



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월02일

(11) 등록번호 10-2712053

(24) 등록일자 2024년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/113 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)

A61K 48/00 (2024.01)

(21) 출원번호 10-2023-7024621(분할)

(22) 출원일자(국제) 2014년05월01일

심사청구일자 2023년08월17일

(85) 번역문제출일자 2023년07월18일

(65) 공개번호 10-2023-0113835

(43) 공개일자 2023년08월01일

(62) 원출원 특허 10-2021-7039866

원출원일자(국제) 2014년05월01일

심사청구일자 2021년12월31일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/036463

(87) 국제공개번호 WO 2014/179627

국제공개일자 2014년11월06일

(30) 우선권주장

61/818,442 2013년05월01일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

WO2011139917 A1*

WO1994002499 A1

WO1994017093 A1

US05763588 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

아이오니스 파마수티컬즈, 인코포레이티드

미합중국 캘리포니아주 92010 칼즈바드 2855 가젤 코트

(72) 발명자

프라카쉬, 타즈하, 피.

미국 92010 캘리포니아주 칼즈바드 가젤 코트 2855

세쓰, 페넛, 피.

미국 92010 캘리포니아주 칼즈바드 가젤 코트 2855

스웨이즈, 에릭, 이.

미국 92010 캘리포니아주 칼즈바드 가젤 코트 2855

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 HBV 및 TTR 발현을 조절하는 조성물 및 방법

(57) 요약

콘주게이트 그룹을 갖는 올리고머 화합물이 본원에 개시되어 있다. 어떤 구현예에서, 상기 올리고머 화합물은 N-아세틸갈락토사민에 접합된다.

(52) CPC특허분류

C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)
C12N 2310/315 (2013.01)
C12N 2310/32 (2013.01)
C12N 2310/3341 (2013.01)
C12N 2310/34 (2013.01)
C12N 2310/351 (2013.01)
C12N 2310/353 (2013.01)
C12N 2320/32 (2013.01)

(30) 우선권주장

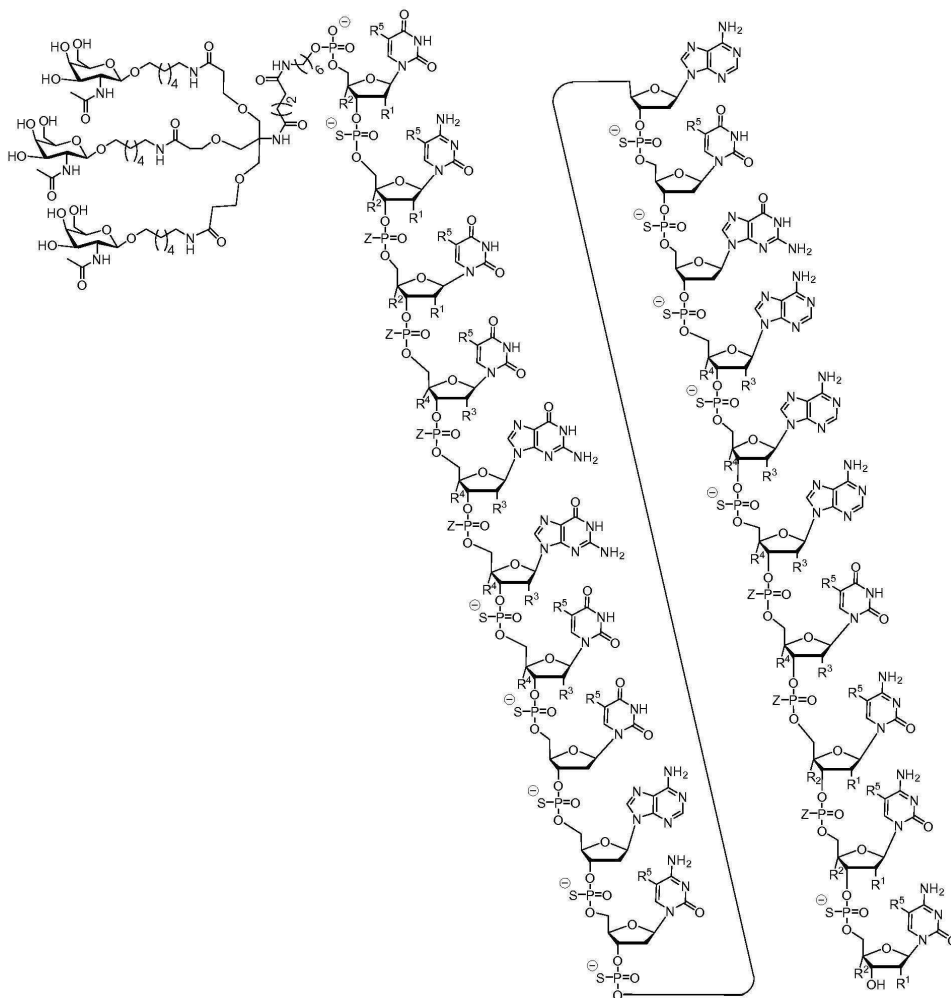
61/823,826	2013년05월15일	미국(US)
61/843,887	2013년07월08일	미국(US)
61/871,673	2013년08월29일	미국(US)
61/880,790	2013년09월20일	미국(US)
61/976,991	2014년04월08일	미국(US)
61/986,867	2014년04월30일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식을 갖는 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염:



여기서 R^1 은 $-OCH_2CH_2OCH_3$ (MOE)이고 R^2 는 H이거나; 또는 R^1 및 R^2 는 함께 브릿지를 형성하고, 여기서 R^1 은 $-O-$ 이고 R^2 는 $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, 또는 $-CH_2CH_2-$ 이고, R^1 및 R^2 가 직접적으로 연결되어 생성되는 브릿지는 $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$, 및 $-O-CH_2CH_2-$ 로부터 선택되고;

각각의 고리에 대해 독립적으로, 동일한 고리 상의 R^3 및 R^4 의 각각의 쌍은: R^3 은 H 및 $-OCH_2CH_2OCH_3$ 로부터 선택되고 R^4 는 H이거나; 또는 R^3 및 R^4 는 함께 브릿지를 형성하고, 여기서 R^3 은 $-O-$ 이고, R^4 는 $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, 또는 $-CH_2CH_2-$ 이고, R^3 및 R^4 가 직접적으로 연결되어 생성되는 브릿지는 $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$, 및 $-O-CH_2CH_2-$ 로부터 선택되고;

R^5 는 H 및 $-CH_3$ 로부터 선택되고;

Z는 S^- 및 O^- 로부터 선택된다.

청구항 2

제1항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염이 나트륨 염인 화합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 화합물 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는, 트랜스티레틴 아밀로이드증을 치료하기 위한 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 트랜스티레틴 아밀로이드증이 노인성 전신 아밀로이드증 (SSA), 가족성 아밀로이드 다발성신경병증 (FAP), 또는 가족성 아밀로이드 심장병 (FAC)인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

서열목록

본원은 전자 형태의 서열목록과 함께 출원되었다. 서열목록은 그 크기가 16 Kb인 파일명 BIOL0248WOSEQ_ST25.txt (2014년 5월 1일에 만들어짐)로서 제공되어 있다. 서열목록의 전자 형태의 정보는 본원에 그 전체가 참고로 편입되어 있다.

배경 기술

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

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

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

발명의 내용

발명의 요약

어떤 구현예에서, 본 개시내용은 접합된 안티센스 화합물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 핵산 유사체에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 접합된 안티센스 화합물을 제공한다. 어떤 구현예

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

[0008] 아시알로당단백질 수용체 (ASGP-R)가 이전에 기재되었다. 예를 들면, Park 등, PNAS vol. 102, No. 47, pp 17125-17129 (2005). 그와 같은 수용체들은 간 세포, 특히 간세포(hepatocyte) 상에서 발현된다. 게다가, 3 개의 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 리간드들의 클러스터를 포함하는 화합물은 ASGP-R에 결합하여, 세포 내로 상기 화합물의 흡수를 야기할 수 있는 것으로 나타났다. 예를 들면, 문헌[Khorev 등, Bioorganic 및 Medicinal Chemistry, 16, 9, pp 5216-5231 (May 2008)]을 참조한다. 따라서, 그와 같은 GalNAc 클러스터를 포함하는 콘주게이트들은 간 세포, 특이적으로 간세포 내로 어떤 화합물의 흡수를 촉진하는데 사용되어 왔다. 예를 들면 어떤 GalNAc-함유 콘주게이트들은 생체내에서 간 세포에서 듀플렉스 siRNA 화합물의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 그와 같은 경우에, GalNAc-함유 콘주게이트는 전형적으로 siRNA 듀플렉스의 센스 가닥에 부착된다. 센스 가닥은 안티센스 가닥이 결국 표적 핵산과 혼성화되기 전에 버려지므로, 상기 콘주게이트는 활성을 방해할 염려가 거의 없다. 전형적으로, 상기 콘주게이트는 siRNA의 센스 가닥의 3' 말단에 부착된다. 예를 들면, U.S. 특허 제8,106,022호를 참고한다. 본원에서 기재된 어떤 콘주게이트 그룹은 더 활성이고/거나 이전에 기재된 콘주게이트 그룹보다 합성하기 더 쉽다.

[0009] 본 발명의 어떤 구현예에서, 콘주게이트는 비제한적으로 RNase H 기반 안티센스 화합물 및 전-mRNA의 표적 핵산의 스플라이싱을 변경하는 안티센스 화합물을 포함하는, 단일가닥 안티센스 화합물에 부착된다. 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트는 이점 (세포 내로의 개선된 흡수)을 제공하기에 충분히 긴 안티센스 화합물에 계속 부착되어 있어야 하지만, 이후에 절단되거나, 또는 표적 핵산에 대한 혼성화 및 스플라이싱 또는 스플라이스 조절과 연관된 RNase H 또는 효소와의 상호작용과 같은, 활성에 필요한 차후 단계를 방해하지 않을 수 있다. 특성들의 이러한 균형이 siRNA 화합물에서보다 단일가닥 안티센스 화합물의 셋팅에서 더 중요하며, 상기 콘주게이트는 센스 가닥에 간편하게 부착될 수 있다. 콘주게이트가 결여된 동일한 안티센스 화합물과 비교하여 생체내에서 간 세포에서 개선된 효능을 갖는 접합된 단일가닥 안티센스 화합물이 본원에 개시된다. 이들 화합물에 대해 특성들의 요구되는 균형을 고려할 때, 그와 같은 개선된 효능은 놀랍다.

[0010] 어떤 구현예에서, 본원의 콘주게이트 그룹은 절단가능 모이어티를 포함한다. 언급한 바와 같이, 기전에 의해 염매이지 않으면서, 콘주게이트가 흡수 증진을 제공하기 위해 충분히 긴 화합물 상에 유지되어야 하는 것이 논리적이지만, 이후에, 상기 콘주게이트의 일부분 또는 이상적으로는 모두가 절단되어 그것의 가장 활성 형태의 모 화합물 (예를 들면, 안티센스 화합물)을 방출하는 것이 바람직하다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 절단가능 뉴클레오사이드이다. 그와 같은 구현예는하나 이상의 절단가능 결합, 예컨대 포스포디에스테르 연결을 통한 뉴클레오사이드를 통해 상기 콘주게이트 (클러스터)의 나머지를안티센스 올리고뉴클레오타이드에 부착시킴으로써 세포에서 내인성 뉴클레아제의 이점을 이용한다. 어떤 구현예에서, 클러스터는 포스포디에스테르 연결을 통해 절단가능 뉴클레오사이드에 결합된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 뉴클레오사이드는 포스포디에스테르 연결에 의해 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (안티센스 화합물)에 부착된다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 2 또는 3 개의 절단가능 뉴클레오사이드를 포함할 수 있다. 그와 같은 구현예에서, 그와 같은 절단가능 뉴클레오사이드는 서로 연결되고/거나, 안티센스 화합물에 연결되고/거나 절단가능 결합 (예컨대 포스포디에스테르 연결)을 통해 클러스터에 연결된다. 본원의 어떤 콘주게이트는 절단가능 뉴클레오사이드를 포함하지 않으며 대신에 절단가능 결합을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드로부터의 콘주게이트의 충분한 절단은 세포에서 절단에 취약한 적어도 하나의 결합 (절단가능 결합)에 의해 제공되는 것으로 나타난다.

[0011] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 전구약물이다. 그와 같은 전구약물은 동물에게 투여되고 결국 더 많은 활성 형태로 대사작용된다. 예를 들면, 접합된 안티센스 화합물은 콘주게이트의 모두 또는 일부를 제거하기 위해 절단되어 콘주게이트의 모두 또는 일부가 결여된 안티센스 화합물의 활성 (또는 더 많은 활성) 형태를 야기한다.

[0012] 어떤 구현예에서, 콘주게이트는 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서 부착된다. 어떤 그와 같은 5'-콘주게이트는 3' 말단에서 부착된 유사한 콘주게이트 그룹을 갖는 대응물보다 더 효율적으로 절단된다. 어떤 구현예에서, 개선된 활성은 개선된 절단과 관련될 수 있다. 어떤 구현예에서, 5' 말단에 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 3' 말단에 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드보다 더 큰 효능을 갖는다 (예를 들면, 실시예 56, 81, 83, 및 84 참고). 게다가, 5'-부착은 보다 간단한 올리고뉴클레오타이드 합성을 허용한다. 전형적으로, 올리고뉴클레오타이드는 3'에서 5' 방향으로 고체 지지체 상에서 합성된다. 3'-접합된 올리고뉴클레오타

이드를 제조하기 위해, 전형적으로 전-접합된 3' 뉴클레오사이드를 고체 지지체에 부착시킨 다음 종래와 같이 올리고뉴클레오타이드를 만든다. 그러나, 상기 접합된 뉴클레오사이드를 고체 지지체에 부착하는 것은 합성에 문제가 된다. 게다가, 상기 접근법을 이용시, 이후 콘주게이트가 올리고뉴클레오타이드의 합성 내내 존재하고 이후 단계 동안 분해될 수 있거나 사용될 수 있는 반응 및 시약의 종류를 제한할 수 있다. 5'-접합된 올리고뉴클레오타이드에 대해 본원에 기재된 구조 및 기술을 이용하여, 당업자는 표준 자동화된 기술을 이용하여 올리고뉴클레오타이드를 합성하고 올리고뉴클레오타이드가 고체 지지체로부터 절단된 후 최종 (5'-most) 뉴클레오사이드를 갖는 콘주게이트를 도입할 수 있다.

[0013] 본 기술분야 및 본 개시내용에 비추어, 숙련가는 본원에서 임의의 콘주게이트 및 접합된 올리고뉴클레오타이드를 쉽게 제조할 수 있다. 게다가, 본원에 개시된 어떤 그와 같은 콘주게이트 및 접합된 올리고뉴클레오타이드의 합성은 더쉽고/거나 단계를 거의 필요로 하지 않으며, 따라서 이전에 개시된 콘주게이트보다 덜 비싸, 제조시 이점을 제공한다. 예를 들면, 어떤 콘주게이트 그룹의 합성은 더 적은 합성 단계로 구성되어, 이전에 기재된 콘주게이트 그룹과 비교하여 증가된 수율을 야기한다. 실시예 46에서의 GalNAc3-10 및 실시예 48에서의 GalNAc3-7 과 같은 콘주게이트 그룹들은 더 많은 화학적 중간체들의 조립을 요구하는 U.S. 제8,106,022호 또는 U.S. 제7,262,177호에 기술된 것과 같은 이전에 기재된 콘주게이트보다 훨씬 더 단순하다. 따라서, 본원에 기재된 이들 및 다른 콘주게이트들은 단일가닥 올리고뉴클레오타이드 및 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드 중 어느 가닥 (예를 들면, siRNA)을 포함하는, 임의의 올리고뉴클레오타이드를 이용하기 위해 이전에 기재된 화합물보다 이점을 갖는다.

[0014] 유사하게, 단지 1 또는 2개의 GalNAc 리간드를 갖는 콘주게이트 그룹들이 본원에서 개시된다. 나타난 바와 같이, 그러한 콘주게이트 그룹들은 안티센스 화합물의 활성을 개선한다. 그러한 화합물들은 3 개의 GalNAc 리간드를 포함하는 콘주게이트보다 제조하기 훨씬 더 쉽다. 1 또는 2개의 GalNAc 리간드를 포함하는 콘주게이트 그룹들은 단일가닥 올리고뉴클레오타이드 및 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드 중 어느 하나 (예를 들면, siRNA)를 포함하는, 임의의 안티센스 화합물에 부착될 수 있다.

[0015] 어떤 구현예에서, 본원의 콘주게이트들은 내성의 어떤 측정값을 실질적으로 변화시키지 않는다. 예를 들면, 접합된 안티센스 화합물들은 비접합된 모 화합물보다 더 면역원성이 아닌 것으로 본원에 나타나 있다. 효능이 개선되므로, 내성이 동일하게 유지되는 (또는 사실상 내성이 효능 증가와 비교하여 단지 약간 악화되긴 하지만) 구현예는 치료요법에 대해 개선된 특성을 갖는다.

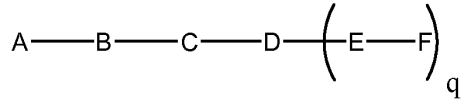
[0016] 어떤 구현예에서, 콘주게이션은 콘주게이션 부재시 덜 매력적인 결과를 갖는 방식으로 안티센스 화합물을 변경시키는 것을 허용한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 완전히 포스포로티오에이트 안티센스 화합물의 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포스포디에스테르 연결로 대체하는 것은 내성의 일부 측정에서 개선을 야기한다. 예를 들면, 어떤 예에서, 하나 이상의 포스포디에스테르를 갖는 그와 같은 안티센스 화합물은 각각의 연결이 포스포로티오에이트인 동일한 화합물보다 덜 면역원성이다. 그러나, 어떤 예에서, 실시예 26에서 나타난 바와 같이, 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결의 포스포디에스테르 연결로의 동일한 대체는 또한 감소된 세포성 흡수 및/또는 효능의 손실을 야기한다. 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 접합된 안티센스 화합물은 접합된 완전한-포스포로티오에이트 대응물과 비교하여 흡수 및 효능에서 손실이 거의 없거나 전혀 없이 연결에서 그와 같은 변화를 견딘다. 사실상, 어떤 구현예에서, 예를 들면, 실시예 44, 57, 59, 및 86에서, 콘주게이트 및 적어도 하나의 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드들은 실제로 또한 동일한 콘주게이트를 포함하는 완전한 포스포로티오에이트 대응물과 비교하여도 생체내에서 증가된 효능을 나타낸다. 게다가, 콘주게이션은 흡수/효능에서 실질적인 증가를 야기하므로, 상기 실질적인 증가에서의 작은 손실은 개선된 내성을 달성하기 위해 허용될 수 있다. 따라서, 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 적어도 하나의 포스포디에스테르 연결을 포함한다.

[0017] 어떤 구현예에서, 본원의 안티센스 화합물의 콘주게이션은 간세포에서 증가된 전달, 흡수 및 활성을 야기한다. 따라서, 더 많은 화합물은 간 조직에 전달된다. 그러나, 어떤 구현예에서, 상기 그러한 증가된 전달은 단독으로 활성의 전체 증가를 설명하지 못한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 더 많은 화합물은 간세포에 들어간다. 어떤 구현예에서, 심지어 증가된 간세포 흡수도 활성의 전체 증가를 설명하지 못한다. 그와 같은 구현예에서, 접합된 화합물의 생리적인 흡수는 증가된다. 예를 들면, 실시예 102에 나타난 바와 같이, GalNAc-함유 콘주게이트의 어떤 구현예는 비-실질 세포에 비해 간세포에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 농축을 증가시킨다. 이 농축은 간세포에서 발현된 유전자를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 대해 유익하다.

[0018] 어떤 구현예에서, 본원의 접합된 안티센스 화합물은 감소된 신장 노출을 야기한다. 예를 들면, 실시예 20에 나

타난 바와 같이, GalNAc-함유 콘주게이트의 어떤 구현예를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 농도는 GalNAc-함유 콘주게이트가 없는 안티센스 올리고뉴클레오타이드보다 신장에서 더 낮다. 이것은 몇 개의 유익한 치료적 연루성을 갖는다. 신장에서의 활성이 추구되지 않는 치료적 징후에 대해, 신장에의 노출은 상응하는 이점 없이 신장 독성을 위대롭게 한다. 게다가, 신장의 고농도는 전형적으로 화합물의 소변으로 손실을 야기하고, 이로써 더 빠른 청소능을 얻는다. 따라서 비-신장 표적에 대해, 신장 축적은 바람직하지 않다.

[0019] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 하기 식으로 나타낸 접합된 안티센스 화합물을 제공한다:



[0020]

여기서

[0021]

A는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고;

[0022]

B는 절단가능 모이어티이고;

[0023]

C은 콘주게이트 링커이고

[0024]

D는 분지화 그룹이고;

[0025]

각각의 E는 테더(tether)이고;

[0026]

각각의 F는 리간드이고; 그리고

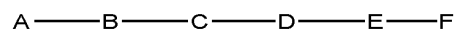
[0027]

q는 정수 1 내지 5이다.

[0028]

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

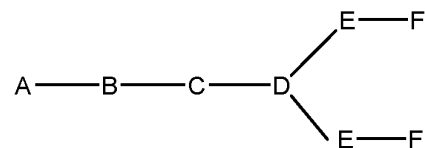
[0029]



[0030]

q = 2인 경우, 식은 하기와 같다:

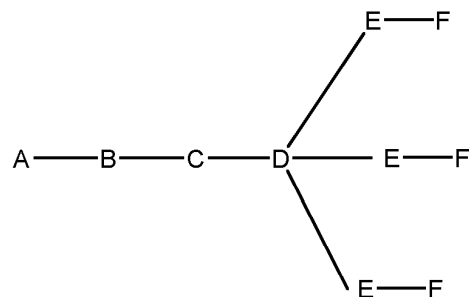
[0031]



[0032]

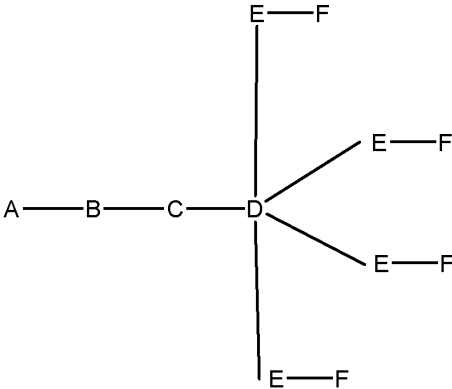
q = 3인 경우, 식은 하기와 같다:

[0033]



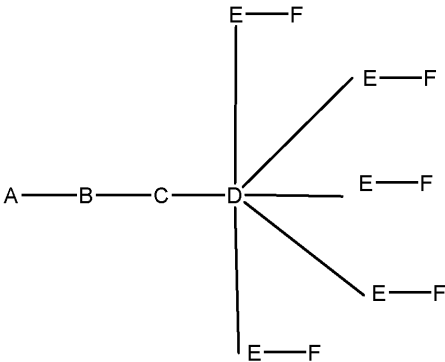
[0034]

[0035] q = 4인 경우, 식은 하기와 같다:



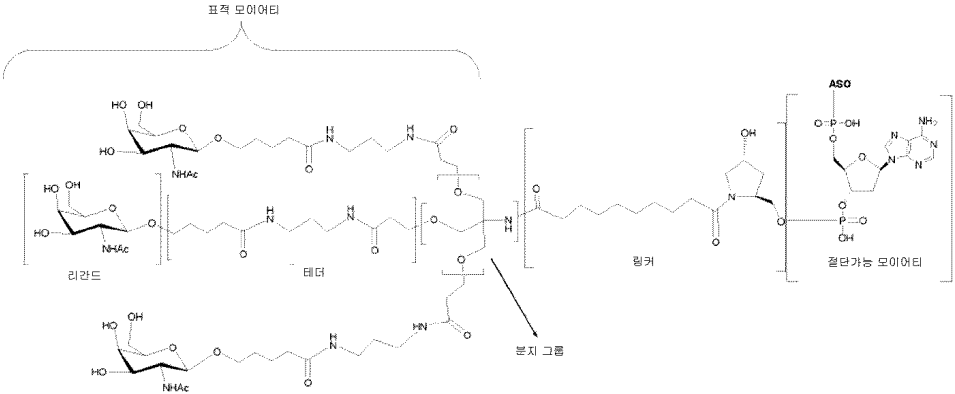
[0036]

[0037] q = 5인 경우, 식은 하기와 같다:



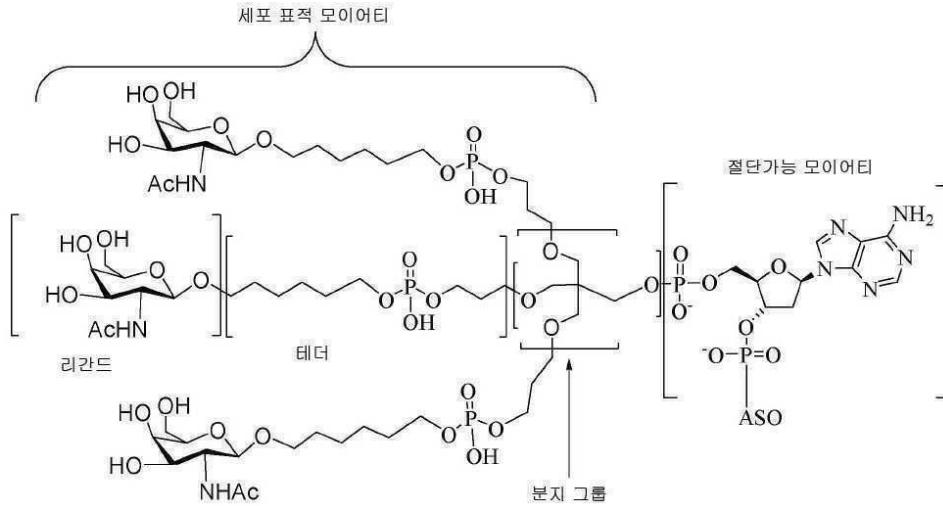
[0038]

[0039] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는 것으로 제공된다:



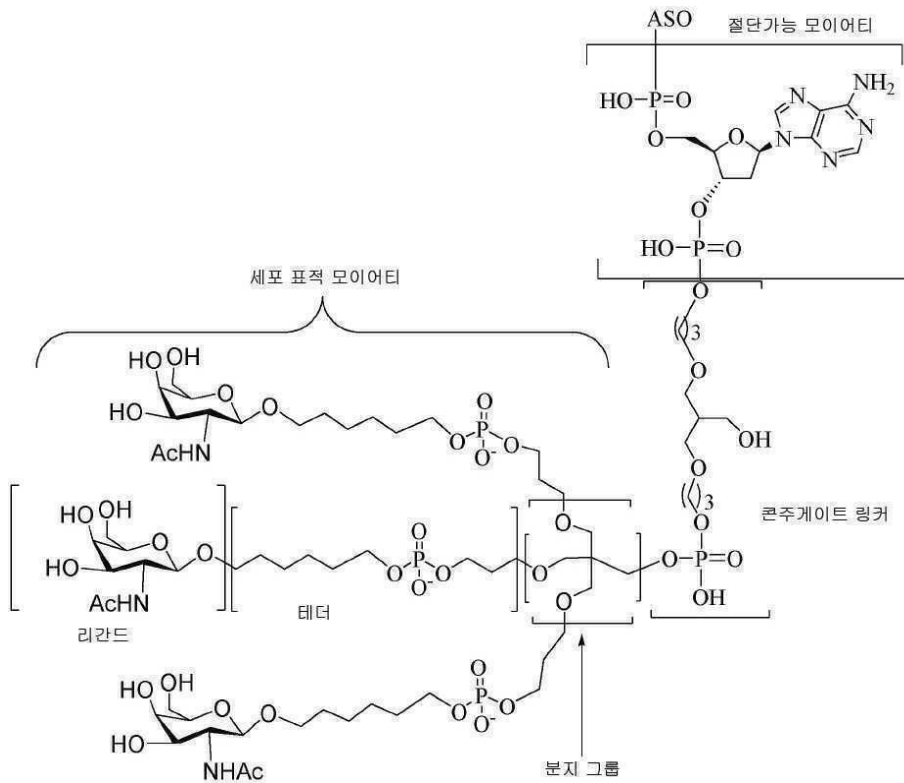
[0040]

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



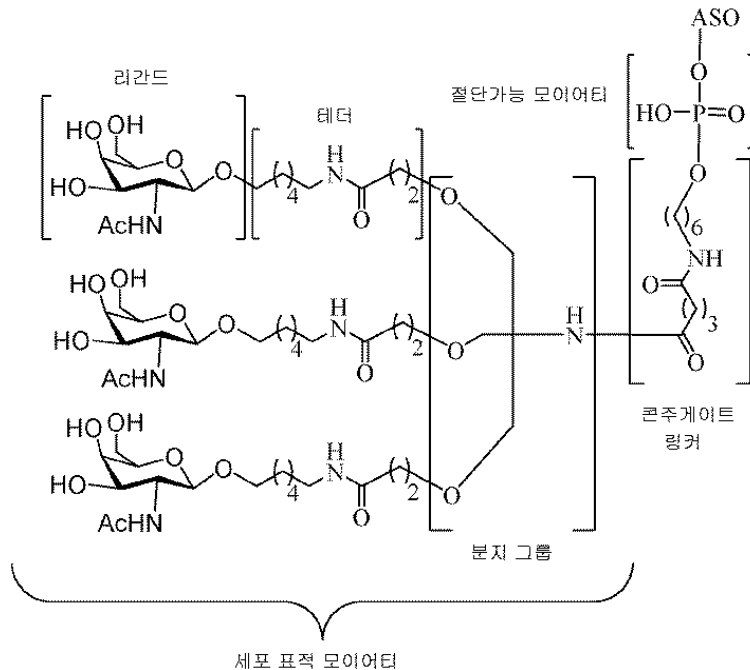
[0042]

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



[0044]

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



[0046]

[0047] 특정한 변수의 1 초과 (예를 들면, 1 초과 "m" 또는 "n")를 갖는 구현예에서, 달리 지적되지 않으면, 각각의 그와 같은 특정한 변수는 독립적으로 선택된다. 따라서, 1 초과 n을 갖는 구조에 대해, 각각의 n은 선택된 독립적으로 선택되고, 이로써, 서로 동일하거나 그렇지 않을 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048]

상세한 설명

[0049]

전술된 일반적인 설명 및 하기 상세한 설명은 단지 예시적이고 설명적인 것이고 개시내용을 제한하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 여기서, 단수의 사용은 달리 구체적으로 언급되지 않으면 복수를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "또는"의 사용은 달리 언급되지 않으면 "및/또는"을 의미한다. 더욱이, 용어 "포함하는" 뿐만 아니라 다른 형태, 예컨대 "포함한다" 및 "포함된"의 사용은 제한적인 것이 아니다. 또한, 용어들 예컨대 "요소" 또는 "구성성분"은, 달리 구체적으로 언급되지 않으면 하나의 유닛을 포함하는 요소 및 구성성분 둘 모두 및 1 초과 유닛을 포함하는 요소 및 구성성분을 포함한다.

[0050]

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

[0051]

A. 정의

[0052]

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

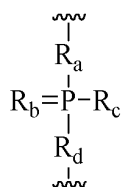
[0053]

달리 지적되지 않으면, 하기 용어들은 하기 의미를 갖는다:

- [0054] 본원에서 사용된 바와 같이, "뉴클레오사이드"는 핵염기 모이어티 및 당 모이어티를 포함하는 화합물을 의미한다. 뉴클레오사이드는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 자연 발생 뉴클레오사이드 (DNA 및 RNA에서 발견됨) 및 변형된 뉴클레오사이드. 뉴클레오사이드는 포스페이트 모이어티에 연결될 수 있다.
- [0055] 본원에서 사용된 바와 같이, "화학적 변형"은 자연 발생 대응물과 비교할 때 화합물에서 화학적 차이를 의미한다. 올리고뉴클레오타이드의 화학적 변형은 뉴클레오사이드 변형 (당 모이어티 변형 및 핵염기 변형 포함) 및 뉴클레오사이드간 연결 변형을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드에 관하여, 화학적 변형은 핵염기 서열에서 단지 차이를 포함하지 않는다.
- [0056] 본원에서 사용된 바와 같이, "푸라노실"은 4 개의 탄소 원자 및 하나의 산소 원자를 포함하는 5-원 고리를 포함하는 구조를 의미한다.
- [0057] 본원에서 사용된 바와 같이, "자연 발생 당 모이어티"는 자연 발생 RNA에서 발견된 리보푸라노실 또는 자연 발생 DNA로서 발견된 데옥시리보푸라노실을 의미한다.
- [0058] 본원에서 사용된 바와 같이, "당 모이어티"는 뉴클레오사이드의 자연 발생 당 모이어티 또는 변형된 당 모이어티를 의미한다.
- [0059] 본원에서 사용된 바와 같이, "변형된 당 모이어티"는 치환된 당 모이어티 또는 당 대응물을 의미한다.
- [0060] 본원에서 사용된 바와 같이, "치환된 당 모이어티"는 자연 발생 당 모이어티가 아닌 푸라노실을 의미한다. 치환된 당 모이어티는 2'-위치, 3'-위치, 5'-위치 및/또는 4'-위치에서 치환기를 포함하는 푸라노실을 비제한적으로 포함한다. 어떤 치환된 당 모이어티는 바이사이클릭 당 모이어티이다.
- [0061] 본원에서 사용된 바와 같이, "2'-치환된 당 모이어티"는 H 또는 OH 이외의 2'-위치에서 치환기를 포함하는 푸라노실을 의미한다. 달리 지적되지 않으면, 2'-치환된 당 모이어티는 바이사이클릭 당 모이어티가 아니다 (즉, 2'-치환된 당 모이어티의 2'-치환기는 푸라노실 고리의 또 하나의 원자에 대해 프릿지를 형성하지 않는다).
- [0062] 본원에서 사용된 바와 같이, "MOE"는 $-OCH_2CH_2OCH_3$ 을 의미한다.
- [0063] 본원에서 사용된 바와 같이, "2'-F 뉴클레오사이드"는 2' 위치에서 불소를 포함하는 당을 포함하는 뉴클레오사이드를 의미한다. 달리 지적되지 않으면, 2'-F 뉴클레오사이드 중 불소는 (천연 리보오스의 OH를 대체하는) 리보 위치에 있다.
- [0064] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "당 대응물"은 푸라노실을 포함하지 않고 뉴클레오사이드의 자연 발생 당 모이어티를 대체할 수 있는 구조를 의미하고, 이로써 수득한 뉴클레오사이드 서브-유닛은 함께 연결될 수 있고/거나 다른 뉴클레오사이드에 연결되어 상보적 올리고머 화합물을 혼성화할 수 있는 올리고머 화합물을 형성할 수 있다. 그와 같은 구조는 푸라노실보다 상이한 원자를 포함하는 고리 (예를 들면, 4, 6, 또는 7-원 고리); 비-산소 원자 (예를 들면, 탄소, 황, 또는 질소)에 의한 푸라노실의 산소의 대체; 또는 원자의 수의 변화 및 산소의 대체 둘 모두를 포함한다. 그와 같은 구조는 치환된 당 모이어티를 대신하는 것 (예를 들면, 추가의 치환기를 임의로 포함하는 6-원 카보사이클릭 바이사이클릭 당 대응물)에 상응하는 치환을 또한 포함할 수 있다. 당 대응물은 또한 더 많은 복합 당 대체물질 (예를 들면, 펩타이드 핵산의 비-고리계)를 포함한다. 당 대응물은 비제한적으로 모폴리노, 사이클로헥세닐 및 사이클로헥시톨을 포함한다.
- [0065] 본원에서 사용된 바와 같이, "바이사이클릭 당 모이어티"는 바이사이클릭 구조가 되는, 제 2 고리를 형성하기 위해 4 내지 7 원 고리의 2 개의 원자를 연결하는 브릿지를 포함하는 (비제한적으로 푸라노실을 포함하는) 4 내지 7 원 고리를 포함하는 변형된 당 모이어티를 의미한다. 어떤 구현예에서, 4 내지 7 원 고리는 당 고리이다. 어떤 구현예에서 4 내지 7 원 고리는 푸라노실이다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 브릿지는 푸라노실의 2'-탄소 및 4'-탄소를 연결한다.
- [0066] 본원에서 사용된 바와 같이, "뉴클레오타이드"는 포스페이트 연결 그룹을 추가로 포함하는 뉴클레오사이드를 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "연결된 뉴클레오타이드"는 포스페이트 연결에 의해 연결되거나 그렇지 않을 수 있고 따라서, 비제한적으로 "연결된 뉴클레오타이드"를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "연결된 뉴클레오타이드"는 연속적 서열로 연결된 뉴클레오타이드이다 (즉 추가의 뉴클레오타이드는 연결된 것들 사이에 존재하지 않는다).
- [0067] 본원에서 사용된 바와 같이, "핵염기"는 올리고뉴클레오타이드에 편입될 수 있는 뉴클레오타이드를 만들기 위해 당 모이어티에 연결될 수 있는 원자의 그룹을 의미하고, 상기 원자의 그룹은 또 하나의 올리고뉴클레오타이드

드 또는 핵산의 상보적 자연 발생 핵염기와 결합할 수 있다. 핵염기는 자연 발생일 수 있거나 변형될 수 있다.

- [0068] 본원에서 사용된 바와 같이 용어들, "비변형된 핵염기" 또는 "자연 발생 핵염기"는 RNA 또는 DNA의 자연 발생 헤테로사이클릭 핵염기: 퓨린계 아데닌 (A) 및 구아닌 (G), 및 피리미딘계 티민 (T), 시토신 (C) (5-메틸 C 포함), 및 우라실 (U)을 의미한다.
- [0069] 본원에서 사용된 바와 같이, "변형된 핵염기"는 자연 발생 핵염기가 아닌 임의의 핵염기를 의미한다.
- [0070] 본원에서 사용된 바와 같이, "변형된 뉴클레오타이드"는 자연 발생 RNA 또는 DNA 뉴클레오타이드와 비교하여 적어도 하나의 화학적 변형을 포함하는 뉴클레오타이드를 의미한다. 변형된 뉴클레오타이드는 변형된 당 모이어티 및/또는 변형된 핵염기를 포함한다.
- [0071] 본원에서 사용된 바와 같이, "바이사이클릭 뉴클레오타이드" 또는 "BNA"는 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0072] 본원에서 사용된 바와 같이, "구속된 에틸 뉴클레오타이드" 또는 "cEt"는 4'-CH(CH₃)-O-2' 브릿지를 포함하는 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0073] 본원에서 사용된 바와 같이, "잠겨진 핵산 뉴클레오타이드" 또는 "LNA"는 4'-CH₂-O-2' 브릿지를 포함하는 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0074] 본원에서 사용된 바와 같이, "2'-치환된 뉴클레오타이드"는 H 또는 OH 외에 2'-위치에서 치환기를 포함하는 뉴클레오타이드 의미한다. 달리 지적되지 않으면, 2'-치환된 뉴클레오타이드는 바이사이클릭 뉴클레오타이드가 아니다.
- [0075] 본원에서 사용된 바와 같이, "데옥시뉴클레오타이드"는 자연 발생 데옥시리보뉴클레오타이드 (DNA)에서 발견되는 바와 같이, 2'-H 푸라노실 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오타이드를 의미한다. 어떤 구현예에서, 2'-데옥시뉴클레오타이드는 변형된 핵염기를 포함할 수 있거나 RNA 핵염기 (예를 들면, 우라실)를 포함할 수 있다.
- [0076] 본원에서 사용된 바와 같이, "올리고뉴클레오타이드"는 복수의 연결된 뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 의미한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 1 이상의 비변형된 리보뉴클레오타이드 (RNA) 및/또는 비변형된 데옥시리보뉴클레오타이드 (DNA) 및/또는 1 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0077] 본원에서 사용된 바와 같이 "올리고뉴클레오타이드"는, 뉴클레오타이드간 연결의 어떤 것도 인 원자를 함유하지 않는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0078] 본원에서 사용된 바와 같이, "변형된 올리고뉴클레오타이드"는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오타이드 및/또는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0079] 본원에서 사용된 바와 같이, "연결" 또는 "연결 그룹"은 원자의 2 이상의 다른 그룹과 함께 연결되는 원자의 그룹을 의미한다.
- [0080] 본원에서 사용된 바와 같이 "뉴클레오타이드간 연결"은 올리고뉴클레오타이드에서 인접한 뉴클레오타이드 사이의 공유 결합을 의미한다.
- [0081] 본원에서 사용된 바와 같이 "자연 발생 뉴클레오타이드간 연결"은 3' 내지 5' 포스포디에스테르 연결을 의미한다.
- [0082] 본원에서 사용된 바와 같이, "변형된 뉴클레오타이드간 연결"은 자연 발생 뉴클레오타이드간 연결 이외의 임의의 뉴클레오타이드간 연결을 의미한다.
- [0083] 본원에서 사용된 바와 같이, "말단 뉴클레오타이드간 연결"은 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 규정된 영역의 마지막 2 개의 뉴클레오타이드의 사이의 연결을 의미한다.
- [0084] 본원에서 사용된 바와 같이, "인 연결 그룹"은 인 원자를 포함하는 연결 그룹을 의미한다. 인 연결 그룹은 하기 식을 갖는 그룹을 비제한적으로 포함한다:



[0085]

[0086]

여기서:

[0087]

R_a 및 R_d 각각은, 독립적으로, O, S, CH_2 , NH, 또는 NJ_1 이고 여기서 J_1 은 C_1-C_6 알킬 또는 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0088]

R_b 은 O 또는 S이고;

[0089]

R_c 은 OH, SH, C_1-C_6 알킬, 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, 치환된 C_1-C_6 알콕시, 아미노 또는 치환된 아미노이고; 그리고

[0090]

J_1 은 R_b 은 O 또는 S이다.

[0091]

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

[0092]

본원에서 사용된 바와 같이, "뉴클레오사이드간 인 연결 그룹"은 2 개의 뉴클레오사이드를 직접적으로 연결하는 인 연결 그룹을 의미한다.

[0093]

본원에서 사용된 바와 같이, "비-뉴클레오사이드간 인 연결 그룹"은 2 개의 뉴클레오사이드를 직접적으로 연결하지 않는 인 연결 그룹을 의미한다. 어떤 구현예에서, 비-뉴클레오사이드간 인 연결 그룹은 뉴클레오사이드 뉴클레오사이드 이외의 그룹에 연결한다. 어떤 구현예에서, 비-뉴클레오사이드간 인 연결 그룹은 2 개의 그룹을 연결하고, 이것 중 어떤 것도 뉴클레오사이드가 아니다.

[0094]

본원에서 사용된 바와 같이, "중성 연결 그룹"은 충전되지 않은 연결 그룹을 의미한다. 중성 연결 그룹은 비제한적으로 하기를 포함한다: 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, MMI ($-CH_2-N(CH_3)-O-$), 아마이드-3 ($-CH_2-C(=O)-N(H)-$), 아마이드-4 ($-CH_2-N(H)-C(=O)-$), 포름아세탈 ($-O-CH_2-O-$), 및 티오포름아세탈 ($-S-CH_2-O-$). 추가의 중성 연결 그룹은 실록산 (디알킬실록산), 카복실레이트 에스테르, 카복사마이드, 설퍼아이드, 설퍼네이트 에스테르 및 아마이드를 포함하는 비이온성 연결을 포함한다 (참고 예를 들면: Carbohydrate Modifications in Antisense Research; Y.S. Sanghvi 및 P.D. Cook Eds. ACS Symposium 시리즈 580; Chapters 3 및 4, (pp. 40-65)). 추가의 중성 연결 그룹은 혼합된 N, O, S 및 CH_2 성분 부분을 포함하는 비이온성 연결을 포함한다.

[0095]

본원에서 사용된 바와 같이, "뉴클레오사이드간 중성 연결 그룹"은 2 개의 뉴클레오사이드를 직접적으로 연결하는 중성 연결 그룹을 의미한다.

[0096]

본원에서 사용된 바와 같이, "비-뉴클레오사이드간 중성 연결 그룹"은 2 개의 뉴클레오사이드를 직접적으로 연결하지 않는 중성 연결 그룹을 의미한다. 어떤 구현예에서, 비-뉴클레오사이드간 중성 연결 그룹은 뉴클레오사이드 뉴클레오사이드 이외의 그룹에 연결한다. 어떤 구현예에서, 비-뉴클레오사이드간 중성 연결 그룹은 2 개의 그룹을 연결하고, 이것 중 어떤 것도 뉴클레오사이드가 아니다.

[0097]

본원에서 사용된 바와 같이, "올리고머 화합물"은 2 이상의 하부구조를 포함하는 폴리머 구조를 의미한다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 1 이상의 콘주게이트 그룹 및/또는 말단기를 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 올리고뉴클레오타이드로 구성된다. 올리고머 화합물은 또한 자연 발생 핵산을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 1 이상의 연결된 모노머 서브유닛의 골격을 포함하고, 여기서 각각의 연결된 모노머 서브유닛은 헤테로사이클릭 염기 모이어티에 직접적으로 또는 간접적으로 부착된다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 헤테로사이클릭 염기 모이어티에 연결되지 않는 모노머 서브유닛을 또한 포함할 수 있고, 그렇게 함으로써 무염기성 부위를 제공한다. 어떤 구현예에서, 모노머 서브유닛, 당 모이어티 또는 대용물 및 헤테로사이클릭 염기 모이어티를 잇는 연결은 독립적으로 변형될 수 있다. 어떤 구현예에서, 헤테로사이클릭 염기를 포함할 수 있거나 그렇지 않은 연결-당 단위는, 모방체 예컨대 펩타이드 핵산 중 모노머로 치환될 수 있다.

- [0098] 본원에서 사용된 바와 같이, "말단기"는 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단 또는 5' 말단 중 하나 또는 둘 모두에 부착된 1 이상의 원자를 의미한다. 어떤 구현예에서 말단기는 콘주게이트 그룹이다. 어떤 구현예에서, 말단기는 1 이상의 말단기 뉴클레오사이드를 포함한다.
- [0099] 본원에서 사용된 바와 같이, "콘주게이트" 또는 "콘주게이트 그룹"은 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고머 화합물에 결합된 원자 또는 원자의 그룹을 의미한다. 일반적으로, 콘주게이트 그룹은 약동학적, 약력학적, 결합, 흡수, 세포성 분포, 세포성 흡수, 전하 및/또는 청소능 특성을 비제한적으로 포함하는, 부착된 화합물의 1 이상의 특성을 변형시킨다.
- [0100] 본원에서 사용된 바와 같이, 콘주게이트 그룹의 문맥 중 "콘주게이트 링커" 또는 "링커"는 임의의 원자 또는 원자의 그룹을 포함하고 (1) 올리고뉴클레오타이드를 콘주게이트 그룹의 또 하나의 부분 또는 (2) 콘주게이트 그룹의 2 이상의 부분에 공유 결합하는 콘주게이트 그룹의 구분을 의미한다.
- [0101] 콘주게이트 그룹은 올리고머 화합물 예컨대 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 대한 공유 결합을 형성하는 결합을 제공하는 라디칼로서 본원에서 보여진다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물 상의 부착점은 올리고머 화합물의 3' 말단 뉴클레오사이드의 3'-하이드록실 그룹의 3'-산소 원자이다. 어떤 구현예에서 올리고머 화합물 상의 부착점은 올리고머 화합물의 5' 말단 뉴클레오사이드의 5'-하이드록실 그룹의 5'-산소 원자이다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물에 대한 부착을 형성하는 결합은 절단가능 결합이다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 그와 같은 절단가능 결합은 절단가능 모이어티의 모두 또는 일부를 구성한다.
- [0102] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 절단가능 모이어티 (예를 들면, 절단가능 결합 또는 절단가능 뉴클레오사이드) 및 탄수화물 클러스터 부분, 예컨대 GalNAc 클러스터 부분을 포함한다. 그와 같은 탄수화물 클러스터 부분은 하기를 포함한다: 표적 모이어티, 및 임의로, 콘주게이트 링커. 어떤 구현예에서, 탄수화물 클러스터 부분은 리간드의 수 및 동일성에 의해 확인된다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 탄수화물 클러스터 부분은 3 개의 GalNAc 그룹을 포함하고 "GalNAc₃"로 칭한다. 어떤 구현예에서, 탄수화물 클러스터 부분은 4 개의 GalNAc 그룹을 포함하고 "GalNAc₄"로 칭한다. (구체적인 테더, 분지화 및 콘주게이트 링커 그룹을 갖는) 구체적인 탄수화물 클러스터 부분은 본원에서 기재되어 있고, 로마 숫자 그 다음 하첨자 "a"로 지정된다. 따라서 "GalNAc3-1_a"는 3 개의 GalNAc 그룹을 갖는 콘주게이트 그룹 및 구체적으로 확인된 테더, 분지화 및 연결 그룹의 구체적인 탄수화물 클러스터 부분을 의미한다. 그와 같은 탄수화물 클러스터 단편은 절단가능 모이어티, 예컨대 절단가능 결합 또는 절단가능 뉴클레오사이드를 통해 올리고머 화합물에 부착된다.
- [0103] 본원에서 사용된 바와 같이, "절단가능 모이어티"는 생리적 조건 하에서 분열될 수 있는 결합 또는 그룹을 의미한다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 세포 또는 아-세포성 구획, 예컨대 용해소체 내에서 절단된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 내인성 효소, 예컨대 뉴클레아제에 의해 절단된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 1, 2, 3, 4, 또는 그 초과 4 개의 절단가능 결합을 갖는 원자의 그룹을 포함한다.
- [0104] 본원에서 사용된 바와 같이, "절단가능 결합"은 분열될 수 있는 임의의 화학 결합을 의미한다. 어떤 구현예에서, 절단가능 결합은 하기 중으로부터 선택된다: 아미드, 폴리아미드, 에스테르, 에테르, 포스포디에스테르의 에스테르 하나 또는 둘 모두, 포스포이트 에스테르, 카바메이트, 디-설파이드, 또는 펩타이드.
- [0105] 본원에서 사용된 바와 같이, "탄수화물 클러스터"는 스캐폴드 또는 링커 그룹에 부착된 1 이상의 탄수화물 잔기를 갖는 화합물을 의미한다. 예를 들면 하기 (참고: Maier 등, "Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting," *Bioconjugate Chemistry*, 2003, (14): 18-29, 이것은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있음, 또는 Rensen 등, "Design and Synthesis of Novel *N*-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor," *J. Med. Chem.* 2004, (47): 5798-5808, 탄수화물 콘주게이트 클러스터의 예에 대해).
- [0106] 본원에서 사용된 바와 같이, "탄수화물 유도체"는 탄수화물을 개시 물질 또는 중간체로서 사용하여 합성될 수 있는 임의의 화합물을 의미한다.
- [0107] 본원에서 사용된 바와 같이, "탄수화물"은 자연 발생 탄수화물, 변형된 탄수화물, 또는 탄수화물 유도체를 의미한다.
- [0108] 본원에서 사용된 바와 같이 "보호 그룹"은 당해분야의 숙련자에게 공지된 임의의 화합물 또는 보호 그룹을 의미한다. 보호 그룹의 비-제한적인 예는 하기에서 발견될 수 있다: "Protective Groups in Organic Chemistry",

T. W. 그린, P. G. M. Wuts, ISBN 0-471-62301-6, John Wiley & Sons, Inc, New York, 이것은 본원에 그 전체가 참고로 편입되어 있다.

- [0109] 본원에서 사용된 바와 같이, "단일가닥"은 그것의 보체에 대해 혼성화되지 않고 안정한 자가-듀플렉스를 형성하기 위한 충분한 자가-상보성이 없는 올리고머 화합물을 의미한다.
- [0110] 본원에서 사용된 바와 같이, "이중가닥"은 서로 혼성화된 한 쌍의 올리고머 화합물 또는 헤어핀 구조를 형성하는 단일 자가-상보적 올리고머 화합물을 의미한다. 어떤 구현예에서, 이중-가닥 올리고머 화합물은 제 1 및 제 2 올리고머 화합물을 포함한다.
- [0111] 본원에서 사용된 바와 같이, "안티센스 화합물"은, 적어도 하나의 안티센스 활성이 생기는, 혼성화할 수 있는 표적 핵산에 대해 상보적인 올리고뉴클레오타이드의 적어도 부분을 포함하거나 그것으로 구성된 화합물을 의미한다.
- [0112] 본원에서 사용된 바와 같이, "안티센스 활성"은 그것의 표적 핵산에 대한 안티센스 화합물의 혼성화가 그 원인인 임의의 검출가능한 및/또는 측정가능한 변화를 의미한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 활성은 표적 핵산 전사체 (예를 들면 mRNA)의 양 또는 활성의 조절을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 활성은 전-mRNA의 스플라이싱의 조절을 포함한다.
- [0113] 본원에서 사용된 바와 같이, "RNase H 기반 안티센스 화합물"이란, 안티센스 화합물을 의미하고, 여기서 안티센스 화합물의 안티센스 활성의 적어도 일부는 표적 핵산에 대한 안티센스 화합물의 혼성화 및 RNase H에 의한 표적 핵산의 차후의 절단이 그 원인이다.
- [0114] 본원에서 사용된 바와 같이, "RISC 기반 안티센스 화합물"은 안티센스 화합물을 의미하고, 여기서 안티센스 화합물의 안티센스 활성의 적어도 일부는 RNA 유도된 사일렌싱 복합체 (RISC)가 그 원인이다.
- [0115] 본원에서 사용된 바와 같이, "검출" 또는 "측정"이란, 검출 또는 측정을 위한 시험 또는 검정이 수행된다는 것을 의미한다. 그와 같은 검출 및/또는 측정으로 값이 제로일 수 있다. 따라서, 검출 또는 측정용 시험으로 활성 없음 (활성 제로)을 발현하면, 그럼에도 불구하고 상기 활성을 검출 또는 측정하는 단계가 수행되었다.
- [0116] 본원에서 사용된 바와 같이, "검출가능한 및/또는 측정가능한 활성"이란, 제로가 아닌 통계적으로 유의미한 활성을 의미한다.
- [0117] 본원에서 사용된 바와 같이, "본질적으로 변하지 않는다"란, 특히 훨씬 더 변하는 또 하나의 파라미터에 대해 특정한 파라미터의 변화가 거의 없거나 없다는 것을 의미한다. 어떤 구현예에서, 파라미터는, 5% 미만 변할 때 본질적으로 변하지 않는다. 어떤 구현예에서, 파라미터는, 2-배 미만 변하지만 또 하나의 파라미터가 적어도 10-배 변한다면 본질적으로 변하지 않는다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 안티센스 활성은 표적 핵산의 양의 변화이다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 비-표적 핵산의 양은, 그것이 표적 핵산보다 훨씬 더 적게 변하지만 그 변화가 제로일 필요는 없다면, 본질적으로 변하지 않는다.
- [0118] 본원에서 사용된 바와 같이, "발현"은, 유전자가 결국 단백질로 되는 과정을 의미한다. 발현은, 비제한적으로, 전사, 후-전사 변형 (예를 들면, 5'-캡의 스플라이싱, 폴리아데닐화, 부가), 및 번역을 포함한다.
- [0119] 본원에서 사용된 바와 같이, "표적 핵산"은, 안티센스 화합물이 원하는 안티센스 활성이 생기도록 혼성화하는 것으로 의도된 핵산 분자를 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 생리적 조건 하에서 혼성화를 허용하기 위해 그것의 표적 핵산에 대해 충분한 상보성을 갖는다.
- [0120] 본원에서 사용된 바와 같이, "핵염기 상보성" 또는 "상보성"은, 핵염기를 참조할 때, 또 하나의 핵염기와 염기 짝짓기할 수 있는 핵염기를 의미한다. 예를 들면, DNA에서, 아데닌 (A)은 티민 (T)에 대해 상보적이다. 예를 들면, RNA에서, 아데닌 (A)은 우라실 (U)에 대해 상보적이다. 어떤 구현예에서, 상보적 핵염기는 그것의 표적 핵산의 핵염기와 염기 짝짓기할 수 있는 안티센스 화합물의 핵염기를 의미한다. 예를 들면, 안티센스 화합물의 어떤 위치에 있는 핵염기가 표적 핵산의 어떤 위치에서 핵염기와 수소 결합할 수 있다면, 이때 올리고뉴클레오타이드와 표적 핵산 사아의 수소 결합의 위치는 핵염기쌍에서 상보적인 것으로 간주된다. 어떤 변형을 포함하는 핵염기는 대응물 핵염기와 쌍을 이루는 능력을 유지할 수 있고 따라서, 여전히 핵염기 상보성을 유지할 수 있다.
- [0121] 본원에서 사용된 바와 같이, 핵염기에 관한 "비-상보적"이란, 수소 결합을 서로 형성하지 않는 한 쌍의 핵염기를 의미한다.

- [0122] 본원에서 사용된 바와 같이, 올리고머 화합물 (예를 들면, 연결된 뉴클레오사이드, 올리고뉴클레오타이드, 또는 핵산)에 관한 "상보적"이란, 핵염기 상보성을 통해 또 하나의 올리고머 화합물 또는 그것의 영역과 혼성화하기 위한 그와 같은 올리고머 화합물 또는 그것의 영역의 용량을 의미한다. 상보적 올리고머 화합물은 각각의 뉴클레오사이드에서 핵염기 상보성을 가질 필요는 없다. 오히려, 일부 미스매치가 용인된다. 어떤 구현예에서, 상보적 올리고머 화합물 또는 영역은 핵염기의 70%에서 상보적이다 (70% 상보적). 어떤 구현예에서, 상보적 올리고머 화합물 또는 영역은 80% 상보적이다. 어떤 구현예에서, 상보적 올리고머 화합물 또는 영역은 90% 상보적이다. 어떤 구현예에서, 상보적 올리고머 화합물 또는 영역은 95% 상보적이다. 어떤 구현예에서, 상보적 올리고머 화합물 또는 영역은 100% 상보적이다.
- [0123] 본원에서 사용된 바와 같이, "미스매치"는, 제 1 및 제 2 올리고머 화합물이 정렬될 때 제 2 올리고머 화합물의 상응하는 위치에서 핵염기와 짝짓기할 수 없는 제 1 올리고머 화합물의 핵염기를 의미한다. 제 1 및 제 2 올리고머 화합물 중 하나 또는 둘 모두는 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0124] 본원에서 사용된 바와 같이, "혼성화"는 상보적 올리고머 화합물 (예를 들면, 안티센스 화합물 및 그것의 표적 핵산)의 짝짓기를 의미한다. 특정한 기전에 제한되지 않으면서, 짝짓기의 가장 공통의 기전은 상보적 핵염기 사이의 왓슨-크릭, 휴그스틴 또는 역전된 휴그스틴 수소 결합일 수 있는 수소 결합을 수반한다.
- [0125] 본원에서 사용된 바와 같이, "특이적으로 혼성화하는"이란, 또 하나의 핵산 부위에 혼성화하는 것보다 더 큰 친화성으로 하나의 핵산 부위에 혼성화하기 위한 올리고머 화합물의 능력을 의미한다.
- [0126] 본원에서 사용된 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 부분에 대한 "완전히 상보적"이란, 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 부분의 각각의 핵염기가 상보적 핵산 또는 그것의 인접부의 핵염기와 짝짓기할 수 있다는 것을 의미한다. 따라서, 완전히 상보적 영역은 하나의 가닥에서 미스매치 또는 비혼성화된 핵염기를 포함하지 않는다.
- [0127] 본원에서 사용된 바와 같이, "퍼센트 상보성"은 표적 핵산의 동등-길이부에 대해 상보적인 올리고머 화합물의 핵염기의 백분율을 의미한다. 퍼센트 상보성은 올리고머 화합물의 총 길이로, 표적 핵산에서 상응하는 위치에서 핵염기에 대해 상보적인 올리고머 화합물의 핵염기의 수를 나누어서 계산된다.
- [0128] 본원에서 사용된 바와 같이, "퍼센트 동일성"은 제 1 핵산에서 핵염기의 총수에 의해 분할된, 제 2 핵산에서의 상응하는 위치에서 핵염기와 동일한 (화학적 변형에 독립적인) 유형인 제 1 핵산에서 핵염기의 수를 의미한다.
- [0129] 본원에서 사용된 바와 같이, "조절"은 조절 전의 분자, 기능, 또는 활성의 양 또는 품질과 비교할 때, 분자, 기능, 또는 활성의 양 또는 품질의 변화를 의미한다. 예를 들면, 조절은 유전자 발현에서 변화, 증가 (자극 또는 유도) 또는 축소감소 (억제 또는 축소)를 포함한다. 추가 예로서, 발현의 조절은 전-mRNA 처리의 스플라이스 부위 선택의 변화를 포함할 수 있고, 조절의 부재에서의 양과 비교하여 특정한 스플라이스 -변이체의 절대적인 또는 상대적인 양이 변한다.
- [0130] 본원에서 사용된 바와 같이, "화학적 모티프"는 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 영역에서 화학적 변형의 패턴을 의미한다. 모티프는 어떤 뉴클레오사이드 및/또는 올리고뉴클레오타이드의 어떤 연결 그룹에서의 변형에 의해 규정될 수 있다.
- [0131] 본원에서 사용된 바와 같이, "뉴클레오사이드 모티프"는 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 영역에서 뉴클레오사이드 변형의 패턴을 의미한다. 그와 같은 올리고뉴클레오타이드의 연결은 변형 또는 비변형될 수 있다. 달리 지적되지 않으면, 뉴클레오사이드를 단지 기재하는 본원의 모티프는 뉴클레오사이드 모티프인 것으로 의도된다. 따라서, 그와 같은 경우에, 연결은 제한되지 않는다.
- [0132] 본원에서 사용된 바와 같이, "당 모티프"는 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 영역에서 당 변형의 패턴을 의미한다.
- [0133] 본원에서 사용된 바와 같이, "연결 모티프"는 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 영역에서 연결 변형의 패턴을 의미한다. 그와 같은 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오사이드는 변형 또는 비변형될 수 있다. 달리 지적되지 않으면, 연결을 단지 기재하는 본원의 모티프는 연결 모티프인 것으로 의도된다. 따라서, 그와 같은 경우에, 뉴클레오사이드는 제한되지 않는다.
- [0134] 본원에서 사용된 바와 같이, "핵염기 변형 모티프"는 올리고뉴클레오타이드에 따른 핵염기에 대한 변형의 패턴을 의미한다. 달리 지적되지 않으면, 핵염기 변형 모티프는 핵염기 서열에 독립적이다.

- [0135] 본원에서 사용된 바와 같이, "서열 모티프"는 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 부분을 따라 배열된 핵염기의 패턴을 의미한다. 달리 지적되지 않으면, 서열 모티프는 화학적 변형에 독립적이고 따라서 화학적 변형을 포함하지 않으면서 화학적 변형의 임의의 조합을 가질 수 있다.
- [0136] 본원에서 사용된 바와 같이, "유형"의 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오사이드에 관한 "변형의 유형"은 뉴클레오사이드의 화학적 변형을 의미하고 변형된 및 비변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 따라서, 달리 지적되지 않으면, "제 1 형의 변형을 갖는 뉴클레오사이드"는 비변형된 뉴클레오사이드일 수 있다.
- [0137] 본원에서 사용된 바와 같이, "상이하게 변형된"은 변형의 부재를 포함하여, 서로 상이한 화학적 변형 또는 화학적 치환기를 의미한다. 따라서, 예를 들면, MOE 뉴클레오사이드 및 비변형된 DNA 뉴클레오사이드는, DNA 뉴클레오사이드는 비변형될지라도 "상이하게 변형"된다. 마찬가지로, DNA 및 RNA는, 둘 모두가 자연 발생 비변형된 뉴클레오사이드일지라도, "상이하게 변형"된다. 동일한하지만 상이한 핵염기를 포함하는 뉴클레오사이드는 상이하게 변형되지 않는다. 예를 들면, 2'-OMe 변형된 당 및 비변형된 아데닌 핵염기를 포함하는 뉴클레오사이드 및 2'-OMe 변형된 당 및 비변형된 티민 핵염기를 포함하는 뉴클레오사이드는 상이하게 변형되지 않는다.
- [0138] 본원에서 사용된 바와 같이, "동일한 유형의 변형"은 변형의 부재를 포함하여 서로 동일한 변형을 의미한다. 따라서, 예를 들면, 2 개의 비변형된 DNA 뉴클레오사이드는, DNA 뉴클레오사이드가 비변형될지라도 "동일한 유형의 변형"을 갖는다. 동일한 유형 변형을 갖는 그와 같은 뉴클레오사이드는 상이한 핵염기를 포함할 수 있다.
- [0139] 본원에서 사용된 바와 같이, "별개의 영역"은 올리고뉴클레오타이드의 부분을 의미하고, 상기 화학적 변형 또는 임의의 인접하는 구간의 화학적 변형의 모티프는 별개의 영역이 서로 구별되도록 하는 적어도 하나의 차이를 포함한다.
- [0140] 본원에서 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제"는 동물에게 투여하는데 사용하기에 적당한 임의의 물질을 의미한다. 어떤 구현예에서, 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제는 멸균한 염수이다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 멸균한 염수는 약품 등급 염수이다.
- [0141] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "대사성 장애"는 대사의 조절 장애 - 에너지를 생산하기 위해 음식의 분해와 연관된 화학 반응의 복잡 세트를 주로 특징으로 하는 질환 또는 병태를 의미한다.
- [0142] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "심혈관 장애"는 심장 또는 혈관의 손상된 기능을 주요하게 특징으로 하는 질환 또는 병태를 의미한다.
- [0143] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "모노 또는 폴리사이클릭 고리계"는 단일 또는 폴리사이클릭 라디칼 고리계로부터 선택된 모든 고리계를 포함하는 것을 의미하고, 상기 고리는 융합 또는 연결되고, 지방족, 지환족, 아릴, 헤테로아릴, 아랄킬, 아릴알킬, 헤테로사이클릭, 헤테로아릴, 헤테로방향족 및 헤테로아릴알킬로부터 개별적으로 선택된 단일 및 혼합된 고리계를 포함하는 것을 의미한다. 그와 같은 모노 및 폴리 고리형 구조는, 각각이 동일한 수준의 포화를 갖거나, 각각이, 독립적으로, 완전 포화된, 부분적으로 포화된 또는 완전 불포화됨을 포함하는 가변 포화도를 갖는 고리를 함유할 수 있다. 각각의 고리는 C, N, O 및 S로부터 선택된 고리 원자를 포함하여 헤테로사이클릭 고리 뿐만 아니라 혼합된 모티프 예컨대 벤즈이미다졸에서 존재할 수 있는 C 고리 원자만을 포함하는 고리를 얻을 수 있고, 여기서 하나의 고리는 유일한 탄소 고리 원자를 가지며 융합 고리는 2 개의 질소 원자를 갖는다. 모노 또는 폴리사이클릭 고리계는 치환기 그룹 예컨대 고리 중의 하나에 부착된 2 =O 그룹을 갖는 프탈이미드로 추가로 치환될 수 있다. 모노 또는 폴리사이클릭 고리계는 다양한 전략을 사용하여 예컨대 직접적으로 고리 원자를 통해 모 분자에 부착될 수 있고, 다중 고리 원자를 통해, 치환기 그룹을 통해 또는 이작용성 연결 모이어티를 통해 융합될 수 있다.
- [0144] 본원에서 사용된 바와 같이, "전구약물"은 불활성 이하 활성 형태의 화합물을 의미하고, 이 화합물은, 대상체에 투여될 때, 대사작용되어 활성, 또는 더 많은 활성, 화합물 (예를 들면, 약물)을 형성한다.
- [0145] - 본원에서 사용된 바와 같이, "치환기" 및 "치환기 그룹"은, 명명된 모 화합물의 원자 또는 그룹을 대체하는 원자 또는 그룹을 의미한다. 예를 들면 변형된 뉴클레오사이드의 치환기는 자연 발생 뉴클레오사이드에서 발견된 원자 또는 그룹과 상이한 임의의 원자 또는 그룹이다 (예를 들면, 변형된 2'-치환기는 H 또는 OH 이외의 뉴클레오사이드의 2'-위치에 있는 임의의 원자 또는 그룹이다). 치환기 그룹은 보호 또는 비보호될 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 개시내용의 화합물은 모 화합물의 하나 또는 하나 초과와 위치에서 치환기를 갖는다. 치환기는 또한, 다른 치환기 그룹으로 추가로 치환될 수 있고 직접적으로 또는 연결 그룹 예컨대 알킬 또는 하이드로카르빌 그룹을 통해 모 화합물에 부착될 수 있다.

- [0146] 마찬가지로, 본원에서 사용된 바와 같이, 화학적 관능 그룹에 관한 "치환기"는 명명된 관능 그룹에 통상적으로 존재하는 원자 또는 원자의 그룹과 상이한 원자 또는 원자의 그룹을 의미한다. 어떤 구현예에서, 치환기는 관능 그룹의 수소 원자를 대체한다 (예를 들면, 어떤 구현예에서, 치환된 메틸 그룹의 치환기는 비치환된 메틸 그룹의 수소 원자 중의 하나는 대체하는 수소 이외의 원자 또는 그룹이다). 달리 지적되지 않으면, 치환기로서 잘 받아들이는 그룹은 비제한적으로, 하기를 포함한다: 할로젠, 하이드록실, 알킬, 알케닐, 알킬닐, 아실 ($-C(O)R_{aa}$), 카복실 ($-C(O)OR_{aa}$), 지방족 그룹, 지환족 그룹, 알콕시, 치환된 옥시 ($-O-R_{aa}$), 아릴, 아랄킬, 헤테로 사이클릭 라디칼, 헤테로아릴, 헤테로아릴알킬, 아미노 ($-N(R_{bb})(R_{cc})$), 이미노 ($=NR_{bb}$), 아마이드 ($-C(O)N(R_{bb})(R_{cc})$) 또는 $-N(R_{bb})C(O)OR_{aa}$), 아지도 ($-N_3$), 니트로 ($-NO_2$), 시아노 ($-CN$), 카바미도 ($-OC(O)N(R_{bb})(R_{cc})$) 또는 $-N(R_{bb})C(O)OR_{aa}$), 우레이도 ($-N(R_{bb})C(O)N(R_{bb})(R_{cc})$), 티오우레이도 ($-N(R_{bb})C(S)N(R_{bb})(R_{cc})$), 구아니디닐 ($-N(R_{bb})C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})$), 아마디닐 ($-C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})$) 또는 $-N(R_{bb})C(=NR_{bb})(R_{aa})$), 티올 ($-SR_{bb}$), 설피닐 ($-S(O)R_{bb}$), 설포닐 ($-S(O)_2R_{bb}$) 및 설포나미딜 ($-S(O)_2N(R_{bb})(R_{cc})$)-또는 $-N(R_{bb})S(O)_2R_{bb}$). 여기서 각각의 R_{aa} , R_{bb} 및 R_{cc} 는, 독립적으로, H, 임의로 연결된 화학적 관능 그룹 또는 추가 치환기 그룹이고, 바람직한 목록은 비제한적으로, 알킬, 알케닐, 알킬닐, 지방족, 알콕시, 아실, 아릴, 아랄킬, 헤테로아릴, 지환족, 헤테로사이클릭 및 헤테로아릴알킬을 포함한다. 본원에서 기재된 화합물 내의 선택된 치환기는 반복되는 정도로 존재한다.
- [0147] 본원에서 사용된 바와 같이, "알킬"은, 본원에서 사용된 바와 같이, 최대 24 개의 탄소 원자를 함유하는 포화된 곧은 또는 분지된 탄화수소 라디칼을 의미한다. 알킬 그룹의 예는 비제한적으로, 하기를 포함한다: 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 이소프로필, n-헥실, 옥틸, 데실, 도데실 등. 알킬 그룹은 전형적으로 1 내지 약 24 개의 탄소 원자, 더욱 전형적으로 1 내지 약 12의 탄소 원자 (C_1 - C_{12} 알킬)를 포함하고, 1 내지 약 6 개의 탄소 원자가 더 바람직하다.
- [0148] 본원에서 사용된 바와 같이, "알케닐"은, 최대 24 개의 탄소 원자를 함유하고 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는, 곧은 또는 분지된 탄화수소 사슬 라디칼을 의미한다. 알케닐 그룹의 예는 비제한적으로, 하기를 포함한다: 에테닐, 프로페닐, 부테닐, 1-메틸-2-부텐-1-일, 디엔 예컨대 1,3-부타디엔 등. 알케닐 그룹은 전형적으로 2 내지 약 24 개의 탄소 원자, 더욱 전형적으로 2 내지 약 12의 탄소 원자를 포함하고 2 내지 약 6 개의 탄소 원자가 더 바람직하다. 알케닐 그룹은, 본원에서 사용된 바와 같이, 1 이상의 추가 치환기 그룹을 임의로 포함할 수 있다.
- [0149] 본원에서 사용된 바와 같이, "알킬닐"은, 최대 24 개의 탄소 원자를 함유하고 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 곧은 또는 분지된 탄화수소 라디칼을 의미한다. 알킬닐 그룹의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 에티닐, 1-프로피닐, 1-부티닐, 등. 알킬닐 그룹은 전형적으로 2 내지 약 24 개의 탄소 원자, 더욱 전형적으로 2 내지 약 12의 탄소 원자를 포함하고 2 내지 약 6 개의 탄소 원자가 더 바람직하다. 알킬닐 그룹은, 본원에서 사용된 바와 같이, 1 이상의 추가 치환기 그룹을 임의로 포함할 수 있다.
- [0150] 본원에서 사용된 바와 같이, "아실"은, 유기산으로부터 하이드록실 그룹의 제거에 의해 형성될 라디칼을 의미하고 일반식 $-C(O)-X$ (여기서 X은 전형적으로 지방족, 지환족 또는 방향족임)을 갖는다. 예들은 지방족 카보닐, 방향족 카보닐, 지방족 설포닐, 방향족 설피닐, 지방족 설피닐, 방향족 포스페이트, 지방족 포스페이트 등을 포함한다. 아실 그룹은, 본원에서 사용된 바와 같이, 임의로 추가 치환기 그룹을 포함할 수 있다.
- [0151] 본원에서 사용된 바와 같이, "지환족"은 고리형 고리계를 의미하고, 상기 고리는 지방족이다. 고리계는 1 이상의 고리를 포함할 수 있고, 여기서 적어도 하나의 고리는 지방족이다. 바람직한 지환족은 고리 중 약 5 내지 약 9 개의 탄소 원자를 갖는 고리를 포함한다. 지환족은, 본원에서 사용된 바와 같이, 임의로 추가 치환기 그룹을 포함할 수 있다.
- [0152] 본원에서 사용된 바와 같이, "지방족"은 최대 24 개의 탄소 원자를 함유하는 곧은 또는 분지된 탄화수소 라디칼을 의미하고, 상기 임의의 2 개의 탄소 원자 사이의 포화는 단일, 이중 또는 삼중결합이다. 지방족 그룹은 바람직하게는 1 내지 약 24 개의 탄소 원자, 더욱 전형적으로 1 내지 약 12의 탄소 원자를 함유하고, 1 내지 약 6 개의 탄소 원자가 더 바람직하다. 지방족 그룹의 곧은 또는 분지된 사슬은 질소, 산소, 황 및 인을 포함하는 1 이상의 헤테로원자로 방해될 수 있다. 헤테로원자에 의해 방해된 그와 같은 지방족 그룹은 비제한적으로, 폴리알콕시, 예컨대 폴리알킬렌 글리콜, 폴리아민, 및 폴리이민을 포함한다. 지방족 그룹은, 본원에서 사용된 바와 같이, 임의로 추가 치환기 그룹을 포함할 수 있다.
- [0153] 본원에서 사용된 바와 같이, "알콕시"는 알킬 그룹과 산소 원자 사이에 형성된 라디칼을 의미하고, 상기 산소

원자는 알콕시 그룹을 모 분자에 부착하도록 사용된다. 알콕시 그룹의 예는 비제한적으로, 하기를 포함한다: 메톡시, 에톡시, 프로톡시, 이소프로톡시, *n*-부톡시, *sec*-부톡시, *tert*-부톡시, *n*-펜톡시, 네오펜톡시, *n*-헥소시 등. 알콕시 그룹은, 본원에서 사용된 바와 같이, 임의로 추가 치환기 그룹을 포함할 수 있다.

[0154] 본원에서 사용된 바와 같이, "아미노알킬"은 아미노 치환된 C_1 - C_{12} 알킬 라디칼을 의미한다. 라디칼의 알킬부는 모 분자와 공유 결합을 형성한다. 아미노 그룹은 임의의 위치에 있을 수 있고 아미노알킬 그룹은 알킬 및/또는 아미노 부분에서 추가 치환기 그룹으로 치환될 수 있다.

[0155] 본원에서 사용된 바와 같이, "아랄킬" 및 "아릴알킬"은 C_1 - C_{12} 알킬 라디칼에 공유 결합된 방향족 그룹을 의미한다. 수득한 아랄킬 (또는 아릴알킬) 그룹의 알킬 라디칼 부는 모 분자와 공유 결합을 형성한다. 예들은 비제한적으로, 벤질, 페닐 등을 포함한다. 아랄킬 그룹은, 본원에서 사용된 바와 같이, 아릴, 또는 라디칼 그룹을 형성하는 둘 모두 그룹에 부착된 추가 치환기 그룹을 임의로 포함한다.

[0156] 본원에서 사용된 바와 같이, "아릴" 및 "방향족"은 1 이상의 방향족 고리를 갖는, 모노- 또는 폴리사이클릭 카보사이클릭 고리계 라디칼을 의미한다. 아릴 그룹의 예는 비제한적으로, 하기를 포함한다: 페닐, 나프틸, 테트라하이드로나프틸, 인다닐, 이데닐 등. 바람직한 아릴 고리계는 1 이상의 고리 중 약 5 내지 약 20 개의 탄소 원자를 갖는다. 아릴 그룹은, 본원에서 사용된 바와 같이, 임의로 추가 치환기 그룹을 포함할 수 있다.

[0157] 본원에서 사용된 바와 같이, "할로" 및 "할로겐"은, 불소, 염소, 브롬 및 요오드로부터 선택된 원자를 의미한다.

[0158] 본원에서 사용된 바와 같이, "헤테로아릴," 및 "헤테로방향족"은, 모노- 또는 폴리-고리형 방향족 고리, 고리계 또는 융합 고리계를 포함하는 라디칼을 의미하고, 여기서 고리 중 적어도 하나는 방향족이고 1 이상의 헤테로원자를 포함한다. 헤테로아릴은 또한, 융합 고리 중 1 이상이 헤테로원자를 함유하지 않는 시스템을 포함하는 융합 고리계를 포함하는 것을 의미한다. 헤테로아릴 그룹은 전형적으로, 황, 질소 또는 산소로부터 선택된 하나 이상의 고리 원자를 포함한다. 헤테로아릴 그룹의 예는 비제한적으로, 하기를 포함한다: 피리디닐, 피라지닐, 피리미디닐, 피롤릴, 피라졸릴, 이미다졸릴, 티아졸릴, 옥사졸릴, 이속사졸릴, 티아디아졸릴, 옥사디아졸릴, 티오펜릴, 푸라닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 벤즈이미다졸릴, 벤조옥사졸릴, 퀴놀살리닐 등. 헤테로아릴 라디칼은 연결 모이어티 예컨대 지방족 그룹 또는 헤테로 원자를 통해 모 분자에 부착될 수 있다. 헤테로아릴 그룹은, 본원에서 사용된 바와 같이, 임의로 추가 치환기 그룹을 포함할 수 있다.

[0159] 본원에서 사용된 바와 같이, "콘주게이트 화합물"은 임의의 원자, 원자의 그룹, 또는 콘주게이트 그룹으로서 사용하기에 적당한 연결된 원자의 그룹을 의미한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 화합물은 약동학적, 약력학적, 결합, 흡수, 세포성 분포, 세포성 흡수, 전하 및/또는 청소능 특성을 비제한적으로 포함하는 1 이상의 특성을 보유하거나 부여할 수 있다.

[0160] 본원에서 사용된 바와 같이, 달리 지적되지 않으면 또는 변형된, 용어 "이중-가닥"은 서로 혼성화된 2 개의 별개의 올리고머 화합물을 의미한다. 그와 같은 이중가닥 화합물은 하나 또는 둘 모두 가닥 (오버행)의 하나 또는 둘 모두 말단에서 1 이상의 또는 비-혼성화 뉴클레오사이드 및/또는 1 이상의 내부 비-혼성화 뉴클레오사이드 (미스매치)를 가질 수 있고, 단, 생리적으로 관련된 조건 하에서 혼성화를 유지하기 위한 충분한 상보성이 있다.

[0161] B. 어떤 화합물

[0162] 어떤 구현예에서, 본 발명은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 콘주게이트를 포함하는 접합된 안티센스 화합물을 제공한다.

[0163] a. 어떤 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0164] 어떤 구현예에서, 본 발명은 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 그와 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 연결된 뉴클레오사이드를 포함하고, 각각의 뉴클레오사이드는 당 모이어티 및 핵염기를 포함한다. 그와 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 구조는 화학적 특징에 관한 것으로 고려된다 (예를 들면, 변형 및 변형의 패턴) 및 핵염기 서열 (예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 서열, 표적 핵산의 동일성 및 서열).

[0165] i. 어떤 화학 특징

[0166] 어떤 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 1 이상의 변형을 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 1 이상의 변형된 뉴클레오사이드 및/또는 변형된 뉴클레오사이드간 연결을 포함

한다. 어떤 구현예에서, 변형된 뉴클레오사이드는 변형된 당 모이어티 및/또는 변형된 핵염기를 포함한다.

[0167] 1. 어떤 당 모이어티

[0168] 어떤 구현예에서, 개시내용의 화합물 변형된 당 모이어티를 포함하는 1 이상의 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 1 이상의 당-변형된 뉴클레오사이드를 포함하는 그와 같은 화합물은 자연 발생 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오사이드만을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 대해 바람직한 특성, 예컨대 증대된 뉴클레아제 안정성 또는 표적 핵산과의 증가된 결합 친화도를 가질 수 있다. 어떤 구현예에서, 변형된 당 모이어티는 치환된 당 모이어티이다. 어떤 구현예에서, 변형된 당 모이어티는 당 대용물이다. 그와 같은 당 대용물은 치환된 당 모이어티의 것에 상응하는 하나 이상의 치환을 포함할 수 있다.

[0169] 어떤 구현예에서, 변형된 당 모이어티는 2' 및/또는 5' 위치에서 치환기를 비제한적으로 포함하는, 1 이상의 비-브릿징 당 치환기를 포함하는 치환된 당 모이어티이다. 2'-위치에 적당한 당 치환기의 예는, 비제한적으로 하기를 포함한다: 2'-F, 2'-OCH₃ ("OMe" 또는 "O-메틸"), 및 2'-O(CH₂)₂OCH₃ ("MOE"). 어떤 구현예에서, 2'-위치에 있는 당 치환기는 알릴, 아미노, 아지도, 티오, O-알릴, O-C₁-C₁₀ 알킬, O-C₁-C₁₀ 치환된 알킬; OCF₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), 및 O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)로부터 선택되고, 여기서 각각의 R_m 및 R_n은, 독립적으로, H 또는 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬이다. 5'-위치에 있는 당 치환기의 예는, 비제한적으로 하기를 포함한다: 5'-메틸 (R 또는 S); 5'-비닐, 및 5'-메톡시. 어떤 구현예에서, 치환된 당류는 1 초과 비-브릿징 당 치환기, 예를 들면, 2'-F-5'-메틸 당 모이어티를 포함한다 (참고, 추가의 5', 2'-비스 치환된 당 모이어티 및 뉴클레오사이드에 대해 예를 들면, PCT 국제 출원 WO 2008/101157).

[0170] 2'-치환된 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오사이드는 2'-치환된 뉴클레오사이드로 불린다. 어떤 구현예에서, 2'- 치환된 뉴클레오사이드는 할로, 알릴, 아미노, 아지도, SH, CN, OCN, CF₃, OCF₃, O, S, 또는 N(R_m)-알킬; O, S, 또는 N(R_m)-알케닐; O, S 또는 N(R_m)-알킬닐; O-알킬레닐-O-알킬, 알킬닐, 알카릴, 아랄킬, O-알카릴, O-아랄킬, O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) 또는 O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)로부터 선택된 2'-치환기 그룹을 포함하고, 여기서 각각의 R_m 및 R_n은, 독립적으로, H, 아미노 보호 그룹 또는 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬이다. 이들 2'-치환기 그룹은 하이드록실, 아미노, 알콕시, 카복시, 벤질, 페닐, 니트로 (NO₂), 티올, 티오알콕시 (S-알킬), 할로젠, 알킬, 아릴, 알케닐 및 알킬닐로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환체 그룹으로 추가로 치환될 수 있다.

[0171] 어떤 구현예에서, 2'- 치환된 뉴클레오사이드는 F, NH₂, N₃, OCF₃, O-CH₃, O(CH₂)₃NH₂, CH₂-CH=CH₂, O-CH₂-CH=CH₂, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂, 및 N-치환된 아세트아미드 (O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)로부터 선택된 2'-치환기 그룹을 포함하고, 여기서 각각의 R_m 및 R_n은, 독립적으로, H, 아미노 보호 그룹 또는 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬이다.

[0172] 어떤 구현예에서, 2'- 치환된 뉴클레오사이드는 F, OCF₃, O-CH₃, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(CH₃)₂, -O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂, 및 O-CH₂-C(=O)-N(H)CH₃로부터 선택된 2'-치환기 그룹을 포함하는 당 모이어티를 포함한다.

[0173] 어떤 구현예에서, 2'- 치환된 뉴클레오사이드는 F, O-CH₃, 및 OCH₂CH₂OCH₃로부터 선택된 2'-치환기 그룹을 포함하는 당 모이어티를 포함한다.

[0174] 어떤 변형된 당 모이어티는 바이사이클릭 당 모이어티가 생기는 제 2 고리를 형성하는 브릿징 당 치환기를 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 바이사이클릭 당 모이어티는 4' 및 2' 푸라노스 고리 원자 사이의 브릿지를 포함한다. 그와 같은 4' 내지 2' 당 치환기의 예는, 비제한적으로 하기를 포함한다: -[C(R_a)(R_b)]_n-, -[C(R_a)(R_b)]_n-O-, -C(R_aR_b)-N(R)-O- 또는, -C(R_aR_b)-O-N(R)-; 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', . 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (cEt) 및 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2', 및 그것의 유사체 (참고, 예를 들면, U.S. 특허 7,399,845, 2008년 7월 15일 발표); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' 및 그것의 유사체, (참고, 예를 들면, WO2009/006478, 2009년 1월 8일 공개); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' 및 그것의 유사체 (참

고, 예를 들면, WO2008/150729, 2008년 12월 11일 공개); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (참고, 예를 들면, US2004/0171570, 2004년 9월 2일 공개); 4'-CH₂-O-N(R)-2', 및 4'-CH₂-N(R)-O-2'-, 여기서 각각의 R는, 독립적으로, H, 보호 그룹, 또는 C₁-C₁₂ 알킬; 4'-CH₂-N(R)-O-2'이고, 여기서 R은 H, C₁-C₁₂ 알킬, 또는 보호 그룹이다 (참고, U.S. 특허 7,427,672, 2008년 9월 23일 발표); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (참고, 예를 들면, Chattopadhyaya, 등, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); 및 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' 및 그것의 유사체 (참고, 공개된 PCT 국제 출원 WO 2008/154401, 2008년 9월 8일 공개).

[0175] 어떤 구현예에서, 그와 같은 4' 내지 2' 브릿지는 -[C(R_a)(R_b)]_n-, -C(R_a)=C(R_b)-, -C(R_a)=N-, -C(=NR_a)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R_a)₂-, -S(=O)_x-, 및 -N(R_a)-로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4 개의 연결된 그룹을 독립적으로 포함하고;

[0176] 여기서:

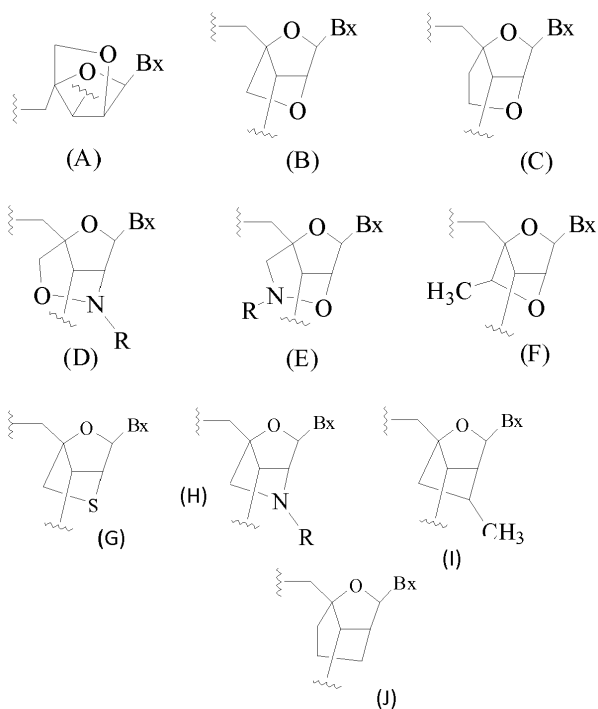
[0177] x는 0, 1, 또는 2이고;

[0178] n은 1, 2, 3, 또는 4이고;

[0179] 각각의 R_a 및 R_b은, 독립적으로, H, 보호 그룹, 하이드록실, C₁-C₁₂ 알킬, 치환된 C₁-C₁₂ 알킬, C₂-C₁₂ 알케닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알케닐, C₂-C₁₂ 알키닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알키닐, C₅-C₂₀ 아릴, 치환된 C₅-C₂₀ 아릴, 헤테로사이클 라디칼, 치환된 헤테로사이클 라디칼, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, C₅-C₇ 지환족 라디칼, 치환된 C₅-C₇ 지환족 라디칼, 할로젠, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, 아실 (C(=O)-H), 치환된 아실, CN, 설폰일 (S(=O)₂-J₁), 또는 설폭실 (S(=O)-J₁)이고; 그리고

[0180] 각각의 J₁ 및 J₂은, 독립적으로, H, C₁-C₁₂ 알킬, 치환된 C₁-C₁₂ 알킬, C₂-C₁₂ 알케닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알케닐, C₂-C₁₂ 알키닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알키닐, C₅-C₂₀ 아릴, 치환된 C₅-C₂₀ 아릴, 아실 (C(=O)-H), 치환된 아실, 헤테로사이클 라디칼, 치환된 헤테로사이클 라디칼, C₁-C₁₂ 아미노알킬, 치환된 C₁-C₁₂ 아미노알킬, 또는 보호 그룹이다.

[0181] 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오사이드는 바이사이클릭 뉴클레오사이드 또는 BNA로 불린다. 바이사이클릭 뉴클레오사이드는, 이하에서 묘사된 바와 같이 비제한적으로, 하기를 포함한다: (A) α-L-메틸렌옥시 (4'-CH₂-O-2') BNA, (B) β-D-메틸렌옥시 (4'-CH₂-O-2') BNA (또한 일명 잠겨진 핵산 또는 LNA), (C) 에틸렌옥시 (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA, (D) 아미노옥시 (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA, (E) 옥시아미노 (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA, (F) 메틸(메틸렌옥시) (4'-CH(CH₃)-O-2') BNA (또한 일명 구속된 에틸 또는 cEt), (G) 메틸렌-thio (4'-CH₂-S-2') BNA, (H) 메틸렌-아미노 (4'-CH₂-N(R)-2') BNA, (I) 메틸 카보사이클릭 (4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA, 및 (J) 프로필렌 카보사이클릭 (4'-(CH₂)₃-2') BNA.



[0182]

[0183]

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

[0184]

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

[0185]

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

[0186]

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

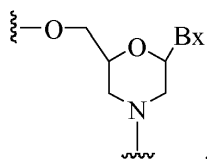
[0187]

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

[0188]

어떤 구현예에서, 당 대용물은 5-원자 이외 것을 갖는 고리를 포함한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 당 대용

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



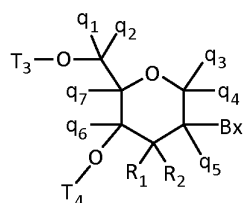
[0189]

[0190]

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

[0191]

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



VI

[0192]

[0193]

여기서 독립적으로 식 VI의 각각의 상기 적어도 하나의 테트라하이드로피란 뉴클레오사이드 유사체에 대해

[0194]

Bx는 핵염기 모이어티이고;

[0195]

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

[0196]

q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ 및 q₇ 각각은, 독립적으로, H, C₁-C₆ 알킬, 치환된 C₁-C₆ 알킬, C₂-C₆ 알케닐, 치환된 C₂-C₆ 알케닐, C₂-C₆ 알키닐, 또는 치환된 C₂-C₆ 알키닐이고; 그리고

[0197]

각각의 R₁ 및 R₂는 하기: 수소, 할로젠, 치환된 또는 비치환된 알콕시, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂, 및 CN 중으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 X은 O, S 또는 NJ₁이고, 각각의 J₁, J₂, 및 J₃은, 독립적으로, H 또는 C₁-C₆ 알킬이다.

[0198]

어떤 구현예에서, 식 VI의 변형된 THP 뉴클레오사이드가 제공되고, 여기서 q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ 및 q₇ 각각은 H 이다. 어떤 구현예에서, q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ 및 q₇ 중 적어도 하나는 H 이외의 것이다. 어떤 구현예에서, q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ 및 q₇ 중 적어도 하나는 메틸이다. 어떤 구현예에서, 식 VI의 THP 뉴클레오사이드가 제공되고 여기서 R₁ 및 R₂ 중 하나는 F이다. 어떤 구현예에서, R₁은 플루오로이고 R₂은 H이고, R₁은 메톡시이고 R₂은 H이고, R₁은 메톡시메톡시이고 R₂은 H이다.

[0199]

많은 다른 바이사이클로 및 트리사이클로 당 대용물 고리계는 안티센스 화합물에 혼합시키기 위해 뉴클레오사이드를 변형시키기 위해 사용될 수 있는 당해기술에서 또한 공지되어 있다 (참고, 예를 들면, 하기 논문 검토: Leumann, J. C, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, 10, 841-854).

[0200]

하기와 같은 변형의 조합이 또한 비제한적으로 제공된다: 2'-F-5'-메틸 치환된 뉴클레오사이드 (참고 다른 개시

된 5', 2'-비스 치환된 뉴클레오사이드에 대해 8/21/08에 공개된 PCT 국제 출원 WO 2008/101157) 및 2'-위치에서의 리보실 고리 산소 원자 대신에 S에 의한 대체 및 추가 치환 (참고 2005년 6월 16일에 공개된 미국 특허 출원 US2005-0130923) 또는 대안적으로 바이사이클릭 핵산의 5'-치환 (참고 11/22/07에 공개된 PCT 국제 출원 WO 2007/134181, 여기서 4'-CH₂-O-2' 바이사이클릭 뉴클레오사이드는 5' 위치에서 5'-메틸 또는 5'-비닐 그룹으로 치환된다). 올리고머화에 의한 카보사이클릭 바이사이클릭 뉴클레오사이드의 합성 및 제조 및 생화학 연구는 하기에서 또한 기재되었다: (참고, 예를 들면, Srivastava 등, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129(26), 8362-8379).

[0201] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 변형된 뉴클레오사이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 이들 변형된 뉴클레오타이드는 변형된 당, 변형된 핵염기, 및/또는 변형된 연결을 포함할 수 있다. 특이적 변형은, 수득한 올리고뉴클레오타이드가 바람직한 특성을 갖도록 선택된다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 1 이상의 RNA-유사 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 1 이상의 DNA-유사 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0202] 2. 어떤 핵염기 변형

[0203] 어떤 구현예에서, 본 개시내용의 뉴클레오사이드는 1 이상의 비변형된 핵염기를 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 개시내용의 뉴클레오사이드는 1 이상의 변형된 핵염기를 포함한다.

[0204] 어떤 구현예에서, 변형된 핵염기는 하기로부터 선택된다: 본원에서 규정된 바와 같은 보편적인 염기, 소수성 염기, 부정확한 염기, 크기-확장된 염기, 및 플루오르화된 염기. 본원에서 규정된 바와 같이 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및, 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실을 포함하는 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린; 5-프로피닐시토신; 5-하이드록시메틸 시토신, 잔틴, 하이포잔틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 다른 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐 (-C≡C-CH₃) 우라실 및 시토신 및 피리미딘계의 다른 알킬 유도체, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실 (슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2-아미노-아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌, 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌, 보편적인 염기, 소수성 염기, 부정확한 염기, 크기-확장된 염기, 및 플루오르화된 염기. 추가의 변형된 핵염기는 하기를 포함한다: 트리사이클릭 피리미딘 예컨대 펜옥사진 시티딘 ([5,4-b][1,4]벤조사진-2(3H)-온), 페노티아진 시티딘 (1H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조티아진-2(3H)-온), G-클램프 예컨대 치환된 펜옥사진 시티딘 (예를 들면 9-(2-아미노에톡시)-H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조사진-2(3H)-온), 카바졸 시티딘 (2H-피리미도[4,5-b]인돌-2-온), 피리도인돌 시티딘 (H-피리도[3',2':4,5]피롤로[2,3-d]피리미딘-2-온). 변형된 핵염기는, 퓨린 또는 피리미딘 염기가 다른 헤테로사이클, 예를 들면 7-데아자-아데닌, 7-데아자구아노신, 2-아미노피리딘 및 2-피리돈으로 대체된 것을 또한 포함할 수 있다. 추가의 핵염기는 하기를 포함한다: 미국 특허 번호 3,687,808에서 개시된 것, *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science 및 Engineering*, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859 에서 개시된 것; Englisch 등, *Angewandte Chemie*, International Edition, 1991, 30, 613에 의해 개시된 것; 및 Sanghvi, Y.S., Chapter 15, *Antisense Research and Applications*, Crooke, S.T. 및 Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, 273-288에 의해 개시된 것.

[0205] 상기 언급된 변형된 핵염기 뿐만 아니라 다른 변형된 핵염기 중 어떤 것의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허들은 비제한적으로, U.S. 3,687,808; 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,681,941; 5,750,692; 5,763,588; 5,830,653 및 6,005,096를 포함하고, 이들중 어떤 것은 통상적으로 본원과 함께 소유되고, 이들 각각은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있다.

[0206] 3. 어떤 뉴클레오사이드간 연결

[0207] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 연결된 뉴클레오사이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 그와 같은 구현예에서, 뉴클레오사이드는 임의의 뉴클레오사이드간 연결을 사용하여 함께 연결될 수 있다. 뉴클레오사이드간 연결 그룹의 2 개의 주요 클래스는 인 원자의 존재 또는 부재에 의해 규정된다. 뉴클레오사이드간 연결을 함유하는 대표적인 인은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 포스포디에스테르 (PO), 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, 포스포라미데이트, 및 포스포로티오에이트 (PS). 뉴클레오사이드간 연결 그룹을 함유하는 대

표적인 비-인은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 메틸렌메틸이미노 ($-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$), 티오디에스테르 ($-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{S}-$), 티오노카바메이트 ($-\text{O}-\text{C}(\text{O})(\text{NH})-\text{S}-$); 실록산 ($-\text{O}-\text{Si}(\text{H})_2-\text{O}-$); 및 N, N'-디메틸하이드라진 ($-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-$). 천연 포스포디에스테르 연결과 비교된 변형된 연결은, 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레아제 저항성을 변형하기 위해, 전형적으로 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 어떤 구현예에서, 키랄 원자를 갖는 뉴클레오사이드간 연결은 라세미 혼합물로서, 또는 별개의 거울상이성질체로서 제조될 수 있다. 대표적인 키랄 연결, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 알킬포스포네이트 및 포스포티오에이트. 인-함유 및 비-인-함유 뉴클레오사이드간 연결의 제조 방법은 당해분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다.

[0208] 본원에서 기재된 올리고뉴클레오타이드는 1 이상의 비대칭 중심을 함유하고 따라서 거울상이성질체, 부분입체 이성질체, 및 다른 입체이성질체 배치를 생기케 하고 이것은 당 아노머에 대해서와 같이 (R) 또는 (S), α 또는 β , 또는 아미노산 등에 대해서와 같이 (D) 또는 (L)로서 절대적인 입체화학에 관하여 규정될 수 있다. 본원에서 제공된 안티센스 화합물 내에 모든 그와 같은 가능한 이성질체, 뿐만 아니라 그것의 라세미 및 광학적으로 순수한 형태가 포함된다.

[0209] 중성 뉴클레오사이드간 연결은 비제한적으로, 하기를 포함한다: 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, MMI ($3'-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-5'$), 아마이드-3 ($3'-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{H})-5'$), 아마이드-4 ($3'-\text{CH}_2-\text{N}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-5'$), 포름아세탈 ($3'-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-5'$), 및 티오포름아세탈 ($3'-\text{S}-\text{CH}_2-\text{O}-5'$). 추가의 중성 뉴클레오사이드간 연결은 실록산 (디알킬실록산), 카복실레이트 에스테르, 카복사마이드, 설페이드, 설포네이트 에스테르 및 아마이드를 포함하는 비이온성 연결을 포함한다 (참고 예를 들면: *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*; Y.S. Sanghvi 및 P.D. Cook, Eds., ACS Symposium 시리즈 580; Chapters 3 및 4, 40-65). 추가의 중성 뉴클레오사이드간 연결은 혼합된 N, O, S 및 CH_2 성분 부분을 포함하는 비이온성 연결을 포함한다.

[0210] 4. 어떤 모티프

[0211] 어떤 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 1 이상의 변형된 뉴클레오사이드 (예를 들면, 변형된 당 및/또는 변형된 핵염기를 포함하는 뉴클레오사이드) 및/또는 1 이상의 변형된 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드에 대한 그와 같은 변형의 패턴은 모티프로서 칭한다. 어떤 구현예에서, 당, 핵염기, 및 연결 모티프는 서로 독립적이다.

[0212] a. 어떤 당 모티프

[0213] 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 규정된 패턴 또는 당 변형 모티프 중 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 영역을 다라 배열된 1 이상의 유형의 변형된 당 모이어티 및/또는 자연 발생 당 모이어티를 포함한다. 그와 같은 모니프는 본원에서 논의된 당 변형 및/또는 다른 공지된 당 변형 중 임의의 것을 포함할 수 있다.

[0214] 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 2 개의 외부 영역 또는 "윙" 및 중심 또는 내부 영역 또는 "갭"을 포함하는 갭머 당 모티프를 갖는 영역을 포함하거나 그것으로 구성된다. 갭머 당 모티프의 3 개의 영역 (5'-윙, 갭, 및 3'-윙)은 뉴클레오사이드의 인접 서열을 형성하고, 여기서 각각의 윙의 뉴클레오사이드의 당 모이어티의 적어도 일부는 갭의 뉴클레오사이드의 당 모이어티의 적어도 일부와 상이하다. 특히적으로, 갭에 아주 가까운 각각의 윙의 뉴클레오사이드 (5'-윙의 3'-대부분 뉴클레오사이드 및 3'-윙의 5'-대부분 뉴클레오사이드)의 적어도 당 모이어티는 인접하는 갭 뉴클레오사이드의 당 모이어티와 상이하고, 따라서 윙과 갭 사이의 경계를 규정한다. 어떤 구현예에서, 갭 내의 당 모이어티는 서로 동일하다. 어떤 구현예에서, 갭은 1 이상의 다른 갭의 뉴클레오사이드의 당 모이어티와 상이한 당 모이어티를 갖는 1 이상의 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 2 개의 윙의 당 모이프는 서로 동일하다 (대칭 당 갭머). 어떤 구현예에서, 5'-윙의 당 모티프는 3'-윙의 당 모티프와 상이하다 (비대칭 당 갭머).

[0215] i. 어떤 5'-윙

[0216] 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 1 내지 8 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 1 내지 7 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 1 내지 6 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 1 내지 5 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 2 내지 5 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 3 내지 5 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 4 또는 5 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-윙은 1 내지 4 개의 연결된 뉴클레오사이드

드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 캡머의 5'-윙은 1 내지 3 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 캡머의 5'-윙은 1 또는 2 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 캡머의 5'-윙은 2 내지 4 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 캡머의 5'-윙은 2 또는 3 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 캡머의 5'-윙은 3 또는 4 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 캡머의 5'-윙은 1 개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 캡머의 5'-윙은 2 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 캡머의 5'-윙은 3 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 캡머의 5'-윙은 4 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 캡머의 5'-윙은 5 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 캡머의 5'-윙은 6 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다.

[0217] 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-wing은 적어도 하나의 바이사이클릭 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-wing은 적어도 2 바이사이클릭 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-wing은 적어도 3 바이사이클릭 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-wing은 적어도 4 바이사이클릭 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-wing은 적어도 하나의 구속된 에틸 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-wing은 적어도 하나의 LNA 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-wing의 각각의 뉴클레오사이드는 바이사이클릭 뉴클레오사이드이다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-wing의 각각의 뉴클레오사이드는 구속된 에틸 뉴클레오사이드이다. 어떤 구현예에서, 갭머의 5'-wing의 각각의 뉴클레오사이드는 LNA 뉴클레오사이드이다.

[0218] 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙은 적어도 하나의 비-바이사이클릭 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙은 적어도 하나의 2'-치환된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙은 적어도 하나의 2'-MOE 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙은 적어도 하나의 2'-OMe 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙의 각각의 뉴클레오사이드는 비-바이사이클릭 변형된 뉴클레오사이드이다. 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-치환된 뉴클레오사이드이다. 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-MOE 뉴클레오사이드이다. 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-OMe 뉴클레오사이드이다.

[0219] 어떤 구현예에서, 캡머의 5'-윙은 적어도 하나의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 캡머의 5'-윙의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-데옥시뉴클레오사이드이다. 어떤 구현예에서, 캡머의 5'-윙은 적어도 하나의 리보뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 캡머의 5'-윙의 각각의 뉴클레오사이드는 리보뉴클레오사이드이다. 어떤 구현예에서, 5'-윙의 1, 1 초과, 또는 각각의 뉴클레오사이드는 RNA-유사 뉴클레오사이드이다.

[0220] 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙은 적어도 하나의 바이사이클릭 뉴클레오사이드 및 적어도 하나의 비-바이사이클릭 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙은 적어도 하나의 바이사이클릭 뉴클레오사이드 및 적어도 하나의 2'-치환된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙은 적어도 하나의 바이사이클릭 뉴클레오사이드 및 적어도 하나의 2'-MOE 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙은 적어도 하나의 바이사이클릭 뉴클레오사이드 및 적어도 하나의 2'-OMe 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙은 적어도 하나의 바이사이클릭 뉴클레오사이드 및 적어도 하나의 2'-테옥시뉴클레오사이드를 포함한다.

[0221] 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙은 적어도 하나의 구속된 에틸 뉴클레오사이드 및 적어도 하나의 비-바이사이클릭 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙은 적어도 하나의 구속된 에틸 뉴클레오사이드 및 적어도 하나의 2'-치환된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙은 적어도 하나의 2'-MOE 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙은 적어도 하나의 구속된 에틸 뉴클레오사이드 및 적어도 하나의 2'-OMe 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갱머의 5'-윙은 적어도 하나의 구속된 에틸 뉴클레오사이드 및 적어도 하나의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함한다.

[0222] ii. 어떤 3'-원

[0223] 어떤 구현예에서, 잭머의 3'-윙은 1 내지 8 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 잭머의 3'-윙은 1 내지 7 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 잭머의 3'-윙은 1 내지 6 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 잭머의 3'-윙은 1 내지 5 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 잭머의 3'-윙은 2 내지 5 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서,

드 및 적어도 하나의 2'-MOE 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 3'-윙은 적어도 하나의 LNA 뉴클레오사이드 및 적어도 하나의 2'-OMe 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 3'-윙은 적어도 하나의 LNA 뉴클레오사이드 및 적어도 하나의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함한다.

[0230] 어떤 구현예에서, 갭머의 3'-윙은 적어도 하나의 바이사이클릭 뉴클레오사이드, 적어도 하나의 비-바이사이클릭 변형된 뉴클레오사이드, 및 적어도 하나의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 3'-윙은 적어도 하나의 구속된 에틸 뉴클레오사이드, 적어도 하나의 비-바이사이클릭 변형된 뉴클레오사이드, 및 적어도 하나의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 3'-윙은 적어도 하나의 LNA 뉴클레오사이드, 적어도 하나의 비-바이사이클릭 변형된 뉴클레오사이드, 및 적어도 하나의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함한다.

[0231] 어떤 구현예에서, 갭머의 3'-윙은 적어도 하나의 바이사이클릭 뉴클레오사이드, 적어도 하나의 2'-치환된 뉴클레오사이드, 및 적어도 하나의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 3'-윙은 적어도 하나의 구속된 에틸 뉴클레오사이드, 적어도 하나의 2'-치환된 뉴클레오사이드, 및 적어도 하나의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 3'-윙은 적어도 하나의 LNA 뉴클레오사이드, 적어도 하나의 2'-치환된 뉴클레오사이드, 및 적어도 하나의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함한다.

[0232] 어떤 구현예에서, 갭머의 3'-윙은 적어도 하나의 바이사이클릭 뉴클레오사이드, 적어도 하나의 2'-MOE 뉴클레오사이드, 및 적어도 하나의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 3'-윙은 적어도 하나의 구속된 에틸 뉴클레오사이드, 적어도 하나의 2'-MOE 뉴클레오사이드, 및 적어도 하나의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 3'-윙은 적어도 하나의 LNA 뉴클레오사이드, 적어도 하나의 2'-MOE 뉴클레오사이드, 및 적어도 하나의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함한다.

[0233] 어떤 구현예에서, 갭머의 3'-윙은 적어도 하나의 바이사이클릭 뉴클레오사이드, 적어도 하나의 2'-OMe 뉴클레오사이드, 및 적어도 하나의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 3'-윙은 적어도 하나의 구속된 에틸 뉴클레오사이드, 적어도 하나의 2'-OMe 뉴클레오사이드, 및 적어도 하나의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 갭머의 3'-윙은 적어도 하나의 LNA 뉴클레오사이드, 적어도 하나의 2'-OMe 뉴클레오사이드, 및 적어도 하나의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함한다.

[0234] iii. 어떤 중심 영역 (갭)

[0235] 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 6 내지 20 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 6 내지 15 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 6 내지 12 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 6 내지 10 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 6 내지 9 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 6 내지 8 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 6 또는 7 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 7 내지 10 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 7 내지 9 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 7 또는 8 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 8 내지 10 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 8 또는 9 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 6 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 7 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 8 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 9 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 10 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 11 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 갭머의 갭은 12 개의 연결된 뉴클레오사이드로 구성된다.

[0236] 어떤 구현예에서, 각각의 갭의 뉴클레오사이드머의 갭은 2'-데옥시뉴클레오사이드이다. 어떤 구현예에서, 갭은 1 이상의 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 각각의 갭의 뉴클레오사이드머의 갭은 2'-데옥시뉴클레오사이드이거나 "DNA-유사"인 변형된 뉴클레오사이드이다. 그와 같은 구현예에서, "DNA-유사"는, 뉴클레오사이드가 DNA에 대해 유사한 특성을 갖는다는 것을 의미하고, 이로써 갭머 및 RNA 분자를 포함하는 듀플렉스는 RNase H를 활성화할 수 있다. 예를 들면, 어떤 조건 하에서, 2'-(ara)-F는 RNase H 활성화를 지지하는 것으로 보여졌고, 따라서 DNA-유사이다. 어떤 구현예에서, 1 이상의 갭의 뉴클레오사이드머의 갭은 2'-데옥시뉴클레오사이드가 아니고 DNA-유사가 아니다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 갭머는, 그럼에도 불구하고, (예를 들면, 비-DNA 뉴클레오사이드의 수 또는 배치에 의해) RNase H 활성화를 지지한다.

- [0237] 어떤 구현예에서, 겹은 1 이상의 변형된 뉴클레오타이드에 의해 방해된 비변형된 2'-데옥시뉴클레오타이드의 스트레치를 포함하고, 따라서 3 개의 아-영역 (1 이상의 2'-데옥시뉴클레오타이드의 2 개의 스트레치 및 1 이상의 차단 변형된 뉴클레오타이드의 스트레치)가 생긴다. 어떤 구현예에서, 비변형된 2'-데옥시뉴클레오타이드의 스트레치는 5, 6, 또는 7 개의 뉴클레오타이드보다 더 길지 않다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 짧은 스트레치는 짧은 겹 영역을 사용하여 달성된다. 어떤 구현예에서, 짧은 스트레치는 더 긴 겹 영역을 차단하여 달성된다.
- [0238] 어떤 구현예에서, 겹은 1 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 겹은 cEt, FHNA, LNA, 및 2-티오-티미딘 중으로부터 선택된 1 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 겹은 1 개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 겹은 5'-Me, 및 5'-(R)-Me 중으로부터 선택된 5'-치환된 당 모이어티를 포함한다. 어떤 구현예에서, 겹은 2 개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 겹은 3 개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 겹은 4 개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 겹은 2 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고 각각의 변형된 뉴클레오타이드는 동일하다. 어떤 구현예에서, 겹은 2 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고 각각의 변형된 뉴클레오타이드는 상이하다.
- [0239] 어떤 구현예에서, 겹은 1 이상의 변형된 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 겹은 1 이상의 메틸 포스포네이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서 겹은 2 이상의 변형된 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 겹은 1 이상의 변형된 연결 및 1 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 겹은 1 개의 변형된 연결 및 1 개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 겹은 2 개의 변형된 연결 및 2 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0240] **b. 어떤 뉴클레오타이드간 연결 모티프**
- [0241] 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 규정된 패턴 또는 변형된 뉴클레오타이드간 연결 모티프에서 올리고뉴클레오타이드 또는 그것의 영역을 따라 배열된 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 교대 뉴클레오타이드간 연결 모티프를 갖는 영역을 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드는 균일하게 변형된 뉴클레오타이드간 연결의 영역을 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결에 의해 균일하게 연결된 영역을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결에 의해 균일하게 연결된다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 각각의 뉴클레오타이드간 연결은 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 각각의 뉴클레오타이드간 연결은 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트로부터 선택되고 적어도 하나의 뉴클레오타이드간 연결은 포스포로티오에이트이다.
- [0242] 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 6 개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 7 개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 8 개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 9 개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 10 개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 11 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 12 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 13 개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 14 개의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다.
- [0243] 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 6 개의 연속되는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결의 적어도 하나의 블록을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 7 개의 연속되는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결의 적어도 하나의 블록을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 8 개의 연속되는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결의 적어도 하나의 블록을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 9 개의 연속되는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결의 적어도 하나의 블록을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 10 개의 연속되는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결의 적어도 하나의 블록을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 12 개의 연속되는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결의 적어도 하나의 블록을 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 적어도 하나의 그와 같은 블록은 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 위치한다.

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

[0244] c. 어떤 핵염기 변형 모티프

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

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

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

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

어떤 구현예에서, 핵염기에 대한 화학적 변형은 어떤 콘주게이트 그룹의 핵염기에의 부착을 포함한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 중 각각의 퓨린 또는 각각의 피리미딘은 임의로 변형되어 콘주게이트 그룹을 포함할 수 있다.

[0250] d. 어떤 전장

어떤 구현예에서, 본 개시내용은 다양한 범위의 길이의 임의의 것의 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 X 내지 Y 연결된 뉴클레오사이드로 구성되고, 여기서 X는 범위 내의 가장 작은 수의 뉴클레오사이드를 나타내고 Y는 범위 내의 최대 수의 뉴클레오사이드를 나타낸다. 어떤 그와 같은 구현예에서, X 및 Y 각각은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 및 50로부터 독립적으로 선택되고; 단 X=Y. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 하기로 구성될 수 있다: 8 내지 9, 8 내지 10, 8 내지 11, 8 내지 12, 8 내지 13, 8 내지 14, 8 내지 15, 8 내지 16, 8 내지 17, 8 내지 18, 8 내지 19, 8 내지 20, 8 내지 21, 8 내지 22, 8 내지 23, 8 내지 24, 8 내지 25, 8 내지 26, 8 내지 27, 8 내지 28, 8 내지 29, 8 내지 30, 9 내지 10, 9 내지 11, 9 내지 12, 9 내지 13, 9 내지 14, 9 내지 15, 9 내지 16, 9 내지 17, 9 내지 18, 9 내지 19, 9 내지 20, 9 내지 21, 9 내지 22, 9 내지 23, 9 내지 24, 9 내지 25, 9 내지 26, 9 내지 27, 9 내지 28, 9 내지 29, 9 내지 30, 10 내지 11, 10 내지 12, 10 내지 13, 10 내지 14, 10 내지 15, 10 내지 16, 10 내지 17, 10 내지 18, 10 내지 19, 10 내지 20, 10 내지 21, 10 내지 22, 10 내지 23, 10 내지 24, 10 내지 25, 10 내지 26, 10 내지 27, 10 내지 28, 10 내지 29, 10 내지 30, 11 내지

12, 11 내지 13, 11 내지 14, 11 내지 15, 11 내지 16, 11 내지 17, 11 내지 18, 11 내지 19, 11 내지 20, 11 내지 21, 11 내지 22, 11 내지 23, 11 내지 24, 11 내지 25, 11 내지 26, 11 내지 27, 11 내지 28, 11 내지 29, 11 내지 30, 12 내지 13, 12 내지 14, 12 내지 15, 12 내지 16, 12 내지 17, 12 내지 18, 12 내지 19, 12 내지 20, 12 내지 21, 12 내지 22, 12 내지 23, 12 내지 24, 12 내지 25, 12 내지 26, 12 내지 27, 12 내지 28, 12 내지 29, 12 내지 30, 13 내지 14, 13 내지 15, 13 내지 16, 13 내지 17, 13 내지 18, 13 내지 19, 13 내지 20, 13 내지 21, 13 내지 22, 13 내지 23, 13 내지 24, 13 내지 25, 13 내지 26, 13 내지 27, 13 내지 28, 13 내지 29, 13 내지 30, 14 내지 15, 14 내지 16, 14 내지 17, 14 내지 18, 14 내지 19, 14 내지 20, 14 내지 21, 14 내지 22, 14 내지 23, 14 내지 24, 14 내지 25, 14 내지 26, 14 내지 27, 14 내지 28, 14 내지 29, 14 내지 30, 15 내지 16, 15 내지 17, 15 내지 18, 15 내지 19, 15 내지 20, 15 내지 21, 15 내지 22, 15 내지 23, 15 내지 24, 15 내지 25, 15 내지 26, 15 내지 27, 15 내지 28, 15 내지 29, 15 내지 30, 16 내지 17, 16 내지 18, 16 내지 19, 16 내지 20, 16 내지 21, 16 내지 22, 16 내지 23, 16 내지 24, 16 내지 25, 16 내지 26, 16 내지 27, 16 내지 28, 16 내지 29, 16 내지 30, 17 내지 18, 17 내지 19, 17 내지 20, 17 내지 21, 17 내지 22, 17 내지 23, 17 내지 24, 17 내지 25, 17 내지 26, 17 내지 27, 17 내지 28, 17 내지 29, 17 내지 30, 18 내지 19, 18 내지 20, 18 내지 21, 18 내지 22, 18 내지 23, 18 내지 24, 18 내지 25, 18 내지 26, 18 내지 27, 18 내지 28, 18 내지 29, 18 내지 30, 19 내지 20, 19 내지 21, 19 내지 22, 19 내지 23, 19 내지 24, 19 내지 25, 19 내지 26, 19 내지 27, 19 내지 28, 19 내지 29, 19 내지 30, 20 내지 21, 20 내지 22, 20 내지 23, 20 내지 24, 20 내지 25, 20 내지 26, 20 내지 27, 20 내지 28, 20 내지 29, 20 내지 30, 21 내지 22, 21 내지 23, 21 내지 24, 21 내지 25, 21 내지 26, 21 내지 27, 21 내지 28, 21 내지 29, 21 내지 30, 22 내지 23, 22 내지 24, 22 내지 25, 22 내지 26, 22 내지 27, 22 내지 28, 22 내지 29, 22 내지 30, 23 내지 24, 23 내지 25, 23 내지 26, 23 내지 27, 23 내지 28, 23 내지 29, 23 내지 30, 24 내지 25, 24 내지 26, 24 내지 27, 24 내지 28, 24 내지 29, 24 내지 30, 25 내지 26, 25 내지 27, 25 내지 28, 25 내지 29, 25 내지 30, 26 내지 27, 26 내지 28, 26 내지 29, 26 내지 30, 27 내지 28, 27 내지 29, 27 내지 30, 28 내지 29, 28 내지 30, 또는 29 내지 30 개의 연결된 뉴클레오타이드. 화합물의 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드의 수가 제한되는 구현예에서, 범위 또는 특정 개수이든 아니든, 상기 화합물은, 그럼에도 불구하고, 추가의 다른 치환기를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, 8-30 개의 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는, 달리 지적되지 않으면 31 개의 뉴클레오타이드를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 제외하고, 그와 같은 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들면 1 이상의 콘주게이트 그룹, 말단기, 또는 다른 치환기를 추가로 포함할 수 있다.

[0252] 게다가, 여기서 올리고뉴클레오타이드는 전장 범위에 의해 그리고 명시된 길이를 갖는 영역에 의해 기재되고, 그리고 상기 영역의 명시된 길이의 합은 전장 범위의 상한 미만이고, 올리고뉴클레오타이드는 명시된 영역의 초과하여 추가의 뉴클레오타이드를 가질 수 있고, 단, 뉴클레오타이드의 총수는 전장 범위의 상한을 초과하지 않는다.

[0253] 5. 어떤 안티센스 올리고뉴클레오타이드 화학 모티프

[0254] 어떤 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 화학적 구조적 특징은 그것의 당 모티프, 뉴클레오타이드간 연결 모티프, 핵염기 변형 모티프 및 전장을 특징으로 한다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 파라미터 각각은 서로 독립적이다. 따라서, 갭머 당 모티프를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 각각의 뉴클레오타이드간 연결은 변형 또는 비변형될 수 있고 당 변형의 갭머 변형 패턴을 따르거나 그렇지 않을 수 있다. 따라서, 당-갭머의 윙 영역 내의 뉴클레오타이드간 연결은 서로 동일 또는 상이할 수 있고 갭 영역의 뉴클레오타이드간 연결과 동일 또는 상이할 수 있다. 마찬가지로, 그와 같은 당-갭머 올리고뉴클레오타이드는 당 변형의 갭머 패턴에 독립적인¹ 이상의 변형된 핵염기를 포함할 수 있다. 당해분야의 숙련가는, 그와 같은 모티프가 조합되어 다양한 올리고뉴클레오타이드를 만들 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0255] 어떤 구현예에서, 뉴클레오타이드간 연결 및 뉴클레오타이드 변형의 선택은 서로 독립적이지 않다.

[0256] i. 어떤 서열 및 표적

[0257] 어떤 구현예에서, 본 발명은 표적 핵산에 대해 상보적인 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 그와 같은 안티센스 화합물은 표적 핵산에 혼성화될 수 있고, 이로써 적어도 하나의 안티센스 활성이 생긴다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 1 이상의 표적 핵산에 특이적으로 혼성화된다. 어떤 구현예에서, 특이적 혼성화 안티센스 화합물은 혼성화를 허용하고 안티센스 활성이 생기도록 하는 표적 핵산에 대한 충분한 상보성 및 특이적 혼성화를 원하는 조건 하에서 (예를 들면, 생체내 또는 치료 용도를 위한 생리적 조건 하에서, 그리고 검정이 시험관내 검정의 경우에 수행된 조건 하에서) 비-표적 핵산 서열에 대한 비-특이적 혼성화를 피하

거나 축소시키기 위해 임의의 비-표적에 대한 불충분한 상보성을 갖는 영역을 포함하는 핵염기 서열을 갖는다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는, 표적 및 비-표적 둘 모두가 표적 서열을 포함할지라도 표적 및 비-표적 사이에서 선택적이다. 그와 같은 구현예에서, 선택성 다른 것과 비교하여 하나의 핵산 분자의 표적 영역의 상대적 접근성으로부터 기인할 수 있다.

[0258] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 올리고뉴클레오타이드의 전장을 가로질러 표적 핵산에 대해 완전히 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 안티센스 화합물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산에 대해 99% 상보적이다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산에 대해 95% 상보적이다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산에 대해 90% 상보적이다.

[0259] 어떤 구현예에서, 그와 같은 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산에 대해 85% 상보적이다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산에 대해 80% 상보적이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 핵산에 대해 완전히 상보적이고 올리고뉴클레오타이드의 전장에 걸쳐 표적 핵산에 대해 적어도 80% 상보적인 영역을 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 완전 상보성의 영역은 그 길이가 6 내지 14 개의 핵염기이다.

[0260] 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 혼성화 영역 및 말단 영역을 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 혼성화 영역은 12-30 개의 연결된 뉴클레오타이드로 구성되고 표적 핵산에 대해 완전히 상보적이다. 어떤 구현예에서, 혼성화 영역은 표적 핵산에 대해 하나의 미스매치를 포함한다. 어떤 구현예에서, 혼성화 영역은 표적 핵산에 대해 2 개의 미스매치를 포함한다. 어떤 구현예에서, 혼성화 영역은 표적 핵산에 대해 3 개의 미스매치를 포함한다. 어떤 구현예에서, 말단 영역은 1-4 말단 뉴클레오타이드로 구성된다. 어떤 구현예에서, 말단 뉴클레오타이드는 3' 말단에 있다. 어떤 구현예에서, 말단 뉴클레오타이드 중 1 이상은 표적 핵산에 대해 상보적이지 않다.

[0261] 안티센스 기전은 올리고뉴클레오타이드와 표적 핵산과의 혼성화를 수반하는 임의의 기전을 포함하고, 상기 혼성화로 생물학적 효과가 생긴다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 혼성화로, 표적 핵산 저하 또는 예를 들면, 표적 핵산의 번역, 전사, 또는 스플라이싱을 수반하는 세포 기구의 수반되는 억제 또는 자극에 의한 점유가 생긴다.

[0262] 표적 RNA의 저하를 수반하는 유형의 안티센스 기전은 RNase H 매개된 안티센스이다. RNase H는 RNA:DNA 듀플렉스의 RNA 가닥을 절단하는 세포성 엔도뉴클레아제이다. "DNA-유사"한 단일가닥 안티센스 화합물이 포유동물 세포에서 RNase H 활성을 유도하는 것으로 당해기술에서 공지되어 있다. 따라서 RNase H의 활성화로, RNA 표적이 절단되고, 그렇게 함으로써 유전자 발현의 DNA-유사 올리고뉴클레오타이드-매개된 억제의 효율이 크게 향상된다.

[0263] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 절단가능 모이어티를 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 1 이상의 절단가능 결합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 링커를 포함한다. 어떤 구현예에서, 링커는 단백질 결합 모이어티를 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 세포-표적 모이어티 (또한 일명 세포-표적화 그룹)를 포함한다. 어떤 구현예에서 세포-표적 모이어티는 분지화 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 세포-표적 모이어티는 1 이상의 테더를 포함한다. 어떤 구현예에서, 세포-표적 모이어티는 탄수화물 또는 탄수화물 클러스터를 포함한다.

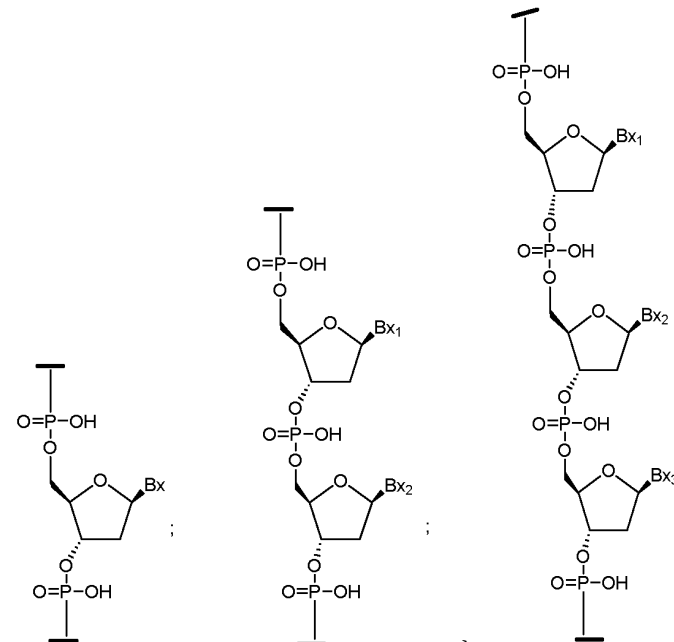
[0264] **ii. 어떤 절단가능 모이어티**

[0265] 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 절단가능 결합이다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 절단가능 결합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 절단가능 모이어티를 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 절단가능 모이어티는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 부착된다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 절단가능 모이어티는 세포-표적 모이어티에 직접적으로 부착된다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 절단가능 모이어티는 콘주게이트 링커에 부착된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 포스페이트 또는 포스포디에스테르를 포함한다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 절단가능 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체이다. 어떤 구현예에서, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체는 퓨린, 치환된 퓨린, 피리미딘 또는 치환된 피리미딘로부터 선택된 임의로 보호된 헤테로사이클릭 염기를 포함한다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 우라실, 티민, 시토신, 4-N-벤조일시토신, 5-메틸시토신, 4-N-벤조일-5-메틸시토신, 아데닌, 6-N-벤조일아데닌, 구아닌 및 2-N-이소부틸릴구아닌로부터 선택된 임의로 보호된 헤테로사이클릭 염기를 포함하는 뉴클레오타이드이다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 포스포디에스테르 연결에 의해 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 3' 위치에 부착되고 포스포디에스테르 또는 포스포로티오에이트 연결에 의해 링커에 부착된 2'-데옥시 뉴클레오타이드이다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 포스포디에스테르 연결에 의해 안티센스 올리고뉴클레오타

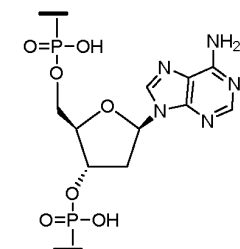
이드의 3' 위치에 부착되고 포스포디에스테르 또는 포스포로티오에이트 연결에 의해 링커에 부착된 2'-데옥시 아데노신이다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 포스포디에스테르 연결에 의해 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 3' 위치에 부착되고 포스포디에스테르 연결에 의해 링커에 부착된 2'-데옥시 아데노신이다.

[0266] 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 3' 위치에 부착된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 5' 위치에 부착된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 2' 위치에 부착된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 포스포디에스테르 연결에 의해 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 부착된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 포스포디에스테르 또는 포스포로티오에이트 연결에 의해 링커에 부착된다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 포스포디에스테르 연결에 의해 링커에 부착된다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 절단가능 모이어티를 포함하지 않는다.

[0267] 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는, 표적화된 세포에 의해 내면화된 직후에 복합물이 동물에게 투여된 후에 절단된다. 세포 내에서 절단가능 모이어티는 절단되고 그렇게 함으로써 활성 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 방출한다. 이론에 의해 구속되지를 바라지 않지만 절단가능 모이어티가 세포 내의 1 이상의 뉴클레아제에 의해 절단되는 것으로 믿는다. 어떤 구현예에서, 1 이상의 뉴클레아제는 절단가능 모이어티와 링커 사이의 포스포디에스테르 연결을 절단한다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0268] 여기서 각각의 Bx, Bx₁, Bx₂, 및 Bx₃은 독립적으로 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0270] iii. 어떤 링커

[0271] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 링커를 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 링커는 절단가능 모이어티에 공유결합된다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 링커는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 링커는 세포-표적 모이어티에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 링커는 추가로, 고형 지지체에 대한 공유 결합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 링커는 추가로, 단백질 결합 모이어티에 대한 공유 결합을 포함한다.

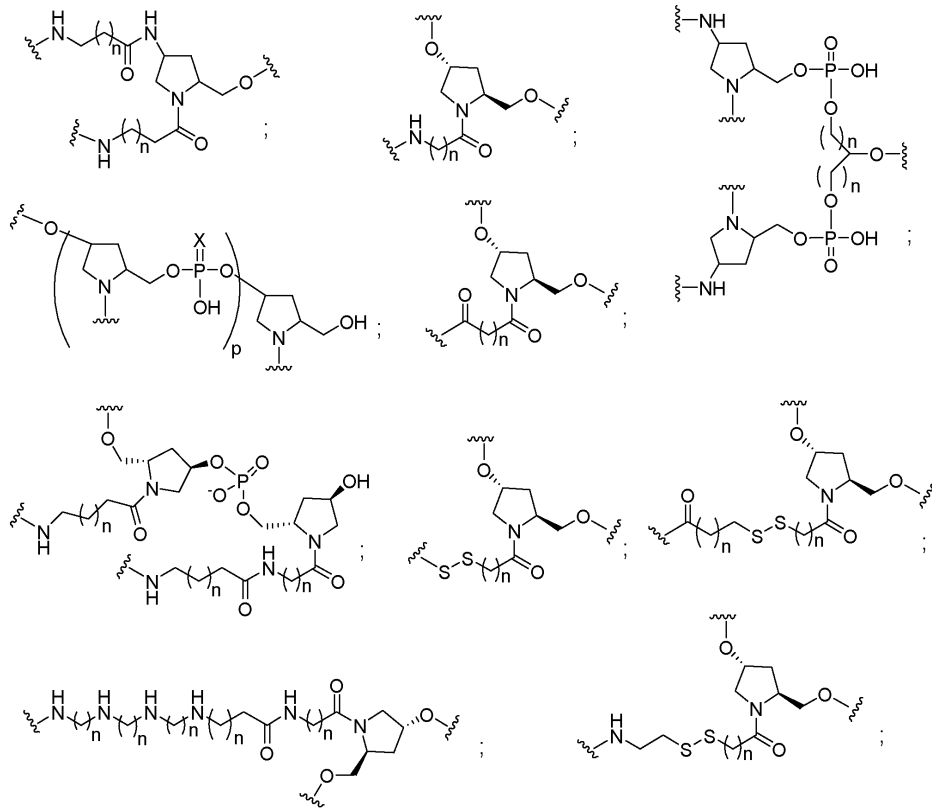
어떤 구현예에서, 링커는 추가로, 고형 지지체에 대한 공유결합을 포함하고, 추가로, 단백질 결합 모이어티에 대한 공유 결합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 링커는 테더링된 리간드의 부착을 위한 다중 위치를 포함한다. 어떤 구현예에서, 링커는 테더링된 리간드의 부착을 위한 다중 위치를 포함하고 분지화 그룹에 부착되지 않는다. 어떤 구현예에서, 링커는 추가로, 1 이상의 절단가능 결합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 링커를 포함하지 않는다.

