



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년07월07일  
(11) 등록번호 10-2830443  
(24) 등록일자 2025년07월02일

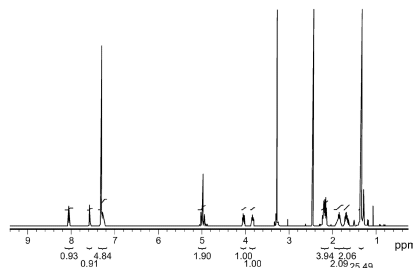
- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07H 15/04 (2006.01) A61K 31/713 (2006.01)  
A61K 47/54 (2017.01) A61K 48/00 (2006.01)  
A61P 43/00 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
- (52) CPC특허분류  
C07H 15/04 (2013.01)  
A61K 31/713 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7010168(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2017년03월07일  
심사청구일자 2023년04월20일  
(85) 번역문제출일자 2023년03월24일  
(65) 공개번호 10-2023-0048446  
(43) 공개일자 2023년04월11일  
(62) 원출원 특허 10-2022-7000160  
원출원일자(국제) 2017년03월07일  
심사청구일자 2022년02월03일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/021175  
(87) 국제공개번호 WO 2017/156012  
국제공개일자 2017년09월14일  
(30) 우선권주장  
62/304,652 2016년03월07일 미국(US)  
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌  
KR1020140012624 A  
(뒷면에 계속)
- 전체 청구항 수 : 총 19 항
- (73) 특허권자  
애로우헤드 파마슈티컬스 인코포레이티드  
미국 91105 캘리포니아주 파사데나 스위트 700 이  
스트 콜로라도 불러버드 177
- (72) 발명자  
로제마, 데이비드, 비.  
미국, 위스콘신 53528, 크로스 플레인스, 길스 웨  
이 4361  
웨이크필드, 대런, 에이치.  
미국, 위스콘신 53719, 피치버그, 스톤맨 드라이  
브 5236  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인정진
- 심사관 : 조호정

(54) 발명의 명칭 치료용 화합물을 위한 표적화 리간드

(57) 요약

생체내에서 화합물을 표적으로 안내하는 데 유용한, 화합물, 예컨대 치료용 화합물에 연결될 수 있는 신규 표적화 리간드가 기재된다. 본원에 개시된 표적화 리간드는 유전자 발현을 조정하기 위해 발현-저해성 올리고머 화합물, 예컨대 RNAi 제제를 간 세포까지 표적화하는 역할을 할 수 있다. 본원에 개시된 표적화 리간드가 발현-저해성 올리고머 화합물에 공액된 경우, 이러한 리간드는 치료, 진단, 표적 입증 및 게놈 발견 적용에서의 사용을 포함하여 여러 가지 적용들에 사용될 수 있다. 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되는 경우 본원에 개시된 표적화 리간드를 포함하는 조성물은 간 세포(liver cell), 예컨대 간세포(hepatocyte)에서 표적 핵산 서열의 발현을 매개할 수 있으며, 이는 세포, 조직 또는 유기체 내에서 유전자 발현 또는 활성의 저해에 반응하는 질병 또는 질환의 치료에 유용할 수 있다.

대표도



- (52) CPC특허분류  
*A61K 47/549* (2017.08)  
*A61K 48/0033* (2013.01)  
*A61P 43/00* (2018.01)  
*C12N 15/113* (2013.01)  
*C12N 2310/14* (2025.05)  
*C12N 2310/317* (2013.01)  
*C12N 2310/32* (2013.01)  
*C12N 2310/321* (2013.01)  
*C12N 2310/322* (2013.01)
- (72) 발명자  
**블로킨, 안드레이, 브이.**  
 미국, 위스콘신 53711, 피치버그, 도우레이 드라이브 5770  
**벤슨, 조나단, 디.**  
 미국, 위스콘신 53719, 매디슨, 사우스 로사 로드 502, 애로우헤드 파마슈티컬스 인코포레이티드  
**리, 켄**  
 미국, 위스콘신 53719, 매디슨, 사우스 로사 로드 502, 애로우헤드 파마슈티컬스 인코포레이티드  
**페이, 타오**  
 미국, 위스콘신 53719, 매디슨, 사우스 로사 로드 502, 애로우헤드 파마슈티컬스 인코포레이티드  
**플레이츠, 프레드**  
 미국, 위스콘신 53719, 매디슨, 사우스 로사 로드 502, 애로우헤드 파마슈티컬스 인코포레이티드
- (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020130132475 A  
 WO2011005980 A1  
 US20120165393 A1  
 US20120157509 A1  
 US07041818 B2  
 C.I.Wooddell et al., Molecular Therapy, Vol.21, No.5, pp.973-85 (2013.5.)
- (30) 우선권주장  
 62/426,916 2016년11월28일 미국(US)  
 62/370,754 2016년08월04일 미국(US)
-

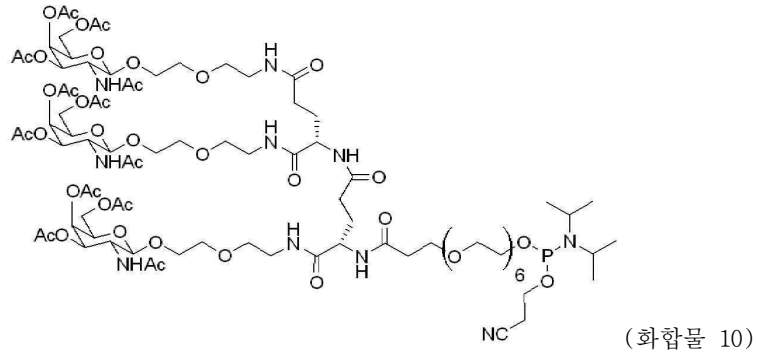


## 명세서

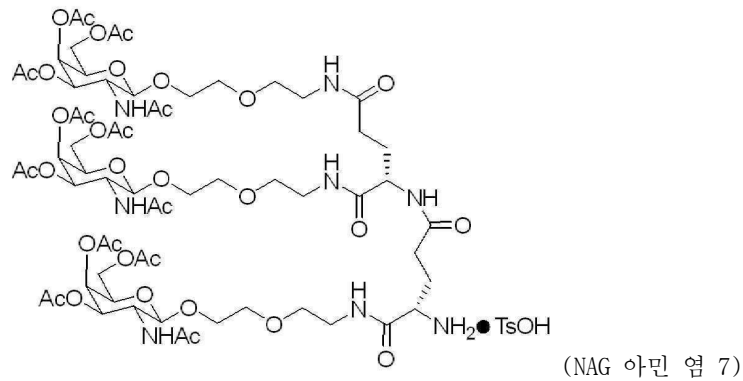
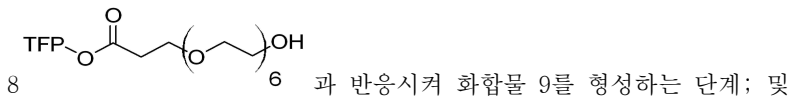
### 청구범위

#### 청구항 1

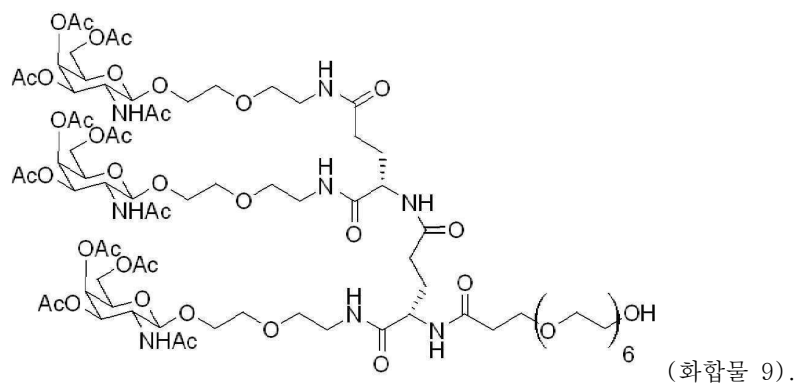
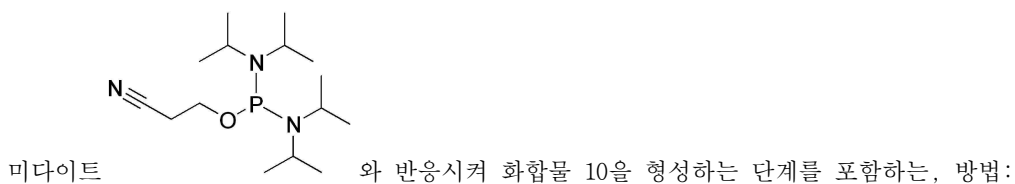
화합물 10의 제조 방법으로서,



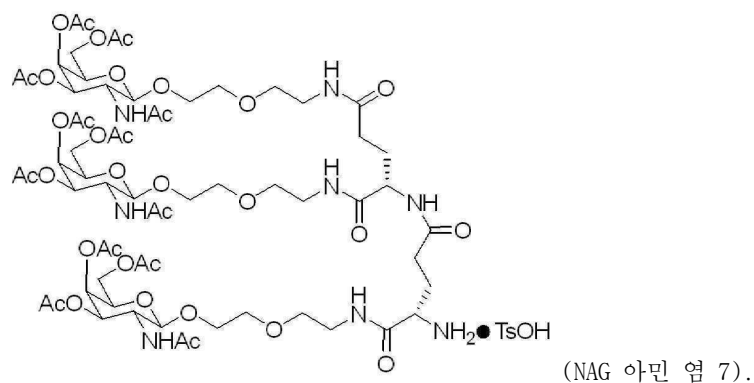
(iia) 트리에틸아민 및 디클로로메탄의 존재 하에서, NAG 아민 염 7을 HO-PEG<sub>6</sub>-CO<sub>2</sub>TFP 에스테르



(i) 4,5-디시아노이미다졸의 존재 하에서, 화합물 9를 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아







#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 단계 (ii)의 반응이 디클로로메탄의 존재 하에서 수행되는 것인, 방법.

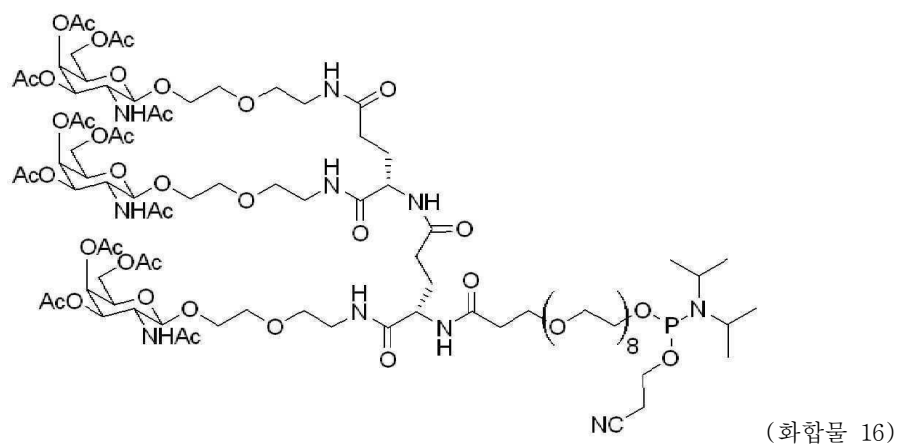
#### 청구항 6

제5항에 있어서,

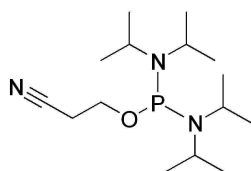
(iii) 상기 단계 (ii)의 반응을 포화된 수성  $\text{NaHCO}_3$ 와 염수의 혼합물을 이용하여 퀀칭시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

#### 청구항 7

화합물 16의 제조방법으로서,

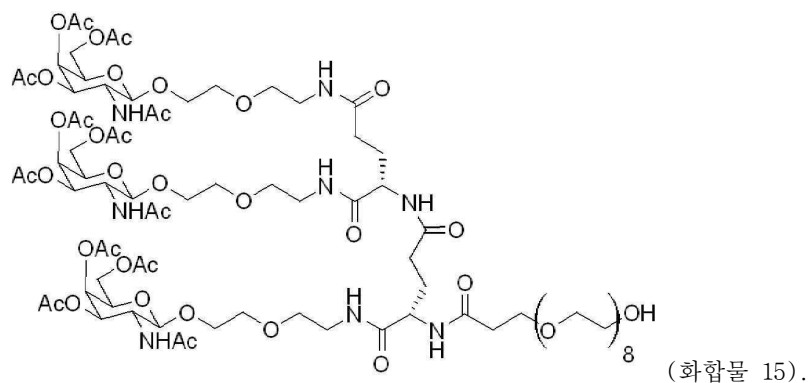


(i) 디이소프로필암모늄 테트라졸라이드의 존재 하에서, 화합물 15를 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필



포스포로디아미다이트

와 반응시켜 화합물 16을 형성하는 단계를 포함하는, 방법:

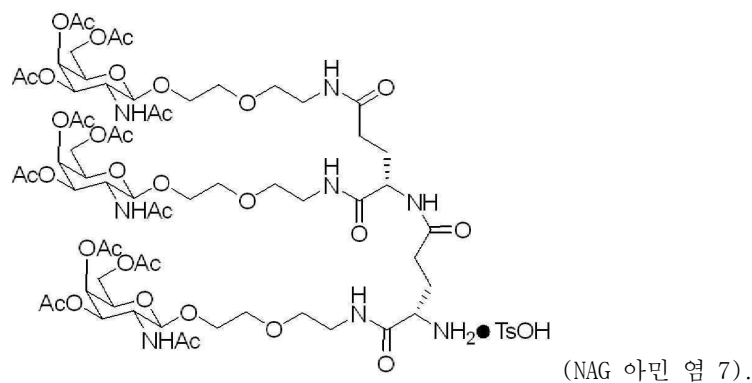


#### 청구항 8

제7항에 있어서,

(ii) N,N-디이소프로필에틸아민의 존재 하에서, NAG 아민 염 7을 HO-PEG<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>TFP 에스테르 18

과 반응시켜 화합물 15를 형성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법:



#### 청구항 9

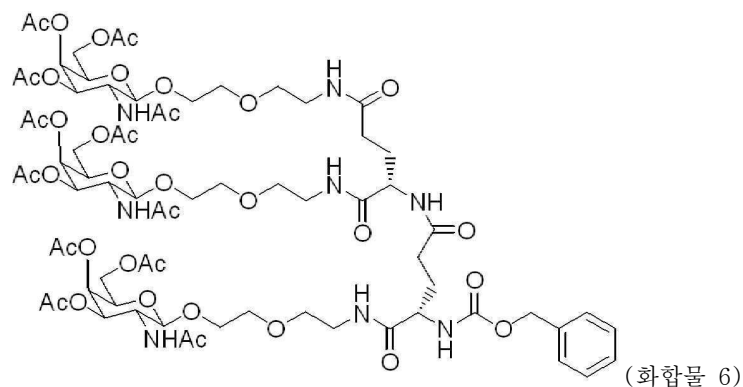
제8항에 있어서,

상기 단계 (ii)의 반응은 디클로로메탄의 존재 하에서 수행되는 것인, 방법.

#### 청구항 10

제1항, 제6항 또는 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

(iv) MeOH의 존재 하에서, 화합물 6을 p-TsOH-H<sub>2</sub>O와 반응시켜 반응 생성물을 형성하는 단계, 및



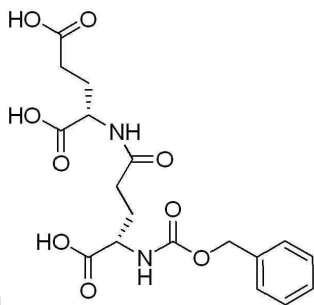
(v) Pd/C의 존재 하에서, 상기 단계 (iv)의 반응 생성물을 H<sub>2</sub>로 수소화하여 NAG 아민 염 7을 형성하는 단계를

추가로 포함하는, 방법.

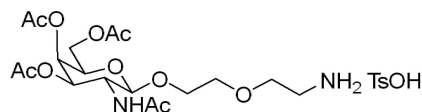
### 청구항 11

제10항에 있어서,

(vi) 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸아미늄 테트라플루오로보레이트 및 디이소프로필에틸아민의



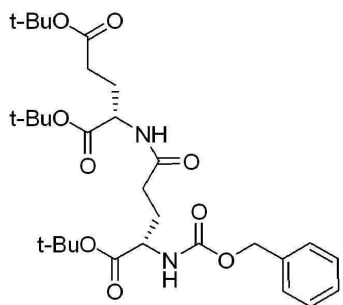
존재 하에서, 화합물 4 를 NAG-아민 *p*-토실레이트 염 5



와 반응시켜 화합물 6을 형성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

### 청구항 12

제11항에 있어서,



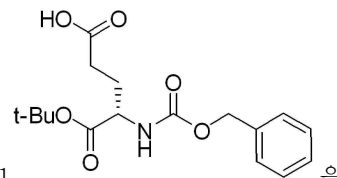
(vii) 화합물 3 을 포름산과 반응시켜 화합물 4를 형성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

### 청구항 13

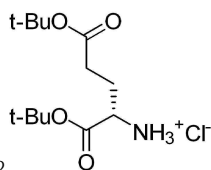
제12항에 있어서, 상기 단계 (vii)의 반응은 45℃의 온도에서 수행되는 것인, 방법.

### 청구항 14

제12항에 있어서,



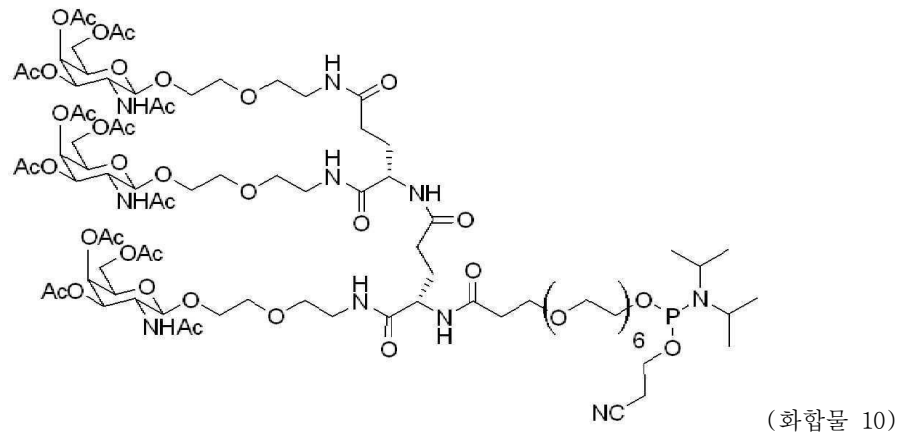
(viii) *N*-메틸모르폴린 및 이소부틸 클로로포르메이트의 존재 하에서, 화합물 1



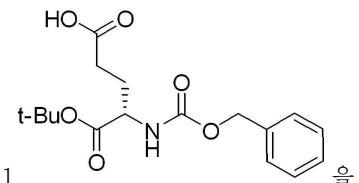
화합물 2 와 반응시켜 화합물 3을 형성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

### 청구항 15

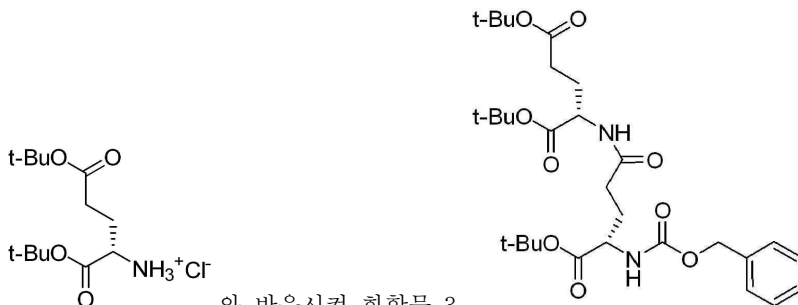
화합물 10의 제조 방법으로서,



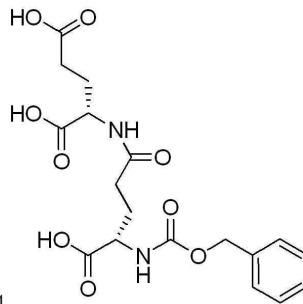
(i-a) *N*-메틸모르폴린 및 이소부틸 클로로포르메이트의 존재 하에서, 화합물 1



화합물 2와 반응시켜 화합물 3을 형성하는 단계;

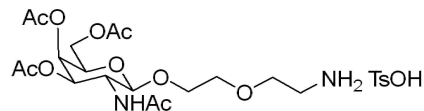


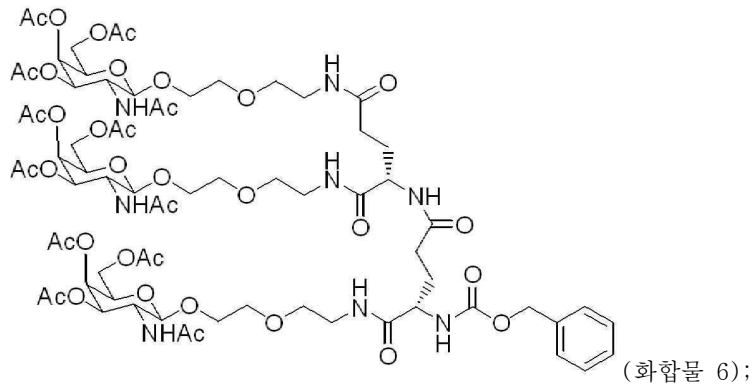
(i-b) 화합물 3을 포름산과 반응시켜 화합물 4를 형성하는 단계;



(i-c) 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸아미늄 테트라플루오로보레이트 및 디이소프로필에틸아민의

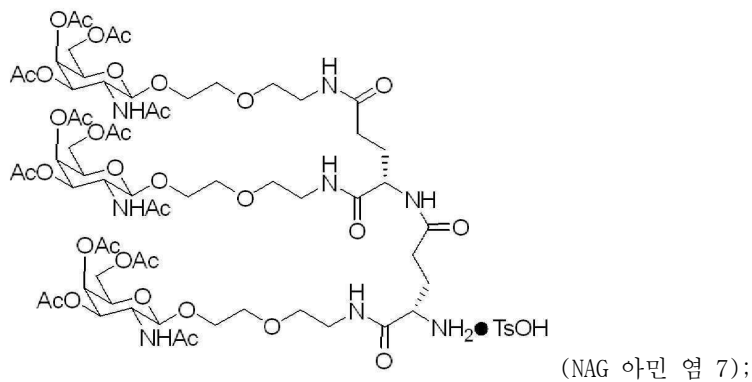
존재 하에서, 화합물 4를 NAG-아민 *p*-토실레이트 염 5와 반응시켜 화합물 6을 형성하는 단계,



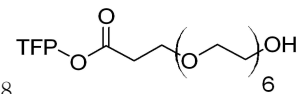


(i-d) MeOH의 존재 하에서, 화합물 6을 *p*-TsOH-H<sub>2</sub>O와 반응시켜 반응 생성물을 형성하는 단계; 및

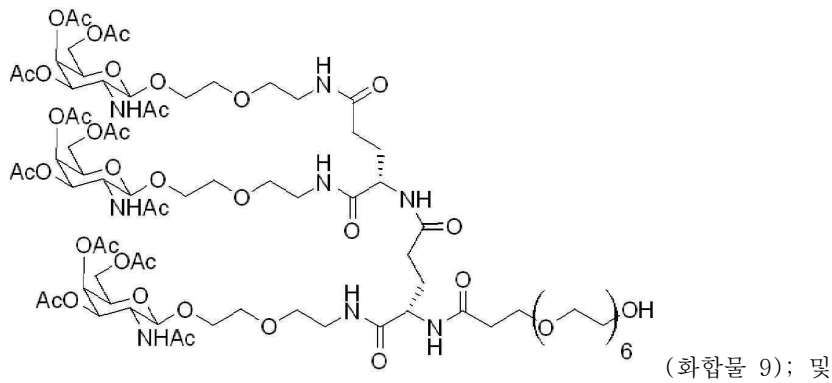
(i-e) Pd/C의 존재 하에서, 상기 단계 (i-d)의 반응 생성물을 H<sub>2</sub>로 수소화하여 NAG 아민 염 7을 형성하는 단계,



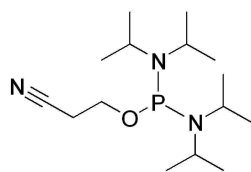
(i-f) 트리에틸아민의 존재 하에서, NAG 아민 염 7을 HO-PEG<sub>6</sub>-CO<sub>2</sub>TFP 에스테르 8



응시켜 화합물 9를 형성하는 단계,



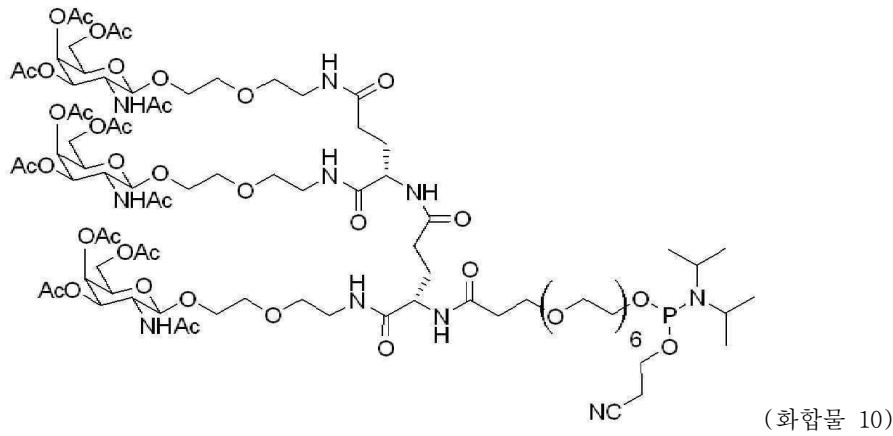
(i-g) 4,5-디시아노이미다졸의 존재 하에서, 화합물 9를 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아



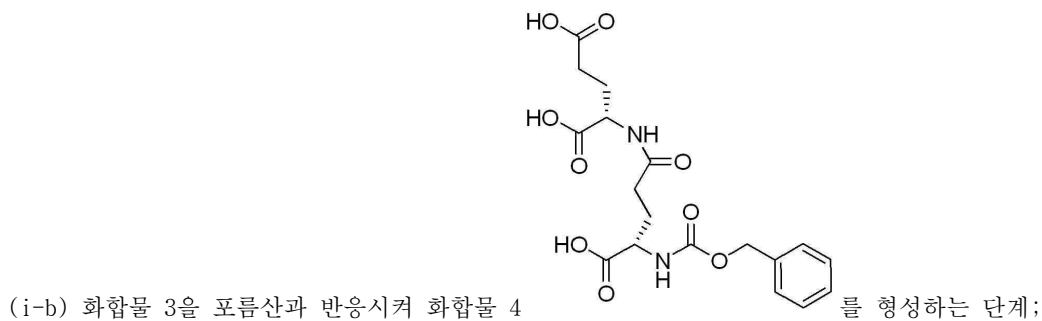
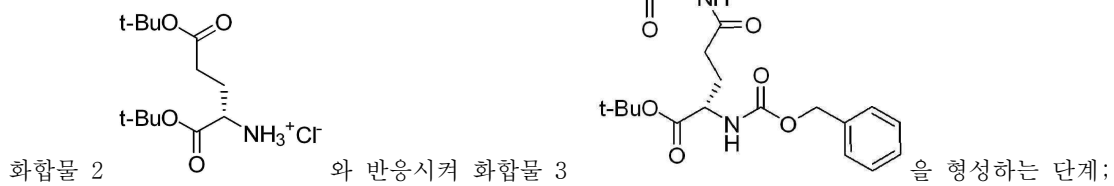
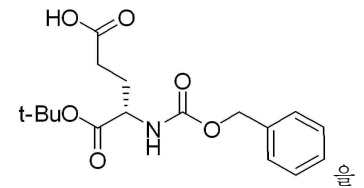
미다이트와 반응시켜 화합물 10을 형성하는 단계를 포함하는, 방법.

## 청구항 16

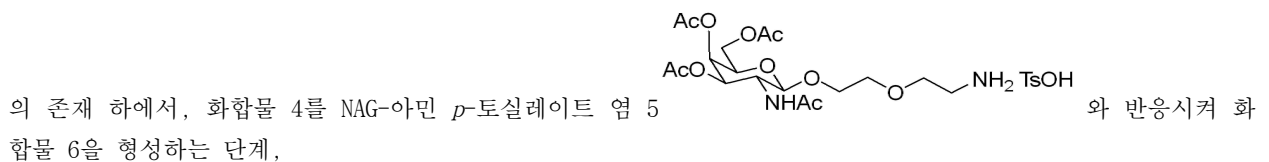
화합물 10의 제조 방법으로서,



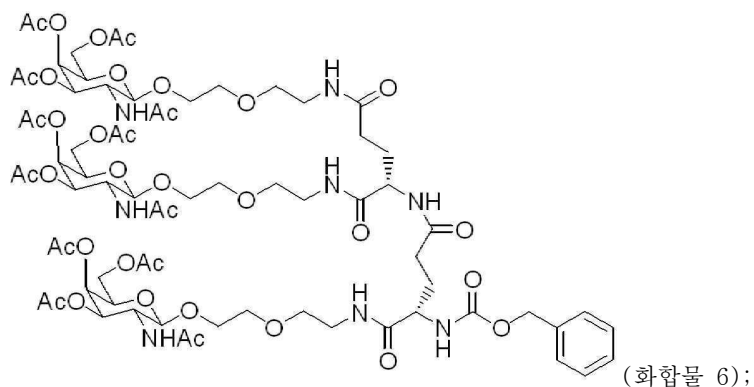
(i-a) *N*-메틸모르폴린 및 이소부틸 클로로포르메이트의 존재 하에서, 화합물 1



(i-c) 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸아미늄 테트라플루오로보레이트 및 디이소프로필에틸아민

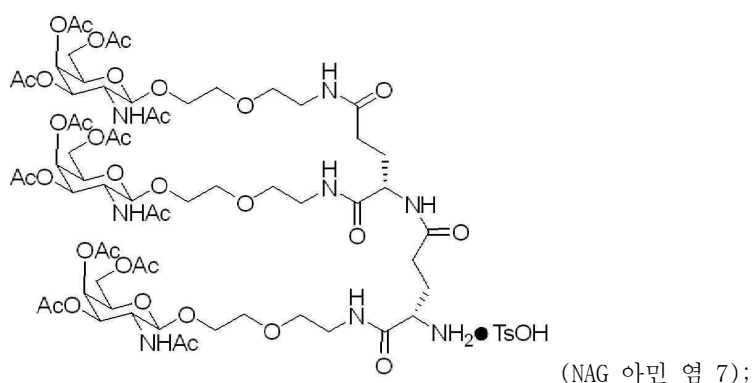




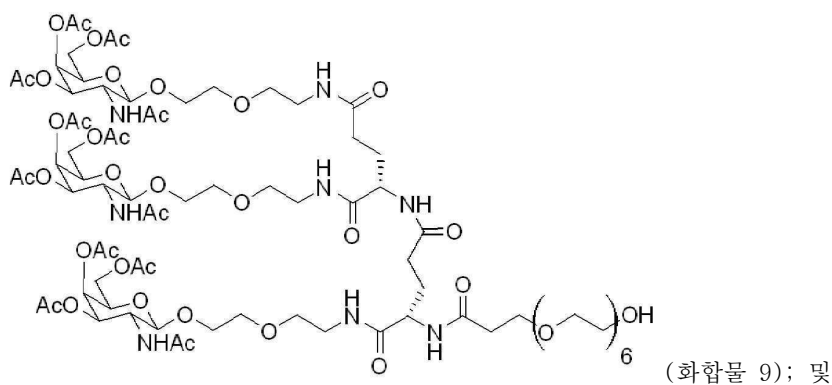
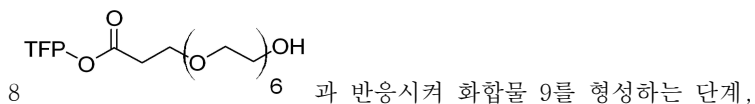


(i-d) MeOH의 존재 하에서, 화합물 6을 *p*-TsOH-H<sub>2</sub>O와 반응시켜 반응 생성물을 형성하는 단계; 및

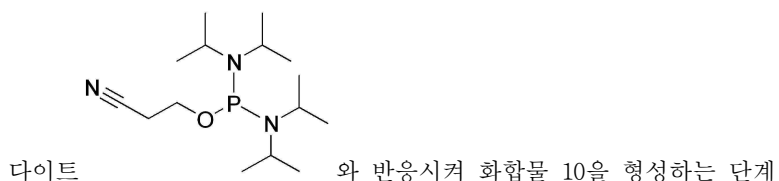
(i-e) Pd/C의 존재 하에서, 상기 단계 (i-d)의 반응 생성물을 H<sub>2</sub>로 수소화하여 NAG 아민 염 7을 형성하는 단계,



(i-f) N,N-디이소프로필에틸아민 및 디클로로메탄의 존재 하에서, NAG 아민 염 7을 HO-PEG<sub>6</sub>-CO<sub>2</sub>TFP 에스테르



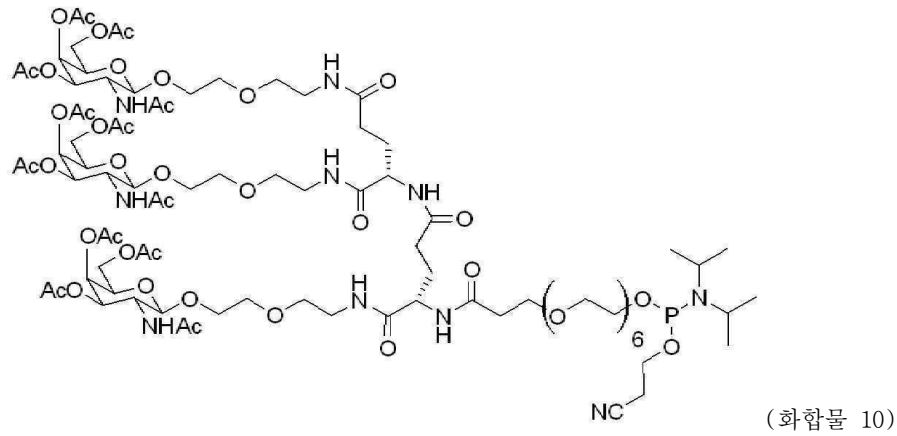
(i-g) 4,5-디시아노이마졸의 존재 하에서, 화합물 9를 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아미



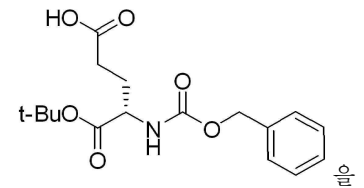
를 포함하는, 방법.

## 청구항 17

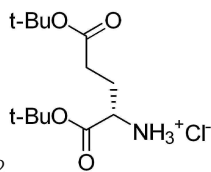
화합물 10의 제조 방법으로서,



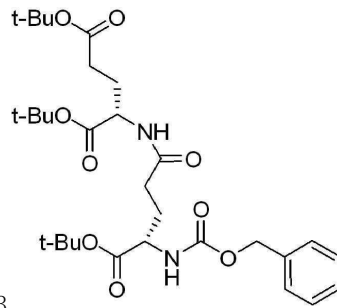
(i-a) *N*-메틸모르폴린 및 이소부틸 클로로포르메이트의 존재 하에서, 화합물 1



화합물 2

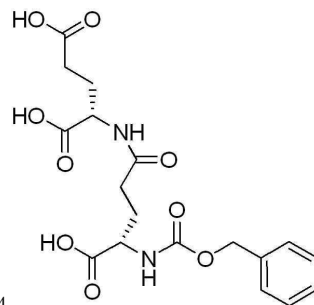


와 반응시켜 화합물 3



을 형성하는 단계;

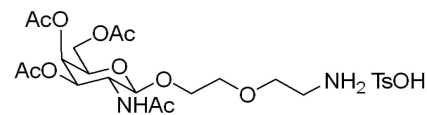
(i-b) 화합물 3을 포름산과 반응시켜 화합물 4



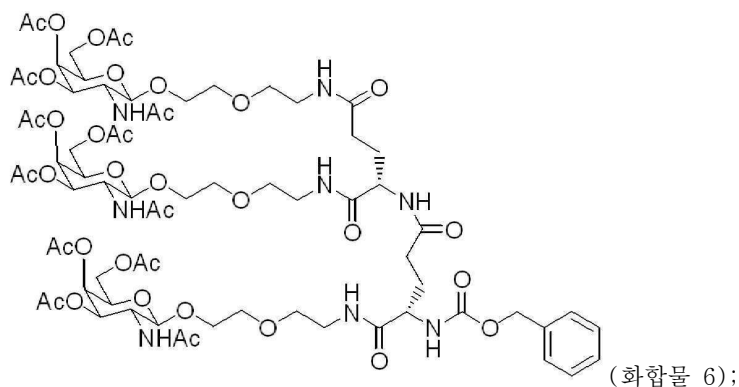
를 형성하는 단계;

(i-c) 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸아미늄 테트라플루오로보레이트 및 디이소프로필에틸아민의

존재 하에서, 화합물 4를 NAG-아민 *p*-토실레이트 염 5

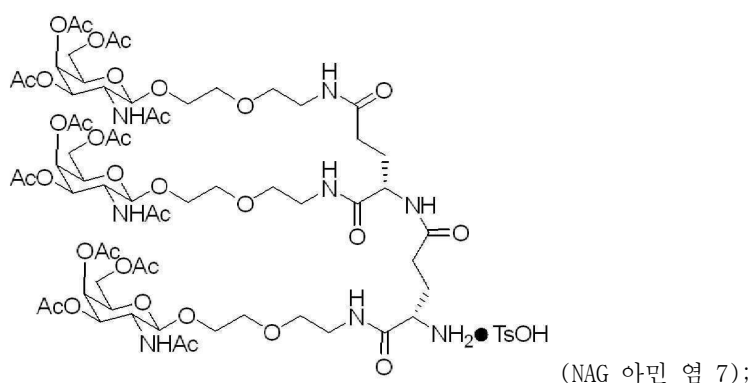


와 반응시켜 화합물 6을 형성하는 단계,

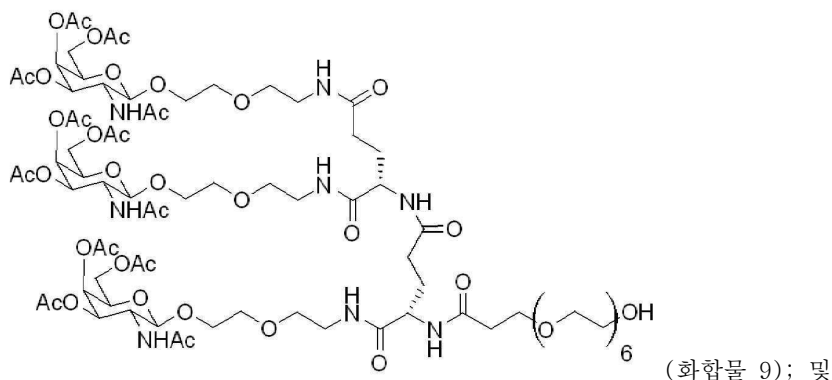


(i-d) MeOH의 존재 하에서, 화합물 6을 *p*-TsOH-H<sub>2</sub>O와 반응시켜 반응 생성물을 형성하는 단계; 및

(i-e) 탄소 상 팔라듐의 존재 하에서, 상기 단계 (i-d)의 반응 생성물을 수소화하여 NAG 아민 염 7을 형성하는 단계,



(i-f) 트리에틸아민의 존재 하에서, NAG 아민 염 7을 HO-PEG<sub>6</sub>-CO<sub>2</sub>TFP 에스테르 8 과 반응시켜 화합물 9를 형성하는 단계,

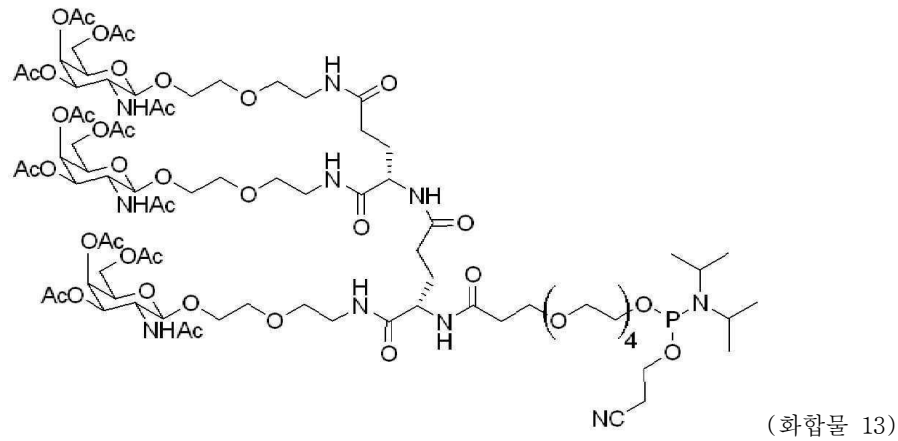


(i-g) 4,5-디시아노이미다졸의 존재 하에서, 화합물 9를 2-시아노에틸-N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아

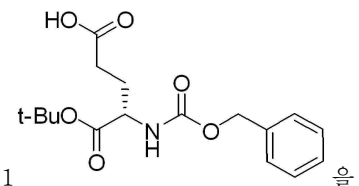
미다이트 와 반응시켜 화합물 10을 형성하는 단계  
를 포함하는, 방법.

