



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월27일

(11) 등록번호 10-2183273

(24) 등록일자 2020년11월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) **A61K 47/42** (2017.01)
A61P 31/16 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7032241
- (22) 출원일자(국제) 2013년11월17일
 심사청구일자 2016년11월09일
- (85) 번역문제출일자 2013년12월04일
- (65) 공개번호 10-2014-0028058
- (43) 공개일자 2014년03월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2011/061282
- (87) 국제공개번호 WO 2012/150960
 국제공개일자 2012년11월08일
- (30) 우선권주장
 13/101,942 2011년05월05일 미국(US)
 13/107,528 2011년05월13일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2009144481 A2*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
 사렘타 쉐러퓨틱스, 인코퍼레이티드
 미국, 매사추세츠 02142, 캠프리지, 스위트 7,
 215 퍼스트 스트리트
- (72) 발명자
 헨슨, 군나르, 제이.
 미국 워싱턴 98011, 보셀, 8700 노스이스트 보셀
 웨이
- (74) 대리인
 특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 56 항

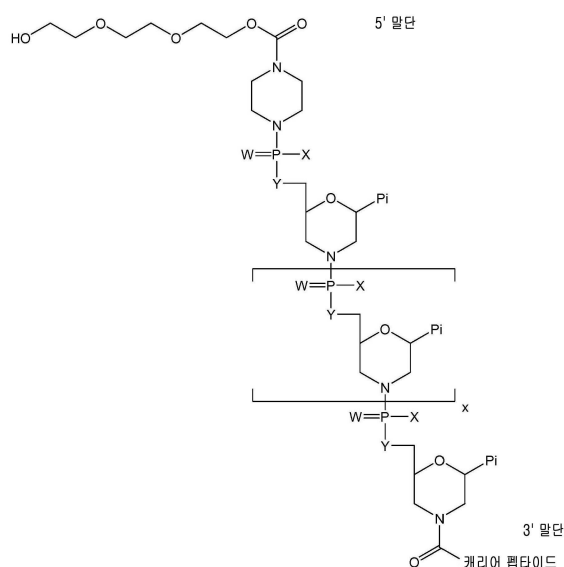
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 펩타이드 올리고뉴클레오타이드 접합체

(57) 요약

캐리어 펩타이드에 접합된 올리고뉴클레오타이드 유사체가 제공된다. 기술된 화합물은 다양한 질환, 예를 들면 단백질 발현의 억제 또는 이상 mRNA의 수정을 통해 유익한 치료효과를 생기게 하는 질환의 치료에 유용하다.

대표도 - 도1c



명세서

청구범위

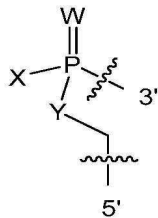
청구항 1

(a) 4 내지 40개의 아미노산 소단위(subunit)를 포함하는 캐리어 펩타이드; 및

(b) 실질적으로 비전하된 골격 및 표적 핵산에 서열 특이적 결합을 위한 표적 염기서열을 포함하는 핵산 유사체를 포함하는 접합체(conjugate)이며,

여기서, 상기 두 개 이상의 아미노산 소단위는 양전하된 아미노산이며, 상기 캐리어 펩타이드가 상기 캐리어 펩타이드의 카르복시 말단에 글리신(G) 아미노산을 포함하고, 7개 이하의 인접 아미노산 소단위(contiguous amino acid subunits)가 아르기닌이고, 상기 캐리어 펩타이드가 상기 핵산 유사체에 공유적으로 부착되는 것이며,

상기 비전하된 골격이 소단위간 결합에 의해 연결된 모르폴리노 고리 구조의 서열을 포함하며, 상기 소단위간 결합이 인접한 모르폴리노 고리 구조의 5'-말단에 하나의 모르폴리노 고리 구조의 3'-말단을 연결하며, 여기서 각각의 모르폴리노 고리 구조가 염기쌍 부분에 결합되어, 상기 핵산 유사체가 표적 핵산에 서열-특이적 방식으로 결합할 수 있고, 여기서 상기 소단위간 결합이 하기 화학식(I) 또는 그의 염을 갖는, 접합체:



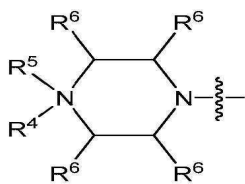
(I)

상기 식에서, 상기 소단위 간 결합(I) 각각이 독립적으로 결합(A) 또는 결합(B)이며,

여기서 결합(A)에서,

W는 각각의 경우에 독립적으로 S 또는 O이고;

X는 각각의 경우에 독립적으로 $-N(CH_3)_2$, $-NR^1R^2$, $-OR^3$ 또는



(II) 이고;

Y는 각각의 경우에 독립적으로 O 또는 $-NR^2$ 이고;

R^1 은 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 메틸이고;

R^2 는 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 $-LNR^4R^5R^7$ 이고;

R^3 는 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 C_1-C_6 알킬이고;

R^4 는 각각의 경우에 독립적으로 수소, 메틸, $-C(=NH)NH_2$, $-Z-L-NHC(=NH)NH_2$ 또는 $-[C(O)CHR'NH]_mH$ 이고, 여기서 Z는 카르보닐(C(O)) 또는 직접 결합이고, R'는 천연적으로 발생하는 아미노산의 측쇄 또는 이의 하나- 또는 두

개- 탄소 동족체(homolog)이고, m은 1 내지 6이며;

R^5 는 각각의 경우에 독립적으로 수소, 메틸 또는 전자쌍이며;

R^6 는 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 메틸이고;

R^7 은 각각의 경우에 독립적으로 수소, C_1-C_6 알킬 또는 C_1-C_6 알콕시알킬이며;

L은 알킬, 알콕시 또는 알킬아미노 기 또는 이의 조합을 포함하는 최대 18개 원소 길이의 선택적 링커이고; 또한

여기서 결합(B)에서:

W는 각각의 경우에 독립적으로 S 또는 O이고;

X는 각각의 경우에 독립적으로 $-NR^8R^9$ 또는 $-OR^3$ 이고; 또한

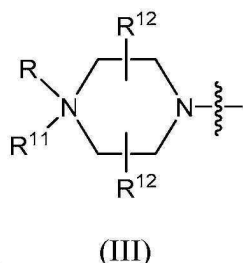
Y는 각각의 경우에 독립적으로 O 또는 $-NR^{10}$ 이고,

R^8 는 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 C_2-C_{12} 알킬이고;

R^9 는 각각의 경우에 독립적으로 수소, C_1-C_{12} 알킬, C_1-C_{12} 아르알킬 또는 아릴이고;

R^{10} 은 각각의 경우에 독립적으로 수소, C_1-C_{12} 알킬 또는 $-LNR^4R^5R^7$ 이고;

여기서 R^8 및 R^9 는 결합하여 5-18 원 모노 또는 바이사이클릭 헤테로사이클을 형성할 수 있거나 또는 R^8 , R^9 또는 R^3 은 R^{10} 과 함께 결합하여 5-7 원 헤테로사이클을 형성할 수 있으며, 또한 X가 4-피페라지노인 경우, X는 다음 구조식 (III)을 가지며:



상기 식에서,

R^{11} 은 각각의 경우에 독립적으로 C_2-C_{12} 알킬, C_1-C_{12} 아미노알킬, C_1-C_{12} 알킬카르보닐, 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로사이클릴이고;

R는 각각의 경우에 독립적으로 전자쌍, 수소 또는 C_1-C_{12} 알킬이고;

R^{12} 는 각각의 경우에 독립적으로 수소, C_1-C_{12} 알킬, C_1-C_{12} 아미노알킬, $-NH_2$, $-CONH_2$, $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}R^{14}R^{15}$, C_1-C_{12} 알킬카르보닐, 옥소, $-CN$, 트리플루오로메틸, 아미달, 아미디닐, 아미디닐알킬, 아미디닐알킬카르보닐, 구아니디닐, 구아니디닐알킬, 구아니디닐알킬카르보닐, 콜레이트, 데옥시콜레이트, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클, $-SR^{13}$ 또는 C_1-C_{12} 알콕시이고, 여기서 R^{13} , R^{14} 및 R^{15} 는 각각의 경우에 독립적으로 C_1-C_{12} 알킬임.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 캐리어 펩타이드가 6 내지 20개의 아미노산 소단위를 포함하는 접합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 양전하된 아미노산이 히스티딘(H), 라이신(L), 아르기닌(R) 또는 이의 조합물인, 집합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 양전하된 아미노산의 적어도 하나가 아르기닌인, 집합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 아미노산 소단위의 각각이, 카르복시 말단 글리신을 제외하고는, 양전하된 아미노산인, 집합체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 양전하된 아미노산의 각각이 아르기닌인, 집합체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 양전하된 아미노산의 적어도 하나가 아르기닌 유사체이고, 상기 아르기닌 유사체가 $R^a N=C(NH_2)R^b$ 구조의 측쇄를 포함하는 양이온성 α -아미노산이며, 여기서 R^a 는 H 또는 R^c 이고; R^b 는 R^c , NH_2 , NHR 또는 $N(R^c)_2$ 이고, 여기서 R^c 는 C_1-C_6 알킬 또는 C_2-C_6 알케닐이고, 또한 산소 또는 질소를 포함하거나 포함하지 않으며, 또는 R^a 및 R^b 는 함께 고리를 형성할 수 있으며, 또한 상기 측쇄는 R^a 또는 R^b 를 통하여 아미노산에 연결되는 것인, 집합체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 아미노산 소단위의 적어도 20%가 양전하된 아미노산인, 집합체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 아미노산 소단위의 적어도 50%가 양전하된 아미노산인, 집합체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 아미노산 소단위의 적어도 80%가 양전하된 아미노산인, 집합체.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 캐리어 펩타이드가 서열 $(R^d)_m$ 을 포함하며, 여기서 R^d 가 각각의 경우에 독립적으로 양전하된 아미노산이고, m 이 2 내지 12 범위의 정수인, 집합체.

청구항 12

제11항에 있어서, R^d 가 각각의 경우에 독립적으로 아르기닌, 히스티딘 또는 라이신인, 집합체.

청구항 13

제11항에 있어서, 각각의 R^d 가 아르기닌인, 집합체.

청구항 14

제1항에 있어서, 각각의 아미노산 소단위가, 카르복시 말단 글리신을 제외하고는, 아르기닌인, 집합체.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 캐리어 펩타이드가 적어도 하나의 소수성 아미노산을 포함하고, 상기 소수성 아미노산이 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴 또는 아르알킬 측쇄를 포함하고, 여기서 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐 측쇄는 6개 탄소원자마다 최대 1개의 헤테로원자를 포함하는, 집합체.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 캐리어 펩타이드가 두 개 이상의 소수성 아미노산을 포함하는, 집합체.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 캐리어 펩타이드가 두 개 이상의 인접 소수성 아미노산을 포함하는, 집합체.

청구항 18

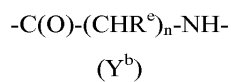
제15항에 있어서, 상기 소수성 아미노산의 적어도 하나가 페닐알라닌인, 집합체.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 소수성 아미노산의 각각이 페닐알라닌인, 집합체.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 캐리어 펩타이드가 하기 식 (Y^b)를 갖는 적어도 하나의 중성 아미노산을 포함하는, 집합체:



여기서 n 은 2 내지 7이고 각각의 R^c 는 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 메틸이다.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 캐리어 펩타이드가 서열 $[(R^dY^bR^d)_x(R^dR^dY^b)_y]_z$ 를 포함하며, 여기서 R^d 는 각각의 경우에 독립적으로 양전하된 아미노산이며, x 및 y 는 각각의 경우에 독립적으로 0 또는 1이고, 단 $x + y$ 는 1 또는 2이고, z 는 1 내지 6 범위의 정수인, 집합체.

청구항 22

제21항에 있어서, R^d 는 각각의 경우에 독립적으로 아르기닌, 히스티딘 또는 라이신인, 집합체.

청구항 23

제21항에 있어서, 각각의 R^d 는 아르기닌인, 집합체.

청구항 24

제21항에 있어서, 적어도 하나의 Y^b 는 6-아미노헥사노익산 또는 β -알라닌인, 집합체.

청구항 25

제1항에 있어서, 상기 캐리어 펩타이드가 서열 ILFQY를 포함하는, 집합체.

청구항 26

제1항에 있어서, 상기 캐리어 펩타이드가 서열 ILFQ, IWFQ 또는 ILIQ을 포함하는, 집합체.

청구항 27

제1항에 있어서, 상기 캐리어 펩타이드가 서열 PPMWS, PPMWT, PPMFS 또는 PPMYS를 포함하는, 집합체.

청구항 28

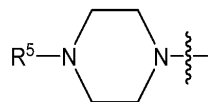
제1항에 있어서, 적어도 하나의 상기 소단위 결합이 결합(A)인, 집합체.

청구항 29

제1항에 있어서, 적어도 하나의 상기 결합(A)에서 X가 $-N(CH_3)_2$ 인, 접합체.

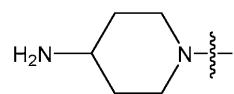
청구항 30

제1항에 있어서, 적어도 하나의 결합(A)에서 X가 다음 구조식을 갖는, 접합체:



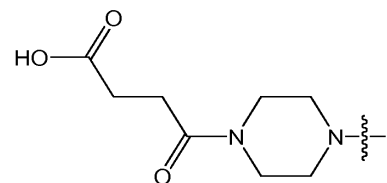
청구항 31

제1항에 있어서, 적어도 하나의 결합(B)에서 X가 다음 구조식을 갖는, 접합체:



청구항 32

제1항에 있어서, 적어도 하나의 결합(B)에서 X가 다음 구조식을 갖는, 접합체:

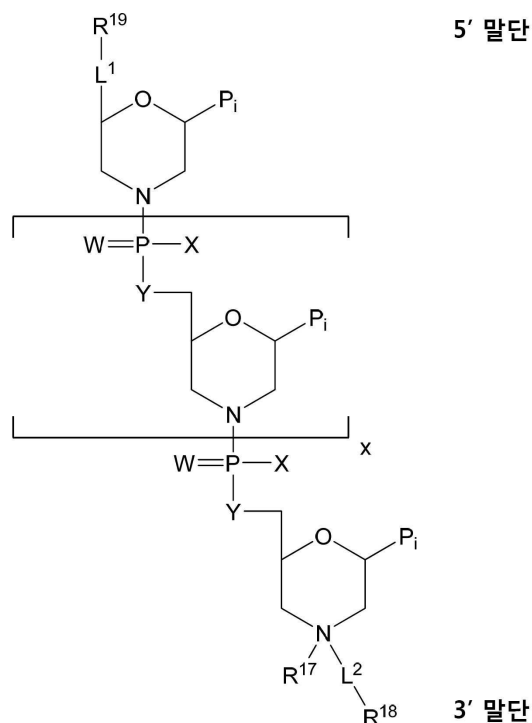


청구항 33

제1항에 있어서, W 및 Y가 각각의 경우에 각각 O인, 접합체.

청구항 34

제1항에 있어서, 상기 핵산 유사체가 하기 화학식(XVII) 또는 그의 염의 구조를 갖는, 접합체:



(XVII)

상기 식에서,

R^{17} 은 각각의 경우에 독립적으로 부재하거나, 수소 또는 C_1-C_6 알킬이고;

R^{18} 및 R^{19} 는 각각의 경우에 독립적으로 부재하거나, 수소, 캐리어 펩타이드, C_2-C_{30} 알킬카르보닐, $-C(=O)OR^{21}$ 또는 R^{20} 이고;

R^{20} 은 각각의 경우에 독립적으로 구아니디닐, 헤테로사이클릴, C_1-C_{30} 알킬, C_3-C_8 사이클로알킬; C_6-C_{30} 아릴, C_7-C_{30} 아르알킬, C_3-C_{30} 알킬카르보닐, C_3-C_8 사이클로알킬카르보닐, C_3-C_8 사이클로알킬알킬카르보닐, C_7-C_{30} 아릴카르보닐, C_7-C_{30} 아르알킬카르보닐, C_2-C_{30} 알킬옥시카르보닐, C_3-C_8 사이클로알킬옥시카르보닐, C_7-C_{30} 아릴옥시카르보닐, C_8-C_{30} 아르알킬옥시카르보닐, 또는 $-P(=O)(R^{22})_2$ 이고;

R^{21} 은 하나 이상의 에테르 결합, 하이드록실 잔기 또는 이의 조합을 포함하는 C_1-C_{30} 알킬이고;

각각의 R^{22} 는 독립적으로 C^6-C^{12} 아릴옥시이고,

Pi는 염기쌍 부분이고;

L^1 및 L^2 는 각각 직접 결합 또는 알킬, 하이드록실, 알콕시, 알킬아미노, 아마이드, 에스테르, 카르보닐, 카르바메이트, 포스포로디아미테이트, 포스포로아미테이트, 포스포로티오에이트 및 포스포디에스테르로부터 선택된 결합을 포함하는 최대 18개 원자 길이의 링커이고;

x는 0 또는 그 이상의 정수이고;

여기서 R^{17} 및 R^{18} 는 둘다 부재하지는 않으며 R^{18} 또는 R^{19} 의 적어도 하나는 상기 캐리어 펩타이드이다.

청구항 35

제1항의 집합체 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 바이러스 감염 또는 신경근육 질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 바이러스 감염이 인플루엔자인, 조성물.

청구항 37

제35항에 있어서, 상기 신경근육 질환이 뒤센(Duchenne) 근육 디스트로피인, 조성물.

청구항 38

제1항의 캐리어 펌프타이드를 핵산 유사체에 접합시키는 단계를 포함하는, 제1항의 핵산 유사체의 세포 내로의 수송을 *in vitro*에서 증진하는 방법으로서, 상기 핵산 유사체의 세포 내로의 수송이 비접합 형태의 핵산 유사체에 비하여 증가되는, 방법.

청구항 39

제34항에 있어서, 상기 캐리어 펄타이드는 서열번호: 60, 69, 70, 89-121, 125, 130-160, 162-257, 276, 277, 281-288, 293-297, 300, 302-412, 419-552, 및 554-566으로부터 선택되는 것인, 접합체.

청구항 40

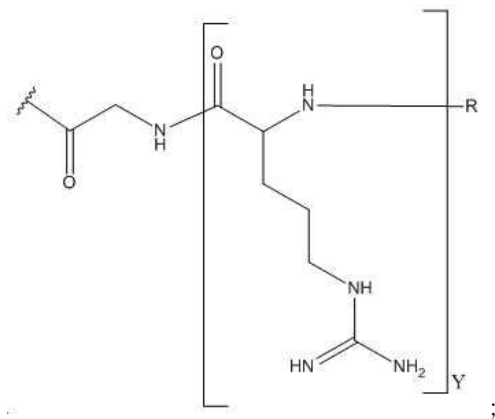
제34항에 있어서, 상기 캐리어 펌타이드는 서열번호: 130, 157-160, 251, 256, 386-388, 및 540으로부터 선택되는 것인, 접합체.

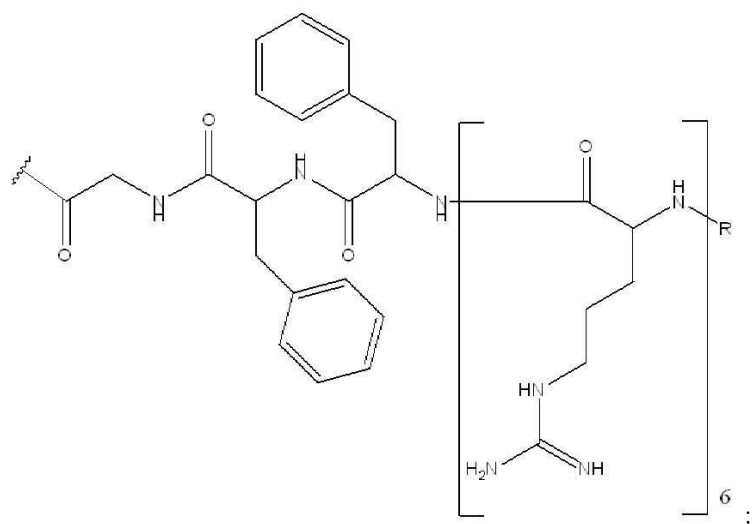
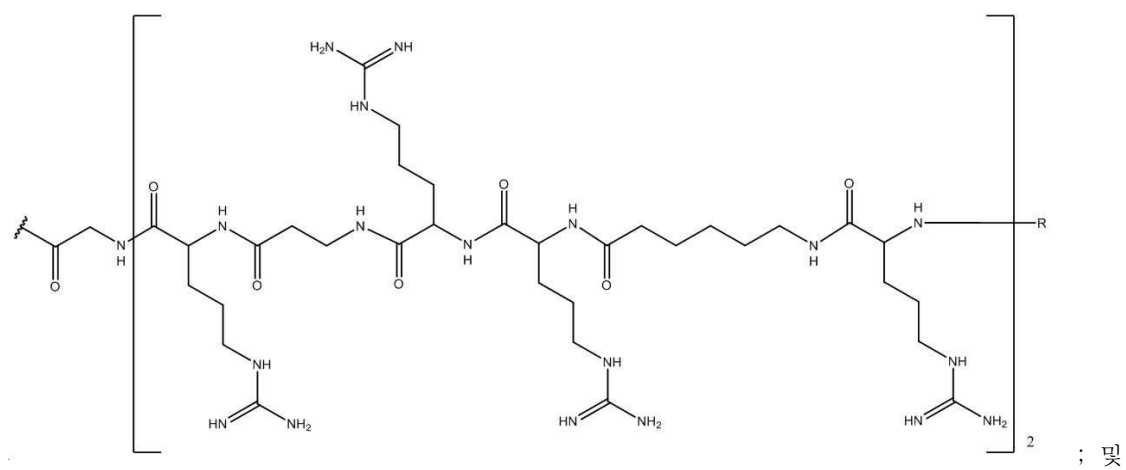
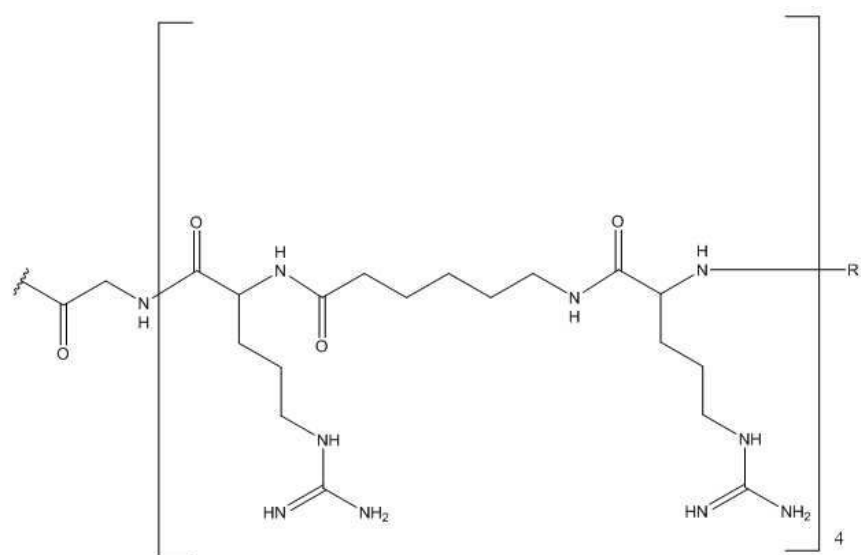
청구항 41

제34항에 있어서, 상기 캐리어 펄타이드는 서열번호: 159인, 접합체.

청구항 42

제1항에 있어서, 상기 캐리어 펩타이드는 하기에서 선택되는 화학식의 캐리어 펩타이드인, 접합체:

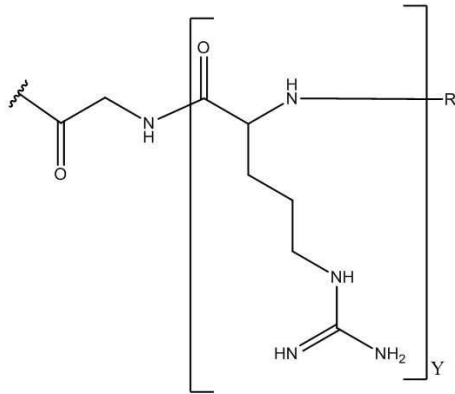




여기서, Y는 4 내지 7의 정수이고; R은 H, 아세틸, 벤조일 및 스테아로일로부터 선택됨.

청구항 43

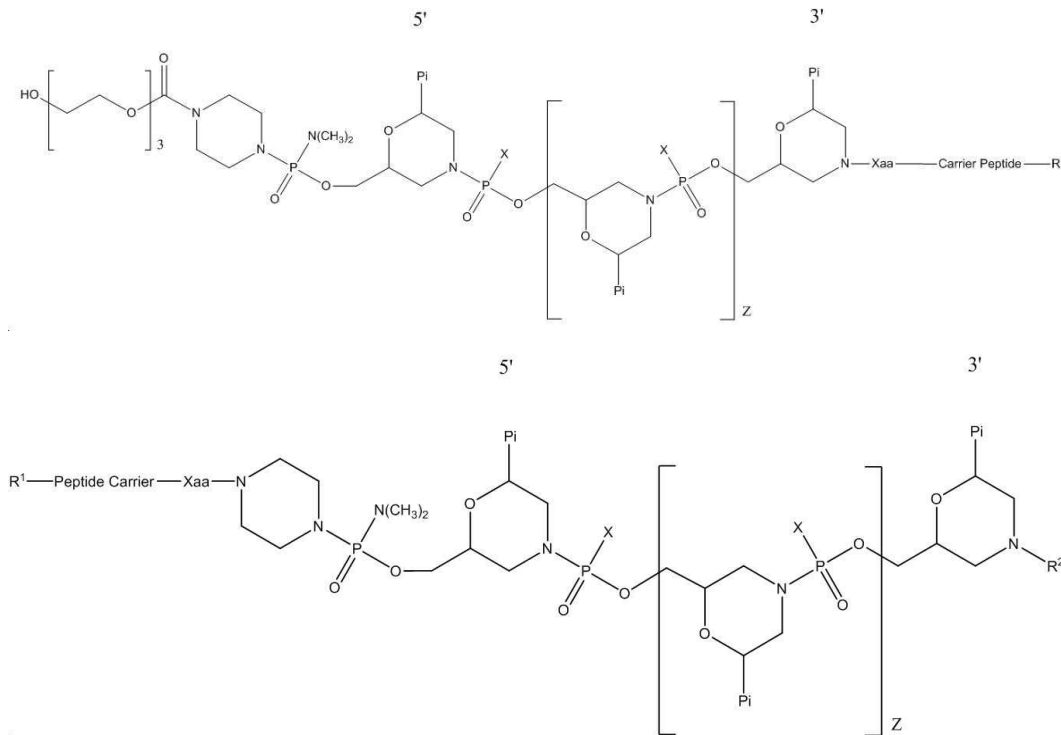
제42항에 있어서, 상기 캐리어 펩타이드는 하기 화학식의 캐리어 펩타이드인, 접합체:



여기서, Y는 6임.

청구항 44

제1항에 있어서, 상기 접합체는



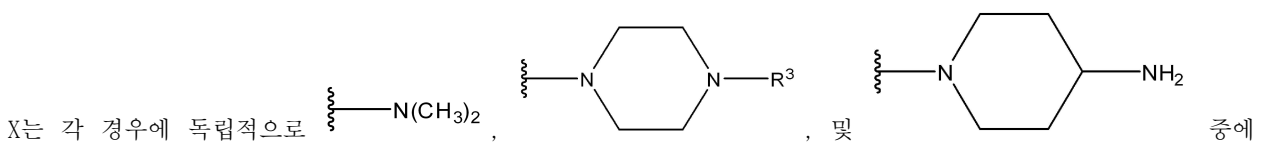
어느 하나의 약제학적으로 허용가능한 염 중에서 선택되며,

여기서, Z는 0 내지 38의 정수이며;

R은 H, 아세틸, 벤조일 및 스테아로일로부터 선택되고;

R¹은 H, 아세틸, 벤조일 및 스테아로일로부터 선택되며;

R²는 H, 아세틸, 벤조일, 스테아로일, 트리틸 및 4-메톡시트리틸로부터 선택되고;



선택되고, 여기서 R^3 는 H, 메틸, 및 전자쌍 중에서 선택되며;

각각의 Pi는 퓨린 또는 피리미딘 염기-짜짓기 부분(moiety)으로, 각 Pi는 함께 표적 염기 서열을 형성하고,

캐리어 펌타이드는 서열번호: 60, 69, 70, 89-121, 125, 130-160, 162-257, 276, 277, 281-288, 293-297, 300, 302-412, 419-552, 및 554-566로부터 선택되며,

Xaa는 카르복시-말단 글리신인, 접합체.

청구항 45

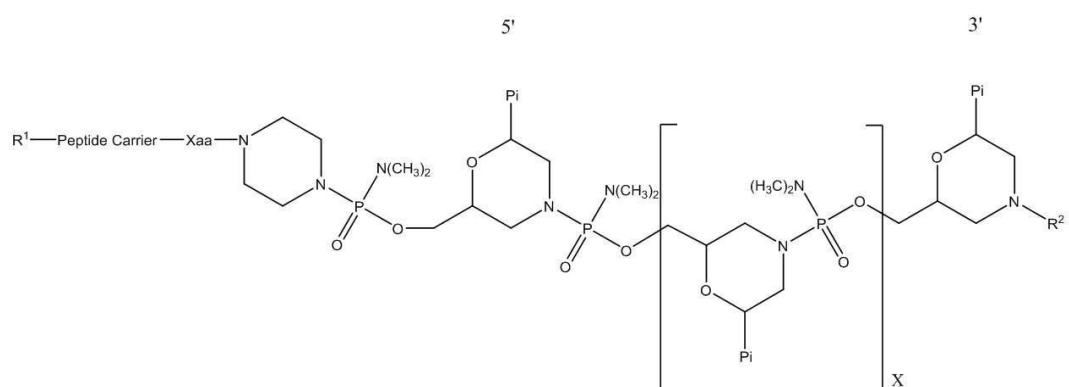
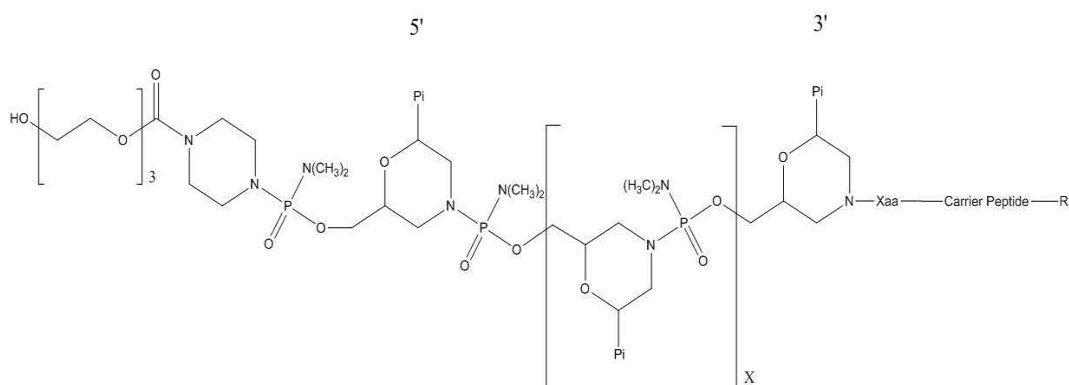
제44항에 있어서, 상기 캐리어 펄타이드는 서열번호: 130, 157-160, 251, 256, 386-388, 및 540으로부터 선택되는, 집합체.

청구항 46

제44항에 있어서, 상기 캐리어 펄타이드는 서열번호: 159인, 접합체.

청구항 47

제1항에 있어서, 상기 접합체는



어느 하나의 약제학적으로 허용가능한 염 중에서 선택되며,

여기서,

X는 0 내지 38의 정수이고;

R은 H, 아세틸, 벤조일 및 스테아로일로부터 선택되며;

R¹은 H, 아세틸, 벤조일 및 스테아로일로로부터 선택되고;

R²는 H, 아세틸, 벤조일, 스테아로일, 트리틸 및 4-메톡시트리틸로부터 선택되며;

각각의 P_i 는 퓨린 또는 피리미딘 염기-짜짓기 부분으로, 각 P_i 는 함께 표적 염기 서열을 형성하고;

캐리어 펩타이드는 서열번호: 60, 69, 70, 89-121, 125, 130-160, 162-257, 276, 277, 281-288, 293-297, 300, 302-412, 419-552, 및 554-566으로부터 선택되며;

Xaa는 카르복시-말단 글리신인, 접합체.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 캐리어 펩타이드는 서열번호: 130, 157-160, 251, 256, 386-388, 및 540으로부터 선택되는, 접합체.

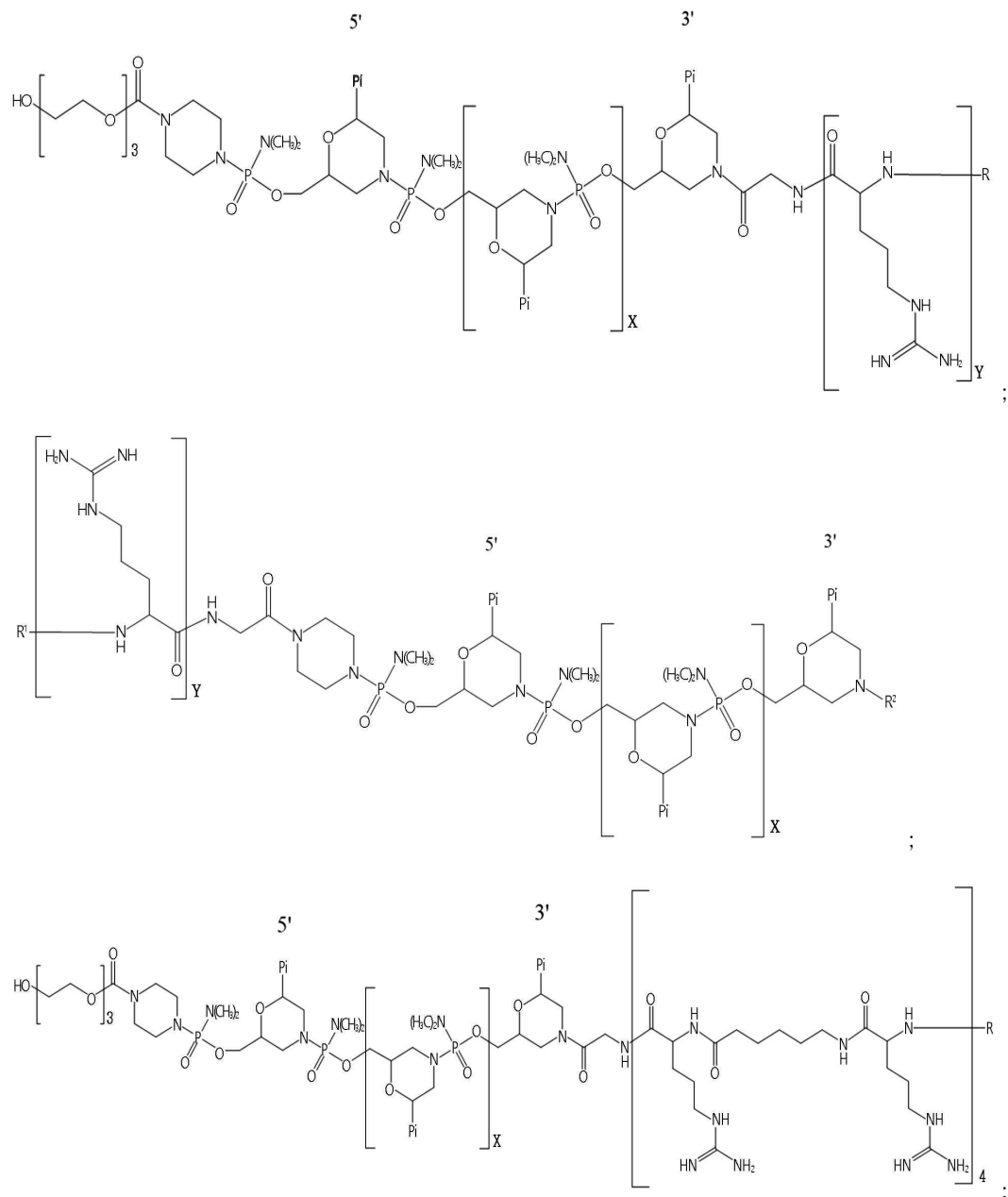
청구항 49

제47항에 있어서, 상기 캐리어 펩타이드는 서열번호: 159인, 접합체.

청구항 50

제47항에 있어서, 각각의 Pi는 독립적으로 아데닌, 시토신, 구아닌, 우라실, 티민 및 이노신으로부터 선택되는, 접합체.

청구항 51



것이거나, 이의 약제학적으로 허용가능한 염인, 화합물로서,

여기서,

X는 0 내지 38의 정수이고;

Y는 4 내지 9의 정수이며;

Z는 6 또는 9이고;

R은 H, 아세틸, 벤조일 및 스테아로일로부터 선택되며;

R¹은 H, 아세틸, 벤조일 및 스테아로일로부터 선택되고;

R²는 H, 아세틸, 벤조일, 스테아로일, 트리틸 및 4-메톡시트리틸로부터 선택되며;

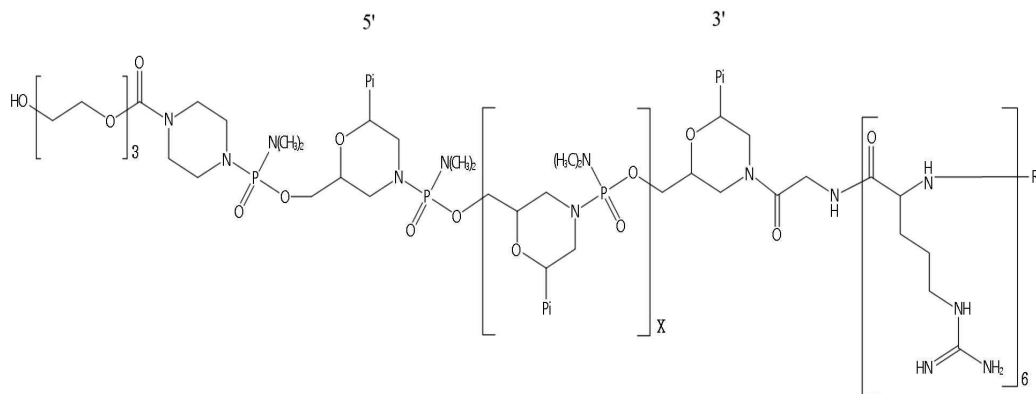
각각의 Pi는 퓨린 또는 피리미딘 염기-짜짓기 부분으로, 각 Pi는 함께 표적 염기 서열을 형성하는, 화합물.

청구항 52

제51항에 있어서, 각각의 Pi는 독립적으로 아데닌, 시토신, 구아닌, 우라실, 티민 및 이노신으로부터 선택되는, 화합물.

청구항 53

제51항에 있어서, 상기 화합물은



화합물.

또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염인,

청구항 54

제53항에 있어서, R은 H인, 화합물.

청구항 55

제53항에 있어서, R은 아세틸인, 화합물.

청구항 56

제53항에 있어서, 각각의 Pi는 독립적으로 아데닌, 시토신, 구아닌, 우라실, 티민 및 이노신으로부터 선택되는, 화합물.

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련출원에 대한 상호참조

[0002] 본 출원은 2011년 5월 5일자 출원된 미국특허출원 13/101,942호 및 2011년 5월 13일자 출원된 미국특허출원 13/107,528호의 35 U.S.C. § 120에 따른 우선권을 주장하며, 이들 출원은 전부 본 명세서에서 참고로 인용된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 안티센스 화합물로서 유용한 올리고뉴클레오타이드 화합물(올리고머), 및 더욱 특히 세포 침투성 펩타이드에 접합된 올리고머 화합물, 및 안티센스 적용에서 이러한 올리고머 화합물의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 잠재적으로 유용한 생물학적 활성을 갖는 많은 약물들의 실제적 유용성은 흔히 이러한 약물을 그들의 표적에 전달하는데 어려움 때문에 방해되고 있다. 세포내에 전달하려는 화합물은 일반적으로 주로 수성 세포외 환경으로부터 전달된 다음 친유성 세포막을 침투하여 세포에 대한 진입을 얻어야 한다. 물질이 특이적 수송 기구로 적극적으로 이동되지 않는 한, 많은 분자들, 특히 대분자들은 실제적인 가용화에 너무 친유성이거나 또는 너무 친수성이어서 막을 침투하지 못한다.

