



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월05일

(11) 등록번호 10-2776167

(24) 등록일자 2025년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/713 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2024.01)

A61K 31/713 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-7000303(분할)

(22) 출원일자(국제) 2018년02월06일

심사청구일자 2024년02월02일

(85) 번역문제출일자 2024년01월04일

(65) 공개번호 10-2024-0010750

(43) 공개일자 2024년01월24일

(62) 원출원 특허 10-2019-7023090

원출원일자(국제) 2018년02월06일

심사청구일자 2021년02월05일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/017062

(87) 국제공개번호 WO 2018/145086

국제공개일자 2018년08월09일

(30) 우선권주장

62/455,231 2017년02월06일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

WO2016205410 A2*

US20150299695 A1

US20080311040 A1

US05552535 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

엠벡 엘에이, 엘.엘.씨.

미국 메릴랜드 (우편번호 20815) 체비 체이스 위스콘신 애비뉴 5425 스위트 801

(72) 발명자

브라운 조나단 마일즈

미국 20815 메릴랜드주 체비 체이스 위스콘신 애비뉴 5425 스위트 801 엠벡 엘에이 엘엘씨

포른로셔 한스-피터

독일 데-95326 쿨름바흐 프리츠-호른슈크-슈트라쎄 9 엑소랩스 게엠베하

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 문동현

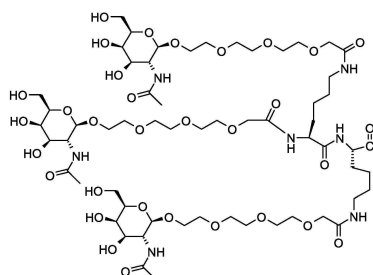
(54) 발명의 명칭 감소된 신장 청소율을 갖는 다중결합 올리고뉴클레오타이드

(57) 요약

본 발명은 링커에 의해 연결된 단위체성 아단위를 갖는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여하는 방법에 관한 것이다. 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 적어도 약 45 kD의 분자량을 갖고 사구체 여과에 기인한 이의 청소율이 감소되도록 설정된다. 본 발명은 또한, 다중결합 올리고뉴클레오타이드 및 다중결합 올리고뉴클레오타이드

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1a



를 합성하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61P 13/12 (2018.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2310/321 (2013.01)

C12N 2310/322 (2013.01)

C12N 2310/351 (2013.01)

C12N 2310/51 (2013.01)

C12N 2320/32 (2013.01)

(72) 발명자

노이먼 크리스틴 케이 에이치

미국 10538 뉴욕주 라치몬트 새킷 드라이브 10

헤드위거 필립

독일 데-95326 쿨름바흐 프리츠-호른슈크-슈트라쎈

9 엑소랩스 게엠베하

(30) 우선권주장

62/522,363 2017년06월20일 미국(US)

62/561,853 2017년09월22일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

약제의 제조에서 이용을 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 조성물로서, 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 4개 이상의 치료적 아단위·····를 포함하고,

각각의 아단위·····는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각각의 아단위·····는 공유 링커 *에 의해 다른 아단위에 연결되며,

단일 또는 이중 가닥 아단위 중에서 적어도 하나는 그 아단위 내에서 단일 가닥의 3' 말단 및 5' 말단에 연결된 공유 링커 *를 포함하고,

다중결합 올리고뉴클레오타이드는 적어도 75% 순수하며,

다중결합 올리고뉴클레오타이드의 분자량은 적어도 45 kD인, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 다중결합 올리고뉴클레오타이드에 포함되는 아단위의 수는 m 이고, m 은 다중결합 올리고뉴클레오타이드가 사구체 여과에 기인한 그의 청소율을 감소시키도록 설정된 분자량 및/또는 크기를 갖는 것을 가능하게 하도록 선택된 정수인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 아단위·····는 길이가 15-30개 뉴클레오타이드인, 조성물.

청구항 4

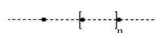
제1항에 있어서, 아단위가 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 아단위가 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 구조체 21:



(구조체 21)을 포함하며, n 은 1 이상의 정수인, 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 각각의 아단위·····는 길이가 17-27, 19-26, 또는 20-25개 뉴클레오타이드인, 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, $n \geq 1$ 이고, $n \leq 17$ 인, 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서, 공유 링커 * 중 하나 이상이 개열가능한 공유 링커를 포함하는, 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서, 각각의 아단위 가 RNA, DNA, 또는 인공 또는 비자연 핵산 유사체인, 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 다중결합 올리고뉴클레오타이드가 하나 이상의 표적화 리간드를 더 포함하는, 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 표적화 리간드가 앵타머인, 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 아단위 중 적어도 하나가 표적화 리간드인, 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 표적화 리간드가 앵타머인, 조성물.

청구항 15

제6항에 있어서, 사구체 여과에 기인한 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 청소율이, 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 단위체성 아단위 , 이합체성 아단위 , 또는 삼합체성 아단위 의 청소율에 비하여 감소되는, 조성물.

청구항 16

제2항 또는 제15항에 있어서, 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 증가된 생체내 순환 반감기를 유발하는, 조성물.

청구항 17

제2항 또는 제15항에 있어서, 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여한 후, 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 예측함으로써 결정되는, 조성물.

청구항 18

제2항 또는 제15항에 있어서, 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 혈청 농도가 미리 결정된 값까지 감소하는데 필요한 시간을 예측함으로써 결정되는, 조성물.

청구항 19

제2항 또는 제15항에 있어서, 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여한 후, 미리 결정된 시점에서 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 혈청 농도를 예측함으로써 결정되는, 조성물.

청구항 20

제2항 또는 제15항에 있어서, 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여한 후, 시간의 추이에서 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 혈청 농도를 나타내는 그래프의 곡선 아래 면적을 예측함으로써 결정되는, 조성물.

청구항 21

제2항 또는 제15항에 있어서, 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 생체이용률을 증가시키는, 조성물.

청구항 22

제2항 또는 제15항에 있어서, 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 세포 흡수를 증가시키는, 조성물.

청구항 23

제2항 또는 제15항에 있어서, 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타드의 생체내 치료 지수/비율을 증가시키는, 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

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련된 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은 2017년 2월 6일자에 제출된 미국 가출원 번호 62/455,231, 2017년 6월 20일자에 제출된 미국 가출원 번호 62/522,363, 그리고 2017년 9월 22일자에 제출된 미국 가출원 번호 62/561,853에 우선권을 주장하고, 이들의 개시는 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 서열 목록을 내포하는데, 이것은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되었고 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된다. 2018년 2월 5일자에 창출된 상기 ASCII 사본은 116244_604_Sequence_Listing.txt로 명명되고 크기에서 24,828 바이트이다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 향상된 약리학 및/또는 약물동력학을 갖는 다중결합 올리고뉴클레오타이드, 그리고 이런 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여하는 방법에 관계한다. 예를 들어, 본 발명의 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 적어도 약 45 kD의 분자량 및/또는 그들의 감소된 신장 청소율을 유발하는 다른 특징을 가질 수 있다.

배경 기술

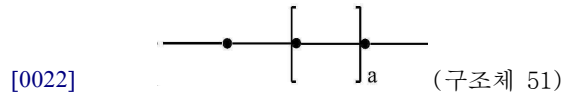
- [0007] 올리고뉴클레오타이드는 현재, 복수 적용 (예를 들어, RNA 간섭, 또는 RNAi)을 갖고 임상 시험이 진행 중인 충분히 확립된 부류의 치료제이다. 하지만, 많은 인자가 여전히 올리고뉴클레오타이드 치료제, 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드의 표적 세포로의 전달 및 올리고뉴클레오타이드의 표적 세포 내로의 차후 내재화를 제한한다.
- [0008] 이들 전달 및 내재화 제한을 해결하려는 시도에서, 많은 관계자들이 지질 나노입자 (LNP, 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드의 음성 전하를 중화시키고 표적 세포 결합 및 내재화를 용이하게 하기 위한 양성으로 하전된 지질을 포함하는 지질 회전타원체)를 조사하였다. LNP가 일부 경우에, 전달 및 내재화를 용이하게 할 수 있긴 하지만, 이들은 좁아진 치료 윈도우를 유발하는 주요 결점, 예를 들면, 불량한 표적화 및 독성을 겪는다.
- [0009] 적어도 부분적으로, LNP의 제한으로 인해, 특정한 세포 표면 수용체를 표적으로 하는 리간드가 또한 조사되었다. 이와 같은 한 가지 리간드, *N*-아세틸갈락토사민 (GalNAc)의 이용은 간세포로 올리고뉴클레오타이드 전달을 위해 선택되는 방법이 되었다. 하지만, GalNAc-접합체의 독물학적 프로파일은 LNP보다 우수할 수 있긴 하지만, 전달이 효율적이지 않다. 이러한 제한은 종종, 1 크기 자릿수 또는 그 이상으로 증가된 용량을 필요하게 만든다. 증가된 용량은 독성, 부작용 및/또는 비용으로 인해 바람직하지 않을 수 있다.
- [0010] 따라서, 이들 및 다른 선행 기술 접근법은 올리고뉴클레오타이드 전달의 문제점 및 한계를 완전히 해결하지는 못한다. 따라서, 향상된 올리고뉴클레오타이드 조성물이 여전히 요구된다.

발명의 내용

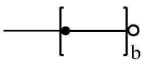
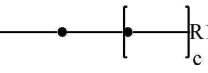
- [0011] 본 발명은 공유 링커에 의해 연결된 올리고뉴클레오타이드의 단위체성 아단위를 갖는 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 형태에서 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여하는 방법에 관계한다. 본 발명의 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 적어도 약 45 kD의 분자량을 갖고, 그리고 사구체 여과에 기인한 이의 청소율이 감소되도록 설정된다. 본 발명은 또한, 다중결합 올리고뉴클레오타이드 및 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법에 관계한다. 예를 들어, 전형적인 siRNA (예를 들어, 이중 가닥 단위체)는 약 15 kD의 분자량 및 상대적으로 낮은 순환 반감기 (예를 들어, 요소 또는 글루코오스와 유사한 사구체 여과율을 갖는다)를 가질 수 있는 반면, 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 다합체는 적어도 약 45 kD의 분자량 및 상대적으로 더욱 높은 순환 반감기 (예를 들어, 사구체 여과율에 기인한 더욱 낮은 청소율을 갖는다)를 가질 수 있다. 본 발명에 따른 다합체의 향상되고 유리한 성질은 증가된 *생체내* 순환 반감기의 면에서 설명될 수 있다. 이들은 또한, 증가된 *생체내에서* 활성의 면에서 설명될 수 있다.
- [0012] 표적화 리간드와 조합될 때, 멀티-접합체 ("다중결합 올리고뉴클레오타이드" 또는 "다합체"로서 또한 지칭됨)는 또한, 단위체성 등가물보다 리간드/수용체 결합 사건마다 더욱 높은 유사하중을 전달할 수 있다. 본 발명은 또한, 새로운 합성 중간체, 그리고 멀티-접합체 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법에 관계한다. 본 발명은 또한, 예로서 유전자 발현의 감소, 생물학적 연구, 의학적 상태의 치료 또는 예방 및/또는 새로운 또는 변경된 표현형의 산출에서 멀티-접합체 올리고뉴클레오타이드를 이용하는 방법에 관계한다.
- [0013] 다양한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 효과량을 개체에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 아단위 를 포함하고, 여기서:
- [0014] 각각의 아단위 는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 그리고 각각의 아단위 는 공유 링커 •에 의해 다른 아단위에 연결되고;
- [0015] 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 사구체 여과에 기인한 이의 청소율을 감소시키도록 설정된 분자량 및/또는 크기를 갖고; 그리고
- [0016] 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 분자량은 적어도 약 45 kD인, 다중결합 올리고뉴클레오타이드.
- [0017] 다양한 양상에서, 본 발명은 아단위 를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서:
- [0018] 각각의 아단위 는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 그리고 각각의 아단위 는 공유 링커 •에 의해 다른 아단위에 연결되고;
- [0019] 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 사구체 여과에 기인한 이의 청소율을 감소시키도록 설정된 분자량 및/또는 크기를 갖고; 그리고

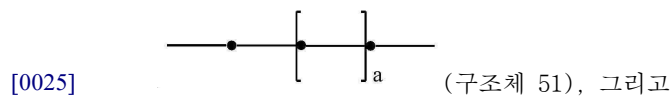
[0020] 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 분자량은 적어도 약 45 kD인, 다중결합 올리고뉴클레오타이드.

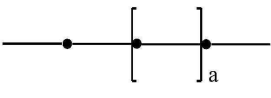
[0021] 다양한 양상에서, 본 발명은 구조체 51을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법을 제공하고:

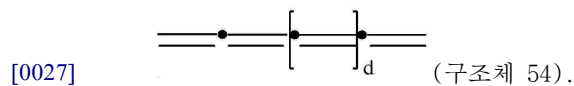


[0023] 여기서 각 — 은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 • 은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 공유 링커이고, 그리고 a는 정수 ≥ 1 이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

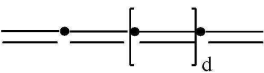
[0024] (i)  (구조체 52)와  (구조체 53)를 반응시켜서, (여기서 ○은 연결 모이어티이고, R1은 연결 모이어티 ○와 반응할 수 있는 화학적 기이고, b 및 c는 각각 독립적으로 정수 ≥ 0 이고, b 및 c는 둘 모두 동시에 제로일 수는 없고, 그리고 $b + c = a$ 임) 하기의 구조체 51을 형성하는 단계:

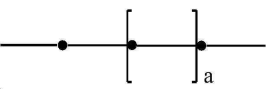


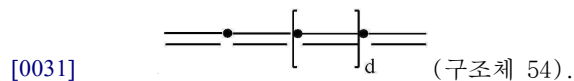
[0026] (ii) 선택적으로, 구조체 51:  (구조체 51)을 상보성 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 — 와 어닐링하여 하기 구조체 54를 형성하는 단계:



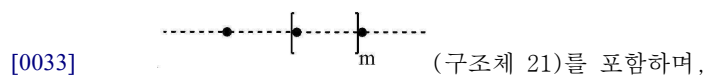
[0028] 다양한 양상에서, 본 발명은 구조체 54를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법을 제공한다:

[0029]  (구조체 54) (여기서 각 — 은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 • 는 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 공유 링커이고, 그리고 $a \geq 1$ 임), 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0030] (i) 구조체 51:  (구조체 51)을 상보성 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 — 와 어닐링하여 하기 구조체 54를 형성하는 단계:



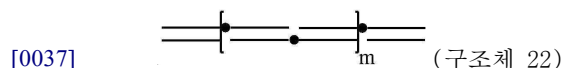
[0032] 다양한 양상에서, 본 발명은 구조체 21을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다:

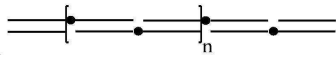


[0034] 여기서 각 ----- 은 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 • 은 인접한 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 공유 링커이고, m은 정수 ≥ 0 이고, 그리고

[0035] 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 생체내에서 사구체 여과를 감소시키도록 설정된 분자 크기 및/또는 분자량을 갖는다.

[0036] 다양한 양상에서, 본 발명은 구조체 22 또는 23을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하며:





(구조체 23)

[0038]

[0039]

여기서 각 — 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 \bullet 은 인접한 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이고, 그리고 m 은 정수 ≥ 1 이고 n 은 정수 ≥ 0 이고, 그리고 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 생체내에서 사구체 여과를 감소시키도록 설정된 분자 크기 및/또는 분자량을 갖는다.

[0040]

다양한 양상에서, 본 발명은 복수의 전술된 바와 같은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 실제로 모든 다중결합 올리고뉴클레오타이드가 생체내에서 사구체 여과를 감소시키도록 설정된 분자 크기 및/또는 분자량을 갖는다.

[0041]

다양한 양상에서, 본 발명은 복수의 전술된 바와 같은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 실제로 모든 다중결합 올리고뉴클레오타이드가 미리 결정된 값의 m 또는 n 을 갖는다.

[0042]

다양한 양상에서, 본 발명은 복수의 본원에서 설명된 바와 같은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 실제로 모든 다중결합 올리고뉴클레오타이드가 동일한 값의 m 또는 n 을 갖는 규정된 다합체 (예를 들어, 멀티-접합체)이다.

[0043]

다양한 양상에서, 본 발명은 복수의 본원에서 설명된 바와 같은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 실제로 모든 다중결합 올리고뉴클레오타이드가 규정된 사합체 ($m = 1$) (예를 들어, 테트라접합체)이다.

[0044]

다양한 양상에서, 본 발명은 복수의 본원에서 설명된 바와 같은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 실제로 모든 다중결합 올리고뉴클레오타이드가 규정된 오합체 (예를 들어, 펜타접합체) 또는 그 이상 ($m > 1$ 또는 $n \geq 1$)이다.

[0045]

다양한 양상에서, 본 발명은 본 발명의 다중결합 올리고뉴클레오타이드 및 제약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0046]

다양한 양상에서, 본 발명은 유전자 발현을 감소시키기 위한 방법을 제공하는데, 상기 방법은 본 발명의 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 본 발명의 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 조성물의 효과량을 치료가 필요한 개체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0047]

다양한 양상에서, 본 발명은 개체를 치료하기 위한 방법을 제공하는데, 상기 방법은 본 발명의 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 본 발명의 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 조성물의 효과량을 치료가 필요한 개체에게 투여하는 것을 포함한다.

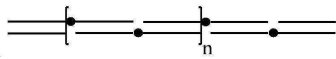
[0048]

다양한 양상에서, 본 발명은 구조체 22 또는 23을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법을 제공한다:



(구조체 22)

[0049]



(구조체 23)

[0050]

[0051]

여기서 각 — 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 \bullet 은 인접한 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이고, 그리고 m 은 정수 ≥ 1 이고 n 은 정수 ≥ 0 이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0052]

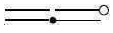

(i) 첫 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 — 및 연결 모이어티 $\text{—}\circ$ 를 포함하는 상보성 두 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 어닐링하여 $\text{—}\circ$ 를 형성하는 단계;



[0053]



(ii) $\text{—}\circ$ 및 세 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 $\text{—}R_1$ 를 반응시켜서, (여기서 R_1 은 연결 모이어티 \circ 와 반응할 수 있는 화학적 기이고) $\text{—}\bullet$ 를 형성하는 단계;

[0054]

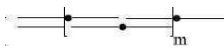
(iii) $\text{—}\bullet$ 및 연결 모이어티 $\text{—}\circ$ 를 포함하는 네 번째 상보성 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 어닐링하여 $\text{—}\bullet\circ$ 를 형성하는 단계;

[0055] (iv)  및 다섯 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ---R_1 를 반응시켜서 하기 구조체  를 형성하는 단계;

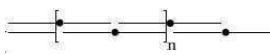
[0056] (v)  및 연결 모이어티 ---O 를 포함하는 여섯 번째 상보성 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 어닐링하여  를 형성하는 단계;

[0057] (vi)  및 일곱 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ---R_1 를 반응시켜서  (구조체 24)를 형성하는 단계;

[0058] (vii) 선택적으로, 연결 모이어티 ---O 를 포함하는 하나 또는 그 이상의 (a) 추가 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드(들) 및 (b) 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드(들) ---R_1 를 어닐링하여 하기 구조체를 형성하는 단계:

[0059]  (구조체 25)

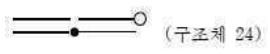
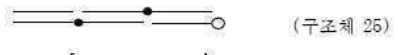

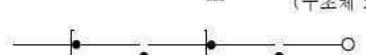
[0060] 여기서 m 은 정수 ≥ 2 이거나 또는

[0061]  (구조체 26)

[0062] 여기서 n 은 정수 ≥ 1 이고; 그리고


[0063] (viii) 최종 상보성 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 --- 를 구조체 24, 25, 또는 26과 어닐링하여 구조체 22 또는 23을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 형성하는 단계.

[0064] 본 발명은 하기 구조체 24, 25, 26, 또는 27을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 더욱 제공한다:

[0065]  (구조체 24)
 (구조체 25)
 (구조체 26)
 (구조체 27)


[0066] 여기서 각 --- 은 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 \bullet 은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이고, 각 O 는 연결 모이어티이고; 그리고 m 은 정수 ≥ 1 이고 n 은 정수 ≥ 1 이다.

[0067] 다양한 양상에서, 본 발명은 구조체 21을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고:

[0068]  (구조체 21)를 포함하며,

[0069] 여기서 각각의 단위체성 아단위 ----- 는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, m 은 정수 ≥ 1 이고, 각 \bullet 은 인접한 단위체성 아단위 ----- 를 연결하는 공유 링커이고, 그리고 단위체성 아단위 ----- 중에서 적어도 하나는 3' 말단에 결합된 공유 링커 \bullet 중에서 하나 및 5' 말단에 결합된 공유 링커 중에서 다른 하나를 갖는 단일 가닥을 포함한다.

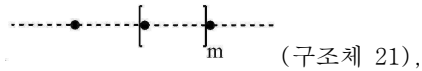
[0070] 다양한 양상에서, 본 발명은 구조체 21을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고:

[0071]  (구조체 21),

[0072] 여기서 각각의 단위체성 아단위 ----- 는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 \bullet 은 인접한 단위체성 아단위 ----- 를 연결하는 공유 링커이고, 그리고 m 은 (a) 개별 단위체성 아단위 ----- 의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키고 및/또는 (b) 개별 단위체성 아단위

.....의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 활성을 증가시키도록 선별된 정수 ≥ 0 이다.

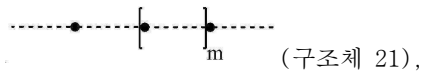
[0073] 구조체 21을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드:



[0074] 여기서 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 •은 인접한 단위체성 아단위를 연결하는 공유 링커이고, 그리고 m은 정수 ≥ 0 이고, 그리고

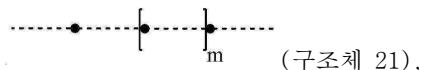
[0076] 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 (a) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키고 및/또는 (b) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 활성을 증가시키도록 설정된 분자 크기 및/또는 분자량을 갖는다.

[0077] 한 가지 또는 그 이상의 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기 및/또는 생체내 활성을 증가시키기 위한 방법, 상기 방법은 구조체 21을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 형태에서 한 가지 또는 그 이상의 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여하는 것을 포함하고:



[0078] 여기서 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 •은 인접한 단위체성 아단위를 연결하는 공유 링커이고, 그리고 m은 (a) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키고 및/또는 (b) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 활성을 증가시키도록 선별된 정수 ≥ 0 이다.

[0080] 한 가지 또는 그 이상의 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기 및/또는 생체내 활성을 증가시키기 위한 방법, 상기 방법은 구조체 21을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 형태에서 한 가지 또는 그 이상의 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여하는 것을 포함하고:



[0081] 여기서 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 •은 인접한 단위체성 아단위를 연결하는 공유 링커이고, 그리고 , m은 정수 ≥ 0 이고, 그리고

[0083] 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 (a) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키고 및/또는 (b) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 활성을 증가시키도록 설정된 분자 크기 및/또는 분자량을 갖는다.

[0084] 다양한 양상에서, 본 발명은 본원에서 설명된 바와 같은 다중결합 올리고뉴클레오타이드 및 제약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0085] 다양한 양상에서, 본 발명은 본원에서 설명된 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 효과량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 유전자 발현을 감소시키기 위한 방법을 제공한다.

[0086] 다양한 양상에서, 본 발명은 병든 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 효과량을 투여하는 것을 포함하는, 개체를 치료하기 위한 방법을 제공한다.

[0087] 다양한 양상에서, 본 발명은 m 단위체성 아단위를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각각의 단위체성 아단위는 공유 링커 •에 의해 다른 단위체성 아단위에 연결되고, 그리고 m은 (a) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키고 및/또는 (b) 개


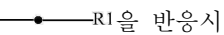

별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내활성을 증가시키도록 선별된 정수 ≥ 3 이다.


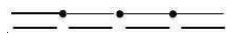
[0088] 다양한 양상에서, 본 발명은 m 단위체성 아단위를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각각의 단위체성 아단위는 공유 링커 •에 의해 다른 단위체성 아단위에 연결되고, m 은 정수 ≥ 3 이고, 그리고 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 (a) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키고 및/또는 (b) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 활성을 증가시키도록 설정된 분자 크기 및/또는 분자량을 갖는다.

[0089] 다양한 양상에서, 본 발명은 구조체 34를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법을 제공하고:

[0090]  (구조체 34)

[0091] 여기서 각 —은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 그리고 각 •은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 공유 링커이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:


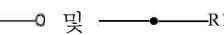

[0092] (i)  및  R_1 을 반응시켜서, (여기서 ○은 연결 모이어티이고, 그리고 R_1 은 연결 모이어티 ○와 반응할 수 있는 화학적 기이고,)  (구조체 34)를 형성하는 단계, 그리고


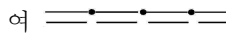
[0093] (ii) 선택적으로,  (구조체 34)를 상보성 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드와 어닐링하여  (구조체 28)을 형성하는 단계.

[0094] 다양한 양상에서, 본 발명은 구조체 35를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법을 제공하고:

[0095]  (구조체 35)

[0096] 여기서 각 —은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 그리고 각 •은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 공유 링커이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:



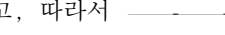
[0097] (i)  및  R_1 을 반응시키고, 여기서 ○는 연결 모이어티이고, 그리고 R_1 은 연결 모이어티 ○와 반응할 수 있는 화학적 기이고, 따라서  (구조체 35)를 형성하는 단계, 그리고


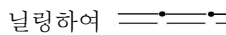
[0098] (ii) 선택적으로,  (구조체 35)를 상보성 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드와 어닐링하여  (구조체 36)을 형성하는 단계.

[0099] 다양한 양상에서, 본 발명은 구조체 37을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법을 제공하고:

[0100]  (구조체 37)


[0101] 여기서 각 —은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 그리고 각 •은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 공유 링커이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:


[0102] (i)  및  R_1 을 반응시키고, 여기서 ○연결 모이어티이고, 그리고 R_1 은 연결 모이어티 ○와 반응할 수 있는 화학적 기이고, 따라서  (구조체 37)를 형성하는 단계, 그리고

[0103] (ii) 선택적으로,  (구조체 37)를 상보성 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드와 어닐링하여  (구조체 38)을 형성하는 단계.

[0104] 당업자는 본 발명의 이들 및 다른 양상이 본원에서 설명된 한 가지 또는 그 이상의 적합한 특질과 조합될 수 있

다는 것을 인식할 것이다.

- [0105] 다양한 구체예에서, 본 발명의 다중결합 올리고뉴클레오타이드, 예를 들면, 구조체 21을 포함하는 것들은 적어도 약 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 또는 65 kD의 분자량을 갖는다.
- [0106] 다양한 구체예에서, 구조체 21을 포함하는 것들을 비롯한 본 발명의 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 적어도 약 40-45, 45-50, 50-55, 55-60, 60-65, 65-70, 또는 70-75 kD의 분자량을 갖는다.
- [0107] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 다중결합 올리고뉴클레오타이드에서 내포된 아단위의 숫자는 m 이고, m 은 다중결합 올리고뉴클레오타이드가 사구체 여과에 기인한 이의 청소율을 감소시키도록 설정된 분자량 및/또는 크기를 갖는 것을 가능하게 하도록 선택된 정수이다. 다양한 양상에서, m 은 예로서, (i) ≥ 2 ; (ii) ≥ 3 ; (iii) ≥ 4 ; (iv) ≥ 4 및 ≤ 17 ; (v) ≥ 4 및 ≤ 8 ; 또는 (vi) 4, 5, 6, 7, 또는 8이다.
- [0108] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 구조체 21을 포함하고:  (구조체 21), 그리고 n 은 정수 ≥ 0 이다.
- [0109] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 이들 아단위는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0110] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 n 은 ≥ 1 이다.
- [0111] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 이들 아단위는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0112] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서:
- [0113] $n = 0$ 일 때, 사구체 여과에 기인한 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 단위체성 아단위 및/또는 이합체성 아단위-.....의 것에 비하여 감소되고; 그리고
- [0114] $n \geq 1$ 일 때, 사구체 여과에 기인한 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 단위체성 아단위, 이합체성 아단위-..... 및/또는 삼합체성 아단위-.....-.....의 것에 비하여 감소되는, 방법.
- [0115] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 증가된 생체내 순환 반감기를 유발한다.
- [0116] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여한 후, 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 예측함으로써 결정된다.
- [0117] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 혈청 농도가 미리 결정된 값까지 감소하는데 필요한 시간을 예측함으로써 결정된다.
- [0118] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여한 후, 미리 결정된 시점에서 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 혈청 농도를 예측함으로써 결정된다.
- [0119] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여한 후, 시간의 추이에서 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 혈청 농도를 나타내는 그래프의 곡선 아래 면적을 예측함으로써 결정된다.

- [0120] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 생체이용률을 증가시킨다.
- [0121] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 세포 흡수를 증가시킨다.
- [0122] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 치료 지수/비율을 증가시킨다.
- [0123] 한 양상에서, 본 발명은 아단위를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 다중결합 올리고뉴클레오타이드에서 내포된 아단위의 숫자는 m 이고, m 은 다중결합 올리고뉴클레오타이드가 사구체 여과에 기인한 이의 청소율을 감소시키도록 설정된 분자량 및/또는 크기를 갖는 것을 가능하게 하도록 선별된 정수를 갖는다. 다양한 양상에서, m 은 예로서, (i) ≥ 2 ; (ii) ≥ 3 ; (iii) ≥ 4 ; (iv) ≥ 4 및 ≤ 17 ; (v) ≥ 4 및 ≤ 8 ; 또는 (vi) 4, 5, 6, 7, 또는 8이다.
- [0124] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 21을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고:
- [0125]  (구조체 21),
- [0126] 식 중, 아단위중에서 적어도 하나는 3' 말단에 결합된 공유 링커 •중에서 하나 및 5' 말단에 결합된 공유 링커 중에서 다른 하나를 갖는 단일 가닥을 포함하고, 그리고 n 은 정수 ≥ 0 인, 다중결합 올리고뉴클레오타이드.
- [0127] 한 양상에서, 본 발명은 아단위를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 각 아단위는 길이에서 15-30, 17-27, 19-26, 또는 20-25개 뉴클레오타이드이다.
- [0128] 한 양상에서, 본 발명은 $n \geq 1$ 및 $n \leq 17$ 인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0129] 한 양상에서, 본 발명은 $n \geq 1$ 및 $n \leq 5$ 인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0130] 한 양상에서, 본 발명은 n 이 예로서, 1, 2, 3, 4, 또는 5인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0131] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 이중 가닥 RNA이고, 그리고 $n \geq 1$ 인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0132] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0133] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0134] 한 양상에서, 본 발명은 아단위가 단일 가닥 및 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드의 조합을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0135] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 RNA, DNA, 또는 인공 또는 비자연 핵산 유사체인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0136] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드 하나 또는 그 이상의 표적화 리간드를 더욱 포함한다.
- [0137] 한 양상에서, 본 발명은 아단위 중에서 적어도 하나가 표적화 리간드인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0138] 한 양상에서, 본 발명은 표적화 리간드가 앵타머인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0139] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 RNA인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0140] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 siRNA, saRNA, 또는 miRNA인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0141] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 이중 가닥 siRNA이고, 그리고 각각의 공유 링커가 siRNA의 센스 가닥을 연

결하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0142] 한 양상에서, 본 발명은 공유 링커•중에서 하나 또는 그 이상이 개열가능한 공유 링커를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0143] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 개열가능한 공유 링커는 산 개열가능한 결합, 환원제 개열가능한 결합, 생체개열가능한 결합, 또는 효소 개열가능한 결합을 내포한다.

[0144] 한 양상에서, 본 발명은 개열가능한 공유 링커가 세포내 조건 하에 개열가능한 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0145] 한 양상에서, 본 발명은 각 공유 링커•가 동일한 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0146] 한 양상에서, 본 발명은 공유 링커•가 2개 또는 그 이상의 상이한 공유 링커를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0147] 한 양상에서, 본 발명은 각 공유 링커•가 2개의 단위체성 아단위를 연결하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0148] 한 양상에서, 본 발명은 적어도 하나의 공유 링커•가 3개 또는 그 이상의 단위체성 아단위를 연결하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.


[0149] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 실제로 동일한 아단위의 동종다합체를 포함한다.

[0150] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 2개 또는 그 이상의 실제로 상이한 아단위의 이종다합체를 포함한다.

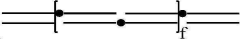
[0151] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 순수하다.

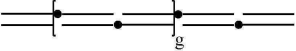
[0152] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 $\overline{\hspace{1cm}}$ 이고, 그리고 n 이 정수 ≥ 1 인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0153] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 $\overline{\hspace{1cm}}$ 이고, n 이 정수 ≥ 1 이고, 그리고 각 공유 링커 •가 동일한 가닥 상에 있는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고:

[0154]  (구조체 54), 여기서 d 는 정수 ≥ 1 이다.

[0155] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 22 또는 23을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고:

 (구조체 22)

[0156]  (구조체 23)

[0157] 여기서 각 $\overline{\hspace{1cm}}$ 은 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 •은 인접한 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 공유 링커이고, f 는 정수 ≥ 1 이고, 그리고 g 는 정수 ≥ 0 인, 다중결합 올리고뉴클레오타이드.

[0158] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 감소된 사구체 여과는 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 단위체성, 이합체성 및/또는 삼합체성 올리고뉴클레오타이드 아단위에 대한 사구체 여과의 비율에 상대적이다.

[0159] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 감소된 사구체 여과는 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시킨다.

[0160] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 감소된 사구체 여과는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 감소된 사구체 여과는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

고뉴클레오티드의 *생체내* 생체이용률을 증가시킨다.

- [0161] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공하고, 여기서 감소된 사구체 여과는 다중결합 올리고뉴클레오티드의 *생체내* 세포 흡수를 증가시킨다.
- [0162] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공하고, 여기서 감소된 사구체 여과는 다중결합 올리고뉴클레오티드의 *생체내* 치료 지수/비율을 증가시킨다.
- [0163] 한 양상에서, 본 발명은 각 올리고뉴클레오티드가 단일 가닥 올리고뉴클레오티드인 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0164] 한 양상에서, 본 발명은 각 올리고뉴클레오티드가 이중 가닥 올리고뉴클레오티드인 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0165] 한 양상에서, 본 발명은 올리고뉴클레오티드가 단일 및 이중 가닥 올리고뉴클레오티드의 조합을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0166] 한 양상에서, 본 발명은 실제로 동일한 올리고뉴클레오티드의 동중다합체를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0167] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공하고, 여기서 실제로 동일한 올리고뉴클레오티드는 *생체내에서* 동일한 분자 표적을 표적으로 하는 siRNA를 각각 포함한다.
- [0168] 한 양상에서, 본 발명은 2개 또는 그 이상의 실제로 상이한 올리고뉴클레오티드의 이중다합체를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0169] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공하고, 여기서 실제로 상이한 올리고뉴클레오티드는 *생체내에서* 상이한 분자 표적을 표적으로 하는 siRNA를 각각 포함한다.
- [0170] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공하고, 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오티드는 PEG를 포함하지 않는다.
- [0171] 한 양상에서, 본 발명은 표적화 리간드를 더욱 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0172] 한 양상에서, 본 발명은 표적화 리간드가 올리고뉴클레오티드에 접합되는 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0173] 한 양상에서, 본 발명은 표적화 리간드가 3' 또는 5' 말단을 통해 올리고뉴클레오티드에 접합되는 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0174] 한 양상에서, 본 발명은 각 공유 링커 •가 동일한 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0175] 한 양상에서, 본 발명은 2개 또는 그 이상의 상이한 공유 링커 •를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0176] 한 양상에서, 본 발명은 • 중에서 하나 또는 그 이상이 개열가능한 공유 링커를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0177] 한 양상에서, 본 발명은 화합물이 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100 % 순수한 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0178] 한 양상에서, 본 발명은 각 올리고뉴클레오티드가 RNA이거나, DNA이거나, 또는 인공 또는 비자연 핵산 유사체를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0179] 한 양상에서, 본 발명은 적어도 하나의 올리고뉴클레오티드가 siRNA인 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0180] 한 양상에서, 본 발명은 각 올리고뉴클레오티드가 길이에서 15-30, 17-27, 19-26, 또는 20-25개 뉴클레오티드인 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0181] 한 양상에서, 본 발명은 표적화 리간드를 구조체 22 또는 23을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오티드에 접합하

는 단계를 더욱 포함하는, 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법을 제공한다.

[0182] 한 양상에서, 본 발명은 표적화 리간드를 첫 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 —에 접합하는 단계를 더욱 포함하는, 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법을 제공한다.

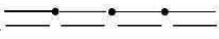
[0183] 한 양상에서, 본 발명은 m이 예로서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

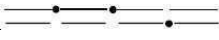
[0184] 한 양상에서, 본 발명은 각각의 단위체성 아단위가 siRNA를 포함하고, 그리고 각각의 공유 링커가 siRNA의 센스 가닥을 연결하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0185] 한 양상에서, 본 발명은 각각의 공유 링커 •가 2개의 단위체성 아단위를 연결하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

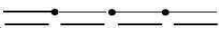
[0186] 한 양상에서, 본 발명은 공유 링커 • 중에서 적어도 하나가 3개 또는 그 이상의 단위체성 아단위를 연결하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0187] 한 양상에서, 본 발명은 각각의 단위체성 아단위가 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 —이고, 그리고 여기서 m이 1인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다:

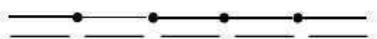



[0188]  (구조체 28) 또는

[0189]  (구조체 29).

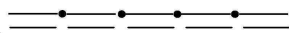
[0190] 한 양상에서, 본 발명은 각각의 단위체성 아단위가 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 —이고, m이 1이고, 그리고 각 공유 링커 •가 동일한 가닥 상에 있는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다:

[0191]  (구조체 28).

[0192] 한 양상에서, 본 발명은 각각의 단위체성 아단위가 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 —이고, 그리고 m이 2인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다:

[0193]  (구조체 30),
 (구조체 31),
 (구조체 32), 또는
 (구조체 33).

[0194] 한 양상에서, 본 발명은 각각의 단위체성 아단위가 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 —이고, 그리고 m이 2이고, 그리고 각 공유 링커 •가 동일한 가닥 상에 있는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다:

[0195]  (구조체 33).

[0196] 한 양상에서, 본 발명은 각각의 단위체성 아단위가 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 —이고, 그리고 m이 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0197] 한 양상에서, 본 발명은 각각의 단위체성 아단위가 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 —이고, m이 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12이고, 그리고 각 공유 링커 •가 동일한 가닥 상에 있는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

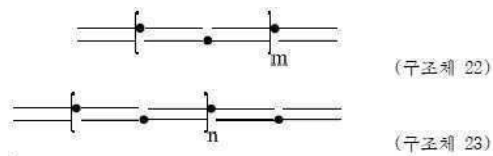
[0198] 한 양상에서, 본 발명은 각각의 단위체성 아단위가 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 —이고,

그리고 m 이 ≥ 13 인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0199] 한 양상에서, 본 발명은 각각의 단위체성 아단위가 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 —이고, m 이 ≥ 13 이고, 그리고 각 공유 링커 •가 동일한 가닥 상에 있는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0200] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 m 은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12이다.

[0201] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 구조체 21은 구조체 22 또는 23이고:



[0202] 여기서 각 —은 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 •은 인접한 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 공유 링커이고, m 은 정수 ≥ 1 이고, 그리고 n 은 정수 ≥ 0 이다.

[0204] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 구조체 21은 PCT/US2016/037685에서 개시된 임의의 구조체와 동일한 및/또는 실제적으로 동일한 구조체가 아니다.

[0205] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 생체내 순환 반감기는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 500, 또는 1,000의 인자로 증가한다.

[0206] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 생체내 순환 반감기는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 증가한다.

[0207] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 생체내 활성에서 증가는 $t_{1/2}$ 에서 생체내 활성의 비율로서 측정된다.

[0208] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 생체내 활성은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 500, 또는 1,000의 인자로 증가한다.

[0209] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 각 올리고뉴클레오타이드은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이다.






[0210] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 각 올리고뉴클레오타이드은 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이다.

[0211] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 올리고뉴클레오타이드은 단일 및 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드의 조합을 포함한다.

[0212] 한 양상에서, 본 발명은 실제적으로 동일한 올리고뉴클레오타이드의 동종다합체를 포함하는, 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공한다.

[0213] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 실제적으로 동일한 올리고뉴클레오타이드는 하기와 같다:

- [0214] (a) 생체내에서 동일한 분자 표적을 표적으로 하는 siRNA;
- [0215] (b) 생체내에서 동일한 분자 표적을 표적으로 하는 miRNA;
- [0216] (c) 생체내에서 동일한 분자 표적을 표적으로 하는 안티센스 RNA; 또는
- [0217] (d) 생체내에서 동일한 분자 표적을 표적으로 하는 siRNA, miRNA 및/또는 안티센스 RNA의 조합.
- [0218] 한 양상에서, 본 발명은 2개 또는 그 이상의 실제로 상이한 올리고뉴클레오타이드의 이중다합체를 포함하는, 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공한다.
- [0219] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 실제로 상이한 올리고뉴클레오타이드는 하기와 같다:
- [0220] (a) 생체내에서 상이한 분자 표적을 표적으로 하는 siRNA;
- [0221] (b) 생체내에서 상이한 분자 표적을 표적으로 하는 miRNA;
- [0222] (c) 생체내에서 상이한 분자 표적을 표적으로 하는 안티센스 RNA; 또는
- [0223] (d) 생체내에서 상이한 분자 표적을 표적으로 하는 siRNA, miRNA 및/또는 안티센스 RNA의 조합.
- [0224] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 하기를 포함하지 않는다: PEG, 폴리에테르 화합물 및/또는 올리고뉴클레오타이드 이외의 중합체.
- [0225] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 나노입자 (NP)에서 또는 더욱 구체적으로, 지질 나노입자 (LNP)에서 조제되지 않는다.
- [0226] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 구조체 21 및 임의선택적 표적화 리간드로 본질적으로 구성된다.
- [0227] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 표적화 리간드를 더욱 포함한다.
- [0228] 한 양상에서, 본 발명은 표적화 리간드가 올리고뉴클레오타이드에 접합되는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0229] 한 양상에서, 본 발명은 표적화 리간드가 3' 또는 5' 말단을 통해 올리고뉴클레오타이드에 접합되는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0230] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 각 공유 링커 •은 동일하다.
- [0231] 한 양상에서, 본 발명은 2개 또는 그 이상의 상이한 공유 링커 •를 포함하는, 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공한다.
- [0232] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 • 중에서 하나 또는 그 이상은 개열가능한 공유 링커를 포함한다.
- [0233] 한 양상에서, 본 발명은 각각의 공유 링커 •가 2개의 단위체성 아단위를 연결하는 선형 구조를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0234] 한 양상에서, 본 발명은 공유 링커 • 중에서 적어도 하나가 3개 또는 그 이상의 단위체성 아단위를 연결하는 분지된 구조를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

- [0235] 한 양상에서, 본 발명은 각각의 단위체성 아단위 가 독립적으로 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ——인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0236] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서:
- [0237] m은 1  (구조체 34)이고;
- [0238] m은 2  (구조체 39)이고;
- [0239] m은 3  (구조체 35)이고;
- [0240] m은 4  (구조 40)이고; 또는
- [0241] m은 5  (구조체 37)이다.
- [0242] 한 양상에서, 본 발명은 m이 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0243] 한 양상에서, 본 발명은 m이 정수 ≥ 13 인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0244] 한 양상에서, 본 발명은 적어도 하나의 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ——가 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0245] 한 양상에서, 본 발명은 각 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드——가 독립적으로 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0246] 본 발명 기술의 이들 및 다른 이점은 첨부된 도면 및 하기 설명을 참조할 때 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0247] 도 1a는 트리-안테나리 N-아세틸갈락토사민 리간드의 화학적 구조를 제공한다.
- 도 1b는 디티오-비스-말레이미도에탄의 화학적 구조를 제공한다.
- 도 2는 5'-GalNAc-FVII 정준 대조를 제공하는데, 이것은 실시예 9와 관련하여 논의된다.
- 도 3은 GalNAc-동종이합체 접합체 (XD-06330)를 제공하는데, 이것은 실시예 10와 관련하여 논의된다.
- 도 4는 GalNAc-동종이합체 접합체 (XD-06360)의 합성의 계통도를 제공하는데, 이것은 실시예 11과 관련하여 논의된다.
- 도 5는 GalNAc-동종이합체 접합체 (XD-06329)의 합성의 계통도를 제공하는데, 이것은 실시예 12와 관련하여 논의된다.
- 도 6은 생쥐 혈청에서 FVII 활성 (FVII 동종이합체성 GalNAc 접합체에 의한 녹다운)을 보여주는 데이터를 제공하는데, 이것은 실시예 13과 관련하여 논의된다.
- 도 7a 및 7b 및 7c는 생쥐 혈청에서 FVII 활성 (GalNAc 함량에 대해 정규화된 FVII 동종이합체성 GalNAc 접합체에 의한 녹다운)을 보여주는 데이터를 제공하는데, 이것은 실시예 13과 관련하여 논의된다.
- 도 8은 FVII, ApoB 및 TTR을 독립적으로 표적으로 하는 정준 GalNAc-siRNAs를 제공하는데, 이들은 실시예 14와 관련하여 논의된다.
- 도 9는 GalNAc-이종삼합체 접합체 (XD-06726)를 제공하는데, 이것은 실시예 15와 관련하여 논의된다. 핵심:이 실시예에서, "GeneA"는 siFVII이고; "GeneB"는 siApoB이고; 그리고 "GeneC"는 siTTR이다.
- 도 10은 GalNAc-접합된 이종삼합체 (XD-06726)에 대한 합성 전략을 위한 계통도를 제공하는데, 이것은 실시예 15와 관련하여 논의된다. 핵심:이 실시예에서, "GeneA"는 siFVII이고; "GeneB"는 siApoB이고; 그리고 "GeneC"는 siTTR이다.
- 도 11은 GalNAc-이종삼합체 접합체 (XD-06727)를 제공하는데, 이것은 실시예 16과 관련하여 논의된다. 핵심:이 실시예에서, "GeneA"는 siFVII이고; "GeneB"는 siApoB이고; 그리고 "GeneC"는 siTTR이다.

도 12는 GalNAc-접합된 이중삼합체 (XD-06727)에 대한 합성 전략을 위한 계통도를 제공하는데, 이것은 실시예 16과 관련하여 논의된다. 핵심:이 실시예에서, "GeneA"는 siFVII이고; "GeneB"는 siApoB이고; 그리고 "GeneC"는 siTTR이다.

도 13은 X20366에 X20336의 부가의 HPLC 분석에 대한 데이터를 제공하는데, 이것은 실시예 16과 관련하여 논의된다.

도 14는 X20336 및 X20366의 반응 산물에 X19580의 추가 부가의 HPLC 분석에 대한 데이터를 제공하는데, 이것은 실시예 16와 관련하여 논의된다.

도 15는 XD-06727을 산출하기 위한 X20336, X20366 및 X19580의 반응 산물에 X18795 (5'-siFVII안티센스-3')의 추가 부가의 HPLC 분석에 대한 데이터를 제공하는데, 이것은 실시예 16과 관련하여 논의된다.

도 16a 및 16b는 혈청 표본에서 TTR 단백질 수준 (ELISA에 의해 측정됨)에 대한 데이터를 제공하는데, 이것은 실시예 18과 관련하여 논의된다.

도 17a 및 17b는 혈청 표본에서 FVII 효소 활성에 대한 데이터를 제공하는데, 이것은 실시예 18과 관련하여 논의된다.

도 18a 및 18b는 혈청 표본에서 ApoB 단백질 수준 (ELISA에 의해 측정됨)에 대한 데이터를 제공하는데, 이것은 실시예 18과 관련하여 논의된다.

도 19a 및 19b는 간 데이터에서 표적 녹다운을 제공하는데, 이것은 실시예 18과 관련하여 논의된다.

도 20은 GalNAc-이중삼합체 접합체 (XD-07140)를 제공하는데, 이것은 실시예 19와 관련하여 논의된다. 핵심:이 실시예에서, "GeneA"는 siFVII이고; "GeneB"는 siApoB이고; 그리고 "GeneC"는 siTTR이다.

도 21은 GalNAc-이중삼합체 접합체 (XD-07140)의 합성을 위한 계통도를 제공하는데, 이것은 실시예 19와 관련하여 논의된다. 핵심:이 실시예에서, "GeneA"는 siFVII이고; "GeneB"는 siApoB이고; 그리고 "GeneC"는 siTTR이다.

도 22는 GalNAc-siFVII-siApoB-siTTR-siFVII 사합체(XD-07140)의 HPLC 결과를 제공하는데, 이것은 실시예 19와 관련하여 논의된다.

도 23은 동종육합체를 합성하기 위한 단계를 도해하는 계통도를 제공하는데, 이것은 실시예 23과 관련하여 논의된다.

도 24a 및 24b는 ssRNA X30835의 수율 및 순도를 보여주는 RP-HPLC 결과를 제공하는데, 이것은 실시예 24와 관련하여 논의된다.

도 24c 및 24d는 ssRNA X30837의 수율 및 순도를 보여주는 RP-HPLC 결과를 제공하는데, 이것은 실시예 24와 관련하여 논의된다.

도 24e는 X30838에 대한 RP-HPLC 결과를 제공하는데, 이것은 실시예 24와 관련하여 논의된다.

도 24f는 X30838, X18795 및 XD-09795에 대한 RP-HPLC 결과를 제공하는데, 이것은 실시예 24와 관련하여 논의된다.

