성하는 브릿징 당 치환기를 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 바이사이클릭 당 모이어티는 4' 및 2' 푸라노스 고리 원자 사이의 브릿지를 포함한다. 그와 같은 4' 내지 2' 당 치환기의 예는, 비제한적으로 하기를 포함한다: -[C(R_a)(R_b)]_n-, -[C(R_a)(R_b)]_n-O-, -C(R_aR_b)-N(R)-O- 또는, -C(R_aR_b)-O-N(R)-; 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', . 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (cEt) 및 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2', 및 그것의 유사체 (참고, 예를 들면, U.S. 특허 7,399,845, 2008년 7월 15일 발표); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' 및 그것의 유사체, (참고, 예를 들면, WO2009/006478, 2009년 1월 8일 공개); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' 및 그것의 유사체 (참고, 예를 들면, WO2008/150729, 2008년 12월 11일 공개); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (참고, 예를 들면, US2004/0171570, 2004년 9월 2일 공개); 4'-CH₂-O-N(R)-2', 및 4'-CH₂-N(R)-O-2', 여기서 각각의 R는, 독립적으로, H, 보호 그룹, 또는 C₁-C₁₂ 알킬; 4'-CH₂-N(R)-O-2'이고, 여기서 R은 H, C₁-C₁₂ 알킬, 또는 보호 그룹이다 (참고, U.S. 특허 7,427,672, 2008년 9월 23일 발표); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (참고, 예를 들면, Chattopadhyaya, 등, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); 및 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' 및 그것의 유사체 (참고, 공개된 PCT 국제 출원 WO 2008/154401, 2008년 9월 8일 공개).

[0730] 어떤 구현예에서, 그와 같은 4' 내지 2' 브릿지는 -[C(R_a)(R_b)]_n-, -C(R_a)=C(R_b)-, -C(R_a)=N-, -C(=NR_a)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R_a)₂-, -S(=O)_x-, 및 -N(R_a)-로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4 개의 연결된 그룹을 독립적으로 포함하고;

[0731] 여기서:

[0732] x는 0, 1, 또는 2이고;

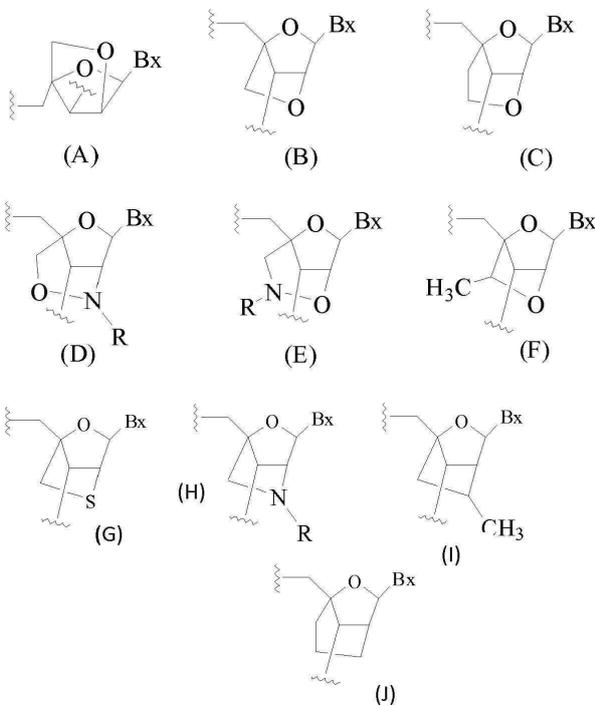
[0733] n은 1, 2, 3, 또는 4이고;

[0734] 각각의 R_a 및 R_b은, 독립적으로, H, 보호 그룹, 하이드록실, C₁-C₁₂ 알킬, 치환된 C₁-C₁₂ 알킬, C₂-C₁₂ 알케닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알케닐, C₂-C₁₂ 알킬닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알킬닐, C₅-C₂₀ 아릴, 치환된 C₅-C₂₀ 아릴, 헤테로사이클

라디칼, 치환된 헤테로사이클 라디칼, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, C₅-C₇ 지환족 라디칼, 치환된 C₅-C₇ 지환족 라디칼, 할로젠, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, 아실 (C(=O)-H), 치환된 아실, CN, 설폰닐 (S(=O)₂-J₁), 또는 설폭실 (S(=O)-J₁)이고; 그리고

[0735] 각각의 J₁ 및 J₂은, 독립적으로, H, C₁-C₁₂ 알킬, 치환된 C₁-C₁₂ 알킬, C₂-C₁₂ 알케닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알케닐, C₂-C₁₂ 알키닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알키닐, C₅-C₂₀ 아릴, 치환된 C₅-C₂₀ 아릴, 아실 (C(=O)-H), 치환된 아실, 헤테로사이클 라디칼, 치환된 헤테로사이클 라디칼, C₁-C₁₂ 아미노알킬, 치환된 C₁-C₁₂ 아미노알킬, 또는 보호 그룹이다.

[0736] 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오사이드는 바이사이클릭 뉴클레오사이드 또는 BNA로 불린다. 바이사이클릭 뉴클레오사이드는, 이하에서 묘사된 바와 같이 비제한적으로, 하기를 포함한다: (A) α-L-메틸렌옥시 (4'-CH₂-O-2') BNA, (B) β-D-메틸렌옥시 (4'-CH₂-O-2') BNA (또한 일명 잠겨진 핵산 또는 LNA), (C) 에틸렌 옥시 (4'-((CH₂)₂-O-2') BNA, (D) 아미노옥시 (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA, (E) 옥시아미노 (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA, (F) 메틸(메틸렌옥시) (4'-CH(CH₃)-O-2') BNA (또한 일명 구속된 에틸 또는 cEt), (G) 메틸렌-thio (4'-CH₂-S-2') BNA, (H) 메틸렌-아미노 (4'-CH₂-N(R)-2') BNA, (I) 메틸 카보사이클릭 (4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA, 및 (J) 프로필렌 카보사이클릭 (4'-((CH₂)₃-2') BNA.



[0737]

[0738] 여기서 Bx는 핵염기 모이어티이고 R은, 독립적으로, H, 보호 그룹, 또는 C₁-C₁₂ 알킬이다.

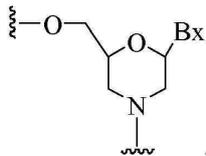
[0739] 추가의 바이사이클릭 당 모이어티는 하기의 예와 같은 당해기술에 공지되어 있다: Singh 등, *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456; Koshkin 등, *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, 97, 5633-5638; Kumar 등, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222; Singh 등, *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039; Srivastava 등, *J. Am. Chem. Soc.*, 129(26) 8362-8379 (Jul. 4, 2007); Elayadi 등, *Curr. Opinion Invens. Drugs*, 2001, 2, 558-561; Braasch 등, *Chem. Biol.*, 2001, 8, 1-7; Orum 등, *Curr. Opinion Mol. Ther.*, 2001, 3, 239-243; U.S. 특허 번호 7,053,207, 6,268,490, 6,770,748, 6,794,499, 7,034,133, 6,525,191, 6,670,461, 및 7,399,845; WO 2004/106356, WO 1994/14226, WO 2005/021570, 및 WO 2007/134181; U.S. 특허 공보 번호 US2004/0171570, US2007/0287831, 및 US2008/0039618; U.S. 특허 시리즈 번호 12/129,154, 60/989,574, 61/026,995, 61/026,998, 61/056,564, 61/086,231, 61/097,787, 및 61/099,844; 및 PCT 국제 출원 번호 PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154, 및 PCT/US2008/068922.

[0740] 어떤 구현예에서, 바이사이클릭 당 모이어티 및 그와 같은 바이사이클릭 당 모이어티를 편입시키는 뉴클레오사이드는 이성질체 배치에 의해 추가로 규정된다. 예를 들면, 4'-2' 메틸렌-옥시 브릿지를 포함하는 뉴클레오사이드는, α-L 배치 또는 β-D 배치로 존재한다. 이전에, α-L-메틸렌옥시 (4'-CH₂-O-2') 바이사이클릭 뉴클레오사이드는 안티센스 활성을 보여준 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 편입되었다 (Frieden 등, *Nucleic Acids Research*, 2003, 21, 6365-6372).

[0741] 어떤 구현예에서, 치환된 당 모이어티는 1 이상의 비-브릿징 당 치환기 및 1 이상의 브릿징 당 치환기를 포함한다 (예를 들면, 5'-치환된 및 4'-2' 다리걸친 당류). (참고, PCT 국제 출원 WO 2007/134181, 11/22/07 공개, 여기서 LNA는 예를 들면, 5'-메틸 또는 5'-비닐 그룹으로 치환됨).

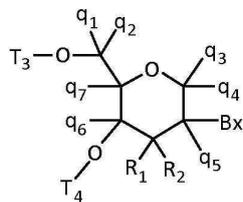
[0742] 어떤 구현예에서, 변형된 당 모이어티는 당 대용물이다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 자연 발생 당의 산소 원자는 치환되고, 예를 들면, 황, 탄소 또는 질소 원자로 치환된다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 그와 같은 변형된 당 모이어티는 상기에서 기재된 바와 같이 브릿징 및/또는 비-브릿징 치환기를 또한 포함한다. 예를 들면, 어떤 당 대용물은 2'-위치에서 (참고, 예를 들면, 공개된 미국 특허 출원 US2005/0130923, 2005년 6월 16일 공개) 및/또는 5' 위치에서 4'-황 원자 및 치환을 포함한다. 추가적인 예로써, 4'-2' 브릿지를 갖는 카보사이클릭 바이사이클릭 뉴클레오사이드가 기재되었다 (참고, 예를 들면, Freier 등, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4429-4443 및 Albaek 등, *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731-7740).

[0743] 어떤 구현예에서, 당 대용물은 5-원자 이외 것을 갖는 고리를 포함한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 당 대용물은 모폴리노를 포함한다. 모폴리노 화합물 및 올리고머 화합물 중 그것의 용도는 수많은 특허들 및 공개된 물품에서 보고되었다 (참고 예를 들면: Braasch 등, *Biochemistry*, 2002, 41, 4503-4510; 및 미국 특허들 5,698,685; 5,166,315; 5,185,444; 및 5,034,506). 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "모폴리노"는 하기 구조를 갖는 당 대용물을 의미한다:



[0744] 어떤 구현예에서, 모폴리노는, 상기 모폴리노 구조로부터의 다양한 치환기 그룹을 부가하거나 변경시킴으로써 변형될 수 있다. 그와 같은 당 대용물은 본원에서 "변형된 모폴리노"라 칭한다.

[0746] 또 하나의 예에 대해, 어떤 구현예에서, 당 대용물은 6-원 테트라하이드로피란을 포함한다. 그와 같은 테트라하이드로피란은 추가로 변형 또는 치환될 수 있다. 그와 같은 변형된 테트라하이드로피란을 포함하는 뉴클레오사이드는, 비제한적으로 하기를 포함한다: 헥시톨 핵산 (HNA), 아니톨 핵산 (ANA), 만니톨 핵산 (MNA) (참고 Leumann, C.J. *Bioorg. & Med. Chem.* (2002) 10:841-854), 플루오로 HNA (F-HNA), 및 식 VI을 갖는 화합물들:



VI

[0747] 여기서 독립적으로 식 VI의 각각의 상기 적어도 하나의 테트라하이드로피란 뉴클레오사이드 유사체에 대해 Bx는 핵염기 모이어티이고;

[0750] T₃ 및 T₄ 각각은, 독립적으로, 테트라하이드로피란 뉴클레오사이드 유사체를 안티센스 화합물에 연결하는 뉴클레오사이드간 연결 그룹이거나, T₃ 및 T₄ 중 하나는 테트라하이드로피란 뉴클레오사이드 유사체를 안티센스 화합물에 연결하는 뉴클레오사이드간 연결 그룹이고 T₃ 및 T₄ 중 다른 것은 H, 하이드록실 보호 그룹, 연결된 콘주게이트 그룹, 또는 5' 또는 3'-말단기이고;

- [0751] $q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6$ 및 q_7 각각은, 독립적으로, H, C_1-C_6 알킬, 치환된 C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐, 치환된 C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, 또는 치환된 C_2-C_6 알키닐이고; 그리고
- [0752] 각각의 R_1 및 R_2 는 하기: 수소, 할로젠, 치환된 또는 비치환된 알콕시, NJ_1J_2 , SJ_1 , N_3 , $OC(=X)J_1$, $OC(=X)NJ_1J_2$, $NJ_3C(=X)NJ_1J_2$, 및 CN 중으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 X은 O, S 또는 NJ_1 이고, 각각의 J_1, J_2 , 및 J_3 은, 독립적으로, H 또는 C_1-C_6 알킬이다.
- [0753] 어떤 구현예에서, 식 VI의 변형된 THP 뉴클레오사이드가 제공되고, 여기서 $q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6$ 및 q_7 각각은 H이다. 어떤 구현예에서, $q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6$ 및 q_7 중 적어도 하나는 H 이외의 것이다. 어떤 구현예에서, $q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6$ 및 q_7 중 적어도 하나는 메틸이다. 어떤 구현예에서, 식 VI의 THP 뉴클레오사이드가 제공되고 여기서 R_1 및 R_2 중 하나는 F이다. 어떤 구현예에서, R_1 은 플루오로이고 R_2 은 H이고, R_1 은 메톡시이고 R_2 은 H이고, R_1 은 메톡시에톡시이고 R_2 은 H이다.
- [0754] 많은 다른 바이사이클로 및 트리사이클로 당 대용물 고리계는 안티센스 화합물에 혼합시키기 위해 뉴클레오사이드를 변형시키기 위해 사용될 수 있는 당해기술에서 또한 공지되어 있다 (참고, 예를 들면, 하기 논문 검토: Leumann, J. C, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2002**, *10*, 841-854).
- [0755] 하기와 같은 변형의 조합이 또한 비제한적으로 제공된다: 2'-F-5'-메틸 치환된 뉴클레오사이드 (참고 다른 개시된 5', 2'-비스 치환된 뉴클레오사이드에 대해 8/21/08에 공개된 PCT 국제 출원 WO 2008/101157) 및 2'-위치에서의 리보실 고리 산소 원자 대신에 S에 의한 대체 및 추가 치환 (참고 2005년 6월 16일에 공개된 미국 특허 출원 US2005-0130923) 또는 대안적으로 바이사이클릭 핵산의 5'-치환 (참고 11/22/07에 공개된 PCT 국제 출원 WO 2007/134181, 여기서 4'- CH_2-O-2' 바이사이클릭 뉴클레오사이드는 5' 위치에서 5'-메틸 또는 5'-비닐 그룹로 추가로 치환된다). 올리고머화에 의한 카보사이클릭 바이사이클릭 뉴클레오사이드의 합성 및 제조 및 생화학 연구는 하기에서 또한 기재되었다: (참고, 예를 들면, Srivastava 등, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, *129*(26), 8362-8379).
- [0756] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 변형된 뉴클레오사이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 이들 변형된 뉴클레오타이드는 변형된 당, 변형된 핵염기, 및/또는 변형된 연결을 포함할 수 있다. 특이적 변형은, 수득한 올리고뉴클레오타이드가 바람직한 특성을 갖도록 선택된다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 1 이상의 RNA-유사 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 1 이상의 DNA-유사 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0757] **2. 어떤 핵염기 변형**
- [0758] 어떤 구현예에서, 본 개시내용의 뉴클레오사이드는 1 이상의 비변형된 핵염기를 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 개시내용의 뉴클레오사이드는 1 이상의 변형된 핵염기를 포함한다.
- [0759] 어떤 구현예에서, 변형된 핵염기는 하기로부터 선택된다: 본원에서 규정된 바와 같은 보편적인 염기, 소수성 염기, 부정확한 염기, 크기-확장된 염기, 및 플루오르화된 염기. 본원에서 규정된 바와 같이 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및, 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실을 포함하는 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린; 5-프로피닐시토신; 5-하이드록시메틸 시토신, 잔틴, 하이포잔틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 다른 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐 ($-C\equiv C-CH_3$) 우라실 및 시토신 및 피리미딘계의 다른 알키닐 유도체, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실 (슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2-아미노-아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌, 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌, 보편적인 염기, 소수성 염기, 부정확한 염기, 크기-확장된 염기, 및 플루오르화된 염기. 추가의 변형된 핵염기는 하기를 포함한다: 트리사이클릭 피리미딘 예컨대 펜옥사진 시티딘([5,4-b][1,4]벤조자진-2(3H)-온), 페노티아진 시티딘 (1H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조티아진-2(3H)-온), G-c랩프 예컨대 치환된 펜옥사진 시티딘 (예를 들면 9-(2-아미노에톡시)-H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조자진-2(3H)-온), 카바졸 시티딘 (2H-피리미도[4,5-b]인돌-2-온), 피리도인돌 시티딘 (H-피리도[3',2':4,5]피롤로[2,3-d]피리미딘-2-온). 변형된 핵염기는, 퓨린 또는 피리미딘 염기가 다른 헤테로사이

클, 예를 들면 7-테아자-아데닌, 7-테아자구아노신, 2-아미노피리딘 및 2-피리돈으로 대체될 것을 또한 포함할 수 있다. 추가의 핵염기는 하기를 포함한다: 미국 특허 번호 3,687,808에서 개시된 것, *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science 및 Engineering*, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859 에서 개시된 것; Englisch 등, *Angewandte Chemie*, International Edition, 1991, 30, 613에 의해 개시된 것; 및 Sanghvi, Y.S., Chapter 15, *Antisense Research and Applications*, Crooke, S.T. 및 Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, 273-288에 의해 개시된 것.

[0760] 상기 언급된 변형된 핵염기 뿐만 아니라 다른 변형된 핵염기 중 어떤 것의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허들은 비제한적으로, U.S. 3,687,808; 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,681,941; 5,750,692; 5,763,588; 5,830,653 및 6,005,096를 포함하고, 이들중 어떤 것은 통상적으로 본원과 함께 소유되고, 이들 각각은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있다.

[0761] **3. 어떤 뉴클레오사이드간 연결**

[0762] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 연결된 뉴클레오사이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 그와 같은 구현예에서, 뉴클레오사이드는 임의 뉴클레오사이드간 연결을 사용하여 함께 연결될 수 있다. 뉴클레오사이드간 연결 그룹의 2 개의 주요 클래스는 인 원자의 존재 또는 부재에 의해 규정된다. 뉴클레오사이드간 연결을 함유하는 대표적인 인은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 포스포디에스테르 (PO), 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트, 및 포스포로티오에이트 (PS). 뉴클레오사이드간 연결 그룹을 함유하는 대표적인 비-인은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 메틸렌메틸이미노 (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-), 티오디에스테르 (-O-C(O)-S-), 티오노카바메이트 (-O-C(O)(NH)-S-); 실록산 (-O-Si(H)₂-O-); 및 N, N'-디메틸하이드라진 (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-). 천연 포스포디에스테르 연결과 비교된 변형된 연결은, 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레아제 저항성을 변형하기 위해, 전형적으로 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 어떤 구현예에서, 키랄 원자를 갖는 뉴클레오사이드간 연결은 라세미 혼합물로서, 또는 별개의 거울상이성질체로서 제조될 수 있다. 대표적인 키랄 연결, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 알킬포스포네이트 및 포스포로티오에이트. 인-함유 및 비-인-함유 뉴클레오사이드간 연결의 제조 방법은 당해분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다.

[0763] 본원에서 기재된 올리고뉴클레오타이드는 1 이상의 비대칭 중심을 함유하고 따라서 거울상이성질체, 부분입체 이성질체, 및 다른 입체이성질체 배치를 생기해 하고 이것은 당 아노머에 대해서와 같이 (R) 또는 (S), α 또는 β, 또는 아미노산 등에 대해서와 같이 (D) 또는 (L)로서 절대적인 입체화학에 관하여 규정될 수 있다. 본원에서 제공된 안티센스 화합물 내에 모든 그와 같은 가능한 이성질체, 뿐만 아니라 그것의 라세미 및 광학적으로 순수한 형태가 포함된다.

[0764] 중성 뉴클레오사이드간 연결은 비제한적으로, 하기를 포함한다: 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, MMI (3'-CH₂-N(CH₃)-O-5'), 아미드-3 (3'-CH₂-C(=O)-N(H)-5'), 아미드-4 (3'-CH₂-N(H)-C(=O)-5'), 포름아세탈 (3'-O-CH₂-O-5'), 및 티오포름아세탈 (3'-S-CH₂-O-5'). 추가의 중성 뉴클레오사이드간 연결은 실록산 (디알킬실록산), 카복실레이트 에스테르, 카복사마이드, 설페이드, 설포네이트 에스테르 및 아미드를 포함하는 비이온성 연결을 포함한다 (참고 예를 들면: *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*; Y.S. Sanghvi 및 P.D. Cook, Eds., ACS Symposium 시리즈 580; Chapters 3 및 4, 40-65). 추가의 중성 뉴클레오사이드간 연결은 혼합된 N, O, S 및 CH₂ 성분 부분을 포함하는 비이온성 연결을 포함한다.

[0765] **4. 어떤 모티프**

[0766] 어떤 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 1 이상의 변형된 뉴클레오사이드 (예를 들면, 변형된 당 및/또는 변형된 핵염기를 포함하는 뉴클레오사이드) 및/또는 1 이상의 변형된 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드에 대한 그와 같은 변형의 패턴은 모티프로서 칭한다. 어떤 구현예에서, 당, 핵염기, 및 연결 모티프는 서로 독립적이다.

[0767] **a. 어떤 당 모티프**

[0768] 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 규정된 패턴 또는 당 변형 모티프 중 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 영역을 다라 배열된 1 이상의 유형의 변형된 당 모이어티 및/또는 자연 발생 당 모이어티를 포함한다. 그와 같은 모티프는 본원에서 논의된 당 변형 및/또는 다른 공지된 당 변형 중 임의 것을 포함할 수 있다.

[0769] 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 2 개의 외부 영역 또는 "윙" 및 중심 또는 내부 영역 또는 "갭"을 포함하는 갭머 당 모티프를 갖는 영역을 포함하거나 그것으로 구성된다. 갭머 당 모티프의 3 개의 영역 (5'-윙, 갭, 및 3'-윙)은 뉴클레오타이드의 인접 서열을 형성하고, 여기서 각각의 윙의 뉴클레오타이드의 당 모이어티의 적어도 일부는 갭의 뉴클레오타이드의 당 모이어티의 적어도 일부와 상이하다. 특히적으로, 갭에 아주 가까운 각각의 윙의 뉴클레오타이드 (5'-윙의 3'-대부분 뉴클레오타이드 및 3'-윙의 5'-대부분 뉴클레오타이드)의 적어도 당 모이어티는 인접하는 갭 뉴클레오타이드의 당 모이어티와 상이하고, 따라서 윙과 갭 사이의 경계를 규정한다. 어떤 구현예에서, 갭 내의 당 모이어티는 서로 동일하다. 어떤 구현예에서, 갭은 1 이상의 다른 갭의 뉴클레오타이드의 당 모이어티와 상이한 당 모이어티를 갖는 1 이상의 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 2 개의 윙의 당 모티프는 서로 동일하다 (대칭 당 갭머). 어떤 구현예에서, 5'-윙의 당 모티프는 3'-윙의 당 모티프와 상이하다 (비대칭 당 갭머).

[0770] i. 어떤 5'-윙

[0771] 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 1 내지 8 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 1 내지 7 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 1 내지 6 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 1 내지 5 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 2 내지 5 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 3 내지 5 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 4 또는 5 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 1 내지 4 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 1 내지 3 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 1 또는 2 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 2 내지 4 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 2 또는 3 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 3 또는 4 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 1 개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 2 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 3 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 4 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 5 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 6 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다.

[0772] 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 적어도 하나의 바이사이클릭 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 적어도 2 바이사이클릭 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 적어도 3 바이사이클릭 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 적어도 4 바이사이클릭 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 적어도 하나의 구속된 에틸 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 적어도 하나의 LNA 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙의 각각의 뉴클레오타이드는 바이사이클릭 뉴클레오타이드이다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙의 각각의 뉴클레오타이드는 구속된 에틸 뉴클레오타이드이다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙의 각각의 뉴클레오타이드는 LNA 뉴클레오타이드이다.

[0773] 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 적어도 하나의 비-바이사이클릭 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 적어도 하나의 2'-치환된 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 적어도 하나의 2'-MOE 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 적어도 하나의 2'-OMe 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙의 각각의 뉴클레오타이드는 비-바이사이클릭 변형된 뉴클레오타이드이다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙의 각각의 뉴클레오타이드는 2'-치환된 뉴클레오타이드이다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙의 각각의 뉴클레오타이드는 2'-MOE 뉴클레오타이드이다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙의 각각의 뉴클레오타이드는 2'-OMe 뉴클레오타이드이다.

[0774] 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 적어도 하나의 2'-데옥시뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙의 각각의 뉴클레오타이드는 2'-데옥시뉴클레오타이드이다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 적어도 하나의 리보뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙의 각각의 뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드이다. 어떤 구현예에서, 5'-윙의 1, 1 초과, 또는 각각의 뉴클레오타이드는 RNA-유사 뉴클레오타이드이다.

[0775] 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 적어도 하나의 바이사이클릭 뉴클레오타이드 및 적어도 하나의 비-바이사이클릭 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 적어도 하나의 바이사이클릭 뉴클레오

클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 7 내지 10 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 7 내지 9 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 7 또는 8 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 8 내지 10 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 8 또는 9 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 6 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 7 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 8 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 9 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 10 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 11 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 12 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다.

[0791] 어떤 구현예에서, 각각의 갭의 뉴클레오사이드머의 갭은 2'-데옥시뉴클레오사이드이다. 어떤 구현예에서, 갭은 1 이상의 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 각각의 갭의 뉴클레오사이드머의 갭은 2'-데옥시뉴클레오사이드이거나 "DNA-유사"인 변형된 뉴클레오사이드이다. 그와 같은 구현예에서, "DNA-유사"는, 뉴클레오사이드가 DNA에 대해 유사한 특성을 갖는다는 것을 의미하고, 이로써 갭머 및 RNA 분자를 포함하는 듀플렉스는 RNase H를 활성화할 수 있다. 예를 들면, 어떤 조건 하에서, 2'-(ara)-F는 RNase H 활성화를 지지하는 것으로 보여졌고, 따라서 DNA-유사이다. 어떤 구현예에서, 1 이상의 갭의 뉴클레오사이드머의 갭은 2'-데옥시뉴클레오사이드가 아니고 DNA-유사가 아니다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 갭머는, 그럼에도 불구하고, (예를 들면, 비-DNA 뉴클레오사이드의 수 또는 배치에 의해) RNase H 활성화를 지지한다.

[0792] 어떤 구현예에서, 갭은 1 이상의 변형된 뉴클레오사이드에 의해 방해된 비변형된 2'-데옥시뉴클레오사이드의 스트레치를 포함하고, 따라서 3 개의 아-영역 (1 이상의 2'-데옥시뉴클레오사이드의 2 개의 스트레치 및 1 이상의 차단 변형된 뉴클레오사이드의 스트레치)가 생긴다. 어떤 구현예에서, 비변형된 2'-데옥시뉴클레오사이드의 스트레치는 5, 6, 또는 7 개의 뉴클레오사이드보다 더 길지 않다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 짧은 스트레치는 짧은 갭 영역을 사용하여 달성된다. 어떤 구현예에서, 짧은 스트레치는 더 긴 갭 영역을 차단하여 달성된다.

[0793] 어떤 구현예에서, 갭은 1 이상의 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭은 cEt, FHNA, LNA, 및 2-티오-티미딘 중으로부터 선택된 1 이상의 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭은 1 개의 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭은 5'-Me, 및 5'-(R)-Me 중으로부터 선택된 5'-치환된 당 모이어티를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭은 2 개의 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭은 3 개의 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭은 4 개의 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭은 2 이상의 변형된 뉴클레오사이드를 포함하고 각각의 변형된 뉴클레오사이드는 동일하다. 어떤 구현예에서, 갭은 2 이상의 변형된 뉴클레오사이드를 포함하고 각각의 변형된 뉴클레오사이드는 상이하다.

[0794] 어떤 구현예에서, 갭은 1 이상의 변형된 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭은 1 이상의 메틸 포스포네이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서 갭은 2 이상의 변형된 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭은 1 이상의 변형된 연결 및 1 이상의 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭은 1 개의 변형된 연결 및 1 개의 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭은 2 개의 변형된 연결 및 2 이상의 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다.

[0795] **b. 어떤 뉴클레오사이드간 연결 모티프**

[0796] 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 규정된 패턴 또는 변형된 뉴클레오사이드간 연결 모티프에서 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 영역을 따라 배열된 변형된 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 교대 뉴클레오사이드간 연결 모티프를 갖는 영역을 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드는 균일하게 변형된 뉴클레오사이드간 연결의 영역을 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결에 의해 균일하게 연결된 영역을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결에 의해 균일하게 연결된다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 각각의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 각각의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트로부터 선택되고 적어도 하나의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트이다.

[0797] 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 6 개의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 7 개의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포

함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 8 개의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 9 개의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 10 개의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 11 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 12 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 13 개의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 14 개의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다.

[0798] 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 6 개의 연속되는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결의 적어도 하나의 블록을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 7 개의 연속되는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결의 적어도 하나의 블록을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 8 개의 연속되는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결의 적어도 하나의 블록을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 9 개의 연속되는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결의 적어도 하나의 블록을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 10 개의 연속되는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결의 적어도 하나의 블록을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 12 개의 연속되는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결의 적어도 하나의 블록을 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 적어도 하나의 그와 같은 블록은 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 위치한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 적어도 하나의 그와 같은 블록은 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단의 3 개의 뉴클레오사이드 내에 위치한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 15 개 미만의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 14 개 미만의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 13 개 미만의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 12 개 미만의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 11 개 미만의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 10 개 미만의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 9 개 미만의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 8 개 미만의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 7 개 미만의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 6 개 미만의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 5 개 미만의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다.

[0799] **c. 어떤 핵염기 변형 모티프**

[0800] 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 규정된 패턴 또는 핵염기 변형 모티프에서 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 영역을 따라 배열된 핵염기에 대한 화학적 변형을 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 핵염기 변형은 캡핑된 모티프에서 배열되어 있다. 어떤 구현예에서, 핵염기 변형은 교대 모티프에서 배열되어 있다. 어떤 구현예에서, 각각의 핵염기는 변형된다. 어떤 구현예에서, 핵염기의 어떤 것도 화학적으로 변형되지 않는다.

[0801] 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 변형된 핵염기의 블록을 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 블록은 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단에 있다. 어떤 구현예에서 블록은 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단의 3 개의 뉴클레오타이드 내에 있다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 블록은 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 있다. 어떤 구현예에서 블록은 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단의 3 개의 뉴클레오타이드 내에 있다.

[0802] 어떤 구현예에서, 핵염기 변형은 올리고뉴클레오타이드의 특정한 위치에서 천연 염기의 기능이다. 예를 들면, 어떤 구현예에서 올리고뉴클레오타이드 중 각각의 퓨린 또는 각각의 피리미딘은 변형된다. 어떤 구현예에서, 각각의 아데닌은 변형된다. 어떤 구현예에서, 각각의 구아닌은 변형된다. 어떤 구현예에서, 각각의 티민은 변형된다. 어떤 구현예에서, 각각의 시토신은 변형된다. 어떤 구현예에서, 각각의 우라실은 변형된다.

[0803] 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 중 시토신 모이어티의 일부 또는 모두는 5-메틸 시토신 모이어티이거나, 어떤 것도 그것은 아니다. 여기서, 5-메틸 시토신은 "변형된 핵염기"가 아니다. 따라서, 달리 지적되지 않으면, 비변형된 핵염기는 5-메틸을 갖는 시토신 잔기 및 5 메틸이 없는 것들 둘 모두를 포함한다. 어떤 구현예에서, 모든 또는 일부의 시토신 핵염기의 메틸화 상태가 명시된다.

[0804] 어떤 구현예에서, 핵염기에 대한 화학적 변형은 어떤 콘주게이트 그룹의 핵염기에의 부착을 포함한다. 어떤 구

현예에서, 올리고뉴클레오타이드 중 각각의 퓨린 또는 각각의 피리미딘은 임의로 변형되어 콘주게이트 그룹을 포함할 수 있다.

[0805] **d. 어떤 전장**

[0806] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 다양한 범위의 길이의 임의 것의 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 X 내지 Y 연결된 뉴클레오사이드로 구성되고, 여기서 X는 범위 내의 가장 작은 수의 뉴클레오사이드를 나타내고 Y는 범위 내의 최대 수의 뉴클레오사이드를 나타낸다. 어떤 그와 같은 구현예에서, X 및 Y 각각은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 및 50로부터 독립적으로 선택되고; 단 X=Y. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 하기로 구성될 수 있다: 8 내지 9, 8 내지 10, 8 내지 11, 8 내지 12, 8 내지 13, 8 내지 14, 8 내지 15, 8 내지 16, 8 내지 17, 8 내지 18, 8 내지 19, 8 내지 20, 8 내지 21, 8 내지 22, 8 내지 23, 8 내지 24, 8 내지 25, 8 내지 26, 8 내지 27, 8 내지 28, 8 내지 29, 8 내지 30, 9 내지 10, 9 내지 11, 9 내지 12, 9 내지 13, 9 내지 14, 9 내지 15, 9 내지 16, 9 내지 17, 9 내지 18, 9 내지 19, 9 내지 20, 9 내지 21, 9 내지 22, 9 내지 23, 9 내지 24, 9 내지 25, 9 내지 26, 9 내지 27, 9 내지 28, 9 내지 29, 9 내지 30, 10 내지 11, 10 내지 12, 10 내지 13, 10 내지 14, 10 내지 15, 10 내지 16, 10 내지 17, 10 내지 18, 10 내지 19, 10 내지 20, 10 내지 21, 10 내지 22, 10 내지 23, 10 내지 24, 10 내지 25, 10 내지 26, 10 내지 27, 10 내지 28, 10 내지 29, 10 내지 30, 11 내지 12, 11 내지 13, 11 내지 14, 11 내지 15, 11 내지 16, 11 내지 17, 11 내지 18, 11 내지 19, 11 내지 20, 11 내지 21, 11 내지 22, 11 내지 23, 11 내지 24, 11 내지 25, 11 내지 26, 11 내지 27, 11 내지 28, 11 내지 29, 11 내지 30, 12 내지 13, 12 내지 14, 12 내지 15, 12 내지 16, 12 내지 17, 12 내지 18, 12 내지 19, 12 내지 20, 12 내지 21, 12 내지 22, 12 내지 23, 12 내지 24, 12 내지 25, 12 내지 26, 12 내지 27, 12 내지 28, 12 내지 29, 12 내지 30, 13 내지 14, 13 내지 15, 13 내지 16, 13 내지 17, 13 내지 18, 13 내지 19, 13 내지 20, 13 내지 21, 13 내지 22, 13 내지 23, 13 내지 24, 13 내지 25, 13 내지 26, 13 내지 27, 13 내지 28, 13 내지 29, 13 내지 30, 14 내지 15, 14 내지 16, 14 내지 17, 14 내지 18, 14 내지 19, 14 내지 20, 14 내지 21, 14 내지 22, 14 내지 23, 14 내지 24, 14 내지 25, 14 내지 26, 14 내지 27, 14 내지 28, 14 내지 29, 14 내지 30, 15 내지 16, 15 내지 17, 15 내지 18, 15 내지 19, 15 내지 20, 15 내지 21, 15 내지 22, 15 내지 23, 15 내지 24, 15 내지 25, 15 내지 26, 15 내지 27, 15 내지 28, 15 내지 29, 15 내지 30, 16 내지 17, 16 내지 18, 16 내지 19, 16 내지 20, 16 내지 21, 16 내지 22, 16 내지 23, 16 내지 24, 16 내지 25, 16 내지 26, 16 내지 27, 16 내지 28, 16 내지 29, 16 내지 30, 17 내지 18, 17 내지 19, 17 내지 20, 17 내지 21, 17 내지 22, 17 내지 23, 17 내지 24, 17 내지 25, 17 내지 26, 17 내지 27, 17 내지 28, 17 내지 29, 17 내지 30, 18 내지 19, 18 내지 20, 18 내지 21, 18 내지 22, 18 내지 23, 18 내지 24, 18 내지 25, 18 내지 26, 18 내지 27, 18 내지 28, 18 내지 29, 18 내지 30, 19 내지 20, 19 내지 21, 19 내지 22, 19 내지 23, 19 내지 24, 19 내지 25, 19 내지 26, 19 내지 27, 19 내지 28, 19 내지 29, 19 내지 30, 20 내지 21, 20 내지 22, 20 내지 23, 20 내지 24, 20 내지 25, 20 내지 26, 20 내지 27, 20 내지 28, 20 내지 29, 20 내지 30, 21 내지 22, 21 내지 23, 21 내지 24, 21 내지 25, 21 내지 26, 21 내지 27, 21 내지 28, 21 내지 29, 21 내지 30, 22 내지 23, 22 내지 24, 22 내지 25, 22 내지 26, 22 내지 27, 22 내지 28, 22 내지 29, 22 내지 30, 23 내지 24, 23 내지 25, 23 내지 26, 23 내지 27, 23 내지 28, 23 내지 29, 23 내지 30, 24 내지 25, 24 내지 26, 24 내지 27, 24 내지 28, 24 내지 29, 24 내지 30, 25 내지 26, 25 내지 27, 25 내지 28, 25 내지 29, 25 내지 30, 26 내지 27, 26 내지 28, 26 내지 29, 26 내지 30, 27 내지 28, 27 내지 29, 27 내지 30, 28 내지 29, 28 내지 30, 또는 29 내지 30 개의 연결된 뉴클레오사이드. 화합물의 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오사이드의 수가 제한되는 구현예에서, 범위 또는 특정 개수이든 아니든, 상기 화합물은, 그럼에도 불구하고, 추가의 다른 치환기를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, 8-30 개의 뉴클레오사이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는, 달리 지적되지 않으면 31 개의 뉴클레오사이드를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 제외하고, 그와 같은 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들면 1 이상의 콘주게이트 그룹, 말단기, 또는 다른 치환기를 추가로 포함할 수 있다.

[0807] 게다가, 여기서 올리고뉴클레오타이드는 전장 범위에 의해 그리고 명시된 길이를 갖는 영역에 의해 기재되고, 그리고 상기 영역의 명시된 길이의 합은 전장 범위의 상한 미만이고, 올리고뉴클레오타이드는 명시된 영역의 초과하여 추가의 뉴클레오사이드를 가질 수 있고, 단, 뉴클레오사이드의 총수는 전장 범위의 상한을 초과하지 않는다.

[0808] **5. 어떤 안티센스 올리고뉴클레오타이드 화학 모티프**

[0809] 어떤 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 화학적 구조적 특징은 그것의 당 모티프, 뉴클레오사이드간

연결 모티프, 핵염기 변형 모티프 및 전장을 특징으로 한다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 파라미터 각각은 서로 독립적이다. 따라서, 갭머 당 모티프를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 각각의 뉴클레오사이드간 연결은 변형 또는 비변형될 수 있고 당 변형의 갭머 변형 패턴을 따르거나 그렇지 않을 수 있다. 따라서, 당-갭머의 링 영역 내의 뉴클레오사이드간 연결은 서로 동일 또는 상이할 수 있고 갭 영역의 뉴클레오사이드간 연결과 동일 또는 상이할 수 있다. 마찬가지로, 그와 같은 당-갭머 올리고뉴클레오타이드는 당 변형의 갭머 패턴에 독립적인 1 이상의 변형된 핵염기를 포함할 수 있다. 당해분야의 숙련가는, 그와 같은 모티프가 조합되어 다양한 올리고뉴클레오타이드를 만들 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0810] 어떤 구현예에서, 뉴클레오사이드간 연결 및 뉴클레오사이드 변형의 선택은 서로 독립적이지 않다.

[0811] **i. 어떤 서열 및 표적**

[0812] 어떤 구현예에서, 본 발명은 표적 핵산에 대해 상보적인 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 그와 같은 안티센스 화합물은 표적 핵산에 혼성화될 수 있고, 이로써 적어도 하나의 안티센스 활성이 생긴다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 1 이상의 표적 핵산에 특이적으로 혼성화된다. 어떤 구현예에서, 특이적 혼성화 안티센스 화합물은 혼성화를 허용하고 안티센스 활성이 생기도록 하는 표적 핵산에 대한 충분한 상보성 및 특이적 혼성화를 원하는 조건 하에서 (예를 들면, 생체내 또는 치료 용도를 위한 생리적 조건 하에서, 그리고 검정이 시험관내 검정의 경우에 수행된 조건 하에서) 비-표적 핵산 서열에 대한 비-특이적 혼성화를 피하거나 축소시키기 위해 임의 비-표적에 대한 불충분한 상보성을 갖는 영역을 포함하는 핵염기 서열을 갖는다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는, 표적 및 비-표적 둘 모두가 표적 서열을 포함할지라도 표적 및 비-표적 사이에서 선택적이다. 그와 같은 구현예에서, 선택성 다른 것과 비교하여 하나의 핵산 분자의 표적 영역의 상대적 접근성으로부터 기인할 수 있다.

[0813] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 올리고뉴클레오타이드의 전장을 가로질러 표적 핵산에 대해 완전히 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 안티센스 화합물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산에 대해 99% 상보적이다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산에 대해 95% 상보적이다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산에 대해 90% 상보적이다.

[0814] 어떤 구현예에서, 그와 같은 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산에 대해 85% 상보적이다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산에 대해 80% 상보적이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 핵산에 대해 완전히 상보적이고 올리고뉴클레오타이드의 전장에 걸쳐 표적 핵산에 대해 적어도 80% 상보적인 영역을 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 완전 상보성의 영역은 그 길이가 6 내지 14 개의 핵염기이다.

[0815] 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 혼성화 영역 및 말단 영역을 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 혼성화 영역은 12-30 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성되고 표적 핵산에 대해 완전히 상보적이다. 어떤 구현예에서, 혼성화 영역은 표적 핵산에 대해 하나의 미스매치를 포함한다. 어떤 구현예에서, 혼성화 영역은 표적 핵산에 대해 2 개의 미스매치를 포함한다. 어떤 구현예에서, 혼성화 영역은 표적 핵산에 대해 3 개의 미스매치를 포함한다. 어떤 구현예에서, 말단 영역은 1-4 말단 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 말단 뉴클레오사이드는 3' 말단에 있다. 어떤 구현예에서, 말단 뉴클레오사이드 중 1 이상은 표적 핵산에 대해 상보적이지 않다.

[0816] 안티센스 기전은 올리고뉴클레오타이드와 표적 핵산과의 혼성화를 수반하는 임의 기전을 포함하고, 상기 혼성화로 생물학적 효과가 생긴다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 혼성화로, 표적 핵산 저하 또는 예를 들면, 표적 핵산의 번역, 전사, 또는 스플라이싱을 수반하는 세포 기구의 수반되는 억제 또는 자극에 의한 점유가 생긴다.

[0817] 표적 RNA의 저하를 수반하는 유형의 안티센스 기전은 RNase H 매개된 안티센스이다. RNase H는 RNA:DNA 듀플렉스의 RNA 가닥을 절단하는 세포성 엔도뉴클레아제이다. "DNA-유사"한 단일가닥 안티센스 화합물이 포유동물 세포에서 RNase H 활성을 유도하는 것으로 당해기술에서 공지되어 있다. 따라서 RNase H의 활성화로, RNA 표적이 절단되고, 그렇게 함으로써 유전자 발현의 DNA-유사 올리고뉴클레오타이드-매개된 억제의 효율이 크게 향상된다.

[0818] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 절단가능 모이어티를 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 1 이상의 절단가능 결합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 링커를 포함한다. 어떤 구현예에서, 링커는 단백질 결합 모이어티를 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 세포-표적 모이어티 (또한 일명 세포-표적화 그룹)을 포함한다. 어떤 구현예에서 세포-표적 모이어티는 분지화 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 세포-표적 모이어티는 1 이상의 테더를 포함한다. 어떤 구현예에서, 세포-표적 모이어티는 탄수화

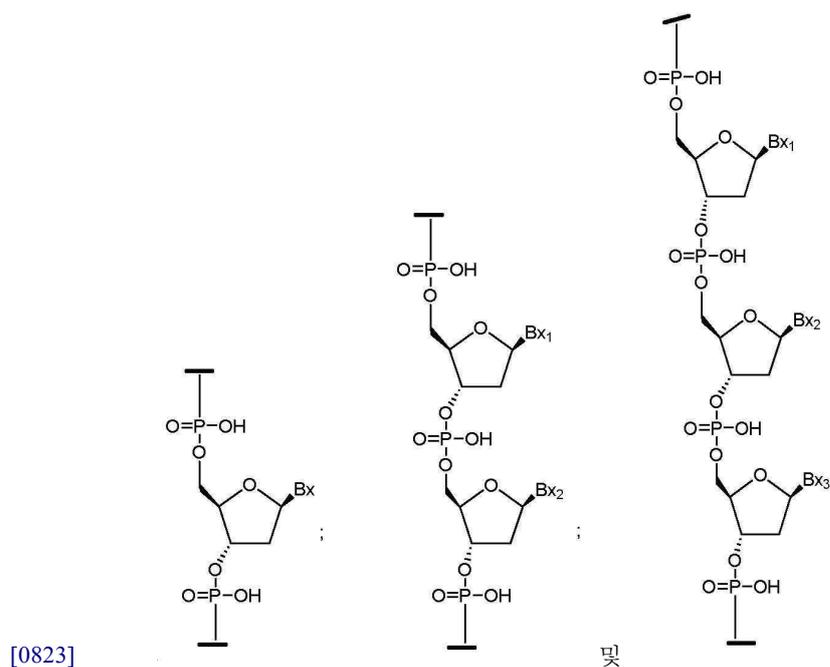
물 또는 탄수화물 클러스터를 포함한다.

[0819] **ii. 어떤 절단가능 모이어티**

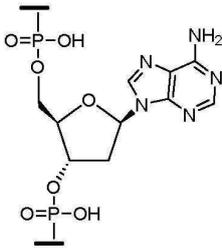
[0820] 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 절단가능 결합이다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 절단가능 결합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 절단가능 모이어티를 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 절단가능 모이어티는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 부착된다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 절단가능 모이어티는 세포-표적 모이어티에 직접적으로 부착된다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 절단가능 모이어티는 콘주게이트 링커에 부착된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 포스페이트 또는 포스포디에스테르를 포함한다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 절단가능 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오사이드 유사체이다. 어떤 구현예에서, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오사이드 유사체는 퓨린, 치환된 퓨린, 피리미딘 또는 치환된 피리미딘로부터 선택된 임의로 보호된 헤테로사이클릭 염기를 포함한다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 우라실, 티민, 시토신, 4-N-벤조일시토신, 5-메틸시토신, 4-N-벤조일-5-메틸시토신, 아데닌, 6-N-벤조일아데닌, 구아닌 및 2-N-이소부틸릴구아닌로부터 선택된 임의로 보호된 헤테로사이클릭 염기를 포함하는 뉴클레오사이드이다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 포스포디에스테르 연결에 의해 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 3' 위치에 부착되고 포스포디에스테르 또는 포스포로티오에이트 연결에 의해 링커에 부착된 2'-데옥시 뉴클레오사이드이다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 포스포디에스테르 연결에 의해 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 3' 위치에 부착되고 포스포디에스테르 또는 포스포로티오에이트 연결에 의해 링커에 부착된 2'-데옥시 아데노신이다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 포스포디에스테르 연결에 의해 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 3' 위치에 부착되고 포스포디에스테르 연결에 의해 링커에 부착된 2'-데옥시 아데노신이다이다.

[0821] 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 3' 위치에 부착된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 5' 위치에 부착된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 2' 위치에 부착된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 포스포디에스테르 연결에 의해 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 부착된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 포스포디에스테르 또는 포스포로티오에이트 연결에 의해 링커에 부착된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 포스포디에스테르 연결에 의해 링커에 부착된다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 절단가능 모이어티를 포함하지 않는다.

[0822] 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는, 표적화된 세포에 의해 내면화된 직후에 복합물이 동물에게 투여된 후에 절단된다. 세포 내에서 절단가능 모이어티는 절단되고 그렇게 함으로써 활성 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 방출한다. 이론에 의해 구속되지를 바라지 않지만 절단가능 모이어티가 세포 내의 1 이상의 뉴클레아제에 의해 절단되는 것으로 믿는다. 어떤 구현예에서, 1 이상의 뉴클레아제는 절단가능 모이어티와 링커 사이의 포스포디에스테르 연결을 절단한다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0824] 여기서 각각의 Bx, Bx₁, Bx₂, 및 Bx₃은 독립적으로 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0825]

[0826] **iii. 어떤 링커**

[0827] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 링커를 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 링커는 절단가능 모이어티에 공유결합된다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 링커는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 링커는 세포-표적 모이어티에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 링커는 추가로, 고행 지지체에 대한 공유 결합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 링커는 추가로, 단백질 결합 모이어티에 대한 공유 결합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 링커는 추가로, 고행 지지체에 대한 공유결합을 포함하고, 추가로, 단백질 결합 모이어티에 대한 공유 결합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 링커는 테더링된 리간드의 부착을 위한 다중 위치를 포함한다. 어떤 구현예에서, 링커는 테더링된 리간드의 부착을 위한 다중 위치를 포함하고 분지화 그룹에 부착되지 않는다. 어떤 구현예에서, 링커는 추가로, 1 이상의 절단가능 결합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 링커를 포함하지 않는다.

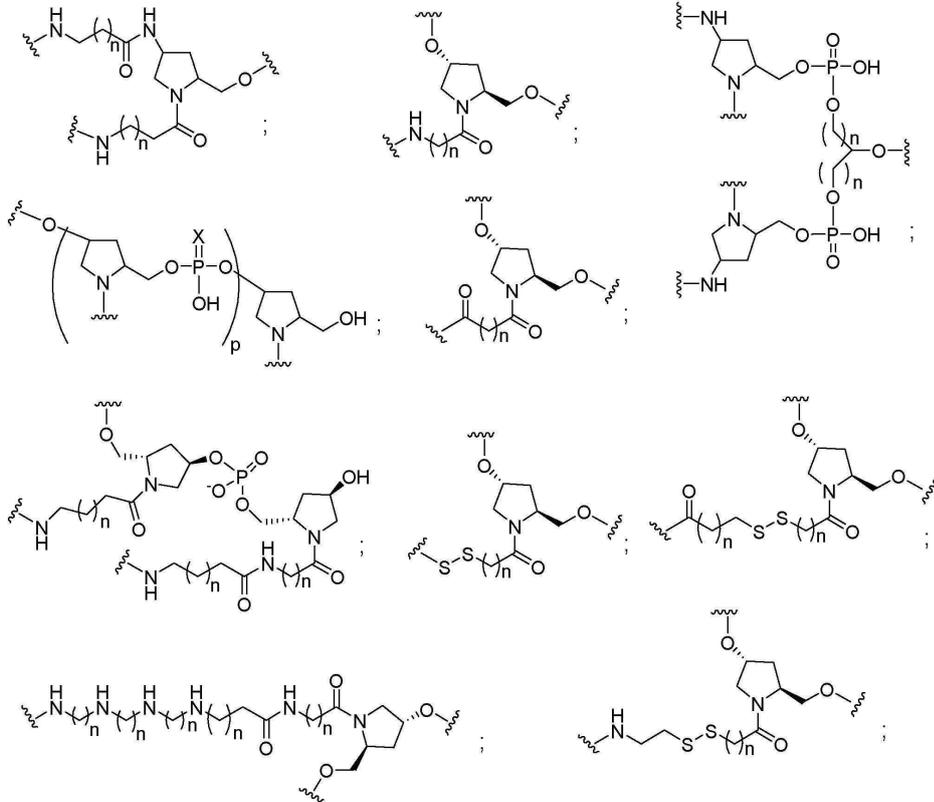
[0828] 어떤 구현예에서, 링커는 알킬, 아마이드, 디설파이드, 폴리에틸렌 글리콜, 에테르, 티오에테르 (-S-) 및 하이드록실아미노 (-O-N(H)-) 그룹으로부터 선택된 그룹을 포함하는 적어도 하나의 선형 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 알킬, 아마이드 및 에테르 그룹으로부터 선택된 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 알킬 및 에테르 그룹으로부터 선택된 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 적어도 하나의 인연결 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 적어도 하나의 포스포디에스테르 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 적어도 하나의 중성 연결 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 세포-표적 모이어티 및 절단가능 모이어티에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 세포-표적 모이어티 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 세포-표적 모이어티, 절단가능 모이어티 및 고행 지지체에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 세포-표적 모이어티, 절단가능 모이어티, 고행 지지체 및 단백질 결합 모이어티에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 1 이상의 절단가능 결합을 포함한다.

[0829] 어떤 구현예에서, 링커는 스캐폴드 그룹에 공유결합된 선형 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 스캐폴드는 알킬, 아마이드, 디설파이드, 폴리에틸렌 글리콜, 에테르, 티오에테르 및 하이드록실아미노 그룹으로부터 선택된 그룹을 포함하는 분지된 지방족 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 스캐폴드는 알킬, 아마이드 및 에테르 그룹으로부터 선택된 그룹을 포함하는 분지된 지방족 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 스캐폴드는 적어도 하나의 모노 또는 폴리사이클릭 고리계를 포함한다. 어떤 구현예에서, 스캐폴드는 적어도 2 개의 모노 또는 폴리사이클릭 고리계를 포함한다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 스캐폴드 그룹에 공유결합되고 스캐폴드 그룹은 절단가능 모이어티 및 링커에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 스캐폴드 그룹에 공유결합되고 스캐폴드 그룹은 절단가능 모이어티, 링커 및 고행 지지체에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 스캐폴드 그룹에 공유결합되고 스캐폴드 그룹은 절단가능 모이어티, 링커 및 단백질 결합 모이어티에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 스캐폴드 그룹에 공유결합되고, 스캐폴드 그룹은 절단가능 모이어티, 링커, 단백질 결합 모이어티 및 고행 지지체에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 스캐폴드 그룹은 1 이상의 절단가능 결합을 포함한다.

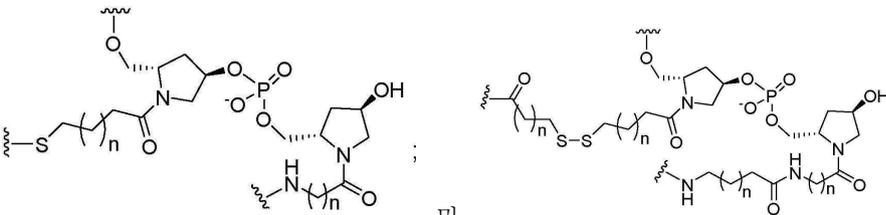
[0830] 어떤 구현예에서, 링커는 단백질 결합 모이어티를 포함한다. 어떤 구현예에서, 단백질 결합 모이어티는 하기를 비제한적으로 포함하는 지질이다: 콜레스테롤, 콜산, 아다만탄 아세트산, 1-피렌 부티르산, 디하이드로테스토스테론, 1,3-비스-0(헥사데실)글리세롤, 제라닐옥시헥실 그룹, 헥사데실글리세롤, 용뇌, 멘톨, 1,3-프로판디올, 헵타데실 그룹, 팔미트산, 미리스트산, 03-(올레오일)리토콜산, 03-(올레오일)콜렌산, 디메톡시트리틸, 또는 펜옥사진), 비타민 (예를 들면, 폴레이트, 비타민 A, 비타민 E, 바이오틴, 피리독살), 펩타이드, 탄수화물 (예를 들면, 모노사카라이드, 디사카라이드, 트리사카라이드, 테트라사카라이드, 올리고당, 다당류), 엔도솜분해적 구

성분, 스테로이드 (예를 들면, 우바올, 헤시게닌, 디오스게닌), 테르펜 (예를 들면, 트리테르펜, 예를 들면, 사르사사포게닌, 프리델린, 에피프리에델라놀 유도된 리토콜산), 또는 양이온성 지질. 어떤 구현예에서, 단백질 결합 모이어티는 C16 내지 C22 장쇄 포화된 또는 불포화된 지방산, 콜레스테롤, 콜산, 비타민 E, 아다만탄 또는 1-펜타플루오로프로필이다.

[0831] 어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



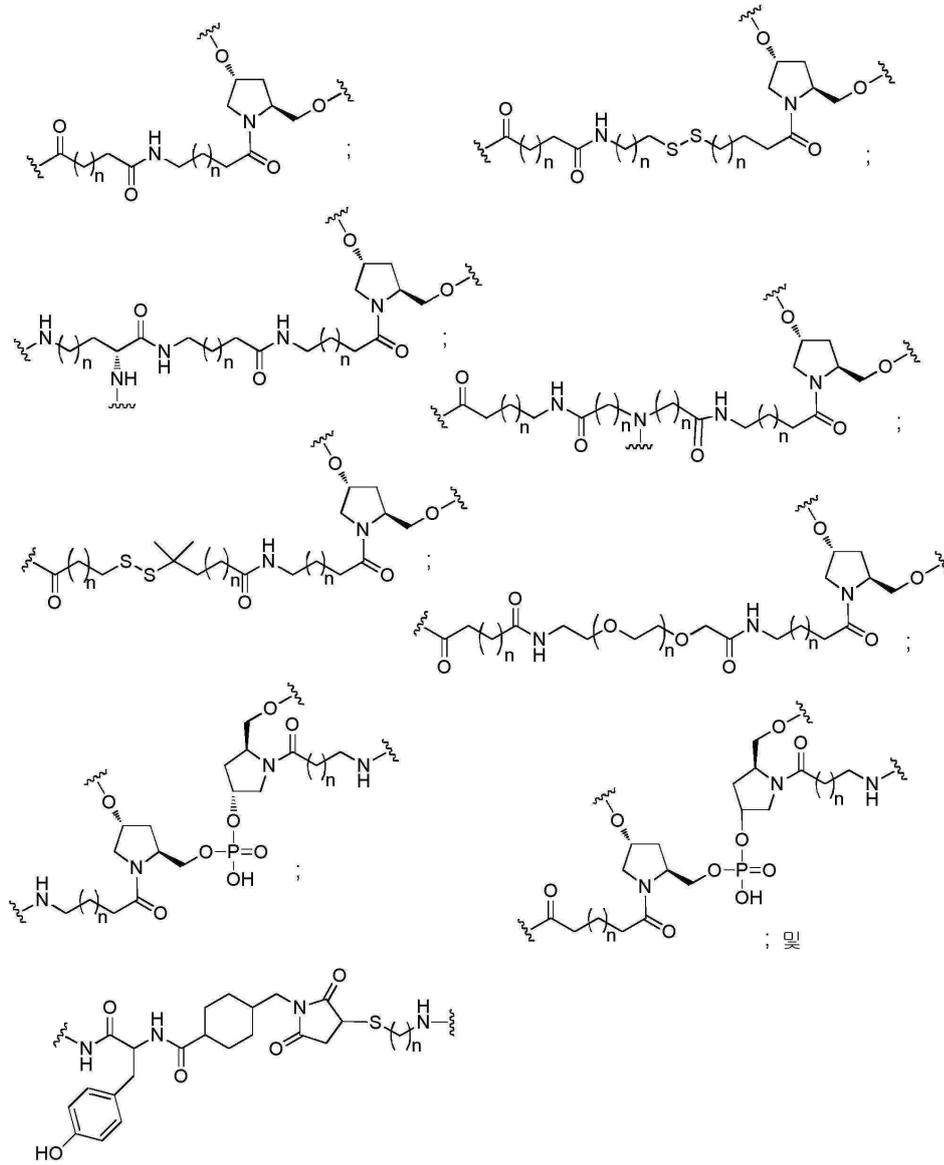
[0832]



[0833]

[0834] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고; 그리고 p는 1 내지 6이다.

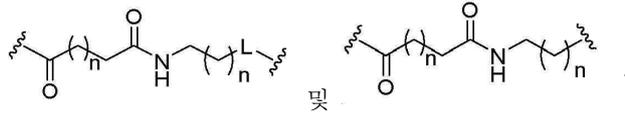
[0835] 어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0836]

[0837] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[0845]



[0846]

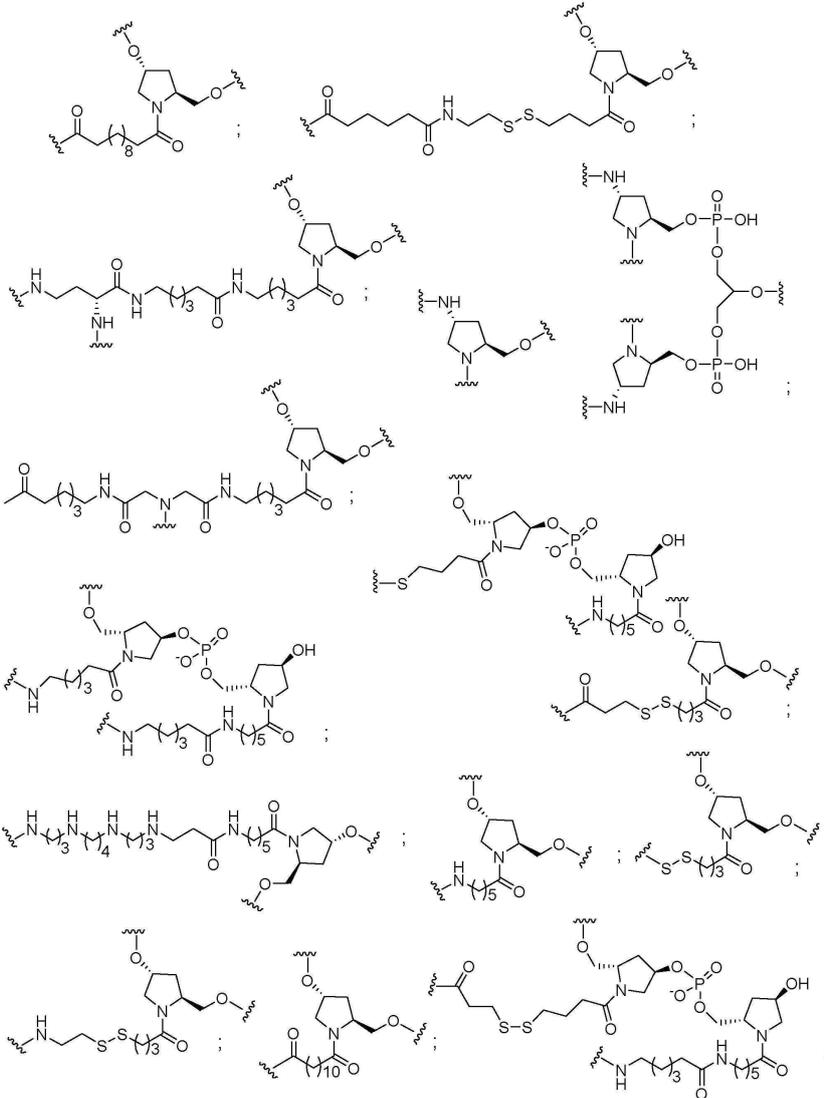
여기서 각각의 L 은, 독립적으로, 인 연결 그룹 또는 중성 연결 그룹; 그리고

[0847]

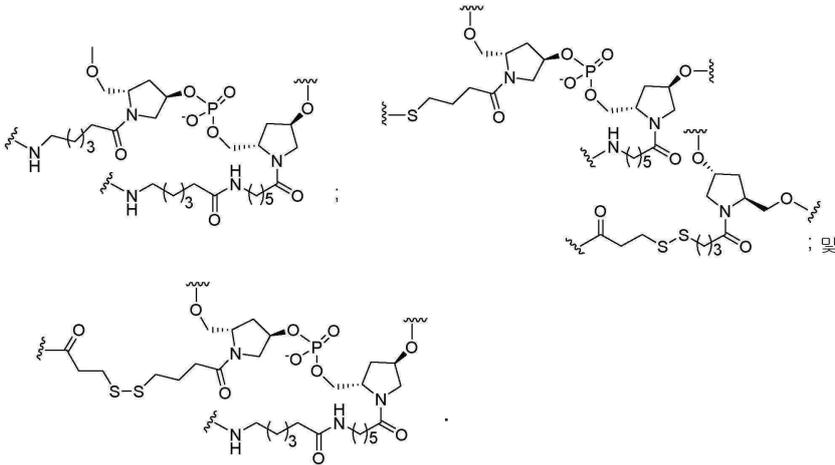
각각의 n 은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[0848]

어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:

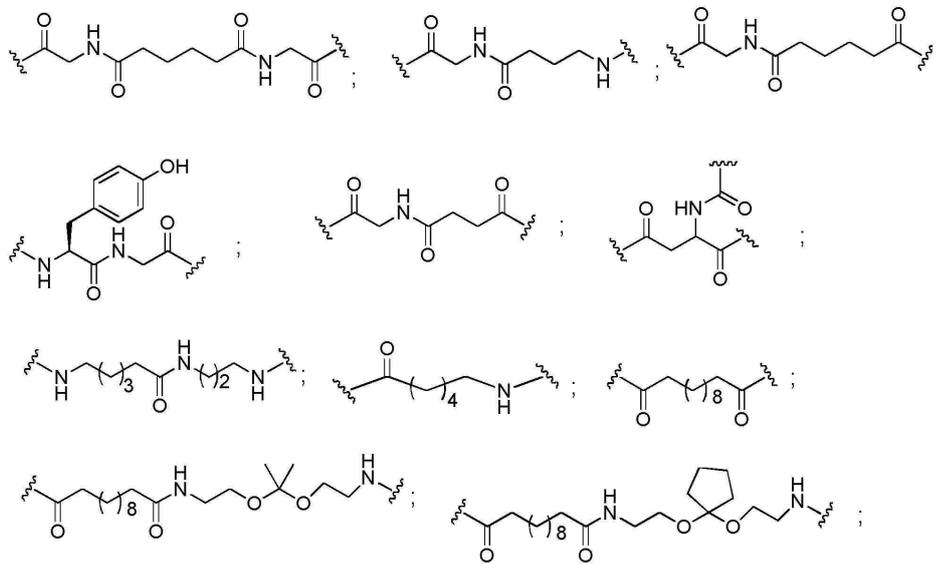


[0849]

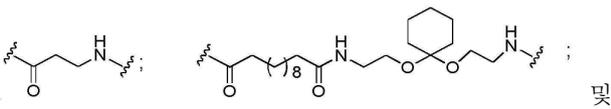


[0850]

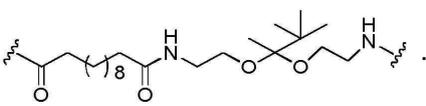
[0851] 어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0852]

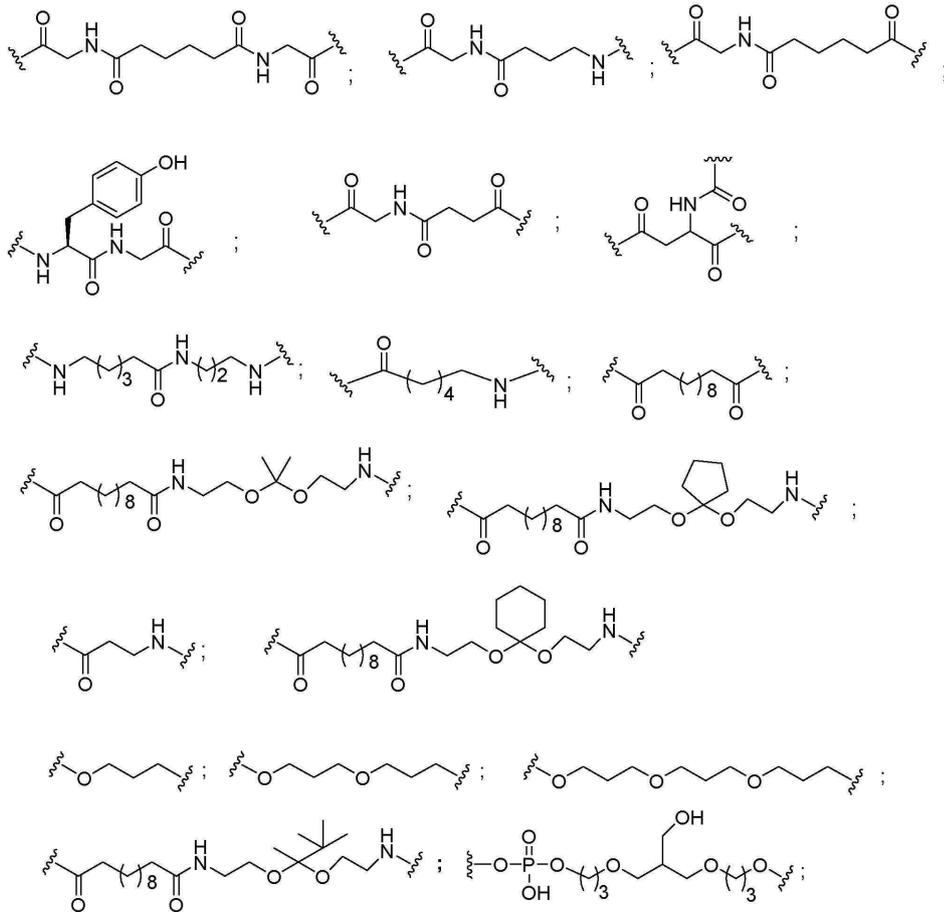


[0853]

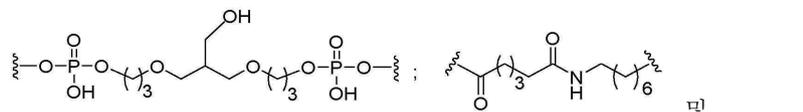


[0854]

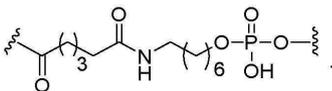
[0855] 어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0856]

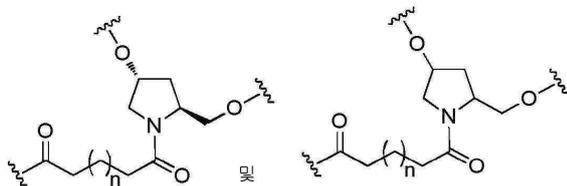


[0857]



[0858]

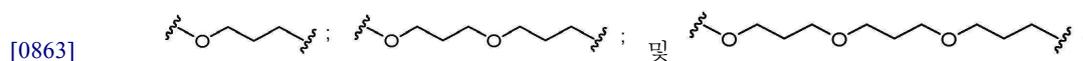
[0859] 어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0860]

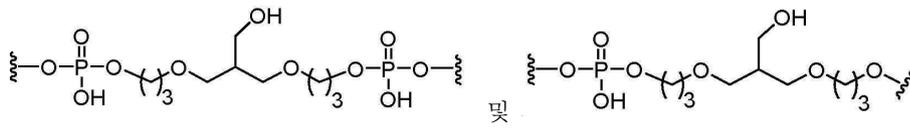
[0861] 여기서 n은 1 내지 20이다.

[0862] 어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



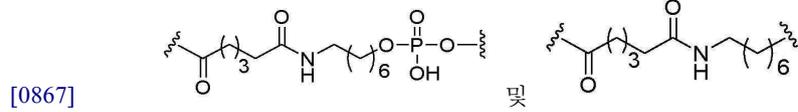
[0863]

[0864] 어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



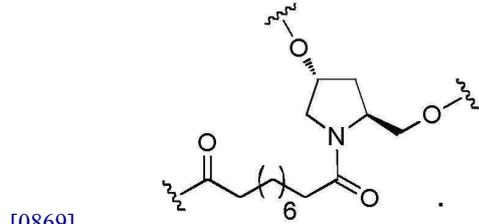
[0865]

[0866] 어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



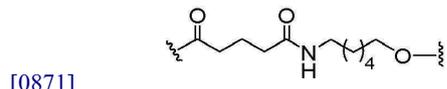
[0867]

[0868] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 하기 구조를 갖는다:



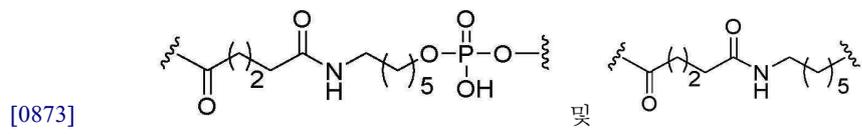
[0869]

[0870] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 하기 구조를 갖는다:



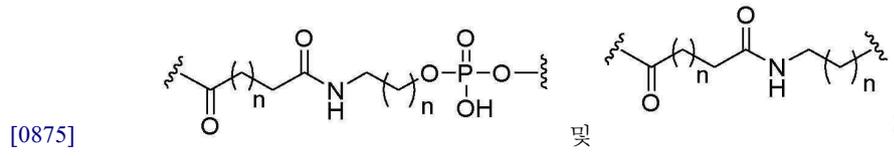
[0871]

[0872] 어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0873]

[0874] 어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0875]

[0876] 여기서 각각의 n은 독립적으로, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7이다.

[0877] **iv. 어떤 세포-표적화 모이어티**

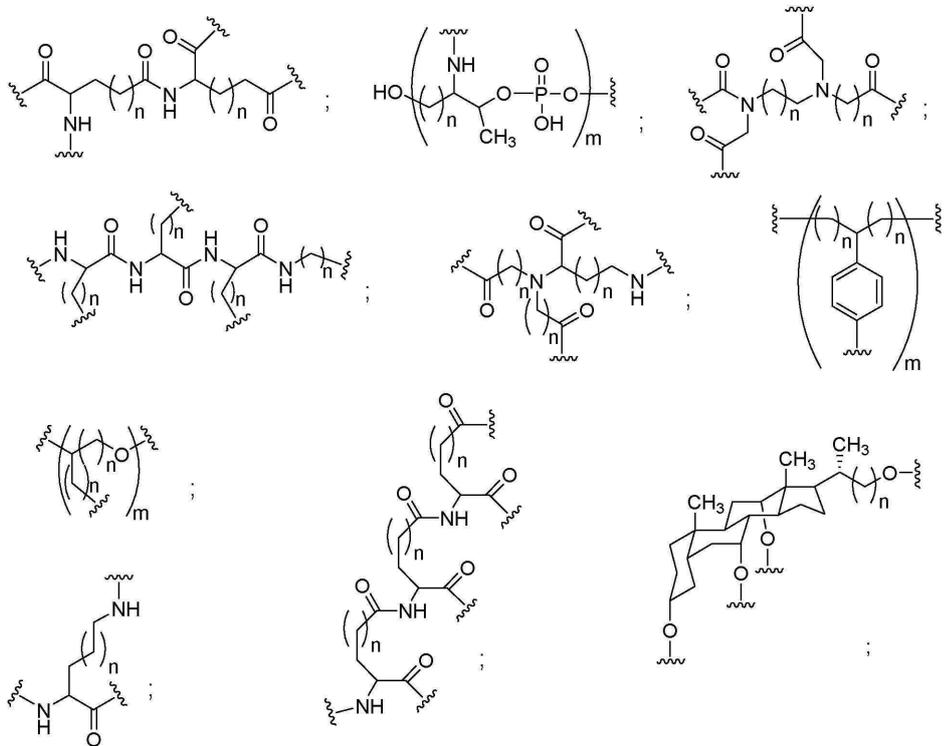
[0878] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 세포-표적화 모이어티를 포함한다. 어떤 그와 같은 세포-표적화 모이어티는 안티센스 화합물의 세포성 흡수를 증가시킨다. 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 분지화 그룹, 1 이상의 테더, 및 1 이상의 리간드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 분지화 그룹, 1 이상의 테더, 1 이상의 리간드 및 1 이상의 절단가능 결합을 포함한다.

[0879] **1. 어떤 분지화 그룹**

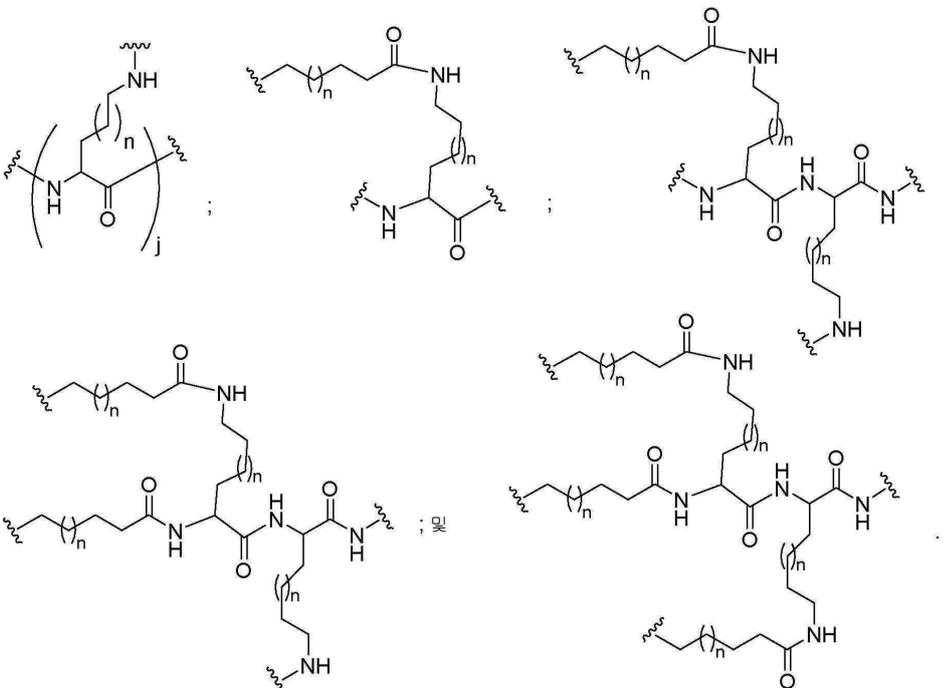
[0880] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 분지화 그룹 및 적어도 2 개의 테더링된 리간드를 포함하는 표적 모이어티를 포함한다. 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 콘주게이트 링커를 첨부한다. 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 절단가능 모이어티를 첨부한다. 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 첨부한다. 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 링커 및 각각의 테더링된 리간드에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 알킬, 아마이드, 디설파이드, 폴리에틸렌 글리콜, 에테르, 티오에테르 및 하이드록실아미노 그룹으로부터 선택된 그룹을 포함하는 분지된 지방족 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 알킬, 아마이드 및 에테르 그룹으로부터 선택된 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 알킬 및 에테르 그룹으로부터 선택

된 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 모노 또는 폴리사이클릭 고리계를 포함한다. 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 1 이상의 절단가능 결합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 분지화 그룹을 포함하지 않는다.

[0881] 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0882]

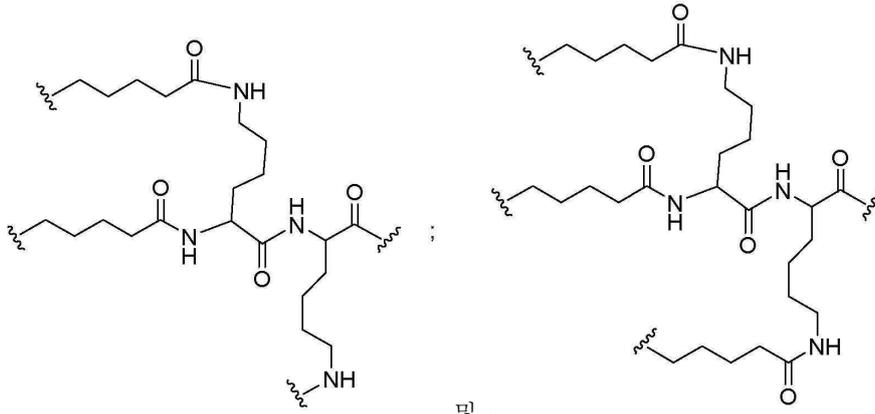


[0883]

[0884] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고;

[0885] j는 1 내지 3이고; 그리고

[0886] m은 2 내지 6이다.

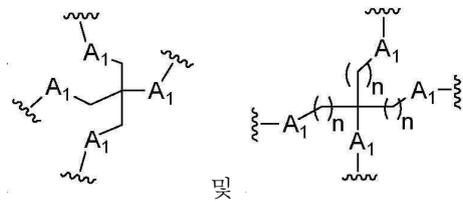


[0893]

및

[0894]

어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0895]

및

[0896]

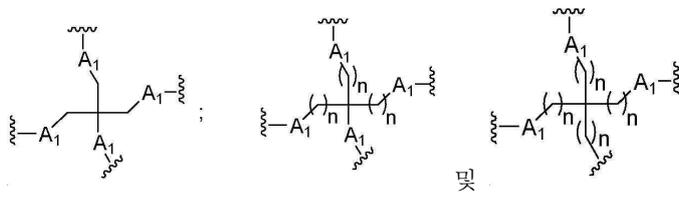
여기서 각각의 A₁은 독립적으로, O, S, C=O 또는 NH이고; 그리고

[0897]

각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[0898]

어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0899]

및

[0900]

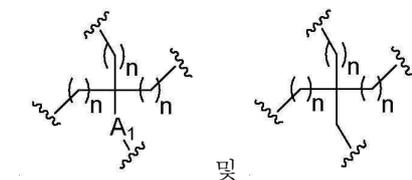
여기서 각각의 A₁은 독립적으로, O, S, C=O 또는 NH이고; 그리고

[0901]

각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[0902]

어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0903]

및

[0904]

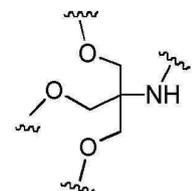
여기서 A₁은 O, S, C=O 또는 NH이고; 그리고

[0905]

각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

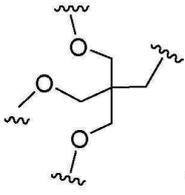
[0906]

어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:

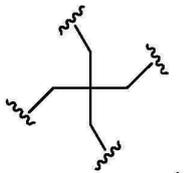


[0907]

[0908] 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0909] 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



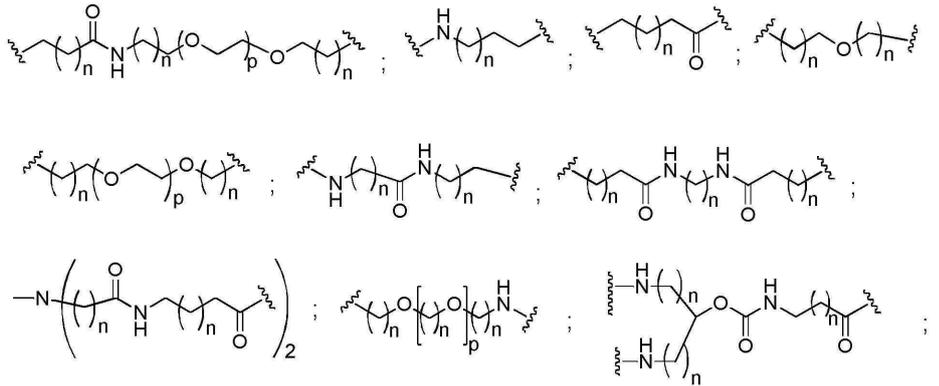
[0911]
[0912] **2. 어떤 테더**

[0913] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 분지화 그룹에 공유결합된 1 이상의 테더를 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 연결 그룹에 공유결합된 1 이상의 테더를 포함한다. 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 임의 조합으로 알킬, 에테르, 티오에테르, 디설파이드, 아마이드 및 폴리에틸렌 글리콜 그룹으로부터 선택된 1 이상의 그룹을 포함하는 선형 지방족 그룹이다. 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 임의 조합으로 알킬, 치환된 알킬, 에테르, 티오에테르, 디설파이드, 아마이드, 포스포디에스테르 및 폴리에틸렌 글리콜 그룹으로부터 선택된 1 이상의 그룹을 포함하는 선형 지방족 그룹이다. 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 임의 조합으로 알킬, 에테르 및 아마이드 그룹으로부터 선택된 1 이상의 그룹을 포함하는 선형 지방족 그룹이다. 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 임의 조합으로 알킬, 치환된 알킬, 포스포디에스테르, 에테르 및 아마이드 그룹으로부터 선택된 1 이상의 그룹을 포함하는 선형 지방족 그룹이다. 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 적어도 하나의 인 연결 그룹 또는 중성 연결 그룹을 포함한다.

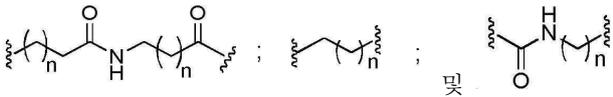
[0914] 어떤 구현예에서, 테더는 1 이상의 절단가능 결합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 테더는 아마이드 또는 에테르 그룹을 통해 분지화 그룹에 부착된다. 어떤 구현예에서, 테더는 포스포디에스테르 그룹을 통해 분지화 그룹에 부착된다. 어떤 구현예에서, 테더는 인 연결 그룹 또는 중성 연결 그룹을 통해 분지화 그룹에 부착된다. 어떤 구현예에서, 테더는 에테르 그룹을 통해 분지화 그룹에 부착된다. 어떤 구현예에서, 테더는 아마이드 또는 에테르 그룹을 통해 리간드에 부착된다. 어떤 구현예에서, 테더는 에테르 그룹을 통해 리간드에 부착된다. 어떤 구현예에서, 테더는 아마이드 또는 에테르 그룹을 통해 리간드에 부착된다. 어떤 구현예에서, 테더는 에테르 그룹을 통해 리간드에 부착된다.

[0915] 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 리간드와 분지화 그룹 사이에 약 8 내지 약 20 개의 원자의 사슬 길이를 포함한다. 어떤 구현예에서, 각각의 테더 그룹은 리간드와 분지화 그룹 사이에 약 10 내지 약 18 개의 원자의 사슬 길이를 포함한다. 어떤 구현예에서, 각각의 테더 그룹은 약 13 개의 원자의 사슬 길이를 포함한다.

[0916] 어떤 구현예에서, 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0917]

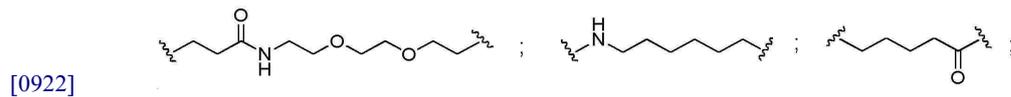


[0918]

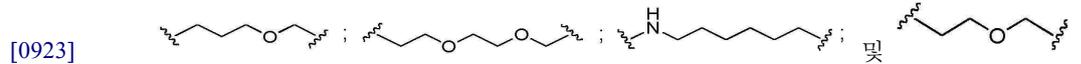
[0919] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고; 그리고

[0920] 각각의 p는 1 내지 약 6이다.

[0921] 어떤 구현예에서, 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:

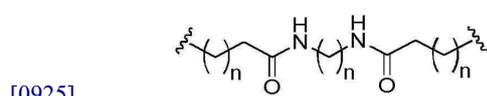


[0922]



[0923]

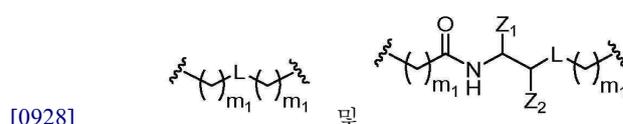
[0924] 어떤 구현예에서, 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0925]

[0926] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[0927] 어떤 구현예에서, 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0928]

[0929] 여기서 L은 인 연결 그룹 또는 중성 연결 그룹 중 하나이고;

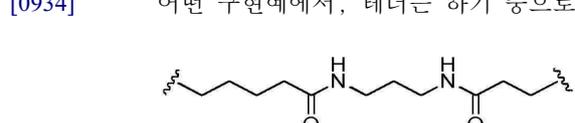
[0930] Z_1 은 C(=O)O-R_2 이고;

[0931] Z_2 는 H, $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬 또는 치환된 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬이고;

[0932] R_2 는 H, $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬 또는 치환된 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬이고; 그리고

[0933] 각각의 m_1 은, 독립적으로, 0 내지 20이고, 여기서 적어도 하나의 m_1 은 각각의 테더에 대해 0 초과이다.

[0934] 어떤 구현예에서, 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0935]

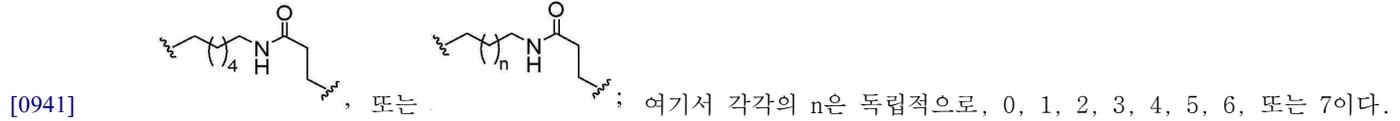
[0936] 어떤 구현예에서, 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0938] 여기서 Z₂는 H 또는 CH₃이고; 그리고

[0939] 각각의 m₁은, 독립적으로, 0 내지 20이고, 여기서 적어도 하나의 m₁은 각각의 테더에 대해 0 초과이다.

[0940] 어떤 구현예에서, 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



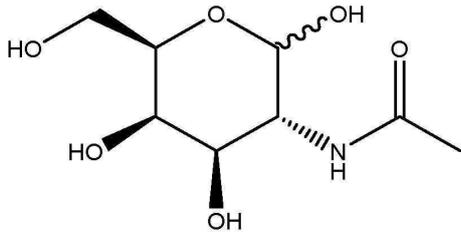
[0942] 어떤 구현예에서, 테더는 인 연결 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 테더는 임의 아마이드 결합을 포함하지 않는다. 어떤 구현예에서, 테더는 인 연결 그룹을 포함하고 임의 아마이드 결합을 포함하지 않는다.

[0943] **3. 어떤 리간드**

[0944] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 리간드를 제공하고, 여기서 각각의 리간드는 테더에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 표적 세포 상의 적어도 하나의 유형의 수용체에 대한 친화성을 갖는 각각의 리간드가 선택된다. 어떤 구현예에서, 포유동물 간 세포의 표면 상의 적어도 하나의 유형의 수용체에 대한 친화성을 갖는 리간드가 선택된다. 어떤 구현예에서, 간 아시알로당단백질 수용체 (ASGP-R)에 대해 친화성을 갖는 리간드가 선택된다. 어떤 구현예에서, 각각의 리간드는 탄수화물이다. 어떤 구현예에서, 각각의 리간드는, 갈락토오스, N-아세틸 갈락토오스아민, 만노스, 글루코오스, 글루코사민 및 푸코스로부터 독립적으로 선택된다. 어떤 구현예에서, 각각의 리간드는 N-아세틸 갈락토오스아민 (GalNAc)이다. 어떤 구현예에서, 표적 모이어티는 2 내지 6 개의 리간드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 표적 모이어티는 3 개의 리간드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 표적 모이어티는 3 N-아세틸 갈락토오스아민 리간드를 포함한다.

[0945] 어떤 구현예에서, 리간드는 탄수화물, 탄수화물 유도체, 변형된 탄수화물, 다당류, 변형된 다당류, 또는 다당류 유도체이다. 어떤 구현예에서, 리간드는 아미노 당 또는 티오 당이다. 예를 들면, 아미노 당은 당해기술에서 공지된 임의 수의 화합물, 예를 들면 글루코사민, 시알산, α-D-갈락토사민, N-아세틸 갈락토사민, 2-아세트아미도-2-데옥시-D-갈락토피라노스 (GalNAc), 2-아미노-3-O-[(R)-1-카복시에틸]-2-데옥시-β-D-글루코피라노스 (β-뮤람산), 2-데옥시-2-메틸아미노-L-글루코피라노스, 4,6-디데옥시-4-포름아미도-2,3-디-O-메틸-D-만노피라노스, 2-데옥시-2-설포아미노-D-글루코피라노스 및 N-설포-D-글루코사민, 및 N-글리콜로일-α-뉴라민산으로부터 선택될 수 있다. 예를 들면, 티오 당류는 5-티오-β-D-글루코피라노스, 메틸 2,3,4-트리-O-아세틸-1-티오-6-O-트리틸-α-D-글루코피라노사이드, 4-티오-β-D-갈락토피라노스, 및 에틸 3,4,6,7-테트라-O-아세틸-2-데옥시-1,5-디티오-α-D-글루코-헵토피라노사이드로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

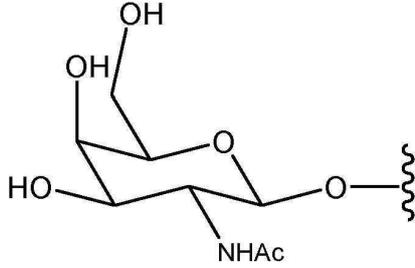
[0946] 어떤 구현예에서, "GalNAc" 또는 "Gal-NAc"는 N-아세틸 갈락토사민으로서 문헌에서 통상적으로 칭해지는 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토피라노스를 의미한다. 어떤 구현예에서, "N-아세틸 갈락토사민"는 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토피라노스를 의미한다. 어떤 구현예에서, "GalNAc" 또는 "Gal-NAc"는 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토피라노스를 의미한다. 어떤 구현예에서, "GalNAc" 또는 "Gal-NAc"는 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토피라노스를 의미하고, 이것은 β-형: 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-β-D-갈락토피라노스 및 α-형: 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토피라노스 둘 모두를 포함한다. 어떤 구현예에서, β-형: 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-β-D-갈락토피라노스 및 α-형: 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토피라노스 둘 모두는 상호교환적으로 사용될 수 있다. 따라서, 하나의 형태가 묘사된 구조에서, 이들 구조는 다른 형태를 또한 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들면, α-형: 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토피라노스의 구조가 보여지는 경우, 이러한 구조는 다른 형태를 또한 포함하는 것으로 의도된다. 어떤 구현예에서, 어떤 바람직한 구현예에서, β-형 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토피라노스는 바람직한 구현예이다.



[0947]

[0948]

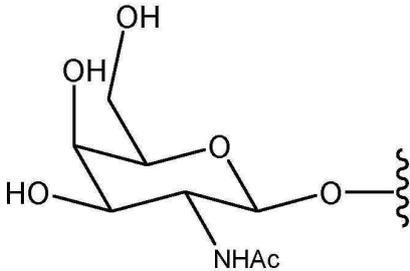
2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토피라노스



[0949]

[0950]

2-(아세틸아미노)-2-데옥시-β-D-갈락토피라노스



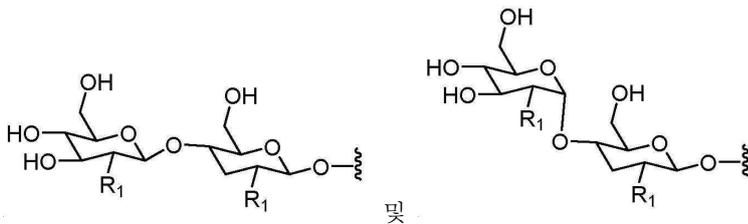
[0951]

[0952]

2-(아세틸아미노)-2-데옥시-α-D-갈락토피라노스

[0953]

어떤 구현예에서 1 이상의 리간드는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



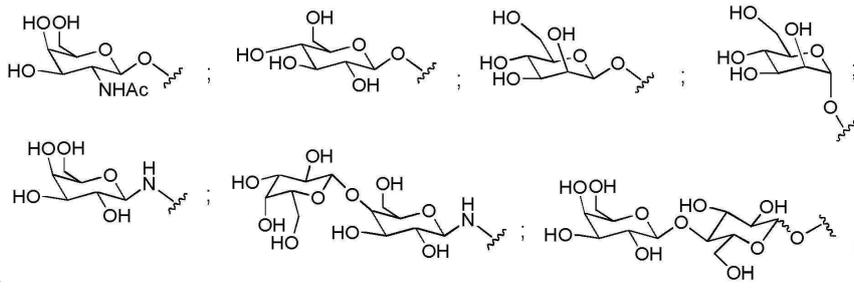
[0954]

[0955]

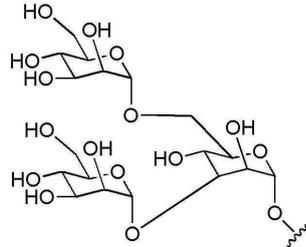
여기서 각각의 R₁은 OH 및 NHCOOH로부터 선택된다.