[0006] 아미노산 잔기 49-57로 구성된 HIV Tat 단백질(서열 RKKRRQRRR을 갖는 (Tat 49 57)의 분절(segment)은 생물학적으로 활성인 펩타이드 및 단백질을 세포에 전달하는데 사용되어 왔다 (예를 들면, Barsoum et al., 1994, PCT 공개번호 WO 94/04686호 참조). Tat (49 60)는 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드의 전달을 증가시키는데 사용되어 왔다(Astriab-Fisher, Sergueev et al. 2000; Astriab-Fisher, Sergueev et al. 2002). 역 Tat, 또는 rTat(57-49) (RRRQRRKKR)는 Tat (49 57)에 비하여 증강된 효능으로 세포 내에 형광물질을 전달하는 것으로 보고되었다(Wender, Mitchell et al. 2000; Rothbard, Kreider et al. 2002). Rothbard 및 Wender는 또한 다른 아르기닌-풍부 수송 고분자를 기술하였다 (PCT 공보 WO 01/62297호; 미국특허 제6,306,993호; 미국특허공개 제2003/0032593호).

[0007] 올리고뉴클레오타이드는 잠재적으로 유용한 약물 화합물의 한 부류이며 이들의 전달은 흔히 치료적 사용에 장애가 되어왔다. 포스포로디아미테이트-결합된 모르폴리노 올리고머 (PMOs; 예를 들면 Summerton and Weller, 1997 참조)는 이 점에서 포스포로티오에이트와 같은 하전된 올리고뉴클레오타이드 유사체보다 더욱 유망한 것으로 발견되었다. PMO는 스플라이싱(splicing) 또는 번역기계 구성요소들의 결합 또는 진행을 방지함으로써 유전자 발현을 억제하는 수용성이고, 비전하된 또는 실질적으로 비전하된 안티센스 분자이다. PMO는 또한 바이러스 복제를 억제하거나 차단하는 것으로 나타났다 (Stein, Skilling et al. 2001; McCaffrey, Meuse et al. 2003). 이들은 효소적 소화에 매우 내성이 있다 (Hudziak, Barofsky et al. 1996). PMO는 무세포 및 세포 배양 모델에서 시험관내에서(Stein, Foster et al. 1997; Summerton and Weller 1997), 및 제프라피시(zebrafish), 개구리 및 섬개 배낭에서 생체내에서(Heasman, Kofron et al. 2000; Nasevicius and Ekker 2000) 뿐만 아니라, 쥐, 마우스, 토끼, 개 및 돼지와 같은 성인 동물 모델에서 (예를 들면 Arora and Iversen 2000; Qin, Taylor et al. 2000; Iversen 2001; Kipshidze, Keane et al. 2001; Devi 2002; Devi, Oldenkamp et al. 2002; Kipshidze,

Kim et al. 2002; Ricker, Mata et al. 2002 참조) 높은 안티센스 특이성 및 효능을 입증하였다.

[0008] 안티센스 PMO 올리고머는 세포에 흡수되고 또한 다른 널리 사용되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드보다 더 적은 비특이적 효과로 생체내에서 더욱 지속적으로 효과가 있는 것으로 나타났다 (예를 들면 P. Iversen, "Phosphoramidite Morpholino Oligomers", in Antisense Drug Technology, S.T. Crooke, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 2001 참조). 아르기닌 풍부 펩타이드에 PMO가 접합하면 이들의 세포 흡수(cell uptake)가 증가되는 것으로 나타났다 (예를 들면 미국특허 제7,468,418호 참조). 그러나 접합체의 독성은 이용가능한 약물 후보로서 이들의 개발을 느리게 하였다.

[0009] 현저한 진보가 이루어졌을 지라도, 개량된 안티센스 또는 항원 성능을 갖는 올리고뉴클레오타이드 접합체에 대한 필요성이 당업계에 남아있다. 이러한 개량된 안티센스 또는 항원 성능은 낮은 독성, 서열 선택성에 부합하지 않는 DNA 및 RNA에 대한 더욱 강한 친화성; 개량된 약물동력학 및 조직 분포; 개량된 세포전달 및 신뢰가능하고 조절가능한 생체의 분포를 포함한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 화합물은 이러한 문제를 다루고 있고 당해 분야에서 기존의 안티센스 분자보다 개선을 제공한다. 글리신 또는 프롤린 아미노산을 통해 실질적으로 비전하된 핵산 유사체에 세포 침투성 펩타이드를 연결시킴으로써, 본 발명자들은 다른 펩타이드 올리고머 접합체와 관련된 독성 문제를 다루었다. 더욱이, 올리고뉴클레오타이드 유사체, 예를 들면 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드의 5' 및/또는 3' 말단에 말단 부위의 소단위간 결합 및/또는 접합의 변형은 또한 접합체의 성질을 개선할 수 있다. 예를 들면, 특정의 실시형태에서 기술된 접합체는 다른 올리고뉴클레오타이드 유사체에 비하여 감소된 독성 및/또는 증가된 세포 전달, 잠재성, 및/또는 조직 분포를 가지며 및/또는 표적 기관에 더욱 효과적으로 전달할 수 있다. 이들 우수한 특성들은 유리한 치료지수, 감소된 임상적 투여 및 제품의 낮은 비용을 초래한다.

과제의 해결 수단

[0011] 따라서 하나의 실시형태에서, 본 발명은

[0012] (a) 아미노산 소단위를 포함하는 캐리어 펩타이드; 및

[0013] (b) 실질적으로 비전하된 골격 및 표적핵산에 서열 특이적 결합을 위한 표적 염기서열을 포함하는 핵산 유사체를 포함하는 접합체(conjugate)이며,

[0015] 여기서, 상기 아미노산 소단위의 두 개 이상이 양전하된 아미노산이며, 상기 캐리어 펩타이드가 캐리어 펩타이드의 카르복시 말단에 글리신(G) 또는 프롤린(P) 아미노산을 포함하며; 또한 상기 캐리어 펩타이드가 핵산 유사체에 공유적으로 부착되는 것인 접합체를 제공한다. 상기 접합체 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 조성물이 또한 제공된다.

[0016] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 접합체에 단백질을 코딩화하는 핵산을 노출시키는 단계를 포함하는 단백질의 생산을 억제하는 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 양상은 청구항 제1항의 캐리어 펩타이드를 핵산 유사체에 접합시키는 단계를 포함하는, 세포 내로 핵산 유사체의 수송을 증강시키는 방법으로, 세포내로 핵산 유사체의 수송이 접합되지 않는 형태의 핵산 유사체에 비하여 증강되는 방법을 포함한다.

[0018] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 기술된 접합체의 치료학적 유효량을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 대상의 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 상기 접합체를 제조하는 방법, 이들의 사용방법 및 핵산 유사체에 접합하는데 유용한 캐리어 펩타이드가 또한 제공된다.

[0019] 본 발명의 이들 및 다른 목적은 다음의 상세한 설명을 참조하여 명확해질 것이다. 이 목적을 위하여, 특정의 배경 정보, 절차, 화합물 및/또는 조성물을 더욱 상세하게 설명하는 다양한 문헌들이 본 명세서에서 기술되며 또

한 이들 각각은 전부 여기서 참고로 인용된다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1A는 포스포로디아미테이트 결합을 포함하는 예시적인 모르폴리노 올리고머 구조를 도시한다.

도 1B는 5' 말단에 캐리어 펩타이드에 접합된 모르폴리노 올리고머를 도시한다.

도 1C는 3' 말단에 캐리어 펩타이드에 접합된 모르폴리노 올리고머를 도시한다.

도 1D-G는 1D 내지 1G로 표시되는 예시적인 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드의 반복 소단위 분절을 도시한다.

도 2는 모르폴리노-T 부분에 결합된 예시적인 소단위간 결합을 도시한다.

도 3은 고체상 합성을 위한 링커의 제조를 나타내는 반응도식이다.

도 4는 올리고머 합성을 위한 고체 지지체의 제조를 증명한다.

도 5A, 5B 및 5C는 각각 마우스 사두근, 가로막 및 심장에서 공지된 접합체에 비교하여 예시적인 접합체에 대한 엑손 스킵핑 데이터(exon skipping data)를 나타낸다.

도 6A, 6B 및 6C는 각각 마우스 사두근, 가로막 및 심장에서 공지된 접합체에 비교하여 예시적인 접합체에 대한 엑손 스킵핑 데이터(exon skipping data)의 대체 도시이다.

도 7A 및 7B는 각각 다양한 펩타이드-올리고머 접합체로 처리된 마우스의 혈중요소 질소(BUN) 수준 및 생존율을 도시하는 그래프이다.

도 8A 및 8B는 각각 다양한 펩타이드-올리고머 접합체로 처리된 마우스의 신장손상 마커(KIM) 데이터 및 클러스테린(Clu)를 나타낸다.

도 9A, 9B, 9C 및 9D는 공지된 접합체에 비교하여 예시적인 접합체로 처리된 마우스에서, 엑손 스킵핑, BUN 수준, 생존율 및 KIM 수준을 각각 비교하는 그래프이다.

도 10은 다양한 접합체로 처리된 마우스의 KIM 데이터를 나타낸다.

도 11은 다양한 접합체로 처리된 마우스의 BUN 분석의 결과를 나타낸다.

도 12는 마우스 신장조직에서 다양한 올리고머의 농도를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

1. 정의

[0022]

다음의 설명에서, 특정의 구체적인 상세는 다양한 실시형태의 철저한 이해를 제공하기 위하여 기술된다. 그러나, 당업자는 본 발명이 이들 상세 없이 실시할 수 있는 것으로 이해할 것이다. 다른 경우에, 잘 알려진 구조는 실시형태의 불필요하게 애매모호한 설명을 피하기 위하여 상세하게 나타내거나 기술하지 않았다. 문맥이 별도로 요구하지 않는 한, 다음의 명세서 및 특허청구범위 전반을 통하여, 단어 "~들을 포함하다" 및 그의 변형어 예를 들어 "~을 포함하다" 및 "~을 포함하는"은 개방적이고, 포괄적인 의미로, 즉 "~을 포함하지만, ~으로 제한되지 않는다"로 해석되어야 한다. 추가로, 본 명세서에 제공된 서두부분은 단지 편의상이지 청구된 발명의 범위 또는 의미를 해석하지 않는다.

[0023]

명세서 전반을 통하여 "하나의 실시형태" 또는 "한 실시형태"에 대한 언급은 실시형태와 관련하여 기술되는 특수한 특징, 구조, 또는 특성은 적어도 하나의 실시형태에 포함된다. 따라서, 본 명세서 전반을 통하여 다양한 위치에서 문구 "하나의 실시형태에서" 또는 "한 실시형태에서"의 기재는 동일한 실시형태를 반드시 전부 언급하는 것이 아니다. 더욱이, 특수한 특징, 구조 또는 특성은 하나 이상의 실시형태에서 임의의 적절한 방법으로 조합할 수 있다. 또한 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 사용되는 단수 형태 "하나" (a, an) 및 "상기" (the)는 문맥이 별도로 명확히 나타내지 않는 한 복수 언급을 포함한다. 용어 "또는"은 문맥이 별도로 명확히 지시되지 않는 한 "및/또는"을 포함하는 의미로 일반적으로 사용된다.

[0024]

본 명세서에서 사용되는 바와 같은 이하의 용어들은 별도로 지시되지 않는 한 다음과 같은 의미를 갖는다.

[0025] "아미노"는 -NH_2 라디칼을 나타낸다.

[0026] "시아노" 또는 "니트릴"은 라디칼을 나타낸다.

[0027] "하이드록시" 또는 "하이드록실"은 라디칼을 나타낸다.

[0028] "이미노"는 =NH 치환체를 나타낸다.

[0029] "구아니딜"은 -NHC(=NH)NH_2 치환체를 나타낸다.

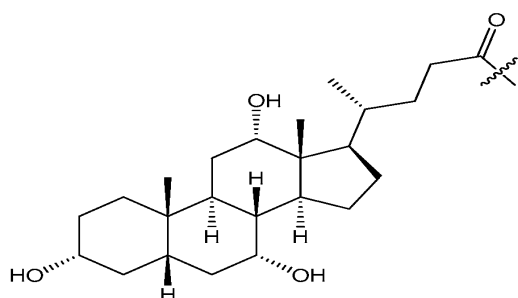
[0030] "아미디닐"은 -C(=NH)NH_2 치환체를 나타낸다.

[0031] "니트로"는 -NO_2 라디칼을 나타낸다.

[0032] "옥소"는 =O 치환체를 나타낸다.

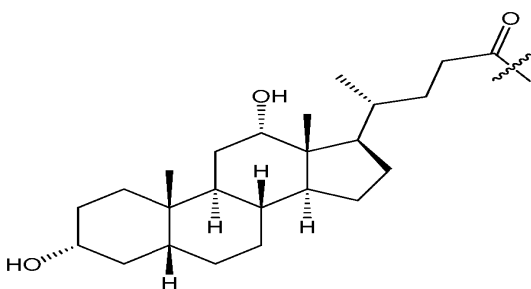
[0033] "티옥소"는 =S 치환체를 나타낸다.

[0034] "콜레이트"는 다음의 구조를 나타낸다:



[0035]

[0036] "테옥시콜레이트"는 다음의 구조를 나타낸다:



[0037]

[0038] "알킬"은 포화 또는 불포화되고 (즉, 하나 이상의 이중 및/또는 삼중결합을 함유하고), 1 내지 30개의 탄소원자를 가지며, 또한 단일 결합에 의해 나머지 분자에 부착되는 직쇄 또는 분지 탄화수소 사슬 라디칼을 나타낸다. 1 내지 30개의 임의의 탄소원자를 포함하는 알킬이 포함된다. 최대 30개의 탄소원자를 포함하는 알킬은 $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ 알킬로서 언급되며, 마찬가지로, 예를 들면, 최대 12개의 탄소원자를 포함하는 알킬은 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 알킬이다. 다른 수의 탄소원자를 포함하는 알킬 (및 여기서 정의된 다른 부분)은 유사하게 표시된다. 알킬기는, $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ 알킬, $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ 알킬, $\text{C}_1\text{-C}_{15}$ 알킬, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 알킬, $\text{C}_1\text{-C}_8$ 알킬, $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬, $\text{C}_1\text{-C}_4$ 알킬, $\text{C}_1\text{-C}_3$ 알킬, $\text{C}_1\text{-C}_2$ 알킬, $\text{C}_2\text{-C}_8$ 알킬, $\text{C}_3\text{-C}_8$ 알킬 및 $\text{C}_4\text{-C}_8$ 알킬을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 대표적인 알킬기는 메틸, 에틸, *n*-프로필, 1-메틸에틸 (이소-프로필), *n*-부틸, *i*-부틸, *s*-부틸, *n*-펜틸, 1,1-디메틸에틸 (*t*-부틸), 3-메틸헥실, 2-메틸헥실, 에틸, 프로프-1-에닐, 부트-1-에닐, 펜트-1-에닐, 펜타-1,4-디에닐, 에틸, 프로피닐, 부트-2-인일, 부트-3-인일, 펜티닐, 헥시닐 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 알킬기는 이하에 기술된 바와 같이 임의로 치환될 수 있다.

[0039] "알킬렌" 또는 "알킬렌 사슬"은 라디칼기에 나머지 분자를 연결하는 직쇄 또는 분지 이가 탄화수소 사슬을 나타낸다. 알킬렌은 포화 또는 불포화될 수 있다 (즉, 하나 이상의 이중 및/또는 삼중결합을 포함한다). 대표적인 알킬렌은 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 알킬렌, $\text{C}_1\text{-C}_8$ 알킬렌, $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬렌, $\text{C}_1\text{-C}_4$ 알킬렌, $\text{C}_1\text{-C}_3$ 알킬렌, $\text{C}_1\text{-C}_2$ 알킬렌, C_1 알킬렌을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 대표적인 알킬렌기는 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, *n*-부틸렌, 에틸렌, 프로

페닐렌, *n*-부테닐렌 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 알킬렌 사슬은 단일 또는 이중 결합을 통하여 나머지 분자에 또한 단일 또는 이중 결합을 통하여 라디칼 기에 부착된다. 나머지 분자와 라디칼기에의 알킬렌 사슬의 부착점은 상기 사슬 내에서 하나의 탄소 또는 임의의 두 개 탄소를 통해 존재할 수 있다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 알킬렌 사슬은 이하에 기술되는 바와 같이 임의로 치환될 수 있다.

[0040] "알콕시"는 식-OR_a의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_a는 정의된 바와 같은 알킬이다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한 알콕시기는 이하에 기술되는 바와 같이 임의로 치환될 수 있다.

[0041] "알콕시알킬"은 식 -R_bOR_a의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_a는 정의된 바와 같은 알킬 라디칼이고, R_b는 정의된 바와 같은 알킬렌 라디칼이다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 알콕시알킬기는 하기에 기술된 바와 같이 임의로 치환될 수 있다.

[0042] "알킬카르보닐"은 식 -C(=O)R_a의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_a는 상기 정의된 바와 같은 알킬 라디칼이다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 알킬카르보닐기는 하기에 정의된 바와 같이 임의로 치환될 수 있다.

[0043] "알킬옥시카르보닐"은 -C(=O)OR_a의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_a는 정의된 바와 같은 알킬 라디칼이다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 알킬옥시카르보닐기는 하기에 정의된 바와 같이 임의로 치환될 수 있다.

[0044] "알킬아미노"는 식 -NHR_a 또는 -NR_aR_a의 라디칼을 나타내며, 여기서 각각의 R_a는 독립적으로 상기에 정의된 바와 같은 알킬 라디칼이다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 알킬아미노기는 하기에 정의된 바와 같이 임의로 치환될 수 있다.

[0045] "아미딜"은 식 -N(H)C(=O)R_a의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_a는 여기서 정의된 바와 같은 알킬 또는 아릴 라디칼이다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 아미딜기는 하기에 정의된 바와 같이 임의로 치환될 수 있다.

[0046] "아미디닐알킬"은 식 -R_b-C(=NH)NH₂의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_b는 상기 정의된 바와 같은 알킬렌 라디칼이다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 아미디닐알킬 기는 하기에 정의된 바와 같이 임의로 치환될 수 있다.

[0047] "아미디닐알킬카르보닐"은 식 -C(=O)R_b-C(=NH)NH₂의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_b는 상기에 정의된 바와 같은 알킬렌 라디칼이다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 아미디닐알킬카르보닐기는 하기에 정의된 바와 같이 임의로 치환될 수 있다.

[0048] "아미노알킬"은 식 -R_b-NR_aR_a의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_b는 상기에서 정의된 바와 같은 알킬렌 라디칼이며, 각각의 R_a는 독립적으로 수소 또는 알킬 라디칼이다.

[0049] "티오알킬"은 식 -SR_a의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_a는 상기에서 정의된 바와 같은 알킬이다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 티오알킬기는 임의로 치환될 수 있다.

[0050] "아릴"은 수소, 6 내지 30개의 탄소원자 및 적어도 하나의 방향족 고리를 포함하는 탄화수소 고리 시스템으로부터 유도된 라디칼을 나타낸다. 아릴 라디칼은 융합 또는 가교된 고리 시스템을 포함할 수 있는 모노사이클릭, 바이사이클릭, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 고리 시스템일 수 있다. 아릴 라디칼은 아세안트릴렌, 아세나프틸렌, 아세펜안트릴렌, 안트라센, 아줄렌, 벤젠, 크리센, 플루오로안텐, 플루오렌, *as*-인다센, *s*-인다센, 인단, 인텐, 나트탈렌, 페닐렌, 펜안트렌, 플레이아덴(pleiadene), 피렌 및 트리페닐렌으로부터 유도된 아릴 라디칼을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 용어 "아릴" 또는 접두어 "아르-"(예를 들면 "아르알킬")은 임의로 치환되는 아릴 라디칼을 포함하는 것으로 의미한다.

[0051] "아르알킬"은 식 -R_b-R_c의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_b는 상기에서 정의된 바와 같은 알킬렌 사슬이며, R_c는 상기에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 아릴 라디칼, 예를 들면 벤질, 디페닐메틸, 트리틸 등이다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 아르알킬기는 임의로 치환될 수 있다.

[0052] "아릴카르보닐"은 식 -C(=O)R_c의 기를 나타내며, 여기서 R_c는 상기에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 아릴 라디

칼, 예를 들면 페닐이다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 아릴카르보닐기는 임의로 치환될 수 있다.

[0053] "아릴옥시카르보닐"은 식 $-C(=O)OR_c$ 의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_c 는 상기에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 아릴 라디칼, 예를 들면 페닐이다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 아릴옥시카르보닐기는 임의로 치환될 수 있다.

[0054] "아르알킬카르보닐"은 식 $-C(=O)R_b-R_c$ 의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_b 는 상기에서 정의된 바와 같은 알킬렌 사슬이며, R_c 는 상기에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 아릴 라디칼, 예를 들면 페닐이다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 아르알킬카르보닐기는 임의로 치환될 수 있다.

[0055] "아르알킬옥시카르보닐"은 식 $-C(=O)OR_b-R_c$ 의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_b 는 상기에서 정의된 바와 같은 알킬렌 사슬이며, R_c 는 상기에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 아릴 라디칼, 예를 들면 페닐이다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 아르알킬옥시카르보닐기는 임의로 치환될 수 있다.

[0056] "아릴옥시"는 식 $-OR_c$ 의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_c 는 상기에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 아릴 라디칼, 예를 들면 페닐이다. 본 명세서에서 별도로 구체적으로 언급되지 않는 한, 아릴카르보닐기는 임의로 치환될 수 있다.

[0057] "사이클로알킬"은 융합 또는 가교된 고리 시스템을 포함할 수 있고, 포화되거나 불포화되며, 또한 단일 결합에 의해 나머지 분자에 부착되는 안정한, 비방향족, 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 고리를 나타낸다. 대표적인 사이클로알킬은 3 내지 15개의 탄소원자 및 3 내지 8개의 탄소원자를 갖는 사이클로알킬을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 모노사이클릭 사이클로알킬 라디칼은 예를 들면, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸 및 사이클로옥틸을 포함한다. 폴리사이클릭 라디칼은 예를 들면 아다만틸, 노르보닐, 데칼리닐, 및 7,7-디메틸-바이사이클로[2.2.1]헵타닐을 포함한다. 본 명세서에서 구체적으로 언급되지 않는 한, 사이클로알킬기는 임의로 치환될 수 있다.

[0058] "사이클로알킬"은 식 $-R_bR_d$ 의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_b 는 상기에서 정의된 바와 같은 알킬렌이고, R_d 는 상기에서 정의된 바와 같은 사이클로알킬 라디칼이다. 본 명세서에서 구체적으로 언급되지 않는 한, 사이클로알킬알킬기는 임의로 치환될 수 있다.

[0059] "사이클로알킬카르보닐"은 식 $-C(=O)R_d$ 의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_d 는 상기에서 정의된 바와 같은 사이클로알킬 라디칼이다. 본 명세서에서 구체적으로 언급되지 않는 한, 사이클로알킬카르보닐기는 임의로 치환될 수 있다.

[0060] "사이클로알킬옥시카르보닐"은 식 $-C(=O)OR_d$ 의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_d 는 상기에서 정의된 바와 같은 사이클로알킬 라디칼이다. 본 명세서에서 구체적으로 언급되지 않는 한, 사이클로알킬옥시카르보닐기는 임의로 치환될 수 있다.

[0061] "융합된"은 기존의 고리 구조에 융합되는 여기서 기술된 임의의 고리 구조를 나타낸다. 융합된 고리가 헤테로사이클릭 고리 또는 헤테로아릴 고리인 경우, 융합된 헤테로사이클릭 고리 또는 융합된 헤테로아릴 고리의 일부가 되는 기존의 고리 구조상에 임의의 탄소원자는 질소원자로 치환될 수 있다.

[0062] "구아니디닐알킬"은 식 $-R_b-NHC(=NH)NH_2$ 의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_b 는 상기에서 정의된 바와 같은 알킬렌 라디칼이다. 본 명세서에서 구체적으로 언급되지 않는 한, 구아니디닐알킬기는 이하에 기술되는 바와 같이 임의로 치환될 수 있다.

[0063] "구아니디닐알킬카르보닐"은 식 $-C(=O)R_b-NHC(=NH)NH_2$ 의 라디칼을 나타내며, 여기서 R_b 는 상기에서 정의된 바와 같은 알킬렌 라디칼이다. 본 명세서에서 구체적으로 언급되지 않는 한, 구아니디닐알킬카르보닐기는 이하에 기술되는 바와 같이 임의로 치환될 수 있다.

[0064] "할로" 또는 "할로젠"은 브로모, 클로로, 플루오로 또는 요오도를 나타낸다.

[0065] "할로알킬"은 상기 정의된 바와 같은 하나 이상의 할로 라디칼에 의해 치환되는 상기 정의된 바와 같은 알킬 라디칼, 예를 들면, 트리플루오로메틸, 디플루오로메틸, 플루오로메틸, 트리클로로메틸, 2,2,2-트리플루오로에틸,

1,2-디플루오로에틸, 3-브로모-2-플루오로프로필, 1,2-디브로모에틸 등을 나타낸다. 본 명세서에서 구체적으로 언급되지 않는 한, 할로알킬기는 임의로 치환될 수 있다.

[0066] "퍼할로" 또는 "퍼플루오로"는 각각 각 수소원자가 할로원자 또는 플루오로 원자에 의해 각각 치환된 부분을 나타낸다.

[0067] "헤테로사이클릴", "헤테로사이클" 또는 "헤테로사이클릭 고리"는 질소, 산소, 인 및 황으로 구성된 그룹으로부터 선택된 1 내지 8개의 헤테로원자 및 2 내지 23개의 탄소원자를 포함하는 안정한 3-원 내지 24-원 비방향족 고리 라디칼을 나타낸다. 본 명세서에서 구체적으로 언급되지 않는 한, 헤테로사이클릴 라디칼은 융합 또는 가교된 고리 시스템을 포함할 수 있는 모노사이클릭, 바이사이클릭, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 고리 시스템일 수 있으며; 또한 헤테로사이클릴 라디칼에서 질소, 탄소 또는 황 원자는 임의로 산화될 수 있으며; 상기 질소원자는 임의로 4급화될 수 있으며; 또한 헤테로사이클릴 라디칼은 부분적으로 또는 전체적으로 포화될 수 있다. 이러한 헤테로사이클릴 라디칼의 예로는 디옥솔란닐, 티에닐[1,3]디티아닐, 테카하이드로이소퀴놀릴, 이미다졸리닐, 이미다졸리디닐, 이소티아졸리디닐, 이옥사졸리디닐, 모르폴리닐, 옥타하이드로인돌릴, 옥타하이드로이소인돌릴, 2-옥소피페라지닐, 2-옥소피페리디닐, 2-옥소피롤리디닐, 옥사졸리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 4-피페리도닐, 피롤리디닐, 피라졸리디닐, 퀴누클리디닐, 티아졸리디닐, 테트라하이드로푸릴, 트리티아닐, 테트라하이드로피라닐, 티오모르폴리닐, 티아모르폴리닐, 1-옥소-티오모르폴리닐, 1,1-디옥소-티오모르폴리닐, 12-크라운-4, 15-크라운-5, 18-크라운-6, 21-크라운-7, 아자-18-크라운-6, 디아자-18-크라운-6, 아자-21-크라운-7, 및 디아자-21-크라운-7을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 본 명세서에서 별도로 언급되지 않는 한, 헤테로사이클릴기는 임의로 치환될 수 있다.

[0068] "헤테로아릴"은 수소원자, 1 내지 13개의 탄소원자, 질소, 산소, 인 및 황으로 구성된 1 내지 6개의 헤테로 원자, 및 적어도 하나의 방향족 고리를 포함하는 5- 내지 14-원 고리 시스템 라디칼을 나타낸다. 본 발명의 목적을 위하여, 상기 헤테로아릴 라디칼은 융합 또는 가교된 고리 시스템을 포함할 수 있는 모노사이클릭, 바이사이클릭, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 고리 시스템일 수 있으며; 또한 상기 헤테로아릴 라디칼에서 질소, 탄소 또는 황 원자는 임의로 산화될 수 있으며; 상기 질소 원자는 임의로 4급화될 수 있다. 그의 예로는 아제피닐, 아크리디닐, 벤즈이미다졸릴, 벤조티아졸릴, 벤조인돌릴, 벤조디옥솔릴, 벤조푸란닐, 벤조옥사졸릴, 벤조티아졸릴, 벤조티아디아졸릴, 벤조[b][1,4]디옥세피닐, 1,4-벤조디옥사닐, 벤조나프토프라닐, 벤족사졸릴, 벤조디옥솔릴, 벤조디옥시닐, 벤조피라닐, 벤조피라노일, 벤조푸라닐, 벤조푸라노일, 벤조티에닐(벤조티오페닐), 벤조트리아졸릴, 벤조[4,6]이미다조[1,2-a]피리디닐, 카르바졸릴, 신놀리닐, 디벤조푸라닐, 디벤조티오페닐, 푸라닐, 푸라노닐, 이소티아졸릴, 이미다졸릴, 인다졸릴, 인돌릴, 인다졸릴, 이소인돌릴, 인돌리닐, 이소인돌리닐, 이소퀴놀릴, 인돌리지닐, 이속사졸릴, 나프티리디닐, 옥사디아졸릴, 2-옥소아제피닐, 옥사졸릴, 옥시라닐, 1-옥시도피리디닐, 1-옥시도피리미디닐, 1-옥시도피라지닐, 1-옥시도피리다지닐, 1-페닐-1H-피롤릴, 페나지닐, 페노티아지닐, 펜옥사지닐, 프탈아지닐, 프테리디닐, 푸리닐, 피롤릴, 피라졸릴, 피리디닐, 피라지닐, 피리미디닐, 피리다지닐, 퀴나졸리닐, 퀴녹살리닐, 퀴놀리닐, 퀴누클리디닐, 이소퀴놀리닐, 테트라하이드로퀴놀리닐, 티아졸릴, 티아디아졸릴, 트라이졸릴, 테트라아졸릴, 트리아지닐, 및 티오페닐(즉, 티에닐)을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 본 명세서에서 별도로 언급되지 않는 한, 헤테로아릴기는 임의로 치환될 수 있다.,

[0069] 상기 기들은 모두 치환되거나 비치환될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "치환된"은 상기 기들(예를 들면, 알킬, 알킬렌, 알콕시, 알콕시알킬, 알킬카르보닐, 알킬옥시카르보닐, 알킬아미노, 아미딜, 아미디닐알킬, 아미디닐알킬카르보닐, 아미노알킬, 아릴, 아르알킬, 아릴카르보닐, 아릴옥시카르보닐, 아르알킬카르보닐, 아르알킬옥시카르보닐, 아릴옥시, 사이클로알킬, 사이클로알킬알킬, 사이클로알킬카르보닐, 사이클로알킬알킬카르보닐, 사이클로알킬옥시카르보닐, 구아니디닐알킬, 구아니디닐알킬카르보닐, 할로알킬, 헤테로사이클릴 및/또는 헤테로아릴)의 어느 것이 추가로 작용화될 수 있으며, 여기서 적어도 하나의 수소원자가 결합에 의해 비수소 원자 치환체로 대체될 수 있다는 것을 의미한다. 본 명세서에서 별도로 언급되지 않는 한, 치환된 기는 옥소, -CO₂H, 니트릴, 니트로, -CONH₂, 하이드록실, 티오옥시, 알킬, 알킬렌, 알콕시, 알콕시알킬, 알킬카르보닐, 알킬옥시카르보닐, 아릴, 아르알킬, 아릴카르보닐, 아릴옥시카르보닐, 아르알킬카르보닐, 아르알킬옥시카르보닐, 아릴옥시, 사이클로알킬, 사이클로알킬알킬, 사이클로알킬카르보닐, 사이클로알킬알킬카르보닐, 사이클로알킬옥시카르보닐, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴, 디알킬아민, 아릴아민, 알킬아릴아민, 디아릴아민, N-옥사이드, 이미드, 및 엔아민; 기중의 실리콘 원자 예를 들어 트리알킬실릴기, 디알킬아릴실릴기, 알킬디아릴실릴기, 트리아릴실릴기, 퍼플루오로알킬 또는 퍼플루오로알콕시, 예를 들면, 트리플루오로메틸 또는 트리플루오로메톡시로부터 선택된 하나 이상의 치환체를 포함할 수 있다. "치환된"은 또한 하나 이상의 수소원자가 고차 결합(예를

들면, 이중 또는 삼중 결합)에 의해 옥소중의 산소와 같은 헤테로원자, 카르보닐, 카르복실, 및 에스테르기; 이민과 같은 기중의 질소, 옥심, 하이드란진 및 니트릴로 대체될 수 있는 상기 기중의 어느 것을 의미한다. 예를 들면, "치환된"은 하나 이상의 수소원자가 $-NR_gC(=O)NR_hR_h$, $-NR_gC(=O)OR_h$, $-NR_gSO_2R_h$, $-OC(=O)NR_gR_h$, $-OR_g$, $-SR_g$, $-SOR_g$, $-SO_2R_g$, $-OSO_2R_g$, $-SO_2OR_g$, $=NSO_2R_g$, 및 $-SO_2NR_gR_h$ 로 대체되는 상기 기 중의 어느 것을 포함한다. "치환된"은 또한 하나 이상의 수소원자가 $-C(=O)R_g$, $-C(=O)OR_g$, $-CH_2SO_2R_g$, $-CH_2SO_2NR_gR_h$, $-SH$, $-SR_g$ 또는 $-SSR_g$ 로 대체되는 상기 그룹중의 어느 것을 포함한다. 전술한 내용에서, R_g 및 R_h 는 동일하거나 상이하며 또한 독립적으로 수소, 알킬, 알콕시, 알킬아미노, 티오알킬, 아릴, 아르알킬, 사이클로알킬, 사이클로알킬알킬, 할로알킬, 헤테로사이클릴, *N*-헤테로사이클릴, 헤테로사이클릴알킬, 헤테로아릴, *N*-헤테로아릴 및/또는 헤테로아릴알킬이다. 그 외에, 전술한 치환체의 각각은 또한 상기 치환체의 하나 이상으로 임의로 치환될 수 있다. 더욱이, 상기 기중의 어느 것은 하나 이상의 내부 산소 또는 황 원자를 포함하도록 치환될 수 있다. 예를 들면, 알킬기는 하나 이상의 내부 산소로 치환되어 에테르 또는 폴리에테르기를 형성할 수 있다. 유사하게, 알킬기는 하나 이상의 내부 황 원자로 치환되어 티오에테르, 디설파이드 등을 형성할 수 있다. 아미딜 부분은 최대 2개의 할로원자로 치환될 수 있지만, 다른 상기 기는 하나 이상의 할로원자로 치환될 수 있다. 상기 기중의 어느 것은 또한 아미노, 모노알킬아미노, 구아니디닐 또는 아미디닐로 치환될 수 있다. 상기 기의 어느 것에 대한 임의 치환체는 또한 아릴포스포릴, 예를 들면 식 $-R_gP(Ar)_3$ 를 포함하며, 여기서 R_g 는 알킬렌이고 Ar 는 아릴 부분, 예를 들면 페닐이다.

[0070] 용어 "안티센스 올리고머" 또는 "안티센스 화합물"은 상호교환적으로 사용되며 또한 소단위(subunit)의 서열을 나타내며, 각각은 리보오스 또는 다른 펜토오스 당 또는 모르폴리노기로 구성된 골격 소단위상에 운반된 염기를 가지며, 여기서 상기 골격기는 화합물 중의 염기를 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍에 의해 핵산(전형적으로 RNA)중의 표적서열로 하이브리드 형성시키고, 표적 서열 중에 핵산:올리고머 헤테로이중사슬을 형성시키는 소단위간 결합에 의해 연결된다. 올리고머는 표적 서열에 정확한 서열 상보성(sequence complementarity) 또는 근사한 상보성을 가질 수 있다. 이러한 안티센스 올리고머는 표적 서열을 포함하는 mRNA의 번역을 차단하거나 억제하도록 고안되며 또한 하이브리드 형성하는 서열에 "관련하는 것"으로 말할 수 있다.

[0071] "모르폴리노 올리고머" 또는 "PMO"은 대표적인 폴리뉴클레오타이드에 결합하는 수소결합할 수 있는 염기를 지지하는 중합체 분자를 나타내며, 여기서 상기 중합체는 펜토오스 당 골격 부분 및 더욱 구체적으로 뉴클레오타이드 및 뉴클레오시드를 대표하는 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 리보오스 골격을 함유하지 않지만, 대신에 고리 질소를 통하여 커플링을 갖는 고리 질소를 함유한다. 예시적인 "모르폴리노" 올리고머는 (티오)포스포르아미데이트 또는 (티오)포스포로디아미데이트 결합에 의해 함께 연결되고, 인접한 소단위의 5' 엑소사이클릭 탄소에 하나의 소단위의 모르폴리노 질소를 결합하는 모르폴리노 소단위 구조를 포함하며, 각각은 염기 특이적 수소 결합에 의하여 폴리뉴클레오타이드 중의 염기에 연결하는데 효과적인 퓨린 또는 피리미딘 염기-쌍 부분을 포함한다. 모르폴리노 올리고머 (안티센스 올리고머를 포함함)는 예를 들면 미국특허 제5,698,685호; 제5,217,866호; 제5,142,047호; 제5,034,506호; 제5,166,315호; 제5,185,444호; 제5,521,063호; 제5,506,337호 및 계류중인 미국특허출원 제12/271,036호; 제12/271,040호; 및 PCT 국제공개 WO/2009/064471호에 상세하게 기술되어 있으며, 이들 모두는 전부 여기서 참고로 인용된다. 대표적인 PMO는 소분자간 결합이 결합(A1)인 PMO를 포함한다.

[0072] "PMO+"는 앞에서 기술된 임의 갯수의 (1-피페라지노)포스포닐리데네옥시, (1-(4-(ω-구아니디노-알카노일)-피페라지노)포스포닐리데네옥시 결합(A2 및 A3)을 포함하는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머를 나타낸다 (예를 들면, 여기서 전부 참고로 인용되는 PCT 국제출원공개 WO/2008/036127호 참조).

[0073] "PMO-X"는 적어도 하나의 (B) 결합 또는 적어도 하나의 기술된 말단 변형(terminal modification)을 포함하는 여기서 기술된 포스포로디아미데이트를 나타낸다.

[0074] "포스포르아미데이트"기는 3개의 부착된 산소원자 및 하나의 부착된 질소원자를 포함하는 반면, "포스포로디아미데이트"기 (예를 들면 도 1D-E 참조)는 2개의 부착된 산소원자 및 2개의 부착된 질소원자를 갖는 인을 포함한다. 본 명세서 및 계류중인 미국특허출원 제61/349,783호 및 제11/801,885호에 기술된 올리고머의 비전하된 또는 변형된 소단위간 결합에서, 하나의 질소는 항상 골격 사슬에 매달려 있다. 포스포로디아미데이트 결합에서 두 번째 질소는 전형적으로 모르폴리노 고리 구조에서 고리 질소이다.

[0075] "티오포스포르아미데이트" 또는 "티오포스포로디아미데이트" 결합은 각각 포스포르아미데이트 또는 포스포로디아미데이트이며, 여기서 하나의 산소원자, 전형적으로 골격에 매달려 있는 산소는 황으로 대체된다.