[0273] 어떤 구현예에서, 링커는 알킬, 아마이드, 디설파이드, 폴리에틸렌 글리콜, 에테르, 티오에테르 (-S-) 및 하이드록실아미노 (-O-N(H)-) 그룹으로부터 선택된 그룹을 포함하는 적어도 하나의 선형 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 알킬, 아마이드 및 에테르 그룹으로부터 선택된 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 알킬 및 에테르 그룹으로부터 선택된 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 적어도 하나의 인 연결 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 적어도 하나의 포스포디에스테르 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 적어도 하나의 중성 연결 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 세포-표적 모이어티 및 절단가능 모이어티에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 세포-표적 모이어티 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 세포-표적 모이어티, 절단가능 모이어티 및 고형 지지체에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 세포-표적 모이어티, 절단가능 모이어티, 고형 지지체 및 단백질 결합 모이어티에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 1 이상의 절단가능 결합을 포함한다.

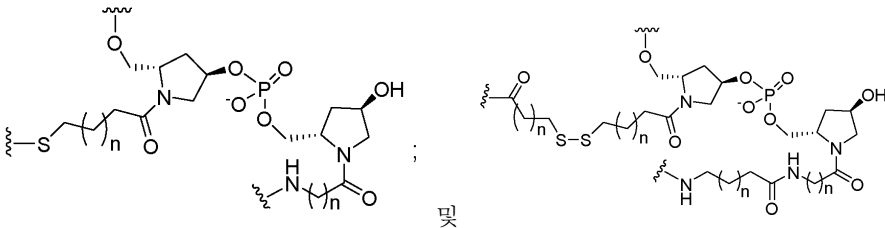
[0274] 어떤 구현예에서, 링커는 스캐폴드 그룹에 공유결합된 선형 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 스캐폴드는 알킬, 아마이드, 디설파이드, 폴리에틸렌 글리콜, 에테르, 티오에테르 및 하이드록실아미노 그룹으로부터 선택된 그룹을 포함하는 분지된 지방족 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 스캐폴드는 알킬, 아마이드 및 에테르 그룹으로부터 선택된 그룹을 포함하는 분지된 지방족 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 스캐폴드는 적어도 하나의 모노 또는 폴리사이클릭 고리계를 포함한다. 어떤 구현예에서, 스캐폴드는 적어도 2 개의 모노 또는 폴리사이클릭 고리계를 포함한다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 스캐폴드 그룹에 공유결합되고 스캐폴드 그룹은 절단가능 모이어티 및 링커에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 스캐폴드 그룹에 공유결합되고 스캐폴드 그룹은 절단가능 모이어티, 링커 및 고형 지지체에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 스캐폴드 그룹에 공유결합되고 스캐폴드 그룹은 절단가능 모이어티, 링커 및 단백질 결합 모이어티에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 선형 그룹은 스캐폴드 그룹에 공유결합되고, 스캐폴드 그룹은 절단가능 모이어티, 링커, 단백질 결합 모이어티 및 고형 지지체에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 스캐폴드 그룹은 1 이상의 절단가능 결합을 포함한다.

[0275] 어떤 구현예에서, 링커는 단백질 결합 모이어티를 포함한다. 어떤 구현예에서, 단백질 결합 모이어티는 하기를 비제한적으로 포함하는 지질이다: 콜레스테롤, 콜산, 아다만탄 아세트산, 1-피렌 부티르산, 디하이드로테스토스테론, 1,3-비스-0(헥사데실)글리세롤, 제라닐옥시헥실 그룹, 헥사데실글리세롤, 용뇌, 멘톨, 1,3-프로판디올, 헵타데실 그룹, 팔미트산, 미리스트산, 03-(올레오일)리토콜산, 03-(올레오일)콜렌산, 디메톡시트리틸, 또는 펜옥사진), 비타민 (예를 들면, 폴레이트, 비타민 A, 비타민 E, 바이오틴, 피리독살), 펩타이드, 탄수화물 (예를 들면, 모노사카라이드, 디사카라이드, 트리스카라이드, 테트라사카라이드, 올리고당, 다당류), 엔도솜분해적 구성성분, 스테로이드 (예를 들면, 우바올, 헤시게닌, 디오스게닌), 테르펜 (예를 들면, 트리테르펜, 예를 들면, 사르사사포게닌, 프리멜린, 에피프리에델라놀 유도된 리토콜산), 또는 양이온성 지질. 어떤 구현예에서, 단백질 결합 모이어티는 C16 내지 C22 장쇄 포화된 또는 불포화된 지방산, 콜레스테롤, 콜산, 비타민 E, 아다만탄 또는 1-펜타플루오로프로필이다.

[0276] 어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



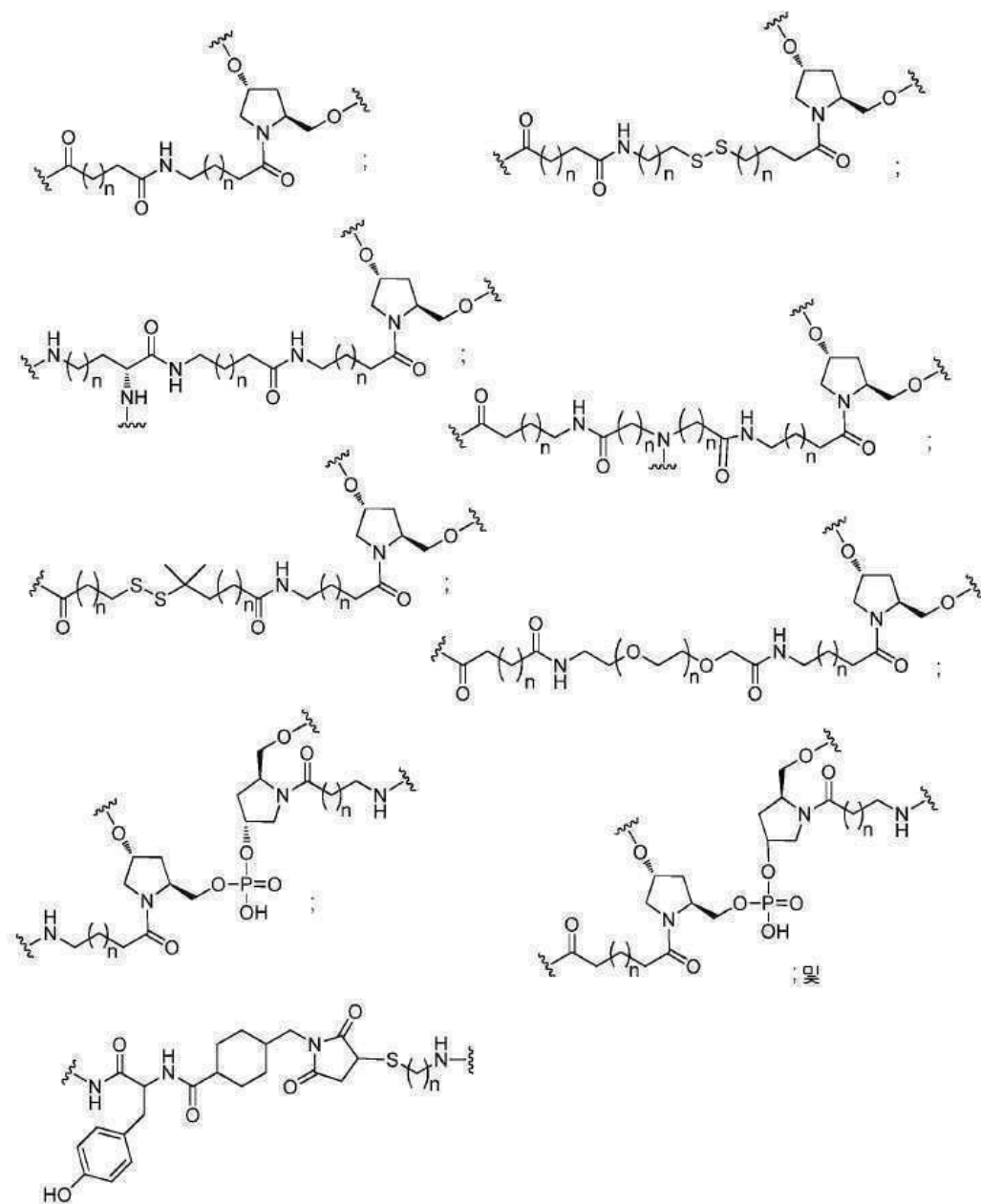
[0277]



[0278]

[0279] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고; 그리고 p는 1 내지 6이다.

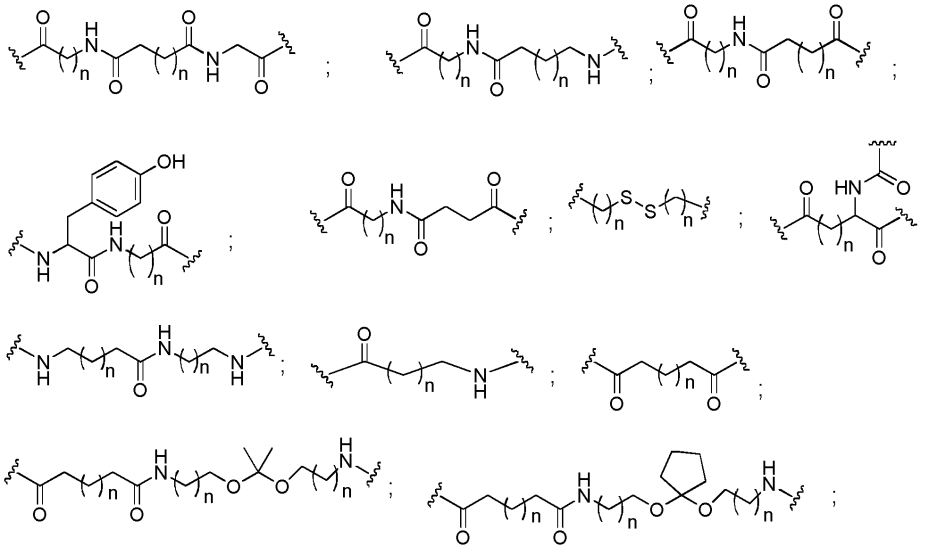
[0280] 어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



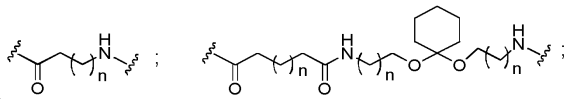
[0281]

[0282] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

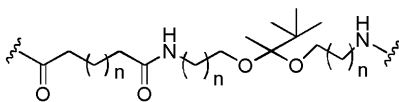
[0283] 어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0284]



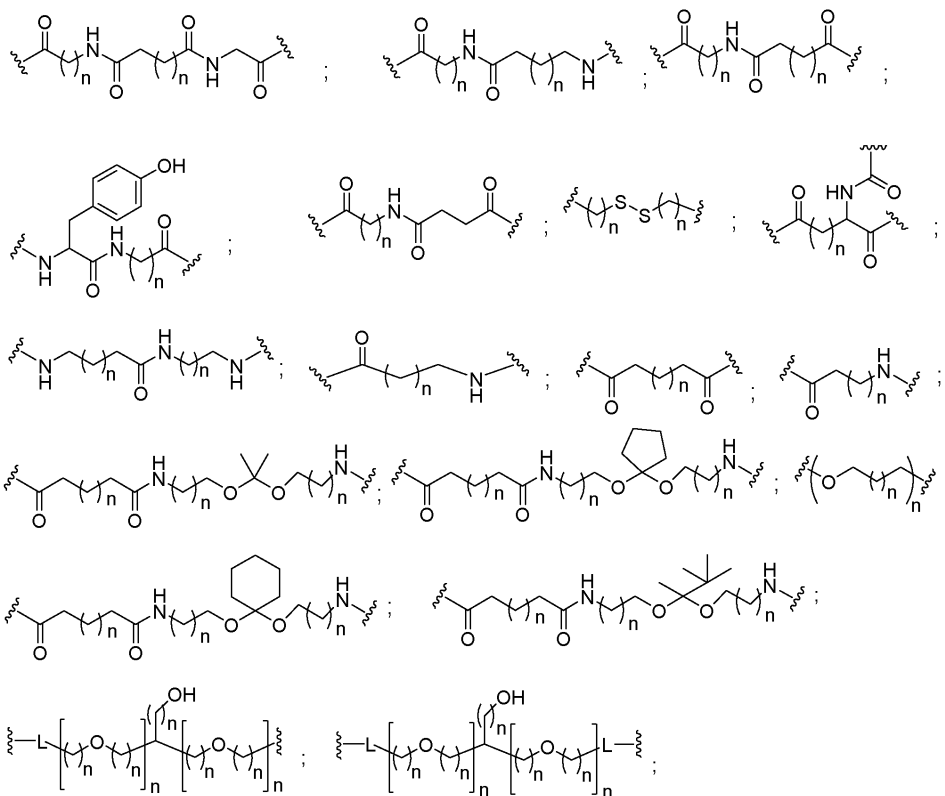
[0285]



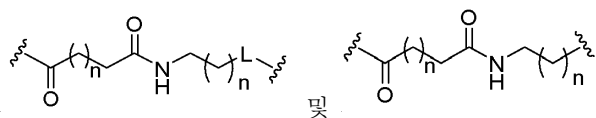
[0286]

[0287] 여기서 n은 1 내지 20이다.

[0288] 어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0289]

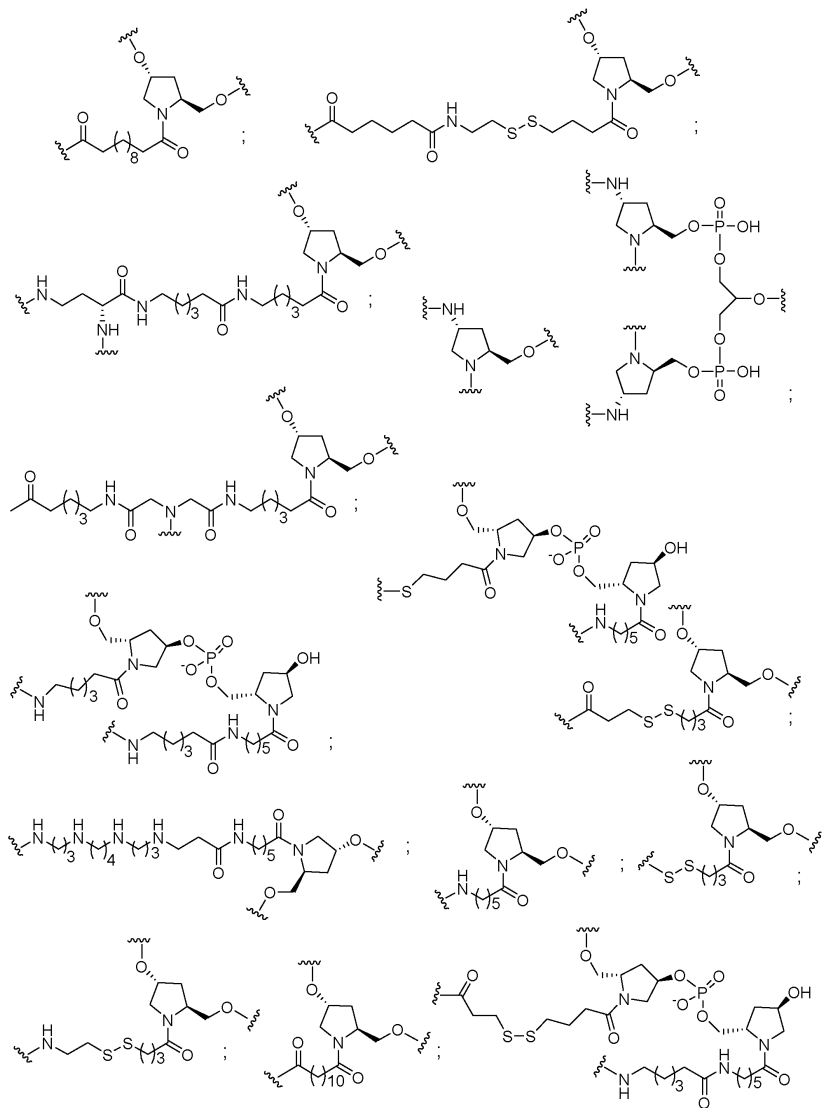


[0290]

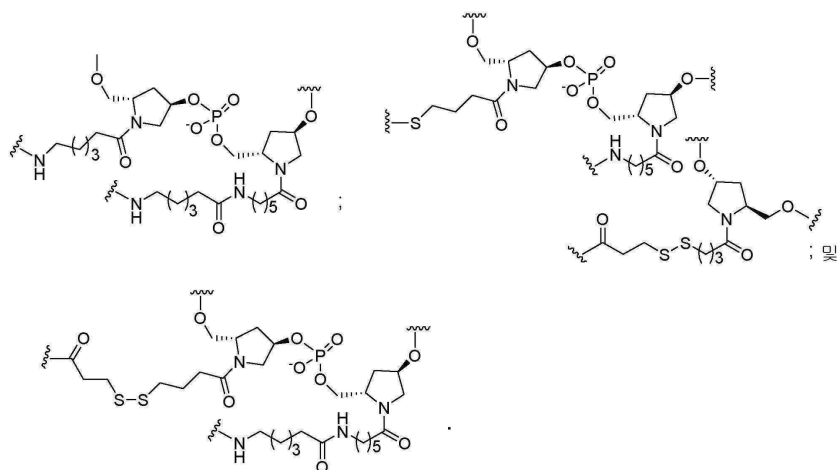
[0291] 여기서 각각의 L은, 독립적으로, 인 연결 그룹 또는 중성 연결 그룹; 그리고

[0292] 각각의 n 은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[0293] 어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:

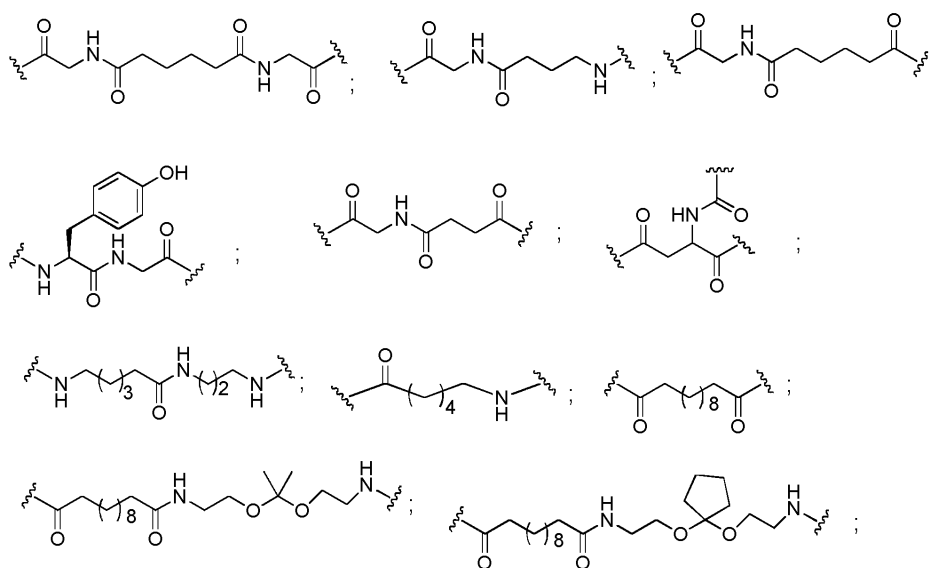


[0294]

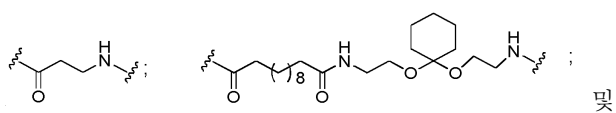


[0295]

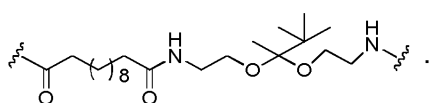
[0296] 어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



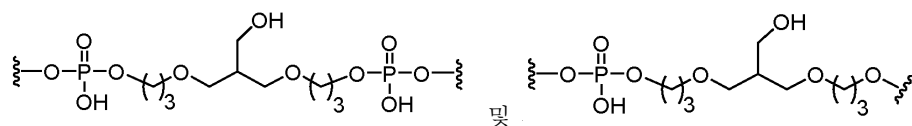
[0297]



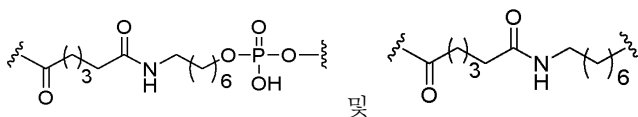
[0298]



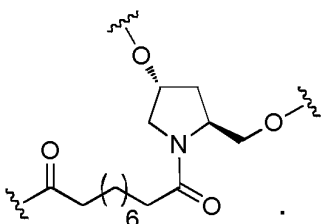
[0299]



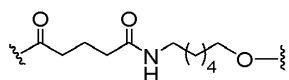
어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



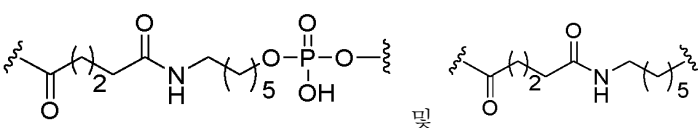
어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 하기 구조를 갖는다:



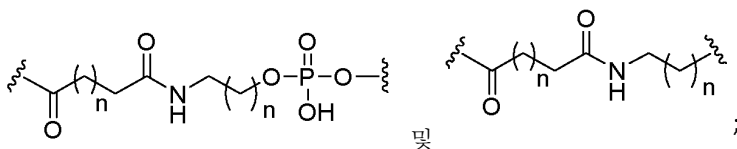
어떤 구현예에서, 콘주게이트 링커는 하기 구조를 갖는다:



어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



어떤 구현예에서, 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



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

iv. 어떤 세포-표적화 모이어티

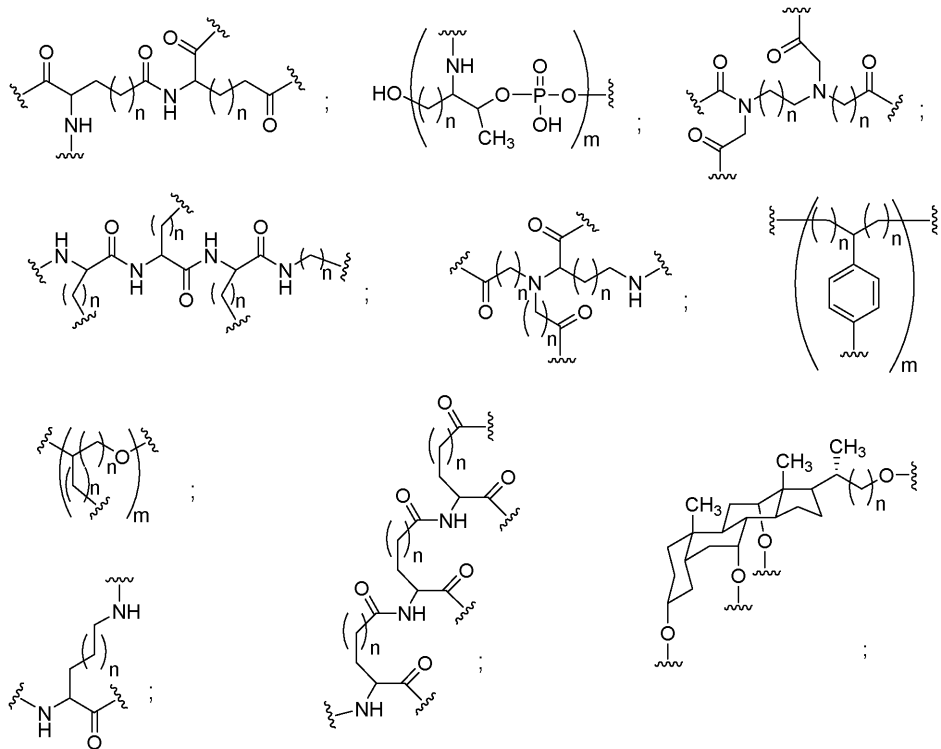
어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 세포-표적화 모이어티를 포함한다. 어떤 그와 같은 세포-표적화 모이어티는 안티센스 화합물의 세포성 흡수를 증가시킨다. 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 분지화 그룹, 1 이상의 테더, 및 1 이상의 리간드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 세포-표적화 모이어티는 분지화 그룹, 1 이상의 테더, 1 이상의 리간드 및 1 이상의 절단가능 결합을 포함한다.

1. 어떤 분지화 그룹

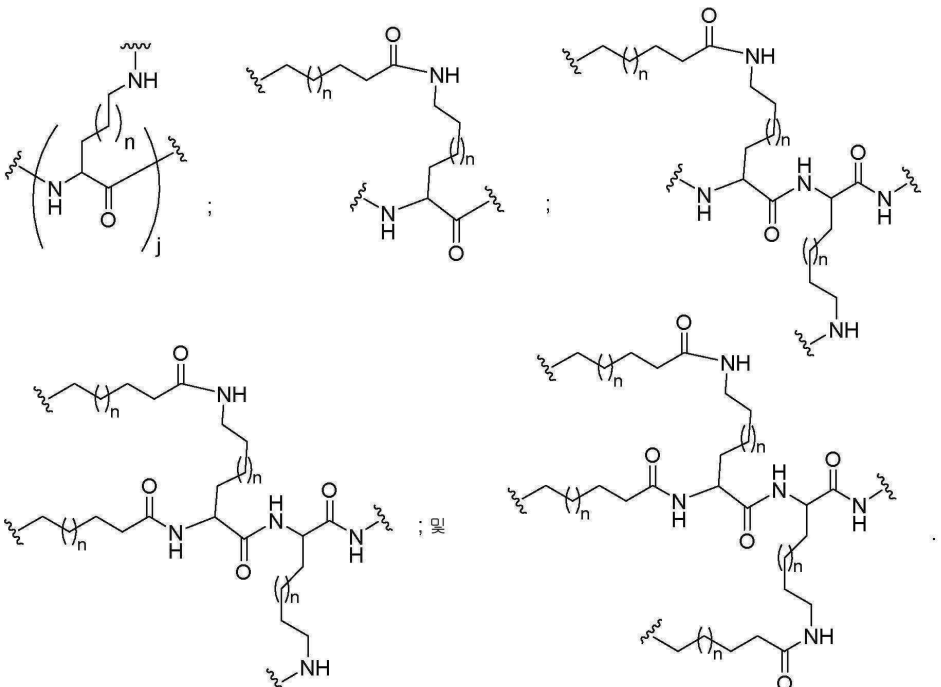
어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 분지화 그룹 및 적어도 2 개의 테더링된 리간드를 포함하는 표적 모이어티를 포함한다. 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 콘주게이트 링커를 첨부한다. 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 절단가능 모이어티를 첨부한다. 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 첨부한다. 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 링커 및 각각의 테더링된 리간드에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 알킬, 아마이드, 디설파이드, 폴리에틸렌 글리콜, 에테르, 티오에테르 및 하이드록실아미노 그룹으로부터 선택된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

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

[0326] 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0327]

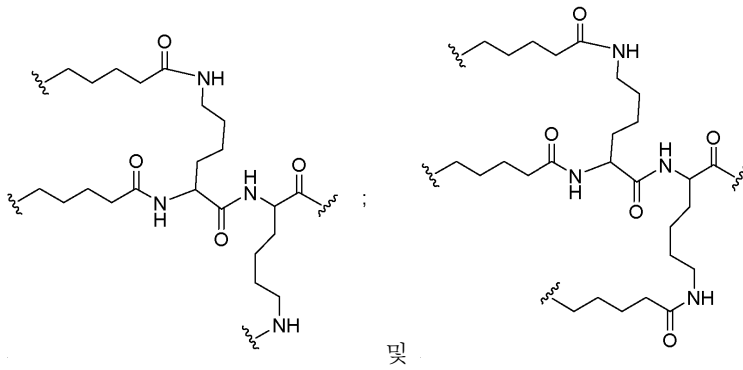


[0328]

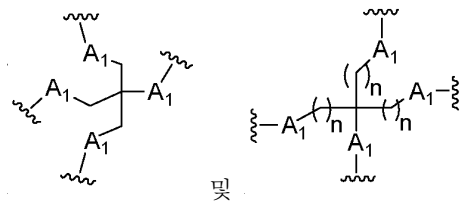
[0329] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고;

[0330] j는 1 내지 3이고; 그리고

[0331] m은 2 내지 6이다.



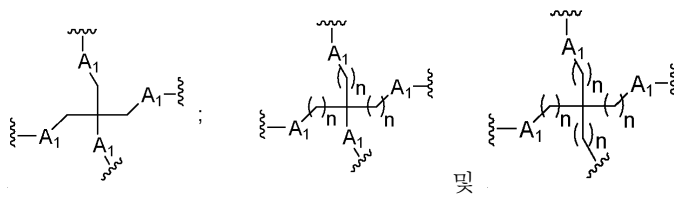
어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



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

각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

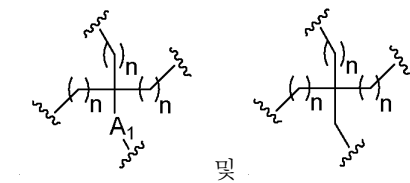
어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



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

각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

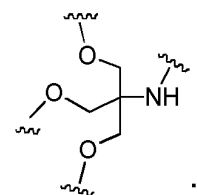
어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



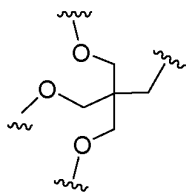
여기서 A₁은 O, S, C=O 또는 NH이고; 그리고

각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:

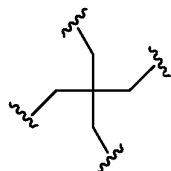


[0353] 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0354]

[0355] 어떤 구현예에서, 분지화 그룹은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0356]

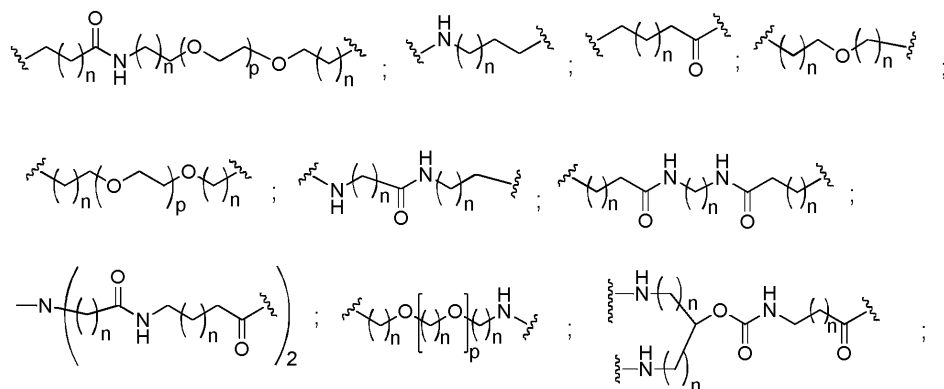
[0357] 2. 어떤 테더

[0358] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 분지화 그룹에 공유결합된 1 이상의 테더를 포함한다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 연결 그룹에 공유결합된 1 이상의 테더를 포함한다. 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 임의의 조합으로 알킬, 에테르, 티오에테르, 디설파이드, 아마이드 및 폴리에틸렌 글리콜 그룹으로부터 선택된 1 이상의 그룹을 포함하는 선형 지방족 그룹이다. 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 임의의 조합으로 알킬, 치환된 알킬, 에테르, 티오에테르, 디설파이드, 아마이드, 포스포디에스테르 및 폴리에틸렌 글리콜 그룹으로부터 선택된 1 이상의 그룹을 포함하는 선형 지방족 그룹이다. 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 임의의 조합으로 알킬, 에테르 및 아마이드 그룹으로부터 선택된 1 이상의 그룹을 포함하는 선형 지방족 그룹이다. 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 임의의 조합으로 알킬, 치환된 알킬, 포스포디에스테르, 에테르 및 아마이드 그룹으로부터 선택된 1 이상의 그룹을 포함하는 선형 지방족 그룹이다. 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 임의의 조합으로 알킬 및 포스포디에스테르로부터 선택된 1 이상의 그룹을 포함하는 선형 지방족 그룹이다. 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 적어도 하나의 인 연결 그룹 또는 중성 연결 그룹을 포함한다.

[0359] 어떤 구현예에서, 테더는 1 이상의 절단가능 결합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 테더는 아마이드 또는 에테르 그룹을 통해 분지화 그룹에 부착된다. 어떤 구현예에서, 테더는 포스포디에스테르 그룹을 통해 분지화 그룹에 부착된다. 어떤 구현예에서, 테더는 인 연결 그룹 또는 중성 연결 그룹을 통해 분지화 그룹에 부착된다. 어떤 구현예에서, 테더는 에테르 그룹을 통해 분지화 그룹에 부착된다. 어떤 구현예에서, 테더는 아마이드 또는 에테르 그룹을 통해 리간드에 부착된다. 어떤 구현예에서, 테더는 에테르 그룹을 통해 리간드에 부착된다. 어떤 구현예에서, 테더는 아마이드 또는 에테르 그룹을 통해 리간드에 부착된다. 어떤 구현예에서, 테더는 에테르 그룹을 통해 리간드에 부착된다.

[0360] 어떤 구현예에서, 각각의 테더는 리간드와 분지화 그룹 사이에 약 8 내지 약 20 개의 원자의 사슬 길이를 포함한다. 어떤 구현예에서, 각각의 테더 그룹은 리간드와 분지화 그룹 사이에 약 10 내지 약 18 개의 원자의 사슬 길이를 포함한다. 어떤 구현예에서, 각각의 테더 그룹은 약 13 개의 원자의 사슬 길이를 포함한다.

[0361] 어떤 구현예에서, 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0362]

[0363]

[0364]

[0365]

[0366]

[0367]

[0368]

[0369]

[0370]

[0371]

[0372]

[0373]

[0374]

[0375]

[0376]

[0377]

[0378]

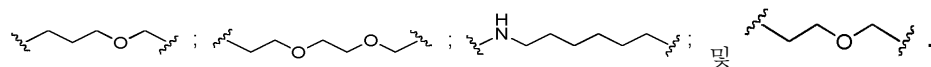
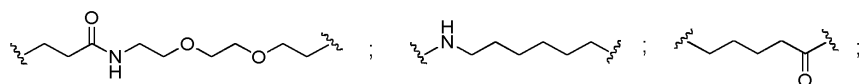
[0379]

[0380]

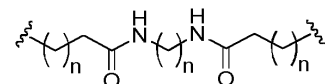
여기서 각각의 n 은, 독립적으로, 1 내지 20이고; 그리고

각각의 p 는 1 내지 약 6이다.

어떤 구현예에서, 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:

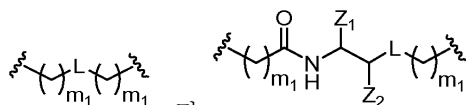


어떤 구현예에서, 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



여기서 각각의 n 은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

어떤 구현예에서, 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



여기서 L 은 인 연결 그룹 또는 중성 연결 그룹 중 하나이고;

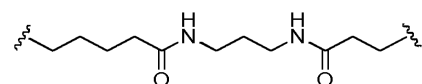
Z_1 은 C(=O)O-R_2 이고;

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

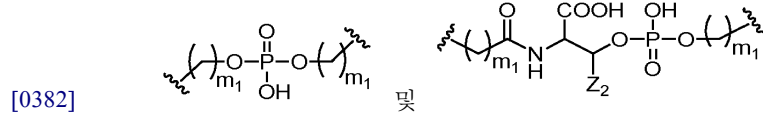
R_2 는 H , $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬 또는 치환된 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬이고; 그리고

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

어떤 구현예에서, 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



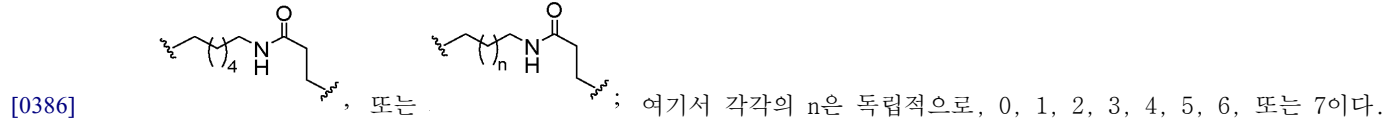
[0381] 어떤 구현예에서, 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0383] 여기서 Z_2 는 H 또는 CH_3 이고; 그리고

[0384] 각각의 m_1 은, 독립적으로, 0 내지 20이고, 여기서 적어도 하나의 m_1 은 각각의 테더에 대해 0 초과이다.

[0385] 어떤 구현예에서, 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



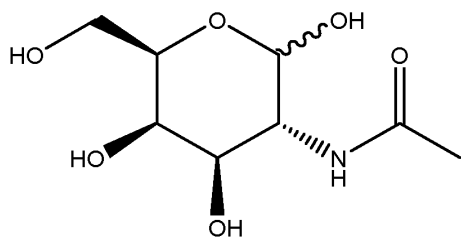
[0387] 어떤 구현예에서, 테더는 인 연결 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 테더는 임의의 아미드 결합을 포함하지 않는다. 어떤 구현예에서, 테더는 인 연결 그룹을 포함하고 임의의 아미드 결합을 포함하지 않는다.

[0388] 3. 어떤 리간드

[0389] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 리간드를 제공하고, 여기서 각각의 리간드는 테더에 공유결합된다. 어떤 구현예에서, 표적 세포 상의 적어도 하나의 유형의 수용체에 대한 친화성을 갖는 각각의 리간드가 선택된다. 어떤 구현예에서, 포유동물 간 세포의 표면 상의 적어도 하나의 유형의 수용체에 대한 친화성을 갖는 리간드가 선택된다. 어떤 구현예에서, 간 아시알로당단백질 수용체 (ASGP-R)에 대해 친화성을 갖는 리간드가 선택된다. 어떤 구현예에서, 각각의 리간드는 탄수화물이다. 어떤 구현예에서, 각각의 리간드는, 갈락토오스, N-아세틸 갈락토오스아민, 만노스, 글루코오스, 글루코사민 및 푸코스로부터 독립적으로 선택된다. 어떤 구현예에서, 각각의 리간드는 N-아세틸 갈락토오스아민 (GalNAc)이다. 어떤 구현예에서, 표적 모이어티는 2 내지 6 개의 리간드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 표적 모이어티는 3 개의 리간드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 표적 모이어티는 3 N-아세틸 갈락토오스아민 리간드를 포함한다.

[0390] 어떤 구현예에서, 리간드는 탄수화물, 탄수화물 유도체, 변형된 탄수화물, 다당 탄수화물 클러스터, 다당류, 변형된 다당류, 또는 다당류 유도체이다. 어떤 구현예에서, 리간드는 아미노 당 또는 티오 당이다. 예를 들면, 아미노 당은 당해기술에서 공지된 임의의 수의 화합물, 예를 들면 글루코사민, 시알산, α -D-갈락토사민, N-아세틸갈락토사민, 2-아세트아미도-2-데옥시-D-갈락토팜피라노스 (GalNAc), 2-아미노-3-O-[(R)-1-카복시에틸]-2-데옥시- β -D-글루코피라노스 (β -뮤람산), 2-데옥시-2-메틸아미노-L-글루코피라노스, 4,6-디데옥시-4-포름아미도-2,3-디-O-메틸-D-만노피라노스, 2-데옥시-2-설포아미노-D-글루코피라노스 및 N-설포-D-글루코사민, 및 N-글리콜로일- α -뉴라민산으로부터 선택될 수 있다. 예를 들면, 티오 당류는 5-티오- β -D-글루코피라노스, 메틸 2,3,4-트리-O-아세틸-1-티오-6-O-트리틸- α -D-글루코피라노사이드, 4-티오- β -D-갈락토팜피라노스, 및 에틸 3,4,6,7-테트라-O-아세틸-2-데옥시-1,5-디티오- α -D-글루코-헵토팜피라노사이드로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

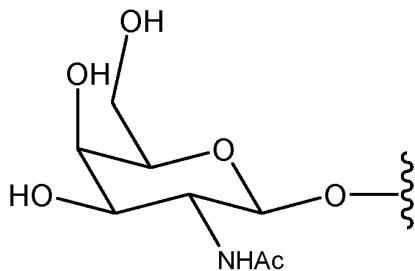
[0391] 어떤 구현예에서, "GalNAc" 또는 "Gal-NAc"는 N-아세틸 갈락토사민으로서 문헌에서 통상적으로 칭해지는 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토팜피라노스를 의미한다. 어떤 구현예에서, "N-아세틸 갈락토사민"는 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토팜피라노스를 의미한다. 어떤 구현예에서, "GalNAc" 또는 "Gal-NAc"는 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토팜피라노스를 의미한다. 어떤 구현예에서, "GalNAc" 또는 "Gal-NAc"는 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토팜피라노스를 의미하고, 이것은 β -형: 2-(아세틸아미노)-2-데옥시- β -D-갈락토팜피라노스 및 α -형: 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토팜피라노스 둘 모두를 포함한다. 어떤 구현예에서, β -형: 2-(아세틸아미노)-2-데옥시- β -D-갈락토팜피라노스 및 α -형: 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토팜피라노스 둘 모두는 상호교환적으로 사용될 수 있다. 따라서, 하나의 형태가 묘사된 구조에서, 이들 구조는 다른 형태를 또한 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들면, α -형: 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토팜피라노스의 구조가 보여지는 경우, 이러한 구조는 다른 형태를 또한 포함하는 것으로 의도된다. 어떤 구현예에서, 어떤 바람직한 구현예에서, β -형 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토팜피라노스는 바람직한 구현예이다.



[0392]

[0393]

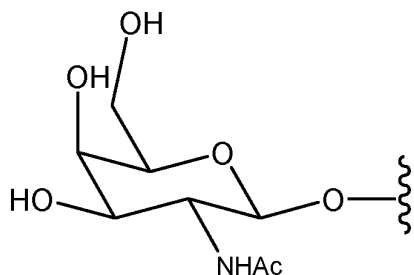
2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토파이라노스



[0394]

[0395]

2-(아세틸아미노)-2-데옥시-β-D-갈락토파이라노스



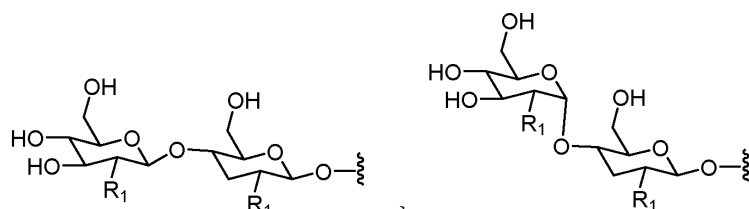
[0396]

[0397]

2-(아세틸아미노)-2-데옥시-α-D-갈락토파이라노스

[0398]

어떤 구현예에서 1 이상의 리간드는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0399]

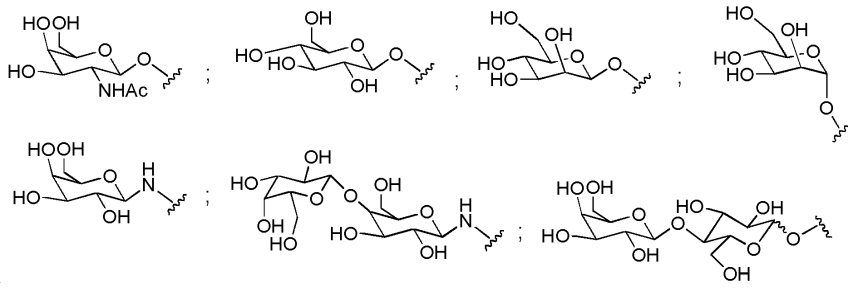
및

[0400]

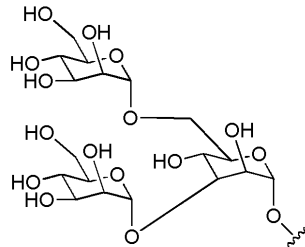
여기서 각각의 R₁은 OH 및 NHCOOH로부터 선택된다.

[0401]

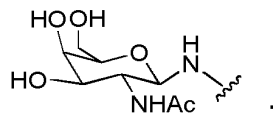
어떤 구현예에서 1 이상의 리간드는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



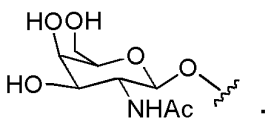
[0402] 및



[0403]
[0404] 어떤 구현예에서 1 이상의 리간드는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:

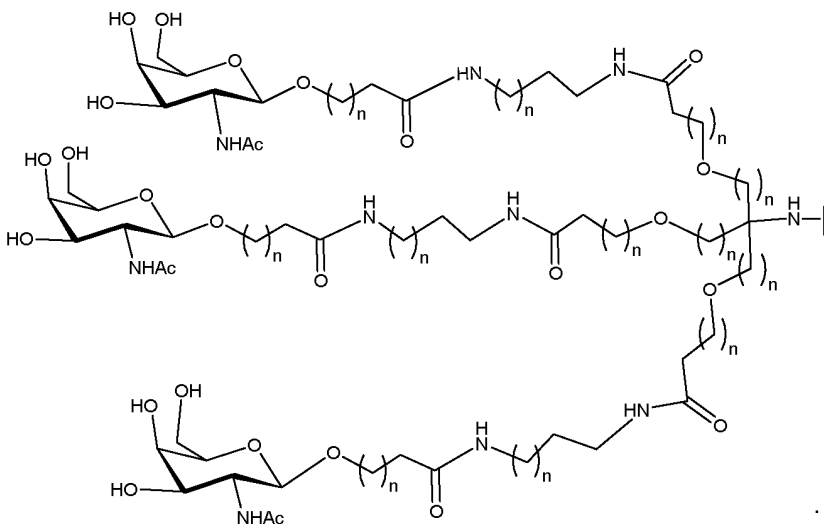


[0405]
[0406] 어떤 구현예에서 1 이상의 리간드는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



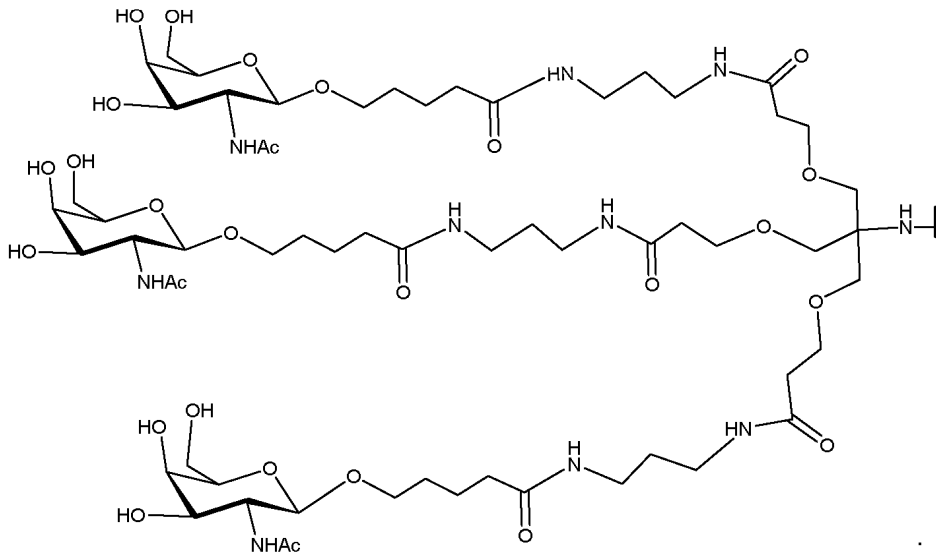
[0407]
[0408] i. 어떤 콘주게이트

[0409] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 상기의 구조적 특징을 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



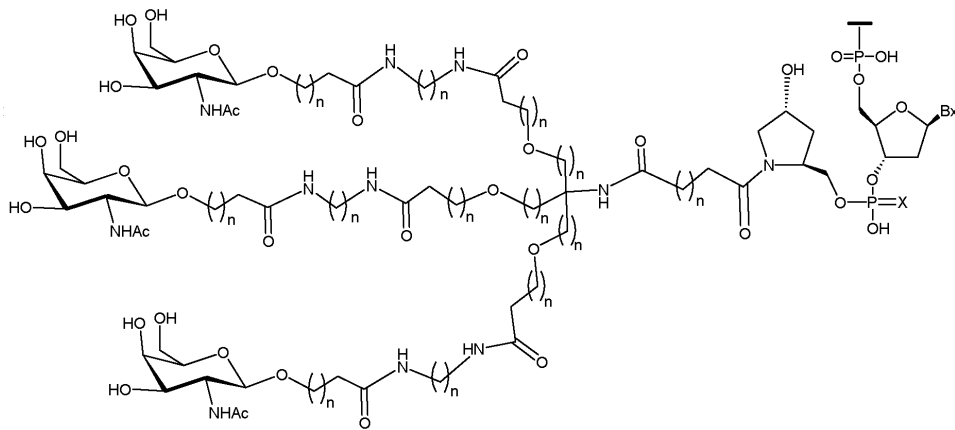
[0410]
[0411] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[0412] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



[0413]

[0414] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



[0415]

[0416] 여기서 각각의 n 은, 독립적으로, 1 내지 20이고;

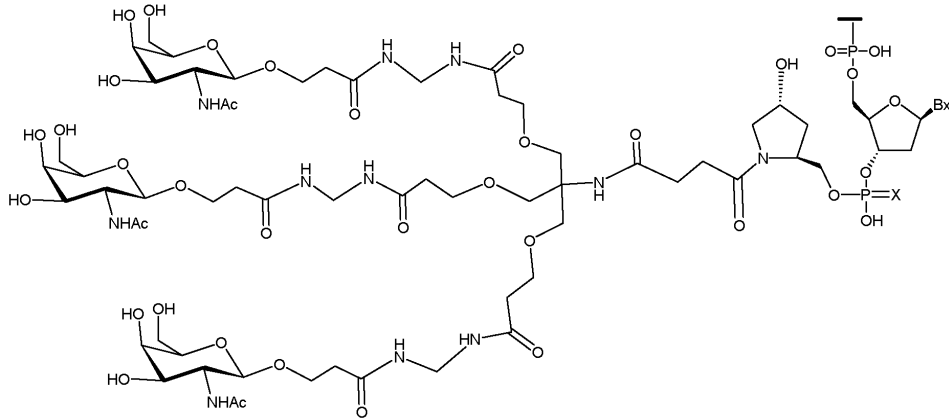
[0417] Z 는 H 또는 연결된 고형 지지체이고;

[0418] Q 는 안티센스 화합물이고;

[0419] X 는 O 또는 S이고; 그리고

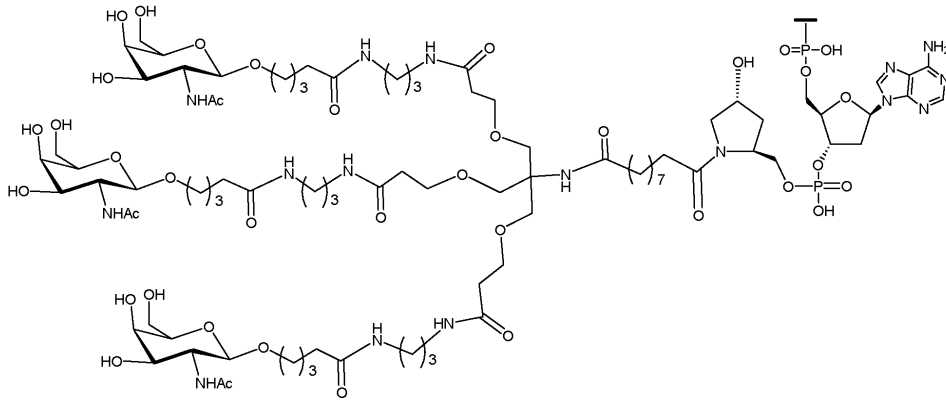
[0420] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다.

[0421] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



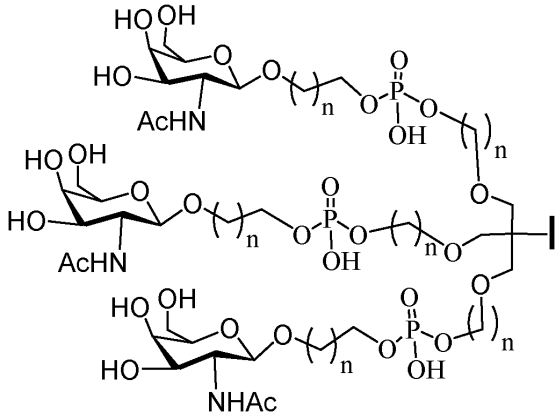
[0422]

[0423] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



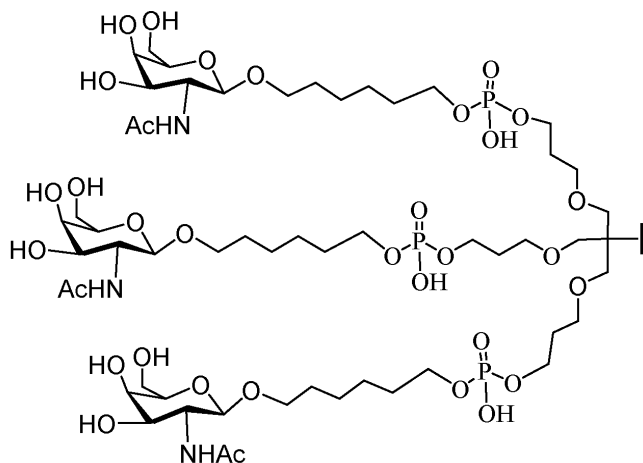
[0424]

[0425] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



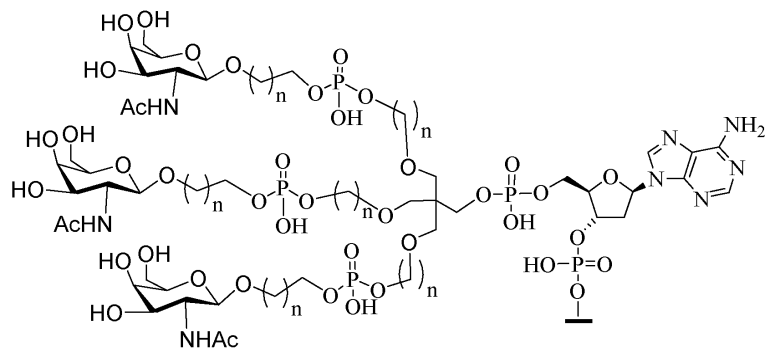
[0426]

[0427] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



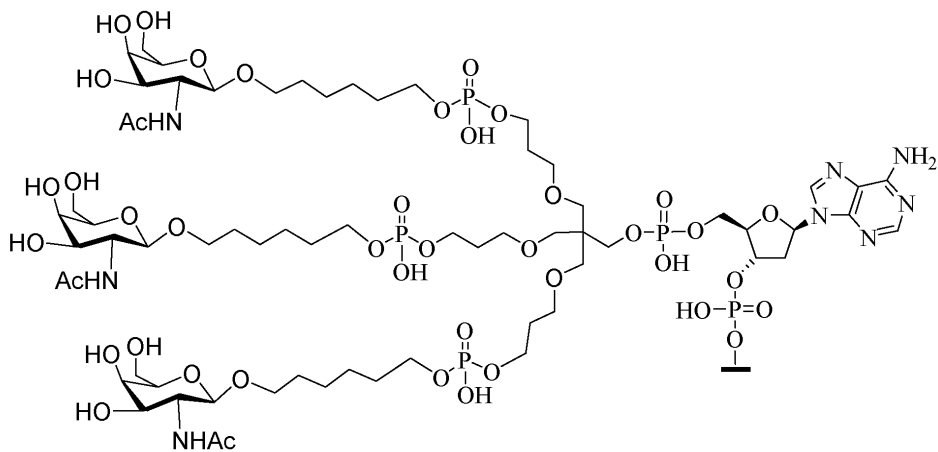
[0428]

[0429] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



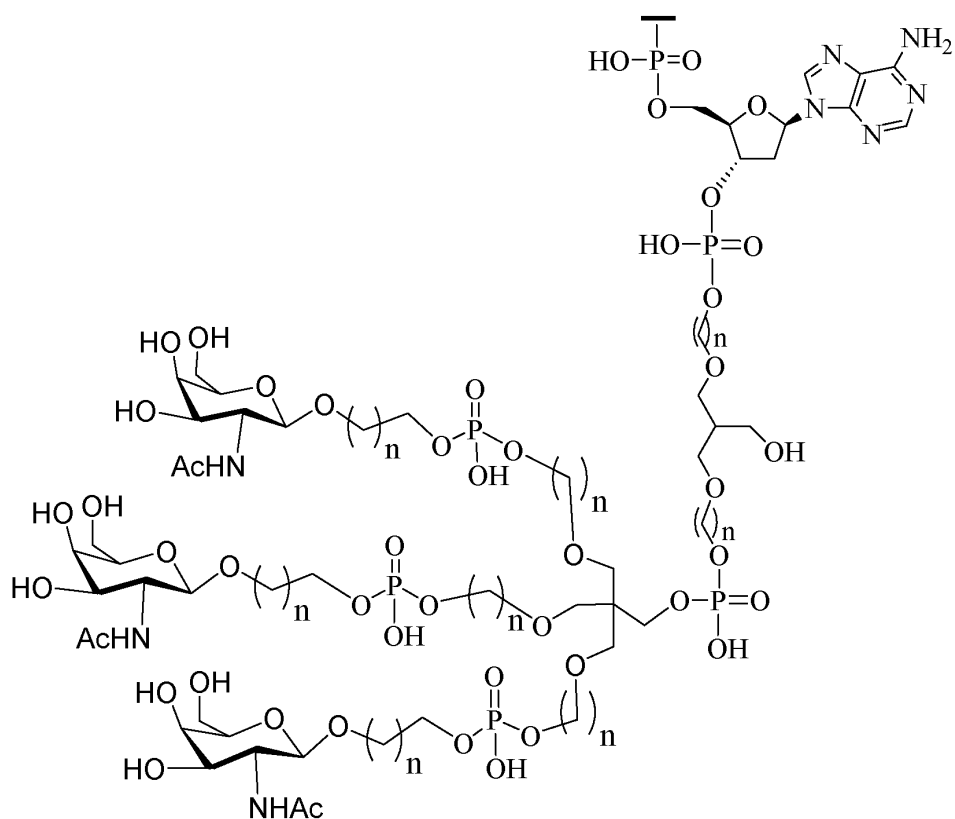
[0430]

[0431] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



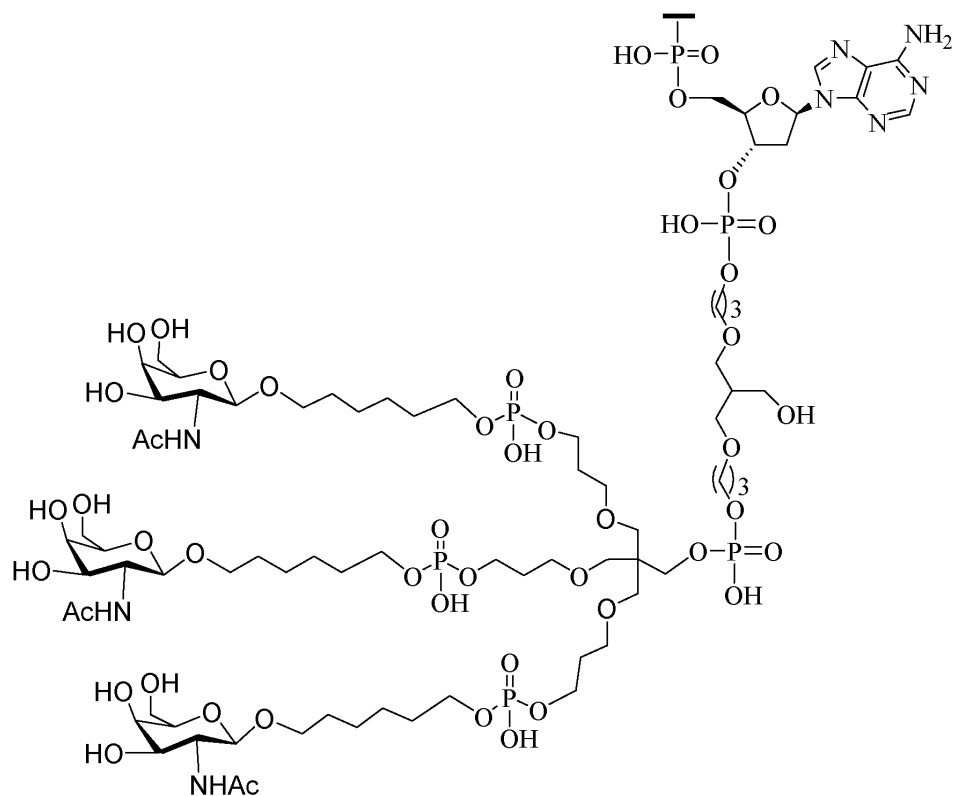
[0432]

[0433] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



[0434]

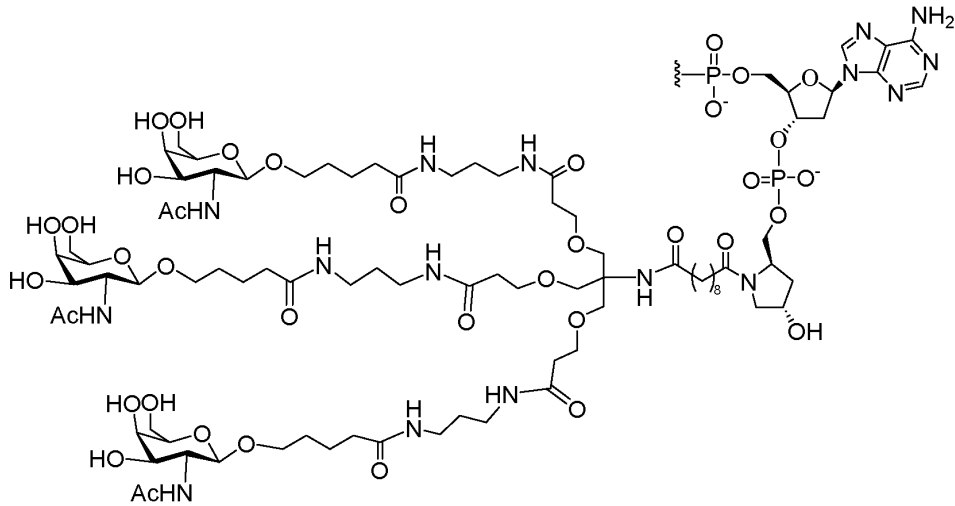
[0435] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



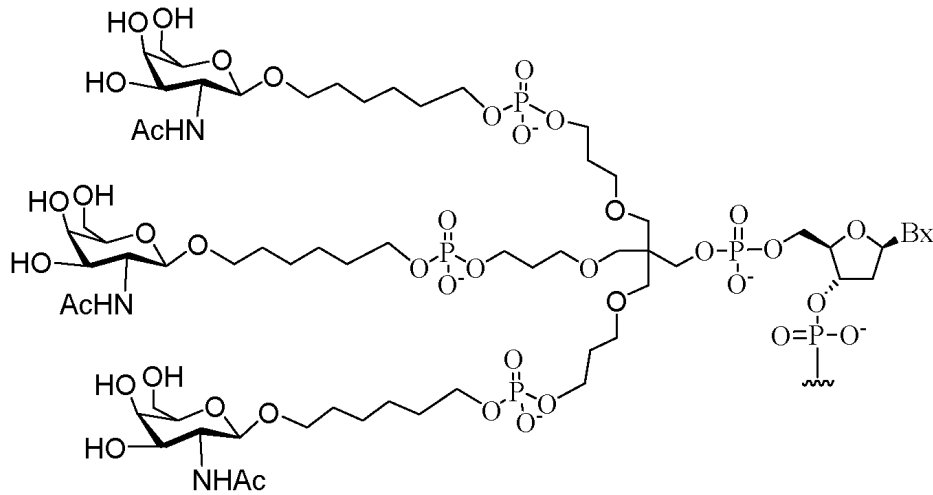
[0436]

[0437] 어떤 구현예에서, 콘주게이트는 피롤리딘을 포함하지 않는다.

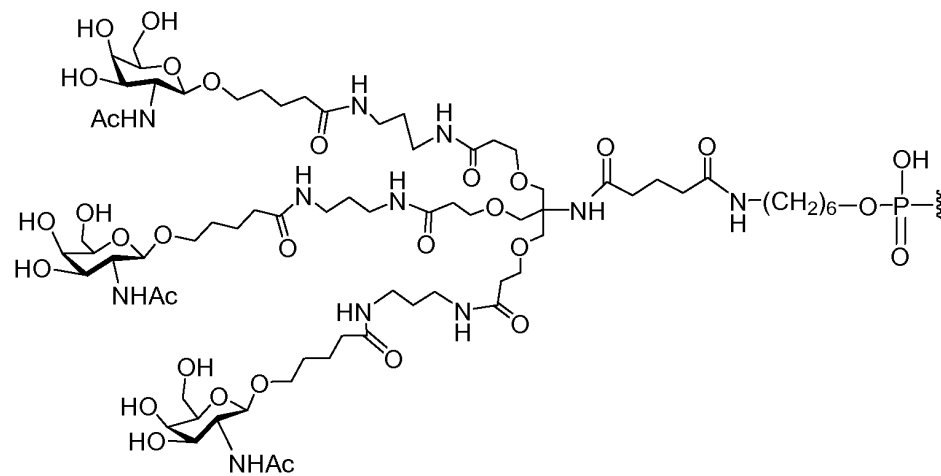
[0438] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



[0439] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:

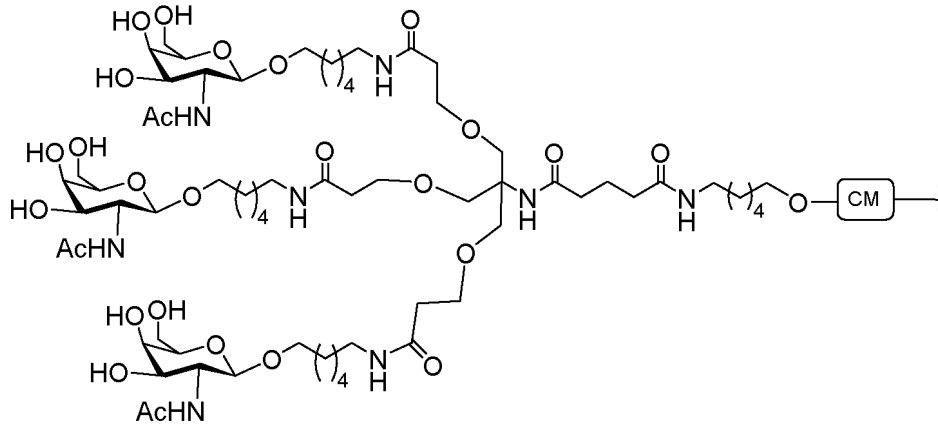


[0441] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



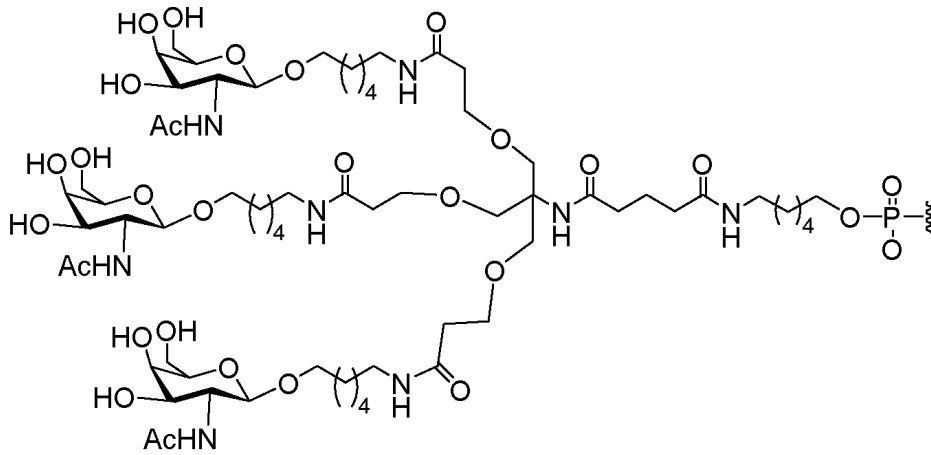
[0443] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:

[0444] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



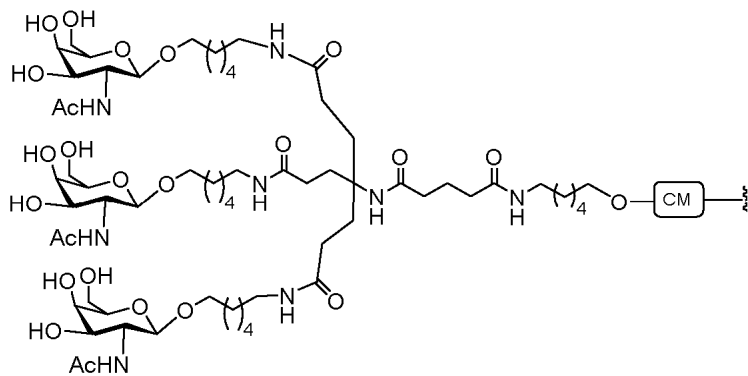
[0445]

[0446] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



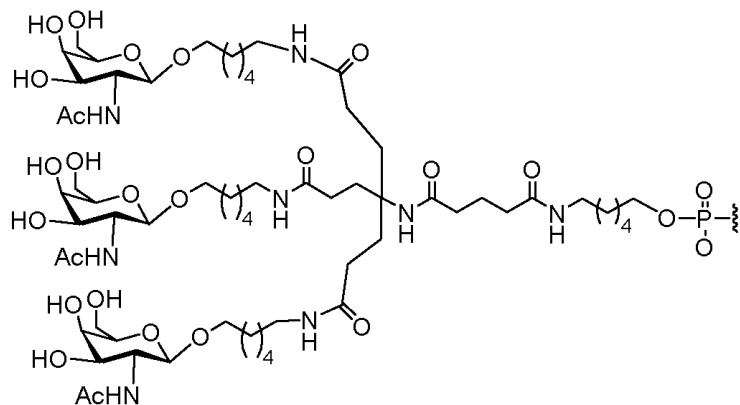
[0447]

[0448] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



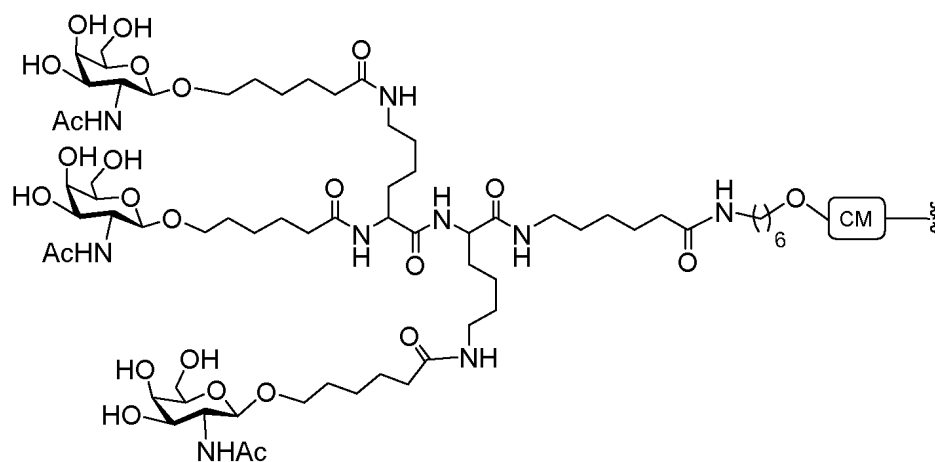
[0449]

[0450] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



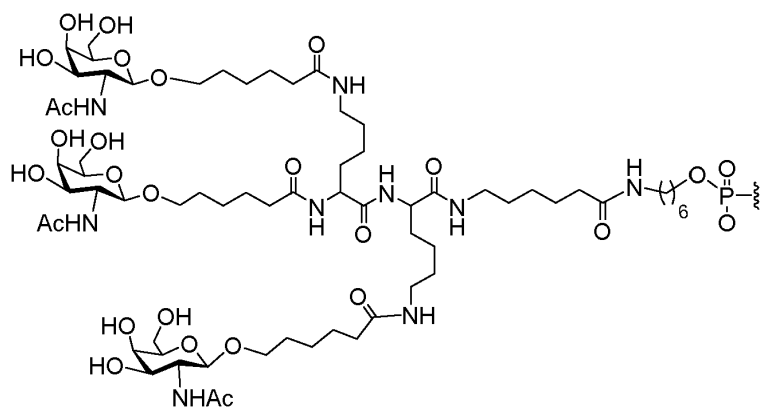
[0451]

[0452] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



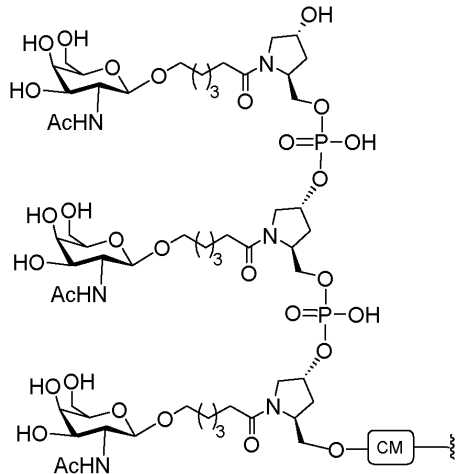
[0453]

[0454] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



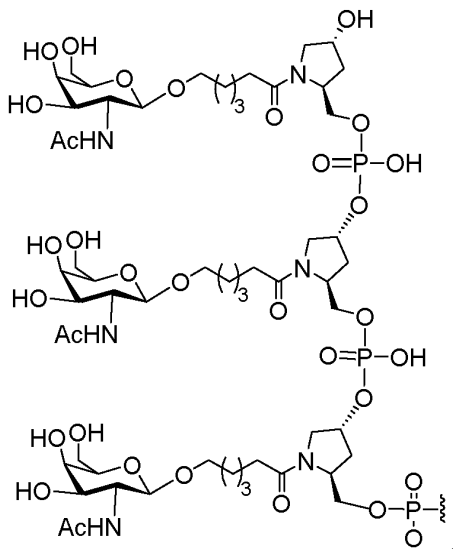
[0455]

[0456] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



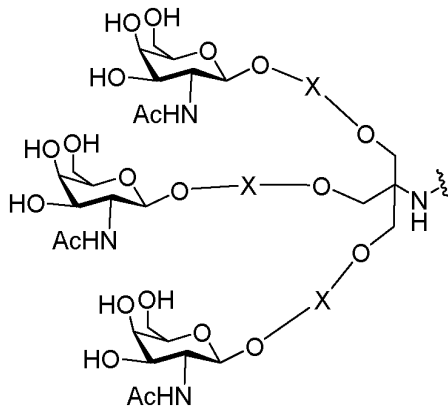
[0457]

[0458] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹은 하기 구조를 갖는다:



[0459]

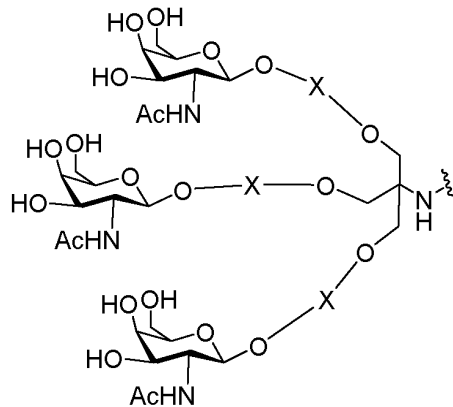
[0460] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0461]

[0462] 여기서 X는 6 내지 11 개의 연속하여 결합된 원자의 치환된 또는 비치환된 테터이다.

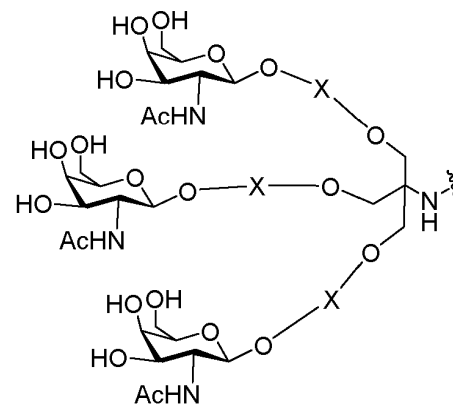
[0463] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0464]

[0465] 여기서 X는 10 개의 연속하여 결합된 원자의 치환된 또는 비치환된 테더이다.

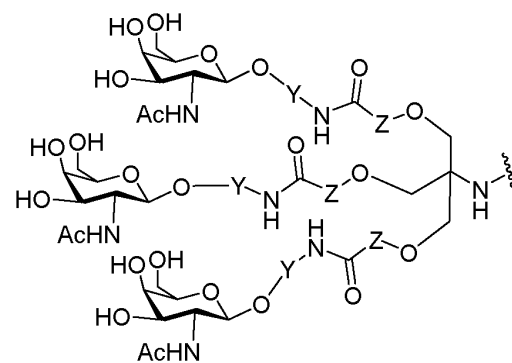
[0466] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0467]

[0468] 여기서 X는 4 내지 11 개의 연속하여 결합된 원자의 치환된 또는 비치환된 테더이고 상기 테더는 정확하게 하나의 아미드 결합을 포함한다.

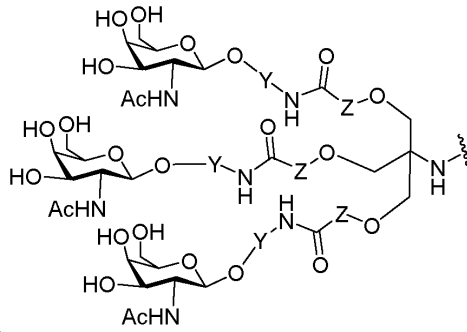
[0469] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0470]

[0471] 여기서 Y 및 Z는 C₁-C₁₂ 치환된 또는 비치환된 알킬, 알케닐, 또는 알키닐 그룹, 또는 에테르, 케톤, 아미드, 에스테르, 카바메이트, 아민, 피페리딘, 포스페이트, 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 트리아졸, 피롤리딘, 디설파이드, 또는 티오에테르를 포함하는 그룹으로부터 독립적으로 선택된다.

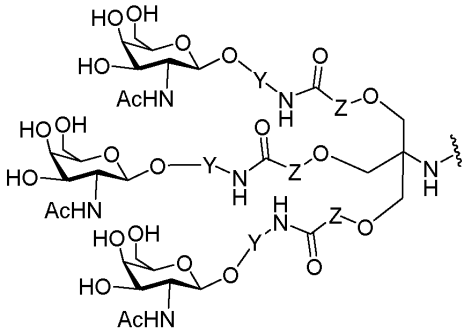
[0472] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0473]

[0474] 여기서 Y 및 Z는 C_1-C_{12} 치환된 또는 비치환된 알킬 그룹, 또는 정확하게 하나의 에테르 또는 정확하게 2 개의 에테르, 아마이드, 아민, 피페리딘, 포스페이트, 포스포디에스테르, 또는 포스포로티오에이트를 포함하는 그룹으로부터 독립적으로 선택된다.

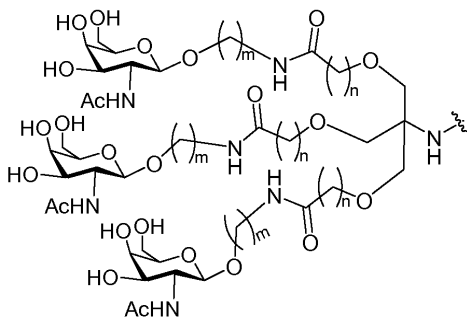
[0475] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0476]

[0477] 여기서 Y 및 Z는 C_1-C_{12} 치환된 또는 비치환된 알킬 그룹으로부터 독립적으로 선택된다.

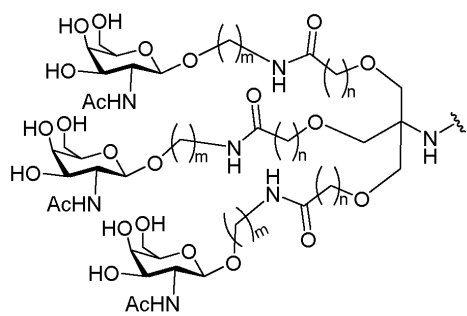
[0478] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0479]

[0480] 여기서 m 및 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 및 12로부터 독립적으로 선택된다.

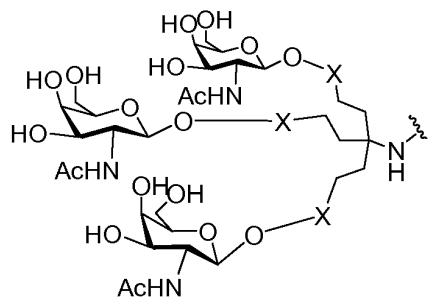
[0481] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0482]

[0483] 여기서 m은 4, 5, 6, 7, 또는 8이고, n은 1, 2, 3, 또는 4이다.

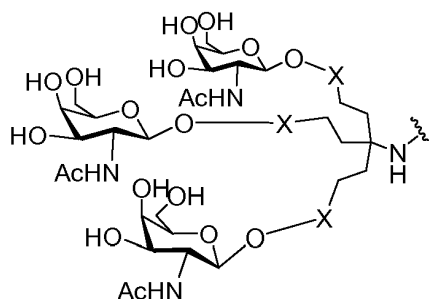
[0484] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0485]

[0486] 여기서 X는 4 내지 13 개의 연속하여 결합된 원자의 치환된 또는 비치환된 테더이고, 여기서 X는 에테르 그룹을 포함하지 않는다.

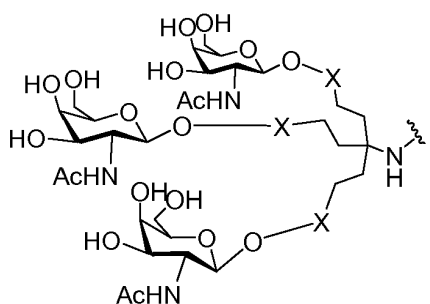
[0487] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0488]

[0489] 여기서 X는 8 개의 연속하여 결합된 원자의 치환된 또는 비치환된 테더이고, 여기서 X는 에테르 그룹을 포함하지 않는다.

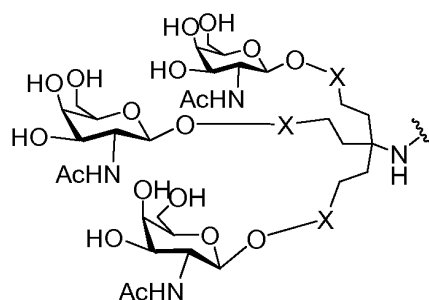
[0490] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0491]

[0492] 여기서 X는 4 내지 13 개의 연속하여 결합된 원자의 치환된 또는 비치환된 테더이고, 상기 테더는 정확하게 하나의 아미드 결합을 포함하고, 여기서 X는 에테르 그룹을 포함하지 않는다.

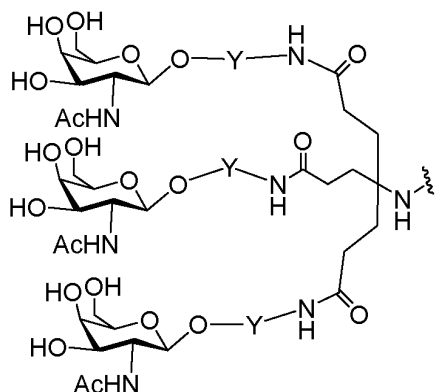
[0493] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0494]

[0495] 여기서 X는 4 내지 13 개의 연속하여 결합된 원자의 치환된 또는 비치환된 테더이고, 상기 테더는 아마이드 결합 및 치환된 또는 비치환된 C₂-C₁₁ 알킬 그룹으로 구성된다.

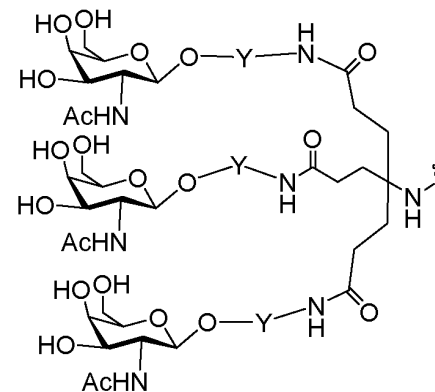
[0496] 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0497]

[0498] 여기서 Y는 C₁-C₁₂ 치환된 또는 비치환된 알킬, 알케닐, 또는 알키닐 그룹, 또는 에테르, 케톤, 아마이드, 에스테르, 카바메이트, 아민, 피페리딘, 포스페이트, 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 트리아졸, 피롤리딘, 디설파이드, 또는 티오에테르를 포함하는 그룹으로부터 선택된다.

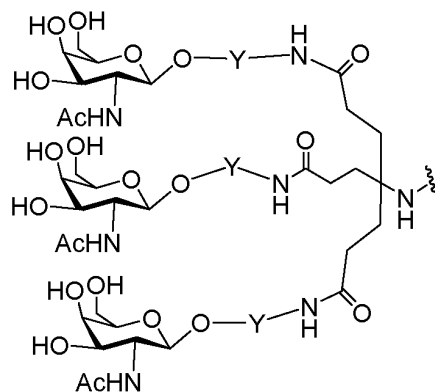
[0499] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0500]

[0501] 여기서 Y는 C₁-C₁₂ 치환된 또는 비치환된 알킬 그룹, 또는 에테르, 아민, 피페리딘, 포스페이트, 포스포디에스테르, 또는 포스포로티오에이트를 포함하는 그룹으로부터 선택된다.

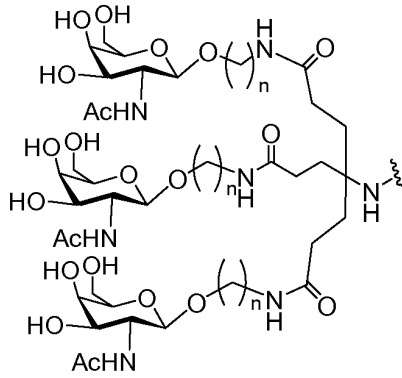
[0502] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0503]

[0504] 여기서 Y는 C₁-C₁₂ 치환된 또는 비치환된 알킬 그룹으로부터 선택된다.

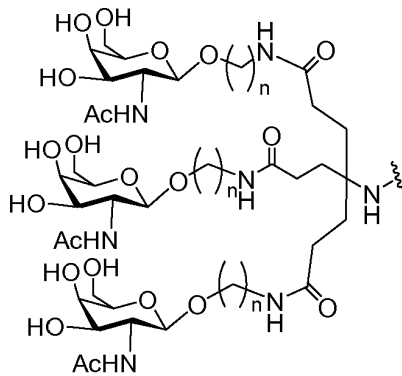
[0505] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0506]

[0507] 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12이다.

[0508] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 세포-표적 모이어티는 하기 구조를 갖는다:

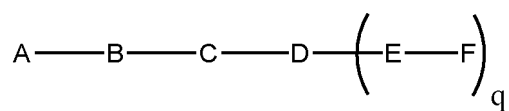


[0509]

[0510] 여기서 n은 4, 5, 6, 7, 또는 8이다.

[0511] **b. 어떤 접합된 안티센스 화합물**

[0512] 어떤 구현예에서, 콘주게이트는 뉴클레오사이드의 2', 3', 또는 5' 위치에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오사이드에 결합된다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[0513]

[0514] 여기서

[0515] A는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고;

[0516] B는 절단가능 모이어티이고;

[0517] C은 콘주게이트 링커이고

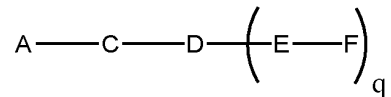
[0518] D는 분지화 그룹이고;

[0519] 각각의 E는 테더이고;

[0520] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[0521] q는 정수 1 내지 5이다.

[0522] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[0523]

[0524] 여기서

[0525] A는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고;

[0526] C은 콘주게이트 링커이고

[0527] D는 분지화 그룹이고;

[0528] 각각의 E는 테더이고;

[0529] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[0530] q는 정수 1 내지 5이다.

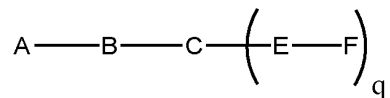
[0531] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 링커는 적어도 하나의 절단가능 결합을 포함한다.

[0532] 어떤 그와 같은 구현예에서, 분지화 그룹은 적어도 하나의 절단가능 결합을 포함한다.

[0533] 어떤 구현예에서 각각의 테더는 적어도 하나의 절단가능 결합을 포함한다.

[0534] 어떤 구현예에서, 콘주게이트는 뉴클레오타이드의 2', 3', 또는 5' 위치에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드에 결합된다.

[0535] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[0536]

[0537] 여기서

[0538] A는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고;

[0539] B는 절단가능 모이어티이고;

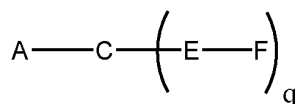
[0540] C은 콘주게이트 링커이고

[0541] 각각의 E는 테더이고;

[0542] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[0543] q는 정수 1 내지 5이다.

[0544] 어떤 구현예에서, 콘주게이트는 뉴클레오타이드의 2', 3', 또는 5' 위치에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드에 결합된다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[0545]

[0546] 여기서

[0547] A는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고;

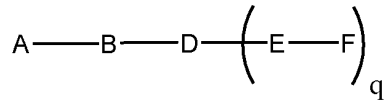
[0548] C은 콘주게이트 링커이고

[0549] 각각의 E는 테더이고;

[0550] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[0551] q는 정수 1 내지 5이다.

[0552] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[0553]

[0554] 여기서

[0555] A는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고;

[0556] B는 절단가능 모이어티이고;

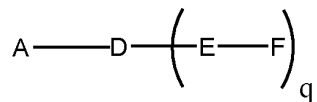
[0557] D는 분지화 그룹이고;

[0558] 각각의 E는 테더이고;

[0559] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[0560] q는 정수 1 내지 5이다.

[0561] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[0562]

[0563] 여기서

[0564] A는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고;

[0565] D는 분지화 그룹이고;

[0566] 각각의 E는 테더이고;

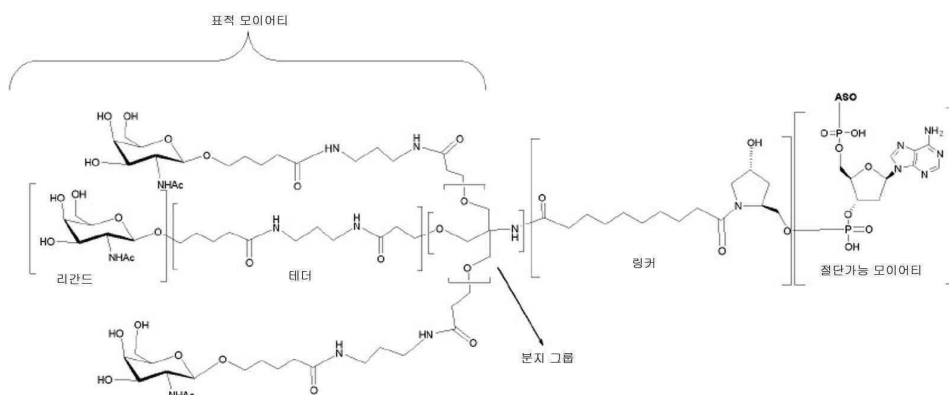
[0567] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[0568] q는 정수 1 내지 5이다.

[0569] 어떤 그와 같은 구현예에서, 콘주게이트 링커는 적어도 하나의 절단가능 결합을 포함한다.

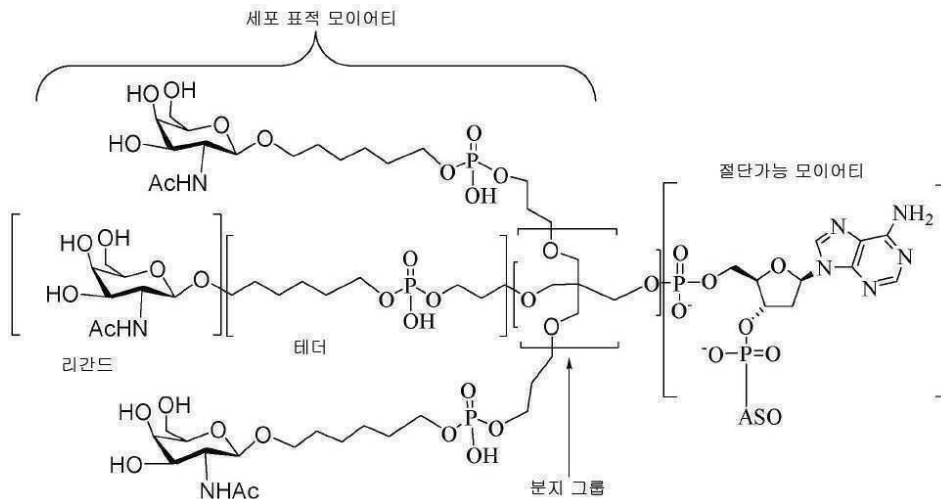
[0570] 어떤 구현예에서 각각의 테더는 적어도 하나의 절단가능 결합을 포함한다.

[0571] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



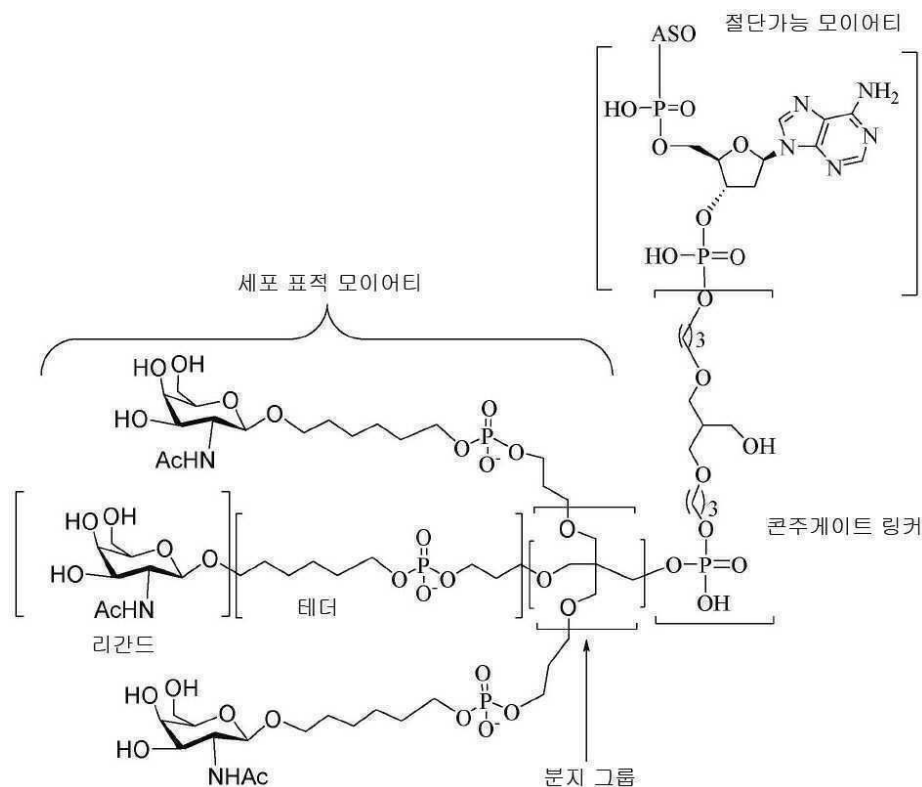
[0572]

[0573] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0574]

[0575] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0576]

[0577] 상기 언급된 콘주게이트, 접합된 안티센스 화합물, 테더, 링커, 분지화 그룹, 리간드, 절단가능 모이어티 뿐만 아니라 다른 변형 중 어떤 것의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허들, 미국 특허 출원 공보, 및 국제 특허 출원 공보는 비제한적으로, 하기를 포함한다: US 5,994,517, US 6,300,319, US 6,660,720, US 6,906,182, US 7,262,177, US 7,491,805, US 8,106,022, US 7,723,509, US 2006/0148740, US 2011/0123520, WO 2013/033230 및 WO 2012/037254, 이들 각각은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있다.

[0578] 상기 언급된 콘주게이트, 접합된 안티센스 화합물, 테더, 링커, 분지화 그룹, 리간드, 절단가능 모이어티 뿐만 아니라 다른 변형의 어떤 것의 제조를 교시하는 대표적인 공보는 비제한적으로, 하기를 포함한다: BIESSEN 등, "The Cholesterol Derivative of a Triantennary Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor: Potent Cholesterol Lowering Agent" J. Med. Chem. (1995) 38:1846-1852, BIESSEN 등, "Synthesis of Cluster Galactosides with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1995) 38:1538-1546, LEE 등, "New and more efficient multivalent glyco-ligands for asialoglycoprotein receptor of mammalian hepatocytes" Bioorganic & Medicinal Chemistry

(2011) 19:2494-2500, RENSEN 등, "Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo" *J. Biol. Chem.* (2001) 276(40):37577-37584, RENSEN 등, "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor " *J. Med. Chem.* (2004) 47:5798-5808, SLIEDREGT 등, "Design and Synthesis of Novel Amphiphilic Dendritic Galactosides for Selective Targeting of Liposomes to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" *J. Med. Chem.* (1999) 42:609-618, 및 Valentijn 등, "Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the Asialoglycoprotein Receptor" *Tetrahedron*, 1997, 53(2), 759-770, 이들 각각은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있다.

[0579]

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

[0580]

C. 어떤 용도 및 특징

[0581]

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

한 대사성, 심혈관 및 다른 질환, 장애 또는 병태의 임의의 것을 본 발명의 접합된 안티센스 화합물로 개선하는 방법이 또한 본원에서 제공된다.

[0582] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 특정한 조직 농도에서 비접합된 대응물보다 더 강하다. 임의의 이론 또는 기전에 구속되지를 바라지 않으면서, 어떤 구현예에서, 콘주게이트는, 접합된 안티센스 화합물이 세포에 더 효율적으로 들어가거나 세포에 더 생산적으로 들어가도록 할 수 있다. 예를 들면, 어떤 구현예에서 접합된 안티센스 화합물은 그것의 비접합된 대응물과 비교하여 더 큰 표적 축소를 나타낼 수 있고, 여기서 접합된 안티센스 화합물 및 그것의 비접합된 대응물 둘 모두는 동일한 농도로 조직에서 존재한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서 접합된 안티센스 화합물은 그것의 비접합된 대응물과 비교하여 더 큰 표적 축소를 나타낼 수 있고, 여기서 접합된 안티센스 화합물 및 그것의 비접합된 대응물 둘 모두는 동일한 농도로 간에서 존재한다.

[0583] 올리고뉴클레오타이드의 생산적인 및 비-생산적인 흡수는 이전에 논의되었다 (참조 예를 들면 Geary, R. S., E. Wancewicz, 등 (2009). "Effect of Dose and Plasma Concentration on Liver Uptake and Pharmacologic Activity of a 2'-Methoxyethyl Modified Chimeric Antisense Oligonucleotide Targeting PTEN." *Biochem. Pharmacol.* 78(3): 284-91; & Koller, E., T. M. Vincent, 등 (2011). "Mechanisms of single-stranded phosphorothioate modified antisense oligonucleotide accumulation in hepatocytes." *Nucleic Acids Res.* 39(11): 4795-807). 본원에서 기재된 콘주게이트 그룹은 생산적인 흡수를 향상시킬 수 있다.

[0584] 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 콘주게이트 그룹은 특정한 유형의 세포 또는 조직에 대해 접합된 안티센스 화합물의 친화성을 증가시켜서 효능을 추가로 향상시킬 수 있다. 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 콘주게이트 그룹은 1 이상의 세포-표면 수용체에 의해 접합된 안티센스 화합물의 인식을 증가시켜서 효능을 추가로 향상시킬 수 있다.. 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 콘주게이트 그룹은 접합된 안티센스 화합물의 세포내이입을 용이하기 하여 효능을 추가로 향상시킬 수 있다.

[0585] 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는, 접합된 안티센스 화합물이 세포에 들어간 후 콘주게이트가 안티센스 올리고뉴클레오타이드로부터 절단되도록 하여 효능을 추가로 향상시킬 수 있다. 따라서, 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 필요한 것보다 더 낮은 용량으로 투여될 수 있다.

[0586] - 포스포로티오에이트 연결은 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 이전에 편입되었다. 그와 같은 포스포로티오에이트 연결은 뉴클레아제에 대해 내성이 있고 따라서 올리고뉴클레오타이드의 안정성을 향상시킨다. 게다가, 포스포로티오에이트 연결은 또한 어떤 단백질에 결합하고, 이 단백질은 간에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 축적하도록 한다. 더 적은 포스포로티오에이트 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 간에서 덜 축적되고 신장에서 더 축적된다 (참고, 예를 들면, Geary, R., "Pharmacokinetic Properties of 2'-O-(2-Methoxyethyl)-Modified Oligonucleotide Analogs in Rats," *-Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics-*, Vol. 296, No. 3, 890-897; & *-Pharmacological Properties of 2'-O-Methoxyethyl Modified Oligonucleotides-* in Antisense a Drug Technology, Chapter 10, Crooke, S.T., ed., 2008) 어떤 구현예에서, 더 적은 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 및 더 많은 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 간에서 덜 축적되고 신장에서 더 축적된다. 간에서의 질환을 표적으로 할 때, 이것은 몇 개의 이유 때문에 바람직하지 않다: (1) 더 적은 약물은 원하는 작용 부위 (간)에 영향을 미치고; (2) 약물은 소변으로 빠져 들어가고 있고; 그리고 (3) 신장은 신장에서 독성이 생길 수 있는 비교적 고농도의 약물에 노출된다. 따라서, 간 질환에 대해, 포스포로티오에이트 연결은 중요한 이점을 제공한다.

[0587] 어떤 구현예에서, 그러나, 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결에 의해 균일하게 연결된 올리고뉴클레오타이드의 투여는 1 이상의 전염증 반응을 포함한다. (참고 예를 들면: *J Lab Clin Med.* 1996 Sep; **128**(3):329-38. "Amplification of antibody production by phosphorothioate oligodeoxynucleotides". Branda 등; and see also for example: *Toxicologic Properties* in Antisense a Drug Technology, Chapter 12, pages 342-351, Crooke, S.T., ed., 2008). 어떤 구현예에서, 대부분의 뉴클레오사이드간 연결이 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 투여는 1 이상의 전염증 반응을 포함한다.

[0588] 어떤 구현예에서, 전염증 효과의 정도는 몇 개의 변수에 의존할 수 있다 (예를 들면 골격 변형, 부정확한 효과, 핵염기 변형, 및/또는 뉴클레오사이드 변형) 참고 예를 들면: *Toxicologic Properties* in Antisense a Drug Technology, Chapter 12, pages 342-351, Crooke, S.T., ed., 2008). 어떤 구현예에서, 전염증 효과의 정도 1 이상의 변수를 조정하여 완화될 수 있다. 예를 들면 주어진 올리고뉴클레오타이드의 전염증 효과의 정도는 임의의 수의 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결로 대체하고 그

렇게 함으로써 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결의 총수를 감소시켜서 완화될 수 있고.

[0589] 어떤 구현예에서, 안정성을 잃지 않으면서 그리고 간으로부터 신장으로의 분포를 이동시키지 않으면서 그렇게 행해질 수 있다면, 포스포로티오에이트 연결의 수를 감소시키는 것이 바람직하다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 포스포로티오에이트 연결의 수는 포스포로티오에이트 연결을 포스포디에스테르 연결로 대체하여 감소될 수 있다. 그와 같은 구현예에서, 더 적은 포스포로티오에이트 연결 및 더 많은 포스포디에스테르 연결을 갖는 안티센스 화합물은 더 적은 전염증 반응을 유도하거나 전염증 반응을 유도하지 않을 수 있다. 더 적은 포스포로티오에이트 연결 및 더 많은 포스포디에스테르 연결을 갖는 안티센스 화합물이 더 적은 전염증 반응을 유도할 수 있을지라도, 더 적은 포스포로티오에이트 연결 및 더 많은 포스포디에스테르 연결을 갖는 안티센스 화합물은 간에서 축적되지 않을 수 있고 더 많은 포스포로티오에이트 연결을 갖는 안티센스 화합물과 비교하여 동일한 또는 유사한 용량에서 덜 유효할 수 있다. 어떤 구현예에서, 따라서 복수의 포스포디에스테르 결합 및 복수의 포스포로티오에이트 결합을 갖지만 또한 간에 대한 안정성 및 우수한 분포를 갖는 안티센스 화합물을 설계하는 것이 바람직하다.

[0590] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은, 포스포로티오에이트 연결의 일부가 더 적은 전염증 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결로 대체될 때라도 비접합된 대응물보다 간에서 더 많이 축적되고 신장에서 덜 축적된다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은, 포스포로티오에이트 연결의 일부가 더 적은 전염증 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결로 대체될 때라도 그것의 비접합된 대응물과 비교하여 간에서 더 많이 축적되고 소변에서 만큼 배출되지는 않는다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트를 사용하면 더 강한 및 더 나은 용인된 안티센스 약물을 설계할 수 있다. 사실상, 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 비접합된 대응물보다 더 큰 치료 지수를 갖는다. 이것으로 접합된 안티센스 화합물이 더 높은 절대적인 용량으로 투여될 수 있는 것은, 전염증 반응의 위험이 더 적고 신장 독성의 위험이 더 적기 때문이다. 이러한 더 높은 용량이 덜 빈번하게 투여하게 되는 것은, 청소능 (대사)가 유사한 것으로 기대되기 때문이다. 게다가, 화합물은 상기에서 기재된 바와 같이 더 강하기 때문에, 농도를 더 낮게 한 후, 치료 활성을 잃지 않으면서 다음 용량 전에 더 낮게 하고, 복용사이에 더욱 더 긴 기간을 허용한다.

[0591] 어떤 구현예에서, 일부 포스포로티오에이트 연결의 포함은 여전히 바람직하다. 예를 들면, 말단 연결은 엑소뉴클레아제에 취약하고 어떤 구현예에서, 그러한 연결은 포스포로티오에이트 또는 다른 변형된 연결이다. 2 개의 데옥시뉴클레오사이드를 연결하는 뉴클레오사이드간 연결은 엔도뉴클레아제에 취약하고 어떤 구현예에서 그러한 연결은 포스포로티오에이트 또는 다른 변형된 연결이다. 데옥시뉴클레오사이드가 연결 데옥시뉴클레오사이드의 5' 측 상에 있는 변형된 뉴클레오사이드와 데옥시뉴클레오사이드 사이의 뉴클레오사이드간 연결은 엔도뉴클레아제에 대해 취약하고 어떤 구현예에서 그러한 연결은 포스포로티오에이트 또는 다른 변형된 연결이다. 어떤 유형의 2 개의 변형된 뉴클레오사이드와, 변형된 뉴클레오사이드가 연결의 5' 측에 있는 어떤 유형의 데옥시뉴클레오사이드 및 변형된 뉴클레오사이드 사이의 뉴클레오사이드간 연결은, 연결이 포스포디에스테르일 수 있는 뉴클레아제 소화에 대해 충분히 내성이 있다.

[0592] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 16 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 15 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 14 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 13 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 12 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 11 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 10 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 9 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 8 개 미만의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다.

[0593] 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 1 이상의 콘주게이트 그룹을 포함하는 안티센스 화합물은 그와 같은 1 이상의 콘주게이트 그룹이 없는 모 안티센스 화합물과 비교하여 증가된 활성 및/또는 효능 및/또는 내성을 갖는다. 따라서, 어떤 구현예에서, 그와 같은 콘주게이트 그룹의 올리고뉴클레오타이드에의 부착은 바람직하다. 그와 같은 콘주게이트 그룹은 올리고뉴클레오타이드의 5'-, 및/또는 3'-말단에서 부착될 수 있다. 어떤 예에서, 5'-말단에서의 부착은 합성적으로 바람직하다. 전형적으로, 올리고뉴클레오타이드는 당해기술에 공지되어 있는 기술을 사용하여 3' 말단 뉴클레오사이드의 고정 지지체에의 부착 및 3'에서 5'로의 뉴클레오사이드의 순차적인 커

플링에 의해 합성된다. 따라서 콘주게이트 그룹이 3'-말단에 있는 것이 바람직하면, (1) 올리고뉴클레오타이드의 차후의 제조를 위해 콘주게이트 그룹을 3'-말단 뉴클레오사이드에 부착하고 상기 접합된 뉴클레오사이드를 고형 지지체에 부착할 수 있거나 (2) 합성 후에 콘주게이트 그룹을 완료된 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단 뉴클레오사이드에 부착할 수 있다. 이들 접근법의 어떤 것도 그렇게 효율적이지 않고 따라서 둘 모두는 비용이 많이 든다. 특히, 본원의 실시예에서 실증된 접합된 뉴클레오사이드의 고형 지지체에의 부착은 비효율적인 과정이다. 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 5'-말단 뉴클레오사이드에의 부착은 3'-말단에서의 부착보다 합성적으로 쉽다. 비-접합된 3' 말단 뉴클레오사이드를 고형 지지체에 부착할 수 있고 표준 및 잘 특성화된 반응을 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 제조할 수 있다. 그 다음 필요하지만 그 결과 최종 커플링 단계에서 콘주게이트 그룹을 갖는 5'뉴클레오사이드를 부착한다. 어떤 구현예에서, 이것은, 3'-접합된 올리고뉴클레오타이드를 제거하기 위해 전형적으로 행해지는 바와 같이, 접합된 뉴클레오사이드를 직접적으로 고형 지지체에 부착시키는 것보다 더 효율적이다. 본원의 실시예는 5'-말단에서의 부착을 실증한다. 또한, 어떤 콘주게이트 그룹은 합성 이점을 갖는다. 예를 들면, 인 연결 그룹을 포함하는 어떤 콘주게이트 그룹은 합성적으로 더 간단하고 이전에 보고된 콘주게이트 그룹을 포함하는 다른 콘주게이트 그룹보다 더 효율적으로 제조된다 (예를 들면, WO/2012/037254).

[0594] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 대상체에게 투여된다. 그와 같은 구현예에서, 본원에서 기재된 1 이상의 콘주게이트 그룹을 포함하는 안티센스 화합물은 그와 같은 1 이상의 콘주게이트 그룹이 없는 모 안티센스 화합물과 비교하여 증가된 활성 및/또는 효능 및/또는 내성을 갖는다. 이전에 구속되지 않으면서, 콘주게이트 그룹은 표적 세포 또는 조직으로의 분포, 전달, 및/또는 흡수를 돕는 것으로 믿는다. 어떤 구현예에서, 표적 세포 또는 조직에 일단 들어오면, 콘주게이트 그룹의 모두 또는 일부가 절단되어 활성 올리고뉴클레오타이드를 방출하는 것이 바람직하다. 어떤 구현예에서, 전체 콘주게이트 그룹이 올리고뉴클레오타이드로부터 절단되는 것이 필요한 것은 아니다. 예를 들면, 실시예 20에서, 접합된 올리고뉴클레오타이드는 마우스 및 수많은 상이한 화학적 종에 투여되었고, 올리고뉴클레오타이드 상에 남아 있는 콘주게이트 그룹의 상이한 부분을 포함하는 각각이 검출되었다 (표 10a). 이러한 접합된 안티센스 화합물은 우수한 효능을 실증했다 (표 10). 따라서, 어떤 구현예에서, 콘주게이트 그룹의 다중 부분 절단의 그와 같은 대사물 프로파일은 활성/효능을 방해하지 않는다. 그럼에도 불구하고, 어떤 구현예에서 전구약물 (접합된 올리고뉴클레오타이드)가 단일 활성 화합물을 산출하는 것이 바람직하다. 어떤 예에서, 다중 형태의 활성 화합물은 발견되면, 각각의 화합물에 대해 상대적인 양 및 활성을 측정하는 것이 필요할 수 있다. 어떤 구현예에서 조절 검토가 필요한 경우 (예를 들면, USFDA 또는 대응물), 단일 (또는 주로 단일) 활성종을 갖는 것이 바람직하다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 그와 같은 단일 활성종이 임의의 부분의 콘주게이트 그룹이 없는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 것이 바람직하다. 어떤 구현예에서, 5'-말단에 있는 콘주게이트 그룹은 콘주게이트 그룹의 완벽한 대사를 생기게 할 수 있을 것 같다. 이전에 구속되지 않으면서, 5' 말단에서 대사에 책임있는 내인성 효소 (예를 들면, 5' 뉴클레아제)는 3' 대응물보다 더 많은 활성/효율적인 것 같다. 어떤 구현예에서, 특이적 콘주게이트 그룹은 단일 활성종에 대한 대사를 더 잘 받아들인다. 어떤 구현예에서, 어떤 콘주게이트 그룹은 올리고뉴클레오타이드에 대한 대사를 더 잘 받아들인다.

[0595] D. 안티센스

[0596] 어떤 구현예에서, 본 발명의 올리고머 화합물은 안티센스 화합물이다. 그와 같은 구현예에서, 올리고머 화합물은 표적 핵산에 대해 상보적이다. 어떤 구현예에서, 표적 핵산은 RNA이다. 어떤 구현예에서, 표적 핵산은 비-코딩 RNA이다. 어떤 구현예에서, 표적 핵산은 단백질을 인코딩한다. 어떤 구현예에서, 표적 핵산은 mRNA, 전-mRNA, microRNA, 작은 비-코딩 RNA를 포함하는 비-코딩 RNA, 및 프로모터-지향된 RNA로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 1 초과의 표적 핵산에 대해 적어도 부분적으로 상보적이다. 예를 들면, 본 발명의 올리고머 화합물은 다중 표적에 전형적으로 결합하는 microRNA 모사체일 수 있다.

[0597] 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 핵산의 핵염기 서열에 대해 적어도 70% 상보적인 핵염기 서열을 갖는 부분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 핵산의 핵염기 서열에 대해 적어도 80% 상보적인 핵염기 서열을 갖는 부분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 핵산의 핵염기 서열에 대해 적어도 90% 상보적인 핵염기 서열을 갖는 부분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 핵산의 핵염기 서열에 대해 적어도 95% 상보적인 핵염기 서열을 갖는 부분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 핵산의 핵염기 서열에 대해 적어도 98% 상보적인 핵염기 서열을 갖는 부분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 핵산의 핵염기 서열에 대해 적어도 100% 상보적인 핵염기 서열을 갖는 부분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 안티센스 화합물의 전장에 걸쳐 표적 핵산의 핵염기 서열에 대해 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 100% 상보적이다.

[0598] 안티센스 기전은 올리고머 화합물과 표적 핵산과의 혼성화를 수반하는 임의의 기전을 포함하고, 상기 혼성화로 생물학적 효과가 생긴다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 혼성화로, 예를 들면, 표적 핵산 또는 표적 핵산과 상호작용하는 핵산의 번역, 전사, 또는 폴리아데닐화를 수반하는 세포 기구의 수반되는 억제 또는 자극과 함께 표적 핵산 저하 또는 점유가 생긴다.

[0599] 표적 RNA의 저하를 수반하는 유형의 안티센스 기전은 RNase H 매개된 안티센스이다. RNase H는 RNA:DNA 듀플렉스의 RNA 가닥을 절단하는 세포성 엔도뉴클레아제이다. "DNA-유사"한 단일가닥 안티센스 화합물이 포유동물 세포에서 RNase H 활성을 유도하는 것으로 당해기술에서 공지되어 있다. 따라서 RNase H의 활성화로, RNA 표적이 절단되고, 그렇게 함으로써 유전자 발현의 DNA-유사 올리고뉴클레오타이드-매개된 억제의 효율이 크게 향상된다.

[0600] 안티센스 기전은 또한, RISC 경로를 이용하는 RNAi 기전을 비제한적으로 포함한다. 그와 같은 RNAi 기전은, 비제한적으로 siRNA, ssRNA 및 microRNA 기전을 포함한다. 그와 같은 기전은 microRNA 모사체 및/또는 항-microRNA의 창출을 포함한다.

[0601] 안티센스 기전 또한, microRNA 또는 mRNA 이외의 비-코딩 RNA를 혼성화하거나 모방하는 기전을 비제한적으로 포함한다. 그와 같은 비-코딩 RNA는 1 이상의 핵산의 전사 또는 번역에 영향을 미치는 프로모터-지향된 RNA 및 짧은 및 긴 RNA를 비제한적으로 포함한다.

[0602] 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 RNAi 화합물이다. 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 콘주게이트를 포함하는 올리고머 올리고뉴클레오타이드는 ssRNA 화합물이다. 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 제 2 올리고머 화합물과 쌍을 이루어 siRNA를 형성한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 제 2 올리고머 화합물은 또한 콘주게이트를 포함한다. 어떤 구현예에서, 제 2 올리고머 화합물은 임의의 변형된 또는 비변형된 핵산이다. 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 siRNA 화합물 중 안티센스 가닥이다. 어떤 구현예에서, 본원에서 기재된 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 siRNA 화합물 중 센스 가닥이다. 접합된 올리고머 화합물이 이중-가닥 siRNA인 구현예에서, 콘주게이트는 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 센스 가닥과 안티센스 가닥 둘 모두 상에 있을 수 있다.

[0603] D. 표적 핵산, 영역 및 분절

[0604] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 임의의 핵산을 표적으로 한다. 어떤 구현예에서, 표적 핵산은 임상적으로 관련된 표적 단백질을 인코딩한다. 그와 같은 구현예에서, 표적 핵산의 조절로 임상 이득이 생긴다. 어떤 표적 핵산은, 비제한적으로, 표 1에서 실증된 표적 핵산을 포함한다.

[0605] 표 1: 어떤 표적 핵산

표적	종	GENBANK® 수납 번호	서열번호
HBV	인간	U95551.1	1
트랜스티레틴 (TTR)	인간	NM_000371.3	2

[0606]

[0607] 표적화 과정은 보통, 원하는 효과가 생기도록 하기 위해 안티센스 상호작용에 대한 표적 핵산 내의 적어도 하나의 표적 영역, 분절, 또는 부위의 결정을 포함한다.

[0608] 어떤 구현예에서, 표적 영역은 핵산의 구조적으로 규정된 영역이다. 예를 들면, 어떤 그와 같은 구현예에서, 표적 영역은 3' UTR, 5' UTR, 엑손, 인트론, 코딩 영역, 번역 개시 영역, 번역 종료 영역, 또는 다른 규정된 핵산 영역 또는 표적 분절을 포함할 수 있다.

[0609] 어떤 구현예에서, 표적 분절은, 접합된 안티센스 화합물이 표적화된 표적 영역의 8-핵염기부에 적어도 관한 것이다. 표적 분절은 표적 분절 중 하나의 5'-말단으로부터 적어도 8 개의 연속되는 핵염기를 포함하는 DNA 또는 RNA 서열을 포함할 수 있다 (잔여 핵염기는 표적 분절의 5'-말단의 업스트림을 즉시 시작하고 DNA 또는 RNA가 약 8 내지 약 30 개의 핵염기를 포함할 때까지 계속되는 동일한 DNA 또는 RNA의 연속되는 스트레치이다). 표적 분절은 또한 표적 분절 중 하나의 3'-말단으로부터 적어도 8 개의 연속되는 핵염기를 포함하는 DNA 또는 RNA 서열로 나타낸다 (잔여 핵염기는 표적 분절의 3'-말단의 업스트림을 즉시 시작하고 DNA 또는 RNA가 약 8 내지 약 30 개의 핵염기를 포함할 때까지 계속되는 동일한 DNA 또는 RNA의 연속되는 스트레치이다). 표적 분절은 표적 분절의 서열의 내부 부분으로부터 적어도 8 개의 연속되는 핵염기를 포함하는 DNA 또는 RNA 서열로 또한 나타낼

수 있고, 접합된 안티센스 화합물이 약 8 내지 약 30 개의 핵염기를 포함할 때까지 하나 또는 둘 모두 방향으로 연장될 수 있다.

[0610] 어떤 구현예에서, 표 1에서 열거된 핵산에 대해 표적화된 안티센스 화합물은 본원에서 기재된 바와 같이 변형될 수 있다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 본원에서 기재된 바와 같이 변형된 당 모이어티, 비변형된 당 모이어티 또는 변형된 및 비변형된 당 모이어티의 혼합물을 가질 수 있다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 본원에서 기재된 바와 같이 변형된 뉴클레오사이드간 연결, 비변형된 뉴클레오사이드간 연결 또는 변형된 및 비변형된 뉴클레오사이드간 연결의 혼합물을 가질 수 있다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 본원에서 기재된 바와 같이 변형된 핵염기, 비변형된 핵염기 또는 변형된 및 비변형된 핵염기의 혼합물을 가질 수 있다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 본원에서 기재된 모티프를 가질 수 있다.

[0611] 어떤 구현예에서, 표 1에서 열거된 핵산에 대해 표적화된 안티센스 화합물은 본원에서 기재된 바와 같이 접합될 수 있다.

[0612] 1. B형 감염 (HBV)

[0613] B형 감염은, 성적으로 및 수직으로 감염된 또는 보균자 모체로부터 그것의 새끼로, 오염된 물질 예컨대 혈액 및 혈액 제제, 오염된 바늘에 의해 비경구로 전달된 바이러스 질환이다,. 20 억명 초과가 매년 약 4 백만 급성 사례, 매년 1 백만 사망, 및 350-400 백만 만성 보균자와 함께 전세계적으로 감염된 것으로 세계보건기구에 의해 추정된다 (세계보건기구: Geographic Prevalence of Hepatitis B Prevalence, 2004. <http://www.who.int/vaccines-surveillance/graphics/htmls/hepbprev.htm>).

[0614] 바이러스, HBV는, 인간 및 비-인간 영장류만이 감염되는 이중-가닥 간친화성 바이러스이다. 바이러스 복제는 주로 간에서, 및 보다 적게는, 신장, 췌장, 골수 및 비장에서 일어난다 (B형 간염 바이러스 생물학. Microbiol Mol Biol Rev. 64: 2000; 51-68.). 바이러스 및 면역 마커는 혈액에서 검출가능하고 특징적인 항원-항체 패턴은 경시적으로 진단된다. 제 1 검출가능한 바이러스 마커는 HBsAg, 그 다음 B형 감염 e 항원 (HBeAg) 및 HBV DNA이다. 역가는 인큐베이션 기간 동안에 높을 수 있지만, HBV DNA 및 HBeAg 수준은 병의 개시에서 떨어지기 시작하고 피크 임상적 병의 시점에서 검출불가능할 수 있다 (B형 간염 바이러스 감염 - 자연 이력 및 임상적 결과. N Engl J Med. 350: 2004; 1118-1129). HBeAg는 혈액에서 검출가능한 바이러스 마커이고 활성 바이러스 복제, 및 따라서 높은 바이러스 부하 및 감염성과 관련된다 (B형 감염 e 항원 - B형 감염의 위험한 최종 단계. N Engl J Med. 347: 2002; 208-210). 항-HBsAb 및 항-HBeAb (IgG)의 존재는 이전에 감염된 개체에서 회복 및 면역력을 나타낸다.

[0615] 현재 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) 및 European Association for the Study of the Liver (EASL)에 의한 만성 HBV 감염에 의한 추천된 치료는 인터페론 알파 (IFN α , 폐결화된 인터페론 알파-2a (Peg-IFN2a), 엔테카비르, 및 테노포비르를 포함한다. 뉴클레오사이드 및 핵염기 치료, 엔테카비르 및 테노포비르는, 바이러스 부하를 감소시키는데 성공적이지만, HBeAg 혈청전환 및 HBsAg 손실률은 IFN α 요법을 사용하여 수득된 것들보다 훨씬 더 낮다. 라미부딘 (3TC), 텔비부딘 (LdT), 및 아데포비르를 사용하는 다른 유사한 치료제가 또한 사용되지만, 일반적으로 뉴클레오사이드/핵염기 치료에 대해, 저항성의 출현은 치료적 효능을 제한한다.

[0616] 따라서, 신규 항-바이러스 치료를 발견하고 개발하는 기술이 필요하다. 추가로, HBeAg 및 HBsAg 혈청전환율을 증가시킬 수 있는 신규 항-HBV 치료가 필요하다. 현재의 임상적 연구는 혈청전환과 HBeAg의 축소 (Fried 등 (2008) Hepatology 47:428) 및 HBsAg의 축소 (Moucarri 등 (2009) Hepatology 49:1151) 사이의 상관관계를 발견했다. 항원 수준의 축소가 HBV 감염의 면역학적 조절을 허용할 수 있는 것은, 높은 수준의 항원이 면역학적 내성을 유도하는 것으로 생각되기 때문이다. HBV에 대한 현재의 뉴클레오사이드 치료는 HBV의 혈청 수준을 극적으로 축소할 수 있지만 HBeAg 및 HBsAg 수준에 대한 영향이 거의 없다.

[0617] HBV를 표적으로 하는 안티센스 화합물은 하기에서 이전에 개시되었다: WO2011/047312, WO2012/145674, 및 WO2012/145697, 각각은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있다. 임상적 연구는 환자에서 HBV를 표적으로 하는 안티센스 화합물의 효과를 평가하기 위해 계획된다. 그러나, 환자에게 추가의 및 더 강한 치료 선택권을 제공할 필요가 여전히 있다.

[0618] HBV 핵산에 대해 표적화된 어떤 접합된 안티센스 화합물

[0619] 어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 1로서 본원에 편입된, GENBANK수납 번호 U95551.1의 서열을 갖는 HBV 핵산에 대해 표적화된다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티

센스 화합물은 서열번호: 1에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 상보적이다.

- [0620] 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 3의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 3의 핵염기 서열을 포함한다.
- [0621] 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 4의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 4의 핵염기 서열을 포함한다.
- [0622] 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 5의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 5의 핵염기 서열을 포함한다.
- [0623] 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 6의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 6의 핵염기 서열을 포함한다.
- [0624] 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 7의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 7의 핵염기 서열을 포함한다.
- [0625] 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 8의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 8의 핵염기 서열을 포함한다.
- [0626] 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 9의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 9의 핵염기 서열을 포함한다.
- [0627] 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 10의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 10의 핵염기 서열을 포함한다.
- [0628] 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 11의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 11의 핵염기 서열을 포함한다.