도 25는 XD-09795 또는 XD-09794의 주사 후 다양한 시점에서 생쥐에서 FVII 안티센스 RNA의 혈청 농도를 보여주는 데이터를 제공하는데, 이것은 실시예 25와 관련하여 논의된다.

도 26a-j는 XD-09795 또는 XD-09794의 주사 후 다양한 시점에서 생쥐에서 다양한 사이토킨의 혈청 수준을 보여주는 데이터를 제공하는데, 이것은 실시예 26와 관련하여 논의된다.

도 27a는 FVII siRNA의 단위체에 대한 합성 전략을 위한 개요도를 제공하는데, 이것은 실시예 28과 관련하여 논의된다.

도 27b는 XD-09794에 대한 RP-HPLC 결과를 제공하는데, 이것은 실시예 28과 관련하여 논의된다.

도 28a는 FVII siRNA의 동종이합체에 대한 합성 전략을 위한 개요도를 제공하는데, 이것은 실시예 29와 관련하여 논의된다.

도 28b는 XD-10635에 대한 RP-HPLC 결과를 제공하는데, 이것은 실시예 29와 관련하여 논의된다.

도 29a는 FVII siRNA의 동종삼합체에 대한 합성 전략을 위한 개요도를 제공하는데, 이것은 실시예 30과 관련하여 논의된다.

도 29b는 XD-10636에 대한 RP-HPLC 결과를 제공하는데, 이것은 실시예 30과 관련하여 논의된다.

도 30a는 FVII siRNA의 동종사합체에 대한 합성 전략을 위한 개요도를 제공하는데, 이것은 실시예 31과 관련하여 논의된다.

도 30b는 XD-10637에 대한 RP-HPLC 결과를 제공하는데, 이것은 실시예 31과 관련하여 논의된다.

도 31a는 FVII siRNA의 동종오합체에 대한 합성 전략을 위한 개요도를 제공하는데, 이것은 실시예 32와 관련하여 논의된다.

도 31b는 XD-10638에 대한 RP-HPLC 결과를 제공하는데, 이것은 실시예 32와 관련하여 논의된다.

도 32a는 FVII siRNA의 동종육합체에 대한 합성 전략을 위한 개요도를 제공하는데, 이것은 실시예 33과 관련하여 논의된다.

도 32b는 XD-10639에 대한 RP-HPLC 결과를 제공하는데, 이것은 실시예 33과 관련하여 논의된다.

도 33a는 모노-DTME 접합체를 통한 FVII siRNA의 동종육합체에 대한 합성 전략을 위한 개요도를 제공하는데, 이것은 실시예 34와 관련하여 논의된다.

도 33b는 XD-09795에 대한 RP-HPLC 결과를 제공하는데, 이것은 실시예 34와 관련하여 논의된다.

도 34a는 모노-DTME 접합체를 통한 FVII siRNA의 동종칠합체에 대한 합성 전략을 위한 개요도를 제공하는데, 이것은 실시예 35와 관련하여 논의된다.

도 34b는 XD-10640에 대한 RP-HPLC 결과를 제공하는데, 이것은 실시예 35와 관련하여 논의된다.

도 35a는 모노-DTME 접합체를 통한 FVII siRNA의 동종팔합체에 대한 합성 전략을 위한 개요도를 제공하는데, 이것은 실시예 36과 관련하여 논의된다.

도 35b는 XD-10641에 대한 RP-HPLC 결과를 제공하는데, 이것은 실시예 36과 관련하여 논의된다.

도 36a는 시간의 추이에서 다양한 FVII siRNA 다합체에 대한 혈청에서 FVII siRNA 수준의 평활선 산점도를 제공하는데, 이것은 실시예 37과 관련하여 논의된다.

도 36b는 시간의 추이에서 다양한 FVII siRNA 다합체에 대한 혈청에서 FVII siRNA 수준의 곧게 표시된 산점도를 제공하는데, 이것은 실시예 37과 관련하여 논의된다.

도 37a-d는 개별 올리고뉴클레오타이드의 투여 후 다양한 시점에서 FVII siRNA 다합체에 대한 혈청에서 FVII siRNA 수준의 막대 차트를 제공하는데, 이것은 실시예 37과 관련하여 논의된다.

도 38a는 FVII 다합체에 대한 혈청에서 FVII siRNA 노출 수준 (곡선 아래 면적)의 막대 차트를 제공하는데, 이것은 실시예 37과 관련하여 논의된다.

도 38b는 단위체에 대해 정규화된 FVII 다합체에 대한 혈청에서 전체 FVII siRNA 수준 (곡선 아래 면적)의 막대 차트를 제공하는데, 이것은 실시예 37과 관련하여 논의된다.


도 39는 다합체가 5 분에서 단위체와 동일한 FVII siRNA 혈청 농도에 도달하는데 소요된 시간의 막대 차트를 제공하는데, 이것은 실시예 38과 관련하여 논의된다.

도 40은 동종사합체성 siRNA에 대한 합성 전략을 위한 계통도를 제공하는데, 이것은 실시예 20과 관련하여 논의된다.

도 41은 교변하는 가닥 상에 연쇄를 갖는 동종사합체성 siRNA에 대한 합성 전략을 위한 계통도를 제공하는데, 이것은 실시예 20과 관련하여 논의된다.

본 발명이 많은 상이한 형태에서 구체예를 포함하긴 하지만, 본 개시가 기술의 원리의 예증으로서 고려되고 본 발명을 예시된 구체예에 한정하는 것으로 의도되지 않는다는 것을 양해하는 조건 하에, 여러 특정한 구체예가 도면에서 도시되고 본원에서 상세하게 설명될 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0248] 본 발명은 공유 링커에 의해 연결된 단위체성 아단위를 갖는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여하는 방법에 관계한다. 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 사구체 여과에 기인한 청소율이 감소되도록, 적어도 약 45 kD의 분자량을 가질 수 있다. 본 발명은 또한, 다중결합 올리고뉴클레오타이드 및 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법에 관계한다. 예를 들어, 전형적인 siRNA (예를 들어, 이중 가닥 단위체)는 약 15 kD의 분자량 및 상대적으로 낮은 순환 반감기 (예를 들어, 요소 또는 글루코오스와 유사한 사구체 여과율을 갖는다)를 가질 수 있는 반면, 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 다합체는 적어도 약 45 kD의 분자량 및 상대적으로 더욱 높은 순환 반감기 (예를 들어, 사구체 여과율에 기인한 청소율의 더욱 낮은 비율을 갖는다)를 가질 수 있다. 본 발명에 따른 다합체의 향상되고 유리한 성질은 증가된 *생체내* 순환 반감기의 면에서 설명될 수 있다. 이들은 또한, 증가된 *생체내에서* 활성의 면에서 설명될 수 있다.
- [0249] 표적화 리간드와 조합될 때, 멀티-접합체는 또한, 단위체성 증가물보다 리간드/수용체 결합 사건마다 더욱 높은 유사하중을 전달할 수 있다. 본 발명은 또한, 새로운 합성 중간체, 그리고 멀티-접합체 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법에 관계한다. 본 발명은 또한, 예로서 유전자 발현의 감소, 생물학적 연구, 의학적 상태의 치료 또는 예방 및/또는 새로운 또는 변경된 표현형의 산출에서 멀티-접합체 올리고뉴클레오타이드를 이용하는 방법에 관계한다.
- [0250] **다중결합 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여하는 방법**
- [0251] 다양한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하는 데, 상기 방법은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 효과량을 개체에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 아단위 를 포함하고, 여기서:
- [0252] 각각의 아단위 는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 그리고 각각의 아단위 는 공유 링커 •에 의해 다른 아단위에 연결되고;
- [0253] 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 사구체 여과에 기인한 이의 청소율을 감소시키도록 설정된 분자량 및/또는 크기를 갖고; 그리고
- [0254] 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 분자량은 적어도 약 45 kD인, 다중결합 올리고뉴클레오타이드.
- [0255] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 병든 개체에게 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 다중결합 올리고뉴클레오타이드에서 내포된 아단위의 숫자는 m이고, m은 다중결합 올리고뉴클레오타이드가 사구체 여과에 기인한 이의 청소율을 감소시키도록 설정된 분자량 및/또는 크기를 갖는 것을 가능하게 하도록 선별된 정수이다. 다양한 양상에서, m은 (i) ≥ 2 ; (ii) ≥ 3 ; (iii) ≥ 4 ; (iv) ≥ 4 및 ≤ 17 ; (v) ≥ 4 및 ≤ 8 ; 또는 (vi) 4, 5, 6, 7, 또는 8이다.
- [0256] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 구조체 21을 포함하고:  (구조체 21), n은 ≥ 0 이상의 정수인, 방법.
- [0257] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 아단위는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0258] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 병든 개체에게 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 n은 ≥ 1 이다.
- [0259] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 아단위는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0260] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 병든 개체에게 투여하는 방법을 제공하고, 여기서:
- [0261] n = 0일 때, 사구체 여과에 기인한 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 단위체성 아단위 및/또는 이합체성 아단위-..... 의 것에 비하여 감소되고; 그리고
- [0262] n ≥ 1 일 때, 사구체 여과에 기인한 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의

단위체성 아단위 ······, 이합체성 아단위·····-····· 및/또는 삼합체성 아단위·····-·····-·····의 것에 비하여 감소되는, 방법.

[0263] **다중결합 올리고뉴클레오타이드의 감소된 청소율을 측정하는 방법**

[0264] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 증가된 *생체내* 순환 반감기를 유발한다.

[0265] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여한 후, 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 *생체내* 순환 반감기를 측정함으로써 결정된다.

[0266] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 혈청 농도가 미리 결정된 값까지 감소하는데 필요한 시간을 측정함으로써 결정된다. 미리 결정된 값은 투여된 용량의 90%, 80%, 70%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1%일 수 있다.

[0267] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여한 후, 미리 결정된 시점에서 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 혈청 농도를 측정함으로써 결정된다.

[0268] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여한 후, 시간의 추이에서 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 혈청 농도를 나타내는 그래프의 곡선 아래 면적을 측정함으로써 결정된다.

[0269] **개체에게 투여된 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 감소된 청소율의 효과**

[0270] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 *생체내* 생체이용률을 증가시킨다.

[0271] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 *생체내* 세포 흡수를 증가시킨다.

[0272] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 사구체 여과에 기인한 감소된 청소율은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 *생체내* 치료 지수/비율을 증가시킨다.

[0273] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 측정된 파라미터는 예로서, 도 37a-37d에서 도시된 바와 같은 단위체성, 이합체성, 삼합체성 및 더욱 높은 숫자 다중결합 올리고뉴클레오타이드에서 아단위의 숫자에 대하여 S자 모양 관계를 갖는다.

[0274] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 다중결합 올리고뉴클레오타이드 및 단위체성 아단위로 시작하는 이의 아단위 각각에 대한 측정된 파라미터는 플로팅될 때, 예로서 도 38a-38b에서 도시된 바와 같은 S자 모양 곡선을 규정한다.

[0275] **다중결합 올리고뉴클레오타이드**

[0276] 다양한 양상에서, 본 발명은 아단위 ······를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서:

[0277] 각각의 아단위 ······는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 그리고 각각의 아단위 ······는 공유 링커 •에 의해 다른 아단위에 연결되고;

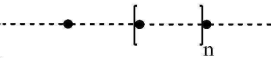
[0278] 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 사구체 여과에 기인한 이의 청소율을 감소시키도록 설정된 분자량 및/또는 크기를 갖고; 그리고

[0279] 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 분자량은 적어도 약 45 kD인, 다중결합 올리고뉴클레오타이드.

[0280] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 다중결합 올리고뉴클레오타이드에서 내포된 아단위의 숫자는 m이고, m은 다중결합 올리고뉴클레오타이드가 사구체 여과에 기인한 이의 청소율을 감소시

키도록 설정된 분자량 및/또는 크기를 갖는 것을 가능하게 하도록 선별된 정수이다. 다양한 양상에서, m 은 (i) ≥ 2 ; (ii) ≥ 3 ; (iii) ≥ 4 ; (iv) ≥ 4 및 ≤ 17 ; (v) ≥ 4 및 ≤ 8 ; 또는 (vi) 4, 5, 6, 7, 또는 8이다.

[0281] 제16항 및 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 구조체 21:

[0282]  (구조체 21)를 포함하며,

[0283] 식 중, 아단위 중에서 적어도 하나는 3' 말단에 결합된 공유 링커 •중에서 하나 및 5' 말단에 결합된 공유 링커 중에서 다른 하나를 갖는 단일 가닥을 포함하고, 그리고 n 은 정수 ≥ 0 인, 다중결합 올리고뉴클레오티드.

[0284] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위 가 길이에서 15-30, 17-27, 19-26, 또는 20-25개 뉴클레오티드인 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0285] 한 양상에서, 본 발명은 $n \geq 1$ 및 $n \leq 17$ 인 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0286] 한 양상에서, 본 발명은 $n \geq 1$ 및 $n \leq 5$ 인 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0287] 한 양상에서, 본 발명은 n 이 1, 2, 3, 4, 또는 5인 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0288] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 이중 가닥 RNA이고, 그리고 $n \geq 1$ 인 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0289] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 단일 가닥 올리고뉴클레오티드인 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0290] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 이중 가닥 올리고뉴클레오티드인 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0291] 한 양상에서, 본 발명은 아단위가 단일 가닥 및 이중 가닥 올리고뉴클레오티드의 조합을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0292] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 RNA, DNA, 또는 인공 또는 비자연 핵산 유사체인 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0293] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 RNA인 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.


[0294] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 siRNA, saRNA, 또는 miRNA인 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.


[0295] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 이중 가닥 siRNA이고, 그리고 각각의 공유 링커가 siRNA의 센스 가닥을 연결하는 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

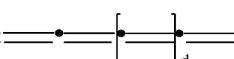
[0296] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공하고, 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오티드는 실제로 동일한 아단위의 동종다합체를 포함한다.

[0297] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공하고, 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오티드는 2개 또는 그 이상의 실제로 상이한 아단위의 이종다합체를 포함한다.

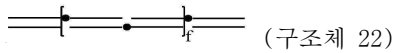
[0298] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공하고, 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오티드는 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 순수하다.

[0299] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 이고, 그리고 n 이 정수 ≥ 1 인 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0300] 한 양상에서, 본 발명은 각 아단위가 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 이고, n 이 정수 ≥ 1 이고, 그리고 각 공유 링커 •가 동일한 가닥 상에 있는 다중결합 올리고뉴클레오티드를 제공하고:

[0301]  (구조체 54), 여기서 d 는 정수 ≥ 1 이다.

[0302] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 22 또는 23을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고:



[0303] (구조체 23)

[0304] 여기서 각 은 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 은 인접한 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 공유 링커이고, f는 정수 ≥ 1 이고, 그리고 g는 정수 ≥ 0 인, 다중결합 올리고뉴클레오타이드.

[0305] 한 양상에서, 본 발명은 복수의 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 실제로 모든 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 n의 미리 결정된 값 및/또는 미리 결정된 분자량을 갖는다.

[0306] 표적 리간드 및 앵타머

[0307] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드 하나 또는 그 이상의 표적화 리간드를 더욱 포함한다.

[0308] 한 양상에서, 본 발명은 아단위 중에서 적어도 하나가 표적화 리간드인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0309] 한 양상에서, 본 발명은 표적화 리간드가 앵타머인 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0310] 링커

[0311] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 공유 링커 중에서 하나 또는 그 이상은 개열가능한 공유 링커를 포함하고, 그리고 예로서, 실시예 20, 22B 및 27에서 논의된 바와 같은 뉴클레오타이드 링커를 포함한다. 뉴클레오타이드 링커는 하나 또는 그 이상의 뉴클레오타이드를 내포하는 링커이고, 그리고 이것이 임의의 다른 기능을 실행하지 않도록 선택될 수 있다.

[0312] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 개열가능한 공유 링커는 산 개열가능한 결합, 환원제 개열가능한 결합, 생체개열가능한 결합, 또는 효소 개열가능한 결합을 내포한다.

[0313] 한 양상에서, 본 발명은 개열가능한 공유 링커가 세포내 조건 하에 개열가능한 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0314] 한 양상에서, 본 발명은 각 공유 링커 가 동일한 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

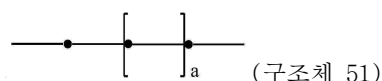
[0315] 한 양상에서, 본 발명은 공유 링커 가 2개 또는 그 이상의 상이한 공유 링커를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0316] 한 양상에서, 본 발명은 각 공유 링커 가 2개의 단위체성 아단위 를 연결하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0317] 한 양상에서, 본 발명은 적어도 하나의 공유 링커 3개 또는 그 이상의 단위체성 아단위 를 연결하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0318] 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 합성의 방법

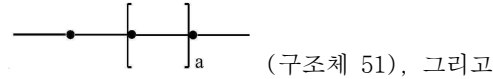
[0319] 다양한 양상에서, 본 발명은 구조체 51을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법을 제공하고:

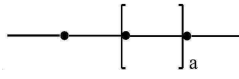


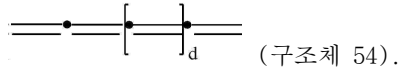
[0321] 여기서 각 은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 공유 링커이고, 그리고 a는 정수 ≥ 1 이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0322] (i) 하기를 반응시키고: (구조체 52) 및 (구조체 53), 여기서 은 연결 모이어티이고, R1은 연결 모이어티 과 반응할 수 있는 화학적 기이고, b 및 c는 각각 독립적으로 정수 ≥ 0 이고, b

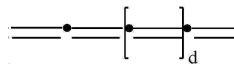
및 c는 둘 모두 동시에 제로일 수는 없고, 그리고 $b + c = a$ 이고, 따라서 구조체 51을 형성하는 단계:

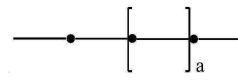


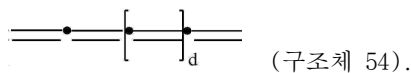
[0324] (ii) 선택적으로, 구조체 51:  (구조체 51)을 상보성 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 —와 어닐링하여 구조체 54를 형성하는 단계:



[0326] 다양한 양상에서, 본 발명은 구조체 54를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법을 제공하고:

[0327]  (구조체 54) 여기서 각 —은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 •는 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 공유 링커이고, 그리고 $a \geq 1$ 이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0328] (i) 구조체 51:  (구조체 51)을 상보성 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 —와 어닐링하여 구조체 54를 형성하는 단계:



[0330] 개체

[0331] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 개체는 설치류, 예를 들면, 생쥐 또는 쥐이다.

[0332] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 개체는 영장류, 예를 들면, 인간이다.

[0333] 생쥐 사구체 여과율 (GFR)은 약 0.15-0.25 ml/분일 수 있다. 인간 GFR은 약 1.8 ml/분/kg일 수 있다(Mahmood I:(1998) Interspecies scaling of renally secreted drugs.Life Sci 63:2365-2371).

[0334] 생쥐는 약 1.46 ml의 혈액을 가질 수 있다. 이런 이유로, 생쥐에서 전체 혈액량의 사구체 여과를 위한 시간은 약 7.3 분 (1.46/0.2)일 수 있다. 인간은 약 5 리터의 혈액을 갖고 체중이 약 70 kg 나갈 수 있다. 이런 이유로, 인간에서 전체 혈액량의 사구체 여과를 위한 시간은 39.7 분 $[5000/126(1.8*70)]$ 일 수 있다.

[0335] 당업자는 상이한 종이 적어도 상기 이유로 인해, 사구체 여과에 의한 상이한 청소율을 가질 수 있다는 것을 인식할 것이다. 당업자는 인간 시간 및 생쥐 시간 사이에 사구체 여과에 의한 청소율의 비율이 약 1:5 또는 1:6일 수 있다는 것을 추론할 수 있다. 다시 말하면, 인간에 의한 일정한 물질 (예를 들어, 특정 올리고뉴클레오타이드)의 청소율은 생쥐의 것보다 5-6 배 느릴 수 있다.

[0336] 한 가지 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 생체내 순환 반감기는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여한 후 30 및 120 분 사이에서 측정된다.

[0337] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 미리 결정된 시점은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여한 후 30 및 120 분 사이에 있다.

[0338] 한 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에게 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공하고, 여기서 곡선 아래 면적은 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여한 후, x 및 y 분 사이에 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 혈청 농도에 근거하여 계산된다. 일부 구체예에서, x는 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 120, 180, 240, 또는 300 분일 수 있고, 그리고 y는 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 720, 840, 960, 1080, 1200, 1320, 1440, 또는 1600 분일 수 있다. 예를 들어, 시간 범위는 30-120 분, 1-1600 분, 또는 300-600 분일 수 있다.

- [0339] 한 양상에서, 본 발명은 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 *생체내* 순환 반감기를 증가시키기 위한 다중결합 올리고뉴클레오타이드 또는 방법을 제공하고, 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 나노입자 (NP)에서 또는 지질 나노입자 (LNP)에서 조제되지 않는다.
- [0340] 본 발명은 또한, 향상된 약력학 및/또는 약물동력학을 갖는 멀티-접합체 올리고뉴클레오타이드에 관계한다. 예를 들어, 멀티-접합체 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개 또는 그 이상의 siRNA를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드)는 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여, 증가된 *생체내* 순환 반감기 및/또는 증가된 *생체내* 활성을 가질 수 있다. 표적화 리간드에 접합될 때, 멀티-접합체는 또한, 단위체성 등가물보다 리간드/수용체 결합 사건마다 더욱 높은 올리고뉴클레오타이드 유사하중을 전달할 수 있다. 본 발명은 또한, 새로운 합성 중간체, 그리고 멀티-접합체 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법에 관계한다. 본 발명은 또한, 예로서 유전자 발현의 감소, 생물학적 연구, 의학적 상태의 치료 또는 예방 및/또는 새로운 또는 변경된 표현형의 산출에서 멀티-접합체 올리고뉴클레오타이드를 이용하는 방법에 관계한다.
- [0341] 본 발명의 다양한 특질이 아래에서 차례로 논의된다.
- [0342] **핵산**
- [0343] 다양한 구체예에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 RNA이거나, DNA이거나, 또는 인공 또는 비자연 핵산 유사체를 포함한다. 다양한 구체예에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥이다. 다양한 구체예에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 이중 가닥 (예를 들어, 역평행 이중 가닥)이다.
- [0344] 다양한 구체예에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 RNA, 예를 들면, 안티센스 RNA (aRNA), CRISPR RNA (crRNA), 긴 비코딩 RNA (lncRNA), 마이크로RNA (miRNA), 피위-상호작용 RNA (piRNA), 짧은 간섭 RNA (siRNA), 전령 RNA (mRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 작은 활성화 (saRNA), 또는 리보자임이다.
- [0345] 한 구체예에서, RNA는 siRNA이다. 예를 들어, 각각의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 siRNA이고 및/또는 15-30개 염기쌍의 길이를 갖는다.
- [0346] 다양한 구체예에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 앵타머이다.
- [0347] siRNA (짧은 간섭 RNA)는 19-22개 핵산으로 구성되는 짧은 이중 가닥 RNA인데, 이것은 표적 유전자를 분해함으로써 유전자의 발현을 억제하기 위해 뉴클레오타이드 서열이 센스 가닥과 동일한 유전자의 mRNA (전령 RNA)를 표적으로 한다 (Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T.(2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.Nature 411:494-8).
- [0348] 본 발명의 방법에서 유용한 핵산의 다른 부류는 miRNAs이다. MiRNAs는 전사후 유전자 조절에서 핵심적인 역할을 수행하는 비코딩 RNAs이다. miRNA는 모든 포유류 단백질-인코딩 유전자 중에서 30 %의 발현을 조절할 수 있다. 이중 가닥 RNA (RNAi)에 의한 특정하고 강력한 유전자 침묵이 추가의 작은 비코딩 RNA와 함께 발견되었다 (Canver, M.C. et al., Nature (2015)). 프리-miRNAs는 성숙 19-25개 뉴클레오타이드 이중나선으로 이출되는, 2-뉴클레오타이드 3'-오버행을 갖는 ~70개 길이 뉴클레오타이드의 짧은 스템 루프이다. 더욱 낮은 염기 대합 안정성을 갖는 miRNA 가닥 (안내 가닥)은 RNA-유도된 침묵 복합체 (RISC) 위에 부하될 수 있다. 운송 안내 가닥은 기능적일 수 있지만, 통상적으로 분해된다. 성숙 miRNA는 3' 번역되지 않은 영역 (UTRs)에서 우세하게 발견되는 표적 mRNAs 내에 부분적으로 상보성 서열 모티프에 RISC를 묶고, 그리고 전사후 유전자 침묵을 유도한다 (Bartel, D.P.Cell, 136:215-233 (2009); Saj, A.& Lai, E.C. Curr Opin Genet Dev, 21:504-510 (2011)). MiRNAs 모방체는 예로서, US 특허 번호 8,765,709에서 설명된다.
- [0349] 일부 구체예에서, RNA는 예로서, US 특허 번호 8,202,846 및 8,383,599에서 설명된 바와 같은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)일 수 있다.
- [0350] 일부 구체예에서, RNA는 CRISPR RNA (crRNA)일 수 있다, 예를 들면, V형의 CRISPR 어레이는 길이에서 42-44개 뉴클레오타이드의 짧은 성숙 crRNAs로 처리될 수 있는데, 각 성숙 crRNA는 동향 반복의 19개 뉴클레오타이드로 시작하고, 그 이후에 스페이서 서열의 23-25개 뉴클레오타이드가 뒤따른다. 대안으로, II형 시스템에서 성숙 crRNAs는 스페이서 서열의 20-24개 뉴클레오타이드로 시작하고, 그 이후에 동향 반복의 약 22개 뉴클레오타이드가 뒤따를 수 있다. CRISPR 시스템은 예로서, 하기 문헌에서 설명된다: US 특허 번호 8,771,945, Jinek et al., Science, 337(6096):816-821 (2012), 그리고 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2013/176772.
- [0351] 다양한 구체예에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 길이에서 15-30, 17-27, 19-26, 20-25, 40-50, 40-150,

100-300, 1000-2000, 또는 10000개까지의 뉴클레오티드이다.

- [0352] 다양한 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 이중 가닥 및 상보성이다. 상보성은 100 % 상보성일 수 있거나, 또는 100 %보다 적은 상보성일 수 있는데, 여기서 올리고뉴클레오티드는 그럼에도 불구하고 혼성화하고, 그리고 유관한 조건 (예를 들어, 생리학적으로 유관한 조건) 하에 이중 가닥으로 남아있다. 예를 들어, 이중 가닥 올리고뉴클레오티드는 적어도 약 80, 85, 90, 또는 95 % 상보성일 수 있다.
- [0353] 일부 구체예에서, RNA는 긴 비코딩 RNA (lncRNA)인데, lncRNAs는 단백질을 인코딩하지 않는 (또는 > 100개 아미노산 개방 해독들을 결여하는) 200개보다 많은 뉴클레오티드의 길이를 갖는 크고 다양한 부류의 전사된 RNA 분자이다. lncRNAs는 인간에서 거의 30,000개의 상이한 전사체를 포괄하는 것으로 생각되고, 따라서 lncRNA 전사체는 비코딩 전사체의 주요 부분을 차지한다 (예를 들어, 하기를 참조한다: Derrien et al., The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*, 22(9):1775-89 (2012)).
- [0354] 또 다른 구체예에서, RNA는 전령 RNA (mRNA)이다. mRNA 및 단백질의 생체내 생산을 위한 전달 방법으로서 이의 적용은 예로서, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2013/151736에서 설명된다.
- [0355] 다른 구체예에서, RNA는 작은 활성화 (saRNA) (예를 들어, 하기에서 설명된 바와 같이: Chappell et al., *Nature Chemical Biology*, 11:214-220 (2015)), 또는 리보자임일 수 있다 (Doherty et al., *Ann Rev Biophys Biomol Struct*, 30:457-475 (2001)).
- [0356] 일부 구체예에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 DNA, 예를 들면, 안티센스 DNA (aDNA) (예를 들어, 안타고미르) 또는 안티센스 캡머이다. 캡머 및 다합체를 비롯한 aDNA의 실례는 예로서, 하기에서 설명된다: Subramanian et al., *Nucleic Acids Res*, 43(19):9123-9132 (2015) 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2013/040429. 안타고미르의 실례는 예로서, US 특허 번호 7,232,806에서 설명된다.
- [0357] 다양한 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 특정한 서열, 예를 들면, 본원에서 개시된 서열 중에서 한 가지를 갖는다.
- [0358] 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 일반적인 절차는 아래의 실시예에서 제공된다. 본 발명용으로 적합될 수 있는 다른 방법은 당해 분야에서 공지된다.
- [0359] **핵산에 대한 변형**
- [0360] 다양한 구체예에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 화학적 변형을 더욱 포함한다. 화학적 변형은 변형된 뉴클레오타이드, 변형된 중추, 변형된 당, 또는 변형된 말단을 포함할 수 있다.
- [0361] 인-내포 연쇄는 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 3' 알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함하는 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 포스포네이트, 3'-아미노 포스포라미데이트 및 아미노알킬포스포라미데이트를 포함하는 포스포라미데이트, 티오노포스포라미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 그리고 이들의 정상적인 3'-5' 연쇄, 2'-5' 연결된 유사체를 갖는 보라노포스페이트, 그리고 뉴클레오타이드 단위의 인접한 쌍이 3'-5'에서 5'-3'으로 또는 2'-5'에서 5'-2'로 연결되는 반전된 극성을 갖는 것들을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.
- [0362] 본 발명의 멀티-접합체에서 내포되는 올리고뉴클레오티드는 예로서, *시험관내에서* 및 *생체내에서* 향상된 효능 및 안정성을 비롯한 다양한 효과를 산출하는 것으로 당해 분야에서 공지된 다양한 전략을 이용하여 변형될 수 있다. 이들 전략 중에는 하기가 있다: 인공 핵산, 예를 들면, 2'-O-메틸치환된 RNA; 2'-플루오로-2' 데옥시 RNA, 펩티드 핵산 (PNA); 모르폴리노; 잠금된 핵산 (LNA); 열린 핵산 (UNA); 가교된 핵산 (BNA); 글리콜 핵산 (GNA); 및 트레오스 핵산 (TNA); 또는 더욱 일반적으로, 자연발생 RNA 및 DNA와 구조적으로 유사하지만 자연발생 분자의 인산염 중추, 당, 또는 핵염기 부분 중에서 한 가지 또는 그 이상에서 변경을 갖는 핵산 유사체, 예를 들면, 이중환상 및 삼환상 뉴클레오타이드 유사체. 전형적으로, 유사체 핵염기는 그 중에서도 특히, 상이한 염기 대합 및 염기 스택킹 성질을 부여한다. 실례는 보편적인 염기를 포함하는데, 이들은 4가지 모든 캐논 염기와 대합을 이룰 수 있다. 인산염-당 중추 유사체의 실례는 PNA를 포함한다. 모르폴리노-기초된 올리고머성 화합물은 하기에서 설명된다: Braasch et al., *Biochemistry*, 41(14):4503-4510 (2002), 그리고 US 특허 번호 5,539,082; 5,714,331; 5,719,262; 및 5,034,506.
- [0363] 본원에서 설명된 제조 방법에서, 올리고뉴클레오티드 중에서 일부는 화학적 기능기로 치환에 의해 말단 단부에

서 변형된다. 치환은 올리고뉴클레오타이드의 3' 또는 5' 단부에서 수행될 수 있고, 그리고 바람직하게는, 단위체의 센스 및 안티센스 가닥 둘 모두의 3' 단부에서 수행되지만, 거기에 항상 한정되는 것은 아니다. 화학적 기능기는 예로서, 술폰기 (-SH), 카르복실기 (-COOH), 아민기 (-NH₂), 히드록시기 (-OH), 포르밀기 (-CHO), 카르보닐기 (-CO-), 에테르기 (-O-), 에스테르기 (-COO-), 니트로기 (-NO₂), 아지드기 (-N₃), 또는 술폰산기 (-SO₃H)를 포함할 수 있다.

[0364]

본 발명의 멀티-접합체에서 내포되는 올리고뉴클레오타이드는 부가적으로 또는 대안으로, 핵염기 (당해 분야에서 단순히 "염기"로서 종종 지칭됨) 변형 또는 치환을 또한 포함하도록 변형될 수 있다. 변형된 핵염기는 자연 핵산에서 단지 드물게 또는 일시적으로만 발견되는 핵염기, 예를 들면, 히포크산틴, 6-메틸아데닌, 5-Me 피리미딘, 특히 5-메틸시토신 (5-메틸-2' 데옥시시토신으로서 또한 지칭됨 및 당해 분야에서 5-Me-C로서 종종 지칭됨), 5-히드록시메틸시토신 (HMC), 글리코실 HMC 및 겐토비오실 HMC뿐만 아니라 합성 핵염기, 예를 들면, 2-아미노아데닌, 2-(메틸아미노)아데닌, 2-(이미다졸릴알킬)아데닌, 2-(아미노알킬아미노)아데닌 또는 다른 헤테로치환된 알킬아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-히드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N₆ (6-아미노핵실)아데닌, 그리고 2,6-디아미노퓨린을 포함한다. Kornberg, A., DNA Replication, W.H.Freeman & Co., San Francisco, pp 75-77 (1980); Gebeyehu *et al.*, Nucl.Acids Res, 15:4513 (1997). 당해 분야에서 공지된 "보편적인" 염기, 예를 들면, 이노신 또한 포함될 수 있다. 5-Me-C 치환은 핵산 이중나선 안정성을 0.6-1.2°C 증가시키는 것으로 밝혀졌고(Sanghvi, Y.S., in Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, pp 276-278 (1993), 그리고 염기 치환의 양상이다. 변형된 핵염기는 다른 합성 및 자연 핵염기, 예를 들면, 5-메틸시토신 (5-me-C), 5-히드록시메틸 시토신, 크산틴, 히포크산틴, 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-프로필 우라실 및 시토신, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실 (슈도-우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-히드록실 그리고 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 그리고 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌, 그리고 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌을 포함할 수 있다. 핵산의 말단에서 히드록시기 (-OH)는 기능기, 예를 들면, 술폰기 (-SH), 카르복실기 (-COOH) 또는 아민기 (-NH₂)로 치환될 수 있다. 치환은 3' 단부 또는 5' 단부에서 수행될 수 있다.

[0365]

링커

[0366]

본 발명의 다양한 양상 및 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 공유적으로 연결된다. 링커는 개열가능하거나 (예를 들어, 세포내 조건 하에서, 올리고뉴클레오타이드 전달 및/또는 작용을 용이하게 하기 위해) 또는 비개열가능할 수 있다. 비록 하기에서 및 실시예에서 친핵체-친전자체 화학을 이용하는 링커의 맥락에서 일반적으로 설명되긴 하지만, 다른 화학 및 형상이 가능하다. 그리고, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 다양한 링커뿐만 아니라 이들의 조성, 합성 및 이용은 당해 분야에서 공지되고 본 발명용으로 적합될 수 있다.

[0367]

다양한 구체예에서, 공유 링커는 친핵성 기 및 친전자성 기의 반응 산물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 공유 링커는 티올 및 말레이미드, 티올 및 비닐술폰, 티올 및 피리디디설피드, 티올 및 요오드아세트아미드, 티올 및 아크릴레이트, 아지드 및 알킨, 또는 아민 및 카르복실기의 반응 산물을 포함할 수 있다. 본원에서 설명된 바와 같이, 이들 기 중에서 한 가지는 올리고뉴클레오타이드에 연결되고 (예를 들어, 3' 또는 5' 단부에서 티올 (-SH) 기능화), 그리고 다른 기는 2개의 올리고뉴클레오타이드를 궁극적으로 연결하는 두 번째 분자 (예를 들어, 연결 작용제)에 의해 포괄된다 (예를 들어, DTME에서 말레이미드).

[0368]

다양한 구체예에서, 공유 링커는 변형되지 않은 디-뉴클레오타이드 연쇄 또는 티올 및 말레이미드의 반응 산물을 포함할 수 있다.

[0369]

다양한 구체예에서, 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 2개 또는 그 이상의 링커는 생체개열가능한 연쇄의 2가지 직교 유형을 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 2가지 직교 생체개열가능한 연쇄는 변형되지 않은 디-뉴클레오타이드, 그리고 티올 및 말레이미드의 반응 산물을 포함할 수 있다.

[0370]

다양한 구체예에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 포스포디에스테르 또는 티오포스포디에스테르를 통해 링커에 연결된다 (예를 들어, 구조체 1에서 R1은 포스포디에스테르 또는 티오포스포디에스테르이다). 다양한 구체예에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 C1-8 알킬, C2-8 알케닐, C2-8 알키닐, 헤테로시클릴, 아릴 및 헤테로아릴, 분지된 알킬, 아릴, 할로-아릴 및/또는 다른 탄소-기초된 결합기를 통해 링커에 연결된다. 다양한 구체예에

서, 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 C2-C10, C3-C6, 또는 C6 알킬을 통해 링커에 연결된다 (예를 들어, 구조체 1에서 R2는 C2-C10, C3-C6, 또는 C6 알킬이다). 바람직한 구체예에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 C6 알킬을 통해 링커에 연결된다. 대안으로, 이들 모이어티 (예를 들어, 구조체 1에서 R1 및/또는 R2)는 임의선택적이고, 그리고 직접적인 연쇄가 가능하다.

[0371] 다양한 구체예에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 티올 및 말레이미드 기의 반응 산물을 통해 링커에 연결된다. (예를 들어, 구조체 1에서 A는 티올 및 말레이미드 기의 반응 산물이다). 이런 화학을 활용하는 바람직한 연결 작용제는 DTME (디티오비스말레이미도에탄), BM(PEG)2 (1,8-비스(말레이미도)디에틸렌 글리콜), BM(PEG)3 (1,11-비스말레이미도-트리에틸렌글리콜), BMOE (비스말레이미도에탄), BMH (비스말레이미도핵산), 또는 BMB (1,4-비스말레이미도부탄)를 포함한다.

[0372] 다시 한 번, 이들 실례는 예시이고 제한하지 않는다. 다양한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 기능적 단부-치환을 통해 직접적으로, 또는 연결 작용제에 의하여 간접적으로 함께 연결될 수 있다. 다양한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 링커에 직접적으로 결합될 수 있다 (예를 들어, 구조체 1의 R1 및 R2가 부재한다). 이런 결합은 예로서, 3'-티오뉴클레오타이드의 이용을 통해 달성될 수 있는데, 이들은 당해 분야에서 일상적인 기술에 따라서 제조될 수 있다. 예를 들어, 하기를 참조한다: Sun et al. "Synthesis of 3'-thioribonucleosides and their incorporation into oligoribonucleotides via phosphoramidite chemistry" RNA.1997 Nov;3(11):1352-63. 다양한 구체예에서, 연결 작용제는 비이온성 친수성 중합체, 예를 들면, 폴리에틸렌글리콜 (PEG), 폴리비닐피롤리돈 및 폴리옥사졸린, 또는 소수성 중합체, 예를 들면, PLGA 및 PLA일 수 있다.

[0373] 공유 결합을 위한 매개체로서 이용되는 중합체 연결 작용제는 PEG, Pluronic, 폴리비닐피롤리돈, 폴리옥사졸린, 또는 이들의 공중합체를 비롯한 비이온성 친수성 중합체; 또는 폴리-L-유산, 폴리-D-유산, 폴리-D,L-유산, 폴리-글리콜산, 폴리-D-유산-코-글리콜산, 폴리-L-유산-코-글리콜산, 폴리-D,L-유산-코-글리콜산, 폴리카프로락톤, 폴리발레로락톤, 폴리히드록시부티레이트, 폴리히드록시발레레이트, 또는 이들의 공중합체를 비롯한 한 가지 또는 그 이상의 생체개열가능한 폴리에스테르 중합체일 수 있지만, 거기에 항상 한정되지는 않는다.

[0374] 연결 작용제는 100-10,000 달톤의 분자량을 가질 수 있다. 이런 연결 작용제의 실례는 디티오-비스-말레이미도에탄 (DTME), 1,8-비스-말레이미도디에틸렌글리콜 (BM(PEG)2), 트리스-(2-말레이미도에틸)-아민 (TMEA), 트리-숙신이미딜 아미노트리아세테이트 (TSAT), 3-암(arm)-폴리(에틸렌 글리콜) (3-암 PEG), 말레이미드, N-히드록시숙신이미드 (NHS), 비닐술폰, 요오도아세틸, 니트로페닐 아지드, 이소시아나산염, 피리딜디설피드, 히드라지드, 그리고 히드록시페닐 아지드를 포함한다.

[0375] 개열가능한 결합 (예를 들어, 시토질의 화학적 환경에 의해 개열되는 환원제 결합)을 갖는 연결 작용제 또는 비개열가능한 결합을 갖는 연결 작용제가 본원에서 이용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 전술한 양상의 연결 작용제는 비개열가능한 결합, 예를 들면, 아마이드 결합 또는 우레탄 결합을 가질 수 있다. 대안으로, 본 발명의 전술한 양상의 연결 작용제는 개열가능한 결합, 예를 들면, 산 개열가능한 결합 (예를 들어, 에스테르, 히드라존, 또는 아세탈의 공유 결합), 환원제 개열가능한 결합 (예를 들어, 디설피드 결합), 생체개열가능한 결합, 또는 효소 개열가능한 결합을 가질 수 있다. 한 구체예에서, 개열가능한 공유 링커는 세포내 조건 하에 개열가능하다. 추가적으로, 약물 변형에 가용한 임의의 연결 작용제가 제한 없이 본 발명의 전술한 양상에서 이용될 수 있다.

[0376] 게다가, 기능기 및 연결 작용제의 조합은 하기를 포함할 수 있다: (a) 기능기가 아미노 및 티올인 경우에, 연결 작용제는 숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트, 또는 숙신이미딜 6-([3(2-피리딜디티오)프로피오아미드]헥사노에이트일 수 있고; (b) 기능기가 아미노인 경우에, 연결 작용제는 3,3' 디티오디프로피온산 디-(N-숙신이미딜 에스테르), 디티오-비스(에틸 1H-이미다졸-1-카복실산염), 또는 디티오-비스(에틸 1H-이미다졸-1-카복실산염)일 수 있고; (c) 기능기가 아미노 및 알킨인 경우에, 연결 작용제는 술폰-N-숙신이미딜3-[[2-(p-아지도살리실아미도)에틸]-1,3'-디티오]프로피오네이트일 수 있고; 그리고 (d) 기능기 y가 티올인 경우에, 연결 작용제는 디티오-비스-말레이미도에탄 (DTME); 1,8-비스-말레이미도디에틸렌글리콜 (BM(PEG)2); 또는 디티오비스(설포숙신이미딜 프로피온산염) (DTSSP)이다.

[0377] 화합물을 제조하는 전술한 방법에서, 기능기를 활성화하는 추가 단계가 포함될 수 있다. 기능기의 활성화에서 이용될 수 있는 화합물은 1-에틸-3,3-디메틸아미노프로필 카르보디이미드, 이미다졸, N-히드록시숙신이미드, 디클로로헥실카보디이미드, N-베타-말레이미도프로피온산, N-베타-말레이미도프로필 숙신이미드 에스테르 또는 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0378] **단위체성 중간 화합물**

[0379] 다양한 양상에서, 본 발명은 공유 링커에 연계된 올리고뉴클레오타이드를 제공하는데, 이것은 예로서, 미리 결정된 크기 및 조성을 갖는 규정된 멀티-접합체 올리고뉴클레오타이드의 합성에서 이용될 수 있다.

[0380] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 1에 따른 화합물을 제공하고:

[0381] $X - R_1 - R_2 - A - R_3 - B$ (구조체 1)

[0382] 여기서:

[0383] X는 3' 또는 5' 말단을 통해 R1에 결합된 핵산이고;

[0384] R1은 인산의 유도체, 티오인산의 유도체, 황산염, 아마이드, 글리콜이거나, 또는 부재하고;

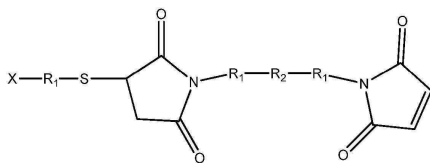
[0385] R2는 C2-C10 알킬, 알콕시, 또는 아릴 기이거나, 또는 부재하고;

[0386] A는 친핵체 및 친전자체의 반응 산물이고;

[0387] R3는 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오프로피오네이트, 또는 디설피드이고; 그리고

[0388] B는 친핵체 또는 친전자체 (예를 들어, 티올, 말레이미드, 비닐술폰, 피리딜디설피드, 요오드아세트아미드, 아크릴레이트, 아지드, 알킨, 아민, 또는 카르복실 기)이다.

[0389] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 2에 따른 화합물을 제공하고:



[0390]

[0391] (구조체 2)

[0392] 여기서:

[0393] X는 3' 또는 5' 말단에서 인산염 또는 이의 유도체, 또는 티오포스페이트 또는 이의 유도체를 통해 R1에 결합된 핵산이고;

[0394] 각 R1은 독립적으로 C2-C10 알킬, 알콕시, 또는 아릴 기이고; 그리고

[0395] R2는 티오프로피오네이트 또는 디설피드 기이다.

[0396] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 3에 따른 화합물을 제공하고:

[0397] $X - R_1 - R_2 - A - R_3 - B$ (구조체 3)

[0398] 여기서:

[0399] X는 3' 또는 5' 말단을 통해 R1에 결합된 핵산이고;

[0400] R1은 인산의 유도체, 예를 들면, 인산염, 포스포디에스테르, 포스포트리에스테르, 포스포네이트, 포스포라미데이트 등, 티오인산의 유도체, 예를 들면, 티오포스페이트, 티오포스포디에스테르, 티오포스포트리에스테르, 티오포스포라미데이트 등, 황산염, 아마이드, 글리콜이거나, 또는 부재하고;

[0401] R2는 C2-C10 알킬, 알콕시, 또는 아릴 기이거나, 또는 부재하고;

[0402] A는 첫 번째와 두 번째 반응성 모이어티의 반응 산물이고;

[0403] R3는 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오프로피오네이트, 또는 디설피드이고; 그리고

[0404] B는 세 번째 반응성 모이어티이다.

[0405] 다양한 양상에서, 본 발명은 또한, 공유 링커에 연계된 올리고뉴클레오타이드를 합성하기 위한 방법을 제공한다.

- [0406] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 1에 따른 화합물을 합성하기 위한 방법 (또는 구조체 2 또는 3에 따른 화합물을 합성하기 위해 적합됨)을 제공하고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0407] 기능화된 핵산 $X - R1 - R2 - A'$ 및 공유 링커 $A'' - R3 - B$ (여기서 A' 및 A'' 는 친핵체 및 친전자체를 포함한다)를 $X - R1 - R2 - A'$ 의 묶은 용액에서 화학양론적 과잉의 $A'' - R3 - B$ 와 반응시켜서 화합물 $X - R1 - R2 - A - R3 - B$ (구조체 1)를 형성하는 단계, 여기서:
- [0408] X 는 3' 또는 5' 말단을 통해 $R1$ 에 결합된 핵산이고;
- [0409] $R1$ 은 포스포디에스테르, 티오포스포디에스테르, 황산염, 아마이드, 글리콜이거나, 또는 부재하고;
- [0410] $R2$ 는 $C2-C10$ 알킬, 알콕시, 또는 아릴 기이거나, 또는 부재하고;
- [0411] A 는 친핵체 및 친전자체의 반응 산물이고;
- [0412] $R3$ 은 $C2-C10$ 알킬, 알콕시, 아릴, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오포스포오네이트, 또는 디설파이드이고; 그리고
- [0413] B 는 친핵체 또는 친전자체 (예를 들어, 티올, 말레이미드, 비닐술폰, 피리딜디설파이드, 요오드아세트아미드, 아크릴레이트, 아지드, 알킨, 아민, 또는 카르복실 기)이다.
- [0414] 상기 방법은 기능화된 핵산 $X - R1 - R2 - A'$ 를 합성하는 단계를 더욱 포함할 수 있는데, 여기서 A' 는 (i) 포스포라미드트 올리고머화 화학을 이용한 핵산의 고체상 합성 동안 티올의 도입 또는 (ii) 고체상 합성 동안 도입된 디설파이드의 환원에 의해 티올 ($-SH$)을 포함한다.
- [0415] 다양한 구체예에서, 구조체 1의 화합물을 합성하기 위한 방법은 구조체 2의 화합물을 합성하는 것을 더욱 포함한다.
- [0416] 공유 링커에 연계된 올리고뉴클레오티드는 실시예에서를 비롯하여, 본원에서 설명된 특질 중에서 한 가지 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 화합물은 본원에서 설명된 핵산 (변형이 있거나 또는 없음), 표적화 리간드 및/또는 링커 중에서 한 가지 또는 그 이상, 또는 요약, 설명 또는 실시예에서 도시된 특정한 구조체 또는 화합물질 중에서 어느 것을 포함할 수 있다. 실시예 1은 티올 종료된 올리고뉴클레오티드를 산출하기 위한 실험 방법론을 제공한다. 실시예 2는 링커에 연계된 올리고뉴클레오티드를 제조하기 위한 실험 방법론을 제공한다.
- [0417] 다양한 구체예에서, 구조체 1, 2 또는 3의 화합물을 합성하기 위한 방법은 구조체 1, 2 또는 3의 형성에 실제로 우호적이고, 그리고 X 의 이합체화를 실제로 예방하는 조건 하에 실행된다. 이들 조건은 반응의 수율을 향상시킬 수 있다 (예를 들어, 산물의 순도를 향상시킨다).
- [0418] 다양한 구체예에서, 구조체 1, 2 또는 3의 화합물을 합성하기 위한 방법에서, 기능화된 핵산 $X - R1 - R2 - A'$ 및 공유 링커 $A'' - R3 - B$ 를 반응시키는 단계는 약 1 mM, 500 μ M, 250 μ M, 100 μ M, 또는 50 μ M 아래의 $X - R1 - R2 - A'$ 농도에서 실행된다. 대안으로, $X - R1 - R2 - A'$ 농도는 약 1 mM, 500 μ M, 250 μ M, 100 μ M, 또는 50 μ M일 수 있다.
- [0419] 다양한 구체예에서, 구조체 1, 2 또는 3의 화합물을 합성하기 위한 방법에서, 기능화된 핵산 $X - R1 - R2 - A'$ 및 공유 링커 $A'' - R3 - B$ 를 반응시키는 단계는 적어도 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 또는 100의 몰 과잉의 $A'' - R3 - B$ 로 실행된다. 대안으로, 몰 과잉의 $A'' - R3 - B$ 는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 또는 100일 수 있다.
- [0420] 다양한 구체예에서, 구조체 1, 2 또는 3의 화합물을 합성하기 위한 방법에서, 기능화된 핵산 $X - R1 - R2 - A'$ 및 공유 링커 $A'' - R3 - B$ 를 반응시키는 단계는 약 7, 6, 5, 또는 4 아래의 pH에서 실행된다. 대안으로, pH는 약 7, 6, 5, 또는 4일 수 있다.
- [0421] 다양한 구체예에서, 구조체 1, 2 또는 3의 화합물을 합성하기 위한 방법에서, 기능화된 핵산 $X - R1 - R2 - A'$ 및 공유 링커 $A'' - R3 - B$ 를 반응시키는 단계는 물 및 수혼화성 유기 보조용매를 포함하는 용액에서 실행된다. 수혼화성 유기 보조용매는 DMF (디메틸포름아미드), NMP (N-메틸-2-피롤리돈), DMSO (디메틸설폭사이드), 또는 아세토니트릴을 포함할 수 있다. 수혼화성 유기 보조용매는 상기 용액의 약 10, 15, 20, 25, 30, 40, 또는 50 %V (v/v)를 구성할 수 있다.
- [0422] 다양한 구체예에서, 화합물은 단리되거나 또는 실제로 순수하다. 예를 들어, 화합물은 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100 % 순수할 수 있다. 한 구체예에서, 화합물은 약 85-95 % 순수하다. 유사하

게, 본 발명에 따른 화합물 및 조성물을 합성하기 위한 방법은 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100 % 순수한 산물을 유발할 수 있다. 한 구체예에서, 산물은 약 85-95 % 순수하다. 제조물은 50 %보다 크거나 또는 이와 동등하게 순수할 수 있고; 바람직하게는 75 %보다 크거나 또는 이와 동등하게 순수할 수 있고; 더욱 바람직하게는 85 %보다 크거나 또는 이와 동등하게 순수할 수 있고; 그리고 훨씬 바람직하게는, 95 %보다 크거나 또는 이와 동등하게 순수할 수 있다.