청구항 18

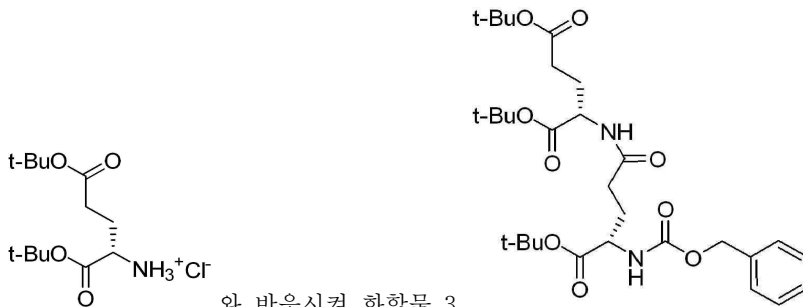
화합물 13의 제조 방법으로서,



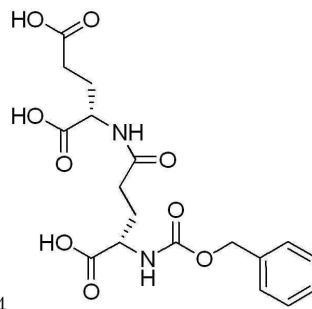
(ii-a) *N*-메틸모르폴린 및 이소부틸 클로로포르메이트의 존재 하에서, 화합물 1



화합물 2와 반응시켜 화합물 3을 형성하는 단계;

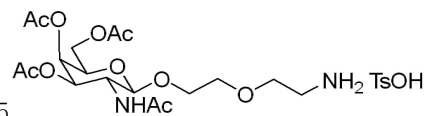


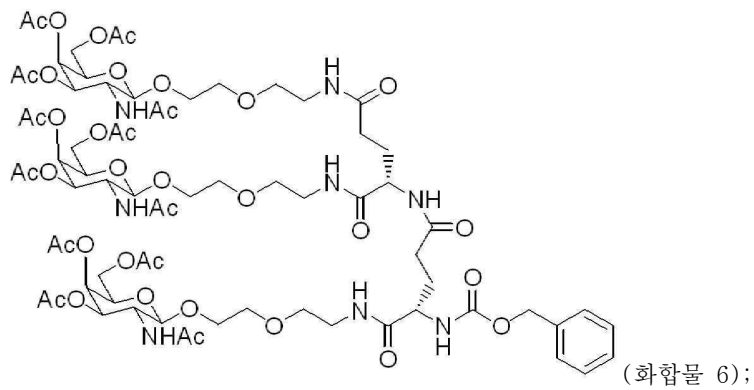
(ii-b) 화합물 3을 포름산과 반응시켜 화합물 4를 형성하는 단계;



(ii-c) 2-(1*H*-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸아미늄 테트라플루오로보레이트 및 디이소프로필에틸아민

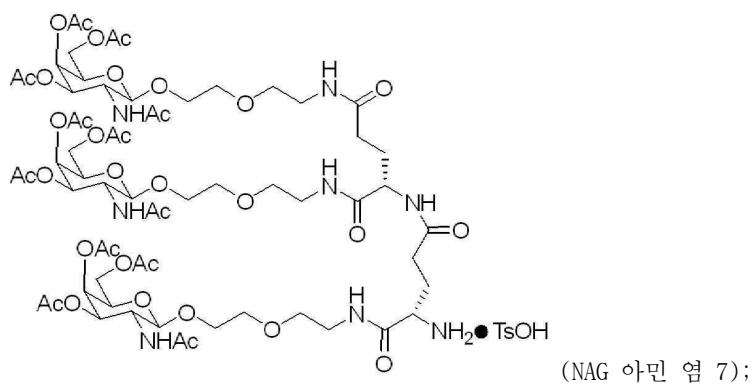
의 존재 하에서, 화합물 4를 NAG-아민 *p*-토실레이트 염 5와 반응시켜 화합물 6을 형성하는 단계,



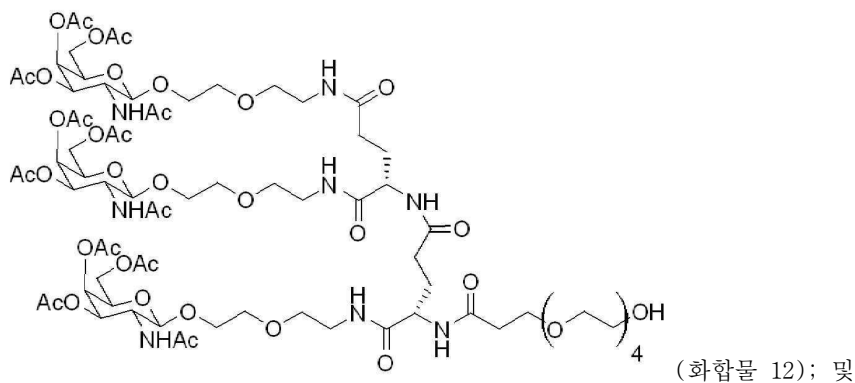
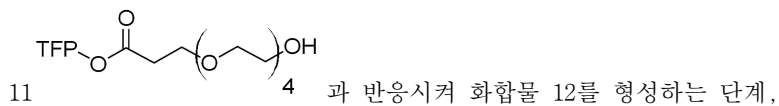


(ii-d) MeOH의 존재 하에서, 화합물 6을 *p*-TsOH-H<sub>2</sub>O와 반응시켜 반응 생성물을 형성하는 단계; 및

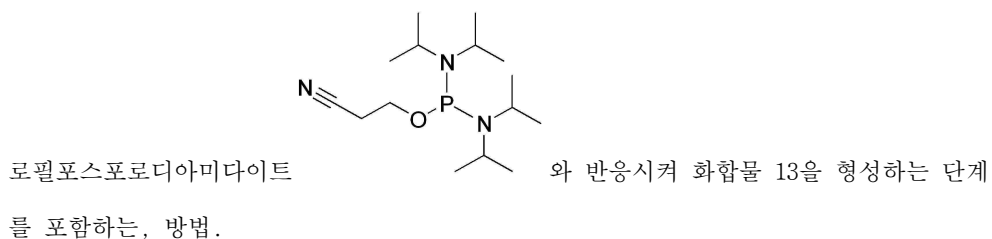
(ii-e) Pd/C의 존재 하에서, 상기 단계 (ii-d)의 반응 생성물을 H<sub>2</sub>로 수소화하여 NAG 아민 염 7을 형성하는 단계,



(ii-f) N,N-디이소프로필에틸아민 및 디클로로메탄의 존재 하에서, NAG 아민 염 7을 HO-PEG<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>TFP 에스테르

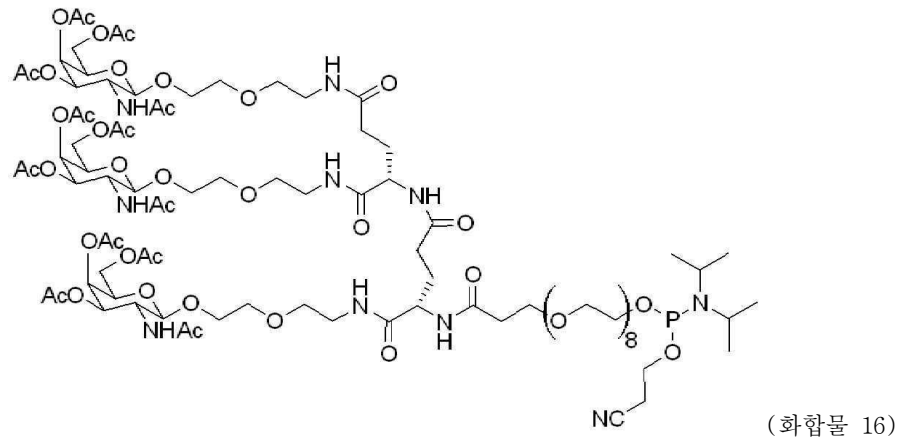


(ii-g) 디이소프로필아모늄 테트라졸라이드의 존재 하에서, 화합물 12를 2-시아노에틸-N,N',N'-테트라이소프

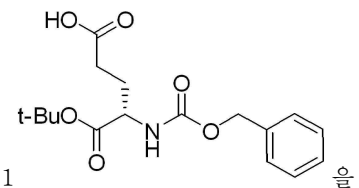


청구항 19

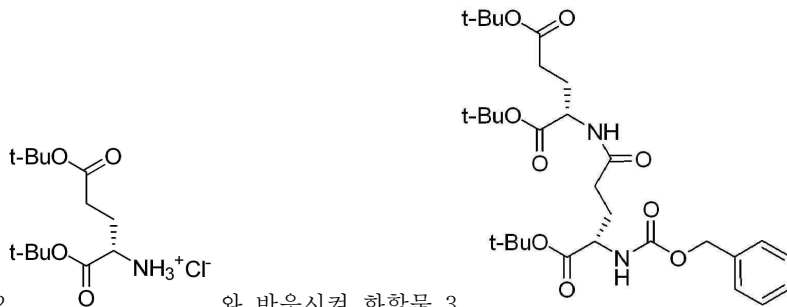
화합물 16의 제조 방법으로서,



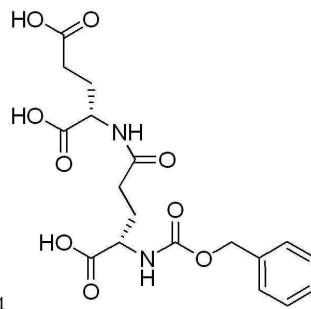
(iii-a) N-메틸모르폴린 및 이소부틸 클로로포르메이트의 존재 하에서, 화합물 1



화합물 2와 반응시켜 화합물 3을 형성하는 단계;

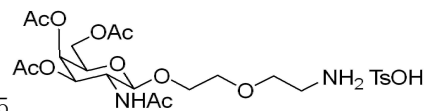


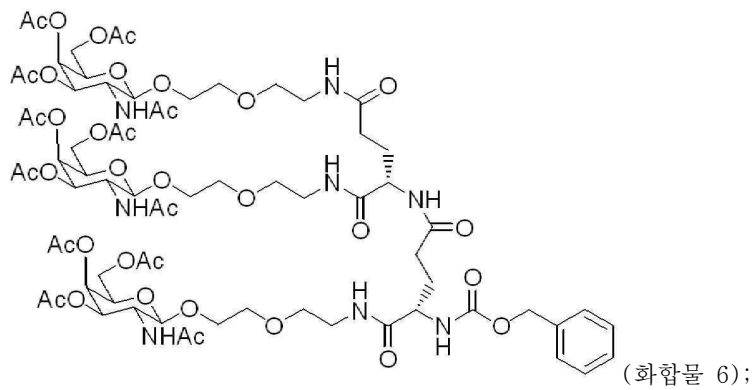
(iii-b) 화합물 3을 포름산과 반응시켜 화합물 4를 형성하는 단계;



(iii-c) 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸암모늄 테트라플루오로보레이트 및 디이소프로필에틸아민

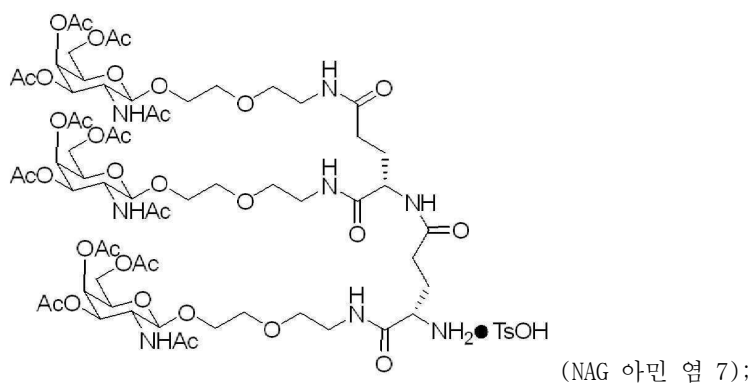
의 존재 하에서, 화합물 4를 NAG-아민 *p*-토실레이트 염 5와 반응시켜 화합물 6을 형성하는 단계,



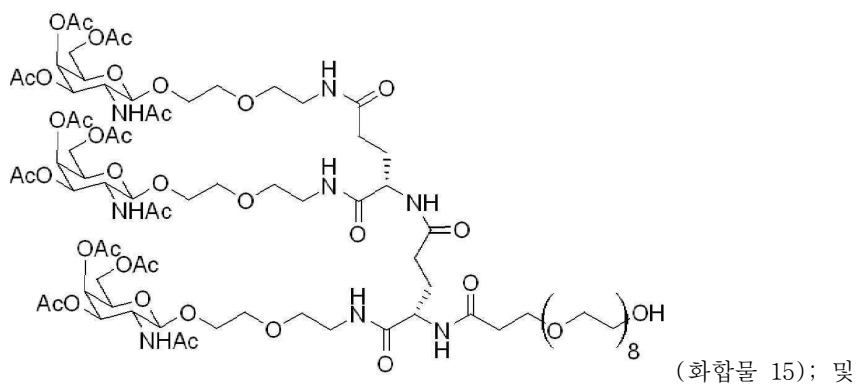
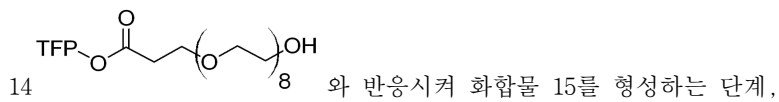


(iii-d) MeOH의 존재 하에서, 화합물 6을 *p*-TsOH-H<sub>2</sub>O와 반응시켜 반응 생성물을 형성하는 단계; 및

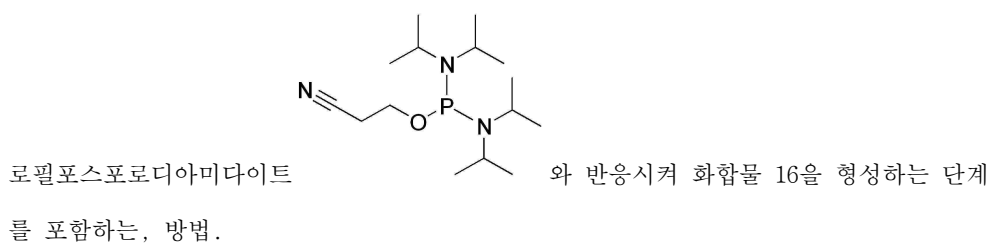
(iii-e) Pd/C의 존재 하에서, 상기 단계 (iii-d)의 반응 생성물을 H<sub>2</sub>로 수소화하여 NAG 아민 염 7을 형성하는 단계,



(iii-f) 디이소프로필에틸아민 및 디클로로메탄의 존재 하에서, NAG 아민 염 7을 HO-PEG<sub>8</sub>-CO<sub>2</sub>TFP 에스테르



(iii-g) 디이소프로필암모늄 테트라졸라이드의 존재 하에서, 화합물 15를 2-시아노에틸-N,N',N'-테트라이소프



청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2016년 3월 7일에 출원된 미국 가특허 출원 62/304,652, 2016년 8월 4일에 출원된 미국 가특허 출원 62/370754, 및 2016년 11월 28일에 출원된 미국 가특허 출원 62/426,916으로부터 우선권을 주장하며, 이들의 각각의 내용은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

## 배경 기술

[0003] 많은 화합물들은 치료 효과를 갖거나 진단 목적에 유용하기 위해 특정한 위치(예를 들어 요망되는 세포(들))까지 전달되어야 한다. 이는 빈번하게는, 생체내에서 치료용 화합물을 전달하려고 시도할 때의 경우이다. 나아가,



화합물을 특정한 위치까지 효율적으로 전달할 수 있는 것은, 이러한 화합물의 투여에 의해 유발될 수 있는 의도치 않은 결과(예컨대 표적외(off-target) 효과)를 제한하거나 잠재적으로 없앨 수 있다. 생체내에서 요망되는 위치로의 화합물, 예컨대 치료용 화합물의 전달을 촉진하기 위한 하나의 방법은 이러한 화합물을 표적화 리간드에 연결하거나 부착함으로써 수행된다.

[0004] 표적화 리간드를 사용하여 표적화될 수 있는 하나의 부류의 치료용 화합물은 올리고머 화합물이다. 표적 핵산에 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고머 화합물은 시험관내 및 생체내 둘 다에서 표적의 기능 및 활성을 변경하는 것으로 나타났다. 올리고머 화합물이 표적 핵산(예컨대 mRNA)을 함유하는 세포까지 전달되는 경우, 이러한 화합물은 표적의 발현을 조정하여, 표적 핵산의 전사 또는 번역을 변경시키는 것으로 나타났다. 소정의 경우, 올리고머 화합물은 핵산 표적을 저해하고/거나 표적 핵산의 분해를 촉발함으로써 유전자의 발현을 감소시킬 수 있다.

[0005] 표적 핵산이 mRNA인 경우, 발현-저해성 올리고머 화합물이 mRNA 표적의 발현을 조정할 수 있는 하나의 메커니즘은 RNA 간섭을 통해서이다. RNA 간섭은, RNA 또는 RNA-유사 분자(예컨대 화학적으로 변형된 RNA 분자)가 분해를 통해 유전자 발현을 침묵시킬 수 있는 생물학적 과정이다. 전사-후 유전자 침묵 과정은, 외래 유전자의 발현을 방지하는 데 사용되는 진화적으로-보존된 세포성 방어 메커니즘인 것으로 생각된다.

[0006] 합성 RNA 및 RNA-유사 분자는 생체내에서 RNA 간섭을 이끌어내는 것으로 나타났다. 예를 들어, Elbashir 등(문헌[Nature 2000, 411, 494-98])은 배양된 포유류 세포에서 합성 21-뉴클레오티드 RNA 분자의 듀플렉스의 도입에 의해 유도되는 RNAi를 기재하고 있다. RNAi 반응 메커니즘을 촉발시킬 수 있는 유형의 합성 RNA 또는 RNA-유사 분자는 변형된 뉴클레오티드 및/또는 하나 이상의 비-포스포디에스테르 연결부로 구성될 수 있다.

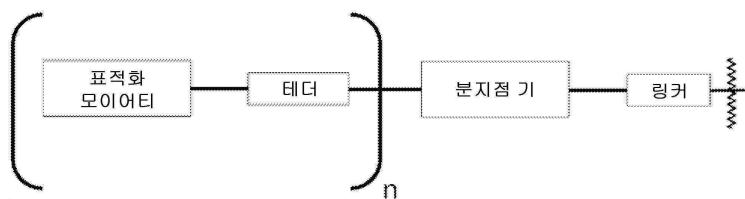
[0007] 부가적으로, 변형된 뉴클레오티드를 또한 포함하고 하나 이상의 비-포스포디에스테르 연결부를 가질 수 있는 단일-가닥 RNA 및 RNA-유사 분자는 또한, 표적 핵산, 예컨대 표적 mRNA의 발현을 변경시킬 수 있다.

### 발명의 내용

[0008] 본원에서, 피험자, 예컨대 인간 환자 또는 동물 내의 특정한 표적 부위, 예를 들어 특정한 기관 또는 조직으로의 치료용 화합물의 전달을 증강시킬 수 있는 표적화 리간드가 개시된다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 표적화 리간드는 발현-저해성 올리고머 화합물의 표적화된 전달을 증강시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 간까지의 발현-저해성 올리고머 화합물의 전달을 증강시킬 수 있다.

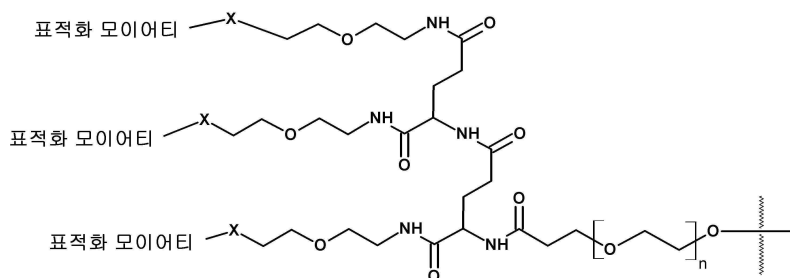
[0009] 본원에 개시된 표적화 리간드는 하나 이상의 표적화 모이어티, 하나 이상의 테더(tether), 하나 이상의 분지점기(branch point group) 및 하나 이상의 링커를 포함하거나 이로 구성된다.

[0010] 본원에서, 식 A의 일반 구조를 포함하거나, 이로 구성되거나, 필수적으로 구성된 표적화 리간드가 개시되어 있으며:



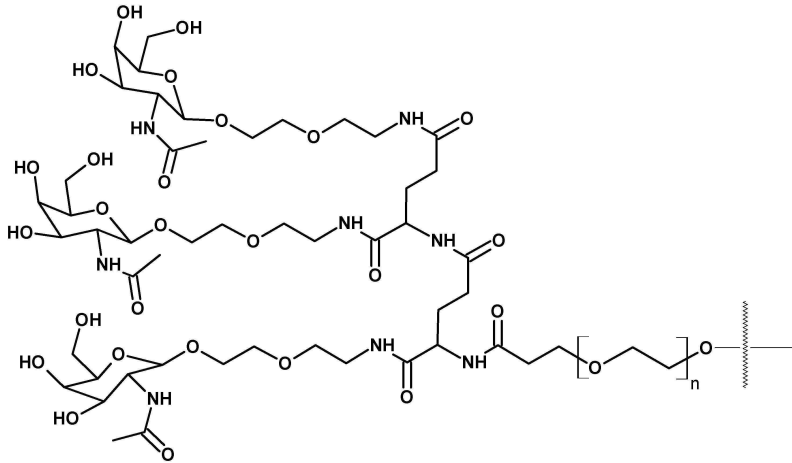
[0011] 상기 식 A에서, n은 1 내지 4(예를 들어 1, 2, 3 또는 4)의 정수이다.

[0013] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드는 식 B의 구조를 포함하거나, 이로 구성되거나, 필수적으로 구성되며:



[0015] 상기 식 B에서, n은 1 내지 20(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20)의 정수이며; X는 O, S 또는 NH이고; 표적화 모이어티는: N-아세틸-갈락토사민, 갈락토스, 갈락토사민, N-포밀-갈락토사민, N-프로피오닐-갈락토사민, N-n-부타노일갈락토사민 및 N-이소-부타노일갈락토사민으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0016] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드는 하기의 구조를 포함하거나, 이로 구성되거나, 필수적으로 구성되며:

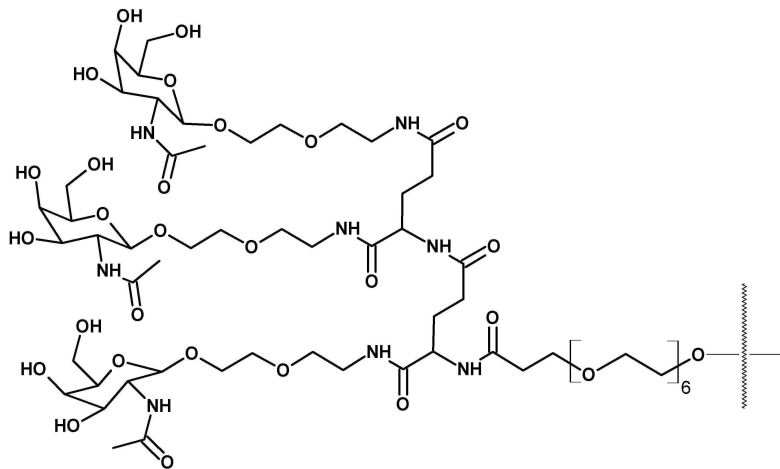


(구조 1)

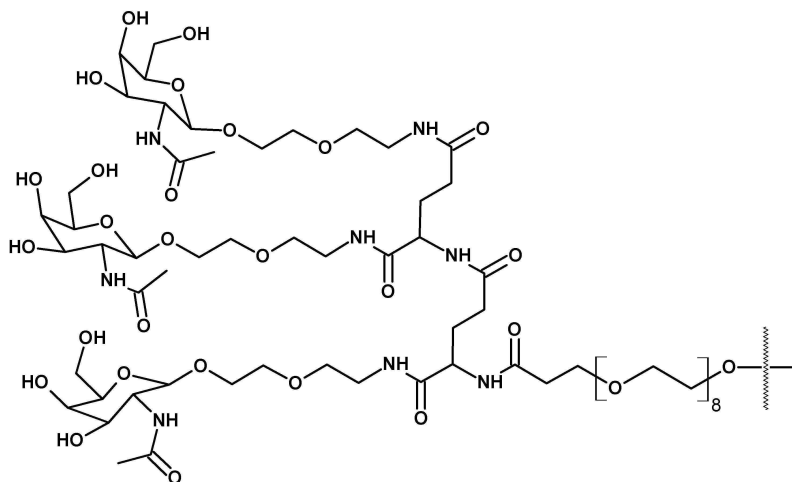
[0017]

[0018] 식 중에서, n은 1 내지 20의 정수이다.

[0019] 일부 실시형태에서, 개시된 표적화 리간드는 하기의 구조들로부터 선택되는 구조를 포함하거나, 이로 구성되거나, 필수적으로 구성된다:

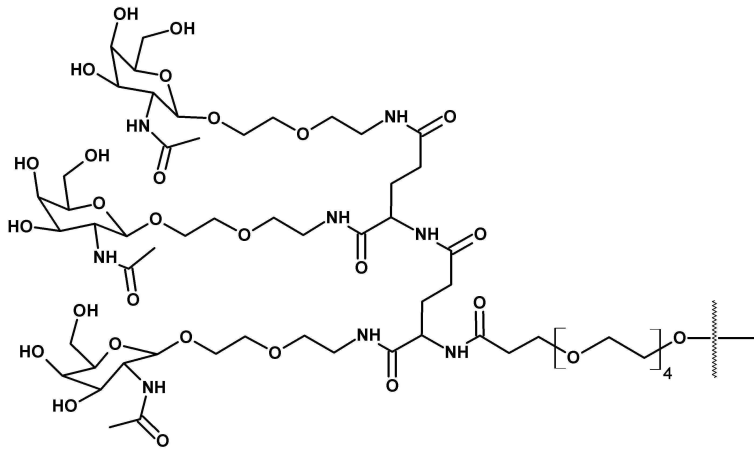


(구조 101);



(구조 102); 및

[0020]



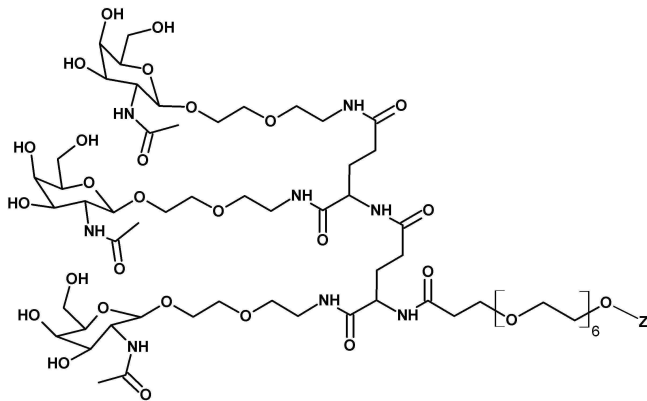
(구조 103)

본원에 개시된 표적화 리간드는 하나 이상의 표적화 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드는 N-아세틸-갈락토사민을 표적화 모이어티로서 포함한다.

본원에 개시된 표적화 리간드는 화합물, 예컨대 치료용 화합물, 예를 들어 발현-저해성 올리고머 화합물, 예를 들어 발현-저해성 올리고머 화합물의 3' 또는 5' 종결 말단에 직접적으로 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물은 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물은 RNAi 제제, 예컨대 이중-가닥 RNAi 제제이다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드는 이중-가닥 RNAi 제제의 센스 가닥(sense strand)의 5' 종결 말단에 연결된다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드는 이중-가닥 RNAi 제제의 센스 가닥의 5' 종결 말단에서 포스페이트, 포스포티오에이트 또는 포스포네이트 기를 통해 RNAi 제제에 연결된다.

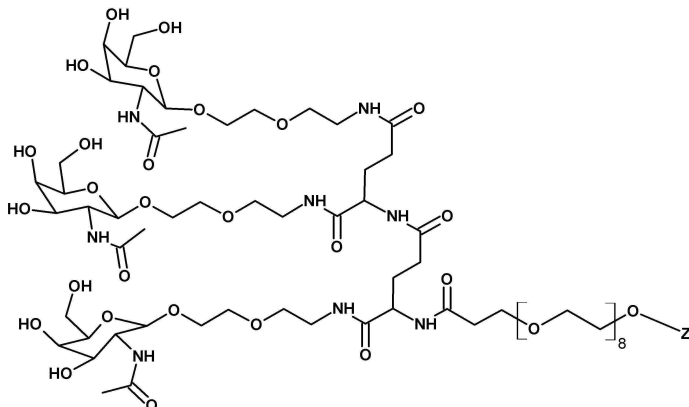
본원에서, 표적화 리간드 및 발현-저해성 올리고머 화합물을 포함하는 조성물이 개시된다. 본원에서, 표적화 리간드 및 RNAi 제제를 포함하는 조성물이 개시된다.

일부 실시형태에서, 표적화 리간드 및 RNAi 제제를 포함하는 본원에 개시된 조성물은 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:



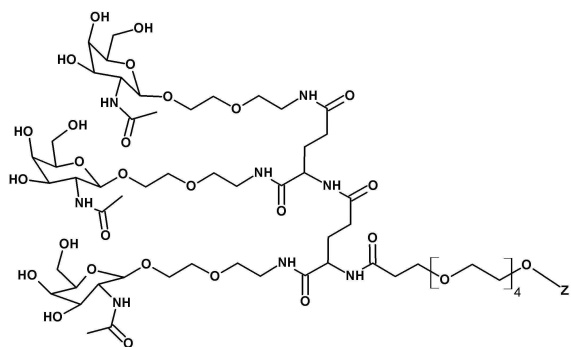
(구조 101a)

식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물을 포함하거나 이로 구성되며;



(구조 102a)

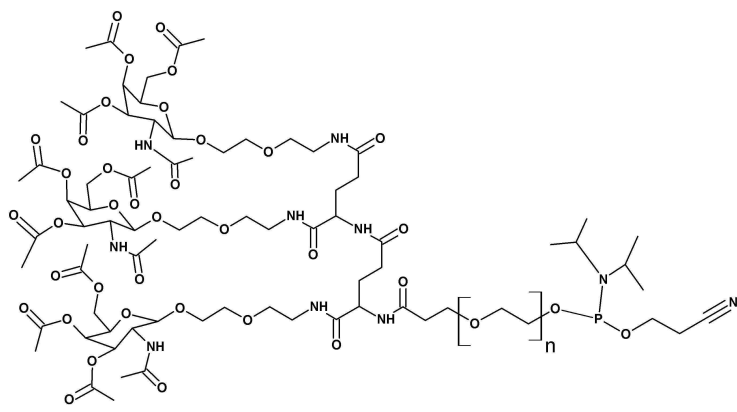
[0029] 식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물을 포함하거나 이로 구성되고;



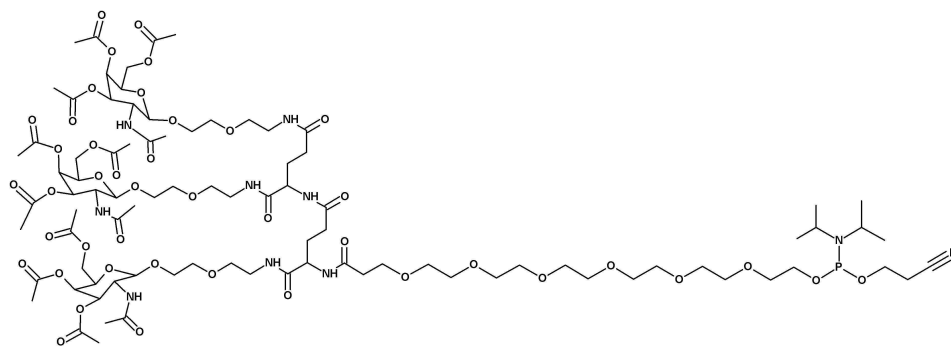
[0031] 식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물을 포함하거나 이로 구성된다.

[0032] 본원에서, 표적화 리간드를 포함하는 포스포아미디트(phosphoramidite) 화합물이 개시된다.

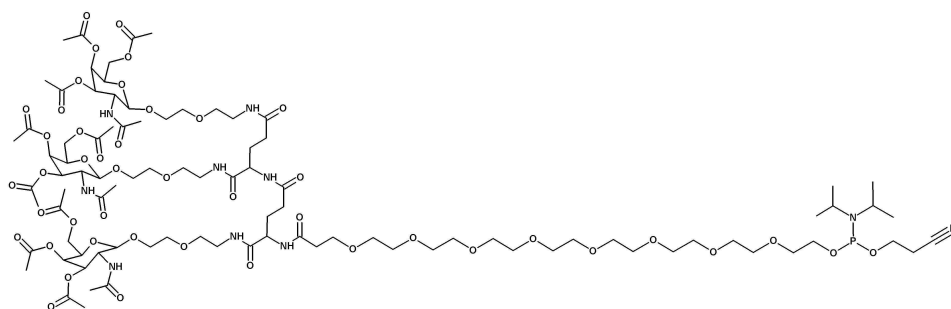
[0033] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드를 포함하는 포스포아미디트 화합물은 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:



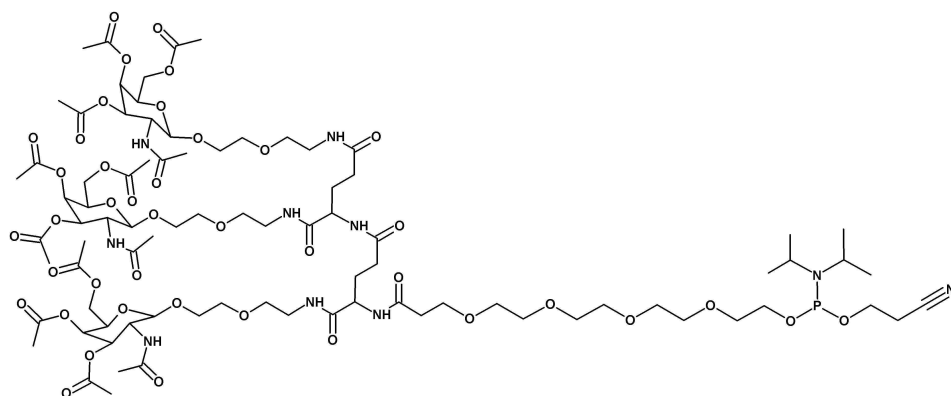
[0035] 식 중에서, n은 1 내지 20(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20)의 정수이다;



(구조 101d);



(구조 102d); 또는



(구조 103d)

[0036]

[0037]

[0038]

[0039]

[0040]

[0041]

또한, 본원에 개시된 표적화 리간드를 포함하는 약제학적 조성물이 개시된다.

치료용 올리고머 화합물의 투여로부터 이득을 얻을 질병 또는 장애의 치료 방법이 개시되며, 이러한 방법은 본원에 개시된 표적화 리간드에 연결된 치료용 올리고머 화합물을 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다.

본원에, 피험자에서 표적 핵산의 발현을 저해하는 방법이 개시되며, 이러한 방법은 치료적 양의, 본원에 개시된 표적화 리간드에 연결된 발현-저해성 올리고머 화합물을 투여하는 단계를 포함한다.

본원에, 생체내에서 발현-저해성 올리고머 화합물을 간까지 전달하는 방법이 개시되며, 이러한 방법은 본원에 개시된 표적화 리간드에 연결된 발현-저해성 올리고머 화합물을 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다.

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "연결된"은, 2개의 분자들 사이에서의 연결을 지칭할 때, 2개의 분자들이 공유 결합에 의해 접합되거나 또는 2개의 분자들이 비공유 결합(예를 들어 수소 결합 또는 이온 결합)을 통해 결합된다는 것을 의미한다. 일부 예들에서, 용어 "연결된"이 비공유 결합을 통한 2개의 분자들 사이에서의 결합을 지칭하는 경우, 2개의 상이한 분자들 사이에서의 결합은 생리학적으로 허용 가능한 완충제(예를 들어 포스페이트 완충 식염수) 내에서  $1 \times 10^{-4}$  M 미만(예를 들어  $1 \times 10^{-5}$  M 미만,  $1 \times 10^{-6}$  M 미만, 또는  $1 \times 10^{-7}$  M 미만)의  $K_D$

를 가진다.

- [0042] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "직접적으로 연결된"은, 제1 화합물 또는 기(group)가 임의의 개입 원자 또는 원자들의 그룹 없이, 제2 화합물 또는 기에 연결됨을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "간접적으로 연결된"은, 제1 화합물이 중간 기, 화합물 또는 분자, 예컨대 연결기를 통해 제2 화합물 또는 기에 연결됨을 지칭한다. 다르게 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같이 용어 "연결된"은 이들 용어가 본원에 정의된 바와 같이 "직접적으로 연결된" 및 "간접적으로 연결된"을 둘 다 포함한다.
- [0043] 본원에 사용된 바와 같이, "올리고머 화합물"은 약 10개 내지 50개의 뉴클레오타이드들 또는 뉴클레오타이드 염기쌍들을 함유하는 뉴클레오타이드 서열이다. 일부 실시형태에서, 올리고머 화합물은 세포 내의 발현된 표적 핵산 또는 표적 유전자 내의 코딩 서열에 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오베이스 서열을 가진다. 일부 실시형태에서, 올리고머 화합물은 유전자를 발현하는 세포에 전달 시, 기저(underlying) 유전자의 발현을 저해할 수 있고, 본원에서 "발현-저해성 올리고머 화합물"로 지칭된다. 유전자 발현은 시험관내 또는 생체내에서 저해될 수 있다. "올리고머 화합물"로는, 올리고뉴클레오타이드, 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드, 단일-가닥 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 짧은 간섭 RNA(siRNA), 이중-가닥 RNA(dsRNA), 마이크로 RNA(miRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 리보자임, 간섭 RNA 분자 및 다이스(dicer) 기질 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 연결된 뉴클레오사이드들의 중합체를 지칭하며, 이들 뉴클레오사이드들은 각각 독립적으로 변형되거나 비변형될 수 있다.
- [0045] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단일-가닥 올리고뉴클레오타이드"는 표적 mRNA에 적어도 부분적으로 상보적인 서열을 갖는 단일-가닥 올리고머 화합물을 의미하며, 이는 포유류 생리학적 조건(또는 시험관내에서 유사한 조건) 하에 수소 결합을 통해 표적 mRNA에 혼성화할 수 있다. 일부 실시형태에서, 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0046] 본원에 사용된 바와 같이, "RNAi 제제"는, 표적 mRNA의 메신저 RNA(mRNA) 전사체의 번역을 서열 특이적 방식으로 분해하거나 저해할 수 있는 RNA 또는 RNA-유사(예를 들어 화학적으로 변형된 RNA) 올리고뉴클레오타이드 분자를 함유하는 제제를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, RNAi 제제는 RNA 간섭 메커니즘(즉, 포유류 세포의 RNA 간섭 경로 머시너리(RNA-유도 침묵 복합체 또는 RISC)와의 상호작용을 통해 RNA 간섭을 유도함)을 통해, 또는 임의의 대안적인 메커니즘(들) 또는 경로(들)에 의해 작동할 수 있다. RNAi 제제가 본원에서 이 용어가 사용되는 바와 같이 주로 RNA 간섭 메커니즘을 통해 작동하긴 하지만, 개시된 RNAi 제제는 임의의 특정한 작용 경로 또는 메커니즘으로 결부되거나 한정되지 않는다. RNAi 제제로는, 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드, 단일-가닥 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 짧은 간섭 RNA(siRNA), 이중-가닥 RNA(dsRNA), 마이크로 RNA(miRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA) 및 다이스 기질 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 본원에 기재된 RNAi 제제는 표적화되는 mRNA에 적어도 부분적으로 상보적인 가닥을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 RNAi 제제는 이중-가닥이고, 안티센스 가닥 및 이러한 안티센스 가닥에 적어도 부분적으로 상보적인 센스 가닥으로 구성된다. RNAi 제제는 변형된 뉴클레오타이드 및/또는 하나 이상의 비-포스포디에스테르 연결부로 구성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 RNAi 제제는 단일-가닥이다.
- [0047] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "침묵시키다," "감소시키다," "저해하다," "하향-조절하다," 또는 "억제시키다"는 주어진 유전자의 발현을 지칭하는 경우, 유전자가 전사되는 세포, 세포군, 조직, 기관 또는 피험자 내의 유전자로부터 전사되는 RNA의 수준 또는 mRNA로부터 번역되는 폴리펩타이드, 단백질 또는 단백질 서브유닛의 수준에 의해 측정되는 바와 같이 유전자의 발현이, 세포, 세포군, 조직, 기관 또는 피험자가 본원에 기재된 표적화 리간드에 연결된 올리고머 화합물로 처리되는 경우, 이렇게 처리되지 않거나 처리되지 않은 제2 세포, 세포군, 조직, 기관 또는 피험자와 비교하여 감소됨을 의미한다.
- [0048] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "서열" 또는 "뉴클레오타이드 서열"은, 뉴클레오베이스 또는 뉴클레오타이드의 연속 또는 순서가 표준 뉴클레오타이드 명명법을 사용하여 문자들의 연속으로 기재되어 있음을 의미한다.
- [0049] 본원에 사용된 바와 같이 그리고 다르게 지시되지 않는 한, 용어 "상보적인"은 제2 뉴클레오타이드 서열(예를 들어 단일-가닥 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이중-가닥 RNAi 제제 안티센스 가닥)과 비교하여 제1 뉴클레오타이드 서열(예를 들어 RNAi 제제 센스 가닥 또는 표적화된 mRNA)을 기재하는 데 사용되는 경우, 제1 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드가 소정의 조건 하에 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드에 혼성화(포유류 생리학적 조건(또는 시험관내에서 유사한 조건) 하에 염기쌍 수소 결합을 형성)하고 듀플렉스 또는 이중 나선 구조를 형성하는 능력을 의미한다. 상보적



인 서열은 왓슨-크릭 염기쌍 또는 비-왓슨-크릭 염기쌍을 포함하고, 천연 또는 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 모방체를 적어도 혼성화 능력에 대해 상기 조건들이 충족되는 정도까지 포함한다.


[0050] 본원에 사용된 바와 같이, "완벽하게 상보적인" 또는 "완전히 상보적인"은, 제1 폴리뉴클레오타이드의 연속적인 (contiguous) 서열 내의 모든(100%) 염기들이 제2 폴리뉴클레오타이드의 연속적인 서열 내의 동일한 수의 염기들과 혼성화할 것임을 의미한다. 연속적인 서열은 제1 또는 제2 뉴클레오타이드 서열의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같이, "부분적으로 상보적인"은, 뉴클레오베이스 서열들의 혼성화된 쌍에서, 제1 폴리뉴클레오타이드의 연속적인 서열 내의 전부는 아니지만 적어도 70%의 염기가 제2 폴리뉴클레오타이드의 연속적인 서열 내의 동일한 수의 염기와 혼성화할 것임을 의미한다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같이, "실질적으로 상보적인"은, 뉴클레오베이스 서열들의 혼성화된 쌍에서, 제1 폴리뉴클레오타이드의 연속적인 서열 내의 전부는 아니지만 적어도 85%의 염기가 제2 폴리뉴클레오타이드의 연속적인 서열 내의 동일한 수의 염기와 혼성화할 것임을 의미한다. 본원에서 용어 "상보적인," "완전히 상보적인" 및 "실질적으로 상보적인"은 이중-가닥 RNAi 제제의 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이, 이중-가닥 RNAi 제제의 안티센스 가닥과 표적 mRNA의 서열 사이, 또는 단일-가닥 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 표적 mRNA의 서열 사이의 염기 매칭에 관하여 사용될 수 있다.

[0053] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다," "치료" 등은, 피험자에서 하나 이상의 증상의 수, 중증도 및/또는 빈도로부터의 경감 또는 완화를 제공하기 위해 취해진 방법 또는 단계를 의미한다.

[0054] 본원에 사용된 바와 같이, 구(phrase) "세포 내로 도입하는"은, 올리고머 화합물을 지칭하는 경우, 올리고머 화합물을 세포 내로 기능적으로 전달하는 것을 의미한다. 구 "기능적인 전달"은, 올리고머 화합물이 유전자 발현의 예상되는 생물학적 활성, 예를 들어 서열-특이적인 저해를 가질 수 있게 하는 방식으로 이러한 올리고머 화합물을 세포까지 전달하는 것을 의미한다.

[0055] 다르게 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같이 부호 의 사용은, 임의의 기 또는 기들이 본원에 기재된 본 발명의 범위에 따라 연결될 수 있음을 의미한다.

[0056] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "이성질체"는, 동일한 분자식을 갖지만 성질, 또는 이들 화합물의 원자의 결합 순서 또는 이들 화합물의 원자의 공간 내에서의 배열이 상이한 화합물들을 지칭한다. 공간 내에서 이들 원자의 배열이 상이한 이성질체들은 "입체이성질체"로 명명된다. 서로 거울상이 아닌 입체이성질체들은 "부분입체이성질체"로 명명되고, 비-중첩 가능한 거울상인 입체이성질체들은 "거울상이성질체" 또는 이따금 광학이성질체로 명명된다. 4개의 비-동일한 치환기에 결합된 탄소 원자는 "키랄 중심"으로 명명된다.

[0057] 본원에 사용된 바와 같이, 구조에서 특정한 형태를 갖는 것으로 구체적으로 식별되지 않는 한, 비대칭성 중심이 존재하고 따라서 거울상이성질체, 부분입체이성질체 또는 다른 입체이성질체 구성을 초래하는 각각의 구조에 대해, 본원에 개시된 각각의 구조는 이들의 광학적으로 순수한 및 라세미 형태들을 포함하여 이러한 모든 가능한 이성질체들을 나타내고자 한다. 예를 들어, 본원에 개시된 구조는 부분입체이성질체 뿐만 아니라 단일 입체이성질체의 혼합물을 망라하고자 한다.