[0629] 표 2: HBV 서열번호: 1에 대해 표적화된 안티센스 화합물

ISIS 번호	표적 개시 부위	서열 (5'-3')	모티프	서열번호
505358	1583	GCAGAGGTGAAGCGAAGTGC	eeeeeddddddddeeee	3
509934	1780	CCAATTTATGCCTACAGCCT	eeeeeddddddddeeee	4
510100	411	GGCATAGCAGCAGGATG	eeddddddddeeee	5
552023	1266	AGGAGTTCCGCAGTATGGAT	eeeeeddddddddeeee	6
552024	1577	GTGAAGCGAAGTGCACACGG	eeeeeddddddddeeee	7
552032	1585	GTGCAGAGGTGAAGCGAAGT	eeeeeddddddddeeee	8
552859	1583	AGGTGAAGCGAAGTGC	ekkddddddddkke	9
552925	1264	TCCGCAGTATGGATCG	ekdddddddkke	10
577119	1780	AATTTATGCCTACAGCCT	kdkdkdddddeeee	11

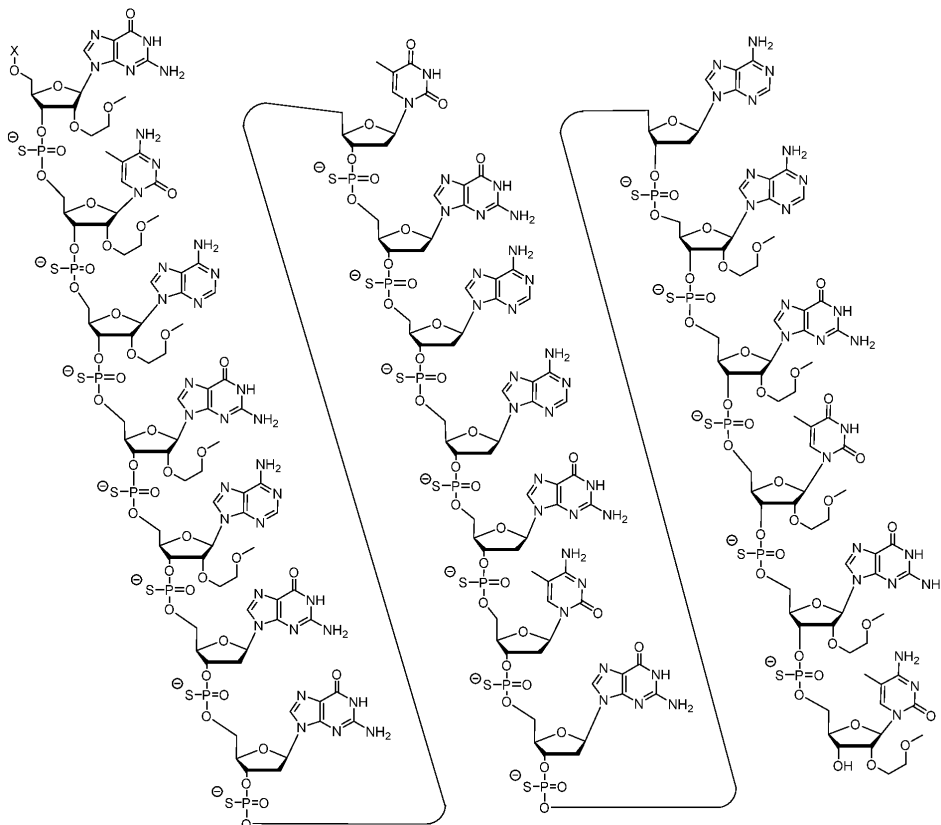
- [0630]
- [0631] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 505358 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 505358는

아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: Ges mCes Aes Ges Aes Gds Gds Tds Gds Ads Ads Gds mCds
Gds Ads Aes Ges Tes Ges mCe, 여기서,

- [0632] A = 아데닌,
- [0633] mC = 5'-메틸시토신
- [0634] G = 구아닌,
- [0635] T = 티민,
- [0636] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오타이드,
- [0637] d = 2'-데옥시뉴클레오타이드, 및
- [0638] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결.
- [0639] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 509934 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 509934는
아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: mCes mCes Aes Aes Tes Tds Tds Ads Tds Gds mCds mCds Tds
Ads mCds Aes Ges mCes mCes Te, 여기서,
- [0640] A = 아데닌,
- [0641] mC = 5'-메틸시토신
- [0642] G = 구아닌,
- [0643] T = 티민,
- [0644] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오타이드,
- [0645] d = 2'-데옥시뉴클레오타이드, 및
- [0646] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결.
- [0647] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 510100 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 510100는
아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: Ges Ges mCes Ads Tds Ads Gds mCds Ads Gds mCds Ads Gds
Ges Aes Tes Ge, 여기서,
- [0648] A = 아데닌,
- [0649] mC = 5'-메틸시토신
- [0650] G = 구아닌,
- [0651] T = 티민,
- [0652] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오타이드,
- [0653] d = 2'-데옥시뉴클레오타이드, 및
- [0654] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결.
- [0655] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 552023 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 552023는
아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: Aes Ges Ges Aes Ges Tes Tds mCds mCds Gds mCds Ads Gds
Tds Ads Tds Ges Ges Aes Te, 여기서,
- [0656] A = 아데닌,
- [0657] mC = 5'-메틸시토신
- [0658] G = 구아닌,
- [0659] T = 티민,
- [0660] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오타이드,
- [0661] d = 2'-데옥시뉴클레오타이드, 및

- [0662] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결.
- [0663] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 552024 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 552024는 아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: Ges Tes Ges Aes Aes Ges mCds Gds Ads Ads Gds Tds Gds mCds Ads mCds Aes mCes Ges Ge, 여기서,
- [0664] A = 아데닌,
- [0665] mC = 5'-메틸시토신
- [0666] G = 구아닌,
- [0667] T = 티민,
- [0668] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오사이드,
- [0669] d = 2'-데옥시뉴클레오사이드, 및
- [0670] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결.
- [0671] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 552032 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 552032는 아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: Ges Tes Ges mCes Aes Ges Ads Gds Gds Tds Gds Ads Ads Gds mCds Gds Aes Aes Ges Te, 여기서,
- [0672] A = 아데닌,
- [0673] mC = 5'-메틸시토신
- [0674] G = 구아닌,
- [0675] T = 티민,
- [0676] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오사이드,
- [0677] d = 2'-데옥시뉴클레오사이드, 및
- [0678] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결.
- [0679] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 552859 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 552859는 아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: Aes Gks Gks Tds Gds Ads Ads Gds mCds Gds Ads Ads Gds Tks Gks mCe, 여기서,
- [0680] A = 아데닌,
- [0681] mC = 5'-메틸시토신
- [0682] G = 구아닌,
- [0683] T = 티민,
- [0684] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오사이드,
- [0685] k = cEt 변형된 뉴클레오사이드,
- [0686] d = 2'-데옥시뉴클레오사이드, 및
- [0687] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결.
- [0688] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 552925 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 552925는 아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: Tes mCks mCds Gds mCds Ads Gds Tds Ads Tds Gds Gds Aks Tes mCks Ge, 여기서,
- [0689] A = 아데닌,
- [0690] mC = 5'-메틸시토신
- [0691] G = 구아닌,

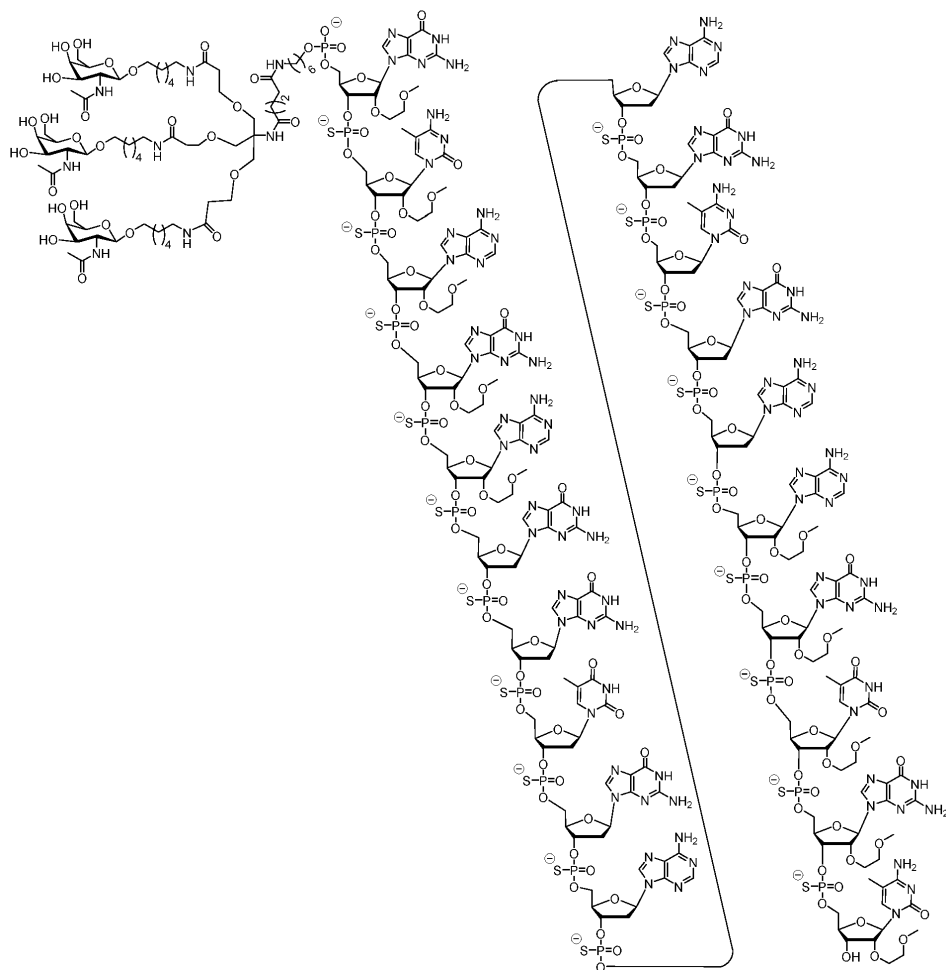
- [0692] T = 티민,
- [0693] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오사이드,
- [0694] k = cEt 변형된 뉴클레오사이드,
- [0695] d = 2'-데옥시뉴클레오사이드, 및
- [0696] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결.
- [0697] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결.
- [0698] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 577119 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 577119는 아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: Aks Ads Tks Tds Tks Ads Tds Gds mCds mCds Tds Ads mCds Aes Ges mCes mCes Te, 여기서,
- [0699] A = 아데닌,
- [0700] mC = 5'-메틸시토신
- [0701] G = 구아닌,
- [0702] T = 티민,
- [0703] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오사이드,
- [0704] k = cEt 변형된 뉴클레오사이드,
- [0705] d = 2'-데옥시뉴클레오사이드, 및
- [0706] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결.
- [0707] 어떤 구현예에서, 아래 화학 구조를 갖는 화합물은 5'-X를 갖는 ISIS 505358을 포함하거나 그것으로 이루어진다, 여기서 X는 본원에 기재된 바와 같은 접합체 그룹이다:



[0708]

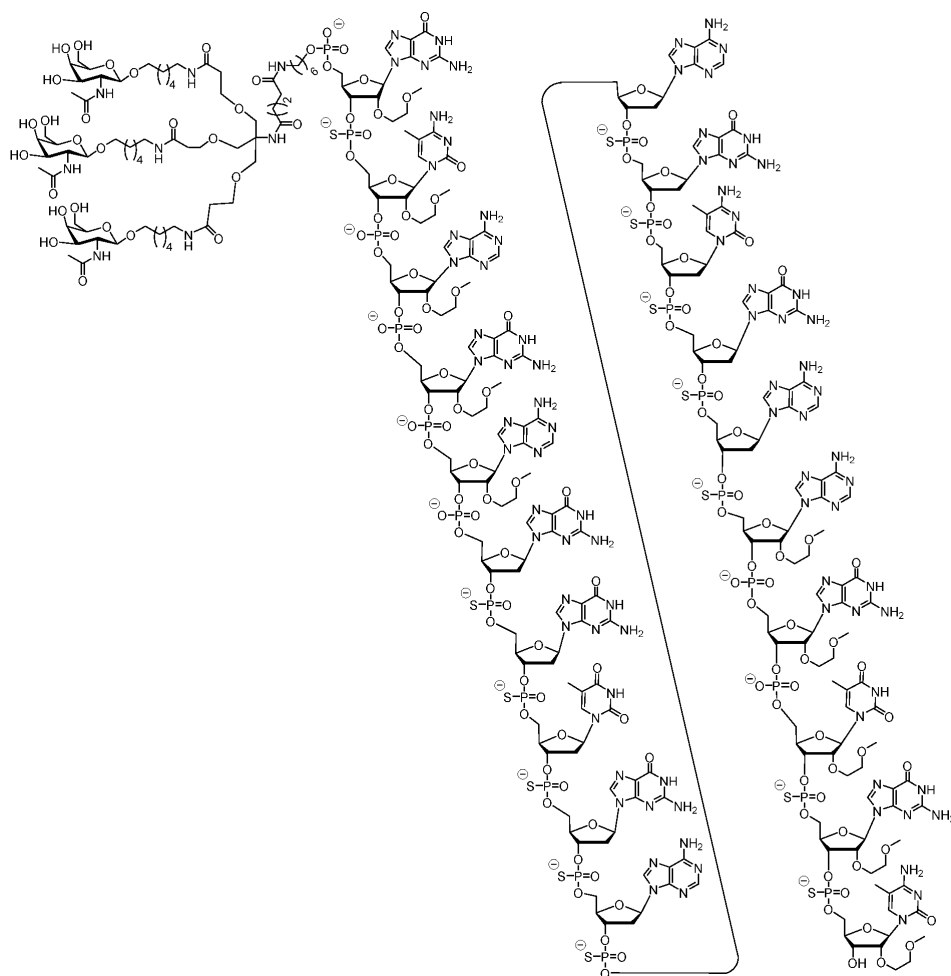
[0709]

어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 화학 구조를 갖는 ISIS 712408을 포함하거나 그것으로 이루어진다:



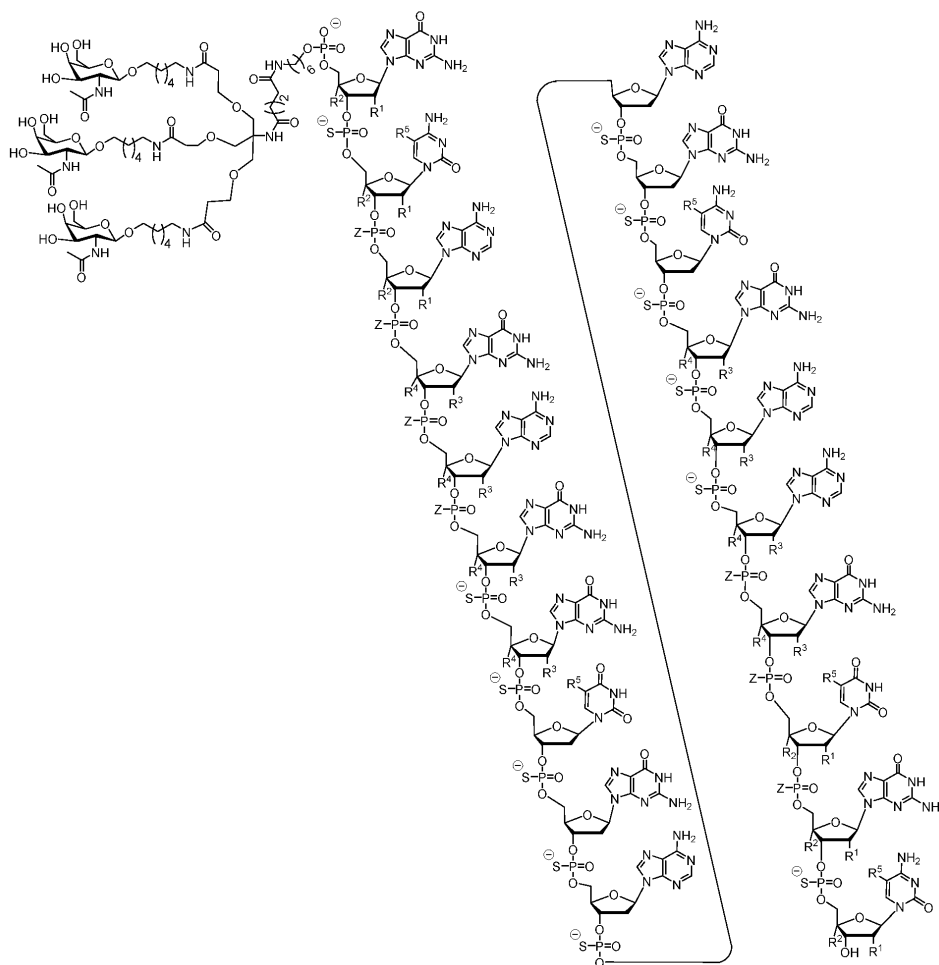
[0710]

[0711] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 화학 구조를 갖는 ISIS 695324을 포함하거나 그것으로 이루어진다:



[0712]

[0713] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 서열번호: 3, 5'-GalNAc, 및 아래 화학 구조로 나타낸 화학적 변형을 포함하거나 그것으로 이루어진다:



[0714]

[0715]

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

[0716]

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

[0717]

그리고 R^5 는 H 및 $-CH_3$ 로부터 선택되고;

[0718]

그리고 Z는 S^- 및 O^- 로부터 선택된다.

[0719]

어떤 구현예에서, 본 화합물은 WO 2012/145697(이것은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있음)에서 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 및 본원에서 기재된 접합체 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 화합물은 WO 2012/145697에서 개시된 서열번호 5-310, 321-802, 804-1272, 1288-1350, 1364-1372, 1375, 1376, 및 1379 중 임의의 것의 핵염기 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 본원에서 기재된 접합체 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 화합물은 WO 2011/ 047312(이것은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있음)에서 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 및 본원에서 기재된 접합체 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 화합물은 WO 2011/ 047312에서 개시된 서열번호 14-22 중 임의의 것의 핵염기 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 본원에서 기재된 접합체 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 화합물은 WO 2012/145674(이것은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있음)에서 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 및 본원에서 기재된 접합체 그룹을

포함한다. 어떤 구현예에서, 본 화합물은 WO 2012/145674에서 개시된 서열번호 18-35 중 임의의 것의 핵염기 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 화합물은 WO 2013/159109(이것은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있음)에서 개시된 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드, 및 본원에서 기재된 접합체 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 화합물은, 하나의 가닥이 WO 2013/159109에서 개시된 서열번호 30-125 중 임의의 것의 핵염기 서열을 갖는 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 모든 상기 언급된 참조된 서열번호의 핵염기 서열은 본원에 참고로 편입되어 있다.

[0720] HBV 치료적 징후

[0721] 어떤 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 HBV의 발현을 조절하기 위해 HBV 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물을 사용하는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, HBV의 발현은 축소된다.

[0722] 어떤 구현예에서, 본 발명은 대상체를 치료하기 위한 약제학적 조성물에서 HBV 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물을 사용하는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 대상체는 HBV-관련된 병태를 갖는다. 어떤 구현예에서, HBV-관련된 병태는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 만성 HBV 감염, 염증, 섬유증, 경변증, 간암, 혈청 간염, 황달, 간암, 간 염증, 간 섬유증, 간경변증, 간부전, 미만성 간세포 염증성 질환, 혈구포식세포 증후군, 혈청 간염, 및 HBV 바이러스혈증. 어떤 구현예에서, HBV-관련된 병태는 하기 중 임의의 것 또는 모두를 포함할 수 있다: 플루-유사 병, 약화, 통증, 두통, 열병, 식욕 상실, 설사, 황달, 메스꺼움 및 구토, 신체의 간 영역의 통증, 클레이- 또는 회색-착색된 대변, 전면적인 가려움, 및 흑색-착색된 소변, B형 간염 바이러스의 존재 동안에 양성 시험과 결합될 때, B형 감염 바이러스 항원, 또는 B형 감염 바이러스 항원에 대해 특이적인 항체의 존재 동안에 양성 시험. 어떤 구현예에서, 대상체는 HBV-관련된 병태의 위험에 처해있다. 이것은, B형 간염 바이러스가 감염된 개체에 대한 성적 노출, 평생 동안 B형 간염 바이러스 감염이 있는 개체와 동일한 집에서 거주, B형 간염 바이러스가 감염된 인간 혈액에 대한 노출, 불법 약물의 주사, 혈우병이 있는 사람, 및 B형 감염이 일반적인 영역의 방문을 포함하는, HBV-관련된 병태를 발달시키는 1 이상의 위험 인자를 갖는 대상체를 포함한다. 어떤 구현예에서, 대상체는 HBV-관련된 병태에 대한 치료가 필요한 것으로 확인되었다.

[0723] 어떤 구현예는 HBV에 감염된 동물에서 HBV DNA 및/또는 HBV 항원 수준을 감소시키는 방법을 제공하고, 이 방법은 상기 동물에게 HBV 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물을 투여하는 것을 포함한다. 어떤 구현예에서, 항원은 HBsAG 또는 HBeAG이다. 어떤 구현예에서, HBV 항원의 양은 혈청전환을 야기하도록 충분히 감소될 수 있다.

[0724] 어떤 구현예에서, 본 발명은 약제의 제조에서 HBV 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물을 사용하는 방법을 제공한다.

[0725] 어떤 구현예에서, 본 발명은 요법에 사용하기 위한, HBV 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물, 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0726] 어떤 구현예는 HBV-관련된 병태의 치료에서 사용하기 위한 HBV 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물을 제공한다. HBV-관련된 병태는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 만성 HBV 감염, 염증, 섬유증, 경변증, 간암, 혈청 간염, 황달, 간암, 간 염증, 간 섬유증, 간경변증, 간부전, 미만성 간세포 염증성 질환, 혈구포식세포 증후군, 혈청 간염, 및 HBV 바이러스혈증.

[0727] 어떤 구현예는 HBV에 감염된 동물에서 HBV DNA 및/또는 HBV 항원 수준의 감소시키는데 사용하기 위한 HBV 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물을 제공하고, 이 방법은 상기 동물에게 HBV 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물을 투여하는 것을 포함한다. 어떤 구현예에서, 항원은 HBsAG 또는 HBeAG이다. 어떤 구현예에서, HBV 항원의 양은 혈청전환을 야기하도록 충분히 감소될 수 있다.

[0728] 본원에서 기재된 임의의 화합물은 상기 언급된 방법 및 용도에서 사용될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, 어떤 구현예에서 상기 언급된 방법 및 용도에서 HBV 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은, 비제한적으로, 하기를 포함할 수 있다: 서열번호: 3-11 중 임의의 것의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함하는 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물; 서열번호: 3-11 중 임의의 것의 핵염기 서열을 포함하는 서열번호: 1에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물; ISIS 505358, ISIS 509934, ISIS 510100, ISIS 552023, ISIS 552024, ISIS 552032, ISIS 552859, ISIS 552925, 또는 ISIS 577119 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 구성된 화합물; WO 2012/145697(이것은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있음)에서 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 및 접합체 그룹을 포함하는 화합물; WO 2012/145697에서 개시된 서열번호 5-310, 321-802, 804-1272, 1288-1350, 1364-1372, 1375, 1376, 및 1379 중 임의의 것의 핵염기 서열을 갖는 안

티센스 올리고뉴클레오타이드 및 본원에서 기재된 접합체 그룹을 포함하는 화합물; WO 2011/ 047312에서 개시된 서열번호 14-22 중 임의의 것의 핵염기 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 본원에서 기재된 접합체 그룹을 포함하는 화합물; WO 2012/145674에서 개시된 서열번호 18-35 중 임의의 것의 핵염기 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물; 또는 하나의 가닥이 WO 2013/159109에서 개시된 서열번호 30-125 중 임의의 것의 핵염기 서열을 갖는 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물.

2. 트랜스티레틴 (TTR)

TTR (하기로도 공지됨: 전알부민, 과티록신혈증, 전알부민이상, 티록신; 노인성 전신 아밀로이드증, 아밀로이드 다발성신경병증, 아밀로이드증 I, PALB; 이상전갑상선소단백혈증성, HST2651; TBPA; 전알부민이상 갑상선기능정상 과티록신혈증)은 티록신 및 레티놀의 수송에 책임있는 혈청/혈장 및 뇌척수액 단백질이다 (Sakaki 등, Mol Biol Med. 1989, 6:161-8). 구조적으로, TTR는 호모테트라머이고; 단백질의 점 돌연변이 및 미스폴딩으로 아밀로이드 원섬유가 침착되고 장애, 예컨대 노인성 전신 아밀로이드증 (SSA), 가족성 아밀로이드 다발성신경병증 (FAP), 및 가족성 아밀로이드 심장병 (FAC)와 연관된다.

TTR은 주로, 간 및 뇌의 맥락막망에 의해, 그리고 더 낮은 정도로, 인간의 망막에 의해 합성된다 (Palha, Clin Chem Lab Med, 2002, 40, 1292-1300). 간에서 합성된 트랜스티레틴은 혈액으로 분비되고, 반면에 맥락막망에서 기원한 트랜스티레틴은 CSF 행이다. 맥락막망에서, 트랜스티레틴 합성은 총 국소 단백질 합성의 약 20% 및 총 CSF 단백질의 25% 정도를 나타낸다 (Dickson 등, J Biol Chem, 1986, 261, 3475-3478).

유전적 및 면역조직화학 진단 시험의 이용가능성과 함께, TTR 아밀로이드증이 환자는 전세계적으로 많은 국가에서 발견되었다. 최근 연구는, TTR 아밀로이드증이 이전에 생각된 희귀한 풍토병은 아니고, 노인 모집단의 25% 정도 걸릴 수 있다는 것을 나타낸다 (Tanskanen 등, Ann Med. 2008;40(3):232-9).

생화학적 수준에서, TTR은 FAP 환자의 아밀로이드 침착에서 주요 단백질 구성성분으로서 확인되었고 (Costa 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1978, 75:4499-4503) 및 나중에, 단백질의 위치 30에서 메티오닌 대신에 발린의 치환은 질환을 야기하는 가장 공통의 분자 결함인 것으로 발견되었다 (Saraiva 등, J. Clin. Invest. 1984, 74: 104-119). FAP에서, TTR 응집물 및 아밀로이드 원섬유의 광범위한 전신 세포의 침착은 결합 조직, 특히 말초 신경계에서 결합 조직을 통해 일어난다 (Sousa 및 Saraiva, Prog. Neurobiol. 2003, 71: 385-400). TTR 침착 다음에, 축삭 변성은 일어나고, 작은 직경의 비수초화된 및 수초화된 섬유에서 개시되고, 결국 신경절 부위에서 신경이 손실된다.

TTR을 표적으로 하는 안티센스 화합물은 US2005/0244869, WO2010/017509, 및 WO2011/139917에서 이전에 개시되었고, 각각은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있다. TTR, ISIS-TTR_{Rx}를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는, 가족성 아밀로이드 다발성신경병증이 있는 대상체를 치료할 때 그것의 유효성을 연구하기 위해 현재 2/3상 임상시험에 있다. 그러나, 환자에게 추가의 및 더 강한 치료 선택권을 제공할 필요가 여전히 있다.

TTR 핵산에 대해 표적화된 어떤 접합된 안티센스 화합물

어떤 구현예에서, 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 2로서 본원에서 편입된, GENBANK® 수납 번호 NM_000371.3의 서열을 갖는 TTR 핵산에 대해 표적화되고, 어떤 그와 같은 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 2에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 상보적이다.

어떤 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 12-19 중 임의의 하나의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 12-19 중 임의의 하나의 핵염기 서열을 포함한다.

어떤 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 12의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 12의 핵염기 서열을 포함한다.

어떤 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 13의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 13의 핵염기 서열을 포함한다.

어떤 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 14의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열

번호: 14의 핵염기 서열을 포함한다.

[0741] 어떤 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 15의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 15의 핵염기 서열을 포함한다.

[0742] 어떤 구현예에서, 서열번호: 16에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 78의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 16에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 78의 핵염기 서열을 포함한다.

[0743] 어떤 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 17의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 17의 핵염기 서열을 포함한다.

[0744] 어떤 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 18의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 18의 핵염기 서열을 포함한다.

[0745] 어떤 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 19의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은 서열번호: 19의 핵염기 서열을 포함한다.

[0746] **표 3: TTR 서열번호: 2에 대해 표적화된 안티센스 화합물**

ISIS 번호	표적 개시 부위	서열 (5'-3')	모티프	서열번호
420915	508	TCTTGTTACATGAAATCCC	eeeeeddddddddeeeee	12
304299	507	CTTGTTACATGAAATCCCA	eeeeeddddddddeeeee	13
420921	515	GGAATACTCTTGTTACATG	eeeeeddddddddeeeee	14
420922	516	TGGAATACTCTTGTTACAT	eeeeeddddddddeeeee	15
420950	580	TTTTATTGTCTCTGCCTGGA	eeeeeddddddddeeeee	16
420955	585	GAATGTTTTATTGTCTCTGC	eeeeeddddddddeeeee	17
420957	587	AGGAATGTTTTATTGTCTCT	eeeeeddddddddeeeee	18
420959	589	ACAGGAATGTTTTATTGTCT	eeeeeddddddddeeeee	19

[0747]

[0748] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 420915 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 420915는 아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: Tes mCes Tes Tes Ges Gds Tds Tds Ads mCds Ads Tds Gds Ads Ads Aes Tes mCes mCes mCe, 여기서

[0749] A = 아데닌,

[0750] mC = 5'-메틸시토신

[0751] G = 구아닌,

[0752] T = 티민,

[0753] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오사이드,

[0754] d = 2'-데옥시뉴클레오사이드, 및

[0755] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결.

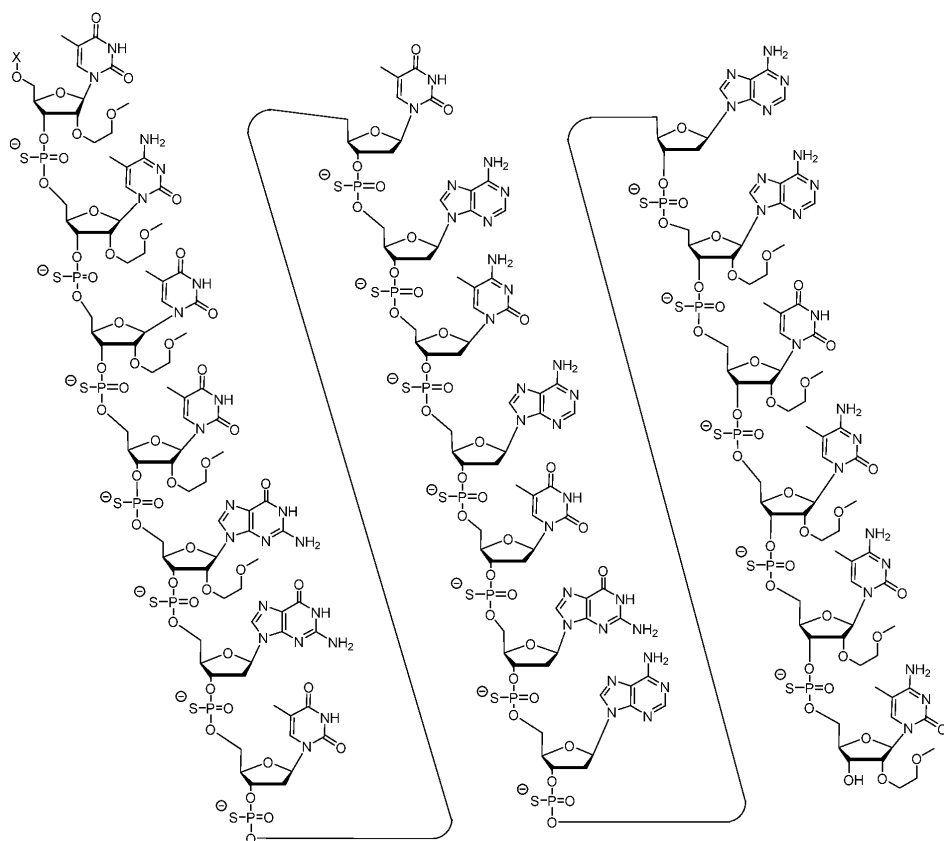
[0756] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 304299 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 304299는 아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: mCes Tes Tes Ges Ges Tds Tds Ads mCds Ads Tds Gds Ads Ads Ads Tes mCes mCes mCes Ae, 여기서

[0757] A = 아데닌,

- [0758] mC = 5'-메틸시토신
- [0759] G = 구아닌,
- [0760] T = 티민,
- [0761] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오사이드,
- [0762] d = 2'-데옥시뉴클레오사이드, 및
- [0763] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결.
- [0764] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 420921 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 420921는 아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: Ges Ges Aes Aes Tes Ads mCds Tds mCds Tds Tds Gds Gds Tds Tds Aes mCes Aes Tes Ge, 여기서
- [0765] A = 아데닌,
- [0766] mC = 5'-메틸시토신
- [0767] G = 구아닌,
- [0768] T = 티민,
- [0769] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오사이드,
- [0770] d = 2'-데옥시뉴클레오사이드, 및
- [0771] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결.
- [0772] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 420922 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 420922는 아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: Tes Ges Ges Aes Aes Tds Ads mCds Tds mCds Tds Tds Gds Gds Tds Tes Aes mCes Aes Te, 여기서
- [0773] A = 아데닌,
- [0774] mC = 5'-메틸시토신
- [0775] G = 구아닌,
- [0776] T = 티민,
- [0777] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오사이드,
- [0778] d = 2'-데옥시뉴클레오사이드, 및
- [0779] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결.
- [0780] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 420950 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 420950는 아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: Tes Tes Tes Tes Aes Tds Tds Gds Tds mCds Tds mCds Tds Gds mCds mCes Tes Ges Ges Ae, 여기서
- [0781] A = 아데닌,
- [0782] mC = 5'-메틸시토신
- [0783] G = 구아닌,
- [0784] T = 티민,
- [0785] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오사이드,
- [0786] d = 2'-데옥시뉴클레오사이드, 및
- [0787] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결.
- [0788] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 420955 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 420955는 아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: Ges Aes Aes Tes Ges Tds Tds Tds Tds Ads Tds Tds Gds Tds

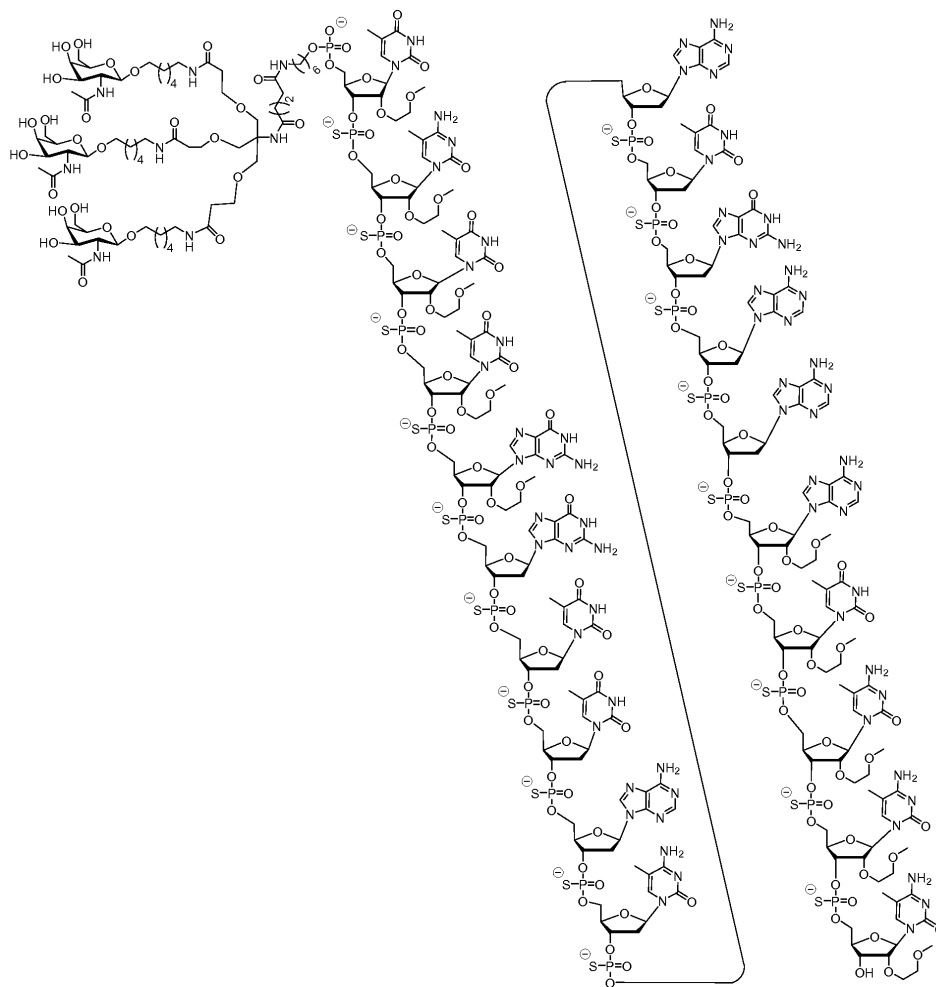
mCds Tes mCes Tes Ges mCe, 여기서

- [0789] A = 아데닌,
- [0790] mC = 5'-메틸시토신
- [0791] G = 구아닌,
- [0792] T = 티민,
- [0793] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오사이드,
- [0794] d = 2'-데옥시뉴클레오사이드, 및
- [0795] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결.
- [0796] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 420957 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 420957는 아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: Aes Ges Ges Aes Aes Tds Gds Tds Tds Tds Tds Ads Tds Tds Gds Tes mCes Tes mCes Te, 여기서
- [0797] A = 아데닌,
- [0798] mC = 5'-메틸시토신
- [0799] G = 구아닌,
- [0800] T = 티민,
- [0801] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오사이드,
- [0802] d = 2'-데옥시뉴클레오사이드, 및
- [0803] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결.
- [0804] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 ISIS 420959 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진다. ISIS 420959는 아래 식을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드이다: Aes mCes Aes Ges Ges Ads Ads Tds Gds Tds Tds Tds Tds Ads Tds Tes Ges Tes mCes Te, 여기서
- [0805] A = 아데닌,
- [0806] mC = 5'-메틸시토신
- [0807] G = 구아닌,
- [0808] T = 티민,
- [0809] e = 2'-O-메톡시에틸 변형된 뉴클레오사이드,
- [0810] d = 2'-데옥시뉴클레오사이드, 및
- [0811] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결.
- [0812] 어떤 구현예에서, 아래 화학 구조를 갖는 화합물은 5'-X를 갖는 ISIS 420915를 포함하거나 그것으로 이루어진다, 여기서 X는 본원에 기재된 바와 같은 접합체 그룹이다:



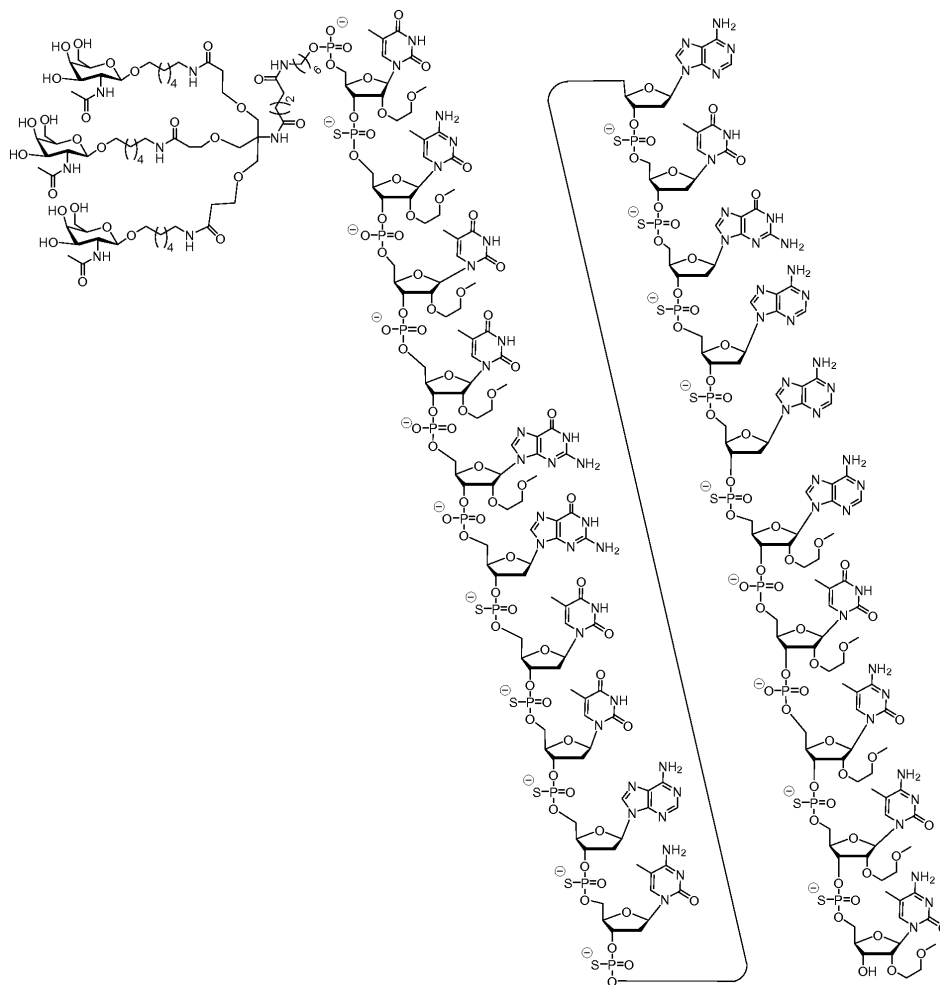
[0813]

[0814] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 화학 구조를 갖는 ISIS 682877을 포함하거나 그것으로 이루어진다:



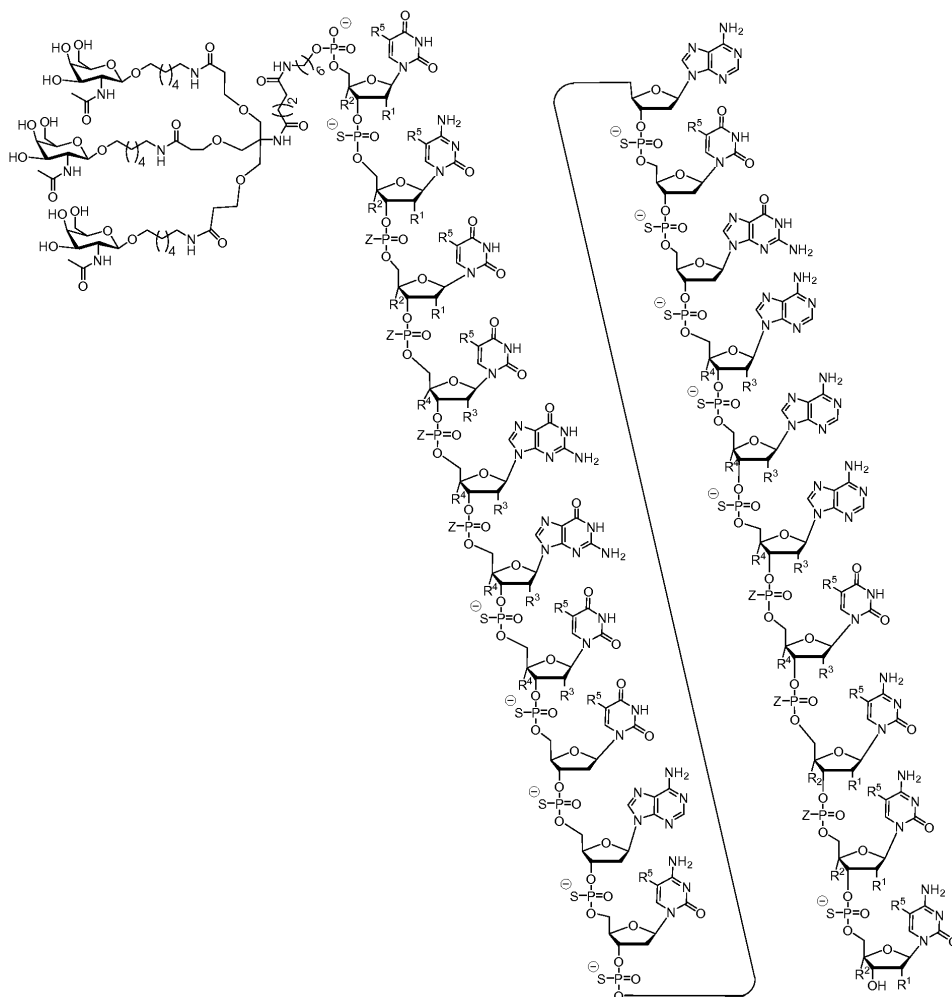
[0815]

[0816] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 아래 화학 구조를 갖는 ISIS 682884을 포함하거나 그것으로 이루어진다:



[0817]

[0818] 어떤 구현예에서, 본 화합물은 서열번호: 12, 5'-GalNAc, 및 아래 화학 구조로 나타낸 화학적 변형을 포함하거나 그것으로 이루어진다:



[0819]

[0820]

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

[0821]

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

[0822]

그리고 R^5 는 H 및 $-CH_3$ 로부터 선택되고;

[0823]

그리고 Z는 S^- 및 O^- 로부터 선택된다.

[0824]

어떤 구현예에서, 본 화합물은 WO 2011/139917 또는 US 8,101,743(이들은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있음)에서 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 및 접합체 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 화합물은 WO 2011/139917에서 개시된 서열번호 8-160, 170-177의 임의의 것의 핵염기 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 본원에서 기재된 콘주게이트 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 화합물은 US 8,101,743에서 개시된 서열번호 12-89의 임의의 것의 핵염기 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 본원에서 기재된 콘주게이트 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 화합물은 US 8,101,743에서 개시된 서열번호 90-133의 임의의 것의 바람직한 표적 분절에 대해 상보적인 핵염기 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 본원에서 기재된 콘주게이트 그룹을 포함한다. 모든 상기 언급된 참조된 서열번호의 핵염기 서열은 본원에 참고로 편입되어

있다.

[0825] TTR 치료적 징후

[0826] 어떤 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 TTR의 발현을 조절하기 위해 TTR 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물을 사용하는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, TTR의 발현은 축소된다.

[0827] 어떤 구현예에서, 본 발명은 대상체를 치료하기 위한 약제학적 조성물에서 TTR 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물을 사용하는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 대상체는 트랜스티레틴 관련된 질환, 장애 또는 병태, 또는 그것의 증상을 갖는다. 어떤 구현예에서, 트랜스티레틴 관련된 질환, 장애 또는 병태는 트랜스티레틴 아밀로이드증이다. "트랜스티레틴-관련된 아밀로이드증" 또는 "트랜스티레틴 아밀로이드증" 또는 "트랜스티레틴 아밀로이드 질환"은, 본원에서 사용된 바와 같이, 트랜스티레틴-함유 아밀로이드 원섬유가 형성되는 트랜스티레틴의 기능장애 또는 조절장애와 연관된 임의의 병리학 또는 질환이다. 트랜스티레틴 아밀로이드증은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 선천성 TTR 아밀로이드증, 연수막성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드 다발성신경병증 (FAP), 가족성 아밀로이드 심근병증, 가족성 눈 연수막성 아밀로이드증, 노인성 심장 아밀로이드증, 또는 노인성 전신 아밀로이드증.

[0828] 어떤 구현예에서, 본 발명은 약제의 제조에서 TTR 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물을 사용하는 방법을 제공한다.

[0829] 어떤 구현예에서, 본 발명은 요법에서 사용하기 위한, TTR 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물, 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0830] 어떤 구현예는 트랜스티레틴 관련된 질환, 그것의 장애 또는 병태, 또는 증상의 치료에서 사용하기 위한, TTR 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 트랜스티레틴 관련된 질환, 장애 또는 병태는 트랜스티레틴 아밀로이드증이다.

[0831] 본원에서 기재된 임의의 화합물은 상기 언급된 방법 및 용도에서 사용될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, 어떤 구현예에서 상기 언급된 방법 및 용도에서 TTR 핵산에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물은, 비제한적으로, 하기를 포함할 수 있다: 서열번호: 12-19 중 임의의 하나의 적어도 8 개의 연속되는 핵염기 서열을 포함하는 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물; 서열번호: 12-19 중 임의의 하나의 핵염기 서열을 포함하는, 서열번호: 2에 대해 표적화된 접합된 안티센스 화합물; ISIS 420915, ISIS 304299, ISIS 420921, ISIS 420922, ISIS 420950, ISIS 420955, ISIS 420957, 또는 ISIS 420959 및 접합체 그룹을 포함하거나 그것으로 이루어진 화합물; WO 2011/139917 또는 US 8,101,743(이들은 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있음)에서 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 및 접합체 그룹을 포함하는 화합물; WO 2011/139917에서 개시된 서열번호 8-160, 170-177 중 임의의 것의 핵염기 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 본원에서 기재된 접합체 그룹을 포함하는 화합물; US 8,101,743에서 개시된 서열번호 12-89 중 임의의 것의 핵염기 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 본원에서 기재된 접합체 그룹을 포함하는 화합물; 또는 US 8,101,743에서 개시된 서열번호 90-133 중 임의의 것의 바람직한 표적 분절에 대해 상보적인 핵염기 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 본원에서 기재된 접합체 그룹을 포함하는 화합물. 모든 상기 언급된 참조된 서열번호의 핵염기 서열은 본원에 참고로 편입되어 있다.

[0832] E. 어떤 약제학적 조성물

[0833] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 1 이상의 안티센스 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 약제학적 조성물은 적당한 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체를 포함한다. 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 멸균한 염수 용액 및 1 이상의 안티센스 화합물을 포함한다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 약제학적 조성물은 멸균한 염수 용액 및 1 이상의 안티센스 화합물 로 구성된다. 어떤 구현예에서, 멸균한 염수는 약품 등급 염수이다. 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 1 이상의 안티센스 화합물 및 멸균수를 포함한다. 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 1 이상의 안티센스 화합물 및 멸균수 로 구성된다. 어떤 구현예에서, 멸균한 염수는 약품 등급 물이다. 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 1 이상의 안티센스 화합물 및 포스페이트-완충된 염수 (PBS)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 1 이상의 안티센스 화합물 및 멸균한 포스페이트-완충된 염수 (PBS) 로 구성된다. 어떤 구현예에서, 멸균한 염수는 약품 등급 PBS이다.

[0834] 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 약제학적 조성물 또는 제형의 제조를 위해 약제학적으로 허용가능한 활성 및/또는 불활성 물질과 혼합될 수 있다. 약제학적 조성물의 제형을 위한 조성물 및 방법은 투여 경로, 질환 정

도, 또는 투여될 용량을 비제한적으로 포함하는 수많은 기준에 의존한다.

- [0835] 안티센스 화합물을 포함하는 약제학적 조성물은 임의의 약제학적으로 허용가능한 염, 에스테르, 또는 그와 같은 에스테르의 염을 포함한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물을 포함하는 약제학적 조성물은, 인간을 포함하는 동물에게 투여시, (직접적으로 또는 간접적으로) 생물학적 활성 대사물 또는 그것의 잔류물을 제공할 수 있는 1 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 따라서, 예를 들면, 본 개시내용은 또한 안티센스 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염, 전구약물, 그와 같은 전구약물의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 다른 생물동등성에 관한 것이다. 적당한 약제학적으로 허용가능한 염은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 나트륨 및 칼륨 염.
- [0836] 전구약물은 활성 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형성하기 위해 신체 내의 내인성 뉴클레아제에 의해 절단된 올리고뉴클레오타이드의 하나 또는 둘 모두의 말단에서 추가의 뉴클레오사이드의 편입을 또한 포함할 수 있다.
- [0837] 지질 모이어티는 다양한 방법으로 핵산 치료에서 사용되었다. 어떤 그와 같은 방법에서, 핵산은 양이온성 지질 및 중성 지질의 혼합물로 만들어진 미리형성된 리포솜 또는 리포플렉스에 도입된다. 어떤 방법에서, 모노- 또는 폴리-양이온성 지질을 갖는 DNA 복합체는 중성 지질의 존재없이 형성된다. 어떤 구현예에서, 지질 모이어티는 특정한 세포 또는 조직에 대한 약제의 분포를 증가시키기 위해 선택된다. 어떤 구현예에서, 지질 모이어티는 지방 조직에 대한 약제의 분포를 증가시키기 위해 선택된다. 어떤 구현예에서, 지질 모이어티는 근육 조직에 대한 약제의 분포를 증가시키기 위해 선택된다.
- [0838] 어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 약제학적 조성물은 1 이상의 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 1 이상의 부형제를 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 부형제는 물, 염 용액, 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 젤라틴, 락토오스, 아밀라아제, 마그네슘 스테아레이트, 탈크, 규산, 점성 파라핀, 하이드록시메틸셀룰로오스 및 폴리비닐피롤리돈로부터 선택된다.
- [0839] 어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 약제학적 조성물은 전달 시스템을 포함한다. 전달 시스템의 예는, 비제한적으로, 리포솜 및 에멀전을 포함한다. 어떤 전달 시스템은 소수성 화합물을 포함하는 것을 포함하는 어떤 약제학적 조성물을 제조하는데 유용하다. 어떤 구현예에서, 어떤 유기 용매 예컨대 디메틸설폭사이드가 사용된다.
- [0840] 어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 약제학적 조성물은 본 개시내용의 1 이상의 약제를 특정 조직 또는 세포형에 전달하기 위해 설계된 1 이상의 조직-특이적 전달 분자를 포함한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 조직-특이적 항체로 코팅된 리포솜을 포함한다.
- [0841] 어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 약제학적 조성물은 보조용매 시스템을 포함한다. 그와 같은 보조용매 시스템의 어떤 것은, 예를 들면, 벤질 알코올, 무극성 계면활성제, 수-혼화성 유기 폴리머, 및 수성상을 포함한다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 보조용매 시스템은 소수성 화합물을 위해 사용된다. 그와 같은 보조용매 시스템의 비-제한적인 예는 VPD 보조용매 시스템이고, 이것은 3% w/v 벤질 알코올, 8% w/v의 무극성 계면활성제 Polysorbate 80TM 및 65% w/v 폴리에틸렌 글리콜 300을 포함하는 무수 에탄올의 용액이다. 그와 같은 보조용매 시스템의 부분은 그것의 용해도 및 독성 특성을 유의미하게 변경시키지 않으면서 상당히 변화될 수 있다. 더욱이, 보조용매 구성성분의 동일성은 변할 수 있고: 예를 들면, 다른 계면활성제는 Polysorbate 80TM 대신에 사용될 수 있고, 폴리에틸렌 글리콜의 분획 크기는 변할 수 있고; 다른 생체적합성 폴리머는 폴리에틸렌 글리콜, 예를 들면, 폴리비닐 피롤리돈을 대신할 수 있다; 및 다른 당류 또는 다당류는 텍스트로오스 대신에 치환될 수 있다.
- [0842] 어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 약제학적 조성물은 경구 투여용으로 제조된다. 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 구강 투여용으로 제조된다.
- [0843] 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 주사 투여용으로 제조된다 (예를 들면, 정맥내, 피하, 근육내, 등). 그와 같은 구현예의 어떤 것에서, 약제학적 조성물은 담체를 포함하고 수용액, 예컨대 물 또는 생리적으로 양립가능한 버퍼 예컨대 한스 용액, 링거액, 또는 생리적 염수 버퍼에서 제형된다. 어떤 구현예에서, 다른 성분이 포함된다 (예를 들면, 용해도에 도움이 되거나 보존제로서 쓰이는 성분). 어떤 구현예에서, 주사가능 서스펜션은 적절한 액체 담체, 현탁화제 등을 사용하여 제조된다. 주사용 어떤 약제학적 조성물은, 예를 들면, 앰플 또는 다중-용량 용기에서단위 투여 형태로 제공된다. 주사용 어떤 약제학적 조성물은 오일성 또는 수성 비히클에서 서스펜션, 용액 또는 에멀전이고, 제형제 예컨대 현탁화제, 안정제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 주사용 약제학적 조성물에서 사용하는데 적당한 어떤 용매는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 친지질성 용매 및 지방 오일, 예컨대 참깨 오일, 합성 지방산 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트 또는 트리글리세라이드, 및 리포솜. 수성

주사 서스펜션은 서스펜션, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로오스, 소르비톨, 또는 텍스트란의 점도를 증가시키는 물질을 함유할 수 있다. 임의로, 그와 같은 서스펜션은 고농축 용액의 제조를 허용하도록 약제의 용해도를 증가시키는 적당한 안정제 및 제제들을 또한 함유할 수 있다.

[0844] 어떤 구현예에서, 약제학적 조성물은 점막통과 투여용으로 제조된다. 그와 같은 구현예의 어떤 것에서 침투될 배리어에 적절한 침투제는 제형에서 사용된다. 그와 같은 침투제는 일반적으로 당해기술에서 공지되어 있다.

[0845] 어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 약제학적 조성물은 올리고뉴클레오타이드를 치료적으로 효과적인 양으로 포함한다. 어떤 구현예에서, 치료적으로 효과적인 양은 질환의 증상을 예방, 완화 또는 개선하거나 치료될 대상체의 생존을 지속하는데 충분하다. 치료적으로 효과적인 양의 결정은 당해분야의 숙련가의 능력 내에 있다.

[0846] 어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 1 이상의 변형된 올리고뉴클레오타이드는 전구약물로서 제형된다. 어떤 구현예에서, 생체내 투여 시, 전구약물은 생물학적으로, 약제학적으로 또는 치료적으로 더 많은 활성 형태의 올리고뉴클레오타이드로 화학적으로 전환된다. 어떤 구현예에서, 전구약물이 유용한 것은, 상응하는 활성 형태보다 투여가 더 쉽기 때문이다. 예를 들면, 어떤 예에서, 전구약물은 상응하는 활성 형태인 것보다(예를 들면, 경구 투여를 통해) 더 생체이용가능할 수 있다. 어떤 예에서, 전구약물은 상응하는 활성 형태와 비교하여 개선된 용해도를 가질 수 있다. 어떤 구현예에서, 전구약물은 상응하는 활성 형태보다 덜 수용성이다. 어떤 예에서, 그와 같은 전구약물은 세포막을 가로지르는 우수한 전달을 가지며, 여기서 수용해도는 이동도에 해롭다. 어떤 구현예에서, 전구약물은 에스테르이다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 에스테르는, 투여 시 카복실산으로 대사작용으로 가수분해된다. 어떤 예에서 카복실산 함유 화합물은 상응하는 활성 형태. 어떤 구현예에서, 전구약물은 산 그룹에 결합된 짧은 펩타이드 (폴리아미노산)을 포함한다. 그와 같은 구현예의 어떤 것에서, 펩타이드는 투여히 절단되어 상응하는 활성 형태를 형성한다.

[0847] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 세포에서 표적 핵산의 양 또는 활성을 축소시키기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 세포는 동물 내의 것이다. 어떤 구현예에서, 동물은 포유동물이다. 어떤 구현예에서, 동물은 설치류이다. 어떤 구현예에서, 동물은 영장류이다. 어떤 구현예에서, 동물은 비-인간 영장류이다. 어떤 구현예에서, 동물은 인간이다

[0848] 어떤 구현예에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 동물에게 투여하는 방법을 제공한다. 적당한 투여 경로, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 경구, 직장, 점막통과, 창자, 장의, 국소, 좌약, 흡입을 통해, 척추강내, 뇌실질내, 복강내, 비강내, 안구내, 종양내, 및 비경구 (예를 들면, 정맥내, 근육내, 수질내, 및 피하). 어떤 구현예에서, 약제학적 척추강내의 전신 노출보다는 오히려 국소를 달성하기 위해 투여된다. 예를 들면, 약제학적 조성물은 원하는 효과 면적에서 (예를 들면, 간으로) 직접적으로 주입될 수 있다.

[0849] 참조에 의한 비제한 개시내용 및 편입

[0850] 본원에서 기재된 어떤 화합물, 조성물 및 방법이 어떤 구현예에 따라 구체적으로 기재되었지만, 하기 실시예는 본원에서 기재된 화합물을 단지 설명하기 위해 쓰이고 그것을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본원에서 인용된 각각의 참조, 유전자은행 수납 번호, 등은 본원에 그 전체가 참고로 편입되어 있다.

[0851] 본원에서 기재된 어떤 화합물, 조성물, 및 방법은 특정한 수의 특정한 요소 또는 특징을 "정확하게 포함하는" 또는 "정확하게 포함한다"는 것으로 기재된다. 그와 같은 설명은, 화합물, 조성물, 또는 방법이 추가의 다른 요소를 포함할 수 있지만, 특정한 요소 또는 특징의 수는 확인된 수라는 것을 나타내기 위해 사용된다. 예를 들면, "정확하게 1 개의 GalNAc을 포함하는 콘주게이트"는, 1 개의 GalNAc에 추가하여 다른 요소를 함유할 수 있지만, 하나 및 단 하나의 GalNAc를 함유하는 콘주게이트이다.

[0852] 이러한 제출을 수반하는 서열목록은 요구되는 바와 같은 "RNA" 또는 "DNA"로서 각각의 서열을 확인하지만, 실제로는, 이들 서열은 화학적 변형의 임의의 조합으로 변형될 수 있다. 당해분야의 숙련가는, 변형된 올리고뉴클레오타이드를 기재하기 위한 "RNA" 또는 "DNA"와 같은 명칭이, 어떤 예에서, 임의적이라는 것을 쉽게 인식할 것이다. 예를 들면, 2'-OH 당 모이어티 및 티민 염기를 포함하는 뉴클레오사이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 변형된 당 (DNA의 천연 2'-H에 대한 2'-OH)을 갖는 DNA로서 또는 변형된 염기 (RNA의 천연 우라실에 대한 티민 (메틸화된 우라실))을 갖는 RNA로서 기재될 수 있다.

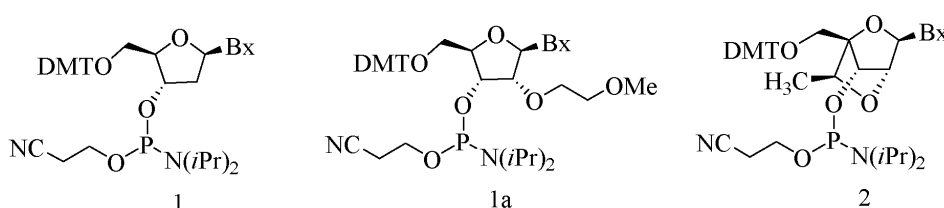
[0853] 따라서, 서열목록에 있는 것들 것 비제한적으로 포함하는 본원에서 제공된 핵산 서열은, 변형된 핵염기를 갖는 그와 같은 핵산을 비제한적으로 포함하는, 천연 또는 변형된 RNA 및/또는 DNA의 임의의 조합을 함유하는 핵산을 포함하는 것으로 의도된다. 추가 실시예에 의해 그리고 비제한적으로, 핵염기 서열 "ATCGATCG"을 갖는 올리고뉴

클레오타이드는, 변형 또는 비변형되든지, 그와 같은 화합물을 비제한적으로 포함하는 그와 같은 핵염기 서열을 갖는 임의의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 화합물은 RNA 염기, 예컨대 서열 "AUCGAUCG"를 갖는 것들 및 일부 DNA 염기 및 일부 RNA 염기 예컨대 "AUCGATCG"를 갖는 것들 및 다른 변형된 염기, 예컨대 "AT^{mc}CGAUCG"를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 ^{mc}C는 5-위치에서 메틸 그룹을 포함하는 시토신 염기를 나타낸다.

[0854] 실시예

[0855] 하기 실시예는 본 개시내용의 어떤 구현예를 설명하고 제한하지는 않는다. 게다가, 특정 구현예가 제공되는 경우, 본 발명자들 특정 구현예의 포괄적인 적용을 고려했다. 예를 들면, 특정한 모티프를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 개시내용은 동일한 또는 유사한 모티프를 갖는 추가의 올리고뉴클레오타이드에 대한 합리적인 지지를 제공한다. 그리고, 예를 들면, 특정한 고-친화성 변형이 특정한 위치에서 나타나는 경우, 동일한 위치에서의 다른 고-친화성 변형은, 달리 지적되지 않으면 적당한 것으로 고려된다.

[0856] 실시예 1: 포스포르아미다이트, 화합물 1, 1a 및 2의 일반적인 제조 방법

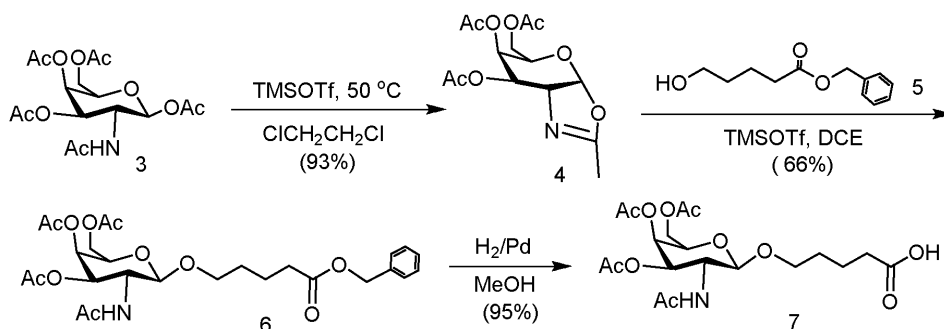


[0857]

[0858] Bx는 헤테로사이클릭 염기이다;

[0859] 화합물 1, 1a 및 2는 본 명세서에서 기재된 바와 같이 잘 알려진 당해기술에서 잘 알려진 절차에 따라 제조되었다: (참고 Seth 등, Bioorg. Med. Chem., 2011, 21(4), 1122-1125, J. Org. Chem., 2010, 75(5), 1569-1581, Nucleic 산 Symposium 시리즈, 2008, 52(1), 553-554); 및 또한 참고 공개된 PCT 국제 출원 (WO 2011/115818, WO 2010/077578, WO2010/036698, WO2009/143369, WO 2009/006478, 및 WO 2007/090071), 및 US 특허 7,569,686).

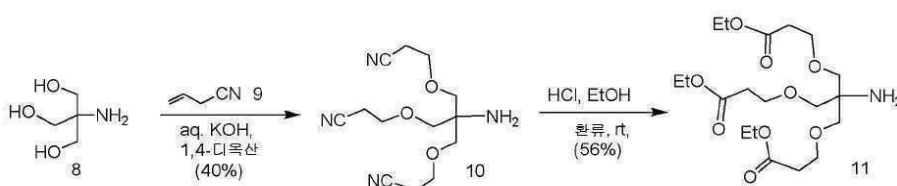
[0860] 실시예 2: 화합물 7의 제조



[0861]

[0862] 화합물 3 (2-아세트아미도-1,3,4,6-테트라-O-아세틸-2-데옥시-β-D갈락토피라노스 또는 갈락토사민 펜타아세테이트)는 시판되고 있다. 화합물 5는 공개된 절차에 따라 제조되었다 (Weber 등, J. Med. Chem., 1991, 34, 2692).

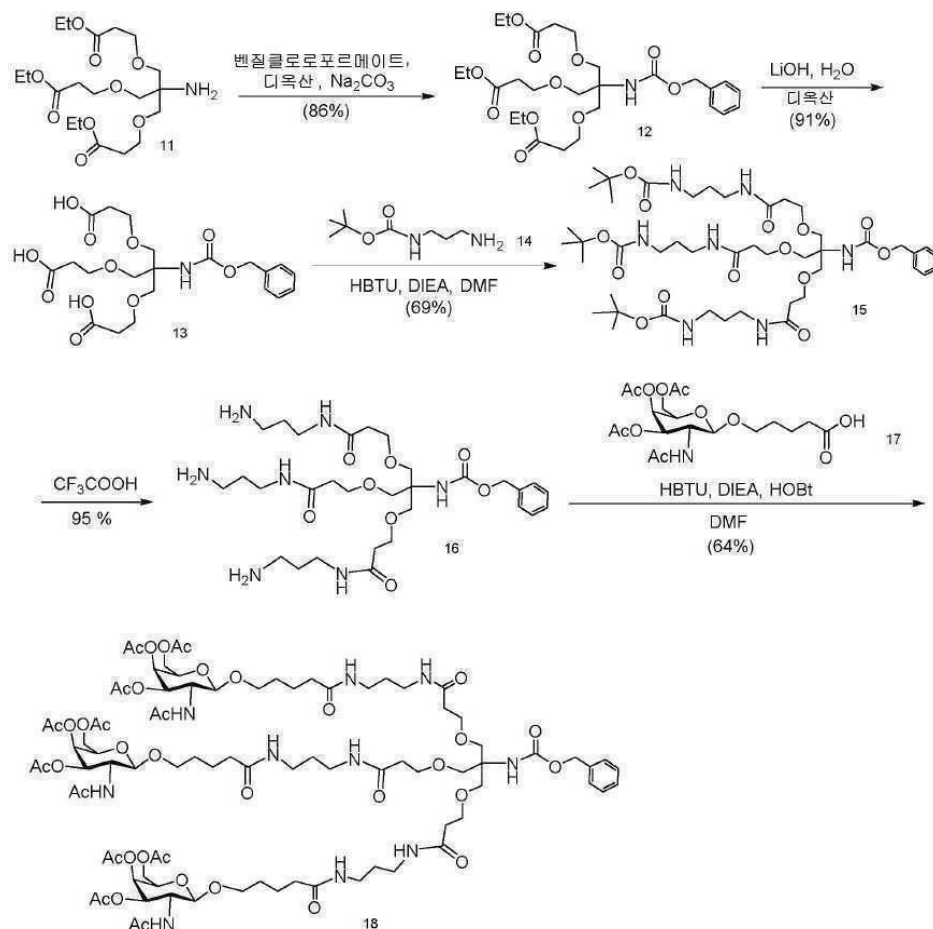
[0863] 실시예 3: 화합물 11의 제조



[0864]

[0865] 화합물 8 및 9는 시판되고 있다.

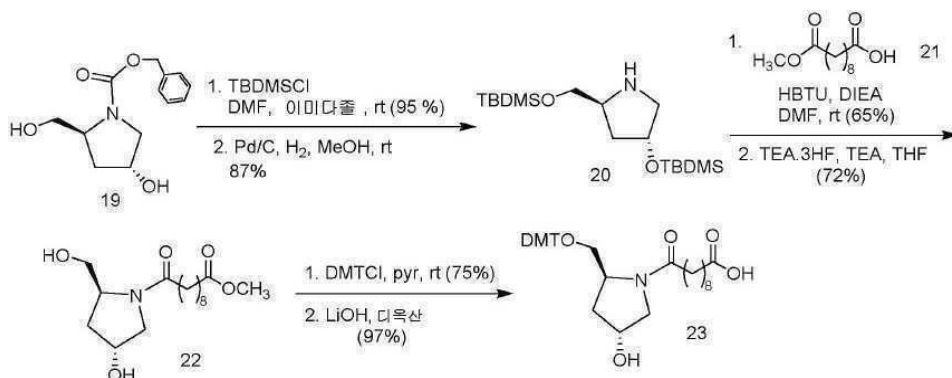
[0866] 실시예 4: 화합물 18의 제조



[0867]

[0868] 화합물 11은 실시예 3에서 실증된 절차에 따라 준비되었다. 화합물 14는 시판되고 있다. 화합물 17은 하기에 의해 보고된 유사한 절차를 사용하여 준비되었다: Rensen 등, *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 5798-5808.

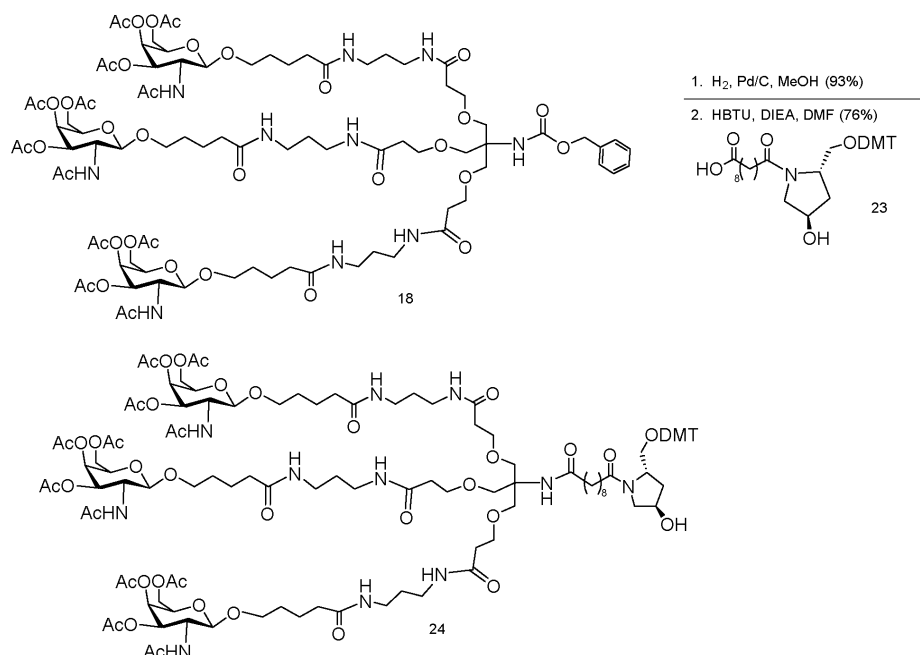
[0869] 실시예 5: 화합물 23의 제조



[0870]

[0871] 화합물 19 및 21는 시판되고 있다.

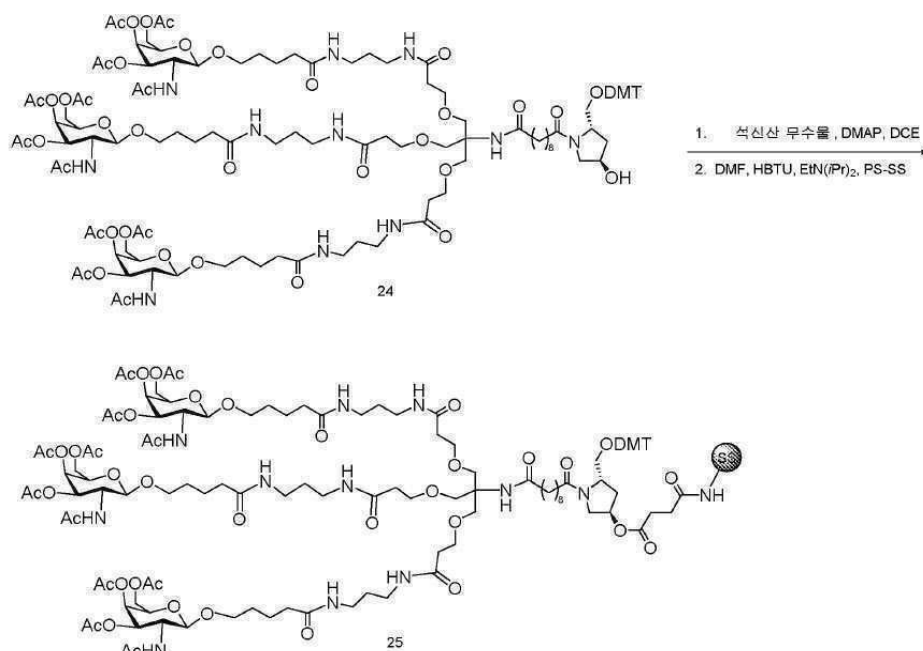
[0872] 실시예 6: 화합물 24의 제조



[0873]

[0874] 화합물 18 및 23는 실시예 4 및 5에서 실증된 절차에 따라 준비되었다.

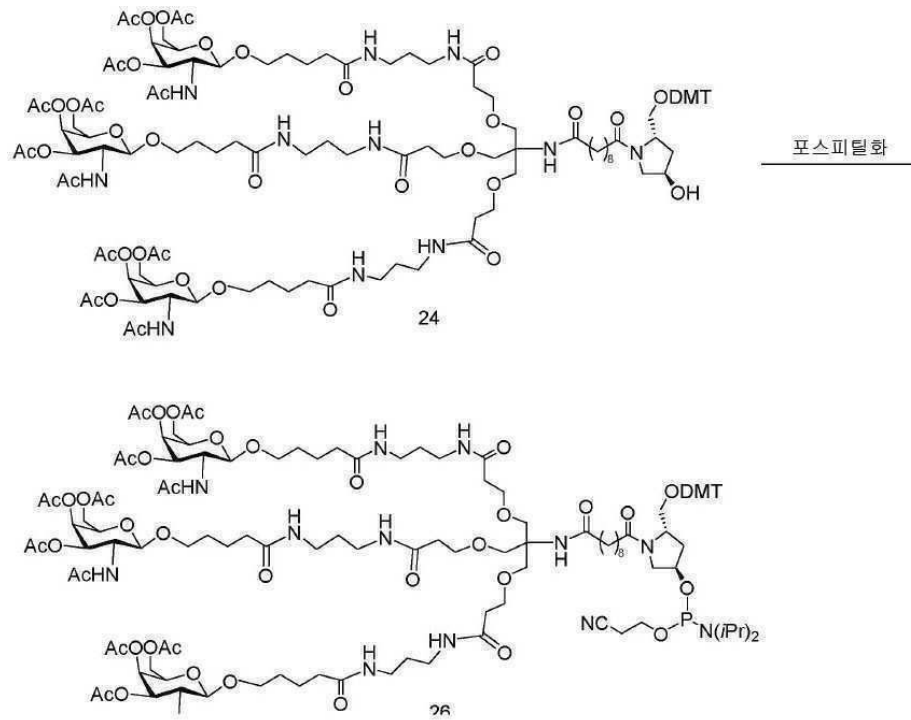
[0875] 실시예 7: 화합물 25의 제조



[0876]

[0877] 화합물 24는 실시예 6에서 실증된 절차에 따라 준비되었다.

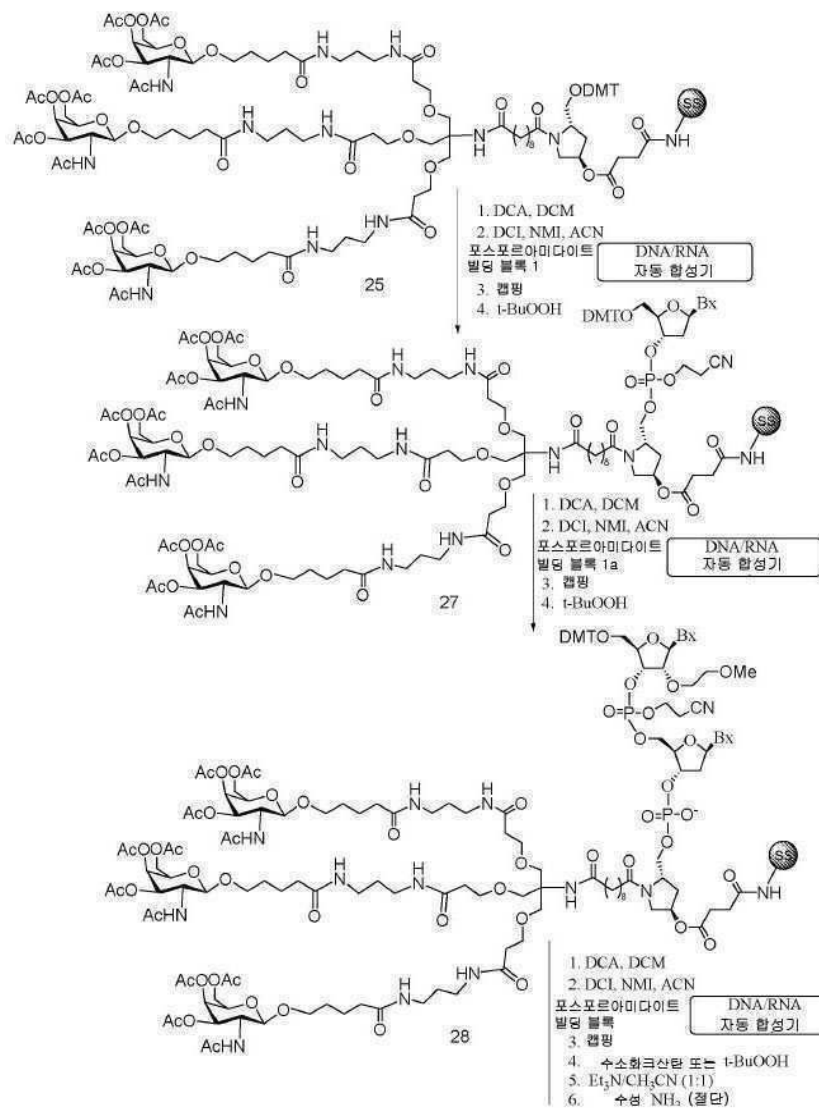
[0878] 실시예 8: 화합물 26



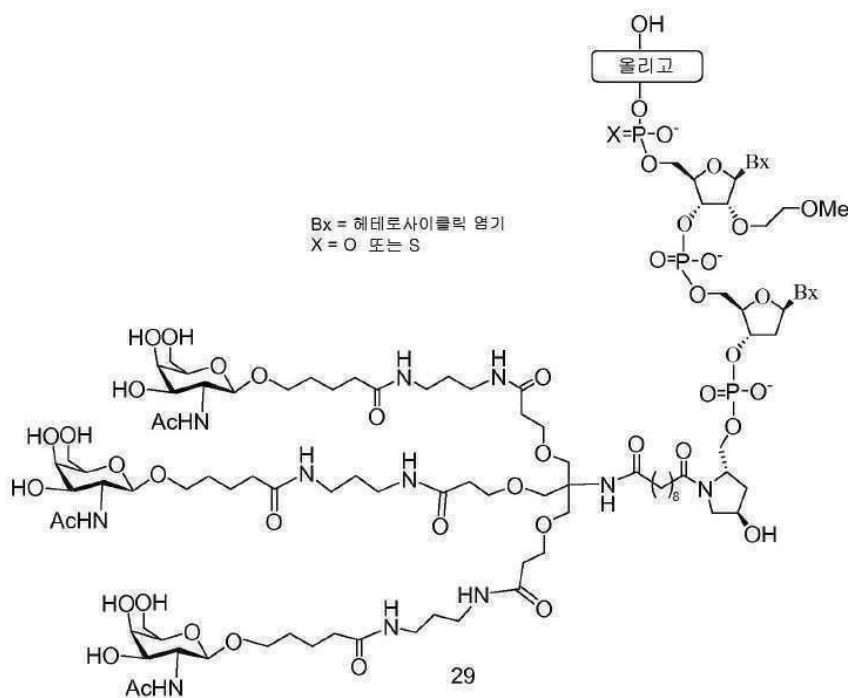
[0879]

[0880] 화합물 24은 실시예 6에서 실증된 절차에 따라 준비된다.

[0881] 실시예 9: GalNAc₃-1를 3' 말단에서 포함하는 집합된 ASO의 일반적인 제조, 화합물 29

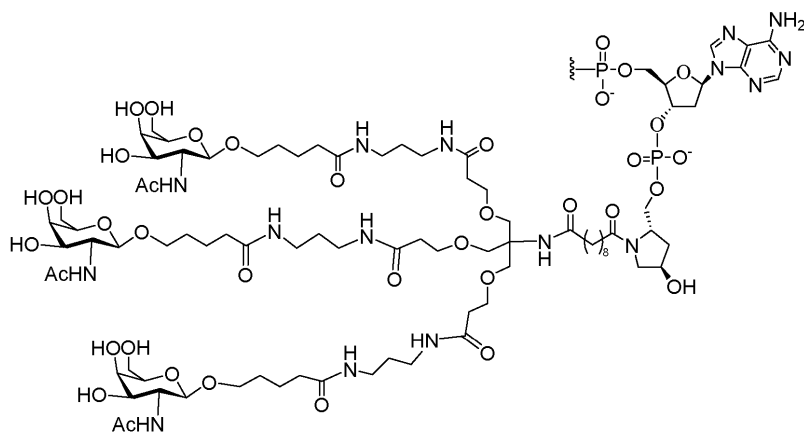


[0882]



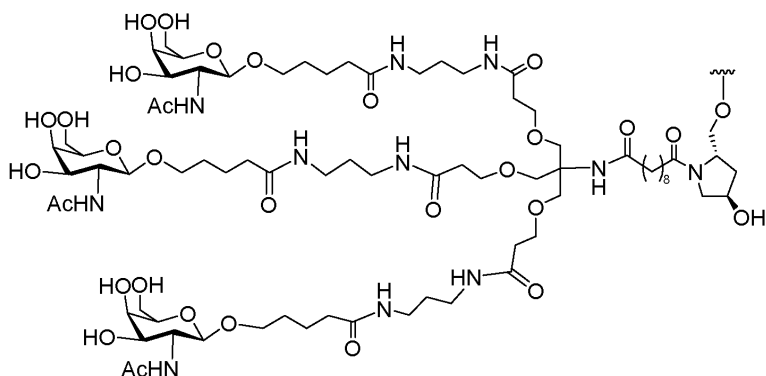
[0883]

[0884] 상기 보호된 **GalNAc₃-1**는 하기 구조를 갖는다:



[0885]

[0886] 콘주게이트 그룹 **GalNAc₃-1** (**GalNAc₃-1_a**)의 **GalNAc₃** 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 여기서 **GalNAc₃-1_a**는 하기 식을 갖는다:

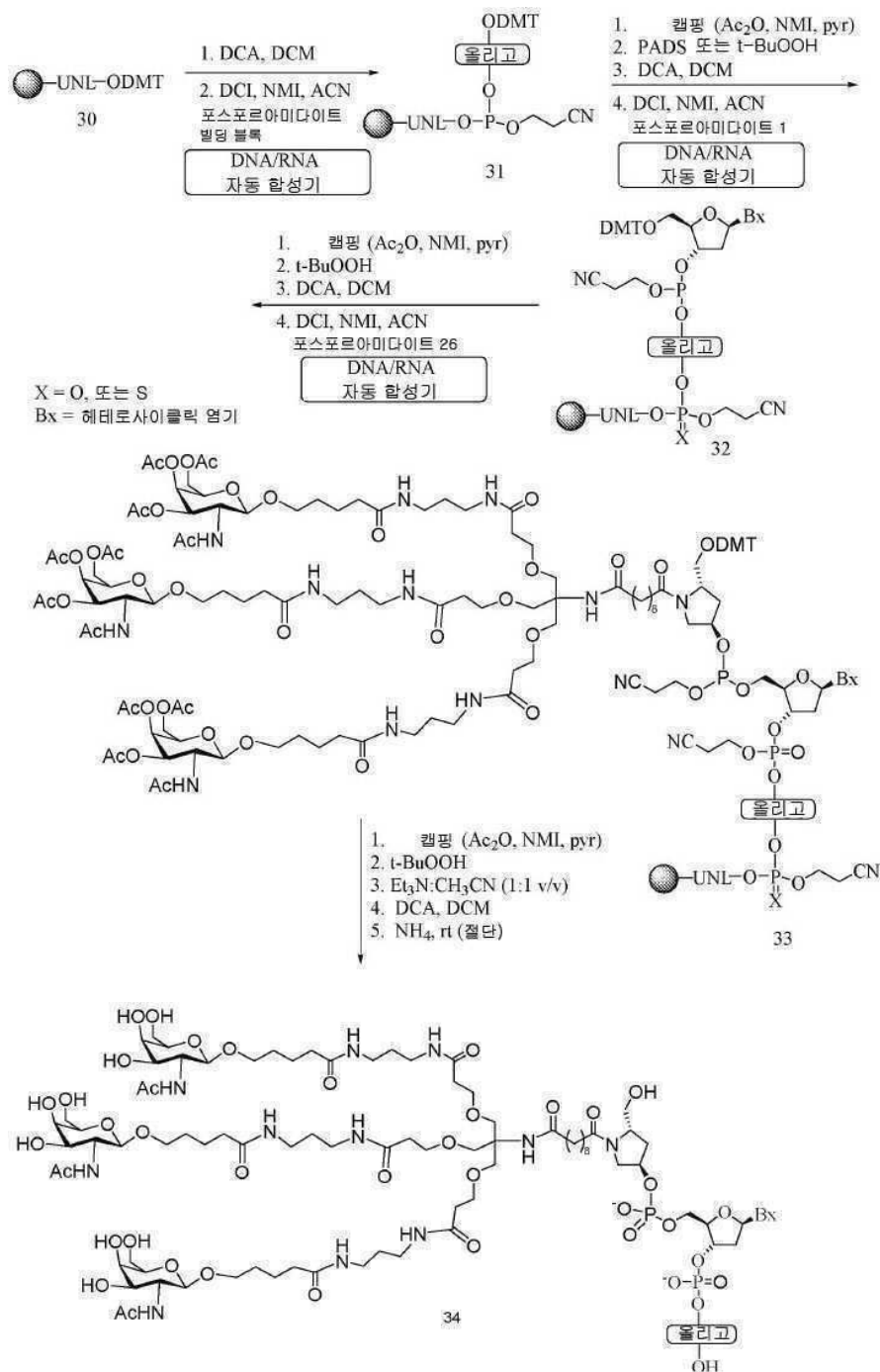


[0887]

[0888] 고휘형 지지체 결합된 보호된 **GalNAc₃-1**, 화합물 25는 실시예 7에서 실증된 절차에 따라 준비되었다. **GalNAc₃-1**를 3' 말단에서 포함하는 올리고머 화합물 29는 자동화된 DNA/RNA 합성에서 표준 절차를 사용하여 제조되었다 (참고 Dupouy 등, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 3623-3627 참고). 포스포르아미다이트 빌딩 블록, 화합물 1 및 1a는 실시예 1에서 실증된 절차에 따라 준비되었다. 실증된 포스포르아미다이트는 대표적이고, 다른 포스포르아미다이트 빌딩 블록이 사용되어 예정된 순서 및 조성을 갖는 올리고 화합물을 제조할 수 있는 것처럼 한정으로서 의도되지 않는다는 것을 의미한다. 고휘형 지지체에 부가된 포스포르아미다이트의 순서 및 양은 조정되어 본원에서 기재된 갭핑된 올리고머 화합물을 제조할 수 있다. 그와 같은 갭핑된 올리고머 화합물은 임의의 주어진 표적에 의해 지시되는 바와 같이 예정된 조성물 및 염기 서열을 가질 수 있다.

[0889]

실시예 10: 5' 말단에서 GalNAc₃-1을 포함하는 접합된 ASO의 일반적인 제조, 화합물 34



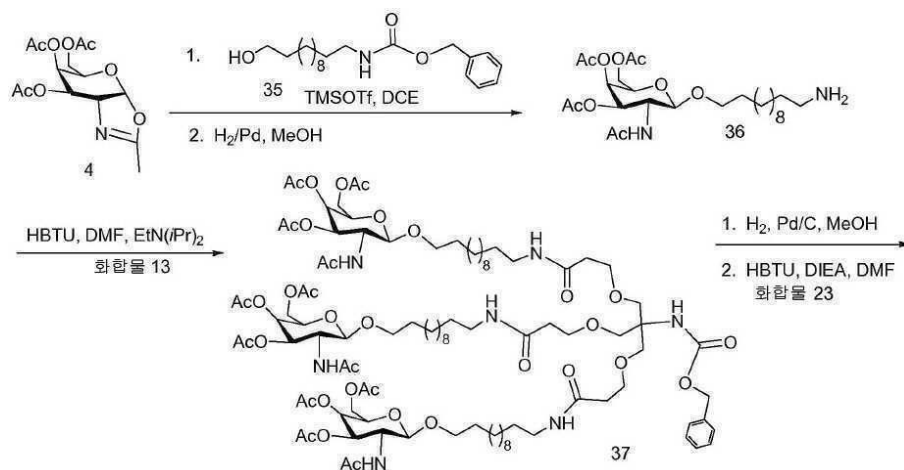
[0890]

[0891]

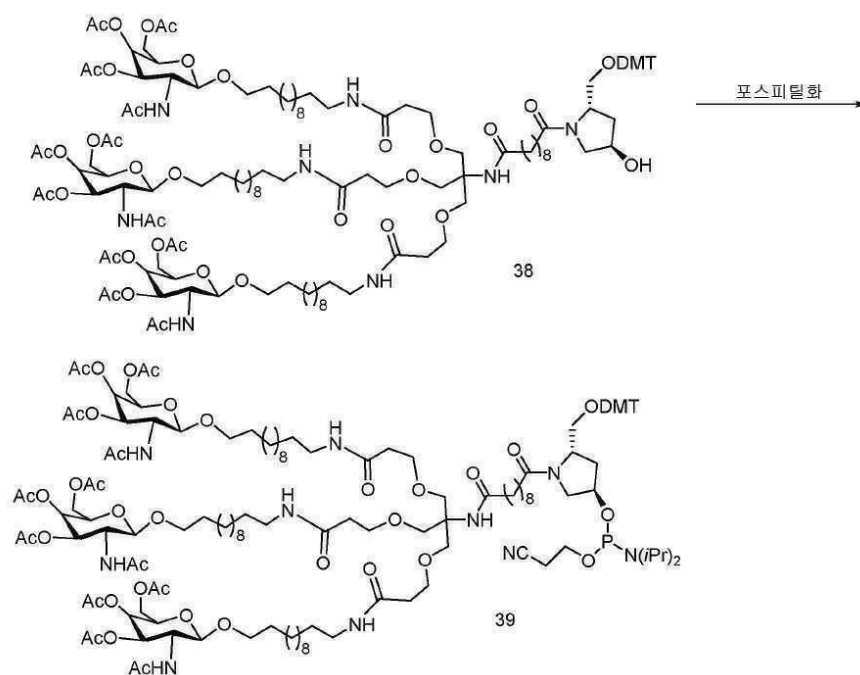
[0892]

임의의 링커TM 30는 시판되고 있다. 5' 말단에서 GalNAc₃-1클러스터를 포함하는 올리고머 화합물 34는 자동화된 DNA/RNA 합성에서 표준 절차를 사용하여 제조된다 (참고 Dupouy 등, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 3623-3627 참고). 포스포르아미다이트 빌딩 블록, 화합물 1 및 1a는 실시예 1에서 실증된 절차에 따라 준비되었다. 실증된 포스포르아미다이트는 대표적이고, 다른 포스포르아미다이트 빌딩 블록이 사용되어 예정된 순서 및 조성을 갖는 올리고 화합물을 제조할 수 있는 것처럼 한정으로서 의도되지 않는다는 것을 의미한다. 고형 지지체에 부가된 포스포르아미다이트의 순서 및 양은 조정되어 본원에서 기재된 캡핑된 올리고머 화합물을 제조할 수 있다. 그와 같은 캡핑된 올리고머 화합물은 임의의 주어진 표적에 의해 지시되는 바와 같이 예정된 조성물 및 염기 서열을 가질 수 있다.

[0893] 실시예 11: 화합물 39의 제조



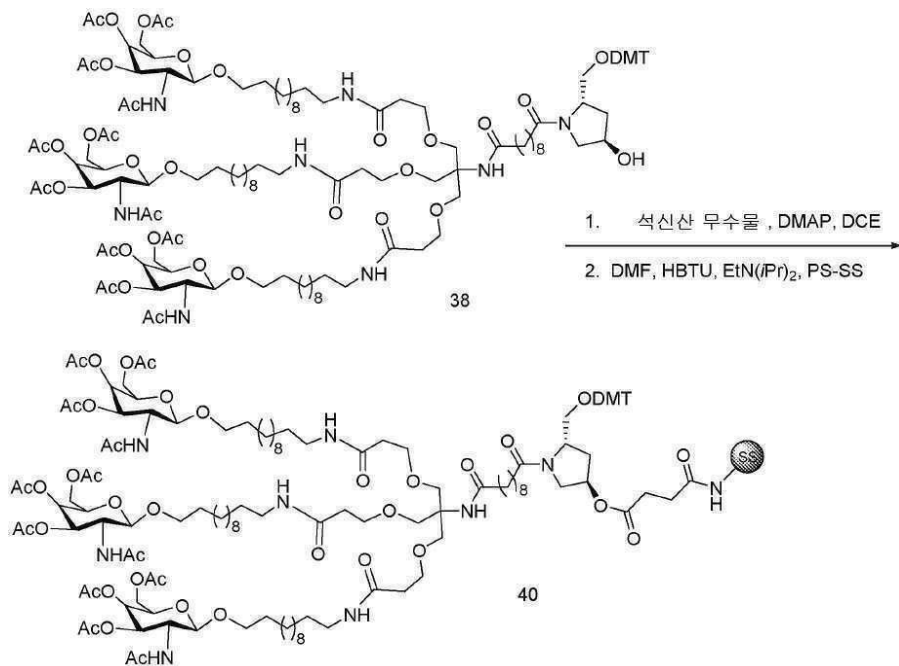
[0894]



[0895]

[0896] 화합물 4, 13 및 23는 실시예 2, 4, 및 5에서 실증된 절차에 따라 준비되었다. 화합물 35는 하기에서 공지된 유사한 절차를 사용하여 준비된다: Rouchaud 등, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, 12, 2346-2353.

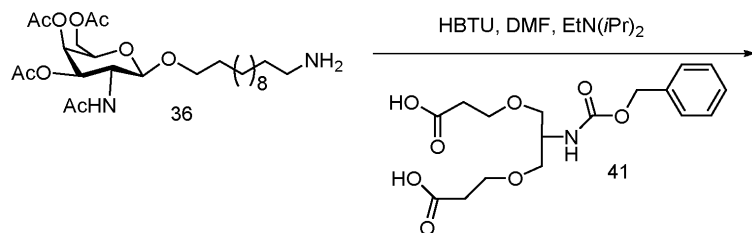
[0897] 실시예 12: 화합물 40의 제조



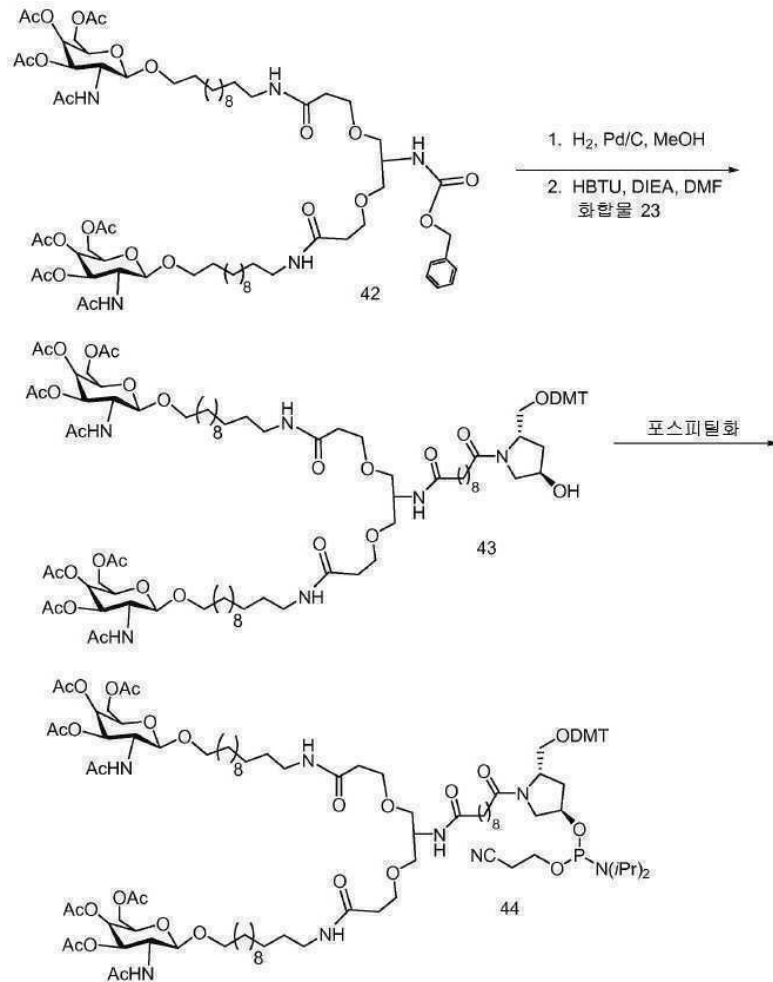
[0898]

[0899] 화합물 38은 실시예 11에서 실증된 절차에 따라 준비된다.

[0900] 실시예 13: 화합물 44의 제조



[0901]



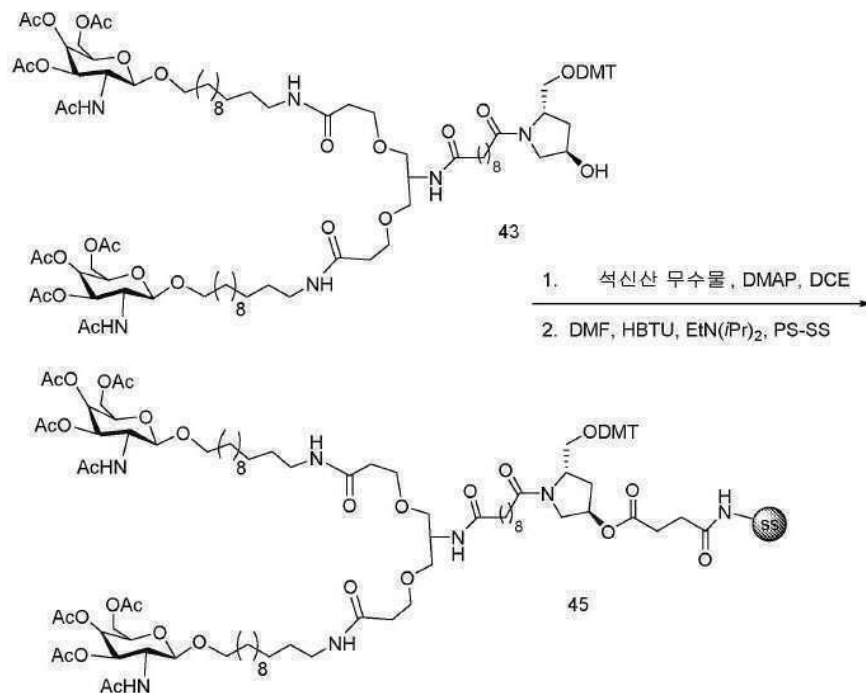
[0902]

[0903]

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

[0904]

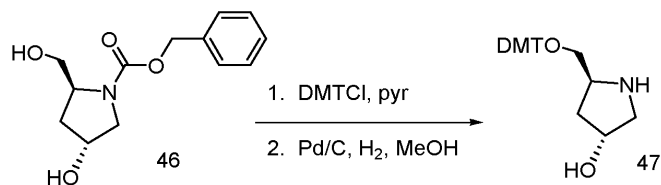
실시예 14: 화합물 45의 제조



[0905]

[0906] 화합물 43은 실시예 13에서 실증된 절차에 따라 준비된다.

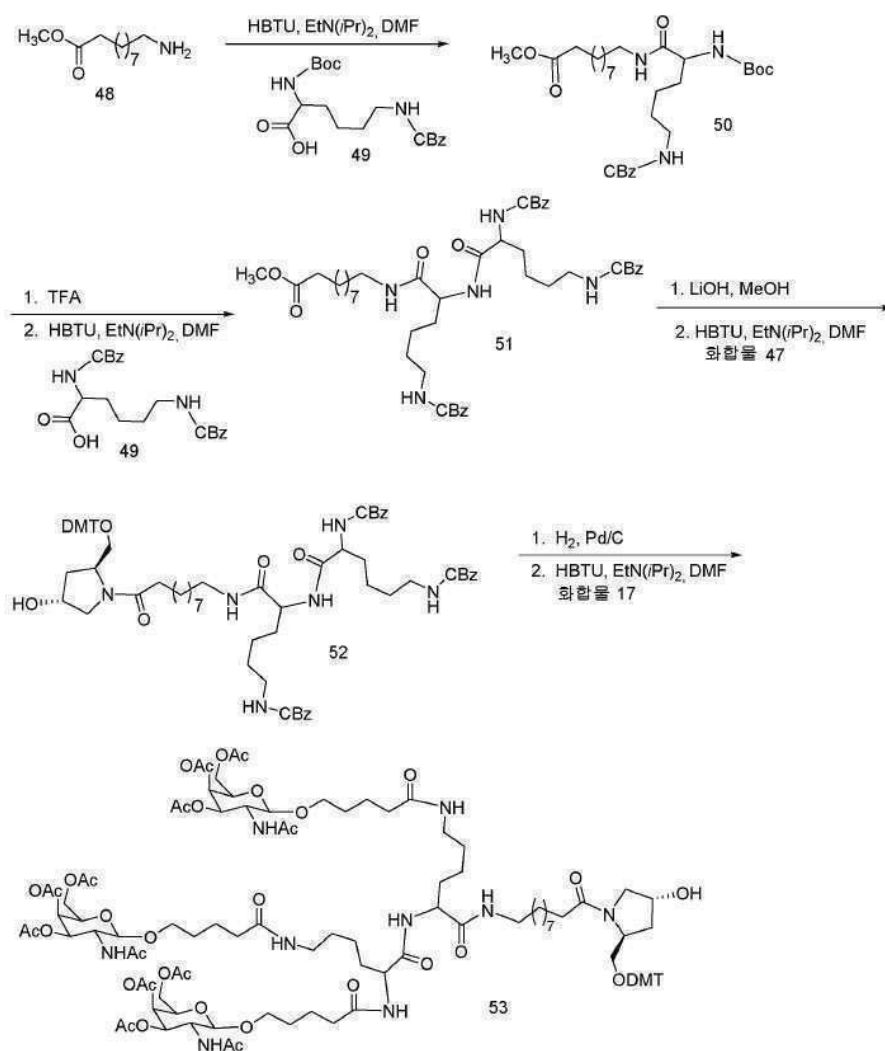
[0907] 실시예 15: 화합물 47의 제조



[0908]

[0909] 화합물 46는 시판되고 있다.

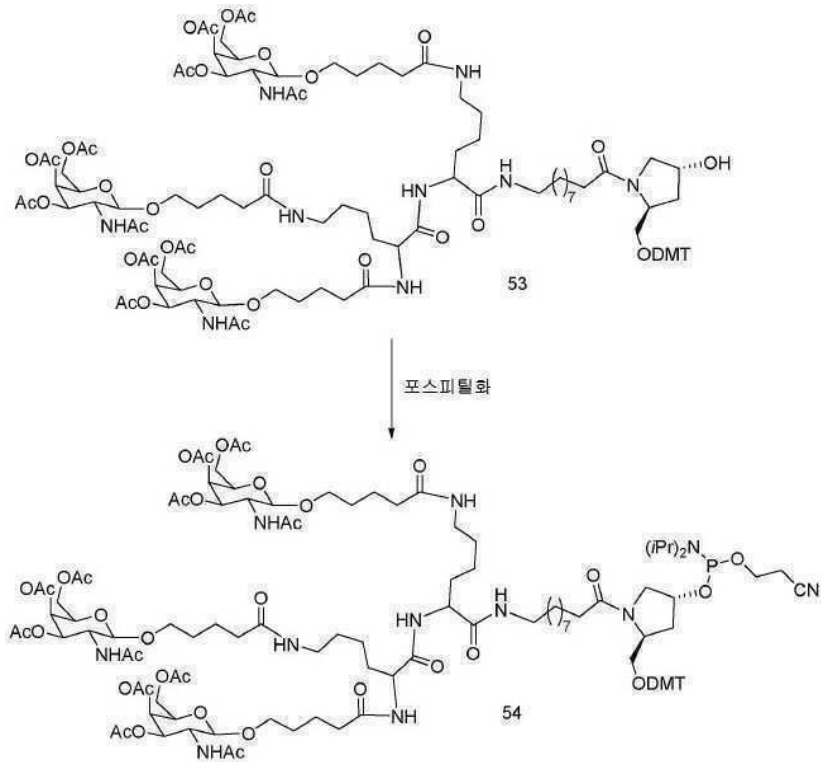
[0910] 실시예 16: 화합물 53의 제조



[0911]

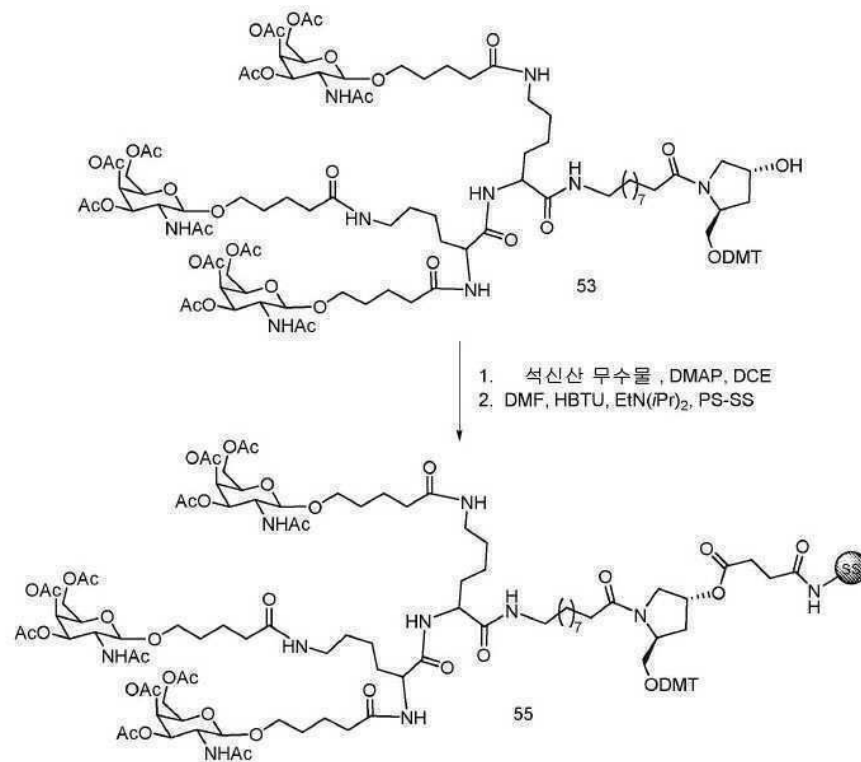
[0912] 화합물 48 및 49는 시판되고 있다. 화합물 17 및 47은 실시예 4 및 15에서 실증된 절차에 따라 준비된다.

[0913] 실시예 17: 화합물 54의 제조



[0914]
[0915] 화합물 53은 실시예 16에서 실증된 절차에 따라 준비된다.

[0916] 실시예 18: 화합물 55의 제조



[0917]
[0918] 화합물 53은 실시예 16에서 실증된 절차에 따라 준비된다.

[0919] 실시예 19: 3' 고체상 기술을 통해 위치에서 GalNAc₃-1을 포함하는 접합된 ASO의 일반적인 제조 방법 (ISIS 647535, 647536 및 651900의 제조)

- [0920] 달리 언급되지 않으면, 올리고머 화합물의 합성을 위해 사용된 모든 시약 및 용액은 상업적 공급원으로부터 구매된다. 표준 포스포라미다이트 빌딩 블록 및 고체 지지체는, 예를 들면 T, A, G, 및 ¹⁸C 잔기를 포함하는 뉴클레오사이드 잔기의 혼입을 위해 사용된다. 무수 아세트니트릴 중의 포스포라미다이트의 0.1 M 용액을 b-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드 및 2'-MOE에 사용하였다.
- [0921] ASO 합성은 ABI 394 합성기 (1-2 μmol 규모) 상에서, 또는 칼럼에 충전된 **GalNAc₃-1** 로딩된 VIMAD 고품 지지체 (110 μmol/g, Guzaev 등, 2003) 상에서 포스포라미다이트 커플링 방법에 의해 GE Healthcare Bioscience ÄKTA 올리고파일럿 합성기 (40-200 μmol 규모) 상에서 수행되었다. 커플링 단계에 대해, 포스포라미다이트는 고품 지지체 상에 로딩 4 배 과잉으로 전달되었고 포스포라미다이트 축합은 10 분 동안 수행되었다. 모든 다른 단계는 제조자에 의해 공급된 표준 프로토콜을 따랐다. 톨루엔 중 6% 디클로로아세트산의 용액은 디메톡시트리틸 (DMT) 그룹을 뉴클레오타이드의 5'-하이드록실 그룹로부터 제거하기 위해 사용되었다. 무수 CH₃CN 중 4,5-디시아노이미다졸 (0.7 M)은 커플링 단계 동안에 활성화제로서 사용되었다. 포스포로티오에이트 연결을 3 분의 접촉 시간 동안에 1:1 피리딘/CH₃CN 중의 크산탄 하이드라이드의 0.1 M 용액을 이용한 황화에 의해 도입하였다. 6% 물을 함유하는 CH₃CN 중의 20% *tert*-부틸하이드로퍼옥사이드의 용액을 산화제로서 사용하여 12분의 접촉 시간으로 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결을 제공하였다.
- [0922] 원하는 서열이 조립된 후, 시아노에틸 포스페이트 보호 그룹은 45 분의 접촉 시간과 함께 트리에틸아민 및 아세트니트릴의 1:1 (v/v) 혼합물을 사용하여 탈보호되었다. 상기 고체-지지체 결합된 ASO를 암모니아수 (28-30 중량 %)에 현탁시키고 55 °C에서 6시간 동안 가열하였다.
- [0923] 그리고 나서, 미결합된 ASO를 여과하고 암모니아를 가열로 제거하였다. 잔류물을 강한 음이온 교환 칼럼 상에서 고압 액체 크로마토그래피에 의해 정제하였다(GE Healthcare Bioscience, Source 30Q, 30 μm, 2.54 x 8 cm, A = 30% 수성 CH₃CN 중의 100 mM 암모늄 아세테이트, B = A 중의 1.5 M NaBr, 60분에 0-40%의 B, 유량 14 mL min⁻¹, λ = 260 nm). 잔류물을 역상 칼럼 상의 HPLC에 의해 탈염하여, 고체 지지체 상의 초기 로딩을 기준으로 15-30%의 단리된 수율로 원하는 ASO를 얻었다. ASO를 Agilent 1100 MSD 시스템을 갖는 이온-쌍-HPLC 커플링된 MS 분석에 의해 규명하였다.
- [0924] 콘주게이트를 포함하지 않는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 당해기술에서 잘 알려진 표준 올리고뉴클레오타이드 합성 절차를 사용하여 합성되었다.
- [0925] 이들 방법을 사용하여, ApoC III을 표적으로 하는 3 개의 별개의 안티센스 화합물이 제조되었다. 아래의 표 4에서 요약된 바와 같이, 각각의 ApoC III을 표적으로 하는 3 개의 안티센스 화합물은 동일한 핵염기 서열을 가졌고; ISIS 304801는 모든 포스포로티오에이트 연결을 갖는 5'-10-5 MOE 캡머이고; ISIS 647535는 ISIS 304801와 동일하고, 단, 3' 말단에서 결합된 **GalNAc₃-1**을 가졌고; 그리고 ISIS 647536은 ISIS 647535와 동일하고, 단, 상기 화합물의 어떤 뉴클레오사이드간 연결은 포스포디에스테르 연결이다. 표 4에서 추가로 요약된 바와 같이, SRB-1을 표적으로 하는 2 개의 별개의 안티센스 화합물이 합성되었다. ISIS 440762는 모든 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 갖는 2-10-2 cEt 캡머였고; ISIS 651900는 ISIS 440762와 동일하고, 단, 3'-말단에서 **GalNAc₃-1**을 포함했다.

[0926] 표 4

[0927] ApoC III 및 SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ASO	서열 (5'에서 3')	표적	계산된 질량	관찰된 질량	서열번호
ISIS 304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	ApoC III	7165.4	7164.4	20
ISIS 647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} - GaINAc₃-1_a	ApoC III	9239.5	9237.8	21
ISIS 647536	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} - GaINAc₃-1_a	ApoC III	9142.9	9140.8	21
ISIS 440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	SRB- 1	4647.0	4646.4	22
ISIS 651900	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ko} A _{do} - GaINAc₃-1_a	SRB- 1	6721.1	6719.4	23

[0928]

[0929]

하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "k"는 6'-(S)-CH₃ 바이사이클릭 뉴클레오사이드 (예를 들면 cEt)를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 상첨자 "m"은 5-메틸시토신을 나타낸다. "GaINAc₃-1"는 실시예 9에서 이전에 보여진 구조를 갖는 콘주게이트 그룹을 나타낸다. GaINAc₃-1은 ASO를 "GaINAc₃-1_a"인 것으로 지정된 콘주게이트의 나머지에 연결하는 절단가능 아데노신을 포함하는 것에 주목한다. 이러한 명명법은 콘주게이트의 일부인 아데노신을 포함하는 완전한 핵염기 서열을 보여주기 위해 상기 표에서 사용된다. 따라서, 상기 표에서, 서열은 "GaINAc₃-1"와 함께 생략된 "A_{do}"로 종료되는 바와 같이 또한 열거될 수 있었다. 절단가능 뉴클레오사이드 또는 절단가능 모이어티가 없는 콘주게이트 그룹의 부분을 나타내기 위해 하첨자 "a"를 사용하는 이러한 관례는 이들 실시예를 통해 사용된다. 절단가능 모이어티가 없는 콘주게이트 그룹의 이러한 부분은 "클러스터" 또는 "콘주게이트 클러스터" 또는 "GaINAc₃ 클러스터"로서 본원에서 칭해진다. 어떤 예에서 그것의 클러스터 및 그것의 절단가능 모이어티를 별도로 제공하여 콘주게이트 그룹을 기재하는 것이 편리하다.

[0930]

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

[0931]

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

[0932]

처리

[0933]

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

[0934]

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

[0935]

ApoC III mRNA 분석

[0936]

마우스의 간 중 ApoC III mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 측정되었다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). ApoC III mRNA 수준은 PBS-처리된 대조군에 대한 정상화 전에 (리보그린을 사용하여) 총 RNA에 대해 결정되었다. 아래의 결과는 PBS-처리된 대조군에 대해 정규화된, 각 처리 그룹에 대한 ApoC III mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 제공되고, "PBS %"로서 나타낸다. 각 ASO의 반 최대 효과적인 복용량 (ED₅₀)은 아래의 표 5에서 또한 제공된다.

[0937]

실증된 바와 같이, 안티센스 화합물 둘 모두는 PBS 대조군에 대한 ApoC III RNA를 감소시켰다. 게다가, GaINAc₃-1 (ISIS 647535)에 접합된 안티센스 화합물은 GaINAc₃-1 콘주게이트 (ISIS 304801)가 없는 안티센스 화합물보다 실질적으로 더 강했다.

표 5

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

ASO	용량 ($\mu\text{mol/kg}$)	% PBS	ED ₅₀ ($\mu\text{mol/kg}$)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	100	--	-	--	
ISIS 304801	0.08	95	0.77	없음	PS/20	20
	0.75	42				
	2.25	32				
	6.75	19				
ISIS 647535	0.08	50	0.074	GalNAc ₃ -1	PS/20	21
	0.75	15				
	2.25	17				
	6.75	8				

ApoC III 단백질 분석 (비탁 검정)

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

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

아래의 표 6에서 보여진 바와 같이, 안티센스 화합물 둘 모두는 PBS 대조군에 대한 ApoC III 단백질을 감소시켰다. 게다가, GalNAc₃-1 (ISIS 647535)에 접합된 안티센스 화합물은 GalNAc₃-1 콘주게이트 (ISIS 304801) 가 없는 안티센스 화합물보다 실질적으로 더 강했다.

표 6

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

ASO	용량 ($\mu\text{mol/kg}$)	% PBS	ED ₅₀ ($\mu\text{mol/kg}$)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0.08	86	0.73	없음	PS/20	20
	0.75	51				
	2.25	23				
	6.75	13				
ISIS 647535	0.08	72	0.19	GalNAc ₃ -1	PS/20	21
	0.75	14				
	2.25	12				
	6.75	11				

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

트리글리세라이드 수준은 PBS 주입된 마우스에 대해 측정되었고 "PBS %"로서 나타낸다. 결과는 표 7에서 제공된

다. 실증된 바와 같이, 안티센스 화합물 둘 모두는 트리글리세라이드 수준을 낮게 했다. 게다가, **GalNAc₃-1** (ISIS 647535)에 접합된 안티센스 화합물은 **GalNAc₃-1** 콘주게이트 (ISIS 304801) 가 없는 안티센스 화합물보다 실질적으로 더 강했다.

표 7

이식유전자 마우스에서 트리글리세라이드 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 ($\mu\text{mol/kg}$)	% PBS	ED ₅₀ ($\mu\text{mol/kg}$)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0.08	87	0.63	없음	PS/20	20
	0.75	46				
	2.25	21				
	6.75	12				
ISIS 647535	0.08	65	0.13	GalNAc₃-1	PS/20	21
	0.75	9				
	2.25	8				
	6.75	9				

혈장 샘플은 HPLC에 의해 분석되어 총 콜레스테롤 및 콜레스테롤 (HDL 및 LDL)의 상이한 분획의 양을 결정했다. 결과는 표 8 및 9에서 제공된다. 실증된 바와 같이, 안티센스 화합물 둘 모두는 총 콜레스테롤 수준을 낮게 했고; 둘 모두는 LDL을 낮게 했고; 그리고 둘 모두는 HDL을 상승시켰다. 게다가, **GalNAc₃-1** (ISIS 647535)에 접합된 안티센스 화합물은 **GalNAc₃-1** 콘주게이트 (ISIS 304801) 가 없는 안티센스 화합물보다 실질적으로 더 강했다. HDL의 증가 및 LDL 수준의 감소는 ApoC III의 안티센스 억제제의 심혈관 유익한 효과이다.

표 8

이식유전자 마우스에서 총 콜레스테롤 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 ($\mu\text{mol/kg}$)	총 콜레스테롤 (mg/dL)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	257	--	--	
ISIS 304801	0.08	226	없음	PS/20	20
	0.75	164			
	2.25	110			
	6.75	82			
ISIS 647535	0.08	230	GalNAc₃-1	PS/20	21
	0.75	82			
	2.25	86			
	6.75	99			

표 9

[0958] 이식유전자 마우스에서 HDL 및 LDL 콜레스테롤 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 ($\mu\text{mol/kg}$)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	17	28	--	--	
ISIS 304801	0.08	17	23	없음	PS/20	32
	0.75	27	12			
	2.25	50	4			
	6.75	45	2			
ISIS 647535	0.08	21	21	GalNAc ₃ -1	PS/20	111
	0.75	44	2			
	2.25	50	2			
	6.75	58	2			

[0959]

[0960] 약동학 분석 (PK)

[0961] ASO의 PK가 또한 평가되었다. 간 및 신장 샘플은 다져졌고 표준 프로토콜을 사용하여 추출되었다. 샘플은 IP-HPLC-MS를 이용하여 MSD1 상에서 분석되었다. 전장 ISIS 304801 및 647535의 조직 수준 ($\mu\text{g/g}$)은 측정되었고 결과는 표 10에서 제공된다. 실증된 바와 같이, 총 전장 안티센스 화합물의 간 농도는 2 개의 안티센스 화합물에 대해 유사했다. 따라서, GalNAc₃-1 접합된 안티센스 화합물기 (상기의 RNA 및 단백질 데이터에 의해 실질되는 바와 같이) 간에서 활성이 더 많을 지라도, 간에서 실질적으로 더 높은 농도로 존재하지 않는다. 사실상, 계산된 EC₅₀ (표 10에서 제공)은, 접합된 화합물의 효능의 관찰된 증가가 증가된 축적에 전적으로 기인할 수 없다는 것을 확인해 준다. 이러한 결과는, 콘주게이트가 안티센스 화합물의 세포로의 생산적인 흡수를 가능하게 개선하여 간 축적 단독 이외의 기전에 의해 효능을 개선했다는 것을 암시한다.

[0962] 상기 결과는 또한, 신장 중 GalNAc₃-1 접합된 안티센스 화합물의 농도가 GalNAc 콘주게이트가 없는 안티센스 화합물의 농도보다 더 낮다는 것을 보여준다. 이것은 몇 개의 유익한 치료적 연루성을 갖는다. 신장에서의 활성이 추구되지 않는 치료적 징후에 대해, 신장에의 노출은 상응하는 이점 없이 신장 독성을 위태롭게 한다. 게다가, 신장의 고농도는 전형적으로 화합물의 소변으로 손실을 야기하고, 이로써 더 빠른 청소능을 얻는다. 따라서, 비-신장 표적에 대해, 신장 축적은 원치 않는다. 이들 데이터는, GalNAc₃-1 콘주게이션이 신장 축적을 축소시킨다는 것을 암시한다.

[0963] 표 10

[0964] 이식유전자 마우스에서 ASO 처리의 PK 분석

ASO	용량 ($\mu\text{mol/kg}$)	간 ($\mu\text{g/g}$)	신장 ($\mu\text{g/g}$)	간 EC_{50} ($\mu\text{g/g}$)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
ISIS 304801	0.1	5.2	2.1	53	없음	PS/20	20
	0.8	62.8	119.6				
	2.3	142.3	191.5				
	6.8	202.3	337.7				
ISIS 647535	0.1	3.8	0.7	3.8	GalNAc₃-1	PS/20	21
	0.8	72.7	34.3				
	2.3	106.8	111.4				
	6.8	237.2	179.3				

[0965]

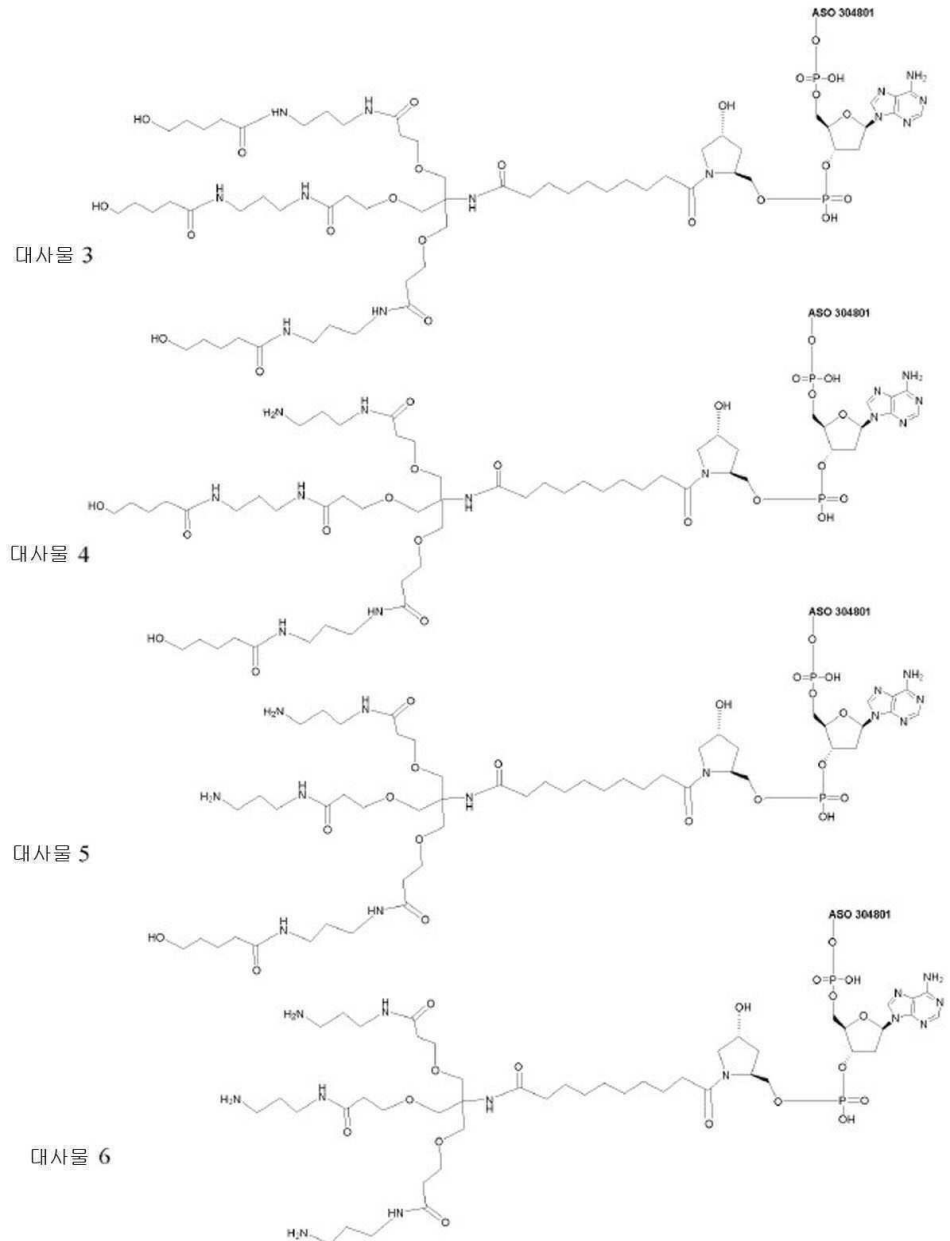
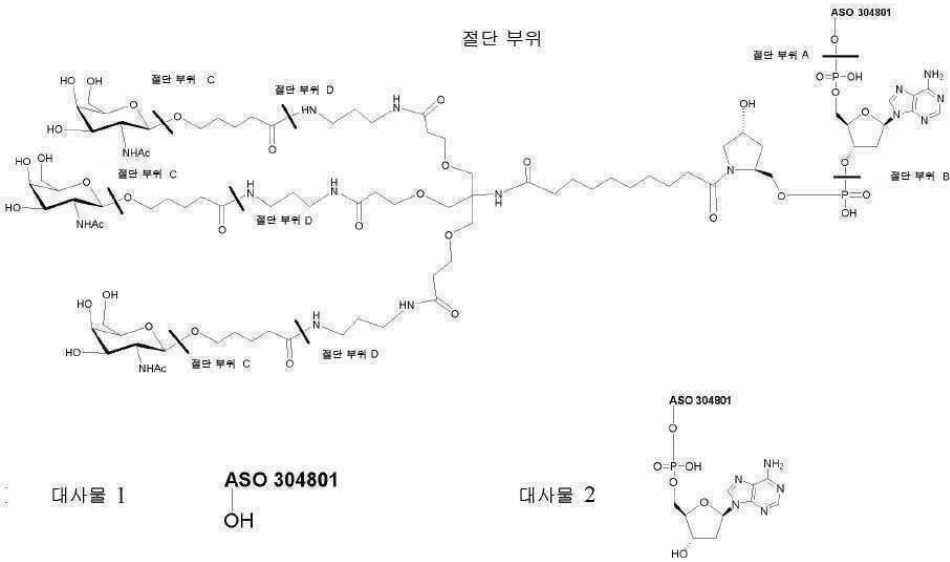
[0966] ISIS 647535의 대사물이 또한 확인되었고, 그것의 질량은 고분해능 질량 분광분석법 분석에 의해 확인되었다. 관찰된 대사물의 절단 부위 및 구조는 아래에서 보여진다. 전장 ASO의 상대 %는 표준 절차를 사용하여 계산되었고 결과는 표 10a에서 제공된다. ISIS 647535의 주요 대상물은 아래에서 보여진 절단 부위 A에서의 절단을 야기하는 전체 콘주게이트 (즉 ISIS 304801)가 없는 전장 ASO였다. 게다가, 다른 절단 부위로부터 수득된 추가 대상물이 또한 관찰되었다. 이들 결과는, 다른 절단가능 결합 예컨대 에스테르, 펩타이드, 디설파이드, 포스포르아미데이트 또는 아실-하이드라존을 **GalNAc₃-1** 당과 ASO (이것은 세포 내의 효소에 의해 절단될 수 있거나, 사이토질의 환원 환경에서 전달될 수 있거나 엔도솜 및 리소솜 내의 산성 pH에 대해 불안정함) 사이에 도입하는 것이 또한 유용할 수 있다는 것을 암시한다.

[0967] 표 10a

[0968] ISIS 647535의 관찰된 전장 대사물

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

[0969]



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

[0973] 인간 ApoC III를 표적으로 하고 표17에서 기재된 ISIS 304801, 647535 및 647536 각각은, 인간 ApoC III 이식 유전자 마우스 인간 ApoC III을 억제하기 위해 그것의 능력에 대한 단일 투여 연구에서 추가로 평가되었다.

[0974] 처리

[0975] 인간 ApoCIII 이식유전자 마우스는 12-시간 명/암 사이클에서 유지되었고 임의로 Teklad 실험실 초우에 공급되었다. 동물은 실험의 개시 전 연구 시설에서 적어도 7 일 동안 순응되었다. ASO는 PBS에서 제조되었고 0.2 마이크로 필터를 통해 여과하여 멸균되었다. ASO는 주사를 위해 0.9PBS %에서 용해되었다.

[0976] 인간 ApoC III 이식유전자 마우스에게 복강내로 1 회 아래에서 보여진 복용량으로 ISIS 304801, 647535 또는 647536 (상기에서 기재됨) 또는 PBS 처리된 대조군이 주입되었다. 처리 그룹은 3마리의 동물로 구성되었고 대조군 그룹은 4 마리의 동물로 구성되었다. 처리 전에 뿐만 아니라 마지막 용량 후에, 혈액을 각 마우스로부터 채혈하고 혈장 샘플을 분석하였다. 마우스는 마지막 투여 72 시간 후에 희생되었다.

[0977] 샘플은 수집되고 분석되어 HDL 및 LDL 분획을 포함하는간; 혈장 트리글리세라이드; 및 콜레스테롤에서 ApoC III mRNA 및 단백질 수준을 결정하고, 상기에서 기재된 바와 같이 평가되었다 (실시예 20). 이들 분석으로부터의 데이터는 아래의 표 11-15에서 제공된다. 혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다. ALT 및 AST 수준은, 안티센스 화합물이 모든 투여된 용량으로 용인되었다는 것을 보여주었다.

[0978] 이들 결과는 **GalNAc₃-1** 콘주게이트 (ISIS 304801) 가 없는 안티센스 화합물과 비교하여 3' 말단 (ISIS 647535 및 647536)에서 **GalNAc₃-1** 콘주게이트를 포함하는 안티센스 화합물에 대한 효능의 개선을 보여준다. 게다가, **GalNAc₃-1** 콘주게이트 및 일부 포스포디에스테르 연결을 포함하는 ISIS 647536은 동일한 콘주게이트를 포함하는 ISIS 647535만큼 강력했고, ASO 내의 모든 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트이다.

[0979] 표 11

[0980] 인간 ApoC III 이식유전자 마우스에서 ApoC III mRNA 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 (mg/kg)	% PBS	ED ₅₀ (mg/kg)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드 간 연결/길이	서열번호
PBS	0	99	--	-	--	
ISIS 304801	1	104	13.2	없음	PS/20	20
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0.3	98	1.9	GalNAc₃-1	PS/20	21
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0.3	103	1.7	GalNAc₃-1	PS/PO/20	21
	1	60				
	3	31				
	10	21				

[0981]

[0982] 표 12

[0983] 인간 ApoC III 이식유전자 마우스에서 ApoC III 혈장 단백질 수준에 대한 ASO 처리의 효과

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

[0984]

[0985] 표 13

[0986] 이식유전자 마우스에서 트리글리세라이드 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 (mg/kg)	% PBS	ED ₅₀ (mg/kg)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	98	--	--	--	
ISIS 304801	1	80	29.1	없음	PS/20	20
	3	92				
	10	70				
	30	47				
ISIS 647535	0.3	100	2.2	GalNAc ₃ -1	PS/20	21
	1	70				
	3	34				
	10	23				
ISIS 647536	0.3	95	1.9	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	21
	1	66				
	3	31				
	10	23				

[0987]

[0988] 표 14

[0989] 이식유전자 마우스에서 총 콜레스테롤 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 (mg/kg)	% PBS	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	96	--	--	
ISIS 304801	1	104	없음	PS/20	20
	3	96			
	10	86			
	30	72			
ISIS 647535	0.3	93	GalNAc ₃ -1	PS/20	21
	1	85			
	3	61			
	10	53			
ISIS 647536	0.3	115	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	21
	1	79			
	3	51			
	10	54			

[0990]

[0991] 표 15

[0992] 이식유전자 마우스에서 HDL 및 LDL 콜레스테롤 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 (mg/kg)	HDL % PBS	LDL % PBS	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	131	90	--	--	
ISIS 304801	1	130	72	없음	PS/20	20
	3	186	79			
	10	226	63			
	30	240	46			
ISIS 647535	0.3	98	86	GalNAc ₃ -1	PS/20	21
	1	214	67			
	3	212	39			
	10	218	35			
ISIS 647536	0.3	143	89	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	21
	1	187	56			
	3	213	33			
	10	221	34			

[0993]

[0994] 이들 결과는, GalNAc₃-1 콘주게이트가 안티센스 화합물의 효능을 개선한다는 것을 확인한다. 결과는 또한, GalNAc₃-1 접합된 안티센스 화합물의 동등한 효능을 보여주고, 여기서 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 혼합된 연결 (6개의 포스포디에스테르 연결을 갖는 ISIS 647536) 및 동일한 안티센스 화합물의 완전한 포스포로티오에

이트 버전 (ISIS 647535)을 갖는다.

[0995] 포스포로티오에이트 연결은 안티센스 화합물에 대한 몇 개의 특성을 제공한다. 예를 들면, 뉴클레아제 소화에서 저장하고 단백질에 결합하고, 이것은 신장/소변에서보다 간에서 화합물의 축적을 야기한다. 이들은, 특히 간에서 조짐을 치료할 때 바람직한 특성이다. 그러나, 포스포로티오에이트 연결은 또한 염증성 반응과 연관되었다. 따라서, 화합물 중 포스포로티오에이트 연결의 수를 감소시키는 것은 염증의 위험, 뿐만 아니라 간에서 저농도의 화합물을 감소시키고, 신장 및 소변에서 농도를 증가시키고, 뉴클레아제의 존재에서의 안정성을 증가시키고, 더 낮은 전체 효능을 낮추는 것으로 기대된다. 본 결과는, 어떤 포스포로티오에이트 연결이 포스포디에스테르 연결로 대체되었던 **GalNAc₃-1** 접합된 안티센스 화합물이 완전한 포스포로티오에이트 연결을 갖는 대응물로서 간에서 표적에 대하여 강력하다는 것을 보여준다. 그와 같은 화합물은 전염증이 덜한 것으로 기재된다 (PS의 축소를 보여주는 실험은 감소된 염증성 효과를 야기한다는 것을 기재하는 실시예 24 참고).

[0996] **실시예 22: 생체내에서 SRB-1을 표적으로 하는 GalNAc₃-1 접합된 변형된 ASO의 효과**

[0997] SRB-1을 표적으로 하고 표 4에서 기재된 ISIS 440762 및 651900 각각을 대상으로 Balb/c 마우스에서 SRB-1을 억제하는 그 능력을 용량-의존적 연구에서 평가하였다.

[0998] *처리*

[0999] 6주령 수컷 Balb/c 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 ISIS 440762, 651900 또는 PBS 처리된 대조군을하기 위해 제시된 복용량으로 피하로 1회 주입하였다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). SRB-1 mRNA 수준을 PBS-처리된 대조군에 대해 정규화하기 전에 총 RNA에 대해 결정하였다(리보그린을 이용하여). 아래의 결과는 PBS-처리된 대조군에 대해 정규화된, 각 처리 그룹에 대해 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 제공되고, "PBS %"로서 나타낸다.

[1000] 표 16에서 입증된 바와 같이, 두 안티센스 화합물들은 SRB-1 mRNA 수준을 낮추었다. 게다가, **GalNAc₃-1** 콘주게이트 (ISIS 651900)을 포함하는 안티센스 화합물은 **GalNAc₃-1** 콘주게이트 (ISIS 440762)가 없는 안티센스 화합물보다 실질적으로 더 강력하였다. 이들 결과는, **GalNAc₃-1** 콘주게이트의 효능 이점이 상이한 표적에 대해 상보적이고 상이한 화학적으로 변형된 뉴클레오사이드를 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 관찰된다는 것을 입증하고, 이러한 예에서 변형된 뉴클레오사이드는 제한된 에틸 당 모이어티 (바이사이클릭 당 모이어티)를 포함한다.

[1001] **표 16**

[1002] Balb/c 마우스에서 SRB-1 mRNA 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 (mg/kg)	간 % PBS	ED ₅₀ (mg/kg)	3' 콘주게이트		뉴클레오사이드 간 연결/길이	서열번호
PBS	0	100		-		--	
ISIS 440762	0.7	85	2.2	없음		PS/14	22
	2	55					
	7	12					
	20	3					
ISIS 651900	0.07	98	0.3	GalNAc₃-1		PS/14	23
	0.2	63					
	0.7	20					
	2	6					
	7	5					

[1003]

[1004] **실시예 23: 인간 말초 혈액 단핵 세포 (hPBMC) 검정 프로토콜**

[1005] hPBMC 검정은 BD Vautainer CPT 튜브 방법을 사용하여 수행하였다. US HealthWorks clinic (Faraday & El Camino Real, Carlsbad)에서 고지에 의한 동의로 자원된 공여체로부터 전혈 샘플을 얻어 4-15 BD 진공채혈기 CPT 8 ml 튜브 (VWR Cat.# BD362753)에 모았다. 각 공여체에 대한 CPT 튜브에서의 대략적인 개시되는 총 전혈액

량을 PBMC 검정 데이터 시트를 사용하여 기록하였다.

