

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0170688

(43) 공개일자 2023년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07H 19/073 (2006.01) A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 31/7072 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01) A61P 29/00 (2023.01)

C07H 19/067 (2006.01) C07H 19/10 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/10 (2017.01)

(52) CPC특허분류

C07H 19/073 (2013.01)

A61K 31/7068 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-7036501

(22) 출원일자(국제) 2022년04월12일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2023년10월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2022/024361

(87) 국제공개번호 WO 2022/221241

국제공개일자 2022년10월20일

(30) 우선권주장

63/174,495 2021년04월13일 미국(US)

63/174,792 2021년04월14일 미국(US)

(71) 출원인

소마로직 오퍼레이팅 컴퍼니, 인코포레이티드

미국, 콜로라도 80301, 보울더, 월터니스 플레이스 2945

(72) 발명자

파울러, 케이트

미국 80301 콜로라도 보울더 월터니스 플레이스

2945 소마로직 오퍼레이팅 컴퍼니 인코포레이티드 내

카터, 제프

미국 80301 콜로라도 보울더 월터니스 플레이스

2945 소마로직 오퍼레이팅 컴퍼니 인코포레이티드 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

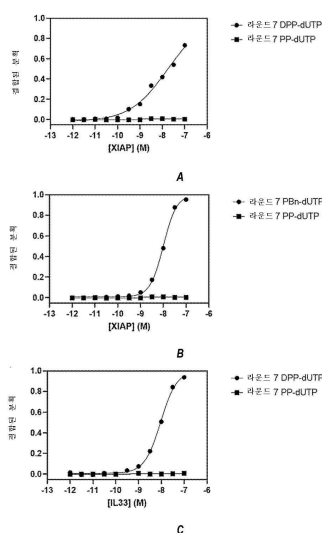
전체 청구항 수 : 총 83 항

(54) 발명의 명칭 변형된 뉴클레오사이드

(57) 요약

5-위치 변형 피리미딘을 포함하는 화합물이 제공된다. 추가로, 적어도 1개의 5-위치 변형 피리미딘을 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 예컨대, 앵타머가 제공된다. 이러한 폴리뉴클레오타이드, 예컨대, 앵타머를 선택하고 이용하는 방법이 또한 제공된다.

대표도 - 도1ac



(52) CPC특허분류

A61K 31/7072 (2013.01)
A61P 19/02 (2018.01)
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
C07H 19/067 (2013.01)
C07H 19/10 (2013.01)
C07H 21/02 (2013.01)
C07H 21/04 (2013.01)
C12N 15/1048 (2013.01)

(72) 발명자

롤로프, 존

미국 80301 콜로라도 보울더 월터니스 플레이스
2945 소마로직 오퍼레이팅 컴퍼니 인코포레이티드
내

젤리나스, 에이미

미국 80301 콜로라도 보울더 월터니스 플레이스
2945 소마로직 오퍼레이팅 컴퍼니 인코포레이티드
내

잔지크, 네보자

미국 80301 콜로라도 보울더 월터니스 플레이스
2945 소마로직 오퍼레이팅 컴퍼니 인코포레이티드
내

명세서

청구범위

청구항 1

5-위치 변형 피리미딘 뉴클레오사이드를 포함하는 화합물 또는 이의 염으로서,

상기 5-위치 변형 피리미딘은 제1 링커에 의해 서로 공유 부착된 2개의 페닐기를 포함하는 모이어티로 치환되고, 상기 모이어티는 제2 링커에 의해 상기 피리미딘의 상기 5-위치에 공유 연결된, 화합물 또는 이의 염.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 링커는 탄소 및 산소로부터 선택된 적어도 1개의 원자를 포함하거나 또는 결합인, 화합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 5-위치 변형 피리미딘은 페닐벤질 모이어티, 펜옥시벤질 모이어티 및 다이페닐메틸 모이어티로부터 선택된 상기 5-위치에서 모이어티를 포함하는, 화합물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 링커는 아마이드 링커, 카보닐 링커, 프로핀일 링커, 알카인 링커, 에스터 링커, 유레아 링커, 카바메이트 링커, 구아니딘 링커, 아미딘 링커, 설폭사이드 링커 및 설폰 링커로부터 선택된 군을 포함하는, 화합물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 링커는 아마이드 링커를 포함하는, 화합물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 아마이드 링커는 1개 이상의 탄소 원자 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 탄소 원자를 더 포함하는, 화합물.

청구항 7

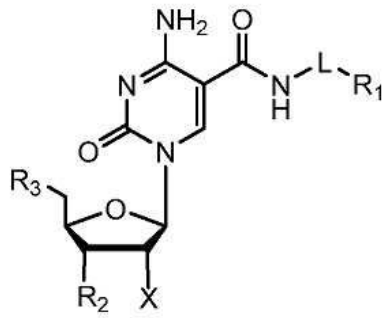
제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 5-위치 변형 유리딘을 포함하는, 화합물.

청구항 8

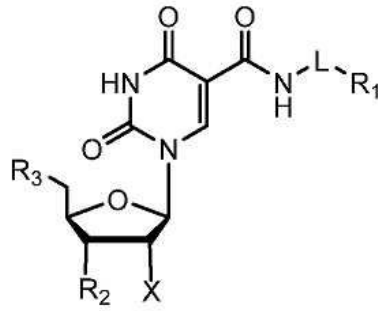
제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 5-위치 변형 사이티딘을 포함하는, 화합물.

청구항 9

하기 화학식 IA 또는 화학식 IB의 구조를 포함하는 화합물:



화학식 IA



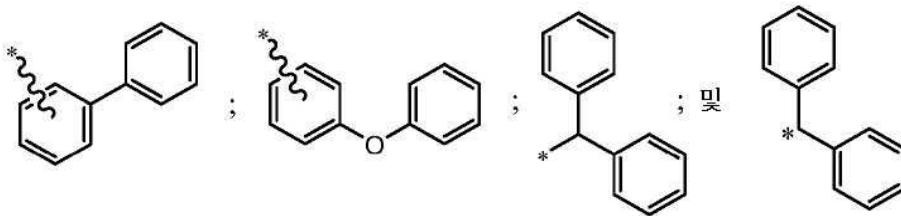
화학식 IB

또는 이들 중 하나의 염,

식 중,

각각의 L은 독립적으로 $-(CH_2)_n-$ 이되, n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고;

각각의 R₁은



로부터

독립적으로

선택되되;

*는 L 기에 대한 R₁ 기의 부착지점을 나타내고;

각각의 X는 독립적으로 -H, -OH, -OMe, -O-알릴, -O-에틸, -O-프로필, -OCH₂CH₂OCH₃, -플루오로, *tert*-부틸다이메틸실릴옥시, -NH₂ 및 -아지도로부터 선택되고;

각각의 R₂는 -OH; -아세틸; -OBz; -OP(N(CH₂CH₃)₂)(OCH₂CH₂CN), -OP(N(R_x)₂)(OCH₂CH₂CN)로부터 독립적으로 선택되되, 각각의 R_x는 독립적으로 (C₁₋₆)알킬; *tert*-부틸다이메틸실릴옥시; -O-ss; -OR; -SR; -ZP(Z')(Z'')-O-R이되; ss는 고체 지지체이며, Z, Z' 및 Z''는 O 및 S로부터 각각 독립적으로 선택되고, R은 인접한 뉴클레오타이드이고;

각각의 R₃은 -OH, -O-트라이틸, -O-4,4'-다이메톡시트라이틸, -O-트라이포스페이트, -OR, -SR, -NH₂, -NHR 및 -Z-P(Z')(Z'')O-R로부터 독립적으로 선택되되, Z, Z' 및 Z''는 O 및 S로부터 각각 독립적으로 선택되고, R은 인접한 뉴클레오타이드이다.

청구항 10

제9항에 있어서, n은 1, 2 또는 3인, 화합물.

청구항 11

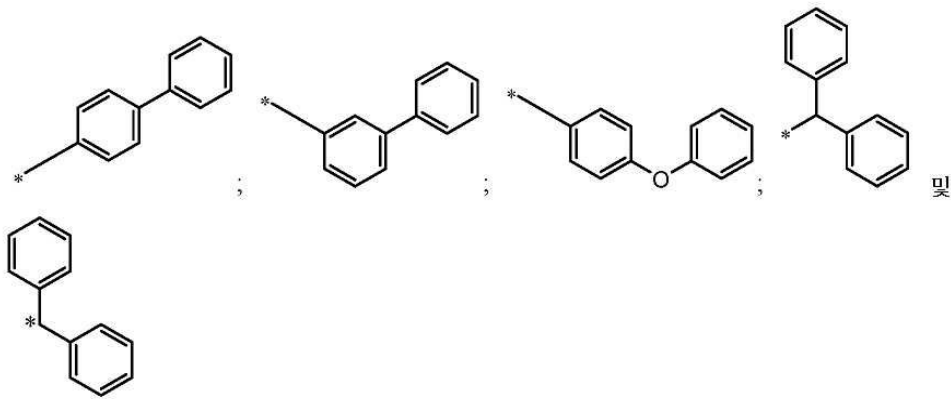
제9항 또는 제10항에 있어서, X는 -H인, 화합물.

청구항 12

제9항 또는 제10항에 있어서, X는 -OMe인, 화합물.

청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 R_1 은



된, 화합물.

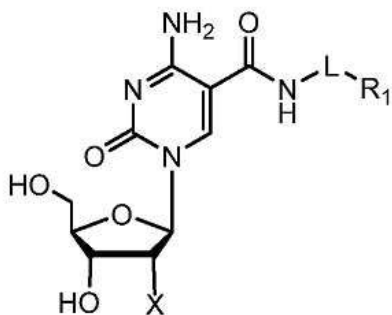
로부터 독립적으로 선택

청구항 14

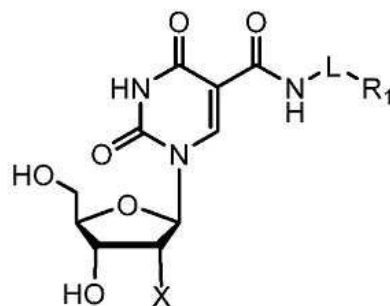
제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 5-위치 변형 피리미딘은 BPEdU, 2'-OMe-BPE-U, 2'-F-BPE-U, PBndU, 2'-OMe-PBn-U, 2'-F-PBn-U, POPdU, 2'-OMe-POP-U, 2'-F-POP-U, DPPdU, 2'-OMe-DPP-U, 2'-F-DPP-U, DBMdU, 2'-OMe-DBM-U, 2'-F-DBM-U, BHdU, 2'-OMe-BH-U, 2'-F-BH-U, BPEdC, 2'-OMe-BPE-C, 2'-F-BPE-C, PBndC, 2'-OMe-PBn-C, 2'-F-PBn-C, POPdC, 2'-OMe-POP-C, 2'-F-POP-C, DPPdC, 2'-OMe-DPP-C, 2'-F-DPP-C, DBMdC, 2'-OMe-DBM-C, 2'-F-DBM-C, BHdC, 2'-OMe-BH-C 및 2'-F-BH-C로부터 선택된, 화합물.

청구항 15

하기 화학식 IIA 또는 화학식 IIB의 구조를 포함하는 화합물:



화학식 IIA



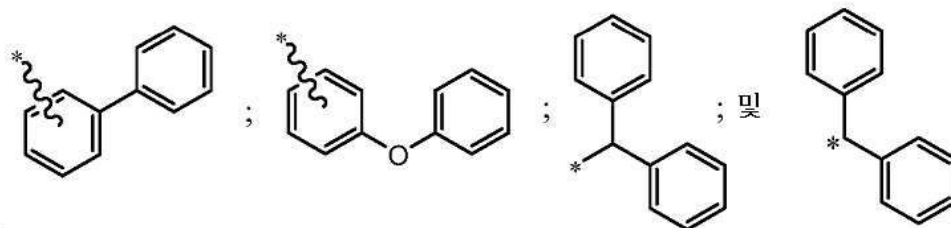
화학식 IIB

또는 이들 중 하나의 염,

식 중,

각각의 L은 독립적으로 $-(CH_2)_n-$ 이되, n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고;

각각의 R_1 은



되고;

로부터 독립적으로 선택

*는 L 기에 대한 R_1 기의 부착지점을 나타내고;

각각의 X는 독립적으로 -H, -OH, -OMe, -O-알릴, -O-에틸, -O-프로필, -OCH₂CH₂OCH₃, -플루오로, *tert*-뷰틸다이 메틸실릴옥시, -NH₂ 및 -아지도로부터 선택된다.

청구항 16

제15항에 있어서, n은 1, 2 또는 3인, 화합물.

청구항 17

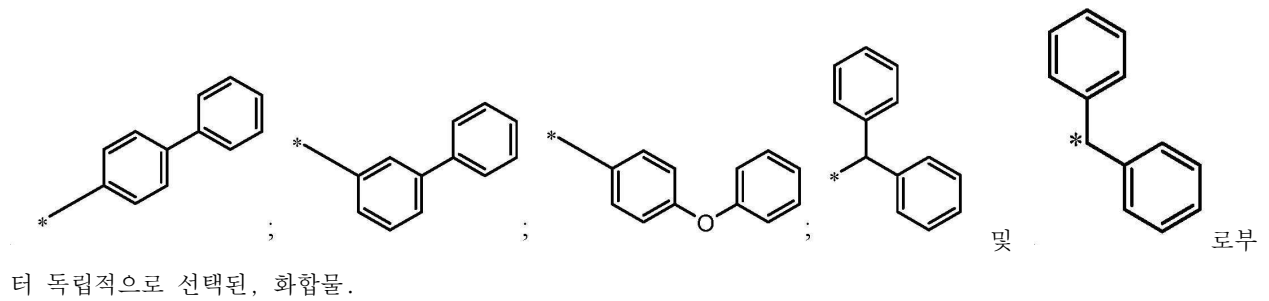
제15항 또는 제16항에 있어서, X는 -H인, 화합물.

청구항 18

제15항 또는 제16항에 있어서, X는 -OMe인, 화합물.

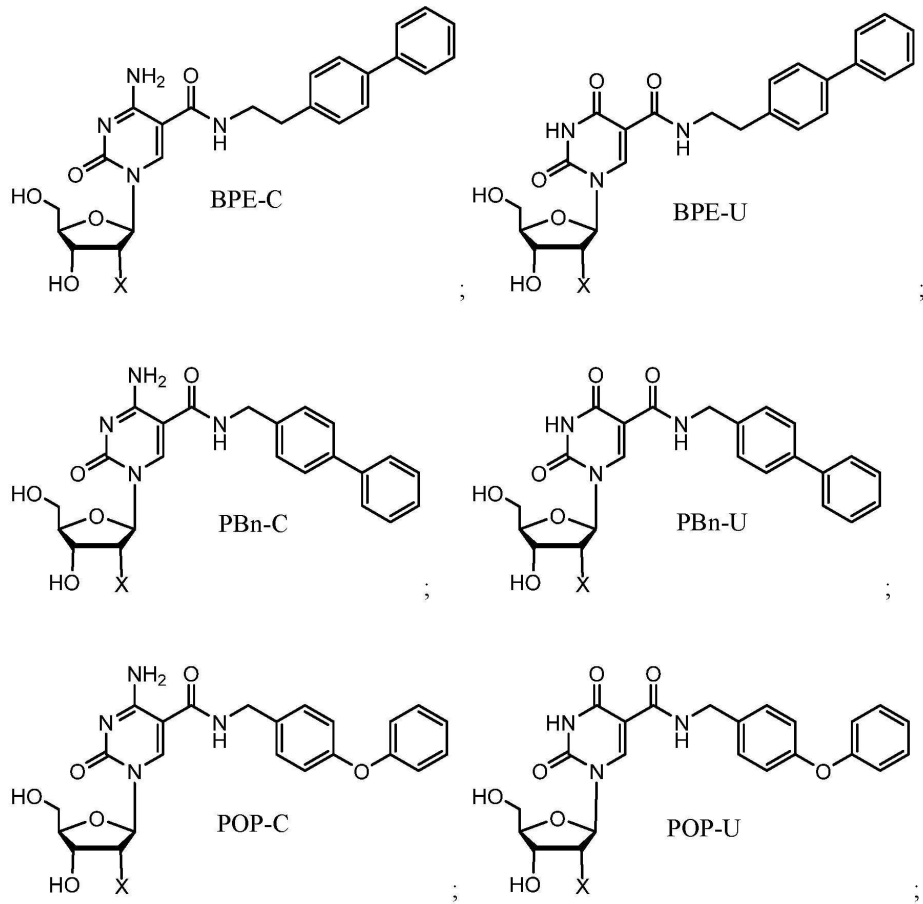
청구항 19

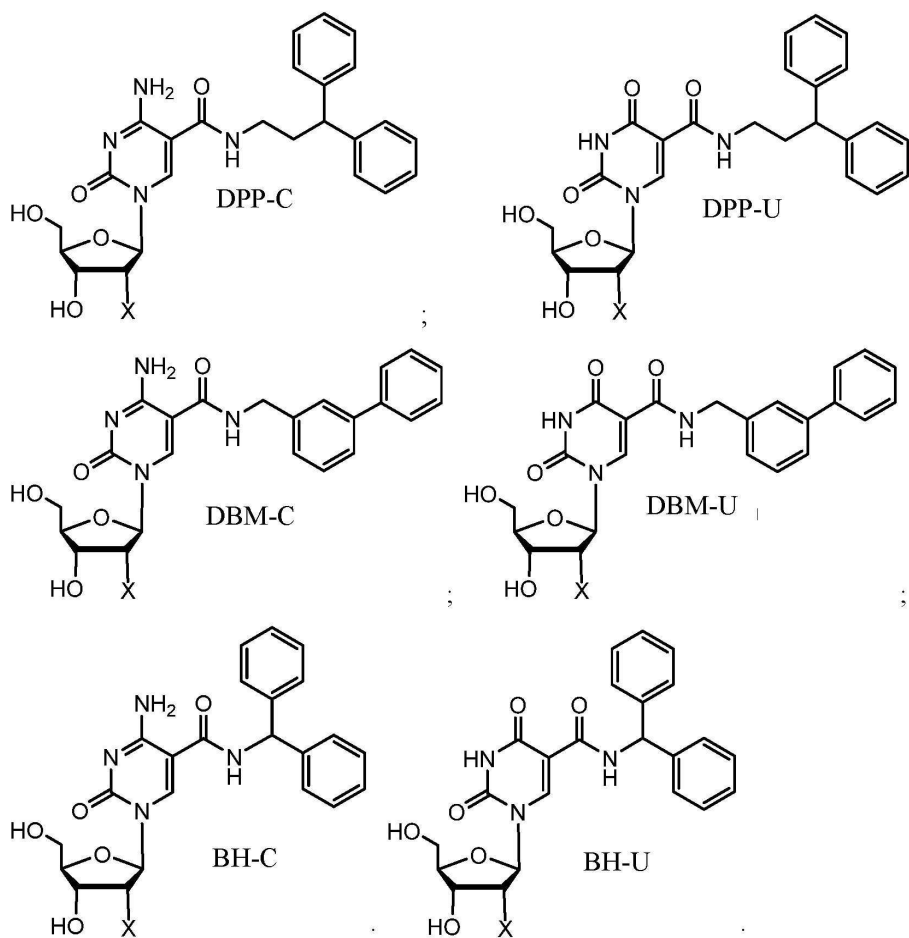
제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 R₁은



청구항 20

다음의 구조를 포함하는 화합물:





또는 이들 중 어느 하나의

염;

식 중, 각각의 X는 독립적으로 -H, -OH, -O-메틸, -O-알릴, -O-에틸, -O-프로필, -OCH₂CH₂OCH₃, -플루오로, *tert*-부틸다이메틸실릴옥시, -NH₂ 및 -아지도로부터 선택된다.

청구항 21

제20항에 있어서, X는 -H인, 화합물.

청구항 22

제20항에 있어서, X는 -OMe인, 화합물.

청구항 23

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 24

제23항에 있어서, RNA, DNA 또는 이들의 조합을 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 15 내지 100, 또는 15 내지 90, 또는 15 내지 80, 또는 15 내지 70, 또는 15 내지 60, 또는 15 내지 50, 또는 20 내지 100, 또는 20 내지 90, 또는 20 내지 80, 또는 20 내지 70, 또는 20 내지 60, 또는 20 내지 50, 또는 30 내지 100, 또는 30 내지 90, 또는 30 내지 80, 또는 30 내지 70, 또는 30 내지 60, 또는 30 내지 50, 또는 40 내지 100, 또는 40 내지 90, 또는 40 내지 80, 또는 40 내지 70, 또는 40 내지 60, 또는 40 내지 50개의 뉴클레오타이드 길이인, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 표적에 결합하는 앵타머인, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 27

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는 앵타머.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 앵타머는 15 내지 100, 또는 15 내지 90, 또는 15 내지 80, 또는 15 내지 70, 또는 15 내지 60, 또는 15 내지 50, 또는 20 내지 100, 또는 20 내지 90, 또는 20 내지 80, 또는 20 내지 70, 또는 20 내지 60, 또는 20 내지 50, 또는 30 내지 100, 또는 30 내지 90, 또는 30 내지 80, 또는 30 내지 70, 또는 30 내지 60, 또는 30 내지 50, 또는 40 내지 100, 또는 40 내지 90, 또는 40 내지 80, 또는 40 내지 70, 또는 40 내지 60, 또는 40 내지 50개의 뉴클레오타이드 길이인, 앵타머.

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, BPEdU, 2'-OMe-BPE-U, 2'-F-BPE-U, PBndU, 2'-OMe-PBn-U, 2'-F-PBn-U, POPdU, 2'-OMe-POP-U, 2'-F-POP-U, DPPdU, 2'-OMe-DPP-U, 2'-F-DPP-U, DBMdU, 2'-OMe-DBM-U, 2'-F-DBM-U, BHdU, 2'-OMe-BH-U, 2'-F-BH-U, BPEdC, 2'-OMe-BPE-C, 2'-F-BPE-C, PBndC, 2'-OMe-PBn-C, 2'-F-PBn-C, POPdC, 2'-OMe-POP-C, 2'-F-POP-C, DPPdC, 2'-OMe-DPP-C, 2'-F-DPP-C, DBMdC, 2'-OMe-DBM-C, 2'-F-DBM-C, BHdC, 2'-OMe-BH-C 및 2'-F-BH-C로부터 선택된 5-위치 변형 피리미딘을 포함하는, 앵타머.

청구항 30

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, BPEdU, 2'-OMe-BPE-U, 2'-F-BPE-U, PBndU, 2'-OMe-PBn-U, 2'-F-PBn-U, POPdU, 2'-OMe-POP-U, 2'-F-POP-U, DPPdU, 2'-OMe-DPP-U, 2'-F-DPP-U, DBMdU, 2'-OMe-DBM-U, 2'-F-DBM-U, BHdU, 2'-OMe-BH-U, 2'-F-BH-U로부터 선택된 적어도 하나의 5-위치 변형 유리딘, 및 BPEdC, 2'-OMe-BPE-C, 2'-F-BPE-C, PBndC, 2'-OMe-PBn-C, 2'-F-PBn-C, POPdC, 2'-OMe-POP-C, 2'-F-POP-C, DPPdC, 2'-OMe-DPP-C, 2'-F-DPP-C, DBMdC, 2'-OMe-DBM-C, 2'-F-DBM-C, BHdC, 2'-OMe-BH-C 및 2'-F-BH-C로부터 선택된 적어도 하나의 5-위치 변형 사이티딘을 포함하는, 앵타머.

청구항 31

제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 앵타머는 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25 또는 적어도 30개 뉴클레오타이드 길이, 또는 5 내지 30, 10 내지 30, 15 내지 30, 5 내지 20, 또는 10 내지 20개 뉴클레오타이드 길이인 앵타머의 5' 말단에서 영역을 포함하되, 상기 앵타머의 상기 5' 말단의 영역은 5-위치 변형 피리미딘을 결여하는, 앵타머.

청구항 32

제26항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 앵타머는 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25 또는 적어도 30개 뉴클레오타이드 길이, 또는 5 내지 30, 10 내지 30, 15 내지 30, 5 내지 20, 또는 10 내지 20개 뉴클레오타이드 길이인 앵타머의 3' 말단에서 영역을 포함하되, 상기 앵타머의 상기 3' 말단의 영역은 5-위치 변형 피리미딘을 결여하는, 앵타머.

청구항 33

적어도 1개의 제1의 5-위치 변형 피리미딘 및 적어도 1개의 제2의 5-위치 변형 피리미딘을 포함하는 앵타머로서, 상기 제1의 5-위치 변형 피리미딘 및 상기 제2의 5-위치 변형 피리미딘은 상이한 5-위치 변형 피리미딘이고, 상기 적어도 1개의 제1의 5-위치 변형 피리미딘은 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 화합물인, 앵타머.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 적어도 1개의 제2의 5-위치 변형 피리미딘은 BndC, 2'-OMe-Bn-C, PEdC, 2'-OMe-PE-C, PPdC, 2'-OMe-PP-C, NapdC, 2'-OMe-Nap-C, 2NapdC, 2'-OMe-2Nap-C, NEdC, 2'-OMe-NE-C, 2NEdC, 2'-OMe-2NE-C,

TyrDC, 2'-OMe-Tyr-C, BndU, 2'-OMe-Bn-U, NapdU, 2'-OMe-Nap-U, PEdU, 2'-OMe-PE-U, IbdU, 2'-OMe-Ib-U, FBndU, 2'-OMe-FBn-U, 2NapdU, 2'-OMe-2Nap-U, NEdU, 2'-OMe-NE-U, MBndU, 2'-OMe-MBn-U, BFdU, 2'-OMe-BF-U, BTdU, 2'-OMe-BT-U, PPdU, 2'-OMe-PP-U, MOEdU, 2'-OMe-MOE-U, TyrDU, 2'-OMe-Tyr-U, TrpdU, 2'-OMe-Trp-U, ThrDU 및 2'-OMe-Thr-U로부터 선택된, 앵타머.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 상기 적어도 1개의 제2의 5-위치 변형 피리미딘은 NapdC, 2'-OMe-Nap-C, 2NapdC, 2'-OMe-2Nap-C, TyrDC, 2'-OMe-Tyr-C, PPdC, 2'-OMe-PP-C, NapdU, 2'-OMe-Nap-U, PPdU, 2'-OMe-PP-U, MOEdU, 2'-OMe-MOE-U, TyrDU, 2'-OMe-Tyr-U, TrpdU, 2'-OMe-Trp-U, ThrDU 및 2'-OMe-Thr-U로부터 선택된, 앵타머.

청구항 36

제26항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 앵타머는 개선된 뉴클레아제 안정성 및/또는 인간 혈청에서의 더 긴 반감기 및/또는 동일한 길이의 앵타머에 비해 개선된 친화도 및/또는 개선된 오프-속도(off-rate) 및 상기 5-위치 변형 피리미딘 대신에 비변형 피리미딘을 포함하는 핵염기 서열을 갖는, 앵타머.

청구항 37

제26항 내지 제36항 중 어느 한 항의 복수의 앵타머를 포함하는 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, 각각의 앵타머는 무작위 영역을 포함하는, 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 무작위 영역은 20 내지 100, 또는 20 내지 90, 또는 20 내지 80, 또는 20 내지 70, 또는 20 내지 60, 또는 20 내지 50, 또는 20 내지 40, 또는 30 내지 100, 또는 30 내지 90, 또는 30 내지 70, 또는 30 내지 60, 또는 30 내지 50, 또는 30 내지 40개 뉴클레오타이드 길이인, 조성물.

청구항 40

앵타머 및 표적을 포함하는 조성물로서, 상기 앵타머 및 상기 표적은 복합체를 형성할 수 있고, 상기 앵타머는 제26항 내지 제35항 중 어느 한 항의 앵타머인, 조성물.

청구항 41

제1 앵타머, 제2 앵타머 및 표적을 포함하는 조성물로서,

상기 제1 앵타머, 상기 제2 앵타머 및 상기 표적은 삼량체 복합체를 형성할 수 있고; 그리고

상기 제1 앵타머는 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는 앵타머이며; 그리고

상기 제2 앵타머는 적어도 1개의 제2의 5-위치 변형 피리미딘을 포함하는, 조성물.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 표적은 단백질, 펩타이드, 탄수화물, 소분자, 세포 및 조직으로부터 선택된, 조성물.

청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서, 상기 표적은 IL-33, XIAP, K-Ras 및 TNF-알파로부터 선택된 표적 단백질인, 조성물.

청구항 44

제26항 내지 제35항 중 하나의 적어도 하나의 앵타머 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 45

제44항에 있어서, IL-33, XIAP, K-Ras 및 TNF-알파로부터 선택된 단백질에 의해 매개된 질환 또는 병태를 치료 또는 예방하기 위한, 억제학적 조성물.

청구항 46

대상체의 질환 또는 병태의 치료 또는 예방 방법으로서, 제26항 내지 제35항 중 어느 한 항의 앵타머 또는 제44항 내지 제45항 중 어느 한 항의 억제학적 조성물을 질환 또는 병태의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 질환 또는 병태는 IL-33, XIAP, K-Ras 및 TNF-알파로부터 선택된 단백질에 의해 매개된, 방법.

청구항 48

제46항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환 또는 병태는 외상성 뇌손상(TBI) 또는 류마티스 관절염인, 방법.

청구항 49

방법으로서,

(a) 표적 분자에 결합할 수 있는 앵타머를 샘플과 접촉시키는 단계;

(b) 상기 앵타머를 상기 샘플과 함께 인큐베이션시켜 앵타머-표적 복합체가 형성되게 하는 단계;

(c) 상기 샘플에서 상기 앵타머-표적 복합체를 풍부화시키는 단계; 및

(d) 상기 앵타머, 상기 앵타머-표적 복합체 또는 상기 표적 분자의 존재에 대해 검출하는 단계로서, 상기 앵타머, 상기 앵타머-표적 복합체 또는 상기 표적 분자의 검출은 상기 표적 분자가 상기 샘플 중에 존재한다는 것을 나타내고, 상기 앵타머, 상기 앵타머-표적 복합체 또는 상기 표적 분자의 검출 결여는 상기 표적 분자가 상기 샘플에 존재하지 않는다는 것을 나타내는, 상기 검출하는 단계

를 포함하되;

상기 앵타머는 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 화합물을 포함하거나, 제26항 내지 제35항 중 어느 한 항의 앵타머인, 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 방법은 경쟁자 분자를 상기 샘플에 첨가하는 단계; 고체 지지체 상에서 상기 앵타머-표적 복합체를 포획하는 단계; 및 경쟁자 분자를 첨가하고 상기 샘플을 희석시키는 단계로부터 선택된 적어도 하나의 추가적인 단계를 포함하되; 상기 적어도 하나의 추가적인 단계는 단계 (a) 또는 단계 (b) 후에 일어나는, 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 경쟁자 분자는 다가음이온 경쟁자로부터 선택된, 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 다가음이온 경쟁자는 올리고뉴클레오타이드, 폴리텍스트란, DNA, 헤파린 및 dNTP로부터 선택된, 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 폴리텍스트란은 텍스트란황산이고; DNA는 청어 정자 DNA 또는 연어 정자 DNA인, 방법.

청구항 54

제49항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 분자는 단백질, 펩타이드, 탄수화물, 소분자, 세포 및 조직으로부터 선택된, 방법.

청구항 55

제49항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플은 전혈, 백혈구, 말초혈액단핵세포, 혈장, 혈청, 가래, 슨, 소변, 정액, 타액, 수막액, 양수, 선액(glandular fluid), 림프액, 유두 흡인물, 기관지 흡인물, 윤활액, 관절 흡인물, 세포, 세포 추출물, 대변, 조직, 조직 생검 및 뇌척수액으로부터 선택된, 방법.

청구항 56

샘플에서 표적을 검출하는 방법으로서,

- (a) 상기 샘플을 제1 앵타머와 접촉시켜 혼합물을 형성하는 단계로서, 상기 제1 앵타머는 상기 표적에 결합하여 제1 복합체를 형성할 수 있는, 상기 혼합물을 형성하는 단계;
- (b) 상기 제1 복합체가 형성되게 하는 조건 하에서 상기 혼합물을 인큐베이션시키는 단계;
- (c) 상기 혼합물을 제2 앵타머와 접촉시키는 단계로서, 상기 제2 앵타머를 상기 제1 복합체에 결합시켜 제2 복합체를 형성할 수 있는, 상기 접촉시키는 단계;
- (d) 상기 제2 복합체가 형성되게 하는 조건 하에서 상기 혼합물을 인큐베이션시키는 단계;
- (e) 상기 혼합물에서 상기 제1 앵타머, 상기 제2 앵타머, 상기 표적, 상기 제1 복합체 또는 상기 제2 복합체의 존재 또는 부재를 검출하는 단계로서, 상기 제1 앵타머, 상기 제2 앵타머, 상기 표적, 상기 제1 복합체 또는 상기 제2 복합체의 존재는 상기 표적이 상기 샘플에 존재한다는 것을 나타내는, 상기 검출하는 단계

를 포함하되;

상기 제1 앵타머는 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 화합물을 포함하고; 그리고

상기 제2 앵타머는 적어도 1개의 제2의 5-위치 변형 피리미딘을 포함하며;

상기 제1 앵타머, 상기 제2 앵타머 및 상기 표적은 삼량체 복합체를 형성할 수 있는, 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 표적 분자는 단백질, 펩타이드, 탄수화물, 소분자, 세포 및 조직으로부터 선택된, 방법.

청구항 58

제56항 또는 제57항에 있어서, 상기 제1 앵타머, 상기 제2 앵타머 및 상기 표적은 삼량체 복합체를 형성할 수 있는, 방법.

청구항 59

제56항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 앵타머는 BndC, 2'-OMe-Bn-C, PEdC, 2'-OMe-PE-C, PPdC, 2'-OMe-PP-C, NapdC, 2'-OMe-Nap-C, 2NapdC, 2'-OMe-2Nap-C, NEdC, 2'-OMe-NE-C, 2NEdC, 2'-OMe-2NE-C, TyrDC, 2'-OMe-Tyr-C, BndU, 2'-OMe-Bn-U, NapdU, 2'-OMe-Nap-U, PEdU, 2'-OMe-PE-U, IbdU, 2'-OMe-Ib-U, FBndU, 2'-OMe-FBn-U, 2NapdU, 2'-OMe-2Nap-U, NEdU, 2'-OMe-NE-U, MBndU, 2'-OMe-MBn-U, BFdU, 2'-OMe-BF-U, BTdU, 2'-OMe-BT-U, PPdU, 2'-OMe-PP-U, MOEdU, 2'-OMe-MOE-U, TyrDU, 2'-OMe-Tyr-U, TrpdU, 2'-OMe-Trp-U, ThrDU 및 2'-OMe-Thr-U로부터 선택된 적어도 1개의 제2의 5-위치 변형 피리미딘을 포함하는, 방법.

청구항 60

제56항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 앵타머는 NapdC, 2'-OMe-Nap-C, 2NapdC, 2'-OMe-2Nap-C, TyrDC, 2'-OMe-Tyr-C, PPdC, 2'-OMe-PP-C, NapdU, 2'-OMe-Nap-U, PPdU, 2'-OMe-PP-U, MOEdU, 2'-OMe-MOE-U, TyrDU, 2'-OMe-Tyr-U, TrpdU, 2'-OMe-Trp-U, ThrDU 및 2'-OMe-Thr-U로부터 선택된 적어도 1개의 제2의 5-위치 변형 피리미딘을 포함하는, 방법.

청구항 61

표적 분자에 결합할 수 있는 하나 이상의 앵타머의 확인 방법으로서,

(a) 앵타머의 라이브러리를 상기 표적 분자와 접촉시켜 혼합물을 형성하고, 앵타머-표적 복합체의 형성을 가능하게 하는 단계로서, 앵타머가 상기 표적 분자에 대해 친화도를 가질 때 상기 앵타머-표적 복합체가 형성되는, 상기 앵타머-표적 복합체의 형성을 가능하게 하는 단계;

(b) 상기 혼합물의 나머지에서 상기 앵타머-표적 복합체를 분할하는 단계(또는 상기 앵타머-표적 복합체를 풍부화시키는 단계);

(c) 상기 앵타머-표적 복합체를 해리시키는 단계; 및

(d) 상기 표적 분자에 결합할 수 있는 상기 하나 이상의 앵타머를 확인하는 단계

를 포함하되;

상기 앵타머의 라이브러리는 복수의 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 제37항 내지 제43항 중 어느 한 항의 조성물인, 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 각각의 폴리뉴클레오타이드는 상기 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단에 고정된 영역을 포함하는, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 각각의 폴리뉴클레오타이드의 상기 5' 말단에 고정된 영역은 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25 또는 적어도 30개 뉴클레오타이드 길이, 또는 5 내지 30, 10 내지 30, 15 내지 30, 5 내지 20, 또는 10 내지 20개 뉴클레오타이드 길이인, 방법.

청구항 64

제61항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 폴리뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에 고정된 영역을 포함하는, 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 각각의 폴리뉴클레오타이드의 상기 3' 말단에 고정된 영역은 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25 또는 적어도 30개 뉴클레오타이드 길이, 또는 5 내지 30, 10 내지 30, 15 내지 30, 5 내지 20, 또는 10 내지 20개 뉴클레오타이드 길이인, 방법.

청구항 66

제61항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 폴리뉴클레오타이드는 무작위 영역을 포함하는, 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 무작위 영역은 20 내지 100, 또는 20 내지 90, 또는 20 내지 80, 또는 20 내지 70, 또는 20 내지 60, 또는 20 내지 50, 또는 20 내지 40, 또는 30 내지 100, 또는 30 내지 90, 또는 30 내지 70, 또는 30 내지 60, 또는 30 내지 50, 또는 30 내지 40개 뉴클레오타이드 길이인, 방법.

청구항 68

제61항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 폴리뉴클레오타이드는 15 내지 100, 또는 15 내지 90, 또는 15 내지 80, 또는 15 내지 70, 또는 15 내지 60, 또는 15 내지 50, 또는 20 내지 100, 또는 20 내지 90, 또는 20 내지 80, 또는 20 내지 70, 또는 20 내지 60, 또는 20 내지 50, 또는 30 내지 100, 또는 30 내지 90, 또는 30 내지 80, 또는 30 내지 70, 또는 30 내지 60, 또는 30 내지 50, 또는 40 내지 100, 또는 40 내지 90, 또는 40 내지 80, 또는 40 내지 70, 또는 40 내지 60, 또는 40 내지 50개의 뉴클레오타이드 길이인, 방법.

청구항 69

제61항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 폴리뉴클레오타이드는 표적에 결합하는 앵타머이고, 상기 라이브러리는 적어도 1000개의 앵타머를 포함하되, 각각의 앵타머는 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 70

제61항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a), (b) 및/또는 (c)는 적어도 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회 또는 10회 반복되는, 방법.

청구항 71

제61항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 분자에 결합할 수 있는 상기 하나 이상의 앵타머가 증폭되는, 방법.

청구항 72

제61항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혼합물은 다가음이온성 경쟁자 분자를 포함하는, 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, 상기 다가음이온 경쟁자는 올리고뉴클레오타이드, 폴리텍스트란, DNA, 헤파린 및 dNTP로부터 선택된, 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 폴리텍스트란은 텍스트란황산이고; DNA는 청어 정자 DNA 또는 연어 정자 DNA인, 방법.

청구항 75

제61항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 분자는 단백질, 펩타이드, 탄수화물, 소분자, 세포 및 조직으로부터 선택된, 방법.

청구항 76

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 화합물, 제26항 내지 제35항 중 어느 한 항의 앵타머, 제37항 내지 제45항 중 어느 한 항의 조성물 또는 제46항 내지 제75항 중 어느 한 항의 방법으로서, 상기 5-위치 변형 피리미딘은 중합효소에 의해 혼입될 수 있는, 화합물, 앵타머, 조성물 또는 방법.

청구항 77

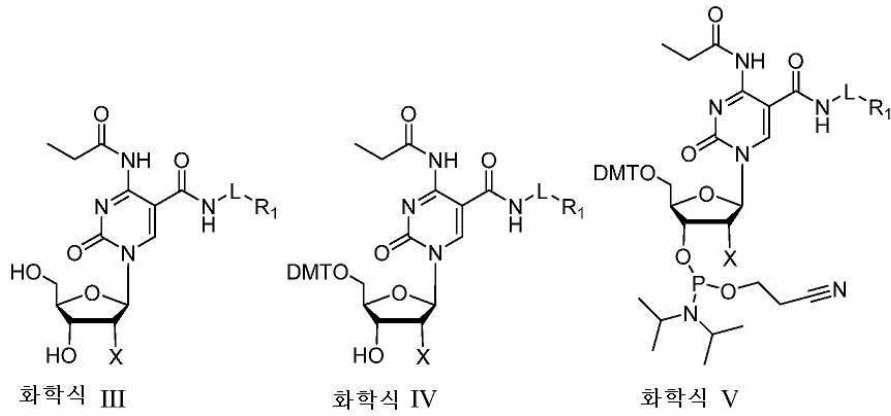
제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 화합물, 제15항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 제23항 내지 제25항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오타이드, 제26항 내지 제35항 중 어느 한 항의 앵타머, 제37항 내지 제43항 중 어느 한 항의 조성물, 및 선택적으로 (a) 억제학적으로 허용 가능한 담체, 예컨대, 용매 또는 용액; (b) 억제학적으로 허용 가능한 부형제, 예컨대, 안정제 또는 완충제; (c) 키트 구성성분을 보유 및/또는 혼합하기 위한 적어도 하나의 용기, 바이알 또는 장치; 및 (d) 전달 장치 중 하나 이상을 포함하는, 키트.

청구항 78

제77항에 있어서, 선택적으로 (e) 앵타머에 결합된 표적 분자를 검출하는 데 유용한 표지제; (f) 고체 지지체, 예컨대, 마이크로어레이 또는 비드; 및 (g) 중합효소 연쇄 반응 산물의 정량화와 관련된 시약, 예컨대, 끼어들기(intercalating) 형광 염료 또는 형광 DNA 프로브 중 하나 이상을 더 포함하는, 키트.

청구항 79

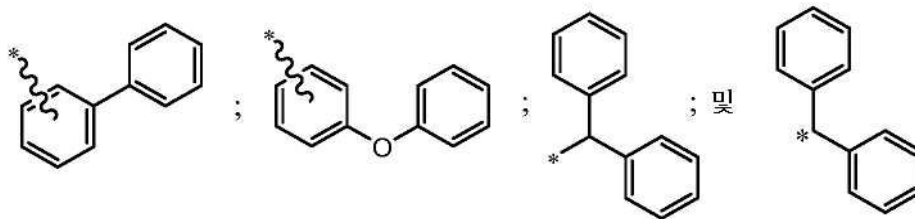
하기 화학식 III, 화학식 IV 또는 화학식 V의 구조를 포함하는 화합물:



나 의 염, 식 중:

각각의 L은 독립적으로 $-(CH_2)_n-$ 이되, n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고;

각각의 R_1 은



고;

*는 L 기에 대한 R_1 기의 부착지점을 나타내고; 그리고

각각의 X는 독립적으로 -H, -OH, -OMe, -O-알릴, -O-에틸, -O-프로필, -OCH₂CH₂OCH₃, -플루오로, *tert*-부틸다이 메틸실릴옥시, -NH₂ 및 -아지도로부터 선택된다.

청구항 80

제79항에 있어서, n은 1, 2 또는 3인, 화합물.

청구항 81

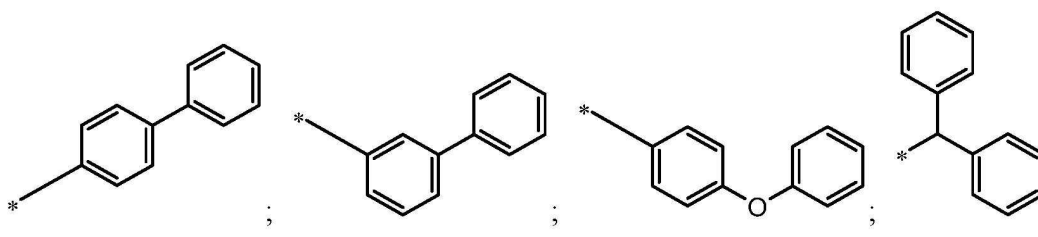
제79항 또는 제80항에 있어서, X는 -H인, 화합물.

청구항 82

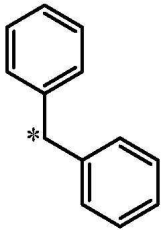
제79항 또는 제80항에 있어서, X는 -OMe인, 화합물.

청구항 83

제79항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, R_1 은



및



로부터 선택된, 화합물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2021년 4월 13일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/174,495호 및 2021년 4월 14일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/174,792호의 우선권의 이익을 주장하며, 이들 각각은 이들의 전문이 임의의 목적을 위해 본 명세서에 참조에 의해 인용된다.