[0058] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "치환된"은, 지정된 원자, 통상 탄소, 산소 또는 질소 원자 상의 임의의 하나 이상의 수소가 본원에 정의된 바와 같은 임의의 기로 대체되되, 단, 이러한 지정된 원자의 정상 원자가가 초과되지 않고 치환이 안정한 화합물을 초래함을 의미한다. 치환기의 비제한적인 예로는, C1-C6 알킬, C2-C6 알케닐, C2-C6 알킬닐, 시아노, 하이드록실, 옥소, 카르복실, 시클로알킬, 시클로알케닐, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴, 아릴, 케토, 알콕시카르보닐, 아릴옥시카르보닐, 헤테로아릴옥시카르보닐 또는 할로(예를 들어 F, Cl, Br, I) 등이 있다. 치환기가 케토 또는 옥소(즉, =O)인 경우, 원자 상의 두(2)개의 수소들은 대체된다. 본원에 사용된 바와 같이 고리 이중 결합은 2개의 인접한 고리 원자들 사이에 형성되는 이중결합이다(예를 들어 C=C, C=N, N=N 등).

[0059] 본 개시내용의 일부 화합물들은 호변이성질체 형태로 존재할 수 있으며, 이 또한 본 개시내용의 범위 내에 포함되고자 한다. "호변이성질체"는, 구조들이 원자의 배열 내에서 확연하게 상이하지만 용이하고 신속한 평형으로 존재하는 화합물이다. 본 개시내용의 화합물들은 상이한 호변이성질체로서 도시될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 화합물이 호변이성질체 형태를 갖는 경우, 모든 호변이성질체 형태들은 본 개시내용의 범위 내에 있고자 하고 화합물의 명칭은 임의의 호변이성질체 형태를 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

- [0060] 본 개시내용의 화합물 및 약제학적으로 허용 가능한 염은 하나 이상의 호변이성질체 형태, 예컨대 헤테로시클릭 고리(예를 들어 뉴클레오베이스 구아닌, 티민 및 시토신) 내에서 케톤 - 에놀, 아마이드 - 니트릴, 락탐 - 락탐, 아마이드 - 이미드산 호변이성질화 현상(tautomerism), 아민 - 엔아민 및 엔아민 - 엔아민 및 기하이성질체 및 이들의 혼합물로 존재할 수 있다. 글루코스 및 다른 당에 의해 나타나는 고리-사슬 호변이성질화 현상은, 당 사슬 분자 내의 알데하이드기(-CHO)를 동일한 분자 내의 하이드록시기(-OH)들 중 하나와 반응시켜 이를 (고리-모양의) 형태로 제공한 결과 발생한다. 이러한 모든 호변이성질체 형태들은 본 개시내용의 범위 내에 포함된다. 호변이성질체는 용액 내에서 호변이성질체성 세트(set)의 혼합물로서 존재한다. 고체 형태에서, 통상 하나의 호변이성질체가 우세하다. 하나의 호변이성질체가 기재될 수 있더라도, 본 개시내용은 본원에 개시된 화합물의 모든 호변이성질체들을 포함한다. 호변이성질화에 의해 호환 가능한 호변이성질체의 개념은 호변이성질화 현상으로 지칭된다. 호변이성질화 현상에서, 전자 및 수소 원자의 동시적인 시프트(shift)가 발생한다.
- [0061] 호변이성질화는: 염기: 1. 탈양자화; 2. 비편재화된 음이온(예를 들어 에놀레이트)의 형성; 3. 음이온의 상이한 위치들에서의 양자화; 산: 1. 양자화; 2. 비편재화된 양이온의 형성; 3. 양이온에 인접한 상이한 위치들에서의 탈양자화에 의해 촉매화된다.
- [0062] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "알킬"은 다르게 명시되지 않는 한, 1개 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지형의 포화된 지방족 탄화수소 기를 지칭한다. 예를 들어, "C1-C6 알킬"은 선형 또는 분지형 배열에 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 탄소를 갖는 알킬기를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "아미노알킬"은, 임의의 위치에서 정상 원자가에 의해 허용되는 바와 같이 하나 이상의 아미노기로 치환된 상기 정의된 바와 같은 알킬기를 지칭한다. 아미노기는 비치환, 모노-치환 또는 디-치환될 수 있다.
- [0063] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "시클로알킬"은 다르게 명시되지 않는 한, 3개 내지 14개의 탄소 원자를 갖는 포화된 또는 불포화된 비방향족 탄화수소 고리 기를 의미한다. 시클로알킬기의 예로는, 시클로프로필, 메틸-시클로프로필, 2,2-디메틸-시클로부틸, 2-에틸-시클로펜틸, 시클로헥실 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 시클로알킬은 다수의 스피로- 또는 융합된 고리들을 포함할 수 있다. 시클로알킬기는 선택적으로, 임의의 위치 상에서 정상 원자가에 의해 허용되는 바와 같이 모노-, 디-, 트리-, 테트라 또는 펜타-치환된다.
- [0064] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "알케닐"은 다르게 명시되지 않는 한, 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 함유하고 2개 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 직선형 또는 분지형의 비-방향족 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 5개 이하의 탄소-탄소 이중 결합이 이러한 기에 존재할 수 있다. 예를 들어, "C2-C6" 알케닐은 2개 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 알케닐 라디칼로서 정의된다. 알케닐기의 예로는, 에테닐, 프로페닐, 부테닐 및 시클로헥세닐 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 알케닐기의 직선형, 분지형 또는 환형 부분은 이중 결합을 함유할 수 있고, 선택적으로, 임의의 위치 상에서 정상 원자가에 의해 허용되는 바와 같이 모노-, 디-, 트리-, 테트라 또는 펜타-치환된다. 용어 "시클로알케닐"은, 특정한 수의 탄소 원자 및 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 모노 탄화수소 기를 의미한다.
- [0065] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "알키닐"은 다르게 명시되지 않는 한, 2개 내지 10개의 탄소 원자를 함유하고 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 함유하는 직선형 또는 분지형의 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 5개 이하의 탄소-탄소 삼중 결합이 존재할 수 있다. 따라서, "C2-C6 알키닐"은 2개 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 알키닐 라디칼을 의미한다. 알키닐기의 예로는, 에티닐, 2-프로피닐 및 2-부티닐 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 알키닐기의 직선형 또는 분지형 부분은 정상 원자가에 의해 허용되는 바와 같이 삼중 결합을 함유할 수 있고, 선택적으로, 임의의 위치 상에서 정상 원자가에 의해 허용되는 바와 같이 모노-, 디-, 트리-, 테트라 또는 펜타-치환될 수 있다.
- [0066] 본원에 사용된 바와 같이, "알콕실" 또는 "알콕시"는 지시된 수의 탄소 원자가 산소 가교를 통해 부착된 상기 정의된 바와 같은 알킬기를 지칭한다. C<sub>1-6</sub> 알콕시는 C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> 및 C<sub>6</sub> 알콕시기를 포함하고자 한다. C<sub>1-8</sub> 알콕시는 C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub> 및 C<sub>8</sub> 알콕시기를 포함하고자 한다. 알콕시의 예로는, 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, i-프로폭시, n-부톡시, s-부톡시, t-부톡시, n-펜톡시, s-펜톡시, n-헥톡시 및 n-옥톡시 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0067] 본원에 사용된 바와 같이, "케토"는 카르보닐 가교를 통해 부착된 본원에 정의된 바와 같은 임의의 알킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 시클로알케닐, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴 또는 아릴 기를 지칭한다. 케토기의 예로는, 알카노일(예를 들어 아세틸, 프로피오닐, 부타노일, 펜타노일, 헥사노일), 알케노일(예를 들어 아크릴로일) 알키노일(예를 들어 에티노일, 프로피노일, 부티노일, 펜티노일, 헥시노일), 아릴오일(예를 들어 벤조일), 헤테



로아릴오일(예를 들어 피롤로일, 이미다졸오일, 퀴놀리노일, 피리디노일) 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0068] 본원에 사용된 바와 같이, "알콕시카르보닐"은 카르보닐 가교를 통해 부착된 상기 정의된 바와 같은 임의의 알콕시기(즉, -C(O)O-알킬)를 지칭한다. 알콕시카르보닐기의 예로는, 메톡시카르보닐, 에톡시카르보닐, 이소-프로폭시카르보닐, n-프로폭시카르보닐, t-부톡시카르보닐, 벤질옥시카르보닐 또는 n-헥톡시카르보닐 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0069] 본원에 사용된 바와 같이, "아릴옥시카르보닐"은 옥시카르보닐 가교를 통해 부착된 상기 정의된 바와 같은 임의의 아릴기(즉, -C(O)O-아릴)를 지칭한다. 아릴옥시카르보닐기의 예로는, 페녹시카르보닐 및 나프틸옥시카르보닐 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0070] 본원에 사용된 바와 같이, "헤테로아릴옥시카르보닐"은 옥시카르보닐 가교를 통해 부착된 본원에 정의된 바와 같은 임의의 헤테로아릴기(즉, -C(O)O-헤테로아릴)를 지칭한다. 헤테로아릴옥시카르보닐기의 예로는, 2-피리딜옥시카르보닐, 2-옥사졸릴옥시카르보닐, 4-티아졸릴옥시카르보닐 또는 피리미디닐옥시카르보닐 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0071] 본원에 사용된 바와 같이, "아릴" 또는 "방향족"은 각각의 고리 내의 7개 이하의 원자들의 임의의 안정한 모노 또는 폴리 탄소 고리를 의미하며, 여기서 적어도 하나의 고리는 방향족이다. 아릴기의 예로는, 페닐, 나프틸, 안트라세닐, 테트라하이드로나프틸, 인다닐 및 비페닐 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 아릴 치환기가 비이고 하나의 고리가 비-방향족인 경우, 부착은 방향족 고리를 통해서인 것으로 이해된다. 아릴기는 선택적으로, 임의의 위치 상에서 정상 원자에게 의해 허용되는 바와 같이 모노-, 디-, 트리-, 테트라 또는 펜타-치환된다.

[0072] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "헤테로아릴"은 각각의 고리 내의 7개 이하의 원자들의 안정한 모노시클릭 또는 폴리시클릭 고리를 나타내며, 여기서 적어도 하나의 고리는 방향족이고 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 내지 4개의 헤테로원자를 함유한다. 헤테로아릴기의 예로는, 아크리디닐, 카르바졸릴, 신놀리닐, 퀴놀살리닐, 피라졸릴, 인돌릴, 벤조트리아졸릴, 푸라닐, 티에닐, 벤조티에닐, 벤조푸라닐, 벤즈이미다졸로닐, 벤조사졸로닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 디하이드로이소인돌로닐, 이미다조피리디닐, 이소인돌로닐, 인다졸릴, 옥사졸릴, 옥사디아졸릴, 이속사졸릴, 인돌릴, 피라지닐, 피리다지닐, 피리디닐, 피리미디닐, 피롤릴, 테트라하이드로퀴놀린 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. "헤테로아릴"은 또한, 임의의 질소-함유 헤테로아릴의 N-옥사이드 유도체를 포함하는 것으로 이해된다. 헤테로아릴 치환기가 비시클릭이고 하나의 고리가 비-방향족이거나 헤테로원자를 함유하지 않는 경우, 부착은 방향족 고리를 통해서이거나 헤테로원자-함유 고리를 통해서인 것으로 이해된다. 헤테로아릴기는 선택적으로, 임의의 위치 상에서 정상 원자에게 의해 허용되는 바와 같이 모노-, 디-, 트리-, 테트라 또는 펜타-치환된다.

[0073] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "헤테로사이클," "헤테로시클릭" 또는 "헤테로사이클릴"은, 폴리시클릭 기를 포함하여, O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 내지 4개의 헤테로원자를 함유하는 3원 내지 14원 방향족 또는 비방향족 헤테로사이클을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "헤테로시클릭"은 또한, 용어 "헤테로사이클" 및 "헤테로사이클릴"과 동의어인 것으로 간주되고, 본원에 나타난 것과 동일한 정의를 갖는 것으로도 이해된다. "헤테로사이클릴"은 상기 언급된 헤테로아릴, 뿐만 아니라 이의 디하이드로 및 테트라하이드로 유사체를 포함하는 것으로 이해된다. 헤테로사이클릴기의 예로는, 아제티디닐, 벤조이미다졸릴, 벤조푸라닐, 벤조푸라자닐, 벤조피라졸릴, 벤조트리아졸릴, 벤조티오펜, 벤조사졸릴, 카르바졸릴, 카르볼리닐, 신놀리닐, 푸라닐, 이미다졸릴, 인돌리닐, 인돌릴, 인돌라지닐, 인다졸릴, 이소벤조푸라닐, 이소인돌릴, 이소퀴놀릴, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 나프토피리디닐, 옥사디아졸릴, 옥소옥사졸리디닐, 옥사졸릴, 옥사졸린, 옥소피페라지닐, 옥소피롤리디닐, 옥소모르폴리닐, 이속사졸린, 옥세타닐, 피라닐, 피라지닐, 피라졸릴, 피리다지닐, 피리도피리디닐, 피리다지닐, 피리딜, 피리디노닐, 피리미딜, 피리미디노닐, 피롤릴, 퀴나졸리닐, 퀴놀릴, 퀴놀살리닐, 테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로푸라닐, 테트라하이드로티오피라닐, 테트라하이드로이소퀴놀리닐, 테트라졸릴, 테트라졸로피리디, 티아디아졸릴, 티아졸릴, 티에닐, 트리아졸릴, 1,4-디옥사닐, 헥사하이드로아제피닐, 피페라지닐, 피페리디닐, 피리딘-2-오닐, 피롤리디닐, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 디하이드로벤조이미다졸릴, 디하이드로벤조푸라닐, 디하이드로벤조티오펜, 디하이드로벤조사졸릴, 디하이드로푸라닐, 디하이드로이미다졸릴, 디하이드로인돌릴, 디하이드로이속사졸릴, 디하이드로이소티아졸릴, 디하이드로옥사디아졸릴, 디하이드로옥사졸릴, 디하이드로피라지닐, 디하이드로피라졸릴, 디하이드로피리디닐, 디하이드로피리미디닐, 디하이드로피롤릴, 디하이드로퀴놀리닐, 디하이드로테트라졸릴, 디하이드로티아디아졸릴, 디하이드로티아졸릴, 디하이드

드로티에닐, 디하이드로트리아졸릴, 디하이드로아제티디닐, 디옥시도티오모르폴리닐, 메틸렌디옥시벤조일, 테트라하이드로푸라닐, 및 테트라하이드로티에닐 및 이의 N-옥사이드 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 헤테로사이클릴 치환기의 부착은 탄소 원자를 통해서 또는 헤테로원자를 통해서 발생할 수 있다. 헤테로사이클릴기는 선택적으로, 임의의 위치 상에서 정상 원자가에 의해 허용되는 바와 같이 모노-, 디-, 트리-, 테트라 또는 펜타-치환된다.

[0074] 당업자는, 본원에 개시된 화합물 및 조성물이, 이러한 화합물 또는 조성물이 위치하는 환경에 따라 양자화된 상태 또는 탈양자화된 상태에서 소정의 원자들(예를 들어 N, O 또는 S 원자)을 가질 수 있음을 쉽게 이해하고 인지할 것이다. 이에 본원에 사용된 바와 같이, 본원에 개시된 구조는, 소정의 작용기들, 예를 들어 OH, SH 또는 NH가 양자화되거나 탈양자화될 수 있음을 예상한다. 본원의 개시내용은 개시된 화합물 및 조성물을 환경의 pH에 따른 이들의 양자화 상태와는 관계없이 망라하고자 하며, 이는 당업자에 의해 쉽게 이해될 것이다.

[0075] 본원의 청구항에 사용된 바와 같이, 구 "~로 구성되는"은, 청구항에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분을 배제한다. 본원의 청구항에 사용되는 경우, 구 "필수적으로 ~로 구성되는"은 청구항의 범위를 명시된 물질 또는 단계, 및 청구된 발명의 기본적인 특징(들) 및 신규 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것들로 한정한다.

[0076] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 보편적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 방법 및 물질들이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있더라도, 적합한 방법 및 물질이 하기에 기재된다. 본원에서 언급된 모든 공개, 특허 출원, 특허 및 다른 참조 문헌들은 이들 전체가 원용에 의해 포함된다. 상충하는 경우, 정의를 포함하여 본 명세서가 좌우할 것이다. 또한, 물질, 방법 및 실시에는 예시적일 뿐, 제한하려는 것이 아니다.

[0077] 본 발명의 다른 특징 및 이점들은 하기 상세한 설명 및 청구항으로부터 명확해질 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0078] 도 1은 화합물 3의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼이다(하기 실시예 1에 기재되어 있음).

도 2는 화합물 4의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼이다(하기 실시예 1에 기재되어 있음).

도 3은 화합물 6의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼이다(하기 실시예 1에 기재되어 있음).

도 4는 화합물 7의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼이다(하기 실시예 1에 기재되어 있음).

도 5는 화합물 9의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼이다(하기 실시예 1에 기재되어 있음).

도 6은 화합물 10의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼이다(본원에서 구조 101d이고 하기 실시예 1에 기재되어 있음).

도 7은 화합물 13의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼이다(본원에서 구조 103d이고 하기 실시예 2에 기재되어 있음).

도 8은 화합물 16의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼이다(본원에서 구조 102d이고 하기 실시예 3에 기재되어 있음).

도 9는 구조 103d에 공액된 AM03704에 대한 HPLC 크로마토그램이다(하기 실시예 5에 기재되어 있음).

도 10은 구조 101d에 공액된 AM03704에 대한 HPLC 크로마토그램이다(하기 실시예 5에 기재되어 있음).

도 11은 구조 102d에 공액된 AM03704에 대한 HPLC 크로마토그램이다(하기 실시예 5에 기재되어 있음).

도 12는 야생형 마우스에서 정규화된 마우스 인자 12(mF12) 단백질 수준을 예시하는 그래프이다(하기 실시예 6에 기재되어 있음).

도 13은 야생형 마우스에서 정규화된 마우스 인자 12(mF12) 단백질 수준을 예시하는 그래프이다(하기 실시예 7에 기재되어 있음).

도 14는 Lp(a) 유전자 도입(Tg; transgenic) 마우스에서 정규화된 지질단백질(a)(Lp(a)) 입자 수준을 예시하는 그래프이다(하기 실시예 8에 기재되어 있음).

도 15는 Lp(a) Tg 마우스에서 정규화된 지질단백질(a)(Lp(a)) 입자 수준을 예시하는 그래프이다(하기 실시예 9에 기재되어 있음).

도 16은 apo(a) 유전자 도입(Tg) 마우스에서 정규화된 apo(a) 수준을 예시하는 그래프이다(하기 실시예 10에 기재되어 있음).

도 17은 시노볼구스 원숭이에서 정규화된 cF12 단백질 수준을 예시하는 그래프이다(하기 실시예 12에 기재되어 있음).

도 18은 PiZ 유전자 도입 마우스에서 정규화된 AAT(Z-AAT) 단백질 수준을 예시하는 그래프이다(하기 실시예 13에 기재되어 있음).

도 19는 야생형 마우스에서 정규화된 마우스 인자 12(mF12) 단백질 수준을 예시하는 그래프이다(하기 실시예 14에 기재되어 있음).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0079] 본원에, 화합물, 예컨대 치료용 또는 진단용 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되는 신규 표적화 리간드가 기재된다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 표적화 리간드에 연결되는 화합물은 RNAi 제제인 치료용 화합물을 포함하거나 이로 구성된다. 표적화 리간드는 치료용 화합물을 표적 핵산 또는 표적 유전자의 요망되는 위치로 표적화하는 데 사용될 수 있다. 또한 본원에, 표적화 리간드 및 치료용 화합물을 포함하는 조성물, 예컨대 표적화 리간드 및 발현-저해성 올리고머 화합물을 포함하거나 이로 구성된 조성물이 기재된다.

[0080] 본원에 개시된 새로운 표적화 리간드는 효율적인 표적화 또는 생물-분포, 생체내 및 시험관내에서의 충분한 안정성을 제공하고, 포스포아미디트로서 합성되기에 적합하며, 이는 제조 비용 및 부담을 감소시키고, 발현-저해성 올리고머 화합물, 예컨대 RNAi 제제에 연결된 이전에 간주된 표적화 리간드를 능가하여 효능을 증가시킬 수 있다.

### [0081] 표적화 리간드

[0082] 표적화 리간드는 하나 이상의 표적화 기(들) 또는 표적화 모이어티(들)로 구성되며, 이는, 이들 리간드가 연결되는 화합물의 약물동력학적 또는 생물-분포 특성을 증강시키고 공액된 조성물의 세포- 또는 조직-특이적인 분포 및 세포-특이적인 흡수를 개선하는 역할을 할 수 있다. 일반적으로, 표적화 리간드는, 이러한 리간드가 연결된 치료용 화합물을 요망되는 표적 부위까지 전달되는 것을 안내하는 데 일조한다. 일부 예들에서, 표적화 모이어티는 세포 또는 세포 수용체에 결합하고, 세포 내로 치료용 화합물의 도입을 촉진하기 위해 엔도시토시스(endocytosis)를 개시할 수 있다. 표적화 모이어티는 세포 수용체 또는 세포 표면 분자 또는 항체에 친화성을 갖는 화합물을 포함할 수 있다. 표적화 모이어티를 함유하는 여러 가지 표적화 리간드들은, 제제를 세포 및 특정한 세포성 수용체까지 표적화하기 위해 치료제 및 다른 화합물에 연결될 수 있다. 표적화 모이어티의 유형으로는, 탄수화물, 콜레스테롤 및 콜레스테릴기, 및 스테로이드가 있다. 세포 수용체에 결합할 수 있는 표적화 모이어티는 당류, 예컨대 갈락토스, 갈락토스 유도체(예컨대 N-아세틸-갈락토사민), 만노스 및 만노스 유도체; 다른 탄수화물; 글리칸; 합텐; 비타민; 폴레이트; 비오틴; 앵타머; 및 펩타이드, 예컨대 RGD-함유 펩타이드, 인슐린, EGF 및 트랜스페린을 포함한다.

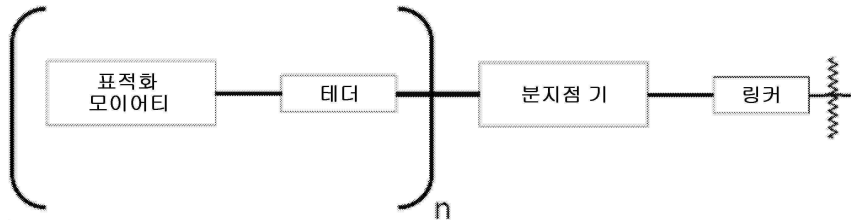
[0083] 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)에 결합하는 것으로 공지된 표적화 모이어티는 특히, 올리고머 화합물을 간까지 전달하는 것을 안내하는 데 특히 유용하다. 아시알로당단백질 수용체는 간세포를 포함한 간 세포 상에서 풍부하게 발현된다. ASGPR을 표적화하는 세포 수용체 표적화 모이어티는 갈락토스 및 갈락토스 유도체를 포함한다. 특히, 2, 3 또는 4개의 N-아세틸-갈락토사민(GalNAc 또는 NAG)으로 구성된 클러스터를 포함하여 갈락토스 유도체의 클러스터는 간 세포 내에서 소정의 화합물들의 흡수를 촉진할 수 있다. 올리고머 화합물에 공액된 GalNAc 클러스터는 조성물을 간까지 안내하는 역할을 하고, 여기서 N-아세틸-갈락토사민 당은 간 세포의 표면 상의 아시알로당단백질 수용체에 결합할 수 있다. 아시알로당단백질 수용체와의 결합은 수용체-매개 엔도시토시스를 개시하는 것으로 여겨지며, 이로써 세포의 내부 내로의 화합물의 도입을 촉진한다.

[0084] 본원에 개시된 표적화 리간드는 1, 2, 3, 4개, 또는 4개 초과 표적화 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드는 분지점 기에 연결된 1, 2, 3, 4개, 또는 4개 초과 표적화 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드는 분지점 기에 연결된 1, 2, 3, 4개, 또는 4개 초과 표적화 모이어티를 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 표적화 모이어티는 테더를 통해 분지점 기

에 연결된다.

[0085] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드는 분지점 기에 연결된 1, 2, 3, 4개, 또는 4개 초과와 아시알로당단백질 수용체(ASGPR) 표적화 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드는 분지점 기에 연결된 1, 2, 3, 4, 또는 4 이상의 ASGPR 표적화 모이어티를 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 ASGPR 표적화 모이어티는 테더를 통해 분지점 기에 연결된다.

[0086] 본원에 기재된 표적화 리간드는 하기 식 I로 표시되며:



[0087]

[0088] 상기 식 I에서,  $n$ 은 1 내지 4(예를 들어 1, 2, 3 또는 4)의 정수이다(식 I). 일부 실시형태에서, 식 I에서  $n$ 은 1 내지 3, 1 내지 2, 2 내지 4, 2 내지 3, 또는 3 내지 4의 정수이다.

[0089] 본원에 개시된 표적화 리간드는 치료용 화합물, 예컨대 올리고머 화합물에 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 부가적인 링커 및/또는 절단 가능한 모이어티를 통해 치료용 화합물에 연결되며, 그런 다음 이는 치료용 화합물에 연결된다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 치료용 화합물 자체에 연결된다.

[0090] 일부 실시형태에서, 치료용 화합물은 발현-저해성 올리고머 화합물이다. 일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물은 RNAi 제제이다. 일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물은 이중-가닥 RNAi 제제이다.

[0091] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 이중-가닥 RNAi 제제의 센스 가닥의 5' 말단에 직접적으로 또는 간접적으로 연결된다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 이중-가닥 RNAi 제제의 센스 가닥의 3' 말단에 직접적으로 또는 간접적으로 연결된다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 이중-가닥 RNAi 제제의 안티센스 가닥의 5' 말단 또는 3' 말단에 직접적으로 또는 간접적으로 연결된다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 단일-가닥 RNAi 제제의 5' 말단 또는 3' 말단에 직접적으로 또는 간접적으로 연결된다.

[0092] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 이중-가닥 RNAi 제제의 센스 가닥의 종결 뉴클레오타이드의 5' 말단에서 포스페이트, 포스포네이트, 포스포티오에이트 또는 다른 뉴클레오타이드간 연결기를 통해 이중-가닥 RNAi 제제에 연결된다.

[0093] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드는 절단 가능한 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 절단 가능한 모이어티는 절단될 수 있는 포스페이트 또는 다른 뉴클레오타이드간 연결기를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 절단 가능한 모이어티를 통해 치료용 화합물에 연결된다.

[0094] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드는, 절단 가능한 모이어티를 포함하는 부가적인 기 또는 기들에 연결된다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 절단 가능한 모이어티에 연결되며, 그런 다음 이러한 모이어티는 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결된다.

[0095] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 포스포아미디트 화합물(본원에서 "포스포아미디트-함유 화합물"로도 지칭됨)이다. 본원에 기재된 표적화 리간드를 포함하는 포스포아미디트 화합물은, 일반적으로 당업계에 공지된 포스포아미디트 합성 방법을 사용하여 표적화 리간드를 치료용 화합물 또는 다른 기에 쉽게 부착시키는 데 유용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드를 포함하는 포스포아미디트 화합물은 일반적으로 당업계에 공지된 방법을 사용하여 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결된다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드-함유 포스포아미디트는 이중-가닥 RNAi 제제의 센스 가닥의 5' 말단에 연결된다.

[0096] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드에 연결된 발현-저해성 올리고머 화합물은 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드는 단일-가닥 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 단일-가닥 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 직접적으로 연결된다. 일부 실시형태에서, 부가적인 기는 표적화 리간드와 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 사이에 삽입된다.

[0097] 일부 실시형태에서, RNAi 제제에 연결된 표적화 리간드는 하나 이상의 N-아세틸-갈락토사민 당을 표적화 모이어티 또는 표적화 모이어티들로서 포함한다.



[0098] 일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결된 표적화 리간드는, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하는 테더를 포함한다. 일부 실시형태에서, 테더는 PEG로 구성된다. 일부 실시형태에서, 테더는 1개 내지 10개의 에틸렌 글리콜 유닛을 갖는 PEG를 포함한다. 일부 실시형태에서, 테더는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 에틸렌 글리콜 유닛을 갖는 PEG를 포함한다.

[0099] 일부 실시형태에서, RNAi 제제에 연결된 표적화 리간드는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 링커로서 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 PEG를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 PEG로 구성된다. 일부 실시형태에서, 링커는 1개 내지 20개의 에틸렌 글리콜 유닛을 갖는 PEG를 포함한다. 일부 실시형태에서, 테더는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 에틸렌 글리콜 유닛을 갖는 PEG를 포함한다.

[0100] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드들 중 임의의 표적화 리간드에 연결된 발현-저해성 올리고머 화합물은 RNAi 제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드는 RNAi 제제에 직접적으로 또는 간접적으로 연결된다.

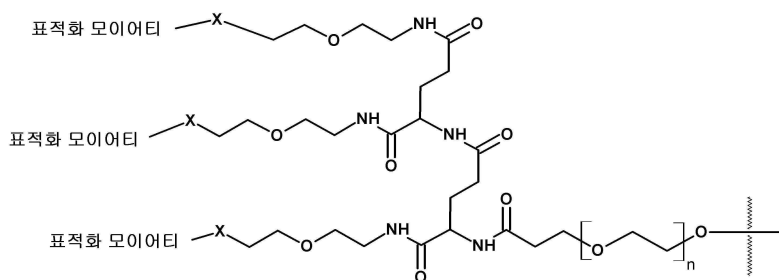
[0101] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드는 RNAi 제제에 직접적으로 연결된다. 일부 실시형태에서, 부가적인 기(들)가 RNAi 제제와 표적화 리간드의 링커 사이에 삽입되기 때문에, 본원에 개시된 표적화 리간드가 RNAi 제제에 간접적으로 연결된다. 일부 실시형태에서, 제2 링커는 상기 링커와 치료용 화합물 사이에 포함된다.

[0102] **표적화 리간드 구조, 및 표적화 리간드를 포함하는 포스포아미디트 화합물**

[0103] 본원에 개시된 표적화 리간드는 하나 이상의 표적화 모이어티, 테더, 분지점 기 및 링커로 구성될 수 있다. 본원에 개시된 표적화 리간드는 1, 2, 3, 4개, 또는 4개 이상의 표적화 모이어티를 함유할 수 있다.

[0104] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드는 포스포아미디트 화합물 형태로 존재하도록 합성된다. 포스포아미디트는 RNA 및 DNA의 화학적 합성에 광범위하게 사용된다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 포스포아미디트-함유 표적화 리간드는 이중-가닥 RNAi 제제의 센스 가닥의 5' 말단에 첨가된다. 특히, 표적화 리간드가 발현-저해성 올리고머 화합물의 5' 종결 말단에 연결되어야 하는 경우, 표적화 리간드를 포스포아미디트로서 제조하는 것이 유리할 수 있다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 표적화 리간드가 발현-저해성 올리고머 화합물의 5' 종결 말단에 연결되는 경우, 표적화 리간드를 포스포아미디트로서 제조하는 것은 마지막 구성성분으로서의 표적화 리간드의 연결부를 허용할 뿐만 아니라(따라서 제조 비용을 감소시킴), 잠재적으로는 표적화 리간드가 이중-가닥 RNAi 제제의 센스 가닥의 5' 종결 말단에 부착되는 경우 RISC 내로의 센스 가닥의 로딩을 이러한 표적화 리간드가 차단하게 할 수 있는 것으로 이해된다. 발현-저해성 올리고머 화합물이 이중-가닥 RNAi 제제인 경우, 표적화 리간드가 RNAi 제제의 센스 가닥의 5' 종결 말단에 연결되어야 하는 경우 이러한 표적화 리간드는 포스포아미디트 화합물로서 제조될 수 있다.

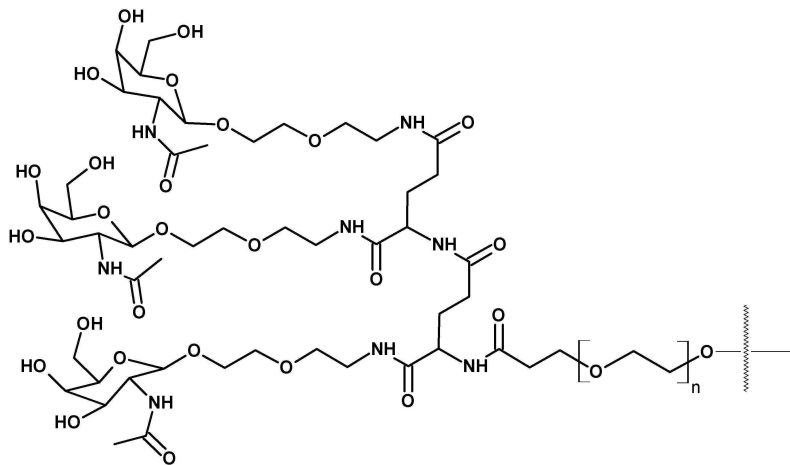
[0105] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기 식 B로 표시되며:



[0106]

[0107] 상기 식 B에서, n은 1 내지 20의 정수이며; X는 O, S 또는 NH이고; 표적화 모이어티는 갈락토스, 갈락토사민, N-포밀-갈락토사민, N-아세틸-갈락토사민, N-프로피오닐-갈락토사민, N-n-부타노일갈락토사민 또는 N-이소-부타노일갈락토사민으로 이루어진 군으로부터 선택된다(식 B). 일부 실시형태에서, n은 6이다. 일부 실시형태에서, n은 8이다. 일부 실시형태에서, n은 4이다.

[0108] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:



[0109]

(구조 1)

[0110]

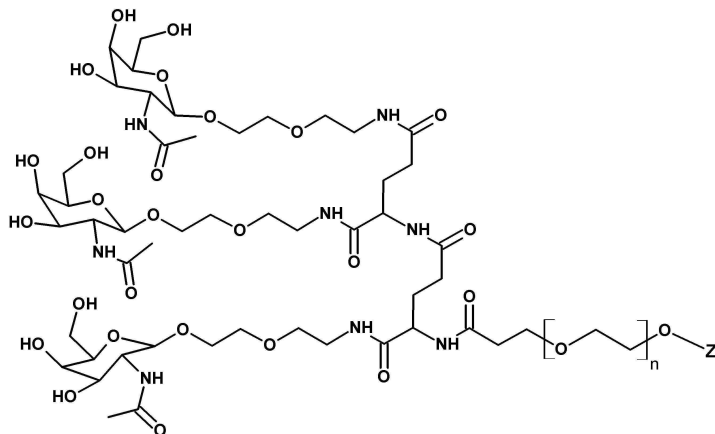
식 중에서, n은 1 내지 20(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20)의 정수이다.

[0111]

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 n = 6인 구조 1로 표시된 구조를 가진다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 n = 8인 구조 1로 표시된 구조를 가진다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 n = 4인 구조 1로 표시된 구조를 가진다.

[0112]

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:



[0113]

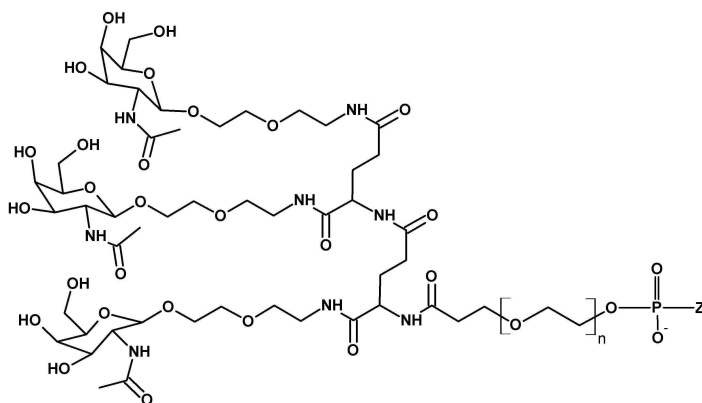
(구조 1a)

[0114]

식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물을 포함하거나 이로 구성된다.

[0115]

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:



[0116]

(구조 1b)

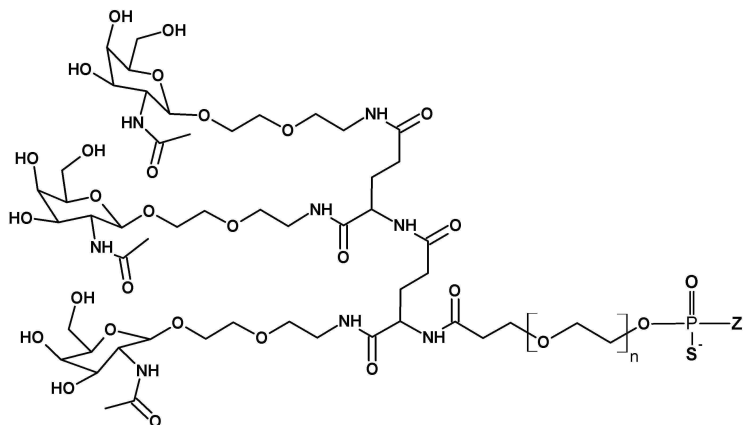
[0117]

식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물로 구성되거나 이를 포함한다.

[0118]

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를

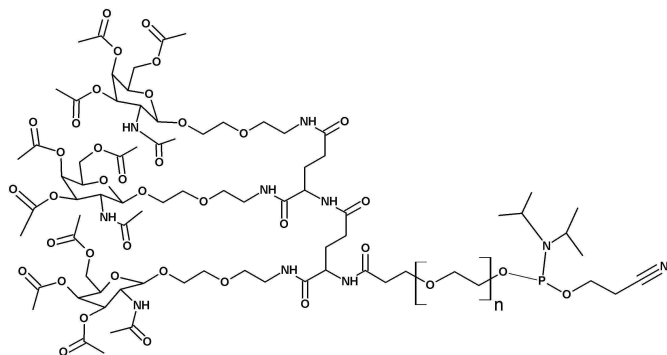
가지며:



(구조 1c)

식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물로 구성되거나 이를 포함한다.

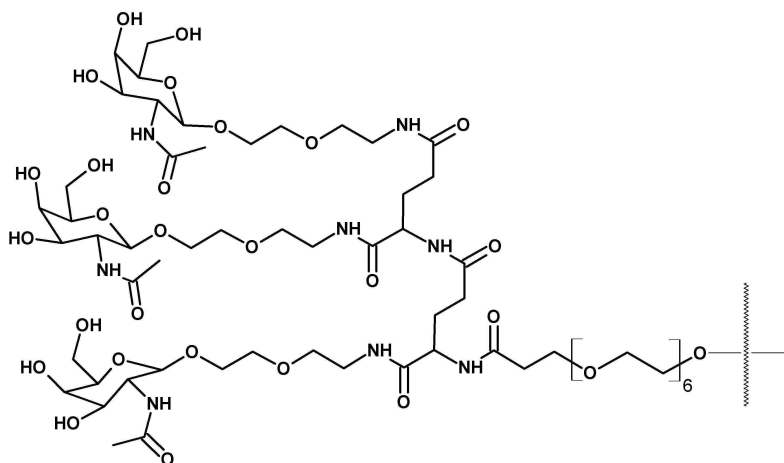
일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 갖는 포스포아미디트-함유 화합물이며:



(구조 1d)

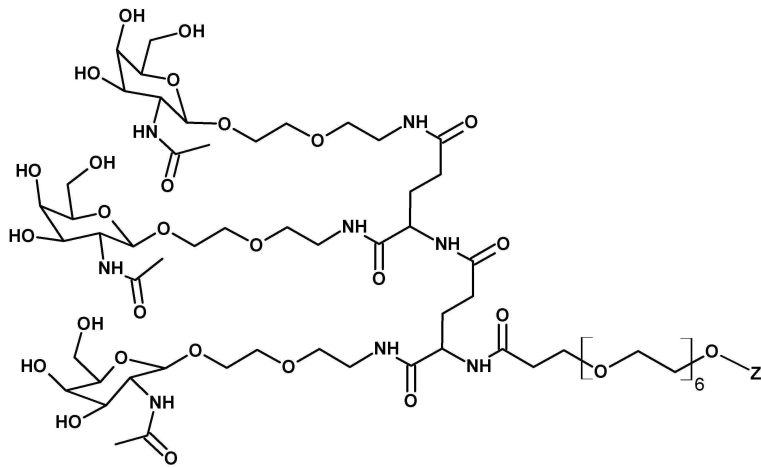
식 중에서, n은 1 내지 20(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20)의 정수이다.

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 포함하거나 이로 구성된다:



(구조 101)

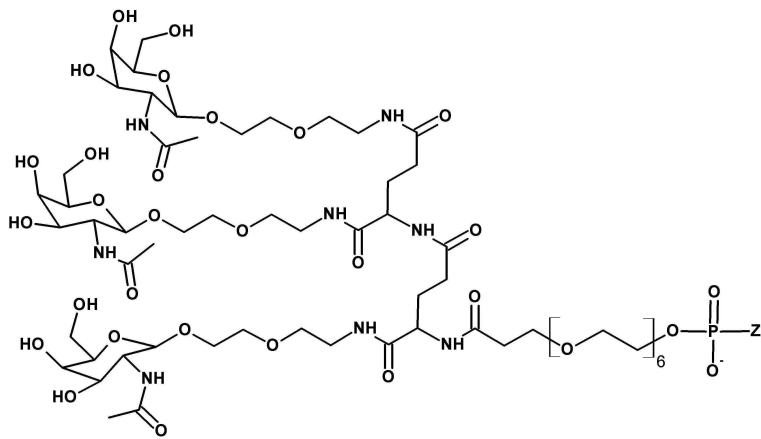
일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:



(구조 101a)

식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물을 포함하거나 이로 구성된다.

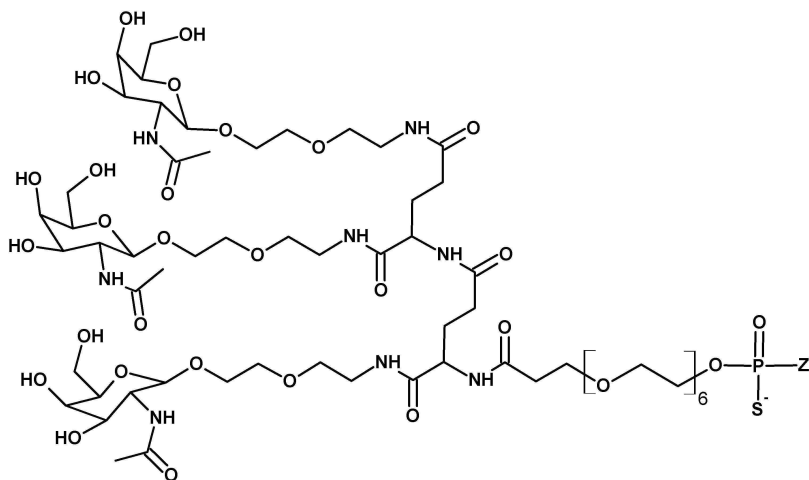
일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:



(구조 101b)

식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물로 구성되거나 이를 포함한다.

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:

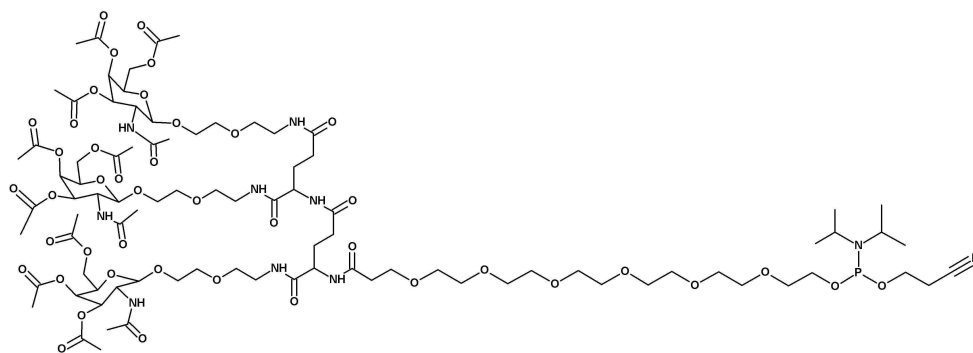


(구조 101c)

식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물로 구성되거나 이를 포함한다.