[1006] 튜브를 8-10회 뒤집어 원심분리 바로 전에 혈액 샘플을 재혼합하였다. CPT 튜브를브레이크 없이(2700 RPM Beckman Allegra 6R)1500-1800 RCF에서 30분간 수평 (swing-out) 로터에서 실온(18-25 °C)에서 원심분리하였다. 세포를 버피 코트 계면 (피콜 및 폴리머 겔 층 사이)로부터 회수하고; 멸균한 50 ml 원뿔형 튜브로 옮기고 5 CPT 튜브/50 ml 원뿔형 튜브/공여체까지 모았다. 그리고 나서, 세포를 PBS (Ca^{++} , Mg^{++} 없음; GIBCO)로 2회 세정하였다. 튜브를 50 ml까지 가득 채우고몇 번 뒤집어 혼합하였다. 그리고 나서, 샘플을 330 x g에서 15분 동안 실온에서 원심분리하고(Beckman Allegra 6R에서 1215 RPM), 펠렛을 건드리지 않고 가능한 한 많은 상청액을 흡인하였다. 튜브를 와류시켜 세포 펠렛을 제거하고 RPMI+10% FBS+펜/스트랩 (~1 ml / 10 ml 시작하는 전혈량)에서 세포를 재현탁시켰다. 60 μl 샘플을 600 μl VersaLyse 시약 (Beckman Coulter Cat# A09777)을 갖는 샘플 바이알 (Beckman Coulter) 내로 피펫팅하고 10-15초 동안 부드럽게 볼텍싱하였다. 샘플을 10분 동안 실온에서 10분 동안 배양하고 다시 혼합한 후 계수하였다. 세포 현탁액을 PBMC 세포형 (1:11의 희석 인자가 다른 파라미터를 이용하여 보관되었음)을 이용하여 Vicell XR 세포 생존력 분석기 (Beckman Coulter) 상에서 계수하였다. 생존 세포/ml 및 생존력을 기록하였다. 세포 현탁액을 1×10^7 생존 PBMC/ RPMI+ 10% FBS+펜/ 스트랩 중에서의 ml로 희석하였다.

[1007] 세포를 50 μl /웰의 96-웰 조직 배양판 (Falcon Microtest)에 5×10^5 로 플레이팅하였다. RPMI+10% FBS+펜/스트랩에 희석된 50 μl /웰의 2x 농도 올리고/대조군을 실험 템플레이트 (100 μl /웰 총)에 따라 부가하였다. 플레이트를 진탕기에 놓고 대략 1분간 혼합하였다. 37 °C에서 24시간 동안 배양한 후; 5% CO_2 , 플레이트를 400 x g에서 10분 동안 원심분리한 다음 MSD 사이토카인 검정 (즉 인간 IL-6, IL-10, IL-8 및 MCP-1)을 위해 상청액을 제거하였다.

[1008] 실시예 24: GalNAc_3 -1 접합된 ASO를 위한 hPBMC 검정에서의 전염증 효과의 평가

[1009] 표 17에 열거된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)에 대해 실시예 23에서 기재된 프로토콜을 사용하여 hPBMC 검정에서의 전염증 효과를 평가하였다. ISIS 353512는검정에서의 IL-6 방출에 대한 고반응군인 것으로 알려진 내부 표준이다. hPBMC를 신선한, 지원된 공여체로부터 단리하고 0, 0.0128, 0.064, 0.32, 1.6, 8, 40 및 200 μM 농도의 ASO로 처리하였다. 24시간 처리 후, 사이토카인 수준을 측정하였다.

[1010] IL-6의 수준을 일차 판독으로서 사용하였다. EC_{50} 및 E_{max} 를 표준 절차를 이용하여 계산하였다. 결과는 두 공여체로부터 $\text{E}_{\text{max}}/\text{EC}_{50}$ 의 평균 비로서 표현되고 " $\text{E}_{\text{max}}/\text{EC}_{50}$ "로 나타내어진다. 더 낮은 비율은 전염증 반응에서 상대적 감소를 가리키고더 높은 비율은 전염증 반응에서 상대적 증가를 가리킨다.

[1011] 시험 화합물과 관련하여, 가장 낮은 전염증 화합물은 PS/PO 연결된 ASO (ISIS 616468)였다. GalNAc_3 -1 접합된 ASO인 ISIS 647535는그의 비-접합된 대응물 ISIS 304801보다 약간 덜 전염증이었다. 이들 결과는, 일부 PO 연결의 혼입이 전염증 반응을 감소시키며 GalNAc_3 -1 콘주게이트의 부가가 화합물을 더 전염증성으로 만들며 전염증 반응을 감소시킬 수 있음을 가리킨다. 따라서, 당업자라면 혼합된 PS/PO 연결 및 GalNAc_3 -1 콘주게이트 모두를 포함하는 안티센스 화합물이 GalNAc_3 -1 콘주게이트를 갖거나 갖지 않는 완벽한 PS 연결된 안티센스 화합물과 비교하여 더 낮은 전염증 반응을 생성할 것임을 예상할 것이다. 이들 결과는, GalNAc_{3-1} 접합된 안티센스 화합물, 특히 감소된 PS 함량을 갖는 화합물이 덜 전염증이라는 것을 보여준다.

[1012] 함께, 이들 결과는, GalNAc_3 -1 접합된 화합물, 특히 감소된 PS 함량을 갖는 화합물이 GalNAc_3 -1 콘주게이트가 없는 대응되는 완전한 PS 안티센스 화합물보다 더 높은 용량으로 투여될 수 있음을 제시한다. 이들 화합물의 경우 반감기가 실질적으로 상이할 것으로 예상되지 않으므로, 그러한 더 높은 투여는 덜 빈번한 복용을 야기할 것이다. 사실상 그러한 투여는 훨씬 덜 빈번할 수 있는데, GalNAc_3 -1 접합된 화합물이 더 강하고(실시예 20-22 참고), 화합물의 농도가 효능에 기초하여 원하는 수준 이하로 떨어지면 재-복용이 필요하기 때문이다.

[1013] 표 17

[1014] 변형된 ASO

ASO	서열 (5'에서 3')	표적	서열번호
ISIS 104838	G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	TNFD	24
ISIS 353512	T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} T _{es} G _{es} G _e	CRP	25
ISIS 304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	ApoC III	20
ISIS 647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} A_{do}'-GalNAc₃-1_a	ApoC III	21
ISIS 616468	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _e	ApoC III	20

[1015]

[1016] 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오타이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오타이드를 나타내고; "k"는 6'-(S)-CH₃ 바이사이클릭 뉴클레오타이드 (예를 들면 cEt)를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 상첨자 "m"은 5-메틸시토신을 나타낸다. "**A_{do}'-GalNAc₃-1_a**"는, 명시된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단에 부착된 실시예 9에 나타난 구조 **GalNAc₃-1**를 갖는 콘주게이트를 가리킨다.

[1017] 표 18

[1018] hPBMC 검정에서 ApoC III를 표적으로 하는 ASO의 전염증 효과

ASO	EC ₅₀ (μM)	E _{max} (μM)	E _{max} /EC ₅₀	3' 콘주게이트	뉴클레오타이드간 연결/길이	서열번호
ISIS 353512 (high responder)	0.01	265.9	26,590	없음	PS/20	25
ISIS 304801	0.07	106.55	1,522	없음	PS/20	20
ISIS 647535	0.12	138	1,150	GalNAc₃-1	PS/20	21
ISIS 616468	0.32	71.52	224	없음	PS/PO/20	20

[1019]

[1020] 실시예 25: 시험관 내에서 인간 ApoC III을 표적으로 하는 GalNAc₃-1 접합된 변형된 ASO의 효과

[1021] 상기 기재된 ISIS 304801 및 647535를 시험관 내에서 시험하였다. 웰당 25,000 세포의 밀도로 이식유전자 마우스 유래의 일차 간세포 세포를 0.03, 0.08, 0.24, 0.74, 2.22, 6.67 및 20 μM 농도의 변형된 올리고뉴클레오타이드로 처리하였다. 대략 16시간의 처리 기간 후, RNA를 상기 세포로부터 분리하고 mRNA 수준을 정량적 실시간 PCR에 의해 측정하고 hApoC III mRNA 수준을, 리보그린에 의해 측정된 바와 같이, 총 RNA 함량에 따라 조정하였다.

[1022] IC₅₀을 표준 방법을 사용하여 계산하였고 그 결과가 표 19에서 제시되어 있다. 예시된 바와 같이, 대조군 ISIS 304801과 비교하여 ISIS 647535로 처리된 세포에서 비교할만한 효능이 관찰되었다.

[1023] 표 19

[1024] 일차 간세포에서 인간 ApoC III를 표적으로 하는 변형된 ASO

ASO	IC ₅₀ (μM)	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
ISIS 304801	0.44	없음	PS/20	20
ISIS 647535	0.31	GalNAc₃-1	PS/20	21

[1025]

[1026] 이 실험에서, 생체내에서 관찰된 **GalNAc₃-1** 콘주게이션의 큰 효능 이점은시험관 내에서 관찰되지 않았다. 시험관 내에서 일차 간세포에서의 차후의 자유 흡수 실험은 GalNAc 콘주게이트가 없는 올리고뉴클레오타이드(실시예 60, 82, 및 92 참고)와 비교하여 다양한 GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 증가된 효능을 나타내지 않았다.

[1027] 실시예 26: ApoC III ASO 활성화에 대한 PO/PS 연결의 효과

[1028] 인간 ApoC III 이식유전자 마우스에게 25 mg/kg의 ISIS 304801, 또는 ISIS 616468 (모두 상기에 기재됨)를 1회 복강내로 주입하거나 PBS 처리된 대조군은 2주간 주당 1회 주입하였다. 처리 그룹은 3마리의 동물로 구성되었고 대조군 그룹은 4 마리의 동물로 구성되었다. 처리 전에 뿐만 아니라 마지막 용량 후에, 혈액을 각 마우스로부터 채혈하고 혈장 샘플을 분석하였다. 마우스를 마지막 투여 72시간 후에 희생시켰다.

[1029] 샘플을 수집하고 상기에서 기재된 바와 같이(실시예 20)간에서의 ApoC III 단백질 수준을 분석하였다. 이들 분석으로부터의 데이터가 하기 표 20에 나타나 있 이들 결과는 전체 PS (ISIS 304801) 대비 웅에서 PO/PS (ISIS 616468)를 갖는 안티센스 화합물의 효능 감소를 보여준다.

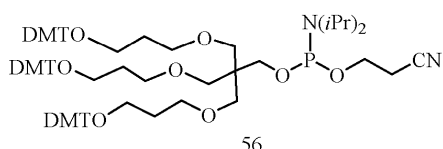
[1030] 표 20

[1031] 인간 ApoC III 이식유전자 마우스에서 ApoC III 단백질 수준에 대한 ASO 처리의 효과

ASO	용량 (mg/kg)	% PBS	3' 콘주게이트	뉴클레오사이드간 연결/길이	서열번호
PBS	0	99	-	--	
ISIS 304801	25 mg/kg/wk for 2 wks	24	없음	Full PS	20
ISIS 616468	25 mg/kg/wk for 2 wks	40	없음	14 PS/6 PO	20

[1032]

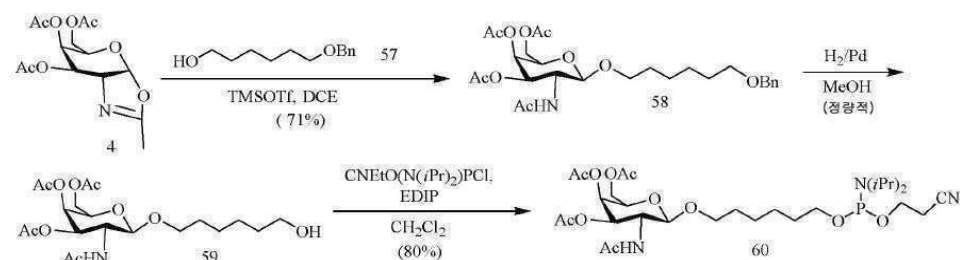
[1033] 실시예 27: 화합물 56



[1034]

[1035] 화합물 56은 Glen Research사부터 상업적으로 이용가능하거나 문헌[Shchepinov 등, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4447-4454]에 의해 보고된 공개된 과정에 따라 제조할 수 있다.

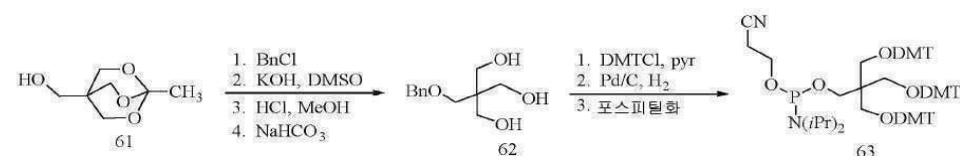
실시예 28: 화합물 60의 제조



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

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

실시예 29: 화합물 63의 제조



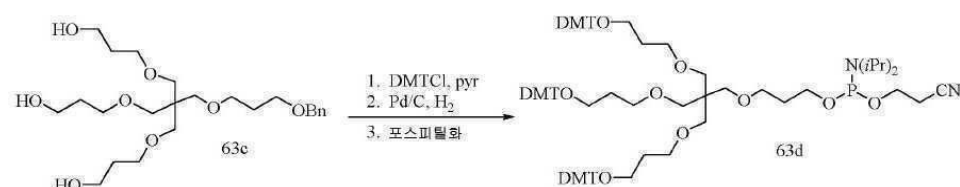
화합물 61 및 62를 하기에 의해 보고된 것과 유사한 과정을 이용하여 제조한다: Tober 등, *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, 3, 566-577; 및 Jiang 등, *Tetrahedron*, 2007, 63(19), 3982-3988.

대안적으로, 화합물 63을 Kim 등, *Synlett*, 2003, 12, 1838-1840; 및 Kim 등, 공개된 PCT 국제 출원, WO 2004063208에 의해 과학 및 특허 문헌에 보고된 것과 유사한 과정을 이용하여 제조한다. **실시예 30: 화합물 63b의 제조**



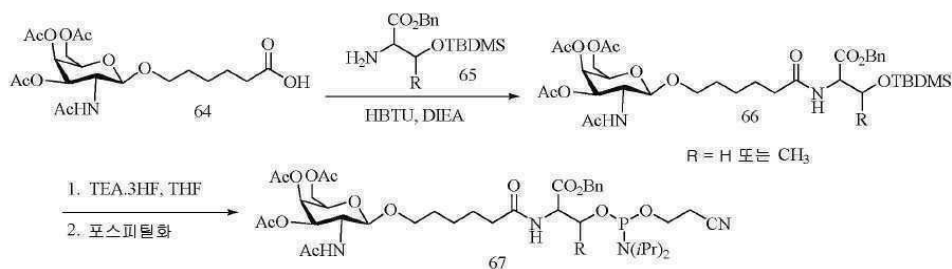
화합물 63a를 하기에 의해 보고된 것들과 유사한 과정을 이용하여 제조한다: Hanessian 등, *Canadian Journal of Chemistry*, 1996, 74(9), 1731-1737.

실시예 31: 화합물 63d의 제조



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

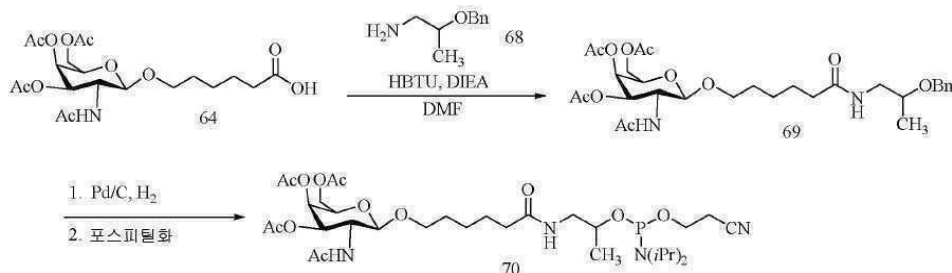
[1049] 실시예 32: 화합물 67의 제조



[1050]

[1051] 화합물 64는 실시예 2에 예시된 과정에 따라 제조하였다. 화합물 65는 Or 등, <i>PCT 국제 출원, WO 2009003009에 의해 보고된 것들과 유사한 과정을 이용하여 제조된다. 화합물 65에 대해 사용된 보호 그룹은 대표적인 것을 의미하며, 사용될 수 있는 본원 명세서에 제시된 것을 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 보호 그룹으로서 제한되지 않는 것으로 의도된다.

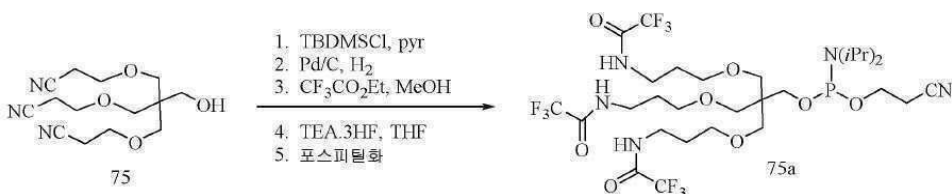
[1052] 실시예 33: 화합물 70의 제조



[1053]

[1054] 화합물 64는 실시예 2에 예시된 과정에 따라 제조하였다. 화합물 68는 상업적으로 이용가능하다. 화합물 68에 대해 사용된 보호 그룹은 대표적인 것을 의미하며, 사용될 수 있는 본원 명세서에서 제공된 것들 것 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 보호 그룹으로서 제한되는 것으로 의도되지 않는다.

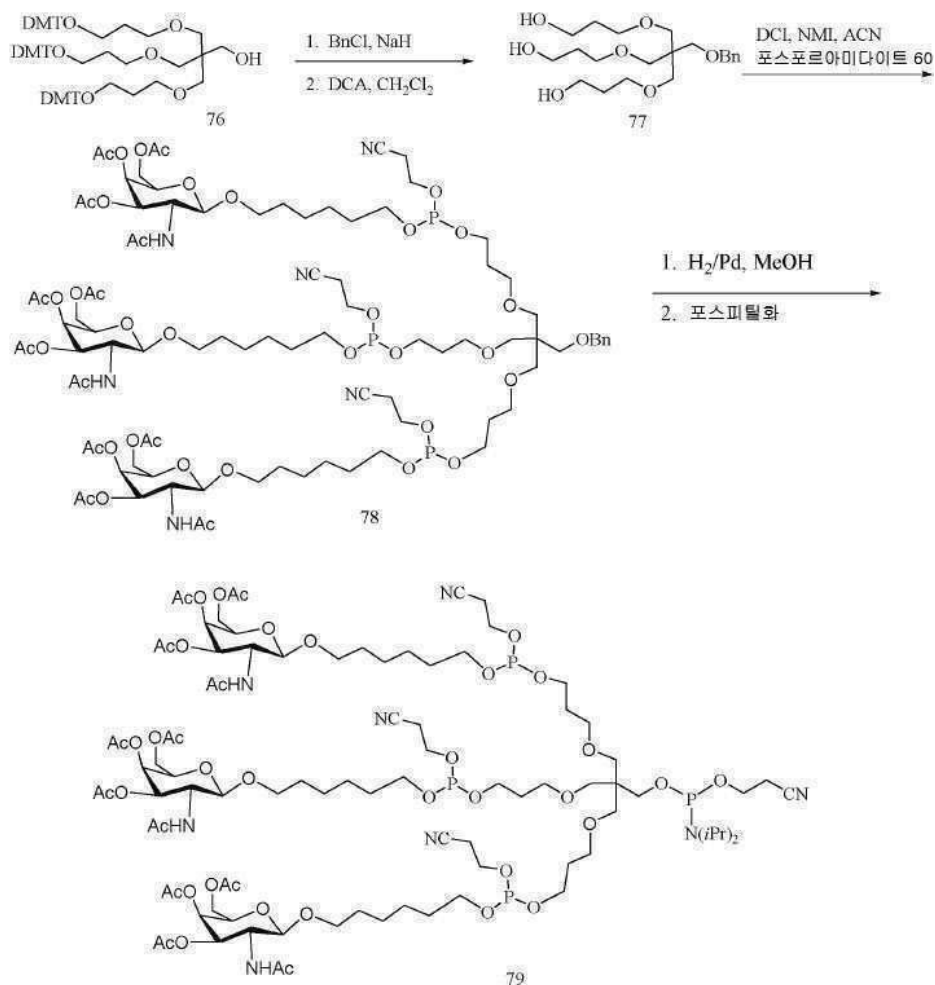
[1055] 실시예 34: 화합물 75a의 제조



[1056]

[1057] 화합물 75를 Shchepinov 등, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4447-4454에 의해 공개된 과정을 이용하여 제조한다.

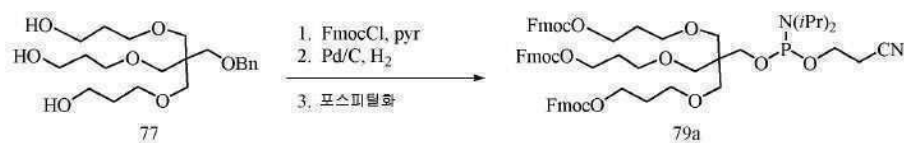
[1058] 실시예 35: 화합물 79의 제조



[1059]

[1060] 화합물 76을 Shchepinov 등, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4447-4454에 의해 공개된 과정을 이용하여 제조하였다.

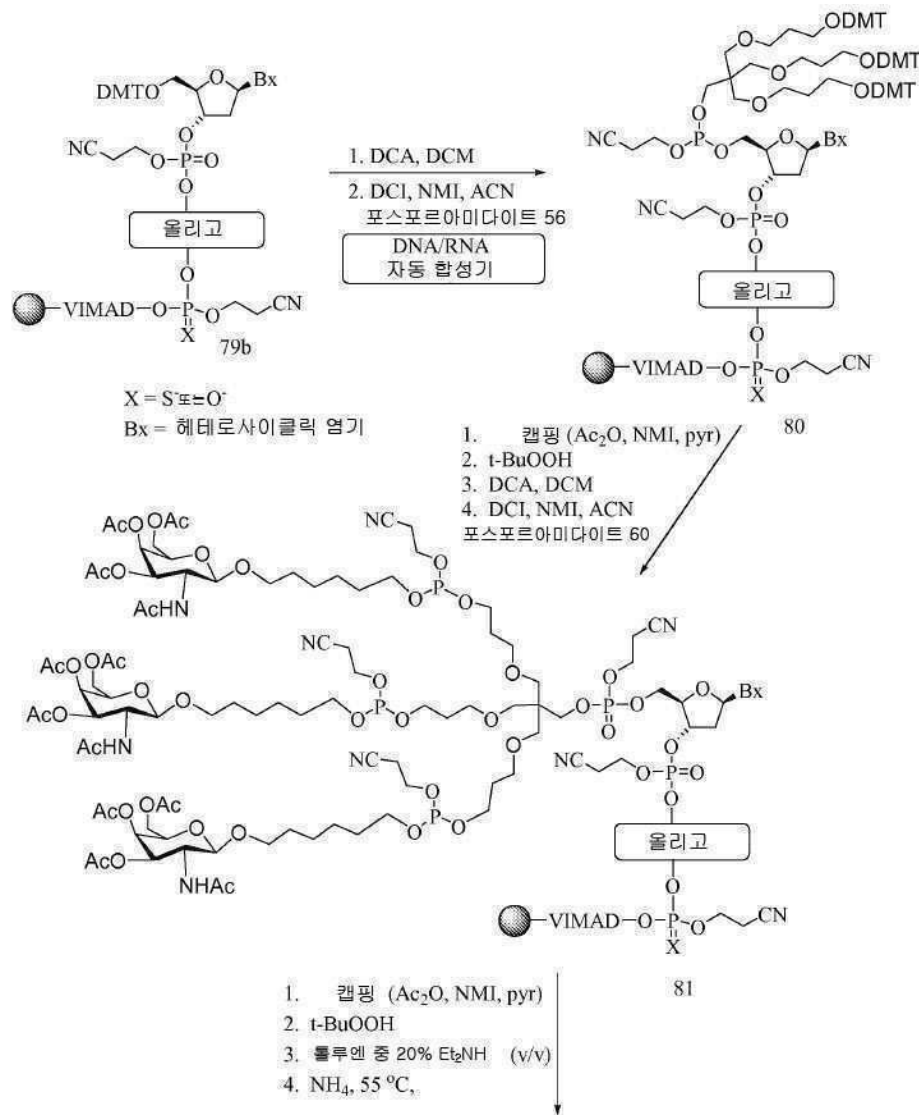
[1061] 실시예 36: 화합물 79a의 제조



[1062]

[1063] 화합물 77을 실시예 35에 예시된 과정에 따라 제조한다.

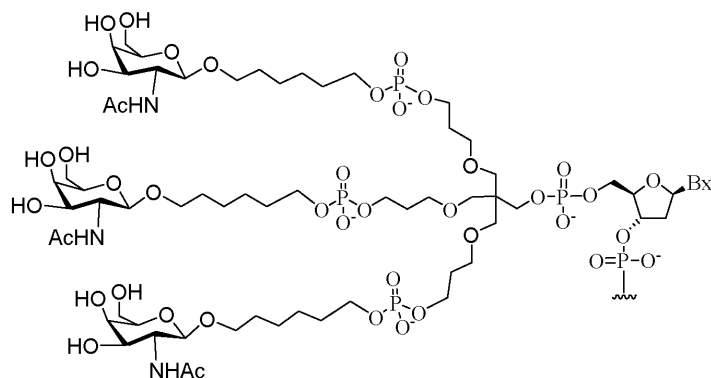
[1064] 실시예 37: 고체 지지체를 통해 5' 말단에 포스포디에스테르 연결된 GaINAc₃-2 콘주게이트를 포함하는 접합된 올리고머 화합물 82의 일반적인 제조 방법 (방법 I)



[1065]

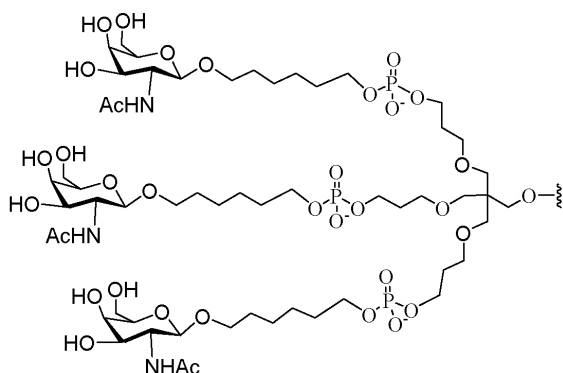
[1066]

[1067] 여기서 GalNAc₃-2는 하기 구조를 갖는다:



[1068]

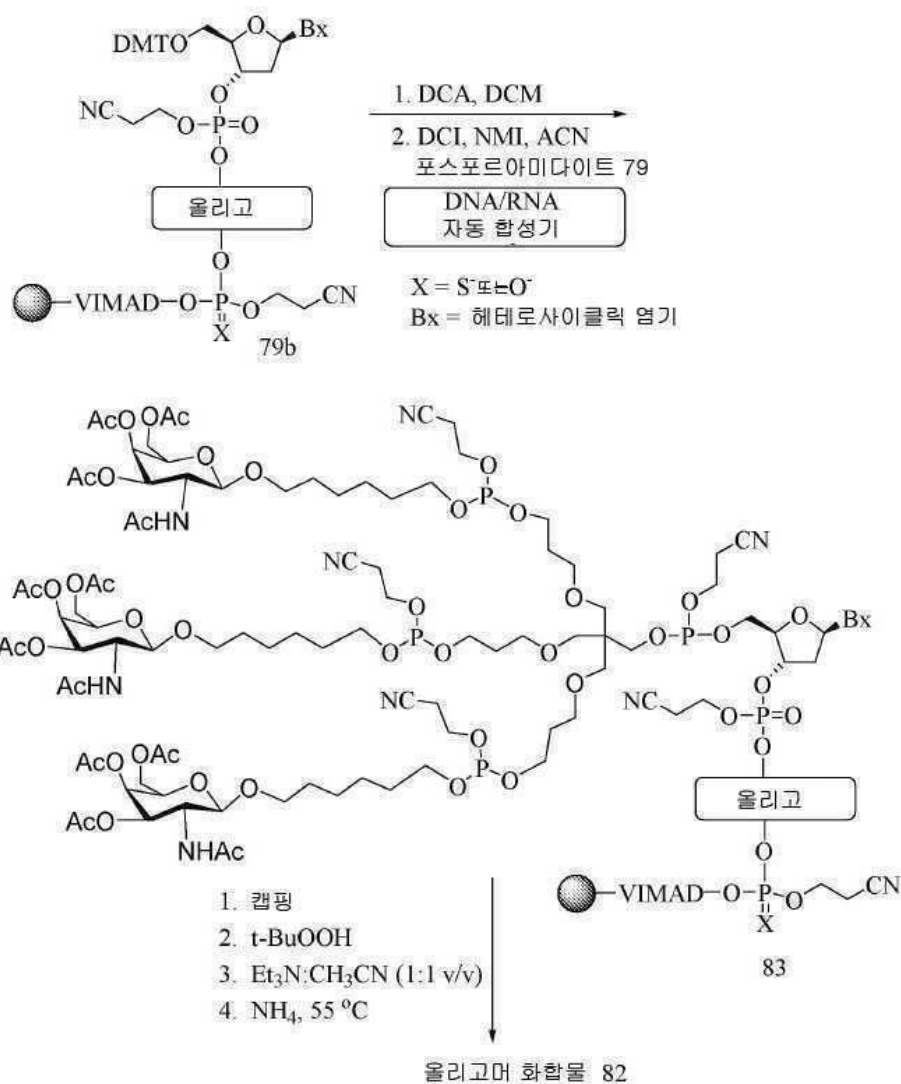
[1069] 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-2의 GalNAc₃ 클러스터 부분 (GalNAc₃-2_a)은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 여기서 GalNAc₃-2_a는 하기 식을 갖는다:



[1070]

[1071] VIMAD-결합된 올리고머 화합물 79b를 하기에 대한 표준 과정을 이용하여 제조하였다: 자동화된 DNA/RNA 합성 (Dupouy 등, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 3623-3627 참고). 포스포르아미다이트 화합물 56 및 60을 각각 실시예 27 및 28에 예시된 과정에 따라 제조하였다. 실증된 포스포르아미다이트는 대표적인 것으로 여겨지며, 5' 말단에 포스포디에스테르 연결된 콘주게이트 그룹을 갖는 올리고머 화합물을 제조하는데 사용될 수 있는 본 명세서에서 제공된 것들을 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 포스포르아미다이트 빌딩 블록으로 한정되는 것으로 의도되지 않는다. 고체 지지체에 부가된 포스포르아미다이트의 순서 및 양은 임의의 예정된 순서 및 조성을 갖는 본원에서 기재된 올리고머 화합물을 제조하기 위해 조정될 수 있다.

[1072] 실시예 38: 5' 말단에 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 콘주게이트를 포함하는 올리고머 화합물 82의 대안적인 제조 방법 (방법 II)



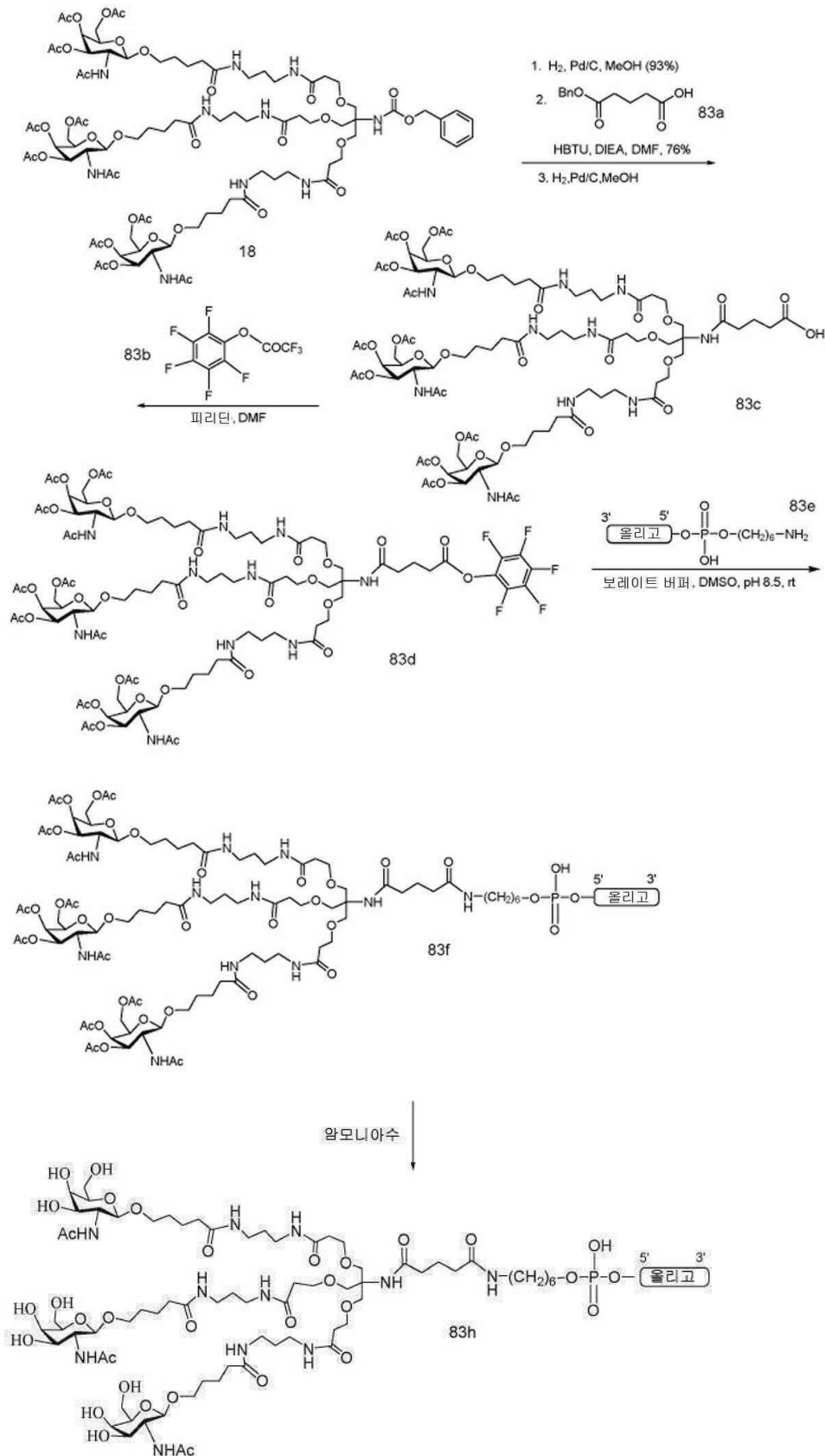
[1073]

[1074]

VIMAD-결합된 올리고머 화합물 79b를 하기에 대한 표준 과정을 이용하여 제조하였다: 자동화된 DNA/RNA 합성 (Dupouy 등, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 3623-3627 참고). GalNAc₃-2 클러스터 포스포르아미다이트인 화합물 79를 실시예 35에 예시된 과정에 따라 제조하였다. 이 대안적인 방법은 합성의 최종 단계에서 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 콘주게이트의 올리고머 화합물 79의 1-단계 설치를 허용한다. 예시된 포스포르아미다이트는 대표적인 것으로 여겨지며, 5' 말단에 포스포디에스테르 콘주게이트를 갖는 올리고머 화합물을 제조하는데 사용될 수 있는 본 명세서에서 제공된 것들을 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 포스포르아미다이트 빌딩 블록으로서 한정되는 것으로 의도되지 않는다. 고체 지지체에 부가된 포스포르아미다이트의 순서 및 양은 임의의 예정된 순서 및 조성을 갖는 본원에서 기재된 올리고머 화합물을 제조하기 위해 조정될 수 있다.

[1075]

실시예 39: 고체 지지체를 통한 5' 말단에 (5' 말단 부착을 위해 변형된 GalNAc₃-1)GalNAc₃-3 콘주게이트를 포함하는 올리고머 화합물 83h의 일반적인 제조 방법



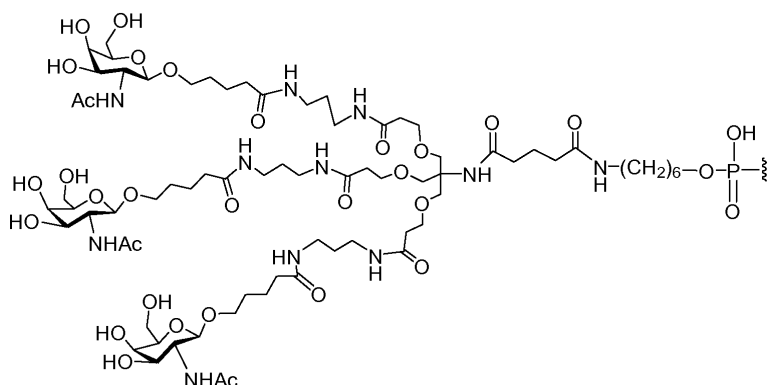
[1076]

[1077]

[1078]

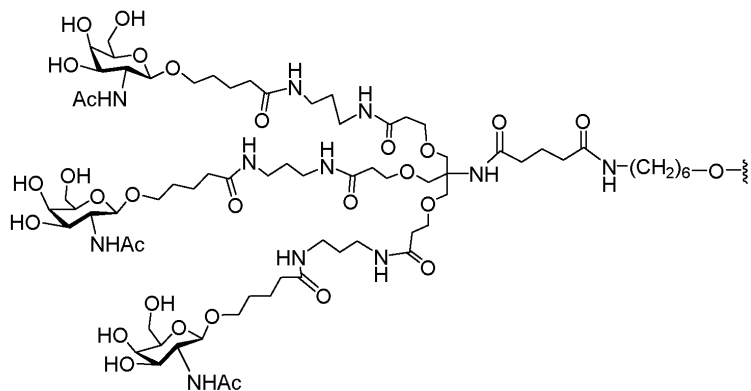
화합물 18을 실시예 4에 예시된 과정에 따라 제조하였다. 화합물 83a 및 83b는 상업적으로 이용가능하다. 포스포디에스테르 연결된 핵시아민을 포함하는 올리고머 화합물 83e를 표준 올리고뉴클레오타이드 합성 과정을 이용하여 제조하였다. 암모니아수를 이용한 상기 보호된 올리고머 화합물의 처리는 5'-GalNAc₃-3' 접합된 올리고머 화합물 (83h)을 제공하였다.

[1079] 여기서 GalNAc_3 -3는 하기 구조를 갖는다:



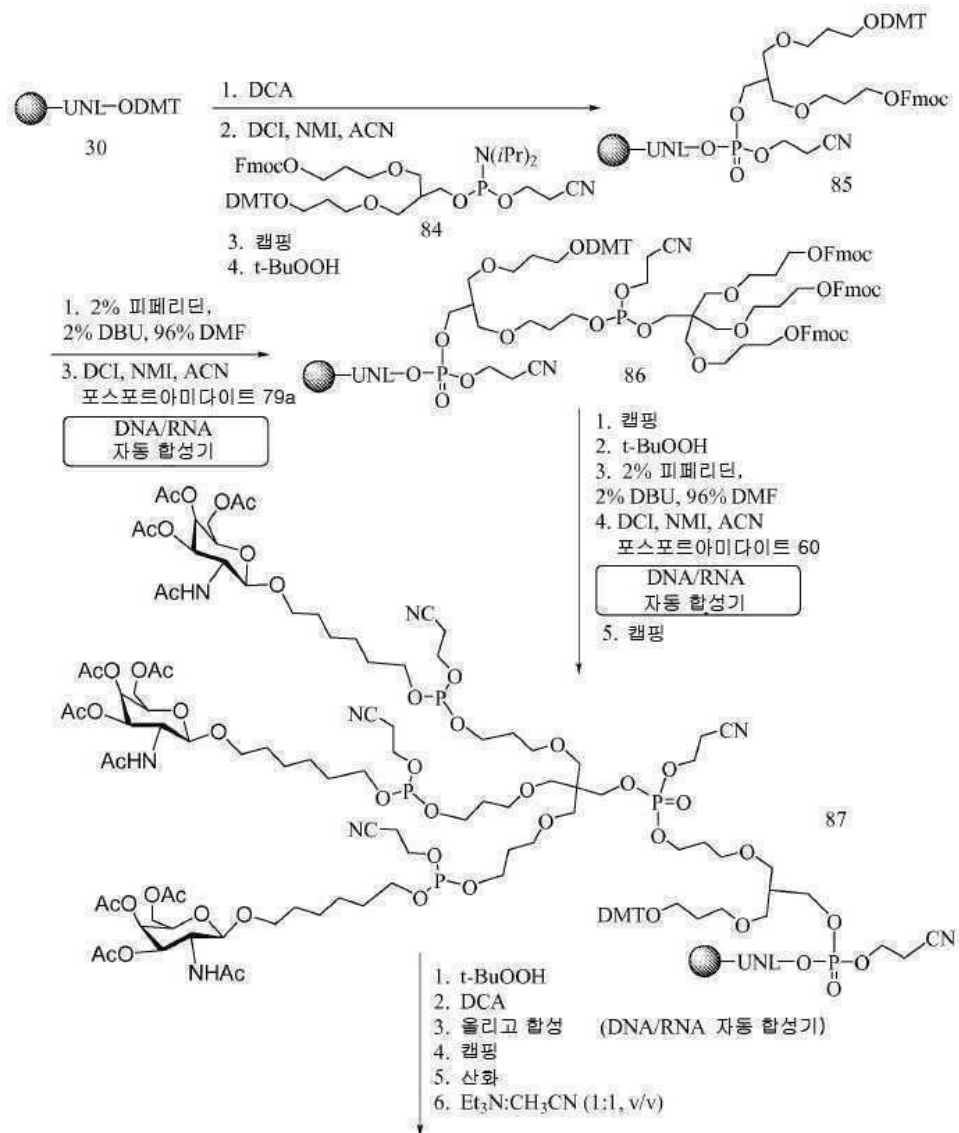
[1080]

[1081] 콘주게이트 그룹 GalNAc_3 -3의 클러스터 부분 (GalNAc_3 -3_a)은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 여기서 GalNAc_3 -3_a는 하기 식을 갖는다:

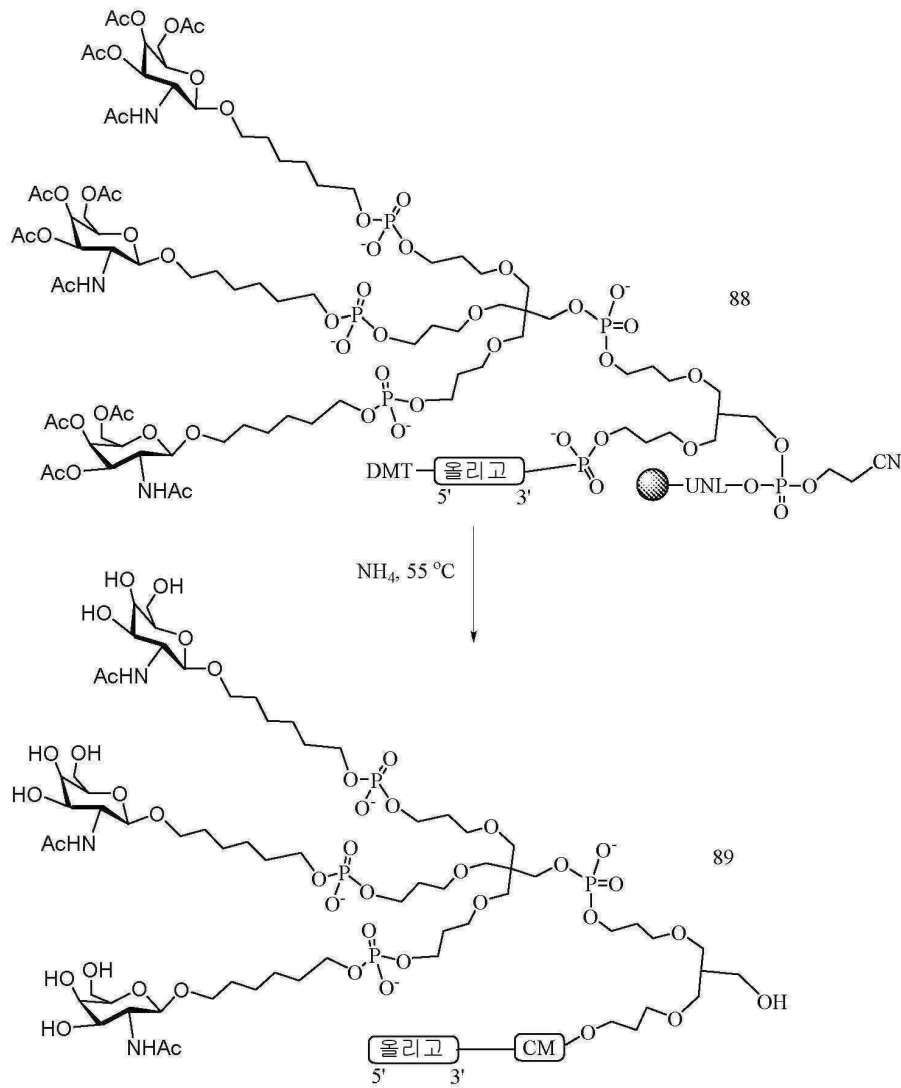


[1082]

[1083] 실시예 40: 고체 지지체를 통한포스포디에스테르 연결된 GalNAc_3 -4 콘주게이트를 포함하는 올리고머 화합물 89의 일반적인 제조 방법



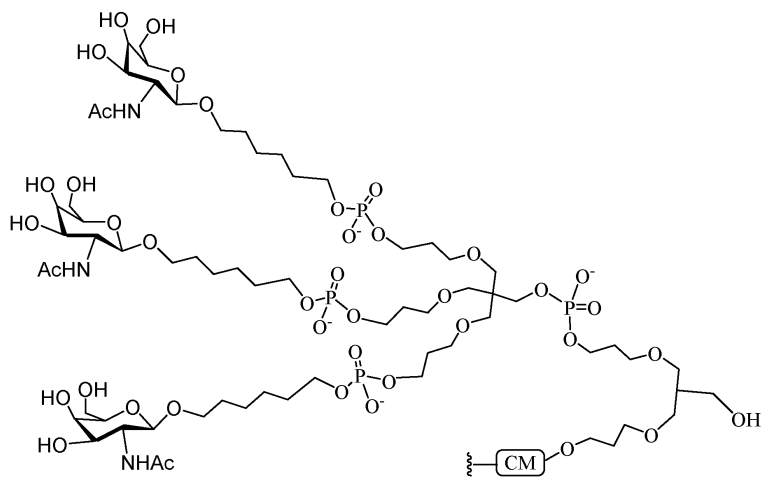
[1084]



[1085]

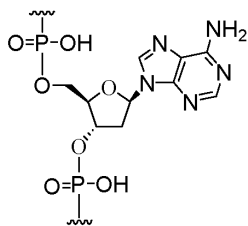
[1086]

여기서 GalNAc₃-4는 하기 구조를 갖는다:



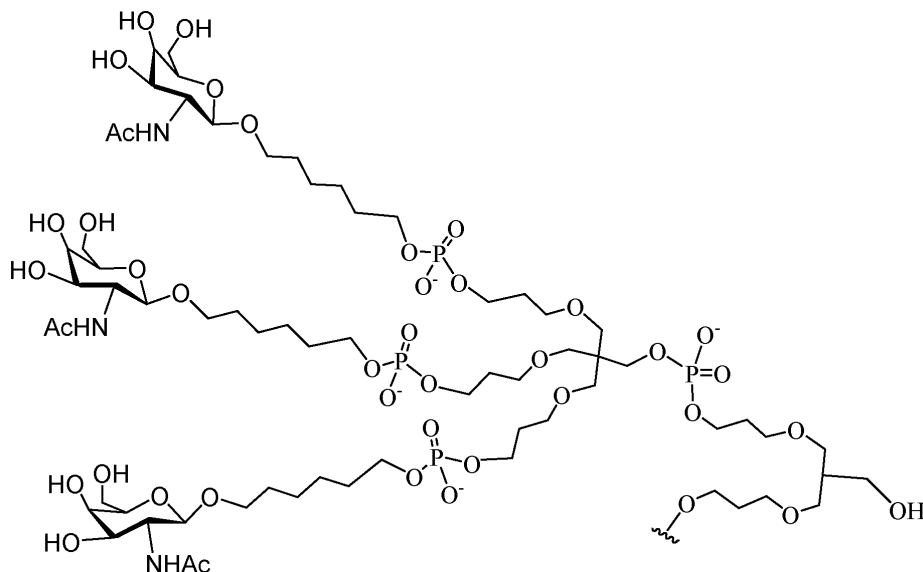
[1087]

[1088] 여기서 CM은 절단가능 모이어티이다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 아래와 같다:



[1089]

[1090] 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-4의 클러스트 부분 (GalNAc₃-4_a)은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 여기서 GalNAc₃-4_a는 하기 식을 갖는다:



[1091]

[1092] 보호된 Unylinker 관능화된 고체 지지체 화합물 30은 상업적으로 이용가능하다. 화합물 84는 문헌에 의해 보고된 것과 유사한 과정을 이용하여 제조된다: (Shchepinov 등, Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4447-4454; Shchepinov 등, Nucleic Acids Research, 1999, 27, 3035-3041; 및 Horner 등, Nucleic Acids Research, 1997, 25, 4842-4849 참고).

[1093] 포스포르아미다이트 빌딩 블록, 화합물 60 및 79a를 실시예 28 및 36에 예시된 과정에 따라 제조한다. 예시된 포스포르아미다이트는 대표적인 것으로 여겨지며, 예정된 순서 및 조성으로 3' 말단에 포스포디에스테르 연결된 콘주게이트를 갖는 올리고머 화합물을 제조하는데 사용될 수 있는 다른 포스포르아미다이트 빌딩 블록로서 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 고체 지지체에 부가된 포스포르아미다이트의 순서 및 양은 임의의 예정된 순서 및 조성을 갖는 본원에서 기재된 올리고머 화합물을 제조하기 위해 조정될 수 있다.

[1094] 실시예 41: 고체상 기술을 통해 5' 위치에 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 (실시예 37 참고, Bx는 아데닌임) 콘주게이트를 포함하는 ASO의 일반적인 제조 방법(ISIS 661134의 제조)

[1095] 달리 언급되지 않으면, 올리고머 화합물의 합성을 위해 사용된 모든 시약 및 용액은 상업적 공급원으로부터 구매된다. 표준 포스포르아미다이트 빌딩 블록 및 고체 지지체는, 예를 들면 T, A, G, 및 ¹⁸C 잔기를 포함하는 뉴클레오사이드 잔기의 혼입을 위해 사용된다. 사용된 포스포르아미다이트 화합물 56 및 60을 5' 말단에 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 콘주게이트를 합성하기 위해 사용하였다. 무수 아세트니트릴 중의 포스포르아미다이트의 0.1 M 용액을 b-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드 및 2'-MOE에 사용하였다.

[1096] ASO 합성을 칼럼 내에 패킹된 VIMAD 고체 지지체 (110 μmol/g, Guzaev 등, 2003) 상의 포스포르아미다이트 커플링 방법에 의해 ABI 394 합성기 (1-2 μmol 크기) 또는 GE Healthcare Bioscience ÄKTA 올리고파일럿 합성기 (40-200 μmol 크기) 상에서 수행하였다. 커플링 단계의 경우, 포스포르아미다이트를 고체 지지체의 초기 로딩에 대해 4배 과량으로 전달하였고, 포스포르아미다이트 커플링을 10분 동안 수행하였다. 다른 모든 단계들은

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

[1097] 원하는 서열이 조립된 후, 시아노에틸 포스페이트 보호 그룹을 45분의 접촉 시간으로 톨루엔 (v/v) 중의 20% 디에틸아민을 이용하여 탈보호시켰다. 상기 고체-지지체 결합된 ASO를 암모니아수 (28-30 중량 %)에 현탁시키고 55 °C에서 6시간 동안 가열하였다.

[1098] 그리고 나서, 미결합된 ASO를 여과하고 암모니아를 가열로 제거하였다. 잔류물을 강한 음이온 교환 칼럼 상에서 고압 액체 크로마토그래피에 의해 정제하였다(GE Healthcare Bioscience, Source 30Q, 30 μm, 2.54 x 8 cm, A = 30% 수성 CH₃CN 중의 100 mM 암모늄 아세테이트, B = A 중의 1.5 M NaBr, 60분에 0-40%의 B, 유량 14 mL min⁻¹, λ = 260 nm). 잔류물을 역상 칼럼 상의 HPLC에 의해 탈염하여, 고체 지지체 상의 초기 로딩을 기준으로 15-30%의 단리된 수율로 원하는 ASO를 얻었다. ASO를 Agilent 1100 MSD 시스템을 갖는 이온-쌍-HPLC 커플링된 MS 분석에 의해 규명하였다.

[1099] 표 21

[1100] SRB-1를 표적화하는 5' 위치에포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 콘주게이트를 포함하는 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	계산된 질량	관찰된 질량	서열번호
661134	GalNAc₃-2_a-o^mA_{ds}T_{ks}^mC_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	6482.2	6481.6	26

[1101]

[1102] 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "k"는 6'-(S)-CH₃ 바이사이클릭 뉴클레오사이드 (예를 들면 cEt)를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 상첨자 "m"은 5-메틸시토신을 나타낸다. GalNAc₃-2_a의 구조가 실시예 37에 나타나 있다.

[1103] 실시예 42: 고체상 기술을 통해5' 위치에 GalNAc₃-3 콘주게이트를 포함하는 ASO의 일반적인 제조 방법(ISIS 661166의 제조)

[1104] ISIS 661166을 위한 합성을 실시예 39 및 41에 예시된 것과 유사한 과정을 이용하여 수행하였다.

[1105] ISIS 661166은 5-10-5 MOE 갭머이며, 상기 5' 위치는 GalNAc₃-3 콘주게이트를 포함한다. ASO를 Agilent 1100 MSD 시스템을 갖는이온-쌍-HPLC 커플링된 MS 분석에 의해 규명하였다.

[1106] 표 21a

[1107] Malat-1을 표적화하는 핵실아미노포스포디에스테르 연결을 통한 5' 위치에 GalNAc₃-3

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	콘주게이트	계산된 질량	관찰된 질량	서열번호
661166	5'-GalNAc₃-3_a-o^mC_{es}G_{es}G_{es}T_{es}G_{es} ^m C _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{es} A _{es} A _{es} T _{es} T _e	5'-GalNAc₃-3	8992.16	8990.51	27

[1108]

[1109] 콘주게이트를 포함하는 ASO

[1110] 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 상첨자 "m"은 5-메틸시토신을 나

타낸다. "5'-GalNAc₃-3a"의 구조가 실시예 39에 나타나 있다.

[1111] 실시예 43: 생체내에서SRB-1을 표적화하는 5' 말단에서의 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 (실시예 37 및 41 참고, Bx는 아데닌임)의 용량-의존적 연구

[1112] 5' 말단에포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 콘주게이트를 포함하는 ISIS 661134 (실시예 41 참고)를 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제를 위해 용량-의존적 연구에서 시험하였다. 비접합된 ISIS 440762 및 651900 (3' 말단에 GalNAc₃-1 콘주게이트, 실시예 9 참고)을비교를 위해 연구에 포함시켰고, 이들은 앞서 표 4에 기재되어 있다.

[1113] 처리

[1114] 6 주령 수컷 Balb/c 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 ISIS 440762, 651900, 661134 또는 PBS 처리된 대조군으로하기 제시된 복용량으로 피하로 1회 주입하였다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 간 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). SRB-1 mRNA 수준을 PBS-처리된 대조군에 대해 정규화하기 전에 총 RNA에 대해 결정하였다(리보그린을 이용하여). 아래의 결과는 PBS-처리된 대조군에 대해 정규화된, 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 제시되며, "PBS %"로서 표시된다. ED₅₀을 이전에 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여 측정하였고 하기에 제시되어 있다.

[1115] 표 22에 예시된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 처리는 SRB-1 mRNA 수준을 용량-의존적 방식으로 낮추었다. 사실상, 5' 말단에포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 콘주게이트를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 661134) 또는 3' 말단에 연결된 GalNAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 651900)는 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 440762)와 비교하여 실질적인 효능 개선을 나타내었다. 게다가, 5' 말단에 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 콘주게이트를 포함하는 ISIS 661134는 3' 말단에 GalNAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 ISIS 651900과 비교하여 효능이 동등하였다.

[1116] 표 22

[1117] SRB-1을 표적화하는 GalNAc₃-1 또는 GalNAc₃-2를 포함하는 ASO

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA 수준 (% PBS)	ED ₅₀ (mg/kg)	콘주게이트	서열번호
PBS	0	100	--	--	
440762	0.2	116	2.58	콘주게이트 없음	22
	0.7	91			
	2	69			
	7	22			
	20	5			
651900	0.07	95	0.26	3' GalNAc ₃ -1	23
	0.2	77			
	0.7	28			
	2	11			
	7	8			
661134	0.07	107	0.25	5' GalNAc ₃ -2	26
	0.2	86			
	0.7	28			
	2	10			
	7	6			

[1118]

[1119] 3' GalNAc₃-1 및 5' GalNAc₃-2에 대한 구조는 실시예 9 및 37에 앞서 기술되었다.

[1120] 약동학 분석 (PK)

[1121] 고용량 그룹 (7 mg/kg)으로부터의 ASO의 PK를 조사하고 실시예 20에 예시된것과 동일한 방식으로 평가하였다. 간 샘플을 갖고 표준 프로토콜을 사용하여 추출하였다. 661134 (5' GalNAc₃-2) 및 ISIS 651900 (3' GalNAc₃-1)의 전장 대사물을 확인하고 이들의 질량을 고분해능 질량 분광분석법 분석에 의해 확인하였다. 상기 결과는 5' 말단에포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-2 콘주게이트를 포함하는 ASO (ISIS 661134)에 대해 검출된 주요 대사물이 ISIS 440762였음을 보여주었다 (테이타 도시되지 않음). 검출가능한 수준에서 추가의 대사물이 관찰되지 않았다. 그의 대응물과 달리, 표 10a에서 이전에 보고된 것과 유사한 추가의 대사물이 3' 말단에 GalNAc₃-1 콘주게이트를 갖는 ASO에 대해 관찰되었다(ISIS 651900). 이들 결과는, 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-1 또는 GalNAc₃-2콘주게이트를 갖는 것이 그것의 효능을없애지 않고 ASO의 PK 프로파일을 개선할 수 있음을 제시한다.

[1122] 실시예 44: SRB-1을 표적화하는 3' 말단에 GalNAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 ASO (실시예 9 참고)의 안티센스 억제에 대한 PO/PS 연결의 효과

[1123] 각각 SRB-1을 표적화하는 3' 말단에 GalNAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 ISIS 655861 및 655862를 대상으로 단일 투여 연구에서 마우스에서 SRB-1을 억제하는 이들의 능력을 시험하였다. 모 비접합된 화합물인 ISIS 353382를 비교를 위해 연구에 포함시켰다.

[1124] ASO는 5-10-5 MOE 겐미이며, 상기 겐 영역은10개의 2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 포함하고 각 윙 영역은 5개의 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. ASO를 실시예 19에서 앞서 예시된 것과 유사한 방법을 이용하여 제조하였고 이는 하기 표 23에 기술되어 있다.

[1125] 표 23

[1126] SRB-1를 표적화하는 3' 말단에 GalNAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	화학	서열번호
353382 (모)	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	전체 PS 콘주게이트 없음	28
655861	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} - GalNAc₃-1_a	GalNAc₃-1 콘주게이트를 갖는 전체 PS	29
655862	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} - GalNAc₃-1_a	GalNAc₃-1 콘주게이트를 갖는 혼합된 PS/PO	29

[1127]

[1128] 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 상첨자 "m"은 5-메틸시토신을 나타낸다. "GalNAc₃-1"의 구조가 실시예 9에 나타나 있다.

[1129] 처리

[1130] 6 주령 수컷 Balb/c 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 ISIS 353382, 655861, 655862 또는 PBS 처리된 대조군으로 하기에 제시된 복용량으로 피하로 1회 주입하였다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 처리 전에 뿐만 아니라 마지막 용량 후에, 혈액을 각 마우스로부터 채혈하고 혈장 샘플을 분석하였다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 간 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). SRB-1 mRNA 수준을 PBS-처리된 대조군에 대해 정규화하기 전에 총 RNA에 대해 결정하였다(리보그린을 이용하여). 아래의 결과는 PBS-처리된 대조군에 정규화된, 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 제시되어 있고, "PBS %"로서 표시되어 있다. ED₅₀을 이전에 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여 측정하였고, 하기에 보고되어 있다.

[1131] 표 24에서 예시된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 처리는 PBS 처리된 대조군과 비교하여 용량-의존 방식으로 SRB-1 mRNA 수준을 낮추었다. 사실상, 3' 말단에 GalNAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 655861 및 655862)는 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 353382)와 비교하여 실질적인 효능 개선을 나타내었다. 게다가, 혼합된 PS/PO 연결을 갖는 ISIS 655862는전체 PS (ISIS 655861)와 비교하여 효능 개선을 나타내었다.

[1132] 표 24

[1133] SRB-1을 표적화하는 3' 말단에 GalNAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 ASO의 안티센스 억제에 대한 PO/PS 연결의 효과

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA 수준 (% PBS)	ED ₅₀ (mg/kg)	화학	서열번호
PBS	0	100	--	--	
353382 (모)	3	76.65	10.4	콘주게이트 없는 전체 PS	28
	10	52.40			
	30	24.95			
655861	0.5	81.22	2.2	GalNAc ₃ -1 콘주게이트를 갖는 전체 PS	29
	1.5	63.51			
	5	24.61			
	15	14.80			
655862	0.5	69.57	1.3	GalNAc ₃ -1 콘주게이트를 갖는 혼합된 PS/PO	29
	1.5	45.78			
	5	19.70			
	15	12.90			

[1134]

[1135]

혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다. 장기 중량을 또한 평가하였다. 상기 결과는 PBS 대조군과 비교하여 ASO 처리된 마우스에서 아미노기전달효소 수준 (표 25) 또는 장기 중량 (데이터 도시되지 않음)의 상승이 관찰되지 않았음을 입증하였다 (데이터 도시되지 않음). 게다가, 혼합된 PS/PO 연결을 갖는 ASO (ISIS 655862)는 전체 PS (ISIS 655861)와 비교하여 유사한 아미노기전달효소 수준을 나타내었다.

[1136]

표 25

[1137]

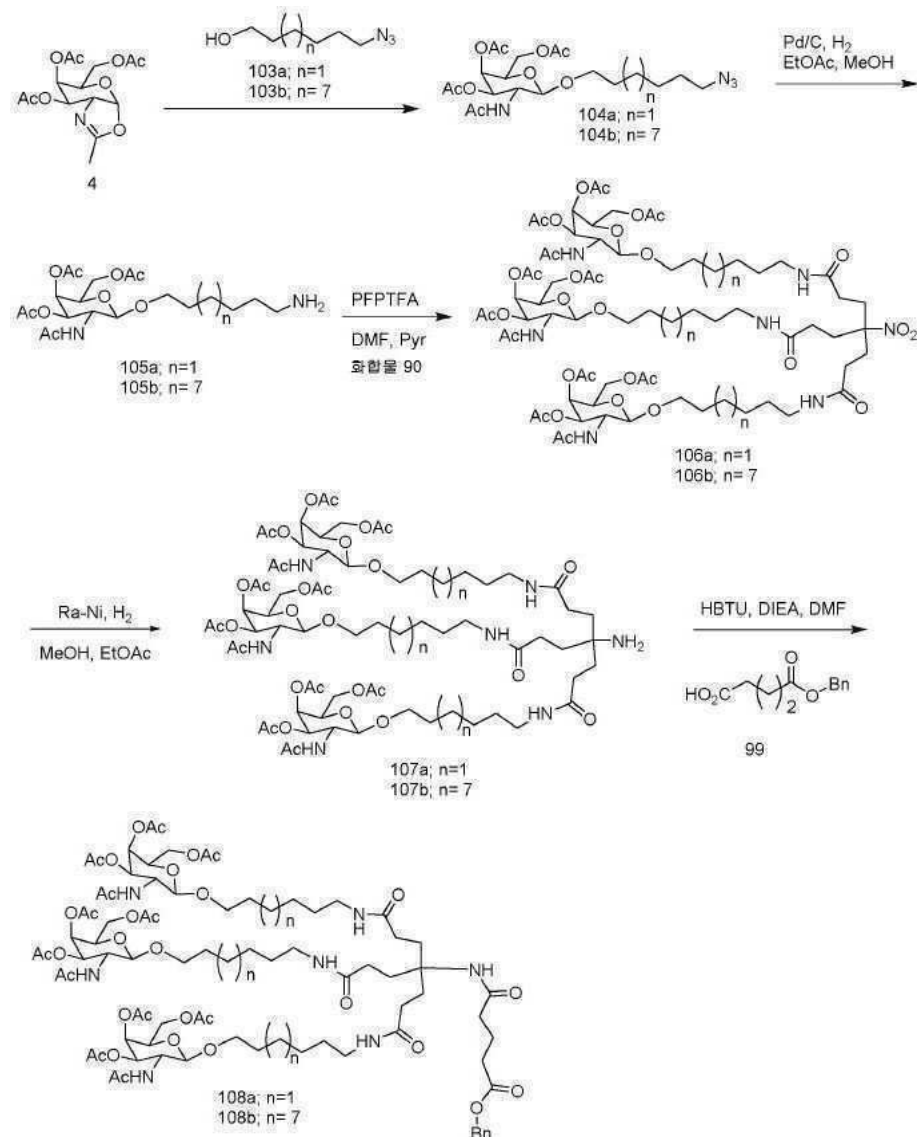
SRB-1를 표적화하는 3' 말단에 GalNAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 ASO의 아미노기전달효소 수준에 대한 PO/PS 연결의 효과

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

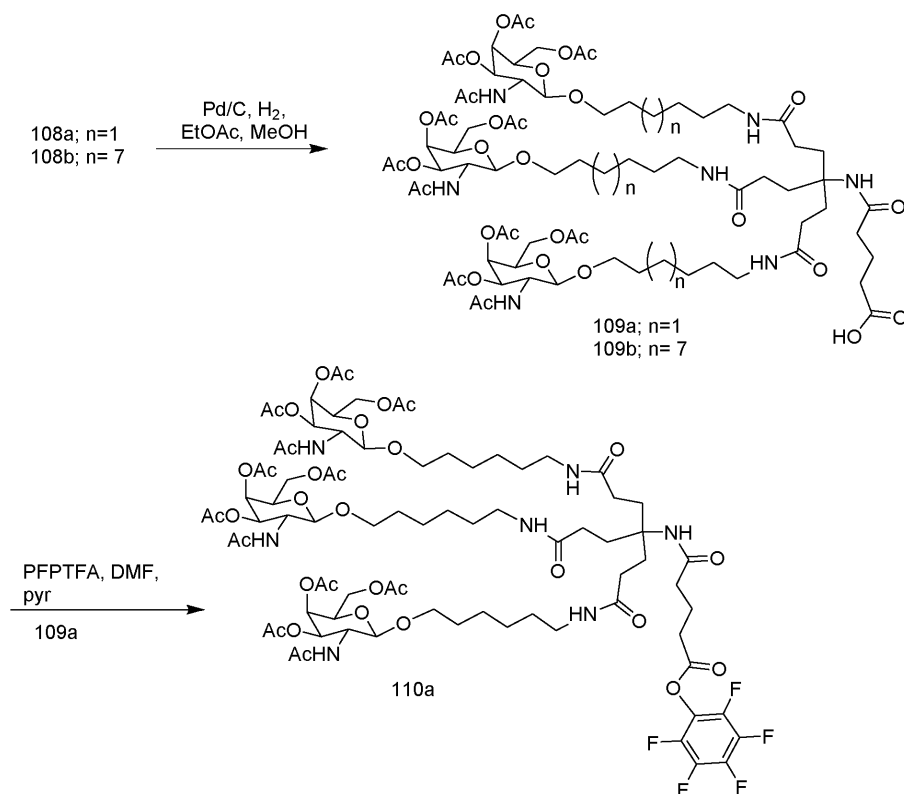
[1138]

[1139]

실시예 45: PFP 에스테르, 화합물 110a의 제조



[1140]



[1141]

[1142]

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

[1143]

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

[1144]

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

[1145]

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

[1146]

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

[1147]

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

[1148]

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

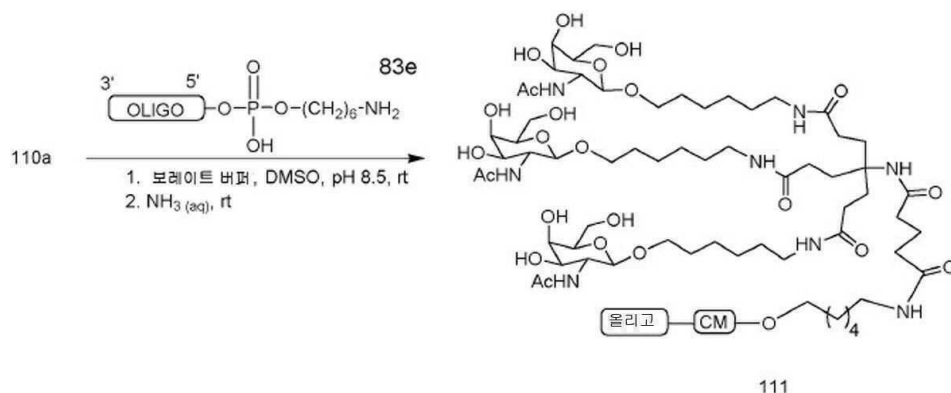
[1149]

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

[1150]

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

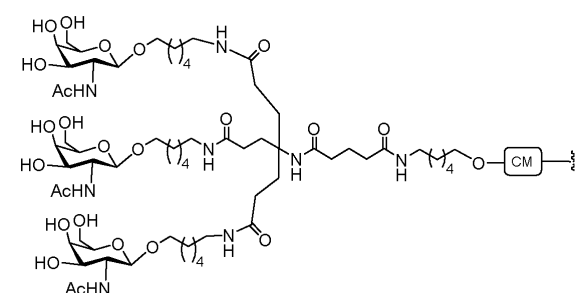
실온에서 약 16시간 혼합 후 완료하였다. 수득한 용액을 12 mL의 물로 희석한 다음 스펀 필터에서 3000 Da의 질량 컷 오프로 3000 rpm으로 스핀다운하였다. 이 과정을 2회 반복하여 소분자 불순물을 제거하였다. 그 다음 용액을 동결건조하고 농축된 암모니아수에서 재용해하고 실온에서 2.5시간 동안 혼합한 다음 진공에서 농축하여 대부분의 암모니아를 제거하였다. 접합된 올리고뉴클레오타이드를 정제하고 RP-HPLC로 탈염하고 동결건조하여 GalNAc₃ 접합된 올리고뉴클레오타이드를 제공하였다.



[1151]

[1152]

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



[1153]

[1154]

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

[1155]

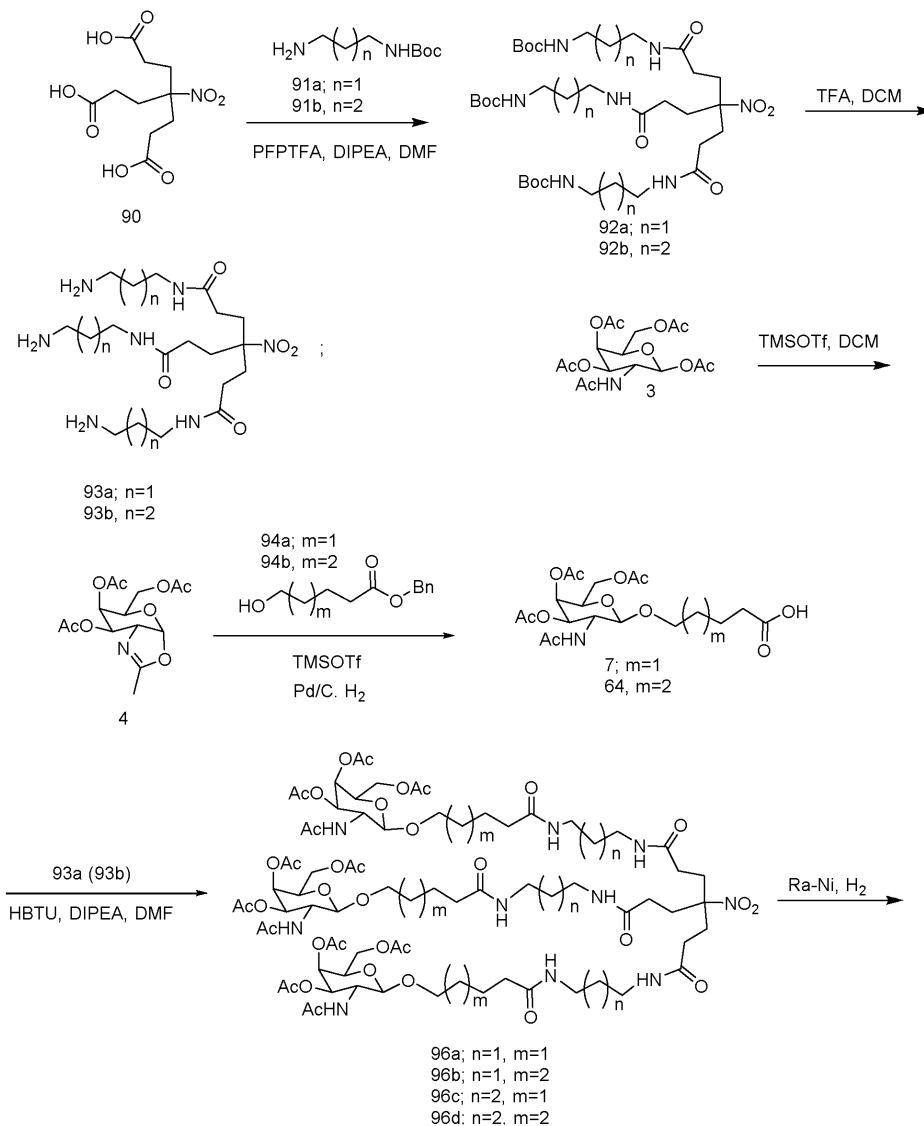
GalNAc₃-10 접합된 올리고뉴클레오타이드

ASO	서열 (5' to 3')	5' 그룹	서열번호
ISIS 660254	NH ₂ (CH ₂) ₆ -o-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} m ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	핵실아민	30
ISIS 666881	GalNAc₃-10a -o-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} m ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc₃-10	30

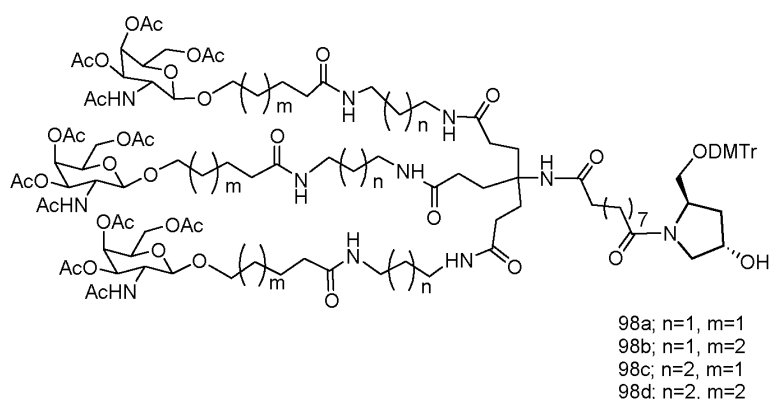
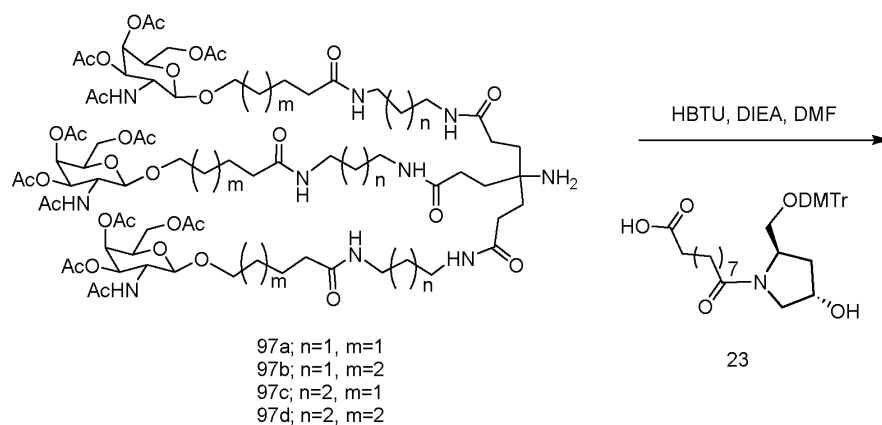
[1156]

[1157] 대문자는 각 뉴클레오사이드에 대한 핵염기를 나타내고 "C"는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오 에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)를 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

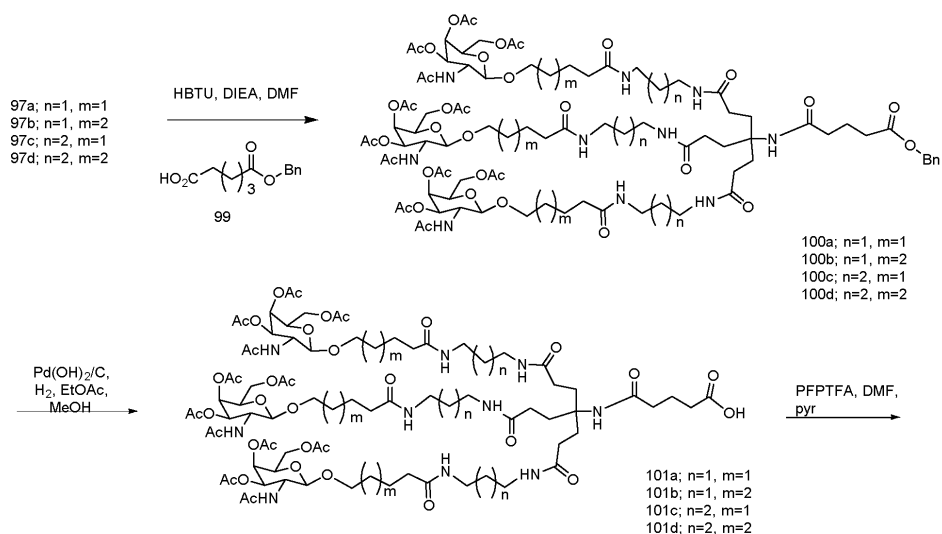
[1158] 실시예 47: GalNAc₃-8을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 102의 제조



[1159]



[1160]



[1161]

[1162]

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

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

[1163] 화합물 92a 또는 92b (6.7 mmol)를 20 mL의 디클로로메탄 및 20 mL의 트리플루오로아세트산으로 실온에서 16시간 동안 처리하였다. 얻어진 용액을 증발시킨 다음 메탄올에 용해시키고 DOWEX-OH 수지로 30분 동안 처리하였다. 얻어진 용액을 여과하고 오일 감압 하에서 환원하여 화합물 93a 및 93b를 85-90% 수율로 얻었다.

[1164] 화합물 7 또는 64 (9.6 mmol)를 DMF (20 mL) 중의 HBTU (3.7g, 9.6 mmol) 및 N, N-디이소프로필에틸아민 (5 mL)로 15분 동안 처리하였다. 여기에 화합물 93a 또는 93b (3 mmol) 중 하나를 첨가하고, 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 이때, DMF를 >75% 감압 하에서 환원시킨 다음 상기 혼합물을 디클로로메탄에 용해시켰다. 유기층을 중탄산나트륨, 물 및 염수로 세정하였다. 그 다음 유기층을 분리하고 황산나트륨 상에서 건조하고, 여과하고 오일 감압 하에서 환원시켰다. 얻어진 오일을 실리카겔 크로마토그래피 (5%-->20% 메탄올/디클로로메탄)에 의해 정제하여 화합물 96a-d를 20-40% 수율로 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

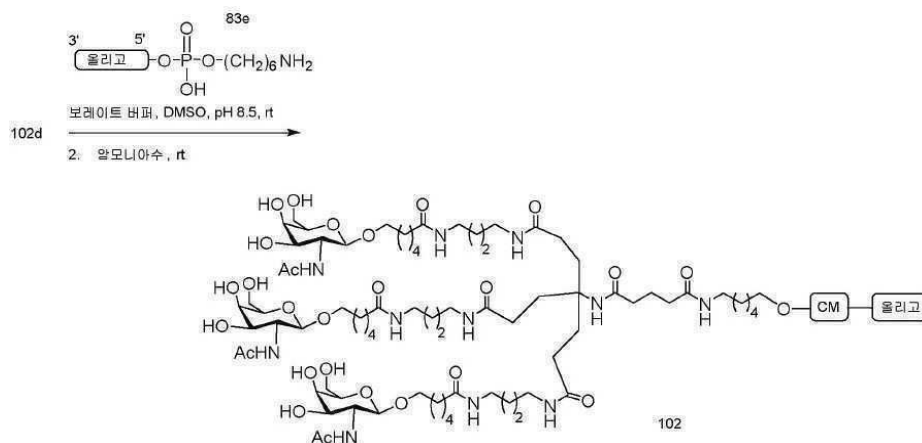
[1165] 화합물 96a-d (0.75 mmol)를 개별적으로, 에탄올 (75 mL)에서 3시간 동안 라니 니켈에 대해 수소첨가하였다. 이때, 촉매를 셀라이트를 통해 여과에 의해 제거하고, 에탄올을 감압 하에서 제거하여 화합물 97a-d를 80-90% 수율로 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

[1166] 화합물 23 (0.32g, 0.53 mmol)을 DMF (30mL) 중에서 HBTU (0.2g, 0.53 mmol) 및 N, N-디이소프로필에틸아민 (0.19 mL, 1.14 mmol)으로 15분 동안 처리하였다. 여기에 화합물 97a-d (0.38 mmol)를 개별적으로 첨가하고, 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 이때, DMF를 >75% 감압 하에서 환원시킨 다음 상기 혼합물을 디클로로메탄에 용해시켰다. 유기층을 중탄산나트륨, 물 및 염수로 세정하였다. 그 다음 유기층을 분리하고 황산나트륨 상에서 건조하고, 여과하고 오일 감압 하에서 환원시켰다. 얻어진 오일을 실리카겔 크로마토그래피 (2%-->20% 메탄올/디클로로메탄)에 의해 정제하여 화합물 98a-d를 30-40% 수율로 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

[1167] 화합물 99 (0.17g, 0.76 mmol)를 DMF (50mL) 중의 HBTU (0.29 g, 0.76 mmol) 및 N, N-디이소프로필에틸아민 (0.35 mL, 2.0 mmol)으로 15분 동안 처리하였다. 여기에 화합물 97a-d (0.51 mmol)를 개별적으로 첨가하고, 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 이때, DMF를 >75% 감압 하에서 환원시킨 다음 상기 혼합물을 디클로로메탄에 용해시켰다. 유기층을 중탄산나트륨, 물 및 염수로 세정하였다. 그 다음 유기층을 분리하고 황산나트륨 상에서 건조하고, 여과하고 오일 감압 하에서 환원시켰다. 얻어진 오일을 실리카겔 크로마토그래피 (5%-->20% 메탄올/디클로로메탄)에 의해 정제하여 화합물 100a-d를 40-60% 수율로 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

[1168] 화합물 100a-d (0.16 mmol)를 개별적으로, 메탄올/에틸 아세테이트 (1:1, 50 mL) 중에서 3시간 동안 10% Pd(OH)₂/C에 대해 수소첨가하였다. 이때, 촉매를 셀라이트를 통한 여과에 의해 제거하고, 유기물을 감압 하에서 제거하여 화합물 101a-d를 80-90% 수율로 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.

[1169] 화합물 101a-d (0.15 mmol)를 개별적으로 DMF (15 mL) 및 피리딘 (0.016 mL, 0.2 mmol)에 용해시켰다. 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트 (0.034 mL, 0.2 mmol)를 아르곤 하에서 적가하고, 반응을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 이때, DMF를 >75% 감압 하에서 환원시킨 다음 상기 혼합물을 디클로로메탄에 용해시켰다. 유기층을 중탄산나트륨, 물 및 염수로 세정하였다. 그 다음 유기층을 분리하고 황산나트륨 상에서 건조하고, 여과하고 오일 감압 하에서 환원시켰다. 얻어진 오일을 실리카겔 크로마토그래피 (2%-->5% 메탄올/디클로로메탄)에 의해 정제하여 화합물 102a-d를 약 80% 수율로 얻었다. LCMS 및 양성자 NMR은 상기 구조와 일치하였다.



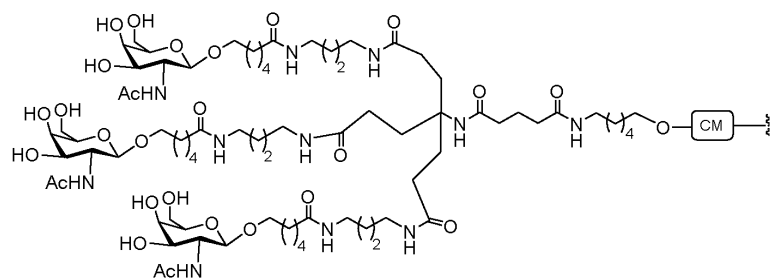
[1170]

[1171]

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

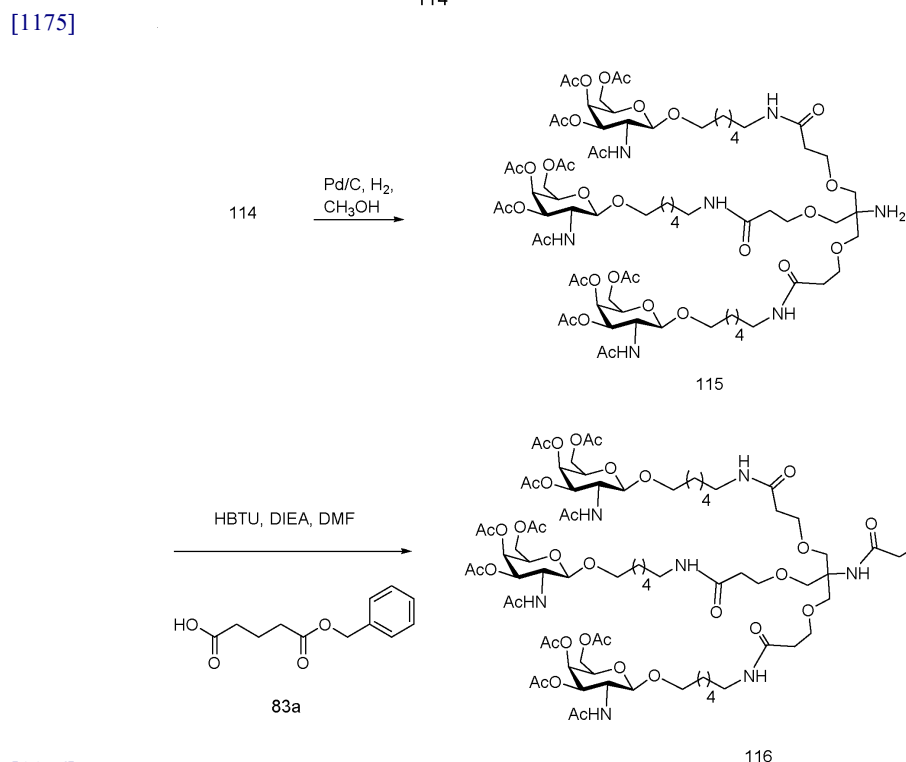
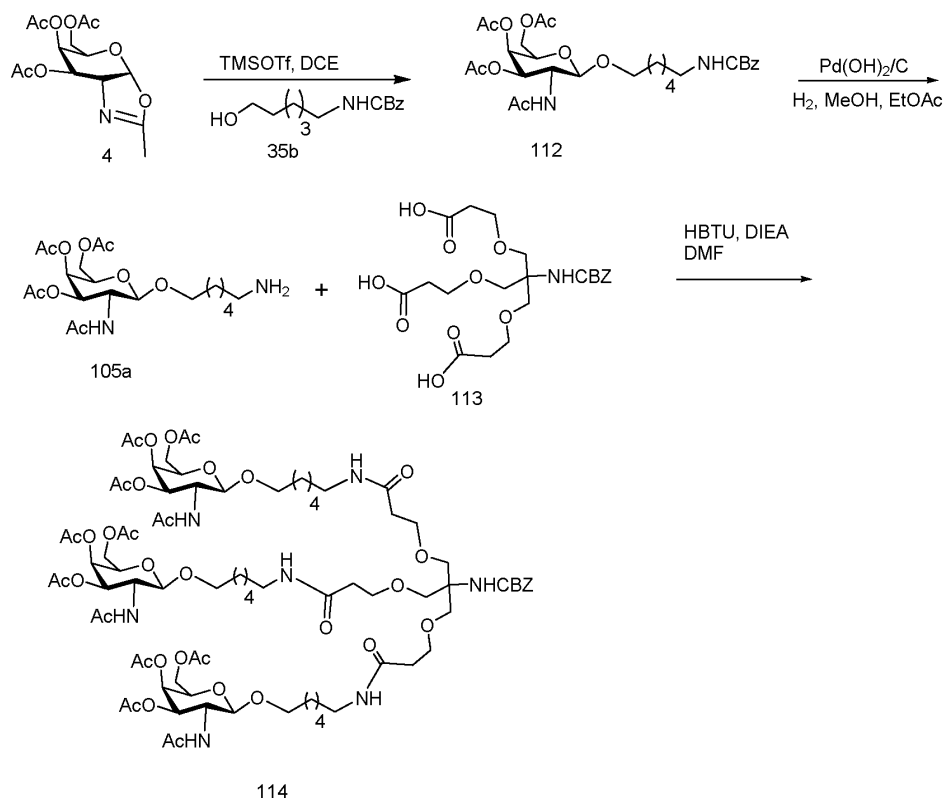
[1172]

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



[1173]

[1174] 실시예 48: GalNAc₃-7을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 119의 제조



[1176]

[1177] 화합물 112를 문헌에 기재된 과정에 따라 합성하였다: (*J. Med. Chem.* 2004, 47, 5798-5808).

[1178] 화합물 112 (5 g, 8.6 mmol)를 1:1 메탄올/에틸 아세테이트 (22 mL/22 mL)에 용해시켰다. 탄소상 수산화팔라듐 (0.5 g)을 부가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 수소 하에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트의 패드를 통해 여과하고 1:1 메탄올/에틸 아세테이트로 패드로 세정하였다. 여과물과 세정물을 조합하고 농축 건조하여 화합물 105a (정량적)를 얻었다. 상기 구조를 LCMS에 의해 확인하였다.

[1179] 화합물 113 (1.25 g, 2.7 mmol), HBTU (3.2 g, 8.4 mmol) 및 DIEA (2.8 mL, 16.2 mmol)를 무수 DMF (17 mL)

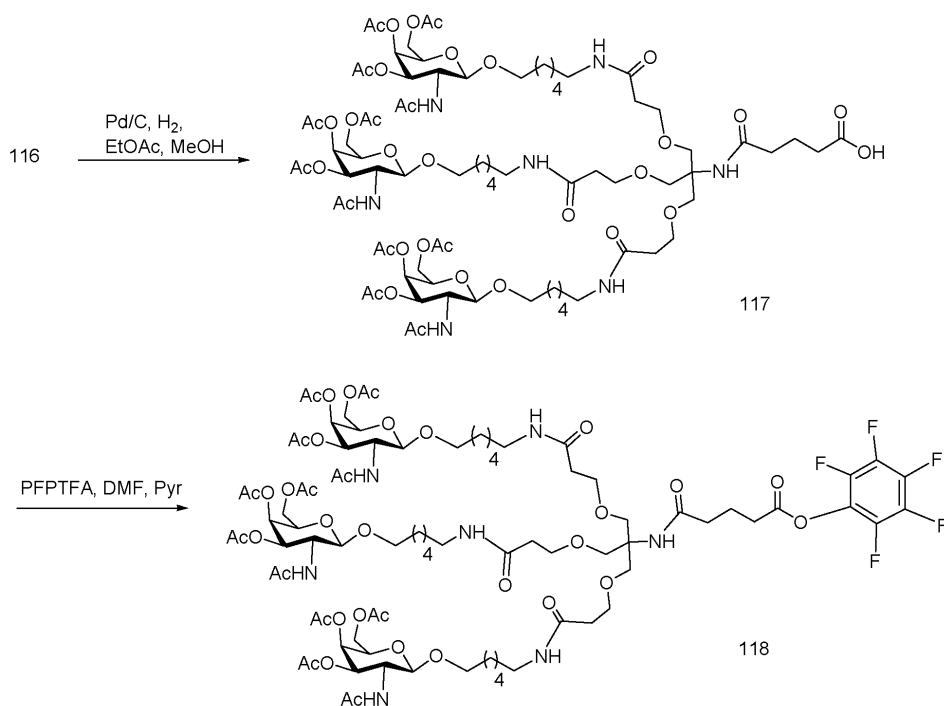
에 용해시키고 상기 반응 혼합물을 실온에서 5분 동안 교반하였다. 여기에 무수 DMF (20 mL) 중의 화합물 105a (3.77 g, 8.4 mmol)의 용액을 추가하였다. 상기 반응을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하여 오일을 얻었다. 잔류물을 CH_2Cl_2 (100 mL)에 용해시키고 수성 포화된 NaHCO_3 용액 (100 mL) 및 염수 (100 mL)로 세정하였다. 유기상을 분리하고, 건조시키고 (Na_2SO_4), 여과하고 증발시켰다. 잔류물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 디클로로메탄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

[1180]

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

[1181]

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



[1182]

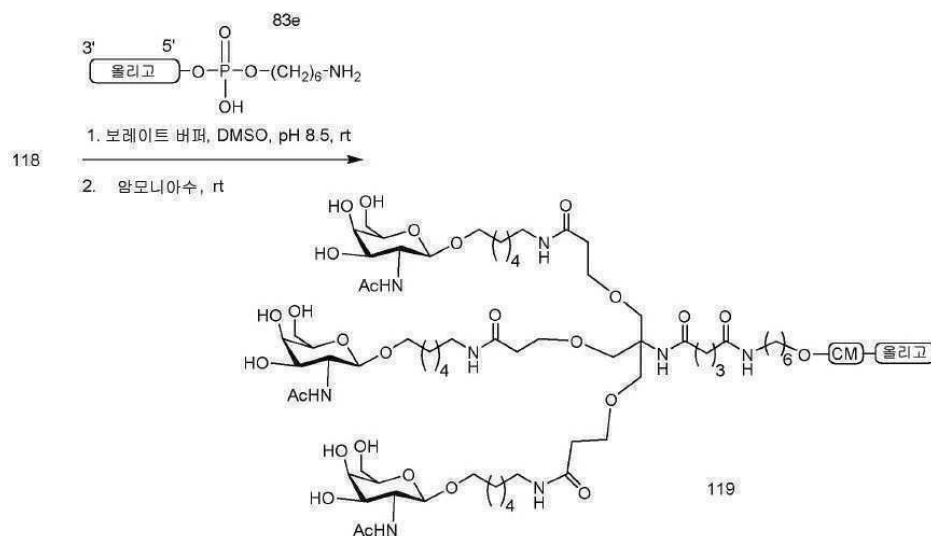
[1183]

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

[1184]

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

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



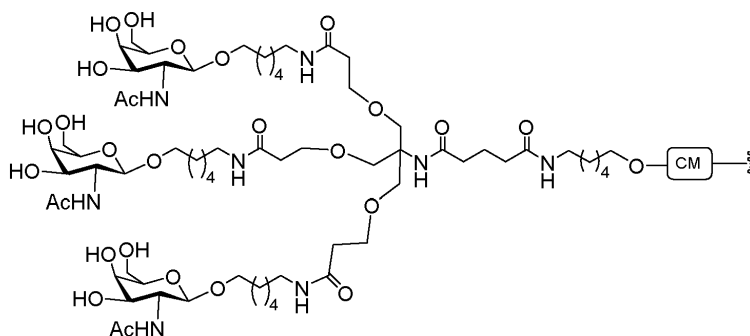
[1185]

[1186]

GalNAc₃-7 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 119를 실시예 46에 예시된 일반적인 과정을 이용하여 제조하였다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-7의 GalNAc₃클러스터 부분 (GalNAc₃-7_a)은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다.

[1187]

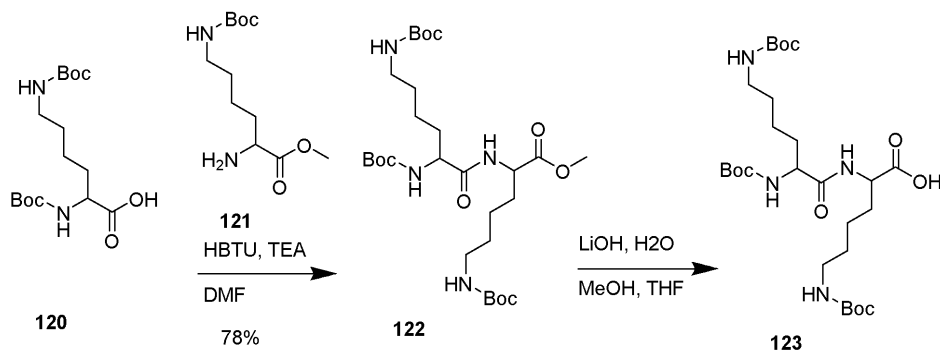
GalNAc₃-7 (GalNAc₃-7_a-CM-)의 구조가 하기에 나타나 있다:



[1188]

[1189]

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



[1190]

[1191]

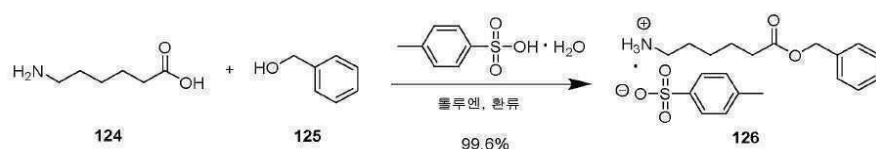
화합물 120 (14.01 g, 40 mmol) 및 HBTU (14.06 g, 37 mmol)를 무수 DMF (80 mL)에 용해시켰다. 트리에틸아민 (11.2 mL, 80.35 mmol)을 부가하고 5분 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 빙욕에서 냉각하고 무수 DMF (20 mL) 중의 화합물 121 (10 g, mmol)의 용액을 부가하였다. 추가의 트리에틸아민 (4.5 mL, 32.28 mmol)을 부가하고 반응 혼합물을 18시간 동안 아르곤 분위기 하에서 교반하였다. 반응을 TLC (에틸 아세테이트:헥산; 1:1; Rf

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

[1192]

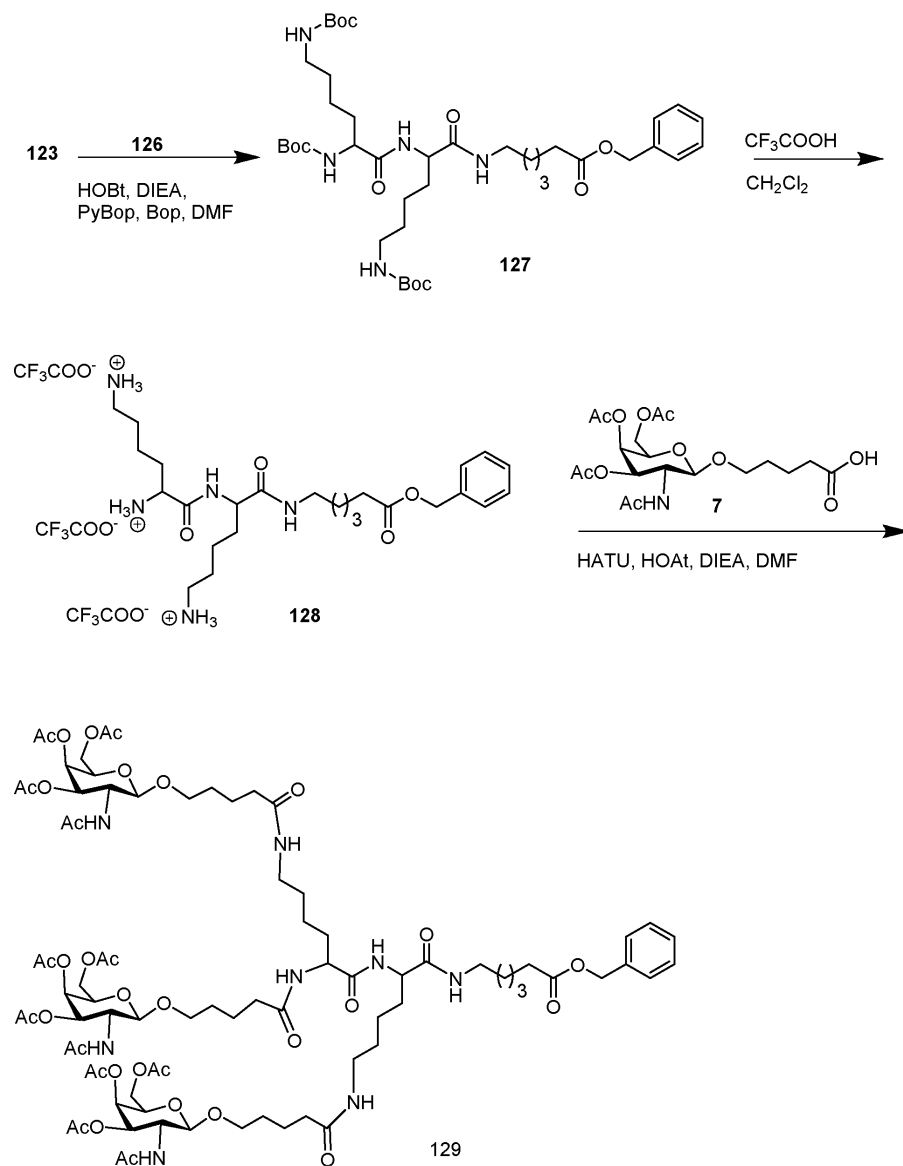
물 (20 mL) 및 THF (10 mL) 중의 LiOH (92.15 mmol)의 용액을 메탄올 (15 mL)에 용해된 화합물 122 (7.75 g, 13.16 mmol)의 냉각된 용액에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 45분 동안 교반하고 TLC (EtOAc:헥산; 1:1)로 관찰하였다. 상기 반응 혼합물을 감압 하에서 절반 용적으로 농축하였다. 남아있는 용액을 빙욕에서 냉각하고 농축된 HCl를 부가하여 중화하였다. 상기 반응 혼합물을 회석하고, EtOAc (120 mL)로 추출하고 염수 (100 mL)로 세정하였다. 에멀전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

[1193]

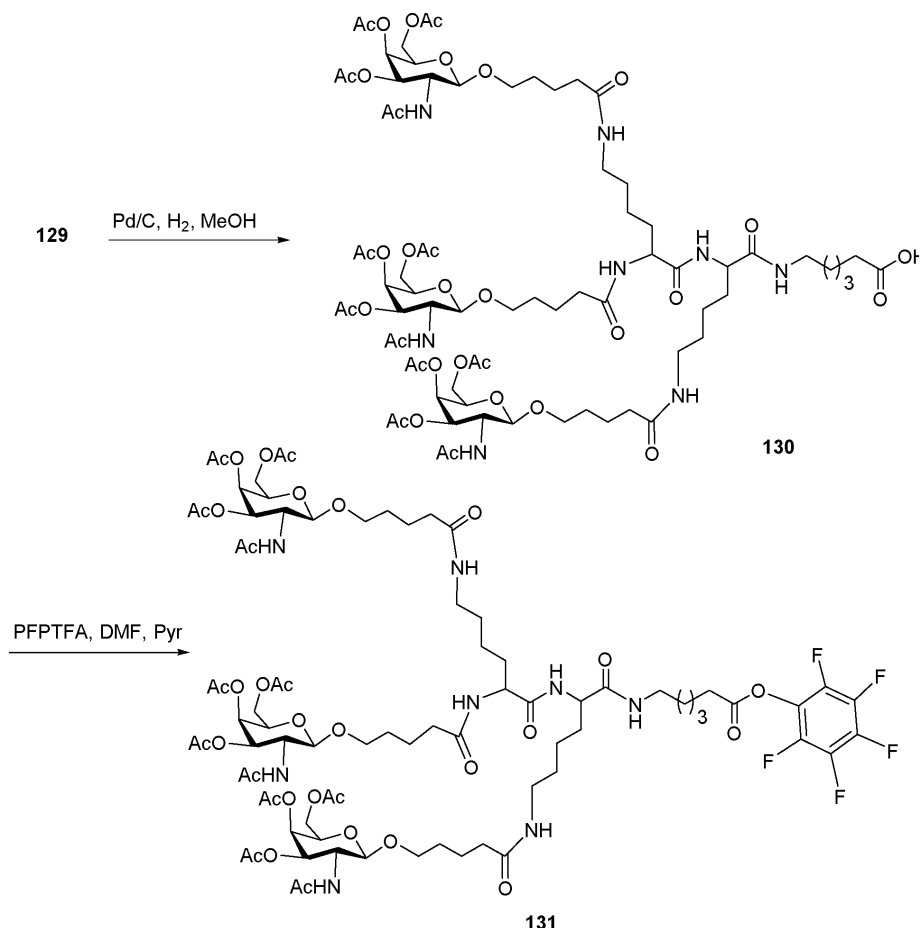


[1194]

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



[1195]



[1196]

[1197]

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

[1198]

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

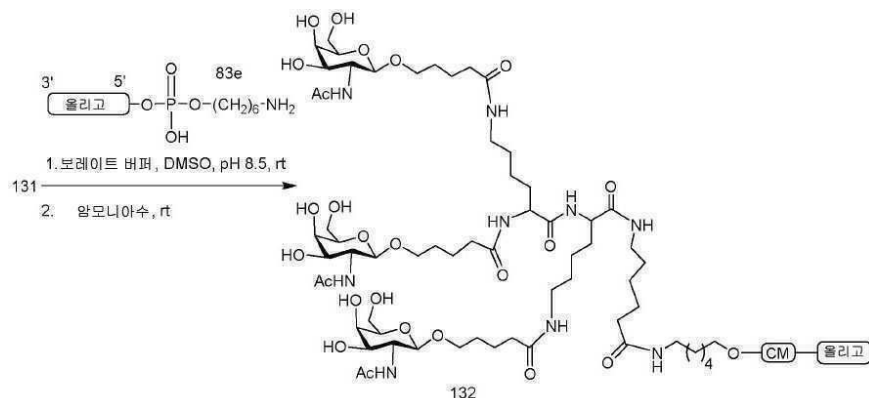
[1199]

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

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

[1200] 화합물 129 (0.09 g, 0.051 mmol)를 20 mL 설파이드 바이알 내에서 메탄올 (5 mL)에 용해시켰다. 여기에 소량의 10% Pd/C (0.015 mg)를 부가하고 반응 용기를 H₂ 가스로 씻어 내었다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 H₂ 분위기 하에서 18시간 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 셀라이트의 패드를 통해 여과하고 셀라이트 패드를 메탄올로 세정하였다. 여과물 및 세정물을 모으고 감압 하에서 농축하여 화합물 130 (0.08 g)을 얻었다. LCMS 및 ¹H NMR은 구조와 일치하였다. 생성물을 추가 정제없이 사용하였다. 질량 *m/z* 838.3 [M + 2H]⁺.

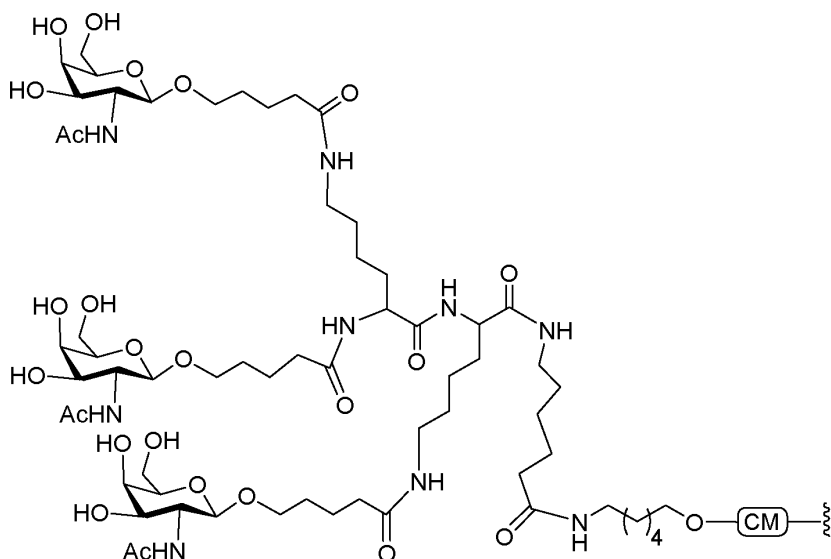
[1201] 10 mL 표시된 둥근바닥 플라스크에 화합물 130 (75.8 mg, 0.046 mmol), 0.37 M 피리딘/DMF (200 μ L) 및 교반 바를 추가하였다. 이 용액에 0.7 M 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트/DMF (100 μ L)를 교반하면서 적가 하였다. 반응을 LC MS에 의해 결정된 바와 같이 1시간 후에 완료하였다. 용매를 감압 하에서 제거하고 잔류물을 CHCl_3 (~ 10 mL)에 용해시켰다. 유기층을 NaHSO_4 (1 M, 10 mL), 수성 포화된 NaHCO_3 (10 mL) 및 염수 (10 mL)에 대해 각각 3회 분할하였다. 유기상을 분리하고 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고 농축하여 화합물 131 (77.7 mg)을 얻었다. LCMS는 구조와 일치한다. 추가 정제없이 사용하였다. 질량 m/z 921.3 $[\text{M} + 2\text{H}]^+$.



[1202]

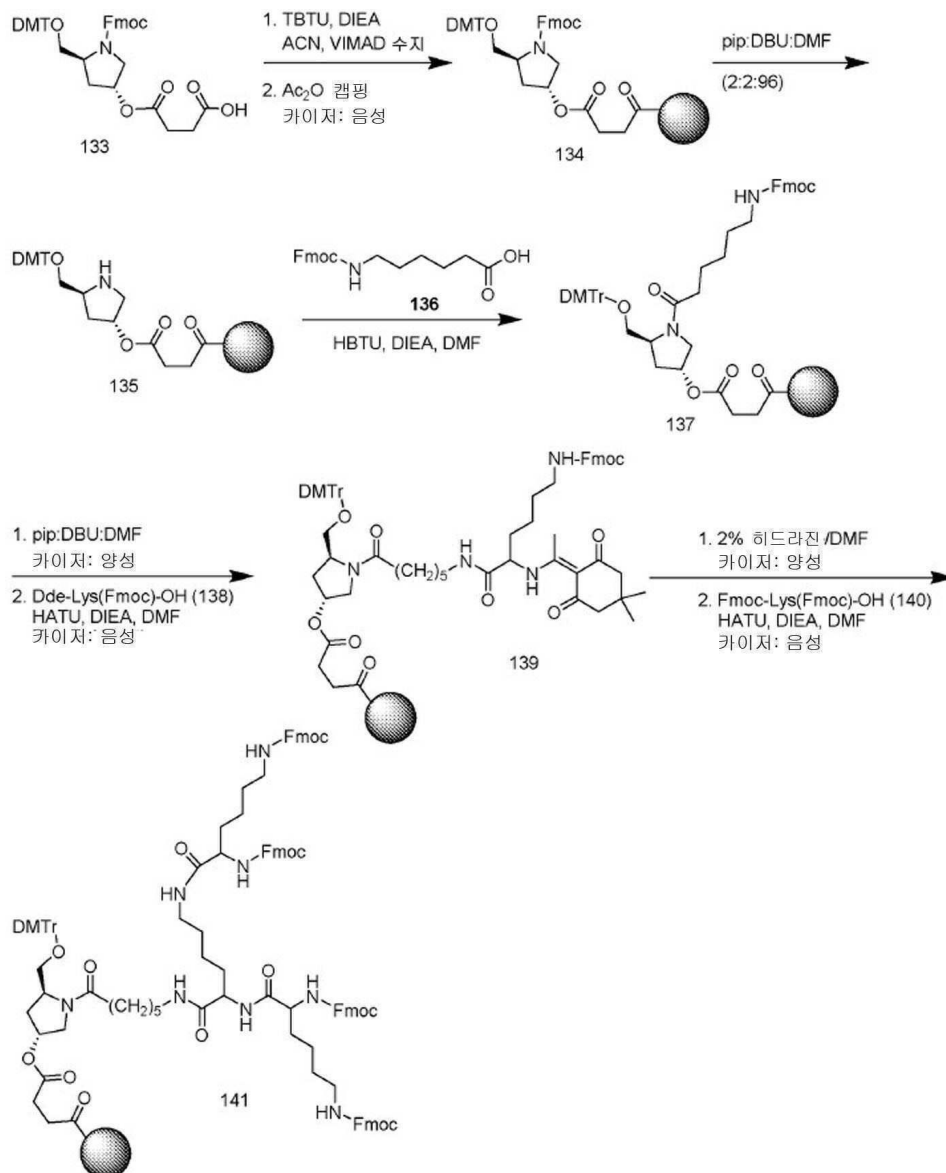
[1203] GaInAc₃-5 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 132를 실시예 46에 예시된 일반적인 과정을 이용하여 제조하였다. 콘주게이트 그룹 GaInAc₃-5의 GaInAc₃ 클러스터 부분 (GaInAc₃-5_a)은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A₄-P(=O)(OH)-이다.

[1204] GalNAc₃-5 (GalNAc₃-5_a-CM-)의 구조가 하기에 나타나 있다:

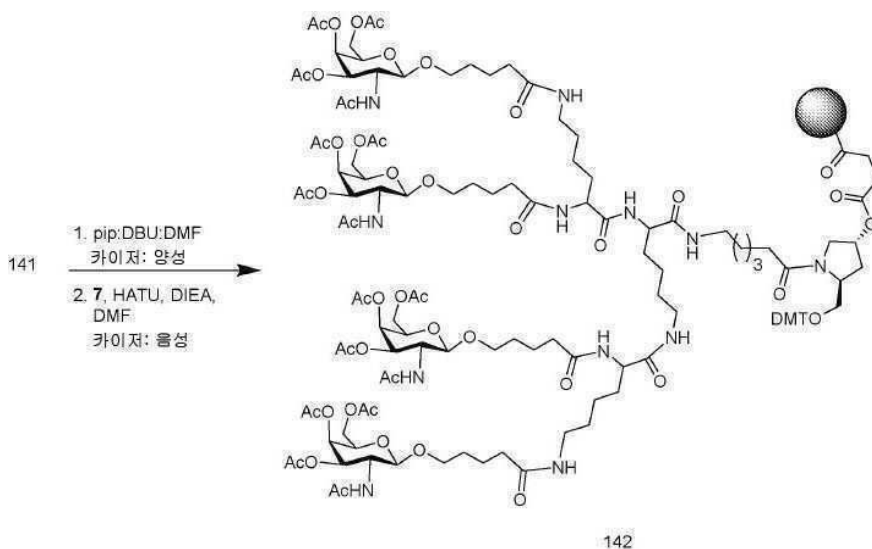


[1205]

[1206] 실시예 50: GalNAc₄-11을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 144의 제조



[1207]



[1208]

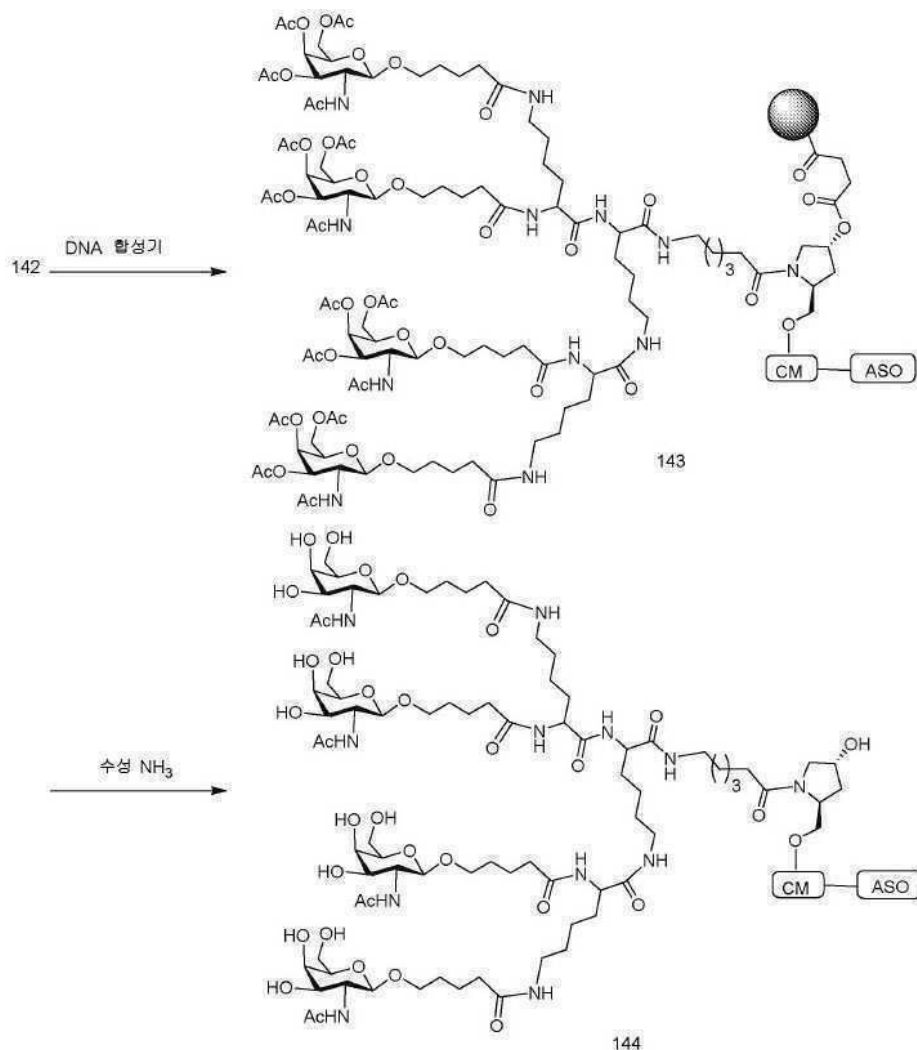
[1209]

화합물 134의 합성. 메리필드 플라스크에 아세토니트릴, 디메틸포름아미드, 디클로로메탄 및 아세토니트릴로 세정된 아미노메틸 VIMAD 수지 (2.5 g, 450 μmol/g)를 추가하였다. 상기 수지를 아세토니트릴 (4 mL)에서 팽창시

켰다. 화합물 133을 20 (1.0 mmol, 0.747 g), TBTU (1.0 mmol, 0.321 g), 아세토니트릴 (5 mL) 및 DIEA (3.0 mmol, 0.5 mL)를 첨가하여 100 mL 둥근바닥 플라스크에서 전-활성화시켰다. 이 용액을 5분 동안 교반한 다음, 흔들면서 메리필드 플라스크에 첨가하였다. 상기 현탁액을 3시간 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 빼내고 수지를 아세토니트릴, DMF 및 DCM으로 세정하였다. 새로운 수지 로딩을 DCM 중에서 500 nm (소멸 계수 = 7600 0)에서 DMT 양이온의 흡광도를 측정하여 정량화하였고 238 $\mu\text{mol/g}$ 인 것으로 결정되었다. 상기 수지를 아세트산 무수물 용액에서 10분간 3회 현탁시켜 캠핑하였다.

[1210] 고체 지지체 결합된 화합물 141을 반복적인 Fmoc-기반 고체상 펩타이드 합성 방법을 사용하여 합성하였다. 소량의 고체 지지체를 빼내고, 암모니아수 (28-30 wt%)에서 6시간 동안 현탁시켰다. 절단된 화합물을 LC-MS에 의해 분석하였고 상기 관찰된 질량은 구조와 일치하였다. 질량 m/z 1063.8 $[\text{M} + 2\text{H}]^+$.

[1211] 고체 지지체 결합된 화합물 142를 고체상 펩타이드 합성 방법을 사용하여 합성하였다.



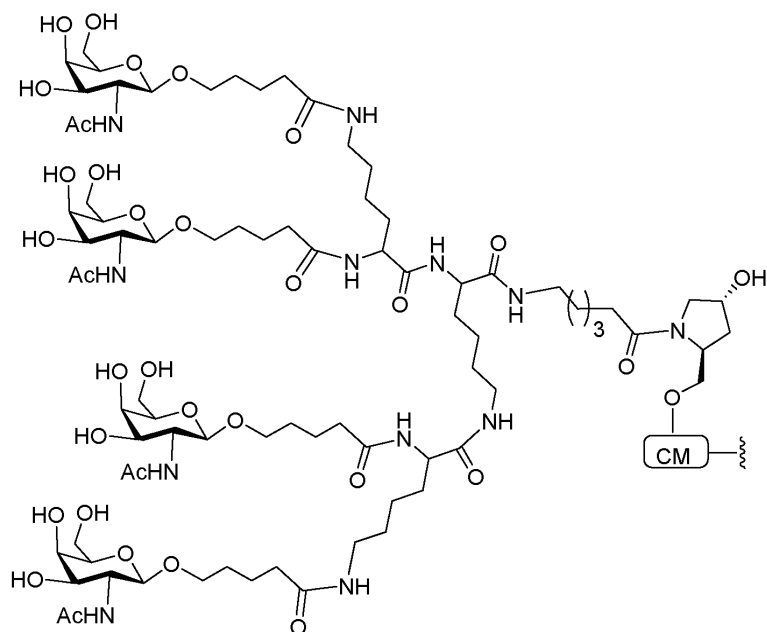
[1212]

[1213] 고체 지지체 결합된 화합물 143을 DNA 합성기 상에서 표준 고체상 합성을 사용하여 합성하였다.

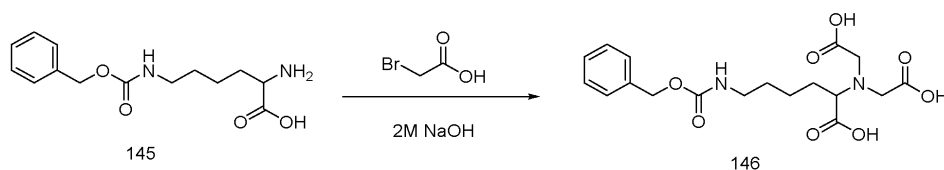
[1214] 고체 지지체 결합된 화합물 143을 암모니아수 (28-30 wt%)에 현탁시키고 55 °C에서 16시간 동안 가열하였다. 상기 용액을 냉각하고 고체 지지체를 여과하였다. 상기 여과물을 농축하고 잔류물을 물에서 용해시키고 강한 음이온 교환 칼럼 상에서 HPLC로 정제하였다. 전장 화합물 144을 함유하는 분획들을 모으고 탈염하였다. 수득한 GalNAc₄-11 접합된 올리고머 화합물을 LC-MS로 분석하였고, 상기 관찰된 질량은 구조와 일치하였다.

[1215] 콘주게이트 그룹 GalNAc₄-11의 GalNAc₄ 클러스터 부분 (GalNAc₄-11_a)은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_n-P(=O)(OH)-이다.

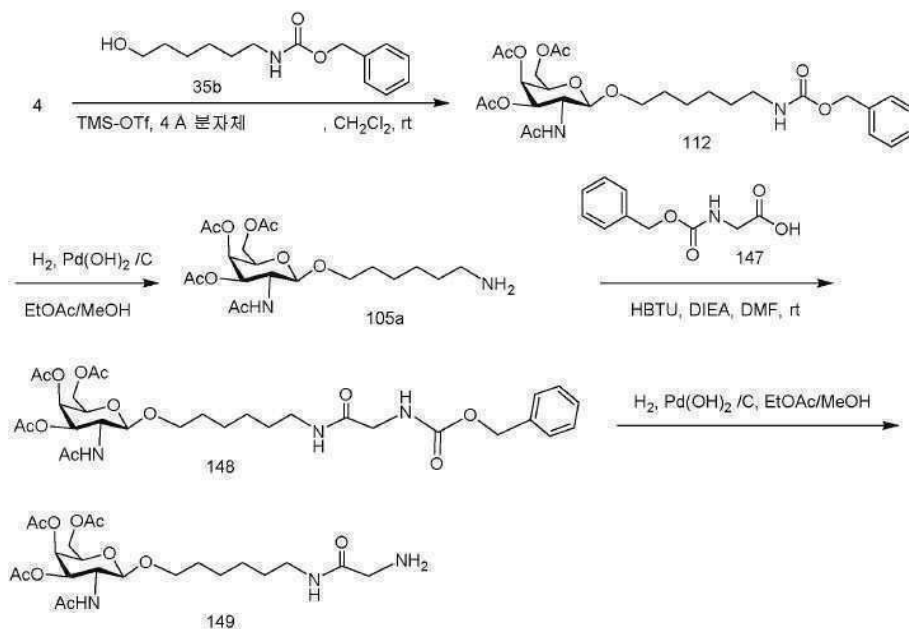
[1216] GalNAc₄-11 (GalNAc₄-11_a-CM)의 구조가 하기에 나타나 있다:



[1217]
[1218] 실시예 51: GalNAc₃-6을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 155의 제조



[1219]
[1220] 화합물 146을 문헌에 기재된 바와 같이 합성하였다: (*Analytical Biochemistry* 1995, 229, 54-60).



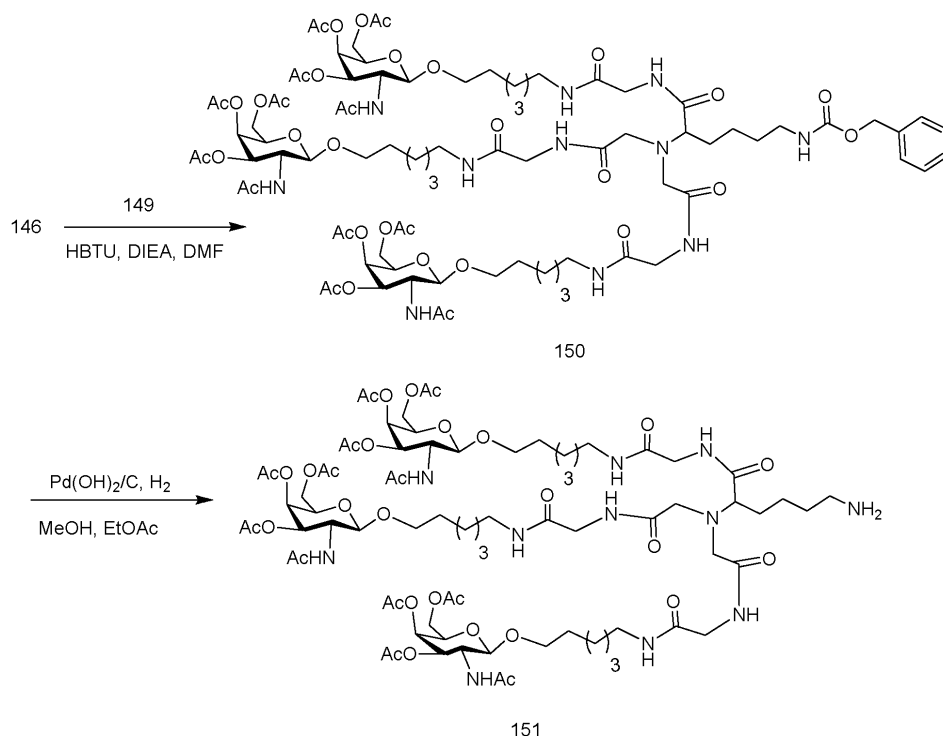
[1221]
[1222] 화합물 4 (15 g, 45.55 mmol) 및 화합물 35b (14.3 그램, 57 mmol)를 CH₂Cl₂ (200 ml)에 용해시켰다. 활성화된 분자체 (4 Å, 2 g, 분말화된)를 첨가하고, 반응을 30분 동안 질소 분위기 하에서 교반하였다. TMS-OTf를 첨가하고(4.1 ml, 22.77 mmol), 반응을 밤새 실온에서 교반하였다. 완료되자마자, 상기 반응을 포화된 수성 NaHCO₃의 용액 (500 ml) 및 부서진 얼음 (~ 150 g) 내로 부어 켄칭하였다. 유기층을 분리하고, 염수로 세정하고,

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

[1223] 화합물 112 (4.27 g, 7.35 mmol)를 1:1 MeOH/EtOAc (40 ml)에 용해시켰다. 상기 용액에 아르곤 스트림을 15분간 기포발생시켜 상기 반응 혼합물을 퍼징하였다. 펄만 촉매 (탄소상 수산화팔라듐, 400 mg)를 부가하고, 수소 가스로 30분 동안 용액에 거품을 일으켰다. 완료시(CH₂Cl₂ 중의 TLC 10% MeOH, 및 LCMS), 촉매를 셀라이트의 패드를 통해 여과로 제거하였다. 상기 여과물을 회전식 증발로 농축하고, 고진공 하에서 잠시 건조하여 화합물 105a (3.28 g)를 얻었다. LCMS 및 ¹H NMR은 원하는 생성물과 일치하였다.

[1224] 화합물 147 (2.31 g, 11 mmol)을 무수 DMF (100 mL)에 용해시켰다. *N,N*-디이소프로필에틸아민 (DIEA, 3.9 mL, 22 mmol)을 부가한 다음 HBTU (4 g, 10.5 mmol)를 부가하였다. 반응 혼합물을 ~ 15 분 동안 질소 하에서 교반하였다. 여기에, 건조 DMF 중의 화합물 105a (3.3 g, 7.4 mmol)의 용액을 부가하고 질소 분위기 하에서 2시간 동안 교반하였다. 반응을 EtOAc로 희석하고 포화된 수성 NaHCO₃ 및 염수로 세정하였다. 유기상을 분리하고, 건조시키고 (MgSO₄), 여과하고, 농축하여 오렌지색 시럽을 얻었다. 조 물질을 CH₂Cl₂ 중의 칼럼 크로마토그래피 2-5 % MeOH에 의해 정제하여 화합물 148(3.44 g, 73 %)을 얻었다. LCMS 및 ¹H NMR은 예상된 생성물과 일치하였다.

[1225] 화합물 148 (3.3 g, 5.2 mmol)을 1:1 MeOH/EtOAc (75 ml) 중에 용해시켰다. 상기 용액에 아르곤 스트림을 15분간 기포발생시켜 상기 반응 혼합물을 퍼징하였다. 펄만 촉매 (탄소상 수산화팔라듐)를 부가하였다 (350 mg). 수소 가스로 30분 동안 용액에 거품을 일으켰다. 완료시 (DCM 중의 TLC 10% MeOH, 및 LCMS), 촉매를 셀라이트의 패드를 통해 여과로 제거하였다. 상기 여과물을 회전식 증발로 농축하고, 고진공 하에서 간단히 건조하여 화합물 149 (2.6 g)를 얻었다. LCMS는 원하는 생성물과 일치하였다. 잔류물을 건조 DMF (10 ml)에 용해시키고 이것을 다음 단계에서 즉시 사용하였다.



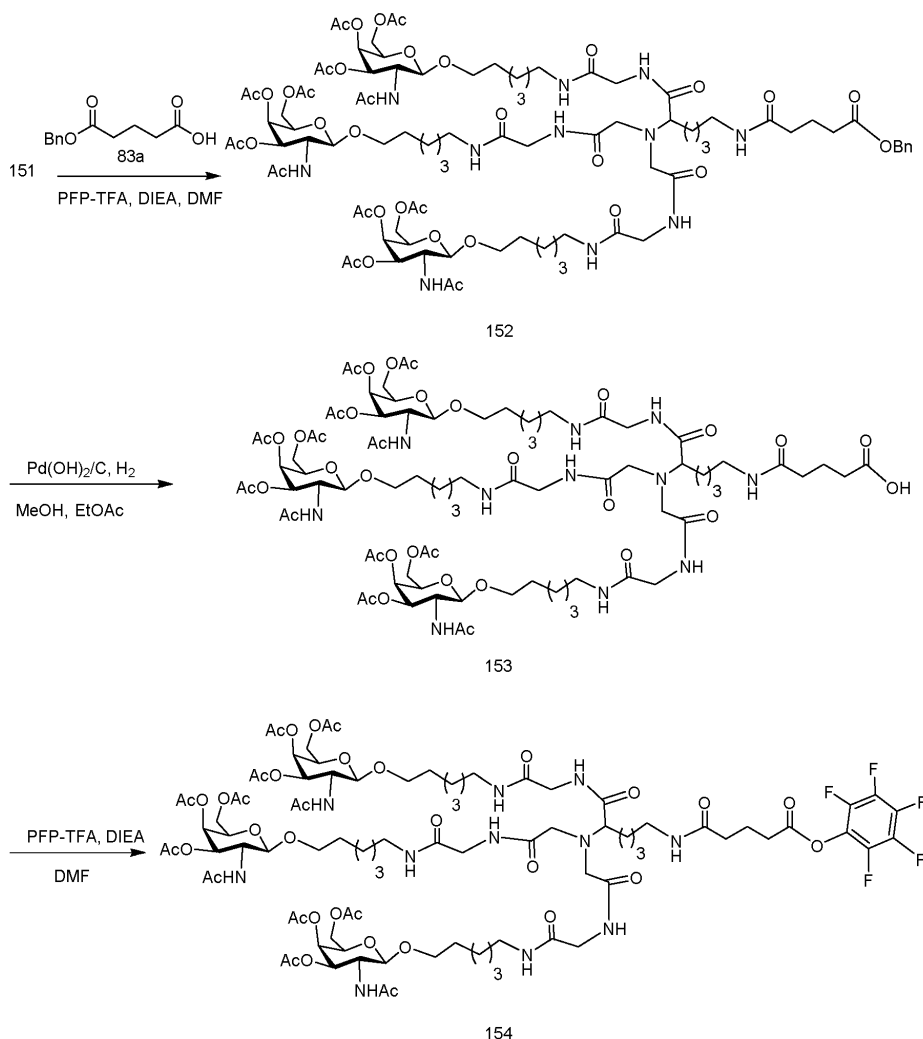
[1226]

[1227] 화합물 146 (0.68 g, 1.73 mmol)을 건조 DMF (20 ml)에 용해시켰다. 여기에, DIEA (450 μ L, 2.6 mmol, 1.5 eq.) 및 HBTU (1.96 g, 0.5.2 mmol)를 부가하였다. 상기 반응 혼합물을 15분 동안 실온에서 질소 하에서 교반하였다. 무수 DMF (10 mL) 중의 화합물 149 (2.6 g)의 용액을 부가하였다. 반응의 pH를 DIEA (필요한 경우)를 첨가하여 pH = 9-10으로 조정하였다. 반응을 실온에서 질소 하에서 2시간 동안 교반하였다. 완료시, 반응을 EtOAc (100 mL)로 희석하고, 수성 포화된 수성 NaHCO₃ 및 염수로 세정하였다. 유기상을 분리하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축하였다. 잔류물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 CH₂Cl₂ 중의 2-10 % MeOH로 용

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

[1228]

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



[1229]

[1230]

화합물 83a (0.11 g, 0.33 mmol)을 무수 DMF (5 mL)에서 용해시키고 *N,N*-디이소프로필에틸아민 (75 μL , 1 mmol) 및 PFP-TFA (90 μL , 0.76 mmol)를 부가하였다. 상기 반응 혼합물은 접촉시 자홍색으로 변하였고, 그 다음 30분 동안 점차 오렌지색으로 변하였다. 반응의 진행을 TLC 및 LCMS로 관찰하였다. 완료시 (PFP 에스테르의 형성), DMF 중의 화합물 151(0.57 g, 0.33 mmol)의 용액을 부가하였다. 반응의 pH를 *N,N*-디이소프로필에틸아민 (필요한 경우)을 첨가하여 pH = 9-10으로 조정하였다. 반응 혼합물을 질소 하에서 ~ 30분 동안 교반하였다. 완료시, 대다수의 용매를 감압 하에서 제거하였다. 잔류물을 CH_2Cl_2 로 희석하고 수성 포화된 NaHCO_3 및 염수로 세정하였다. 유기상을 분리하고, MgSO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축하여 오렌지색 시럽을 얻었다. 잔류물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 (CH_2Cl_2 중 2-10 % MeOH)에 의해 정제하여 화합물 152(0.35 g, 55 %)를 얻었다. LCMS 및 ^1H NMR은 원하는 생성물과 일치하였다.