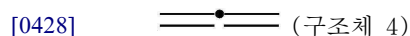
[0423] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 약은 대략의 보통의 일상적인 의미에 따라서 이용된다. 예를 들어, "약 X"는 X의 값에 대한 계측 오차의 범위 안에 있는 유사한 양 또는 X와 거의 동일하고 X와 본질적으로 동일한 성질을 갖는 양을 비롯하여, 진술된 바와 같은 대략의 값 X를 포괄한다.

[0424] 본원에서 이용된 바와 같이, "단리된"은 다른, 원치 않는 물질로부터 분리되는 화합물을 포함한다. 단리된 화합물은 실제로 순수한 상태에서 합성되거나, 또는 미가공 반응 혼합물의 다른 성분의 잔류량을 비롯한 어느 정도의 불순물이 남아있을 수 있다는 점을 제외하고, 미가공 반응 혼합물의 다른 성분으로부터 분리될 수 있다. 유사하게, "순수한 또는 실제로 순수한"은 이의 의도된 용도 (예를 들어, 제약학적 제제에서 또는 차후 화학 반응을 위한 물질로서)를 허용할 만큼 충분히 불순물이 없다는 것을 의미한다. "X % 순수한"은 화합물이 예로서, 분석법, 예를 들면, HPLC에 의할 수 있는 유관한 척도에 의해 전체 조성물 중에서 X %이라는 것을 의미한다.


[0425] 이합체성 화합물 및 중간체

[0426] 다양한 양상에서, 본 발명은 이합체성 규정된 멀티-접합체 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 이들 화합물은 동종 이합체 (예를 들어, 실제로 동일한, 예를 들면, *생체내에서* 동일한 유전자를 표적으로 하는 2개의 올리고뉴클레오타이드) 및 이종이합체 (예를 들어, 실제로 상이한, 예를 들면, 상이한 서열이거나 또는 *생체내에서* 상이한 유전자를 표적으로 하는 2개의 올리고뉴클레오타이드)를 포함한다.

[0427] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 4에 따른 단리된 화합물을 제공하고:



[0429] 여기서:

[0430] 각  은 *생체내에서* 동일한 분자 표적과 반응하도록 설계된 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 그리고

[0431] • 는 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥을 그들의 3' 또는 5' 말단에서 연결하고 구조체 - R1 - R2 - A - R3 - A - R2 - R1 -을 갖는 공유 링커이고, 여기서:

[0432] 각 R1은 인산의 유도체, 예를 들면, 인산염, 포스포디에스테르, 포스포트리에스테르, 포스포네이트, 포스포라미데이트 등, 티오인산의 유도체, 예를 들면, 티오포스페이트, 티오포스포디에스테르, 티오포스포트리에스테르, 티오포스포라미데이트 등,

[0433] 황산염, 아미드, 글리콜이거나, 또는 부재하고;

[0434] 각 R2는 독립적으로 C2-C10 알킬, 알콕시, 또는 아릴 기이거나, 또는 부재하고;


[0435] 각 A는 독립적으로 친핵체 및 친전자체의 반응 산물이고, 그리고


[0436] R3은 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오프로피오네이트, 또는 디설피드이다.

[0437] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 5에 따른 단리된 화합물을 제공하고:



[0439] 여기서:

[0440]  는 첫 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이고,

[0441]  는 첫 번째로부터 상이한 서열을 갖는 두 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 그리고

[0442] • 는 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥을 그들의 3' 또는 5' 말단에서 연결하고 구조체 - R1 -

R2 - A - R3 - A - R2 - R1 -을 갖는 공유 링커이고, 여기서:

[0443] 각 R1은 인산의 유도체, 예를 들면, 인산염, 포스포디에스테르, 포스포트리에스테르, 포스포네이트, 포스포라미데이트 등, 티오인산의 유도체, 예를 들면, 티오포스페이트, 티오포스포디에스테르, 티오포스포트리에스테르, 티오포스포라미데이트 등,

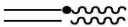
[0444] 황산염, 아마이드, 글리콜이거나, 또는 부재하고;

[0445] 각 R2는 독립적으로 C2-C10 알킬, 알콕시, 또는 아릴 기이거나, 또는 부재하고;


[0446] 각 A는 독립적으로 티올 및 말레이미드, 티올 및 비닐술폰, 티올 및 피리딜디설피드, 티올 및 요오드아세트아미드, 티올 및 아크릴레이트, 아지드 및 알킨, 또는 아민 및 카르복실 기의 반응 산물이고, 그리고


[0447] R3은 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오포로피오네이트, 또는 디설피드이다.

[0448] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 6에 따른 단리된 화합물을 제공하고:

[0449]  (구조체 6)

[0450] 여기서:

[0451]  는 첫 번째 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이고,

[0452]  는 첫 번째로부터 상이한 서열을 갖는 두 번째 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이고, 그리고

[0453] •는 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 그들의 3' 또는 5' 말단에서 연결하고 구조체 - R1 - R2 - A - R3 - A - R2 - R1 -을 갖는 공유 링커이고, 여기서:

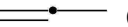
[0454] 각 R1은 인산의 유도체, 예를 들면, 인산염, 포스포디에스테르, 포스포트리에스테르, 포스포네이트, 포스포라미데이트 등, 티오인산의 유도체, 예를 들면, 티오포스페이트, 티오포스포디에스테르, 티오포스포트리에스테르, 티오포스포라미데이트 등, 황산염, 아마이드, 글리콜이거나, 또는 부재하고;

[0455] 각 R2는 독립적으로 C2-C10 알킬, 알콕시, 또는 아릴 기이거나, 또는 부재하고;


[0456] 각 A는 독립적으로 티올 및 말레이미드, 티올 및 비닐술폰, 티올 및 피리딜디설피드, 티올 및 요오드아세트아미드, 티올 및 아크릴레이트, 아지드 및 알킨, 또는 아민 및 카르복실 기의 반응 산물이고, 그리고


[0457] R3은 C2-C10 알킬, 알콕시, 아릴, 알킬디티오 기, 에테르, 티오에테르, 티오포로피오네이트, 또는 디설피드이다.

[0458] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 11에 따른 단리된 화합물을 제공하고:

[0459]  (구조체 11)

[0460] 여기서:

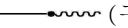
[0461]  는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이고,



[0462]  는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이고, 그리고

[0463] •는 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이다.

[0464] 다양한 양상에서, 본 발명은 이합체성 규정된 멀티-접합체 올리고뉴클레오티드를 합성하기 위한 방법을 제공한다.

[0465] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 5의 화합물을 합성하기 위한 방법을 제공하고:

[0466]  (구조체 5)

[0467] 여기서  은 첫 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이고,  은 첫 번째로부터 상이한 서열을 갖는 두 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이고, 그리고 •는 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥을 그들의

3' 또는 5' 말단에서 연결하는 공유 링커이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0468] (i) 첫 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ---R_1 를 이중기능성 연결 모이어티 \bigcirc 와 반응시키는 단계, 여기서 R_1 은 단일치환된 산물 $\text{---}\bigcirc$ 을 생산하는 조건 하에 \bigcirc 와 반응할 수 있는 화학적 기이고;

[0469] (ii) $\text{---}\bigcirc$ 을 두 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ---R_2 와 반응시키고, 여기서 R_2 는 \bigcirc 와 반응할 수 있는 화학적 기이고, 따라서 $\text{---}\bigcirc\text{---}$ 을 형성하는 단계.

[0470] 상기 방법은 상보성 --- 및 --- 을 어닐링하여 구조체 6을 산출하는 단계를 더욱 포함할 수 있다:

[0471] $\text{---}\bigcirc\text{---}$ (구조체 6).

[0472] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 4의 단리된 화합물을 합성하기 위한 방법을 제공하고:

[0473] $\text{---}\bigcirc\text{---}$ (구조체 4)

[0474] 여기서 각 --- 은 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 그리고 \bigcirc 은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥을 그들의 3' 또는 5' 말단에서 연결하는 공유 링커이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0475] (i) 첫 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ---R_1 를 이중기능성 연결 모이어티 \bigcirc 와 반응시키고, 여기서 R_1 은 \bigcirc 와 반응할 수 있는 화학적 기이고, 따라서 단일치환된 산물 $\text{---}\bigcirc$ 을 형성하는 단계;

[0476] (ii) $\text{---}\bigcirc$ 을 두 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ---R_2 와 반응시키고, 여기서 R_2 는 \bigcirc 와 반응할 수 있는 화학적 기이고, 따라서 단일 가닥 이합체 $\text{---}\bigcirc\text{---}$ 를 형성하는 단계;

[0477] (iii) 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 동시에 또는 연속적으로 어닐링하여 $\text{---}\bigcirc\text{---}$ 을 형성하는 단계.

[0478] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 4의 단리된 화합물을 합성하기 위한 방법을 제공하고: $\text{---}\bigcirc\text{---}$ (구조체 4), 여기서 각 --- 은 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 그리고 \bigcirc 은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥을 그들의 3' 또는 5' 말단에서 연결하는 공유 링커이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0479] (i) 하기에 의해 $\text{---}\bigcirc\text{---}$ 을 형성하는 단계:

[0480] (a) 첫 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 --- 및 두 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ---R_1 을 어닐링하여 ---R_1 를 형성하고, 그리고 ---R_1 을 세 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ---R_2 와 반응시키고, 여기서 R_1 및 R_2 는 직접적으로 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 \bigcirc 를 형성할 수 있는 화학적 모이어티이고, 따라서 $\text{---}\bigcirc\text{---}$ 을 형성하거나; 또는

[0481] (b) 두 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ---R_1 및 세 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ---R_2 를 반응시켜서 $\text{---}\bigcirc\text{---}$ 를 형성하고, 그리고 첫 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 --- 및 $\text{---}\bigcirc\text{---}$ 를 어닐링하여 $\text{---}\bigcirc\text{---}$ 를 형성함;

[0482] (ii) $\text{---}\bigcirc\text{---}$ 및 네 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 --- 를 어닐링하여 $\text{---}\bigcirc\text{---}$ 를 형성하는 단계.

[0483] 이러한 방법론은 예로서, 단계 (ii)를 생략함으로써, $\text{---}\bigcirc\text{---}$ (구조체 11)에 따른 단리된 화합물을 합성하는데 적합될 수 있다.

[0484] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 4의 단리된 화합물을 합성하기 위한 방법을 제공하고: $\text{---}\bigcirc\text{---}$ (구조체 4), 여기서 각 --- 은 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 그리고 \bigcirc 은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥을 그들의 3' 또는 5' 말단에서 연결하는 공유 링커이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0485] (a) 첫 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 --- 및 두 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ---R_1 을 어닐링

하여 ---R_1 를 형성하는 단계;

[0486] (b) 세 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ---R_2 및 네 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 --- 을 어닐링 하여 ---R_2 를 형성하는 단계;

[0487] (c) ---R_1 및 ---R_2 을 반응시키고, 여기서 R1 및 R2는 직접적으로 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 \bullet 를 형성할 수 있는 화학적 모이어티이고, 따라서 $\text{---}\bullet\text{---}$ 을 형성하는 단계.

[0488] 본 발명에 따른 다른 화합물 및 조성물에서처럼, 이합체성 화합물 및 중간체는 실시예에서를 비롯하여, 본원에서 설명된 특질 중에서 한 가지 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 화합물은 본원에서 설명된 핵산 (변형이 있거나 또는 없음), 표적화 리간드 및/또는 링커 중에서 한 가지 또는 그 이상, 또는 요약, 설명 또는 실시예에서 도시된 특정한 구조체 또는 화합물질 중에서 어느 것을 포함할 수 있다.

[0489] 실시예 3은 이합체화된 올리고뉴클레오타이드를 제조하기 위한 실례 방법론을 제공하고, 그리고 실시예 4는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 어닐링하여 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드를 형성하기 위한 실례 방법론을 제공한다. 실시예 7은 상기 합성에서 유용한 다양한 올리고뉴클레오타이드 전구체를 제조하기 위한 실례 방법론을 제공한다. 실시예 8은 상기 합성에서 또한 유용한 다양한 올리고뉴클레오타이드 다합체를 제조하기 위한 실례 방법론을 제공한다.

[0490] 이형이합체의 실례는 실시예 9 및 10에서 제공된다.

[0491] 동종이합체의 실례는 실시예 12-15에서 제공된다.

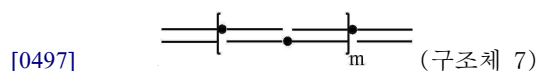
[0492] 다양한 구체예에서, R1, R2, 그리고 이중기능성 연결 모이어티 \bullet 는 본원에서 설명되고 도시된 바와 같은 공유 링커 \bullet 을 형성할 수 있다. 예를 들어, 다양한 구체예에서, R1 및 R2는 반응성 모이어티, 예를 들면, 친전자체 또는 친핵체를 각각 독립적으로 포함할 수 있다. 한 구체예에서, R1 및 R2는 티올, 말레이미드, 비닐술폰, 피리딜디설피드, 요오드아세트아미드, 아크릴레이트, 아지드, 알킨, 아민, 그리고 카복실기로 구성된 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있다. 다양한 구체예에서, 이중기능성 연결 모이어티 \bullet 는 상기 단계 (i) 및 (ii)에 따라서 연속적으로 반응될 수 있는 2개의 반응성 모이어티, 예를 들면, R1 및 R2에서 친전자체/친핵체와 반응될 수 있는 두 번째 친전자체/친핵체를 포함한다. 이중기능성 연결 모이어티 \bullet 의 실례는 DTME, BM(PEG)2, BM(PEG)3, BMOE, BMH, 또는 BMB를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0493] 본 발명의 이들 합성 방법뿐만 아니라 모든 다른 합성 방법은 표적화 리간드를 분자에 부가하는 단계를 더욱 포함할 수 있다. 실시예 6은 표적화 리간드 (예를 들어, GalNAc)를 부가하기 위한 실례 방법론을 제공한다. 표적화 리간드를 부가하기 위한 추가 방법은 당해 분야에서 공지되고 당업자에 의해 본 발명에 맞게 적용될 수 있다.

[0494] **다중결합 ($n>2$) 화합물 및 중간체**

[0495] 다양한 양상에서, 본 발명은 규정된 트리-접합체 및 규정된 테트라접합체를 비롯한 다중결합 ($n>2$) 규정된 멀티-접합체 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0496] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 7 또는 8에 따른 화합물을 제공하고:

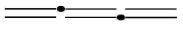



[0499] 여기서:

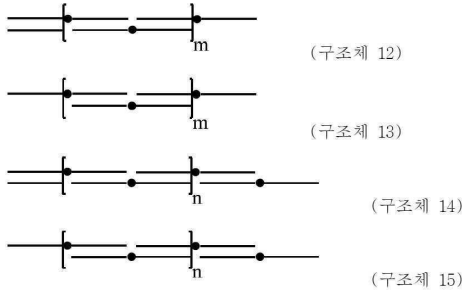
[0500] 각 --- 은 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고,

[0501] 각 \bullet 은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이고, 그리고

[0502] m은 정수 ≥ 1 이고 n은 정수 ≥ 0 이다.


[0503] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 9에 따른 화합물을 제공하고, 그리고 여기서 $n = 0$ 이다:  (구조체 9). 한 양상에서, 본 발명은 구조체 10에 따른 화합물을 제공하고, 그리고 여기서 $m = 1$ 이다:  (구조체 10).


[0504] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 12, 13, 14, 또는 15에 따른 화합물을 제공하고:



[0505]

[0506] 여기서:

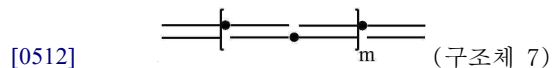
[0507] 각  은 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고,


[0508] 각  은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이고,


[0509] 각 \bullet 은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이고, 그리고 m 은 정수 ≥ 1 이고 n 은 정수 ≥ 0 이다.







[0510] 다양한 양상에서, 본 발명은 규정된 트리-접합체 및 규정된 테트라접합체를 비롯한 다중결합 ($n > 2$) 규정된 멀티-접합체 올리고뉴클레오타이드를 합성하기 위한 방법을 제공한다.







[0511] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 7 또는 8에 따른 화합물을 합성하기 위한 방법을 제공하고:








[0514] 여기서: 각  은 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 \bullet 은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이고, 그리고 m 은 정수 ≥ 1 이고 n 은 정수 ≥ 0 이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0515] (i) 하기에 의해  을 형성하는 단계:

[0516] (a) 첫 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드  및 두 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드  을 어닐링 하여  를 형성하고, 그리고  을 세 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드  와 반응시키고, 여기서 R_1 및 R_2 는 직접적으로 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 \bullet 를 형성할 수 있는 화학적 모이티티이고, 따라서  을 형성하거나; 또는

[0517] (b) 두 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드  및 세 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드  을 반응시켜서  를 형성하고, 그리고 첫 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드  및  를 어닐링하여  를 형성함;

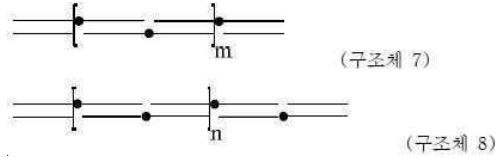
[0518] (ii)  및 두 번째 단일 가닥 이합체  를 어닐링하여  를 형성하고, 그리고 선택적으로, 하나 또는 그 이상의 추가 단일 가닥 이합체  를  에 어닐링하여 하기를 형성하는 단계:



[0519] , 여기서 m 은 정수 ≥ 1 이고 n 은 정수 ≥ 0 이고; 그리고

[0520] (iii) 네 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 —를 단계 (ii)의 산물에 어닐링하여 구조체 7 또는 8을 형성하는 단계.

[0521] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 7 또는 8에 따른 화합물을 합성하기 위한 방법을 제공하고:

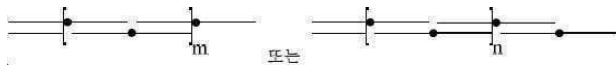


[0522]

[0523] 여기서: 각 —은 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 •은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이고, 그리고 m 은 정수 ≥ 1 이고 n 은 정수 ≥ 0 이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0524] (i) 첫 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 — 및 첫 번째 단일 가닥 이합체 —•—를 어닐링하여 —•—를 형성하는 단계;

[0525] (ii) —•— 및 두 번째 단일 가닥 이합체 —•—를 어닐링하여 —•—를 형성하고, 그리고 선택적으로, 하나 또는 그 이상의 추가 단일 가닥 이합체 —•—를 —•—에 어닐링하여 하기를 형성하는 단계:



[0526] , 여기서 m 은 정수 ≥ 1 이고 n 은 정수 ≥ 0 이고; 그리고

[0527] (iii) 두 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 —를 단계 (ii)의 산물에 어닐링하여 구조체 7 또는 8을 형성하는 단계.

[0528] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 9의 화합물을 합성하기 위한 방법을 제공하고: —•— (구조체 9), 여기서 각 —은 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 •은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0529] (i) 하기에 의해 —•—을 형성하는 단계:

[0530] (a) 첫 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 — 및 두 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 — R_1 를 어닐링하여 — R_1 를 형성하고, 그리고 — R_1 을 세 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 — R_2 와 반응시키고, 여기서 R_1 및 R_2 는 직접적으로 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 •를 형성할 수 있는 화학적 모이어티이고, 따라서 —•—을 형성함; 또는

[0531] (b) 두 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 — R_1 및 세 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 — R_2 를 반응시켜서 —•—를 형성하고, 그리고 첫 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 — 및 —•—를 어닐링하여 —•—를 형성함;

[0532] (ii) —•— 및 단일 가닥 이합체 —•—을 어닐링하여 —•—를 형성하는 단계; 그리고

[0533] (iii) —•— 및 네 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 —를 어닐링하여 —•—를 형성하는 단계.

[0534] 한 양상에서, 본 발명은 구조체 10의 화합물을 합성하기 위한 방법을 제공하고: —•— (구조체 10)

10), 여기서 각 --- 은 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 \bullet 은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

(i) 하기에 의해 $\text{---}\bullet\text{---}$ 을 형성하는 단계:

(a) 첫 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 --- 및 두 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ---R_1 을 어닐링 하여 ---R_1 를 형성하고, 그리고 ---R_1 을 세 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ---R_2 와 반응시키고, 여기서 R1 및 R2는 직접적으로 또는 간접적으로 반응하여 공유 링커 \bullet 를 형성할 수 있는 화학적 모이어티이고, 따라서 $\text{---}\bullet\text{---}$ 을 형성함; 또는

(b) 두 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ---R_1 및 세 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 ---R_2 을 반응시켜서 $\text{---}\bullet\text{---}$ 를 형성하고, 그리고 첫 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 --- 및 $\text{---}\bullet\text{---}$ 를 어닐링하여 $\text{---}\bullet\text{---}$ 를 형성함;

(ii) $\text{---}\bullet\text{---}$ 및 단일 가닥 이합체 $\text{---}\bullet\text{---}$ 을 어닐링하여 $\text{---}\bullet\text{---}\bullet\text{---}$ 를 형성하는 단계;

(iii) $\text{---}\bullet\text{---}\bullet\text{---}$ 및 두 번째 단일 가닥 이합체 $\text{---}\bullet\text{---}$ 을 어닐링하여 $\text{---}\bullet\text{---}\bullet\text{---}\bullet\text{---}$ 를 형성하는 단계; 그리고

(iv) $\text{---}\bullet\text{---}\bullet\text{---}\bullet\text{---}$ 및 네 번째 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 --- 를 어닐링하여 $\text{---}\bullet\text{---}\bullet\text{---}\bullet\text{---}$ 를 형성하는 단계.

본 발명에 따른 다른 화합물 및 조성물에서처럼, 이합체성 화합물 및 중간체는 실시예에서를 비롯하여, 본원에서 설명된 특질 중에서 한 가지 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 화합물은 본원에서 설명된 핵산(변형이 있거나 또는 없음), 표적화 리간드 및/또는 링커 중에서 한 가지 또는 그 이상, 또는 요약, 설명 또는 실시예에서 도시된 특정한 구조체 또는 화합물질 중에서 어느 것을 포함할 수 있다.

실시예 7은 상기 합성에서 유용한 다양한 올리고뉴클레오타이드 전구체를 제조하기 위한 실례 방법론을 제공한다. 실시예 8은 상기 합성에서 또한 유용한 다양한 올리고뉴클레오타이드 다합체를 제조하기 위한 실례 방법론을 제공한다.

다양한 구체예에서, R1, R2, 그리고 이중기능성 연결 모이어티 \bullet 는 본원에서 설명되고 도시된 바와 같은 공유 링커 \bullet 을 형성할 수 있다. 예를 들어, 다양한 구체예에서, R1 및 R2는 반응성 모이어티, 예를 들면, 친전자체 또는 친핵체를 각각 독립적으로 포함할 수 있다. 한 구체예에서, R1 및 R2는 티올, 말레이미드, 비닐술폰, 피리딜디설피드, 요오드아세트아미드, 아크릴레이트, 아지드, 알킨, 아민, 그리고 카르복실기로 구성된 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있다. 다양한 구체예에서, 이중기능성 연결 모이어티 \bullet 는 상기 단계 (i) 및 (ii)에 따라서 연속적으로 반응될 수 있는 2개의 반응성 모이어티, 예를 들면, R1 및 R2에서 친전자체/친핵체와 반응될 수 있는 두 번째 친전자체/친핵체를 포함한다. 이중기능성 연결 모이어티 \bullet 의 실례는 DTME, BM(PEG)2, BM(PEG)3, BMOE, BMH, 또는 BMB를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

2개 또는 그 이상의 공유 링커 \bullet 를 포함하는 다양한 구체예에서 (예를 들어, 구조체 7-16에서), 링커는 모두 동일하다. 대안으로, 화합물 또는 조성물은 2개 또는 그 이상의 상이한 공유 링커 \bullet 를 포함할 수 있다.

다양한 구체예에서, 각 $\text{---}\bullet\text{---}$ 은 2개의 센스 또는 2개의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 독립적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, siRNA의 경우에, $\text{---}\bullet\text{---}$ 은 2개의 활성 가닥 또는 2개의 운송 가닥을 포함할 수 있다.

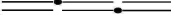




다양한 구체예에서, 각 $\text{---}\bullet\text{---}$ 은 1개의 센스 및 1개의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 독립적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, siRNA의 경우에, $\text{---}\bullet\text{---}$ 은 1개의 활성 가닥 및 1개의 운송 가닥을 포함할 수 있다.

다양한 구체예에서, 화합물 또는 조성물은 실제로 동일한 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드의 동중다합체를 포

함한다. 실제로 동일한 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 *생체내에서* 동일한 분자 표적을 표적으로 하는 siRNA를 각각 포함할 수 있다.

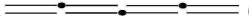




[0548] 다양한 구체예에서, 화합물 또는 조성물은 2개 또는 그 이상의 실제로 상이한 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드의 이중다합체를 포함한다. 실제로 상이한 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 상이한 유전자를 표적으로 하는 siRNA를 각각 포함할 수 있다.

[0549] 다양한 구체예에서, 화합물은 구조체 9를 포함하고, 그리고 $n = 0$ 이다:


[0550]  (구조체 9). 화합물은 표적화 리간드를 더욱 포함할 수 있다. 화합물은 *생체내에서* 상이한 분자 표적을 표적으로 하는 siRNA를 각각 포함하는 2 또는 3개의 실제로 상이한 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 를 더욱 포함할 수 있다. 화합물은 표적화 리간드, 인자 VII를 표적으로 하는 첫 번째 siRNA 안내 가닥 및 상기 안내 가닥에 혼성화된 첫 번째 운송 가닥을 포함하는 1개의 , 아포지질단백질 B를 표적으로 하는 두 번째 siRNA 안내 가닥 및 상기 두 번째 안내 가닥에 혼성화된 두 번째 운송 가닥을 포함하는 1개의 , 그리고 TTR을 표적으로 하는 세 번째 siRNA 안내 가닥 및 상기 세 번째 안내 가닥에 혼성화된 세 번째 운송 가닥을 포함하는 1개의 를 더욱 포함할 수 있다. 표적화 리간드는 *N*-아세틸갈락토사민 (GalNAc)을 포함할 수 있다.


[0551] 삼합체의 실례는 실시예 17, 18 및 20에서 제공된다.



[0552] 다양한 구체예에서, 화합물은 구조체 10을 포함하고, 그리고 $m = 1$ 이다:

[0553]  (구조체 10). 화합물은 표적화 리간드를 더욱 포함할 수 있다. 화합물은 *생체내에서* 상이한 분자 표적을 표적으로 하는 siRNA를 각각 포함하는 2, 3, 또는 4개의 실제로 상이한 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 를 더욱 포함할 수 있다. 화합물은 표적화 리간드, 인자 VII를 표적으로 하는 첫 번째 siRNA 안내 가닥 및 상기 안내 가닥에 혼성화된 첫 번째 운송 가닥을 포함하는 1개의 , 아포지질단백질 B를 표적으로 하는 두 번째 siRNA 안내 가닥 및 상기 두 번째 안내 가닥에 혼성화된 두 번째 운송 가닥을 포함하는 1개의 , 그리고 TTR을 표적으로 하는 세 번째 siRNA 안내 가닥 및 상기 세 번째 안내 가닥에 혼성화된 세 번째 운송 가닥을 포함하는 1개의 를 더욱 포함할 수 있다. 표적화 리간드는 *N*-아세틸갈락토사민 (GalNAc)을 포함할 수 있다.

[0554] 사합체의 실례는 실시예 21에서 제공된다.

[0555] 다양한 구체예에서, 각각의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, , 예로서 구조체 4에서)는 인자 VII를 표적으로 하는 siRNA 안내 가닥 및 상기 안내 가닥에 혼성화된 운송 가닥을 포함한다.

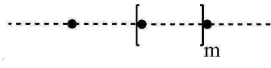
[0556] 다양한 구체예에서 (예를 들어, 구조체 4에서), 화합물은 표적화 리간드를 더욱 포함하고, 각각의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, )는 siRNA 안내 가닥 및 상기 안내 가닥에 혼성화된 운송 가닥을 포함하고, 그리고 상기 화합물은 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100 % 순수하다.

[0557] 다양한 구체예에서, 적어도 하나의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, , 예로서 구조체 6에서)는 인자 VII를 표적으로 하는 첫 번째 siRNA 안내 가닥 및 상기 안내 가닥에 혼성화된 첫 번째 운송 가닥을 포함하고, 그리고 적어도 하나의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, , 예로서 구조체 6에서)는 아포지질단백질 B를 표적으로 하는 두 번째 siRNA 안내 가닥 및 상기 두 번째 안내 가닥에 혼성화된 두 번째 운송 가닥을 포함한다.

[0558] **증가된 순환 반감기 및/또는 생체내 활성을 갖는 올리고뉴클레오타이드**

[0559] 본 발명은 *생체내에서* 증가된 순환 반감기 및/또는 활성을 갖는 다중결합 올리고뉴클레오타이드뿐만 아니라 이들 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 조성물 및 이들의 합성과 이용을 위한 방법을 제공한다.

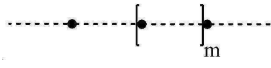
[0560] 다양한 양상에서, 본 발명은 구조체 21을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고:



[0561] (구조체 21),

[0562] 여기서 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, m 은 정수 ≥ 1 이고, 각 •은 인접한 단위체성 아단위를 연결하는 공유 링커이고, 그리고 단위체성 아단위중에서 적어도 하나는 3' 말단에 결합된 공유 링커 • 중에서 하나 및 5' 말단에 결합된 공유 링커 중에서 다른 하나를 갖는 단일 가닥을 포함한다.

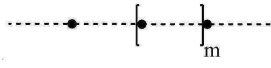
[0563] 다양한 양상에서, 본 발명은 구조체 21을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고:



[0564] (구조체 21),

[0565] 여기서 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 •은 인접한 단위체성 아단위를 연결하는 공유 링커이고, 그리고 m 은 (a) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키고 및/또는 (b) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 활성을 증가시키도록 선택된 정수 ≥ 0 이다.

[0566] 다양한 양상에서, 본 발명은 구조체 21을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고:

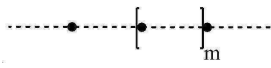


[0567] (구조체 21)를 포함하며,

[0568] 여기서 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 •은 인접한 단위체성 아단위를 연결하는 공유 링커이고, 그리고 m 은 정수 ≥ 0 이고, 그리고

[0569] 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 (a) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키고 및/또는 (b) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 활성을 증가시키도록 설정된 분자 크기 및/또는 분자량을 갖는다.

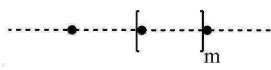
[0570] 다양한 양상에서, 본 발명은 한 가지 또는 그 이상의 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기 및/또는 생체내 활성을 증가시키기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 구조체 21을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 형태에서 한 가지 또는 그 이상의 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여하는 것을 포함하고:



[0571] (구조체 21),

[0572] 여기서 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 •은 인접한 단위체성 아단위를 연결하는 공유 링커이고, 그리고 m 은 (a) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키고 및/또는 (b) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 활성을 증가시키도록 선택된 정수 ≥ 0 이다.

[0573] 다양한 양상에서, 본 발명은 한 가지 또는 그 이상의 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기 및/또는 생체내 활성을 증가시키기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 구조체 21을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 형태에서 한 가지 또는 그 이상의 올리고뉴클레오타이드를 개체에게 투여하는 것을 포함하고:



[0574] (구조체 21),

[0575] 여기서 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 •은 인접한 단위체성 아단위를 연결하는 공유 링커이고, 그리고 , m 은 정수 ≥ 0 이고, 그리고

[0576] 여기서 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 (a) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고

뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키고 및/또는 (b) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 활성을 증가시키도록 설정된 분자 크기 및/또는 분자량을 갖는다.

[0577] 다양한 양상에서, 본 발명은 m 단위체성 아단위를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각각의 단위체성 아단위는 공유 링커•에 의해 다른 단위체성 아단위에 연결되고, 그리고 m은 (a) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키고 및/또는 (b) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 활성을 증가시키도록 선별된 정수 ≥ 3 이다.

[0578] 다양한 양상에서, 본 발명은 m 단위체성 아단위를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각각의 단위체성 아단위는 공유 링커•에 의해 다른 단위체성 아단위에 연결되고, m은 정수 ≥ 3 이고, 그리고 상기 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 (a) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키고 및/또는 (b) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 활성을 증가시키도록 설정된 분자 크기 및/또는 분자량을 갖는다.

[0579] 다양한 구체예에서, 증가는 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 단위체성 아단위에 대한 순환 반감기 및/또는 활성에 상대적이다. 순환 반감기 (및 다른 성질, 예를 들면, 사구체 여과에 대한 이의 관계)는 올리고뉴클레오타이드 흡수 및 청소율 섹션에서 및 아래의 실시예 25와 37에서 더욱 상세하게 논의된다. 다양한 구체예에서, 생체내 순환 반감기는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 500, 또는 1,000의 인자로 증가한다. 생체내 순환 반감기는 적어도 2의 인자로 증가할 수 있다. 생체내 순환 반감기는 적어도 10의 인자로 증가할 수 있다. 다양한 구체예에서, 생체내 활성에서 증가는 t최대에서 생체내 활성의 비율로서 측정된다. 다양한 구체예에서, 생체내 활성은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 500, 또는 1,000의 인자로 증가한다. 생체내 활성은 적어도 2의 인자로 증가할 수 있다. 생체내 활성은 적어도 10의 인자로 증가할 수 있다. 한 구체예에서, 증가는 생쥐에서 증가이다. 한 구체예에서, 증가는 인간에서 증가이다.


[0580] 다양한 구체예에서, m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12이다.

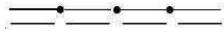
[0581] 다양한 구체예에서, m은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12이다.

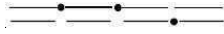
[0582] 다양한 구체예에서, 각각의 단위체성 아단위는 siRNA를 포함하고, 그리고 각각의 공유 링커는 siRNA의 센스 가닥을 연결한다.


[0583] 다양한 구체예에서, 각각의 공유 링커 •는 2개의 단위체성 아단위를 연결한다.


[0584] 다양한 구체예에서, 공유 링커 • 중에서 적어도 하나는 3개 또는 그 이상의 단위체성 아단위를 연결한다.

[0585] 다양한 구체예에서, 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 이고, 그리고 m은 1이다:

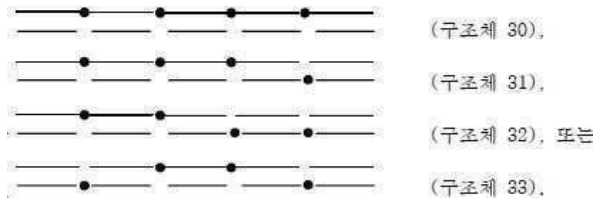
[0586]  (구조체 28) 또는

[0587]  (구조체 29).

[0588] 다양한 구체예에서, 각각의 단위체성 아단위가 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 이고, m이 1이고, 그리고 각 공유 링커 •가 동일한 가닥 상에 있다:

[0589]  (구조체 28).

[0590] 다양한 구체예에서, 각각의 단위체성 아단위가 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 ≡이고, 그리고 m이 2이다:



[0591]

[0592] 다양한 구체예에서, 각각의 단위체성 아단위가 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 ≡이고, 그리고 m이 2이고, 그리고 각 공유 링커 •는 동일한 가닥 상에 있다:

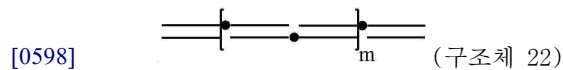
[0593] ≡•≡•≡•≡ (구조체 33).

[0594] 다양한 구체예에서, 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 ≡이고, 그리고 m은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12이다.

[0595] 다양한 구체예에서, 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 ≡이고, m은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12이고, 그리고 각 공유 링커 •는 동일한 가닥 상에 있다.

[0596] 다양한 구체예에서, 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 ≡이고, 그리고 m은 ≥ 13 이다.

[0597] 다양한 구체예에서, 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 ≡이고, m은 ≥ 13 이고, 그리고 각 공유 링커 •는 동일한 가닥 상에 있다. 다양한 구체예에서, 구조체 21은 구조체 22 또는 23이고:



[0600] 여기서: 각 ≡은 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 각 •은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥을 연결하는 공유 링커이고, 그리고 m은 정수 ≥ 1 이고 n은 정수 ≥ 0 이다.

[0601] 다양한 구체예에서, 구조체 21은 PCT/US2016/037685에서 개시된 구조체가 아니다.

[0602] 다양한 구체예에서, 각 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이다.

[0603] 다양한 구체예에서, 각 올리고뉴클레오타이드는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드이다.






[0604] 다양한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 단일 및 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드의 조합을 포함한다.


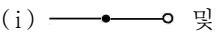
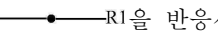


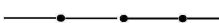
[0605] 다양한 구체예에서, 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 각각의 공유 링커 •가 2개의 단위체성 아단위를 연결하는 선형 구조를 포함한다.

[0606] 다양한 구체예에서, 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 공유 링커 • 중에서 적어도 하나가 3개 또는 그 이상의 단위체성 아단위를 연결하는 분지된 구조를 포함한다.

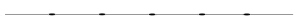


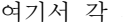

[0607] 예를 들어, 구조체 21은 구조체 41일 수 있었다.






- [0608] 다양한 구체예에서, 각각의 단위체성 아단위는 독립적으로 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ——이다. 일부 이런 구체예에서,
- [0609] m은 1  (구조체 34)이고;
- [0610] m은 2  (구조체 39)이고;
- [0611] m은 3  (구조체 35)이고;
- [0612] m은 4  (구조 40)이고; 또는
- [0613] m은 5  (구조체 37)이다.
- [0614] 일부 이런 구체예에서, m은 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12이다. 일부 이런 구체예에서, m은 정수 ≥ 13 이다. 이와 같은 한 가지 구체예에서, 적어도 하나의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ——는 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 이와 같은 한 가지 구체예에서, 각 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 ——는 독립적으로 안티센스 올리고뉴클레오티드이다.
- [0615] 다양한 구체예에서, 다중결합 올리고뉴클레오티드는 실제로 동일한 올리고뉴클레오티드의 동종다합체를 포함한다. 실제로 동일한 올리고뉴클레오티드는 *생체내에서* 동일한 분자 표적을 표적으로 하는 siRNA일 수 있다. 실제로 동일한 올리고뉴클레오티드는 *생체내에서* 동일한 분자 표적을 표적으로 하는 miRNA일 수 있다. 실제로 동일한 올리고뉴클레오티드는 *생체내에서* 동일한 분자 표적을 표적으로 하는 안티센스 RNA일 수 있다. 실제로 동일한 올리고뉴클레오티드는 *생체내에서* 동일한 분자 표적을 표적으로 하는 siRNA, miRNA 및/또는 안티센스 RNA의 조합일 수 있다.
- [0616] 다양한 구체예에서, 다중결합 올리고뉴클레오티드는 2개 또는 그 이상의 실제로 상이한 올리고뉴클레오티드의 이종다합체를 포함한다. 실제로 상이한 올리고뉴클레오티드는 *생체내에서* 상이한 분자 표적을 표적으로 하는 siRNA일 수 있다. 실제로 상이한 올리고뉴클레오티드는 *생체내에서* 상이한 분자 표적을 표적으로 하는 miRNA일 수 있다. 실제로 상이한 올리고뉴클레오티드는 *생체내에서* 상이한 분자 표적을 표적으로 하는 안티센스 RNA일 수 있다. 실제로 상이한 올리고뉴클레오티드는 *생체내에서* 상이한 분자 표적을 표적으로 하는 siRNA, miRNA 및/또는 안티센스 RNA의 조합일 수 있다.
- [0617] 중합체 링커, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 일정한 약물의 순환 반감기를 증가시키기 위한 시도에서 이용되었다. 이런 접근법은 치료적 작용제를 "회식하는" 것 (예를 들어, 단위 질량당 더욱 적은 활성제)을 비롯한 결점을 가질 수 있다. 본 발명은 이런 접근법으로부터 구별될 수 있다. 예를 들어, 다양한 구체예에서, 다중결합 올리고뉴클레오티드는 PEG를 포함하지 않는다. 다양한 구체예에서, 다중결합 올리고뉴클레오티드는 폴리에테르 화합물을 포함하지 않는다. 다양한 구체예에서, 다중결합 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 이외의 중합체를 포함하지 않는다.
- [0618] 나노입자 (NP), 예를 들면, 지질 나노입자 (LNP)가 일정한 약물의 순환 반감기를 증가시키기 위한 시도에서 이용되었다. 이런 접근법은 증가된 독성 (예를 들어, 양이온성 지질로부터)을 비롯한 결점을 가질 수 있다. 본 발명은 이런 접근법으로부터 구별될 수 있다. 예를 들어, 다양한 구체예에서, 다중결합 올리고뉴클레오티드는 NP 또는 LNP에서 조제되지 않는다.
- [0619] 포스포로티오에이트 기가 일정한 약물의 순환 반감기를 증가시키기 위한 시도에서 이용되었다. 이런 접근법은 더욱 낮은 활성 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드/혈장 단백질 응집에 기인한)을 비롯한 결점을 가질 수 있다. 본 발명은 이런 접근법으로부터 구별될 수 있다. 예를 들어, 다양한 구체예에서, 다중결합 올리고뉴클레오티드는 포스포로티오에이트를 포함하지 않는다.
- [0620] 다양한 구체예에서, 다중결합 올리고뉴클레오티드는 표적화 리간드를 더욱 포함한다. 다양한 구체예에서, 다중결합 올리고뉴클레오티드는 구조체 21 및 임의선택적 표적화 리간드로 본질적으로 구성된다. 다중결합 올리고뉴클레오티드는 본원에서 논의된 표적화 리간드 중에서 어느 것을 이용할 수 있다 (예를 들어, 아래의 표적화 리간드 섹션을 참조한다). 다양한 구체예에서, 표적화 리간드는 올리고뉴클레오티드에 접합된다, 예를 들면, 표적화 리간드는 3' 또는 5' 말단을 통해 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다.


- [0621] 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 본원에서 논의된 링커 중에서 어느 것을 이용할 수 있다 (예를 들어, 상기 링커 섹션을 참조한다). 다양한 구체예에서, 각 공유 링커 •는 동일하다. 다양한 구체예에서, 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 2개 또는 그 이상의 상이한 공유 링커 •를 포함한다. 다양한 구체예에서, • 중에서 하나 또는 그 이상은 개열가능한 공유 링커를 포함한다. 개열가능한 링커는 일부 상황에서 특히 유리할 수 있다. 예를 들어, 세포내 개열은 세포 표적화 및 진입 후 단일 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 복수의 생물학적으로 활성 올리고뉴클레오타이드로 전환하여 (예를 들어, 단일 siRNA 작제물이 4개 또는 그 이상의 활성 siRNA를 전달할 수 있다), 효능을 증가시키고 바람직하지 않은 부작용을 감소시킬 수 있다.
- [0622] 다양한 구체예에서, • 중에서 하나 또는 그 이상은 뉴클레오타이드 링커 (예를 들어, 개열가능한 뉴클레오타이드 링커, 예를 들면, UUU)를 포함한다. 대안으로, 일부 구체예에서, 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 링커를 명시적으로 배제한다.
- [0623] 다양한 구체예에서, 화합물은 단리되거나 또는 실제로 순수하다. 예를 들어, 화합물은 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100 % 순수할 수 있다. 한 구체예에서, 화합물은 약 85-95 % 순수하다. 유사하게, 본 발명에 따른 화합물 및 조성물을 합성하기 위한 방법은 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100 % 순수한 산물을 유발할 수 있다. 한 구체예에서, 산물은 약 85-95 % 순수하다. 제조물은 50 %보다 크거나 또는 이와 동등하게 순수할 수 있고; 바람직하게는 75 %보다 크거나 또는 이와 동등하게 순수할 수 있고; 더욱 바람직하게는 85 %보다 크거나 또는 이와 동등하게 순수할 수 있고; 그리고 훨씬 바람직하게는, 95 %보다 크거나 또는 이와 동등하게 순수할 수 있다.
- [0624] 다양한 구체예에서, 각 올리고뉴클레오타이드는 RNA이거나, DNA이거나, 또는 인공 또는 비자연 핵산 유사체를 포함한다. 다양한 구체예에서, 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드는 siRNA, miRNA, 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 다양한 다른 가능한 올리고뉴클레오타이드 및 치환은 예로서, 상기 핵산 섹션에서 논의된다.
- [0625] 다양한 구체예에서, 각 올리고뉴클레오타이드는 길이에서 15-30, 17-27, 19-26, 또는 20-25개 뉴클레오타이드이다. 다양한 구체예에서, 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 길이에서 15-30, 17-27, 19-26, 20-25, 40-50, 40-150, 100-300, 1000-2000, 또는 10000개까지의 뉴클레오타이드이다.
- [0626] 다양한 구체예에서, 구조체 21을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 적어도 약 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 또는 65 kD의 분자량을 갖는다. 다양한 구체예에서, 구조체 21을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 적어도 약 40-45, 45-50, 50-55, 55-60, 60-65, 65-70, 또는 70-75 kD의 분자량을 갖는다. 분자량은 다중결합 올리고뉴클레오타이드에 공유 결합된 모든 것, 예를 들면, 표적화 리간드 및 링커를 포함할 수 있다.
- [0627] 비록 구조체 21을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드가 다양한 방법 (예를 들어, 사합체성 또는 그 이상의 다합체를 만들기 위한 본원에서 설명된 것들)에 의해 합성될 수 있긴 하지만, 일정한 결과는 특정한 방법론을 필요로 할 수도 있다. 예를 들어, 하기의 방법 (뿐만 아니라 실시예 22에서 도시된 것들)은 동일한 가닥 상에서 각 공유 링커 •를 갖는 다합체를 효율적으로 생산하도록 설계된다.
- [0628] 예를 들어, 한 양상에서, 본 발명은 구조체 34를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법을 제공한다:
- [0629]  (구조체 34)
- [0630] 여기서 각 — 은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 그리고 각 •은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 공유 링커이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0631] (i)  및 를 반응시키고, 여기서 ○은 연결 모이어티이고, 그리고 R₁은 연결 모이어티 ○와 반응할 수 있는 화학적 기이고, 따라서  (구조체 34)를 형성하는 단계, 그리고
- [0632] (ii) 선택적으로,  (구조체 34)를 상보성 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드와 어닐링하여  (구조체 28)을 형성하는 단계.
- [0633] 예를 들어, 한 양상에서, 본 발명은 구조체 35를 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법을 제공한다:


공하고:

[0634]  (구조체 35)

[0635] 여기서 각  은 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이고, 그리고 각  은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 연결하는 공유 링커이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

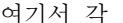

[0636] (i)  및  R_1 을 반응시키고, 여기서  는 연결 모이어티이고, 그리고 R_1 은 연결 모이어티  와 반응할 수 있는 화학적 기이고, 따라서  (구조체 35)를 형성하는 단계, 그리고


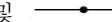



[0637] (ii) 선택적으로,  (구조체 35)를 상보성 단일 가닥 올리고뉴클레오티드와 어닐링하여


[0638]  (구조체 36)을 형성하는 단계.