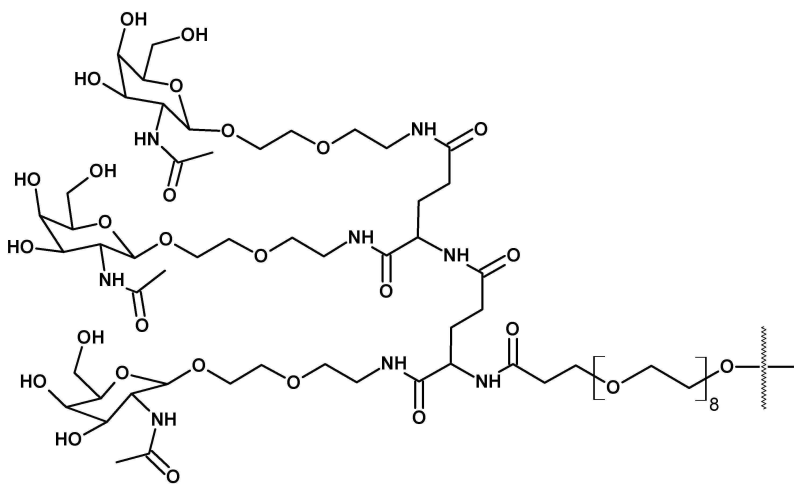
일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 갖는 포스포아미디트-함유 화합물이다:





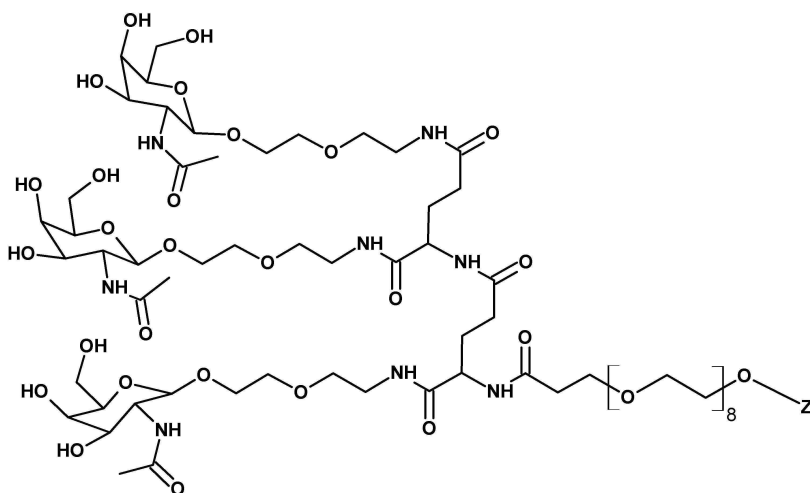
(구조 101d)

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 포함하거나 이로 구성된다:



(구조 102)

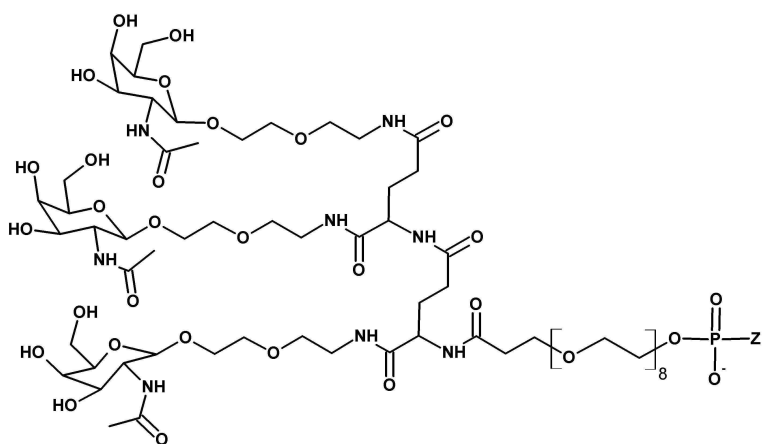
일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:



(구조 102a)

식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물을 포함하거나 이로 구성된다.

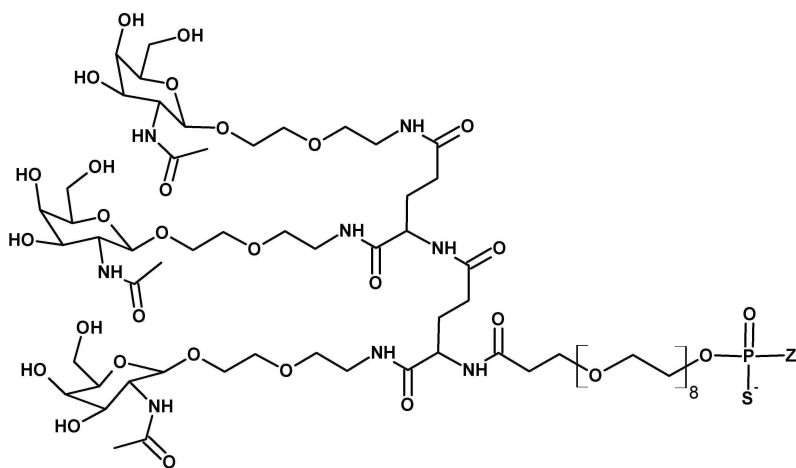
일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:



[0143] (구조 102b)

[0144] 식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물로 구성되거나 이를 포함한다.

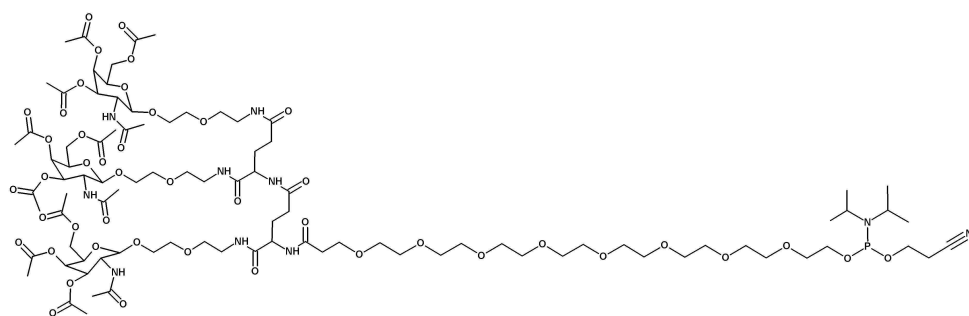
[0145] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:



[0146] (구조 102c)

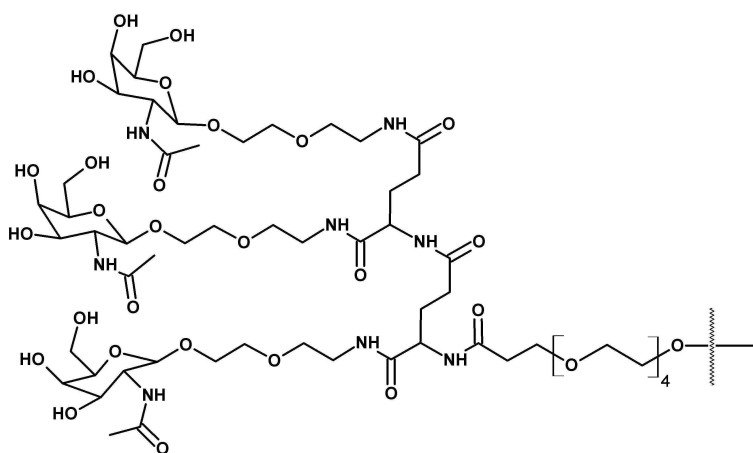
[0147] 식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물로 구성되거나 이를 포함한다.

[0148] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 갖는 포스포아미디트-함유 화합물이다:



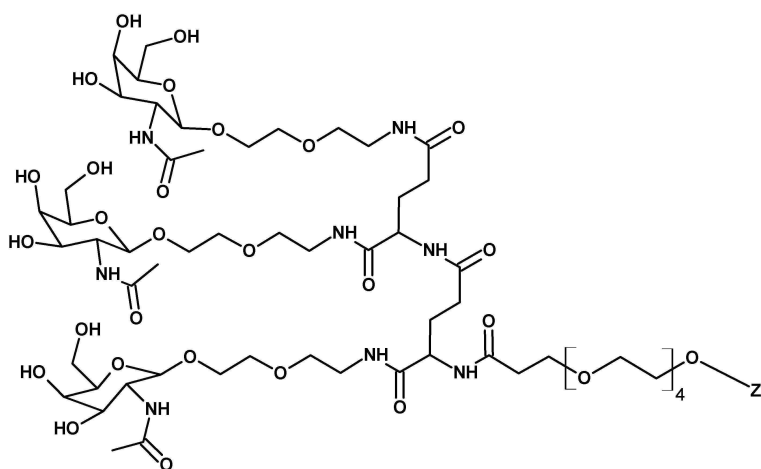
[0149] (구조 102d)

[0150] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드 하기의 구조로 표시된 구조를 포함하거나 이로 구성된다:



(구조 103)

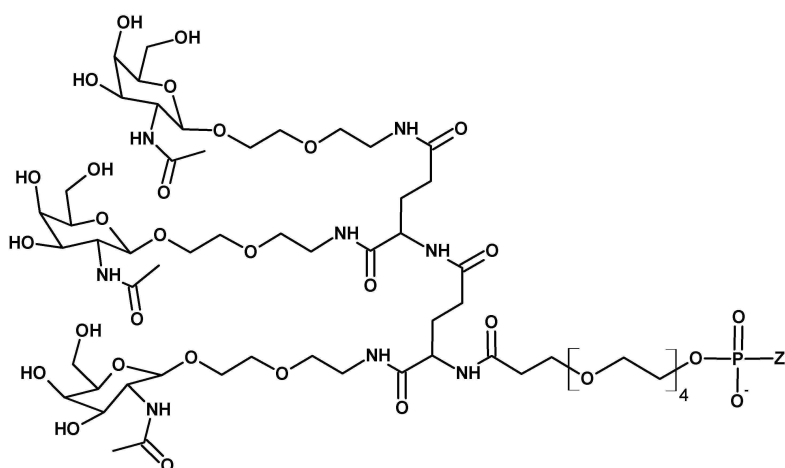
일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:



(구조 103a)

식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물을 포함하거나 이로 구성된다.

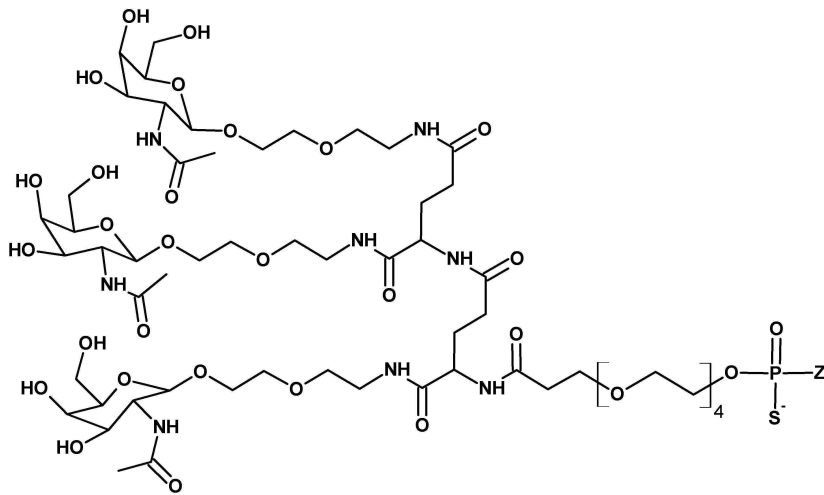
일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:



(구조 103b)

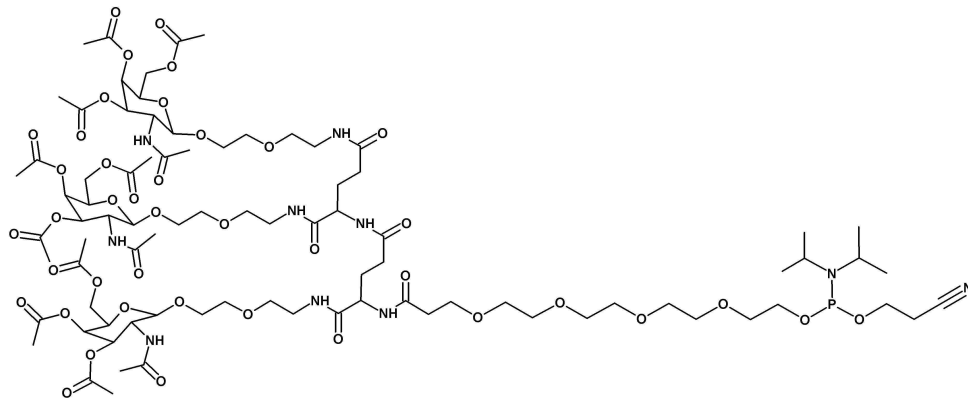
식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물로 구성되거나 이를 포함한다.

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:



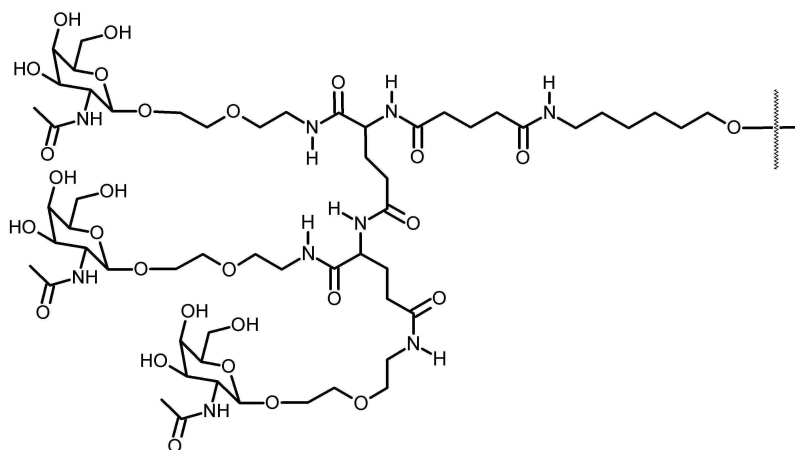
식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물로 구성되거나 이를 포함한다.

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 갖는 포스포아미디트-함유 화합물이다:

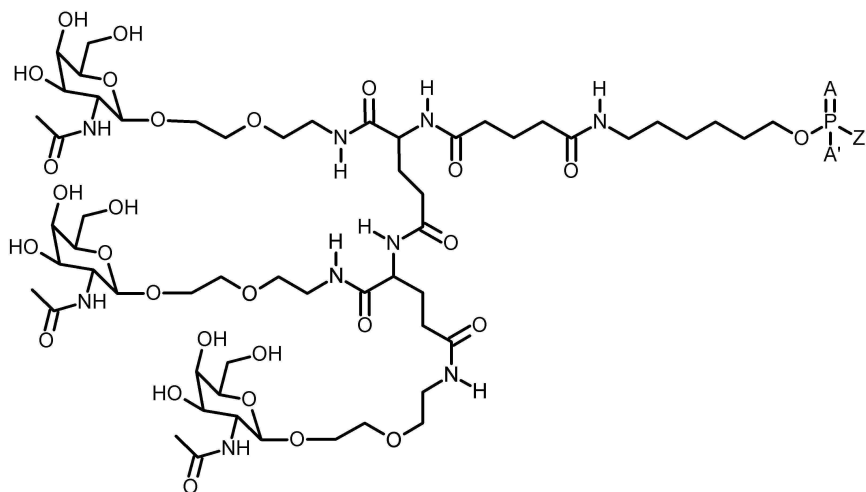


(구조 103d)

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 가진다:

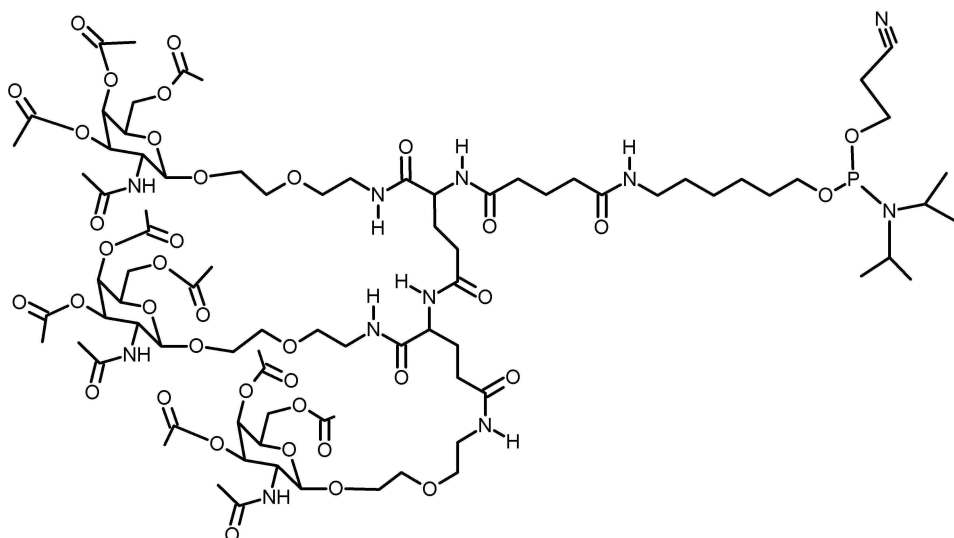


일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물은 표적화 리간드에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:

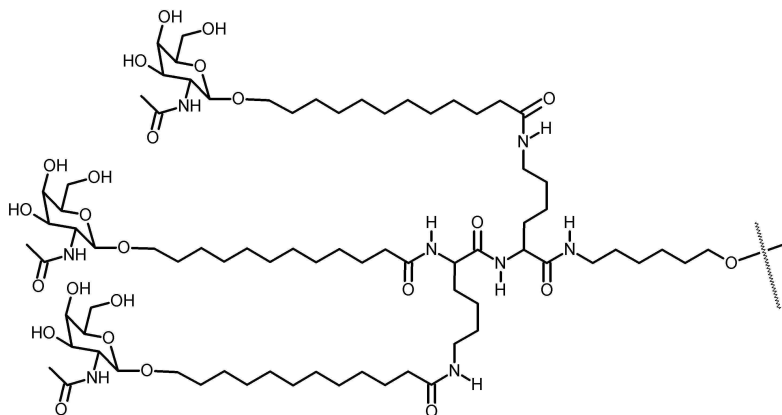


식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물로 구성되거나 이를 포함하며; A는 O 또는 S이고; A'는 O<sup>-</sup>, S<sup>-</sup> 또는 NH<sup>-</sup>이다.

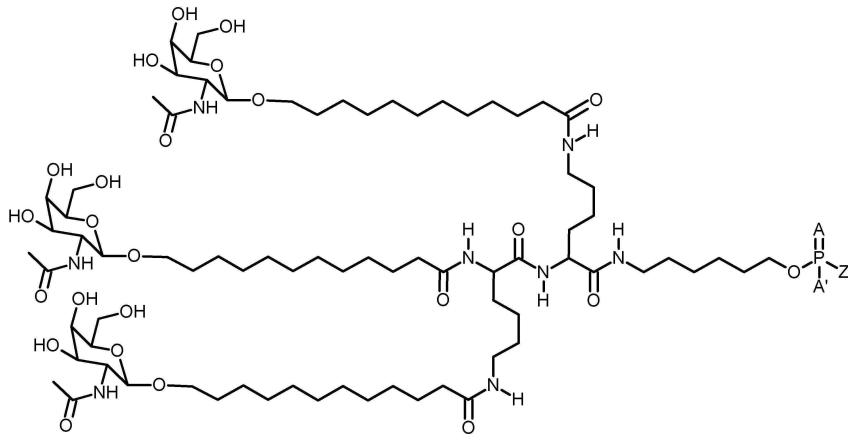
일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 갖는 포스포아미디트-함유 화합물이다:



일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 가진다:



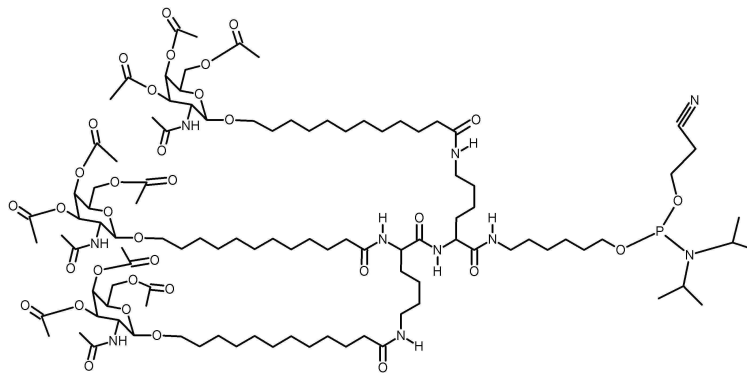
일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물은 표적화 리간드에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:



(구조 3b)

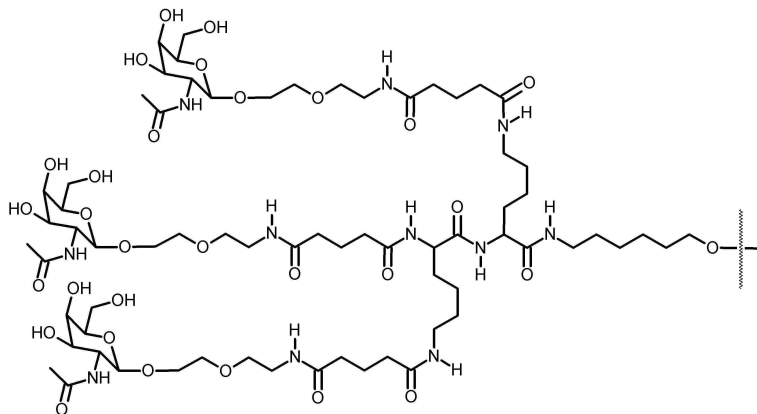
식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물로 구성되거나 이를 포함하며; A는 O 또는 S이고; A'는 O<sup>-</sup>, S<sup>-</sup> 또는 NH<sup>-</sup>이다.

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 갖는 포스포아미디트-함유 화합물이다:



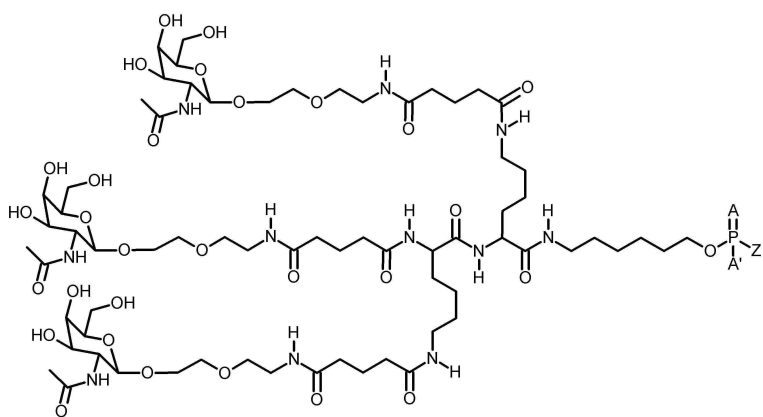
(구조 3d)

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 가진다:



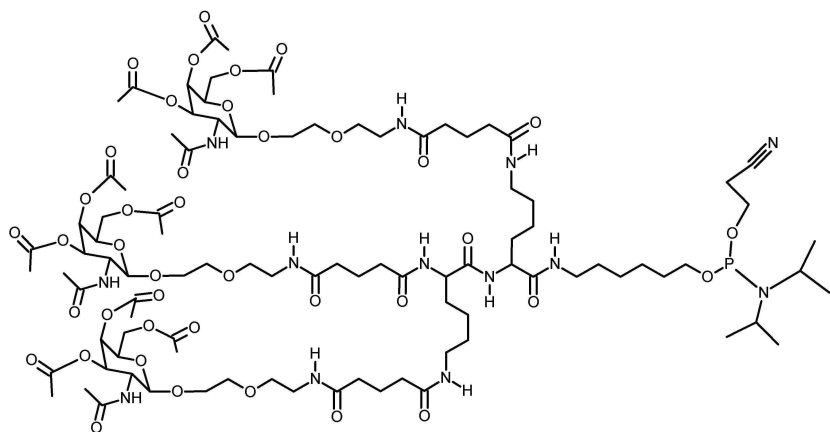
(구조 4)

일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물은 표적화 리간드에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:

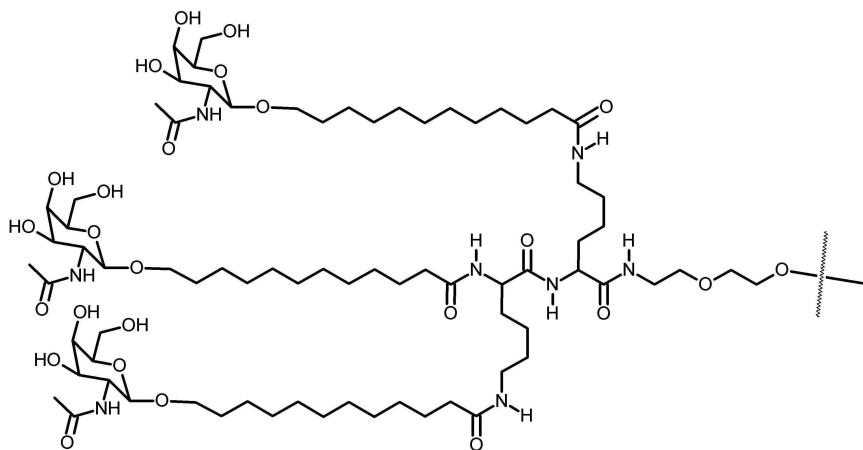


식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물로 구성되거나 이를 포함하며; A는 O 또는 S이고; A'는  $O^-$ ,  $S^-$  또는  $NH^-$ 이다.

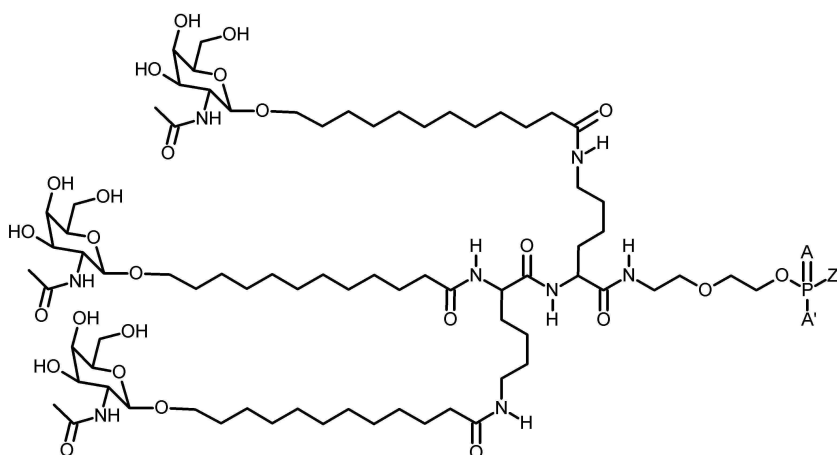
일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 갖는 포스포아미디트-함유 화합물이다:



일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 가진다:



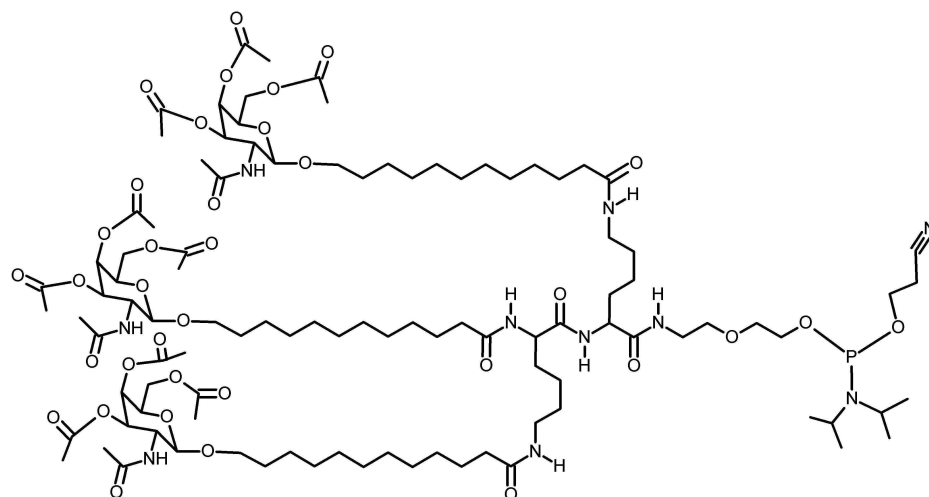
일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물은 표적화 리간드에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:



(구조 5b)

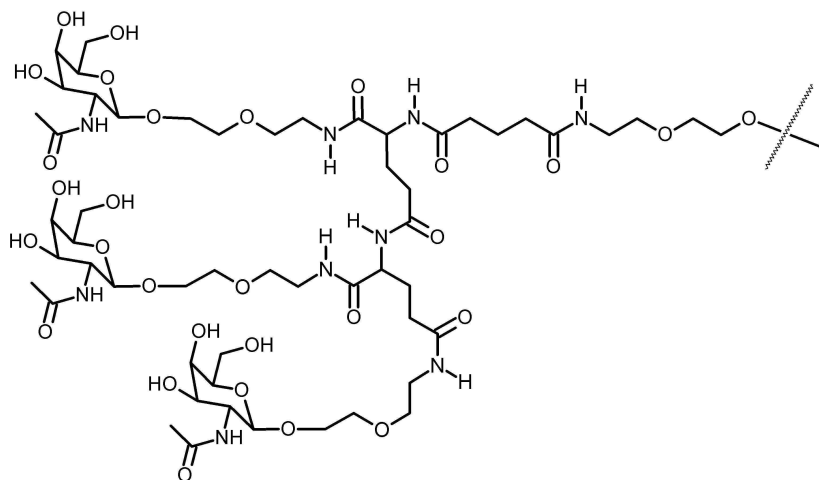
식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물로 구성되거나 이를 포함하며; A는 O 또는 S이고; A'는  $O^-$ ,  $S^-$  또는  $NH^-$ 이다.

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 갖는 포스포아미디트-함유 화합물이다:



(구조 5d)

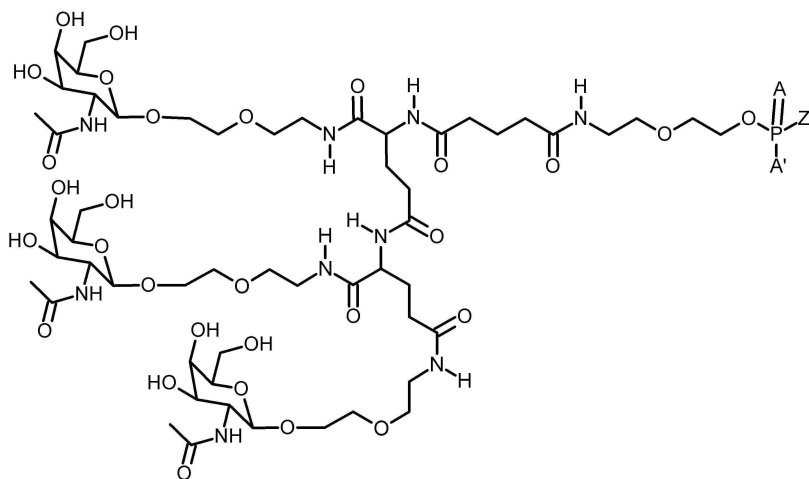
일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 가진다:



(구조 6)

일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물은 표적화 리간드에 연결되고, 하기의 구조로 표시된 구조를 가지며:

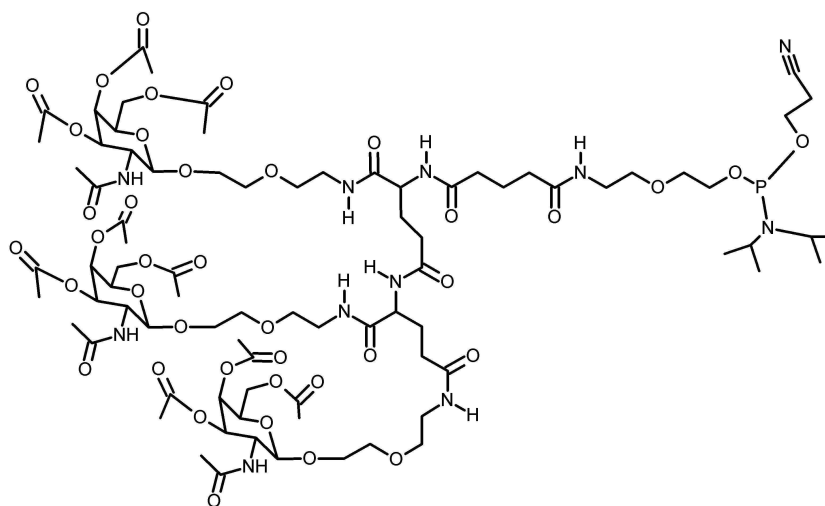




[0194] (구조 6b)

[0195] 식 중에서, Z는 발현-저해성 올리고머 화합물로 구성되거나 이를 포함하며; A는 O 또는 S이고; A'는 O<sup>-</sup>, S<sup>-</sup> 또는 NH<sup>-</sup>이다.

[0196] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조로 표시된 구조를 갖는 포스포아미디트-함유 화합물이다:



[0197] (구조 6d)

[0198] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 갈락토스 클러스터의 형태이다. 본원에 사용된 바와 같이, 갈락토스 클러스터는 2개 내지 4개의 종결 갈락토스 유도체들을 갖는 표적화 리간드를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 갈락토스 유도체는, 아시알로당단백질 수용체에 대한 친화성을 갈락토스와 동일하거나 그보다 크게 갖는 갈락토스 및 갈락토스의 유도체를 둘 다 포함한다. 갈락토스 유도체는 표적화 모이어티 형태인 당류 당이다. 종결 갈락토스 유도체는 당류의 C-1 탄소를 통해 테더에 연결될 수 있다.

[0199] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 각각이 아시알로당단백질 수용체에 대한 친화성을 갖는 3개의 종결 갈락토사민 또는 갈락토사민 유도체(예컨대 N-아세틸-갈락토사민)들로 구성된다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 3개의 종결 N-아세틸-갈락토사민(GalNAc 또는 NAG)들을 표적화 모이어티로서 포함한다.

[0200] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 각각이 아시알로당단백질 수용체에 대한 친화성을 갖는 4개의 종결 갈락토사민 또는 갈락토사민 유도체(예컨대 N-아세틸-갈락토사민)들로 구성된다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 4개의 종결 N-아세틸-갈락토사민(GalNAc 또는 NAG)들을 표적화 모이어티로서 포함한다.

[0201] 일부 실시형태에서, 각각의 표적화 모이어티는, N-아세틸-갈락토사민인 갈락토사민 유도체를 포함한다. 표적화 모이어티로서 사용될 수 있는 아시알로당단백질 수용체에 대한 친화성을 갖는 다른 당류는 갈락토스, 갈락토사민, N-포밀-갈락토사민, N-아세틸-갈락토사민, N-프로피오닐-갈락토사민, N-n-부타노일갈락토사민 및 N-이소-부타노일갈락토사민을 포함하는 목록으로부터 선택될 수 있다. 아시알로당단백질 수용체에 대한 수많은 갈락토스 유도체들의 친화성은 연구되어 있거나(예를 들어: 문헌[Iobst, S.T. and Drickamer, K. *J.B.C.* 1996, 271, 6686] 참조), 당업계에서 잘 공지되고 보편적으로 사용되는 방법을 사용하여 쉽게 확인된다.

[0202] 3개의 종결 N-아세틸-갈락토사민을 지칭하는 경우 당업계에서 보편적으로 사용되는 용어는 트리-안테너리(tri-antennary), 3가 및 삼량체를 포함한다.

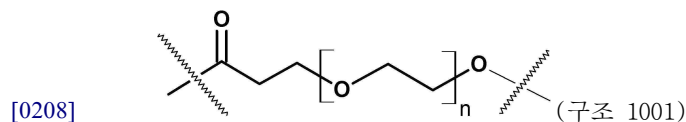
[0203] **링커**

[0204] 본원에 개시된 표적화 리간드는 링커를 포함한다.

[0205] 링커는 한쪽 말단에서는 분지점 기에 연결되고, 다른 한쪽 말단에서는 치료용 화합물(또는 표적화 리간드가 포스포아미디트 화합물로서 합성되는 경우, 포스포아미디트 형성 시약을 이용하여 포스포틸화(phosphitylation) 반응을 통해 포스포아미디트의 인 원자)에 연결된 원자들의 그룹이다. 일부 실시형태에서, 링커는 한쪽 말단에서는 분지점 기에 연결되고, 다른 한쪽 말단에서는 이후에 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되는 기 또는 기들에 연결된다. 일부 실시형태에서, 링커는 올리고머 화합물에 직접적으로 연결된다. 일부 실시형태에서, 링커는 절단 가능한 모이어티에 연결되며, 이후에 이는 올리고머 화합물에 연결된다. 절단 가능한 모이어티의 예로는 예를 들어, 포스페이트기, 디설파이드 모이어티를 포함하는 기, 및/또는 절단될 수 있는 다른 뉴클레오시드 간 연결부 등이 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 절단 가능한 모이어티에 연결되지 않는다. 일부 실시형태에서, 링커는 포스포티오에이트기 또는 포스포네이트 기에 연결된다.

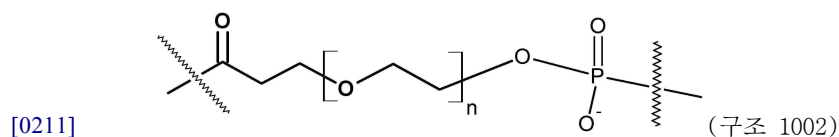
[0206] 일부 실시형태에서, 링커는 폴리에틸렌 글리콜("PEG") 모이어티로 구성되거나 이를 포함한다. PEG 모이어티를 링커 내로 혼입하는 것은, 소정의 다른 링커들, 예컨대 치환된 또는 비치환된 알킬 사슬로 구성되거나 이를 포함하는 링커를 능가하는 소정의 유익한 특성들을 부여한다. 예를 들어, PEG 모이어티를 링커 내로 혼입하는 것은, 뉴클레오타이드 합성에서 보편적으로 사용되는 용매 내에서의 표적화 리간드-함유 포스포아미디트 화합물의 용해도를, 알킬 사슬 링커를 함유하는 화합물과 비교하여 증가시키며, 이는 간략화된 제조 과정을 초래할 수 있다.

[0207] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조를 갖는 링커를 포함하며:



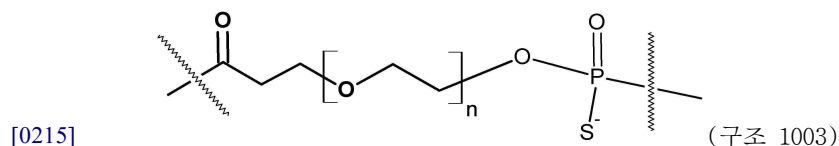
[0209] 식 중에서, n은 1 내지 20(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20)의 정수이다.

[0210] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조를 갖는 포스페이트기에 연결된 링커를 포함하며:



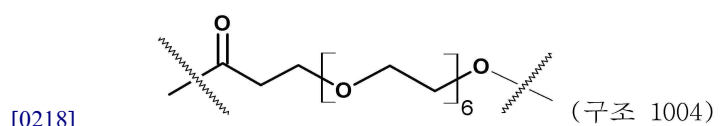
[0212] 식 중에서, n은 1 내지 20의 정수이다.

[0214] \*일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조를 갖는 포스포티오에이트기에 연결된 링커를 포함하며:

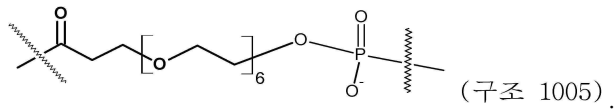


[0216] 식 중에서, n은 1 내지 20(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20)으로부터 선택된다.

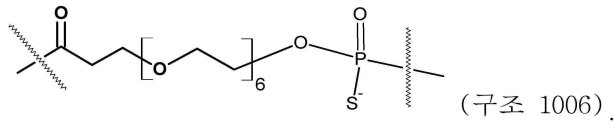
[0217] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조를 갖는 링커를 포함한다:



[0219] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조를 갖는 포스페이트기에 연결된 링커를 포함한다:



일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조를 갖는 포스포티오에이트에 연결된 링커를 포함한다:



일부 실시형태에서, 링커는 이중-가닥 RNAi 제제인 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결된다. 일부 실시형태에서, 링커는 이중-가닥 RNAi 제제의 센스 가닥의 5' 말단에 연결된다. 일부 실시형태에서, 링커는 이중-가닥 RNAi 제제의 센스 가닥의 3' 말단에 연결된다. 일부 실시형태에서, 링커는 이중-가닥 RNAi 제제의 안티센스 가닥의 3' 말단에 연결된다. 일부 실시형태에서, 링커는 이중-가닥 RNAi 제제의 안티센스 가닥의 5' 말단에 연결된다.

일부 실시형태에서, 링커는 절단 가능한 모이어티에 연결된다. 일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물의 종결 포스페이트기는 절단 가능한 모이어티로서 역할을 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 독립적으로 선택되는 절단 가능한 모이어티는 링커에 연결된다. 본원에 사용된 바와 같이, 절단 가능한 모이어티는, 세포 밖에서는 안정하지만 표적 세포 내로 도입 시 절단되는 기이다. 절단 가능한 모이어티는 소정의 조건, 예컨대 pH 또는 소정의 절단 제제, 예컨대 분해를 촉진하는 분자, 또는 산환원제 하에 절단에 취약하다.

일부 실시형태에서, 절단 가능한 모이어티는 pH에 취약할 수 있다. 예를 들어, 엔도솜 및 리소솜은 일반적으로, 인간 혈액(대략 7.35 내지 7.45의 pH)보다 더 산성인 pH(대략 4.5 내지 6.5의 pH)를 갖는 것으로 공지되어 있고, 이는 절단 가능한 모이어티의 절단을 촉진할 수 있다.

일부 실시형태에서, 절단 가능한 모이어티는 포스페이트기이다. 포스페이트기는 포스페이트기를 분해하거나 가수분해하는 것으로 공지된 제제에 의해 절단될 수 있다.

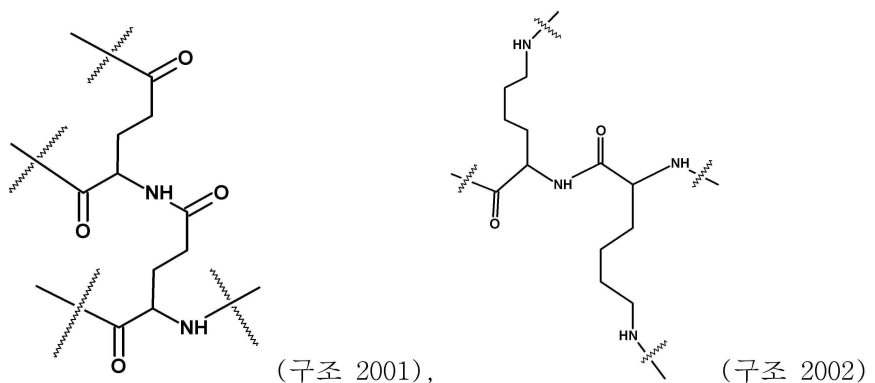
#### 분지점 기

본원에 개시된 표적화 리간드는 적어도 하나의 분지점 기를 포함한다. 본원에 개시된 표적화 리간드의 분지점 기는 링커에 부착된다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드의 분지점 기는 한쪽 말단에서는 링커에 연결되고, 다른 쪽 말단(들)에서는 하나 이상의 테더에 연결된다. 일부 실시형태에서, 분지점 기는 링커 및 하나 이상의 테더에 부착된다. 일부 실시형태에서, 분지점 기는 발현-저해성 올리고머 화합물에 간접적으로 (예를 들어 링커를 통해) 부착된다. 일부 실시형태에서, 분지점 기는 부가적인 기 또는 기들을 통해 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결된다.