[0956]

어떤 구현예에서 1 이상의 리간드는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:

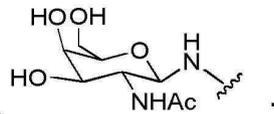


[0957] 및



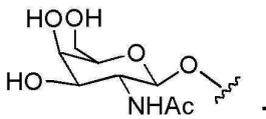
[0958]

[0959] 어떤 구현예에서 1 이상의 리간드는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0960]

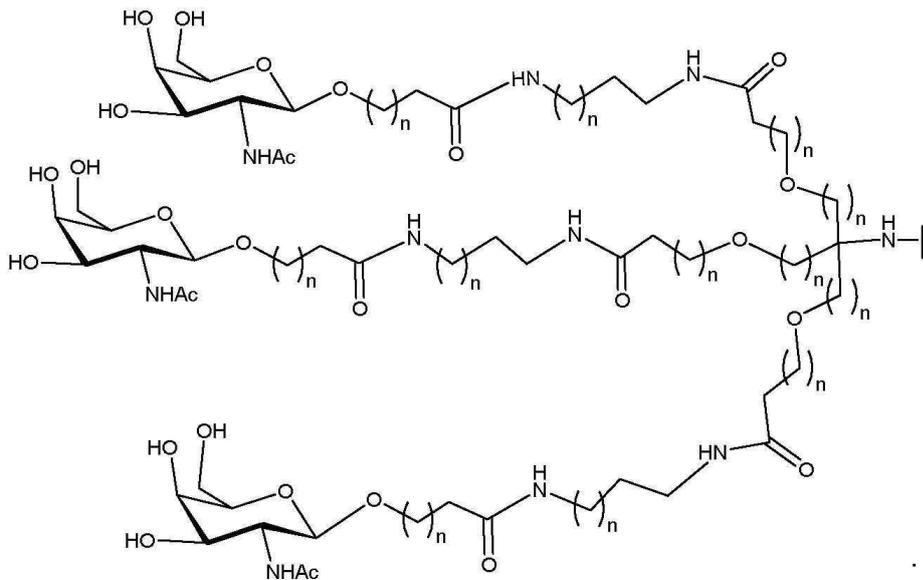
[0961] 어떤 구현예에서 1 이상의 리간드는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0962]

[0963] i. 어떤 콘주게이트

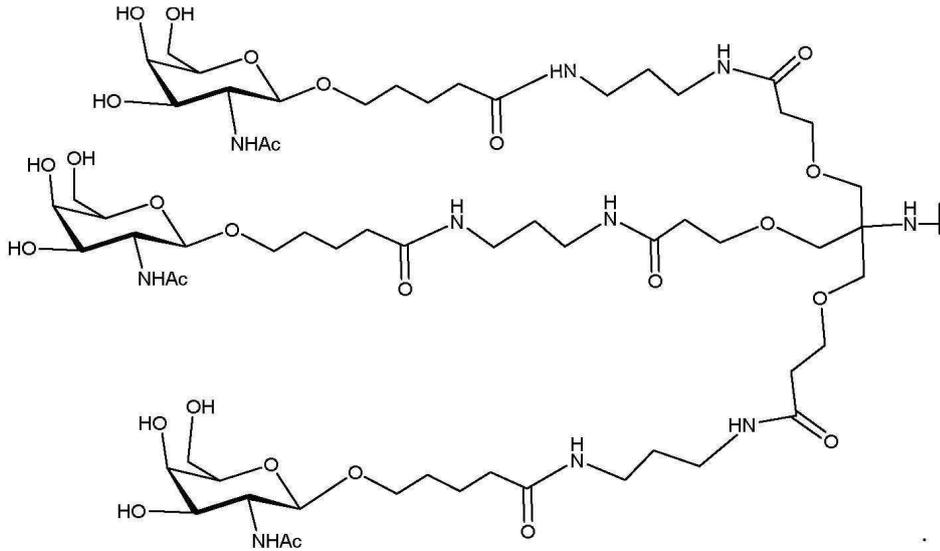
[0964] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 상기의 구조적 특징을 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



[0965]

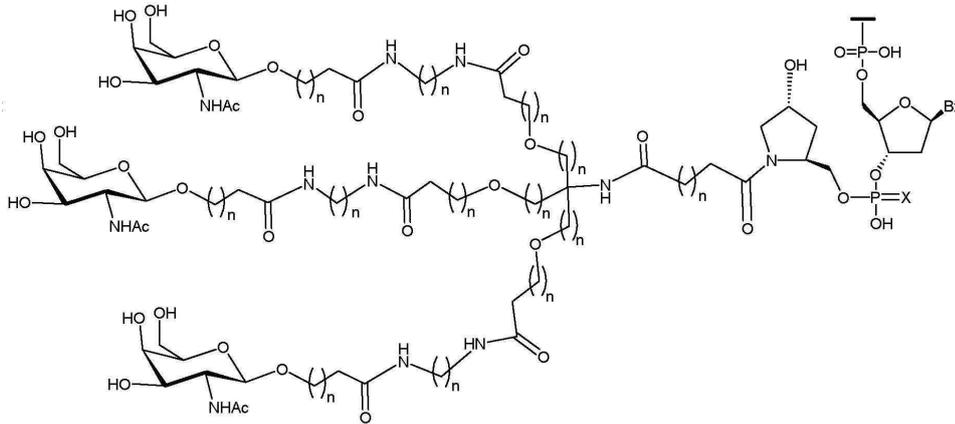
[0966] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[0967] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



[0968]

[0969] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



[0970]

[0971] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고;

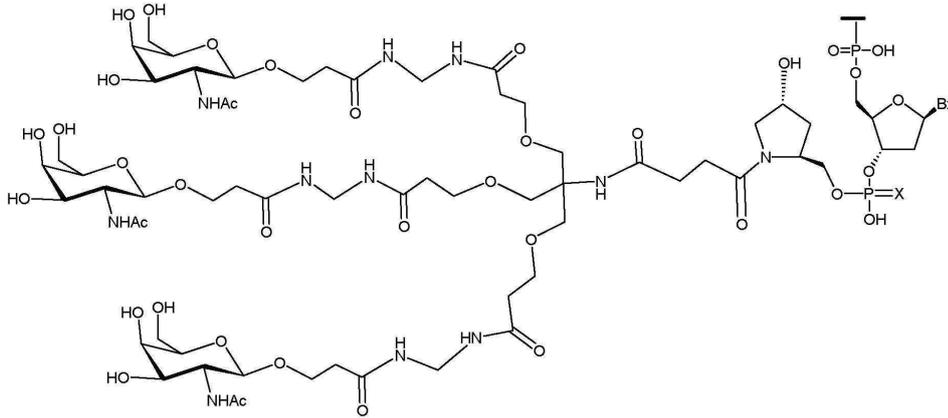
[0972] Z는 H 또는 연결된 고휘형 지지체이고;

[0973] Q는 안티센스 화합물이고;

[0974] X는 O 또는 S이고; 그리고

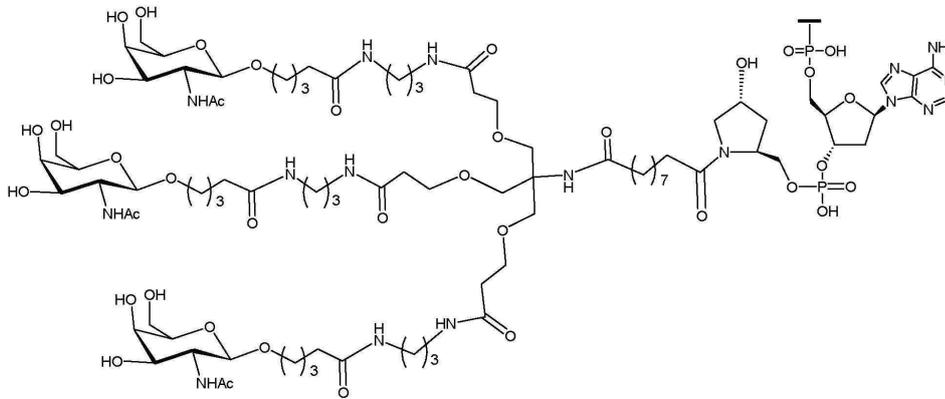
[0975] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0976] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



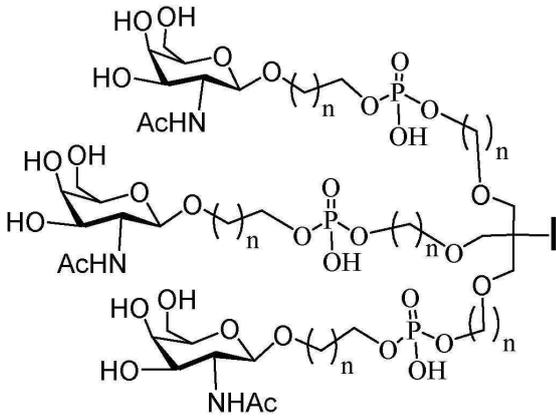
[0977]

[0978] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



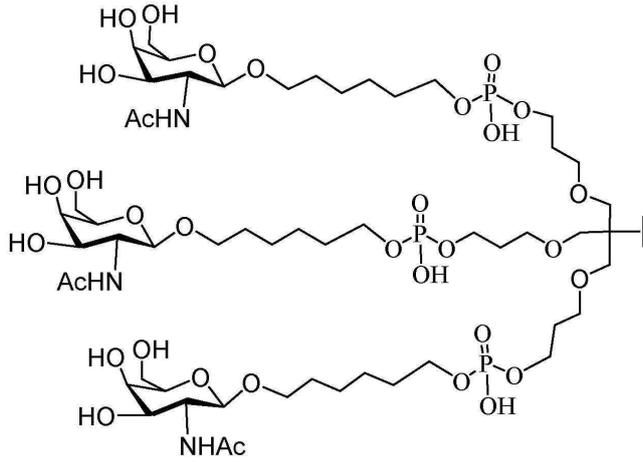
[0979]

[0980] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



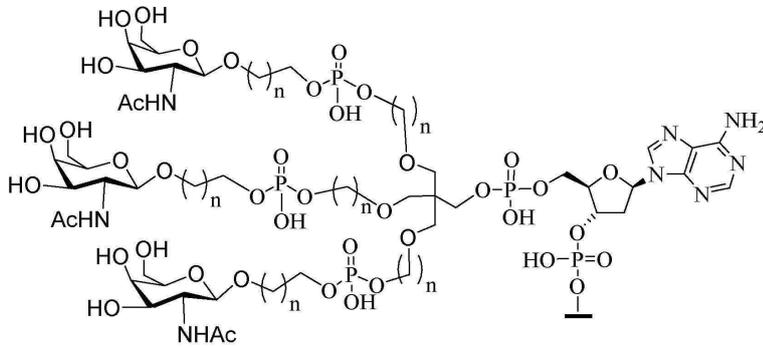
[0981]

[0982] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



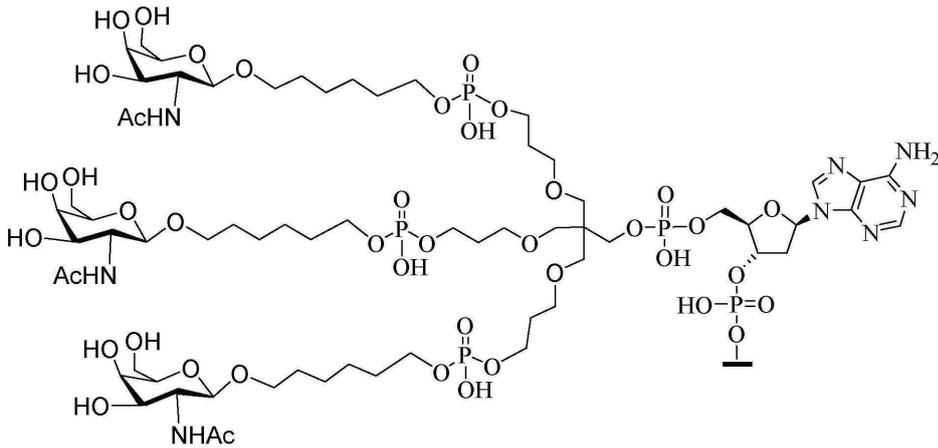
[0983]

[0984] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



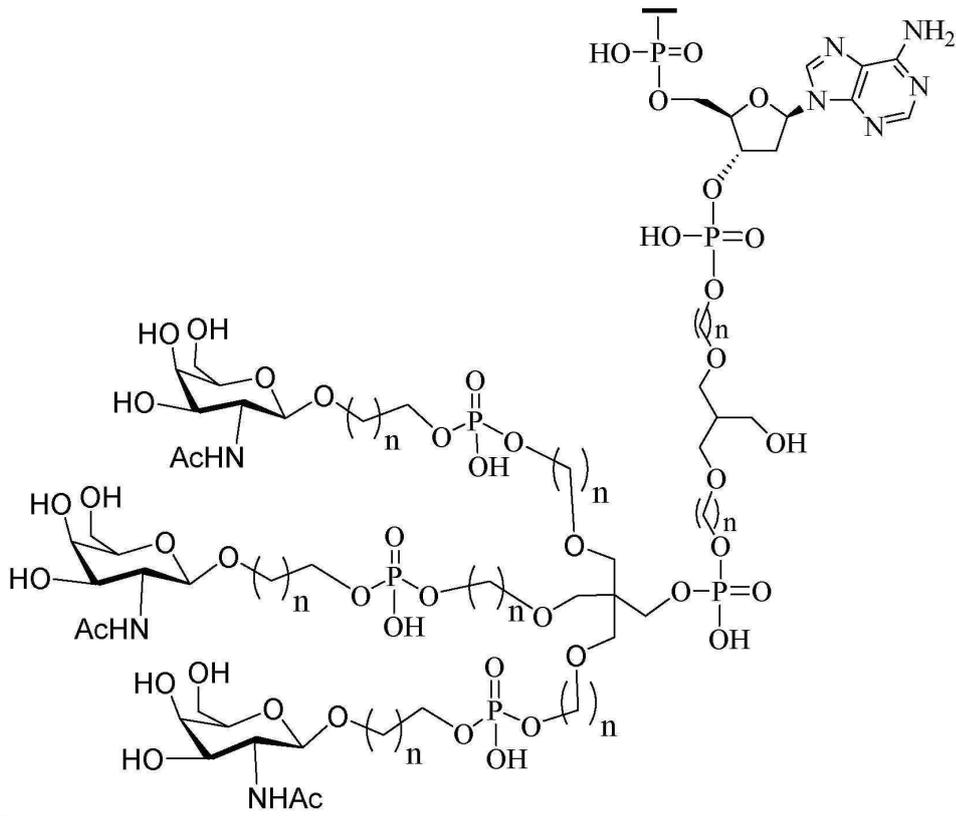
[0985]

[0986] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



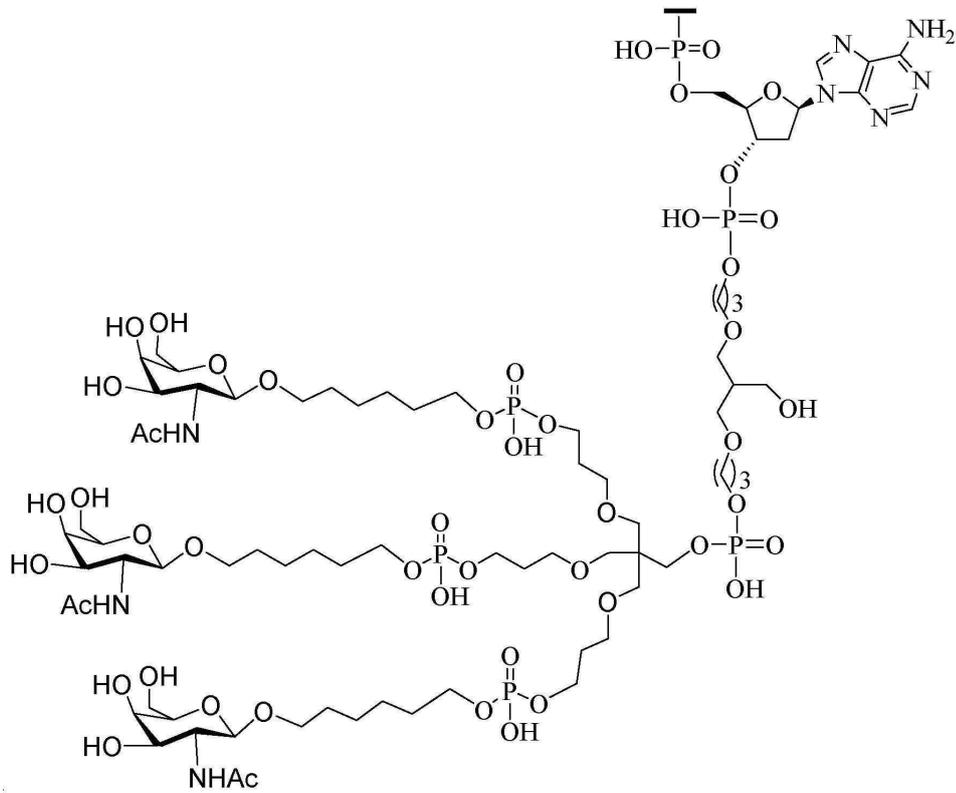
[0987]

[0988] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



[0989]

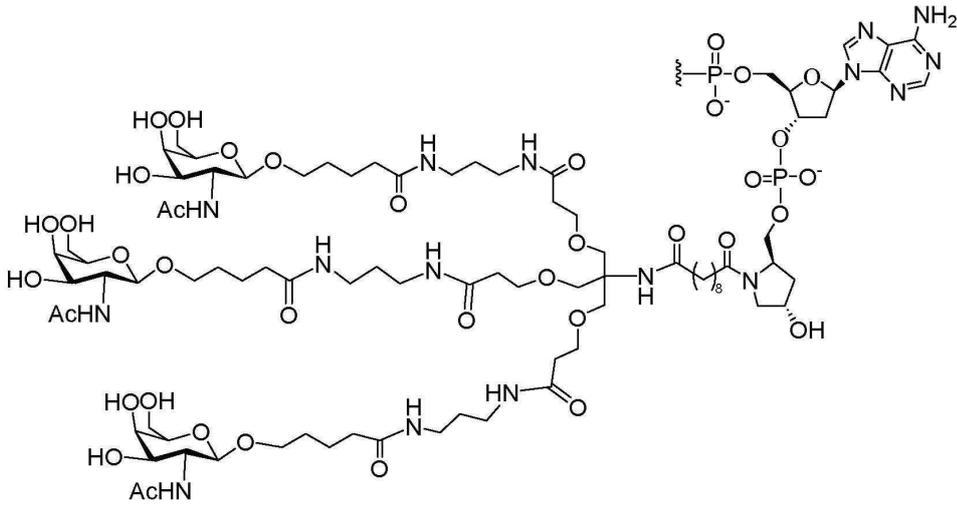
[0990] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



[0991]

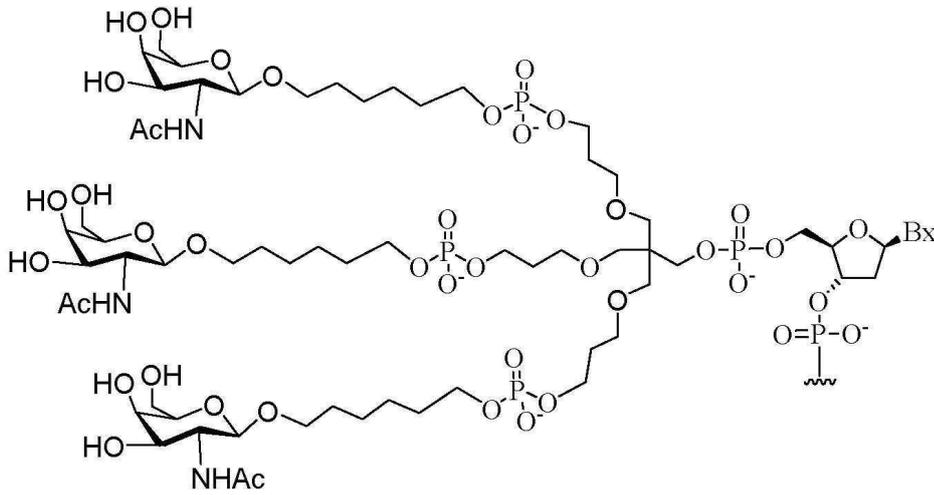
[0992] 어떤 구현예에서, 콘주게이트는 피롤리딘을 포함하지 않는다.

[0993] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



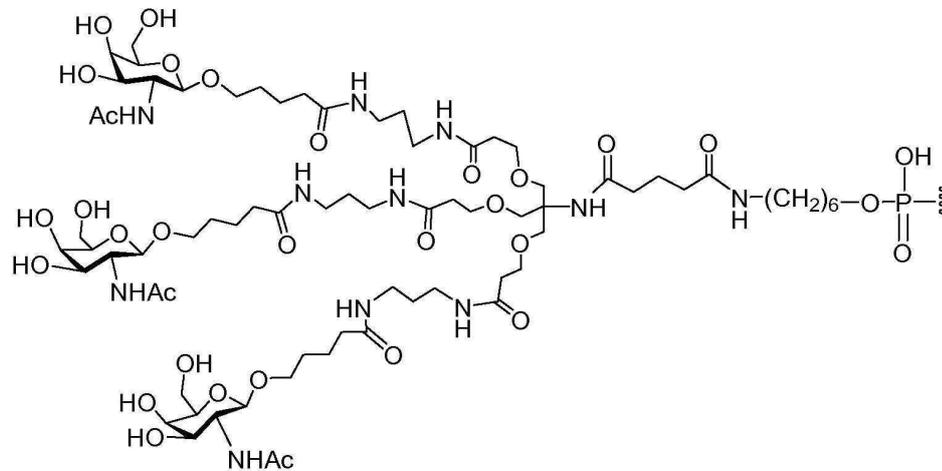
[0994]

[0995] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



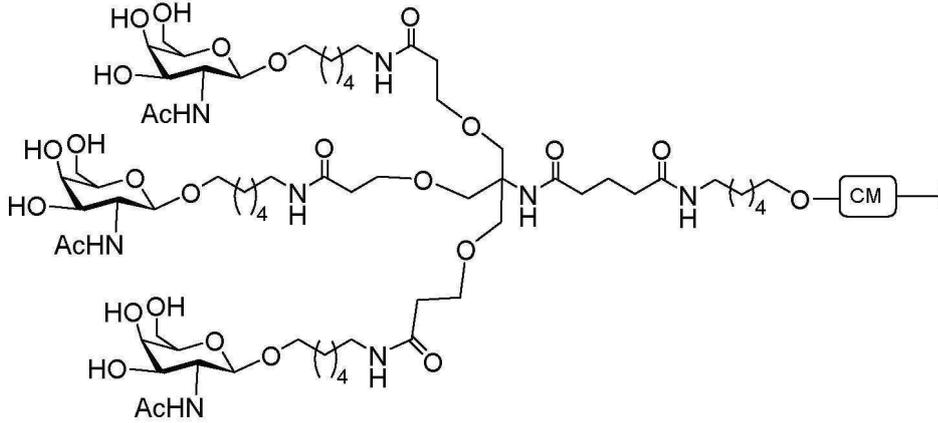
[0996]

[0997] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



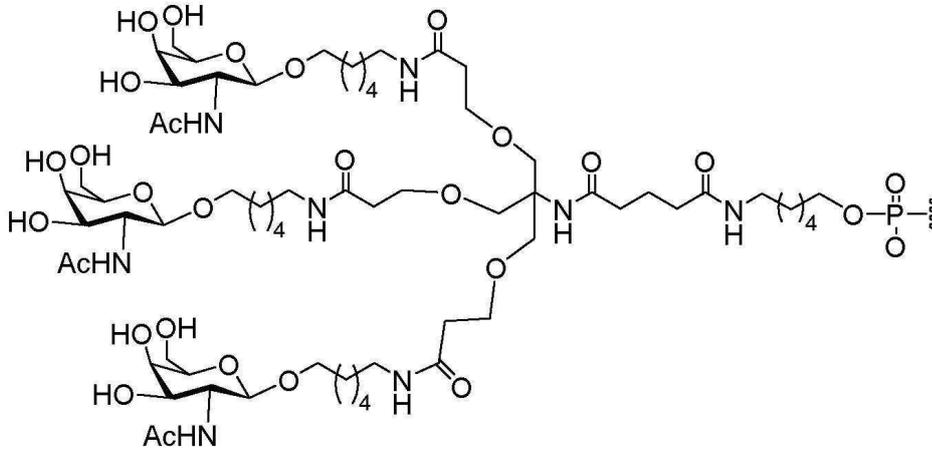
[0998]

[0999] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



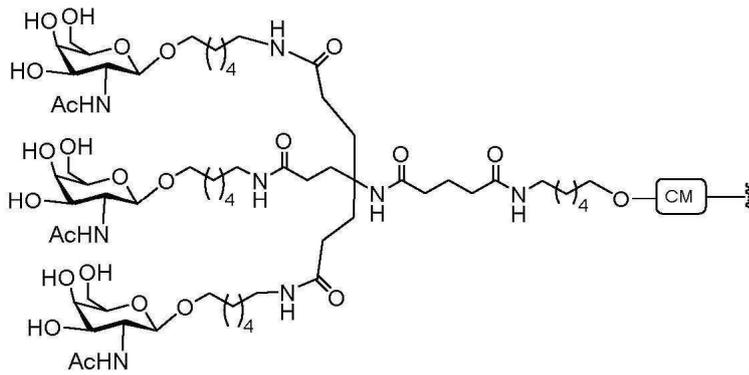
[1000]

[1001] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



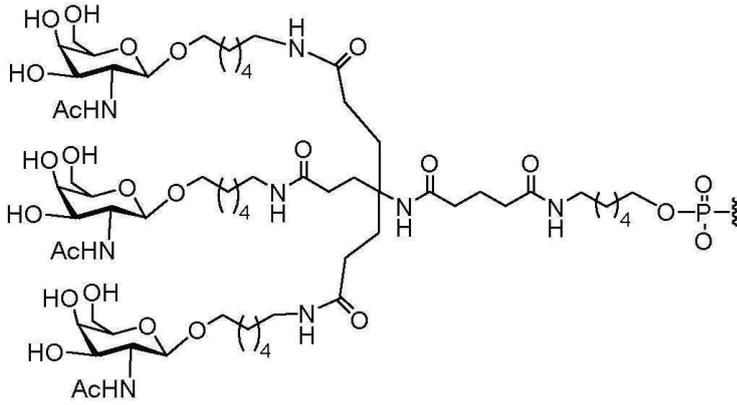
[1002]

[1003] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



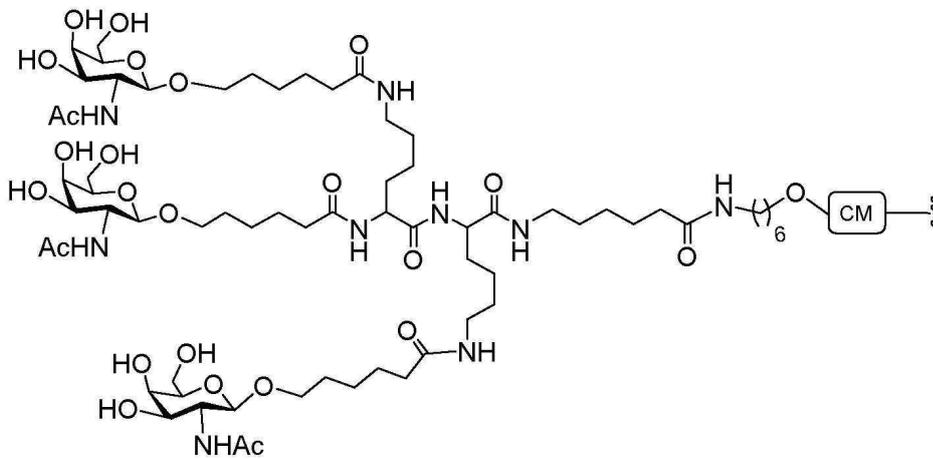
[1004]

[1005] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



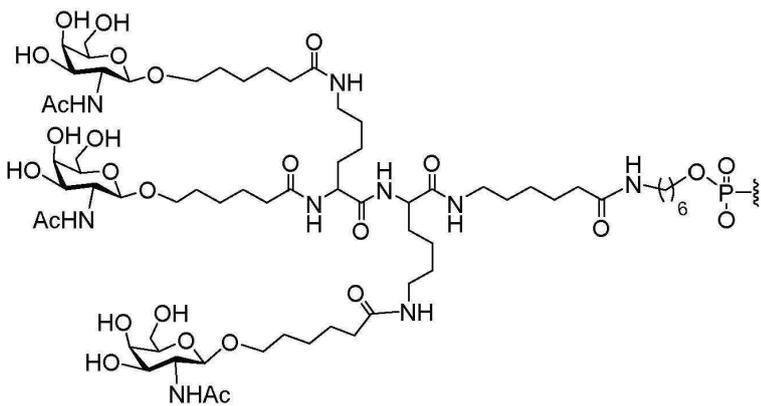
[1006]

[1007] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



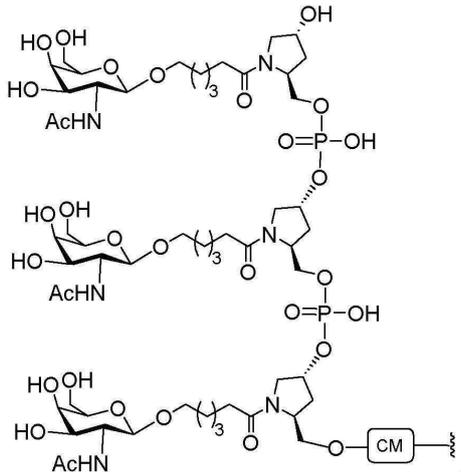
[1008]

[1009] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



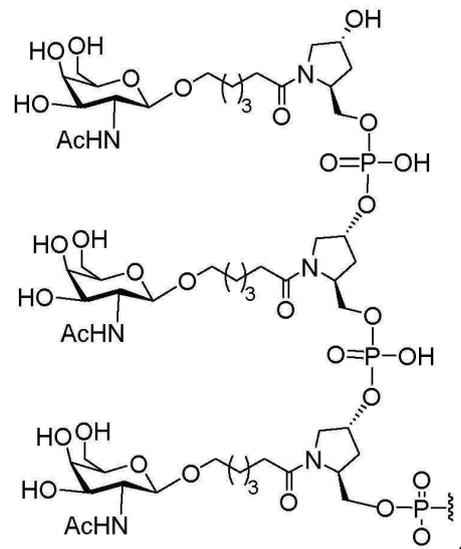
[1010]

[1011] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



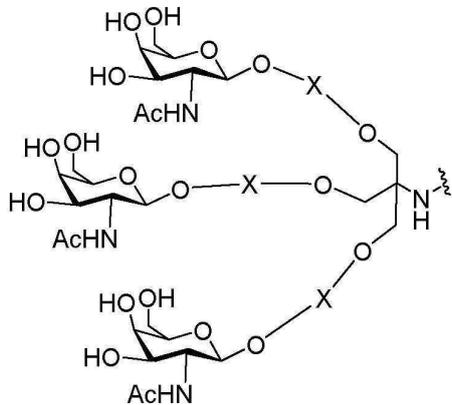
[1012]

[1013] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



[1014]

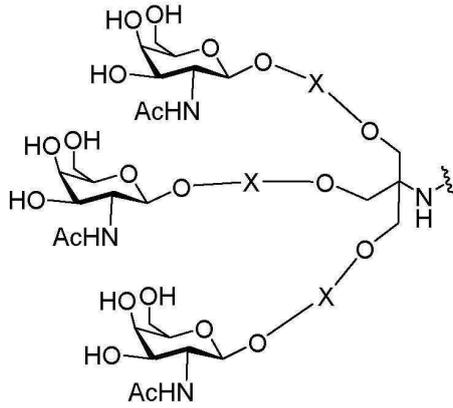
[1015] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[1016]

[1017] 여기서 X는 6 내지 11 개의 연속하여 결합된 원자의 치환된 또는 비치환된 테더이다.

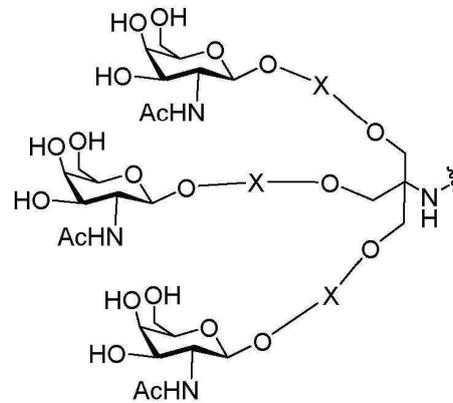
[1018] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[1019]

[1020] 여기서 X는 10 개의 연속하여 결합된 원자의 치환된 또는 비치환된 테더이다.

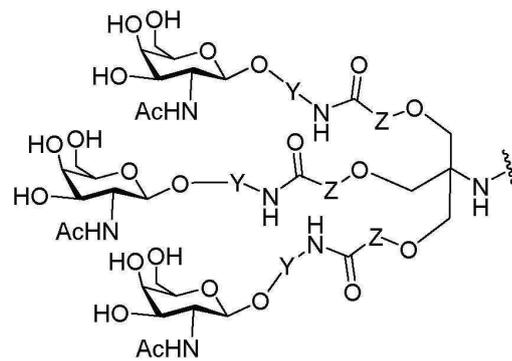
[1021] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[1022]

[1023] 여기서 X는 4 내지 11 개의 연속하여 결합된 원자의 치환된 또는 비치환된 테더이고 상기 테더는 정확하게 하나의 아미드 결합을 포함한다.

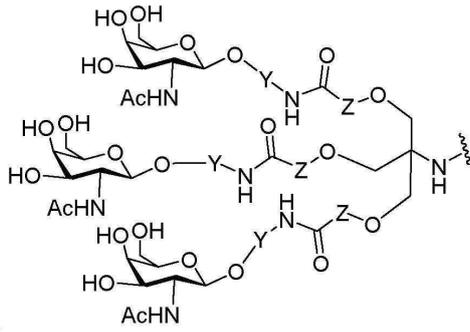
[1024] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[1025]

[1026] 여기서 Y 및 Z는 C₁-C₁₂ 치환된 또는 비치환된 알킬, 알케닐, 또는 알키닐 그룹, 또는 에테르, 케톤, 아미드, 에스테르, 카바메이트, 아민, 피페리딘, 포스페이트, 포스포디에스테르, 포스포리티오에이트, 트리아졸, 피롤리딘, 디설파이드, 또는 티오에테르를 포함하는 그룹으로부터 독립적으로 선택된다.

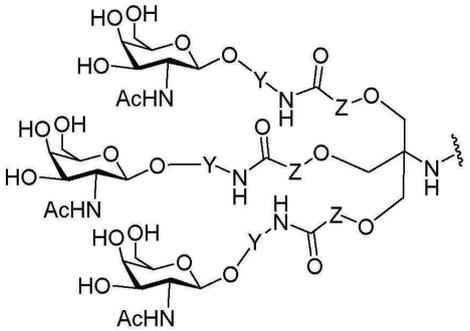
[1027] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[1028]

[1029] 여기서 Y 및 Z는 C₁-C₁₂ 치환된 또는 비치환된 알킬 그룹, 또는 정확하게 하나의 에테르 또는 정확하게 2 개의 에테르, 아마이드, 아민, 피페리딘, 포스페이트, 포스포디에스테르, 또는 포스포로티오에이트를 포함하는 그룹으로부터 독립적으로 선택된다.

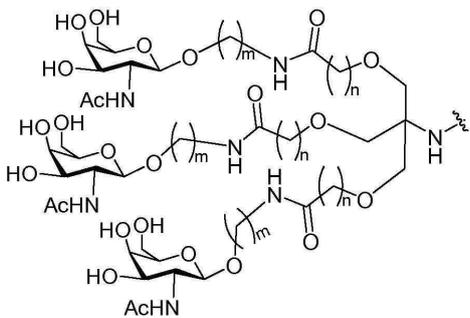
[1030] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[1031]

[1032] 여기서 Y 및 Z는 C₁-C₁₂ 치환된 또는 비치환된 알킬 그룹으로부터 독립적으로 선택된다.

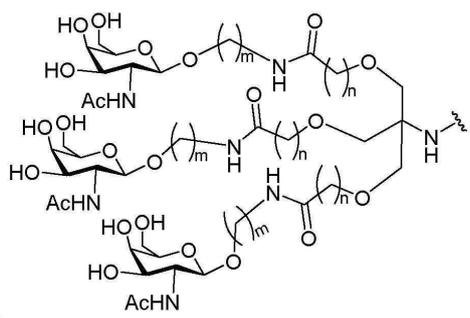
[1033] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[1034]

[1035] 여기서 m 및 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 및 12로부터 독립적으로 선택된다.

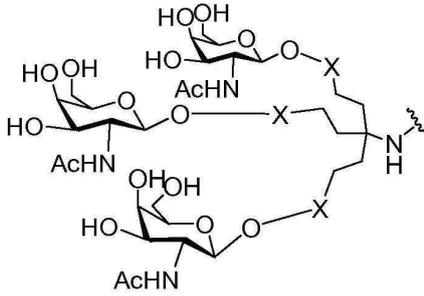
[1036] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[1037]

[1038] 여기서 m은 4, 5, 6, 7, 또는 8이고, n은 1, 2, 3, 또는 4이다.

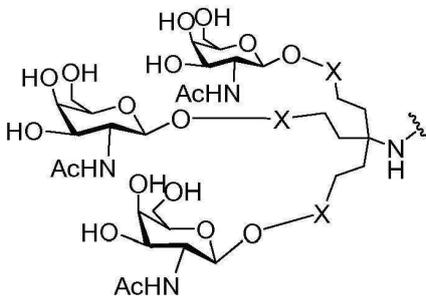
[1039] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[1040]

[1041] 여기서 X는 4 내지 13 개의 연속하여 결합된 원자의 치환된 또는 비치환된 테더이고, 여기서 X는 에테르 그룹을 포함하지 않는다.

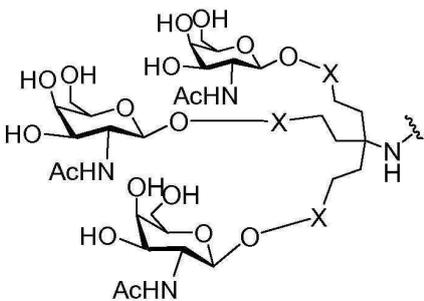
[1042] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[1043]

[1044] 여기서 X는 8 개의 연속하여 결합된 원자의 치환된 또는 비치환된 테더이고, 여기서 X는 에테르 그룹을 포함하지 않는다.

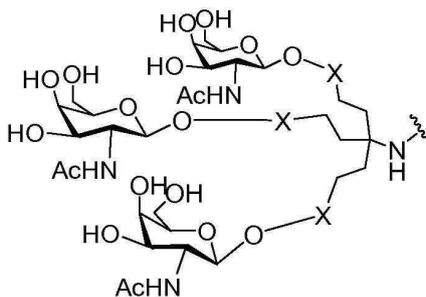
[1045] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[1046]

[1047] 여기서 X는 4 내지 13 개의 연속하여 결합된 원자의 치환된 또는 비치환된 테더이고, 상기 테더는 정확하게 하나의 아미드 결합을 포함하고, 여기서 X는 에테르 그룹을 포함하지 않는다.

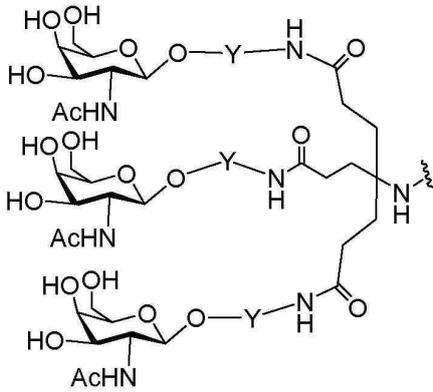
[1048] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[1049]

[1050] 여기서 X는 4 내지 13 개의 연속하여 결합된 원자의 치환된 또는 비치환된 테더이고, 상기 테더는 아마이드 결합 및 치환된 또는 비치환된 C₂-C₁₁ 알킬 그룹으로 구성된다.

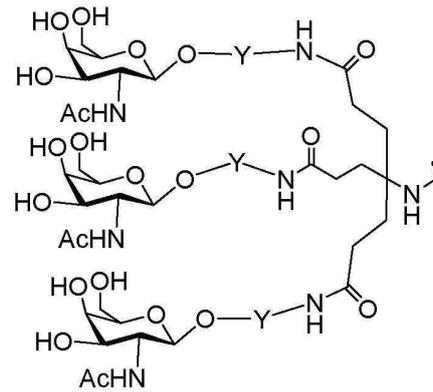
[1051] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[1052]

[1053] 여기서 Y는 C₁-C₁₂ 치환된 또는 비치환된 알킬, 알케닐, 또는 알키닐 그룹, 또는 에테르, 케톤, 아마이드, 에스테르, 카바메이트, 아민, 피페리딘, 포스페이트, 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 트리아졸, 피롤리딘, 디설파이드, 또는 티오에테르를 포함하는 그룹으로부터 선택된다.

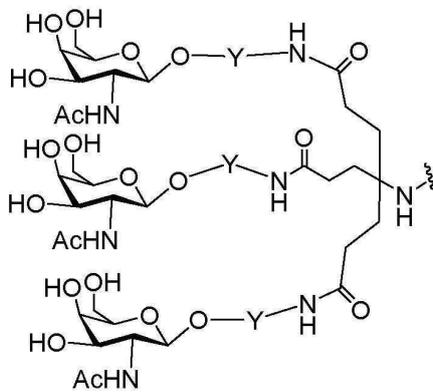
[1054] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[1055]

[1056] 여기서 Y는 C₁-C₁₂ 치환된 또는 비치환된 알킬 그룹, 또는 에테르, 아민, 피페리딘, 포스페이트, 포스포디에스테르, 또는 포스포로티오에이트를 포함하는 그룹으로부터 선택된다.

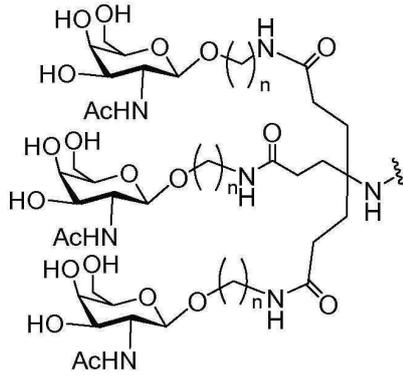
[1057] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[1058]

[1059] 여기서 Y는 C₁-C₁₂ 치환된 또는 비치환된 알킬 그룹으로부터 선택된다.

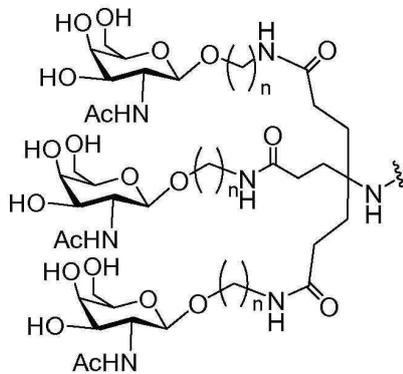
[1060] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[1061]

[1062] 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12이다.

[1063] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:

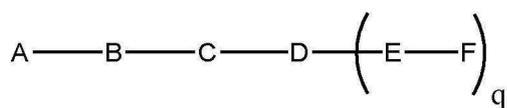


[1064]

[1065] 여기서 n은 4, 5, 6, 7, 또는 8이다.

[1066] **b. 어떤 접합된 안티센스 화합물**

[1067] 어떤 구현예에서, 콘주게이트는 뉴클레오사이드의 2', 3', 또는 5' 위치에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오사이드에 결합된다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[1068]

[1069] 여기서

[1070] A는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고;

[1071] B는 절단가능 모이어티이고;

[1072] C은 콘주게이트 링커이고;

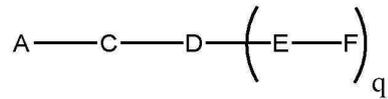
[1073] D는 분지화 그룹이고;

[1074] 각각의 E는 테더이고;

[1075] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[1076] q는 정수 1 내지 5이다.

[1077] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[1078]

[1079] 여기서

[1080] A는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고;

[1081] C은 콘주게이트 링커이고;

[1082] D는 분지화 그룹이고;

[1083] 각각의 E는 테더이고;

[1084] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[1085] q는 정수 1 내지 5이다.

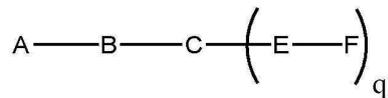
[1086] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 링커는 적어도 하나의 절단가능 결합을 포함한다.

[1087] 어떤 그와 같은 구현예에서, 분지화 그룹은 적어도 하나의 절단가능 결합을 포함한다.

[1088] 어떤 구현예에서 각각의 테더는 적어도 하나의 절단가능 결합을 포함한다.

[1089] 어떤 구현예에서, 콘주게이트는 뉴클레오타이드의 2', 3', 또는 5' 위치에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드에 결합된다.

[1090] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[1091]

[1092] 여기서

[1093] A는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고;

[1094] B는 절단가능 모이어티이고;

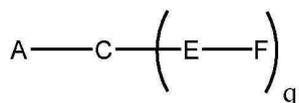
[1095] C은 콘주게이트 링커이고;

[1096] 각각의 E는 테더이고;

[1097] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[1098] q는 정수 1 내지 5이다.

[1099] 어떤 구현예에서, 콘주게이트는 뉴클레오타이드의 2', 3', 또는 5' 위치에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드에 결합된다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[1100]

[1101] 여기서

[1102] A는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고;

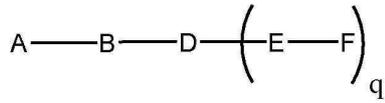
[1103] C은 콘주게이트 링커이고

[1104] 각각의 E는 테더이고;

[1105] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[1106] q는 정수 1 내지 5이다.

[1107] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[1108]

[1109] 여기서

[1110] A는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고;

[1111] B는 절단가능 모이어티이고;

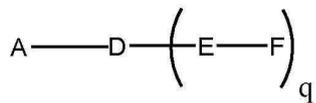
[1112] D는 분지화 그룹이고;

[1113] 각각의 E는 테더이고;

[1114] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[1115] q는 정수 1 내지 5이다.

[1116] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[1117]

[1118] 여기서

[1119] A는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고;

[1120] D는 분지화 그룹이고;

[1121] 각각의 E는 테더이고;

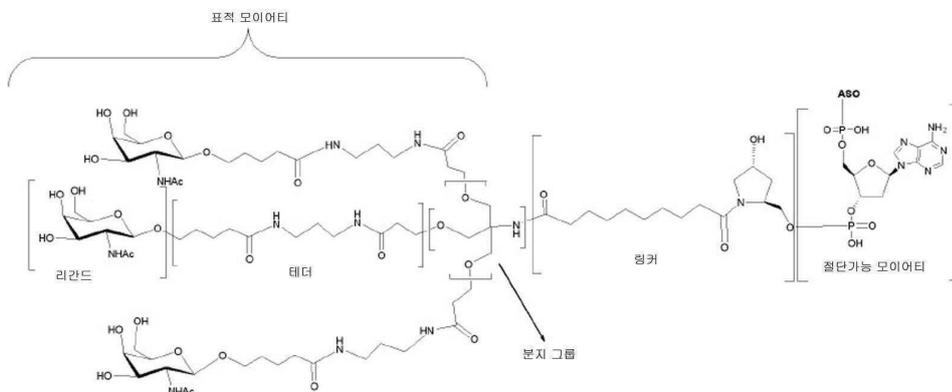
[1122] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[1123] q는 정수 1 내지 5이다.

[1124] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 링커는 적어도 하나의 절단가능 결합을 포함한다.

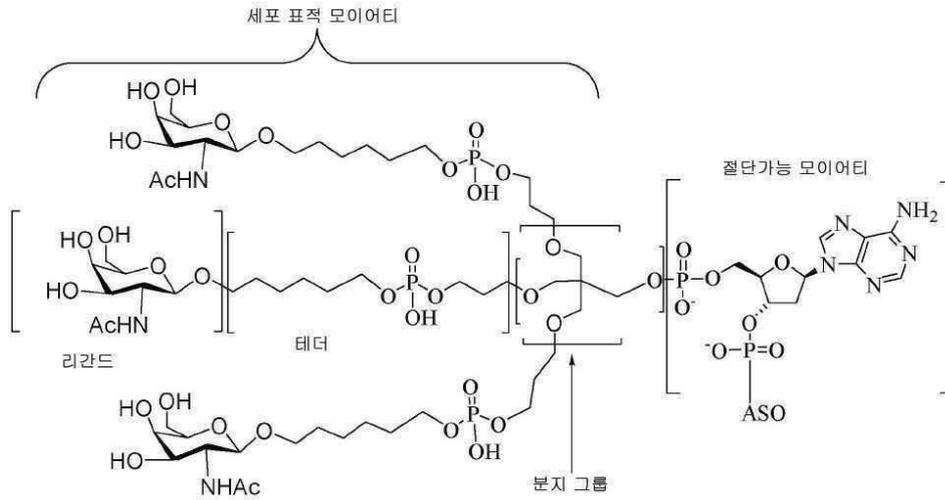
[1125] 어떤 구현예에서 각각의 테더는 적어도 하나의 절단가능 결합을 포함한다.

[1126] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



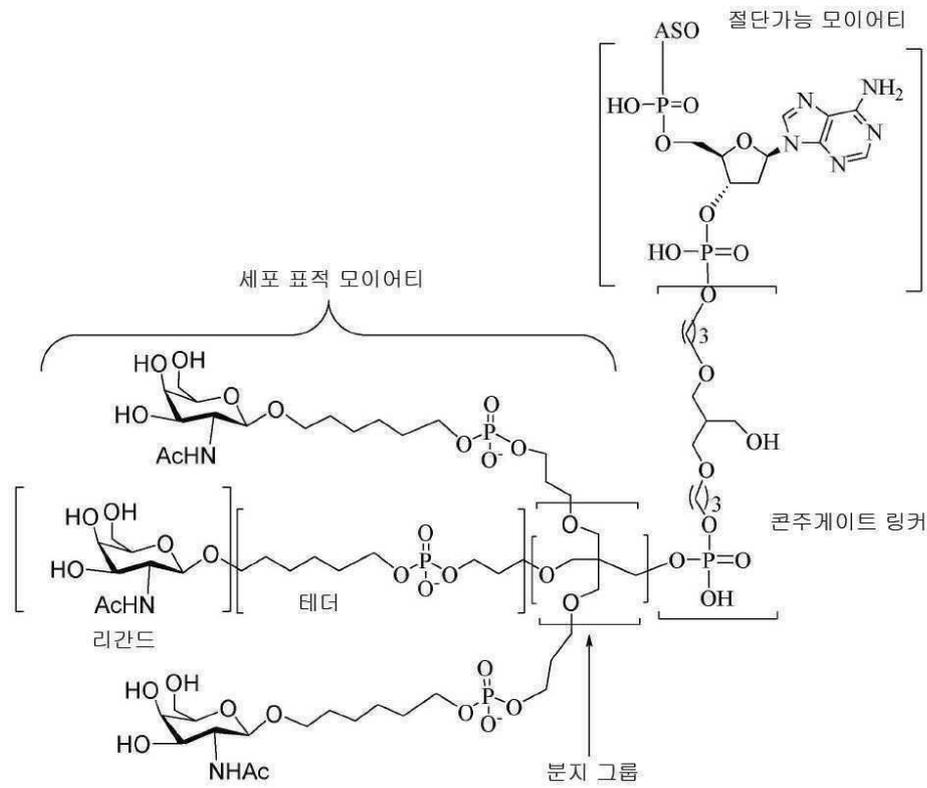
[1127]

[1128] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



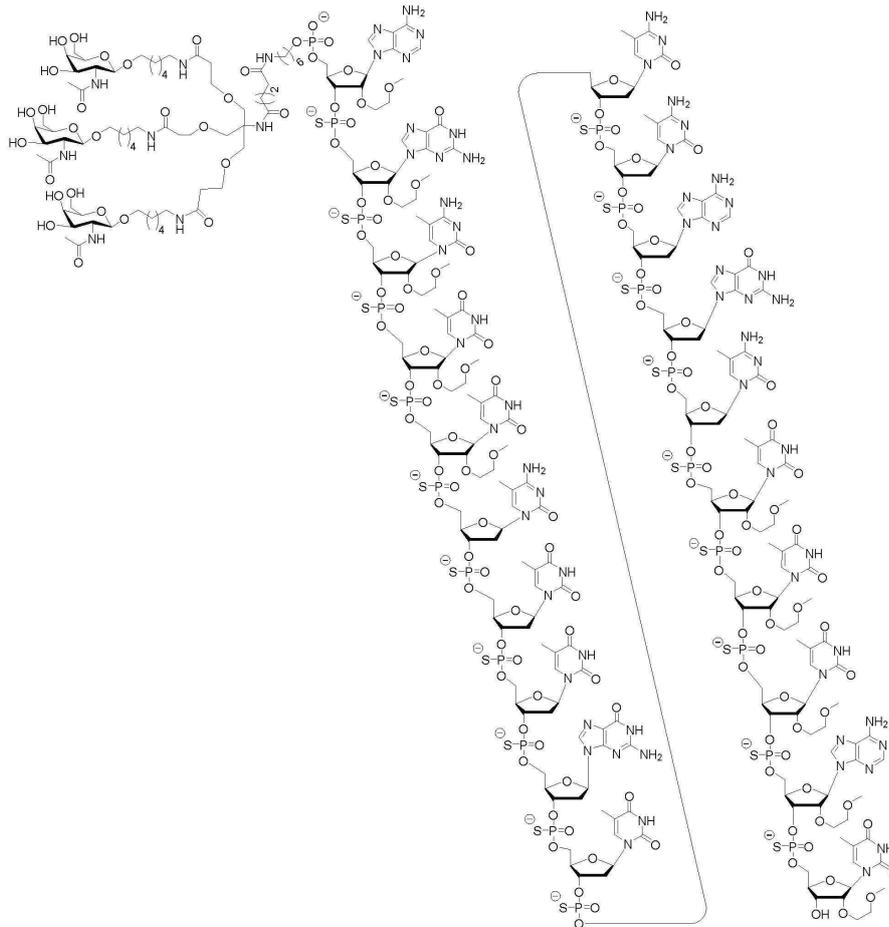
[1129]

[1130] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[1131]

[1132] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[1133]

[1134] 상기 언급된 콘주게이트, 접합된 안티센스 화합물, 테더, 링커, 분지화 그룹, 리간드, 절단가능 모이어티 뿐만 아니라 다른 변형 중 어떤 것의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허들, 미국 특허 출원 공보, 및 국제 특허 출원 공보는 비제한적으로, 하기를 포함한다: US 5,994,517, US 6,300,319, US 6,660,720, US 6,906,182, US 7,262,177, US 7,491,805, US 8,106,022, US 7,723,509, US 2006/0148740, US 2011/0123520, WO 2013/033230 및 WO 2012/037254, 이들 각각은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있다.

[1135]

상기 언급된 콘주게이트, 접합된 안티센스 화합물, 테더, 링커, 분지화 그룹, 리간드, 절단가능 모이어티 뿐만 아니라 다른 변형의 어떤 것의 제조를 교시하는 대표적인 공보는 비제한적으로, 하기를 포함한다: BIESSEN 등, "The Cholesterol Derivative of a Triantennary Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor: Potent Cholesterol Lowering Agent" J. Med. Chem. (1995) 38:1846-1852, BIESSEN 등, "Synthesis of Cluster Galactosides with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor " J. Med. Chem. (1995) 38:1538-1546, LEE 등, "New and more efficient multivalent glycoligands for asialoglycoprotein receptor of mammalian hepatocytes" Bioorganic & Medicinal Chemistry (2011) 19:2494-2500, RENSEN 등, "Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo" J. Biol. Chem. (2001) 276(40):37577-37584, RENSEN 등, "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor " J. Med. Chem. (2004) 47:5798-5808, SLIEDREGT 등, "Design and Synthesis of Novel Amphiphilic Dendritic Galactosides for Selective Targeting of Liposomes to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1999) 42:609-618, 및 Valentijn 등, "Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the Asialoglycoprotein Receptor" *Tetrahedron*, 1997, 53(2), 759-770, 이들 각각은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있다.

[1136]

어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 RNase H 기반 올리고뉴클레오타이드 (예컨대 깎머) 또는 스플라이

스 조절 올리고뉴클레오타이드 (예컨대 완전히 변형된 올리고뉴클레오타이드) 및 적어도 1, 2 또는 3 개의 GalNAc 그룹을 포함하는 임의 콘주게이트 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서 접합된 안티센스 화합물은 하기 참조 중 임의 것에서 발견된 임의 콘주게이트 그룹을 포함한다: Lee, *Carbohydr Res*, 1978, 67, 509-514; Connolly 등, *J Biol Chem*, 1982, 257, 939-945; Pavia 등, *Int J Pep Protein Res*, 1983, 22, 539-548; Lee 등, *Biochem*, 1984, 23, 4255-4261; Lee 등, *Glycoconjugate J*, 1987, 4, 317-328; Toyokuni 등, *Tetrahedron Lett*, 1990, 31, 2673-2676; Biessen 등, *J Med Chem*, 1995, 38, 1538-1546; Valentijn 등, *Tetrahedron*, 1997, 53, 759-770; Kim 등, *Tetrahedron Lett*, 1997, 38, 3487-3490; Lee 등, *Bioconjug Chem*, 1997, 8, 762-765; Kato 등, *Glycobiol*, 2001, 11, 821-829; Rensen 등, *J Biol Chem*, 2001, 276, 37577-37584; Lee 등, *Methods Enzymol*, 2003, 362, 38-43; Westerlind 등, *Glycoconj J*, 2004, 21, 227-241; Lee 등, *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(19), 5132-5135; Maierhofer 등, *Bioorg Med Chem*, 2007, 15, 7661-7676; Khorev 등, *Bioorg Med Chem*, 2008, 16, 5216-5231; Lee 등, *Bioorg Med Chem*, 2011, 19, 2494-2500; Kornilova 등, *Analyt Biochem*, 2012, 425, 43-46; Pujol 등, *Angew Chemie Int Ed Engl*, 2012, 51, 7445-7448; Biessen 등, *J Med Chem*, 1995, 38, 1846-1852; Sliedregt 등, *J Med Chem*, 1999, 42, 609-618; Rensen 등, *J Med Chem*, 2004, 47, 5798-5808; Rensen 등, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26, 169-175; van Rossenberg 등, *Gene Ther*, 2004, 11, 457-464; Sato 등, *J Am Chem Soc*, 2004, 126, 14013-14022; Lee 등, *J Org Chem*, 2012, 77, 7564-7571; Biessen 등, *FASEB J*, 2000, 14, 1784-1792; Rajur 등, *Bioconjug Chem*, 1997, 8, 935-940; Duff 등, *Methods Enzymol*, 2000, 313, 297-321; Maier 등, *Bioconjug Chem*, 2003, 14, 18-29; Jayaprakash 등, *Org Lett*, 2010, 12, 5410-5413; Manoharan, *Antisense Nucleic 산 Drug Dev*, 2002, 12, 103-128; Merwin 등, *Bioconjug Chem*, 1994, 5, 612-620; Tomiya 등, *Bioorg Med Chem*, 2013, 21, 5275-5281; 국제 출원 WO1998/013381; WO2011/038356; WO1997/046098; WO2008/098788; WO2004/101619; WO2012/037254; WO2011/120053; WO2011/100131; WO2011/163121; WO2012/177947; WO2013/033230; WO2013/075035; WO2012/083185; WO2012/083046; WO2009/082607; WO2009/134487; WO2010/144740; WO2010/148013; WO1997/020563; WO2010/088537; WO2002/043771; WO2010/129709; WO2012/068187; WO2009/126933; WO2004/024757; WO2010/054406; WO2012/089352; WO2012/089602; WO2013/166121; WO2013/165816; 미국 특허들 4,751,219; 8,552,163; 6,908,903; 7,262,177; 5,994,517; 6,300,319; 8,106,022; 7,491,805; 7,491,805; 7,582,744; 8,137,695; 6,383,812; 6,525,031; 6,660,720; 7,723,509; 8,541,548; 8,344,125; 8,313,772; 8,349,308; 8,450,467; 8,501,930; 8,158,601; 7,262,177; 6,906,182; 6,620,916; 8,435,491; 8,404,862; 7,851,615; 공개된 미국 특허 출원 공보 US2011/0097264; US2011/0097265; US2013/0004427; US2005/0164235; US2006/0148740; US2008/0281044; US2010/0240730; US2003/0119724; US2006/0183886; US2008/0206869; US2011/0269814; US2009/0286973; US2011/0207799; US2012/0136042; US2012/0165393; US2008/0281041; US2009/0203135; US2012/0035115; US2012/0095075; US2012/0101148; US2012/0128760; US2012/0157509; US2012/0230938; US2013/0109817; US2013/0121954; US2013/0178512; US2013/0236968; US2011/0123520; US2003/0077829; US2008/0108801; 및 US2009/0203132; 이들 각각은 그 전체가 참고로 편입되어 있다.

[1137] **C. 어떤 용도 및 특징**

[1138] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 *생체내* 강력한 표적 RNA 축소를 나타낸다. 어떤 구현예에서, 비접합된 안티센스 화합물은 신장에서 축적된다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 간에서 축적된다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 잘 용인된다. 그와 같은 특성이 대사성, 심혈관 및 다른 질환, 장애 또는 병태에 연루된 것을 비제한적으로 포함하는, 많은 표적 RNA의 억제에 특히 유용한 접합된 안티센스 화합물에게 부여된다. 따라서, 간 조직을 그와 같은 질환, 장애 또는 병태와 연관된 RNA에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물과 접촉시켜 그와 같은 질환, 장애 또는 병태를 치료하는 방법이 본원에서 제공된다. 따라서, 다양한 대사성, 심혈관 및 다른 질환, 장애 또는 병태의 임의 것을 본 발명의 접합된 안티센스 화합물로 개선하는 방법이 또한 본원에서 제공된다.

[1139] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 특정한 조직 농도에서 비접합된 대응물보다 더 강하다. 임의 이론 또는 기전에 구속되지를 바라지 않으면서, 어떤 구현예에서, 콘주게이트는, 접합된 안티센스 화합물이 세포에 더 효율적으로 들어가거나 세포에 더 생산적으로 들어가도록 할 수 있다. 예를 들면, 어떤 구현예에서 접합된 안티센스 화합물은 그것의 비접합된 대응물과 비교하여 더 큰 표적 축소를 나타낼 수 있고, 여기서 접합된 안티센스 화합물 및 그것의 비접합된 대응물 둘 모두는 동일한 농도로 조직에서 존재한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서 접합된 안티센스 화합물은 그것의 비접합된 대응물과 비교하여 더 큰 표적 축소를 나타낼 수 있고, 여기서 접합된 안티센스 화합물 및 그것의 비접합된 대응물 둘 모두는 동일한 농도로 간에서 존재한다.

- [1140] 올리고뉴클레오타이드의 생산적인 및 비-생산적인 흡수는 이전에 논의되었다 (참조 예를 들면 Geary, R. S., E. Wanciewicz, 등 (2009). "Effect of Dose and Plasma Concentration on Liver Uptake and Pharmacologic Activity of a 2'-Methoxyethyl Modified Chimeric Antisense Oligonucleotide Targeting PTEN." *Biochem. Pharmacol.* 78(3): 284-91; & Koller, E., T. M. Vincent, 등 (2011). "Mechanisms of single-stranded phosphorothioate modified antisense oligonucleotide accumulation in hepatocytes." *Nucleic Acids Res.* 39(11): 4795-807). 본원에서 기재된 콘주게이트 그룹은 생산적인 흡수를 향상시킬 수 있다.
- [1141] 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 콘주게이트 그룹은 특정한 유형의 세포 또는 조직에 대해 접합된 안티센스 화합물의 친화성을 증가시켜서 효능을 추가로 향상시킬 수 있다. 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 콘주게이트 그룹은 1 이상의 세포-표면 수용체에 의해 접합된 안티센스 화합물의 인식을 증가시켜서 효능을 추가로 향상시킬 수 있다. 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 콘주게이트 그룹은 접합된 안티센스 화합물의 세포내이입을 용이하게 하여 효능을 추가로 향상시킬 수 있다.
- [1142] 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는, 접합된 안티센스 화합물이 세포에 들어간 후 콘주게이트가 안티센스 올리고뉴클레오타이드로부터 절단되도록 하여 효능을 추가로 향상시킬 수 있다. 따라서, 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 필요한 것보다 더 낮은 용량으로 투여될 수 있다.
- [1143] 포스포로티오에이트 연결은 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 이전에 편입되었다. 그와 같은 포스포로티오에이트 연결은 뉴클레아제에 대해 내성이 있고 따라서 올리고뉴클레오타이드의 안정성을 향상시킨다. 게다가, 포스포로티오에이트 연결은 또한 어떤 단백질에 결합하고, 이 단백질은 간에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 축적하도록 한다. 더 적은 포스포로티오에이트 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 간에서 덜 축적되고 신장에서 더 축적된다 (참고, 예를 들면, Geary, R., "Pharmacokinetic Properties of 2'-O-(2-Methoxyethyl)-Modified Oligonucleotide Analogs in Rats," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 296, No. 3, 890-897; & *Pharmacological Properties of 2'-O-Methoxyethyl Modified Oligonucleotides* in Antisense a Drug Technology, Chapter 10, Crooke, S.T., ed., 2008) 어떤 구현예에서, 더 적은 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 및 더 많은 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 간에서 덜 축적되고 신장에서 더 축적된다. 간에서의 절환을 표적으로 할 때, 이것은 몇 개의 이유 때문에 바람직하지 않다: (1) 더 적은 약물은 원하는 작용 부위 (간)에 영향을 미치고; (2) 약물은 소변으로 빠져 들어가 있고; 그리고 (3) 신장은 신장에서 독성이 생길 수 있는 비교적 고농도의 약물에 노출된다. 따라서, 간 절환에 대해, 포스포로티오에이트 연결은 중요한 이점을 제공한다.
- [1144] 어떤 구현예에서, 그러나, 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결에 의해 균일하게 연결된 올리고뉴클레오타이드의 투여는 1 이상의 전염증 반응을 포함한다. (참고 예를 들면: *J Lab Clin Med.* 1996 Sep; **128(3):329-38**. "Amplification of antibody production by phosphorothioate oligodeoxynucleotides". Branda 등; and see also for example: *Toxicologic Properties* in Antisense a Drug Technology, Chapter 12, pages 342-351, Crooke, S.T., ed., 2008). 어떤 구현예에서, 대부분의 뉴클레오사이드간 연결이 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 투여는 1 이상의 전염증 반응을 포함한다.
- [1145] 어떤 구현예에서, 전염증 효과의 정도는 몇 개의 변수에 의존할 수 있다 (예를 들면 골격 변형, 부정확한 효과, 핵염기 변형, 및/또는 뉴클레오사이드 변형) 참고 예를 들면: *Toxicologic Properties* in Antisense a Drug Technology, Chapter 12, pages 342-351, Crooke, S.T., ed., 2008). 어떤 구현예에서, 전염증 효과의 정도 1 이상의 변수를 조정하여 완화될 수 있다. 예를 들면 주어진 올리고뉴클레오타이드의 전염증 효과의 정도는 임의 수의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결로 대체하고 그렇게 함으로써 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결의 총수를 감소시켜서 완화될 수 있고.
- [1146] 어떤 구현예에서, 안정성을 잃지 않으면서 그리고 간으로부터 신장으로의 분포를 이동시키지 않으면서 그렇게 행해질 수 있다면, 포스포로티오에이트 연결의 수를 감소시키는 것이 바람직하다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 포스포로티오에이트 연결의 수는 포스포로티오에이트 연결을 포스포디에스테르 연결로 대체하여 감소될 수 있다. 그와 같은 구현예에서, 더 적은 포스포로티오에이트 연결 및 더 많은 포스포디에스테르 연결을 갖는 안티센스 화합물은 더 적은 전염증 반응을 유도하거나 전염증 반응을 유도하지 않을 수 있다. 더 적은 포스포로티오에이트 연결 및 더 많은 포스포디에스테르 연결을 갖는 안티센스 화합물이 더 적은 전염증 반응을 유도할 수 있을지라도, 더 적은 포스포로티오에이트 연결 및 더 많은 포스포디에스테르 연결을 갖는 안티센스 화합물은 간에서 축적되지 않을 수 있고 더 많은 포스포로티오에이트 연결을 갖는 안티센스 화합물과 비교하여 동일한 또는

유사한 용량에서 덜 유효할 수 있다. 어떤 구현예에서, 따라서 복수의 포스포디에스테르 결합 및 복수의 포스포로티오에이트 결합을 갖지만 또한 간에 대한 안정성 및 우수한 분포를 갖는 안티센스 화합물을 설계하는 것이 바람직하다.

[1147] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은, 포스포로티오에이트 연결의 일부가 더 적은 전염증 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결로 대체될 때라도 비접합된 대응물보다 간에서 더 많이 축적되고 신장에서 덜 축적된다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은, 포스포로티오에이트 연결의 일부가 더 적은 전염증 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결로 대체될 때라도 그것의 비접합된 대응물과 비교하여 간에서 더 많이 축적되고 소변에서 만큼 배출되지는 않는다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트를 사용하면 더 강한 및 더 나은 용인된 안티센스 약물을 설계할 수 있다. 사실상, 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 비접합된 대응물보다 더 큰 치료 지수를 갖는다. 이것으로 접합된 안티센스 화합물이 더 높은 절대적인 용량으로 투여될 수 있는 것은, 전염증 반응의 위험이 더 적고 신장 독성의 위험이 더 적기 때문이다. 이러한 더 높은 용량이 덜 빈번하게 투여하게 되는 것은, 청소능 (대사)가 유사한 것으로 기대되기 때문이다. 게다가, 화합물은 상기에서 기재된 바와 같이 더 강하기 때문에, 농도를 더 낮게 한 후, 치료 활성을 잃지 않으면서 다음 용량 전에 더 낮게 하고, 복용 사이에 더욱 더 긴 기간을 허용한다.

[1148] 어떤 구현예에서, 일부 포스포로티오에이트 연결의 포함은 여전히 바람직하다. 예를 들면, 말단 연결은 엑소뉴클레아제에 취약하고 어떤 구현예에서, 그러한 연결은 포스포로티오에이트 또는 다른 변형된 연결이다. 2 개의 데옥시뉴클레오사이드를 연결하는 뉴클레오사이드간 연결은 엔도뉴클레아제에 취약하고 어떤 구현예에서 그러한 연결은 포스포로티오에이트 또는 다른 변형된 연결이다. 데옥시뉴클레오사이드가 연결 데옥시뉴클레오사이드의 5' 측 상에 있는 변형된 뉴클레오사이드와 데옥시뉴클레오사이드 사이의 뉴클레오사이드간 연결은 엔도뉴클레아제에 대해 취약하고 어떤 구현예에서 그러한 연결은 포스포로티오에이트 또는 다른 변형된 연결이다. 어떤 유형의 2 개의 변형된 뉴클레오사이드와, 변형된 뉴클레오사이드가 연결의 5' 측에 있는 어떤 유형의 데옥시뉴클레오사이드 및 변형된 뉴클레오사이드 사이의 뉴클레오사이드간 연결은, 연결이 포스포디에스테르일 수 있는 뉴클레아제 소화에 대해 충분히 내성이 있다.

[1149] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 16 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 15 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 14 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 13 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 12 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 11 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 10 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 9 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 8 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다.

[1150] 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 1 이상의 콘주게이트 그룹을 포함하는 안티센스 화합물은 그와 같은 1 이상의 콘주게이트 그룹이 없는 모 안티센스 화합물과 비교하여 증가된 활성 및/또는 효능 및/또는 내성을 갖는다. 따라서, 어떤 구현예에서, 그와 같은 콘주게이트 그룹의 올리고뉴클레오타이드에의 부착은 바람직하다. 그와 같은 콘주게이트 그룹은 올리고뉴클레오타이드의 5'-, 및/또는 3'-말단에서 부착될 수 있다. 어떤 예에서, 5'-말단에서의 부착은 합성적으로 바람직하다. 전형적으로, 올리고뉴클레오타이드는 당해기술에 공지되어 있는 기술을 사용하여 3' 말단 뉴클레오사이드의 고행 지지체에의 부착 및 3'에서 5'로의 뉴클레오사이드의 순차적인 커플링에 의해 합성된다. 따라서 콘주게이트 그룹이 3'-말단에 있는 것이 바람직하면, (1) 올리고뉴클레오타이드의 차후의 제조를 위해 콘주게이트 그룹을 3'-말단 뉴클레오사이드에 부착하고 상기 접합된 뉴클레오사이드를 고행 지지체에 부착할 수 있거나 (2) 합성 후에 콘주게이트 그룹을 완료된 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단 뉴클레오사이드에 부착할 수 있다. 이들 접근법의 어떤 것은 그렇게 효율적이지 않고 따라서 둘 모두는 비용이 많이 든다. 특히, 본원의 실시예에서 실증된 접합된 뉴클레오사이드의 고행 지지체에의 부착은 비효율적인 과정이다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 5'-말단 뉴클레오사이드에의 부착은 3'-말단에서의 부착보다 합성적으로 쉽다. 비-접합된 3' 말단 뉴클레오사이드를 고행 지지체에 부착할 수 있고 표준 및 잘 특성화된 반응을 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 제조할 수 있다. 그 다음 필요하지만 그 결과 최종 커플링 단계에서 콘주게이트 그룹을 갖는 5'뉴클레오사이드를 부착한다. 어떤 구현예에서, 이것은, 3'-접합된 올리고뉴클레오타이드를 제거

하기 위해 전형적으로 행해지는 바와 같이, 접합된 뉴클레오사이드를 직접적으로 고품 지지체에 부착시키는 것보다 더 효율적이다. 본원의 실시예는 5'-말단에서의 부착을 실증한다. 또한, 어떤 콘주게이트 그룹은 합성 이점을 갖는다. 예를 들면, 인 연결 그룹을 포함하는 어떤 콘주게이트 그룹은 합성적으로 더 간단하고 이전에 보고된 콘주게이트 그룹을 포함하는 다른 콘주게이트 그룹보다 더 효율적으로 제조된다 (예를 들면, WO/2012/037254).

- [1151] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 대상체에게 투여된다. 그와 같은 구현예에서, 본원에서 기재된 1 이상의 콘주게이트 그룹을 포함하는 안티센스 화합물은 그와 같은 1 이상의 콘주게이트 그룹이 없는 모 안티센스 화합물과 비교하여 증가된 활성 및/또는 효능 및/또는 내성을 갖는다. 기전에 구속되지 않으면서, 콘주게이트 그룹은 표적 세포 또는 조직으로의 분포, 전달, 및/또는 흡수를 돕는 것으로 믿는다. 어떤 구현예에서, 표적 세포 또는 조직에 일단 들어오면, 콘주게이트 그룹의 모두 또는 일부가 절단되어 활성 올리고뉴클레오타이드를 방출하는 것이 바람직하다. 어떤 구현예에서, 전체 콘주게이트 그룹이 올리고뉴클레오타이드로부터 절단되는 것이 필요한 것은 아니다. 예를 들면, 실시예 20에서, 접합된 올리고뉴클레오타이드는 마우스 및 수많은 상이한 화학적 종에 투여되었고, 올리고뉴클레오타이드 상에 남아 있는 콘주게이트 그룹의 상이한 부분을 포함하는 각각이 검출되었다 (표 23a). 이러한 접합된 안티센스 화합물은 우수한 효능을 실증했다 (표 23). 따라서, 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 다중 부분 절단의 그와 같은 대사물 프로파일은 활성/효능을 방해하지 않는다. 그럼에도 불구하고, 어떤 구현예에서 전구약물 (접합된 올리고뉴클레오타이드)가 단일 활성 화합물을 산출하는 것이 바람직하다. 어떤 예에서, 다중 형태의 활성 화합물은 발견되면, 각각의 화합물에 대해 상대적인 양 및 활성을 측정하는 것이 필요할 수 있다. 어떤 구현예에서 조절 검토가 필요한 경우 (예를 들면, USFDA 또는 대응물), 단일 (또는 주로 단일) 활성종을 갖는 것이 바람직하다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 그와 같은 단일 활성종이 임의 부분의 콘주게이트 그룹이 없는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 것이 바람직하다. 어떤 구현예에서, 5'-말단에 있는 콘주게이트 그룹은 콘주게이트 그룹의 완벽한 대사를 생기게 할 수 있을 것 같다. 기전에 구속되지 않으면서, 5' 말단에서 대사에 책임있는 내인성 효소 (예를 들면, 5' 뉴클레아제)는 3' 대응물보다 더 많은 활성/효율적인 것 같다. 어떤 구현예에서, 특이적 콘주게이트 그룹은 단일 활성종에 대한 대사를 더 잘 받아들인다. 어떤 구현예에서, 어떤 콘주게이트 그룹은 올리고뉴클레오타이드에 대한 대사를 더 잘 받아들인다.

[1152] D. 안티센스

- [1153] 어떤 구현예에서, 본 발명의 올리고머 화합물은 안티센스 화합물이다. 그와 같은 구현예에서, 올리고머 화합물은 표적 핵산에 대해 상보적이다. 어떤 구현예에서, 표적 핵산은 RNA이다. 어떤 구현예에서, 표적 핵산은 비-코딩 RNA이다. 어떤 구현예에서, 표적 핵산은 단백질을 인코딩한다. 어떤 구현예에서, 표적 핵산은 mRNA, 전-mRNA, microRNA, 작은 비-코딩 RNA를 포함하는 비-코딩 RNA, 및 프로모터-지향된 RNA로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 1 초과의 표적 핵산에 대해 적어도 부분적으로 상보적이다. 예를 들면, 본 발명의 올리고머 화합물은 다중 표적에 전형적으로 결합하는 microRNA 모사체일 수 있다.

- [1154] 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 핵산의 핵염기 서열에 대해 적어도 70% 상보적인 핵염기 서열을 갖는 부분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 핵산의 핵염기 서열에 대해 적어도 80% 상보적인 핵염기 서열을 갖는 부분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 핵산의 핵염기 서열에 대해 적어도 90% 상보적인 핵염기 서열을 갖는 부분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 핵산의 핵염기 서열에 대해 적어도 95% 상보적인 핵염기 서열을 갖는 부분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 핵산의 핵염기 서열에 대해 적어도 98% 상보적인 핵염기 서열을 갖는 부분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 핵산의 핵염기 서열에 대해 적어도 100% 상보적인 핵염기 서열을 갖는 부분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 안티센스 화합물의 전장에 걸쳐 표적 핵산의 핵염기 서열에 대해 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 100% 상보적이다.

- [1155] 안티센스 기전은 올리고머 화합물과 표적 핵산과의 혼성화를 수반하는 임의 기전을 포함하고, 상기 혼성화로 생물학적 효과가 생긴다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 혼성화로, 예를 들면, 표적 핵산 또는 표적 핵산과 상호작용하는 핵산의 번역, 전사, 또는 폴리아데닐화를 수반하는 세포 기구의 수반되는 억제 또는 자극과 함께 표적 핵산 저하 또는 점유가 생긴다.

- [1156] 표적 RNA의 저하를 수반하는 유형의 안티센스 기전은 RNase H 매개된 안티센스이다. RNase H는 RNA:DNA 듀플렉스의 RNA 가닥을 절단하는 세포성 엔도뉴클레아제이다. "DNA-유사"한 단일가닥 안티센스 화합물이 포유동물 세포에서 RNase H 활성을 유도하는 것으로 당해기술에서 공지되어 있다. 따라서 RNase H의 활성화로, RNA 표적이 절단되고, 그렇게 함으로써 유전자 발현의 DNA-유사 올리고뉴클레오타이드-매개된 억제의 효율이 크게

향상된다.

[1157] 안티센스 기전은 또한, RISC 경로를 이용하는 RNAi 기전을 비제한적으로 포함한다. 그와 같은 RNAi 기전은, 비제한적으로 siRNA, ssRNA 및 microRNA 기전을 포함한다. 그와 같은 기전은 microRNA 모사체 및/또는 항-microRNA의 창출을 포함한다.

[1158] 안티센스 기전 또한, microRNA 또는 mRNA 이외의 비-코딩 RNA를 혼성화하거나 모방하는 기전을 비제한적으로 포함한다. 그와 같은 비-코딩 RNA는 1 이상의 핵산의 전사 또는 번역에 영향을 미치는 프로모터-지향된 RNA 및 짧은 및 긴 RNA를 비제한적으로 포함한다.

[1159] 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 RNAi 화합물이다. 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 콘주게이트를 포함하는 올리고머 올리고뉴클레오타이드는 ssRNA 화합물이다. 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 제 2 올리고머 화합물과 쌍을 이루어 siRNA를 형성한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 제 2 올리고머 화합물은 또한 콘주게이트를 포함한다. 어떤 구현예에서, 제 2 올리고머 화합물은 임의 변형된 또는 비변형된 핵산이다. 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 siRNA 화합물 중 안티센스 가닥이다. 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 siRNA 화합물 중 센스 가닥이다. 접합된 올리고머 화합물이 이중-가닥 siRNA인 구현예에서, 콘주게이트는 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 센스 가닥과 안티센스 가닥 둘 모두 상에 있을 수 있다.

[1160] **D. 아포지질단백질 C-III (apoCIII)**

[1161] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 임의 ApoCIII 핵산을 표적으로 한다. 어떤 구현예에서, 표적 핵산은 임상적으로 관련된 ApoCIII 표적 단백질을 인코딩한다. 그와 같은 구현예에서, 표적 핵산의 조절로 임상 이득이 생긴다.

[1162] 표적화 과정은 보통, 원하는 효과가 생기도록 하기 위해 안티센스 상호작용에 대한 표적 핵산 내의 적어도 하나의 표적 영역, 분절, 또는 부위의 결정을 포함한다.

[1163] 어떤 구현예에서, 표적 영역은 핵산의 구조적으로 규정된 영역이다. 예를 들면, 어떤 그와 같은 구현예에서, 표적 영역은 3' UTR, 5' UTR, 엑손, 인트론, 코딩 영역, 번역 개시 영역, 번역 종료 영역, 또는 다른 규정된 핵산 영역 또는 표적 분절을 포함할 수 있다.

[1164] 어떤 구현예에서, 표적 분절은, 접합된 안티센스 화합물이 표적화된 표적 영역의 8-핵염기부에 적어도 관한 것이다. 표적 분절은 표적 분절 중 하나의 5'-말단으로부터 적어도 8 개의 연속되는 핵염기를 포함하는 DNA 또는 RNA 서열을 포함할 수 있다 (잔여 핵염기는 표적 분절의 5'-말단의 업스트림을 즉시 시작하고 DNA 또는 RNA가 약 8 내지 약 30 개의 핵염기를 포함할 때까지 계속되는 동일한 DNA 또는 RNA의 연속되는 스트레치이다). 표적 분절은 또한 표적 분절 중 하나의 3'-말단으로부터 적어도 8 개의 연속되는 핵염기를 포함하는 DNA 또는 RNA 서열로 나타낸다 (잔여 핵염기는 표적 분절의 3'-말단의 업스트림을 즉시 시작하고 DNA 또는 RNA가 약 8 내지 약 30 개의 핵염기를 포함할 때까지 계속되는 동일한 DNA 또는 RNA의 연속되는 스트레치이다). 표적 분절은 표적 분절의 서열의 내부 부분으로부터 적어도 8 개의 연속되는 핵염기를 포함하는 DNA 또는 RNA 서열로 또한 나타낼 수 있고, 접합된 안티센스 화합물이 약 8 내지 약 30 개의 핵염기를 포함할 때까지 하나 또는 둘 모두 방향으로 연장될 수 있다.

[1165] 어떤 구현예에서, ApoCIII 핵산에 대해 표적화된 안티센스 화합물은 본원에서 기재된 바와 같이 변형될 수 있다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 본원에서 기재된 바와 같이 변형된 당 모이어티, 비변형된 당 모이어티 또는 변형된 및 비변형된 당 모이어티의 혼합물을 가질 수 있다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 본원에서 기재된 바와 같이 변형된 뉴클레오사이드간 연결, 비변형된 뉴클레오사이드간 연결 또는 변형된 및 비변형된 뉴클레오사이드간 연결의 혼합물을 가질 수 있다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 본원에서 기재된 바와 같이 변형된 핵염기, 비변형된 핵염기 또는 변형된 및 비변형된 핵염기의 혼합물을 가질 수 있다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 본원에서 기재된 모티프를 가질 수 있다.

[1166] 어떤 구현예에서, ApoCIII 핵산에 대해 표적화된 안티센스 화합물은 본원에서 기재된 바와 같이 접합될 수 있다.

[1167] ApoCIII은 HDL 및 트리글리세라이드 (TG)-풍부 지질단백질의 구성요소이다. 상승된 ApoCIII 수준은 상승된 TG 수준 및 질환 예컨대 심혈관 질환, 대사성 증후군, 비만 및 당뇨병과 연관되어 있다. 상승된 TG 수준은 췌장염

과 연관되어 있다. ApoCIII은 지질단백질 리파제 (LPL)의 억제를 통해 그리고 세포-표면 글리코사미노글리칸 매트릭스에 결합하는 지질단백질에 의해 개체를 통해 지방분해를 억제함으로써 TG-풍부 지질단백질의 청소능을 느리게 한다. ApoCIII을 표적으로 하는 안티센스 화합물은 하기에서 이전에 개시되었다: W02004/093783 및 W02012/149495, 각각은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있다.

[1168] ApoCIII 핵산에 대해 표적화된 어떤 접합된 안티센스 화합물

[1169] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 (서열번호: 1로서 편입된) GENBANK® 수납 번호 NM_000040.1; (서열번호: 2로서 편입된) 뉴클레오타이드 20262640 내지 20266603로부터 끝이 잘린 유전자은행 수납 번호 NT_033899.8; 및 (서열번호: 3으로서 편입된) 뉴클레오타이드 6238608 내지 6242565로부터 끝이 잘린 유전자은행 수납 번호 NT_035088.1 중 임의 것의 서열을 갖는 ApoCIII 핵산에 대해 표적화된다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 1-3 중 임의 것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 상보적이다.

[1170] 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 87의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 87의 핵염기 서열을 포함한다.

[1171] 표 A: ApoCIII 서열번호: 1에 대해 표적화된 안티센스 화합물

ISIS 번호	표적 개시 부위	서열 (5'-3')	모티프	서열번호
304801	508	AGCTTCTGTCCAGCTTTAT	eeeeeddddddddeeeee	87
647535	508	AGCTTCTGTCCAGCTTTAT	eeeeeddddddddeeeeeod	87
616468	508	AGCTTCTGTCCAGCTTTAT	eeeeeddddddddeeeee	87
647536	508	AGCTTCTGTCCAGCTTTAT	eeoeoeoeoddddddddeoeoe oeeeod	87

[1172]

[1173] ApoCIII 치료적 징후

[1174] 어떤 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 ApoCIII의 발현을 조절하기 위해 ApoCIII 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물을 사용하는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, ApoCIII의 발현은 축소된다.

[1175] 어떤 구현예에서, 본 발명은 대상체를 치료하기 위한 약제학적 조성물에서 ApoCIII 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물을 사용하는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 대상체는 심혈관 및/또는 대사성 질환, 장애 또는 병태를 갖는다. 어떤 구현예에서, 대상체는 하기를 갖는다: 파트리글리세라이드혈증, 비-가족성 파트리글리세라이드혈증, 가족성 파트리글리세라이드혈증, 이종접합 가족성 파트리글리세라이드혈증, 동종접합 가족성 파트리글리세라이드혈증, 혼합된 이상지질혈증, 죽상동맥경화증, 죽상동맥경화증을 발달시킬 위험, 관상동맥 심장병, 관상동맥 심장병의 이력, 조기 발병 관상동맥 심장병, 관상동맥 심장병에 대한 1 이상의 위험 인자, II형 당뇨병, 이상지질혈증을 수반하는 II형 당뇨병, 이상지질혈증, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, 과지방산혈증, 간 지방증, 비-알코올성 지방간염, 췌장염 및/또는 비-알코올성 지방간 질환.

[1176] 어떤 구현예에서, 본 발명은 약제의 제조에서 ApoCIII 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물을 사용하는 방법을 제공한다.

[1177] E. 어떤 핵산 GalNAc 콘주게이트

[1178] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 핵염기 서열을 갖는 안티센스 화합물 및 GalNAc 콘주게이트에 부착된 아래의 표의 안티센스 화합물의 변형을 포함한다. 모든 뉴클레오사이드간 연결은, 달리 지적되지 않으면 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결이다. 하첨자 "l"는 LNA 바이사이클릭 뉴클레오사이드를 나타낸다. 하첨자 "d"는 2'-데옥시 뉴클레오사이드를 나타낸다. 하첨자 "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타낸다. "V"는 2-아미노-2'-데옥시아데노신을 나타낸다.

[1179] 표 B

서열 5' 에서 3'	모티프	화학	뉴클레오사이드간 연결	서열번호
T ₁ G ₁ G ₁ C ₁ A ₁ A ₁ G ₁ C ₁ A ₁ T ₁ C ₁ C ₁ G ₁ T ₁ A ₁	3-9-3-1	LNA/테옥시	포스포로티오에이트	222
C ₁ T ₁ C ₁ A ₁ A ₁ T ₁ C ₁ C ₁ A ₁ T ₁ G ₁ G ₁ C ₁ A ₁ G ₁ C ₁	4-8-3-1	LNA/테옥시	포스포로티오에이트	223
A ₁ C ₁ C ₁ A ₁ A ₁ G ₁ T ₁ T ₁ C ₁ C ₁ A ₁ T ₁ C ₁ A ₁ G ₁ C ₁	3-10-3	LNA/테옥시	포스포로티오에이트	224
G ₁ C ₁ A ₁ T ₁ T ₁ G ₁ G ₁ T ₁ A ₁ T ₁ C ₁ A ₁	2-8-3	LNA/테옥시	포스포로티오에이트	225
T ₁ T ₁ C ₁ A ₁ G ₁ C ₁ A ₁ T ₁ T ₁ G ₁ G ₁ T ₁ A ₁ T ₁ C ₁ A ₁ G ₁ T ₁ G ₁	5-10-5	LNA/테옥시	포스포로티오에이트	226
C ₁ A ₁ G ₁ C ₁ A ₁ T ₁ T ₁ G ₁ G ₁ T ₁ A ₁ T ₁ C ₁ A ₁ G ₁	3-10-3	LNA/테옥시	포스포로티오에이트	227
C ₁ A ₁ G ₁ C ₁ A ₁ T ₁ T ₁ G ₁ G ₁ T ₁ A ₁ T ₁ C ₁ A ₁	3-9-3	LNA/테옥시	포스포로티오에이트	228
A ₁ G ₁ C ₁ A ₁ T ₁ T ₁ G ₁ G ₁ T ₁ A ₁ T ₁ C ₁ A ₁	3-8-3	LNA/테옥시	포스포로티오에이트	229
G ₁ C ₁ A ₁ T ₁ T ₁ G ₁ G ₁ T ₁ A ₁ T ₁ C ₁	2-8-2	LNA/테옥시	포스포로티오에이트	230
CGGCATGCTATTTTGTGA			포스포로티오에이트	231
GGCTAAATCGCTCCACCAAG			포스포로티오에이트	232
CTCTAGCGTCTTAAAGCCGA			포스포로티오에이트	233
GCTGCATGATCTCCTTGGCG			포스포로티오에이트	234
ACGTTGAGGGGCATCGTCGC			모폴리노	235
GGGTCTGCVGCGGVTTGGT			포스포로티오에이트	236
GTTVCTVCTCCVCTCCTCTG			포스포로티오에이트	237
TATCCGGAGGGCTCGCCATGCTGCT			포스포로티오에이트	238
T _c C _c C _c C _c G _c C _c CTGTGACAT _c G _c C _c A _c T _c T _c	6-8-6	MOE/테옥시		239
C _e A _e G _e C _e AGCAGAGTCTTCAT _e C _e A _e T _e	4-13-4	MOE/테옥시		240
G _e G _e G _e A _e C _e G _e C _e G _e G _e C _e G _e C _e T _e C _e G _e T _e C _e A _e T _e	4-12-4	MOE/테옥시		241
C _e C _e A _e C _e A _e A _e G _e C _e T _e G _e T _e C _e C _e A _e G _e T _e C _e T _e A _e A _e	5-10-5	MOE/테옥시		242
C _e C _e G _e C _e A _e G _e C _e C _e A _e T _e G _e C _e C _e T _e C _e T _e T _e G _e G _e	3-9-8	MOE/테옥시		243

[1180]

[1181] F. 어떤 약제학적 조성물

[1182] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 1 이상의 안티센스 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 약제학적 조성물은 적당한 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 보균자를 포함한다. 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 멸균한 염수 용액 및 1 이상의 안티센스 화합물을 포함한다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 약제학적 조성물은 멸균한 염수 용액 및 1 이상의 안티센스 화합물 로 구성된다. 어떤 구현예에서, 멸균한 염수는 약품 등급 염수이다. 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 1 이상의 안티센스 화합물 및 멸균수를 포함한다. 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 1 이상의 안티센스 화합물 및 멸균수 로 구성된다. 어떤 구현예에서, 멸균한 염수는 약품 등급 물이다. 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 1 이상의 안티센스 화합물 및 포스페이트-완충된 염수 (PBS)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 1 이상의 안티센스 화합물 및 멸균한 포스페이트-완충된 염수 (PBS) 로 구성된다. 어떤 구현예에서, 멸균한 염수는 약품 등급 PBS이다.

[1183] 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 약제학적 조성물 또는 제형의 제조를 위해 약제학적으로 허용가능한 활성 및/또는 불활성 물질과 혼합될 수 있다. 약제학적 조성물의 제형을 위한 조성물 및 방법은 투여 경로, 질환 정도, 또는 투여될 용량을 비제한적으로 포함하는 수많은 기준에 의존한다.

[1184] 안티센스 화합물을 포함하는 약제학적 조성물은 임의 약제학적으로 허용가능한 염, 에스테르, 또는 그와 같은 에스테르의 염을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물을 포함하는 약제학적 조성물은, 인간을 포함하는 동물에게 투여시, (직접적으로 또는 간접적으로) 생물학적 활성 대사물 또는 그것의 잔류물을 제공할 수 있는 1 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 따라서, 예를 들면, 본 개시내용은 또한 안티센스 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염, 전구약물, 그와 같은 전구약물의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 다른 생물동등성에 관한 것이다. 적당한 약제학적으로 허용가능한 염은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 나트륨 및 칼륨 염.

[1185] 전구약물은 활성 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형성하기 위해 신체 내의 내인성 뉴클레아제에 의해 절단된 올리고뉴클레오타이드의 하나 또는 둘 모두의 말단에서 추가의 뉴클레오사이드의 편입을 또한 포함할 수 있다.