[0003]

기술분야

[0004]

본 개시내용은 일반적으로 변형된 뉴클레오사이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드, 예컨대, 표적 분자에 결합할 수 있는 앵타머 분야에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 하나 이상의 염기-변형 뉴클레오사이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드, 예컨대, 앵타머, 및 이러한 앵타머의 제조 및 이용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

변형된 뉴클레오사이드는 치료제, 진단제로서, 그리고 이들의 특성(예를 들어, 안정성)을 개선시키도록 올리고뉴클레오타이드에 혼입을 위해 사용되어 왔다.

[0006]

SELEX(지수적 풍부화를 위한 리간드의 체계적 진화(Systematic Evolution of Ligands for EXponential Enrichment))는 표적 분자에 선택적으로 결합하는 올리고뉴클레오타이드("앵타머"로 지칭됨)를 확인하는 방법이다. SELEX 공정은, 예를 들어, 미국 특허 제5,270,163호에 기재되어 있다. SELEX 방법은 결합 친화도 및 선택성의 사실상 임의의 목적하는 기준을 달성하기 위한 올리고뉴클레오타이드의 무작위 혼합물로부터의 올리고뉴클레오타이드의 선택 및 확인을 수반한다. SELEX 공정 과정에서 확인되는 올리고뉴클레오타이드에 특정 유형의 변형된 뉴클레오사이드를 도입함으로써, 뉴클레아제 안정성, 순전하, 친수성 또는 친유성은 올리고뉴클레오타이드의 3차원 구조 및 표적 결합 능력의 차이를 제공하도록 변경될 수 있다.

[0007]

앵타머와 같은 올리고뉴클레오타이드에 혼입될 수 있는 대안의 변형된 뉴클레오사이드 및 변형된 뉴클레오사이드에 대한 당업계의 요구가 남아있다. 본 개시내용은 이런 요구 중 하나 이상을 충족시키는 것을 목적으로 하거나 다른 이익을 제공한다.

발명의 내용

[0008]

앞서 언급한 것 및 본 발명의 다른 목적, 특징 및 이점은 수반하는 도면을 참조로 하여 진행되는 다음의 상세한 설명으로부터 더욱 자명하게 될 것이다.

[0009]

특정 비제한적인 예시적 실시형태는 다음과 같다:

[0010]

실시형태 1. 5-위치 변형 피리미딘 뉴클레오사이드를 포함하는 화합물 또는 이의 염으로서, 상기 5-위치 변형 피리미딘은 제1 링커에 의해 서로 공유 부착된 2개의 페닐기를 포함하는 모이어티로 치환되고, 상기 모이어티는 제2 링커에 의해 피리미딘의 5-위치에 공유 연결된, 화합물 또는 이의 염.

[0011]

실시형태 2. 실시형태 1에 있어서, 제1 링커는 탄소 및 산소로부터 선택된 적어도 1개의 원자를 포함하거나 또는 결합인, 화합물.

[0012]

실시형태 3. 실시형태 1 내지 2 중 어느 하나에 있어서, 상기 5-위치 변형 피리미딘은 페닐벤질 모이어티, 펜옥시벤질 모이어티 및 다이페닐메틸 모이어티로부터 선택된 5-위치에서 모이어티를 포함하는, 화합물.

[0013]

실시형태 4. 실시형태 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 링커는 아마이드 링커, 카보닐 링커, 프로핀

일 링커, 알카인 링커, 에스터 링커, 유레아 링커, 카바메이트 링커, 구아니딘 링커, 아미딘 링커, 설폭사이드 링커 및 설폰 링커로부터 선택된 군을 포함하는, 화합물.

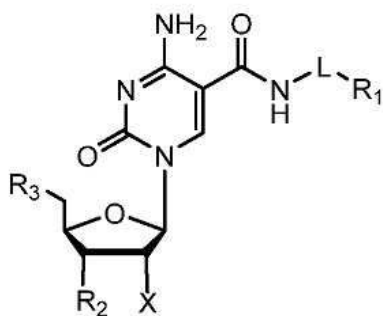
[0014] 실시형태 5. 실시형태 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 링커는 아마이드 링커를 포함하는, 화합물.

[0015] 실시형태 6. 실시형태 5에 있어서, 상기 아마이드 링커는 1개 이상의 탄소 원자 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 탄소 원자를 더 포함하는, 화합물.

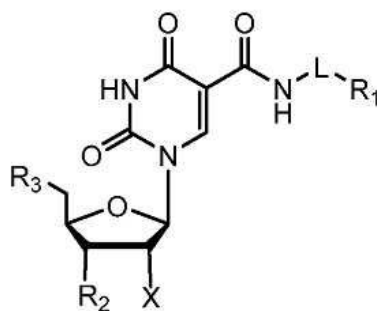
[0016] 실시형태 7. 실시형태 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 5-위치 변형 유리딘을 포함하는, 화합물.

[0017] 실시형태 8. 실시형태 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 5-위치 변형 사이티딘을 포함하는, 화합물.

[0018] 실시형태 9. 하기 화학식 IA 또는 화학식 IB의 구조를 포함하는 화합물:



화학식 IA



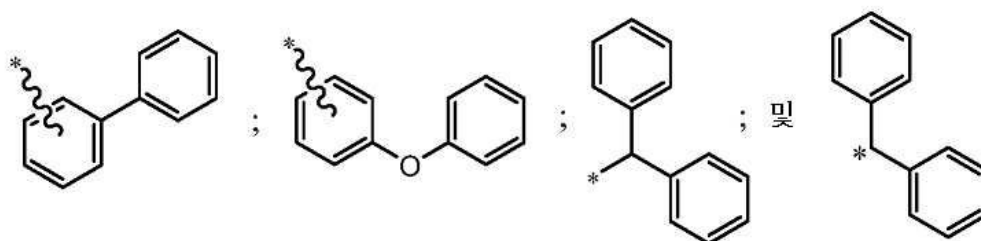
화학식 IB

[0019] 또는 이들 중 하나의 염,

[0020] 식 중,

[0021] 각각의 L은 독립적으로 $-(CH_2)_n-$ 이되, n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고;

[0022] 각각의 R₁은 독립적으로



[0023] 로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0024] *는 L 기에 대한 R₁ 기의 부착지점을 나타내고;

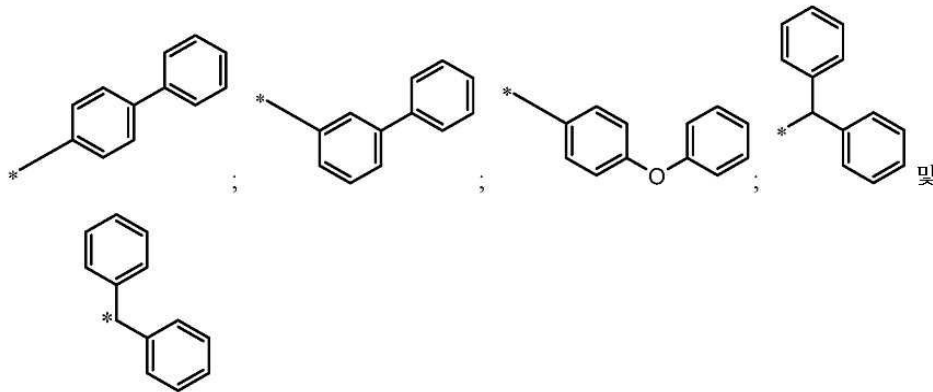
[0025] 각각의 X는 -H, -OH, -OMe, -O-알릴, -O-에틸, -O-프로필, -OCH₂CH₂OCH₃, -플루오로, *tert*-부틸다이메틸실릴옥시, -NH₂ 및 -아지도로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

[0026] 각각의 R₂는 -OH; -아세틸; -OBz; -OP(N(CH₂CH₃)₂)(OCH₂CH₂CN), -OP(N(R_x)₂)(OCH₂CH₂CN)로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, 각각의 R_x는 독립적으로 (C₁₋₆)알킬; *tert*-부틸다이메틸실릴옥시; -O-ss; -OR; -SR; -ZP(Z')(Z'')-O-R이되; ss는 고체 지지체이며, Z, Z' 및 Z''는 O 및 S로부터 각각 독립적으로 선택되고, R은 인접한 뉴클레오타이드이고;

[0027] 각각의 R₃은 -OH, -O-트라이틸, -O-4,4'-다이메톡시트라이틸, -O-트라이포스페이트, -OR, -SR, -NH₂, -NHR 및 -Z-P(Z')(Z'')O-R로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, Z, Z' 및 Z''는 O 및 S로부터 각각 독립적으로 선택되고, R은 인접한 뉴클레오타이드이다.

[0028] 실시형태 10. 실시형태 9에 있어서, n은 1, 2 또는 3인, 화합물.

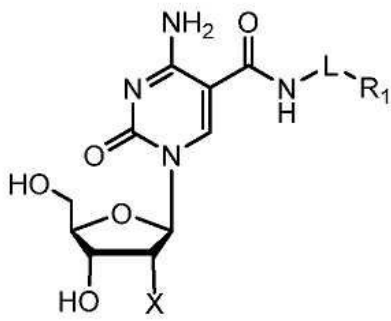
- [0029] 실시형태 11. 실시형태 9 내지 10 중 어느 하나에 있어서, X는 -H인, 화합물.
- [0030] 실시형태 12. 실시형태 9 내지 10 중 어느 하나에 있어서, X는 -OMe인, 화합물.
- [0031] 실시형태 13. 실시형태 9 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 각각의 R₁은



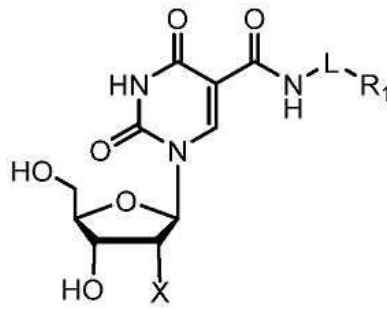
- [0032] 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된, 화합물.

- [0033] 실시형태 14. 실시형태 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 5-위치 변형 피리미딘은 BPEdU, 2'-OMe-BPE-U, 2'-F-BPE-U, PBndU, 2'-OMe-PBn-U, 2'-F-PBn-U, POPdU, 2'-OMe-POP-U, 2'-F-POP-U, DPPdU, 2'-OMe-DPP-U, 2'-F-DPP-U, DBMdU, 2'-OMe-DBM-U, 2'-F-DBM-U, BHdU, 2'-OMe-BH-U, 2'-F-BH-U, BPEdC, 2'-OMe-BPE-C, 2'-F-BPE-C, PBndC, 2'-OMe-PBn-C, 2'-F-PBn-C, POPdC, 2'-OMe-POP-C, 2'-F-POP-C, DPPdC, 2'-OMe-DPP-C, 2'-F-DPP-C, DBMdC, 2'-OMe-DBM-C, 2'-F-DBM-C, BHdC, 2'-OMe-BH-C 및 2'-F-BH-C로부터 선택된, 화합물.

- [0034] 실시형태 15. 하기 화학식 IIA 또는 화학식 IIB의 구조를 포함하는 화합물:



화학식 IIA



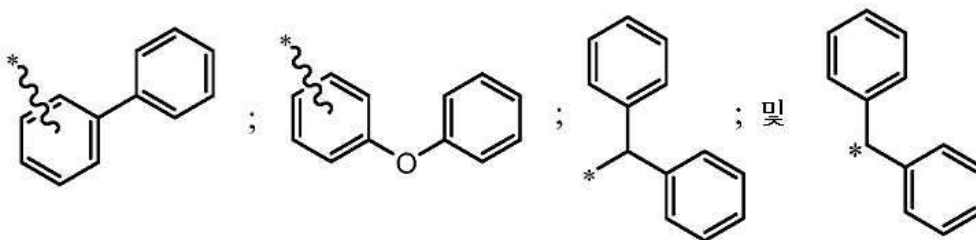
화학식 IIB

- [0035] 또는 이들 중 하나의 염,

- [0036] 식 중,

- [0037] 각각의 L은 독립적으로 -(CH₂)_n-이되, n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고;

- [0038] 각각의 R₁은 독립적으로



- [0039] 부터 선택되며;

- [0040] *는 L 기에 대한 R₁ 기의 부착지점을 나타내고;

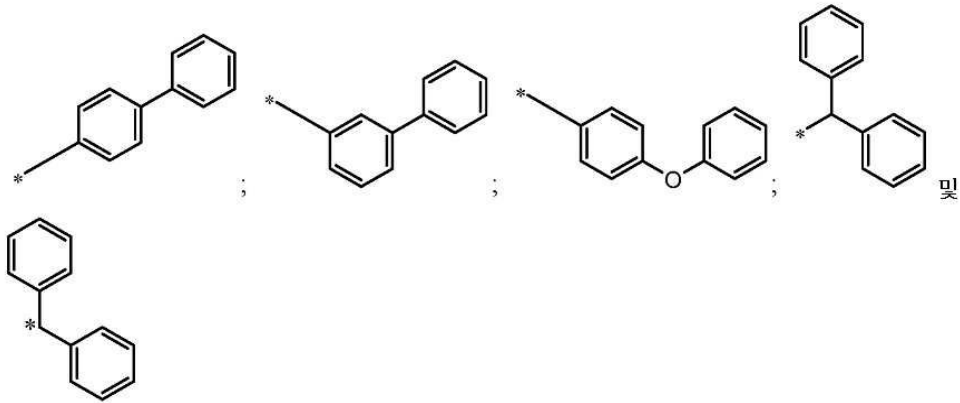
[0041] 각각의 X는 -H, -OH, -OMe, -O-알릴, -O-에틸, -O-프로필, -OCH₂CH₂OCH₃, -플루오로, *tert*-뷰틸다이메틸실릴옥시, -NH₂ 및 -아지도로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0042] 실시형태 16. 실시형태 15에 있어서, n은 1, 2 또는 3인, 화합물.

[0043] 실시형태 17. 실시형태 15 내지 16 중 어느 하나에 있어서, X는 -H인, 화합물.

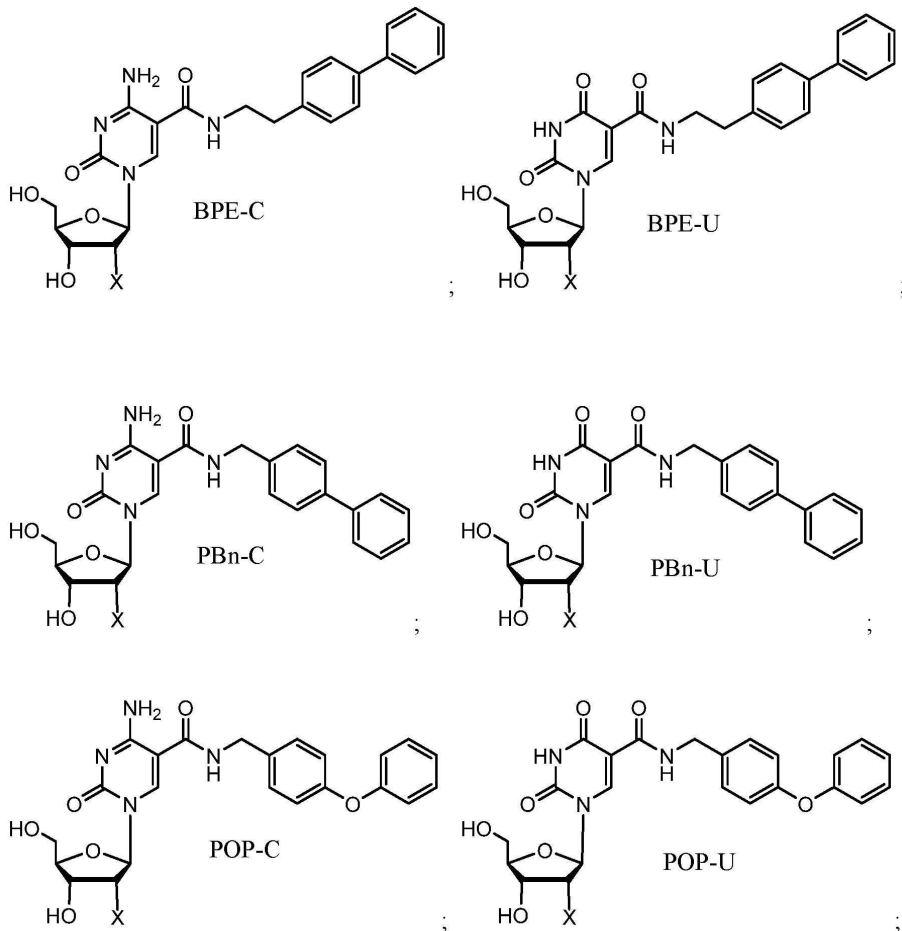
[0044] 실시형태 18. 실시형태 15 내지 16 중 어느 하나에 있어서, X는 -OMe인, 화합물.

[0045] 실시형태 19. 실시형태 15 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 각각의 R₁은

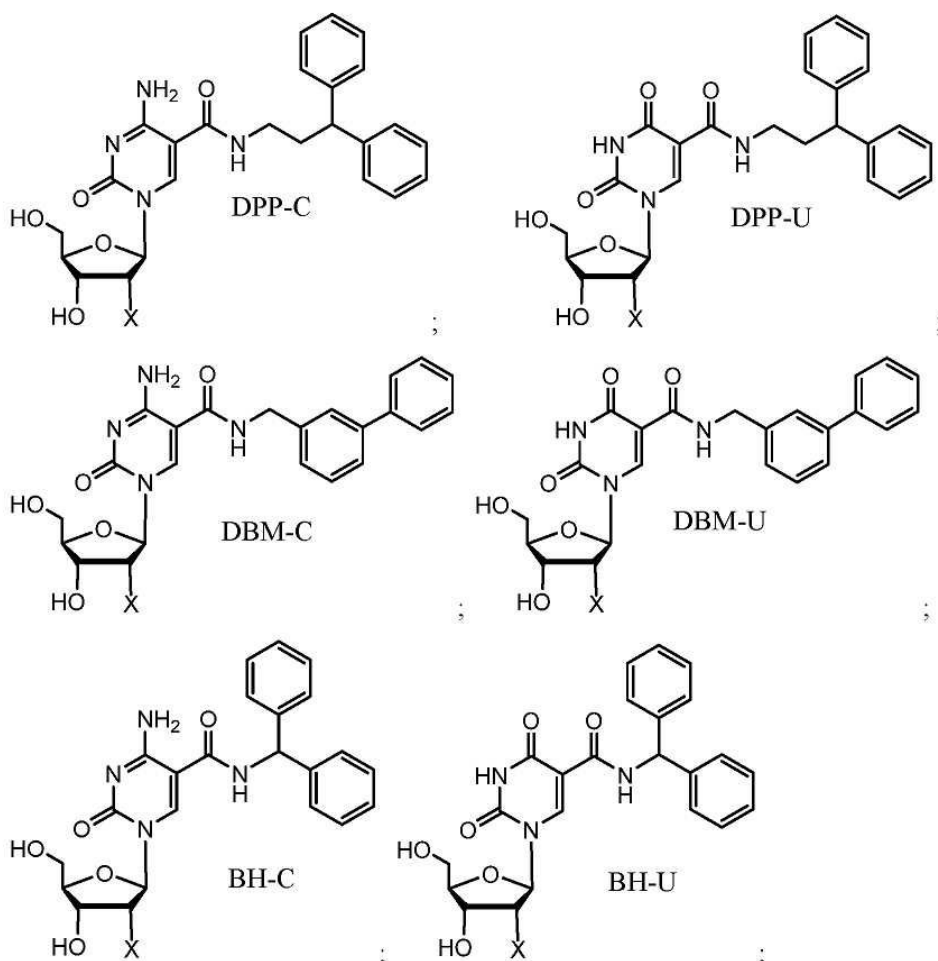


[0046] 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된, 화합물.

[0047] 실시형태 20. 다음의 구조를 포함하는 화합물:



[0048]



[0049] 또는 이들 중 어느 하나의 염 ;

[0050] 각각의 X는 -H, -OH, -O-메틸, -O-알릴, -O-에틸, -O-프로필, -OCH₂CH₂OCH₃, -플루오로, *tert*-부틸다이메틸실릴 옥시, -NH₂ 및 -아지도로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0051] 실시형태 21. 실시형태 20에 있어서, X는 -H인 화합물.

[0052] 실시형태 22. 실시형태 20에 있어서, X는 -OMe인 화합물.

[0053] 실시형태 23. 실시형태 1 내지 14 중 어느 하나의 화합물을 포함하는 올리고뉴클레오타이드.

[0054] 실시형태 24. 실시형태 23에 있어서, RNA, DNA 또는 이들의 조합을 포함하는, 올리고뉴클레오타이드.

[0055] 실시형태 25. 실시형태 23 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 15 내지 100, 또는 15 내지 90, 또는 15 내지 80, 또는 15 내지 70, 또는 15 내지 60, 또는 15 내지 50, 또는 20 내지 100, 또는 20 내지 90, 또는 20 내지 80, 또는 20 내지 70, 또는 20 내지 60, 또는 20 내지 50, 또는 30 내지 100, 또는 30 내지 90, 또는 30 내지 80, 또는 30 내지 70, 또는 30 내지 60, 또는 30 내지 50, 또는 40 내지 100, 또는 40 내지 90, 또는 40 내지 80, 또는 40 내지 70, 또는 40 내지 60, 또는 40 내지 50개의 뉴클레오타이드 길이인, 올리고뉴클레오타이드.

[0056] 실시형태 26. 실시형태 23 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 표적에 결합하는 앵타머인, 올리고뉴클레오타이드.

[0057] 실시형태 27. 실시형태 1 내지 14 중 어느 하나의 화합물을 포함하는 앵타머.

[0058] 실시형태 28. 실시형태 26 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 상기 앵타머는 15 내지 100, 또는 15 내지 90, 또는 15 내지 80, 또는 15 내지 70, 또는 15 내지 60, 또는 15 내지 50, 또는 20 내지 100, 또는 20 내지 90, 또는 20 내지 80, 또는 20 내지 70, 또는 20 내지 60, 또는 20 내지 50, 또는 30 내지 100, 또는 30 내지 90, 또는 30 내지 80, 또는 30 내지 70, 또는 30 내지 60, 또는 30 내지 50, 또는 40 내지 100, 또는 40 내지 90, 또는 40 내지 80, 또는 40 내지 70, 또는 40 내지 60, 또는 40 내지 50개의 뉴클레오타이드 길이인, 앵타머.

[0059] 실시형태 29. 실시형태 26 내지 28 중 어느 하나에 있어서, BPEdU, 2'-OMe-BPE-U, 2'-F-BPE-U, PBndU, 2'-OMe-

PBn-U, 2'-F-PBn-U, POPdU, 2'-OMe-POP-U, 2'-F-POP-U, DPPdU, 2'-OMe-DPP-U, 2'-F-DPP-U, DBMdU, 2'-OMe-DBM-U, 2'-F-DBM-U, BHdU, 2'-OMe-BH-U, 2'-F-BH-U, BPEdC, 2'-OMe-BPE-C, 2'-F-BPE-C, PBndC, 2'-OMe-PBn-C, 2'-F-PBn-C, POPdC, 2'-OMe-POP-C, 2'-F-POP-C, DPPdC, 2'-OMe-DPP-C, 2'-F-DPP-C, DBMdC, 2'-OMe-DBM-C, 2'-F-DBM-C, BHdC, 2'-OMe-BH-C 및 2'-F-BH-C로부터 선택된 5-위치 변형 피리미딘을 포함하는, 앵타머.

[0060] 실시형태 30. 실시형태 26 내지 29 중 어느 하나에 있어서, BPEdU, 2'-OMe-BPE-U, 2'-F-BPE-U, PBndU, 2'-OMe-PBn-U, 2'-F-PBn-U, POPdU, 2'-OMe-POP-U, 2'-F-POP-U, DPPdU, 2'-OMe-DPP-U, 2'-F-DPP-U, DBMdU, 2'-OMe-DBM-U, 2'-F-DBM-U, BHdU, 2'-OMe-BH-U, 2'-F-BH-U로부터 선택된 적어도 하나의 5-위치 변형 유리딘, 및 BPEdC, 2'-OMe-BPE-C, 2'-F-BPE-C, PBndC, 2'-OMe-PBn-C, 2'-F-PBn-C, POPdC, 2'-OMe-POP-C, 2'-F-POP-C, DPPdC, 2'-OMe-DPP-C, 2'-F-DPP-C, DBMdC, 2'-OMe-DBM-C, 2'-F-DBM-C, BHdC, 2'-OMe-BH-C 및 2'-F-BH-C로부터 선택된 적어도 하나의 5-위치 변형 사이티딘을 포함하는, 앵타머.

[0061] 실시형태 31. 실시형태 26 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 상기 앵타머는 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25 또는 적어도 30개 뉴클레오타이드 길이, 또는 5 내지 30, 10 내지 30, 15 내지 30, 5 내지 20, 또는 10 내지 20개 뉴클레오타이드 길이인 앵타머의 5' 말단에서 영역을 포함하되, 상기 앵타머의 5' 말단의 영역은 5-위치 변형 피리미딘을 결여하는, 앵타머.

[0062] 실시형태 32. 실시형태 26 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 상기 앵타머는 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25 또는 적어도 30개 뉴클레오타이드 길이, 또는 5 내지 30, 10 내지 30, 15 내지 30, 5 내지 20, 또는 10 내지 20개 뉴클레오타이드 길이인 앵타머의 3' 말단에서 영역을 포함하되, 상기 앵타머의 3' 말단의 영역은 5-위치 변형 피리미딘을 결여하는, 앵타머.

[0063] 실시형태 33. 적어도 1개의 제1의 5-위치 변형 피리미딘 및 적어도 1개의 제2의 5-위치 변형 피리미딘을 포함하는 앵타머로서, 제1의 5-위치 변형 피리미딘 및 제2의 5-위치 변형 피리미딘은 상이한 5-위치 변형 피리미딘이고, 적어도 1개의 제1의 5-위치 변형 피리미딘은 실시형태 1 내지 14 중 어느 하나에 따른 화합물인, 앵타머.

[0064] 실시형태 34. 실시형태 33에 있어서, 상기 적어도 1개의 제2의 5-위치 변형 피리미딘은 BndC, 2'-OMe-Bn-C, 2'-F-Bn-C, PEdC, 2'-OMe-PE-C, 2'-F-PE-C, PPdC, 2'-OMe-PP-C, 2'-F-PP-C, NapdC, 2'-OMe-Nap-C, 2'-F-Nap-C, 2NapdC, 2'-OMe-2Nap-C, 2'-F-2Nap-C, NEdC, 2'-OMe-NE-C, 2'-F-NE-C, 2NEdC, 2'-OMe-2NE-C, 2'-F-2NE-C, TyrdC, 2'-OMe-Tyr-C, 2'-F-Tyr-C, BndU, 2'-OMe-Bn-U, 2'-F-Bn-U, NapdU, 2'-OMe-Nap-U, 2'-F-Nap-U, PEdU, 2'-OMe-PE-U, 2'-F-PE-U, Ibdu, 2'-OMe-Ib-U, 2'-F-Ib-U, FBndU, 2'-OMe-FBn-U, 2'-F-FBn-U, 2NapdU, 2'-OMe-2Nap-U, 2'-F-2Nap-U, NEdU, 2'-OMe-NE-U, 2'-F-NE-U, MBndU, 2'-OMe-MBn-U, 2'-F-MBn-U, BFdU, 2'-OMe-BF-U, 2'-F-BF-U, BTdU, 2'-OMe-BT-U, 2'-F-BT-U, PPdU, 2'-OMe-PP-U, 2'-F-PP-U, MOEdU, 2'-OMe-MOE-U, 2'-F-MOE-U, Tyrdu, 2'-OMe-Tyr-U, 2'-F-Tyr-U, TrpdU, 2'-OMe-Trp-U, 2'-F-Trp-U, Thrdu, 2'-OMe-Thr-U 및 2'-F-Thr-U 중 하나 이상으로 이루어진 군으로부터 선택된, 앵타머.

[0065] 실시형태 35. 실시형태 33 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 적어도 1개의 제2의 5-위치 변형 피리미딘은 NapdC, 2'-OMe-Nap-C, 2'-F-Nap-C, 2NapdC, 2'-OMe-2Nap-C, 2'-F-2Nap-C, TyrdC, 2'-OMe-Tyr-C, 2'-F-Tyr-C, PPdC, 2'-OMe-PP-C, 2'-F-PP-C, NapdU, 2'-OMe-Nap-U, 2'-F-Nap-U, PPdU, 2'-OMe-PP-U, 2'-F-PP-U, MOEdU, 2'-OMe-MOE-U, 2'-F-MOE-U, Tyrdu, 2'-OMe-Tyr-U, 2'-F-Tyr-U, TrpdU, 2'-OMe-Trp-U, 2'-F-Trp-U, Thrdu, 2'-OMe-Thr-U 및 2'-F-Thr-U 중 하나 이상으로 이루어진 군으로부터 선택된, 앵타머.

[0066] 실시형태 36. 실시형태 26 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 앵타머는 개선된 뉴클레아제 안정성 및/또는 인간 혈청에서의 더 긴 반감기 및/또는 동일한 길이의 앵타머에 비해 개선된 친화도 및/또는 개선된 오프-속도(off-rate) 및 5-위치 변형 피리미딘 대신에 비변형 피리미딘을 포함하는 핵염기 서열을 갖는, 앵타머.

[0067] 실시형태 37. 실시형태 26 내지 36 중 어느 하나의 복수의 앵타머를 포함하는 조성물.

[0068] 실시형태 38. 실시형태 37에 있어서, 각각의 앵타머는 무작위 영역을 포함하는, 조성물.

[0069] 실시형태 39. 실시형태 38에 있어서, 무작위 영역은 20 내지 100, 또는 20 내지 90, 또는 20 내지 80, 또는 20 내지 70, 또는 20 내지 60, 또는 20 내지 50, 또는 20 내지 40, 또는 30 내지 100, 또는 30 내지 90, 또는 30 내지 70, 또는 30 내지 60, 또는 30 내지 50, 또는 30 내지 40개 뉴클레오타이드 길이인, 조성물.

[0070] 실시형태 40. 앵타머 및 표적을 포함하는 조성물로서, 상기 앵타머 및 표적은 복합체를 형성할 수 있고, 상기 앵타머는 실시형태 26 내지 35 중 어느 하나의 앵타머인, 조성물.

[0071] 실시형태 41. 제1 앵타머, 제2 앵타머 및 표적을 포함하는 조성물로서, 제1 앵타머, 제2 앵타머 및 표적은 삼량

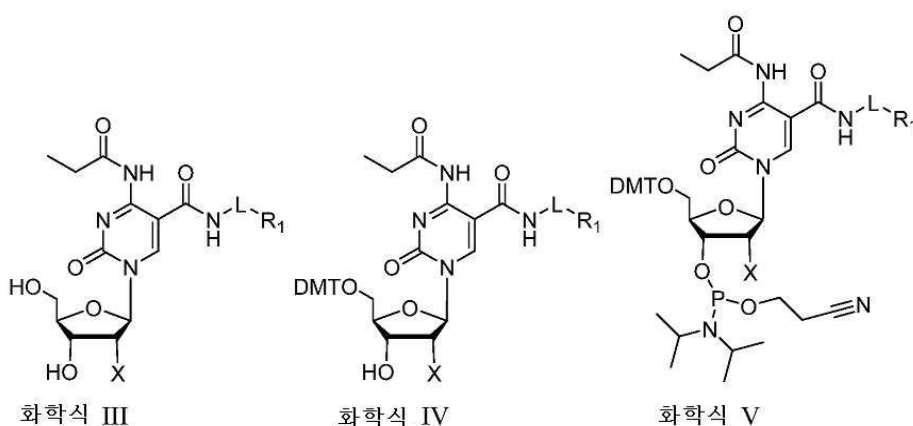
체 복합체를 형성할 수 있고; 제1 앵타머는 실시형태 1 내지 14 중 어느 하나의 화합물을 포함하는 앵타머이며; 제2 앵타머는 적어도 1개의 제2의 5-위치 변형 피리미딘을 포함하는, 조성물.

- [0072] 실시형태 42. 실시형태 41에 있어서, 상기 표적은 단백질, 펩타이드, 탄수화물, 소분자, 세포 및 조직으로부터 선택된, 조성물.
- [0073] 실시형태 43. 실시형태 41 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 상기 표적은 IL-33, XIAP, K-Ras 및 TNF-알파로부터 선택된 표적 단백질인, 조성물.
- [0074] 실시형태 44. 실시형태 26 내지 35 중 어느 하나의 적어도 하나의 앵타머, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0075] 실시형태 45. 실시형태 44에 있어서, IL-33, XIAP, K-Ras 및 TNF-알파로부터 선택된 단백질에 의해 매개된 질환 또는 병태를 치료 또는 예방하기 위한, 약제학적 조성물.
- [0076] 실시형태 46. 대상체의 질환 또는 병태의 치료 또는 예방 방법으로서, 실시형태 26 내지 35 중 어느 하나의 앵타머 또는 실시형태 44 내지 45 중 어느 하나의 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0077] 실시형태 47. 실시형태 46에 있어서, 상기 질환 또는 병태는 IL-33, XIAP, K-Ras 및 TNF-알파로부터 선택된 단백질에 의해 매개된, 방법.
- [0078] 실시형태 48. 실시형태 46 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 상기 질환 또는 병태는 외상성 뇌손상(TBI) 또는 류마티스 관절염인, 방법.
- [0079] 실시형태 49. (a) 표적 분자에 결합할 수 있는 앵타머를 샘플과 접촉시키는 단계; (b) 앵타머를 샘플과 함께 인큐베이션시켜 앵타머-표적 복합체가 형성되게 하는 단계; (c) 샘플에서 앵타머-표적 복합체를 풍부화시키는 단계; 및 (d) 앵타머, 앵타머-표적 복합체 또는 표적 분자의 존재에 대해 검출하는 단계로서, 앵타머, 앵타머-표적 복합체 또는 표적 분자의 검출은 표적 분자가 샘플 중에 존재한다는 것을 나타내고, 앵타머, 앵타머-표적 복합체 또는 표적 분자의 검출 결여는 표적 분자가 샘플에 존재하지 않는다는 것을 나타내는, 단계를 포함하되; 상기 앵타머는 실시형태 1 내지 14 중 어느 하나의 화합물을 포함하거나 또는 실시형태 26 내지 35 중 어느 하나의 앵타머인, 방법.
- [0080] 실시형태 50. 실시형태 49에 있어서, 상기 방법은 경쟁자 분자를 샘플에 첨가하는 단계; 고체 지지체 상에서 앵타머-표적 복합체를 포획하는 단계; 및 경쟁자 분자를 첨가하고 샘플을 회석시키는 단계로부터 선택된 적어도 하나의 추가적인 단계를 포함하되; 적어도 하나의 추가적인 단계는 단계 (a) 또는 단계 (b) 후에 일어나는, 방법.
- [0081] 실시형태 51. 실시형태 50에 있어서, 상기 경쟁자 분자는 다가음이온 경쟁자로부터 선택된, 방법.
- [0082] 실시형태 52. 실시형태 51에 있어서, 상기 다가음이온 경쟁자는 올리고뉴클레오타이드, 폴리텍스트란, DNA, 헤파린 및 dNTP로부터 선택된, 방법.
- [0083] 실시형태 53. 실시형태 52에 있어서, 폴리텍스트란은 텍스트란황산이고; DNA는 청어 정자 DNA 또는 연어 정자 DNA인, 방법.
- [0084] 실시형태 54. 실시형태 49 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 표적 분자는 단백질, 펩타이드, 탄수화물, 소분자, 세포 및 조직으로부터 선택된, 방법.
- [0085] 실시형태 55. 실시형태 49 내지 54 중 어느 하나에 있어서, 샘플은 전혈, 백혈구, 말초혈액단핵세포, 혈장, 혈청, 가래, 슨, 소변, 정액, 타액, 수막액, 양수, 선액(glandular fluid), 림프액, 유두 흡인물, 기관지 흡인물, 윤활액, 관절 흡인물, 세포, 세포 추출물, 대변, 조직, 조직 생검 및 뇌척수액으로부터 선택된, 방법.
- [0086] 실시형태 56. 샘플에서 표적을 검출하는 방법으로서, (a) 샘플을 제1 앵타머와 접촉시켜 혼합물을 형성하는 단계로서, 제1 앵타머는 표적에 결합하여 제1 복합체를 형성할 수 있는 단계; (b) 제1 복합체가 형성되게 하는 조건 하에서 혼합물을 인큐베이션시키는 단계; (c) 혼합물을 제2 앵타머와 접촉시키는 단계로서, 제2 앵타머는 제1 복합체에 결합하여 제2 복합체를 형성할 수 있는 단계; (d) 제2 복합체가 형성되게 하는 조건 하에서 혼합물을 형성하는 단계; (e) 혼합물에서 제1 앵타머, 제2 앵타머, 표적, 제1 복합체 또는 제2 복합체의 존재 또는 부재를 검출하는 단계로서, 제1 앵타머, 제2 앵타머, 표적, 제1 복합체 또는 제2 복합체의 존재는 표적이 샘플에

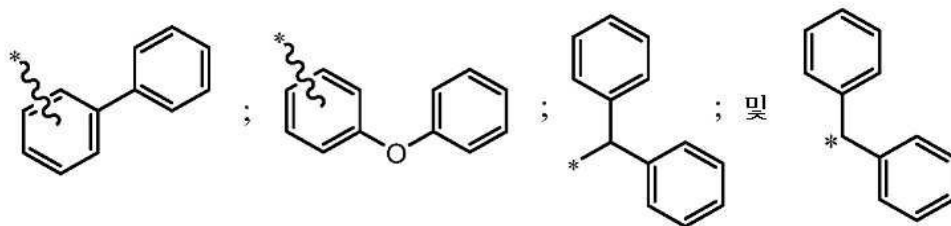
존재한다는 것을 나타내는, 단계를 포함하되; 제1 앵타머는 실시형태 1 내지 14 중 어느 하나의 화합물을 포함하고; 제2 앵타머는 적어도 1개의 제2의 5-위치 변형 피리미딘을 포함하며; 제1 앵타머, 제2 앵타머 및 표적은 삼량체 복합체를 형성할 수 있는, 방법.

- [0087] 실시형태 57. 실시형태 56에 있어서, 표적 분자는 단백질, 펩타이드, 탄수화물, 소분자, 세포 및 조직으로부터 선택된, 방법.
- [0088] 실시형태 58. 실시형태 56 내지 57 중 어느 하나에 있어서, 제1 앵타머, 제2 앵타머 및 표적은 삼량체 복합체를 형성할 수 있는, 방법.
- [0089] 실시형태 59. 실시형태 56 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 제2 앵타머는 BndC, 2'-OMe-Bn-C, PEdC, 2'-OMe-PE-C, PPdC, 2'-OMe-PP-C, NapdC, 2'-OMe-Nap-C, 2NapdC, 2'-OMe-2Nap-C, NEdC, 2'-OMe-NE-C, 2NEdC, 2'-OMe-2NE-C, TyrdC, 2'-OMe-Tyr-C, BndU, 2'-OMe-Bn-U, NapdU, 2'-OMe-Nap-U, PEdU, 2'-OMe-PE-U, Ibdu, 2'-OMe-Ib-U, FBndU, 2'-OMe-FBn-U, 2NapdU, 2'-OMe-2Nap-U, NEdU, 2'-OMe-NE-U, MBndU, 2'-OMe-MBn-U, BFdu, 2'-OMe-BF-U, BTdu, 2'-OMe-BT-U, PPdU, 2'-OMe-PP-U, MOEdU, 2'-OMe-MOE-U, Tyrdu, 2'-OMe-Tyr-U, TrpdU, 2'-OMe-Trp-U, Thrdu 및 2'-OMe-Thr-U 중 하나 이상으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 제2의 5-위치 변형 피리미딘을 포함하는, 방법.
- [0090] 실시형태 60. 실시형태 56 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 제2 앵타머는 NapdC, 2'-OMe-Nap-C, 2NapdC, 2'-OMe-2Nap-C, TyrdC, 2'-OMe-Tyr-C, PPdC, 2'-OMe-PP-C, NapdU, 2'-OMe-Nap-U, PPdU, 2'-OMe-PP-U, MOEdU, 2'-OMe-MOE-U, Tyrdu, 2'-OMe-Tyr-U, TrpdU, 2'-OMe-Trp-U, Thrdu 및 2'-OMe-Thr-U 중 하나 이상으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 제2의 5-위치 변형 피리미딘을 포함하는, 방법.
- [0091] 실시형태 61. 표적 분자에 결합할 수 있는 하나 이상의 앵타머를 확인하는 방법으로서, (a) 앵타머의 라이브러리를 표적 분자와 접촉시켜 혼합물을 형성하고, 앵타머-표적 복합체의 형성을 가능하게 하는 단계로서, 앵타머가 표적 분자에 대해 친화도를 가질 때 앵타머-표적 복합체가 형성되는, 단계; (b) 혼합물의 나머지에서 앵타머-표적 복합체를 분할하는 단계(또는 앵타머-표적 복합체를 풍부화하는 단계); (c) 앵타머-표적 복합체를 해리시키는 단계; 및 (d) 표적 분자에 결합할 수 있는 하나 이상의 앵타머를 확인하는 단계를 포함하되; 앵타머의 라이브러리는 복수의 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 실시형태 37 내지 43 중 어느 하나의 조성물인, 방법.
- [0092] 실시형태 62. 실시형태 61에 있어서, 각각의 폴리뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단에 고정된 영역을 포함하는, 방법.
- [0093] 실시형태 63. 실시형태 62에 있어서, 각각의 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단에 고정된 영역은 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25 또는 적어도 30개 뉴클레오타이드 길이, 또는 5 내지 30, 10 내지 30, 15 내지 30, 5 내지 20, 또는 10 내지 20개 뉴클레오타이드 길이인, 방법.
- [0094] 실시형태 64. 실시형태 61 내지 63 중 어느 하나에 있어서, 각각의 폴리뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에 고정된 영역을 포함하는, 방법.
- [0095] 실시형태 65. 실시형태 64에 있어서, 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에 고정된 영역은 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25 또는 적어도 30개 뉴클레오타이드 길이, 또는 5 내지 30, 10 내지 30, 15 내지 30, 5 내지 20, 또는 10 내지 20개 뉴클레오타이드 길이인, 방법.
- [0096] 실시형태 66. 실시형태 61 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 각각의 폴리뉴클레오타이드는 무작위 영역을 포함하는, 방법.
- [0097] 실시형태 67. 실시형태 66에 있어서, 무작위 영역은 20 내지 100, 또는 20 내지 90, 또는 20 내지 80, 또는 20 내지 70, 또는 20 내지 60, 또는 20 내지 50, 또는 20 내지 40, 또는 30 내지 100, 또는 30 내지 90, 또는 30 내지 70, 또는 30 내지 60, 또는 30 내지 50, 또는 30 내지 40개 뉴클레오타이드 길이인, 방법.
- [0098] 실시형태 68. 실시형태 61 내지 67 중 어느 하나에 있어서, 각각의 폴리뉴클레오타이드는 15 내지 100, 또는 15 내지 90, 또는 15 내지 80, 또는 15 내지 70, 또는 15 내지 60, 또는 15 내지 50, 또는 20 내지 100, 또는 20 내지 90, 또는 20 내지 80, 또는 20 내지 70, 또는 20 내지 60, 또는 20 내지 50, 또는 30 내지 100, 또는 30 내지 90, 또는 30 내지 80, 또는 30 내지 70, 또는 30 내지 60, 또는 30 내지 50, 또는 40 내지 100, 또는 40 내지 90, 또는 40 내지 80, 또는 40 내지 70, 또는 40 내지 60, 또는 40 내지 50개의 뉴클레오타이드 길이인, 방법.