본원에 개시된 분지점 기는 하나 이상의 표적화 모이어티의 부착을 허용하고 추가로 링커에의 부착을 허용하는 임의의 기일 수 있다.

\*본원에 개시된 분지점 기는 2, 3 또는 4개의 갈락토스 유도체의 부착을 허용하고 추가로 링커에의 분지점의 부착을 허용하는 임의의 기일 수 있다.

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조를 갖는 분지점을 포함한다:



[0234] **테더**

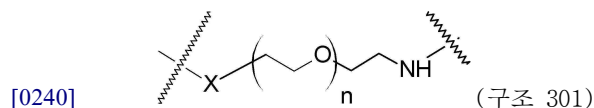
[0235] 본원에 개시된 표적화 리간드는 하나 이상의 테더를 포함한다. 테더는 분지점 기와 각각의 표적화 모이어티 사이에서 연결된다. 일부 실시형태에서, 테더는 한쪽 말단에서는 표적화 리간드에 직접적으로 연결되고 다른쪽 말단에서는 분지점 기에 직접적으로 연결된다. 일부 실시형태에서, 테더는 한쪽 말단에서는 표적화 리간드에 직접적으로 연결되고 다른쪽 말단에서는 분지점 기에 간접적으로 연결된다. 일부 실시형태에서, 테더는 한쪽 말단에서는 표적화 리간드에 간접적으로 연결되고 다른쪽 말단에서는 분지점 기에 간접적으로 연결된다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 표적화 리간드는 3개의 테더들 및 3개의 표적화 모이어티들을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 표적화 리간드는 4개의 테더들 및 4개의 표적화 모이어티들을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 표적화 리간드는 하나의 테더 및 하나의 표적화 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 표적화 리간드는 다수의 테더들 및 다수의 표적화 모이어티들을 포함한다.

[0236] 일부 실시형태에서, 부가적인 테더 또는 다른 기들은 테더와 표적화 모이어티 사이에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 제2 테더는 테더와 표적화 모이어티 사이에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 제2 테더 및 제3 테더는 테더와 표적화 모이어티 사이에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 제2, 제3 및 제4 테더는 테더와 표적화 모이어티 사이에 삽입된다. 본원에 개시된 바와 같이, 모든 표적화 모이어티에 대해 적어도 하나의 테더가 존재한다. 일부 실시형태에서, 각각의 표적화 모이어티에 대해 1개 초과 테더가 존재한다. 본원에 개시된 표적화 리간드는 이러한 조성물을 망라하고자 한다.

[0237] 일부 실시형태에서, 부가적인 기는 테더와 분지점 기 사이에 삽입될 수 있다.

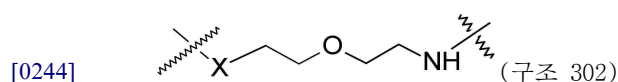
[0238] 본원에 개시된 바와 같이, 테더는, 표적화 모이어티와 분지점 기, 링커 및 치료용 화합물 사이의 연결부에 가요성(flexibility) 및/또는 길이를 추가로 부가할 수 있는 스페이서로서 역할을 한다. 일부 실시형태에서, 테더는 알킬기(시클로알킬기를 포함함), 알케닐기(시클로알케닐기를 포함함), 알키닐기, 아릴기, 아랄킬기, 아랄케닐기 또는 아랄키닐기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 테더는 하나 이상의 헤테로원자, 헤테로사이클, 헤테로아릴, 아미노산, 뉴클레오타이드 또는 당류를 포함한다.

[0239] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조를 갖는 테더를 포함하며:



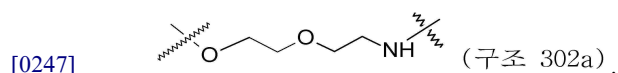
[0242] \*식 중에서, n은 1 내지 20(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20)의 정수이고, X는 O, S 또는 NH이다.

[0243] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조를 갖는 테더를 포함하며:

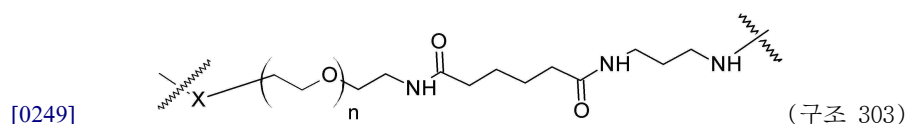


[0245] 식 중에서, X는 O, S 또는 NH이다.

[0246] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조를 갖는 테더를 포함한다:

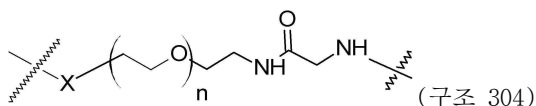


[0248] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조를 갖는 테더를 포함하며:



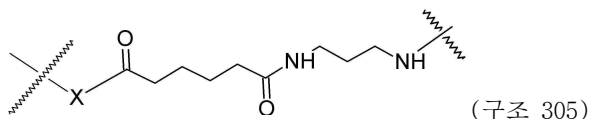
[0250] 식 중에서, n은 1 내지 20(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20)의 정수이고, X는 O, S 또는 NH이다.

[0251] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조를 갖는 테더를 포함하며:



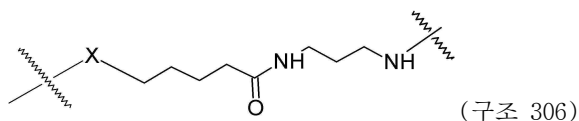
식 중에서,  $n$ 은 1 내지 20(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20)의 정수이고,  $X$ 는 O, S 또는 NH이다.

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조를 갖는 테더를 포함하며:



식 중에서,  $X$ 는 O, S 또는 NH이다.

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하기의 구조를 갖는 테더를 포함하며:



식 중에서,  $X$ 는 O, S 또는 NH이다.

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 1개 초과 유형의 테더를 포함한다. 일부 실시형태에서, 테더는 가요성 친수성 스페이서로서 작용하고(예를 들어, 미국 5,885,968; 및 문헌[Biessen et al. *J. Med. Chem.* **1995**, *39*, 1538-1546]을 참조하며, 둘 다 이들 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함됨), PEG 스페이서를 포함한다. 다른 실시형태에서, PEG 스페이서는 1개 내지 20개의 에틸렌 유닛(PEG<sub>1</sub> 내지 PEG<sub>20</sub>)을 가진다. 예를 들어, PEG 스페이서는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 에틸렌 유닛을 가진다.

#### **표적화 모이어티:**

본원에 개시된 표적화 리간드는 1개 내지 4개, 또는 4개 초과 표적화 모이어티를 포함할 수 있다.

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 갈락토스 클러스터일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 갈락토스 클러스터는 2개 내지 4개의 종결 갈락토스 유도체들을 갖는 표적화 리간드를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 갈락토스 유도체는, 아시알로당단백질 수용체에 대한 친화성을 갈락토스와 동일하거나 그보다 크게 갖는 갈락토스 및 갈락토스의 유도체를 둘 다 포함한다. 갈락토스 유도체는 표적화 모이어티 형태인 당류 당이다. 종결 갈락토스 유도체는 당류의 C-1 탄소를 통해 테더에 연결된다.

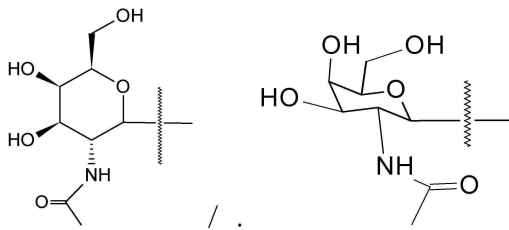
일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 각각이 아시알로당단백질 수용체에 대한 친화성을 갖는 3개의 종결 갈락토사민 또는 갈락토사민 유도체(예컨대 N-아세틸-갈락토사민)들로 구성된다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 3개의 종결 N-아세틸-갈락토사민(GalNAc 또는 NAG)들을 표적화 모이어티로서 포함한다. 예를 들어, 구조(1, 101, 102 및 103)은 각각, 3개의 종결 N-아세틸-갈락토사민들을 표적화 모이어티로서 갖는 표적화 리간드이다.

일부 실시형태에서, 각각의 표적화 모이어티는 N-아세틸-갈락토사민인 갈락토사민 유도체를 포함한다. 표적화 모이어티로서 사용될 수 있는 아시알로당단백질 수용체에 대한 친화성을 갖는 다른 당류들은 갈락토스, 갈락토사민, N-포밀-갈락토사민, N-프로피오닐-갈락토사민, N-n-부타노일갈락토사민 및 N-이소-부타노일갈락토사민을 포함하는 목록으로부터 선택될 수 있다. 아시알로당단백질 수용체에 대한 수많은 갈락토스 유도체들의 친화성이 연구되어 있거나(예를 들어 문헌[Iobst, S.T. and Drickamer, K. *J.B.C.* 1996, *271*, 6686]을 참조하며, 이는 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함됨), 당업계에서 잘 공지되고 보편적으로 사용되는 방법을 사용하여 쉽게 확인된다.

일부 실시형태에서, 표적화 모이어티는 세포-표적화 모이어티이다.

일부 실시형태에서, 표적화 모이어티는 N-아세틸-갈락토사민을 포함한다:





[0268]

[0269]

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 3개의 표적화 모이어티들을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 4개의 표적화 모이어티들을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 하나의 표적화 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 2개의 표적화 모이어티들을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 4개 이상의 표적화 모이어티들을 포함한다.

[0270]

일부 실시형태에서, 표적화 모이어티는 갈락토스, 갈락토사민, N-포밀-갈락토사민, N-아세틸-갈락토사민, N-프로피오닐-갈락토사민, N-n-부타노일갈락토사민 또는 N-이소-부타노일갈락토사민 중 하나 이상을 포함한다.

[0271]

예를 들어 일부 실시형태에서, 구조 1 내지 6 중 임의의 구조에서 N-아세틸-갈락토사민 표적화 모이어티는 대안적인 표적화 모이어티로 대체될 수 있다. 일부 실시형태에서, 구조(101, 102 또는 103) 중 임의의 구조에서 N-아세틸-갈락토사민 표적화 모이어티는 대안적인 표적화 모이어티로 대체될 수 있다. 이러한 대안적인 표적화 모이어티로는, 예를 들어 갈락토스, 갈락토사민, N-포밀-갈락토사민, N-아세틸-갈락토사민, N-프로피오닐-갈락토사민, N-n-부타노일갈락토사민 또는 N-이소-부타노일갈락토사민 등이 있다.

[0272]

부가적으로 일부 실시형태에서, 구조 1 내지 6의 표적화 모이어티는 예를 들어, 다른 탄수화물; 글리칸; 합텐; 비타민; 폴레이트; 비오틴; 앵타머; 및/또는 펩타이드, 예컨대 RGD-함유 펩타이드, 인슐린, EGF, 및/또는 트랜스페린으로 대체될 수 있다. 일부 실시형태에서, 구조(101, 102 또는 103)의 표적화 모이어티는 예를 들어, 다른 탄수화물; 글리칸; 합텐; 비타민; 폴레이트; 비오틴; 앵타머; 및/또는 펩타이드, 예컨대 RGD-함유 펩타이드, 인슐린, EGF, 및/또는 트랜스페린으로 대체될 수 있다.

[0273]

일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 N-아세틸-갈락토사민 삼량체 형태이다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 N-아세틸-갈락토사민 사량체 형태이다.

[0274]

#### 올리고머 화합물

[0275]

본원에 개시된 표적화 리간드는 올리고머 화합물에 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, 올리고머 화합물은 발현-저해성 올리고머 화합물이다. 일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물은 RNAi 제제이다. 일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물은 이중-가닥 RNAi 제제이다. 일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물은 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이다. 발현-저해성 올리고머 화합물은 당업계에서 보편적으로 사용되는 방법을 사용하여 합성될 수 있다.

[0276]

발현-저해성 올리고머 화합물은 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 염기(또는 뉴클레오베이스)는 모든 핵산들의 구성분이고 아데닌(A), 구아닌(G), 시토신(C), 티민(T) 및 우라실(U)을 포함하는 헤테로시클릭 피리미딘 또는 퓨린 화합물이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "뉴클레오타이드"는 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 모방체, 어베이식(abasic) 부위, 또는 대리 대체(surrogate replacement) 모이어티를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "변형된 뉴클레오타이드"는 리보뉴클레오타이드(2'-하이드록실 뉴클레오타이드) 이외의 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 모방체, 어베이식 부위, 또는 대리 대체(surrogate replacement) 모이어티이다. 변형된 뉴클레오타이드는 2'-변형된 뉴클레오타이드(즉, 5원 당의 2' 위치에 하이드록실기 이외의 기를 갖는 뉴클레오타이드)를 포함한다. 변형된 뉴클레오타이드로는: 2'-변형된 뉴클레오타이드, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드(본원에서 뉴클레오타이드 서열에서 소문자 'n'으로 표시됨), 2'-데옥시-2'-플루오로 뉴클레오타이드(본원에서 Nf로 표시되고, 또한 본원에서 2'-플루오로 뉴클레오타이드로 표시됨), 2'-데옥시 뉴클레오타이드(본원에서 dN으로 표시됨), 2'-메톡시에틸(2'-O-2'-메톡시에틸) 뉴클레오타이드(본원에서 NM 또는 2'-MOE로 표시됨), 2'-아미노 뉴클레오타이드, 2'-알킬 뉴클레오타이드, 3' 내지 3' 연결부(인버티드(inverted)) 뉴클레오타이드(본원에서 invdN, invN, invn, invX로 표시됨), 비-천연 염기를 포함하는 뉴클레오타이드, 락드(locked) 뉴클레오타이드, 가교된 뉴클레오타이드, 펩타이드 핵산, 2',3'-세코(seco) 뉴클레오타이드 모방체(언락드(unlocked) 뉴클레오베이스 유사체, 본원에서 N<sub>UNA</sub> 또는 NUNA로 표시됨), 락드 뉴클레오타이드(본원에서 N<sub>LNA</sub> 또는 NLNA로 표시됨), 3'-O-메톡시(2' 뉴클레오타이드간 연결됨) 뉴클레오타이드(본원에서 3'-OMen으로 표시됨), 2'-F-아라비노 뉴클레오타이드(본원

에서 NfANA 또는 Nf<sub>ANA</sub>로 표시됨), 모르폴리노 뉴클레오타이드, 비닐 포스포네이트 테옥시리보뉴클레오타이드(본원에서 vpdN으로 표시됨), 비닐 포스포네이트 뉴클레오타이드 및 어베이식 뉴클레오타이드(본원에서 X 또는 Ab로 표시됨) 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 주어진 화합물 내의 모든 위치들이 균일하게 변형되는 것이 필수적인 것은 아니다. 역으로, 1개 초과 변형이 단일 발현-저해성 올리고머 화합물 또는 심지어 이의 단일 뉴클레오타이드 내에 혼입될 수 있다. 발현-저해성 올리고머 화합물은 당업계에 공지된 방법에 의해 합성되고/거나 변형될 수 있다. 각각의 뉴클레오타이드에서의 변형은 다른 뉴클레오타이드의 변형과는 독립적이다.

[0277] 변형된 뉴클레오베이스는 합성 및 천연 뉴클레오베이스, 예컨대 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘, N-2-, N-6- 및 0-6-치환된 퓨린(예를 들어 2-아미노프로필아데닌), 5-프로피닐우라실, 5-프로피닐시토신, 5-메틸시토신(5-me-C), 5-하이드록시메틸 시토신, 크산틴, 하이포크산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 다른 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티미딘, 2-티오시토신, 5-할로우라실, 5-할로시토신, 5-프로피닐 우라실, 5-프로피닐 시토신, 6-아조-우라실, 6-아조-시토신, 6-아조-티미딘, 5-우라실(슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-치환된 우라실 및 시토신(예를 들어 5-할로 우라실 및 시토신(예를 들어 5-브로모우라실 및 5-브로모시토신)), 5-트리플루오로메틸 우라실, 5-트리플루오로메틸 시토신), 7-메틸구아닌, 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌, 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자아데닌, 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌을 포함한다.

[0278] 본원에 기재된 발현-저해성 올리고머 화합물의 경우, 임의의 변형된 뉴클레오타이드는 포스포이트-함유 또는 비-포스포이트-함유 공유 뉴클레오시드간 연결부에 의해 연결될 수 있다. 변형된 뉴클레오시드간 연결부 또는 백본으로는, 5'-포스포티오에이트기(본원에서 sN, sn, sNf 또는 sdN에서와 같이 뉴클레오타이드 앞에서 소문자 's'로 표시됨), 키랄 포스포티오에이트, 티오포스포에이트, 포스포디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬-포스포트리에스테르, 3'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함하여 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 포스포네이트, 3'-아미노 포스포아미디트 및 아미노알킬포스포아미디트를 포함하여 포스포아미디트, 티오노포스포아미디트, 티오노알킬-포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 모르폴리노 연결부, 정상적인 3'-5' 연결부를 갖는 보라노포스포에이트, 보라노포스포에이트의 2'-5' 연결된 유사체, 및 인버티드 극성을 갖는 보라노포스포에이트 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니고, 여기서 뉴클레오시드 유닛의 인접한 쌍들은 3'-5' 내지 5'-3' 또는 2'-5' 내지 5'-2'로 연결된다. 변형된 뉴클레오시드간 연결부 또는 백본에는 인 원자가 결여되어 있다. 인 원자가 결여된 변형된 뉴클레오시드간 연결부로는, 단쇄 알킬 또는 시클로알킬 당-간(inter-sugar) 연결부, 혼합된 헤테로원자 및 알킬 또는 시클로알킬 당-간 연결부, 또는 하나 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로시클릭 당-간 연결부 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 변형된 뉴클레오시드간 백본으로는, 실록산 백본, 설파이드 백본, 설폭사이드 백본, 설폰 백본, 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본, 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본, 알켄-함유 백본, 설파메이트 백본, 메틸렌이미노 및 메틸렌하이드라지노 백본, 설포네이트 및 설폰아미드 백본, 아미드 백본, 및 혼합된 N, O, S 및 CH<sub>2</sub> 구성성분을 갖는 다른 백본 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0279] 일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물은 이중-가닥 RNAi 제제이고, 서로 적어도 부분적으로 상보적인(적어도 70% 상보적인) 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함한다. 안티센스 가닥은, 표적 mRNA 내의 서열에 완벽하게 상보적인(100% 상보적인) 또는 적어도 실질적으로 상보적인(적어도 85% 상보적인) 서열을 갖는 영역을 함유한다. 이중-가닥 RNAi 제제 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 길이는 각각, 16개 내지 30개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 센스 및 안티센스 가닥은 동일한 길이일 수 있거나, 상이한 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 센스 가닥은 약 19개 뉴클레오타이드 길이인 한편, 안티센스 가닥은 약 21개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 센스 가닥은 약 21개 뉴클레오타이드 길이인 한편, 안티센스 가닥은 약 23개 뉴클레오타이드 길이이다. 다른 실시형태에서, 센스 및 안티센스 가닥들은 각각 독립적으로 17개 내지 21개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 센스 및 안티센스 가닥들은 둘 다 각각 21개 내지 26개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 센스 및 안티센스 가닥들은 둘 다 각각 26개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 센스 및 안티센스 가닥들은 각각 독립적으로 17개 내지 26개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 이중-가닥 RNAi 제제는 약 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24개 뉴클레오타이드의 듀플렉스 길이를 가진다. 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이의 이러한 완벽한 또는 실질적인 상보성 영역은 전형적으로 15개 내지 25개 뉴클레오타이드 길이(예를 들어 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개 뉴클레오타이드 길이)를 가지고, 안티센스 가닥의 5' 말단 또는 부근에서 발생한다.

[0280] 본원에 개시된 리간드에 공액된 발현-저해성 올리고머 화합물은 선택적으로 및 독립적으로, 코어 서열의 3' 말

단, 5' 말단, 또는 3' 및 5' 말단들 둘 다에 부가적인 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 뉴클레오티드를 (연장부(extension)로서) 포함한다. 이들 부가적인 뉴클레오티드는 존재하는 경우, 표적화된 mRNA 내의 상응하는 서열에 상보적일 수 있거나 상보적이지 않을 수 있다.

[0281] 일부 실시형태에서, 이중-가닥 RNAi 제제가 본원에 개시된 표적화 리간드에 컨주게이션되는 경우, 부가적인 센스 가닥 부가적인 뉴클레오티드는 존재하는 경우, 표적화된 mRNA 내의 상응하는 서열과 동일하거나 동일하지 않을 수 있다. 부가적인 안티센스 가닥 부가적인 뉴클레오티드는 존재하는 경우, 센스 가닥의 상응하는 부가적인 뉴클레오티드가 존재한다면 이 뉴클레오티드에 상보적일 수 있거나 상보적이지 않을 수 있다.

[0282] 이중-가닥 RNAi 제제는 안티센스 가닥을 센스 가닥과 어닐링함으로써 형성될 수 있다.

[0283] 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 RNAi 제제의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 3' 또는 5' 말단에서 RNAi 제제에 연결된다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 센스 가닥의 5' 말단에 연결된다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 센스 가닥의 3' 말단에 연결된다. 일부 실시형태에서, 표적화 리간드는 불안정한(labile), 절단 가능한 또는 가역적인 결합을 통해 RNAi 제제에 연결된다. 일부 실시형태에서, 불안정한, 절단 가능한 또는 가역적인 결합은 RNAi 제제와 표적화 리간드 사이에 첨가된 절단 가능한 모이어티에 포함된다.

[0284] 일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물은 단일-가닥 올리고뉴클레오티드이다. 일부 실시형태에서, 단일-가닥 올리고뉴클레오티드는 표적 mRNA의 발현을 저해하기 위해 RNA 간섭 메커니즘을 이용한다. 일부 실시형태에서, 단일-가닥 올리고뉴클레오티드는 RNA 간섭 이외의 메커니즘을 통해 표적 핵산의 발현을 감소시키는 데 활성적이다.

[0285] 일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물에 공역된 기재된 표적화 리간드가 투여되는 피험자에서의 표적의 유전자 발현 수준 및/또는 mRNA 수준은, 투여 이전의 피험자 또는 표적화 리간드 컨주게이트를 수여받지 않은 피험자와 비교하여, 적어도 약 5%, 예를 들어 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%만큼 감소된다. 피험자에서의 유전자 발현 수준 및/또는 mRNA 수준은 피험자의 세포, 세포군 및/또는 조직에서 감소될 수 있다. 일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물에 공역된 기재된 표적화 리간드가 투여된 피험자에서의 단백질 수준은, 표적화 리간드 컨주게이트가 투여되기 이전의 피험자 또는 표적화 리간드 컨주게이트를 수여받지 않은 피험자와 비교하여, 적어도 약 5%, 예를 들어 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%만큼 감소된다. 피험자에서의 단백질 수준은 피험자의 세포, 세포군, 조직, 혈액 및/또는 다른 유체에서 감소될 수 있다. 유전자 발현, mRNA 또는 단백질 수준의 감소는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 평가될 수 있다. mRNA 수준 및/또는 단백질 수준의 감소 또는 저하는 수합해서 본원에서, 표적화된 유전자의 발현을 저해하거나, 저하시키거나 감소시키는 것으로 지칭된다.

[0286] 개시된 표적화 리간드와 함께 사용될 수 있는 특정한 발현-저해성 올리고머 화합물은 당업계에 공지되어 있다. 특히, 많은 참조문헌들은, 간으로의 조성물의 전달을 위해 본원에 개시된 표적화 리간드에 컨주게이션될 수 있는 발현-저해성 올리고머 화합물을 개시하고 있다. 비제한적인 예로는, 발명의 명칭이 LPA의 유전자 발현을 저해하기 위한 조성물 및 방법인 미국 특허출원 15/281,309가 있으며, 이는 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함되며, (지질단백질(a) 입자의 일부인 apo(a) 단백질의 발현을 저해하고, 이로써 지질단백질(a) 입자(Lp(a))의 발현을 저해하기 위해) 인간 아포지질단백질(a) 유전자[LPA]를 표적화하는 다양한 이중-가닥 발현-저해성 올리고머 화합물들을 개시하고 있으며, 이는 본원에 개시된 표적화 리간드와 함께 사용하기에 적합하다. apo(a) 유전자[LPA]는 주로, 인간 및 비-인간 영장류의 간에서 발현된다. 유사하게는 예를 들어, 발명의 명칭이 B형 간염 바이러스 감염에 대한 RNAi 치료법인 미국 특허 출원 15/229,314가 있으며, 이 또한 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함되며, B형 간염 바이러스를 표적화하는 다양한 이중-가닥 발현-저해성 올리고머 화합물들을 개시하고 있으며, 이는 본원에 개시된 표적화 리간드와 함께 사용하기에 적합하다. B형 간염 바이러스는 엄격한 간영양성(hepatotropic)의 이중-가닥 DNA-함유 바이러스이고, 헤파드나비리대(Hepadnaviridae) 과(family)에 속하는 헤파드나바이러스(Hepadnavirus)의 일 구성원(member)으로 분류된다. 나아가 또 다른 예로서, 발명의 명칭이 인자 XII의 유전자 발현을 저해하기 위한 조성물 및 방법인 미국 특허 출원 15/229,314가 있으며, 이는 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함되고, 인자 XII(또는 인자 12, F12) 유전자를 표적화하는 다양한 이중-가닥 발현-저해성 올리고머 화합물들을 개시하고 있으며, 이는 본원에 개시된 표적화 리간드와 함께 사용하기에 적합하다. 인자 XII는 주로 간에서 발현되고 혈액에서 발견되는 세린 프로테아제이다. 부가적으로 또 다른 예로서, 발명의 명칭이 알파-1 안티트립신의 유전자 발현을 저해하기 위한 조성물 및 방법인 미국 특허 출원 14/740,307이 있으며, 이는 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함되고, 알파-1 안티트립신(또



는 AAT) 유전자를 표적화하는 다양한 이중-가닥 발현-저해성 올리고머 화합물들을 개시하고 있으며, 이는 본원에 개시된 표적화 리간드와 함께 사용하기에 적합하다. AAT는 세르핀(serpin) 슈퍼패밀리에 속하는 프로테아제 저해제이고, 정상적인 AAT 단백질은 주로 간에서 간세포에 의해 합성된 다음 혈액 내로 분비된다. 나아가, 발명의 명칭인 APOC3-관련 질병의 치료를 위한 유기 조성물인 WO 2016/01123이 있으며, 이는 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함되고, 인간 아포지질단백질 III(APOC3)을 표적화하는 다양한 이중-가닥 발현-저해성 올리고머 화합물들을 개시하고 있으며, 이는 본원에 개시된 표적화 리간드와 함께 사용하기에 적합하다. 아포지질단백질 C-III은 트리글리세라이드-풍부 입자의 간 흡수를 저해하는 것으로 여겨지는 지질단백질의 구성성분이다. 본원에 개시된 표적화 리간드와 함께 사용하기에 적합할 수 있는 발현-저해성 올리고머 화합물을 포함하여 다양한 치료용 화합물들을 개시하고 있는 부가적인 참조문헌들이 또한 당업계에서 확인될 수 있다. 이들로는, 간으로의 표적화가 바람직할 조성물 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0287] **약제학적 조성물 및 제형**

[0288] 본원에 개시된 표적화 리간드는 올리고머 화합물에 연결되는 경우, 이러한 화합물의 투여로부터 이득을 얻을 질병 또는 장애를 갖는 피험자(예를 들어 인간 또는 포유류)를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드는 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되는 경우, 표적 mRNA의 발현의 감소 또는 저해로부터 이득을 얻을 질병 또는 장애를 갖는 피험자(예를 들어 인간)를 치료하는 데 사용될 수 있다. 피험자에게, 본원에 개시된 표적화 리간드에 연결된 임의의 하나 이상의 발현-저해성 올리고머 화합물, 예컨대 RNAi 제제가 치료적 유효량으로 투여된다. 피험자는 인간, 환자 또는 인간 환자일 수 있다. 피험자는 성인, 청소년, 어린이 또는 유아일 수 있다. 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결된 표적화 리간드를 포함하는 기재된 약제학적 조성물은 질병의 치료적 치료 방법을 제공하는 데 사용될 수 있다. 이러한 방법은 본원에 기재된 약제학적 조성물을 인간 또는 동물에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0289] 본원에 개시된 약제학적 조성물 및 방법은 세포, 세포군, 세포군, 조직 또는 피험자에서 표적 mRNA의 수준을 저하시킬 수 있으며, 이는: 치료적 유효량의, 표적화 리간드에 연결된 본원에 기재된 발현-저해성 올리고머 화합물을 피험자에게 투여함으로써, 피험자에서 표적 mRNA의 발현을 저해하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 피험자는 이전에, 표적화된 세포 또는 조직에서 표적 유전자의 병원성 상향조절을 갖는 것으로 식별되었다.

[0290] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 적어도 하나의 표적화 리간드에 연결된 발현-저해성 올리고머 화합물을 포함한다. 이들 약제학적 조성물은 특히, 표적 세포, 세포군, 조직 또는 유기체에서 표적 mRNA의 발현을 저해하는 데 있어서 유용하다. 약제학적 조성물은 표적 mRNA 수준의 감소 또는 표적 유전자의 발현의 저해로부터 이득을 얻게 될 질병 또는 장애를 갖는 피험자를 치료하는 데 사용될 수 있다. 약제학적 조성물은 표적 mRNA 수준의 감소 또는 표적 유전자의 발현의 저해로부터 이득을 얻게 될 질병 또는 장애가 발병할 위험에 있는 피험자를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 이러한 방법은 본원에 기재된 바와 같이 발현-저해성 올리고머 화합물, 예컨대 RNAi 제제에 연결된 표적화 리간드를 포함하는 조성물을 치료 받을 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, (비히클, 담체, 희석제 및/또는 전달 중합체를 포함하여) 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 부형제가, 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결된 표적화 리간드를 포함하는 약제학적 조성물에 첨가되어, 생체내에서 인간에 전달하기에 적합한 약제학적 제형을 형성한다.

[0291] 일부 실시형태에서, 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결된 표적화 리간드를 포함하는 기재된 약제학적 조성물은 표적 mRNA의 발현과 연관된 임상적 표시(clinical presentation)를 치료하거나 관리하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 치료적 또는 예방적 유효량의 하나 이상의 약제학적 조성물은 이러한 치료, 예방 또는 관리가 필요한 피험자에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 올리고머 화합물에 공유 연결된 공액된 리간드들 중 임의의 리간드의 투여는 피험자에서 질병의 증상의 수, 중증도 및/또는 빈도를 저하시키는 데 사용될 수 있다.

[0292] 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결된 표적화 리간드를 포함하는 기재된 약제학적 조성물은 표적 mRNA의 발현의 감소 또는 저해로부터 이득을 얻게 될 질병 또는 장애를 갖는 피험자에서 적어도 하나의 증상을 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 피험자에게 본원에 기재된 표적화 리간드에 연결된 발현-저해성 올리고머 화합물, 예컨대 RNAi 제제를 포함하는 하나 이상의 약제학적 조성물이 치료적 유효량으로 투여됨으로써, 증상이 치료된다. 다른 실시형태에서, 피험자에게 하나 이상의 발현-저해성 올리고머 화합물이 예방적 유효량으로 투여됨으로써, 적어도 하나의 증상이 예방된다.

[0293] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드에 연결된 발현-저해성 올리고머 화합물이 투여되는 피험자에서 표적 mRNA의 발현 또는 수준은, 약제학적 조성물을 수여 받지 않는 피험자와 비교하여, 적어도 약 5%, 예를 들어 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%,

95% 또는 98%만큼 감소된다. 피험자에서 유전자 발현 수준은 피험자의 세포, 세포군 및/또는 조직에서 감소될 수 있다. 일부 실시형태에서, mRNA의 수준이 감소된다. 다른 실시형태에서, 발현된 단백질 수준이 감소된다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 표적화 리간드에 연결된 발현-저해성 올리고머 화합물이 투여되는 피험자에서 단백질의 수준은, 약제학적 조성물을 수여 받지 않는 피험자와 비교하여, 적어도 약 5%, 예를 들어 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%만큼 감소된다. 발현, mRNA 수준 또는 단백질 수준의 감소는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 평가될 수 있다. mRNA 수준 및/또는 단백질 수준의 감소 또는 저하는 수합해서 본원에서는, 표적 RNA의 감소 또는 저하, 또는 표적 mRNA의 발현의 저해 또는 감소로서 지칭된다.

[0294] 투여 경로는, 발현-저해성 올리고머 화합물이 신체와 접촉하게 되는 길(path)이다. 일반적으로, 포유류의 치료를 위해 약물 및 핵산을 투여하는 방법은 당업계에 잘 공지되어 있고, 본원에 기재된 조성물의 투여에 적용될 수 있다. 본원에 기재된 표적화 리간드에 연결된 발현-저해성 올리고머 화합물은 특정한 경로에 적절하게 맞춰진 조제물 내에서 임의의 적합한 경로를 통해 투여될 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 약제학적 조성물은 주사에 의해, 예를 들어 정맥내, 근육내, 피내, 피하, 관절내 또는 복강내 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 약제학적 조성물은 흡입에 의해 투여된다.

[0295] 본원에 기재된 표적화 리간드에 연결된 발현-저해성 올리고머 화합물을 포함하는 약제학적 조성물은 당업계에 공지된 올리고뉴클레오타이드 전달 기술을 사용하여 세포, 세포군, 종양, 조직 또는 피험자에게 전달될 수 있다. 일반적으로, 당업계에 인지된 핵산 분자의 임의의 적합한 전달 방법(시험관내 또는 생체내)은 본원에 기재된 조성물에 사용하기 위해 개조될 수 있다. 예를 들어, 전달은 국소(local) 투여(예를 들어 직접 주사, 이식 또는 국소(topical) 투여), 전신 투여, 또는 피하, 정맥내, 복강내, 또는 비경구 경로, 예컨대 두개내(intracranial)(예를 들어 뇌실내(intraventricular), 뇌실질내(intraparenchymal) 및 척추강내(intrathecal)), 근육내, 경피, 기도(에어로졸), 비강, 경구, 직장, 또는 국소(협측(buccal) 및 설하(sublingual) 포함) 투여에 의해서일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 조성물은 피하 또는 정맥내 주입 또는 주사에 의해 투여된다.

[0296] 이에 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 약제학적 조성물은 피험자에게 투여되기 위해 제형화될 수 있다.

[0297] 본원에 사용된 바와 같이, 약제학적 조성물 또는 약제는 기재된 치료용 화합물 및 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 부형제 중 적어도 하나의 약리학적 유효량을 포함한다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 약물 전달 시스템에 의도적으로 포함되는 활성 약제학적 성분(API, 치료용 생성물, 예를 들어 F12 RNAi 제제) 이외의 성분이다. 부형제는 의도된 투약량에서 치료 효과를 발휘하지 않거나 발휘하지 않고자 한다. 부형제는, a) 제조 동안 약물 전달 시스템의 가공에 일조하며, b) API의 안정성, 생체이용률 또는 환자 수용성을 보호하거나, 지지하거나 증강시키며, c) 생성물 식별을 돕고/거나 d) 저장 또는 사용 동안 API의 전반적인 안전성, 효과 또는 전달의 임의의 다른 속성을 증강시키는 작용을 할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 불활성 성분일 수 있거나 불활성 성분이 아닐 수 있다.

[0298] 부형제로는: 흡수 증강제, 접착 방지제(anti-adherent), 소포제, 항산화제, 결합제, 완충제, 담체, 코팅제, 착색제, 전달 증강제, 전달 중합체, 텍스투란, 텍스투로스, 희석제, 봉해제, 유화제, 증량제(extender), 충전제, 방향제(flavor), 글리덴트(glidant), 습윤제, 윤활제, 오일, 중합체, 보존제, 식염수, 염, 용매, 당, 현탁제, 서방성 매트릭스, 감미제, 농조화제, 장성제(tonicity agent), 비히클, 발수제 및 보습제 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0299] 주사용으로 적합한 약제학적 조성물은 멸균 수용액(물에서 가용성인 경우) 또는 분산액, 및 멸균 주사액 또는 분산액의 임기 제조(extemporaneous preparation)를 위한 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여의 경우, 적합한 담체로는, 생리학적 식염수, 정균수(bacteriostatic water), Cremophor ELTM(미국 뉴저지주 파시페니 소재의 BASF사) 또는 포스페이트 완충 식염수(PBS) 등이 있다. 이러한 담체는 제조 및 저장 조건 하에 안정해야 하고, 미생물, 예컨대 박테리아 및 진균류의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유효성은 예를 들어 코팅제, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우, 등장화제(isotonic agent), 예를 들어 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 및 소듐 클로라이드를 조성물에 포함

하는 것이 바람직할 것이다. 주사 가능한 조성물의 연장된 흡수는, 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 야기될 수 있다.

- [0300] 멸균 주사액은, 필요한 양의 활성 화합물을 상기 열거된 성분들 중 하나 또는 조합과 함께 적절한 용매 내에 혼합하고, 필요하다면 후속해서 필터 멸균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로 분산액은, 활성 화합물을, 베이식(basic) 분산 매질 및 상기 열거된 것들 유래의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내에 혼합함으로써 제조된다. 멸균 주사액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은, 이의 이전에 멸균-여과된 용액 유래의 활성 성분 + 임의의 부가적인 요망되는 성분의 분말을 제공하는 진공 건조 및 동결-건조를 포함한다.
- [0301] 관절내 투여에 적합한 제형은 미세결정질 형태로 존재할 수 있는 약물의 멸균 수성 조제물 형태, 예를 들어 수성 미세결정질 현탁액의 형태일 수 있다. 리포솜 제형 또는 생분해성 중합체 시스템이 또한, 관절내 투여 및 안내(ophthalmic) 투여 둘 다를 위한 약물을 제시하는 데 사용될 수 있다.
- [0302] 눈 치료를 포함하여 국소 투여에 적합한 제형으로는, 액체 또는 반(semi)-액체 조제물, 예컨대 도찰제(liniment), 로션, 젤, 어플리컨트(applicant), 수-중-유 또는 유-중-수 에멀전, 예컨대 크림, 연고 또는 페이스트; 또는 용액 또는 현탁액, 예컨대 점적액 등이 있다. 피부 표면으로의 국소 투여를 위한 제형은 약물을 피부학적으로 허용 가능한 담체, 예컨대 로션, 크림, 연고 또는 비누와 함께 분산시킴으로써 제조될 수 있다. 적용을 국소화하고 제거를 저해하기 위해 필름 또는 층을 피부에 걸쳐 형성할 수 있는 담체가 유용하다. 내부 조직 표면으로의 국소 투여의 경우, 제제는 조직 표면으로의 흡수를 증강시키는 것으로 공지된 액체 조직 접착제 또는 다른 성분에서 분산될 수 있다. 예를 들어, 하이드록시프로필셀룰로스 또는 피브리노젠/트롬빈 용액이 유리하게 사용될 수 있다. 대안적으로, 조직-코팅 용액, 예컨대 펙틴-함유 제형이 사용될 수 있다.
- [0303] 흡입 치료를 위해, 스프레이 캔, 네블라이저 또는 애토마이저(atomizer)를 이용하여 분배되는 분말(자가-추진형 또는 스프레이 제형)의 흡입이 사용될 수 있다. 이러한 제형은 분말 흡입 디바이스 또는 자가-추진형 분말-분배 제형으로부터 폐 투여를 위한 미세 분말 형태로 존재할 수 있다. 자가-추진형 용액 및 스프레이 제형의 경우, 그 효과는, 요망되는 스프레이 특징을 갖는(즉, 요망되는 입자 크기를 갖는 스프레이를 생성할 수 있는) 밸브를 선택함으로써, 또는 조절된 입자 크기의 현탁화된 분말로서 활성 성분을 혼합함으로써 달성될 수 있다. 흡입에 의한 투여를 위해, 화합물은 또한, 적합한 추진제, 예를 들어 가스, 예컨대 이산화탄소를 함유하는 가압된 용기 또는 디스펜서, 또는 네블라이저로부터 에어로졸 스프레이의 형태로 전달될 수 있다.
- [0304] 전신 투여는 또한, 경점막 또는 경피 수단에 의해 수행될 수 있다. 경점막 또는 경피 투여를 위해, 침투되어야 하는 장벽에 적절한 침투제가 제형에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 경점막 투여의 경우 세제 및 담즙산염을 포함한다. 경점막 투여는 비강 스프레이 또는 좌제의 사용을 통해 달성될 수 있다. 경피 투여의 경우, 활성 화합물은 전형적으로, 일반적으로 당업계에 공지된 바와 같이 연고, 고약, 젤 또는 크림으로 제형화된다.
- [0305] 활성 화합물은, 신체로부터의 급속한 제거에 대해 이러한 화합물을 보호할 담체, 예컨대 임플란트 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함하여, 조절된 방출 제형을 이용하여 제조될 수 있다. 생분해성의 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조 방법은 당업자에게 명백해질 것이다. 리포솜 현탁액이 또한, 약제학적으로 허용 가능한 담체로서 사용될 수 있다. 이들은 당업자에게 공지된 방법에 따라, 예를 들어 미국 특허 4,522,811에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.
- [0306] 경구 또는 비경구 조성물은 투여의 용이성 및 투약량의 균일성을 위해 투약량 유닛 형태로 제형화될 수 있다. 투약량 유닛 형태는 치료 받을 피험자에 대한 유니터리(unitary) 투약량으로서 적당한 물리적으로 별개의 유닛을 지칭하며; 각각의 유닛은, 요망되는 치료 효과를 생성하도록 계산된 예정된 양의 활성 화합물을 필요한 약제학적 담체와 공동으로 함유한다. 개시내용의 투약량 유닛 형태에 대한 사양(specification)은 달성되어야 하는 활성 화합물 및 치료 효과의 독특한 특징, 및 개체의 치료를 위한 이러한 활성 화합물의 화합(compounding) 분야에 고유한 한계에 의해 지시되고 직접적으로 의존한다. 더욱이, 투여는 볼루스(bolus)의 주기적인 주사에 의해 수행될 수 있거나, 외부 저장소(external reservoir)(예를 들어 정맥내 백(bag))로부터의 정맥내, 근육내 또는 복강내 투여에 의해 보다 지속적으로 될 수 있다.
- [0307] 본 개시내용의 방법과 함께, 게놈약학(pharmacogenomics)(즉, 개체의 유전형과, 외래 화합물 또는 약물에 대한 해당 개체의 반응 사이의 관계에 대한 연구)가 고려될 수 있다. 치료제의 대사의 차이는, 약리학적 활성 약물의 용량과 혈액 농도 사이의 관계를 변경함으로써 중증 독성 또는 치료 실패를 초래할 수 있다. 따라서, 의사 또는

임상의는, 약물을 투여할지의 여부를 결정하는 것 뿐만 아니라 약물을 이용한 치료의 투약량 및/또는 치료 섭생을 맞추는 데 있어서, 관련 있는 게놈약학 연구에서 수득된 지식을 적용하는 것을 고려할 수 있다.