- [0076] "소단위간 결합"은 예를 들면 화학식(I)와 같은 두 개의 모르폴리노 소단위를 포함하는 결합을 나타낸다.
- [0077] 본 명세서에서 사용되는 용어 "비전하된", "양이온성" 및 "음이온성"은 근사한 중성 pH, 예를 들면 약 6 내지 8 에서 화학적 부분의 주요상태(predominant state)를 나타낸다. 예를 들면, 상기 용어는 생리학적 pH, 즉 약 7.4 에서 화학적 부분의 주요 상태를 나타낼 수 있다.
- [0078] "저급알킬"은 1 내지 6개의 탄소원자의 알킬 라디칼, 예를 들면 메틸, 에틸, n-부틸, i-부틸, t-부틸, 이소아밀, n-펜틸 및 이소펜틸을 나타낸다. 특정의 실시형태에서, "저급알킬"기는 1 내지 4개의 탄소원자를 갖는다. 다른 실시형태에서, "저급 알킬"기는 1 내지 2개의 탄소원자를 가지며, 즉 메틸 또는 에틸이다. 유사하게, "저급 알케닐"은 2 내지 6개, 바람직하게는 3 또는 4개의 탄소원자의 알케닐 라디칼, 예를 들면 알릴 및 부테닐을 나타낸다.
- [0079] "비간섭 치환체"(non-interfering substituent)는 그의 의도된 표적에 결합하기 위하여 본 명세서에 기술된 바와 같은 안티센스 올리고머의 능력에 역효과를 내지는 것이다. 이러한 치환체는 작은 및/또는 비교적 비극성기, 예를 들면 메틸, 에틸, 메톡시, 에톡시 또는 플루오로를 포함한다.
- [0080] 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 올리고머는 상기 올리고머가 37℃ 이상, 45℃ 이상, 바람직하게는 적어도 50℃, 및 전형적으로 60℃-80℃ 또는 그 이상의 T_m을 갖는 생리학적 조건하에 표적에 하이브리드 형성하는 경우 표적 폴리뉴클레오타이드에 "특이적으로 하이브리드 형성한다". 올리고머의 "T_m"은 상보적인 폴리뉴클레오타이드에 50% 하이브리드 형성하는 온도이다. T_m은 예를 들면 Miyada *et al.*, *Methods Enzymol.* **154**:94-107 (1987)에 기술된 바와 같이 생리적 식염수 중에 표준 조건하에 결정된다. 이러한 하이브리드 형성은 표적 서열에 안티센스의 "근사한" 또는 "실질적인" 상보성은 물론 정확한 상보성과 함께 일어날 수 있다.
- [0081] 폴리뉴클레오타이드는 하이브리드 형성이 두 개의 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 사이에 역평행 구조에서 일어나는 경우에 서로에 "상보적"인 것으로 기술된다. 상보성 (하나의 폴리뉴클레오타이드가 다른 것에 상보적인 정도)은 일반적으로 인정되는 염기 쌍 규칙에 따라 서로 수소결합을 형성하는 것으로 기대되는 반대 가닥에서 염기의 비율에 관하여 정량할 수 있다.
- [0082] 첫번째 서열은 폴리뉴클레오타이드가 첫번째 서열을 생리학적 조건하에 두 번째 폴리뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하거나 특이적으로 하이브리드 형성하는 경우 두번째 서열에 관하여 "안티센스 서열"이다.
- [0083] 용어 "표적 서열"은 RNA 게놈에서 표적서열에 상보적 (의미상 추가로, 실질적으로상보적)인 올리고뉴클레오타이드 유사체중의 서열이다. 유사체 화합물의 전체 서열, 또는 단지 일부분은 표적 서열에 상보적일 수 있다. 예를 들면, 20개의 염기를 갖는 유사체에서, 단지 12-14개가 표적서열일 수 있다. 전형적으로, 표적 서열은 유사체에서 인접한 염기를 형성하지만, 대안적으로는 예를 들면 유사체의 반대 말단으로부터 함께 위치하는 경우 표적 서열을 스패닝(span)하는 서열을 구성하는 비-인접한 서열을 형성할 수 있다.
- [0084] 올리고뉴클레오타이드 유사체 (예를 들면, 비전하된 올리고뉴클레오타이드 유사체)의 "골격"(backbone)은 예를 들면 본 명세서에서 기술된 바와 같은 모르폴리노 올리고머에 대해 염기쌍 부분을 지지하는 구조를 나타낸다. 상기 "골격"은 소분자간 결합 (예를 들면, 인-함유 결합)에 의해 연결된 모르폴리노 고리 구조를 포함한다. "실질적으로 비전하된 골격"은 올리고뉴클레오타이드 유사체의 골격을 나타내며, 여기서 소분자간 결합의 50% 미만은 거의 중성 pH에서 전하된다. 예를 들면, 실질적으로 비전하된 골격은 중성 pH 부근에서 전하되는 50% 미만, 40% 미만, 30%, 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만 또는 심지어 0%의 소단위간 결합을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 실질적으로 비전하된 골격은 4개의 (생리학적 pH에서) 비전하된 결합마다 (생리학적 pH에서) 많아야 하나의 전하된 소분자간 결합(생리학적 pH에서), 8개마다 1개, 또는 16개의 비전하된 결합마다 많아야 1개를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 기술된 상기 핵산 유사체는 완전히 비전하된다.
- [0085] 표적 및 표적 서열은 하이브리드 형성이 역평행 구조에서 일어나는 경우 서로에 대해 "상보적"인 것으로 기술된다. 표적 서열은 표적 서열에 "근사한" 또는 "실질적인" 상보성을 가질 수 있으며 또한 여기서 기술된 방법을 목적으로 작용하며, 즉 아직도 "상보적"이다. 바람직하게, 여기서 기술되는 방법에서 사용된 올리고뉴클레오타이드 유사체 화합물은 10개의 뉴클레오타이드마다 표적서열과 많아야 하나의 미스매치(mismatch), 및 바람직하게는 20개 중의 많아야 하나의 미스매치(mismatch)를 갖는다. 대안적으로, 사용된 안티센스 올리고머는 여기서 기술된 바와 같은 예시적인 표적 서열과, 적어도 80%, 적어도 90% 서열 상동성 또는 적어도 95% 서열 상동성을 갖는다. RNA 표적에 상보적인 결합을 목적으로, 이하에 기술된 바와 같이, 구아닌 염기는 시토시네오르 우라실(cytosine or uracil) RNA 염기에 상보적일 수 있다.

- [0086] "헤테로듀플렉스"(heteroduplex)는 올리고뉴클레오타이드 유사체와 표적 RNA의 상보적인 부분 사이의 듀플렉스를 나타낸다. "뉴클레아제-내성 헤테로듀플렉스"는 그의 상보적인 표적에 대한 안티센스 올리고머의 결합에 의해 형성되는 헤테로듀플렉스를 나타내며, 따라서 상기 헤테로듀플렉스는 예를 들면 이중가닥 RNA/RNA 또는 RNA/DNA 복합체를 절단할 수 있는 RNase H와 같은 세포내 및 세포외 뉴클레아제에 의한 생체내 소화에 실질적으로 내성이 있다.
- [0087] 약제는 세포막을 거쳐 수동적 확산보다는 메카니즘에 의해 세포에 들어가는 경우 "포유류 세포에 의해 적극적으로 섭취된다". 약제는 예를 들면 "능동수송"(active transport)에 의해 수송될 수 있으며, 이것은 예를 들면 ATP-의존적 수송 메카니즘에 의해 또는 "촉진된 수송"에 의해 포유류 세포막에 걸쳐 약제의 수송을 나타내고, 수송 단백질에 약제의 결합을 필요로 하고 다음에 막에 걸쳐 결합체의 통과를 촉진하는 수송 메카니즘에 의해 세포막에 걸쳐 안티센스 약제의 수송을 나타낸다.
- [0088] 용어 "조절 발현" 및/또는 "안티센스 활성"은 RNA의 발현 또는 번역을 간섭하여 소정의 단백질의 발현을 증가시키거나 또는 더욱 전형적으로는 감소시킬 수 있는 능력을 나타낸다. 감소된 단백질 발현의 경우에, 안티센스 올리고머는 소정의 유전자의 발현을 직접적으로 차단하거나, 또는 상기 유전자로부터 전사된 RNA의 파괴촉진에 기여할 수 있다. 본 명세서에 기술된 바와 같은 모르폴리노 올리고머는 전자의 (입체 차단) 메카니즘을 통해 작용하는 것으로 믿어진다. 입체 차단 올리고머의 바람직한 안티센스 표적은 다른 영역이 모르폴리노 올리고머를 사용하여 성공적으로 표적화되더라도 ATG 시작코돈 영역, 스플라이스 부위(splice site), 스플라이드 부위에 밀접하게 인접한 영역, 및 mRNA의 5'-비번역된 영역을 포함한다.
- [0089] "아미노산 소단위"는 일반적으로 아미노산 잔기(-CO-CHR-NH-)이지만; β - 또는 다른 아미노산 잔기 (예를 들면, -CO-CH₂CHR-NH-)일 수 있으며, 식중 R은 아미노산 측쇄이다.
- [0090] 용어 "천연적으로 발생하는 아미노산"은 천연에서 발견되는 단백질에 존재하는 아미노산을 나타낸다. 용어 "비천연 아미노산"은 천연에서 발견되는 단백질에 존재하지 않는 아미노산을 나타내며, 예를 들면, 베타-알라닌(β -Ala) 및 6-아미노헥사노익 산(Ahx)을 포함한다.
- [0091] "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은, 전형적으로 선택된 표적 핵산 서열 번역을 억제함으로써, 원하는 치료효과를 생기게 하는데 유효한 1회 용량 또는 일련의 용량의 일부의 어느 것으로서 포유동물에 투여되는 안티센스 올리고머의 양을 나타낸다.
- [0092] 개체 (예를 들면, 인간 등의 포유동물) 또는 세포의 "치료"는 개체 또는 세포의 천연 과정을 변경하려고 하는 시도에서 사용되는 임의 타입의 간섭이다. 치료는 약제학적 조성물의 투여를 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며, 또한 예방적으로 또는 병적 사건의 개시후에 또는 병인물질과 접촉후에 수행할 수 있다.
- [0093] II. 캐리어 펩타이드
- [0094] A. 캐리어 펩타이드의 성질
- [0095] 상기 지정한 바와 같이, 본 발명은 캐리어 펩타이드 및 핵산 유사체의 접합체(conjugate)에 관한 것이다. 캐리어 펩타이드(carrer peptide)는 일반적으로 핵산 유사체의 세포 침투를 증강시키는데 효과적이다. 더욱이, 출원인은 놀랍게도 (예를 들면, 캐리어 펩타이드의 카르복시 또는 아미노 말단에) 핵산 유사체와 나머지 캐리어 펩타이드 사이에 글리신(G) 또는 프롤린(P) 아미노산을 포함시키면 접합체의 독성을 감소시키는 반면, 효능은 동일하게 유지하거나 또는 캐리어 단백질과 핵산 유사체 사이에 상이한 결합을 갖는 접합체에 대하여 증가된다는 것을 발견하였다. 따라서 본 발명의 접합체는 다른 펩타이드-올리고머 접합체보다 더 양호한 치료 창을 가지며 더 유망한 약물 후보이다.
- [0096] 감소된 독성 외에도, 핵산 유사체와 캐리어 단백질 사이에 글리신 또는 프롤린 아미노 소단위의 존재는 추가적인 이점을 제공하는 것으로 믿어진다. 예를 들면, 글리신은 저가이고 라세미화의 임의 가능성 없이 핵산 유사체 (또는 선택적 링커)에 용이하게 커플링된다. 유사하게, 프롤린은 라세미화 없이 용이하게 커플링되고 또한 헥시스 형성제가 아닌 캐리어 펩타이드를 제공한다. 프롤린의 소수성은 또한 세포의 지질 이중과 캐리어 펩타이드의 상호작용에 관하여 특정의 이점을 부여할 수 있다. (예를 들면 특정의 실시형태에서) 다수의 프롤린을 포함하는 캐리어 펩타이드는 G-테트라플렉스 형성에 저항할 수 있다. 마지막으로, 특정의 실시형태에서, 프롤린 부분이 아르기닌 아미노산 소단위에 인접하는 경우, 프롤린 부분은 아르기닌-프롤린 아미드 결합이 공통의 엔도펩티다제에 의해 절단될 수 없기 때문에 접합체에 대사성을 부여한다.
- [0097] 상기 지정한 바와 같이, 글리신 또는 프롤린 아미노산 소단위를 통하여 핵산 유사체에 결합된 캐리어 단백질을

포함하는 접합체는 다른 공지된 접합체에 비하여 낮은 독성 및 유사한 효능을 갖는다. 본 출원을 지지하기 위해 수행된 실험들은 신장 독성 마커가 다른 접합체에 비하여 본 발명의 접합체에서 훨씬 더 낮다는 것을 보여준다 (예를 들면, 실시예 30에 기술된 신장 손상 마커(KIM) 및 혈중 요소 질소(BUN) 데이터 참조). 이론으로 구속받고 싶지 않지만, 본 발명자들은 기술된 접합체의 감소된 독성이 핵산 유사체 (예를 들면, 카르복시 말단)에 부착되는 펩타이드의 부분에서 아미노핵산 또는 β -알라닌과 같은 비천연 아미노산의 부재와 관련될 수 있다고 믿는다. 이들 비천연 아미노산은 생체내에서 절단되지 않기 때문에, 비절단 펩타이드의 독성 농도가 축적하여 독성 효과의 원인이 될 수 있다고 생각된다.

- [0098] 글리신 또는 프롤린 부분은 캐리어 펩타이드의 아미노 또는 카르복시 말단일 수 있으며, 일부의 경우에, 캐리어 펩타이드는 글리신 또는 프롤린 소단위를 통하여 핵산 유사체에 직접 연결될 수 있거나 또는 캐리어 펩타이드는 선택적 링커를 통하여 핵산 유사체에 연결될 수 있다.
- [0099] 하나의 실시형태에서, 본 발명은
- [0100] (a) 아미노산 소단위를 포함하는 캐리어 펩타이드; 및
- [0101] (b) 실질적으로 비전하 골격 및 표적핵산에 서열 특이적 결합을 위한 표적 염기서열을 포함하는 핵산 유도체를
- [0102] 를 포함하는 접합체(conjugate)이며,
- [0103] 여기서, 상기 아미노산 소단위의 두 개 이상이 양전하된 아미노산이며, 상기 캐리어 펩타이드가 캐리어 펩타이드의 카르복시 말단에 글리신(G) 또는 프롤린 (P) 아미노산 소단위를 포함하며 또한 상기 캐리어 펩타이드가 핵산 유사체에 공유적으로 부착되는 것인 접합체를 제공한다. 일부 실시형태에서, 7 개 이하의 인접한 아미노산 소단위는 아르기닌이고, 예를 들면 6개 또는 그 이하의 인접한 아미노산 소단위는 아르기닌이다. 일부 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 카르복시 말단에 글리신 아미노산 소단위를 포함한다. 다른 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 카르복시 말단에 단일 글리신 또는 프롤린을 포함하며 (즉 카르복시 말단에 글리신 또는 프롤린 이량체 또는 삼량체를 포함하지 않는다).
- [0104] 특정의 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는, 실질적으로 비전하된 골격을 갖는 안티센스 올리고머에 접합되었을 때, 다음 (i) 또는 (ii)에 의해 입증되는 바와 같이 비접합 형태의 안티센스 올리고머에 비하여 그의 표적 서열에 안티센스 올리고머의 결합을 증가시키는데 효과적이다:
- [0105] (i) 그의 표적 서열에 안티센스 올리고머의 결합이 코드화된 단백질의 번역 시작 코돈을 차단하는데 효과적인 경우, 비접합된 올리고머에 의해 제공되는 것에 비하여 코드화된 단백질의 발현에서 감소, 또는
- [0106] (ii) 그의 표적 서열에 안티센스 올리고머의 결합이 정확하게 스플라이드 되었을 때 상기 단백질을 코드화하는 프리-mRNA에서 이상 스플라이스 부위를 차단하는데 효과적인 경우, 비접합된 올리고머에 의해 제공되는 것에 비하여 코드화 단백질의 발현에서 증가. 이들 효과의 측정에 적합한 분석은 이하에 더욱 설명된다. 하나의 실시형태에서, 펩타이드의 접합은 여기서 기술된 바와 같이 무세포 번역 분석에서 이러한 활성을 제공한다. 일부 실시형태에서, 활성은 적어도 2개의 인자, 적어도 5개의 인자 또는 적어도 10개의 인자에 의해 강화된다.
- [0107] 대안적으로 또는 추가적으로, 캐리어 펩타이드는 비접합 형태의 유사체에 비하여, 세포내로 핵산 유사체의 수송을 증가시키는데 효과적이다. 특정의 실시형태에서, 수송은 적어도 2개의 인자, 적어도 5개의 인자 또는 적어도 10개의 인자에 의해 강화된다.
- [0108] 다른 실시형태에서, 캐리어 단백질은 말단 글리신 또는 프롤린 아미노 소단위가 없는 캐리어 펩타이드를 포함하는 접합체과 관련하여 접합체의 독성을 감소시키는데 (즉, 최대 허용 용량을 증가시키는데) 효과적이다. 특정의 실시형태에서, 독성은 적어도 2개의 인자, 적어도 5개의 인자 또는 적어도 10개의 인자에 의해 감소된다.
- [0109] 펩타이드 수송 부위의 추가 이점은 안티센스 올리고머와 그의 표적 핵산 서열 사이에 듀플렉스를 안정화할 수 있는 그의 예상되는 능력이다. 이론으로 구속받고 싶지 않지만, 듀플렉스를 안정화할 수 있는 이러한 능력은 양전하된 수송 부위와 음전하된 핵산 사이의 정전기 상호작용으로부터 초래할 수 있다.
- [0110] 캐리어 단백질의 길이는 특히 제한되지 않으며 또한 상이한 실시형태에서 변화한다. 일부 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 4 내지 40개의 아미노산 소단위를 포함한다. 다른 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 6 내지 30개, 6 내지 20개, 8 내지 25개 또는 10 내지 20개의 아미노산 소단위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 직쇄형인 반면, 다른 실시형태에서는 분지형이다.

- [0111] 일부 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 양전하된 아미노산 소단위, 예를 들면 아르기닌 아미노산 소단위에 풍부하다. 캐리어 펩타이드는 아미노산 소단위의 적어도 10%가 양전하되는 경우 양전하 아미노산에 "풍부"하다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 아미노산 소단위의 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90%는 양전하된다. 또 다른 실시형태에서, 모든 아미노산 소단위는, 글리신 또는 프롤린 아미노산 소단위를 제외하고는, 양전하된다. 또 다른 실시형태에서, 양전하된 아미노산 소단위의 모두는 아르기닌이다.
- [0112] 다른 실시형태에서, 캐리어 펩타이드에서 양전하된 아미노산 소단위의 수는 1 내지 20개, 예를 들면 1 내지 10개 또는 1 내지 6개 범위이다. 특정의 실시형태에서, 캐리어 펩타이드에서 양전하된 아미노산의 수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20이다.
- [0113] 양전하된 아미노산은 천연적으로 발생하거나, 비천연 발생하거나, 합성, 변형될 수 있거나 또는 천연적으로 발생하는 아미노산의 유사체일 수 있다. 예를 들면, 순수 양전하를 갖는 변형 아미노산은 이하에 더욱 상세한 설명에서 본 발명에서 사용하기 위해 구체적으로 설계될 수 있다. 아미노산에 대한 다수의 상이한 유형의 변형은 당해분야에 잘 알려져 있다. 특정의 실시형태에서, 양전하된 아미노산은 히스티딘(H), 라이신(K) 또는 아르기닌(R)이다. 다른 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 단지 천연 아미노산 소단위를 포함한다 (즉, 비천연 아미노산을 함유하지 않는다). 다른 실시형태에서, 말단 아미노산은 예를 들면 N-말단에 예를 들면 아세틸, 벤조일 또는 스테아릴 부위로 개평할 수 있다.
- [0114] H, K 및/또는 R의 임의의 수, 조합 및/또는 서열은 캐리어 펩타이드 내에 존재할 수 있다. 일부 실시형태에서, 아미노산 소단위의 전부는 카르복실 말단 글리신 또는 프롤린을 제외하고는 양전하된 아미노산이다. 다른 실시형태에서, 양전하된 아미노산의 적어도 하나는 아르기닌이다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 양전하된 아미노산의 전부는 아르기닌이며, 또한 또 다른 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 아르기닌 및 카르복시 말단 글리신 또는 프롤린으로 구성된다. 또 다른 실시형태에서, 상기 캐리어 펩타이드는 7개 이내의 인접한 아르기닌, 예를 들면 6개 이내의 인접한 아르기닌을 포함한다.
- [0115] 다른 유형의 양전하된 아미노산도 또한 고안된다. 예를 들면, 특정의 실시형태에서, 양전하된 아미노산의 적어도 하나는 아르기닌 유사체이다. 예를 들면, 아르기닌 유사체는 식 $R^a N=C(NH_2)R^b$ 의 측쇄를 포함하는 양이온 α -아미노산일 수 있으며, 식중 R^a 는 H 또는 R^c 이고; R^b 는 R^c , NH_2 , NHR , 또는 $N(R^c)_2$ 이고, R^c 는 저급 알킬 또는 저급 알케닐이고, 선택적으로 산소 또는 질소를 포함하거나, 또는 R^a 및 R^b 는 함께 고리를 형성할 수 있으며, 상기 측쇄는 R^a 또는 R^b 를 통하여 아미노산에 연결된다. 캐리어 펩타이드는 이들 아르기닌 유사체의 임의의 수를 포함할 수 있다.
- [0116] 양전하된 아미노산은 캐리어 펩타이드 내의 임의의 서열에서 발생할 수 있다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 양전하된 아미노산은 교대로 될 수 있거나 또는 순차적일 수 있다. 예를 들면, 캐리어 펩타이드는 서열 $(R^d)_m$ 을 포함할 수 있으며, 여기서 R^d 는 각 경우에 독립적으로 양전하된 아미노산이고, m은 2 내지 12, 2 내지 10, 2 내지 8 또는 2 내지 6 범위의 정수이다. 예를 들면, 특정의 실시형태에서, R^d 는 아르기닌이고, 캐리어 펩타이드는 $(R)_4$, $(R)_5$, $(R)_6$, $(R)_7$ 및 $(R)_8$ 로부터 선택된 서열 또는 $(R)_4$, $(R)_5$, $(R)_6$ 및 $(R)_7$ 로부터 선택된 서열을 포함하며, 예를 들면 구체적인 실시형태에서 캐리어 펩타이드는 서열 $(R)_6$, 예를 들면 $(R)_6G$ 또는 $(R)_6P$ 를 포함한다.
- [0117] 다른 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 서열 $(R^d)_m$ 및 카르복실 말단 글리신 또는 프롤린을 포함하며, 여기서 R^d 는 각각의 경우에 독립적으로 양전하된 아미노산이며, m은 2 내지 12, 2 내지 10, 2 내지 8 또는 2 내지 6 범위의 정수이다. 특정의 실시형태에서 R^d 는 각각의 경우에 독립적으로 아르기닌, 히스티딘 또는 라이신이다. 예를 들면, 특정의 실시형태에서 R^d 는 아르기닌이고, 캐리어 펩타이드는 $(R)_4$, $(R)_5$, $(R)_6$, $(R)_7$ 및 $(R)_8$ 로부터 선택된 서열 및 카르복시 말단 글리신 또는 프롤린으로 구성된다. 예를 들면, 구체적인 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 서열 $(R)_6G$ 또는 $(R)_6P$ 로 구성된다.
- [0118] 일부 다른 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 하나 이상의 소수성 아미노산 소단위를 포함할 수 있으며, 상기 소

수성 아미노산 소단위는 치환된 또는 비치환된 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴 또는 아르알킬 측쇄를 포함하고 여기서 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐 측쇄는 6개의 탄소원자 산마다 많아야 한개의 헤테로원자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 소수성 아미노산은 페닐알라닌(F)이다. 예를 들면, 상기 캐리어 펩타이드는 페닐 알라닌(F)과 같은 2개 이상의 인접한 소수성 아미노산, 예를 들면 2개의 인접한 페닐알라닌 부위를 포함할 수 있다. 소수성 아미노산(들)은 캐리어 펩타이드 서열중의 임의의 지점에서 존재할 수 있다.

[0119] 다른 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 서열 $[(R^d Y^b R^d)_x (R^d R^d Y^b)_y]_z$, 또는 $[(R^d R^d Y^b)_y (R^d Y^b R^d)_x]_z$ 를 포함하며, 여기서 R^d 는 각각의 경우에 독립적으로 양전하된 아미노산이며, x 및 y는 각각의 경우에 독립적으로 0 또는 1이고, 단 $x + y$ 는 1 또는 2이고, z는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이고 또한 Y^b 는 하기 식이다:



[0120] 여기서 n은 2 내지 7이고 각각의 R^e 는 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 메틸이다. 이들 실시형태의 일부에서, R^d 는 각각의 경우에 독립적으로 아르기닌, 히스티딘 또는 라이신이다. 다른 실시형태에서, 각각의 R^d 는 아르기닌이다. 다른 실시형태에서, n은 5이고 Y^b 는 아미노헥사노익산 부위이다. 다른 실시형태에서, n은 2이고 Y^b 는 β -알라닌 부위이다. 또 다른 실시형태에서, R^e 는 수소이다.

[0122] 전술한 것의 특정 실시양태에서, x는 1이고 y는 0이며, 또한 캐리어 펩타이드는 서열 $(R^d Y^b R^d)_z$ 를 포함한다. 다른 실시형태에서, n은 5이고 Y^b 는 아미노헥사노익산 부위이다. 다른 실시형태에서, n은 2이고 Y^b 는 β -알라닌 부위이다. 또 다른 실시형태에서, R^e 는 수소이다.

[0123] 전술한 것의 또 다른 실시형태에서, x는 0이고 y는 1이고, 또한 캐리어 펩타이드는 서열 $(R^d R^d Y^b)_z$ 를 포함한다. 다른 실시형태에서, n은 5이고 Y^b 는 아미노헥사노익산 부위이다. 다른 실시형태에서, n은 2이고 Y^b 는 β -알라닌 부위이다. 또 다른 실시형태에서, R^e 는 수소이다.

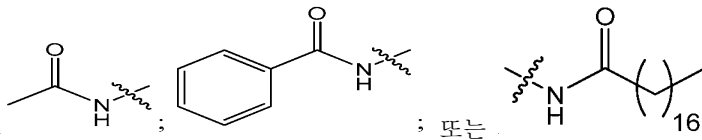
[0124] 다른 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 서열 $(R^d Y^b)_p$ 를 포함하며, 여기서 R^d 및 Y^b 는 상기 정의된 바와 같으며 또한 p는 2 내지 8 범위의 정수이다. 다른 실시형태에서, 각각의 R^d 는 아르기닌이다. 다른 실시형태에서, n은 5이고 Y^b 는 아미노헥사노익산 부위이다. 다른 실시형태에서, n은 2이고 Y^b 는 β -알라닌 부위이다. 또 다른 실시형태에서, R^e 는 수소이다.

[0125] 다른 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 서열 ILFQY를 포함한다. 상기 펩타이드는 여기서 기술된 다른 서열의 어느 것에 추가하여 ILFQY 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 캐리어 펩타이드는 ILFQY 및 $[(R^d Y^b R^d)_x (R^d R^d Y^b)_y]_z$, $[(R^d R^d Y^b)_y (R^d Y^b R^d)_x]_z$, $(R^d Y^b)_p$ 또는 이의 조합을 포함할 수 있으며, 여기서 R^d , x, y 및 Y^b 는 상기 정의된 바와 같다. $[(R^d Y^b R^d)_x (R^d R^d Y^b)_y]_z$, $[(R^d R^d Y^b)_y (R^d Y^b R^d)_x]_z$ 또는 $(R^d Y^b)_p$ 서열은 ILFQY 서열의 아미노 말단, 카르복시 말단 또는 이들 둘 다에 존재할 수 있다. 특정의 실시형태에서, x는 1이고 y는 0이며 또한 캐리어 펩타이드는 선택적 Z 링커를 통하여 ILFQY 서열에 연결된 $(R^d Y^b R^d)_z$ 를 포함한다.

[0126] 다른 관련 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 서열 ILFQ, IWFQ 또는 ILIQ를 포함한다. 다른 실시형태는 서열 PPMWS, PPMWT, PPMFS 또는 PPMYS를 포함하는 캐리어 펩타이드를 포함한다. 캐리어 펩타이드는 예를 들면 서열 $[(R^d Y^b R^d)_x (R^d R^d Y^b)_y]_z$, $[(R^d R^d Y^b)_y (R^d Y^b R^d)_x]_z$ 또는 $(R^d Y^b)_p$ (식중, R^d , x, y 및 Y^b 는 상기 정의된 바와 같음)에 추가하여 본 명세서에 기술된 이들 서열을 포함할 수 있다.

[0127] 캐리어 펩타이드의 일부 실시형태는 천연적으로 발생하는 아미노산 소단위에 대한 변형을 포함하며, 예를 들면 상기 아미노산 말단 또는 카르복시 말단 아미노산 소단위는 변형될 수 있다. 이러한 변형은 자유 아미노 또는

자유 카르복시를 소수성 기로 캐핑하는 것을 포함한다. 예를 들면, 아미노 말단은 아세틸, 벤조일 또는 스테아릴 부위로 캐핑할 수 있다. 예를 들면, 표 1에서 펩타이드 서열의 어느 것은 표에서 구체적으로 나타내지 않았을지라도 이러한 변형을 가질 수 있다. 이들 실시형태에서, 캐리어 펩타이드의 아미노 말단은 다음과 같이 나타낼 수 있다:



또 다른 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 알라닌, 아스파라긴, 시스테인, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 라이신, 메티오닌, 세린 또는 트레오닌의 적어도 하나를 포함한다.

본 명세서에 기술된 실시양태의 일부에서, 캐리어 펩타이드는 기술된 서열 및 카르복시 말단 글리신 또는 프롤린 아미노산 소단위로 구성된다.

일부 실시양태에서, 캐리어 펩타이드는 다음의 서열 (아미노 말단에 카르복시 말단): R_6G , R_7G , R_8G , R_5GR_4G , $R_5F_2R_4G$, $Tat-G$, $rTat-G$, $(RXR_2G_2)_2$ 또는 $(RXR_3X)_2G$ 로 구성되지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 R_6G , R_8G 또는 R_5F_2G 로 구성되지 않는다. 추가로 다른 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 $Tat-G$, $rTat-G$, R_9F_2G , $R_5F_2R_4$, R_4G , R_5G , R_6G , R_7G , R_8G , R_9G , $(RXR)_4G$, $(RXR)_5G$, $(RXRRBR)_2G$, $(RAR)_4F_2$ 또는 $(RGR)_4F_2$ 로 구성되지 않는다. 다른 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 "페네트라틴"(Penetratin) 또는 " R_5Pen "로 구성되지 않는다.

또 다른 양상에서, 본 발명은 펩타이드-핵산 유사체 접합체를 제공하며, 실질적으로 비전하된 골격 및 표적화 염기서열을 갖는 핵산 유사체, 및 상기 핵산 유사체에 공유적으로 결합되고, 카르복시 말단 글리신 또는 프롤린 아미노산 소단위를 포함하고 R^d 소단위, Y 소단위, 및 선택적 Z 소단위로부터 선택된 8 내지 16개의 추가적인 다른 소단위로 구성되고, 적어도 8개의 R^d 소단위, 적어도 2개의 Y 소단위 및 많아야 3개의 Z 소단위를 포함하는 펩타이드를 포함하고,

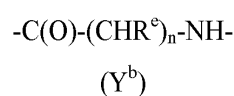
여기서, 상기 소단위의 >50%는 R^d 소단위이고,

(a) 각각의 R^d 소단위는 독립적으로 아르기닌 또는 아르기닌 유사체를 나타내고, 상기 아르기닌 유사체는 식 $R^aN=C(NH_2)R^b$ 의 측쇄를 포함하는 양이온성 α -아미노산이고, 여기서 R^a 는 H 또는 R^c 이고; R^b 는 R^c , NH_2 , NHR , 또는 $N(R^c)_2$ 이고, 여기서 R^c 는 저급 알킬 또는 저급 알케닐이고 또한 선택적으로 질소 또는 R^a 를 포함하거나 또는 R^b 는 함께 고리를 형성할 수 있으며, 또한 상기 측쇄는 R^a 또는 R^b 를 통해 아미노산에 연결되며;

(b) 상기 적어도 두 개의 Y 소단위는 Y^a 또는 Y^b 이며, 여기서:

(i) 각각의 Y^a 는 독립적으로 치환된 또는 비치환된 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 및 아르알킬로부터 독립적으로 선택된 측쇄를 갖는 중성 α -아미노산 소단위이며, 여기서 상기 측쇄는, 치환된 알킬, 알케닐 및 알키닐로부터 선택된 경우, 2개의 탄소원자마다, 바람직하게는 4개의 탄소원자마다, 및 더욱 바람직하게는 6개의 탄소원자마다 많아야 한 개의 헤테로원자를 포함하며, 또한 여기서 상기 소단위는 인접하거나 또는 링커 부위를 플랭키하며, 또한

(ii) Y^b 는



이며,

여기서 n은 2 내지 7이고 각각의 R^c 는 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 메틸이며, 또한

- [0141] (c) Z는 알라닌, 아스파라긴, 시스테인, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 라이신, 메티오닌, 세린, 트레오닌 및 생리학적 pH에서 음전하된 측쇄 (예를 들면, 카르복실레이트 측쇄)를 제외하는 천연적으로 발생하는 측쇄의 하나 또는 두 개의 탄소 동족체인 아미노산으로부터 선택된 아미노산 소단위를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 상기 측쇄는 중성이다. 다른 실시양태에서, Z 측쇄는 천연적으로 발생하는 아미노산의 측쇄이다. 일부 실시형태에서 선택적 Z 소단위는 알라닌, 글리신, 메티오닌, 세린, 및 트레오닌으로부터 선택된다. 캐리어 펩타이드는 0, 1, 2, 또는 3개의 Z 소단위를 포함할 수 있으며, 일부 실시형태에서는 많아야 2개의 Z 소단위를 포함한다.
- [0142] 선택된 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 정확하게는 타입 Y^a 의 2개 Y 소단위를 가지며, 이는 인접하거나 또는 시스테인 소단위를 플랭킹한다. 일부 실시형태에서, 두 개의 Y^a 소단위는 인접한다. 다른 실시형태에서, Y^a 소단위의 측쇄는 천연적으로 발생하는 아미노산 또는 그의 1개 및 2개 탄소 동족체의 측쇄를 포함하고, 생리학적 pH에서 전하된 측쇄를 제외한다. 다른 가능한 측쇄는 천연적으로 발생하는 아미노산의 측쇄이다. 추가의 실시형태에서, 측쇄는 아릴 또는 아르알킬 측쇄이고, 예를 들면 각각의 Y^a 는 독립적으로 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 류신, 이소류신 및 발린으로부터 선택된다.
- [0143] 선택된 실시형태에서, 각각의 Y^a 는 독립적으로 페닐알라닌 및 티로신으로부터 선택된다. 추가의 실시형태에서, 각각의 Y^a 는 페닐알라닌이다. 이것은 예를 들면 아르기닌 소단위, 페닐알라닌 소단위, 글리신 또는 프롤린 아미노산 소단위, 선택적 링커 부분, 및 핵산 유사체로 구성된 접합체를 포함한다. 하나의 이러한 접합체는 식 $\text{Arg}_9\text{Phe}_2\text{aa}$ 를 갖는 펩타이드를 포함하며, 여기서 aa는 글리신 또는 프롤린이다.
- [0144] 전술한 캐리어 펩타이드는 또한 ILFQY, ILFQ, IWFQ 또는 ILIQ를 포함할 수 있다. 다른 실시형태는 서열 PPMWS, PPMWT, PPMFS 또는 PPMYS를 포함하는 전술한 캐리어 펩타이드를 포함한다.
- [0145] 본 발명의 펩타이드-올리고머 접합체는 무세포 번역 시스템을 포함하는 단백질 발현 시스템에서 표적 mRNA의 발현을 억제하고; 표적 프리-mRNA의 스플라이싱을 억제하고; 또한 바이러스의 핵산 복제 또는 mRNA 전사를 조절하는 바이러스의 복제를 억제하는 것을 포함하는 다양한 기능에서 비접합된 올리고머보다 더 효과적이다.
- [0146] 또한 본 발명의 범위내에는 다른 약리학적 약제 (즉 핵산 유사체가 아님) 및 캐리어 펩타이드의 접합체가 포함된다. 구체적으로, 일부 실시형태는
- [0147] (a) 아미노산 소단위를 포함하는 캐리어 펩타이드; 및
- [0148] (b) 약리학적 약제
- [0149] 를 포함하는 접합체를 제공하며;
- [0150] 여기서:
- [0151] 아미노산 소단위의 두 개 이상은 양전하된 아미노산이며, 캐리어 펩타이드는 캐리어 펩타이드의 카르복시 말단에 글리신(G) 또는 프롤린(P) 아미노산 소단위를 포함하며, 또한 캐리어 펩타이드는 약리학적 약제에 공유적으로 부착된다. 이들 실시형태에서 캐리어 펩타이드는 본 명세서에 기술된 캐리어 펩타이드의 어느 것일 수 있다. 약리학적 약제를 캐리어 펩타이드에 접합시켜 약리학적 약제를 전달하는 방법이 또한 제공된다.
- [0152] 공급하고자 하는 약리학적 약제는 형광 화합물과 같은 검출용으로 사용되는 화합물일 수 있을 지라도 생리학적 활성제, 예를 들면 치료적 또는 예방적 약제일 수 있다. 생리학적 활성제는 바이오분자, 예를 들어 펩타이드, 단백질, 사카라이드, 또는 핵산, 특히 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 또는 "소분자" 유기 또는 무기 화합물로부터 선택된 약물을 포함한다. "소분자" 화합물은 상술한 바와 같은 바이오분자가 아닌 유기, 무기, 또는 유기 금속 화합물로서 광범위하게 정의될 수 있다. 전형적으로, 이러한 화합물은 1000 미만, 또는 일부 실시형태에서 500 미만의 분자량을 갖는다.
- [0153] 하나의 실시형태에서, 전달하려고 하는 약리학적 약제는 단일 아미노산, 디펩타이드, 또는 트리펩타이드를 포함하지 않는다. 또 하나의 실시형태에서는 짧은 올리고펩타이드를 포함하지 않으며, 즉 올리고 펩타이드는 6개 미만의 아미노산 소단위를 갖는다. 추가의 실시형태에서는 더 긴 올리고펩타이드를 포함하지 않으며, 즉 올리고 펩타이드는 7 내지 20개의 아미노산 소단위를 갖는다. 추가의 실시형태에서는 20개 이상의 아미노산 소단위를 갖는 폴리펩타이드, 또는 단백질을 포함하지 않는다.
- [0154] 캐리어 펩타이드는 글리신 또는 프롤린 소단위가 없는 상응하는 펩타이드에 접합된 약리학적 약제와 관련하여,

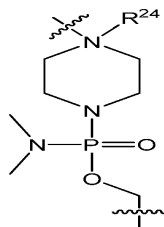
더 적은 독성 및/또는 비접합 형태를 갖는 약리학적 약제에 비하여 세포 내에 약리학적 약제의 수송을 증가시키는데 효과적이다. 일부 실시형태에서, 수송은 적어도 2개, 적어도 5개 또는 적어도 10개의 인자에 의해 증가된다. 다른 실시형태에서, 독성은 적어도 2개, 적어도 5개, 또는 적어도 10개의 인자에 의해 감소된다 (즉 최대 내성 용량이 증가한다).

[0155] A. 펩타이드 링커

[0156] 캐리어 펩타이드는 당업자에게 이용가능한 다양한 방법에 의해 전달하고자 하는 약제 (예를 들면, 핵산 유사체, 약리학적 약제 등)에 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 간접하는 링커 없이 핵산 유사체에 직접적으로 연결된다. 이와 관련하여, 핵산 유사체 상에서 자유 카르복시의 자유 아민과 말단 아미노산 사이에 아미드 결합의 형성은 접합체를 형성하는데 유용할 수 있다. 특정의 실시형태에서, 카르복시 말단 글리신 또는 프롤린 소단위는 핵산 유사체의 3' 말단에 직접 연결된다. 예를 들면, 캐리어 펩타이드는 카르복시 말단 글리신 또는 프롤린 부분과 3' 모르폴리노 고리 질소 사이에 아미드 결합을 형성함으로써 연결될 수 있다 (예를 들면, 도 1C 참조).

[0157] 일부 실시형태에서, 핵산 유사체는 Y^a 또는 Y^b 소단위, 시스테인 소단위, 및 비전하된, 비아미노산 링커 부분으로부터 선택된 링커 부분을 통하여 캐리어에 접합된다. 다른 실시형태에서, 핵산 유사체는 핵산 유사체의 5' 또는 3' 단부에서 글리신 또는 프롤린을 통하여 직접적으로 캐리어 펩타이드에 연결된다. 일부 실시형태에서, 캐리어 펩타이드는 핵산 유사체의 3'에 글리신 또는 프롤린 아미노산 소단위를 통하여 직접적으로 연결되며, 예를 들면 아미드 결합을 통하여 3' 모르폴리노 질소에 직접적으로 연결된다.

[0158] 다른 실시형태에서, 접합체는 말단 글리신 또는 프롤린 아미노산 소단위 사이에 결합 부분을 포함한다. 실시형태의 일부에서, 링커는 알킬, 하이드록실, 알콕시, 알킬아미노, 아미드, 에스테르, 카르보닐, 카르바메이트, 포스포로디아미데이트, 포스포로아미데이트, 포스포로티오에이트 및 포스포디에스테르로부터 선택된 결합을 포함하는 길이 최대 18개의 원자이다. 특정의 실시형태에서, 상기 링커는 포스포로디아미데이트 및 피페라진 결합을 포함한다. 예를 들면, 일부 실시형태에서 링커는 하기 화학식(XXIX)을 갖는다:



(XXIX)

[0160] 상기 식에서, R^{24} 는 부존재하거나, H 또는 C_1-C_6 알킬이다. 특정의 실시형태에서, R^{24} 는 부존재하며 다른 실시형태에서 화학식(XXIX)는 핵산 유사체 (예를 들면, 모르폴리노 올리고머)의 5' 말단을 캐리어 펩타이드에 연결한다 (예를 들면 도 1B 참조).