- [0099] 실시형태 69. 실시형태 61 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 각각의 폴리뉴클레오타이드는 표적에 결합하는 앵타머이고, 라이브러리는 적어도 1000개의 앵타머를 포함하되, 각각의 앵타머는 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 방법.
- [0100] 실시형태 70. 실시형태 61 내지 69 중 어느 하나에 있어서, 단계 (a), (b) 및/또는 (c)는 적어도 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회 또는 10회 반복되는, 방법.
- [0101] 실시형태 71. 실시형태 61 내지 70 중 어느 하나에 있어서, 표적 분자에 결합할 수 있는 하나 이상의 앵타머가 증폭되는, 방법.
- [0102] 실시형태 72. 실시형태 61 내지 71 중 어느 하나에 있어서, 상기 혼합물은 다가음이온성 경쟁자 분자를 포함하는, 방법.
- [0103] 실시형태 73. 실시형태 72에 있어서, 상기 다가음이온 경쟁자는 올리고뉴클레오타이드, 폴리텍스트란, DNA, 핵산 및 dNTP로부터 선택된, 방법.
- [0104] 실시형태 74. 실시형태 73에 있어서, 폴리텍스트란은 텍스트란황산이고; DNA는 청어 정자 DNA 또는 연어 정자 DNA인, 방법.
- [0105] 실시형태 75. 실시형태 61 내지 74 중 어느 하나에 있어서, 표적 분자는 단백질, 펩타이드, 탄수화물, 소분자, 세포 및 조직으로부터 선택된, 방법.
- [0106] 실시형태 76. 실시형태 1 내지 14 중 어느 하나의 화합물, 실시형태 26 내지 35 중 어느 하나의 앵타머, 실시형태 37 내지 45 중 어느 하나의 조성물 또는 실시형태 46 내지 75 중 어느 하나의 방법으로서, 5-위치 변형 피리미딘은 중합효소에 의해 혼입될 수 있는, 화합물, 앵타머, 조성물 또는 방법.
- [0107] 실시형태 77. 실시형태 1 내지 14 중 어느 하나의 화합물, 실시형태 15 내지 22 중 어느 하나의 화합물, 실시형태 23 내지 25 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드, 실시형태 26 내지 35 중 어느 하나의 앵타머, 실시형태 37 내지 43 중 어느 하나의 조성물, 및 선택적으로 (a) 약제학적으로 허용 가능한 담체, 예컨대, 용매 또는 용액; (b) 약제학적으로 허용 가능한 부형제, 예컨대, 안정제 또는 완충제; (c) 키트 구성성분을 보유 및/또는 혼합하기 위한 적어도 하나의 용기, 바이알 또는 장치; 및 (d) 전달 장치 중 하나 이상을 포함하는, 키트.
- [0108] 실시형태 78. 실시형태 77에 있어서, 선택적으로 (e) 앵타머에 결합된 표적 분자를 검출하는 데 유용한 표지제; (f) 고체 지지체, 예컨대, 마이크로어레이 또는 비드; 및 (g) 중합효소 연쇄 반응 산물의 정량화와 관련된 시약, 예컨대, 끼어들기(intercalating) 형광 염료 또는 형광 DNA 프로브 중 하나 이상을 더 포함하는, 키트.
- [0109] 실시형태 79. 화학식 III, 화학식 IV 또는 화학식 V의 구조를 포함하는 화합물:



- [0110] 또는 이들 중 어느 하나의 염, 식 중:
- [0111] 각각의 L은 독립적으로 $-(CH_2)_n-$ 이되, n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고;
- [0112] 각각의 R_1 은



[0113] 로부터 독립적으로 선택되고;

[0114] *는 L 기에 대한 R₁ 기의 부착지점을 나타내고; 그리고

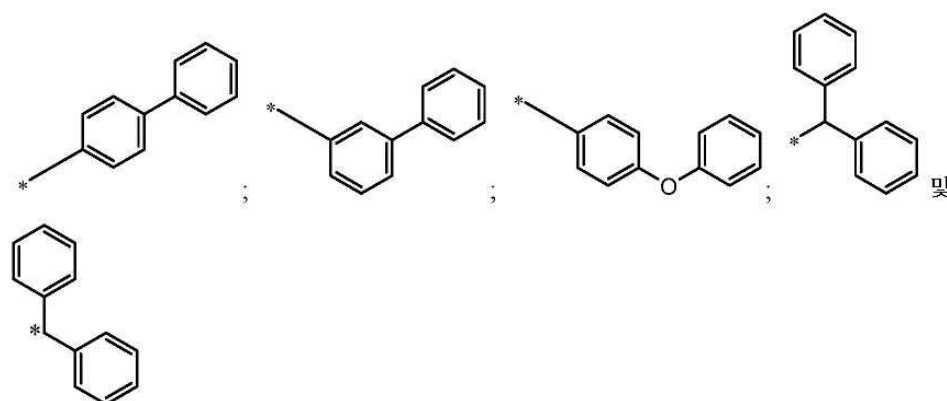
[0115] 각각의 X는 독립적으로 -H, -OH, -OMe, -O-알릴, -O-에틸, -O-프로필, -OCH₂CH₂OCH₃, -플루오로, *tert*-부틸다이메틸실릴옥시, -NH₂ 및 -아지도로부터 선택된다.

[0116] 실시형태 80. 제79항에 있어서, n은 1, 2 또는 3인, 화합물.

[0117] 실시형태 81. 제79항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, X는 -H인, 화합물.

[0118] 실시형태 82. 제79항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, X는 -OMe인, 화합물.

[0119] 실시형태 83. 제79항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, R₁은



[0120] 로부터 선택된, 화합물.

도면의 간단한 설명

[0121] **도 1A 내지 도 1I.** 라운드 7의 용량-의존적 결합은 다양한 단백질 표적에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다. 각각의 결합 곡선에 대해, 라이브러리-단백질 복합체의 분획을 단백질 농도의 함수로서 플롯팅하였다. 평형 결합 상수(K_d 값)을 4모수 s자형 용량-반응 모델에 데이터를 적합화시킴으로써 결정하였다. (A) 라운드 7의 비교는 XIAP 표적에 대한 PP-dUTP 및 DPP-dUTP 함유 라이브러리에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다. (B) 라운드 7의 비교는 XIAP 표적에 대한 PP-dUTP 및 PBn-dUTP 함유 라이브러리에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다. (C) 라운드 7의 비교는 IL-33 표적에 대한 PP-dUTP 및 DPP-dUTP 함유 라이브러리에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다. (D) 라운드 7의 비교는 IL-33 표적에 대한 PP-dUTP 및 PBn-dUTP 함유 라이브러리에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다. (E) 라운드 7의 비교는 K-Ras 표적에 대한 PP-dUTP 및 POP-dUTP 함유 라이브러리에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다. (F) 라운드 7의 비교는 K-Ras 표적에 대한 PP-dUTP 및 DPP-dUTP 함유 라이브러리에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다. (G) 라운드 7의 비교는 K-Ras 표적에 대한 PP-dUTP 및 PBn-dUTP 함유 라이브러리에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다. (H) 라운드 7의 비교는 K-Ras 표적에 대한 PP-dUTP 및 BPE-dUTP 함유 라이브러리에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다. (I) 라운드 7의 비교는 TNF-알파 표적에 대한 PP-dUTP 및 POP-dUTP 함유 라이브러리에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다.

도 2. 앵타머에 혼입될 수 있는 특정 예시적 5-위치 변형 유리딘 및 사이티딘.

도 3. 유리딘의 5-위치에 존재할 수 있는 특정 예시적 변형. C-5 변형의 화학 구조는 유리딘의 5-위치에 변형을 연결하는 예시적 아마이드 결합을 포함한다. 나타낸 5-위치 모이어티는 서로 공유 부착된 2개의 페닐기를 포함

한다. 나타낸 5-위치 모이어티는 페닐벤질 모이어티(예를 들어, BPE, PBnd, DBM), 4-펜옥시벤질 모이어티(예를 들어, POP), 다이페닐프로필 모이어티(예를 들어, DPP), 벤즈하이드릴 모이어티(예를 들어, BH)를 포함한다.

도 4. 사이티딘의 5-위치에 존재할 수 있는 특정 예시적 변형. C-5 변형의 화학 구조는 사이티딘의 5-위치에 변형을 연결하는 예시적 아마이드 결합을 포함한다. 나타낸 5-위치 모이어티는 서로 공유 부착된 2개의 페닐기를 포함한다. 나타낸 5-위치 모이어티는 페닐벤질 모이어티(예를 들어, BPE, PBnd, DBM), 4-펜옥시벤질 모이어티(예를 들어, POP), 다이페닐프로필 모이어티(예를 들어, DPP), 벤즈하이드릴 모이어티(예를 들어, BH)를 포함한다.

도 5. 유리딘의 5-위치에 존재할 수 있는 특정 예시적 변형. C-5 변형의 화학 구조는 유리딘의 5-위치에 변형을 연결하는 예시적 아마이드 결합을 포함한다. 나타낸 5-위치 모이어티는 벤질 모이어티(예를 들어, Bn, PE 및 PP), 나프틸 모이어티(예를 들어, Nap, 2Nap, NE), 뷰틸 모이어티(예를 들어, iBu), 플루오로벤질 모이어티(예를 들어, FBn), 타이로실 모이어티(예를 들어, Tyr), 3,4-메틸렌다이옥시 벤질(예를 들어, MBn), 몰폴리노 모이어티(예를 들어, MOE), 벤조퓨란일 모이어티(예를 들어, BF), 인돌 모이어티(예를 들어, Trp) 및 하이드록시프로필 모이어티(예를 들어, Thr)를 포함한다.

도 6. 사이티딘의 5-위치에 존재할 수 있는 특정 예시적 변형. C-5 변형의 화학 구조는 사이티딘의 5-위치에 변형을 연결하는 예시적 아마이드 결합을 포함한다. 나타낸 5-위치 모이어티는 벤질 모이어티(예를 들어, Bn, PE 및 PP), 프틸 모이어티(예를 들어, Nap, 2Nap, NE 및 2NE) 및 타이로실 모이어티(예를 들어, Tyr)를 포함한다.

도 7A 내지 도 7F. 라운드 8(TNF α 및 sL-셀렉틴) 또는 라운드 6(B7-H4)의 용량-의존적 결합은 다양한 단백질 표적에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다. 각각의 결합 곡선에 대해, 라이브러리-단백질 복합체의 분획을 단백질 농도의 함수로서 플롯팅하였다. 평형 결합 상수(K_d 값)을 4모수 s자형 용량-반응 모델에 데이터를 적합화시킴으로써 결정하였다. (A) 라운드 8의 비교는 TNF α 표적에 대한 Bn-dCTP, PP-dCTP 및 DPP-dCTP 함유 라이브러리에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다. (B) 라운드 8의 비교는 TNF α 표적에 대한 Bn-dCTP, PP-dCTP 및 PBn-dCTP 함유 라이브러리에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다. (C) 라운드 8의 비교는 TNF α 표적에 대한 Bn-dCTP, PP-dCTP 및 POP-dCTP 함유 라이브러리에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다. (D) 라운드 8의 비교는 B7-H4 표적에 대한 Bn-dCTP 및 PBn-dCTP 함유 라이브러리에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다. (E) 라운드 8의 비교는 sL-셀렉틴 표적에 대한 PP-dCTP 및 PBn-dCTP 함유 라이브러리에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다. (F) 라운드 8의 비교는 sL-셀렉틴 표적에 대한 PP-dCTP 및 POP-dCTP 함유 라이브러리에 대해 SELEX 풀을 풍부화시켰다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0122] 달리 언급되지 않는 한, 기술 용어는 통상적인 용법에 따라 사용된다. 분자 생물학에서 통상적인 용어의 정의는 문헌[Benjamin Lewin, *Genes V*, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 및 Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)]에서 찾을 수 있다.

[0123] 달리 설명되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시내용이 속하는 기술분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 단수의 용어는 문맥에 달리 분명하게 나타나지 않는 한, 복수의 대상을 포함한다. "A 또는 B를 포함하는"은 A 또는 B, 또는 A와 B를 포함하는 것을 의미한다. 핵산 또는 폴리펩타이드에 대해 주어진 모든 염기 크기 또는 아미노산 크기, 및 모든 분자량 또는 분자량 값은 근사 값이며, 설명을 위해 제공된다는 것을 추가로 이해할 것이다.

[0124] 추가로, 본 명세서에 제공된 범위는 범위 내의 모든 값에 대한 약칭인 것으로 이해된다. 예를 들어, 1 내지 50의 범위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50으로 이루어진 군으로부터의 임의의 수, 수의 조합 또는 임의의 하위 범위(뿐만 아니라 달리 분명하게 지시되지 않는 한 이들의 분율)를 포함하는 것으로 이해된다. 임의의 농도 범위, 백분율 범위, 비 범위 또는 정수 범위는 달리 표시되지 않는 한, 열거된 범위 내의 임의의 정수의 값 및, 적절한 경우, 이들의 분율(예컨대, 정수의 1/10 및 1/100)을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 또한, 임의의 물리적 특징, 예컨대, 중합체 서브유닛, 크기 또는 두께에 관해 본 명세서에 열거된 임의의 수 범위는, 달리 표시되지 않는 한, 열거된 범위 내의 임의의 정수를 포함하는 것으로 이해될 것이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "약" 또는 "본질적으로 이루어진"은, 달리 표시되지 않는 한, 표시된 범위, 값 또는 구조의 $\pm 20\%$ 를 의미한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용

어 "포함하다(include)" 및 "포함하다(comprise)"는 개방적 의미이며, 동의어로 사용된다.

[0125] 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동일한 방법 및 물질이 본 개시내용의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질을 아래에 기재한다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 다른 참고 문헌은 이들의 전문이 참조에 의해 인용된다. 상충되는 경우에, 용어의 설명을 포함하는 본 명세서로 조절할 것이다. 또한, 물질, 방법 및 실시예는 단지 예시적이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0126] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "뉴클레오타이드"는 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드, 또는 이들의 변형된 형태뿐만 아니라 이들의 유사체를 지칭한다. 뉴클레오타이드는 퓨린(예를 들어, 아데닌, 하이포잔틴, 구아닌 및 이들의 유도체 및 유사체)뿐만 아니라 피리미딘(예를 들어, 사이토신, 유라실, 티민 및 이들의 유도체 및 유사체)을 포함하는 종을 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "사이티딘"은 일반적으로, 달리 구체적으로 표시되지 않는 한, 사이토신 염기를 포함하는 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 또는 변형된 리보뉴클레오타이드를 지칭하기 위해 사용된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "사이티딘"은 2'-변형된 사이티딘, 예컨대, 2'-플루오로, 2'-메톡시 등을 포함한다. 유사하게, 용어 "변형된 사이티딘" 또는 특정 변형된 사이티딘은 또한, 달리 구체적으로 표시되지 않는 한, 변형된 사이토신 염기를 포함하는 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 또는 변형된 리보뉴클레오타이드(예컨대, 2'-플루오로, 2'-메톡시 등)를 지칭한다. 용어 "유리딘"은 일반적으로, 달리 구체적으로 표시되지 않는 한, 유라실 염기를 포함하는 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 또는 변형된 리보뉴클레오타이드를 지칭하기 위해 사용된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "유리딘"은 2'-변형된 유리딘, 예컨대, 2'-플루오로, 2'-메톡시 등을 포함한다. 유사하게, 용어 "변형된 유리딘" 또는 특정 변형된 유리딘은 또한, 달리 구체적으로 표시되지 않는 한, 변형된 유라실 염기를 포함하는 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 또는 변형된 리보뉴클레오타이드(예컨대, 2'-플루오로, 2'-메톡시 등)를 지칭한다.

[0127] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "5-위치 변형 사이티딘" 또는 "C-5 변형된 사이티딘"은, 예를 들어, 도 2 및 도 4에 나타난 바와 같이, 사이티딘의 C-5 위치에서 변형을 갖는 사이티딘을 지칭한다. 일부 실시형태에서, C5-변형된 사이티딘은, 예를 들어, 이들의 트라이포스페이트 형태로, 중합효소(예를 들어, KOD DNA 중합효소)에 의해 올리고뉴클레오타이드에 혼입될 수 있다. 비제한적인 예시적 5-위치 변형 사이티딘은 도 4에 나타난 것을 포함한다. 비제한적인 예시적 C-5 변형된 사이티딘은 5-[N-(4-페닐벤질)카복스아마이드]-2'-데옥시사이티딘("PBndC"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=H); 5-[N-(4-페닐벤질)카복스아마이드]-2'-O-메틸사이티딘("2'-OMe-PBn-C"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=OMe); 5-[N-(4-페닐벤질)카복스아마이드]-2'-플루오로사이티딘("2'-F-PBn-C"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=F); 5-[N-(4-펜옥시벤질)카복스아마이드]-2'-데옥시사이티딘("POPdC"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=H); 5-[N-(4-펜옥시벤질)카복스아마이드]-2'-O-메틸사이티딘("2'-OMe-POP-C"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=OMe); 5-[N-(4-펜옥시벤질)카복스아마이드]-2'-플루오로사이티딘("2'-F-POP-C"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=F); 5-[N-(3,3-다이페닐프로필)카복스아마이드]-2'-데옥시사이티딘("DPPdC"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=H); 5-[N-(3,3-다이페닐프로필)카복스아마이드]-2'-O-메틸사이티딘("2'-OMe-DPP-C"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=OMe); 5-[N-(3,3-다이페닐프로필)카복스아마이드]-2'-플루오로사이티딘("2'-F-DPP-C"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=F); 5-{N-[(1,1'-바이페닐)-4-일)에틸]카복시아마이드}-2'-데옥시사이티딘("BPEdC"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=H); 5-{N-[(1,1'-바이페닐)-4-일)에틸]카복시아마이드}-2'-O-메틸사이티딘("2'-OMe-BPE-C"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=OMe); 5-{N-[(1,1'-바이페닐)-4-일)에틸]카복시아마이드}-2'-플루오로사이티딘("2'-F-BPE-C"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=F); 5-[N-(3-페닐벤질)카복스아마이드]-2'-데옥시사이티딘("DBMdC"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=H); 5-[N-(3-페닐벤질)카복스아마이드]-2'-O-메틸사이티딘("2'-OMe-DBM-C"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=OMe); 5-[N-(3-페닐벤질)카복스아마이드]-2'-플루오로사이티딘("2'-F-DBM-C"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=F); 5-[N-(3,3-다이페닐메틸)카복스아마이드]-2'-데옥시사이티딘("BHdC"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=H); 및 5-[N-(3,3-다이페닐메틸)카복스아마이드]-2'-O-메틸사이티딘("2'-OMe-BH-C"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=OMe); 및 5-[N-(3,3-다이페닐메틸)카복스아마이드]-2'-플루오로사이티딘("2'-F-BH-C"로 지칭하고 도 4에 나타냄, 여기서, X=F)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 추가로 포함될 수 있는 비제한적인 예시적 5-위치 변형 사이티딘은 5-(N-벤질카복스아마이드)-2'-데옥시사이티딘("BndC"로 지칭됨); 5-(N-벤질카복스아마이드)-2'-O-메틸사이티딘("2'-OMe-Bn-C"로 지칭됨); 5-(N-벤질카복스아마이드)-2'-플루오로사이티딘("2'-F-Bn-C"로 지칭됨); 5-(N-2-페닐에틸카복스아마이드)-2'-데옥시사이티딘("PEdC"로 지칭됨); 5-(N-2-페닐에틸카복스아마이드)-2'-O-메틸사이티딘("2'-OMe-PE-C"로 지칭됨); 5-(N-2-페닐에틸카복스아마이드)-2'-플루오로사이티딘("2'-F-PE-C"로 지칭됨);

5-(N-3-페닐프로필카복스아마이드)-2'-데옥시사이티딘("PPdC"로 지칭됨); 5-(N-3-페닐프로필카복스아마이드)-2'-O-메틸사이티딘("2'-OMe-PP-C"로 지칭됨); 5-(N-3-페닐프로필카복스아마이드)-2'-플루오로사이티딘("2'-F-PP-C"로 지칭됨); 5-(N-1-나프틸메틸카복스아마이드)-2'-데옥시사이티딘("NapdC"로 지칭됨); 5-(N-1-나프틸메틸카복스아마이드)-2'-O-메틸사이티딘("2'-OMe-Nap-C"로 지칭됨); 5-(N-1-나프틸메틸카복스아마이드)-2'-플루오로사이티딘("2'-F-Nap-C"로 지칭됨); 5-(N-2-나프틸메틸카복스아마이드)-2'-데옥시사이티딘("2NapdC"로 지칭됨); 5-(N-2-나프틸메틸카복스아마이드)-2'-O-메틸사이티딘("2'-OMe-2Nap-C"로 지칭됨); 5-(N-2-나프틸메틸카복스아마이드)-2'-플루오로사이티딘("2'-F-2Nap-C"로 지칭됨); 5-(N-1-나프틸-2-에틸카복스아마이드)-2'-데옥시사이티딘("NEdC"로 지칭됨); 5-(N-1-나프틸-2-에틸카복스아마이드)-2'-O-메틸사이티딘("2'-OMe-NE-C"로 지칭됨); 5-(N-1-나프틸-2-에틸카복스아마이드)-2'-플루오로사이티딘("2'-F-NE-C"로 지칭됨); 5-(N-2-나프틸-2-에틸카복스아마이드)-2'-데옥시사이티딘("2NEdC"로 지칭됨); 5-(N-2-나프틸-2-에틸카복스아마이드)-2'-O-메틸사이티딘("2'-OMe-2NE-C"로 지칭됨); 5-(N-2-나프틸-2-에틸카복스아마이드)-2'-플루오로사이티딘("2'-F-2NE-C"로 지칭됨); 5-(N-타이로실카복스아마이드)-2'-데옥시사이티딘("Tyr dC"로 지칭됨); 5-(N-타이로실카복스아마이드)-2'-O-메틸사이티딘("2'-OMe-Tyr-C"로 지칭됨); 및 5-(N-타이로실카복스아마이드)-2'-플루오로사이티딘("2'-F-Tyr-C"로 지칭됨)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

- [0128] 일부 실시형태에서, C5-변형된 사이티딘은, 예를 들어, 이들의 트라이포스페이트 형태로, 중합효소(예를 들어, KOD DNA 중합효소)에 의해 올리고뉴클레오타이드에 혼입될 수 있다.
- [0129] 본 명세서에 기재된 C-5 변형된 사이티딘의 화학적 변형은 또한 개별적으로 또는 임의의 조합으로, 2'-위치 당 변형(예를 들어, 2'-O-메틸 또는 2'-플루오로), 환외 아민에서의 변형, 및 4-티오사이티딘의 치환 등과 조합될 수 있다.
- [0130] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "C-5 변형된 유리딘" 또는 "5-위치 변형 유리딘"은 유리딘, 예를 들어, 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 유리딘의 C-5 위치에서 변형을 갖는 유리딘을 지칭한다. 일부 실시형태에서, C5-변형된 유리딘은, 예를 들어, 이들의 트라이포스페이트 형태로, 중합효소(예를 들어, KOD DNA 중합효소)에 의해 올리고뉴클레오타이드에 혼입될 수 있다. 비제한적인 예시적 5-위치 변형 유리딘은 도 3에 나타난 것을 포함한다. 비제한적인 예시적 5-위치 변형 유리딘은
- [0131] 5-[N-(4-페닐벤질)카복스아마이드]-2'-데옥시유리딘(PBndU),
- [0132] 5-[N-(4-페닐벤질)카복스아마이드]-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-PBn-U),
- [0133] 5-[N-(4-페닐벤질)카복스아마이드]-2'-플루오로유리딘(2'-F-PBn-U),
- [0134] 5-[N-(4-펜옥시벤질)카복스아마이드]-2'-데옥시유리딘(POPdU),
- [0135] 5-[N-(4-펜옥시벤질)카복스아마이드]-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-POP-U),
- [0136] 5-[N-(4-펜옥시벤질)카복스아마이드]-2'-플루오로유리딘(2'-F-POP-U),
- [0137] 5-[N-(3,3-다이페닐프로필)카복스아마이드]-2'-데옥시유리딘(DPPdU),
- [0138] 5-[N-(3,3-다이페닐프로필)카복스아마이드]-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-DPP-U),
- [0139] 5-[N-(3,3-다이페닐프로필)카복스아마이드]-2'-플루오로유리딘(2'-F-DPP-U),
- [0140] 5-{N-[(1,1'-바이페닐)-4-일]에틸}카복시아마이드]-2'-데옥시유리딘(BPEdU),
- [0141] 5-{N-[(1,1'-바이페닐)-4-일]에틸}카복시아마이드]-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-BPE-U),
- [0142] 5-{N-[(1,1'-바이페닐)-4-일]에틸}카복시아마이드]-2'-플루오로유리딘(2'-F-BPE-U),
- [0143] 5-[N-(3-페닐벤질)카복스아마이드]-2'-데옥시유리딘(DBMdU),
- [0144] 5-[N-(3-페닐벤질)카복스아마이드]-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-DBM-U),
- [0145] 5-[N-(3-페닐벤질)카복스아마이드]-2'-플루오로유리딘(2'-F-DBM-U),
- [0146] 5-[N-(3,3-다이페닐메틸)카복스아마이드]-2'-데옥시유리딘(BHdU),
- [0147] 5-[N-(3,3-다이페닐메틸)카복스아마이드]-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-BH-U),
- [0148] 5-[N-(3,3-다이페닐메틸)카복스아마이드]-2'-플루오로유리딘(2'-F-BH-U)

[0149] 을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0150] 추가로 포함될 수 있는 비제한적인 예시적 5-위치 변형 유리딘은 도 5에 나타난 것을 포함한다.

[0151] 추가로 포함될 수 있는 비제한적인 예시적 5-위치 변형 유리딘은 5-(N-벤질카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘 (BndU), 5-(N-벤질카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-Bn-U), 5-(N-벤질카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-Bn-U), 5-(N-벤에틸카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘(PEdU), 5-(N-벤에틸카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-PE-U), 5-(N-벤에틸카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-PE-U), 5-(N-티오펜메틸카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘(ThdU), 5-(N-티오펜메틸카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-Th-U), 5-(N-티오펜메틸카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-Th-U), 5-(N-아이소뷰틸카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘(iBudU), 5-(N-아이소뷰틸카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-iBu-U), 5-(N-아이소뷰틸카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-iBu-U), 5-(N-타이로실카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘(TyrdU), 5-(N-타이로실카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-Tyr-U), 5-(N-타이로실카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-Tyr-U), 5-(N-3,4-메틸렌다이옥시벤질카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘(MBndU), 5-(N-3,4-메틸렌다이옥시벤질카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-MBn-U), 5-(N-3,4-메틸렌다이옥시벤질카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-MBn-U), 5-(N-4-플루오로벤질카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘(FBndU), 5-(N-4-플루오로벤질카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-FBn-U), 5-(N-4-플루오로벤질카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-FBn-U), 5-(N-3-페닐프로필카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘(PPdU), 5-(N-3-페닐프로필카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-PP-U), 5-(N-3-페닐프로필카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-PP-U), 5-(N-다이하이드록시메틸에틸카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘(ImdU), 5-(N-다이하이드록시메틸에틸카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-Im-U), 5-(N-다이하이드록시메틸에틸카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-Im-U), 5-(N-트립트아미노카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘(TrpdU), 5-(N-트립트아미노카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-Trp-U), 5-(N-트립트아미노카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-Trp-U), 5-(N-R-트레오닌일카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘(ThrdU), 5-(N-R-트레오닌일카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-Thr-U), 5-(N-R-트레오닌일카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-Thr-U), 5-(N-[1-(3-트라이메틸암모늄) 프로필]카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘 클로라이드, 5-(N-[1-(3-트라이메틸암모늄) 프로필]카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘 클로라이드, 5-(N-[1-(3-트라이메틸암모늄) 프로필]카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘 클로라이드, 5-(N-나프틸메틸카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘(NapdU), 5-(N-나프틸메틸카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-Nap-U), 5-(N-나프틸메틸카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-Nap-U), 5-(N-[1-(2,3-다이하이드록시프로필)]카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘, 5-(N-[1-(2,3-다이하이드록시프로필)]카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘, 5-(N-[1-(2,3-다이하이드록시프로필)]카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘, 5-(N-2-나프틸메틸카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘(2NapdU), 5-(N-2-나프틸메틸카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-2Nap-U), 5-(N-2-나프틸메틸카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-2Nap-U), 5-(N-1-나프틸에틸카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘(NEdU), 5-(N-1-나프틸에틸카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-NE-U), 5-(N-1-나프틸에틸카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-NE-U), 5-(N-2-나프틸에틸카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘(2NEdU), 5-(N-2-나프틸에틸카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-2NE-U), 5-(N-2-나프틸에틸카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-2NE-U), 5-(N-3-벤조퓨란일메틸카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘(BFdU), 5-(N-3-벤조퓨란일메틸카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-BF-U), 5-(N-3-벤조퓨란일메틸카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-BF-U), 5-(N-3-벤조티오펜메틸카복스아마이드)-2'-데옥시유리딘(BTdU), 5-(N-3-벤조티오펜메틸카복스아마이드)-2'-O-메틸유리딘(2'-OMe-BT-U), 5-(N-3-벤조티오펜메틸카복스아마이드)-2'-플루오로유리딘(2'-F-BT-U)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0152] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "변형하다", "변형된", "변형" 및 이들의 임의의 변형은, 올리고뉴클레오타이드에 관해 사용될 때, 올리고뉴클레오타이드의 4개의 구성성분 뉴클레오타이드 염기(즉, A, G, T/U 및 C) 중 적어도 하나가 자연 발생적 뉴클레오타이드의 유사체 또는 에스터라는 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드에 뉴클레아제 저항성을 부여한다. 추가적인 변형은 골격 변형, 메틸화, 보통의 염기쌍 조합물, 예컨대, 아이소염기, 아이소사이티딘 및 아이소구아니딘 등을 포함할 수 있다. 변형은 또한 3' 및 5' 변형, 예컨대, 캡핑을 포함할 수 있다. 다른 변형은 유사체, 뉴클레오타이드간 변형이 있는 자연 발생적 뉴클레오타이드, 예를 들어, 비하전 결합(예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트라이에스터, 포스포아미데이트, 카바메이트 등)이 있는 것 및 하전된 결합(예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로다이트 오에이트 등)을 갖는 것, 삽입체(예를 들어, 아크리딘, 소랄렌 등)를 갖는 것, 킬레이터(예를 들어, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화 금속 등)를 함유하는 것, 알킬화제를 함유하는 것, 및 변형된 결합(예를 들어, 알파 아노머 핵산 등)을 갖는 것 중 하나 이상의 치환을 포함할 수 있다. 추가로, 뉴클레오타이드의 당에 보통 존재하는

임의의 하이드록실기는 포스포네이트기 또는 포스페이트기로 대체되거나; 표준 보호기로 보호되거나; 또는 추가적인 뉴클레오타이드에 또는 고체 지지체에 대한 추가 결합을 제조하도록 활성화될 수 있다. 5' 및 3' 말단의 OH 기는 인산화되거나, 아민, 약 1 내지 약 20개의 탄소 원자로부터의 유기 캡핑기, 일부 실시형태에서 약 10 내지 약 80kDa 범위의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 중합체, 다른 실시형태에서 약 20 내지 약 60kDa 범위의 PEG 중합체, 또는 다른 친수성 또는 소수성 생물학적 또는 합성 중합체로 치환될 수 있다.

[0153] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "핵산", "올리고뉴클레오타이드" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드의 중합체 지칭하기 위해 상호 호환적으로 사용되고, DNA, RNA, DNA/RNA 혼성체 및 이런 종류의 핵산, 올리고뉴클레오타이드 및 폴리뉴클레오타이드의 변형을 포함하되, 임의의 위치에서 뉴클레오타이드 단위에 대한 다양한 독립체 또는 모이어티의 부착이 포함된다. 용어 "폴리뉴클레오타이드", "올리고뉴클레오타이드" 및 "핵산"은 이중- 또는 단일-가닥 분자뿐만 아니라 삼중-나선 분자를 포함한다. 핵산, 올리고뉴클레오타이드 및 폴리뉴클레오타이드는 용어 앵타머보다 더 광범위한 용어이고, 따라서, 용어 핵산, 올리고뉴클레오타이드, 및 폴리뉴클레오타이드는 앵타머인 뉴클레오타이드의 중합체를 포함하지만, 용어 핵산, 올리고뉴클레오타이드 및 폴리뉴클레오타이드는 앵타머로 제한되지 않는다.

[0154] 폴리뉴클레오타이드는 또한 2'-O-메틸, 2'-O-알릴, 2'-O-에틸, 2'-O-프로필, 2'-O-CH₂CH₂OCH₃, 2'-플루오로, 2'-NH₂ 또는 2'-아지도, 탄소화식 당 유사체, α-아노머 당, 에피머 당, 예컨대, 아라비노스, 자일로스 또는 릿소스, 피라노스 당, 퓨라노스 당, 세도헥톨로스, 비환식 유사체 및 비염기성 뉴클레오사이드 유사체, 예컨대, 메틸 리보사이드를 포함하는, 일반적으로 당업계에 공지된 리보스 또는 데옥시리보스 당의 유사한 형태를 함유할 수 있다. 본 명세서에 언급된 바와 같이, 하나 이상의 포스포다이에스터 결합은 대안의 연결기로 대체될 수 있다. 이들 대안의 연결기는, 포스페이트가 P(O)S("티오에이트"), P(S)S("다이티오에이트"), (O)NR^X₂("아미데이트"), P(O) R^X, P(O)OR^X, CO 또는 CH₂("폼아세탈")로 대체되고, 이때 각각의 R^X 또는 R^X'가 독립적으로 H이거나, 또는 에터(-O-) 결합, 알릴, 알켄일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일 또는 아랄딜을 선택적으로 함유하는 치환 또는 비치환된 알킬(C1-C20)인, 실시형태를 포함한다. 폴리뉴클레오타이드의 모든 결합이 동일할 필요는 없다. 당, 퓨린 및 피리미딘의 유사체 형태의 치환은, 예를 들어, 폴리아마이드 골격과 같은 대안의 골격 구조와 같이, 최종 생성물을 설계하는 데 유리할 수 있다.

[0155] 폴리뉴클레오타이드는 또한 탄소화식 당 유사체, α-아노머 당, 에피머 당, 예컨대, 아라비노스, 자일로스 또는 릿소스, 피라노스 당, 퓨라노스 당, 세도헥톨로스, 비환식 유사체 및 비염기성 뉴클레오사이드 유사체, 예컨대, 메틸 리보사이드의 유사한 형태를 함유할 수 있다.

[0156] 존재한다면, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 서열에 의해 가로막힐 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 중합 후에, 예컨대, 표지 구성성분과의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다.

[0157] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "적어도 하나의 뉴클레오타이드"는, 핵산의 변형을 지칭할 때, 핵산의 하나, 여러 개 또는 모든 뉴클레오타이드를 지칭하며, 이는 핵산의 임의의 또는 모든 A, C, T, G 또는 U의 핵산의 임의의 또는 모든 경우가 변형될 수도 있고 변형되지 않을 수도 있다는 것을 나타낸다.

[0158] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "핵산 리간드", "앵타머", "소마머(SOMAmer)" 및 "클론"은 표적 분자 상에서 바람직한 작용을 갖는 비-자연 발생적 핵산을 지칭하기 위해 상호 호환적으로 사용된다. 바람직한 작용은 표적의 결합, 표적의 촉매적 변화, 표적 또는 표적의 기능적 활성을 변형 또는 변경시키는 방법으로 표적과의 반응, (자살 저해제와 같이) 표적에 대한 공유 부착 및 표적과 다른 분자 사이의 반응을 용이하게 하는 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 작용은 표적 분자에 대한 특정 결합 친화도이며, 이러한 표적 분자는 왓슨/크릭 염기쌍(Watson/Crick base pairing) 또는 삼중 나선 형성과 독립적인 메커니즘을 통해 앵타머에 결합하는 폴리뉴클레오타이드 이외의 3차원 화학 구조이되, 앵타머는 표적 분자에 의해 결합되는 공지된 생리학적 기능을 갖는 핵산이 아니다. 주어진 표적에 대한 앵타머는, (a) 후보 혼합물을 표적과 접촉시키는 단계로서, 후보 혼합물의 다른 핵산에 비해 표적에 대해 증가된 친화도를 갖는 핵산은 후보 혼합물의 나머지에서부터 분할될 수 있는 단계; (b) 후보 혼합물의 나머지에서부터 증가된 친화도 핵산을 분할하는 단계; 및 (c) 증가된 친화도 핵산을 증폭시켜 핵산의 리간드-풍부 혼합물을 수득하고, 이에 의해 표적 분자의 앵타머가 확인되는 단계를 포함하는 방법에 의해, 핵산의 후보 혼합물로부터 확인된 핵산을 포함하며, 여기서 앵타머는 표적의 리간드이다. 친화도 상호작용이 정도 문제라는 것이 인식되지만; 그러나, 이와 관련하여, 표적에 대한 앵타머의 "특정

결합 친화도"는, 앵타머가 혼합물 또는 샘플에서 다른 비-표적 구성성분에 결합하는 것보다 훨씬 더 높은 정도로 일반적으로 이의 표적에 결합한다는 것을 의미한다. "앵타머", "소마머" 또는 "핵산 리간드"는 특정 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 분자의 한 가지 유형 또는 종의 복제물의 세트이다. 앵타머는 임의의 적합한 수의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. "앵타머"는 분자의 하나 초과와 이러한 세트를 지칭한다. 상이한 앵타머는 동일 또는 상이한 수의 뉴클레오타이드 중 하나를 가질 수 있다. 앵타머는 DNA 또는 RNA일 수 있고, 단일 가닥, 이중 가닥일 수 있거나, 또는 이중 가닥 또는 삼중가닥 영역을 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 앵타머는 본 명세서에 기재되거나 당업계에 공지된 바와 같은 SELEX 공정을 이용해서 제조된다.

[0159] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "소마머" 또는 느린 오프-속도 변형 앵타머는 개선된 오프-속도 특징을 갖는 앵타머를 지칭한다. 소마머는 미국 특허 제7,947,447호(발명의 명칭: "Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates")에 기재된 개선된 SELEX 방법을 이용해서 생성될 수 있다.

[0160] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 두 상이한 유형의 5-위치 변형 피리미딘 또는 C-5 변형된 피리미딘을 포함하는 앵타머는 "이중 변형된 앵타머", "두 변형된 염기"를 갖는 앵타머, "두 염기 변형" 또는 "2염기 변형"을 갖는 앵타머, "이중 변형된 염기"를 갖는 앵타머로 지칭될 수 있으며, 이들 모두는 상호 호환적으로 사용될 수 있다. 앵타머 또는 앵타머 라이브러리의 라이브러리는 또한 동일한 기술을 사용할 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 앵타머는 BPEdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BPE-U) 및 BPEdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BPE-C), BPEdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BPE-U) 및 PBndC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-PBn-C), BPEdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BPE-U) 및 POPdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-POP-C), BPEdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BPE-U) 및 DPPdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DPP-C), BPEdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BPE-U) 및 DBMdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DBM-C), BPEdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BPE-U) 및 BHdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BH-C), PBndU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-PBn-U) 및 BPEdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BPE-C), PBndU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-PBn-U) 및 PBndC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-PBn-C), PBndU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-PBn-U) 및 POPdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-POP-C), PBndU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-PBn-U) 및 DPPdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DPP-C), POPdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-POP-U) 및 BPEdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BPE-C), POPdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-POP-U) 및 PBndC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-PBn-C), POPdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-POP-U) 및 POPdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-POP-C), POPdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-POP-U) 및 DPPdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DPP-C), DPPdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DPP-U) 및 BPEdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BPE-C), DPPdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DPP-U) 및 PBndC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-PBn-C), DPPdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DPP-U) 및 POPdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-POP-C), DPPdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DPP-U) 및 DPPdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DPP-C), DBMdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DBM-U) 및 BPEdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BPE-C), DBMdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DBM-U) 및 PBndC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-PBn-C), DBMdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DBM-U) 및 POPdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-POP-C), DBMdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DBM-U) 및 DPPdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DPP-C), DBMdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DBM-U) 및 DBMdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DBM-C), DBMdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DBM-U) 및 BHdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BH-C), BHdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BH-U) 및 BPEdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BPE-C), BHdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BH-U) 및 PBndC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-PBn-C), BHdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BH-U) 및 POPdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-POP-C), BHdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BH-U) 및 DPPdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DPP-C), BHdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BH-U) 및 DBMdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DBM-C), BHdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BH-U) 및 BHdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BH-C)로부터 선택된 두 상이한 5-위치 변형 피리미딘을 포함한다. 일부 실시형태에서, 앵타머는 두 상이한 5-위치 변형 피리미딘을 포함하되, 제1의 5-위치 변형 피리미딘은 BPEdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BPE-U), PBndU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-PBn-U), POPdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-

POP-U), DPPdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DPP-U), BPEdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-BPE-C), PBndC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-PBn-C), POPdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-POP-C), DPPdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-DPP-C)로부터 선택되고, 제2의 5-위치 변형 피리미딘은 NapdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-Nap-C), NapdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-Nap-U), PPdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-PP-U), MOEdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-MOE-U), Tyrdu(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-Tyr-U), Thrdu(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-Thr-U), PPdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-PP-C), 2NapdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-2Nap-U), TrpdU(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-Trp-U), 2NapdC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-2Nap-C), TyrduC(또는 이의 2'-변형된 형태, 예컨대, 2'-OMe-Tyr-C)로부터 선택된 상이한 5-위치 변형 피리미딘이다. 일부 실시형태에서, 앵타머는 적어도 1개의 제1 변형 유리딘 및/또는 티미딘 또는 적어도 1개의 제1 변형 사이티딘을 포함하되, 적어도 1개의 제1 변형 유리딘 및/또는 티미딘 또는 적어도 1개의 제1 변형된 사이티딘은 서로 공유 부착된 2개의 페닐기를 포함하는 모이어티를 갖는 5-위치에서 변형된다. 일부 실시형태에서, 앵타머는 적어도 1개의 제2 변형 유리딘 및/또는 티미딘 및 적어도 1개의 제2 변형된 사이티딘을 포함하되, 적어도 1개의 제2 변형 유리딘 및/또는 티미딘은 나프틸 모이어티, 벤질 모이어티, 플루오로벤질 모이어티, 타이로실 모이어티, 인돌 모이어티, 몰폴리노 모이어티, 아이소부틸 모이어티, 3,4-메틸렌다이옥시 벤질 모이어티, 벤조티오펜일 모이어티 및 벤조퓨란일 모이어티로부터 선택된 모이어티를 갖는 5-위치에서 변형되고, 적어도 1개의 제2 변형된 사이티딘은 나프틸 모이어티, 타이로실 모이어티 및 벤질 모이어티로부터 선택된 모이어티를 갖는 5-위치에서 변형된다. 특정 실시형태에서, 모이어티는 아마이드 링커, 카보닐 링커, 에스터 링커, 유레아 링커, 카바메이트 링커, 구아니딘 링커, 아미딘 링커, 설폭사이드 링커 및 설폰 링커로부터 선택된 기를 포함하는 링커를 통해 염기의 5-위치에 공유적으로 연결된다.

[0161] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 단일 유형의 5-위치 변형 피리미딘 또는 C-5 변형된 피리미딘을 포함하는 앵타머는 "단일 변형된 앵타머", "단일 변형된 염기"를 갖는 앵타머, "단일 염기 변형" 또는 "단일 염기 변형된"을 갖는 앵타머로 지칭될 수 있으며, 이들 모두는 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 앵타머 또는 앵타머 라이브러리의 라이브러리는 또한 동일한 기술을 사용할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "단백질"은 "펩타이드", "폴리펩타이드" 또는 "펩타이드 단편"과 동의어로 사용된다. "정제된" 폴리펩타이드, 단백질, 펩타이드 또는 펩타이드 단편은 아미노산 서열이 얻어진 세포, 조직 또는 무세포 공급원으로부터의 세포 물질 또는 다른 오염 단백질이 실질적으로 없거나, 또는 화학적으로 합성될 때 화학적 잔구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없다.

[0162] 특정 실시형태에서, 앵타머의 유라실의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%는 5-위치에서 변형된다. 특정 실시형태에서, 앵타머의 사이토신의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%는 5-위치에서 변형된다.

[0163] 변형된 뉴클레오타이드

[0164] 특정 실시형태에서, 개시내용은 5-위치 변형 피리미딘을 포함하는 올리고뉴클레오타이드, 예컨대, 앵타머를 제공한다.

[0165] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 5-위치 변형 피리미딘 뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 제공하되, 상기 5-위치 변형 피리미딘은 제1 링커에 의해 서로 공유 부착된 2개의 페닐기를 포함하는 모이어티로 치환되고, 상기 모이어티는 제2 링커에 의해 피리미딘의 5-위치에 공유 연결된다.

[0166] 일부 실시형태에서, 제1 링커는 탄소 및 산소로부터 선택된 적어도 1개의 원자를 포함하거나 결합이다.

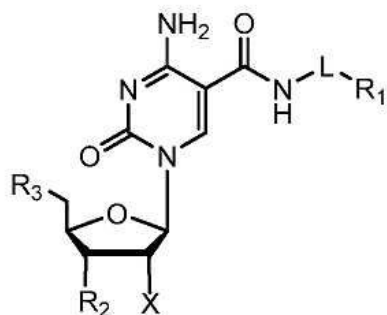
[0167] 일부 실시형태에서, 5-위치 변형 피리미딘은 페닐벤질 모이어티, 펜옥시벤질 모이어티 및 다이페닐메틸 모이어티로부터 선택된 5-위치에서 모이어티를 포함한다.

[0168] 일부 실시형태에서, 제2 링커는 아마이드 링커, 카보닐 링커, 프로판일 링커, 알카인 링커, 에스터 링커, 유레아 링커, 카바메이트 링커, 구아니딘 링커, 아미딘 링커, 설폭사이드 링커 및 설폰 링커로부터 선택된 군을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 링커는 아마이드 링커를 포함한다. 일부 실시형태에서, 아마이드 링커는 1개 이상의 탄소 원자 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 탄소 원자를 더 포함한다.

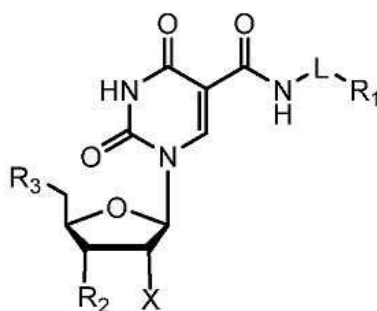
[0169] 일부 실시형태에서, 화합물은 5-위치 변형 유리딘을 포함한다.