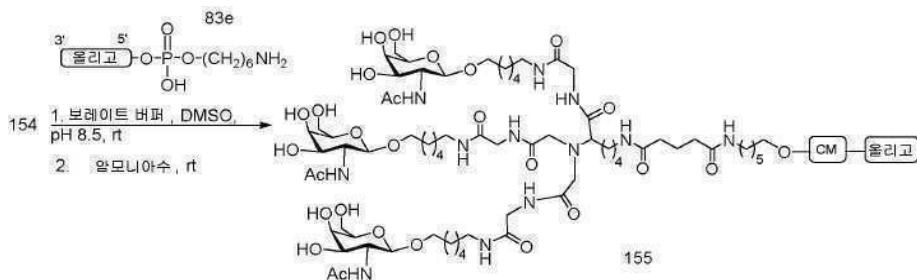
[1231]

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

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

[1232]

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



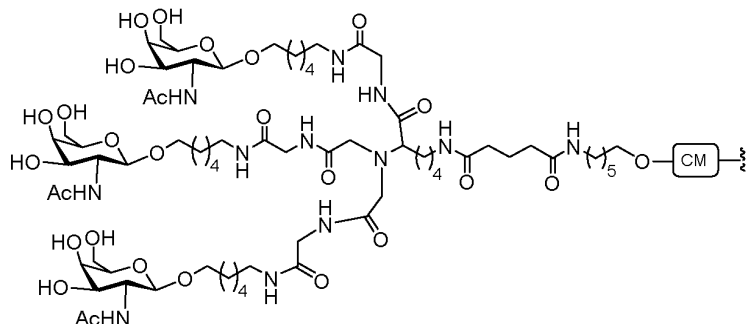
[1233]

[1234]

GalNAc₃-6 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 155를 실시예 46에 예시된 일반적인 과정을 이용하여 제조하였다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-6의 GalNAc₃ 클러스터 부분 (GalNAc₃-6_a)은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다.

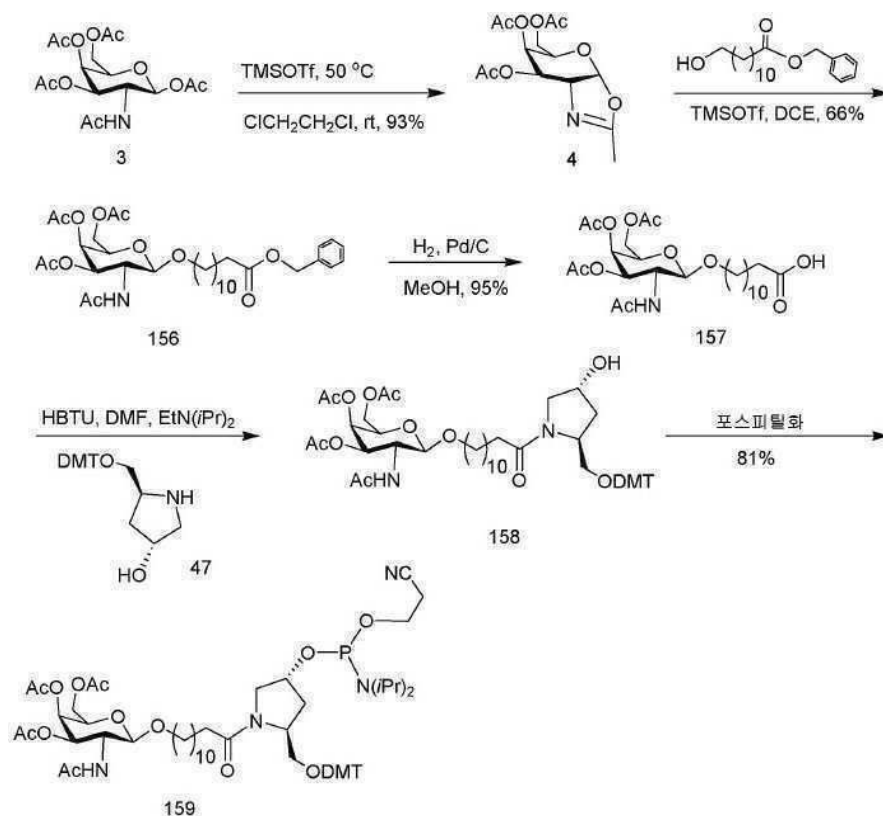
[1235]

GalNAc₃-6 (GalNAc₃-6_a-CM-)의 구조가 하기에 나타나 있다:



[1236]

[1237] 실시예 52: GalNAc₃-9를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 160의 제조



[1238]

[1239] 화합물 156를 문헌에 기재된 과정에 따라 합성하였다: (*J. Med. Chem.* 2004, 47, 5798-5808).

[1240]

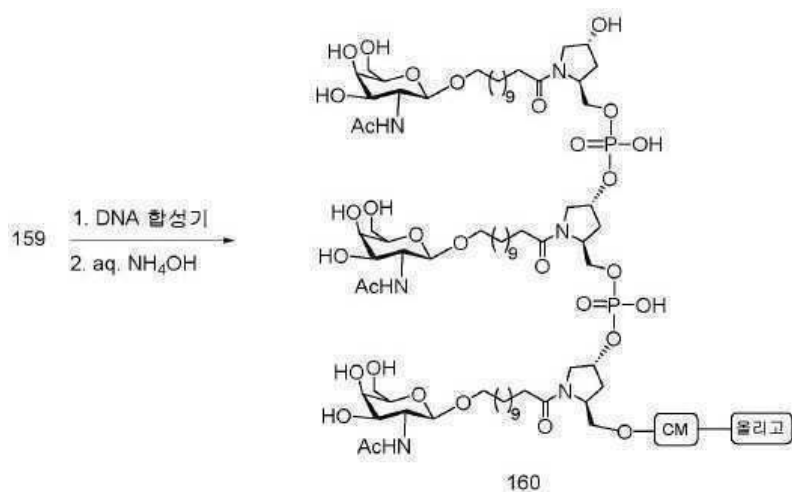
화합물 156(18.60 g, 29.28 mmol)을 메탄올 (200 mL)에 용해시켰다. 탄소상 팔라듐 (6.15 g, 10 wt%, 로딩 (건조 기준), 매트릭스 탄소 분말, 습성)을 부가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 수소 하에서 18시간 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 셀라이트의 패드를 통해 여과하고 셀라이트 패드를 메탄올로 철저히 세정하였다. 조합된 여과물을 세정하고 농축 건조하였다. 잔류물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 디클로로메탄 중의 5-10 % 메탄올로 용출시켜 화합물 157 (14.26 g, 89%)을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

[1241]

화합물 157 (5 g, 9.17 mmol)을 무수 DMF (30 mL)에 용해시켰다. HBTU (3.65 g, 9.61 mmol) 및 *N,N*-디이소프로필에틸아민 (13.73 mL, 78.81 mmol)을 부가하고 상기 반응 혼합물을 실온에서 5분 동안 교반하였다. 여기에, 화합물 47 (2.96 g, 7.04 mmol)의 용액을 부가하였다. 반응을 실온에서 8시간 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 포화된 $NaHCO_3$ 수용액에 부었다. 상기 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하고 유기층을 염수로 세정하고 건조시키고 (Na_2SO_4), 여과하고 증발시켰다. 수득된 잔류물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 헥산 중의 50% 에틸 아세테이트로 용출시켜 화합물 158 (8.25g, 73.3%)을 얻었다. 구조를 MS 및 1H NMR 분석에 의해 확인하였다.

[1242]

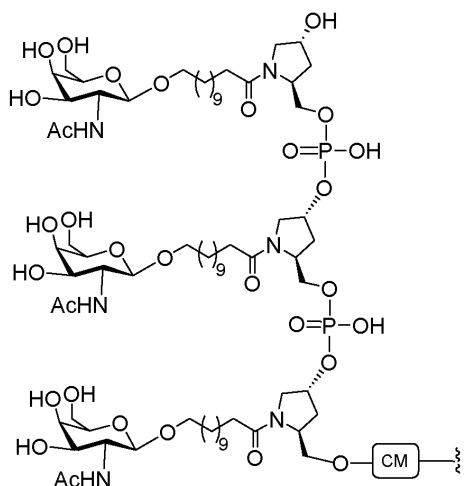
화합물 158 (7.2 g, 7.61 mmol)을 감압 하에서 P_2O_5 로 건조시켰다. 상기 건조된 화합물을 무수 DMF (50 mL)에 용해시켰다. 여기에, 1H-테트라졸 (0.43 g, 6.09 mmol) 및 *N*-메틸이미다졸 (0.3 mL, 3.81 mmol) 및 2-시아노에틸-*N,N,N',N'*-테트라이소프로필 포스포로디아미다이트 (3.65 mL, 11.50 mmol)를 부가하였다. 상기 반응 혼합물을 아르곤 분위기 하에서 4시간 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 에틸 아세테이트 (200 mL)로 희석하였다. 상기 반응 혼합물을 포화된 $NaHCO_3$ 및 염수로 세정하였다. 유기상을 분리하고, 건조시키고 (Na_2SO_4), 여과하고 증발시켰다. 잔류물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 헥산 중의 50-90 % 에틸 아세테이트로 용출시켜 화합물 159 (7.82 g, 80.5%)를 얻었다. 구조를 LCMS 및 ^{31}P NMR 분석에 의해 확인하였다.



[1243]

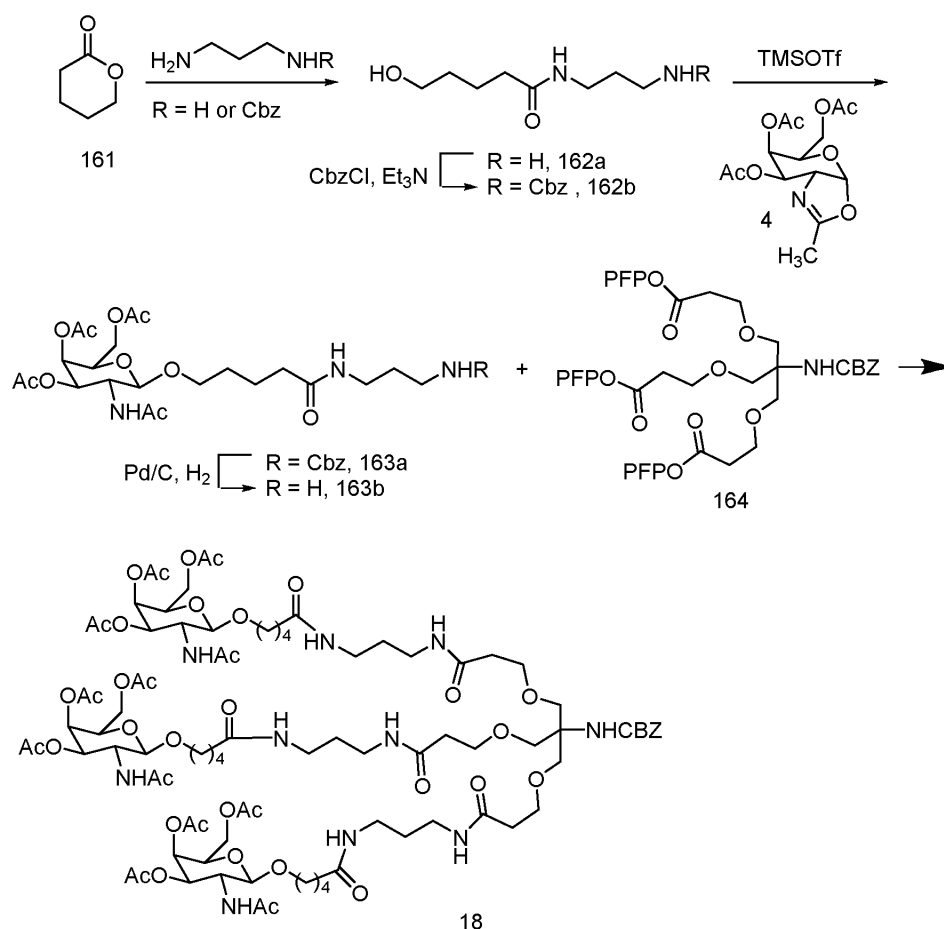
[1244]

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



[1245]

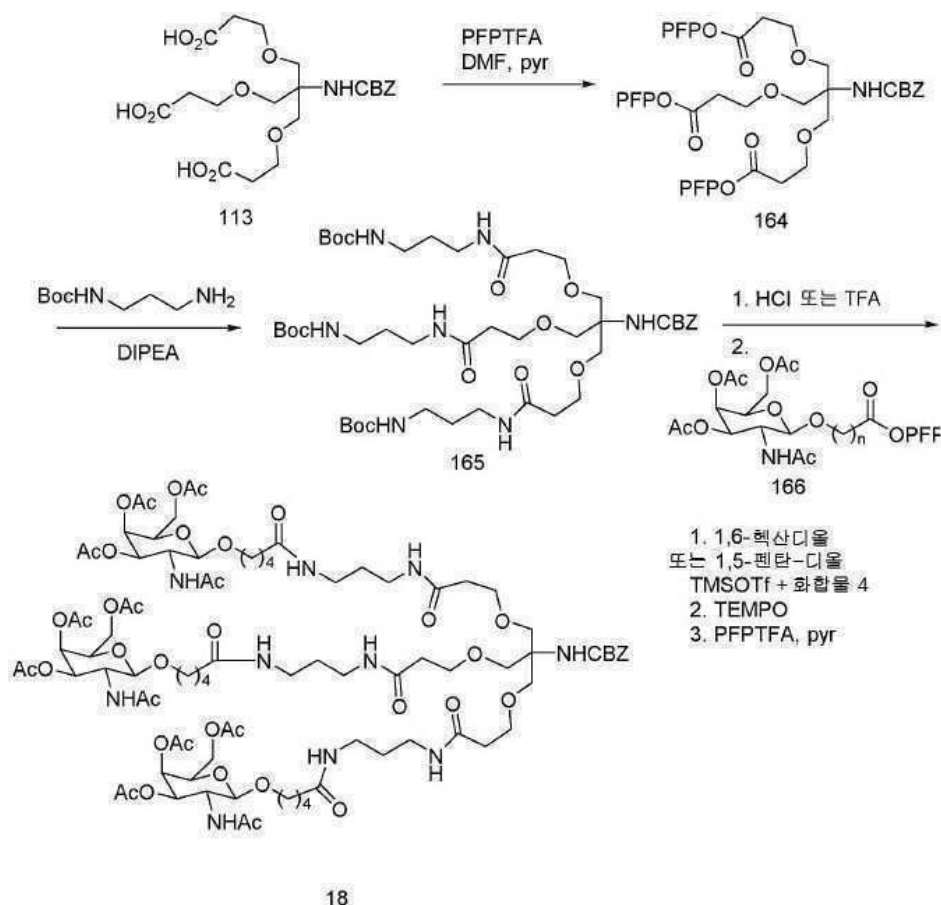
[1246] 실시예 53: 화합물 18 (GalNAc₃-1a 및 GalNAc₃-3a)의 제조를 위한 대안적인 절차



[1247]

[1248] 락톤 161을 디아미노 프로판 (3-5 eq) 또는 모노-Boc 보호된 디아미노 프로판 (1 eq)과 반응시켜 알코올 162a 또는 162b를 제공하였다. 비보호된 프로판디아민이 상기 반응에 사용되는 경우, 과잉 디아민을 고진공 하에서 증발에 의해 제거하였고, 162a 내의 유리 아미노 그룹을 CbzCl을 이용하여 보호하여 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제 후백색 고체물로서 162b를 제공하였다. 알코올 162b를 TMSOTf의 존재하에 화합물 4와 추가 반응시켜 163a를 제공하였고, 이는 촉매적 수소첨가를 이용한 Cbz 그룹의 제거에 의해 163b로 전환되었다. 펜타플루오로 페닐 (PFP) 에스테르 164를 3가산 113 (참고 실시예 48)을 DMF (0.1 내지 0.5 M) 중의 PFPTFA (3.5 eq) 및 피리딘 (3.5 eq)과 반응시켜 제조하였다. 상기 트리에스테르 164를 아민 163b (3-4 eq) 및 DIPEA (3-4 eq)와 직접 반응시켜 화합물 18을 제공하였다. 상기 방법은 중간체의 정제를 상당히 용이하게 하며 실시예 4에 기재된 과정을 이용하여 형성된 부산물의 형성을 최소화한다.

[1249] 실시예 54: 화합물 18 (GalNAc₃-1a 및 GalNAc₃-3a)의 제조를 위한 대안적인 절차



[1250]

[1251] triPFP 에스테르 164를 상기 실시예 53에 개괄된 절차를 이용하여 산 113으로부터 제조하였고 모노-Boc 보호된 디아민과 반응시켜 165를 본질적으로 정량적 수율로 제공하였다. 상기 Boc 그룹을 염산 또는 트리플루오로아세트산으로 제거하여 트리아민을 제공하였고, 이를 적당한 염기, 예컨대 DIPEA의 존재하에 PFP 활성화된 산 166과 반응시켜 화합물 18을 제공하였다.

[1252]

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

[1253]

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

[1254]

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

[1255]

표 26

[1256] SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ASO	서열 (5'에서 3')	모티프	콘주게이트	서열번호
ISIS 353382 (모)	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	없음	28
ISIS 655861	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do}^-$ GalNAc₃-1_a	5/10/5	GalNAc₃-1	29
ISIS 664078	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{eo} A_{do}^-$ GalNAc₃-9_a	5/10/5	GalNAc₃-9	29
ISIS 661161	GalNAc₃-3_{a-o} A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc₃-3	30
ISIS 665001	GalNAc₃-8_{a-o} A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc₃-8	30

[1257]

[1258] 대문자는 각 뉴클레오사이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)를 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

[1259] GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-9는 실시예 52에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-3는 실시예 39에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-8는 실시예 47에서 이전에 보여졌다.

[1260] 처리

[1261] 6 주령 수컷 Balb/c 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 ISIS 353382, 655861, 664078, 661161, 665001 또는 염수가 아래에서 보여진 복용량으로 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 간 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 아래의 결과는 염수 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

[1262] 표 27에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리 용량-의존 방식에서 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다. 사실상, 3' 말단에서 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-1 및 GalNAc₃-9 콘주게이트 (ISIS 655861 및 ISIS 664078) 및 5' 말단에서 연결된 GalNAc₃-3 및 GalNAc₃-8 콘주게이트 (ISIS 661161 및 ISIS 665001)을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 353382)와 비교하여 효능의 실질적인 개선을 보여주었다. 더욱이, 3' 말단에서 GalNAc₃-9 콘주게이트를 포함하는 ISIS 664078은 3' 말단에서 GalNAc₃-1 콘주게이트를 포함하는 ISIS 655861과 비교하여 본질적으로 동등하게 강력했다. GalNAc₃-3 또는 GalNAc₃-9, 각각을 포함하는 5' 접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드, ISIS 661161 및 ISIS 665001은, 3' 접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 655861 및 ISIS 664078)와 비교하여 증가된 효능을 가졌다.

[1263] 표 27

[1264] SRB-1을 표적으로 하는 GalNAc₃-1, 3, 8 또는 9를 함유하는 ASO

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

[1265]

[1266] 혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다. 총 빌리루빈 및 BUN가 또한 평가되었다. 체중의 변화를 염수 그룹으로부터 유의미한 변화 없이 평가했다. ALT, AST, 총 빌리루빈 및 BUN 값은 아래의 표에서 보여진다.

[1267] 표 28

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

[1268]

[1269] 실시예 56: 생체내에서 SRB-1를 표적으로 하는 3' 또는 5'-콘주게이트 그룹 (GalNac₃-1, 2, 3, 5, 6, 7 및 10의 비교)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 용량-의존적 연구

[1270]

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

[1271]

표 29

[1272] SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ASO	서열 (5'에서 3')	모티프	콘주게이트	서열번호
ISIS 353382 (모)	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	5/10/5	콘주게이트 없음	28
ISIS 655861	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do}^-$ GalNAc₃-1_a	5/10/5	GalNAc₃-1	29
ISIS 664507	GalNAc₃-2_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	5/10/5	GalNAc₃-2	30
ISIS 661161	GalNAc₃-3_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	5/10/5	GalNAc₃-3	30
ISIS 666224	GalNAc₃-5_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	5/10/5	GalNAc₃-5	30
ISIS 666961	GalNAc₃-6_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	5/10/5	GalNAc₃-6	30
ISIS 666981	GalNAc₃-7_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	5/10/5	GalNAc₃-7	30
ISIS 666881	GalNAc₃-10_a-o $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	5/10/5	GalNAc₃-10	30

[1273]

[1274]

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

[1275]

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

[1276]

처리

[1277]

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

[1278]

표 30에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리 용량-의존 방식에서 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다. 사실상, 접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 353382)와 비교하여 효능의 실질적인 개선을 보여주었다. 5' 접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 3' 접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 비교하여 효능의 약간의 증가를 보여주었다.

[1279] 표 30

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

[1280]

[1281]

혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다. 총 빌리루빈 및 BUN가 또한 평가되었다. 체중의 변화를 염수 그룹으로부터 유의미한 변화 없이 평가했다. ALT, AST, 총 빌리루빈 및 BUN 값은 아래의 표 31에서 보여진다.

[1282] 표 31

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

[1283]

[1284] 실시예 57: 생체내에서 ApoC III을 표적으로 하는 3'-콘주게이트 그룹을 포마우스에게 아래에서 명시된 용량이 1 회 주입되었고 42 일의 과정 동안 ApoC-III 및 혈장 트리글리세라이드 (혈장 TG) 수준에 대해 모니터링되었다. 연구는 각 그룹에서 인간 APOC-III을 발현시키는 3 개의 이식유전자 마우스를 사용하여 수행되었다.

[1285] 표 32

[1286] ApoC III를 표적으로 하는 변형된 ASO

ASO	서열 (5'에서 3')	연결	서열번호
ISIS 304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} mC _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	PS	20
ISIS 647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} A_{do}'-GalNAc₃-1_a	PS	21
ISIS 647536	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _{eo} A_{do}'-GalNAc₃-1_a	PO/PS	21

[1287]

[1288] 대문자는 각 뉴클레오타이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오타이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오타이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 (PS)를 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

[1289] GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다.

[1290] 표 33

[1291] ApoC III mRNA (1 일째 염수 %) 및 혈장 TG 수준 (1 일째 염수 %)

ASO	용량	표적	3 일째	7 일째	14 일째	35 일째	42 일째
염수	0 mg/kg	ApoC-III	98	100	100	95	116
ISIS 304801	30 mg/kg	ApoC-III	28	30	41	65	74
ISIS 647535	10 mg/kg	ApoC-III	16	19	25	74	94
ISIS 647536	10 mg/kg	ApoC-III	18	16	17	35	51
염수	0 mg/kg	혈장 TG	121	130	123	105	109
ISIS 304801	30 mg/kg	혈장 TG	34	37	50	69	69
ISIS 647535	10 mg/kg	혈장 TG	18	14	24	18	71
ISIS 647536	10 mg/kg	혈장 TG	21	19	15	32	35

[1292]

[1293] 상기 표에서 보여질 수 있는 바와 같이, 작용의 지속시간은 비접합된 올리고뉴클레오타이드와 비교하여 3'-콘주게이트 그룹의 부가와 함께 증가되었다. 접합된 완벽한 PS 올리고뉴클레오타이드 647535와 비교하여 접합된 혼합된 PO/PS 올리고뉴클레오타이드 647536에 대한 작용의 지속시간이 추가로 증가되었다.

[1294] 실시예 58: 생체내에서 SRB-1을 표적으로 하는 3'-콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 용량-의존적 연구 (GalNAc₃-1 및 GalNAc₄-11의 비교)

[1295] 아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다. 비접합된 ISIS 440762은 비접합된 표준으로서 포함되었다. 각각의 콘주게이트 그룹은 포스포디에스테르 연결된 2'-데옥시아데노신 뉴클레오타이드 절단가능 모이어티에 의해 각 올리고뉴클레오타의 3' 말단에서 부착되었다.

[1296] GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-11_a의 구조는 실시예 50에서 이전에 보여졌다.

[1297] 처리

[1298] 6 주령 수컷 Balb/c 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 ISIS 440762, 651900, 663748 또는 염수가 아래에서 보여진 복용량으로 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 간 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 아래의 결과는 염수 대조군에

대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

[1299] 표 34에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다. 3' 말단(ISIS 651900 및 ISIS 663748)에서 포스포디에스테르 연결된 GalNAc₃-1 및 GalNAc₄-11 콘주게이트를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 440762) 와 비교하여 효능의 실질적인 개선을 보여주었다. 2 개의 접합된 올리고뉴클레오타이드, GalNAc₃-1 및 GalNAc₄-11는, 동등하게 강력했다.

[1300] **표 34**

[1301] **SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO**

ASO	서열 (5'에서 3')	용량 mg/kg	% 염수 대조군	서열번호
염수			100	
ISIS 440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} mC _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	0.6	73.45	22
		2	59.66	
		6	23.50	
ISIS 651900	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} mC _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ko} A _{do} -GalNAc ₃ -1 _a	0.2	62.75	23
		0.6	29.14	
		2	8.61	
		6	5.62	
ISIS 663748	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} mC _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ko} A _{do} -GalNAc ₄ -11 _a	0.2	63.99	23
		0.6	33.53	
		2	7.58	
		6	5.52	

[1302] 대문자는 각 뉴클레오타이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오타이드를 나타내고; "k"는 6'-(S)-CH₃ 바이사이클릭 뉴클레오타이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오타이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

[1304] 혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다. 총 빌리루빈 및 BUN가 또한 평가되었다. 체중의 변화를 염수 그룹으로부터 유의미한 변화 없이 평가했다. ALT, AST, 총 빌리루빈 및 BUN 값은 아래의 표 35에서 보여진다.

[1305] 표 35

ISIS 번호	복용량 mg/kg	ALT	AST	총 빌리루빈	BUN	콘주게이트
염수		30	76	0.2	40	
440762	0.60	32	70	0.1	35	없음
	2	26	57	0.1	35	
	6	31	48	0.1	39	
651900	0.2	32	115	0.2	39	GalNac ₃ -1 (3')
	0.6	33	61	0.1	35	
	2	30	50	0.1	37	
	6	34	52	0.1	36	
663748	0.2	28	56	0.2	36	GalNac ₄ -11 (3')
	0.6	34	60	0.1	35	
	2	44	62	0.1	36	
	6	38	71	0.1	33	

[1306]

[1307] 실시예 59: 생체내 FXI을 표적으로 하는 GalNac₃-1 접합된 ASO의 효과

[1308] 아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 FXI의 안티센스 억제에 대한 다중 용량 연구에서 시험되었다. ISIS 404071은 비접합된 표준으로서 포함되었다. 각각의 콘주게이트 그룹은 포스포디에스테르 연결된 2'-테옥시아데노신 뉴클레오사이드 절단가능 모이어티에 의해 각 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에서 부착되었다.

[1309] 표 36

[1310] FXI를 표적으로 하는 변형된 ASO

ASO	서열 (5'에서 3')	연결	서열번호
ISIS 404071	T _{es} G _{es} G _{es} T _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{es} G _{es} A _{es} G _{es} G _e	PS	31
ISIS 656172	T _{es} G _{es} G _{es} T _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{es} G _{es} A _{es} G _{es} G _{eo} A _{do} '-GalNac ₃ -1 _a	PS	32
ISIS 656173	T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _{eo} A _{do} '-GalNac ₃ -1 _a	PO/PS	32

[1311]

[1312] 대문자는 각 뉴클레오사이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "s"는 포스포포티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)를 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

[1313] GalNac₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다.

[1314] 처리

[1315] 6 주령 수컷 Balb/c 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 피하로 매주 2회 3 주 동안 아래에서 보여진 복용량으로 ISIS 404071, 656172, 656173 또는 PBS 처리된 대조군이 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 간 FXI mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 혈장 FXI 단백질 수준은 ELISA를 사용하여 또한 측정되었다. FXI mRNA 수준은 PBS-처리된 대조군에 대한 정상화 전에 (RIBOGREEN®를 사용하여) 총 RNA에 대해 결정되었다. 아래의 결과는 각 처리 그룹에 대한 FXI mRNA 수준의 평균 퍼센트로져 제공된다. 데이터는 PBS-처리된 대조군에 대해 정규화되었고 "% PBS"로 나타낸다. ED₅₀s는

이전에 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여 측정되었고 아래에서 제공된다.

표 37

인자 XI mRNA (염수 %)

ASO	용량 mg/kg	% 대조군	콘주게이트	연결
염수		100	없음	
ISIS 404071	3	92	없음	PS
	10	40		
	30	15		
ISIS 656172	0.7	74	GalNAc ₃ -1	PS
	2	33		
	6	9		
ISIS 656173	0.7	49	GalNAc ₃ -1	PO/PS
	2	22		
	6	1		

표 37에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 FXI mRNA 수준을 낮게 했다. 3'-GalNAc₃-1 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 404071) 와 비교하여 효능의 실질적인 개선을 보여주었다. 2 개의 접합된 올리고뉴클레오타이드 사이에 효능의 개선이 추가로, PS 연결의 일부를 PO (ISIS 656173)로 치환하여 제공되었다.

표 37a에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 FXI 단백질 수준을 낮게 했다. 3'-GalNAc₃-1 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 404071) 와 비교하여 효능의 실질적인 개선을 보여주었다. 2 개의 접합된 올리고뉴클레오타이드 사이에 효능의 개선이 추가로, PS 연결의 일부를 PO (ISIS 656173)로 치환하여 제공되었다.

표 37a

인자 XI 단백질 (염수 %)

ASO	용량 mg/kg	단백질 (% 대조군)	콘주게이트	연결
염수		100	없음	
ISIS 404071	3	127	없음	PS
	10	32		
	30	3		
ISIS 656172	0.7	70	GalNAc ₃ -1	PS
	2	23		
	6	1		
ISIS 656173	0.7	45	GalNAc ₃ -1	PO/PS
	2	6		
	6	0		

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

[1325] 표 38

ISIS 번호	복용량 mg/kg	ALT	AST	총 알부민	총 빌리루빈	CRE	BUN	콘주게이트
염수		71.8	84.0	3.1	0.2	0.2	22.9	
404071	3	152.8	176.0	3.1	0.3	0.2	23.0	없음
	10	73.3	121.5	3.0	0.2	0.2	21.4	
	30	82.5	92.3	3.0	0.2	0.2	23.0	
656172	0.7	62.5	111.5	3.1	0.2	0.2	23.8	GalNac ₃ -1 (3')
	2	33.0	51.8	2.9	0.2	0.2	22.0	
	6	65.0	71.5	3.2	0.2	0.2	23.9	
656173	0.7	54.8	90.5	3.0	0.2	0.2	24.9	GalNac ₃ -1 (3')
	2	85.8	71.5	3.2	0.2	0.2	21.0	
	6	114.0	101.8	3.3	0.2	0.2	22.7	

[1326]

[1327] 실시예 60: 시험관내 SRB-1을 표적으로 하는 접합된 ASO의 효과

[1328] 아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 일차 마우스 간세포에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 다중 용량 연구에서 시험되었다. ISIS 353382은 비접합된 표준으로서 포함되었다. 각각의 콘주게이트 그룹은 포스포디에스테르 연결된 2'-데옥시아데노신 뉴클레오타이드 절단가능 모이어티에 의해 각 올리고뉴클레오타이드의 3' 또는 5' 말단에서 부착되었다.

[1329] 표 39

[1330] SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ASO	서열 (5'에서 3')	모티프	콘주게이트	서열번호
ISIS 353382	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	없음	28
ISIS 655861	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} -GalNac ₃ -1 _a	5/10/5	GalNac ₃ -1	29
ISIS 655862	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} -GalNac ₃ -1 _a	5/10/5	GalNac ₃ -1	29
ISIS 661161	GalNac ₃ -3 _a -o-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNac ₃ -3	30
ISIS 665001	GalNac ₃ -8 _a -o-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNac ₃ -8	30
ISIS 664078	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} -GalNac ₃ -9 _a	5/10/5	GalNac ₃ -9	29
ISIS 666961	GalNac ₃ -6 _a -o-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNac ₃ -6	30
ISIS 664507	GalNac ₃ -2 _a -o-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNac ₃ -2	30
ISIS 666881	GalNac ₃ -10 _a -o-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNac ₃ -10	30
ISIS 666224	GalNac ₃ -5 _a -o-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNac ₃ -5	30
ISIS 666981	GalNac ₃ -7 _a -o-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNac ₃ -7	30

[1331]

[1332] 대문자는 각 뉴클레오타이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오타이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오타이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결 (PO)을 나타내

고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

[1333] GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-3a의 구조는 실시예 39에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-8a의 구조는 실시예 47에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-9a의 구조는 실시예 52에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-6a의 구조는 실시예 51에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-2a의 구조는 실시예 37에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-10a의 구조는 실시예 46에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-5a의 구조는 실시예 49에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-7a의 구조는 실시예 48에서 이전에 보여졌다.

[1334] 처리

[1335] 상기 열거된 올리고뉴클레오타이드는 25,000 세포/웰의 밀도에서 플레이팅된 일차 마우스 간세포 세포에서 시험관 내에서 시험되었고, 0.03, 0.08, 0.24, 0.74, 2.22, 6.67 또는 20 nM 변형된 올리고뉴클레오타이드로 처리되었다. 대략 16 시간의 치료 기간 후, RNA는 세포로부터 단리되었고 mRNA 수준은 정량적 실시간 PCR에 의해 측정되었고 SRB-1 mRNA 수준은 RIBOGREEN®에 의해 측정된 바와 같이 총 RNA 함량에 따라 조정되었다.

[1336] IC₅₀는 표준 방법을 사용하여 계산되었고 결과는 표 53에서 제공된다. 이 결과는, 시약 또는 전기천공 기술이 올리고뉴클레오타이드의 세포로의 유입을 인공적으로 촉진하기 위해 사용되지 않은 유리 흡수 조건 하에서, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트를 포함하지 않는 모 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 353382)보다 간세포에서 유의미하게 더 강했다는 것을 보여준다.

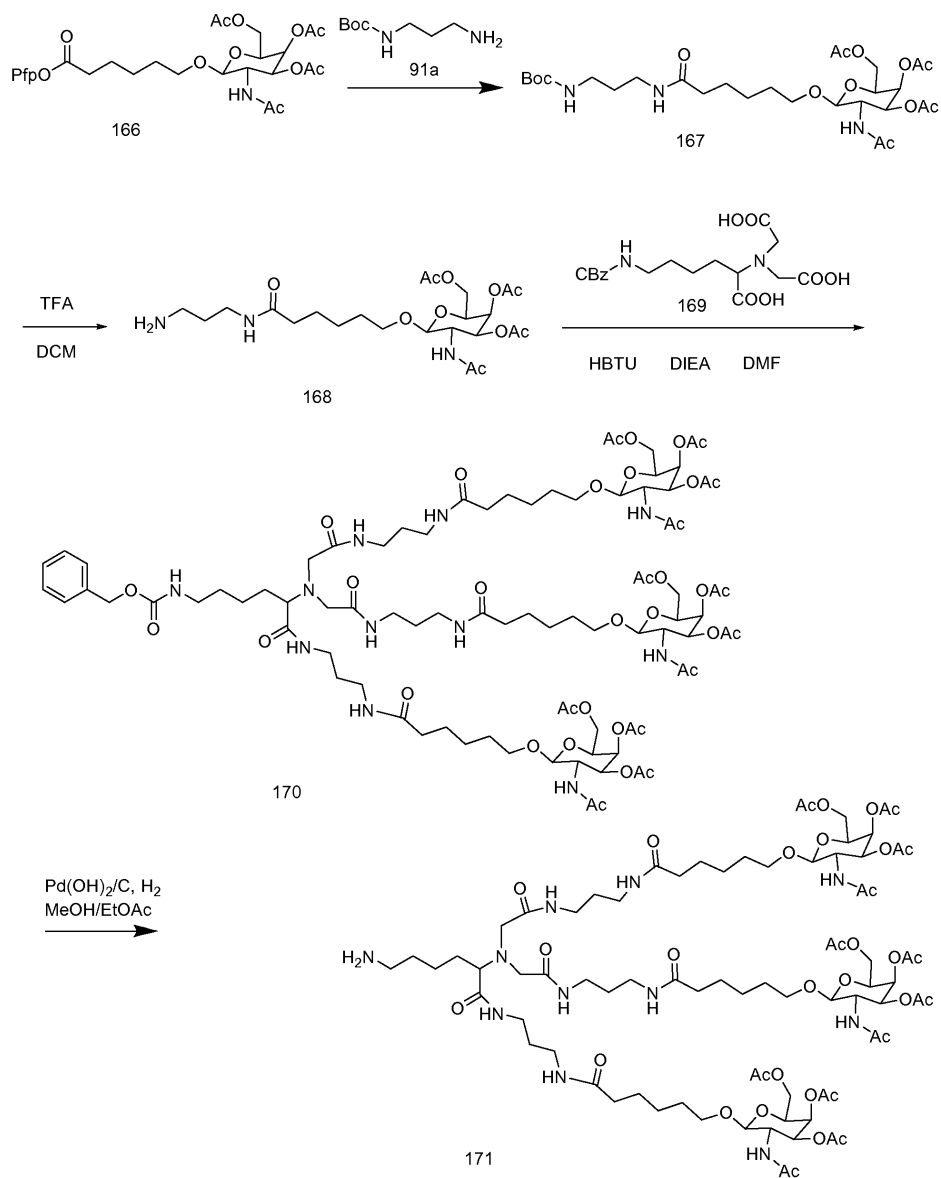
[1337] 표 40

ASO	IC ₅₀ (nM)	뉴클레오사이드간 연결	콘주게이트	서열번호
ISIS 353382	190 ^a	PS	없음	28
ISIS 655861	11 ^a	PS	GalNAc₃-1	29
ISIS 655862	3	PO/PS	GalNAc₃-1	29
ISIS 661161	15 ^a	PS	GalNAc₃-3	30
ISIS 665001	20	PS	GalNAc₃-8	30
ISIS 664078	55	PS	GalNAc₃-9	29
ISIS 666961	22 ^a	PS	GalNAc₃-6	30
ISIS 664507	30	PS	GalNAc₃-2	30
ISIS 666881	30	PS	GalNAc₃-10	30
ISIS 666224	30 ^a	PS	GalNAc₃-5	30
ISIS 666981	40	PS	GalNAc₃-7	30

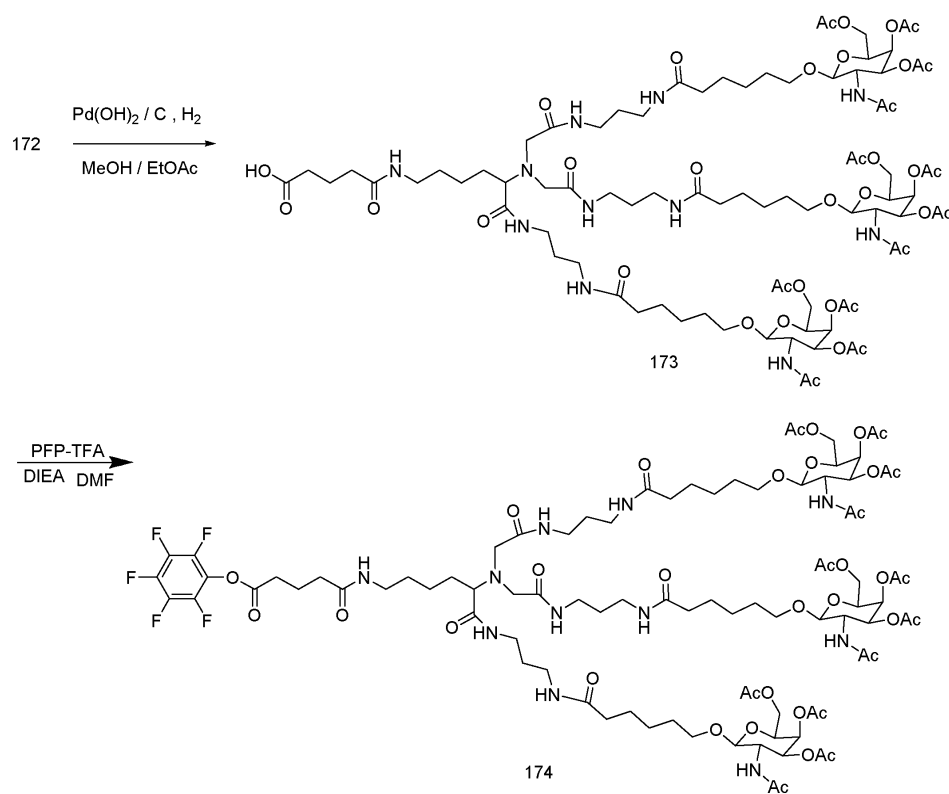
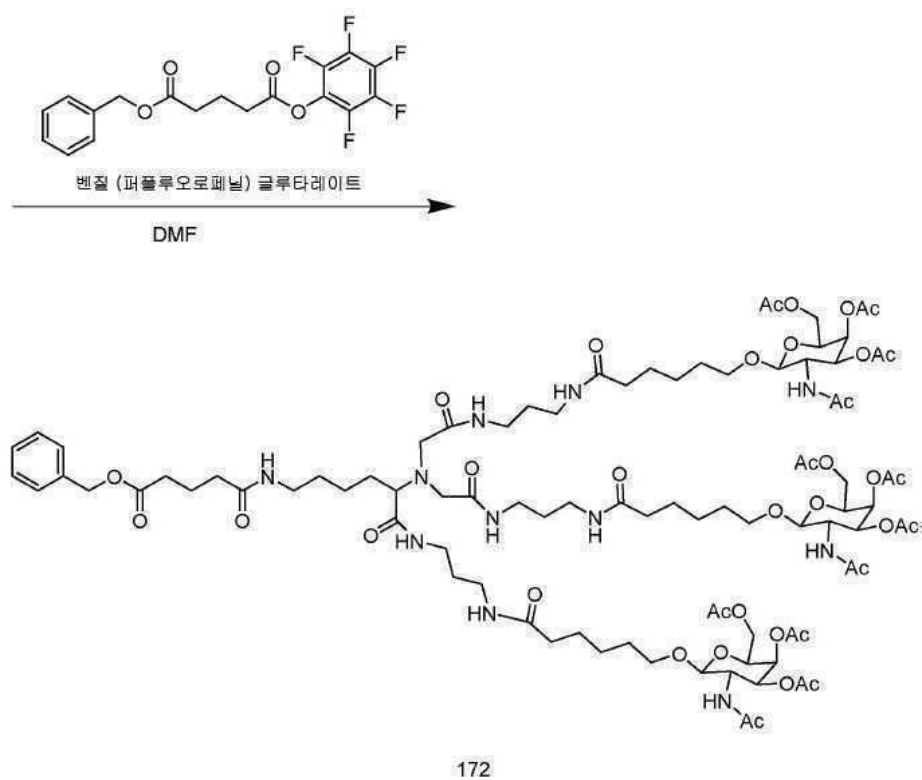
[1338]

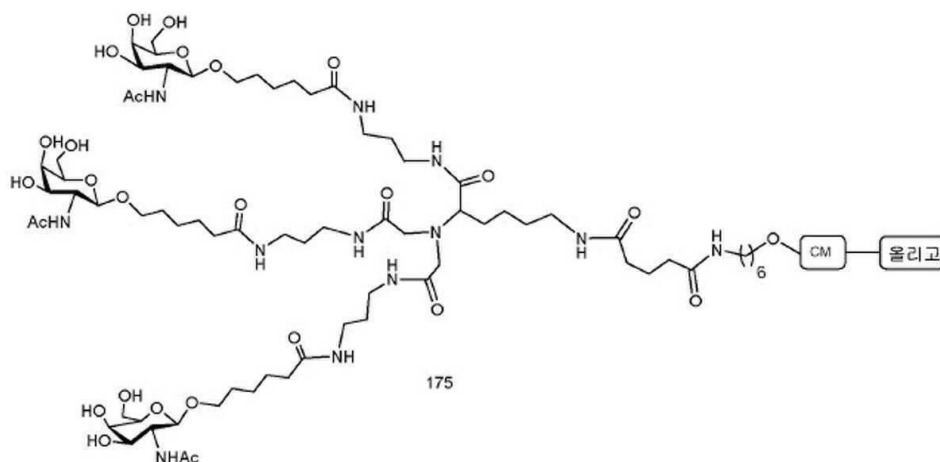
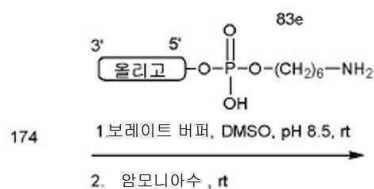
[1339] ^a다중 시험의 평균.

[1340] 실시예 61: GalNAc₃-12를 포함하는 올리고머 화합물 175의 제조



[1341]

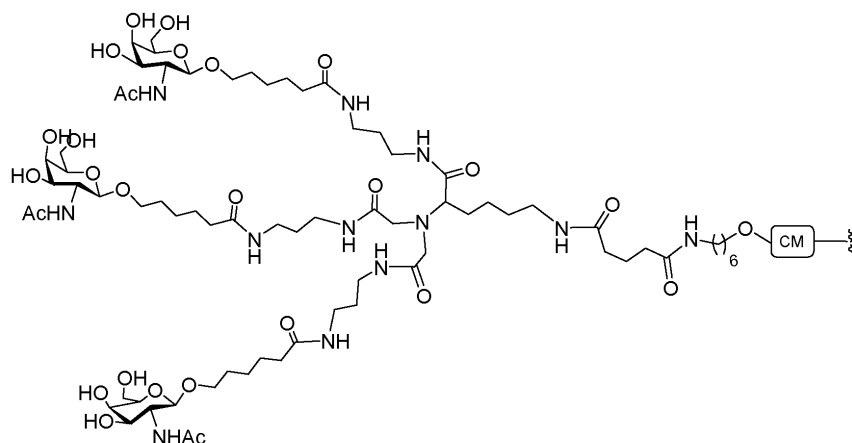




[1344]

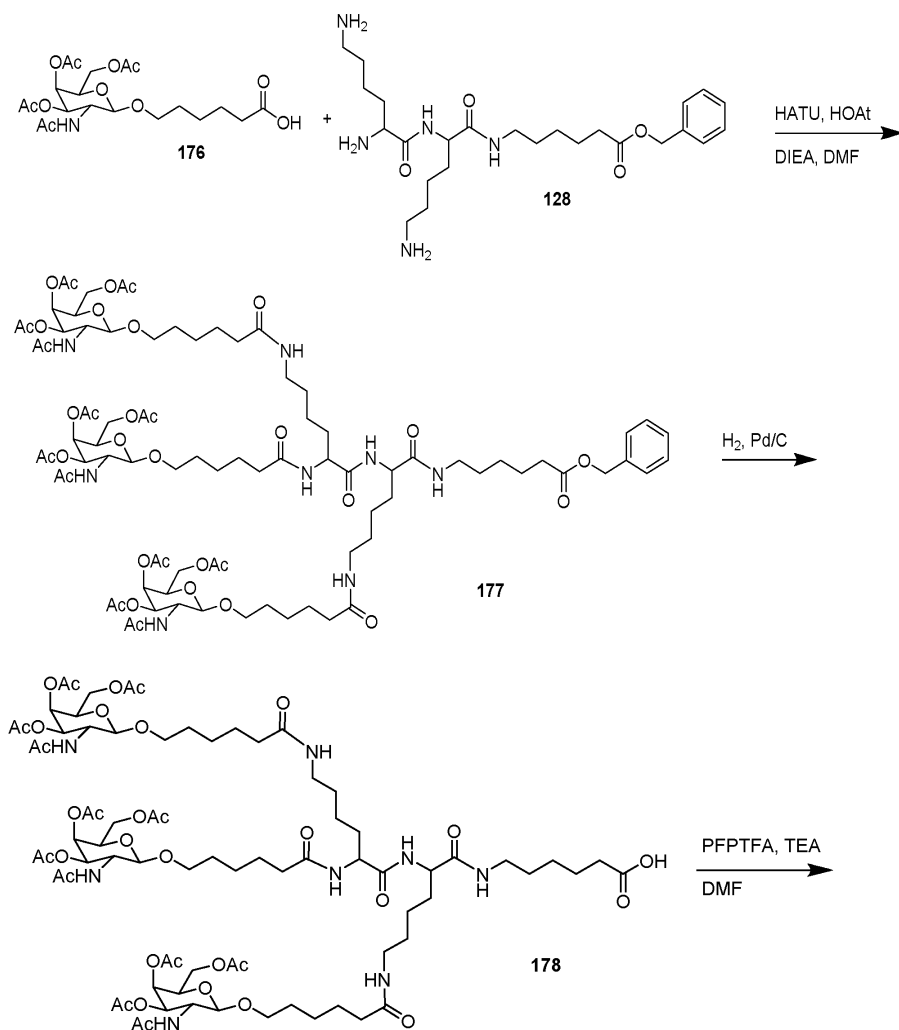
[1345]

화합물 169는 시판되고 있다. 화합물 172를, 벤질 (피플루오로페닐) 글루타레이트를 화합물 171에 부가하여 제조했다. 벤질 (피플루오로페닐) 글루타레이트를, DMF 중 PFP-TFA 및 DIEA을 5-(벤질옥시)-5-옥소펜탄산에 부가하여 제조했다. GalNAc₃-12 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 175는, 실시예 46에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 화합물 174로부터 제조되었다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-12 (GalNAc₃-12a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다. GalNAc₃-12 (GalNAc₃-12a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:

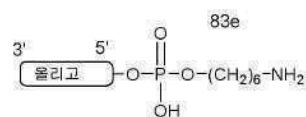
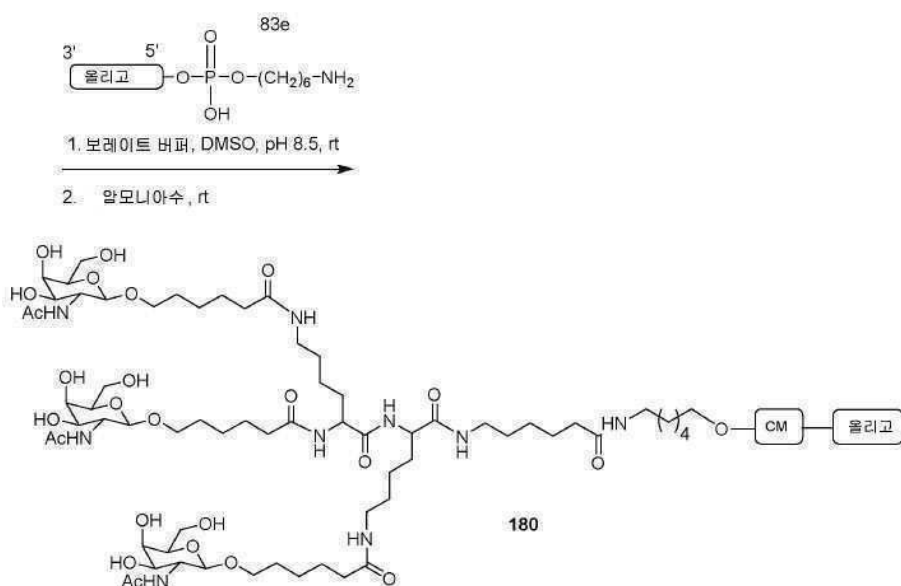
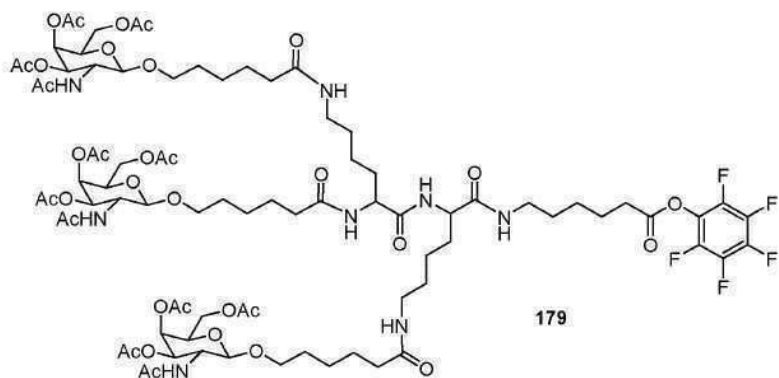


[1346]

[1347] 실시예 62: GalNAc₃-13을 포함하는 올리고머 화합물 180의 제조



[1348]

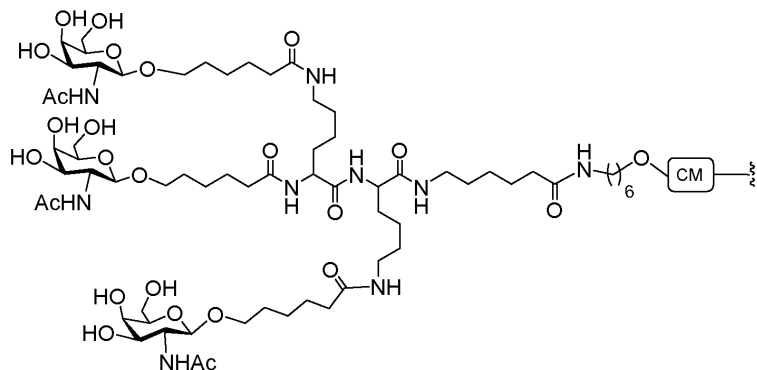


1. 보레이트 버퍼, DMSO, pH 8.5, rt
2. 알모니아수, rt

[1349]

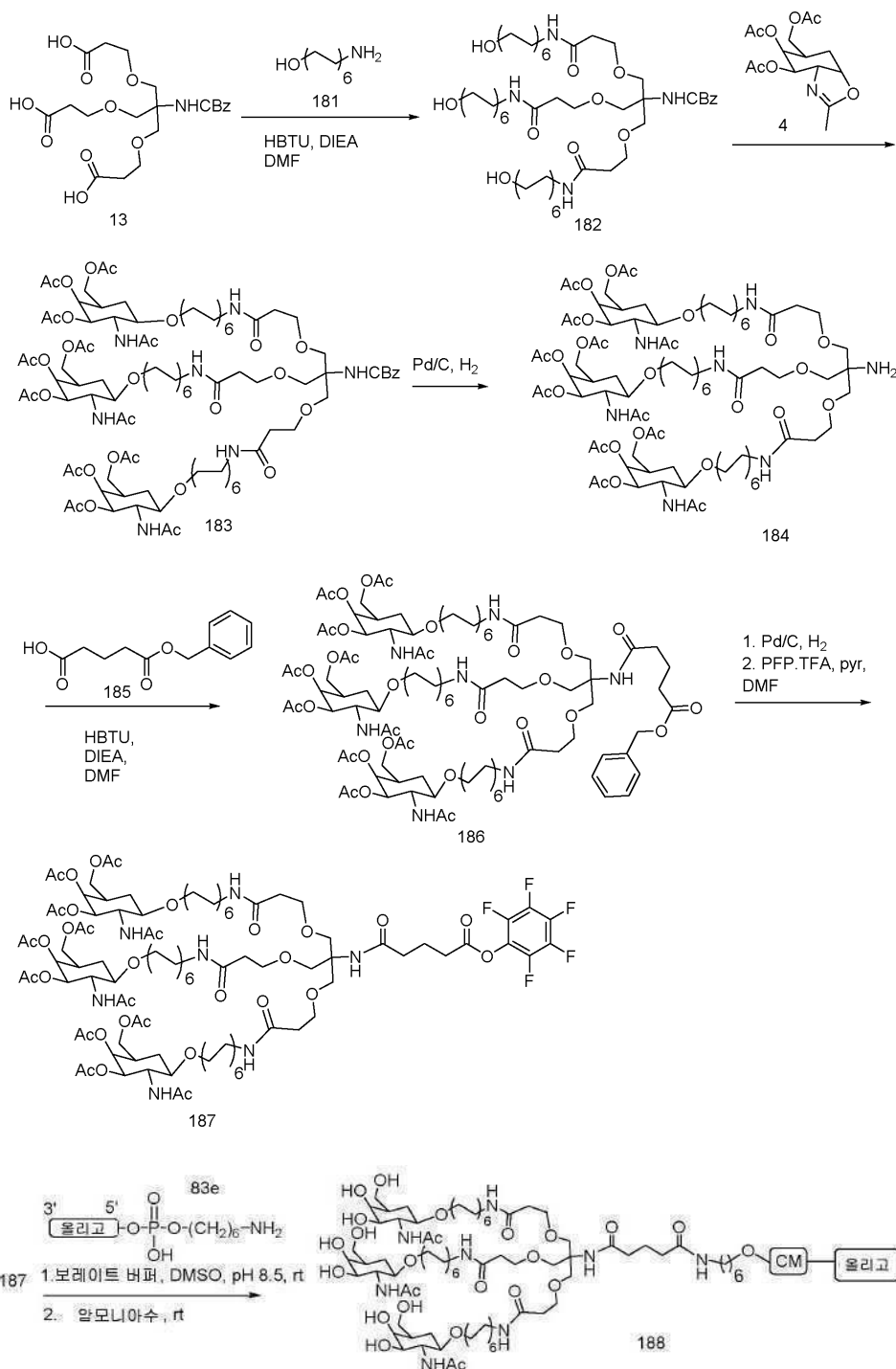
[1350]

화합물 176은 실시예 2에서 보여진 일반적인 절차를 사용하여 제조되었다. GalNAc₃-13 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 180은, 실시예 49에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 화합물 177로부터 제조되었다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-13 (GalNAc₃-13a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다. GalNAc₃-13 (GalNAc₃-13a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:



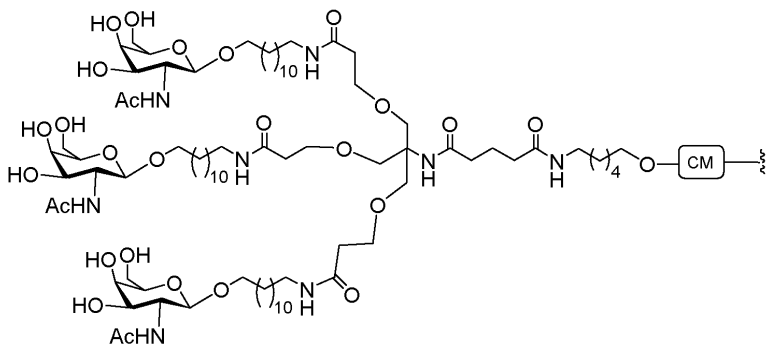
[1351]

[1352] 실시예 63: GalNAc₃-14를 포함하는 올리고머 화합물 188의 제조

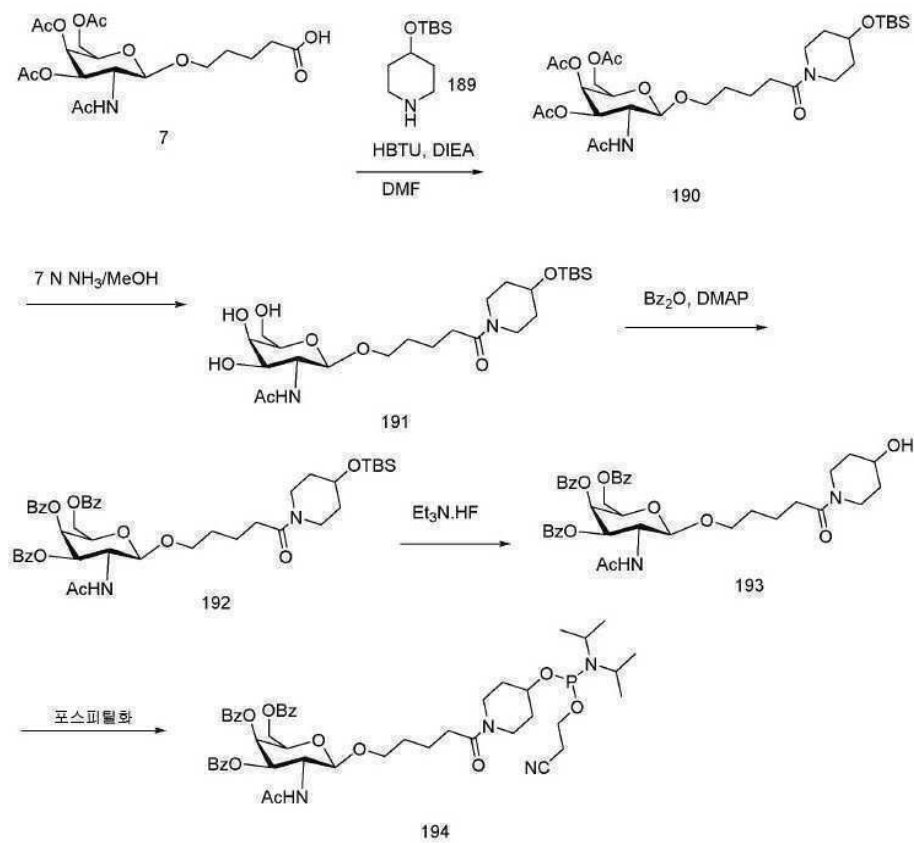


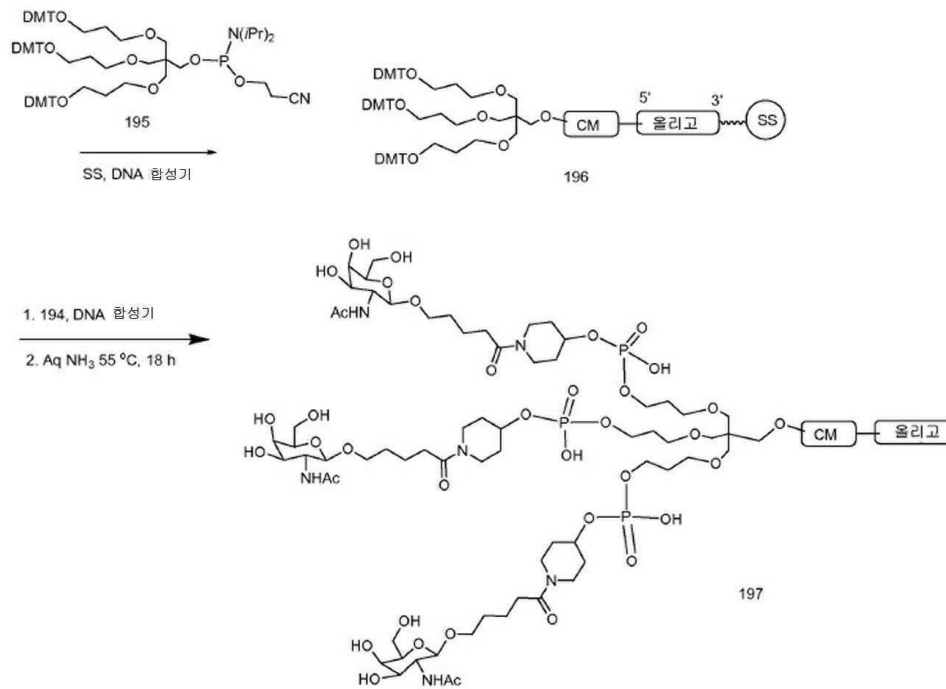
[1354]

[1355] 화합물 181 및 185는 시판되고 있다. GalNAc₃-14 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 188은, 실시예 46에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 화합물 187로부터 제조되었다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-14 (GalNAc₃-14a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다. GalNAc₃-14 (GalNAc₃-14a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:



실시예 64: GalNAc₃-15를 포함하는 올리고머 화합물 197의 제조

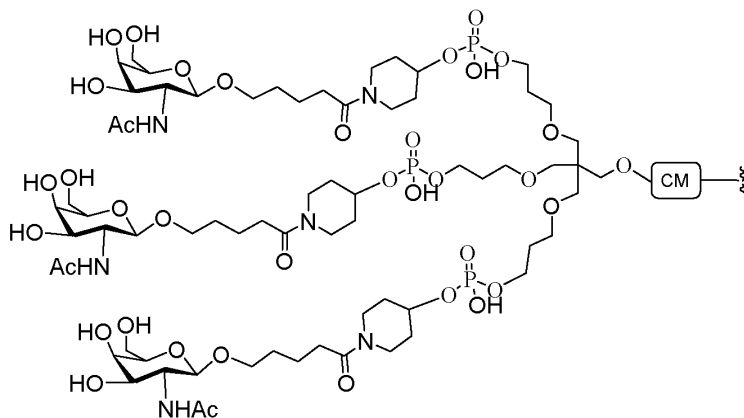




[1359]

[1360]

화합물 189는 시판되고 있다. 화합물 195은 실시예 31에서 보여진 일반적인 절차를 사용하여 제조되었다. GalNAc₃-15 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 197은, 표준 올리고뉴클레오타이드 합성 절차를 사용하여 화합물 194 및 195로부터 제조되었다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-15 (GalNAc₃-15a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_n-P(=O)(OH)-이다. GalNAc₃-15 (GalNAc₃-15a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:



[1361]

[1362]

실시예 65: 생체내에서 SRB-1를 표적으로 하는 5'-콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 용량-의존적 연구 (GalNAc₃-3, 12, 13, 14, 및 15의 비교)

[1363]

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

[1364]

표 41

[1365] SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	콘주게이트	서열 번호
353382	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	없음	28
661161	GalNAC₃-3_a-o'-A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAC ₃ -3	30
671144	GalNAC₃-12_a-o'-A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAC ₃ -12	30
670061	GalNAC₃-13_a-o'-A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAC ₃ -13	30
671261	GalNAC₃-14_a-o'-A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAC ₃ -14	30
671262	GalNAC₃-15_a-o'-A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAC ₃ -15	30

[1366]

[1367] 대문자는 각 뉴클레오타이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오타이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오타이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

[1368]

GalNAC₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 이전에 보여졌다. GalNAC₃-12_a의 구조는 실시예 61에서 이전에 보여졌다. GalNAC₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 이전에 보여졌다. GalNAC₃-14_a의 구조는 실시예 63에서 이전에 보여졌다. GalNAC₃-15_a의 구조는 실시예 64에서 이전에 보여졌다.

[1369]

처리

[1370]

6 내지 8 주령 C57b16 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 아래에서 보여진 복용량으로 ISIS 353382, 661161, 671144, 670061, 671261, 671262, 또는 염수가 1 회 또는 2 회 피하로 주입되었다. 2 회 복용된 마우스는 제 1 용량 3일 후에 제 2 용량을 수용했다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 간 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 아래의 결과는 염수 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

[1371]

표 42에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다. 표준 녹다운의 유의미한 차이는 단회 용량을 수용한 동물과 2 회 용량을 수용한 동물 사이에 관찰되지 않았다 (참고 ISIS 353382 복용량 30 및 2 x 15 mg/kg; 및 ISIS 661161 복용량 5 및 2 x 2.5 mg/kg). 포스포디에스테르 연결된 GalNAC₃-3, 12, 13, 14, 및 15 콘주게이트를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 335382) 와 비교하여 효능의 실질적인 개선을 보여주었다.

[1372]

표 42

[1373] SRB-1 mRNA (% 염수)

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% 염수)	ED ₅₀ (mg/kg)	콘주게이트
염수	n/a	100.0	n/a	n/a
353382	3	85.0	22.4	없음
	10	69.2		
	30	34.2		
	2 x 15	36.0		
661161	0.5	87.4	2.2	GalNAc ₃ -3
	1.5	59.0		
	5	25.6		
	2 x 2.5	27.5		
	15	17.4		
671144	0.5	101.2	3.4	GalNAc ₃ -12
	1.5	76.1		
	5	32.0		
	15	17.6		
670061	0.5	94.8	2.1	GalNAc ₃ -13
	1.5	57.8		
	5	20.7		
	15	13.3		
671261	0.5	110.7	4.1	GalNAc ₃ -14
	1.5	81.9		
	5	39.8		
	15	14.1		
671262	0.5	109.4	9.8	GalNAc ₃ -15
	1.5	99.5		
	5	69.2		
	15	36.1		

[1374]

[1375]

혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다. 총 빌리루빈 및 BUN가 또한 평가되었다. 체중의 변화는 염수 그룹으로부터 유의미한 차이 없이 평가되었다 (데이터 도시되지 않음). ALT, AST, 총 빌리루빈 및 BUN 값은 아래의 표 43에서 보여진다.

[1376] 표 43

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	총 빌리루빈 (mg/dL)	BUN (mg/dL)	콘주게이트
염수	n/a	28	60	0.1	39	n/a
353382	3	30	77	0.2	36	없음
	10	25	78	0.2	36	
	30	28	62	0.2	35	
	2 x 15	22	59	0.2	33	
661161	0.5	39	72	0.2	34	GalNAc ₃ -3
	1.5	26	50	0.2	33	
	5	41	80	0.2	32	
	2 x 2.5	24	72	0.2	28	
	15	32	69	0.2	36	
671144	0.5	25	39	0.2	34	GalNAc ₃ -12
	1.5	26	55	0.2	28	
	5	48	82	0.2	34	
	15	23	46	0.2	32	
670061	0.5	27	53	0.2	33	GalNAc ₃ -13
	1.5	24	45	0.2	35	
	5	23	58	0.1	34	
	15	24	72	0.1	31	
671261	0.5	69	99	0.1	33	GalNAc ₃ -14
	1.5	34	62	0.1	33	
	5	43	73	0.1	32	
	15	32	53	0.2	30	
671262	0.5	24	51	0.2	29	GalNAc ₃ -15
	1.5	32	62	0.1	31	
	5	30	76	0.2	32	
	15	31	64	0.1	32	

[1377]

[1378] 실시예 66: 5'-GalNAc₃ 클러스터를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제에 대한 다양한 절단가능 모이어티의 효과

[1379] 아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다. 각각의 GalNAc₃ 콘주게이트 그룹은 포스포디에스테르 연결된 뉴클레오사이드 (절단가능 모이어티 (CM))에 의해 각 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서 부착되었다.

[1380] 표 44

[1381] SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번 호
661161	GalNAc₃-3_a-o'-A_{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	30
670699	GalNAc₃-3_a-o'-T_{do} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	T _d	33
670700	GalNAc₃-3_a-o'-A_{eo} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _e	30
670701	GalNAc₃-3_a-o'-T_{eo} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	T _e	33
671165	GalNAc₃-13_a-o'-A_{do} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -13a	A _d	30

[1382]

[1383] 대문자는 각 뉴클레오타이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오타이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오타이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

[1384] GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-13a의 구조는 실시예 62에서 이전에 보여졌다.

[1385] 처리

[1386] 6 내지 8 주령 C57b16 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 ISIS 661161, 670699, 670700, 670701, 671165, 또는 염수가 아래에서 보여진 복용량으로 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 간 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 아래의 결과는 염수 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

[1387] 표 45에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다. 다양한 절단가능 모이어티 모두를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 유사한 효능을 보여주었다.

[1388] 표 45

[1389] SRB-1 mRNA (염수 %)

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% 염수)	GalNAC ₃ 클러스터	CM
염수	n/a	100.0	n/a	n/a
661161	0.5	87.8	GalNAC ₃ -3a	A _d
	1.5	61.3		
	5	33.8		
	15	14.0		
670699	0.5	89.4	GalNAC ₃ -3a	T _d
	1.5	59.4		
	5	31.3		
	15	17.1		
670700	0.5	79.0	GalNAC ₃ -3a	A _e
	1.5	63.3		
	5	32.8		
	15	17.9		
670701	0.5	79.1	GalNAC ₃ -3a	T _e
	1.5	59.2		
	5	35.8		
	15	17.7		
671165	0.5	76.4	GalNAC ₃ -13a	A _d
	1.5	43.2		
	5	22.6		
	15	10.0		

[1390]

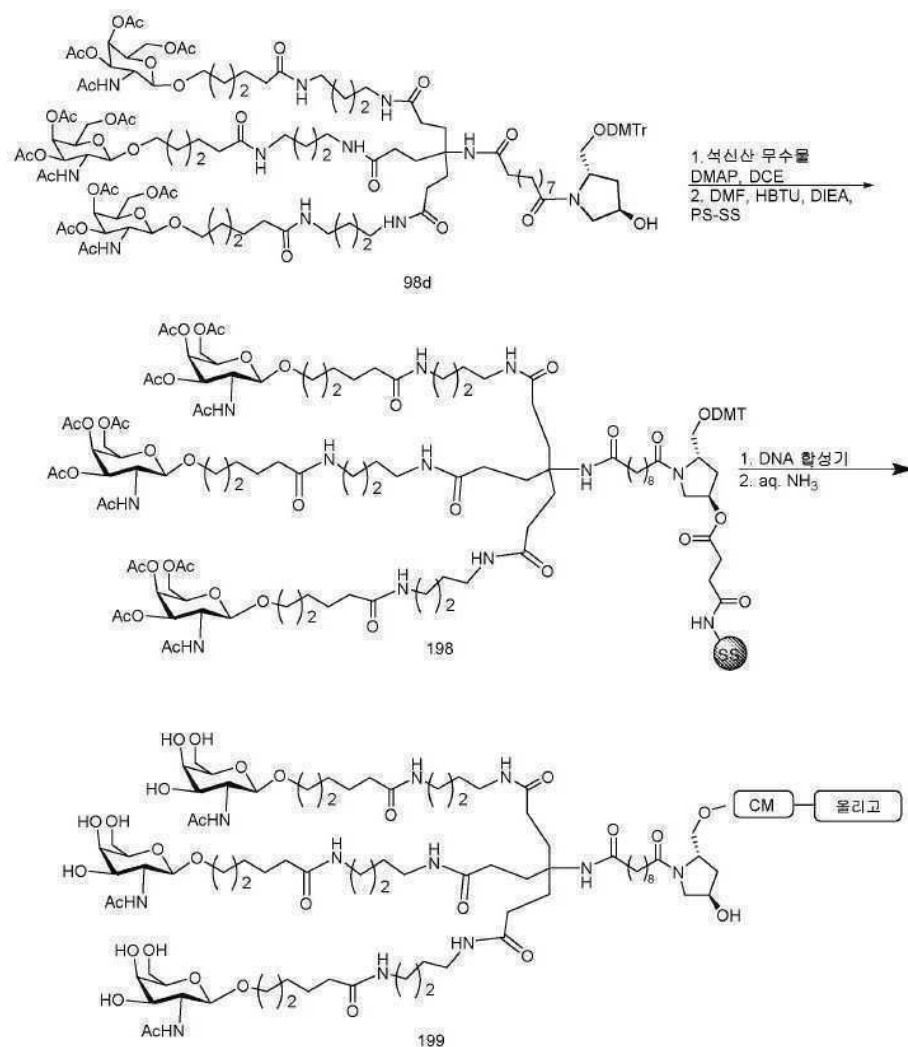
[1391] 혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다. 총 빌리루빈 및 BUN가 또한 평가되었다. 체중의 변화는 염수 그룹으로부터 유의미한 차이 없이 평가되었다 (데이터 도시되지 않음). ALT, AST, 총 빌리루빈 및 BUN 값은 아래의 표 46에서 보여진다.

[1392] 표 46

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	총 빌리루빈 (mg/dL)	BUN (mg/dL)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
염수	n/a	24	64	0.2	31	n/a	n/a
661161	0.5	25	64	0.2	31	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	24	50	0.2	32		
	5	26	55	0.2	28		
	15	27	52	0.2	31		
670699	0.5	42	83	0.2	31	GalNAc ₃ -3a	T _d
	1.5	33	58	0.2	32		
	5	26	70	0.2	29		
	15	25	67	0.2	29		
670700	0.5	40	74	0.2	27	GalNAc ₃ -3a	A _e
	1.5	23	62	0.2	27		
	5	24	49	0.2	29		
	15	25	87	0.1	25		
670701	0.5	30	77	0.2	27	GalNAc ₃ -3a	T _e
	1.5	22	55	0.2	30		
	5	81	101	0.2	25		
	15	31	82	0.2	24		
671165	0.5	44	84	0.2	26	GalNAc ₃ -13a	A _d
	1.5	47	71	0.1	24		
	5	33	91	0.2	26		
	15	33	56	0.2	29		

[1393]

[1394] 실시예 67: GalNAc₃-16을 포함하는 올리고머 화합물 199의 제조

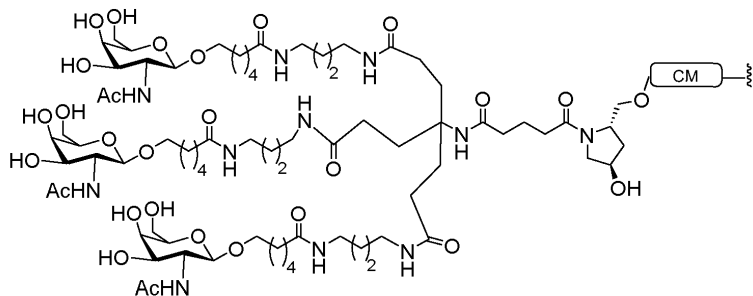


[1395]

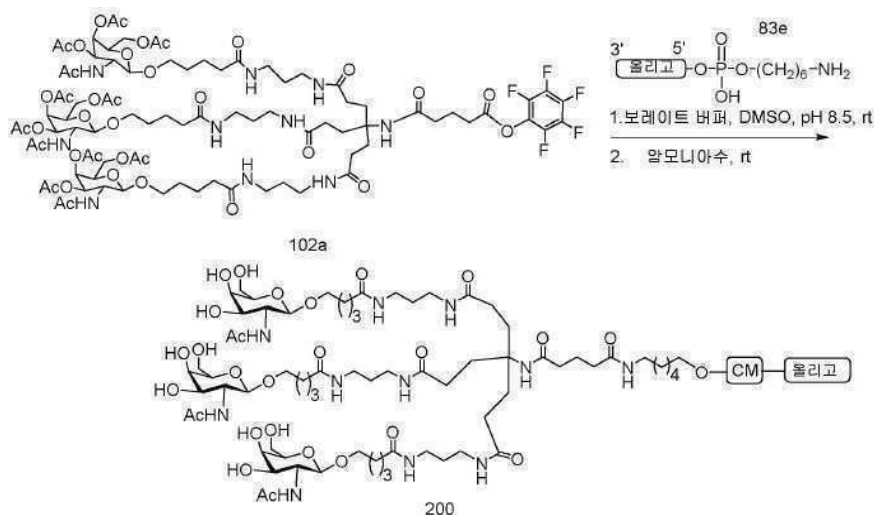
[1396]

GalNAc₃-16 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 199는, 실시예 7 및 9에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 제조된다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-16 (GalNAc₃-16a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다. GalNAc₃-16 (GalNAc₃-16a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:

[1397]



[1398] 실시예 68: GalNAc₃-17을 포함하는 올리고머 화합물 200의 제조

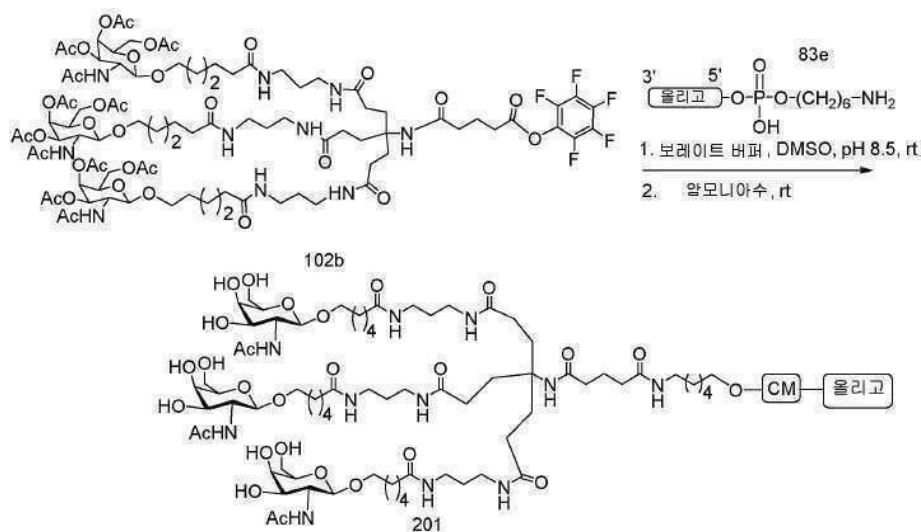


[1399]

[1400] GalNAc₃-17 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 200은, 실시예 46에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 제조되었다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-17 (GalNAc₃-17a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{A}_d-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-$ 이다. GalNAc₃-17 (GalNAc₃-17a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:

[1401]

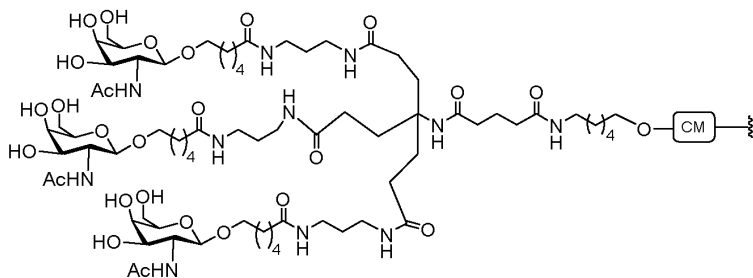
[1402] 실시예 69: GalNAc₃-18을 포함하는 올리고머 화합물 201의 제조



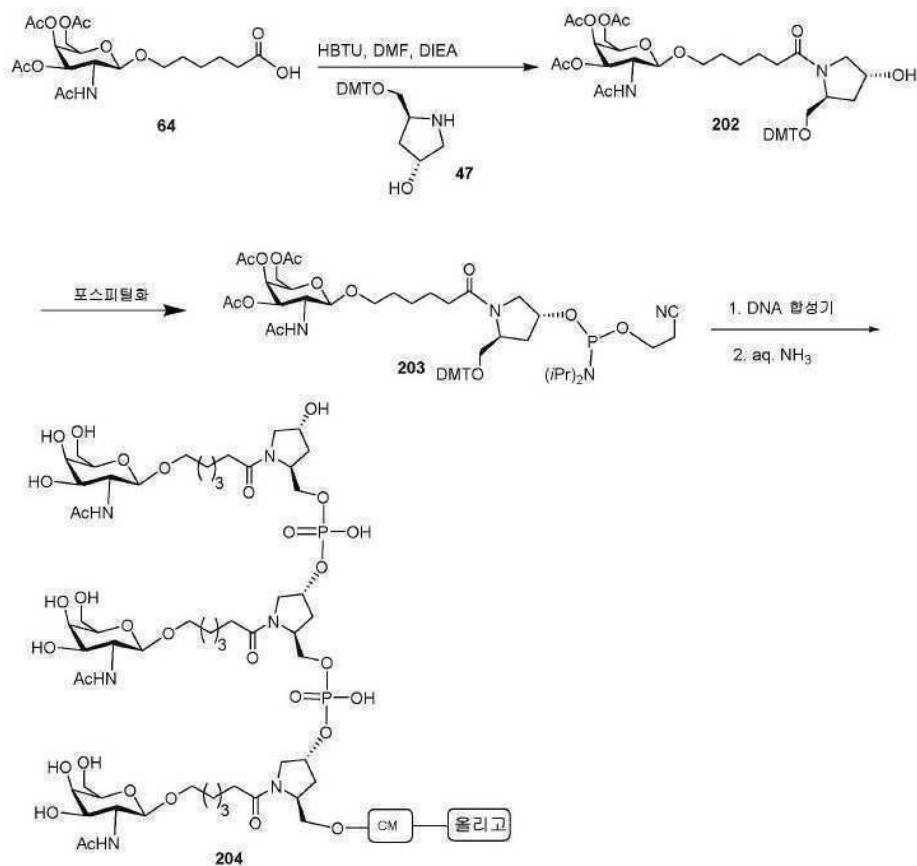
[1403]

[1404] GalNAc₃-18 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 201은, 실시예 46에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 제조되었다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-18 (GalNAc₃-18a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-$

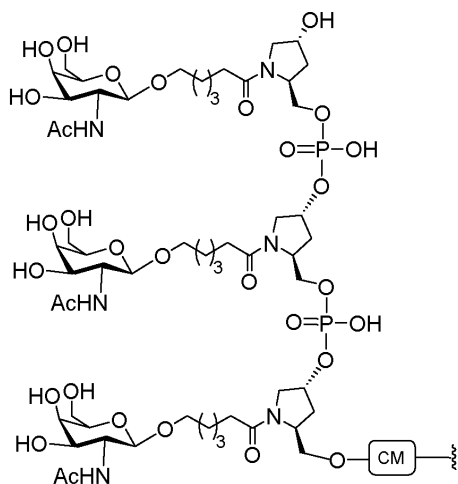
$A_d-P(=O)(OH)-$ 이다. $GalNAc_3-18$ ($GalNAc_3-18_a-CM-$)의 구조는 이하에서 보여진다:



실시예 70: $GalNAc_3-19$ 을 포함하는 올리고머 화합물 204의 제조

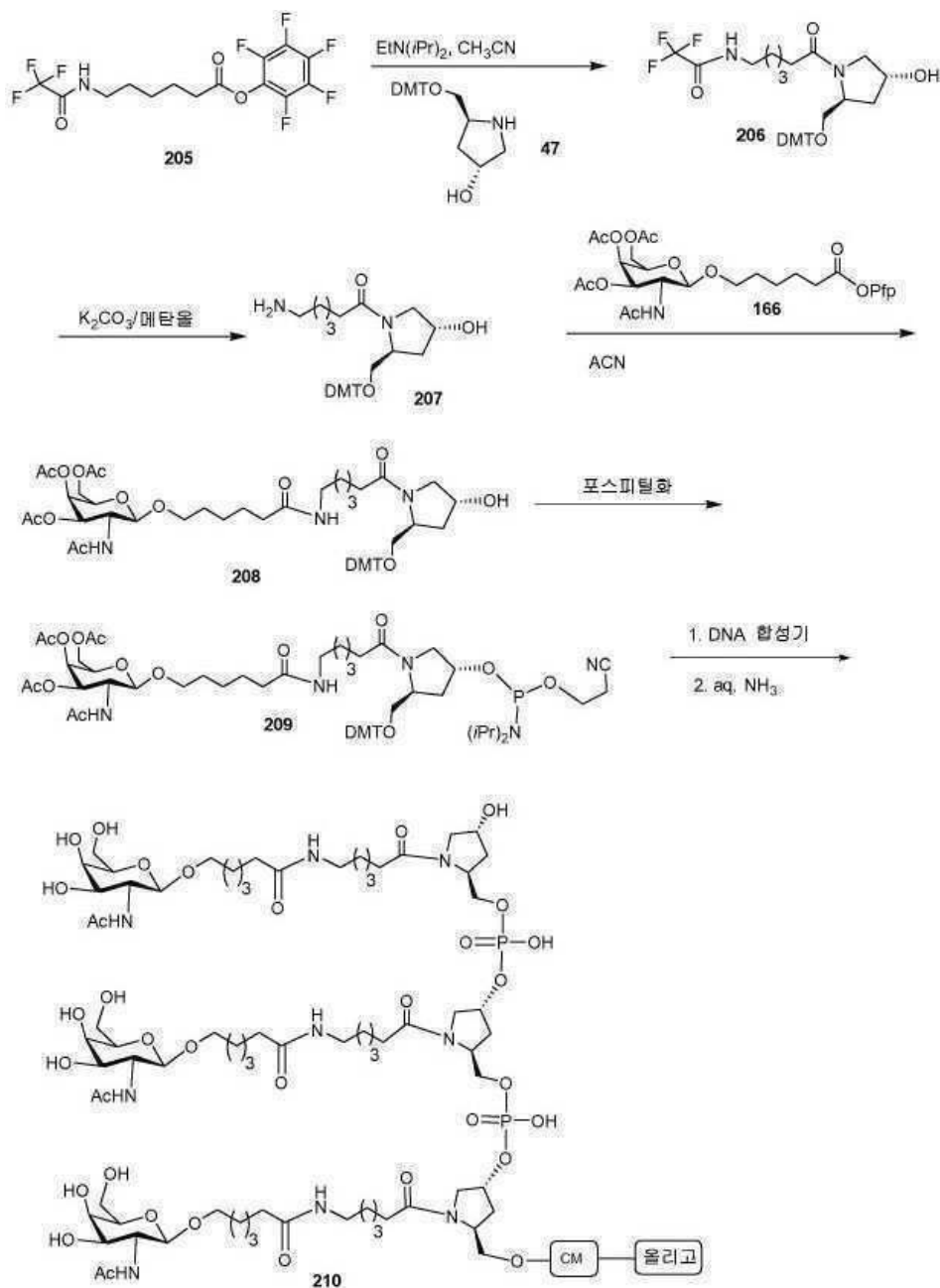


$GalNAc_3-19$ 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 204는, 실시예 52에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 화합물 64로부터 제조되었다. 콘주게이트 그룹 $GalNAc_3-19$ ($GalNAc_3-19_a$)의 $GalNAc_3$ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 $-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-$ 이다. $GalNAc_3-19$ ($GalNAc_3-19_a-CM-$)의 구조는 이하에서 보여진다:



[1409]

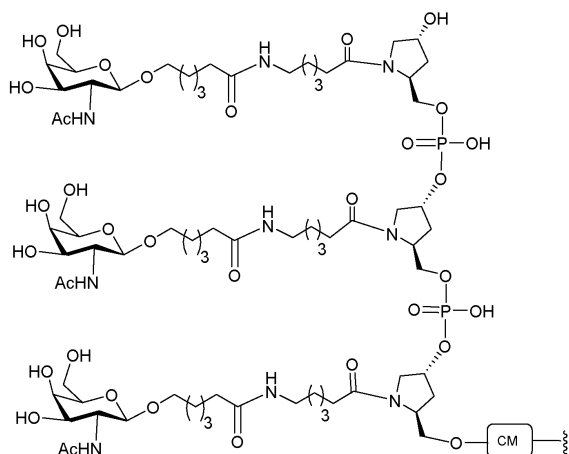
[1410] 실시예 71: GaINAc₃-20을 포함하는 올리고머 화합물 210의 제조



[1411]

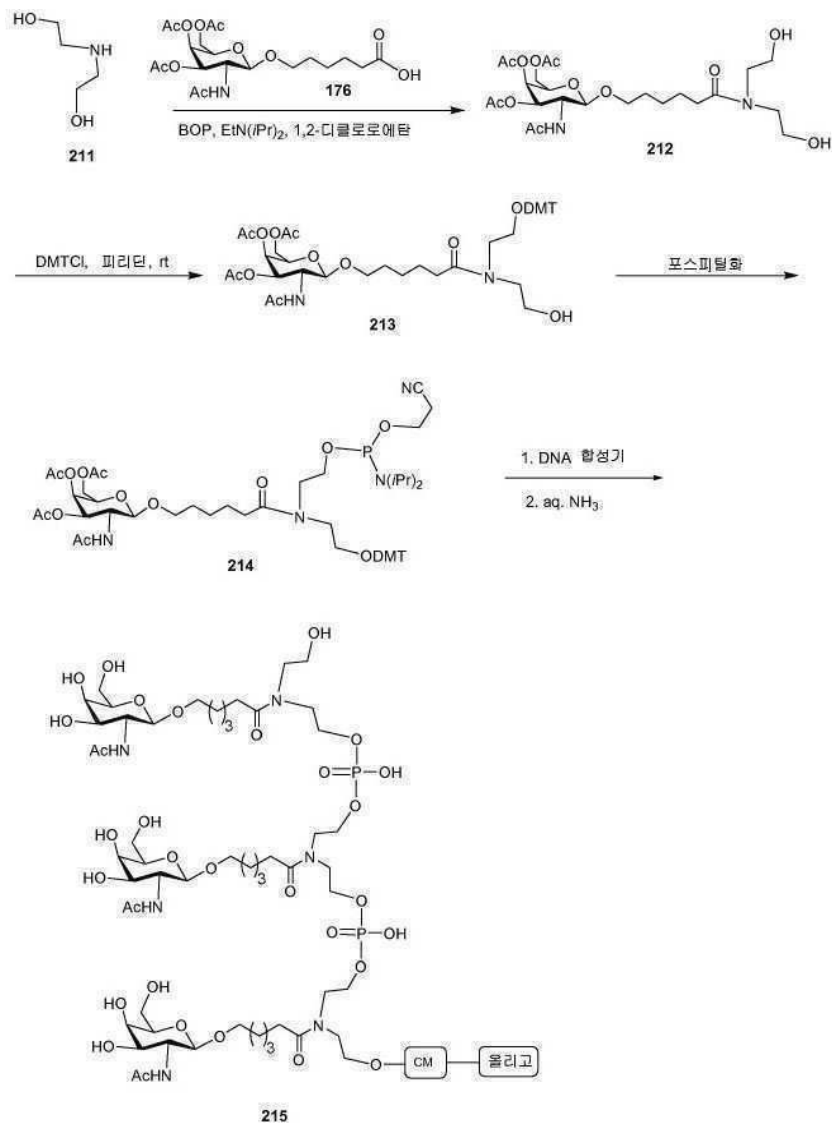
[1412]

화합물 205을, 트리플릭산 무수물을 6-아미노헥산산에 부가하여 제조된 아세토니트릴에서 PFP-TFA 및 DIEA을 6-(2,2,2-트리플루오로아세트아미도)헥산산에 부가하여 제조했다. 반응 혼합물을 80 °C로 가열하고, 그 다음 실온으로 낮게 했다. GalNAc₃-20 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 210은, 실시예 52에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 화합물 208로부터 제조되었다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-20 (GalNAc₃-20a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다. GalNAc₃-20 (GalNAc₃-20a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:



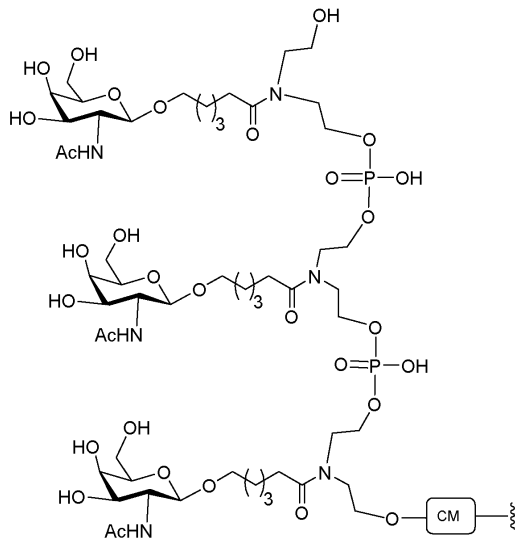
[1413]

[1414] 실시예 72: GalNAc₃-21을 포함하는 올리고머 화합물 215의 제조



[1415]

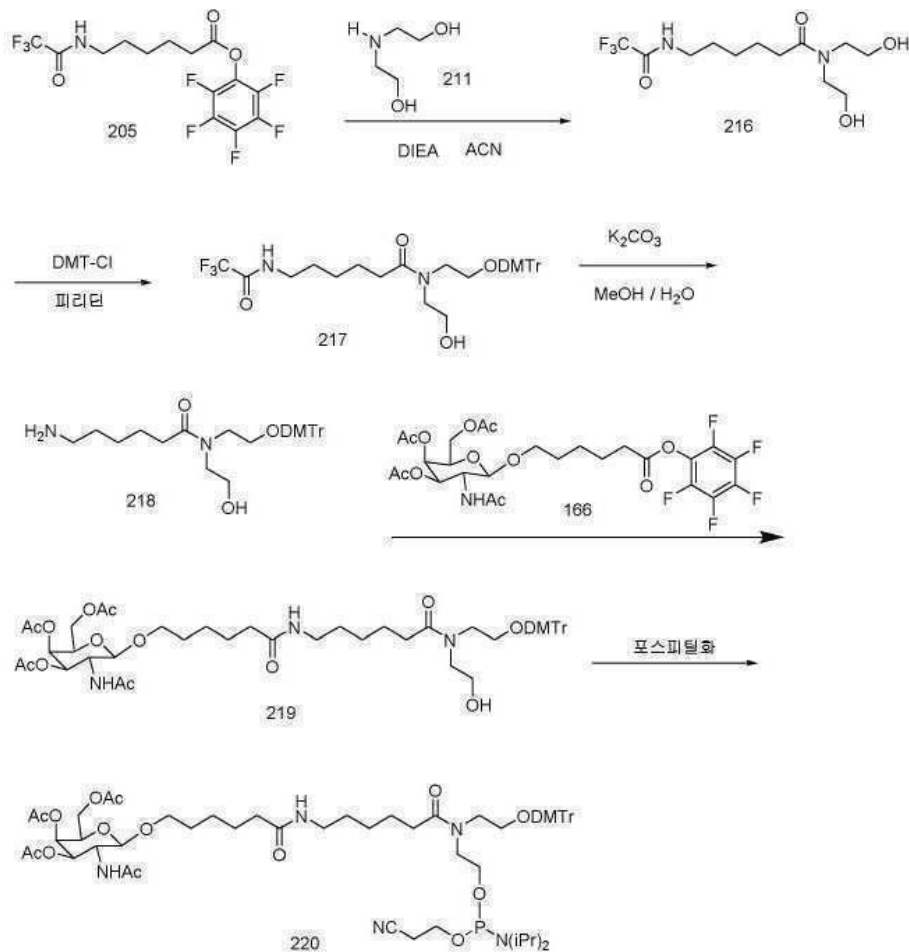
[1416] 화합물 211는 시판되고 있다. GalNAc₃-21 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 215은, 실시예 52에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 화합물 213로부터 제조되었다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-21 (GalNAc₃-21_a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다. GalNAc₃-21 (GalNAc₃-21_a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:



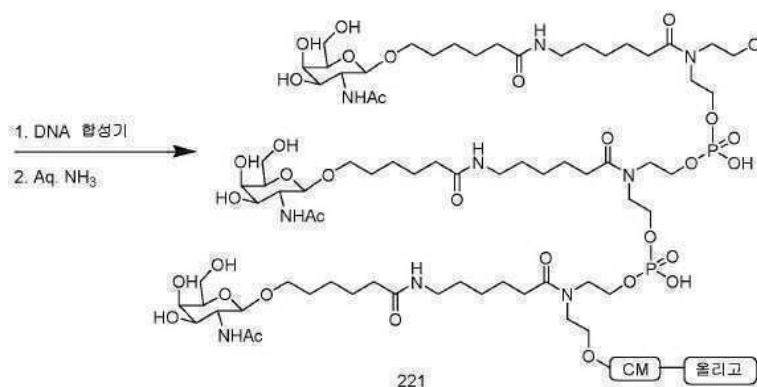
[1417]

[1418]

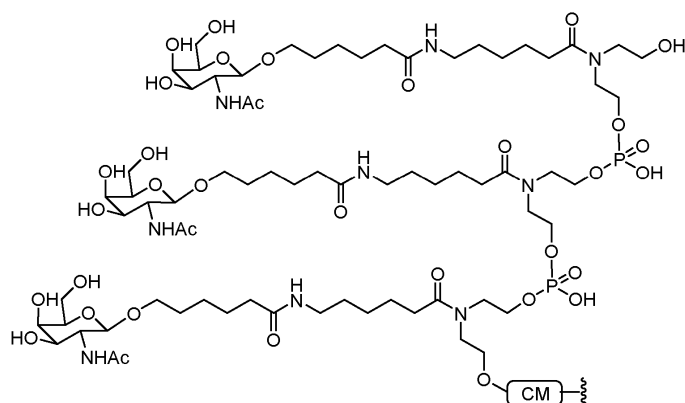
실시예 73: GalNAc₃-22을 포함하는 올리고머 화합물 221의 제조



[1419]



화합물 220은 디이소프로필암모늄 테트라졸라이드를 사용하여 화합물 219로부터 제조되었다. GalNAc₃-21 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 221은, 실시예 52에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 화합물 220로부터 제조된다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₃-22 (GalNAc₃-22a)의 GalNAc₃ 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-이다. GalNAc₃-22 (GalNAc₃-22a-CM-)의 구조는 이하에서 보여진다:



실시예 74: 5'-GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제에 대한 다양한 절단가능 모이어티의 효과

아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다. 각각의 GalNAc₃ 콘주게이트 그룹은 각 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서 부착되었다.

표 47

[1426] SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
353382	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}$ $^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	n/a	n/a	28
661161	GalNAc₃-3a-o-A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc ₃ -3a	A _d	30
666904	GalNAc₃-3a-o-G $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc ₃ -3a	PO	28
675441	GalNAc₃-17a-o-A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc ₃ -17a	A _d	30
675442	GalNAc₃-18a-o-A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc ₃ -18a	A _d	30

[1427]

[1428] 모든 표에서, 대문자는 각 뉴클레오타이드에 대한 핵염기를 나타내고 ^mC는 5-메틸 시토신을 나타낸다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오타이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오타이드를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결 (PO)을 나타내고; 그리고 "o'"는 -O-P(=O)(OH)-를 나타낸다. 콘주게이트 그룹은 굵은 글자체이다.

[1429] GalNAc₃-3a의 구조는 실시예 39에서 이전에 보여졌다. GalNAc₃-17a의 구조는 실시예 68에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-18a의 구조는 실시예 69에서 보여졌다.

[1430] 처리

[1431] 6 내지 8 주령 C57BL/6 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 표 47에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 염수가 아래에서 보여진 복용량으로 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 아래의 결과는 염수 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

[1432] 표 48에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다. GalNAc 콘주게이트를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사한 효능을 보여주었고 GalNAc 콘주게이트가 없는 모 올리고뉴클레오타이드보다 유의미하게 더 강했다.

[1433] 표 48

[1434] SRB-1 mRNA (염수 %)

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% 염수)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
염수	n/a	100.0	n/a	n/a
353382	3	79.38	n/a	n/a
	10	68.67		
	30	40.70		
661161	0.5	79.18	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	75.96		
	5	30.53		
	15	12.52		
666904	0.5	91.30	GalNAc ₃ -3a	PO
	1.5	57.88		
	5	21.22		
	15	16.49		
675441	0.5	76.71	GalNAc ₃ -17a	A _d
	1.5	63.63		
	5	29.57		
	15	13.49		
675442	0.5	95.03	GalNAc ₃ -18a	A _d
	1.5	60.06		
	5	31.04		
	15	19.40		

[1435]

[1436] 혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 염수 주입된 마우스에 대해 측정되었다. 총 빌리루빈 및 BUN가 또한 평가되었다. 체중의 변화를 염수 그룹으로부터 유의미한 변화 없이 평가했다 (데이터 도시되지 않음). ALT, AST, 총 빌리루빈 및 BUN 값은 아래의 표 49에서 보여진다.

[1437] 표 49

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	총 빌리루빈 (mg/dL)	BUN (mg/dL)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
염수	n/a	26	59	0.16	42	n/a	n/a
353382	3	23	58	0.18	39	n/a	n/a
	10	28	58	0.16	43		
	30	20	48	0.12	34		
661161	0.5	30	47	0.13	35	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	23	53	0.14	37		
	5	26	48	0.15	39		
	15	32	57	0.15	42		
666904	0.5	24	73	0.13	36	GalNAc ₃ -3a	PO
	1.5	21	48	0.12	32		
	5	19	49	0.14	33		
	15	20	52	0.15	26		
675441	0.5	42	148	0.21	36	GalNAc ₃ -17a	A _d
	1.5	60	95	0.16	34		
	5	27	75	0.14	37		
	15	24	61	0.14	36		
675442	0.5	26	65	0.15	37	GalNAc ₃ -18a	A _d
	1.5	25	64	0.15	43		
	5	27	69	0.15	37		
	15	30	84	0.14	37		

[1438]

[1439] 실시예 75: 5'-콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 약력학적 분석

[1440] 상기 표 41, 44 및 47 중 ASO의 PK를, 실시예 65, 66, 및 74에서 기재된 처리 절차에 따라 수득된 간 샘플을 사용하여 평가했다. 간 샘플을 다지고 표준 프로토콜을 사용하여 추출하고 내부 표준과 함께 IP-HPLC-MS로 분석했다. 모든 대사물의 조합된 조직 수준 ($\mu\text{g/g}$)은 적절한 UV 피크를 통합하여 측정되었고, (이 경우에 Isis 번호 353382인 "모") 콘주게이트를 누락한 전장 ASO의 조직 수준을 적절한 추출된 이온 크로마토그램 (EIC)를 사용하여 측정했다.

[1441] 표 50

[1442] 간 중 PK 분석

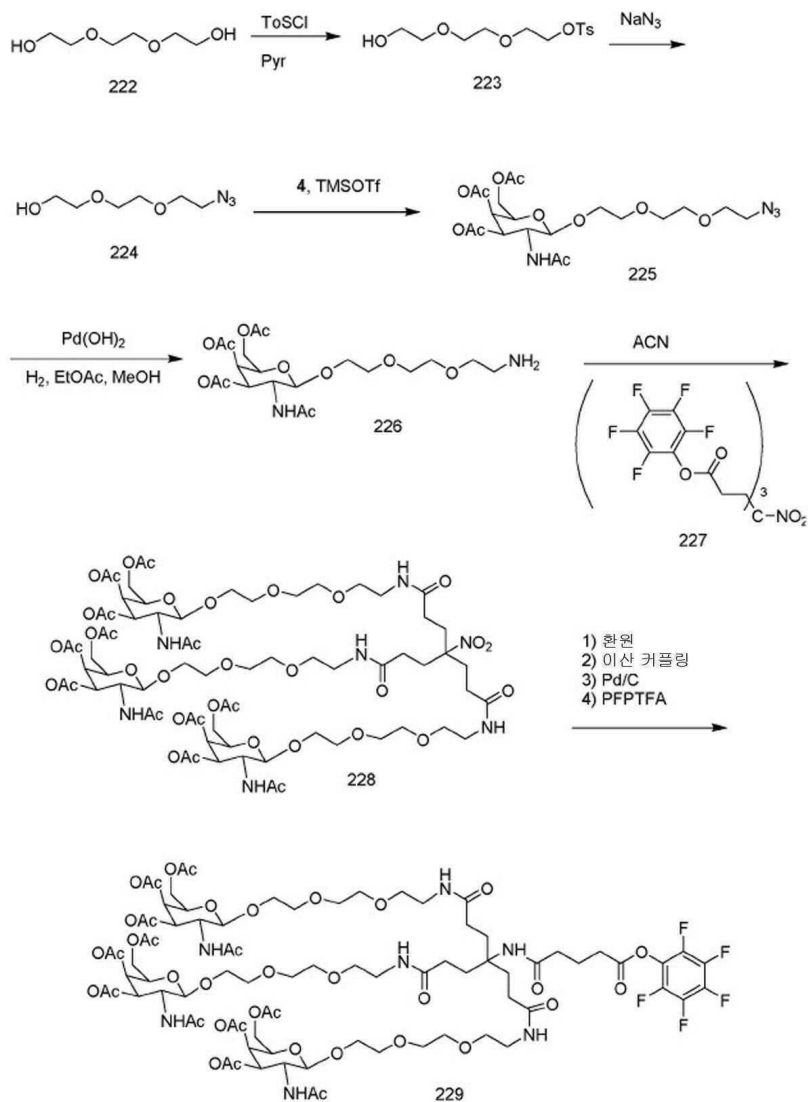
ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	UV에 의한 총 조직 수준 (µg/g)	EIC에 의한 모 ASO 조직 수준 (µg/g)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
353382	3	8.9	8.6	n/a	n/a
	10	22.4	21.0		
	30	54.2	44.2		
661161	5	32.4	20.7	GalNAc ₃ -3a	A _d
	15	63.2	44.1		
671144	5	20.5	19.2	GalNAc ₃ -12a	A _d
	15	48.6	41.5		
670061	5	31.6	28.0	GalNAc ₃ -13a	A _d
	15	67.6	55.5		
671261	5	19.8	16.8	GalNAc ₃ -14a	A _d
	15	64.7	49.1		
671262	5	18.5	7.4	GalNAc ₃ -15a	A _d
	15	52.3	24.2		
670699	5	16.4	10.4	GalNAc ₃ -3a	T _d
	15	31.5	22.5		
670700	5	19.3	10.9	GalNAc ₃ -3a	A _e
	15	38.1	20.0		
670701	5	21.8	8.8	GalNAc ₃ -3a	T _e
	15	35.2	16.1		
671165	5	27.1	26.5	GalNAc ₃ -13a	A _d
	15	48.3	44.3		
666904	5	30.8	24.0	GalNAc ₃ -3a	PO
	15	52.6	37.6		
675441	5	25.4	19.0	GalNAc ₃ -17a	A _d
	15	54.2	42.1		
675442	5	22.2	20.7	GalNAc ₃ -18a	A _d
	15	39.6	29.0		

[1443]

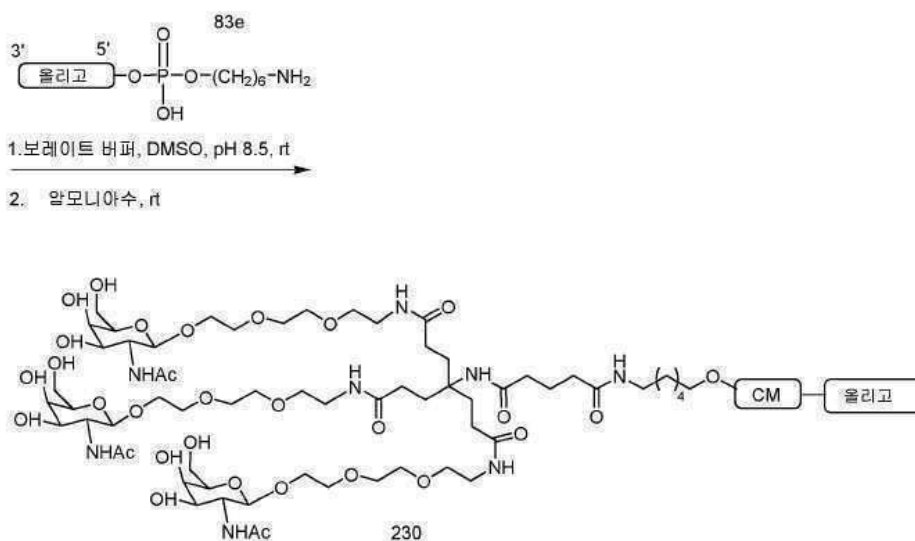
[1444]

상기 표 50의 결과는, 특히 GalNAc₃ 콘주게이트 그룹의 유무에 따라 올리고뉴클레오타이드 사이의 복용의 차리를 고려할 때, 올리고뉴클레오타이드 투여 72 시간 후에 GalNAc₃ 콘주게이트 그룹 (ISIS 353382)를 포함하지 않는 모 올리고뉴클레오타이드보다 GalNAc₃ 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 간 조직 수준이 더 크다는 것을 보여준다. 더욱이, 72 시간까지, GalNAc₃ 콘주게이트 그룹을 포함하는 각 올리고뉴클레오타이드의 40-98%는 대사작용되어 모 화합물을 얻었고, 이것은, GalNAc₃ 콘주게이트 그룹이 올리고뉴클레오타이드로부터 절단되었다는 것을 나타낸다.

[1445] 실시예 76: Ga1NAc₃-23을 포함하는 올리고머 화합물 230의 제조



[1446]



[1447]

[1448]

화합물 222는 시판되고 있다. 44.48 ml (0.33 mol)의 화합물 222를 피리딘 (500mL) 중 토실 클로라이드 (25.39 g, 0.13 mol)로 16 시간 동안 처리했다. 그 다음 반응을 증발시켜 오일을 얻고, EtOAc에서 용해시키고 물, 포화 NaHCO₃, 염수로 세정하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 에틸 아세테이트를 농축 건조하고 칼럼 크로마토그래피로

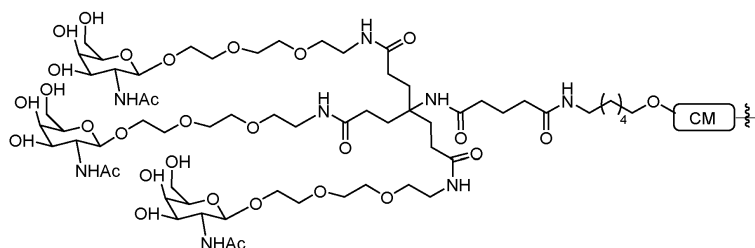
정제하고, EtOAc/헥산 (1:1) 그 다음 CH_2Cl_2 중 10% 메탄올로 용출하여 화합물 223을 무색 오일로서 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 10 g (32.86 mmol)의 1-토실트리에틸렌 글리콜 (화합물 223)을 DMSO (100mL) 중 아지드화나트륨 (10.68 g, 164.28 mmol)로 실온에서 17 시간 동안 처리했다. 그 다음 반응 혼합물을 물에 붓고, EtOAc로 추출했다. 유기 층을 물로 3 회 세정하고 Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 유기 층을 농축 건조하여 5.3g 의 화합물 224 (92%)을 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 1-아지도트리에틸렌 글리콜 (화합물 224, 5.53 g, 23.69 mmol) 및 화합물 4 (6 g, 18.22 mmol)을 4A 분자체 (5g), 및 디클로로메탄 (100mL) 중 TMSOTf (1.65 ml, 9.11 mmol)로 불활성 분위기 하에서 처리했다. 14 시간 후, 반응을 여과하여 체를 제거하고, 유기 층을 포화 NaHCO_3 , 물, 염수로 세정하고, Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 유기 층을 농축 건조하고 칼럼 크로마토그래피로 정제하고, 디클로로메탄 중 2 내지 4% 메탄올의 구배로 용출하여 화합물 225를 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 화합물 225 (11.9 g, 23.59 mmol)을 펄만 촉매 상에서 EtOAc/메탄올 (4:1, 250mL)에서 수소첨가했다. 8 시간 후, 촉매를 여과로 제거하고 용매를 제거하고 건조시켜 화합물 226을 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다.

[1449]

화합물 227를 산출하기 위해, DMF (100mL) 중 니트로메탄트리스프로피온산 (4.17 g, 15.04 mmol) 및 휘니그 염기 (10.3 ml, 60.17 mmol)의 용액을 펜타플루오로트리플루오로 아세테이트 (9.05 ml, 52.65 mmol)로 적가 처리했다. 30 분 후, 반응을 빙수에 붓고 EtOAc로 추출했다. 유기 층을 물, 염수로 세정하고, Na_2SO_4 상에서 건조했다. 유기 층을 농축 건조하고 그 다음 헵탄으로부터 재결정화하여 화합물 227을 백색 고형물로서 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 화합물 227(1.5 g, 1.93 mmol) 및 화합물 226 (3.7 g, 7.74 mmol)을 실온에서 아세토니트릴 (15 mL)에서 2 시간 동안 교반했다. 그 다음 반응을 증발 건조하고 디클로로메탄 중 2 내지 10% 메탄올의 구배로 용출하는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 228을 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 화합물 228 (1.7 g, 1.02 mmol)을 에탄올 (100mL) 중 라니 니켈 (약 2g 습성)로 수소의 분위기에서 처리했다. 12 시간 후, 촉매를 여과로 제거하고 유기 층을 증발시켜 고형물을 얻었고, 이것을 직접적으로 다음 단계에서 사용했다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 이러한 고형물 (0.87 g, 0.53 mmol)을 DMF (5mL) 중 벤질글루타르산 (0.18 g, 0.8 mmol), HBTU (0.3 g, 0.8 mmol) 및 DIEA (273.7 μl , 1.6 mmol)로 처리했다. 16 시간 후, DMF를 감압 하에서 65°C에서 제거하여 오일을 얻었고, 오일을 디클로로메탄에서 용해시켰다. 유기 층을 포화 NaHCO_3 , 염수로 세정하고, Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 유기 층의 증발 후, 화합물을 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 디클로로메탄 중 2 내지 20% 메탄올의 구배로 용출하여 커플링된 생성물을 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 벤질 에스테르를 수소 분위기 하에서 1 시간 동안 펄만 촉매로 탈보호했다. 그 다음 촉매를 여과로 제거하고 용매를 제거하고 건조시켜 산을 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 산 (486 mg, 0.27 mmol)을 건조 DMF (3 mL)에서 용해시켰다. 피리딘 (53.61 μl , 0.66 mmol)을 부가하고 반응을 아르곤으로 퍼지했다. 펜타플루오로트리플루오로 아세테이트 (46.39 μl , 0.4 mmol)을 반응 혼합물에 서서히 부가했다. 반응의 색상은 담황색에서 암적색으로 변했고, 열은 연기가 생겼고, 이것을 아르곤의 스트림으로 없앴다. 반응을 실온에서 1 시간 동안 교반되도록 했다 (반응의 완료는 LCMS으로 확인되었다). 용매를 감압 (회전증발기) 하에서 70 °C에서 제거했다. 잔류물을 DCM으로 희석하고 1N NaHSO_4 , 염수로 세정하고, 포화된 중탄산나트륨 및 염수로 다시 세정했다. 유기물을 Na_2SO_4 상에서 건조하고, 여과하고, 농축 건조하여 225 mg의 화합물 229를 잘 부서지는 황색 폼으로서 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다.

[1450]

Ga1Nac_3 -23 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고머 화합물 230은, 실시예 46에서 실증된 일반적인 절차를 사용하여 화합물 229로부터 제조되었다. Ga1Nac_3 -23 콘주게이트 그룹 (Ga1Nac_3 -23_a)의 Ga1Nac_3 클러스터 부분은 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. Ga1Nac_3 -23 (Ga1Nac_3 -23_a-CM)의 구조는 이하에서 보여진다:



[1451]

[1452] 실시예 77: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제

[1453] 아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

[1454] 표 51

[1455] SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번 호
661161	GalNAc ₃ -3 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	30
666904	GalNAc ₃ -3 _a -o'-G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	PO	28
673502	GalNAc ₃ -10 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -10a	A _d	30
677844	GalNAc ₃ -9 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -9a	A _d	30
677843	GalNAc ₃ -23 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -23a	A _d	30
655861	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1a	A _d	29
677841	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -19 _a	GalNAc ₃ -19a	A _d	29
677842	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -20 _a	GalNAc ₃ -20a	A _d	29

[1456]

[1457] GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌고, GalNAc₃-9_a의 구조는 실시예 52에서 보여졌고, GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 보여졌고, GalNAc₃-19_a의 구조는 실시예 70에서 보여졌고, GalNAc₃-20_a의 구조는 실시예 71에서 보여졌고, GalNAc₃-23_a의 구조는 실시예 76에서 보여졌다.

[1458] 처리

[1459] 6 내지 8 주령 C57BL/6 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 각각에게 아래에서 보여진 복용량으로 표 51에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 염수가 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 72 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 아래의 결과는 염수 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

[1460] 표 52에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다.

[1461] 표 52

[1462] SRB-1 mRNA (% 염수)

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% 염수)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
염수	n/a	100.0	n/a	n/a
661161	0.5	89.18	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	77.02		
	5	29.10		
	15	12.64		
666904	0.5	93.11	GalNAc ₃ -3a	PO
	1.5	55.85		
	5	21.29		
	15	13.43		
673502	0.5	77.75	GalNAc ₃ -10a	A _d
	1.5	41.05		
	5	19.27		
	15	14.41		
677844	0.5	87.65	GalNAc ₃ -9a	A _d
	1.5	93.04		
	5	40.77		
	15	16.95		
677843	0.5	102.28	GalNAc ₃ -23a	A _d
	1.5	70.51		
	5	30.68		
	15	13.26		
655861	0.5	79.72	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1.5	55.48		
	5	26.99		
	15	17.58		
677841	0.5	67.43	GalNAc ₃ -19a	A _d
	1.5	45.13		
	5	27.02		
	15	12.41		
677842	0.5	64.13	GalNAc ₃ -20a	A _d
	1.5	53.56		
	5	20.47		
	15	10.23		

[1463]

[1464] 혈청 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 표준 프로토콜을 사용하여 또한 측정되었다. 총 빌리루빈 및 BUN가 또한 평가되었다. 체중의 변화가 평가되었고, 염수 그룹으로부터 유의미한 변화는 없었다 (데이터 도시되지 않음). ALT, AST, 총 빌리루빈 및 BUN 값은 아래의 표 53에서 보여진다.

[1465] 표 53

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	총 빌리루빈 (mg/dL)	BUN (mg/dL)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
염수	n/a	21	45	0.13	34	n/a	n/a
661161	0.5	28	51	0.14	39	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	23	42	0.13	39		
	5	22	59	0.13	37		
	15	21	56	0.15	35		
666904	0.5	24	56	0.14	37	GalNAc ₃ -3a	PO
	1.5	26	68	0.15	35		
	5	23	77	0.14	34		
	15	24	60	0.13	35		
673502	0.5	24	59	0.16	34	GalNAc ₃ -10a	A _d
	1.5	20	46	0.17	32		
	5	24	45	0.12	31		
	15	24	47	0.13	34		
677844	0.5	25	61	0.14	37	GalNAc ₃ -9a	A _d
	1.5	23	64	0.17	33		
	5	25	58	0.13	35		
	15	22	65	0.14	34		
677843	0.5	53	53	0.13	35	GalNAc ₃ -23a	A _d
	1.5	25	54	0.13	34		
	5	21	60	0.15	34		
	15	22	43	0.12	38		
655861	0.5	21	48	0.15	33	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1.5	28	54	0.12	35		
	5	22	60	0.13	36		
	15	21	55	0.17	30		
677841	0.5	32	54	0.13	34	GalNAc ₃ -19a	A _d
	1.5	24	56	0.14	34		
	5	23	92	0.18	31		
	15	24	58	0.15	31		
677842	0.5	23	61	0.15	35	GalNAc ₃ -20a	A _d
	1.5	24	57	0.14	34		

[1466]

	5	41	62	0.15	35		
	15	24	37	0.14	32		

[1467]

[1468] 실시예 78: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 안지오텐시노겐을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체 내 안티센스 억제

[1469] 아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 정상혈압 스프레그 다우리 랫트에서 안지오텐시노겐 (AGT)의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

[1470] 표 54

[1471] AGT을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번 호
552668	$mC_{es}A_{es}mC_{es}T_{es}G_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}mC_{ds}mC_{ds}mC_{ds}A_{es}G_{es}$ $G_{es}A_{es}T_e$	n/a	n/a	34
669509	$mC_{es}A_{es}mC_{es}T_{es}G_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}mC_{ds}mC_{ds}mC_{ds}A_{es}G_{es}$ $G_{es}A_{es}T_{eo}A_{do}-GalNAc_3-1_a$	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	35

[1472]

[1473] GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다.

[1474] 처리

[1475] 6 주령, 수컷 스프래그 다우리 랫트 각각에게 피하로 주당 1회 아래에서 보여진 복용량으로, 총 3 회 용량 동안, 표 54에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS가 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 랫트는 최종 용량 후 72 시간에 희생되었다. AGT 간 mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 측정되었다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). AGT 혈장 단백질 수준은 총 안지오텐시노겐 ELISA (카탈로그 # JP27412, IBL International, Toronto, ON)을 1:20,000 희석된 혈장과 함께 사용하여 측정되었다. 아래의 결과는 간에서 AGT mRNA 수준 또는 PBS 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹의 혈장에서 AGT 단백질 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

[1476] 표 55에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 AGT 간 mRNA 및 혈장 단백질 수준을 낮게 했고, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트가 없는 모 올리고뉴클레오타이드 보다 유의미하게 더 강했다.

[1477] 표 55

[1478] AGT 간 mRNA 및 혈장 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	AGT 간 mRNA (% PBS)	AGT 혈장 단백질 (% PBS)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a
552668	3	95	122	n/a	n/a
	10	85	97		
	30	46	79		
	90	8	11		
669509	0.3	95	70	GalNAc ₃ -1 _a	A _d
	1	95	129		
	3	62	97		
	10	9	23		

[1479]

[1480] 혈장 및 체중 중 간 아미노기전달효소 수준, 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)는, 또한 표준 프로토콜을 사용하여 희생 시에 측정되었다. 결과는 아래의 표 56에서 보여준다.

[1481] 표 56

[1482] 간 아미노기전달효소 수준 및 랫트 체중

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	체중 (% of 기준선)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
PBS	n/a	51	81	186	n/a	n/a
552668	3	54	93	183	n/a	n/a
	10	51	93	194		
	30	59	99	182		
	90	56	78	170		
669509	0.3	53	90	190	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1	51	93	192		
	3	48	85	189		
	10	56	95	189		

[1483]

[1484] 실시예 79: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 ApoC-III을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드의 생체내 작용의 지속시간

[1485] 아래의 표 57에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 작용의 지속시간에 대한 단위 용량 연구에서 시험되었다.

[1486] 표 57

[1487] APOC-III을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번 호
304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	n/a	n/a	20
647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1a	A _d	21
663083	GalNAc ₃ -3 _a -o'-A _{do} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	36
674449	GalNAc ₃ -7 _a -o'-A _{do} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -7a	A _d	36
674450	GalNAc ₃ -10 _a -o'-A _{do} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -10a	A _d	36
674451	GalNAc ₃ -13 _a -o'-A _{do} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -13a	A _d	36

[1488]

[1489] GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다, GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌고, GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌고, GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 보여졌고, GalNAc₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 보여졌다.

[1490] 처리

[1491] 인간 APOC-III을 발현시키는 6 내지 8 주령 이식유전자 마우스 각각에게 표 57에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS 가 피하로 1 회 주입되었다. 각각의 처리 그룹은 3 마리의 동물로 구성되었다. 복용 전에 채혈하여 기준선을 결정하고 복용 후 72 시간, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 및 6 주에서 결정했다. 혈장 트리글리세라이드 및 APOC-III 단백질 수준은 실시예 20에서 기재된 바와 같이 측정되었다. 아래의 결과는 기준선 수준에 대해 정규화된 각 처리 그룹의 혈장 트리글리세라이드 및 APOC-III 수준의 평균 퍼센트로서 나타내고, 이것은, GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드가, 모의 복용량이 GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 복용량의 3 배일지라도, 콘주게이트 그룹 (ISIS 304801)없는 모 올리고뉴클레오타이드

드보다 더 긴 작용의 지속시간을 나타낸다는 것을 보여준다.

표 58

이식유전자 마우스 중 혈장 트리글리세라이드 및 APOC-III 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	시점 (복용후 일수)	트리글리세라이드 (% 기준선)	APOC-III 단백질 (% 기준선)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
PBS	n/a	3	97	102	n/a	n/a
		7	101	98		
		14	108	98		
		21	107	107		
		28	94	91		
		35	88	90		
		42	91	105		
304801	30	3	40	34	n/a	n/a
		7	41	37		
		14	50	57		
		21	50	50		
		28	57	73		
		35	68	70		
		42	75	93		
647535	10	3	36	37	GalNAc ₃ -1a	A _d
		7	39	47		
		14	40	45		
		21	41	41		
		28	42	62		
		35	69	69		
		42	85	102		
663083	10	3	24	18	GalNAc ₃ -3a	A _d
		7	28	23		
		14	25	27		
		21	28	28		
		28	37	44		
		35	55	57		
		42	60	78		
674449	10	3	29	26	GalNAc ₃ -7a	A _d
		7	32	31		
		14	38	41		
		21	44	44		

		28	53	63		
		35	69	77		
		42	78	99		
674450	10	3	33	30	GalNAc ₃ -10a	A _d
		7	35	34		
		14	31	34		
		21	44	44		
		28	56	61		
		35	68	70		
		42	83	95		
674451	10	3	35	33	GalNAc ₃ -13a	A _d
		7	24	32		
		14	40	34		
		21	48	48		
		28	54	67		
		35	65	75		
		42	74	97		

[1495]

[1496]

실시예 80: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 알파-1 항트립신 (A1AT)를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제

[1497]

아래의 표 59에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 A1AT의 용량-의존적 억제에 대한 연구에서 시험되었다.

[1498]

표 59

[1499]

A1AT을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
476366	A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	n/a	n/a	37
656326	A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _{eo} A_{do}-GalNAc₃-1_a	GalNAc ₃ -1a	A _d	38
678381	GalNAc₃-3_a-o_oA_{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	39
678382	GalNAc₃-7_a-o_oA_{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	GalNAc ₃ -7a	A _d	39
678383	GalNAc₃-10_a-o_oA_{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	GalNAc ₃ -10a	A _d	39
678384	GalNAc₃-13_a-o_oA_{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	GalNAc ₃ -13a	A _d	39

[1500]

[1501]

GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다, GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌고, GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌고, GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 보여졌고, GalNAc₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 보여졌다.

[1502]

처리

[1503]

6 주령, 수컷 C57BL/6 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 각각에게 피하로 주당 1회 아래에서 보여진 복용량으로, 총 3 회 용량 동안, 표 59에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS가 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. The 마우스는 최종 투여 72 시간 후에 희생되었다. A1AT 간 mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 측정되었다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). A1AT 혈장 단백질 수준은 마우스 알파 1-항트립신 ELISA를 사용하여 결정되었다 (카탈로그 #

41-A1AMS-E01, Alpc, Salem, NH). 아래의 결과는 PBS 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 A1AT 간 mRNA 및 혈장 단백질 수준의 평균 퍼센트로부터 나타난다.

[1504] 표 60에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 A1AT 간 mRNA 및 A1AT 혈장 단백질 수준을 낮게 했다. GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 모 (ISIS 476366)보다 유의미하게 더 강했다.

[1505] 표 60

[1506] A1AT 간 mRNA 및 혈장 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	A1AT 간 mRNA (% PBS)	A1AT 혈장 단백질 (% PBS)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a
476366	5	86	78	n/a	n/a
	15	73	61		
	45	30	38		
656326	0.6	99	90	GalNAc ₃ -1a	A _d
	2	61	70		
	6	15	30		
	18	6	10		
678381	0.6	105	90	GalNAc ₃ -3a	A _d
	2	53	60		
	6	16	20		
	18	7	13		
678382	0.6	90	79	GalNAc ₃ -7a	A _d
	2	49	57		
	6	21	27		
	18	8	11		
678383	0.6	94	84	GalNAc ₃ -10a	A _d
	2	44	53		
	6	13	24		
	18	6	10		
678384	0.6	106	91	GalNAc ₃ -13a	A _d
	2	65	59		
	6	26	31		
	18	11	15		

[1507]

[1508] 혈장 중 간 아미노기전달효소 및 BUN 수준은 표준 프로토콜을 사용하여 희생 시에 측정되었다. 체중 및 장기 중량이 또한 측정되었다. 결과는 아래의 표 61에서 보여진다. 체중은 기준선에 대한 %로서 보여진다. 장기 중량은 PBS 대조군 그룹에 대한 체중의 %로서 보여진다.

[1509] 표 61

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	체중 (% 기준선)	간 중량 (Rel % BW)	신장 중량 (Rel % BW)	비장 중량 (Rel % BW)
PBS	n/a	25	51	37	119	100	100	100
476366	5	34	68	35	116	91	98	106
	15	37	74	30	122	92	101	128
	45	30	47	31	118	99	108	123
656326	0.6	29	57	40	123	100	103	119
	2	36	75	39	114	98	111	106
	6	32	67	39	125	99	97	122
	18	46	77	36	116	102	109	101
678381	0.6	26	57	32	117	93	109	110
	2	26	52	33	121	96	106	125
	6	40	78	32	124	92	106	126
	18	31	54	28	118	94	103	120
678382	0.6	26	42	35	114	100	103	103
	2	25	50	31	117	91	104	117
	6	30	79	29	117	89	102	107
	18	65	112	31	120	89	104	113
678383	0.6	30	67	38	121	91	100	123
	2	33	53	33	118	98	102	121
	6	32	63	32	117	97	105	105
	18	36	68	31	118	99	103	108
678384	0.6	36	63	31	118	98	103	98
	2	32	61	32	119	93	102	114
	6	34	69	34	122	100	100	96
	18	28	54	30	117	98	101	104

[1510]

[1511] 실시예 81: GalNAc₃ 클러스터를 포함하는 A1AT를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드의 생체내 작용의 지속시간

[1512] 표 59에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 작용의 지속시간에 대한 단회 용량 연구에서 시험되었다.