[0308] 약제학적 조성물은 이러한 약제학적 조성물에서 보편적으로 확인되는 다른 부가적인 구성성분을 함유할 수 있다. 이러한 부가적인 구성성분으로는: 진양약(anti-pruritic), 아스트린젠트, 국소 마취제 또는 항염증제(예를 들어 항히스타민, 디펜하이드라민 등) 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 또한, 본원에 정의된 RNAi 제제를 발현하거나 포함하는 세포, 조직 또는 단리된 기관은 "약제학적 조성물"로서 사용될 수 있는 것으로 예상된다. 본원에 사용된 바와 같이, "약리학적 유효량," "치료적 유효량" 또는 간단히 "유효량"은, 약물학적, 치료적 또는 예방적 결과를 생성하기 위한 RNAi 제제의 해당 양을 지칭한다.

[0309] 일반적으로, 활성 화합물의 유효량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 100 mg/kg의 체중/일(day), 예를 들어 약 1.0 mg/kg 내지 약 50 mg/kg의 체중/일의 범위일 것이다. 일부 실시형태에서, 활성 화합물의 유효량은 약 0.25 mg/kg 내지 약 5 mg/kg의 체중/용량의 범위일 것이다. 일부 실시형태에서, 활성 성분의 유효량은 약 0.5 mg/kg 내지 약 3 mg/kg의 체중/용량의 범위일 것이다. 투여되는 양은 또한, 환자의 전반적인 건강 상태, 전달되는 화합물의 상대적인 생물학적 효능, 제형 내의 부형제의 존재 및 유형, 및 투여 경로와 같은 변수들에 따라 다를 것이다. 또한, 투여되는 초기 투약량은, 요망되는 혈액-수준 또는 조직 수준을 신속하게 달성하기 위해 상기 상한(above upper) 수준을 넘어 증가될 수 있거나, 초기 투약량은 최적보다 작을 수 있다.

[0310] 질병의 치료를 위해, 또는 질병 치료용 약제 또는 조성물의 형성을 위해, 표적화 리간드에 연결된 발현-저해성 올리고머 화합물, 예컨대 RNAi 제제를 포함하는 본원에 기재된 약제학적 조성물은 부형제, 또는 비제한적으로 제2의 또는 다른 발현-저해성 올리고머 화합물, 저분자 약물, 항체, 항체 단편 및/또는 백신을 포함하여 제2 치료제 또는 치료와 함께 조합될 수 있다.

[0311] 기재된 표적화 리간드가 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결되는 경우 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제 또는 보조제(adjuvant)에 첨가되는 경우, 이러한 리간드는 키트, 용기, 팩 또는 디스펜서 내로 포장될 수 있다. 본원에 기재된 약제학적 조성물은 예비-충전된 주사기 또는 바이알 내에 포장될 수 있다.

[0312] 상기 제공된 실시형태는 이제 하기의 비제한적인 실시예와 함께 예시된다.

### [0313] 실시예

[0314] 하기 실시예는 제한하는 것이 아니며, 본원에 개시된 소정의 실시형태를 예시하려는 것이다.

[0315] 실시예의 합성에 대한 하기의 실험 상세사항에 사용되는 약어들 중 일부는 하기에 정의된다: h 또는 hr = 시간(들); min = 분(들); mol = 몰수(mole)(들); mmol = 밀리몰(들); M = 몰(molar);  $\mu$ M = 마이크로몰(micromolar); g = 그램(들);  $\mu$ g = 마이크로그램(들); rt 또는 RT = 실온; L = 리터(들); mL = 밀리리터(들); wt = 중량; Et<sub>2</sub>O = 디에틸 에테르; THF = 테트라하이드로푸란; DMSO = 디메틸 설펝사이드; EtOAc = 에틸 아세테이트; Et<sub>3</sub>N 또는 TEa = 트리에틸아민; *i*-Pr<sub>2</sub>NEt 또는 DIPEA 또는 DIEA = 디이소프로필에틸아민; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 또는 DCM = 메틸렌 클로라이드; CHCl<sub>3</sub> = 클로로포름; CDCl<sub>3</sub> = 중수소화된 클로로포름; CCl<sub>4</sub> = 탄소 테트라클로라이드; MeOH = 메탄올; EtOH = 에탄올; DMF = 디메틸포름아미드; BOC = *t*-부톡시카르보닐; CBZ = 벤질옥시카르보닐; TBS = *t*-부틸디메틸실릴; TBSCl = *t*-부틸디메틸실릴 클로라이드; TFA = 트리플루오로아세트산; DMAP = 4-디메틸아미노피리딘; NaN<sub>3</sub> = 소듐 아자이드; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 소듐 설펝이트; NaHCO<sub>3</sub> = 소듐 비카르보네이트; NaOH = 소듐 하이드록사이드; MgSO<sub>4</sub> = 마그네슘 설펝이트; K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = 포타슘 카르보네이트; KOH = 포타슘 하이드록사이드; NH<sub>4</sub>OH = 암모늄 하이드록사이드; NH<sub>4</sub>Cl = 암모늄 클로라이드; SiO<sub>2</sub> = 실리카; Pd-C = 탄소 상 팔라듐; HCl = 수소 클로라이드 또는 염산; NMM = *N*-메틸모르폴린; H<sub>2</sub> = 수소 가스; KF = 포타슘 플루오라이드; EDC-HCl = N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드; MTBE = 메틸-*tert*-부틸 에테르; MeOH = 메탄올; Ar = 아르곤; SiO<sub>2</sub> = 실리카; R<sub>T</sub> = 체류 시간.

[0316] 부가적으로, 본원에 개시된 표적화 리간드와 함께 사용하기에 적합한 예시적인 발현-저해성 올리고머 화합물은 하기의 실시예의 다양한 표들에 나타나 있다. 하기 표기법은 본원에 개시된 표에 나타난 서열에 대한 변형된 뉴클레오타이드를 가리키는 데 사용된다:

[0317] N = 2'-OH (비변형된) 리보뉴클레오타이드(f 또는 d 표시가 없는 대문자)

[0318] n = 2'-OMe 변형된 뉴클레오타이드

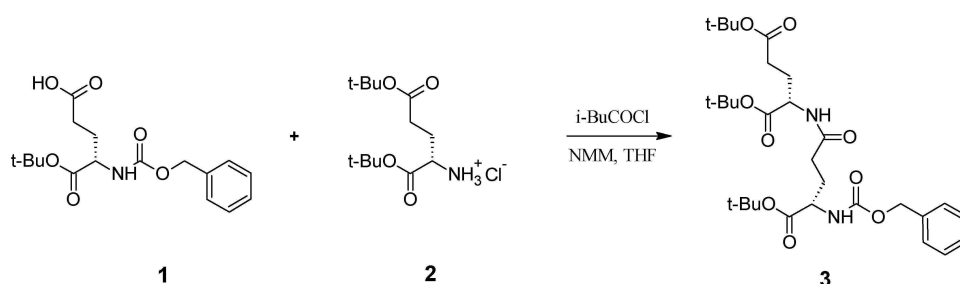


[0319]	Nf	=	2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드
[0320]	dN	=	2'-데옥시 뉴클레오타이드
[0321]	N <sub>UNA</sub>	=	2',3'-세코 뉴클레오타이드 모방체(언락드 뉴클레오베이스 유사체)
[0322]	N <sub>LNA</sub>	=	락드 뉴클레오타이드
[0323]	Nf <sub>ANA</sub>	=	2'-F-아라비노 뉴클레오타이드
[0324]	NM	=	2'-메톡시에틸 뉴클레오타이드
[0325]	X 또는 Ab	=	어베이식 리보스
[0326]	R	=	리비톨(ribitol)
[0327]	(invdN)	=	인버티드 데옥시리보뉴클레오타이드(3'-3' 연결된 뉴클레오타이드)
[0328]	(invAb)	=	인버티드 어베이식 뉴클레오타이드
[0329]	(invX)	=	인버티드 어베이식 뉴클레오타이드
[0330]	(invn)	=	인버티드 2'-OMe 뉴클레오타이드
[0331]	s	=	포스포티오에이트 연결된 뉴클레오타이드
[0332]	vpdN	=	비닐 포스포네이트 데옥시리보뉴클레오타이드
[0333]	(3'OMen)	=	3'-OMe 뉴클레오타이드
[0334]	(5Me-Nf)	=	5'-Me, 2'-플루오로 뉴클레오타이드
[0335]	cPrp	=	시클로프로필 포스포네이트

[0336] 본 개시내용의 화합물은 당업자에게 공지된 합성 화학 기술을 사용하여 제조될 수 있다.

[0337] **실시예 1. 표적화 리간드 포스포아미드트 화합물 구조 101b의 합성.**

[0338] 1) 트리-*tert*-부틸 *N*-[*N*-(벤질옥시카르보닐)-*L*-γ-글루타밀]-*L*-글루타메이트(**3**)의 제조



[0339]

[0340] 열전대(thermocouple), 자기 교반 막대, 질소 투입구 및 분말 깔때기가 장착된 질소-플러싱된(flushed), 250-mL 3-목 둥근-바닥 플라스크에, **1**(10.00 g, 29.64 mmol), 및 후속해서 THF(100 mL)를 첨가하였다. 생성된 용액을 교반하고, *N*-메틸모르폴린(7.82 mL, 71.15 mmol)을 첨가하였다.

[0341] 분말 깔때기를 고무 격막(rubber septum)으로 대체하고, 혼합물을 얼음 수조를 사용하여 0℃까지 냉각시켰다. 이소부틸 클로로포르메이트(*i*BuCOCl, 3.85 mL, 29.64 mmol, 1.0 당량)를 10분에 걸쳐 반응 혼합물에 적가하여, 4.0℃ 미만의 포트 온도(pot temperature)를 유지하였다. 첨가 후, 혼합물을 40분 더 교반하고, 격막을 분말 깔때기로 대체하였다. 반응 혼합물에, **2**(8.767 g, 29.64 mmol, 1.0 당량)를 15분에 걸쳐 나누어서 첨가하여, 4.0℃ 미만의 포트 온도를 유지하였다. **2**의 첨가 후, 얼음 수조 및 분말 깔때기를 제거하고, 반응물을 잔여 단계들 동안 주위 온도까지 가온시켰다. **2**의 첨가 후, 투명한 무색 용액을 25분 동안 숙성시켰다(aged).

[0342] **2**의 첨가의 시작 후 40분째에 반응 시료(5-mL 부피 측정 플라스크에서 5.0 mL ACN으로 희석된 98 μL)를 취하고, RP-HPLC에 의해 전환 퍼센트(percent conversion)에 대해 분석하였다. **1**의 잔여물이 23%인 것으로 확인 되었으며, 따라서 반응 60분 후, 부가적인 *i*BuCOCl(1.16 mL, 30 몰%) 및 **2**(2.63 g, 30 몰%)를 순차적으로 첨가 하였다. 시료가 HPLC에 의해 99% 초과인 전환을 나타낼 때까지, 용액을 부가적인 60분 동안 숙성시켰다. 총 반

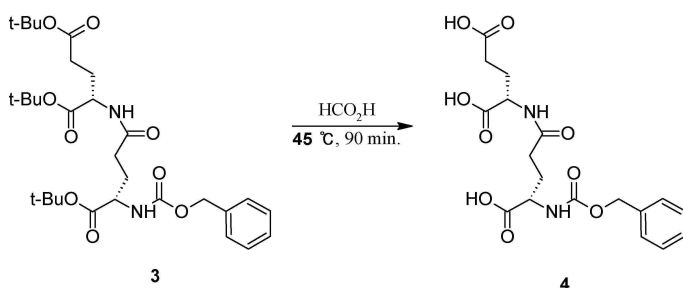
응 시간은 2의 초기 첨가의 시작으로부터 2.5시간이었다.

[0343] 반응 용액을 얼음 수조 내에서 3℃까지 냉각된 0.5 M HCl<sub>(aq)</sub>의 교반 용액에 붓고, 약 5분 동안 교반하였다. 쿼친(quenched) 반응 혼합물을 500-mL 분리 깔때기로 옮기고, 에틸 아세테이트(100 mL)를 첨가하였다. 층들을 분리하고, 유기상을 염수(100 mL)로 세척하고, MgSO<sub>4</sub>로 건조한 다음, 500-mL 둥근-바닥 플라스크 내로 여과하고, 진공내에서 농축시켜, 진한(thick) 무색 오일을 수득하였다. 오일을 MTBE(100 mL) 내에서 용해시키고, 진공내에서 농축시켜 진한 무색 오일을 한번 더 수득하였다.

[0344] 교반중인 오일에, 헥산(100 mL)을 첨가하였다. 백색 헤이즈(haze)가 용액 내에 나타났으며, 그런 다음 이러한 헤이즈는 추가의 교반 시 사라졌다. 시드(seed) 결정물을 첨가하고, 혼합물을 40분 동안 교반하였으며, 이러한 동안 백색 결정이 서서히 형성되었다.

[0345] 20분 이내에, 슬러리가 교반을 정체시키기에 충분히 진하였으며, 부가적인 헥산(50 mL)을 첨가하였다. 40분 후, 슬러리를 코스 프릿티드(coarse fritted) 깔때기에 걸쳐 여과하고, 헥산(각각 약 10 mL)으로 3회 세척한 다음, 깔때기 내에서 1시간 동안 기건(air-dried)하여, 3을 미세한 백색 분말(15.64 g, 91%)로서 수득하였다. 화합물 3의 <sup>1</sup>H NMR은 도 1에 나타나 있다. 75 그램 스케일(scale)에서, 수율은 917%이었으며, 순도는 99%이었다.

[0346] 2) *N*-[*N*-(벤질옥시카르보닐)-*L*-γ-글루타릴]-*L*-글루탐산(4)의 제조



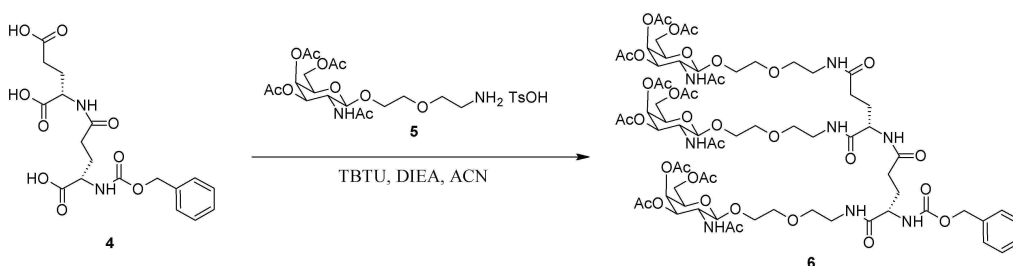
[0347]

[0348] 오버헤드 교반기, 분말 깔때기, 열전대 및 가열 맨틀(heating mantle)이 장착된 3000-mL, 3-목 둥근-바닥 플라스크에, 3(72.57 g, 125.4 mmol) 및 포름산(시약 등급, 95% 초과, 1.45 L, 20 부피 당량)을 첨가하였다. 분말 깔때기를 스톱퍼(stopper)/N<sub>2</sub>에 의해 대체하고, 생성된 용액을 45℃까지 가열한 다음, 1시간 동안 교반하고, 이때 RP-HPLC에 의해 모니터링하였다. 2.0 영역% 미만의 모노-*t*-부틸 에스테르가 잔류하였을 때, 반응은 완전한 것으로 여겨졌다.

[0349] 포름산의 첨가 후 60분째에 반응 시료(950 μL의 H<sub>2</sub>O 내로 희석된 50 μL)를 취하고, 잔류한 모노-*t*-부틸 에스테르의 퍼센트에 대해 시료를 RP-HPLC에 의해 분석하였다. 분석은, 1.8% 모노-*t*-Bu 에스테르가 잔류하였음을 보여주었고; 따라서, 90분째에 열을 제거하였다.

[0350] 반응물을 톨루엔 및 아세토니트릴(ACN, 각각 1500 mL)로 희석시키고, 혼합물을 진공내에서 농축시켰다. 포름산을, 1:1 ACN:톨루엔(약 600 mL)을 이용하여 공비(azeotropically) 제거하고, ACN(각각 약 500 mL)으로 2회 세척하였다. 물질을 고 진공 상에서 밤새 건조하여, 백색의 포말성(foamy) 고체 화합물 4(54.3 g, 정량적 수율)을 수득하였다. 화합물 4(L/N 1321-063B)의 <sup>1</sup>H NMR은 도 2에 나타나 있다.

[0351] 3) *N*-[*N*-(벤질옥시카르보닐)-*L*-γ-글루타릴]-*L*-글루탐산, 트리-[NAG-PEG<sub>2</sub>]-아미드(6)의 제조



[0352]

[0353] 1-리터 둥근-바닥 플라스크에, NAG-아민 *p*-토실레이트 염(5, 59.19 g, 97.6 mmol, 4.13 당량) 및 *Z*-비스-Glu 3 가산(triacid)(4, 10.01 g, 23.6 mmol, 1.0 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 아세토니트릴(500 mL)에

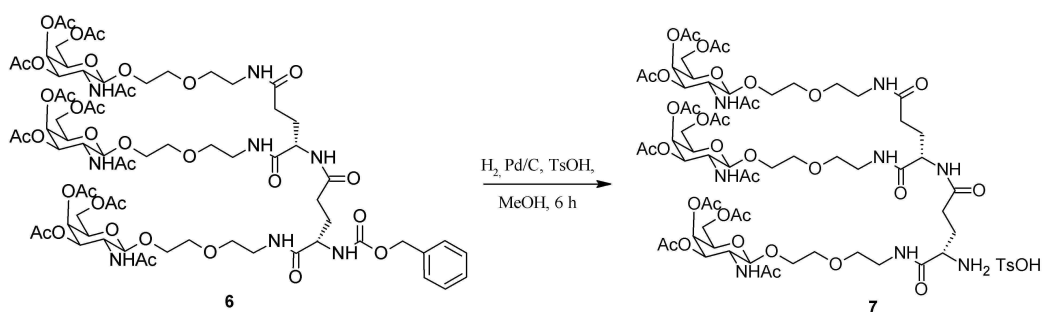
용해시키고, 진공내에서 농축시켜, 물을 공비 제거하였다. 잔여물을 신선한 아세트니트릴(400 mL) 내에서 용해시키고, 교반 막대를 함유하고 열전대가 장착된 질소-플러싱된 1-리터 3-목 둥근-바닥 플라스크로 옮겼다. 물 함량을 KF(257 ppm)에 의해 측정하였다.

[0354] 교반중인 용액에, 질소 하에 TBTU(28.20 g, 87.8 mmol, 3.7 당량)를 분말 깔때기를 통해 첨가하였다. 깔때기 상의 잔여 TBTU를 부가적인 아세트니트릴(100 mL)을 사용하여 반응물 내로 행구었다. DIPEA(34.0 mL, 25.2 g, 8.0 당량)를 주사기를 통해 20분에 걸쳐 적가하여, 반응 온도를 25℃ 미만에서 유지하였다. 혼합물을 DIPEA 첨가의 시작 후 2시간 동안 교반하였으며, 이때 HPLC에 의해 모니터링하였다. 78분째의 분석은 출발 물질의 완전한 소모를 보여주었다.

[0355] 2시간 후, 용매를 진공 내에서 제거하였다. 생성된 진한 오일을 디클로로메탄(1000 mL) 내에서 용해시키고, 1.0 N HCl<sub>(aq)</sub>(3 x 500 mL) 및 포화된 NaHCO<sub>3(aq)</sub>(3 x 500 mL)를 이용하여 세척하였다. 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 걸쳐 건조하고, 여과한 다음, 진공내에서 농축시켜, 황백색의 왁스질 고체(33.5 g)를 수득하였다.

[0356] 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를, 클로로포름 및 메탄올을 용출제로서 사용하여 ISCO CombiFlash 자동화된 정제 시스템 상에서 수행하였다. UV 크로마토그램(220 nm)을 기반으로 생성물을 함유하는 것으로 의심되는 모든 분획들을 HPLC에 의해 분석하고, 적어도 97.0% AUC의 생성물을 함유하는 모든 분획들을 풀링하고(pooled), 농축시켜, 18.75 g(97.0% 순도)의 **6**을 수득하였다. 불순한 분획을 풀링하여, 부가적인 12.2 g(78.8% 순도)의 **6**을 수득하였다. **6**의 총 수율은 70.9%이었다. 화합물 **6**의  $^1\text{H}$  NMR은 도 3에 나타나 있다.

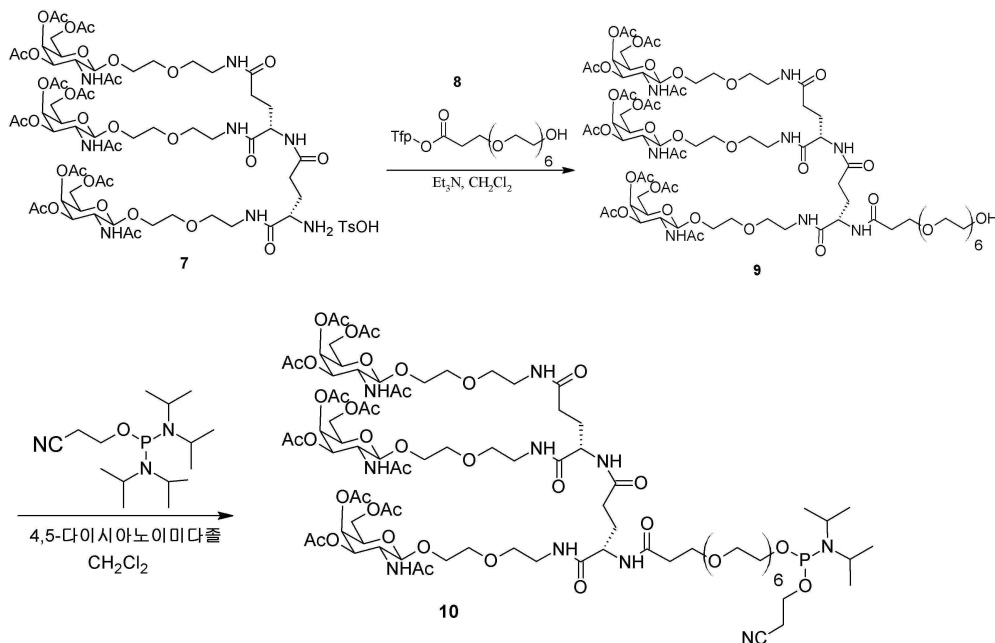
[0357] 4) 트리-NAG-비스-Glu-NH<sub>2</sub> 토실레이트 염(7)의 제조.



[0358]

[0359] *p*-TsOH-H<sub>2</sub>O(0.657 g, 3.46 mmol)와 함께 MeOH(155 mL) 중 화합물 **6**(5.737 g, 3.46 mmol)을 Pd/C 10%(688 mg)의 존재 하에 6시간 동안 수소화하였다. TLC(CHCl<sub>3</sub>:MeOH= 8.5:1.5)는, 반응이 해당 시간에 의해 완료되었음을 확인시켜 주었다. 반응 플라스크에 Ar을 충전하고, EtOH(200 mL)를 첨가한 다음, 용액을 셀라이트 케이크(celite cake)를 통해 여과하였다. 생성물을 농축시키고, 진공 내에서 건조하였다. 4.81 g의 생성물 토실레이트 염 **7**을 수득하였다. 화합물 **7**의 <sup>1</sup>H NMR은 도 4에 나타나 있다.

[0360] 5) 트리-NAG-비스-Glu-NH-PEG<sub>6</sub>-OH(**9**)의 제조:



[0361]

[0362] 절차 A(트리-NAG 아민 염 **7**이 96% 미만의 순도인 경우): NAG 아민 염 **7**(약 90% 순도, 18.50 g, 10.90 mmol) 및 HO-PEG<sub>6</sub>-CO<sub>2</sub>TFP 에스테르 **8**(6.57 g, 13.08 mmol)을 디클로로메탄(185 mL) 내에서 용해시키고, 0℃까지 냉각시켰다. 이 용액에, 트리에틸아민(6.10 mL, 43.59 mmol)을 첨가하였다. 용액을 실온까지 가온시키고, 18시간 동안 교반하였으며, 이때 HPLC에 의해 모니터링하였다. 반응물을 포화된 수성 NaHCO<sub>3</sub> 및 염수(1:1, 140 mL)를 이용하여 퀀칭시키고, RT에서 30분 동안 교반하고, 층들을 분리하였다. 유기층을 포화된 수성 NaHCO<sub>3</sub>(3 x 140 mL) 및 염수(1:1)로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조하였다. 건조제를 여과하고, 용액을 농축시키고, 플래쉬 크로마토그래피를 통해 정제하여, **9**(13.56 g, 67%)를 백색 고체 물질로서 수득하였다. 화합물 **9**의 <sup>1</sup>H NMR은 도 5에 나타나 있다.

[0363] 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를, 디클로로메탄 및 메탄올을 용출제로서 사용하여 ISCO CombiFlash 자동화된 정제 시스템 상에서 수행하였다. 순수한 분획을 풀링하고, 농축시켜, 13.56 g의 **9**(99% 순도)를 수득하였다. 불순한 분획을 풀링하여, 4.9 g의 **9**(약 95% 순도)를 수득하였다.

[0364] 절차 B(트리-NAG 아민 염 **7**이 96% 초과 순도인 경우): DCM (40mL) 중 생성물 **7**(1.94 g, 1.272 mmol)을 Ar 하에 HO-PEG<sub>6</sub>-CO<sub>2</sub>TFP 에스테르 **8**(767 mg, 1.526 mmol) 및 DIPEA(443 μL, 2.544 mmol)를 이용하여 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공내에서 농축시켜, CHCl<sub>3</sub> 내에서 용해시키고, 교반중인 Et<sub>2</sub>O(90 mL)에 적가하였다. 침전물을 분리하고, Et<sub>2</sub>O(3x35 mL)로 행군 다음, 진공 내에서 건조하였다. 수율 2.275 g(96%).

[0365] 6) 트리-NAG-비스-Glu-NH-PEG<sub>6</sub> 포스포아미디트(**10**)의 제조:

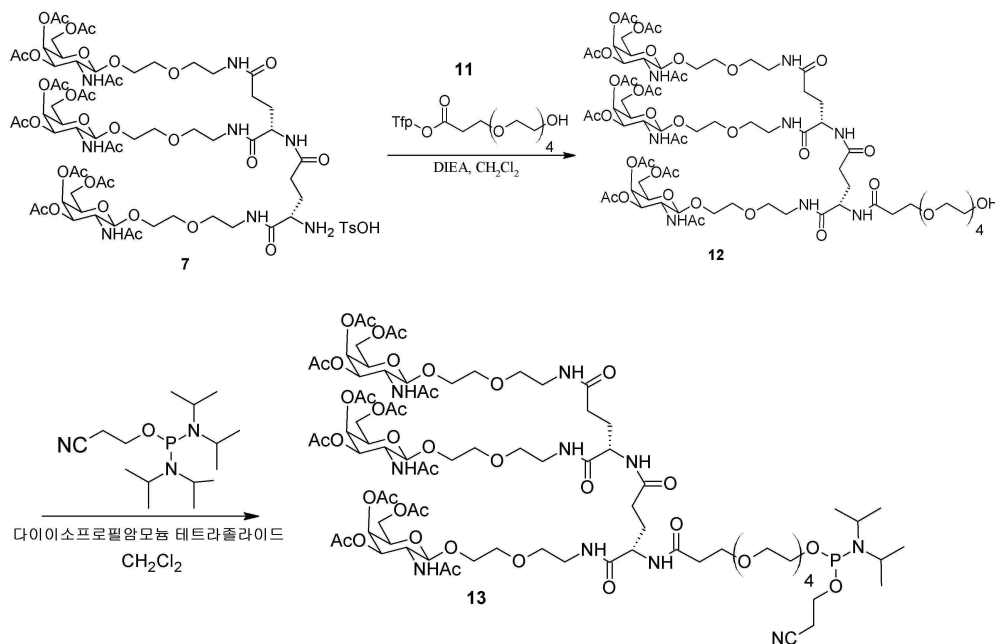
[0366] 화합물 **9**(6.62 g, 3.56 mmol) 및 4,5-디시아노이미다졸(0.11 g, 0.89 mmol)을 무수 디클로로메탄(230 mL) 내에 용해시키고, 질소 분위기 하에 놓았다. 이 혼합물에, 무수 디클로로메탄(5 mL) 중 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포다아미디트("Phos 시약", 1.46 mL, 4.62 mmol) 용액을 5분에 걸쳐 적가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였으며, 이때 HPLC에 의해 모니터링하였다(1% 미만의 잔여 SM).

[0367] 반응 혼합물을 포화된 수성 NaHCO<sub>3</sub>(2 x 150 mL), H<sub>2</sub>O 중 3% DMF(v/v, 2 x 150 mL), H<sub>2</sub>O(3 x 150 mL) 및 염수(1 x 150 mL)를 이용하여 세척하고, 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 건조하였다. 건조제를 여과하고, 용액을 진공내에서 농축시켜, 미정제 생성물을 수득하였다. 미정제 생성물을 5% 톨루엔-헥산(50 mL) 내에 현탁시키고, 5분 동안 교반하였으며, 이후 용매를 디캔팅하였다(decanted). 5% 톨루엔-헥산(1 x 50 mL) 및 헥산(2 x 50 mL)을 이용하여 과정을 반복하였다. 고체를 진공에 걸쳐 건조하여, 6.69 g의 **10**을 백색 고체 물질(91%)(화합물 **10**)로서 수득하였다. 화합물 **10**(본원에서 구조 101d)의 <sup>1</sup>H NMR은 도 6에 나타나 있다.



[0368] 실시예 2. 표적화 리간드 포스포아미디트 화합물 구조 103d의 합성.

[0369] 1) 트리-NAG-비스-Glu-NH-PEG<sub>4</sub>-OH(12)의 제조:



[0370]

[0371] 상기 실시예 1의 생성물 7(2.44 g, 1.44 mmol)을 DCM(30 mL) 내에 용해시키고, 아르곤 분위기 하에 놓았다. 이 용액에, HO-PEG<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>TFP 에스테르 11(717 mg, 1.73 mmol) 및 DIPEA(502  $\mu$ L, 2.88 mmol)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공내에서 농축시키고, CHCl<sub>3</sub> 내에 용해시켰다. 그런 다음, 용액을 교반중인 Et<sub>2</sub>O(90 mL)에 적가하였다. 침전물을 분리하고, Et<sub>2</sub>O로 행균 다음, 진공 내에서 건조하여, 2.60 g(102%)의 생성물 12를 수득하였으며, 이를 추가의 정제 없이 사용하였다.

[0372] 2) 트리-NAG-비스-Glu-NH-PEG<sub>4</sub> 포스포아미디트(13)의 제조:

[0373] 생성물 12(1.80 g, 1.01 mmol)를 피리딘을 이용하여 2회 공동증발시킨 후, 무수 디클로로메탄(25 mL) 내에 용해시키고, 아르곤 분위기 하에 놓았다. 이 용액에, 디이소프로필암모늄 테트라졸라이드(87 mg, 0.51 mmol) 및 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포디아미디트(458 mg, 1.52 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 5시간 동안 교반하였으며, 이때, TLC(CHCl<sub>3</sub>: MeOH: Et<sub>3</sub>N 95:5:2)에 의해 모니터링하였다. 일단, 모든 출발 물질들이 소모되고 나면, 반응 혼합물을 DCM(250 mL)을 이용하여 희석시키고, 포화된 수성 NaHCO<sub>3</sub>(100 mL) 및 포화된 수성 염수(100 mL)를 이용하여 세척하였다. 유기층을 소듐 설페이트를 이용하여 건조하고, 여과한 다음, 농축시켰다. 미정제 물질을 컬럼 크로마토그래피(DCM: MeOH: Et<sub>3</sub>N 97:3:2)에 의해 정제하여, 1.04 g(53%)의 화합물 13을 수득하였다. 화합물 13(본원에서 구조 103d)의 <sup>1</sup>H NMR은 도 7에 나타나 있다.

[0374] 실시예 3. 표적화 리간드 포스포아미디트 화합물 구조 102d의 합성.



로로메탄 또는 무수 아세트니트릴(50 mM) 내에 용해시킨 한편, 모든 다른 아미디트들을 무수 아세트니트릴(50 mM) 내에 용해시키고, 분자체(molecular sieve)(3 Å)를 첨가하였다. 5-벤질티오-1H-테트라졸(BTT, 아세트니트릴 중 250 mM) 또는 5-에틸티오-1H-테트라졸(ETT, 아세트니트릴 중 250 mM)을 활성화제 용액으로서 사용하였다. 커플링 시간은 10분(RNA), 15분(표적화 리간드), 90초(2'OMe) 및 60초(2'F)이었다. 포스포티오에이트 연결부를 도입하기 위해, 무수 아세트니트릴 중 3-페닐 1,2,4-디티아졸린-5-온(POS, 미국 메사추세츠주 레오민스터 소재의 PolyOrg, Inc.사로부터 입수됨)의 100 mM 용액을 이용하였다.

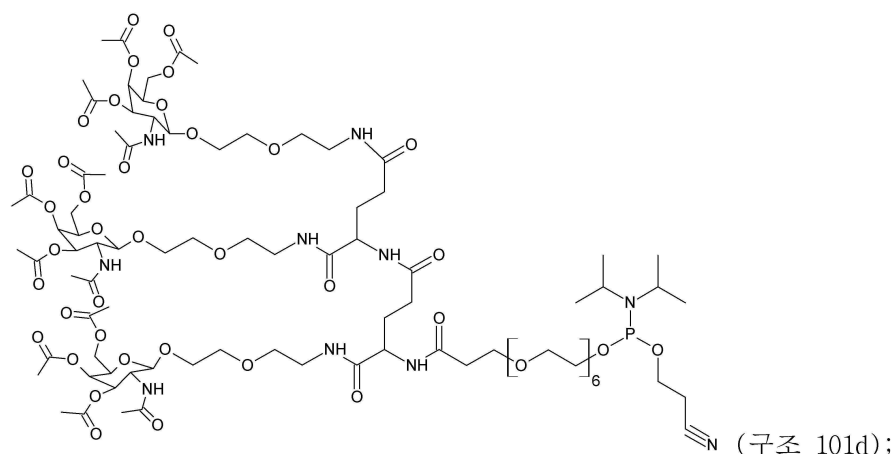
[0382] B. 지지체 결합된 올리고머의 절단 및 탈보호. 고체상 합성의 마무리 후, 건조된 고체 지지체에, 수 중 40 중량% 메틸아민과 28% 암모늄 하이드록사이드 용액(Aldrich사)의 1:1 부피 용액을 30℃에서 2시간 동안 처리하였다. 용액을 증발시키고, 고체 잔여물을 물 내에서 재구성하였다(하기 참조).

[0383] C. 정제. 미정제 올리고머를, TKSgel SuperQ-5PW 13u 컬럼 및 Shimadzu LC-8 시스템을 사용하여 음이온 교환 HPLC에 의해 정제하였다. 완충제 A는 20 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 9.0이었고 20% 아세트니트릴을 함유하였으며, 완충제 B는 1.5 M 소듐 클로라이드 첨가에 의해 완충제 A와 동일하였다. 260 nm에서 UV 트레이스(trace)를 기록하였다. 적절한 분획을 풀링한 다음, 100 mM 암모늄 비카르보네이트, pH 6.7의 러닝 완충제 및 20% 아세트니트릴과 함께 Sephadex G-25 배지를 이용하여 패킹된 GE Healthcare XK 16/40 컬럼을 사용하여 크기 배제 HPLC 상에서 진행시켰다.

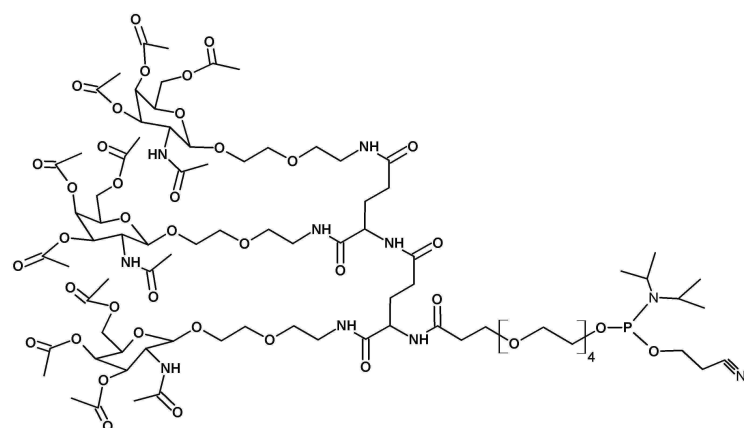
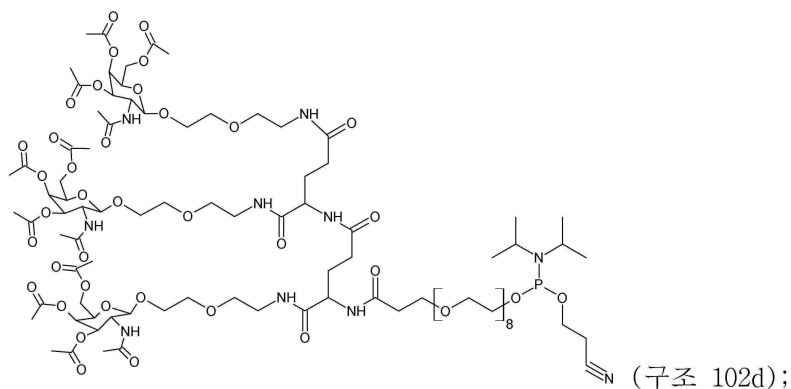
[0384] D. 어닐링. 상보적인 가닥들을, 0.2x PBS(포스페이트-완충 식염수, 1x, Corning, Cellgro사) 내에서 등몰의(equimolar) RNA 용액들(센스 및 안티센스)을 조합함으로써 혼합하여, RNAi 제제를 형성하였다. 이 용액을 70℃에서 서모믹서(thermomixer) 내로 넣고, 95℃까지 가열한 다음, 95℃에서 5분 동안 유지시키고, 실온까지 서서히 냉각시켰다. 일부 RNAi 제제들을 동결건조하고, -15℃ 내지 -25℃에 저장하였다. 0.2x PBS 내에서 UV-Vis 분광계 상에서 용액 흡광도를 측정함으로써 듀플렉스 농도를 확인하였다. 그런 다음, 260 nm에서의 용액 흡광도에 전환 인자(conversion factor) 및 희석 인자(dilution factor)를 곱하여, 듀플렉스 농도를 확인하였다. 다르게 언급되지 않는 한, 모든 전환 인자들은 0.037 mg/(mL·cm)이었다. 일부 실험의 경우, 전환 인자를 실험적으로 확인된 흡광 계수(extinction coefficient)로부터 계산하였다.

[0385] 실시예 5. PEG 링커의 길이가 다양한 표적화 리간드를 포함하는 포스포아미디트-함유 화합물의 특성

[0386] 하기 표적화 리간드 포스포아미디트 화합물들을 실시예 1 내지 4에서 상기 개시된 방법에 따라 합성하였다:



[0387]



[0388]

[0389]

구조 101d, 102d 및 103d의 포스포아미디트 화합물들을 각각, F12를 표적화하는 이중-가닥 RNAi 제제를 합성하는 데 사용될 수 있는 센스 가닥인 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 AM03704-SS의 5' 말단에서 컨쥬게이션을 위해 16 당량에서 전달하였다. AM03704는 하기 표에 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 가진다:

[0390]

표 1. 실시예 5의 센스 가닥 서열.

	5' → 3'	서열 번호:
센스 가닥 서열: (AM03704-SS)	uauaugscsccaagaAfaGfugaaagacc(inv dA)	1

[0391]

[0392]

조성물을 디클로로메탄(DCM) 내에 용해시키고, 체(sieve)에 걸쳐 건조하였다. 구조 103d(즉, PEG-4 링커를 가짐)의 포스포아미디트 화합물은 0.05 M 및 0.25 M 둘 다에서 젤화 문제를 제시하였다. 도 9에 나타낸 바와 같이 이들 조건 하에, 오로지 매우 소량의 표적화 리간드 구조 103d는 올리고뉴클레오타이드 AM03704-SS의 5' 종결 말단에 컨쥬게이션할 수 있었다.

[0393]

구조 101d 및 102d는 둘 다, 올리고뉴클레오타이드에 대한 표적화 리간드의 컨쥬게이션을 나타내었다. 도 9는 구조 101d에 공액된 AM03704에 대한 HPLC 크로마토그래프를 보여준다. 구조 101의 표적화 리간드의 경우, 대략 78%의 표적화 리간드-공액된 올리고뉴클레오타이드(FLP = 전장 생성물)가 형성된 것으로 확인되었다. 도 10은 구조 102d에 공액된 AM03704에 대한 HPLC 크로마토그래프를 보여준다. 대략 40%의 표적화 리간드-공액된 올리고뉴클레오타이드가 형성되었으며, 한편 대략 60%의 올리고뉴클레오타이드는 비공액된 상태로 남아있었다.

[0394]

놀랍고 예상치 못하게도, 16 당량에서, 구조 101d는, 서열의 5' 말단에서 올리고뉴클레오타이드에 대한 컨쥬게이션에 관하여, 구조 102d 및 구조 103d를 둘 다 실질적으로 능가하였다. 부가적으로, 구조 101d 및 102d는 둘 다, 구조 103d와 비교하여 더 큰 용해도를 보여주었다. 상기 주지된 바와 같이, 구조 103d는 올리고뉴클레오타이드 합성에 전형적인 표준 농도 및 용매 조건을 사용하여서는 용해되기 어려웠다. 구조 103의 표적화 리간드를 갖는 발현-저해성 올리고머 화합물에 연결된 표적화 리간드의 제조(구조 103d의 포스포아미디트 화합물을 사용

함으로써)는 보다 공격적인 극성 용매의 첨가를 필요로 하였다.

[0395] 실시예 6. 야생형 마우스에서 F12 발현-저해성 올리고머 화합물을 사용하여 GalNAc 표적화 리간드에 대한 3' 및 5' 센스 가닥 부착 부위들의 비교.

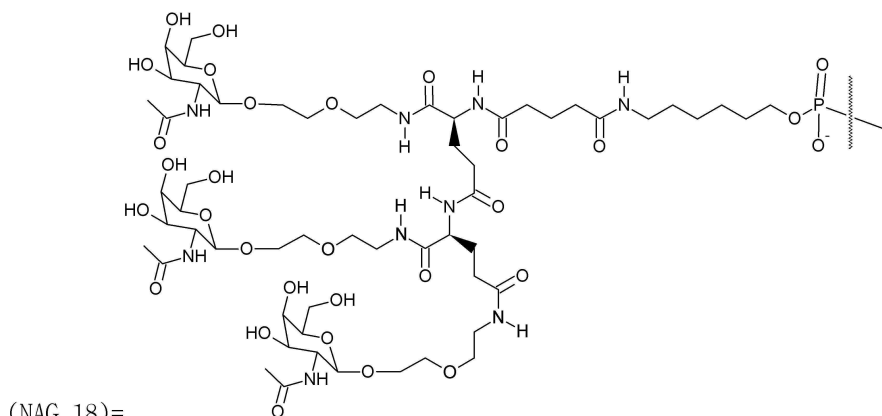
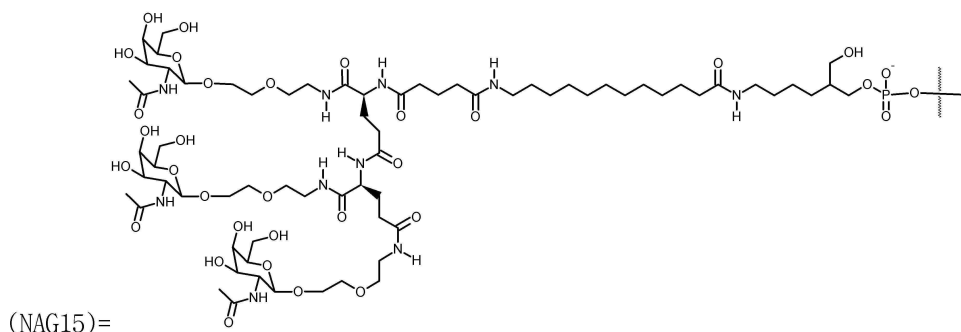
[0396] 센스 가닥의 3' 및 5' 종결 말단들 사이에서 GalNAc 리간드의 부착 부위들의 차이를 평가하기 위해, F12에 관한 발현-저해성 올리고머 화합물(이중-가닥 RNAi 제제)(본원에서 F12 RNAi 제제로 지칭됨)을 하기 표 2에 나타난 서열을 갖도록 제조하였다:

[0397] 표 2. 실시예 6의 F12 발현-저해성 올리고머 화합물(RNAi 제제 듀플렉스).