[0161] 일부 실시형태에서, R^d 소단위의 측쇄 부분은 독립적으로 구아니딜($HN=C(NH_2)NH-$), 아미디닐($HN=C(NH_2)C<$), 2-아미노디하이드로피리디닐, 2-아미노테트라하이드로피리미디닐, 2-아미노피리디닐 및 2-아미노 피리미디닐로부터 선택된다.

[0162] 일부 실시형태에서, R^d 소단위의 측쇄 부분은 독립적으로 구아니딜 ($HN=C(NH_2)NH-$), 아미디닐($HN=C(NH_2)C<$), 2-아미노디하이드록시피리미디닐, 2-아미노테트라하이드록시피리미디닐, 2-아미노피리디닐 및 2-아미노 피리미디닐로부터 선택된다.

[0163] 다수개의 캐리어 펩타이드는 필요에 따라 단일 화합물에 부착될 수 있으며, 대안적으로, 다수개의 화합물은 단일 수송체에 접합될 수 있다. 캐리어 펩타이드와 핵산 유사체 사이의 링커는 또한 천연 또는 비천연 아미노산 (예를 들면, 6-아미노핵산노익산 또는 β -알라닌)으로 구성될 수 있다. 이러한 링커는 또한 예를 들면 카르보디이미드에 의해 촉진된 축합에 의해 형성된 (예를 들면 3' 모르폴리노 질소 또는 5' OH에서) 핵산 유사체의 아

민 또는 하이드록시기와 수송체 펩타이드의 카르복시 말단 사이에 직접 결합을 포함할 수 있다.

[0164]

일반적으로, 링커는 접합체의 수송 또는 기능을 방해하지 않는 임의의 비반응성 부분을 포함할 수 있다. 링커는 예를 들면 에테르, 티오에테르, 아마이드, 또는 카르바메이트 결합을 함유하는 것과 같이, 정상 사용 조건하에 절단되지 않는 것들로부터 선택될 수 있다. 다른 실시형태에서는 생체내에서 절단될 수 있는 캐리어 펩타이드와 화합물 (예를 들면, 올리고뉴클레오타이드 유사체, 약리학적 약제 등) 사이의 결합을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 생체내에서 절단될 수 있는 결합은 당해 분야에 알려져 있으며 또한 예를 들면, 효소적으로 가수분해된 카르복실산 에스테르, 및 글루타미온의 존재하에 절단되는 디설파이드를 포함한다. 또한 적절한 파장의 방사선을 적용시켜 생체내에서 오르토-니트로페닐 에테르와 같은 광분해 절단 가능한 결합을 절단하는 것이 실현 가능할 수 있다. 절단 가능한 디설파이드기를 추가로 포함하는 예시적인 헤테로이중작용성 결합체는 N-하이드록시숙신이미딜 3-[(4-아지도페닐)디티오]프로피오네이트 및 Vanin, E.F. 및 Ji, T.H., Biochemistry 20:6754-6760 (1981)에 기술된 다른 것을 포함한다.

[0165]

C. 예시적인 캐리어 펩타이드

[0166]

예시적인 캐리어 펩타이드 및 올리고뉴클레오타이드 서열의 표는 하기 표 1에 제공된다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 펩타이드 올리고머를 제공하며, 여기서 상기 펩타이드는 표 1에서 펩타이드 서열의 어느 하나를 포함하거나 이들로 구성된다. 또 다른 실시형태에서, 상기 핵산 유사체는 표 1f에서 올리고뉴클레오타이드의 어느 것을 포함하거나 이들로 구성된다. 추가로 다른 실시형태에서, 본 발명은 펩타이드 올리고머를 제공하며, 여기서 상기 펩타이드는 표 1에서 펩타이드 서열의 어느 것을 포함하거나 또는 이들로 구성되며, 상기 핵산은 표 1에서 올리고뉴클레오타이드의 어느 것을 포함하거나 이들로 구성된다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 표 1에서 서열의 어느 하나를 포함하거나 이들로 구성된 펩타이드를 제공한다.

[0167]

표 1. 예시적인 캐리어 펩타이드 및 올리고뉴클레오타이드 서열

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5'· 3')	서열 번호
(RFF) ₃ ; CP0407	RFFRFFRFF-aa	89
RTR	RTRTRFLRRT-aa	90
RFFR	RFFRFFRFFR-aa	91
KTR	KTRTKFLKKT-aa	92
KFF	KFFKFFKFF-aa	93
KFFK	KFFKFFKFFK-aa	94
(RFF) ₂	RFFRFF-aa	95
(RFF) ₂ R	RFFRFFR-aa	96
RX	RXXRXXR-aa	97
(RXR) ₄ ; P007	RXXRXXRXXR-aa	98
Tat ₄₇₋₅₈	YGRKKRRQRRR-aa	99
Tat ₄₈₋₅₈	GRKKRRQRRR-aa	100

[0168]

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5' · 3')	서열 번호
Tat ₄₉₋₅₈	RKKRRQRRR-aa	101
페네프라틴	RQIKIWFQNRRMKWKKGG-aa	102
트랜스포르탄	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-aa	103
2XHph-1	YARVRRRGPRGYARVRRRGPRR-aa	104
Hph-1	YARVRRRGPRR-aa	105
Sim-2	AKAARQAAR-aa	106
HSV1 VP22	DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE-aa	107
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-aa	108
Pep-2	KETWFETWFTEWSQPKKKRKV-aa	109
ANTP	RQIKIWFQNRRMKWKK-aa	110
R ₆ Pen	RRRRRR-RQIKIWFQNRRMKWKKGG-aa	111
rTat	RRRQRRKKRC-aa	112
pTat	CYGRKKRRQRRR-aa	113
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFFC-aa	114
R ₉ CF ₂ RRRRRRRR RCFF	RRRRRRRRRCFF-aa	115
R ₈ CF ₂ R	RRRRRRRRRCFFR-aa	116
R ₆ CF ₂ R ₃	RRRRRRRCFFRRR-aa	117
R ₅ FCFR ₄	RRRRRRCFFRRRR-aa	118
R ₅ F ₂ R ₄	RRRRRFFRRRR-aa	119
R ₄ CF ₂ R ₅	RRRRCFFRRRRRR-aa	120
R ₂ CF ₂ R ₇	RRCFFRRRRRRRR-aa	121
CF ₂ R ₉	CFFRRRRRRRRRR-aa	122
CR ₉ F ₂	CRRRRRRRRRRFF-aa	123
F ₂ R ₉	FFRRRRRRRRRR-aa	124
R ₅ F ₂ CF ₂ R ₄	RRRRRFFCFFRRRR-aa	125
R ₉ I ₂	RRRRRRRRRRII-aa	126
R ₈ F ₃	RRRRRRRRRFFF-aa	127
R ₉ F ₄	RRRRRRRRRFFFF-aa	128
R ₈ F ₂	RRRRRRRRRFF-aa	129
R ₆ F ₂	RRRRRRRFF-aa	130
R ₅ F ₂	RRRRRFF-aa	131
(RRX) ₃ RR	RRXRRXRRXRR-aa	132
(RXR) ₄	RXRRXRRXRRXR-aa	133

[0169]

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5'· 3')	서열 번호
(XRR) ₄	XRRXRRXRRXRR-aa	134
(RX) ₅ RR	RXXRXRXRXRXR-aa	135
(RXR) ₃	RXXRXRXRXR-aa	136
(RXR) ₂ R	RXXRXRR-aa	137
(RXR) ₂	RXXRXR-aa	138
(RKX) ₃ RK	RKXRXKXRXK-aa	139
(RHX) ₃ RH	RHXRXHXRHXH-aa	140
R ₈ CF ₂ R	RRRRRRRRCFFR-aa	141
(RRX) ₃ RR	RRXRXRXRXRR-aa	142
(RXR) ₄ ; P007	RXXRXRXRXRXR-aa	143
(XRR) ₄	XRRXRRXRRXRR-aa	144
(RX) ₅ R	RXXRXRXRXRXR-aa	145
(RX) ₇ R	RXXRXRXRXRXRXR-aa	146
(RXR) ₅	RXXRXRXRXRXRXR-aa	147
(RXRRBR) ₂ ; B	RXRRBRXRRBR-aa	148
(RXR) ₃ RBR	RXXRXRXRRBR-aa	149
(RB) ₅ RXRB R	RBRBRBRBRBRXRBR-aa	150
RBRBRBRX RBRBRBR	RBRBRBRXRBRBRBR-aa	151
X(RB) ₃ RX(R B) ₃ R-X	XRBRBRBRXRBRBRBR-aa	152
(RBRX) ₄	RBRXRBRXRBRXRBR-aa	153
(RB) ₄ (RX) ₃ R	RBRBRBRBRXRXRXR-aa	154
RX(RB) ₂ RX(RB) ₃ R	RXRBRBRXRBRBRBR-aa	155
(RB) ₇ R	RBRBRBRBRBRBRBR-aa	156
R ₄	tg-RRRR-aa	157
R ₅	tg-RRRRR-aa	158
R ₆	tg-RRRRRR-aa	159
R ₇	tg-RRRRRRR-aa	160
R ₈	tg-RRRRRRRR-aa	161
R ₅ GR ₄	tg-RRRRRGRRRR-aa	162
R ₅ F ₂ R ₄	tg-RRRRRFFRRRR-aa	163

[0170]

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5'· 3')	서열 번호
Tat	tg-RKKRRQRRR-aa	164
rTat	tg-RRRQRRKKR-aa	165
	RXRRXR-aa	166
	RBRRBR-aa	167
	RXRRBR-aa	168
	RBRRXR-aa	169
	RXRY ^b RXR-aa	170
	RBRY ^b RBR-aa	171
	RXRY ^b RBR-aa	172
	RBRY ^b RXR-aa	173
	RXRILFQYRXR-aa	174
	RBRILFQYRBR-aa	175
	RXRILFQYRBR-aa	176
	RBRILFQYRXR-aa	177
	RXRRXRRXR-aa	178
	RBRRBRRBR-aa	179
	RXRRBRRXR-aa	180
	RXRRBRRBR-aa	181
	RXRRXRRBR-aa	182
	RBRRXRRBR-aa	183
	RBRRXRRXR-aa	184
	RBRRBRRXR-aa	185
	RXRY ^b RXRRXR-aa	186
	RXRRXRY ^b RXR-aa	187
	RXRILFQYRXRRXR-aa	188
	RXRRXRILFQYRXR-aa	189
	RXRY ^b RXRY ^b RXR-aa	190
	RXRILFQYRXRILFQYRXR-aa	191
	RXRILFQYRXRY ^b RXR-aa	192
	RXRY ^b RXRILFQYRXR-aa	193
	RBRY ^b RBRRBR-aa	194
	RBRRBRY ^b RBR-aa	195
	RBRILFQYRBRRBR-aa	196
	RBRRBRLFQYRBR-aa	197
	RBRYRBRY ^b RBR-aa	198

[0171]

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5' · 3')	서열 번호
	RBRILFQYRBRILFQYRBR-aa	199
	RBRY ^b RBRILFQYRBR-aa	200
	RBRILFQYRBR ^b RBR-aa	201
	RXRY ^b RBRRXR-aa	202
	RXRRBR ^b RXR-aa	203
	RXRILFQYRBRRXR-aa	204
	RXRRBRILFQYRXR-aa	205
	RXRY ^b RBRY ^b RXR-aa	206
	RXRILFQYRBRILFQYRXR-aa	207
	RXRY ^b RBRILFQYRXR-aa	208
	RXRILFQYRBR ^b RXR-aa	209
	RXRY ^b RBRRBR-aa	210
	RXRRBR ^b RBR-aa	211
	RXRILFQYRBRRBR-aa	212
	RXRRBRILFQYRBR-aa	213
	RXRY ^b RBRY ^b RBR-aa	214
	RXRILFQYRBRILFQYRBR-aa	215
	RXRY ^b RBRILFQYRBR-aa	216
	RXRILFQYRBR ^b RBR-aa	217
	RXRY ^b RXRRBR-aa	218
	RXRRXRY ^b RBR-aa	219
	RXRILFQYRXRRBR-aa	220
	RXRRXRILFQYRBR-aa	221
	RXRY ^b RXRY ^b RBR-aa	222
	RXRILFQYRXRILFQYRBR-aa	223
	RXRY ^b RXRILFQYRBR-aa	224
	RXRILFQYRXRY ^b RBR-aa	225
	RBRY ^b RXRRBR-aa	226
	RBRRXRY ^b RBR-aa	227
	RBRILFQYRXRRBR-aa	228
	RBRRXRILFQYRBR-aa	229
	RBRY ^b RXRY ^b RBR-aa	230
	RBRILFQYRXRILFQYRBR-aa	231
	RBRY ^b RXRILFQYRBR-aa	232
	RBRILFQYRXRY ^b RBR-aa	233

[0172]

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5'· 3')	서열 번호
	RBRY ^b RXRRXR-aa	234
	RBRXRY ^b RXR-aa	235
	RBRILFYRXRRXR-aa	236
	RBRXRILFYRXR-aa	237
	RBRY ^b RXRY ^b RXR-aa	238
	RBRILFYRXRILFYRXR-aa	239
	RBRY ^b RXRILFYRXR-aa	240
	RBRILFYRXRY ^b RXR-aa	241
	RBRY ^b RBRXR-aa	242
	RBRBRRY ^b RXR-aa	243
	RBRILFYRBRXR-aa	244
	RBRBRILFYRXR-aa	245
	RBRY ^b RBRY ^b RXR-aa	246
	RBRILFYRBRILFYRXR-aa	247
	RBRY ^b RBRILFYRXR-aa	248
	RBRILFYRBRRY ^b RXR-aa	249
	RXRRXRRXRRXR-aa	250
	RXRRBRXRILFYRXRBRXR-aa	251
	RXRRBRXRBR-aa	252
	YGRKKRRQRRP-aa	253
	RXRRXRRXRRXRBASSLNIXC-aa	254
	RXRRBRXRILFYRXRBRXRBASSLNIXC-aa	255
	RXRRBRXRASSLNIXRBRXRBC-aa	256
	RXRRBRXRRBRXBASSLNIA-aa	257
	THRPPMWSPVWP-aa	258
	HRPPMWSPVWP-aa	259
	THRPPMWSPV-aa	260
	THRPPMWSP-aa	261
	THRPPMWSPVFP-aa	262
	THRPPMWSPVYP-aa	263
	THRPPMWSPAWP-aa	264
	THRPPMWSPLWP-aa	265
	THRPPMWSPIWP-aa	266
	THRPPMWTPVVWP-aa	267
	THRPPMFSPVWP-aa	268

[0173]

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5' · 3')	서열 번호
	THRPPMWS-aa	269
	HRPPMWSPVW-aa	270
	THRPPMYSPVWP-aa	271
	THRPPnleWSPVWP-aa (nle = 노르류신)	272
	THKPPMWSPVWP-aa	273
	SHRPPMWSPVWP-aa	274
	STFTHPR-aa	275
	YDIDNRR-aa	276
	AYKPVGR-aa	277
	HAIYPRH-aa	278
	HTPNSTH-aa	279
	ASSPVHR-aa	280
	SSLPLRK-aa	281
	KKRS-aa	282
	KRSK-aa	283
	KKRSK-aa	284
	KSRK-aa	285
	SRKR-aa	286
	RKRK-aa	287
	KSRKR-aa	288
	QHPPWRV-aa	289
	THPPTTH-aa	290
	YKHTPTT-aa	291
	QGMHRGT-aa	292
	SRKRK-aa	293
	KSRKRK-aa	294
	PKKKRKV-aa	295
	GKKRSKV-aa	296
	KSRKRKL-aa	297
	HSPSKIP-aa	298
	HMATFHY-aa	299
	AQPNKFK-aa	300
	NLTRLHT-aa	301
	KKKR-aa	302
	KKRK-aa	303

[0174]

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5' · 3')	서열 번호
	KKKRRK-aa	304
	RRRRRRRQIKIWFQNRRMKWKKGGC-aa	305
	RRRRRRRQIKIWFQNRRMKWKKGGC-aa	306
	RQIKIWFQNRRMKWKKGGC-aa	307
	RRRRRRRQIKIWFQNRRMKWKKC-aa	308
	RXRRXRRXRRQIKIWFQNRRMKWKKGGC-aa	309
	RRRRRRRQIKILFQNRXRXRXRC-aa	310
	RXRRXRRXRXRC-aa	311
	RXRRXRRXRXRXRC-aa	312
	RXRRXRRXRIKILFQNRRMKWKKGGC-aa	313
	RXRRXRRXRIKILFQNRRMKWKKC-aa	314
	RXRRXRRXRIKILFQNRMKWKKC-aa	315
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWKKC-aa	316
	RXRRXRRXRIKILFQNRMKWKKC-aa	317
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWKKC-aa	318
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWKKC-aa	319
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWKAC-aa	320
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWHKAC-aa	321
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWHRC-aa	322
	RXRRXRRXRIKILFQNRRMKWKKC-aa	323
	RARARARARIKILFQNRRMKWKKC-aa	324
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWHKAC-aa	325
	RXRRXRRXRIHILFQNXRMKWHKAC-aa	326
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWHKAC-aa	327
	RXRRXRRXRIKILFQYXRMKWHKAC-aa	328
	RXRRXRRXRLYSPLSFQXRMKWHKAC-aa	329
	RXRRXRRXRISILFQYXRMKWHKAC-aa	330
	RXRRXRRXRILFQYXRMKWHKAC-aa	331
	RXRRXRIKILFQYXRMKWHKAC-aa	332
	RXRRARRXRIHILFQYXRMKWHKAC-aa	333
	RARRRRRARIHILFQYXRMKWHKAC-aa	334
	RXRRXRRXRIHILFQYXRMKWHKAC-aa	335
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWHKAC-aa	336
	RXRRXRRXRIHILFQNXRMKWHKAC-aa	337
	RXRRXRRXRIKILFQNRRMKWHK-aa	338

[0175]

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5' · 3')	서열 번호
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWHK-aa	339
	RXRRXRRXRILFQNRRMKWHK-aa	340
	RXRRXRRXRILFQNXRMKWHK-aa	341
	RXRRXRRXRIHILFQNRRMKWHK-aa	342
	RXRRXRRXRIHILFQNXRMKWHK-aa	343
	RXRRXRRXRIRILFQNRRMKWHK-aa	344
	RXRRXRRXRIRILFQNXRMKWHK-aa	345
	RXRRXRRXRIILFQNRRMKWHK-aa	346
	RXRRXRRXRIILFQNXRMKWHK-aa	347
	RXRRXRRXRKILFQNRRMKWHK-aa	348
	RXRRXRRXRKILFQNXRMKWHK-aa	349
	RXRRXRRXRILFQNRRMKWHK-aa	350
	RXRRXRRXRILFQNXRMKWHK-aa	351
	RXRRXRRXRHILFQNRRMKWHK-aa	352
	RXRRXRRXRHILFQNXRMKWHK-aa	353
	RXRRXRRXRILFQNRRMKWHK-aa	354
	RXRRXRRXRILFQNXRMKWHK-aa	355
	RXRRXRRXRILFQNRRMKWHK-aa	356
	RXRRXRRXRILFQNXRMKWHK-aa	357
	RXRRXRRXRIKILFYRRMKWHK-aa	358
	RXRRXRRXRIKILFYXRMKWHK-aa	359
	RXRRXRRXRILFYRRMKWHK-aa	360
	RXRRXRRXRILFYXRMKWHK-aa	361
	RXRRXRRXRIHILFYRRMKWHK-aa	362
	RXRRXRRXRIHILFYXRMKWHK-aa	363
	RXRRXRRXRIRILFYRRMKWHK-aa	364
	RXRRXRRXRIRILFYXRMKWHK-aa	365
	RXRRXRRXRIILFYRRMKWHK-aa	366
	RXRRXRRXRIILFYXRMKWHK-aa	367
	RXRRXRRXRKILFYRRMKWHK-aa	368
	RXRRXRRXRKILFYXRMKWHK-aa	369
	RXRRXRRXRILFYRRMKWHK-aa	370
	RXRRXRRXRILFYXRMKWHK-aa	371
	RXRRXRRXRHILFYRRMKWHK-aa	372
	RXRRXRRXRHILFYXRMKWHK-aa	373

[0176]

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5'· 3')	서열 번호
	RXRRXRRXRILFQYRRMKWHK-aa	374
	RXRRXRRXRILFQYXRMKWHK-aa	375
	RXRRXRRXRILFQYRRMKWHK-aa	376
	RXRRXRRXRILFQYXRMKWHK-aa	377
	RXRRXRRXR-aa	378
	RXRRXRRXRXR-aa	379
	RARRAR-aa	380
	RARRARRAR-aa	381
	RARRARRARRAR-aa	382
	RXRRXRI-aa	383
	RXRRARRXR-aa	384
	RARRXRRAR-aa	385
	RRRRR-aa	386
	RRRRRR-aa	387
	RRRRRRR-aa	388
	RXRRXRRXRRXC-aa	389
	RXRRXRRXRRXRC-aa	390
	RXRRXRRXRIKILFQNRRMKWKKGGC-aa	391
	RXRRXRRXRIKILFQNRRMKWKKC-aa	392
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWKKC-aa	393
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWKKC-aa	394
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWKKC-aa	395
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWKKC-aa	396
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWKKC-aa	397
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWKAC-aa	398
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWHKAC-aa	399
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWHRC-aa	400
	RXRRXRRXRIKILFQNRRMKWKKC-aa	401
	RARARARARIKILFQNRRMKWKKC-aa	402
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWHKAC-aa	403
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWHKAC-aa	404
	RXRRXRRXRIKILFQNXRMKWHKAC-aa	405
	RXRRXRRXRIKILFQYXRMKWHKAC-aa	406
	RXRRXRRXRLYSPLSFQXRMKWHKAC-aa	407
	RRMKWHK-aa	408

[0177]

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5'· 3')	서열 번호
	XRMKWHK-aa	409
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXXRMKWHK-aa	410
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXXRMKWHK-aa	411
	RRRRRRRQIKILFQNPKKKRKVGGC-aa	412
	HHFFRRRRRRRRRFFC-aa	413
	HHHHHHRRRRRRRRRFFC-aa	414
	HHHHHHFFRRRRRRRRRFFC-aa	415
	HHHHHHXXRRRRRRRRRFFC-aa	416
	HHHHHHXXFFRRRRRRRRRFFC-aa	417
	HHHXRRRRRRRRRFFXHHHC-aa	418
	XRMKWHK-aa	419
	XRWKWHK-aa	420
	RXRARXR-aa	421
	RXRXRXR-aa	422
	RARXRAR-aa	423
	RXRAR-aa	424
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXXHMKWHK-aa	425
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXXRWKWHK-aa	426
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXXHWKWHK-aa	427
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXRXRARXR-aa	428
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXRXRXRXR-aa	429
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXRRRXR-aa	430
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXRARXRAR-aa	431
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXRARXR-aa	432
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXRAR-aa	433
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXXRMKWHK-aa	434
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXXHMKWHK-aa	435
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXXRWKWHK-aa	436
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXXHWKWHK-aa	437
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXRXRARXR-aa	438
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXRXRXRXR-aa	439
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXRRRXR-aa	440
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXRARXRAR-aa	441
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXRARXR-aa	442
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXRAR-aa	443

[0178]

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5'· 3')	서열 번호
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXXHMKWHK-aa	444
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXXRWKWHK-aa	445
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXXHWKWHK-aa	446
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXRXRARXR-aa	447
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXRXRXRXR-aa	448
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXRXRXR-aa	449
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXRARXRAR-aa	450
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXRXRARXR-aa	451
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILFQXRXRAR-aa	452
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXXRMKWHK-aa	453
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXXHMKWHK-aa	454
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXXRWKWHK-aa	455
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXXHWKWHK-aa	456
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXRXRARXR-aa	457
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXRXRXRXR-aa	458
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXRXRXR-aa	459
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXRARXRAR-aa	460
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXRXRARXR-aa	461
	XXXXXXXXXXXXXXXXXILIQXRAR-aa	462
	RXRARRXRARXA-aa	463
	RXRARRXRILFQYXHMKWHKAC-aa	464
	RXRARRXRILFQYXRMKWHKAC-aa	465
	RXRARRXRILFQYXRWKWHKAC-aa	466
	RXRXRXRXRRC-aa	467
	RXRXRXRRIXILFQNXRMKWHKAC-aa	468
	RXRXRXRRIHILFQNXRMKWHKAC-aa	469
	RXRXRXRRIXILFQYXRMKWHKAC-aa	470
	RXRXRXRRLYSPLSFQXRMKWHKAC-aa	471
	RXRXRXRILFQYXRMKWHKAC-aa	472
	RXRXRILFQYXRMKWHKAC-aa	473
	RARRRRARILFQYXRMKWHKAC-aa	474
	RXRARRXRILFQYXRMKWHKAC-aa	475
	RARRRRARILFQYXRMKWHKAC-aa	476
	RXRARRXRILFQYXRMKWHKAC-aa	477
	RXRARRXRILFQYXHMKWHKAC-aa	478

[0179]

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5' · 3')	서열 번호
	RXRRARRXRILFYXRMKWHKAC-aa	479
	RXRRARRXRILFYXRWKWHKAC-aa	480
	RXRRARRXRILFYXHWKWHKAC-aa	481
	RXRRARRXRILFYRXRAXRAC-aa	482
	RXRRARRXRILFYRXRXRXRAC-aa	483
	RXRRARRXRILQYXRMKWHKAC-aa	484
	RXRRXRILFYRXRXRC-aa	485
	RXRRARRXRILFYRXRAXRAC-aa	486
	RXRRARRXRILFYRXRXRXRAC-aa	487
	RXRRARRXRILQYXRMKWHKAC-aa	488
	RXRRXRILFYRXRXRCYS-aa	489
	RARRXRRARILFYRARXRARAC-aa	490
	RARRXRRARILFYRXRAXRAC-aa	491
	RARRXRRARILFYRXRXRXRAC-aa	492
	RARRXRRARILFYRXRAXAC-aa	493
	RXRRARRXRILFYRXRXRXRAC-aa	494
	RXRRARRXRILFYRXRAXAC-aa	495
	RXRRARRXRIHILFQNXRMKWHKAC-aa	496
	RXRRARRXRRARXAC-aa	497
	RXRRARRXRILFYXHMKWHK-aa	498
	RXRRARRXRILFYXRMKWHK-aa	499
	RXRRARRXRILFYXRWKWHK-aa	500
	RXRRARRXRILFYXRMKWHK-aa	501
	RXRRARRXRILFYRXRAXR-aa	502
	RXRRARRXRILFYRXRXRXR-aa	503
	RXRRARRXRILFYRXRXRXR-aa	504
	RXRRARRXRILFYRARXRAR-aa	505
	RXRRARRXRILFYRXRAR-aa	506
	RXRRARRXRILQYXHMKWHK-aa	507
	RXRRARRXRILQYXRMKWHK-aa	508
	RXRRARRXRILQYXRWKWHK-aa	509
	RXRRARRXRILQYXRMKWHK-aa	510
	RXRRARRXRILQYRXRAXR-aa	511
	RXRRARRXRILQYRXRXRXR-aa	512
	RXRRARRXRILQYRXRXRXR-aa	513

[0180]

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5' · 3')	서열 번호
	RXRRARRXRILIQYRARXRAR-aa	514
	RXRRARRXRILIQYXRAR-aa	515
	RARRXRRARILFQYXHMKWHK-aa	516
	RARRXRRARILFQYXRMKWHK-aa	517
	RARRXRRARILFQYXRWKWHK-aa	518
	RARRXRRARILFQYXRMKWHK-aa	519
	RARRXRRARILFQYRXXRAXR-aa	520
	RARRXRRARILFQYRXXRXR-aa	521
	RARRXRRARILFQYRXXRXR-aa	522
	RARRXRRARILFQYRARXRAR-aa	523
	RARRXRRARILFQYRXXR-aa	524
	RARRXRRARILIQYXHMKWHK-aa	525
	RARRXRRARILIQYXRMKWHK-aa	526
	RARRXRRARILIQYXRWKWHK-aa	527
	RARRXRRARILIQYXRMKWHK-aa	528
	RARRXRRARILIQYRXXRAXR-aa	529
	RARRXRRARILIQYRXXRXR-aa	530
	RARRXRRARILIQYRXXRXR-aa	531
	RARRXRRARILIQYRARXRAR-aa	532
	RARRXRRARILIQYRXXR-aa	533
	RXRRXRILFQYXHMKWHK-aa	534
	RXRRXRILFQYXRMKWHK-aa	535
	RXRRXRILFQYXRWKWHK-aa	536
	RXRRXRILFQYXRMKWHK-aa	537
	RXRRXRILFQYRXXRAXR-aa	538
	RXRRXRILFQYRXXRXR-aa	539
	RXRRXRILFQYRXXRXR-aa	540
	RXRRXRILFQYRARXRAR-aa	541
	RXRRXRILFQYRXXR-aa	542
	RXRRXRILIQYXHMKWHK-aa	543
	RXRRXRILIQYXRMKWHK-aa	544
	RXRRXRILIQYXRWKWHK-aa	545
	RXRRXRILIQYXRMKWHK-aa	546
	RXRRXRILIQYRXXRAXR-aa	547
	RXRRXRILIQYRXXRXR-aa	548

[0181]

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5' · 3')	서열 번호
	RXRRXRILIQYRXXR-aa	549
	RXRRXRILIQYRARXRAR-aa	550
	RXRRXRILIQYRXXR-aa	551
	PRPXXXXXXXXXXXXPRG-aa	552
	RRRRRRRR-aa	553
	RRMKWKK-aa	554
	PKKKRKV-aa	555
	CKDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAKK-aa	556
	RKKRRQRRR-aa	557
	RKKRRQRR-aa	558
	RKKRRQR-aa	559
	KKRRQRRR-aa	560
	KKRRQRRR-aa	561
	AKKRRQRRR-aa	562
	RAKRRQRRR-aa	563
	RKARRQRRR-aa	564
	RKKARQRRR-aa	565
	CRWRWKCKK-aa	566
덴구(Dengue)	CGGTCCACGTAGACTAACAAC	1
JEV	GAAGTTCACACAGATAAACTTCT	2
M1/M2AUG. 20.22	CGGTTAGAAGACTCATCTTT	3
M1/M2AUG. 25.26	TTTCGACATCGGTTAGAAGACTCAT	4
NP-AUG	GAGACGCCATGATGTGGATGTC	5
피코르나바이러스	GAAACACGGACACCCAAAGTAGT	6
덴구 3'-CS	TCCCAGCGTCAATATGCTGTTT	7
아레나바이러스	GCCTAGGATCCACGGTGCGC	8
RSV-L 표적	GGGACAAAATGGATCCCATTATTAATGGAAATTC TGCTAA	9
RSV-AUG-2	TAATGGGATCCATTTTGTCCC	10
RSV-AUG3	AATAATGGGATCCATTTTGTCCC	11
RSV-AUG4	CATTAATAATGGGATCCATTTTGTCCC	12
RSV-AUG5	GAATTTCCATTAATAATGGGATCCATTTTG	13

[0182]

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5' · 3')	서열 번호
RSV-AUG6	CAGAATTTCCATTAATAATGGGATCCATT	14
M23D	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	15
AVI-5225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT- RXRRBRRXRRBRXB	16
eGFP654	GCTATTACCTTAACCCAG	17
huMSTN 표적	GAAAAAAGATTATATTGATTTTAAAATCATGCAA AAACTGCAACTCTGTGTT	18
muMSTN25- 104	CATACATTTGCAGTTTTTGCATCAT	19
muMSTN25- 183	TCATTTTTTAAAAATCAGCACAAATCTT	20
muMSTN25- 194	CAGTTTTTGCATCATTTTTTAAAAATC	21
Exon44-A	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA	22
Exon44-B	AAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCAC	23
Exon44-C	TTGTGTCTTTCTGAGAAACTGTTCA	24
Exon45-A	CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAA	25
Exon45-B	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA	26
Exon45-C	CATTCAATGTTCTGACAACAGTTTGCCGCT	27
Exon50-A	CTTACAGGCTCCAATAGTGGTCAGT	28
Exon50-B	CCACTCAGAGCTCAGATCTTCTAACTTCC	29
Exon50-C	GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	30
Exon51-A	ACATCAAGGAAGATGGCATTCTAGTTTGG	31
Exon51-B	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	32
Exon51-C	GAGCAGGTACCTCCAACATCAAGGAA	33
Exon53-A	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	34
Exon53-B	TGTTCTTGTACTTCATCCCACTGATTCTGA	35
SMN2-A	CTTTCATAATGCTGGCAG	36
SMN2-B	CATAATGCTGGCAG	37
SMN2-C	GCTGGCAG	38
CAG 9mer	CAG CAG CAG	39
CAG 12mer	CAG CAG CAG CAG	40
CAG 15mer	CAG CAG CAG CAG CAG	41
CAG 18mer	CAG CAG CAG CAG CAG CAG	42
AGC 9mer	AGC AGC AGC	43
AGC 12mer	AGC AGC AGC AGC	44

[0183]

명칭	서열 (아미노· 카르복시 말단 또는 5' · 3')	서열 번호
AGC 15mer	AGC AGC AGC AGC AGC	45
AGC 18mer	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	46
GCA 9mer	GCA GCA GCA	47
GCA 12mer	GCA GCA GCA GCA	48
GCA 15mer	GCA GCA GCA GCA GCA	49
GCA 18mer	GCA GCA GCA GCA GCA GCA	50
AGC 25mer	AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC A	51
CAG 25mer	CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG C	52
CAGG 9mer	CAG GCA GGC	53
CAGG 12mer	CAG GCA GGC AGG	54
CAGG 24mer	CAG GCA GGC AGG CAG GCA GGC AGG	55

[0184]

[0185]

aa = 글리신 또는 프롤린; B = β-알라닌; X = 6-아미노헥사노익산; tg = 비변형 아미노 말단, 또는 아세틸, 벤조일 또는 스테아로일 기로 캐핑된 아미노 말단 (즉 아세틸 아미드, 벤조일 아미드 또는 스테아로일 아미드) 및

Y^b 는 식 $-C(O)-(CHR^c)_n-NH-$ 을 가지며, 여기서 n 은 2 내지 7이고 각각의 R^c 는 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 메틸이다. 간략하게, 모든 서열이 말단 tg기와 주지되는 것은 아니다. 그러나, 상기 서열의 각각은 비변형된 아미노말단 또는 아세틸, 벤조일 또는 스테아로일기로 캡핑된 아미노말단을 포함할 수 있다.

[0186] III. 안티센스 올리고머

[0187] 본 발명의 접합체에 포함된 핵산 유사체는 폴리뉴클레오타이드의 표적 서열에 염기-특이적 결합이 가능한 실질적으로 비전하된 합성 올리고머, 예를 들면 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체이다. 이러한 유사체는 예를 들면 메틸포스포네이트, 펩타이드 핵산, 실질적으로 비전하된 N3'→5' 포스포르아미데이트 및 모르폴리노 올리고머를 포함한다.

[0188] 유사체 골격에 의해 지지되는 염기 쌍으로 제공되는 핵산 유사체의 염기서열은 지지된 염기쌍 그룹이 표준 또는 변형된 A, T, C, G 및 U 염기 또는 비-가닥 이노신(I) 및 7-테아자-G 염기를 포함하는 임의의 서열일 수 있다.

[0189] 일부 실시형태에서, 핵산 유사체는 모르폴리노 올리고머, 즉 도 1에 도시된형태의 모르폴리노 소단위로 구성된 올리고뉴클레오타이드 유사체이며, 여기서 (i) 구조는 인접한 소단위의 5' 엑소사이클릭 탄소에 하나의 소단위의 모르폴리노 질소를 결합하는, 1 내지 3개의 원자 길이, 바람직하게는 2개의 원자 길이의 인-함유 결합에 의해 함께 연결되며, 또한 (ii) Pi 및 Pj는, 염기 특이적 수소결합에 의해, 폴리뉴클레오타이드중의 염기에 연결하는데 효과적인 퓨린 또는 피리미딘 염기쌍 부분이다. 퓨린 또는 피리미딘 염기쌍 부분은 전형적으로 아데닐, 시토신, 구아닌, 우라실 또는 티민이다. 모르폴리노 올리고머의 합성, 구조, 및 결합 특성은 이하에 더욱 기술되며 또한 미국특허 제5,698,685호, 제5,217,866호, 제5,142,047호, 제5,034,506호, 제5,166,315호, 제5,521,063호 및 제5,506,337호에 상세히 기술되어 있으며, 이들 전부 여기서 참고로 인용된다.

[0190] 모르폴리노-기본 올리고머의 바람직한 화학적 특성은 높은 Tm을 갖는 표적 RNA를 포함하는 상보적 염기 표적 핵산을 사용하여, 심지어 8-14개의 염기로 짧은 올리고머를 사용하여 선택적으로 하이브리드 형성하는 능력, 포유동물 세포내에 적극적으로 수송하는 능력, 및 RNase 분해를 저항하는 올리고머:RNA 헤테로듀플렉스의 능력을 포함한다.

[0191] 바람직한 실시형태에서, 모르폴리노 올리고머는 길이 약 8-10 소단위이다. 더욱 바람직하게, 올리고머는 길이 약 8-20, 약 8-16, 약 10-30, 또는 약 12-25 소단위이다. 평균성과 같은 일부 적용에 있어서, 짧은 올리고머, 예를 들어 길이 약 8-12개의 소단위가 본 명세서에 기술된 바와 같이 펩타이드 수송체에 부착되었을 때 특히 유리할 수 있다.

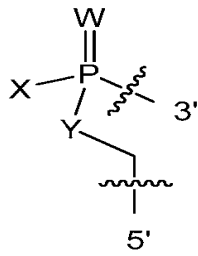
[0192] A. 변형 소단위간 링커를 갖는 올리고머

[0193] 본 발명의 한 가지 실시형태는 변형 소단위간 결합을 포함하는 핵산 유사체 (예를 들면, 모르폴리노 올리고머)를 포함하는 펩타이드-올리고머 접합체에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 접합체는 상응하는 비변형 올리고머에서보다 DNA 및 RNA에 대해 더 높은 친화성을 가지며, 또한 다른 소단위간 결합을 갖는 올리고머에 비하여 개선된 세포 전달, 효능, 및/또는 조직 분포 특성을 입증한다. 하나의 실시형태에서, 접합체는 하기에 정의된 바와 같은 타입 (A)의 하나 이상의 소단위간 결합을 포함한다. 다른 실시형태에서, 접합체는 하기에 정의된 바와 같은 타입 (B)의 하나 이상의 소단위간 결합을 포함한다. 추가로 다른 실시형태에서, 접합체는 이하에 더욱 상세히 기술된 바와 같은 타입(A)와 타입(B)의 소단위간 결합을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 접합체는 이하에 상세히 기술된 바와 같은 모르폴리노 올리고머를 포함한다. 다양한 결합 타입 및 올리고머의 구조적 특징과 성질은 다음의 논의에서 더욱 상세하게 기술된다.