[0170] 일부 실시형태에서, 화합물은 5-위치 변형 사이티딘을 포함한다.

[0171] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 화학식 IA 또는 화학식 IB의 구조를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제공한다:



화학식 IA

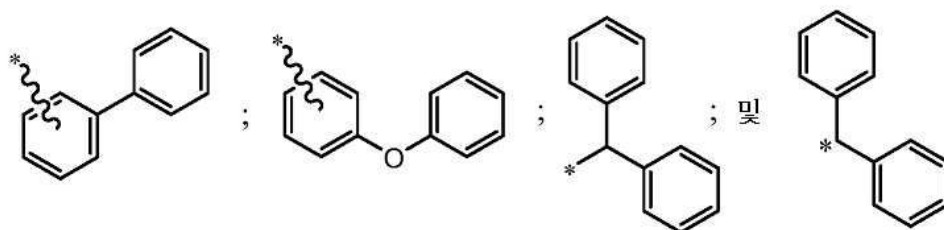


화학식 IB

[0172] 또는 이들 중 하나의 염,

[0173] 일부 실시형태에서, 각각의 L은 독립적으로 $-(CH_2)_n-$ 이되, n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0174] 일부 실시형태에서, 각각의 R₁은 독립적으로



[0175] 로 이루어진 군으로부터 선택되며; *는 L 기에 대한 R₁ 기의 부착지점을 나타낸다.

[0176] 일부 실시형태에서, 각각의 X는 -H, -OH, -OMe, -O-알릴, -O-에틸, -O-프로필, -OCH₂CH₂OCH₃, -플루오로, *tert*-부틸다이메틸실릴옥시, -NH₂ 및 -아지도로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

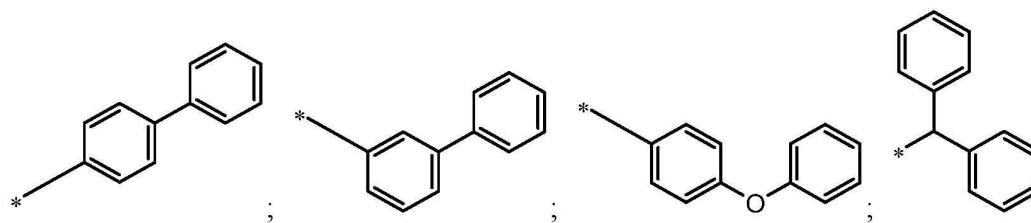
[0177] 일부 실시형태에서, 각각의 R₂는 -OH; -아세틸; -OBz; -OP(N(CH₂CH₃)₂)(OCH₂CH₂CN), -OP(N(R_x)₂)(OCH₂CH₂CN)로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, 각각의 R_x는 독립적으로 (C₁₋₆)알킬; *tert*-부틸다이메틸실릴옥시; -O-ss; -OR; -SR; -ZP(Z')(Z'')O-R이되; ss는 고체 지지체이며, Z, Z' 및 Z''는 0 및 S로부터 각각 독립적으로 선택되고, R은 인접한 뉴클레오타이드이다.

[0178] 일부 실시형태에서, 각각의 R₃는 -OH, -O-트라이틸, -O-4,4'-다이메톡시트라이틸, -O-트라이포스페이트, -OR, -SR, -NH₂, -NHR 및 -ZP(Z')(Z'')O-R로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, Z, Z' 및 Z''는 0 및 S로부터 각각 독립적으로 선택되고, R은 인접한 뉴클레오타이드이다.

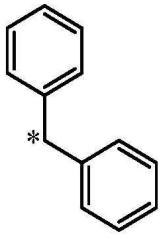
[0179] 일부 실시형태에서, n은 1, 2 또는 3이다.

[0180] 일부 실시형태에서, X는 -H 또는 -OMe이다.

[0181] 일부 실시형태에서, 각각의 R₁은



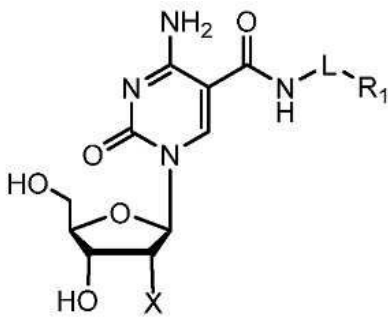
및



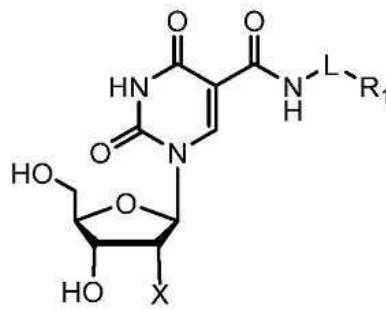
로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0182] 일부 실시형태에서, 5-위치 변형 피리미딘은 BPdU, 2'-OMe-BPE-U, 2'-F-BPE-U, PBndU, 2'-OMe-PBn-U, 2'-F-PBn-U, POPdU, 2'-OMe-POP-U, 2'-F-POP-U, DPPdU, 2'-OMe-DPP-U, 2'-F-DPP-U, DBMdU, 2'-OMe-DBM-U, 2'-F-DBM-U, BHdU, 2'-OMe-BH-U, 2'-F-BH-U, BPdC, 2'-OMe-BPE-C, 2'-F-BPE-C, PBndC, 2'-OMe-PBn-C, 2'-F-PBn-C, POPdC, 2'-OMe-POP-C, 2'-F-POP-C, DPPdC, 2'-OMe-DPP-C, 2'-F-DPP-C, DBMdC, 2'-OMe-DBM-C, 2'-F-DBM-C, BHdC, 2'-OMe-BH-C 및 2'-F-BH-C로부터 선택된다.

[0183] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 하기 화학식 IIA 또는 화학식 IIB의 구조를 포함하는 화합물을 제공한다:



화학식 IIA

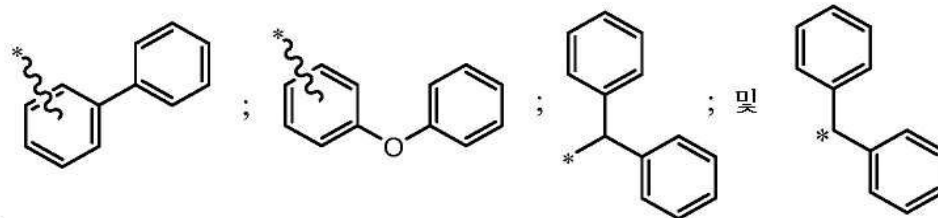


화학식 IIB

[0184] 또는 이들 중 하나의 염.

[0185] 일부 실시형태에서, 각각의 L은 독립적으로 $-(CH_2)_n$ -이되, n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0186] 일부 실시형태에서, 각각의 R₁은 독립적으로



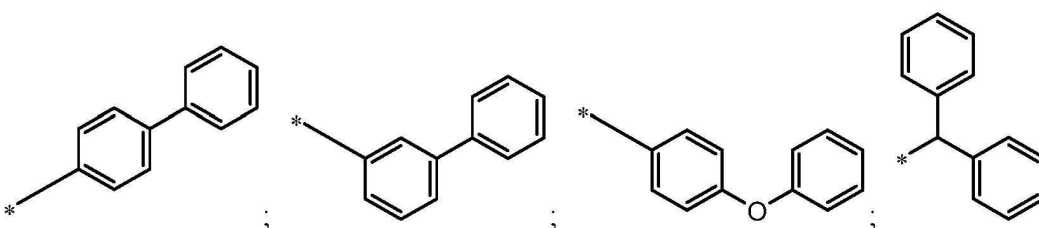
[0187] 로 이루어진 군으로부터 선택되며; *는 L 기에 대한 R₁ 기의 부착지점을 나타낸다.

[0188] 일부 실시형태에서, 각각의 X는 -H, -OH, -OMe, -O-알릴, -O-에틸, -O-프로필, -OCH₂CH₂OCH₃, -플루오로, *tert*-뷰틸다이메틸실릴옥시, -NH₂ 및 -아지도로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

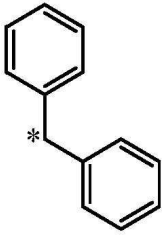
[0189] 일부 실시형태에서, n은 1, 2 또는 3이다.

[0190] 일부 실시형태에서, X는 -H 또는 -OMe이다.

[0191] 일부 실시형태에서, 각각의 R₁은



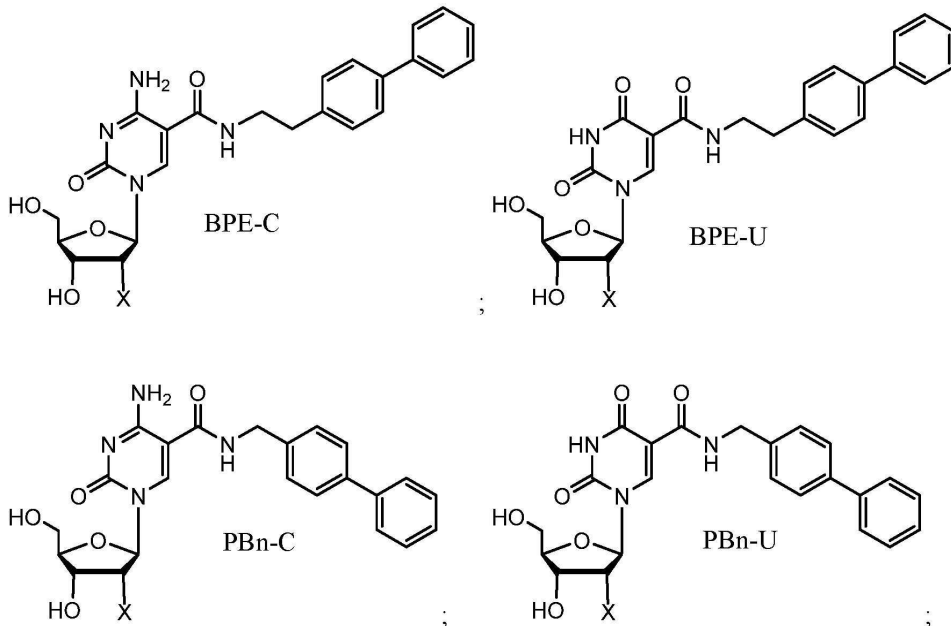
및



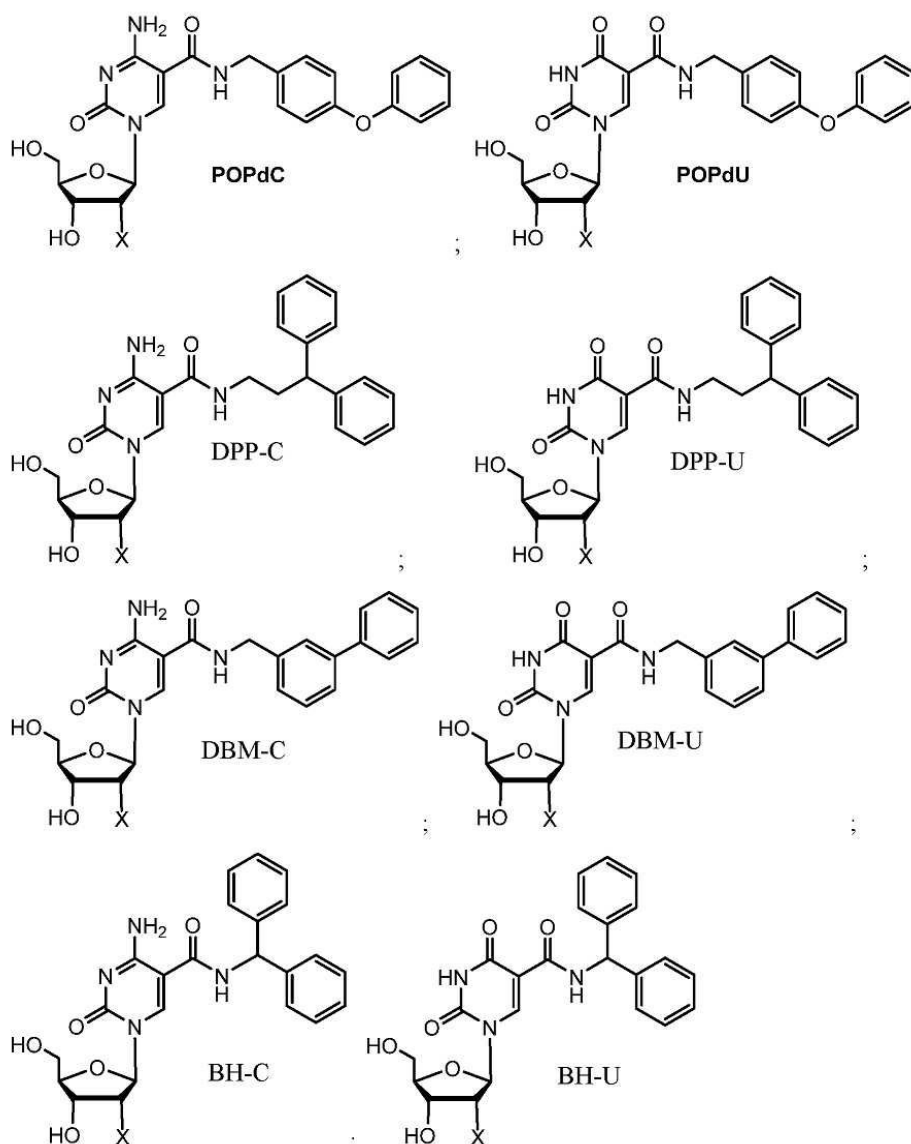
로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0192] 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 도 3 또는 도 4에 나타낸 바와 같이 적어도 하나의 변형된 피리미딘을 포함하되, 각각의 X는 -H, -OH, -OMe, -O-알릴, -F, -OEt, -OPr, -OCH₂CH₂OCH₃, NH₂ 및 -아지도로부터 독립적으로 선택된다.

[0193] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은



[0194]

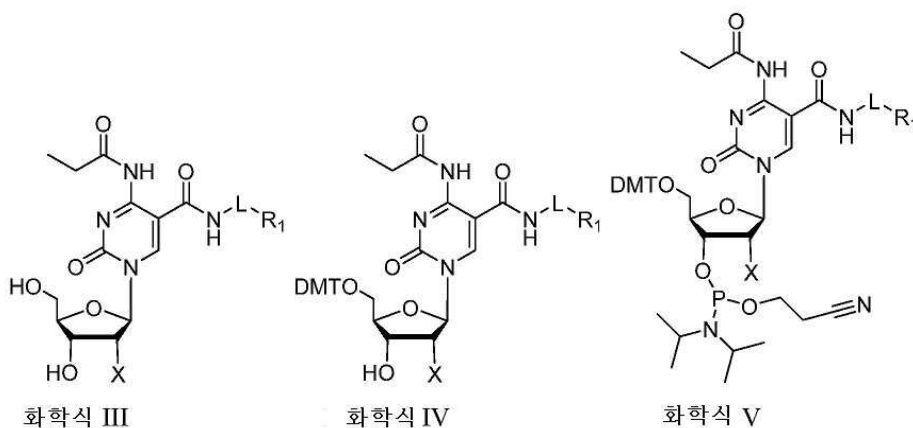


[0195] 로부터 선택된 화합물 또는 이들 중 어느 하나의 염을 제공한다.

[0196] 일부 실시형태에서, 각각의 X는 -H, -OH, -O-메틸, -O-알릴, -O-에틸, -O-프로필, -OCH₂CH₂OCH₃, -플루오로, tert-부틸다이메틸실릴옥시, -NH₂ 및 -아지도로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0197] 일부 실시형태에서, X는 -H 또는 -OMe이다.

[0198] 일부 실시형태에서, 하기 화학식 III, 화학식 IV, 또는 화학식 V의 구조를 포함하는 화합물:

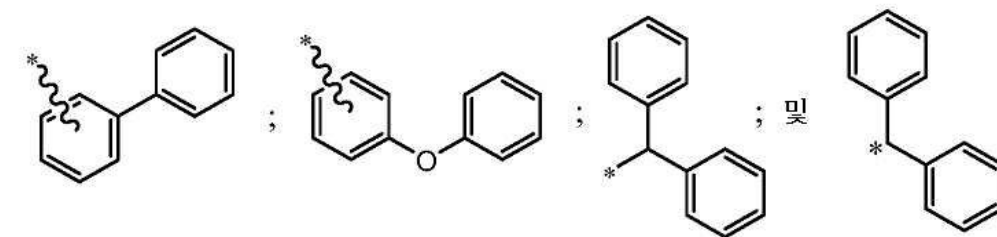


[0199] 또는 이들 중 어느 하나의

염이 제공된다.

[0200] 일부 실시형태에서, 각각의 L은 독립적으로 $-(CH_2)_n-$ 이되, n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0201] 일부 실시형태에서, 각각의 R_1 은 독립적으로



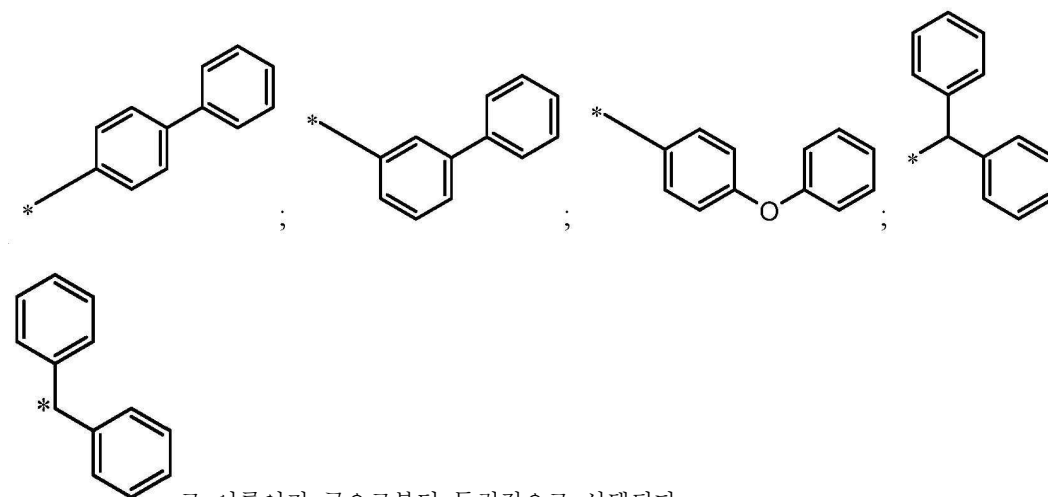
로 이루어진 군으로부터 선택되며; *는 L 기에 대한 R_1 기의 부착지점을 나타낸다.

[0202] 일부 실시형태에서, 각각의 X는 -H, -OH, -OMe, -O-알릴, -O-에틸, -O-프로필, $-OCH_2CH_2OCH_3$, -플루오로, *tert*-부틸다이메틸실릴옥시, $-NH_2$ 및 -아지도로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0203] 일부 실시형태에서, n은 1, 2 또는 3이다.

[0204] 일부 실시형태에서, X는 -H 또는 -OMe이다.

[0205] 일부 실시형태에서, 각각의 R_1 은



로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0206] 본 명세서에 기재된 임의의 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 앵타머일 수 있다. 일부 이러한 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 표적 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 앵타머이다.

[0207] 올리고뉴클레오타이드의 제조

[0208] 올리고데옥시뉴클레오사이드의 자동화된 합성은 여러 실험실에서의 일상적 실행이다(예를 들어, 문헌[Matteucci, M. D. and Caruthers, M. H., (1990) J. Am. Chem. Soc., 103:3185-3191]을 참조하며, 이의 내용은 본 명세서에 이들의 전문이 참조에 의해 원용된다). 올리고리보뉴클레오사이드의 합성이 또한 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Scaringe, S. A., et al., (1990) Nucleic Acids Res. 18:5433-5441]을 참조하며, 이의 내용은 본 명세서에 이들의 전문이 참조에 의해 원용된다). 본 명세서에 언급된 바와 같이, 포스포르아미다이트는 화학적 합성에 의해 변형된 뉴클레오사이드를 올리고뉴클레오타이드에 혼입하는 데 유용하고, 트라이포스페이트는 효소적 합성에 의해 올리고뉴클레오타이드에 변형된 뉴클레오사이드를 혼입하는 데 유용하다. (예를 들어, 문헌[Vaught, J. D. et al. (2004) J. Am. Chem. Soc., 126:11231-11237; Vaught, J. V., et al. (2010) J. Am. Chem. Soc. 132, 4141-4151; Gait, M. J. "Oligonucleotide Synthesis a practical approach" (1984) IRL Press (Oxford, UK); Herdewijn, P. "Oligonucleotide Synthesis" (2005) (Humana Press, Totowa, N.J.) (이들 각각은 본 명세서에 전문이 참조에 의해 원용됨).

[0209] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 화합물은 상업적으로 입수 가능한 합성기를 이용해서 자동화된 방법을

포함하는 표준 포스포르아미다이트 올리고뉴클레오타이드 합성 방법에서 사용될 수 있다.

[0210] 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드 합성에서 본 명세서에 제공된 화합물의 용도는 목적하는 올리고뉴클레오타이드 생성물의 수율을 개선시킨다.

SELEX 방법

[0212] 용어 "SELEX" 및 "SELEX 공정"은 일반적으로 (1) 바람직한 방식, 예를 들어, 단백질에 고친화도로 결합으로 표적 분자와 상호작용하는 핵산의 선택과, (2) 해당 선택된 핵산의 증폭의 조합을 지칭하기 위해 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용된다. SELEX 공정은 특정 표적 분자 또는 바이오마커에 대해 고친화도로 앵타머를 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0213] SELEX는 일반적으로 핵산의 후보 혼합물을 제조하는 것, 후보 혼합물을 목적하는 표적 분자에 결합시켜 친화도를 형성하는 것, 비결합 후보 핵산으로부터 친화도 복합체를 분리시키는 것, 친화도 복합체로부터 핵산을 분리 및 단리시키는 것, 핵산을 정제하는 것 및 특정 앵타머 서열을 확인하는 것을 포함한다. 상기 공정은 선택된 앵타머의 친화도를 추가로 개선시키는 다회의 라운드를 포함할 수 있다. 상기 공정은 공정의 하나 이상의 시점에 증폭 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,475,096호(발명의 명칭: "Nucleic Acid Ligands")를 참조한다. SELEX 공정은 표적에 공유 결합하는 앵타머뿐만 아니라 표적에 비공유 결합하는 앵타머를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,705,337호(발명의 명칭: "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX")를 참조한다.

[0214] SELEX 공정은 앵타머 상에 개선된 특징, 예를 들어, 개선된 생체내 안정성 또는 개선된 전달 특징을 부여하는 변형된 뉴클레오타이드를 함유하는 고친화도 앵타머를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 변형의 예는 리보스 및/또는 포스페이트 및/또는 염기 위치에서 화학적 치환을 포함한다. 변형된 뉴클레오타이드를 함유하는 SELEX 공정-확인 앵타머는 피리미딘의 5'- 및 2'-위치에서 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드 유도체를 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 기재하는 미국 특허 제5,660,985호(발명의 명칭: "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides")에 기재되어 있다. 미국 특허 제5,580,737호는 2'-아미노 (2'-NH₂), 2'-플루오로 (2'-F) 및/또는 2'-O-메틸 (2'-OMe)로 변형된 하나 이상의 뉴클레오타이드를 함유하는 고도로 특이적인 앵타머를 기재한다. 또한 확장된 물리적 및 화학적 특성을 갖는 핵산 라이브러리 및 SELEX 및 photoSELEX에서의 이들의 용도를 기재하는 미국 특허 출원 공개 번호 20090098549호(발명의 명칭: "SELEX and PHOTOSELEX")를 참조한다.

[0215] SELEX는 또한 바람직한 오프-속도 특징을 갖는 앵타머를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에 전문이 참조에 의해 인용되며 표적 분자에 결합할 수 있는 앵타머를 생성하기 위한 개선된 SELEX 방법을 기재하는 미국 특허 제7,947,447호(발명의 명칭: "Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates")를 참조한다. 각각의 표적 분자로부터의 느린 해리 속도를 갖는 앵타머 및 광앵타머를 생성하는 방법이 기재된다. 상기 방법은 후보 혼합물을 표적 분자와 접촉시키는 단계, 핵산-표적 복합체의 형성이 일어나도록 하는 단계, 및 느린 오프-속도 풍부화 공정을 수행하는 단계를 수반하되, 빠른 해리 속도를 갖는 핵산-표적 복합체는 해리되고, 개선되지 않는 반면, 느린 오프-속도를 갖는 복합체는 무손상으로 남아있다. 추가적으로, 상기 방법은 후보 핵산 혼합물의 생성에서 변형된 뉴클레오타이드를 사용하여 개선된 오프-속도 성능을 갖는 앵타머를 생성하는 단계를 포함한다(미국 특허 제8,409,795호(발명의 명칭: "SELEX and PhotoSELEX") 참조). (또한 미국 특허 제7,855,054호 및 미국 특허 공개 제20070166740호 참조). 각각의 이들 출원은 본 명세서에 전문이 참조에 의해 인용된다.

[0216] "표적" 또는 "표적 분자" 또는 "표적"은 본 명세서에서, 핵산이 바람직한 방식으로 작용할 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. 표적 분자는 단백질, 펩타이드, 핵산, 탄수화물, 지질, 다당류, 당단백질, 호르몬, 수용체, 항원, 항체, 바이러스, 병원균, 독성 물질, 기질, 대사물질, 전이 상태 유사체, 보조인자, 저해제, 약물, 염료, 영양소, 성장 인자, 세포, 조직, 임의의 앞선 언급한 것의 임의의 부분 또는 단편일 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 사실상 임의의 화학적 또는 생물학적 효과기는 적합한 표적일 수 있다. 임의의 크기의 분자는 표적으로서 작용할 수 있다. 표적은 또한 특정 방법에서 표적과 핵산 사이의 상호작용 가능성 또는 강도를 향상시키기 위해 변형될 수 있다. 표적은 또한 특정 화합물 또는 분자의 임의의 약간의 변형, 예컨대, 단백질의 경우에, 예를 들어, 아미노산 서열의 약간의 변형, 이황화물 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예컨대, 분자의 동일성을 실질적으로 변경시키지 않는 표지 구성성분과의 접합을 포함할 수 있다. "표적 분자" 또는 "표적"은 앵타머에 결합할 수 있는 분자 또는 다중분자 구조의 하나의 유형 또는 종의 복제물의 세트이다. "표적 분자" 또는 "표적"은 분자의 하나 초과와 이러한 세트를 지칭한다. 표적이

펩타이드인 SELEX 공정의 실시형태는 미국 특허 제6,376,190호(발명의 명칭: "Modified SELEX Processes Without Purified Protein")에 기재되어 있다. 일부 실시형태에서, 표적은 단백질이다.

[0217] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "경쟁자 분자" 및 "경쟁자"는 비표적 분자와 비특이적 복합체를 형성할 수 있는 임의의 분자를 지칭하기 위해 상호 교환적으로 사용된다. 이와 관련하여, 비-표적 분자는 앵타머를 포함하지 않으며, 예를 들어, 경쟁자는 앵타머가 다른 비-표적 분자에 비특이적으로 결합(재결합)하는 것을 저해하는 데 사용될 수 있다. "경쟁자 분자" 또는 "경쟁자"는 분자의 하나의 유형 또는 종의 복제물의 세트이다. "경쟁자 분자" 또는 "경쟁자"는 분자의 하나 초과와 이러한 세트를 지칭한다. 경쟁자 분자는 올리고뉴클레오타이드, 다가 음이온(예를 들어, 헤파린, 청어 정자 DNA, 연어 정자 DNA, tRNA, 텍스트란황산, 폴리텍스트란, 비염기성 포스포다이에스터 중합체, dNTP 및 파이로포스페이트)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 다양한 실시형태에서, 하나 이상의 경쟁자의 조합이 사용될 수 있다.

[0218] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "비특이적 복합체"는 앵타머 이외의 둘 이상의 분자와 이의 표적 분자 사이의 비공유 회합을 지칭한다. 비특이적 복합체는 분자 부류 간의 상호작용을 나타낸다. 비특이적 복합체는 앵타머와 비-표적 분자, 경쟁자와 비-표적 분자, 경쟁자와 표적 분자, 및 표적 분자와 비-표적 분자 사이에서 형성된 복합체를 포함한다.

[0219] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "느린 오프-속도 풍부화 공정"은, 느린 해리 속도를 갖는 앵타머 친화도 복합체의 상대 농도가 더 빠르고, 덜 바람직한 해리 속도를 갖는 앵타머 친화도 복합체의 농도에 비해 증가되도록 후보 화합물의 특정 구성성분의 상대 농도를 변경시키는 공정을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 느린 오프-속도 풍부화 공정은 용액-기반 느린 오프-속도 풍부화 공정이다. 따라서, 혼합물에서 앵타머 친화도 복합체를 형성하는 표적도 핵산도 느린 오프-속도 풍부화 공정 동안 고체 지지체 상에 고정되지 않도록, 용액-기반 느린 오프-속도 풍부화 공정이 용액에서 일어난다. 다양한 실시형태에서, 느린 오프 속도 풍부화 공정은 경쟁자 분자의 첨가 및 이와 함께 인큐베이션, 혼합물의 회석 또는 이들의 조합(예를 들어, 경쟁자 분자의 존재 하에서의 혼합물의 회석)을 포함하는 하나 이상의 단계를 포함할 수 있다. 느린 오프-속도 풍부화 공정의 효과는 일반적으로 상이한 앵타머 친화도 복합체(즉, 후보 혼합물에서 표적 분자와 상이한 핵산 사이에서 형성된 앵타머 친화도 복합체)의 상이한 해리 속도에 따른 것이기 때문에, 느린 오프-속도 풍부화 공정의 지속기간은 빠른 해리 속도를 갖는 앵타머 친화도 복합체의 수를 실질적으로 감소시키면서 느린 해리 속도를 갖는 고비용의 앵타머 친화도 복합체를 유지하기 위해 선택된다. 느린 오프-속도 풍부화 공정은 SELEX 공정 동안 1회 이상의 주기에서 사용될 수 있다. 경쟁자의 회석 및 첨가가 조합하여 사용될 때, 이들은 동시에 또는 순차적으로, 임의의 순서로 수행될 수 있다. 느린 오프 속도 풍부화 공정은 혼합물에서 총 표적(단백질) 농도가 낮을 때 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, SELEX 공정의 후속 라운드를 위해 앵타머 보유 핵산이 회수된다는 것을 유념하여, 느린 오프-속도 풍부화 공정이 회석을 포함할 때, 혼합물은 가능한 많이 회석될 수 있다. 일부 실시형태에서, 느린 오프-속도 풍부화 공정에는 경쟁자뿐만 아니라 회석의 사용이 포함되어, 혼합물이 경쟁자를 사용하지 않고 요구되는 것보다 적게 회석될 수 있게 한다.

[0220] 일부 실시형태에서, 느린 오프-속도 풍부화 공정은 경쟁자의 첨가를 포함하고, 경쟁자는 다가음이온(예를 들어, 헤파린 또는 텍스트란황산(텍스트란))이다. 헤파린 또는 텍스트란은 사전 SELEX 선택에서 특정 앵타머의 확인에서 사용되었다. 그러나, 이러한 방법에서, 헤파린 또는 텍스트란은 표적 및 앵타머가 결합되어 복합체를 형성하는 평형 단계 동안에 존재한다. 이러한 방법에서, 헤파린 또는 텍스트란의 농도가 증가함에 따라, 고친화도 표적/앵타머 복합체 대 저친화도 표적/앵타머 복합체의 비는 증가된다. 그러나, 고농도의 헤파린 또는 텍스트란은 핵산과 경쟁자 사이의 표적 결합에 대한 경쟁으로 인해 평형상태에서 고친화도 표적/앵타머 복합체 수를 감소시킬 수 있다. 대조적으로, 일부 실시형태에서, 상기 방법은 표적/앵타머 복합체가 형성되는 것이 가능해진 후에 경쟁자를 첨가하므로, 형성된 복합체의 수에는 영향을 미치지 않는다. 표적과 앵타머 사이에 평형상태 결합이 일어난 후 경쟁자를 첨가하는 것은 비평형상태를 생성하고, 이는 더 소수의 표적/앵타머 복합체에 의해 시간이 지남에 따라 새로운 평형상태로 진행된다. 새로운 평형상태에 도달되기 전에 표적/앵타머 복합체를 트래핑하는 것은, 빠른 오프-속도 복합체가 먼저 해리될 것이기 때문에, 느린 오프-속도 앵타머에 대한 샘플을 풍부화시킨다.

[0221] 다른 실시형태에서, 다가음이온 경쟁자(예를 들어, 텍스트란황산 또는 다른 다가음이온 물질)는 느린 오프-속도 풍부화 공정에서 사용되어 다가음이온의 존재 하에서 불응성(refractory)인 앵타머의 확인을 가능하게 한다. 이와 관련하여, "다가음이온 불응성 앵타머"는 비다가음이온 불응성 앵타머를 포함하는 앵타머/표적 복합체보다 다가음이온 불응성 물질을 또한 함유하는 용액에서 더 적게 해리될 가능성이 있는 앵타머/표적 복합체를 형성할 수 있는 앵타머이다. 이런 방식에서, 다가음이온 불응성 앵타머는 샘플에서 표적의 존재 또는 양 또는 농도를

검출하는 분석 방법의 수행에서 사용될 수 있으며, 여기서, 검출 방법은 앵타머에 불응성인 다가음이온 물질(예를 들어, 텍스트란황산)의 사용을 포함한다.

[0222] 따라서, 일부 실시형태에서, 다가음이온 불응성 앵타머를 생성하는 방법이 제공된다. 핵산의 후보 혼합물을 표적과 접촉시킨 후에, 후보 혼합물에서 표적과 핵산은 평형상태가 된다. 다가음이온 경쟁자가 도입되고, 후보 혼합물에서 대부분의 빠른 오프 속도 앵타머가 표적 분자로부터 해리되는 것을 보장하기에 충분한 기간 동안 용액에서 인큐베이션된다. 또한, 다가음이온 경쟁자의 존재 하에 해리될 수 있는 후보 혼합물의 앵타머는 표적 분자로부터 방출될 것이다. 혼합물은 표적 분자와 관련하여 남아있는 고친화도, 느린 오프-속도 앵타머를 분리시키기 위해 그리고 임의의 비복합체화된 물질을 용액으로부터 제거하기 위해 분할된다. 이어서, 앵타머는 표적 분자로부터 방출되고 분리될 수 있다. 분리된 앵타머는 또한 증폭될 수 있고, 추가적인 선택 라운드가 선택된 앵타머의 전체 성능을 증가시키는 데 적용될 수 있다. 이 공정은 또한 느린 오프-속도 앵타머의 선택이 특정 적용에 필요하지 않다면 최소 인큐베이션 시간으로 사용될 수 있다.

[0223] 따라서, 일부 실시형태에서 변형된 SELEX 공정은 느린(긴) 오프 속도를 갖는 앵타머의 확인 또는 생성을 위해 제공되며, 표적 분자와 후보 혼합물은 접촉되고, 후보 혼합물에 함유된 표적 분자와 핵산 사이에서 평형상태 결합이 일어나는 데 충분한 기간 동안 함께 인큐베이션된다. 평형상태 결합 후에, 과량의 경쟁자 분자, 예를 들어, 다가음이온 경쟁자는 혼합물에 첨가되고, 혼합물은 사전 결정된 기간 동안 과량의 경쟁자 분자와 함께 인큐베이션된다. 이런 사전결정된 인큐베이션 시간보다 적은 오프 속도를 갖는 상당한 비율의 앵타머는 사전결정된 인큐베이션 기간 동안 표적으로부터 해리될 것이다. 표적에 의한 이들 "빠른" 오프 속도 앵타머의 재회합은 표적에 비특이적으로 결합하고 표적 결합 부위를 점유할 수 있는 과량의 경쟁자 분자 때문에 최소화된다. 더 긴 오프 속도를 갖는 상당한 비율의 앵타머는 사전 결정된 인큐베이션 기간 동안 표적에 복합체화된 채로 남아있을 것이다. 인큐베이션 기간의 종료 시, 혼합물의 나머지에서부터 핵산-표적 복합체를 분할하는 것은 빠른 오프 속도를 갖는 것으로부터 느린 오프-속도 앵타머 집단의 분리를 가능하게 한다. 해리 단계는 이들의 표적으로부터 느린 오프-속도 앵타머를 해리시키는 데 사용될 수 있고, 표적 분자에 대해 고친화도 및 특이성을 갖는 느린 오프-속도 앵타머의 (개개 앵타머의 또는 느린 오프-속도 앵타머 그룹의) 분리, 확인, 서열분석, 합성 및 증폭을 가능하게 한다. 통상적인 SELEX에 의해, 경쟁자 분자의 접촉, 평형상태 결합, 첨가, 경쟁자 분자와 함께 인큐베이션 및 느린 오프-속도 앵타머의 분할 단계가 필요한 경우 여러 번 되풀이/반복될 수 있도록, 새로운 후보 혼합물의 합성에서 1라운드의 변형된 SELEX 공정로부터 확인된 앵타머 서열이 사용될 수 있다.

[0224] 경쟁자의 첨가 전 표적과 후보 혼합물의 평형상태 결합의 조합, 다음에 과량의 경쟁자의 첨가 및 사전 결정된 기간 동안 경쟁자와 함께 인큐베이션은 앞서 달성된 것보다 훨씬 더 큰 오프 속도를 갖는 앵타머 집단의 선택을 가능하게 한다.

[0225] 평형상태 결합을 달성하기 위해, 후보 혼합물은 적어도 약 5분, 또는 적어도 약 15분, 약 30분, 약 45분, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간 또는 약 6시간 동안 표적과 함께 인큐베이션될 수 있다.

[0226] 후보 혼합물 및 표적 분자의 혼합물과 함께 경쟁자 분자의 사전결정된 인큐베이션 기간은, (만약에 있다면) 표적에 대한 알려진 앵타머의 표적 특성 및 알려진 오프 속도와 같은 인자를 고려해서, 원하는 경우에 선택될 수 있다. 사전결정된 인큐베이션 기간은 적어도 약 5분, 적어도 약 10분, 적어도 약 20분, 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 1시간, 적어도 약 2시간, 적어도 약 3시간, 적어도 약 4시간, 적어도 약 5시간, 적어도 약 6시간으로부터 선택될 수 있다.

[0227] 다른 실시형태에서, 희석은 오프-속도 풍부화 공정으로서 사용되고, 희석된 후보 혼합물, 표적 분자/앵타머 복합체의 인큐베이션은 적어도 약 5분, 적어도 약 10분, 적어도 약 20분, 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 1시간, 적어도 약 2시간, 적어도 약 3시간, 적어도 약 4시간, 적어도 약 5시간, 적어도 약 6시간으로부터 선택될 수 있는 사전결정된 기간 동안 가해질 수 있다.

[0228] 본 개시내용의 일부 실시형태는 느린 오프-속도 앵타머의 확인, 생성, 합성 및 용도에 관한 것이다. 이들은 비공유 앵타머-표적 복합체로부터의 해리 속도($t_{1/2}$)가 통상적인 SELEX에 의해 보통 얻어지는 앵타머보다 더 높은 앵타머이다. 앵타머 및 표적의 비공유 복합체를 함유하는 혼합물의 경우, $t_{1/2}$ 는 앵타머의 절반이 앵타머-표적 복합체로부터 해리되는 동안 취해진 시간을 나타낸다. 본 개시내용에 따른 느린 해리 속도의 $t_{1/2}$ 는 약 30분 이상; 약 30분 내지 약 240분; 약 30분 내지 약 60분; 약 60분 내지 약 90분, 약 90분 내지 약 120분; 약 120분 내지 약 150분; 약 150분 내지 약 180분; 약 180분 내지 약 210분; 약 210분 내지 약 240분 중 하나로부터 선택된다.

- [0229] SELEX 절차에 의해 확인된 앵타머의 특성규명 특징은 이의 표적에 대한 고친화도이다. 앵타머는 약 1 μ M 미만, 약 100nM 미만, 약 10nM 미만, 약 1nM 미만, 약 100pM 미만, 약 10 pM 미만, 약 1pM 미만 중 하나로부터 선택된 이의 표적에 대한 해리 상수(k_d)를 가질 것이다.
- [0230] **올리고뉴클레오타이드의 라이브러리**
- [0231] 일부 실시형태에서, 무작위 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 라이브러리가 제공된다. 이러한 라이브러리는, 일부 실시형태에서, SELEX를 수행하는 데 유용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드의 라이브러리의 각 올리고뉴클레오타이드는 다수의 무작위화된 위치, 예컨대, 적어도 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50, 또는 20 내지 100, 20 내지 80, 20 내지 70, 20 내지 60, 20 내지 50, 20 내지 40, 또는 30 내지 40개의 무작위화된 위치를 포함한다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드의 라이브러리의 각 올리고뉴클레오타이드는 무작위화된 위치에 축적하는 고정된 서열을 포함한다. 이러한 고정된 축적 서열은 서로 동일하거나 상이할 수 있고(즉, 5' 축적 서열과 3' 축적 서열은 동일하거나 상이할 수 있음), 일부 실시형태에서, 라이브러리의 모든 구성원에 대해 동일할 수 있다(즉, 라이브러리의 모든 구성원은 동일한 5' 축적 서열을 가질 수 있고/있거나 라이브러리의 모든 구성원은 동일한 3' 축적 서열을 가질 수 있다).
- [0232] 일부 실시형태에서, 무작위화된 위치는 최대 4개 이상의 상이한 뉴클레오타이드 염기로 구성될 수 있으며, 이중 하나 이상은 변형된다. 일부 실시형태에서, 한 가지 유형의 뉴클레오타이드 염기 모두는 변형 또는 비변형된다(예를 들어, 무작위화된 영역 또는 변형 또는 모두에서 사이티딘의 모두는 비변형된다). 일부 실시형태에서, 무작위화된 영역에서 한 유형의 뉴클레오타이드 염기는 변형 형태와 비변형 형태 둘 다에 존재한다. 일부 이러한 실시형태에서, 무작위화된 위치는 2개의 변형 및 2개의 비변형된 뉴클레오타이드 염기로 이루어진다. 일부 이러한 실시형태에서, 무작위화된 위치는 아데닌, 구아닌, C5-변형된 사이티딘 및 C5-변형된 유리딘으로 이루어진다. 비제한적인 예시적 C5-변형된 사이티딘 및 C5-변형된 유리딘은 도 2 내지 도 6에 나타난다. 올리고뉴클레오타이드의 라이브러리 및 이의 제조 방법은, 예를 들어, 본 명세서의 실시예에서 추가로 기재된다.
- [0233] **예시적인 앵타머**
- [0234] 일부 실시형태에서, 표적 분자에 결합하는 앵타머가 제공된다. 일부 실시형태에서, 표적 분자는 표적 단백질이다.
- [0235] 일부 실시형태에서, IL-33에 결합하는 앵타머가 제공된다.
- [0236] 일부 실시형태에서, IL-33에 결합하는 앵타머는 15 내지 100, 또는 15 내지 90, 또는 15 내지 80, 또는 15 내지 70, 또는 15 내지 60, 또는 15 내지 50, 20 내지 100, 또는 20 내지 90, 또는 20 내지 80, 또는 20 내지 70, 또는 20 내지 60, 또는 20 내지 50, 또는 30 내지 100, 또는 30 내지 90, 또는 30 내지 80, 또는 30 내지 70, 또는 30 내지 60, 또는 30 내지 50, 또는 40 내지 100, 또는 40 내지 90, 또는 40 내지 80, 또는 40 내지 70, 또는 40 내지 60, 또는 40 내지 50 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0237] 일부 실시형태에서, XIAP에 결합하는 앵타머가 제공된다.
- [0238] 일부 실시형태에서, XIAP에 결합하는 앵타머는 15 내지 100, 또는 15 내지 90, 또는 15 내지 80, 또는 15 내지 70, 또는 15 내지 60, 또는 15 내지 50, 20 내지 100, 또는 20 내지 90, 또는 20 내지 80, 또는 20 내지 70, 또는 20 내지 60, 또는 20 내지 50, 또는 30 내지 100, 또는 30 내지 90, 또는 30 내지 80, 또는 30 내지 70, 또는 30 내지 60, 또는 30 내지 50, 또는 40 내지 100, 또는 40 내지 90, 또는 40 내지 80, 또는 40 내지 70, 또는 40 내지 60, 또는 40 내지 50 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0239] 일부 실시형태에서, K-Ras에 결합하는 앵타머가 제공된다.
- [0240] 일부 실시형태에서, K-Ras에 결합하는 앵타머는 15 내지 100, 또는 15 내지 90, 또는 15 내지 80, 또는 15 내지 70, 또는 15 내지 60, 또는 15 내지 50, 20 내지 100, 또는 20 내지 90, 또는 20 내지 80, 또는 20 내지 70, 또는 20 내지 60, 또는 20 내지 50, 또는 30 내지 100, 또는 30 내지 90, 또는 30 내지 80, 또는 30 내지 70, 또는 30 내지 60, 또는 30 내지 50, 또는 40 내지 100, 또는 40 내지 90, 또는 40 내지 80, 또는 40 내지 70, 또는 40 내지 60, 또는 40 내지 50 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0241] 일부 실시형태에서, TNF-알파에 결합하는 앵타머가 제공된다.
- [0242] 일부 실시형태에서, TNF-알파에 결합하는 앵타머는 15 내지 100, 또는 15 내지 90, 또는 15 내지 80, 또는 15 내지 70, 또는 15 내지 60, 또는 15 내지 50, 20 내지 100, 또는 20 내지 90, 또는 20 내지 80, 또는 20 내지 70,

70, 또는 20 내지 60, 또는 20 내지 50, 또는 30 내지 100, 또는 30 내지 90, 또는 30 내지 80, 또는 30 내지 70, 또는 30 내지 60, 또는 30 내지 50, 또는 40 내지 100, 또는 40 내지 90, 또는 40 내지 80, 또는 40 내지 70, 또는 40 내지 60, 또는 40 내지 50 뉴클레오타이드 길이이다.