[1186] 지질 모이어티는 다양한 방법으로 핵산 치료에서 사용되었다. 어떤 그와 같은 방법에서, 핵산은 양이온성 지질 및 중성 지질의 혼합물로 만들어진 미리형성된 리포솜 또는 리포플렉스에 도입된다. 어떤 방법에서, 모노- 또는 폴리-양이온성 지질을 갖는 DNA 복합체는 중성 지질의 존재없이 형성된다. 어떤 구현예에서, 지질 모이어티는 특정한 세포 또는 조직에 대한 약제의 분포를 증가시키기 위해 선택된다. 어떤 구현예에서, 지질 모이어티는 지방 조직에 대한 약제의 분포를 증가시키기 위해 선택된다. 어떤 구현예에서, 지질 모이어티는 근육 조직에 대한 약제의 분포를 증가시키기 위해 선택된다.

[1187] 어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 약제학적 조성물은 1 이상의 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 1 이상의 부형제를 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 부형제는 물, 염 용액, 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 젤라틴, 락토

오스, 아밀라아제, 마그네슘 스테아레이트, 탈크, 규산, 점성 파라핀, 하이드록시메틸셀룰로오스 및 폴리비닐피롤리돈로부터 선택된다.

- [1188] 어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 약제학적 조성물은 전달 시스템을 포함한다. 전달 시스템의 예는, 비제한적으로, 리포솜 및 에멀전을 포함한다. 어떤 전달 시스템은 소수성 화합물을 포함하는 것을 포함하는 어떤 약제학적 조성물을 제조하는데 유용하다. 어떤 구현예에서, 어떤 유기 용매 예컨대 디메틸설폭사이드가 사용된다.
- [1189] 어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 약제학적 조성물은 본 개시내용의 1 이상의 약제를 특정 조직 또는 세포형에 전달하기 위해 설계된 1 이상의 조직-특이적 전달 분자를 포함한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 조직-특이적 항체로 코팅된 리포솜을 포함한다.
- [1190] 어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 약제학적 조성물은 보조용매 시스템을 포함한다. 그와 같은 보조용매 시스템의 어떤 것은, 예를 들면, 벤질 알코올, 무극성 계면활성제, 수-혼화성 유기 폴리머, 및 수성상을 포함한다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 보조용매 시스템은 소수성 화합물을 위해 사용된다. 그와 같은 보조용매 시스템의 비-제한적인 예는 VPD 보조용매 시스템이고, 이것은 3% w/v 벤질 알코올, 8% w/v의 무극성 계면활성제 Polysorbate 80TM 및 65% w/v 폴리에틸렌 글리콜 300을 포함하는 무수 에탄올의 용액이다. 그와 같은 보조용매 시스템의 부분은 그것의 용해도 및 독성 특성을 유의미하게 변경시키지 않으면서 상당히 변화될 수 있다. 더욱이, 보조용매 구성성분의 동일성은 변할 수 있고: 예를 들면, 다른 계면활성제는 Polysorbate 80TM 대신에 사용될 수 있고, 폴리에틸렌 글리콜의 분획 크기는 변할 수 있고; 다른 생체적합성 폴리머는 폴리에틸렌 글리콜, 예를 들면, 폴리비닐 피롤리돈을 대신할 수 있다; 및 다른 당류 또는 다당류는 텍스트로오스 대신에 치환될 수 있다.
- [1191] 어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 약제학적 조성물은 경구 투여용으로 제조된다. 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 구강 투여용으로 제조된다.
- [1192] 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 주사 투여용으로 제조된다 (예를 들면, 정맥내, 피하, 근육내, 등). 그와 같은 구현예의 어떤 것에서, 약제학적 조성물은 보균자를 포함하고 수용액, 예컨대 물 또는 생리적으로 양립가능한 버퍼 예컨대 한스 용액, 링거액, 또는 생리적 염수 버퍼에서 제형된다. 어떤 구현예에서, 다른 성분이 포함된다 (예를 들면, 용해도에 도움이 되거나 보존제로서 쓰이는 성분). 어떤 구현예에서, 주사가능 서스펜션은 적절한 액체 보균자, 현탁화제 등을 사용하여 제조된다. 주사용 어떤 약제학적 조성물은, 예를 들면, 앰플 또는 다중-용량 용기에서단위 투여 형태로 제공된다. 주사용 어떤 약제학적 조성물은 오일성 또는 수성 비히클에서 서스펜션, 용액 또는 에멀전이고, 제형제 예컨대 현탁화제, 안정제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 주사용 약제학적 조성물에서 사용하는 데 적당한 어떤 용매는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 친지질성 용매 및 지방 오일, 예컨대 참깨 오일, 합성 지방산 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트 또는 트리글리세라이드, 및 리포솜. 수성 주사 서스펜션은 서스펜션, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로오스, 소르비톨, 또는 텍스트란의 점도를 증가시키는 물질을 함유할 수 있다. 임의로, 그와 같은 서스펜션은 고농축 용액의 제조를 허용하도록 약제의 용해도를 증가시키는 적당한 안정제 및 제제들을 또한 함유할 수 있다.
- [1193] 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 점막통과 투여용으로 제조된다. 그와 같은 구현예의 어떤 것에서 침투될 배리어에 적절한 침투제는 제형에서 사용된다. 그와 같은 침투제는 일반적으로 당해기술에서 공지되어 있다.
- [1194] 어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 약제학적 조성물은 올리고뉴클레오타이드를 치료적으로 효과적인 양으로 포함한다. 어떤 구현예에서, 치료적으로 효과적인 양은 질환의 증상을 예방, 완화 또는 개선하거나 치료될 대상체의 생존을 지속하는데 충분하다. 치료적으로 효과적인 양의 결정은 당해분야의 숙련가의 능력 내에 있다.
- [1195] 어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 1 이상의 변형된 올리고뉴클레오타이드는 전구약물로서 제형된다. 어떤 구현예에서, 생체내 투여 시, 전구약물은 생물학적으로, 약제학적으로 또는 치료적으로 더 많은 활성 형태의 올리고뉴클레오타이드로 화학적으로 전환된다. 어떤 구현예에서, 전구약물이 유용한 것은, 상응하는 활성 형태보다 투여가 더 쉽기 때문이다. 예를 들면, 어떤 예에서, 전구약물은 상응하는 활성 형태인 것보다(예를 들면, 경구 투여를 통해) 더 생체이용가능할 수 있다. 어떤 예에서, 전구약물은 상응하는 활성 형태와 비교하여 개선된 용해도를 가질 수 있다. 어떤 구현예에서, 전구약물은 상응하는 활성 형태보다 덜 수용성이다. 어떤 예에서, 그와 같은 전구약물은 세포막을 가로지르는 우수한 전달을 가지며, 여기서 수용해도는 이동도에 해롭다. 어떤 구현예에서, 전구약물은 에스테르이다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 에스테르는, 투여 시 카복실산으로 대사작용으로 가수분해된다. 어떤 예에서 카복실산 함유 화합물은 상응하는 활성 형태. 어떤 구현예에서, 전구약물은 산 그룹에 결합된 짧은 펩타이드 (폴리아미노산)을 포함한다. 그와 같은 구현예의 어떤 것에서, 펩타이드는 투여히 절

단되어 상응하는 활성 형태를 형성한다.

- [1196] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 세포에서 표적 핵산의 양 또는 활성을 축소시키기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 세포는 동물 내의 것이다. 어떤 구현예에서, 동물은 포유동물이다. 어떤 구현예에서, 동물은 설치류이다. 어떤 구현예에서, 동물은 영장류이다. 어떤 구현예에서, 동물은 비-인간 영장류이다. 어떤 구현예에서, 동물은 인간이다
- [1197] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 동물에게 투여하는 방법을 제공한다. 적당한 투여 경로, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 경구, 직장, 점막통과, 창자, 장의, 국소, 좌약, 흡입을 통해, 척추강내, 뇌실내, 복강내, 비강내, 안구내, 종양내, 및 비경구 (예를 들면, 정맥내, 근육내, 수질내, 및 피하). 어떤 구현예에서, 약제학적 척추강내 투여는 전신 노출보다는 오히려 국소를 달성하기 위해 투여된다. 예를 들면, 약제학적 조성물은 원하는 효과 면적에서 (예를 들면, 간으로) 직접적으로 주입될 수 있다.
- [1198] 참조에 의한 비제한 개시내용 및 편집
- [1199] 본원에서 기재된 어떤 화합물, 조성물 및 방법이 어떤 구현예에 따라 구체적으로 기재되었지만, 하기 실시예는 본원에서 기재된 화합물을 단지 설명하기 위해 쓰이고 그것을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본원에서 인용된 각각의 참조, 유전자은행 수납 번호, 등은 본원에 그 전체가 참고로 편집되어 있다.
- [1200] 이러한 제출을 수반하는 서열목록은 요구되는 바와 같은 "RNA" 또는 "DNA"로서 각각의 서열을 확인하지만, 실제로는, 이들 서열은 화학적 변형의 임의 조합으로 변형될 수 있다. 당해분야의 숙련가는, 변형된 올리고뉴클레오타이드를 기재하기 위한 "RNA" 또는 "DNA"와 같은 명칭이, 어떤 예에서, 임의적이라는 것을 쉽게 인식할 것이다. 예를 들면, 2'-OH 당 모이어티 및 티민 염기를 포함하는 뉴클레오사이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 변형된 당 (DNA의 천연 2'-H에 대한 2'-OH)을 갖는 DNA로서 또는 변형된 염기 (RNA의 천연 우라실에 대한 티민 (메틸화된 우라실))을 갖는 RNA로서 기재될 수 있다.
- [1201] 따라서, 서열목록에 있는 것들 것 비제한적으로 포함하는 본원에서 제공된 핵산 서열은, 변형된 핵염기를 갖는 그와 같은 핵산을 비제한적으로 포함하는, 천연 또는 변형된 RNA 및/또는 DNA의 임의 조합을 함유하는 핵산을 포함하는 것으로 의도된다. 추가 실시예에 의해 그리고 비제한적으로, 핵염기 서열 "ATCGATCG"을 갖는 올리고뉴클레오타이드는, 변형 또는 비변형되든지, 그와 같은 화합물을 비제한적으로 포함하는 그와 같은 핵염기 서열을 갖는 임의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 화합물은 RNA 염기, 예컨대 서열 "AUCGAUCG"를 갖는 것들 및 일부 DNA 염기 및 일부 RNA 염기 예컨대 "AUCGATCG"를 갖는 것들 및 다른 변형된 염기, 예컨대 "AT^mCGAUCG"를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 ^mC는 5-위치에서 메틸 그룹을 포함하는 시토신 염기를 나타낸다.
- [1202] 삭제
- [1203] 삭제
- [1204] 삭제
- [1205] 삭제
- [1206] 삭제
- [1207] 삭제

- [1208] 삭제
- [1209] 삭제
- [1210] 삭제
- [1211] 삭제
- [1212] 삭제
- [1213] 삭제
- [1214] 삭제
- [1215] 삭제
- [1216] 삭제
- [1217] 삭제
- [1218] 삭제
- [1219] 삭제
- [1220] 삭제
- [1221] 삭제
- [1222] 삭제
- [1223] 삭제
- [1224] 삭제
- [1225] 삭제

- [1226] 삭제
- [1227] 삭제
- [1228] 삭제
- [1229] 삭제
- [1230] 삭제
- [1231] 삭제
- [1232] 삭제
- [1233] 삭제
- [1234] 삭제
- [1235] 삭제
- [1236] 삭제
- [1237] 삭제
- [1238] 삭제
- [1239] 삭제
- [1240] 삭제
- [1241] 삭제
- [1242] 삭제
- [1243] 삭제

- [1244] 삭제
- [1245] 삭제
- [1246] 삭제
- [1247] 삭제
- [1248] 삭제
- [1249] 삭제
- [1250] 삭제
- [1251] 삭제
- [1252] 삭제
- [1253] 삭제
- [1254] 삭제
- [1255] 삭제
- [1256] 삭제
- [1257] 삭제
- [1258] 삭제
- [1259] 삭제
- [1260] 삭제
- [1261] 삭제

- [1262] 삭제
- [1263] 삭제
- [1264] 삭제
- [1265] 삭제
- [1266] 삭제
- [1267] 삭제
- [1268] 삭제
- [1269] 삭제
- [1270] 삭제
- [1271] 삭제
- [1272] 삭제
- [1273] 삭제
- [1274] 삭제
- [1275] 삭제
- [1276] 삭제
- [1277] 삭제
- [1278] 삭제
- [1279] 삭제

- [1280] 삭제
- [1281] 삭제
- [1282] 삭제
- [1283] 삭제
- [1284] 삭제
- [1285] 삭제
- [1286] 삭제
- [1287] 삭제
- [1288] 삭제
- [1289] 삭제
- [1290] 삭제
- [1291] 삭제
- [1292] 삭제
- [1293] 삭제
- [1294] 삭제
- [1295] 삭제
- [1296] 삭제
- [1297] 삭제

- [1298] 삭제
- [1299] 삭제
- [1300] 삭제
- [1301] 삭제
- [1302] 삭제
- [1303] 삭제
- [1304] 삭제
- [1305] 삭제
- [1306] 삭제
- [1307] 삭제
- [1308] 삭제
- [1309] 삭제
- [1310] 삭제
- [1311] 삭제
- [1312] 삭제
- [1313] 삭제
- [1314] 삭제
- [1315] 삭제

- [1316] 삭제
- [1317] 삭제
- [1318] 삭제
- [1319] 삭제
- [1320] 삭제
- [1321] 삭제
- [1322] 삭제
- [1323] 삭제
- [1324] 삭제
- [1325] 삭제
- [1326] 삭제
- [1327] 삭제
- [1328] 삭제
- [1329] 삭제
- [1330] 삭제
- [1331] 삭제
- [1332] 삭제
- [1333] 삭제

- [1334] 삭제
- [1335] 삭제
- [1336] 삭제
- [1337] 삭제
- [1338] 삭제
- [1339] 삭제
- [1340] 삭제
- [1341] 삭제
- [1342] 삭제
- [1343] 삭제
- [1344] 삭제
- [1345] 삭제
- [1346] 삭제
- [1347] 삭제
- [1348] 삭제
- [1349] 삭제
- [1350] 삭제
- [1351] 삭제

- [1352] 삭제
- [1353] 삭제
- [1354] 삭제
- [1355] 삭제
- [1356] 삭제
- [1357] 삭제
- [1358] 삭제
- [1359] 삭제
- [1360] 삭제
- [1361] 삭제
- [1362] 삭제
- [1363] 삭제
- [1364] 삭제
- [1365] 삭제
- [1366] 삭제
- [1367] 삭제
- [1368] 삭제
- [1369] 삭제

- [1370] 삭제
- [1371] 삭제
- [1372] 삭제
- [1373] 삭제
- [1374] 삭제
- [1375] 삭제
- [1376] 삭제
- [1377] 삭제
- [1378] 삭제
- [1379] 삭제
- [1380] 삭제
- [1381] 삭제
- [1382] 삭제
- [1383] 삭제
- [1384] 삭제
- [1385] 삭제
- [1386] 삭제
- [1387] 삭제

- [1388] 삭제
- [1389] 삭제
- [1390] 삭제
- [1391] 삭제
- [1392] 삭제
- [1393] 삭제
- [1394] 삭제
- [1395] 삭제
- [1396] 삭제
- [1397] 삭제
- [1398] 삭제
- [1399] 삭제
- [1400] 삭제
- [1401] 삭제
- [1402] 삭제
- [1403] 삭제
- [1404] 삭제
- [1405] 삭제

- [1406] 삭제
- [1407] 삭제
- [1408] 삭제
- [1409] 삭제
- [1410] 삭제
- [1411] 삭제
- [1412] 삭제
- [1413] 삭제
- [1414] 삭제
- [1415] 삭제
- [1416] 삭제
- [1417] 삭제
- [1418] 삭제
- [1419] 삭제
- [1420] 삭제
- [1421] 삭제
- [1422] 삭제
- [1423] 삭제

- [1424] 삭제
- [1425] 삭제
- [1426] 삭제
- [1427] 삭제
- [1428] 삭제
- [1429] 삭제
- [1430] 삭제
- [1431] 삭제
- [1432] 삭제
- [1433] 삭제
- [1434] 삭제
- [1435] 삭제
- [1436] 삭제
- [1437] 삭제
- [1438] 삭제
- [1439] 삭제
- [1440] 삭제
- [1441] 삭제

- [1442] 삭제
- [1443] 삭제
- [1444] 삭제
- [1445] 삭제
- [1446] 삭제
- [1447] 삭제
- [1448] 삭제
- [1449] 삭제
- [1450] 삭제
- [1451] 삭제
- [1452] 삭제
- [1453] 삭제
- [1454] 삭제
- [1455] 삭제
- [1456] 삭제
- [1457] 삭제
- [1458] 삭제
- [1459] 삭제

- [1460] 삭제
- [1461] 삭제
- [1462] 삭제
- [1463] 삭제
- [1464] 삭제
- [1465] 삭제
- [1466] 삭제
- [1467] 삭제
- [1468] 삭제
- [1469] 삭제
- [1470] 삭제
- [1471] 삭제
- [1472] 삭제
- [1473] 삭제
- [1474] 삭제
- [1475] 삭제
- [1476] 삭제
- [1477] 삭제

- [1478] 삭제
- [1479] 삭제
- [1480] 삭제
- [1481] 삭제
- [1482] 삭제
- [1483] 삭제
- [1484] 삭제
- [1485] 삭제
- [1486] 삭제
- [1487] 삭제
- [1488] 삭제
- [1489] 삭제
- [1490] 삭제
- [1491] 삭제
- [1492] 삭제
- [1493] 삭제
- [1494] 삭제
- [1495] 삭제

- [1496] 삭제
- [1497] 삭제
- [1498] 삭제
- [1499] 삭제
- [1500] 삭제
- [1501] 삭제
- [1502] 삭제
- [1503] 삭제
- [1504] 삭제
- [1505] 삭제
- [1506] 삭제
- [1507] 삭제
- [1508] 삭제
- [1509] 삭제
- [1510] 삭제
- [1511] 삭제
- [1512] 삭제
- [1513] 삭제

- [1514] 삭제
- [1515] 삭제
- [1516] 삭제
- [1517] 삭제
- [1518] 삭제
- [1519] 삭제
- [1520] 삭제
- [1521] 삭제
- [1522] 삭제
- [1523] 삭제
- [1524] 삭제
- [1525] 삭제
- [1526] 삭제
- [1527] 삭제
- [1528] 삭제
- [1529] 삭제
- [1530] 삭제
- [1531] 삭제

- [1532] 삭제
- [1533] 삭제
- [1534] 삭제
- [1535] 삭제
- [1536] 삭제
- [1537] 삭제
- [1538] 삭제
- [1539] 삭제
- [1540] 삭제
- [1541] 삭제
- [1542] 삭제
- [1543] 삭제
- [1544] 삭제
- [1545] 삭제
- [1546] 삭제
- [1547] 삭제
- [1548] 삭제
- [1549] 삭제

- [1550] 삭제
- [1551] 삭제
- [1552] 삭제
- [1553] 삭제
- [1554] 삭제
- [1555] 삭제
- [1556] 삭제
- [1557] 삭제
- [1558] 삭제
- [1559] 삭제
- [1560] 삭제
- [1561] 삭제
- [1562] 삭제
- [1563] 삭제
- [1564] 삭제
- [1565] 삭제
- [1566] 삭제
- [1567] 삭제

- [1568] 삭제
- [1569] 삭제
- [1570] 삭제
- [1571] 삭제
- [1572] 삭제
- [1573] 삭제
- [1574] 삭제
- [1575] 삭제
- [1576] 삭제
- [1577] 삭제
- [1578] 삭제
- [1579] 삭제
- [1580] 삭제
- [1581] 삭제
- [1582] 삭제
- [1583] 삭제
- [1584] 삭제
- [1585] 삭제

- [1586] 삭제
- [1587] 삭제
- [1588] 삭제
- [1589] 삭제
- [1590] 삭제
- [1591] 삭제
- [1592] 삭제
- [1593] 삭제
- [1594] 삭제
- [1595] 삭제
- [1596] 삭제
- [1597] 삭제
- [1598] 삭제
- [1599] 삭제
- [1600] 삭제
- [1601] 삭제
- [1602] 삭제
- [1603] 삭제

- [1604] 삭제
- [1605] 삭제
- [1606] 삭제
- [1607] 삭제
- [1608] 삭제
- [1609] 삭제
- [1610] 삭제
- [1611] 삭제
- [1612] 삭제
- [1613] 삭제
- [1614] 삭제
- [1615] 삭제
- [1616] 삭제
- [1617] 삭제
- [1618] 삭제
- [1619] 삭제
- [1620] 삭제
- [1621] 삭제

- [1622] 삭제
- [1623] 삭제
- [1624] 삭제
- [1625] 삭제
- [1626] 삭제
- [1627] 삭제
- [1628] 삭제
- [1629] 삭제
- [1630] 삭제
- [1631] 삭제
- [1632] 삭제
- [1633] 삭제
- [1634] 삭제
- [1635] 삭제
- [1636] 삭제
- [1637] 삭제
- [1638] 삭제
- [1639] 삭제

- [1640] 삭제
- [1641] 삭제
- [1642] 삭제
- [1643] 삭제
- [1644] 삭제
- [1645] 삭제
- [1646] 삭제
- [1647] 삭제
- [1648] 삭제
- [1649] 삭제
- [1650] 삭제
- [1651] 삭제
- [1652] 삭제
- [1653] 삭제
- [1654] 삭제
- [1655] 삭제
- [1656] 삭제
- [1657] 삭제

- [1658] 삭제
- [1659] 삭제
- [1660] 삭제
- [1661] 삭제
- [1662] 삭제
- [1663] 삭제
- [1664] 삭제
- [1665] 삭제
- [1666] 삭제
- [1667] 삭제
- [1668] 삭제
- [1669] 삭제
- [1670] 삭제
- [1671] 삭제
- [1672] 삭제
- [1673] 삭제
- [1674] 삭제
- [1675] 삭제

- [1676] 삭제
- [1677] 삭제
- [1678] 삭제
- [1679] 삭제
- [1680] 삭제
- [1681] 삭제
- [1682] 삭제
- [1683] 삭제
- [1684] 삭제
- [1685] 삭제
- [1686] 삭제
- [1687] 삭제
- [1688] 삭제
- [1689] 삭제
- [1690] 삭제
- [1691] 삭제
- [1692] 삭제
- [1693] 삭제

- [1694] 삭제
- [1695] 삭제
- [1696] 삭제
- [1697] 삭제
- [1698] 삭제
- [1699] 삭제
- [1700] 삭제
- [1701] 삭제
- [1702] 삭제
- [1703] 삭제
- [1704] 삭제
- [1705] 삭제
- [1706] 삭제
- [1707] 삭제
- [1708] 삭제
- [1709] 삭제
- [1710] 삭제
- [1711] 삭제

- [1712] 삭제
- [1713] 삭제
- [1714] 삭제
- [1715] 삭제
- [1716] 삭제
- [1717] 삭제
- [1718] 삭제
- [1719] 삭제
- [1720] 삭제
- [1721] 삭제
- [1722] 삭제
- [1723] 삭제
- [1724] 삭제
- [1725] 삭제
- [1726] 삭제
- [1727] 삭제
- [1728] 삭제
- [1729] 삭제

- [1730] 삭제
- [1731] 삭제
- [1732] 삭제
- [1733] 삭제
- [1734] 삭제
- [1735] 삭제
- [1736] 삭제
- [1737] 삭제
- [1738] 삭제
- [1739] 삭제
- [1740] 삭제
- [1741] 삭제
- [1742] 삭제
- [1743] 삭제
- [1744] 삭제
- [1745] 삭제
- [1746] 삭제
- [1747] 삭제

- [1748] 삭제
- [1749] 삭제
- [1750] 삭제
- [1751] 삭제
- [1752] 삭제
- [1753] 삭제
- [1754] 삭제
- [1755] 삭제
- [1756] 삭제
- [1757] 삭제
- [1758] 삭제
- [1759] 삭제
- [1760] 삭제
- [1761] 삭제
- [1762] 삭제
- [1763] 삭제
- [1764] 삭제
- [1765] 삭제

- [1766] 삭제
- [1767] 삭제
- [1768] 삭제
- [1769] 삭제
- [1770] 삭제
- [1771] 삭제
- [1772] 삭제
- [1773] 삭제
- [1774] 삭제
- [1775] 삭제
- [1776] 삭제
- [1777] 삭제
- [1778] 삭제
- [1779] 삭제
- [1780] 삭제
- [1781] 삭제
- [1782] 삭제
- [1783] 삭제

- [1784] 삭제
- [1785] 삭제
- [1786] 삭제
- [1787] 삭제
- [1788] 삭제
- [1789] 삭제
- [1790] 삭제
- [1791] 삭제
- [1792] 삭제
- [1793] 삭제
- [1794] 삭제
- [1795] 삭제
- [1796] 삭제
- [1797] 삭제
- [1798] 삭제
- [1799] 삭제
- [1800] 삭제
- [1801] 삭제

- [1802] 삭제
- [1803] 삭제
- [1804] 삭제
- [1805] 삭제
- [1806] 삭제
- [1807] 삭제
- [1808] 삭제
- [1809] 삭제
- [1810] 삭제
- [1811] 삭제
- [1812] 삭제
- [1813] 삭제
- [1814] 삭제
- [1815] 삭제
- [1816] 삭제
- [1817] 삭제
- [1818] 삭제
- [1819] 삭제

- [1820] 삭제
- [1821] 삭제
- [1822] 삭제
- [1823] 삭제
- [1824] 삭제
- [1825] 삭제
- [1826] 삭제
- [1827] 삭제
- [1828] 삭제
- [1829] 삭제
- [1830] 삭제
- [1831] 삭제
- [1832] 삭제
- [1833] 삭제
- [1834] 삭제
- [1835] 삭제
- [1836] 삭제
- [1837] 삭제

- [1838] 삭제
- [1839] 삭제
- [1840] 삭제
- [1841] 삭제
- [1842] 삭제
- [1843] 삭제
- [1844] 삭제
- [1845] 삭제
- [1846] 삭제
- [1847] 삭제
- [1848] 삭제
- [1849] 삭제
- [1850] 삭제
- [1851] 삭제
- [1852] 삭제
- [1853] 삭제
- [1854] 삭제
- [1855] 삭제

- [1856] 삭제
- [1857] 삭제
- [1858] 삭제
- [1859] 삭제
- [1860] 삭제
- [1861] 삭제
- [1862] 삭제
- [1863] 삭제
- [1864] 삭제
- [1865] 삭제
- [1866] 삭제
- [1867] 삭제
- [1868] 삭제
- [1869] 삭제
- [1870] 삭제
- [1871] 삭제
- [1872] 삭제
- [1873] 삭제

- [1874] 삭제
- [1875] 삭제
- [1876] 삭제
- [1877] 삭제
- [1878] 삭제
- [1879] 삭제
- [1880] 삭제
- [1881] 삭제
- [1882] 삭제
- [1883] 삭제
- [1884] 삭제
- [1885] 삭제
- [1886] 삭제
- [1887] 삭제
- [1888] 삭제
- [1889] 삭제
- [1890] 삭제
- [1891] 삭제

- [1892] 삭제
- [1893] 삭제
- [1894] 삭제
- [1895] 삭제
- [1896] 삭제
- [1897] 삭제
- [1898] 삭제
- [1899] 삭제
- [1900] 삭제
- [1901] 삭제
- [1902] 삭제
- [1903] 삭제
- [1904] 삭제
- [1905] 삭제
- [1906] 삭제
- [1907] 삭제
- [1908] 삭제
- [1909] 삭제

- [1910] 삭제
- [1911] 삭제
- [1912] 삭제
- [1913] 삭제
- [1914] 삭제
- [1915] 삭제
- [1916] 삭제
- [1917] 삭제
- [1918] 삭제
- [1919] 삭제
- [1920] 삭제
- [1921] 삭제
- [1922] 삭제
- [1923] 삭제
- [1924] 삭제
- [1925] 삭제
- [1926] 삭제
- [1927] 삭제

- [1928] 삭제
- [1929] 삭제
- [1930] 삭제
- [1931] 삭제
- [1932] 삭제
- [1933] 삭제
- [1934] 삭제
- [1935] 삭제
- [1936] 삭제
- [1937] 삭제
- [1938] 삭제
- [1939] 삭제
- [1940] 삭제
- [1941] 삭제
- [1942] 삭제
- [1943] 삭제
- [1944] 삭제
- [1945] 삭제

- [1946] 삭제
- [1947] 삭제
- [1948] 삭제
- [1949] 삭제
- [1950] 삭제
- [1951] 삭제
- [1952] 삭제
- [1953] 삭제
- [1954] 삭제
- [1955] 삭제
- [1956] 삭제
- [1957] 삭제
- [1958] 삭제
- [1959] 삭제
- [1960] 삭제
- [1961] 삭제
- [1962] 삭제
- [1963] 삭제

- [1964] 삭제
- [1965] 삭제
- [1966] 삭제
- [1967] 삭제
- [1968] 삭제
- [1969] 삭제
- [1970] 삭제
- [1971] 삭제
- [1972] 삭제
- [1973] 삭제
- [1974] 삭제
- [1975] 삭제
- [1976] 삭제
- [1977] 삭제
- [1978] 삭제
- [1979] 삭제
- [1980] 삭제
- [1981] 삭제

- [1982] 삭제
- [1983] 삭제
- [1984] 삭제
- [1985] 삭제
- [1986] 삭제
- [1987] 삭제
- [1988] 삭제
- [1989] 삭제
- [1990] 삭제
- [1991] 삭제
- [1992] 삭제
- [1993] 삭제
- [1994] 삭제
- [1995] 삭제
- [1996] 삭제
- [1997] 삭제
- [1998] 삭제
- [1999] 삭제

- [2000] 삭제
- [2001] 삭제
- [2002] 삭제
- [2003] 삭제
- [2004] 삭제
- [2005] 삭제
- [2006] 삭제
- [2007] 삭제
- [2008] 삭제
- [2009] 삭제
- [2010] 삭제
- [2011] 삭제
- [2012] 삭제
- [2013] 삭제
- [2014] 삭제
- [2015] 삭제
- [2016] 삭제
- [2017] 삭제

- [2018] 삭제
- [2019] 삭제
- [2020] 삭제
- [2021] 삭제
- [2022] 삭제
- [2023] 삭제
- [2024] 삭제
- [2025] 삭제
- [2026] 삭제
- [2027] 삭제
- [2028] 삭제
- [2029] 삭제
- [2030] 삭제
- [2031] 삭제
- [2032] 삭제
- [2033] 삭제
- [2034] 삭제
- [2035] 삭제

- [2036] 삭제
- [2037] 삭제
- [2038] 삭제
- [2039] 삭제
- [2040] 삭제
- [2041] 삭제
- [2042] 삭제
- [2043] 삭제
- [2044] 삭제
- [2045] 삭제
- [2046] 삭제
- [2047] 삭제
- [2048] 삭제
- [2049] 삭제
- [2050] 삭제
- [2051] 삭제
- [2052] 삭제
- [2053] 삭제

- [2054] 삭제
- [2055] 삭제
- [2056] 삭제
- [2057] 삭제
- [2058] 삭제
- [2059] 삭제
- [2060] 삭제
- [2061] 삭제
- [2062] 삭제
- [2063] 삭제
- [2064] 삭제
- [2065] 삭제
- [2066] 삭제
- [2067] 삭제
- [2068] 삭제
- [2069] 삭제
- [2070] 삭제
- [2071] 삭제

- [2072] 삭제
- [2073] 삭제
- [2074] 삭제
- [2075] 삭제
- [2076] 삭제
- [2077] 삭제
- [2078] 삭제
- [2079] 삭제
- [2080] 삭제
- [2081] 삭제
- [2082] 삭제
- [2083] 삭제
- [2084] 삭제
- [2085] 삭제
- [2086] 삭제
- [2087] 삭제
- [2088] 삭제
- [2089] 삭제

- [2090] 삭제
- [2091] 삭제
- [2092] 삭제
- [2093] 삭제
- [2094] 삭제
- [2095] 삭제
- [2096] 삭제
- [2097] 삭제
- [2098] 삭제
- [2099] 삭제
- [2100] 삭제
- [2101] 삭제
- [2102] 삭제
- [2103] 삭제
- [2104] 삭제
- [2105] 삭제
- [2106] 삭제
- [2107] 삭제

- [2108] 삭제
- [2109] 삭제
- [2110] 삭제
- [2111] 삭제
- [2112] 삭제
- [2113] 삭제
- [2114] 삭제
- [2115] 삭제
- [2116] 삭제
- [2117] 삭제
- [2118] 삭제
- [2119] 삭제
- [2120] 삭제
- [2121] 삭제
- [2122] 삭제
- [2123] 삭제
- [2124] 삭제
- [2125] 삭제

- [2126] 삭제
- [2127] 삭제
- [2128] 삭제
- [2129] 삭제
- [2130] 삭제
- [2131] 삭제
- [2132] 삭제
- [2133] 삭제
- [2134] 삭제
- [2135] 삭제
- [2136] 삭제
- [2137] 삭제
- [2138] 삭제
- [2139] 삭제
- [2140] 삭제
- [2141] 삭제
- [2142] 삭제
- [2143] 삭제

- [2144] 삭제
- [2145] 삭제
- [2146] 삭제
- [2147] 삭제
- [2148] 삭제
- [2149] 삭제
- [2150] 삭제
- [2151] 삭제
- [2152] 삭제
- [2153] 삭제
- [2154] 삭제
- [2155] 삭제
- [2156] 삭제
- [2157] 삭제
- [2158] 삭제
- [2159] 삭제
- [2160] 삭제
- [2161] 삭제

- [2162] 삭제
- [2163] 삭제
- [2164] 삭제
- [2165] 삭제
- [2166] 삭제
- [2167] 삭제
- [2168] 삭제
- [2169] 삭제
- [2170] 삭제
- [2171] 삭제
- [2172] 삭제
- [2173] 삭제
- [2174] 삭제
- [2175] 삭제
- [2176] 삭제
- [2177] 삭제
- [2178] 삭제
- [2179] 삭제

- [2180] 삭제
- [2181] 삭제
- [2182] 삭제
- [2183] 삭제
- [2184] 삭제
- [2185] 삭제
- [2186] 삭제
- [2187] 삭제
- [2188] 삭제
- [2189] 삭제
- [2190] 삭제
- [2191] 삭제
- [2192] 삭제
- [2193] 삭제
- [2194] 삭제
- [2195] 삭제
- [2196] 삭제
- [2197] 삭제

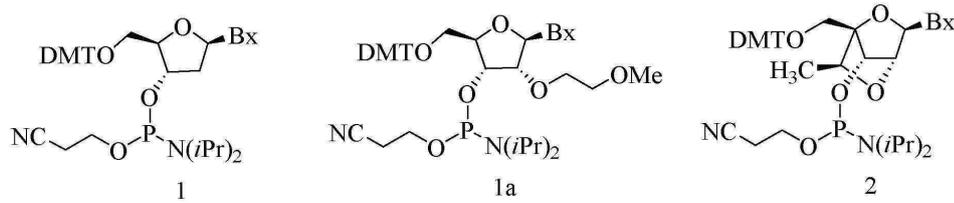
- [2198] 삭제
- [2199] 삭제
- [2200] 삭제
- [2201] 삭제
- [2202] 삭제
- [2203] 삭제
- [2204] 삭제
- [2205] 삭제
- [2206] 삭제
- [2207] 삭제
- [2208] 삭제
- [2209] 삭제
- [2210] 삭제

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

하기 실시예는 본 개시내용의 어떤 구현예를 설명하고 제한하지는 않는다. 게다가, 특정 구현예가 제공되는 경우, 본 발명자들 특정 구현예의 포괄적인 적용을 고려했다. 예를 들면, 특정한 모티프를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 개시내용은 동일한 또는 유사한 모티프를 갖는 추가의 올리고뉴클레오타이드에 대한 합리적인 지지를 제공한다. 그리고, 예를 들면, 특정한 고-친화성 변형이 특정한 위치에서 나타나는 경우, 동일한 위치에서의 다른 고-친화성 변형은, 달리 지적되지 않으면 적당한 것으로 고려된다.

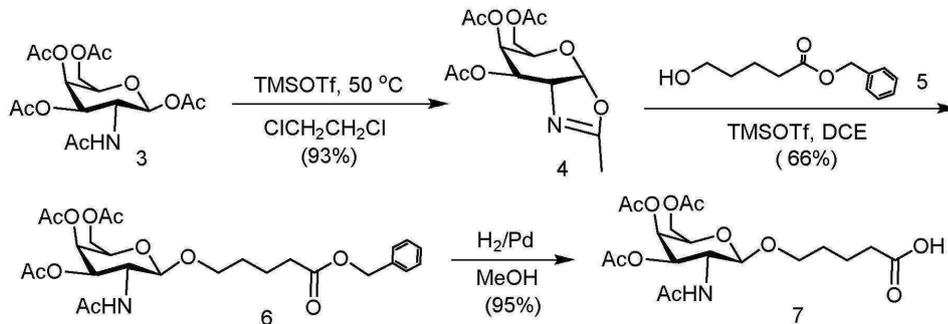
실시예 1: 포스포르아미다이트, 화합물 1, 1a 및 2의 일반적인 제조 방법



Bx는 헤테로사이클릭 염기이다;

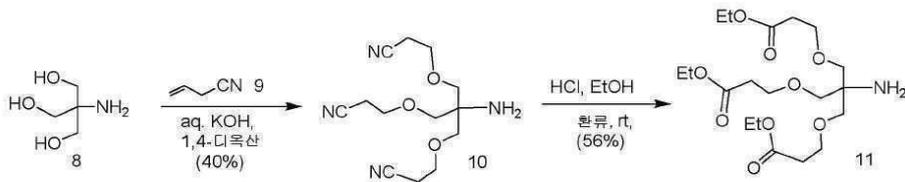
화합물 1, 1a 및 2는 본 명세서에서 기재된 바와 같이 잘 알려진 당해기술에서 잘 알려진 절차에 따라 제조되었다: (참고 Seth 등, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, 21(4), 1122-1125, *J. Org. Chem.*, 2010, 75(5), 1569-1581, *Nucleic acid Symposium 시리즈*, 2008, 52(1), 553-554); 및 또한 참고 공개된 PCT 국제 출원 (WO 2011/115818, WO 2010/077578, WO2010/036698, WO2009/143369, WO 2009/006478, 및 WO 2007/090071), 및 US 특허 7,569,686).

실시예 2: 화합물 7의 제조



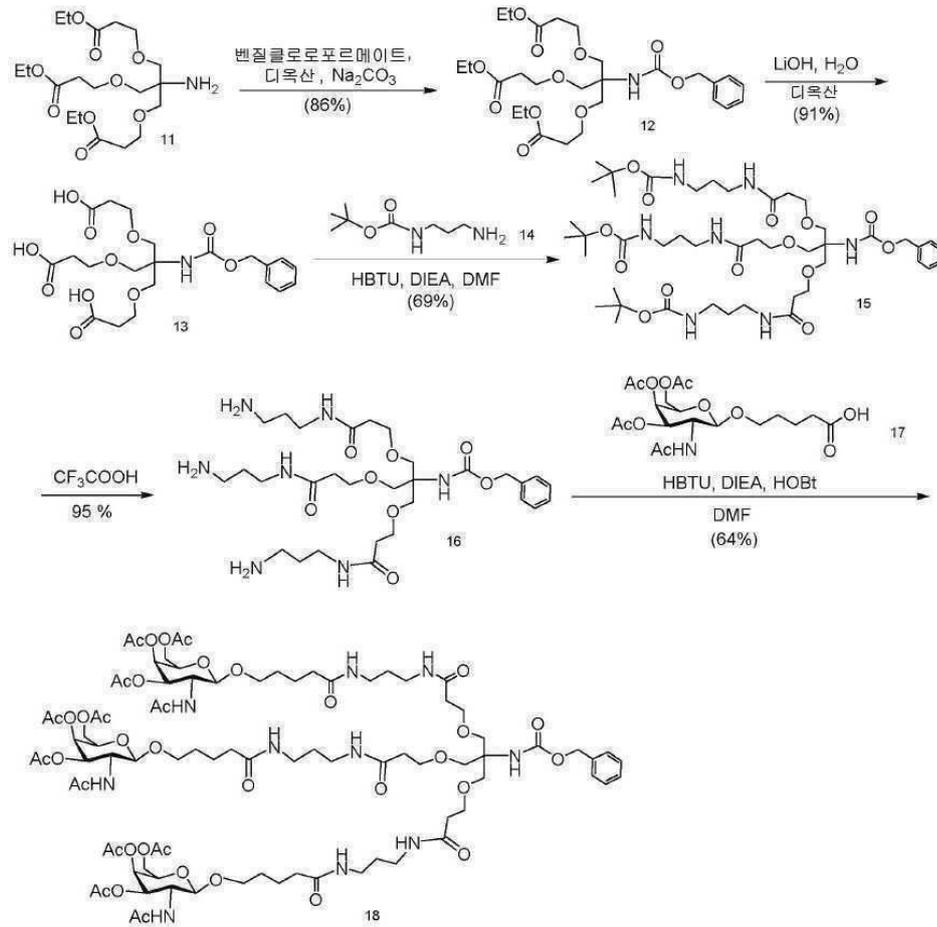
화합물 3 (2-아세트아미도-1,3,4,6-테트라-O-아세틸-2-데옥시-β-D갈락토피라노스 또는 갈락토사민 펜타아세테이트)는 시판되고 있다. 화합물 5는 공개된 절차에 따라 제조되었다 (Weber 등, *J. Med. Chem.*, 1991, 34, 2692).

실시예 3: 화합물 11의 제조



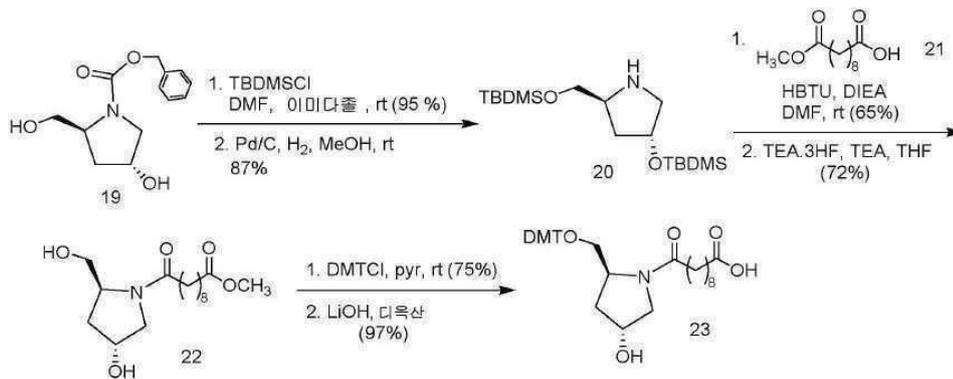
화합물 8 및 9는 시판되고 있다.

실시예 4: 화합물 18의 제조



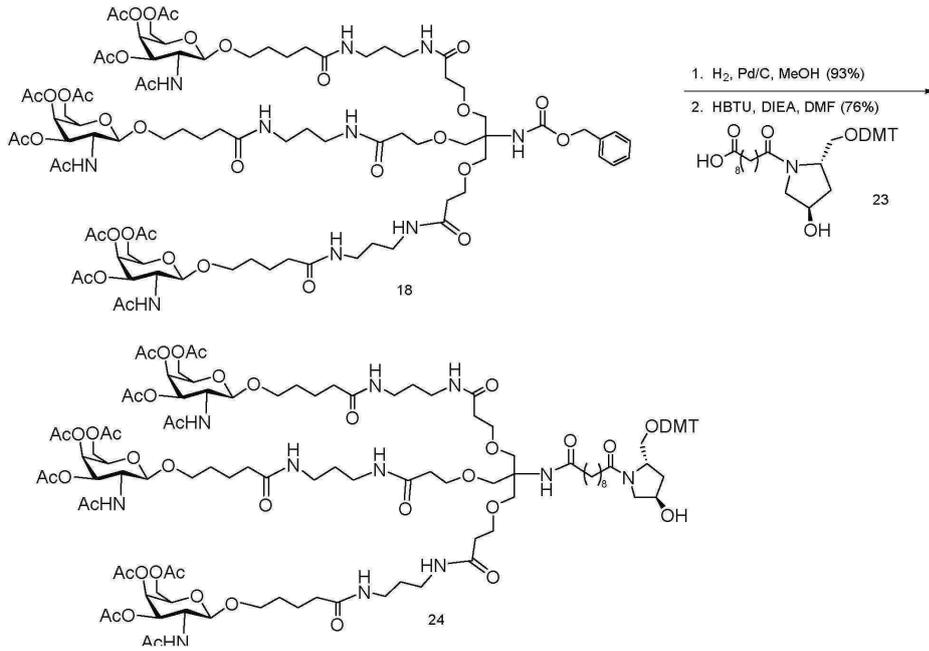
화합물 11은 실시예 3에서 실증된 절차에 따라 준비되었다. 화합물 14는 시판되고 있다. 화합물 17은 하기에 의해 보고된 유사한 절차를 사용하여 준비되었다: Rensen 등, *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 5798-5808.

실시예 5: 화합물 23의 제조



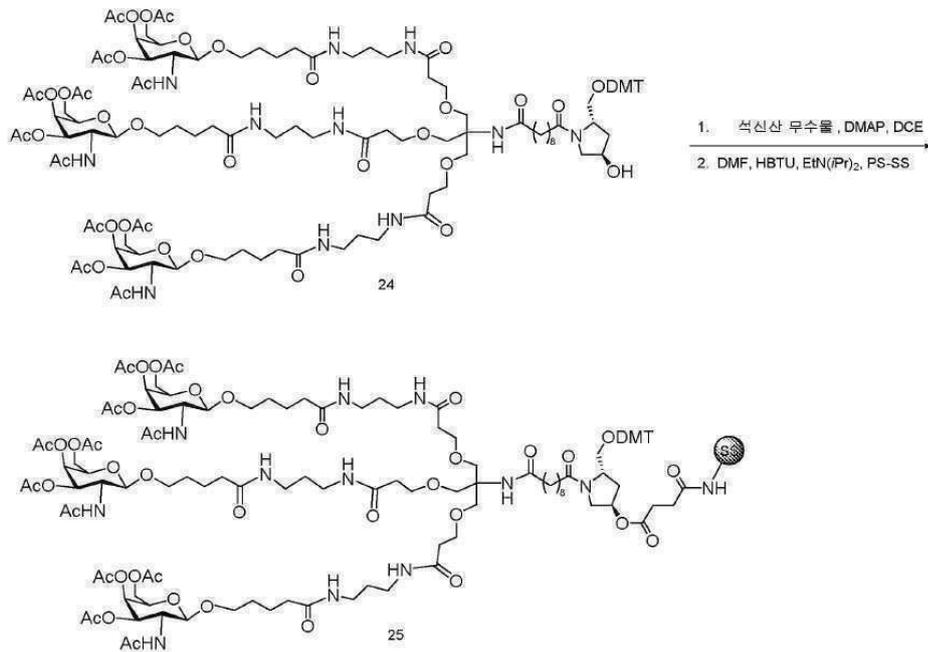
화합물 19 및 21는 시판되고 있다.

실시예 6: 화합물 24의 제조



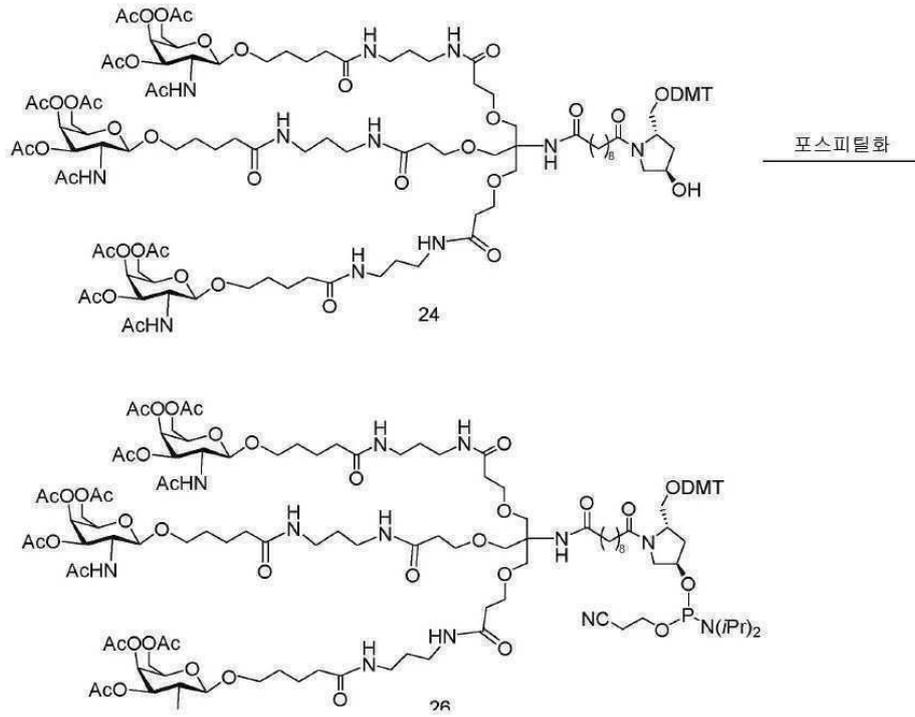
화합물 18 및 23는 실시예 4 및 5에서 실증된 절차에 따라 준비되었다.

실시예 7: 화합물 25의 제조



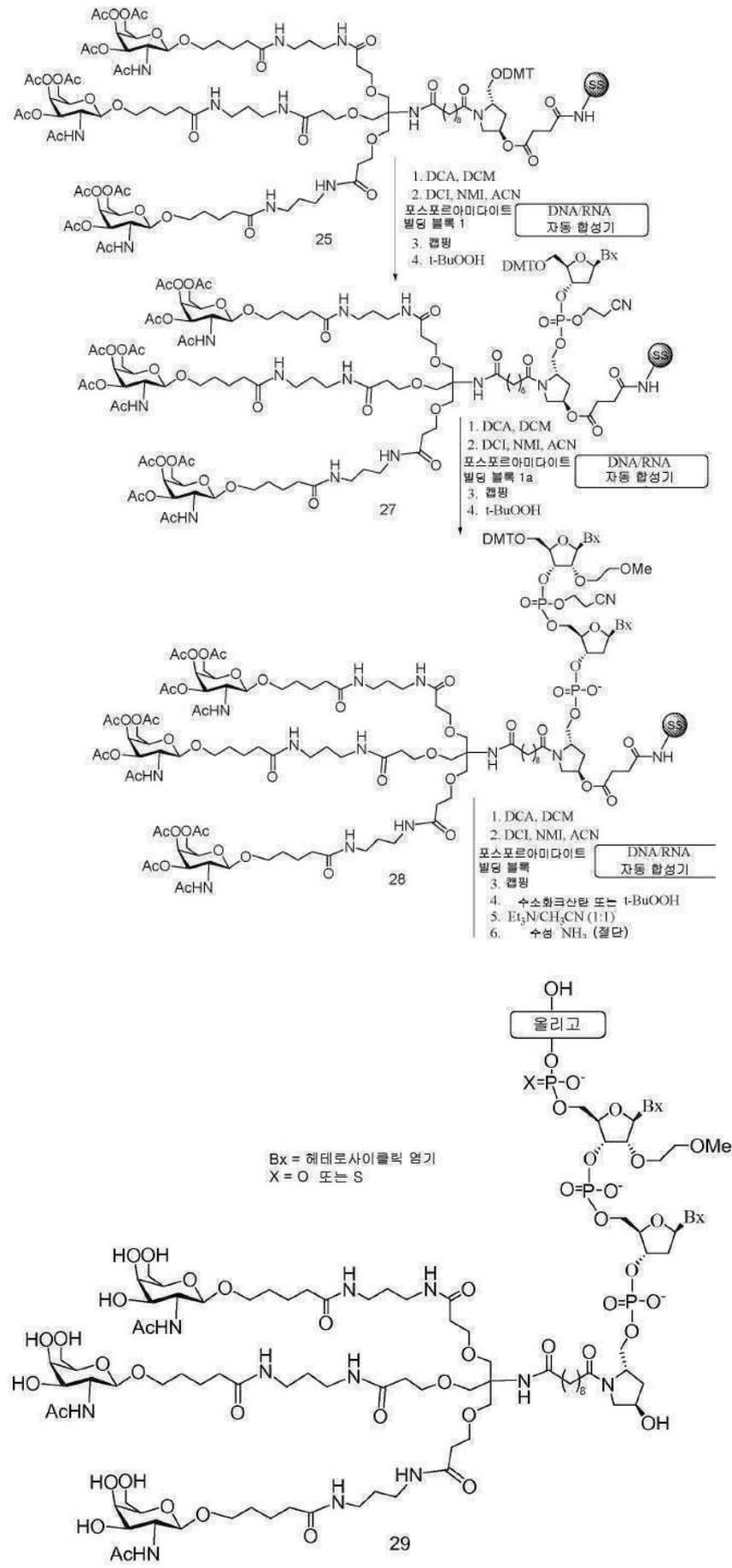
화합물 24는 실시예 6에서 실증된 절차에 따라 준비되었다.

실시예 8: 화합물 26

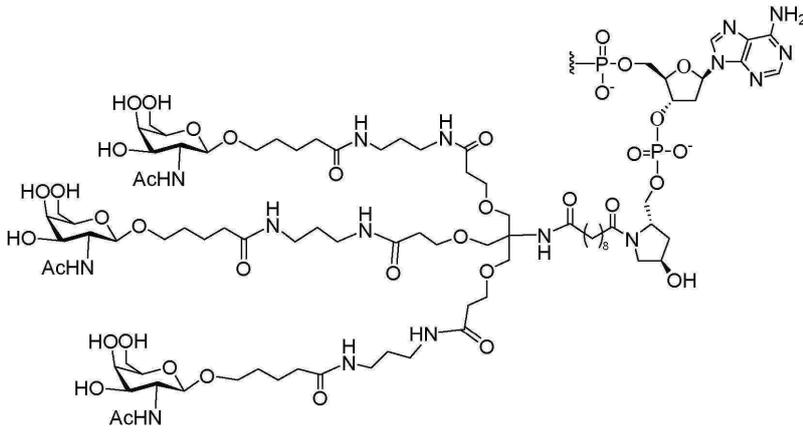


화합물 24은 실시예 6에서 실증된 절차에 따라 준비된다.

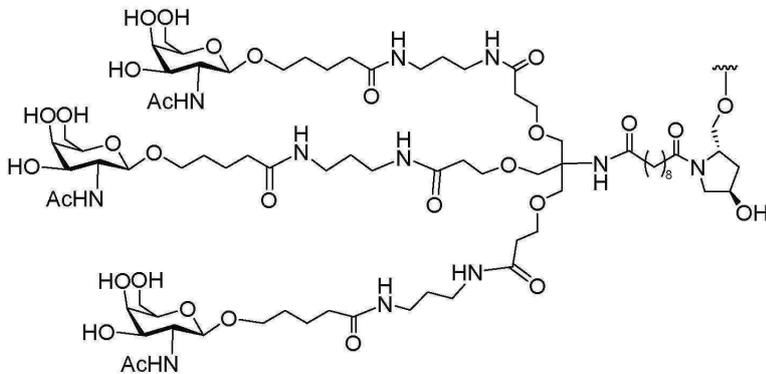
실시예 9: Ga1Nac₃-1를 3' 말단에서 포함하는 접합된 ASO의 일반적인 제조, 화합물 29



상기 보호된 GalNAc₃-1는 하기 구조를 갖는다:

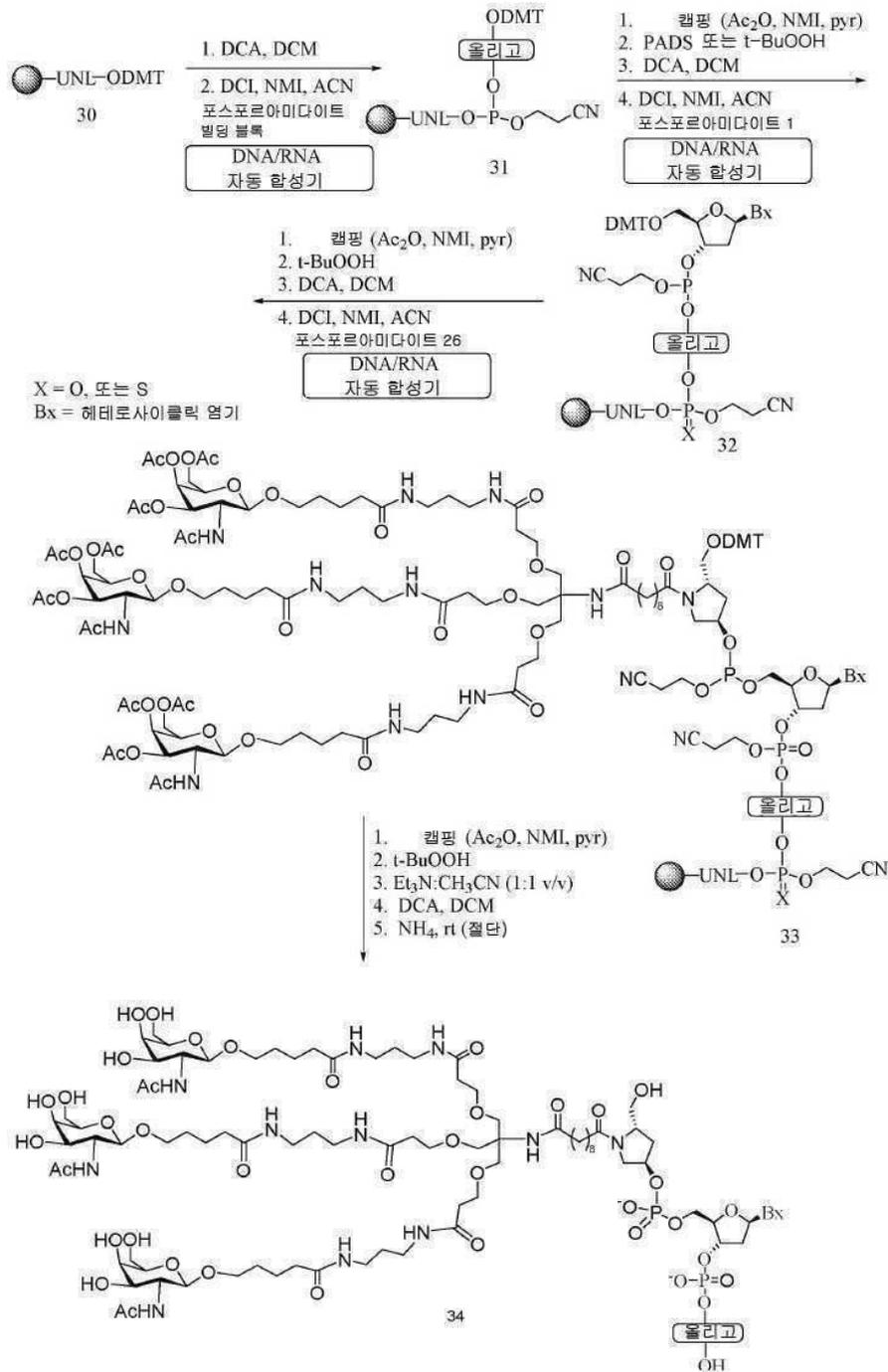


콘주게이트 그룹 GalNAc₃-1 (GalNAc₃-1_a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 여기서 GalNAc₃-1_a는 하기 식을 갖는다:



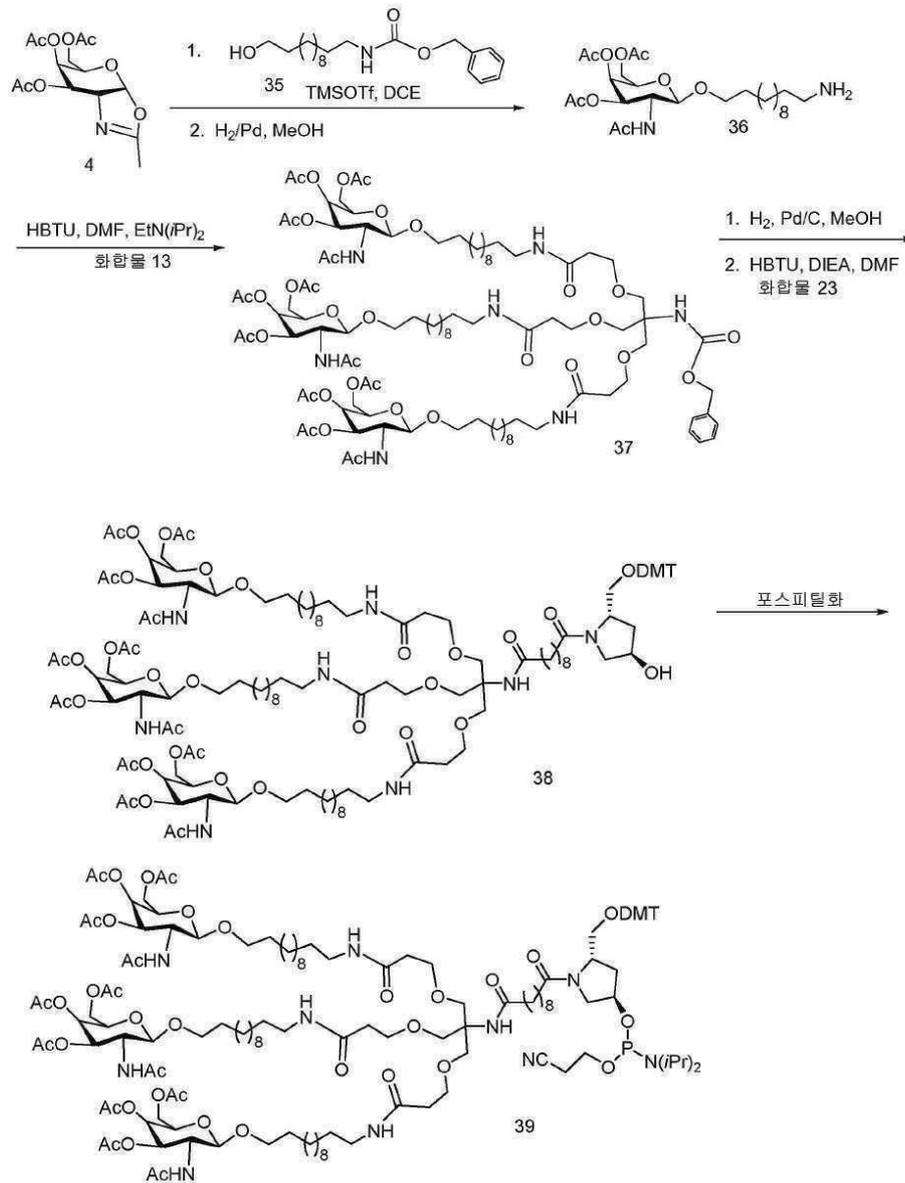
고형 지지체 결합된 보호된 GalNAc₃-1, 화합물 25는 실시예 7에서 실증된 절차에 따라 준비되었다. GalNAc₃-1를 3' 말단에서 포함하는 올리고머 화합물 29는 자동화된 DNA/RNA 합성에서 표준 절차를 사용하여 제조되었다 (참고 Dupouy 등, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 3623-3627 참고). 포스포르아미다이트 빌딩 블록, 화합물 1 및 1a는 실시예 1에서 실증된 절차에 따라 준비되었다. 실증된 포스포르아미다이트는 대표적이고, 다른 포스포르아미다이트 빌딩 블록이 사용되어 예정된 순서 및 조성을 갖는 올리고 화합물을 제조할 수 있는 것처럼 한정으로서 의도되지 않는다는 것을 의미한다. 고형 지지체에 부가된 포스포르아미다이트의 순서 및 양은 조정되어 본원에서 기재된 깎핑된 올리고머 화합물을 제조할 수 있다. 그와 같은 깎핑된 올리고머 화합물은 임의 주어진 표적에 의해 지시되는 바와 같이 예정된 조성물 및 염기 서열을 가질 수 있다.

실시예 10: 5' 말단에서 GaINAc₃-1을 포함하는 접합된 ASO의 일반적인 제조, 화합물 34



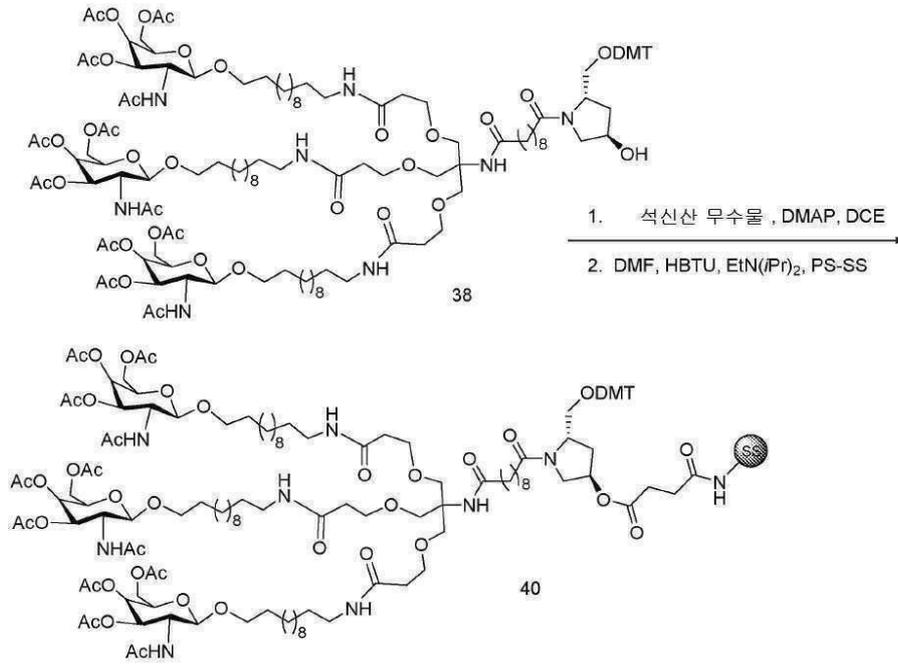
임의 링커TM 30는 시판되고 있다. 5' 말단에서 GaINAc₃-1클러스터를 포함하는 올리고머 화합물 34는 자동화된 DNA/RNA 합성에서 표준 절차를 사용하여 제조된다 (참고 Dupouy 등, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 3623-3627 참고). 포스포르아미다이트 빌딩 블록, 화합물 1 및 1a는 실시예 1에서 실증된 절차에 따라 준비되었다. 실증된 포스포르아미다이트는 대표적이고, 다른 포스포르아미다이트 빌딩 블록이 사용되어 예정된 순서 및 조성을 갖는 올리고 화합물을 제조할 수 있는 것처럼 한정으로서 의도되지 않는다는 것을 의미한다. 고품지체체에 부가된 포스포르아미다이트의 순서 및 양은 조정되어 본원에서 기재된 캡핑된 올리고머 화합물을 제조할 수 있다. 그와 같은 캡핑된 올리고머 화합물은 임의 주어진 표적에 의해 지시되는 바와 같이 예정된 조성물 및 염기 서열을 가질 수 있다.

실시예 11: 화합물 39의 제조



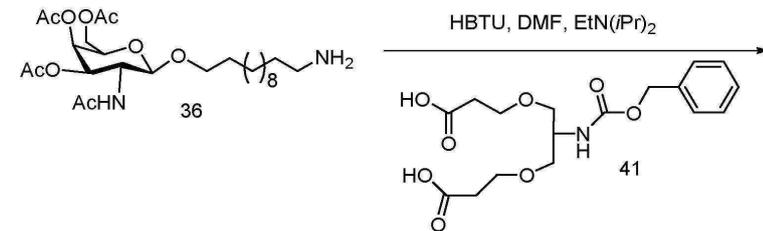
화합물 4, 13 및 23는 실시예 2, 4, 및 5에서 실증된 절차에 따라 준비되었다. 화합물 35는 하기에서 공지된 유사한 절차를 사용하여 준비된다: Rouchaud 등, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, 12, 2346-2353.

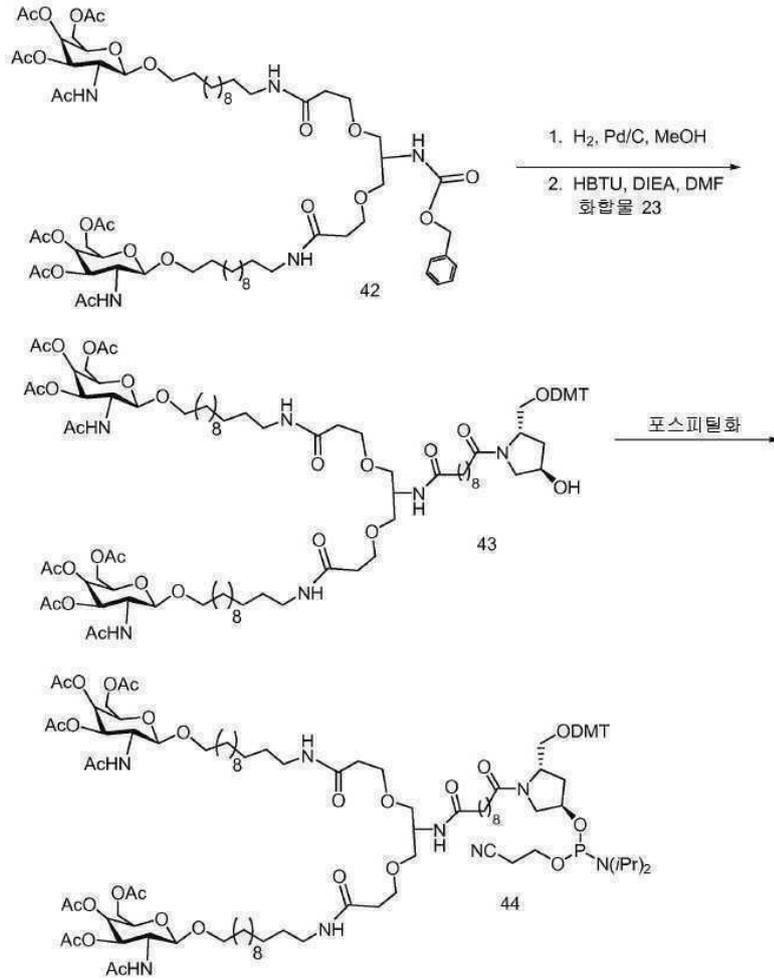
실시예 12: 화합물 40의 제조



화합물 38은 실시예 11에서 실증된 절차에 따라 준비된다.

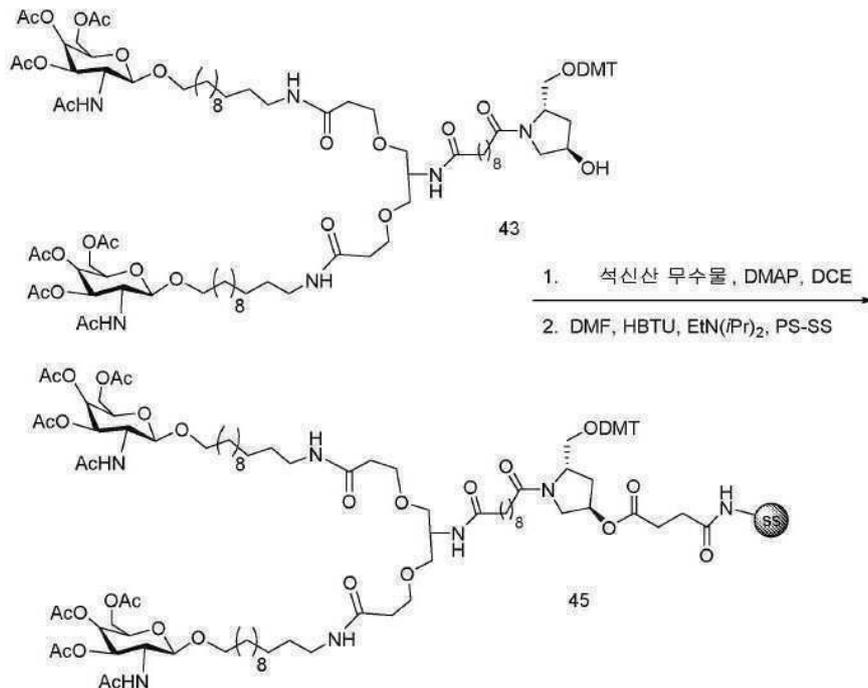
실시예 13: 화합물 44의 제조





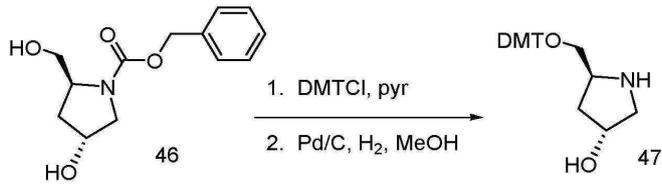
화합물 23 및 36은 실시예 5 및 11에서 실증된 절차에 따라 준비된다. 화합물 41는 하기에서 공지된 유사한 절차를 사용하여 준비된다: WO 2009082607.

실시예 14: 화합물 45의 제조



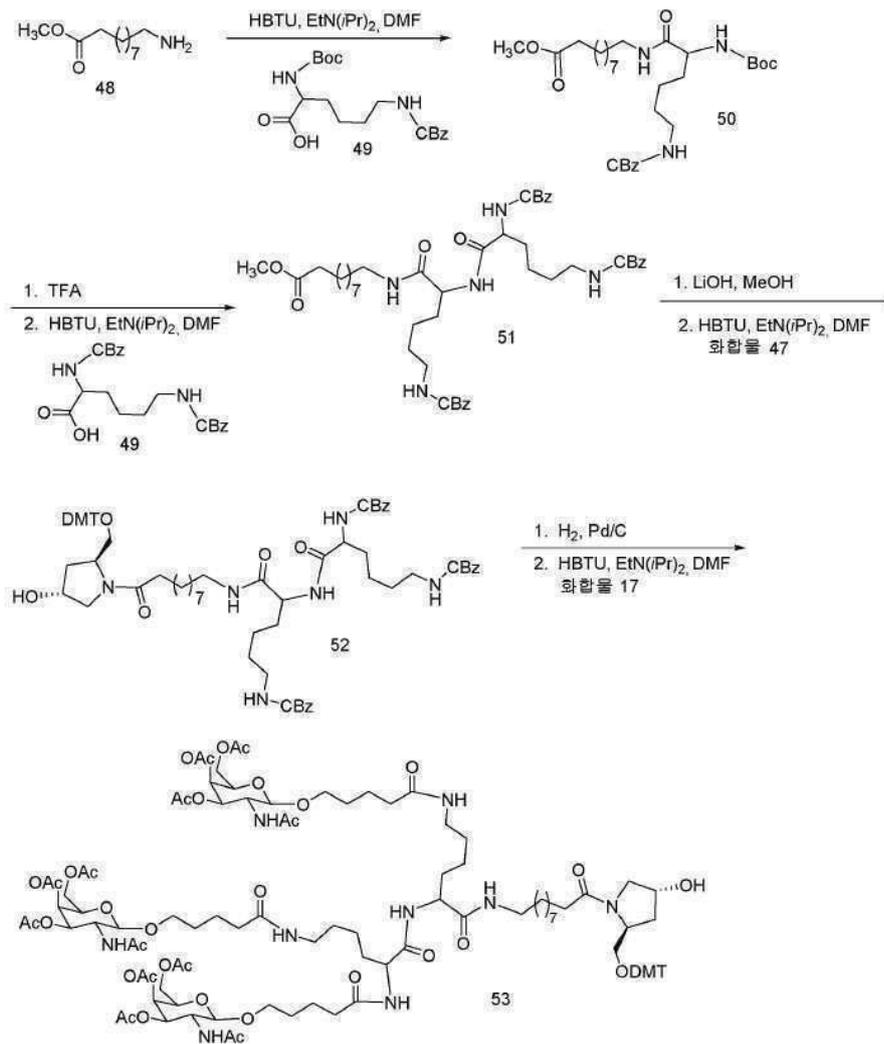
화합물 43은 실시예 13에서 실증된 절차에 따라 준비된다.

실시예 15: 화합물 47의 제조



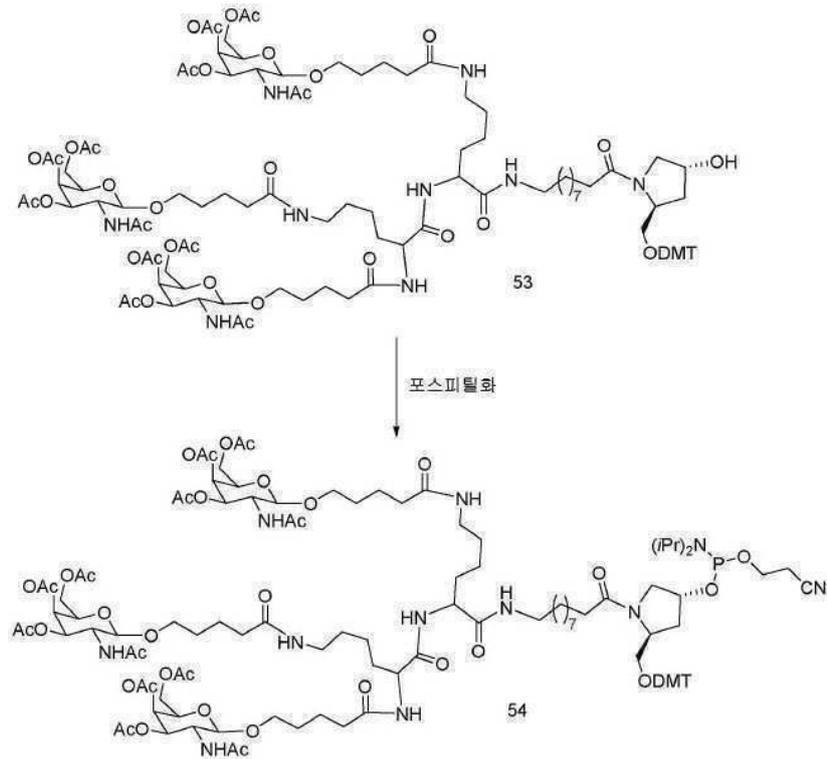
화합물 46는 시판되고 있다.

실시예 16: 화합물 53의 제조



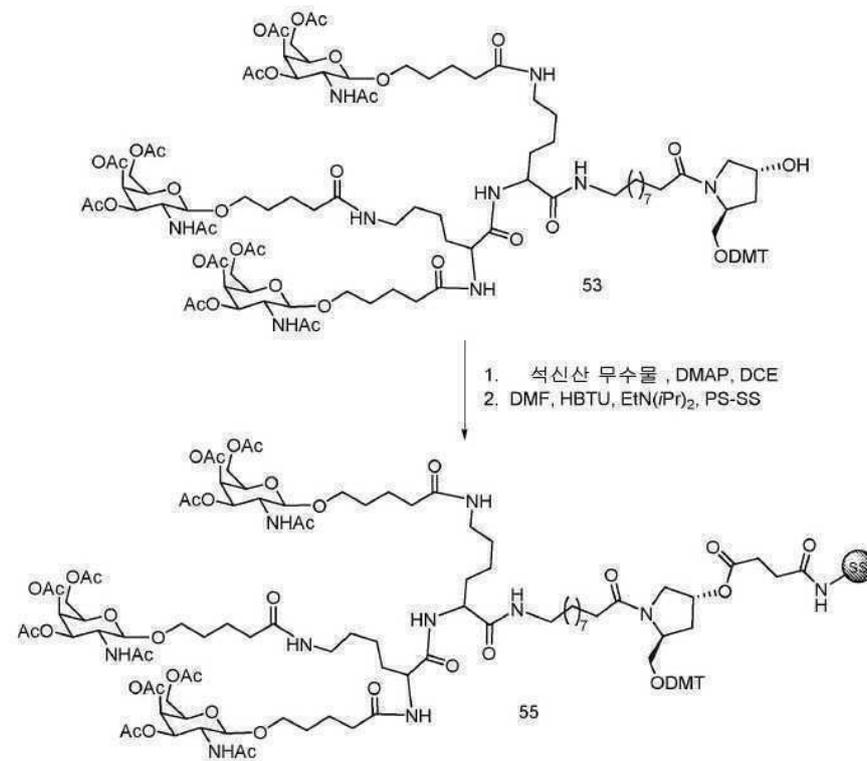
화합물 48 및 49는 시판되고 있다. 화합물 17 및 47은 실시예 4 및 15에서 실증된 절차에 따라 준비된다.

실시예 17: 화합물 54의 제조



화합물 53은 실시예 16에서 실증된 절차에 따라 준비된다.

실시예 18: 화합물 55의 제조



화합물 53은 실시예 16에서 실증된 절차에 따라 준비된다.

실시예 19: 3' 고체상 기술을 통해 위치에서 GalNAc₃-1을 포함하는 접합된 ASO의 일반적인 제조 방법 (ISIS 647535, 647536 및 651900의 제조)

달리 언급되지 않으면, 올리고머 화합물의 합성을 위해 사용된 모든 시약 및 용액은 상업적 공급원으로부터 구매된다. 표준 포스포라미다이트 빌딩 블록 및 고체 지지체는, 예를 들면 T, A, G, 및 ¹³C 잔기를 포함하는 뉴클레오사이드 잔기의 혼입을 위해 사용된다. 무수 아세트니트릴 중의 포스포라미다이트의 0.1 M 용액을 b-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드 및 2'-MOE에 사용하였다.

ASO 합성은 ABI 394 합성기 (1-2 μmol 규모) 상에서, 또는 칼럼에 충전된 **GalNAc₃-1** 로딩된 VIMAD 고품 지지체 (110 μmol/g, Guzaev 등, 2003) 상에서 포스포라미다이트 커플링 방법에 의해 GE Healthcare Bioscience **ÅKTA** 올리고과일렛 합성기 (40-200 μmol 규모) 상에서 수행되었다. 커플링 단계에 대해, 포스포라미다이트는 고품 지지체 상에 로딩 4 배 과잉으로 전달되었고 포스포라미다이트 축합은 10 분 동안 수행되었다. 모든 다른 단계는 제조자에 의해 공급된 표준 프로토콜을 따랐다. 톨루엔 중 6% 디클로로아세트산의 용액은 디메톡시트리틸 (DMT) 그룹을 뉴클레오타이드의 5'-하이드록실 그룹로부터 제거하기 위해 사용되었다. 무수 CH₃CN 중 4,5-디시아노이미다졸 (0.7 M)은 커플링 단계 동안에 황설제로서 사용되었다. 포스포로티오에이트 연결을 3 분의 접촉 시간 동안에 1:1 피리딘/CH₃CN 중의 크산탄 하이드라이드의 0.1 M 용액을 이용한 황화에 의해 도입하였다. 6% 물을 함유하는 CH₃CN 중의 20% *tert*-부틸하이드로퍼옥사이드의 용액을 산화제로서 사용하여 12분의 접촉 시간으로 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결을 제공하였다.

원하는 서열이 조립된 후, 시아노에틸 포스페이트 보호 그룹은 45 분의 접촉 시간과 함께 트리에틸아민 및 아세트니트릴의 1:1 (v/v) 혼합물을 사용하여 탈보호되었다. 상기 고체-지지체 결합된 ASO를 암모니아수 (28-30 중량 %)에 현탁시키고 55 °C에서 6시간 동안 가열하였다.

그리고 나서, 미결합된 ASO를 여과하고 암모니아를 가열로 제거하였다. 잔류물을 강한 음이온 교환 칼럼 상에서 고압 액체 크로마토그래피에 의해 정제하였다(GE Healthcare Bioscience, Source 30Q, 30 μm, 2.54 x 8 cm, A = 30% 수성 CH₃CN 중의 100 mM 암모늄 아세테이트, B = A 중의 1.5 M NaBr, 60분에 0-40%의 B, 유량 14 mL min⁻¹, λ = 260 nm). 잔류물을 역상 칼럼 상의 HPLC에 의해 탈염하여, 고체 지지체 상의 초기 로딩을 기준으로 15-30%의 단리된 수율로 원하는 ASO를 얻었다. ASO를 Agilent 1100 MSD 시스템을 갖는 이온-쌍-HPLC 커플링된 MS 분석에 의해 규명하였다.

콘주게이트를 포함하지 않는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 당해기술에서 잘 알려진 표준 올리고뉴클레오타이드 합성 절차를 사용하여 합성되었다.

이들 방법을 사용하여, ApoC III을 표적으로 하는 3 개의 별개의 안티센스 화합물이 제조되었다. 아래의 표 17에서 요약된 바와 같이, 각각의 ApoC III를 표적으로 하는 3 개의 안티센스 화합물은 동일한 핵염기 서열을 가졌고; ISIS 304801는 모든 포스포로티오에이트 연결을 갖는 5-10-5 MOE 잭머이고; ISIS 647535는 ISIS 304801와 동일하고, 단, 3' 말단에서 접합된 **GalNAc₃-1**을 가졌고; 그리고 ISIS 647536은 ISIS 647535와 동일하고, 단, 상기 화합물의 어떤 뉴클레오사이드간 연결은 포스포디에스테르 연결이다. 표 17에서 추가로 요약된 바와 같이, SRB-1을 표적으로 하는 2 개의 별개의 안티센스 화합물이 합성되었다. ISIS 440762는 모든 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 갖는 2-10-2 cEt 잭머였고; ISIS 651900는 ISIS 440762와 동일하고, 단, 3'-말단에서 **GalNAc₃-1**을 포함했다.

표 17

ApoC III 및 SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ASO	서열 (5' 에서 3')	표적	계산된 질량	관찰된 질량	서열번호
ISIS 304801	A _{es} G _{es} ¹³ C _{es} T _{es} T _{es} ¹³ C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ¹³ C _{ds} ¹³ C _{ds} A _{ds} G _{ds} ¹³ C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	ApoC III	7165.4	7164.4	244
ISIS 647535	A _{es} G _{es} ¹³ C _{es} T _{es} T _{es} ¹³ C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ¹³ C _{ds} ¹³ C _{ds} A _{ds} G _{ds} ¹³ C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} ' - GalNAc₃-1_a	ApoC III	9239.5	9237.8	245
ISIS 647536	A _{es} G _{eo} ¹³ C _{eo} T _{eo} T _{eo} ¹³ C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ¹³ C _{ds} ¹³ C _{ds} A _{ds} G _{ds} ¹³ C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} ' - GalNAc₃-1_a	ApoC III	9142.9	9140.8	245
ISIS 440762	T _{is} ¹³ C _{is} A _{is} G _{is} T _{is} ¹³ C _{ds} A _{is} T _{is} G _{is} A _{is} ¹³ C _{ds} T _{is} T _{is} ¹³ C _k	SRB-1	4647.0	4646.4	246
ISIS 651900	T _{is} ¹³ C _{is} A _{is} G _{is} T _{is} ¹³ C _{ds} A _{is} T _{is} G _{is} A _{is} ¹³ C _{ds} T _{is} T _{is} ¹³ C _{is} A _{do} ' - GalNAc₃-1_a	SRB-1	6721.1	6719.4	247

하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를

나타내고; "k"는 6'-(S)-CH₃ 바이사이클릭 뉴클레오사이드 (예를 들면 cEt)를 나타내고; "s"는 포스포리티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 상첨자 "m"은 5-메틸시토신을 나타낸다. "GalNAc₃-1"는 실시예 9에서 이전에 보여진 구조를 갖는 콘주게이트 그룹을 나타낸다. GalNAc₃-1은 ASO를 "GalNAc₃-1_a"인 것으로 지정된 콘주게이트의 나머지에 연결하는 절단가능 아데노신을 포함하는 것에 주목한다. 이러한 명명법은 콘주게이트의 일부인 아데노신을 포함하는 완전한 핵염기 서열을 보여주기 위해 상기 표에서 사용된다. 따라서, 상기 표에서, 서열은 "GalNAc₃-1"와 함께 생략된 "A₄₀"로 종료되는 바와 같이 또한 열거될 수 있었다. 절단가능 뉴클레오사이드 또는 절단가능 모이어티가 없는 콘주게이트 그룹의 부분을 나타내기 위해 하첨자 "a"를 사용하는 이러한 관례는 이들 실시예를 통해 사용된다. 절단가능 모이어티가 없는 콘주게이트 그룹의 이러한 부분은 "클러스터" 또는 "콘주게이트 클러스터" 또는 "GalNAc₃ 클러스터"로서 본원에서 칭해진다. 어떤 예에서 그것의 클러스터 및 그것의 절단가능 모이어티를 별도로 제공하여 콘주게이트 그룹을 기재하는 것이 편리하다.

실시예 20: huApoC III 이식유전자 마우스에서 인간 ApoC III의 용량-의존적 안티센스 억제

인간 ApoC III를 각각 표적으로 하고 상기에서 기재된 ISIS 304801 및 ISIS 647535는, 별도로 시험되었고 인간 ApoC III 이식유전자 마우스에서 인간 ApoC III을 억제하기 위한 그것의 능력에 대한 용량-의존적 연구에서 평가되었다.

처리

인간 ApoCIII 이식유전자 마우스는 12-시간 명/암 사이클에서 유지되었고 임의로 Teklad 실험실 초우에 제공되었다. 동물은 실험의 개시 전 연구 시설에서 적어도 7일 동안 순응되었다. ASO는 PBS에서 제조되었고 0.2 마이크로미터 필터를 통한 필터링으로 멸균되었다. ASO는 주사를 위해 0.9PBS %에서 용해되었다.

인간 ApoC III 이식유전자 마우스에게 복강내로 2 주 동안 1주 1회 ISIS 304801 또는 647535가 0.08, 0.25로 주입되었다. 0.75, 2.25 또는 6.75 μmol/kg 또는 PBS 대조군으로서, 각 처리 그룹은 4 마리의 동물로 구성되었다. 마지막 용량의 투여 48 시간 후, 혈액을 각 마우스로부터 뽑고 그리고 마우스는 희생되었고 조직은 수집되었다.

ApoC III mRNA 분석

마우스의 간 중 ApoC III mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 측정되었다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). ApoC III mRNA 수준은 PBS-처리된 대조군에 대한 정상화 전에 (리보그린을 사용하여) 총 RNA에 대해 결정되었다. 아래의 결과는 PBS-처리된 대조군에 대해 정규화된, 각 처리 그룹에 대한 ApoC III mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 제공되고, "PBS %"로서 나타낸다. 각 ASO의 반 최대 효과적인 복용량 (ED₅₀)은 아래의 표 18에서 또한 제공된다.

실증된 바와 같이, 안티센스 화합물 둘 모두는 PBS 대조군에 대한 ApoC III RNA를 감소시켰다. 게다가, GalNAc₃-1 (ISIS 647535)에 접합된 안티센스 화합물은 GalNAc₃-1 콘주게이트 (ISIS 304801)가 없는 안티센스 화합물보다 실질적으로 더 강했다.

표 18

인간 ApoC III 이식유전자 마우스에서 ApoC III mRNA 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 ($\mu\text{mol/kg}$)	% PBS	ED ₅₀ ($\mu\text{mol/kg}$)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	100	--	-	--	
ISIS 304801	0.08	95	0.77	없음	PS/20	244
	0.75	42				
	2.25	32				
	6.75	19				
ISIS 647535	0.08	50	0.074	GalNAc ₃ -1	PS/20	245
	0.75	15				
	2.25	17				
	6.75	8				

ApoC III 단백질 분석 (비탁 검정)

혈장 ApoC III 단백질 분석은 하기에 의해 보고된 절차를 사용하여 결정되었다: Graham 등, *Circulation Research*, 2013년 3월 29일 인쇄 전에 온라인에서공개.

마우스로부터 단리된 대략 100 μl 의 혈장은 Olympus 임상 분석기 및 시판되는 비탁 ApoC III 검정을 사용하여 회색없이 분석되었다 (Kamiya, Cat# KAI-006, Kamiya Biomedical, Seattle, WA). 검정 프로토콜은 판매인에 의해 기재된 바와 같이 수행되었다.

아래의 표 19에서 보여진 바와 같이, 안티센스 화합물 둘 모두는 PBS 대조군에 대한 ApoC III 단백질을 감소시켰다. 게다가, GalNAc₃-1 (ISIS 647535)에 접합된 안티센스 화합물은 GalNAc₃-1 콘주게이트 (ISIS 304801)가 없는 안티센스 화합물보다 실질적으로 더 강했다.

표 19

인간 ApoC III 이식유전자 마우스에서 ApoC III 혈장 단백질 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 ($\mu\text{mol/kg}$)	% PBS	ED ₅₀ ($\mu\text{mol/kg}$)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0.08	86	0.73	없음	PS/20	244
	0.75	51				
	2.25	23				
	6.75	13				
ISIS 647535	0.08	72	0.19	GalNAc ₃ -1	PS/20	245
	0.75	14				
	2.25	12				
	6.75	11				

혈장 트리글리세라이드 및 콜레스테롤은 블라이 및 다이어 (Bligh, 예를 들면 및 Dyer, W.J. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917, 1959)(Bligh, E 및 Dyer, W, *Can J Biochem Physiol*, 37, 911-917, 1959)(Bligh, E 및 Dyer, W, *Can J Biochem Physiol*, 37, 911-917, 1959)의 방법에 의해 추출되었고, Beckmann Coulter 임상 분석기 및 시판되는 시약을 사용하여 측정되었다.

트리글리세라이드 수준은 PBS 주입된 마우스에 대해 측정되었고 "PBS %"로서 나타낸다. 결과는 표 20에서 제공된다. 실증된 바와 같이, 안티센스 화합물 둘 모두는 트리글리세라이드 수준을 낮게 했다. 게다가, GalNAc₃-1 (ISIS 647535)에 접합된 안티센스 화합물은 GalNAc₃-1 콘주게이트 (ISIS 304801)가 없는 안티센스 화합물보다 실질적으로 더 강했다.

표 20

이식유전자 마우스에서 트리글리세라이드 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 ($\mu\text{mol/kg}$)	% PBS	ED ₅₀ ($\mu\text{mol/kg}$)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0.08	87	0.63	없음	PS/20	244
	0.75	46				
	2.25	21				
	6.75	12				
ISIS 647535	0.08	65	0.13	GalNAc ₃ -1	PS/20	245
	0.75	9				
	2.25	8				
	6.75	9				

혈장 샘플은 HPLC에 의해 분석되어 총 콜레스테롤 및 콜레스테롤 (HDL 및 LDL)의 상이한 분획의 양을 결정했다. 결과는 표 21 및 22에서 제공된다. 실증된 바와 같이, 안티센스 화합물 둘 모두는 총 콜레스테롤 수준을 낮게 했고; 둘 모두는 LDL을 낮게 했고; 그리고 둘 모두는 HDL을 상승시켰다. 게다가, GalNAc₃-1 (ISIS 647535)에 접합된 안티센스 화합물은 GalNAc₃-1 콘주게이트 (ISIS 304801)가 없는 안티센스 화합물보다 실질적으로 더 강했다. HDL의 증가 및 LDL 수준의 감소는 ApoC III의 안티센스 억제의 심혈관 유익한 효과이다.