듀플렉스 ID: AD02803	5' → 3'	서열 번호:
센스 가닥 서열: (AM03628-SS)	uAuAugscsccaagaAfaGfugaaagacca(NAG15)	2
안티센스 가닥 서열: (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscuAu	3
듀플렉스 ID: AD02807	5' → 3'	서열 번호:
센스 가닥 서열: (AM03632-SS)	(NAG18)uauaugscsccaagaAfaGfugaaagacc(inv dA)	4
안티센스 가닥 서열: (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscuAu	5

[0398]

[0399] 상기 표 2에서, 하기 표기법을 사용하였다:



[0400]

[0401] (NAG18)은 본원에서 구조 2로 표시된 화학 구조를 가진다.

[0402] F12 RNAi 제제의 각각의 가닥을 MerMade96E®(Bioautomation사) 또는 MerMade12®(Bioautomation사)를 사용하여 올리고뉴클레오타이드 합성에 사용되는 고체상 상에서 포스포아미디트에 따라 합성하고, 상보적인 가닥들을 본

원의 실시예 4에 일반적으로 기재된 방법에 따라 0.2x PBS(포스페이트-완충 식염수, 1x Corning, Cellgro) 내에서 등물의 RNA 용액들(센스 및 안티센스)들을 조합함으로써 혼합하여, 듀플렉스를 형성하였다.

[0403] 각각의 GalNAc 리간드(즉, (NAG15) 또는 (NAG18))에 연결된 F12 RNAi 제제들을 피하(SC) 주사 분야에 공지된 바와 같은 약제학적으로 허용 가능한 완충제 내에서 조합하였다.

[0404] 각각의 GalNAc 리간드에 연결된 F12 RNAi 제제를 SC 주사를 통해 전달하였다. 제1일에 SC 주사를, 완충 식염수 내에 식염수, 또는 2개의 F12 RNAi 제제들 중 하나(AD02803 또는 AD02807)를 3 mg/kg(mpk) 용량으로 함유하는 용액을 200  $\mu$ l 용액/20 g 마우스로 하여, 등 쪽이면서 어깨들 사이의 느슨한 피부 내로 주사하였다. 1개의 치료군 당 세(3) 마리의 야생형 마우스들이 존재하였다. 상기 나타낸 바와 같이, AD02803은 센스 가닥의 3' 종결 말단에 부착된 (NAG15)를 포함하는 한편, AD2807은 센스 가닥의 5' 말단에 부착된 (NAG18)을 포함한다.

[0405] 치료를 받은 마우스 유래의 혈청 시료를 제8일, 제15일, 제22일 및 제29일에 취하여, 녀다운을 모니터링하였다. 혈청 내에서 순환하는 마우스 F12 단백질 (mF12) 수준을 내부적으로 개발된 mF12 alphaLISA®(Perkin Elmer 사)에 의해 정량화함으로써, 녀다운을 측정하였다. 특정한 출혈일(bleed date)에서의 발현을, 해당되는 동일한 일자에 대한 식염수 대조군의 평균으로 정규화하였다.

[0406] 도 12는 이 연구의 결과를 보여준다. 최하점(제22일)에서, AD02803은 순환하는 F12 수준에서 대략 70% 감소를 보여주었으며, 한편 AD02807은 80% 초과 감소를 보여주었다. 데이터는 또한, 제29일에 AD02803-치료된 마우스는 AD2807-치료된 마우스와 비교하여 기준선으로의 보다 빠른 복귀를 보여주었기 때문에, 녀다운 효과의 길이의 차이를 보여준다.

[0407] 이들 데이터는, 센스 가닥의 5' 말단 상의 GalNAc 리간드의 연결이 3' 센스 가닥에서의 연결을 능가함을 지지한다.

[0408] **실시예 7. 야생형 마우스에서 F12 발현-저해성 올리고머 화합물을 사용하는 GalNAc 표적화 리간드에 대한 3' 및 5' 센스 가닥 부착 부위들의 추가의 비교.**

[0409] 이중-가닥 발현-저해성 올리고머 화합물(이중-가닥 RNAi 제제)의 센스 가닥의 3' 및 5' 종결 말단들 상에서의 GalNAc 리간드의 부착 부위를 더 평가하기 위해, F12 유전자에 관한 조성물을, 하기 표 3에 나타낸 서열을 갖도록 제조하였다:

[0410] 표 3. 실시예 7의 F12 발현-저해성 올리고머 화합물(RNAi 제제 듀플렉스).

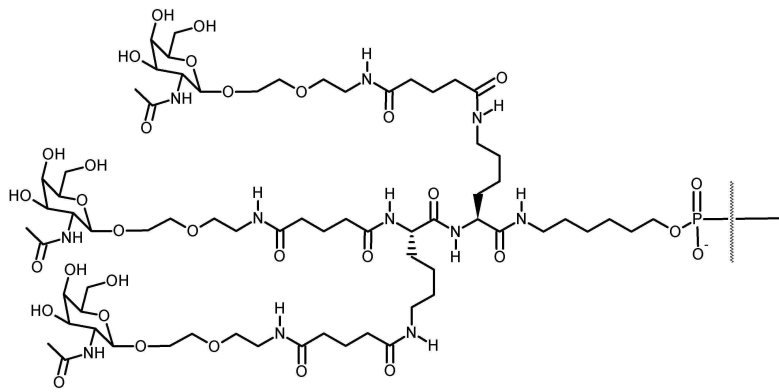
듀플렉스 ID: AD02815	5' → 3'	서열 번호:
센스 가닥 서열: (AM03640-SS)	(NAG20)uauaugscscgaagaAfaGfugaaagacc(invda)	6
안티센스 가닥 서열: (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscuAu	7
듀플렉스 ID: AD02816	5' → 3'	서열 번호:
센스 가닥 서열: (AM03641-SS)	uAuAugscscgaagaAfaGfugaaagacca(NAG20)	8
안티센스 가닥 서열: (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscuAu	9

[0411]

[0412] 상기 표 3에서, 하기 표기법이 사용된다:

[0413] (NAG20)=





(NAG20)은 본원에서 구조 4로 표시된 화학 구조를 가진다.

F12 RNAi 제제의 각각의 가닥을 MerMade96E®(Bioautomation사) 또는 MerMade12®(Bioautomation사)를 사용하여 올리고뉴클레오타이드 합성에 사용되는 고체상 상에서 포스포아미디트에 따라 합성하고, 상보적인 가닥들을 본원의 실시예 4에 일반적으로 기재된 방법에 따라 0.2x PBS(포스페이트-완충 식염수, 1x Corning, Cellgro) 내에서 등물의 RNA 용액들(센스 및 안티센스)들을 조합함으로써 혼합하여, 듀플렉스를 형성하였다.

각각의 GalNAc 리간드(즉, (NAG20))에 연결된 F12 RNAi 제제를 피하(SC) 주사 분야에 공지된 바와 같은 약제학적으로 허용 가능한 완충제 내에서 조합하였다.

각각의 GalNAc 리간드에 연결된 F12 RNAi 제제를 SC 주사를 통해 전달하였다. 제1일에 SC 주사를, 완충 식염수 내에 식염수, 또는 2개의 F12 RNAi 제제들 중 하나(AD02815 또는 AD02816)를 3 mg/kg(mpk) 용량으로 함유하는 용액을 200  $\mu$ l 용액/20 g 마우스로 하여, 등 쪽이면서 어깨들 사이의 느슨한 피부 내로 주사하였다. 1개의 치료군 당 세(3) 마리의 야생형 마우스들이 존재하였다. 상기 표 3에 나타낸 바와 같이, AD02815는 센스 가닥의 5' 말단에 부착된 (NAG20)을 포함하는 한편, AD02816은 센스 가닥의 3' 종결 말단에 부착된 (NAG20)을 포함한다.

치료를 받은 마우스 유래의 혈청 시료를 제8일, 제15일, 제22일 및 제29일에 취하여, 녀다운을 모니터링하였다. 혈청 내에서 순환하는 마우스 F12 단백질 (mF12) 수준을 내부적으로 개발된 mF12 alphaLISA®(Perkin Elmer 사)에 의해 정량화함으로써, 녀다운을 측정하였다. 특정한 출혈일에서의 발현을, 해당되는 동일한 일자에 대한 식염수 대조군의 평균으로 정규화하였다.

도 13은 이 실험의 결과를 보여준다. 최하점(제22일)에서, AD02816은 순환하는 F12 수준에서 대략 60%의 감소를 보여주었으며, 한편 AD02815는 79%의 감소를 보여주었다. 데이터는 또한, 녀다운 효과의 길이의 차이를 보여준다. 제29일에 AD02816-치료된 마우스는 식염수 수준으로부터 40%의 녀다운을 보여주는 한편, AD02815-치료된 마우스는 71%의 녀다운을 보여준다. 이들 데이터는, 센스 가닥의 5' 종결 말단에서 GalNAc 리간드의 연결을 지지한다.

**실시예 8. *Lp(a)* 유전자 도입(*Tg*) 마우스에서 구조 101의 표적화 리간드에 연결된 *Lp(a)* 발현-저해성 올리고머 화합물(이중-가닥 RNAi 제제).**

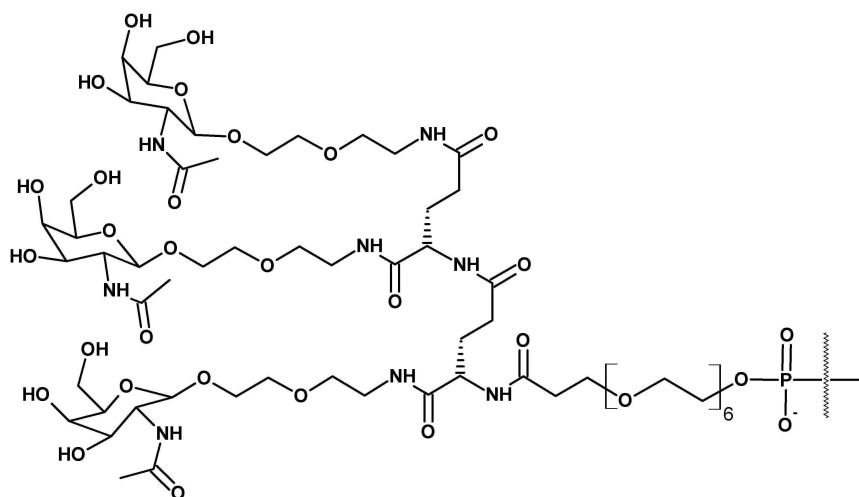
*Lp(a)* 발현-저해성 올리고머 화합물(이중-가닥 *Lp(a)* RNAi 제제)을 하기 표 5에 나타낸 서열을 갖도록 제조하였다:

[0423] 표 4. 실시예 8의 LP(a) 발현-저해성 올리고머 화합물(RNAi 제제 듀플렉스).

듀플렉스 ID: AD03547	5' → 3'	서열 번호:
센스 가닥 서열: (AM04498-SS)	(NAG29)uauauaasuuaucgaGfGfcucauucucsa(invAb)	10
안티 센스가닥 서열: (AM04507-AS)	usGfsasGfaAfuGfaGfccuCfgAfuAfausuAUAUA	11
듀플렉스 ID: AD03549	5' → 3'	서열 번호:
센스 가닥 서열: (AM04502-SS)	(NAG25)uauauaasuuaucgaGfGfcucauucucsa(invAb)	12
안티 센스가닥 서열: (AM04507-AS)	usGfsasGfaAfuGfaGfccuCfgAfuAfausuAUAUA	13

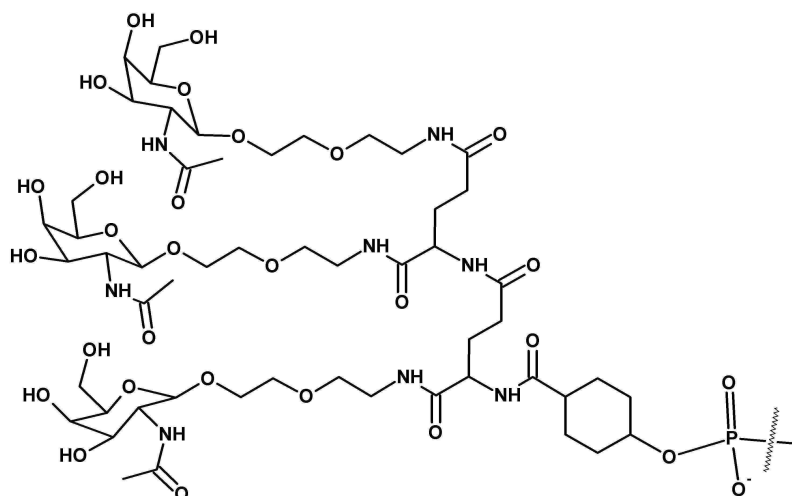
[0424]

[0425] 상기 표 4에서, 하기 표기법을 사용하였다:



[0426]

(NAG25)=



[0427]

(NAG29)=

[0428]

(NAG25)는 본원에서 구조 101로 표시된 화학 구조를 가진다.

[0429]

LP(a) RNAi 제제의 각각의 가닥을 MerMade96E®(Bioautomation사) 또는 MerMade12®(Bioautomation사)를 사용



하여 올리고뉴클레오타이드 합성에 사용되는 고체상 상에서 포스포아미디트에 따라 합성하고, 상보적인 가닥들을 본원의 실시예 4에 일반적으로 기재된 방법에 따라 0.2x PBS(포스페이트-완충 식염수, 1x, Corning, Cellgro) 내에서 등몰의 RNA 용액들(센스 및 안티센스)들을 조합함으로써 혼합하여, 듀플렉스를 형성하였다.

[0430] Lp(a) 유전자 도입(Tg) 마우스(문헌[Frazer KA et al 1995, Nature Genetics 9:424-431])를 사용하여, N-아세틸-갈락토사민 리간드가 공액된 이중-가닥 RNAi 제제의 효능을 생체내에서 평가하였다. 이러한 마우스는 5' 및 3' 둘 다에 추가적인 서열을 갖는 완전한(full) LPA 유전자(apo(a) 단백질을 인코딩함)를 함유하는 YAC 유래의 인간 apo(a), 뿐만 아니라 인간 apoB-100을 발현함으로써, 인간화된 Lp(a) 입자를 생성한다(이하 "Lp(a) Tg 마우스"로 지칭됨(문헌[Callow MJ et al 1994, PNAS 91:2130-2134])).

[0431] 각각의 GalNAc 리간드(즉, (NAG25) 또는 (NAG29))에 연결된 Lp(a) RNAi 제제들을 피하(SC) 주사 분야에 공지된 바와 같은 약제학적으로 허용 가능한 완충제 내에서 조합하였다.

[0432] 센스 가닥의 5' 말단에서 각각의 GalNAc 리간드(즉, (NAG25) 또는 (NAG29))에 연결된 Lp(a) RNAi 제제를 SC 주사를 통해 전달하였다. 제1일에 SC 주사를, 완충 식염수 내에 식염수, 또는 Lp(a) RNAi 제제들(AD03547 또는 AD03549)을 1 mg/kg(mpk) 용량으로 함유하는 용액을 200  $\mu$ l 용액/20 g 마우스로 하여, 등 쪽이면서 어깨들 사이의 느슨한 피부 내로 주사하였다. 1개의 치료군 당 네(4) 마리의 Lp(a) Tg 마우스들이 존재하였다.

[0433] 치료를 받은 마우스 유래의 혈청 시료를 제-1일(투약-이전), 제5일, 제11일, 제16일, 제22일, 제29일 및 제36일에 취하였다. 혈청 내에서 순환하는 Lp(a) 입자 수준을 계산함으로써, 낙다운을 확인하였다. Lp(a) 입자 수준을, Cobas® Integra 400(Roche Diagnostics사) 상에서 제조업체의 권고사항에 따라 측정하였다. 정규화를 위해, 시점에서 각각의 동물에 대한 Lp(a) 수준을 해당 동물에서의 투약-이전(이러한 경우 제-1일)의 발현 수준으로 나누어서, "제-1일로 정규화된" 발현 비율을 확인하였다. 그런 다음, 개별 동물에 대한 "제-1일로 정규화된" 비율을 식염수 대조군 내의 모든 마우스들의 "제-1일로 정규화된" 비율 평균으로 나누어서, 특정한 시점에서의 발현을 식염수 대조군으로 정규화하였다. 이로써, 각각의 시점에 대한 발현이 대조군 내에서의 발현으로 정규화되었다. 실험 오차는 표준 편차로서 주어진다.

[0434] 결과를 도 14에 나타낸다. AD03549(NAG25)는 최하점(제16일)에서 71%의 낙다운을 보여주었고, AD03547(NAG29)은 최하점(제11일)에서 81%의 낙다운을 보여주었다. 두 촉발제(trigger)들은 모두 최하점 이후에 유사한 회복 곡선을 보여주었으며, 이때 제36일에 26% 미만의 낙다운이 존재하였다. 이들 데이터는, 보여진 GalNAc 리간드가, 단일 1 mg/kg 용량으로 치료된 Lp(a) Tg 마우스에서 초기 낙다운 활성 및 낙다운 기간 둘 다에서 유사함을 지지한다.

[0435] **실시예 9. 표적화 리간드 구조 101에 연결된 Lp(a) 발현-저해성 올리고머 화합물(이중-가닥 RNAi 제제)의 투여 후, Lp(a) 유전자 도입(Tg) 마우스에서의 Lp(a) 낙다운.**

[0436] Lp(a) 발현-저해성 올리고머 화합물(이중-가닥 Lp(a) RNAi 제제)을, 하기 표 5에 나타난 서열을 갖도록 제조하였다:

[0437] 표 5. 실시예 9의 Lp(a) 발현-저해성 올리고머 화합물(RNAi 제제 듀플렉스).

듀플렉스 ID:	5' → 3'	서열 번호:
AD03272		
센스 가닥 서열: (AM04138-SS)	(NAG25)uauausasguuacgAfGfGfcucauucuc(inv dA)	14
안티센스 가닥 서열: (AM02860-AS)	usGfsaGfaAfuGfaGfccuCfgAfuAfaCfucsusuAu	15

[0438]

[0439] 표 5에서, (NAG25)는 상기 실시예 8에 나타난 것과 동일한 구조이고, 본원에서 구조 101로 표시된 화학 구조를 가진다.

[0440] Lp(a) RNAi 제제의 각각의 가닥을 MerMade96E®(Bioautomation사) 또는 MerMade12®(Bioautomation사)를 사용하여 올리고뉴클레오타이드 합성에 사용되는 고체상 상에서 포스포아미디트에 따라 합성하고, 상보적인 가닥들을 본원의 실시예 4에 일반적으로 기재된 방법에 따라 0.2x PBS(포스페이트-완충 식염수, 1x, Corning, Cellgro)

내에서 등물의 RNA 용액들(센스 및 안티센스)들을 조합함으로써 혼합하여, 듀플렉스를 형성하였다.

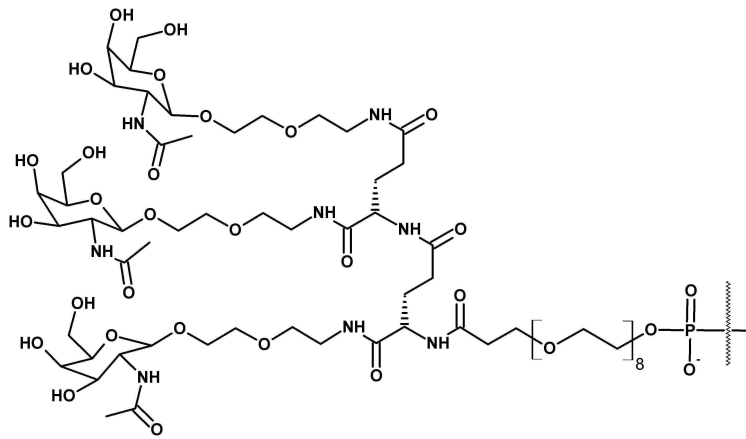
- [0441] Lp(a) Tg 마우스를 사용하여, N-아세틸-갈락토사민 리간드가 공액된 이중-가닥 RNAi 제제의 효능을 생체내에서 평가하였다.
- [0442] 표적화 리간드 구조 101에 연결된 Lp(a) RNAi 제제를 피하(SC) 주사 분야에 공지된 바와 같은 약제학적으로 허용 가능한 완충제 내에서 조합하였다.
- [0443] 센스 가닥의 5' 말단에서 표적화 리간드에 연결된 Lp(a) RNAi 제제를 SC 주사를 통해 전달하였다. 제1일에 SC 주사를, 완충 식염수 내에 식염수, 또는 RNAi 제제 AD03272를 1 mg/kg(mpk) 용량으로 함유하는 용액을 200  $\mu$ l 용액/20 g 마우스로 하여, 등 쪽이면서 어깨들 사이의 느슨한 피부 내로 주사하였다. 1개의 치료군 당 네(4) 마리의 Lp(a) Tg 마우스들이 존재하였다.
- [0444] 치료를 받은 마우스 유래의 혈청 시료를 제-1일(투약-이전), 제8일, 제15일, 제22일, 제29일, 제36일 및 제43일에 취하였다. 혈청 내에서 순환하는 Lp(a) 입자 수준을 계산함으로써, 낙다운을 확인하였다. Lp(a) 입자 수준을, Cobas® Integra 400(Roche Diagnostics사) 상에서 제조업체의 권고사항에 따라 측정하였다. 정규화를 위해, 시점에서 각각의 동물에 대한 Lp(a) 수준을 해당 동물에서의 투약-이전(이러한 경우 제-1일)의 발현 수준으로 나누어서, "제-1일로 정규화된" 발현 비율을 확인하였다. 그런 다음, 개별 동물에 대한 "제-1일로 정규화된" 비율을 식염수 대조군 내의 모든 마우스들의 "제-1일로 정규화된" 비율 평균으로 나누어서, 특정한 시점에서의 발현을 식염수 대조군으로 정규화하였다. 이로써, 각각의 시점에 대한 발현이 대조군 내에서의 발현으로 정규화되었다. 실험 오차는 표준 편차로서 주어진다.
- [0445] 결과를 도 15에 나타낸다. AD03272는 최하점(제15일)에서 88%의 낙다운을 보여주었고, 제29일에 75%의 낙다운을 유지하였다. 이들 데이터는, 구조 1008의 표적화 리간드가, 유전자 도입 마우스에서 단일 1 mg/kg 용량으로 처리 시, LPA-표적화된 RNAi 제제를 간까지 표적화하고 85% 초과 낙다운을 수득할 수 있음을 지지한다.
- [0446] 실시예 10. 표적화 리간드 구조 101, 102 및 103에 연결된 Lp(a) 발현-저해성 올리고머 화합물(이중-가닥 RNAi 제제)의 투여 후, apo(a) 유전자 도입(Tg) 마우스에서 아포지질단백질(a)(apo(a)) 낙다운.
- [0447] Lp(a) 발현-저해성 올리고머 화합물(이중-가닥 Lp(a) RNAi 제제)을 하기 표 4에 나타낸 서열을 갖도록 제조하였다:

[0448] 표 6. 실시예 10의 LP(a) 발현-저해성 올리고머 화합물(RNAi 제제 듀플렉스).

듀플렉스 ID: AD03275	5' → 3'	서열 번호 :
센스 가닥 서열: (AM04138-SS)	(NAG25)uauausasguuauucgAfGfGfcucauucuc(invda)	16
안티센스 가닥 서열: (AM04133-AS)	usGfsagaauGfaGfccuCfgauaacucsusuau	17
듀플렉스 ID: AD03341	5' → 3'	서열 번호 :
센스 가닥 서열: (AM04233-SS)	(NAG26)uauausasguuauucgAfGfGfcucauucuCM(invda)	18
안티센스 가닥 서열: (AM04133-AS)	usGfsagaauGfaGfccuCfgauaacucsusuau	19
듀플렉스 ID: AD03421	5' → 3'	서열 번호 :
센스 가닥 서열: (AM04372-SS)	(NAG27)uauausasguuauucgAfGfGfcucauucuCM(invda)	20
안티센스 가닥 서열: (AM04133-AS)	usGfsagaauGfaGfccuCfgauaacucsusuau	21

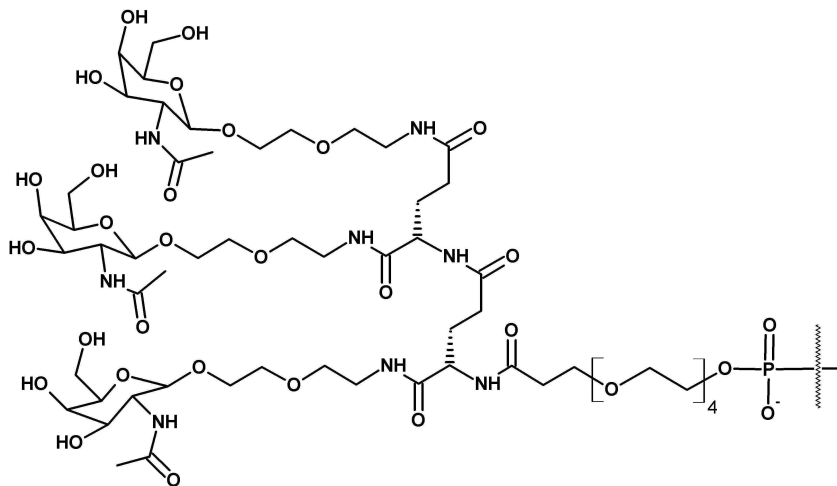
[0449]

[0450] 상기 표 6에서, 하기 표기법을 사용하였다:



(NAG26) =

;



(NAG27) =

[0451]

[0452]

부가적으로, (NAG25)는 상기 실시예 8에 나타난 것과 동일한 구조이고, 본원에서 구조 101로 표시된 화학 구조를 가진다. (NAG26)은 본원에서 구조 102로 표시된 화학 구조를 가진다. (NAG27)은 본원에서 구조 103으로 표시된 화학 구조를 가진다. 상기 표 7에 나타난 바와 같이, 선택된 상이한 표적화 리간드들 이외에, 조성물은 동일하다.

[0453]

Lp(a) RNAi 제제의 각각의 가닥을 MerMade96E®(Bioautomation사) 또는 MerMade12®(Bioautomation사)를 사용하여 올리고뉴클레오타이드 합성에 사용되는 고체상 상에서 포스포아미디트에 따라 합성하고, 상보적인 가닥들을 본원의 실시예 10에 일반적으로 기재된 방법에 따라 0.2x PBS(포스페이트-완충 식염수, 1x, Corning, Cellgro) 내에서 등물의 RNA 용액들(센스 및 안티센스)들을 조합함으로써 혼합하여, 듀플렉스를 형성하였다.

[0454]

Apo(a) 유전자 도입(Tg) 마우스를 사용하여, N-아세틸-갈락토사민 리간드가 공역된 이중-가닥 RNAi 제제의 효능을 생체내에서 평가하였다. Apo(a) Tg 마우스(문헌[Frazer KA et al 1995, Nature Genetics 9:424-431])는 5' 및 3' 둘 다에 부가적인 서열을 갖는 완전한 *LPA* 유전자(apo(a) 단백질을 인코딩함)를 함유하는 YAC 유래의 인간 apo(a)를 발현한다(이하 "Apo(a) Tg 마우스"로 지칭됨).

[0455]

각각의 GalNAc 리간드(즉, (NAG25), (NAG26) 또는 (NAG27))에 연결된 Lp(a) RNAi 제제들을 피하(SC) 주사 분야에 공지된 바와 같은 약제학적으로 허용 가능한 완충제 내에서 조합하였다.

[0456]

센스 가닥의 5' 말단에서 각각의 GalNAc 리간드(즉, (NAG25), (NAG26) 또는 (NAG27))에 연결된 Lp(a) RNAi 제제를 SC 주사를 통해 전달하였다. 제1일에 SC 주사를, 완충 식염수 내에 식염수, 또는 각각의 RNAi 제제들(AD03275, AD03341 또는 AD03421)을 1 mg/kg(mpk) 용량으로 함유하는 용액을 200  $\mu$ l 용액/20 g 마우스로 하여, 등 쪽이면서 어깨들 사이의 느슨한 피부 내로 투여하였다. 1개의 치료군 당 세(3) 마리의 apo(a) Tg 마우스들이 존재하였다.

[0457]

치료를 받은 마우스 유래의 혈청 시료를 제-1일(투약-이전), 제8일, 제15일, 제22일, 제29일, 제36일 및 제43일에 취하였다. 혈청 내에서 순환하는 apo(a) 단백질 수준을 apo(a)용 ELISA(Abcam)를 사용하여

모니터링함으로써, 녀다운을 확인하였다. 정규화를 위해, 시점에서 각각의 동물에 대한 apo(a) 수준을 해당 동물에서의 치료-이전(이러한 경우 제-1일)의 발현 수준으로 나누어서, "제-1일로 정규화된" 발현 비율을 확인하였다. 그런 다음, 개별 동물에 대한 "제-1일로 정규화된" 비율을 식염수 대조군 내의 모든 마우스들의 "제-1일로 정규화된" 비율 평균으로 나누어서, 특정한 시점에서의 발현을 식염수 대조군으로 정규화하였다. 이로써, 각각의 시점에 대한 발현이 대조군 내에서의 발현으로 정규화되었다. 실험 오차는 평균의 표준 오차로서 주어진다.

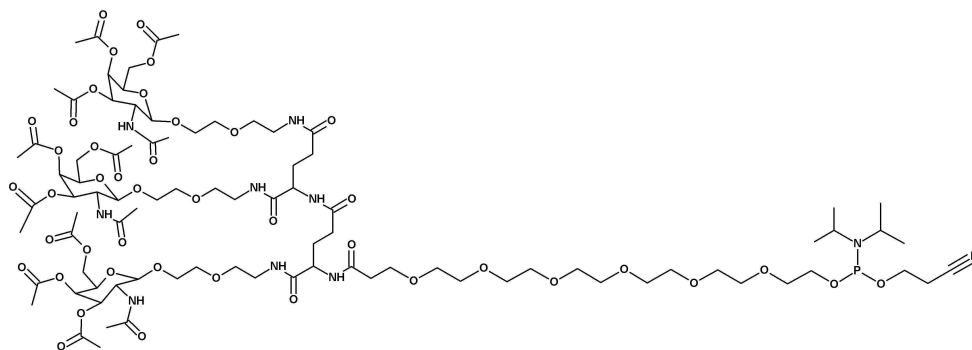
[0458] 결과를 도 16에 나타낸다. 표적화 리간드 구조 101(NAG25)을 함유하는 Lp(a) RNAi 제제 AD03275는 최하점(제22일)에서 82%의 녀다운을 보여주었고, 제29일에 72%의 녀다운을 유지하였다. 표적화 리간드 구조 102(NAG26)를 함유하는 Lp(a) RNAi 제제 AD03341은 최하점(제15일)에서 87%의 녀다운을 보여주었으나, 제29일에 녀다운은 45%이었고, 이는 투약-이전의 apo(a) 수준으로의 복귀가 증가하였음을 가리킨다. 표적화 리간드 구조 103(NAG27)을 함유하는 Lp(a) RNAi 제제 AD03421은 최하점(제15일)에서 70%의 녀다운을 보여주었고, 제29일에 녀다운은 50%이었다. 이들 데이터는, 구조 101(NAG25), 구조 102(NAG26) 및 구조 103(NAG27)이 모두 초기에 유사한 녀다운 활성을 보여줌을 지지한다. 그러나, 이들 데이터는 또한, AD03275(구조 101 (NAG25))가 구조 102(NAG26) 및 구조 103(NAG27)보다 우수한 녀다운 기간을 갖고 더 양호한 녀다운(제29일에 72% 녀다운)을 유지함을 보여준다.

[0459] 실시예 11. 시노물구스 원숭이에서 표적화 리간드 구조 101에 연결된 LP(a) 발현-저해성 올리고머 화합물(이중 가닥 RNAi 제제).

[0460] 구조 101로 표시된 표적화 리간드에 연결된 5개의 상이한 LPA RNAi 제제들을 제조하여, 시노물구스 마카크(cynomolgus macaque)(마카카 파스시쿨라리스(Macaca fascicularis)) 영장류에서 이들의 성능을 평가하였다: AD03460, AD03536, AD03851, AD03853 및 AD04110.

[0461] Lp(a) RNAi 제제의 각각의 가닥을 MerMade96E®(Bioautomation사) 또는 MerMade12®(Bioautomation사)를 사용하여 올리고뉴클레오타이드 합성에 사용되는 고체상 상에서 포스포아미디트에 따라 합성하고, 상보적인 가닥들을 본원의 실시예 4에 일반적으로 기재된 방법에 따라 0.2x PBS(포스페이트-완충 식염수, 1x, Corning, Cellgro) 내에서 동물의 RNA 용액들(센스 및 안티센스)들을 조합함으로써 혼합하여, 듀플렉스를 형성하였다.

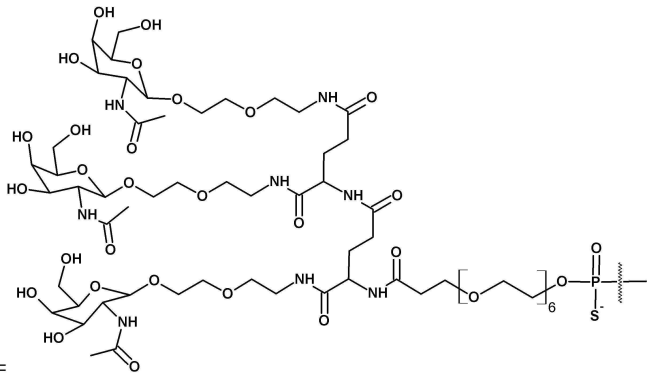
[0462] 모든 다섯(5)개의 Lp(a) RNAi 제제들에 대한 표적화 리간드들을, 일반적으로 본원에 기재되고 당업계에 공지된 비-뉴클레오시드 포스포아미디트 합성을 사용하여 센스 가닥의 5' 종결 말단에 첨가하였다. 각각의 Lp(a) RNAi 제제에 대한 표적화 리간드를 하기 포스포아미디트 화합물을 사용하여 각각의 RNAi 제제의 5' 종결 말단에 연결하였다:



[0463] (구조 101d)

[0464] AD03460 및 AD03536은 각각의 RNAi 제제의 센스 가닥의 5' 말단에 공액된 표적화 리간드(NAG25)를 포함하였다. (NAG25)는 상기 실시예 8에서와 동일한 구조를 가진다.

[0465] AD03851, AD03853 및 AD04110은 각각의 RNAi 제제의 센스 가닥의 5' 말단에 공액된 표적화 리간드(NAG25)를 함유하였다.



(NAG25)s=

혈액 시료를 채혈하고, 제8일 및 제15일에 지질단백질(a) 수준에 대해 분석하였다. Lp(a) 수준을 3개의 투약-이전 값들의 평균으로 정규화하였다. 정규화된 Lp(a) 수준을 하기 표에 기록한다:

	정규화된 Lp(a) 제 8 일	정규화된 Lp(a) 제 15 일
식염수	1.01 ±0.06	1.15 ±0.07
AD03460	0.68 ±0.12	0.40 ±0.13
AD03536	0.54 ±0.07	0.21 ±0.06
AD03851	0.41 ±0.08	0.18 ±0.08
AD03853	0.50 ±0.23	0.27 ±0.17
AD04110	0.59 ±0.13	0.43 ±0.10

이들 데이터는, 유의한 낙다운이, 본원에서 구조 101과 동일한 표적화 리간드 구조에 공역된 다수의 상이한 Lp(a) RNAi 제제들을 2 mg/kg(mpk) 용량으로 투여한 시노몰구스 원숭이에서 달성되었음을 보여준다.

**실시예 12: 시노몰구스 원숭이에서 구조 101의 표적화 리간드에 연결된 F12 발현-저해성 올리고머 화합물(이중-가닥 RNAi 제제).**

F12 발현-저해성 올리고머 화합물(이중-가닥 F12 RNAi 제제)을 하기 표 7에 나타난 서열을 갖도록 제조하였다:

표 7. 실시예 12의 F12 발현-저해성 올리고머 화합물(RNAi 제제 듀플렉스).

5' → 3'		
듀플렉스 ID: AD03635		서열 번호 :
센스 가닥 서열: (AM04130-SS)	(NAG25)uauaugscsccaagaAfaGfugaaagacc(invda)	22
안티센스 가닥 서열: (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscuAu	23

상기 표 7에서, (NAG25)는 실시예 8에 나타난 것과 동일한 구조를 나타내고, 본원에서 구조 101로 표시된다.

Lp(a) RNAi 제제의 각각의 가닥을 MerMade96E®(Bioautomation사) 또는 MerMade12®(Bioautomation사)를 사용하여 올리고뉴클레오타이드 합성에 사용되는 고체상 상에서 포스포아미디트에 따라 합성하고, 상보적인 가닥들을 본원의 실시예 4에 일반적으로 기재된 방법에 따라 0.2x PBS(포스페이트-완충 식염수, 1x, Corning, Cellgro) 내에서 등물의 RNA 용액들(센스 및 안티센스)들을 조합함으로써 혼합하여, 듀플렉스를 형성하였다.

센스 가닥의 5' 말단에서 표적화 리간드에 공역된 F12 RNAi 제제를 피하(SC) 주사 분야에 공지된 바와 같은 억제학적으로 허용 가능한 완충제 내에서 제조하고, 조합하였다.



[0477] 제1일에, 시노몰구스 마카크(마카카 파스시콜라리스) 영장류에게 AD03635를 3 mg/kg으로 피하 주사하였다. 1개의 치료군 당 세(3)마리의 원숭이들에게 투약하였다.

[0478] 치료를 받은 시노몰구스 원숭이 유래의 혈청 시료를 제-7일 및 제1일(투약-이전), 및 제8일, 제15일 및 제22일에 취하여, 낙다운을 모니터링하였다. 혈청 내의 순환하는 시노(cyno) F12 단백질(cF12) 수준을 인간 F12 ELISA 키트(Molecular Innovations사)에 의해 정량화함으로써 낙다운을 측정하였다. 각각의 시점에서 각각의 동물에 대한 cF12 수준을 해당 동물에서의 치료-이전(제-7일 및 제1일의 평균)의 발현 수준으로 나누어서, "투약-이전으로 정규화된" 발현 비율을 확인하였다. 실험 오차는 표준 편차로서 주어진다.

[0479] 도 17은 그 결과를 보여준다. (NAG25)(본원에서 구조 101)에 연결된 F12 RNAi 제제는 시노몰구스 원숭이에서 낙다운을 보여주었다.

[0480] **실시예 13: PiZ 유전자 도입 마우스에서 구조 101의 표적화 리간드에 연결된 알파-1 안티트립신 발현-저해성 올리고머 화합물(이중-가닥 RNAi 제제).**

[0481] 알파-1 안티트립신(AAT) 유전자에 관한 RNAi 제제를 생체내에서 평가하기 위해, 유전자 도입 PiZ 마우스 모델(PiZ 마우스)을 사용하였다. PiZ 마우스는 인간 PiZ AAT 돌연변이체 대립유전자를 갖고 있으며 인간 AATD를 모델로 한다(문헌[Carlson et al., Journal of Clinical Investigation 1989]).

[0482] AAT 발현-저해성 올리고머 화합물(이중 가닥 RNAi 제제)을 하기 표 8에 나타난 서열을 갖도록 제조하였다:

[0483] 표 8. 실시예 13의 AAT 발현-저해성 올리고머 화합물(RNAi 제제 듀플렉스).

듀플렉스 ID:	5' → 3'	서열 번호:
AD04454		
센스 가닥 서열: (AM05662-SS)	(NAG25)scsgauaucaUfCfAfccaaguuccsa(invAb)	24
안티센스 가닥 서열: (AM05663-AS)	usGfsgAfaCfuugguGfaUfgAfuAfusCfsg	25

[0484]

[0485] 표 8에서, (NAG25)는 상기 실시예 11에 나타난 바와 같은 화학 구조를 가진다.

[0486] AAT RNAi 제제를 약제학적으로 허용 가능한 식염수 완충제 내에서 제조하고, PiZ 마우스에게 200 µl 용액/20 g 마우스로 하여, 등 쪽이면서 어깨들 사이의 느슨한 피부 내로 피하(SC) 주사하여, AAT 유전자 발현의 낙다운을 평가하였다. 각각의 마우스에게 AD04454를 5 mg/kg(mpk)의 단일 SC 용량으로 투여하였다. 3 마리의 마우스들에게 AAT RNAi 제제를 투약하였다(n = 3).

[0487] 혈장 시료를 채혈하고, 제-1일, 제1일(투약-이전), 제8일 및 제15일에 AAT (Z-AAT) 단백질 수준에 대해 분석하였다. AAT 수준을 제1일(투약-이전)의 AAT 혈장 수준으로 정규화하였다. 혈장 내의 순환하는 인간 Z-AAT 수준을 ELISA 키트에 의해 정량화함으로써, 단백질 수준을 측정하였다.

[0488] 평균 정규화된 AAT(Z-AAT) 수준을 도 18에 나타낸다. 본원의 구조 101의 표적화 리간드에 연결된 AAT RNAi 제제는 PiZ 유전자 도입 마우스에서 낙다운을 보여주었다.

[0489] **실시예 14: 구조 101의 표적화 리간드에 연결된 F12 발현-저해성 올리고머 화합물(이중-가닥 RNAi 제제)의 투여 후, 야생형 마우스에서 F12 낙다운.**

[0490] F12 발현-저해성 올리고머 화합물(이중-가닥 F12 RNAi 제제)을 하기 표 9에 나타난 서열을 갖도록 제조하였다:

[0491] 표 9. 실시예 14의 F12 발현-저해성 올리고머 화합물(RNAi 제제 듀플렉스).

듀플렉스 ID:	5' → 3'	서열 번호:
AD03632		
센스 가닥 서열: (AM04613-SS)	(NAG25)gcgaugscsccaagaAfaGfugaaagacc(invda)	26
안티센스 가닥 서열: (AM04048-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsasucgc	27

[0492]

[0493] 표 9에서, (NAG25)는 상기 실시예 8에 나타난 바와 같은 화학 구조를 가지고, 본원에 개시된 구조 101로 표시된다.

[0494] F12 RNAi 제제의 각각의 가닥을 MerMade96E®(Bioautomation사) 또는 MerMade12®(Bioautomation사)를 사용하여 올리고뉴클레오타이드 합성에 사용되는 고체상 상에서 포스포아미디트에 따라 합성하고, 상보적인 가닥들을 본원의 실시예 10에 일반적으로 기재된 방법에 따라 0.2x PBS(포스페이트-완충 식염수, 1x, Corning, Cellgro) 내에서 등몰의 RNA 용액들(센스 및 안티센스)들을 조합함으로써 혼합하여, 듀플렉스를 형성하였다.

[0495] 각각의 GalNAc 표적화 리간드(즉, (NAG25))에 공액된 F12 RNAi 제제를 피하(SC) 주사 분야에 공지된 바와 같은 약제학적으로 허용 가능한 완충제 내에서 조합하였다.