[0243] 일부 실시형태에서, 표적에 결합하는 앵타머 분자(예를 들어, 임의의 IL-33, XIAP, K-Ras, TNF-알파)는 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25 또는 적어도 30개 뉴클레오타이드 길이, 또는 5 내지 30, 10 내지 30, 15 내지 30, 5 내지 20, 또는 10 내지 20개 뉴클레오타이드 길이인 앵타머의 5' 말단에서 영역을 포함하되, 상기 앵타머의 5' 말단의 영역은 5-위치 변형 피리미딘을 결여한다.

[0244] 일부 실시형태에서, 표적에 결합하는 앵타머 분자(예를 들어, 임의의 IL-33, XIAP, K-Ras, TNF-알파)는 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25 또는 적어도 30개 뉴클레오타이드 길이, 또는 5 내지 30, 10 내지 30, 15 내지 30, 5 내지 20, 또는 10 내지 20개 뉴클레오타이드 길이인 앵타머의 3' 말단에서 영역을 포함하되, 상기 앵타머의 3' 말단의 영역은 5-위치 변형 피리미딘을 결여하는, 앵타머.

[0245] 일부 실시형태에서, 외상성 뇌손상(TBI) 또는 류마티스 관절염의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 본 명세서에 제공된 앵타머를 투여하는 단계를 포함하는 외상성 뇌손상 또는 류마티스 관절염의 치료 또는 예방 방법이 제공된다.

[0246] 염

[0247] 화합물의 상응하는 염, 예를 들어, 약제학적으로-허용 가능한 염을 제조, 정제 및/또는 조절하는 것이 편리하거나 바람직할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 염의 예는 문헌[Berge et al. (1977) "Pharmaceutically Acceptable Salts" J. Pharm. Sci. 66:1-19]에서 논의된다.

[0248] 예를 들어, 화합물이 음이온성이거나, 또는 음이온성일 수 있는 작용기를 갖는다면(예를 들어, $-COOH$ 는 $-COO^-$ 일 수 있음), 염은 적합한 양이온에 의해 형성될 수 있다. 적합한 무기 양이온의 예는 알칼리 금속 이온, 예컨대, Na^+ 및 K^+ , 알칼리토금속 양이온, 예컨대, Ca^{2+} 및 Mg^{2+} , 및 기타 양이온, 예컨대, Al^{3+} 을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 적합한 유기 양이온의 예는 암모늄 이온(즉, NH_4^+) 및 치환된 암모늄 이온(예를 들어, NH_3R^{X+} , $NH_2R_2^{X+}$, NHR_3^{X+} , NR_4^{X+})을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 적합한 치환된 암모늄 이온의 예는 에틸아민, 다이에틸아민, 디사이클로헥실아민, 트라이에틸아민, 뷰틸아민, 에틸렌다이아민, 에탄올아민, 다이에탄올아민, 피페리딘, 벤질아민, 페닐벤질아민, 콜린, 메글루민 및 트로메타민뿐만 아니라 아미노산, 예컨대, 라이신 및 아르기닌으로부터 유래된 것이다. 공통 4차 암모늄 이온의 예는 $N(CH_3)_4^+$ 이다.

[0249] 화합물이 양이온성이거나, 또는 양이온성(예를 들어, $-NH_2$ 는 $-NH_3^+$ 일 수 있음)일 수 있는 작용기를 갖는다면, 염은 적합한 음이온에 의해 형성될 수 있다. 적합한 무기 음이온의 예는 다음의 무기산으로부터 유래된 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: 염산, 브로민화수소산, 아이오딘화수소산, 황산, 아황산, 질산, 아질산, 인산 및 인.

[0250] 적합한 유기 음이온의 예는 다음의 유기산으로부터 유래된 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: 2-아세톡시벤조산, 아세트산, 아스코르브산, 아스파르트산, 벤조산, 캠퍼실론산, 신남산, 시트르산, 에데트산, 에탄다이설향산, 에탄설향산, 푸마르산, 글루코헵톤산, 글루콘산, 글루탐산, 글리콜산, 하이드록시말레산, 하이드록시나프탈렌 카복실산, 이세티온산, 락트산, 락토바이옉산, 라우르산, 말레산, 말산, 메탄설향산, 점액산, 올레산, 옥살산, 팔미트산, 팜산, 판토텐산, 페닐아세트산, 페닐설향산, 프로피온산, 피루브산, 살리실산, 스테아르산, 석신산, 설파닐산, 타르타르산, 톨루엔설향산 및 발레르산. 적합한 중합체 유기 음이온의 예는 다음의 중합체산으로부터 유래된 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: 탄산, 카복시메틸 셀룰로스.

[0251] 달리 명시되지 않는 한, 특정 화합물에 대한 언급은 또한 이의 염 형태를 포함한다.

[0252] 앵타머를 포함하는 키트

[0253] 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 임의의 앵타머를 포함하는 키트를 제공한다. 이러한 키트는, 예를 들어, 적어도 하나의 앵타머를 포함할 수 있고; 구성성분은 선택적으로, 예를 들어: (a) 약제학적으로 허용 가능한 담체, 예컨대, 용매 또는 용액; (b) 약제학적으로 허용 가능한 부형제, 예컨대, 안정제 또는 완충제; (c) 키트 구성성분을 보유 및/또는 혼합하기 위한 적어도 1개의 용기, 바이알, 또는 장치; 및 (d) 전달 장치 중 적어도

하나를 포함할 수 있다. 키트는 선택적으로 (e) 앵타머에 결합된 표적 분자를 검출하는 데 유용한 표지제; (f) 고체 지지체, 예컨대, 마이크로어레이 또는 비드; 및 (g) 중합효소 연쇄 반응 산물의 정량화와 관련된 시약, 예컨대, 끼어들기 형광 염료 또는 형광 DNA 프로브 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0254] 실시예

[0255] 본 발명의 일부 실시형태를 더 완전하게 예시하기 위해 다음의 실시예를 제시한다. 이들은 결코 본 발명의 광범위한 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 당업자는 본 발명의 정신으로부터 벗어나는 일 없이 다양한 화합물을 설계하기 위해 이러한 발견의 기본 원칙을 용이하게 채택할 수 있다.

[0256] 뉴클레오사이드 트라이포스페이트의 음이온 교환 HPLC 정제를 위한 일반 절차.

[0257] 뉴클레오사이드 트라이포스페이트를, 분취 HPLC 시스템에 설치되고, 278nm에서 검출하는 Source Q 수지(GE Healthcare)가 패키징된 HPLC 칼럼을 이용해서 음이온 교환 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 선형 용리 구배는 2종의 완충제(완충제 A: 10mM 트라이에틸중탄산암모늄/10% 아세트나이트릴, 및 완충제 B: 1M 트라이에틸중탄산암모늄/10% 아세트나이트릴)를 사용하였고, 구배를 용리 과정에 걸쳐 낮은 완충제 B 함량으로부터 높은 완충제 B까지 주위 온도에서 실행한다. 목적하는 생성물은 전형적으로 칼럼으로부터 용리를 위한 최종 물질이었고, 대략 10분에서 12분 체류 시간에 걸쳐 광범위 피크로서 관찰되었다(초기 용리 생성물은 다양한 반응 부산물을 포함하였고, 뉴클레오사이드 다이포스페이트가 가장 유의미하였다). 생성물 용리 동안에 여러 분획을 수집하였다. Waters Symmetry 칼럼(PN:WAT054215)을 갖는 Waters 2795 HPLC 상에서 역상 HPLC에 의해 분획을 분석하였다. 순수 생성물-함유 분획(전형적으로 90% 초과)을 Genevac HT-12 증발기에서 증발시켜 무색 내지 연한 황갈색 수지를 얻었다.

[0258] 뉴클레오사이드 트라이포스페이트의 역상 HPLC 정제를 위한 일반 절차.

[0259] 뉴클레오사이드 트라이포스페이트를, Waters 분취 HPLC 시스템에 설치되고, 278nm에서 검출하는 Waters Novapak C8, 30mm×300mm 칼럼(PN: 186002473)을 이용해서 역상 교환 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 선형 용리 구배는 2종의 완충제(완충제 A: 100mM 트라이에틸중탄산암모늄, 및 완충제 B: 100% 아세트나이트릴)를 사용하였고, 구배를 용리 과정에 걸쳐 낮은 완충제 B 함량으로부터 높은 완충제 B까지 주위 온도에서 실행한다. 목적하는 생성물은 전형적으로 칼럼으로부터 용리를 위한 최종 물질이었고, 대략 5분에서 12분 체류 시간에 걸쳐 광범위 피크로서 관찰되었다(초기 용리 생성물은 다양한 반응 부산물을 포함하였다). 생성물 용리 동안에 여러 분획을 수집하였다. Waters Symmetry 칼럼(PN:WAT054215)을 갖는 Waters 2795 HPLC 상에서 역상 HPLC에 의해 분획을 분석하였다. 순수 생성물-함유 분획(전형적으로 90% 초과)을 Genevac HT-12 증발기에서 증발시켜 무색 내지 연한 황갈색 수지를 얻었다.

[0260] 탈이온수에서 분획을 재구성하였고, 최종 분석을 위해 폴링하였다. 278nm에서 Hewlett Packard 8452A 다이오드 어레이 분광광도계를 이용하는 분석에 의해 생성물 정량화를 수행하였다. 식 $A = \epsilon CL$ 을 통해 생성물 수율을 계산하였고, 여기서, A는 UV 흡광도이며, ϵ 은 추정 흡광 계수이며, L은 경로 길이(1cm)이다.

[0261] 실시예 1: 변형된 데옥시사이티딘의 제조

[0262] 단계 1: 5-(N-카복사마이드)-2'-데옥시사이티딘 유도체(반응식 1, 생성물 2)의 합성:

[0263] 상업적으로 입수 가능한 5-아이오도-2'-데옥시사이티딘(반응식 1, 생성물 1)을 둥근 바닥 플라스크에 채웠고, 무수 N,N-다이메틸폼아마이드(DMF)에 용해시켰다. 출발 물질을 실온에서 24 내지 48시간 동안 필수 방향족 1차 아민(RCH₂NH₂, 4 내지 8 eq.), 일산화탄소(<= 1atm) 및 (Ph₃P)₄Pd(2mol%)에 의한 처리에 의해 상응하는 N-치환된 카복사마이드로 전환시켰다. 박층 크로마토그래피(실리카겔, 용리액: 8 내지 12% 메탄올/다이클로로메탄) 또는 역상 HPLC(2489 검출기가 있는 Waters 2795 HPLC 및 Waters Symmetry 칼럼, 30분에 걸쳐 완충제 A: 100mM 트라이에틸암모늄 아세테이트, 완충제 B: 아세트나이트릴, 구배: 30% 내지 70% 완충제 B를 이용함)에 의해 반응 진행을 모니터링하였다. 얻어진 조질의 반응 혼합물을 셀라이트층을 통해 여과시켜 과량의 촉매 및 고체 부산물을 제거하였다. 이어서, 여과액을 다이클로로메탄 중에 희석시켰고, 탈이온수로 세척하여 과량의 DMF를 제거하였고, 다이클로로메탄층에서 형성된 백색 내지 회백색 결정질 고체를 생성하였다. 고체 물질을 함유하는 유기층을 Schott 보틀에 수집하였고, 실온에서 몇 시간 동안 밤새 교반하였고, 이어서, 여과 후, 고체를 염화메틸렌으로 세척하였다. 필터 케이크를 진공 하에 건조시켰고, 얻어진 백색 내지 회백색 고체 5-변형된 사이티딘 카복사마이드를 대략 50% 내지 70% 수율로 회수하였다.

[0264] 단계 2: 4-N-아세틸-5-(N-카복사마이드)-2'-데옥시사이티딘 유도체(반응식 1, 생성물 3)의 합성:

[0265] 단계 1의 생성물을 둥근 바닥 플라스크에 채웠고, 무수 N,N-다이메틸폼아마이드(DMF)에 용해시키고 나서, 적절 한 무수물(아세트산 무수물 또는 프로피온산 무수물, 2 당량)로 처리하였고, 혼합물을 실온에서 40℃까지 최소 18시간 동안 아르곤 하에 교반하였다. 반응 진행을 HPLC(2489 검출기가 있는 Waters 2795 HPLC, 및 30분에 걸쳐 Waters Symmetry 칼럼, 완충제 A: 100mM 트라이에틸암모늄 아세테이트, 완충제 B: 아세트나이트릴, 구배: 30% 내지 70% 완충제 B)에 의해 모니터링하였다. 반응 완료 시, 조질의 혼합물을 에틸 아세테이트에 희석시키고, 분 별 깔때기에 옮기고 나서, 2% 중탄산나트륨 용액(1×), 탈이온수(1×) 및 염수(1×)로 세척하였다. 유기층을 Schott 보트에 수집하고, 백색 내지 회백색 결정질 고체가 형성되는 동안 밤새 실온에서 몇 시간 동안 교반하였 다. 혼합물을 여과시키고, 고체 및 유리제품을 에틸 아세테이트로 세척하였다. 필터 케이크를 진공 하에 건조시 켜고, 얻어진 백색 내지 회백색 고체 4-N-아세틸-5-변형된 사이티딘 카복스아마이드를 대략 50% 내지 70% 수율 로 회수하였다.

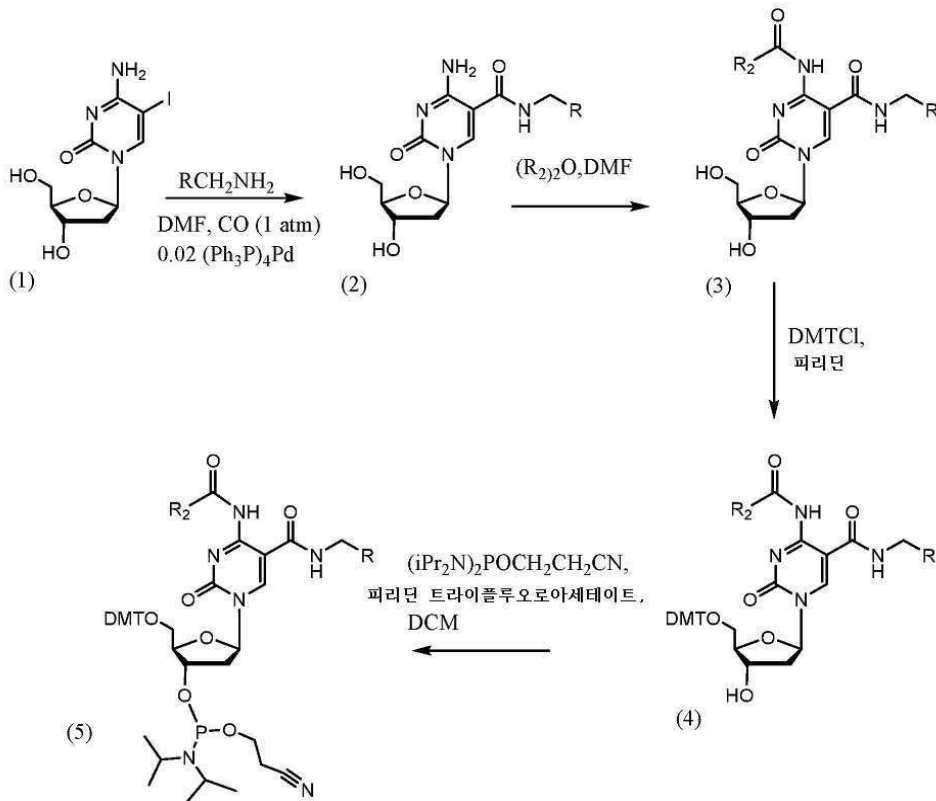
[0266] 단계 3: 5'-O-(4,4'-다이메톡시트라이틸)-4-N-아세틸-5-(N-카복스아마이드)-2'-데옥시사이티딘 유도체(반응식 1, 생성물 4)의 합성:

[0267] 자기 교반하면서 둥근 바닥 플라스크에서, 단계 2의 생성물을 아르곤 하에서 무수 피리딘 중에 용해시켰다. 1시 간 과정에 걸쳐, 4,4'-다이메톡시트라이틸 클로라이드(1.1 당량)를 교반 혼합물에 4 내지 5 부분으로 첨가하였 다. 반응물을 추가 시간 동안 교반하였고, 이어서, 에탄올(6 당량)로 반응을 중단시키고, 반응 혼합물을 끈적한 잔사로 증발시켰다. 조질의 물질을 에틸 아세테이트 중에 용해시켰고, 2% 중탄산나트륨(1×)으로 세척하였고, 황산나트륨으로 건조시키고, 여과 후 오렌지-황색 거품으로 증발시켰다. 조질의 물질을 플래시 칼럼 크로마토그 래피(1% 트라이에틸아민/99% 에틸 아세테이트로 사전 처리한 실리카겔; 생성물을 75% 에틸 아세테이트/25% 헥산 으로 용리시킴)에 의해 정제하였다. 생성물-함유 분획을 농축시켜 70% 내지 80% 수율로 백색 내지 회백색 거품 을 제공하였다.

[0268] 단계 4: 5'-O-(4,4'-다이메톡시트라이틸)-4-N-아세틸-5-(N-카복스아마이드)-2'-데옥시사이티딘-3'-O-(N,N-다이 아이소프로필-0-2-사이아노에틸포스포르아미다이트) 유도체(반응식 1, 생성물 5)의 합성

[0269] 자기 교반하면서 둥근 바닥 플라스크에서, 단계 3의 생성물을 아르곤 하에서 무수 다이클로로메탄 중에 용해시 켜고, 반응 혼합물에 2-사이아노에틸-N,N,N',N'-테트라아이소프로필포스핀(1.5 당량)을 첨가한 후에 피리딘 트 라이플루오로아세테이트(1.7 당량)를 첨가하였다. 반응물을 30 내지 60분 동안 교반하였고, 이어서, 박층 크로 마토그래피(실리카겔, 용리액: 50 내지 60% 에틸 아세테이트/헥산)에 의해 분석하였고, 이는 반응이 완료되었다 는 것을 나타냈다. 조질의 혼합물을 1% 트라이에틸아민/99% 에틸 아세테이트로 사전 조건화한 실리카겔 플래시 칼럼에 적용하였고, 60% 에틸 아세테이트/40% 헥산으로 평형상태로 만들었다. 생성물을 동일한 이동상으로 용리 시키고, 0℃까지 냉각시키고 나서, 아르곤을 살포하고 나서, 아르곤-퍼지 보트에 수집하였다. 생성물-함유 분획 을 농축시켜 70% 내지 80% 수율로 백색 내지 회백색 거품을 제공하였다.

[0270] 반응식 1



[0271]

[0272]

2-사이아노에틸포스포르아미다이트 시약(CEP 시약)의 제조를 위해, 5-(N-카복시아마이드)-2'-데옥시사이티딘 유도체를 선택적으로 N-보호하였고, 이어서, 피리딘 중 4,4'-다이메톡시트라이틸 클로라이드와의 반응에 의해 (4,4'-다이메톡시트라이틸)-유도체(4)로 5'-O-보호하였다(예를 들어, 문헌[Ross et al., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 25, 765-770 (2006)] 참조). 2-사이아노에틸-N,N,N',N'-테트라아이소프로필 포스핀과 3'-알코올의 피리딘류 트라이플루오로아세테이트 촉매 촉합(예를 들어, 문헌[Sanghvi, et al., Organic Process Research & Development, 4, 175-181 (2000)] 참조) 및 탈기 용매를 이용한 실리카겔 플래시 크로마토그래피에 의한 최종 정제(예를 들어, 문헌[Still et al., J. Org. Chem., 43, 2923-2925 (1978)] 참조)로 고순도(>98%) CEP 시약(5)의 합성을 완료하였다.

[0273]

5'-트라이포스페이트 시약(TPP 시약, 반응식 2)의 제조를 위해, 5'-O-DMT-보호된 뉴클레오사이드(반응식 1 또는 2, 생성물 4)를 피리딘 중 아세트산 무수물로 아세틸화시킨 후, 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(반응식 2, 생성물 6)을 이용해서 DMT 및 4-N-아세틸 보호기를 절단하였다(예를 들어, 문헌[Leonard and Neelima, Tetrahedron Letters, 36(43), 7833-7836 (1995)] 참조). 얻어진 결정질 3'-O-아세테이트화된 뉴클레오사이드는 Ludwig-Eckstein 공정에 의해 조질의 5'-O-트라이포스페이트로 전환되었다(Ludwig, J. and Eckstein, F. J. Org. Chem., 1989, 54:631) (반응식 2, 생성물 7). 이들 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드는 고순도(>90%)를 얻기 위해 일반적으로 2단계 정제 공정: 음이온-교환 크로마토그래피(AEX) 다음에 역상 분취 HPLC를 필요로 한다.

[0274]

실시예 1-1: 5-[(N-(3,3-다이페닐프로필)카복시아마이드)-2'-데옥시사이티딘(DPPdC) 유도체의 제조

[0275]

5-[(N-(3,3-다이페닐프로필)카복시아마이드)-2'-데옥시사이티딘 뉴클레오사이드(반응식 1, 생성물 2)의 합성: 상업적으로 입수 가능한 5-아이오도-2'-데옥시사이티딘(반응식 1, 생성물 1, 20g, 56.8mmol)을 둥근 바닥 플라스크에 채웠고, 무수 N,N-다이메틸폼아마이드(DMF, 137mL)에 용해시켰다. 출발 물질을 실온에서 24 내지 48시간 동안 필수 방향족 1차 아민(3,3-다이페닐프로필아민, (51.6g, 244mmol, 4.3 eq.), 일산화탄소(<= 1atm), 비스(다이벤질리덴 아세톤) 팔라듐(0)(1.14g, 2mmol, 0.035 eq) 및 트라이페닐포스핀(2.34g, 8.5mmol, 0.15 eq)에 의한 처리에 의해 상응하는 N-치환된 카복시아마이드로 전환시켰다. 박층 크로마토그래피(실리카겔, 용리액: 8 내지 12% 메탄올/다이클로로메탄) 또는 역상 HPLC(2489 검출기가 있는 Waters 2795 HPLC 및 Waters Symmetry 칼럼, 30분에 걸쳐 완충제 A: 100mM 트라이에틸암모늄 아세테이트, 완충제 B: 아세트나이트릴, 구배: 30% 내지 70% 완충제 B를 이용함)에 의해 반응 진행을 모니터링하였다. 얻어진 조질의 반응 혼합물 셀라이트층을 통해 여과시켜

과량의 촉매 및 고체 부산물을 제거하였다. 이어서, 여과액을 다이클로로메탄 중에 회석시켰고, 탈이온수로 세척하여 과량의 DMF를 제거하였고, 다이클로로메탄층에서 형성된 백색 내지 회백색 결정질 고체를 생성하였다. 고체 물질을 함유하는 유기층을 Schott 보트에 수집하였고, 실온에서 몇 시간 동안 밤새 교반하였고, 이어서, 여과 후, 고체를 염화메틸렌으로 세척하였다. 필터 케이크를 진공 하에 건조시켰고, 얻어진 백색 내지 회백색 고체 5-변형된 사이티딘 카복사아미드를 회수하였다(14.65g, 56% 수율). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 8.37 (s, 1H), 8.14(t, J = 5.3 Hz, 1H), 7.99 (bs, 1H), 7.69 (bs, 1H), 7.24-7.33 (m, 8H), 7.13-7.21 (m, 2H), 6.12 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 5.24 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 5.09 (t, J = 5.6 Hz), 4.22-4.30 (m, 1H), 4.03 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 3.83 (t, J_A = 7.5, J_B = 3.9 Hz, 1H), 3.55-3.72 (m, 2H), 3.08 (dd, J_A = 13.5, J_B = 6.0 Hz, 2H), 2.10-2.32 (m, 4H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): δ = 170.53 (1C), 165.72 (1C), 163.98 (1C), 153.93 (1C), 145.19 (2C), 145.14 (2C), 144.13 (1C), 128.91 (4C), 128.09 (2C), 128.07 (2C), 126.59 (2C), 99.74 (1C), 86.44 (1C), 85.59 (1C), 75.07 (1C), 61.68 (1C), 48.52 (1C), 38.37 (1C), 37.93 (1C), 34.67 (1C), 21.32 (1C). $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_5$ 에 대한 MS (m/z), 464.52; 실측치 463.2 $[\text{M-H}]^-$ (ESI^-).

[0276]

4-*N*-아세틸-5-[3,3-다이페닐프로필]카복사아미드]-2'-데옥시사이티딘 뉴클레오사이드(반응식 1, 1, 생성물 3)의 합성: 앞 단계의 생성물(반응식 1, 생성물 2, 14.5g, 31.2mmol)을 둥근 바닥 플라스크에 채웠고, 무수 N,N-다이메틸폼아미드(DMF, 284ml) 중에 용해시키고, 아세트산 무수물(5.9ml, 62mmol, 2 eq)로 처리하고 나서, 혼합물을 실온 내지 40°C에서 아르곤 하에 대략 5.5시간 동안 교반하였다. 반응 진행을 HPLC(2489 검출기가 있는 Waters 2795 HPLC, 및 30분에 걸쳐 Waters Symmetry 칼럼, 완충제 A: 100mM 트라이에틸암모늄 아세테이트, 완충제 B: 아세트나이트릴, 구배: 30% 내지 70% 완충제 B)에 의해 모니터링하였다. 반응 완료 시, 조질의 혼합물을 에틸 아세테이트에 회석시키고, 분별 깔때기에 옮기고 나서, 2% 중탄산나트륨 용액(1×), 탈이온수(1×) 및 염수(1×)로 세척하였다. 유기층을 Schott 보트에 수집하고, 미세한 결정질 고체가 형성되는 동안 밤새 실온에서 몇 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 여과시키고, 고체 및 유리체품을 에틸 아세테이트로 세척하였다. 필터 케이크를 진공 하에 건조시켰고, 얻어진 백색 내지 회백색 고체 생성물을 회수하였다(12.04g, 76% 수율). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 11.32 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.36-8.45 (m, 1H), 7.23-7.36 (m, 8H), 7.11-7.20 (m, 2H), 6.09 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 5.24-5.31 (m, 1H), 4.22-4.32 (m, 1H), 3.88-3.94 (m, 1H), 3.57-3.75 (m, 2H), 3.05-3.16 (m, 2H), 2.36-2.41 (bs, 3H), 2.14-2.36(m, 4H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): δ = 170.63 (1C), 164.80 (1C), 159.17 (1C), 152.64 (1C), 145.45 (1C), 144.58/144.56 (2C), 144.56 (1C), 128.36 (4C), 127.52 (4C), 126.03 (2C), 99.94(1C), 88.09 (1C), 86.89 (1C), 69.35 (1C), 60.55 (1C), 47.92 (1C), 40.51 (1C), 37.98 (1C), 33.91 (1C), 26.10 (1C). $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_6$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 506.56; 실측치 505.3 $[\text{M-H}]^-$ (ESI^-).

[0277]

5'-*O*-(4,4'-다이메톡시트라이틸)-4-*N*-아세틸-5-[*N*-(3,3-다이페닐프로필)카복사아미드]-2'-데옥시사이티딘(반응식 1, 생성물 4)의 합성: 자기 교반하면서 둥근 바닥 플라스크에서, 앞 단계의 생성물(반응식 1, 생성물 3, 12.2g, 24.1mmol)을 아르곤 하에 무수 피리딘(80ml) 중에 용해시켰다. 1시간 과정에 걸쳐, 4,4'-다이메톡시트라이틸 클로라이드(9.2g, 27.0mmol, 1.1 eq)를 교반 혼합물에 4부분으로 첨가하였다. 반응물을 추가 시간 동안 교반하였고, 이어서, 에탄올(9.5ml, 163mmol, 6.8 당량)로 반응을 중단시키고, 반응 혼합물을 끈적한 잔사로 증발시켰다. 조질의 물질을 에틸 아세테이트 중에 용해시키고, 분별 깔때기에 옮기고 나서, 2% 중탄산나트륨(1×)으로 세척하였다. 유기층을 수집하였고, 황산나트륨으로 건조시키고 나서, 여과 후 오렌지색-황색 거품으로 증발시켰다. 조질의 물질을 플래시 칼럼 크로마토그래피(1% 트라이에틸아민/99% 에틸 아세테이트로 사전 처리한 실리카겔; 생성물을 80% 내지 90% 에틸 아세테이트/20% 내지 10% 헥산으로 용리시킴)에 의해 정제하였다. 생성물-함유 분획을 농축시켜 백색 내지 회백색 거품(15.27g, 78% 수율)을 제공하였다. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 11.36 (s, 1H), 8.57 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.09-7.39 (m, 19H), 6.72-6.87 (d, 4H), 6.10 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 5.15 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 4.35 (dt, J_A = 9.9, J_B = 4.5 Hz 1H), 4.08-3.98 (m, 1H), 3.92 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 3.68 (d, J = 2.4 Hz, 6H), 3.17-3.31 (m, 2H), 2.78-3.02 (m, 2H), 2.33-2.46 (m, 4H), 2.17-2.29 (m, 1H), 1.92-2.11 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): δ = 170.61 (1C), 164.61 (1C), 159.26 (1C), 157.93/157.90 (2C), 152.54 (1C), 144.97 (1C), 144.65 (1C), 144.23 (2C),

135.40/135.35 (2C), 129.57 (1C), 129.49 (1C), 128.34 (4C), 127.66 (1C), 127.54 (1C), 127.41/127.40 (4C), 126.51 (1C), 126.04 (2C), 113.00 (4C), 99.94(1C), 87.39 (1C), 86.32 (1C), 85.60 (1C), 69.90 (1C), 59.66 (1C), 54.85/54.82 (2C), 48.27 (1C), 40.37 (1C), 38.16 (1C), 33.73 (1C), 26.13 (1C). $C_{48}H_{48}N_4O_8$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 808.93; 실측치 807.3 $[M-H]^-$ (ESI $^-$).

[0278]

5'-O-(4,4'-다이메톡시트라이틸)-4-N-아세틸-5-[N-(3,3-다이페닐프로필)카복사아마이드]-2'-데옥시사이티딘-3'-O-(N,N-다이아이소프로필-O-2-사이아노에틸포스포라미다이트)(반응식 1, 생성물 5)의 합성: 자기 교반하면서 둥근 바닥 플라스크에서, 앞 단계의 생성물(반응식 1, 생성물 4, 14.0g, 17.3mmol)을 아르곤 하에서 무수 다이클로로메탄(43ml) 중에 용해시켰다. 반응 혼합물에 2-사이아노에틸-N,N,N',N'-테트라아이소프로필포스핀(8.2ml, 26mmol, 1.5 eq) 다음에, 피리디늄 트라이플루오로아세테이트(5.4g, 28.2mmol, 1.6 eq)를 첨가하였다. 반응물을 30분 동안 교반하였고, 이어서, 박층 크로마토그래피(실리카겔, 용리액: 60% 에틸 아세테이트/40% 헥산)에 의해 분석하였고, 이는 반응이 완료되었다는 것을 나타냈다. 조질의 혼합물을 1% 트라이에틸아민/99% 에틸 아세테이트로 사전 조건화한 실리카겔 플래시 칼럼에 적용하였고, 60% 에틸 아세테이트/40% 헥산으로 평형상태로 만들었다. 생성물을 동일한 이동상으로 용리시키고, 0℃까지 냉각시키고 나서, 아르곤을 살포하고 나서, 아르곤-퍼지 보틀에 수집하였다. 생성물-함유 분획을 농축시켜 백색 내지 회백색 거품(13.85g, 79% 수율)을 제공하였다. ^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.36 (s, 1H), 8.56 (bt, 1H), 8.41-8.47 (d, 1H), 7.11-7.37 (m, 19H), 6.74-6.83 (d, 4H), 6.03-6.10 (m, 1H), 4.30-4.44 (m, 1H), 4.12-4.22 (m, 1H), 3.91 (dd, J_A = 14.1, J_B = 7.5 Hz, 1H), 3.63-3.78 (m, 7H), 3.43-3.62 (m, 3H), 3.22-3.37 (m, 2H), 2.79-3.02 (m, 2H), 2.75 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 2.64 (t, J = 6.0, Hz, 1H), 2.33-2.45 (m, 5H), 1.94-2.08 (m, 2H), 1.11 (dd, J_A = 12.3, J_B = 6.6 Hz 12H), 0.97 (d, J = 6.6 Hz, 3H). ^{31}P -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 147.56/147.56 (s, 1P). $C_{57}H_{65}N_6O_9P$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 1009.15; 실측치 1007.3 $[M-H]^-$ (ESI $^-$).

[0279]

5-[N-(3,3-다이페닐프로필)카복사아마이드]-3'-O-아세틸-2'-데옥시사이티딘 뉴클레오사이드(반응식 2, 생성물 6)의 합성: 자기 교반하면서 둥근 바닥 플라스크에서, 출발 물질(반응식 2, 생성물 4, 1.26g, 1.56mmol)을 아르곤 하에서 무수 피리딘(10ml) 중에 용해시켰다. 아세트산 무수물(1ml, 10.5mmol, 6.7 eq)을 교반 혼합물에 첨가하였다. 반응물을 29시간 동안 교반하고 나서, 반응 진행을 HPLC(2489 검출기가 있는 Waters 2795 HPLC, 및 30분에 걸쳐 Waters Symmetry 칼럼, 완충제 A: 100mM 트라이에틸암모늄 아세테이트, 완충제 B: 아세토나이트릴, 구배: 75% 완충제 B 등용매)에 의해 모니터링하였다. 조질의 혼합물을 증발시켰고, 두 아세톤 공증발로 인한 황색 거품을 회수하였다. 잔사를 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(10ml, 95mmol) 중에 용해시켰고(Leonard, N. J. *Tetrahedron Letters*, 1995, 36:7833), 대략 50℃에서 16시간 동안 가열하였다. DMT 기의 완전 절단을 TLC(5% 메탄올/다이클로로메탄)에 의해 확인하였다. 적색 용액을 잘 교반된 메탄올(대략 75ml)에 부어서 반응 중단시켰다. 얻어진 황색 용액을 진공 하에 농축시키고, 잔사를 뜨거운 에틸 아세테이트(20ml)에 용해시켰다. 냉각 시 생성물은 결정화되었고, 얻어진 슬러리를 0℃에서 교반한 후에, 여과시켰고, 에틸 아세테이트로 세척하였다. 3'-O-아세틸-뉴클레오사이드(생성물 6)를 백색 고체(0.55g, 70% 수율)로서 단리시켰다. ^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.38 (s, 1H), 8.26 (bt, J = 4.8 Hz, 1H), 8.04 (bs, 1H), 7.77 (bs, 1H), 7.24-7.41 (m, 8H), 7.12-7.23 (m, 2H), 6.17 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 5.23-5.30 (m, 1H), 5.18 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 3.98-4.14 (m, 2H), 3.62-3.77 (m, 2H), 3.10 (dd, J_A = 12.3, J_B = 6.6 Hz, 2H), 2.35-2.48 (m, 2H), 2.22-2.35 (m, 2H), 2.08 (s, 3H). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 170.53 (1C), 165.72 (1C), 163.98 (1C), 153.93 (1C), 145.19 (2C), 145.14 (2C), 144.13 (1C), 128.91 (4C), 128.09 (2C), 128.07 (2C), 126.59 (2C), 99.74 (1C), 86.44 (1C), 85.59 (1C), 75.07 (1C), 61.68 (1C), 48.52 (1C), 38.37 (1C), 37.93 (1C), 34.67 (1C), 21.32 (1C). $C_{27}H_{30}N_4O_6$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 506.56; 실측치 506.2 $[M-H]^-$ (ESI $^-$).

[0280]

5-[N-(3,3-다이페닐프로필)카복사아마이드]-2'-데옥시사이티딘-5'-O-트라이포스페이트(트리스-트라이에틸암모늄 염)(7)의 합성: 트라이포스페이트(7)를 500 μ mol-규모($5\times$)에서 Ludwig and Eckstein(Ludwig, J. and Eckstein, F. J. *Org. Chem.* 1989, 54:631)의 절차에 의해 3'-O-아세틸-뉴클레오사이드(6)로부터 합성하였다. 조질의 트라이포스페이트 생성물을, 암모니아분해 및 증발 후에, 일반 절차(위)에 기재한 바와 같이 음이온 교환 크로마토그래피 및 역상 크로마토그래피에 의해 정제하였다. $[\epsilon_{est.} 13.700cm^{-1} M^{-1}]$ 단리된 정제 생성물은 59.8 μ mol

(12% 수율)이었다. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ = 7.95 (s, 1H), 7.22-7.28 (m, 4H), 7.11-7.19 (m, 4H), 6.97-7.05 (m, 2H), 6.05 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 4.51 (오중선, J = 3.0 Hz, 1H), 4.10-4.17 (m, 3H), 3.92 (t, J = 7.5Hz, 1H), 3.29-3.40 (m, 1H), 3.18.-3.29 (m, 1H), 3.00 (q, J = 7.5 Hz, 19H), 2.25-2.37 (m, 3H), 2.11-2.22 (m, 1H), 1.11 (t, J = 7.2 Hz, 29H). $^{13}\text{C-NMR}$ (80 MHz, DMSO-d_6): δ = 165.52 (1C), 163.55 (1C), 155.78 (1C), 145.35/145.38 (2C), 142.70 (1C), 128.81 (4C), 127.45 (4C), 126.18/126.20 (2C), 100.74 (1C), 86.84 (1C), 85.86/85.98 (1C), 70.70 (1C), 65.27/65.34 (1C), 49.60 (1C), 46.50 (3C), 39.76 (1C), 39.01 (1C), 33.50 (1C), 8.17 (3C). $^{31}\text{P-NMR}$ (100 MHz, D_2O): δ = -9.94 (d, J = 16.7 Hz, 1P), -11.60 (d, J = 17.0 Hz, 1P), -23.30 (t, J = 17 Hz, 1P). $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{P}_3$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 703.45; 실측치 703.1 $[\text{M-H}]^-$ (ESI^-).

[0281] 실시예 1-2: 5-[*N*-(4-페닐벤질)카복사아마이드]-2'-데옥시사이티딘(PBndC) 유도체의 제조

[0282] 5-[*N*-(4-페닐벤질)카복사아마이드]-2'-데옥시사이티딘 뉴클레오사이드(반응식 1, 생성물 2)의 합성: 상업적으로 입수 가능한 5-아이오도-2'-데옥시사이티딘(반응식 1, 생성물 1, 20.87g, 69.1mmol)을 둥근 바닥 플라스크에 채웠고, 무수 N,N -다이메틸폼아마이드(DMF, 150mL)에 용해시켰다. 출발 물질을 실온에서 24 내지 48시간 동안 4-페닐벤질아민, (47.83g, 261mmol, 4.2 eq.), 일산화탄소($\leq 1\text{atm}$), 비스(다이벤질리덴 아세톤) 팔라듐(0)(1.25g, 2.17mmol, 0.035 eq) 및 트라이페닐포스펜(2.54g, 9.7mmol, 0.15 eq)에 의한 처리에 의해 상응하는 N -치환된 카복사아마이드로 전환시켰다. 박층 크로마토그래피(실리카겔, 용리액: 8 내지 12% 메탄올/다이클로로메탄) 또는 역상 HPLC(2489 검출기가 있는 Waters 2795 HPLC 및 Waters Symmetry 칼럼, 30분에 걸쳐 완충제 A: 100mM 트라이에틸암모늄 아세테이트, 완충제 B: 아세트나이트릴, 구배: 30% 내지 70% 완충제 B를 이용함)에 의해 반응 진행을 모니터링하였다. 얻어진 조질의 반응 혼합물 셀라이트층을 통해 여과시켜 과량의 촉매 및 고체 부산물을 제거하였다. 이어서, 여과액을 다이클로로메탄 중에 희석시켰고, 탈이온수로 세척하여 과량의 DMF를 제거하였고, 수성층과 다이클로로메탄층에서 형성된 백색 내지 회백색 결정질 고체를 생성하였다. 고체 물질을 함유하는 각 층을 그 자체의 Schott 보틀에 별개로 수집하였고, 실온에서 몇 시간 동안 밤새 교반하였고, 이어서, 여과 후, 고체를 염화메틸렌으로 세척하였다. 필터 케이크를 진공 하에 건조시켰고, 얻어진 백색 내지 회백색 고체 5-변형된 사이티딘 카복사아마이드를 회수하였다(17.00g, 63% 수율). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 8.85 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.62-7.73 (m, 4H), 7.36-7.52 (m, 5H), 6.20 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 5.30 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 5.12 (t, J = 5.4, 1H), 4.43-4.56 (m, 2H), 4.28-4.34 (1H), 3.88 (dd, J_A = 7.8, J_B = 4.2 Hz), 3.60-3.73 (d, J = 4.2 Hz, 2H), 2.24 (t, J = 6.0, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): δ = 166.70 (1C), 164.75 (1C), 154.77 (1C), 145.08 (1C), 141.20 (1C), 140.04 (1C), 139.70 (1C), 130.18 (2C), 129.03 (2C), 128.59 (2C), 127.92 (2C), 127.82 (2C), 99.98 (1C), 88.88 (1C), 87.07 (1C), 71.24 (1C), 62.28 (1C), 43.24 (1C), 41.41 (1C). $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_5$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 436.47; 실측치 435.2 $[\text{M-H}]^-$ (ESI^-).

[0283] 4-*N*-프로피온일-5-[(4-페닐벤질)카복사아마이드]-2'-데옥시사이티딘 뉴클레오사이드(반응식 1, 생성물 3)의 합성: 앞 단계의 생성물(반응식 1, 생성물 2, 16.83g, 38.62mmol)을 둥근 바닥 플라스크에 채우고, 무수 N,N -다이메틸폼아마이드(DMF, 350mL) 중에 용해시키고 나서, 프로피온산 무수물(10mL, 80mmol, 2 eq)로 처리하고 혼합물을 아르곤 하에서 40°C에서 대략 6시간 동안 교반하였다. 반응 진행을 HPLC(2489 검출기가 있는 Waters 2795 HPLC, 및 30분에 걸쳐 Waters Symmetry 칼럼, 완충제 A: 100mM 트라이에틸암모늄 아세테이트, 완충제 B: 아세트나이트릴, 구배: 30% 내지 70% 완충제 B)에 의해 모니터링하였다. 반응 완료 시, 조질의 혼합물을 다이클로로메탄 중에 희석시키고, 분별 깔때기에 옮기고 나서, 탈이온수(1×)로 세척하였다. 유기층 및 수성층을 별개의 Schott 보틀에 수집하였고, 결정질 고체가 형성되는 동안 밤새 실온에서 몇 시간 동안 밤새 교반하였다. 얻어진 혼합물을 여과시키고, 고체 및 유리제품을 에틸 아세테이트로 세척하였다. 필터 케이크를 진공 하에 건조시켰고, 얻어진 백색 내지 회백색 고체 생성물을 회수하였다(12.74g, 767% 수율). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 11.39 (s, 1H), 9.03 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.76 (s, 1H), 7.62-7.69 (m, 4H), 7.41-7.50 (m, 4H), 7.33-7.40 (m, 1H), 6.12 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 5.30 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 5.13 (t, J = 5.3, 1H), 4.40-4.58 (m, 2H), 4.23-4.34 (1H), 3.93 (dd, J_A = 7.8, J_B = 3.9 Hz, 1H), 3.58-3.76 (d, J = 4.2 Hz, 2H), 2.81

(dd, $J_A = 14.7$, $J_B = 7.2$ Hz, 2H), 2.31-2.48 (m, 1H), 2.18-2.29 (m, 1H), 1.06 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (80 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 174.58$ (1C), 165.58 (1C), 159.75 (1C), 153.28 (1C), 146.18 (1C), 140.42 (1C), 139.38 (1C), 138.46 (1C), 129.39 (2C), 128.41 (2C), 127.83 (1C), 127.14 (2C), 127.06 (2C), 100.49 (1C), 88.69 (1C), 87.49 (1C), 70.15 (1C), 61.22 (1C), 42.75 (1C), 40.98 (1C), 31.74 (1C), 9.04 (1C). $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_6$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 492.53; 실측치 491.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (ESI $^-$).