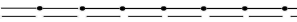
[0639] 예를 들어, 한 양상에서, 본 발명은 구조체 37을 포함하는 다중결합 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법을 제공한다:



[0640]  (구조체 37)

[0641] 여기서 각  은 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이고, 그리고 각  은 인접한 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 연결하는 공유 링커이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0642] (i)  및  R_1 을 반응시키고, 여기서  는 연결 모이어티이고, 그리고 R_1 은 연결 모이어티  와 반응할 수 있는 화학적 기이고, 따라서  (구조체 37)을 형성하는 단계, 그리고

[0643] (ii) 선택적으로,  (구조체 37)을 상보성 단일 가닥 올리고뉴클레오티드와 어닐링하여

[0644]  (구조체 38)을 형성하는 단계.

[0645] 본 발명은 또한, 단일 가닥 다중결합 올리고뉴클레오티드를 합성하기 위한 방법을 제공하고, 예로서 여기서 m 은 2  (구조체 39)이거나; m 은 4  (구조체 40)이거나; m 은 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12이거나; 또는 m 은 ≥ 13 이다 (아래의 실시예 22를 참조한다).

[0646] 다중결합 화합물은 본원에서 개시된 특질 중에서 한 가지 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 화합물은 본원에서 설명된 핵산 (변형이 있거나 또는 없음), 표적화 리간드 및/또는 링커 중에서 한 가지 또는 그 이상, 또는 요약, 설명 또는 실시예에서 도시된 특정한 구조체 또는 화합물질 중에서 어느 것을 포함할 수 있다. 유사하게, 화합물은 요약, 설명 또는 실시예에서 도시된 임의의 조성물 (예를 들어, 실험적 또는 의학적 용도로)에서 제조될 수 있다. 예시적인 실례는 아래의 **제약학적 조성물** 섹션에서 제공된다.

[0647] 올리고뉴클레오티드 흡수 및 청소율

[0648] 혈류 내에 약물의 생체이용률은 표적 세포 흡수 대 신장 청소율 사이에 균형으로서 특징화될 수 있다. 실질적인 관점으로부터, **생체내** 순환 반감기 및/또는 **생체내** 활성은 신장 청소율/사구체 여과에 대한 우수한 프록시인데, 그 이유는 이들이 쉽게 정량되고 예측될 수 있기 때문이고, 그리고 이들의 향상 (예를 들어, 증가)이 향상된 약력학 및/또는 약물동력학과 상관할 수 있기 때문이다.

[0649] 혈액 내에서 치료적 작용제, 예를 들면, 올리고뉴클레오티드 (ONT)의 흡수율은 하기와 같이 표현될 수 있는, 다수 인자의 함수이다: 흡수율 = $f \{ (ONT \text{ 농도}) \times (혈류 속도) \times (수용체 사본수/세포) \times (세포의 숫자) \times (\text{평형 해리 상수 } K_d) \times (\text{내재화 비율}) \}$. 소정의 리간드/수용체 쌍의 경우에, 사본수, KD , 세포의 숫자 및 내재화 비율은 일정할 것이다. 이것은 GalNAc 리간드 시스템이 간세포에 대해 효과적인 이유를 설명할 수 있다 - 이것은 높은 사본 숫자로 존재하는 ASGP 수용체를 표적으로 한다. 일부 ASGP/GalNAc 변이체의 KD 는 나노몰 범위 내에 있

고, 그리고 내재화 비율은 매우 높다.

[0650] 하지만, 효과적인 표적화는 또한, ONT 농도에 의존하는데, 이것은 혈류로부터 청소율로 인해 시간의 추이에서 급격하게 감소한다. 치료제의 청소율은 하기와 같이 표현될 수 있다: $\text{청소율} = f \{ (\text{혈류 속도}) \times (\text{신장 여과 속도}) \times (\text{다른 청소율 기전}) \}$. 시간 t 에서 ONT의 결과의 농도는 하기와 같이 표현될 수 있다: $(\text{ONT 농도})_t = f \{ (\text{초기 농도}) - (\text{청소율} \times t) \}$.

[0651] 인간에서, 청소율은 신장에서 사구체 여과에 주로 기인한다. 일반적으로, 약 45 kD보다 작은 분자는 약 30 분의 반감기를 갖는다. 생쥐에서, 청소율은 훨씬 빠르고, 순환 반감기는 약 5 분이다. 임의의 특정 이론에 한정됨 없이, 본 발명은 특이적으로 설정된 다중결합 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 특정한 조성, 크기, 중량 등)를 이용하여 사구체 여과를 감소시키고, 더욱 낮은 청소율을 야기하고, 소정의 시점 t 에서 순환 중인 더욱 높은 농도의 ONT (예를 들어, 증가된 혈청 반감기, 더욱 높은 전반적인 흡수 및 더욱 높은 활성)을 유발할 수 있는 것으로 생각된다.

[0652] 다시 한 번, 임의의 특정 이론에 한정됨 없이, 실제 사구체 여과율은 직접적으로 예측하기가 어려울 수 있다. 예를 들어, 사구체 모세관을 통과하는 화합물은 siRNA와 같은 화합물을 유의미한 기간 동안 유지할 수 있는 세포, 예를 들면, 세뇨관 상피 세포에 의해 쉽게 흡수된다 (예를 들어, 하기를 참조한다: Henry, S.P. et al; Toxicology, 301, 13-20 (2012) 및 van de Water, F.M et al; Drug metabolism and Disposition, 34, No 8, 1393-1397 (2006)). 이에 더하여, 흡수된 화합물은 분해 산물로 물질대사될 수 있고, 이들은 이후, 소변으로 배출된다. 따라서, 특정한 시점에서 치료적 작용제, 예를 들면, siRNA의 농도 (예를 들어, 소변에서)가 사구체 여과율을 반드시 나타낼 필요는 없다. 하지만, 사구체 여과에 관련되고 직접적으로 예측가능한 혈청 반감기는 사구체 여과에 대한 적합한 프록시인 것으로 고려될 수 있다.

[0653] 하기 표는 성분의 순환 반감기 ($t_{1/2}$)를 증가시키는 것이 시간 t 에서 상기 성분의 결과의 농도에 대해 가질 수 있는 극적인 효과를 보여준다:

t (분):	0	30	60	90	120	150	180	210	240
30 분 $t_{1/2}$	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.4
60 분 $t_{1/2}$	100		50		25		12.5		6.25
90 분 $t_{1/2}$	100			50			25		
120 분 $t_{1/2}$	100				50				25

값은 시간 t 에서 % 초기 용량으로서 제시된다.

[0654]

[0655] 따라서, 성분의 반감기를 2의 인자로 증가시키는 것은 2 시간에서 이의 잔여 농도를 4의 인자로 증가시킨다. 반감기를 4의 인자로 증가시키는 것은 잔여 농도에서 훨씬 극적인 향상을 야기한다 - 2 및 4 시간에서, 각각 8의 인자 및 60보다 큰 인자로.

[0656] 전형적인 siRNA (예를 들어, 이중 가닥 단위체)는 약 15kD의 분자량을 갖는다. 본 발명에 따른 siRNA 사합체는 약 60 kD의 분자량을 가질 수 있다. 임의의 특정 이론에 한정됨 없이, 이런 다합체 (사합체, 오합체 등)는 생체 내에서 감소된 사구체 여과를 유발하는 분자 크기 및/또는 분자량을 갖도록 설정될 수 있는 것으로 생각된다. 이런 다합체는 증가된 순환 반감기를 가질 것이다. 따라서, 본 발명에 따른 다합체는 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 증가된 생체내 순환 반감기 및/또는 증가된 생체내 활성을 갖도록 설정될 수 있다. 게다가, 만약 적합한 표적화 리간드에 의해 지향되면, 다합체 (예를 들어, 사합체)는 단위체성 등가물보다 리간드/수용체 결합 사건마다 수 배 (예를 들어, 4배)의 유사하중을 전달할 것이다. 조합으로, 이들 효과는 치료적 작용제의 생체이용률 및 흡수에서 극적인 증가를 야기할 수 있다. 이것은 사본수, KD, 표적 세포의 숫자 및 소정의 리간드/수용체 쌍의 내재화 비율의 일부 조합이 준최적인 경우에 특히 유리할 수 있다.

[0657] 따라서, 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 (a) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 순환 반감기를 증가시키고 및/또는 (b) 개별 단위체성 아단위의 것에 비하여 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 생체내 활성을 증가시키도록 선별된 구조를 갖는다. 예를 들어, 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 이러한 목적으로 설정된 분자 크기 및/또는 분자량을 가질 수 있다.

[0658] **제약학적 조성물**

[0659] 다양한 양상에서, 본 발명은 전술된 화합물 또는 조성물 중에서 한 가지 또는 그 이상을 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다. 본원에서 이용된 바와 같이, 제약학적 조성물은 질환을 예방하거나, 진단하거나, 경감하거나, 치료하거나 또는 치유하는데 이용될 수 있는, 식품 이외의 물질 조성물을 포함한다. 유사하게, 본 발명에 따른 다양한 화합물 또는 조성물은 약제로서 이용을 위한 및/또는 약제의 제조에서 이용을 위한 구체예를 포함하는

것으로 이해되어야 한다.

[0660] 제약학적 조성물은 본 발명에 따른 화합물 또는 조성물 및 제약학적으로 허용되는 부형제를 포함할 수 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, 부형제는 활성 성분과 동시에 조제되는 자연 또는 합성 물질일 수 있다. 부형제는 장기간 안정화, 용적 증가 (예를 들어, 벌킹 작용제, 충전제, 또는 희석제), 또는 최종 복용 형태에서 활성 성분에 치료적 증강을 부여하는, 예를 들면, 약물 흡수를 용이하게 하거나, 점성을 감소시키거나, 또는 용해도를 증강하는 목적으로 포함될 수 있다. 부형제는 또한, 제조 및 배포, 예를 들면, 활성 성분의 취급을 보조하고 및/또는 시험관내 안정성 (예를 들어, 변성 또는 응집을 예방함으로써)을 보조하는데 유용할 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 온당한 부형제 선별은 투여 루트, 복용 형태 및 활성 성분(들)을 비롯한 다양한 인자에 의존할 수 있다.

[0661] 올리고뉴클레오타이드는 국부적으로 또는 전신적으로 전달될 수 있고, 그리고 본 발명의 제약학적 조성물은 이에 맞게 변할 수 있다. 예를 들어, 투여는 임의의 특정 전달 시스템에 반드시 한정되지는 않고, 그리고 제한 없이, 비경구 (피하, 정맥내, 척수내, 관절내, 근육내, 또는 복막내 주사 포함), 직장, 국소, 경피, 또는 경구를 포함할 수 있다. 개체에게 투여는 단일 투약에서 또는 반복 투여에서, 그리고 다양한 생리학적으로 허용되는 형태 중에서 어느 것에서 및/또는 제약학적 조성물의 일부로서 허용되는 제약학적 담체 및/또는 첨가제와 함께 일어날 수 있다. 생리학적으로 허용되는 제제, 그리고 표준 제약학적 조제 기술, 용량 및 부형제는 당업자에게 널리 알려져 있다 (예를 들어, 하기를 참조한다: Physicians' Desk Reference (PDR®) 2005, 59th ed., Medical Economics Company, 2004; 및 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, eds. Gennado et al. 21th ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2005).

[0662] 제약학적 조성물은 본 발명에 따른 화합물 또는 조성물의 효과량을 포함할 수 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, 효과량은 특정의 진술된 목적의 달성을 유발하는 농도 또는 양일 수 있거나, 또는 그 이상의 양은 예로서, 위약과 비교하여 변화를 유발하는데 적절한 양을 의미한다. 효과량이 치료 효과량인 경우에, 이것은 예로서, 치료적 용도에 적절한 양, 그리고 질환을 예방하거나, 진단하거나, 경감하거나, 치료하거나 또는 치유하는데 충분한 양일 수 있다. 효과량은 당해 분야에서 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 효과량은 예로서, 인간 임상 시험에 의해 경험적으로 결정될 수 있다. 효과적인 양은 또한, 당해 분야에서 공지된 전환 인자를 이용하여, 다른 동물 (예를 들어, 인간)에서 이용을 위해 동물 (예를 들어, 생쥐, 쥐, 원숭이, 돼지, 개)로부터 외삽될 수 있다. 예를 들어, Freireich et al., Cancer Chemother Reports 50(4):219-244 (1966)를 참조한다.

[0663] 전달 운반체 및 표적화 리간드

[0664] 다양한 양상에서, 본 발명은 전달 수송체에서 조제된 진술된 화합물 또는 조성물 중에서 한 가지 또는 그 이상을 제공한다. 예를 들어, 전달 수송체는 지질 나노입자 (LNP), 엑소솜, 마이크로소포, 또는 바이러스 벡터일 수 있다. 유사하게, 다양한 양상에서, 본 발명은 진술되고 표적화 리간드를 더욱 포함하는 화합물 또는 조성물 중에서 한 가지 또는 그 이상을 제공한다. 예를 들어, 표적화 리간드는 *N*-아세틸갈락토사민 (GalNAc), 콜레스테롤, 토크페롤, 엽산염, 2-[3-(1,3-디카르복시프로필)-우레이도]펜타디옥산 (DUPA), 또는 아니스아미드를 포함한다. 표적화 리간드는 예로서, 3' 또는 5' 말단을 통해 핵산에 결합될 수 있다 (예를 들어, 직접적으로). 일부 구체예에서, 2개의 표적화 리간드가 올리고뉴클레오타이드에 접합되는데, 여기서 하나의 리간드는 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단을 통해 접합되고, 그리고 다른 리간드는 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단을 통해 접합된다. 하나 또는 그 이상의 표적화 리간드는 올리고뉴클레오타이드의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥, 또는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 둘 모두에 접합될 수 있다. 본 발명용으로 적합될 수 있는 추가 실례는 아래에 논의된다.

[0665] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 생물학적 표적 또는 작용 기전과 상관없이, 치료적 올리고뉴클레오타이드는 생물체 (예를 들어, 치료가 필요한 동물, 예를 들면, 인간)에서 표적 세포에 접근하기 위해 일련의 생리학적 장애물을 극복해야 한다. 예를 들어, 치료적 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로, 바람직하지 않은 면역 반응을 이끌어 내지 않으면서, 혈류 내에 청소율을 방지하고, 표적 세포 유형에 들어가고, 그리고 이후, 세포질에 들어가야 한다. 이러한 과정은 일반적으로, 비효율적인 것으로 고려된다, 예를 들면, *생체내에서* 엔도솜에 들어가는 siRNA 중에서 95 % 또는 그 이상이 리소솜에서 분해되거나, 또는 유전자 침묵에 어떤 영향도 주지 못하고 세포 밖으로 밀려나올 수 있다.

[0666] 이들 장애물을 극복하기 위해, 과학자들은 다양한 약물 전달 운반체를 설계하였다. 이들 운반체는 소형 분자 약물, 단백질 약물, 그리고 다른 치료적 분자에 더하여 치료적 RNAs를 전달하는데 이용되었다. 약물 전달 운반체는 당, 지질, 지질-유사 물질, 단백질, 중합체, 펩티드, 금속, 하이드로겔, 접합체, 그리고 펩티드와 같은 다양

한 물질로부터 만들어졌다. 많은 약물 전달 운반체는 이들 군의 조합으로부터 양상을 통합한다, 예를 들면, 일부 약물 전달 운반체는 당 및 지질을 조합할 수 있다. 일부 다른 실례에서, 약물은 세포를 모의하도록 의도되는 '세포 유사' 물질에 직접적으로 숨겨질 수 있고, 반면 다른 경우에, 약물은 세포 그 자체 내로 또는 위에 넣어질 수 있다. 약물 전달 운반체는 자극, 예를 들면, pH 변화, 생체분자 농도, 자기장 및 열에 대한 응답으로 약물을 방출하도록 설계될 수 있다.

[0667] 많은 작업은 올리고뉴클레오타이드, 예를 들면, siRNA를 간에 전달하는데 주력하였다. *생체내에서* 간세포에 효과적인 siRNA 전달을 위해 필요한 용량은 지난 10 년 동안 10,000 배 이상 감소하였다 - 2006년에 보고된 전달 운반체는 목표 단백질 생산까지 10 mg/kg보다 많은 siRNA를 필요로 할 수 있었던 반면, 현재는 새로운 전달 운반체로 목표 단백질 생산이 0.001 mg/kg siRNA의 전신 주사 후 감소될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 전달 효율에서 증가는 적어도 부분적으로, 전달 운반체에서 발달에 기인될 수 있다.

[0668] 다른 중요한 진전은 보조 성분이 전달에 영향을 주는 방식에 관한 증가된 이해이었다. 보조 성분은 일차 약물 전달 시스템에 추가된 화학 구조체를 포함할 수 있다. 종종, 보조 성분은 입자 안정성 또는 특정한 장기로의 전달을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 나노입자는 지질로 만들어질 수 있지만, 이들 지질 나노입자에 의해 매개된 전달은 친수성 중합체 및/또는 소수성 분자의 존재에 의해 영향을 받을 수 있다. 나노입자 전달에 영향을 주는 한 가지 중요한 친수성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜)이다. 다른 친수성 중합체는 비이온성 계면활성제를 포함한다. 나노입자 전달에 영향을 주는 소수성 분자는 콜레스테롤, 1-2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC), 1-2-디-O-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTMA), 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP) 등을 포함한다.

[0669] 약물 전달 시스템은 또한, 표적화 리간드 또는 접합체 시스템을 이용하여 설계되었다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 간세포 및/또는 다른 세포 유형 내로의 전달을 용이하게 하기 위해 콜레스테롤, 당, 펩티드, 그리고 다른 핵산에 접합될 수 있다. 이런 접합체 시스템은 특정한 수용체에 결합함으로써 특정한 세포 유형 내로의 전달을 용이하게 할 수 있다.

[0670] 당업자는 공지된 전달 운반체 및 표적화 리간드가 일반적으로, 본 발명에 따른 이용을 위해 적합될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 전달 운반체 및 표적화 리간드의 실례뿐만 아니라 이들의 용도는 하기에서 발견될 수 있다:

Sahay, G., et al. Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nat Biotechnol*, 31: 653-658 (2013); Wittrup, A., et al. Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. *Nat Biotechnol* (2015); Whitehead, K.A., Langer, R. & Anderson, D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature reviews. Drug Discovery*, 8: 129-138 (2009); Kanasty, R., Dorkin, J.R., Vegas, A. & Anderson, D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature Materials*, 12: 967-977 (2013); Tibbitt, M.W., Dahlman, J.E. & Langer, R. Emerging Frontiers in Drug Delivery. *J Am Chem Soc*, 138: 704-717 (2016); Akinc, A., et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 1357-1364 (2010); Nair, J.K., et al. Multivalent *N*-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc*, 136: 16958-16961 (2014); Ostergaard, M.E., et al. Efficient Synthesis and Biological Evaluation of 5'-GalNAc Conjugated Antisense Oligonucleotides. *Bioconjugate chemistry* (2015); Sehgal, A., et al. An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nature Medicine*, 21: 492-497 (2015); Semple, S.C., et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol*, 28: 172-176 (2010); Maier, M.A., et al. Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Molecular therapy: the journal of the American Society of*

Gene Therapy, 21: 1570-1578 (2013); Love, K.T., et al. Lipid-like materials for low-dose, *in vivo* gene silencing. *Proc Nat Acad USA*, 107: 1864-1869 (2010); Akinc, A., et al. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat Biotechnol*, 26: 561-569 (2008); Eguchi, A., et al. Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain-dsRNA binding domain fusion protein. *Nat Biotechnol*, 27: 567-571 (2009); Zuckerman, J.E., et al. Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. *Proc Nat Acad USA*, 111: 11449-11454 (2014); Zuckerman, J.E. & Davis, M.E. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14: 843-856 (2015); Hao, J., et al. Rapid Synthesis of a Lipocationic Polyester Library via Ring-Opening Polymerization of Functional Valerolactones for Efficacious siRNA Delivery. *J Am Chem Soc*, 29: 9206-9209 (2015); Siegwart, D.J., et al. Combinatorial synthesis of chemically diverse core-shell nanoparticles for intracellular delivery. *Proc Nat Acad USA*, 108: 12996-13001 (2011); Dahlman, J.E., et al. *In vivo* endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight. *Nat Nano* 9, 648-655 (2014); Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R. & Rudzinski, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 70, 1-20 (2001); Kim, H.J., et al. Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS Nano*, 8: 8979-8991 (2014); Krebs, M.D., Jeon, O. & Alsberg, E. Localized and sustained delivery of silencing RNA from macroscopic biopolymer hydrogels. *J Am Chem Soc* 131, 9204-9206 (2009); Zimmermann, T.S., et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441: 111-114 (2006); Dong, Y., et al. Lipopeptide nanoparticles for potent and selective siRNA delivery in rodents and nonhuman primates. *Proc Nat Acad USA*, 111: 3955-3960 (2014); Zhang, Y., et al. Lipid-modified aminoglycoside derivatives for *in vivo* siRNA delivery. *Advanced Materials*, 25: 4641-4645 (2013); Molinaro, R., et al. Biomimetic proteolipid vesicles for targeting inflamed tissues. *Nat Mater* (2016); Hu, C.M., et al. Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking. *Nature*, 526: 118-121 (2015); Cheng, R., Meng, F., Deng, C., Klok, H.-A. & Zhong, Z. Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery. *Biomaterials*, 34: 3647-3657 (2013); Qiu, Y. & Park, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*,

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

[0673]

[0674]

다양한 구체예에서, 본 발명의 화합물 및 조성물은 예로서, 생물학적으로 활성 모이어티를 비롯한 다른 화학적 또는 생물학적 모이어티에 접합되거나 또는 이들로 전달될 수 있다. 생물학적으로 활성 모이어티는 생물학적 효과, 바람직하게는 계측가능한 생물학적 효과를 갖는 임의의 분자 또는 작용제이다. 화학적 또는 생물학적 모이어티는 예로서, 단백질, 펩티드, 아미노산, 핵산 (예를 들어, DNA, 모든 유형의 RNA, RNA 및 DNA 앵타머, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 그리고 안티센스 miRNA 저해제 포함), 표적화 리간드, 탄수화물, 다당류, 지질, 유기 화합물, 그리고 무기 화학적 화합물을 포함한다.

[0675]

본원에서 이용된 바와 같이, 용어 표적화 리간드는 예로서, 나노입자 또는 전달 접합체의 세포 수용체 부착을 실시가능하게 함으로써 특정한 표적, 예를 들면, 특정한 신체 조직 또는 세포 유형에 나노입자 또는 전달 접합체의 유사하중을 전달하는 목적으로 나노입자의 표면에서 또는 전달 접합체 (예를 들어, 멀티-접합체 올리고뉴클레오타이드, 다중결합 올리고뉴클레오타이드)의 일부로서 접근가능하게 만들어질 수 있는 모이어티를 포함할 수 있다. 적합한 표적화 리간드의 실례는 세포 특이적 펩티드 또는 단백질 (예를 들어, 트랜스페린 및 단일클론 항체), 앵타머, 세포 성장 인자, 비타민 (예를 들어, 엽산), 다당류 (예를 들어, 갈락토오스 및 만노오스), 다당류, 아르기닌-글리신-아스파르트산 (RGD), 그리고 *N*-아세틸갈락토사민 (GalNac)으로부터 유래된 아시알로당단백질 수용체 리간드를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 리간드는 당해 분야에서 공지된 다양한 기술을 이용하여, 예를 들면, 공유 결합, 예를 들면, 디설피드 결합, 아마이드 결합 또는 에스테르 결합을 통해, 또는 비공유 결합, 예를 들면, 비오틴-스트렙타비딘 또는 금속-리간드 복합체를 통해 본 발명의 전술한 화합물 내로 통합될 수 있다.

[0676]

발명의 범위 내에 추가의 생물학적으로 활성 모이어티는 예로서, CRISPR/Cas 시스템, TALEs, TALENs 및 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFNs)에 관련된 올리고뉴클레오타이드, 폴리펩티드 및 단백질과 같은 물질을 비롯한 공지된 유전자 편집 물질 중에서 어느 것이다.

[0677]

다양한 구체예에서, 본 발명의 화합물 및 조성물은 세포내 전달을 위한 나노입자를 형성하기 위해 담체 물질 내에 캡슐화될 수 있다. 공지된 담체 물질은 양이온성 중합체, 지질 또는 펩티드, 또는 이들의 화학적 유사체를 포함한다. Jeong et al., *BIOCONJUGATE CHEM.*, Vol. 20, No. 1, pp. 5-14 (2009). 양이온성 지질의 실례는 디올레일 포스파티딜에탄올아민, 콜레스테롤 디올레일 포스파티딜콜린, N-[1-(2,3-디올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 염화물 (DOTMA), 1,2-디올레오일옥시-3-(트리메틸암모니오)프로판 (DOTAP), 1,2-디올레오일-3-(4'-트리메틸-암모니오)부타노일-sn-글리세롤(DOTB), 1,2-디아실-3-디메틸암모늄-프로판 (DAP), 1,2-디아실-3-트리메틸암모늄-프로판 (TAP), 1,2-디아실-sn-글리세롤-3-에틸포스포콜린, 3 베타-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤 (DC-콜레스테롤), 디메틸디옥타데실암모늄 브롬화물 (DDAB), 그리고 이들의 공중합체를 포함한다. 양이온성 중합체의 실례는 폴리에틸렌이민, 폴리아민, 폴리비닐아민, 폴리(알킬아민 염산염), 폴리아미도아민 덴드리머, 디에틸아미노에틸-텍스트란, 폴리비닐피롤리돈, 키틴, 키토산, 그리고 폴리(2-디메틸아

미노)에틸 메타크릴레이트를 포함한다. 한 구체예에서, 담체는 한 가지 또는 그 이상의 아실화된 아민을 내포하는데, 이들의 성질은 다른 공지된 담체 물질과 비교하여 *생체내에서* 이용에 더욱 우수하게 적합할 수 있다.

[0678] 한 구체예에서, 담체는 양이온성 펩티드, 예를 들면, KALA (양이온성 용해성 펩티드), 폴리리신, 폴리글루타민산 또는 프로타민이다. 한 구체예에서, 담체는 양이온성 지질, 예를 들면, 디올레일 포스파티딜에탄올아민 또는 콜레스테롤 디올레일 포스파티딜콜린이다. 한 구체예에서, 담체는 양이온성 중합체, 예를 들면, 폴리에틸렌이민, 폴리아민, 또는 폴리비닐아민이다.

[0679] 다양한 구체예에서, 본 발명의 화합물 및 조성물은 엑소솜 내에 캡슐화될 수 있다. 엑소솜은 혈액, 소변, 그리고 세포 배양액의 배양된 배지를 비롯한 생물학적 유체에서 존재하는, 30 및 100 nm 사이의 직경을 갖는 세포-유래된 소포이다. 합성 엑소솜 및 엑소솜 모방체를 비롯한 엑소솜은 당해 분야에서 기술에 따라서, 약물 전달에서 이용을 위해 적합될 수 있다. 예를 들어, 하기를 참조한다: "A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles - endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy" Biochim Biophys Acta.1846(1):75-87 (2014); "Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges" Acta Pharmaceutica Sinica B, 2016년 3월 8일에 온라인으로 가용 (인쇄 중); 및 "Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems" International Journal of Nanomedicine, 7:1525-1541 (2012).

[0680] 다양한 구체예에서, 본 발명의 화합물 및 조성물은 마이크로소포 내에 캡슐화될 수 있다. 마이크로소포 (때때로, 순환하는 마이크로소포, 또는 마이크로입자로 불림)는 거의 모든 세포 유형으로부터 벗겨진 100 nm 내지 1000 nm의 범위에서 원형질막의 단편이고, 그리고 엑소솜으로서 알려져 있는 더욱 작은 세포내에서 산출된 세포외 소포와 상이하다. 마이크로소포는 세포간 신호전달에서 일정한 역할을 수행하고, 그리고 세포 사이에 mRNA, miRNA 및 단백질을 수송할 수 있다. 합성 마이크로소포 및 마이크로소포 모방체를 비롯한 마이크로소포는 당해 분야에서 기술에 따라서, 약물 전달에서 이용을 위해 적합될 수 있다. 예를 들어, 하기를 참조한다: "Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells" Journal of Controlled Release, 220:727-737 (2015); "Therapeutic Uses of Exosomes" J Circ Biomark, 1:0 (2013).

[0681] 다양한 구체예에서, 본 발명의 화합물 및 조성물은 바이러스 벡터를 이용하여 전달될 수 있다. 바이러스 벡터는 유전 물질을 세포 내로 전달하기 위해 분자 생물학자에 의해 통상적으로 이용되는 도구이다. 이러한 과정은 살아있는 생물체 내부에서 (*생체내에서*) 또는 세포 배양액에서 (*시험관내에서*) 수행될 수 있다. 바이러스 벡터는 당해 분야에서 기술에 따라서, 약물 전달에서 이용을 위해 적합될 수 있다. 예를 들어, 하기를 참조한다: "Viruses as nanomaterials for drug delivery" Methods Mol Biol, 26:207-21 (2011); "Viral and nonviral delivery systems for gene delivery" Adv Biomed Res, 1:27 (2012); 및 "Biological Gene Delivery Vehicles:Beyond Viral Vectors" Molecular Therapy, 17(5):767-777 (2009).

[0682] LNP 조제 및 특징화를 위한 일반적인 절차는 아래의 실시예에서 제공되고, LNP 제제의 작업 실패 그리고 다른 *시험관내* 및 *생체내* 검사 역시 그러하다. 다른 방법은 당해 분야에서 공지되고, 그리고 당업자에 의해 본 발명 용으로 적합될 수 있다.

[0683] **치료 방법 또는 유전자 발현을 감소시키는 방법**

[0684] 다양한 양상에서, 본 발명은 예로서, 의학적 치료, 연구, 또는 동물 및 식물에서 새로운 또는 변경된 표현형의 산출을 위해 멀티-접합체 올리고뉴클레오티드를 이용하기 위한 방법을 제공한다.

[0685] 한 양상에서, 본 발명은 본 발명에 따른 화합물 또는 조성물의 효과량을 치료가 필요한 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체를 치료하기 위한 방법을 제공한다. 이런 치료적 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 치료적 올리고뉴클레오티드, 예를 들면, siRNA 또는 miRNA일 것이다.

[0686] 이들 및 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물 및 화합물은 전달 수송체에서 제약학적 조성물의 형태에서 투여되거나, 또는 표적화 리간드에 연계될 수 있다.

[0687] 한 양상에서, 본 발명은 유전자 발현을 침묵시키거나 또는 감소시키기 위한 방법을 제공하는데, 상기 방법은 본 발명에 따른 화합물 또는 조성물의 효과량을 치료가 필요한 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 이런 치료적 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 유전자 발현을 침묵시키거나 또는 감소시키는 올리고뉴클레오티드, 예를 들면, siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드일 것이다.

- [0688] 유사하게, 본 발명은 2개 또는 그 이상의 유전자의 발현을 침묵시키거나 또는 감소시키기 위한 방법을 제공하는데, 상기 방법은 본 발명에 따른 화합물 또는 조성물의 효과량을 치료가 필요한 개체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 화합물 또는 조성물은 2개 또는 그 이상의 유전자를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 화합물 또는 조성물은 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 유전자를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0689] 한 양상에서, 본 발명은 표적화 리간드 결합 사건마다 2개 또는 그 이상의 올리고뉴클레오타이드를 세포에게 전달하기 위한 방법을 제공하는데, 상기 방법은 본 발명에 따른 화합물 또는 조성물의 효과량을 치료가 필요한 개체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 화합물 또는 조성물은 표적화 리간드를 포함한다.
- [0690] 한 양상에서, 본 발명은 미리 결정된 화학양론적 비율의 2개 또는 그 이상의 올리고뉴클레오타이드를 세포에 전달하기 위한 방법을 제공하는데, 상기 방법은 본 발명에 따른 화합물 또는 조성물의 효과량을 치료가 필요한 개체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 화합물 또는 조성물은 미리 결정된 화학양론적 비율의 2개 또는 그 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0691] 본원에서 이용된 바와 같이, 개체는 치료 또는 투여에 종속되는 세포 또는 생물체를 포함한다. 개체는 동물, 예를 들면, 포유동물, 예를 들면, 실험 동물 (생쥐, 원숭이) 또는 수의학적 환자, 또는 영양류, 예를 들면, 인간일 수 있다. 제한 없이, 치료 또는 투여가 필요한 개체는 질환 (예를 들어, 본 발명의 화합물 및 조성물을 이용하여 치료될 수 있는)을 앓는 개체, 또는 장애 (예를 들어, 본 발명의 화합물 및 조성물을 이용하여 해소될 수 있는, 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 유전자가 침묵되거나 또는 발현이 감소될 수 있는)를 앓는 개체를 포함할 수 있다.
- [0692] 유전자 녹다운의 예측 및 동물 실험을 위한 일반적인 절차는 아래의 실시예에서 제공되고, 다른 시험관내 및 생체내 검사의 작업 실험 역시 그러하다. 다른 방법은 당해 분야에서 공지되고, 그리고 당업자에 의해 본 발명용으로 적합될 수 있다.
- [0693] 하기 실시예는 예시이고 제한하지 않는다. 기술의 많은 변이는 본 발명의 리뷰 시에 당업자에게 명백해질 것이다. 기술의 범위는 이런 이유로, 실시예에 관하여 결정되지 않아야 하고, 그 대신에 전체 범위의 등가물과 함께 첨부된 청구항에 관하여 결정되어야 한다.
- [0694] **실시예**
- [0695] **일반적인 절차 1: 단일 사슬 올리고뉴클레오타이드 합성**
- [0696] 올리고리보뉴클레오타이드는 포스포라미디트 화학을 이용하여, 10 μ mol 규모에서 ABI 394 및 3900 합성장치 (Applied Biosystems)에서, 또는 28 μ mol 규모에서 Oligopilot 10 합성장치에서 조립되었다. 고체 지지체는 2'-테옥시티미딘 (Glen Research, Sterling, Virginia, USA), 또는 제어된 다공성 유리 (CPG, 520Å, 75 μ mol/g의 부하에서, Prime Synthesis, Aston, PA, USA로부터 획득됨)로 폴리스티렌 부하되었다. 보조적인 합성 시약, DNA-, 2'-O-메틸 RNA-, 그리고 2'-테옥시-2'-플루오르-RNA 포스포라미디트는 SAFC Proligo (Hamburg, Germany)로부터 획득되었다. 구체적으로, 2'-O-메틸-우리딘 (2'-OMe-U), 4-N-아세틸-2'-O-메틸-시티딘 (2'-OMe-C^{Ac}), 6-N-벤조일-2'-O-메틸-아데노신 (2'-OMe-A^{bz}) 및 2-N-이소부틸릴구아노신 (2'-OMe-G^{iBu})의 5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-3'-O-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필) 포스포라미디트 단위체가 소중합체 서열을 구축하는데 이용되었다. 2'-플루오르 변형은 2'-OMe RNA 빌딩 블록과 동일한 핵염기 보호 기를 보유하는 상응하는 포스포라미디트를 이용하여 도입되었다. 5-에틸티오-1H-테트라졸 (ETT, 아세토니트릴에서 0.5 M)을 활성인자로서 이용할 때, 모든 포스포라미디트 (아세토니트릴에서 70 mM)에 대한 연계 시간은 3 분이었다. 포스포로티오에이트 연쇄는 피리딘 및 아세토니트릴의 1:1 (v/v) 혼합물에서 50 mM 3-((디메틸아미노-메틸리덴)아미노)-3H-1,2,4-디티아졸-3-티온 (DDTT, AM Chemicals, Oceanside, California, USA)을 이용하여 도입되었다.
- [0697] DMT 기의 제거를 포함하는 고체상 합성 ("DMT 오프 합성")의 완결 시에, 올리고뉴클레오타이드는 고체 지지체로부터 개열되고, 그리고 공개된 방법에 따라서 25°C에서 3 시간 동안, 수성 메틸아민 (41 %) 및 농축된 수성 암모니아 (32 %)로 구성되는 1:1 혼합물을 이용하여 탈보호되었다 (Wincott, F. *et al*: Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes. Nucleic Acids Res, 23:2677-2684 (1995)).
- [0698] 차후에, 미가공 소중합체는 Source Q15로 채워진 칼럼 (GE Healthcare) 및 AKTA Explorer 시스템 (GE Healthcare)을 이용한 음이온성 교환 HPLC에 의해 정제되었다. 완충액 A는 20 % 수성 아세토니트릴에서 10 mM 과염소산나트륨, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4 (Fluka, Buchs, Switzerland)이었고, 그리고 완충액 B는 500

mM 과염소산나트륨을 갖는 완충액 A와 동일하였다. 32 칼럼 용적 (CV) 내에 22 % B 내지 42 % B의 구배가 이용되었다. 280 nm에서 UV 흔적이 기록되었다. 온당한 분획물은 모아지고 3M NaOAc, pH=5.2 및 70 % 에탄올로 침전되었다. 펠렛이 원심분리에 의해 수집되었다. 대안으로, 탈염이 제조업체의 권고에 따라서, 세파텍스 HiPrep 칼럼 (GE Healthcare)을 이용하여 실행되었다.

[0699] 올리고뉴클레오타이드는 물에서 재구성되었고, 그리고 이들 올리고뉴클레오타이드의 정체는 전기분무 이온화 질량 분광분석법 (ESI-MS)에 의해 확증되었다. 순도는 분석적 음이온-교환 HPLC에 의해 사정되었다.

[0700] **일반적인 절차 2: 지질 나노입자 조제**

[0701] 1,2-디스테아로일-3-포스파티딜콜린 (DSPC)은 Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA)로부터 구입되었다. α -[3'-(1,2-디미리스토일-3-프로파녹시)-카르복사미드-프로필]- ω -메톡시-폴리옥시에틸렌 (PEG-c-DOMG)은 NOF (Bouwvelen, Belgium)로부터 획득되었다. 콜레스테롤은 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)로부터 구입되었다.

[0702] 독점 아미노지질 KL22 및 KL52는 특허 문헌 (Constien et al. "Novel Lipids and Compositions for Intracellular Delivery of Biologically Active Compounds" US 2012/0295832 A1)에서 개시된다. KL52 및 KL22 지질, DSPC, 콜레스테롤, 그리고 PEG-c-DOMG의 원액은 에탄올에서 50 mM의 농도에서 제조되고 -20°C에서 보관되었다. 이들 지질은 다양한 물 비율을 산출하도록 조합되고 (아래의 개별 실시예를 참조한다), 그리고 에탄올로 25 mM의 최종 지질 농도까지 희석되었다. H₂O에서 10 mg/mL의 농도에서 siRNA 원액은 50 mM 구연산나트륨 완충액, pH 3에서 희석되었다. KL22 및 KL52는 때때로, 하기 실시예에서 각각, XL 7 및 XL 10으로서 지칭된다.

[0703] 지질 나노입자 (LNP) 제제는 7:1의 전체 지질 대 siRNA 중량 비율에서 지질 용액을 siRNA 용액과 조합함으로써 제조되었다. 지질 에탄올성 용액은 33 % 에탄올을 내포하는 현탁액을 제공하기 위해, 수성 siRNA 용액 내로 신속하게 주입되었다. 이들 용액은 주입기 펌프 (Harvard Pump 33 Dual Syringe Pump Harvard Apparatus Holliston, MA)의 보조에 의해 주입되었다.

[0704] 차후에, 이들 제제는 일차 산물의 용적의 200-배 용적에서 인산염 완충된 식염수 (PBS), pH 7.4에 대해, 10 kD의 MWCO (RC 막)를 갖는 Slide-A-Lyzer 카세트 (Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, IL)를 이용하여 2 회 투석되어 에탄올이 제거되고 완충액 교환이 달성되었다. 첫 번째 투석은 실온에서 3 시간 동안 실행되었고, 그리고 이후, 이들 제제는 4°C에서 하룻밤 동안 투석되었다. 결과의 나노입자 현탁액은 0.2 μ m 세균 필터 (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)를 통해 유리 바이알 내로 여과되고 크립프 폐쇄로 밀봉되었다.

[0705] **일반적인 절차 3: LNP 특징화**

[0706] 제제의 입자 크기 및 제타 전위는 각각, 1X PBS 및 15 mM PBS에서 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK)를 이용하여 결정되었다.

[0707] 리포솜 제제에서 siRNA 농도는 UV-vis에 의해 측정되었다. 간단히 말하면, 1X PBS에서 100 μ L의 희석된 제제가 메탄올 및 클로로포름의 900 μ L의 4:1 (v/v) 혼합물에 첨가되었다. 혼합한 후, 용액의 흡광도 스펙트럼이 DU 800 분광광도계 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA)에서 230 nm 및 330 nm 사이에 기록되었다. 리포솜 제제에서 siRNA 농도는 제제에서 이용된 siRNA의 흡광 계수, 그리고 260 nm의 파장에서 흡광도 및 330 nm의 파장에서 기준선 값 사이에 차이에 근거하여 계산되었다.

[0708] 나노입자에 의한 siRNA의 캡슐화는 Quant-iTTM RiboGreen[®] RNA 검정 (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA)에 의해 평가되었다. 간단히 말하면, 표본은 TE 완충액 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5)에서 대략 5 μ g/mL의 농도로 희석되었다. 50 μ L의 희석된 표본은 폴리스티렌 96 웰 평판으로 이전되었고, 이후 50 μ L의 TE 완충액 또는 50 μ L의 2 % 트리톤(Triton) X-100 용액이 첨가되었다. 평판은 37°C의 온도에서 15 분 동안 배양되었다. RiboGreen 시약이 TE 완충액에서 1:100 희석되었고, 100 μ L의 이러한 용액이 각 웰에 첨가되었다. 형광 강도는 ~480 nm의 여기 파장 및 ~520 nm의 방출 파장에서 형광 평판 판독기 (Wallac Victor 1420 Multilabel 계수기; Perkin Elmer, Waltham, MA)를 이용하여 측정되었다. 시약 블랭크의 형광 값이 각 표본의 형광 값으로부터 감산되었고, 그리고 유리 siRNA의 백분율이 무손상 표본 (Triton X-100의 첨가 없음)의 형광 강도를 파괴된 표본 (Triton X-100의 첨가에 의해 유발됨)의 형광 값으로 나눔으로써 결정되었다.

[0709] **일반적인 절차 4: 동물 실험**

- [0710] 생쥐 계통 C57BL/6N이 모든 생체내 실험에 이용되었다. 동물은 Charles River (Sulzfeld, Germany)로부터 획득되었고, 그리고 실험의 시점에서 6 및 8 주령 사이이었다. 정맥내 투여되는 LNP 제제는 꼬리 정맥 내로 200 μ L의 주입에 의해 주사되었다. 피하 투여되는 화합물은 100-200 μ L의 용적에서 주사되었다. 혈액은 주사 전날 ("채혈전") 및 실험 동안 주사후 지시된 시점에서 하악하 정맥 채혈에 의해 수집되었다. 혈청이 혈청 분리 튜브 (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)로 분리되고 분석 때까지 동결 유지되었다. 화합물 투여 후 7 일에, 생쥐는 CO₂ 흡입에 의해 마취되고 경부 탈구에 의해 희생되었다. 혈액이 심장 천자에 의해 수집되었고, 그리고 혈청이 전술된 바와 같이 분리되었다. mRNA 정량을 위한 조직이 수확되고 액체 질소에서 즉시 동결되었다.
- [0711] **일반적인 절차 5: 유전자 녹다운의 계측**
- [0712] 혈청 단백질 수준의 결정은 하기를 이용하여 달성되었다: 인자 VII는 제조업체의 권고에 따라서, 발색 효소 활성 검정 BIOPHEN FVII (#221304, Hyphen BioMed, Maria Enzersdorf, Austria)을 이용하여 분석되었다. 생쥐 혈청은 분석 전에 1:3000 희석되었다. 405 nm에서 비색 발달의 흡광도는 Victor 3 멀티표지 계수기 (Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany)를 이용하여 계측되었다.
- [0713] 혈청에서 ApoB 단백질은 ELISA (CloudClone Corp./ Hoelzel Diagnostics, Cologne, Germany, #SEC003Mu)에 의해 계측되었다. 생쥐 혈청의 1:5000 희석액은 제조업체의 사용설명서에 따라서 처리되었고, 그리고 450 nm에서 흡광도는 임의의 Victor 3 멀티표지 계수기 (Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany)를 이용하여 계측되었다.
- [0714] 혈청에서 트랜스티레틴 (TTR, 전알부민으로서 또한 알려져 있음) 단백질은 ELISA (#KA2070, Novus Biologicals, / Biotechnie, Wiesbaden, Germany)에 의해 계측되었다. 생쥐 혈청의 1:4000 희석액은 제조업체의 사용설명서에 따라서 처리되었고, 그리고 450 nm에서 흡광도는 임의의 Victor 3 멀티표지 계수기 (Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany)를 이용하여 계측되었다.
- [0715] mRNA 수준의 정량을 위해, 동결된 조직 조각 (30-50 mg) 이 냉각된 1.5 mL 반응 튜브로 이전되었다. 3,3 μ L/mL 단백질분해효소 K (50 μ g/ μ L) (Epicenter Biotechnologies, Madison, USA)를 내포하는 1 mL 용해 혼합물 (Epicenter Biotechnologies, Madison, USA)이 첨가되었고, 그리고 조직이 초음파발생장치 (HD2070, Bandelin, Berlin, Germany)를 이용하여 수 초 동안 초음파처리에 의해 용해되고 열혼합기 (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Germany)에서 65°C 에서 30 분 동안 단백질분해효소 K로 소화되었다. 용해물은 분석 때까지 -80°C에서 보관되었다. mRNA 분석을 위해, 용해물이 해동되었고, 그리고 mRNA 수준이 제조업체의 권고에 따라서, QuantiGene 1.0 (FVII, ApoB 및 GAPDH) 또는 Quantigene 2.0 (TTR) 분지된 DNA (bdNA) 검정 키트 (Panomics, Fremont, Calif., USA, Cat-No: QG0004)를 이용하여 정량되었다. 검정 판독으로서, 화학발광 신호가 Victor 2 Light 발광 계수기 (Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany)에서 상대적 발광 단위 (RLU)로서 계측되었다. 상응하는 mRNA에 대한 신호는 동일한 용해물로부터 GAPDH mRNA에 대한 신호에 의해 분할된다. 값은 GAPDH에 대해 정규화된 mRNA 발현으로서 보고된다.
- [0716] **추가적인 일반적인 절차 1: 단일 사슬 올리고뉴클레오타이드 합성**
- [0717] 올리고리보뉴클레오타이드는 포스포라미디트 화학을 이용하여, 10 μ mol 규모에서 ABI 394 및 3900 합성장치 (Applied Biosystems)에서, 또는 28 μ mol 규모에서 Oligopilot 10 합성장치에서 조립되었다. 고체 지지체는 2'-테옥시티미딘 (Glen Research, Sterling, Virginia, USA), 또는 제어된 다공성 유리 (CPG, 520 Å, 75 μ mol/g의 부하에서, Prime Synthesis, Aston, PA, USA로부터 획득됨)로 폴리스티렌 부하되었다. 보조적인 합성 시약, DNA-, 2'-O-메틸 RNA-, 그리고 2'-테옥시-2'-플루오르-RNA 포스포라미디트는 SAFC Proligo (Hamburg, Germany)로부터 획득되었다. 구체적으로, 2'-O-메틸-우리딘 (2'-OMe-U), 4-N-아세틸-2'-O-메틸-시티딘 (2'-OMe-Cac), 6-N-벤조일-2'-O-메틸-아데노신 (2'-OMe-Abz) 및 2-N-이소부틸릴구아노신 (2'-OMe-GiBu)의 5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-3'-O-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필) 포스포라미디트 단위체가 소중합체 서열을 구축하는데 이용되었다. 2'-플루오르 변형은 2'-OMe RNA 빌딩 블록과 동일한 핵염기 보호 기를 보유하는 상응하는 포스포라미디트를 이용하여 도입되었다. 5-에틸티오-1H-테트라졸 (ETT, 아세토니트릴에서 0.5 M)을 활성인자로써 이용할 때, 모든 포스포라미디트 (아세토니트릴에서 70 mM)에 대한 연계 시간은 3 분이었다. 포스포로티오에이트 연쇄는 피리딘 및 아세토니트릴의 1:1 (v/v) 혼합물에서 50 mM 3-((디메틸아미노-메틸리덴)아미노)-3H-1,2,4-디티아졸-3-티온 (DDTT, AM Chemicals, Oceanside, California, USA)을 이용하여 도입되었다.
- [0718] DMT 기의 제거를 포함하는 고체상 합성 ("DMT 오프 합성")의 완결 시에, 올리고뉴클레오타이드는 고체 지지체로부터 개열되고, 그리고 공개된 방법에 따라서 25°C에서 3 시간 동안, 수성 메틸아민 (41 %) 및 농축된 수성 암모니아 (32 %)로 구성되는 1:1 혼합물을 이용하여 탈보호되었다 (Wincott, F. et al: Synthesis, deprotection,

analysis and purification of RNA and ribozymes. Nucleic Acids Res, 23:2677-2684 (1995)).