[1513] 처리

[1514] 6 주령, 수컷 C57BL/6 마우스 각각에게 표 59에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS를 피하로 1 회 주입했다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 혈액을 복용 전날에 취하여 기준선을 결정했고 복용 후 5, 12, 19, 및 25 일에서 결정했다. 혈장 A1AT 단백질 수준은 ELISA를 통해 측정되었다 (참고 실시예 80). 아래의 결과는 기준선 수준에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 혈장 A1AT 단백질 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다. 이 결과는, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 더 강했고 GalNAc 콘주게이트 (ISIS 476366) 없는 모보다 더 긴 작용의 지속시간을 가졌다는 것을 보여준다. 더욱이, 5'-GalNAc 콘주게이트 (ISIS 678381, 678382, 678383, 및 678384)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 3'-GalNAc 콘주게이트 (ISIS 656326)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드보다 더욱 더 긴 작용의 지속시간과 함께 일반적으로 더욱 더 강했다.

[1515] 표 62

[1516] 마우스 중 혈장 A1AT 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	시점 (복용후 일수)	A1AT (% 기준선)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
PBS	n/a	5	93	n/a	n/a
		12	93		
		19	90		
		25	97		
476366	100	5	38	n/a	n/a
		12	46		
		19	62		
		25	77		
656326	18	5	33	GalNAc ₃ -1a	A _d
		12	36		
		19	51		
		25	72		
678381	18	5	21	GalNAc ₃ -3a	A _d
		12	21		
		19	35		
		25	48		
678382	18	5	21	GalNAc ₃ -7a	A _d
		12	21		
		19	39		
		25	60		
678383	18	5	24	GalNAc ₃ -10a	A _d
		12	21		
		19	45		
		25	73		
678384	18	5	29	GalNAc ₃ -13a	A _d
		12	34		
		19	57		
		25	76		

[1517]

[1518] 실시예 82: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 시험관내 안티센스 억제

[1519] 일차 마우스 간 간세포는 96 웰 플레이트에서 15,000 세포/웰에서 처리 2시간 전에 씨딩되었다. 표 63에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 2, 10, 50, 또는 250 nM에서 Williams E 배지에서 부가되었고 세포는 밤새 37 °C에서 5% CO₂에서 인큐베이션되었다. 세포는 올리고뉴클레오타이드 부가 다음 16 시간 동안 용해되었고, 총 RNA는 RNease 3000 BioRobot (Qiagen)를 사용하여 정제되었다. SRB-1 mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 측정되었다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). IC₅₀ 값은 Prism 4 소프트웨어 (GraphPad)를 사용하여 측정되었다. 이 결과는, 다양한 상이한 GalNAc 콘주게이트 그룹 및 다양한 상이한 절단가능 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 GalNAc 콘주게이트 그룹 (ISIS 353382 및 666841)이 없는 모 올리고뉴클레오타이드보다 시험관내 유리 흡수 실험에서 유의미하게 더 강하다는 것을 보여준다.

[1520] 표 63

[1521] 시험관내 SRB-1 발현의 억제

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	연결	GalNAc 클러스터	CM	IC ₅₀ (nM)	서열번 호
353382	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	n/a	n/a	250	28
655861	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} - GalNAc_3 - 1_a$	PS	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	40	29
661161	GalNAc₃-3_a-o-A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNAc ₃ -3 _a	A _d	40	30
661162	GalNAc₃-3_a-o-A_{do} $G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_e$	PO/PS	GalNAc ₃ -3 _a	A _d	8	30
664078	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} - GalNAc_3 - 9_a$	PS	GalNAc ₃ -9 _a	A _d	20	29
665001	GalNAc₃-8_a-o-A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNAc ₃ -8 _a	A _d	70	30
666224	GalNAc₃-5_a-o-A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNAc ₃ -5 _a	A _d	80	30
666841	$G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_e$	PO/PS	n/a	n/a	>250	28
666881	GalNAc₃-10_a-o-A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNAc ₃ -10 _a	A _d	30	30
666904	GalNAc₃-3_a-o-A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds}$ $A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNAc ₃ -3 _a	PO	9	28
666924	GalNAc₃-3_a-o-T_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNAc ₃ -3 _a	T _d	15	33
666961	GalNAc₃-6_a-o-A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNAc ₃ -6 _a	A _d	150	30
666981	GalNAc₃-7_a-o-A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNAc ₃ -7 _a	A _d	20	30
670061	GalNAc₃-13_a-o-A_{do} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNAc ₃ -13 _a	A _d	30	30
670699	GalNAc₃-3_a-o-T_{do} $G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_e$	PO/PS	GalNAc ₃ -3 _a	T _d	15	33

[1522]

670700	$\text{GalNAc}_3\text{-3}_a\text{-o-AeoG}_{es}^m\text{C}_{eo}\text{T}_{eo}\text{T}_{eo}\text{C}_{eo}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{eo}\text{C}_{eo}\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PO/PS	GalNAc ₃ -3 _a	A _e	30	30
670701	$\text{GalNAc}_3\text{-3}_a\text{-o-TeoG}_{es}^m\text{C}_{eo}\text{T}_{eo}\text{T}_{eo}\text{C}_{eo}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{eo}\text{C}_{eo}\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PO/PS	GalNAc ₃ -3 _a	T _e	25	33
671144	$\text{GalNAc}_3\text{-12}_a\text{-o-AdoG}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{es}\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{es}\text{C}_{es}\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PS	GalNAc ₃ -12 _a	A _d	40	30
671165	$\text{GalNAc}_3\text{-13}_a\text{-o-AdoG}_{es}^m\text{C}_{eo}\text{T}_{eo}\text{T}_{eo}\text{C}_{eo}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{eo}\text{C}_{eo}\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PO/PS	GalNAc ₃ -13 _a	A _d	8	30
671261	$\text{GalNAc}_3\text{-14}_a\text{-o-AdoG}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{es}\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{es}\text{C}_{es}\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PS	GalNAc ₃ -14 _a	A _d	>250	30
671262	$\text{GalNAc}_3\text{-15}_a\text{-o-AdoG}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{es}\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{es}\text{C}_{es}\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PS	GalNAc ₃ -15 _a	A _d	>250	30
673501	$\text{GalNAc}_3\text{-7}_a\text{-o-AeoG}_{es}^m\text{C}_{eo}\text{T}_{eo}\text{T}_{eo}\text{C}_{eo}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{eo}\text{C}_{eo}\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PO/PS	GalNAc ₃ -7 _a	A _d	30	30
673502	$\text{GalNAc}_3\text{-10}_a\text{-o-AeoG}_{es}^m\text{C}_{eo}\text{T}_{eo}\text{T}_{eo}\text{C}_{eo}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{eo}\text{C}_{eo}\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PO/PS	GalNAc ₃ -10 _a	A _d	8	30
675441	$\text{GalNAc}_3\text{-17}_a\text{-o-AdoG}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{es}\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{es}\text{C}_{es}\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PS	GalNAc ₃ -17 _a	A _d	30	30
675442	$\text{GalNAc}_3\text{-18}_a\text{-o-AdoG}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{es}\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{es}\text{C}_{es}\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PS	GalNAc ₃ -18 _a	A _d	20	30
677841	$\text{G}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{es}\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}$ $\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{es}\text{C}_{es}\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{eo}\text{A}_{do}\text{-GalNAc}_3\text{-19}_a$	PS	GalNAc ₃ -19 _a	A _d	40	29
677842	$\text{G}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{es}\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}$ $\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{es}\text{C}_{es}\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{eo}\text{A}_{do}\text{-GalNAc}_3\text{-20}_a$	PS	GalNAc ₃ -20 _a	A _d	30	29
677843	$\text{GalNAc}_3\text{-23}_a\text{-o-AdoG}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{es}\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{es}\text{C}_{es}\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PS	GalNAc ₃ -23 _a	A _d	40	30

[1523]

[1524]

GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌고, GalNAc₃-5_a의 구조는 실시예 49에서 보여졌고, GalNAc₃-6_a의 구조는 실시예 51에서 보여졌고, GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌고, GalNAc₃-8_a의 구조는 실시예 47에서 보여졌고, GalNAc₃-9_a의 구조는 실시예 52에서 보여졌고, GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 보여졌고, GalNAc₃-12_a의 구조는 실시예 61에서 보여졌고, GalNAc₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 보여졌고, GalNAc₃-14_a의 구조는 실시예 63에서 보여졌고, GalNAc₃-15_a의 구조는 실시예 64에서 보여졌고, GalNAc₃-17_a의 구조는 실시예 68에서 보여졌고, GalNAc₃-18_a의 구조는 실시예 69에서 보여졌고, GalNAc₃-19_a의 구조는 실시예 70에서 보여졌고, GalNAc₃-20_a의 구조는 실시예 71에서 보여졌고, GalNAc₃-23_a의 구조는 실시예 76에서 보여졌다.

[1525]

실시예 83: GalNAc₃ 클러스터를 포함하는 인자 XI를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제

[1526]

아래의 표 64에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 인자 XI의 용량-의존적 억제에 대한 연구에서 시험되었다.

[1527]

표 64

[1528] 인자 XI를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc 클러스터	CM	서열번호
404071	$T_{es}G_{es}G_{es}T_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}^mC_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{es}G_{es}$ $A_{es}G_{es}G_e$	n/a	n/a	31
656173	$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}^mC_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{eo}G_{eo}$ $A_{es}G_{es}G_{eo}A_{do}$ -GalNAc ₃ - 1_a	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	32
663086	GalNAc₃-3_a-o-A_{do} $T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}^mC_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_e$	GalNAc ₃ -3 _a	A _d	40
678347	GalNAc₃-7_a-o-A_{do} $T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}^mC_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_e$	GalNAc ₃ -7 _a	A _d	40
678348	GalNAc₃-10_a-o-A_{do} $T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}^mC_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_e$	GalNAc ₃ -10 _a	A _d	40
678349	GalNAc₃-13_a-o-A_{do} $T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}^mC_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_e$	GalNAc ₃ -13 _a	A _d	40

[1529]

[1530] GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌다, GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌고, GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌고, GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 보여졌고, GalNAc₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 보여졌다.

[1531]

처리

[1532]

6 내지 8 주령 마우스 각각에게 피하로 주당 1회 아래에서 보여진 복용량으로, 총 3 회 용량 동안, 아래에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 또는 PBS가 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 각 처리 그룹은 4 마리의 동물로 구성되었다. 인자 XI 간 mRNA 수준은 실시간 PCR을 사용하여 측정되었고 표준 프로토콜에 따라 사이클로필린에 대해 정규화되었다. 간 아미노기전달효소, BUN, 및 빌리루빈이 또한 측정되었다. 아래의 결과는 PBS 대조군에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 평균 퍼센트로서 나타낸다.

[1533]

표 65에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 인자 XI 간 mRNA를 낮게 했다. 이 결과는, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트 (ISIS 404071) 가 없는 모보다 더 강했다는 것을 보여준다. 더욱이, 5'-GalNAc 콘주게이트 (ISIS 663086, 678347, 678348, 및 678349)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 3'-GalNAc 콘주게이트 (ISIS 656173)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드보다 더욱 더 강했다.

[1534]

표 65

[1535] 인자 XI 간 mRNA, 간 아미노기전달효소, BUN, 및 빌리루빈 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	인자 XI mRNA (% PBS)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	빌리루빈 (mg/dL)	GalNAc ₃ 클러스터	서열번 호
PBS	n/a	100	63	70	21	0.18	n/a	n/a
404071	3	65	41	58	21	0.15	n/a	31
	10	33	49	53	23	0.15		
	30	17	43	57	22	0.14		
656173	0.7	43	90	89	21	0.16	GalNAc ₃ -1a	32
	2	9	36	58	26	0.17		
	6	3	50	63	25	0.15		
663086	0.7	33	91	169	25	0.16	GalNAc ₃ -3a	40
	2	7	38	55	21	0.16		
	6	1	34	40	23	0.14		
678347	0.7	35	28	49	20	0.14	GalNAc ₃ -7a	40
	2	10	180	149	21	0.18		
	6	1	44	76	19	0.15		
678348	0.7	39	43	54	21	0.16	GalNAc ₃ -10a	40
	2	5	38	55	22	0.17		
	6	2	25	38	20	0.14		
678349	0.7	34	39	46	20	0.16	GalNAc ₃ -13a	40
	2	8	43	63	21	0.14		
	6	2	28	41	20	0.14		

[1536]

[1537] 실시예 84: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 인자 XI를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드의 생체내 작용의 지속시간

[1538] 표 64에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 작용의 지속시간에 대한 단회 용량 연구에서 시험되었다.

[1539] 처리

[1540] 6 내지 8 주령 마우스 각각에게 표 64에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS를 피하로 1 회 주입했다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 혈액을 복용 전날에 꼬리 출혈에 의해 취해서 기준선을 결정하고 복용 후 3, 10, 및 17 일에서 측정했다. 혈장 인자 XI 단백질 수준은 인자 XI 포획 및 바이오티닐화된 검출 항체 (R & D SYSTEMS, Minneapolis, MN (카탈로그 # AF2460 및 # BAF2460, 각각)) 및 OptEIA 시약 세트 B (카탈로그 # 550534, BD Biosciences, San Jose, CA)를 사용하여 ELISA에 의해 측정되었다. 아래의 결과는 기준선 수준에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 혈장 인자 XI 단백질 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다. 이 결과는, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 GalNAc 콘주게이트 (ISIS 404071) 없는 모보다 더 긴 작용의 지속시간과 함께 더 강했다는 것을 보여준다. 더욱이, 5'-GalNAc 콘주게이트 (ISIS 663086, 678347, 678348, 및 678349)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 3'-GalNAc 콘주게이트 (ISIS 656173)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드보다 더욱 더 긴 작용의 지속시간과 함께 더 더욱 더 강했다.

[1541] 표 66

[1542] **마우스 중 혈장 인자 XI 단백질 수준**

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	시점 (복용후 일수)	인자 XI (% 기준선)	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
PBS	n/a	3	123	n/a	n/a	n/a
		10	56			
		17	100			
404071	30	3	11	n/a	n/a	31
		10	47			
		17	52			
656173	6	3	1	GalNAc ₃ -1a	A _d	32
		10	3			
		17	21			
663086	6	3	1	GalNAc ₃ -3a	A _d	40
		10	2			
		17	9			
678347	6	3	1	GalNAc ₃ -7a	A _d	40
		10	1			
		17	8			
678348	6	3	1	GalNAc ₃ -10a	A _d	40
		10	1			
		17	6			
678349	6	3	1	GalNAc ₃ -13a	A _d	40
		10	1			
		17	5			

[1543]

[1544] **실시예 85: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제**

[1545] 표 63에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

[1546] *처리*

[1547] 6 내지 8 주령 C57BL/6 마우스 각각에게 피하로 주당 1회 아래에서 보여진 복용량으로, 총 3 회 용량 동안, 표 63에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 염수가 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 마우스는 최종 투여 후 48 시간에 희생되었고 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 SRB-1 mRNA 수준을 측정했다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 아래의 결과는 염수 대조군으로 정규화된 각 처리 그룹에 대한 간 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

[1548] 표 67 및 68에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다.

[1549] **표 67**

[1550] 간 중 SRB-1 mRNA

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% 염수)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
염수	n/a	100	n/a	n/a
655861	0.1	94	GalNAc ₃ -1a	A _d
	0.3	119		
	1	68		
	3	32		
661161	0.1	120	GalNAc ₃ -3a	A _d
	0.3	107		
	1	68		
	3	26		
666881	0.1	107	GalNAc ₃ -10a	A _d
	0.3	107		
	1	69		
	3	27		
666981	0.1	120	GalNAc ₃ -7a	A _d
	0.3	103		
	1	54		
	3	21		
670061	0.1	118	GalNAc ₃ -13a	A _d
	0.3	89		
	1	52		
	3	18		
677842	0.1	119	GalNAc ₃ -20a	A _d
	0.3	96		
	1	65		
	3	23		

[1551]

[1552] 표 68

[1553] 간 중 SRB-1 mRNA

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% 염수)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
661161	0.1	107	GalNAc ₃ -3a	A _d
	0.3	95		
	1	53		
	3	18		
677841	0.1	110	GalNAc ₃ -19a	A _d
	0.3	88		
	1	52		
	3	25		

[1554]

[1555] 간 아미노기전달효소 수준, 총 빌리루빈, BUN, 및 체중은 표준 프로토콜을 사용하여 또한 측정되었다. 각 처리 그룹의 평균 값은 아래의 표 69에서 보여진다.

[1556] 표 69

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	빌리루빈 (mg/dL)	BUN (mg/dL)	체중 (%) 기준선	GalNAc ₃ 클러스터	CM
염수	n/a	19	39	0.17	26	118	n/a	n/a
655861	0.1	25	47	0.17	27	114	GalNAc ₃ -1a	A _d
	0.3	29	56	0.15	27	118		
	1	20	32	0.14	24	112		
	3	27	54	0.14	24	115		
661161	0.1	35	83	0.13	24	113	GalNAc ₃ -3a	A _d
	0.3	42	61	0.15	23	117		
	1	34	60	0.18	22	116		
	3	29	52	0.13	25	117		
666881	0.1	30	51	0.15	23	118	GalNAc ₃ -10a	A _d
	0.3	49	82	0.16	25	119		
	1	23	45	0.14	24	117		
	3	20	38	0.15	21	112		
666981	0.1	21	41	0.14	22	113	GalNAc ₃ -7a	A _d
	0.3	29	49	0.16	24	112		
	1	19	34	0.15	22	111		
	3	77	78	0.18	25	115		
670061	0.1	20	63	0.18	24	111	GalNAc ₃ -13a	A _d
	0.3	20	57	0.15	21	115		
	1	20	35	0.14	20	115		
	3	27	42	0.12	20	116		
677842	0.1	20	38	0.17	24	114	GalNAc ₃ -20a	A _d
	0.3	31	46	0.17	21	117		
	1	22	34	0.15	21	119		
	3	41	57	0.14	23	118		

[1557]

[1558] 실시예 86: GalNAc₃ 클러스터를 포함하는 TTR를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제

[1559] 아래의 표 70에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 인간 TTR 유전자를 발현시키는 이식유전자 마우스에서 인간 트랜스프레틴 (TTR)의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

[1560] 처리

[1561] 8 주령 TTR 이식유전자 마우스 각각에게 피하로 주당 1회 3 주 동안, 총 3 회 용량 동안, 아래의 표에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 및 복용량 또는 PBS가 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. The 마우스는 최종 투여 72 시간 후에 희생되었다. 꼬리 출혈은 실험을 통해 다양한 시점에서 수행되었고, 혈장 TTR 단백질, ALT, 및 AST 수준은 측정되고 표 72-74에서 보고되었다. 상기 동물이 희생된 후, 혈장 ALT, AST, 및 인간 TTR 수준은 체중, 장기 중량, 및 간 인간 TTR mRNA 수준에서와 같이 측정되었다. TTR 단백질 수준은 임상 분석기 (AU480, Beckman Coulter, CA)를 사용하여 측정되었다. 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)은 표준 프로토콜에 따라 사용되어 간 인간 TTR mRNA 수준을 측정했다. 표 71-74에서 제공된 결과는 각 처리 그룹의 평균 값이다. mRNA 수준은 PBS 그룹의 평균에 대한 평균 값이다. 혈장 단백질 수준은 기준선에서 PBS 그룹의 평균 값에 대한 평균 값이다. 체중은 각 개별적인 처리 그룹에 대한 희생까지 기준선으로부터의 평균 퍼센트 체중 변화이다. 보여진 장기 중량은 동물의 체중으로 정규화되고, 그 다음 각 처리 그룹의 평균 정규화된 장기 중량은 PBS 그룹의 평균 정규화된 장기 중량에 대해 나타난다.

[1562] 표 71 내지 74에서, "BL"는 제 1 용량 직전에 취한 기준선, 측정을 나타낸다. 표 71 및 72에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 TTR 발현 수준을 낮게 했다. GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트 (ISIS 420915) 가 없는 모보다 더 강했다. 더

옥이, GalNAc 콘주게이트 및 혼합된 PS/PO 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트 및 완벽한 PS 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드.

표 70

인간 TTR을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 5'에서 3'	연결	GalNAc 클러스터	CM	서열번호
420915	$T_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} G_{ds} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds}$ $A_{es} T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS	n/a	n/a	41
660261	$T_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} G_{ds} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds}$ $A_{es} T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_{eo} A_{do'}-GalNAc_3-1_a$	PS	GalNAc ₃ -1a	A _d	42
682883	GalNAc₃-3_{a-o'} $T_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds}$ $T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -3a	PO	74
682884	GalNAc₃-7_{a-o'} $T_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds}$ $T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -7a	PO	41
682885	GalNAc₃-10_{a-o'} $T_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds}$ $A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -10a	PO	41
682886	GalNAc₃-13_{a-o'} $T_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds}$ $A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -13a	PO	41
684057	$T_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo}$ $T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_{eo} A_{do'}-GalNAc_3-19_a$	PS/PO	GalNAc ₃ -19a	A _d	42

표 72에 대한 범례는 실시예 74에서 발견될 수 있다. GalNAc₃-1의 구조는 실시예 9에서 보여졌다. GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌다. GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌다. GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 보여졌다. GalNAc₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 보여졌다. GalNAc₃-19_a의 구조는 실시예 70에서 보여졌다.

표 71

생체내 인간 TTR의 안티센스 억제

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	TTR mRNA (% PBS)	혈장 TTR 단백질 (% PBS)	GalNAc 클러스터	CM	서열번호
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a	
420915	6	99	95	n/a	n/a	41
	20	48	65			
	60	18	28			
660261	0.6	113	87	GalNAc ₃ -1a	A _d	42
	2	40	56			
	6	20	27			
	20	9	11			

표 72

[1571] 생체내 인간 TTR의 안티센스 억제

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	TTR mRNA (% PBS)	혈장 TTR 단백질 (% PBS at BL)				GalNAc 클러스터	CM	서열번호
			BL	3 일째	10 일째	17 일째 (After sac)			
PBS	n/a	100	100	96	90	114	n/a	n/a	
420915	6	74	106	86	76	83	n/a	n/a	41
	20	43	102	66	61	58			
	60	24	92	43	29	32			
682883	0.6	60	88	73	63	68	GalNAc ₃ - 3a	PO	41
	2	18	75	38	23	23			
	6	10	80	35	11	9			
682884	0.6	56	88	78	63	67	GalNAc ₃ - 7a	PO	41
	2	19	76	44	25	23			
	6	15	82	35	21	24			
682885	0.6	60	92	77	68	76	GalNAc ₃ - 10a	PO	41
	2	22	93	58	32	32			
	6	17	85	37	25	20			
682886	0.6	57	91	70	64	69	GalNAc ₃ - 13a	PO	41
	2	21	89	50	31	30			
	6	18	102	41	24	27			
684057	0.6	53	80	69	56	62	GalNAc ₃ - 19a	A _d	42
	2	21	92	55	34	30			
	6	11	82	50	18	13			

[1572]

[1573] 표 73

[1574] 아미노기전달효소 수준, 체중 변화, 및 장기 장기 중량

ISIS 번호	복 용 량 (mg /kg)	ALT (U/L)				AST (U/L)				신체 (% BL)	간 (% PBS)	비장 (% PBS)	신장 (% PBS)	서열 번호
		BL	3 일 째	10 일 째	17 일 째	BL	3 일 째	10 일 째	17 일 째					
PBS	n/a	33	34	33	24	58	62	67	52	105	100	100	100	n/a
420915	6	34	33	27	21	64	59	73	47	115	99	89	91	41
	20	34	30	28	19	64	54	56	42	111	97	83	89	
	60	34	35	31	24	61	58	71	58	113	102	98	95	
660261	0.6	33	38	28	26	70	71	63	59	111	96	99	92	42
	2	29	32	31	34	61	60	68	61	118	100	92	90	
	6	29	29	28	34	58	59	70	90	114	99	97	95	
	20	33	32	28	33	64	54	68	95	114	101	106	92	

[1575]

[1576] 표 74

[1577] 아미노기전달효소 수준, 체중 변화, 및 장기 장기 중량

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)				AST (U/L)				신체 (% BL)	간 (%) PBS)	비장 (% PBS)	신장 (% PBS)	서열 번호
		BL	3 일 째	10 일 째	17 일 째	BL	3 일 째	10 일 째	17 일 째					
PBS	n/a	32	34	37	41	62	78	76	77	104	100	100	100	n/a
420915	6	32	30	34	34	61	71	72	66	102	103	102	105	41
	20	41	34	37	33	80	76	63	54	106	107	135	101	
	60	36	30	32	34	58	81	57	60	106	105	104	99	
682883	0.6	32	35	38	40	53	81	74	76	104	101	112	95	41
	2	38	39	42	43	71	84	70	77	107	98	116	99	
	6	35	35	41	38	62	79	103	65	105	103	143	97	
682884	0.6	33	32	35	34	70	74	75	67	101	100	130	99	41
	2	31	32	38	38	63	77	66	55	104	103	122	100	
	6	38	32	36	34	65	85	80	62	99	105	129	95	
682885	0.6	39	26	37	35	63	63	77	59	100	109	109	112	41
	2	30	26	38	40	54	56	71	72	102	98	111	102	
	6	27	27	34	35	46	52	56	64	102	98	113	96	
682886	0.6	30	40	34	36	58	87	54	61	104	99	120	101	41
	2	27	26	34	36	51	55	55	69	103	91	105	92	
	6	40	28	34	37	107	54	61	69	109	100	102	99	
684057	0.6	35	26	33	39	56	51	51	69	104	99	110	102	42
	2	33	32	31	40	54	57	56	87	103	100	112	97	
	6	39	33	35	40	67	52	55	92	98	104	121	108	

[1578]

[1579] 실시예 87: GalNAc₃ 클러스터를 포함하는 TTR를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드의 단회 용량에 의한 생체내 작용의 지속시간

[1580] ISIS 번호 420915 및 660261 (참고 표 70)은 마우스에서 작용의 지속시간에 대한 단회 용량 연구에서 시험되었다. ISIS 번호 420915, 682883, 및 682885 (참고 표 70)은 또한 마우스에서 작용의 지속시간에 대한 단회 용량 연구에서 시험되었다.

[1581] 처리

[1582] 인간 TTR을 발현시키는 8 주령, 수컷 이식유전자 마우스 각각에게 100 mg/kg ISIS 번호 420915 또는 13.5 mg/kg ISIS 번호 660261가 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 꼬리 출혈은 복용 전에 수행되어 기준선을 결정했고 복용 3, 7, 10, 17, 24, 및 39 일 후에 측정했다. 혈장 TTR 단백질 수준은 실시예 86에서 기재된 바와 같이 측정되었다. 아래의 결과는 기준선 수준에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 혈장 TTR 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

[1583] 표 75

[1584] 혈장 TTR 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	시점 (복용후 일수)	TTR (% 기준선)	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
420915	100	3	30	n/a	n/a	41
		7	23			
		10	35			
		17	53			
		24	75			
		39	100			
660261	13.5	3	27	GalNAc ₃ -1a	A _d	42
		7	21			
		10	22			
		17	36			
		24	48			
		39	69			

[1585]

[1586] 처리

[1587] 인간 TTR을 발현시키는 암컷 이식유전자 마우스 각각에게 100 mg/kg ISIS 번호 420915, 10.0 mg/kg ISIS 번호 682883, 또는 10.0 mg/kg 682885가 피하로 한번 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 꼬리 출혈은 복용 전에 수행되어 기준선을 결정했고 복용 3, 7, 10, 17, 24, 및 39 일 후에 측정했다. 혈장 TTR 단백질 수준은 실시예 86에서 기재된 바와 같이 측정되었다. 아래의 결과는 기준선 수준에 대해 정규화된 각 처리 그룹에 대한 혈장 TTR 수준의 평균 퍼센트로서 나타낸다.

[1588] 표 76

[1589] 혈장 TTR 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	시점 (복용후 일수)	TTR (% 기준선)	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
420915	100	3	48	n/a	n/a	41
		7	48			
		10	48			
		17	66			
		31	80			
682883	10.0	3	45	GalNAc ₃ -3a	PO	41
		7	37			
		10	38			
		17	42			
		31	65			
682885	10.0	3	40	GalNAc ₃ -10a	PO	41
		7	33			
		10	34			
		17	40			
		31	64			

[1590]

[1591] 표 75 및 76의 결과는, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 콘주게이트가 없는 모 올리고뉴클레오타이드 (ISIS 420915)보다 더 긴 지속시간과 함께 더 강하다는 것을 보여준다.

[1592] 실시예 88: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 SMN을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 스플라이싱 조절

[1593] 표 77에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 운동 뉴런 (SMN)의 인간 생존의 스플라이싱 조절에 대해 시험되었다.

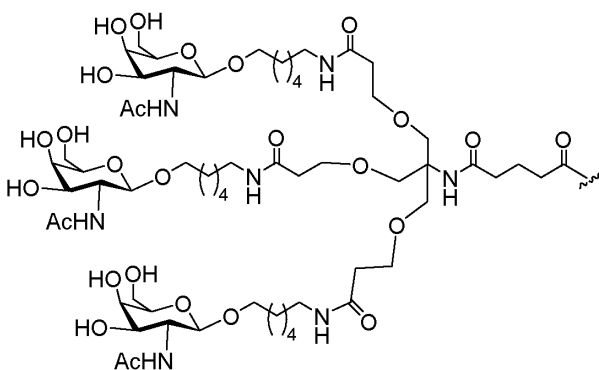
[1594] 표 77

[1595] SMN를 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번 호
387954	A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} G _e	n/a	n/a	43
699819	GalNAc₃-7_a -o/A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -7a	PO	43
699821	GalNAc₃-7_a -o/A _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{eo} T _{eo} G _{eo} ^m C _{eo} T _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -7a	PO	43
700000	A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} G _{eo} A_{do} - GalNAc₃-1_a	GalNAc ₃ -1a	A _d	44
703421	X-ATT ^m CA ^m CTTT ^m CATAATG ^m CTGG	n/a	n/a	43
703422	GalNAc₃-7_b -X-ATT ^m CA ^m CTTT ^m CATAATG ^m CTGG	GalNAc ₃ -7b	n/a	43

[1596]

[1597] GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 이전에 보여졌다. "X"는 Gene Tools (Philomath, OR)에 의해 산출된 5' 일차 아민을 나타내고, GalNAc₃-7_b는 이하에서 보여진 바와 같은 링커의 -NH-C₆-O 부분이 없는 GalNAc₃-7_a의 구조를 나타낸다:



[1598]

[1599] ISIS 번호 703421 및 703422는 모폴리노 올리고뉴클레오타이드이고, 여기서 2 개의 올리고뉴클레오타이드의 각 뉴클레오타이드는 모폴리노 뉴클레오타이드이다.

[1600] 처리

[1601] 인간 SMN를 발현시키는 6 주령 이식유전자 마우스는 표 78에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 염수가 피하로 한번 주입되었다. 각 처리 그룹은 2 마리 수컷 및 2 마리 암컷으로 구성되었다. 마우스는 복용 3 일 후에 희생되어 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR을 사용하여 엑손 7 유무에 따른 간 인간 SMN mRNA 수준을 측정했다. 총 RNA는 리보그린 시약을 사용하여 측정되었다. SMN mRNA 수준은 총 mRNA로 정규화되었고, 염수 처리 그룹의 평균으로 추가로 정규화되었다. 엑손 7 포함 SMN mRNA 대 엑손 7 누락 SMN mRNA의 수득한 평균 비는 표 78에서 보여진다. 이 결과는, 스플라이싱을 조절하고 GalNAc 콘주게이트를 포함하는 완전히 변형된 올리고뉴클레오타이드가 GalNAc 콘주게이트가 없는 모 올리고뉴클레오타이드보다 간에서 스플라이싱을 변형할 때 유의미하게 더 강하다는 것을 보여준다. 더욱이, 이러한 추세는 2'-MOE 및 모폴리노 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 다중 변형 화합물을 위해 유지된다.

[1602] 표 78

[1603] 생체내에서 인간 SMN을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드의 효과

ISIS 번호	용량 (mg/kg)	+ Exon 7 / - Exon 7	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
염수	n/a	1.00	n/a	n/a	n/a
387954	32	1.65	n/a	n/a	43
387954	288	5.00	n/a	n/a	43
699819	32	7.84	GalNAc ₃ -7a	PO	43
699821	32	7.22	GalNAc ₃ -7a	PO	43
700000	32	6.91	GalNAc ₃ -1a	A _d	44
703421	32	1.27	n/a	n/a	43
703422	32	4.12	GalNAc ₃ -7b	n/a	43

[1604]

[1605] 실시예 89: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 아포지질단백질 (Apo(a))을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제

[1606] 아래의 표 79에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 이식유전자 마우스에서 Apo(a)의 용량-의존적 억제에 대한 연구에서 시험되었다.

[1607] 표 79

[1608] APO(a)를 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
494372	T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} ^m C _e	n/a	n/a	53
681257	GalNAc₃-7a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	53

[1609]

[1610] GalNAc₃-7a의 구조는 실시예 48에서 보여졌다.

[1611] 처리

[1612] 8 주령, 암컷 C57BL/6 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 각각에게 피하로 주당 1회 아래에서 보여진 복용량으로, 총 6 번 용량 동안에, 표 79에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS가 주입되었다. 각 처리 그룹은 3 내지 4 마리의 동물로 구성되었다. 꼬리 출혈은 제 1 용량 전날에 및 각 용량 다음 매주 수행되어 혈장 Apo(a) 단백질 수준을 측정했다. 마우스는 최종 투여 2 일 후에 희생되었다. Apo(a) 간 mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약을 사용하여 측정되었다 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). Apo(a) 혈장 단백질 수준은 ELISA를 사용하여 측정되었고, 간 아미노기전달효소 수준이 측정되었다. 표 80의 mRNA 및 혈장 단백질 결과는 PBS 처리된 그룹에 대한 처리 그룹 평균 퍼센트로서 나타낸다. 혈장 단백질 수준은 PBS 그룹의 기준선 (BL) 값으로 추가로 정규화되었다. 평균 절대적인 아미노기전달효소 수준 및 체중 (기준선 평균에 대한 %)은 표 81에서 보고된다.

[1613] 표 80에서 실증된 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 Apo(a) 간 mRNA 및 혈장 단백질 수준을 낮게 했다. 더욱이, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트가 없는 모 올리고뉴클레오타이드보다 더 긴 작용의 지속시간과 함께 유의미하게 더 강했다. 표 81에서 실증된 바와 같이, 아미노기전달효소 수준 및 체중은 올리고뉴클레오타이드에 의해 영향을 받지 않았고, 이것은, 올리고뉴클레오타이드가 잘 용인되었다는 것을 나타낸다.

[1614] 표 80

[1615] Apo(a) 간 mRNA 및 혈장 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	Apo(a) mRNA (% PBS)	Apo(a) 혈장 단백질 (% PBS)						
			BL	1 주째	2 주째	3 주째	4 주째	5 주째	6 주째
PBS	n/a	100	100	120	119	113	88	121	97
494372	3	80	84	89	91	98	87	87	79
	10	30	87	72	76	71	57	59	46
	30	5	92	54	28	10	7	9	7
681257	0.3	75	79	76	89	98	71	94	78
	1	19	79	88	66	60	54	32	24
	3	2	82	52	17	7	4	6	5
	10	2	79	17	6	3	2	4	5

[1616]

[1617] 표 81

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	체중 (% 기준선)
PBS	n/a	37	54	103
494372	3	28	68	106
	10	22	55	102
	30	19	48	103
681257	0.3	30	80	104
	1	26	47	105
	3	29	62	102
	10	21	52	107

[1618]

[1619] 실시예 90: GalNAc₃ 클러스터를 포함하는 TTR을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내 안티센스 억제

[1620] 아래의 표 82에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 인간 TTR 유전자를 발현시키는 이식유전자 마우스에서 인간 트랜스티레틴 (TTR)의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

[1621] 처리

[1622] TTR 이식유전자 마우스 각각에게 피하로 주당 1회 3 주 동안, 총 3 회 용량 동안, 표 83에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 및 복용량 또는 PBS이 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 제 1 용량 전에, 꼬리 출혈이 수행되어 기준선 (BL)에서 혈장 TTR 단백질 수준을 측정했다. 마우스는 최종 투여 72 시간 후에 희생되었다. TTR 단백질 수준은 임상 분석기 (AU480, Beckman Coulter, CA)를 사용하여 측정되었다. 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)은 표준 프로토콜에 따라 사용되어 간 인간 TTR mRNA 수준을 측정했다. 표 83에서 제공된 결과는 각 처리 그룹의 평균 값이다. mRNA 수준은 PBS 그룹의 평균에 대한 평균 값이다. 혈장 단백질 수준은 기준선에서 PBS 그룹의 평균 값에 대한 평균 값이다. "BL"는 제 1 용량 직전에 취한 기준선, 측정을 나타낸다. 표 83에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식에서 TTR 발현 수준을 낮게 했다. GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트 (ISIS 420915)가 없는 모보다 더 강했고, 포스포디에스테르 또는 테옥시아데노신 절단 가능 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 콘주게이트가 없는 모와 비교하여 효능의 유의미한 개선을 보여주었다 (참고 ISIS 번호 682883 및 666943 vs 420915 및 실시예 86 및 87 참고).

[1623] 표 82

[1624] 인간 TTR을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 5'에서 3'	연결	GalNAc 클러스터	CM	서열번호
420915	$T_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds}$ $A_{es} T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS	n/a	n/a	41
682883	GalNAc₃-3a-o $T_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds}$ $T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -3a	PO	41
666943	GalNAc₃-3a-o-A_{do} $T_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -3a	A _d	45
682887	GalNAc₃-7a-o-A_{do} $T_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -7a	A _d	45
682888	GalNAc₃-10a-o-A_{do} $T_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -10a	A _d	45
682889	GalNAc₃-13a-o-A_{do} $T_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -13a	A _d	45

[1625]

[1626]

표 82에 대한 범례는 실시예 74에서 발견될 수 있다. GalNAc₃-3a의 구조는 실시예 39에서 보여졌다. GalNAc₃-7a의 구조는 실시예 48에서 보여졌다. GalNAc₃-10a의 구조는 실시예 46에서 보여졌다. GalNAc₃-13a의 구조는 실시예 62에서 보여졌다.

[1627]

표 83

[1628]

생체내 인간 TTR의 안티센스 억제

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	TTR mRNA (% PBS)	TTR 단백질 (% BL)	GalNAc 클러스터	CM
PBS	n/a	100	124	n/a	n/a
420915	6	69	114	n/a	n/a
	20	71	86		
	60	21	36		
682883	0.6	61	73	GalNAc ₃ -3a	PO
	2	23	36		
	6	18	23		
666943	0.6	74	93	GalNAc ₃ -3a	A _d
	2	33	57		
	6	17	22		
682887	0.6	60	97	GalNAc ₃ -7a	A _d
	2	36	49		
	6	12	19		
682888	0.6	65	92	GalNAc ₃ -10a	A _d
	2	32	46		
	6	17	22		
682889	0.6	72	74	GalNAc ₃ -13a	A _d
	2	38	45		
	6	16	18		

[1629]

[1630]

실시예 91: 비-인간 영장류에서 GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 인자 VII를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내의 안티센스 억제

[1631] 아래의 표 84에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 원숭이에서 인자 VII의 안티센스 억제에 대해 비-말단, 용량 단계적 확대 연구에서 시험되었다.

[1632]처리

[1633]비-나이프 원숭이 각각에게 0, 15, 및 29일에 상승하는 용량의 표 84에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS가 피하로 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리의 수컷 및 1 마리의 암컷으로 구성되었다. 제 1 용량 전에 및 그 후 다양한 시점에서, 채혈이 수행되어 혈장 인자 VII 단백질 수준을 측정했다. 인자 VII 단백질 수준은 ELISA에 의해 측정되었다. 표 85에서 제공된 결과는 기준선 (BL)에서 PBS 그룹의 평균 값에 대한 각 처리 그룹의 평균 값이고, 상기 측정은 제 1 용량 직전에 취해졌다. 표 85에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식으로 인자 VII 발현 수준을 낮게 했고, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트가 없는 올리고뉴클레오타이드와 비교하여 원숭이에서 유의미하게 더 강했다.

[1634]표 84

[1635]인자 VII을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 5'에서 3'	연결	GalNAc 클러스터	CM	서열번호
407935	A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _e	PS	n/a	n/a	46
686892	GalNAc₃-10a-<i>o</i> -A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _e	PS	GalNAc ₃ -10a	PO	46

[1636]

[1637]표 84에 대한 범례는 실시예 74에서 발견될 수 있다. GalNAc₃-10a의 구조는 실시예 46에서 보여졌다.

[1638]표 85

[1639]인자 VII 혈장 단백질 수준

ISIS 번호	일수	용량 (mg/kg)	인자 VII (% BL)
407935	0	n/a	100
	15	10	87
	22	n/a	92
	29	30	77
	36	n/a	46
	43	n/a	43
686892	0	3	100
	15	10	56
	22	n/a	29
	29	30	19
	36	n/a	15
	43	n/a	11

[1640]

[1641]실시예 92: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 ApoCIII을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 일차 간세포에서의 안티센스 억제

[1642]일차 마우스 간세포는 15,000 세포/웰에서 96-웰 플레이트에서 씨딩되었고, 마우스 ApoC-III을 표적으로 하는, 표 86에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는, 0.46, 1.37, 4.12, 또는 12.35, 37.04, 111.11, 또는 333.33 nM 또는 1.00 μM에서 부가되었다. 24 시간 동안 올리고뉴클레오타이드와 함께 인큐베이션한 후, 세포는 용해되었고 총 RNA는 RNeasy (Qiagen)를 사용하여 정제되었다. ApoC-III mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 실시간 PCR 및 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약 (Molecular Probes, Inc.)을 사용하여 측정되었다. IC₅₀ 값은 Prism 4 소프트웨어 (GraphPad)를 사용하여 측정되었다. 이 결과는, 절단가능 모이어티가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-

연결된 테옥시아데노신인 지와는 무관하게, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 콘주게이트가 없는 모 올리고뉴클레오타이드보다 유의미하게 더 강했다는 것을 보여준다.

표 86

마우스 일차 간세포 중 마우스 APOC-III 발현의 억제

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	CM	IC ₅₀ (nM)	서열번호
440670	${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_e$	n/a	13.20	47
661180	${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_{eo}A_{do}$ -GalNAc ₃ -1 _a	A _d	1.40	48
680771	GalNAc₃-3_{a-o} ${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_e$	PO	0.70	47
680772	GalNAc₃-7_{a-o} ${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_e$	PO	1.70	47
680773	GalNAc₃-10_{a-o} ${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_e$	PO	2.00	47
680774	GalNAc₃-13_{a-o} ${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_e$	PO	1.50	47
681272	GalNAc₃-3_{a-o} ${}^mC_{es}A_{eo}G_{eo}{}^mC_{eo}T_{eo}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{eo}$ $A_{eo}G_{es}{}^mC_{es}A_e$	PO	< 0.46	47
681273	GalNAc₃-3_{a-o}A_{do} ${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}$ ${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_e$	A _d	1.10	49
683733	${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_{eo}A_{do}$ -GalNAc ₃ -19 _a	A _d	2.50	48

GalNAc₃-1_a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌고, GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌고, GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 보여졌고, GalNAc₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-19_a의 구조는 실시예 70에서 보여졌다.

실시예 93: 혼합된 웜 및 5'-GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내의 안티센스 억제

표 87에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

표 87

[1650] SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
449093	T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	n/a	n/a	50
699806	GalNAc₃-3a-o ·T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -3a	PO	50
699807	GalNAc₃-7a-o ·T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7a	PO	50
699809	GalNAc₃-7a-o ·T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	50
699811	GalNAc₃-7a-o ·T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7a	PO	50
699813	GalNAc₃-7a-o ·T _{ks} T _{ds} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ds} ^m C _k	GalNAc ₃ -7a	PO	50
699815	GalNAc₃-7a-o ·T _{es} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	50

[1651]

[1652] GalNAc₃-3a의 구조는 실시예 39에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-7a의 구조는 실시예 48에서 이전에 보여졌다. 하첨자: "e"는 2'-MOE 변형된 뉴클레오사이드를 나타내고; "d"는 β-D-2'-데옥시리보뉴클레오사이드를 나타내고; "k"는 6'-(S)-CH₃ 바이사이클릭 뉴클레오사이드 (cEt)를 나타내고; "s"는 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결 (PS)을 나타내고; "o"는 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 (PO)를 나타낸다. 상첨자 "m"은 5-메틸 시토신을 나타낸다.

[1653] 처리

[1654] 6 내지 8 주령 C57BL/6 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 표 87에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 염수가 아래에서 보여진 복용량으로 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. The 마우스는 최종 투여 72 시간 후에 희생되었다. 간 SRB-1 mRNA 수준은 실시간 PCR를 사용하여 측정되었다. SRB-1 mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 사이클로필린 mRNA 수준에 대해 정규화되었다. 결과는 염수 대조군 그룹에 대한 각 처리 그룹을 위해 SRB-1 mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 제공된다. 표 88에서 실증된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 용량-의존 방식으로 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했고, GalNAc 콘주게이트를 포함하고 완전한 cEt 또는 혼합된 당 변형이었던 염을 갖는 갭머 올리고뉴클레오타이드는 콘주게이트가 없고 완전한 cEt 변형된 염을 포함하는 모 올리고뉴클레오타이드보다 유의미하게 더 강했다.

[1655] 체중, 간 트랜스아미나제, 총 빌리루빈, 및 BUN가 또한 측정되었고, 각 처리 그룹에 대한 평균 값은 표 88에서 보여진다. 체중은 올리고뉴클레오타이드 용량 직전에 측정된 기준선 체중 (% BL)에 대한 평균 퍼센트 체중로서 보여진다.

[1656] 표 88

[1657] SRB-1 mRNA, ALT, AST, BUN, 및 총 빌리루빈 수준 및 체중

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% PBS)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bil	BUN	체중 (% BL)
PBS	n/a	100	31	84	0.15	28	102
449093	1	111	18	48	0.17	31	104
	3	94	20	43	0.15	26	103
	10	36	19	50	0.12	29	104
699806	0.1	114	23	58	0.13	26	107
	0.3	59	21	45	0.12	27	108
	1	25	30	61	0.12	30	104
699807	0.1	121	19	41	0.14	25	100
	0.3	73	23	56	0.13	26	105
	1	24	22	69	0.14	25	102
699809	0.1	125	23	57	0.14	26	104
	0.3	70	20	49	0.10	25	105
	1	33	34	62	0.17	25	107
699811	0.1	123	48	77	0.14	24	106
	0.3	94	20	45	0.13	25	101
	1	66	57	104	0.14	24	107
699813	0.1	95	20	58	0.13	28	104
	0.3	98	22	61	0.17	28	105
	1	49	19	47	0.11	27	106
699815	0.1	93	30	79	0.17	25	105
	0.3	64	30	61	0.12	26	105
	1	24	18	41	0.14	25	106

[1658]

[1659] 실시예 94: 2'-당 변형 및 5'-GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내의 안티센스 억제

[1660] 표 89에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

[1661] 표 89

[1662] SRB-1를 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번 호
353382	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	n/a	n/a	28
700989	G _{ms} C _{ms} U _{ms} U _{ms} C _{ms} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} U _{ms} C _{ms} C _{ms} U _m sU _m	n/a	n/a	51
666904	GalNAc ₃ -3a'-o'-G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	PO	28
700991	GalNAc ₃ -7a'-o'-G _{ms} C _{ms} U _{ms} U _{ms} C _{ms} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} U _{ms} C _{ms} C _{ms} U _{ms} U _m	GalNAc ₃ -7a	PO	51

[1663]

[1664] 하첨자 "m"은 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오사이드를 나타낸다. 완전한 표 범례에 대한 실시예 74 참고. GalNAc₃-3a의 구조는 실시예 39에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-7a의 구조는 실시예 48에서 이전에 보여졌다.

[1665] 처리

[1666] 이러한 연구는 실시예 93에서 기재된 프로토콜을 사용하여 완료되었다. 결과는 아래의 표 90에서 보여지고 GalNAc 콘주게이트를 포함하는 2'-MOE 및 2'-OMe 변형된 올리고뉴클레오타이드 둘 모두가 콘주게이트가 없는 각 모 올리고뉴클레오타이드보다 유의미하게 더 강했다는 것을 보여준다. 체중, 간 트랜스아미나제, 총 빌리루빈, 및 BUN 측정의 결과는, 모든 화합물이 용인되었다는 것을 명시했다.

[1667] 표 90

[1668] SRB-1 mRNA

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% PBS)
PBS	n/a	100
353382	5	116
	15	58
	45	27
700989	5	120
	15	92
	45	46
666904	1	98
	3	45
	10	17
700991	1	118
	3	63
	10	14

[1669]

[1670] 실시예 95: 바이사이클릭 뉴클레오타이드 및 5'-GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고 뉴클레오타이드에 의한 생체내의 안티센스 억제

[1671] 표 91에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

[1672] 표 91

[1673] SRB-1을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열 번호
440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	n/a	n/a	22
666905	GalNAc₃-3a-σ ^m T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -3a	PO	22
699782	GalNAc₃-7a-σ ^m T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7a	PO	22
699783	GalNAc₃-3a-σ ^m T _{ls} ^m C _{ls} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ls} ^m C _l	GalNAc ₃ -3a	PO	22
653621	T _{ls} ^m C _{ls} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ls} ^m C _{lo} A_{do}-GalNAc₃-1a	GalNAc ₃ -1a	A _d	23
439879	T _{gs} ^m C _{gs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _d G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{gs} ^m C _g	n/a	n/a	22
699789	GalNAc₃-3a-σ ^m T _{gs} ^m C _{gs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _d G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{gs} ^m C _g	GalNAc ₃ -3a	PO	22

[1674]

[1675] 하첨자 "g"는 플루오로-HNA 뉴클레오타이드를 나타내고, 하첨자 "l"는 2'-O-CH₂-4' 브릿지를 포함하는 잠겨진 뉴클레오타이드를 나타낸다. 다른 약어에 대한 실시예 74 표 범례 참고. GalNAc₃-1a의 구조는 실시예 9에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-3a의 구조는 실시예 39에서 이전에 보여졌고, GalNAc₃-7a의 구조는 실시예 48에서 이전에 보여졌다.

[1676] 처리

[1677] 이러한 연구는 실시예 93에서 기재된 프로토콜을 사용하여 완료되었다. 결과는 아래의 표 92에서 보여지고 GalNAc 콘주게이트 및 다양한 바이사이클릭 뉴클레오사이드 변형을 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 콘주게이트가 없고 바이사이클릭 뉴클레오사이드 변형을 포함하는 모 올리고뉴클레오타이드보다 유의미하게 더 강했다는 것을 보여준다. 더욱이, GalNAc 콘주게이트 및 플루오로-HNA 변형을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 콘주게이트가 없고 플루오로-HNA 변형을 포함하는 모 올리고뉴클레오타이드보다 유의미하게 더 강했다. 체중, 간 트랜스 아미나제, 총 빌리루빈, 및 BUN 측정의 결과는, 모든 화합물이 용인되었다는 것을 명시했다.

[1678] 표 92

[1679] SRB-1 mRNA, ALT, AST, BUN, 및 총 빌리루빈 수준 및 체중

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% PBS)
PBS	n/a	100
440762	1	104
	3	65
	10	35
666905	0.1	105
	0.3	56
	1	18
699782	0.1	93
	0.3	63
	1	15
699783	0.1	105
	0.3	53
	1	12
653621	0.1	109
	0.3	82
	1	27
439879	1	96
	3	77
	10	37
699789	0.1	82
	0.3	69
	1	26

[1680]

[1681] 실시예 96: GalNAc₃ 콘주게이트 그룹을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 혈장 단백질 결합

[1682] ApoC-III을 표적으로 하는 표 57에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 및 Apo(a)을 표적으로 하는 표 93에서의 올리고뉴클레오타이드는 한외 검정에서 시험되어 혈장 단백질 결합을 평가했다.

[1683] 표 93

[1684] Apo(a)을 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열 번호
494372	T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} T _{es} ^m C _e	n/a	n/a	53
693401	T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	n/a	n/a	53
681251	GalNAc₃-7_a-o' T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	53
681257	GalNAc₃-7_a-o' T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	53

[1685]

[1686]

표 범례에 대한 실시예 74 참조 GalNAc₃-7a의 구조는 실시예 48에서 이전에 보여졌다.

[1687]

Ultrafree-MC 한외여과 장치 (30,000 NMWL, 저-결합 재생된 셀룰로오스 막, 밀리포어, Bedford, MA)을 300 μL의 0.5% Tween 80으로 전-컨디셔닝하고 10 분 동안 2000 g에서 원심분리하고, 그 다음 H₂O 중 대조 올리고뉴클레오타이드의 300 μL의 300 μg/mL 용액으로 전-컨디셔닝하고 16 분 동안 2000 g에서 원심분리했다. 본 연구에서 사용될 표 57 및 93으로부터의 각 시험 올리고뉴클레오타이드의 필터에 대한 비-특이적 결합을 평가하기 위해, H₂O 중 올리고뉴클레오타이드의 300 μL의 250 ng/mL 용액을 pH 7.4에서 전-컨디셔닝된 필터 내에 두었고 16 분 동안 2000 g에서 원심분리했다. 비여과된 및 여과된 샘플을 ELISA 검정으로 분석하여 올리고뉴클레오타이드 농도를 측정했다. 3 개의 복제물을 사용하여 각 샘플에 대한 평균 농도를 얻었다. 미여과된 샘플에 대한 여과된 샘플의 평균 농도를 사용하여 혈장의 주재에서 필터를 통해 회수된 올리고뉴클레오타이드의 퍼센트를 결정한다 (% 회수율).

[1688]

정상, 무약물 인간 지원자, 사이노물구스 원숭이, 및 CD-1 마우스로부터의 K3-EDTA에서 수집된 냉동된 전체의 혈장 샘플을, Bioreclamation LLC (Westbury, NY)로부터 구매했다. 시험 올리고뉴클레오타이드를 1.2 mL 분취량의 혈장에 2 개의 농도 (5 및 150 μg/mL)에서 부가했다. 분취량 (300 μL)의 각 스파이킹된 혈장 샘플을 전-컨디셔닝된 필터 장치에 내에 두고 37°C에서 30 분 동안 인큐베이션하고, 즉시 그 다음 2000 g에서 16 분 동안 원심분리했다. 분취량의 여과된 및 미여과된 스파이킹된 혈장 샘플을 ELISA로 분석하여 각 샘플 중 올리고뉴클레오타이드 농도를 측정했다. 농도 당 3 개의 복제물을 사용된 각 샘플 중 결합된 및 미결합된 올리고뉴클레오타이드의 평균 백분율을 측정했다. 미여과된 샘플의 농도에 대한 여과된 샘플의 평균 농도는 사용되어 혈장 단백질에 결합되지 않는 혈장(미결합된 %) 중 올리고뉴클레오타이드의 퍼센트를 측정한다. 최종 미결합된 올리고뉴클레오타이드 값은 각 올리고뉴클레오타이드에 대해 % 미결합된 %를 % 회수율로 나누어서 비-특이적 결합을 위해 수정된다. 최종 % 결합된 올리고뉴클레오타이드 값은 100에서 최종 % 미결합된 값을 빼서 결정된다. 결과는 각 종의 혈장에서 시험된 2 개의 올리고뉴클레오타이드의 농도 시험 (5 및 150 μg/mL)에 대해 표 94에서 보여진다. 이 결과는, GalNAc 콘주게이트 그룹이 혈장 단백질 결합에 대한 유의미한 영향을 갖지 않는다는 것을 보여준다. 더욱이, 완벽한 PS 뉴클레오사이드간 연결 및 혼합된 PO/PS 연결 둘 모두를 갖는 올리고뉴클레오타이드는 혈장 단백질에 결합하고, 완벽한 PS 연결을 갖는 것은 혼합된 PO/PS 연결을 갖는 것보다 어느 정도 더 큰 정도로 혈장 단백질에 결합한다.

[1689]

표 94

[1690] 혈장 단백질에 결합된 변형된 올리고뉴클레오타이드의 퍼센트

ISIS 번호	인간 혈장		원숭이 혈장		마우스 혈장	
	5 µg/mL	150 µg/mL	5 µg/mL	150 µg/mL	5 µg/mL	150 µg/mL
304801	99.2	98.0	99.8	99.5	98.1	97.2
663083	97.8	90.9	99.3	99.3	96.5	93.0
674450	96.2	97.0	98.6	94.4	94.6	89.3
494372	94.1	89.3	98.9	97.5	97.2	93.6
693401	93.6	89.9	96.7	92.0	94.6	90.2
681251	95.4	93.9	99.1	98.2	97.8	96.1
681257	93.4	90.5	97.6	93.7	95.6	92.7

[1691]

[1692] 실시예 97: GalNAc₃ 콘주게이트 그룹을 포함하는 TTR을 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

[1693] GalNAc 콘주게이트를 포함하는 표 95에서 보여진 올리고뉴클레오타이드는 설계되어 TTR을 표적으로 했다.

[1694] 표 95

[1695] TTR을 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
666941	GalNAc ₃ -3 _{a-o'} A _{do} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -3	A _d	45
666942	T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -3 _a	GalNAc ₃ -1	A _d	42
682876	GalNAc ₃ -3 _{a-o'} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -3	PO	41
682877	GalNAc ₃ -7 _{a-o'} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7	PO	41
682878	GalNAc ₃ -10 _{a-o'} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -10	PO	41
682879	GalNAc ₃ -13 _{a-o'} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -13	PO	41
682880	GalNAc ₃ -7 _{a-o'} A _{do} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7	A _d	45
682881	GalNAc ₃ -10 _{a-o'} A _{do} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -10	A _d	45
682882	GalNAc ₃ -13 _{a-o'} A _{do} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -13	A _d	45
684056	T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -19 _a	GalNAc ₃ -19	A _d	42

[1696]

[1697] 표 95의 범례는 실시예 74에서 발견될 수 있다. GalNAc₃-1의 구조는 실시예 9에서 보여졌다. GalNAc₃-3_a의 구조는 실시예 39에서 보여졌다. GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌다. GalNAc₃-10_a의 구조는 실시예 46에서 보여졌다. GalNAc₃-13_a의 구조는 실시예 62에서 보여졌다. GalNAc₃-19_a의 구조는 실시예 70에서 보여졌다.

[1698] 실시예 98: hPMBC 검정에서 GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 전-염증 효과의 평가

[1699] 표 96에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 실시예 23 및 24에서 기재된 바와 같이 hPMBC 검정에서 전-염증 효과에 대해 시험되었다. (올리고뉴클레오타이드의 설명에 대한 표 17, 70, 82, 및 95을 참고한다) ISIS 353512는 양성 대조군으로서 사용된 고반응군이고, 다른 올리고뉴클레오타이드는 표 70, 82, 및 95에서 기재되어 있다.

표 96에서 보여진 이러한 결과는 하나의 지원자 공여체로부터의 혈액을 사용하여 획득되었다. 이 결과는, 혼합된 PO/PS 뉴클레오사이드간 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드가 완벽한 PS 연결을 갖는 동일한 올리고뉴클레오타이드와 비교하여 유의미하게 더 낮은 전-염증 반응을 생산했다는 것을 보여준다. 더욱이, GalNAc 콘주게이트 그룹은 이러한 검정에서 유의미한 효과를 가지지 않았다.

표 96

ISIS 번호	E _{max} /EC ₅₀	GalNAc ₃ 클러스터	연결	CM
353512	3630	n/a	PS	n/a
420915	802	n/a	PS	n/a
682881	1311	GalNAc ₃ -10	PS	A _d
682888	0.26	GalNAc ₃ -10	PO/PS	A _d
684057	1.03	GalNAc ₃ -19	PO/PS	A _d

실시예 99: 아시알로당단백질 수용체에 대한 GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 결합 친화성

아시알로당단백질 수용체에 대한 표 97에서 열거된 올리고뉴클레오타이드의 결합 친화성 (올리고뉴클레오타이드의 설명에 대한 표 63 참고)은 경쟁적 수용체 결합 검정에서 시험되었다. 경쟁자 리간드, α1-산 당단백질 (AGP)는, 50 mM 나트륨 아세테이트 버퍼 (pH 5)에서 1 U 뉴라미니다제-아가로스과 함께 16 시간 동안 37°C에서 인큐베이션되었고, > 90% 탈시알릴화는 시알산 검정 또는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 확인되었다. 요오드 모노클로라이드는 사용되어 Atsma 등에 의한 절차에 따라 AGP를 요오드화했다 (참조 Lipid Res. 1991 Jan; 32(1):173-81.) 이러한 방법에서, 탈시알릴화된 α1-산 당단백질 (de-AGP)을 0.25 M NaOH 중 10 mM 염화요오드, Na¹²⁵I, 및 1 M 글리신에 부가했다. 10 분 동안 실온에서 인큐베이션한 후, ¹²⁵I -라벨링된 de-AGP를, 3 KDMWCO 스핀 칼럼을 사용하여 혼합물을 2회 농축하여 유리 ¹²⁵I로부터 분리했다. 단백질을, Agilent SEC-3 칼럼 (7.8x300mm) 및 β-RAM 계수기가 구비된 HPLC 시스템 상에서 라벨링 효율 및 순도에 대해 시험했다. ¹²⁵I -라벨링된 de-AGP 및 ASO를 함유하는 다양한 GalNAc-클러스터를 이용하는 경쟁 실험을 하기와 같이 수행했다. 인간 HepG2 세포 (10⁶ 세포/ml)을 2 mL의 적절한 성장 배지에서 6-웰 플레이트 상에서 플레이트팅했다. 10% 우태 혈청 (FBS), 2 mM L-글루타민 및 10mM HEPES 로 보강된 MEM 배지를 사용했다. 세포를 16-20 시간 동안 37°C에서 5% 및 10% CO₂ 각각과 함께 인큐베이션했다. 세포를 실험 전에 FBS가 없는 배지로 세정했다. 세포를, 적절한 성장 배지를 2% FBS, 10⁻⁸ M ¹²⁵I -라벨링된 de-AGP와 함께 함유하는 1ml 경쟁 혼합물 및 10⁻¹¹ 내지 10⁻⁵ M 범위의 농도에서 ASO를 함유하는 GalNAc-클러스터로 30 분 동안 37°C에서 인큐베이션했다. 비-특이적 결합을 10⁻² M GalNAc 당의 존재에서 결정했다. 세포를 FBS가 없는 배지로 2회 세정하여 미결합된 ¹²⁵I -라벨링된 de-AGP 및 경쟁자 GalNAc ASO를 제거했다. 세포를, 1% β-머캅토에탄올을 함유하는 Qiagen's RLT 버퍼를 사용하여 용해시켰다. 용해물을 짧은 10 분 동결/용해 사이클 후 등근바닥 검정 튜브로 이동시키고 γ-계수기 상에서 검정했다. 비-특이적 결합을 공제한 후 ¹²⁵I 단백질 카운트를 최저 GalNAc-ASO 농도 카운트의 값으로 나누었다. 억제 곡선 비선형회귀 알고리즘을 사용하는 단일 부위 경쟁적 결합 방정식에 따라 적합화되어 결합 친화성 (K_D's)을 계산했다.

표 97의 결과는 5 개의 상이한 날에 수행된 실험으로부터 획득되었다. 상첨자 "a"로 나타낸 올리고뉴클레오타이드에 대한 결과는 2 개의 상이한 날에 실험 시행의 평균이다. 이 결과는, 5'-말단 상에 GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 3'-말단 상에 GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드보다 1.5 내지 16배 더 큰 친화성을 갖는 인간 HepG2 세포 상에서 아시알로당단백질 수용체를 결합했다는 것을 보여준다.

표 97

[1706] 아시알로당단백질 수용체 결합 검정 결과

ISIS 번호	GalNAc 콘주게이트	GalNAc 콘주게이트가 부착된 올리고뉴클레오타이드 말단	K _D (nM)
661161 ^a	GalNAc ₃ -3	5'	3.7
666881 ^a	GalNAc ₃ -10	5'	7.6
666981	GalNAc ₃ -7	5'	6.0
670061	GalNAc ₃ -13	5'	7.4
655861 ^a	GalNAc ₃ -1	3'	11.6
677841 ^a	GalNAc ₃ -19	3'	60.8

[1707]

[1708] 실시예 100: 생체내에서 Apo(a)를 표적으로 하는 GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내의 안티센스 억제

[1709] 아래의 표 98a에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 작용의 지속시간에 대한 단위 용량 연구에서 시험되었다.

[1710] 표 98a

[1711] APO(a)를 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
681251	GalNAc₃-7_a -o'-T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	53
681257	GalNAc₃-7_a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	53

[1712]

[1713] GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌다.

[1714] 처리

[1715] 인간 Apo(a)을 발현시키는 암컷 이식유전자 마우스 각각에게, 피하로 주당 1회, 총 6 번 용량 동안에, 표 98b에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 및 복용량 또는 PBS이 주입되었다. 각각의 처리 그룹은 3 마리의 동물로 구성되었다. 혈액을, 복용 전달에 뽑아서 Apo(a) 단백질의 기준선 수준을 혈장에서 그리고 제 1 용량 다음 72 시간, 1 주, 및 2 주에서 측정했다. 추가의 채혈은 제 1 용량 다음 3 주, 4 주, 5 주, 및 6 주에서 일어날 것이다. 혈장 Apo(a) 단백질 수준은 ELISA를 사용하여 측정되었다. 표 98b의 결과는 기준선 수준 (% BL)에 대해 정규화된, 각 처리 그룹에 대한 혈장 Apo(a) 단백질 수준의 평균 퍼센트로서 제공되고, 이 결과는, GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 Apo(a) 발현에서 강력한 축소를 나타내었다는 것을 보여준다. 이러한 강력한 효과는 완벽한 PS 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 및 혼합된 PO 및 PS 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 대해 관찰되었다.

[1716] 표 98b

[1717] Apo(a) 혈장 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	72 시간에서 Apo(a) (% BL)	1 주에서 Apo(a) (% BL)	3 주에서 Apo(a) (% BL)
PBS	n/a	116	104	107
681251	0.3	97	108	93
	1.0	85	77	57
	3.0	54	49	11
	10.0	23	15	4
681257	0.3	114	138	104
	1.0	91	98	54
	3.0	69	40	6
	10.0	30	21	4

[1718]

[1719] 실시예 101: 안정한 모이어티를 통해 연결된 GalNAc 클러스터를 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 안티센스 억제

[1720]

표 99에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스 APOC-III 발현의 억제에 대해 생체내에서 시험되었다. C57Bl/6 마우스 각각에게 표 99에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS를 피하로 1 회 주입했다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. ISIS 440670로 처리된 각각의 마우스는 2, 6, 20, 또는 60 mg/kg의 용량을 수용했다. ISIS 680772 또는 696847로 처리된 각각의 마우스는 0.6, 2, 6, 또는 20 mg/kg을 수용했다. ISIS 696847의 GalNAc 콘주게이트 그룹은 쉽게 절단가능 포스포디에스테르 함유 연결 대신에 안정한 모이어티, 포스포로티오에이트 연결을 통해 연결된다. 동물은 용량 후 72 시간에 희생되었다. 간 APOC-III mRNA 수준은 실시간 PCR를 사용하여 측정되었다. APOC-III mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 사이클로필된 mRNA 수준에 대해 정규화되었다. 결과는 염수 대조군 그룹에 대한 각 처리 그룹을 위해 APOC-III mRNA 수준의 평균 퍼센트로서 표 99에서 제공된다. 이 결과는, GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 콘주게이트 그룹이 없는 올리고뉴클레오타이드보다 유의미하게 더 강했다는 것을 보여준다. 더욱이, 절단가능 모이어티 (ISIS 680772)를 통해 올리고뉴클레오타이드에 연결된 GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 안정한 모이어티 (ISIS 696847)를 통해 올리고뉴클레오타이드에 연결된 GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드보다 더욱 더 강했다.

[1721]

표 99

[1722]

마우스 APOC-III를 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	CM	복용량 (mg/kg)	APOC-III mRNA (% PBS)	서열번호
440670	$mC_{es}A_{es}G_{es}mC_{es}T_{es}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}mC_{es}A_{es}G_{es}mC_{es}A_e$	n/a	2	92	47
			6	86	
			20	59	
			60	37	
680772	GalNAc₃-7_{a-o} $mC_{es}A_{es}G_{es}mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}mC_{es}A_{es}G_{es}mC_{es}A_e$	PO	0.6	79	47
			2	58	
			6	31	
			20	13	
696847	GalNAc₃-7_{a-s} $mC_{es}A_{es}G_{es}mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}mC_{es}A_{es}G_{es}mC_{es}A_e$	n/a (PS)	0.6	83	47
			2	73	
			6	40	
			20	28	

[1723]

[1724]

GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌다.

[1725] 실시예 102: GalNAc 콘주게이트를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 간에서의 분포

[1726] GalNAc 콘주게이트를 포함하지 않는 ISIS 353382 (참고 표 23) 및 GalNAc 콘주게이트를 포함하는 ISIS 655861 (참고 표 23)의 간 분포는 평가되었다. 수컷 balb/c 마우스에게 표 100에서 열거된 복용량으로 ISIS 353382 또는 655861을 피하로 1회 주입했다. 각각의 처리 그룹은 2 마리의 동물로 구성된 ISIS 655861에 대한 18 mg/kg 그룹을 제외하고 3 마리의 동물로 구성되었다. 동물을 복용 48 시간 후에 희생시켜 올리고뉴클레오타이드의 간 분포를 측정했다. 세포 당 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자의 수를 측정하기 위해, 루테늄 (II) 트리스-바이피리딘 태그 (MSD TAG, 중간 규모발견)을 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 검출하기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드 프로브에 접합된다. 표 100에 존재하는 결과는 세포 당 올리고뉴클레오타이드 분자의 수백만 단위로 각 처리 그룹에 대한 올리고뉴클레오타이드의 평균 농도이다. 이 결과는, 동등 투여량에서, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 GalNAc 콘주게이트를 포함하지 않는 올리고뉴클레오타이드보다 전체 간 및 간세포에서 더 높은 농도로 존재한다는 것을 보여준다. 더욱이, GalNAc 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 GalNAc 콘주게이트를 포함하지 않는 올리고뉴클레오타이드 보다 더 낮은 비-실질 간 세포 중 농도로 존재했다. 그리고 간세포 및 비-실질 간 세포 중 ISIS 655861의 농도는 세포에 대해 유사했지만, 간은 용적으로 대략 80% 간세포이다. 따라서, 간에 존재했던 대다수의 ISIS 655861 올리고뉴클레오타이드는 간세포에서 발견되었고, 반면에 간에 존재했던 대다수의 ISIS 353382 올리고뉴클레오타이드는 비-실질 간 세포에서 발견되었다.

[1727] 표 100

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	전체 간 중 농도 (분자*10 ⁶ / 세포)	간세포 중 농도 (분자*10 ⁶ / 세포)	비-실질 간 세포 중 농도 (분자*10 ⁶ / 세포)
353382	3	9.7	1.2	37.2
	10	17.3	4.5	34.0
	20	23.6	6.6	65.6
	30	29.1	11.7	80.0
	60	73.4	14.8	98.0
	90	89.6	18.5	119.9
655861	0.5	2.6	2.9	3.2
	1	6.2	7.0	8.8
	3	19.1	25.1	28.5
	6	44.1	48.7	55.0
	18	76.6	82.3	77.1

[1728]

[1729] 실시예 103: GalNAc₃ 콘주게이트를 포함하는 ApoC-III을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드의 생체내 작용의 지속시간

[1730] 아래의 표 101에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 작용의 지속시간에 대한 단회 용량 연구에서 시험되었다.

[1731] 표 101

[1732] APOC-III을 표적으로 하는 변형된 ASO

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	n/a	n/a	20
663084	GalNAc₃-3a'-o'-A_{do} A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	36
679241	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _{eo} A_{do}'-GalNAc₃-19a	GalNAc ₃ -19a	A _d	21

[1733]

[1734] GalNAc₃-3a의 구조는 실시예 39에서 보여졌고, GalNAc₃-19a의 구조는 실시예 70에서 보여졌다.

[1735] 처리

[1736] 인간 APOC-III을 발현시키는 암컷 이식유전자 마우스 각각에게 표 101에서 열거된 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS를 피하로 1 회 주입했다. 각각의 처리 그룹은 3 마리의 동물로 구성되었다. 복용 전에 채혈하여 복용 다음에 기준선 및 3, 7, 14, 21, 28, 35, 및 42 일에서 측정했다. 혈장 트리글리세라이드 및 APOC-III 단백질 수준은 실시예 20에서 기재된 바와 같이 측정되었다. 표 102에서의 결과는 기준선 수준에 대해 정규화된, 각 처리 그룹에 대한 혈장 트리글리세라이드 및 APOC-III 수준의 평균 퍼센트로서 제공된다. 실시예 79의 표 58의 결과와 아래의 표 102의 결과와의 비교는, 포스포디에스테르와 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결의 혼합물을 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결만을 포함하는 동등한 올리고뉴클레오타이드보다 작용의 증가된 지속시간을 나타냈다는 것을 보여준다.

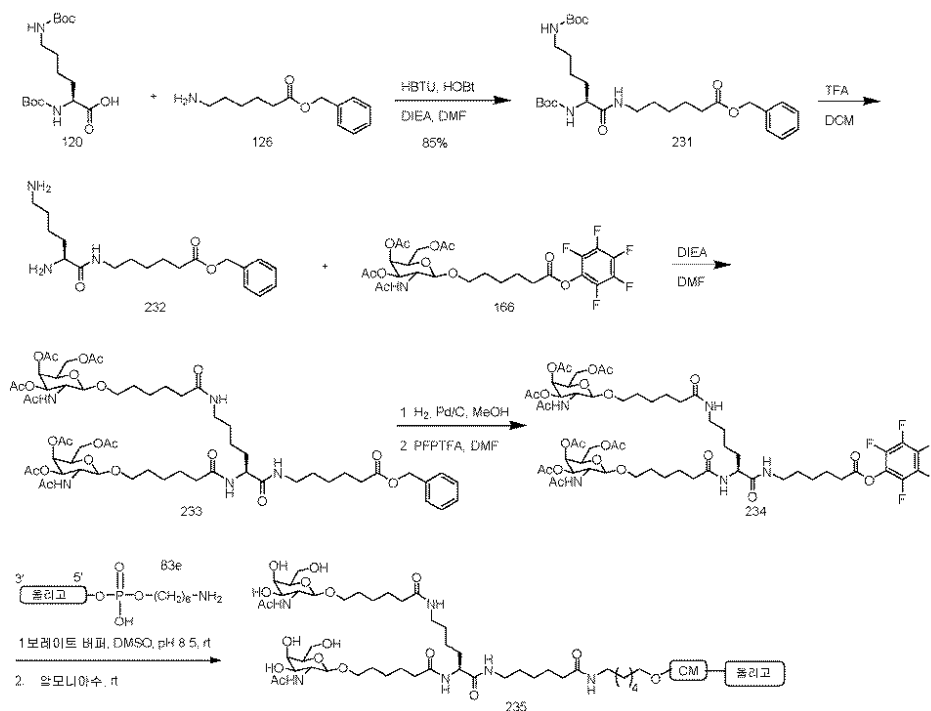
[1737] 표 102

[1738] 이식유전자 마우스 중 혈장 트리글리세라이드 및 APOC-III 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	시점 (복용후 일수)	트리글리세라이드 (% 기준선)	APOC-III 단백질 (% 기준선)	GalNAc ₃ 클러스터	CM
PBS	n/a	3	96	101	n/a	n/a
		7	88	98		
		14	91	103		
		21	69	92		
		28	83	81		
		35	65	86		
		42	72	88		
304801	30	3	42	46	n/a	n/a
		7	42	51		
		14	59	69		
		21	67	81		
		28	79	76		
		35	72	95		
		42	82	92		
663084	10	3	35	28	GalNAc ₃ -3a	A _d
		7	23	24		
		14	23	26		
		21	23	29		
		28	30	22		
		35	32	36		
		42	37	47		
679241	10	3	38	30	GalNAc ₃ -19a	A _d
		7	31	28		
		14	30	22		
		21	36	34		
		28	48	34		
		35	50	45		
		42	72	64		

[1739]

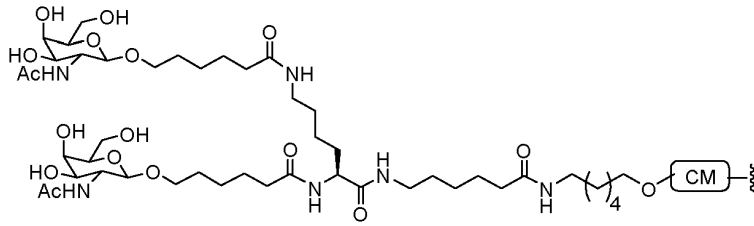
[1740] 실시예 104: 5'-GalNAc₂ 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 합성



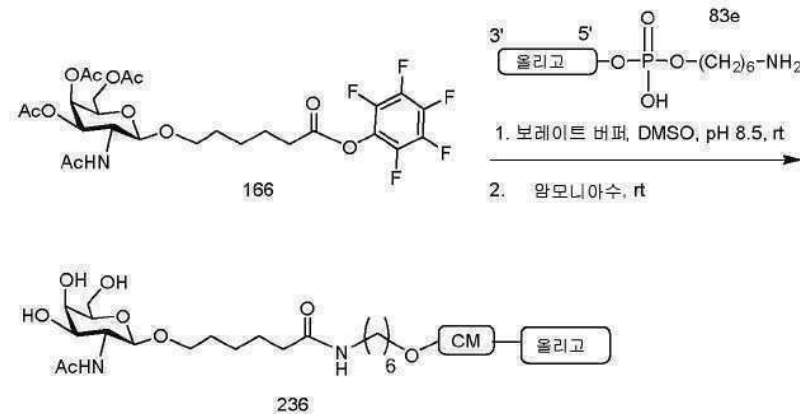
[1741]

[1742]

화합물 120은 시판되고 있고, 화합물 126의 합성은 실시예 49에서 기재되어 있다. 화합물 120 (1 g, 2.89 mmol), HBTU (0.39 g, 2.89 mmol), 및 HOBt (1.64 g, 4.33 mmol)을 DMF (10 mL)에서 용해시키고, *N,N*-디이소프로필에틸아민 (1.75 mL, 10.1 mmol)을 부가했다. 약 5 분 후, 아미노헥산산 벤질 에스테르 (1.36 g, 3.46 mmol)을 반응에 부가했다. 3 시간 후, 반응 혼합물을 100 mL의 1 M NaHSO₄에 붓고 2 x 50 mL 에틸 아세테이트로 추출했다. 유기 층들을 조합하고 3 x 40 mL 포화 NaHCO₃ 및 2 x 염수로 세정하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 농축했다. 생성물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 (DCM:EA:Hex, 1:1:1)로 정제하여 화합물 231을 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 화합물 231 (1.34 g, 2.438 mmol)을 디클로로메탄 (10 mL)에서 용해시키고 트리플루오르아세트산 (10 mL)을 부가했다. 실온에서 2 시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 감압 하에서 농축하고 톨루엔 (3 x 10 mL)로 공-증발시켰다. 잔류물을 감압 하에서 건조하여 화합물 232를 트리플루오르아세트산 염으로서 얻었다. 화합물 166의 합성은 실시예 54에서 기재되어 있다. 화합물 166 (3.39 g, 5.40 mmol)을 DMF (3 mL)에서 용해시켰다. 화합물 232 (1.3 g, 2.25 mmol)의 용액을 DMF (3 mL)에서 용해시키고 *N,N*-디이소프로필에틸아민 (1.55 mL)을 부가했다. 반응을 실온에서 30 분 동안 교반하고, 그 다음 물 (80 mL)에 붓고 수성 층을 EtOAc (2x100 mL)로 추출했다. 유기 상을 분리하고 포화 수성 NaHCO₃ (3 x 80 mL), 1 M NaHSO₄ (3 x 80 mL) 및 염수 (2 x 80 mL)로 세정하고, 그 다음 건조시키고 (Na₂SO₄), 여과하고, 농축했다. 잔류물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 233을 얻었다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 화합물 233 (0.59 g, 0.48 mmol)을 메탄올 (2.2 mL) 및 에틸 아세테이트 (2.2 mL)에서 용해시켰다. 탄소상 팔라듐 (10 wt% Pd/C, 습성, 0.07 g)을 부가하고, 반응 혼합물을 수소 분위기 하에서 3 시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 셀라이트의 패드를 통해 여과하고 농축하여 카복실산을 얻었다. 카복실산 (1.32 g, 1.15 mmol, 클러스터 유리 산)을 DMF (3.2 mL)에서 용해시켰다. 이것에 *N,N*-디이소프로필에틸아민 (0.3 mL, 1.73 mmol) 및 PFPTFA (0.30 mL, 1.73 mmol)을 부가했다. 실온에서 30 분 교반 후 반응 혼합물을 물 (40 mL)에 붓고 EtOAc (2 x 50 mL)로 추출했다. 표준 워크업은 상기에서 기재된 바와 같이 완료되어 화합물 234를 산출했다. LCMS 및 NMR은 구조와 일치했다. 올리고뉴클레오타이드 235는 실시예 46에서 기재된 일반적인 절차를 사용하여 제조되었다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₂-24의 GalNAc₂ 클러스터 부분 (GalNAc₂-24_a)은 올리고뉴클레오타이드 상에 존재하는 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. GalNAc₂-24 (GalNAc₂-24_a-CM)의 구조는 이하에서 보여진다:

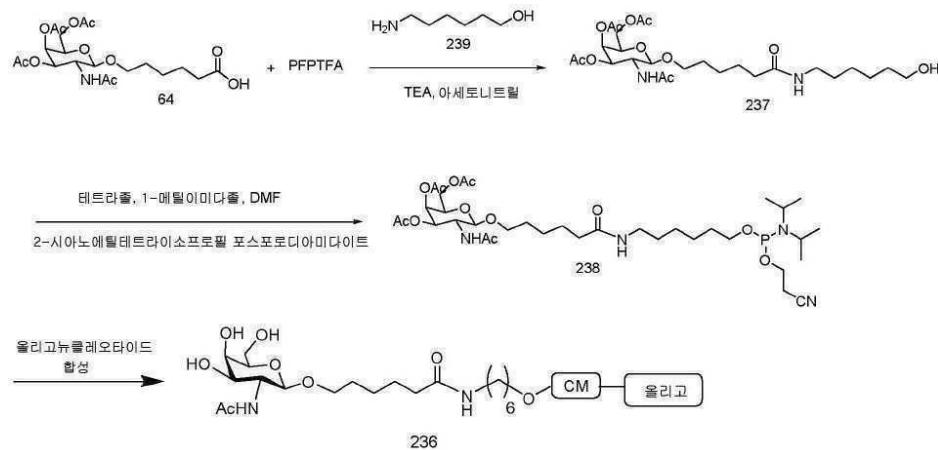


실시예 105: GalNAc₁-25 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 합성

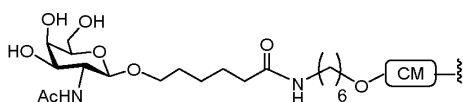


화합물 166의 합성은 실시예 54에서 기재되어 있다. 올리고뉴클레오타이드 236는 실시예 46에서 기재된 일반적인 절차를 사용하여 제조되었다.

대안적으로, 올리고뉴클레오타이드 236는 아래에서 보여진 도식을 사용하여 합성되었고, 및 화합물 238은 사용되어 실시예 10에서 기재된 절차를 사용하여 올리고뉴클레오타이드 236을 형성했다.



콘주게이트 그룹 GalNAc₁-25의 GalNAc₁ 클러스터 부분 (GalNAc₁-25_a)은 올리고뉴클레오타이드 상에 존재하는 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. GalNAc₁-25 (GalNAc₁-25_a-CM)의 구조는 이하에서 보여진다:



실시예 106: 5'-GalNAc2 또는 5'-GalNAc3 콘주게이트를 포함하는 SRB-1을 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내의 안티센스 억제

표 103 및 104에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 SRB-1의 안티센스 억제에 대한 용량-의존적 연구에서 시험되었다.

[1753] 처리

[1754] 6 주령, 수컷 C57BL/6 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에게 2, 7, 또는 20 mg/kg의 ISIS 번호 440762; 또는 0.2, 0.6, 2, 6, 또는 20 mg/kg의 ISIS 번호 686221, 686222, 또는 708561; 또는 염수가 피하로 1회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. The 마우스는 최종 투여 72 시간 후에 희생되었다. 간 SRB-1 mRNA 수준은 실시간 PCR를 사용하여 측정되었다. SRB-1 mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 사이클로필된 mRNA 수준에 대해 정규화되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 용량-의존 방식으로 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했고, ED₅₀ 결과는 표 103 및 104에서 제공된다. 이전의 연구는, 3가 GalNAc-접합된 올리고뉴클레오타이드가 결국 1가 GalNAc 접합된 올리고뉴클레오타이드로부터 유의미하게 더 강했던 2가 GalNAc-접합된 올리고뉴클레오타이드보다 유의미하게 더 강했다는 것을 보여주었지만, (참고, 예를 들면, Khorev 등, Bioorg. Bioorg. & Med. Chem., Vol. 16, 5216-5231 (2008)), 1가, 2가, 및 3가 GalNAc 클러스터를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 처리는 표 103 및 104에서 보여진 바와 같은 유사한 효능으로 SRB-1 mRNA 수준을 낮게 했다.

[1755] 표 103

[1756] SRB-1을 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc 클러스터	ED ₅₀ (mg/kg)	서열 번호
440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	n/a	4.7	22
686221	GalNAc₂-24_a-o -A _{do} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₂ -24 _a	0.39	26
686222	GalNAc₃-13_a-o -A _{do} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -13 _a	0.41	26

[1757]

[1758] 표 범례에 대한 실시예 93 참조. GalNAc₃-13a의 구조는 실시예 62에서 이전에 보여졌고, GalNAc₂-24a의 구조는 실시예 104에서 보여졌다.

[1759] 표 104

[1760] SRB-1을 표적으로 하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc 클러스터	ED ₅₀ (mg/kg)	서열 번호
440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	n/a	5	22
708561	GalNAc₁-25_a-o -T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₁ -25 _a	0.4	22

[1761]

[1762] 표 범례에 대한 실시예 93 참조. GalNAc₁-25a의 구조는 실시예 105에서 보여졌다.

[1763] 간 중 표 103 및 104에서의 올리고뉴클레오타이드의 농도는 실시예 75에서 기재된 절차를 사용하여 또한 평가되었다. 아래의 표 104a 및 104b에서 보여진 결과는 μg 올리고뉴클레오타이드 / 간 조직의그램의 단위로 UV에 의해 측정된 바와 같이, 각 처리 그룹에 대한 평균 총 안티센스 올리고뉴클레오타이드 조직 수준이다. 이 결과는, GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 GalNAc 콘주게이트 그룹이 없는 올리고뉴클레오타이드의 동일한 용량보다 유의미하게 더 높은 수준에서 간에서 축적된다는 것을 보여준다. 더욱이, 그의 각 콘주게이트 그룹 모두 중 1, 2 또는 3 개의 GalNAc 리간드를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 유사한 수준으로 간에서 축적된다. 이러한 결과는 상기에서 인용된 Khorev 등 문헌 참조의 관점에서 놀랍고 상기 표 103 및 104에서 보여진 활성 데이터와 일치한다.

[1764] 표 104a

[1765] GalNAc₂ 또는 GalNAc₃ 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 간 농도

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	[안티센스 올리고뉴클레오타이드] (μg/g)	GalNAc 클러스터	CM
440762	2	2.1	n/a	n/a
	7	13.1		
	20	31.1		
686221	0.2	0.9	GalNAc ₂ -24 _a	A _d
	0.6	2.7		
	2	12.0		
	6	26.5		
686222	0.2	0.5	GalNAc ₃ -13 _a	A _d
	0.6	1.6		
	2	11.6		
	6	19.8		

[1766]

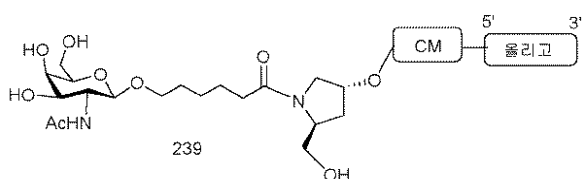
[1767] 표 104b

[1768] GalNAc₁ 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 간 농도

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	[안티센스 올리고뉴클레오타이드] (μg/g)	GalNAc 클러스터	CM
440762	2	2.3	n/a	n/a
	7	8.9		
	20	23.7		
708561	0.2	0.4	GalNAc ₁ -25 _a	PO
	0.6	1.1		
	2	5.9		
	6	23.7		
	20	53.9		

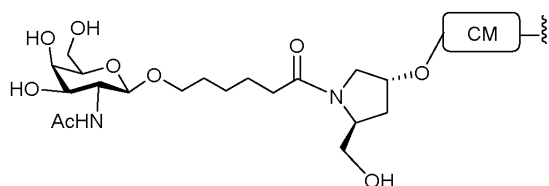
[1769]

[1770] 실시예 107: GalNAc₁-26 또는 GalNAc₁-27 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 합성



[1771]

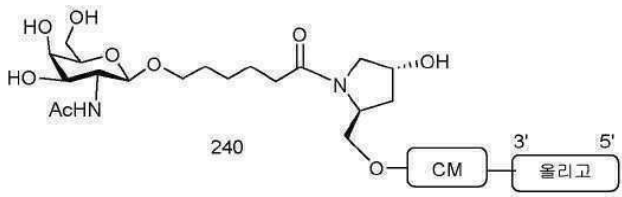
[1772] 올리고뉴클레오타이드 239는 DMF 중 HBTU 및 DIEA를 사용하여 화합물 47 (참고 실시예 15)의 산 64 (참고 실시예 32)에의 커플링을 통해 합성된다. 수득한 아마이드 함유 화합물은 포스포리틸화되고, 그 다음 실시예 10에서 기재된 절차를 사용하여 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부가된다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₁-26의 GalNAc₁ 클러스터 부분 (GalNAc₁-26_a)은 올리고뉴클레오타이드 상에 존재하는 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. GalNAc₁-26 (GalNAc₁-26_a-CM)의 구조는 이하에서 보여진다:



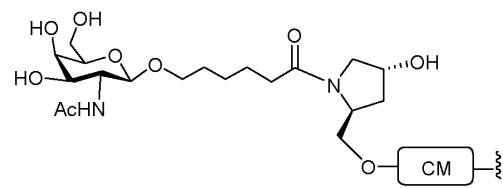
[1773]

[1774] GalNAc₁ 콘주게이트 그룹을 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단에 부가하기 위해, 화합물 47 및 64의 반응으로부터

형성된 아미드는 실시예 7에서 기재된 절차를 사용하여 고정 지지체에 부가된다. 그 다음 올리고뉴클레오타이드 합성은 실시예 9에서 기재된 절차를 사용하여 완료되어 올리고뉴클레오타이드 240을 형성한다.



콘주게이트 그룹 GalNAc₁-27의 GalNAc₁ 클러스터 부분 (GalNAc₁-27_a)은 올리고뉴클레오타이드 상에 존재하는 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. GalNAc₁-27 (GalNAc₁-27_a-CM)의 구조는 이하에서 보여진다:



실시예 108: 생체내에서 Apo(a)를 표적으로 하는 GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 의한 생체내의 안티센스 억제

아래의 표 105에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 마우스에서 단회 용량 연구에서 시험되었다.

표 105

AP0(a)를	표적으로	하는	변형된	ASO
ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc ₃ 클러스터	CM	서열번호
494372	T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} ^m C _e	n/a	n/a	53
681251	GalNAc₃-7_a-o -T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	53
681255	GalNAc₃-3_a-o -T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -3a	PO	53
681256	GalNAc₃-10_a-o -T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -10a	PO	53
681257	GalNAc₃-7_a-o -T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	53
681258	GalNAc₃-13_a-o -T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -13a	PO	53
681260	T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _{eo} A_{do} - GalNAc₃-19	GalNAc ₃ -19a	A _d	52

GalNAc₃-7_a의 구조는 실시예 48에서 보여졌다.

처리

인간 Apo(a)를 발현시키는 수컷 이식유전자 마우스 각각에게, 올리고뉴클레오타이드가 그리고 그리고 표 106에서 열거된 복용량으로 또는 PBS가 피하로 1 회 주입되었다. 각 처리 그룹은 4 마리 동물로 구성되었다. 혈액은 혈장 중 Apo(a) 단백질의 기준선 수준을 측정하기 위해 복용 전 날 및 제 1 용량 다음 1 주에 뽑았다. 추가의 채혈은 대략 8 주 동안 매주 일어날 것이다. 혈장 Apo(a) 단백질 수준은 ELISA를 사용하여 측정되었다. 표 106의 결과는 기준선 수준 (% BL)으로 정규화된, 각 처리 그룹에 대한 혈장 Apo(a) 단백질 수준의 평균 퍼센트로서

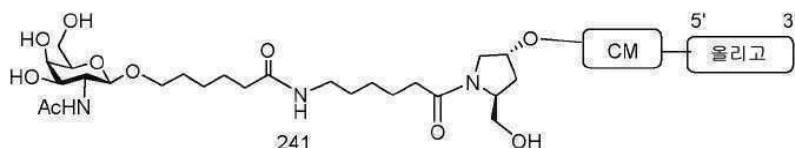
제공된다. 이 결과는, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 Apo(a) 단백질 발현을 축소시킨다는 것을 보여준다. 더욱이, GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 콘주게이트 그룹을 포함하지 않는 올리고뉴클레오타이드보다 Apo(a) 발현에서 더욱 더 강한 축소를 나타내었다.

표 106

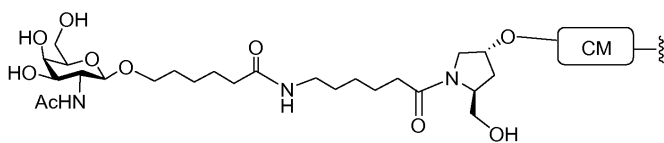
Apo(a) 혈장 단백질 수준

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	1 주에서 Apo(a) (% BL)
PBS	n/a	143
494372	50	58
681251	10	15
681255	10	14
681256	10	17
681257	10	24
681258	10	22
681260	10	26

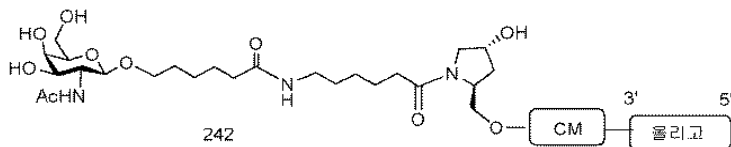
실시예 109: GalNAc₁-28 또는 GalNAc₁-29 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 합성



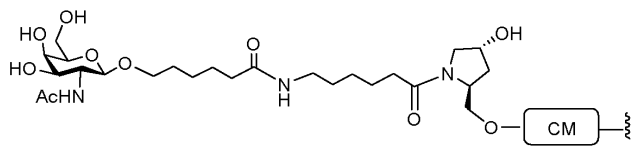
올리고뉴클레오타이드 241은 실시예 71에서 기재된 것과 유사한 절차를 사용하여 합성되어 포스포르아미다이트 중간체를 형성하고, 그 다음 실시예 10에서 기재된 절차를 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 합성한다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₁-28의 GalNAc₁ 클러스터 부분 (GalNAc₁-28_a)은 올리고뉴클레오타이드 상에 존재하는 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. GalNAc₁-28 (GalNAc₁-28_a-CM)의 구조는 이하에서 보여진다:



GalNAc₁ 콘주게이트 그룹을 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단에 부가하기 위해, 실시예 71에서 기재된 것과 유사한 절차가 사용되어 하이드록실 중간체를 형성하고, 그 다음 이것은 실시예 7에서 기재된 절차를 사용하여 고형 지지체에 부가된다. 그 다음 올리고뉴클레오타이드 합성은 실시예 9에서 기재된 절차를 사용하여 완료되어 올리고뉴클레오타이드 242를 형성한다.



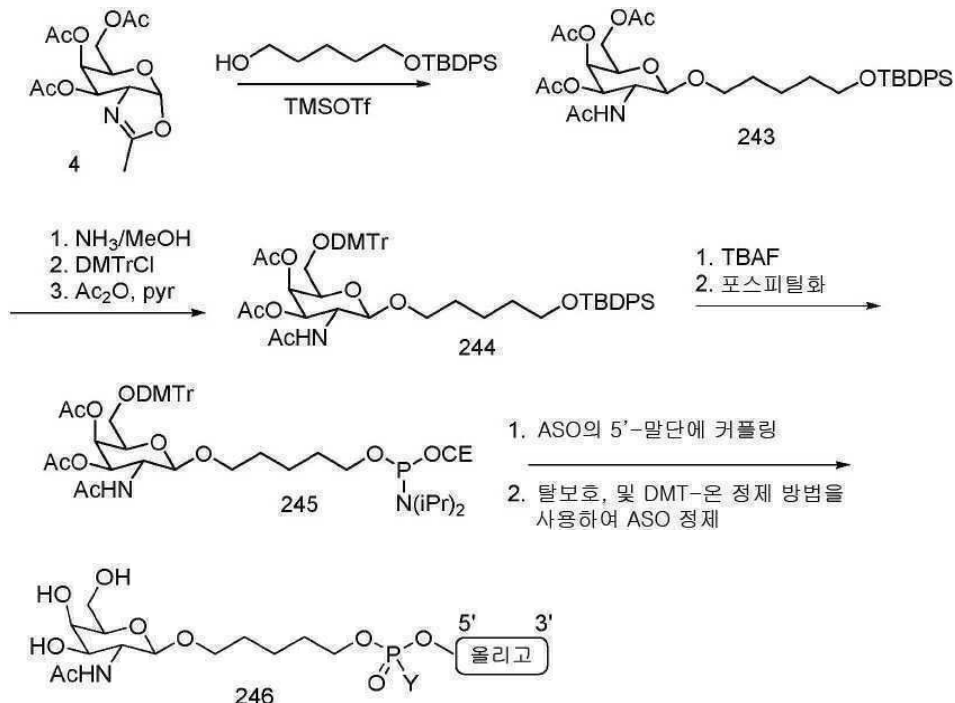
콘주게이트 그룹 GalNAc₁-29의 GalNAc₁ 클러스터 부분 (GalNAc₁-29_a)은 올리고뉴클레오타이드 상에 존재하는 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. GalNAc₁-29 (GalNAc₁-29_a-CM)의 구조는 이하에서 보여진다:



[1795]

[1796]

실시예 110: GalNAc₁-30 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 합성



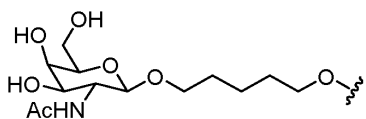
[1797]

[1798]

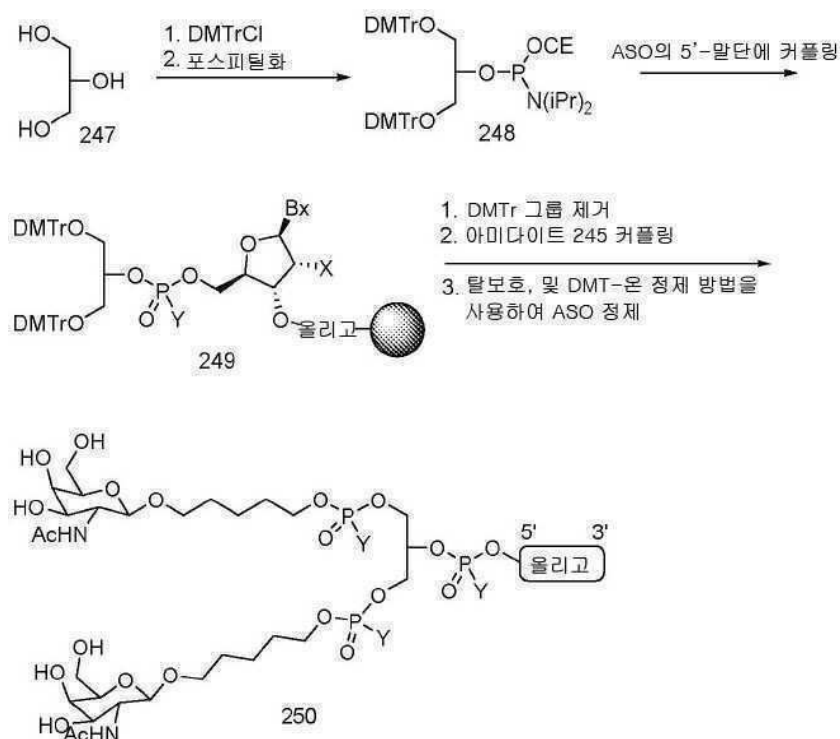
[1799]

GalNAc₁-30 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 246(여기서 Y는 O, S, 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 아미노, 치환된 아미노, 아지도, 알케닐 또는 알킬닐로부터 선택됨)는, 상기에 보여진 바와 같이 합성된다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₁-30의 GalNAc₁ 클러스터 부분 (GalNAc₁-30_a)은 다양한 콘주게이트 그룹을 제공하기 위해 임의의 절단가능 모이어티와 조합될 수 있다. 어떤 구현예에서, Y는 절단가능 모이어티의 일부이다. 어떤 구현예에서, Y는 안정한 모이어티의 일부이고 절단가능 모이어티는 올리고뉴클레오타이드 상에 존재한다. GalNAc₁-30_a의 구조는 아래에서 보여진다:

[1800]



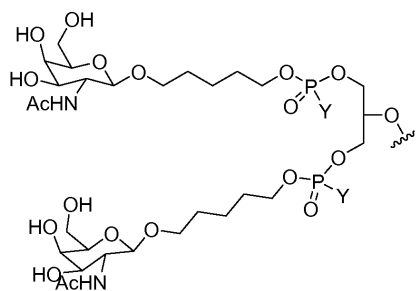
[1801] 실시예 111: GalNAc₂-31 또는 GalNAc₂-32 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 합성



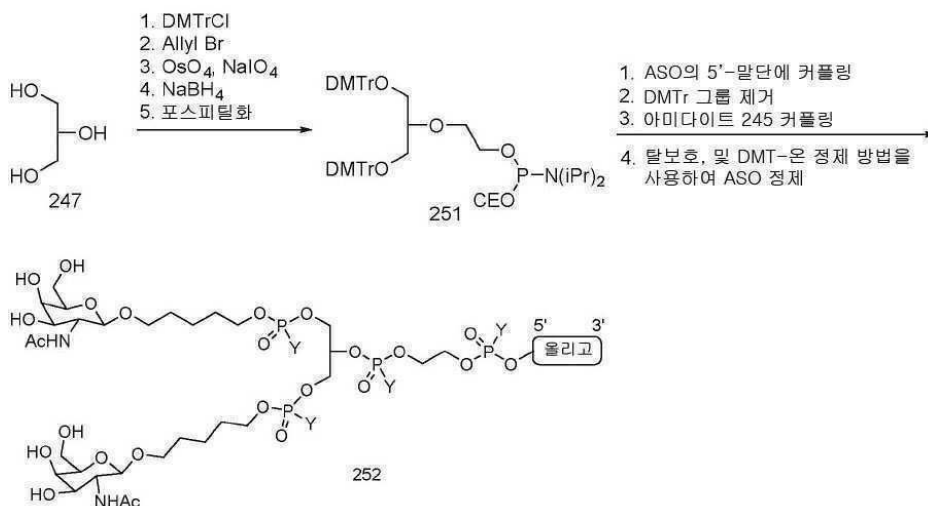
[1802]

[1803] GalNAc₂-31 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 250(여기서 Y는 O, S, 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 아미노, 치환된 아미노, 아지도, 알케닐 또는 알킬닐로부터 선택됨)은, 상기에 보여진 바와 같이 합성된다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₂-31의 GalNAc₂ 클러스터 부분 (GalNAc₂-31_a)는 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 직접적으로 인접한 Y-함유 그룹은 절단가능 모이어티의 일부이다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 직접적으로 인접한 Y-함유 그룹은 안정한 모이어티의 일부이고 절단가능 모이어티는 올리고뉴클레오타이드 상에 존재한다. GalNAc₂-31_a의 구조는 아래에서 보여진다:

[1804]

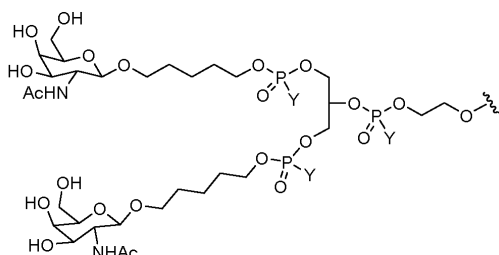


[1805] GalNAc₂-32 콘주게이트를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 합성은 아래에서 보여진다.



[1806]

[1807] GalNAc₂-32 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 252(여기서 Y는 O, S, 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 아미노, 치환된 아미노, 아지도, 알케닐 또는 알키닐로부터 선택됨)는, 상기에 보여진 바와 같이 합성된다. 콘주게이트 그룹 GalNAc₂-32의 GalNAc₂ 클러스터 부분 (GalNAc₂-32_a)는 임의의 절단가능 모이어티와 조합되어 다양한 콘주게이트 그룹을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 직접적으로 인접한 Y-함유 그룹은 절단가능 모이어티의 일부이다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 직접적으로 인접한 Y-함유 그룹은 안정한 모이어티의 일부이고 절단가능 모이어티는 올리고뉴클레오타이드 상에 존재한다. GalNAc₂-32_a의 구조는 아래에서 보여진다:



[1808]

[1809] 실시예 112: GalNAc₁ 콘주게이트를 포함하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

[1810] SRB-1를 표적으로 하는 표 107 중 올리고뉴클레오타이드는 1 개의 GalNAc 리간드를 함유하는 콘주게이트 그룹을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 효능을 추가 시험하기 위해 GalNAc₁ 콘주게이트 그룹으로 합성되었다.

[1811] 표 107

ISIS 번호	서열 (5'에서 3')	GalNAc 클러스터	CM	서열번호
711461	GalNAc₁-25_{a-o}-A_{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -25 _a	A _d	30
711462	GalNAc₁-25_{a-o} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -25 _a	PO	28
711463	GalNAc₁-25_{a-o} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -25 _a	PO	28
711465	GalNAc₁-26_{a-o}-A_{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -26 _a	A _d	30
711466	GalNAc₁-26_{a-o} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -26 _a	PO	28
711467	GalNAc₁-26_{a-o} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -26 _a	PO	28
711468	GalNAc₁-28_{a-o}-A_{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -28 _a	A _d	30
711469	GalNAc₁-28_{a-o} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -28 _a	PO	28
711470	GalNAc₁-28_{a-o} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -28 _a	PO	28
713844	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} · GalNAc₁-27_a	GalNAc ₁ -27 _a	PO	28
713845	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} · GalNAc₁-27_a	GalNAc ₁ -27 _a	PO	28
713846	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} · A_{do}·GalNAc₁-27_a	GalNAc ₁ -27 _a	A _d	29
713847	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} · GalNAc₁-29_a	GalNAc ₁ -29 _a	PO	28
713848	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} · GalNAc₁-29_a	GalNAc ₁ -29 _a	PO	28
713849	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} · A_{do}·GalNAc₁-29_a	GalNAc ₁ -29 _a	A _d	29
713850	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} · A_{do}·GalNAc₁-29_a	GalNAc ₁ -29 _a	A _d	29

[1812]

[1813]

실시예 113: 간염 B 바이러스 (HBV)를 표적으로 하는 GalNAc 콘주게이트 그룹을 포함하는 변형된 올리고뉴클레오타이드

[1814]

아래의 표 108에서 열거된 올리고뉴클레오타이드는 HBV를 표적으로 하기 위해 설계되었다. 어떤 구현예에서, 절단가능 모이어티는 포스포디에스테르 연결이다.

[1815] 표 108

서열 (5'에서 3')	서열번호
GalNAc₃-3-G_{es}^mC_{es}A_{es}G_{es}A_{es}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{es}G_{es}T_{es}G_{es}^mC_e	3
GalNAc₃-3-G_{es}^mC_{eo}A_{eo}G_{eo}A_{eo}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{eo}G_{eo}T_{es}G_{es}^mC_e	3
GalNAc₃-7-G_{es}^mC_{es}A_{es}G_{es}A_{es}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{es}G_{es}T_{es}G_{es}^mC_e	3
GalNAc₃-7-G_{es}^mC_{eo}A_{eo}G_{eo}A_{eo}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{eo}G_{eo}T_{es}G_{es}^mC_e	3
GalNAc₃-10-G_{es}^mC_{es}A_{es}G_{es}A_{es}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{es}G_{es}T_{es}G_{es}^mC_e	3
GalNAc₃-10-G_{es}^mC_{eo}A_{eo}G_{eo}A_{eo}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{eo}G_{eo}T_{es}G_{es}^mC_e	3
GalNAc₃-13-G_{es}^mC_{es}A_{es}G_{es}A_{es}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{es}G_{es}T_{es}G_{es}^mC_e	3
GalNAc₃-13-G_{es}^mC_{eo}A_{eo}G_{eo}A_{eo}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{eo}G_{eo}T_{es}G_{es}^mC_e	3
G_{es}^mC_{es}A_{es}G_{es}A_{es}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{es}G_{es}T_{es}G_{es}^mC_e-GalNAc₃-19	3
G_{es}^mC_{eo}A_{eo}G_{eo}A_{eo}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{eo}G_{eo}T_{es}G_{es}^mC_e-GalNAc₃-19	3
GalNAc₃-24-G_{es}^mC_{es}A_{es}G_{es}A_{es}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{es}G_{es}T_{es}G_{es}^mC_e	3
GalNAc₃-24-G_{es}^mC_{eo}A_{eo}G_{eo}A_{eo}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{eo}G_{eo}T_{es}G_{es}^mC_e	3
GalNAc₃-25-G_{es}^mC_{es}A_{es}G_{es}A_{es}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{es}G_{es}T_{es}G_{es}^mC_e	3
GalNAc₃-25-G_{es}^mC_{eo}A_{eo}G_{eo}A_{eo}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{eo}G_{eo}T_{es}G_{es}^mC_e	3

[1816]

본 발명은 하기 구현예를 포함한다:

[1817]

[구현예 1]

[1818]

변형된 올리고뉴클레오타이드 및 접합체 기를 포함하는 화합물로서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 8 내지 80 개의 연결된 뉴클레오타이드로 이루어지고 트랜스티레틴 (TTR)을 인코딩하는 서열번호: 2에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 또는 100% 상보적인 핵염기 서열을 갖는 화합물.

[1819]

[구현예 2]

[1820]

구현예 1에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 서열번호: 2의 핵염기 507-608 내에서 상보적이고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 2에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 또는 100% 상보적인 것인 화합물.

[1821]

[구현예 3]

[1822]

구현예 1에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 서열번호: 2의 핵염기 507-526, 508-527, 515-534, 516-535, 580-599, 585-604, 587-606, 또는 589-608 내에서 상보적이고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 2에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 또는 100% 상보적인 것인 화합물.

[1823]

[구현예 4]

[1824]

구현예 1에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 30 개의 연결된 뉴클레오타이드로 이루어지고 서열번호: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 또는 19의 임의의 핵염기 서열의 적어도 8 개의 인접 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는 화합물.

[1825]

[구현예 5]

[1826]

구현예 4에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 또는 19에 나열된 서열을 포함하는 핵염기 서열을 갖는 화합물.

[1827]

[구현예 6]

[1828]

구현예 4에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 또는 19에 나열된 서열로 이루어진 핵염기 서열을 갖는 화합물.

[1829]

[구현예 7]

[1830]

구현예 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 20 개의 연결된 뉴클레오타이드로 이루어진 것인 화합물.

[1831]

[구현예 8]

[1832]

구현예 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 변형된 당을 포함하는 화합물.

[1833]

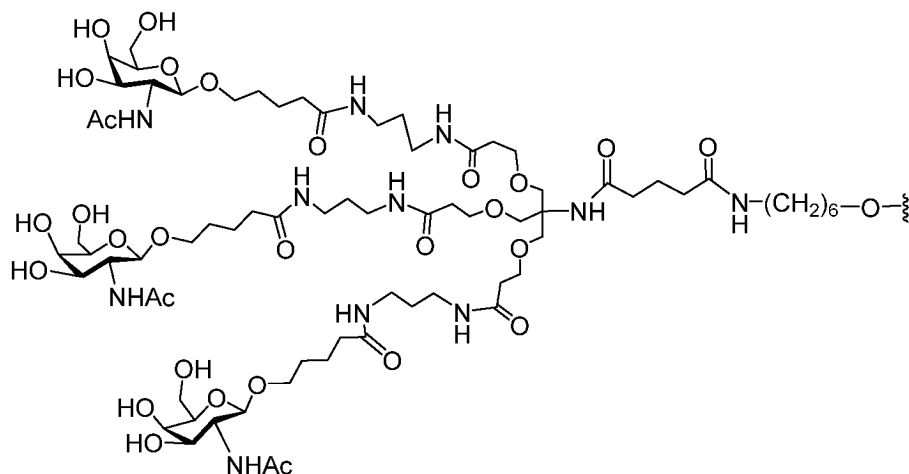
- [1834] [구현예 9]
- [1835] 구현예 8에 있어서, 상기 변형된 당은 바이사이클릭 당인 화합물.
- [1836] [구현예 10]
- [1837] 구현예 9에 있어서, 상기 바이사이클릭 당은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 화합물: 4'-(CH₂)-O-2'(LNA); 4'-(CH₂)₂-O-2'(ENA); 및 4'-CH(CH₃)-O-2'(cEt).
- [1838] [구현예 11]
- [1839] 구현예 8에 있어서, 상기 변형된 당은 2'-O-메톡시에틸인 화합물.
- [1840] [구현예 12]
- [1841] 구현예 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 변형된 핵염기를 포함하는 화합물.
- [1842] [구현예 13]
- [1843] 구현예 12에 있어서, 상기 변형된 핵염기는 5-메틸시토신인 화합물.
- [1844] [구현예 14]
- [1845] 구현예 1 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 또는 19에 나열된 서열로 이루어진 핵염기 서열을 갖는 20 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는,
- [1846] 10 개의 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 겹 분절;
- [1847] 5 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 뿔 분절; 및
- [1848] 5 개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 뿔 분절을 포함하고;
- [1849] 상기 겹 분절은 상기 5' 뿔 분절과 상기 3' 뿔 분절 사이에 배치되고; 상기 5' 뿔 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고; 상기 3' 뿔 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고; 여기서 각각의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이고; 그리고 여기서 각각의 시토신은 5-메틸시토신인 화합물.
- [1850] [구현예 15]
- [1851] 구현예 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 단일가닥인 화합물.
- [1852] [구현예 16]
- [1853] 구현예 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 이중-가닥인 화합물.
- [1854] [구현예 17]
- [1855] 구현예 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [1856] [구현예 18]
- [1857] 구현예 17에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결인 화합물.
- [1858] [구현예 19]
- [1859] 구현예 18에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [1860] [구현예 20]
- [1861] 구현예 18에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 2 개의 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간

연결을 포함하는 화합물.

- [1862] [구현예 21]
- [1863] 구현예 18에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 3 개의 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [1864] [구현예 22]
- [1865] 구현예 18에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 4 개의 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [1866] [구현예 23]
- [1867] 구현예 18에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 5 개의 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [1868] [구현예 24]
- [1869] 구현예 18에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 6 개의 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [1870] [구현예 25]
- [1871] 구현예 18에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 7 개의 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [1872] [구현예 26]
- [1873] 구현예 19 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 각각의 뉴클레오타이드간 연결은 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결 및 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결로부터 선택되는 화합물.
- [1874] [구현예 27]
- [1875] 구현예 18에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 각각의 뉴클레오타이드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [1876] [구현예 28]
- [1877] ISIS 304299 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [1878] [구현예 29]
- [1879] ISIS 420915 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [1880] [구현예 30]
- [1881] ISIS 420921 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [1882] [구현예 31]
- [1883] ISIS 420922 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [1884] [구현예 32]
- [1885] ISIS 420950 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [1886] [구현예 33]
- [1887] ISIS 420955 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [1888] [구현예 34]
- [1889] ISIS 420957 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [1890] [구현예 35]

- [1891] ISIS 420959 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [1892] [구현예 36]
- [1893] 구현예 1 내지 35 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 변형된 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서 변형된 올리고뉴클레오타이드에 연결되는 화합물.
- [1894] [구현예 37]
- [1895] 구현예 1 내지 35 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 변형된 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에서 변형된 올리고뉴클레오타이드에 연결되는 화합물.
- [1896] [구현예 38]
- [1897] 구현예 1 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 정확하게 하나의 리간드를 포함하는 화합물.
- [1898] [구현예 39]
- [1899] 구현예 1 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 정확하게 2 개의 리간드를 포함하는 화합물.
- [1900] [구현예 40]
- [1901] 구현예 1 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 3 개 이상의 리간드를 포함하는 화합물.
- [1902] [구현예 41]
- [1903] 구현예 1 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 정확하게 3 개의 리간드를 포함하는 화합물.
- [1904] [구현예 42]
- [1905] 구현예 38 내지 41 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 리간드는 하기 중으로부터 선택되는 화합물: 폴리사카라이드, 변형된 폴리사카라이드, 만노스, 갈락토오스, 만노스 유도체, 갈락토오스 유도체, D-만노피라노스, L-만노피라노스, D-아라비노오스, L-갈락토오스, D-자일로푸라노스, L-자일로푸라노스, D-글루코오스, L-글루코오스, D-갈락토오스, L-갈락토오스, α -D-만노푸라노스, β -D-만노푸라노스, α -D-만노피라노스, β -D-만노피라노스, α -D-글루코피라노스, β -D-글루코피라노스, α -D-글루코푸라노스, β -D-글루코푸라노스, α -D-프루토프라노스, α -D-프루토피라노스, α -D-갈락토피라노스, β -D-갈락토피라노스, α -D-갈락토프라노스, β -D-갈락토프라노스, 글루코사민, 시알산, α -D-갈락토사민, N-아세틸갈락토사민, 2-아미노-3-*O*[(*R*)-1-카복시에틸]-2-데옥시- β -D-글루코피라노스, 2-데옥시-2-메틸아미노-L-글루코피라노스, 4,6-디데옥시-4-포름아미도-2,3-디-*O*-메틸-D-만노피라노스, 2-데옥시-2-설포아미노-D-글루코피라노스, N-글라이콜로일- α -뉴라민산, 5-티오- β -D-글루코피라노스, 메틸 2,3,4-트리-*O*-아세틸-1-티오-6-*O*-트리틸- α -D-글루코피라노사이드, 4-티오- β -D-갈락토피라노스, 에틸 3,4,6,7-테트라-*O*-아세틸-2-데옥시-1,5-디티오- α -D-글루코-헵토피라노사이드, 2,5-안하이드로-D-알로노니트릴, 리보오스, D-리보오스, D-4-티오리보오스, L-리보오스, L-4-티오리보오스.
- [1906] [구현예 43]
- [1907] 구현예 42에 있어서, 각각의 리간드는 N-아세틸 갈락토사민인 화합물.
- [1908] [구현예 44]

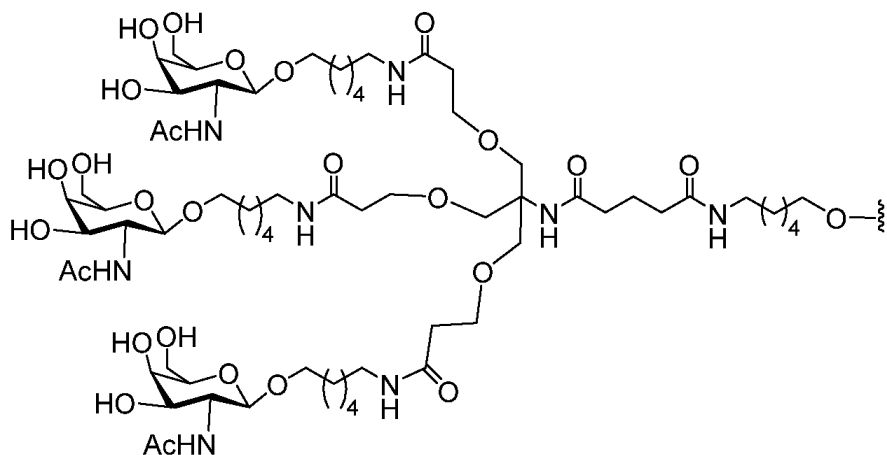
[1909] 구현예 1 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[1910]

[1911] [구현예 45]

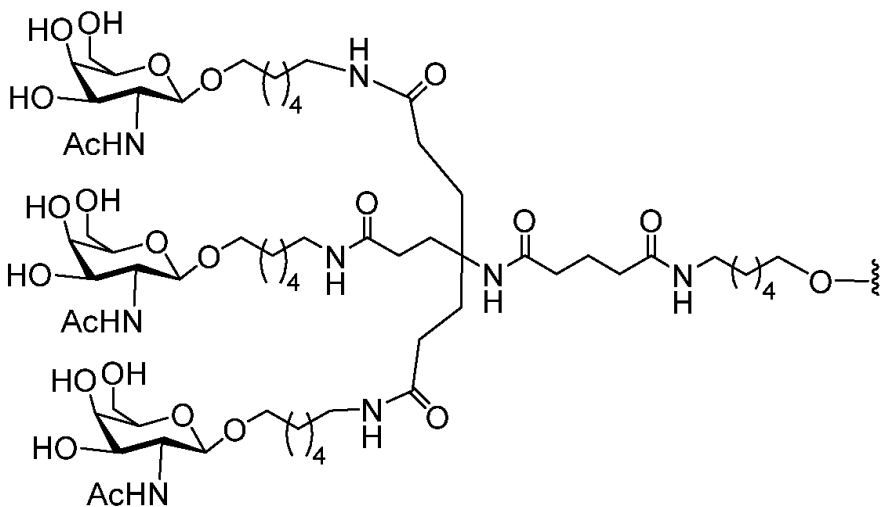
[1912] 구현예 1 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[1913]

[1914] [구현예 46]

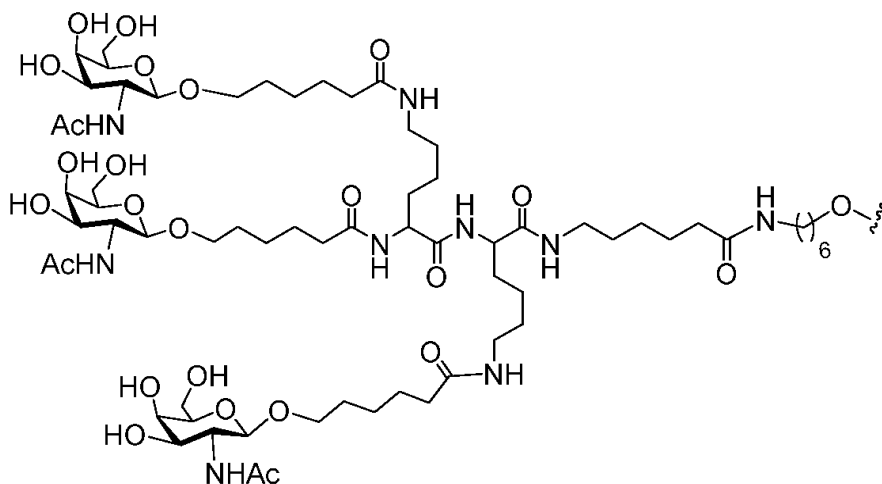
[1915] 구현예 1 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[1916]

[1917] [구현예 47]

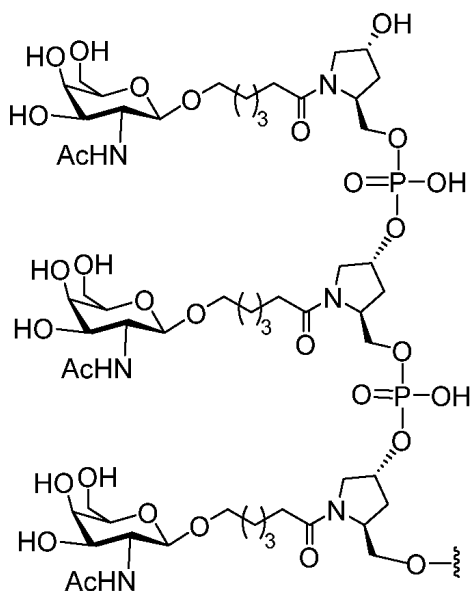
[1918] 구현예 1 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[1919]

[1920] [구현예 48]

[1921] 구현예 1 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



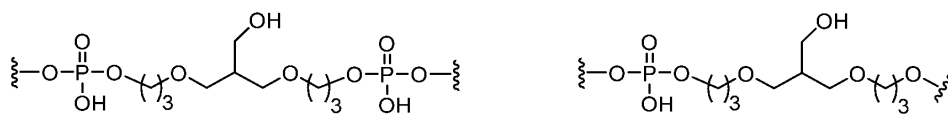
[1922]

[1923] [구현예 49]

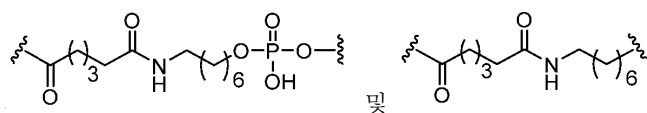
[1924] 구현예 1 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 적어도 하나의 인 연결 기 또는 중성 연결 기를 포함하는 화합물.

[1925] [구현예 50]

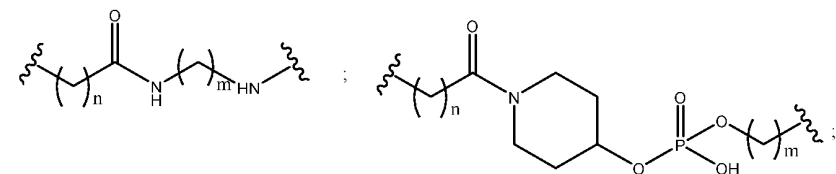
[1926] 구현예 1 내지 49 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기 중으로부터 선택된 구조를 포함하는 화합물:



[1927]



[1928]



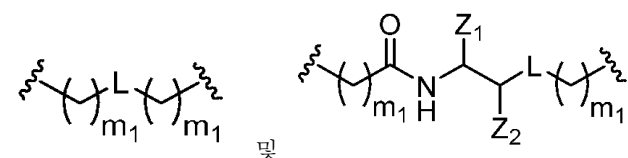
[1929]

[1930] 여기서 n은 1 내지 12이고; 그리고

[1931] 여기서 m은 1 내지 12이다.

[1932] [구현예 51]

[1933] 구현예 1 내지 49 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 테더 (tether)를 갖는 화합물:



[1934]

[1935] 여기서 L은 인 연결 기 또는 중성 연결 기이고;

[1936] Z₁은 C(=O)O-R₂이고;

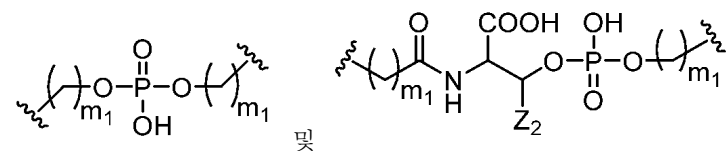
[1937] Z₂는 H, C₁-C₆알킬 또는 치환된 C₁-C₆알킬이고;

[1938] R₂는 H, C₁-C₆알킬 또는 치환된 C₁-C₆알킬이고; 그리고

[1939] 각각의 m₁은, 독립적으로, 0 내지 20이고, 여기서 적어도 하나의 m₁은 각각의 테더에 대해 0 초과이다.

[1940] [구현예 52]

[1941] 구현예 1 내지 51 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 테더를 갖는 화합물:



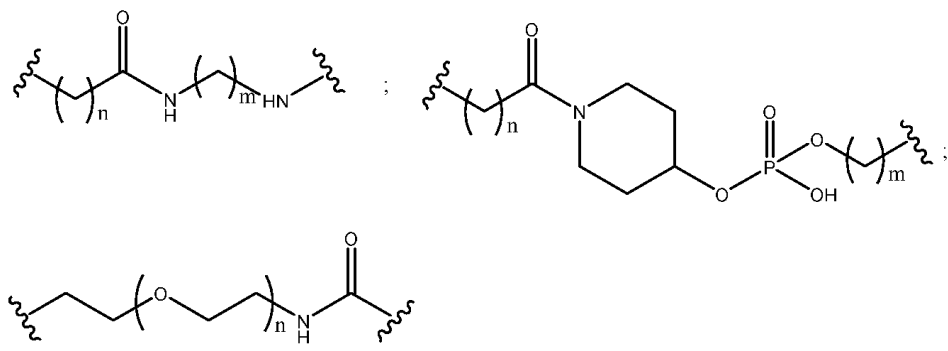
[1942]

[1943] 여기서 Z₂는 H 또는 CH₃이고; 그리고

[1944] 각각의 m₁은, 독립적으로, 0 내지 20이고, 여기서 적어도 하나의 m₁은 각각의 테더에 대해 0 초과이다.

[1945] [구현예 53]

[1946] 구현예 1 내지 51 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 테더를 갖는 화합물:



[1947]

[1948]

여기서 n 은 1 내지 12이고; 그리고

[1949]

여기서 m 은 1 내지 12이다.

[1950]

[구현예 54]

[1951]

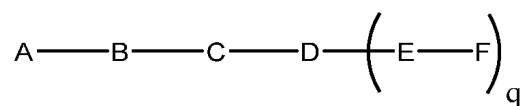
구현예 1 내지 53 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 변형된 올리고뉴클레오타이드에 공유결합되는 화합물.

[1952]

[구현예 55]

[1953]

구현예 1 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식으로 나타낸 구조를 갖는 화합물:



[1954]

[1955]

여기서

[1956]

A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[1957]

B는 절단가능 모이어티이고

[1958]

C는 접합체 링커이고

[1959]

D는 분지화 기이고

[1960]

각각의 E는 테터이고;

[1961]

각각의 F는 리간드이고; 그리고

[1962]

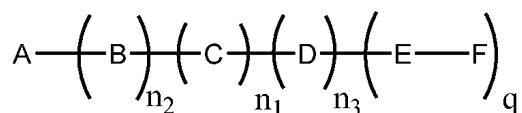
q 는 정수 1 내지 5이다.

[1963]

[구현예 56]

[1964]

구현예 1 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식으로 나타낸 구조를 갖는 화합물:



[1965]

[1966]

여기서:

[1967]

A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[1968]

B는 절단가능 모이어티이고

[1969]

C는 접합체 링커이고

[1970]

D는 분지화 기이고

[1971]

각각의 E는 테터이고;

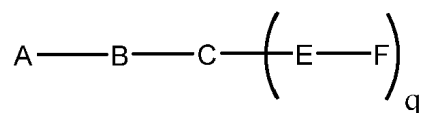
[1972] 각각의 F는 리간드이고;

[1973] 각각의 n은 독립적으로 0 또는 1이고; 그리고

[1974] q는 정수 1 내지 5이다.

[1975] [구현예 57]

[1976] 구현예 1 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식으로 나타낸 구조를 갖는 화합물:



[1977]

[1978] 여기서

[1979] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[1980] B는 절단가능 모이어티이고;

[1981] C는 집합체 링커이고;

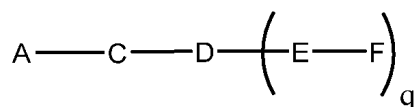
[1982] 각각의 E는 테더이고;

[1983] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[1984] q는 정수 1 내지 5이다.

[1985] [구현예 58]

[1986] 구현예 1 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식으로 나타낸 구조를 갖는 화합물:



[1987]

[1988] 여기서

[1989] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[1990] C는 집합체 링커이고;

[1991] D는 분지화 기이고;

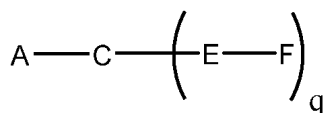
[1992] 각각의 E는 테더이고;

[1993] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[1994] q는 정수 1 내지 5이다.

[1995] [구현예 59]

[1996] 구현예 1 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식으로 나타낸 구조를 갖는 화합물:



[1997]

[1998] 여기서

[1999] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[2000] C는 집합체 링커이고;

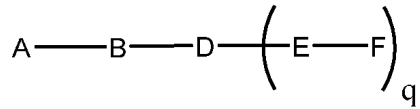
[2001] 각각의 E는 테더이고;

[2002] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[2003] q는 정수 1 내지 5이다.

[2004] [구현예 60]

[2005] 구현예 1 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식으로 나타낸 구조를 갖는 화합물:



[2006]

[2007] 여기서

[2008] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[2009] B는 절단가능 모이어티이고;

[2010] D는 분지화 기이고;

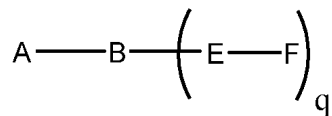
[2011] 각각의 E는 테더이고;

[2012] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[2013] q는 정수 1 내지 5이다.

[2014] [구현예 61]

[2015] 구현예 1 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식으로 나타낸 구조를 갖는 화합물:



[2016]

[2017] 여기서

[2018] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[2019] B는 절단가능 모이어티이고;

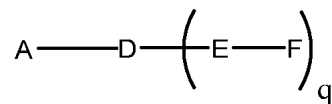
[2020] 각각의 E는 테더이고;

[2021] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[2022] q는 정수 1 내지 5이다.