[0284]

5'-*O*-(4,4'-다이메톡시트라이틸)-4-*N*-아세틸-5-[*N*-(4-페닐벤질)카복사아마이드]-2'-데옥시사이티딘 유도체(반응식 1, 생성물 4)의 합성: 자기 교반하면서 둥근 바닥 플라스크에서, 앞 단계의 생성물(16.01g, 32.5mmol)을 아르곤 하에 무수 피리딘(108mL) 중에 용해시켰다. 1시간 과정에 걸쳐, 4,4'-다이메톡시트라이틸 클로라이드(13.13g, 38.8mmol, 1.1 eq)를 교반 혼합물에 5부분으로 첨가하였다. 반응물을 추가 15분 동안 교반하였고, 이어서, 에탄올(11.5mL, 195mmol, 6 eq)로 반응을 중단시키고, 반응 혼합물을 끈적한 잔사로 증발시켰다. 조질의 물질을 따듯한 다이클로로메탄 중에 용해시키고, 분별 깔때기에 옮기고 나서, 2% 중탄산나트륨(1×)으로 세척하였다. 유기층을 수집하였고, 황산나트륨으로 건조시키고 나서, 여과 후 오렌지색-황색 거품으로 증발시켰다. 조질의 물질을 플래시 칼럼 크로마토그래피(1% 트라이에틸아민/99% 에틸 아세테이트로 사전 처리한 실리카겔; 생성물을 80% 내지 90% 에틸 아세테이트/20% 내지 10% 헥산으로 용리시킴)에 의해 정제하였다. 생성물-함유 분획을 농축시켜 백색 내지 회백색 거품(15.27g, 78% 수율)을 제공하였다. ^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 11.49$ (s, 1H), 9.13 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.59-7.68 (m, 2H), 7.52-7.59 (m, 2H), 7.42-7.51 (m, 2H), 6.12 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 5.33 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.26 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H), 4.13-4.22 (m, 1H), 4.00-4.09 (m, 1H), 3.71 (bs, 6H), 3.19-3.33 (m, 2H), 2.83 (dd, $J_A = 14.4$, $J_B = 7.2$, 2H), 2.35-2.46 (m, 1H), 2.21-2.33 (m, 1H), 1.07 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 174.59$ (1C), 165.47 (1C), 159.84 (1C), 158.53 (1C), 153.15 (1C), 146.06 (1C), 145.28 (1C), 140.35 (1C), 139.41 (1C), 138.13 (1C), 136.00 (1C), 130.17 (1C), 130.11 (1C), 129.39 (2C), 128.49 (2C), 128.13 (1C), 127.85 (1C), 127.14 (1C), 127.07 (2C), 127.04 (2C), 113.61 (4C), 100.48 (1C), 87.98 (1C), 86.19 (1C), 70.70 (1C), 64.41 (1C), 55.41 (2C), 42.79 (1C), 40.73 (1C), 31.83 (1C), 9.04 (1C). $\text{C}_{47}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_8$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 794.90; 실측치 793.3 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (ESI $^-$).

[0285]

5'-*O*-(4,4'-다이메톡시트라이틸)-4-*N*-아세틸-5-[*N*-(4-페닐벤질)카복사아마이드]-2'-데옥시사이티딘-3'-*O*-(*N,N*-다이아이소프로필-*O*-2-사이아노에틸포스포르아미다이트)(반응식 1, 생성물 5)의 합성: 자기 교반하면서 둥근 바닥 플라스크에서, 단계 3(반응식 1, 생성물 4, 11.88g, 14.9mmol)의 생성물을 아르곤 하에 무수 다이클로로메탄(38mL) 중에 용해시켰다. 반응 혼합물에 2-사이아노에틸-*N,N,N',N'*-테트라아이소프로필포스핀(8mL, 25.2mmol, 1.5 eq)을 첨가한 후에, 피리딘 트라이플루오로아세테이트(4.75g, 24.6mmol, 2.1 eq)를 첨가하였다. 반응물을 30분 동안 교반하였고, 이어서, 박층 크로마토그래피(실리카겔, 용리액: 60% 에틸 아세테이트/40% 헥산)에 의해 분석하였고, 이는 반응이 완료되었다는 것을 나타냈다. 조질의 혼합물을 1% 트라이에틸아민/99% 에틸 아세테이트로 사전 조건화한 실리카겔 플래시 칼럼에 적용하였고, 60% 에틸 아세테이트/40% 헥산으로 평형상태로 만들었다. 생성물을 동일한 이동상으로 용리시키고, 0°C까지 냉각시키고 나서, 아르곤을 살포하고 나서, 아르곤-퍼지 보틀에 수집하였다. 생성물-함유 분획을 농축시켜 백색 내지 회백색 거품(12.04g, 81% 수율)을 제공하였다. ^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 11.48$ (s, 1H), 9.12 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H), 8.54/8.57 (s, 1H), 7.59-7.66 (m, 2H), 7.51-7.58 (m, 2H), 7.43-7.50 (m, 2H), 7.18-7.40 (m, 12H), 6.77-6.89 (m, 4H), 6.03-6.13 (m, 1H), 4.12-4.47 (m, 4H), 3.70 (s, 6H), 3.43-3.780 (m, 4H), 3.22-3.36 (m, 2H), 2.82 (dd, $J_A = 14.9$, $J_B = 7.4$ Hz, 2H), 2.76 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 2.64 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 2.36-2.46 (m, 2H), 1.02-1.17 (m, 12H), 0.98 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H). ^{31}P -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 147.55/147.35$ (s, 1P). $\text{C}_{56}\text{H}_{63}\text{N}_6\text{O}_9\text{P}$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 995.13; 실측치 993.4 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (ESI $^-$).

[0286]

5-[*N*-(4-페닐벤질) 카복사아마이드]-3'-*O*-아세틸-2'-데옥시사이티딘 뉴클레오사이드(반응식 2, 생성물 6)의 합성: 자기 교반하면서 둥근 바닥 플라스크에서, 출발 물질(반응식 2, 생성물 4, 1.26g, 1.56mmol)을 아르곤 하에 무수 피리딘(10mL) 중에 용해시켰다. 아세트산 무수물(1mL, 10.5mmol, 6.7 eq)을 교반 혼합물에 첨가하였다.

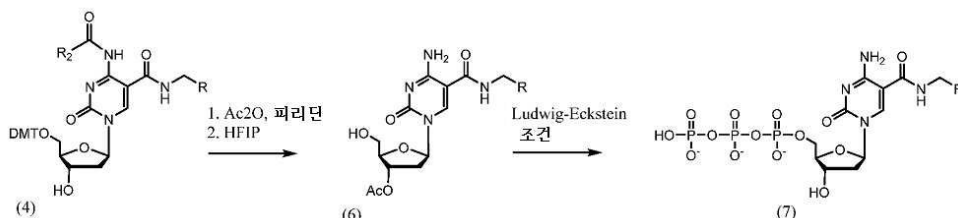
반응물을 16.5시간 동안 교반하였고, 반응 진행을 TLC(8% 메탄올/다이클로로메탄)에 의해 모니터링하였다. 조질의 혼합물을 증발시켜 연한 황색 거품을 회수하였다. 잔사를 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(10mℓ, 95mmol) 중에 용해시켰고(Leonard, N. *J. Tetrahedron Letters*, **1995**, 36:7833), 대략 50℃에서 22.25시간 동안 가열하였다. DMT 기의 완전 절단을 TLC(8% 메탄올/다이클로로메탄)에 의해 확인하였다. 적색 용액을 잘 교반된 메탄올(대략 75mℓ)에 부어서 반응 중단시켰다. 얻어진 황색 용액을 진공 하에 농축시키고, 잔사를 뜨거운 에틸 아세테이트(20mℓ)에 용해시켰다. 냉각 시 생성물은 결정화되었고, 얻어진 슬러리를 0℃에서 교반한 후에, 여과시켰고, 에틸 아세테이트로 세척하였다. 3'-*O*-아세틸-뉴클레오사이드(6)를 백색 고체(0.45g, 56% 수율)로서 단리시켰다. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.86 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.99-8.18 (bs, 1H), 7.75-7.88 (bs, 1H), 7.60-7.68 (m, 4H), 7.32-7.51 (m, 5H), 6.16 (dd, J_A = 8.1, J_B = 6.0 Hz, 1H), 5.20-5.27 (m, 1H), 5.14 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.38-4.53 (m, 2H), 4.06 (dd, J_A = 5.7, J_B = 3.9 Hz, 1H), 3.59-3.72 (m, 2H), 2.28-2.47 (m, 2H), 2.07 (s, 3H). ¹³C-NMR (80 MHz, DMSO-d₆): δ = 170.52 (1C), 165.85 (1C), 164.00 (1C), 153.88 (1C), 144.44 (1C), 140.43 (1C), 139.29 (1C), 138.56 (1C), 129.40 (2C), 128.28 (2C), 127.82 (1C), 127.154 (2C), 127.05 (2C), 99.52 (1C), 86.44 (1C), 85.55 (1C), 75.11 (1C), 61.67 (1C), 42.50 (1C), 37.79 (1C), 21.33 (1C). C₂₅H₂₆N₄O₆에 대한 MS (*m/z*) 계산치, 478.51; 실측치 477.2 [M-H]⁻ (ESI⁻).

[0287]

5-[*N*-(4-페닐벤질)카복시아마이드]-2'-데옥시유리딘-5'-*O*-트라이포스페이트(트리스-트라이에틸암모늄 염)(반응식 2, 생성물 7)의 합성: 트라이포스페이트(7)를 500 μmol-규모(5×)에서 Ludwig and Eckstein(Ludwig, J. and Eckstein, F. *J. Org. Chem.* **1989**, 54:631)의 절차에 의해 3'-*O*-아세틸-뉴클레오사이드(6)로부터 합성하였다. 조질의 트라이포스페이트 생성물을, 암모니아분해 및 증발 후에, 일반 절차(위)에 기재한 바와 같이 음이온 교환 크로마토그래피 및 역상 크로마토그래피에 의해 정제하였다. [ε_{est.} 13,700cm⁻¹ M⁻¹] 단리된 정제 생성물은 275 μmol(55% 수율)이었다. ¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 8.40 (s, 1H), 7.51-7.60 (m, 4H), 7.32-7.43 (m, 4H), 7.25-7.33 (m, 1H), 6.09 (t, J=6.5 Hz, 1H), 4.57 (오중선, J = 3.6 mHz, 1H), 4.43 (q, J = 15.3 Hz, 2H), 4.11-4.23 (m, 3H), 3.00 (q, J = 7.5 Hz, 19H), 2.31-2.42 (m, 1H), 2.16-2.90 (m, 1H), 1.135 (t, J = 7.2 Hz, 31H). ¹³C-NMR (75 Hz, D₂O): δ = 166.29 (1C), 163.67 (1C), 155.92 (1C), 143.40 (1C), 140.04 (1C), 139.14 (1C), 138.02 (1C), 129.07 (2C), 128.00 (2C), 86.89 (1C), 86.07/85.96 (1C), 70.50 (1C), 65.23/65.16 (1C), 41.01 (3C), 42.95 (1C), 39.88 (1C), 8.16 (3C). ³¹P-NMR (100 MHz, D₂O): δ = 8.60 (d, J = 16.9 Hz, 1P), -11.40 (d, J = 16.8 Hz, 1P), -23.00 (t, J = 17.0 Hz, 1P). C₂₅H₂₆N₄O₁₄P₃에 대한 MS (*m/z*) 계산치, 675.40; 실측치 675.1 [M-H]⁻ (ESI⁻).

[0288]

반응식 2



[0289]

[0290]

실시예 2: 변형된 데옥시유리딘의 제조

[0291]

단계 1: 5'-*O*-(4,4'-다이메톡시트라이틸)-5-(*N*-카복시아마이드)-2'-데옥시유리딘 유도체(반응식 3, 생성물 9)의 합성:

[0292]

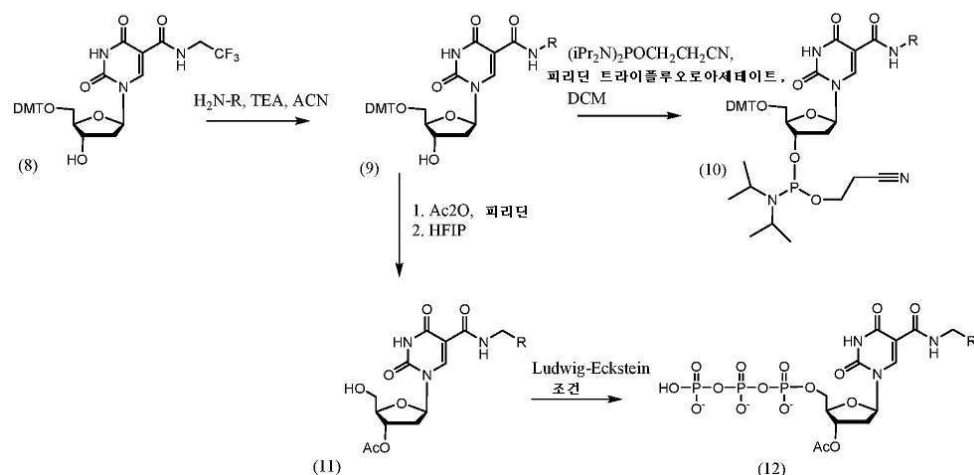
출발 물질인 5'-*O*-다이메톡시트라이틸-5-트라이플루오로에톡시카보닐-2'-데옥시유리딘(반응식 3, 생성물 8)을 Matsuda 등(Noruma, Y.; Ueno, Y.; Matsuda, A. *Nucleic Acids Research* **1997**, 25:2784-2791; Ito, T.; Ueno, Y.; Matsuda, A. *Nucleic Acid Research* **2003**, 31:2514-2523)의 절차에 의해 제조하였다. (8), 필수 방향족 1 차 아민(RCH₂NH₂(1.3 당량), 트라이에틸아민(2 당량) 및 무수 아세트나이트릴의 용액을 비활성 분위기 하에 40

내지 50℃에서 18 내지 24시간 동안 가열하였다. (8)의 아마이드(9)로의 정량적 전환을 박층 크로마토그래피(실리카겔, 5% 메탄올/다이클로로메탄) 또는 HPLC에 의해 확인하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시키고, 잔사를 1% 트라이에틸아민/에틸 아세테이트 중 0 내지 3% 메탄올의 용리액을 이용해서 실리카겔 플래시 크로마토그래피(Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*:2923)에 의해 정제하였다. 순수한 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 증발시켜 (9)를 백색 거품으로서 80 내지 90% 수율로 얻었다.

[0293] **단계 2: 5'-O-(4,4'-다이메톡시트라이틸)-5-(N-카복시아마이드)-2'-데옥시유리딘-3'-CE 포스포르아미다이트 유도체(반응식 3, 생성물 10)의 합성:**

[0294] 자기 교반하면서 둥근 바닥 플라스크에서, DMT-보호된 뉴클레오사이드(9)를 아르곤 하에 무수 다이클로로메탄 중에 용해시켰다. 반응 혼합물에 2-사이아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필 포스핀(1.05 당량)을 첨가하고, 피리딘을 트라이플루오로아세테이트(1.1 당량)를 첨가하였다. 반응물을 30 내지 60분 동안 교반하였고, 이어서, 박층 크로마토그래피(실리카겔, 용리액: 5% 메탄올/95% 다이클로로메탄)에 의해 분석하였고, 이는 반응이 완료되었다는 것을 나타냈다. 조질의 혼합물을 1% 트라이에틸아민/20% 헥산/79% 에틸 아세테이트로 평형상태로 만든 실리카겔 플래시 칼럼에 적용하였고, 생성물을 동일한 이동상으로 용리시키고, 0℃까지 냉각시키고 나서, 아르곤을 살포하고 나서, 아르곤-퍼지 보틀에 수집하였다. 생성물-함유 분획을 농축시켜 80% 내지 90% 수율로 백색 내지 회백색 거품을 제공하였다.

[0295] **반응식 3**



[0296]

[0297] 5'-트라이포스페이트 시약(TPP 시약, 반응식 3, 생성물 12)의 제조를 위해, 5'-O-DMT-보호된 뉴클레오사이드(반응식 3, 생성물 9)를 피리딘 중 아세트산 무수물로 아세틸화한 후, 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(HFIP, 반응식 3, 생성물 11)로 DMT를 절단하였다(예를 들어, 문헌[Leonard and Neelima, 1995] 참조). 얻어진 결정질 3'-O-아세틸화된 뉴클레오사이드는 Ludwig-Eckstein(Ludwig, J. and Eckstein, F. *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*:631) 공정(반응식 3, 생성물 12)에 의해 조질의 5'-O-트라이포스페이트로 전환되었다. 이들 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드는 고순도(>90%)의 목적하는 생성물을 얻기 위해 일반적으로 2단계 정제 공정: 음이온-교환 크로마토그래피(AEX) 다음에 역상 분취 HPLC를 필요로 한다.

[0298] **실시예 2-1: 5-[N(3,3-다이페닐프로필) 카복시아마이드]-2'-데옥시유리딘(DPPdU) 유도체(반응식 3)의 제조**

[0299] **5'-O-(4,4'-다이메톡시트라이틸)-5-[N(3,3-다이페닐프로필) 카복시아마이드]-2'-데옥시유리딘(반응식 3, 생성물 9)의 합성:** 출발 물질, 5'-O-다이메톡시트라이틸-5-트라이플루오로에톡시카보닐-2'-데옥시유리딘(반응식 3, 생성물 8, 10.55g, 16.6mmol))을 건조, 아르곤-퍼지 둥근 바닥 플라스크에 채웠다. 건조 아세트나이트릴(22ml) 및 3,3-다이페닐프로필아민(4.38g, 20.7mmol, 1.25 eq)을 플라스크에 첨가하고, 혼합물을 교반하여 고체를 용해시켰다. 트라이에틸아민(4.6ml, 33.2mmol, 2 eq)을 교반 혼합물에 첨가하였고, 이를 수욕에 옮기고 나서, 비활성 분위기 하에 40℃에서 가열하였다. 반응 진행을 역상 HPLC(2489 검출기가 있는 Waters 2795 HPLC, 및 30분에 걸쳐 Waters Symmetry 칼럼, 완충제 A: 100mM 트라이에틸암모늄 아세테이트, 완충제 B: 아세트나이트릴, 구배: 70% 완충제 B 등용매)에 의해 모니터링하였다. 대략 6.5시간 교반한 후에, 분석은 반응이 완료되었다는 것을 나타냈다. 혼합물을 실온에서 추가 16시간 동안 교반하였고, 교반을 중단하였을 때, 용매를 증발시켜 노르스름한 거품을 회수하였다. 조질의 혼합물을 1% 트라이에틸아민/79% 에틸 아세테이트/20% 헥산으로 평형상태로 만든 실

리카겔 플래시 칼럼에 적용하였다. 생성물을 처음에 동일한 이동상으로 용리시키고, 이는 용리가 99% 에틸 아세테이트/1% 트라이에틸아민 및 최종적으로 2% 메탄올/97% 에틸 아세테이트/1% 트라이에틸아민으로 진행됨에 따라 변형되어 용리가 완료되었다. 생성물-함유 분획을 농축시켜 백색 내지 회백색 거품(11.58g, 91% 수율)을 제공하였다. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3CN): δ = 8.65 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.43-7.48 (m, 2H), 7.26-7.383 (m, 14H), 7.16-7.23 (m, 3H), 6.87 (dd, J_A = 9.0, J_B = 2.1 Hz, 4H), 6.12 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 4.29 (td, J_A = 10.1, J_B = 3.8 Hz, 1H), 3.98-4.05 (m, 2H), 3.75 (d, J = 0.6, 6H), 3.29 (d, J = 4.2 Hz, 2H), 3.19-3.27 (m, 2H), 2.19-2.44 (m, 4H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3CN): δ = 163.24 (1C), 7.43-7.48 (m, 2H), 7.26-7.383 (m, 14H), 7.16-7.23 (m, 3H), 6.87 (dd, J_A =9.0, J_B =2.1 Hz, 4H), 6.12 (t, J =6.6 Hz, 1H), 4.29 (td, J_A =10.1, J_B = 3.8 Hz, 1H), 3.98-4.05 (m, 2H), 3.75 (d, J = 0.6, 6H), 3.29 (d, J = 4.2 Hz, 2H), 3.19-3.27 (m, 2H), 2.19-2.44 (m, 4H).). $\text{C}_{46}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_8$, 767.88에 대한 MS (m/z) 계산치; 실측치 766.2 [M-H] $^-$ (ESI $^-$).

[0300]

5'-*O*-(4,4'-다이메톡시트라이틸)-4-*N*-아세틸-5-[*N*-(3,3-다이페닐프로필) 카복사아마이드]-2'-데옥시유리딘-3'-*O*-(*N,N*-다이아이소프로필-*O*-2-사이아노에틸포스포라미다이트) (반응식 3, 생성물 10)의 합성: 자기 교반하면서 둥근 바닥 플라스크에서, 앞 단계의 생성물(반응식 3, 생성물 9, 10.36g, 13.5mmol)을 아르곤 하에서 무수 다이클로로메탄(34ml) 중에 용해시켰다. 반응 혼합물에 2-사이아노에틸-*N,N,N',N'*-테트라아이소프로필포스핀(4.5 ml, 14.2mmol, 1.05 eq)을 첨가한 후에 피리딘 트라이플루오로아세테이트(2.98g, 14.9mmol, 1.1 eq)를 첨가하였다. 반응물을 1.25시간 동안 교반하였고, 이어서, 박층 크로마토그래피(실리카겔, 용리액: 60% 에틸 아세테이트/40% 헥산)에 의해 분석하였고, 이는 반응이 완료되었다는 것을 나타냈다. 조질의 혼합물을 50% 에틸 아세테이트/49% 헥산/1% 트라이에틸아민으로 평형상태로 만든 실리카겔 플래시 칼럼에 적용하였고, 증가된 농도의 에틸 아세테이트를 이용해서 생성물 용리를 달성하였고, 59% 에틸 아세테이트/40% 헥산/1% 트라이에틸아민을 이용해서 최종 분획을 용리시켰다. 모든 이동상을 0°C로 냉각시켰고, 아르곤을 살포하고 나서, 생성물을 아르곤-퍼지 보트에 수집하였다. 생성물-함유 분획을 농축시켜 백색 내지 회백색 거품(8.97g, 69% 수율)을 제공하였다. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 12.93 (s, 1H), 8.70 (t, J =5.7 Hz, 1H), 8.47/8.46 (s, 1H), 7.12-7.40 (m, 19H), 6.86 (dd, J_A = 9.0, J_B = 2.4 Hz, 4H), 6.04-6.13 (m, 1H), 4.28-4.40 (m, 1H), 4.03-4.12 (m, 1H), 3.92-4.01 (m, 1H), 3.69/3.68 (s, 6H), 3.64-3.76 (m, 1H), 3.40-3.62 (m, 4H), 3.11-3.31 (m, 4H), 2.75 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 2.64 (td, J_A = 6.0, J_B = 0.8 Hz, 1H), 2.36-2.47 (m, 2H), 2.26 (dd, J_A = 14.4, J_B = 7.2 Hz 2H), 1.10 (dd, J_A = 12.3, J_B = 6.6 Hz 9H), 0.95 (d, J = 9.3 Hz, 3H). $^{31}\text{P-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 147.22/147.58 (s, 1P). $\text{C}_{55}\text{H}_{62}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 968.10; 실측치 966.3 [M-H] $^-$ (ESI $^-$).

[0301]

5-[*N*-(3,3-다이페닐프로필) 카복사아마이드]-3'-*O*-아세틸-2'-데옥시유리딘 뉴클레오사이드(반응식 3, 생성물 11)의 합성 자기 교반하면서 둥근 바닥 플라스크에서, 출발 물질(반응식 3, 생성물 9, 0.953g, 1.24mmol)을 아르곤 하에서 무수 피리딘(10ml) 중에 용해시켰다. 아세트산 무수물(1ml, 10.5mmol, 8.5 eq)을 교반 혼합물에 첨가하였다. 반응물을 25시간 실온에서 교반하였고, 박층 크로마토그래피(TLC, 80% 에틸 아세테이트/20% 헥산)에 의해 반응 완료를 확인하였다. 조질의 혼합물을 증발시켰고, 톨루엔에서 공증발시켜 연한 황색 내지 황갈색 거품을 회수하였다. 잔사를 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(HFIP, 10ml, 95mmol) 중에 용해시켰고(Leonard, N. J. *Tetrahedron Letters*, 1995, 36:7833), 대략 50°C에서 18시간 동안 가열하였다. DMT 기의 완전 절단을 TLC(5% 메탄올/다이클로로메탄)에 의해 확인하였다. 적색 용액을 잘 교반된 메탄올(대략 50 내지 75ml)에 부어서 반응 중단시켰다. 얻어진 황색 용액을 진공 하에 농축시키고, 잔사를 뜨거운 에틸 아세테이트(10 내지 20 ml)에 용해시켰다. 냉각 시 생성물은 결정화되었고, 얻어진 슬러리를 0°C에서 교반한 후에, 여과시켰고, 에틸 아세테이트로 세척하였다. 3'-*O*-아세틸-뉴클레오사이드(생성물 11)를 백색 고체(0.40g, 64% 수율)로서 단리시켰다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 11.94 (s, 1H), 8.77 (bt, J = 5.8 Hz, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.22-7.35 (m, 8H), 7.16 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 6.14 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 5.22-5.26 (m, 1H), 5.19 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.63 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.10 (dd, J_A = 5.2, J_B = 3.2 Hz, 1H), 3.58-3.67 (m, 2H), 2.31-2.41 (m,

2H), 2.26 (dd, $J_A = 14.0$, $J_B = 7.2$ Hz, 2H), 2.06 (s, 3H). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 170.46$ (1C), 163.69 (1C), 161.81 (1C), 150.07 (1C), 146.15 (1C), 144.99 (2C), 128.93 (4C), 128.02 (4C), 126.61 (2C), 106.14 (1C), 85.85 (1C), 85.77 (1C), 75.23 (1C), 61.65 (1C), 48.70 (1C), 38.05 (1C), 37.84 (1C), 34.97 (1C), 21.30 (1C). $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 507.54; 실측치 506.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (ESI^-).

[0302]

5- $\{N$ -(3,3-다이페닐프로필)카복사마이드}-2'-데옥시유리딘-5'- O -트라이포스페이트(트리스-트라이에틸암모늄 염) (반응식 3, 생성물 12)의 합성: 트라이포스페이트(12)를 500 μmol -규모($5\times$)에서 Ludwig 및 Eckstein(Ludwig, J. and Eckstein, F. *J. Org. Chem.* 1989, 54:631)의 절차에 의해 3'- O -아세틸-뉴클레오사이드(11)로부터 합성하였다. 조질의 트라이포스페이트 생성물을, 암모니아분해 및 증발 후에, 일반 절차(위)에 기재한 바와 같이 음이온 교환 크로마토그래피 및 역상 크로마토그래피에 의해 정제하였다. [$\epsilon_{\text{est.}}$ 13.700 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$] 단리된 정제 생성물은 59.8 μmol (12% 수율)이었다. ^1H -NMR (300 MHz, D_2O): $\delta = 7.95$ (s, 1H), 7.22-7.28 (m, 4H), 7.11-7.19 (m, 4H), 6.96-7.05 (d, 2H), 6.05 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 4.51 (오중선, $J = 3.0$ Hz, 1H), 4.10-4.18 (m, 3H), 3.92 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.17-3.40 (m, 2H), 2.90 (q, $J = 7.5$ Hz, 19H), 2.25-2.38 (m, 3H), 2.11-2.22 (m, 1H), 1.11 (t, $J = 7.5$ Hz, 29H). ^{31}P -NMR (100 MHz, D_2O): $\delta = -9.93$ (d, $J = 20.3$ Hz, 1P), -11.63 (d, $J = 20.9$ Hz, 1P), -11.63 (d, $J = 20.9$ Hz, 1P). $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{P}_3$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 704.43; 실측치 704.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (ESI^-).

[0303]

실시예 2-1: 5- $\{N$ -(2-(4-바이페닐에틸) 카복사마이드)-2'-데옥시유리딘(BPEDU) 유도체(반응식 3)의 제조

[0304]

5'- O -(4,4'-다이메톡시트라이틸)- 5- $\{N$ -(2-(4-바이페닐에틸) 카복사마이드)-2'-데옥시유리딘(반응식 3, 생성물 9)의 합성: 출발 물질, 5'- O -다이메톡시트라이틸-5-트라이플루오로에톡시카보닐-2'-데옥시유리딘(반응식 3, 생성물 8, 10.45g, 15.9mmol))을 건조, 아르곤-퍼지 둥근 바닥 플라스크에 채웠다. 건조 아세트나이트릴(20mL) 및 2-(4-바이페닐) 에틸아민(3.81g, 19.1mmol, 1.2 eq)을 플라스크에 첨가하고, 혼합물을 교반하여 고체를 용해시켰다. 트라이에틸아민(4.4mL, 31.8mmol, 2 eq)을 교반 혼합물에 첨가하였고, 이를 수욕에 옮기고 나서, 비활성 분위기 하에 40°C에서 가열하였다. 반응 진행을 박층 크로마토그래피(실리카겔, 용리액: 8% 메탄올/다이클로로메탄) 및 역상 HPLC(2489 검출기가 있는 Waters 2795 HPLC, 및 30분에 걸쳐 Waters Symmetry 칼럼, 완충제 A: 100mM 트라이에틸암모늄 아세테이트, 완충제 B: 아세트나이트릴, 구배: 70% 완충제 B 등용매)에 의해 모니터링하였다. 대략 6시간 교반한 후에, 분석은 반응이 여전히 완료되지 않았다는 것을 나타냈다. 혼합물을 실온에서 추가 16시간 동안 교반하였고, 재분석하였고, 완료를 확인하였다. 교반을 중단하였고, 용매를 증발시켜 노르스름한 거품을 회수하였다. 조질의 혼합물을 1% 트라이에틸아민/79% 에틸 아세테이트/20% 헥산으로 평형상태로 만든 실리카겔 플래시 칼럼에 적용하였다. 생성물을 처음에 동일한 이동상으로 용리시켰고, 이는 0 내지 2% 메탄올/1% 트라이에틸아민/에틸 아세테이트로 진행됨에 따라 변형되어 용리가 완료되었다. 생성물-함유 분획을 농축시켜 백색 내지 회백색 거품(10.89g, 91% 수율)을 제공하였다. ^1H -NMR (300 MHz, CD_3CN): $\delta = 8.69$ (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 8.57 (s, 1H), 7.57-7.67 (m, 4H), 7.44-7.50 (m, 4H), 7.29-7.40 (m, 8H), 7.20-7.26 (m, 1H), 6.86-6.92 (m, 4H), 6.11 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.28 (dt, $J_A = 7.5$, $J_B = 3.9$ Hz, 1H), 4.01 (dd, $J_A=8.3$, $J_B=4.3$ Hz, 1H), 3.61 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.30 (d, $J = 4.2$ Hz, 2H), 2.90 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.33-2.43 (m, 1H), 2.19-2.29 (m, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3CN): $\delta = 163.02$ (1C), 161.59 (1C), 158.65 (1C), 149.45 (1C), 145.53 (1C), 145.08 (1C), 140.61 (1C), 138.94 (1C), 138.83 (1C), 135.88 (1C), 135.87 (1C), 130.09 (1C), 130.08 (1C), 129.32 (2C), 128.88 (2C), 128.04 (2C), 127.88 (2C), 127.26 (1C), 126.95 (2C), 126.79 (2C), 126.75 (1C), 113.13 (2C), 113.11 (2C), 105.75 (1C), 86.42 (1C), 86.37 (1C), 86.31 (1C), 71.03 (1C), 63.55 (1C), 54.89 (2C), 40.34 (1C), 40.25 (1C), 34.92 (1C). $\text{C}_{45}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_8$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 753.85; 실측치 745.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (ESI^-).

[0305]

5'- O -(4,4'-다이메톡시트라이틸)- 5- $\{N$ -(2-(4-바이페닐에틸) 카복사마이드)-2'-데옥시유리딘-3'- O -(N,N -다이아이스프로필- O -2-사이아노에틸포스포르아미다이트)(반응식 3, 생성물 10)의 합성: 자기 교반하면서 둥근 바닥 플라스크에서, 앞 단계의 생성물(반응식 3, 생성물 9, 18.76g, 24.9mmol)을 아르곤 하에서 무수 다이클로로메탄(62mL) 중에 용해시켰다. 반응 혼합물에 2-사이아노에틸- N,N,N',N' -테트라아이스프로필포스핀(8.3mL, 26.1mmol,

1.05 eq)을 첨가한 후에 피리딘 트라이플루오로아세트이트(5.40g, 14.9mmol, 1.1 eq)를 첨가하였다. 반응물을 30 분 동안 교반하였고, 이어서, 박층 크로마토그래피(실리카겔, 용리액: 5% 메탄올/다이클로로메탄)에 의해 분석하였고, 이는 반응이 완료되었다는 것을 나타냈다. 조질의 혼합물을 69% 에틸 아세테이트/30% 헥산/1% 트라이에틸아민으로 평형상태로 만든 실리카겔 플래시 칼럼에 적용하였고, 증가된 농도의 에틸 아세테이트를 이용해서 생성물 용리를 달성하였고, 79% 에틸 아세테이트/20% 헥산/1% 트라이에틸아민을 이용해서 최종 분획을 용리시켰다. 모든 이동상을 0°C로 냉각시켰고, 아르곤을 살포하고 나서, 생성물을 아르곤-퍼지 보틀에 수집하였다. 생성물-함유 분획을 농축시켜 백색 내지 회백색 거품(20.97g, 88% 수율)을 제공하였다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 11.93 (s, 1H), 8.78 (t, J =5.7 Hz, 1H), 8.52/8.50 (s, 1H), 7.55-7.68 (m, 4H), 7.11-7.49 (m, 16H), 6.84-6.92 (m, 4H), 6.03-6.13 (m, 1H), 4.29-4.41 (m, 1H), 4.07-4.13 (m, 1H), 3.73 (s, 6H), 3.42-3.70 (m, 6H), 3.18-3.31 (m, 2H), 2.83 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.75 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.64 (td, J_A = 6.0, J_B = 0.9 Hz, 1.5H), 2.36-2.46 (m, 2H), 1.10 (dd, J_A = 12.3, J_B = 6.6 Hz, 12H), 0.96 (d, J = 6.9 Hz, 2H). $^{31}\text{P-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 147.32/147.66 (s, 1P). $\text{C}_{54}\text{H}_{60}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 954.07; 실측치 952.6 $[\text{M-H}]^-$ (ESI $^-$).

[0306]

5'-O-(4,4'-다이메톡시트라이틸)- 5-{N-[2-(4-바이페닐) 에틸 카복사마이드]}-3'-O-아세틸-2'-데옥시유리딘 뉴클레오사이드(반응식 3, 생성물 11)의 합성: 자기 교반하면서 둥근 바닥 플라스크에서, 출발 물질(반응식 3, 생성물 9, 0.98g, 1.30mmol)을 아르곤 하에서 무수 피리딘(10mL) 중에 용해시켰다. 아세트산 무수물(1mL, 10.5mmol, 8.1 eq)을 교반 혼합물에 적가하였다. 반응물을 25시간 실온에서 교반하였고, 박층 크로마토그래피(TLC, 80% 에틸 아세테이트/20% 헥산)에 의해 반응 완료를 확인하였다. 조질의 혼합물을 증발시켜 연한 황색 내지 황갈색 거품을 회수하였다. 잔사를 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(10mL, 95mmol) 중에 용해시켰고 (Leonard, N. J. *Tetrahedron Letters*, 1995, 36:7833), 대략 50°C에서 17시간 동안 가열하였다. DMT 기의 완전 절단을 TLC(5% 메탄올/다이클로로메탄)에 의해 확인하였다. 적색 용액을 잘 교반된 메탄올(대략 25 내지 30 mL)에 부어서 반응 중단시켰다. 고체는 거의 바로 형성되기 시작하였고; 차가운 아이소프로필 에터를 이용한 여과에 의해 생성물을 회수하여 필터 케이크를 세척하였을 때, 혼합물을 대략 18시간 교반하였다. 3'-O-아세틸-뉴클레오사이드(생성물 11)를 백색 고체(0.680g, 대략 100% 수율)로서 단리시켰다. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 11.99 (s, 1H), 8.80 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.76 (s, 1H), 7.64 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.45 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.31-7.37 (m, 4H), 6.14 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 5.22-5.26 (m, 1H), 5.19 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 4.09 (d, J =1.5 Hz, 1H), 3.62 (dd, J_A = 7.5, J_B = 4.0 Hz, 2H), 3.62 (dd, J_A = 7.5, J_B = 4.0 Hz, 2H), 2.84 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.30-2.40 (m, 2H), 2.06 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3CN): δ = 170.50 (1C), 165.59 (1C), 161.85 (1C), 150.03 (1C), 146.30 (1C), 140.42 (1C), 139.05 (1C), 138.54 (1C), 129.72 (2C), 129.37 (1C), 127.70 (1C), 127.14 (2C), 126.96 (2C), 106.03 (1C), 85.87 (1C), 85.80 (1C), 75.25 (1C), 61.65(1C), 40.57 (1C), 38.10 (1C), 35.33 (1C), 21.30 (1C). $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_7$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 493.52; 실측치 492.1 $[\text{M-H}]^-$ (ESI $^-$).

[0307]

5'-O-(4,4'-다이메톡시트라이틸)- 5-{N-[2-(4-바이페닐)에틸 카복사마이드]}-2'-데옥시유리딘-5'-O-트라이포스페이트(트리스-트라이에틸암모늄 염)(반응식 3, 생성물 12)의 합성: 트라이포스페이트(12)를 500 μmol -규모(5 $\times$)에서 Ludwig and Eckstein(Ludwig, J. and Eckstein, F. *J. Org. Chem.* 1989, 54:631)의 절차에 의해 3'-O-아세틸-뉴클레오사이드(11)로부터 합성하였다. 조질의 트라이포스페이트 생성물을, 암모니아분해 및 증발 후에, 일반 절차(위)에 기재한 바와 같이 음이온 교환 크로마토그래피 및 역상 크로마토그래피에 의해 정제하였다. [$\epsilon_{\text{est.}}$ 13.700cm $^{-1}$ M $^{-1}$] 단리된 정제 생성물은 182 μmol (35.9% 수율)이었다. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ = 8.38 (s, 1H), 7.55-7.61 (m, 5H), 7.40-7.46 (m, 2H), 7.32-7.37 (m, 3H), 6.11 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 4.53 (오중선, J = 3.2 Hz, 1H), 4.16-4.21 (m, 1H), 4.09-4.15 (m, 2H), 3.60 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.14 (q, J = 7.2 Hz, 24H), 2.89 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.25-2.40 (m, 2H), 2.26 (m, 1H), 1.22 (t, J = 7.2 Hz, 36H). $^{31}\text{P-NMR}$ (100 MHz, D_2O): δ = -10.91 (d, J = 19.8 Hz, 1P), -11.41 (d, J = 19.9 Hz, 1P), -23.32 (t, J = 19.8 Hz, 1P). $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{P}_3$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 690.41; 실측치 690.1 $[\text{M-H}]^-$ (ESI $^-$).

[0308] 실시예 2-3. 5'-[N-(4-펜옥시페닐메틸) 카복사마이드]-2'-데옥시유리딘(POPdU) 유도체(반응식 3)의 제조:

[0309] 5'-O-(4,4'-다이메톡시트라이틸)-5-[N-(4-펜옥시페닐메틸)카복사마이드]-2'-데옥시유리딘(반응식 3, 생성물 9)의 합성: 출발 물질, 5'-O-다이메톡시트라이틸-5-트라이플루오로에톡시카보닐-2'-데옥시유리딘(반응식 3, 생성물 8, 28.47g, 43.4mmol)을 건조, 아르곤-퍼지 둥근 바닥 플라스크에 채웠다. 건조 아세트나이트릴(54mℓ) 및 4-펜옥시페닐메틸아민(10.38g, 52.1mmol, 1.2 eq)을 플라스크에 첨가하고, 혼합물을 교반하여 고체를 용해시켰다. 트라이에틸아민(12mℓ, 86.8mmol, 2 eq)을 교반 혼합물에 첨가하였다. 반응물을 실온에서 비활성 분위기 하에 22시간 동안 교반하였다. 이때, 반응 진행을 역상 HPLC(2489 검출기가 있는 Waters 2795 HPLC, 및 30분에 걸쳐 Waters Symmetry 칼럼, 완충제 A: 100mM 트라이에틸암모늄 아세테이트, 완충제 B: 아세트나이트릴, 구배: 70% 완충제 B 등용매)에 의해 평가하였고, 완료된 것을 발견하였다. 교반을 중단하였고, 용매를 증발시켜 노르스름한 거품을 회수하였다. 조질의 혼합물을 99% 에틸 아세테이트 1% 트라이에틸아민으로 평형상태로 만든 실리카겔 플래시 칼럼에 적용하였다. 생성물을 처음에 동일한 이동상으로 용리시켰고, 이는 0 내지 1.5% 메탄올/1% 트라이에틸아민/에틸 아세테이트로 진행됨에 따라 변형되어 용리가 완료되었다. 생성물-함유 분획을 농축시켜 백색 내지 회백색 거품(28.89g, 88% 수율)을 제공하였다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 9.25 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 7.40-7.22 (m, 15H), 7.15-7.19 (m, 1H), 7.08-7.17 (m, 1H), 6.92-7.00 (m, 6H), 6.84-6.90 (m, 4H), 6.10 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 4.40-4.52 (m, 2H), 4.11 (dt, J_A = 10.4, J_B = 4.0 Hz, 1H), 3.95 (dd, J_A = 8.6, J_B = 4.4 Hz, 1H), 3.70 (d, J = 1.6, 6H), 3.19 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 2.25-2.33 (m, 1H), 2.16-2.24 (m, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 163.39 (1C), 161.21 (1C), 158.49 (1C), 158.47 (1C), 157.31 (1C), 155.88 (1C), 150.42 (1C), 145.83 (1C), 145.34 (1C), 135.93(1C), 135.81 (1C), 134.98 (1C), 130.45 (2C), 130.26 (2C), 130.15 (2C), 129.54 (2C), 123.63 (1C), 118.74 (2C), 118.69 (2C), 113.68/ 113.67 (4C), 105.56 (1C), 86.38 (1C), 86.31 (1C), 86.20 (1C), 70.88 (1C), 64.09 (1C), 55.41/55.40 (2C), 44.85 (1C), 40.56 (1C). $\text{C}_{44}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_9$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 755.82; 실측치 754.2 $[\text{M-H}]^-$ (ESI $^-$).

[0310] 5'-O-(4,4'-다이메톡시트라이틸)-5-[N-(4-펜옥시페닐메틸) 카복사마이드]-2'-데옥시유리딘-3'-O-(N,N-다이아 이소프로필-O-2-사이아노에틸포스포라미다이트)(반응식 3, 생성물 10)의 합성: 자기 교반하면서 둥근 바닥 플라스크에서, 앞 단계의 생성물(반응식 3, 생성물 9, 29.14g, 38.6mmol)을 아르곤 하에서 무수 다이클로로메탄 (100mℓ) 중에 용해시켰다. 반응 혼합물에 2-사이아노에틸-N,N,N',N'-테트라아이스프로필포스핀(12mℓ, 40.5mmol, 1.05 eq)을 첨가한 후에 피리딘 트라이플루오로아세테이트(8.30g, 43.0mmol, 1.1 eq)를 첨가하였다. 반응물을 3 시간 동안 교반하였고, 이어서, 박층 크로마토그래피(실리카겔, 용리액: 55% 에틸 아세테이트/45% 헥산)에 의해 분석하였고, 이는 반응이 완료되었다는 것을 나타냈다. 조질의 혼합물을 59% 에틸 아세테이트/40% 헥산/1% 트라이에틸아민으로 평형상태로 만든 실리카겔 플래시 칼럼에 적용하였고, 0℃까지 냉각시킨 동일한 이동상을 이용해서 생성물 용리를 달성하였고, 아르곤을 살포하고, 아르곤-퍼지 보틀에 생성물을 수집하였다. 생성물-함유 분 획을 농축시켜 백색 내지 회백색 거품(30.25g, 82% 수율)을 제공하였다. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.98 (s, 1H), 9.09 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 8.53 8.52 (s, 1H), 7.08-7.40 (m, 14H), 6.91-7.00 (m, 4H), 6.82-6.87 (m, 4H), 6.04-6.13 (m, 1H), 4.29-4.55 (m, 3H), 4.05-4.14 (m, 1H), 3.71 (bs, 6H), 3.46-3.70 (m, 4H), 3.18-3.31 (m, 2H), 2.75 (t, J = 6.0, 1H), 2.64 (td, J_A = 6.0, J_B = 0.3 Hz, 1H), 2.37-2.48 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 0.97 (d, J = 6.9 Hz, 2H). $^{31}\text{P-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 147.32/ 147.65 (s, 1P). $\text{C}_{53}\text{H}_{58}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 956.05; 실측치 954.3 $[\text{M-H}]^-$ (ESI $^-$).