[0496] 조성물을 SC 주사를 통해 전달하였다. 제1일에 SC 주사를, 완충 식염수 내에 식염수, 또는 AD03632를 3 mg/kg(mpk) 용량으로 함유하는 용액을 200 µl 용액/20 g 마우스로 하여, 등 쪽이면서 어깨들 사이의 느슨한 피부 내로 주사하였다. 1개의 치료군 당 세(3) 마리의 야생형 마우스들이 존재하였다. 상기 나타난 바와 같이, AD03632는 센스 가닥의 5' 종결 말단에 연결된 구조(NAG25)를 포함한다.

[0497] 치료를 받은 마우스 유래의 혈청 시료를 제-1일(투약-이전), 제8일, 제15일, 제22일, 제29일 및 제36일에 취하여, 너다운을 모니터링하였다. 혈청 내에서 순환하는 마우스 F12 단백질(mF12) 수준을 내부적으로 개발된 mF12 alphaLISA®(Perkin Elmer)에 의해 정량화함으로써, 너다운을 측정하였다. 각각의 시점에서 각각의 동물에 대한 mF12 수준을, 해당 동물에서의 치료-이전의 발현 수준으로 나누어서, "투약-이전으로 정규화된" 발현 비율을 확인하였다. 그런 다음, 개별 동물에 대한 "투약-이전으로 정규화된" 비율을 식염수 대조군 내의 모든 마우스들의 "투약-이전으로 정규화된" 비율 평균으로 나누어서, 특정한 시점에서의 발현을 식염수 대조군으로 정규화하였다. 이로써, 각각의 시점에 대한 발현이 대조군 내에서의 발현으로 정규화되었다. 실험 오차는 표준 편차로서 주어진다.

[0498] 이러한 연구의 결과를 도 19에 나타낸다. 본원에 개시된 표적화 리간드 구조 101을 포함하는 AD03632는 모든 시점들에 걸쳐 유의한 너다운을 보여준다.

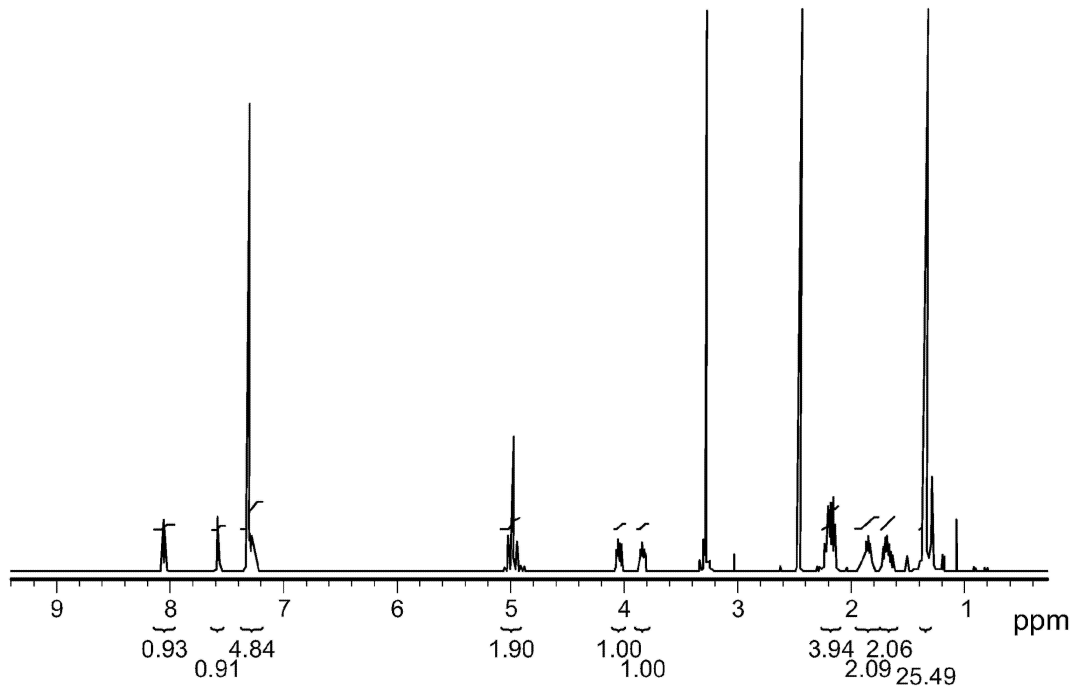
[0499] 다른 실시형태

[0500] 본 발명이 이의 상세한 설명과 함께 기재되어 있긴 하지만, 상기 설명은 본 발명을 예시하고자 하는 것이고 그 범위를 제한하려는 것이 아니며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구항의 범위에 의해 한정됨을 이해한다. 다른 양태, 이점 및 변형은 하기 청구항의 범위 내에 포함된다.

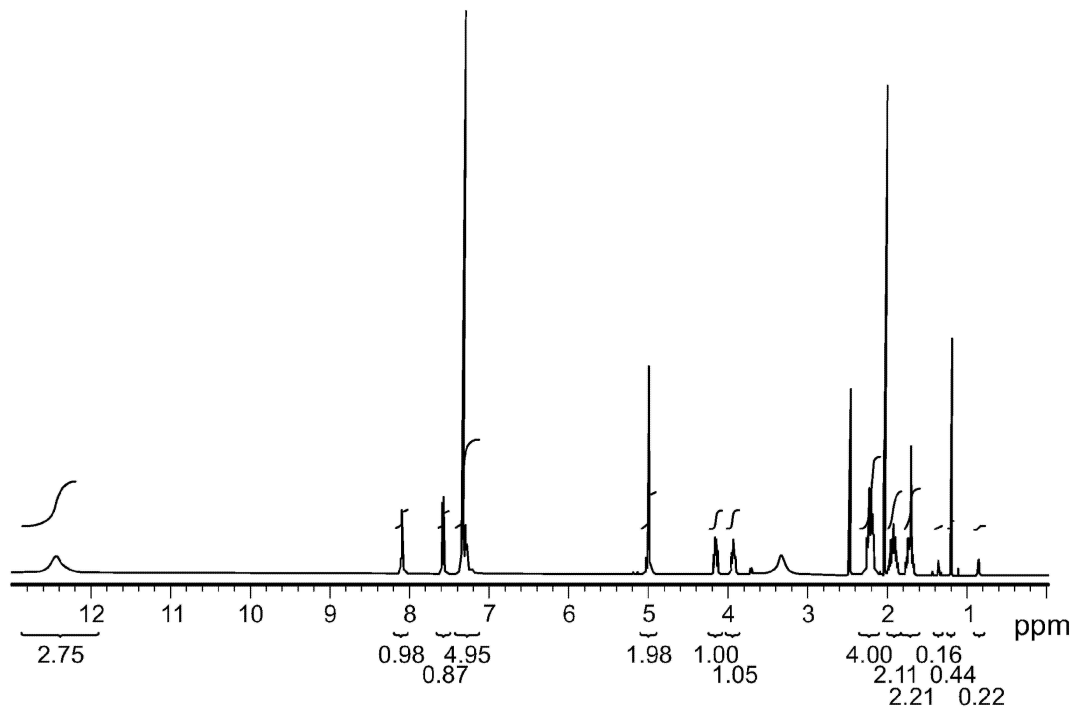


도면

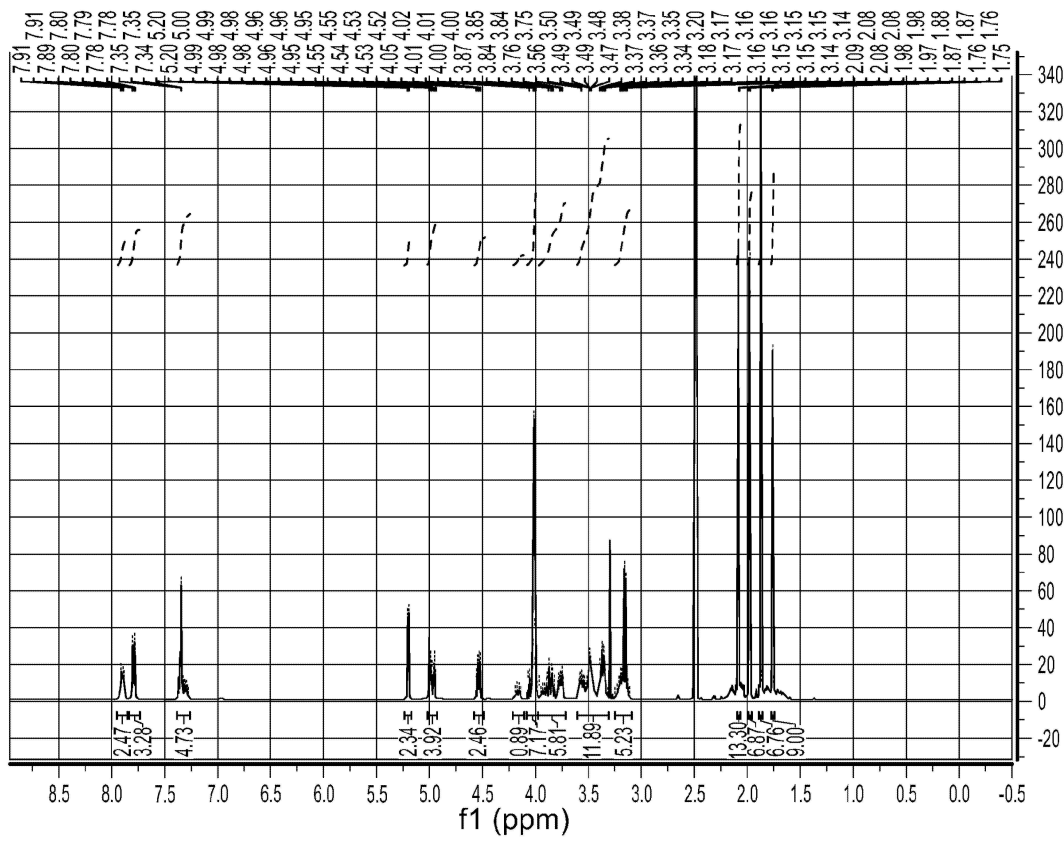
도면1



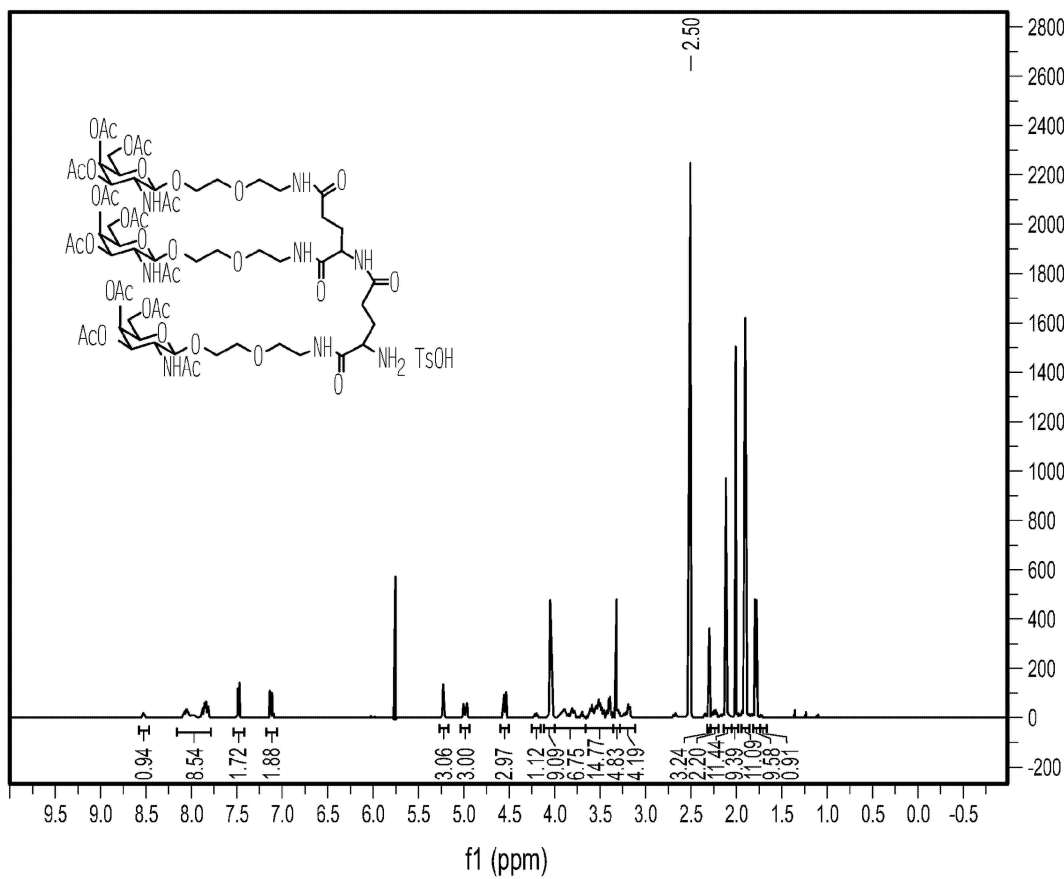
도면2



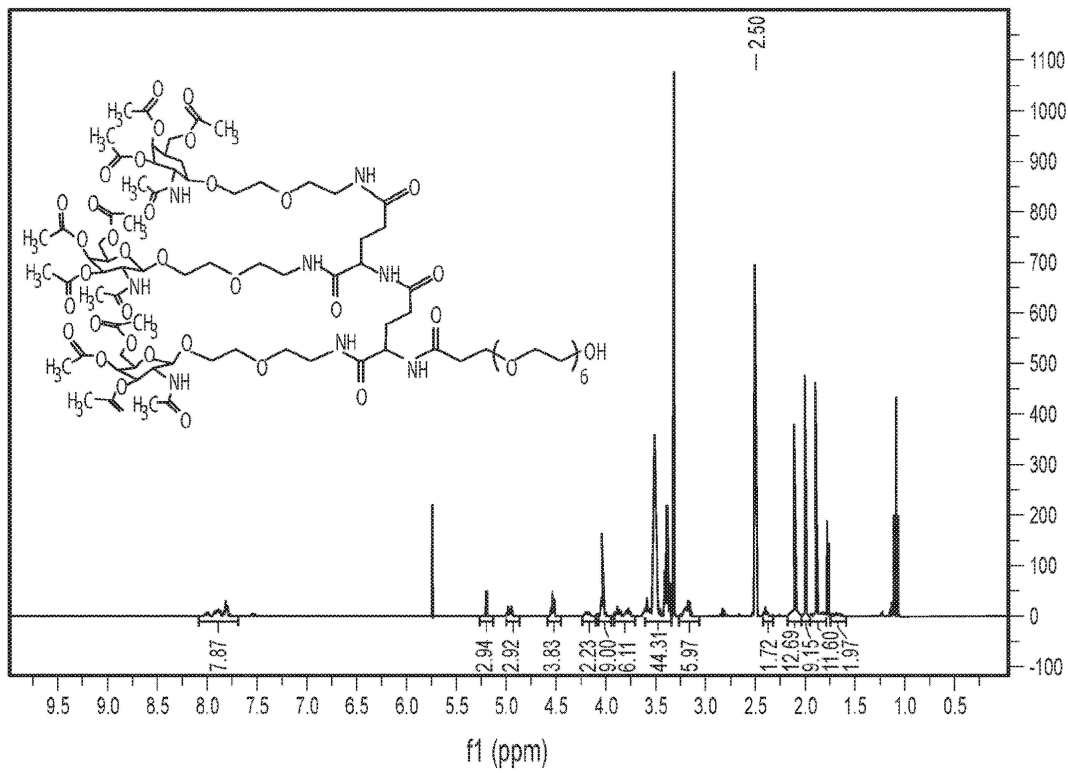
도면3



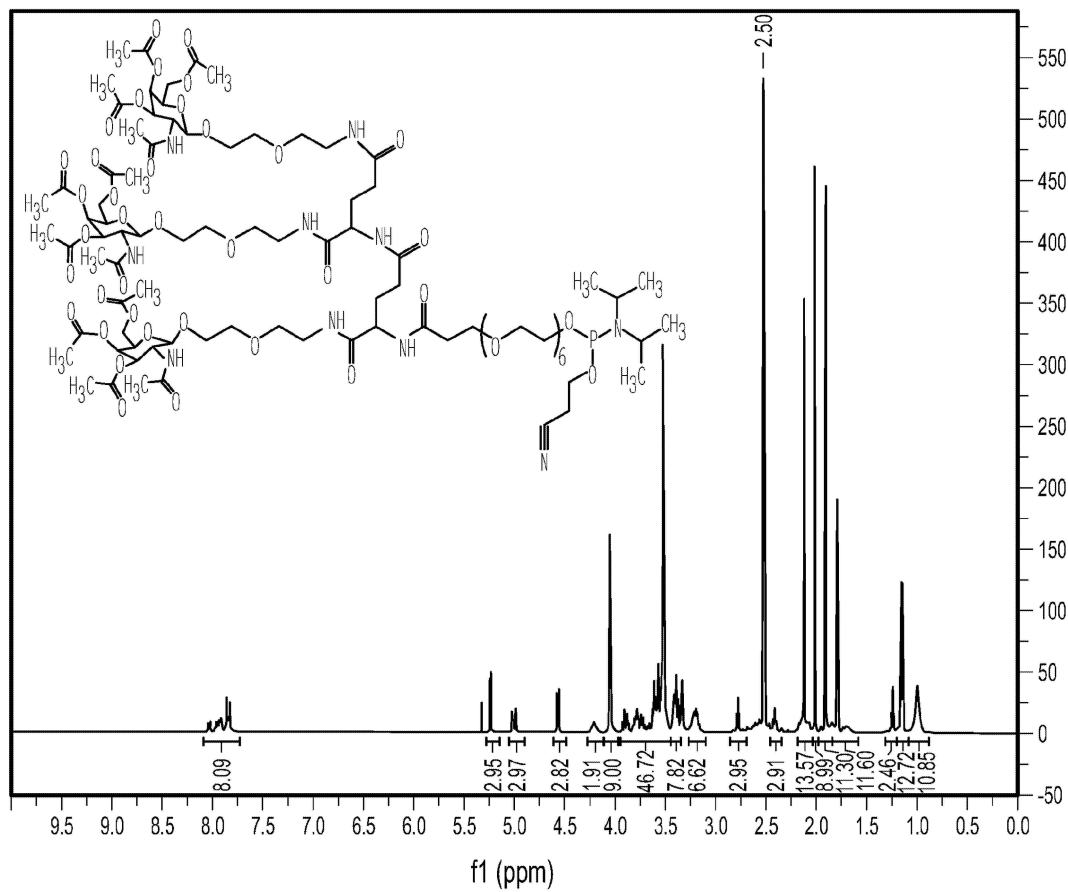
도면4



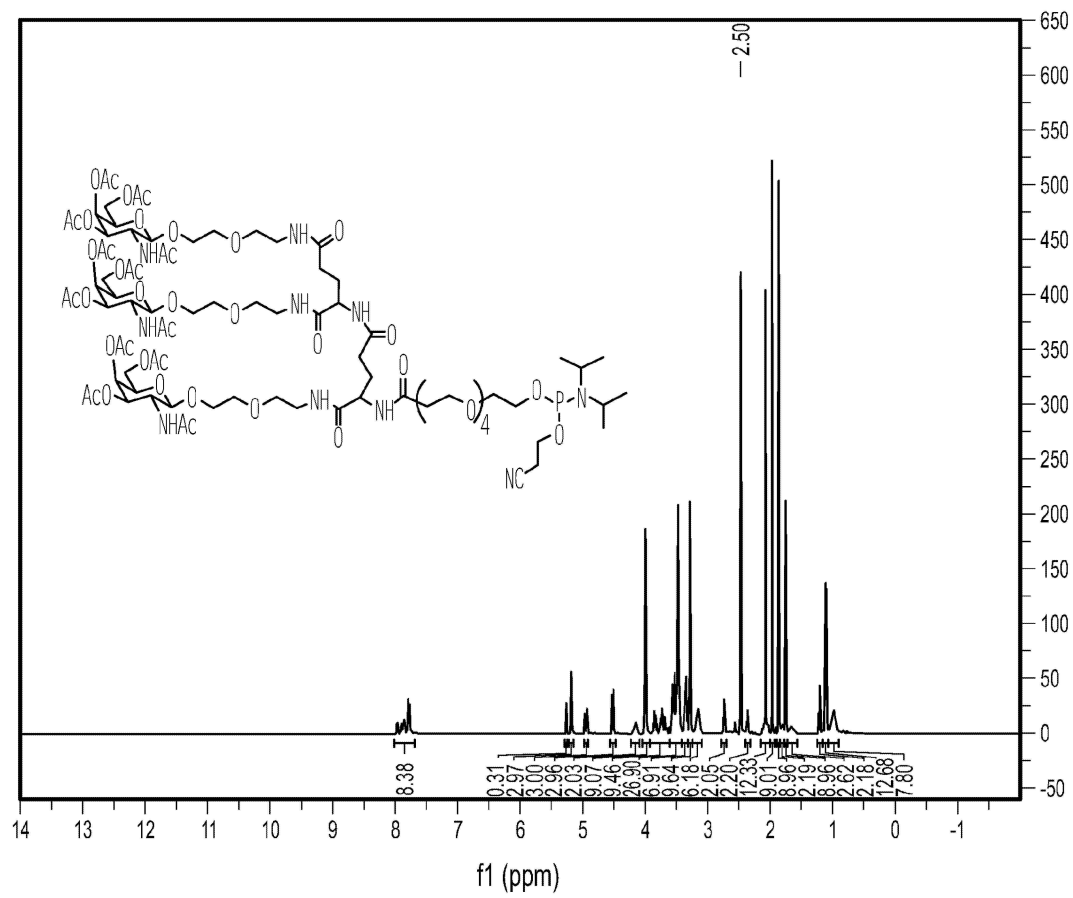
도면5



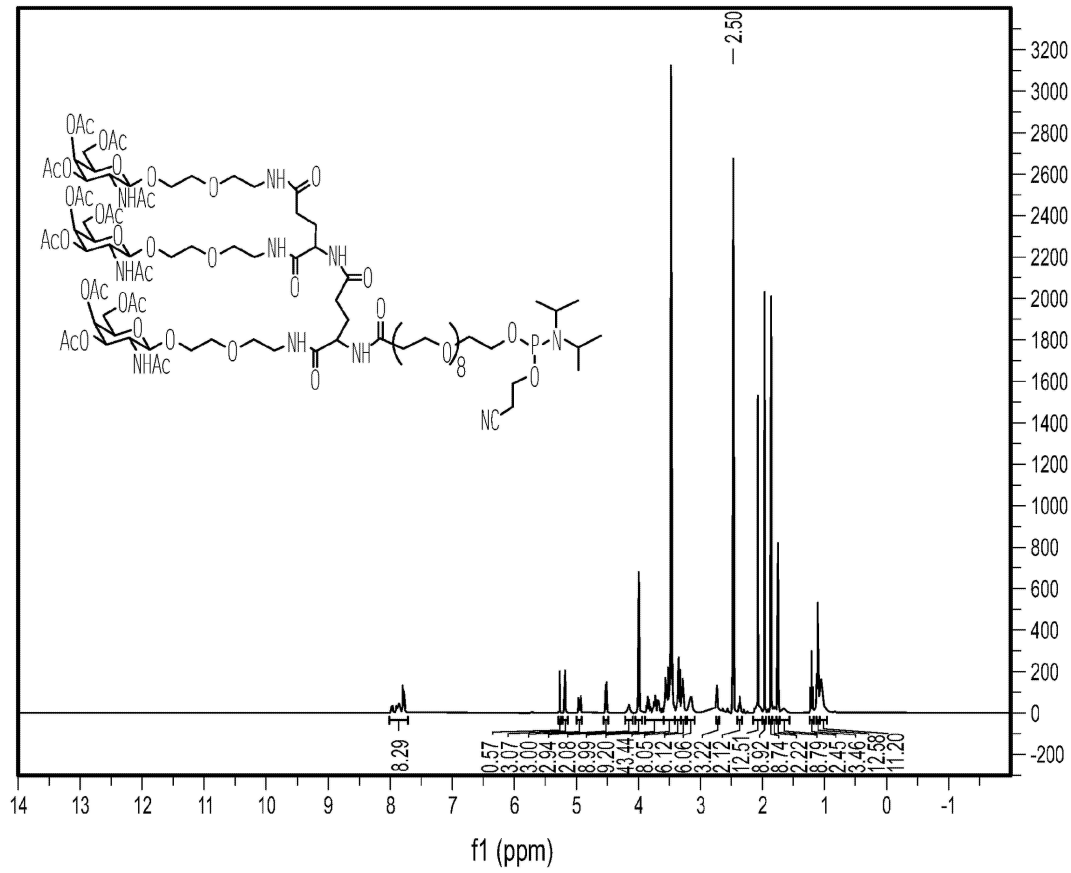
도면6



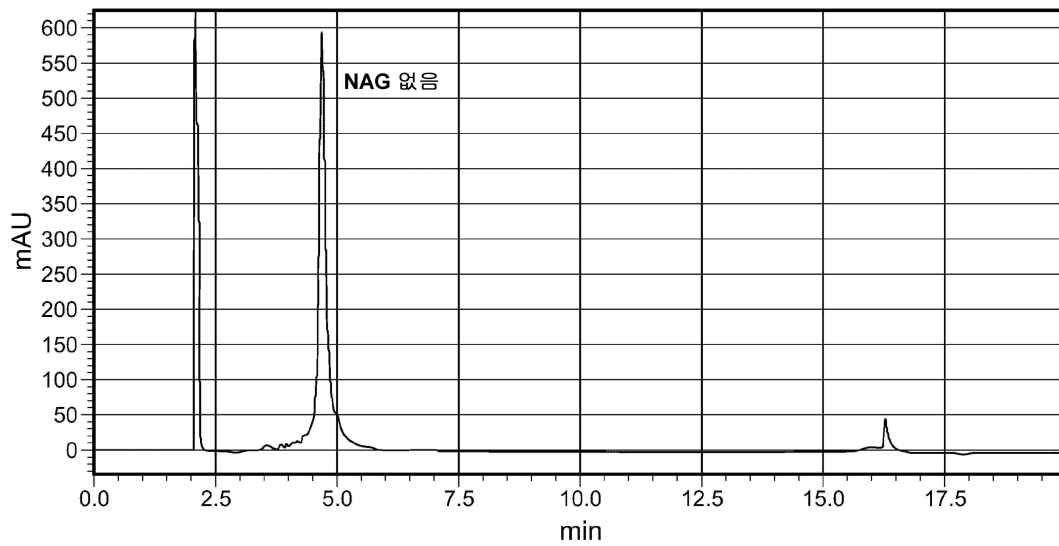
도면7



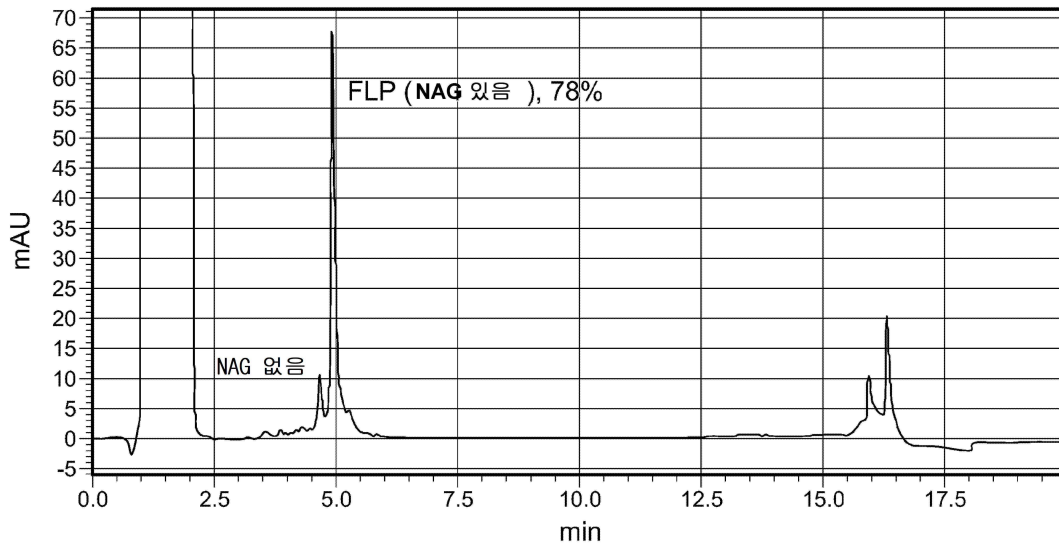
도면8



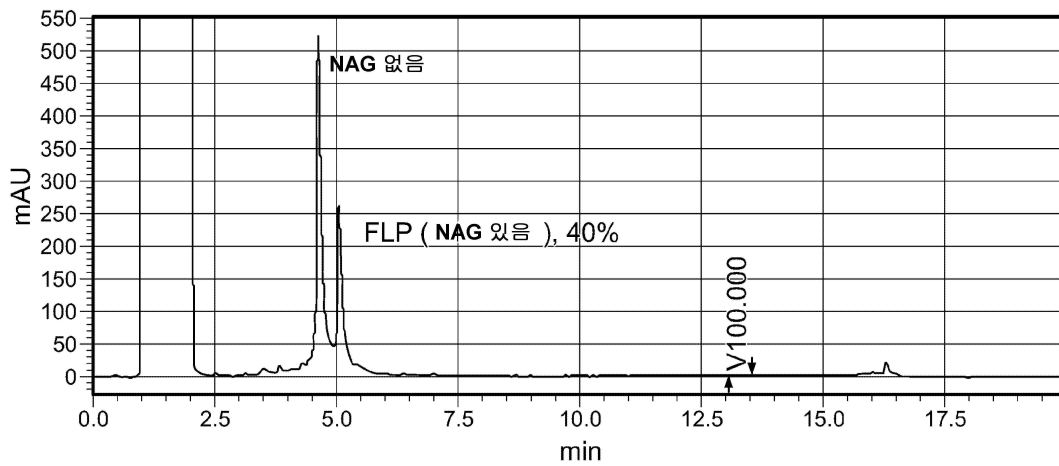
도면9



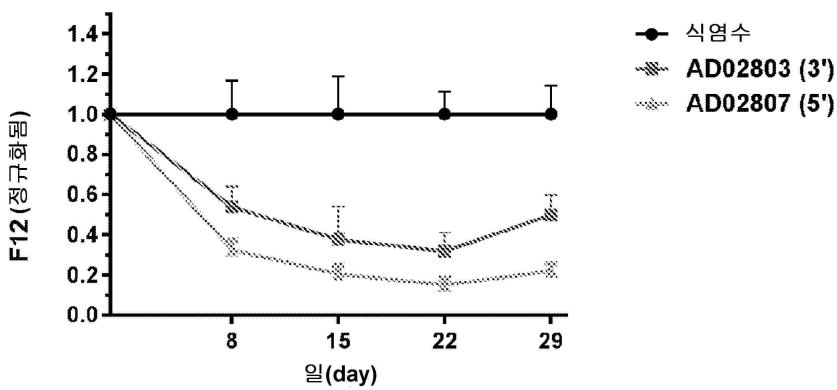
도면10



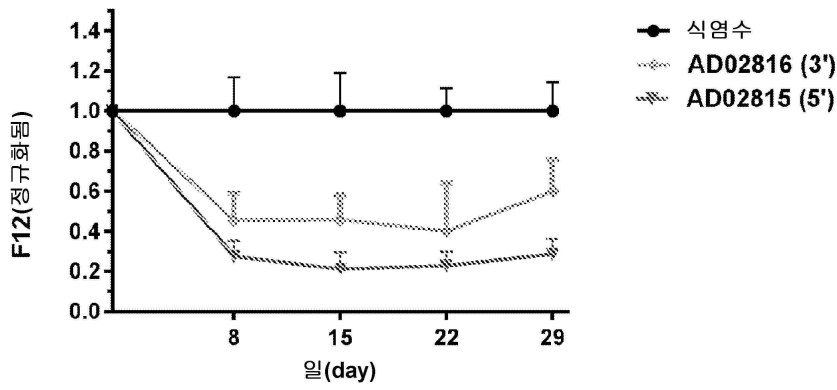
도면11



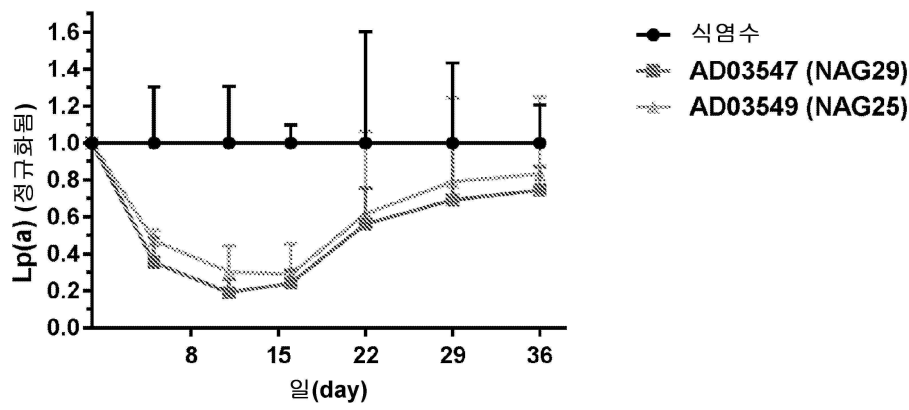
도면12



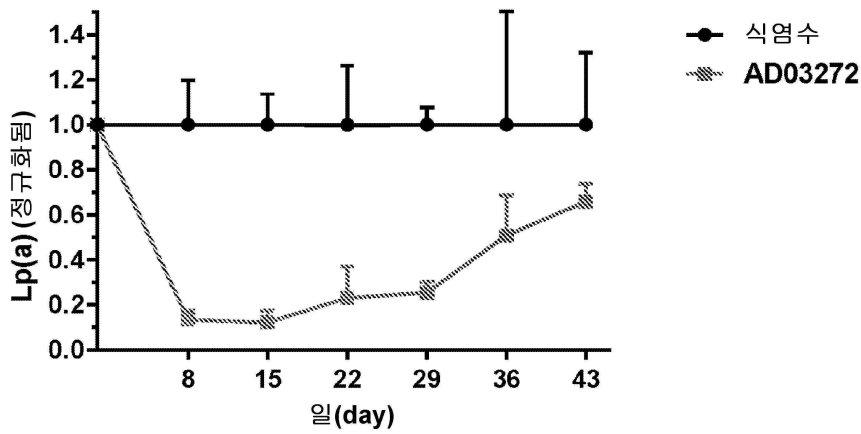
도면13



도면14

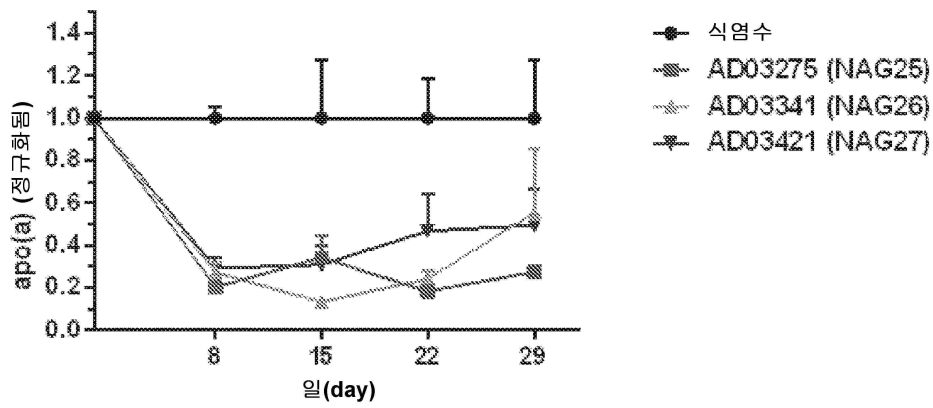


도면15

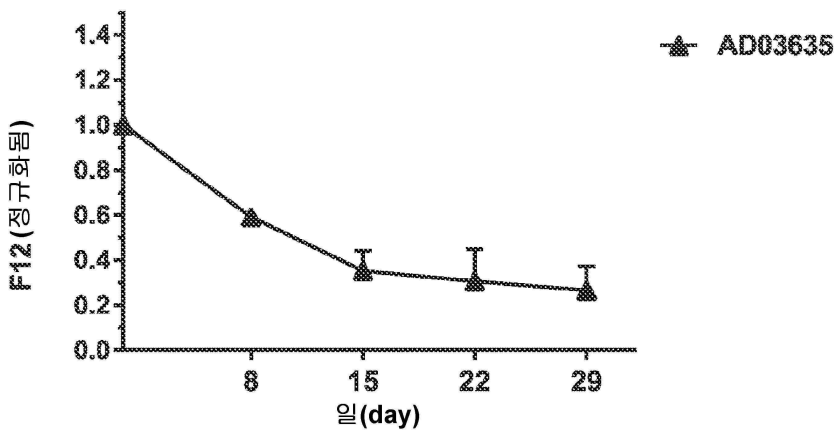




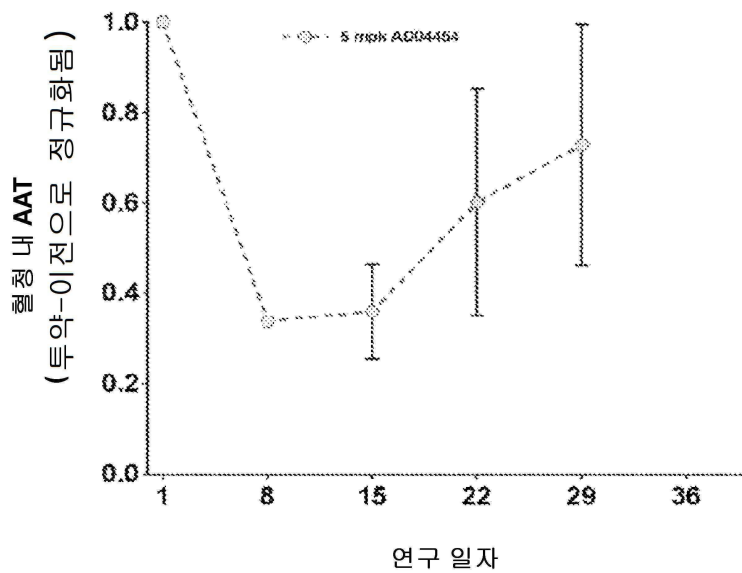
도면16



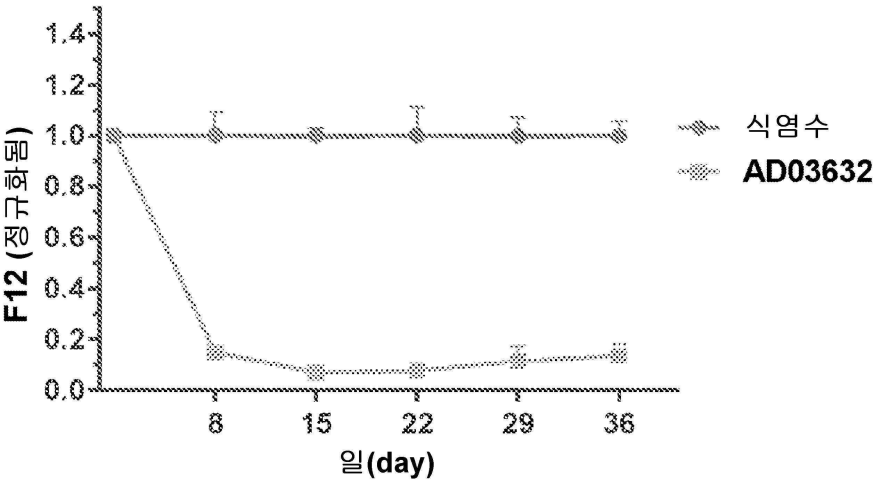
도면17



도면18



도면19



서열 목록

- <110> Arrowhead Pharmaceuticals, Inc.
- <120> Targeting Ligands For Therapeutic Compounds
- <130> IP-ARROW1812
- <150> US 62/304652
- <151> 2016-03-07
- <150> US 62/370754
- <151> 2016-08-04
- <150> US 62/426916
- <151> 2016-11-28
- <150> PCT/US 2017/021175
- <151> 2017-03-07
- <160> 27
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 26
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> RNAi agent sense strand
- <400> 1
- uauaugccca agaaagugaa agacca

26

- <210> 2
- <211> 26

<212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> RNAi agent sense strand  
 <400> 2  
 uauaugccca agaaagugaa agacca 26  
 <210> 3  
 <211> 26  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> RNAi agent antisense strand  
 <400> 3  
 uggucuuuca cuuucuuggg cucuau 26  
 <210> 4  
 <211> 26  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> RNAi agent sense strand  
  
 <400> 4  
 uauaugccca agaaagugaa agacca 26  
 <210> 5  
 <211> 26  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> RNAi agent antisense strand  
 <400> 5  
 uggucuuuca cuuucuuggg cucuau 26  
 <210> 6  
 <211> 26  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> RNAi agent sense strand  
 <400> 6  
 uauaugccca agaaagugaa agacca 26

<210> 7

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNAi agent antisense strand

<400> 7

uggucuuuca cuuucuuggg cucuau

26

<210> 8

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNAi agent sense strand

<400> 8

uauaugccca agaaagugaa agacca

26

<210> 9

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNAi agent antisense strand

<400> 9

uggucuuuca cuuucuuggg cucuau

26

<210> 10

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNAi agent sense strand

<400> 10

uauauaaaaa ucgaggcuca uucuca

26

<210> 11

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNAi agent antisense strand

<400> 11  
 ugagaaugag ccucgauaau uauaua 26  
 <210>  
 > 12  
 <211> 26  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> RNAi agent sense strand  
 <400> 12  
 uauauaauua ucgaggcuca uucuca 26  
 <210> 13  
 <211> 26  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> RNAi agent antisense strand  
 <400> 13  
 ugagaaugag ccucgauaau uauaua 26  
 <210> 14  
 <211> 26  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> RNAi agent sense strand  
 <400> 14  
 uauauaguua ucgaggcuca uucuca 26  
 <210> 15  
 <211> 26  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> RNAi agent antisense strand  
 <400> 15  
 ugagaaugag ccucgauaac ucuuau 26  
 <210> 16  
 <211> 26  
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNAi agent sense strand

<400> 16

uauauaguua ucgaggcuca uucuca 26

<210>

> 17

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNAi agent antisense strand

<400> 17

ugagaaugag ccucgauaac ucuuau 26

<210> 18

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNAi agent sense strand

<400> 18

uauauaguua ucgacgcuca uucuca 26

<210> 19

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNAi agent antisense strand

<400> 19

ugagaaugag ccucgauaac ucuuau 26

<210> 20

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNAi agent sense strand

<400> 20

uauauaguua ucgaggcuca uucuca 26

<210> 21

<211> 26  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> RNAi agent antisense strand  
 <400> 21  
 ugagaaugag ccucgauaac ucuuau 26  
 <210  
 > 22  
 <211> 26  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> RNAi agent sense strand  
 <400> 22  
 uauaugccca agaaagugaa agacca 26  
 <210> 23  
 <211> 26  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> RNAi agent antisense strand  
 <400> 23  
 uggucuuuca cuuucuuggg cucuau 26  
 <210> 24  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> RNAi agent sense strand  
 <400> 24  
 cgauaucauc accaaguucc a 21  
 <210> 25  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> RNAi agent antisense strand  
 <400> 25



uggaacuugg ugaugauauc g	21
<210> 26	
<211> 26	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RNAi agent sense strand	
<400> 26	
gcgaugccca agaaagugaa agacca	26
<210	
> 27	
<211> 26	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RNAi agent antisense strand	
<400> 27	
uggucuuuca cuuucuuggg caucgc	26