- [0719] 차후에, 미가공 소중합체는 Source Q15로 채워진 칼럼 (GE Healthcare) 및 AKTA Explorer 시스템 (GE Healthcare)을 이용한 음이온성 교환 HPLC에 의해 정제되었다. 완충액 A는 20 % 수성 아세트니트릴에서 10 mM 과염소산나트륨, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4 (Fluka, Buchs, Switzerland)이었고, 그리고 완충액 B는 500 mM 과염소산나트륨을 갖는 완충액 A와 동일하였다. 32 칼럼 용적 (CV) 내에 22 % B 내지 42 % B의 구배가 이용되었다. 280 nm에서 UV 흔적이 기록되었다. 온당한 분획물은 모아지고 3M NaOAc, pH=5.2 및 70 % 에탄올로 침전되었다. 펠렛이 원심분리에 의해 수집되었다. 대안으로, 탈염이 제조업체의 권고에 따라서, 세파텍스 HiPrep 칼럼 (GE Healthcare)을 이용하여 실행되었다.
- [0720] 올리고뉴클레오티드는 물에서 재구성되었고, 그리고 이들 올리고뉴클레오티드의 정체는 전기분무 이온화 질량 분광분석법 (ESI-MS)에 의해 확증되었다. 순도는 분석적 음이온-교환 HPLC에 의해 사정되었다.
- [0721] 5'-아미노핵심 링커가 TFA-보호된 핵심아미노-링커 포스포라미디트 (Sigma-Aldrich, SAFC, Hamburg, Germany)를 이용하여 도입되었다. 3'-핵심아미노-링커가 CPG 위에 고정된 프탈리미도 보호된 핵심아미노-링커 (Prime Synthesis, Aston, PA, USA)를 이용하여 도입되었다. 탈보호 및 정제는 상기와 같이 수행되었다.
- [0722] **추가적 일반적인 절차 2: 티올-종료된 siRNA의 산출**
- [0723] 3'- 또는 5'-말단 티올 기는 1-O-디메톡시트리틸-핵심-디설피드, 1'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포라미디트 링커 (NucleoSyn, Olivet Cedex, France)를 통해 도입되었다. 상기와 같은 탈보호 및 정제 후, 각각의 디설피드 내포 소중합체는 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (TEABc, 0.1M, pH 8.5, Sigma, #90360)에서 디티오프레이톨 (DTT) (0.1 M DTT 원액 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany, #646563)을 이용하여 환원되었다. 올리고뉴클레오티드는 TEABc 완충액 (100mM, pH 8.5)에서 용해되어 1 mM 용액이 산출되었다. 디설피드 환원을 달성하기 위해, 50-100 배 물 DTT 과잉이 올리고뉴클레오티드 용액에 첨가되었다. 환원의 진행은 Thermo Fisher로부터 획득된 Dionex DNA Pac 200 칼럼 (4x 250 mm)에서 분석적 AEX HPLC에 의해 모니터링되었다. 환원된 물질, 다시 말하면, 상응하는 티올 (C6SH)은 시작 물질에 앞서 용리한다. 반응의 완결 후, GE Healthcare로부터 HiPrep 칼럼 및 용리액으로서 물을 이용한 크기 배제 크로마토그래피에 의해 과잉 시약이 제거된다. 차후에, 올리고뉴클레오티드는 3 M NaOAc (pH 5.2) 및 에탄올을 이용하여 침전되고, 그리고 -20°C에서 보관된다.
- [0724] **추가적 일반적인 절차 3: 이중 가닥 RNA (dsRNA)를 형성하기 위한 단일 가닥 RNAs (ssRNAs)의 어닐링을 위한 일반적인 절차**
- [0725] dsRNAs는 센스 가닥에 비하여 약간 과잉의 필요한 상보성 안티센스 가닥(들)을 혼합하고, 그리고 20 mM NaCl/4 mM 인산나트륨 pH 6.8 완충액에서 어닐링함으로써 RNA 단일 가닥으로부터 산출되었다. 성공적인 이중나선 형성은 GE Healthcare로부터 슈퍼텍스 75 칼럼 (10 x 300 mm)을 이용한 선천적 크기 배제 HPLC에 의해 확증되었다. 표본은 이용 때까지 동결 보관되었다.
- [0726] 본원에서 설명된 서열에서 대문자 "A", "C", "G" 및 "U"는 RNA 뉴클레오티드를 나타낸다. 소문자 "c", "g", "a" 및 "u"는 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트를 나타내고; 그리고 "dT"는 테옥시티미딘 잔기를 나타낸다. 대문자 A, C, G, U, 그 이후에 "f"는 2'-플루오르 뉴클레오티드를 지시한다. "(SHC6)"은 티오핵심 링커를 나타낸다. "(DTME)"는 개열가능한 동중이중기능성 교차연결제 디티오비스말레이미도에탄을 나타내고, "C6NH2" 및 "C6NH"는 아미노핵심 링커를 나타내기 위해 교체가능하게 이용된다. "C6SSC6"은 디핵심디설피드 링커를 나타낸다. "InvdT"는 반전된 티미딘을 의미한다.
- [0727] **추가적 일반적인 절차 4: 순차적 어닐링에 의해 다중결합 siRNAs를 산출하기 위한 일반적인 절차**
- [0728] 단계별 어닐링을 통한 다중결합 siRNAs의 제조는 물에서 수행되었고, 그리고 상보성 가닥의 단계별 부가를 활용하였다. 용액의 가열/냉각은 필요하지 않았다. 각 부가 후, 어닐링 용액의 분취량이 이전되고, 그리고 선천적 조건 (20°C) 하에 분석적 RP HPLC를 이용하여 이중나선 형성에 대해 모니터링되었다. 동물 양의 상보성 단일 가닥을 조합하는데 필요한 양은 최근접 이웃 방법에 의해 연산된 개별 단일 가닥에 대한 소광 계수에 근거하여 계산되었다. 만약 분석적 RP HPLC 추적이 과잉 단일 가닥을 보여주면, 이중나선 형성을 강제하기 위해 추가량의 상응하는 상보성 가닥이 부가되었다 ("이중나선 적정").
- [0729] 이중나선 적정은 20°C에 평형화된 XBridge C18 올리고 BEH (2.5 μm; 2.1x50 mm, Waters) 칼럼이 구비된 Dionex Ultimate 3000 HPLC 시스템을 이용하여 모니터링되었다. 진단 파장은 260 nm이었다. 완충액 A는 1 % 메탄올을

내포하는 100 mM 헥사플루오로-이소프로판올 (HFIP), 16.3 mM 트리에틸아민 (TEA)이었다. 완충액 B는 MeOH가 95 %인 점을 제외하고 동일한 조성을 가졌다. 30 분 동안 5 % 내지 70 % 완충액 B의 구배가 250 μ L/분의 유속에서 적용되었다. 체류 시간을 확립하기 위해, 2개의 상보성 가닥이 독립적으로 이동되었다. 이후, 이중나선 용액을 내포하는 분취량이 분석되고, 그리고 성분 단일 가닥의 체류 시간과 비교되었다. 이중나선 용액이 유의미한 양의 단일 가닥을 보여주는 경우에, 상응하는 상보성 가닥이 이중나선 용액에 추가되었다.

[0730] 실시예 1: 티올-중요된 siRNA의 산출

[0731] 필요한 경우에 3'- 또는 5'-말단 티올 기가 1-O-디메톡시트리틸-핵심-디설피드, 1'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포라미디트 링커 (NucleoSyn, Olivet Cedex, France)를 통해 도입되었다. 고체상 합성의 완결 및 DMT 기의 최종 제거 ("DMT 오프 합성") 시에, 올리고뉴클레오타이드는 고체 지지체로부터 개열되고, 그리고 10°C에서 6 시간 동안 수성 메틸아민 (41 %) 및 농축된 수성 암모니아 (32 %)로 구성되는 1:1 혼합물을 이용하여 탈보호되었다. 차후에, 미가공 올리고뉴클레오타이드는 AKTA Explorer 시스템 (GE Healthcare, Freiburg, Germany)에서 음이온-교환 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)에 의해 정제되었다. 정제된 (C₆SSC₆)-올리고뉴클레오타이드는 에탄올의 첨가 및 냉동기에서 하룻밤 동안 저장에 의해 침전되었다. 펠렛이 원심분리에 의해 수집되었다. 올리고뉴클레오타이드는 물에서 재구성되었고, 그리고 이들 올리고뉴클레오타이드의 정체는 전기분무 이온화 질량 분광분석법 (ESI-MS)에 의해 확증되었다. 순도는 분석적 음이온-교환 및 RP HPLC에 의해 사정되었다.

[0732] 각각의 디설피드 내포 소중합체는 이후, 100 mM DL-디티오프레이틀 (DTT) 용액을 이용하여 환원되었다. 1.0 M DTT 원액 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany, #646563)은 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (TEABc, 1M, pH 8.5, Sigma, #90360) 및 물로 희석되어 DTT 및 TEABc에서 각각 100 mM 용액이 제공되었다. 올리고뉴클레오타이드는 TEABc 완충액 (100mM, pH 8.5)에서 용해되어 1 mM 용액이 산출되었다. 디설피드 환원을 달성하기 위해, 50-100 배 물 DTT 과잉이 올리고뉴클레오타이드 용액에 첨가된다. 환원의 진행은 Thermo Fisher로부터 획득된 Dionex DNA Pac 200 칼럼 (4x 250 mm)에서 분석적 AEX HPLC에 의해 모니터링되었다. 환원된 물질, 다시 말하면, 상응하는 티올 (C6SH)은 시작 물질에 앞서 용리한다. 반응의 완결 후, GE Healthcare로부터 HiPrep 칼럼 및 용리액으로서 물을 이용한 크기 배제 크로마토그래피에 의해 과잉 시약이 제거된다. 차후에, 올리고뉴클레오타이드는 3 M NaOAc (pH 5.2) 및 에탄올을 이용하여 침전되고, 그리고 마이너스 20°C에서 보관된다.

[0733] 실시예 2: 모노-DTME 소중합체의 제조를 위한 일반적인 절차

[0734] 티올 변형된 올리고뉴클레오타이드는 25 % 아세트니트릴을 내포하는 300 mM NaOAc (pH 5.2)에서 용해되어 20 OD/mL 용액이 제공되었다. 15.6 mM 용액을 공급하기 위해, 40 당량 디티오비스말레이미도에탄 (DTME, Thermo Fisher, # 22335)이 아세트니트릴에서 용해되었다. DTME 용액이 올리고뉴클레오타이드-내포 용액에 첨가되고, 그리고 열혼합기 (Eppendorf, Hamburg, Germany)에서 25°C에서 교반되었다. 반응의 진행은 Dionex DNA Pac200 칼럼 (4x 250 mm)을 이용한 분석적 AEX HPLC에 의해 모니터링되었다. 필요한 순도 수준 과잉에 따라서, DTME가 HiPrep 칼럼 (GE Healthcare)을 이용한 크기 배제 HPLC에 의해 제거되거나, 또는 미가공 반응 혼합물이 GE Healthcare로부터 상업적으로 가용한 Source 15 Q 수지로 채워진 칼럼을 이용한 예비 AEX HPLC에 의해 정제된다.

[0735] 실시예 3: DTME 기능성을 통한 이합체의 제조를 위한 일반적인 절차

[0736] 실시예 2에서 절차에 따라서 제조된 DTME 변형된 올리고뉴클레오타이드는 티올 링커가 구비된 다른 올리고뉴클레오타이드와 반응되었다. 이러한 반응은 반응 파트너 중에서 하나의 상보성 올리고뉴클레오타이드의 사전 어닐링 후, 단일 가닥 서열에서 실행될 수 있었다. 결과적으로, 원하는 경우에, DTME 변형된 올리고뉴클레오타이드는 티올 변형된 올리고뉴클레오타이드와 직접적으로 반응되거나, 또는 이의 상보성 가닥과 어닐링되었고, 그리고 결과의 이중나선은 티올 변형된 올리고뉴클레오타이드와 반응되었다. 대안으로, 티올 변형된 올리고뉴클레오타이드는 이의 상보성 가닥과 어닐링되었고, 그리고 이러한 이중나선은 DTME 변형된 단일 가닥과 반응되었다. 모든 사례에서, 반응은 300 mM NaOAc (pH 5.2)의 존재에서 수성 용액에서 실행되었다.

[0737] 실시예 4: 이중 가닥 RNA (dsRNA)를 형성하기 위한 단일 가닥 RNAs (ssRNAs)의 어닐링을 위한 일반적인 절차

[0738] dsRNAs는 동물 양의 상보성 센스 및 안티센스 가닥을 혼합하고, 그리고 20 mM NaCl/4 mM 인산나트륨 pH 6.8 완충액에서 어닐링함으로써 RNA 단일 가닥으로부터 산출되었다. 성공적인 이중나선 형성은 GE Healthcare로부터 슈퍼텍스 75 칼럼 (10 x 300 mm)을 이용한 선천적 크기 배제 HPLC에 의해 확증되었다. 표본은 이용 때까지 동결 보관되었다.

[0739] 실시예 5: 3'- 또는 5'- NH₂ 유도체화된 올리고뉴클레오타이드의 제조를 위한 일반적인 절차

[0740] 센스 가닥의 5'-단부에서 C-6-아미노링커가 구비된 RNA는 ÄKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany) 및 고체 지지체로서 제어된 다공성 유리 (CPG) (Prime Synthesis, Aston, PA, USA)를 이용하여 140 μmol 의 규모에서 고체상에서 표준 포스포라미디트 화학에 의해 생산되었다. 2'-O-메틸 및 2'-F 뉴클레오타이드를 내포하는 소중합체는 상응하는 2'-OMe-포스포라미디트, 2'-F-메틸 포스포라미디트를 이용하여 산출되었다. 센스 가닥의 5' 단부에서 5'-아미노핵심 링커는 TFA-보호된 핵심아미노링커 포스포라미디트 (Sigma-Aldrich, SAFC, Hamburg, Germany)를 이용하여 도입되었다. 핵심아미노-링커가 3'-위치에서 필요한 경우에, CPG 위에 고정된 프탈리미도 보호된 핵심아미노-링커 (Prime Synthesis, Aston, PA, USA)가 이용되었다. 개열 및 탈보호는 물에서 41 % 메틸아민 및 농축된 수성 암모니아 (1:1 v/v)의 혼합물을 이용하여 달성되었다. 미가공 올리고뉴클레오타이드는 음이온 교환 HPLC 및 GE Healthcare로부터 획득된 Source 15Q 수지로 채워진 칼럼 (2.5 x 18 cm)을 이용하여 정제되었다.

[0741] 실시예 6: GalNAc 리간드 접합을 위한 일반적인 방법

[0742] 삼가 GalNAc 리간드는 *Hadwiger et al.*, 특허 출원 US2012/0157509 A1에서 개시된 바와 같이 제조되었다. 상응하는 카르복실산 유도체는 하기의 절차에 따라서 NHS 화학을 이용하여 활성화되었다:

[0743] 3GalNAc-COOH (90 μmol , 206 mg)가 2.06 mL DMF에서 용해되었다. 이러한 용액에 N-히드록시숙신이미드 (NHS, 14.3 mg (99 μmol , 1.1 eq.) 및 디이소프로필카르보디이미드 (DIC, 18.29 μL , 1.05 eq., 94 μmol)가 0°C에서 추가되었다. 이러한 용액은 주위 온도에서 하룻밤 동안 교반되었다. 반응의 완결은 TLC (DCM:MeOH=9:1)에 의해 모니터링되었다.

[0744] 아미노핵심 링커가 구비된 전구체 올리고뉴클레오타이드는 4.4 mM 용액을 제공하기 위해, 탄산나트륨 완충액 (pH 9.6):DMSO 2:3 v/v에서 용해되었다. 이러한 용액에 NHS 활성화된 GalNAc 용액 (1.25 eq, 116 μL)의 분취량이 첨가되었다. 25°C에서 1 시간 동안 진탕 후, 다른 분취량 (116 μL)의 NHS 활성화된 GalNAc가 첨가되었다. 일단 RP HPLC 분석이 적어도 85 %보다 많은 접합된 물질을 보여주면, 미가공 접합체는 에탄올의 첨가 및 하룻밤 동안 냉동기에서 저장에 의해 침전되었다. 펠렛이 원심분리에 의해 수집되었다. 펠렛은 1 mL 농축된 수성 암모니아에서 용해되고, 그리고 GalNAc 당 잔기로부터 O-아세트산염을 제거하기 위해 실온에서 4 시간 동안 교반되었다. RP HPLC ESI MS에 의한 O-아세트산염의 정량적 제거의 확증 후, 상기 물질은 100 mM 트리에틸 암모늄 아세트산염 (TEAA)으로 희석되었고, 그리고 미가공 반응 혼합물은 ÄKTA explorer HPLC 시스템에서 60°C에서 XBridge 예비 C18 (5 μm , 10x 50 mm, Waters) 칼럼을 이용한 RP HPLC에 의해 정제되었다. 용매 A는 100 mM 수성 TEAA이었고, 그리고 용매 B는 95 % CAN에서 100 mM TEAA이었는데, 둘 모두 완충액 프리-가열기에 의하여 60°C로 가열되었다. 3.5 mL/분의 유속으로 60 분 동안 5 % 내지 25 % B의 구배가 이용되었다. 화합물의 용리가 260 및 280 nm에서 관찰되었다. 1.0 mL의 용적을 갖는 분획물은 수집되고 분석적 RP HPLC/ESI-MS에 의해 분석되었다. 85 %보다 큰 순도를 갖는 표적 접합체를 내포하는 분획물은 조합되었다. 정확한 분자량은 ESI/MS에 의해 확증되었다.

[0745] 실시예 7: 올리고뉴클레오타이드 전구체

[0746] 상기 실시예에서 설명된 방법론을 이용하여, 하기의 단일 가닥 단위체, 이합체 및 GalNAc 태깅된 단위체 및 이합체가 제조되었다:

[0747] 표 1: 올리고뉴클레오타이드 전구체 -단일 가닥 ("X")

서열 번호:	ID	FVII 센스 가닥 (5'-3')
1	X18791	(C ₆ SSC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)(C ₆ NH ₂)
2	X18792	(C ₆ SSC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)(C ₆ NH)(Ga1Nac ₃)
3	X18793	(SHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)(C ₆ NH)(Ga1Nac ₃)
4	X18794	(C ₆ SSC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)
5	X19569	(SHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)
6	X19574	(DTME)(SHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)
	ID	FVII 안티센스 가닥 (5'-3')
7	X18796	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu(C ₆ SSC ₆)dT
8	X18797	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu(C ₆ SH)
9	X18798	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu(C ₆ SH)(DTME)
	ID	ApoB 센스 가닥 (5'-3')
10	X19577	(C ₆ SSC ₆)cuAfuUfuGfgAfgAfaAfuCfGaf(invdt)
11	X19578	(SHC ₆)cuAfuUfuGfgAfgAfaAfuCfGaf(invdt)
12	X19579	(DTME)(SHC ₆)cuAfuUfuGfgAfgAfaAfuCfGaf(invdt)

[0748]

[0749] 표 2: 올리고뉴클레오타이드 단일 가닥된 센스 및 안티센스 쌍; 및 어닐링 후의 결과 이중나선 ("XD-").

이중나선 ID	서열 번호 :	단일 가닥 ID	서열 (5' -3')	표적/가닥
XD-00376	13	X01162	GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdT	FVIIs
	14	X00549	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCdTsdT	FVIIas
XD-00030	16	X00116	GcAAAGGcGuGccAAcucAdTsdT	FVIIs
	17	X00117	UGAGUUGcACGCCUUGCdTsdT	FVIIas
XD-01078	19	X02943	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	ApoBs
	20	X02944	uuGGAUCAAuAuAAGAuUCscsU	ApoBas
XD-00194	22	X00539	cuuAcGcuAGuAcuucGAdTsdT	LUCs
	23	X00540	UCGAAGuACuACGuAAGdTsdT	LUCas

[0750]

[0751] 표 3: 유도된 올리고뉴클레오타이드 단일 가닥된 센스 및 안티센스 쌍; 및 어닐링 후의 결과 이중나선.

이중나선 ID	서열 번호 :	단일 가닥 ID	서열 (5'-3')	표적
XD-06328	26	X18790	(Ga1Nac3)(NHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	FVII
	28	X18796	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	
XD-06728	28	X20124	(Ga1Nac3)(NHC ₆)cuAfuUfuGfgAfgAfaAfuCfGaf(invdt)	ApoB
	29	X19583	UfsCfGafUfuCfuCfuCfaAfaAfuAfgusu	
XD-06386	31	X20216	(Ga1Nac3)(NHC ₆)sAfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf(i nvdt)	TTR
	32	X19684	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	
	34	X19671	gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)(C ₆ NH)(Ga1Nac3)	FVII
XD-06961	36	X18788	gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	FVII
	28	X18796	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	

[0752]

[0753] 표 4: DTME에 의해 링크된 단일 가닥된 올리고뉴클레오타이드 이합체

서열 번호 :	ID	서열 (5' -3')	표적/가닥
37 & 125	X15049	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA(SHC ₆)(DTME)GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdT(SHC ₆)	ApoBs/F7s
38 & 126	X12714	GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdT(SHC ₆)(DTME)GUfAAGACfUfUfGAGAUfAUfCfCdTsdT(SHC ₆)	F7s/F7as
39 & 127	X19575	(SHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)(C ₆ NH)(Ga1Nac ₃)(DTME)(SHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	F7s/F7s
40 & 128	X19819	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu(C ₆ SH)(DTME)UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu(C ₆ SH)	F7as/F7as
41 & 129	X20336	(SHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)(C ₆ NH)(Ga1Nac ₃)(DTME)(SHC ₆)cuAfuUfuGfgAfgAfaAfuCfGaf(invdt)	F7s/ApoBs

[0754]

[0755] 표 5: 단일 가닥 DTME 이합체 및 상응하는 단량체; 및 어닐링 후의 결과 이중나선

이중 나선 ID	SEQ ID	단일 가닥 ID	서열 (5' -3')	표적/가 닥
XD- 0531 1	37 & 130	X15049	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA(SHC6)(DTME)GGAUfCfAUfCfUfCfAAG UfCfUfUfACfCdTsdT(SHC6)	ApoBs- FVIIIs
	14	X00549	5'-GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfCdTsdT-3' +	FVIIIs
	20	X02944	5'-uuGGAUCAAAuAuAAGAUcCsCsU-3'	ApoBas
XD- 0531 2	38 & 131	X12714	GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfCdTsdT(SHC6)(DTME)GUfAAG ACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfCdTsdT(SHC6)	FVIIIs- FVIIIs
	13	X01162	5'-GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfCdTsdT-3'	FVIIIs
	14	X00549	5'-GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfCdTsdT-3'	FVIIIs

[0756]

[0757] 표 6: 화학적으로 합성된 디설파이드-링크된 이합체 및 삼합체

SEQ ID	단일 가닥 ID	서열 (5' -3')	표적/가 닥
44 & 132	X20366	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu(C6SSC6)UfsCfGfAfuUfuCfuCfu CfcAfaAfuAfgusu	TTRas/Ap oBas
45 & 133	X22413	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf(invdt)(C6SSC6)gcAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	FVIIIs/TT Rs
46 & 134 & 135	X20256	(SHC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)(C6NH)(GaINAc3)(SPDP) (NHC6)cuAfuUfuGfgAfgAfaAfuCfGfAf(invdt)(C6SSC6)AfsasCfaGfuGf uUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf(invdt)	FVIIIs/Ap oBs/TTRs
47 & 136	X20366	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu(C ₆ SSC ₆)UfsCfGfAfuUfuCfuCfu CfcAfaAfuAfgusu	TTRas/Ap oBas
48 & 137	X22413	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf(invdt)(C ₆ SSC ₆)gcAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	FVIIIs/TT Rs

[0758]

[0759] 핵심: 상기 표 1-6 (그리고 하기의 표들)의 서열 부분에서: 대문자 "A", "C", "G" 및 "U"는 RNA 뉴클레오타이드를 나타낸다. 소문자 "c", "g", "a" 및 "u"는 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오타이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트를 나타내고; 그리고 "dT"는 테옥시티미딘 잔기를 나타낸다. 대문자 A, C, G, U, 그 이후에 "f"는 2'-플루오르 뉴클레오타이드를 지시한다. "(SHC6)"은 티오핵실 링커를 나타낸다. "(DTME)"는 개열가능한 동종이중기능성 교차연결제 디티오비스말레이미도에탄올을 나타내는데, 이의 구조는 도 1b에서 도시된다. "(BMPEG2)"는 비개열가능한 동종이중기능성 교차연결제 1,8-비스말레이미도-디에틸렌글리콜을 나타낸다. "C6NH2" 및 "C6NH"는 아미노핵실 링커를 나타내기 위해 교체가능하게 이용된다. "C6SSC6"은 디핵실디설파이드 링커를 나타낸다. "GaINAc3" 및 "GaINAc"는 트리-안테나리 N-아세틸갈락토사민 리간드를 나타내기 위해 교체가능하게 이용되고, 이의 화학 구조는 도 1a에서 도시된다. "SPDP"는 숙신이미드 3-(2-피리디디티오)프로피오네이트 및 아미노링커 구비된 RNA의 반응의 반응 산물을 나타낸다. "Invdt"는 반전된 티미딘을 의미한다.

[0760] 차트의 표적/가닥 부분에서: "F7" 또는 "FVII"는 인자 VII 전사체 (mRNA)를 표적으로 하는 siRNA 서열을 명명한다. "ApoB"는 아포지질단백질 B 전사체를 표적으로 하는 siRNA 서열을 명명한다. "TTR"은 트랜스티레틴 전사체를 표적으로 하는 siRNA 서열을 명명한다. 센스 가닥은 "s"로서 명명된다; 안티센스 가닥은 "as"로서 명명된다.

[0761] 실시예 8: 순차적 어닐링에 의해 이합체성, 삼합체성 및 사합체성 siRNAs를 산출하기 위한 일반적인 절차

[0762] 이합체성, 삼합체성 및 사합체성 siRNAs의 제조를 위해, 단계별 어닐링 절차가 수행되었다. 어닐링은 물에서 수행되고, 그리고 상보성 가닥의 단계별 부가를 활용하였다. 용액의 가열/냉각은 필요하지 않았다. 각 부가 후, 어닐링 용액의 분취량이 이전되고, 그리고 선천적 조건 (20℃) 하에 분석적 RP HPLC를 이용하여 이중나선 형성에 대해 모니터링되었다. 동물 양의 상보성 단일 가닥을 조합하는데 필요한 양은 최근접 이웃 방법에 의해 연산된 개별 단일 가닥에 대한 소량 계수에 근거하여 계산되었다. 만약 분석적 RP HPLC 추적이 과잉 단일 가닥을 보여준다면, 이중나선 형성을 강제하기 위해 추가량의 상응하는 상보성 가닥이 추가되었다 ("이중나선 적정").

[0763] 이중나선 적정은 20℃에 평형화된 XBridge C18 올리고 BEH (2.5 μm; 2.1x50 mm, Waters) 칼럼이 구비된 Dionex Ultimate 3000 HPLC 시스템을 이용하여 모니터링되었다. 진단 파장은 260 nm이었다. 완충액 A는 1 % 메탄올을 내포하는 100 mM 헥사플루오로-이소프로판올 (HFIP), 16.3 mM 트리에틸아민 (TEA)이었다. 완충액 B는 MeOH가 95 %인 점을 제외하고 동일한 조성을 가졌다. 30 분 동안 5 % 내지 70 % 완충액 B의 구배가 250 μL/분의 유속에서

적용되었다. 체류 시간을 확립하기 위해, 2개의 상보성 가닥이 독립적으로 이동되었다. 이후, 이중나선 용액을 내포하는 분취량이 분석되고, 그리고 성분 단일 가닥의 체류 시간과 비교되었다. 이중나선 용액이 유의미한 양의 단일 가닥을 보여주는 경우에, 상응하는 상보성 가닥이 이중나선 용액에 부가되었다.

[0764] 실시예 9: 5'-GalNAc-FVII 정준 대조 (XD-06328)의 제조

[0765] 5'-GalNAc-FVII 정준 대조 (XD-06328) (도 2를 참조한다)는 실시예 4에서 설명된 방법에 의해 ssRNA 가닥 X18790 및 X18795를 어닐링함으로써 제조되었다. 산물은 HPLC 분석에 의해 결정될 때, 91.6 % 순도에서 획득되었다.

[0767] 실시예 10: 3' 안티센스 가닥 및 센스 가닥의 외부 3' 단부에 접합된 GalNAc를 연결하는 개열가능한 링커를 갖는 3'-GalNAc-FVII-DTME-FVII 동중이합체 (XD-06330)의 제조

[0768] FVII를 표적으로 하는 GalNAc-접합된 동중이합체성 siRNA XD-06330 (도 3)은 실시예 8에서 설명된 이중나선 적정법에 따라서, 단일 가닥 이합체 X19819를 X18788 및 X19571과 단계별로 조합함으로써 제조되었다 (10mg, 323 nmol). 단리된 물질은 HPLC 분석에 의해 본질적으로 순수하였다.

[0769] 표 8: GalNAc-FVII-DTME- FVII 동중이합체 (XD-06330)의 합성에서 이용된 소중합체의 화학량론

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

[0771] 실시예 11: 5' 센스 가닥 및 센스 가닥의 외부 3' 단부에 접합된 GalNAc를 연결하는 개열가능한 링커를 갖는 3'-GalNAc-FVII-DTME-FVII 동중이합체 (XD-06360)의 제조

[0772] FVII를 표적으로 하는 GalNAc-접합된 동중이합체성 siRNA XD-06360은 도 4에서 묘사된 합성 전략 및 실시예 8에서 설명된 방법론을 이용하여, 단일 가닥을 단계별로 조합함으로써 제조되었다 (11 mg, 323 nmol).

[0773] 모든 반응성 단계는 고품질 물질을 생산하였는데, 소중합체 X19575는 이온 교환 및 역상 크로마토그래피에 의해 각각 91.7 및 93.4 % 순수한 것으로 결정되었고, 그리고 소중합체 XD-06360은 비-변성 역상 HPLC에 의해 결정될 때 86.8 % 순도에서 단리되었다. 합성에서 이용된 다양한 소중합체의 화학량론은 표 9에서 도시된다.

[0774] 표 9: GalNAc-FVII-FVII 동중이합체 (XD-06360)의 합성에서 이용된 소중합체의 화학량론

서열 번호:	ID	표적	E (L/mol*cm)	Nmol/OD	MW (유리산)	MW Na 염	Req OD
39	X19575	FVIIIs-FVIIIs	384800	2.60	15413.1	16314.4	137
26	X18795	FVIIas	194800	5.13	6849.4 x2	7289.1 x2	139
50	XD-06360				29111.9	30892.6	

[0776] 실시예 12: 3' 안티센스 가닥 및 센스 가닥의 내부 5' 단부에 접합된 GalNAc를 연결하는 개열가능한 링커를 갖는 5'-GalNAc-FVII-DTME-FVII 동중이합체 (XD-06329)의 제조

[0777] FVII를 표적으로 하는 GalNAc-접합된 동중이합체성 siRNA XD-06329는 1150 nmol의 X18788 및 1150 nmol X18798을 어닐링함으로써 도 5에서 묘사된 바와 같이 제조되었다. 개별 가닥의 OD의 합계는 450 OD이었고, 그리고 조합된 용액, 다시 말하면, 이중나선은 흡광증가에 기인한 394 OD를 가졌다 (394 OD = 1150 nmol 이중나선). 이러한 DTME 변형된 이중나선은 1150 nmol X18797 (3'-SH 변형된 FVII 안티센스) (224 OD)와 반응되었다. HPLC 정제 후, 364 OD "절반-이합체" siRNA가 단리되었다. "절반-이합체" FVII siRNA (10 mg, 323 nmol, 174 ODs)는 이후, 5'GalNAc-FVII 센스 (X18790) (323 nmol, 62.3 OD)과 어닐링되어 최종 산물 XD-06329가 산출되었다.

[0778] 실시예 13: FVII 동중이합체성 GalNAc 접합체 (XD-06329, XD-06330 및 XD-06360)에 의한 생체내 FVII 유전자 녹다운의 결정.

[0779] 인자 VII에 대해 표적화된 동중이합체성, GalNAc-접합된 siRNAs의 3가지 상이한 변이체 (XD-06329, XD-06330

및 XD-06360) 및 단위체성 GalNAc-접합된 FVII-siRNA (XD-06328)는 전술된 바와 같은 동물 실험에서 *생체내* 효력에 대해 검사되었다 (일반적인 절차:동물 실험). 군 크기는 치료 군의 경우에 n=4 생쥐 및 식염수 대조의 경우에 n=5이었다. 모든 화합물은 0.2 mL의 용적에서 상이한 용량 (25 mg/kg 또는 50 mg/kg)에서 피하 주사되었다. 혈액은 치료에 앞서 1 일 및 치료후 1, 3과 7 일에 수집되고, 그리고 FVII 효소 활성에 대해 분석되었다. 결과는 도 6에서 도시된다.

[0780] 동종이합체성 GalNAc-접합체 (XD-06329, XD-06330 및 XD-06360)의 침묵 활성, 작용 개시 및 효능은 단위 중량 기초마다 녹다운에 대해 단위체성, 정준 대조 (XD-06328)에 필적하였다. 독성의 어떤 징후도 관찰되지 않았다 (예를 들어, 체중 감소, 이상 행동). 하지만, 상기 데이터를 GalNAc 함량에 대해 정규화하면, 이들 동종이합체성 GalNAc 접합체 모두 GalNAc 단위체보다 FVII 녹다운에서 더욱 효과적이었고, 따라서 리간드/수용체 결합 사건마다 더욱 효율적인 siRNA 흡수를 증명하였다. 이들 결과는 도 7a 및 7b에서 도시된다.

[0781] 도 7a. 각 시점에서 인자 VII 혈청 값은 1X PBS가 주사된 대조 생쥐에 대해 정규화된다. 각 데이터 포인트에서 막대는 왼쪽에서 오른쪽으로, 각각 식염수, XD-06328, XD-06329, XD-06330 및 XD-06360에 상응한다.

[0782] 도 7b. 각 시점에서 인자 VII 혈청 값은 각 개별 군에 대한 채혈전 값에 대해 정규화된다. 각 데이터 포인트에서 막대는 왼쪽에서 오른쪽으로, 각각 식염수, XD-06328, XD-06329, XD-06330 및 XD-06360에 상응한다.

[0783] 실시예 14:FVII (XD-06328), ApoB (XD-06728) 및 TTR (XD-06386)을 독립적으로 표적으로 하는 정준 GalNAc-siRNAs의 제조.

[0784] FVII (XD-06328), ApoB (XD-06728) 및 TTR (XD-06386)을 독립적으로 표적으로 하는 3개의 정준 siRNAs (도 8을 참조한다)는 독립적으로, 고체상 합성에 의해 제조되었다. 3개의 센스 가닥 (각각, X18790, X20124, X20216)이 5'-핵심아민 링커로 별개로 제조되었다. 올리고뉴클레오타이드의 개열 및 탈보호, 그리고 미가공 물질의 HPLC 정제 이후에, 각 올리고에 피아세틸화된 GalNAc 클러스터의 접합이 NHS 화학을 이용하여 달성되었다. 비누화에 의한 0-아세트산염의 제거는 수성 암모니아에 의해 매개되었다. 상보성 안티센스 가닥 (각각, X18795, X19583 및 X19584)이 앞서 제공된 표준 절차에 의해 합성되고, 그 이후에 GalNAc 접합된 단일 가닥에 어닐링되어 각각, 99.7, 93.1 및 93.8 % 순도에서 FVII (XD-06328), ApoB (XD-06728) 및 TTR (XD-06386)을 표적으로 하는 siRNAs가 산출되었다.

[0785] 표 10:GalNAc-siRNA 접합체

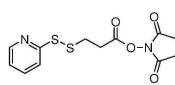
이중나선 ID	서열 번호:	ssRNA	서열 5'-3'	
XD-06328	138	X18790	(GalNAc3)(NHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	FVII
	139	X18795	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	
XD-06728	140	X20124	(GalNAc3)(NHC ₆)cuAfuUfuGfgAfgAfaAfuCfGf(invdt)	ApoB
	141	X19583	UfsCfGfAfuUfuCfuCfuCfaAfaAfuAfgusu	
XD-06386	142	X20216	(GalNAc3)(NHC ₆)sAfsasCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfaAf(invdt)	TTR
	143	X19584	usUfsaUfaGfaGfcAfaAfcAfcUfgUfususu	

[0786]

[0787] 실시예 15: 센스 가닥에서 개열가능한 연쇄를 갖는 GalNAc-FVII-ApoB-TTR 삼합체 (XD-06726)의 제조

[0788] GalNAc에 접합된, FVII, ApoB 및 TTR을 표적으로 하는 이중삼합체 (도 9를 참조한다)는 도 10에서 묘사된 바와 같이, 고체상 및 용액상의 하이브리드 전략을 이용하여 합성되었다.

[0789] 이합체 X19581은 상응하는 상업적으로 가용한 TFA 보호된 포스포라미디트 (SAFC Proligo, Hamburg, Germany)를 이용하여, 5' 단부에서 아미노핵심 링커로 고체상 화학을 이용하여 만들어졌다. 상기 서열은 상기 개설했던 조건에 따라서, 고체 지지체로부터 개열되고, 탈보호되고, 정제되었다. 추가 디설피드 링커를 설치하기 위해, 상기 올리고뉴클레오타이드의 5'-아미노핵심링커가 Sigma (#P3415)로부터 가용한 SPDP (숙신이미딜 3-(2-피리딜디티



오)프로피오네이트)와 반응되었다. 928 nmol (400 OD) 올리고뉴클레오타이드가 20 % 디메틸 포름아미드 (DMF)를 내포하는 4.7 mL 100 mM TEAB, pH 8.5에서 용해되었다. 이러한 용액에 100 μ L DMF에서 1.4 mg (4.6 μ mol, 5 eq) SPDP의 용액이 첨가되었다. 일단 분석적 RP HPLC가 시작 물질의 소비를 지시하면, 미가공 반응 혼합물이 Waters로부터 구입된 C18 XBridge 칼럼 (10x 50 mm)에서 정제되었다. RP 정제가 ÄKTA explorer HPLC 시스템에서 수행되었다. 용매 A는 100 mM 수성 TEAA였고, 그리고 용매 B는 95 % ACN에서 100 mM TEAA이

었다. 용매는 완충액 프리-가열기에 의해 60℃로 가열되었고, 그리고 칼럼은 동일한 온도에서 오븐에서 유지되었다. 4 mL/분의 유속으로 45 분 동안 0 % 내지 35 % B의 구배가 이용되었다. 화합물의 용리가 260 및 280 nm에서 관찰되었다. 1.5 mL의 용적을 갖는 분획물이 수집되고 분석적 RP HPLC/ESI-MS에 의해 분석되었다. 적합한 분획물은 조합되었고, 그리고 올리고뉴클레오타이드 X19582는 에탄올 및 3M NaOAc (pH 5.2)의 첨가 후 마이너스 20℃에서 침전되었다. 정제는 RP-HPLC ESI-MS에 의해 확증되었다.

[0790] 단일 가닥 삼합체를 제조하기 위해, 상기 올리고뉴클레오타이드 X19582 (255 nmol)가 1.3 mL 물에서 용해되었다. 이러한 용액에 306 nmol (1.2 eq)의 티올 변형된 올리고뉴클레오타이드 X18793이 첨가되었다. 반응 혼합물은 200 mM TEAA 및 20 % 아세트오트릴을 내포하였다. 반응의 진행은 RP HPLC에 의해 추적되었다. 일단 시작 물질이 소비되면, 반응 혼합물은 구배가 45 분 동안 0 % B에서 30 % B로 이행되었다는 점을 제외하고, 이전 단락에서 설명된 바와 동일한 조건을 이용하여 정제되었다.

[0791] 단일 가닥 이중삼합체 X20256 (siFVII, siApoB 및 siTTR의 연결된 센스 가닥 내포)이 높은 순도에서 획득되었다. X20256의 서열은 표 11에서 도시된다.

[0792] 표 11: 단일-가닥 이중삼합체

서열 번호 :	ID	서열	표적/가닥
52 & 144 & 145	X20256	(SHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)(C ₆ NH)(GalNAc ₃)(SPDP)(NHC ₆)cuAfuUfuGfgAfgAfaAfuCfGaf(invdt)(C ₆ SSC ₆)AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf(invdt)	FVIIs/ApoBs/TTRs

[0793]

[0794] 주의: 원칙적으로 상기 서열은 단일 고체상 합성을 통해 접근가능하다. 이 경우에 있어서, SPDP 및 C₆NH₂는 C₆SSC₆ 포스포라미디트에 의해 대체될 것이다. 하지만, 전체 작제물의 서열 길이로 인해, 이런 합성은 도전적일 것이다.

[0795] 그 후에, 실시예 8에서 설명된 이중나선 적정법에 따라서, 안티센스 단일 가닥을 센스 가닥 이중삼합체성 중간체 (X20256)에 단계별로 연속적으로 부가함으로써, FVII, ApoB 및 TTR을 동시에 표적으로 하는 이중삼합체성 이중나선 작제물 (XD-06726), 7 mg (150 nmol)이 제조되었다. 7 mg의 물질이 획득되었는데, 이것은 HPLC에 의해 본질적으로 순수하였다.

[0796] 표 12: GalNAc-FVII-ApoB-TTR 삼합체 (XD-06726)의 합성에서 이용된 소중합체의 화학량론.

서열 번호:	ID	표적	E (L/mol*cm)	Nmol/OD	MW (유리산)	MW Na 염	Req OD
52 & 144 & 145	X20256	FVIIs-ApoBs-TTRs	623900	1.60	22690.8	24075.7	94
29	X19583	ApoBas	206500	4.84	6762.4	7202.1	31
32	X19584	TTRas	240400	4.16	7596.1	8079.7	36
26	X18795	FVIIas	194800	5.13	6849.4	7289.1	29
53	XD-06726				43898.7	46646.6	

[0797]

[0798] 실시예 16: 교번하는 센스 및 안티센스 가닥에서 개열가능한 연쇄를 갖는 GalNAc-FVII-ApoB-TTR 삼합체 (XD-06727)의 제조.

[0799] FVII, ApoB 및 TTR을 동시에 표적으로 하는 9 mg (192 nmol)의 삼합체성 siRNA XD-06727 (도 11을 참조한다)은 실시예 8에서 설명된 방법론을 이용하여, 도 12에서 묘사된 바와 같이 단일 가닥을 단계별로 조합함으로써 높은 순도에서 제조되었다.

[0800] 표 13A: GalNAc-siFVII-siApoB-siTTR 삼합체 (XD-06727)의 합성에서 이용된 소중합체의 화학량론

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

[0801]

[0802] 이중삼합체 (XD-06727)을 생산한 합성은 고도로 효율적이다. 본 실시예에서, 반응물질의 거의 100 % 전환이 각 단계에서 달성되었다. 도 13, 14 및 15를 참조한다.

[0803] 실시예 17: FVII, ApoB 및 TTR을 개별적으로 표적으로 하는 모아진 siRNAs의 LNP 제제의 제조

[0804] FVII (XD-00030), ApoB (XD-01078) 및 TTR (XD-06729)을 표적으로 하는 단위체성 siRNAs는 지질 나노입자에서 조제되고, 그리고 일반적인 절차:지질 나노입자 조제 및 일반적인 절차:LNP 특징화에서 설명된 방법론을 이용하여 특징화되었다. 지질 조성물은 XL10:DSPC:콜레스테롤:PEG-DOMG/50:10:38.5:1.5 몰 퍼센트이었다. 88 % 캡슐화가 달성되었고, 그리고 결과의 입자는 83 nm 크기, 2.2 mV의 제타 전위 및 0.04의 PDI를 가졌다.

[0805] 표 13B:TTR을 표적으로 하는 단위체성 siRNA (XD-06729)

dsRNA ID	ssRNA ID	서열 번호:	서열	표적/가닥
XD- 06729	X21072	154	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTsdT	TTRs
	X21073	155	UuAuAGAGcAAGAacACUGdTsdT	TTRas

[0806]

[0807] 실시예 18:GalNAc-접합된 이중삼합체성 SiRNAs에 의한 mRNA 녹다운의 사정

[0808] 이중삼합체성 GalNAc-접합된 siRNAs (FVII, ApoB 및 TTR에 표적화됨)의 생체내 효력을 결정하기 위해, 동물 실험이 전술된 바와 같이 수행되었는데 (일반적인 절차:동물 실험), 치료 군의 경우에 n=4 생쥐 및 식염수 대조의 경우에 n=5의 군 크기가 이용되었다. 이중삼합체 XD-06726 및 XD-06727뿐만 아니라 3개의 단위체성 GalNAc-접합된 siRNAs (FVII를 표적으로 하는 XD-06328; TTR을 표적으로 하는 XD-06386 및 ApoB를 표적으로 하는 XD-06728)의 풀은 이들 삼합체의 경우에 50 mg/kg 전체 RNA 및 각각의 단위체성 접합체의 경우에 17 mg/kg의 농도에서 피하 주사되었다 (0.1 mL 용적). 비교를 위해, 동일한 표적 (FVII (XD-00030), ApoB (XD-01078) 및 TTR (XD-06729))을 향해 지향된 LNP-조제된 siRNAs (NPA-741-1)의 풀이 siRNA마다 0.5 mg/kg에서 정맥내 주사되었다. 혈액은 치료에 앞서 1 일 및 치료후 1, 3과 7 일에 전술된 바와 같이 수집되었고 (일반적인 절차:동물 실험), 그리고 FVII, ApoB 및 TTR의 혈청 수준은 일반적인 절차:유전자 녹다운의 계측에 따라서 계측되었다. 결과는 도 16a 및 16b, 17a 및 17b, 그리고 18a 및 18b에서 도시된다. 간 용해물에서 mRNA 수준은 주사후 7 일에서 계측되었다 (도 19a 및 19b).

[0809] 군 A (XD-06726)에서 1마리 동물은 TTR 혈청 수준에 대한 어떤 효과도 보여주지 않았다. 2개의 TTR 단백질 그래프 중에서 첫 번째는 상기 비-반응 동물에 대한 값이 제외된 데이터를 보여준다.

[0810] 비교를 위해, 불량한 TTR 반응을 보여주는 상기 동물로부터 값이 두 번째 FVII 그래프로부터 제외되었다.

[0811] ApoB 혈청 수준은 한 가지 군의 동물 내에서뿐만 아니라 식염수 대조의 상이한 시점 사이에서 높은 변이를 보여준다.

[0812] 3가지 유전자 모두의 녹다운이 또한, 상기 일반적인 절차:유전자 녹다운의 계측에 따라서 간 조직으로부터 mRNA에 대한 bDNA 검정을 이용하여 계측되었다. 표적 유전자 수준은 하우스키퍼 GAPDH에 대해 정규화되었다.

[0813] 실시예 19: GalNAc-FVII-ApoB-TTR-FVII 사합체 (XD-07140)의 제조

[0814] FVII, ApoB 및 TTR을 동시에 표적으로 하는 12.4 nmol의 사합체성 siRNA XD-07140 (도 20을 참조한다)은 도 21에서 묘사된 바와 같이, 그리고 실시예 8에서 설명된 이중나선 적정법에 따라서 단일 가닥을 단계별로 조합함으로써 제조되었다. HPLC 분석은 산물이 높은 순도에서 획득된다는 것을 보여주었다.

[0815] 표 14: GalNAc-FVII-ApoB-TTR-FVII 사합체 (XD-07140)의 합성에서 이용된 소중합체의 화학량론

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

[0816]

[0817] 실시예 20: 동중사합체의 합성

[0818] 본 발명에 따른 다중결합 올리고뉴클레오티드는 본원에서 개시된 방법 중에서 어느 것에 의해 합성될 수 있다. 동중사합체에 대한 2가지 실험 방법이 아래에 제공된다. 이들 실험은 더욱 긴 다합체 (예를 들어, 오합체, 육합체 등)를 합성하는데 쉽게 적합될 수 있다.

[0819] 단일 가닥에서 연쇄를 갖는 동중사합체성 siRNA는 합성장치에서 센스 가닥의 사합체를 제조하고 (각 센스 가닥은 개열가능한 링커를 통해 연결됨), 그리고 이후, 도 40에서 도시된 바와 같이, 표적화 리간드를 차후에 부가하고 안티센스 가닥을 어닐링함으로써 합성될 수 있다. 센스 가닥의 개열가능한 링커는 디설피드 (보여 지는 바와 같이) 또는 다른 불안정 연쇄 (예를 들어, 화학적으로 변형되지 않은 핵산 서열, 예를 들면, UUU/우리딘-우리딘-우리딘)일 수 있다.

[0820] 도 40에서 도시된 반응식에서 변이는 대안적 링커를 이용하고, 안티센스 가닥을 연결하고, 센스 가닥을 어닐링하여, 더욱 긴 다합체를 합성하는 것을 포함하거나, 또는 기계-기초된 합성의 기술적인 한계에 봉착하는 경우에, 하나 또는 그 이상의 다합체를 합성하고, 그리고 이후, 한 가지 또는 그 이상의 용액상 화학적 반응을 이용하여 상기 다합체를 함께 연결하는 것을 포함할 수 있다 (예를 들어, 반응식 1마다 2개의 사합체, 리간드가 있는 것 사합체 및 리간드가 없는 다른 사합체를 합성하고, 어느 한쪽 또는 양쪽 가닥은 타당하면, 연결을 용이하게 하는 기능기로 변형되고, 그리고 이후, 연결 모이어티, 예를 들면, 예로서 DTME의 부가와 함께 또는 부가 없이 공유 결합의 형성을 통해 이들 2개의 사합체를 함께 연결함).

[0821] 대안으로, 동중사합체는 교번하는 가닥에서 연쇄로 도 41에서 도시된 바와 같이 조립될 수 있었다.