[2023] [구현예 62]

[2024] 구현예 1 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식으로 나타낸 구조를 갖는 화합물:



[2025]

[2026] 여기서

[2027] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[2028] D는 분지화 기이고;

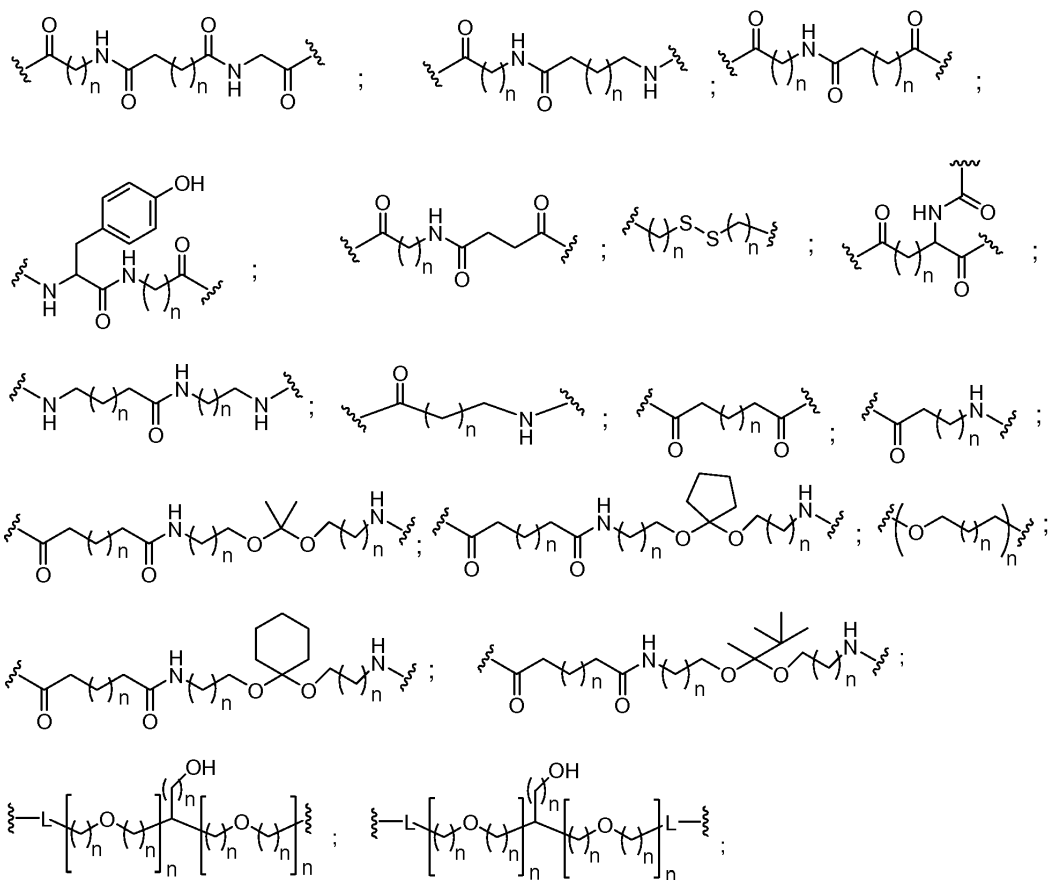
[2029] 각각의 E는 테더이고;

[2030] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

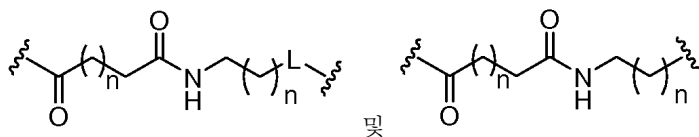
[2031] q는 정수 1 내지 5이다.

[2032] [구현예 63]

[2033] 구현예 1 내지 62 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



[2034]



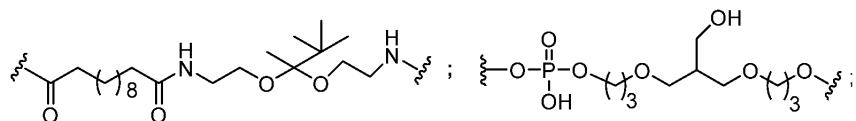
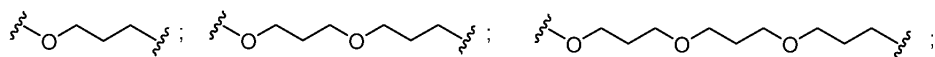
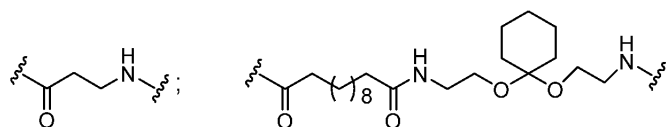
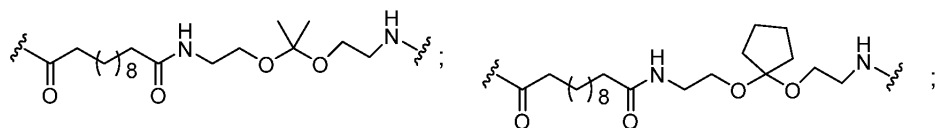
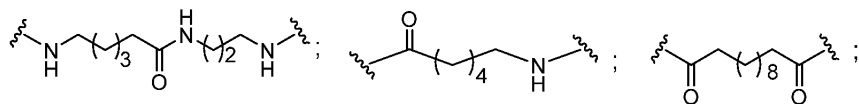
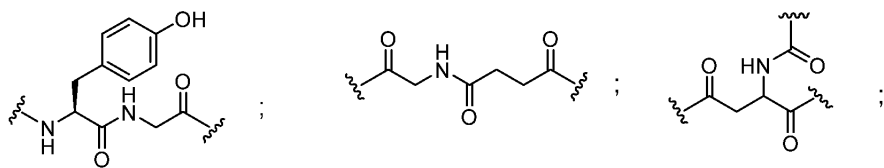
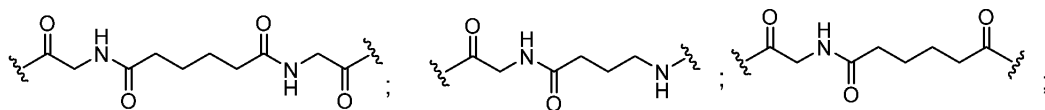
[2035] 및

[2036] 여기서 각각의 L은, 독립적으로, 인 연결 기 또는 중성 연결 기이고; 그리고

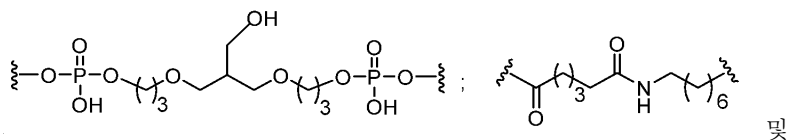
[2037] 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[2038] [구현예 64]

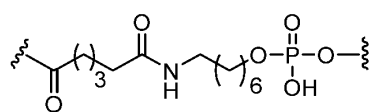
[2039] 구현예 1 내지 62 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



[2040]



[2041]



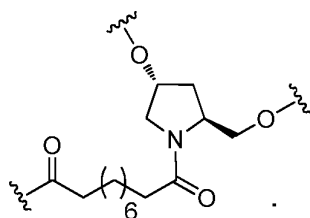
[2042]

[구현예 65]

[2043]

구현예 1 내지 62 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 구조를 갖는 화합물:

[2044]



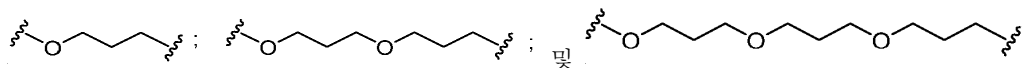
[2045]

[구현예 66]

[2046]

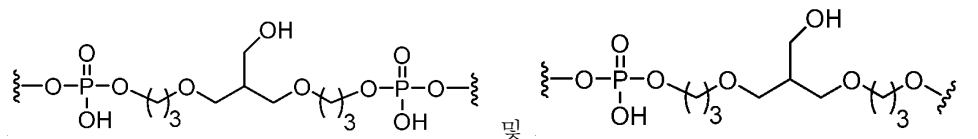
구현예 1 내지 62 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:

[2047]



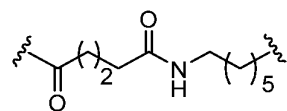
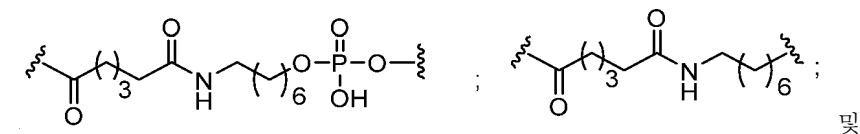
[구현예 67]

구현예 1 내지 62 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



[구현예 68]

구현예 1 내지 63 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



[구현예 69]

구현예 1 내지 63 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 피롤리딘을 포함하는 화합물.

[구현예 70]

구현예 1 내지 64 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 피롤리딘을 포함하지 않는 화합물.

[구현예 71]

구현예 1 내지 63, 69 또는 70 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 PEG를 포함하는 화합물.

[구현예 72]

구현예 1 내지 63 또는 69 내지 71 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 아마이드를 포함하는 화합물.

[구현예 73]

구현예 1 내지 63 또는 69 내지 72 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 적어도 2 개의 아마이드를 포함하는 화합물.

[구현예 74]

구현예 1 내지 63 또는 71 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 아마이드를 포함하지 않는 화합물.

[구현예 75]

구현예 1 내지 63 또는 69 내지 73 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 폴리아미드를 포함하는 화합물.

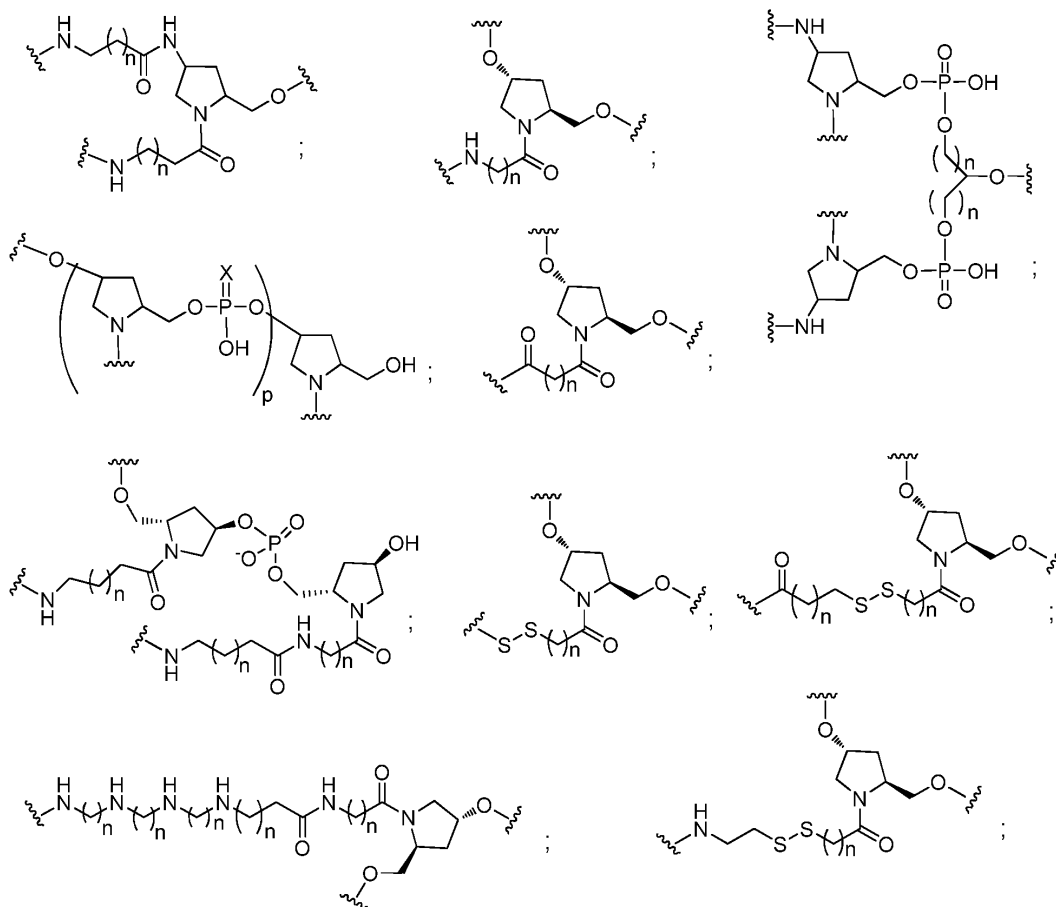
[구현예 76]

구현예 1 내지 63 또는 69 내지 75 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 아민을 포함하는 화합물.

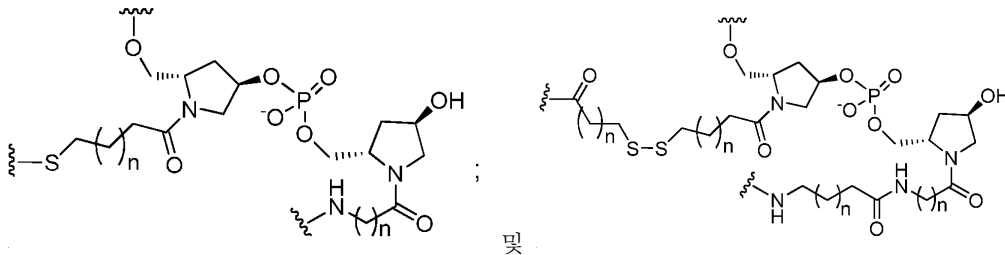
[구현예 77]

구현예 1 내지 63 또는 69 내지 76 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 1 개 이상의 디설파이드 결합을 포함하는 화합물.

- [2074] [구현예 78]
- [2075] 구현예 1 내지 63 또는 69 내지 77 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 단백질 결합 모이어티를 포함하는 화합물.
- [2076] [구현예 79]
- [2077] 구현예 78에 있어서, 상기 단백질 결합 모이어티는 지질을 포함하는 화합물.
- [2078] [구현예 80]
- [2079] 구현예 78에 있어서, 상기 단백질 결합 모이어티는 하기 중으로부터 선택되는 화합물: 콜레스테롤, 콜산, 아다만탄 아세트산, 1-피렌 부티르산, 디하이드로테스토스테론, 1,3-비스-O(헥사데실)글리세롤, 제라닐옥시헥실 기, 헥사데실글리세롤, 보르네올, 멘톨, 1,3-프로판디올, 헵타데실 기, 팔미트산, 미리스트산, 03-(올레오일)리토콜산, 03-(올레오일)콜렌산, 디메톡시트리틸, 또는 펜옥사진), 비타민 (예를 들면, 폴레이트, 비타민 A, 비타민 E, 바이오틴, 피리독살), 펩타이드, 탄수화물 (예를 들면, 모노사카라이드, 디사카라이드, 트리스카라이드, 테트라사카라이드, 올리고사카라이드, 폴리사카라이드), 엔도솜분해적 구성성분, 스테로이드 (예를 들면, 우바올, 헤시게닌, 디오스게닌), 테르펜 (예를 들면, 트리테르펜, 예를 들면, 사르사사포게닌, 프리델린, 에피프리델라놀 유도된 리토콜산), 또는 양이온성 지질.
- [2080] [구현예 81]
- [2081] 구현예 78에 있어서, 상기 단백질 결합 모이어티는 하기 중으로부터 선택되는 화합물: C16 내지 C22 장쇄 포화된 또는 불포화된 지방산, 콜레스테롤, 콜산, 비타민 E, 아다만탄 또는 1-펜타플루오로프로필.
- [2082] [구현예 82]
- [2083] 구현예 1 내지 63 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



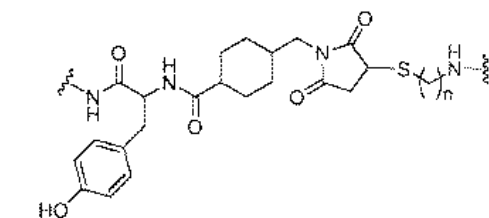
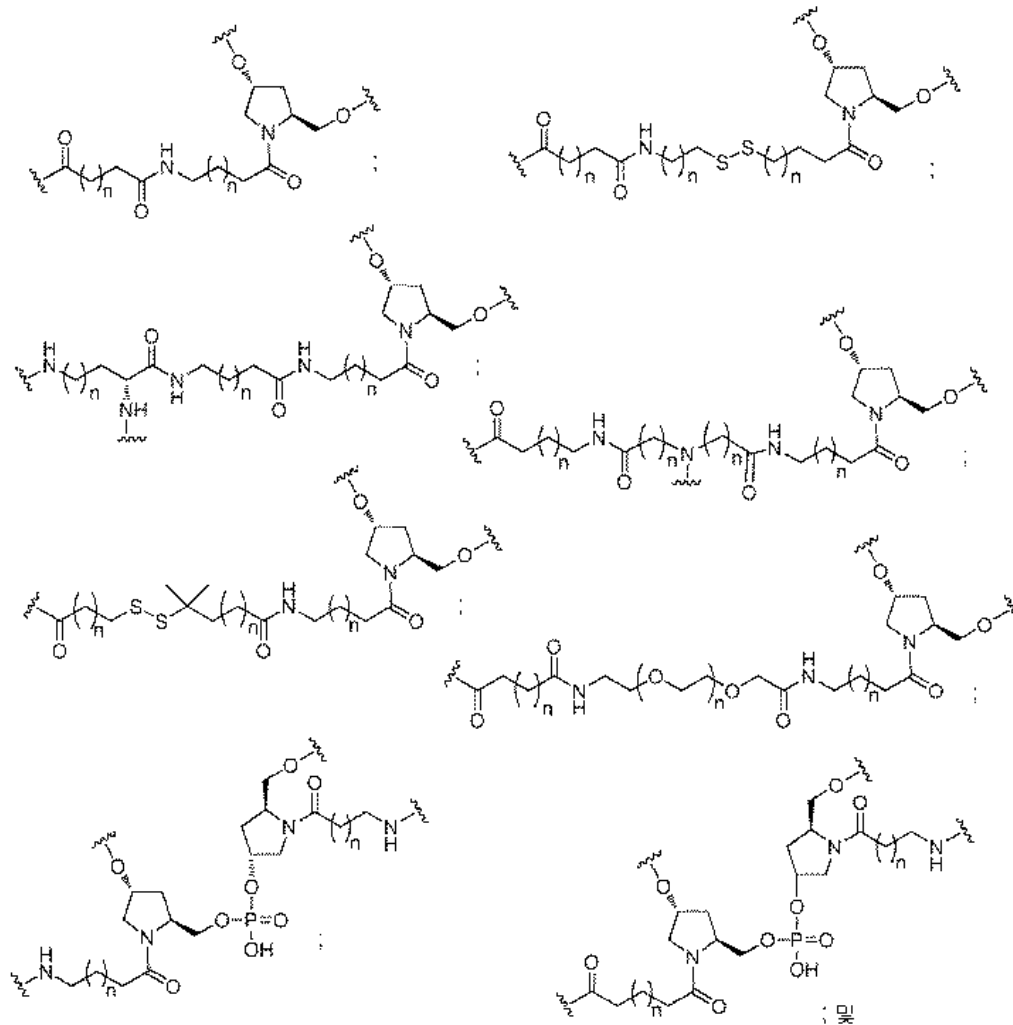
[2084]



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

[구현예 83]

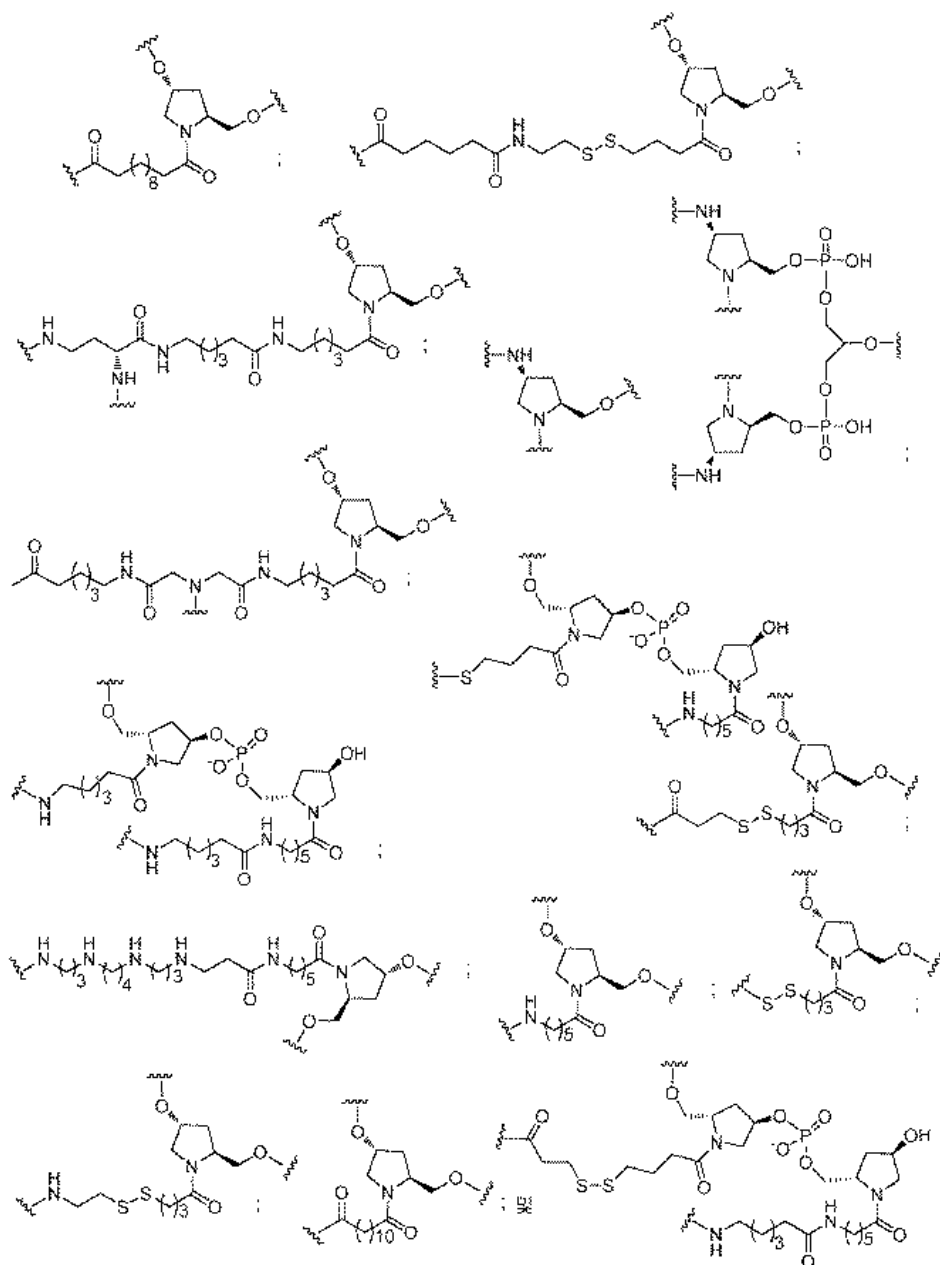
구현예 1 내지 63 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[구현예 84]

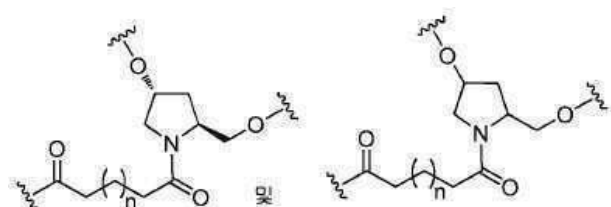
구현예 1 내지 63 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



[2093]

[2094] [구현예 85]

[2095] 구현예 1 내지 63 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:

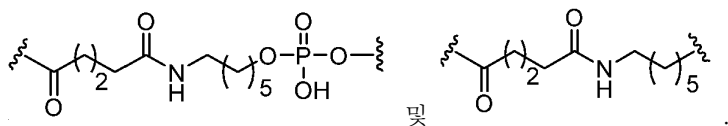


[2096]

[2097] 여기서 n 은 1 내지 20이다.

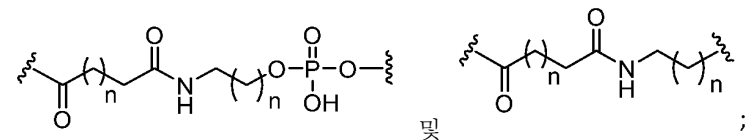
[2098] [구현예 86]

[2099] 구현에 1 내지 63 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



[구현예 87]

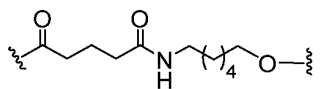
구현예 1 내지 63 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



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

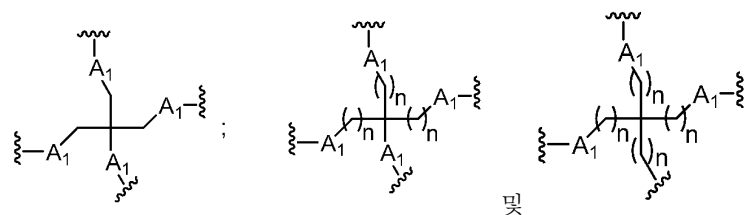
[구현예 88]

구현예 1 내지 63 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 구조를 갖는 화합물:



[구현예 89]

구현예 1 내지 88 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조 중 하나를 갖는 화합물:

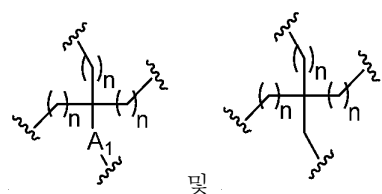


여기서 각각의 A₁은 독립적으로, O, S, C=O 또는 NH이고; 그리고

각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[구현예 90]

구현예 1 내지 88 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조 중 하나를 갖는 화합물:

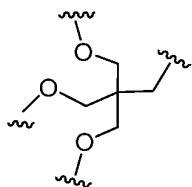


여기서 각각의 A₁은 독립적으로, O, S, C=O 또는 NH이고; 그리고

각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[구현예 91]

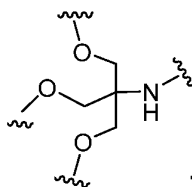
구현예 1 내지 88 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2120]

[2121] [구현예 92]

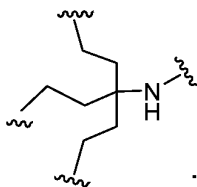
[2122] 구현예 1 내지 88 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2123]

[2124] [구현예 93]

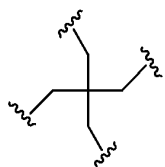
[2125] 구현예 1 내지 88 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2126]

[2127] [구현예 94]

[2128] 구현예 1 내지 88 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조를 갖는 화합물:



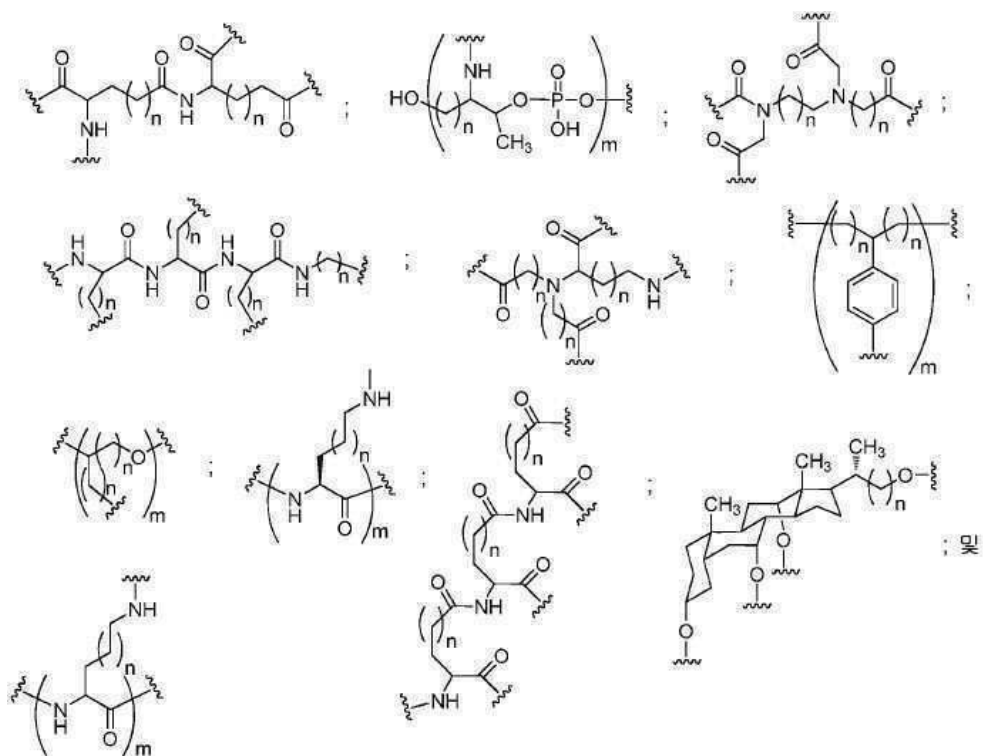
[2129]

[2130] [구현예 95]

[2131] 구현예 1 내지 88 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 에테르를 포함하는 화합물.

[2132] [구현예 96]

[2133] 구현예 1 내지 88 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조를 갖는 화합물:



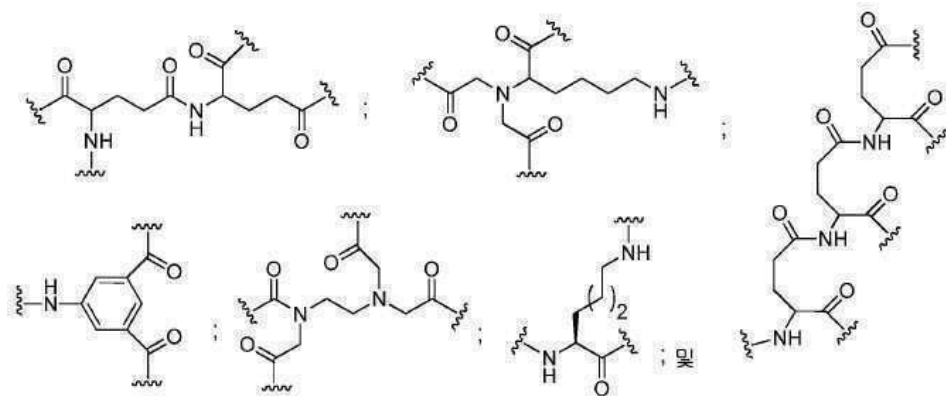
[2134]

[2135] 각각의 n 은, 독립적으로, 1 내지 20이고; 그리고

[2136] m 은 2 내지 6이다.

[2137] [구현예 97]

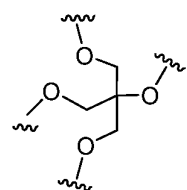
[2138] 구현예 1 내지 88 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2139]

[2140] [구현예 98]

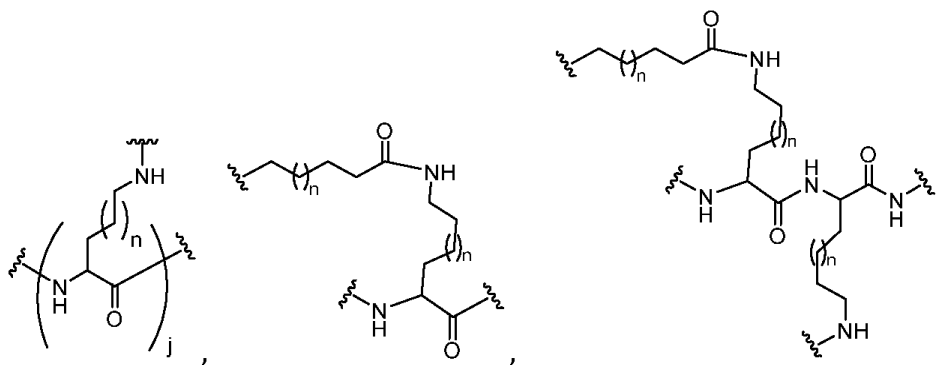
[2141] 구현예 1 내지 88 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조를 갖는 화합물:



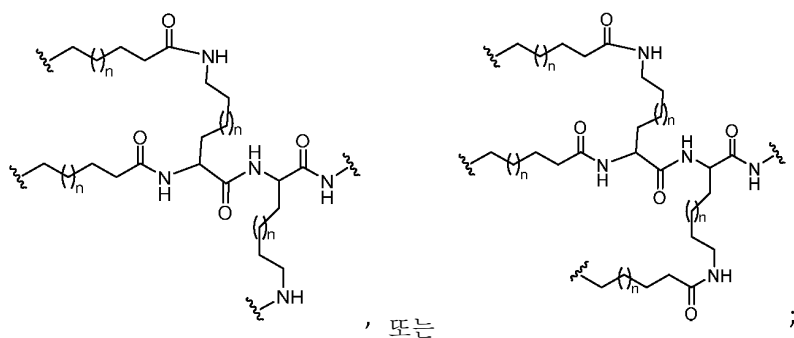
[2142]

[2143] [구현예 99]

[2144] 구현예 1 내지 88 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2145]



[2146]

, 또는

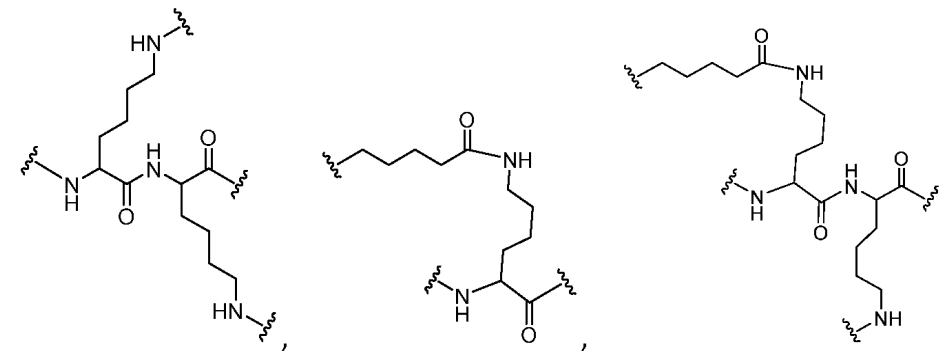
;

[2147] 여기서 각각의 j는 정수 1 내지 3이고; 그리고

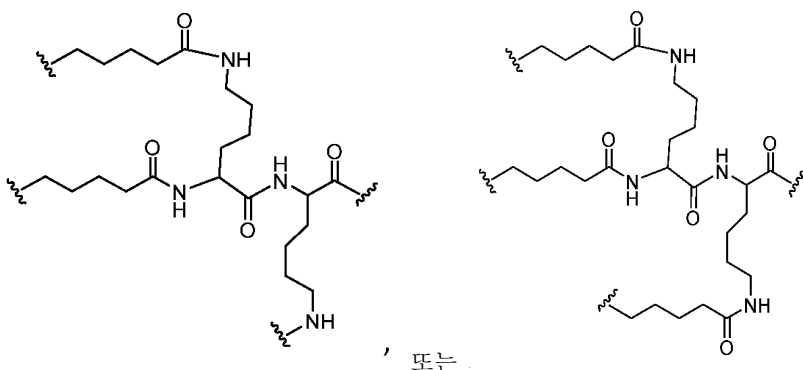
[2148] 여기서 각각의 n은 정수 1 내지 20이다.

[2149] [구현예 100]

[2150] 구현예 1 내지 88 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2151]

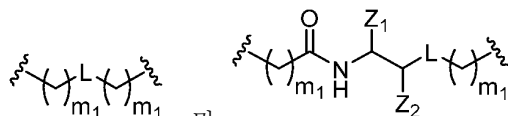


[2152]

, 또는

[2153] [구현예 101]

[2154] 구현예 1 내지 100 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 테더는 하기 중으로부터 선택되는 화합물:



[2155] 및

[2156] 여기서 L은 인 연결 기 및 중성 연결 기로부터 선택되고;

[2157] Z₁은 C(=O)O-R₂이고;

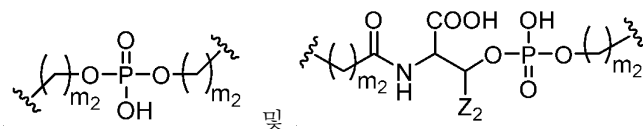
[2158] Z₂는 H, C₁-C₆알킬 또는 치환된 C₁-C₆알킬이고;

[2159] R₂는 H, C₁-C₆알킬 또는 치환된 C₁-C₆알킬이고; 그리고

[2160] 각각의 m₁은, 독립적으로, 0 내지 20이고, 여기서 적어도 하나의 m₁은 각각의 테더에 대해 0 초과이다.

[2161] [구현예 102]

[2162] 구현예 1 내지 100 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 테더는 하기 중으로부터 선택되는 화합물:



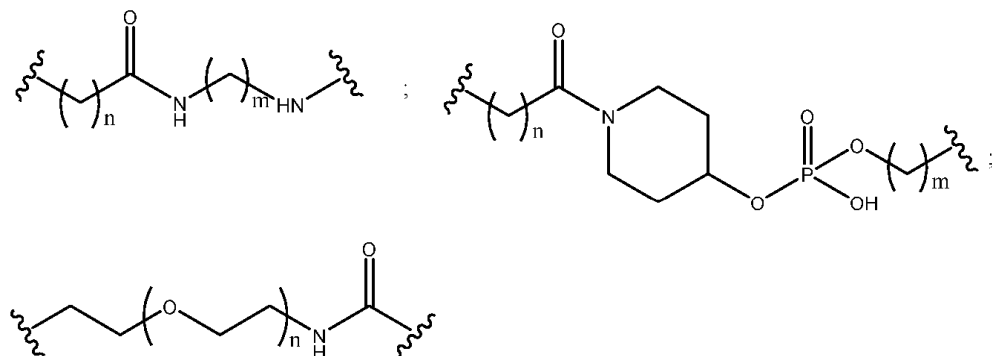
[2163] 및

[2164] 여기서 Z₂는 H 또는 CH₃이고; 그리고

[2165] 각각의 m₂은, 독립적으로, 0 내지 20이고, 여기서 적어도 하나의 m₂은 각각의 테더에 대해 0 초과이다.

[2166] [구현예 103]

[2167] 구현예 1 내지 100 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 테더는 하기 중으로부터 선택되는 화합물:



[2168] ;

[2169] 여기서 n은 1 내지 12이고; 그리고

[2170] 여기서 m은 1 내지 12이다.

[2171] [구현예 104]

[2172] 구현예 1 내지 100 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 테더는 에틸렌 글리콜을 포함하는 화합물.

[2173] [구현예 105]

[2174] 구현예 1 내지 100 또는 102 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 테더는 아미드를 포함하는 화합물.

[2175] [구현예 106]

[2176] 구현예 1 내지 100 또는 102 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 테더는 폴리아미드를 포함하는 화합물.

[2177] [구현예 107]

[2178] 구현예 1 내지 100 또는 102 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 테더는 아민을 포함하는 화합물.

[2179] [구현예 108]

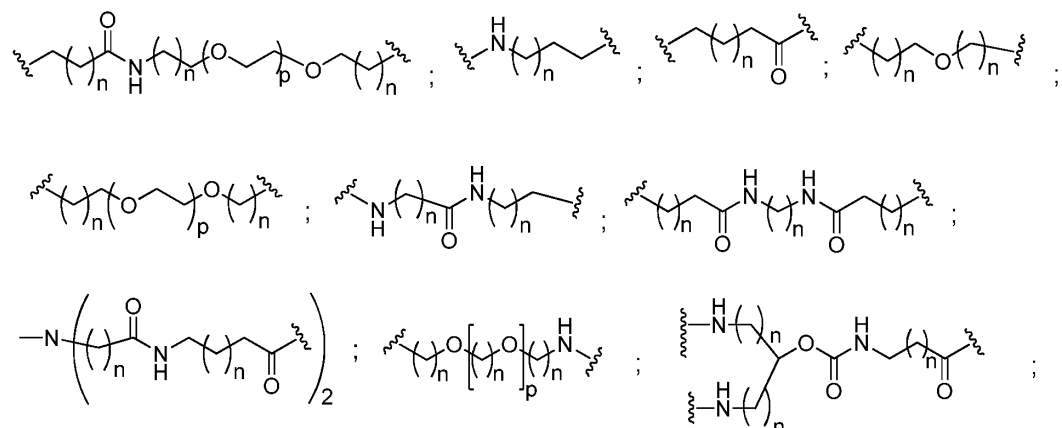
[2180] 구현예 1 내지 100 또는 102 내지 107 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2 개의 테더는 서로 상이한 것인 화합물.

[2181] [구현예 109]

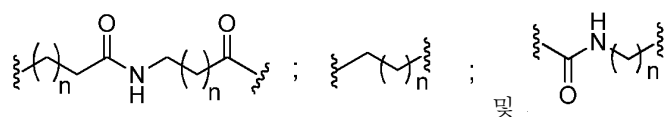
[2182] 구현예 1 내지 100 또는 102 내지 107 중 어느 한 항에 있어서, 모든 테더는 서로 동일한 것인 화합물.

[2183] [구현예 110]

[2184] 구현예 1 내지 100 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 테더는 하기 중으로부터 선택되는 화합물:



[2185]



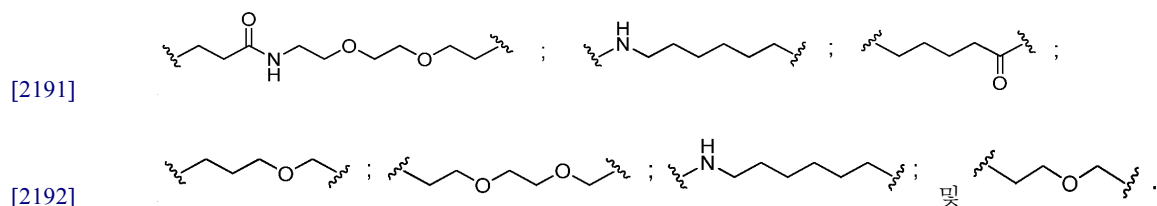
[2186]

[2187] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고; 그리고

[2188] 각각의 p는 1 내지 약 6이다.

[2189] [구현예 111]

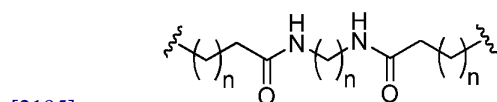
[2190] 구현예 1 내지 100 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 테더는 하기 중으로부터 선택되는 화합물:



[2192]

[2193] [구현예 112]

[2194] 구현예 1 내지 100 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 테더는 하기 구조를 갖는 화합물:

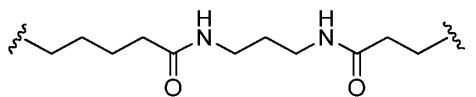


[2195]

[2196] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[2197] [구현예 113]

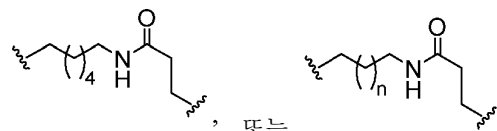
[2198] 구현예 1 내지 100 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 테더는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2199]

[2200] [구현예 114]

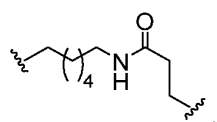
[2201] 구현예 1 내지 100 중 어느 한 항에 있어서, 상기 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



[2202] , 또는 ; 여기서 각각의 n은 독립적으로, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7이다.

[2203] [구현예 115]

[2204] 구현예 1 내지 100 중 어느 한 항에 있어서, 상기 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



[2205]

[2206] [구현예 116]

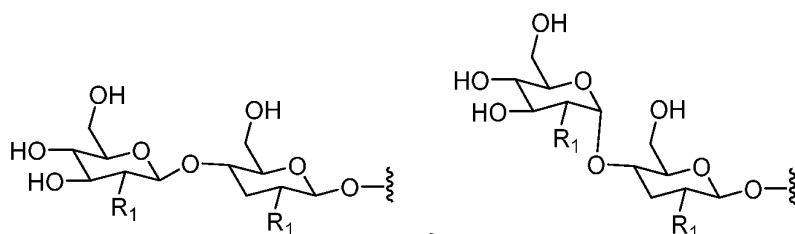
[2207] 구현예 1 내지 115 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드는 갈락토오스인 화합물.

[2208] [구현예 117]

[2209] 구현예 1 내지 115 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드는 만노스-6-포스페이트인 화합물.

[2210] [구현예 118]

[2211] 구현예 1 내지 115 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 리간드는 하기 중으로부터 선택되는 화합물:

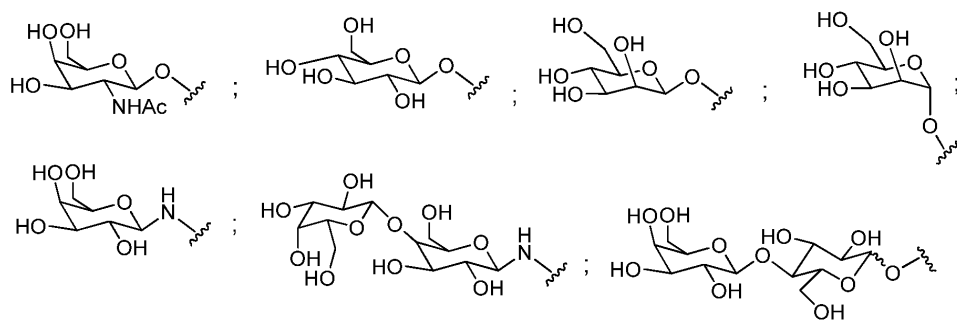


[2212] 및

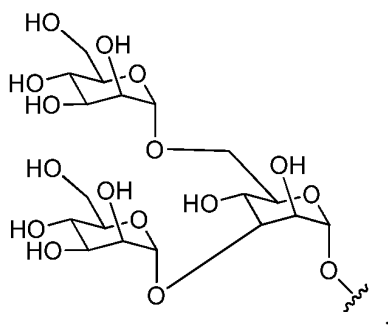
[2213] 여기서 각각의 R₁은 OH 및 NHCOOH로부터 선택된다.

[2214] [구현예 119]

[2215] 구현예 1 내지 115 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 리간드는 하기 중으로부터 선택되는 화합물:



[2216] 및



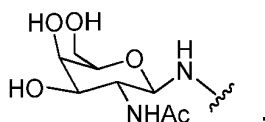
[2217]

[구현예 120]

[2218]

구현예 1 내지 115 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 리간드는 하기 구조를 갖는 화합물:

[2219]



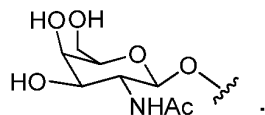
[2220]

[구현예 121]

[2221]

구현예 1 내지 115 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 리간드는 하기 구조를 갖는 접합된 안티센스 화합물:

[2222]



[2223]

[구현예 122]

[2224]

구현예 1 내지 121 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 세포-표적화 모이어티를 포함하는 화합물.

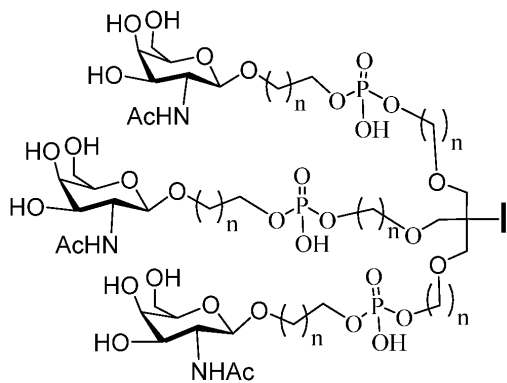
[2225]

[구현예 123]

[2226]

구현예 122에 있어서, 상기 접합체 기는 하기 구조를 갖는 세포-표적화 모이어티를 포함하는 화합물:

[2227]



[2228]

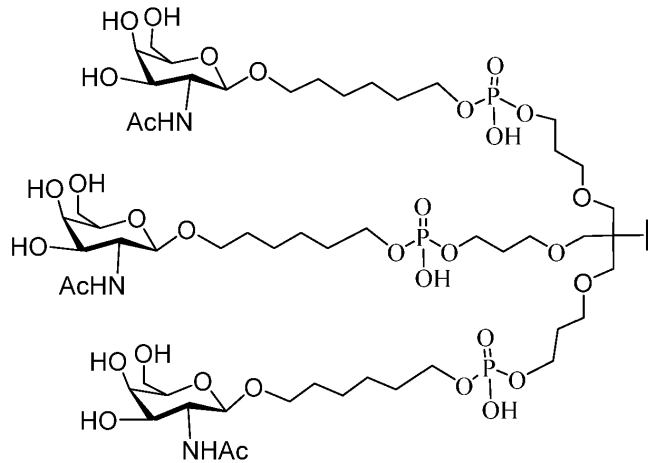
여기서 각각의 n 은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[2229]

[구현예 124]

[2230]

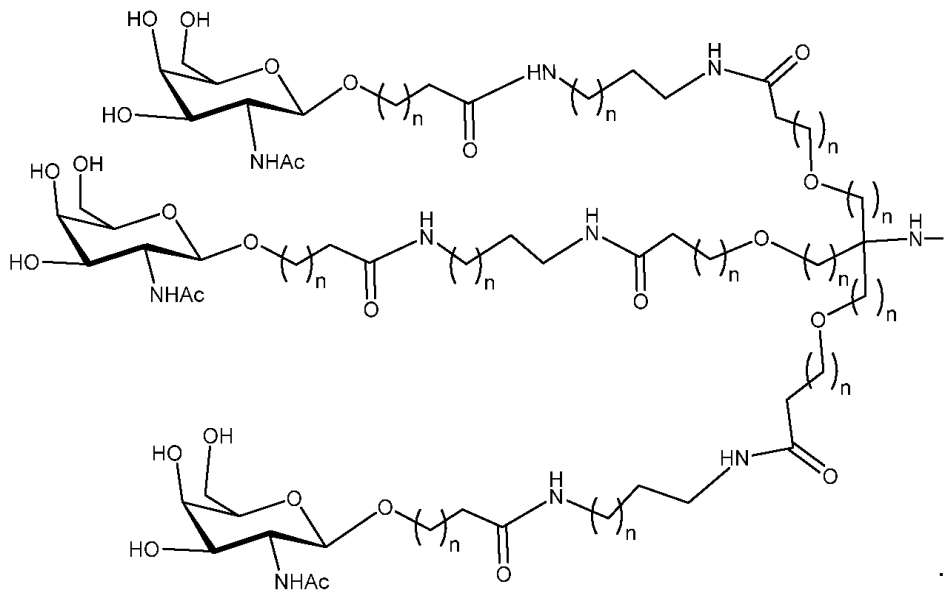
[2231] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2232]

[2233] [구현예 125]

[2234] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:

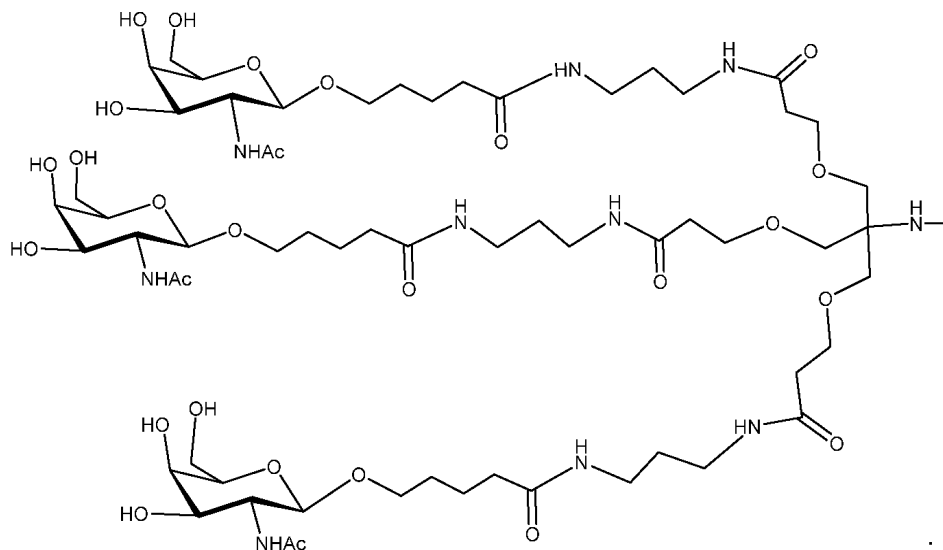


[2235]

[2236] 여기서 각각의 n 은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[2237] [구현예 126]

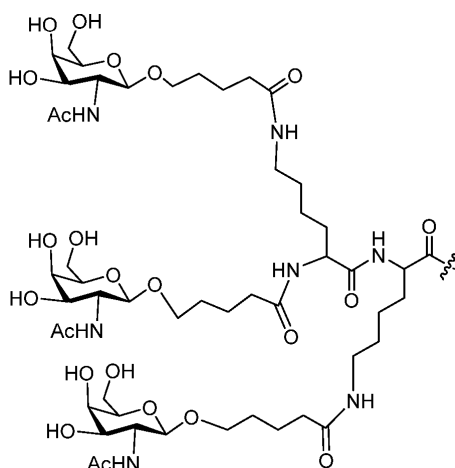
[2238] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2239]

[2240] [구현예 127]

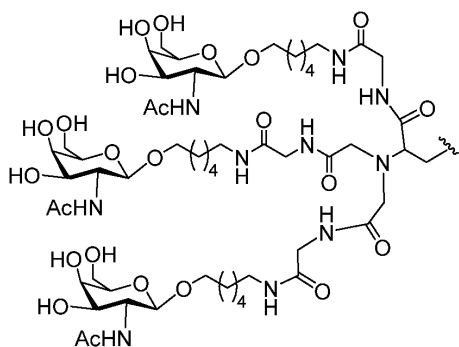
[2241] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2242]

[2243] [구현예 128]

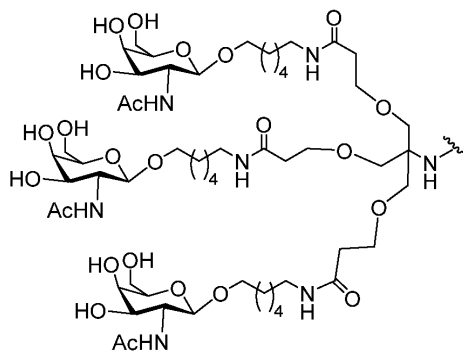
[2244] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2245]

[2246] [구현예 129]

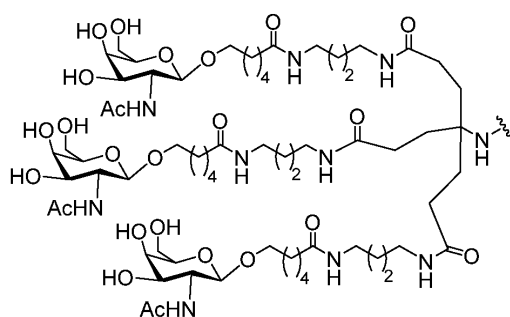
[2247] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2248]

[2249] [구현예 130]

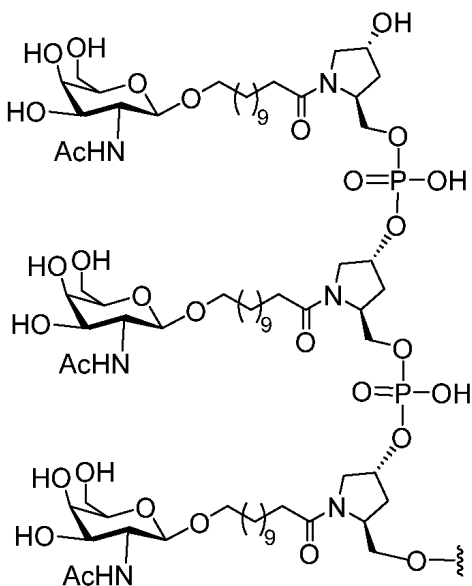
[2250] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2251]

[2252] [구현예 131]

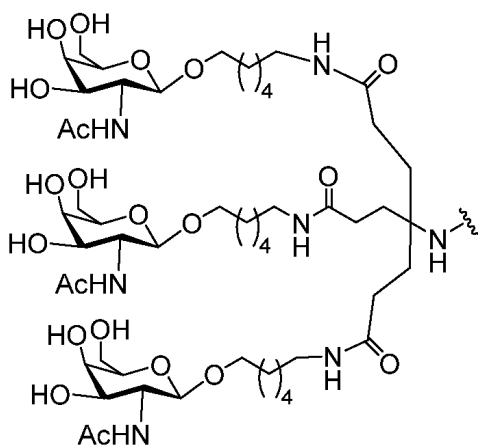
[2253] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2254]

[2255] [구현예 132]

[2256] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



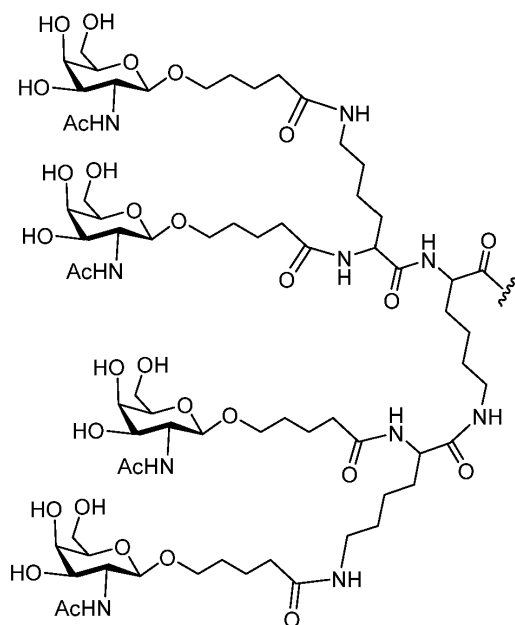
[2257]

[2258]

[구현예 133]

[2259]

구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



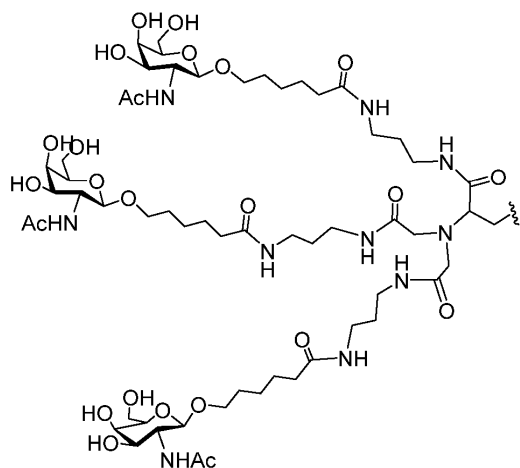
[2260]

[2261]

[구현예 134]

[2262]

구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:

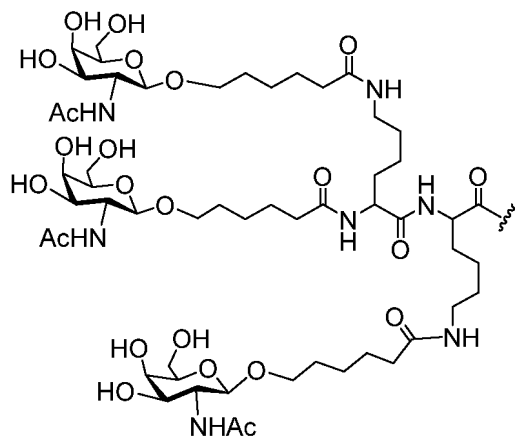


[2263]

[2264]

[구현예 135]

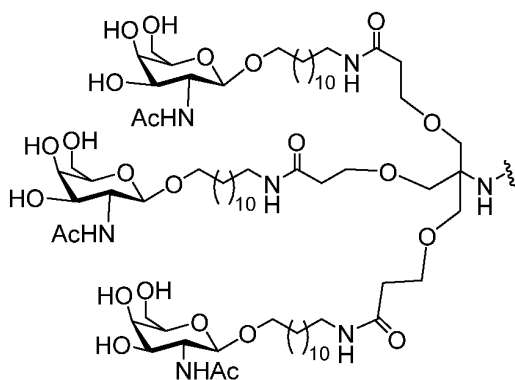
[2265] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2266]

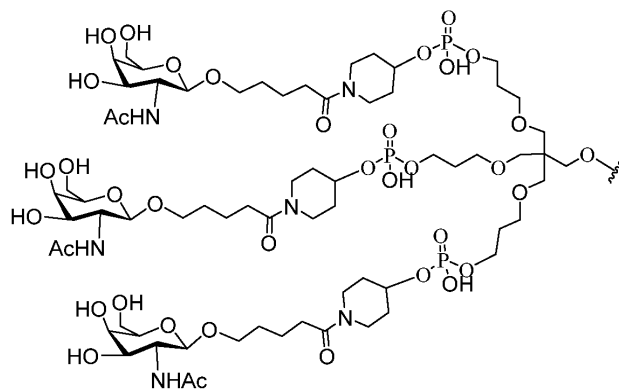
[구현예 136]

[2268] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2269]

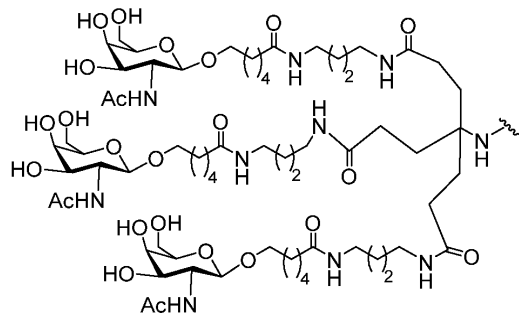
[2270] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2271]

[구현예 137]

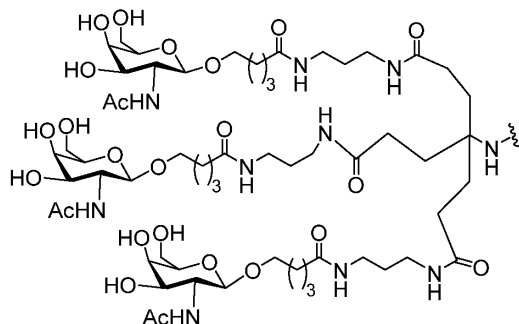
[2273] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2274]

[구현예 138]

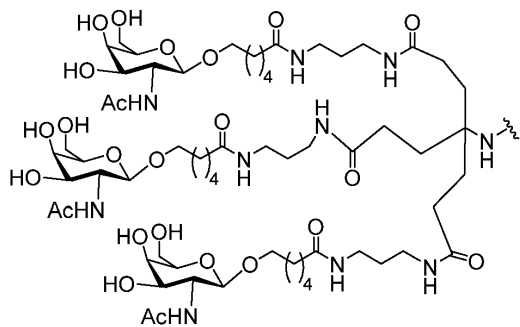
[2276] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2277]

[구현예 139]

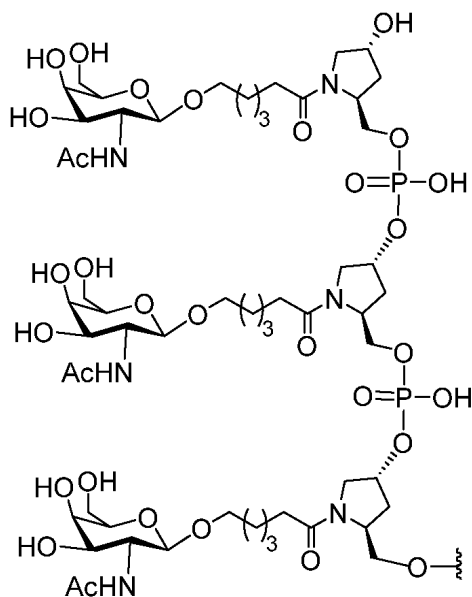
[2279] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2280]

[구현예 140]

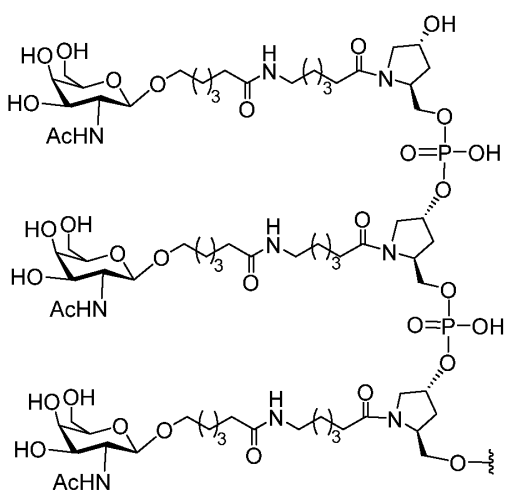
[2282] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2283]

[2284] [구현예 141]

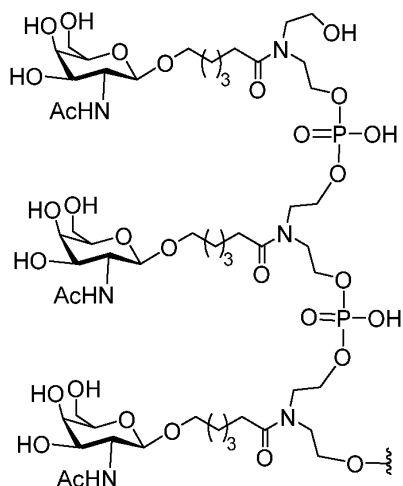
[2285] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2286]

[2287] [구현예 142]

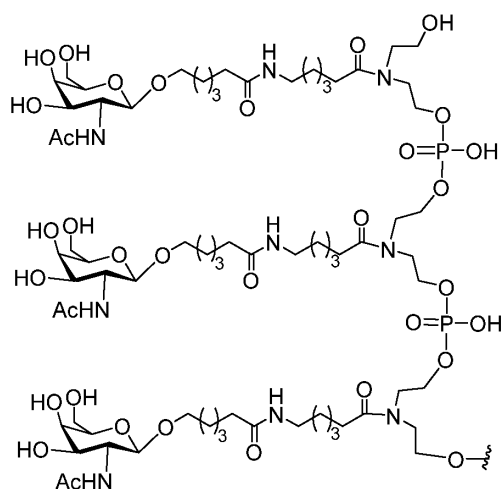
[2288] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2289]

[2290] [구현예 143]

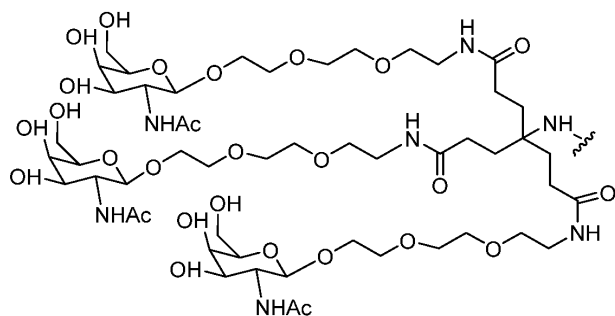
[2291] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2292]

[2293] [구현예 144]

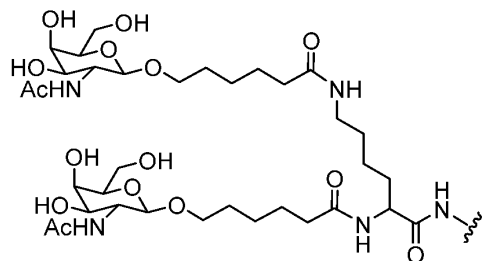
[2294] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2295]

[2296] [구현예 145]

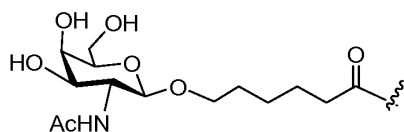
[2297] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2298]

[2299] [구현예 146]

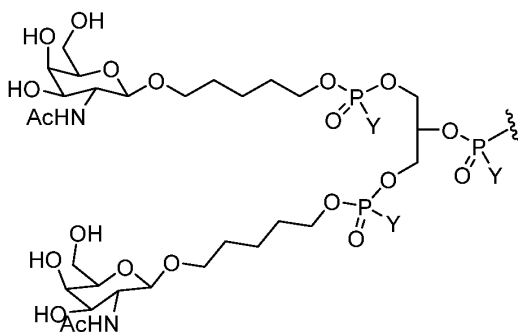
[2300] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2301]

[2302] [구현예 147]

[2303] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:

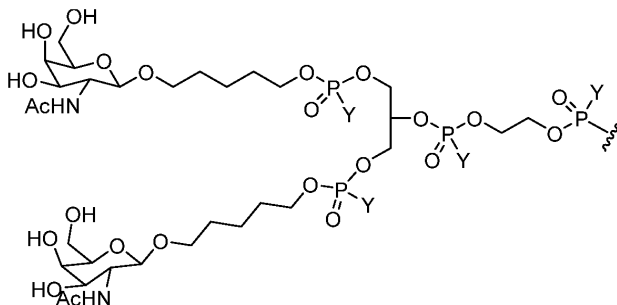


[2304]

[2305] 여기서 각각의 Y는 O, S, 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀알킬, 아미노, 치환된 아미노, 아지도, 알케닐 또는 알킬닐로부터 선택된다.

[2306] [구현예 148]

[2307] 구현예 1 내지 121 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:

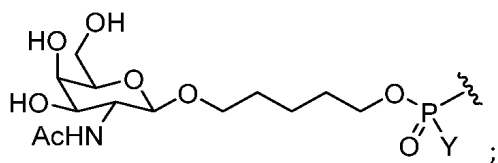


[2308]

[2309] 여기서 각각의 Y는 O, S, 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀알킬, 아미노, 치환된 아미노, 아지도, 알케닐 또는 알킬닐로부터 선택된다.

[2310] [구현예 149]

[2311] 구현예 122에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:

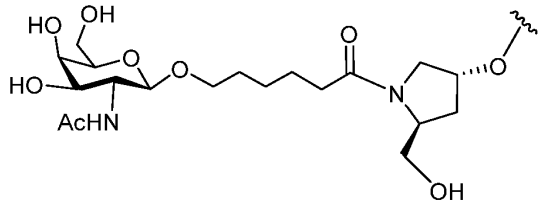


[2312]

[2313] 여기서 각각의 Y는 O, S, 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀알킬, 아미노, 치환된 아미노, 아지도, 알케닐 또는 알킬로부터 선택된다.

[2314] [구현예 150]

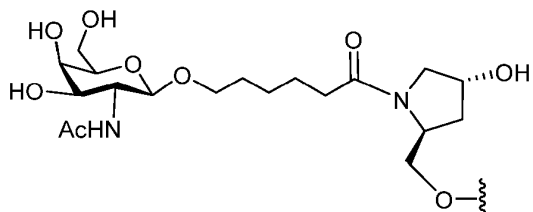
[2315] 구현예 1 내지 149 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2316]

[2317] [구현예 151]

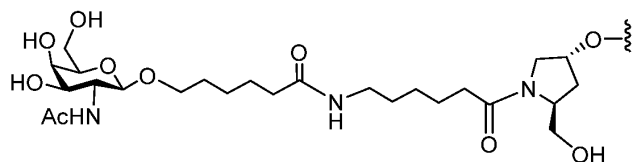
[2318] 구현예 1 내지 149 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2319]

[2320] [구현예 152]

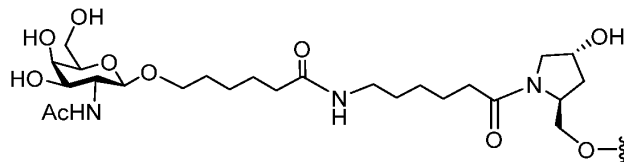
[2321] 구현예 1 내지 149 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2322]

[2323] [구현예 153]

[2324] 구현예 1 내지 149 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2325]

[2326] [구현예 154]

[2327] 구현예 1 내지 153 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기 중으로부터 선택된 절단가능 모이어티를 포함하는 화합물: 포스포디에스테르, 아마이드, 테옥시뉴클레오사이드, 또는 에스테르.

[2328] [구현예 155]

[2329] 구현예 1 내지 154 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 포스포디에스테르 절단가능 모이어티를 포함하는

화합물.

[2330] [구현예 156]

[2331] 구현예 1 내지 152 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 절단가능 모이어티를 포함하지 않고, 상기 접합체 기는 접합체 기와 올리고뉴클레오타이드 사이의 포스포로티오에이트 연결을 포함하는 화합물.

[2332] [구현예 157]

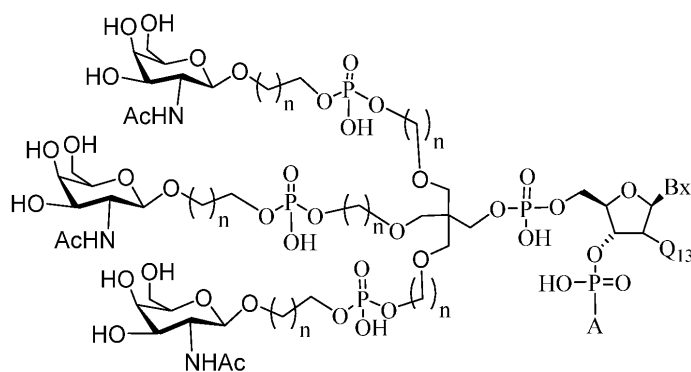
[2333] 구현예 1 내지 156 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 아마이드 절단가능 모이어티를 포함하는 화합물.

[2334] [구현예 158]

[2335] 구현예 1 내지 156 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 에스테르 절단가능 모이어티를 포함하는 화합물.

[2336] [구현예 159]

[2337] 구현예 1 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[2338]

[2339] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고;

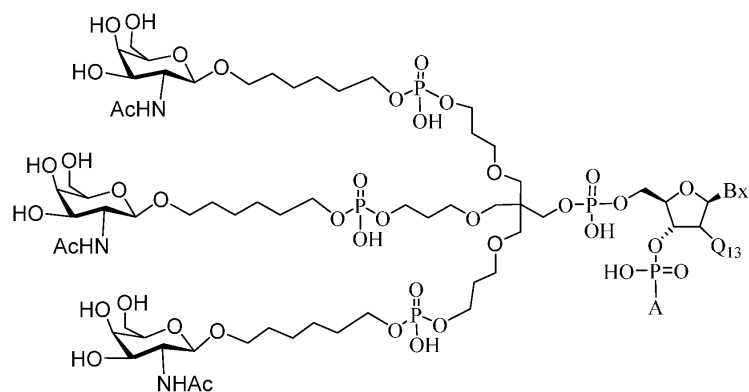
[2340] Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[2341] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[2342] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[2343] [구현예 160]

[2344] 구현예 1 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[2345]

[2346] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고;

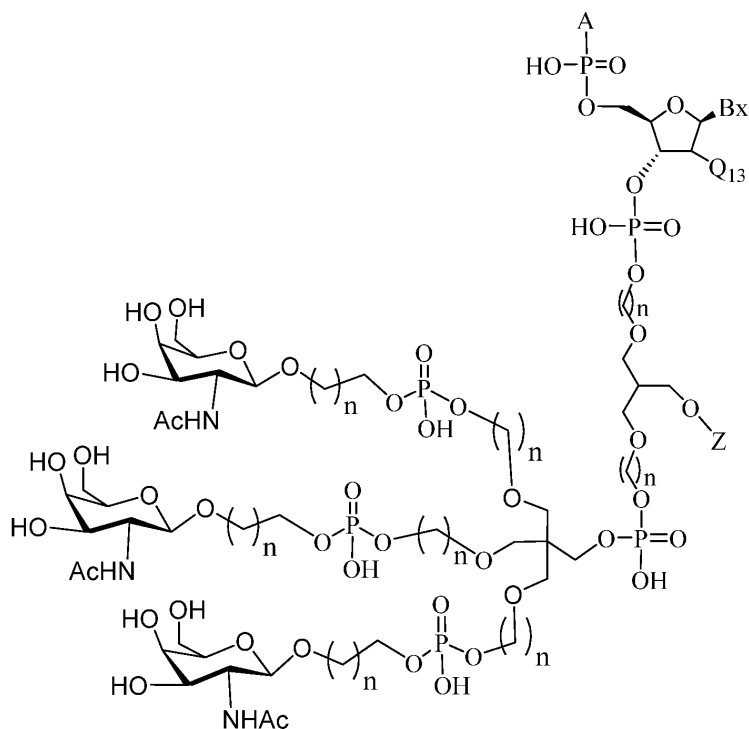
[2347] Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[2348] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[2349] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[2350] [구현예 161]

[2351] 구현예 1 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[2352]

[2353] 여기서 각각의 n 은, 독립적으로, 1 내지 20이고;

[2354] Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

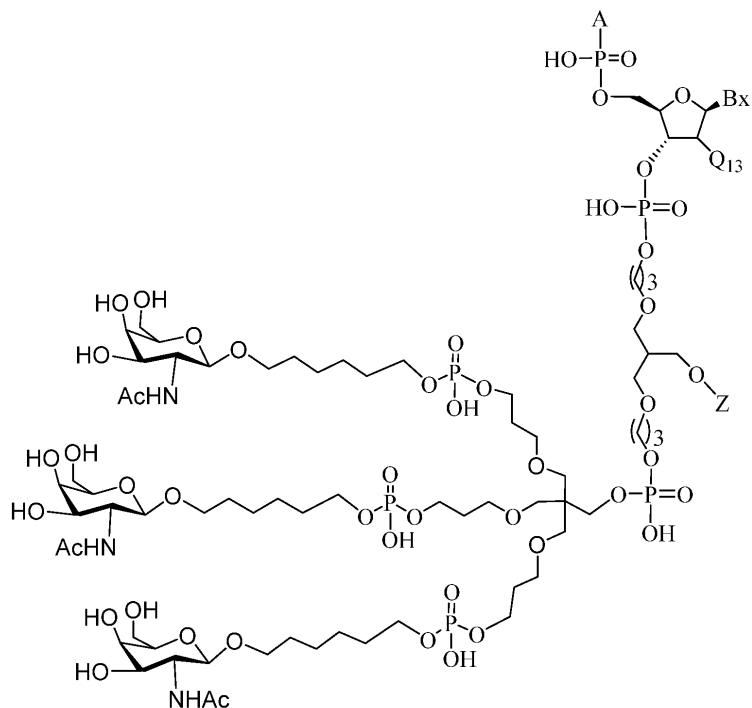
[2355] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[2356] Z는 H 또는 연결된 고형 지지체이고; 그리고

[2357] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[2358] [구현예 162]

[2359] 구현예 1 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[2360]

[2361] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고;

[2362] Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

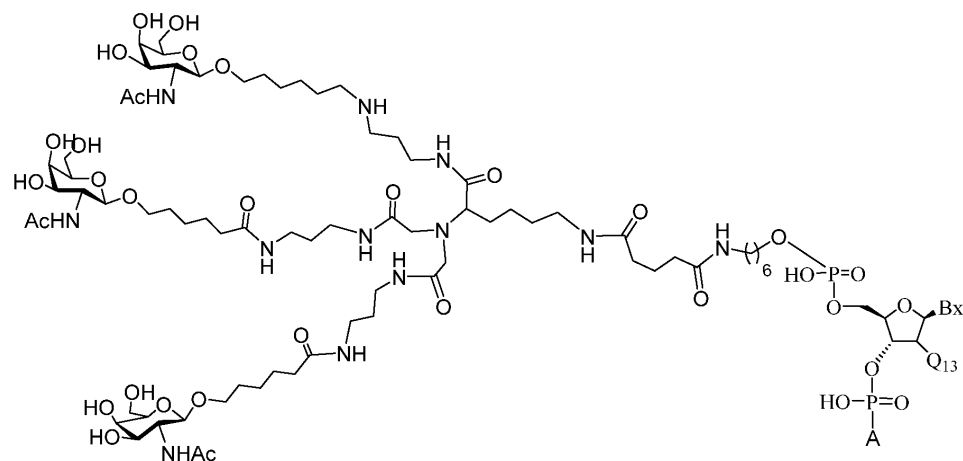
[2363] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[2364] Z는 H 또는 연결된 고형 지지체이고; 그리고

[2365] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[2366] [구현예 163]

[2367] 구현예 1 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[2368]

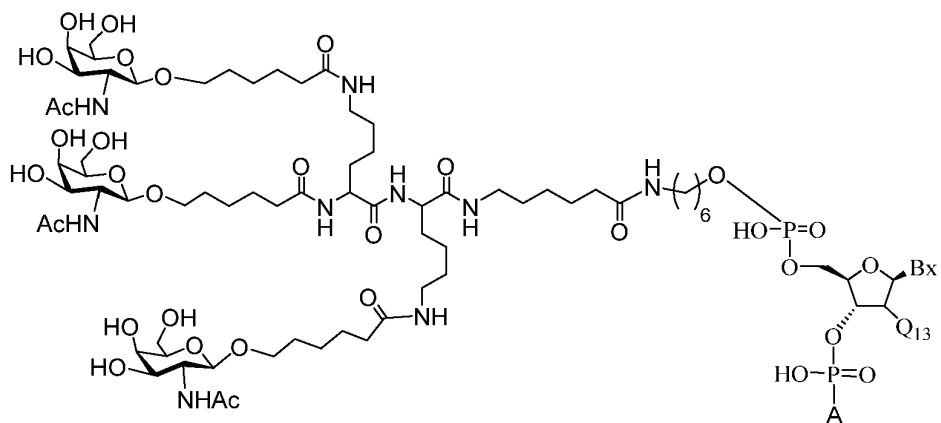
[2369] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[2370] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[2371] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[2372] [구현예 164]

[2373] 구현예 1 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[2374]

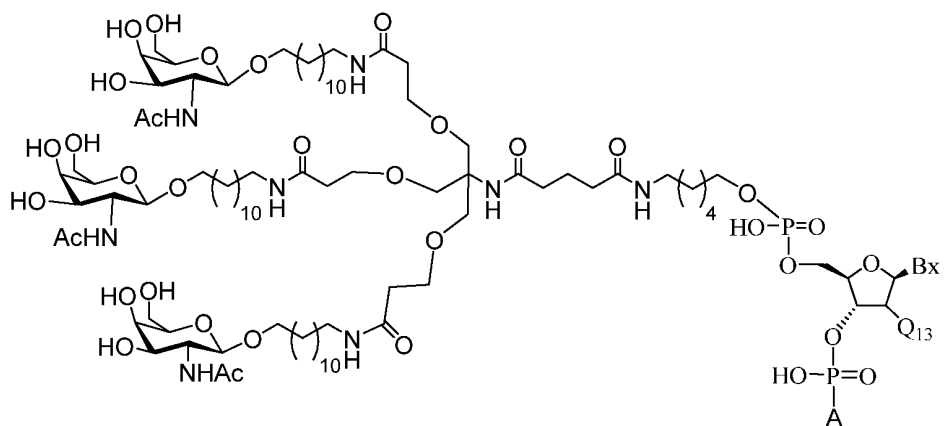
[2375] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[2376] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[2377] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[2378] [구현예 165]

[2379] 구현예 1 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[2380]

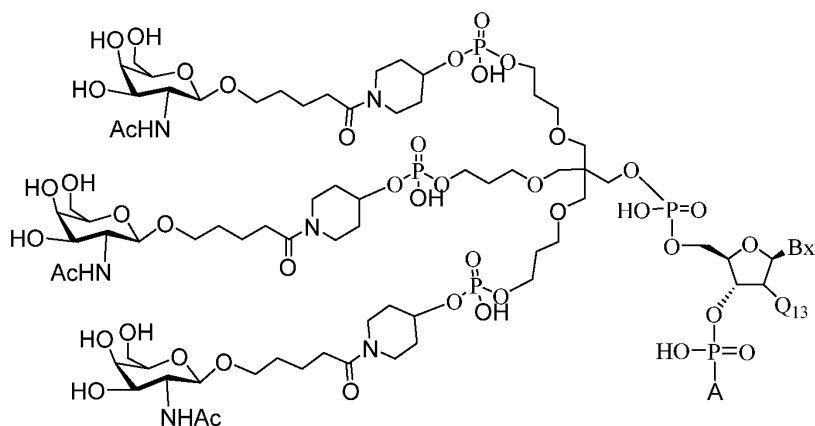
[2381] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[2382] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[2383] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[2384] [구현예 166]

[2385] 구현예 1 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[2386]

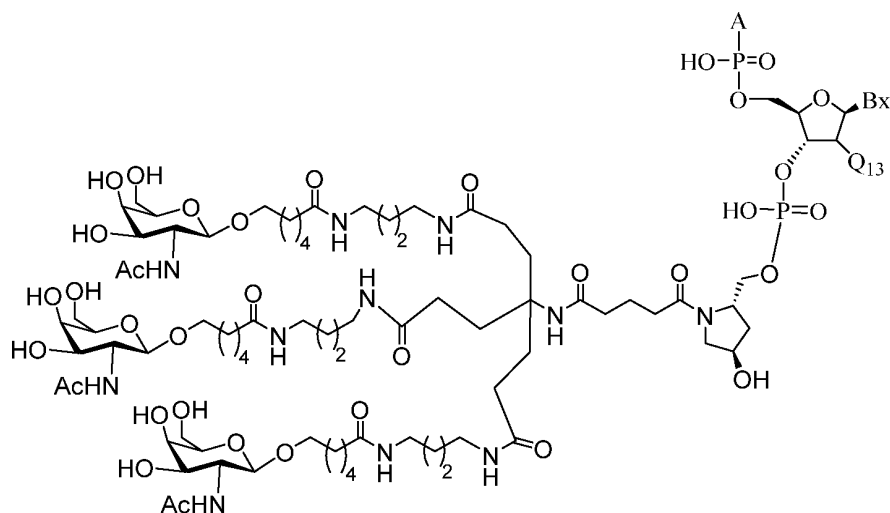
[2387] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[2388] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[2389] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[2390] [구현예 167]

[2391] 구현예 1 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[2392]

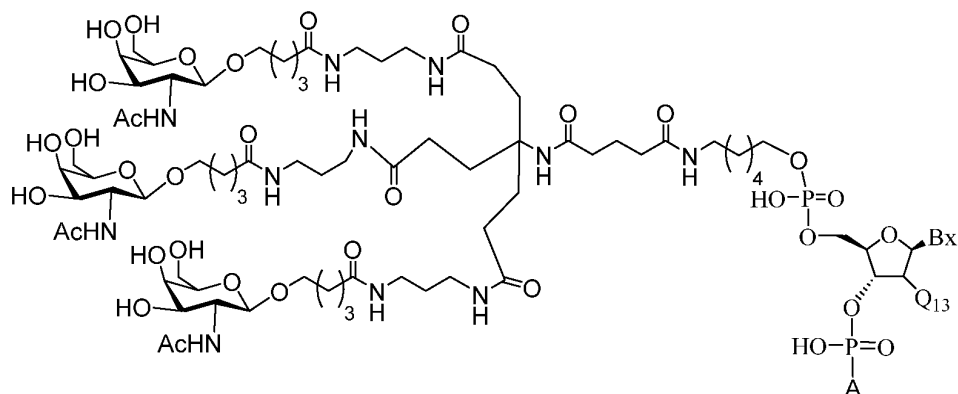
[2393] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[2394] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[2395] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[2396] [구현예 168]

[2397] 구현예 1 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[2398]

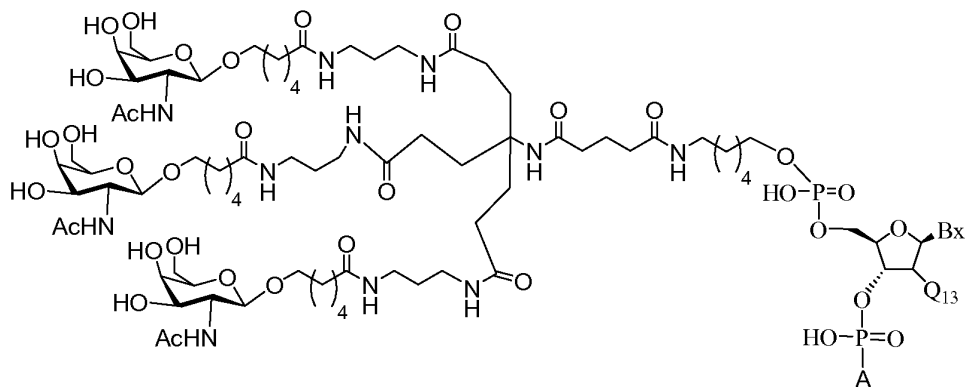
[2399] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[2400] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[2401] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[2402] [구현예 169]

[2403] 구현예 1 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[2404]

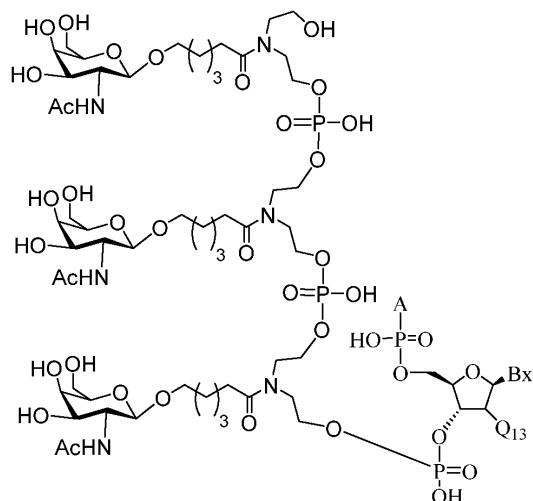
[2405] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[2406] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[2407] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[2408] [구현예 170]

[2421] 구현예 1 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[2422]

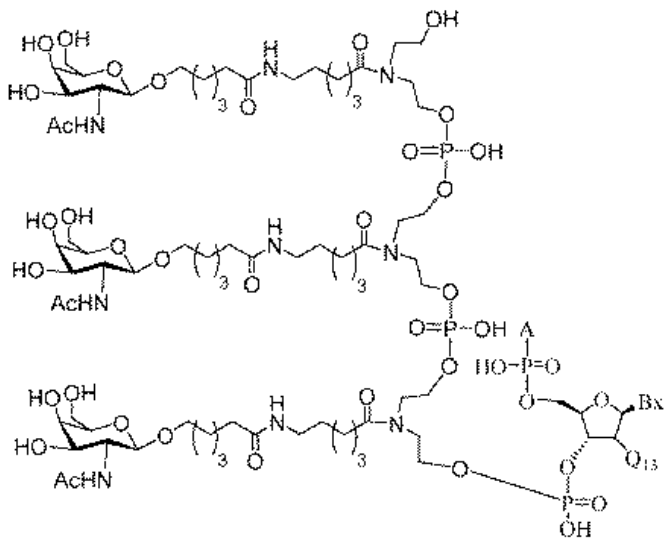
[2423] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[2424] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[2425] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[2426] [구현예 173]

[2427] 구현예 1 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[2428]

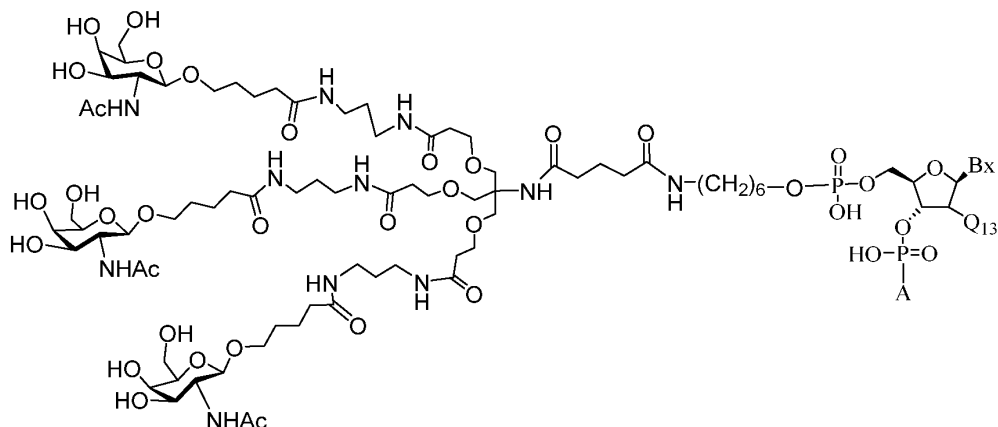
[2429] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[2430] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[2431] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[2432] [구현예 174]

[2433] 구현예 1 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2434]

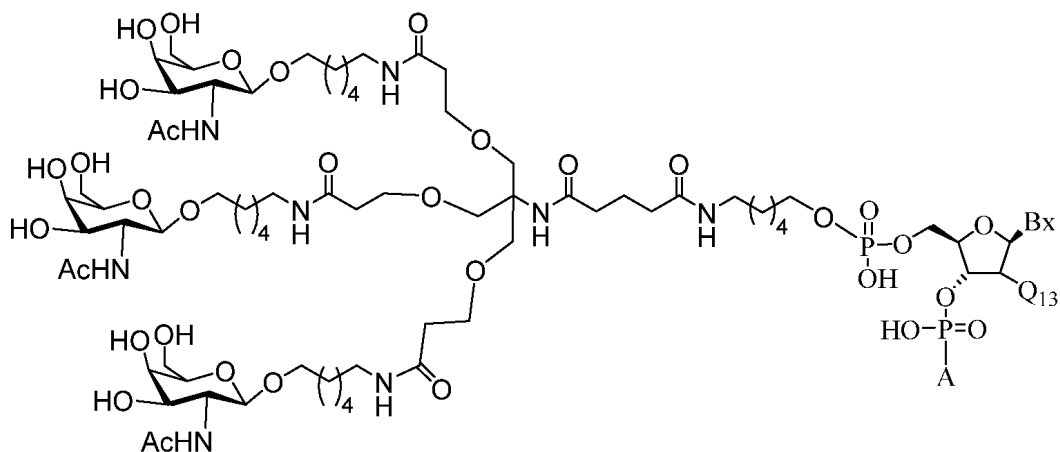
[2435] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[2436] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[2437] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[2438] [구현예 175]

[2439] 구현예 1 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2440]

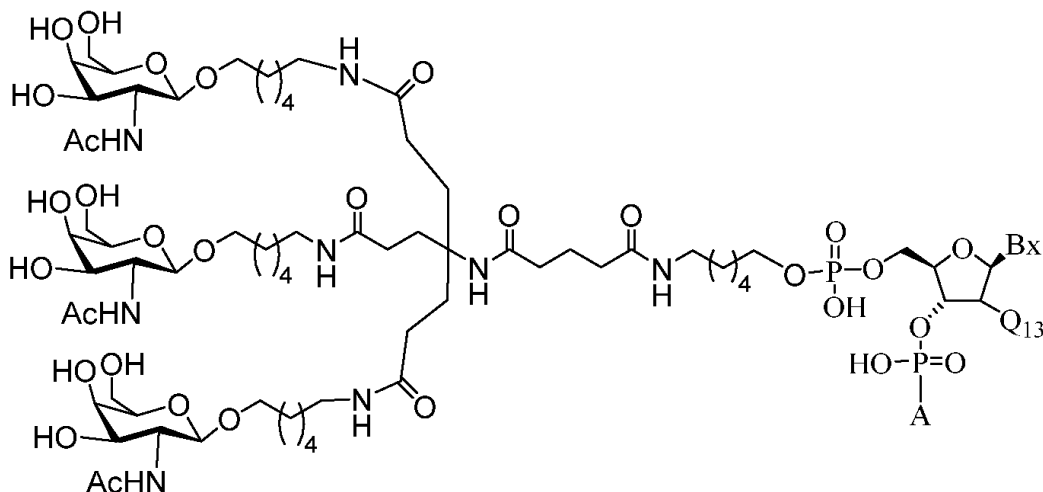
[2441] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[2442] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[2443] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[2444] [구현예 176]

[2445] 구현예 1 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2446]

[2447] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[2448] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[2449] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[2450] [구현예 177]

[2451] 구현예 159 내지 176 중 어느 한 항에 있어서, B_x 는 아데닌, 구아닌, 티민, 우라실, 또는 시토신, 또는 5-메틸 시토신 중으로부터 선택되는 화합물.

[2452] [구현예 178]

[2453] 구현예 159 내지 177 중 어느 한 항에 있어서, B_x 는 아데닌인 화합물.

[2454] [구현예 179]

[2455] 구현예 159 내지 177 중 어느 한 항에 있어서, B_x 는 티민인 화합물.

[2456] [구현예 180]

[2457] 구현예 159 내지 176 중 어느 한 항에 있어서, Q_{13} 은 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 인 화합물.

[2458] [구현예 181]

[2459] 구현예 159 내지 176 중 어느 한 항에 있어서, Q_{13} 은 H인 화합물.

[2460] [구현예 182]

[2461] 구현예 1 내지 181 중 어느 한 항의 화합물 또는 그것의 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제 중 적어도 하나를 포함하는 조성물.

[2462] [구현예 183]

[2463] 구현예 1 내지 181 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는 전구약물.

[2464] [구현예 184]

[2465] 구현예 1 내지 181 중 어느 한 항의 화합물, 청구항 182의 조성물, 또는 청구항 183의 전구약물을 동물에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

[2466] [구현예 185]

[2467] 구현예 184에 있어서, 상기 동물은 인간인 방법.

- [2468] [구현예 186]
- [2469] 구현예 184 또는 185에 있어서, 상기 화합물의 투여는 트랜스티레틴 아밀로이드증을 예방, 치료, 개선하거나 그것의 진행을 느리게 하는 방법.
- [2470] [구현예 187]
- [2471] 구현예 184 내지 186 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물 또는 조성물 및 제 2 제제를 공-투여하는 것을 포함하는 방법.
- [2472] [구현예 188]
- [2473] 구현예 187에 있어서, 상기 화합물 또는 조성물 및 제 2 제제는 함께 투여되는 방법.
- [2474] [구현예 189]
- [2475] 구현예 184 내지 188 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여는 맥락막망에 대한 것인 방법.
- [2476] [구현예 190]
- [2477] 동물에서 트랜스티레틴 mRNA 또는 단백질 발현을 감소키는 방법으로서, 상기 방법은 상기 동물에게 청구항 1 내지 181 중 어느 한 항의 화합물, 청구항 182의 조성물, 또는 청구항 183의 전구약물을 투여하고, 그렇게 함으로써 동물에서 트랜스티레틴 mRNA 또는 단백질 발현을 감소시키는 것을 포함하는 방법.
- [2478] [구현예 191]
- [2479] 구현예 190에 있어서, 상기 동물은 인간인 방법.
- [2480] [구현예 192]
- [2481] 구현예 190 또는 191에 있어서, 트랜스티레틴 mRNA 또는 단백질 발현의 감소는 트랜스티레틴 아밀로이드증을 예방, 치료, 개선하거나 그것의 진행을 느리게 하는 방법.
- [2482] [구현예 193]
- [2483] 구현예 190 내지 192 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물 또는 조성물 및 제 2 제제를 공-투여하는 것을 포함하는 방법.
- [2484] [구현예 194]
- [2485] 구현예 193에 있어서, 상기 화합물 또는 조성물 및 제 2 제제는 함께 투여되는 방법.
- [2486] [구현예 195]
- [2487] 구현예 190 내지 194 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물 또는 조성물은 맥락막망에 투여되는 방법.
- [2488] [구현예 196]
- [2489] 대상체에서 트랜스티레틴 아밀로이드증을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 대상체에게 치료적으로 효과적인 양의 청구항 1 내지 181 중 어느 한 항의 화합물, 청구항 182의 조성물, 또는 청구항 183의 전구약물을 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [2490] [구현예 197]
- [2491] 구현예 196에 있어서, 상기 화합물 또는 조성물의 투여는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 트랜스티레틴 아밀로이드증과 연관된 적어도 하나의 증상을 감소시키는 방법: 차분하지 못함, 공조 결여, 안진, 경련성 반신부전마비, 근육 공조의 결여, 손상된 시력, 불면증, 이상 감각, 간대성근경련, 시각상실, 언어 장애, 손목굴 증후군, 발작, 지주막하 출혈, 뇌졸중 및 뇌에서의 출혈, 수두증, 운동실조증, 및 강직성 마비, 혼수상태, 감각신경병증, 지각이상증, 지각감퇴, 운동 신경병증, 자율신경병증, 기립성 저혈압, 주기적인 변비, 주기적인 설사, 메스꺼움, 구토, 감소된 땀흘리기, 발기부전, 지연된 위 배출, 요폐, 요실금, 진행성 심장병, 피로, 숨가쁨, 체중 감소, 식욕 결핍, 저림, 따끔거림, 약화, 확장된 혀, 신장 증후군, 울혈성 심장기능상실, 운동시 호흡곤란, 말초 부종, 부정맥, 심계항진, 변덕스러움, 실신, 체위성 저혈압, 말초 신경 문제, 감각 운동 손상, 하지신경병증, 상지 신경병증, 통각과민증, 변경된 온도 감각, 하지 약화, 악액질, 말초 부종, 간비대, 자반병, 심장확장 기능장애, 조기 심실 수축, 두개 신경병증, 줄어든 심부반사, 초자체에서의 아밀로이드 침전물, 유리체

불투명, 안구 건조, 녹내장, 동공에서의 부채꼴 외관, 및 물 체류로 인한 발의 팽윤.

- [2492] [구현예 198]
- [2493] 구현예 196 또는 197에 있어서, 상기 화합물 또는 조성물 및 제 2 체제를 공-투여하는 것을 포함하는 방법.
- [2494] [구현예 199]
- [2495] 구현예 198에 있어서, 상기 화합물 또는 조성물 및 제 2 체제는 함께 투여되는 방법.
- [2496] [구현예 200]
- [2497] 구현예 196 내지 199 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물 또는 조성물은 맥락막망에 투여되는 방법.
- [2498] [구현예 201]
- [2499] 구현예 196 내지 200 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 인간인 방법.
- [2500] [구현예 202]
- [2501] 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 접합체 기를 포함하는 화합물로서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 8 내지 80 개의 연결된 뉴클레오타이드로 이루어지고 B형 간염 바이러스 (HBV)를 인코딩하는 서열번호: 1에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 또는 100% 상보적인 핵염기 서열을 갖는 방법.
- [2502] [구현예 203]
- [2503] 구현예 202에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 서열번호: 1의 핵염기 1583-1602, 1780-1799, 411-427, 1266-1285, 1577-1596, 1585-1604, 1583-1598, 1264-1279, 또는 1780-1797 내에서 상보적이고, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 1에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 또는 100% 상보적인 것인 화합물.
- [2504] [구현예 204]
- [2505] 구현예 202에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 30 개의 연결된 뉴클레오타이드로 이루어지고 서열번호: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 11의 임의의 핵염기 서열의 적어도 8 개의 인접 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는 화합물.
- [2506] [구현예 205]
- [2507] 구현예 204에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 11에 나열된 서열을 포함하는 핵염기 서열을 갖는 화합물.
- [2508] [구현예 206]
- [2509] 구현예 204에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 11에 나열된 서열로 이루어진 핵염기 서열을 갖는 화합물.
- [2510] [구현예 207]
- [2511] 구현예 202 내지 206 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는,
- [2512] 연결된 데옥시뉴클레오타이드로 이루어진 겹 분절;
- [2513] 연결된 뉴클레오타이드로 이루어진 5' 윙 분절; 및
- [2514] 연결된 뉴클레오타이드로 이루어진 3' 윙 분절을 포함하고;
- [2515] 상기 겹 분절은 상기 5' 윙 분절과 상기 3' 윙 분절 사이에 배치되고; 상기 5' 윙 분절의 각각의 뉴클레오타이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고; 상기 3' 윙 분절의 각각의 뉴클레오타이드는 2'-O-메톡시에틸 당을 포함하고; 여기서 각각의 뉴클레오타이드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이고; 그리고 여기서 각각의 시토신은 5-메틸시토신인 화합물.
- [2516] [구현예 208]
- [2517] 구현예 202 내지 207 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는,

- [2518] 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 갭 분절;
- [2519] 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 윙 분절; 및
- [2520] 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 윙 분절을 포함하고;
- [2521] 상기 갭 분절은 상기 5' 윙 분절과 상기 3' 윙 분절 사이에 배치되고; 상기 5' 윙 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-O-메톡시에틸 당 또는 구속된 에틸 당을 포함하고; 상기 3' 윙 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-O-메톡시에틸 당 또는 구속된 에틸 당을 포함하고; 여기서 각각의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이고; 그리고 여기서 각각의 시토신은 5-메틸시토신인 화합물.
- [2522] [구현예 209]
- [2523] 구현예 202 내지 208 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 단일가닥인 화합물.
- [2524] [구현예 210]
- [2525] 구현예 202 내지 208 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 이중-가닥인 화합물.
- [2526] [구현예 211]
- [2527] 구현예 202 내지 210 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [2528] [구현예 212]
- [2529] 구현예 211에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결인 화합물.
- [2530] [구현예 213]
- [2531] 구현예 212에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [2532] [구현예 214]
- [2533] 구현예 212에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 2 개의 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [2534] [구현예 215]
- [2535] 구현예 212에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 3 개의 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [2536] [구현예 216]
- [2537] 구현예 212에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 4 개의 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [2538] [구현예 217]
- [2539] 구현예 212에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 5 개의 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [2540] [구현예 218]
- [2541] 구현예 212에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 6 개의 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [2542] [구현예 219]
- [2543] 구현예 212에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 7 개의 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [2544] [구현예 220]

- [2545] 구현예 213 내지 219 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 각각의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결 및 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결로부터 선택되는 화합물.
- [2546] [구현예 221]
- [2547] 구현예 212에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 각각의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결을 포함하는 화합물.
- [2548] [구현예 222]
- [2549] ISIS 505358 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [2550] [구현예 223]
- [2551] ISIS 509934 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [2552] [구현예 224]
- [2553] ISIS 510100 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [2554] [구현예 225]
- [2555] ISIS 552023 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [2556] [구현예 226]
- [2557] ISIS 552024 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [2558] [구현예 227]
- [2559] ISIS 552032 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [2560] [구현예 228]
- [2561] ISIS 552859 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [2562] [구현예 229]
- [2563] ISIS 552925 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [2564] [구현예 230]
- [2565] ISIS 577119 및 접합체 기로 이루어진 화합물.
- [2566] [구현예 231]
- [2567] 구현예 202 내지 230 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 변형된 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서 변형된 올리고뉴클레오타이드에 연결되는 화합물.
- [2568] [구현예 232]
- [2569] 구현예 202 내지 230 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 변형된 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에서 변형된 올리고뉴클레오타이드에 연결되는 화합물.
- [2570] [구현예 233]
- [2571] 구현예 202 내지 232 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 정확하게 하나의 리간드를 포함하는 화합물.
- [2572] [구현예 234]
- [2573] 구현예 202 내지 232 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 정확하게 2 개의 리간드를 포함하는 화합물.
- [2574] [구현예 235]
- [2575] 구현예 202 내지 232 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 3 개 이상의 리간드를 포함하는 화합물.
- [2576] [구현예 236]

[2577] 구현예 202 내지 232 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 정확하게 3 개의 리간드를 포함하는 화합물.

[2578] [구현예 237]

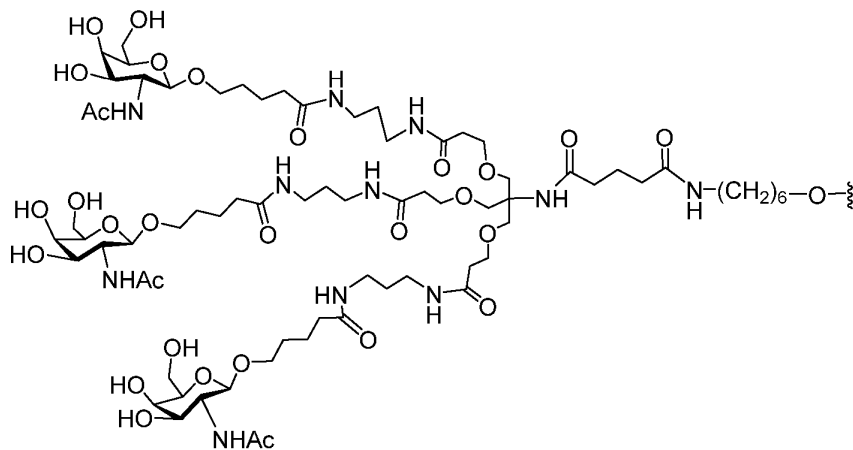
[2579] 구현예 202 내지 236 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 리간드는 하기 중으로부터 선택되는 화합물: 폴리사카라이드, 변형된 폴리사카라이드, 만노스, 갈락토오스, 만노스 유도체, 갈락토오스 유도체, D-만노피라노스, L-만노피라노스, D-아라비노스, L-갈락토오스, D-자일로푸라노스, L-자일로푸라노스, D-글루코오스, L-글루코오스, D-갈락토오스, L-갈락토오스, α-D-만노푸라노스, β-D-만노푸라노스, α-D-만노피라노스, β-D-만노피라노스, α-D-글루코피라노스, β-D-글루코피라노스, α-D-글루코푸라노스, β-D-글루코푸라노스, α-D-프루토프라노스, α-D-프루토피라노스, α-D-갈락토피라노스, β-D-갈락토피라노스, α-D-갈락토프라노스, β-D-갈락토프라노스, 글루코사민, 시알산, α-D-갈락토사민, N-아세틸갈락토사민, 2-아미노-3-O-[(R)-1-카복시에틸]-2-데옥시-β-D-글루코피라노스, 2-데옥시-2-메틸아미노-L-글루코피라노스, 4,6-디데옥시-4-포름아미도-2,3-디-O-메틸-D-만노피라노스, 2-데옥시-2-설포아미노-D-글루코피라노스, N-글라이콜로일-α-뉴라민산, 5-티오-β-D-글루코피라노스, 메틸 2,3,4-트리-O-아세틸-1-티오-6-O-트리틸-α-D-글루코피라노사이드, 4-티오-β-D-갈락토피라노스, 에틸 3,4,6,7-테트라-O-아세틸-2-데옥시-1,5-디티오-α-D-글루코-헵토피라노사이드, 2,5-안하이드로-D-알로노니트릴, 리보오스, D-리보오스, D-4-티오리보오스, L-리보오스, L-4-티오리보오스.

[2580] [구현예 238]

[2581] 구현예 237에 있어서, 각각의 리간드는 N-아세틸 갈락토사민인 화합물.

[2582] [구현예 239]

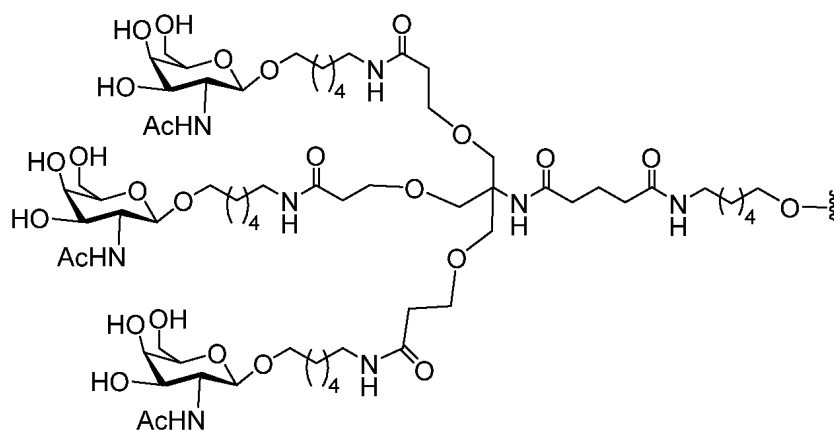
[2583] 구현예 202 내지 238 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2584]

[2585] [구현예 240]

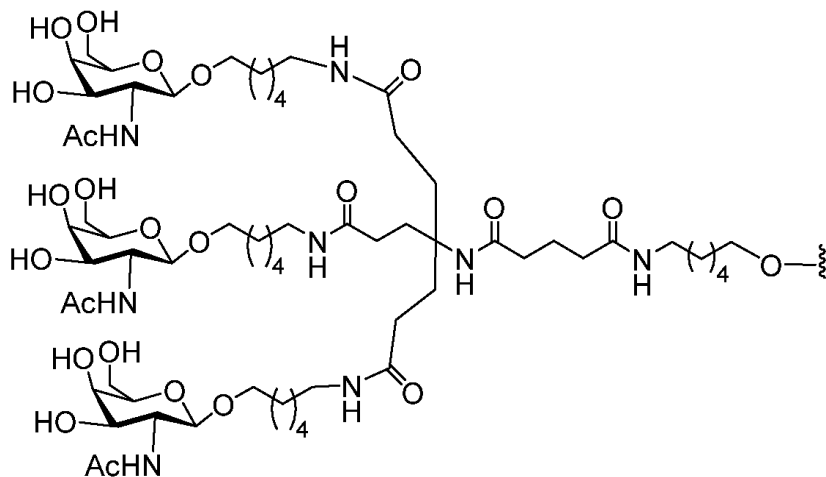
[2586] 구현예 202 내지 238 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2587]

[2588] [구현예 241]

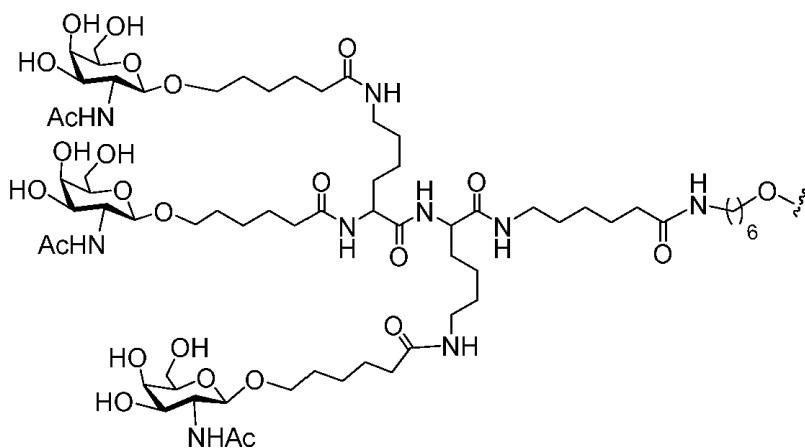
[2589] 구현예 202 내지 238 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2590]

[2591] [구현예 242]

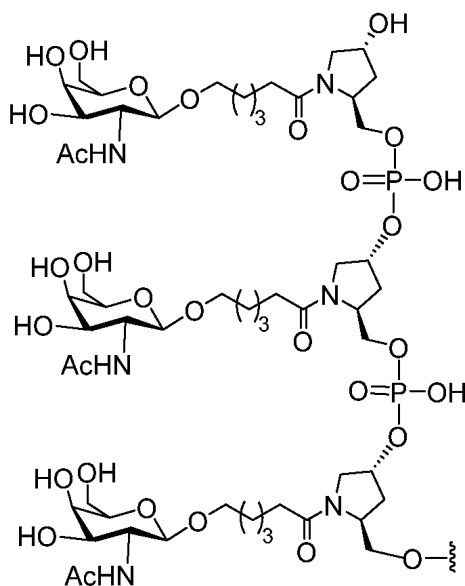
[2592] 구현예 202 내지 238 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2593]

[2594] [구현예 243]

[2595] 구현예 202 내지 238 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2596]

[2597]

[구현예 244]

[2598]

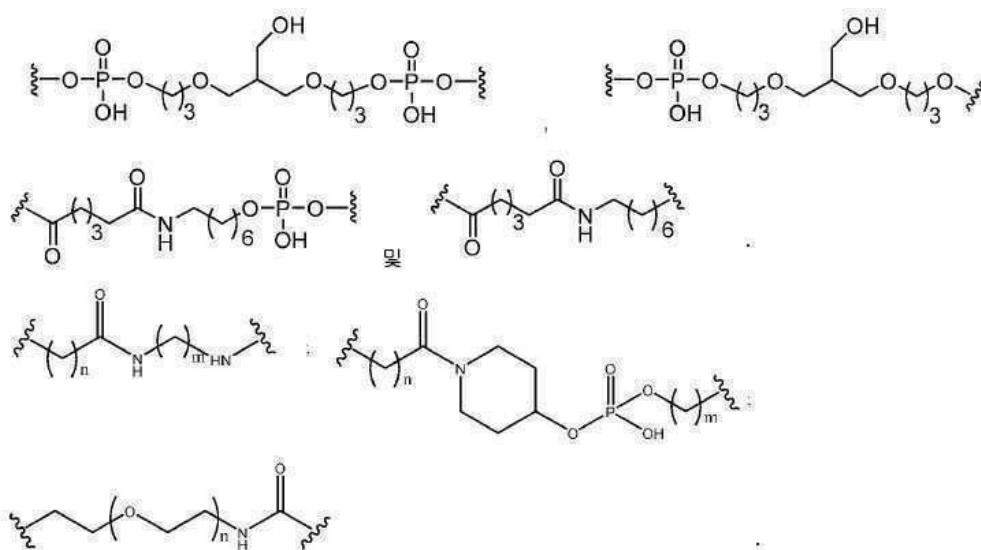
구현예 202 내지 243 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 적어도 하나의 인 연결 기 또는 중성 연결 기를 포함하는 화합물.

[2599]

[구현예 245]

[2600]

구현예 202 내지 244 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기 중으로부터 선택된 구조를 포함하는 화합물:



[2601]

[2602]

여기서 n은 1 내지 12이고; 그리고

[2603]

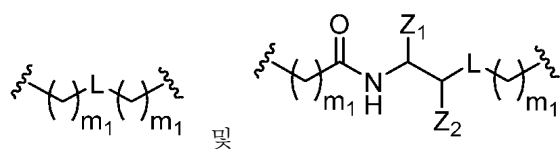
여기서 m은 1 내지 12이다.

[2604]

[구현예 246]

[2605]

구현예 202 내지 245 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 테더를 갖는 화합물:



[2606]

[2607] 여기서 L은 인 연결 기 또는 중성 연결 기이고;

[2608] Z₁은 C(=O)O-R₂이고;

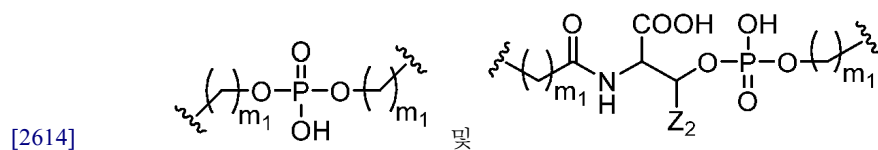
[2609] Z₂는 H, C₁-C₆알킬 또는 치환된 C₁-C₆알킬이고;

[2610] R₂는 H, C₁-C₆알킬 또는 치환된 C₁-C₆알킬이고; 그리고

[2611] 각각의 m₁은, 독립적으로, 0 내지 20이고, 여기서 적어도 하나의 m₁은 각각의 테더에 대해 0 초과이다.

[2612] [구현예 247]

[2613] 구현예 202 내지 246 중 어느 한 항에 있어서, 접합체 기는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 테더를 갖는 화합물:

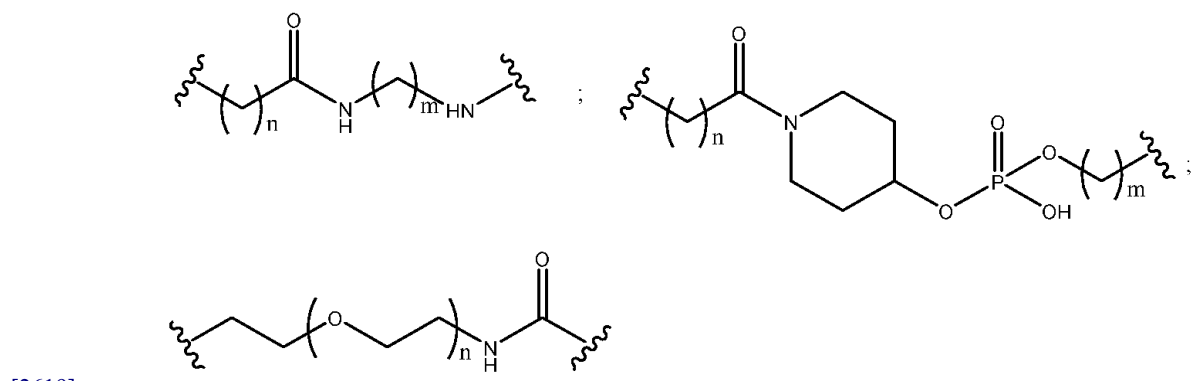


[2615] 여기서 Z₂는 H 또는 CH₃이고; 그리고

[2616] 각각의 m₁은, 독립적으로, 0 내지 20이고, 여기서 적어도 하나의 m₁은 각각의 테더에 대해 0 초과이다.

[2617] [구현예 248]

[2618] 구현예 202 내지 247 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 테더를 갖는 화합물:



[2620] 여기서 n은 1 내지 12이고; 그리고

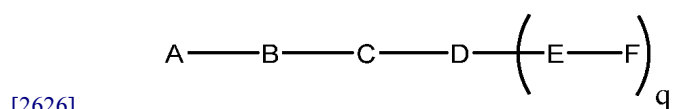
[2621] 여기서 m은 1 내지 12이다.

[2622] [구현예 249]

[2623] 구현예 202 내지 248 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 변형된 올리고뉴클레오타이드에 공유결합되는 화합물.

[2624] [구현예 250]

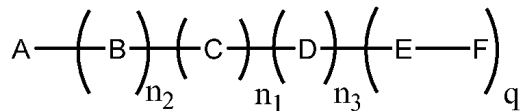
[2625] 구현예 202 내지 249 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식으로 나타낸 구조를 갖는 화합물:



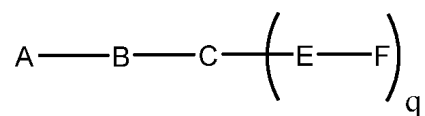
[2627] 여기서

[2628] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

- [2629] B는 절단가능 모이어티이고
- [2630] C는 접합체 링커이고
- [2631] D는 분지화 기이고
- [2632] 각각의 E는 테더이고;
- [2633] 각각의 F는 리간드이고; 그리고
- [2634] q는 정수 1 내지 5이다.
- [2635] [구현예 251]
- [2636] 구현예 202 내지 249 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식으로 나타낸 구조를 갖는 화합물:

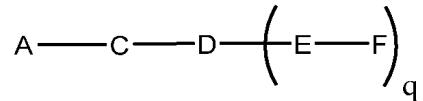


- [2637]
- [2638] 여기서:
- [2639] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;
- [2640] B는 절단가능 모이어티이고
- [2641] C는 접합체 링커이고
- [2642] D는 분지화 기이고
- [2643] 각각의 E는 테더이고;
- [2644] 각각의 F는 리간드이고;
- [2645] 각각의 n은 독립적으로 0 또는 1이고; 그리고
- [2646] q는 정수 1 내지 5이다.
- [2647] [구현예 252]
- [2648] 구현예 202 내지 249 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식으로 나타낸 구조를 갖는 화합물:



- [2649]
- [2650] 여기서
- [2651] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;
- [2652] B는 절단가능 모이어티이고;
- [2653] C는 접합체 링커이고;
- [2654] 각각의 E는 테더이고;
- [2655] 각각의 F는 리간드이고; 그리고
- [2656] q는 정수 1 내지 5이다.
- [2657] [구현예 253]

[2658] 구현예 202 내지 249 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식으로 나타낸 구조를 갖는 화합물:



[2659]

[2660] 여기서

[2661] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[2662] C는 접합체 링커이고;

[2663] D는 분지화 기이고;

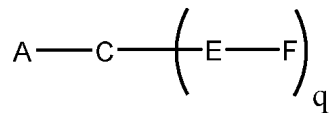
[2664] 각각의 E는 테더이고;

[2665] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[2666] q는 정수 1 내지 5이다.

[2667] [구현예 254]

[2668] 구현예 202 내지 249 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식으로 나타낸 구조를 갖는 화합물:



[2669]

[2670] 여기서

[2671] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[2672] C는 접합체 링커이고;

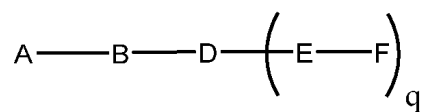
[2673] 각각의 E는 테더이고;

[2674] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[2675] q는 정수 1 내지 5이다.

[2676] [구현예 255]

[2677] 구현예 202 내지 249 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식으로 나타낸 구조를 갖는 화합물:



[2678]

[2679] 여기서

[2680] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[2681] B는 절단가능 모이어티이고;

[2682] D는 분지화 기이고;

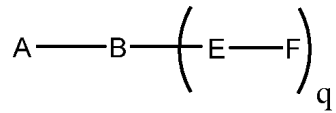
[2683] 각각의 E는 테더이고;

[2684] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[2685] q는 정수 1 내지 5이다.

[2686] [구현예 256]

[2687] 구현예 202 내지 249 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식으로 나타낸 구조를 갖는 화합물:



[2688]

[2689] 여기서

[2690] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[2691] B는 절단가능 모이어티이고;

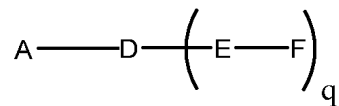
[2692] 각각의 E는 테더이고;

[2693] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[2694] q는 정수 1 내지 5이다.

[2695] [구현예 257]

[2696] 구현예 202 내지 249 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식으로 나타낸 구조를 갖는 화합물:



[2697]

[2698] 여기서

[2699] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[2700] D는 분지화 기이고;

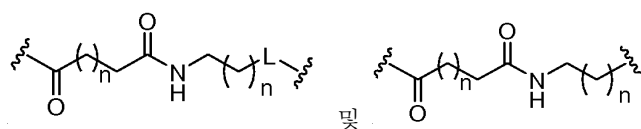
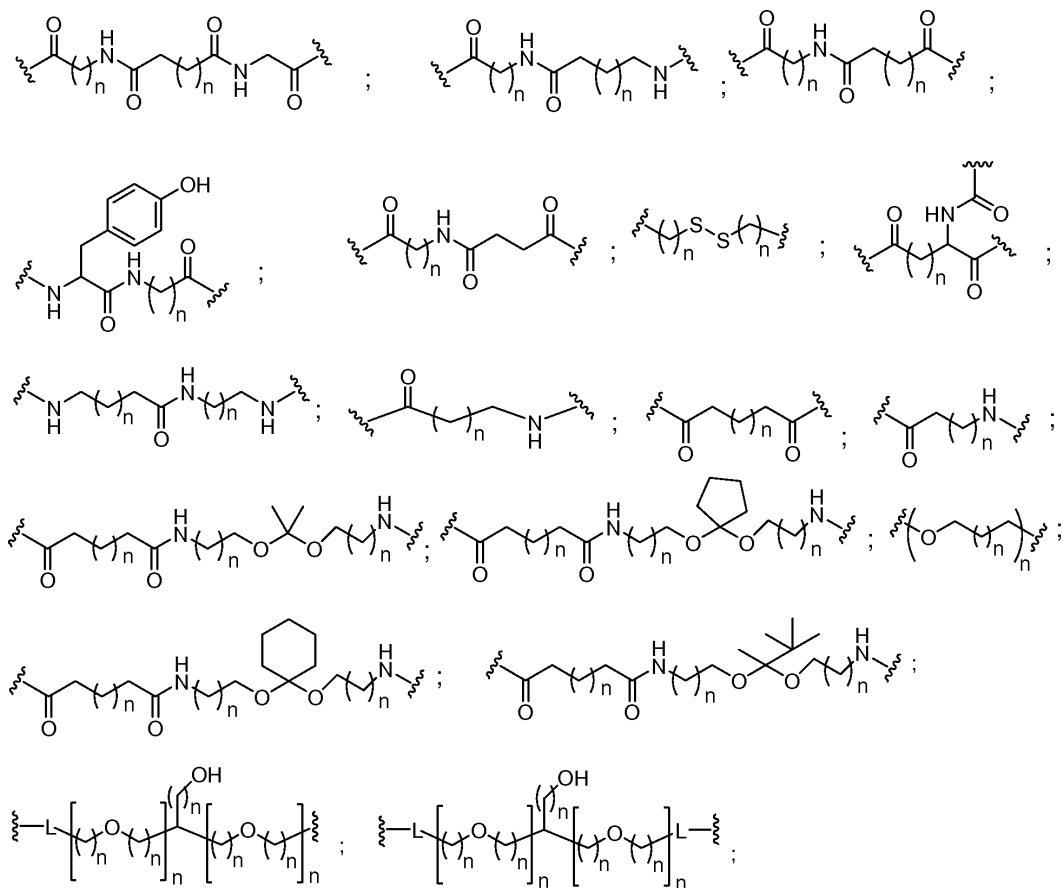
[2701] 각각의 E는 테더이고;

[2702] 각각의 F는 리간드이고; 그리고

[2703] q는 정수 1 내지 5이다.

[2704] [구현예 258]

[2705] 구현예 202 내지 257 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:

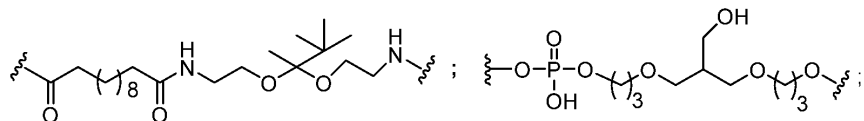
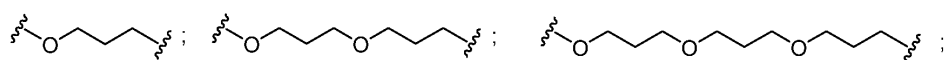
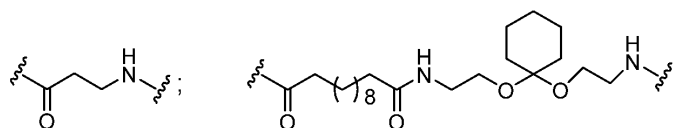
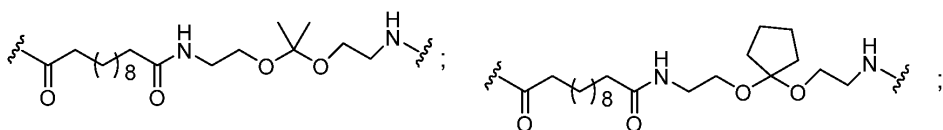
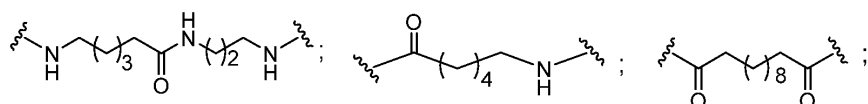
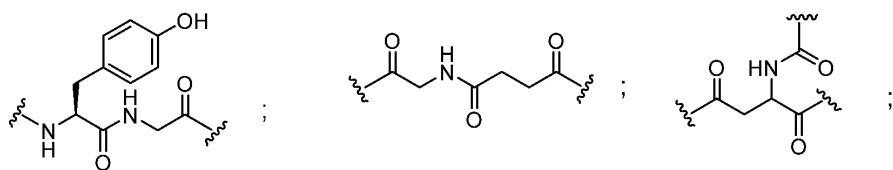
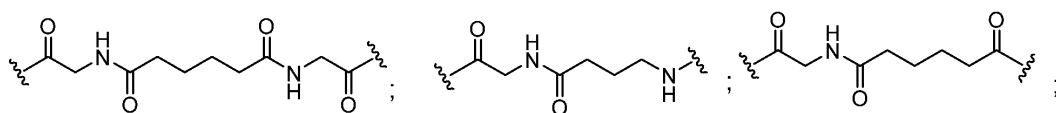


[2708] 여기서 각각의 L 은, 독립적으로, 인 연결 기 또는 중성 연결 기이고; 그리고

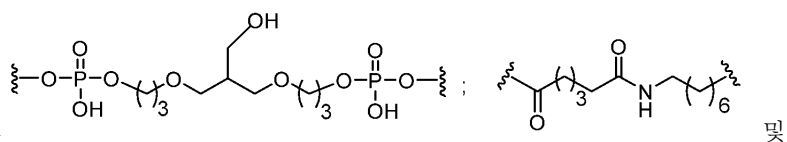
[2709] 각각의 n 은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[2710] [구현예 259]

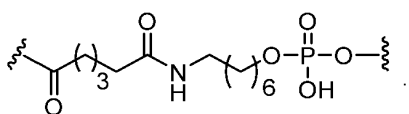
[2711] 구현예 202 내지 257 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



[2712]



[2713]



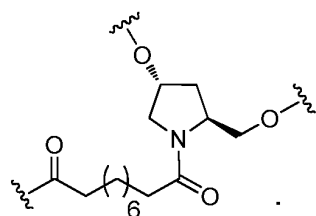
[2714]

[구현예 260]

[2715]

[2716] 구현예 202 내지 257 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 구조를 갖는 화합물:

[2716]



[2717]

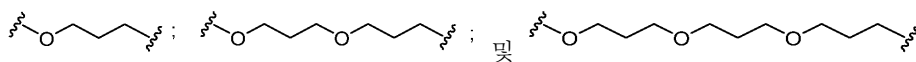
[구현예 261]

[2718]

[2719] 구현예 202 내지 257 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:

[2719]

[2720]



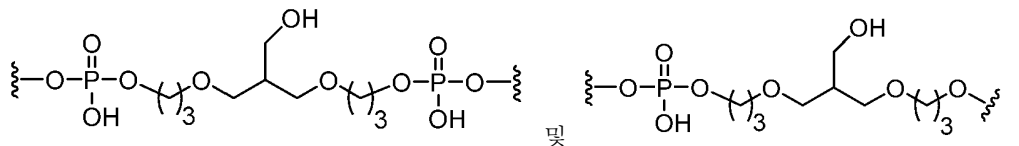
[2721]

[구현예 262]

[2722]

구현예 202 내지 257 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:

[2723]



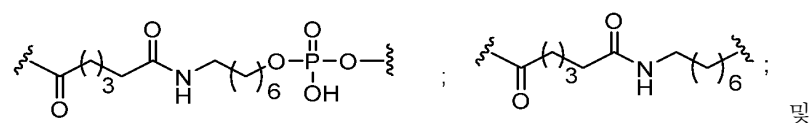
[2724]

[구현예 263]

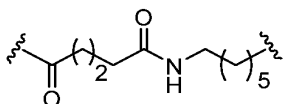
[2725]

구현예 202 내지 257 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:

[2726]



[2727]



[2728]

[구현예 264]

[2729]

구현예 202 내지 263 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 피롤리딘을 포함하는 화합물.

[2730]

[구현예 265]

[2731]

구현예 202 내지 263 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 피롤리딘을 포함하지 않는 화합물.

[2732]

[구현예 266]

[2733]

구현예 202 내지 265 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 PEG를 포함하는 화합물.

[2734]

[구현예 267]

[2735]

구현예 202 내지 266 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 아미드를 포함하는 화합물.

[2736]

[구현예 268]

[2737]

구현예 202 내지 266 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 적어도 2 개의 아미드를 포함하는 화합물.

[2738]

[구현예 269]

[2739]

구현예 202 내지 266 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 아미드를 포함하지 않는 화합물.

[2740]

[구현예 270]

[2741]

구현예 202 내지 269 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 폴리아미드를 포함하는 화합물.

[2742]

[구현예 271]

[2743]

구현예 202 내지 270 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 아민을 포함하는 화합물.

[2744]

[구현예 272]

[2745]

구현예 202 내지 271 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 1 개 이상의 디설파이드 결합을 포함하는 화합물.

[2746]

[구현예 273]

[2747] 구현예 202 내지 272 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 단백질 결합 모이어티를 포함하는 화합물.