표 21

이식유전자 마우스에서 총 콜레스테롤 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 ($\mu\text{mol/kg}$)	총 콜레스테롤 (mg/dL)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	257	--	--	
ISIS 304801	0.08	226	없음	PS/20	244
	0.75	164			
	2.25	110			
	6.75	82			
ISIS 647535	0.08	230	GalNAc ₃ -1	PS/20	245
	0.75	82			
	2.25	86			
	6.75	99			

표 22

이식유전자 마우스에서 HDL 및 LDL 콜레스테롤 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 ($\mu\text{mol/kg}$)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	17	28	--	--	
ISIS 304801	0.08	17	23	없음	PS/20	244
	0.75	27	12			
	2.25	50	4			
	6.75	45	2			
ISIS 647535	0.08	21	21	GalNAc ₃ -1	PS/20	245
	0.75	44	2			
	2.25	50	2			
	6.75	58	2			

약동학 분석 (PK)

ASO의 PK가 또한 평가되었다. 간 및 신장 샘플은 다져졌고 표준 프로토콜을 사용하여 추출되었다. 샘플은 IP-HPLC-MS를 이용하여 MSD1 상에서 분석되었다. 전장 ISIS 304801 및 647535의 조직 수준 ($\mu\text{g/g}$)은 측정되었고 결과는 표 23에서 제공된다. 실증된 바와 같이, 총 전장 안티센스 화합물의 간 농도는 2 개의 안티센스 화합물에 대해 유사했다. 따라서, **GalNAc₃-1** 접합된 안티센스 화합물기 (상기의 RNA 및 단백질 데이터에 의해 실질되는 바와 같이) 간에서 활성이 더 많을 지라도, 간에서 실질적으로 더 높은 농도로 존재하지 않는다. 사실상, 계산된 EC₅₀ (표 23에서 제공)은, 접합된 화합물의 효능의 관찰된 증가가 증가된 추적에 전적으로 기인할 수 없다는 것을 확인해 준다. 이러한 결과는, 콘주게이트가 안티센스 화합물의 세포로의 생산적인 흡수를 가능하게 개선하여 간 추적 단독 이외의 기전에 의해 효능을 개선했다는 것을 암시한다.

상기 결과는 또한, 신장 중 **GalNAc₃-1** 접합된 안티센스 화합물의 농도가 GalNAc 콘주게이트가 없는 안티센스 화합물의 농도보다 더 낮다는 것을 보여준다. 이것은 몇 개의 유익한 치료적 연루성을 갖는다. 신장에서의 활성이 추구되지 않는 치료적 징후에 대해, 신장에의 노출은 상응하는 이점 없이 신장 독성을 위태롭게 한다. 게다가, 신장의 고농도는 전형적으로 화합물의 소변으로 손실을 야기하고, 이로써 더 빠른 청소능을 얻는다. 따라서, 비-신장 표적에 대해, 신장 추적은 원치 않는다. 이들 데이터는, **GalNAc₃-1** 콘주게이션이 신장 추적을 축소시킨다는 것을 암시한다.

표 23

이식유전자 마우스에서 ASO 처리의 PK 분석

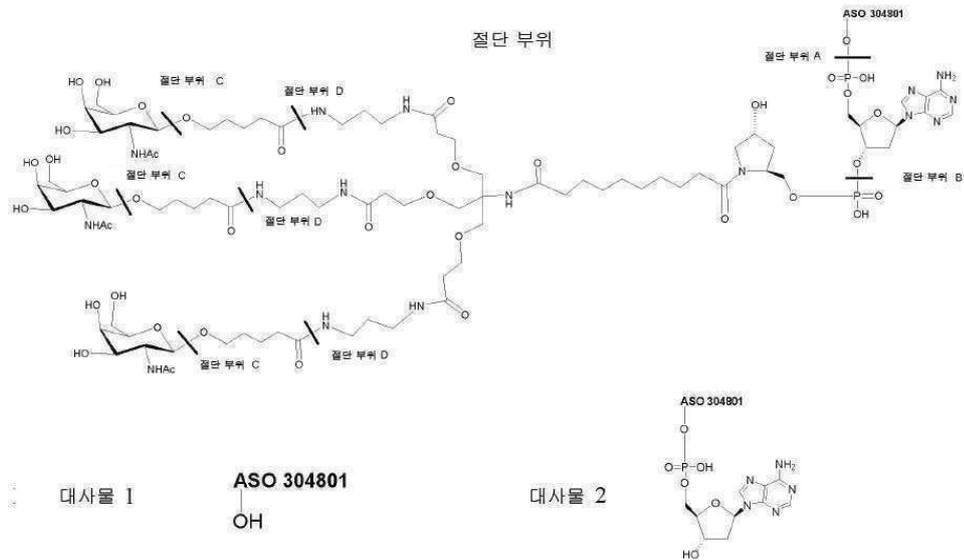
ASO	용량 ($\mu\text{mol/kg}$)	간 ($\mu\text{g/g}$)	신장 ($\mu\text{g/g}$)	간 EC ₅₀ ($\mu\text{g/g}$)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
ISIS 304801	0.1	5.2	2.1	53	없음	PS/20	244
	0.8	62.8	119.6				
	2.3	142.3	191.5				
	6.8	202.3	337.7				
ISIS 647535	0.1	3.8	0.7	3.8	GalNAc₃-1	PS/20	245
	0.8	72.7	34.3				
	2.3	106.8	111.4				
	6.8	237.2	179.3				

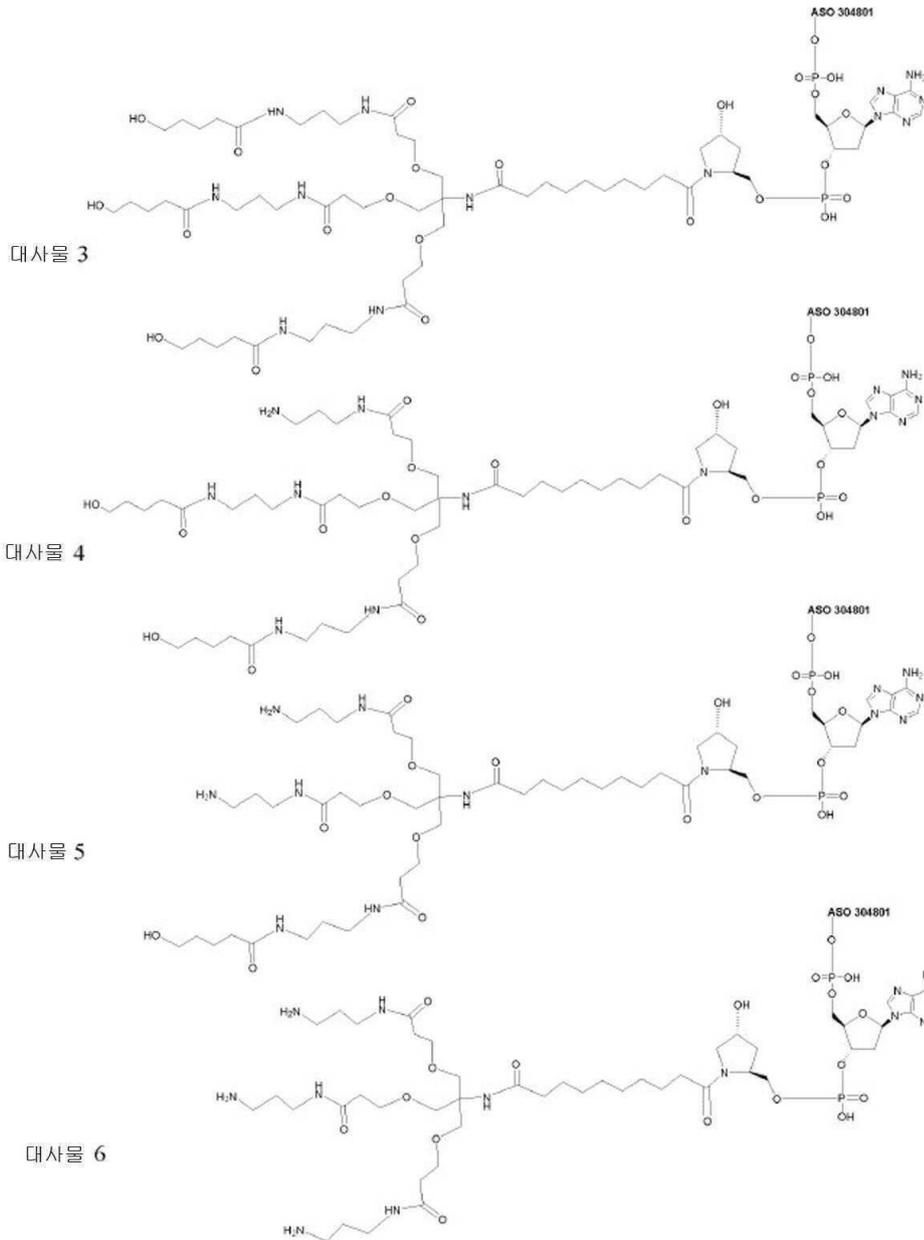
ISIS 647535의 대사물이 또한 확인되었고, 그것의 질량은 고분해능 질량 분광분석법 분석에 의해 확인되었다. 관찰된 대사물의 절단 부위 및 구조는 아래에서 보여진다. 전장 ASO의 상대 %는 표준 절차를 사용하여 계산되었고 결과는 표 23a에서 제공된다. ISIS 647535의 주요 대상물은 아래에서 보여진 절단 부위 A에서의 절단을 야기하는 전체 콘주게이트 (즉 ISIS 304801)가 없는 전장 ASO였다. 게다가, 다른 절단 부위로부터 수득된 추가 대상물이 또한 관찰되었다. 이들 결과는, 다른 절단가능 결합 예컨대 에스테르, 펩타이드, 디설파이드, 포스포르아미데이트 또는 아실-하이드라존을 **GalNAc₃-1** 당과 ASO (이것은 세포 내의 효소에 의해 절단될 수 있거나, 사이토질의 환원 환경에서 전달될 수 있거나 엔도솜 및 리소솜 내의 산성 pH에 대해 불안정함) 사이에 도입하는 것이 또한 유용할 수 있다는 것을 암시한다.

표 23a

ISIS 647535의 관찰된 전장 대사물

대사물	ASO	절단 부위	상대 %
1	ISIS 304801	A	36.1
2	ISIS 304801 + dA	B	10.5
3	ISIS 647535 마이너스 [3 개의 GalNAc]	C	16.1
4	ISIS 647535 마이너스 [3 개의 GalNAc + 1 5-하이드록시-펜탄산 테더]	D	17.6
5	ISIS 647535 마이너스 [2 GalNAc + 2 5-하이드록시-펜탄산 테더]	D	9.9
6	ISIS 647535 마이너스 [3 개의 GalNAc + 3 5-하이드록시-펜탄산 테더]	D	9.8





실시예 21: 단일 투여 연구에서 인간 ApoC III 이식유전자 마우스에서 인간 ApoC III의 안티센스 억제

인간 ApoC III를 표적으로 하고 표17에서 기재된 ISIS 304801, 647535 및 647536 각각은, 인간 ApoC III 이식 유전자 마우스 인간 ApoC III을 억제하기 위해 그것의 능력에 대한 단일 투여 연구에서 추가로 평가되었다.

처리

인간 ApoCIII 이식유전자 마우스는 12-시간 명/암 사이클에서 유지되었고 *임의로* Teklad 실험실 초우에 공급되었다. 동물은 실험의 개시 전 연구 시설에서 적어도 7 일 동안 순응되었다. ASO는 PBS에서 제조되었고 0.2 마이크론 필터를 통해 여과하여 멸균되었다. ASO는 주사를 위해 0.9PBS %에서 용해되었다.

인간 ApoC III 이식유전자 마우스에게 복강내로 1 회 아래에서 보여진 복용량으로 ISIS 304801, 647535 또는 647536 (상기에서 기재됨) 또는 PBS 처리된 대조군이 주입되었다. 처리 그룹은 3마리의 동물로 구성되었고 대조군 그룹은 4 마리의 동물로 구성되었다. 처리 전에 뿐만 아니라 마지막 용량 후에, 혈액을 각 마우스로부터 채혈하고 혈장 샘플을 분석하였다. 마우스는 마지막 투여 72 시간 후에 희생되었다.

샘플은 수집되고 분석되어 HDL 및 LDL 분획을 포함하는간; 혈장 트리글리세라이드; 및 콜레스테롤에서 ApoC III mRNA 및 단백질 수준을 결정하고, 상기에서 기재된 바와 같이 평가되었다 (실시예 20). 이들 분석으로부터의 데이터는 아래의 표 24-28에서 제공된다. 혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다.

ALT 및 AST 수준은, 안티센스 화합물이 모든 투여된 용량으로 용인되었다는 것을 보여주었다.

이들 결과는 **GalNAc₃-1** 콘주게이트 (ISIS 304801)가 없는 안티센스 화합물과 비교하여 3' 말단 (ISIS 647535 및 647536)에서 **GalNAc₃-1** 콘주게이트를 포함하는 안티센스 화합물에 대한 효능의 개선을 보여준다. 게다가, **GalNAc₃-1** 콘주게이트 및 일부 포스포디에스테르 연결을 포함하는 ISIS 647536은 동일한 콘주게이트를 포함하는 ISIS 647535만큼 강력했고, ASO 내의 모든 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트이다.

표 24

인간 ApoC III 이식유전자 마우스에서 ApoC III mRNA 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 (mg/kg)	% PBS	ED ₅₀ (mg/kg)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	99	--	-	--	
ISIS 304801	1	104	13.2	없음	PS/20	244
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0.3	98	1.9	GalNAc ₃ -1	PS/20	245
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0.3	103	1.7	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	245
	1	60				
	3	31				
	10	21				

표 25

인간 ApoC III 이식유전자 마우스에서 ApoC III 혈장 단백질 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 (mg/kg)	% PBS	ED ₅₀ (mg/kg)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	99	--	--	--	
ISIS 304801	1	104	23.2	없음	PS/20	244
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0.3	98	2.1	GalNAc ₃ -1	PS/20	245
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0.3	103	1.8	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	245
	1	60				
	3	31				
	10	21				

표 26

이식유전자 마우스에서 트리글리세라이드 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 (mg/kg)	% PBS	ED ₅₀ (mg/kg)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	98	--	--	--	
ISIS 304801	1	80	29.1	없음	PS/20	244
	3	92				
	10	70				
	30	47				
ISIS 647535	0.3	100	2.2	GalNAc ₃ -1	PS/20	245
	1	70				
	3	34				
	10	23				
ISIS 647536	0.3	95	1.9	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	245
	1	66				
	3	31				
	10	23				

표 27

이식유전자 마우스에서 총 콜레스테롤 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 (mg/kg)	% PBS	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	96	--	--	
ISIS 304801	1	104	없음	PS/20	244
	3	96			
	10	86			
	30	72			
ISIS 647535	0.3	93	GalNAc ₃ -1	PS/20	245
	1	85			
	3	61			
	10	53			
ISIS 647536	0.3	115	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	245
	1	79			
	3	51			
	10	54			

표 28

이식유전자 마우스에서 HDL 및 LDL 콜레스테롤 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 (mg/kg)	HDL % PBS	LDL % PBS	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	131	90	--	--	
ISIS 304801	1	130	72	없음	PS/20	244
	3	186	79			
	10	226	63			
	30	240	46			
ISIS 647535	0.3	98	86	GalNAc ₃ -1	PS/20	245
	1	214	67			
	3	212	39			
	10	218	35			
ISIS 647536	0.3	143	89	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	245
	1	187	56			
	3	213	33			
	10	221	34			

이들 결과는, GalNAc₃-1 콘주게이트가 안티센스 화합물의 효능을 개선한다는 것을 확인한다. 결과는 또한, GalNAc₃-1 접합된 안티센스 화합물의 동등한 효능을 보여주고, 여기서 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 혼합된 연결 (6개의 포스포디에스테르 연결을 갖는 ISIS 647536) 및 동일한 안티센스 화합물의 완전한 포스포로티오에이트 버전 (ISIS 647535)을 갖는다.

포스포로티오에이트 연결은 안티센스 화합물에 대한 몇 개의 특성을 제공한다. 예를 들면, 뉴클레아제 소화에서 저장하고 단백질에 결합하고, 이것은 신장/소변에서보다 간에서 화합물의 축적을 야기한다. 이들은, 특히 간에서 조짐을 치료할 때 바람직한 특성이다. 그러나, 포스포로티오에이트 연결은 또한 염증성 반응과 연관되었다. 따라서, 화합물 중 포스포로티오에이트 연결의 수를 감소시키는 것은 염증의 위험, 뿐만 아니라 간에서 저농도의 화합물을 감소시키고, 신장 및 소변에서 농도를 증가시키고, 뉴클레아제의 존재에서의 안정성을 증가시키고, 더 낮은 전체 효능을 낮추는 것으로 기대된다. 본 결과는, 어떤 포스포로티오에이트 연결이 포스포디에스테르 연결로 대체되었던 GalNAc₃-1 접합된 안티센스 화합물이 완전한 포스포로티오에이트 연결을 갖는 대응물로서 간에서 표적에 대항하여 강력하다는 것을 보여준다. 그와 같은 화합물은 전염증이 덜한 것으로 기재된다 (PS의 축소를 보여주는 실험은 감소된 염증성 효과를 야기한다는 것을 기재하는 실시예 24 참고).

실시예 22: 생체내에서 SRB-1을 표적으로 하는 GalNAc₃-1 접합된 변형된 ASO의 효과

SRB-1을 표적으로 하고 표 17에서 기재된 ISIS 440762 및 651900 각각을 대상으로 Balb/c 마우스에서 SRB-1을 억제하는 그 능력을 용량-의존적 연구에서 평가하였다.

처리

6주령 수컷 Balb/c 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 ISIS 440762, 651900 또는 PBS 처리된 대조군을 하기에 제시된 복용량으로 피하로 1회 주입하였다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). SRB-1 mRNA 수준을 PBS-처리된 대조군에 대해 정규화하기 전에 총 RNA에 대해 결정하였다(리보그린을 이용하여). 아래의 결과는 PBS-처리된 대조군에 대해 정규화된, 각 처리 그룹에 대해 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 제공되고, "PBS %"로서 나타낸다.

표 29에서 입증된 바와 같이, 두 안티센스 화합물들은 SRB-1 mRNA 수준을 낮추었다. 게다가, GalNAc₃-1 콘주게이트 (ISIS 651900)을 포함하는 안티센스 화합물은 GalNAc₃-1 콘주게이트 (ISIS 440762)가 없는 안티센스 화합물보다 실질적으로 더 강력하였다. 이들 결과는, GalNAc₃-1 콘주게이트의 효능 이점이 상이한 표적에 대해 상보적이고 상이한 화학적으로 변형된 뉴클레오사이드를 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 관찰된다는 것을 입증하고, 이러한 예에서 변형된 뉴클레오사이드는 제한된 에틸 당 모이어티 (바이사이클릭 당 모이어티)를 포함한다.

표 29

Balb/c 마우스에서 SRB-1 mRNA 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 (mg/kg)	간 % PBS	ED ₅₀ (mg/kg)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	100		-	--	
ISIS 440762	0.7	85	2.2	없음	PS/14	246
	2	55				
	7	12				
	20	3				
ISIS 651900	0.07	98	0.3	GalNAc ₃ -1	PS/14	247
	0.2	63				
	0.7	20				
	2	6				
	7	5				

실시예 23: 인간 말초 혈액 단핵 세포 (hPBMC) 검정 프로토콜

hPBMC 검정은 BD Vautainer CPT 튜브 방법을 사용하여 수행하였다. US HealthWorks clinic (Faraday & El Camino Real, Carlsbad)에서 고지에 의한 동의로 자원된 공여체로부터 전혈 샘플을 얻어 4-15 BD 진공채혈기 CPT 8 ml 튜브 (VWR Cat.# BD362753)에 모았다. 각 공여체에 대한 CPT 튜브에서의 대략적인 개시되는 총 전혈액량을 PBMC 검정 데이터 시트를 사용하여 기록하였다.

튜브를 8-10회 뒤집어 원심분리 바로 전에 혈액 샘플을 재혼합하였다. CPT 튜브를브레이크 없이(2700 RPM Beckman Allegra 6R)1500-1800 RCF에서 30분간 수평 (swing-out) 로터에서 실온(18-25 °C)에서 원심분리하였다. 세포를 버퍼 코트 계면 (피콜 및 폴리머 겔 층 사이)로부터 회수하고; 멸균한 50 ml 원뿔형 튜브로 옮기고 5 CPT 튜브/50 ml 원뿔형 튜브/공여체까지 모았다. 그리고 나서, 세포를 PBS (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ 없음; GIBCO)로 2회 세정하였다. 튜브를 50 ml까지 가득 채우고몇 번 뒤집어 혼합하였다. 그리고 나서, 샘플을 330 x g에서 15분 동안 실온에서 원심분리하고(Beckman Allegra 6R에서 1215 RPM), 펠렛을 건드리지 않고 가능한 한 많은 상청액을 흡인하였다. 튜브를 와류시켜 세포 펠렛을 제거하고 RPMI+10% FBS+펜/스트랩 (~1 ml / 10 ml 시작하는 전혈량)에서 세포를 재현탁시켰다. 60 µl 샘플을 600 µl VersaLyse 시약 (Beckman Coulter Cat# A09777)을 갖는 샘플 바이알 (Beckman Coulter) 내로 피펫팅하고 10-15초 동안 부드럽게 볼텍싱하였다. 샘플을 10분 동안 실온에서 10분 동안 배양하고 다시 혼합한 후 계수하였다. 세포 현탁액을 PBMC 세포형 (1:11의 희석 인자가 다른 파라미터를 이용하여 보관되었음)을 이용하여 Vicell XR 세포 생존력 분석기 (Beckman Coulter) 상에서 계수하였다. 생존 세포/ml 및 생존력을 기록하였다. 세포 현탁액을 1 x 10⁷ 생존 PBMC/ RPMI+ 10% FBS+펜/ 스트랩 중에서의 ml로 희석하였다.

세포를 50 µl/웰의 96-웰 조직 배양관 (Falcon Microtest)에 5 x 10⁵로 플레이팅하였다. RPMI+10% FBS+펜/스트랩에 희석된 50 µl/웰의 2x 농도 올리고/대조군을 실험 템플레이트 (100 µl/웰 총)에 따라 추가하였다. 플레이트를 진탕기에 놓고 대략 1분간 혼합하였다. 37 °C에서 24시간 동안 배양한 후; 5% CO₂, 플레이트를 400 x g에서 10분 동안 원심분리한 다음 MSD 사이토카인 검정 (즉 인간 IL-6, IL-10, IL-8 및 MCP-1)을 위해 상청액을 제거하였다.

실시예 24: GalNAc₃-1 접합된 ASO를 위한 hPBMC 검정에서의 전염증 효과의 평가

표 30에 열거된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)에 대해 실시예 23에서 기재된 프로토콜을 사용하여 hPBMC 검정에서의 전염증 효과를 평가하였다. ISIS 353512는 검정에서의 IL-6 방출에 대한 고반응군인 것으로 알려진 내부 표준이다. hPBMC를 신선한, 지원된 공여체로부터 단리하고 0, 0.0128, 0.064, 0.32, 1.6, 8, 40 및 200 µM 농도의 ASO로 처리하였다. 24시간 처리 후, 사이토카인 수준을 측정하였다.

IL-6의 수준을 일차 판독으로서 사용하였다. EC₅₀ 및 E_{max}를 표준 절차를 이용하여 계산하였다. 결과는 두 공여체로부터 E_{max}/EC₅₀의 평균 비로서 표현되고 "E_{max}/EC₅₀"로 나타내어진다. 더 낮은 비율은 전염증 반응에서 상대적 감소를 가리키고 더 높은 비율은 전염증 반응에서 상대적 증가를 가리킨다.

시험 화합물과 관련하여, 가장 낮은 전염증 화합물은 PS/PO 연결된 ASO (ISIS 616468)였다. GalNAc₃-1 접합된 ASO인 ISIS 647535는그의 비-접합된 대응물 ISIS 304801보다 약간 덜 전염증이었다. 이들 결과는, 일부 PO 연결

의 혼입이 전염증 반응을 감소시키며 **Ga1NAc₃-1** 콘주게이트의 부가가 화합물을 더 전염증성으로 만들며 전염증 반응을 감소시킬 수 있음을 가리킨다. 따라서, 당업자라면 혼합된 PS/PO 연결 및 **Ga1NAc₃-1** 콘주게이트 모두를 포함하는 안티센스 화합물이 **Ga1NAc₃-1** 콘주게이트를 갖거나 갖지 않는 완벽한 PS 연결된 안티센스 화합물과 비교하여 더 낮은 전염증 반응을 생성할 것임을 예상할 것이다. 이들 결과는, **Ga1NAc₃-1** 접합된 안티센스 화합물, 특히 감소된 PS 함량을 갖는 화합물이 덜 전염증이라는 것을 보여준다.

함께, 이들 결과는, **Ga1NAc₃-1** 접합된 화합물, 특히 감소된 PS 함량을 갖는 화합물이 **Ga1NAc₃-1** 콘주게이트가 없는 대응되는 완전한 PS 안티센스 화합물보다 더 높은 용량으로 투여될 수 있음을 제시한다. 이들 화합물의 경우 반감기가 실질적으로 상이할 것으로 예상되지 않으므로, 그러한 더 높은 투여는 덜 빈번한 복용을 야기할 것이다. 사실상 그러한 투여는 훨씬 덜 빈번할 수 있는데, **Ga1NAc₃-1** 접합된 화합물이 더 강하고(실시예 20-22 참고), 화합물의 농도가 효능에 기초하여 원하는 수준 이하로 떨어지면 재-복용이 필요하기 때문이다.

표 30

변형된 ASO

ASO	서열 (5'에서 3')	표적	서열번호
ISIS 104838	G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	TNF α	248
ISIS 353512	T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} T _{es} G _{es} G _e	CRP	249
ISIS 304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	ApoC III	244
ISIS 647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} - Ga1NAc₃-1_a	ApoC III	245
ISIS 616468	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _e	ApoC III	244

하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "k"는 6'-(S)-CH₃ 바이사이클릭 뉴클레오사이드 (예를 들면 cEt)를 나타내고; "s"는 포스포리티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 상첨자 "m"은 5-메틸시토신을 나타낸다. "**A_{do}-Ga1NAc₃-1_a**"는, 명시된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단에 부착된 실시예 9에 나타난 구조 **Ga1NAc₃-1**를 갖는 콘주게이트를 가리킨다.

***표 31**

hPBMC 검정에서 ApoC III를 표적으로 하는 ASO의 전염증 효과

ASO	EC ₅₀ (μM)	E _{max} (μM)	E _{max} /EC ₅₀	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
ISIS 353512 (고반응군)	0.01	265.9	26,590	없음	PS/20	249
ISIS 304801	0.07	106.55	1,522	없음	PS/20	244
ISIS 647535	0.12	138	1,150	Ga1NAc₃-1	PS/20	245
ISIS 616468	0.32	71.52	224	없음	PS/PO/20	244

실시예 25: 시험관 내에서 인간 ApoC III을 표적으로 하는 Ga1NAc₃-1 접합된 변형된 ASO의 효과

상기 기재된 ISIS 304801 및 647535를 시험관 내에서 시험하였다. 웰당 25,000 세포의 밀도로 이식유전자 마우스 유래의 일차 간세포 세포를 0.03, 0.08, 0.24, 0.74, 2.22, 6.67 및 20 μM 농도의 변형된 올리고뉴클레오타이드로 처리하였다. 대략 16시간의 처리 기간 후, RNA를 상기 세포로부터 분리하고 mRNA 수준을 정량적 실시간 PCR에 의해 측정하고 hApoC III mRNA 수준을, 리보그린에 의해 측정된 바와 같이, 총 RNA 함량에 따라 조정하였

다.

IC₅₀을 표준 방법을 사용하여 계산하였고 그 결과가 표 32에서 제시되어 있다. 예시된 바와 같이, 대조군 ISIS 304801과 비교하여 ISIS 647535로 처리된 세포에서 비교할만한 효능이 관찰되었다.

표 32

일차 간세포에서 인간 ApoC III를 표적으로 하는 변형된 ASO

ASO	IC ₅₀ (μM)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
ISIS 304801	0.44	없음	PS/20	244
ISIS 647535	0.31	GaINAc₃-1	PS/20	245

이 실험에서, 생체내에서 관찰된 **GaINAc₃-1** 콘주게이션의 큰 효능 이점은시험관 내에서 관찰되지 않았다. 시험관 내에서 일차 간세포에서의 차후의 자유 흡수 실험은 GaINAc 콘주게이트가 없는 올리고뉴클레오타이드(실시예 60, 82, 및 92 참고)와 비교하여 다양한 GaINAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 증가된 효능을 나타내지 않았다.

실시예 26: ApoC III ASO 활성화에 대한 PO/PS 연결의 효과

인간 ApoC III 이식유전자 마우스에게 25 mg/kg의 ISIS 304801, 또는 ISIS 616468 (모두 상기에 기재됨)를 1회 복강내로 주입하거나 PBS 처리된 대조군은 2주간 주당 1회 주입하였다. 처리 그룹은 3마리의 동물로 구성되었고 대조군 그룹은 4 마리의 동물로 구성되었다. 처리 전에 뿐만 아니라 마지막 용량 후에, 혈액을 각 마우스로부터 채혈하고 혈장 샘플을 분석하였다. 마우스를 마지막 투여 72시간 후에 희생시켰다.

샘플을 수집하고 상기에서 기재된 바와 같이(실시예 20)간에서의 ApoC III 단백질 수준을 분석하였다. 이들 분석으로부터의 데이터가 하기 표 33에 나타나 있다.

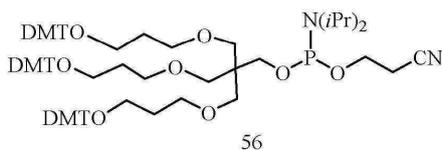
이들 결과는 전체 PS (ISIS 304801) 대비 웅에서 PO/PS (ISIS 616468)를 갖는 안티센스 화합물의 효능 감소를 보여준다.

표 33

인간 ApoC III 이식유전자 마우스에서 ApoC III 단백질 수준에 대한 ASO 처리의 효과

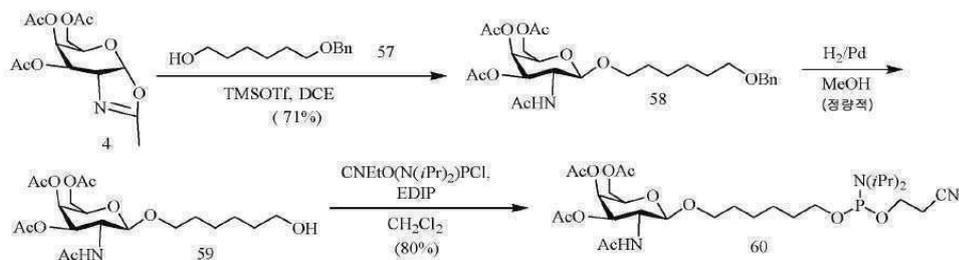
ASO	용량 (mg/kg)	% PBS	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	99	-	--	
ISIS 304801	25 mg/kg/wk 2 주 동안	24	없음	Full PS	244
ISIS 616468	25 mg/kg/wk 2 주 동안	40	없음	14 PS/6 PO	245

실시예 27: 화합물 56



화합물 56은 Glen Research사부터 상업적으로 이용가능하거나 문헌[Shchepinov 등, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4447-4454]에 의해 보고된 공개된 과정에 따라 제조할 수 있다.

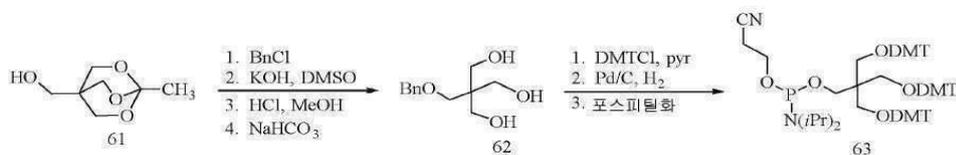
실시예 28: 화합물 60의 제조



화합물 4를 실시예 2에서 예시된 과정에 따라 제조하였다. 화합물 57는 상업적으로 이용가능하다. 화합물 60을 구조적 분석에 의해 확인하였다.

화합물 57은 대표적인 것으로 여겨지며, 예정된 조성을 갖는 포스포라미다이트를 제조하는데 사용될 수 있는 본 명세서에서 제공된 것들을 포함하나 이제 제한되지 않는 다른 모노보호된 치환된 또는 비치환된 알킬 디올로서 제한되는 것으로 의도되지 않는다.

실시예 29: 화합물 63의 제조



화합물 61 및 62를 하기에 의해 보고된 것과 유사한 과정을 이용하여 제조한다: Tober 등, *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, 3, 566-577; 및 Jiang 등, *Tetrahedron*, 2007, 63(19), 3982-3988.

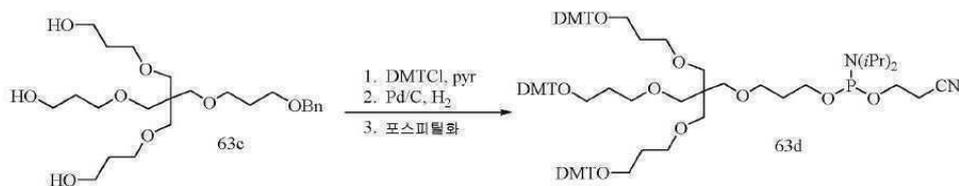
대안적으로, 화합물 63을 Kim 등, *Synlett*, 2003, 12, 1838-1840; 및 Kim 등, 공개된 PCT 국제 출원, WO 2004063208에 의해 과학 및 특허 문헌에 보고된 것과 유사한 과정을 이용하여 제조한다.

실시예 30: 화합물 63b의 제조



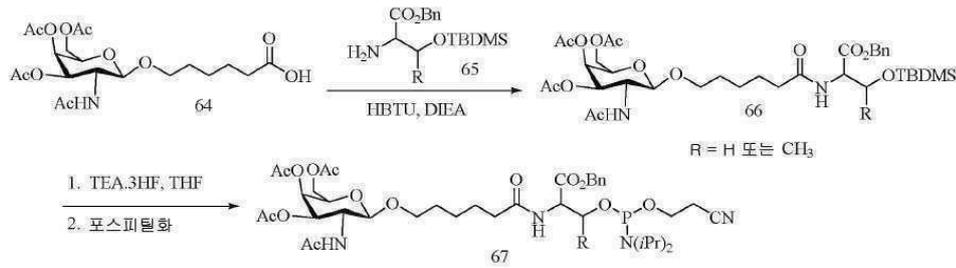
화합물 63a를 하기에 의해 보고된 것들과 유사한 과정을 이용하여 제조한다: Hanessian 등, *Canadian Journal of Chemistry*, 1996, 74(9), 1731-1737.

실시예 31: 화합물 63d의 제조



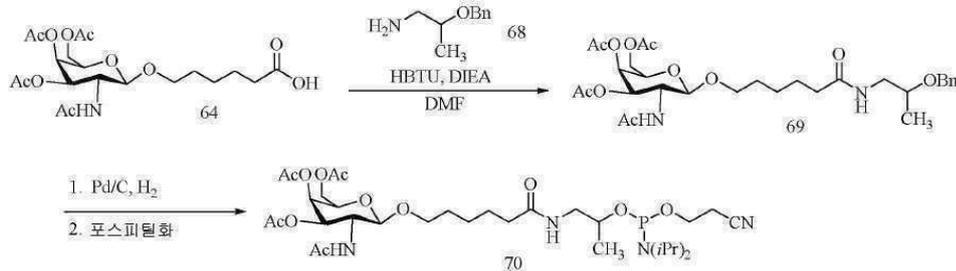
화합물 63c를 Chen 등, *Chinese Chemical Letters*, 1998, 9(5), 451-453에 의해 보고된 것들과 유사한 과정을 이용하여 제조한다.

실시예 32: 화합물 67의 제조



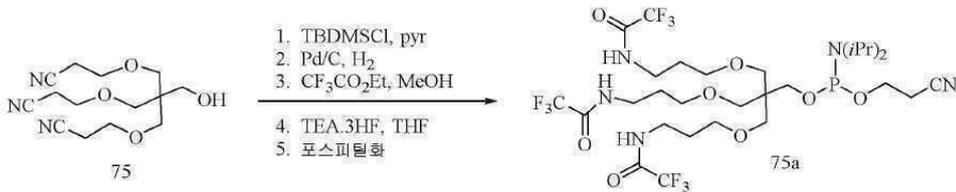
화합물 64는 실시예 2에 예시된 과정에 따라 제조하였다. 화합물 65는 Or 등에 의해 공개된 PCT 국제 출원, WO 2009003009에 의해 보고된 것들과 유사한 과정을 이용하여 제조된다. 화합물 65에 대해 사용된 보호 그룹은 대표적인 것을 의미하며, 사용될 수 있는 본원 명세서에 제시된 것을 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 보호 그룹으로서 제한되지 않는 것으로 의도된다.

실시예 33: 화합물 70의 제조



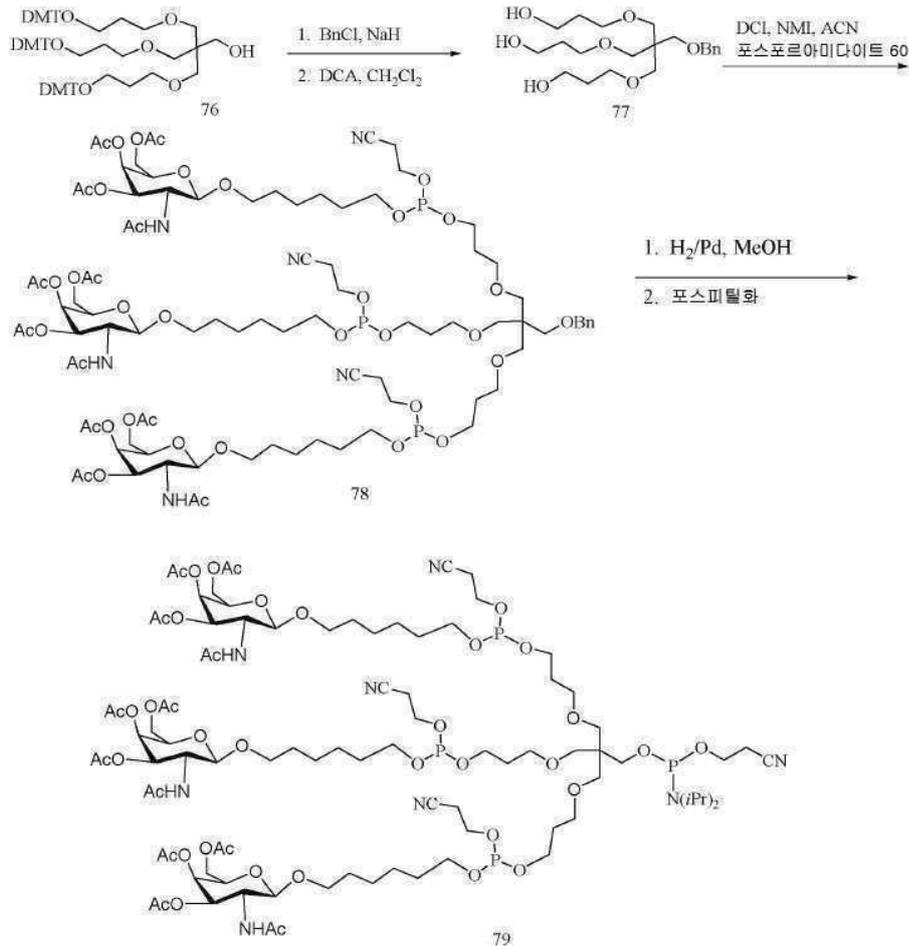
화합물 64는 실시예 2에 예시된 과정에 따라 제조하였다. 화합물 68는 상업적으로 이용가능하다. 화합물 68에 대해 사용된 보호 그룹은 대표적인 것을 의미하며, 사용될 수 있는 본원 명세서에서 제공된 것들 것 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 보호 그룹으로서 제한되는 것으로 의도되지 않는다.

실시예 34: 화합물 75a의 제조



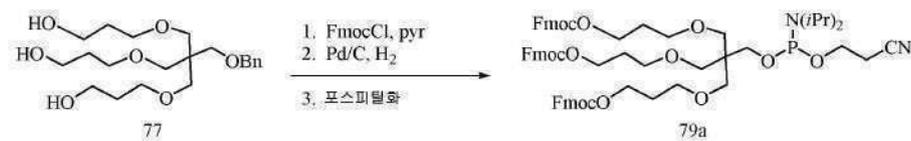
화합물 75를 Shchepinov 등, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4447-4454에 의해 공개된 과정을 이용하여 제조한다.

실시예 35: 화합물 79의 제조



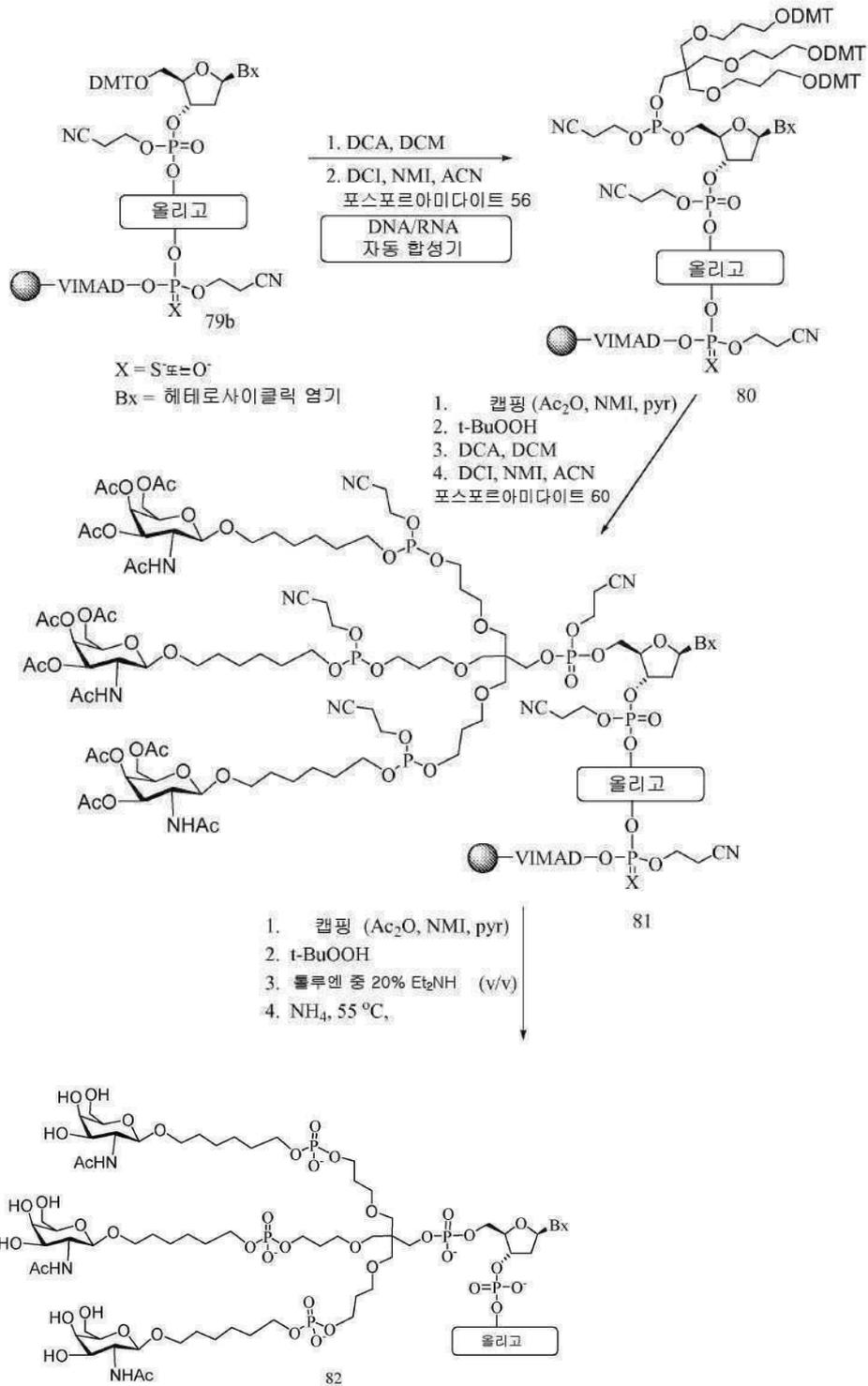
화합물 76을 Shchepinov 등, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4447-4454에 의해 공개된 과정을 이용하여 제조하였다.

실시예 36: 화합물 79a의 제조

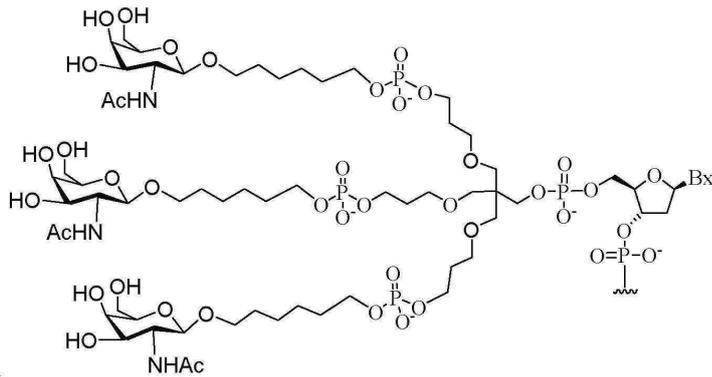


화합물 77을 실시예 35에 예시된 과정에 따라 제조한다.

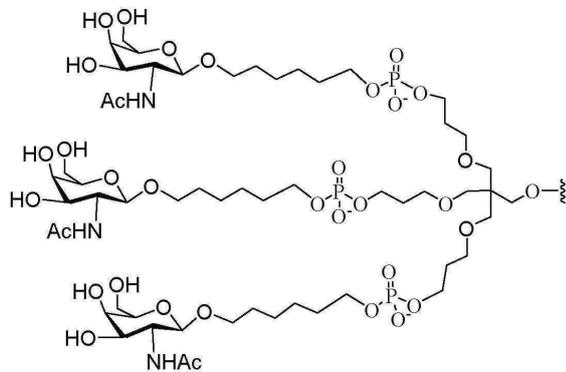
실시예 37: 고체 지지체를 통해 5' 말단에 포스포디에스테르 연결된 GaINAc₃-2 콘주게이트를 포함하는 접합된 올리고머 화합물 82의 일반적인 제조 방법 (방법 I)



여기서 GalNAc₃-2는 하기 구조를 갖는다:

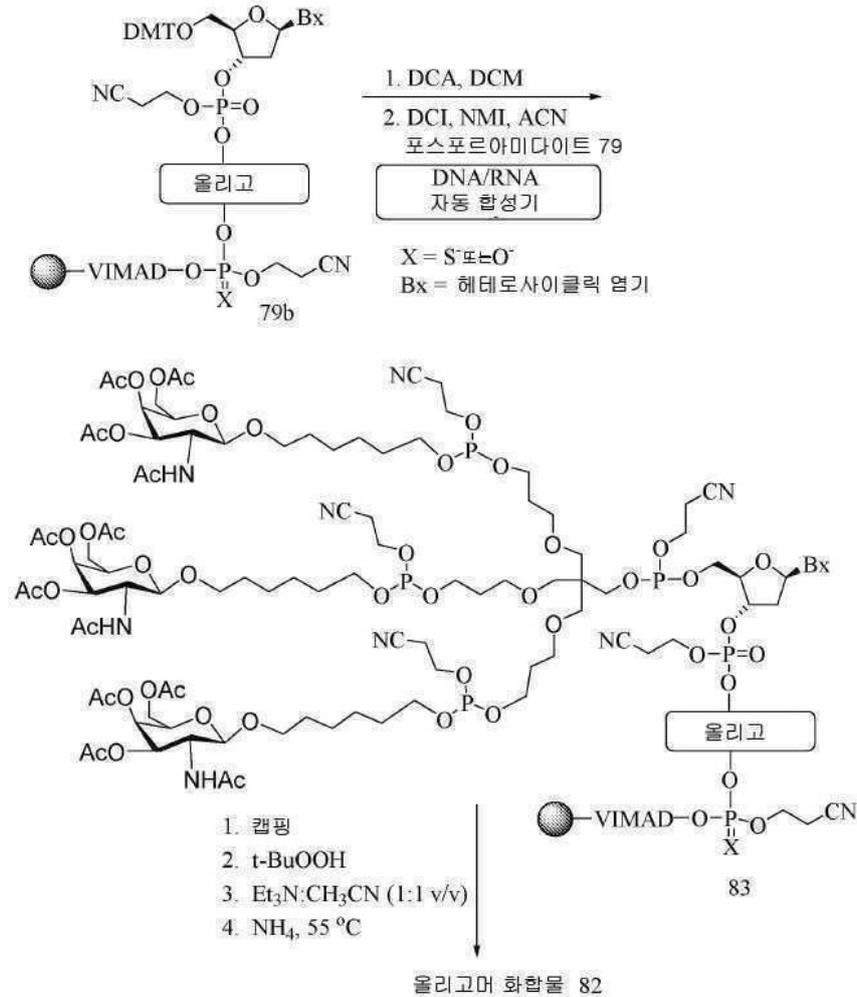


콘주게이트 그룹 GalNAc₃-2의 GalNAc₃ 클러스터 부분 (GalNAc₃-2_a)은 임의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 여기서 GalNAc₃-2_a는 하기 식을 갖는다:



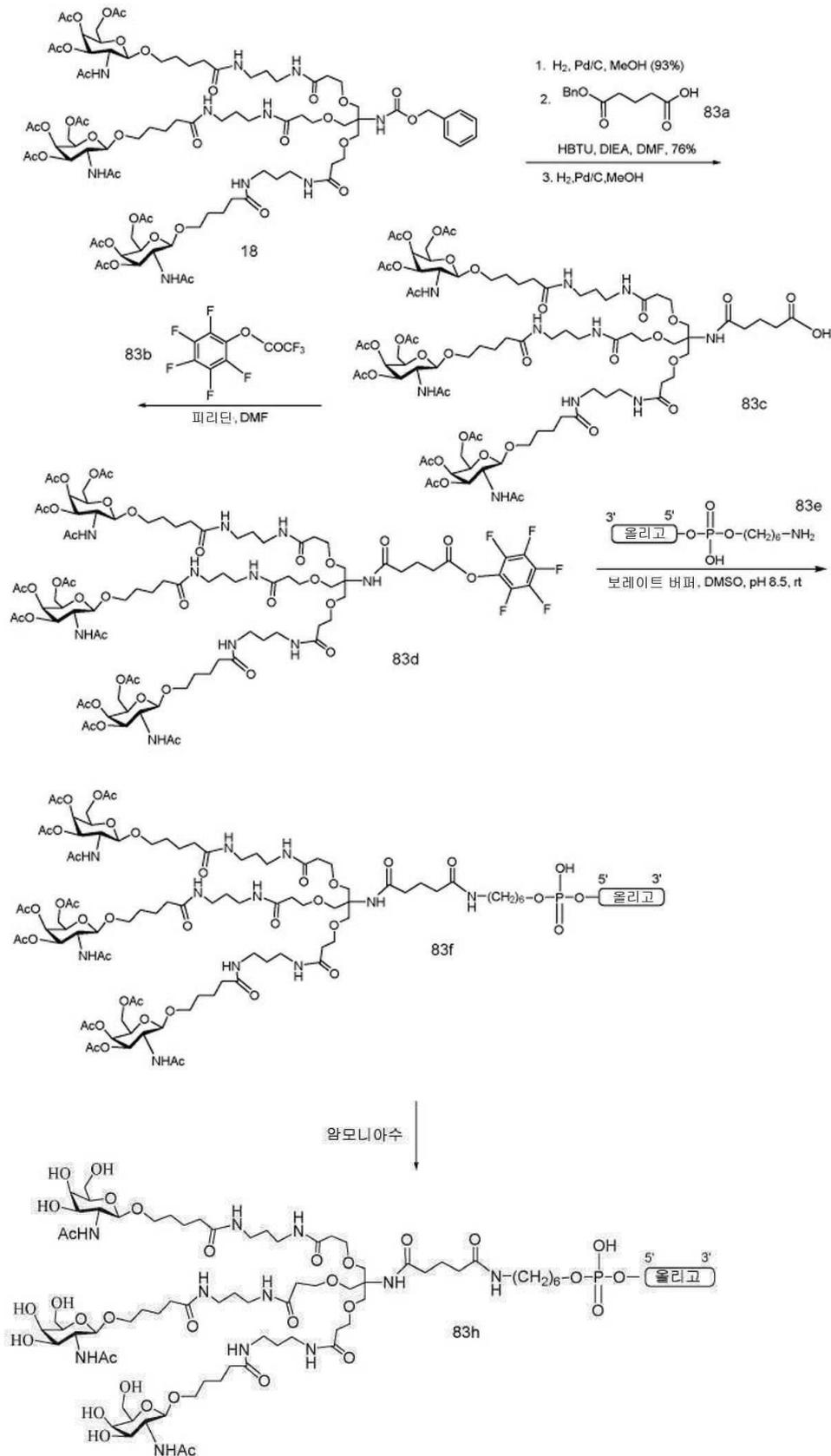
VIMAD-결합된 올리고머 화합물 79b를 하기에 대한 표준 과정을 이용하여 제조하였다: 자동화된 DNA/RNA 합성 (Dupouy 등, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 3623-3627 참고). 포스포르아미다이트 화합물 56 및 60을 각각 실시예 27 및 28에 예시된 과정에 따라 제조하였다. 실증된 포스포르아미다이트는 대표적인 것으로 여겨지며, 5' 말단에 포스포디에스테르 연결된 콘주게이트 그룹을 갖는 올리고머 화합물을 제조하는데 사용될 수 있는 본 명세서에서 제공된 것들을 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 포스포르아미다이트 빌딩 블록으로 한정되는 것으로 의도되지 않는다. 고체 지지체에 부가된 포스포르아미다이트의 순서 및 양은 임의 예정된 순서 및 조성을 갖는 본원에서 기재된 올리고머 화합물을 제조하기 위해 조정될 수 있다.

실시예 38: 5' 말단에 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 콘주게이트를 포함하는 올리고머 화합물 82의 대안적인 제조 방법 (방법 II)

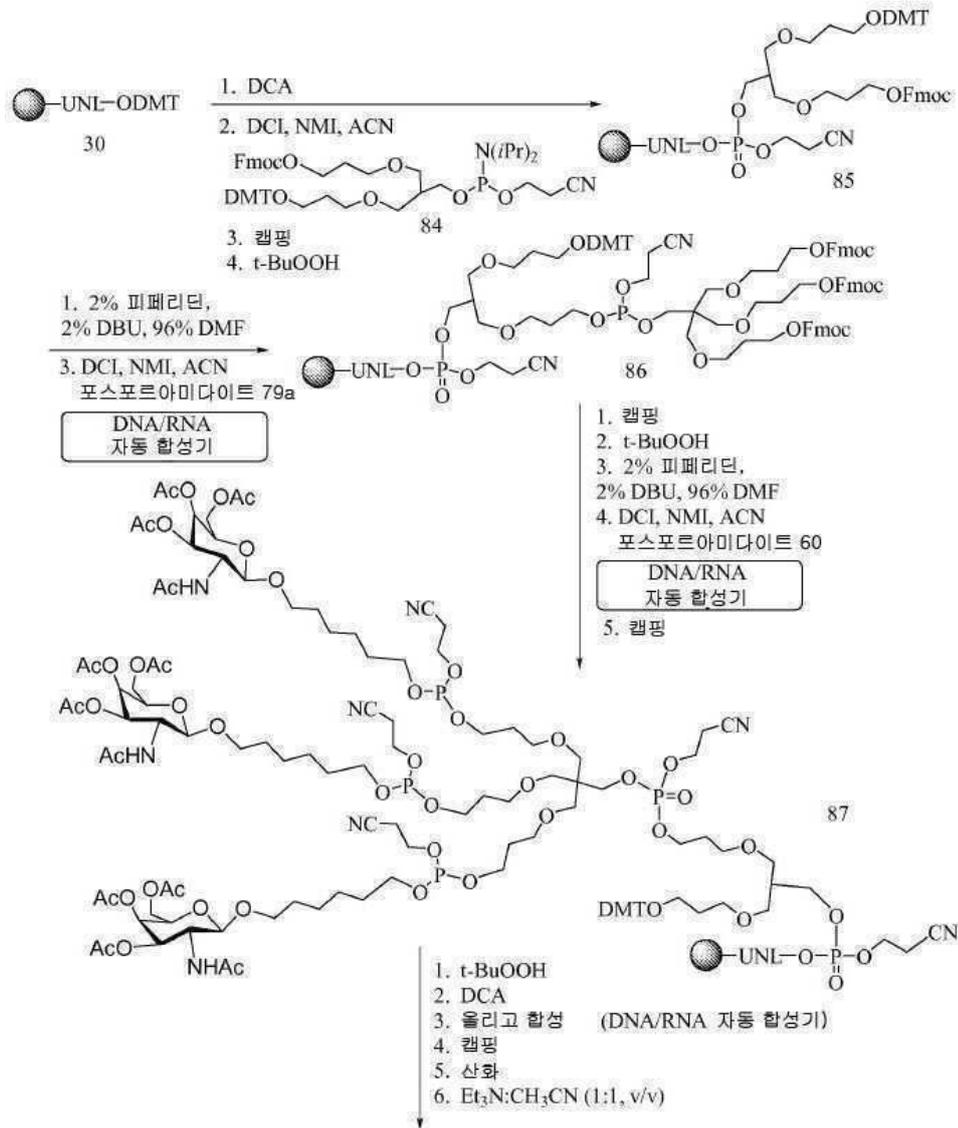


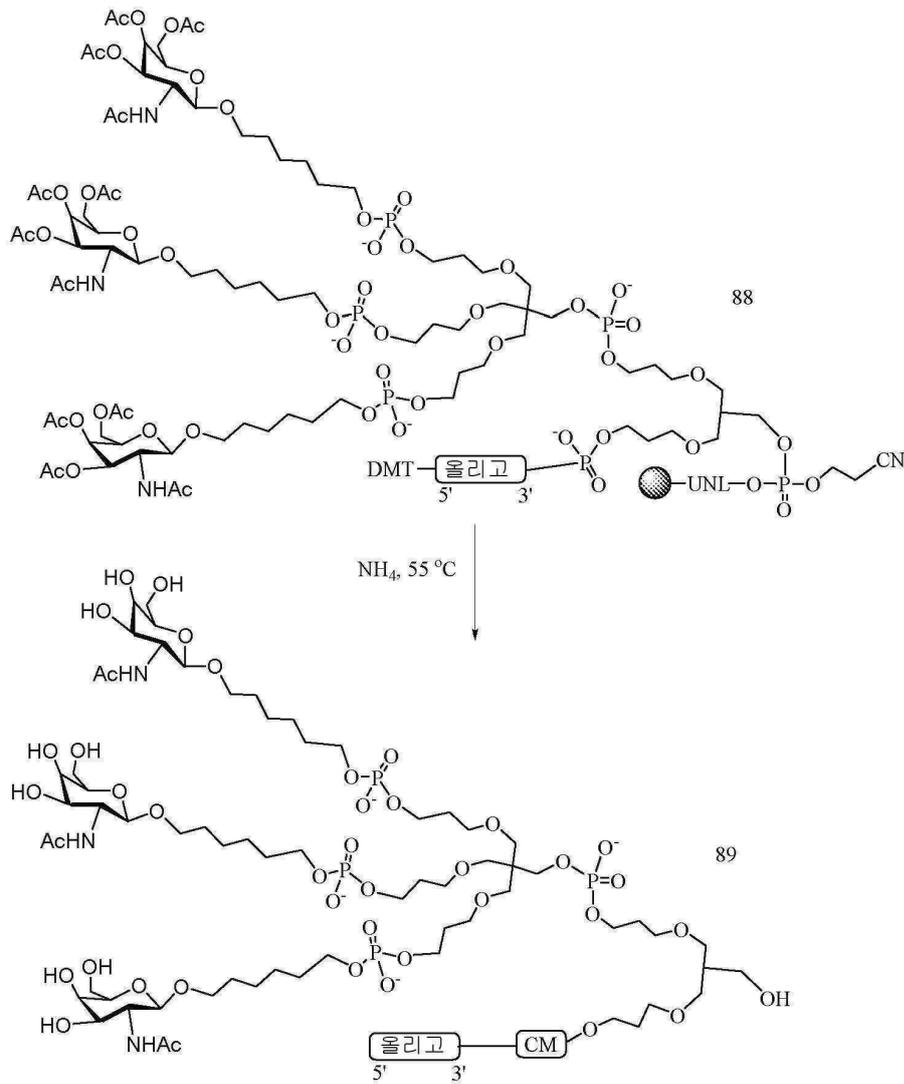
VIMAD-결합된 올리고머 화합물 79b를 하기에 대한 표준 과정을 이용하여 제조하였다: 자동화된 DNA/RNA 합성 (Dupouy 등, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 3623-3627 참고). Ga1Nac₃-2 클러스터 포스포르아미다이트인 화합물 79를 실시예 35에 예시된 과정에 따라 제조하였다. 이 대안적인 방법은 합성의 최종 단계에서 포스포디에스테르 연결된 Ga1Nac₃-2 콘주게이트의 올리고머 화합물에서의 1-단계 설치를 허용한다. 예시된 포스포르아미다이트는 대표적인 것으로 여겨지며, 5' 말단에 포스포디에스테르 콘주게이트를 갖는 올리고머 화합물을 제조하는데 사용될 수 있는 본 명세서에서 제공된 것들을 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 포스포르아미다이트 빌딩 블록으로서 한정되는 것으로 의도되지 않는다. 고체 지지체에 부가된 포스포르아미다이트의 순서 및 양은 임의 예정된 순서 및 조성을 갖는 본원에서 기재된 올리고머 화합물을 제조하기 위해 조정될 수 있다.

실시예 39: 고체 지지체를 통한 5' 말단에 (5' 말단 부착을 위해 변형된 Ga1Nac3-1)Ga1Nac3-3 콘주게이트를 포함하는 올리고머 화합물 83h의 일반적인 제조 방법

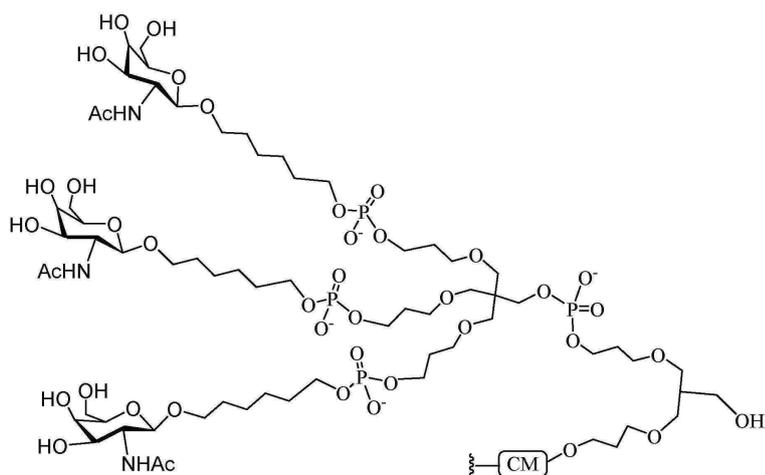


화합물 18을 실시예 4에 예시된 과정에 따라 제조하였다. 화합물 83a 및 83b는 상업적으로 이용가능하다. 포스포디에스테르 연결된 헥실아민을 포함하는 올리고머 화합물 83e를 표준 올리고뉴클레오타이드 합성 과정을 이용하여 제조하였다. 암모니아수를 이용한 상기 보호된 올리고머 화합물의 처리는 5'-GalNAc₃-3' 접합된 올리고머 화합물 (83h)을 제공하였다.

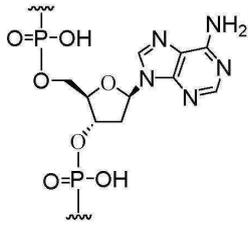




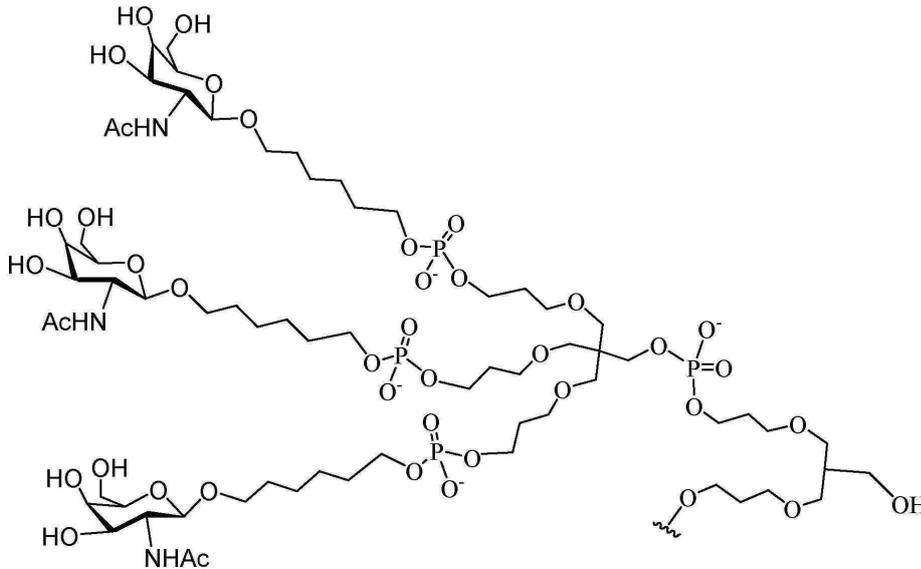
여기서 Ga1NAc₃-4는 하기 구조를 갖는다:



여기서 CM은 절단가능 모이어티이다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 아래와 같다:



콘주게이트 그룹 GalNAc₃-4의 클러스트 부분 (GalNAc₃-4_a)은 임의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 여기서 GalNAc₃-4_a는 하기 식을 갖는다:



보호된 Unylinker 관능화된 고체 지지체 화합물 30은 상업적으로 이용가능하다. 화합물 84는 문헌에 의해 보고된 것과 유사한 과정을 이용하여 제조된다: (Shchepinov 등, Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4447-4454; Shchepinov 등, Nucleic Acids Research, 1999, 27, 3035-3041; 및 Horner 등, Nucleic Acids Research, 1997, 25, 4842-4849 참고).

포스포라미다이트 빌딩 블록, 화합물 60 및 79a를 실시예 28 및 36에 예시된 과정에 따라 제조한다. 예시된 포스포라미다이트는 대표적인 것으로 여겨지며, 예정된 순서 및 조성으로 3' 말단에 포스포디에스테르 연결된 콘주게이트를 갖는 올리고머 화합물을 제조하는데 사용될 수 있는 다른 포스포라미다이트 빌딩 블록로서 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 고체 지지체에 부가된 포스포라미다이트의 순서 및 양은 임의 예정된 순서 및 조성을 갖는 본원에서 기재된 올리고머 화합물을 제조하기 위해 조정될 수 있다.

실시예 41: 고체상 기술을 통해 5' 위치에 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 (실시예 37 참고, Bx는 아데닌임) 콘주게이트를 포함하는 ASO의 일반적인 제조 방법 (ISIS 661134의 제조)

달리 언급되지 않으면, 올리고머 화합물의 합성을 위해 사용된 모든 시약 및 용액은 상업적 공급원로부터 구매된다. 표준 포스포라미다이트 빌딩 블록 및 고체 지지체는, 예를 들면 T, A, G, 및 ¹⁸C 잔기를 포함하는 뉴클레오사이드 잔기의 혼입을 위해 사용된다. 사용된 포스포라미다이트 화합물 56 및 60을 5' 말단에 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 콘주게이트를 합성하기 위해 사용하였다. 무수 아세트니트릴 중의 포스포라미다이트의 0.1 M 용액을 b-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드 및 2'-MOE에 사용하였다.

ASO 합성을 칼럼 내에 패키징된 VIMAD 고체 지지체 (110 μmol/g, Guzaev 등, 2003) 상의 포스포라미다이트 커플링 방법에 의해 ABI 394 합성기 (1-2 μmol 크기) 또는 GE Healthcare Bioscience ÄKTA 올리고파일럿 합성기 (40-200 μmol 크기) 상에서 수행하였다. 커플링 단계의 경우, 포스포라미다이트를 고체 지지체의 초기 로딩에 대해 4배 과량으로 전달하였고, 포스포라미다이트 커플링을 10분 동안 수행하였다. 다른 모든 단계들

은 제조자에 의해 공급된 표준 프로토콜을 따랐다. 톨루엔 중의 6% 디클로로아세트산 용액을 뉴클레오타이드의 5'-하이드록실 그룹으로부터 디메톡시트리틸 (DMT) 그룹을 제거하는데 사용하였다. 무수 CH₃CN 중의 4,5-디시아노이미다졸 (0.7 M)을 커플링 단계 동안에 활성화제로서 사용하였다. 포스포리티오에이트 연결을 3분의 접촉 시간 동안에 1:1 피리딘/CH₃CN 중의 크산탄 하이드라이드의 0.1 M 용액을 이용한 황화에 의해 도입하였다. 6% 물을 함유하는 CH₃CN 중의 20% *tert*-부틸하이드로퍼옥사이드의 용액을 산화제로서 사용하여 12분의 접촉 시간으로 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결을 제공하였다.

원하는 서열이 조립된 후, 시아노에틸 포스페이트 보호 그룹을 45분의 접촉 시간으로 톨루엔 (v/v) 중의 20% 디에틸아민을 이용하여 탈보호시켰다. 상기 고체-지지체 결합된 ASO를 암모니아수 (28-30 중량 %)에 현탁시키고 55 °C에서 6시간 동안 가열하였다.

그리고 나서, 미결합된 ASO를 여과하고 암모니아를 가열로 제거하였다. 잔류물을 강한 음이온 교환 칼럼 상에서 고압 액체 크로마토그래피에 의해 정제하였다(GE Healthcare Bioscience, Source 30Q, 30 μm, 2.54 x 8 cm, A = 30% 수성 CH₃CN 중의 100 mM 암모늄 아세테이트, B = A 중의 1.5 M NaBr, 60분에 0-40%의 B, 유량 14 mL min⁻¹, λ = 260 nm). 잔류물을 역상 칼럼 상의 HPLC에 의해 탈염하여, 고체 지지체 상의 초기 로딩을 기준으로 15-30%의 단리된 수율로 원하는 ASO를 얻었다. ASO를 Agilent 1100 MSD 시스템을 갖는 이온-쌍-HPLC 커플링된 MS 분석에 의해 규명하였다.

표 34

SRB-1를 표적화하는 5' 위치에포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 콘주게이트를 포함하는 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	계산된 질량	관찰된 질량	서열번호
661134	GalNAc ₃ -2 _{a-o} -A _{4o} T _{1s} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	6482.2	6481.6	250

하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "k"는 6'-(S)-CH₃ 바이사이클릭 뉴클레오사이드 (예를 들면 cEt)를 나타내고; "s"는 포스포리티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 상첨자 "m"은 5-메틸시토신을 나타낸다. GalNAc₃-2_a의 구조가 실시예 37에 나타나 있다.

실시예 42: 고체상 기술을 통해 5' 위치에 GalNAc₃-3 콘주게이트를 포함하는 ASO의 일반적인 제조 방법(ISIS 661166의 제조)

ISIS 661166을 위한 합성을 실시예 39 및 41에 예시된 것과 유사한 과정을 이용하여 수행하였다.

ISIS 661166은 5-10-5 MOE 갭머이며, 상기 5' 위치는 GalNAc₃-3 콘주게이트를 포함한다. ASO를 Agilent 1100 MSD 시스템을 갖는이온-쌍-HPLC 커플링된 MS 분석에 의해 규명하였다.

표 34a

Malat-1을 표적화하는 핵실아미노포스포디에스테르 연결을 통한 5' 위치에 GalNAc₃-3

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	콘주게이트	계산된 질량	관찰된 질량	서열번호
661166	5'-GalNAc ₃ -3 _{a-o} ^m C _{es} G _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{es} A _{es} A _{es} T _{es} T _e	5'-GalNAc ₃ -3	8992.16	8990.51	251

콘주게이트를 포함하는 ASO

*하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포리티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 상첨자 "m"은 5-메틸시토신을 나타낸다. "5'-GalNAc₃-3a"의 구조가 실시예 39에 나타나 있다.

실시예 43: 생체내에서 SRB-1을 표적화하는 5' 말단에서의 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 (실시예 37 및 41 참고, Bx는 아데닌임)의 용량-의존적 연구

5' 말단에 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 콘주게이트를 포함하는 ISIS 661134 (실시예 41 참고)를 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제를 위해 용량-의존적 연구에서 시험하였다. 비접합된 ISIS 440762 및 651900 (3' 말단에 GalNAc₃-1 콘주게이트, 실시예 9 참고)을 비교를 위해 연구에 포함시켰고, 이들은 앞서 표 17에 기재되어 있다.

처리

6 주령 수컷 Balb/c 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 ISIS 440762, 651900, 661134 또는 PBS 처리된 대조군으로 하기 제시된 복용량으로 피하로 1회 주입하였다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 간 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). SRB-1 mRNA 수준을 PBS-처리된 대조군에 대해 정규화하기 전에 총 RNA에 대해 결정하였다(리보그린을 이용하여). 아래의 결과는 PBS-처리된 대조군에 대해 정규화된, 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 제시되며, "PBS %"로서 표시된다. ED₅₀을 이전에 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여 측정하였고 하기에 제시되어 있다.

표 35에 예시된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 처리는 SRB-1 mRNA 수준을 용량-의존적 방식으로 낮추었다. 사실상, 5' 말단에 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 콘주게이트를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 661134) 또는 3' 말단에 연결된 GalNAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 651900)는 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 440762)와 비교하여 실질적인 효능 개선을 나타내었다. 게다가, 5' 말단에 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 콘주게이트를 포함하는 ISIS 661134는 3' 말단에 GalNAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 ISIS 651900과 비교하여 효능이 동등하였다.

표 35

SRB-1을 표적화하는 GalNAc₃-1 또는 GalNAc₃-2를 포함하는 ASO

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA 수준 (% PBS)	ED ₅₀ (mg/kg)	콘주게이트	서열번호
PBS	0	100	--	--	
440762	0.2	116	2.58	콘주게이트 없음	250
	0.7	91			
	2	69			
	7	22			
	20	5			
651900	0.07	95	0.26	3' GalNAc ₃ -1	247
	0.2	77			
	0.7	28			
	2	11			
	7	8			
661134	0.07	107	0.25	5' GalNAc ₃ -2	250
	0.2	86			
	0.7	28			
	2	10			
	7	6			

3' GalNAc₃-1 및 5' GalNAc₃-2에 대한 구조는 실시예 9 및 37에 앞서 기술되었다.

약동학 분석 (PK)

고용량 그룹 (7 mg/kg)으로부터의 ASO의 PK를 조사하고 실시예 20에 예시된 것과 동일한 방식으로 평가하였다. 간 샘플을 갖고 표준 프로토콜을 사용하여 추출하였다. 661134 (5' GalNAc₃-2) 및 ISIS 651900 (3' GalNAc₃-1)의 전장 대사물을 확인하고 이들의 질량을 고분해능 질량 분광분석법 분석에 의해 확인하였다. 상기 결과는 5' 말단에 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 콘주게이트를 포함하는 ASO (ISIS 661134)에 대해 검출된 주요 대사물이 ISIS 440762였음을 보여주었다 (데이터 도시되지 않음). 검출가능한 수준에서 추가의 대사물이 관찰되

지 않았다. 그의 대응물과 달리, 표 23a에서 이전에 보고된 것과 유사한 추가의 대사물이 3' 말단에 GaINAc₃-1 콘주게이트를 갖는 ASO에 대해 관찰되었다(ISIS 651900). 이들 결과는, 포스포디에스테르 연결된 GaINAc₃-1 또는 GaINAc₃-2콘주게이트를 갖는 것이 그것의 효능을 없애지 않고 ASO의 PK 프로파일을 개선할 수 있음을 제시한다.

실시에 44: SRB-1을 표적화하는 3' 말단에 GaINAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 ASO (실시에 9 참고)의 안티센스 억제에 대한 PO/PS 연결의 효과

각각 SRB-1을 표적화하는 3' 말단에 GaINAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 ISIS 655861 및 655862를 대상으로 단일 투여 연구에서 마우스에서 SRB-1을 억제하는 이들의 능력을 시험하였다. 모 비접합된 화합물인 ISIS 353382를 비교를 위해 연구에 포함시켰다.

ASO는 5-10-5 MOE 겹치기이며, 상기 겹치기 영역은 10개의 2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 포함하고 각 윙 영역은 5개의 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. ASO를 실시에 19에서 앞서 예시된 것과 유사한 방법을 이용하여 제조하였고 이는 하기 표 36에 기술되어 있다.

표 36

SRB-1를 표적화하는 3' 말단에 GaINAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	화학	서열번호
353382 (모)	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	전체 PS 콘주게이트 없음	252
655861	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} ⁻ GaINAc₃-1_a	GaINAc₃-1 콘주게이트를 갖는 전체 PS	253
655862	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} ⁻ GaINAc₃-1_a	GaINAc₃-1 콘주게이트를 갖는 혼합된 PS/PO	253

하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 상첨자 "m"은 5-메틸시토신을 나타낸다. "GaINAc₃-1"의 구조가 실시에 9에 나타나 있다.

처리

6 주령 수컷 Balb/c 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 ISIS 353382, 655861, 655862 또는 PBS 처리된 대조군으로 하기에 제시된 복용량으로 피하로 1회 주입하였다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 처리 전에 뿐만 아니라 마지막 용량 후에, 혈액을 각 마우스로부터 채혈하고 혈장 샘플을 분석하였다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 간 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). SRB-1 mRNA 수준을 PBS-처리된 대조군에 대해 정규화하기 전에 총 RNA에 대해 결정하였다(리보그린을 이용하여). 아래의 결과는 PBS-처리된 대조군에 정규화된, 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 제시되어 있고, "PBS %"로서 표시되어 있다. ED₅₀을 이전에 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여 측정하였고, 하기에 보고되어 있다.

표 37에서 예시된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 처리는 PBS 처리된 대조군과 비교하여 용량-의존 방식으로 SRB-1 mRNA 수준을 낮추었다. 사실상, 3' 말단에 GaINAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 655861 및 655862)는 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 353382)와 비교하여 실질적인 효능 개선을 나타내었다. 게다가, 혼합된 PS/PO 연결을 갖는 ISIS 655862는 전체 PS (ISIS 655861)와 비교하여 효능 개선을 나타내었다.

표 37

SRB-1을 표적화하는 3' 말단에 GaINAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 ASO의 안티센스 억제에 대한 PO/PS 연결의 효과

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA 수준 (% PBS)	ED ₅₀ (mg/kg)	화학	서열번호
PBS	0	100	--	--	
353382 (모)	3	76.65	10.4	콘주게이트 없는 전체 PS	252
	10	52.40			
	30	24.95			
655861	0.5	81.22	2.2	GalNAc ₃ -1 콘주게이트를 갖는 전체 PS	253
	1.5	63.51			
	5	24.61			
	15	14.80			
655862	0.5	69.57	1.3	GalNAc ₃ -1 콘주게이트를 갖는 혼합된 PS/PO	253
	1.5	45.78			
	5	19.70			
	15	12.90			

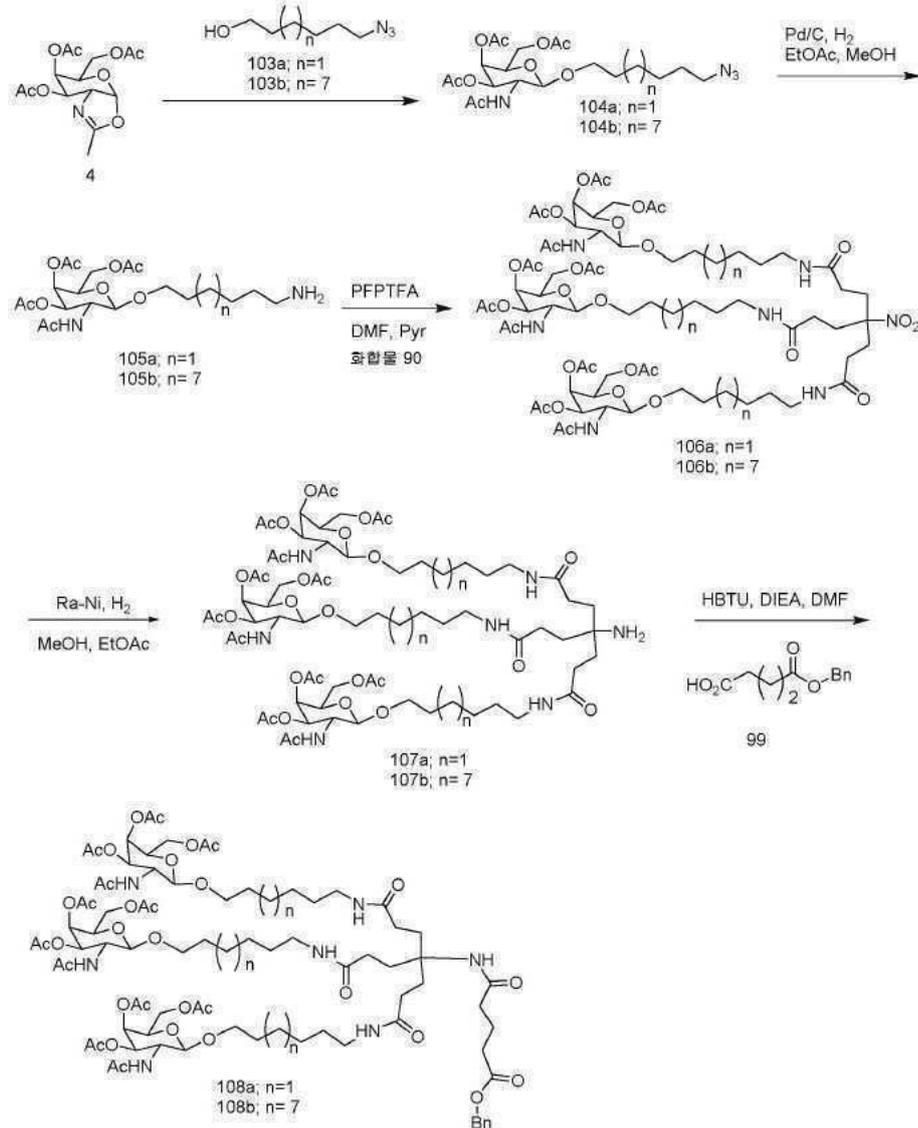
혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다. 장기 중량을 또한 평가하였다. 상기 결과는 PBS 대조군과 비교하여 ASO 처리된 마우스에서 아미노기전달효소 수준 (표 38) 또는 장기 중량 (데이터 도시되지 않음)의 상승이 관찰되지 않았음을 입증하였다 (데이터 도시되지 않음). 게다가, 혼합된 PS/PO 연결을 갖는 ASO (ISIS 655862)는 전체 PS (ISIS 655861)와 비교하여 유사한 아미노기전달효소 수준을 나타내었다.

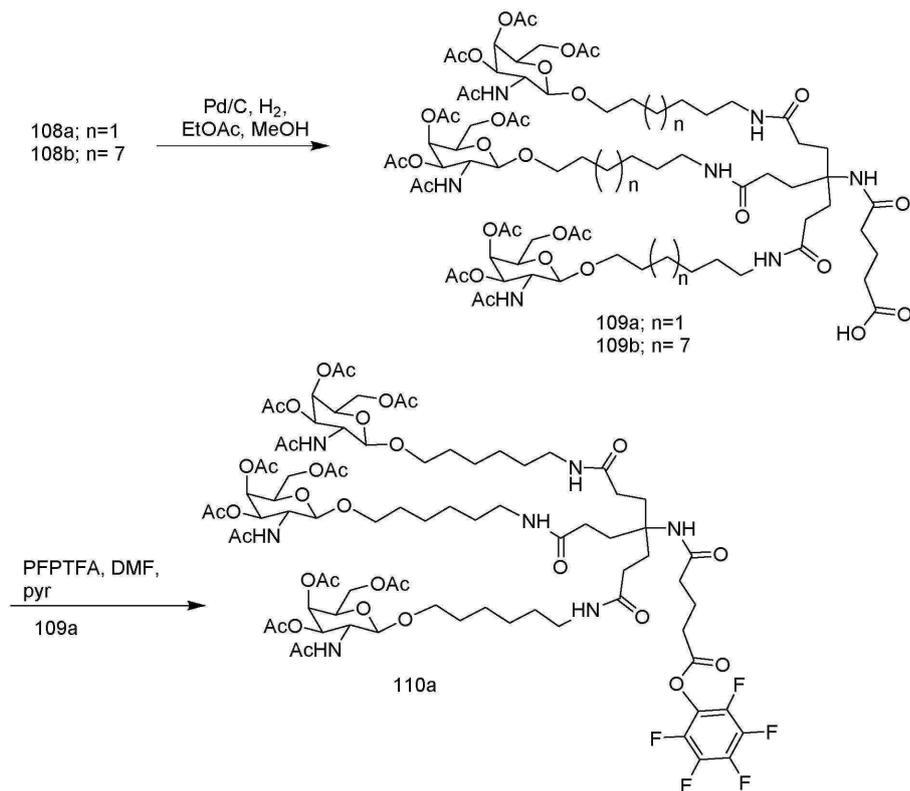
표 38

SRB-1를 표적화하는 3' 말단에 GalNAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 ASO의 아미노기전달효소 수준에 대한 PO/PS 연결의 효과

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	화학	서열번호
PBS	0	28.5	65	--	
353382 (모)	3	50.25	89	콘주게이트 없는 전체 PS	252
	10	27.5	79.3		
	30	27.3	97		
655861	0.5	28	55.7	GalNAc ₃ -1 를 갖는 전체 PS	253
	1.5	30	78		
	5	29	63.5		
	15	28.8	67.8		
655862	0.5	50	75.5	GalNAc ₃ -1 를 갖는 혼합된 PS/PO	253
	1.5	21.7	58.5		
	5	29.3	69		
	15	22	61		

실시예 45: PFP 에스테르, 화합물 110a의 제조





화합물 4 (9.5g, 28.8 mmol)를 개별적으로 화합물 103a 또는 103b (38 mmol), 및 디클로로메탄 (200 mL) 중 TMSOTf (0.5 eq.) 및 분자체로 처리하고, 16시간 동안 실온에서 교반하였다. 이 때, 유기 층을 셀라이트를 통해 여과한 다음 중탄산나트륨, 물 및 염수로 세정하였다. 그 다음 유기층을 분리하고 황산나트륨 상에서 건조하고, 여과하고 감압 하에서 환원시켰다. 얻어진 오일을 실리카겔 크로마토그래피 (2%→10% 메탄올/디클로로메탄)로 정제하여 >80% 수율로 화합물 104a 및 104b를 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

화합물 104a 및 104b를 화합물 100a-d (실시예 47)와 동일한 조건으로 처리하여 >90% 수율로 화합물 105a 및 105b를 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

화합물 105a 및 105b를 화합물 901a-d와 동일한 조건 하에서 화합물 90으로 개별적으로 처리하여, 화합물 106a (80%) 및 106b (20%)를 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

화합물 106a 및 106b를 화합물 96a-d (실시예 47)와 동일한 조건 하에서 처리하여 107a (60%) 및 107b (20%)를 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

화합물 107a 및 107b를 화합물 97a-d (실시예 47)와 동일한 조건 하에서 처리하여, 화합물 108a 및 108b를 40-60% 수율로 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

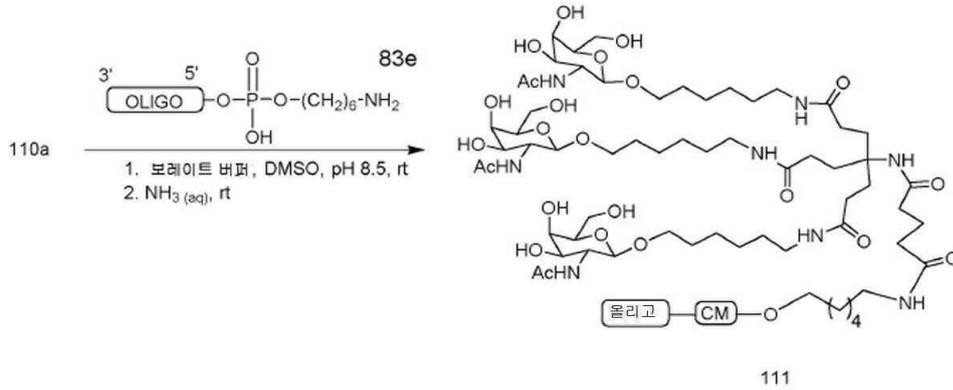
화합물 108a (60%) 및 108b (40%)을 화합물 100a-d (실시예 47)와 동일한 조건으로 처리하여, 화합물 109a 및 109b를 >80% 수율로 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

화합물 109a를 화합물 101a-d (실시예 47)와 동일한 조건 하에서 처리하여, 화합물 110a를 30-60% 수율로 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다. 대안적으로, 화합물 110b는 화합물 109b로 시작하는 개시되는 유사한 방식으로 제조될 수 있다.

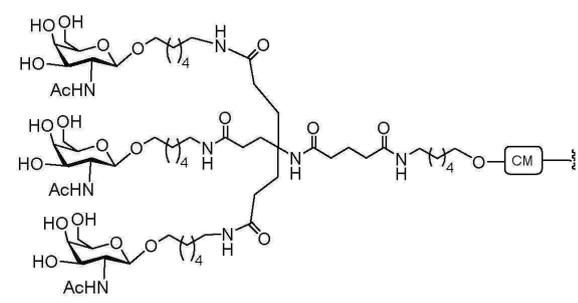
실시예 46: PFP 에스테르 (올리고뉴클레오타이드 111)과의 콘주게이션을 위한 일반적인 절차; ISIS 666881 (GalNAc₃-10)의 제조

5'-핵심아미노 변형된 올리고뉴클레오타이드를 합성하고 표준 고체상 올리고뉴클레오타이드 과정을 이용하여 정제하였다. 5'-핵심아미노 변형된 올리고뉴클레오타이드를 0.1 M 나트륨 테트라보레이트, pH 8.5 (200 μL)에 용해시키고 DMSO (50 μL)에 용해된 3 당량의 선택된 PFP 에스테르화된 GalNAc₃ 클러스터를 부가하였다. 만약 PFP 에스테르가 ASO 용액 부가시 침전되면, 모든 PFP 에스테르가 용액 내에 있을 때까지 DMSO를 부가하였다. 반응은

실온에서 약 16시간 혼합 후 완료하였다. 수득한 용액을 12 mL의 물로 희석한 다음 스펀 필터에서 3000 Da의 질량 컷오프로 3000 rpm으로 스펀다운하였다. 이 과정을 2회 반복하여 소분자 불순물을 제거하였다. 그 다음 용액을 동결건조하고 농축된 암모니아수에서 재용해하고 실온에서 2.5시간 동안 혼합한 다음 진공에서 농축하여 대부분의 암모니아를 제거하였다. 접합된 올리고뉴클레오타이드를 정제하고 RP-HPLC로 탈염하고 동결건조하여 GalNAc₃ 접합된 올리고뉴클레오타이드를 제공하였다.



올리고뉴클레오타이드 111은 GalNAc₃-10과 접합된다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-10의 클러스트 부분 (GalNAc₃-10a)은 임의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 하기GalNAc₃-10을 이용하여 합성된 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 666881)에서 나타난 바와 같은 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다. GalNAc₃-10 (GalNAc₃-10_a-CM-)의 구조가 하기에 나타나 있다:



일반적인 절차에 따라 ISIS 666881을 제조하였다. 5'-핵실아미노 변형된 올리고뉴클레오타이드 ISIS 660254를 합성하고 표준 고체상 올리고뉴클레오타이드 과정을 이용하여 정제하였다. ISIS 660254 (40 mg, 5.2 μmol)을 0.1 M 나트륨 테트라보레이트, pH 8.5 (200 μL)에 용해시키고 DMSO (50 μL)에 용해된 3 당량의 PFP 에스테르 (화합물 110a)를 부가하였다. PFP 에스테르는 PFP 에스테르를 완전히 용해시키기 위해 추가의 DMSO (600 μL)를 필요로 하는 ASO 용액에 부가시 침전되었다. 상기 반응을 실온에서 16시간 혼합한 후 완료하였다. 상기 용액을 물로 12 mL 총 용적으로 희석하고 스펀 필터에서 3000 Da의 질량 컷오프로 3000 rpm으로 스펀다운하였다. 이 과정을 2회 반복하여 소분자 불순물을 제거하였다. 용액을 동결건조하고 실온에서 2.5시간 동안 혼합하면서 농축된 암모니아수에 재용해한 다음 진공에서 농축하여 대부분의 암모니아를 제거하였다. 접합된 올리고뉴클레오타이드를 정제하고 RP-HPLC로 탈염하고 동결건조하여 중량으로 90% 수율로 ISIS 666881를 얻었다 (42 mg, 4.7 μmol).