[0311] 5'-O-(4,4'-다이메톡시트라이틸)-5-[N-(4-펜옥시페닐메틸) 카복사마이드]-2'-데옥시유리딘(반응식 3, 생성물 11)의 합성: 자기 교반하면서 둥근 바닥 플라스크에서, 출발 물질(반응식 3, 생성물 9, 0.79g, 1.05mmol)을 아르곤 하에서 무수 피리딘(10mℓ) 중에 용해시켰다. 아세트산 무수물(1mℓ, 10.5mmol, 10 eq)을 첨가하고, 교반 혼합 물에 적가하였다. 반응물을 20시간 실온에서 교반하였고, 박층 크로마토그래피(TLC, 80% 에틸 아세테이트/20% 헥산)에 의해 반응 완료를 확인하였다. 조질의 혼합물을 톨루엔과 함께 공증발시켜 연한 황색 내지 황갈색 거품 을 회수하였다. 잔사를 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(HFIP, 10mℓ, 95mmol) 중에 용해시켰고(Leonard, N. J. *Tetrahedron Letters*, 1995, 36:7833), 대략 50℃에서 16시간 동안 가열하였다. DMT 기의 완전 절단을

TLC(5% 메탄올/다이클로로메탄)에 의해 확인하였다. 적색 용액을 잘 교반된 메탄올(대략 20 내지 30mL)에 부어서 반응 중단시켰다. 거의 바로 소량의 고체가 형성되기 시작하였다. 혼합물의 용적은 증발에 의해 대략 50%만큼 감소되었고, 혼합물을 대략 1시간 동안 교반하였다. 이때까지, 혼합물은 고체에 의해 걸쭉하게 되었고, 차가운 아이소프로필 에터를 이용해서 여과함으로써 생성물을 회수하여 필터 케이크를 세척하였다. 3'-O-아세틸-뉴클레오사이드(생성물 11)를 백색 고체(0.36g, 69% 수율)로서 분리시켰다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.94 (s, 1H), 9.12 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 8.79 (s, 1H), 7.27-7.41 (m, 2H), 7.32 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.12 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.92-7.02 (m, 4H), 6.15 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 5.24 (bt, J = 2.4 Hz, 1H), 5.19 (bt, J = 4.4 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.10 (bdd, J_A = 5.0, J_B = 3.4 Hz, 1H), 3.58-3.68 (m, 2H), 2.29-2.42 (m, 2H), 2.06 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 170.48 (1C), 163.63 (1C), 161.96 (1C), 157.32 (1C), 155.91 (1C), 155.91 (1C), 146.49 (1C), 134.78 (1C), 130.47 (2C), 129.60 (2C), 123.75 (1C), 119.20 (2C), 118.83 (2C), 106.10 (1C), 85.91 (1C), 85.81 (1C), 75.22 (1C), 61.65 (1C), 48.04 (1C), 38.12 (1C), 37.84 (1C), 34.97 (1C), 21.30 (1C). $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_8$ 에 대한 MS (m/z) 계산치, 495.49; 실측치 494.1 $[\text{M-H}]^-$ (ESI^-).

[0312] **5'-O-(4,4'-다이메톡시트라이틸)- 5-{N-[2-(4-바이페닐에틸) 카복사마이드]}-2'-데옥시유리딘-5'-O-트라이포스페이트(트리스-트라이에틸암모늄 염)(반응식 3, 생성물 12)의 합성:** 트라이포스페이트(12)를 500 μmol -규모(5 $\times$)에서 Ludwig 및 Eckstein(Ludwig, J. and Eckstein, F. *J. Org. Chem.* 1989, 54:631)의 절차에 의해 3'-O-아세틸-뉴클레오사이드(11)로부터 합성하였다. 조질의 트라이포스페이트 생성물을, 암모니아분해 및 증발 후에, 일반 절차(위)에 기재한 바와 같이 음이온 교환 크로마토그래피 및 역상 크로마토그래피에 의해 정제하였다. $[\epsilon_{\text{est.}} 13.700\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}]$ 단리된 정제 생성물은 192 μmol (38.2% 수율)이었다. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ = 8.38 (s, 1H), 7.14-7.26 (m, 4H), 7.05 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.76-6.82 (m, 4H), 6.09 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 4.5 (오중선, J = 3.3 Hz, 1H), 4.39 (q, J = 15.3 Hz, 2H), 4.60 (dd, J_A =15.1, J_B = 3.4 Hz, 1H), 4.05-4.17 (m, 3H), 3.08 (q, J = 7.5 Hz, 23H), 2.26-2.37 (m, 2H), 1.16 (t, J = 7.5 Hz, 35H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): δ = 163.49 (1C), 156.60 (1C), 155.82 (1C), 150.38 (1C), 146.45 (1C), 133.41(1C), 130.01 (2C), 129.04 (2C), 123.76 (1C), 118.87 (2C), 118.60 (2C), 105.70 (1C), 101.53 (1C), 86.91 (1C), 85.92/ 85.81 (1C), 70.86 (1C), 65.49 (1C), 46.59 (8C), 42.28 (1C), 38.74 (1C), 22.74 (1C), 8.19 (8C). $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_{16}\text{P}_3$ 692.38에 대한 MS (m/z) 계산치; 실측치 692.0 $[\text{M-H}]^-$ (ESI^-).

[0313] **실시예 3: 5-위치 변형된 피리미딘 뉴클레오타이드를 갖는 앵타머의 선택**

[0314] 본 실시예는 단일 페닐 변형된 뉴클레오타이드 라이브러리와 직접 비교에서 바이페닐 변형된 dU 라이브러리를 이용한 DNA 앵타머의 선택 및 생산을 위한 대표적인 방법을 제공한다.

[0315] **후보 혼합물의 제조**

[0316] 부분적으로 무작위화된 ssDNA 올리고뉴클레오타이드의 후보 혼합물을 바이오틴일화된 ssDNA 주형에 어닐링된 DNA 프라이머의 중합효소 연장에 의해 제조하였다(아래의 표 1에 나타냄). 후보 혼합물은 dATP, dGTP, dCTP, 및 5-(N-3-페닐프로필카복사마이드)-2'-데옥시유리딘 트라이포스페이트(PP-dUTP), 5-[N-(4-페닐벤질)카복사마이드]-2'-데옥시유리딘 트라이포스페이트(PBn-dUTP), 5-[N-(4-펜옥시벤질)카복사마이드]-2'-데옥시유리딘 트라이포스페이트(POP-dUTP), 5-{N-[(1,1'-바이페닐)-4-일)에틸]카복사마이드}-2'-데옥시유리딘 트라이포스페이트(BPE-dUTP) 또는 5-[N-(3,3'-다이페닐프로필)카복사마이드]-2'-데옥시유리딘 트라이포스페이트(DPP-dUTP))를 함유하는 40-뉴클레오타이드 무작위화 카세트를 함유하였다.

표 1

주형 및 프라이머의 서열

올리고뉴클레오타이드 표기	서열(5'→3')	서열번호
주형 1	AB'AB' TTT TTT TTT TGC TCT GGT CCC GCT CTT G -(N) ₄₀ - CAG TTT CAG GCA GGC TAG GC	1
프라이머 1	ATA TAT ATG CCT AGC CTG CCT GAA ACT G	2
프라이머 2	AB'AB' TTT TTT TTT TGC TCT GGT CCC GCT CTT G	3

B' = 바이오틴

[0317]

[0318]

9200 마이크로리터의 Streptavidin Plus UltraLink Resin(PIERCE)의 50% 슬러리를 40ml의 16mM NaCl로 1회, 3회 세척하였다. 수지를 8.5ml 16mM NaCl의 최종 용적으로 재현탁시켰다. 2개의 바이오틴 잔기(서열에서 B'로 표기함) 및 40개의 무작위화된 위치(서열에서 N₄₀으로 표기)를 갖는 주형 1(서열번호 1)의 352 나노몰을 세척한 UltraLink SA 비드에 첨가하고, 37℃에서 30분 동안 회전시켰다. 이어서, 비드를 16mM NaCl로 3회 세척하였다. 각 세척 사이에서, 원심분리에 의해 비드를 회수하였다. 이제 포획된 주형을 함유하는 비드를 18nmol의 프라이머 1(서열번호 2), 1×SQ20 완충제(120mM Tris-HCl, pH7.8, 10mM KCl, 7mM MgSO₄, 6mM(NH₄)₂SO₄, 0.001% BSA 및 0.1% Triton X-100), 112 단위의 KOD XL DNA 중합효소(EMD MILLIPORE) 및 1mM의 각각의 dATP, dGTP, dCTP 및 PP-dUTP, PBn-dUTP, POP-dUTP, BPE-dUTP 또는 DPP-dUTP 중 하나를 함유하는 1.125ml의 연장 반응 완충제에서 현탁시켰다. 비드를 68℃에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 비드를 16mM NaCl로 3회 세척하였다. 앵타머 라이브러리를 2ml의 20mM NaOH로 비드로부터 용리시켰다. 용리된 라이브러리를 52μl의 1N HCl 및 100μl HEPES pH 7.5 및 2μl 10% TWEEN-20로 즉시 중화시켰다. 라이브러리를 AMICON Ultracel YM-3 필터를 이용해서 대략 0.32ml 내지 0.52ml로 농축시켰고, 라이브러리의 농도를 자외선 흡광도 분광학에 의해 결정한다.

[0319]

표적 단백질의 고정

[0320]

SELEX에서 사용한 다음의 단백질 표적을 상업적 제조업자로부터 구입하였다: 인터류킨-33(IL-33) 단백질, Novoprotein 카탈로그 # C233; XIAP 단백질, R&D Systems 카탈로그 # 895-XB-050; TNF-알파 단백질, Acro Biosystems 카탈로그 TNA-5228; KRAS(K-Ras) 단백질, Sino Biological 카탈로그 # 12259-H07E. His-태그된 생성 표적 단백질을 SELEX(라운드 1 내지 7)에 대해 His-태그 Dynabeads(Thermo Fisher) 상자성 비드(MyOne SA, Invitrogen, 또는 본 명세서에서 이후에 His 비드로 지칭함) 상에 고정하였다. 40mM HEPES(4-(2-하이드록시에틸)피페라진-1-에탄설폰산) 완충제를 NaOH, 102mM NaCl, 5mM KCl, 5mM MgCl₂ 및 0.01% TWEEN 20를 이용해서 pH 7.5로 조정함)로 구성된 20ml의 SB18T0.01 완충제로 3회 세척함으로써 비드(40mg)를 제조하였다. 최종적으로, 비드를 SB18T0.01에서 2.5mg/ml로 현탁시키고, 사용을 위해 4℃에서 보관하였다.

[0321]

느린 오프-속도 풍부화 공정에 의한 앵타머 선택

[0322]

총 7 라운드의 SELEX 공정을 친화도 및 느린 오프 속도에 대한 선택으로 완료하였다. 각 라운드 전에, 배경을 감소시키기 위해 그리고 단백질에 대한 비특이적 결합을 갖는 앵타머를 얻은 가능성을 감소시키기 위해 카운터 선택을 수행하였다. 다음과 같이 카운터 선택을 수행하였다.

[0323]

라운드 1의 경우, SB18T0.01에서 대략 1nmol의 DNA를 함유하는 100μl의 DNA 후보 혼합물을 95℃에서 5분 동안 가열하였고, 이어서, 70℃까지 5분 동안, 그 다음에, 48℃까지 5분 동안 냉각시키고 나서, 37℃ 블럭에 5분 동안 옮겼다. 이어서, 샘플을 10μl의 단백질 경쟁자 혼합물(SB18T0.01에서 0.1% HSA, 10 μM 카세인 및 10 μM 프로트롬빈), 및 0.025mg(10μl)의 HEXA-His로 코팅된 His 비드(Anaspec, 카탈로그 # 24420)와 합하였고, 37℃에서 10분 동안 혼합하면서 인큐베이션시켰다. 비드를 자기 분리(magnetic separation)에 의해 제거하였다.

[0324]

라운드 2 내지 7의 경우, 앞 라운드에서 얻은 DNA 후보 혼합물의 65μl 분취액(앞 라운드에서 얻은 65%의 eDNA)를 16μl의 5× SB18T0.01과 혼합하였다. 샘플을 95℃까지 3분 동안 가열하였고, 0.1℃/초의 속도로 37℃까지 냉각시켰다. 이어서, 샘플을 9μl의 단백질 경쟁자 혼합물(SB18T0.01에서 0.1% HSA, 10 μM 카세인 및 10 μM 프로트롬빈), 및 0.025mg(10μl)의 His 비드와 합하였고, 37℃에서 10분 동안 혼합하면서 인큐베이션시켰다. 비드를 자기 분리에 의해 제거하였다.

[0325]

제1 카운터 선택 후에, 표적 단백질을 라운드 1 선택 공정에 대해 His 비드 상에 사전 고정시켰다. 이를 달성하

기 위해, 0.125mg의 단백질 His 비드를 50pmol의 표적 단백질과 혼합하였고, 30분 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. SB18T0.01로 비드를 세척함으로써 비결합 표적을 제거하였다. 카운터-선택-DNA 후보 혼합물(100 μ l)을 비드에 첨가하였고, 37℃에서 60분 동안 혼합하면서 인큐베이션시켰다. 제1 라운드에서 느린 오프-속도 풍부화 공정을 사용하지 않았고, 비드를 100 μ l SB18T0.01로 5회 간단하게 세척하였다. 세척 후에, 170 μ l의 2mM NaOH를 첨가하고, 37℃에서 5분 동안 혼합하면서 인큐베이션시킴으로써 결합된 앵타머를 비드로부터 용리시켰다. 비드의 자기 분리 후에 앵타머-함유-용리액(170 μ l)을 새로운 관에 옮겼고, 용액을 40 μ l의 중화 완충제(500mM Tris-HCl pH 7.5, 8mM HCl)의 첨가에 의해 중화시켰다.

[0326] 라운드 2 내지 7의 경우, 아래에 기재하는 바와 같이 DNA 후보 혼합물 및 표적 단백질을 이용해서 선택을 수행하는 한편, 동시에, DNA 후보 혼합물을 이용하였지만, 표적 단백질 없이 동일한 선택을 수행하였다. 표적 단백질이 있는 샘플(신호 S) 및 표적 단백질이 없는 샘플(배경 B)에 대한 PCR로부터 얻은 Ct 값의 비교를 다음 라운드에서 표적 농도를 감소시키기 위한 가이드로서 사용하였다. 델타 Ct 값이 4보다 크지만, 8보다 적다면, 표적 단백질은 다음 라운드에서 3배 감소되었다. 델타 Ct 값이 8보다 크다면, 표적은 다음 라운드에서 10배 감소되었다.

[0327] 라운드 2의 경우, 표지된 표적 단백질(10 μ l에서 5pmol)을 40 μ l의 카운터 선택 DNA 후보 혼합물과 혼합하였고, 37℃에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. 50 μ l의 10mM 텍스트란황산을 첨가한 직후 0.0125mg의 His 비드를 첨가함으로써 느린 오프-속도 풍부화 공정을 시작하였다. 이를 15분 동안 37℃에서 혼합하면서 인큐베이션시켰다. 이어서, 비드를 100 μ l의 SB18T0.01로 5회 세척하였다. 100 μ l의 과염소산나트륨을 첨가하고, 혼합하면서 37℃에서 10분 동안 인큐베이션시킴으로써 비드로부터 앵타머 가닥을 용리시켰다. 비드를 자기 분리에 의해 제거하고, 100 μ l의 앵타머 용리액을 새로운 관에 옮겼다.

[0328] 각 표적 및 라이브러리 조합에 대한 델타 Ct 값을 기준으로 필요한 경우 표적 단백질의 양을 낮추는 것을 제외하고 라운드 2에 대해 기재한 바와 같이 라운드 3 내지 7을 수행하였다. His 비드 첨가의 15분(라운드 3 및 4), 30분(라운드 5 및 6), 45분(라운드 7) 전에 텍스트란황산을 첨가하였다.

[0329] 라운드 2 내지 7의 경우, 과염소산염 용리 후에, 100 μ l의 앵타머 용리액을 본 명세서에서 이후에 프라이머 비드로 지칭되는 프라이머 2(서열번호 3)로 사전 결합된 0.0625mg(25 μ l)의 SA 비드로 포획하고, 진탕하면서 50℃에서 10분 동안 인큐베이션시킨 후에, 진탕시키면서 25℃에서 10분 동안 인큐베이션시켰다. 비드를 100 μ l SB18T0.01로 2회 및 16mM NaCl로 1회 세척하였다. 결합된 앵타머를 120 μ l 물로 용리시켰고, 75℃에서 2분 동안 인큐베이션시켰다. 비드를 자기 분리에 의해 제거하고, 120 μ l의 앵타머 용리액을 새로운 관에 옮겼다. 0.5ml 1 M NaCl, 0.01% tween-20에서 15mg SA 비드(1.5ml의 10mg/ml SA 비드를 2ml 20mM NaOH로 1회, 2ml SB18T0.01로 2회 세척함)를 재현탁시키고 7nmol의 프라이머 2(서열번호 3)를 첨가함으로써 프라이머 비드를 제조하였다. 혼합물을 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후에, 비드를 1ml SB18T0.01로 2회 및 1ml 16mM NaCl로 2회 세척하였다. 비드를 5 M NaCl, 0.01% tween-20에서 2.5mg/ml까지 재현탁시켰다.

[0330] 앵타머 증폭 및 정제

[0331] 각 라운드로부터의 선택된 앵타머 DNA를 증폭시켰고, QPCR에 의해 정량화하였다. 48 μ l DNA를 12 μ l QPCR 혼합물(10 $\times$ KOD DNA 증합효소 완충제; Novagen #71157, 5X로 희석, 25mM MgCl₂, 5 μ M 정방향 PCR 프라이머(프라이머 1, 서열번호 2), 5 μ M 바이오틴일화된 역 PCR 프라이머(프라이머 2, 서열번호 3), 5 $\times$ SYBR Green I, 0.075U/ μ l KOD XL DNA 증합효소, 및 1mM의 각각 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP)에 첨가하였고, 다음의 프로토콜을 이용해서 Bio-Rad MyIQ QPCR 기기에서 열순환시켰다: 15초 동안 96℃ 및 30분 동안 68℃의 1주기; 다음에 15초 동안 96℃, 1분 동안 68℃의 25주기. 기기 소프트웨어를 이용해서 정량화를 행하였고, 표적 단백질 유무와 상관없이 선택한 DNA의 복제물 수를 비교하여 신호/배경비를 결정하였다.

[0332] 증폭 후에, 바이오틴일화된 안티센스 가닥을 통해 SA 비드 상에서 PCR 산물을 포획하였다. 25ml SA 비드(10mg/ml)를 25ml 20mM NaOH로 1회, 25ml SB18T0.01로 2회 세척하였고, 25ml SB18T0.01에서 재현탁시켰고, 4℃에서 보관하였다. 25 μ l SA 비드(SB18T0.01에서 10mg/ml)를 50 μ l 이중-가닥 QPCR 생성물에 첨가하고, 혼합하면서 5분 동안 25℃에서 인큐베이션시켰다. 100 μ l 20mM NaOH를 첨가하고, 혼합하면서 25℃에서 1분 동안 인큐베이션시킴으로써 비드로부터 "센스" 가닥을 용리시켰다. 용리 가닥을 버리고, 비드를 SB18T0.01로 2회 및 16mM NaCl로 1회 세척하였다.

[0333] PP-dUTP, PBn-dUTP, POP-dUTP, BPE-dUTP 또는 DPP-dUTP 중 하나를 함유하는 앵타머 센스 가닥을 프라이머 연장에 의해 고정된 안티센스 가닥으로부터 제조하였다. 비드를 40 μ l 프라이머 연장 반응 혼합물(1 $\times$ 프라이머 연장

완충제(120mM Tris-HCl pH 7.8, 10mM KCl, 7mM MgSO₄, 6mM(NH₄)₂SO₄, 0.1% TRITON X-100 및 0.001% 소 혈청 알부민), 4 μM 정방향 프라이머(프라이머 1, 서열번호 2), 0.5mM 각각 dATP, dCTP, dGTP, 및 PP-dUTP, PBn-dUTP, POP-dUTP, BPE-dUTP 또는 DPP-dUTP 중 하나, 및 0.075U/μl KOD XL DNA 중합효소에서 현탁시키고, 68℃에서 45분 동안 혼합하면서 인큐베이션시켰다. 비드를 SB18TO.01로 2회, 16mM NaCl로 1회 세척하였고, 85μl의 20mM NaOH를 첨가하고, 37℃에서 2분 동안 혼합하면서 인큐베이션시킴으로써 비드로부터 앵타머 가닥을 용리시켰다. 83μl 앵타머 용리액을 자기 분리 후에 새로운 관에 옮기고, 20μl의 80mM HCl로 중화시키고, 5μl의 0.1 M HEPES, pH 7.5로 완충시켰다.

[0334] **선택 엄격도 및 피드백**

[0335] 선택 단계의 상대 표적 단백질 농도는 아래의 법칙에 따라 QPCR 신호(ΔC_t)에 반응하여 각 라운드에서 낮아졌다:

[0336] $\Delta C_t < 4$ 인 경우, $[P](i+1) = [P](i)$

[0337] $4 \leq \Delta C_t < 8$ 인 경우, $[P](i+1) = [P](i)/3.2$

[0338] $\Delta C_t \geq 8$ 인 경우, $[P](i+1) = [P](i)/10$

[0339] $[P]$ = 단백질 농도이고, i = 현재의 라운드 번호.

[0340] 각 선택 라운드 후에, 풍부화된 DNA 혼합물의 수렴 상태를 결정하였다. 10μl 이중-가닥 QPCR 산물을 4mM MgCl₂ 함유 1× SYBR 그린 I을 이용해서 200μl로 희석시켰다. 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드의 복합체 혼합물에 대한 혼성화 시간을 측정하는 C₀t 분석을 이용해서 샘플을 수렴에 대해 분석하였다. 샘플을 다음의 프로토콜을 이용해서 열 순환시켰다: 1분 동안 98℃, 1분 동안 85℃의 3주기; 1분 동안 98℃, 이어서, 30분 동안 85℃의 2주기. 85℃에서 30분 동안, 5-초 간격으로 형광 영상을 측정하였다. 형광 강도를 시간의 로그 함수로서 플롯팅하였고, 각각의 SELEX 라운드에 의한 증가된 혼성화 속도가 관찰되었으며, 이는 서열 수렴을 나타낸다.

[0341] **실시예 4: 단백질 표적에 대한 풍부화된 SELEX 풀에 대한 평형상태 결합 상수(K_d)**

[0342] 본 실시예는 SELEX 풀-단백질 결합 친화도를 측정하고 K_d를 결정하기 위해 본 명세서에서 사용한 방법을 제공한다.

[0343] 풍부화된 라운드 7 SELEX 풀의 결합 친화도를 아래의 표 2에 나타내고, 결정하였다. 간략히 말해서, 풍부화된 SELEX 풀의 결합 상수(K_d 값)를 재조합 XIAP, IL-33, TNF-알파 및 K-Ras 단백질에 대한 결합에 대해 필터 결합 분석에 의해 결정하였다. 풍부화된 SELEX 풀의 K_d 값을 SB18T 완충제에서 측정하였다. 라운드 7 풍부화된 SELEX 풀을 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제(New England Biolabs) 및 γ-[³²P]ATP(Perkin-Elmer)를 이용해서 5' 말단에 표지하였다. 방사성표지된 앵타머(20,000 내지 40,000 CPM, 대략 0.03nM)를 10⁻⁷ 내지 10⁻¹² M 범위의 농도에서 표적 단백질과 혼합하였고, 37℃에서 40분 동안 인큐베이션시켰다.

[0344] 인큐베이션 후에, 반응물을 동일한 용적의 10mM 텍스트란황산 및 0.014mg의 His-태그 Dyna 비드(Invitrogen)와 혼합하였고, 37℃에서 5분 동안 혼합하면서 인큐베이션시켰다. 결합된 복합체를 Durapore 필터 플레이트(EMD Millipore) 상에서 포획하였고, 결합된 앵타머의 분획을 포스포이미저(phosphorimager)(Typhoon FLA 9500, GE)를 정량화시켰고, 데이터를 ImageQuant(GE)에서 분석하였다.

[0345] 결합 친화도를 결정하기 위해, 아래의 식:

[0346] $y = (\max - \min)(\text{단백질})/(K_d + \text{단백질}) + \min.$

[0347] 을 이용해서 데이터를 적합화시켜, GraphPad Prism 버전 7.00을 이용해서 플롯팅하거나, 또는 데이터를 4모수 s 자형 용량-반응 모델을 이용해서 적합화시켰다. 모든 데이터를 GraphPad Prism 버전 7.00을 이용해서 플롯팅하였다. 결과를 도 1A 내지 도 1I 및 표 2에 나타낸다.

표 2

표적	SELEX 라운드 7 풀	Kd (M)
XIAP	dATP, dGTP, dCTP, PP-dUTP	$> 1.0 \times 10^{-6}$
XIAP	dATP, dGTP, dCTP, DPP-dUTP	1.7×10^{-8}
XIAP	dATP, dGTP, dCTP, PBn-dUTP	1.0×10^{-8}
IL-33	dATP, dGTP, dCTP, PP-dUTP	$> 1.0 \times 10^{-6}$
IL-33	dATP, dGTP, dCTP, PBn-dUTP	9.3×10^{-9}
K-Ras	dATP, dGTP, dCTP, PP-dUTP	1.7×10^{-9}
K-Ras	dATP, dGTP, dCTP, POP-dUTP	2.8×10^{-10}
K-Ras	dATP, dGTP, dCTP, DPP-dUTP	1.2×10^{-10}
K-Ras	dATP, dGTP, dCTP, PBn-dUTP	1.4×10^{-10}
K-Ras	dATP, dGTP, dCTP, BPE-dUTP	1.8×10^{-10}
TNF-알파	dATP, dGTP, dCTP, PP-dUTP	1.4×10^{-9}
TNF-알파	dATP, dGTP, dCTP, POP-dUTP	7.2×10^{-11}

[0348]

[0349] 실시예 5: 바이페닐 변형된 뉴클레오타이드에 의한 앵타머의 선택

[0350] 본 실시예는 단일 페닐 변형된 뉴클레오타이드 라이브러리와의 직접 비교에서 바이페닐 변형된 dC 라이브러리를 이용한 DNA 앵타머의 선택 및 생산을 위한 대표적인 방법을 제공한다.

[0351]

후보 혼합물의 제조

[0352]

부분적으로 무작위화된 ssDNA 올리고뉴클레오타이드의 후보 혼합물을 바이오틴일화된 ssDNA 주형에 어닐링된 DNA 프라이머의 중합효소 연장에 의해 제조하였다(아래의 표 3에 나타냄). 후보 혼합물은 dATP, dGTP, dUTP를 함유하는 40-뉴클레오타이드 무작위화된 카세트, 및 다음의 PP-dCTP, Bn-dCTP, DPP-dCTP, PBn-dCTP 또는 POP-dCTP 중 하나를 함유하였다.

표 3

주형 및 프라이머의 서열		
올리고뉴클레오타이드 표기	서열(5'→3')	서열번호
주형 1	AB'AB' TTTTTTTT CTC CCT TCT TCT CTT TCT TCT TC -(N) ₄₀ - GTC ACG GCT CCG CGA CAT ATA TAT	4
프라이머 1	ATA TAT ATG TCG CGG AGC CGT GAC	5
프라이머 2	AB'AB' TTTTTTTT CTC CCT TCT TCT CTT TCT TCT TC	6

[0353]

B' = 바이오틴

[0354]

4900 마이크로리터의 Streptavidin Plus UltraLink Resin(PIERCE)의 50% 슬러리를 1XSB18T 완충제로 1회 및 16mM NaCl로 3회 세척하였다. 수지를 6개의 관에 동일하게 나누었고, 2개의 바이오틴 잔기(서열에서 B'로 표기함) 및 40개의 무작위화된 위치(서열에서 N₄₀으로 표기)를 갖는 주형 1(서열번호 4)의 28 나노몰을 세척한 UltraLink SA 비드에 첨가하고, 37°C에서 30분 동안 회전시켰다. 이어서, 비드를 16mM NaCl로 3회 세척하였다. 각 세척 사이에서, 원심분리에 의해 비드를 회수하였다. 이제 포획된 주형을 함유하는 비드를 56nmol의 프라이머 1(서열번호 5), 1× SQ20 완충제(120mM Tris-HCl, pH 7.8, 10mM KCl, 7mM MgSO₄, 6mM(NH₄)₂SO₄, 0.001% BSA 및 0.1% Triton X-100), 112 단위의 KOD XL DNA 중합효소(EMD MILLIPORE) 및 1mM의 각각의 dATP, dGTP, dUTP 및 Bn-dCTP, PP-dCTP, PBn-dCTP, POP-dCTP 또는 DPP-dCTP 중 하나를 함유하는 1.67mL의 연장 반응 완충제에서 현탁시켰다. 비드를 71°C에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 비드를 16mM NaCl로 3회 세척하였다. 앵타머

라이브러리를 1ml의 20mM NaOH로 비드로부터 용리시켰다. 용리된 라이브러리를 15 μ l의 1N HCl 및 10 μ l HEPES pH 7.5 및 1 μ l 10% TWEEN-20로 즉시 중화시켰다. 각각의 라이브러리의 농도를 자외선 흡광도 분광학에 의해 결정하였다.

[0355]

표적 단백질의 고정

[0356]

SELEX에서 사용한 다음의 단백질 표적을 상업적 제조업자로부터 구입하였다: TNF α Acro Biosystems 카탈로그 TNA-5228; B7-H4, R&D Systems 카탈로그 6576-B7-050; sL-셀렉틴, R&D Systems 카탈로그 728-LS-100. His-태그된 생성 표적 단백질을 SELEX(라운드 1 내지 7)에 대해 His-태그 Dynabeads(Thermo Fisher) 상자성 비드(MyOne SA, Invitrogen, 또는 본 명세서에서 이후에 His 비드로 지칭함) 상에 고정하였다. 20ml의 SB18T0.01로 3회 세척함으로써 비드(40mgs)를 제조하였다. 최종적으로, 비드를 SB18T0.01에서 2.5mgs/ml로 현탁시키고, 사용을 위해 4°C에서 보관하였다.

[0357]

느린 오프-속도 풍부화 공정에 의한 앵타머 선택

[0358]

총 8 라운드의 SELEX 공정을 친화도 및 느린 오프 속도에 대한 선택으로 완료하였다. 각 라운드 전에, 배경을 감소시키기 위해 그리고 단백질에 대한 비특이적 결합을 갖는 앵타머를 얻은 가능성을 감소시키기 위해 카운터 선택을 수행하였다. 다음과 같이 카운터 선택을 수행하였다.

[0359]

라운드 1의 경우, SB18T0.01에서 대략 1nmol의 DNA를 함유하는 100 μ l의 DNA 후보 혼합물을 95°C에서 5분 동안 가열하였고, 이어서, 70°C까지 5분 동안, 그 다음에, 48°C까지 5분 동안 냉각시키고 나서, 37°C 블록에 5분 동안 옮겼다. 이어서, 샘플을 10 μ l의 단백질 경쟁자 혼합물(SB18T0.01에서 0.1% HSA, 10 μ M 카세인 및 10 μ M 프로트롬빈), 및 0.025mg(10 μ l)의 HEXA-His로 코팅된 His 비드(Anaspec, 카탈로그 # 24420)와 합하였고, 37°C에서 10분 동안 혼합하면서 인큐베이션시켰다. 비드를 자기 분리에 의해 제거하였다.

[0360]

라운드 2 내지 8의 경우, 앞 라운드에서 얻은 DNA 후보 혼합물의 65 μ l 분취액(앞 라운드에서 얻은 65%의 eDNA)를 16 μ l의 5 $\times$ SB18T0.01과 혼합하였다. 샘플을 95°C까지 3분 동안 가열하였고, 0.1°C/초의 속도로 37°C까지 냉각시켰다. 이어서, 샘플을 9 μ l의 단백질 경쟁자 혼합물(SB18T0.01에서 0.1% HSA, 10 μ M 카세인 및 10 μ M 프로트롬빈), 및 0.025mg(10 μ l)의 His 비드와 합하였고, 37°C에서 10분 동안 혼합하면서 인큐베이션시켰다. 비드를 자기 분리에 의해 제거하였다.

[0361]

제1 카운터 선택 후에, 표적 단백질을 라운드 1 선택 공정에 대해 His 비드 상에 사전 고정시켰다. 이를 달성하기 위해, 0.125mg의 단백질 His 비드를 50pmol의 표적 단백질과 혼합하였고, 30분 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. SB18T0.01로 비드를 세척함으로써 비결합 표적을 제거하였다. 카운터-선택-DNA 후보 혼합물(100 μ l)을 비드에 첨가하였고, 37°C에서 60분 동안 혼합하면서 인큐베이션시켰다. 제1 라운드에서 느린 오프-속도 풍부화 공정을 사용하지 않았고, 비드를 100 μ l SB18T0.01로 5회 간단하게 세척하였다. 세척 후에, 170 μ l의 2mM NaOH를 첨가하고, 37°C에서 5분 동안 혼합하면서 인큐베이션시킴으로써 결합된 앵타머를 비드로부터 용리시켰다. 비드의 자기 분리 후에 앵타머-함유-용리액(170 μ l)을 새로운 관에 옮겼고, 용액을 40 μ l의 중화 완충제(500mM Tris-HCl pH 7.5, 8mM HCl)의 첨가에 의해 중화시켰다.

[0362]

라운드 2 내지 8의 경우, 아래에 기재하는 바와 같이 DNA 후보 혼합물 및 표적 단백질을 이용해서 선택을 수행하는 한편, 동시에, DNA 후보 혼합물을 이용하였지만, 표적 단백질 없이 동일한 선택을 수행하였다. 표적 단백질이 있는 샘플(신호 S) 및 표적 단백질이 없는 샘플(배경 B)에 대한 PCR로부터 얻은 Ct 값의 비교를 다음 라운드에서 표적 농도를 감소시키기 위한 가이드로서 사용하였다. 델타 Ct 값이 4보다 크지만, 8보다 적다면, 표적 단백질은 다음 라운드에서 3배 감소되었다. 델타 Ct 값이 8보다 크다면, 표적은 다음 라운드에서 10배 감소되었다.

[0363]

라운드 2의 경우, 표지된 표적 단백질(10 μ l에서 5pmol)을 40 μ l의 카운터 선택 DNA 후보 혼합물과 혼합하였고, 37°C에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. 50 μ l의 10mM 텍스트란황산을 첨가한 직후 0.0125mg의 His 비드를 첨가함으로써 느린 오프-속도 풍부화 공정을 시작하였다. 이를 15분 동안 37°C에서 혼합하면서 인큐베이션시켰다. 이어서, 비드를 100 μ l의 SB18T0.01로 5회 세척하였다. 100 μ l의 과염소산나트륨을 첨가하고, 혼합하면서 37°C에서 10분 동안 인큐베이션시킴으로써 비드로부터 앵타머 가당을 용리시켰다. 비드를 자기 분리에 의해 제거하고, 100 μ l의 앵타머 용리액을 새로운 관에 옮겼다.

[0364]

각 표적 및 라이브러리 조합에 대한 델타 Ct 값을 기준으로 필요한 경우 표적 단백질의 양을 낮추는 것을 제외하고 라운드 2에 대해 기재한 바와 같이 라운드 3 내지 8을 수행하였다. His 비드 첨가의 15분(라운드 3 및 4),

30분(라운드 5 및 6), 45분(라운드 7 및 8) 전에 텍스트란황산을 첨가하였다.

[0365] 라운드 2 내지 8의 경우, 과염소산염 용리 후에, 100 μ l의 앵타머 용리액을 본 명세서에서 이후에 프라이머 비드로 지칭되는 프라이머 2(서열번호 6)로 사전 결합된 0.0625mg(25 μ l)의 SA 비드로 포획하고, 진탕하면서 50 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 인큐베이션시킨 후에, 진탕시키면서 25 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 인큐베이션시켰다. 비드를 100 μ l SB18T0.01로 2회 및 16mM NaCl로 1회 세척하였다. 결합된 앵타머를 120 μ l 물로 용리시켰고, 75 $^{\circ}$ C에서 2분 동안 인큐베이션시켰다. 비드를 자기 분리에 의해 제거하고, 120 μ l의 앵타머 용리액을 새로운 관에 옮겼다. 0.5ml 1M NaCl, 0.01% tween-20에서 120mg SA 비드(1.5ml의 10mg/ml SA 비드를 2ml 20mM NaOH로 1회, 2ml SB18T0.01로 2회 세척함)를 재현탁시키고 14nmol의 프라이머 2(서열번호 6)를 첨가함으로써 프라이머 비드를 제조하였다. 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후에, 비드를 1ml SB18T0.01로 2회 및 1ml 16mM NaCl로 2회 세척하였다. 비드를 5M NaCl, 0.01% tween-20에서 2.5mg/ml까지 재현탁시켰다.

[0366] 앵타머 증폭 및 정제

[0367] 각 라운드로부터의 선택된 앵타머 DNA를 증폭시켰고, QPCR에 의해 정량화하였다. 48 μ l DNA를 12 μ l QPCR 혼합물(10 $\times$ KOD DNA 증합효소 완충제; Novagen #71157, 5X로 희석, 25mM MgCl₂, 5 μ M 정방향 PCR 프라이머(프라이머 1, 서열번호 5), 5 μ M 바이오틴일화된 역 PCR 프라이머(프라이머 2, 서열번호 6), 5 $\times$ SYBR Green I, 0.075 U/ μ l KOD XL DNA 증합효소, 및 1mM의 각각 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP)에 첨가하였고, 다음의 프로토콜을 이용해서 Bio-Rad MyIQ QPCR 기기에서 열순환시켰다: 15초 동안 96 $^{\circ}$ C 및 30분 동안 71 $^{\circ}$ C의 1주기; 다음에 15초 동안 96 $^{\circ}$ C, 1분 동안 71 $^{\circ}$ C의 25주기. 기기 소프트웨어를 이용해서 정량화를 행하였고, 표적 단백질 유무와 상관없이 선택한 DNA의 복제물 수를 비교하여 신호/배경비를 결정하였다.

[0368] 증폭 후에, 바이오틴일화된 안티센스 가닥을 통해 SA 비드 상에서 PCR 산물을 포획하였다. 25ml SA 비드(10mg/ml)를 25ml 20mM NaOH로 1회, 25ml SB18T0.01로 2회 세척하였고, 25ml SB18T0.01에서 재현탁시켰고, 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 25 μ l SA 비드 (SB18T0.01에서 10mg/ml)를 50 μ l 이중-가닥 QPCR 생성물에 첨가하고, 혼합하면서 5분 동안 25 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션시켰다. 100 μ l 20mM NaOH를 첨가하고, 혼합하면서 25 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 인큐베이션시킴으로서 비드로부터 "센스" 가닥을 용리시켰다. 용리 가닥을 버리고, 비드를 SB18T0.01로 2회 및 16mM NaCl로 1회 세척하였다.

[0369] Bn-dCTP, PP-dCTP, PBn-dCTP, POP-dCTP 또는 DPP-dCTP 중 하나를 함유하는 앵타머 센스 가닥을 프라이머 연장에 의해 고정된 안티센스 가닥으로부터 제조하였다. 비드를 40 μ l 프라이머 연장 반응 혼합물(1 $\times$ 프라이머 연장 완충제(120mM Tris-HCl pH 7.8, 10mM KCl, 7mM MgSO₄, 6mM(NH₄)₂SO₄, 0.1% TRITON X-100 및 0.001% 소 혈청 알부민), 4 μ M 정방향 프라이머(프라이머 1, 서열번호 5), 0.5mM 각각 dATP, dUTP, dGTP, 및 Bn-dCTP, PP-dCTP, PBn-dCTP, POP-dCTP 또는 DPP-dCTP 중 하나 및 0.075U/ μ l KOD XL DNA 증합효소)에서 현탁시키고, 71 $^{\circ}$ C에서 45분 동안 혼합하면서 인큐베이션시켰다. 비드를 SB18T0.01로 2회, 16mM NaCl로 1회 세척하였고, 85 μ l의 20mM NaOH를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 2분 동안 혼합하면서 인큐베이션시킴으로써 비드로부터 앵타머 가닥을 용리시켰다. 83 μ l 앵타머 용리액을 자기 분리 후에 새로운 관에 옮기고, 20 μ l의 80mM HCl로 중화시키고, 5 μ l의 0.1M HEPES, pH 7.5로 완충시켰다.

[0370] 선택 엄격도 및 피드백

[0371] 선택 단계의 상대 표적 단백질 농도는 아래의 법칙에 따라 QPCR 신호(Δ Ct)에 반응하여 각 라운드에서 낮아졌다:

[0372] Δ Ct < 4인 경우, [P](i+1) = [P](i)

[0373] $4 \leq \Delta$ Ct < 8인 경우, [P](i+1) = [P](i)/3.2

[0374] Δ Ct $\geq$ 8인 경우, [P](i+1) = [P](i)/10

[0375] [P] = 단백질 농도이고, i = 현재의 라운드 번호.

[0376] 각 선택 라운드 후에, 풍부화된 DNA 혼합물의 수렴 상태를 결정하였다. 10 μ l 이중-가닥 QPCR 산물을 4mM MgCl₂ 함유 1 $\times$ SYBR 그린 I을 이용해서 200 μ l로 희석시켰다. 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드의 복합체 혼합물에 대한 혼성화 시간을 측정하는 C0t 분석을 이용해서 샘플을 수렴에 대해 분석하였다. 샘플을 다음의 프로토콜을 이용해서 열 순환시켰다: 1분 동안 98 $^{\circ}$ C, 1분 동안 85 $^{\circ}$ C의 3주기; 1분 동안 98 $^{\circ}$ C, 이어서, 30분 동안 85 $^{\circ}$ C의 2주기. 85 $^{\circ}$ C에서 30분 동안, 5-초 간격으로 형광 영상을 측정하였다. 형광 강도를 시간의 로그 함수로서 플롯팅하

였고, 각각의 SELEX 라운드에 의한 증가된 혼성화 속도가 관찰되었으며, 이는 서열 수렴을 나타낸다.

[0377] 실시예 6: 단백질 표적에 대한 풍부화된 SELEX 풀에 대한 평형상태 결합 상수(Kd)

[0378] SELEX 풀-단백질 결합 친화도를 측정하고 Kd를 결정하기 위해 다음의 방법을 사용하였다.

[0379] 풍부화된 라운드 6 또는 라운드 8 SELEX 풀의 결합 친화도를 아래의 표 4에 나타내고, 결정하였다. 간략히 말해서, 풍부화된 SELEX 풀의 결합 상수(Kd 값)를 재조합 TNF α 및 B7-H4 단백질에 대한 결합에 대해 필터 결합 분석에 의해 결정하였다. 풍부화된 SELEX 풀의 Kd 값을 SB18T 완충제에서 측정하였다. 라운드 6 또는 라운드 8 풍부화된 SELEX 풀을 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제(New England Biolabs) 및 γ -[32P]ATP (Perkin-Elmer)를 이용하여 5' 말단에 표지하였다. 방사성표지된 앵타머(20,000 내지 40,000CPM, 대략 0.03nM)를 10-7 내지 10-12M 범위의 농도에서 표적 단백질과 혼합하였고, 37℃에서 40분 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후에, 반응물을 동일한 용적의 10mM 텍스트란황산 및 0.014mg의 His-태그 Dyna 비드(Invitrogen)와 혼합하였고, 37℃에서 5분 동안 혼합하면서 인큐베이션시켰다(TNF α 및 sL-셀렉틴). B7-H4 단백질의 경우, 2.2mg의 Zorbax 수지(Agilent Technologies)를 각 반응물에 첨가하였다. 결합된 복합체를 Durapore 필터 플레이트(EMD Millipore) 상에서 포획하였고, 결합된 앵타머의 분획을 포스포이미저(phosphor imager)(Typhoon FLA 9500, GE)를 정량화시켰고, 데이터를 ImageQuant(GE)에서 분석하였다.

[0380] 결합 친화도를 결정하기 위해, 아래의 식:

[0381] $y = (\max - \min)/(\text{단백질})/(K_d + \text{단백질}) + \min$ 을 이용해서 데이터를 적합화시키고, GraphPad Prism 버전 7.00을 이용해서 플롯팅하거나, 또는 데이터를 4모수 s자형 용량-반응 모델을 이용해서 적합화시켰다. 모든 데이터를 GraphPad Prism 버전 7.00을 이용해서 플롯팅하였다. 결과를 도 7A 내지 도 7F 및 표 4에 나타낸다.