[0822] 도 41에서, "-SH"는 술폰드릴 기를 나타내고, "Mal"은 DTME를 나타내고, "-CL-"은 개열가능한 링커를 나타낸다. 도면 41에서 도시된 반응식에서 변이는 대안적 링커를 이용하고 더욱 긴 다합체를 합성하는 것을 포함할 수 있다.

[0823] 실시예 21: 리간드 접합체의 합성

[0824] 도 41에서 도시된 리간드 접합체는 하기와 같이 합성될 수 있다:

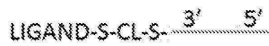
[0825] 단위체의 센스 및 안티센스 가닥 둘 모두의 3'-술폰드릴 유도체가 합성된다:



[0828] 각각의 부분은 상응하는 모노-말레이미드 유도체로 전환된다:

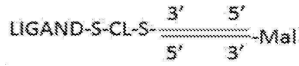


[0831] 이렇게 획득된 센스 가닥 말레이미드 유도체의 일부는 이후, 선택되는 표적화 리간드의 술폰드릴 유도체로 처리된다:



(구조체 65)

약간 물 과잉의 안티센스-말레이미드 유도체가 이후, 첨가되고, 그리고 원하는 리간드-ds-siRNA-말레이미드 산물이 예비 크로마토그래피에 의해 분리된다:



(구조체 66)

동종사합체의 약간 물 과잉의 각 센스 및 안티센스 성분이 이후, 도 41에서 개시된 바와 같이 상기 서열에서 부가되고, 각 단계에서 산물은 필요할 때, 예비 크로마토그래피에 의해 정제된다.

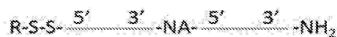
실시예 22: 다중결합 올리고뉴클레오타이드의 합성

본 발명에 따른 다중결합 올리고뉴클레오타이드는 본원에서 개시된 또는 선행 기술로부터 적합한 방법 중에서 어느 것에 의해 합성될 수 있다. 동종다합체에 대한 실례 방법이 아래에 제공되지만, 현재의 합성은 또한, 이종다합체를 합성하는데 쉽게 적용될 수 있다.

이들 실례는 또한, 상이한 길이의 다합체를 합성하는데 적용될 수 있다. 예를 들어, 사합체 및 단위체 (또는 삼합체 및 이합체)를 조합하여 오합체를 생산하기 위해 본질적으로 동일한 합성 및 연결 화학이 이용될 수 있다. 유사하게, 사합체 및 삼합체를 조합하여 칠합체 등을 생산할 수 있다. 상보성 연결 화학 (예를 들어, 클릭 화학)이 더욱 큰 다합체를 조립하는데 이용될 수 있다.

실시예 22A: 미리 합성된 동종이합체를 통한 siRNA의 동종사합체의 합성

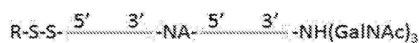
단계 1: 센스 가닥 동종이합체가 합성되는데, 여기서 2개의 센스 가닥은 뉴클레아제 개열가능한 올리고뉴클레오타이드 (NA)에 의해 연결되고 아미노 기능기 및 디설피드 모이어티로 종결된다.



(구조체 67)

개별 가닥 (이들 및 다른 단계를 위한)은 일반적인 절차: 단일 사슬 올리고뉴클레오타이드 합성 섹션에서 상기 개시된 바와 같이 합성된다. 올리고뉴클레오타이드 가닥 합성, 연결 및 화학적 변형을 위한 다른 방법은 선행 기술로부터 적용될 수 있다.

단계 2: 트리-안테나리 GalNAc 리간드가 이후, 아실 활성화된 트리안테나리 GalNAc 리간드와의 반응을 통해 센스 가닥 동종이합체의 한쪽 부분의 말단 아미노 기능기에 부가된다.



(구조체 68)

단계 3: 센스 가닥 동종이합체의 나머지 부분이 디설피드 기를 개열하기 위한 물 과잉의 디티오프레이톨로 처리되어 티올 종료된 센스 가닥 동종이합체가 산출된다.



(구조체 69)

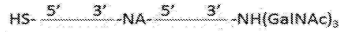
단계 4: 이러한 물질은 이종다합체를 제조하는데 이용된 절차에 따라서 디티오비스말레이미도에탄 (DTME)으로 단일유도체화된다 (상기 참조).



(구조체 70)

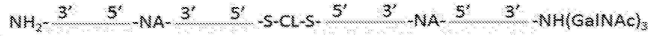
단계 5: GalNAc 유도체화된 동종이합체의 디설피드 기가 또한, 물 과잉의 디티오프레이톨로 처리에 의해 개열된

다.



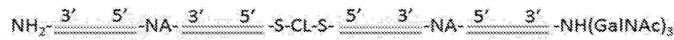
(구조체 71)

단계 6: GalNAc 종료된 동종이합체가 이후, 말단 티올-기의 반응을 통해 모노-DTME 유도체화된 동종이합체에 연결되어 단일 가닥 동종사합체가 산출된다. "-S-CL-S-"는 DTME 내에 개열가능한 디설피드 기, 예를 들면, 개열가능한 링커 (CL)를 나타낸다.



(구조체 72)

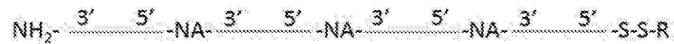
단계 7: 이러한 물질은 이후, 4 분자 당량의 안티센스 단위체와 어닐링되어 원하는 이중 가닥 동종사합체가 산출된다 (이러한 어닐링 단계는 임의선택적이고, 그리고 예로서, 단일 가닥 다합체, 예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제조하기 위해 제외될 수 있다).



(구조체 73)

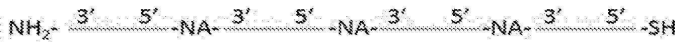
실시예 22B: 미리 합성된 동종이합체 및 동종사합체를 통한 siRNA의 동종육합체의 합성

단계 1: 센스 가닥 동종사합체가 합성되는데, 여기서 4개의 센스 가닥은 뉴클레아제 개열가능한 올리고뉴클레오타이드에 의해 연결되고 아미노 기능기 및 디설피드 모이어티로 종결된다.



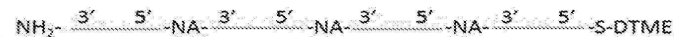
(구조체 74)

단계 2: 이러한 물질은 디설피드 기를 개열하기 위해 물 과잉의 디티오프레이톨로 처리된다.



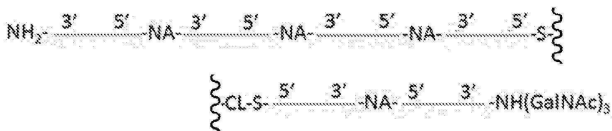
(구조체 75)

단계 3: 이러한 물질은 이중다합체를 제조하는데 이용된 절차에 따라서 디티오비스말레이미도에탄 (DTME)으로 단일유도체화된다 (상기 참조).



(구조체 76)

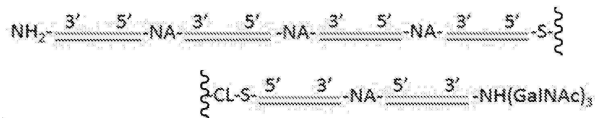
단계 4: 이러한 물질은 티올 종료된 GalNAc 동종이합체와 반응되어 단일 가닥 동종육합체가 산출된다.



(구조체 77)

주의: 구조체 77, 78, 81, 82, 89 및 91에서, 단일 연속 구조는 부호 S 에 의해 2 부분으로 나누어진다.

단계 5: 이러한 물질은 이후, 6 분자 당량의 안티센스 단위체와 어닐링되어 원하는 이중 가닥 동종육합체가 산출된다 (이러한 어닐링 단계는 임의선택적이고, 그리고 예로서, 단일 가닥 다합체, 예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제조하기 위해 제외될 수 있다).



[0879]

[0880]

(구조체 78)

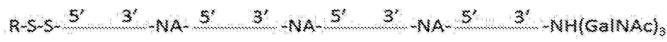
[0881]

실시예 22C: 미리 합성된 동종사합체를 통한 siRNA의 동종팔합체의 합성

[0882]

단계 1: 상기 합성된 아미노 말단 동종사합체의 한쪽 부분이 아실 활성화된 트리안테나리 GalNAc 리간드와의 반응에 의해 상응하는 GalNAc 유도체로 전환된다.

[0883]



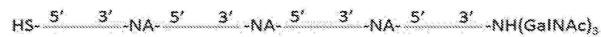
[0884]

(구조체 79)

[0885]

단계 2: 이러한 물질은 디설피드 기를 개열하기 위해 물 과잉의 디티오프레이톨로 처리된다.

[0886]

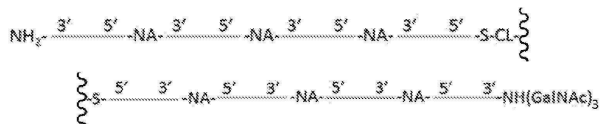


[0887]

(구조체 80)

[0888]

단계 3: 이러한 물질은 모노-DTME 유도체화된 사합체와 반응되어 말단 GalNAc 유도체화된 단일 가닥 팔합체가 산출된다.



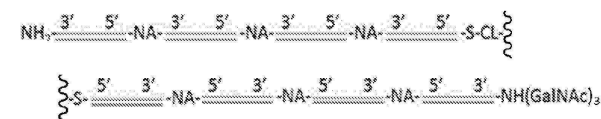
[0889]

[0890]

(구조체 81)

[0891]

단계 4: 이러한 물질은 이후, 8 분자 당량의 안티센스 단위체와 어닐링되어 원하는 이중 가닥 동종팔합체가 산출된다 (이러한 어닐링 단계는 임의선택적이고, 그리고 예로서, 단일 가닥 다합체, 예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오티드를 제조하기 위해 제외될 수 있다).



[0892]

[0893]

(구조체 82)

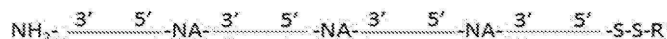
[0894]

실시예 22D: 티올/말레이미드 및 아지드/아세틸렌 ("클릭") 링커의 조합을 이용하여, 미리 합성된 동종사합체를 통한 안티센스 올리고뉴클레오티드의 동종십이합체의 합성

[0895]

단계 1: 3개의 뉴클레아제 개열가능한 올리고뉴클레오티드 링커 및 말단 디설피드 및 아미노 기를 내포하는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 동종사합체가 합성된다.

[0896]



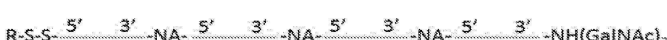
[0897]

(구조체 83)

[0898]

단계 2: 이러한 물질은 아실 활성화된 트리안테나리 GalNAc 리간드와의 반응에 의해 상응하는 GalNAc 유도체로 전환된다

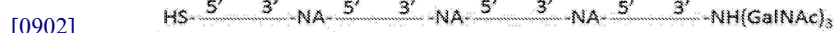
[0899]



[0900]

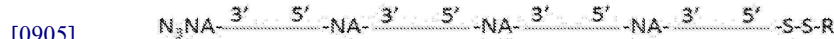
(구조체 84)

[0901] 단계 3: 이러한 물질은 디설피드 기를 개열하기 위해 물 과잉의 디티오프레이톨로 처리된다.



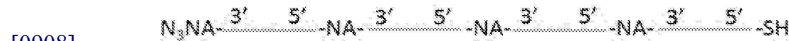
[0903] (구조체 85)

[0904] 단계 4: 별개로, 3개의 뉴클레아제 개열가능한 올리고뉴클레오타이드 링커 및 말단 디설피드 및 아지드 기를 내포하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 동종사합체가 합성된다.



[0906] (구조체 86)

[0907] 단계 5: 이러한 물질은 디설피드 기를 개열하기 위해 물 과잉의 디티오프레이톨로 처리된다.



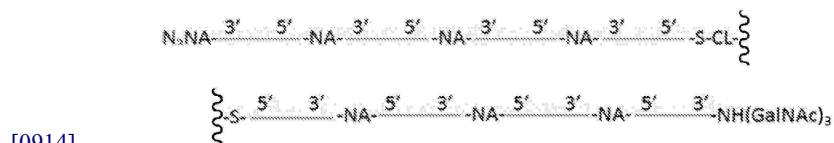
[0909] (구조체 87)

[0910] 단계 6: 이러한 물질은 siRNA 이중다합체를 제조하는데 이용된 절차에 따라서 디티오비스말레이미도에탄 (DTME)으로 단일유도체화된다 (상기 참조).



[0912] (구조체 88)

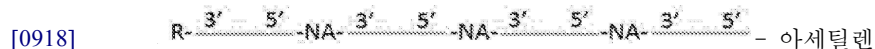
[0913] 단계 7: 이러한 물질은 티올-종료된 GalNAc 유도체화된 사합체와 반응되어 말단 GalNAc 유도체화된 단일 가닥 안티센스 팔합체가 산출된다.



[0915] (구조체 89)

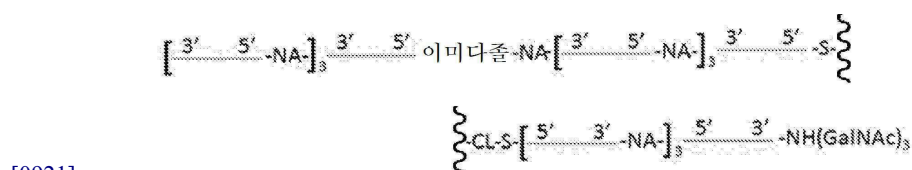
[0916] 단계 8: 별개로, 3개의 뉴클레아제 개열가능한 올리고뉴클레오타이드 링커 및 말단 아세틸렌 기를 내포하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 세 번째 동종사합체가 합성된다. 후자는 유도체화되지 않거나, 또는 입체적으로 변형된 유도체, 예를 들면, 디벤조시클로옥틴 (DBCO, Glen Research, VA, USA)일 수 있다.

[0917] 실시예 합성장치



[0919] (구조체 90)

[0920] 단계 9: 이러한 물질은 이후, 단계 7에서 제조된 아지드-종료된 팔합체와 반응되어 원하는 안티센스 동종십이합체가 산출된다. 만약 사합체에서 말단 아세틸렌이 유도체화되지 않으면, 연결을 달성하기 위해 금속 염 촉매제, 예를 들면, 구리 1 염화물이 필요할 것이다. 대조적으로 만약 말단 아세틸렌이 DBCO이면, 연계 반응은 자연발생적일 것이다.



[0922] (구조체 91)

[0923] 이러한 방법론, 또는 대안적 연결 화학을 이용하는 방법은 또한, 다른 길이의 다합체 (예를 들어, 9, 10, 11,

13, 14, 15, ... 올리고뉴클레오타이드)를 만드는데 이용될 수 있다. 이런 다합체는 단일 가닥 다합체를 상보성 올리고뉴클레오타이드와 어닐링함으로써 이중 가닥으로 만들어질 수 있다.

[0924] **실시예 23: 동종육합체 siRNA의 합성**

[0925] 생체개열가능한 연쇄의 2가지 직교 유형, i) 합성장치에서 쉽게 도입되는 변형되지 않은 디-뉴클레오타이드 연쇄 및 ii) 합성후 도입된 티올/말레이미드 유도체를 내포하는 FVII siRNA의 동종육합체가 작제되었다. FVII 동종육합체 (XD-09795)는 도 23에서 도해된 바와 같이, 동종이합체 (X30835) 및 동종사합체 (X30837)를 조합함으로써 조립되었다. 동종이합체 및 동종사합체 둘 모두 고체 지지체에서 표준 기술을 통해, 각 말단에서 아미노 기 및 디설피드 기를 갖도록 합성되었다. 차단해제 및 정제 후, 동종이합체 및 동종사합체는 이후, 티올/말레이미드 반응을 통해 함께 연결되고 안티센스 가닥 X18795와 어닐링되어 FVII 동종육합체 (XD-09795)가 제공되었다.

[0926] 단일 가닥 동종이합체 X30835, 단일 가닥 동종사합체 X30837, 결과의 단일 가닥 동종육합체 X30838뿐만 아니라 이중 가닥 육합체 XD-09795 및 이중 가닥 단위체 XD-09794의 서열은 표 15에서 도시된다.

[0927] 표 15: 실시예 23에서 올리고뉴클레오타이드의 서열

이중나선 ID	서열 번호:	ss-ID	서열 (5'-3')
	146	X30835	(DTME)(SHC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)dCdA gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)(NH2C6)
	147	X30837	(SHC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)dCdAgcAfaA fgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcC faAfcUfcAf (invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (i nvdT)(NH2C6)
XD09794	148	X18789	(NH2C6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)
	26	X18795	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu
XD09795	146 & 147	X30838	[(DTME)(SHC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)dCd AgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)(NH2C6)] (SHC6)g cAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGf uGfcCfaAfcUfcAf (invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUf cAf (invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)(N H2C6)
	26	X18795	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu

[0928]

[0929] **실시예 24: 동종육합체 siRNA의 합성에서 순도 및 수율**

[0930] 실시예 23에서 설명된 합성 단계는 각각, 도 24a-24b, 24c-24d, 24e 및 24f에서 HPLC 추적 데이터에 의해 제시 된 바와 같이, 중간 산물, 동종이합체 (X30835), 동종사합체 (X30837) 및 동종육합체 (X30878)뿐만 아니라 결과 의 dsRNA 동종육합체 (XD-09795)의 높은 수율 및 순도를 유발하였다.

[0931] **실시예 25: 동종육합체 siRNA 및 상응하는 단위체 사이에 생체내 순환 반감기의 비교**

[0932] FVII 동종육합체 XD-09795 및 상응하는 FVII 단위체 XD-09794의 혈청 반감기는 생쥐에서 결정되었다. 간단히 말 하면, 동종육합체 또는 상응하는 단위체는 코호트당 대략 11 주령의 4마리 C57/BL6N 암컷 생쥐의 3개 코호트 내 로 정맥내 (IV) 일시 주사를 통해 투여되었다. 용량은 FVII 단위체 및 FVII 육합체 둘 모두에 대해 20mg/kg이었 고, 그리고 혈액 표본은 IV 일시 주사 후 5, 30, 60 및 120 분에 뽑혀졌다. FVII 안티센스의 농도는 안티센스 가닥에 상보적인 형광 PNA 프로브를 통해 다양한 시점에서 결정되었고, 그리고 결과는 도 25에서 도시된다.

[0933] 도 25에서 도시된 바와 같이, 투여된 FVII 단위체 중에서 단지 대략 10%만 5 분 후 순환 상태에 있었고, 그리고 30 분 후에는 본질적으로 전부가 사라졌다. 대조적으로, 투여된 FVII 육합체 중에서 거의 모두가 5 분 후 순환 상태에 있었고, 30 분 후에는 초기 용량의 1/3이 남아있었다. 상기 데이터는 육합체의 생체내 순환 반감기가 단 위치체보다 거의 30-배 컸다는 것을 증명한다.

[0934] **실시예 26: MSD U-Plex 플랫폼을 이용하여 t= 5, 30, 60 및 120 분에서 채취된 혈액 표본 내에 사이토킨의 수준 의 결정**

[0935] 육합체에 대한 임의의 불리한 독물학적 반응을 사정하기 위해, MSD U-Plex 플랫폼을 이용하여 혈액 표본 내에 사이토킨 수준의 분석이 수행되었다. 단위체 XD-09794 및 동종육합체 XD-09795 처리된 코호트로부터 혈액 표본 이 다양한 시점에서 사이토킨 수준에 대해 분석되었다. 10가지 사이토킨 (IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, KC-GRO, TNF- α 및 GM-CSF)의 혈청 수준이 검정되고 도 26 a-j에서 도시되었다. 검정된 10가 지 사이토킨 중에서, 4가지 사이토킨의 혈청 수준은 단위체 및 육합체 사이에 변화가 없었고, 그리고 나머지 6 가지에서는 혈청 수준이 사실상 동일하였다.

[0936] 실시예 27: 동종다합체 합성

[0937] FVII mRNA를 향해 지향된 siRNA의 동종다합체는 하기의 서열을 이용하여 상기 방법론을 통해 제조되었다:

[0938] FVII 센스: 5'-gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)-3' (서열 번호:35)

[0939] FVII 안티센스: 5'-UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu-3' (서열 번호:26),

[0940] 이들 서열은 아래와 같이 엔도뉴클레아제 개열가능한 링커 dCdA 및 환원성으로 개열가능한 링커 DTME를 통해 연결됨:

[0941] 표 16A: 실시예 28-36에서 올리고뉴클레오타이드

서열 ID	형상/가닥
X18789	단위체 센스
X18795	단위체 안티센스
XD-09794	ds 단위체
X30833	이합체 센스
X18795	단위체 안티센스
XD-10635	ds 이합체
X34003	삼합체 센스
X18795	단위체 안티센스
XD-10636	ds 삼합체
X30836	사합체 센스
X18795	단위체 안티센스
XD-10637	ds 사합체
X-34004	오합체 센스
X18795	단위체 안티센스
XD-10638	ds 오합체
X34005	육합체 센스
X18795	단위체 안티센스
XD-10639	ds 육합체
X30837	사합체 센스 티올
X30834	이합체 센스 티올
X30835	이합체 센스-S-DTME
X30838	육합체 센스
X18795	단위체 안티센스
XD-09795	ds 육합체
X34006	오합체 센스 티올
X30834	이합체 센스 티올
X30835	이합체 센스-S-DTME
X34009	칠합체 센스
X18795	단위체 안티센스
XD-10640	ds 칠합체
X34007	육합체 센스 티올
X30834	이합체 센스 티올
X30835	이합체 센스-S-DTME
X34010	팔합체 센스
X18795	단위체 안티센스
XD-10641	ds 팔합체

[0942]

[0943] 표 16B:FVII siRNA 동중다합체 XD-10635, XD-10636, XD-06386, XD-10635

이중나 선 ID	서열 번호 :	단일 가닥 ID	서열 (5'-3')	형상
XD- 10635	149	X30833	(C6SSC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invT)C6NH2)	이합체
	26	X18795	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	
XD- 10636	150	X34003	(C6SSC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invT)C6NH2)	삼합체
	26	X18795	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	
XD- 06386	151	X30836	(C6SSC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invT)C6NH2)	사합체
	26	X18795	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	
XD- 10635	152	X34004	(C6SSC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invT)C6NH2)	오합체
	26	X18795	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	
XD- 06728	153	X34005	(C6SSC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invT)C6NH2)	육합체
	26	X18795	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	

[0944]

[0945] 실시예 28:FVII 단위체 XD-09794의 합성

[0946]

센스 가닥에서 5'-말단에서 아미노 기능기를 갖는 FVII siRNA의 단위체성 센스 가닥 X18789가 도 27a 및 27b에서 도시된 바와 같이 합성되고 정제되었다. 수율, 48.3 mg, 6.694 mmol, 18.6%. 상응하는 안티센스 가닥 X18795가 수율 46.3mg, 6.35 mmol, 31.9%로 유사하게 합성되었다. 5.35 mg (747.3 nmol)의 센스 가닥 및 5.45 mg (747.3 nmol)의 안티센스 가닥이 이후, 어닐링되어 10.8 mg (747.4 nmol)의 상응하는 이중 가닥 FVII 단위체 (XD-09794)가 산출되었다.

[0947]

실시예 29: FVII 이합체 XD-10635의 합성

[0948]

3'- 및 5'- 말단에서 각각 아미노 및 디설피드 기를 갖고 dCdA 개열가능한 링커를 내포하는 FVII siRNA X30833의 동중이합체성 센스 가닥이 도 28a 및 28b에서 도시된 바와 같이 합성되고 정제되었다. 수율, 35.8 mg, 6.694 mmol, 18.6%.

[0949]

5.51 mg (362.6 nmol)의 센스 가닥 X30833 및 5.29 mg (725.2 nmol)의 안티센스 가닥 X18795가 이후, 어닐링되어 10.8 mg (362.6 nmol)의 상응하는 이중 가닥 FVII 동중이합체 (XD-10635)가 산출되었다.

[0950]

실시예 30: FVII 삼합체 XD-10636의 합성

[0951]

3'- 및 5'- 말단에서 각각 아미노 및 디설피드 기를 갖고 2개의 dCdA 개열가능한 링커를 내포하는 FVII siRNA X34003의 동중삼합체성 센스 가닥이 도 29a 및 29b에서 도시된 바와 같이 합성되고 정제되었다. 수율, 19.6 mg (857.9 nmol, 19.3%).

[0952]

5.16 mg (225.5 nmol)의 센스 가닥 X34003 및 4.93 mg (676.5 nmol)의 안티센스 가닥 X18795가 이후, 어닐링되어 10.1 mg (225.5 nmol)의 상응하는 이중 가닥 FVII 동중삼합체 (XD-10636)가 산출되었다.

[0953]

실시예 31: FVII 사합체 XD-10637의 합성

[0954]

3'- 및 5'-말단에서 각각 아미노 및 디설피드 기를 갖고 3개의 dCdA 개열가능한 링커를 내포하는 FVII siRNA X30836의 동중사합체성 센스 가닥이 도 30a 및 30b에서 도시된 바와 같이 합성되고 정제되었다. 수율, 53.1 mg (1734.5 nmol, 13%).

[0955]

5.53mg (180.8 nmol)의 센스 가닥 X30836 및 5.27 mg (723.2 nmol)의 안티센스 가닥 X18795가 이후, 어닐링되어 10.8 mg (180.8 nmol)의 상응하는 이중 가닥 FVII 동중사합체 (XD-10637)가 산출되었다.

[0956]

실시예 32: FVII 오합체 XD-10638의 합성

[0957]

3'- 및 5'- 말단에서 각각 아미노 및 디설피드 기를 갖고 4개의 dCdA 개열가능한 링커를 내포하는 FVII siRNA

X34004의 동종오탁체성 센스 가닥이 도 31a 및 31b에서 도시된 바와 같이 합성되고 정제되었다. 수율, 35.9 mg (938 nmol, 10.6%).

[0958] 5.53mg (144.5 nmol)의 센스 가닥 X34004 및 5.27 mg (723.2 nmol)의 안티센스 가닥 X18795가 이후, 어닐링되어 10.8 mg (144.5 nmol)의 상응하는 이중 가닥 FVII 동종오탁체 (XD-10638)가 산출되었다.

[0959] **실시예 33: FVII 옥합체 XD-10639의 합성**

[0960] 3'- 및 5'- 말단에서 각각 아미노 및 디설피드 기를 갖고 5개의 dCdA 개열가능한 링커를 내포하는 FVII siRNA X34005의 동종옥합체성 센스 가닥이 도 32a 및 32b에서 도시된 바와 같이 합성되고 정제되었다. 수율, 21.4 mg (466.1 nmol, 5.3%).

[0961] 5.15mg (144.5 nmol)의 센스 가닥 X34005 및 4.89 mg (723.2 nmol)의 안티센스 가닥 X18795가 이후, 어닐링되어 10.04 mg (111.9 nmol)의 상응하는 이중 가닥 FVII 동종옥합체 (XD-10639)가 산출되었다.

[0962] **실시예 34: FVII 옥합체 XD-09795의 합성**

[0963] 도 33a-33b에서 도시된 바와 같이, 3' 말단 둘 모두에서 아미노 기를 갖고, 그리고 4개의 dCdA 개열가능한 링커 및 1개의 환원성으로 개열가능한 DTME 링커를 내포하는 FVII siRNA X30838의 동종옥합체성 센스 가닥이 실시예 28 및 30에서 제조된 FVII siRNA X30833의 동종이합체성 센스 가닥 및 FVII siRNA X30836의 동종사합체성 센스 가닥을 통해 합성되고 정제되었다. DTT를 이용하여 X30833 및 X30836으로부터 디설피드 기가 개열되어, 각각 97.6% 및 91.9% 수율에서 상응하는 5-티올 유도체 X30834 및 X30837이 제공되었다. 전술된 절차를 이용하여, 14.9 mg (986.7 nmol)의 X30834가 이후, 10.6 mg (700.5 nmol, 71.0%)의 상응하는 모노-DTME 유도체 X30835로 전환되었고, 이것은 1 당량의 X30837과 반응되어 4.2mg (90.7 nmol, 64%)의 단일 가닥 동종옥합체 X30838이 제공되었다. 3.8mg (83 nmol)의 센스 가닥 X30838 및 3.7 mg (502 nmol, 6 몰 당량)의 안티센스 가닥 X18795가 이후, 어닐링되어 7.5 mg (83.7 nmol)의 상응하는 이중 가닥 FVII 동종옥합체 (XD-09795)가 산출되었다.

[0964] **실시예 35: FVII 칠합체 XD-10640의 합성**

[0965] 도 34a-34b에서 도시된 바와 같이, 3' 말단 둘 모두에서 아미노 기를 갖고 5개의 dCdA 개열가능한 링커를 내포하는 FVII siRNA X34009의 동종칠합체성 센스 가닥이 FVII siRNA X30833의 동종이합체성 센스 가닥 및 FVII siRNA X34004의 동종오탁체성 센스 가닥을 통해 합성되고 정제되었다. DTT를 이용하여 X30833 및 X34004로부터 디설피드 기가 개열되어 각각, 상응하는 5-티올 유도체 X30834 (28.3mg, 1877.9 nmol, 86.7%) 및 X34006 (21.8 mg, 572.2 nmol)이 제공되었다. 전술된 절차를 이용하여, X30834가 이후, 상응하는 모노-DTME 유도체 X30835 (22.6 mg, 1465.2 nmol, 78.1%)로 전환되었다. 8.8 mg (572.2 nmol)의 X30835가 X34006 (21.8mg, 572.2 nmol)과 반응되어 단일 가닥 동종칠합체 X34009 (8.96 mg, 167.3 nmol, 29.2%)가 제공되었다. 5.53 mg, (103.3 nmol)의 센스 가닥 X34009 및 5.27 mg (723.1 nmol)의 안티센스 가닥 X18795가 이후, 어닐링되어 10.8 mg (103.3 nmol)의 상응하는 이중 가닥 FVII 동종칠합체 (XD-10640)가 산출되었다.

[0966] **실시예 36: FVII 팔합체 XD-10641의 합성**

[0967] 도 35a-35b에서 도시된 바와 같이, 3' 말단 둘 모두에서 아미노를 갖고 6개의 dCdA 개열가능한 링커를 내포하는 FVII siRNA X34010의 동종팔합체성 센스 가닥이 FVII siRNA X30833의 동종이합체성 센스 가닥 및 FVII siRNA X34005의 동종옥합체성 센스 가닥을 통해 합성되고 정제되었다. DTT를 이용하여 X34005로부터 디설피드 기가 개열되어 상응하는 5-티올 유도체 X34007 (11.5mg, 251nmol, 99.7%)이 제공되었고, 이것은 이전에 획득된 모노-DTME 동종이합체 유도체 X30835 (3.85mg, 250.2 nmol)와 반응되어 단일 가닥 동종팔합체 X34010 (5.2 mg, 85.0 nmol, 34.0%)이 제공되었다. 4.92 mg (80.33 nmol)의 센스 가닥 X34010 및 4.68 mg (642.4 nmol)의 안티센스 가닥 X18795가 이후, 어닐링되어 9.6 mg (80.3 nmol)의 상응하는 이중 가닥 FVII 동종팔합체 (XD-10641)가 산출되었다.

[0968] **실시예 37: 동물 실험**

[0969] 동종다합체 XD-10635, XD-10636, XD-10637, XD-10638, XD-10639, XD-10640 및 XD-10641, 그리고 상응하는 단위체 XD-09794의 혈청 반감기는 코호트당 대략 11 주령의 4마리 C57/BL6N 암컷 생쥐의 3개 코호트 내로 꼬리 정맥을 통해 x1 PBS에서 1ng/ml의 농도에서 검사 물질의 iv 일시 주사에 의해 결정되었다. 용량은 FVII 단위체 및 FVII 다합체 둘 모두에 대해 20mg/kg이었고, 그리고 혈액 표본은 5, 30, 60, 120 및 360 분에서 뽑혀졌다. 혈청 표본은 단백질을 분해효소 K로 소화되었고, 그리고 특정한 상보성 Atto425-웹티드 핵산-형광 프로브가 안티센스 가닥에 혼성화되었다. 후속 AEX-HPLC 분석은 대사산물로부터 무손상 안티센스 가닥의 식별을 가능하게 하여, 상기

방법의 높은 특이성을 이끌어냈다. 무손상 부모 화합물에 대한 값만 각각, 시간의 추이에서 FVII 다합체에 대한 혈청 내에 FVII siRNA 수준의 평활선 산점도 및 곧게 표시된 산점도로서 아래의 표 17에서 도시되고, 그리고 도 36a 및 36b에서 도해된다.

표 17: 시간에 따라 FVII 동중-다합체에 대한 혈청 내 FVII siRNA 농도.

분석 ID	LLOQ	동물 ID	그룹	용량 수준	성별	시점	[FVII] ng/mL
식염	1 ng/mL	S1	25	0 mg/kg	F	7 일	BLOQ
식염	1 ng/mL	S2	25	0 mg/kg	F	7 일	BLOQ
식염	1 ng/mL	S3	25	0 mg/kg	F	7 일	BLOQ
식염	1 ng/mL	S4	25	0 mg/kg	F	7 일	BLOQ
						평균	BLOQ
						SD	n.a.
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A1	1	20 mg/kg	F	5 분	30,988.3
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A2	1	20 mg/kg	F	5 분	32,628.0
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A3	1	20 mg/kg	F	5 분	37,508.9
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A4	1	20 mg/kg	F	5 분	35,858.3
						평균	34,245.9
						SD	2,970.8
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A5	2	20 mg/kg	F	30 분	3,107.0
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A6	2	20 mg/kg	F	30 분	3,520.2
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A7	2	20 mg/kg	F	30 분	3,371.1
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A8	2	20 mg/kg	F	30 분	2,664.5
						평균	3,165.7
						SD	375.3
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A1	1	20 mg/kg	F	1 시간	1,339.8
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A2	1	20 mg/kg	F	1 시간	953.0
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A3	1	20 mg/kg	F	1 시간	1,435.8
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A4	1	20 mg/kg	F	1 시간	1,730.9
						평균	1,364.9
						SD	321.1
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A5	2	20 mg/kg	F	2 시간	598.8
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A6	2	20 mg/kg	F	2 시간	202.7
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A7	2	20 mg/kg	F	2 시간	302.5
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A8	2	20 mg/kg	F	2 시간	124.6

분석 ID	LLoQ	동물 ID	그룹	용량 수준	성별	시점	[FVII] ng/mL
						평균	307.2
						SD	207.6
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A9	3	20 mg/kg	F	6 시간	4.2
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A10	3	20 mg/kg	F	6 시간	4.0
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A11	3	20 mg/kg	F	6 시간	3.5
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A12	3	20 mg/kg	F	6 시간	14.5
						평균	6.6
						SD	5.3
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A9	3	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A10	3	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A11	3	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
단량체 XD-09794	1 ng/mL	A12	3	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
						평균	BLOQ
						SD	n.a.
						SD	
이합체 XD-10635	1 ng/mL	B1	4	20 mg/kg	F	5 분	82,272.1
이합체 XD-10635	1 ng/mL	B2	4	20 mg/kg	F	5 분	90,574.4
이합체 XD-10635	1 ng/mL	B3	4	20 mg/kg	F	5 분	94,213.6
이합체 XD-10635	1 ng/mL	B4	4	20 mg/kg	F	5 분	92,612.6
						평균	89,918.2
						SD	5,310.5
이합체 XD-10635	1 ng/mL	B5	5	20 mg/kg	F	30 분	6,107.7
이합체 XD-10635	1 ng/mL	B6	5	20 mg/kg	F	30 분	5,204.0
이합체 XD-10635	1 ng/mL	B7	5	20 mg/kg	F	30 분	7,221.8
이합체 XD-10635	1 ng/mL	B8	5	20 mg/kg	F	30 분	6,677.9
						평균	6,302.9
						SD	862.3
이합체 XD-10635	1 ng/mL	B1	4	20 mg/kg	F	1 시간	2,114.2
이합체 XD-10635	1 ng/mL	B2	4	20 mg/kg	F	1 시간	2,911.0

[0972]

분석 ID	LOQ	동물 ID	그룹	용량 수준	성별	시점	[FVII] ng/mL
이합제 XD-10635	1 ng/mL	B3	4	20 mg/kg	F	1 시간	2,722.5
이합제 XD-10635	1 ng/mL	B4	4	20 mg/kg	F	1 시간	2,092.7
						평균	2,460.1
						SD	419.0
이합제 XD-10635	1 ng/mL	B5	5	20 mg/kg	F	2 시간	558.0
이합제 XD-10635	1 ng/mL	B6	5	20 mg/kg	F	2 시간	348.9
이합제 XD-10635	1 ng/mL	B7	5	20 mg/kg	F	2 시간	2,718.7
이합제 XD-10635	1 ng/mL	B8	5	20 mg/kg	F	2 시간	549.0
						평균	1,043.7
						SD	1,120.9
이합제 XD-10635	1 ng/mL	B9	6	20 mg/kg	F	6 시간	16.9
이합제 XD-10635	1 ng/mL	B10	6	20 mg/kg	F	6 시간	19.6
이합제 XD-10635	1 ng/mL	B11	6	20 mg/kg	F	6 시간	30.3
이합제 XD-10635	1 ng/mL	B12	6	20 mg/kg	F	6 시간	1,273.8
						평균	335.2
						SD	625.8
이합제 XD-10635	1 ng/mL	B9	6	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
이합제 XD-10635	1 ng/mL	B10	6	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
이합제 XD-10635	1 ng/mL	B11	6	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
이합제 XD-10635	1 ng/mL	B12	6	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
						평균	BLOQ
						SD	n.a.
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C1	7	20 mg/kg	F	5 분	144,194.8
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C2	7	20 mg/kg	F	5 분	172,691.1
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C3	7	20 mg/kg	F	5 분	155,857.5
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C4	7	20 mg/kg	F	5 분	147,988.0
						평균	155,182.9
						SD	12,642.5

[0973]

분석 ID	LLOQ	동물 ID	그룹	용량 수준	성별	시점	[FV11] ng/mL
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C5	8	20 mg/kg	F	30 분	15,887.3
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C6	8	20 mg/kg	F	30 분	16,202.8
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C7	8	20 mg/kg	F	30 분	17,932.3
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C8	8	20 mg/kg	F	30 분	17,537.3
						평균	16,889.9
						SD	997.2
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C1	7	20 mg/kg	F	1 시간	6,276.1
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C2	7	20 mg/kg	F	1 시간	3,939.7
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C3	7	20 mg/kg	F	1 시간	4,018.8
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C4	7	20 mg/kg	F	1 시간	4,884.4
						평균	4,779.8
						SD	1,085.5
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C5	8	20 mg/kg	F	2 시간	102.7
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C6	8	20 mg/kg	F	2 시간	197.9
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C7	8	20 mg/kg	F	2 시간	1,680.9
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C8	8	20 mg/kg	F	2 시간	469.5
						평균	612.8
						SD	728.9
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C9	9	20 mg/kg	F	6 시간	32.7
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C10	9	20 mg/kg	F	6 시간	8.0
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C11	9	20 mg/kg	F	6 시간	27.5
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C12	9	20 mg/kg	F	6 시간	12.1
						평균	20.1
						SD	11.9
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C9	9	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C10	9	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C11	9	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
삼합제 XD-10636	1 ng/mL	C12	9	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ

[0974]

분석 ID	LLOQ	동물 ID	그룹	용량 수준	성별	시점	[FVII] ng/mL
						평균	BLOQ
						SD	n.a.
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D1	10	20 mg/kg	F	5 분	174,506.7
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D2	10	20 mg/kg	F	5 분	184,149.5
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D3	10	20 mg/kg	F	5 분	180,077.0
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D4	10	20 mg/kg	F	5 분	204,796.1
						평균	185,882.3
						SD	13,214.1
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D5	11	20 mg/kg	F	30 분	89,104.1
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D6	11	20 mg/kg	F	30 분	88,408.8
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D7	11	20 mg/kg	F	30 분	79,389.4
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D8	11	20 mg/kg	F	30 분	83,820.0
						평균	85,180.6
						SD	4,516.8
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D1	10	20 mg/kg	F	1 시간	25,278.6
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D2	10	20 mg/kg	F	1 시간	24,494.1
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D3	10	20 mg/kg	F	1 시간	23,070.4
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D4	10	20 mg/kg	F	1 시간	31,567.0
						평균	26,102.5
						SD	3,755.9
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D5	11	20 mg/kg	F	2 시간	9,191.5
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D6	11	20 mg/kg	F	2 시간	8,969.4
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D7	11	20 mg/kg	F	2 시간	5,059.5
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D8	11	20 mg/kg	F	2 시간	14,666.2
						평균	9,471.7
						SD	3,948.9
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D9	12	20 mg/kg	F	6 시간	15.4
사합제	1 ng/mL	D10	12	20 mg/kg	F	6 시간	254.3

[0975]

분석 ID	LLOQ	동물 ID	그룹	용량 수준	성별	시점	[FVII] ng/mL
XD-10637							
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D11	12	20 mg/kg	F	6 시간	58.3
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D12	12	20 mg/kg	F	6 시간	17.5
						평균	86.4
						SD	113.7
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D9	12	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D10	12	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D11	12	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
사합제 XD-10637	1 ng/mL	D12	12	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
						평균	BLOQ
						SD	n.a.
오합제 XD-10638	1 ng/mL	E1	13	20 mg/kg	F	5 분	201,669.6
오합제 XD-10638	1 ng/mL	E2	13	20 mg/kg	F	5 분	214,525.8
오합제 XD-10638	1 ng/mL	E3	13	20 mg/kg	F	5 분	247,544.7
오합제 XD-10638	1 ng/mL	E4	13	20 mg/kg	F	5 분	207,872.5
						평균	217,903.2
						SD	20,446.4
오합제 XD-10638	1 ng/mL	E5	14	20 mg/kg	F	30 분	112,318.2
오합제 XD-10638	1 ng/mL	E6	14	20 mg/kg	F	30 분	110,786.0
오합제 XD-10638	1 ng/mL	E7	14	20 mg/kg	F	30 분	94,714.7
오합제 XD-10638	1 ng/mL	E8	14	20 mg/kg	F	30 분	47,610.6
						평균	91,357.4
						SD	30,231.8
오합제 XD-10638	1 ng/mL	E1	13	20 mg/kg	F	1 시간	48,800.2
오합제 XD-10638	1 ng/mL	E2	13	20 mg/kg	F	1 시간	46,770.8
오합제 XD-10638	1 ng/mL	E3	13	20 mg/kg	F	1 시간	57,711.0
오합제 XD-10638	1 ng/mL	E4	13	20 mg/kg	F	1 시간	42,458.4
						평균	48,935.1

[0976]

분석 ID	LLOQ	동물 ID	그룹	용량 수준	성별	시점	[FVII] ng/mL
						SD	6,420.4
오함제 XD-10638	1 ng/mL	E5	14	20 mg/kg	F	2 시간	19,806.0
오함제 XD-10638	1 ng/mL	E6	14	20 mg/kg	F	2 시간	20,633.6
오함제 XD-10638	1 ng/mL	E7	14	20 mg/kg	F	2 시간	18,214.2
오함제 XD-10638	1 ng/mL	E8	14	20 mg/kg	F	2 시간	27,970.4
						평균	21,656.1
						SD	4,327.6
오함제 XD-10638	1 ng/mL	E9	15	20 mg/kg	F	6 시간	16.4
오함제 XD-10638	1 ng/mL	E10	15	20 mg/kg	F	6 시간	15.7
오함제 XD-10638	1 ng/mL	E11	15	20 mg/kg	F	6 시간	14.2
오함제 XD-10638	1 ng/mL	E12	15	20 mg/kg	F	6 시간	49.4
						평균	23.9
						SD	17.0
오함제 XD-10638	1 ng/mL	E9	15	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
오함제 XD-10638	1 ng/mL	E10	15	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
오함제 XD-10638	1 ng/mL	E11	15	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
오함제 XD-10638	1 ng/mL	E12	15	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
						평균	BLOQ
						SD	n.a.
옥함제 XD-10639	1 ng/mL	F1	16	20 mg/kg	F	5 분	221,882.0
옥함제 XD-10639	1 ng/mL	F2	16	20 mg/kg	F	5 분	227,901.1
옥함제 XD-10639	1 ng/mL	F3	16	20 mg/kg	F	5 분	230,969.3
옥함제 XD-10639	1 ng/mL	F4	16	20 mg/kg	F	5 분	229,232.9
						평균	227,496.3
						SD	3,948.1
옥함제 XD-10639	1 ng/mL	F5	17	20 mg/kg	F	30 분	125,871.8
옥함제 XD-10639	1 ng/mL	F6	17	20 mg/kg	F	30 분	145,598.8
옥함제	1 ng/mL	F7	17	20 mg/kg	F	30 분	76,775.7

[0977]

분석 ID	LLOQ	동물 ID	그룹	용량 수준	성별	시점	[FVI1] ng/mL
XD-10639							
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F8	17	20 mg/kg	F	30 분	107,085.3
						평균	113,832.9
						SD	29,284.7
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F1	16	20 mg/kg	F	1 시간	69,114.9
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F2	16	20 mg/kg	F	1 시간	76,580.8
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F3	16	20 mg/kg	F	1 시간	68,920.5
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F4	16	20 mg/kg	F	1 시간	78,412.0
						평균	73,257.1
						SD	4,952.6
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F5	17	20 mg/kg	F	2 시간	25,963.0
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F6	17	20 mg/kg	F	2 시간	33,380.4
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F7	17	20 mg/kg	F	2 시간	19,372.0
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F8	17	20 mg/kg	F	2 시간	31,798.1
						평균	27,628.4
						SD	6,361.7
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F9	18	20 mg/kg	F	6 시간	52.7
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F10	18	20 mg/kg	F	6 시간	33.1
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F11	18	20 mg/kg	F	6 시간	69.4
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F12	18	20 mg/kg	F	6 시간	47.3
						평균	50.6
						SD	15.0
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F9	18	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F10	18	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F11	18	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
옥합제 XD-10639	1 ng/mL	F12	18	20 mg/kg	F	7 일	3.4
						평균	BLOQ
						SD	n.a.
칠합제	1 ng/mL	G1	19	20 mg/kg	F	5 분	189,155.8

[0978]

분석 ID	LLOQ	동물 ID	그룹	용량 수준	성별	시점	[FVII] ng/mL
XD-10640							
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G2	19	20 mg/kg	F	5 분	203,092.8
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G3	19	20 mg/kg	F	5 분	227,234.0
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G4	19	20 mg/kg	F	5 분	266,250.0
						평균	221,433.2
						SD	33,765.8
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G5	20	20 mg/kg	F	30 분	123,590.6
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G6	20	20 mg/kg	F	30 분	119,556.1
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G7	20	20 mg/kg	F	30 분	120,686.6
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G8	20	20 mg/kg	F	30 분	142,606.4
						평균	126,609.9
						SD	10,798.9
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G1	19	20 mg/kg	F	1 시간	73,022.3
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G2	19	20 mg/kg	F	1 시간	58,856.0
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G3	19	20 mg/kg	F	1 시간	64,204.3
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G4	19	20 mg/kg	F	1 시간	74,596.0
						평균	67,669.7
						SD	7,445.7
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G5	20	20 mg/kg	F	2 시간	13,907.3
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G6	20	20 mg/kg	F	2 시간	12,667.2
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G7	20	20 mg/kg	F	2 시간	17,123.0
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G8	20	20 mg/kg	F	2 시간	24,537.2
						평균	17,058.7
						SD	5,327.6
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G9	21	20 mg/kg	F	6 시간	45.5
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G10	21	20 mg/kg	F	6 시간	151.3
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G11	21	20 mg/kg	F	6 시간	56.1
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G12	21	20 mg/kg	F	6 시간	58.7
						평균	77.9

[0979]

분석 ID	LLOQ	동물 ID	그룹	용량 수준	성별	시점	[FVII] ng/mL
						SD	49.3
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G9	21	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G10	21	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G11	21	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
칠합제 XD-10640	1 ng/mL	G12	21	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
						평균	BLOQ
						SD	n.a.
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H1	22	20 mg/kg	F	5 분	203,428.1
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H2	22	20 mg/kg	F	5 분	231,234.5
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H3	22	20 mg/kg	F	5 분	243,057.5
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H4	22	20 mg/kg	F	5 분	246,973.6
						평균	231,173.4
						SD	19,669.6
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H5	23	20 mg/kg	F	30 분	152,545.2
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H6	23	20 mg/kg	F	30 분	116,917.0
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H7	23	20 mg/kg	F	30 분	127,392.7
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H8	23	20 mg/kg	F	30 분	119,659.9
						평균	129,128.7
						SD	16,228.9
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H1	22	20 mg/kg	F	1 시간	59,270.6
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H2	22	20 mg/kg	F	1 시간	67,819.6
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H3	22	20 mg/kg	F	1 시간	74,942.8
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H4	22	20 mg/kg	F	1 시간	75,228.9
						평균	69,315.5
						SD	7,522.7
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H5	23	20 mg/kg	F	2 시간	37,353.7
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H6	23	20 mg/kg	F	2 시간	16,390.7
팔합제	1 ng/mL	H7	23	20 mg/kg	F	2 시간	27,527.3

분석 ID	LLOQ	동물 ID	그룹	용량 수준	성별	시점	[FVII] ng/mL
XD-10641							
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H8	23	20 mg/kg	F	2 시간	20,359.7
						평균	25,407.9
						SD	9,201.2
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H9	24	20 mg/kg	F	6 시간	81.2
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H10	24	20 mg/kg	F	6 시간	76.9
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H11	24	20 mg/kg	F	6 시간	162.5
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H12	24	20 mg/kg	F	6 시간	138.5
						평균	114.8
						SD	42.4
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H9	24	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H10	24	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H11	24	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
팔합제 XD-10641	1 ng/mL	H12	24	20 mg/kg	F	7 일	BLOQ
						평균	BLOQ
						SD	n.a.