[0194] 1. 결합(A)

[0195] 출원인들은 안티센스 활성, 바이오분산 및/또는 다른 바람직한 성질의 증가가 다양한 소분자간 결합을 갖는 올리고머를 제조함으로써 최적화될 수 있다는 것을 발견하였다. 예를 들면, 올리고머는 하나 이상의 타입(A)의 소분자간 결합을 선택적으로 포함하고 또한 특징의 실시형태에서 올리고머는 적어도 하나의 타입(A)의 결합을 포함하며, 예를 들면, 각각의 결합은 타입 (A)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 각각의 타입 (A) 결합은 동일한 구조를 갖는다. 타입(A)의 결합은 본 명세서에서 전부 참고로 인용되는 공유 미국특허 제7,943,762호에 기술된

결합을 포함한다. 결합(A)는 다음 화학식(I) 또는 그의 염 또는 이성체를 가지며, 여기서 3' 및 5'는 각각 모르폴리노그리의 3' 및 5'에 대한 부착점을 나타낸다 (즉 이하에 논의된 화학식(I)):

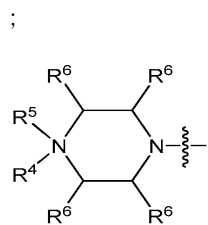


I

상기식에서,

W 는 각각의 경우에 독립적으로 S 또는 O이고;

X는 각각의 경우에 독립적으로 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{NR}^1\text{R}^2$, $-\text{OR}^3$ 또는 다음 식(II)이고



(II)

Y 는 각각의 경우에 독립적으로 O 또는 $-\text{NR}^2$ 이고;

R^1 는 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 메틸이고;

R^2 는 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 $-\text{LNR}^4\text{R}^5\text{R}^7$ 이고;

R^3 는 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬이고;

R^4 는 각각의 경우에 독립적으로 수소, 메틸, $-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-\text{Z-L-NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 또는 $-\text{[C(=O)CHR}'\text{NH}]_m\text{H}$ 이고, 여기서 Z는 $-\text{C}(=\text{O})-$ 또는 직접결합이고, R'는 천연적으로 발생하는 아미노산 또는 그의 하나 또는 두 개의 탄소 동족체의 측쇄이고, 또한 m은 1 내지 6이고;

R^5 는 각각의 경우에 독립적으로 수소, 메틸 또는 전자쌍이고;

R^6 는 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 메틸이고;

R^7 은 각각의 경우에 독립적으로 수소, $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬 또는 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알콕시알킬이고;

L은 알킬, 알콕시 또는 알킬아미노기를 포함하는 길이 최대 18개 원자의 선택적 링커 또는 그의 조합이다.

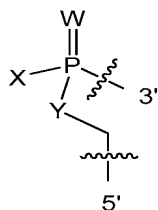
일부 실시예에서, 올리고머는 적어도 하나의 타입(A) 결합을 포함한다. 일부 다른 실시형태에서, 올리고머는 적어도 두 개의 연속적인 타입(A) 결합을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 올리고머 중의 결합의 적어도 5%는 타입(A)이며; 예를 들면, 일부 실시형태에서, 결합의 5%-95%, 10% 내지 90%, 10% 내지 50%, 또는 10% 내지 35%는 결합 타입(A)일 수 있다. 일부 구체적인 실시형태에서, 적어도 하나의 타입(A) 결합은 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 이고, 더욱 다른 실시형태에서 올리고머 중의 각각의 결합은 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 이다. 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 타입(A) 결합은 피페리진-1-일, 예를 들면 비치환된 피페라진-1-일 (예를 들면, A2 또는 A3)이다. 다른 실시형태에서, 각각의 타입(A) 결합은 피페리진-1-일, 예를 들면 비치환된 피페라진-1-일이다.

- [0212] 일부 실시형태에서, W는 각각의 경우에 독립적으로 S 또는 O이고, 또한 특정의 실시형태에서 W는 O이다.
- [0213] 일부 실시형태에서, X는 각각의 경우에 독립적으로 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{NR}^1\text{R}^2$, $-\text{OR}^3$ 이다. 일부 실시형태에서, X는 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 이다. 다른 양상에서 X는 $-\text{NR}^1\text{R}^2$ 이고, 또한 다른 실시예에서 X는 $-\text{OR}^3$ 이다.
- [0214] 일부 실시형태에서, R^1 은 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 메틸이다. 일부 실시형태에서, R^1 은 수소이다. 다른 실시형태에서 X는 메틸이다.
- [0215] 일부 실시형태에서, R^2 는 각각의 경우에 독립적으로 수소이다. 다른 실시형태에서, R^2 는 각각의 경우에 $-\text{LNR}^4\text{R}^5\text{R}^7$ 이다. 일부 실시형태에서, R^3 는 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 C_1 - C_6 알킬이다. 다른 실시형태에서, R^3 는 메틸이다. 또 다른 실시형태에서, R^3 는 에틸이다. 일부 다른 실시형태에서, R^3 는 n-프로필 또는 이소프로필이다. 일부 다른 실시형태에서, R^3 는 C_4 알킬이다. 다른 실시형태에서, R^3 는 C_5 알킬이다. 일부 실시형태에서 R^3 는 C_6 알킬이다.
- [0216] 특정의 실시형태에서, R^4 는 각각의 경우에 독립적으로 수소이다. 다른 실시형태에서, R^4 는 메틸이다. 추가로 다른 실시형태에서, R^4 는 $-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 이고, 또한 다른 실시형태에서 R^4 는 $-\text{Z-L-NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 이다. 추가로 다른 실시형태에서, R^4 는 $-\text{C}(=\text{O})\text{CHR}'\text{NH}]_m\text{H}$ 이다. Z는 하나의 실시형태에서 $-\text{C}(=\text{O})-$ 이고 Z는 또 다른 실시형태에서 직접 결합이다. R'는 천연적으로 발생하는 아미노산의 측쇄이다. 일부 실시형태에서, R'는 천연적으로 발생하는 아미노산의 측쇄의 하나 또는 두 개의 탄소 동족체이다.
- [0217] m은 1 내지 6의 정수이다. m은 1일 수 있다. m은 2일 수 있다. m은 3일 수 있다. m은 4일 수 있다. m은 5일 수 있다. m은 6일 수 있다.
- [0218] 일부 실시형태에서, R^5 는 각각의 경우에 독립적으로 수소, 메틸 또는 전자쌍이다. 일부 실시형태에서, R^5 는 수소이다. 다른 실시형태에서, R^5 는 메틸이다. 추가로 다른 실시형태에서, R^5 는 전자쌍이다.
- [0219] 일부 실시형태에서, R^6 은 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 메틸이다. 일부 실시형태에서, R^6 은 수소이다. 다른 실시형태에서, R^6 은 메틸이다.
- [0220] 다른 실시형태에서, R^7 은 각각의 경우에 독립적으로 수소 C_1 - C_6 알킬 또는 C_2 - C_6 알콕시알킬이다. 일부 실시형태에서, R^7 은 수소이다. 다른 실시형태에서, R^7 은 C_1 - C_6 알킬이다. 또 다른 실시형태에서, R^7 은 C_2 - C_6 알콕시알킬이다. 일부 실시형태에서, R^7 는 메틸이다. 다른 실시형태에서, R^7 은 에틸이다. 추가로 다른 실시형태에서, R^7 은 n-프로필 또는 이소프로필이다. 일부 다른 실시형태에서, R^7 은 C_4 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^7 은 C_5 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^7 은 C_6 알킬이다. 추가로 다른 실시형태에서, R^7 은 C_2 알콕시알킬이다. 일부 다른 실시형태에서, R^7 은 C_3 알콕시알킬이다. 추가로 다른 실시형태에서, R^7 은 C_4 알콕시알킬이다. 일부 실시형태에서, R^7 은 C_5 알콕시알킬이다. 다른 실시형태에서, R^7 은 C_6 알콕시알킬이다.
- [0221] 상기 지정한 바와 같은 링커 기 L은 알킬 (예, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 알콕시(예, $-\text{C-O-C-}$), 및 알킬아미노(예, $-\text{CH}_2-\text{NH-}$)로부터 선택된 그의 골격에서 결합을 포함하며, 단 L에서 말단 원자 (예를 들면, 카르보닐 또는 질소에 인접한 것들)은 탄소원자이다. 분지 결합 (예, $-\text{CH}_2-\text{CHCH}_3-$)이 가능하더라도, 링커는 일반적으로 분지되지 않는다. 하나의 실시형태에서, 링커는 탄화수소 링커이다. 이러한 링커는 식 $(\text{CH}_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 12, 바람직하게는 2 내지 8, 및 더욱 바람직하게는 2 내지 6이다.
- [0222] 임의의 수의 결합 타입 (A)를 갖는 올리고머가 제공된다. 일부 실시형태에서, 올리고머는 타입 (A)의 결합을 함유하지 않는다. 특정의 실시형태에서, 결합의 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90 퍼센트는 결합 (A)

이다. 선택된 실시형태에서, 결합의 10 내지 80, 20 내지 80, 20 내지 60, 20 내지 50, 20 내지 40, 또는 20 내지 35 퍼센트는 결합 (A)이다. 추가의 다른 실시형태에서, 각각의 결합은 타입(A)이다.

[0223] 2. 결합(B)

[0224] 일부 실시형태에서, 올리고머는 적어도 하나의 타입(A) 결합을 포함한다. 예를 들면, 올리고머는 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 타입(B) 결합을 포함할 수 있다. 타입 (B) 결합은 인접할 수 있거나 또는 올리고머를 통하여 배치될 수 있다. 결합 타입(B)는 하기 화학식(I) 또는 그의 염 또는 이성체를 갖는다:



[0225] (I)

[0226] 상기 식에서,

[0227] W 는 각각의 경우에 독립적으로 S 또는 O이고;

[0228] X는 각각의 경우에 독립적으로 $-NR^8R^9$ 또는 $-OR^3$ 이고; 또한

[0229] Y는 각각의 경우에 독립적으로 O 또는 $-NR^{10}$ 이고,

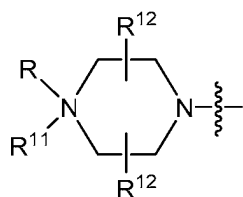
[0230] R^3 는 는 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 C_1-C_6 알킬이고;

[0231] R^8 은 는 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 C_2-C_{12} 알킬이고;

[0232] R^9 는 는 각각의 경우에 독립적으로 수소, C_1-C_{12} 알킬, C_1-C_{12} 아르알킬 또는 아릴이고;

[0233] R^{10} 은 각각의 경우에 독립적으로 수소, C_1-C_{12} 알킬 또는 $-LNR^4R^5R^7$ 이고;

[0234] 여기서 R^8 및 R^9 는 결합하여 5 내지 18원 모노 또는 바이사이클릭 헤테로사이클을 형성할 수 있거나 또는 R^8 , R^9 또는 R^3 는 R^{10} 과 함께 결합하여 5 내지 7 원 헤테로사이클을 형성할 수 있으며, 또한 X은 4-피페라지노이드, X는 하기 화학식 (III)을 가지며:



[0235] (III)

[0236] 상기 식에서,

[0237] R^{11} 은 각각의 경우에 독립적으로 C_2-C_{12} 알킬, C_1-C_{12} 아미노알킬, C_1-C_{12} 알킬카르보닐, 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로사이클릴이고;

[0238] R은 각각의 경우에 독립적으로 전자쌍, 수소 또는 C_1-C_{12} 알킬이고; 또한

[0239] R^{12} 는 각각의 경우에 독립적으로 수소, C_1-C_{12} 알킬, C_1-C_{12} 아미노알킬, $-NH_2$, $-CONH_2$, $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}R^{14}R^{15}$, C_1-C_{12}

알킬카르보닐, 옥소, -CN, 트리플루오로메틸, 아미달, 아미디닐, 아미디닐알킬, 아미디닐알킬카르보닐, 구아니디닐, 구아니디닐알킬, 구아니디닐알킬카르보닐, 콜레이트, 테옥시콜레이트, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클, -SR¹³ 또는 C₁-C₁₂ 알콕시이고, R¹³, R¹⁴ 및 R¹⁵는 각각의 경우에 독립적으로 C₁-C₁₂ 알킬이다.

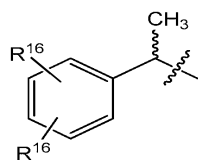
[0240] 일부 예에서, 올리고머는 타입(B)의 한 가지 결합을 포함한다. 일부 다른 실시형태에서, 올리고머는 타입(B)의 두 가지 결합을 포함한다. 일부 다른 실시형태에서, 올리고머는 타입(B)의 세 가지 결합을 포함한다. 일부 다른 실시형태에서, 올리고머는 타입(B)의 결합을 포함한다. 추가의 다른 실시형태에서, 타입(B)의 결합은 연속적이다 (즉, 타입(B)의 결합은 서로 인접한다). 추가의 실시형태에서, 올리고머 내의 결합의 적어도 5%는 타입(B)이다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 결합의 5% 내지 95%, 10% 내지 90%, 10% 내지 50%, 또는 10% 내지 35%는 결합 타입(B)일 수 있다.

[0241] 다른 실시형태에서, R³는 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 C₁-C₆ 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R³는 메틸일 수 있다. 일부 실시형태에서, R³는 에틸일 수 있다. 일부 다른 실시형태에서, R³는 n-프로필 또는 이소프로필일 수 있다. 추가의 다른 실시형태에서, R³는 C₄알킬일 수 있다. 일부 실시형태에서, R³는 C₅ 알킬일 수 있다. 일부 실시형태에서, R³는 C₆알킬일 수 있다.

[0242] 일부 실시형태에서, R⁸은 각각의 경우에 독립적으로 수소 또는 C₂-C₁₂ 알킬이다. 일부 실시형태에서, R⁸은 수소이다. 추가의 다른 실시형태에서, R⁸은 에틸이다. 일부 다른 실시형태에서, R⁸은 n-프로필 또는 이소프로필이다. 일부 실시형태에서, R⁸은 C₄ 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R⁸은 C₅ 알킬이다. 다른 실시형태에서, R⁸은 C₆ 알킬이다. 일부 실시형태에서, R⁸은 C₇ 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R⁸은 C₈ 알킬이다. 다른 실시형태에서, R⁸은 C₉ 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R⁸은 C₁₀알킬이다. 일부 실시형태에서, R⁸은 C₁₁알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R⁸는 C₁₂ 알킬이다. 일부 다른 실시형태에서 R⁸는 C₂-C₁₂ 알킬이고 또한 상기 C₂-C₁₂ 알킬은 하나 이상의 이중 결합 (예, 알켄), 삼중결합 (예, 알킨) 또는 이들 둘 다를 포함한다. 일부 실시형태에서, R⁸은 비치환된 C₂-C₁₂ 알킬이다.

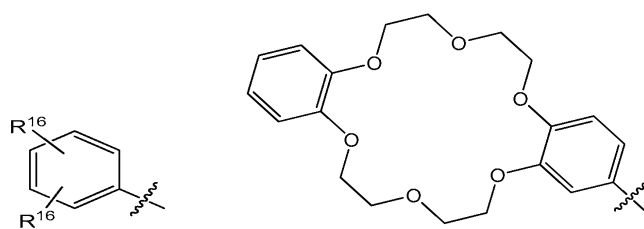
[0243] 일부 실시형태에서, R⁹는 각각의 경우에 독립적으로 수소, C₁-C₁₂ 알킬, C₁-C₁₂ 아르알킬 또는 아릴이다. 일부 실시형태에서, R⁹는 수소이다. 추가의 다른 실시형태에서, R⁹는 C₁-C₁₂ 알킬이다. 다른 실시형태에서, R⁹는 메틸이다. 추가의 다른 실시형태에서, R⁹는 에틸이다. 일부 실시형태에서, R⁹는 n-프로필 또는 이소프로필이다. 일부 실시형태에서, R⁹는 C₄ 알킬이다. 일부 실시형태에서, R⁹는 C₅ 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R⁹는 C₆ 알킬이다. 일부 실시형태에서, R⁹는 C₇ 알킬이다. 일부 실시형태에서, R⁹는 C₈ 알킬이다. 일부 실시형태에서, R⁹는 C₉ 알킬이다. 일부 실시형태에서, R⁹는 C₁₀ 알킬이다. 일부 실시형태에서, R⁹는 C₁₁ 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R⁹는 C₁₂ 알킬이다.

[0244] 일부 다른 실시형태에서, R⁹는 C₁-C₁₂아르알킬이다. 예를 들면, 일부 실시형태에서 R⁹는 벤질이고 상기 벤질은 페닐 고리 또는 벤질 탄소 상에 임의로 치환될 수 있다. 이와 관련하여 치환체는 알킬 및 알콕시기, 예를 들면 메틸 또는 메톡시를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 벤질기는 벤질 탄소에서 메틸로 치환된다. 예를 들면 일부 실시형태에서, R⁹는 다음 화학식 (XIV)을 갖는다:



(XIV)

다른 실시형태에서, R^9 는 아릴이다. 예를 들면, 일부 실시형태에서 R^9 는 페닐이고, 상기 페닐은 임의로 치환될 수 있다. 이와 관련하여 치환체는 알킬 및 알콕시기, 예를 들면 메틸 또는 메톡시를 포함한다. 다른 실시형태에서, R^9 는 페닐이고, 상기 페닐은 크라운 에테르 부분, 예를 들면 12-18원 크라운 에테르를 포함한다. 하나의 실시형태에서 크라운 에테르는 18원이고 또한 추가의 페닐 부분을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면 하나의 실시형태에서 R^9 는 하기 화학식 (XV) 또는 (XVI) 중의 하나를 갖는다:

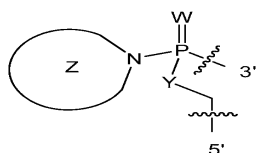


(XV) 또는

(XVI)

일부 실시형태에서, R^{10} 는 각각의 경우에 독립적으로 수소, C_1 - C_{12} 알킬 또는 $-LNR^4R^5R^7$ 이고, 여기서 R^4 , R^5 및 R^7 은 결합(A)에 대하여 상기 정의된 바와 같다. 다른 실시형태에서, R^{10} 는 수소이다. 다른 실시형태에서, R^{10} 는 C_1 - C_{12} 알킬이고, 또한 다른 실시형태에서 R^{10} 는 $-LNR^4R^5R^7$ 이다. 일부 실시형태에서, R^{10} 는 메틸이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{10} 는 에틸이다. 일부 실시형태에서, R^{10} 는 C_3 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{10} 는 C_4 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{10} 는 C_5 알킬이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{10} 는 C_6 알킬이다. 다른 실시형태에서 R^{10} 는 C_7 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{10} 는 C_8 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{10} 는 C_9 알킬이다. 다른 실시형태에서, R^{10} 는 C_{10} 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{10} 는 C_{11} 알킬이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{10} 는 C_{12} 알킬이다.

일부 실시형태에서, R^8 및 R^9 는 결합하여 5-18 원 모노 또는 바이사이클릭 헤테로사이클을 형성한다. 일부 실시형태에서 상기 헤테로사이클은 5 또는 6 원 모노사이클릭 헤테로사이클이다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 결합(B)는 하기 화학식(IV)을 갖는다:

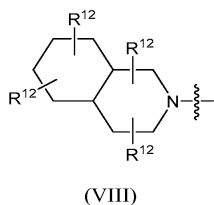
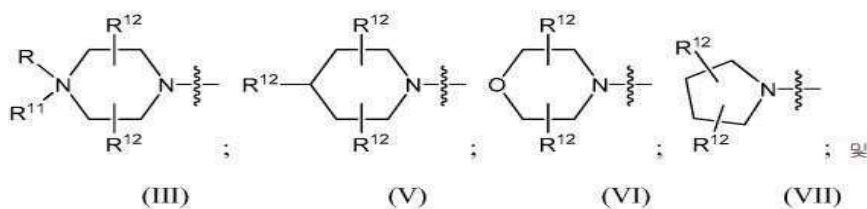


(IV)

상기 식에서,

Z는 5 또는 6원 모노사이클릭 헤테로사이클을 나타낸다.

다른 실시형태에서, 헤테로사이클은 바이사이클릭, 예를 들면 12-원 바이사이클릭 헤테로사이클이다. 상기 헤테로사이클은 피페리딘일 수 있다. 상기 헤테로사이클은 모르폴리노일 수 있다. 상기 헤테로사이클은 피페리딘일 수 있다. 상기 헤테로사이클은 데카하이드로이소퀴놀린일 수 있다. 대표적인 헤테로사이클은 다음 식을 포함한다:



일부 실시형태에서, R^{11} 은 각각의 경우에 독립적으로 C_2 - C_{12} 알킬, C_1 - C_{12} 아미노알킬, 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로사이클릴이다.

일부 실시형태에서, R^{11} 은 C_2 - C_{12} 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{11} 은 에틸이다. 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_3 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{11} 은 이소프로필이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_4 알킬이다. 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_5 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{11} 은 C_6 알킬이다. 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_7 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{11} 은 C_8 알킬이다. 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_9 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_{10} 알킬이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_{11} 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{11} 은 C_{12} 알킬이다.

다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_1 - C_{12} 아미노알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{11} 은 메틸아미노이다. 일부 실시형태에서, R^{11} 은 에틸아미노이다. 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_3 아미노알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_4 아미노알킬이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_5 아미노알킬이다. 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_6 아미노알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_7 아미노알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{11} 은 C_8 아미노알킬이다. 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_9 아미노알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_{10} 아미노알킬이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_{11} 아미노알킬이다. 다른 실시형태에서 R^{11} 은 C_{12} 아미노알킬이다.

다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_1 - C_{12} 알킬카르보닐이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_1 알킬카르보닐이다. 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_2 알킬카르보닐이다. 일부 실시형태에서, R^{11} 은 C_3 알킬카르보닐이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_4 알킬카르보닐이다. 일부 실시형태에서, R^{11} 은 C_5 알킬카르보닐이다. 일부 실시형태에서, R^{11} 은 C_6 알킬카르보닐이다. 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_7 알킬카르보닐이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_8 알킬카르보닐이다. 일부 실시형태에서, R^{11} 은 C_9 알킬카르보닐이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_{10} 알킬카르보닐이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{11} 은 C_{11} 알킬카르보닐이다. 일부 실시형태에서, R^{11} 은 C_{12} 알킬카르보닐이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{11} 은 $-C(=O)(CH_2)_nCO_2H$ 이고, 여기서 n 은 1 내지 6이다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, n 은 1이다. 다른 실시형태에서 n 은 2이다. 추가의 다른 실시형태에서, n 은 3이다. 일부 다른 실시형태에서, n 은 4이다. 추가의 다른 실시형태에서, n 은 5이다. 다른 실시형태에서, n 은 6이다.

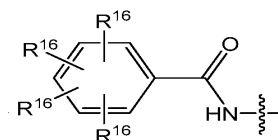
다른 실시형태에서, R^{11} 은 아릴이다. 예를 들면 일부 실시형태에서, R^{11} 은 페닐이다. 일부 실시형태에서, 상기 페닐은 예를 들면 니트로기로 치환된다.

- [0261] 다른 실시형태에서, R^{11} 은 헤테로아릴이다. 예를 들면 일부 실시형태에서, R^{11} 은 피리디닐이다. 다른 실시형태에서, R^{11} 은 피리미디닐이다.
- [0262] 다른 실시형태에서, R^{11} 은 헤테로사이클릴이다. 예를 들면 일부 실시형태에서, R^{11} 은 피페리디닐, 예를 들면 피페리딘-4-일이다.
- [0263] 일부 실시형태에서, R^{11} 은 에틸, 이소프로필, 피페리디닐, 피리미디닐, 콜레이트, 데옥시콜레이트, 또는 $-C(=O)(CH_2)_nCO_2H$ 이며, 여기서 n 은 1 내지 6이다.
- [0264] 일부 실시형태에서, R 은 전자쌍이다. 다른 실시형태에서, R 은 수소이고 또한 실시형태에서 R 은 C_1 - C_{12} 알킬이다. 일부 실시형태에서, R 은 메틸이다. 일부 실시형태에서, R 은 에틸이다. 다른 실시형태에서, R 은 C_3 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R 은 이소프로필이다. 일부 다른 실시형태에서, R 은 C_4 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R 은 C_5 알킬이다. 일부 실시형태에서, R 은 C_6 알킬이다. 다른 실시형태에서, R 은 C_7 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R 은 C_8 알킬이다. 다른 실시형태에서, R 은 C_9 알킬이다. 일부 실시형태에서, R 은 C_{10} 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R 은 C_{11} 알킬이다. 일부 실시형태에서, R 은 C_{12} 알킬이다.
- [0265] 일부 실시형태에서, R^{12} 는 각각의 경우에 독립적으로 수소, C_1 - C_{12} 알킬, C_1 - C_{12} 아미노알킬, $-NH_2$, $-CONH_2$, $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}R^{14}R^{15}$, 옥소, $-CN$, 트리플루오로메틸, 아미달, 아미디닐, 아미디닐알킬, 아미디닐알킬카르보닐, 구아니디닐, 구아니디닐알킬, 구아니디닐알킬카르보닐, 콜레이트, 데옥시콜레이트, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클, $-SR^{13}$ 또는 C_1 - C_{12} 알콕시이고, 여기서 R^{13} , R^{14} 및 R^{15} 는 각각의 경우에 독립적으로 C_1 - C_{12} 알킬을 포함한다.
- [0266] 일부 실시형태에서, R^{12} 는 수소이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_1 - C_{12} 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_1 - C_{12} 아미노알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 $-NH_2$ 이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 $-CONH_2$ 이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 $-NR^{13}R^{14}$ 이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 $-NR^{13}R^{14}R^{15}$ 이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_1 - C_{12} 알킬카르보닐이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 옥소이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 $-CN$ 이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 트리플루오로메틸이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 아미달이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 아미디닐이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 아미디닐알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 아미디닐알킬카르보닐이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 구아니디닐, 예를 들면 모노 메틸구아니디닐 또는 디메틸구아니디닐이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 구아니디닐알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 아미디닐알킬카르보닐이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 콜레이트이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 데옥시콜레이트이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 아릴이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 헤테로아릴이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 헤테로사이클이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 $-SR^{13}$ 이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_1 - C_{12} 알콕시이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 디메틸 아민이다.
- [0267] 다른 실시형태에서, R^{12} 는 메틸이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{12} 는 에틸이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_3 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 이소프로필이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_4 알킬이다. 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_5 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_6 알킬이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_7 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_8 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_9 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_{10} 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_{11} 알킬이다. 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_{12} 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, 상기 알킬 부분은 하나 이상의 산소와 치환되어 에테르 부분, 예를 들면 메톡시메틸 부분을 형성한다.

[0268] 일부 실시형태에서, R^{12} 는 메틸아미노이다. 다른 실시형태에서, R^{12} 는 에틸아미노이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_3 아미노알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_4 아미노알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_5 아미노알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_6 아미노알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_7 아미노알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_8 아미노알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_9 아미노알킬이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_{10} 아미노알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_{11} 아미노알킬이다. 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_{12} 아미노알킬이다. 일부 실시형태에서, 상기 아미노알킬은 디메틸아미노 알킬이다.

[0269] 추가의 다른 실시형태에서, R^{12} 는 아세틸이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_2 알킬카르보닐이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_3 알킬카르보닐이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_4 알킬카르보닐이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_5 알킬카르보닐이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_6 알킬카르보닐이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_7 알킬카르보닐이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_8 알킬카르보닐이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_9 알킬카르보닐이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_{10} 알킬카르보닐이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_{11} 알킬카르보닐이다. 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_{12} 알킬카르보닐이다. 상기 알킬카르보닐은 카르복시 부분으로 치환되며, 예를 들면 상기 알킬카르보닐은 치환되어 숙신산 부분 (즉, 3-카르복시알킬카르보닐)을 형성한다. 다른 실시형태에서, 상기 알킬 카르보닐은 말단 -SH기로 치환된다.

[0270] 일부 실시형태에서, R^{12} 는 아미딜이다. 일부 실시형태에서, 상기 아미딜은 예를 들면 -SH로 더욱 치환된 알킬 부분, 카르바메이트 또는 이의 조합을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 아미딜은 아릴 부분, 예를 들면 페닐로 치환된다. 특정의 실시형태에서, R^{12} 는 다음 화학식(IX)를 가질 수 있다:



(IX)

[0271] 상기 식에서, R^{16} 은 각각의 경우에 독립적으로 수소, C_1 - C_{12} 알킬, C_1 - C_{12} 알콕시, -CN, 아릴 또는 헤테로아릴이다.

[0273] 일부 실시형태에서, R^{12} 는 메톡시이다. 다른 실시형태에서, R^{12} 는 에톡시이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_3 알콕시이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_4 알콕시이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_5 알콕시이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_6 알콕시이다. 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_7 알콕시이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_8 알콕시이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_9 알콕시이다. 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_{10} 알콕시이다. 일부 실시형태에서, R^{12} 는 C_{11} 알콕시이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_{12} 알콕시이다.

[0274] 특정의 실시형태에서, R^{12} 는 피롤리디닐, 예를 들면 피롤리딘-1-일이다. 다른 실시형태에서, R^{12} 는 피페리디닐, 예를 들면 피페리딘-1-일 또는 피페리딘-4-일이다. 다른 실시형태에서, R^{12} 는 모르폴리노, 예를 들면 모르폴린-4-일이다. 다른 실시형태에서, R^{12} 는 페닐이고, 추가의 실시형태에서, 상기 페닐은 예를 들면 니트로기로 치환된다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{12} 는 피리미디닐, 예를 들면 피리미딘-2-일이다.

[0275] 다른 실시형태에서, R^{13} , R^{14} 및 R^{15} 는 각각의 경우에 독립적으로 C_1 - C_{12} 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{13} , R^{14} 또

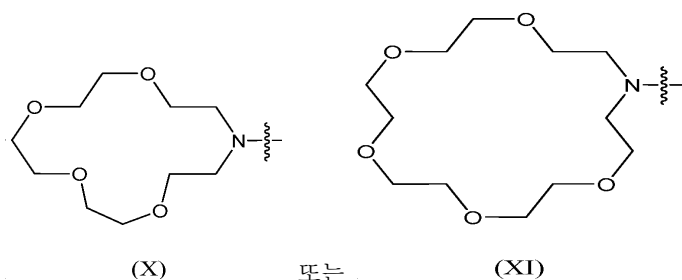
는 R^{15} 는 메틸이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{13} , R^{14} 또는 R^{15} 는 에틸이다. 다른 실시형태에서, R^{13} , R^{14} 또는 R^{15} 는 C_3 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{13} , R^{14} 또는 R^{15} 는 이소프로필이다. 다른 실시형태에서, R^{13} , R^{14} 또는 R^{15} 는 C_4 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{13} , R^{14} 또는 R^{15} 는 C_5 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{13} , R^{14} 또는 R^{15} 는 C_6 알킬이다. 다른 실시형태에서, R^{13} , R^{14} 또는 R^{15} 는 C_7 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{13} , R^{14} 또는 R^{15} 는 C_8 알킬이다. 다른 실시형태에서, R^{13} , R^{14} 또는 R^{15} 는 C_9 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{13} , R^{14} 또는 R^{15} 는 C_{10} 알킬이다. 일부 실시형태에서 R^{13} , R^{14} 또는 R^{15} 는 C_{11} 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{13} , R^{14} 또는 R^{15} 는 C_{12} 알킬이다.

[0276] 상기 지정한 바와 같이, 일부 실시형태에서, R^{12} 는 아릴 부분으로 치환된 아미달이다. 이와 관련하여, R^{16} 의 각 경우는 동일하거나 상이할 수 있다. 이들 실시형태의 특정한 것에서, R^{16} 은 수소이다. 다른 실시형태에서, R^{16} 은 $-CN$ 이다. 다른 실시형태에서, R^{16} 는 헤테로아릴, 예를 들면 트레트라졸릴이다. 특정의 다른 실시형태에서, R^{16} 은 메톡시이다. 다른 실시형태에서, R^{16} 은 아릴이고, 상기 아릴은 임의로 치환된다. 이와 관련하여 선택적 치환은 C_1 - C_{12} 알킬, C_1 - C_{12} 알콕시, 예를 들면 메톡시; 트리플루오로메톡시; 할로, 예를 들면 클로로; 및 트리플루오로 메틸이다.

[0277] 다른 실시형태에서, R^{16} 는 메틸이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{16} 는 에틸이다. 일부 실시형태에서, R^{16} 는 C_3 알킬이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{16} 는 이소프로필이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{16} 는 C_4 알킬이다. 다른 실시형태에서, R^{16} 는 C_5 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{16} 는 C_6 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{16} 는 C_7 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{16} 는 C_8 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{16} 는 C_9 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{16} 는 C_{10} 알킬이다. 다른 실시형태에서, R^{16} 는 C_{11} 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{16} 는 C_{12} 알킬이다.

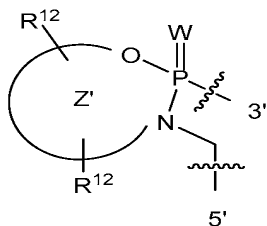
[0278] 일부 실시형태에서, R^{16} 은 메톡시이다. 일부 실시형태에서, R^{16} 은 에톡시이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{16} 은 C_3 알콕시이다. 일부 실시형태에서, R^{16} 은 C_4 알콕시이다. 다른 실시형태에서, R^{16} 은 C_5 알콕시이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{16} 은 C_6 알콕시이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{16} 은 C_7 알콕시이다. 일부 실시형태에서, R^{16} 은 C_8 알콕시이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{16} 은 C_9 알콕시이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{16} 은 C_{10} 알콕시이다. 일부 실시형태에서, R^{16} 은 C_{11} 알콕시이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{16} 은 C_{12} 알콕시이다.

[0279] 일부 다른 실시형태에서, R^8 및 R^9 는 결합하여 12-18 원 크라운 에테르를 형성한다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 상기 크라운 에테르는 18원이며, 다른 실시형태에서 상기 크라운 에테르는 15원이다. 특정의 실시형태에서 R^8 및 R^9 는 결합하여 다음 화학식 (X) 또는 (XI)중의 하나를 갖는 헤테로사이클을 형성한다.



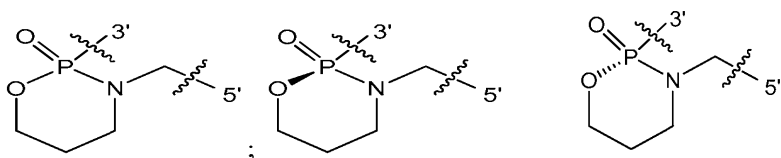
[0281] 일부 실시형태에서, R^8 , R^9 또는 R^3 는 R^{10} 과 함께 결합하여 5-7원 헤테로사이클을 형성한다. 예를 들면, 일부

실시형태에서, R^3 는 R^{10} 과 함께 결합하여 5-7 원 헤테로사이클을 형성한다. 일부 실시형태에서, 상기 헤테로사이클은 5-원이다. 다른 실시형태에서, 상기 헤테로사이클은 7-원이다. 일부 실시형태에서, 상기 헤테로사이클은 다음 화학식 (XII)로 표시된다:



(XII)

상기 식에서, Z' 는 5-7 원 헤테로사이클을 나타낸다. 화학식(XI)의 특정의 실시형태에서, R^{12} 는 각 경우에 수소이다. 예를 들면 결합 (B)는 다음 화학식 (B1), (B2) 또는 (B3)의 하나를 가질 수 있다:



(B1)

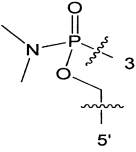
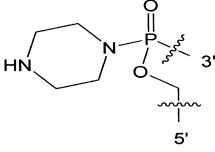
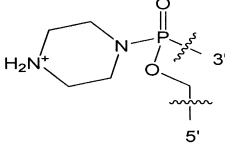
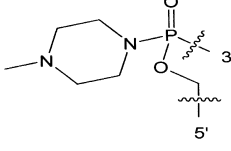
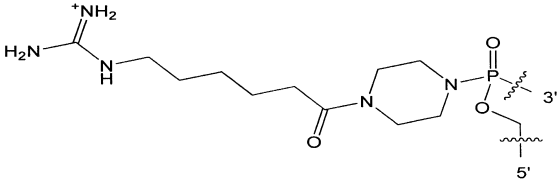
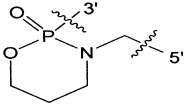
(B2)

(B3)

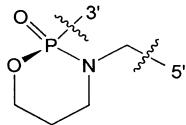
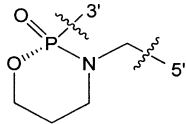
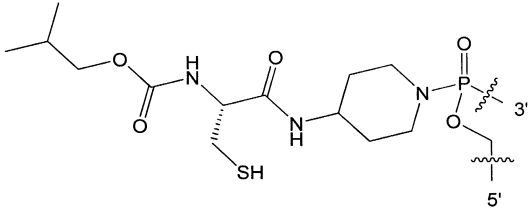
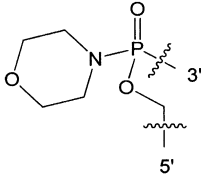
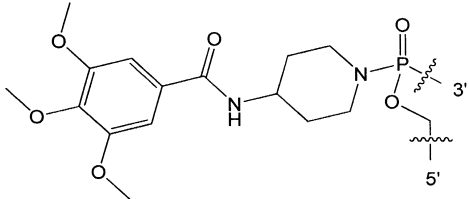
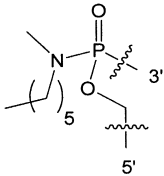
특정의 다른 실시형태에서, R^{12} 는 C_1-C_{12} 알킬카르보닐 또는 아미딜이고, 이는 아릴포스포릴 부분, 예를 들면 트리페닐 포스포릴 부분으로 더욱 치환된다. 이러한 구조를 갖는 결합의 예는 B56 및 B55를 포함한다.

특정의 실시형태에서, 결합 (B)는 구조식 A1-A5중의 어느 하나를 갖지 않는다. 표 2는 타입 (A) 및 (B)의 대표적인 결합을 나타낸다.