표 4

표적	SELEX 라운드 6 또는 라운드 8 풀	Kd (M)
TNF α	dATP, dGTP, dUTP, PP-dCTP	$>1.0 \times 10^{-6}$
TNF α	dATP, dGTP, dUTP, Bn-dCTP	$>1.0 \times 10^{-6}$
TNF α	dATP, dGTP, dUTP, DPP-dCTP	1.3×10^{-9}
TNF α	dATP, dGTP, dUTP, PBn-dCTP	1.1×10^{-9}
TNF α	dATP, dGTP, dUTP, POP-dCTP	3.7×10^{-10}
B7-H4	dATP, dGTP, dUTP, Bn-dCTP	$>1.0 \times 10^{-6}$
B7-H4	dATP, dGTP, dUTP, PBn-dCTP	8.0×10^{-9}
sL-셀렉틴	dATP, dGTP, dUTP, PP-dCTP	4.5×10^{-9}
sL-셀렉틴	dATP, dGTP, dUTP, PBn-dCTP	6.1×10^{-10}
sL-셀렉틴	dATP, dGTP, dUTP, POP-dCTP	2.4×10^{-10}

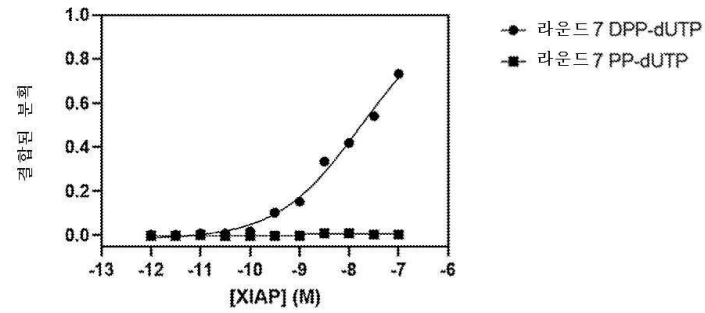
[0383] 결과

[0384] SELEX의 라운드 8의 완료 후에, 라운드 6 및 8로부터의 친화도 풍부화된 풀을 필터 결합 분석에서 분석하여, 고친화도 결합 서열을 함유하는 해당 서열을 확인하고 SELEX에서 단일 페닐 고리 dC 변형(Bn-dC, PP-dC)에 비교해서 바이페닐 dC 변형(DPP-dC, PBn-dC, POP-dC)의 값을 평가하였다. 본 발명자들은 DPP-dC, PBn-dC 및 POP-dC의 바이페닐 dC 변형이 SELEX 풀 친화도 결합에서 개선된 결과를 나타냈다는 것을 발견하였다. TNF α 단백질은 Bn-dC 및 PP-dC 변형 라운드 8 SELEX 풀의 경우 1.0×10^{-7} M의 단백질 농도까지 측정 가능한 결합 친화도를 갖지 않았다. 그러나, 고친화도 DPP-dC, PBn-dC 및 POP-dC 라운드 8 풀(표 4)의 결합을 측정하였고, 이는 이들 변형된 라이브러리가 SELEX에서 성공적이었다는 것을 나타낸다. 유사하게, B7-H4 단백질에 대한 라운드 6 풀은 Bn-dC에 대한 측정 가능한 결합 친화도를 갖지 않은 반면, PBn-dC 변형 풀은 8.0×10^{-9} M의 고친화도를 가졌다. sL-셀렉틴 단백질은 라운드 8 풀(4.5×10^{-9} M)에 대한 보통의 PP-dC 결합 친화도를 가졌지만, PBn-dC 및 POP-dC의 바이페닐 라이브러리는 유의미하게 개선된 친화도(각각 6.1×10^{-10} M 및 2.4×10^{-10} M)를 가졌다. 이런 결과는 바이페닐 라이

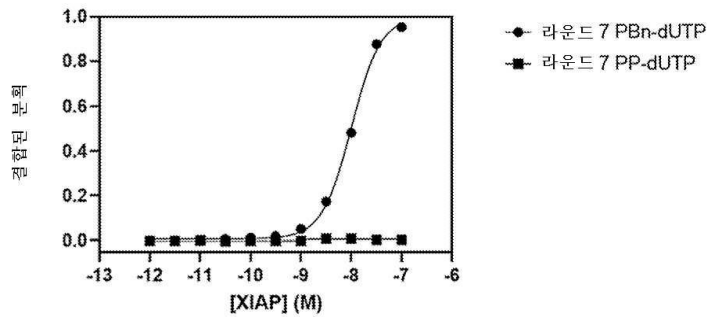
브러리 풀이 단일 페닐 PP-dC 풀보다 더 높은 친화도 서열에 대해 풍부화된다는 것을 나타낸다. 종합하면, 이런 결과는 바이페닐 변형된 dC 라이브러리가 SELEX에서 개선된 결과를 초래한다는 것을 나타낸다.

도면

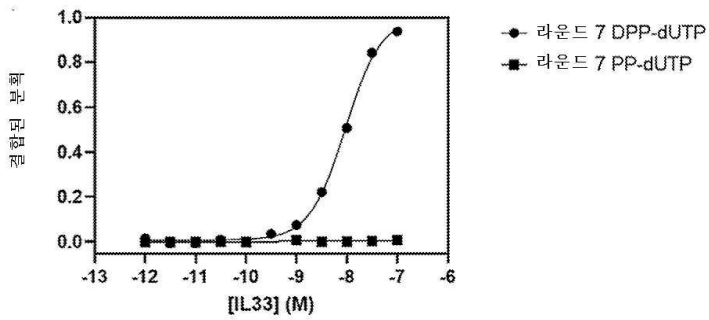
도면1ac



A

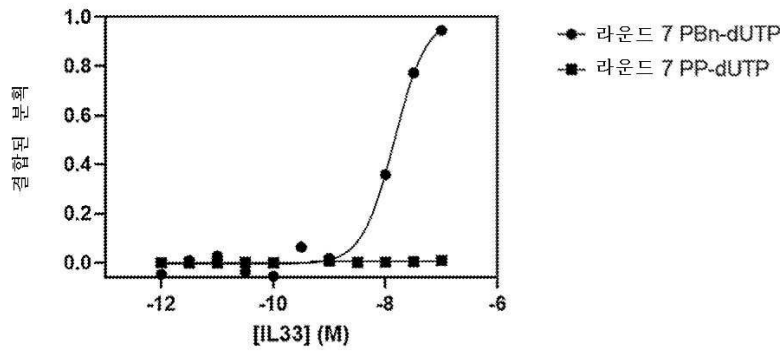


B

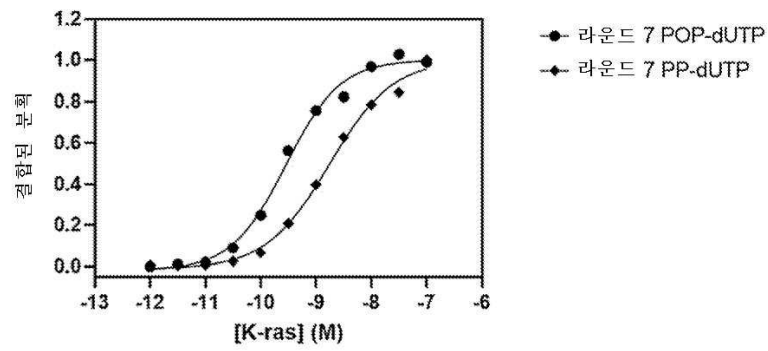


C

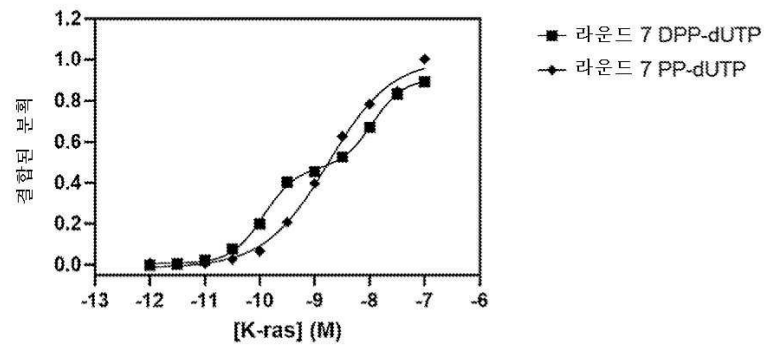
도면 1df



D

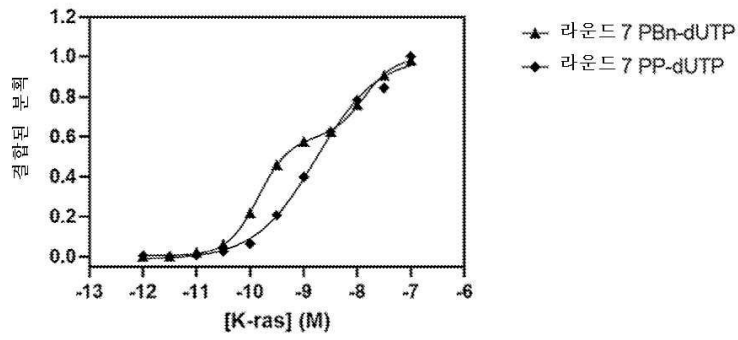


E

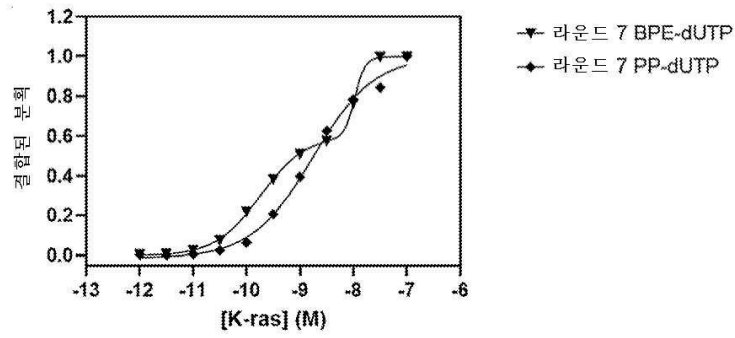


F

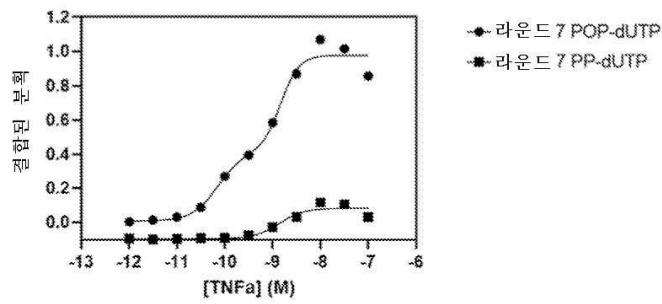
도면 1gi



G

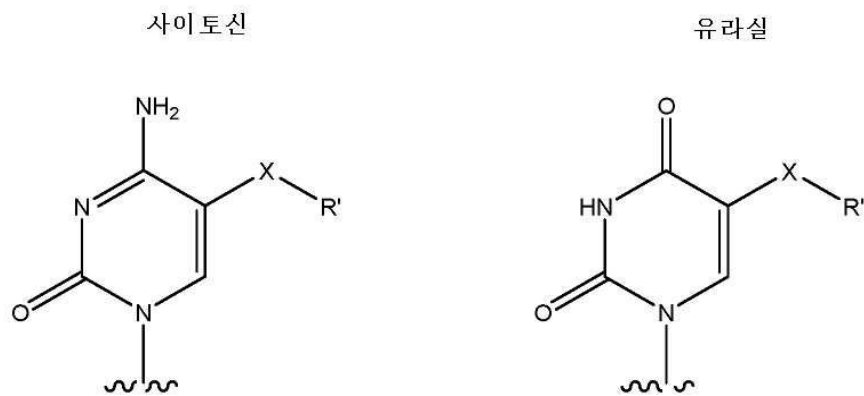


H



I

도면2a

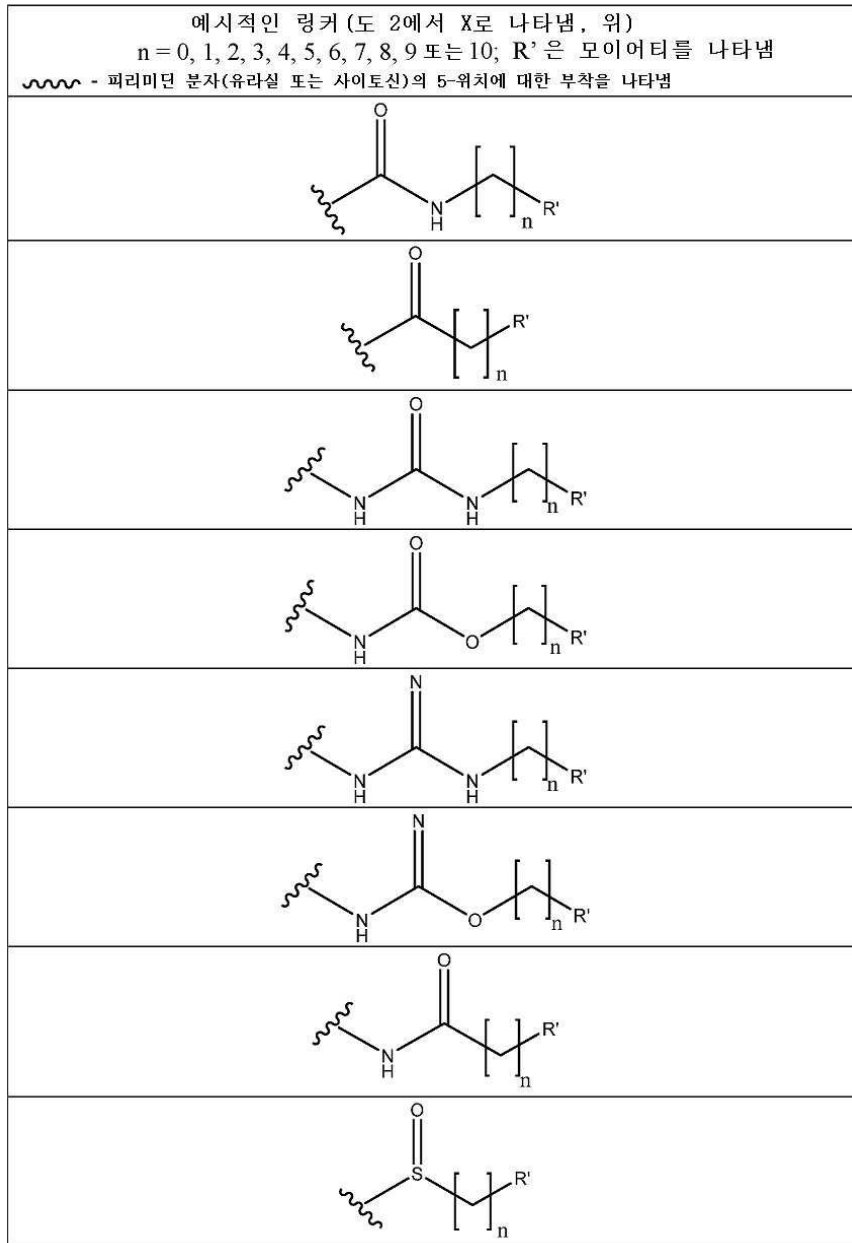


~~~~~ - 핵산 분자의 골격 (예를 들어, 포스페이트-데옥시리보스 골격)에 대한 부착을 나타냄

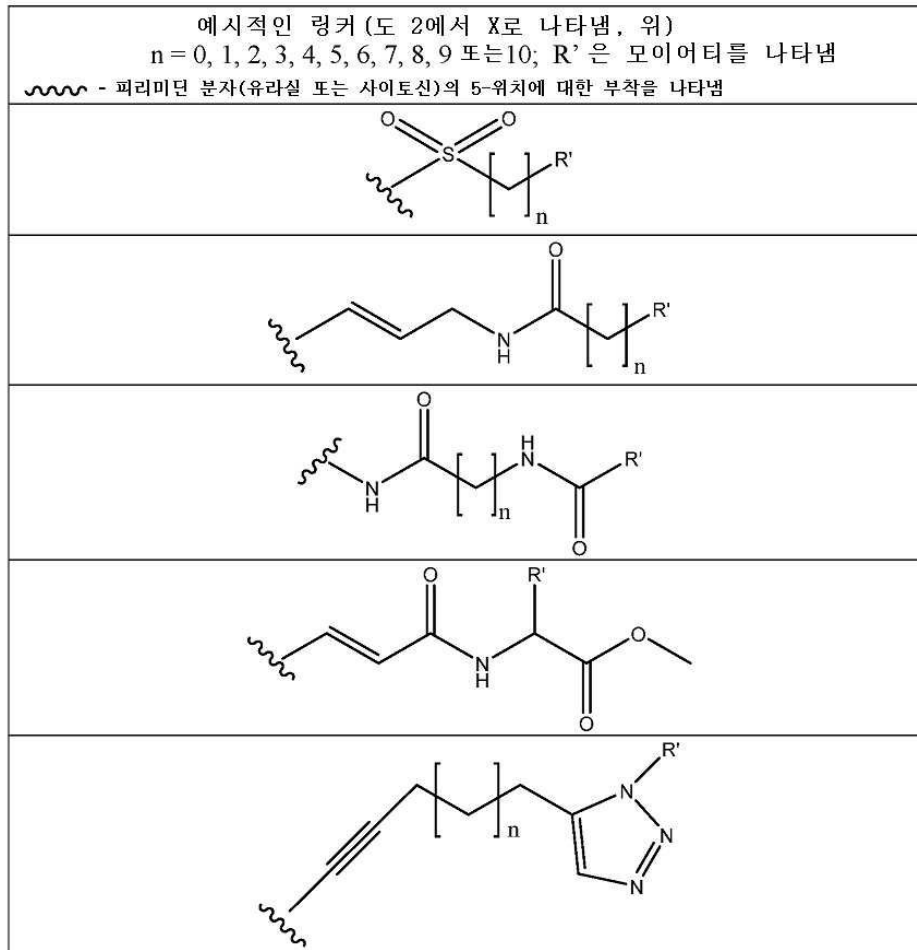
X - 피리미딘 분자 (유라실 또는 사이토신)의 5-위치에 부착된 링커를 나타냄

R' - 링커 (X)를 통해 피리미딘 분자의 5-위치에 부착된 모이어티를 나타냄

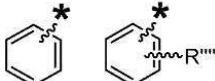
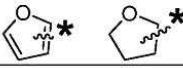
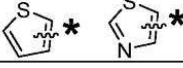
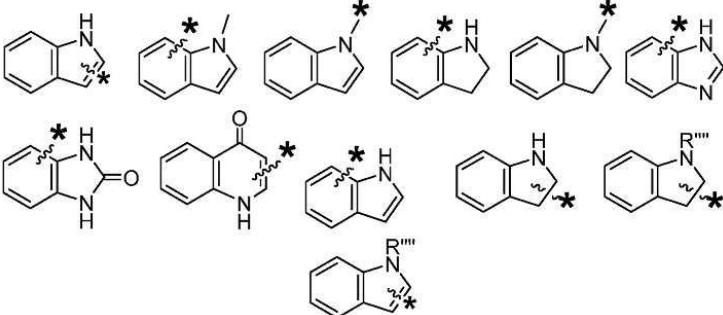
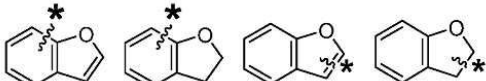
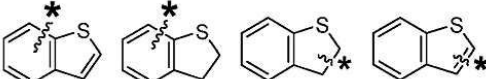
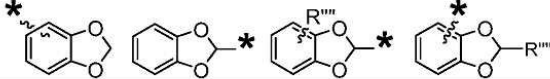
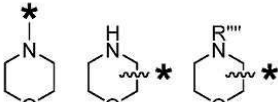
도면2b



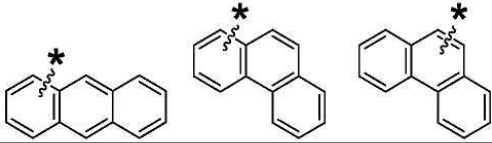
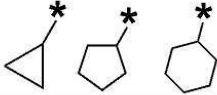
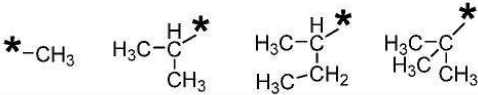
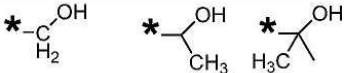
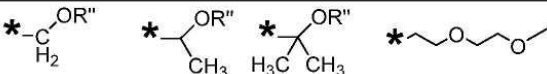
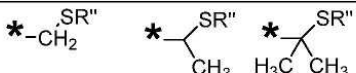
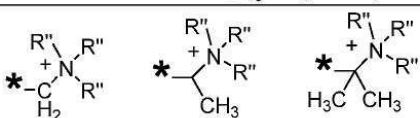
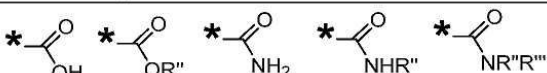
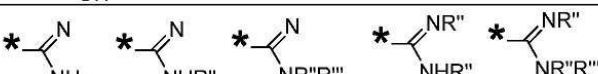
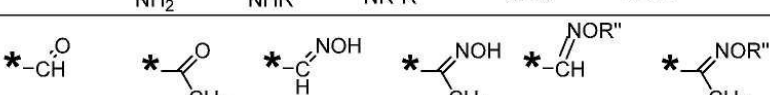
도면2c



도면2d

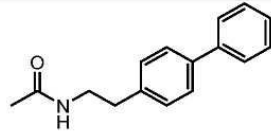
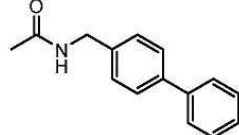
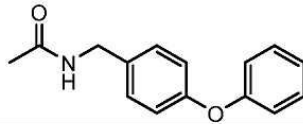
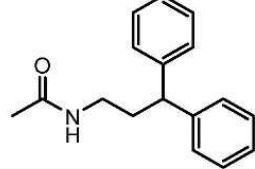
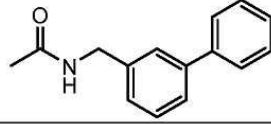
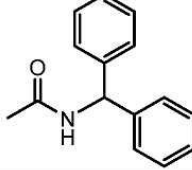
| 그룹   | R' 구조 (*는 X(링커)에 대한 R' 기의 부착지점을 나타냄)                                                |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| I    |    |
| II   |    |
| III  |    |
| IV   |    |
| V    |    |
| VI   |  |
| VII  |  |
| VIII |  |
| IX   |  |
| X    |  |

도면2e

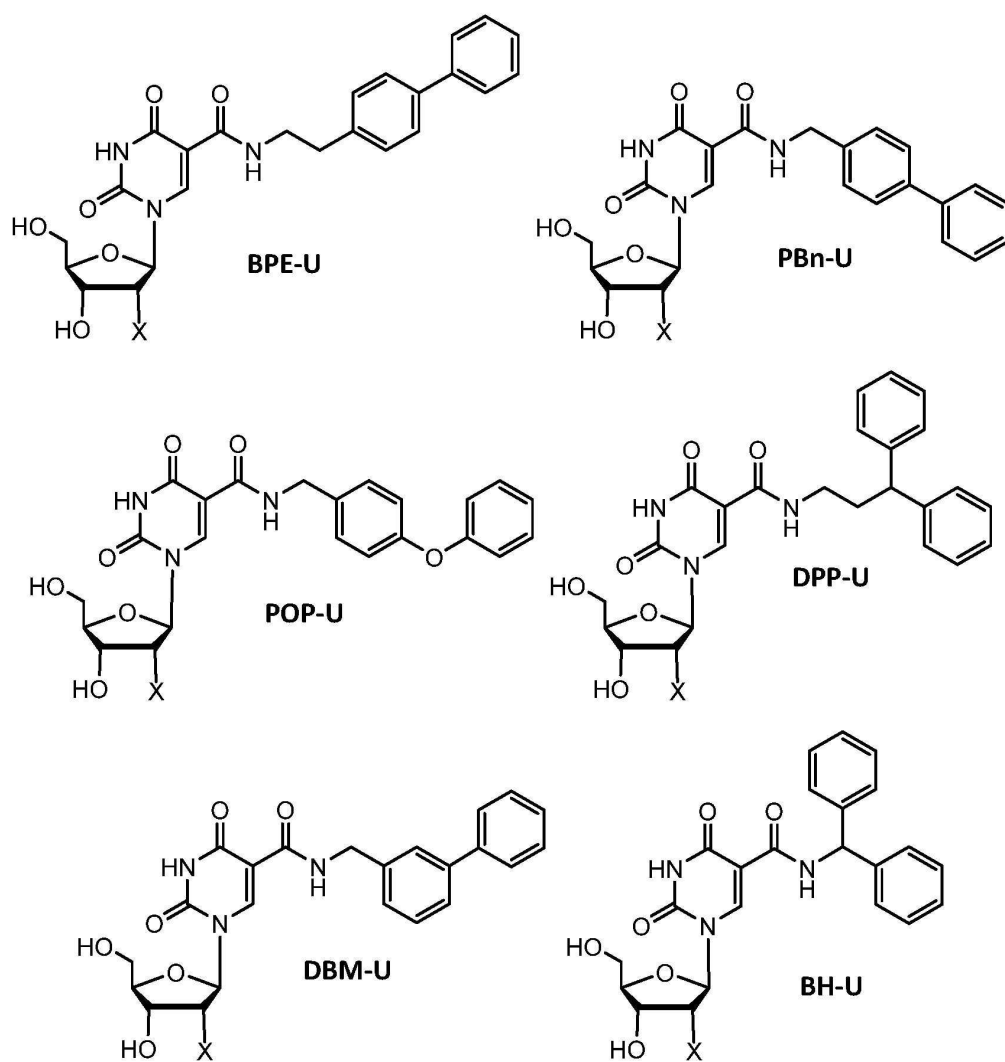
| 그룹    | R' 구조 (*는 X(링커)에 대한 R' 기의 부착지점을 나타냄)                                                 |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| XI    |     |
| XII   |     |
| XIII  |     |
| XIV   |     |
| XV    |    |
| XVI   |     |
| XVII  |    |
| XVIII |  |
| XIX   |  |
| XX    |  |

R'' 및 R'''은 독립적으로 할로겐 (-F, -Cl, -Br, -I); 나이트릴 (-CN); -NH<sub>2</sub>; -OH; 분지형 저급 알킬 (C1-C20); 선형 저급 알킬 (C1-C20); 1차 아마이드; 2차 아마이드; 3차 아마이드; 및 알콕시기로부터 선택됨

도면3a

| 약어   | 아마이드 결합을 통해<br>부착된 5-dU 변형 | 화학 구조                                                                                |
|------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| BPE  | ((1,1'-바이페닐)-4-일) 에틸       |    |
| PBnd | 4-페닐벤질                     |    |
| POP  | 4-펜옥시벤질                    |    |
| DPP  | 3,3-다이페닐프로필                |    |
| DBM  | 3-페닐벤질                     |   |
| BH   | 벤즈하이드릴                     |  |

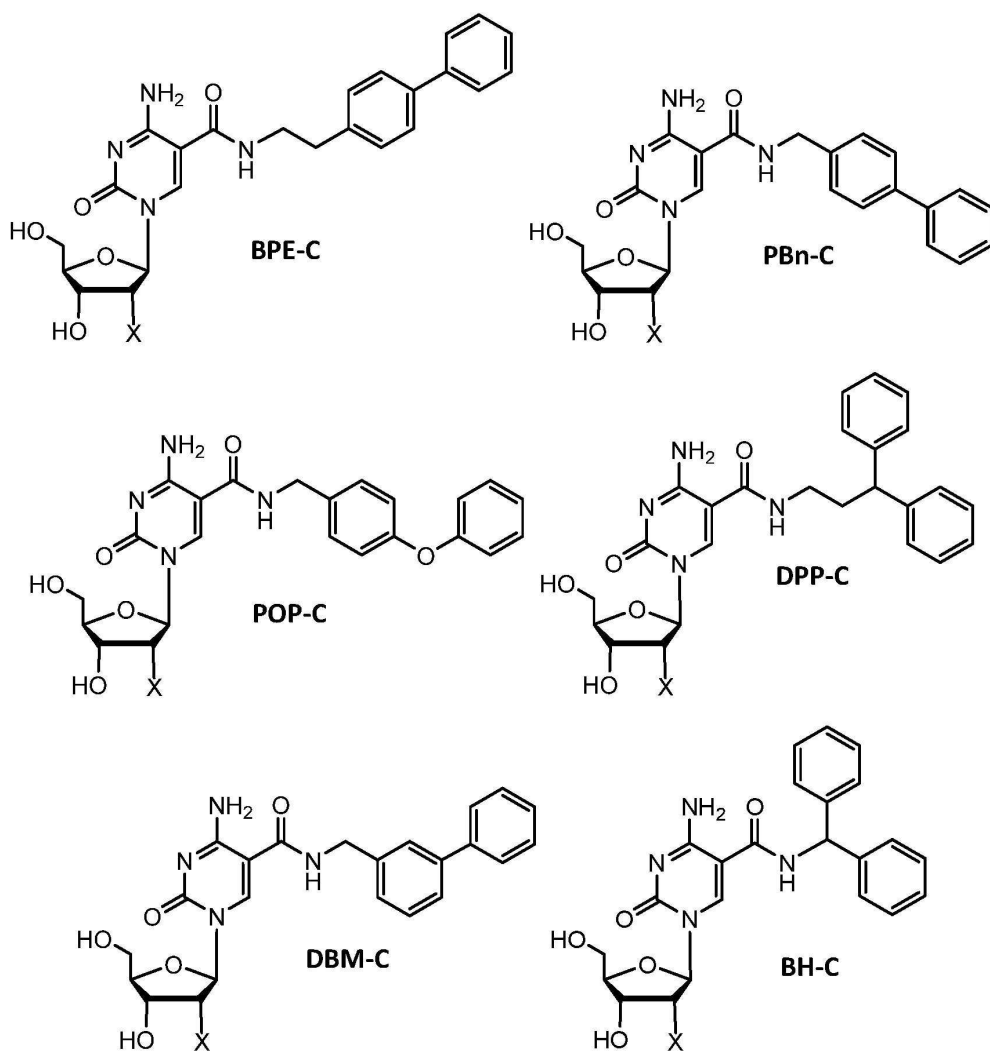
도면3b



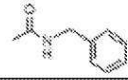
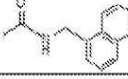
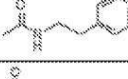
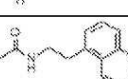
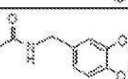
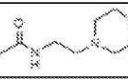
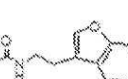
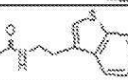
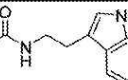
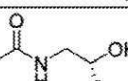
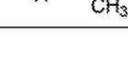
도면4a

| 약어   | 아마이드 결합을 통해<br>부착된 5-dC 변형 | 화학 구조 |
|------|----------------------------|-------|
| BPE  | ((1,1'-바이페닐)-4-일) 에틸       |       |
| PBnd | 4-페닐 벤질                    |       |
| POP  | 4-펜 옥시 벤질                  |       |
| DPP  | 3,3-다이페닐 프로필               |       |
| DBM  | 3-페닐 벤질                    |       |
| BH   | 벤즈하이 드릴                    |       |

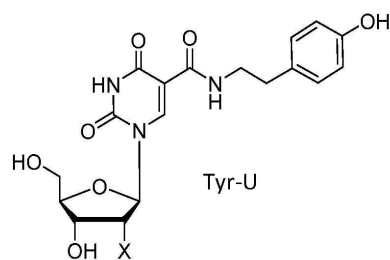
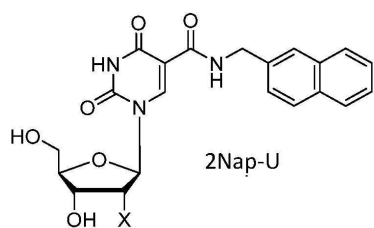
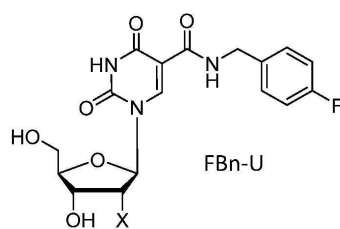
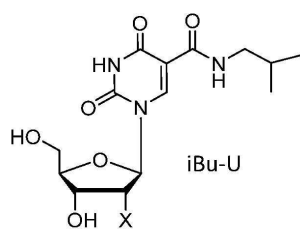
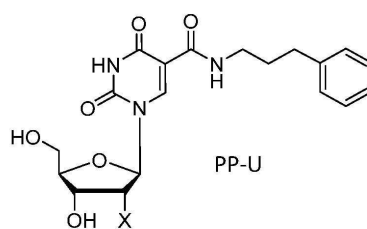
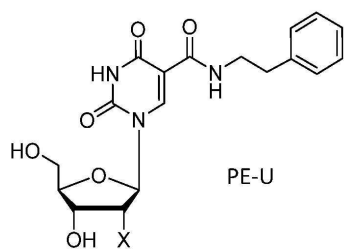
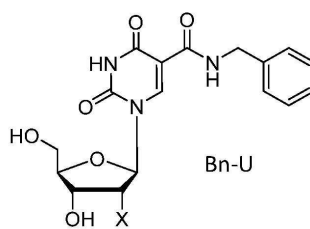
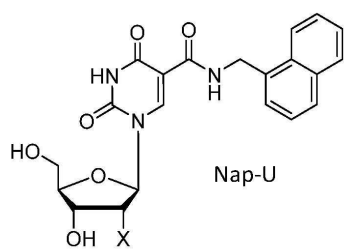
도면4b



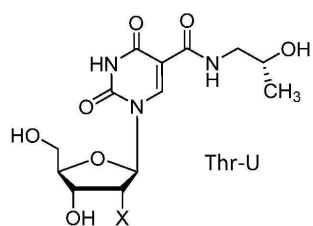
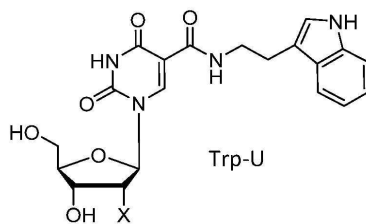
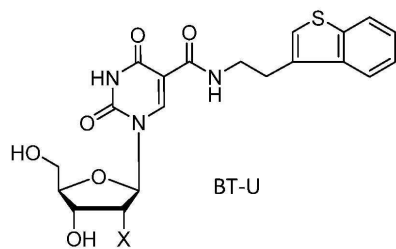
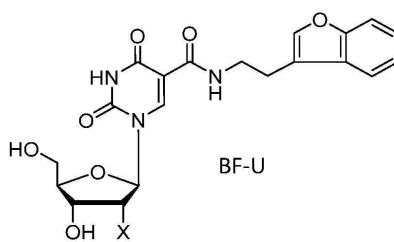
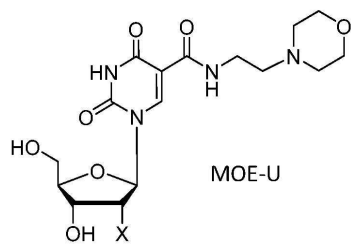
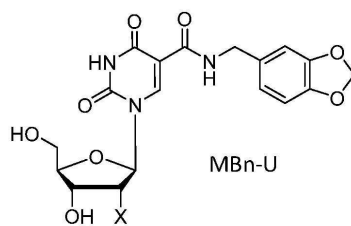
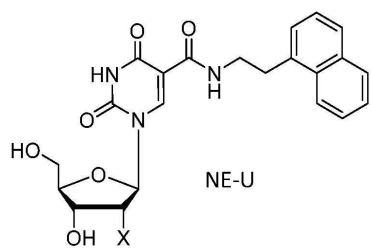
도면5a

| 약어   | 아마이드 결합을 통해 부착된 5-dU 변형 | 화학 구조                                                                                |
|------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Bn   | 벤질 메틸                   |    |
| Nap  | 1-나프틸 메틸                |    |
| PE   | 2-페닐 에틸                 |    |
| PP   | 3-페닐 프로필                |    |
| iBu  | 아이소-부틸                  |    |
| FBn  | 4-플루오로 벤질 메틸            |    |
| 2Nap | 2-나프틸 메틸                |    |
| Tyr  | 타이로실                    |    |
| NE   | 1-나프틸 에틸                |  |
| MBn  | 3,4-메틸렌 다이옥시 벤질         |  |
| MOE  | 몰폴리노에틸                  |  |
| BF   | 3-벤조퓨란일 에틸              |  |
| BT   | 3-벤조티오펜일 에틸             |  |
| Trp  | 3-인돌-2-에틸               |  |
| Thr  | (R)-2-하이드록시 프로필         |  |

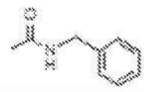
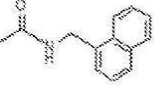
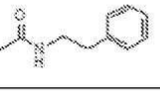
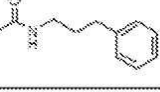
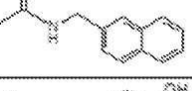
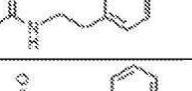
도면5b



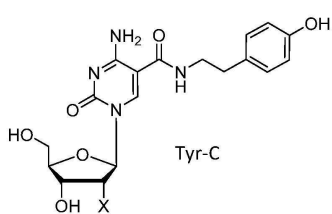
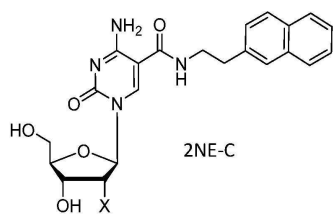
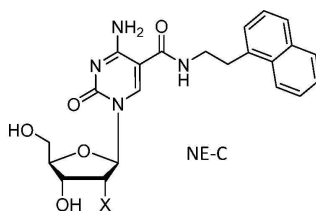
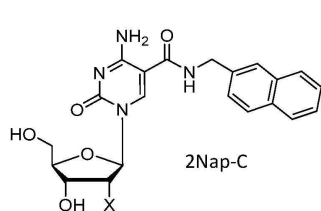
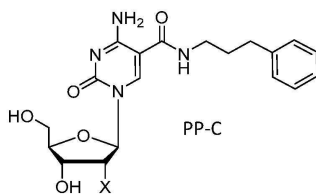
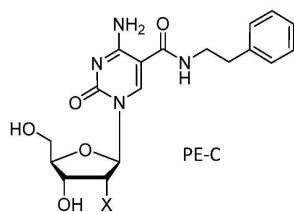
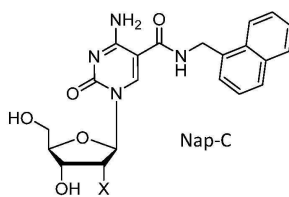
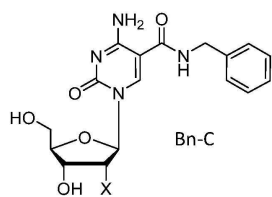
도면5c



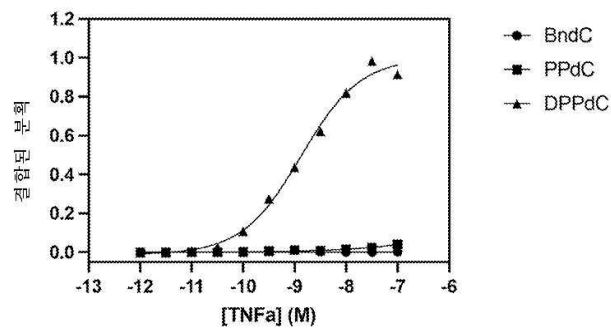
도면6a

| 약어   | 아마이드 결합을 통해 부착된<br>5-dC 변형 | 화학 구조                                                                                |
|------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Bn   | 벤질메틸                       |    |
| Nap  | 1-나프틸메틸                    |    |
| PE   | 2-페닐에틸                     |    |
| PP   | 3-페닐프로필                    |    |
| 2Nap | 2-나프틸메틸                    |    |
| Tyr  | 타이로실                       |    |
| NE   | 1-나프틸에틸                    |  |
| 2NE  | 2-나프틸-2-에틸                 |  |

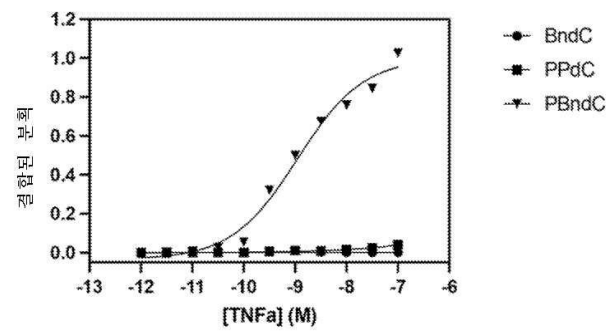
도면6b



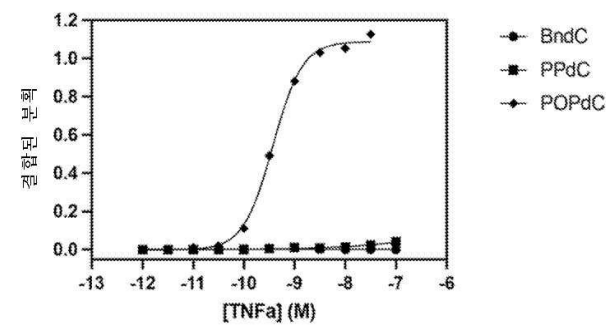
도면7ac



A

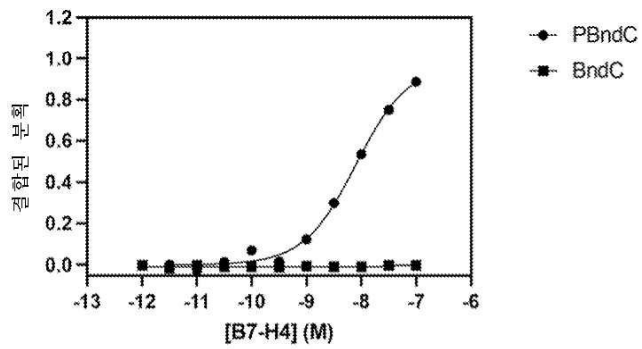


B

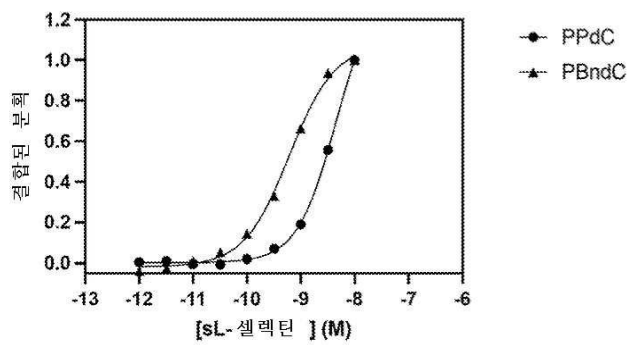


C

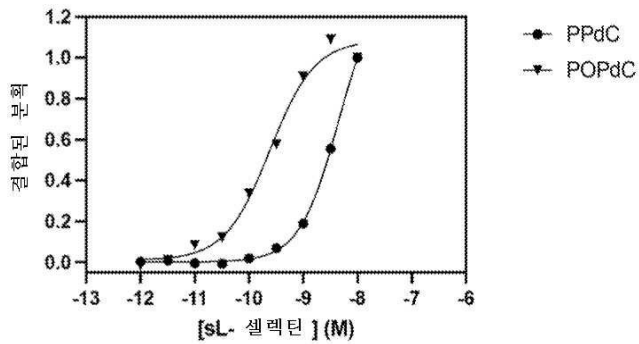
## 도면7df



D



E



F

## 서열목록

### SEQUENCE LISTING

<110> SOMALOGIC OPERATING CO., INC.

<120> MODIFIED NUCLEOSIDES

<130> WO/2022/221241

<140> PCT/US2022/024361

<141> 2022-04-12

<150> US 63/174,792

<151> 2021-04-14  
 <150> US 63/174,495  
 <151> 2021-04-13  
 <160> 6  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 53  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> Biotinylated ssDNA template  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (2)..(4)  
 <223> n = biotin  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (33)..(33)  
  
 <223> n = 40-nucleotide randomized cassette  
 <400> 1  
 anantttttt ttttgctctg gtcccgtctt tgncagtttc aggcaggcta ggc 53  
 <210> 2  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> Forward PCR primer  
 <400> 2  
 atatatatgc cttagcctgcc tgaaactg 28  
 <210> 3  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> Biotinylated reverse PCR primer  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (2)..(4)  
 <223> n = biotin  
 <400> 3

anantttttt ttttgctctg gtcgccgtct tg 32

<210> 4

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Biotinylated ssDNA template

<220><221> misc\_feature

<222> (2)..(4)

<223> n = biotin

<220><221> misc\_feature

<222> (36)..(36)

<223> n = 40-nucleotide randomized cassette

<400> 4

anantttttt ttctcccttc ttctctttct tcttcngtca cggtccgcg acatatatat 60

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Forward PCR primer

<400> 5

atatatatgt cgcgagccg tgac 24

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Biotinylated reverse PCR primer

<220><221> misc\_feature

<222> (2)..(4)

<223> n = biotin

<400> 6

anantttttt ttctcccttc ttctctttct tcttc 35