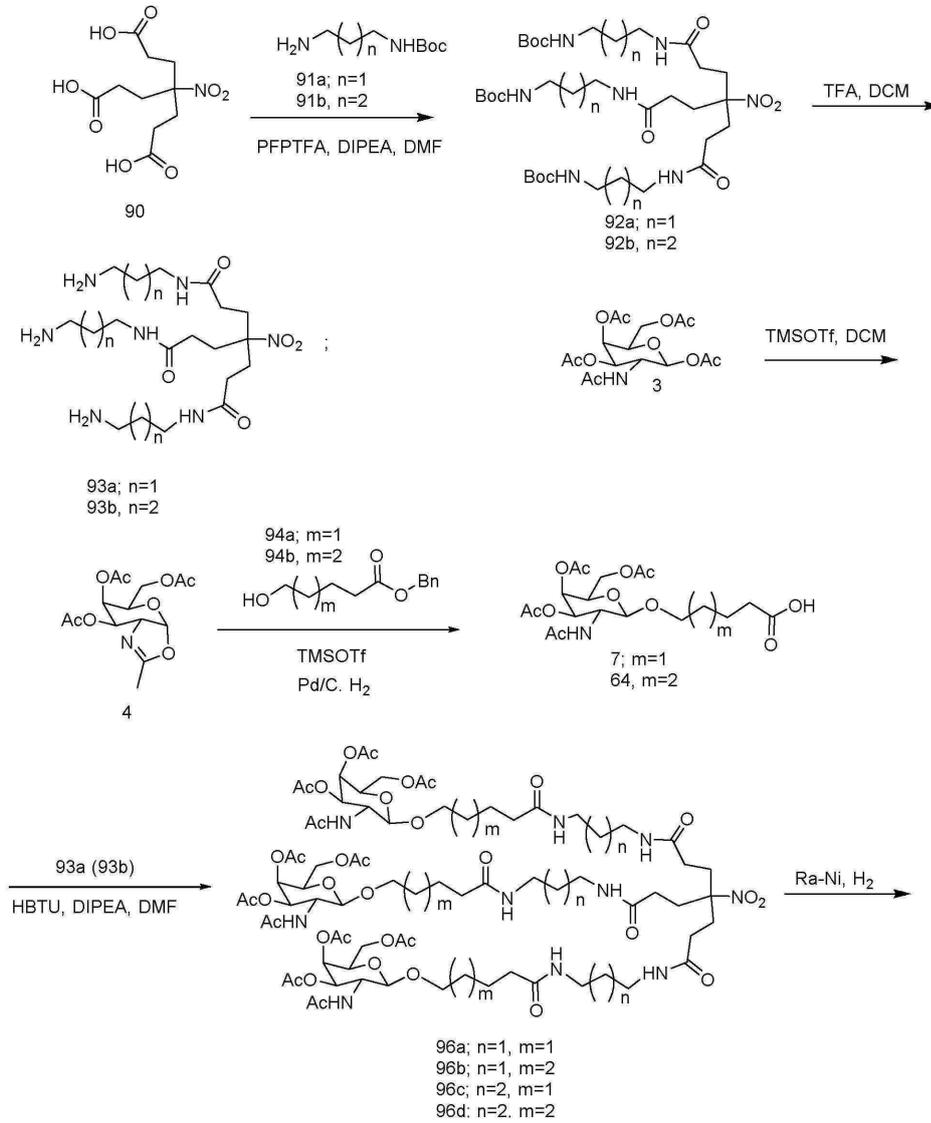
GalNAc₃-10 접합된 올리고뉴클레오타이드

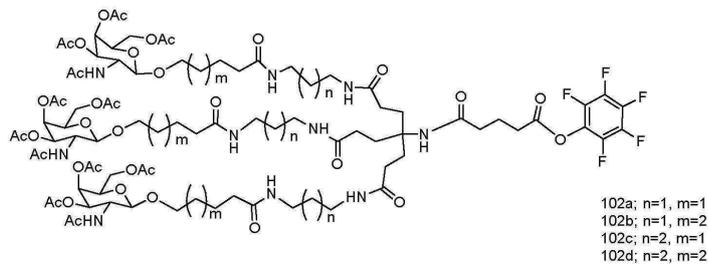
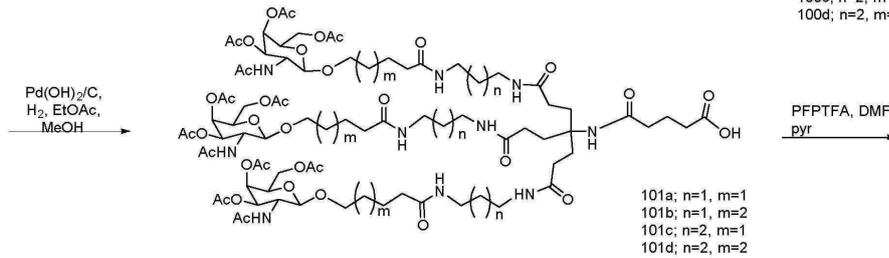
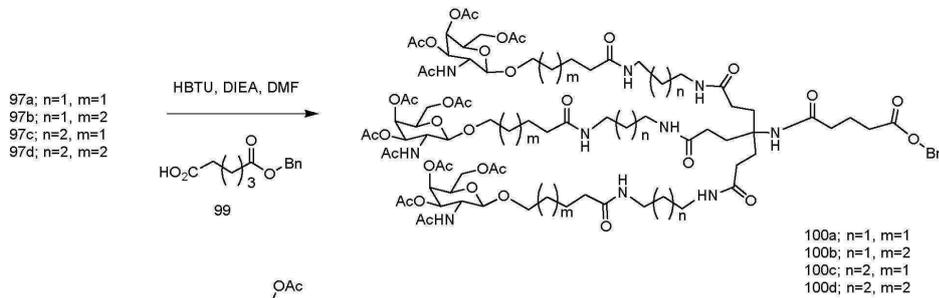
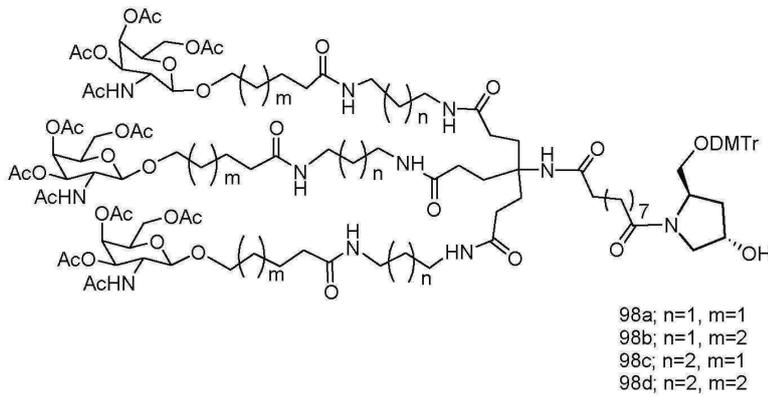
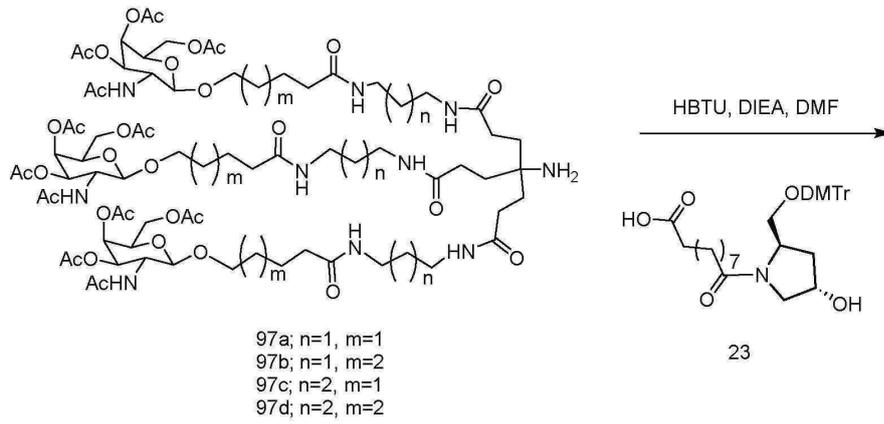
ASO	서열 (5'에서 3')	5' 그룹	서열번호
ISIS 660254	NH ₂ (CH ₂) ₆ -A _{dc} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	핵실아민	254
ISIS 666881	GalNAc ₃ -10 _a - o'-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -10	254

대문자는 각 뉴클레오사이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포리티오

에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)를 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

실시예 47: GaINAc₃-8을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 102의 제조





3가산 90 (4 g, 14.43 mmol)을 DMF (120 mL) 및 N, N-디이소프로필에틸아민 (12.35 mL, 72 mmol)에 용해시켰다. 헥사플루오로페닐 트리플루오로아세테이트 (8.9 mL, 52 mmol)를 아르곤 하에 적가하고, 반응을 실온에서 30분 동안 교반하였다. Boc-디아민 91a 또는 91b (68.87 mmol)를 N, N-디이소프로필에틸아민 (12.35 mL, 72 mmol)과 함께 부가하고, 반응을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 이때, DMF를 >75% 감압 하에서 환원

시킨 다음 상기 혼합물을 디클로로메탄에 용해시켰다. 유기층을 중탄산나트륨, 물 및 염수로 세정하였다. 그 다음 유기층을 분리하고 황산나트륨 상에서 건조하고, 여과하고 오일 감압 하에서 환원시켰다. 얻어진 오일을 실리카겔 크로마토그래피 (2%-->10% 메탄올/디클로로메탄)로 정제하여 화합물 92a 및 92b를 대략적인 80% 수율로 생성하였다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

화합물 92a 또는 92b (6.7 mmol)를 20 mL의 디클로로메탄 및 20 mL의 트리플루오로아세트산으로 실온에서 16시간 동안 처리하였다. 얻어진 용액을 증발시킨 다음 메탄올에 용해시키고 DOWEX-OH 수지로 30분 동안 처리하였다. 얻어진 용액을 여과하고 오일 감압 하에서 환원하여 화합물 93a 및 93b를 85-90% 수율로 얻었다.

화합물 7 또는 64 (9.6 mmol)를 DMF (20 mL) 중의 HBTU (3.7g, 9.6 mmol) 및 N, N-디이소프로필에틸아민 (5 mL)로 15분 동안 처리하였다. 여기에 화합물 93a 또는 93b (3 mmol) 중 하나를 첨가하고, 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 이때, DMF를 >75% 감압 하에서 환원시킨 다음 상기 혼합물을 디클로로메탄에 용해시켰다. 유기층을 중탄산나트륨, 물 및 염수로 세정하였다. 그 다음 유기층을 분리하고 황산나트륨 상에서 건조하고, 여과하고 오일 감압 하에서 환원시켰다. 얻어진 오일을 실리카겔 크로마토그래피 (5%-->20% 메탄올/디클로로메탄)에 의해 정제하여 화합물 96a-d를 20-40% 수율로 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

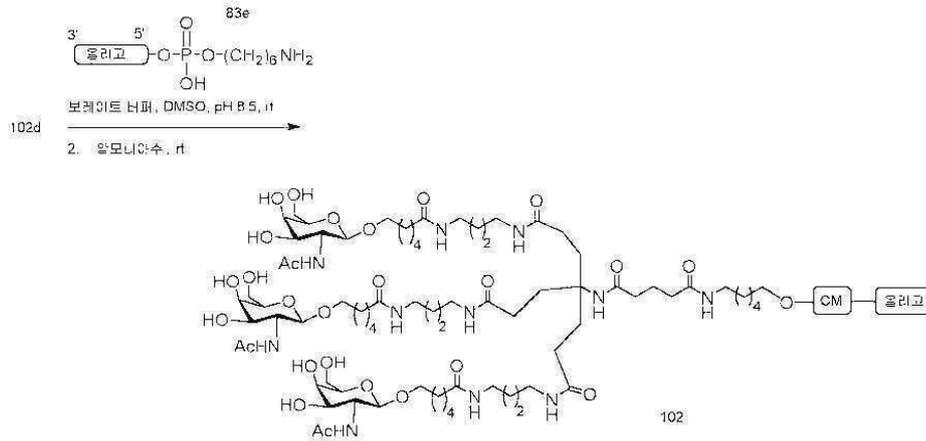
화합물 96a-d (0.75 mmol)를 개별적으로, 에탄올 (75 mL)에서 3시간 동안 라니 니켈에 대해 수소첨가하였다. 이때, 촉매를 셀라이트를 통해 여과에 의해 제거하고, 에탄올을 감압 하에서 제거하여 화합물 97a-d를 80-90% 수율로 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

화합물 23 (0.32g, 0.53 mmol)을 DMF (30mL) 중에서 HBTU (0.2g, 0.53 mmol) 및 N, N-디이소프로필에틸아민 (0.19 mL, 1.14 mmol)으로 15분 동안 처리하였다. 여기에 화합물 97a-d (0.38 mmol)를 개별적으로 첨가하고, 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 이때, DMF를 >75% 감압 하에서 환원시킨 다음 상기 혼합물을 디클로로메탄에 용해시켰다. 유기층을 중탄산나트륨, 물 및 염수로 세정하였다. 그 다음 유기층을 분리하고 황산나트륨 상에서 건조하고, 여과하고 오일 감압 하에서 환원시켰다. 얻어진 오일을 실리카겔 크로마토그래피 (2%-->20% 메탄올/디클로로메탄)에 의해 정제하여 화합물 98a-d를 30-40% 수율로 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

화합물 99 (0.17g, 0.76 mmol)를 DMF (50mL) 중의 HBTU (0.29 g, 0.76 mmol) 및 N, N-디이소프로필에틸아민 (0.35 mL, 2.0 mmol)으로 15분 동안 처리하였다. 여기에 화합물 97a-d (0.51 mmol)를 개별적으로 첨가하고, 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 이때, DMF를 >75% 감압 하에서 환원시킨 다음 상기 혼합물을 디클로로메탄에 용해시켰다. 유기층을 중탄산나트륨, 물 및 염수로 세정하였다. 그 다음 유기층을 분리하고 황산나트륨 상에서 건조하고, 여과하고 오일 감압 하에서 환원시켰다. 얻어진 오일을 실리카겔 크로마토그래피 (5%-->20% 메탄올/디클로로메탄)에 의해 정제하여 화합물 100a-d를 40-60% 수율로 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

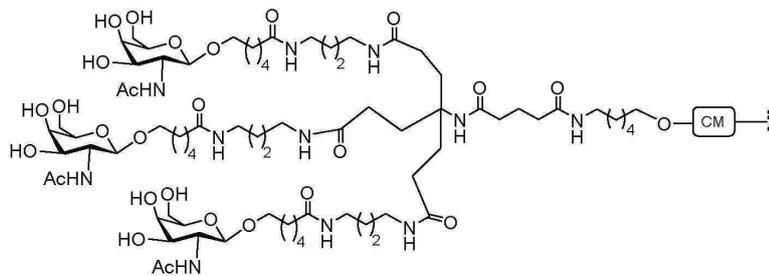
화합물 100a-d (0.16 mmol)를 개별적으로, 메탄올/에틸 아세테이트 (1:1, 50 mL) 중에서 3시간 동안 10% Pd(OH)₂/C에 대해 수소첨가하였다. 이때, 촉매를 셀라이트를 통한 여과에 의해 제거하고, 유기물을 감압 하에서 제거하여 화합물 101a-d를 80-90% 수율로 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

화합물 101a-d (0.15 mmol)를 개별적으로 DMF (15 mL) 및 피리딘 (0.016 mL, 0.2 mmol)에 용해시켰다. 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트 (0.034 mL, 0.2 mmol)를 아르곤 하에서 적가하고, 반응을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 이때, DMF를 >75% 감압 하에서 환원시킨 다음 상기 혼합물을 디클로로메탄에 용해시켰다. 유기층을 중탄산나트륨, 물 및 염수로 세정하였다. 그 다음 유기층을 분리하고 황산나트륨 상에서 건조하고, 여과하고 오일 감압 하에서 환원시켰다. 얻어진 오일을 실리카겔 크로마토그래피 (2%-->5% 메탄올/디클로로메탄)에 의해 정제하여 화합물 102a-d를 약 80% 수율로 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

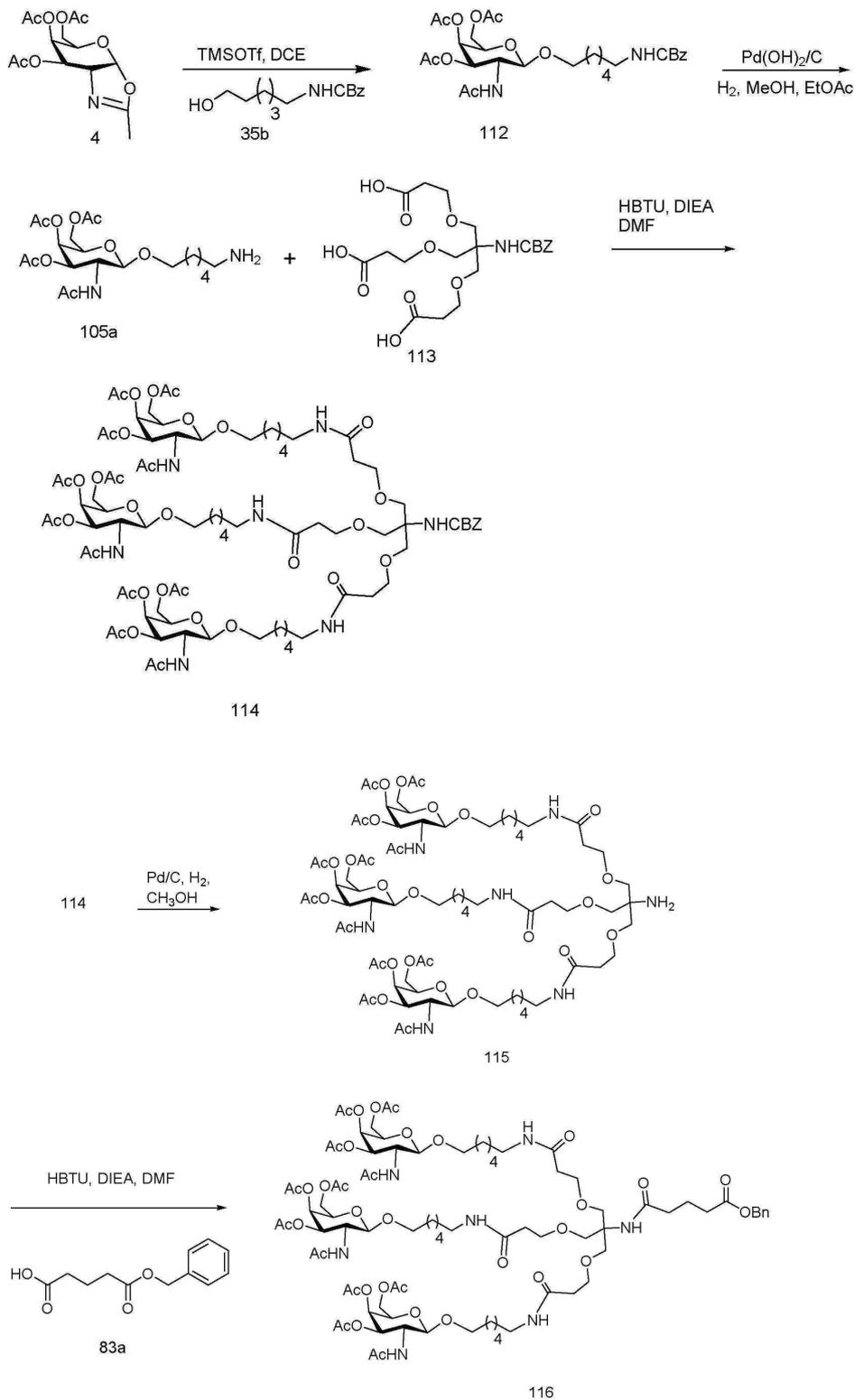


GalNAc₃-8 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 102를 실시예 46에 예시된 일반적인 과정을 이용하여 제조하였다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-8의 클러스트 부분 (GalNAc₃-8a)의 GalNAc₃은 임의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A₄-P(=O)(OH)-이다.

GalNAc₃-8 (GalNAc₃-8_a-CM-)의 구조가 하기에 나타나 있다:



실시예 48: Ga1NAc₃-7을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 119의 제조



화합물 112를 문헌에 기재된 과정에 따라 합성하였다: (*J. Med. Chem.* 2004, 47, 5798-5808).

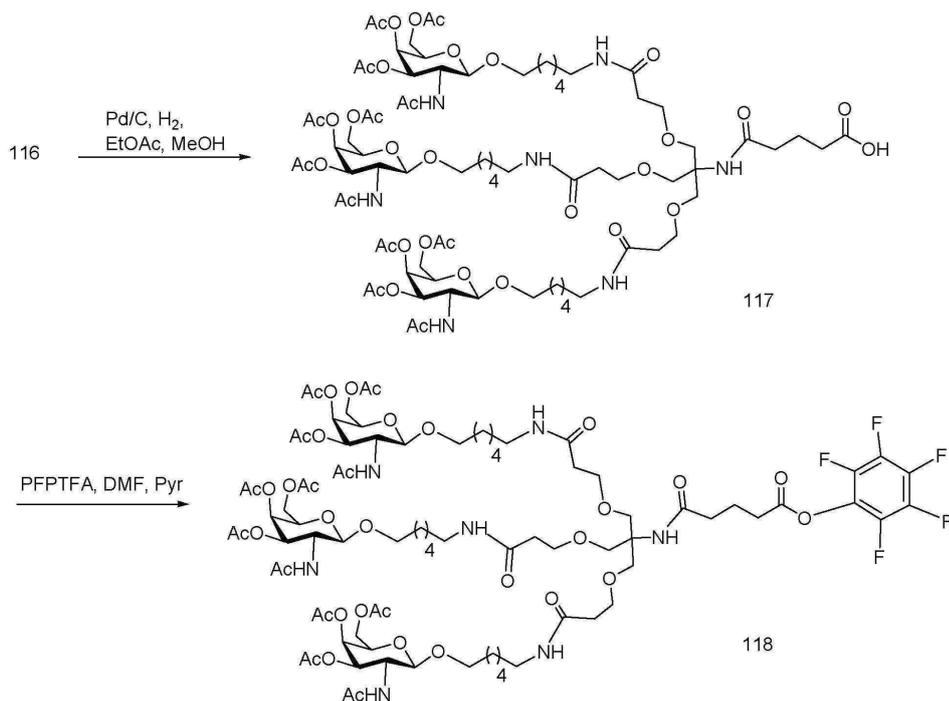
화합물 112 (5 g, 8.6 mmol)를 1:1 메탄올/에틸 아세테이트 (22 mL/22 mL)에 용해시켰다. 탄소상 수산화팔라듐 (0.5 g)을 추가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 수소 하에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트의 패드를 통해 여과하고 1:1 메탄올/에틸 아세테이트로 패드로 세정하였다. 여과물과 세정물을 조합하고 농축 건조하여 화합물 105a (정량적)를 얻었다. 상기 구조를 LCMS에 의해 확인하였다.

화합물 113 (1.25 g, 2.7 mmol), HBTU (3.2 g, 8.4 mmol) 및 DIEA (2.8 mL, 16.2 mmol)를 무수 DMF (17 mL)에

용해시키고상기 반응 혼합물을 실온에서 5분 동안 교반하였다. 여기에 무수 DMF (20 mL) 중의 화합물 105a (3.77 g, 8.4 mmol)의 용액을 추가하였다. 상기 반응을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하여 오일을 얻었다. 잔류물을 CH_2Cl_2 (100 mL)에 용해시키고 수성 포화된 NaHCO_3 용액 (100 mL) 및 염수 (100 mL)로 세정하였다. 유기상을 분리하고, 건조시키고 (Na_2SO_4), 여과하고 증발시켰다. 잔류물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 디클로로메탄 중의 10 내지 20 % MeOH로 용출시켜 화합물 114 (1.45 g, 30%)를 얻었다. 구조를 LCMS 및 ^1H NMR 분석에 의해 확인하였다.

화합물 114 (1.43 g, 0.8 mmol)를 1:1 메탄올/에틸 아세테이트 (4 mL/4 mL)에 용해시켰다. 탄소상 팔라듐 (습성, 0.14 g)을 추가하였다. 반응 혼합물을 수소로 씻어내고 실온에서 수소 하에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트의 패드를 통해 여과하였다. 셀라이트 패드를 메탄올/에틸 아세테이트 (1:1)로 세정하였다. 여과물과 세정물을 함께 조합하고 감압 하에서 증발시켜 화합물 115 (정량적)를 얻었다. 구조를 LCMS 및 ^1H NMR 분석에 의해 확인하였다.

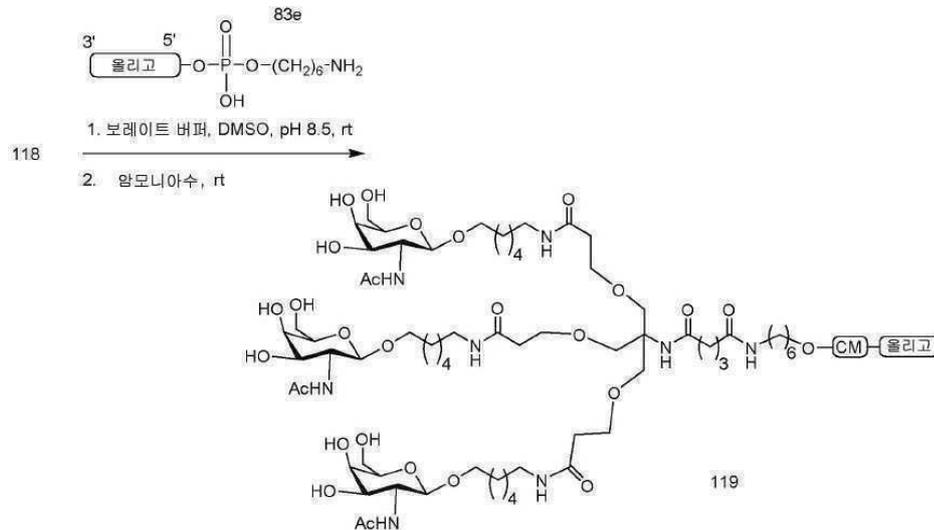
화합물 83a (0.17 g, 0.75 mmol), HBTU (0.31 g, 0.83 mmol) 및 DIEA (0.26 mL, 1.5 mmol)를 무수 DMF (5 mL)에 용해시키고 상기 반응 혼합물을 실온에서 5분 동안 교반하였다. 여기에 무수 DMF 중의 화합물 115 (1.22 g, 0.75 mmol)의 용액을 추가하고 반응을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하고 잔류물을 CH_2Cl_2 에 용해시켰다. 유기층을 수성 포화된 NaHCO_3 용액 및 염수로 세정하고 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고 여과하였다. 유기층을 농축 건조하고 수득된 잔류물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 디클로로메탄 중의 3 내지 15 % MeOH로 용출시켜 화합물 116 (0.84 g, 61%)을 얻었다. 구조를 LC MS 및 ^1H NMR 분석에 의해 확인하였다.



화합물 116 (0.74 g, 0.4 mmol)을 1:1 메탄올/에틸 아세테이트 (5 mL/5 mL)에 용해시켰다. 탄소상 팔라듐 (습성, 0.074 g)을 추가하였다. 반응 혼합물을 수소로 씻어내고 실온에서 수소 하에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트의 패드를 통해 여과하였다. 셀라이트 패드를 메탄올/에틸 아세테이트 (1:1)로 세정하였다. 여과물과 세정물을 함께 조합하고 감압 하에서 증발시켜 화합물 117 (0.73 g, 98%)을 얻었다. 구조를 LCMS 및 ^1H NMR 분석에 의해 확인하였다.

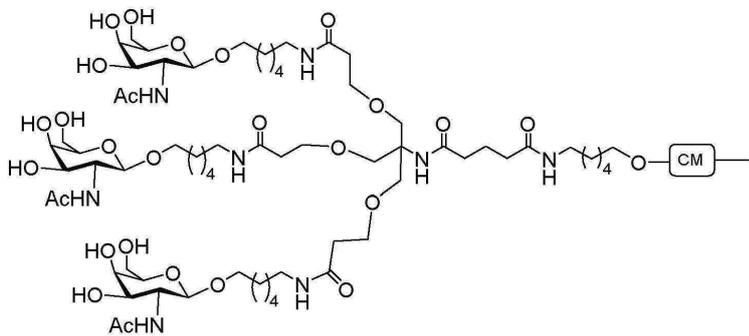
화합물 117 (0.63 g, 0.36 mmol)을 무수 DMF (3 mL)에 용해시켰다. 이 용액에 *N,N*-디이소프로필에틸아민 (70 μL , 0.4 mmol) 및 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트 (72 μL , 0.42 mmol)를 추가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하고 수성 포화된 NaHCO_3 용액에 부었다. 상기 혼합물을 디클로로메탄으로 추출하고, 염수로 세정하고 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 상기 디클로로메탄 용액을 농축 건조하고 실리카겔 칼럼

크로마토그래피로 정제하고 디클로로메탄 중 5 내지 10 % MeOH로 용출하여 화합물 118 (0.51 g, 79%)을 얻었다. 구조를 LCMS 및 ¹H 및 ¹H 및 ¹⁹F NMR에 의해 확인하였다.

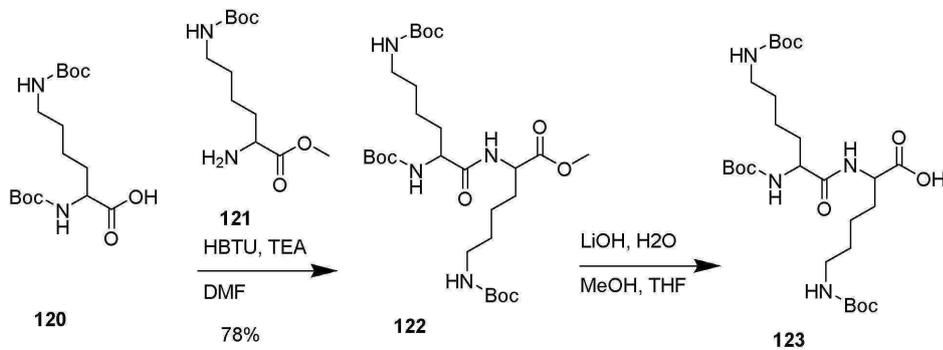


GalNAc₃-7 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 119를 실시예 46에 예시된 일반적인 과정을 이용하여 제조하였다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-7의 GalNAc₃클러스트 부분 (GalNAc₃-7_a)은 임의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다.

GalNAc₃-7 (GalNAc₃-7_a-CM-)의 구조가 하기에 나타나 있다:



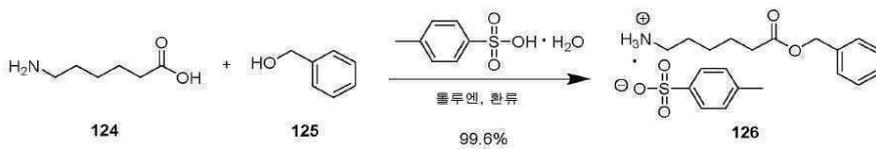
실시예 49: GalNAc₃-5를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 132의 제조



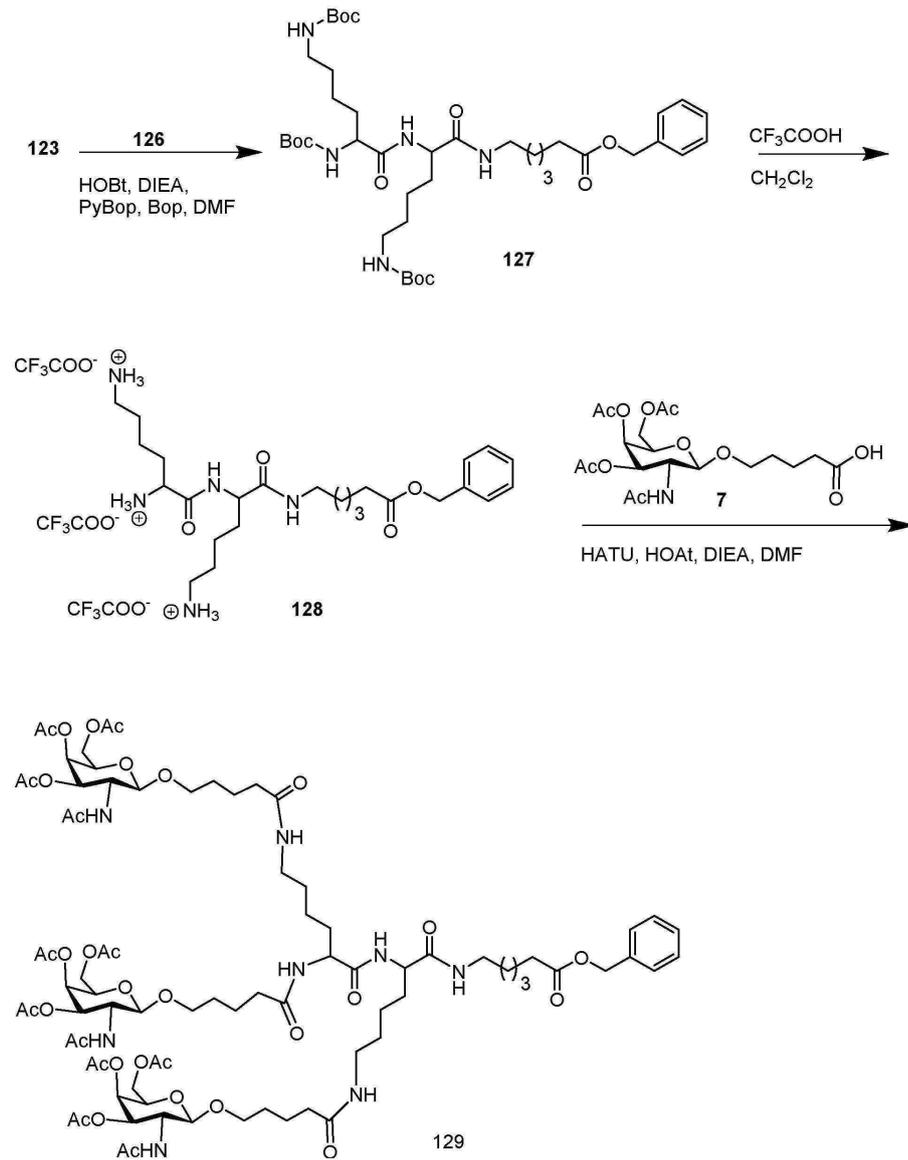
화합물 120 (14.01 g, 40 mmol) 및 HBTU (14.06 g, 37 mmol)를 무수 DMF (80 mL)에 용해시켰다. 트리에틸아민 (11.2 mL, 80.35 mmol)을 부가하고 5분 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 빙욕에서 냉각하고 무수 DMF (20 mL) 중의 화합물 121 (10 g, mmol)의 용액을 부가하였다. 추가의 트리에틸아민 (4.5 mL, 32.28 mmol)을 부가하고 반응 혼합물을 18시간 동안 아르곤 분위기 하에서 교반하였다. 반응을 TLC (에틸 아세테이트:헥산; 1:1; Rf

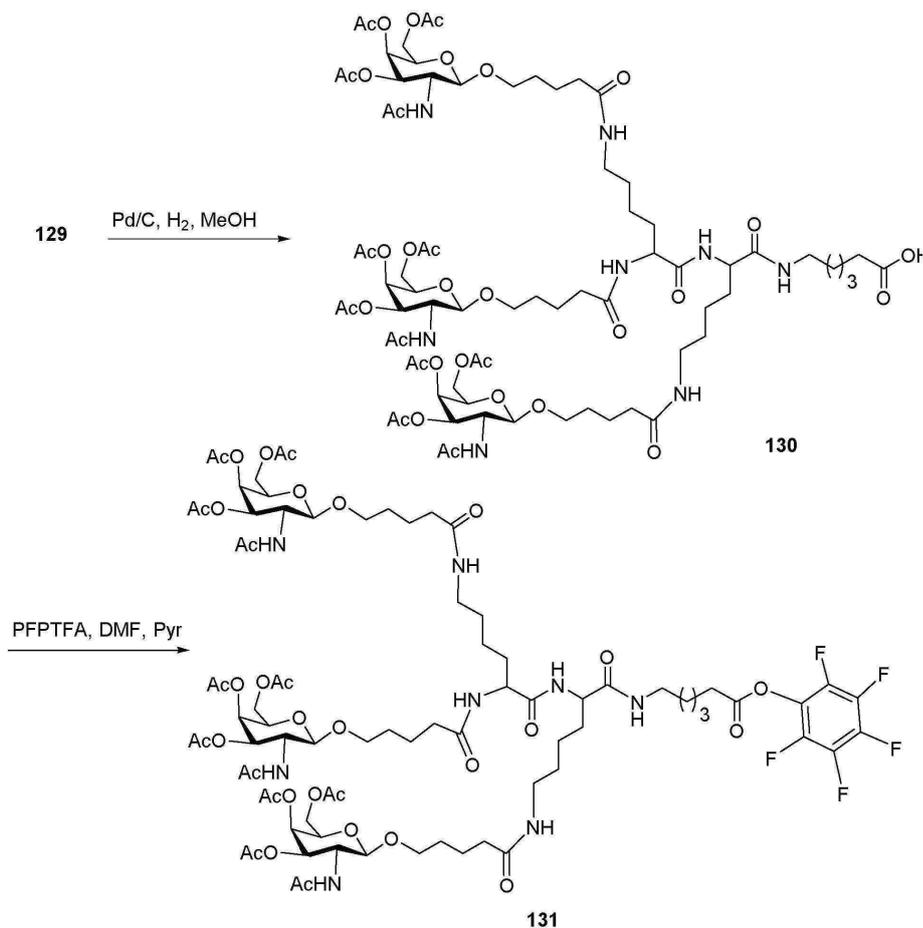
= 0.47)에 의해 관찰하였다. 용매를 감압 하에서 제거하였다. 잔류물을 EtOAc (300 mL)에서 취하고 1M NaHSO₄ (3 x 150 mL), 수성 포화된 NaHCO₃ 용액 (3 x 150 mL) 및 염수 (2 x 100 mL)로 세정하였다. 유기층을 Na₂SO₄로 건조시켰다. 건조제를 여과로 제거하고 유기층을 회전식 증발로 농축하였다. 조 혼합물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 헥산 중 35 ©50% EtOAc를 사용하여 용출하여 화합물 122 (15.50 g, 78.13%)를 얻었다. 구조를 LCMS 및 ¹H NMR 분석에 의해 확인하였다. 질량 *m/z* 589.3 [M + H]⁺.

물 (20 mL) 및 THF (10 mL) 중의 LiOH (92.15 mmol)의 용액을 메탄올 (15 mL)에 용해된 화합물 122 (7.75 g, 13.16 mmol)의 냉각된 용액에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 45분 동안 교반하고 TLC (EtOAc:헥산; 1:1)로 관찰하였다. 상기 반응 혼합물을 감압 하에서 절반 용적으로 농축하였다. 남아있는 용액을 빙욕에서 냉각하고 농축된 HCl를 부가하여 중화하였다. 상기 반응 혼합물을 희석하고, EtOAc (120 mL)로 추출하고 염수 (100 mL)로 세정하였다. 에멀전 형성하고 밤새 정치하여 제거하였다. 유기층을 분리하고, (Na₂SO₄)로 건조시키고, 여과하고 증발시켜 화합물 123 (8.42 g)을 얻었다. 잔류 염은 과다 질량의 원인인 것 같다. LCMS는 구조와 일치한다. 생성물을 임의 추가 정제없이 사용하였다. M.W.cal:574.36; M.W.fd:575.3 [M + H]⁺.



화합물 126을 문헌에 기재된 과정에 따라 합성하였다: (*J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 958-963).





화합물 123(7.419 g, 12.91 mmol), HOBt (3.49 g, 25.82 mmol) 및 화합물 126 (6.33 g, 16.14 mmol)을 DMF (40 mL)에 용해시키고 수득한 반응 혼합물을 빙욕에서 냉각하였다. 여기에 *N, N*-디이소프로필에틸아민 (4.42 mL, 25.82 mmol), PyBop (8.7 g, 16.7 mmol) 그 다음 Bop 커플링 시약 (1.17 g, 2.66 mmol)을 아르곤 분위기 하에서 추가하였다. 얼음 수조를 제거하고 용액을 실온으로 가온하였다. 반응을 TLC (DCM:MeOH:AA; 89:10:1)에 의해 결정된 바와 같이 1시간 후에 완료시켰다. 상기 반응 혼합물을 감압 하에서 농축하였다. 잔류물을 EtOAc (200 mL)에 용해시키고 1 M NaHSO₄ (3x100 mL), 수성 포화된 NaHCO₃ (3x100 mL) 및 염수 (2x100 mL)로 세정하였다. 분리된 유기상을 건조시키고 (Na₂SO₄), 여과하고 농축하였다. 잔류물을 50% 헥산/EtOAc 내지 100% EtOAc의 구배로 실리카겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 백색 포말로서 화합물 127 (9.4 g)을 얻었다. LCMS 및 ¹H NMR은 구조와 일치하였다. 질량 *m/z* 778.4 [M + H]⁺.

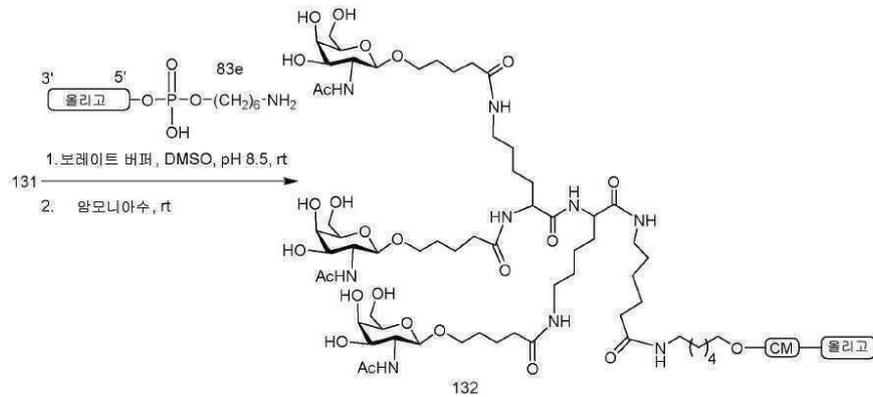
트리플루오로아세트산 (12 mL)을 디클로로메탄 (12 mL) 중의 화합물 127 (1.57 g, 2.02 mmol)의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 감압 하에서 톨루엔 (30 mL)으로 공-증발시켜 건조하였다. 수득된 잔류물을 아세토니트릴 (30 mL) 및 톨루엔 (40 mL)으로 2회 공-증발시켜 화합물 128 (1.67 g)을 트리플루오로아세트산 염으로서 얻었고 다음 단계 동안에 추가 정제없이 사용하였다. LCMS 및 ¹H NMR은 구조와 일치하였다. 질량 *m/z* 478.2 [M + H]⁺.

화합물 7 (0.43 g, 0.963 mmol), HATU (0.35 g, 0.91 mmol), 및 HOAt (0.035 g, 0.26 mmol)을 함께 조합하고 둥근바닥 플라스크에서 감압 하에서 P₂O₅로 4시간 동안 건조시킨 다음 무수 DMF (1 mL)에 용해시키고 5분 동안 교반하였다. 여기에 무수 DMF (0.2 mL) 및 *N, N*-디이소프로필에틸아민 (0.2 mL) 중의 화합물 128 (0.20 g, 0.26 mmol)의 용액을 추가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 아르곤 분위기 하에서 교반하였다. 반응을 LCMS 및 TLC (7% MeOH/DCM)에 의해 결정된 바와 같이 30분 후에 완료시켰다. 상기 반응 혼합물을 감압 하에서 농축하였다. 잔류물을 DCM (30 mL)에 용해시키고 1 M NaHSO₄ (3x20 mL), 수성 포화된 NaHCO₃ (3 x 20 mL) 및 염수 (3x20 mL)로 세정하였다. 유기상을 분리하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고 농축하였다. 잔류물을 디클로

로메탄 중의 5-15% MeOH를 이용한 실리카겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 129 (96.6 mg)를 얻었다. LC MS 및 ¹H NMR은 구조와 일치한다. 질량 *m/z* 883.4 [M + 2H]⁺.

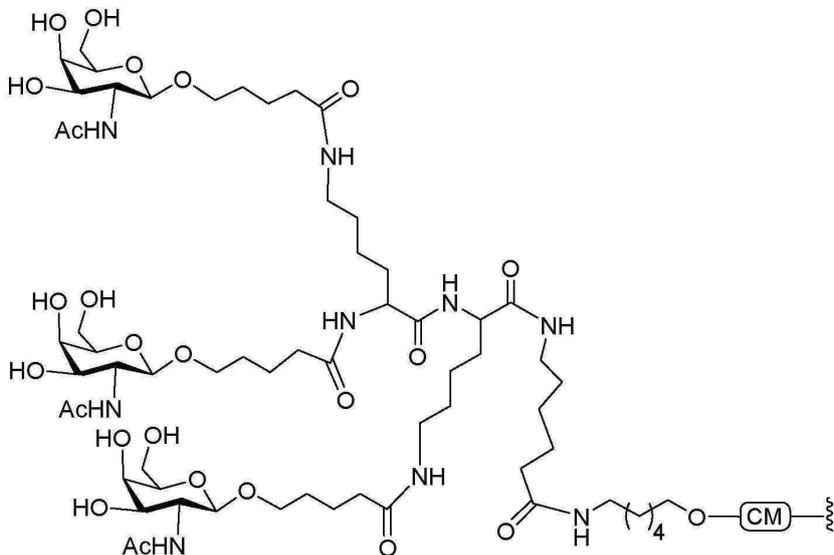
화합물 129 (0.09 g, 0.051 mmol)를 20 mL 섭광 바이알 내에서 메탄올 (5 mL)에 용해시켰다. 여기에 소량의 10% Pd/C (0.015 mg)를 부가하고 반응 용기를 H₂ 가스로 씻어 내었다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 H₂ 분위기 하에서 18시간 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 셀라이트의 패드를 통해 여과하고 셀라이트 패드를 메탄올로 세정하였다. 여과물 및 세정물을 모으고 감압 하에서 농축하여 화합물 130 (0.08 g)을 얻었다. LCMS 및 ¹H NMR은 구조와 일치하였다. 생성물을 추가 정제없이 사용하였다. 질량 *m/z* 838.3 [M + 2H]⁺.

10 mL 표시된 둥근바닥 플라스크에 화합물 130 (75.8 mg, 0.046 mmol), 0.37 M 피리딘/DMF (200 μL) 및 교반바를 부가하였다. 이 용액에 0.7 M 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트/DMF (100 μL)를 교반하면서 적가하였다. 반응을 LC MS에 의해 결정된 바와 같이 1시간 후에 완료하였다. 용매를 감압 하에서 제거하고 잔류물을 CHCl₃ (~ 10 mL)에 용해시켰다. 유기층을 NaHSO₄ (1 M, 10 mL), 수성 포화된 NaHCO₃ (10 mL) 및 염수 (10 mL)에 대해 각각 3회 분할하였다. 유기상을 분리하고 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고 농축하여 화합물 131 (77.7 mg)을 얻었다. LCMS는 구조와 일치한다. 추가 정제없이 사용하였다. 질량 *m/z* 921.3 [M + 2H]⁺.

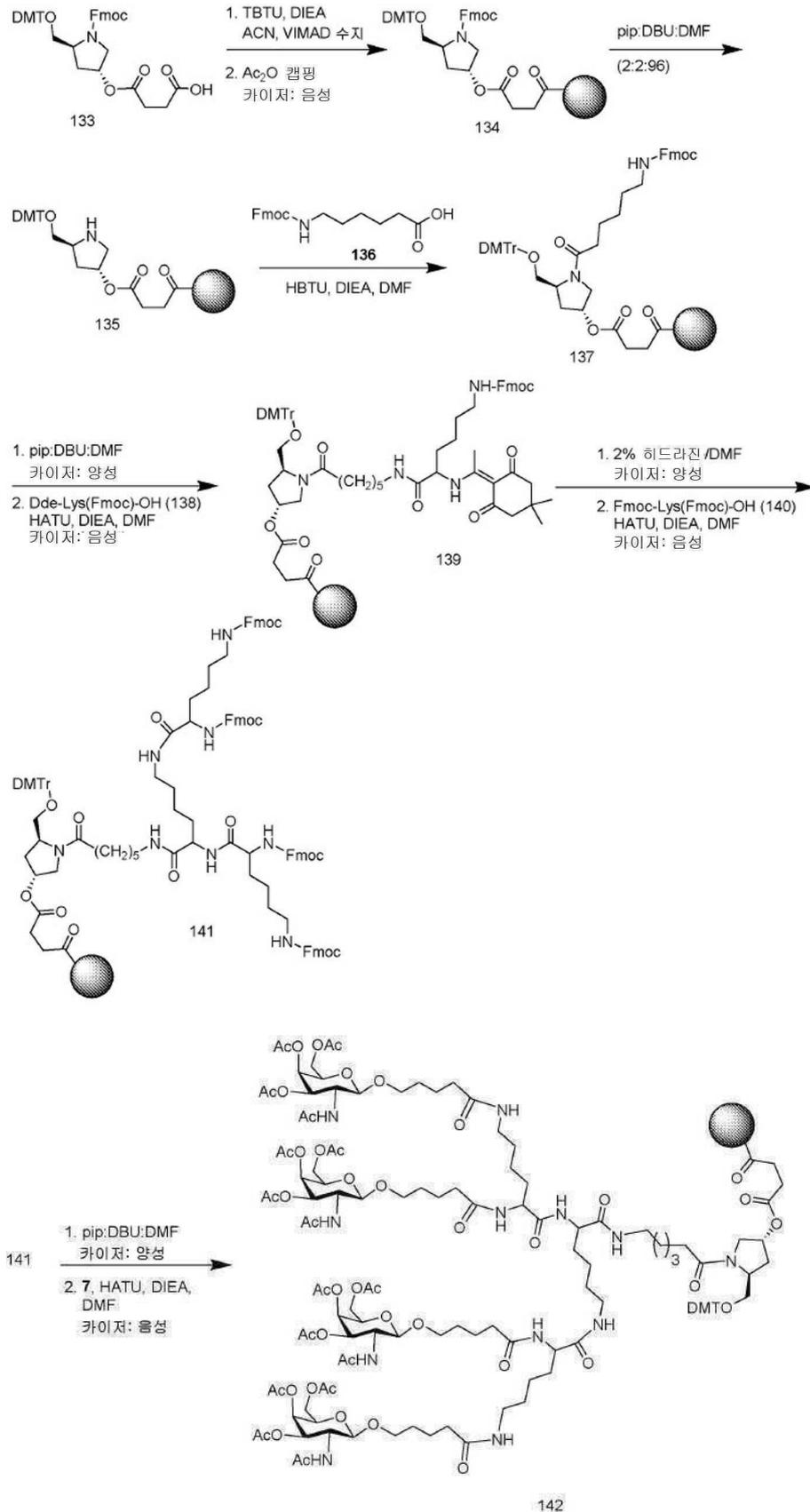


GalNAc₃-5 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 132를 실시예 46에 예시된 일반적인 과정을 이용하여 제조하였다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-5의 GalNAc₃ 클러스터 부분 (GalNAc₃-5_a)은 임의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다.

GalNAc₃-5 (GalNAc₃-5_a-CM-)의 구조가 하기에 나타나 있다:



실시예 50: GaINAc₄-11을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 144의 제조

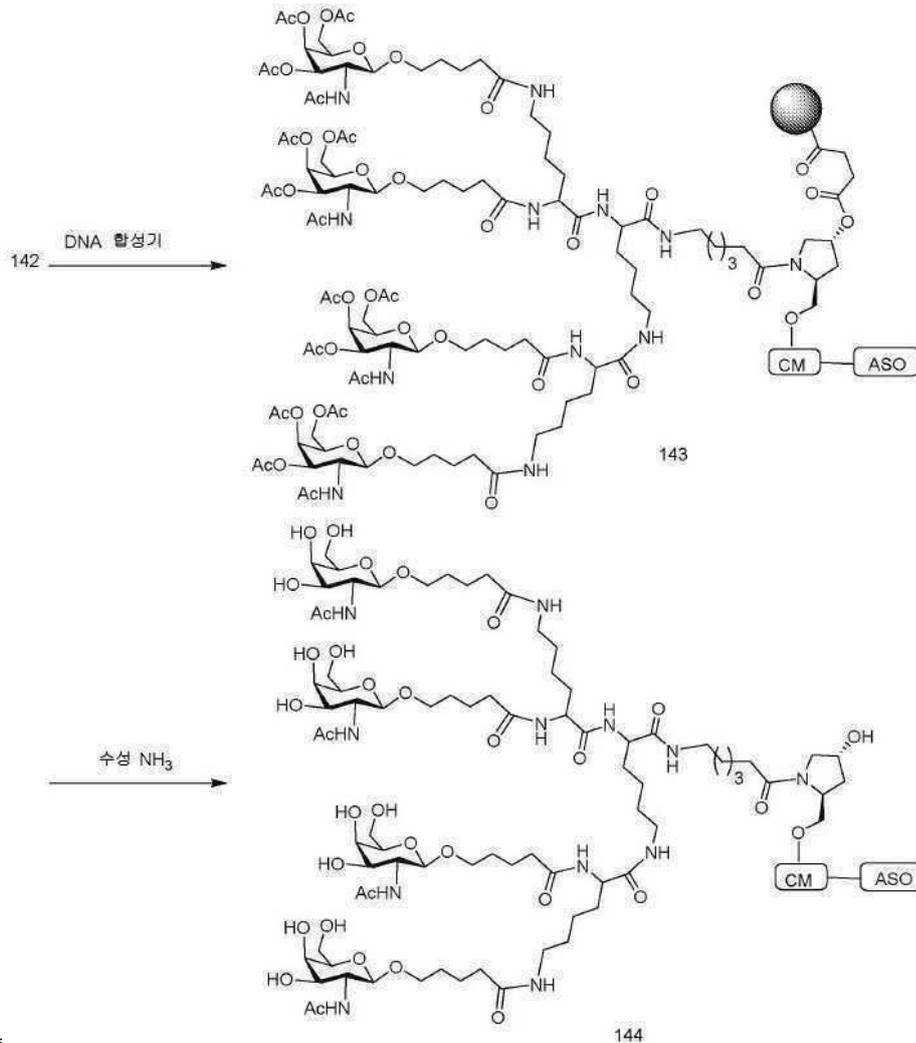


화합물 134의 합성. 메리필드 플라스크에 아세토니트릴, 디메틸포름아미드, 디클로로메탄 및 아세토니트릴로 세정된 아미노메틸 VIMAD 수지 (2.5 g, 450 μmol/g)를 부가하였다. 상기 수지를 아세토니트릴 (4 mL)에서 팽창시켰다. 화합물 133을 20 (1.0 mmol, 0.747 g), TBTU (1.0 mmol, 0.321 g), 아세토니트릴 (5 mL) 및 DIEA (3.0

mmol, 0.5 mL)를 첨가하여 100 mL 등근바닥 플라스크에서 전-활성화시켰다. 이 용액을 5분 동안 교반한 다음, 흔들면서 메리필드 플라스크에 첨가하였다. 상기 현탁액을 3시간 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 빼내고 수지를 아세트니트릴, DMF 및 DCM으로 세정하였다. 새로운 수지 로딩을 DCM 중에서 500 nm (소멸 계수 = 7600 0)에서 DMT 양이온의 흡광도를 측정하여 정량화하였고 238 $\mu\text{mol/g}$ 인 것으로 결정되었다. 상기 수지를 아세트산 무수물 용액에서 10분간 3회 현탁시켜 캠퍼링하였다.

고체 지지체 결합된 화합물 141을 반복적인 Fmoc-기반 고체상 펩타이드 합성 방법을 사용하여 합성하였다. 소량의 고체 지지체를 빼내고, 암모니아수 (28-30 wt%)에서 6시간 동안 현탁시켰다. 절단된 화합물을 LC-MS에 의해 분석하였고 상기 관찰된 질량은 구조와 일치하였다. 질량 m/z 1063.8 $[\text{M} + 2\text{H}]^+$.

고체 지지체 결합된 화합물 142를 고체상 펩타이드 합성 방법을 사용하여 합성하였다.



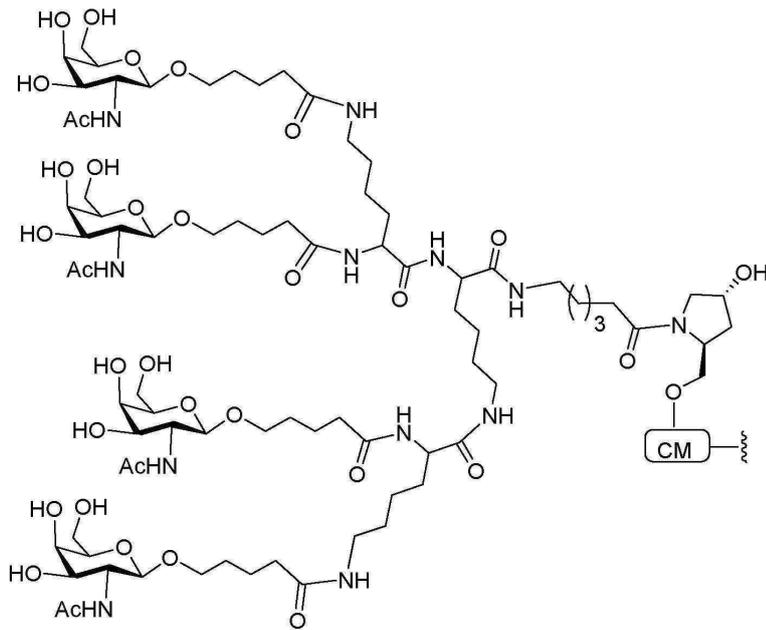
*

고체 지지체 결합된 화합물 143을 DNA 합성기 상에서 표준 고체상 합성을 사용하여 합성하였다.

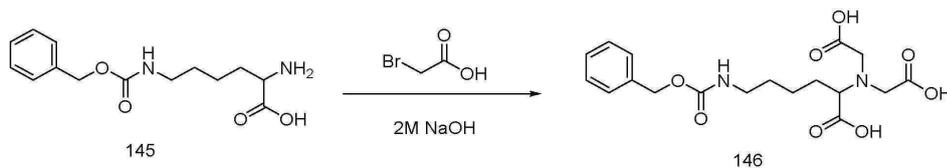
고체 지지체 결합된 화합물 143을 암모니아수 (28-30 wt%)에 현탁시키고 55 °C에서 16시간 동안 가열하였다. 상기 용액을 냉각하고 고체 지지체를 여과하였다. 상기 여과물을 농축하고 잔류물을 물에서 용해시키고 강한 음이온 교환 칼럼 상에서 HPLC로 정제하였다. 전장 화합물 144를 함유하는 분획들을 모으고 탈염하였다. 수득한 GalNAc₄-11 접합된 올리고머 화합물을 LC-MS로 분석하였고, 상기 관찰된 질량은 구조와 일치하였다.

콘주게이트 그룹 GalNAc₄-11의 GalNAc₄ 클러스터 부분 (GalNAc₄-11_a)은 임의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_n-P(=O)(OH)-이다.

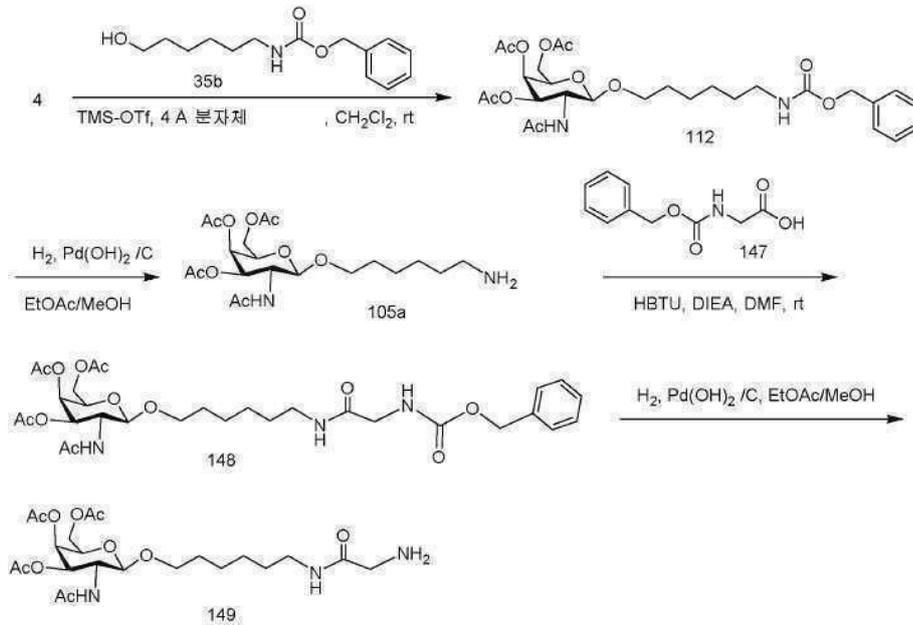
GalNAc₄-11 (GalNAc₄-11_a-CM)의 구조가 하기에 나타나 있다:



실시예 51: GalNAc₃-6을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 155의 제조



화합물 146을 문헌에 기재된 바와 같이 합성하였다: (*Analytical Biochemistry* 1995, 229, 54-60).



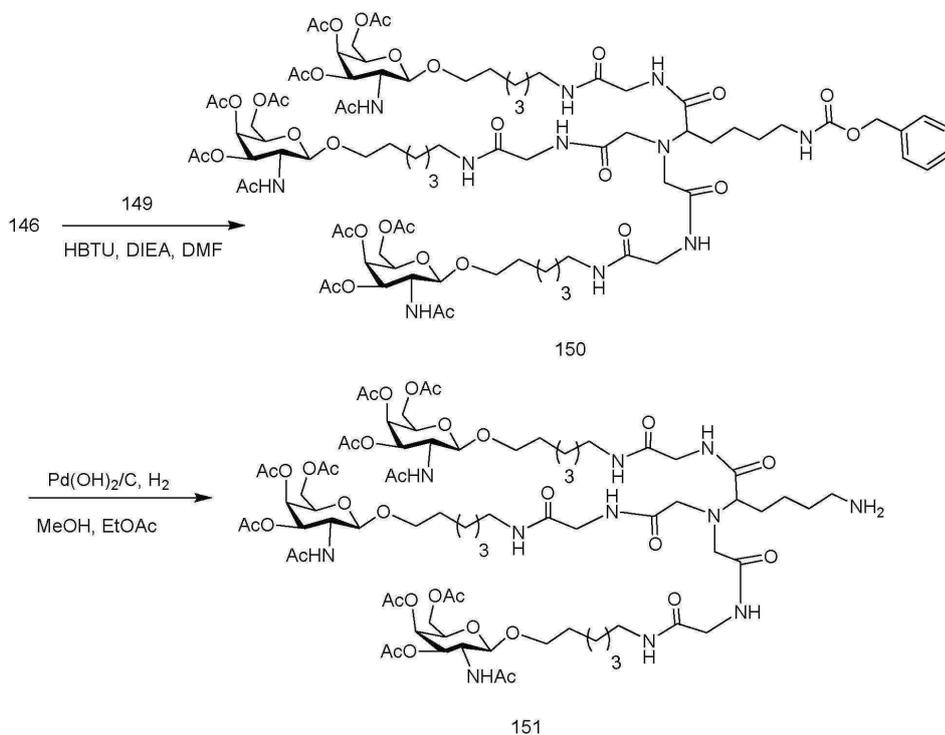
화합물 4 (15 g, 45.55 mmol) 및 화합물 35b (14.3 그램, 57 mmol)를 CH₂Cl₂ (200 ml)에 용해시켰다. 활성화된 분자체 (4 Å, 2 g, 분말화된)를 첨가하고, 반응을 30분 동안 질소 분위기 하에서 교반하였다. TMS-OTf를 첨가하고(4.1 ml, 22.77 mmol), 반응을 밤새 실온에서 교반하였다. 완료되자마자, 상기 반응을 포화된 수성 NaHCO₃의 용액 (500 ml) 및 부서진 얼음 (~ 150 g) 내로 부어 켄칭하였다. 유기층을 분리하고, 염수로 세정하고,

MgSO₄로 건조하고, 여과하고, 감압 하에서 농축하여 오렌지색 오일을 얻었다. 조 물질을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 CH₂Cl₂ 중의 2-10 % MeOH로 용출시켜 화합물 112 (16.53 g, 63 %)를 얻었다. LCMS 및 ¹H NMR은 예상된 화합물과 일치하였다.

화합물 112 (4.27 g, 7.35 mmol)를 1:1 MeOH/EtOAc (40 ml)에 용해시켰다. 상기 용액에 아르곤 스트림을 15분간 기포발생시켜 상기 반응 혼합물을 퍼징하였다. 펄만 촉매 (탄소상 수산화팔라듐, 400 mg)를 부가하고, 수소 가스로 30분 동안 용액에 거품을 일으켰다. 완료시(CH₂Cl₂ 중의 TLC 10% MeOH, 및 LCMS), 촉매를 셀라이트의 패드를 통해 여과로 제거하였다. 상기 여과물을 회전식 증발로 농축하고, 고진공 하에서 잠시 건조하여 화합물 105a (3.28 g)를 얻었다. LCMS 및 ¹H NMR은 원하는 생성물과 일치하였다.

화합물 147 (2.31 g, 11 mmol)을 무수 DMF (100 mL)에 용해시켰다. N, N-디이소프로필에틸아민 (DIEA, 3.9 mL, 22 mmol)을 부가한 다음 HBTU (4 g, 10.5 mmol)를 부가하였다. 반응 혼합물을 ~ 15 분 동안 질소 하에서 교반하였다. 여기에, 건조 DMF 중의 화합물 105a (3.3 g, 7.4 mmol)의 용액을 부가하고 질소 분위기 하에서 2시간 동안 교반하였다. 반응을 EtOAc로 희석하고 포화된 수성 NaHCO₃ 및 염수로 세정하였다. 유기상을 분리하고, 건조시키고 (MgSO₄), 여과하고, 농축하여 오렌지색 시럽을 얻었다. 조 물질을 CH₂Cl₂ 중의 칼럼 크로마토그래피 2-5 % MeOH에 의해 정제하여 화합물 148(3.44 g, 73 %)을 얻었다. LCMS 및 ¹H NMR은 예상된 생성물과 일치하였다.

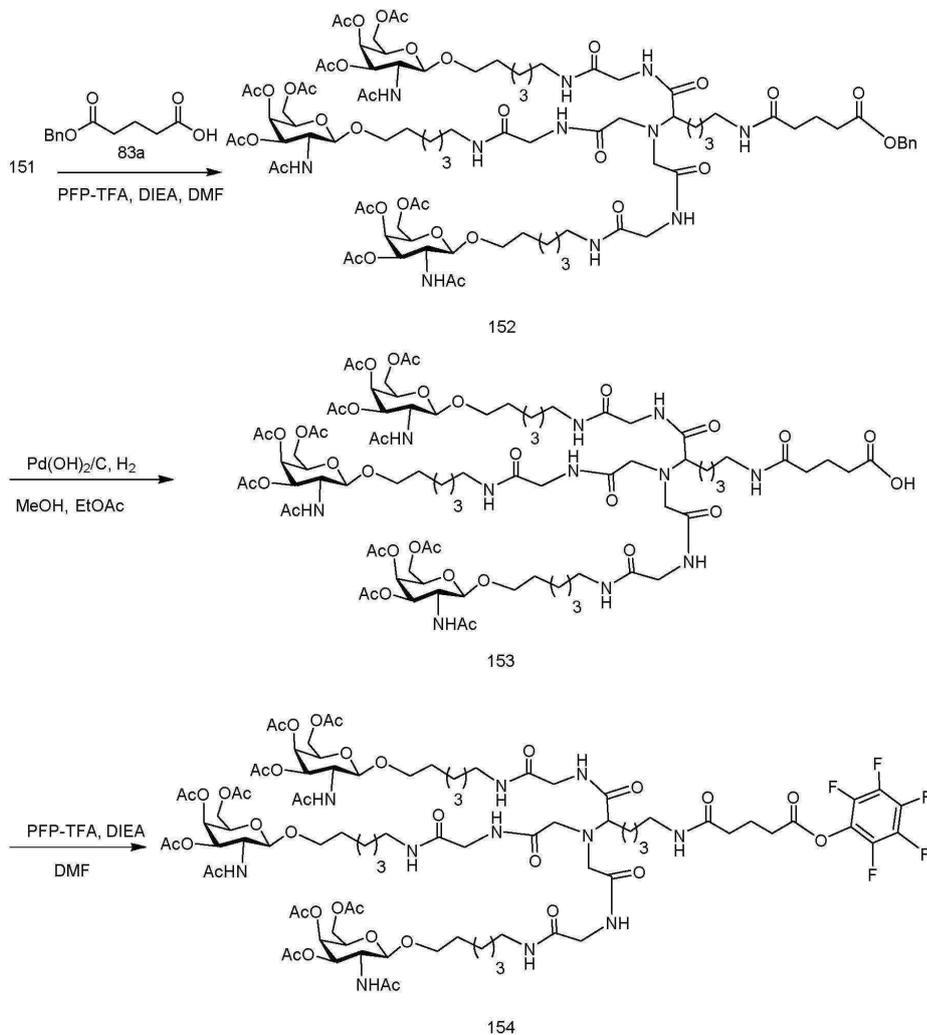
화합물 148 (3.3 g, 5.2 mmol)을 1:1 MeOH/EtOAc (75 ml) 중에 용해시켰다. 상기 용액에 아르곤 스트림을 15분간 기포발생시켜 상기 반응 혼합물을 퍼징하였다. 펄만 촉매 (탄소상 수산화팔라듐)를 부가하였다 (350 mg). 수소 가스로 30분 동안 용액에 거품을 일으켰다. 완료시 (DCM 중의 TLC 10% MeOH, 및 LCMS), 촉매를 셀라이트의 패드를 통해 여과로 제거하였다. 상기 여과물을 회전식 증발로 농축하고, 고진공 하에서 간단히 건조하여 화합물 149 (2.6 g)를 얻었다. LCMS는 원하는 생성물과 일치하였다. 잔류물을 건조 DMF (10 ml)에 용해시키고 이것을 다음 단계에서 즉시 사용하였다.



화합물 146 (0.68 g, 1.73 mmol)을 건조 DMF (20 ml)에 용해시켰다. 여기에, DIEA (450 μL, 2.6 mmol, 1.5 eq.) 및 HBTU (1.96 g, 0.5.2 mmol)를 부가하였다. 상기 반응 혼합물을 15분 동안 실온에서 질소 하에서 교반하였다. 무수 DMF (10 mL) 중의 화합물 149 (2.6 g)의 용액을 부가하였다. 반응의 pH를 DIEA (필요한 경우)를 첨가하여 pH = 9-10으로 조정하였다. 반응을 실온에서 질소 하에서 2시간 동안 교반하였다. 완료시, 반응을 EtOAc (100 mL)로 희석하고, 수성 포화된 수성 NaHCO₃ 및 염수로 세정하였다. 유기상을 분리하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축하였다. 잔류물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 CH₂Cl₂ 중의 2-10 % MeOH로 용

출시케 화합물 150 (0.62 g, 20 %)을 얻었다. LCMS 및 ¹H NMR은 원하는 생성물과 일치하였다.

화합물 150 (0.62 g)을 1:1 MeOH/ EtOAc (5 L)에 용해시켰다. 상기 용액에 아르곤 스트림을 15분간 기포발생시켜 상기 반응 혼합물을 퍼징하였다. 펄만 촉매 (탄소상 수산화팔라듐)를 추가하였다 (60 mg). 수소 가스로 30분 동안 용액에 거품을 일으켰다. 완료시 (DCM 중 TLC 10% MeOH, 및 LCMS), 촉매를 여과 (주사기-팁 테플론 필터, 0.45 μm)에 의해 제거하였다. 여과물을 회전식 증발로 농축하고, 고진공 하에서 간단히 건조하여 화합물 151 (0.57 g)을 얻었다. LCMS는 원하는 생성물과 일치하였다. 생성물을 4 mL 건조 DMF에서 용해시키고 다음 단계에서 즉시 사용하였다.

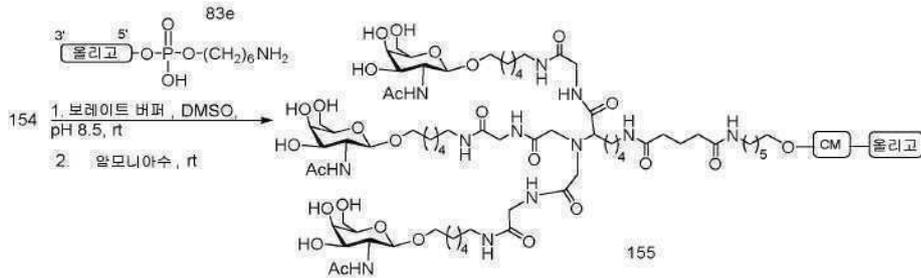


화합물 83a (0.11 g, 0.33 mmol)을 무수 DMF (5 mL)에서 용해시키고 *N,N*-디이소프로필에틸아민 (75 μL, 1 mmol) 및 PFP-TFA (90 μL, 0.76 mmol)를 추가하였다. 상기 반응 혼합물은 접촉시 자홍색으로 변하였고, 그 다음 30분 동안 점차 오렌지색으로 변하였다. 반응의 진행을 TLC 및 LCMS로 관찰하였다. 완료시 (PFP 에스테르의 형성), DMF 중의 화합물 151(0.57 g, 0.33 mmol)의 용액을 추가하였다. 반응의 pH를 *N,N*-디이소프로필에틸아민 (필요한 경우)을 첨가하여 pH = 9-10으로 조정하였다. 반응 혼합물을 질소 하에서 ~ 30분 동안 교반하였다. 완료시, 대다수의 용매를 감압 하에서 제거하였다. 잔류물을 CH₂Cl₂로 희석하고 수성 포화된 NaHCO₃ 및 염수로 세정하였다. 유기상을 분리하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축하여 오렌지색 시럽을 얻었다. 잔류물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 (CH₂Cl₂ 중 2-10 % MeOH)에 의해 정제하여 화합물 152(0.35 g, 55 %)를 얻었다. LCMS 및 ¹H NMR은 원하는 생성물과 일치하였다.

화합물 152 (0.35 g, 0.182 mmol)를 1:1 MeOH/EtOAc (10 mL)에 용해시켰다. 상기 용액에 아르곤 스트림을 15분간 기포발생시켜 상기 반응 혼합물을 퍼징하였다. 펄만 촉매 (탄소상 수산화팔라듐)를 추가하였다 (35 mg). 용액에 수소 가스를 30분간 기포발생시켰다. 완료시 (DCM 중 TLC 10% MeOH, 및 LCMS), 촉매를 여과 (주사기-팁 테플론 필터, 0.45 μm)에 의해 제거하였다. 상기 여과물을 회전식 증발로 농축하고, 고진공 하에서 잠시 건조하

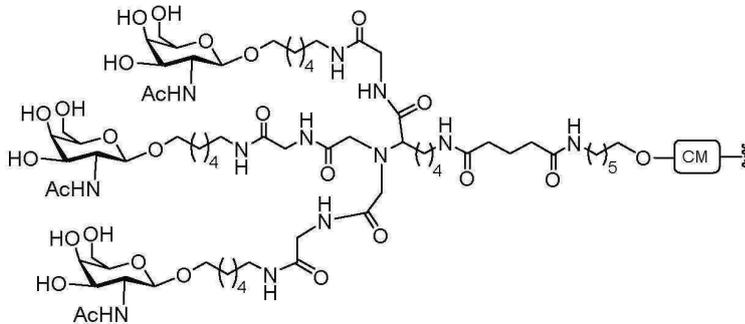
여 화합물 153 (0.33 g, 정량적)을 얻었다. LCMS는 원하는 생성물과 일치하였다.

화합물 153 (0.33 g, 0.18 mmol)을 교반하면서 질소 하에서 무수 DMF (5 mL)에 용해시켰다. 여기에 *N,N*-디이소프로필에틸아민 (65 μ L, 0.37 mmol) 및 PFP-TFA (35 μ L, 0.28 mmol)를 추가하였다. 반응 혼합물을 질소 하에서 ~ 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물은 점착시 자홍색으로 변하였고, 점차 오렌지색으로 변하였다. 더 많은 *N,N*-디이소프로필에틸아민을 첨가하여 상기 반응 혼합물의 pH를 pH = 9-10으로 유지시켰다. 반응의 진행을 TLC 및 LCMS로 관찰하였다. 완료시, 대다수의 용매를 감압 하에서 제거하였다. 잔류물을 CH_2Cl_2 (50 mL)로 희석하고, 포화된 수성 NaHCO_3 및 염수로 세정하였다. 유기층을 MgSO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축하여 오렌지색 시럽을 얻었다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 CH_2Cl_2 중의 2-10 % MeOH로 용출시켜 화합물 154 (0.29 g, 79 %)를 얻었다. LCMS 및 ^1H NMR은 원하는 생성물과 일치하였다.

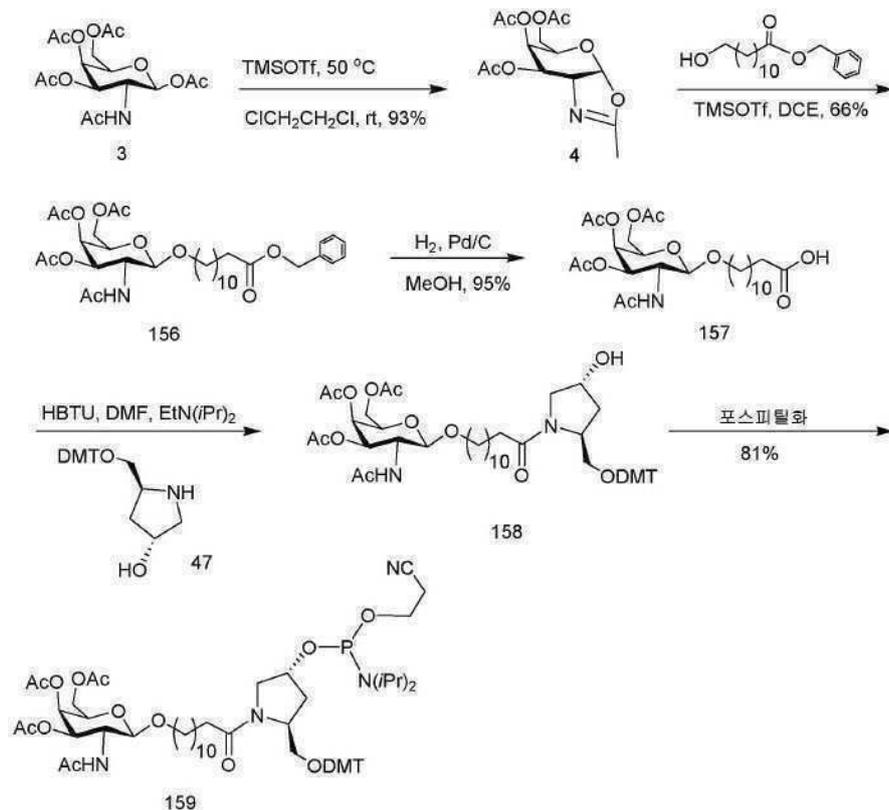


GalNAc_3 -6 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 155를 실시예 46에 예시된 일반적인 과정을 이용하여 제조하였다. 콘주게이트 그룹 GalNAc_3 -6의 GalNAc_3 클러스터 부분 (GalNAc_3 -6_a)은 임의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{A}_d-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-$ 이다.

GalNAc_3 -6 (GalNAc_3 -6_a-CM-)의 구조가 하기에 나타나 있다:



실시예 52: GaINAc₃-9를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 160의 제조

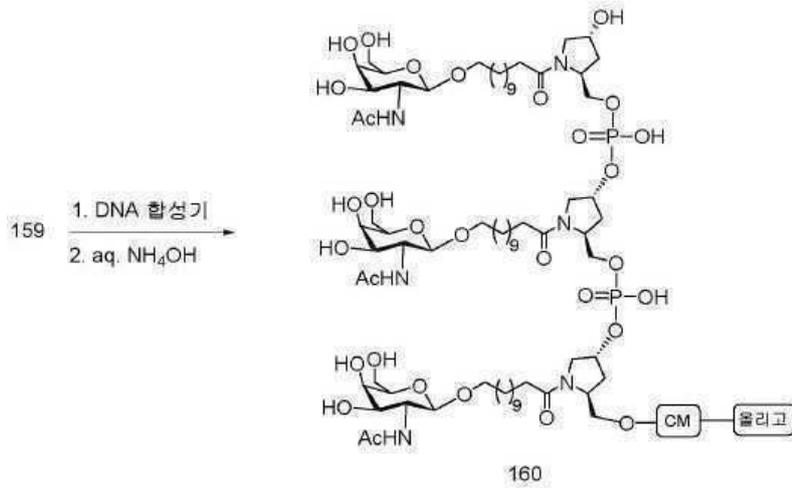


화합물 156를 문헌에 기재된 과정에 따라 합성하였다: (*J. Med. Chem.* 2004, 47, 5798-5808).

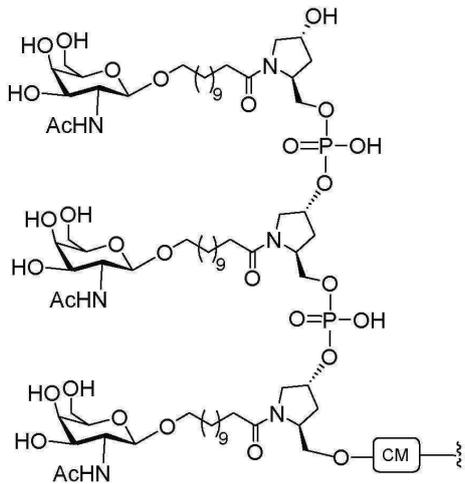
화합물 156(18.60 g, 29.28 mmol)을 메탄올 (200 mL)에 용해시켰다. 탄소상 팔라듐 (6.15 g, 10 wt%, 로딩 (건조 기준), 매트릭스 탄소 분말, 습성)을 부가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 수소 하에서 18시간 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 셀라이트의 패드를 통해 여과하고 셀라이트 패드를 메탄올로 철저히 세정하였다. 조합된 여과물을 세정하고 농축 건조하였다. 잔류물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 디클로로메탄 중의 5-10 % 메탄올로 용출시켜 화합물 157 (14.26 g, 89%)을 얻었다. 질량 m/z 544.1 [M-H]⁻.

화합물 157 (5 g, 9.17 mmol)을 무수 DMF (30 mL)에 용해시켰다. HBTU (3.65 g, 9.61 mmol) 및 *N,N*-디이소프로필에틸아민 (13.73 mL, 78.81 mmol)을 부가하고 상기 반응 혼합물을 실온에서 5분 동안 교반하였다. 여기에, 화합물 47 (2.96 g, 7.04 mmol)의 용액을 부가하였다. 반응을 실온에서 8시간 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 포화된 NaHCO₃ 수용액에 부었다. 상기 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하고 유기층을 염수로 세정하고 건조시키고 (Na₂SO₄), 여과하고 증발시켰다. 수득된 잔류물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 헥산 중의 50% 에틸 아세테이트로 용출시켜 화합물 158 (8.25g, 73.3%)을 얻었다. 구조를 MS 및 ¹H NMR 분석에 의해 확인하였다.

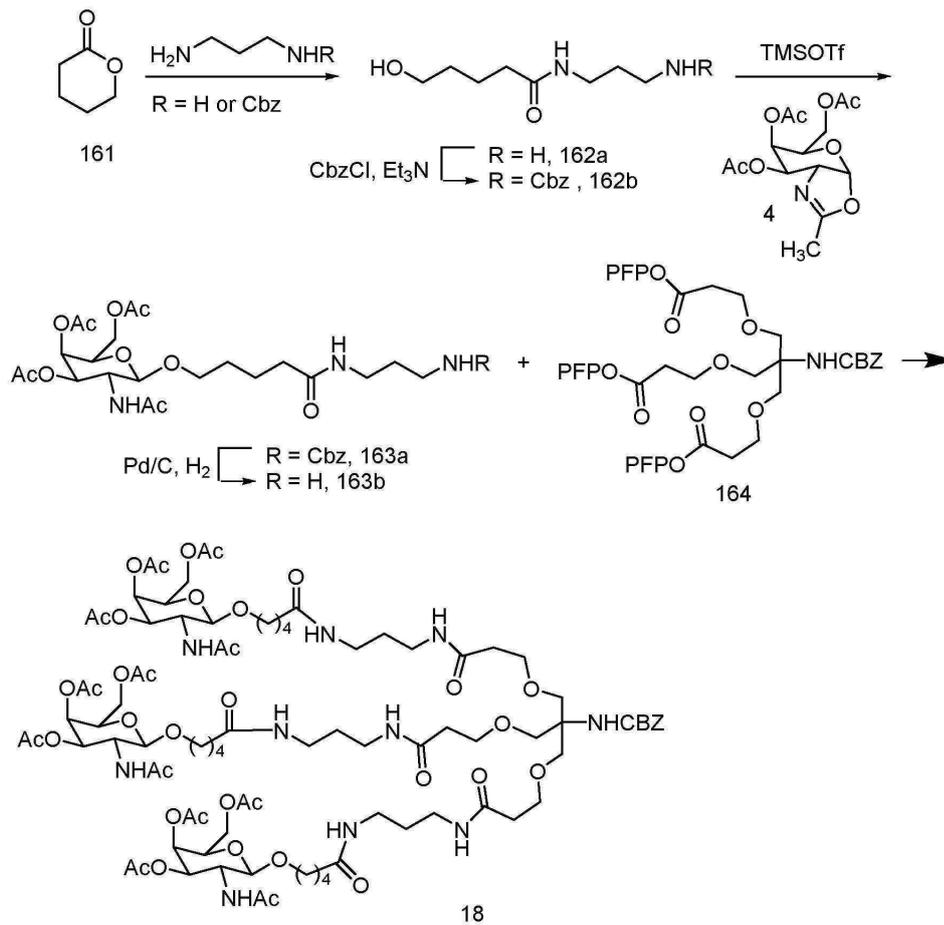
화합물 158 (7.2 g, 7.61 mmol)을 감압 하에서 P₂O₅로 건조시켰다. 상기 건조된 화합물을 무수 DMF (50 mL)에 용해시켰다. 여기에, 1H-테트라졸 (0.43 g, 6.09 mmol) 및 *N*-메틸이미다졸 (0.3 mL, 3.81 mmol) 및 2-시아노에틸-*N,N,N'*,*N'*-테트라이소프로필 포스포로디아미다이트 (3.65 mL, 11.50 mmol)를 부가하였다. 상기 반응 혼합물을 아르곤 분위기 하에서 4시간 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 에틸 아세테이트 (200 mL)로 희석하였다. 상기 반응 혼합물을 포화된 NaHCO₃ 및 염수로 세정하였다. 유기상을 분리하고, 건조시키고 (Na₂SO₄), 여과하고 증발시켰다. 잔류물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 헥산 중의 50-90 % 에틸 아세테이트로 용출시켜 화합물 159 (7.82 g, 80.5%)를 얻었다. 구조를 LCMS 및 ³¹P NMR 분석에 의해 확인하였다.



GalNAc₃-9 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 160을 표준 올리고뉴클레오타이드 합성 과정을 이용하여 제조하였다. 화합물 159의 3 유닛을고체 지지체에 커플링시킨다음 뉴클레오타이드 포스포르아미다이트에 커플링시켰다. 암모니아수를 이용한 상기 보호된 올리고머 화합물의처리는 화합물 160을 생성하였다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-9의 GalNAc₃ 클러스터 부분 (GalNAc₃-9_a)은 임의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_n-P(=O)(OH)-이다. GalNAc₃-9 (GalNAc₃-9_a-CM)의 구조가 하기에 나타나 있다:

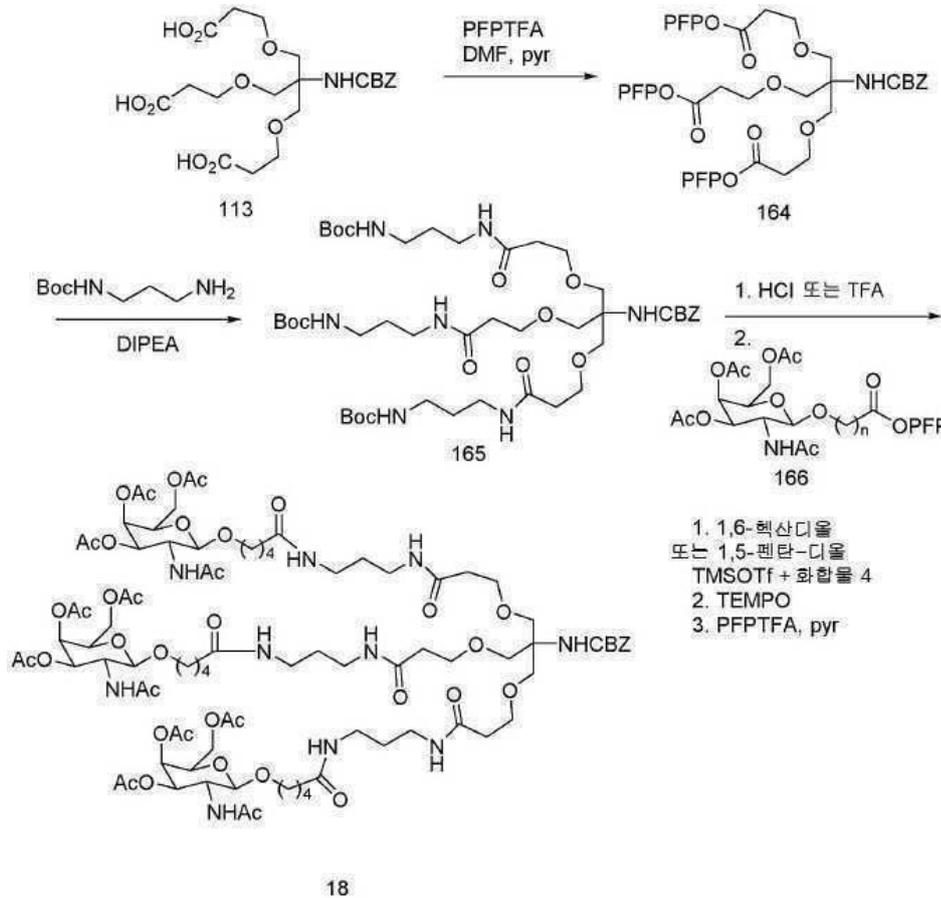


실시예 53: 화합물 18 (GalNAc₃-1a 및 GalNAc₃-3a)의 제조를 위한 대안적인 절차



락톤 161을 디아미노 프로판 (3-5 eq) 또는 모노-Boc 보호된 디아미노 프로판 (1 eq)과 반응시켜 알코올 162a 또는 162b를 제공하였다. 비보호된 프로판디아민이 상기 반응에 사용되는 경우, 과잉 디아민을 고진공 하에서 증발에 의해 제거하였고, 162a 내의 유리 아미노 그룹을 CbzCl을 이용하여 보호하여 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제 후백색 고체물로서 162b를 제공하였다. 알코올 162b를 TMSOTf의 존재하에 화합물 4와 추가 반응시켜 163a를 제공하였고, 이는 촉매적 수소첨가를 이용한 Cbz 그룹의 제거에 의해 163b로 전환되었다. 펜타플루오로 페닐 (PFPO) 에스테르 164를 3가산 113 (참고 실시예 48)을 DMF (0.1 내지 0.5 M) 중의 PFPTFA (3.5 eq) 및 피리딘 (3.5 eq)과 반응시켜 제조하였다. 상기 트리에스테르 164를 아민 163b (3-4 eq) 및 DIPEA (3-4 eq)와 직접 반응시켜 화합물 18을 제공하였다. 상기 방법은 중간체의 정제를 상당히 용이하게 하며 실시예 4에 기재된 과정을 이용하여 형성된 부산물의 형성을 최소화한다.

실시예 54: 화합물 18 (GalNAc₃-1a 및 GalNAc₃-3a)의 제조를 위한 대안적인 절차



triPFP 에스테르 164를 상기 실시예 53에 개괄된 절차를 이용하여 산 113으로부터 제조하였고 모노-Boc 보호된 디아민과 반응시켜 165를 본질적으로 정량적 수율로 제공하였다. 상기 Boc 그룹을 염산 또는 트리플루오로아세트산으로 제거하여 트리아민을 제공하였고, 이를 적당한 염기, 예컨대 DIPEA의 존재하에 PFP 활성화된 산 166과 반응시켜 화합물 18을 제공하였다.

PFP 보호된 Gal-NAc 산 166을 DMF 중 PFPTFA (1-1.2 eq) 및 피리딘 (1-1.2 eq)으로 처리하여 상응하는 산으로부터 제조하였다. 전구체 산을 결국, 아세토니트릴 및 물 중의 TEMPO (0.2 eq) 및 BAIB를 이용한 산화에 의해 상응하는 알코올로부터 제조하였다. 전구체 알코올을 실시예 47에 앞서 기재된 조건을 이용하여 1,6-헥산디올 (또는 1,5-펜탄디올 또는 다른 n 값에 대한 다른 디올) (2-4 eq) 및 TMSOTf와의 반응에 의해 당 중간체 4로부터 제조하였다.

실시예 55: 생체내에서 SRB-1을 표적으로 하는 3' 또는 5'-콘주게이트 그룹 (GalNAc₃-1, 3, 8 및 9의 비교)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 용량-의존적 연구

아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다. 비접합된 ISIS 353382는 표준으로서 포함된다. 각각의 다양한 GalNAc₃ 콘주게이트 그룹은 포스포디에스테르 연결된 2'-데옥시아데노신 뉴클레오사이드 (절단가능 모이어티)에 의해 각 올리고뉴클레오타이드의 3' 또는 5' 말단에서 부착되었다.

표 39

SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ASO	서열 (5'에서 3')	모티프	콘주게이트	서열번호
ISIS 353382 (모)	$G_{es}^m C_{es}^m T_{es} T_{es}^m C_{es}^m A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds}^m A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}$	5/10/5	없음	252
ISIS 655861 GaINAc₃-1_a	$G_{es}^m C_{es}^m T_{es} T_{es}^m C_{es}^m A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds}^m A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} A_{do}'$	5/10/5	GaINAc₃-1	253
ISIS 664078 GaINAc₃-9_a	$G_{es}^m C_{es}^m T_{es} T_{es}^m C_{es}^m A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds}^m A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} A_{do}'$	5/10/5	GaINAc₃-9	253
ISIS 661161 GaINAc₃-3_a	$G_{es}^m C_{es}^m T_{es} T_{es}^m C_{es}^m A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds}^m A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}$	5/10/5	GaINAc₃-3	254
ISIS 665001 GaINAc₃-8_a	$G_{es}^m C_{es}^m T_{es} T_{es}^m C_{es}^m A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds}^m A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}$	5/10/5	GaINAc₃-8	254

대문자는 각 뉴클레오사이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포포티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)를 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

GaINAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다. GaINAc₃-9는 실시예 52에서 이전에 보여졌다. GaINAc₃-3는 실시예 39에서 이전에 보여졌다. GaINAc₃-8는 실시예 47에서 이전에 보여졌다.

처리

6 주령 수컷 Balb/c 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 ISIS 353382, 655861, 664078, 661161, 665001 또는 염수가 아래에서 보여진 복용량으로 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 간 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 아래의 결과는 염수 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

표 40에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리 용량-의존 방식에서 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다. 사실상, 3' 말단에서 포스포디에스테르 연결된 GaINAc₃-1 및 GaINAc₃-9 콘주게이트 (ISIS 655861 및 ISIS 664078) 및 5' 말단에서 연결된 GaINAc₃-3 및 GaINAc₃-8 콘주게이트 (ISIS 661161 및 ISIS 665001)을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 353382)와 비교하여 효능의 실질적인 개선을 보여주었다. 더욱이, 3' 말단에서 GaINAc₃-9 콘주게이트를 포함하는 ISIS 664078은 3' 말단에서 GaINAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 ISIS 655861와 비교하여 본질적으로 동등하게 강력했다. GaINAc₃-3 또는 GaINAc₃-9, 각각을 포함하는 5' 접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드, ISIS 661161 및 ISIS 665001은, 3' 접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 655861 및 ISIS 664078)와 비교하여 증가된 효능을 가졌다.

표 40

SRB-1을 표적으로 하는 GalNac₃-1, 3, 8 또는 9를 함유하는 ASO

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% 염수)	큰주게이트
염수	n/a	100	
353382	3	88	없음
	10	68	
	30	36	
655861	0.5	98	GalNac ₃ -1 (3')
	1.5	76	
	5	31	
	15	20	
664078	0.5	88	GalNac ₃ -9 (3')
	1.5	85	
	5	46	
	15	20	
661161	0.5	92	GalNac ₃ -3 (5')
	1.5	59	
	5	19	
	15	11	
665001	0.5	100	GalNac ₃ -8 (5')
	1.5	73	
	5	29	
	15	13	

혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다. 총 빌리루빈 및 BUN가 또한 평가되었다. 체중의 변화를 염수 그룹으로부터 유의미한 변화 없이 평가했다. ALT, AST, 총 빌리루빈 및 BUN 값은 아래의 표에서 보여진다.