도 37a, 37b, 37c 및 37d는 각각 5 분, 30 분, 60 분, 및 120 분에서의 FVII 다합체에 대한 혈청 내의 FVII siRNA 수준의 막대 차트 그래프를 도시한다.

도 38a 및 38b는 ng*분/mL단위의 FVII 다합체에 대한 곡선하 면적으로 표시되고 단량체 AUC 값으로 표준화된 혈청 중의 총 FVII siRNA 수준을 나타낸다.

[0984] 표 18:FVII siRNA 단량체 및 다합체에 대한 곡선 값 하의 면적.

	단량체	이합체	삼합체	사합체	오합체	육합체	칠합체	팔합체
5	34,245.0	82272	155182	185882	217903	227496	221433	231173
30	3,165.0	6302	16889	85180	91357	133832	126609	129128
60	1,364.0	2460	4779	26102	48935	73257	67669	69315
120	307.0	1043	612	9471	21656	27268	17058	25407
360	6.6	625	20	86	23.9	50.6	77	115
총 AUC (min * ng / mL)	621727	1604630	2713490	7271583	10689448	13420917	11862813	13384588
AUC, 단량체로 정규화됨	1.0	2.6	4.4	11.7	17.2	21.6	19.1	21.5

[0985]

[0986] 다합체의 혈청 반감기는 하기 식에 따라 비선형 1 상 감쇠를 사용하여 FVII 농도 자료로부터 계산하였다:

[0987] $Y = (Y_0 - \text{안정기}) * \exp(-k * x) + \text{안정기}$

[0988] 상기 Y는 시간 X에서의 농도이고 반감기는 $2/k$ 의 자연로그이다. 초기 조건과 최종 조건에 관한 4 가지 상이한 가정은 하기와 같이 적용되었다:

[0989] 1:자료에 대한 가정은 없다

[0990] 2:모든 siRNA가 동일한 초기 농도로 주입되었다 (즉, $t=0$ 에서의 농도는 모두에 대해 동일함).

[0991] 3:모든 siRNA 농도는 모두 $t=\infty$ 에서 0으로 감소한다.

[0992] 4:모든 siRNA를 동일한 초기 농도 (즉, $t=0$ 에서의 농도는 모두에서 동일함)로 주입하였고 모든 siRNA 농도는 모두 $t=\infty$ 에서 0으로 감소하였다.

[0993] 표 19:FVII siRNA 동중-다합체의 계산된 혈청 반감기.

	단량체	이합체	삼합체	사합체	오합체	육합체	칠합체	팔합체
½ 수명, 가정 없음 (분)	7.10	6.10	7.63	20.82	20.65	29.1	31.66	30.81
½ 수명, 0 (분)에 모든 샘플 안정기	7.37	6.59	7.93	21.23	23.38	31.50	31.62	31.92
½ 수명, 모든 샘플은 동일한 초기 값 = 231173 으로 시작함	1.80	3.61	8.39	19.29	24.21	33.65	35.07	36.63
½ 수명, 모든 샘플은 동일한 초기 값 = 123173 으로 시작하고, 0(분)에 안정기입	1.81	3.68	8.45	19.88	25.83	34.72	34.39	36.49

[0994]

[0995] 실시예 38: FVII siRNA 동중다합체가 5 분에 단량체와 동일한 FVII siRNA 농도에 도달하는데 걸리는 시간 계산.

[0996] 단량체의 FVII 농도가 이미 유의미하게 제1 샘플 시간 (5분)에 주입된 것의 50% 미만이었고, 다합체의 혈청 FVII 수준이 5분에서 단량체의 혈청 FVII 수준과 동일하게 되는데 걸리는 시간도 또한 하기 식을 사용하여 계산하였다:

[0997] $Y = (Y_0 - \text{안정기}) * \exp(-k * x) + \text{안정기}$

[0998] 식 중, 안정기는 5 분에서 단량체의 농도 (34,245 ng/ml)로 설정하였고 도 39에 나타내었다.

[0999] 하기 계산을 수행하여 FVII siRNA 동중-다합체가 5분에서 FVII siRNA 단량체의 농도에 도달하는 시간을 분으로 측정하였다:

[1000] $Y = (Y_0 - \text{안정기}) * \exp(-k * x) + \text{안정기}$, 식 중, x는 시간(분)이고

[1001] $34245 = (231173 - 0) * e^{(-kx)} + 0$, 식 중, x는 분이고

[1002] $34245 = 231173 * e^{(-kx)}$

[1003] $0.14813453 = e^{-kx}$

[1004] $\ln(0.14813453) = -kx$

[1005] -1.909625779 = kx

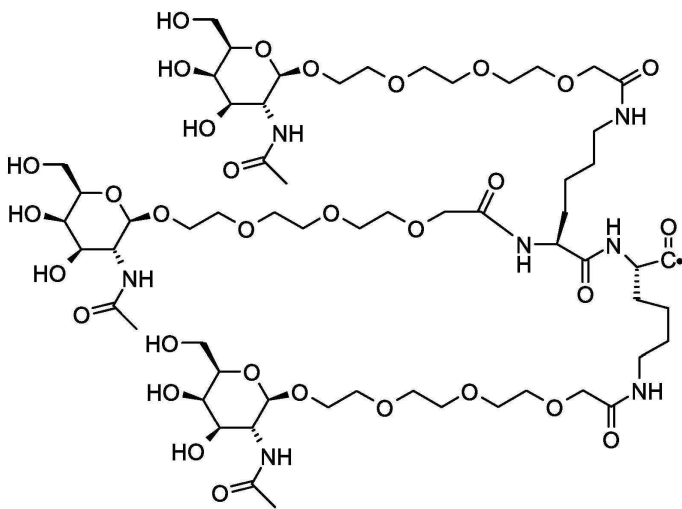
[1006] 표 20:FVII siRNA homo-다합체가 5 분에 FVII siRNA 단량체의 농도에 도달할 때까지 계산된 시간.

	단량체	이합체	삼합체	사합체	오합체	육합체	칠합체	팔합체
상이한 작제물에 대한 k 값	0.3819	0.1882	0.08203	0.03487	0.02683	0.01996	0.02015	0.019
시간(분)	5.0	10.1	23.3	54.8	71.2	95.7	94.8	100.5

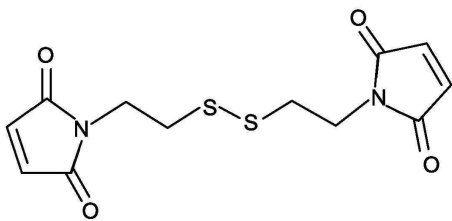
[1007]