[0287] 표 2. 대표적인 소단위간 결합

번호.	명칭	구조식
A1	PMO	
A2	PMO ⁺ (비양자화된 형태 도시)	
A3	PMO ⁺ (+)	
A4	PMO ^{mepip} (m+)	
A5	PMO ^{GUX}	
B1	PMO ^{CP}	

[0288]

번호.	명칭	구조식
B2	PMO ^{cps}	
B3	PMO ^{cpr}	
B4	PMO ^{Shc}	
B5	PMO 모르폴리노 (m)	
B6	PMO ^{tri} (t)	
B7	PMO ^{hex} (h)	

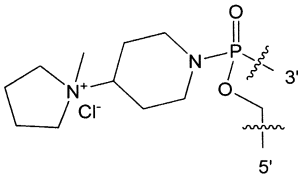
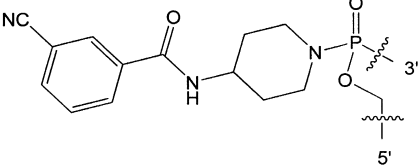
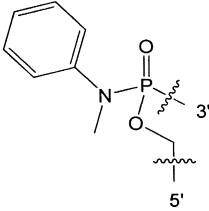
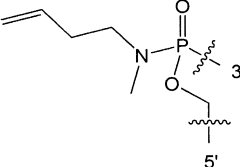
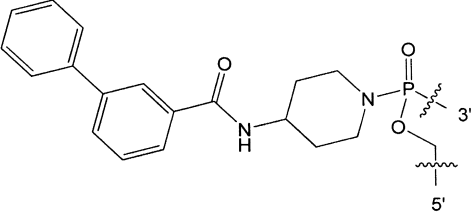
[0289]

번호.	명칭	구조식
B8	PMO ^{dodec}	
B9	PMO ^{dihex}	
B10	PMO ^{apn} (a)	
B11	PMO ^{pyr} (p)	
B12	PMO ^{pyr} (HCl Salt)	

[0290]

번호.	명칭	구조식
B13	PMO ^{rba}	
B14	PMO ^{sba}	
B15	PMO ^{dimethylapn}	
B16	PMO ^{etpip}	
B17	PMO ^{ipppip}	

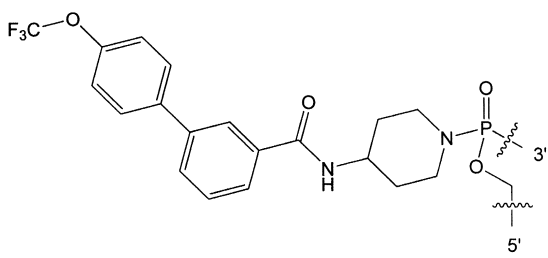
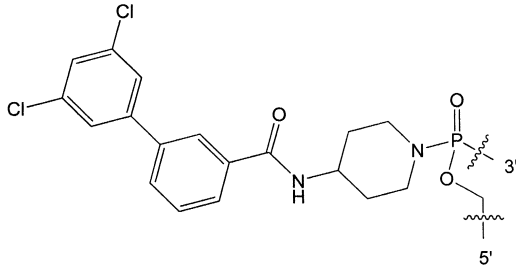
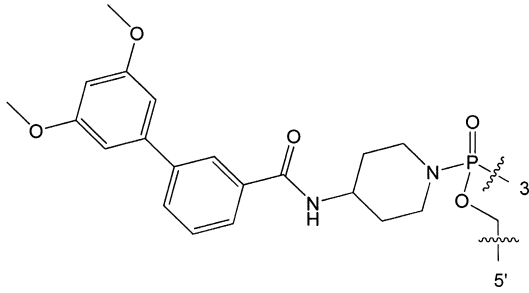
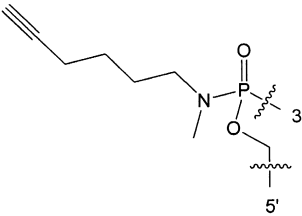
[0291]

번호.	명칭	구조식
B18	PMO ^{pyrQMe}	
B19	PMO ^{cb}	
B20	PMO ^{ma}	
B21	PMO ^{bu}	
B22	PMO ^{bi}	

[0292]

번호.	명칭	구조식
B23	PMO ^{pip}	
B24	PMO ^{odmb}	
B25	PMO ^{tfb}	
B26	PMO ^{ctfb}	

[0293]

번호.	명칭	구조식
B27	PMO ^{ptfb}	
B28	PMO ^{dcb}	
B29	PMO ^{dmb}	
B30	PMO ^{hy}	

[0294]

번호.	명칭	구조식
B31	PMO ^{6ce}	
B32	PMO ^b	
B33	PMO ^a	
B34	PMO ^{npp}	
B35	PMO ^o	

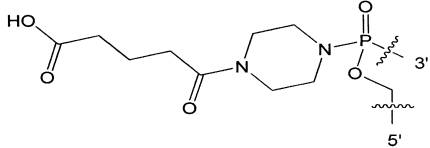
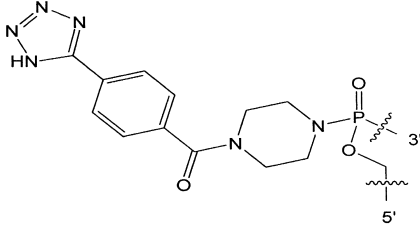
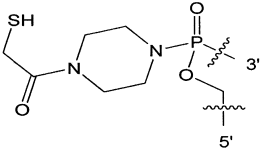
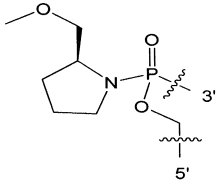
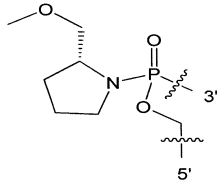
[0295]

번호.	명칭	구조식
B36	PMO ^{4ce}	
B37	PMO ^{5ce}	
B38	PMO ^{3p}	
B39	PMO ^{cyp}	
B40	PMO ^{mop}	

[0296]

번호.	명칭	구조식
B41	PMO ^{PP}	
B42	PMO ^{dmepip}	
B43	PMO ^{NPpip}	
B44	PMO ^{bipip}	
B45	PMO ^{suc}	

[0297]

번호.	명칭	구조식
46	PMO 글루타릭	
B47	PMO ^{tet}	
B48	PMO 티올 (SH)	
B49	PMO ^{pros}	
B50	PMO ^{proR}	

[0298]

번호.	명칭	구조식
B51	PMO ^{tmc}	
B52	PMO ^{ca}	
B53	PMO ^{dca}	
B54	PMO ^{guan} (g)	
B55	PMO ^{+phos}	

번호.	명칭	구조식
B56	PMO ^{apnphos}	

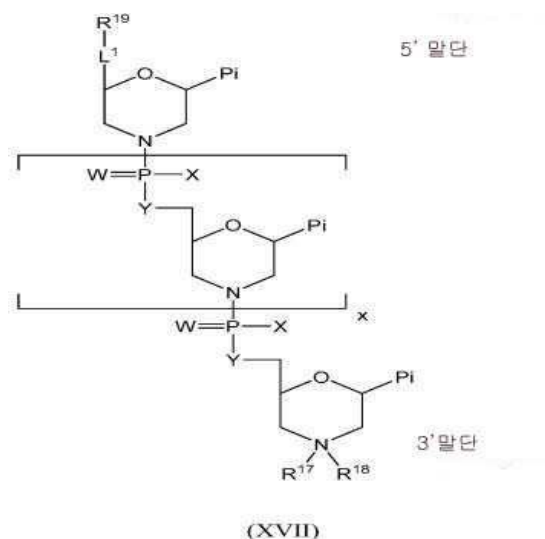
이후의 서열 및 검토에서, 결합에 대한 상기 명칭이 흔히 사용된다. 예를 들면, PMO^{apn} 결합을 포함하는 염기는 ^{apn}B로서 예시되며, 여기서 B는 염기이다. 다른 결합은 유사하게 표시된다. 그 외에, 약자 표시가 사용될 수 있으며, 예를 들면 상기 괄호 안의 약자 표시가 사용될 수 있다 (예를 들면, ^aB는 ^{apn}B를 나타낸다). 다른 용이하게 확인가능한 약자가 또한 사용될 수 있다.

B. 변형 말단기를 갖는 올리고머

캐리어 펩타이드 외에도, 접합체는 또한 변형 말단기를 포함하는 올리고머를 포함할 수 있다. 출원인들은 다양한 화학부문을 갖는 올리고머의 3' 및/또는 5' 말단의 변형이 접합체에 유익한 치료적 특성 (예들 들면, 증가된 세포전달, 효능 및/또는 조직내 분포 등)을 제공한다는 것을 발견하였다. 다양한 실시형태에서, 변형 말단기는 소수성 부분을 포함하는 반면, 다른 실시형태에서 변형 말단기는 친수성을 포함한다. 변형 말단기는 상술한

결합과 함께 또는 결합 없이 존재할 수 있다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 캐리어 펩타이드가 접합되는 올리고머는 하나 이상의 변형 말단기 및 타입(A) 결합, 예를 들면 X가 $-N(CH_3)_2$ 인 결합을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 올리고머는 하나 이상의 변형 말단기 및 타입(B) 결합, 예를 들면 X가 4-아미노피페리딘-1-일(즉, APN)인 결합을 포함한다. 추가의 다른 실시형태에서, 상기 올리고머는 하나 이상의 변형 말단기 및 결합(A)와 (B)의 혼합물을 포함한다. 예를 들면, 상기 올리고머는 하나 이상의 변형 말단기(예를 들면, 트리틸 또는 트리페닐 아세틸) 및 X가 $-N(CH_3)_2$ 인 결합 및 X가 4-아미노피페리딘-1-일인 결합을 포함할 수 있다. 변형 말단기 및 변형 결합의 다른 조합은 또한 올리고머에 유리한 치료적 특성을 제공한다.

[0304] 하나의 실시형태에서, 말단 변형을 포함하는 상기 올리고머는 하기 화학식(XVII) 또는 그의 염 또는 이성체를 갖는다:



[0305]

상기 식에서,

[0306]

X, W 및 Y는 결합 (A) 및 (B)의 어느 것에 대해 상기 정의된 바와 같고;

[0307]

R^{17} 은 각각의 경우에 독립적으로 부재하거나, 수소 또는 C_1-C_6 알킬이고;

[0308]

R^{18} 및 R^{19} 는 각각의 경우에 독립적으로 부재하거나, 수소, 캐리어 펩타이드, 천연 또는 비천연 아미노산, C_2-C_{30} 알킬카르보닐, $-C(=O)OR^{21}$ 또는 R^{20} 이고;

[0309]

R^{20} 은 각각의 경우에 독립적으로 구아니디닐, 헤테로사이클릴, C_1-C_{30} 알킬, C_3-C_8 사이클로알킬; C_6-C_{30} 아릴, C_7-C_{30} 아르알킬, C_3-C_{30} 알킬카르보닐, C_3-C_8 사이클로알킬카르보닐, C_3-C_8 사이클로알킬알킬카르보닐, C_7-C_{30} 아릴카르보닐, C_7-C_{30} 아르알킬카르보닐, C_2-C_{30} 알킬옥시카르보닐, C_3-C_8 사이클로알킬옥시카르보닐, C_7-C_{30} 아릴옥시카르보닐, C_8-C_{30} 아르알킬옥시카르보닐, 또는 $-P(=O)(R^{22})_2$ 이고;

[0310]

Pi는 각각의 경우에 독립적으로 염기쌍 부분이고;

[0311]

L^1 는 알킬, 하이드록실, 알콕시, 알킬아미노, 아미드, 에스테르, 디설파이드, 카르보닐, 카르바메이트, 포스포로디아미테이트, 포스포로아미테이트, 포스포로티오에이트, 피페라진 및 포스포디에스테르로부터 선택된 결합을 포함하는 길이 최대 18개 원자의 선택적 링커이고; 또한

[0312]

x는 0 또는 그 이상의 정수이고; 또한 여기서 R^{18} 또는 R^{19} 의 적어도 하나는 R^{20} 이고; 또한

[0313]

여기서 R^{18} 또는 R^{19} 의 적어도 하나는 R^{20} 이고, 단 R^{17} 과 R^{18} 는 둘 다 존재하지 않는다.

[0314]

변형 말단기를 갖는 올리고머는 임의 갯수의 타입 (A) 및 (B)의 결합을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 올리고머는 단지 결합 타입 (A)를 포함할 수 있다. 예를 들면 각각의 결합에서 X는 $-N(CH_3)_2$ 일 수 있다. 대안적으로,

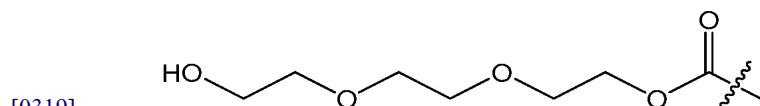
[0315]

상기 올리고머는 결합(B)를 포함할 수 있을 뿐이다. 특정의 실시형태에서, 상기 올리고머는 결합 (A)와 (B)의 혼합물을 포함하며, 예를 들면 1 내지 4 개의 타입(B) 결합 및 나머지 결합은 타입 (A)이다. 이와 관련하여 결합은 X가 타입(B)의 경우 아미노피페리디닐이고 타입(A)의 경우 디메틸아미노인 결합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0316] 일부 실시형태에서, R^{17} 은 부존재한다. 일부 실시형태에서, R^{17} 은 수소이다. 일부 실시형태에서, R^{17} 은 C_1 - C_6 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{17} 은 메틸이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{17} 은 에틸이다. 일부 실시형태에서, R^{17} 은 C_3 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{17} 은 이소프로필이다. 다른 실시형태에서, R^{17} 은 C_4 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{17} 은 C_5 알킬이다. 일부 다른 실시형태에서, R^{17} 은 C_6 알킬이다.

[0317] 다른 실시형태에서, R^{18} 은 부존재한다. 일부 실시형태에서, R^{18} 은 수소이다. 일부 실시형태에서, R^{18} 은 캐리어 펩타이드이다. 일부 실시형태에서, R^{18} 은 천연 또는 비천연 아미노산, 예를 들면 트리메틸글리신이다. 일부 실시형태에서, R^{18} 은 R^{20} 이다.

[0318] 다른 실시형태에서, R^{19} 은 부존재한다. 일부 실시형태에서, R^{19} 은 수소이다. 일부 실시형태에서, R^{19} 은 캐리어 펩타이드이다. 일부 실시형태에서, R^{19} 은 천연 또는 비천연 아미노산, 예를 들면 트리메틸글리신이다. 일부 실시형태에서, R^{19} 은 $-C(=O)OR^{17}$ 이며, 예를 들면 R^{19} 는 다음 식을 가질 수 있다:



[0320] 다른 실시형태에서, R^{18} 또는 R^{19} 은 C_2 - C_{30} 알킬카르보닐, 예를 들면 $-C(=O)(CH_2)_nCO_2H$ 이며, 여기서 n 은 1 내지 6, 예를 들면 2이다. 다른 예에서, R^{18} 또는 R^{19} 은 아세틸이다.

[0321] 일부 실시형태에서, R^{20} 은 각각의 경우에 독립적으로 구아니디닐, 헤테로사이클릴, C_1 - C_{30} 알킬, C_3 - C_8 사이클로알킬; C_6 - C_{30} 아릴, C_7 - C_{30} 아르알킬, C_3 - C_{30} 알킬카르보닐, C_3 - C_8 사이클로알킬카르보닐, C_3 - C_8 사이클로알킬알킬카르보닐, C_6 - C_{30} 아릴카르보닐, C_7 - C_{30} 아르알킬카르보닐, C_2 - C_{30} 알킬옥시카르보닐, C_3 - C_8 사이클로알킬옥시카르보닐, C_7 - C_{30} 아릴옥시카르보닐, C_8 - C_{30} 아르알킬옥시카르보닐, $-C(=O)OR^{21}$, 또는 $-P(=O)(R^{22})_2$ 이며, 여기서 R^{21} 는 하나 이상의 산소 또는 하이드록실 부분 또는 이의 조합을 포함하는 C_1 - C_{30} 알킬이며, 각각의 R^{22} 는 C^6 - C^{12} 아릴옥시이다.

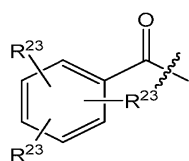
[0322] 특정의 다른 실시형태에서, R^{19} 은 $-C(=O)OR^{21}$ 이고 R^{18} 은 수소, 구아니디닐, 헤테로사이클릴, C_1 - C_{30} 알킬, C_3 - C_8 사이클로알킬; C_6 - C_{30} 아릴, C_3 - C_{30} 알킬카르보닐, C_3 - C_8 사이클로알킬카르보닐, C_3 - C_8 사이클로알킬알킬카르보닐, C_7 - C_{30} 아릴카르보닐, C_7 - C_{30} 아르알킬카르보닐, C_2 - C_{30} 알킬옥시카르보닐, C_3 - C_8 사이클로알킬옥시카르보닐, C_7 - C_{30} 아릴옥시카르보닐, C_8 - C_{30} 아르알킬옥시카르보닐, 또는 $-P(=O)(R^{22})_2$ 이며, 여기서 각각의 R^{22} 는 C^6 - C^{12} 아릴옥시이다.

[0323] 다른 실시형태에서, R^{20} 은 각각의 경우에 독립적으로 구아니디닐, 헤테로사이클릴, C_1 - C_{30} 알킬, C_3 - C_8 사이클로알킬; C_6 - C_{30} 아릴, C_3 - C_{30} 알킬카르보닐, C_3 - C_8 사이클로알킬카르보닐, C_3 - C_8 사이클로알킬알킬카르보닐, C_7 - C_{30} 아릴카르보닐, C_7 - C_{30} 아르알킬카르보닐, C_2 - C_{30} 알킬옥시카르보닐, C_3 - C_8 사이클로알킬옥시카르보닐, C_7 - C_{30} 아릴옥시카르보닐, C_8 - C_{30} 아르알킬옥시카르보닐, 또는 $-P(=O)(R^{22})_2$ 이다. 다른 예에서 R^{20} 은 각각의 경우에 독립적으로 구아니디닐, 헤테로사이클릴, C_1 - C_{30} 알킬, C_3 - C_8 사이클로알킬; C_6 - C_{30} 아릴, C_7 - C_{30} 아르알킬, C_3 - C_8 사이클로알킬카르

보닐, C₃-C₈ 사이클로알킬알킬카르보닐, C₇-C₃₀ 아릴카르보닐, C₇-C₃₀ 아르알킬카르보닐, C₂-C₃₀ 알킬옥시카르보닐, C₃-C₈사이클로알킬옥시카르보닐, C₇-C₃₀ 아릴옥시카르보닐, C₈-C₃₀ 아르알킬옥시카르보닐, 또는 -P(=O)(R²²)₂이다.

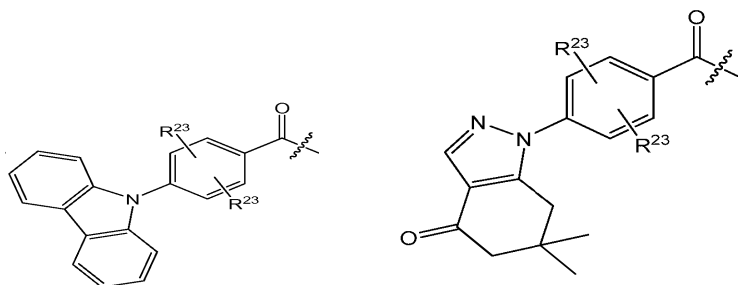
[0324] 일부 실시형태에서, R²⁰은 구아니디닐, 예를 들면 모노 메틸구아니디닐 또는 디메틸구아니디닐이다. 다른 실시형태에서, R²⁰은 헤테로사이클릴이다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, R²⁰은 피페리딘-4-일이다. 일부 실시형태에서, 피페리딘-4-일은 트리틸 또는 Boc기로 치환된다. 다른 실시형태에서, R²⁰은 C₃-C₈ 사이클로알킬이다. 다른 실시형태에서, R²⁰은 C₆-C₃₀ 아릴이다.

[0325] 일부 실시형태에서, R²⁰은 C₇-C₃₀ 아릴카르보닐이다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, R²⁰은 다음 식(XVIII)을 갖는다:



[0326] (XVIII)

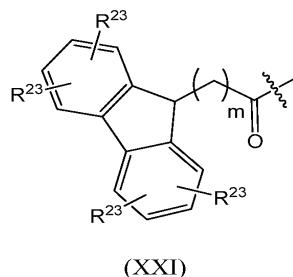
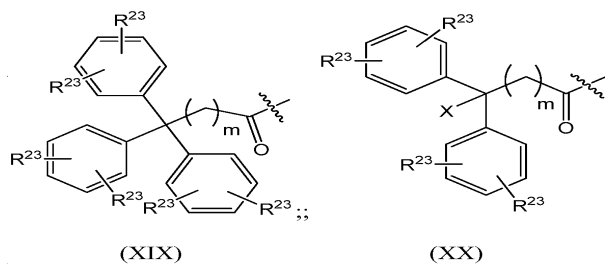
[0327] 상기식에서, R²³는 각각의 경우에 독립적으로 수소, 할로, C₁-C₃₀ 알킬, C₁-C₃₀ 알콕시, C₁-C₃₀ 알킬옥시카르보닐, C₇-C₃₀ 아르알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로사이클알킬이고, 여기서 하나의 R²³는 다른 R²³와 결합하여 헤테로사이클릴 고리를 형성한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 R²³는 수소이고, 예를 들면 일부 실시형태에서 각각의 R²³는 수소이다. 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 R²³은 C₁-C₃₀ 알콕시이고, 예를 들면 일부 실시형태에서, 각각의 R²³은 메톡시이다. 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 R²³는 헤테로아릴이고, 예를 들면 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 R²³는 다음 식 (XVIIIa) 또는 (XVIIIb)의 하나를 가진다:



[0328] (XVIIIa) 또는 (XVIIIb)

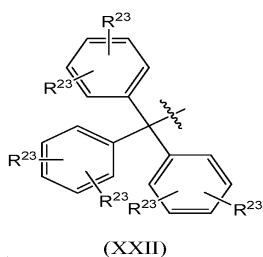
[0329] 추가의 다른 실시형태에서, 하나의 R²³은 다른 R²³과 결합하여 헤테로사이클릴 고리를 형성한다. 예를 들면 하나의 실시형태에서, R²⁰은 5-카르복시플루오레스세인이다.

[0330] 다른 실시형태에서, R²⁰은 C₇-C₃₀ 아르알킬카르보닐이다. 예를 들면, 다양한 실시형태에서, R²⁰은 다음 식(XIX), (XX) 또는 (XXI) 중의 하나를 가진다:



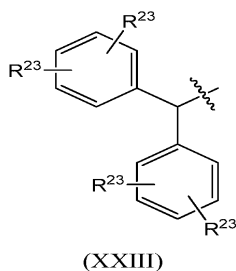
상기 식에서, R^{23} 은 각각의 경우에 독립적으로 수소, 할로, C_1-C_{30} 알킬, C_1-C_{30} 알콕시, C_1-C_{30} 알킬옥시카르보닐, C_7-C_{30} 아르알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로사이클알킬이고, 여기서 R^{23} 은 다른 R^{23} 과 결합하여 헤테로사이클릴 고리를 형성하며, X는 -OH 또는 할로이고 또한 m은 0 내지 6의 정수이다. 일부 구체적 실시형태에서, m은 0이다. 다른 실시형태에서, m은 1인 반면, 다른 실시형태에서 m은 2이다. 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 R^{23} 은 수소이고, 예를 들면 일부 실시형태에서 각각의 R^{23} 은 수소이다. 일부 실시형태에서, X는 수소이다. 다른 실시형태에서, X는 -OH이다. 다른 실시형태에서 X는 Cl이다. 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 R^{23} 은 C_1-C_{30} 알콕시, 예를 들면 메톡시이다.

추가적 다른 실시형태에서, R^{20} 은 C_7-C_{30} 아르알킬, 예를 들면 트리틸이다. 다른 실시형태에서 R^{20} 은 메톡시 트리틸이다. 일부 실시형태에서, R^{20} 은 다음 식(XXII)을 갖는다:



상기 식에서, R^{23} 은 각각의 경우에 독립적으로 수소, 할로, C_1-C_{30} 알킬, C_1-C_{30} 알콕시, C_1-C_{30} 알킬옥시카르보닐, C_7-C_{30} 아르알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로사이클알킬이고, 하나의 R^{23} 은 다른 R^{23} 과 결합하여 헤테로사이클릴 고리를 형성한다. 예를 들면, 일부 실시형태에서 각각의 R^{23} 은 수소이다. 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 R^{23} 은 C_1-C_{30} 알콕시, 예를 들면 메톡시이다.

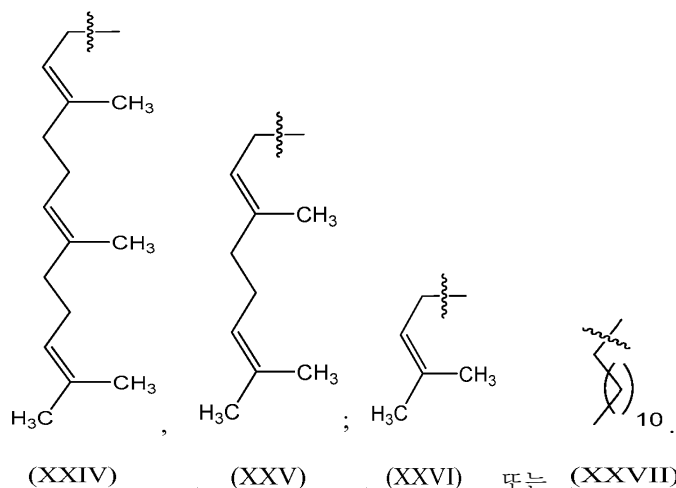
[0337] 또 다른 실시형태에서, R^{20} 은 C_7-C_{30} 아르알킬이고 R^{20} 은 다음 식(XXIII)을 갖는다:



[0338]

[0339] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 R^{23} 은 할로, 예를 들면 클로로이다. 일부 다른 실시형태에서, 하나의 R^{23} 은 파라 위치에 클로로이다.

[0340] 다른 실시형태에서, R^{20} 은 C_1-C_{30} 알킬이다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, R^{20} 은 C_4-C_{20} 알킬이고 선택적으로 하나 이상의 이중 결합을 포함한다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, R^{20} 은 삼중 결합 예를 들면, 말단 삼중 결합을 포함하는 C_4-10 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{20} 은 헥신-6-일이다. 일부 실시형태에서, R^{20} 은 다음 식(XXIV), (XXV), (XXVI) 또는 (XXVII) 중 하나를 갖는다:



[0341]

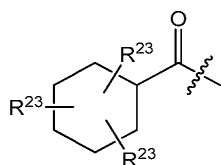
[0342] 추가의 다른 실시형태에서, R^{20} 은 C_3-C_{30} 알킬카르보닐, 예를 들면 C_3-C_{10} 알킬 카르보닐이다. 일부 실시형태에서, R^{20} 은 $-C(=O)(CH_2)_pSH$ 또는 $-C(=O)(CH_2)_pSSHet$ 이고, 여기서 p 는 1 내지 6의 정수이고 Het는 헤테로아릴이다. 예를 들면 p 는 1일 수 있거나 또는 p 는 2일 수 있다. 다른 예에서 Het는 피리디닐, 예를 들면 피리딘-2-일이다. 다른 실시형태에서, 상기 C_3-C_{30} 알킬카르보닐은 추가의 올리고머로 치환되며, 예를 들면 일부 실시형태에서 상기 올리고머는 다른 올리고머의 3' 위치에서 C_3-C_{30} 알킬 카르보닐을 포함한다. 이러한 말단 변형은 본 발명의 범위내에 포함된다.

[0343]

다른 실시형태에서 R^{20} 은 아릴포스포릴 부분, 예를 들면 트리페닐 포스포릴로 더욱 치환된 C_3-C_{30} 알킬 카르보닐이다. 이러한 R^{20} 기의 예는 표 3에서 구조식 33을 포함한다.

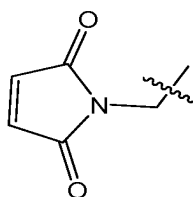
[0344]

다른 예에서, R^{20} 은 C_3-C_8 사이클로알킬카르보닐, 예를 들면 C_5-C_7 알킬카르보닐이다. 이들 실시형태에서, R^{20} 은 다음 식 (XXVIII)을 갖는다:

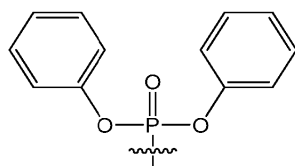


(XXVIII)

상기 식에서, R^{23} 은 각각의 경우에 독립적으로 수소, 할로, C_1-C_{30} 알킬, C_1-C_{30} 알콕시, C_1-C_{30} 알킬옥시카르보닐, C_7-C_{30} 아르알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로사이클알킬이고, 하나의 R^{23} 은 다른 R^{23} 와 결합하여 헤테로사이클 고리를 형성한다. 일부 실시형태에서, R^{23} 은 헤테로사이클알킬이고, 예를 들면 일부 실시형태에서 R^{23} 은 다음 식을 갖는다:



일부 다른 실시형태에서, R^{20} 은 C_3-C_8 사이클로알킬알킬카르보닐이다. 다른 실시형태에서, R^{20} 은 C_2-C_{30} 알킬옥시카르보닐이다. 다른 실시형태에서, R^{20} 은 C_3-C_8 사이클로알킬옥시카르보닐이다. 다른 실시형태에서, R^{20} 은 C_7-C_{30} 아릴옥시카르보닐이다. 다른 실시형태에서, R^{20} 은 C_8-C_{30} 아르알킬옥시카르보닐이다. 다른 실시형태에서, R^{20} 은 $-P(=O)(R^{22})_2$ 이고, 각각의 R^{22} 는 C^6-C^{12} 아릴옥시이고, 예를 들면 일부 실시형태에서, R^{20} 은 다음 식 (C24)을 갖는다:



(C24)

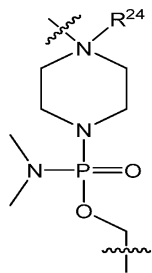
다른 실시형태에서, R^{20} 은 하나 이상의 할로 원자를 포함한다. 예를 들면 일부 실시형태에서 R^{20} 은 상기 R^{20} 부분의 어느 하나의 퍼플루오로 유사체를 포함한다. 다른 실시형태에서, R^{20} 은 p-트리플루오로메틸페닐, 트리플루오로메틸트리틸, 퍼플루오로펜틸, 또는 펜타플루오로페닐이다.

일부 실시형태에서, 상기 3' 말단은 변형을 포함하며, 다른 실시형태에서 5' 말단은 변형을 포함한다. 다른 실시형태에서, 3'와 5' 말단은 둘 다 변형을 포함한다. 따라서 일부 실시형태에서 R^{18} 는 부존재하고 R^{19} 는 R^{20} 이다. 다른 실시형태에서 R^{19} 는 부존재하고, R^{18} 은 R^{20} 이다. 추가의 다른 실시형태에서 R^{18} 및 R^{19} 는 각각의 R^{20} 이다.

일부 실시형태에서, 상기 올리고머는 3' 또는 5' 변형 외에도 세포 침투성 펩타이드를 포함한다. 따라서 일부 실시형태에서 R^{19} 는 세포 침투성 펩타이드이며 R^{18} 는 R^{20} 이다. 다른 실시형태에서, R^{18} 는 세포 침투성 펩타이드이고 R^{19} 는 R^{20} 이다. 전술한 것의 추가 실시형태에서, 세포 침투성 펩타이드는 아르기닌 풍부 펩타이드이다.

일부 실시형태에서, 올리고머에 5' 말단기 (즉 R^{19})를 결합시키는 링커 L^1 은 존재하거나 또는 부존재할 수 있다. 링커는 임의의 수의 작용기 및 길이를 포함하며, 단 상기 링커는 올리고머에 5' 말단기를 결합시키는 능력을 보유하며 또한 상기 링커는 서열 특이적 방식으로 표적 서열에 결합하는 올리고머의 능력을 방해하지 않는다. 하나의 실시형태에서, L 은 포스포로디아미데이트 및 피페라진 결합을 포함한다. 예를 들면 일부 실시형

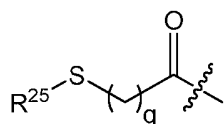
태에서, L은 다음 식(XXIX)을 갖는다:



(XXIX)

상기 식에서, R^{24} 는 부존재하거나, 수소 또는 C_1-C_6 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{24} 는 부존재한다. 일부 실시형태에서, R^{24} 는 수소이다. 일부 실시형태에서, R^{24} 는 C_1-C_6 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{24} 는 메틸이다. 일부 실시형태에서, R^{24} 는 에틸이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{24} 는 C_3 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{24} 는 이소프로필이다. 추가의 일부 실시형태에서, R^{24} 는 C_4 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^{24} 는 C_5 알킬이다. 추가의 다른 실시형태에서, R^{24} 는 C_6 알킬이다.

추가의 다른 실시형태에서, R^{20} 는 C_3-C_{30} 알킬카르보닐이고 R^{20} 은 다음 식(XXX)을 갖는다:



(XXX)

상기식에서, R^{25} 은 수소 또는 $-SR^{26}$ 이고, 여기서 R^{26} 은 수소, C_1-C_{30} 알킬, 헤테로사이클릴, 아릴 또는 헤테로아릴이고 q는 0 내지 6의 정수이다.

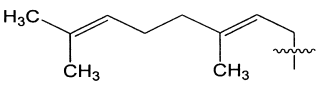
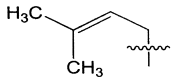
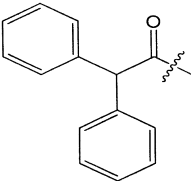
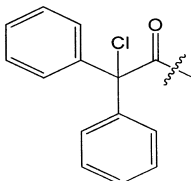
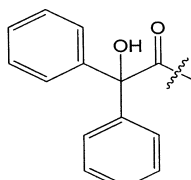
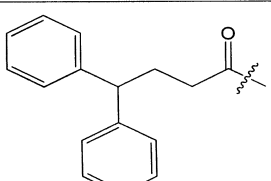
상기중 어느 하나의 추가 실시형태에서, R^{23} 은 각각의 경우에 독립적으로 수소, 할로, C_1-C_{30} 알킬, C_1-C_{30} 알콕시, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로사이클알킬이다.

일부 다른 실시형태에서, 올리고머의 3' 말단만이 상기 지시된 기중의 어느 하나에 접합된다. 일부 다른 실시형태에서, 올리고머의 단지 5' 말단만이 상기 지시된 기중의 어느 하나에 접합된다. 다른 실시형태에서, 3' 및 5' 말단은 둘 다 상기 지시된 기중의 하나를 포함한다. 말단기는 상기 지시된 기중의 어느 하나 또는 표 3에 예시된 구체적 기중의 어느 하나로부터 선택될 수 있다.

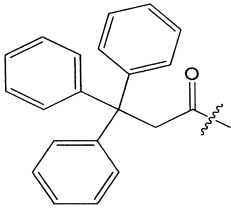
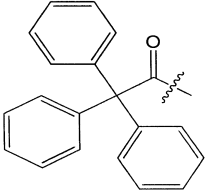
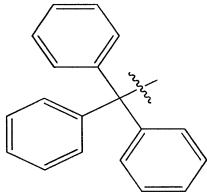
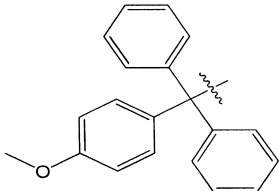
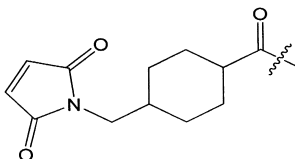
[0361] 표 3. 대표적인 말단기

번호	명칭	구조식
C1	트리메톡시벤조일	
C2	9-플루오렌-카르복실	
C3	4-카르바졸릴벤조일	
C4	4-인다졸릴론벤조일	
C5	파르네실	

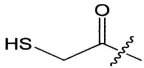
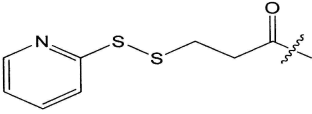
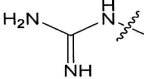
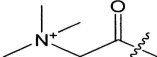
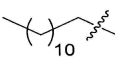
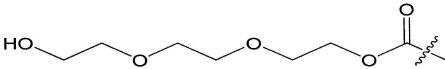
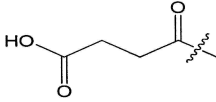
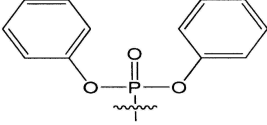
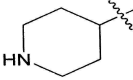
[0362]

번호	명칭	구조식
C6	게라닐	
C7	프레닐	
C8	디페닐아세틸	
C9	클로로디페닐아세틸	
C10	하이드록시디페닐아세틸	
C11	트리페닐프로피오닐	

[0363]

번호	명칭	구조식
C12	프리페닐프로필	
C13	트리페닐아세틸	
C14	트리틸 (Tr)	
C15	메톡시트리틸 (MeOTr)	
C16	메틸숙신이미달- 사이클로헥소일	

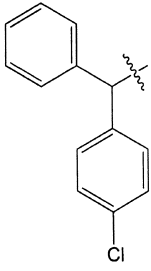
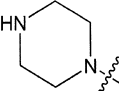
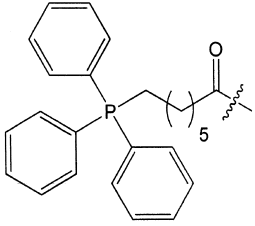
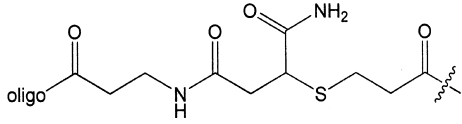
[0364]

번호	명칭	구조식
C17	티오아세틸	
C18	COCH ₂ CH ₂ SSPy	
C19	구아니디닐	
C20	트리메틸글리신	
C21	라우로일	
C22	트리에틸렌글리콜로일 (EG3)	
C23	숙시 닉아세틸	
C24	디페닐포스포릴	
C25	피페리딘-4-일	

[0365]

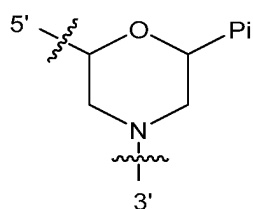
번호	명칭	구조식
C26	트리틸피페리딘-4-일	
C27	Boc- 피페리딘-4-일	
C28	헥신-6-일	
C29	5-카르복시플루오레세인	
C30	벤즈히드릴	

[0366]

번호	명칭	구조식
C31	p-클로로벤즈히드릴	
C32	피페라지닐 (pip)	
C33	트리페닐포스	
C34	이량체화	 Oligo = 추가의 올리고머

C. 접합체의 성질

상기에서 지정한 바와 같이, 본 발명은 캐리어 펩타이드 및 올리고뉴클레오타이드 유사체 (즉, 올리고머)의 접합체에 관한 것이다. 올리고머는 올리고머에 다양한 특성 (예를 들면, 증가된 안티센스 활성)을 부여하는 다양한 변형을 포함할 수 있다. 특정의 실시형태에서, 상기 올리고머는 소단위간 결합에 의해 연결된 모르폴리노 고리 구조의 서열을 포함하는 골격을 포함하며, 상기 소단위간 결합은 인접한 모르폴리노 고리 구조의 5'-말단에 하나의 모르폴리노 고리구조의 3' 말단을 연결하며, 여기서 각각의 모르폴리노 고리 구조는 염기쌍 부분에 결합되며, 따라서 상기 올리고머는 표적 핵산에 서열 특이적 방식으로 결합할 수 있다. 모르폴리노 고리 구조는 다음 식(i)을 가질 수 있다:



(i)

상기 식에서, Pi는 각각의 경우에 독립적으로 염기쌍 부분이다.

각각의 모르폴리노 고리구조는 염기쌍 부분을 형성하기 위하여 염기쌍 부분 (Pi)을 지지하며, 이것은 전형적으로 세포에서 또는 치료되는 피검체에서 선택된 안티센스 표적에 하이브리드 형성하도록 설계된다. 염기쌍 부분은 천연 DNA 또는 RNA (A, G, C, T, 또는 U) 또는 유사체, 예를 들어 하이포잔틴 (뉴클레오사이드 인도신의 염기 화합물) 또는 5-메틸 시토신일 수 있다. 올리고머에 개량된 결합 친화성을 부여하는 유사체 염기가 또한 사용될 수 있다. 이와 관련하여 예시적인 유사체는 C5-프로피닐-변형 피리미딘, 9-(아미노에톡시)페녹사진(G-클램프) 등을 포함한다.

- [0373] 상기에서 지정한 바와 같이, 상기 올리고머는 본 발명의 한 양상에 따라 변형되어 하나 이상의 (B)결합, 예를 들면 2 내지 5개 비전하된 결합마다 최대 약 1개, 전형적으로 10개의 비전하된 결합마다 3 내지 5개의 비전하된 결합을 포함할 수 있다. 특정의 실시형태는 또한 하나 이상의 타입(B) 결합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 안티센스 활성의 최적 개선은 골격 결합의 최대 약 절반이 타입(B)인 경우에 나타난다. 최대 개선은 아니지만 일부는 전형적으로 작은 수, 예를 들면 10-20%의 (B)결합으로 나타난다.
- [0374] 하나의 실시형태에서, 상기 결합 타입(A) 및 (B)는 골격을 따라 산재된다. 일부 실시형태에서, 상기 올리고머는 그의 전체 길이를 따라 (A) 및 (B)의 엄격한 교대 형태를 갖지 않는다. 캐리어 펩타이드에 추가하여, 상기 올리고머는 상술한 바와 같은 5' 및/또는 3' 변형을 임의로 포함할 수 있다.
- [0375] (A) 결합의 블록 및 (B) 결합의 블록을 갖는 올리고머가 또한 고려되며, 예를 들면 (A)결합의 중앙 블록은 결합 (B)의 블록에 의해 플랭킹 될 수 있거나 또는 그 반대일 수 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 올리고머는 대략 동일한 길이 5', 3을 가지며; 또한 중앙 영역에서 (B) 또는 (A)의 퍼센트는 약 50% 이상, 약 70% 이상이다. 안티센스 적용을 위해 사용되는 올리고머는 일반적으로 길이 약 10 내지 약 40개의 소단위, 더욱 바람직하게는 약 15 내지 25개의 소단위 범위이다. 예를 들면, 안티센스 올리고머에 유용한 길이인 19 내지 20개의 소단위를 갖는 본 발명의 올리고머는 이상적으로 2 내지 7개, 예를 들면 4 내지 6개, 또는 3 내지 5개의 (B) 결합 및 나머지 (A) 결합을 가질 수 있다. 14 내지 15개 소단위를 갖는 올리고머는 이상적으로 2 내지 5개, 예를 들면 3 또는 4개의 (B) 결합 및 나머지 (A) 결합을 가질 수 있다.
- [0376] 모르폴리노 소단위는 또한 하기에 더욱 설명되는 바와 같이 비-인-기본 소단위간 결합에 의해 연결될 수 있다.
- [0377] 그들의 비변형 상태에서 비전하되지만 가지달린 아민 치환체를 가질 수 있는 다른 올리고뉴클레오타이드 유사체 결합이 또한 사용될 수 있다. 예를 들면, 모르폴리노 고리상에 5' 질소원자는 설파미드 결합 (또는 인이 탄소 또는 황으로 각각 대체되는 경우 우레아 결합)에서 사용될 수 있다.
- [0378] 일부 실시형태에서, 안티센스 적용의 경우, 상기 올리고머는 핵산 표적 서열에 100% 상보적일 수 있거나, 또는 올리고머와 핵산 표적 서열이 시험관내에서 일어날 수 있는 다른 유형의 분해 및 세포 셀룰라제의 작용을 유지 시키는데 충분히 안정하는 한 예를 들면 변이체를 수용하기 위해 미스매치(mismatch)를 포함할 수 있다. 미스매치는, 존재한다면, 중앙에서보다 하이브리드 듀플렉스의 말단 영역을 향하여 더 불안정하다. 허용되는 미스매치의 수는 듀플렉스 안정성의 잘 이해되는 원칙에 따라 클랙큐올리고머의 길이, 듀플렉스에서 G:C 염기쌍의 백분율, 및 듀플렉스에서 미스매치(들)의 위치에 따라 달라질 것이다. 이러한 안티센스 올리고머가 핵산 표적서열에 필수적으로 100% 상보적이지 않을지라도, 핵산표적의 생물학적 활성, 예를 들면 부호화 단백질(들)의 발현이 조절되도록 표적서열에 안정적으로 및 특이적으로 결합하는데 효과적이다.
- [0379] 올리고머와 표적 서열 사이에 형성된 듀플렉스의 안정성은 결합 T_m 의 관수 및 세포 효소 절단에 대한 듀플렉스의 민감성이다. 상보적 서열 RNA에 대하여 안티센스 화합물의 T_m 은 통상적인 방법, 예를 들면 Hames *et al.*, Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, 1985, pp.107-108에 기술된 바와 같은 방법 또는 Miyada C.G. 및 Wallace R.B., 1987, Oligonucleotide hybridization techniques, *Methods Enzymol.* Vol. 154 pp. 94-107에 기술된 방법에 의해 측정할 수 있다.
- [0380] 일부 실시형태에서, 각각의 안티센스 올리고머는 체온보다 높은 상보적 서열 RNA에 대하여 또는 50°C 이상의 다른 실시형태에서 결합 T_m 을 갖는다. 다른 실시형태에서, T_m 은 60-80°C 또는 그 이상의 범위이다. 잘 알려진 원칙에 따르면, 상보적 기본 RNA 하이브리드에 대하여 올리고머의 T_m 은 듀플렉스에서 C:G 쌍 염기의 비를 증가시키므로써 및/또는 헤테로듀플렉스의 (염기쌍에서) 길이를 증가시키므로써 증가될 수 있다. 동시에, 세포 업테이크를 최적화할 목적으로, 올리고머의 크기를 제한하는 것이 유리할 수 있다. 이 때문에, 20개 염기 또는 그 미만의 길이에서 높은 T_m (50°C 또는 그 이상)을 나타내는 화합물은 일반적으로 높은 T_m 값의 20개 이상의 염기를 요구하는 것들보다 바람직하다. 일부 적용을 위하여, 더 긴 올리고머, 예를 들면 20개 이상의 긴 염기가 특정의 이점들을 가질 수 있다. 예를 들면, 특정의 실시형태에서 더 긴 올리고머는 엑손 스킵 또는 스플라이드 조절에서 사용하는데있어서 특수한 유용성을 발견할 수 있다.
- [0381] 표적 서열 염기는 정상 DNA 염기 또는 그의 유사체, 예를 들면 표적-서열 RNA 염기에 와트슨-크릭 염기쌍이 가능한 우라실 및 이노신일 수 있다.
- [0382] 올리고머는 또한 표적 뉴클레오타이드가 우라실 잔기인 경우 아데닌 대신에 구아닌 염기를 혼입할 수 있다. 이것은 표적 서열이 상이한 바이러스 종에 걸쳐 변화하는 경우에 유용하며 또한 임의의 소정의 뉴클레오타이드 잔

기에서 변화는 시토신 또는 우라실이다. 변동성(variability)의 지점에서 표적화 올리고머 중에 구아닐을 이용함으로써, 우라실과의 염기쌍에 대한 구아닌 (C/U:G 염기 쌍으로 명명됨)의 잘 알려진 능력이 이용될 수 있다. 이들 위치에 구아닌을 혼입함으로써, 단일 올리고머는 광범위한 RNA 표적 변동성을 효과적으로 표적화할 수 있다.