표 41

ISIS 번호	복용량 mg/kg	ALT	AST	총 빌리루빈	BUN	콘주게이트
염수		24	59	0.1	37.52	
353382	3	21	66	0.2	34.65	없음
	10	22	54	0.2	34.2	
	30	22	49	0.2	33.72	
655861	0.5	25	62	0.2	30.65	GalNac ₃ -1 (3')
	1.5	23	48	0.2	30.97	
	5	28	49	0.1	32.92	
	15	40	97	0.1	31.62	
664078	0.5	40	74	0.1	35.3	GalNac ₃ -9 (3')
	1.5	47	104	0.1	32.75	
	5	20	43	0.1	30.62	
	15	38	92	0.1	26.2	
661161	0.5	101	162	0.1	34.17	GalNac ₃ -3 (5')
	1.5 g	42	100	0.1	33.37	
	5 g	23	99	0.1	34.97	
	15	53	83	0.1	34.8	
665001	0.5	28	54	0.1	31.32	GalNac ₃ -8 (5')
	1.5	42	75	0.1	32.32	
	5	24	42	0.1	31.85	
	15	32	67	0.1	31.	

실시에 56: 생체내에서 SRB-1를 표적으로 하는 3' 또는 5'-콘주게이트 그룹 (GalNac₃-1, 2, 3, 5, 6, 7 및 10의 비교)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 용량-의존적 연구

아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다. 비접합된 ISIS 353382는 표준으로서 포함된다. 각각의 다양한 GalNac₃ 콘주게이트 그룹은 포스포디에스테르 연결된 2'-테옥시아테노신 뉴클레오사이드 (절단가능 모이어티)에 의해 각 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서 부착되었고, 단 3' 말단에서 부착된 GalNac₃ 콘주게이트 그룹을 갖는 ISIS 655861는 제외된다.

표 42

SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ASO	서열 (5'에서 3')	모티프	콘주게이트	서열번호
ISIS 353382 (표준)	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es}	5/10/5	콘주게이트 없음	252
ISIS 655861	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} A_{do}-GalNac₃-1_a	5/10/5	GalNac ₃ -1	253
ISIS 664507	GalNac₃-2_a ^m A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es}	5/10/5	GalNac ₃ -2	254
ISIS 661161	GalNac₃-3_a ^m A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es}	5/10/5	GalNac ₃ -3	254
ISIS 666224	GalNac₃-5_a ^m A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es}	5/10/5	GalNac ₃ -5	254
ISIS 666961	GalNac₃-6_a ^m A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es}	5/10/5	GalNac ₃ -6	254
ISIS 666981	GalNac₃-7_a ^m A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es}	5/10/5	GalNac ₃ -7	254
ISIS 666881	GalNac₃-10_a ^m A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es}	5/10/5	GalNac ₃ -10	254

대문자는 각 뉴클레오사이드에 대한 핵염기를 나타내고 ¹³C는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오 에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)를 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-2_a의 구조는 실시예 37에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-5_a의 구조는 실시예 49에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-6_a의 구조는 실시예 51에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 이전에 보여졌다.

처리

6 주령 수컷 Balb/c 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 ISIS 353382, 655861, 664507, 661161, 666224, 666961, 666981, 666881 또는 염수가 아래에서 보여진 복용량으로 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 간 SRB-1 mRNA 수준을 결정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 아래의 결과는 염수 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

표 43에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리 용량-의존 방식에서 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다. 사실상, 접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 353382) 와 비교하여 효능의 실질적인 개선을 보여주었다. 5' 접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 3' 접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 비교하여 효능의 약간의 증가를 보여주었다.

표 43

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% 염수)	큰주게이트
염수	n/a	100.0	
353382	3	96.0	없음
	10	73.1	
	30	36.1	
655861	0.5	99.4	GalNAc ₃ -1 (3')
	1.5	81.2	
	5	33.9	
	15	15.2	
664507	0.5	102.0	GalNAc ₃ -2 (5')
	1.5	73.2	
	5	31.3	
	15	10.8	
661161	0.5	90.7	GalNAc ₃ -3 (5')
	1.5	67.6	
	5	24.3	
	15	11.5	
666224	0.5	96.1	GalNAc ₃ -5 (5')
	1.5	61.6	
	5	25.6	
	15	11.7	
666961	0.5	85.5	GalNAc ₃ -6 (5')
	1.5	56.3	
	5	34.2	
	15	13.1	
666981	0.5	84.7	GalNAc ₃ -7 (5')
	1.5	59.9	
	5	24.9	
	15	8.5	
666881	0.5	100.0	GalNAc ₃ -10 (5')
	1.5	65.8	
	5	26.0	
	15	13.0	

혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다. 총 빌리루빈 및 BUN가 또한 평가되었다. 체중의 변화를 염수 그룹으로부터 유의미한 변화 없이 평가했다. ALT, AST, 총 빌리루빈 및 BUN 값은 아래의 표 44에서 보여진다.

표 44

ISIS 번호	복용량 mg/kg	ALT	AST	총 빌리루빈	BUN	콘주게이트
염수		26	57	0.2	27	
353382	3	25	92	0.2	27	없음
	10	23	40	0.2	25	
	30	29	54	0.1	28	
655861	0.5	25	71	0.2	34	GalNac ₃ -1 (3')
	1.5	28	60	0.2	26	
	5	26	63	0.2	28	
	15	25	61	0.2	28	
664507	0.5	25	62	0.2	25	GalNac ₃ -2 (5')
	1.5	24	49	0.2	26	
	5	21	50	0.2	26	
	15	59	84	0.1	22	
661161	0.5	20	42	0.2	29	GalNac ₃ -3 (5')
	1.5 g	37	74	0.2	25	
	5 g	28	61	0.2	29	
	15	21	41	0.2	25	
666224	0.5	34	48	0.2	21	GalNac ₃ -5 (5')
	1.5	23	46	0.2	26	
	5	24	47	0.2	23	
	15	32	49	0.1	26	
666961	0.5	17	63	0.2	26	GalNac ₃ -6 (5')
	1.5	23	68	0.2	26	
	5	25	66	0.2	26	
	15	29	107	0.2	28	
666981	0.5	24	48	0.2	26	GalNac ₃ -7 (5')
	1.5	30	55	0.2	24	
	5	46	74	0.1	24	
	15	29	58	0.1	26	
666881	0.5	20	65	0.2	27	GalNac ₃ -10 (5')
	1.5	23	59	0.2	24	
	5	45	70	0.2	26	
	15	21	57	0.2	24	

실시예 57: 생체내에서 ApoC III을 표적으로 하는 3'-콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 작용 연구의 지속 시간

마우스에게 아래에서 명시된 용량이 1 회 주입되었고 42 일의 과정 동안 ApoC-III 및 혈장 트리글리세라이드 (혈장 TG) 수준에 대해 모니터링되었다. 연구는 각 그룹에서 인간 APOC-III을 발현시키는 3 개의 이식유전자 마우스를 사용하여 수행되었다.

표 45

ApoC III를 표적으로 하는 변형된 ASO

ASO	서열 (5'에서 3')	연결	서열번호
ISIS 304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} m ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	PS	244
ISIS 647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNac ₃ -1 _a	PS	245
ISIS 647536	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNac ₃ -1 _a	PO/PS	245

대문자는 각 뉴클레오사이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오

에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)를 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다.

표 46

ApoC III mRNA (1 일째 염수 %) 및 혈장 TG 수준 (1 일째 염수 %)

ASO	용량	표적	3 일째	7 일째	14 일째	35 일째	42 일째
염수	0 mg/kg	ApoC-III	98	100	100	95	116
ISIS 304801	30 mg/kg	ApoC-III	28	30	41	65	74
ISIS 647535	10 mg/kg	ApoC-III	16	19	25	74	94
ISIS 647536	10 mg/kg	ApoC-III	18	16	17	35	51
염수	0 mg/kg	혈장 TG	121	130	123	105	109
ISIS 304801	30 mg/kg	혈장 TG	34	37	50	69	69
ISIS 647535	10 mg/kg	혈장 TG	18	14	24	18	71
ISIS 647536	10 mg/kg	혈장 TG	21	19	15	32	35

상기 표에서 보여질 수 있는 바와 같이, 작용의 지속시간은 비접합된 올리고뉴클레오타이드와 비교하여 3'-콘주게이트 그룹의 부가와 함께 증가되었다. 접합된 완벽한 PS 올리고뉴클레오타이드 647535와 비교하여 접합된 혼합된 PO/PS 올리고뉴클레오타이드 647536에 대한 작용의 지속시간이 추가로 증가되었다.

실시예 58: 생체내에서 SRB-1을 표적으로 하는 3'-콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 용량-의존적 연구 (GalNAc₃-1 및 GalNAc₄-11의 비교)

아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다. 비접합된 ISIS 440762은 비접합된 표준으로서 포함되었다. 각각의 콘주게이트 그룹은 포스포디에스테르 연결된 2'-데옥시아데노신 뉴클레오사이드 절단가능 모이티에 의해 각 올리고뉴클레오타의 3' 말단에서 부착되었다.

GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-11_a의 구조는 실시예 50에서 이전에 보여졌다.

처리

6 주령 수컷 Balb/c 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 ISIS 440762, 651900, 663748 또는 염수가 아래에서 보여진 복용량으로 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 간 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 아래의 결과는 염수 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

표 47에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다. 3' 말단(ISIS 651900 및 ISIS 663748)에서 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-1 및 GalNAc₄-11 콘주게이트를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 440762)와 비교하여 효능의 실질적인 개선을 보여주었다. 2 개의 접합된 올리고뉴클레오타이드, GalNAc₃-1 및 GalNAc₄-11는, 동등하게 강력했다.

표 47

SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ASO	서열 (5'에서 3')	용량 mg/kg	% 염수 대조군	서열번호
염수			100	
ISIS 440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} mC _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	0.6	73.45	246
		2	59.66	
		6	23.50	
ISIS 651900	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} mC _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ko} A _{do} -GalNac ₃ -1 _a	0.2	62.75	247
		0.6	29.14	
		2	8.61	
		6	5.62	
ISIS 663748	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} mC _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ko} A _{do} -GalNac ₄ -11 _a	0.2	63.99	247
		0.6	33.53	
		2	7.58	
		6	5.52	

대문자는 각 뉴클레오사이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "k"는 6'-(S)-CH₃ 바이사이클릭 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다. 총 빌리루빈 및 BUN가 또한 평가되었다. 체중의 변화를 염수 그룹으로부터 유의미한 변화 없이 평가했다. ALT, AST, 총 빌리루빈 및 BUN 값은 아래의 표 48에서 보여진다.

표 48

ISIS 번호	복용량 mg/kg	ALT	AST	총 빌리루빈	BUN	콘주게이트
염수		30	76	0.2	40	
440762	0.60	32	70	0.1	35	없음
	2	26	57	0.1	35	
	6	31	48	0.1	39	
651900	0.2	32	115	0.2	39	GalNac ₃ -1 (3')
	0.6	33	61	0.1	35	
	2	30	50	0.1	37	
	6	34	52	0.1	36	
663748	0.2	28	56	0.2	36	GalNac ₄ -11 (3')
	0.6	34	60	0.1	35	
	2	44	62	0.1	36	
	6	38	71	0.1	33	

실시예 59: 생체내 FXI을 표적으로 하는 GalNac₃-1 접합된 ASO의 효과

아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 FXI의 안티센스 억제에 대한 다중 용량 연구에서 시험되었다. ISIS 404071은 비접합된 표준으로서 포함되었다. 각각의 콘주게이트 그룹은 포스포디에스테르 연결된 2'-데옥시아데노신 뉴클레오사이드 절단가능 모이어티에 의해 각 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에서 부착되었다.

표 49

FXI를 표적으로 하는 변형된 ASO

ASO	서열 (5'에서 3')	연결	서열번호
ISIS 404071	T _{es} G _{es} G _{es} T _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{es} G _{es} A _{es} G _{es} G _e	PS	255
ISIS 656172	T _{es} G _{es} G _{es} T _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{es} G _{es} A _{es} G _{es} G _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	PS	256
ISIS 656173	T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	PO/PS	256

대문자는 각 뉴클레오사이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)를 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다.

처리

6 주령 수컷 Balb/c 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 피하로 매주 2회 3 주 동안 아래에서 보여진 복용량으로 ISIS 404071, 656172, 656173 또는 PBS 처리된 대조군이 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 간 FXI mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 혈장 FXI 단백질 수준은 ELISA를 사용하여 또한 측정되었다. FXI mRNA 수준은 PBS-처리된 대조군에 대한 정상화 전에 (RIBOGREEN®를 사용하여) 총 RNA에 대해 결정되었다. 아래의 결과는 각 처리 그룹에 대한 FXI mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 제공된다. 데이터는 PBS-처리된 대조군에 대해 정규화되었고 "% PBS"로 나타낸다. ED₅₀s는 이전에 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여 측정되었고 아래에서 제공된다.

표 50

인자 XI mRNA (염수 %)

ASO	용량 mg/kg	% 대조군	콘주게이트	연결
염수		100	없음	
ISIS 404071	3	92	없음	PS
	10	40		
	30	15		
ISIS 656172	0.7	74	GalNAc ₃ -1	PS
	2	33		
	6	9		
ISIS 656173	0.7	49	GalNAc ₃ -1	PO/PS
	2	22		
	6	1		

표 50에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 FXI mRNA 수준을 낮게 했다. 3'-GalNAc₃-1 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 404071) 와 비교하여 효능의 실질적인 개선을 보여주었다. 2 개의 접합된 올리고뉴클레오타이드 사이에 효능의 개선이 추가로, PS 연결의 일부를 PO (ISIS 656173)로 치환하여 제공되었다.

표 50a에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 FXI 단백질 수준을 낮게 했다. 3'-GalNAc₃-1 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 404071) 와 비교하여 효능의 실질적인 개선을 보여주었다. 2 개의 접합된 올리고뉴클레오타이드 사이에 효능의 개선이 추가로, PS 연결의 일부를 PO (ISIS 656173)로 치환하여 제공되었다.

표 50a

인자 XI 단백질 (염수 %)

ASO	용량 mg/kg	단백질 (% 대조군)	콘주게이트	연결
염수		100	없음	
ISIS 404071	3	127	없음	PS
	10	32		
	30	3		
ISIS 656172	0.7	70	GalNAc ₃ -1	PS
	2	23		
	6	1		
ISIS 656173	0.7	45	GalNAc ₃ -1	PO/PS
	2	6		
	6	0		

혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다. 총 빌리루빈, 총 알부민, CRE 및 BUN 가 또한 평가되었다. 체중의 변화를 염수 그룹으로부터 유의미한 변화 없이 평가했다. ALT, AST, 총 빌리루빈 및 BUN 값은 아래의 표에서 보여진다.

표 51

ISIS 번호	복용량 mg/kg	ALT	AST	총 알부민	총 빌리루빈	CRE	BUN	콘주게이트
염수		71.8	84.0	3.1	0.2	0.2	22.9	
404071	3	152.8	176.0	3.1	0.3	0.2	23.0	없음
	10	73.3	121.5	3.0	0.2	0.2	21.4	
	30	82.5	92.3	3.0	0.2	0.2	23.0	
656172	0.7	62.5	111.5	3.1	0.2	0.2	23.8	GalNAc ₃ -1 (3')
	2	33.0	51.8	2.9	0.2	0.2	22.0	
	6	65.0	71.5	3.2	0.2	0.2	23.9	
656173	0.7	54.8	90.5	3.0	0.2	0.2	24.9	GalNAc ₃ -1 (3')
	2	85.8	71.5	3.2	0.2	0.2	21.0	
	6	114.0	101.8	3.3	0.2	0.2	22.7	

실시에 60: 시험관내 SRB-1을 표적으로 하는 접합된 ASO의 효과

아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 일차 마우스 간세포에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 다중 용량 연구에서 시험되었다. ISIS 353382은 비접합된 표준으로서 포함되었다. 각각의 콘주게이트 그룹은 포스포디에스테르 연결된 2'-테옥시아데노신 뉴클레오사이드 절단가능 모이머에 의해 각 올리고뉴클레오타이드의 3' 또는 5' 말단에서 부착되었다.

표 52

SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ASO	서열 (5'에서 3')	모티프	콘주게이트	서열번호
ISIS 353382	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}$	5/10/5	없음	252
ISIS 655861	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} A_{do}^m$ GalNAc₃-1_a	5/10/5	GalNAc ₃ -1	253
ISIS 655862	$G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} A_{do}^m$ GalNAc₃-1_a	5/10/5	GalNAc ₃ -1	253
ISIS 661161	GalNAc₃-3_a $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}$	5/10/5	GalNAc ₃ -3	254
ISIS 665001	GalNAc₃-8_a $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}$	5/10/5	GalNAc ₃ -8	254
ISIS 664078	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} A_{do}^m$ GalNAc₃-9_a	5/10/5	GalNAc ₃ -9	253
ISIS 666961	GalNAc₃-6_a $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}$	5/10/5	GalNAc ₃ -6	254
ISIS 664507	GalNAc₃-2_a $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}$	5/10/5	GalNAc ₃ -2	254
ISIS 666881	GalNAc₃-10_a $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}$	5/10/5	GalNAc ₃ -10	254
ISIS 666224	GalNAc₃-5_a $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}$	5/10/5	GalNAc ₃ -5	254
ISIS 666981	GalNAc₃-7_a $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}$	5/10/5	GalNAc ₃ -7	254

대문자는 각 뉴클레오사이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포포티오 에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-8_a의 구조는 실시예 47에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-9_a의 구조는 실시예 52에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-6_a의 구조는 실시예 51에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-2_a의 구조는 실시예 37에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-5_a의 구조는 실시예 49에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 이전에 보여졌다.

처리

상기 열거된 올리고뉴클레오타이드는 25,000 세포/웰의 밀도에서 플레이팅된 일차 마우스 간세포 세포에서 시험관 내에서 시험되었고, 0.03, 0.08, 0.24, 0.74, 2.22, 6.67 또는 20 nM 변형된 올리고뉴클레오타이드로 처리되었다. 대략 16 시간의 치료 기간 후, RNA는 세포로부터 분리되었고 mRNA 수준은 정량적 실시간 PCR에 의해 측정되었고 SRB-1 mRNA 수준은 RIBOGREEN®에 의해 측정된 바와 같이 총 RNA 함량에 따라 조정되었다.

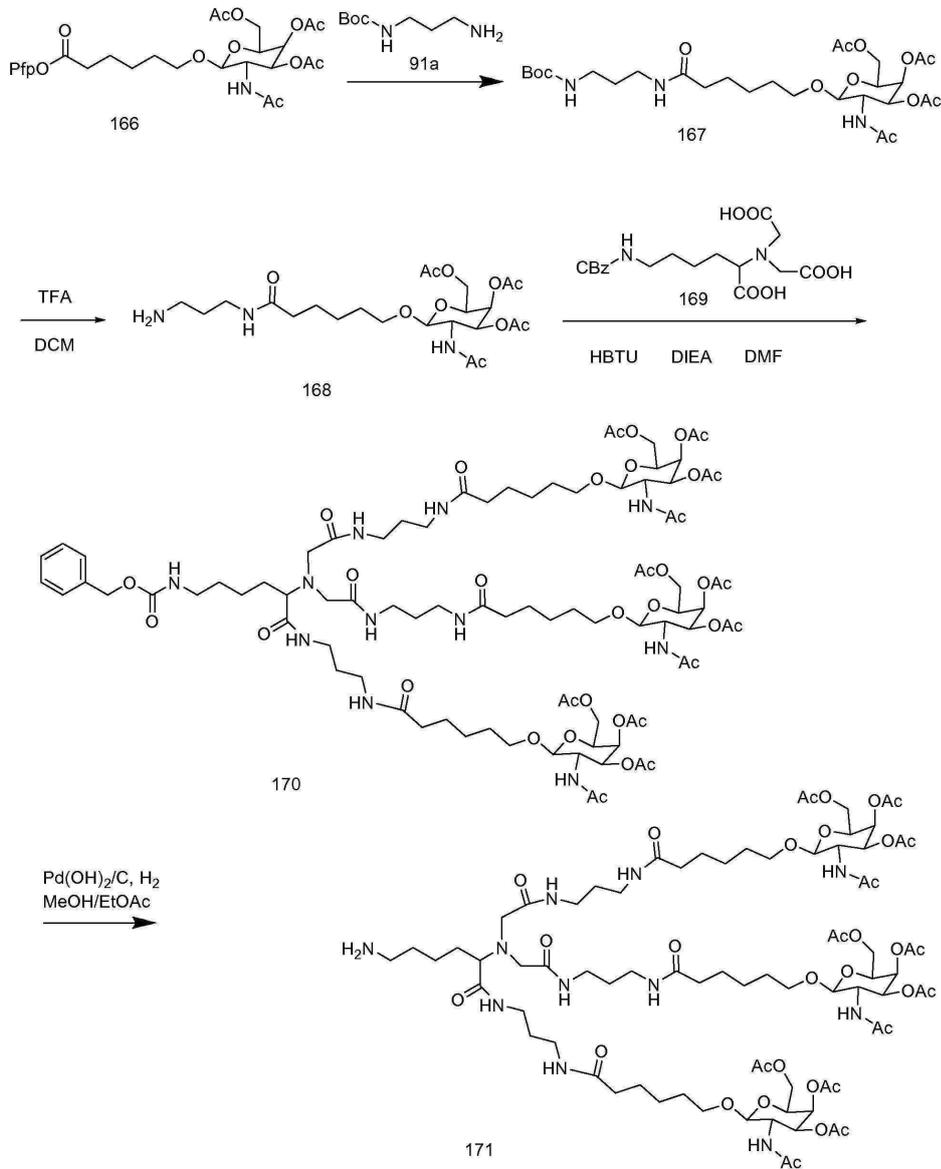
IC₅₀는 표준 방법을 사용하여 계산되었고 결과는 표 53에서 제공된다. 이 결과는, 시약 또는 전기천공 기술이 올리고뉴클레오타이드의 세포로의 유입을 인공적으로 촉진하기 위해 사용되지 않은 유리 흡수 조건 하에서, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트를 포함하지 않는 모 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 353382)보다 간세포에서 유의미하게 더 강했다는 것을 보여준다.

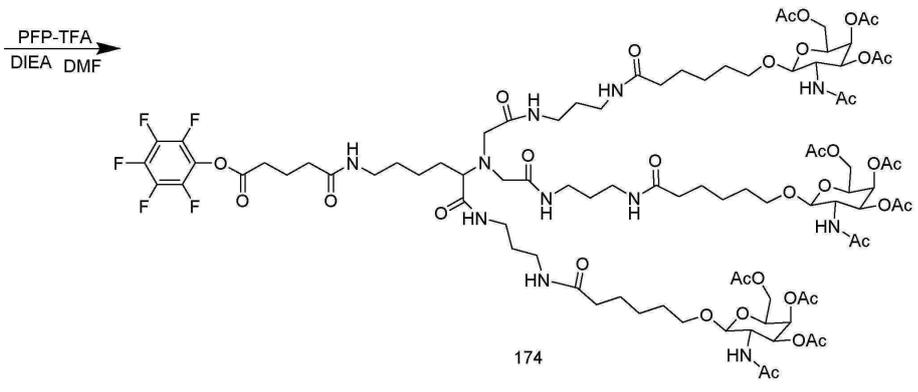
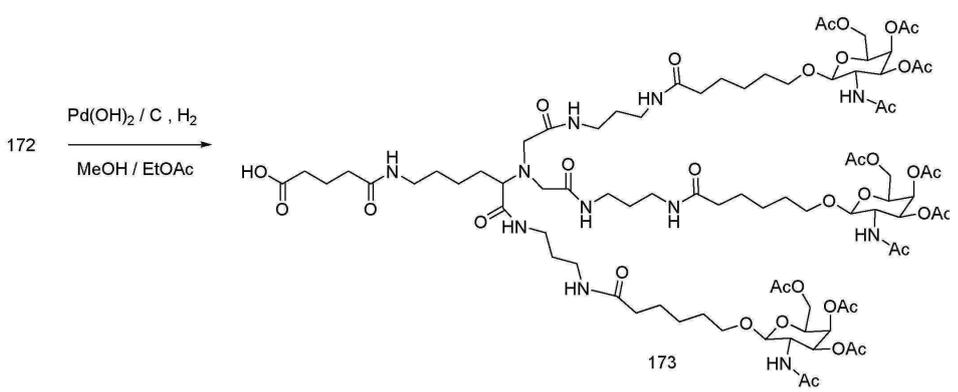
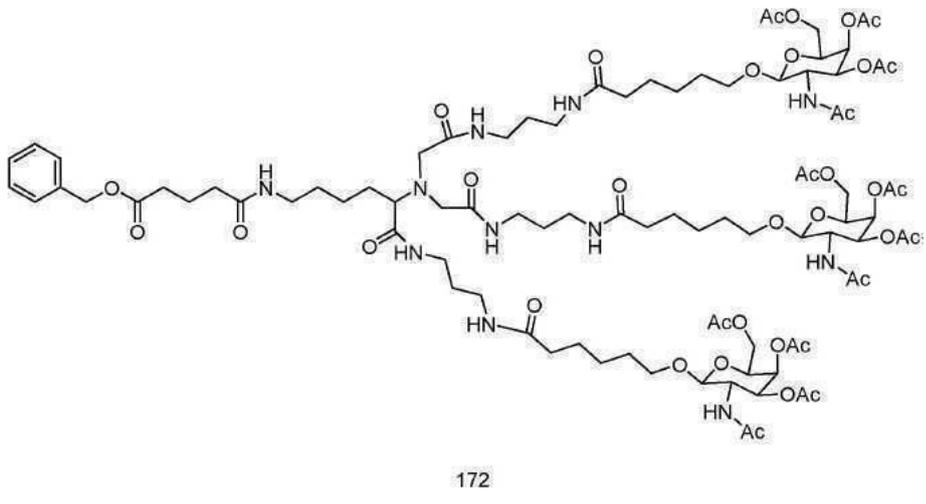
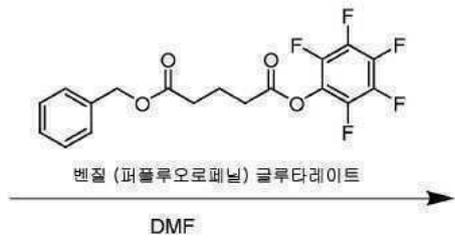
표 53

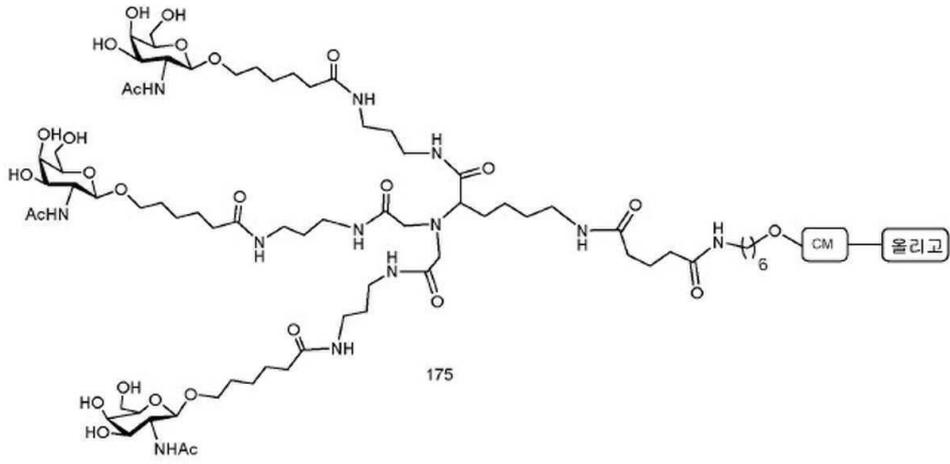
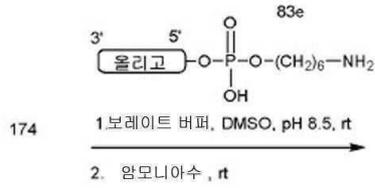
ASO	IC ₅₀ (nM)	뉴클레오사이드간 연결	콘주게이트	서열번호
ISIS 353382	190 ^a	PS	없음	252
ISIS 655861	11 ^a	PS	GalNAc ₃ -1	253
ISIS 655862	3	PO/PS	GalNAc ₃ -1	253
ISIS 661161	15 ^a	PS	GalNAc ₃ -3	254
ISIS 665001	20	PS	GalNAc ₃ -8	254
ISIS 664078	55	PS	GalNAc ₃ -9	253
ISIS 666961	22 ^a	PS	GalNAc ₃ -6	254
ISIS 664507	30	PS	GalNAc ₃ -2	254
ISIS 666881	30	PS	GalNAc ₃ -10	254
ISIS 666224	30 ^a	PS	GalNAc ₃ -5	254
ISIS 666981	40	PS	GalNAc ₃ -7	254

^a 다중 시행의 평균.

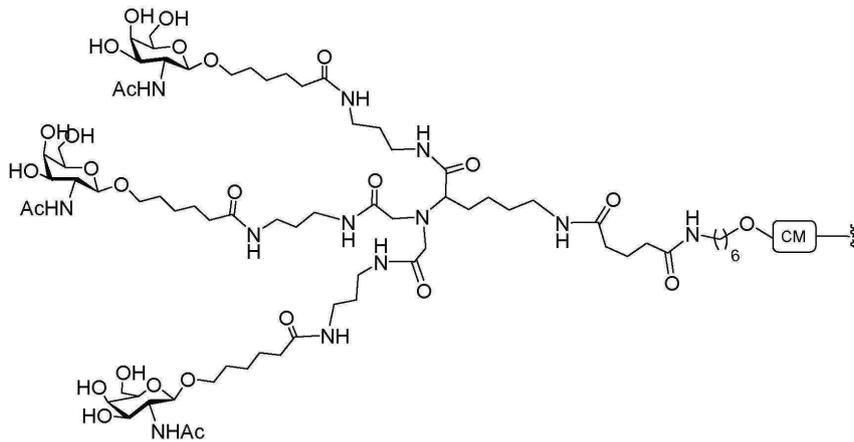
실시예 61: GalNAc₃-12를 포함하는 올리고머 화합물 175의 제조



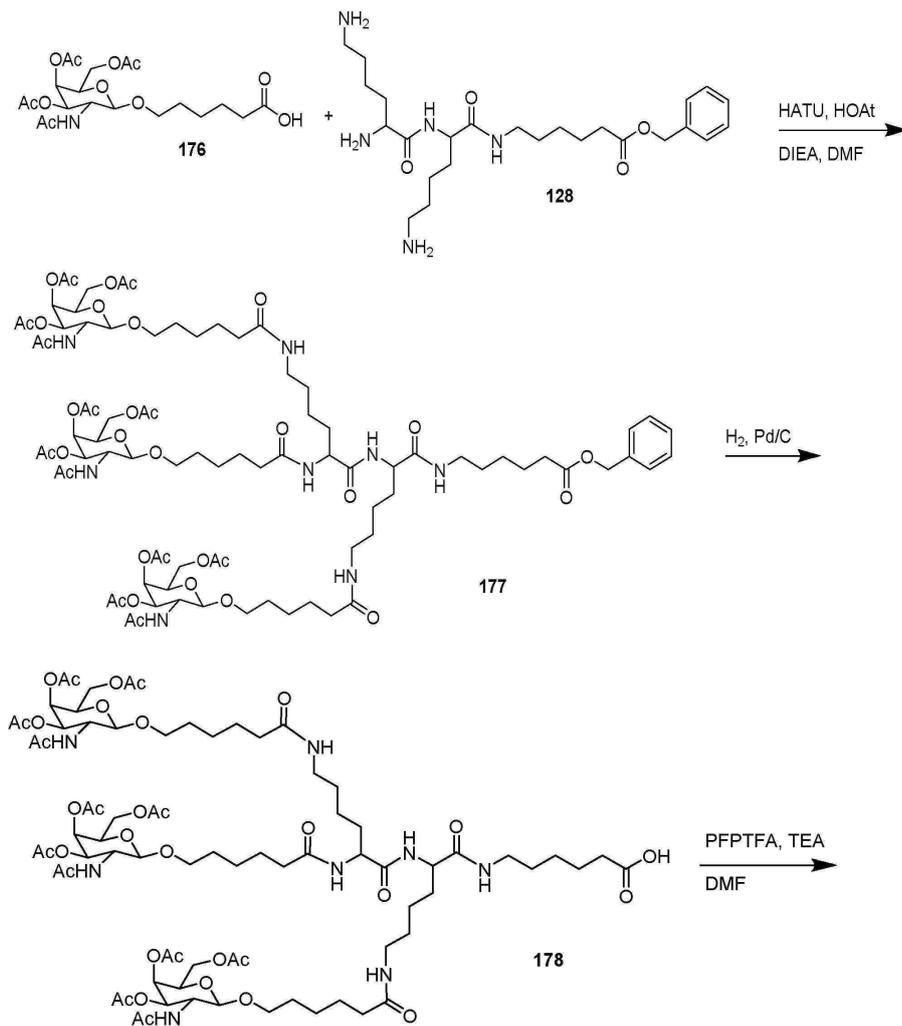


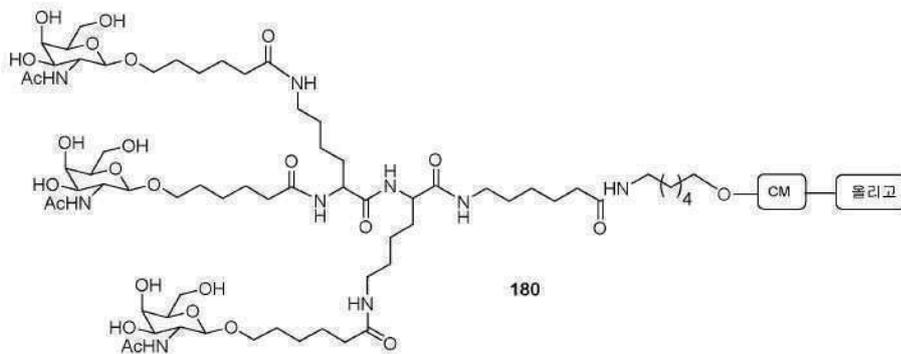
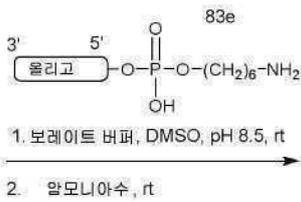
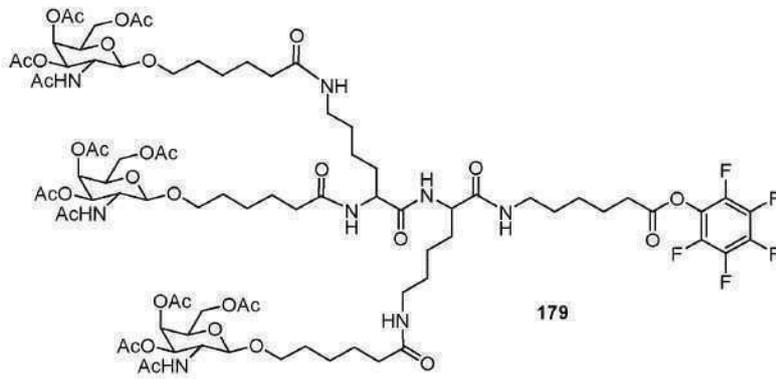


화합물 169는 시판되고 있다. 화합물 172를, 벤질 (피플루오로페닐) 글루타레이트를 화합물 171에 추가하여 제조했다. 벤질 (피플루오로페닐) 글루타레이트를, DMF 중 PFP-TFA 및 DIEA을 5-(벤질옥시)-5-옥소펜탄산에 추가하여 제조했다. GalNAc₃-12 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 175는, 실시예 46에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 화합물 174로부터 제조되었다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-12 (GalNAc₃-12a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다. GalNAc₃-12 (GalNAc₃-12_a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:

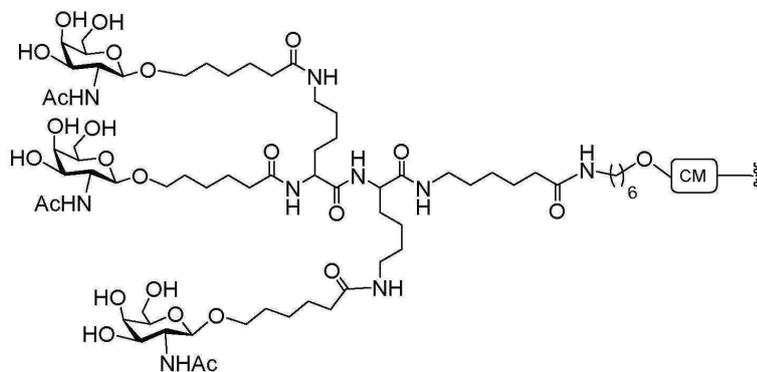


실시예 62: Ga1NAc₃-13을 포함하는 올리고머 화합물 180의 제조

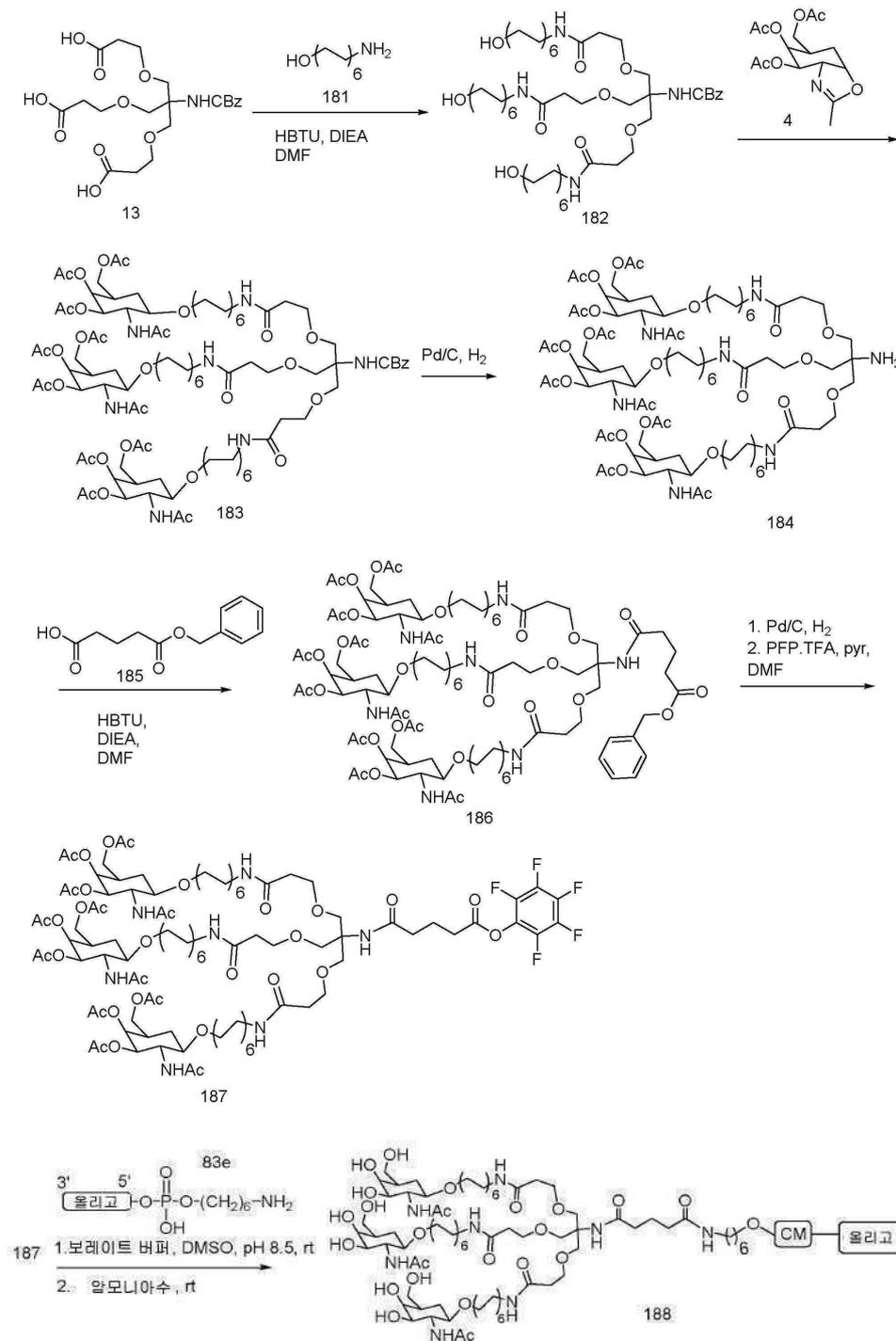




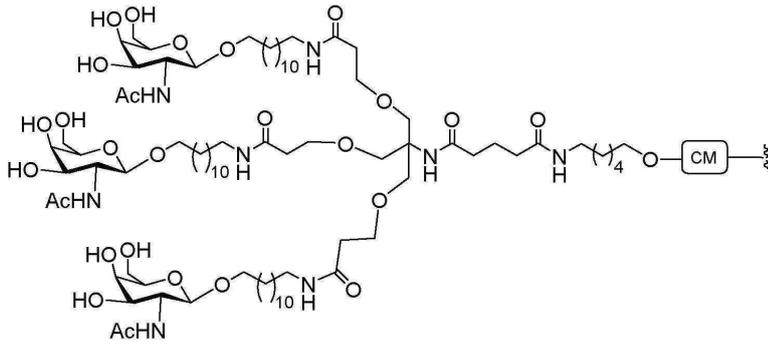
화합물 176은 실시예 2에서 보여진 일반적인 절차를 사용하여 제조되었다. GalNAc₃-13 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 180은, 실시예 49에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 화합물 177로부터 제조되었다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-13 (GalNAc₃-13a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_n-P(=O)(OH)-이다. GalNAc₃-13 (GalNAc₃-13_a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:



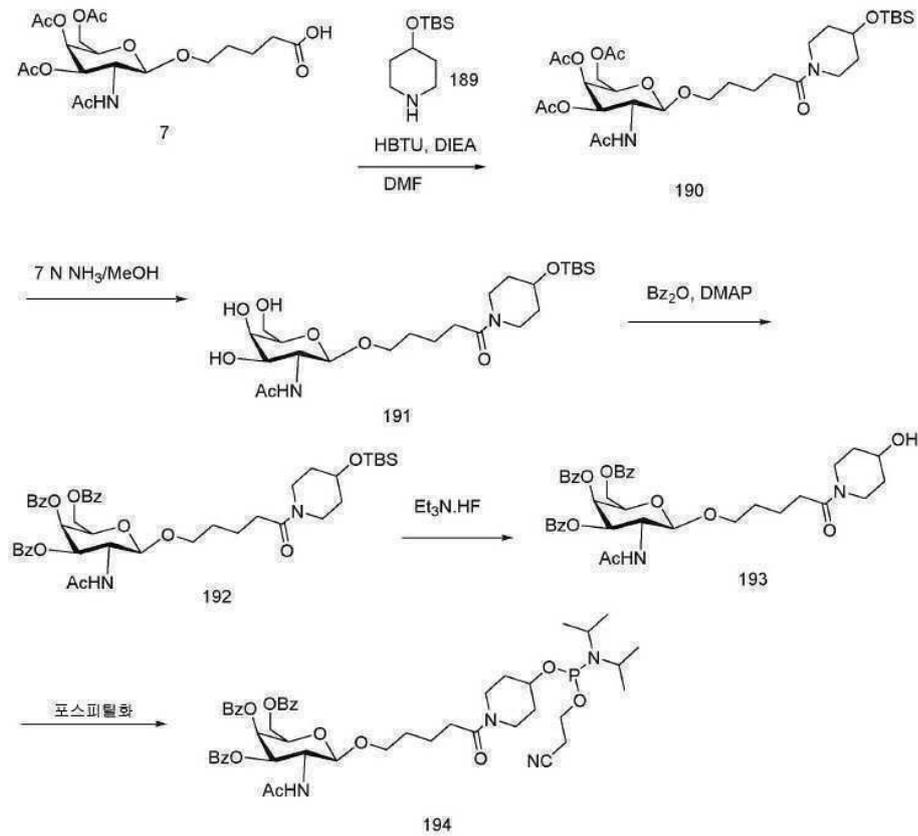
실시예 63: Ga1Nac₃-14를 포함하는 올리고머 화합물 188의 제조

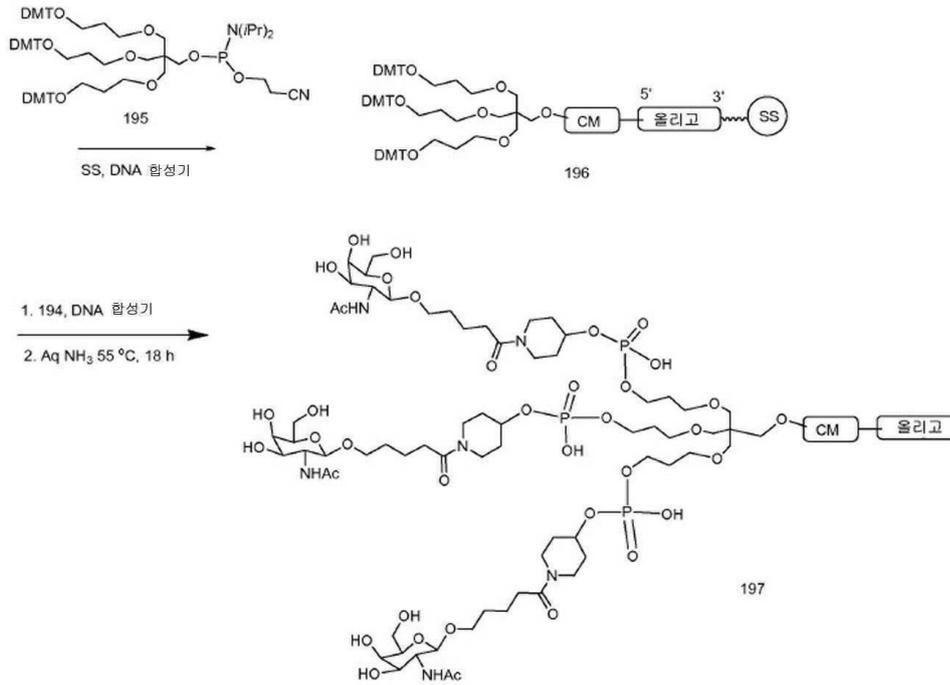


화합물 181 및 185는 시판되고 있다. Ga1Nac₃-14 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 188은, 실시예 46에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 화합물 187로부터 제조되었다. 콘주게이트 그룹 Ga1Nac₃-14 (Ga1Nac₃-14a)의 Ga1Nac₃ 클러스터 부분은 임의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다. Ga1Nac₃-14 (Ga1Nac₃-14_a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:

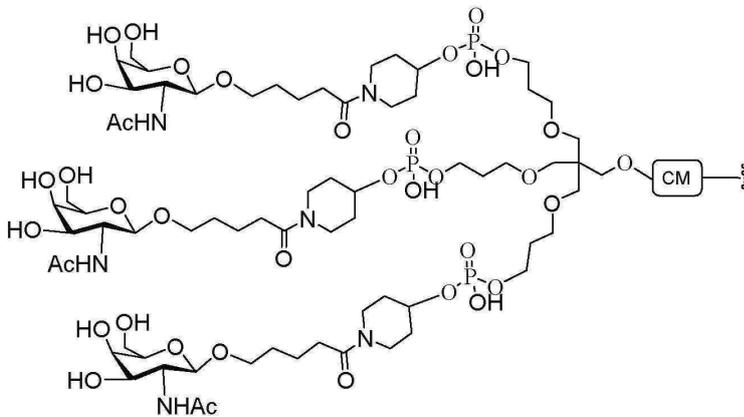


실시예 64: GalNAc₃-15를 포함하는 올리고머 화합물 197의 제조





화합물 189는 시판되고 있다. 화합물 195은 실시예 31에서 보여진 일반적인 절차를 사용하여 제조되었다. GalNAc₃-15 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 197은, 표준 올리고뉴클레오타이드 합성 절차를 사용하여 화합물 194 및 195로부터 제조되었다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-15 (GalNAc₃-15a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다. GalNAc₃-15 (GalNAc₃-15a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:



실시예 65: 생체내에서 SRB-1를 표적으로 하는 5'-콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 용량-의존적 연구 (GalNAc₃-3, 12, 13, 14, 및 15의 비교)

아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다. 비접합된 ISIS 353382는 표준으로서 포함된다. 각각의 GalNAc₃ 콘주게이트 그룹은 포스포디에스테르 연결된 2'-데옥시아데노신 뉴클레오타이드 (절단가능 모이어티)에 의해 각 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서 부착되었다.

표 54

SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	콘주게이트	서열번호
353382	$C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} T_e$	없음	252
661161	$GalNac_3-3_{a'o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNac ₃ -3	254
671144	$GalNac_3-12_{a'o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNac ₃ -12	254
670061	$GalNac_3-13_{a'o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNac ₃ -13	254
671261	$GalNac_3-14_{a'o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNac ₃ -14	254
671262	$GalNac_3-15_{a'o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNac ₃ -15	254

대문자는 각 뉴클레오사이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

GalNac₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 이전에 보여졌다. GalNac₃-12_a의 구조는 실시예 61에서 이전에 보여졌다. GalNac₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 이전에 보여졌다. GalNac₃-14_a의 구조는 실시예 63에서 이전에 보여졌다. GalNac₃-15_a의 구조는 실시예 64에서 이전에 보여졌다.

처리

6 내지 8 주령 C57b16 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 아래에서 보여진 복용량으로 ISIS 353382, 661161, 671144, 670061, 671261, 671262, 또는 염수가 1 회 또는 2 회 피하로 주입되었다. 2 회 복용된 마우스는 제 1 용량 3일 후에 제 2 용량을 수용했다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 간 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 아래의 결과는 염수 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

표 55에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다. 표준 녹다운의 유의미한 차이는 단회 용량을 수용한 동물과 2 회 용량을 수용한 동물 사이에 관찰되지 않았다 (참고 ISIS 353382 복용량 30 및 2 x 15 mg/kg; 및 ISIS 661161 복용량 5 및 2 x 2.5 mg/kg). 포스포디에스테르 연결된 GalNac₃-3, 12, 13, 14, 및 15 콘주게이트를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 335382) 와 비교하여 효능의 실질적인 개선을 보여주었다.

표 55

SRB-1 mRNA (% 염수)

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% 염수)	ED ₅₀ (mg/kg)	콘주게이트
염수	n/a	100.0	n/a	n/a
353382	3	85.0	22.4	없음
	10	69.2		
	30	34.2		
	2 x 15	36.0		
661161	0.5	87.4	2.2	GalNAc ₃ -3
	1.5	59.0		
	5	25.6		
	2 x 2.5	27.5		
	15	17.4		
671144	0.5	101.2	3.4	GalNAc ₃ -12
	1.5	76.1		
	5	32.0		
	15	17.6		
670061	0.5	94.8	2.1	GalNAc ₃ -13
	1.5	57.8		
	5	20.7		
	15	13.3		
671261	0.5	110.7	4.1	GalNAc ₃ -14
	1.5	81.9		
	5	39.8		
	15	14.1		
671262	0.5	109.4	9.8	GalNAc ₃ -15
	1.5	99.5		
	5	69.2		
	15	36.1		

혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다. 총 빌리루빈 및 BUN가 또한 평가되었다. 체중의 변화는 염수 그룹으로부터 유의미한 차이 없이 평가되었다 (데이터 도시되지 않음). ALT, AST, 총 빌리루빈 및 BUN 값은 아래의 표 56에서 보여진다.

표 56

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	총 빌리루빈 (mg/dL)	BUN (mg/dL)	콘주게이트
염수	n/a	28	60	0.1	39	n/a
353382	3	30	77	0.2	36	없음
	10	25	78	0.2	36	
	30	28	62	0.2	35	
	2 x 15	22	59	0.2	33	
	0.5	39	72	0.2	34	
661161	1.5	26	50	0.2	33	GalNAc ₃ -3
	5	41	80	0.2	32	
	2 x 2.5	24	72	0.2	28	
	15	32	69	0.2	36	
	0.5	25	39	0.2	34	
671144	1.5	26	55	0.2	28	GalNAc ₃ -12
	5	48	82	0.2	34	
	15	23	46	0.2	32	
	0.5	27	53	0.2	33	
670061	1.5	24	45	0.2	35	GalNAc ₃ -13
	5	23	58	0.1	34	
	15	24	72	0.1	31	
	0.5	69	99	0.1	33	
671261	1.5	34	62	0.1	33	GalNAc ₃ -14
	5	43	73	0.1	32	
	15	32	53	0.2	30	
	0.5	24	51	0.2	29	
671262	1.5	32	62	0.1	31	GalNAc ₃ -15
	5	30	76	0.2	32	
	15	31	64	0.1	32	

실시예 66: 5'-GalNAc₃ 클러스터를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제에 대한 다양한 절단가능 모이어티의 효과

아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다. 각각의 GalNAc₃ 콘주게이트 그룹은 포스포디에스테르 연결된 뉴클레오사이드 (절단가능 모이어티 (C M))에 의해 각 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서 부착되었다.

표 57

SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
661161	GalNAc ₃ -3 _{a'o} -A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} ^m G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m	GalNAc ₃ -3a	A _d	254
670699	GalNAc ₃ -3 _{a'o} -T _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} ^m G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m	GalNAc ₃ -3a	T _d	257
670700	GalNAc ₃ -3 _{a'o} -A _{eo} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{es} G _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} ^m G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{eo} T _{es} T _{es} ^e	GalNAc ₃ -3a	A _e	254
670701	GalNAc ₃ -3 _{a'o} -T _{eo} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{es} G _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} ^m G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{eo} T _{es} T _{es} ^e	GalNAc ₃ -3a	T _e	257
671165	GalNAc ₃ -13 _{a'o} -A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} ^m G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{eo} T _{es} T _{es} ^e	GalNAc ₃ -13a	A _d	254

대문자는 각 뉴클레오사이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포포티오 에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

GalNAc₃-3a의 구조는 실시예 39에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-13a의 구조는 실시예 62에서 이전에 보여졌다.

처리

6 내지 8 주령 C57b16 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 ISIS 661161, 670699, 670700, 670701, 671165, 또는 염수가 아래에서 보여진 복용량으로 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 간 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 아래의 결과는 염수 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

표 58에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다. 다양한 절단가능 모이어티 모두를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 유사한 효능을 보여주었다.

표 58

SRB-1 mRNA (염수 %)

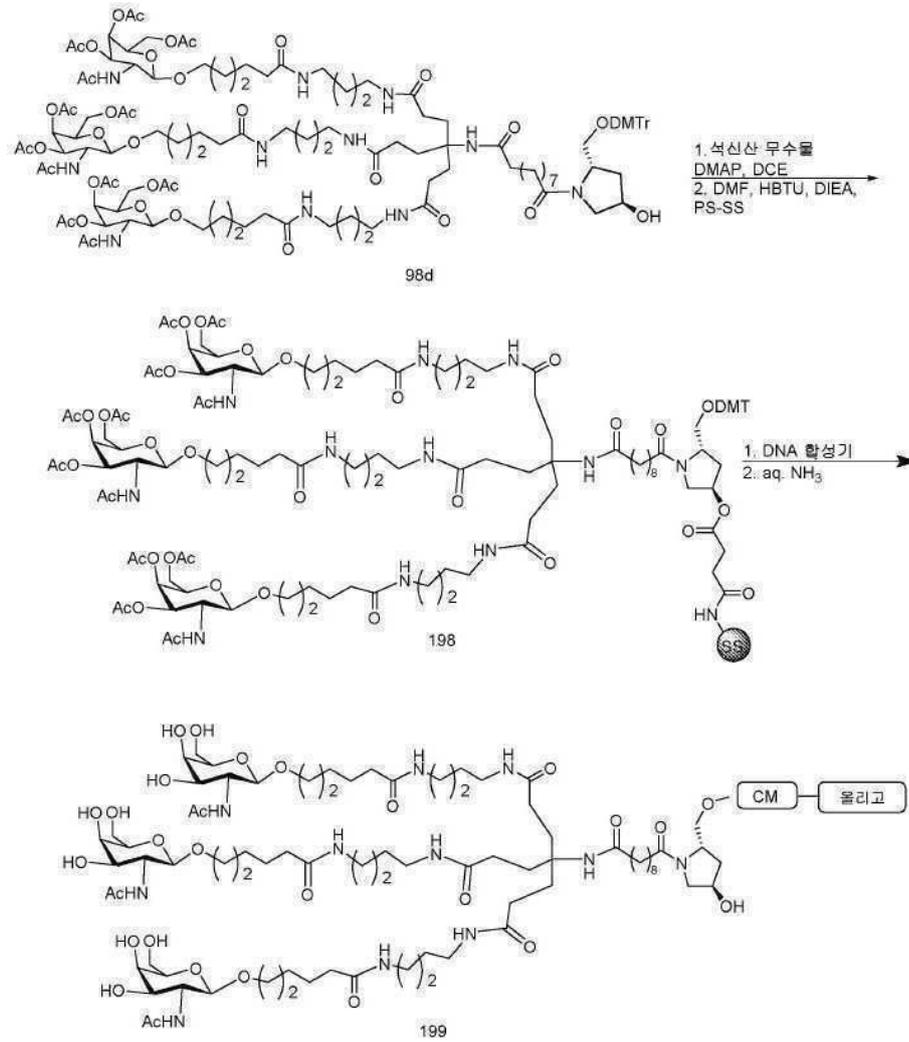
ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% 염수)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
염수	n/a	100.0	n/a	n/a
661161	0.5	87.8	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	61.3		
	5	33.8		
	15	14.0		
670699	0.5	89.4	GalNAc ₃ -3a	T _d
	1.5	59.4		
	5	31.3		
	15	17.1		
670700	0.5	79.0	GalNAc ₃ -3a	A _e
	1.5	63.3		
	5	32.8		
	15	17.9		
670701	0.5	79.1	GalNAc ₃ -3a	T _e
	1.5	59.2		
	5	35.8		
	15	17.7		
671165	0.5	76.4	GalNAc ₃ -13a	A _d
	1.5	43.2		
	5	22.6		
	15	10.0		

혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다. 총 빌리루빈 및 BUN가 또한 평가되었다. 체중의 변화는 염수 그룹으로부터 유의미한 차이 없이 평가되었다 (데이터 도시되지 않음). ALT, AST, 총 빌리루빈 및 BUN 값은 아래의 표 56에서 보여진다.

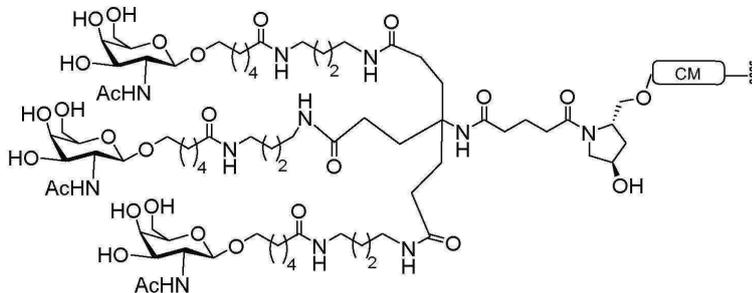
표 59

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	총 빌리루빈 (mg/dL)	BUN (mg/dL)	GalNAC ₃ 클러스터	CM
염수	n/a	24	64	0.2	31	n/a	n/a
661161	0.5	25	64	0.2	31	GalNAC ₃ -3a	A _d
	1.5	24	50	0.2	32		
	5	26	55	0.2	28		
	15	27	52	0.2	31		
670699	0.5	42	83	0.2	31	GalNAC ₃ -3a	T _d
	1.5	33	58	0.2	32		
	5	26	70	0.2	29		
	15	25	67	0.2	29		
670700	0.5	40	74	0.2	27	GalNAC ₃ -3a	A _e
	1.5	23	62	0.2	27		
	5	24	49	0.2	29		
	15	25	87	0.1	25		
670701	0.5	30	77	0.2	27	GalNAC ₃ -3a	T _e
	1.5	22	55	0.2	30		
	5	81	101	0.2	25		
	15	31	82	0.2	24		
671165	0.5	44	84	0.2	26	GalNAC ₃ -13a	A _d
	1.5	47	71	0.1	24		
	5	33	91	0.2	26		
	15	33	56	0.2	29		

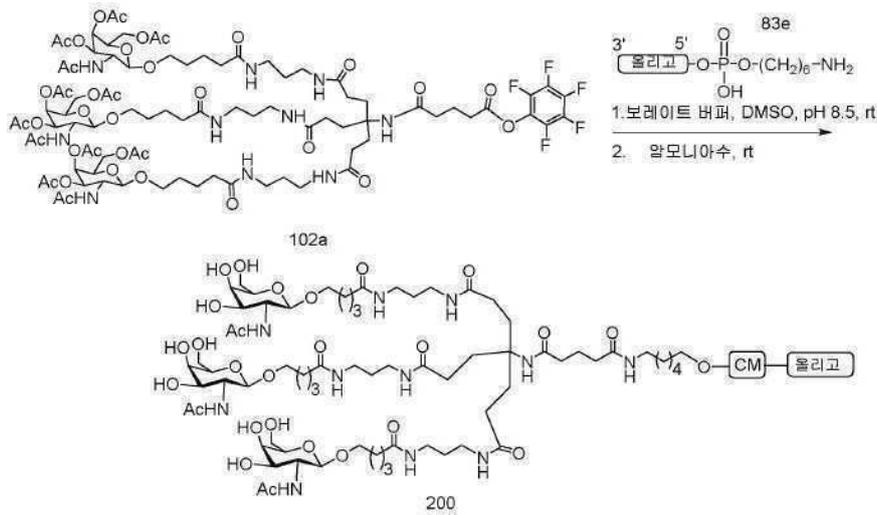
실시예 67: GalNAc₃-16을 포함하는 올리고머 화합물 199의 제조



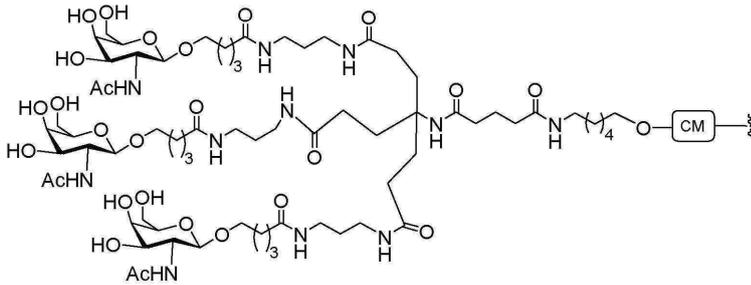
GalNAc₃-16 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 199는, 실시예 7 및 9에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 제조된다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-16 (GalNAc₃-16a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다. GalNAc₃-16 (GalNAc₃-16a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:



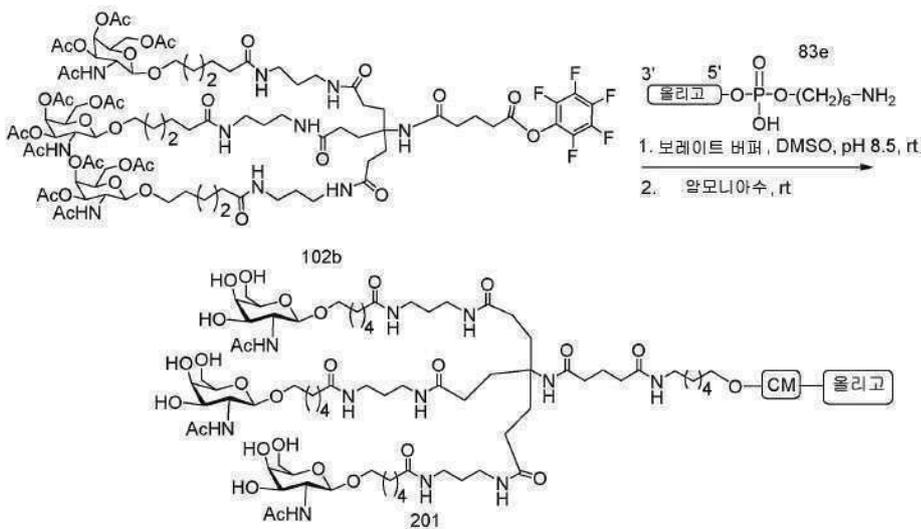
실시예 68: Ga1NAc₃-17을 포함하는 올리고머 화합물 200의 제조



Ga1NAc₃-17 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 200은, 실시예 46에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 제조되었다. 콘주게이트 그룹 Ga1NAc3-17 (Ga1NAc3-17a)의 Ga1NAc₃ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다. Ga1NAc₃-17 (Ga1NAc₃-17_a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:

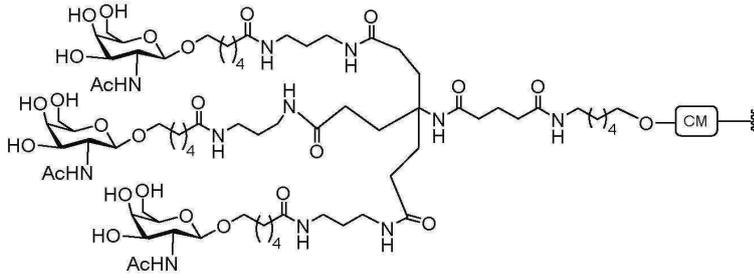


실시예 69: Ga1NAc₃-18을 포함하는 올리고머 화합물 201의 제조

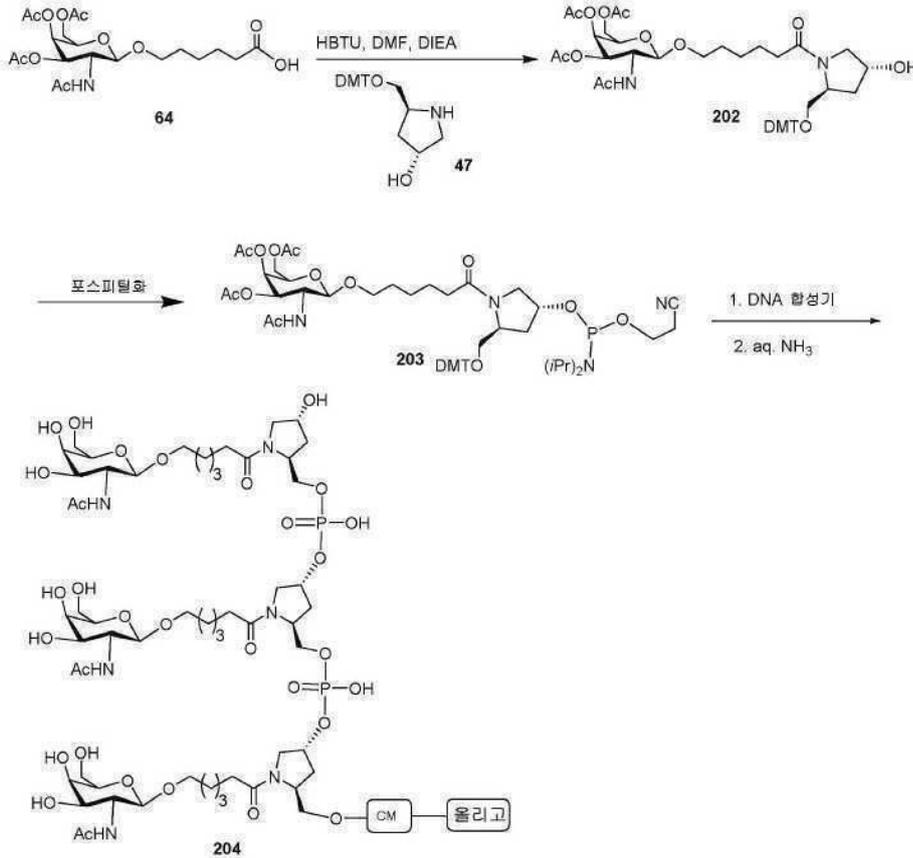


Ga1NAc₃-18 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 201은, 실시예 46에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 제조되었다. 콘주게이트 그룹 Ga1NAc3-18 (Ga1NAc3-18a)의 Ga1NAc₃ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-

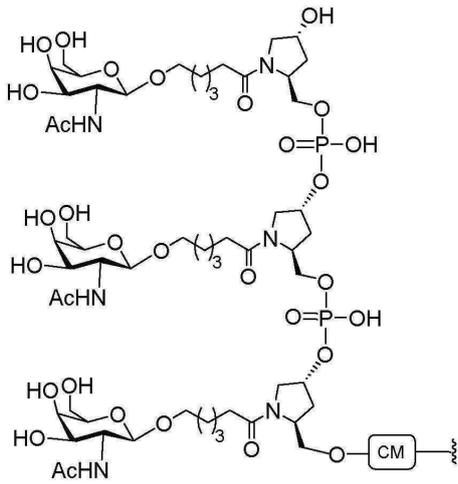
$A_4-P(=O)(OH)-$ 이다. $GalNAc_3-18$ ($GalNAc_3-18_a-CM-$)의 구조는 이하에서 보여진다:



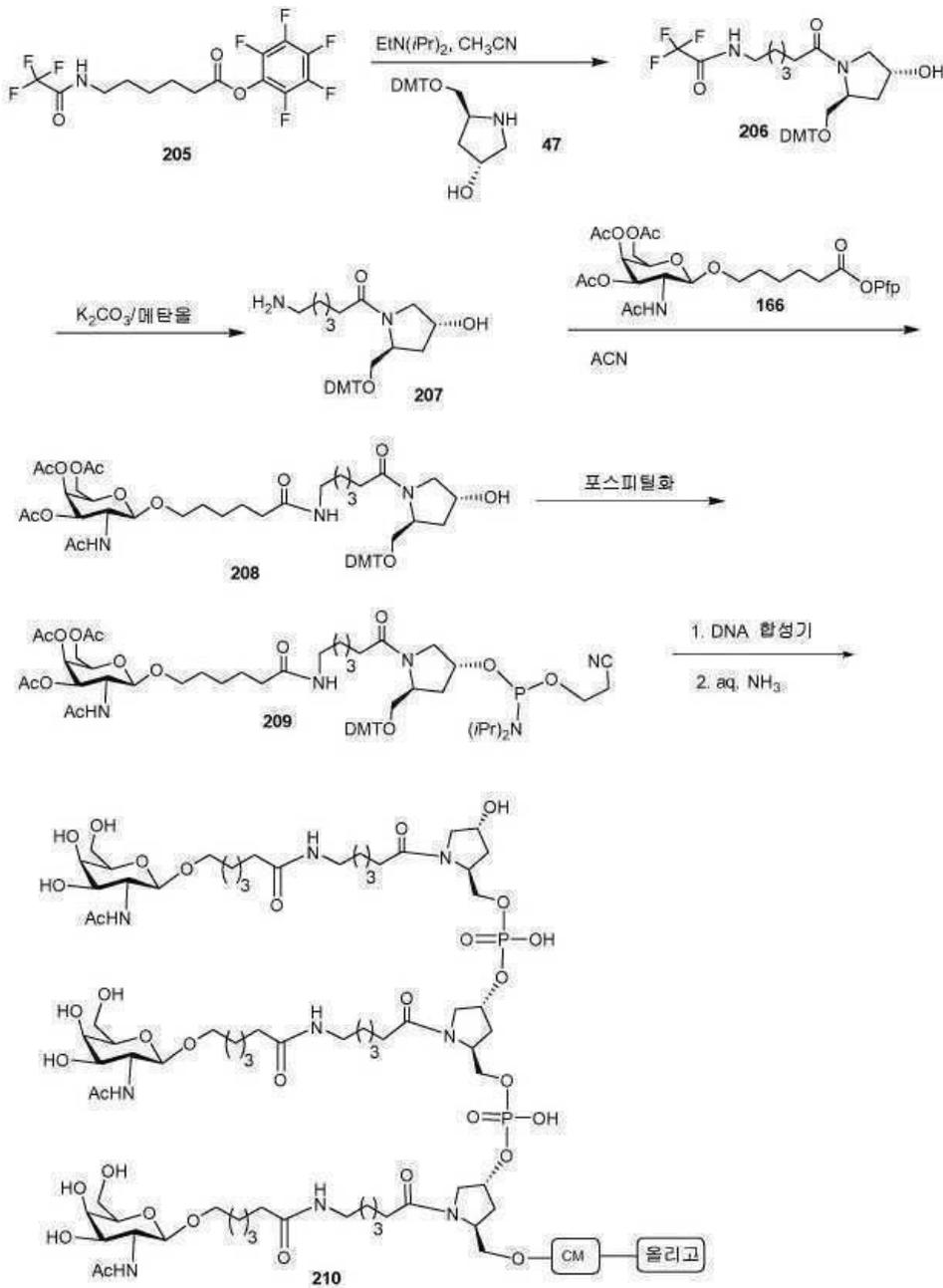
실시예 70: $GalNAc_3-19$ 을 포함하는 올리고머 화합물 204의 제조



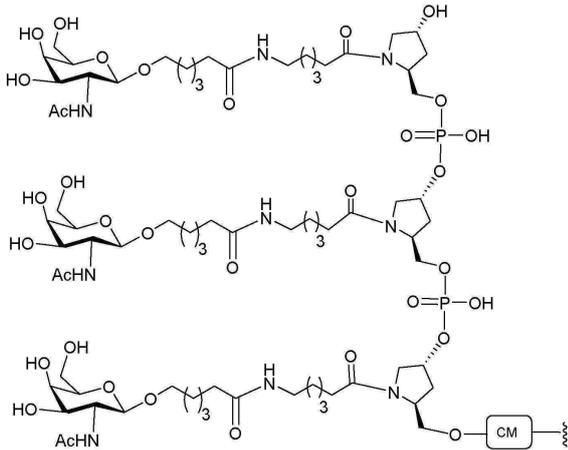
$GalNAc_3-19$ 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 204는, 실시예 52에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 화합물 64로부터 제조되었다. 콘주게이트 그룹 $GalNAc_3-19$ ($GalNAc_3-19a$)의 $GalNAc_3$ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 $-P(=O)(OH)-A_4-P(=O)(OH)-$ 이다. $GalNAc_3-19$ ($GalNAc_3-19_a-CM-$)의 구조는 이하에서 보여진다:



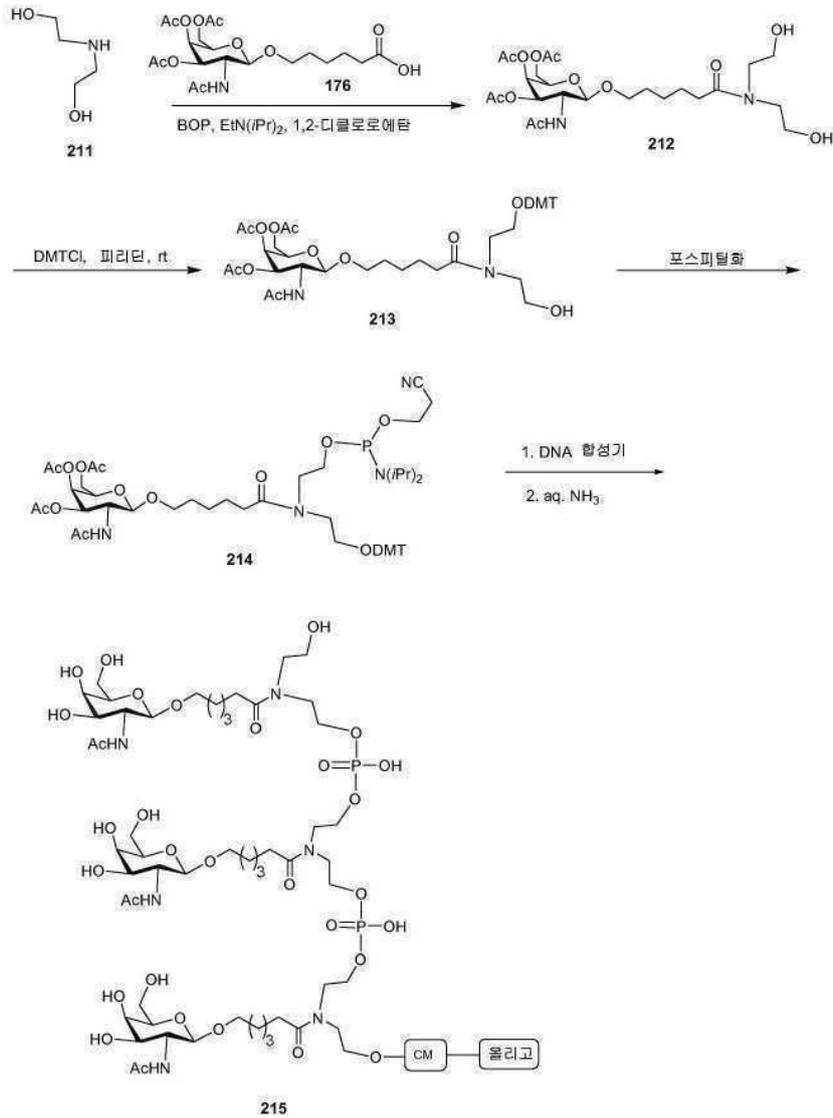
실시예 71: GalNAc₃-20을 포함하는 올리고머 화합물 210의 제조



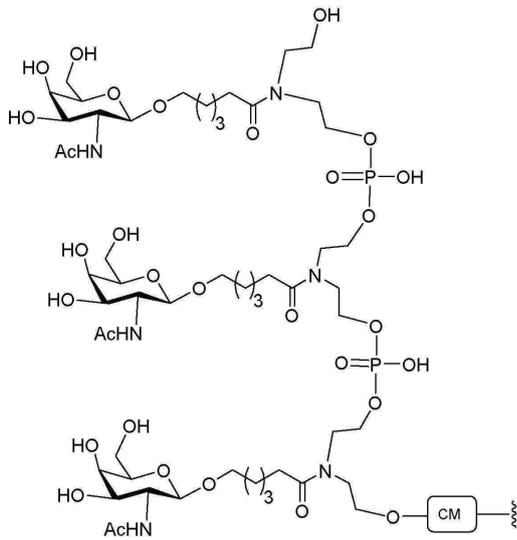
화합물 205를, 트리플릭산 무수물을 6-아미노헥산산에 부가하여 제조된 아세토니트릴에서 PFP-TFA 및 DIEA을 6-(2,2,2-트리플루오로아세트아미도)헥산산에 부가하여 제조했다. 반응 혼합물을 80 °C로 가열하고, 그 다음 실온으로 낮게 했다. Ga1Nac₃-20 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 210은, 실시예 52에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 화합물 208로부터 제조되었다. 콘주게이트 그룹 Ga1Nac3-20 (Ga1Nac3-20a)의 Ga1Nac₃ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다. Ga1Nac₃-20 (Ga1Nac₃-20_a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:



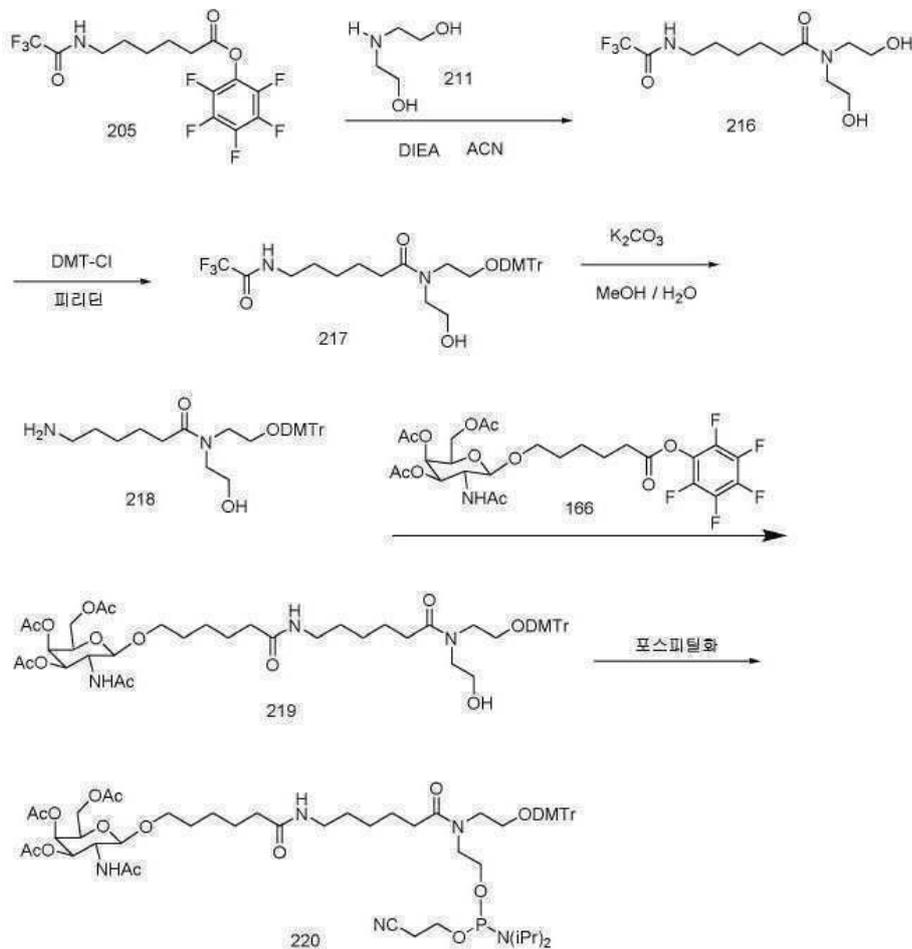
실시예 72: GalNAc₃-21을 포함하는 올리고머 화합물 215의 제조

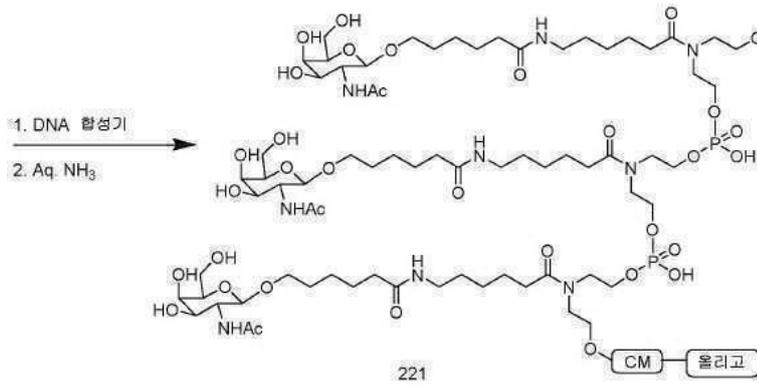


화합물 211는 시판되고 있다. GalNAc₃-21 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 215은, 실시예 52에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 화합물 213로부터 제조되었다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-21 (GalNAc₃-21_a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다. GalNAc₃-21 (GalNAc₃-21_a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:

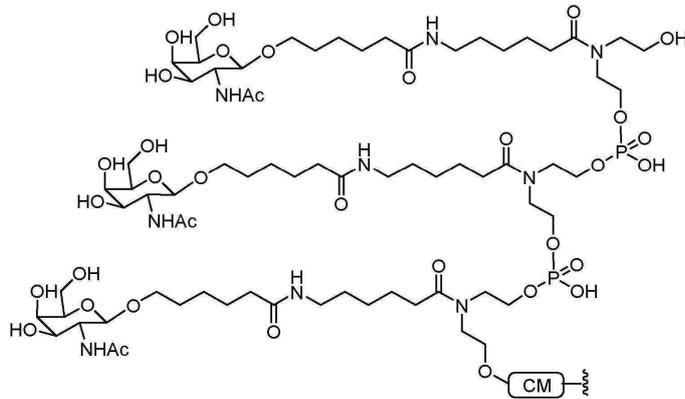


실시예 73: GalNAc₃-22을 포함하는 올리고머 화합물 221의 제조





화합물 220은 디이소프로필암모늄 테트라졸라이드를 사용하여 화합물 219로부터 제조되었다. GalNAc₃-21 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 221은, 실시예 52에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 화합물 220로부터 제조된다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-22 (GalNAc₃-22a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다. GalNAc₃-22 (GalNAc₃-22_a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:



실시예 74: 5'-GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제에 대한 다양한 절단가능 모이어티의 효과

아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다. 각각의 GalNAc₃ 콘주게이트 그룹은 각 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서 부착되었다.

표 60

SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
353382	G _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} ^m G _{es} ^m T _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} ^m T _{es} ^m G _{es} ^m A _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m	n/a	n/a	252
661161	GalNAc ₃ -3 _a -A _{do} G _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} ^m G _{es} ^m T _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} ^m T _{es} ^m G _{es} ^m A _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m G _{es} ^m A _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m	GalNAc ₃ -3a	A _d	254
666904	GalNAc ₃ -3 _a -G _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} ^m G _{es} ^m T _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} ^m T _{es} ^m G _{es} ^m A _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m	GalNAc ₃ -3a	PO	252
675441	GalNAc ₃ -17 _a -A _{do} G _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} ^m G _{es} ^m T _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} ^m T _{es} ^m G _{es} ^m A _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m	GalNAc ₃ -17a	A _d	254
675442	GalNAc ₃ -18 _a -A _{do} G _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} ^m G _{es} ^m T _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} ^m T _{es} ^m G _{es} ^m A _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m T _{es} ^m T _{es} ^m	GalNAc ₃ -18a	A _d	254

모든 표에서, 대문자는 각 뉴클레오타이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자:

"e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-17a의 구조는 실시예 68에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-18a의 구조는 실시예 69에서 보여졌다.

처리

6 내지 8 주령 C57BL/6 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 표 60에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 염수가 아래에서 보여진 복용량으로 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 아래의 결과는 염수 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

표 61에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다. GalNAc 콘주게이트를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사한 효능을 보여주었고 GalNAc 콘주게이트가 없는 모 올리고뉴클레오타이드보다 유의미하게 더 강했다.

표 61

SRB-1 mRNA (염수 %)

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% 염수)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
염수	n/a	100.0	n/a	n/a
353382	3	79.38	n/a	n/a
	10	68.67		
	30	40.70		
661161	0.5	79.18	GalNAc ₃ -3 _a	A _d
	1.5	75.96		
	5	30.53		
	15	12.52		
666904	0.5	91.30	GalNAc ₃ -3 _a	PO
	1.5	57.88		
	5	21.22		
	15	16.49		
675441	0.5	76.71	GalNAc ₃ -17a	A _d
	1.5	63.63		
	5	29.57		
	15	13.49		
675442	0.5	95.03	GalNAc ₃ -18a	A _d
	1.5	60.06		
	5	31.04		
	15	19.40		

혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다. 총 빌리루빈 및 BUN가 또한 평가되었다. 체중의 변화를 염수 그룹으로부터 유의미한 변화 없이 평가했다 (데이터 도시되지 않음). ALT, AST, 총 빌리루빈 및 BUN 값은 아래의 표 62에서 보여진다.

표 62

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	총 빌리루빈 (mg/dL)	BUN (mg/dL)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
염수	n/a	26	59	0.16	42	n/a	n/a
353382	3	23	58	0.18	39	n/a	n/a
	10	28	58	0.16	43		
	30	20	48	0.12	34		
661161	0.5	30	47	0.13	35	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	23	53	0.14	37		
	5	26	48	0.15	39		
	15	32	57	0.15	42		
666904	0.5	24	73	0.13	36	GalNAc ₃ -3a	PO
	1.5	21	48	0.12	32		
	5	19	49	0.14	33		
	15	20	52	0.15	26		
675441	0.5	42	148	0.21	36	GalNAc ₃ -17a	A _d
	1.5	60	95	0.16	34		
	5	27	75	0.14	37		
	15	24	61	0.14	36		
675442	0.5	26	65	0.15	37	GalNAc ₃ -18a	A _d
	1.5	25	64	0.15	43		
	5	27	69	0.15	37		
	15	30	84	0.14	37		

실시에 75: 5'-콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 약력학적 분석

상기 표 54, 57 및 60 중 ASO의 PK를, 실시에 65, 66, 및 74에서 기재된 처리 절차에 따라 수득된 간 샘플을 사용하여 평가했다. 간 샘플을 다지고 표준 프로토콜을 사용하여 추출하고 내부 표준과 함께 IP-HPLC-MS로 분석했다. 모든 대사물의 조합된 조직 수준 ($\mu\text{g/g}$)은 적절한 UV 피크를 통합하여 측정되었고, (이 경우에 Isis 번호 353382인 "모") 콘주게이트를 누락한 전장 ASO의 조직 수준을 적절한 추출된 이온 크로마토그램 (EIC)를 사용하여 측정했다.

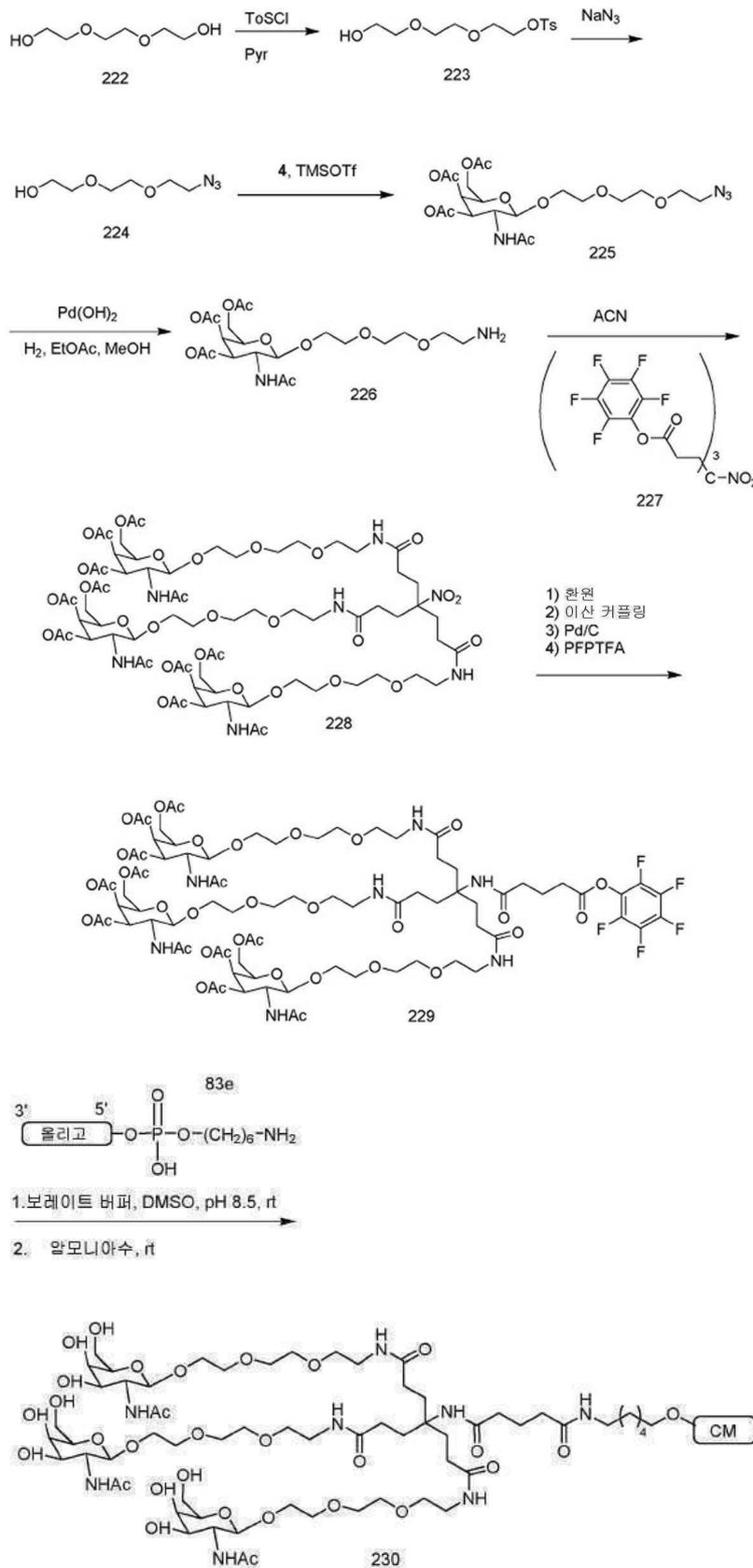
표 63

간 중 PK 분석

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	UV에 의한 총 조직 수준 (µg/g)	EIC에 의한 모 ASO 조직 수준 (µg/g)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
353382	3	8.9	8.6	n/a	n/a
	10	22.4	21.0		
	30	54.2	44.2		
661161	5	32.4	20.7	GalNAc ₃ -3a	A _d
	15	63.2	44.1		
671144	5	20.5	19.2	GalNAc ₃ -12a	A _d
	15	48.6	41.5		
670061	5	31.6	28.0	GalNAc ₃ -13a	A _d
	15	67.6	55.5		
671261	5	19.8	16.8	GalNAc ₃ -14a	A _d
	15	64.7	49.1		
671262	5	18.5	7.4	GalNAc ₃ -15a	A _d
	15	52.3	24.2		
670699	5	16.4	10.4	GalNAc ₃ -3a	T _d
	15	31.5	22.5		
670700	5	19.3	10.9	GalNAc ₃ -3a	A _e
	15	38.1	20.0		
670701	5	21.8	8.8	GalNAc ₃ -3a	T _e
	15	35.2	16.1		
671165	5	27.1	26.5	GalNAc ₃ -13a	A _d
	15	48.3	44.3		
666904	5	30.8	24.0	GalNAc ₃ -3a	PO
	15	52.6	37.6		
675441	5	25.4	19.0	GalNAc ₃ -17a	A _d
	15	54.2	42.1		
675442	5	22.2	20.7	GalNAc ₃ -18a	A _d
	15	39.6	29.0		

상기 표 63의 결과는, 특히 GalNAc₃ 콘주게이트 그룹의 유무에 따라 올리고뉴클레오타이드 사이의 복용의 차이를 고려할 때, 올리고뉴클레오타이드 투여 72 시간 후에 GalNAc₃ 콘주게이트 그룹 (ISIS 353382)를 포함하지 않는 모 올리고뉴클레오타이드보다 GalNAc₃ 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 간 조직 수준이 더 크다는 것을 보여준다. 더욱이, 72 시간까지, GalNAc₃ 콘주게이트 그룹을 포함하는 각 올리고뉴클레오타이드의 40-98%는 대사작용되어 모 화합물을 얻었고, 이것은, GalNAc₃ 콘주게이트 그룹이 올리고뉴클레오타이드로부터 절단되었다는 것을 나타낸다.

실시예 76: GaINAc₃-23을 포함하는 올리고머 화합물 230의 제조

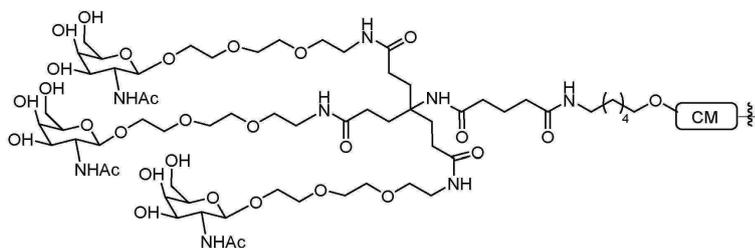


화합물 222는 시판되고 있다. 44.48 ml (0.33 mol)의 화합물 222를 피리딘 (500mL) 중 토실 클로라이드 (25.39 g, 0.13 mol)로 16 시간 동안 처리했다. 그 다음 반응을 증발시켜 오일을 얻고, EtOAc에서 용해시키고 물, 포화 NaHCO₃, 염수로 세정하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 에틸 아세테이트를 농축 건조하고 칼럼 크로마토그래피로

정제하고, EtOAc/헥산 (1:1) 그 다음 CH_2Cl_2 중 10% 메탄올로 용출하여 화합물 223을 무색 오일로서 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 10 g (32.86 mmol)의 1-토실트리에틸렌 글리콜 (화합물 223)을 DMSO (100mL) 중 아지드화나트륨 (10.68 g, 164.28 mmol)로 실온에서 17 시간 동안 처리했다. 그 다음 반응 혼합물을 물에 붓고, EtOAc로 추출했다. 유기 층을 물로 3 회 세정하고 Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 유기 층을 농축 건조하여 5.3g 의 화합물 224 (92%)을 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 1-아지도트리에틸렌 글리콜 (화합물 224, 5.53 g, 23.69 mmol) 및 화합물 4 (6 g, 18.22 mmol)을 4A 분자체 (5g), 및 디클로로메탄 (100mL) 중 TMSOTf (1.65 ml, 9.11 mmol)로 불활성 분위기 하에서 처리했다. 14 시간 후, 반응을 여과하여 체를 제거하고, 유기 층을 포화 NaHCO_3 , 물, 염수로 세정하고, Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 유기 층을 농축 건조하고 칼럼 크로마토그래피로 정제하고, 디클로로메탄 중 2 내지 4% 메탄올의 구배로 용출하여 화합물 225를 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 화합물 225 (11.9 g, 23.59 mmol)을 펠만 촉매 상에서 EtOAc/메탄올 (4:1, 250mL)에서 수소첨가했다. 8 시간 후, 촉매를 여과로 제거하고 용매를 제거하고 건조시켜 화합물 226을 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다.