도면

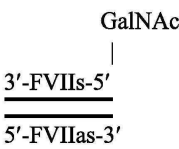
도면1a



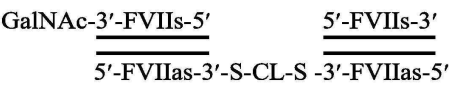
도면1b



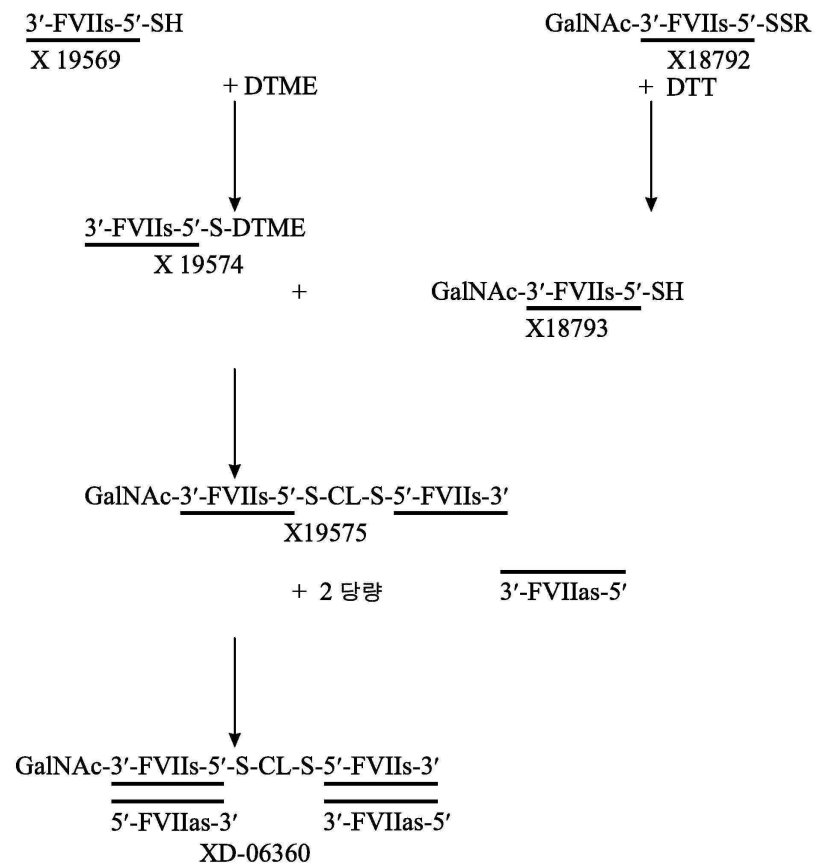
도면2



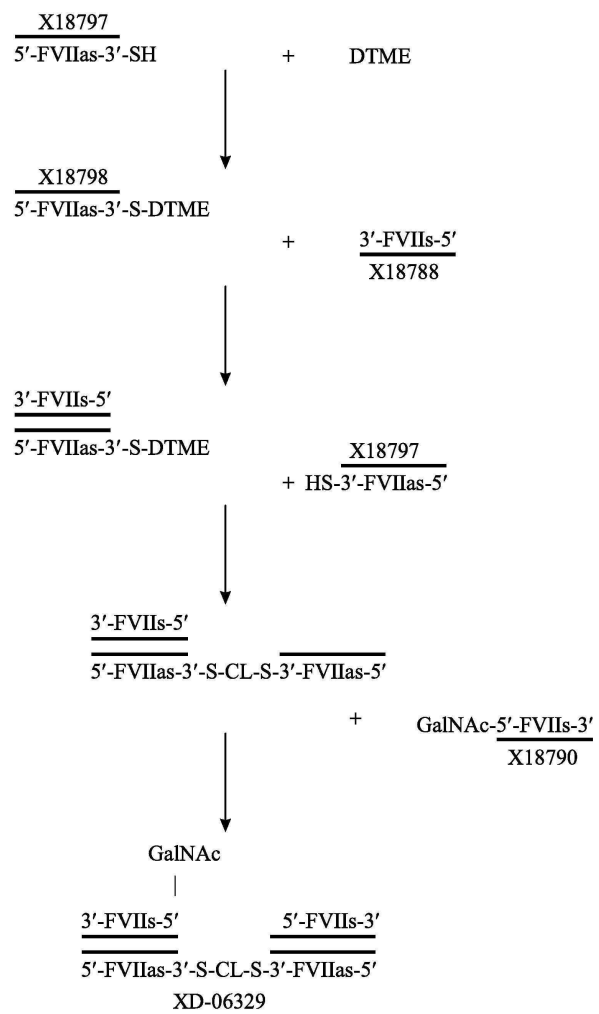
도면3



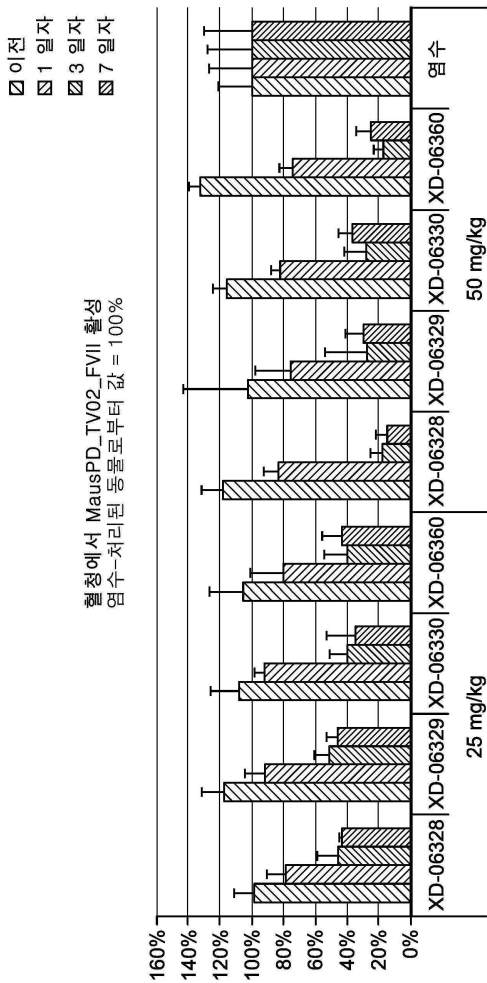
도면4



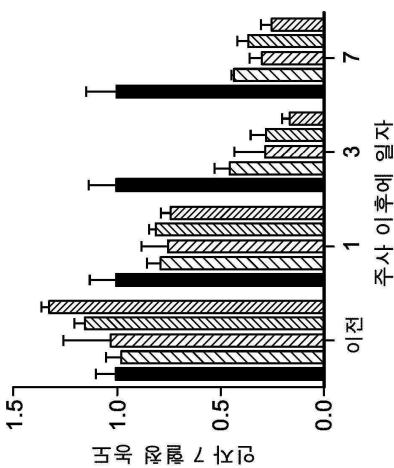
도면5



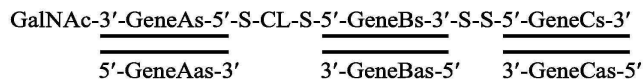
도면6



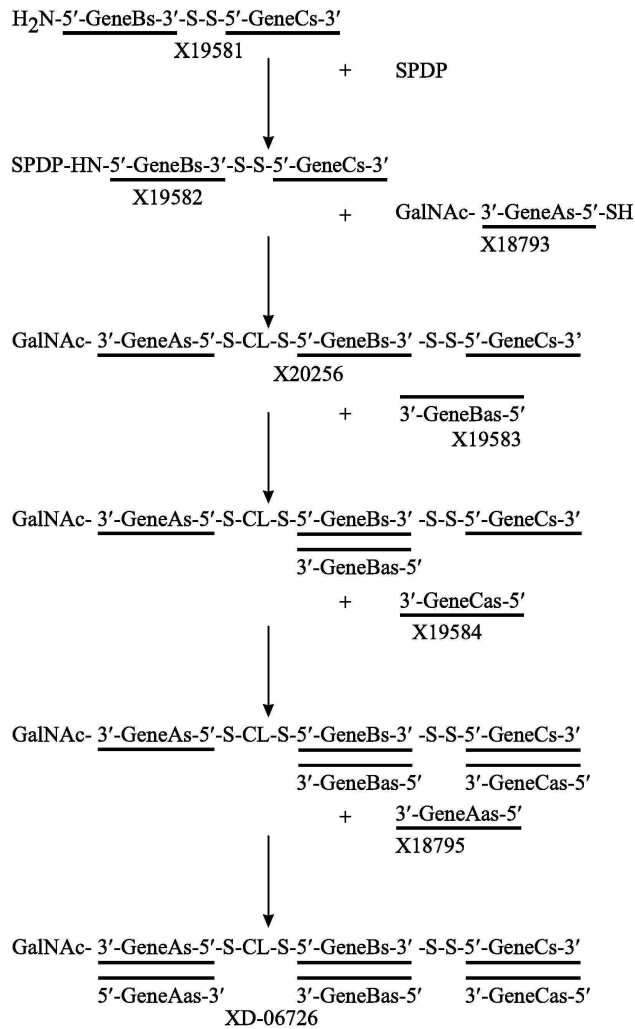
도면7a



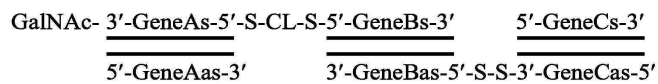
도면9



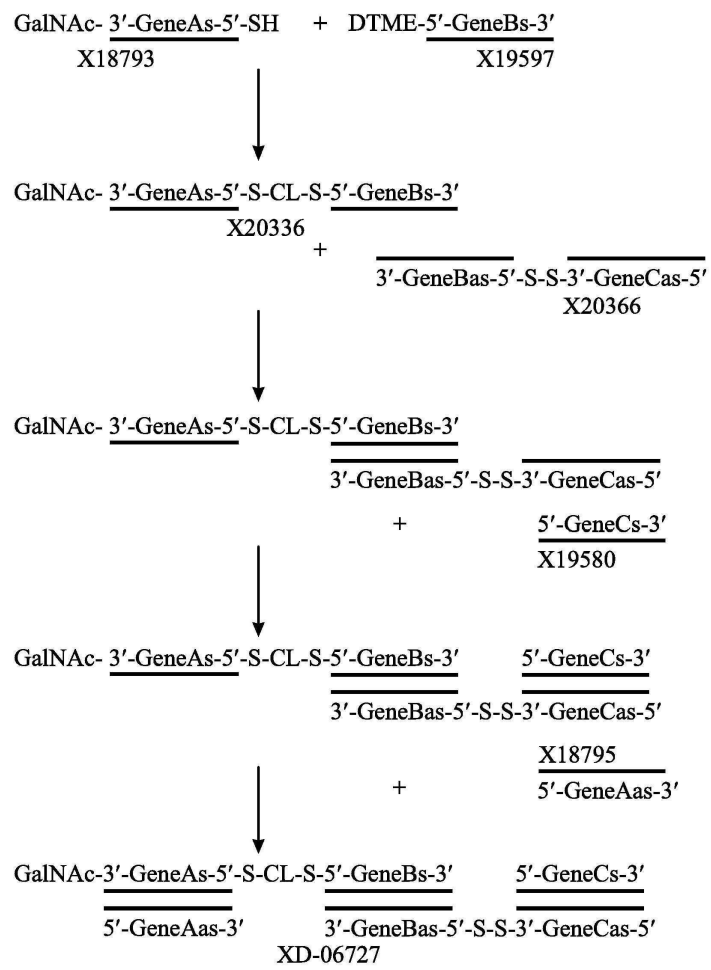
도면10



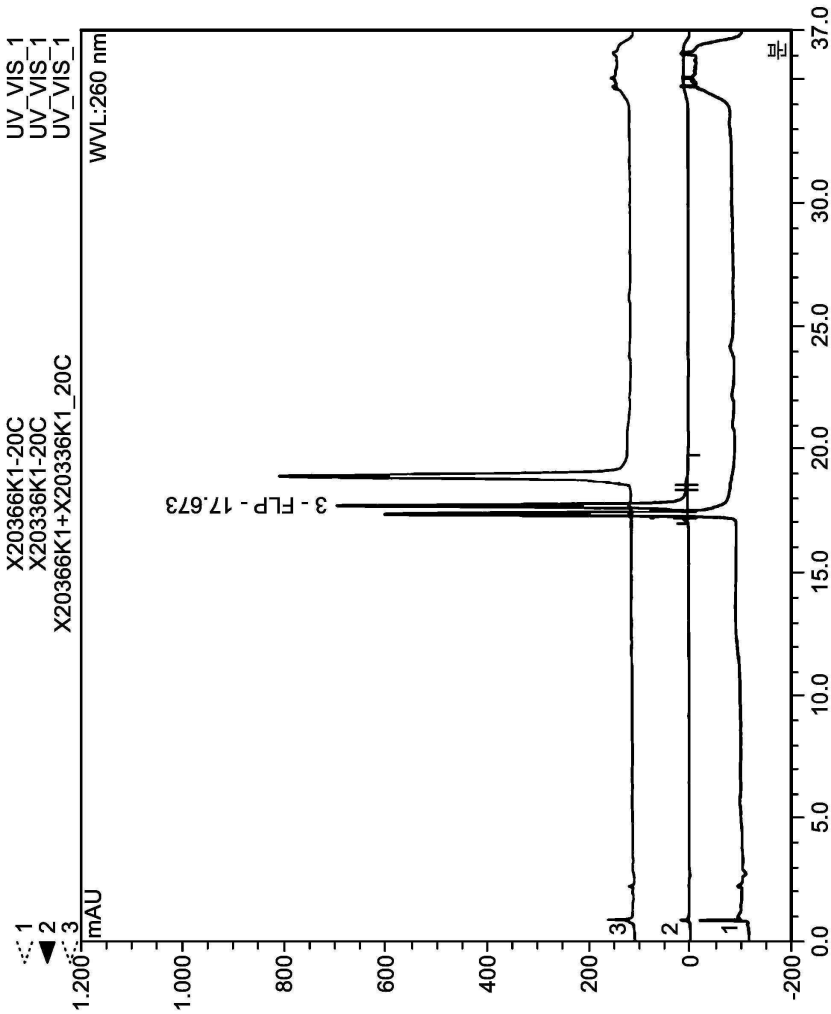
도면11



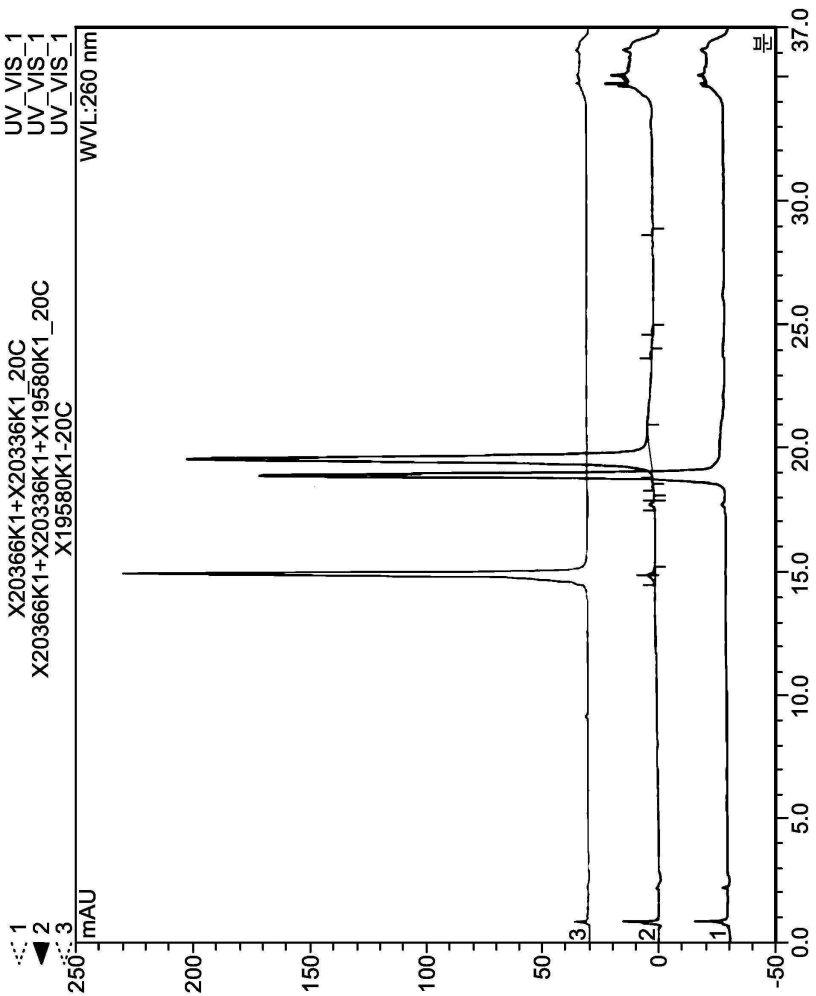
도면12



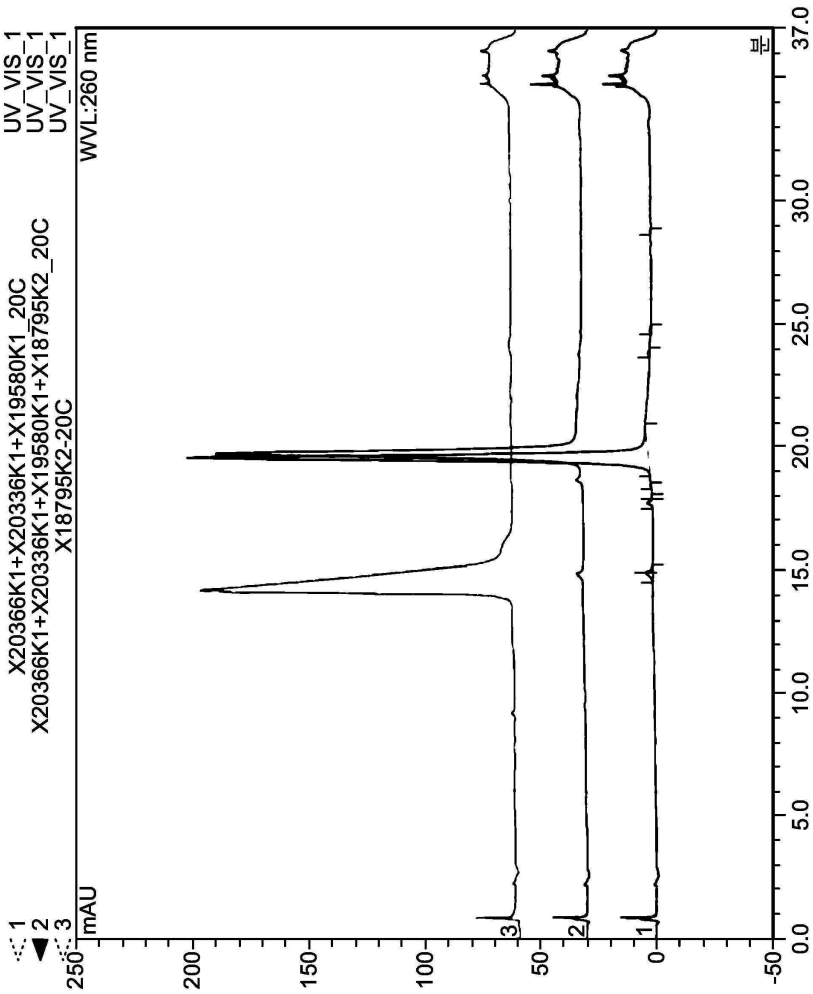
도면13



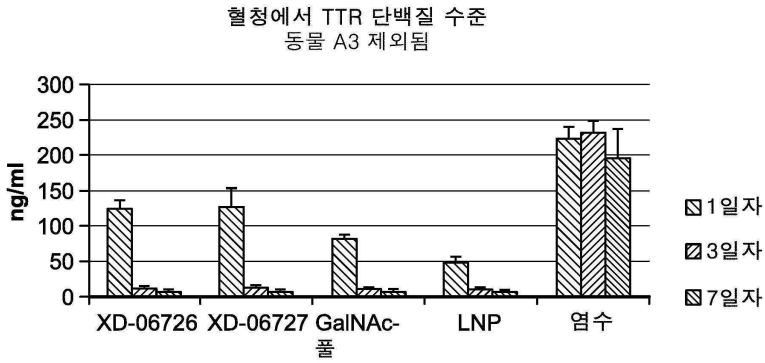
도면14



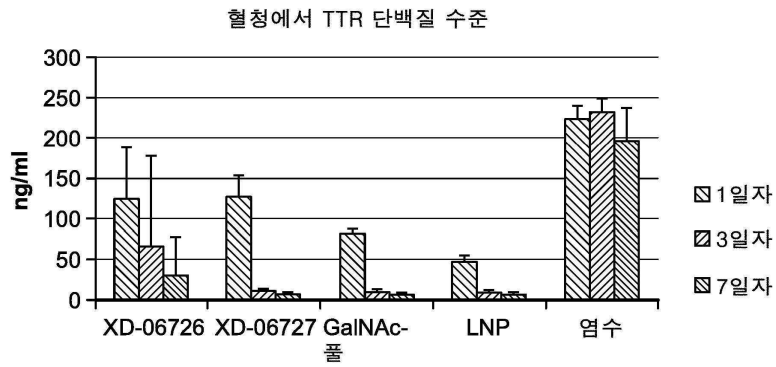
도면15



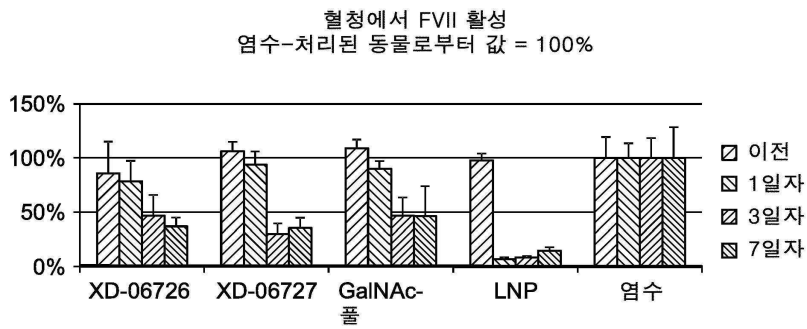
도면16a



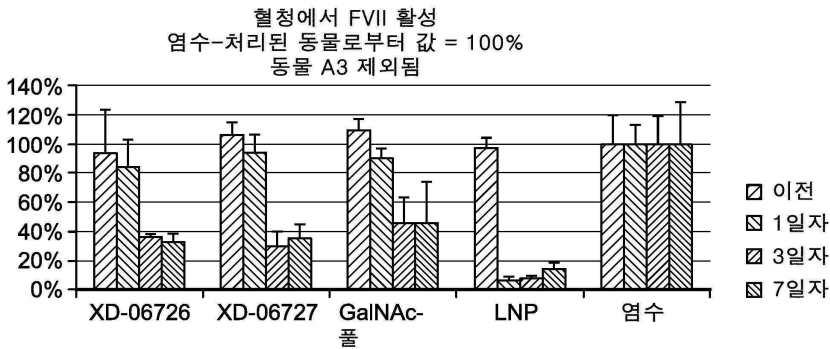
도면16b



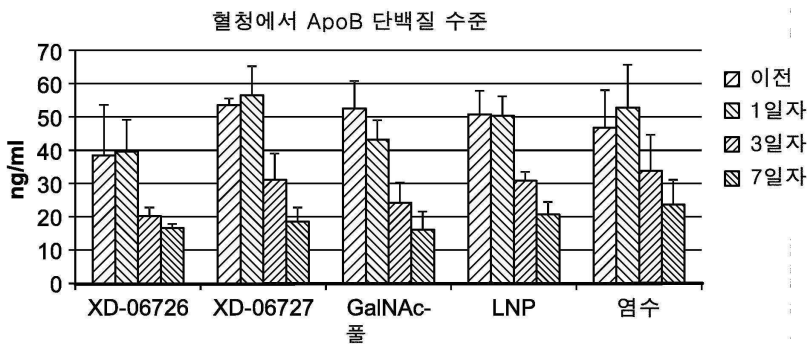
도면17a



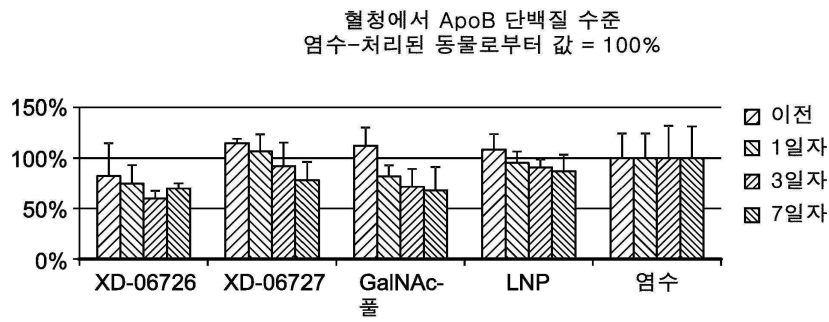
도면17b



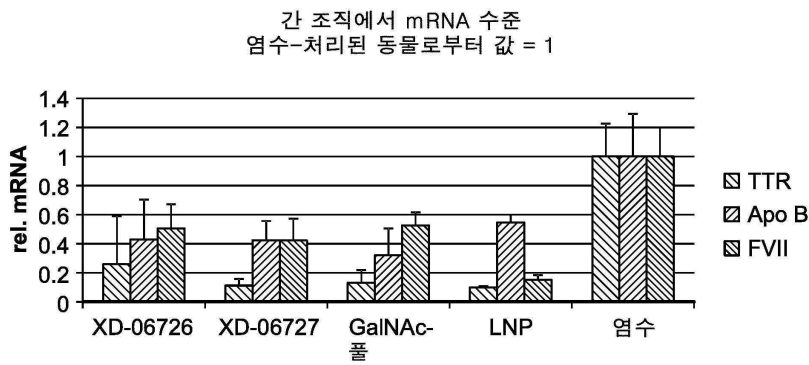
도면18a



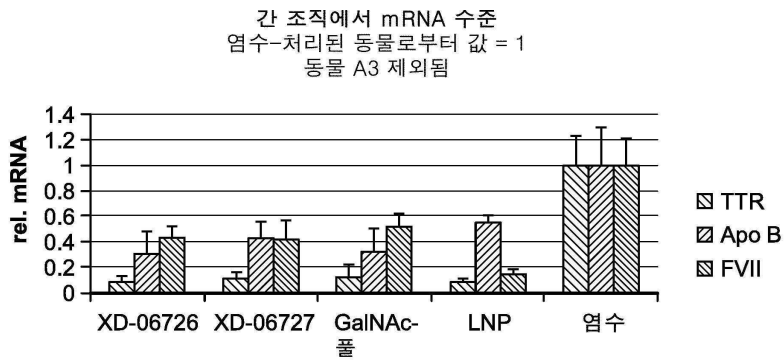
도면18b



도면19a



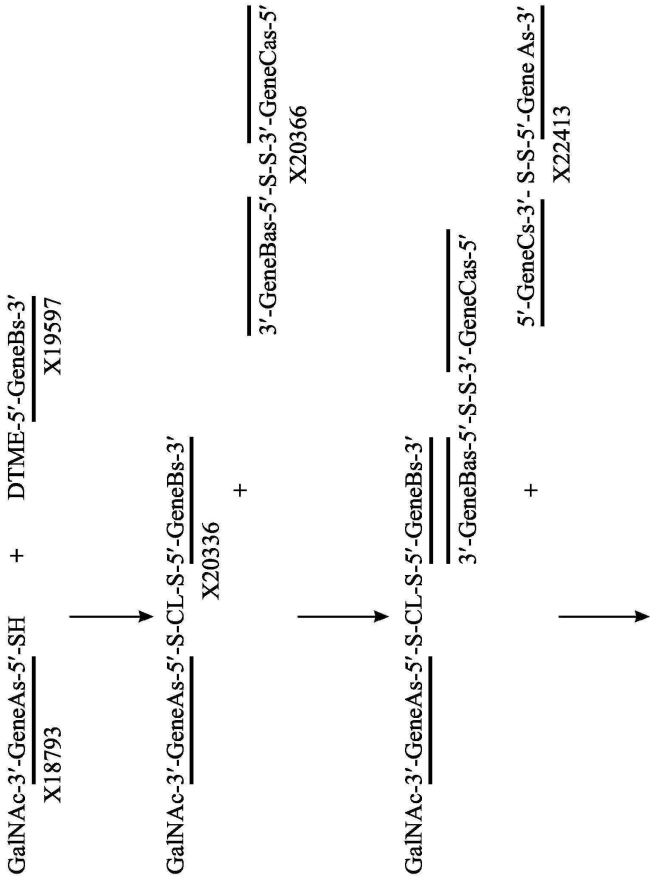
도면19b



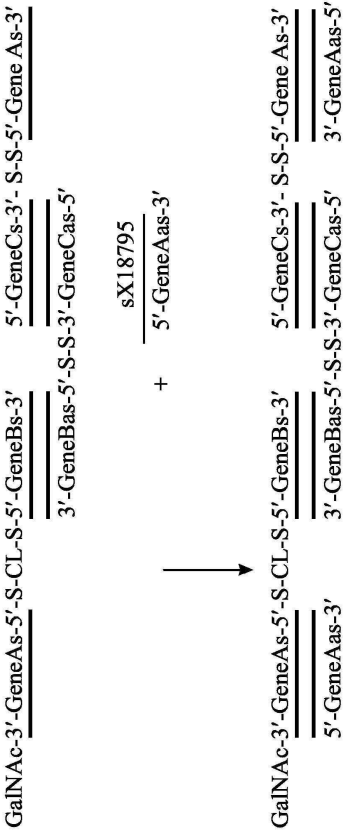
도면20



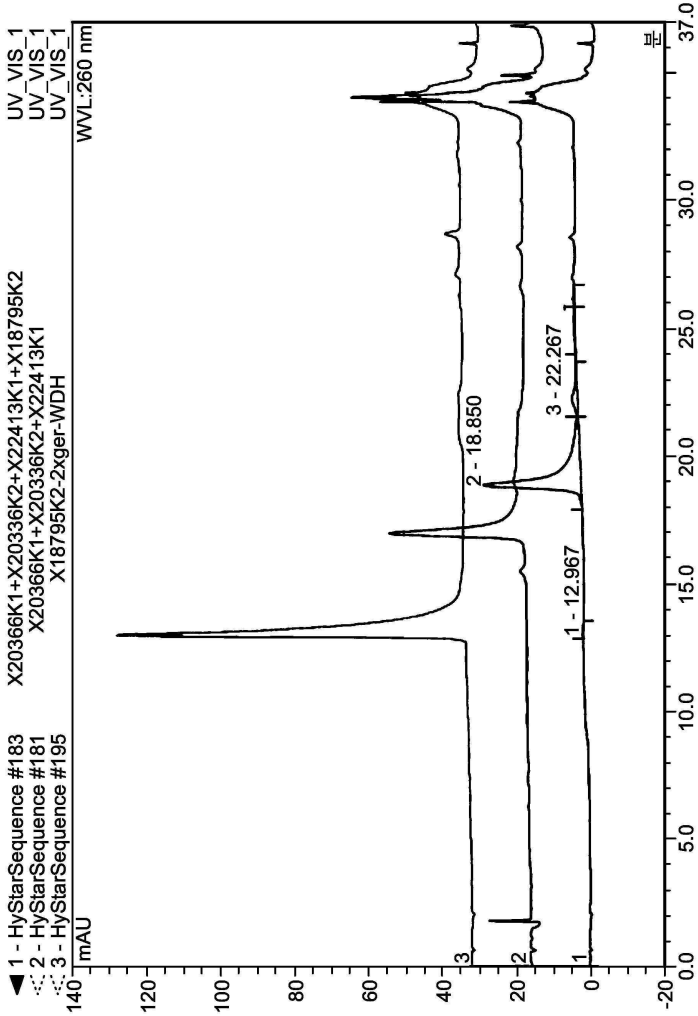
도면21a



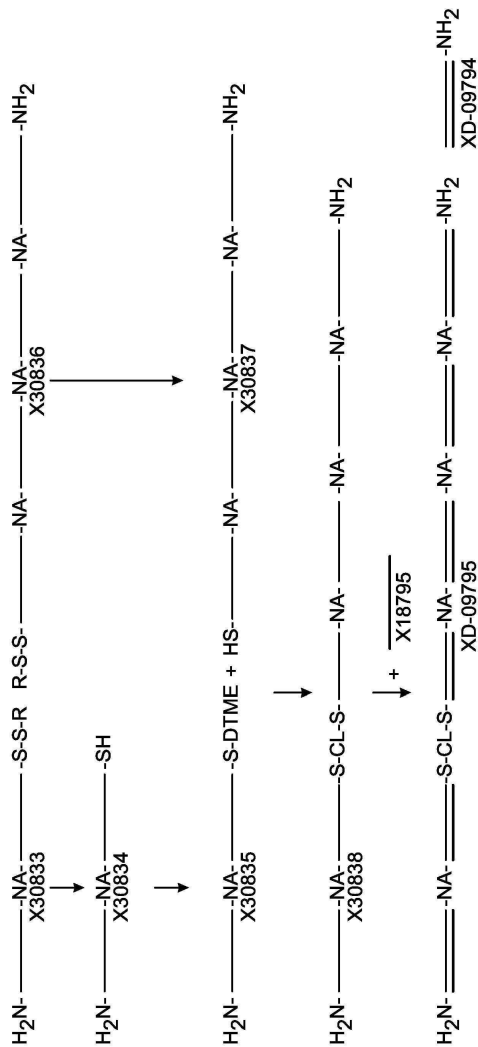
도면21b



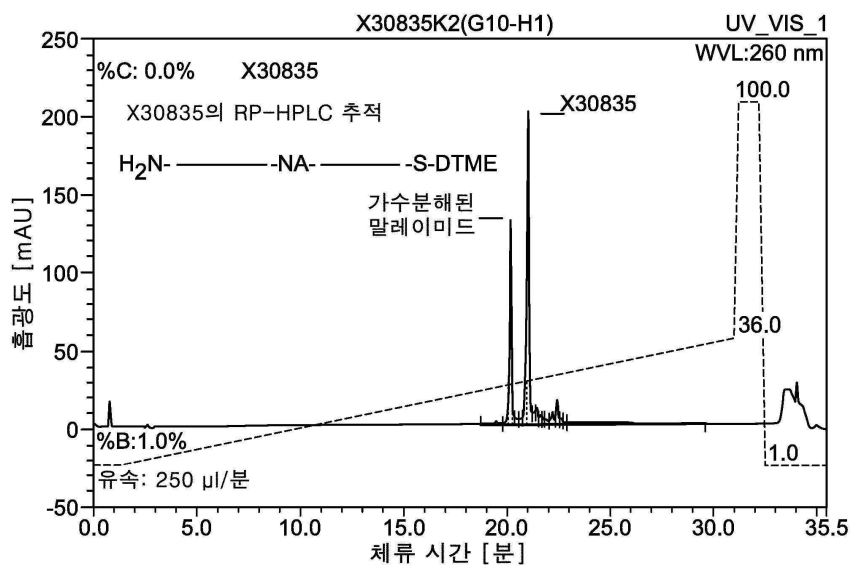
도면22



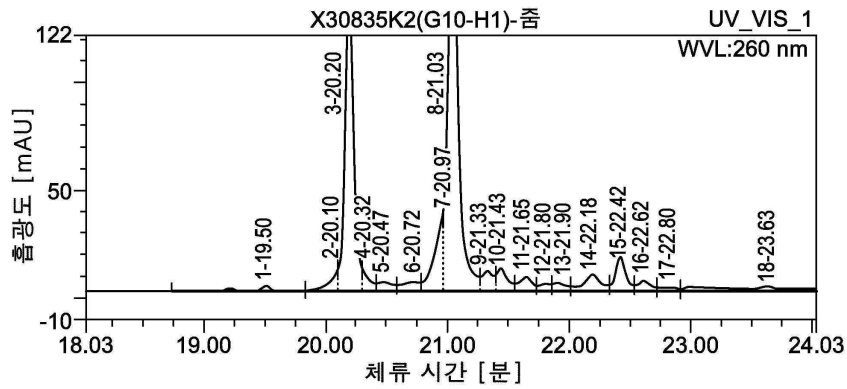
도면23



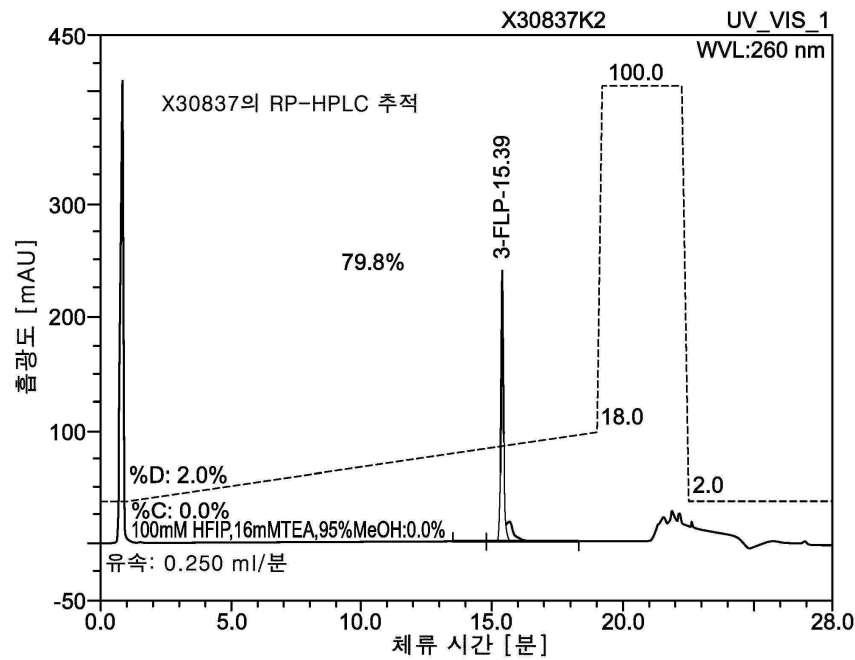
도면24a



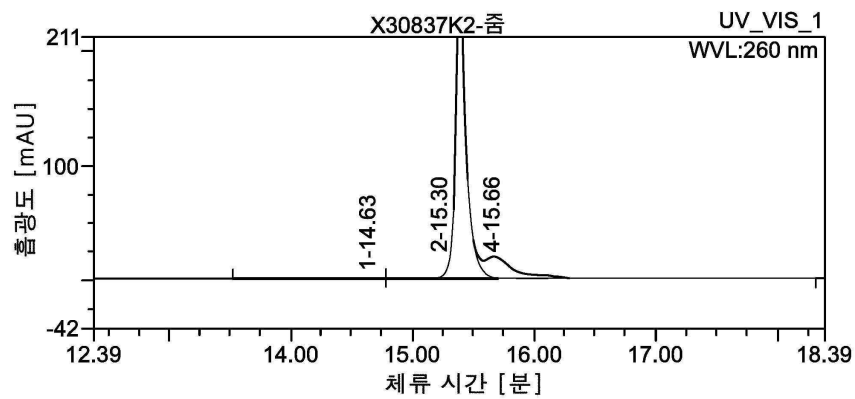
도면24b



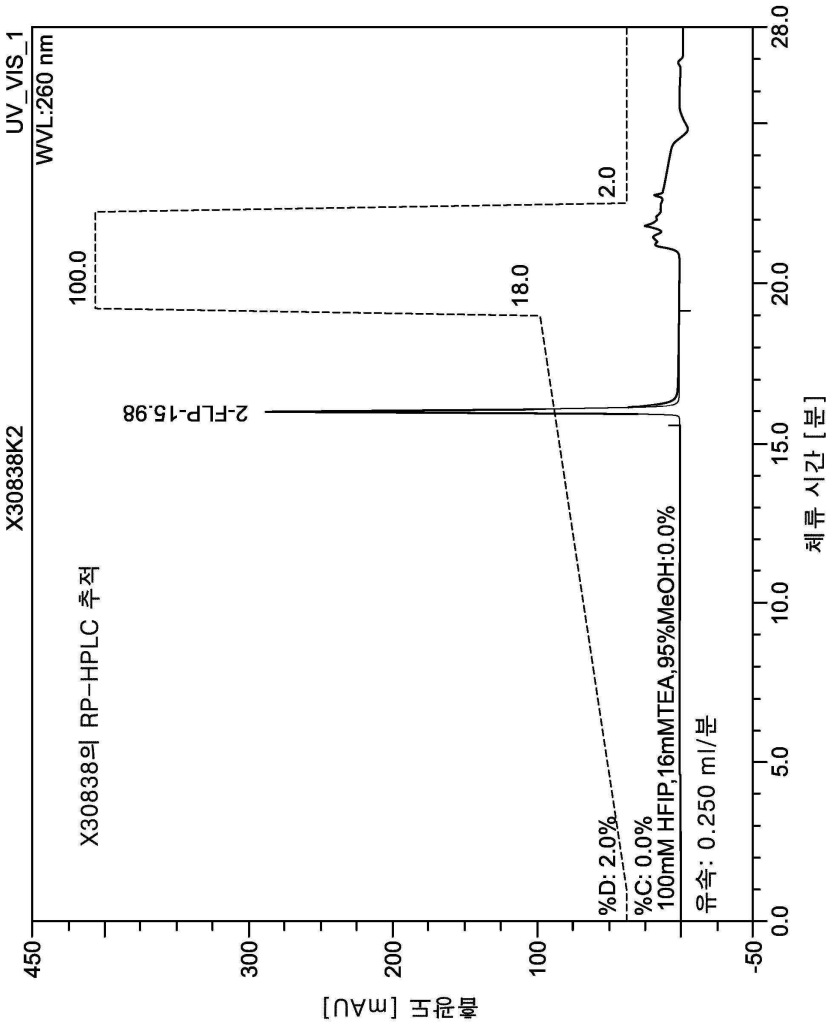
도면24c



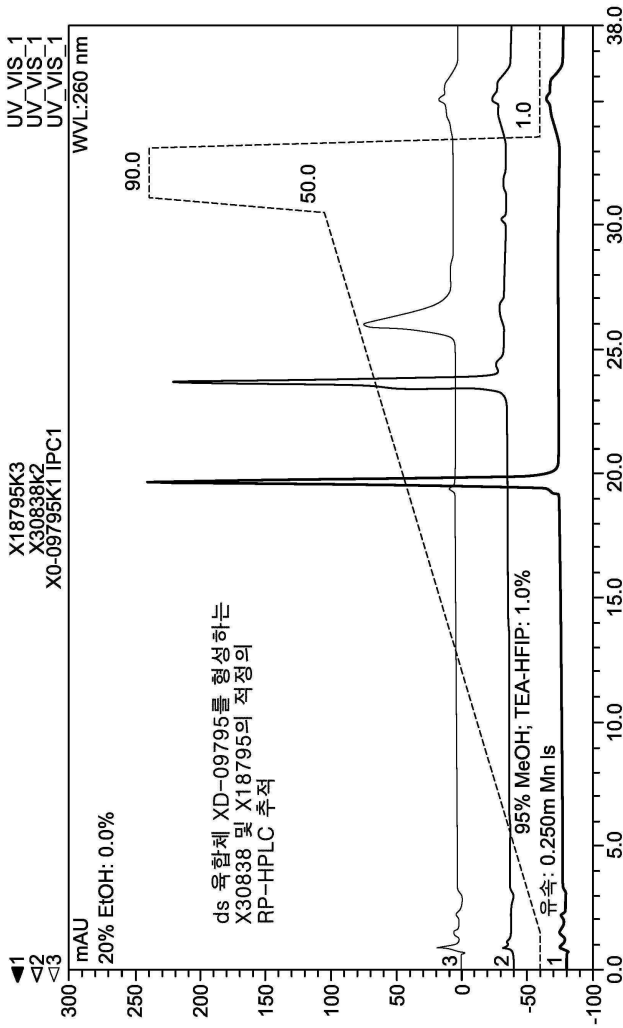
도면24d



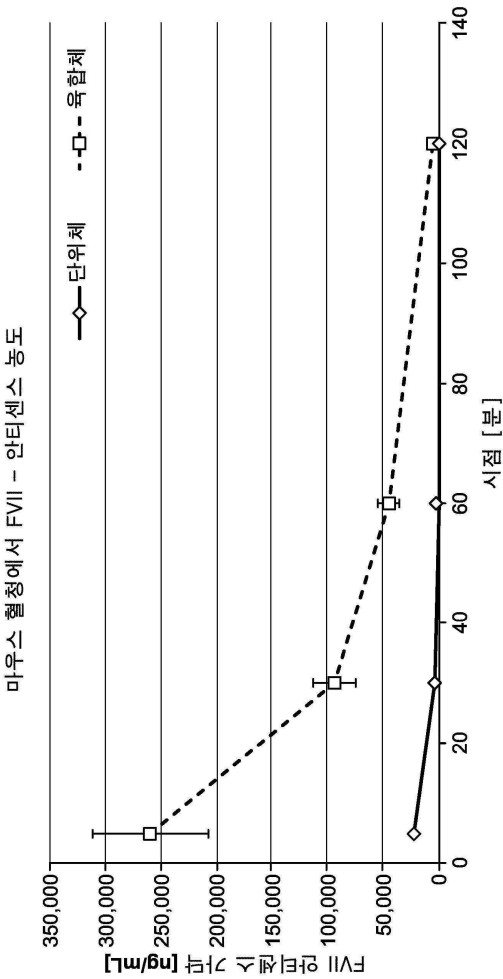
도면24e



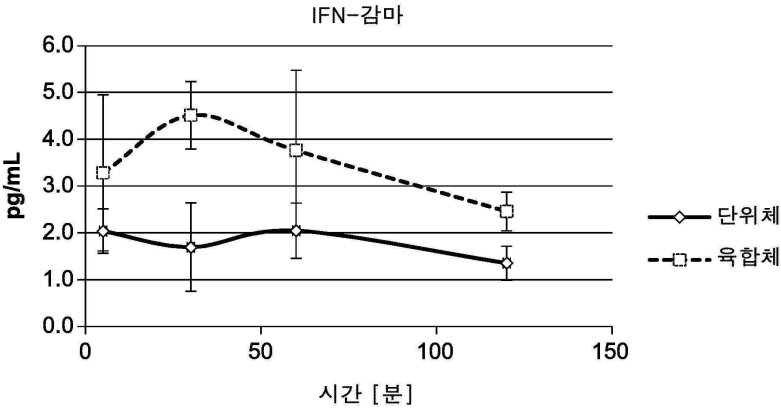
도면24f



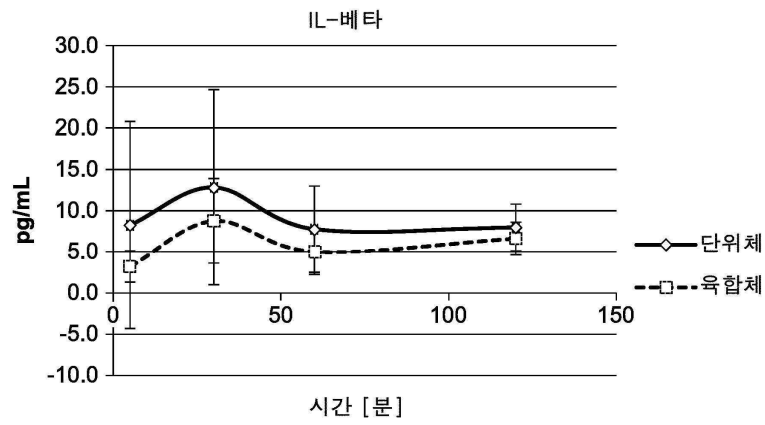
도면25



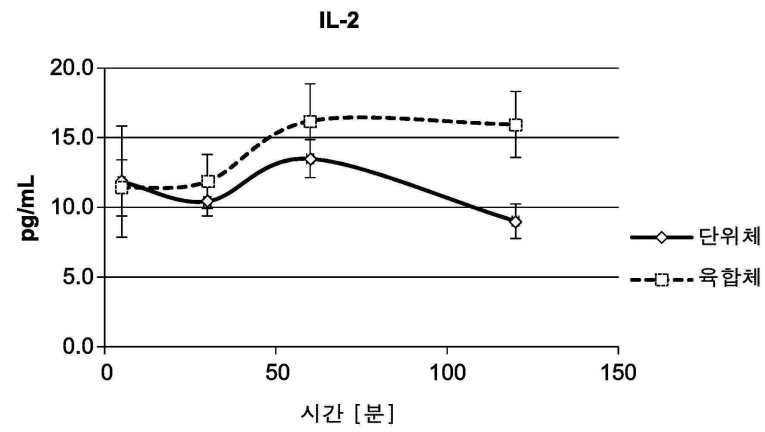
도면26a



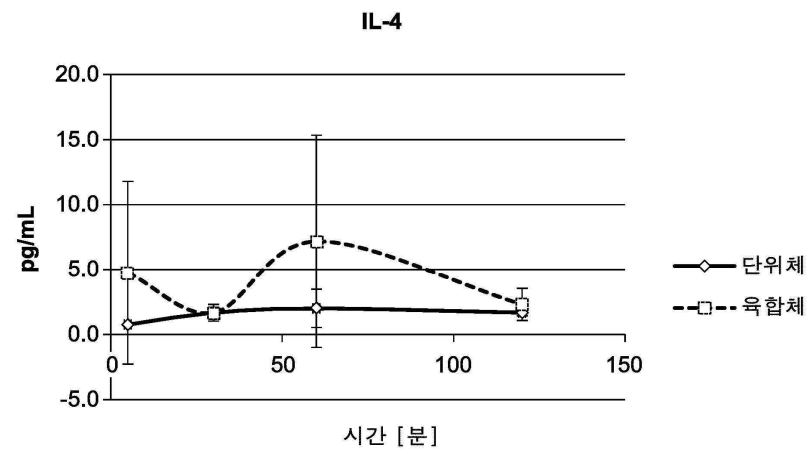
도면26b



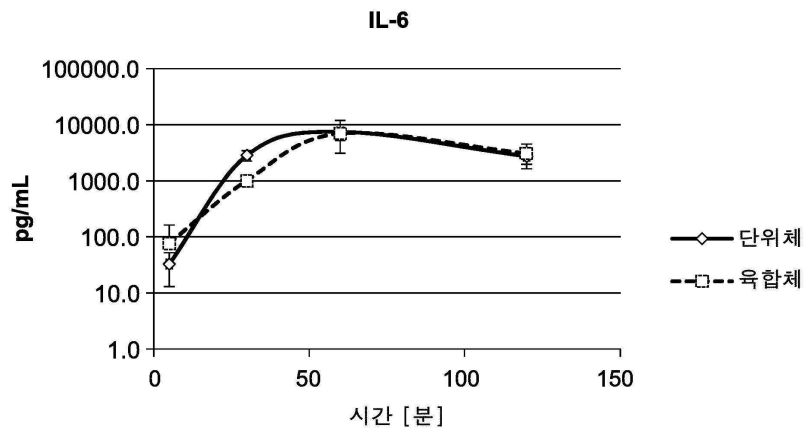
도면26c



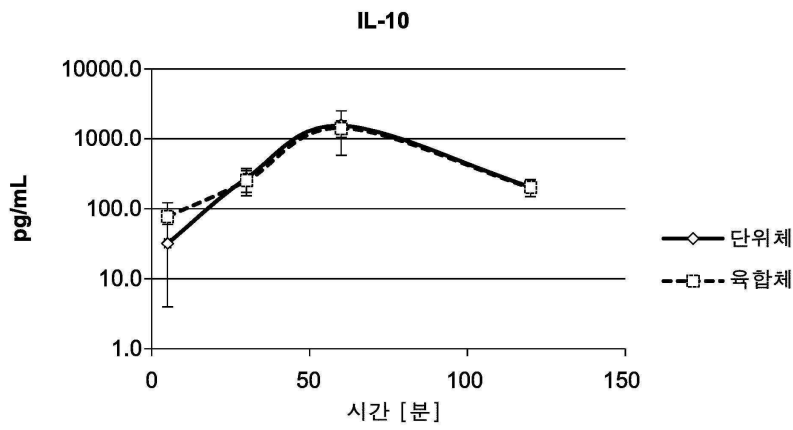
도면26d



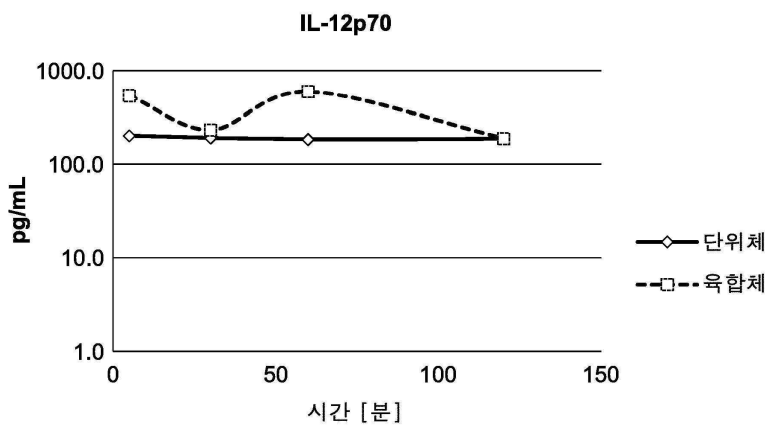
도면26e



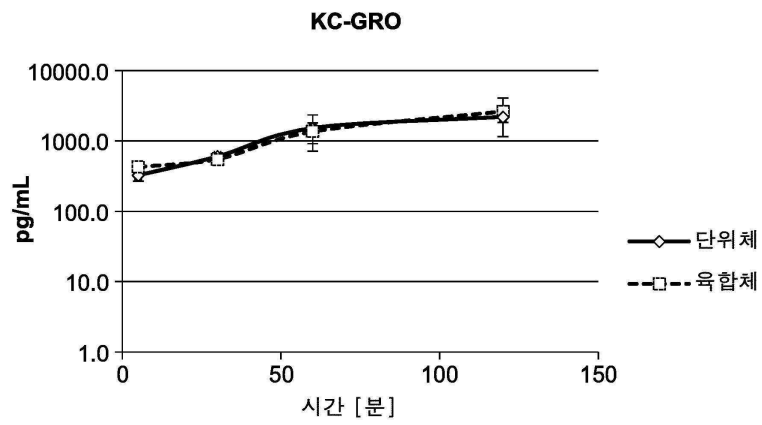
도면26f



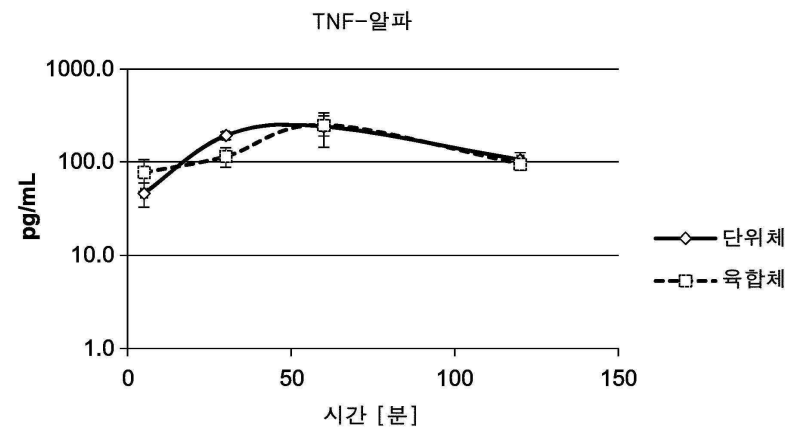
도면26g



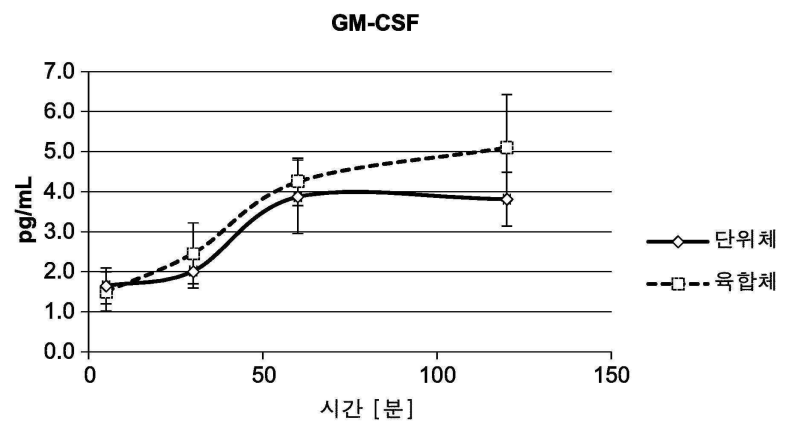
도면26h



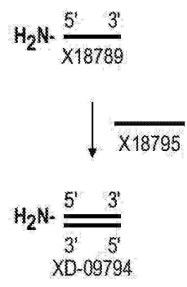
도면26i



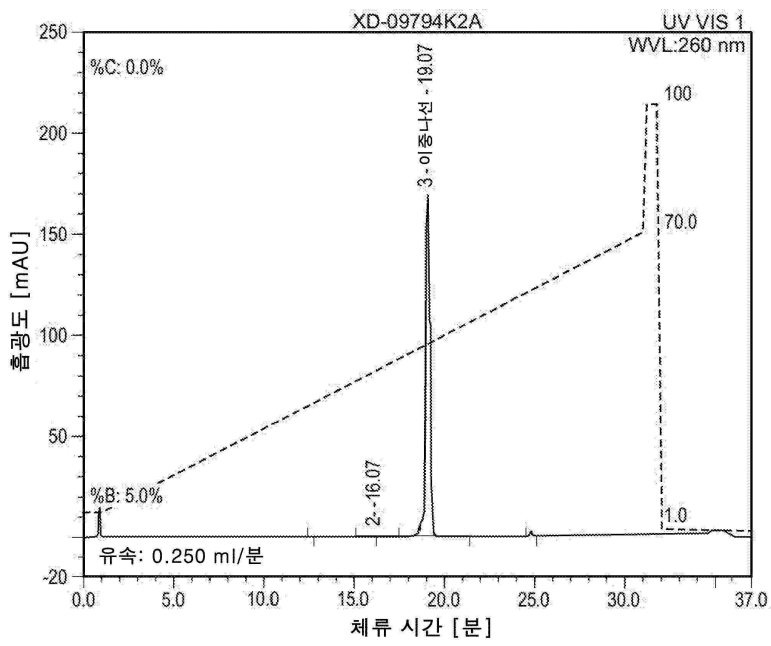
도면26j



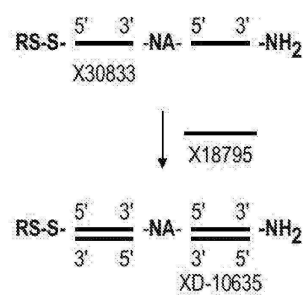
도면27a



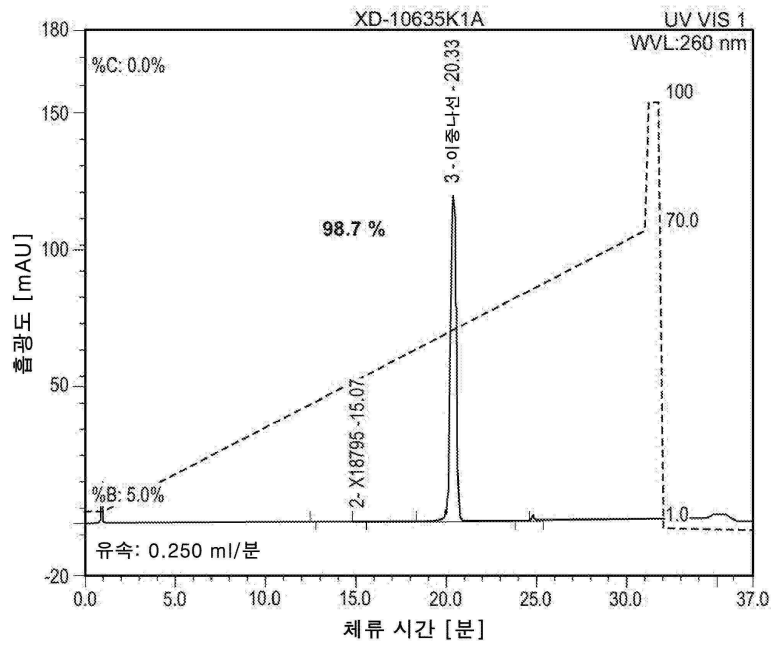
도면27b



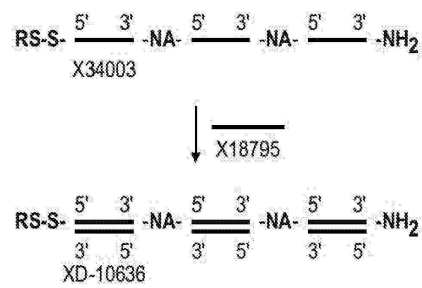
도면28a



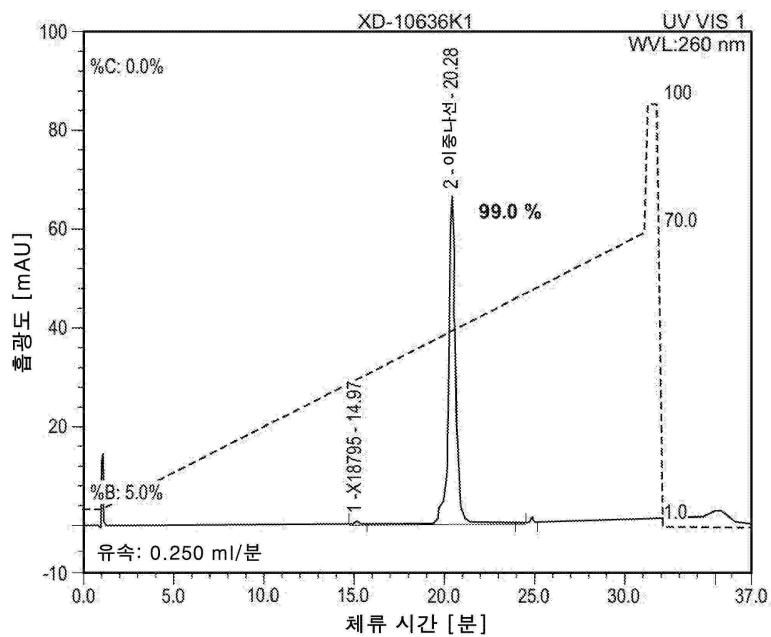
도면28b



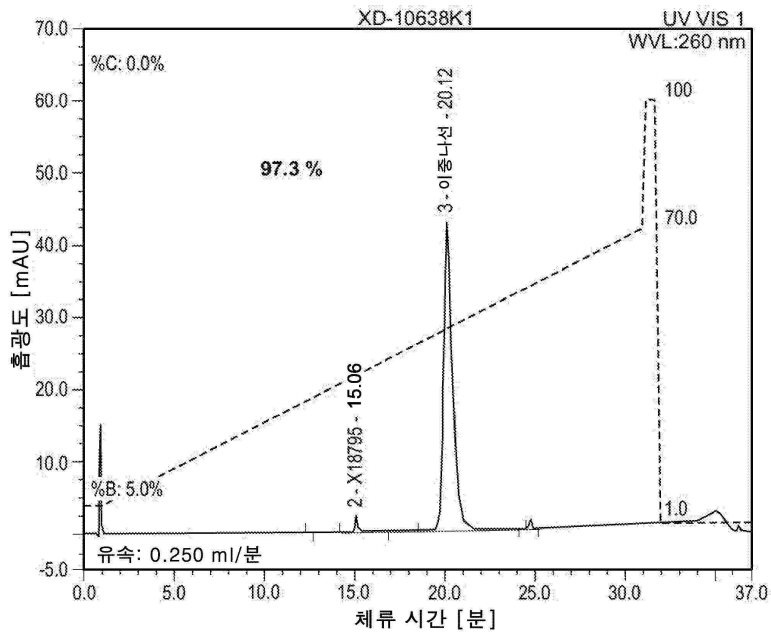
도면29a



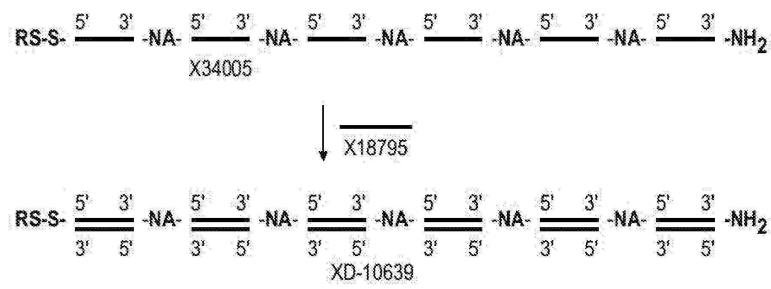
도면29b



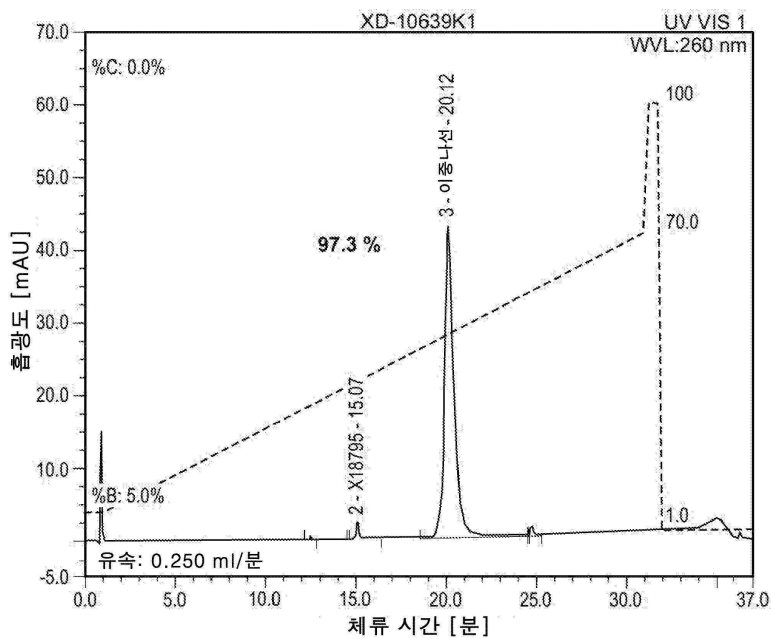
도면31b



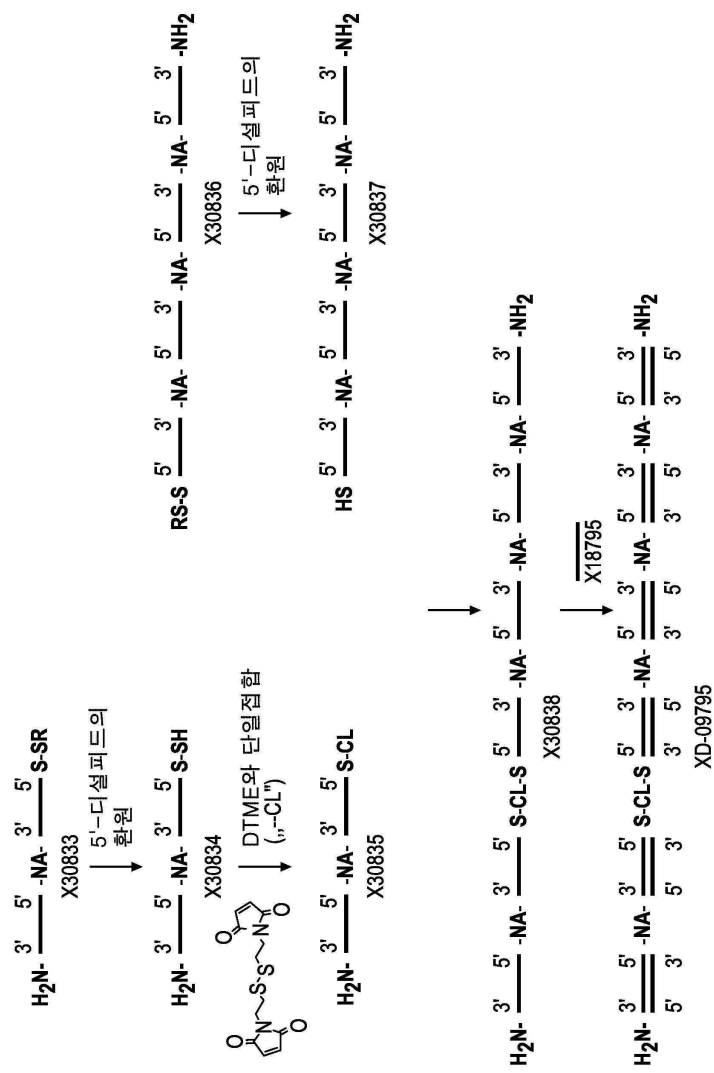
도면32a



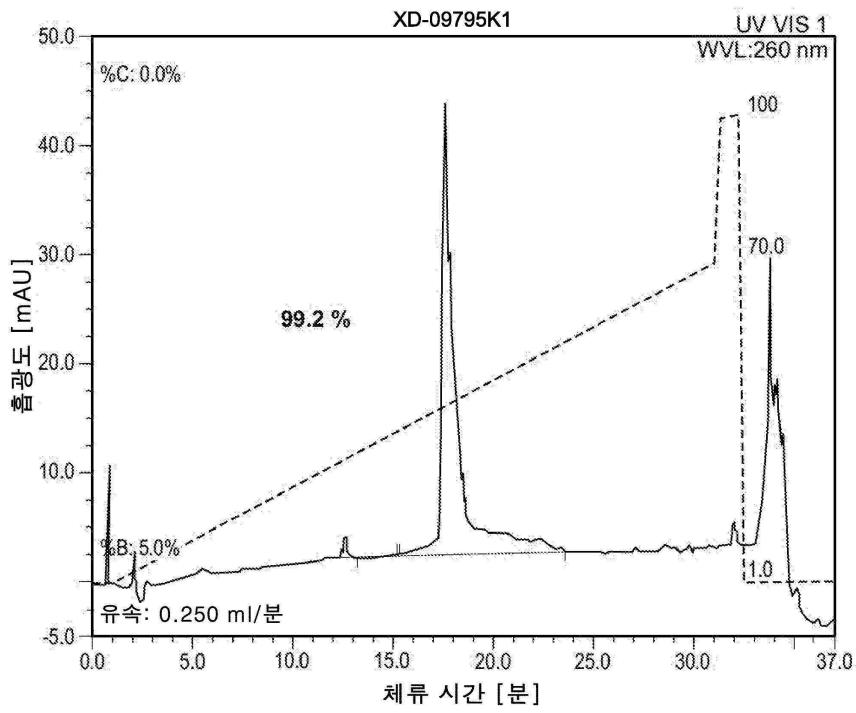
도면32b



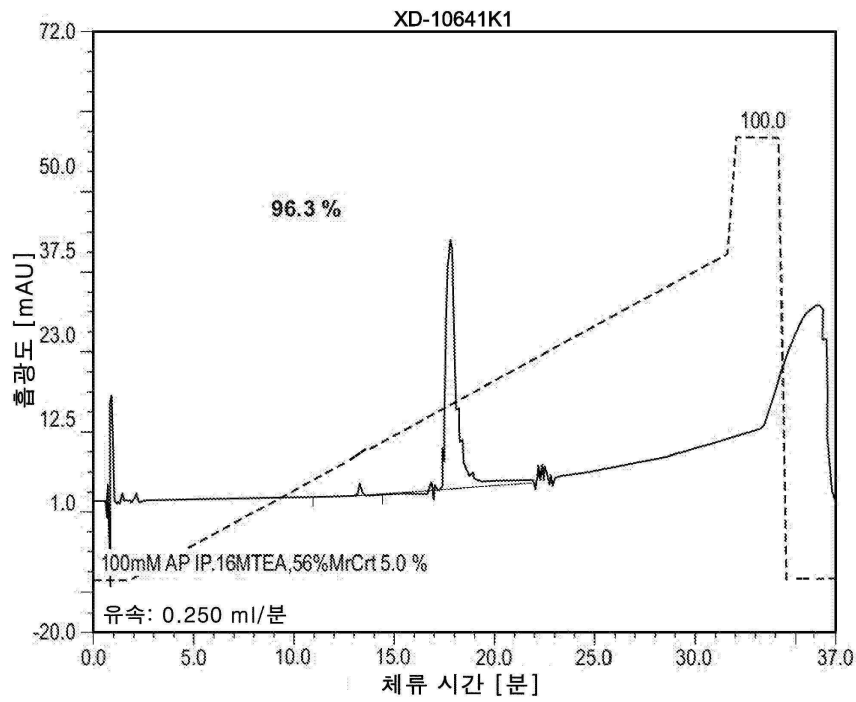
도면33a



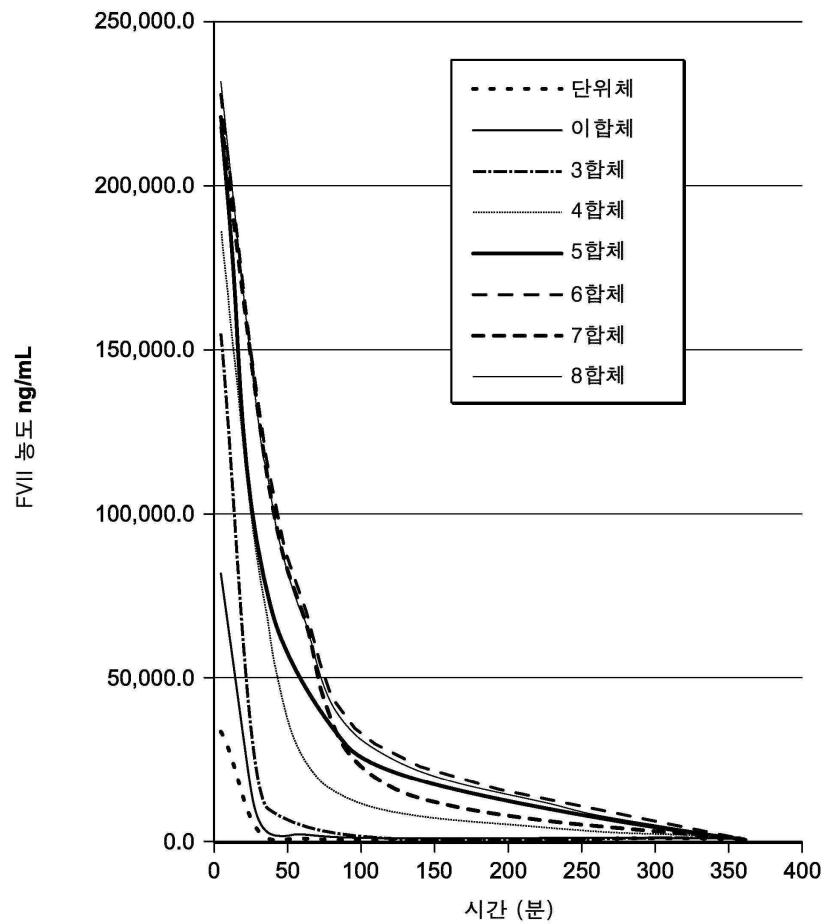
도면33b



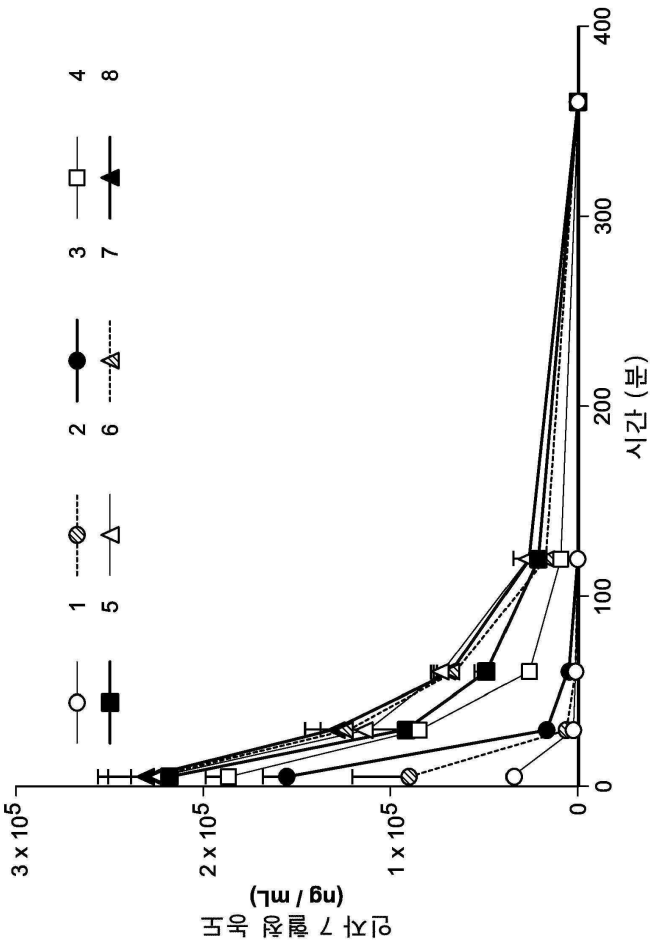
도면35b



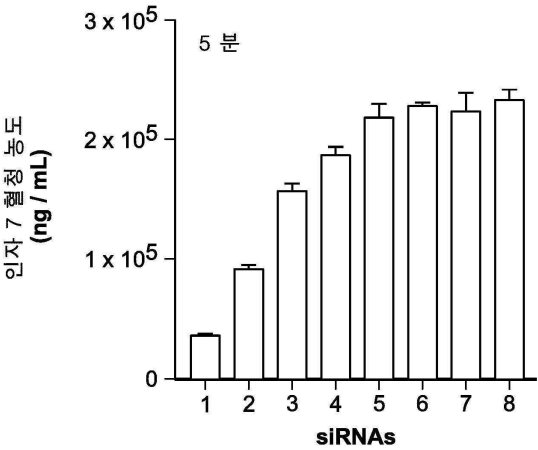
도면36a



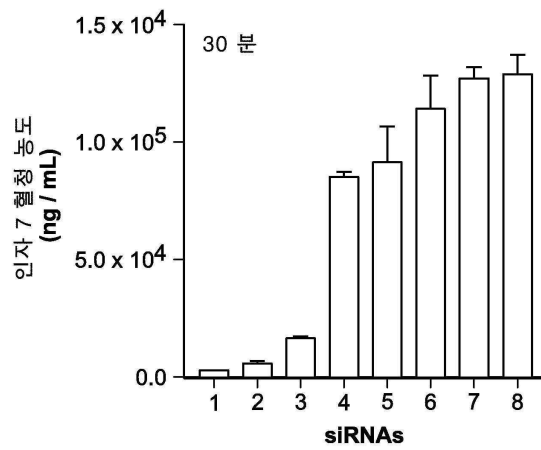
도면36b



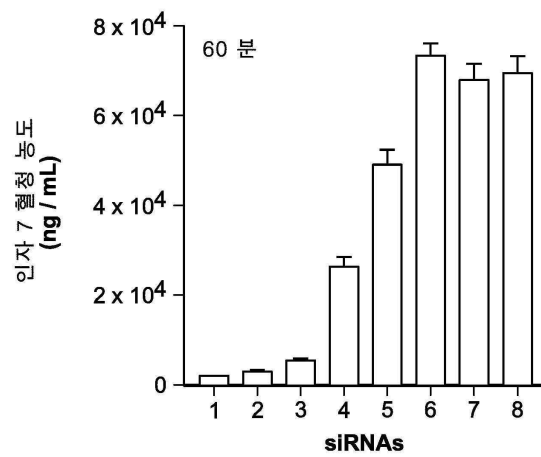
도면37a



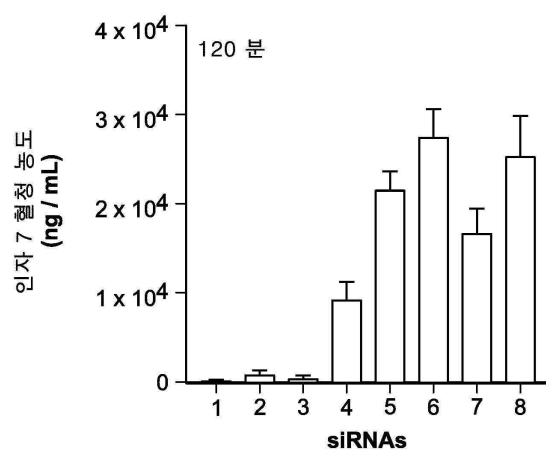
도면37b



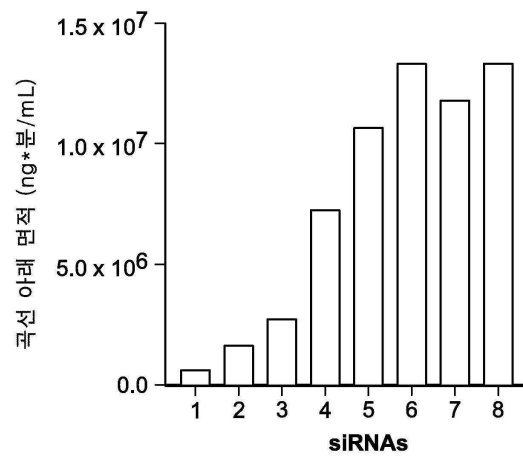
도면37c



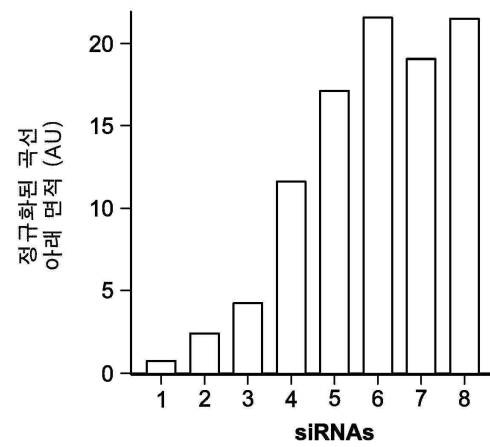
도면37d



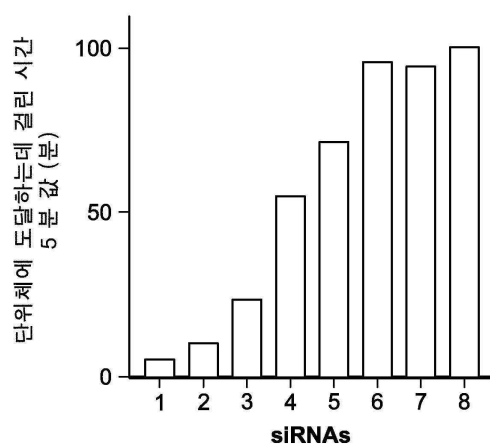
도면38a



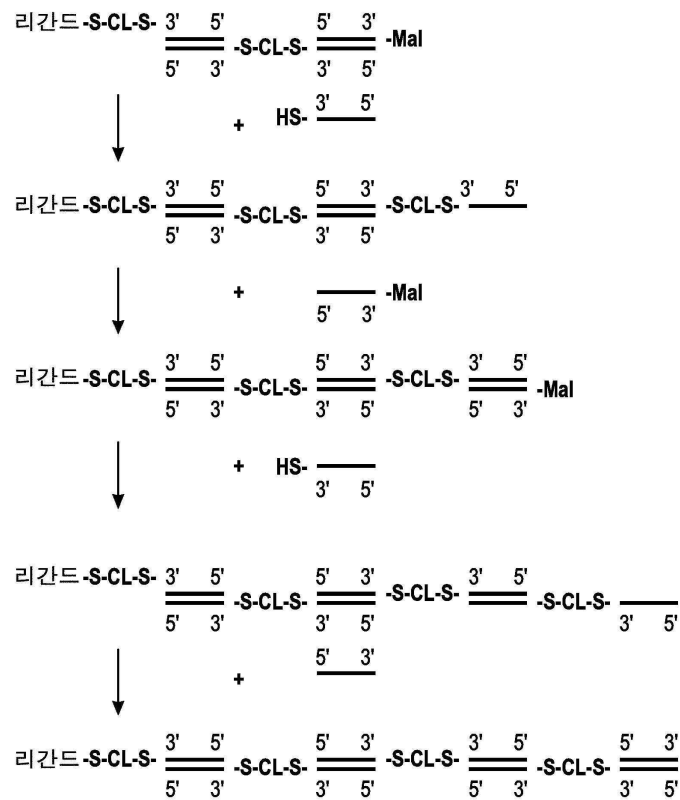
도면38b



도면39



도면41b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MPEGA LA, LLC

<120> MULTIMERIC OLIGONUCLEOTIDES HAVING DECREASED KIDNEY CLEARANCE

<130> 116244-604

<140>

<141>

<150> 62/561,853

<151> 2017-09-22

<150> 62/522,363

<151> 2017-06-20

<150> 62/455,231

<151> 2017-02-06

<160> 155

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 1

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 2

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 3

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

<400> 4

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 5

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

oligonucleotide

<400> 6

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 7	
ugaguuggca cgccuuugcu ut	22
<210> 8	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 8	
ugaguuggca cgccuuugcu u	21
<210> 9	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 9	
ugaguuggca cgccuuugcu u	21
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 10	
cuauuuggag agaaaucgat	20
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 11

cuauuuggag agaaaucgat 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 12

cuauuuggag agaaaucgat 20

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 13

ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 14
guaagacuug agaugaucct t 21
<210> 15
<400> 15
000
<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 16
gcaaaggcgu gccaacucat t 21
<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 17
ugaguuggca cgccuuugct t 21
<210> 18
<400> 18
000
<210> 19
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 19

ggaaucuuau auuugaucca a 21

<210> 20

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 20

uuggaucaaa uauaagauuc ccu 23

<210> 21

<400> 21

000

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 22

cuuacgcuga guacuucgat t 21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 23

ucgaaguacu cagcguaagt t	21
<210> 24	
<400> 24	
000	
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide	
<400> 25	
gcaaaggcgu gccaacucat	20
<210> 26	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 26	
ugaguuggca cgccuuugcu u	21
<210> 27	
<400> 27	
000	
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide	

<400> 28	
cuauuuggag agaaaucgat	20
<210> 29	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 29	
ucgauuucuc uccaaauagu u	21
<210> 30	
<400> 30	
000	
<210> 31	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide	
<400> 31	
aacaguguuc uugcucuaua at	22
<210> 32	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 32	
uuauagagca agaacacugu uuu	23
<210> 33	
<400> 33	

000

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 34

gcaaaggcgu gccaacucat

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 35

gcaaaggcgu gccaacucat

20

<210> 36

<400> 36

000

<210> 37

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 37

ggaauuuau auuugaucca a

21

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 38

ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 39

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 40

<211

> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 40

ugaguuggca cgccuuugcu u 21

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

oligonucleotide

<400> 41

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 42

<400> 42

000

<210> 43

<400> 43

000

<210> 44

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 44

uuauagagca agaacacugu uuu 23

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 45

aacaguguuc uugcucuaua at 22

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 46

gcaaaggcgu gccaacucat

20

<210> 47

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 47

uuauagagca agaacacugu uuu

23

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 48

aacaguguuc uugcucuaua at

22

<210> 49

<400> 49

000

<210> 50

<400> 50

000

<210> 51

<400> 51

000

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 52

gcaaaggcgu gccaacucat

20

<210> 53

<400> 53

000

<210> 54

<400> 54

000

<210> 55

<400> 55

000

<210> 56

<400> 56

000

<210> 57

<400> 57

000

<210> 58

<400> 58

000

<210> 59

<400> 59

000

<210> 60

<400> 60

000

<210> 61

<400> 61

000

<210> 62

<400> 62

000

<210> 63

<400> 63

000

<210> 64

<400> 64

000

<210> 65

<400> 65

000

<210> 66

<400> 66

000

<210> 67

<400> 67

000

<210> 68

<400> 68

000

<210> 69

<400> 69

000

<210> 70

<400> 70

000

<210> 71

<400> 71

000

<210> 72

<400> 72

000

<210> 73

<400> 73

000

<210> 74

<400> 74

000

<210> 75

<400> 75

000

<210> 76

<400> 76

000

<210> 77

<400> 77

000

<210> 78

<400> 78

000

<210> 79

<400> 79

000

<210> 80

<400> 80

000

<210> 81

<400> 81

000

<210> 82

<400> 82

000

<210> 83

<400> 83

000

<210> 84

<400> 84

000

<210> 85
<400> 85
000
<210> 86
<400> 86
000
<210> 87
<400> 87
000
<210> 88
<400> 88
000
<210> 89
<400> 89
000
<210> 90
<400> 90
000
<210> 91
<400> 91
000
<210> 92
<400> 92
000
<210> 93
<400> 93
000
<210> 94
<400> 94
000
<210> 95
<400> 95
000
<210> 96

<400> 96

000

<210> 97

<400> 97

000

<210> 98

<400> 98

000

<210> 99

<400> 99

000

<210> 100

<400> 100

000

<210> 101

<400> 101

000

<210> 102

<400> 102

000

<210> 103

<400> 103

000

<210> 104

<400> 104

000

<210> 105

<400> 105

000

<210> 106

<400> 106

000

<210> 107

<400> 107

000

<210> 108

<400> 108

000

<210> 109

<400> 109

000

<210> 110

<400> 110

000

<210> 111

<400> 111

000

<210> 112

<400> 112

000

<210> 113

<400> 113

000

<210

> 114

<400> 114

000

<210> 115

<400> 115

000

<210> 116

<400> 116

000

<210> 117

<400> 117

000

<210> 118

<400> 118

000

<210> 119
 <400> 119
 000
 <210> 120
 <400> 120
 000
 <210> 121
 <400> 121
 000
 <210> 122
 <400> 122
 000
 <210> 123
 <400> 123
 000
 <210> 124
 <400> 124
 000
 <210> 125
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 125
 ggaucaucuc aagucuuact t
 <210> 126
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

21

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 126
guaagacuug agaugaucct t 21
<210> 127
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 127
gcaaaggcgu gccaacucat 20
<210> 128
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 128
ugaguuggca cgccuuugcu u 21
<210> 129
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 129
cuauuuggag agaaaucgat 20
<210> 130

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 130
 ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 131
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 131
 guaagacuug agaugaucct t 21

<210> 132
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 132
 ucgauuucuc ucbaauagu u 21

<210> 133
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide	
<400> 133	
gcaaaggcgu gccaacucat	20
<210> 134	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide	
<400> 134	
cuaauuggag agaaaucgat	20
<210> 135	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide	
<400> 135	
aacaguguuc uugcucuaua at	22
<210> 136	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 136	
ucgauuucuc uccaaauagu u	21
<210> 137	

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 137

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 138

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 138

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 139

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 139

ugaguuggca cgccuuugcu u 21

<210> 140

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 140
cuauuuggag agaaaucgat 20
<210> 141
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 141
ucgauuucuc uccaaauagu u 21
<210> 142
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 142
aacaguguuc uugcucuaua at 22
<210> 143
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 143
uuauagagca agaacacugu uuu 23
<210> 144
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 144

cuauuuggag agaaaucgat

20

<210> 145

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 145

aacaguguuc uugcucuaua at

22

<210> 146

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 146

gcaaaggcgu gccaacucat cagcaaaggc gugccaacuc at

42

<210> 147

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 147

gcaaaggcgu gccaacucat cagcaaaggc gugccaacuc atcagcaaag gcgugccaac 60

ucatcagcaa aggcgugcca acucat 86

<210> 148

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 148

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 149

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 149

gcaaaggcgu gccaacucat cagcaaaggc gugccaacuc at 42

<210> 150

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 150

gcaaaggcgu gccaacucat cagcaaaggc gugccaacuc atcagcaaag gcgugccaac 60

ucat 64

<210> 151

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 151

gcaaaggcgu gccaacucat cagcaaaggc gugccaacuc atcagcaaag gcgugccaac 60

ucatcagcaa aggcgugcca acucat 86

<210> 152

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 152

gcaaaggcgu gccaacucat cagcaaaggc gugccaacuc atcagcaaag gcgugccaac 60

ucatcagcaa aggcgugcca acucatcagc aaaggcgugc caacucat 108

<210> 153

<211> 130

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 153

gcaaaggcgu gccaacucat cagcaaaggc gugccaacuc atcagcaaag gcgugccaac 60

ucatcagcaa aggcgugcca acucatcagc aaaggcgugc caacucatca gcaaaggcgu 120

gccaacucat 130

<210> 154

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 154

caguguucuu gcucuauaat t 21

<210> 155

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 155

uuauagagca agaacacugt t 21