[0383] 상기 화합물 (예를 들면, 올리고머, 소단위간 결합, 말단기)는 상이한 이성체 형태, 예를 들면 구조적 이성체 (예를 들면, 토토머)로 존재할 수 있다. 입체 이성체에 대해서는, 상기 화합물은 키랄중심을 가질 수 있으며 또한 라세미체, 거울상이성체 풍부 혼합물, 개개 거울상 이성체, 혼합물 또는 부분 입체이성체 또는 개개 부분입체 이성체로서 발생할 수 있다. 모든 이러한 이성체 형태는 그의 혼합물을 포함하여 본 발명의 범위에 포함된다. 상기 화합물은 또한 아트로프 이성체를 생기게 할 수 있는 축 키랄성(axial chirality)을 가질 수 있다. 더욱이, 상기 화합물의 결정형태의 일부는 본 발명의 범위에 포함되는 다형체로서 존재할 수 있다. 그 외에, 상기 화합물의 일부는 물 또는 다른 유기 용매와의 용매화물을 형성할 수 있다. 이러한 용매화물은 유사하게 본 발명의 범위에 포함된다.

[0384] 본 명세서에 기술되는 올리고머는 단백질의 생산 또는 바이러스의 복제를 억제하는 방법에서 사용될 수 있다. 따라서 하나의 실시형태에서 이러한 단백질을 코드화하는 핵산은 본 명세서에 기술된 바와 같은 올리고머에 노출된다. 전술한 것의 추가 실시형태에서, 안티센스 올리고머는 본 명세서에 기술된 바와 같은 5' 또는 3' 변형 말단기 또는 이의 조합을 포함하며, 및 염기상 부분 B는 단백질의 생산을 억제하는데 효과적인 위치에서 핵산의 일부를 하이브리드 형성하는데 효과적인 서열을 형성한다. 하나의 실시형태에서, 상기 위치는 본 명세서에 기술된 바와 같은 mRNA의 ATG 시작 코돈 영역, 프리-mRNA의 스플라이드 부분, 또는 바이러스 표적 서열이다.

[0385] 하나의 실시형태에서, 상기 올리고머는 약 50°C 이상의 표적서열에 결합하는 것에 대하여 T_m 을 가지며, 또한 포유동물 세포 또는 박테리아 세포에 의해 흡수된다. 또 다른 실시형태에서, 상기 올리고머는 수송 부분, 예를 들면 본 명세서에 기술된 바와 같은 아르기닌 풍부 펩타이드에 접합되어 이러한 업테이크를 촉진할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 말단 변형은 수송 부분으로서 작용하여 포유동물 및/또는 박테리아 세포에 의한 업테이크를 촉진할 수 있다.

[0386] 모르폴리노 올리고머의 제조 및 특성은 이하에 더욱 상세하게 기술되며 또한 미국특허 제5,185,444호 및 국제출원공보 WO/2009/064471호에 기술되며, 이들 각각은 전부 본 명세서에서 참고로 인용된다.

[0387] D. 접합체의 제형 및 투여

[0388] 본 발명은 또한 기술된 접합체의 제형 및 전달을 위해 제공된다. 따라서 하나의 실시형태에서 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩타이드-올리고머 접합체 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0389] 표적 핵산에 접합체의 효과적인 전달은 치료에 있어 중요한 면이다. 안티센스 올리고머 전달의 경로는 경구 및 비경구 경로, 예를 들면 정맥내, 피하, 복강내, 및 근육내를 포함하는 다양한 전신경로는 물론 흡입, 경피 및 국소 전달을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 적절한 경로는 치료 중인 피검체의 증상에 적절한 것으로 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 피부의 바이러스성 감염의 치료에서 안티센스 올리고머의 적절한 전달 경로는 국소 전달인 반면, 바이러스성 호흡기 감염의 치료를 위해 안티센스 올리고머의 전달은 흡입이다. 올리고머는 또한 바이러스성 감염 부위에 또는 혈류에 직접 전달할 수 있다.

[0390] 상기 접합체는 생리학적으로 및/또는 약제학적으로 허용가능한 임의의 편리한 부형제로 투여할 수 있다. 이러한 조성물은 당해 분야에서 통상의 기술자들에 의해 사용되는 다양한 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 그의 예는 식염수, 인산염 완충 식염수(PBS), 물, 수성 에탄올, 에멀전, 예를 들어 오일/물 에멀전 또는 트리글리세라이드 에멀전, 정제 및 캡슐제를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 적절한 생리학적으로 허용가능한 담체의 선택은 선택된 투여 양상에 따라 달라질 것이다.

[0391] 본 발명의 화합물 (예, 접합체)는 일반적으로 자유 산 또는 자유 염기로서 사용될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 화합물은 산 또는 염기 부가염의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 자유 아미노 화합물의 산부가염은 당해 분야에 잘 알려진 방법으로 제조할 수 있으며 또한 유기 및 무기 산으로부터 형성될 수 있다. 적절한 유기산은 말산, 푸마르산, 벤조산, 아스코르브산, 숙신산, 메탄설폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 옥살산, 프로피온산, 타타르산, 살리실산, 시트르산, 글루콘산, 락트산, 만델산, 신남산, 아스파르트산, 스테아르산, 팔미

트산, 글리콜산, 글루탐산, 및 벤젠설폰산을 포함한다. 적절한 무기산은 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산 및 질산을 포함한다. 염기 부가염은 카르복실레이트 음이온과 함께 형성하는 이들 염을 포함하며 또한 알칼리 및 알칼리 토금속 (예를 들면, 리튬, 나트륨, 칼륨, 망간, 바륨 및 칼슘)으로부터 선택된 것들과 같은 유기 및 무기 양이온은 물론 암모늄 이온 및 그의 치환된 유도체 (예를 들면 디벤질 암모늄, 벤질 암모늄, 2-하이드록시에틸 암모늄 등)으로부터 선택된 것들과 같은 유기 및 무기 양이온과 함께 형성된 염을 포함한다. 따라서, 화학식 (I)의 "약제학적으로 허용가능한 염"이란 용어는 임의의 및 모든 허용가능한 염 형태를 포함하는 것으로 의도된다.

[0392] 그 외에, 전구약물은 또한 본 발명의 문맥 내에 포함된다. 전구약물은 이러한 전구약물이 환자에게 투여되는 경우 생체내에서 화학식(I)의 화합물을 방출하는 임의의 공유결합 캐리어이다. 전구약물은 일반적으로 변형이 일상적인 조작에 의해 또는 생체내에서 절단되어 모체 화합물을 생성하는 방식으로 작용기를 변형시켜 제조된다. 전구약물은 예를들면 투여되었을 때 절단되어 하이드록시, 아민 또는 설프히드릴 기를 형성하는 임의의 기에 하이드록시, 아민 또는 설프히드릴기가 결합되는 본 발명의 화합물을 포함한다. 따라서 전구약물의 대표적인 예는 화학식(I)의 화합물의 알코올 및 아민 작용기의 아세테이트, 포르메이트 및 벤조에이트 유도체를 포함한다 (그러나 이들로 제한되지 않는다). 추가로, 카르복실산(-COOH)의 경우에, 메틸 에스테르, 에틸 에스테르 등과 같은 에스테르가 사용될 수 있다.

[0393] 일부 경우에는, 리포솜이 세포내에 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 업테이트를 촉진하기 위하여 사용할 수 있다 (예를 들면, Williams, S.A., Leukemia 10(12):1980-1989, 1996; Lappalainen et al., Antiviral Res. 23:119, 1994; Uhlmann et al., 안티센스 올리고뉴클레오타이드: 새로운 치료원리, Chemical Reviews, Volume 90, No. 4, pages 544-584, 1990; Gregoriadis, G., Chapter 14, Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine, pp. 287-341, Academic Press, 1979 참조). 하이드로겔은 또한 예를 들면 국제출원공보 WO 93/01286 호에 기술된 바와 같이 안티센스 올리고머 투여를 위한 부형체로서 사용될 수 있다. 대안적으로, 올리고뉴클레오타이드는 미세구 또는 미세입자로 투여될 수 있다. (예를 들면, Wu, G.Y. and Wu, C.H., J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 1987 참조). 대안적으로, 안티센스 올리고머와 함께 복합된 가스 충전 미세기포의 사용은 미국 특허 제6,245,747호에 기술된 바와 같이 표적조직에 대한 전달을 증가시킬 수 있다. 서방성 조성물이 또한 사용될 수 있다. 이들은 필름 또는 마이크로 캡슐과 같은 성형품 형태의 반투과성 고분자 매트릭스를 포함할 수 있다.

[0394] 하나의 실시형태에서, 안티센스 억제제는 특이적 바이러스의 복제를 억제하는데 효과적인 안티센스 약제로, 감염된 세포를 바이러스와 접촉시킴으로써 또는 바이러스에 의해 숙주 동물의 감염을 치료하는데 효과적이다. 안티센스 약제는 적절한 약제학적 담체 중에 소정의 바이러스로 감염된 포유동물 피검체, 예를 들면 인간 또는 가축에게 투여된다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 숙주 중의 RNA 바이러스의 성장을 억제하는 것으로 고려된다. RNA 바이러스는 수적으로 감소되거나 또는 숙주의 정상 성장 또는 발전에 다소 해로운 효과를 제거할 수 있다.

[0395] 본 방법의 한 가지 양상에서, 피검체는 인간 피검체, 예를 들면 국소 또는 전신 바이러스성 감염증을 갖는 것으로 진단된 환자이다. 환자의 증상은 또한 예를 들면 (1) 면역이 저하되고; (2) 화상 희생자이고; (3) 유치 카테터를 가지며; 또는 (4) 수술을 하려고 하거나 수술을 최근에 행한 환자의 경우에, 본 발명의 안티센스 올리고머의 예방적 투여에 영향을 줄 수 있다. 하나의 바람직한 실시형태에서, 올리고머는 약제학적으로 허용가능한 담체중에 함유된 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머이며 또한 경구적으로 전달된다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 올리고머는 약제학적으로 허용가능한 올리고머 중에 함유된 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머이며 또한 정맥내에 (i.v.) 전달된다.

[0396] 본 방법의 또 다른 적용에 있어서, 피검체는 가축동물, 예를 들면 닭, 칠면조, 돼지, 암소 또는 염소 등이며, 또한 치료는 예방적 또는 치료적이다. 본 발명은 또한 상술한 유형의 항바이러스성 안티센스 화합물의 치료량 이하의 양으로 보충된 식용 곡물을 함유하는 가축 및 가금 식용 조성물을 포함한다. 또한 항바이러스제의 치료량 이하의 수준으로 보충된 식용 곡물을 가축 및 가금에게 공급하는 방법에 있어서, 상기 식용 곡물이 상술한 바와 같이 항바이러스성 올리고뉴클레오타이드의 치료량 이하의 양으로 보충되는 개선이 고려된다.

[0397] 하나의 실시형태에서, 접합체는 적어도 200-400 nM 안티센스 올리고머의 피크 혈중농도를 초래하는데 효과적인 양 및 방법으로 투여된다. 전형적으로, 안티센스 올리고머의 하나 이상의 투여량은 일반적으로 일정한 간격으로 약 1 내지 2 주 동안 투여된다. 경구투여를 위해 바람직한 용량은 70kg당 약 1-1000 mg 올리고머이다. 일부 경우에, 올리고머/환자 1000mg 이상의 투여량이 필요할 수 있다. 정맥내 투여의 경우, 바람직한 투여량은 70kg 당

올리고머 약 0.5 mg 내지 1000 mg이다. 접합체는 일정한 간격으로 짧은 기간 동안, 예를 들면 2주 또는 그 이하 동안 매일 투여한다. 그러나, 일부 경우에 접합체는 더 긴 시간 동안 간헐적으로 투여된다. 투여는 항생물질의 투여 또는 다른 치료학적 치료에 이어서 또는 이와 동시에 행할 수 있다. 상기 치료 계획은 면역 분석, 다른 바이오화학 시험 및 치료중인 피검체의 생리학적 시험을 기본으로 하여, 지시된 바와 같이 조절할 수 있다 (투여량, 빈도, 경로 등).

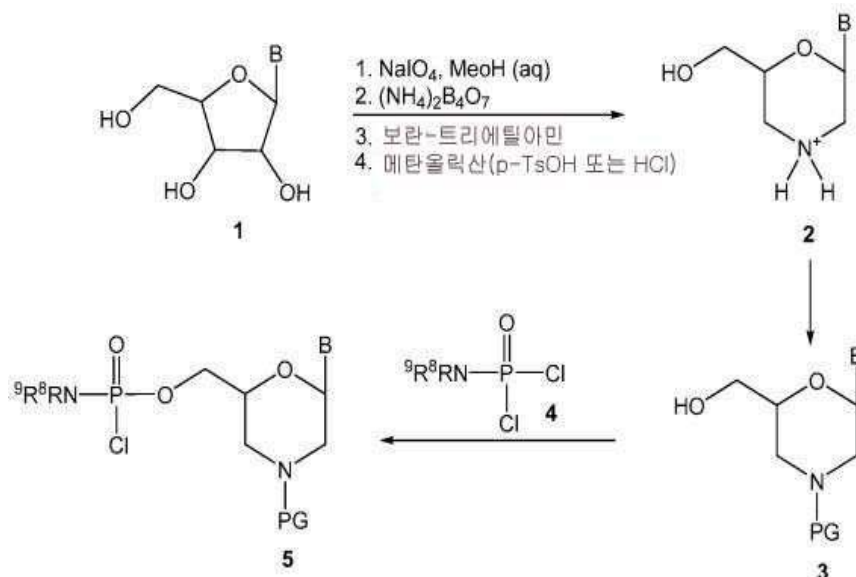
[0398] 본 발명의 접합체를 사용하는 유효한 생체내 치료 계획은 기간, 투여량, 빈도 및 투여 경로는 물론 치료중인 피검체의 증상에 따라 변할 수 있다 (즉, 국소 또는 전신 감염에 대한 반응에서 투여에 비해 예방적 투여). 따라서 최적의 치료 결과를 달성하기 위하여, 이러한 생체내 치료법은 흔히 치료중인 바이러스성 감염의 특수한 유형에 적합한 시험에 의해 모니터링하고 또한 투여량 또는 치료 계획에서 상응하는 조절을 필요로 할 것이다. 치료는 전혈구계수(CBC), 핵산 검출방법, 면역진단시험, 바이러스 배양, 또는 헤테로듀플렉스의 검출과 같은 질환 및/또는 감염의 일반적 징조에 의해 모니터링 할 수 있다.

[0399] 하나 이상의 유형의 RNA 바이러스의 성장을 억제하거나 없애는 본 발명의 생체내 투여된 항바이러스성 접합체의 효과는 안티센스 올리고머의 투여 전에, 도중에 및 이후에 피검체로부터 취한 생물학적 시료 (조직, 혈액, 요소 등)로부터 결정할 수 있다. 시료의 분석은 (1) 당해분야의 기술자들에게 알려진 절차, 예를 들면 전기영동 겔 이동성 분석을 사용하여, 표적 및 비표적 서열로 헤테로듀플렉스 형성의 존재 또는 부존재를 모니터링하고; (2) ELISA 또는 웨스턴 블로팅과 같은 표준 기술로 측정시 바이러스성 단백질 생산량을 모니터링하거나; 또는 (3) 예를 들면 Spearman-Kärber의 방법에 의한 바이러스 역가에 대한 영향을 측정하는 것을 포함한다. (예를 들면, Pari, G.S. et al., *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* 39(5):1157-1161, 1995; Anderson, K.P. et al., *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* 40(9):2004-2011, 1996; Cottral, G.E. (ed) in: *Manual of Standard Methods for Veterinary Microbiology*, pp. 60-93, 1978 참조).

[0400] E. 접합체의 제조

[0401] 모르폴리노 소단위, 변형 소단위간 결합 및 이를 포함하는 올리고머는 실시예 및 미국특허 제5,185,444호 및 제 7,943,762호에 기술된 바와 같이 제조할 수 있으며, 이들 특허는 여기서 전부 참고로 인용된다. 모르폴리노 소단위는 다음과 같은 일반 반응도식 I에 따라 제조할 수 있다.

[0402] 반응도식 1. 모르폴리노 소단위의 제조



[0403]

[0404] 반응도식 1을 참조하면, B는 염기쌍 부분을 나타내고, PG는 보호기를 나타내며, 모르폴리노 소단위는 도시된 바와 같은 상응하는 리비뉴클레오시드(1)로부터 제조할 수 있다. 모르폴리노 소단위 (2)는 적절한 보호기 전구체, 예를 들면 염화트리틸과의 반응에 의해 선택적으로 보호될 수 있다. 3' 보호기는 일반적으로 이하에 상세하게 기술된 바와 같이 고체 상 올리고머 합성중에 제거된다. 염기쌍 부분은 고체상 올리고머 합성 중에 적절히 보호될 수 있다. 적절한 보호기는 아데닐 및 시토신의 경우 벤조일을 포함하고 하이포잔티(I)의 경우 피발로일옥

시메틸을 포함한다. 피발로일옥시메틸기는 하이포잔틴 헤테로사이클릭 염기의 N1 위치상에 도입될 수 있다. 비보호된 하이포잔틴 소단위가 사용될 수 있지만, 활성화 반응의 수율은 염기가 보호될 때 훨씬 우수하다. 다른 적절한 보호기는 여기서 전부 참고로 인용되는 계류중인 미국특허출원 제12/271,040호에 기술되어 있다.

[0405] 3을 활성화 인 화합물 4와 반응시키면 원하는 결합부분 (5)을 갖는 모르폴리노 소단위를 생기게 한다. 구조식 4의 화합물은 당업자에게 알려진 임의의 수의 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 이러한 화합물은 상응하는 아민과 옥시염화인의 반응에 의해 제조할 수 있다. 이와 관련하여, 아민 출발 물질은 당해분야에 알려진 임의의 방법, 예를 들면 실시예 및 미국특허 제7,943,762호에 기술된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 상기 도식이 타입 (B) (예, X는 $-NR^8R^9$ 임)을 나타내더라도, 타입(A)(예, X는 디메틸아민임)의 결합은 유사한 방법으로 제조할 수 있다.

[0406] 구조식 5의 화합물은 소분자간 결합을 포함하는 올리고머의 제조를 위한 고체상 자동화 올리고머 합성에서 사용될 수 있다. 이러한 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 간단히, 구조식 5의 화합물은 고체 지지체에 링커를 함유하도록 5' 말단에 변형될 수 있다. 예를 들면, 화합물 5는 L^1 및/또는 R^{19} 를 포함하는 링커에 의해 고체 지지체에 결합될 수 있다. 예시적인 방법은 도 3 및 4에서 입증된다. 이러한 방식으로, 올리고는 올리고 합성이 완료되고 올리고머가 고체 지지체로부터 절단된 후에 5' 말단 변형을 포함할 수 있다. 일단 지지되면, 5의 보호기 (예, 트리틸)는 제거되고 또한 자유 아민은 구조식 5의 두번째 화합물의 활성화 인 부분과 반응된다. 이러한 서열은 원하는 길이의 올리고머가 얻어질 때까지 반복한다. 말단 5' 끝에서 보호기는 5'-변형이 바람직한 경우에 제거되거나 떨어질 수 있다. 올리고는 임의의 수의 방법을 사용하여 고체 지지체로부터 제거될 수 있으며, 예를 들면 염기로 처리하여 고체 지지체에 대한 결합을 절단한다.

[0407] 펩타이드 올리고머 접합체는 적절한 활성화제 (예, HATU)의 존재하에 자유 NH (예를 들면 아모르폴리노 올리고머의 3' NH)를 포함하는 올리고머와 원하는 펩타이드 (당해 분야에 알려진 표준 펩타이드 합성 방법에 따라 제조됨)을 커플링시켜 제조할 수 있다. 접합체는 당해 분야에 알려진 다수의 기술, 예를 들면 SCX 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있다.

[0408] 변형 모르폴리노 소단위 및 펩타이드 올리고머 접합체의 제조는 실시예에 더욱 상세하게 기술된다. 임의의 수의 변형 결합을 포함하는 펩타이드 올리고머 접합체는 본 명세서에 기술된 방법, 당해 분야에 알려지고 및/또는 본 명세서에 참고로 기술된 방법들을 사용하여 제조할 수 있다. 또한 전술한 바와 같이 제조된 PMO+ 모르폴리노 올리고머의 글로벌 변형은 실시예에 기술되어 있다 (예를 들면, PCT 공개 WO2008036127호 참조).

[0409] F. 올리고머의 안티센스 활성

[0410] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같이 펩타이드-올리고머 접합체에 단백질을 코드화하는 핵산을 노출시키는 단계를 포함하는 단백질의 생산을 억제하는 방법을 제공한다. 따라서 하나의 실시형태에서 이러한 단백질을 코드화하는 핵산은 본 명세서에 기술된 바와 같이 접합체에 노출되며, 여기서 염기쌍 부분 Pi는 단백질의 생산을 억제하는데 효과적인 위치에서 핵산의 일부에 하이브리드 형성하는데 효과적인 서열을 형성한다. 올리고머는 예를 들면 mRNA의 ATG 시작 코돈 영역, 프리-mRNA의 스플라이스 부위, 또는 이하에 기술된 바와 같은 바 이러스 표적 서열을 표적화할 수 있다.

[0411] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 염기쌍 부위를 지지하는 소단위간 결합의 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 유사체를 포함하는 펩타이드 올리고머 접합체의 안티센스 활성을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 올리고뉴클레오타이드에 본 명세서에 기술된 바와 같은 캐리어 펩타이드를 접합하는 것을 포함한다.

[0412] 일부 실시형태에서, 안티센스 활성의 증가는 하기 (i) 또는 (ii)에 의해 입증될 수 있다:

[0413] (i) 그의 표적 서열에 안티센스 올리고머의 결합이 코드화 단백질을 위한 번역 시작 코돈을 차단하는데 효과적인 경우 상응하는 비변형 올리고머에 의해 제공되는 것에 대해서 코드화 단백질의 발현에서의 감소, 또는

[0414] (ii) 그의 표적 서열에 안티센스 올리고머의 결합이, 정확하게 스플라이스 되었을 때 상기 단백질을 코드화하는 프리-mRNA에서 이상 스플라이스 부위를 차단하는데 효과적인 경우에, 상응하는 비변형 올리고머에 의해 제공되는 것에 대해서, 코드화 단백질의 발현의 증가. 이들 효과의 측정에 적합한 분석은 이하에 더욱 기술된다. 하나의 실시형태에서, 변형은 세포 자유 번역 분석에서 이러한 활성, 세포 배양에서 스플라이스 수정 번역 분석, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 작용 동물 모델 시스템의 스플라이스 수정 증가를 제공한다. 하나의 실시형태

에서, 활성은 적어도 2개, 적어도 5개 또는 적어도 10개의 요소에 의해 증가된다.

[0415] 항바이러스 적용, 신경근육 질환의 치료, 세균감염, 염증 및 다발성 낭포 신질환을 포함하는 본 발명의 집합체의 다양한 예시적인 적용이 이하에 기술된다. 이러한 기술내용은 본 발명을 어떠한 방식으로든 제한하는 것을 의미하지 않고, 본 명세서에 기술된 집합체를 사용하여 설명될 수 있는 광범위한 인간 및 동물 질환 증상을 예시하는 역할을 한다.

[0416] G. 집합체의 예시적인 치료 용도

[0417] 캐리어 펩타이드에 접합된 올리고머는 양호한 효능 및 저독성을 포함하며, 따라서 올리고머 또는 펩타이드-올리고머 집합체를 사용하여 얻어진 것보다 더 양호한 치료 창을 생기게 한다. 다음의 기술내용은 집합체의 치료적 용도의 예시적인 실시예를 제공하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0418] 1. ssRNA 바이러스의 줄기 루프 이차 구조의 표적화

[0419] 예시적인 안티센스 항바이러스성 화합물의 한 부류는 12-40개 소단위의 서열 및 표적화된 바이러스의 양성-센스 RNA 가닥의 5'-말단 40개 염기내에 줄기 루프 이차구조와 관련된 영역에 상보적인 표적화 서열을 갖는 본 명세서에 기술된 바와 같은 모르폴리오 올리고머이다. (예를 들면, 본 명세서에서 전부 참고로 인용되는 PCT 공보 WO/2006/033933호 또는 미국출원공개 제 20060269911호 및 제20050096291호 참조).

[0420] 본 발명은 서열이 줄기 루프 이차 구조를 형성할 수 있는 감염 바이러스의 양성 가닥의 5'-말단 40개 염기 내의 한 영역을 바이러스 표적 서열로서 먼저 동정하는 것을 포함한다. 다음에 단계적 고체상 합성에 의해 내부 이중 구조를 형성할 수 있는 바이러스 게놈 영역에 상보적인 적어도 12개이 소단위의 표적화 서열을 갖는 모르폴리오 올리고머가 구성되며, 여기서 상기 올리고머는 올리고뉴클레오타이드 화합물과 바이러스의 양성 센스 가닥으로 구성되고 또한 적어도 45°C의 줄기 루프 구조의 해리 T_m 및 이러한 줄기 루프 구조의 파괴를 특징으로 하는 헤테로 듀플렉스 구조를 바이러스 표적서열과 함께 형성할 수 있다. 상기 올리고머는 본 명세서에 기술된 캐리어 펩타이드에 접합된다.

[0421] 표적 서열은 입력 RNA 서열의 최소 자유 에너지 상태에 대한 조사를 기본으로 하여 이차구조 예측을 수행할 수 있는 컴퓨터 프로그램에 의해, 5'-말단 서열, 예를 들면 5'-말단 40개 염기에 의해 동정할 수 있다.

[0422] 관련된 양상에서, 집합체는 포유동물 숙주 세포에서 단일 가닥 양성 센스 게놈을 가지며 또한 플라비바이러스(Flaviviridae), 피코노바이러스(Picornoviridae), 칼리시바이러스(Caliciviridae), 토가바이러스(Togaviridae), 아르테리바이러스(Arteriviridae), 코로나바이러스(Coronaviridae), 아스트로바이러스(Astroviridae) 또는 헤페바이러스(Hepeviridae) 패밀리의 하나로부터 선택된 RNA 바이러스의 복제를 억제하는 방법에서 사용할 수 있다. 본 방법은 내부 줄기 고리 이차구조를 형성할 수 있는 양성 가닥 바이러스 게놈의 5'-가닥 바이러스 게놈의 5'-말단 40개 염기 내의 한 영역에 상보적인 적어도 12개의 소단위의 표적 서열을 갖는 본 명세서에 기술된 바와 같은 집합체의 바이러스 억제량을 감염된 숙주세포에 투여하는 단계를 포함한다. 본 집합체는, 숙주세포에 투여하였을 때, (i) 올리고뉴클레오타이드 화합물과 바이러스의 양성 센스가닥으로 구성되고 또한 (ii) 이러한 줄기 루프 이차구조의 파괴 및 적어도 45°C의 해리를 나타내는 헤테로 듀플렉스 구조를 형성하는데 효과적이다. 집합체는 바이러스로 감염되거나 또는 바이러스 감염의 위험이 있는 포유동물 피검체에 투여할 수 있다.

[0423] 뎅기(dengue) 및 일본 뇌염 바이러스의 말단 줄기 루프 구조를 표적하는 예시적인 표적화 서열은 이하에 각각 서열번호 1 및 2로서 나열된다.

[0424] ssRNA 바이러스의 말단 줄기 루프 구조를 표적하는 추가의 예시적인 표적 서열은 또한 본 명세서에서 전부 참고로 인용되는 미국특허출원 제11/801,885호 및 PCT 공보WO/2008/036127 호에서 발견될 수 있다.

[0425] 2. ssRNA 바이러스의 일차 개방 해독 프레임의 표적화

[0426] 예시적 집합체의 두번째 부류는 복수의 기능적 단백질을 함유하는 폴리단백질을 코드화하는 첫번째 개방 해독 프레임 및 12kb 미만의 단일 가닥 양성 센스 게놈을 갖는 피코르나바이러스, 칼리시바이러스, 토가바이러스, 코

로나바이러스, 및 플라비바이러스 패밀리의 성장을 억제하는데 사용된다. 특수한 실시형태에서, 바이러스는 코로나 바이러스 패밀리로부터 RNA 바이러스 또는 플라비바이러스 패밀리로부터 웨스트 나일, 황열병, 또는 뎅기 바이러스이다. 억제 접합체는 바이러스 게놈의 첫번째 개방 해독 프레임의 AUG 시작 부위를 걸치는 바이러스 표적서열에 실질적으로 상보적인 표적 염기 서열을 갖는 본 명세서에서 기술된 바와 같은 안티센스 올리고머를 포함한다. 본 방법의 한 가지 실시형태에서, 본 접합체는 바이러스로 감염된 포유동물 피검체에 투여된다. 예를 들면 본 명세서에서 전부 참고로 인용되는 PCT 공보 WO/2005/007805호 및 미국특허출원 공개 2003224353호 참조.

[0427] 바람직한 표적 서열은 바이러스 게놈의 첫번째 개방 해독 프레임(ORF1)의 AUG 시작부위를 걸치는 영역이다. 첫번째 ORF는 일반적으로 중합효소, 헬리카제 및 프로테아제와 같은 비구조적 단백질을 함유하는 폴리단백질을 코드화한다. "AUG 시작 부위를 스캐닝(span)하는" 표적 서열이 AUG 시작 부위의 한쪽에 적어도 3개의 염기 및 다른 쪽에 적어도 두개의 염기 (총 적어도 8개의 염기)를 포함한다는 것을 의미한다. 바람직하게, 이것은 시작 부위의 각 측면에서 적어도 4개의 염기 (총 적어도 11개의 염기)를 포함한다.

[0428] 더욱 일반적으로, 바람직한 표적 부위는 다양한 바이러스 분리체 사이에 보존되는 표적을 포함한다. 다른 유리한 부위는 IRES (내부 리보솜 결합부위), 트랜스활성화 단백질 결합 부위, 및 복제의 개시 부위를 포함한다. 다수의 중복 유전자를 제공할 수 있는 복합체 및 큰 바이러스 게놈은 바이러스 존재에 대한 숙주 반응 및 바이러스 침입을 위해 코드화하는 세포 유전자를 표적화함으로써 효과적으로 표적화될 수 있다.

[0429] 다양한 바이러스 게놈서열은 NCBI 유전자 은행 데이터베이스와 같은 잘 알려진 근원으로부터 이용가능하다. ORF1의 AUG 시작 부위는 또한 의존하는 유전자 데이터 베이스 또는 참조문헌에서 동정할 수 있거나, 또는 예상되는 ORF1 시작 부위의 영역에서 AUG 코돈에 대한 서열을 스캐닝함으로써 발견할 수 있다.

[0430] 4개의 바이러스 패밀리의 각각에 대한 일반적 게놈 유기화는 이하에 제공되며, 이어서 각각의 패밀리 내에서 선택된 멤버 (속, 종 또는 균주)에 대해 얻어진 예시적인 표적 서열이 제공된다.

[0431] 3. 인플루엔자 바이러스의 표적화

[0432] 예시적인 접합체의 세번째 부위는 오르토믹소바이러스(Orthomyxoviridae) 패밀리의 바이러스 성장을 억제하거나 또는 바이러스 감염을 치료하는데 사용된다. 하나의 실시형태에서, 숙주세포는 본 명세서에서 기술된 바와 같은 접합체, 예를 들면 다음으로부터 선택된 표적 부분에 하이브리드 형성하는데 효과적인 염기서열을 포함하는 접합체와 접촉된다: 1) 음성 센스 바이러스성 RNA 분절의 5' 또는 3' 말단 25 염기; 2) 양성 센스 cRNA의 5' 또는 3' 말단의 말단 25개 염기; 3) 인플루엔자 바이러스 mRNA의 AUG 시작 코돈을 둘러싸는 45개 염기 및; 4) 교대 스플라이싱에 인플루엔자 mRNA의 스플라이스 공여체 또는 수용체 부위를 둘러싸는 50개 염기. (예를 들면, 본 명세서에서 전부 참고로 인용되는 PCT 공보 WO/2006/047683호; 미국출원 공개 제 20070004661호; 및 PCT 출원 제2010/056613호 및 미국출원 제12/945,081호 참조).

[0433] 이와 관련하여 예시적인 접합체는 서열번호: 3을 포함하는 올리고머를 포함하는 접합체를 포함한다.

[0434] 표 4. 변형 소단위간 결합 또는 말단기를 도입하는 인플루엔자 표적 서열

NG-10-0038	PMOhex	CGG T ^h TA GAA GAC ^h TCA TC ^h T TT
NG-10-0039	PMOhex	CGG T ^h TA GAA GAC ^h TCA ^h TC ^h T ^h TT
NG-10-0096	PMOapn	CGG T ^a TA GAA GAC ^a TCA TC ^a T TT
NG-10-0097	PMOapn	CGG ^a T ^a TA GAA GAC ^a TCA ^a TC ^a T TT
NG-10-0099	PMOpyr	CGG P ^T TA GAA GAC P ^T CA P ^T C ^P T TT
NG-10-0107	PMOthiol	CGG T ^{SH} TA GAA GAC ^{SH} TCA TC ^{SH} T TT
NG-10-0108	PMOsucc	CGG T ^s TA GAA GAC ^s TCA TC ^s T TT
NG-10-0111	PMOguan	CGG T ^g TA GAA GAC ^g TCA TC ^g T TT
NG-10-0141	PMOpyr	CGG T ^P TA GAA GAC P ^T CA TC ^P T TT
NG-10-0142	PMOpyr	CGG T ^P TA GAA GAC P ^T CA P ^T C ^P T TT
NG-10-0158	PMO 글루타릭	CGG T ^{glu} TA GAA GAC ^{glu} TCA TC ^{glu} T TT
NG-10-0159	PMOcyclo-glut	CGG T ^{cp9lu} TA GAA GAC ^{cp9lu} TCA TC ^{cp9lu} T TT
NG-10-0160	PMO 콜릭산	CGG T ^{ca} TA GAA GAC ^{ca} TCA TC ^{ca} T TT
NG-10-0161	PMO 데옥시 CA	CGG T ^{dca} TA GAA GAC ^{dca} TCA TC ^{dca} T TT
NG-10-0180	PMOapn	TT ^a T CGA CA ^a T CGG T ^a TA GAA GAC ^a TCA T
NG-10-0174	PMOm	CGG T ^m TA GAA GAC ^m TCA TC ^m T TT
NG-10-0222	PMO MeT	CGG T ^{Me} TA GAA GAC +TCA TC+T TT
NG-10-0223	PMO FarnT	CGG T ^{Farn} TA GAA GAC +TCA TC+T TT
NG-10-0538	PMOapn-트리틸	CGG T ^a TA GAA GAC ^a TCA TC ^a T TT
NG-10-0539	PMOapn-트리틸	CGG T ^P TA GAA GAC P ^T CA TC ^P T TT
NG-10-0015	PMO	CGG TTA GAA GAC TCA TCT TT
NG-11-0170	PMOplus	CGG +TTA GAA GAC +TCA TC+T TT
NG-11-0145	PMOplus-벤즈히드릴	CGG T+TA GAA GAC +TCA TC+T TT**
NG-11-0148	PMO 이소프로필 Pip	CGG TiprpiptTA GAA GAC iprpiptTCA TCiprpiptT TT
NG-11-0173	PMOpyr	CGG pTTA GAA GAC pTCA TCpT TT
NG-11-0291	트리메틸 Gly	CGG T*+TA GAA GAC *+TCA TC*+T TT

[0435]

[0436]

**3'-벤즈히드릴; *+ 결합은 PMOplus에서 아실화된 트리메틸 글리신이고, PMOm은 3-질소 위치상에 메틸기를 갖는 T 염기를 나타낸다.

[0437]

접합체는 포유동물에서 인플루엔자 바이러스 감염을 치료하는데 특히 유용하다. 접합체는 인플루엔자 바이러스에 감염되거나 인플루엔자 바이러스 감염 위험에 있는 포유동물 피검체에 투여될 수 있다.

[0438]

4. 피코르나바이러스 패미리의 바이러스 표적화

[0439]

예시적인 접합체의 네번째 부류는 피코르나바이러스 패미리의 바이러스 성장을 억제하고 또한 바이러스 감염을 치료하는데 사용된다. 접합체는 포유동물에서 엔테로바이러스(Enterovirus) 및/또는 리노바이러스(Rhinovirus)를 치료하는 특히 유용하다. 이러한 실시형태에서, 접합체는 바이러스 5' 미번역 영역의 32개 보존된 뉴클레오타이드 영역 중의 하나 내에 RNA 바이러스와 관련된 영역에 상보적인 표적화 서열을 갖는 적어도 12개의 소단위를 포함하는, 12-40개 소단위의 서열을 갖는 모르폴리노 올리고머를 포함한다. (예를 들면, 여기에서 전부 참고로 인용되는 PCT 공보 WO/2007/030576호 및 WO/2007/030691호 또는 계류중인 공동출원인의 미국출원 제 11/518,058호 및 제 11/517,757호 참조). 예시적인 표적화 서열은 이하에 서열번호:6으로 나열된다.