화합물 227를 산출하기 위해, DMF (100mL) 중 니트로메탄트리스프로피온산 (4.17 g, 15.04 mmol) 및 휘니그 염기 (10.3 ml, 60.17 mmol)의 용액을 펜타플루오로트리플루오로 아세테이트 (9.05 ml, 52.65 mmol)로 적가 처리했다. 30 분 후, 반응을 빙수에 붓고 EtOAc로 추출했다. 유기 층을 물, 염수로 세정하고, Na_2SO_4 상에서 건조했다. 유기 층을 농축 건조하고 그 다음 헵탄으로부터 재결정화하여 화합물 227을 백색 고형물로서 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 화합물 227(1.5 g, 1.93 mmol) 및 화합물 226 (3.7 g, 7.74 mmol)을 실온에서 아세토니트릴 (15 mL)에서 2 시간 동안 교반했다. 그 다음 반응을 증발 건조하고 디클로로메탄 중 2 내지 10% 메탄올의 구배로 용출하는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 228을 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 화합물 228 (1.7 g, 1.02 mmol)을 에탄올 (100mL) 중 라니 니켈 (약 2g 습성)로 수소의 분위기에서 처리했다. 12 시간 후, 촉매를 여과로 제거하고 유기 층을 증발시켜 고형물을 얻었고, 이것을 직접적으로 다음 단계에서 사용했다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 이러한 고형물 (0.87 g, 0.53 mmol)을 DMF (5mL) 중 벤질글루타르산 (0.18 g, 0.8 mmol), HBTU (0.3 g, 0.8 mmol) 및 DIEA (273.7 μl , 1.6 mmol)로 처리했다. 16 시간 후, DMF 를 감압 하에서 65°C에서 제거하여 오일을 얻었고, 오일을 디클로로메탄에서 용해시켰다. 유기 층을 포화 NaHCO_3 , 염수로 세정하고, Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 유기 층의 증발 후, 화합물을 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 디클로로메탄 중 2 내지 20% 메탄올의 구배로 용출하여 커플링된 생성물을 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 벤질 에스테르를 수소 분위기 하에서 1 시간 동안 펠만 촉매로 탈보호했다. 그 다음 촉매를 여과로 제거하고 용매를 제거하고 건조시켜 산을 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 산 (486 mg, 0.27 mmol)을 건조 DMF (3 mL)에서 용해시켰다. 피리딘(53.61 μl , 0.66 mmol)을 부가하고 반응을 아르곤으로 퍼지했다. 펜타플루오로트리플루오로 아세테이트 (46.39 μl , 0.4 mmol)을 반응 혼합물에 서서히 부가했다. 반응의 색상은 담황색에서 암적색으로 변했고, 열은 연기가 생겼고, 이것을 아르곤의 스트림으로 없앴다. 반응을 실온에서 1 시간 동안 교반되도록 했다 (반응의 완료는 LCMS으로 확인되었다). 용매를 감압 (회전증발기) 하에서 70 °C에서 제거했다. 잔류물을 DCM으로 희석하고 1N NaHSO_4 , 염수로 세정하고, 포화된 중탄산나트륨 및 염수로 다시 세정했다. 유기물을 Na_2SO_4 상에서 건조하고, 여과하고, 농축 건조하여 225 mg의 화합물 229를 잘 부서지는 황색 폼으로서 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다.

GalNAc₃-23 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 230은, 실시예 46에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 화합물 229로부터 제조되었다. GalNAc₃-23 콘주게이트 그룹 (GalNAc₃-23_a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. GalNAc₃-23 (GalNAc₃-23_a-CM)의 구조는 이하에서 보여진다:



실시예 77: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제

아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

표 64

SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
661161	GalNAc ₃ -3a ^o -A _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} G ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} T ^m _{es} G ^m _{es} A ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es}	GalNAc ₃ -3a	A _d	254
666904	GalNAc ₃ -3a ^o -G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} G ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} T ^m _{es} G ^m _{es} A ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es}	GalNAc ₃ -3a	PO	252
673502	GalNAc ₃ -10a ^o -A _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} G ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} T ^m _{es} G ^m _{es} A ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es}	GalNAc ₃ -10a	A _d	254
677844	GalNAc ₃ -9a ^o -A _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} G ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} T ^m _{es} G ^m _{es} A ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es}	GalNAc ₃ -9a	A _d	254
677843	GalNAc ₃ -23a ^o -A _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} G ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} T ^m _{es} G ^m _{es} A ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es}	GalNAc ₃ -23a	A _d	254
655861	G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} G ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} T ^m _{es} G ^m _{es} A ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} A _{do} -GalNAc ₃ -1a	GalNAc ₃ -1a	A _d	253
677841	G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} G ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} T ^m _{es} G ^m _{es} A ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} A _{do} -GalNAc ₃ -19a	GalNAc ₃ -19a	A _d	253
677842	G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} G ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} T ^m _{es} G ^m _{es} A ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} A _{do} -GalNAc ₃ -20a	GalNAc ₃ -20a	A _d	253

GalNAc₃-1a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-3a의 구조는 실시예 39에서 보여졌고, GalNAc₃-9a의 구조는 실시예 52에서 보여졌고, GalNAc₃-10a의 구조는 실시예 46에서 보여졌고, GalNAc₃-19a의 구조는 실시예 70에서 보여졌고, GalNAc₃-20a의 구조는 실시예 71에서 보여졌고, GalNAc₃-23a의 구조는 실시예 76에서 보여졌다.

처리

6 내지 8 주령 C57BL/6 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 각각에게 아래에서 보여진 복용량으로 표 64에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 염수가 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 아래의 결과는 염수 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

표 65에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다.

표 65

SRB-1 mRNA (% 염수)

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% 염수)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
염수	n/a	100.0	n/a	n/a
661161	0.5	89.18	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	77.02		
	5	29.10		
	15	12.64		
666904	0.5	93.11	GalNAc ₃ -3a	PO
	1.5	55.85		
	5	21.29		
	15	13.43		
673502	0.5	77.75	GalNAc ₃ -10a	A _d
	1.5	41.05		
	5	19.27		
	15	14.41		
677844	0.5	87.65	GalNAc ₃ -9a	A _d
	1.5	93.04		
	5	40.77		
	15	16.95		
677843	0.5	102.28	GalNAc ₃ -23a	A _d
	1.5	70.51		
	5	30.68		
	15	13.26		
655861	0.5	79.72	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1.5	55.48		
	5	26.99		
	15	17.58		
677841	0.5	67.43	GalNAc ₃ -19a	A _d
	1.5	45.13		
	5	27.02		
	15	12.41		
677842	0.5	64.13	GalNAc ₃ -20a	A _d
	1.5	53.56		
	5	20.47		
	15	10.23		

혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 또한 측정되었다. 총 빌리루빈 및 BUN가 또한 평가되었다. 체중의 변화가 평가되었고, 염수 그룹으로부터 유의미한 변화는 없었다 (데이터 도시되지 않음). ALT, AST, 총 빌리루빈 및 BUN 값은 아래의 표 66에서 보여진다.

표 66

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	총 빌리루빈 (mg/dL)	BUN (mg/dL)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
염수	n/a	21	45	0.13	34	n/a	n/a
661161	0.5	28	51	0.14	39	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	23	42	0.13	39		
	5	22	59	0.13	37		
	15	21	56	0.15	35		
666904	0.5	24	56	0.14	37	GalNAc ₃ -3a	PO
	1.5	26	68	0.15	35		
	5	23	77	0.14	34		
	15	24	60	0.13	35		
673502	0.5	24	59	0.16	34	GalNAc ₃ -10a	A _d
	1.5	20	46	0.17	32		
	5	24	45	0.12	31		
	15	24	47	0.13	34		
677844	0.5	25	61	0.14	37	GalNAc ₃ -9a	A _d
	1.5	23	64	0.17	33		
	5	25	58	0.13	35		
	15	22	65	0.14	34		
677843	0.5	53	53	0.13	35	GalNAc ₃ -23a	A _d
	1.5	25	54	0.13	34		
	5	21	60	0.15	34		
	15	22	43	0.12	38		
655861	0.5	21	48	0.15	33	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1.5	28	54	0.12	35		
	5	22	60	0.13	36		
	15	21	55	0.17	30		
677841	0.5	32	54	0.13	34	GalNAc ₃ -19a	A _d
	1.5	24	56	0.14	34		
	5	23	92	0.18	31		
	15	24	58	0.15	31		
677842	0.5	23	61	0.15	35	GalNAc ₃ -20a	A _d
	1.5	24	57	0.14	34		

	5	41	62	0.15	35		
	15	24	37	0.14	32		

실시예 78: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 안지오텐시노제를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체 내 안티센스 억제

아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 정상혈압 스프레그 다우리 랫트에서 안지오텐시노젠 (AGT)의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

표 67

AGT을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
552668	${}^mC_{es}A_{es}{}^mC_{es}T_{es}G_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}A_{es}G_{es}$ $G_{es}A_{es}T_{es}$	n/a	n/a	258
669509	${}^mC_{es}A_{es}{}^mC_{es}T_{es}G_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}A_{es}G_{es}$ $G_{es}A_{es}T_{es}A_{do}$ -GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	259

GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다.

처리

6 주령, 수컷 스프래그 다우리 랫트 각각에게 피하로 주당 1회 아래에서 보여진 복용량으로, 총 3 회 용량 동안, 표 67에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS가 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 랫트는 최종 용량 후 72 시간에 희생되었다. AGT 간 mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 측정되었다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). AGT 혈장 단백질 수준은 총 안지오텐시노겐 ELISA (카탈로그 # JP27412, IBL International, Toronto, ON)을 1:20,000 희석된 혈장과 함께 사용하여 측정되었다. 아래의 결과는 간에서 AGT mRNA 수준 또는 PBS 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹의 혈장에서 AGT 단백질 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

표 68에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 AGT 간 mRNA 및 혈장 단백질 수준을 낮게 했고, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트가 없는 모 올리고뉴클레오타이드 보다 유의미하게 더 강했다.

표 68

AGT 간 mRNA 및 혈장 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	AGT 간 mRNA (% PBS)	AGT 혈장 단백질 (% PBS)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a
552668	3	95	122	n/a	n/a
	10	85	97		
	30	46	79		
	90	8	11		
669509	0.3	95	70	GalNAc ₃ -1 _a	A _d
	1	95	129		
	3	62	97		
	10	9	23		

혈장 및 체중 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 또한 표준 프로토콜을 사용하여 희생 시에 측정되었다. 결과는 아래의 표 69에서 보여준다.

표 69

간 아미노기전달효소 수준 및 랫트 체중

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	체중 (기준선의 %)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
PBS	n/a	51	81	186	n/a	n/a
552668	3	54	93	183	n/a	n/a
	10	51	93	194		
	30	59	99	182		
	90	56	78	170		
	0.3	53	90	190		
669509	1	51	93	192	GalNAc ₃ -1 _a	A _d
	3	48	85	189		
	10	56	95	189		

실시예 79: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 ApoC-III을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드의 생체내 작용의 지속시간

아래의 표 70에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 작용의 지속시간에 대한 단회 용량 연구에서 시험되었다.

표 70

APOC-III을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	n/a	n/a	244
647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _{es} A _{do} -GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	245
663083	GalNAc ₃ -3 _a ·A _{do} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -3 _a	A _d	260
674449	GalNAc ₃ -7 _a ·A _{do} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -7 _a	A _d	260
674450	GalNAc ₃ -10 _a ·A _{do} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -10 _a	A _d	260
674451	GalNAc ₃ -13 _a ·A _{do} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -13 _a	A _d	260

GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다, GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌고, GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌고, GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 보여졌고, GalNAc₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 보여졌다.

처리

인간 APOC-III을 발현시키는 6 내지 8 주령 이식유전자 마우스 각각에게 표 70에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS가 피하로 1 회 주입되었다. 각각의 처리 그룹은 3 마리의 동물로 구성되었다. 복용 전에 채혈하여 기준선을 결정하고 복용 후 72 시간, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 및 6 주에서 결정했다. 혈장 트리글리세라이드 및 APOC-III 단백질 수준은 실시예 20에서 기재된 바와 같이 측정되었다. 아래의 결과는 기준선 수준에 대해 정규화된 각 처리 그룹의 혈장 트리글리세라이드 및 APOC-III 수준의 평균 퍼센트로서 나타내고, 이것은, GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드가, 모의 복용량이 GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 복용량의 3 배일지라도, 콘주게이트 그룹 (ISIS 304801)가 없는 모 올리고뉴클레오타이드보다 더 긴 작용의 지속시간을 나타낸다는 것을 보여준다.

표 71

이식유전자 마우스 중 혈장 트리글리세라이드 및 APOC-III 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	시점 (복용후 일수)	트리글리세라이드 (% 기준선)	APOC-III 단백질 (% 기준선)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
PBS	n/a	3	97	102	n/a	n/a
		7	101	98		
		14	108	98		
		21	107	107		
		28	94	91		
		35	88	90		
		42	91	105		
304801	30	3	40	34	n/a	n/a
		7	41	37		
		14	50	57		
		21	50	50		
		28	57	73		
		35	68	70		
		42	75	93		
647535	10	3	36	37	GalNAc ₃ -1a	A _d
		7	39	47		
		14	40	45		
		21	41	41		
		28	42	62		
		35	69	69		
		42	85	102		
663083	10	3	24	18	GalNAc ₃ -3a	A _d
		7	28	23		
		14	25	27		
		21	28	28		
		28	37	44		
		35	55	57		
		42	60	78		
674449	10	3	29	26	GalNAc ₃ -7a	A _d
		7	32	31		
		14	38	41		
		21	44	44		

		28	53	63		
		35	69	77		
		42	78	99		
674450	10	3	33	30	GalNAc ₃ -10a	A _d
		7	35	34		
		14	31	34		
		21	44	44		
		28	56	61		
		35	68	70		
		42	83	95		
674451	10	3	35	33	GalNAc ₃ -13a	A _d
		7	24	32		
		14	40	34		
		21	48	48		
		28	54	67		
		35	65	75		
		42	74	97		

실시예 80: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 알파-1 항트립신 (A1AT)를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에

의한 생체내 안티센스 억제

아래의 표 72에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 A1AT의 용량-의존적 억제에 대한 연구에서 시험되었다.

표 72

A1AT을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
476366	A ^m C ^{es} C ^m C ^{es} A ^{es} A ^{ds} T ^{ds} T ^{ds} C ^{ds} A ^{ds} G ^{ds} A ^{ds} A ^{ds} G ^{ds} G ^{ds} A ^{es} A ^{es} G ^{es} G ^{es} A ^e	n/a	n/a	261
656326	A ^m C ^{es} C ^m C ^{es} A ^{es} A ^{ds} T ^{ds} T ^{ds} C ^{ds} A ^{ds} G ^{ds} A ^{ds} A ^{ds} G ^{ds} G ^{ds} A ^{es} A ^{es} G ^{es} G ^{es} A ^{es} A ^{ds} GalNAc₃-1_a	GalNAc ₃ -1a	A _d	262
678381	GalNAc₃-3_a A ^m C ^{es} C ^m C ^{es} A ^{es} A ^{ds} T ^{ds} T ^{ds} C ^{ds} A ^{ds} G ^{ds} A ^{ds} A ^{ds} G ^{ds} G ^{ds} A ^{es} A ^{es} G ^{es} G ^{es} A ^e	GalNAc ₃ -3a	A _d	263
678382	GalNAc₃-7_a A ^m C ^{es} C ^m C ^{es} A ^{es} A ^{ds} T ^{ds} T ^{ds} C ^{ds} A ^{ds} G ^{ds} A ^{ds} A ^{ds} G ^{ds} G ^{ds} A ^{es} A ^{es} G ^{es} G ^{es} A ^e	GalNAc ₃ -7a	A _d	263
678383	GalNAc₃-10_a A ^m C ^{es} C ^m C ^{es} A ^{es} A ^{ds} T ^{ds} T ^{ds} C ^{ds} A ^{ds} G ^{ds} A ^{ds} A ^{ds} G ^{ds} G ^{ds} A ^{es} A ^{es} G ^{es} G ^{es} A ^e	GalNAc ₃ -10a	A _d	263
678384	GalNAc₃-13_a A ^m C ^{es} C ^m C ^{es} A ^{es} A ^{ds} T ^{ds} T ^{ds} C ^{ds} A ^{ds} G ^{ds} A ^{ds} A ^{ds} G ^{ds} G ^{ds} A ^{es} A ^{es} G ^{es} G ^{es} A ^e	GalNAc ₃ -13a	A _d	263

GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다, GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌고, GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌고, GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 보여졌고, GalNAc₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 보여졌다.

처리

6 주령, 수컷 C57BL/6 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 각각에게 피하로 주당 1회 아래에서 보여진 복용량으로, 총 3 회 용량 동안, 표 72에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS가 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 72 시간 후에 희생되었다. A1AT 간 mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 측정되었다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). A1AT 혈장 단백질 수준은 마우스 알파 1-항트립신 ELISA을 사용하여 결정되었다 (카탈로그 # 41-A1AMS-E01, Alpco, Salem, NH). 아래의 결과는 PBS 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 A1AT 간 mRNA 및 혈장 단백질 수준의 평균 퍼센트로부터 나타낸다.

표 73에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 A1AT 간 mRNA 및 A1AT 혈장 단백질 수준을 낮게 했다. GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 모 (ISIS 476366)보다 유의미하게 더 강했다.

표 73

A1AT 간 mRNA 및 혈장 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	A1AT 간 mRNA (% PBS)	A1AT 혈장 단백질 (% PBS)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a
476366	5	86	78	n/a	n/a
	15	73	61		
	45	30	38		
656326	0.6	99	90	GalNAc ₃ -1a	A _d
	2	61	70		
	6	15	30		
	18	6	10		
678381	0.6	105	90	GalNAc ₃ -3a	A _d
	2	53	60		
	6	16	20		
	18	7	13		
678382	0.6	90	79	GalNAc ₃ -7a	A _d
	2	49	57		
	6	21	27		
	18	8	11		
678383	0.6	94	84	GalNAc ₃ -10a	A _d
	2	44	53		
	6	13	24		
	18	6	10		
678384	0.6	106	91	GalNAc ₃ -13a	A _d
	2	65	59		
	6	26	31		
	18	11	15		

혈장 중 간 아미노기전달효소 및 BUN 수준은 표준 프로토콜을 사용하여 희생 시에 측정되었다. 체중 및 장기 중량이 또한 측정되었다. 결과는 아래의 표 74에서 보여진다. 체중은 기준선에 대한 %로서 보여진다. 장기 중량은 PBS 대조군 그룹에 대한 체중의 %로서 보여진다.

표 74

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	체중 (% 기준선)	간 중량 (Rel % BW)	신장 중량 (Rel % BW)	비장 중량 (Rel % BW)
PBS	n/a	25	51	37	119	100	100	100
476366	5	34	68	35	116	91	98	106
	15	37	74	30	122	92	101	128
	45	30	47	31	118	99	108	123
656326	0.6	29	57	40	123	100	103	119
	2	36	75	39	114	98	111	106
	6	32	67	39	125	99	97	122
	18	46	77	36	116	102	109	101
678381	0.6	26	57	32	117	93	109	110
	2	26	52	33	121	96	106	125
	6	40	78	32	124	92	106	126
	18	31	54	28	118	94	103	120
678382	0.6	26	42	35	114	100	103	103
	2	25	50	31	117	91	104	117
	6	30	79	29	117	89	102	107
	18	65	112	31	120	89	104	113
678383	0.6	30	67	38	121	91	100	123
	2	33	53	33	118	98	102	121
	6	32	63	32	117	97	105	105
	18	36	68	31	118	99	103	108
678384	0.6	36	63	31	118	98	103	98
	2	32	61	32	119	93	102	114
	6	34	69	34	122	100	100	96
	18	28	54	30	117	98	101	104

실시예 81: GalNAc₃ 클러스터를 포함하는 A1AT를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드의 생체내 작용의 지속시간

표 72에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 작용의 지속시간에 대한 단회 용량 연구에서 시험되었다.

처리

6 주령, 수컷 C57BL/6 마우스 각각에게 표 72에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS를 피하로 1 회 주입했다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 혈액을 복용 전날에 취하여 기준선을 결정했고 복용 후 5, 12, 19, 및 25 일에서 결정했다. 혈장 A1AT 단백질 수준은 ELISA를 통해 측정되었다 (참고 실시예 80). 아래의 결과는 기준선 수준에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 혈장 A1AT 단백질 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다. 이 결과는, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 더 강했고 GalNAc 콘주게이트 (ISIS 476366) 없는 모보다 더 긴 작용의 지속시간을 가졌다는 것을 보여준다. 더욱이, 5'-GalNAc 콘주게이트 (ISIS 678381, 678382, 678383, 및 678384)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 3'-GalNAc 콘주게이트 (ISIS 656326)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드보다 더욱 더 긴 작용의 지속시간과 함께 일반적으로 더욱 더 강했다.

표 75

마우스 중 혈장 A1AT 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	시점 (복용후 일수)	A1AT (% 기준선)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
PBS	n/a	5	93	n/a	n/a
		12	93		
		19	90		
		25	97		
476366	100	5	38	n/a	n/a
		12	46		
		19	62		
		25	77		
656326	18	5	33	GalNAc ₃ -1a	A _d
		12	36		
		19	51		
		25	72		
678381	18	5	21	GalNAc ₃ -3a	A _d
		12	21		
		19	35		
		25	48		
678382	18	5	21	GalNAc ₃ -7a	A _d
		12	21		
		19	39		
		25	60		
678383	18	5	24	GalNAc ₃ -10a	A _d
		12	21		
		19	45		
		25	73		
678384	18	5	29	GalNAc ₃ -13a	A _d
		12	34		
		19	57		
		25	76		

실시예 82: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 시험관내 안티센스 억제

일차 마우스 간 간세포는 96 웰 플레이트에서 15,000 세포/웰에서 처리 2시간 전에 씨딩되었다. 표 76에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 2, 10, 50, 또는 250 nM에서 Williams E 배지에서 부가되었고 세포는 밤새 37 °C에서 5% CO₂에서 인큐베이션되었다. 세포는 올리고뉴클레오타이드 부가 다음 16 시간 동안 용해되었고, 총 RNA는 RNease 3000 BioRobot (Qiagen)를 사용하여 정제되었다. SRB-1 mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 측정되었다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). IC₅₀ 값은 Prism 4 소프트웨어 (GraphPad)를 사용하여 측정되었다. 이 결과는, 다양한 상이한 GalNAc 콘주게이트 그룹 및 다양한 상이한 절단가능 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 GalNAc 콘주게이트 그룹 (ISIS 353382 및 666841)이 없는 모 올리고뉴클레오타이드보다 시험관내 유리 흡수 실험에서 유의미하게 더 강하다는 것을 보여준다.

표 76

시험관내 SRB-1 발현의 억제

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	연결	GalNac 클러스티	CM	IC ₅₀ (nM)	서열번호
353382	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m$ $C_{ds} T_{ds} T_{es} C_{es} C_{es} T_{es} T_e$	PS	n/a	n/a	250	252
655861	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m$ $C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} - GalNac_3-1_a$	PS	GalNac ₃ -1 _a	A _d	40	253
661161	GalNac₃-3_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es} C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNac ₃ -3 _a	A _d	40	254
661162	GalNac₃-3_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo} C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_e$	PO/PS	GalNac ₃ -3 _a	A _d	8	254
664078	$C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m$ $C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} - GalNac_3-9_a$	PS	GalNac ₃ -9 _a	A _d	20	253
665001	GalNac₃-8_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNac ₃ -8 _a	A _d	70	254
666224	GalNac₃-5_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNac ₃ -5 _a	A _d	80	254
666841	$G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m$ $C_{ds} T_{ds} T_{eo} C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_e$	PO/PS	n/a	n/a	>250	252
666881	GalNac₃-10_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNac ₃ -10 _a	A _d	30	254
666904	GalNac₃-3_a-o $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds}$ $A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es} C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNac ₃ -3 _a	PO	9	252
666924	GalNac₃-3_a-o $T_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es} C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNac ₃ -3 _a	T _d	15	257
666961	GalNac₃-6_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNac ₃ -6 _a	A _d	150	254
666981	GalNac₃-7_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNac ₃ -7 _a	A _d	20	254
670061	GalNac₃-13_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNac ₃ -13 _a	A _d	30	254
670699	GalNac₃-3_a-o $T_{do} G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo} C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_e$	PO/PS	GalNac ₃ -3 _a	T _d	15	257
670700	GalNac₃-3_a-o $A_{eo} G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo} C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_e$	PO/PS	GalNac ₃ -3 _a	A _e	30	254
670701	GalNac₃-3_a-o $T_{eo} G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo} C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_e$	PO/PS	GalNac ₃ -3 _a	T _e	25	257
671144	GalNac₃-12_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNac ₃ -12 _a	A _d	40	254
671165	GalNac₃-13_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo} C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_e$	PO/PS	GalNac ₃ -13 _a	A _d	8	254
671261	GalNac₃-14_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNac ₃ -14 _a	A _d	>250	254
671262	GalNac₃-15_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNac ₃ -15 _a	A _d	>250	254
673501	GalNac₃-7_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo} C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_e$	PO/PS	GalNac ₃ -7 _a	A _d	30	254
673502	GalNac₃-10_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo} C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_e$	PO/PS	GalNac ₃ -10 _a	A _d	8	254
675441	GalNac₃-17_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNac ₃ -17 _a	A _d	30	254
675442	GalNac₃-18_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNac ₃ -18 _a	A _d	20	254
677841	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m$ $C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} - GalNac_3-19_a$	PS	GalNac ₃ -19 _a	A _d	40	253
677842	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m$ $C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} - GalNac_3-20_a$	PS	GalNac ₃ -20 _a	A _d	30	253
677843	GalNac₃-23_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNac ₃ -23 _a	A _d	40	254

GalNac₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌고, GalNac₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌고, GalNac₃-5_a의 구조는 실시예 49에서 보여졌고, GalNac₃-6_a의 구조는 실시예 51에서 보여졌고, GalNac₃-7_a의 구조는 실시예 48

에서 보여졌고, GalNAc₃-8_a의 구조는 실시예 47에서 보여졌고, GalNAc₃-9_a의 구조는 실시예 52에서 보여졌고, GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 보여졌고, GalNAc₃-12_a의 구조는 실시예 61에서 보여졌고, GalNAc₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 보여졌고, GalNAc₃-14_a의 구조는 실시예 63에서 보여졌고, GalNAc₃-15_a의 구조는 실시예 64에서 보여졌고, GalNAc₃-17_a의 구조는 실시예 68에서 보여졌고, GalNAc₃-18_a의 구조는 실시예 69에서 보여졌고, GalNAc₃-19_a의 구조는 실시예 70에서 보여졌고, GalNAc₃-20_a의 구조는 실시예 71에서 보여졌고, GalNAc₃-23_a의 구조는 실시예 76에서 보여졌다.

***실시예 83: GalNAc₃ 클러스터를 포함하는 인자 XI를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제**

*아래의 표 77에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 인자 XI의 용량-의존적 억제에 대한 연구에서 시험되었다.

표 77

인자 XI를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc 클러스터	CM	시열번호
404071	T _{es} G _{es} G _{es} T _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{es} G _{es} A _{es} G _{es} G _e	n/a	n/a	255
656173	T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	256
663086	GalNAc ₃ -3 _a -o-A _{do} T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{ec} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -3 _a	A _d	264
678347	GalNAc ₃ -7 _a -o-A _{do} T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{ec} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -7 _a	A _d	264
678348	GalNAc ₃ -10 _a -o-A _{do} T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{ec} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -10 _a	A _d	264
678349	GalNAc ₃ -13 _a -o-A _{do} T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{ec} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -13 _a	A _d	264

GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다, GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌고, GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌고, GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 보여졌고, GalNAc₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 보여졌다.

처리

6 내지 8 주령 마우스 각각에게 피하로 주당 1회 아래에서 보여진 복용량으로, 총 3 회 용량 동안, 아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 또는 PBS가 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 각 처리 그룹은 4 마리의 동물로 구성되었다. 인자 XI 간 mRNA 수준은 실시간 PCR을 사용하여 측정되었고 표준 프로토콜에 따라 사이클로필린에 대해 정규화되었다. 간 아미노기전달효소, BUN, 및 빌리루빈이 또한 측정되었다. 아래의 결과는 PBS 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 평균 퍼센트로서 나타낸다.

표 78에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 인자 XI 간 mRNA를 낮게 했다. 이 결과는, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트 (ISIS 404071)가 없는 모보다 더 강했다는 것을 보여준다. 더욱이, 5'-GalNAc 콘주게이트 (ISIS 663086, 678347, 678348, 및 678349)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 3'-GalNAc 콘주게이트 (ISIS 656173)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드보다 더욱 더 강했다.

표 78

인자 XI 간 mRNA, 간 아미노기전달효소, BUN, 및 빌리루빈 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	인자 XI mRNA (% PBS)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	빌리루빈 (mg/dL)	GalNAc ₃ 클러스터	서열번호
PBS	n/a	100	63	70	21	0.18	n/a	n/a
404071	3	65	41	58	21	0.15	n/a	255
	10	33	49	53	23	0.15		
	30	17	43	57	22	0.14		
656173	0.7	43	90	89	21	0.16	GalNAc ₃ -1a	256
	2	9	36	58	26	0.17		
	6	3	50	63	25	0.15		
663086	0.7	33	91	169	25	0.16	GalNAc ₃ -3a	264
	2	7	38	55	21	0.16		
	6	1	34	40	23	0.14		
678347	0.7	35	28	49	20	0.14	GalNAc ₃ -7a	264
	2	10	180	149	21	0.18		
	6	1	44	76	19	0.15		
678348	0.7	39	43	54	21	0.16	GalNAc ₃ -10a	264
	2	5	38	55	22	0.17		
	6	2	25	38	20	0.14		
678349	0.7	34	39	46	20	0.16	GalNAc ₃ -13a	255
	2	8	43	63	21	0.14		
	6	2	28	41	20	0.14		

실시예 84: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 인자 XI를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드의 생체내 작용의 지속시간

표 77에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 작용의 지속시간에 대한 단회 용량 연구에서 시험되었다.

처리

6 내지 8 주령 마우스 각각에게 표 77에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS를 피하로 1 회 주입했다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 혈액을 복용 전날에 꼬리 출혈에 의해 취해서 기준선을 결정하고 복용 후 3, 10, 및 17 일에서 측정했다. 혈장 인자 XI 단백질 수준은 인자 XI 포획 및 바이오티닐화된 검출 항체 (R & D SYSTEMS, Minneapolis, MN (카탈로그 # AF2460 및 # BAF2460, 각각)) 및 OptEIA 시약 세트 B (카탈로그 # 550534, BD Biosciences, San Jose, CA)를 사용하여 ELISA에 의해 측정되었다. 아래의 결과는 기준선 수준에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 혈장 인자 XI 단백질 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다. 이 결과는, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 GalNAc 콘주게이트 (ISIS 404071) 없는 모보다 더 긴 작용의 지속시간과 함께 더 강했다는 것을 보여준다. 더욱이, 5'-GalNAc 콘주게이트 (ISIS 663086, 678347, 678348, 및 678349)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 3'-GalNAc 콘주게이트 (ISIS 656173)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드보다 더욱 더 긴 작용의 지속시간과 함께 더 더욱 더 강했다.

표 79

마우스 중 혈장 인자 XI 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	시점 (복용후 일수)	인자 XI (% 기준선)	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
PBS	n/a	3	123	n/a	n/a	n/a
		10	56			
		17	100			
404071	30	3	11	n/a	n/a	255
		10	47			
		17	52			
656173	6	3	1	GalNAc ₃ -1a	A _d	256
		10	3			
		17	21			
663086	6	3	1	GalNAc ₃ -3a	A _d	264
		10	2			
		17	9			
678347	6	3	1	GalNAc ₃ -7a	A _d	264
		10	1			
		17	8			
678348	6	3	1	GalNAc ₃ -10a	A _d	264
		10	1			
		17	6			
678349	6	3	1	GalNAc ₃ -13a	A _d	264
		10	1			
		17	5			

실시예 85: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제

표 76에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

처리

6 내지 8 주령 C57BL/6 마우스 각각에게 피하로 주당 1회 아래에서 보여진 복용량으로, 총 3 회 용량 동안, 표 76에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 염수가 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 48 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 아래의 결과는 염수 대조군으로 정규화된 각 처리 그룹에 대한 간 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

표 80 및 81에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다.

표 80

간 중 SRB-1 mRNA

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% 염수)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
염수	n/a	100	n/a	n/a
655861	0.1	94	GalNAc ₃ -1a	A _d
	0.3	119		
	1	68		
	3	32		
661161	0.1	120	GalNAc ₃ -3a	A _d
	0.3	107		
	1	68		
	3	26		
666881	0.1	107	GalNAc ₃ -10a	A _d
	0.3	107		
	1	69		
	3	27		
666981	0.1	120	GalNAc ₃ -7a	A _d
	0.3	103		
	1	54		
	3	21		
670061	0.1	118	GalNAc ₃ -13a	A _d
	0.3	89		
	1	52		
	3	18		
677842	0.1	119	GalNAc ₃ -20a	A _d
	0.3	96		
	1	65		
	3	23		

표 81

간 중 SRB-1 mRNA

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% 염수)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
661161	0.1	107	GalNAc ₃ -3a	A _d
	0.3	95		
	1	53		
	3	18		
677841	0.1	110	GalNAc ₃ -19a	A _d
	0.3	88		
	1	52		
	3	25		

간 아미노기전달효소 수준, 총 빌리루빈, BUN, 및 체중은 표준 프로토콜을 사용하여 또한 측정되었다. 각 처리 그룹의 평균 값은 아래의 표 82에서 보여진다.

표 82

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	빌리루빈 (mg/dL)	BUN (mg/dL)	체중 (% 기준선)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
염수	n/a	19	39	0.17	26	118	n/a	n/a
655861	0.1	25	47	0.17	27	114	GalNAc ₃ -1a	A _d
	0.3	29	56	0.15	27	118		
	1	20	32	0.14	24	112		
	3	27	54	0.14	24	115		
661161	0.1	35	83	0.13	24	113	GalNAc ₃ -3a	A _d
	0.3	42	61	0.15	23	117		
	1	34	60	0.18	22	116		
	3	29	52	0.13	25	117		
666881	0.1	30	51	0.15	23	118	GalNAc ₃ -10a	A _d
	0.3	49	82	0.16	25	119		
	1	23	45	0.14	24	117		
	3	20	38	0.15	21	112		
666981	0.1	21	41	0.14	22	113	GalNAc ₃ -7a	A _d
	0.3	29	49	0.16	24	112		
	1	19	34	0.15	22	111		
	3	77	78	0.18	25	115		
670061	0.1	20	63	0.18	24	111	GalNAc ₃ -13a	A _d
	0.3	20	57	0.15	21	115		
	1	20	35	0.14	20	115		
	3	27	42	0.12	20	116		
677842	0.1	20	38	0.17	24	114	GalNAc ₃ -20a	A _d
	0.3	31	46	0.17	21	117		
	1	22	34	0.15	21	119		
	3	41	57	0.14	23	118		

실시예 86: GalNAc₃ 클러스터를 포함하는 TTR를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제

*아래의 표 83에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 인간 TTR 유전자를 발현시키는 이식유전자 마우스에서 인간 트랜스페틴 (TTR)의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

처리

8 주령 TTR 이식유전자 마우스 각각에게 피하로 주당 1회 3 주 동안, 총 3 회 용량 동안, 아래의 표에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 및 복용량 또는 PBS가 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 72 시간 후에 희생되었다. 꼬리 출혈은 실험을 통해 다양한 시점에서 수행되었고, 혈장 TTR 단백질, ALT, 및 AST 수준은 측정되고 표 85-87에서 보고되었다. 상기 동물이 희생된 후, 혈장 ALT, AST, 및 인간 TTR 수준은 체중, 장기 중량, 및 간 인간 TTR mRNA 수준에서와 같이 측정되었다. TTR 단백질 수준은 임상 분석기 (AU480, Beckman Coulter, CA)를 사용하여 측정되었다. 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)은 표준 프로토콜에 따라 사용되어 간 인간 TTR mRNA 수준을 측정했다. 표 84-87에서 제공된 결과는 각 처리 그룹의 평균 값이다. mRNA 수준은 PBS 그룹의 평균에 대한 평균 값이다. 혈장 단백질 수준은 기준선에서 PBS 그룹의 평균 값에 대한 평균 값이다. 체중은 각 개별적인 처리 그룹에 대한 희생까지 기준선으로부터의 평균 퍼센트 체중 변화이다. 보여진 장기 중량은 동물의 체중으로 정규화되고, 그 다음 각 처리 그룹의 평균 정규화된 장기 중량은 PBS 그룹의 평균 정규화된 장기 중량에 대해 나타낸다.

표 84 내지 87에서, "BL"는 제 1 용량 직전에 취한 기준선, 측정을 나타낸다. 표 84 및 85에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 TTR 발현 수준을 낮게 했다. GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트 (ISIS 420915)가 없는 모보다 더 강했다. 더욱이, GalNAc 콘주게이트 및 혼합된 PS/PO 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘

주게이트 및 완벽한 PS 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드.

표 83

인간 TTR을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 5'에서 3'	연결	GalNAc 클러스터	CM	서열번호
420915	$T_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds}$ $A_{es} T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS	n/a	n/a	265
660261	$T_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds}$ $A_{es} T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e A_{do}$ -GalNAc ₃ -1 _a	PS	GalNAc ₃ -1a	A _d	266
682883	GalNAc ₃ -3 _a - $T_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds}$ $T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -3a	PO	265
682884	GalNAc ₃ -7 _a - $T_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds}$ $T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -7a	PO	265
682885	GalNAc ₃ -10 _a - $T_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds}$ $A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -10a	PO	265
682886	GalNAc ₃ -13 _a - $T_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds}$ $A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -13a	PO	265
684057	$T_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e A_{do}$ -GalNAc ₃ -19 _a	PS/PO	GalNAc ₃ -19a	A _d	266

표 85에 대한 범례는 실시예 74에서 발견될 수 있다. GalNAc₃-1의 구조는 실시예 9에서 보여졌다. GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌다. GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌다. GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 보여졌다. GalNAc₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 보여졌다. GalNAc₃-19_a의 구조는 실시예 70에서 보여졌다.

표 84

생체내 인간 TTR의 안티센스 억제

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	TTR mRNA (% PBS)	혈장 TTR 단백질 (% PBS)	GalNAc 클러스터	CM	서열번호
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a	
420915	6	99	95	n/a	n/a	265
	20	48	65			
	60	18	28			
660261	0.6	113	87	GalNAc ₃ -1a	A _d	266
	2	40	56			
	6	20	27			
	20	9	11			

표 85

생체내 인간 TTR의 안티센스 억제

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	TTR mRNA (% PBS)	혈장 TTR 단백질 (BL에서 PBS %)				GalNAc 클러스터	CM	서열번호
			BL	3 일째	10 일째	17 일째 (낭 후)			
PBS	n/a	100	100	96	90	114	n/a	n/a	
420915	6	74	106	86	76	83	n/a	n/a	265
	20	43	102	66	61	58			
	60	24	92	43	29	32			
682883	0.6	60	88	73	63	68	GalNAc ₃ -3a	PO	265
	2	18	75	38	23	23			
	6	10	80	35	11	9			
682884	0.6	56	88	78	63	67	GalNAc ₃ -7a	PO	265
	2	19	76	44	25	23			
	6	15	82	35	21	24			
682885	0.6	60	92	77	68	76	GalNAc ₃ -10a	PO	265
	2	22	93	58	32	32			
	6	17	85	37	25	20			
682886	0.6	57	91	70	64	69	GalNAc ₃ -13a	PO	265
	2	21	89	50	31	30			
	6	18	102	41	24	27			
684057	0.6	53	80	69	56	62	GalNAc ₃ -19a	A _d	266
	2	21	92	55	34	30			
	6	11	82	50	18	13			

표 86

아미노기전달효소 수준, 체중 변화, 및 장기 장기 중량

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)				AST (U/L)				신체 (% BL)	간 (% PBS)	비장 (% PBS)	신장 (% PBS)	서열 번호
		BL	3 일째	10 일째	17 일째	BL	3 일째	10 일째	17 일째					
PBS	n/a	33	34	33	24	58	62	67	52	105	100	100	100	n/a
420915	6	34	33	27	21	64	59	73	47	115	99	89	91	265
	20	34	30	28	19	64	54	56	42	111	97	83	89	
	60	34	35	31	24	61	58	71	58	113	102	98	95	
660261	0.6	33	38	28	26	70	71	63	59	111	96	99	92	266
	2	29	32	31	34	61	60	68	61	118	100	92	90	
	6	29	29	28	34	58	59	70	90	114	99	97	95	
	20	33	32	28	33	64	54	68	95	114	101	106	92	

표 87

아미노기전달효소 수준, 체중 변화, 및 장기 장기 중량

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)				AST (U/L)				신체 (% BL)	간 (% PBS)	비장 (% PBS)	신장 (% PBS)	서열 번호
		BL	3 일째	10 일째	17 일째	BL	3 일째	10 일째	17 일째					
PBS	n/a	32	34	37	41	62	78	76	77	104	100	100	100	n/a
420915	6	32	30	34	34	61	71	72	66	102	103	102	105	265
	20	41	34	37	33	80	76	63	54	106	107	135	101	
	60	36	30	32	34	58	81	57	60	106	105	104	99	
682883	0.6	32	35	38	40	53	81	74	76	104	101	112	95	265
	2	38	39	42	43	71	84	70	77	107	98	116	99	
	6	35	35	41	38	62	79	103	65	105	103	143	97	
682884	0.6	33	32	35	34	70	74	75	67	101	100	130	99	265
	2	31	32	38	38	63	77	66	55	104	103	122	100	
	6	38	32	36	34	65	85	80	62	99	105	129	95	
682885	0.6	39	26	37	35	63	63	77	59	100	109	109	112	265
	2	30	26	38	40	54	56	71	72	102	98	111	102	
	6	27	27	34	35	46	52	56	64	102	98	113	96	
682886	0.6	30	40	34	36	58	87	54	61	104	99	120	101	265
	2	27	26	34	36	51	55	55	69	103	91	105	92	
	6	40	28	34	37	107	54	61	69	109	100	102	99	
684057	0.6	35	26	33	39	56	51	51	69	104	99	110	102	266
	2	33	32	31	40	54	57	56	87	103	100	112	97	
	6	39	33	35	40	67	52	55	92	98	104	121	108	

실시예 87: GalNAc₃ 클러스터를 포함하는 TTR를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드의 단위 용량에 의한 생체내 작용의 지속시간

ISIS 번호 420915 및 660261 (참고 표 83)은 마우스에서 작용의 지속시간에 대한 단위 용량 연구에서 시험되었다. ISIS 번호 420915, 682883, 및 682885 (참고 표 83)은 또한 마우스에서 작용의 지속시간에 대한 단위 용량 연구에서 시험되었다.

처리

인간 TTR을 발현시키는 8 주령, 수컷 이식유전자 마우스 각각에게 100 mg/kg ISIS 번호 420915 또는 13.5 mg/kg ISIS 번호 660261가 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 꼬리 출혈은 복용 전에 수행되어 기준선을 결정했고 복용 3, 7, 10, 17, 24, 및 39 일 후에 측정했다. 혈장 TTR 단백질 수준은 실시예 86에서 기재된 바와 같이 측정되었다. 아래의 결과는 기준선 수준에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 혈장 TTR 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

표 88

혈장 TTR 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	시점 (복용 후 일수)	TTR (% 기준선)	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
420915	100	3	30	n/a	n/a	265
		7	23			
		10	35			
		17	53			
		24	75			
		39	100			
660261	13.5	3	27	GalNAc ₃ -1a	A _d	266
		7	21			
		10	22			
		17	36			
		24	48			
		39	69			

처리

인간 TTR을 발현시키는 암컷 이식유전자 마우스 각각에게 100 mg/kg ISIS 번호 420915, 10.0 mg/kg ISIS 번호 682883, 또는 10.0 mg/kg 682885가 피하로 한번 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 꼬리 출혈은 복용 전에 수행되어 기준선을 결정했고 복용 3, 7, 10, 17, 24, 및 39 일 후에 측정했다. 혈장 TTR 단백질 수준은 실시예 86에서 기재된 바와 같이 측정되었다. 아래의 결과는 기준선 수준에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 혈장 TTR 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

표 89

혈장 TTR 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	시점 (복용 후 일수)	TTR (% 기준선)	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
420915	100	3	48	n/a	n/a	265
		7	48			
		10	48			
		17	66			
		31	80			
682883	10.0	3	45	GalNAc ₃ -3a	PO	265
		7	37			
		10	38			
		17	42			
		31	65			
682885	10.0	3	40	GalNAc ₃ -10a	PO	265
		7	33			
		10	34			
		17	40			
		31	64			

표 88 및 89의 결과는, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 콘주게이트가 없는 모 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 420915)보다 더 긴 지속시간과 함께 더 강하다는 것을 보여준다.

실시예 88: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 SMN을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 스플라이싱 조절

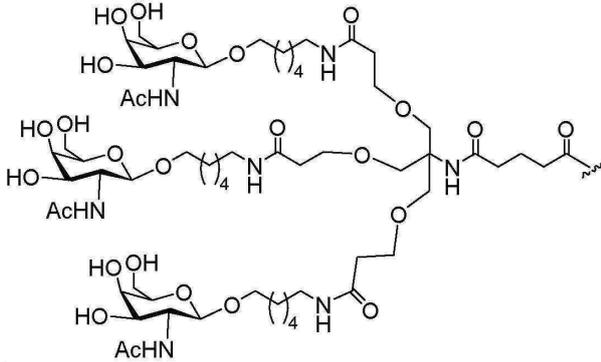
표 90에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 운동 뉴런 (SMN)의 인간 생존의 스플라이싱 조절에 대해 시험되었다.

표 90

SMN를 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
387954	A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _e	n/a	n/a	267
699819	GalNAc ₃ -7 _a -o-A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -7a	PO	267
699821	GalNAc ₃ -7 _a -o-A _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{eo} T _{eo} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} G _{eo} G _e	GalNAc ₃ -7a	PO	267
700000	A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _e s G _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1a	A _d	268
703421	X-ATT ^m CA ^m CTTT ^m CATAATG ^m CTGG	n/a	n/a	267
703422	GalNAc ₃ -7 _b -X-ATT ^m CA ^m CTTT ^m CATAATG ^m CTGG	GalNAc ₃ -7b	n/a	267

GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 이전에 보여졌다. "X"는 Gene Tools (Philomath, OR)에 의해 산출된 5' 일차 아민을 나타내고, GalNAc₃-7_b는 이하에서 보여진 바와 같은 링커의 -NH-C₆-O 부분이 없는 GalNAc₃-7_a의 구조를 나타낸다:



ISIS 번호 703421 및 703422는 모폴리노 올리고뉴클레오타이드이고, 여기서 2 개의 올리고뉴클레오타이드의 각 뉴클레오타이드는 모폴리노 뉴클레오타이드이다.

처리

인간 SMN를 발현시키는 6 주령 이식유전자 마우스는 표 91에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 염수가 피하로 한번 주입되었다. 각 처리 그룹은 2 마리 수컷 및 2 마리 암컷으로 구성되었다. 마우스는 복용 3 일 후에 희생되어 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR을 사용하여 엑손 7 유무에 따른 간 인간 SMN mRNA 수준을 측정했다. 총 RNA는 리보그린 시약을 사용하여 측정되었다. SMN mRNA 수준은 총 mRNA로 정규화되었고, 염수 처리 그룹의 평균으로 추가로 정규화되었다. 엑손 7 포함 SMN mRNA 대 엑손 7 누락 SMN mRNA의 수득한 평균 비는 표 91에서 보여진다. 이 결과는, 스플라이싱을 조절하고 GalNAc 콘주게이트를 포함하는 완전히 변형된 올리고뉴클레오타이드가 GalNAc 콘주게이트가 없는 모 올리고뉴클레오타이드보다 간에서 스플라이싱을 변경할 때 유의미하게 더 강하다는 것을 보여준다. 더욱이, 이러한 추세는 2'-MOE 및 모폴리노 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 다중 변형 화학을 위해 유지된다.

표 91

생체내에서 인간 SMN을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드의 효과

ISIS 번호	용량 (mg/kg)	+엑손 7 / -엑손 7	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
염수	n/a	1.00	n/a	n/a	n/a
387954	32	1.65	n/a	n/a	267
387954	288	5.00	n/a	n/a	267
699819	32	7.84	GalNAc ₃ -7a	PO	267
699821	32	7.22	GalNAc ₃ -7a	PO	267
700000	32	6.91	GalNAc ₃ -1a	A _d	268
703421	32	1.27	n/a	n/a	267
703422	32	4.12	GalNAc ₃ -7b	n/a	267

실시예 89: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 아포지질단백질 (Apo(a))을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제

아래의 표 92에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 이식유전자 마우스에서 Apo(a)의 용량-의존적 억제에 대한 연구에서 시험되었다.

표 92

APO(a)를 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
494372	T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} ^m C _e	n/a	n/a	277
681257	GalNAc ₃ -7 _a ·T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	277

GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌다.

처리

8 주령, 암컷 C57BL/6 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 각각에게 피하로 주당 1회 아래에서 보여진 복용량으로, 총 6 번 용량 동안에, 표 92에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS가 주입되었다. 각 처리 그룹은 3 내지 4 마리의 동물로 구성되었다. 꼬리 출혈은 제 1 용량 전날에 및 각 용량 다음 매주 수행되어 혈장 Apo(a) 단백질 수준을 측정했다. 마우스는 최종 투여 2 일 후에 희생되었다. Apo(a) 간 mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 측정되었다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). Apo(a) 혈장 단백질 수준은 ELISA를 사용하여 측정되었고, 간 아미노기전달효소 수준이 측정되었다. 표 93의 mRNA 및 혈장 단백질 결과는 PBS 처리된 그룹에 대한 처리 그룹 평균 퍼센트로서 나타낸다. 혈장 단백질 수준은 PBS 그룹의 기준선 (BL) 값으로 추가로 정규화되었다. 평균 절대적인 아미노기전달효소 수준 및 체중 (기준선 평균에 대한 %)은 표 94에서 보고된다.

표 93에서 실증된 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 Apo(a) 간 mRNA 및 혈장 단백질 수준을 낮게 했다. 더욱이, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트가 없는 모 올리고뉴클레오타이드보다 더 긴 작용의 지속시간과 함께 유의미하게 더 강했다. 표 94에서 실증된 바와 같이, 아미노기전달효소 수준 및 체중은 올리고뉴클레오타이드에 의해 영향을 받지 않았고, 이것은, 올리고뉴클레오타이드가 잘 용인되었다는 것을 나타낸다.

표 93

Apo(a) 간 mRNA 및 혈장 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	Apo(a) mRNA (% PBS)	Apo(a) 혈장 단백질 (% PBS)						
			BL	1 주째	2 주째	3 주째	4 주째	5 주째	6 주째
PBS	n/a	100	100	120	119	113	88	121	97
494372	3	80	84	89	91	98	87	87	79
	10	30	87	72	76	71	57	59	46
	30	5	92	54	28	10	7	9	7
681257	0.3	75	79	76	89	98	71	94	78
	1	19	79	88	66	60	54	32	24
	3	2	82	52	17	7	4	6	5
	10	2	79	17	6	3	2	4	5

표 94

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	체중 (% 기준선)
PBS	n/a	37	54	103
494372	3	28	68	106
	10	22	55	102
	30	19	48	103
681257	0.3	30	80	104
	1	26	47	105
	3	29	62	102
	10	21	52	107

실시에 90: GalNAc₃ 클러스터를 포함하는 TTR을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제

아래의 표 95에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 인간 TTR 유전자를 발현시키는 이식유전자 마우스에서 인간 트랜스페린 (TTR)의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

처리

TTR 이식유전자 마우스 각각에게 피하로 주당 1회 3 주 동안, 총 3 회 용량 동안, 표 96에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 및 복용량 또는 PBS이 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 제 1 용량 전에, 꼬리 출혈이 수행되어 기준선 (BL)에서 혈장 TTR 단백질 수준을 측정했다. 마우스는 최종 투여 72 시간 후에 희생되었다. TTR 단백질 수준은 임상 분석기 (AU480, Beckman Coulter, CA)를 사용하여 측정되었다. 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)은 표준 프로토콜에 따라 사용되어 간 인간 TTR mRNA 수준을 측정했다. 표 96에서 제공된 결과는 각 처리 그룹의 평균 값이다. mRNA 수준은 PBS 그룹의 평균에 대한 평균 값이다. 혈장 단백질 수준은 기준선에서 PBS 그룹의 평균 값에 대한 평균 값이다. "BL"는 제 1 용량 직전에 취한 기준선, 측정을 나타낸다. 표 96에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 TTR 발현 수준을 낮게 했다. GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트 (ISIS 420915)가 없는 모보다 더 강했고, 포스포디에스테르 또는 테옥시아데노신 절단 가능 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 콘주게이트가 없는 모와 비교하여 효능의 유의미한 개선을 보여주었다 (참고 ISIS 번호 682883 및 666943 vs 420915 및 실시예 86 및 87 참고).

표 95

인간 TTR을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 5'에서 3'	연결	GalNAc 클러스터	CM	서열번호
420915	T ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} G ^m _{es} G ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} A ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} T ^m _{es} G ^m _{es} A ^m _{es} A ^m _{es} A ^m _{es}	PS	n/a	n/a	265
682883	GalNAc ₃ -3-a-o-T ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} G ^m _{es} G ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} A ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} A ^m _{es} A ^m _{es} A ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es}	PS/PO	GalNAc ₃ -3a	PO	265
666943	GalNAc ₃ -3-a-o-A ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} G ^m _{es} G ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} A ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} A ^m _{es} A ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es}	PS/PO	GalNAc ₃ -3a	A _d	269
682887	GalNAc ₃ -7-a-o-A ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} G ^m _{es} G ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} A ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} A ^m _{es} A ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es}	PS/PO	GalNAc ₃ -7a	A _d	269
682888	GalNAc ₃ -10-a-o-A ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} G ^m _{es} G ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} A ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} A ^m _{es} A ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es}	PS/PO	GalNAc ₃ -10a	A _d	269
682889	GalNAc ₃ -13-a-o-A ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} G ^m _{es} G ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} A ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{es} A ^m _{es} A ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es}	PS/PO	GalNAc ₃ -13a	A _d	269

표 95에 대한 범례는 실시예 74에서 발견될 수 있다. GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌다. GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌다. GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 보여졌다. GalNAc₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 보여졌다.

표 96

생체내 인간 TTR의 안티센스 억제

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	TTR mRNA (% PBS)	TTR 단백질 (% BL)	GalNAc 클러스터	CM
PBS	n/a	100	124	n/a	n/a
420915	6	69	114	n/a	n/a
	20	71	86		
	60	21	36		
682883	0.6	61	73	GalNAc ₃ -3a	PO
	2	23	36		
	6	18	23		
666943	0.6	74	93	GalNAc ₃ -3a	A _d
	2	33	57		
	6	17	22		
682887	0.6	60	97	GalNAc ₃ -7a	A _d
	2	36	49		
	6	12	19		
682888	0.6	65	92	GalNAc ₃ -10a	A _d
	2	32	46		
	6	17	22		
682889	0.6	72	74	GalNAc ₃ -13a	A _d
	2	38	45		
	6	16	18		

실시예 91: 비-인간 영장류에서 GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 인자 VII를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내의 안티센스 억제

아래의 표 97에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 원숭이에서 인자 VII의 안티센스 억제에 대해 비-말단, 용량 단계적 확대 연구에서 시험되었다.

처리

비-나이프 원숭이 각각에게 0, 15, 및 29일에 상승하는 용량의 표 97에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS가 피하로 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리의 수컷 및 1 마리의 암컷으로 구성되었다. 제 1 용량 전에 및 그 후 다양한 시점에서, 채혈이 수행되어 혈장 인자 VII 단백질 수준을 측정했다. 인자 VII 단백질 수준은 ELISA에 의해 측정되었다. 표 98에서 제공된 결과는 기준선 (BL)에서 PBS 그룹의 평균 값에 대한 각 처리 그룹의 평균 값이고, 상기 측정은 제 1 용량 직전에 취해졌다. 표 98에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식으로 인자 VII 발현 수준을 낮게 했고, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트가 없는 올리고뉴클레오타이드와 비교하여 원숭이에서 유의미하게 더 강했다.

표 97

인자 VII을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 5'에서 3'	연결	GalNAc 클러스터	CM	서열번호
407935	A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _e	PS	n/a	n/a	270
686892	GalNAc ₃ -10 _{a-o} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _e	PS	GalNAc ₃ -10a	PO	270

표 97에 대한 범례는 실시예 74에서 발견될 수 있다. GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 보여졌다.

표 98

인자 VII 혈장 단백질 수준

ISIS 번호	일수	용량 (mg/kg)	인자 VII (% BL)
407935	0	n/a	100
	15	10	87
	22	n/a	92
	29	30	77
	36	n/a	46
	43	n/a	43
686892	0	3	100
	15	10	56
	22	n/a	29
	29	30	19
	36	n/a	15
	43	n/a	11

실시예 92: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 ApoCIII을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 일차 간세포에서의 안티센스 억제

일차 마우스 간세포는 15,000 세포/웰에서 96-웰 플레이트에서 씨딩되었고, 마우스 ApoC-III을 표적으로 하는, 표 99에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는, 0.46, 1.37, 4.12, 또는 12.35, 37.04, 111.11, 또는 333.33 nM 또는 1.00 μM에서 추가되었다. 24 시간 동안 올리고뉴클레오타이드와 함께 인큐베이션한 후, 세포는 용해되었고 총 RNA는 RNeasy (Qiagen)를 사용하여 정제되었다. ApoC-III mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약 (Molecular Probes, Inc.)을 사용하여 측정되었다. IC₅₀ 값은 Prism 4 소프트웨어 (GraphPad)를 사용하여 측정되었다. 이 결과는, 절단가능 모이어티가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-연결된 테옥시아데노신인 지와는 무관하게, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 콘주게이트가 없는 모 올리고뉴클레오타이드보다 유의미하게 더 강했다는 것을 보여준다.

표 99

마우스 일차 간세포 중 마우스 APOC-III 발현의 억제

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	CM	IC ₅₀ (nM)	서열번호
440670	^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	n/a	13.20	271
661180	^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -1 _a	A _d	1.40	272
680771	GalNAc ₃ -3 _a -o' ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	0.70	271
680772	GalNAc ₃ -7 _a -o' ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	1.70	271
680773	GalNAc ₃ -10 _a -o' ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	2.00	271
680774	GalNAc ₃ -13 _a -o' ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	1.50	271
681272	GalNAc ₃ -3 _a -o' ^m C _{es} A _{eo} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{eo} A _{eo} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	< 0.46	271
681273	GalNAc ₃ -3 _a -o' ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	A _d	1.10	273
683733	^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -19 _a	A _d	2.50	272

GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌고, GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌고, GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 보여졌고, GalNAc₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-19_a의 구조는 실시예 70에서 보여졌다.

실시예 93: 혼합된 웡 및 5'-GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내의 안티센스 억제

표 100에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시

험되었다.

표 100

SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
449093	T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	n/a	n/a	274
699806	GalNAc ₃ -3a ^o T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -3a	PO	274
699807	GalNAc ₃ -7a ^o T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7a	PO	274
699809	GalNAc ₃ -7a ^o T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	274
699811	GalNAc ₃ -7a ^o T _{ds} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7a	PO	274
699813	GalNAc ₃ -7a ^o T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ds} ^m C _k	GalNAc ₃ -7a	PO	274
699815	GalNAc ₃ -7a ^o T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	274

GalNAc₃-3a의 구조는 실시예 39에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-7a의 구조는 실시예 48에서 이전에 보여졌다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "k"는 6'-(S)-CH₃ 바이사이클릭 뉴클레오사이드 (cEt)를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)를 나타낸다. 상첨자 "m"은 5-메틸 시토신을 나타낸다.

처리

6 내지 8 주령 C57BL/6 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 표 100에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 염수가 아래에서 보여진 복용량으로 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 72 시간 후에 희생되었다. 간 SRB-1 mRNA 수준은 실시간 PCR를 사용하여 측정되었다. SRB-1 mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 사이클로필린 mRNA 수준에 대해 정규화되었다. 결과는 염수 대조군 그룹에 대한 각 처리 그룹을 위해 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 제공된다. 표 101에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식으로 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했고, GalNAc 콘주게이트를 포함하고 완전한 cEt 또는 혼합된 당 변형이었던 링을 갖는 갭머 올리고뉴클레오타이드는 콘주게이트가 없고 완전한 cEt 변형된 링을 포함하는 모 올리고뉴클레오타이드보다 유의미하게 더 강했다.

체중, 간 트랜스아미나제, 총 빌리루빈, 및 BUN가 또한 측정되었고, 각 처리 그룹에 대한 평균 값은 표 101에서 보여진다. 체중은 올리고뉴클레오타이드 용량 직전에 측정된 기준선 체중 (% BL)에 대한 평균 퍼센트 체중로서 보여진다.

표 101

SRB-1 mRNA, ALT, AST, BUN, 및 총 빌리루빈 수준 및 체중

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% PBS)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bil	BUN	체중 (% BL)
PBS	n/a	100	31	84	0.15	28	102
449093	1	111	18	48	0.17	31	104
	3	94	20	43	0.15	26	103
	10	36	19	50	0.12	29	104
699806	0.1	114	23	58	0.13	26	107
	0.3	59	21	45	0.12	27	108
	1	25	30	61	0.12	30	104
699807	0.1	121	19	41	0.14	25	100
	0.3	73	23	56	0.13	26	105
	1	24	22	69	0.14	25	102
699809	0.1	125	23	57	0.14	26	104
	0.3	70	20	49	0.10	25	105
	1	33	34	62	0.17	25	107
699811	0.1	123	48	77	0.14	24	106
	0.3	94	20	45	0.13	25	101
	1	66	57	104	0.14	24	107
699813	0.1	95	20	58	0.13	28	104
	0.3	98	22	61	0.17	28	105
	1	49	19	47	0.11	27	106
699815	0.1	93	30	79	0.17	25	105
	0.3	64	30	61	0.12	26	105
	1	24	18	41	0.14	25	106

실시에 94: 2'-당 변형 및 5'-GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내의 안티센스 억제

표 102에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

표 102

SRB-1를 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
353382	G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _e	n/a	n/a	252
700989	G ^m _{ms} C ^m _{ms} U ^m _{ms} U ^m _{ms} C ^m _{ms} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} U ^m _{ms} C ^m _{ms} C ^m _{ms}	n/a	n/a	275
666904	GalNAc ₃ -3 ^m _a -G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds}	GalNAc ₃ -3a	PO	252
700991	GalNAc ₃ -7 ^m _a -G ^m _{ms} C ^m _{ms} U ^m _{ms} U ^m _{ms} C ^m _{ms} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds}	GalNAc ₃ -7a	PO	275

하첨자 "m"은 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오사이드를 나타낸다. 완전한 표 범례에 대한 실시예 74 참고. GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-7a의 구조는 실시예 48에서 이전에 보여졌다.

처리

이러한 연구는 실시예 93에서 기재된 프로토콜을 사용하여 완료되었다. 결과는 아래의 표 103에서 보여지고 GalNAc 콘주게이트를 포함하는 2'-MOE 및 2'-OMe 변형된 올리고뉴클레오타이드 둘 모두가 콘주게이트가 없는 각 모 올리고뉴클레오타이드보다 유의미하게 더 강했다는 것을 보여준다. 체중, 간 트랜스아미나제, 총 빌리루빈, 및 BUN 측정의 결과는, 모든 화합물이 용인되었다는 것을 명시했다.

표 103

SRB-1 mRNA

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% PBS)
PBS	n/a	100
353382	5	116
	15	58
	45	27
700989	5	120
	15	92
	45	46
666904	1	98
	3	45
	10	17
700991	1	118
	3	63
	10	14

실시예 95: 바이사이클릭 뉴클레오사이드 및 5'-GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고 뉴클레오타이드에 의한 생체내의 안티센스 억제

표 104에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

표 104

SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열 번호
440762	T ^m _{ks} C ^m _{ks} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{ks} C ^m _k	n/a	n/a	246
666905	GalNAc ₃ -3 _a -o-T ^m _{ks} C ^m _{ks} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{ks} C ^m _k	GalNAc ₃ -3 _a	PO	246
699782	GalNAc ₃ -7 _a -o-T ^m _{ks} C ^m _{ks} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{ks} C ^m _k	GalNAc ₃ -7 _a	PO	246
699783	GalNAc ₃ -3 _a -o-T ^m _{ks} C ^m _{ks} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{ks} C ^m _k	GalNAc ₃ -3 _a	PO	246
653621	T ^m _{is} C ^m _{is} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{is} C ^m _{is} A ^m _{do} -GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	247
439879	T ^m _{gs} C ^m _{gs} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{gs} C ^m _g	n/a	n/a	246
699789	GalNAc ₃ -3 _a -o-T ^m _{gs} C ^m _{gs} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{gs} C ^m _g	GalNAc ₃ -3 _a	PO	246

하첨자 "g"는 플루오로-HNA 뉴클레오사이드를 나타내고, 하첨자 "l"는 2'-O-CH₂-4' 브릿지를 포함하는 잠겨진 뉴클레오사이드를 나타낸다. 다른 약어에 대한 실시예 74 표 범례 참고. GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 이전에 보여졌다.

처리

이러한 연구는 실시예 93에서 기재된 프로토콜을 사용하여 완료되었다. 결과는 아래의 표 105에서 보여지고 GalNAc 콘주게이트 및 다양한 바이사이클릭 뉴클레오사이드 변형을 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 콘주게이트가 없고 바이사이클릭 뉴클레오사이드 변형을 포함하는 모 올리고뉴클레오타이드보다 유의미하게 더 강했다는 것을 보여준다. 더욱이, GalNAc 콘주게이트 및 플루오로-HNA 변형을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 콘주게이트가 없고 플루오로-HNA 변형을 포함하는 모 올리고뉴클레오타이드보다 유의미하게 더 강했다. 체중, 간 트랜스 아미나제, 총 빌리루빈, 및 BUN 측정의 결과는, 모든 화합물이 용인되었다는 것을 명시했다.

표 105

SRB-1 mRNA, ALT, AST, BUN, 및 총 빌리루빈 수준 및 체중

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% PBS)
PBS	n/a	100
440762	1	104
	3	65
	10	35
666905	0.1	105
	0.3	56
	1	18
699782	0.1	93
	0.3	63
	1	15
699783	0.1	105
	0.3	53
	1	12
653621	0.1	109
	0.3	82
	1	27
439879	1	96
	3	77
	10	37
699789	0.1	82
	0.3	69
	1	26

실시예 96: GalNAc₃ 콘주게이트 그룹을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 혈장 단백질 결합

ApoC-III을 표적으로 하는 표 70에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 및 Apo(a)을 표적으로 하는 표 106에서의 올리고뉴클레오타이드는 한외 검정에서 시험되어 혈장 단백질 결합을 평가했다.

표 106

Apo(a)을 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열 번호
494372	T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} T _{es} ^m C _e	n/a	n/a	277
693401	T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ec} G _{ec} T _{es} T _{es} ^m C _e	n/a	n/a	277
681251	GalNAc ₃ -7 _a ·o ^m T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	277
681257	GalNAc ₃ -7 _a ·o ^m T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ec} G _{ec} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	277

표 범례에 대한 실시예 74 참조 GalNAc₃-7a의 구조는 실시예 48에서 이전에 보여졌다.

Ultrafree-MC 한외여과 장치 (30,000 NMWL, 저-결합 재생된 셀룰로오스 막, 밀리포어, Bedford, MA)을 300 μL의 0.5% Tween 80으로 전-컨디셔닝하고 10 분 동안 2000 g에서 원심분리하고, 그 다음 H₂O 중 대조 올리고뉴클레오타이드의 300 μL의 300 μg/mL 용액으로 전-컨디셔닝하고 16 분 동안 2000 g에서 원심분리했다. 본 연구에서 사용될 표 70 및 106으로부터의 각 시험 올리고뉴클레오타이드의 필터에 대한 비-특이적 결합을 평가하기 위해, H₂O 중 올리고뉴클레오타이드의 300 μL의 250 ng/mL 용액을 pH 7.4에서 전-컨디셔닝된 필터 내에 두었고 16 분 동안 2000 g에서 원심분리했다. 비여과된 및 여과된 샘플을 ELISA 검정으로 분석하여 올리고뉴클레오타이드 농도를 측정했다. 3개의 복제물을 사용하여 각 샘플에 대한 평균 농도를 얻었다. 미여과된 샘플에 대한 여과된 샘플의 평균 농도를 사용하여 혈장의 주재에서 필터를 통해 회수된 올리고뉴클레오타이드의 퍼센트를 결정한다 (% 회수율).

정상, 무약물 인간 지원자, 사이노물구스 원숭이, 및 CD-1 마우스로부터의 K3-EDTA에서 수집된 냉동된 전체의

혈장 샘플을, Bioreclamation LLC (Westbury, NY)로부터 구매했다. 시험 올리고뉴클레오타이드를 1.2 mL 분취량의 혈장에 2 개의 농도 (5 및 150 $\mu\text{g/mL}$)에서 부가했다. 분취량 (300 μL)의 각 스파이킹된 혈장 샘플을 전-컨디셔닝된 필터 장치에 내에 두고 37°C에서 30 분 동안 인큐베이션하고, 즉시 그 다음 2000 g에서 16 분 동안 원심분리했다. 분취량의 여과된 및 미여과된 스파이킹된 혈장 샘플을 ELISA로 분석하여 각 샘플 중 올리고뉴클레오타이드 농도를 측정했다. 농도 당 3 개의 복제물을 사용된 각 샘플 중 결합된 및 미결합된 올리고뉴클레오타이드의 평균 백분율을 측정했다. 미여과된 샘플의 농도에 대한 여과된 샘플의 평균 농도는 사용되어 혈장 단백질에 결합되지 않는 혈장(미결합된 %) 중 올리고뉴클레오타이드의 퍼센트를 측정한다. 최종 미결합된 올리고뉴클레오타이드 값은 각 올리고뉴클레오타이드에 대해 % 미결합된 %를 % 회수율로 나누어서 비-특이적 결합을 위해 수정된다. 최종 % 결합된 올리고뉴클레오타이드 값은 100에서 최종 % 미결합된 값을 빼서 결정된다. 결과는 각 종의 혈장에서 시험된 2 개의 올리고뉴클레오타이드의 농도 시험 (5 및 150 $\mu\text{g/mL}$)에 대해 표 107에서 보여진다. 이 결과는, GalNAc 콘주게이트 그룹이 혈장 단백질 결합에 대한 유의미한 영향을 갖지 않는다는 것을 보여준다. 더욱이, 완벽한 PS 뉴클레오사이드간 연결 및 혼합된 PO/PS 연결 둘 모두를 갖는 올리고뉴클레오타이드는 혈장 단백질에 결합하고, 완벽한 PS 연결을 갖는 것은 혼합된 PO/PS 연결을 갖는 것보다 어느 정도 더 큰 정도로 혈장 단백질에 결합한다.

표 107

혈장 단백질에 결합된 변형된 올리고뉴클레오타이드의 퍼센트

ISIS 번호	인간 혈장		원숭이 혈장		마우스 혈장	
	5 $\mu\text{g/mL}$	150 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	150 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	150 $\mu\text{g/mL}$
304801	99.2	98.0	99.8	99.5	98.1	97.2
663083	97.8	90.9	99.3	99.3	96.5	93.0
674450	96.2	97.0	98.6	94.4	94.6	89.3
494372	94.1	89.3	98.9	97.5	97.2	93.6
693401	93.6	89.9	96.7	92.0	94.6	90.2
681251	95.4	93.9	99.1	98.2	97.8	96.1
681257	93.4	90.5	97.6	93.7	95.6	92.7

실시예 97: GalNAc₃ 콘주게이트 그룹을 포함하는 TTR을 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

GalNAc 콘주게이트를 포함하는 표 108에서 보여진 올리고뉴클레오타이드는 설계되어 TTR을 표적으로 했다.

표 108

TTR을 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
666941	GalNAc ₃ -3 _{a-o} -A _{do} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -3	A _d	269
666942	T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -3 _a	GalNAc ₃ -1	A _d	266
682876	GalNAc ₃ -3 _{a-o} -T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -3	PO	265
682877	GalNAc ₃ -7 _{a-o} -T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7	PO	265
682878	GalNAc ₃ -10 _{a-o} -T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -10	PO	265
682879	GalNAc ₃ -13 _{a-o} -T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -13	PO	265
682880	GalNAc ₃ -7 _{a-o} -A _{do} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7	A _d	269
682881	GalNAc ₃ -10 _{a-o} -A _{do} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -10	A _d	269
682882	GalNAc ₃ -13 _{a-o} -A _{do} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -13	A _d	269
684056	T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -19 _a	GalNAc ₃ -19	A _d	266

표 108의 범례는 실시예 74에서 발견될 수 있다. GalNAc₃-1의 구조는 실시예 9에서 보여졌다. GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌다. GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌다. GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서

보여졌다. GalNAc₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 보여졌다. GalNAc₃-19_a의 구조는 실시예 70에서 보여졌다.

실시예 98: hPMBC 검정에서 GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 전-염증 효과의 평가

표 109에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 실시예 23 및 24에서 기재된 바와 같이 hPMBC 검정에서 전-염증 효과에 대해 시험되었다. (올리고뉴클레오타이드의 설명에 대한 표 30, 83, 95, 및 108을 참고한다) ISIS 353512는 양성 대조군으로서 사용된 고반응군이고, 다른 올리고뉴클레오타이드는 표 83, 95, 및 108에서 기재되어 있다. 표 109에서 보여진 이러한 결과는 하나의 지원자 공여체로부터의 혈액을 사용하여 획득되었다. 이 결과는, 혼합된 PO/PS 뉴클레오사이드간 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드가 완벽한 PS 연결을 갖는 동일한 올리고뉴클레오타이드와 비교하여 유의미하게 더 낮은 전-염증 반응을 생산했다는 것을 보여준다. 더욱이, GalNAc 콘주게이트 그룹은 이러한 검정에서 유의미한 효과를 가지지 않았다.

표 109

ISIS 번호	E _{max} /EC ₅₀	GalNAc ₃ 클러스터	연결	CM
353512	3630	n/a	PS	n/a
420915	802	n/a	PS	n/a
682881	1311	GalNAc ₃ -10	PS	A _d
682888	0.26	GalNAc ₃ -10	PO/PS	A _d
684057	1.03	GalNAc ₃ -19	PO/PS	A _d

실시예 99: 아시알로당단백질 수용체에 대한 GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 결합 친화성

아시알로당단백질 수용체에 대한 표 110에서 열거된 올리고뉴클레오타이드의 결합 친화성 (올리고뉴클레오타이드의 설명에 대한 표 76 참고)은 경쟁적 수용체 결합 검정에서 시험되었다. 경쟁자 리간드, α1-산 당단백질 (AGP)는, 50 mM 나트륨 아세테이트 버퍼 (pH 5)에서 1 U 뉴라미니다제-아가로스화 함께 16 시간 동안 37°C에서 인큐베이션되었고, > 90% 탈시알릴화는 시알산 검정 또는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 확인되었다. 요오드 모노클로라이드는 사용되어 Atsma 등에 의한 절차에 따라 AGP를 요오드화했다 (참고 Lipid Res. 1991 Jan; 32(1):173-81.) 이러한 방법에서, 탈시알릴화된 α1-산 당단백질 (de-AGP)을 0.25 M NaOH 중 10 mM 염화요오드, Na¹²⁵I, 및 1 M 글리신에 추가했다. 10 분 동안 실온에서 인큐베이션한 후, ¹²⁵I-라벨링된 de-AGP를, 3 KDMWCO 스핀 칼럼을 사용하여 혼합물을 2회 농축하여 유리 ¹²⁵I로부터 분리했다. 단백질을, Agilent SEC-3 칼럼 (7.8x300mm) 및 β-RAM 계수기가 구비된 HPLC 시스템 상에서 라벨링 효율 및 순도에 대해 시험했다. ¹²⁵I-라벨링된 de-AGP 및 ASO를 함유하는 다양한 GalNAc-클러스터를 이용하는 경쟁 실험을 하기와 같이 수행했다. 인간 HepG2 세포 (10⁶ 세포/ml)을 2 mL의 적절한 성장 배지에서 6-웰 플레이트 상에서 플레이팅했다. 10% 우태 혈청 (FBS), 2 mM L-글루타민 및 10mM HEPES 로 보강된 MEM 배지를 사용했다. 세포를 16-20 시간 동안 37°C에서 5% 및 10% CO₂ 각각과 함께 인큐베이션했다. 세포를 실험 전에 FBS가 없는 배지로 세정했다. 세포를, 적절한 성장 배지를 2% FBS, 10⁻⁸ M ¹²⁵I-라벨링된 de-AGP와 함께 함유하는 1ml 경쟁 혼합물 및 10⁻¹¹ 내지 10⁻⁵ M 범위의 농도에서 ASO를 함유하는 GalNAc-클러스터로 30 분 동안 37°C에서 인큐베이션했다. 비-특이적 결합을 10⁻² M GalNAc 당의 존재에서 결정했다. 세포를 FBS가 없는 배지로 2회 세정하여 미결합된 ¹²⁵I-라벨링된 de-AGP 및 경쟁자 GalNAc ASO를 제거했다. 세포를, 1% β-머캅토에탄올을 함유하는 Qiagen's RLT 버퍼를 사용하여 용해시켰다. 용해물을 짧은 10 분 동결/용해 사이클 후 둥근바닥 검정 튜브로 이동시키고 γ-계수기 상에서 검정했다. 비-특이적 결합을 공제한 후 ¹²⁵I 단백질 카운트를 최저 GalNAc-ASO 농도 카운트의 값으로 나누었다. 억제 곡선 비선형회귀 알고리즘을 사용하는 단일 부위 경쟁적 결합 방정식에 따라 적합화되어 결합 친화성 (K_D's)을 계산했다.

표 110의 결과는 5 개의 상이한 날에 수행된 실험으로부터 획득되었다. 상첨자 "a"로 나타난 올리고뉴클레오타이드에 대한 결과는 2 개의 상이한 날에 실험 시행의 평균이다. 이 결과는, 5'-말단 상에 GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 3'-말단 상에 GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드보다 1.5 내지 16-배 더 큰 친화성을 갖는 인간 HepG2 세포 상에서 아시알로당단백질 수용체를 결합했다는 것을

보여준다.

표 110

아시알로당단백질 수용체 결합 검정 결과

ISIS 번호	GalNAc 콘주게이트	GalNAc 콘주게이트가 부착된 올리고뉴클레오타이드 말단	K _D (nM)
661161 ^a	GalNAc ₃ -3	5'	3.7
666881 ^a	GalNAc ₃ -10	5'	7.6
666981	GalNAc ₃ -7	5'	6.0
670061	GalNAc ₃ -13	5'	7.4
655861 ^a	GalNAc ₃ -1	3'	11.6
677841 ^a	GalNAc ₃ -19	3'	60.8

실시예 100: 생체내에서 Apo(a)를 표적으로 하는 GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내의 안티센스 억제

아래의 표 111a에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 작용의 지속시간에 대한 단회 용량 연구에서 시험되었다.

표 111a

APO(a)를 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
681251	GalNAc ₃ -7 _a -o ^m T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	277
681257	GalNAc ₃ -7 _a -o ^m T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	277

GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌다.

처리

인간 Apo(a)을 발현시키는 암컷 이식유전자 마우스 각각에게, 피하로 주당 1회, 총 6 번 용량 동안에, 표 111b에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 및 복용량 또는 PBS이 주입되었다. 각각의 처리 그룹은 3 마리의 동물로 구성되었다. 혈액을, 복용 전날에 뽑아서 Apo(a) 단백질의 기준선 수준을 혈장에서 그리고 제 1 용량 다음 72 시간, 1 주, 및 2 주에서 측정했다. 추가의 채혈은 제 1 용량 다음 3 주, 4 주, 5 주, 및 6 주에서 일어날 것이다. 혈장 Apo(a) 단백질 수준은 ELISA를 사용하여 측정되었다. 표 111b의 결과는 기준선 수준 (% BL)에 대해 정규화된, 각 처리 그룹에 대한 혈장 Apo(a) 단백질 수준의 평균 퍼센트로서 제공되고, 이 결과는, GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 Apo(a) 발현에서 강력한 축소를 나타내었다는 것을 보여준다. 이러한 강력한 효과는 완벽한 PS 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 및 혼합된 PO 및 PS 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 대해 관찰되었다.

표 111b

Apo(a) 혈장 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	72 시간에서 Apo(a) (% BL)	1 주에서 Apo(a) (% BL)	3 주에서 Apo(a) (% BL)
PBS	n/a	116	104	107
681251	0.3	97	108	93
	1.0	85	77	57
	3.0	54	49	11
	10.0	23	15	4
681257	0.3	114	138	104
	1.0	91	98	54
	3.0	69	40	6
	10.0	30	21	4

실시예 101: 안정한 모이어티를 통해 연결된 GalNAc 클러스터를 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 안티센스 억제

표 112에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스 APOC-III 발현의 억제에 대해 생체내에서 시험되었다. C57Bl/6 마우스 각각에게 표 112에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS를 피하로 1 회 주입했다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. ISIS 440670로 처리된 각각의 마우스는 2, 6, 20, 또는 60 mg/kg의 용량을 수용했다. ISIS 680772 또는 696847로 처리된 각각의 마우스는 0.6, 2, 6, 또는 20 mg/kg을 수용했다. ISIS 696847의 GalNAc 콘주게이트 그룹은 쉽게 절단가능 포스포디에스테르 함유 연결 대신에 안정한 모이어티, 포스포티오에이트 연결을 통해 연결된다. 동물은 용량 후 72 시간에 희생되었다. 간 APOC-III mRNA 수준은 실시간 PCR를 사용하여 측정되었다. APOC-III mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 사이클로필린 mRNA 수준에 대해 정규화되었다. 결과는 염수 대조군 그룹에 대한 각 처리 그룹을 위해 APOC-III mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 표 112에서 제공된다. 이 결과는, GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 콘주게이트 그룹이 없는 올리고뉴클레오타이드보다 유의미하게 더 강했다는 것을 보여준다. 더욱이, 절단가능 모이어티 (ISIS 680772)를 통해 올리고뉴클레오타이드에 연결된 GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 안정한 모이어티 (ISIS 696847)를 통해 올리고뉴클레오타이드에 연결된 GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드보다 더욱 더 강했다.

표 112

마우스 APOC-III를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	CM	복용량 (mg/kg)	APOC-III mRNA (% PBS)	서열번호
440670	${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_e$	n/a	2	92	271
			6	86	
			20	59	
			60	37	
680772	GalNAc₃-7_{a-o} - ${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_e$	PO	0.6	79	271
			2	58	
			6	31	
			20	13	
696847	GalNAc₃-7_{a-s} - ${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_e$	n/a (PS)	0.6	83	271
			2	73	
			6	40	
			20	28	

GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌다.

실시예 102: GalNAc 콘주게이트를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 간에서의 분포

GalNAc 콘주게이트를 포함하지 않는 ISIS 353382 (참고 표 36) 및 GalNAc 콘주게이트를 포함하는 ISIS 655861 (참고 표 36)의 간 분포는 평가되었다. 수컷 balb/c 마우스에게 표 113에서 열거된 복용량으로 ISIS 353382 또는 655861을 피하로 1회 주입했다. 각각의 처리 그룹은 2 마리의 동물로 구성된 ISIS 655861에 대한 18 mg/kg 그룹을 제외하고 3 마리의 동물로 구성되었다. 동물을 복용 48 시간 후에 희생시켜 올리고뉴클레오타이드의 간 분포를 측정했다. 세포 당 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자의 수를 측정하기 위해, 루테늄 (II) 트리스-바

이피리딘 태그 (MSD TAG, 중간 규모발견)을 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 검출하기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드 프로브에 접합된다. 표 113에 존재하는 결과는 세포 당 올리고뉴클레오타이드 분자의 수백만 단위로 각 처리 그룹에 대한 올리고뉴클레오타이드의 평균 농도이다. 이 결과는, 동등 투여량에서, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 GalNAc 콘주게이트를 포함하지 않는 올리고뉴클레오타이드보다 전체 간 및 간세포에서 더 높은 농도로 존재한다는 것을 보여준다. 더욱이, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트를 포함하지 않는 올리고뉴클레오타이드 보다 더 낮은 비-실질 간 세포 중 농도로 존재했다. 그리고 간세포 및 비-실질 간 세포 중 ISIS 655861의 농도는 세포에 대해 유사했지만, 간은 용적으로 대략 80% 간세포이다. 따라서, 간에 존재했던 대다수의 ISIS 655861 올리고뉴클레오타이드는 간세포에서 발견되었고, 반면에 간에 존재했던 대다수의 ISIS 353382 올리고뉴클레오타이드는 비-실질 간 세포에서 발견되었다.

표 113

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	전체 간 중 농도 (분자*10 ⁶ / 세포)	간세포 중 농도 (분자*10 ⁶ / 세포)	비-실질 간 세포 중 농도 (분자*10 ⁶ / 세포)
353382	3	9.7	1.2	37.2
	10	17.3	4.5	34.0
	20	23.6	6.6	65.6
	30	29.1	11.7	80.0
	60	73.4	14.8	98.0
	90	89.6	18.5	119.9
655861	0.5	2.6	2.9	3.2
	1	6.2	7.0	8.8
	3	19.1	25.1	28.5
	6	44.1	48.7	55.0
	18	76.6	82.3	77.1

실시예 103: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 ApoC-III을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드의 생체내 작용의 지속시간

아래의 표 114에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 작용의 지속시간에 대한 단회 용량 연구에서 시험되었다.

표 114

APOC-III을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _a	n/a	n/a	244
663084	GalNAc ₃ -3 _a -A _{do} A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -3 _a	A _d	260
679241	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -19 _a	GalNAc ₃ -19 _a	A _d	245

GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌고, GalNAc₃-19_a의 구조는 실시예 70에서 보여졌다.

처리

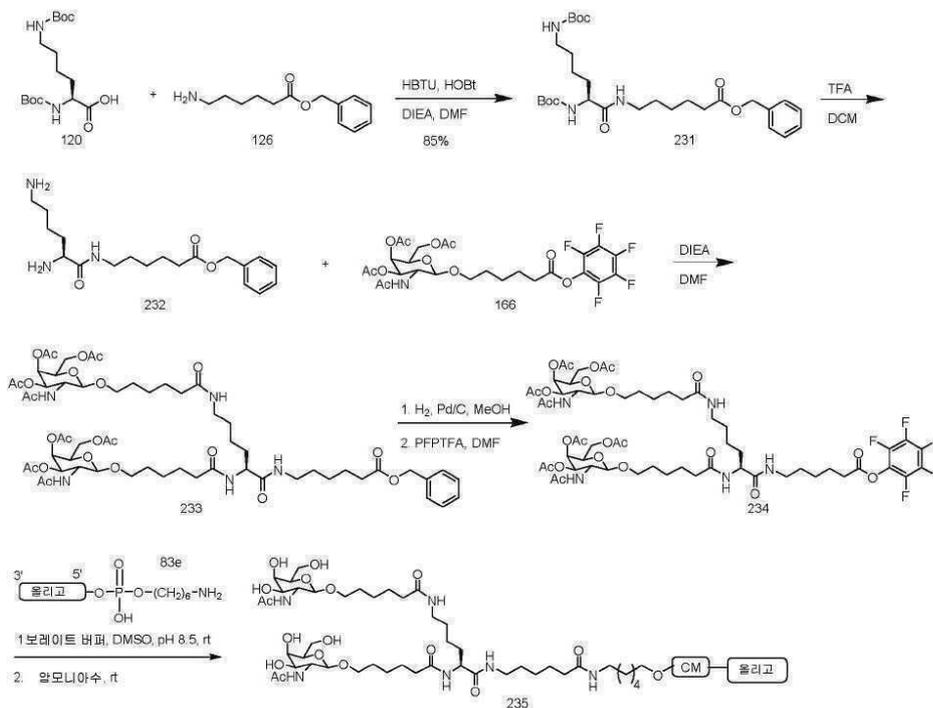
인간 APOC-III을 발현시키는 암컷 이식유전자 마우스 각각에게 표 114에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS를 피하로 1 회 주입했다. 각각의 처리 그룹은 3 마리의 동물로 구성되었다. 복용 전에 채혈하여 복용 다음에 기준선 및 3, 7, 14, 21, 28, 35, 및 42 일에서 측정했다. 혈장 트리글리세라이드 및 APOC-III 단백질 수준은 실시예 20에서 기재된 바와 같이 측정되었다. 표 115에서의 결과는 기준선 수준에 대해 정규화된, 각 처리 그룹에 대한 혈장 트리글리세라이드 및 APOC-III 수준의 평균 퍼센트로서 제공된다. 실시예 79의 표 71의 결과와 아래의 표 115의 결과와의 비교는, 포스포디에스테르와 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결의 혼합물을 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결만을 포함하는 동등한 올리고뉴클레오타이드보다 작용의 증가된 지속시간을 나타냈다는 것을 보여준다.

표 115

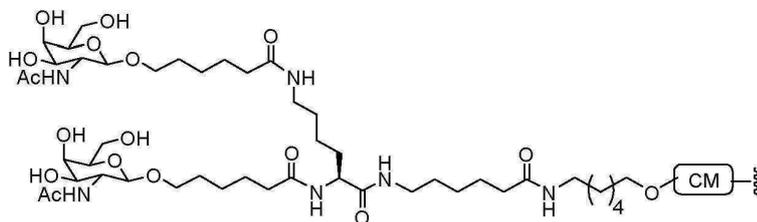
이식유전자 마우스 중 혈장 트리글리세라이드 및 APOC-III 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	시점 (복용후 일수)	트리글리세라이드 (% 기준선)	APOC-III 단백질 (% 기준선)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
PBS	n/a	3	96	101	n/a	n/a
		7	88	98		
		14	91	103		
		21	69	92		
		28	83	81		
		35	65	86		
		42	72	88		
304801	30	3	42	46	n/a	n/a
		7	42	51		
		14	59	69		
		21	67	81		
		28	79	76		
		35	72	95		
		42	82	92		
663084	10	3	35	28	GalNAc ₃ -3a	A _d
		7	23	24		
		14	23	26		
		21	23	29		
		28	30	22		
		35	32	36		
		42	37	47		
679241	10	3	38	30	GalNAc ₃ -19a	A _d
		7	31	28		
		14	30	22		
		21	36	34		
		28	48	34		
		35	50	45		
		42	72	64		

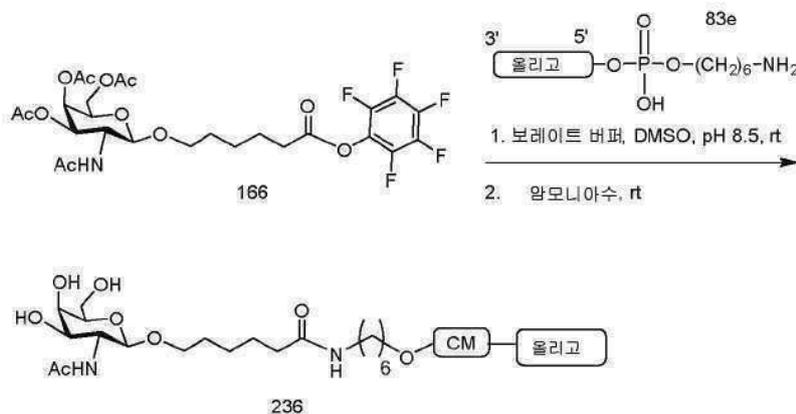
실시예 104: 5'-GalNAc₂ 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 합성



화합물 120은 시판되고 있고, 화합물 126의 합성은 실시예 49에서 기재되어 있다. 화합물 120 (1 g, 2.89 mmol), HBTU (0.39 g, 2.89 mmol), 및 HOBt (1.64 g, 4.33 mmol)을 DMF (10 mL)에서 용해시키고, *N,N*-디이소프로필에틸아민 (1.75 mL, 10.1 mmol)을 추가했다. 약 5 분 후, 아미노헥산산 벤질 에스테르 (1.36 g, 3.46 mmol)을 반응에 추가했다. 3 시간 후, 반응 혼합물을 100 mL의 1 M NaHSO₄에 붓고 2 x 50 mL 에틸 아세테이트로 추출했다. 유기 층들을 조합하고 3 x 40 mL 포화 NaHCO₃ 및 2 x 염수로 세정하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 농축했다. 생성물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 (DCM:EA:Hex, 1:1:1)로 정제하여 화합물 231을 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 화합물 231 (1.34 g, 2.438 mmol)을 디클로로메탄 (10 mL)에서 용해시키고 트리플루오르아세트산 (10 mL)을 추가했다. 실온에서 2 시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 감압 하에서 농축하고 톨루엔 (3 x 10 mL)로 공-증발시켰다. 잔류물을 감압 하에서 건조하여 화합물 232를 트리플루오르아세트산 염으로서 얻었다. 화합물 166의 합성은 실시예 54에서 기재되어 있다. 화합물 166 (3.39 g, 5.40 mmol)을 DMF (3 mL)에서 용해시켰다. 화합물 232 (1.3 g, 2.25 mmol)의 용액을 DMF (3 mL)에서 용해시키고 *N,N*-디이소프로필에틸아민 (1.55 mL)을 추가했다. 반응을 실온에서 30 분 동안 교반하고, 그 다음 물 (80 mL)에 붓고 수성 층을 EtOAc (2x100 mL)로 추출했다. 유기 상을 분리하고 포화 수성 NaHCO₃ (3 x 80 mL), 1 M NaHSO₄ (3 x 80 mL) 및 염수 (2 x 80 mL)로 세정하고, 그 다음 건조시키고 (Na₂SO₄), 여과하고, 농축했다. 잔류물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 233을 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 화합물 233 (0.59 g, 0.48 mmol)을 메탄올 (2.2 mL) 및 에틸 아세테이트 (2.2 mL)에서 용해시켰다. 탄소상 팔라듐 (10 wt% Pd/C, 습성, 0.07 g)을 추가하고, 반응 혼합물을 수소 분위기 하에서 3 시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 셀라이트의 패드를 통해 여과하고 농축하여 카복실산을 얻었다. 카복실산 (1.32 g, 1.15 mmol, 클러스터 유리 산)을 DMF (3.2 mL)에서 용해시켰다. 이것에 *N,N*-디이소프로필에틸아민 (0.3 mL, 1.73 mmol) 및 PFPTFA (0.30 mL, 1.73 mmol)을 추가했다. 실온에서 30 분 교반 후 반응 혼합물을 물 (40 mL)에 붓고 EtOAc (2 x 50 mL)로 추출했다. 표준 워크업은 상기에서 기재된 바와 같이 완료되어 화합물 234를 산출했다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 올리고뉴클레오타이드 235는 실시예 46에서 기재된 일반적인 절차를 사용하여 제조되었다. 콘주게이트 그룹 Ga1Nac₂-24의 Ga1Nac₂ 클러스터 부분 (Ga1Nac₂-24_a)은 올리고뉴클레오타이드 상에 존재하는 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. Ga1Nac₂-24 (Ga1Nac₂-24_a-CM)의 구조는 이하에서 보여진다:

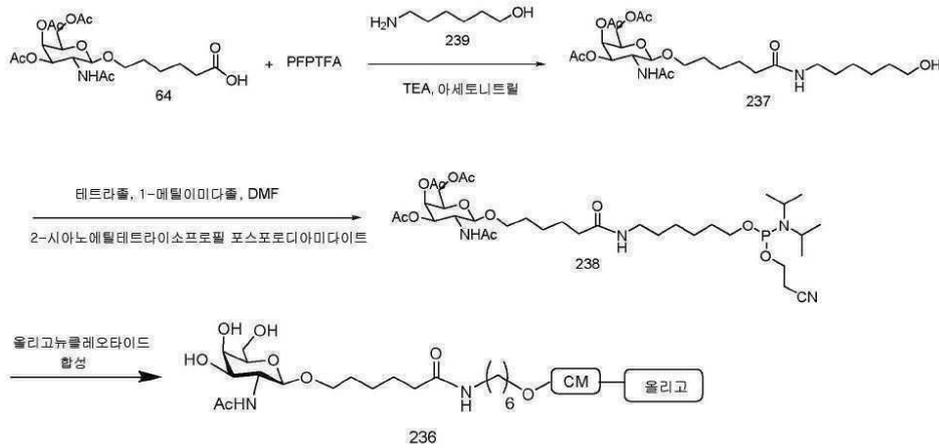


실시예 105: Ga1Nac₁-25 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 합성

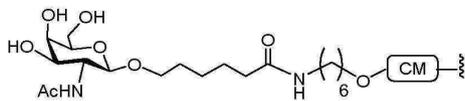


화합물 166의 합성은 실시예 54에서 기재되어 있다. 올리고뉴클레오타이드 236는 실시예 46에서 기재된 일반적인 절차를 사용하여 제조되었다.