[2748] [구현예 274]

[2749] 구현예 273에 있어서, 상기 단백질 결합 모이어티는 지질을 포함하는 화합물.

[2750] [구현예 275]

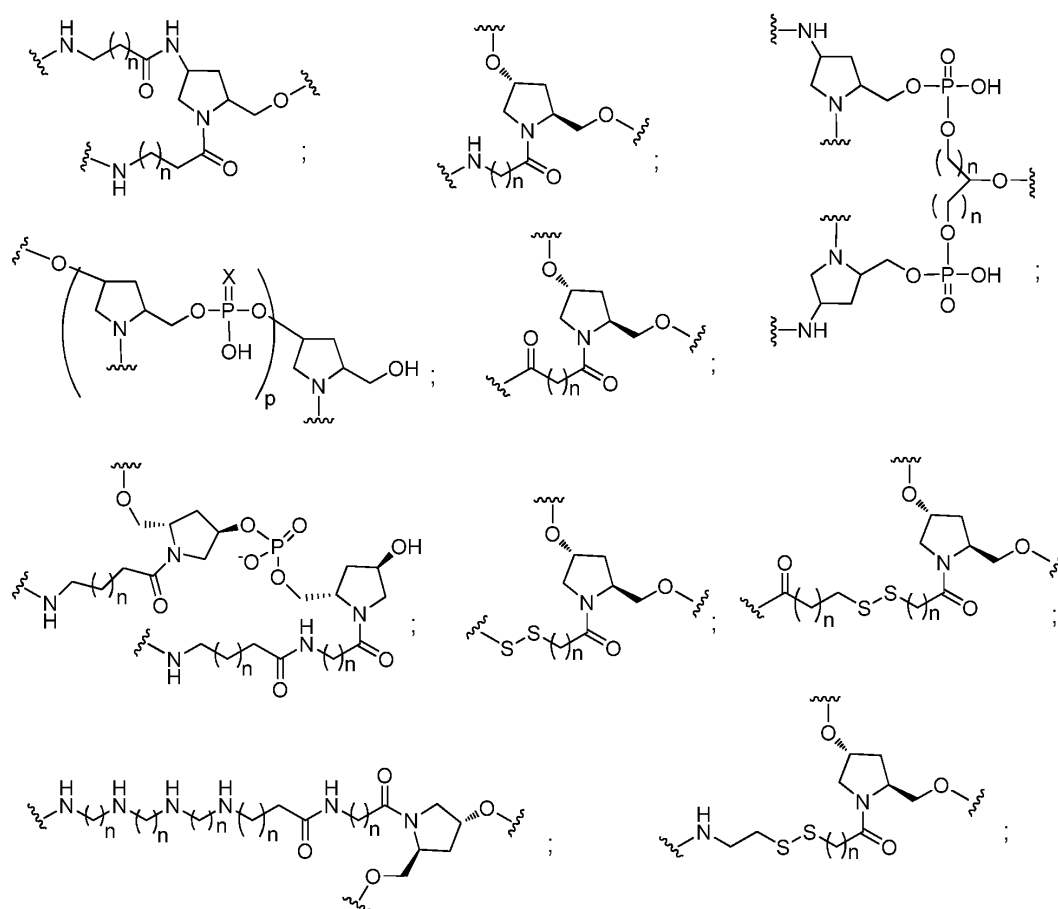
[2751] 구현예 273에 있어서, 상기 단백질 결합 모이어티는 하기 중으로부터 선택되는 화합물: 콜레스테롤, 콜산, 아다만탄 아세트산, 1-피렌 부티르산, 디하이드로테스토스테론, 1,3-비스-(0(헥사데실)글리세롤, 제라닐옥시헥실 기, 헥사데실글리세롤, 보르네올, 멘톨, 1,3-프로판디올, 헵타데실 기, 팔미트산, 미리스트산, 03-(올레오일)리토콜산, 03-(올레오일)콜렌산, 디메톡시트리틸, 또는 펜옥사진), 비타민 (예를 들면, 폴레이트, 비타민 A, 비타민 E, 바이오틴, 피리독살), 펩타이드, 탄수화물 (예를 들면, 모노사카라이드, 디사카라이드, 트리스카라이드, 테트라사카라이드, 올리고사카라이드, 폴리사카라이드), 엔도솜분해적 구성성분, 스테로이드 (예를 들면, 우바올, 헤시게닌, 디오스게닌), 테르펜 (예를 들면, 트리테르펜, 예를 들면, 사르사사포게닌, 프리텔린, 에피프리텔라놀 유도된 리토콜산), 또는 양이온성 지질.

[2752] [구현예 276]

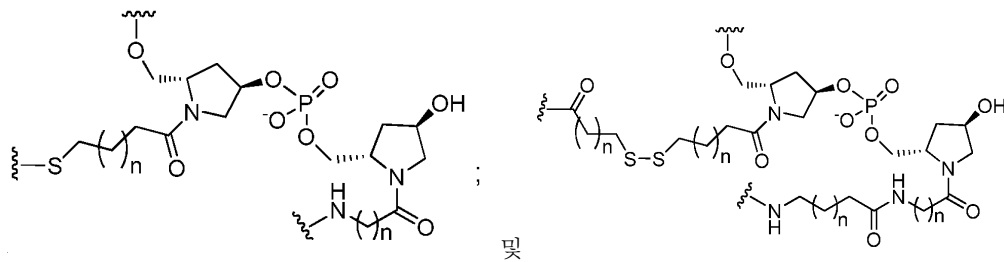
[2753] 구현예 273에 있어서, 상기 단백질 결합 모이어티는 하기 중으로부터 선택되는 화합물: C16 내지 C22 장쇄 포화된 또는 불포화된 지방산, 콜레스테롤, 콜산, 비타민 E, 아다만탄 또는 1-펜타플루오로프로필.

[2754] [구현예 277]

[2755] 구현예 202 내지 276 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



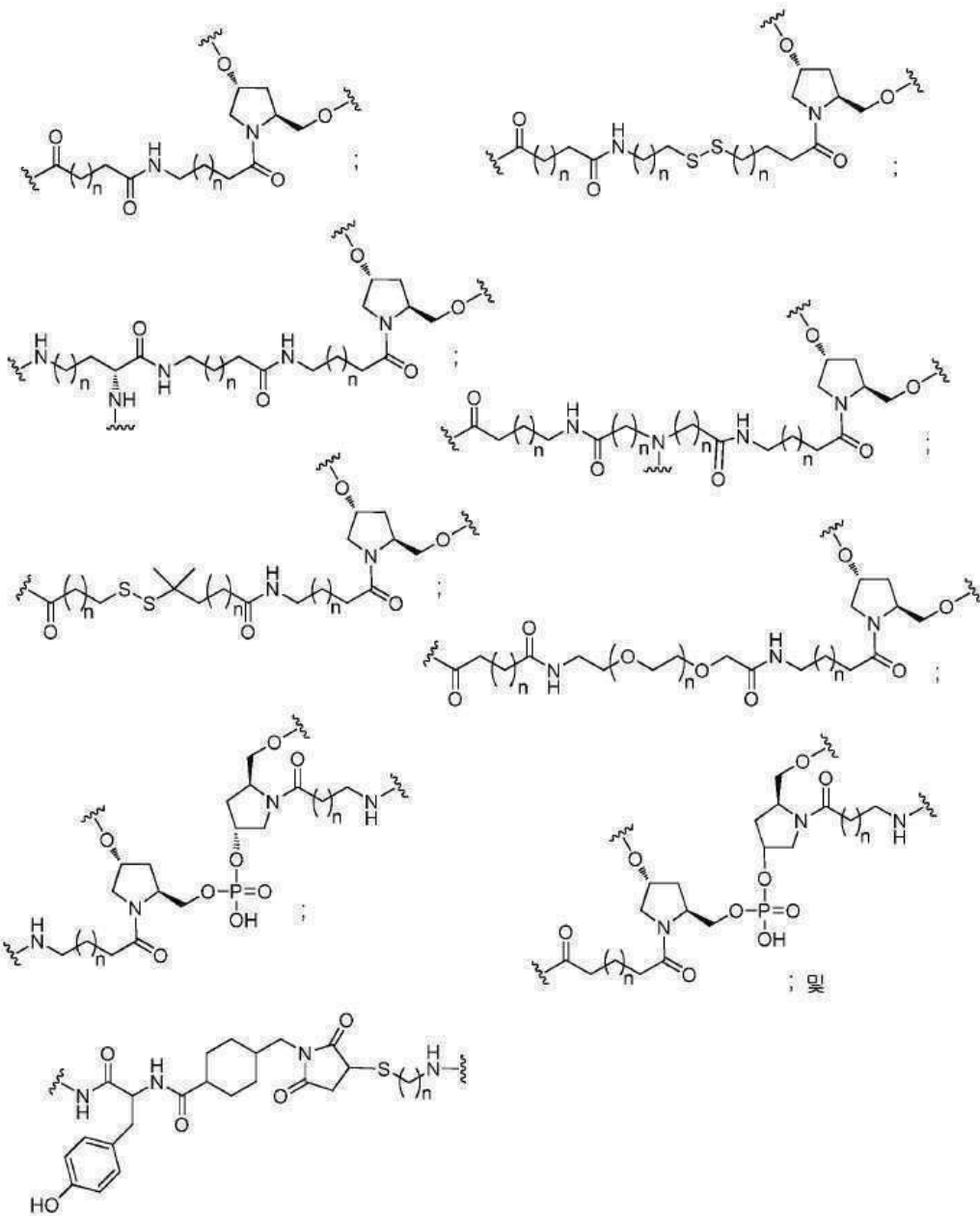
[2756]



여기서 각각의 n 은, 독립적으로, 1 내지 20이고; 그리고 p 는 1 내지 6이다.

[구현예 278]

구현예 202 내지 277 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:

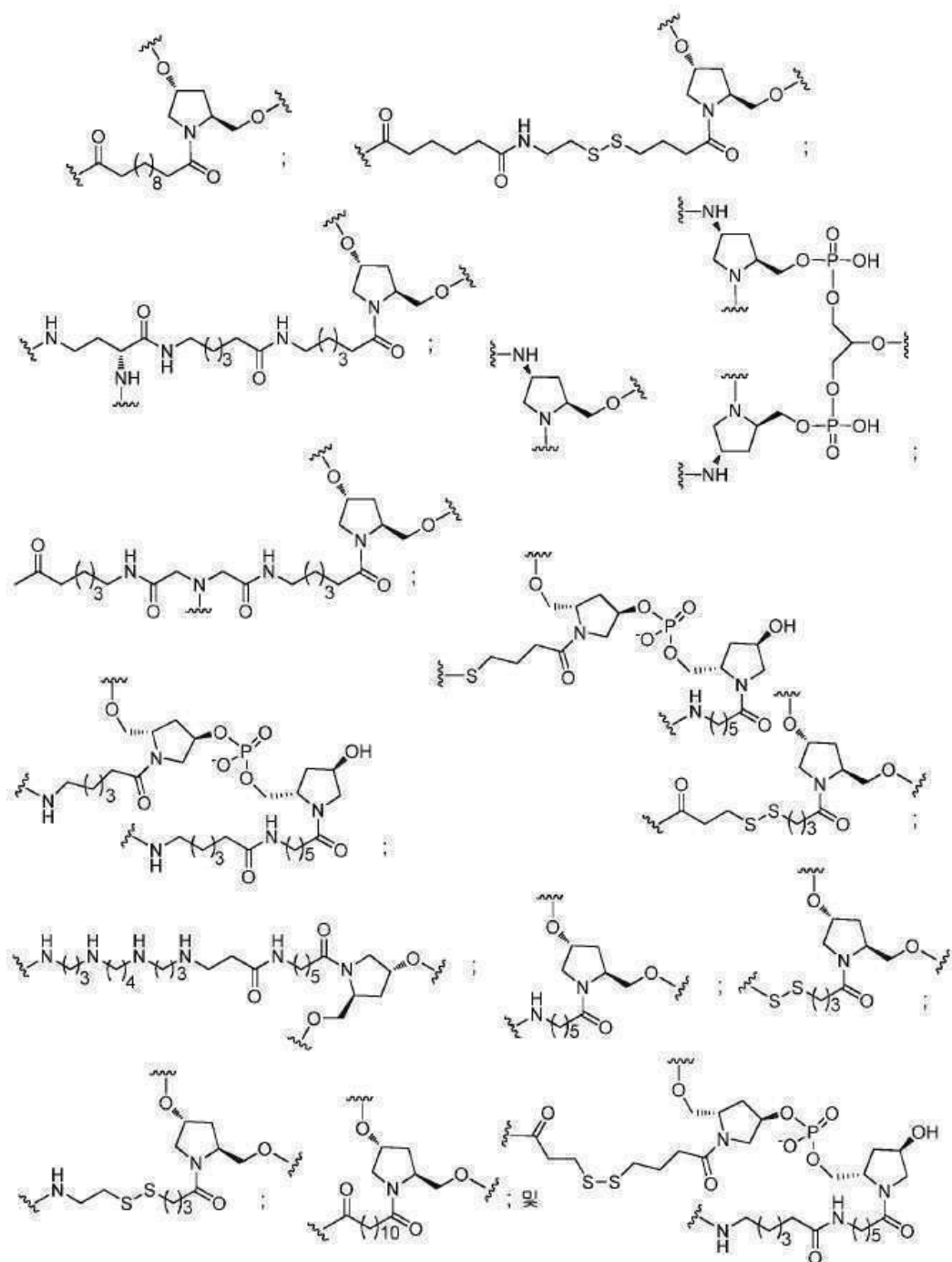


여기서 각각의 n 은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[구현예 279]

[2764]

구현예 202 내지 277 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



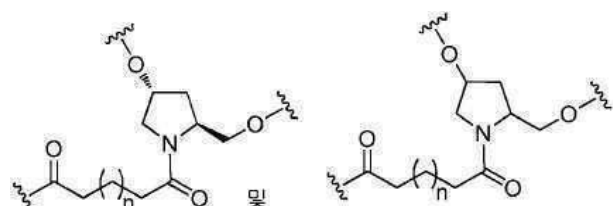
[2765]

[구현예 280]

[2766]

[2767]

구현예 202 내지 277 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:

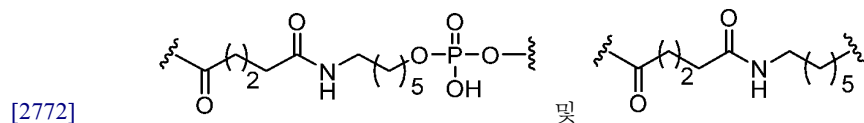


[2768]

[2769] 여기서 n은 1 내지 20이다.

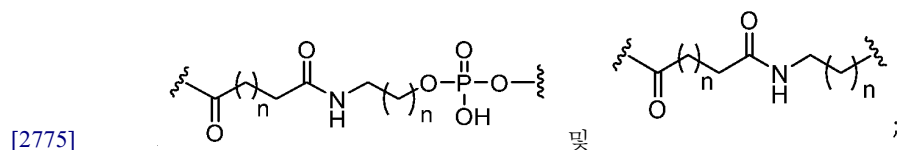
[2770] [구현예 281]

[2771] 구현예 202 내지 277 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



[2773] [구현예 282]

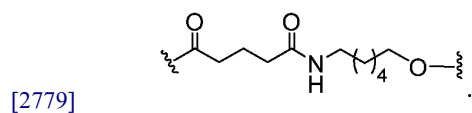
[2774] 구현예 202 내지 277 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



[2776] 여기서 각각의 n은 독립적으로, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7이다.

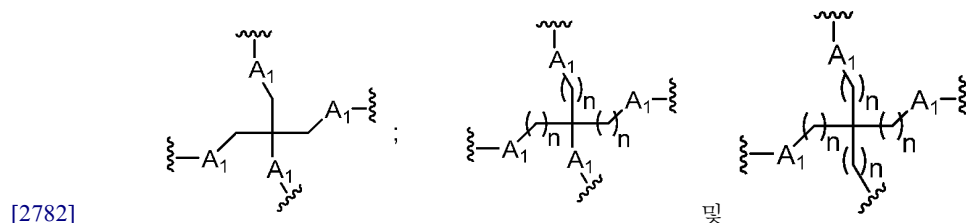
[2777] [구현예 283]

[2778] 구현예 202 내지 277 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 링커는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2780] [구현예 284]

[2781] 구현예 202 내지 283 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조 중 하나를 갖는 화합물:

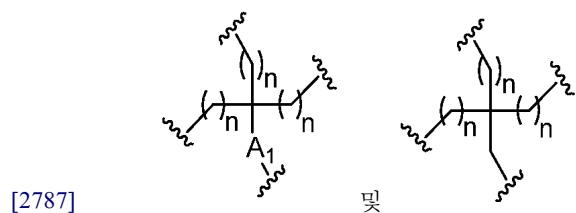


[2783] 여기서 각각의 A₁은 독립적으로, O, S, C=O 또는 NH이고; 그리고

[2784] 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[2785] [구현예 285]

[2786] 구현예 202 내지 283 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조 중 하나를 갖는 화합물:

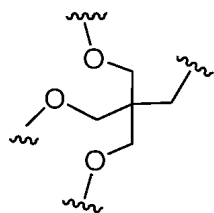


[2788] 여기서 각각의 A₁은 독립적으로, O, S, C=O 또는 NH이고; 그리고

[2789] 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[2790] [구현예 286]

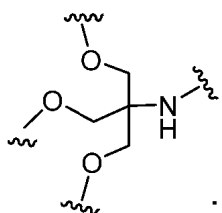
[2791] 구현예 202 내지 283 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2792]

[2793] [구현예 287]

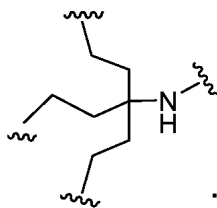
[2794] 구현예 202 내지 283 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2795]

[2796] [구현예 288]

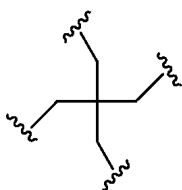
[2797] 구현예 202 내지 283 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2798]

[2799] [구현예 289]

[2800] 구현예 202 내지 283 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조를 갖는 화합물:



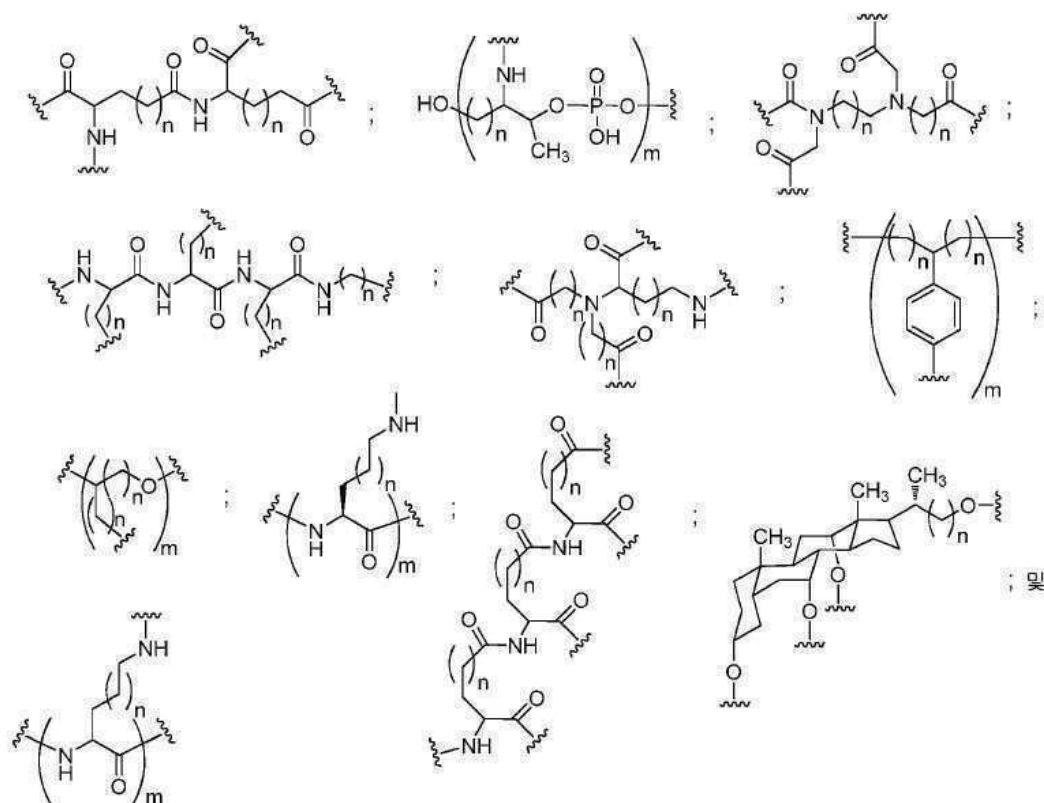
[2801]

[2802] [구현예 290]

[2803] 구현예 202 내지 283 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 에테르를 포함하는 화합물.

[2804] [구현예 291]

[2805] 구현예 202 내지 283 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조를 갖는 화합물:



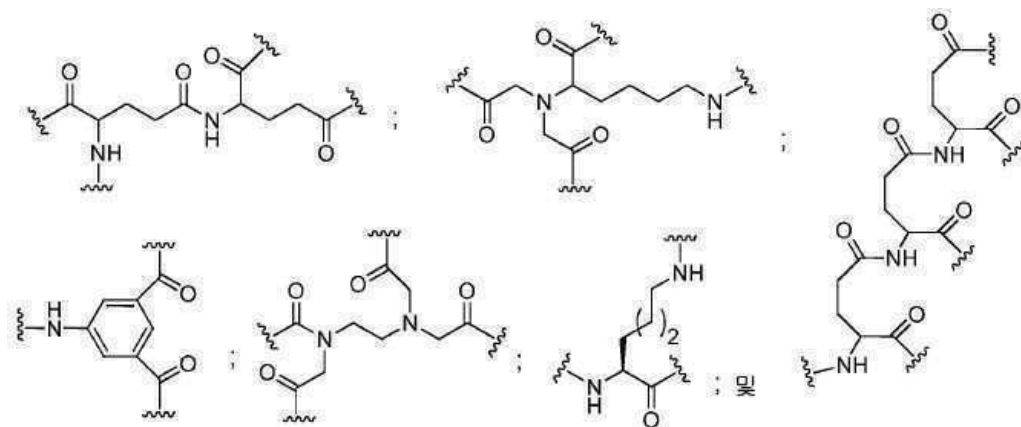
[2806]

[2807] 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고; 그리고

[2808] m은 2 내지 6이다.

[2809] [구현예 292]

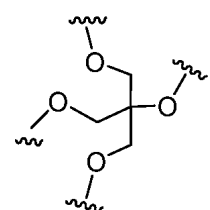
[2810] 구현예 202 내지 283 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2811]

[2812] [구현예 293]

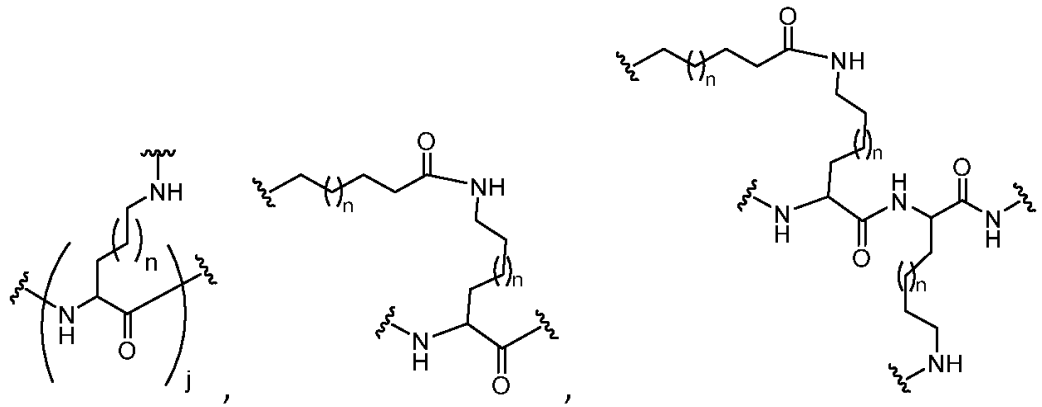
[2813] 구현예 202 내지 283 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기 구조를 갖는 화합물:



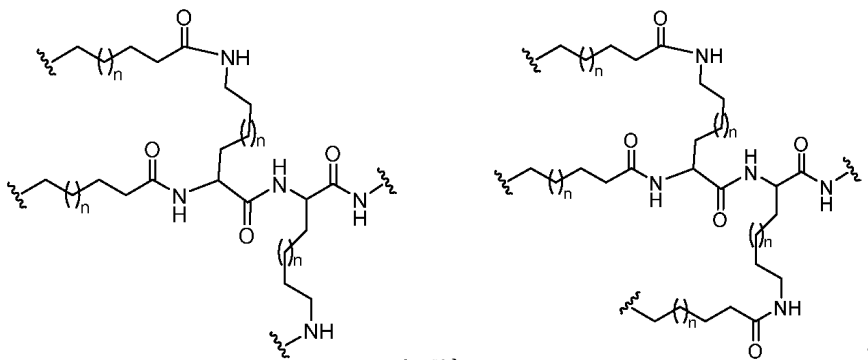
[2814]

[2815] [구현예 294]

[2816] 구현예 202 내지 283 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2817]



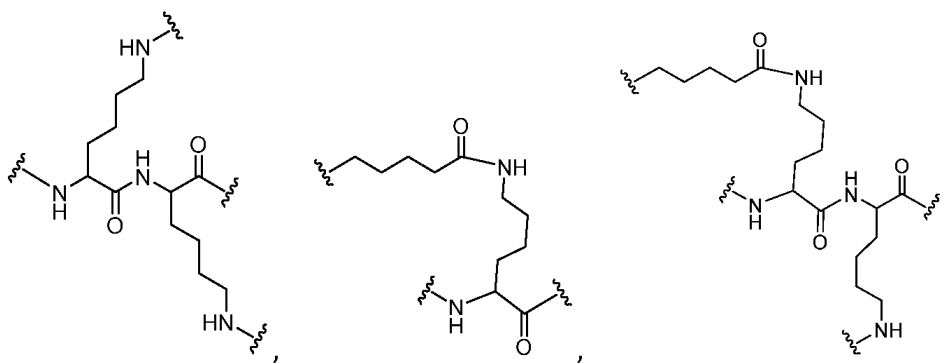
[2818] , 또는 ;

[2819] 여기서 각각의 j는 정수 1 내지 3이고; 그리고

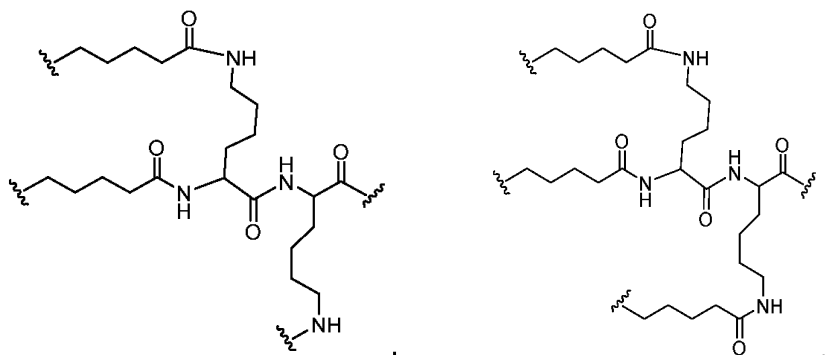
[2820] 여기서 각각의 n은 정수 1 내지 20이다.

[2821] [구현예 295]

[2822] 구현예 202 내지 283 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분지화 기는 하기를 포함하는 화합물:



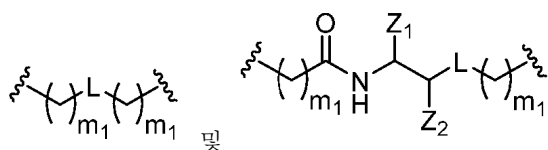
[2823]



[2824] , 또는 .

[2825] [구현예 296]

[2826] 구현예 202 내지 295 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 테더는 하기 중으로부터 선택되는 화합물:



[2827] 및

[2828] 여기서 L은 인 연결 기 및 중성 연결 기로부터 선택되고;

[2829] Z₁은 C(=O)O-R₂이고;

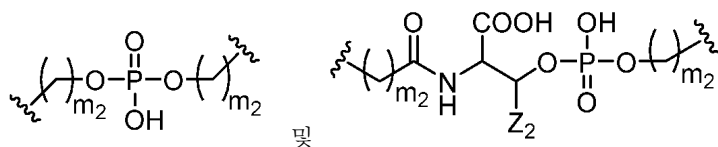
[2830] Z₂는 H, C₁-C₆알킬 또는 치환된 C₁-C₆알킬이고;

[2831] R₂는 H, C₁-C₆알킬 또는 치환된 C₁-C₆알킬이고; 그리고

[2832] 각각의 m₁은, 독립적으로, 0 내지 20이고, 여기서 적어도 하나의 m₁은 각각의 테더에 대해 0 초과이다.

[2833] [구현예 297]

[2834] 구현예 202 내지 295 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 테더는 하기 중으로부터 선택되는 화합물:



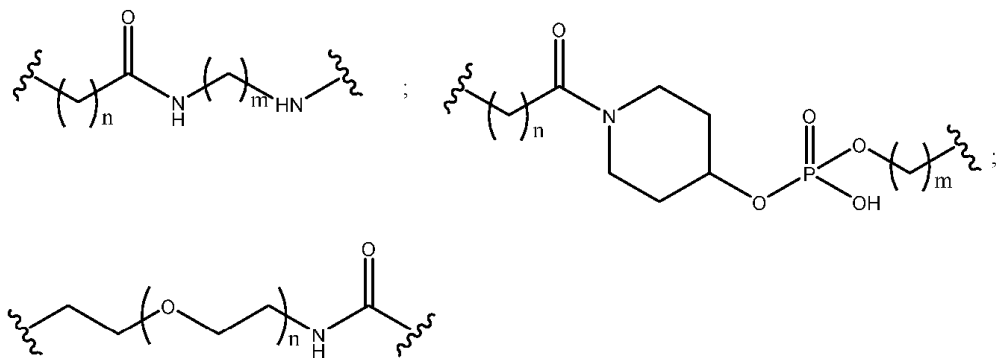
[2835] 및

[2836] 여기서 Z₂는 H 또는 CH₃이고; 그리고

[2837] 각각의 m₂은, 독립적으로, 0 내지 20이고, 여기서 적어도 하나의 m₂은 각각의 테더에 대해 0 초과이다.

[2838] [구현예 298]

[2839] 구현예 202 내지 295 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 테더는 하기 중으로부터 선택되는 화합물:



[2840]

[2841] 여기서 n 은 1 내지 12이고; 그리고

[2842] 여기서 m 은 1 내지 12이다.

[2843] [구현예 299]

[2844] 구현예 202 내지 295 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 테더는 에틸렌 글리콜을 포함하는 화합물.

[2845] [구현예 300]

[2846] 구현예 202 내지 295 또는 297 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 테더는 아미드를 포함하는 화합물.

[2847] [구현예 301]

[2848] 구현예 202 내지 295 또는 297 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 테더는 폴리아미드를 포함하는 화합물.

[2849] [구현예 302]

[2850] 구현예 202 내지 295 또는 297 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 테더는 아민을 포함하는 화합물.

[2851] [구현예 303]

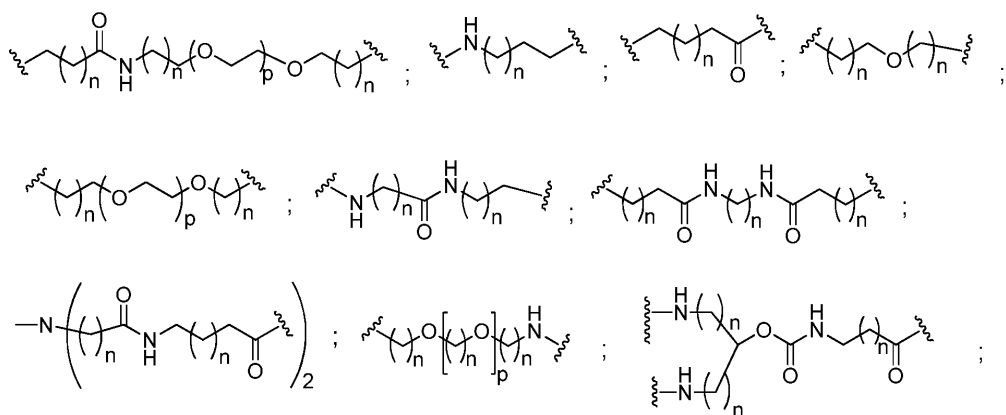
[2852] 구현예 202 내지 295 또는 297 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2 개의 테더는 서로 상이한 것인 화합물.

[2853] [구현예 304]

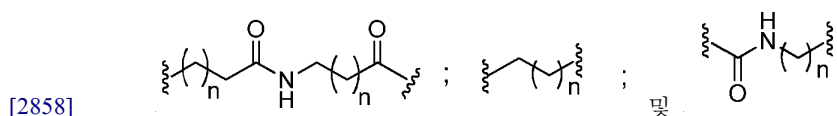
[2854] 구현예 202 내지 295 또는 297 중 어느 한 항에 있어서, 모든 테더는 서로 동일한 것인 화합물.

[2855] [구현예 305]

[2856] 구현예 202 내지 304 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 테더는 하기 중으로부터 선택되는 화합물:



[2857]



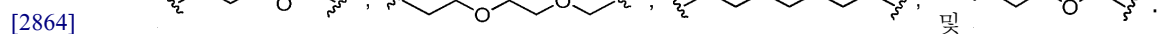
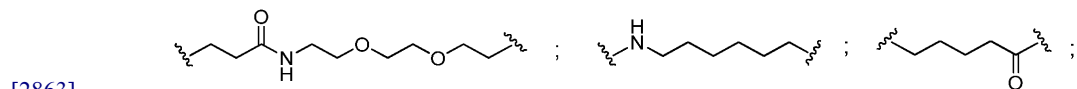
[2858]

[2859] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고; 그리고

[2860] 각각의 p는 1 내지 약 6이다.

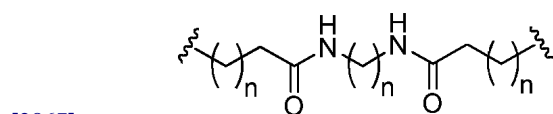
[2861] [구현예 306]

[2862] 구현예 202 내지 304 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 테더는 하기 중으로부터 선택되는 화합물:



[2865] [구현예 307]

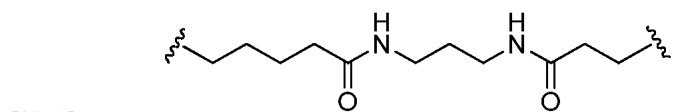
[2866] 구현예 202 내지 304 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 테더는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2868] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

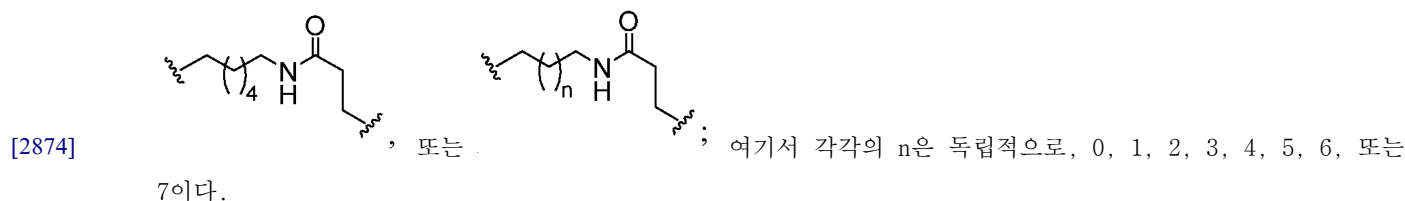
[2869] [구현예 308]

[2870] 구현예 202 내지 304 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 테더는 하기 구조를 갖는 화합물:



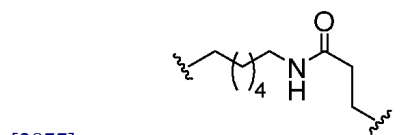
[2872] [구현예 309]

[2873] 구현예 202 내지 304 중 어느 한 항에 있어서, 상기 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



[2875] [구현예 310]

[2876] 구현예 202 내지 304 중 어느 한 항에 있어서, 상기 테더는 하기 중으로부터 선택된 구조를 갖는 화합물:



[2878] [구현예 311]

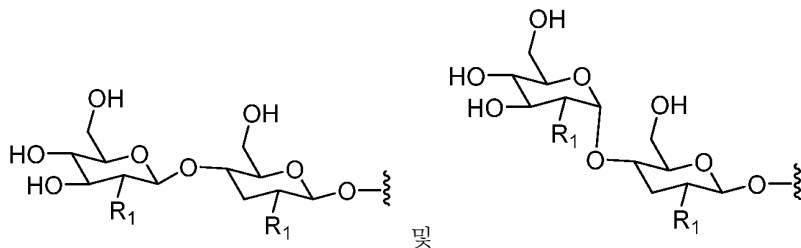
[2879] 구현예 202 내지 310 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드는 갈락토오스인 화합물.

[2880] [구현예 312]

[2881] 구현예 202 내지 310 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드는 만노스-6-포스페이트인 화합물.

[2882] [구현예 313]

[2883] 구현예 202 내지 310 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 리간드는 하기 중으로부터 선택되는 화합물:

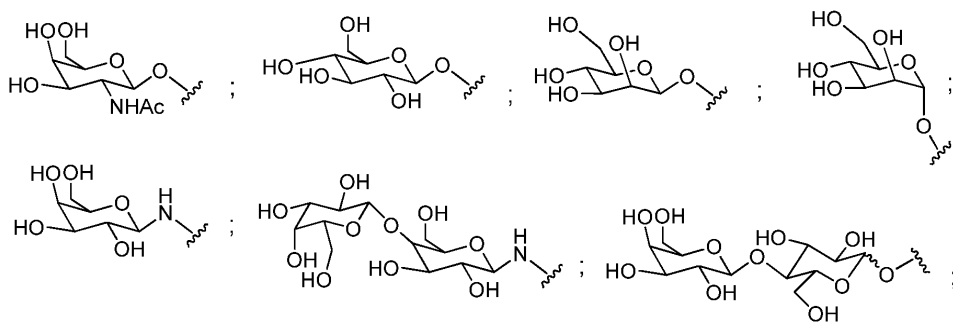


[2884] 및

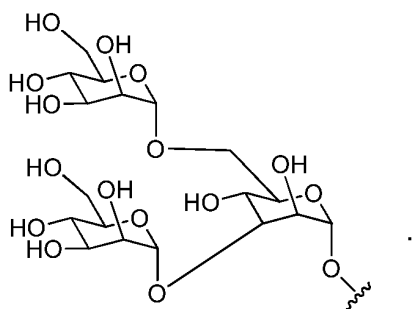
[2885] 여기서 각각의 R₁은 OH 및 NHCOOH로부터 선택된다.

[2886] [구현예 314]

[2887] 구현예 202 내지 310 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 리간드는 하기 중으로부터 선택되는 화합물:



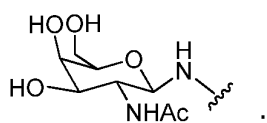
[2888] 및



[2889]

[2890] [구현예 315]

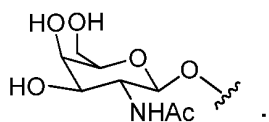
[2891] 구현예 202 내지 310 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 리간드는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2892]

[2893] [구현예 316]

[2894] 구현예 202 내지 310 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 리간드는 하기 구조를 갖는 접합된 안티센스 화합물:



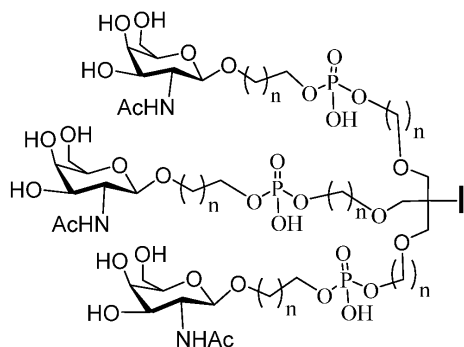
[2895]

[2896] [구현예 317]

[2897] 구현예 202 내지 317 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 세포-표적화 모이어티를 포함하는 화합물.

[2898] [구현예 318]

[2899] 구현예 317에 있어서, 상기 접합체 기는 하기 구조를 갖는 세포-표적화 모이어티를 포함하는 화합물:

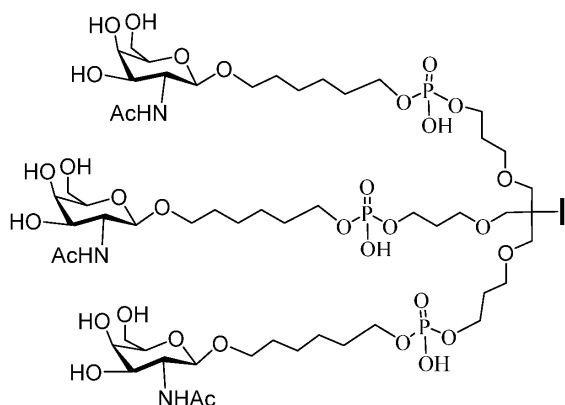


[2900]

[2901] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[2902] [구현예 319]

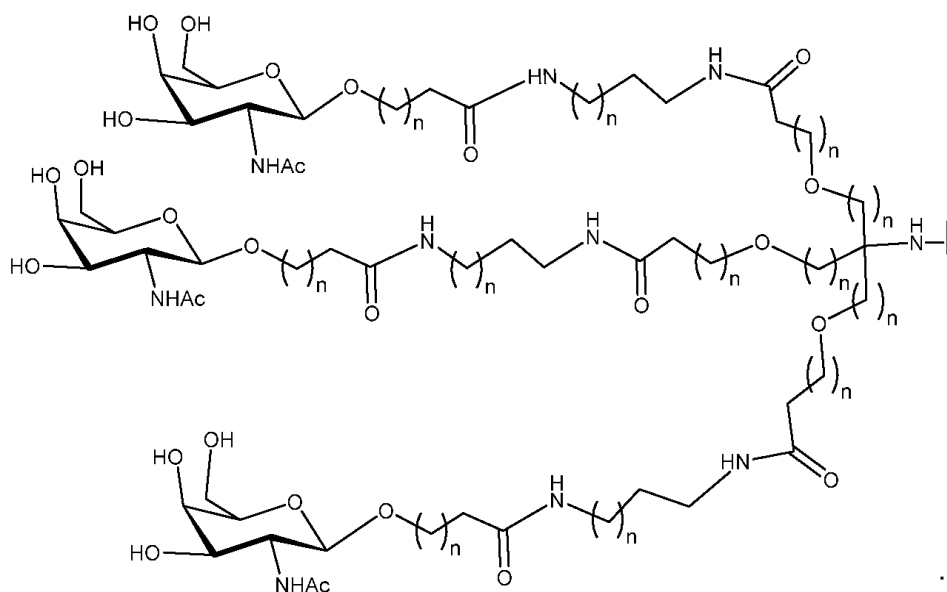
[2903] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2904]

[2905] [구현예 320]

[2906] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:

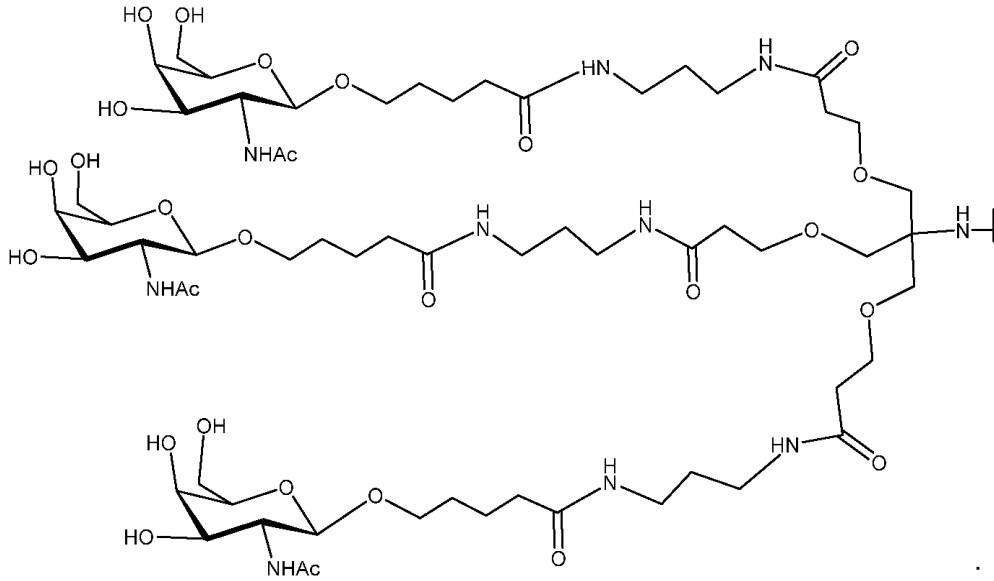


[2907]

[2908] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이다.

[2909] [구현예 321]

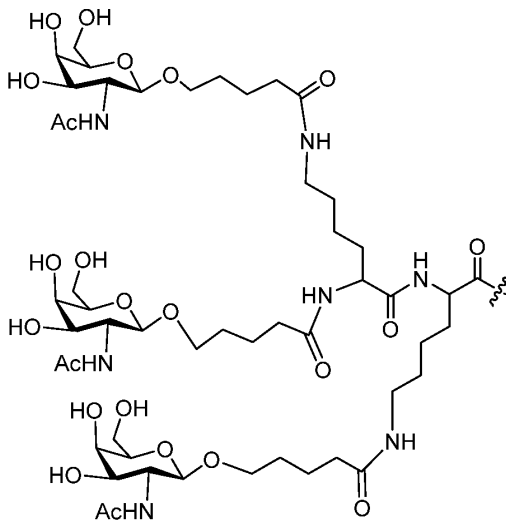
[2910] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2911]

[2912] [구현예 322]

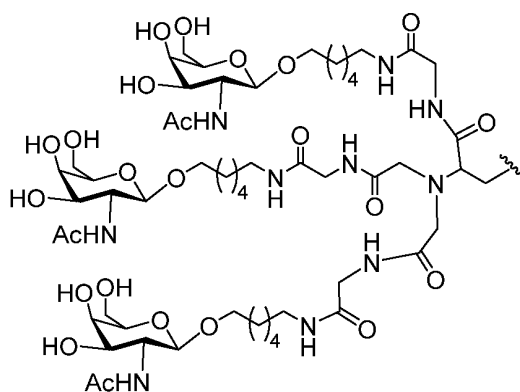
[2913] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



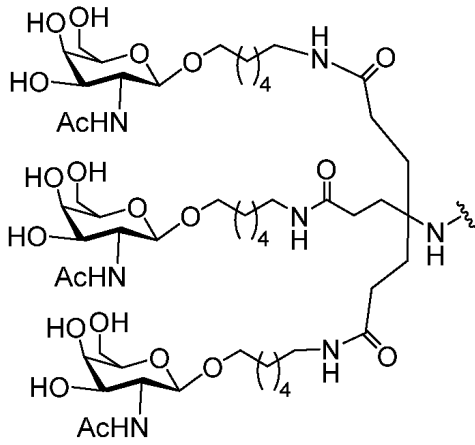
[2914]

[2915] [구현예 323]

[2916] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



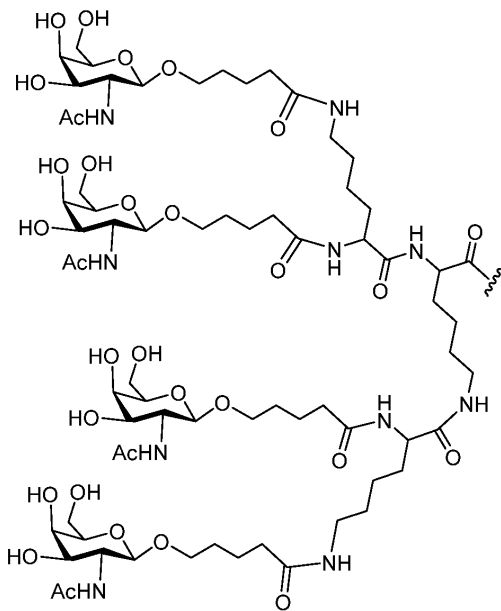
[2917]



[2929]

[2930] [구현예 328]

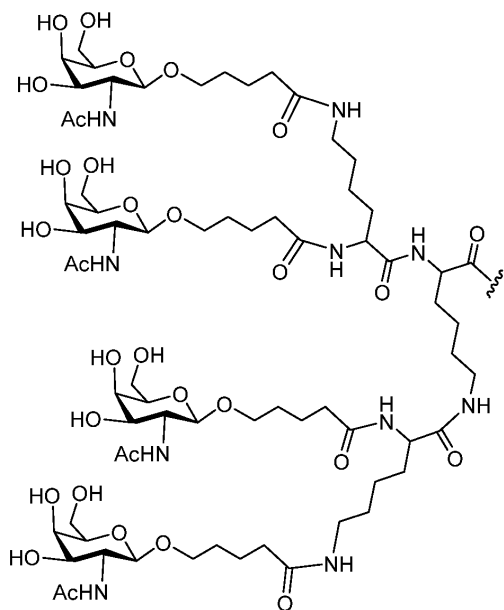
[2931] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2932]

[2933] [구현예 329]

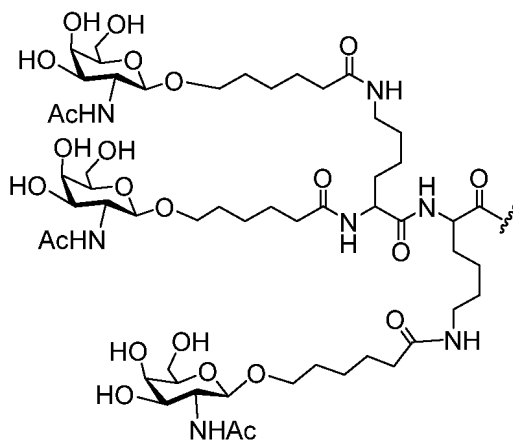
[2934] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2935]

[2936] [구현예 330]

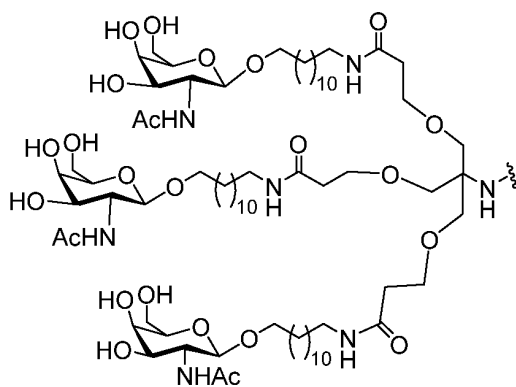
[2937] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2938]

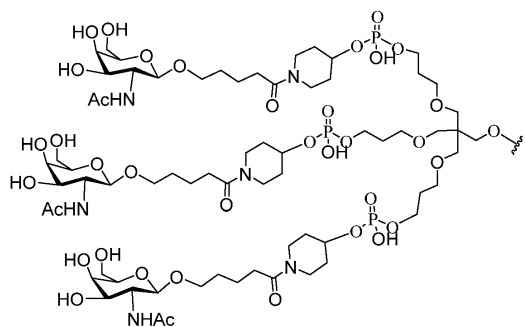
[2939] [구현예 331]

[2940] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2941]

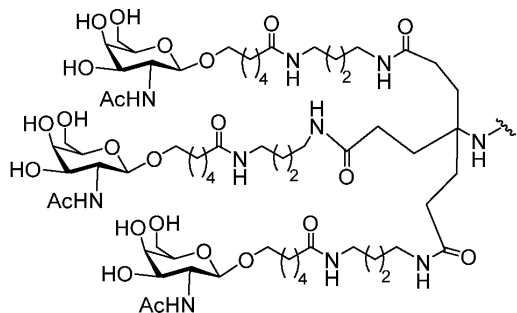
[2942] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2943]

[2944] [구현예 332]

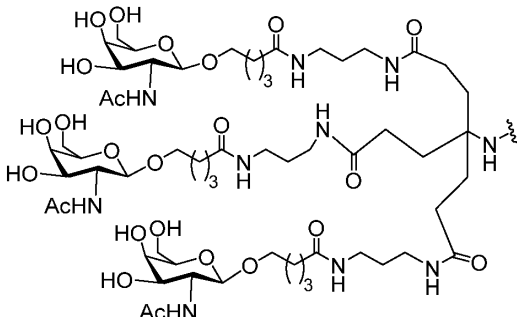
[2945] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2946]

[2947] [구현예 333]

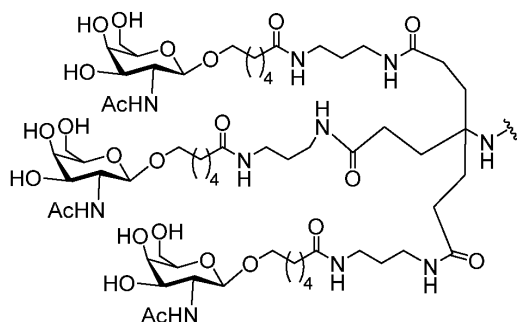
[2948] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2949]

[2950] [구현예 334]

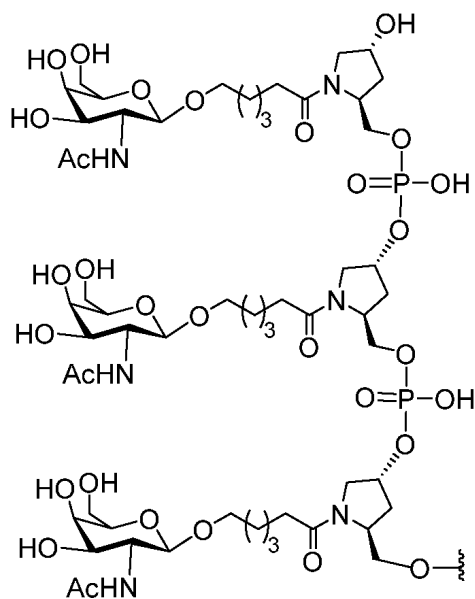
[2951] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2952]

[2953] [구현예 335]

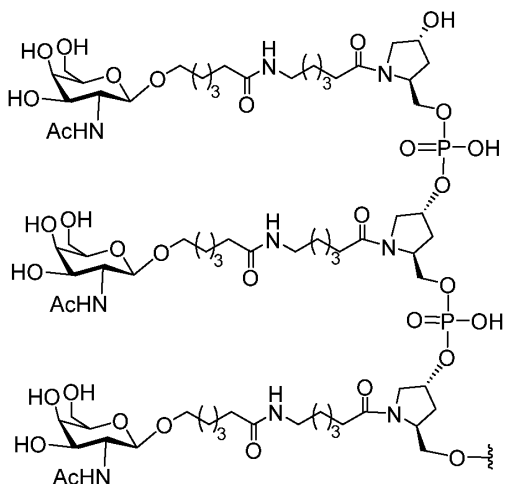
[2954] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2955]

[구현예 336]

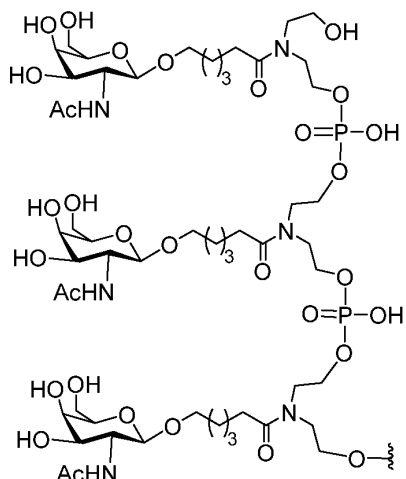
[2957] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2958]

[구현예 337]

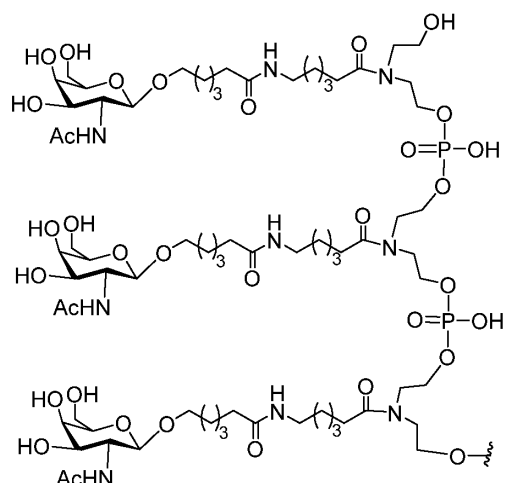
[2960] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2961]

[2962] [구현예 338]

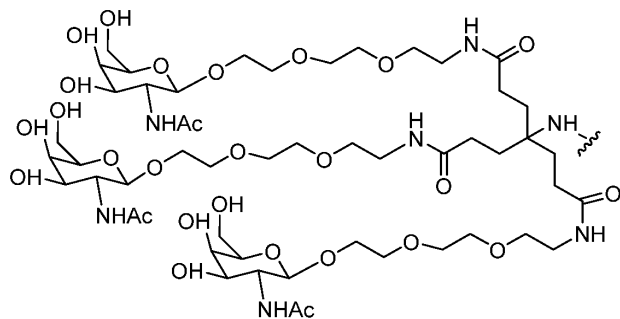
[2963] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2964]

[2965] [구현예 339]

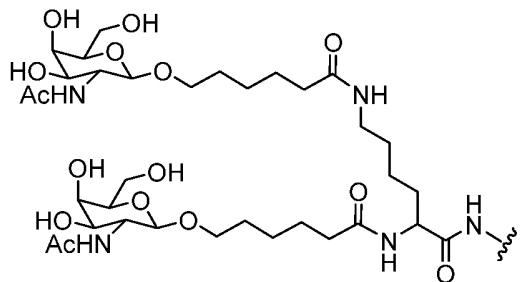
[2966] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2967]

[2968] [구현예 340]

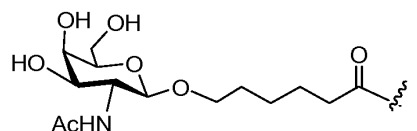
[2969] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:



[2970]

[2971] [구현예 341]

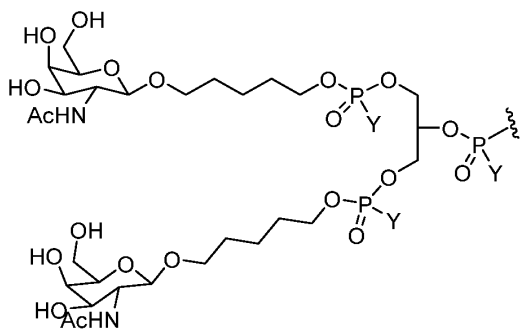
[2972] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:



[2973]

[2974] [구현예 342]

[2975] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기를 포함하는 화합물:

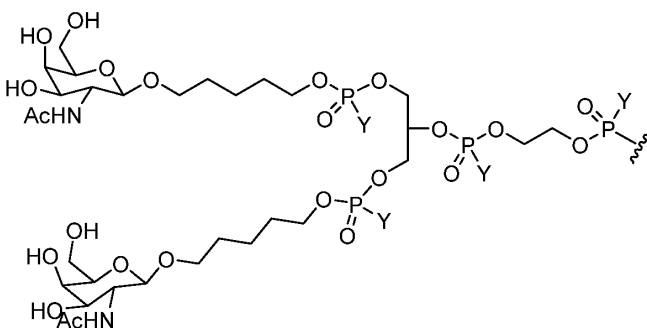


[2976]

[2977] 여기서 각각의 Y는 O, S, 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀알킬, 아미노, 치환된 아미노, 아지도, 알케닐 또는 알킬닐로부터 선택된다.

[2978] [구현예 343]

[2979] 구현예 202 내지 317 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:

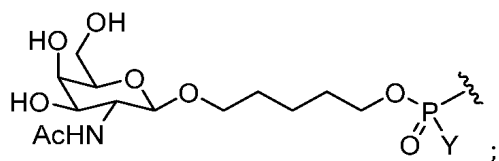


[2980]

[2981] 여기서 각각의 Y는 O, S, 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀알킬, 아미노, 치환된 아미노, 아지도, 알케닐 또는 알킬닐로부터 선택된다.

[2982] [구현예 344]

[2983] 구현예 317에 있어서, 상기 세포-표적화 모이어티는 하기 구조를 갖는 화합물:

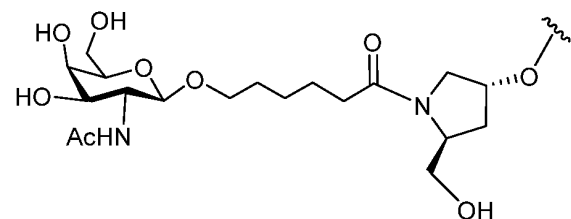


[2984]

[2985] 여기서 각각의 Y는 O, S, 치환된 또는 비치환된 C_1 - C_{10} 알킬, 아미노, 치환된 아미노, 아지도, 알케닐 또는 알킬로부터 선택된다.

[2986] [구현예 345]

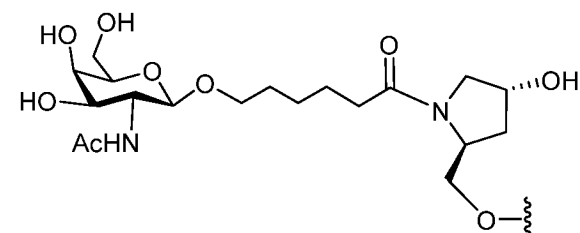
[2987] 구현예 202 내지 317 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2988]

[2989] [구현예 346]

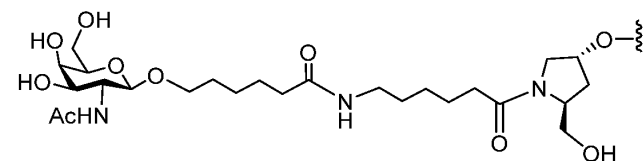
[2990] 구현예 202 내지 317 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2991]

[2992] [구현예 347]

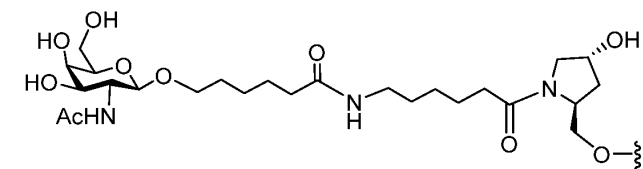
[2993] 구현예 202 내지 317 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[2994]

[2995] [구현예 348]

[2996] 구현예 202 내지 317 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:

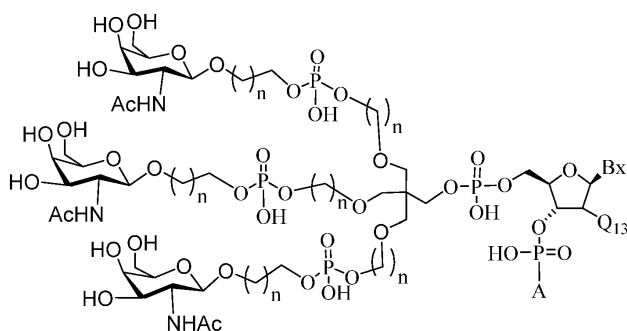


[2997]

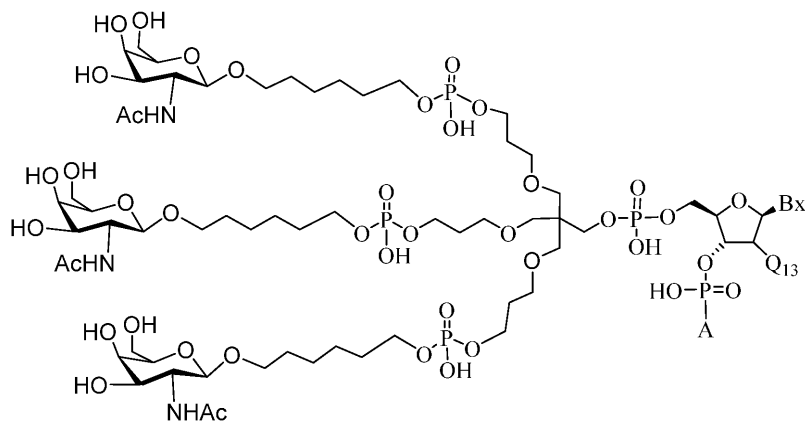
[2998] [구현예 349]

[2999] 구현예 202 내지 348 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기 중으로부터 선택된 절단가능 모이어티를 포함하는 화합물: 포스포디에스테르, 아마이드, 테옥시뉴클레오사이드, 또는 에스테르.

- [3000] [구현예 350]
- [3001] 구현예 202 내지 348 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 포스포디에스테르 절단가능 모이어티를 포함하는 화합물.
- [3002] [구현예 351]
- [3003] 구현예 202 내지 348 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 절단가능 모이어티를 포함하지 않고, 상기 접합체 기는 접합체 기와 올리고뉴클레오타이드 사이의 포스포로티오에이트 연결을 포함하는 화합물.
- [3004] [구현예 352]
- [3005] 구현예 202 내지 351 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 아미드 절단가능 모이어티를 포함하는 화합물.
- [3006] [구현예 353]
- [3007] 구현예 202 내지 351 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 에스테르 절단가능 모이어티를 포함하는 화합물.
- [3008] [구현예 354]
- [3009] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



- [3010]
- [3011] 여기서 각각의 n 은, 독립적으로, 1 내지 20이고;
- [3012] Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;
- [3013] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고
- [3014] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.
- [3015] [구현예 355]
- [3016] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



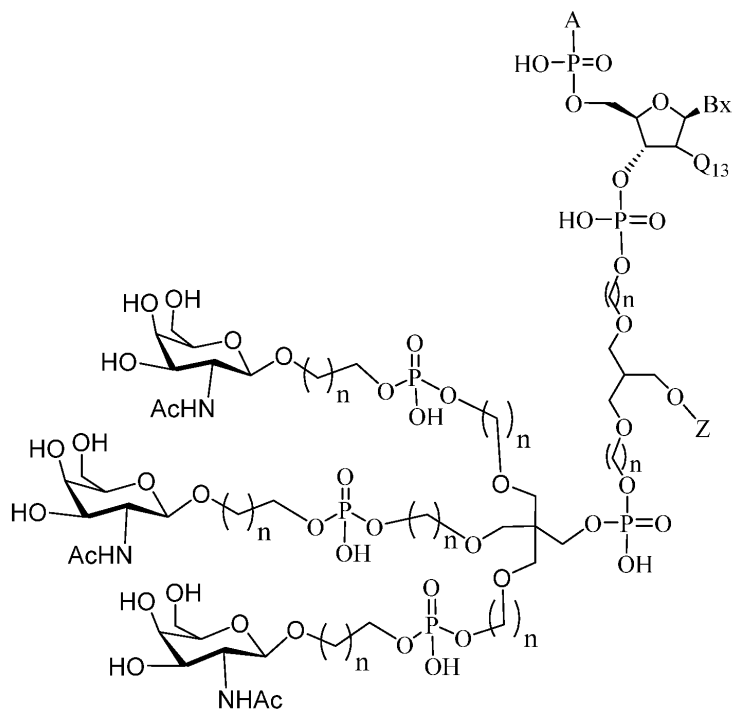
- [3017]
- [3018] 여기서 각각의 n 은, 독립적으로, 1 내지 20이고;
- [3019] Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[3020] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[3021] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3022] [구현예 356]

[3023] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[3024]

[3025] 여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고;

[3026] Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

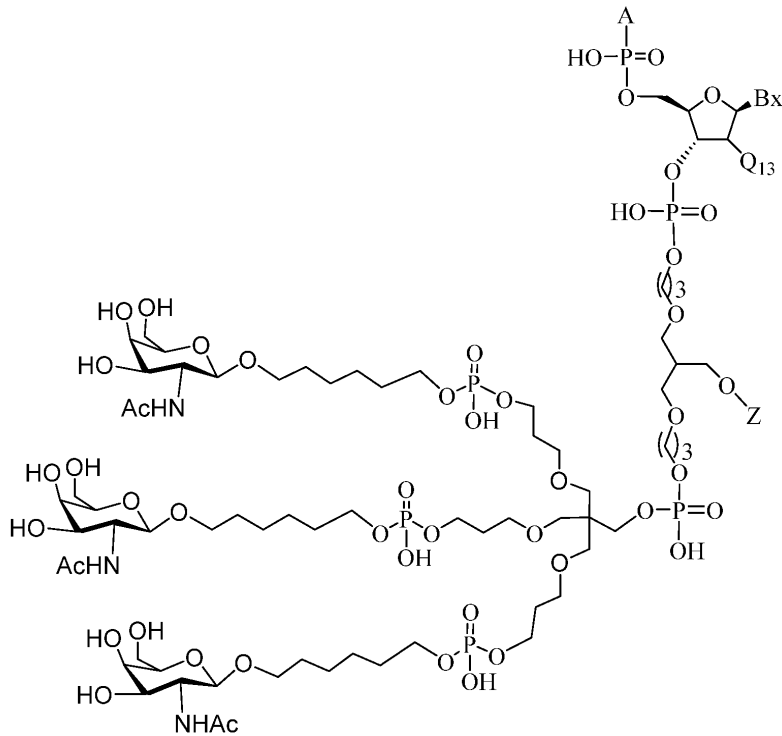
[3027] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[3028] Z는 H 또는 연결된 고형 지지체이고; 그리고

[3029] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3030] [구현예 357]

[3031] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[3032]

[3033]

여기서 각각의 n은, 독립적으로, 1 내지 20이고;

[3034]

Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[3035]

A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고;

[3036]

Z는 H 또는 연결된 고형 지지체이고; 그리고

[3037]

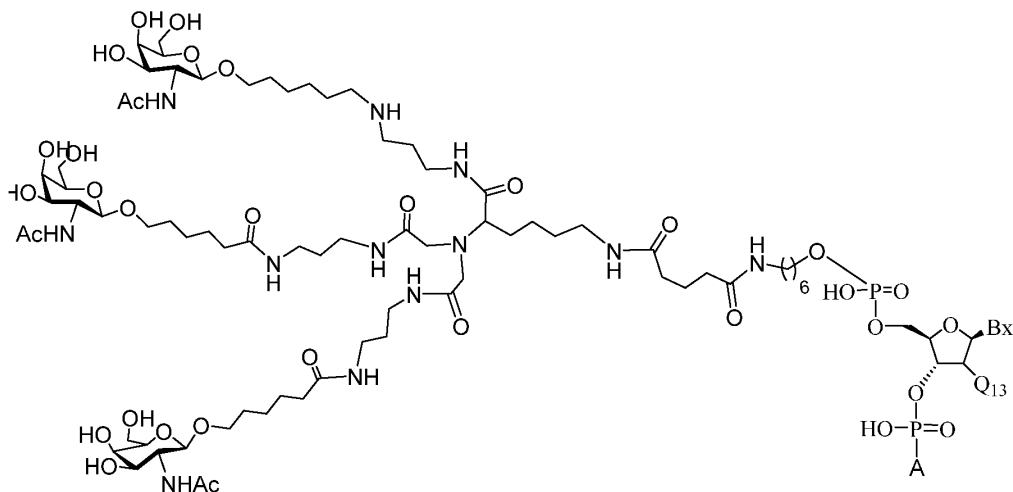
Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3038]

[구현예 358]

[3039]

구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[3040]

[3041]

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

[3042]

A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

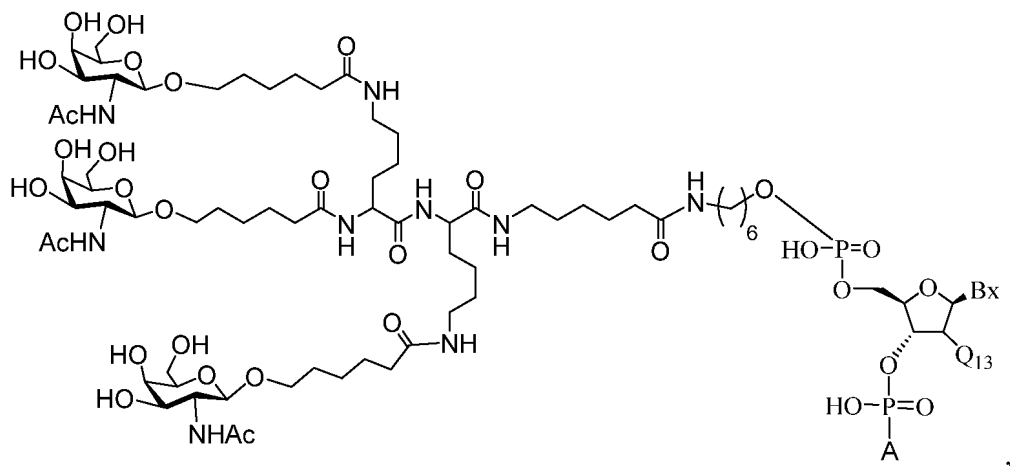
[3043]

Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3044]

[구현예 359]

[3045] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[3046]

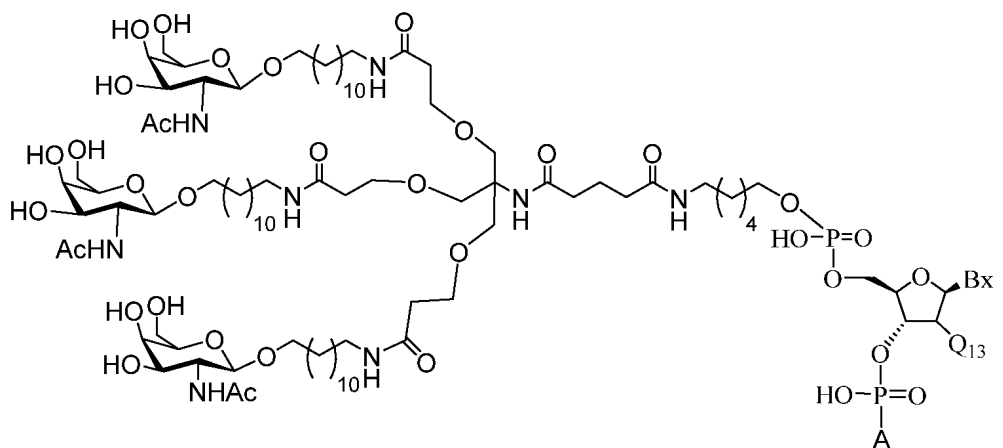
[3047] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{OCH}_3$ 이고;

[3048] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[3049] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3050] [구현예 360]

[3051] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[3052]

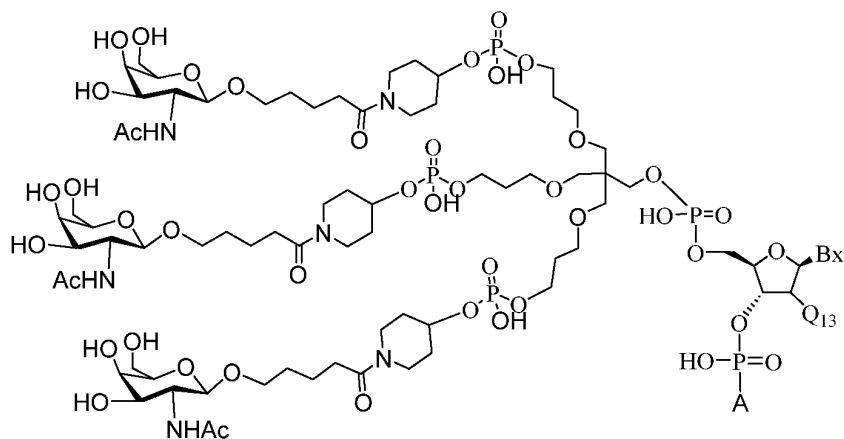
[3053] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{OCH}_3$ 이고;

[3054] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[3055] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3056] [구현예 361]

[3057] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[3058]

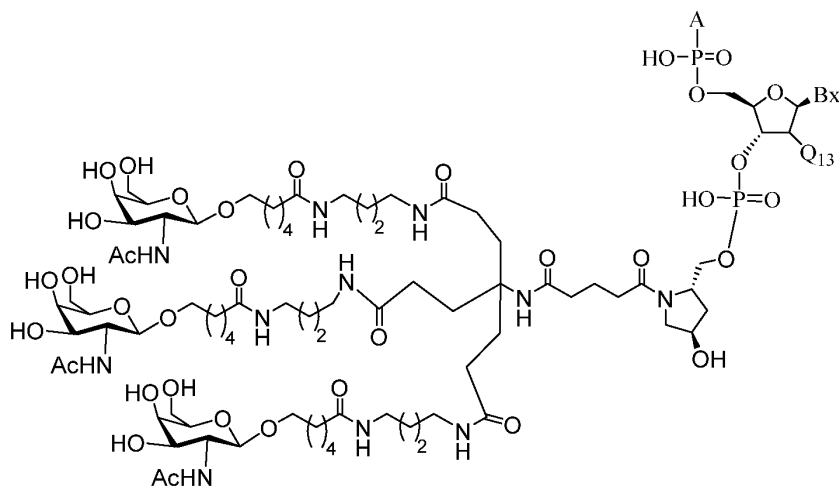
[3059] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[3060] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[3061] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3062] [구현예 362]

[3063] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[3064]

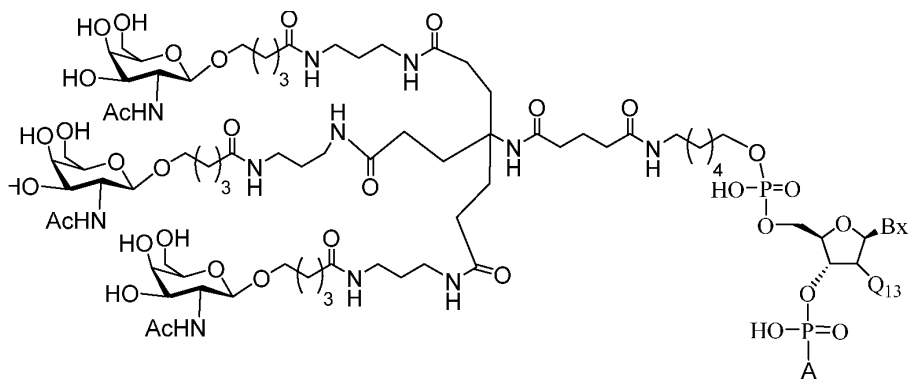
[3065] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[3066] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[3067] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3068] [구현예 363]

[3069] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[3070]

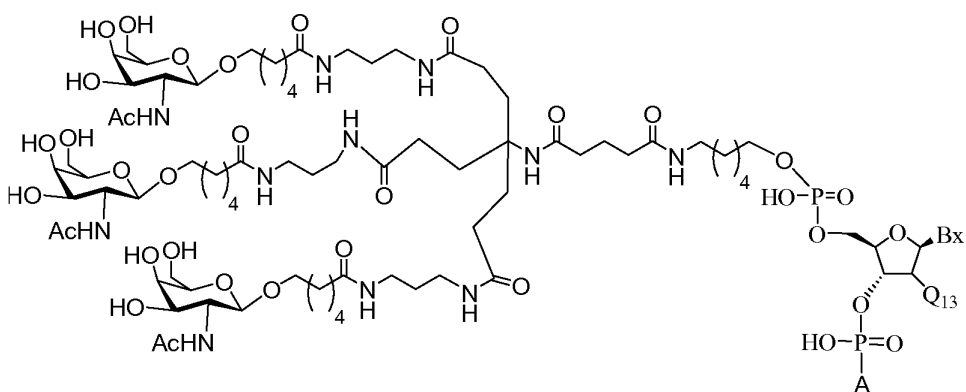
[3071] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[3072] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[3073] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3074] [구현예 364]

[3075] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[3076]

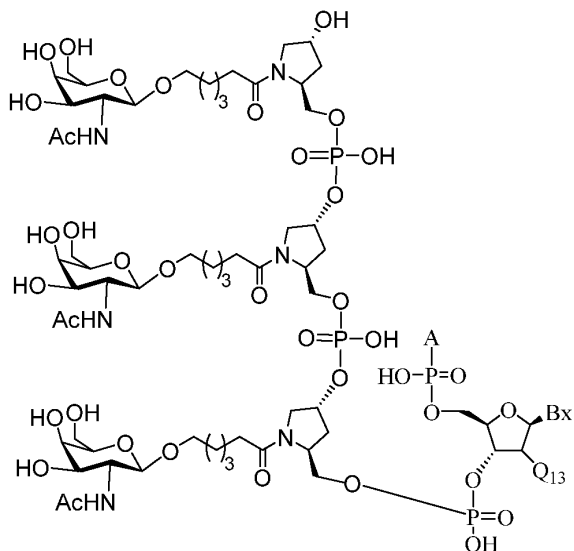
[3077] 여기서 Q₁₃은 H 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이고;

[3078] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[3079] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3080] [구현예 365]

[3081] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[3082]

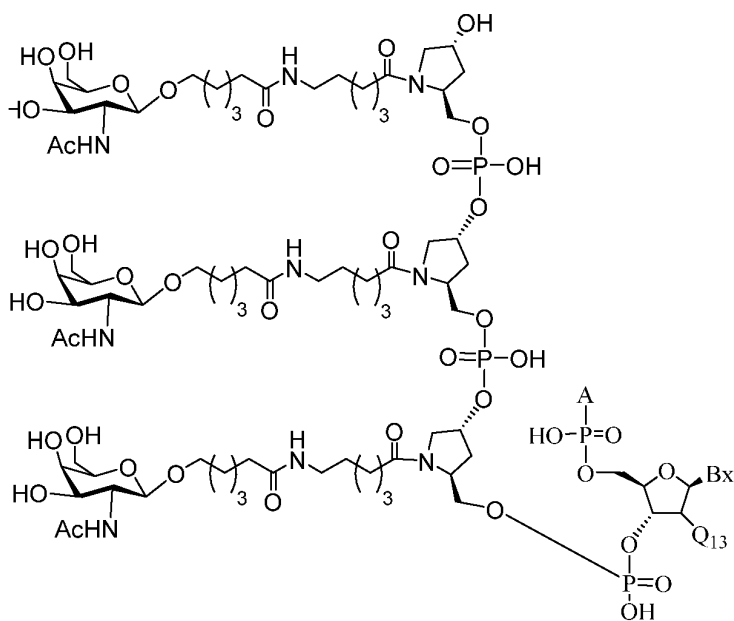
[3083] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[3084] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[3085] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3086] [구현예 366]

[3087] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[3088]

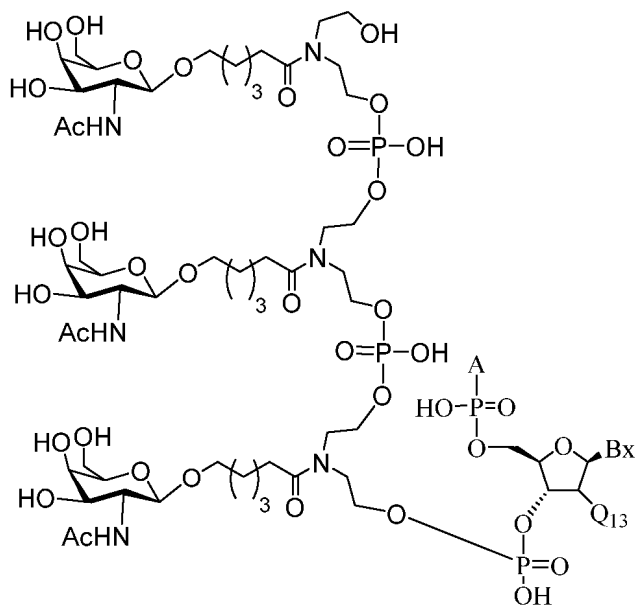
[3089] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[3090] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[3091] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3092] [구현예 367]

[3093] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[3094]

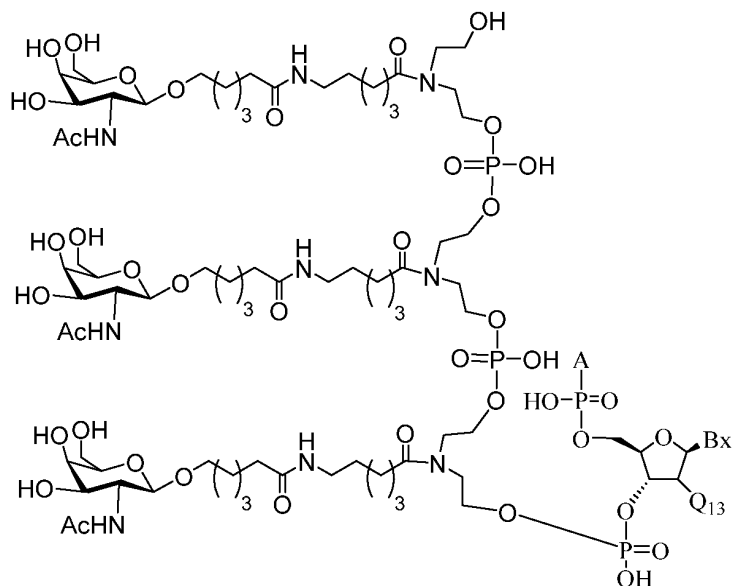
[3095] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[3096] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[3097] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3098] [구현예 368]

[3099] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물:



[3100]

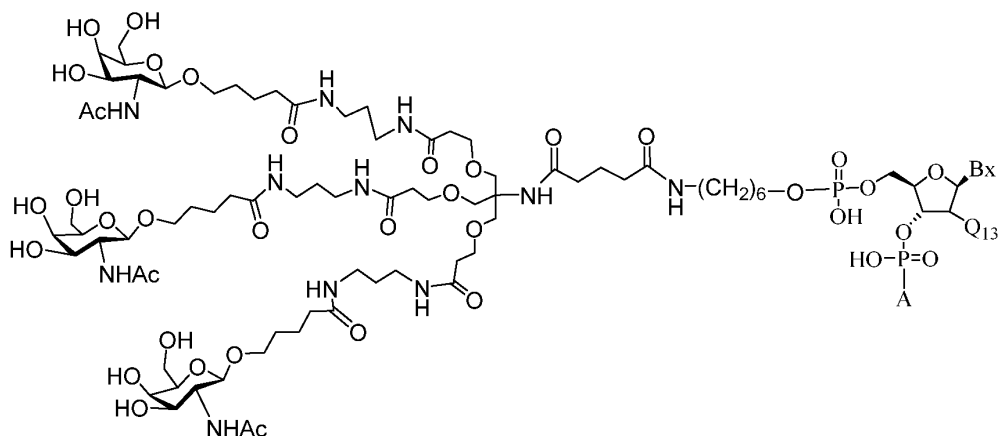
[3101] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[3102] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[3103] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3104] [구현예 369]

[3105] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[3106]

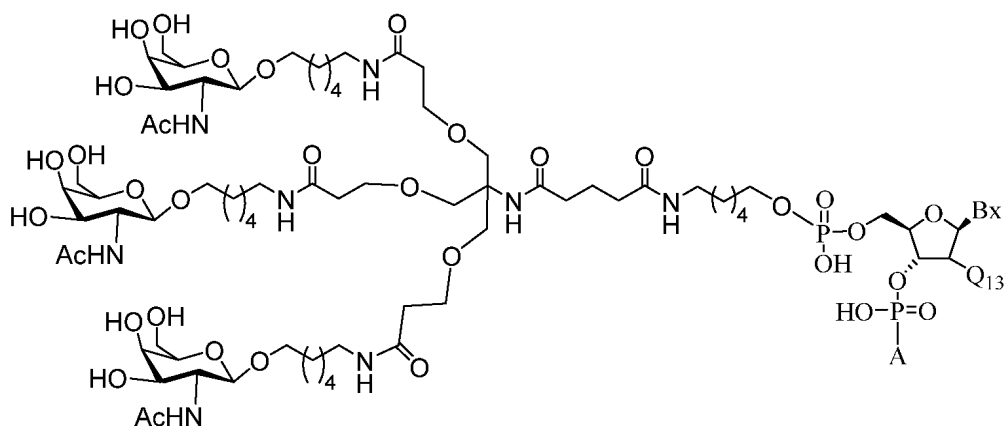
[3107] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[3108] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[3109] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3110] [구현예 370]

[3111] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[3112]

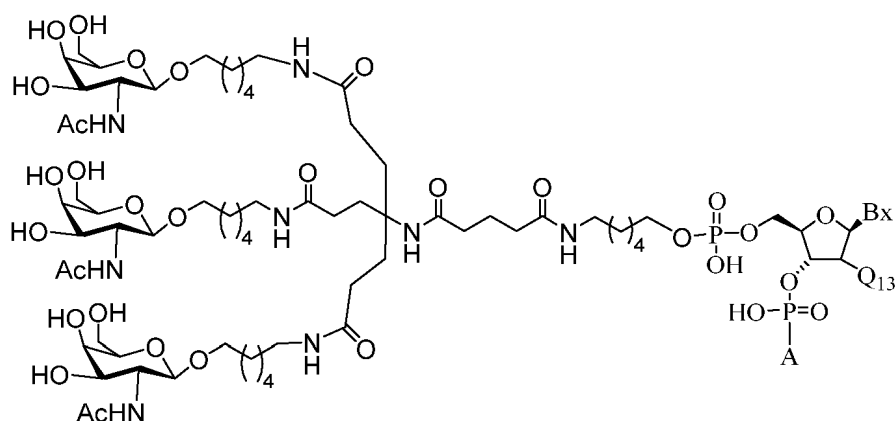
[3113] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[3114] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[3115] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3116] [구현예 371]

[3117] 구현예 202 내지 353 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 기는 하기를 포함하는 화합물:



[3118]

[3119] 여기서 Q_{13} 은 H 또는 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 이고;

[3120] A는 변형된 올리고뉴클레오타이드이고; 그리고

[3121] Bx는 헤테로환 염기 모이어티이다.

[3122] [구현예 372]

[3123] 구현예 354 내지 371 중 어느 한 항에 있어서, Bx는 아데닌, 구아닌, 티민, 우라실, 또는 시토신, 또는 5-메틸 시토신 중으로부터 선택되는 화합물.

[3124] [구현예 373]

[3125] 구현예 354 내지 372 중 어느 한 항에 있어서, Bx는 아데닌인 화합물.

[3126] [구현예 374]

[3127] 구현예 354 내지 372 중 어느 한 항에 있어서, Bx는 티민인 화합물.

[3128] [구현예 375]

[3129] 구현예 354 내지 371 중 어느 한 항에 있어서, Q_{13} 은 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 인 화합물.

[3130] [구현예 376]

[3131] 구현예 354 내지 371 중 어느 한 항에 있어서, Q_{13} 은 H인 화합물.

[3132] [구현예 377]

[3133] 구현예 202 내지 376 중 어느 한 항의 화합물 또는 그것의 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제 중 적어도 하나를 포함하는 조성물.

[3134] [구현예 378]

[3135] 구현예 202 내지 376 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는 전구약물.

[3136] [구현예 379]

[3137] 대상체에서 HBV-관련된 질환, 장애 또는 병태를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 청구항 202 내지 376 중 어느 한 항의 화합물, 청구항 377의 조성물, 또는 청구항 378의 전구약물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 질환, 장애 또는 병태는 황달, 간 염증, 간 섬유증, 염증, 간경변증, 간부전, 간암, 미만성 간세포 염증성 질환, 혈구포식세포 증후군, 혈청 간염, HBV 바이러스혈증, 또는 간 질환-관련된 이식인 방법.

[3138] [구현예 380]

[3139] HBV에 감염된 대상체에서 HBV 항원 수준을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 청구항 202 내지 376 중 어느 한 항의 화합물, 청구항 377의 조성물, 또는 청구항 378의 전구약물을 상기 대상체에게 투여하고, 그렇게 함으

로써 대상체에서 HBV 항원 수준을 감소시키는 것을 포함하는 방법.

[구현예 381]

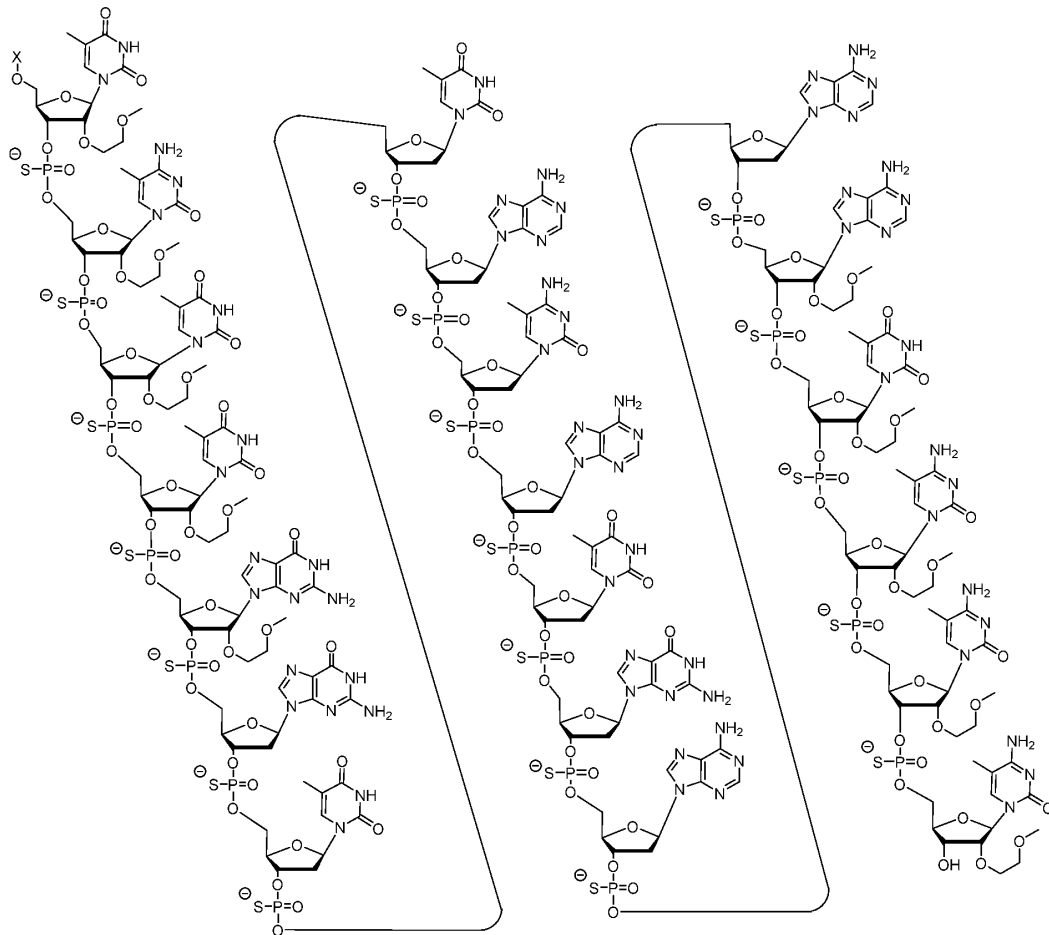
구현예 380에 있어서, 상기 HBV 항원은 HBsAG인 방법.

[구현예 382]

구현예 380에 있어서, 상기 HBV 항원은 HBeAG인 방법.

[구현예 383]

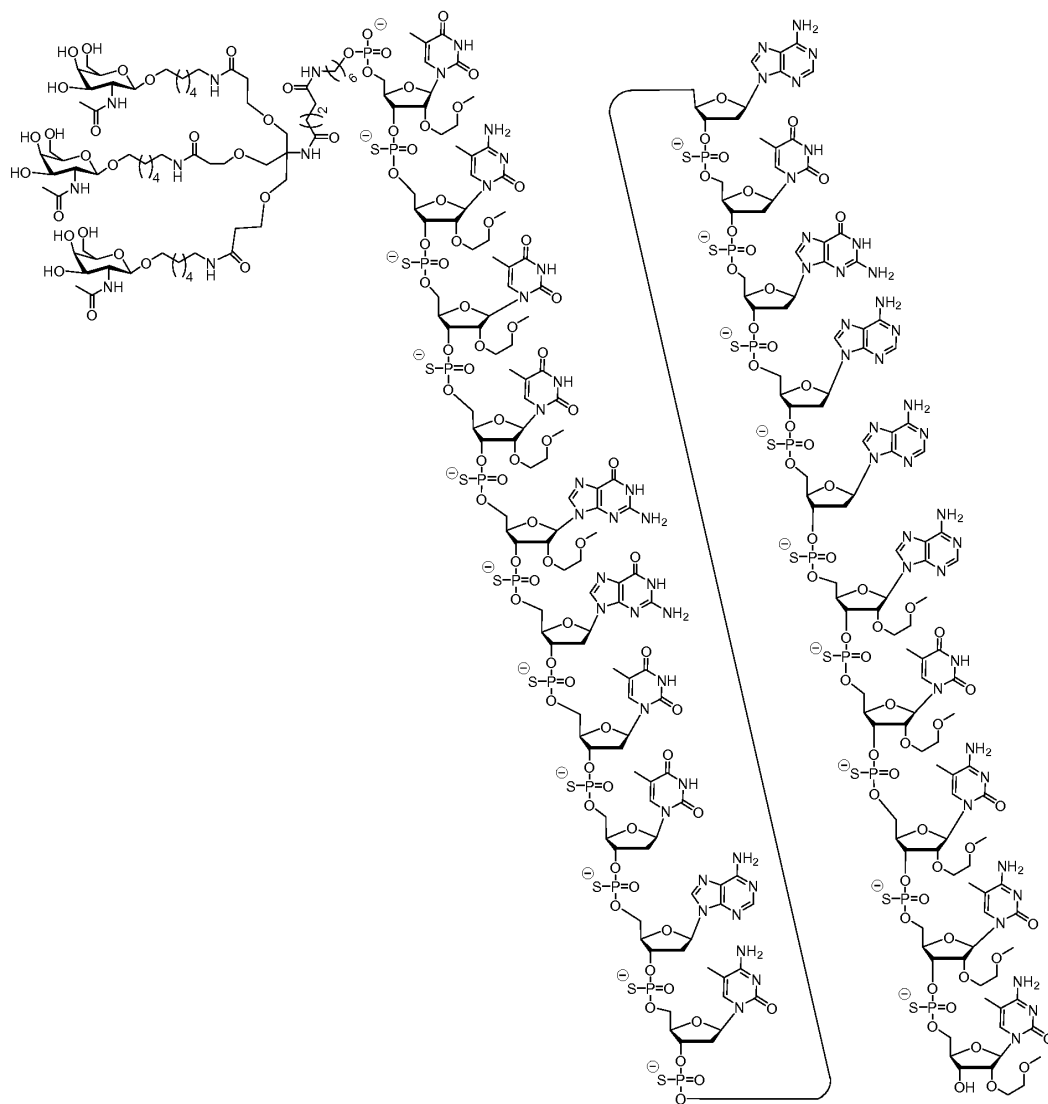
하기 구조를 포함하는 화합물:



여기서 X는 GalNAc를 포함하는 접합체 기이다.

[구현예 384]

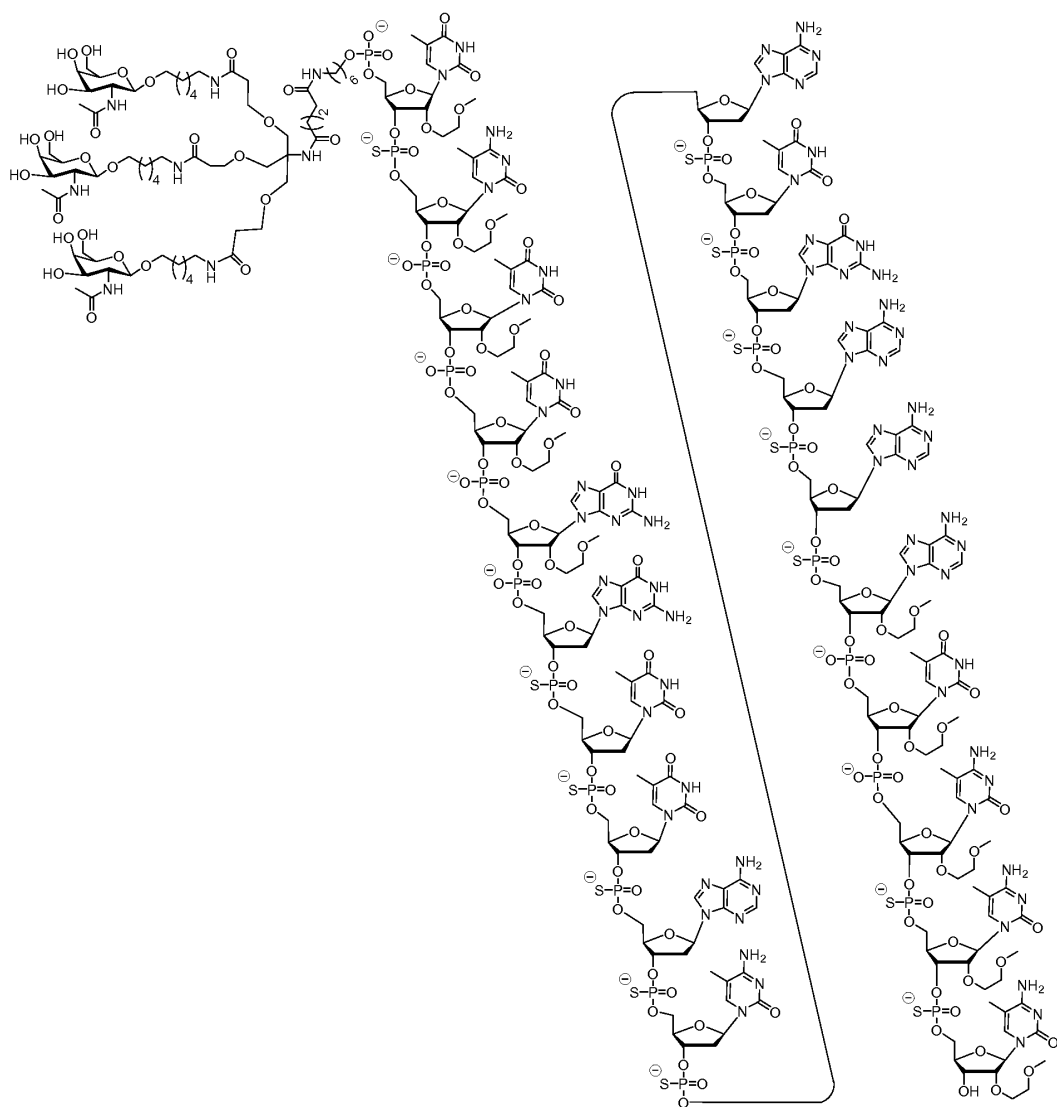
[3149] 하기 구조를 포함하는 화합물:



[3150]

[3151] [구현예 385]

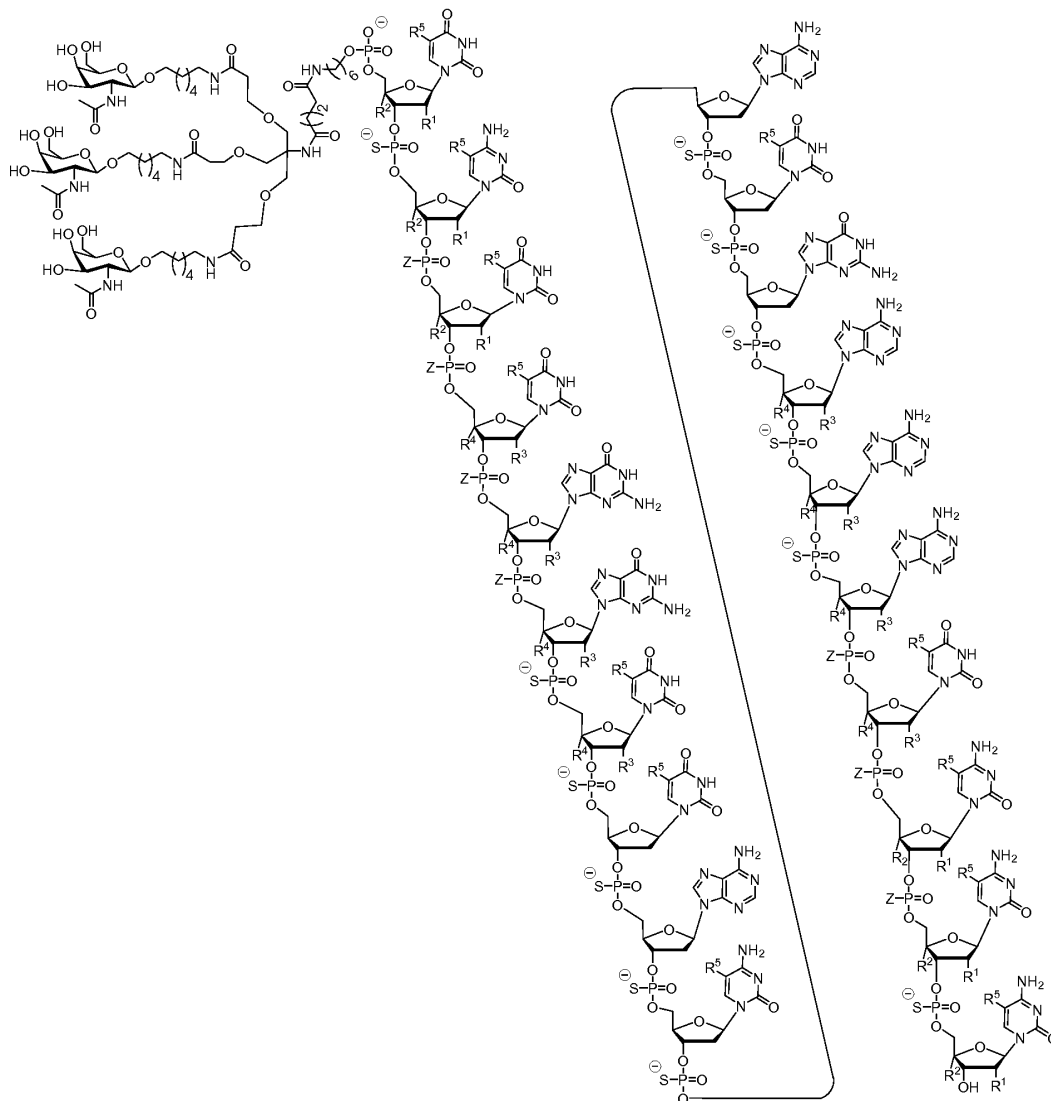
[3152] 하기 구조를 포함하는 화합물:



[3153]

[3154] [구현예 386]

[3155] 하기 구조를 포함하는 화합물:



[3156]

[3157] 여기서 R^1 은 $-OCH_2CH_2OCH_3$ (MOE)이고 R^2 는 H이거나; 또는 R^1 및 R^2 는 함께 브릿지를 형성하고, 여기서 R^1 은 $-O-$ 이고 R^2 는 $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, 또는 $-CH_2CH_2-$ 이고, 그리고 R^1 및 R^2 는 직접적으로 연결되고, 이로써 수득한 브릿지는 $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$, 및 $-O-CH_2CH_2-$ 로부터 선택되고;

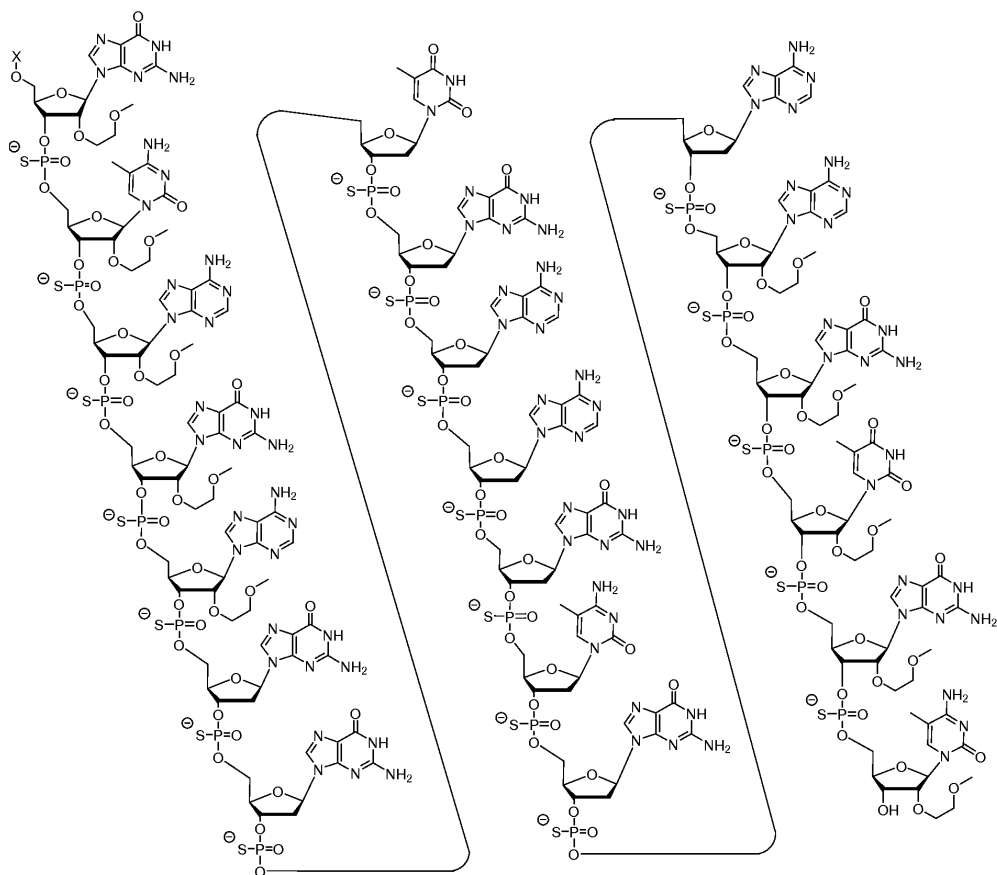
[3158] 그리고 동일한 고리 상의 R^3 및 R^4 의 각각의 쌍에 대해, 독립적으로 각각의 고리에 대해: R^3 은 H 및 $-OCH_2CH_2OCH_3$ 로부터 선택되고 R^4 는 H이거나; 또는 R^3 및 R^4 는 함께 브릿지를 형성하고, 여기서 R^3 은 $-O-$ 이고, 그리고 R^4 는 $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, 또는 $-CH_2CH_2-$ 이고 R^3 및 R^4 는 직접적으로 연결되고, 이로써 수득한 브릿지는 $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$, 및 $-O-CH_2CH_2-$ 로부터 선택되고;

[3159] 그리고 R^5 는 H 및 $-CH_3$ 로부터 선택되고;

[3160] 그리고 Z는 S 및 O로부터 선택된다.

[3161] [구현예 387]

[3162] 하기 구조를 포함하는 화합물:



[3163]

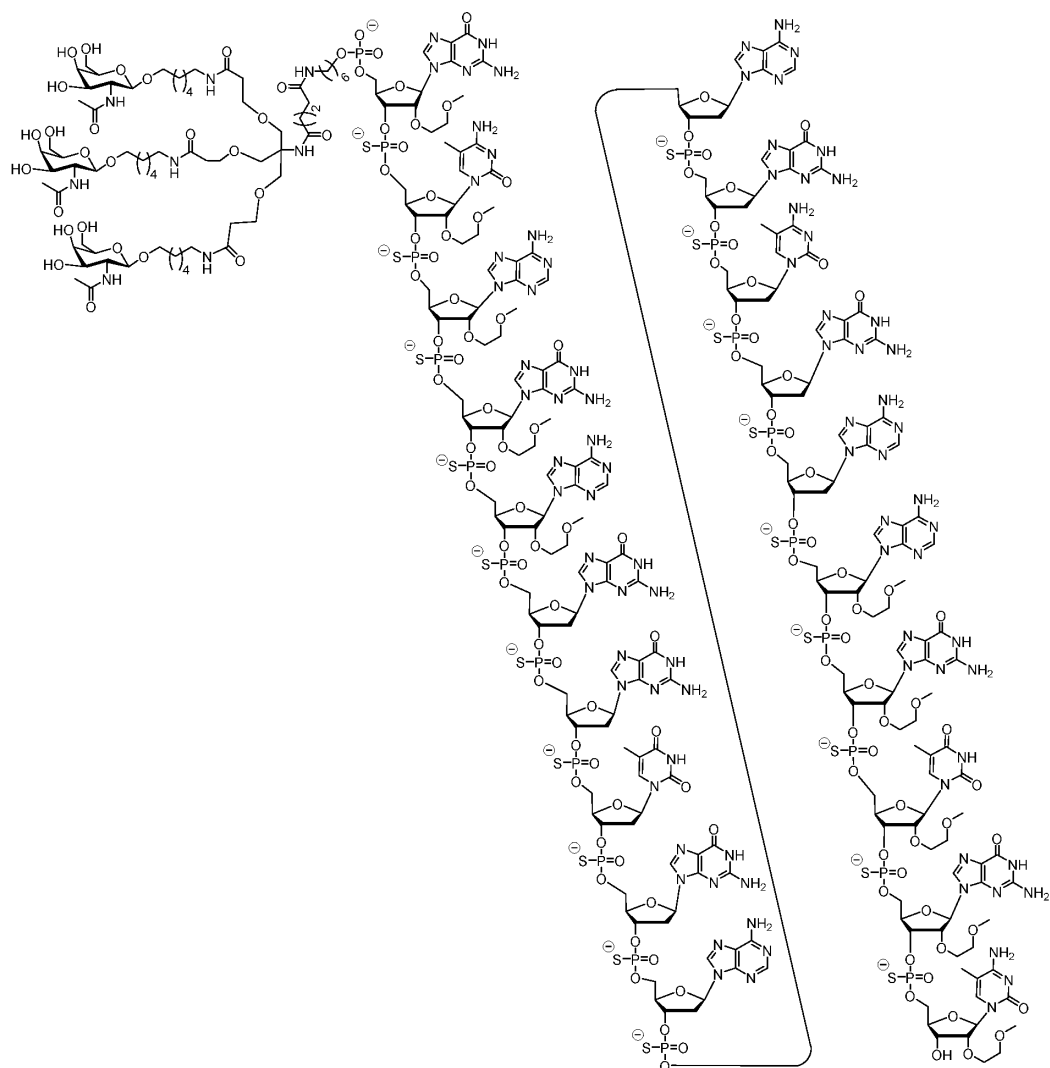
[3164]

여기서 X는 GalNAc를 포함하는 접합체 기이다.

[3165]

[구현예 388]

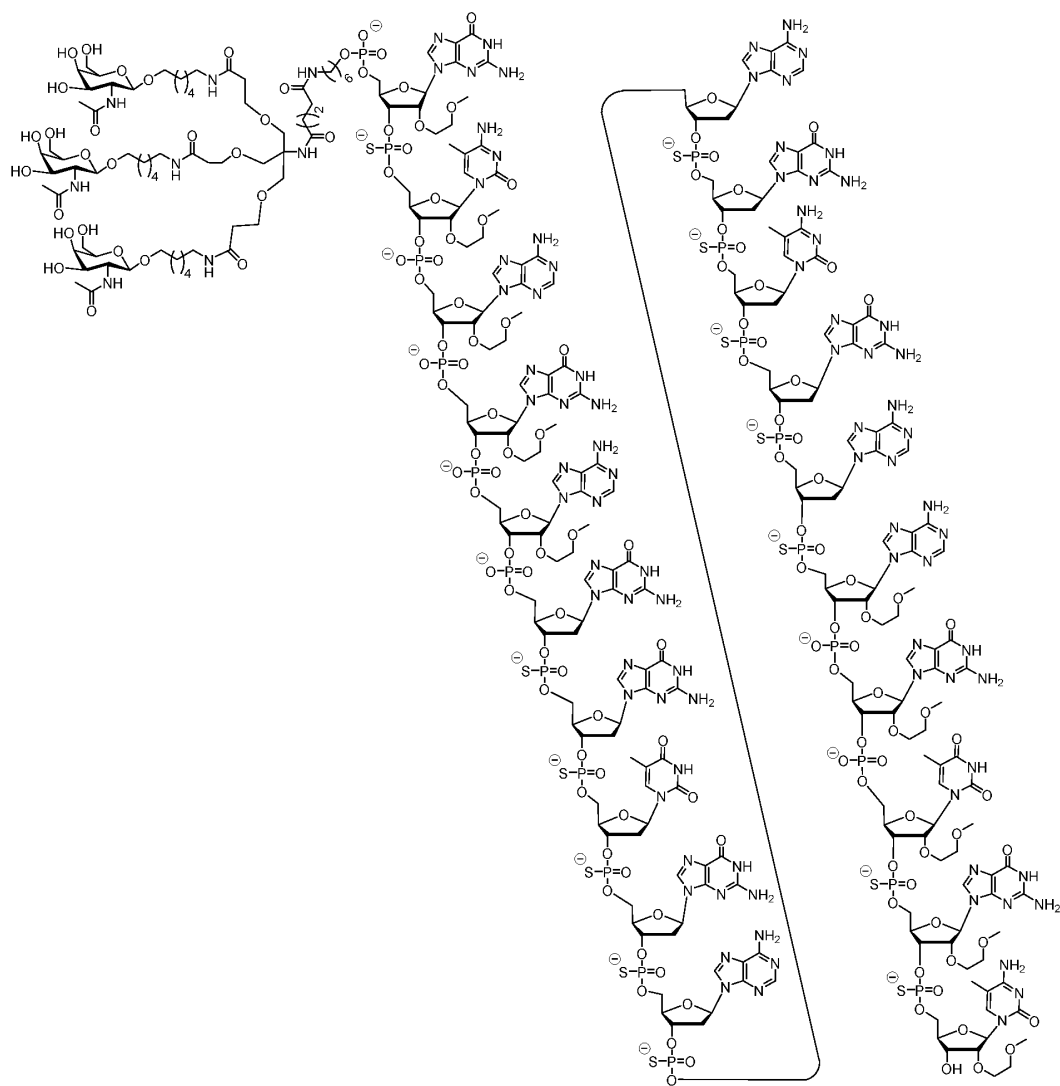
[3166] 하기 구조를 포함하는 화합물:



[3167]

[3168] [구현예 389]

[3169] 하기 구조를 포함하는 화합물:

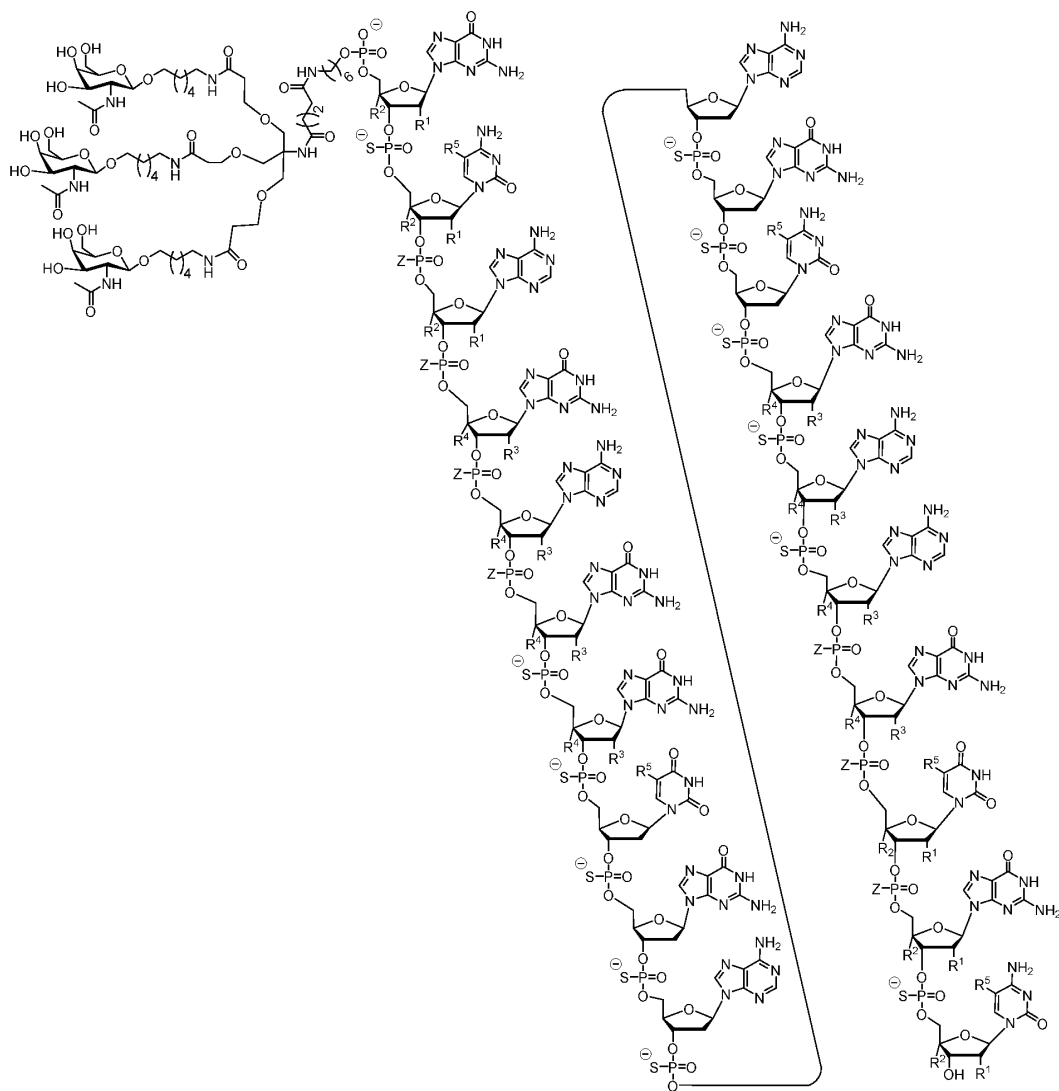


[3170]

[3171]

[구현예 390]

[3172] 하기 구조를 포함하는 화합물:



[3173]

[3174] 여기서 R^1 은 $-OCH_2CH_2OCH_3$ (MOE)이고 R^2 는 H이거나; 또는 R^1 및 R^2 는 함께 브릿지를 형성하고, 여기서 R^1 은 $-O-$ 이고 R^2 는 $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, 또는 $-CH_2CH_2-$ 이고, 그리고 R^1 및 R^2 는 직접적으로 연결되고, 이로써 수득한 브릿지는 $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$, 및 $-O-CH_2CH_2-$ 로부터 선택되고

[3175] 그리고 동일한 고리 상의 R^3 및 R^4 의 각각의 쌍에 대해, 독립적으로 각각의 고리에 대해: R^3 은 H 및 $-OCH_2CH_2OCH_3$ 로부터 선택되고 R^4 는 H이거나; 또는 R^3 및 R^4 는 함께 브릿지를 형성하고, 여기서 R^3 은 $-O-$ 이고, 그리고 R^4 는 $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, 또는 $-CH_2CH_2-$ 이고 R^3 및 R^4 는 직접적으로 연결되고, 이로써 수득한 브릿지는 $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$, 및 $-O-CH_2CH_2-$ 로부터 선택되고:

[3176] 그리고 R^5 는 H 및 $-CH_3$ 로부터 선택되고;

[3177] 그리고 Z는 S^- 및 O^- 로부터 선택된다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING HBV AND TTR EXPRESSION

<130> BIOL0248W0

<150> 61/818,442

<151> 2013-05-01

<150> 61/823,826

<151> 2013-05-15

<150> 61/843,887

<151> 2013-07-08

<150> 61/871,673

<151> 2013-08-29

<150> 61/880,790

<151> 2013-09-20

<150> 61/976,991

<151> 2014-04-08

<150> 61/986,867

<151> 2014-04-30

<160> 53

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3182

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 1

aattccacaa cctttcacca aactctgcaa gatcccagag tgagaggcct gtatttcctt	60
gctgggtggct ccagttcagg agcagtaaac cctgttccga ctactgcctc tcccttatcg	120
tcaatcttct cgaggattgg ggaccctgcg ctgaacatgg agaacatcac atcaggattc	180
ctaggacccc ttctcgtgtt acaggcgggg tttttcttgt tgacaagaat cctcacaata	240
ccgcagagtc tagactcgtg gtggacttct ctcaattttc tagggggaac taccgtgtgt	300
cttggccaaa attgcagtc cccaacctcc aatcactcac caacctcctg tcttccaact	360
tgtcctgggt atcgctggat gtgtctgcgg cgttttatca tcttctctt catcctgctg	420
ctatgcctca tcttcttgtt ggtttctctg gactatcaag gtatgttgcc cgtttgtcct	480
ctaattccag gatcctcaac caccagcacg ggaccatgcc gaacctgcat gactactgct	540

caaggaacct ctatgtatcc ctccgtttgc tgiaccaaac cttcggacgg aaattgcacc	600
tgtattccca tcccatcatc ctgggctttc ggaaaattcc tatgggagtg ggcctcagcc	660
cgtttctcct ggctcagttt actagtgccca tttgttcagt ggttcgtagg gctttccccc	720
actgtttggc tttcagttat atggatgatg tggatattggg ggccaagtct gtacagcatc	780
ttgagtcctt tttaccgct gttaccaatt ttcttttgc tttgggtata catttaaacc	840
ctaacaaaac aaagagatgg gggtactctc tgaattttat gggttatgtc attggaagtt	900
atgggtcctt gccacaagaa cacatcatc aaaaaatcaa agaattgttt agaaaacttc	960
ctattaacag gcctattgat tggaaagtat gtcaacgaat tgtgggtctt ttgggttttg	1020
ctgccccatt tacacaatgt gggtatcctg cgttaatgcc cttgtatgca tgtattcaat	1080
ctaagcaggc tttcactttc tcgccaactt acaaggcctt tctgtgtaaa caatacctga	1140
acctttacc cgttgccgg caacggccag gtctgtgccca agtgtttgct gacgcaacc	1200
ccactggctg gggcttggtc atgggccatc agcgctgctg tggaaccttt tcggctcctc	1260
tgccgatcca tactgcggaa ctctagccg cttgttttgc tcgcagcagg tctggagcaa	1320
acattatcgg gactgataac tctgttgtcc tctcccga atatacatcg tatccatggc	1380
tgctaggctg tgctgccaac tggatcctgc gcgggacgtc ctttgtttac gtcccgctcg	1440
cgtgaatcc tgcggacgac ctttctcggg gtctgttggg actctctcgt cccctctcc	1500
gtctgccgtt cgcaccgacc acggggcgca cctctcttta cgcggactcc cgtctgtgc	1560
cttctcatct gccggaccgt gtgcacttcg cttcacctct gcacgtcgca tggagaccac	1620
cgtgaacgcc caccgaatgt tgcccaaggt cttacataag aggactcttg gactctctgc	1680
aatgtcaacg accgaccttg aggcatactt caaagactgt ttgtttaaag actgggagga	1740
gttgggggag gagattagat taaaggtctt tgtactagga ggctgtaggc ataaattggt	1800
ctgcgcacca gcacatgca actttttcac cttcgcctaa tcattctcttg ttcattgctt	1860
actgttcaag cctccaagct gtgccttggg tggctttggg gcatggacat cgacccttat	1920
aaagaatttg gagctactgt ggagtactc tcgtttttgc cttctgactt ctttcttca	1980
gtacgagatc ttctagatac cgcctcagct ctgtatcggg aagccttaga gtctctgag	2040
cattgttcac ctcacatac tgcactcagg caagcaattc tttgctgggg ggaactaatg	2100
actctagcta cctgggtggg tgtaatttg gaagatccag catctagaga cctagtagtc	2160
agttatgtca aactaatat gggcctaaag ttcaggcaac tcttgtggtt tcacatttct	2220
tgtctcactt ttggaagaga aaccgttata gagtatttgg tgtctttcgg agtgtggatt	2280
cgcactctc cagcttatag accacaaaat gccctatcc tatcaacact tccggaaact	2340
actgttgta gacgacgagg caggctccct agaagaagaa ctccctcgcc tcgcagacga	2400

agggtctcaat cgccgcgtcg cagaagatct caatctcggg aacctcaatg ttagtattcc 2460
 ttggactcat aaggtagggga actttactgg tctttattct tctactgtac ctgtctttaa 2520

tctctattgg aaaacacat cttttcctaa tatacattta caccaagaca ttatcaaaaa 2580
 atgtgaacag ttigtaggcc cacttacagt taatgagaaa agaagattgc aattgattat 2640
 gcctgctagg ttttatccaa aggttaccaa atatttacca ttggataagg gtattaaacc 2700
 ttattatcca gaacatctag ttaatcatta cttccaaact agacactatt tacacactct 2760
 atggaaggcg ggtatattat ataagagaga aacaacacat agcgctcat tttgtgggtc 2820
 accatattct tgggaacaag atctacagca tggggcagaa tctttccacc agcaatcctc 2880
 tgggattctt tcccgaccac cagttggatc cagccttcag agcaaacaca gcaaatccag 2940

attgggactt caatccaac aaggacacct ggccagacgc caacaaggta ggagctggag 3000
 cattcgggct gggtttcacc ccaccgcacg gaggcctttt ggggtggagc cctcaggctc 3060
 agggcatact acaaactttg ccagcaaac cgctctctgc ctccaccaat cgccagacag 3120
 gaaggcagcc taccccgtg tctccacctt tgagaaacac tcatcctcag gccatgcagt 3180
 gg 3182

<210> 2
 <211> 938
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

gttgactaag tcaataatca gaatcagcag gtttgcagtc agattggcag ggataagcag 60

cctagctcag gagaagttag tataaaagcc ccaggctggg agcagccatc acagaagtcc 120
 actcattctt ggcaggatgg cttctcatcg tctgtctctc ctctgccttg ctggactggt 180
 atttgtgtct gaggttgccc ctacgggcac cgttgaatcc aagtgtctc tgatgggtcaa 240
 agttctagat gctgtccgag gcagtcctgc catcaatgtg gccgtgcatg ttttcagaaa 300
 ggctgctgat gacacctggg agccatttgc ctctgggaaa accagttagt ctggagagct 360
 gcatgggctc acaactgagg aggaatttgi agaagggata tacaagtgg aatagacac 420
 caaatcttac tggaaggcac ttggcatctc ccattccat gagcatgcag aggtggtatt 480

cacagccaac gactccggcc cccgccgcta caccattgcc gccctgctga gcccctactc 540
 ctattccacc acggctgtcg tcaccaatcc caaggaatga gggacttctc ctccagtggg 600
 cctgaaggac gagggatggg atttcatgta accaagagta ttccattttt actaaagcag 660
 tgttttcacc tcatatgcta tgttagaagi ccaggcagag acaataaaac attcctgtga 720

aaggcacttt tcattccact ttaacttgat tttttaaat cccttattgt cccttccaaa 780
 aaaaagagaa tcaaaat tttt acaaagaatc aaaggaattc tagaaagtat ctgggcagaa 840
 cgctaggaga gatccaaatt tccattgtct tgcaagcaaa gcacgtatta aatatgatct 900

gcagccatta aaaagacaca ttctgtaaaa aaaaaaaa 938

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 3
 gcagaggtga agcgaagtgc 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 4
 ccaatttatg cctacagcct 20

<210> 5
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 5
 ggcatagcag caggatg 17

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 6
 aggagttccg cagtatggat 20

<210> 7

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 7
 gtgaagcgaa gtgcacacgg 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 8
 gtgcagaggt gaagcgaagt 20

<210> 9
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 9
 aggtgaagcg aagtgc 16

<210> 10
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 10
 tccgcagtat ggatcg 16

<210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 11

aatttatgcc tacagcct	18
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 12	
tcttggttac atgaaatccc	20
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 13	
cttggttaca tgaaatccca	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 14	
ggaataactct tggttacatg	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 15	
tggaataactc ttggttacat	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	

<400> 16	
ttttattgtc tctgcctgga	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 17	
gaatgtttta ttgtctctgc	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 18	
aggaatgttt tattgtctct	20
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 19	
acaggaatgt tttattgtct	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 20	
agcttcttgt ccagctttat	20
<210> 21	
<211> 21	
<212> DNA	

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 21

agcttcttgt ccagctttat a 21

<210> 22

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 22

tcagtcatga cttc 14

<210> 23

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 23

tcagtcatga ctta 15

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 24

gctgattaga gagaggtccc 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 25

tccatttca ggagacctgg 20

<210> 26

<211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 26
 atcagtcatg acttc 15
 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 27
 cgggtgcaagg ctttaggaatt 20
 <210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 28
 gcttcagtca tgacttcctt 20

 <210> 29
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 29
 gcttcagtca tgacttcctt a 21
 <210> 30
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 30
 agcttcagtc atgacttcct t 21

<210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 31
 tggtaatcca ctttcagagg 20

<210> 32
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 32
 tggtaatcca ctttcagagg a 21

<210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 33
 tgcttcagtc atgacttcct t 21

<210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 34
 cactgatttt tgcccaggat 20

<210> 35
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 35	
cactgatttt tgcccaggat a	21
<210> 36	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 36	
aagcttcttg tccagcttta t	21
<210> 37	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 37	
accaattca gaaggaagga	20
<210> 38	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 38	
accaattca gaaggaagga a	21
<210> 39	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 39	
aaccaattc agaaggaagg a	21
<210> 40	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 40
 atggtaatcc actttcagag g 21

<210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 41
 tcttggttac atgaaatccc 20
 <210> 42
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 42
 tcttggttac atgaaatccc a 21
 <210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 43
 attcactttc ataatgctgg 20
 <210> 44
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 44
 attcactttc ataatgctgg a 21
 <210> 45
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 45
 atcttggtta catgaaatcc c 21
 <210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 46
 atgcatggtg atgcttctga 20

 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 47
 cagctttatt agggacagca 20
 <210> 48
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 48
 cagctttatt agggacagca a 21
 <210> 49
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 49
 acagctttat tagggacagc a 21

<210> 50
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 50
 ttcagtcatg acttcc 16
 <210> 51
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> bases at these positions are RNA
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(18)
 <223> bases at these positions are RNA
 <400> 51
 gcuucagtca tgactucc 18

 <210> 52
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 52
 tgctccgttg gtgcttggtc a 21
 <210> 53
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 53
 tgctccgttg gtgcttggtc 20