대안적으로, 올리고뉴클레오타이드 236은 아래에서 보여진 도식을 사용하여 합성되었고, 및 화합물 238은 사용되어 실시예 10에서 기재된 절차를 사용하여 올리고뉴클레오타이드 236을 형성했다.



콘주게이트 그룹 Ga1Nac1-25의 Ga1Nac₁ 클러스터 부분 (Ga1Nac_{1-25_a})은 올리고뉴클레오타이드 상에 존재하는 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. Ga1Nac₁₋₂₅ (Ga1Nac_{1-25_a}-CM)의 구조는 이하에서 보여진다:



실시예 106: 5'-Ga1Nac2 또는 5'-Ga1Nac3 콘주게이트를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내의 안티센스 억제

표 116 및 117에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

처리

6 주령, 수컷 C57BL/6 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 2, 7, 또는 20 mg/kg의 ISIS 번호 440762; 또는 0.2, 0.6, 2, 6, 또는 20 mg/kg의 ISIS 번호 686221, 686222, 또는 708561; 또는 염수가 피하로 1회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 72 시간 후에 희생되었다. 간 SRB-1 mRNA 수준은 실시간 PCR를 사용하여 측정되었다. SRB-1 mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 사이클로필린 mRNA 수준에 대해 정규화되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 용량-의존 방식으로 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했고, ED₅₀ 결과는 표 116 및 117에서 제공된다. 이전의 연구는, 3가 Ga1Nac-접합된 올리고뉴클레오타이드가 결국 1가 Ga1Nac 접합된 올리고뉴클레오타이드로부터 유의미하게 더 강했던 2가 Ga1Nac-접합된 올리고뉴클레오타이드보다 유의미하게 더 강했다는 것을 보여주었지만, (참고, 예를 들면, Khorev 등, *Bioorg. Bioorg. & Med. Chem.*, Vol. 16, 5216-5231 (2008)), 1가, 2가, 및 3가 Ga1Nac 클러스터를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 표 116 및 117에서 보여진 바와 같은 유사한 효능으로 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다.

표 116

SRB-1을 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	Ga1Nac 클러스터	ED ₅₀ (mg/kg)	서열 번호
440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	n/a	4.7	246
686221	Ga1Nac ₂ -24 _a ·o·A _{do} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	Ga1Nac ₂ -24 _a	0.39	250
686222	Ga1Nac ₃ -13 _a ·o·A _{do} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	Ga1Nac ₃ -13 _a	0.41	250

표 범례에 대한 실시예 93 참조. Ga1Nac₃-13a의 구조는 실시예 62에서 이전에 보여졌고, Ga1Nac₂-24a의 구조는 실시예 104에서 보여졌다.

표 117

SRB-1을 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc 클러스터	ED ₅₀ (mg/kg)	서열 번호
440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	n/a	5	246
708561	GalNAc _{1-25a} ·T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc _{1-25a}	0.4	246

표 범례에 대한 실시예 93 참조. GalNAc_{1-25a}의 구조는 실시예 105에서 보여졌다.

간 중 표 116 및 117에서의 올리고뉴클레오타이드의 농도는 실시예 75에서 기재된 절차를 사용하여 또한 평가되었다. 아래의 표 117a 및 117b에서 보여진 결과는 µg 올리고뉴클레오타이드 / 간 조직의 그램의 단위로 UV에 의해 측정된 바와 같이, 각 처리 그룹에 대한 평균 총 안티센스 올리고뉴클레오타이드 조직 수준이다. 이 결과는, GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 GalNAc 콘주게이트 그룹이 없는 올리고뉴클레오타이드의 동일한 용량보다 유의미하게 더 높은 수준에서 간에서 축적된다는 것을 보여준다. 더욱이, 그의 각 콘주게이트 그룹 모두 중 1, 2 또는 3 개의 GalNAc 리간드를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 유사한 수준으로 간에서 축적된다. 이러한 결과는 상기에서 인용된 Khorev 등 문헌 참조의 관점에서 놀랍고 상기 표 116 및 117에서 보여진 활성 데이터와 일치한다.

표 117a

GalNAc₂ 또는 GalNAc₃ 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 간 농도

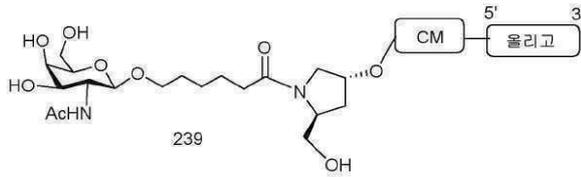
ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	[안티센스 올리고뉴클레오타이드] (µg/g)	GalNAc 클러스터	CM
440762	2	2.1	n/a	n/a
	7	13.1		
	20	31.1		
686221	0.2	0.9	GalNAc _{2-24a}	A _d
	0.6	2.7		
	2	12.0		
	6	26.5		
686222	0.2	0.5	GalNAc _{3-13a}	A _d
	0.6	1.6		
	2	11.6		
	6	19.8		

표 117b

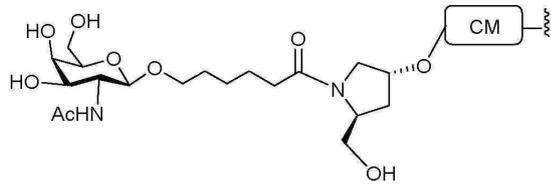
GalNAc₁ 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 간 농도

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	[안티센스 올리고뉴클레오타이드] (µg/g)	GalNAc 클러스터	CM
440762	2	2.3	n/a	n/a
	7	8.9		
	20	23.7		
708561	0.2	0.4	GalNAc _{1-25a}	PO
	0.6	1.1		
	2	5.9		
	6	23.7		
	20	53.9		

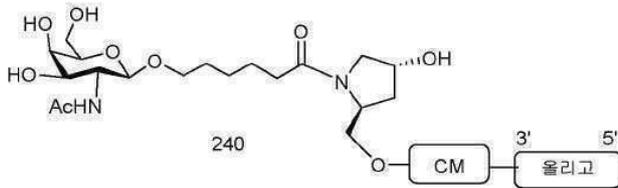
실시예 107: GalNAc₁-26 또는 GalNAc₁-27 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 합성



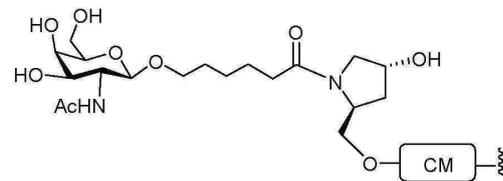
올리고뉴클레오타이드 239는 DMF 중 HBTU 및 DIEA를 사용하여 화합물 47 (참고 실시예 15)의 산 64 (참고 실시예 32)에의 커플링을 통해 합성된다. 수득한 아마이드 함유 화합물은 포스포티라화되고, 그 다음 실시예 10에서 기재된 절차를 사용하여 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부가된다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₁-26의 GalNAc₁ 클러스터 부분 (GalNAc₁-26_a)은 올리고뉴클레오타이드 상에 존재하는 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. GalNAc₁-26 (GalNAc₁-26_a-CM)의 구조는 이하에서 보여진다:



GalNAc₁ 콘주게이트 그룹을 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단에 부가하기 위해, 화합물 47 및 64의 반응으로부터 형성된 아마이드는 실시예 7에서 기재된 절차를 사용하여 고휘형 지지체에 부가된다. 그 다음 올리고뉴클레오타이드 합성은 실시예 9에서 기재된 절차를 사용하여 완료되어 올리고뉴클레오타이드 240을 형성한다.



콘주게이트 그룹 GalNAc₁-27의 GalNAc₁ 클러스터 부분 (GalNAc₁-27_a)은 올리고뉴클레오타이드 상에 존재하는 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. GalNAc₁-27 (GalNAc₁-27_a-CM)의 구조는 이하에서 보여진다:



실시예 108: 생체내에서 Apo(a)를 표적으로 하는 GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내의 안티센스 억제

아래의 표 118에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 단회 용량 연구에서 시험되었다.

표 118

APO(a)를 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
494372	T _{es} C _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} ^m C _e	n/a	n/a	277
681251	GalNAc ₃ -7 _a o' ^m T _{es} C _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	277
681255	GalNAc ₃ -3 _a o' ^m T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -3a	PO	277
681256	GalNAc ₃ -10 _a o' ^m T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -10a	PO	277
681257	GalNAc ₃ -7 _a o' ^m T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	277
681258	GalNAc ₃ -13 _a o' ^m T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -13a	PO	277
681260	T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e o' ^m A _{do} -GalNAc ₃ -19	GalNAc ₃ -19a	A _d	276

GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌다.

처리

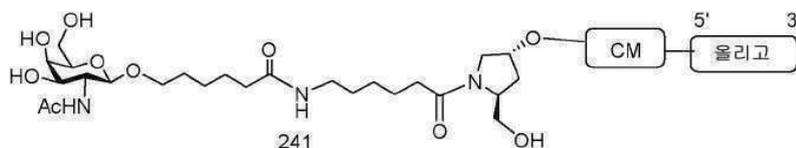
인간 Apo(a)를 발현시키는 수컷 이식유전자 마우스 각각에게, 올리고뉴클레오타이드가 그리고 그리고 표 119에서 열거된 복용량으로 또는 PBS가 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 혈액은 혈장 중 Apo(a) 단백질의 기준선 수준을 측정하기 위해 복용 전 날 및 제 1 용량 다음 1 주에 뽑았다. 추가의 채혈은 대략 8 주 동안 매주 일어날 것이다. 혈장 Apo(a) 단백질 수준은 ELISA를 사용하여 측정되었다. 표 119의 결과는 기준선 수준 (% BL)으로 정규화된, 각 처리 그룹에 대한 혈장 Apo(a) 단백질 수준의 평균 퍼센트로서 제공된다. 이 결과는, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 Apo(a) 단백질 발현을 축소시킨다는 것을 보여준다. 더욱이, GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 콘주게이트 그룹을 포함하지 않는 올리고뉴클레오타이드보다 Apo(a) 발현에서 더욱 더 강한 축소를 나타내었다.

표 119

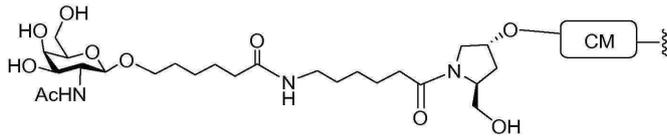
Apo(a) 혈장 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	1 주에서 Apo(a) (% BL)
PBS	n/a	143
494372	50	58
681251	10	15
681255	10	14
681256	10	17
681257	10	24
681258	10	22
681260	10	26

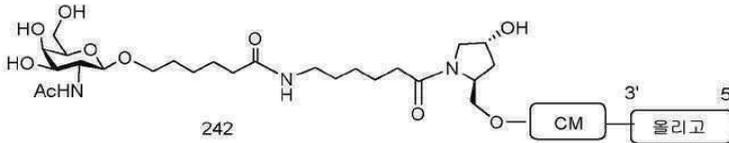
실시예 109: GalNAc₁-28 또는 GalNAc₁-29 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 합성



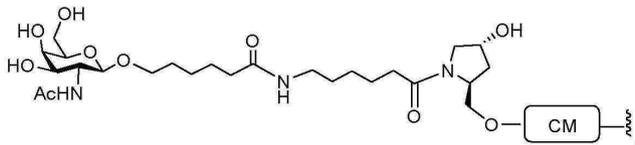
올리고뉴클레오타이드 241은 실시예 71에서 기재된 것과 유사한 절차를 사용하여 합성되어 포스포르아미다이트 중간체를 형성하고, 그 다음 실시예 10에서 기재된 절차를 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 합성한다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₁-28의 GalNAc₁ 클러스터 부분 (GalNAc₁-28_a)은 올리고뉴클레오타이드 상에 존재하는 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. GalNAc₁-28 (GalNAc₁-28_a-CM)의구조는 이하에서 보여진다:



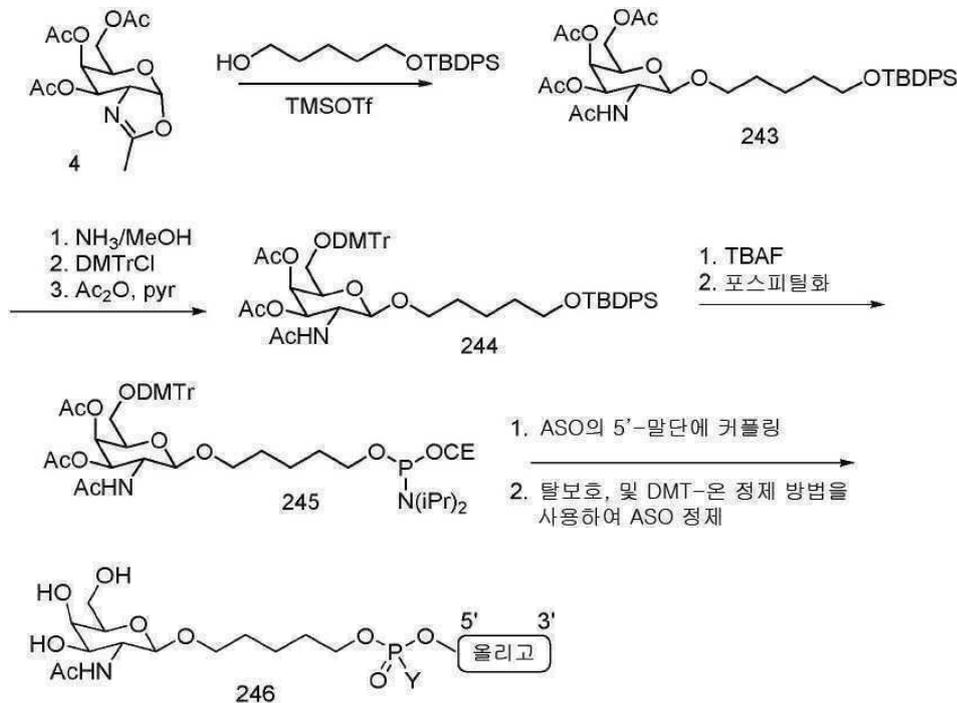
GalNAc₁ 콘주게이트 그룹을 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단에 부가하기 위해, 실시예 71에서 기재된 것과 유사한 절차가 사용되어 하이드록실 중간체를 형성하고, 그 다음 이것은 실시예 7에서 기재된 절차를 사용하여 고품질 지지체에 부가된다. 그 다음 올리고뉴클레오타이드 합성은 실시예 9에서 기재된 절차를 사용하여 완료되어 올리고뉴클레오타이드 242를 형성한다.



콘주게이트 그룹 GalNAc₁-29의 GalNAc₁ 클러스터 부분 (GalNAc₁-29_a)은 올리고뉴클레오타이드 상에 존재하는 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. GalNAc₁-29 (GalNAc₁-29_a-CM)의 구조는 이하에서 보여진다:

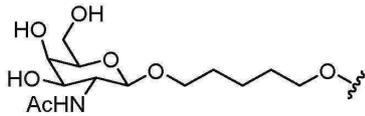


실시예 110: GalNAc₁-30 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 합성

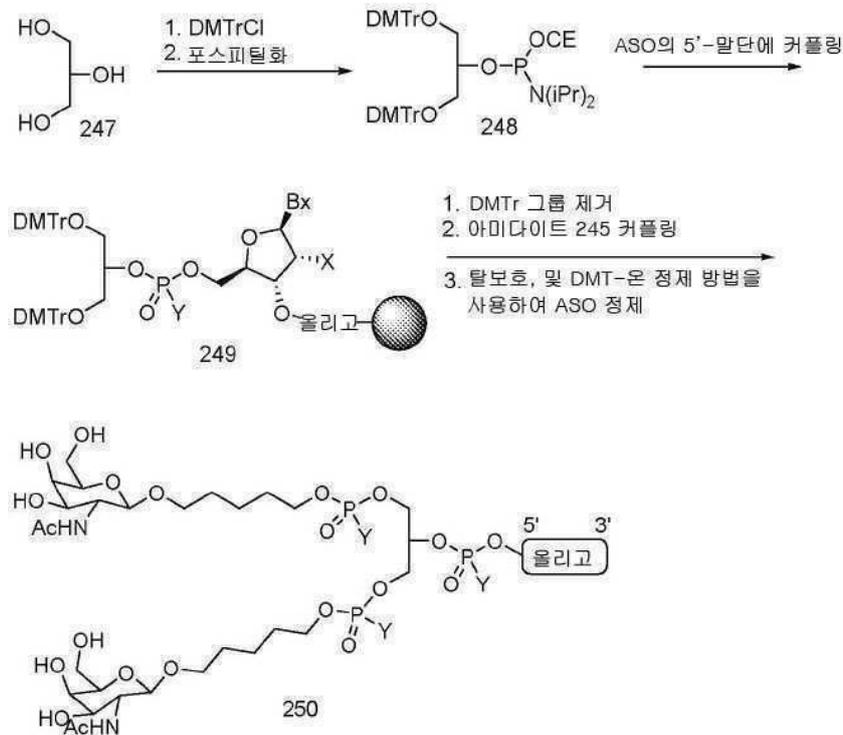


GalNAc₁-30 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 246(여기서 Y는 O, S, 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 아미노, 치환된 아미노, 아지도, 알케닐 또는 알킬닐로부터 선택됨)는, 상기에 보여진 바와 같이 합성된다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₁-30의 GalNAc₁ 클러스터 부분 (GalNAc₁-30_a)은 다양한 콘주게이트 그룹을 제공하기 위해 임의의 절단가능 모이어티와 조합될 수 있다. 어떤 구현예에서, Y는 절단가능 모이어티의 일부이다. 어떤 구현예에서, Y는 안정한 모이어티의 일부이고 절단가능 모이어티는 올리고뉴클레오타이드 상에 존재한다.

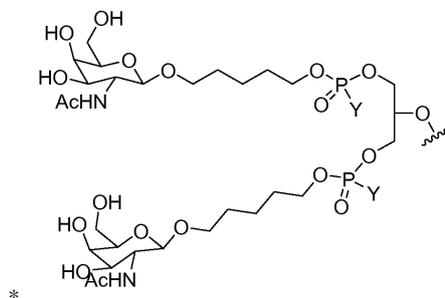
GalNAc₁-30_a의 구조는 아래에서 보여진다:



실시예 111: GalNAc₂-31 또는 GalNAc₂-32 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 합성

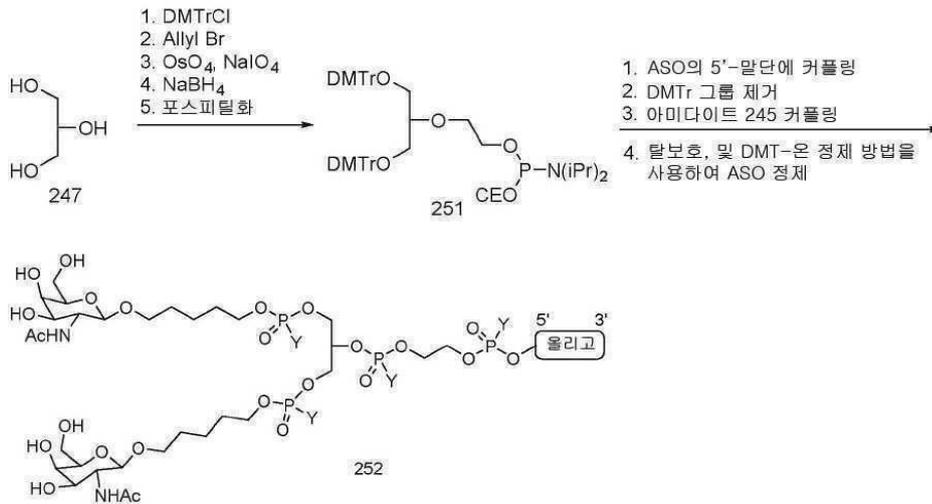


GalNAc₂-31 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 250(여기서 Y는 O, S, 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 아미노, 치환된 아미노, 아지도, 알케닐 또는 알킬닐로부터 선택됨)은, 상기에 보여진 바와 같이 합성된다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₂-31의 GalNAc₂ 클러스터 부분 (GalNAc₂-31_a)는 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 직접적으로 인접한 Y-함유 그룹은 절단가능 모이어티의 일부이다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 직접적으로 인접한 Y-함유 그룹은 안정한 모이어티의 일부이고 절단가능 모이어티는 올리고뉴클레오타이드 상에 존재한다. GalNAc₂-31_a의 구조는 아래에서 보여진다:

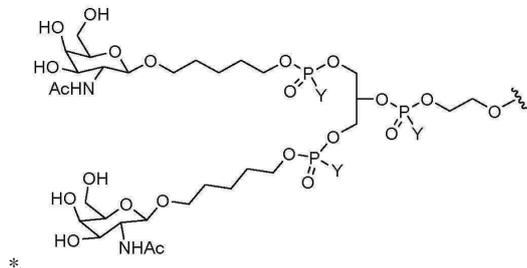


*

GalNAc₂-32 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 합성은 아래에서 보여진다.



GalNAc₂-32 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 252(여기서 Y는 O, S, 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 아미노, 치환된 아미노, 아지도, 알케닐 또는 알킬닐로부터 선택됨)는, 상기에 보여진 바와 같이 합성된다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₂-32의 GalNAc₂ 클러스터 부분 (GalNAc₂-32_a)는 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 직접적으로 인접한 Y-함유 그룹은 절단가능 모이어티의 일부이다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 직접적으로 인접한 Y-함유 그룹은 안정한 모이어티의 일부이고 절단가능 모이어티는 올리고뉴클레오타이드 상에 존재한다. GalNAc₂-32_a의 구조는 아래에서 보여진다:



실시예 112: GalNAc₁ 콘주게이트를 포함하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

SRB-1를 표적으로 하는 표 120 중 올리고뉴클레오타이드는 1 개의 GalNAc 리간드를 함유하는 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 효능을 추가 시험하기 위해 GalNAc₁ 콘주게이트 그룹으로 합성되었다.

cgagagggcggacgggaccg

안티센스 가닥 (서열번호: 15)

|||||

gctctccgctgcctggc

보체 (서열번호: 16)

상기 듀플렉스의 RNA 가닥은 본원에 개시된 방법에 의해 합성되거나 Dharmacon Research Inc., (Lafayette, CO)로부터 구입될 수 있다. 일단 합성되면, 상보적 가닥들은 어닐링된다. 상기 단일 가닥들을 분주하고 50 μM의 농도로 희석한다. 일단 희석되면, 30 μL의 각 가닥을 어닐링 버퍼의 5X 용액 15 μL와 조합한다. 상기 버퍼의 최종 농도는 100 mM 칼륨 아세테이트, 30 mM HEPES-KOH pH 7.4, 및 2mM 마그네슘 아세테이트이다. 최종 부피는 75 μL이다. 이 용액을 90°C에서 1분간 배양한 다음, 15초 동안 원심분리한다. 상기 튜브를 37°C에서 1시간 동안 정치하고, 이때 dsRNA 듀플렉스를 실험과정에 사용한다. dsRNA 듀플렉스의 최종 농도는 20 μM이다. 이 용액은 냉동(-20°C)에서 보관될 수 있고 최대 5회까지 냉동-해동될 수 있다.

일단 제조되면, 상기 듀플렉스된 안티센스 화합물들을 대상으로 아포지질단백질 C-III 발현을 조절하는 능력을 평가한다.

세포가 80% 컨플루언시에 도달하면, 이들을 본 발명의 듀플렉스된 안티센스 화합물로 처리한다. 96-웰 플레이트에서 성장한 세포의 경우, 웰을 200 μL OPTI-MEM-1™ 감소된-혈청 배지(Gibco BRL)로 1회 세척한 다음, 12 μg/mL 리포펙틴™ 시약(Gibco BRL) 및 200 nM의 최종 농도의 원하는 듀플렉스된 안티센스 화합물을 함유하는 130 μL의 OPTI-MEM-1™ 배지로 처리한다. 처리 5시간 후, 배지를 새 배지로 교체한다. 세포를 처리 16시간 후 수확하고, 이때 RNA를 분리하고 표적 감소를 RT-PCR에 의해 측정한다.

실시예 114: 2'-MOE 윙 및 데옥시 캡을 갖는 키메라 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드에 의한 인간 아포지질단백질 C-III 발현의 안티센스 억제

본 발명에 따라, 공개된 서열(서열번호: 3으로서 본원에 편입된 게놈 서열에 해당하는 GenBank 수납 번호 NT_035088.1의 뉴클레오타이드 6238608 내지 6242565, 및 서열번호: 1로서 본원에 편입된 GenBank 수납 번호 NM_000040.1)을 이용하여, 인간 아포지질단백질 C-III RNA의 상이한 영역을 표적으로 하기 위해 일련의 안티센스 화합물을 설계하였다. 상기 화합물들이 표 121에 나타나 있다. "표적 부위"는 화합물이 결합하는 특정 표적 서열상의 첫 번째(5'-최말단) 뉴클레오타이드 숫자를 가리킨다. 표 121에서의 모든 화합물들은 20 뉴클레오타이드 길이의 키메라 올리고뉴클레오타이드("캡머")이며, 두 부위(5' 및 3' 방향) 상에서 5-뉴클레오타이드 "윙"의 측면에 있는, 10개의 2'-데옥시뉴클레오타이드로 이루어진 중심 "캡" 영역으로 구성된다. 상기 윙은 (2'-MOE)뉴클레오타이드로도 알려진 2'-O-(2-메톡시에틸) 뉴클레오타이드로 구성된다. 뉴클레오사이드간(골격) 연결은 상기 올리고뉴클레오타이드 전체에 걸쳐 포스포로티오에이트(P=S)이다. 모든 시티딘 잔기는 5-메틸시티딘이다. 상기 화합물들은 대상으로 본원에서의 다른 실시예에서 기술된 바와 같이 정량적 실시간 PCR에 의해 인간 아포지질단백질 C-III mRNA 수준에 대한 이들의 효과를 분석하였다. 데이터는 HepG2 세포를 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리한 3번의 실험의 평균이다. 각각의 데이터 포인트에 대한 양성 대조군은 서열 ID 번호에 의해 상기 표에서 확인된다. 존재하는 경우, "N.D."는 "데이터 없음"를 가리킨다.

표 121 - 2'-MOE 윙 및 데옥시 캡을 갖는 키메라 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드에 의한 인간 아포지질단백질 C-III mRNA의 억제 수준

ISIS #	영역	표적 서열번호	표적 부위	서열	% 억제율	서열번호	대조군 서열번호
167824	5'UTR	3	414	ctggagcagctgcctctagg	79	19	1
167835	코딩	3	1292	ccctgcatgaagctgagaag	60	20	1
167837	코딩	1	141	gtgcttcatgtaaccctgca	88	21	1
167846	코딩	3	1369	tgctctgtgggccacctgg	66	22	1
167848	코딩	3	3278	tgctccagtagtctttcagg	81	23	1
167851	코딩	3	3326	tgacctcagggccaaatcc	41	24	1
304739	5'UTR	3	401	ctctagggatgaactgagca	62	25	1
304740	5'UTR	3	408	cagctgcctctagggatgaa	44	26	1
304741	5'UTR	1	17	ttctggagcagctgcctct	57	27	1
304742	5'UTR	1	24	acctctgttctggagcagc	78	28	1
304743	개시 코돈	1	29	atggcacctctgtcctgga	78	29	1
304744	개시 코돈	3	1065	gggtgcatggcacctctgt	73	30	1
304745	코딩	3	1086	ggcaacaacaaggagtacc	90	31	1
304746	코딩	3	1090	ggagggcaacaagaagga	80	32	1
304747	코딩	1	87	agctcgggcagagccagg	49	33	1
304748	코딩	1	92	tctgaagctcgggcagagga	72	34	1
304749	코딩	1	97	cggcctctgaagctcgggca	11	35	1
304750	코딩	3	1267	catcctcggcctctgaagct	49	36	1
304751	코딩	3	1273	gggagggatcctcggcctct	65	37	1
304752	코딩	3	1278	gagaagggagggatcctcg	82	38	1
304753	코딩	3	1281	gctgagaagggagggatcct	75	39	1
304754	코딩	3	1289	tgcatgaagctgagaagggga	74	40	1
304755	코딩	1	143	gcgtgcttcatgtaaccctg	95	41	1
304756	코딩	3	1313	ttggtggcgtgcttcatgta	92	42	1
304757	코딩	3	1328	gcatcctggcgttcttgggt	98	43	1
304758	코딩	3	1334	ctcagtgatccttggcgggt	97	44	1
304759	코딩	3	1336	tgctcagtgatccttggcg	93	45	1
304760	코딩	3	1347	ctcctgcacgctgctcagtg	65	46	1
304761	코딩	3	1349	gactcctgcacgctgctcag	77	47	1
304762	코딩	3	1358	gccacctgggactcctgcac	89	48	1
304763	코딩	1	210	gcccctggcctgctgggcca	71	49	1
304764	코딩	1	211	agcccctggcctgctgggcc	62	50	1
304765	코딩	3	3253	gaagccatcgggtcaccagc	71	51	1
304766	코딩	3	3255	ctgaagccatcgggtcaccca	85	52	1
304767	코딩	3	3265	tttcagggaaactgaagccat	73	53	1
304768	코딩	3	3273	cagtagtcttcagggaaact	40	54	1
304769	코딩	3	3283	aacgggtgctccagtagtctt	66	55	1

304770	코딩	3	3287	cctaacgggtgctccagtag	88	56	1
304771	코딩	3	3295	gaactgtcctaacgggtgc	59	57	1
304772	코딩	3	3301	ctcagagaactgtccttaa	88	58	1
304773	코딩	3	3305	agaactcagagaactgtcc	75	59	1
304774	코딩	3	3310	atcccagaactcagagaact	0	60	1
304775	코딩	3	3320	cagggtccaaatacccagaac	70	61	1
304776	코딩	3	3332	ttggtctgacctcagggtcc	90	62	1
304777	코딩	3	3333	gttggtctgacctcagggtc	84	63	1
304778	코딩	3	3339	gctgaagtgtgtcgtgacctc	81	64	1
304779	코딩	3	3347	cagccacggctgaagtgtgt	75	65	1
304780	정지 코돈	3	3351	caggcagccacggctgaagt	83	66	1
304781	정지 코돈	3	3361	attgaggtctcaggcagcca	79	67	1
304782	3'UTR	3	3385	tggataggcaggtggacttg	64	68	1
304783	3'UTR	1	369	ctcgcaggtggataggcag	76	69	1
304784	3'UTR	1	374	aggagctcgaggtggata	58	70	1
304785	3'UTR	1	380	gacccaaggagctcgagg a	73	71	1
304786	3'UTR	1	385	tgcaggacccaaggagctcg	92	72	1
304787	3'UTR	3	3417	tggagattgcaggaccaag	88	73	1
304788	3'UTR	3	3422	agccctggagattgcaggac	69	74	1
304789	3'UTR	3	3425	ggcagccctggagattgcag	76	75	1
304790	3'UTR	3	3445	cctttaagcaacctacagg	65	76	1
304791	3'UTR	3	3450	ctgtccctttaagcaacct	53	77	1
304792	3'UTR	3	3456	agaactgtccctttaag	72	78	1
304793	3'UTR	3	3461	cactgagaatactgtccctt	67	79	1
304794	3'UTR	3	3469	taggagagcactgagaatac	59	80	1
304795	3'UTR	3	3472	gggtaggagagcactgaga a	74	81	1
304796	3'UTR	3	3509	aggccagcatgcctggaggg	63	82	1
304797	3'UTR	3	3514	ttggaggccagcatgcctg	55	83	1
304798	3'UTR	3	3521	agctttattggaggccagc	90	84	1
304799	3'UTR	3	3526	tgtccagctttattggagg	85	85	1
304800	3'UTR	3	3528	ctgtccagctttattggga	94	86	1
304801	3'UTR	3	3533	agcttctgtccagctttat	74	87	1
304802	3'UTR	3	3539	catagcagctctgtccag	73	88	1
304803	엑손:인트론 접합	3	416	acctggagcagctgcctcta	87	89	1
304804	엑손:인트론 접합	3	424	agggcattacctggagcagc	68	90	1
304805	인트론:엑손 접합	3	1053	acctctgttcctgcaaggaa	74	91	1
304806	엑손:인트론 접합	3	1121	aagtgttacgggcagagggc	78	92	1
304807	엑손:인트론 접합	3	1380	gcgggtgtacctggcctgct	52	93	1
304808	인트론	3	2337	aacctgtgtgaactgcac	59	94	1
304809	인트론	3	2405	agtgagcaataccgcctgag	80	95	1
304810	인트론	3	2542	cgggcttgaattggctcagg	56	96	1

상기 표에서 나타난 바와 같이, 서열번호 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 및 96은 이 분석에서 인간 아포지질단백질 C-III 발현의 적어도 45% 억제에 입증하였으므로 바람직하다. 서열번호 75, 86 및 85가 더 바람직하다. 이들 바람직한 서열이 상보적인 표적 영역은 본원에서 "바람직한 표적 분절"로서 지칭되며 따라서 본 발명의 화합물에 의해 표적화하는데 바람직하다. 이들 바람직한 표적 분절은 하기 표 123에 나타나 있다. 상기 서열들은 상기 표에 나타난 바람직한 안티센스 화합물의 역보체에 해당한다. "표적 부위"는 올리고뉴클레오타이드가 결합하는 특정한 표적 핵산 상의 첫 번째(5'-최말단) 뉴클레오타이드 수를 가리킨다. 또한 바람직한 표적 분절 각각이 발견된 종들이 표 123에 나타나 있다.

실시예 115: 2'-MOE 링 및 테옥시 캡을 갖는 키메라 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드에 의한 마우스 아포지질단백질 C-III 발현의 안티센스.

본 발명에 따라, 공개된 서열(서열번호: 11로 편집된 GenBank 수납 번호 L04150.1)을 이용하여, 마우스 아포지질단백질 C-III RNA의 상이한 영역을 표적화하기 위해 두 번째 일련의 안티센스 화합물을 설계하였다. 상기 화합물이 표 2에 나타나 있다. "표적 부위"는 상기 화합물이 결합하는 특정한 표적 핵산상의 첫 번째(5'-최말단) 뉴클레오타이드 수를 가리킨다. 표 2에서의 모든 화합물들은 두 측면(5' 및 3' 방향) 상에 5-뉴클레오타이드 "링"의 측면에 있는 10개의 2'-테옥시뉴클레오타이드로 이루어진 중심 "캡" 영역으로 구성된, 20개 올리고뉴클레오타이드 길이의 키메라 올리고뉴클레오타이드("캡머")이다. 상기 링은 (2'-MOE)뉴클레오타이드로도 공지된 2'-O-(2-메톡시에틸)뉴클레오타이드로 구성되어 있다. 뉴클레오사이드간(골격) 연결은 상기 올리고뉴클레오타이드 전체에 걸쳐 포스포로티오에이트(P=S)이다. 모든 시티딘 잔기는 5-메틸시티딘이다. 상기 화합물을 대상으로 본

원에서의 다른 실시예에서 기재된 정량적 실시간 PCR에 의해 마우스 아포지질단백질 C-III mRNA 수준에 대한 이들의 효과를 분석하였다. 데이터는 마우스 일차 간세포 세포가 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리된 3가지 실험의 평균이다. 존재하는 경우, "N.D."는 "데이터 없음"을 가리킨다.

표 122 - 2'-MOE 워그 및 테옥시 겹을 갖는 키메라 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드에 의한 마우스 아포지질단백질 C-III mRNA 수준의 억제

ISIS #	영역	표적 서열번호	표적 부위	서열	% 억제율	서열번호
167858	5'UTR	11	1	tagggataaaaactgagcagg	47	97
167859	5'UTR	11	21	ctggagtagctagctgcttc	30	98
167860	개시 코돈	11	41	gctgcatggcacctacgtac	80	99
167861	코딩	11	62	ccacagtgaggagcgtccgg	86	100
167862	코딩	11	88	ggcagatgccaggagagcca	55	101
167863	코딩	11	104	ctaccttcagctgggca	56	102
167864	코딩	11	121	cagcagcaaggatccctcta	83	103
167865	코딩	11	131	gcacagagcccagcagcaag	49	104
167867	코딩	11	215	ccctggccaccgcagctata	67	105
167868	코딩	11	239	atctgaagtgattgtccatc	11	106
167869	코딩	11	254	agtagccttcaggaatctg	57	107
167870	코딩	11	274	ctgtcagtaaactgtctcc	89	108
167871	코딩	11	286	gaagccggtgaactgtcag	55	109
167872	코딩	11	294	gaatcccagaagccggtgaa	29	110
167873	코딩	11	299	ggttagaatcccagaagccg	55	111
167874	코딩	11	319	tggagttggttgctcag	79	112
167875	경지 코돈	11	334	tcacgactcaatagctggag	77	113
167877	3'UTR	11	421	ccctaaagcaacctcagg	71	114
167878	3'UTR	11	441	agacatgagaacatacttc	81	115
167879	3'UTR	11	471	catgttaggtgagatctag	87	116
167880	3'UTR	11	496	tcttatccagcttattagg	98	117

상기 표에서 나타난 바와 같이, 서열번호 97, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 107, 108, 109, 111, 112, 113, 114, 115, 116 및 117은 이 실험에서 마우스 아포지질단백질 C-III 발현의 적어도 45% 억제를 입증하였으므로 바람직하다. 서열번호 117, 116, 및 100이 더 바람직하다. 이들 바람직한 서열들이 상보적인 표적 영역은 본원에서 "바람직한 표적 분절"로 지칭되며 따라서 본 발명의 화합물에 의해 표적화하는데 바람직하다. 이들 바람직한 표적 분절은 하기 표에 나타나 있다. 상기 서열들은 상기 표에 나타난 바람직한 안티센스 화합물의 역보체에 해당한다. 이들 서열은 티민(T)을 함유하고 있는 것으로 나타나 있으나 당해분야의 숙련가는 티민(T)이 RNA 서열에서 우라실(U)에 의해 일반적으로 대체된다는 것을 인식할 것이다. "표적 부위"는 상기 화합물이 결합하는 특정한 표적 핵산 상의 첫 번째(5'-최말단) 뉴클레오타이드 수를 가리킨다. 또한 상기 바람직한 표적 분절 각각이 발견된 종들이 표 3에 나타나 있다.

표 123 - 아포지질단백질 C-II에서 확인된 바람직한 표적 분질의 서열 및 위치.

부위 ID	표적 서열번호	표적 부위	서열	서열번호의 상대적 비교	아래에서 활성화	서열번호
82975	3	414	cctagaggcagctgctccag	19	H. 사피엘스	118
82980	3	1292	cttctcagctcatgcaggg	20	H. 사피엘스	119
82981	1	141	tgagggttacatgaagcac	21	H. 사피엘스	120
82985	3	1369	ccaggtggcccagcaggcca	22	H. 사피엘스	121
82987	3	3278	cctgaaagactactggagca	23	H. 사피엘스	122
220510	3	401	tgctcagttcatccctagag	25	H. 사피엘스	123
220512	1	17	agaggcagctgctccaggaa	27	H. 사피엘스	124
220513	1	24	gctgctccaggaacagaggt	28	H. 사피엘스	125
220514	1	29	tccaggaacagaggtgccat	29	H. 사피엘스	126
220515	3	1065	acagaggtgccatgcagccc	30	H. 사피엘스	127
220516	3	1086	gggtactcctgtgttgcc	31	H. 사피엘스	128
220517	3	1090	actcctgtgttgccctcc	32	H. 사피엘스	129
220518	1	87	tcttgcctctgcccagct	33	H. 사피엘스	130
220519	1	92	gcctctgcccagctcaga	34	H. 사피엘스	131
220521	3	1267	agctcagaggccgaggatg	36	H. 사피엘스	132
220522	3	1273	agaggccgaggatgcctccc	37	H. 사피엘스	133
220523	3	1278	ccgaggatgcctccctctc	38	H. 사피엘스	134
220524	3	1281	aggatgcctccctctcagc	39	H. 사피엘스	135
220525	3	1289	tccttctcagttcatgca	40	H. 사피엘스	136
220526	1	143	cagggttacatgaagcacgc	41	H. 사피엘스	137
220527	3	1313	tacatgaagcagccaccaa	42	H. 사피엘스	138
220528	3	1328	accaagaccgccaaggatgc	43	H. 사피엘스	139
220529	3	1334	accgccaaggatgcactgag	44	H. 사피엘스	140
220530	3	1336	cgccaaggatgcactgagca	45	H. 사피엘스	141
220531	3	1347	cactgagcagcgtgcaggag	46	H. 사피엘스	142
220532	3	1349	ctgagcagcgtgcaggagtc	47	H. 사피엘스	143
220533	3	1358	gtgcaggagtcccagggtgc	48	H. 사피엘스	144
220534	1	210	tgcccagcaggccaggggc	49	H. 사피엘스	145
220535	1	211	ggccagcaggccaggggct	50	H. 사피엘스	146
220536	3	3253	gctgggtgaccgatggcttc	51	H. 사피엘스	147
220537	3	3255	tggtgaccgatggcttcag	52	H. 사피엘스	148
220538	3	3265	atggctcagttccctgaaa	53	H. 사피엘스	149
220540	3	3283	aagactactggagcaccgtt	55	H. 사피엘스	150
220541	3	3287	ctactggagcaccgtaagg	56	H. 사피엘스	151
220542	3	3295	gcaccgtaaggacaagttc	57	H. 사피엘스	152
220543	3	3301	ttaaggacaagttctctgag	58	H. 사피엘스	153
220544	3	3305	ggacaagttctctgagttct	59	H. 사피엘스	154
220546	3	3320	gttctgggattggaccctg	61	H. 사피엘스	155
220547	3	3332	ggaccctgaggctcagaccaa	62	H. 사피엘스	156

220548	3	3333	gaccctgaggtcagaccaac	63	H. 사피엘스	157
220549	3	3339	gaggtcagaccaactcagc	64	H. 사피엘스	158
220550	3	3347	accaacttcagccgtggctg	65	H. 사피엘스	159
220551	3	3351	acttcagccgtggctgcctg	66	H. 사피엘스	160
220552	3	3361	tggctgcctgagacctcaat	67	H. 사피엘스	161
220553	3	3385	caagtccacctgcctatcca	68	H. 사피엘스	162
220554	1	369	ctgcctatccatcctgcgag	69	H. 사피엘스	163
220555	1	374	tatccatcctgcgagctcct	70	H. 사피엘스	164
220556	1	380	tcctgcgagctcctgggtc	71	H. 사피엘스	165
220557	1	385	cgagctcctgggtcctgca	72	H. 사피엘스	166
220558	3	3417	ctgggtcctgcaatctcca	73	H. 사피엘스	167
220559	3	3422	gtcctgcaatctccagggtc	74	H. 사피엘스	168
220560	3	3425	ctgcaatctccagggtcgc	75	H. 사피엘스	169
220561	3	3445	cctgtaggtgcttaaaagg	76	H. 사피엘스	170
220562	3	3450	aggttgcttaaaaggacag	77	H. 사피엘스	171
220563	3	3456	cttaaaaggacagtattct	78	H. 사피엘스	172
220564	3	3461	aaggacagtattctcagtg	79	H. 사피엘스	173
220565	3	3469	gtattctcagtgctctcta	80	H. 사피엘스	174
220566	3	3472	ttctcagtgctctctacc	81	H. 사피엘스	175
220567	3	3509	ccctcaggcatgctggcct	82	H. 사피엘스	176
220568	3	3514	caggcatgctggcctccaa	83	H. 사피엘스	177
220569	3	3521	gctggctcccaataaagct	84	H. 사피엘스	178
220570	3	3526	cctccaataaagctggaca	85	H. 사피엘스	179
220571	3	3528	tccaataaagctggacaag	86	H. 사피엘스	180
220572	3	3533	ataaagctggacaagaagct	87	H. 사피엘스	181
220573	3	3539	ctggacaagaagctgctatg	88	H. 사피엘스	182
220574	3	416	tagaggcagctgctccaggt	89	H. 사피엘스	183
220575	3	424	gctgctccaggtaatgcct	90	H. 사피엘스	184
220576	3	1053	ttcctgcaaggaacagaggt	91	H. 사피엘스	185
220577	3	1121	gcctctgcccgtaacactt	92	H. 사피엘스	186
220578	3	1380	agcaggccaggtacaccgc	93	H. 사피엘스	187
220579	3	2337	gtgcagttcacaacagggtt	94	H. 사피엘스	188
220580	3	2405	ctcaggcgtattgctcact	95	H. 사피엘스	189
220581	3	2542	cctgacctaatcaagccc	96	H. 사피엘스	190
82997	11	1	cctgctcagtttatcccta	97	M. 머스쿨러스	191
82999	11	41	gtacgtaggtgccatgcagc	99	M. 머스쿨러스	192
83000	11	62	ccggacgctcctcactgtgg	100	M. 머스쿨러스	193
83001	11	88	tggctctcctggcatctgcc	101	M. 머스쿨러스	194
83002	11	104	tgcccagctgaagaggtag	102	M. 머스쿨러스	195
83003	11	121	tagagggatccttgctgctg	103	M. 머스쿨러스	196
83004	11	131	cttgctgctgggctctgtgc	104	M. 머스쿨러스	197
83006	11	215	tatagctgctgggccagg	105	M. 머스쿨러스	198
83008	11	254	cagattcctgaaggctact	107	M. 머스쿨러스	199
83009	11	274	ggagcaagttactgacaag	108	M. 머스쿨러스	200
83010	11	286	ctgacaagttaccggcttc	109	M. 머스쿨러스	201

83012	11	299	cgctctgggattctaacc	111	M. 머스쿨러스	202
83013	11	319	ctgaggaccaaccaactcca	112	M. 머스쿨러스	203
83014	11	334	ctccagctattgagctgga	113	M. 머스쿨러스	204
83016	11	421	cctgaaggtgcttaaggg	114	M. 머스쿨러스	205
83017	11	441	gaaagtatttctatgtct	115	M. 머스쿨러스	206
83018	11	471	ctagatctcacctaaacatg	116	M. 머스쿨러스	207
83019	11	496	cctaataaagctggataaga	117	M. 머스쿨러스	208

이들 "바람직한 표적 분절"은 본 발명의 안티센스 화합물과의 혼성화 여지가 있고 접근가능한 것으로 실험에 의해 확인되어 왔으므로, 당해분야의 숙련가는 단지 통상적인 실험을 이용하여 이들 바람직한 표적 분절에 특이적으로 혼성화하고 그 결과 아포지질단백질 C-III의 발현을 억제하는 다른 화합물을 포함하는 본 발명의 추가 구현예를 인식하거나 알아낼 수 있을 것이다.

본 발명에 따르면, 안티센스 화합물은 안티센스 올리고머 화합물, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임,

외부 가이드 서열(EGS) 올리고뉴클레오타이드, 대안적인 스플라이서, 프라이머, 프로브, 및 표적 핵산 중 적어도 일부와 혼성화하는 다른 짧은 올리고머 화합물을 포함한다.

실시예 116: 2'-MOE 링 및 테옥시 캡을 갖는 키메라 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드에 의한 인간 아포지질단백질 C-III 수준의 억제 - 추가의 안티센스 화합물

본 발명에 따라, 공개된 서열을 이용하여(서열번호: 3으로서 본원에 편입된 게놈 서열에 해당하는, GenBank 수납 번호 NT_035088.1의 뉴클레오타이드 6238608 내지 6242565, 및 서열번호: 1로서 본원에 편입된 GenBank 수납 번호 NM_000040.1), 인간 아포지질단백질 C-III RNA의 상이한 영역을 표적화하도록 부가적인 일련의 안티센스 화합물을 설계하였다. 상기 화합물들은 표 124에 나타나 있다. "표적 부위"는 화합물이 결합하는 특정한 표적 핵산 상의 첫 번째(5'-최말단) 뉴클레오타이드 수를 가리킨다. 표 124에서의 모든 화합물은 양 측면(5' 및 3' 방향) 상에서 5-뉴클레오타이드 "링"의 측면에 있는 10개의 키메라 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 중심 "캡" 영역으로 구성된, 20개 올리고뉴클레오타이드 길이의 키메라 올리고뉴클레오타이드("캡머")이다. 상기 링은 (2'-MOE) 뉴클레오타이드로도 공지된 2'-O-(2-메톡시에틸)뉴클레오타이드로 구성되어 있다. 뉴클레오사이드 간 (골격) 연결은 상기 올리고뉴클레오타이드를 통한 포스포로티오에이트(P=S)이다. 모든 시티딘 잔기는 5-메틸 시티딘이다. 상기 화합물들을 대상으로 본원에서의 다른 실시예에서 기재된 정량적 실시간 PCR에 의해 마우스 아포지질단백질 C-III mRNA 수준에 대한 이들의 효과를 분석하였다.

HepG2 세포를 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리하였다. 존재하는 경우, "N.D.는 " "데이터 없음"을 가리킨다.

표 124 - 2'-MOE 링 및 테옥시 캡을 갖는 키메라 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드에 의한 인간 아포지질단백질 C-III mRNA 수준의 억제

ISIS #	표적 서열번호	표적 부위	서열	% 억제율	서열번호
167826	3	1063	gctgcatggcacctctgttc	0	209
167828	3	1110	ggcagaggccaggagcgcca	0	210
167830	1	91	ctgaagctcgggcagaggcc	9	211
167832	1	101	tcctcggcctctgaagctcg	0	212
167840	3	1315	tcttggtggcgtgctcatg	0	213
167842	3	1335	gctcagtgcaccttggcgg	38	214
167844	3	1345	cctgcacgctgctcagtga	28	215
167847	3	3256	actgaagccatcggtcacc	0	216
167850	3	3306	cagaactcagagaactgtc	0	217
167852	3	3336	gaagttggctgacctcagg	0	218
167853	3	3420	ccctggagattgcaggacc	0	219
167854	3	3426	gggcagccctggagattgca	22	220
167855	3	3446	ccctttaagcaacctacag	27	221

실시예 117: 2'-MOE 링 및 테옥시 캡을 갖는 키메라 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드에 의한 인간 아포지질단백질 C-III 발현의 안티센스 억제 : HepG2 세포에서의 용량-반응 연구

본 발명에 따라, 실시예 15 및 17에서의 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 하위집단을 용량-반응 연구에서 추가 조사하였다. ISIS 167842(서열번호: 214), ISIS 167844(서열번호: 215), ISIS 167846(서열번호: 22), ISIS 167837(서열번호: 21), ISIS 304789(서열번호: 75), ISIS 304799(서열번호: 85), 및 ISIS 304800(서열번호: 86)의 처리 용량은 50, 150 및 300 nM였다. 상기 화합물들을 대상으로 본원에서의 다른 실시예에서 기재된 정량적 실시간 PCR에 의해 HepG2에서 인간의 아포지질단백질 C-III mRNA 수준에 대한 이들의 효과를 분석하였다. 데이터는 두 실험으로부터의 평균이며 하기 표에 나타나 있다.

표 125 2'-MOE 링 및 테옥시 캡을 갖는 키메라 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드에 의한 인간 아포지질단백질 C-III mRNA 수준의 억제

ISIS #	서열번호	올리고뉴클레오타이드의 용량		
		50 nM	150 nM	300 nM
		% 억제율		
167842	214	88	77	92
167844	215	86	86	84
167846	22	79	80	79
167837	21	83	86	84
304789	75	81	91	92
304799	85	82	93	88
304800	86	80	86	91

이들 테이타는 아포지질단백질 C-III의 발현이 표적 아포지질단백질 C-III을 표적화하는 안티센스 화합물로 세포를 처리시 용량-의존 방식으로 억제된다는 것을 증명한다. 이들 화합물을 대상으로 Hep3B 세포에서 mRNA 수준을 감소시키는 이들의 능력을 Hep3B 세포에서 추가 분석하였고, ISIS 167842 및 167837이 또한 이 세포주에서 용량 의존 방식으로 아포지질단백질 C-III 발현을 억제하였음이 결정되었다.

실시예 118: 사이노몰구스 원숭이 일차 간세포에서 아포지질단백질 C-III의 안티센스 억제

추가 구현예에서, 인간 아포지질단백질 C-III을 표적으로 한 안티센스 화합물들은 대상으로 일차 사이노몰구스 원숭이 간세포에서 아포지질단백질 C-III 발현에 대한 이들의 효과를 시험하였다. 미리-플레이팅된 일차 사이노몰구스 원숭이 간세포를 InVitro Technologies(Baltimore, MD)로부터 구입하였다. 세포를 10% 우태 혈청 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), 100 units/mL 및 100 µg/mL 스트렙토마이신(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)이 보충된 고-글루코오스 DMEM(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)에서 배양하였다.

24-웰 플레이트 내의 웰당 80,000 세포의 밀도의 세포를 10, 50, 150 및 300 nM의 ISIS 304789(서열번호: 75), ISIS 304799(서열번호: 85) 또는 ISIS 304800(서열번호: 86)으로 처리하였다. ISIS 113529(CTCTTACTGTGCTGTGGACA, 서열번호: 17)는 대조군 올리고뉴클레오타이드로 제공되었다. ISIS 113529는 5-뉴클레오타이드 양 측면(5' 및 3' 방향) 상에 "윙"의 측면에 있는 10개의 키메라 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 중심 "갭" 영역으로 구성된, 20개 올리고뉴클레오타이드 길이의 키메라 올리고뉴클레오타이드("갭머")이다. 상기 윙은 2'-MOE)뉴클레오타이드로도 공지된 2'-O-(2-메톡시에틸)뉴클레오타이드로 구성되어 있다. 뉴클레오사이드간(골격) 연결은 올리고뉴클레오타이드 전체에 걸쳐 포스포로티오에이트(P=S)이다. 모든 시티딘 잔기는 5-메틸시티딘이다.

안티센스 올리고뉴클레오타이드로 처리 24시간 후, 사이노몰구스 원숭이 아포지질단백질 C-III mRNA를 측정하기 위해 인간 아포지질단백질 C-III 서열에 대해 설계된 프라이머 및 프로브(정방향 프라이머: TCAGCTTCATGCAGGTTACAT (서열번호: 5) 역방향 프라이머: ACGCTGCTCAGTGCATCCT(서열번호: 6) 및 PCR 프로브는: FAM-AAGCACGCCACCAAGACGCC-TAMRA(서열번호: 7))를 이용하여, 본원에서의 다른 실시예에 기재된 바와 같이 실시간 PCR에 의해 아포지질단백질 C-III mRNA를 측정하였다. 실시간 PCR에 의해 얻어진 유전자 표적 양을 정규화하기 위해, 인간 GAPDH에 대해 설계된 프라이머 및 프로브(정방향 프라이머: GAAGGTGAAGTCCGAGTC(서열번호: 8) 역방향 프라이머: GAAGATGGTATGGGATTTC(서열번호: 9) 및 PCR 프로브는: 5' JOE-CAAGCTTCCC GTTCTCAGCC- TAMRA 3'(서열번호: 10)) 및 PCR 프로브를 사용하여 사이노몰구스 원숭이 아포지질단백질 GAPDH mRNA를 측정하였다. 처리되지 않은 세포들은 데이터가 정규화된 대조군으로서 제공되었다. 데이터는 세 가지 실험의 평균이며 하기 표에 제시되어 있다.

표 126 - 사이노몰구스 원숭이 일차 간세포에서 아포지질단백질 C-III의 안티센스 억제

ISIS #	서열번호	올리고뉴클레오타이드의 용량			
		10 nM	50 nM	150 nM	300 nM
		% 억제율			
304789	75	0	7	1	55
304799	85	34	60	66	48
304800	86	9	53	59	57
113529	222	N.D.	N.D.	0	0

실시예 119: 사이노몰구스 원숭이 아포지질단백질 C-III 서열

추가 구현예에서, 사이노몰구스 원숭이 아포지질단백질 C-III 유전자의 일부를 시퀀싱하였다. 인간 아포지질단백질 C-III mRNA 서열(서열번호: 1로서 본원에 그 전체가 편입됨)의 위치 8 내지 476은 ISIS 304789가 혼성화하는 표적 분절을 함유한다. 사이노몰구스 원숭이 아포지질단백질 C-III mRNA의 상응하는 영역을 시퀀싱하였다. RNA를 일차 사이노몰구스 원숭이 간세포(InVitro Technologies, Gaithersburg, MD)로부터 분리 및 정제하고 역전사효소 반응시켰다(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA로부터의 키트). 상기 얻어진 cDNA는 인간 아포지질단백질 C-III mRNA의 위치 8 및 476 각각에 대해 설계된 5' 및 3' 프라이머를 사용한, 40회의 PCR 증폭에 대한 기질이였다(Amplitaq PCR kit, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). 상기 얻어진 468 bp 단편의 겔 정제 후, 각 산물의 정방향 및 역방향 시퀀싱 반응을 Retrogen(San Diego, CA)에 의해 수행하였다. 이 사이노몰구스 원숭이 서열은 서열번호: 223으로서 본원에 편입되어 있으며 인간 아포지질단백질 C-III mRNA의 위치 8 내지 476과 92% 동일하다.

실시예 120: 사이노몰구스 원숭이 아포지질단백질 C-III에 표적화된 2'-MOE 링 및 데옥시 캡을 갖는 키메라 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드

추가 구현예에서, 서열번호: 223으로서 본원에 편입된 사이노몰구스 원숭이 아포지질단백질 C-III의 서열을 사용하여 사이노몰구스 아포지질단백질 C-III mRNA에 100% 상보성을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 설계하였다. ISIS 340340(GGCAGCCCTGGAGGCTGCAG; 서열번호: 18로서 본원에 편입됨)은 ISIS 304789이 혼성화하는 인간 아포지질단백질 C-III의 3'UTR에 상응하는 영역 내에, 서열번호: 223의 뉴클레오타이드 397을 표적화한다. ISIS 340340은 양 측면(5' 및 3' 방향) 상에 5-뉴클레오타이드 "링"의 측면에 있는 10개의 키메라 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 중심 "캡" 영역으로 구성된, 20개 올리고뉴클레오타이드 길이의 키메라 올리고뉴클레오타이드("캡머")이다. 상기 링은 2' 메톡시에틸(2'-MOE) 뉴클레오타이드로 구성되어 있다. 뉴클레오사이드간(골격) 연결은 올리고뉴클레오타이드 전체에 걸쳐 포스포로티오에이트(P=S)이다. 모든 시티딘 잔기는 5-메틸시티딘이다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Isis Pharmaceuticals, Inc.

- <120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING APOLIPROTEIN C-III
EXPRESSION
- <130> BIOL0249WO
- <150> 61/818,422
- <151> 2013-05-01
- <150> 61/823,826
- <151> 2013-05-15
- <150> 61/843,887
- <151> 2013-07-08
- <150> 61/871,673
- <151> 2013-08-29
- <150> 61/880,790
- <151> 2013-09-20
- <150> 61/976,991
- <151> 2014-04-08

<150> 61/986,867
 <151> 2014-04-30
 <160> 277
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 533
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

```

tgctcagttc atccctagag gcagctgctc caggaacaga ggtgccatgc agccccgggt      60
actccttggt gttgcectcc tggcgctcct ggcctctgcc cgagcttcag aggccgagga      120
tgccctcctt ctcagcttca tgcagggtta catgaagcac gccaccaaga ccgccaagga      180
tgcaactgag agcgtgcagg agtcccaggt ggcccagcag gccaggggct gggtgaccga      240
tggtttcagt tcctgaaag actactggag caccgttaag gacaagttct ctgagttctg      300
ggatttggac cctgaggtca gaccaacttc agccgtggct gcctgagacc tcaatacccc      360

aagtccacct gectatccat cctgcgagct ccttgggtcc tgcaatctcc agggctgccc      420
ctgtaggttg cttaaaaggg acagtattct cagtgtcttc ctaccccacc tcatgctctg      480
ccccctcca ggcattctgg cctcccaata aagctggaca agaagctgct atg          533
    
```

<210> 2
 <211> 3964
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

```

ctactccagg ctgtgttcag ggcttggggc tggtagggg aggggctga aattccagtg      60
tgaaaggctg agatgggccc gaggeccctg gcctatgtcc aagccatttc cctctcacc      120
agcctctccc tggggagcca gtcagctagg aaggaatgag ggctccccag gccaccccc      180

agttcctgag ctcatctggg ctgcagggtt ggcgggacag cagcgtggac tcagtctcct      240
agggatttcc caactctccc gccccttgc tgcatttga caccctgcct caggccctca      300
tctccactgg tcagcaggtg acctttgccc agcgccttgg gtctctcagt cctgtctgcc      360
tggagatgat ataaaacagg tcagaacct cctgcctgtc tgctcagttc atccctagag      420
gcagctgctc caggtaatgc cctctgggga ggggaaagag gaggggagga ggatgaagag      480
gggcaagagg agctccctgc ccagcccagc cagcaagcct ggagaagcac ttgctagagc      540
    
```

taaggaagcc tcggagctgg acgggtgccc cccaccctc atcataacct gaagaacatg 600

 gagggccggg aggggtgtca cttgccaaa gctacacagg ggggtgggct ggaagtggct 660
 ccaagtgcag gttccccct cattettcag gcttagggct ggaggaagcc ttagacagcc 720
 cagtcctacc ccagacaggg aaactgaggc ctggagaggg ccagaaatca cccaagaca 780
 cacagcatgt tggctggact ggacggagat cagtccagac cgcaggtgcc ttgatgttca 840
 gtctggtggg ttttctgctc cateccacc acctccctt gggcctcgat cctctgcccc 900
 tcaccagtcc cccttctgag agcccgtatt agcaggggagc cggcccctac tccttctggc 960
 agaccagct aaggttctac cttaggggccc acgccacctc cccagggagg ggtccagagg 1020

 catggggacc tggggtgccc ctcacaggac acttccttgc aggaacagag gtgcatgca 1080
 gccccgggta ctcttgttg ttgccctctt ggcgctctctg gcctctgccc gtaagcactt 1140
 ggtgggactg ggctgggggc aggggtggagg caacttgggg atccagctcc caatgggtgg 1200
 tcaagcagga gccagggct cgtccagagg ccgatccacc ccaactcagcc ctgctctttc 1260
 ctccagagct tcagaggccg aggatgcctc ctttctcagc ttcattgcagg gttacatgaa 1320
 gcacgccacc aagaccgcca aggatgcaact gacgagcgtg caggagtccc aggtggccca 1380
 gcaggccagg tacaccgct ggcctccctc cccatcccc ctgccagctg cctccattcc 1440

 caccgcccc tgcctggtg agatcccaac aatggaatgg aggtgctcca gcctccctg 1500
 ggctgtgcc tcttcagcct cctctttcct cacaggcct ttgtcaggct gctgcgggag 1560
 agatgacaga gttgagactg cattctccc aggtccctcc tttctcccc gagcagctct 1620
 agggcgtgcc gttttagccc tcatttccat tttctttcc tttcccttcc tttctctttc 1680
 tattctttc tttctttctt tttcttttc tttctttctt tttcttttc tttctttctt 1740
 tctttcttc cttctttctt ttctttctt ttttctttt ctttctttct ttctttctt 1800
 tctttttctt tttttcttc cttttcttt ctttccctct cttctttct cttttcttt 1860

 cttcttttt tttttttaa ggagtctccc tctgtcacct aggctggagt gcagtgggtc 1920
 catctcgget cactgcaacc tccgtctccc gggttcaacc cattctctg cctcagcctc 1980
 ccaagtagct gggattacag gcacgcgcca ccacaccag ctaattttg tatttttagc 2040
 agagatgggg tttcaccatg ttggccaggt tggctttgaa ttctgacct caggggatcc 2100
 tctgectcg gcctccaaa gtgctgggat tacagcatg agccactgcg cctggcccca 2160
 tttcttttt ctgaaggctt ggctagagca gtggtctca gcctttttgg caccagggac 2220
 cagttttgtg gtggacaatt tttccatggg ccagcgggga tggttttggg atgaagctgt 2280

tccacctcag atcatcaggc attagattct cataaggagc cctccaccta gatccctggc 2340
 atgtgcagtt cacaataggg ttcacactcc tatgagaatg taaggccact tgatctgaca 2400
 ggaggcggag ctcaggcggg attgtctact caccaccac tcacttcgtg ctgtgcagcc 2460
 cggtcctaa cagtccatgg accagtacct atctatgact tgggggttgg ggacccttg 2520
 gctaggggtt tgccttggga ggccccacct gacccaattc aagccctga gtgcttctgc 2580
 tttgttctaa gacctggggc cagtgtgagc agaagtgtgt ccttctctc ccatctgcc 2640
 cctgcccac agtactctcc tctcccctac tccttctcc acctcacct gactggcatt 2700

agctggcata gcagagggtg tcataaacat tcttagtccc cagaaccggc tttggggtag 2760
 gtgttat ttt ctcactttgc agatgagaaa attgaggctc agagcgatta ggtgacctgc 2820
 cccagatcac acaactaatc aatcctcaa tgactttcca aatgagagc tgctcctc 2880
 tgtcctacc tgcctcagagc caccaggttg tgcaactcca ggcggtgctg tttgcacaga 2940
 aaacaatgac agccttgacc tttcacatct cccaccctg tcacttttg cctcaggccc 3000
 aggggcataa acatctgagg tgacctggag atggcagggt ttgacttgtg ctggggttcc 3060
 tgcaaggata tctcttctcc cagggtggca gctgtggggg attcctgcct gaggtctcag 3120

ggctgtcgtc cagtgaagtt gagagggttg tgtggtcctg actggtgtcg tccagtgggg 3180
 acatgggtgt ggggtccatg gttgectaca gaggagtct catgccctgc tctgttgctt 3240
 cccctgactg atttaggggc tgggtgaccg atggcttcag ttcctgaaa gactactgga 3300
 gcaccgttaa ggacaagttc tctgagttct gggatttga ccctgagtc agaccaactt 3360
 cagccgtggc tgcctgagac ctcaataacc caagtccacc tgcctatcca tctgcgagc 3420
 tccttgggtc ctgcaatctc cagggtctgc cctgtaggtt gcttaaaagg gacagtattc 3480
 tcagtctct cctaccccac ctcatgctg gccccctcc aggcattgtg gcctccaat 3540

aaagctggac aagaagetgc tatgagtggg ccgtcgcaag tgtgcatct gtgtctgggc 3600
 atgggaaagg gccgaggctg ttctgtgggt gggcactgga cagactccag gtcaggcagg 3660
 catggaggcc agcgtctat ccaccttctg gtagctgggc agtctctggg cctcagttc 3720
 ttcactctta aggtaggaat caccctcctg acctgectt ccttgacagc tttgtcgga 3780
 aggtcaaaca ggacaataag tttgtgata ctttgataaa ctgttaggtg ctgcacaaca 3840
 tgacttgagt gtgtgcccc tgccagccac tatgcctggc acttaagtgt tcatcagagt 3900
 tgagactgtg tigttttact caaaactgtg gagctgacct cccctatcca ggccccctag 3960

ccct 3964

<210> 3

<211> 3958

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

ctactccagg ctgtgttcag ggcttggggc tggtagggg aggggcctga aattccagtg      60
tgaaaggctg agatgggccc gaggccctg gcctatgtcc aagccatttc ccctctcacc      120
agcctctccc tggggagcca gtcagctagg aaggaatgag ggctccccag gcccaccccc      180
agttcctgag ctcatctggg ctgcagggct ggcgggacag cagcgtggac tcagtctcct      240
agggatttcc caactctccc gcccgttgc tgcattctga caccctgcct caggccctca      300

tctccactgg tcagcaggtg acctttgccc agcgccttgg gtcctcagtg cctgctgccc      360
tggagatgat ataaaacagg tcagaacct cctgcctgtc tgctcagttc atccctagag      420
gcagctgctc caggtaatgc cctctgggga ggggaaagag gaggggagga ggatgaagag      480
gggcaagagg agctccctgc ccagcccagc cagcaagcct ggagaagcac ttgctagagc      540
taaggaagcc tcggagctgg acgggtgccc ccaccctc atcataacct gaagaacatg      600
gaggccccgg aggggtgtca cttgccaaa gctacatagg gggtagggct ggaagtggct      660
ccaagtgcag gttccccct cattcttcag gcttagggct ggaggaagcc ttagacagcc      720

cagtccctacc ccagacagg aaactgaggc ctggagaggg ccagaaatca ccaaagaca      780
cacagcatgt tggttgact ggacggagat cagtccagac cgcaggtgcc ttgatgttca      840
gtctggtggg ttttctgctc catcccacc acctcccttt gggcctcgat ccctcgcctc      900
tcaccagtcc cccttctgag agcccgtatt agcagggagc cggcccctac tccttctggc      960
agaccagct aaggttctac cttaggggccc acgccacctc cccagggagg ggtccagagg     1020
catggggacc tggggtgccc ctcacaggac acttccttgc aggaacagag gtccatgca     1080
gccccgggta ctcttgttg ttgccctcct ggcgctcctg gcctctgccc gtaagcactt     1140

ggtagggactg ggctgggggc agggtaggag caacttgggg atcccagtcc caatgggtgg     1200
tcaagcagga gccagggct cgtccatagg ccgatecacc cactcagcc ctgctctttc     1260
ctcaggagct tcagaggccg aggatgcctc cttctcagc tteatgcagg getacatgaa     1320
gcacgccacc aagaccgcca aggatgcact gacgagcgtg caggagtccc aggtggccca     1380
gcaggccagg tacaccgct ggctccctc cccatcccc ctgccagctg cctccattcc     1440
caccacccc tgcctggtg agateccaac aatggaatgg aggtgctcca gcctccctg     1500
ggcctgtgcc tctcagcct cctcttctc cacaggcct ttgtcaggct gctgcgggag     1560

agatgacaga gttgagactg cattctccc agtccctcc tttctccca gagcagtctc     1620
agggcgcgcc gtttagccc tcatttccat tttcttcc tttcccttc tttcccttc     1680

```

tattttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt 1740
 tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt 1800
 tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt 1860
 tttttttt taatggagtc tccctctgc acccaggctg gagtgcagtg gtgcatctc 1920
 ggctcactgc aacctccgtc tcccgggttc aaccattct cctgcctcag cctcccaagt 1980

agctgggatt acaggcacgc gccaccacac ccagctaatt tttgtatatt tagcagagat 2040
 ggggtttcac catgttgcc aggttggctc tgaattcctg acctcagggg atcctcctgc 2100
 ctggcctcc caaagcctg ggattacagg catgagccac tgcgcctggc cccattttcc 2160
 ttttctgaag gtctggctag agcagtggc ctcagcctt ttggcaccag ggaccagttt 2220
 tgtggtggac aatttttcca tggccagcg gggatggtt tgggatgaag ctgttcacc 2280
 tcagatcctc aggcattaga ttctcataag gagccctcca cctagatccc tggcatgtgc 2340
 agttcacaac agggttcaca ctccatgag aatgtaaggc cacttgatct gacaggaggc 2400

ggagctcagg cggatattgt cactcacca cactcactt cgtgctgtgc agccccgctc 2460
 ctaacagtcc atggaccagt acctatctat gacttggggg ttggggacce ctgggctagg 2520
 ggtttgcctt gggaggcccc acctgacctt attcaagccc gtgagtgtt ctgctttgtt 2580
 ctaagacctg gggccagtgt gacgagaagt gtgtcctcc tctccatcc tgccttgc 2640
 catcagtact ctctctccc ctactcctt ctccacctca cctgactgg cattagctgg 2700
 catagcagag gtgtcataa acattcttag tccccagaac cggctttggg gtaggtgta 2760
 ttttctcact ttgcagatga gaaaattgag gctcagagcg attaggtgac ctgccccaga 2820

tcacacaact aatcaatcct ccaatgactt tccaaatgag aggctgcctc cctctgtcct 2880
 acctgtcga gagccaccag gttgtgcaac tccaggcggg gctgtttgca cagaaaacaa 2940
 tgacagcctt gacctttcac atctcccac cctgtcactt tgtgcctcag gccaggggc 3000
 ataaacatct gaggtgacct ggagatggca gggtttgact tgtgctgggg ttctgcaag 3060
 gatattctt ctcccagggt ggcagctgtg ggggattcct gcctgagtc tcagggtgt 3120
 cgtccagtga agttgagagg gtggtgtggt cctgactggt gtcgtccagt ggggacatgg 3180
 gtgtgggtcc catggttgc tacagaggag ttctcatgcc ctgctctgtt gcttcccctg 3240

actgatitag gggctgggtg accgatggct tcagttccct gaaagactac tggagcaccg 3300
 ttaaggacaa gtctctgag ttctgggatt tggacctga ggtcagacca acttcagccg 3360
 tggctgctg agacctcaat accccaagtc cactgccta tccatcctgc cagctccttg 3420
 ggtctgcaa tctccagggc tgcccctgta ggttgcttaa aaggacagt attctcagtg 3480
 ctctctacc ccacctcatg cctggcccc ctccaggcat gctggcctcc caataagct 3540

ggacaagaag ctgctatgag tgggccgtcg caagtgtgcc atctgtgtct gggcatggga 3600
aagggccgag gctgttctgt ggggtggcac tggacagact ccaggtcagg caggcatgga 3660

ggccagcgct ctatccacct tctgtagct gggcagtctc tgggcctcag tttcttcac 3720
tctaaggtag gaatcacctt cegtaccctg ccttccttga cagctttgtg cggaaggtca 3780
aacaggacaa taagtttctg gatactttga taaactgtta ggtgctgcac aacatgactt 3840
gagtgtgtgc cccatgccag ccactatgcc tggcacttaa gttgtcatca gagttgagac 3900
tgtgtgtgtt tactcaaac tgtggagctg acctccccta tccaggccac ctaccct 3958

<210> 4
<400> 4
000
<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> Primer
<400> 5
tcagcttcat gcagggttac at 22

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> Primer
<400> 6
aagcacgcca ccaagaccgc c 21

<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> Probe
<400> 7
gaaggtgaag gtcggagtc 19

<210> 8
<211> 19

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 8
 gaaggtgaag gtcggagtc 19

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 9
 gaagatgggtg atgggatttc 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Probe
 <400> 10
 caagcttccc gttctcagcc 20

<210> 11
 <211> 518
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 11
 cctgctcagt ttatcccta gaagcagcta gctactccag gtacgtaggt gccatgcagc 60
 cccggacgct cctcactgtg gccctcttgg ctctctctggc atctgcccga gctgaagagg 120

tagagggatc cttgctgctg ggctctgtgc agggctacat ggaacaagcc tccaagacgg 180
 tccaggatgc gctaagtagc gtgcaggagt ccgatatagc tgcggtggcc aggggctgga 240
 tggacaatca cttcagattc ctgaaaggct actggagcaa gtttactgac aagttcaccg 300
 gcttctggga ttctaacct gaggaccaac caactccagc tattgagtgc tgagacttct 360
 gtgttgcaga tgtgctgtt cctccatcct getgcecccc tccaggcctg ccaggtggcc 420
 cctgaagggt gctttaaggg gaaagtatgt tctcatgtct tcaccctcc ctagatctca 480

cctaaacatg ctgtccctaa taaagctgga taagaagc 518

<210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 12
 cgagaggcgg acgggaccg 19
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 13
 cgagaggcgg acgggaccgt t 21
 <210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 14
 ttgctctccg cctgccctgg c 21

<210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 15
 cgagaggcgg acgggaccg 19
 <210> 16
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 16
 gctctccgcc tgccttggc 19
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 17
 ctcttactgt cgtgtggaca 20

 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 18
 ggccagccctg gagctgcag 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 19
 ctggagcagc tgctctagg 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 20
 ccctgcatga agctgagaag 20

 <210> 21
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 21
 gtgcttcacg taaccctgca 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 22
 tggcctgctg ggccacctgg 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 23
 tgctccagta gtctttcagg 20

 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 24
 tgacctcagg gtccaaatcc 20
 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 25
 ctctaggat gaactgagca 20
 <210> 26

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 26
 cagctgcctc tagggatgaa 20

<210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 27
 ttcttgagc agctgcctct 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 28
 acctctgttc ctggagcagc 20

<210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 29
 atggcacctc tgttctgga 20

<210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 30

gggctgcatg gcacctctgt 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 31

ggcaacaaca aggagtaccc 20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 32

ggagggcaac aacaaggagt 20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 33

agctcgggca gaggccagga 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 34

tctgaagctc gggcagaggc 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 35
 cggcctctga agctcgggca 20

<210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 36
 catcctcggc ctctgaagct 20

<210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 37
 gggaggcatc ctcgccctct 20

<210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 38
 gagaaggag gcatcctcg 20

<210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 39
 gctgagaagg gagcatcct 20

<210> 40
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 40
 tgc atgaagc tgagaaggga 20
 <210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 41
 gcgtgcttca tgtaaccctg 20

 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 42
 ttggtggcgt gcttcatgta 20
 <210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 43
 gcatccttgg cggctcttgg 20
 <210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 44
 ctcagtgc at ccttggcgg 20

 <210> 45

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 45
 tgctcagtgc atccttggcg 20
 <210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 46
 ctctgcacg ctgctcagtg 20
 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 47
 gactcctgca cgtgctcag 20

 <210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 48
 gccacctggg actcctgcac 20
 <210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 49
 gccctggcc tgetgggcca 20

<210> 50
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 50
 agcccctggc ctgctgggcc 20

<210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 51
 gaagccatcg gtcaccacgc 20

<210> 52
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 52
 ctgaagccat cggcaccca 20

<210> 53
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 53
 tttcagggaa ctgaagccat 20

<210> 54
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 54	
cagtagtcctt tcaggaact	20
<210> 55	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 55	
aacggtgctc cagtagtctt	20
<210> 56	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 56	
ccttaacggt gctccagtag	20
<210> 57	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 57	
gaacttgtec ttaacggtgc	20
<210> 58	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 58	
ctcagagaac ttgtccttaa	20
<210> 59	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 59
 agaactcaga gaacttgccc 20

 <210> 60
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 60
 atcccagaac tcagagaact 20
 <210> 61
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 61
 cagggtccaa atcccagaac 20
 <210> 62
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 62
 ttggtctgac ctcagggtcc 20

 <210> 63
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 63
 gttggtctga cctcagggtc 20
 <210> 64
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 64
 gctgaagttg gtctgacctc 20
 <210> 65
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 65
 cagccacggc tgaagttggt 20

 <210> 66
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 66
 caggcagcca cggtgaagt 20
 <210> 67
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 67
 attgaggtct caggcagcca 20
 <210> 68
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 68
 tggataggca ggtggacttg 20

<210> 69
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 69
 ctcgcaggat ggataggcag 20
 <210> 70
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 70
 aggagctcgc aggatggata 20
 <210> 71
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 71
 gaccaagga gctcgcagga 20

 <210> 72
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 72
 tgcaggacc aaggagctcg 20
 <210> 73
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 73

tggagattgc aggaccaag 20

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 74

agccctggag attgcaggac 20

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 75

ggcagccctg gagattgcag 20

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 76

ccttttaagc aacctacagg 20

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 77

ctgtcccttt taagcaacct 20

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 78
 agaataactgt ccctttaag 20
 <210> 79
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 79
 cactgagaat actgtcctt 20
 <210> 80
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 80
 taggagagca ctgagaatac 20
 <210> 81
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 81
 ggtaggaga gcactgagaa 20
 <210> 82
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 82
 aggccagcat gcctggaggg 20
 <210> 83
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 83
 ttgggaggcc agcatgcctg 20

<210> 84
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 84
 agctttattg ggaggccagc 20

<210> 85
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 85
 tgtccagctt tattgggagg 20

<210> 86
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 86
 cttgtccagc tttattggga 20

<210> 87
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 87
 agcttcttgt ccagctttat 20

<210> 88

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 88
 catagcagct tcttgccag 20
 <210> 89
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 89
 acctggagca gctgcctcta 20

 <210> 90
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 90
 agggcattac ctggagcagc 20
 <210> 91
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 91
 acctctgttc ctgcaaggaa 20
 <210> 92
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 92

aagtgccttac gggcagaggc	20
<210> 93	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 93	
gcgggtgtac ctggcctgct	20
<210> 94	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 94	
aaccctgttg tgaactgcac	20
<210> 95	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 95	
agtgagcaat accgcctgag	20
<210> 96	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 96	
cgggcttgaa ttaggtcagg	20
<210> 97	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 97
 tagggataaa actgagcagg 20
 <210> 98
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 98
 ctggagtagc tagctgcttc 20

 <210> 99
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 99
 gctgcatggc acctacgtac 20
 <210> 100
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 100
 ccacagtgag gagcgtccgg 20
 <210> 101
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 101
 ggacagatgcc aggagagcca 20

 <210> 102
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 102
 ctacctcttc agctcgggca 20
 <210> 103
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 103
 cagcagcaag gatccctcta 20
 <210> 104
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 104

 gcacagagcc cagcagcaag 20
 <210> 105
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 105
 ccctggccac cgcagctata 20
 <210> 106
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 106
 atctgaagtg attgtccatc 20
 <210> 107

<211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 107
 agtagccttt caggaatctg 20
 <210> 108
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 108
 cttgtcagta aacttgctcc 20
 <210> 109
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 109
 gaagccggtg aacttgtcag 20

 <210> 110
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 110
 gaatcccaga agccggtgaa 20
 <210> 111
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 111

ggttagaatc ccagaagccg 20
 <210> 112
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 112

tggagttggt tggcctcag 20
 <210> 113
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 113

tcacgactca atagctggag 20
 <210> 114
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 114

cccttaaagc aaccttcagg 20
 <210> 115
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 115

agacatgaga acatacttcc 20
 <210> 116
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 116
 catgtttagg tgagatctag 20
 <210> 117
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 117
 tcttatccag ctttattagg 20

 <210> 118
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 118
 cctagaggca gctgctccag 20
 <210> 119
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 119
 cttctcagct tcatgcaggg 20
 <210> 120
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 120

 tgcagggtta catgaagcac 20
 <210> 121
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 121
 ccaggtggcc cagcaggcca 20
 <210> 122
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 122
 cctgaaagac tactggagca 20
 <210> 123
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 123
 tgctcagttc atccctagag 20
 <210> 124
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 124
 agaggcagct gtcaggaa 20
 <210> 125
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 125
 gctgctccag gaacagaggt 20

<210> 126
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 126
 tccaggaaca gaggtgccat 20
 <210> 127
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 127
 acagaggtgc catgcagccc 20
 <210> 128
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 128

 ggttactcct tgttggcc 20
 <210> 129
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 129
 actccttgtt gttgccctcc 20
 <210> 130
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 130

tcctggcctc tgccccgagct 20

<210> 131

<211> 20

<212> DNA

<213

> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 131

gcctctgccc gagcttcaga 20

<210> 132

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 132

agcttcagag gccgaggatg 20

<210> 133

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 133

agaggccgag gatgcctccc 20

<210> 134

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 134

ccgaggatgc ctcccttctc 20

<210> 135

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 135
 aggatgcctc ccttctcagc 20
 <210> 136
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 136

 tcccttctca gcttcacgca 20
 <210> 137
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 137
 cagggttaca tgaagcacgc 20
 <210> 138
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 138
 tacatgaagc acgccaccaa 20
 <210> 139
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 139
 accaagaccg ccaaggatgc 20
 <210> 140
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 140
 accgccaagg atgcactgag 20
 <210> 141
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 141
 cgccaaggat gcactgagca 20

 <210> 142
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 142
 cactgagcag cgtgcaggag 20
 <210> 143
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 143
 ctgagcagcg tgcaggagtc 20
 <210> 144
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 144

 gtcaggagt cccaggtggc 20

<210> 145
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 145
 tggcccagca ggccaggggc 20
 <210> 146
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 146
 ggcccagcag gccaggggct 20
 <210> 147
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 147
 gctgggtgac cgatggcttc 20
 <210> 148
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 148
 tgggtgaccg atggcttcag 20
 <210> 149
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 149

atggcttcag ttcctgaaa 20

<210> 150
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 150

aagactactg gagcaccgtt 20

<210> 151
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 151

ctactggagc accgttaagg 20

<210> 152
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 152

gcaccgttaa ggacaagttc 20

<210> 153
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 153

ttaaggacaa gttctctgag 20

<210> 154
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 154
 ggacaagttc tctgagttct 20
 <210> 155
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 155
 gttctgggat ttggaccctg 20
 <210> 156
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 156
 ggaccctgag gtcagaccaa 20
 <210> 157
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 157
 gaccctgagg tcagaccaac 20
 <210> 158
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 158
 gaggtcagac caacttcagc 20
 <210> 159
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 159
 accaacttca gccgtggctg 20
 <210> 160
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 160

 acttcagccg tggctgcctg 20
 <210> 161
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 161
 tggctgcctg agacctcaat 20
 <210> 162
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 162
 caagtccacc tgctatcca 20
 <210> 163
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 163
 ctgcctatcc atcctgcgag 20

<210> 164
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 164
 tatccatcct gcgagctcct 20
 <210> 165
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 165
 tcctgcgagc tccttgggtc 20

 <210> 166
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 166
 cgagctcctt gggtcctgca 20
 <210> 167
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 167
 cttgggtcct gcaatctcca 20
 <210> 168
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 168

gtcctgcaat ctccagggt 20

<210> 169

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 169

ctgcaatctc cagggtgcc 20

<210> 170

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 170

cctgtaggtt gcttaaaagg 20

<210> 171

<211> 20

<212> DNA

<213>

> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 171

aggttgctta aaaggacag 20

<210> 172

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 172

cttaaaaggg acagtattct 20

<210> 173

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 173
 aaggacagt attctcagtg 20

<210> 174
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 174
 gtattctcag tgctctccta 20

<210> 175
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 175
 ttctcagtc tctctaccc 20

<210> 176
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 176
 ccctccagc atgctggcct 20

<210> 177
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 177
 caggcatgct ggctcccaa 20

<210> 178

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 178
 gctggcctcc caataaagct 20
 <210> 179
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 179
 cctccaata aagctggaca 20
 <210> 180
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 180
 tccaataaa gctggacaag 20
 <210> 181
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 181
 ataaagctgg acaagaagct 20

 <210> 182
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 182

ctggacaaga agctgctatg 20

<210> 183

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 183

tagaggcagc tgctccaggt 20

<210> 184

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 184

gctgctccag gtaatgcct 20

<210> 185

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 185

ttccttgac gaacagaggt 20

<210> 186

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 186

gcctctgccc gtaagcactt 20

<210> 187

<211> 20

<212> DNA

<213

> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 187
 agcaggccag gtacaccgc 20
 <210> 188
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 188
 gtgcagttca caacagggt 20
 <210> 189
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 189
 ctcaggcggg attgctcact 20

 <210> 190
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 190
 cctgacctaa ttcaagcccg 20
 <210> 191
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 191
 cctgctcagt tttatcceta 20
 <210> 192
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 192

 gtacgtaggt gccatgcagc 20
 <210> 193
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 193
 ccggacgctc ctcaactgtgg 20
 <210> 194
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 194
 tggctctcct ggcacttgcc 20
 <210> 195
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 195
 tgccccgagct gaagaggtag 20
 <210> 196
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 196
 tagagggatc cttgctgctg 20
 <210> 197

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 197
 cttgctgctg ggctctgtgc 20

<210> 198
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 198
 tatagctgcg gtggccaggg 20

<210> 199
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 199
 cagattcctg aaaggctact 20

<210> 200
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 200

ggagcaagtt tactgacaag 20
 <210> 201
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 201

ctgacaagtt caccggcttc 20

<210> 202

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 202

cggttctgg gattctaacc 20

<210> 203

<211> 20

<212> DNA

<213

> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 203

ctgaggacca accaactcca 20

<210> 204

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 204

ctccagctat tgagtcgtga 20

<210> 205

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 205

cctgaaggtt gctttaaggg 20

<210> 206

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 206
 gaaagtatgt tctcatgtct 20
 <210> 207
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 207
 ctagatctca cctaaacatg 20
 <210> 208
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 208

 cctaataaag ctggataaga 20
 <210> 209
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 209
 gctgcatggc acctctgttc 20
 <210> 210
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 210
 ggcagaggcc aggagcgcca 20
 <210> 211
 <211> 20
 <212> DNA

<213
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 211
 ctgaagctcg ggcagaggcc 20
 <210> 212
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 212
 tcctcggcct ctgaagctcg 20
 <210> 213
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 213
 tcttggtggc gtgcttcatg 20
 <210> 214
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 214
 gctcagtgca tccttggcgg 20
 <210> 215
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 215
 cctgcacgct gctcagtgca 20
 <210> 216

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 216

 actgaagcca tgggtcaccc 20
 <210> 217
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 217
 cagaactcag agaacttgtc 20
 <210> 218
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 218
 gaagttggtc tgacctcagg 20
 <210> 219
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 219
 ccctggagat tgcaggaccc 20
 <210> 220
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 220

gggcagccct ggagattgca	20
<210> 221	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 221	
ccctttaag caacctacag	20
<210> 222	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 222	
tggcaagcat cctgta	16
<210> 223	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 223	
ctcaatccat ggcagc	16
<210> 224	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 224	
accaagtttc ttcagc	16
<210> 225	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 225
 gcattggtat tca 13
 <210> 226
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 226
 ttcagcattg gtattcagtg 20
 <210> 227
 <211> 16
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 227
 cagcattggt attcag 16
 <210> 228
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 228
 cagcattggt attca 15
 <210> 229
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 229
 agcattggtta ttca 14
 <210> 230
 <211> 12

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 230
 gcattggtat tc 12
 <210> 231
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 231
 cggcatgtct attttgta 18
 <210> 232
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 232

 ggctaaatcg ctccaccaag 20
 <210> 233
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 233
 ctctagcgtc ttaaagccga 20
 <210> 234
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 234
 gctgcatgat tccttggcg 20
 <210> 235

<211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 235
 acgttgaggg gcatcgtcgc 20
 <210> 236
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 236
 gggctctgcvg cgggvtggt 19
 <210> 237
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 237
 gttvtvctt ccvctgct g 21

 <210> 238
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 238
 tatccggagg gctcgccatg ctgct 25
 <210> 239
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 239

tcccgctgt gacatgcatt 20
 <210> 240
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 240

cagcagcaga gtcttcatca t 21
 <210> 241
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 241

gggacgcggc gctcggcat 20
 <210> 242
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 242

ccacaagctg tccagtctaa 20
 <210> 243
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 243

cgcagccat gcgtcttgg 20
 <210> 244
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 244
 agcttcttgt ccagctttat 20
 <210> 245
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 245
 agcttcttgt ccagctttat a 21

 <210> 246
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 246
 tcagtcatga cttc 14
 <210> 247
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 247
 tcagtcatga cttca 15
 <210> 248
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 248

 gctgattaga gagaggtccc 20
 <210> 249
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 249
 tccatttca ggagacctgg 20
 <210> 250
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 250
 atcagtcatg acttc 15
 <210> 251
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 251
 cggcgcaagg ctttaggaatt 20
 <210> 252
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 252
 gcttcagtca tgacttcctt 20
 <210> 253
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 253
 gcttcagtca tgacttcctt a 21

<210> 254
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 254
 agcttcagtc atgacttctt t 21
 <210> 255
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 255
 tggtaatcca ctttcagagg 20
 <210> 256
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 256

 tggtaatcca ctttcagagg a 21
 <210> 257
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 257
 tgcttcagtc atgacttctt t 21
 <210> 258
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 258

cactgatttt tgcccaggat 20

<210> 259

<211> 21

<212> DNA

<213

> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 259

cactgatttt tgcccaggat a 21

<210> 260

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 260

aagcttcttg tccagcttta t 21

<210> 261

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 261

accaattca gaaggaagga 20

<210> 262

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 262

accaattca gaaggaagga a 21

<210> 263

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 263
 aaccaattc agaaggaagg a 21
 <210> 264
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 264

 atggtaatcc actttcagag g 21
 <210> 265
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 265
 tcttggttac atgaaatccc 20
 <210> 266
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 266
 tcttggttac atgaaatccc a 21
 <210> 267
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 267
 attcactttc ataatgetgg 20
 <210> 268
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 268
 attcactttc ataatgctgg a 21
 <210> 269
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 269
 atcttggtta catgaaatcc c 21

 <210> 270
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 270
 atgcatggtg atgcttctga 20
 <210> 271
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 271
 cagctttatt agggacagca 20
 <210> 272
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 272

 cagctttatt agggacagca a 21

<210> 273
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 273
 acagctttat tagggacagc a 21
 <210> 274
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 274
 ttcagtcatg acttcc 16
 <210> 275
 <211> 18
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(18)
 <400> 275
 gcuucagtca tgactucc 18
 <210> 276
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 276
 tgctccgttg gtgcttgttc a 21
 <210> 277
 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220

><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 277

tgctccgttg gtgcttggtc

20