[0440]

5. 플라비바이러스 패미리의 바이러스 표적화

[0441]

예시적 접합체의 다섯번째 부류는 동물세포에서 플라비바이러스의 복제를 억제하는데 사용된다. 본 부류의 예시적인 접합체는 양성 가닥 플라비바이러스 RNA의 3'-CS 서열 또는 5'-고리화 서열(5'-CS)의 적어도 일부를 포함하는 바이러스의 양성 가닥 RNA 게놈의 영역에 상보적인 적어도 8개 염기의 서열을 갖는 길이 8-40개의 뉴클레

오타이드 염기의 프로폴리노 올리고머를 포함한다. 매우 바람직한 표적은 3'-CS이며 또한 땀기 바리어스의 예시적인 표적 서열은 이하에 서열번호: 7로 나열된다 (예를 들면, 본 명세서에서 전부 참고로 인용되는 PCT 국제공보 WO/2005/030800호 또는 계류중인 공동출원인의 미국출원 제10/913,996호 참조).

[0442] 6. 니도바이러스 패미리의 바이러스 표적화

[0443] 예시적인 접합체의 여섯번째 부류는 바이러스 감염된 동물세포의 복제를 억제하는데 사용된다. 이러한 부류의 예시적 접합체는 8 내지 25개의 뉴클레오타이드 염기를 함유하고 또한 양성가닥 바이러스 게놈 및 음성가닥 3' 서브게놈 영역의 5' 선도영역에서 전사조절 서열 (TRS) 사이에 염기쌍을 파괴할 수 있는 서열을 갖는 모르폴리노 올리고머를 포함한다 (예를 들면, 본 명세서에서 전부 참고로 인용되는 PCT 국제공보 WO/2005/065268호 또는 미국출원공개 제20070037763호 참조).

[0444] 7. 필로바이러스 표적화

[0445] 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기술된 바와 같은 하나 이상의 접합체는 본 명세서에서 기술된 바와 같은 접합체, 예를 들면 이하에 더욱 기술되는 바와 같이, 양성 가닥 mRNA의 AUG 시작부위 영역 내에 적어도 12개의 인접한 염기로 구성된 표적서열에 상보적인 표적 염기서열을 갖는 접합체로 에볼라(Ebola) 바이러스 또는 마르부르그(Marburg) 바이러스의 숙주세포를 접촉시킴으로써 상기 숙주세포내에서 복제를 억제하는 방법에서 사용될 수 있다.

[0446] 필로바이러스 게놈은 안티센스 배열에서 분절되지 않는 단일가닥 RNA의 대략 19,000 염기이다. 게놈은 vRNA에 상보적인 단일 시스템 mRNA로부터 7개 단백질을 코드화한다.

[0447] 표적서열은 마이너스 가닥 바이러스 RNA의 3' 말단 30개 염기 또는 선택된 에볼라 바이러스 단백질의 AUG 시작 코돈의 하류 (25 염기 내) 또는 상류 (100 염기 내)이거나 또는 스캔하는 양성 가닥 (센스) RNA 서열이다. 바람직한 단백질 표적은 엘. 뉴클레오타이드 NP 및 VP30이 또한 고려되더라도 바이러스 중합효소 아단위 VP35 및 VP24이다. 이들중에서 초기 단백질이 선호되며, 예를 들면 VP35가 후기 발현 L 중합효소보다 더 선호된다.

[0448] 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기술된 바와 같은 하나 이상의 접합체는 필로바이러스 mRNA 서열의 양성 가닥 mRNA의 AUG 시작 부위 영역 내에 적어도 12개 인접 염기로 구성된 표적 서열에 상보적인 표적 염기 서열을 갖는 본 명세서에 기술된 접합체로 에볼라 바이러스 또는 마르부르그 바이러스의 숙주 세포를 접촉시킴으로써 상기 숙주세포내에서 복제를 억제하는 방법에서 사용될 수 있다 (예를 들면, 본 명세서에서 참고로 인용되는 PCT공보 WO/2006/050414호 또는 미국특허 제 7,524,829호 및 제7,507,196호, 및 미국출원 제12/402,455호; 제 12/402,461호; 제12/402,464호; 및 제12/853,180호와 연속출원 참조).

[0449] 8. 아레나 바이러스의 표적화

[0450] 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기술된 바와 같은 접합체는 아레나바이러스 패미리에서 종에 의해 포유 동물 세포의 바이러스 감염을 억제하는 방법에서 사용될 수 있다. 하나의 양상에서, 상기 접합체는 상기 바이러스로 감염된 포유동물 피검체를 치료하는데 사용될 수 있다 (예를 들면, 본 명세서에서 참고로 인용되는 PCT공보 WO/2007/103529호 또는 미국특허 제7,582,615호 참조).

[0451] 표 5는 구세계 또는 신세계 아레나바이러스 분류에 의해 조직된 바와 같은 본 발명의 접합체에 의해 표적화된 표적 바이러스의 예시적인 리스트이다.

[0452] 표 5. 표적화 아레나바이러스

패밀리	속	바이러스
아레나바이러스	아레나바이러스	구세계 아레나바이러스
		라사바이러스 (LASV)
		림프구성맥락수막염 바이러스 (LCMV)
		Mopeia 바이러스 (MOPV)
		신세계 아레나바이러스
		구아나리토 바이러스 (GTOV)
		주닌 바이러스 (JUNV)
		Machupo 바이러스 (MACV)
		Pichinide 바이러스 (PICV)
		Pirital 바이러스 (PIRV)
		Sabiá 바이러스 (SABV)
		Tacaribe 바이러스 (TCRV)
		화이트워터 아로요 바이러스 (WWAV)

[0453]

[0454]

아레나바이러스의 게놈은 S(소) 및 L(대)로 지정된 두 개의 단일 가닥 RNA 분절로 구성된다. 비리온에서, S-대 L-분절 RNA의 물비는 대략 2:1이다. 완전한 S-분절 RNA 서열은 여러 가지 아레나바이러스에 대해서 결정되며 또한 3,366 내지 3,535 뉴클레오타이드 범위이다. 완전한 L-분절 RNA 서열은 또한 여러 가지 아레나바이러스에 대해 결정되며 또한 7,102 내지 7,279 뉴클레오타이드 범위이다. S 및 L 분절의 3' 말단 서열은 마지막 19개 뉴클레오타이드의 17에서 동일하다. 이들 말단 서열은 모든 공지된 아레나바이러스 중에 보존된다. 각각의 게놈 RNA의 시작에서 5' 말단 19 또는 20개 뉴클레오타이드는 각각의 상응하는 3' 말단과 불완전하게 상보적이다. 이러한 상보성 때문에, 3' 및 5' 말단은 염기쌍으로 생각되며 또한 팬핸들(panhandle)구조를 형성한다.

[0455]

안티게놈, 바이러스 상보적 RNA(vcRNA) 가닥을 형성하기 위해 감염 비리온 또는 바이러스 RNA (vRNA)의 복제는 감염된 세포에서 일어난다. vRNA와 vcRNA는 둘 다 상보적 mRNA를 코드화한다. 따라서 아레나바이러스는 음성-또는 양성-센스 RNA바이러스보다는 음양 공존성 RNA 바이러스로서 분류된다. 바이러스 유전자의 음양 공존성 배열은 L- 및 S-분절 둘 다에 있다. NP 및 중합효소 유전자는 각각 S 및 L vRNA 분절의 3'에 위치하며 또한 통상적인 음성 센스에서 부호화한다 (즉, 이들은 vRNA 또는 게놈 상보적 mRNA의 전사를 통해 발현된다). S 및 L vRNA 분절의 5' 말단에 위치한 유전자, 즉 GPC 및 Z는 각각 mRNA 센스에서 발현되지만, 이들이 게놈 vRNA로부터 직접 번역된다는 증거는 없다. 대신에 이들 유전자는 안티게놈 (즉 vcRNA)로부터 게놈-센스 mRNA의 전사를 통해 발현되며, 게놈 vRNA의 전장 상보적 카피는 복제성 중간체로서 작용한다.

[0456]

바이러스의 아레나바이러스 패밀리에 대한 예시적인 표적서열은 서열번호: 8로서 나열된다.

[0457]

9. 호흡기 세포융합 바이러스의 표적화

[0458]

호흡기 세포융합 바이러스(RSV)는 어린 아이들에게 하나의 가장 중요한 병원체이다. RSV-원인성 아랫 호흡기 증상, 예를 들면 세기관지염 및 폐렴은 흔히 1년생 미만의 아이들에서 입원을 요한다. 심폐질환을 가진 아이들 및 조기에 태어난 아이들은 특히 이러한 감염으로부터 심한 질환을 경험하기 쉽다. RSV 감염은 또한 연세드신 고위험군 성인에서 중요한 질병이며, 또한 노인에서 바이러스 폐렴의 두번째 가장 흔히 확인되는 원인이다 (Falsey, Hennessey et al. 2005). 세계 보건기구는 RSV가 세계적으로 매년 6400만 임상 감염 및 16만명 사망을 담당한다고 평가하고 있다. RSV 감염의 방지를 위해 현재 이용가능한 백신은 없다. RSV 생물학, 역학, 병태생리학 및 숙주면역 반응에 대한 우리 이해의 많은 주요한 진보는 과거 몇 십년에 걸쳐 일어났을 지라도, RSV 감염증을 가진 유아 및 어린이의 최적 관리에 관하여 상당한 논쟁을 계속하고 있다. 라바리린은 RSV 감염증을 치료하기 위한 유일한 라이센스 항바이러스 약제이지만, 그의 용도는 고위험 또는 중증 질환 유아로 제한된다. 리바비린의 유용성은 그의 비용, 변화가능한 효능, 및 내성 바이러스를 발생시키는 경향으로 제한된다 (Marquardt 1995; Prince 2001). 추가로 유효한 안티-RSV 약제에 대한 현재의 필요성이 잘 인정되고 있다.

[0459]

캡타이드 접합된 PMO (PPMO)는 조직 배양에서 및 생체내 동물 모델 시스템에서 둘다 RSV를 억제하는데 효과적일 수 있는 것으로 잘 알려져 있다 (Lai, Stein et al. 2008). RSV L mRNA의 5'-말단 영역 및 번역시작 부분 영역을 포함하는 서열을 표적하도록 고안된 두 개의 안티센스 PPMO는 두 개의 인간 기도 세포주의 배양에서 안티-RSV 활성에 대해 시험하였다. 이들중의 하나, 즉 (RSV-AUG-2; 서열번호: 10)은 바이러스 역가를 $>2.0 \log_{10}$ 까지 감소시켰다. RSV 접종 전에 RSV-AUG-2 PPMO에 의한 BALB/c 마우스의 비강내(i.n.) 치료는 5일 감염 후 (p.i.) 폐조직에서 $1.2 \log_{10}$ 의 바이러스 역가의 감소 및 7일 감염 후 약독화 폐 감염을 생기게 하였다. 이들 데이터는

RSV-AUG-2가 잠재적 치료적용을 위한 후보로서 더욱 조사 가치가 있는 강력한 안티-RSV 활성을 생기게 한다는 것을 보여주었다 (Lai, Stein et al. 2008). 상술한 바와 같이 RSV-AUG-2 PPMO에 의한 성공에도 불구하고, 종전의 펩타이드 접합체와 관련된 독성을 설명하기 위해 본 명세서에 기술된 접합체를 사용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 하나 이상의 접합체는 본 명세서에 기술된 접합체, 예를 들면 이하에 상세하게 기술되는 바와 같이 RSV로부터 anmRNA의 AUG 시작부위 영역 내에 적어도 12개의 인접 염기로 구성된 표적 서열에 상보적인 표적염기 서열을 갖는 접합체로 RSV의 숙주세포를 접촉 시킴으로써, 상기 숙주 세포내에서 복제를 억제하는 방법에서 사용할 수 있다.

[0460] RSV의 L 유전자는 바이러스 RNA 의존성 RNA 중합효소 복합체의 중요한 성분을 코드화한다. RSV-AUG-2 PPMO 형태의 RSV L 유전자 mRNA의 AUG 번역 시작 부분 코돈을 스패닝하는 서열에 대해 고안된 안티센스 PPMO는 코드화 서열 내에 L mRNA의 5' 말단에 위치한 "유전자 시작" 서열(GS)에서 13 nt까지 서열에 상보적이다. 따라서 바람직한 L유전자 표적 서열은 표 6에 서열번호: 9로 나타난 바와 같이 L유전자 부호화 서열내에 22개 염기 또는 3' 방향으로 40 개 염기를 확장하는 L 유전자 mRNA의 5' 말단으로부터 임의의 12 인접 염기에 상보적이다. 예시적인 RSV L 유전자 표적 서열은 표 6에서 서열번호: 10-14로서 이하에 나열된다. 본 명세서에 기술된 소단위간 변형의 임의의 것은 올리고머 내에 혼입되어 안티센스 활성, 증가된 세포내 전달 및/또는 개선된 치료 활성에 대한 조직 특이성을 제공한다. 본 발명의 소단위간 결합을 포함하는 예시적인 올리고머 서열은 이하 표 6에 나열된다.

[0461] 표 6. RSV 표적 및 표적 서열

명칭	서열 (5' to 3')	서열번호
L 표적	GGGACAAAATGGATCCCATTATTAAATGGAAATTCTGCTAA	9
RSV-AUG-2	TAATGGGATCCATTTTGTC	10
RSV-AUG3	AATAATGGGATCCATTTTGTC	11
RSV-AUG4	CATTAATAATGGGATCCATTTTGTC	12
RSV-AUG5	GAATTTCCATTAATAATGGGATCCATTTTG	13
RSV-AUG6	CAGAATTTCCATTAATAATGGGATCCATT	14
RSV-AUG _{3apn} *	AATAA ^{apn} TGGGA ^{apn} TCCA ^{apn} TT ^{apn} TTG ^{apn} TCCC	11
RSV-AUG _{3guan}	AATAA ^{guan} TGGGA ^{guan} TCCA ^{guan} TT ^{guan} TTG ^{guan} TCCC	11

[0463] 10. 신경근육 질환

[0464] 또 하나의 실시형태에서, 치료적 접합체는 포유동물 피검체에서 신경근육 질환과 관련된 질환 증상을 치료하는데 사용하기 위해 제공된다. 안티센스 올리고머(예, 서열번호: 16)는 듀센형 근이영양증(Duchene muscular dystrophy, DMD)의 MDX 마우스 모델에서 활성을 갖는 것으로 나타났다. 일부 실시형태에서 사용되는 결합을 도입하는 예시적인 올리고머 서열은 표 7에 나열된다. 일부 실시형태에서 접합체는 다음 (a) 및 (b)로부터 선택된 올리고머를 포함한다:

[0465] (a) 전술한 바와 같이 근육 쇠약 증상을 치료하기 위한, 서열번호: 18로 확인되는 인간 미오스타틴 mRNA의 표적 영역에서 적어도 12개의 인접한 염기에 상보적인 염기 서열을 갖는 인간 미오스타틴에 대해 표적화된 안티센스 올리고머 (예를 들면, 본 명세서에 참고로 인용되는 미국특허출원 제12/493,140호, 및 PCT 공보 WO2006/086667호 참조). 예시적인 쥐류 표적 서열은 서열번호: 19-20으로 나열된다; 및

[0466] (b) 전술한 바와 같이 DMD를 치료하기 위한, 디스트로핀 단백질의 부분 활성을 회복하기 위해, 서열번호: 22 내지 35로부터 선택된 서열을 갖는 PPMO와 같은 DMD 단백질 (디스트로핀) 중에 엑손 스킵핑을 생산할 수 있는 안티

센스 올리고머 (예를 들면, 본 명세서에서 참고로 인용되는 PCT 국제공보 WO/2010/048586호 및 WO/2006/000057호 또는 미국특허 공개 제09/061960호 참조).

[0467] 여러 다른 신경근육 질환은 본 발명의 변형 결합 및 말단기를 사용하여 치료할 수 있다. 척추근육 수축증(SMA) 및 근육긴장성 디스트로피 (DM)를 치료하기 위한 예시적인 화합물은 이하에서 논의된다.

[0468] SMA는 척추에서 알파-운동 뉴런의 만성 손실에 의해 원인이 되는 보통 염색체 열성 질환이며, 어린이 및 성인에 영향을 미칠 수 있다. 생존 운동 뉴런(SMN)의 감소된 발현은 질환을 담당한다 (Hua, Sahashi et al. 2010). SMA의 원인이 되는 변이는 SMN1 유전자에서 발견되지만, 이원성 유전자 SMN2는 엑손 7이 없는 대체 스플라이스 형태(델타 SMN2)로부터 발현되는 경우 SMN1의 손실을 보상함으로써 생존성을 허용할 수 있다. 인트론 6, 엑손 7 및 인트론 7로 표적화된 안티센스 화합물은 모두 엑손 7 봉입체를 다양한 정도로 유도하는 것으로 나타났다. 인트론 7로 표적화된 안티센스 화합물이 바람직하다(예를 들면, PCT 국제공보 WO/2010/148249호, WO/2010/120820호, WO/2007/002390호 및 미국특허 제7838657호 참조). SMN2 프리-mRNA를 표적화하고 개선된 엑손 7을 유도하는 예시적인 안티센스 서열은 서열번호: 36-38로 나열된다. 본 명세서에 기술된 변형 결합 및 말단기를 사용하여 이들 올리고머 서열의 선택된 변형은 당해 분야에 알려진 것들에 비하여 개선된 성질을 갖는 것으로 고려된다. 더욱이, SMN2 유전자의 인트론 7에 표적화되고 본 발명의 특징을 포함하는 임의의 올리고머는 엑손 7 봉입체를 유도하는 잠재성을 가지며 또한 SMA 환자들에게 잠재성을 가지는 것으로 고려된다. 근육긴장 디스트로피 타입 1 (DM1) 및 타입 2 (DM2)는 신경근육 퇴화를 유도하는 독성 RNA의 발현에 의해 원인이 되는 우성의 유전성 질환이다. DM1 및 DM2는 각각 전사 디스트로피 미오토니카 단백질 키나제(DMPK) 및 아연 핑거 단백질 9 (ZNF9)의 3'-UTR 및 인트론 1 영역에서 긴 폴리 CUG 및 폴리CCUG 반복과 연관되어 있다 (예를 들면, 국제공보 WO2008/036406 참조). 정상 개체가 무려 30 CTG 반복을 가지는 반면, DM1 환자들은 50 내지 수천개 범위의 다수개의 반복을 가진다. 질환의 중증도 및 발병의 나이는 반복의 수와 관련되어 있다. 성인 발병을 갖는 환자는 더 온화한 증상을 나타내고 100 미만의 반복을 가진다. 청소년 시작 DM1 환자는 무려 500개이 반복을 가지며 또한 선천성 경우는 일반적으로 수천개의 CTG 반복을 가진다. CUG 반복을 함유하는 확장된 전사는 이차 구조를 형성하며, 핵내 포커스 형태로 핵내에 축적되며 또한 RNA-결합 단백질 (RNA-BP)을 격리한다. 여러 가지 RNA-BP는 근육 블라인드상(MBNL) 단백질 및 CUG-결합 단백질 (CUGBP)을 포함하는 질환에서 연루되어 있다. MBNL 단백질은 광수용체 및 근육분화에 필요한 초파리속 근육 블라인드(*Drosophila muscleblind*; Mbl) 단백질에 상응한다. MBNL 및 CUGBP는 심장 트로포닌 T (cTNT), 인슐린 수용체 (IR) 및 근육 특유의 염소이온 채널 (CIC-1)과 같은 DM1에서 영향받는 전사의 길항 스플라이싱 조절체로서 확인되었다.

[0469] DMPK 유전자의 확장된 반복으로 표적화된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 RNA-BP 분화를 변위하고 DM1의 동물 모델에서 근육긴장 증상을 역전시킬 수 있다 (국제공보 WO2008/036406). 본 발명의 특징을 포함하는 올리고머는 DM1 및 DM2 환자에 대해 개선된 활성 및 치료 잠재성을 제공하는 것으로 고려된다. 상기 기술된 폴리CUG 및 폴리CCUG 반복으로 표적화된 예시적 서열은 서열번호 39-55로서 하기에 나열되며 또한 본 명세서에서 전부 참고로 인용되는 미국출원 제13/101,942호에 더욱 기술된다.

[0470] 신경근육 장애를 치료하기 위한 본 발명의 추가적인 실시형태가 예상되며 또한 다른 DNA 반복 불안정성 유전자 장애를 치료하기 위해 고안된 올리고머를 포함한다. 이들 질환은 국제공보 WO2008/018795에 기술된 바와 같은 헌팅톤 병, 척추 소뇌 실조, X-연결 척추 및 숨뇌 근육 위축증 타입 10 (SCA10)을 포함한다.

[0471] 표 7. 변형 소단위간 결합 및/또는 3' 및/또는 5' 말단기를 도입하는 M23D 서열 (서열번호:15)

NG	PMO-X Mo 변형	5'	서열	3'
NG-10-0383	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	트리페닐아세틸
NG-10-0325	트리페닐포스	OH	GGC CAA ACC FCG GCF TAC CFG AAA T	트리페닐포스
NG-10-0272	PMO-파네실	OH	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	파네실
NG-10-0102	PMO	OH	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	트리틸
NG-10-0330	트리메톡시벤조 일	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	트리메톡시벤조 일
NG-10-0056	PMOplus 5'-pol	EG3	GGC C'A'A *ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	H
NG-07-0064	PMO-3'-트리틸	H- Pip	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	트리틸
NG-10-0382	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	트리페닐프로피 오닐
NG-10-0278	PMOpyr	EG3	GGC CAA ACC pTCG GCpT pTAC CpTG AAA pT	H
NG-10-0210	PMOapn	EG3	GGC C'A'A aACC TCG GCT TAC CTG AAA T	H

[0472]

NG	PMO-X Mo 변형	5'	서열	3'
NG-10-0098	PMOPyr	EG3	GGC CAA ACC ^P TCG GC ^P T TAC C ^P TG AAA T	H
NG-10-0070	PMOapn	EG3	GGC CAA ACC ^A TCG GC ^A T TAC C ^A TG AAA ^A T	H
NG-10-0095	PMOapn	EG3	GGC CAA ACC ^A TCG GC ^A T ^A TAC C ^A T G AAA ^A T	H
NG-10-0317	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	파네실
NG-10-0477	PMO triMe Gly	EG3	GGC CAA ACC FCG GCF TAC CFG AAA F	트리메틸글리신
NG-10-0133	PMOapn	OH	GGC C ^A AA ^A ACC ^A TCG GC ^A T ^A TAC C ^A TG AAA ^A T	H
NG-10-0387	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	2-OH, 디페닐아세트
NG-10-0104	PMOguan	EG3	GGC CAA ACC ^G TCG GC ^G T TAC C ^G T G AAA T	Δ ⁸
NG-10-0420	PMOplus 메틸	EG3	GGC CAA ACC ^m *TCG GC ^m *T TAC C ^m *TG AAA ^m *T	Trityl
NG-10-0065	PMOtri	EG3	GGC CAA ACC ^t TCG GC ^t T TAC C ^t T G AAA T	H
NG-10-	PMO-X	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	9-플루오렌- 카르복실 I

[0473]

NG	PMO-X Mo 변형	5'	서열	3'
0607				
NG-10-0060	PMOcp	EG3	GGC CAA ACC ^{CP} TCG GC ^{CP} T TAC C ^{CP} T G AAA T	H
NG-10-0162	PMO-COCH ₂ SH	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	COCH ₂ SH
NG-10-0328	디페닐아세틸	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	디페닐아세틸
NG-10-0134	PMOapnPMOtri	OH	GGC C ^A AA ^A ACC ^T TCG GC ^T T ^T TAC C ^T TG AAA ^T T	H
NG-10-0386	PMO	DPA	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	5'-디페닐아크,3'- 트리틸
NG-07-0064	PMO-3'-트리틸	H-Pip	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	트리틸
NG-10-0059	PMOcp	EG3	GGC CAA ACC ^{CP} TCG GC ^{CP} T ^{CP} TAC C ^{CP} T G AAA ^{CP} T	H
NG-10-0135	PMOtri	OH	GGC CAA ACC ^T TCG GC ^T T ^T TAC C ^T TG AAA ^T T	H
NG-10-0168	PMOapn PMOcys	OH	GGC CAA ACC ^A TCG GC ^A T ^A TAC C ^A TG AAA ^{SH} ^{CP} T	H
NG-10-0113	PMOapnPMOtri	OH	GGC CAA ACC ^A TCG GC ^T T ^T TAC C ^A TG AAA ^A T	H
NG-	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	디페닐포스포릴

[0474]

NG	PMO-X Mo 변형	5'	서열	3'
10-0385				
NG-10-0279	PMO	OH	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	게라닐
NG-10-0055	PMOplus <i>disp</i>	EG3	GGC C [*] AA [*] ACC [*] TCG GC [*] T TAC C [*] TG AAA T	H
NG-10-0105	PMOsucc	EG3	GGC CAA ACC [*] TCG GC [*] T TAC C [*] T G AAA T	Δ^5
NG-10-0805	PMO-X	EG3	GGC CAA ACC ^{Htpip} TCG GC ^{Htpip} T TAC C ^{Htpip} TG AAA ^{Htpip} T	H
NG-10-0811	PMO-X	EG3	GGC CAA ACC ^{pyrQMe} TCG GC ^{pyrQMe} T TAC C ^{pyrQMe} TG AAA ^{pyrQMe} T	H
NG-10-0057	PMOplus 3'- <i>pol</i>	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC C [*] TG [*] A [*] A [*] A T	H
NG-10-0625	PMO-X	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	5-카르복시- 플루오레세인
NG-10-0804	이량체	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	<i>이량체화</i>
NG-10-0066	PMOtri	EG3	GGC CAA ACC ^t TCG GC ^t T TAC C ^t T G AAA ^t T	H
NG-10-0280	PMO 디설파이드	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	COCH ₂ CH ₂ SSPy

[0475]

NG	PMO-X Mo 변형	5'	서열	3'
NG-10-0212	PMOapn	EG3	GGC CaAaA aACC aTCG GCaT aTaAC CaTG aAaAa aT	H
NG-10-0156	3'-MeO 트리틸	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	MeO-Tr
NG-10-0062	PMOhex	EG3	GGC CAA ACC ^h TCG GC ^h T TAC C ^h T G AAA ^h T	H
NG-11-0043	PMO-X	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	구아니디닐
NG-10-0206	PMOplus	EG3	GGC C+A+A +ACC +TCG GC+T +T+AC C+TG +A+A+A +T	H
NG-10-0383	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	트리페닐아세틸
NG-10-0325	트리페닐포스	OH	GGC CAA ACC FCG GCF TAC CFG AAA T	트리페닐포스
NG-10-0272	PMO-파네실	OH	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	파네실

* 이량체화는 두 개의 단량체의 3' 말단을 연결하는 결합에 의해 이량체화된다는 것을 나타낸다. 예를 들면, 결합은 $-COCH_2CH_2-S-CH(CONH_2)CH_2-CO-NHCH_2CH_2CO-$ 또는 임의의 다른 적절한 결합일 수 있다. EG3은 트리에틸렌 글리콜 테일을 나타낸다 (예를 들면, 실시예 30 및 31에서 접합체 참조).

11. 항균 적용

본 발명은 다른 실시형태에서 포유동물 숙주에서 박테리아 감염을 치료하는데 사용하기 위한 항균 안티센스 올리고머를 포함하는 접합체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 올리고머는 10-20 염기를 포함하며 또한 아실 캐리어 단백질(acpP), 기라제(gyrase) A 소단위 (gyrA), ftsZ, 리보솜 단백질 S10 (rpsJ), leuD, mgtC, pirG, pcaA, 및 cna1 유전자를 위한 감염성 균의 mRNA의 표적 영역에 상보적인 적어도 10개의 인접 염기의 표적 서열을 포함하며, 여기서 상기 표적 영역은 박테리아 mRNA의 번역시작 코돈, 또는 번역시작 코돈의 상류 (즉, 5') 또는 하류 (즉, 3') 방향으로 20 염기 내에 있는 서열을 포함하며, 또한 상기 올리고머는 mRNA에 결합하여 헤테로듀플렉스를 형성하며, 그리하여 박테리아의 복제를 억제한다.

12. 핵 호르몬 수용체의 조절

또 다른 실시형태에서, 본 발명은, 주로 수용체를 코드화하는 프리-mRNA의 스플라이싱을 조절하거나 또는 변형 시킴으로써, 핵 호르몬 수용체 슈퍼 패밀리 (NHRSF)로부터 핵 호르몬 수용체 (NHR)의 발현을 조절하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 특수한 NHR의 예는 글루코코르티코이드 수용체 (GR), 프로게스테론 수용체(PR) 및 안드로젠 수용체 (AR)을 포함한다. 특정의 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 접합체는 수용체의 리간드 독립적 또는 다른 선택된 형태의 증가된 발현 및 비활성 형태의 감소된 발현을 유도한다.

본 발명의 실시형태는 올리고머를 포함하는 접합체, 예를 들면, 본 명세서에 기술된 다른 NHR-영역 중에서, NHRSF 프리-mRNA의 "리간드-결합 엑손" 및/또는 인접한 인트론을 포함하는 NHR의 선택된 엑손 또는 인트론 서열에 상보적인 올리고머를 포함하는 접합체를 포함한다. 용어 "리간드-결합 엑손"은 야생형 mRNA에 존재하지만,

일차 전사물("프리-mRNA")로부터 제거하여 mRNA의 리간드 독립 형태를 만든다. 특정의 실시형태에서, 상보성은 스플라이스 부위를 스패닝하는 프리-mRNA의 서열내의 서열을 기본으로 할 수 있으며, 이것은 엑손-인트론 교차 점을 스패닝하는 서열을 기본으로 하는 상보성을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 다른 실시형태에서, 상보성은 단지 인트론의 서열을 기본으로 할 수 있다. 다른 실시형태에서, 상보성은 단지 엑손의 서열을 기본으로 할 수 있다 (예를 들면, 여기서 참고로 인용되는 미국출원 제13/046,356호 참조).

[0483] NHR 조절체는 유전자 전사가 NHR에 의해 자극되거나 억제되는 유전자의 발현 생성물과 관련된 질환을 포함하는, NHR-관련 질환을 치료하는데 유용할 수 있다. 예를 들면, AP-1 및/또는 NF- κ B를 억제하는 NHR의 조절체는, 본 명세서에서 기술되고 또한 당해 분야에 알려진 다른 것들 중에서, 염증성 및 면역 질환 및 장애 예를 들어 골관절염, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 천식, 염증성 장질환, 이식거부 및 이식 편대 숙주병을 치료하는데 유용할 수 있다. 트랜스활성화를 길항하는 화합물은 다른 것들 중에서, 당뇨병, 골다공증 및 녹내장과 같은 글루코코르티코이드의 증가된 농도와 관련된 대사성 질환을 치료하는데 유용할 수 있다. 또한, 트랜스활성화를 길항하는 화합물은 아디슨 병 및 기타와 같은 글루코코르티코이드의 결핍과 관련된 대사성 질환을 치료하는데 유용할 수 있다.

[0484] 본 발명의 실시형태는 인접한 소단위의 5' 엑소사이클릭 탄소에 하나의 소단위의 모르폴리노 질소를 결합하는 인-함유 소단위간 결합에 의해 연결된 모르폴리노 소단위로 구성된 안티센스 올리고머 및 캐리어 단백질을 포함하는 접합체로 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 세포의 핵 NHR 활성 또는 발현을 조절하는 방법을 포함하며, 여기서 상기 올리고뉴클레오타이드는 표적 서열에 상보적인 적어도 10개 인접 염기의 표적 서열 미치 10-40 염기를 함유하며, 또한 상기 표적 서열은 NHR의 프리-mRNA 전사물이며, 그리하여 NHR의 활성 또는 발현을 조절한다. 특정의 실시형태에서, 상기 올리고머는 프리-mRNA 전사물의 스플라이싱을 변화시키며 또한 NHR의 변이체의 발현을 증가시킨다. 일부 실시형태에서, 상기 올리고머는 프리-mRNA 전사물의 하나 이상의 엑손의 전체적 또는 부분적 엑손 스킵핑을 유도한다. 특정의 실시형태에서, 상기 하나 이상의 엑손은 NHR의 리간드 결합 도메인의 적어도 일부를 코드화하며 또한 상기 변이체는 NHR의 리간드 독립형태이다. 특정의 실시형태에서, 상기 하나 이상의 엑손은 NHR의 트랜스 활성화 도메인의 적어도 일부를 코드화하며 또한 상기 변이체는 감소된 전사 활성화를 갖는다. 특정의 실시형태에서, 상기 하나 이상의 엑손은 NHR의 DNA-결합 도메인의 적어도 일부를 코드화한다. 특정의 실시형태에서, 상기 하나 이상의 엑손은 NHR의 N-말단 활성화 도메인의 적어도 일부를 코드화한다. 특정의 실시형태에서, 상기 하나 이상의 엑손은 NHR의 카르복시-말단 도메인의 적어도 일부를 코드화한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 변이체는 NF-KB, AP-1, 또는 이들 둘 다에 결합하며 또한 이들의 프로-염증성 표적 유전자의 하나 이상의 전사를 감소시킨다.

[0485] 특정의 실시형태에서, 상기 올리고머는 NHR의 트랜스활성화 전사활성을 자극한다. 다른 실시형태에서, 상기 올리고머는 NHR의 트랜스활성화 전사활성을 길항한다. 특정의 실시형태에서, 상기 올리고머는 NHR의 트랜스 억제 활성을 자극한다. 다른 실시형태에서, 상기 올리고머는 NHR의 트랜스 억제활성을 길항한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 올리고머는 NHR의 트랜스활성화 전사 활성을 길항하며 또한 NHR의 트랜스억제 활성을 자극한다 (예를 들면, 여기서 참고로 인용되는 미국특허출원 제 61/313,652호 참조),

[0486] 실시예

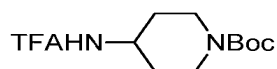
[0487] 별도의 지시가 없는 한, 모든 화합물질은 시그마-알드리치-플루카(Sigma-Aldrich-Fluka)로부터 입수하였다. 벤조일 아데노신, 벤조일 시티딘 및 페닐아세틸 구아노신은 영국 Carbosynth Limited로부터 입수하였다.

[0488] 본 명세서에 기술된 바와 같은 추가의 결합 변형을 포함하는 PMO, PMO+, PPMO 및 PMO의 합성은 당해 분야에 공지되고 계류중인 미국특허출원 제12/271,036호 및 제12/271,040호 및 PCT 국제공보 WO/2009/064471호에 기술된 방법들을 사용하여 수행하였으며, 이들 특허는 본 명세서에서 전부 참고로 인용된다.

[0489] 3' 트리틸 변형을 갖는 PMO는 탈트리틸화 단계가 생략되는 것을 제외하고는 실질적으로 PCT 공개공보 WO/2009/064471호에 기술된 바와 같이 합성하였다.

[0490] 실시예 1.

[0491] *tert*-부틸 4-(2,2,2-트리플루오로아세트아미도)피페리딘-1-카복실레이트

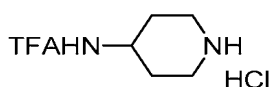


[0492]

[0493] DCM (250 mL) 중에 *tert*-부틸 4-아미노피페리딘-1-카복실레이트 (48.7 g, 0.243 mol) 및 DIPEA (130 mL, 0.749 mol)의 현탁액에 교반하면서 에틸 트리플루오로아세테이트(35.6 mL, 0.300 mol)를 첨가하였다. 20 시간 후에, 용액을 시트르산 용액 (200 mL x 3, 10 % w/v aq) 및 중탄산 나트륨 용액(200 mL x 3, 농축 수성)으로 세척하고, 건조시키고(MgSO₄), 실리카(24 g)를 통하여 여과시켰다. 실리카를 DCM으로 세척하고 결합된 용출물을 부분적으로 농축하고(100 mL), 다음 단계에서 직접 사용하였다. APCI/MS 계산치 C₁₂H₁₉F₃N₂O₃ 296.1, 실측치 *m/z* = 294.9 (M-1).

[0494] 실시예 2

[0495] 2,2,2-트리플루오로-N-(피페리딘-4-일)아세트아미드 하이드로클로라이드

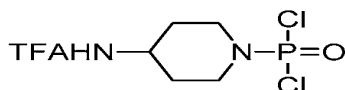


[0496]

[0497] 실시예 1의 표제 화합물(100 mL)의 교반 DCM 용액에 1,4-디옥산 (4 M)중에 염화수소 용액 (250 mL, 1.0 mol)을 적가하였다. 6시간 동안 교반을 계속한 다음, 현탁액을 여과하고, 고체를 디에틸 에테르 (500 mL)로 세척하여 백색 고체로서 표제 화합물 (54.2 g, 96% 수율)을 제공하였다. APCI/MS 계산치 C₇H₁₁F₃N₂O 196.1, 실측치 *m/z* = 196.9 (M+1).

[0498] 실시예 3

[0499] (4-(2,2,2-트리플루오로아세트아미도)피페리딘-1-일)포스포닉 디클로라이드

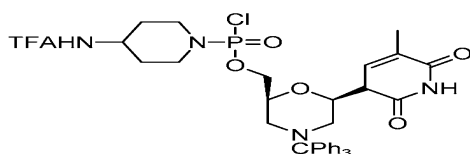


[0500]

[0501] DCM (250 mL) 중에 실시예 2의 화합물 (54.2 g, 0.233 mol)의 냉각 (빙/수욕) 현탁액에 옥시염화인(23.9 mL, 0.256 mol) 및 DIPEA (121.7 mL, 0.699 mol)을 적가하고 교반하였다. 15 분후에, 욱을 제거하고 혼합물을 계속 교반하여 실온으로 가온시켰다. 1 시간 후에, 혼합물을 부분적으로 농축시키고(100 mL), 현탁액을 여과하고 고체를 디에틸 에테르로 세척하여 백색 고체로 표제 화합물 (43.8 g, 수율 60%)을 생성시켰다. 용출물을 부분적으로 농축시키고(100 mL), 수득된 현탁액을 여과시키고, 고체를 디에틸 에테르로 세척하여 추가적인 표제 화합물 (6.5 g, 수율 9%)을 생성시켰다. ESI/MS 계산치: 1-(4-니트로페닐)피레라진 유도체 C₁₇H₂₂ClF₃N₅O₄P 483.1, 실측치 *m/z* = 482.1 (M-1).

[0502] 실시예 4

[0503] ((2S,6S)-6-((R)-5-메틸-2,6-디옥소-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘-3-일)-4-트리틸모르폴린-2-일)메틸(4-(2,2,2-트리플루오로아세트아미도)피페리딘-1-일)포스포노클로라이드



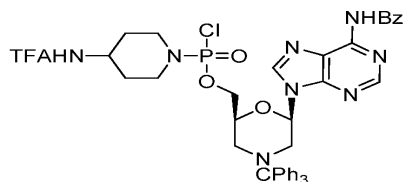
[0504]

[0505] DCM (100 mL) 중에 실시예 3의 표제 화합물 (29.2 g, 93.3 mmol)의 교반된, 냉각된 (빙/수욕) 용액에 Mo(Tr)T # (22.6 g, 46.7 mmol), 2,6-루티딘 (21.7 mL, 187 mmol), 및 4-(디메틸아미노)피리딘(1.14 g, 9.33 mmol)의 DCM 용액 (100 mL)을 10분에 걸쳐 적가하였다. 욱은 실온으로 가온시켰다. 15 시간 후에, 용액을 시트르산 용액

(200 mL x 3, 10 % w/v aq)으로 세척하고, 건조하고 (MgSO₄), 농축시킨 다음 조 오일을 칼럼상에 직접 부하 (load)시켰다. 크로마토그래피 [SiO₂ 칼럼 (120 g), 헥산/EtOAc 용출물 (구배 1:1 내지 0:1), 반복 x 3] 분획을 농축시켜 백색 고체로서 표제 화합물 (27.2 g, 수율 77%)을 생성시켰다. ESI/MS 계산치: 1-(4-니트로페닐)피페라진 유도체 C₄₆H₅₀F₃N₈O₈P 930.3, 실측치 m/z = 929.5 (M-1).

[0506] 실시예 5

[0507] ((2S,6R)-6-(6-벤즈아미도-9H-퓨린-9-일)-4-트리틸모르폴린-2-일)메틸(4-(2,2,2-트리플루오로아세트아미도)피페리딘-1-일)포스포노클로리데이트

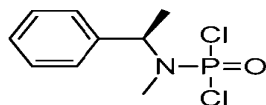


[0508]

[0509] 표제 화합물은 실시예 4에 기술된 것과 유사한 방법으로 합성하여 백색 고체로서 표제 화합물(15.4 g, 수율 66%)을 제공하였다. ESI/MS 계산치: 1-(4-니트로페닐)피페라진 유도체 C₅₃H₅₃F₃N₁₁O₇P 1043.4, 실측치 m/z = 1042.5 (M-1).

[0510] 실시예 6

[0511] (R)-메틸(1-페닐에틸)포스포르아미딕 디클로라이드

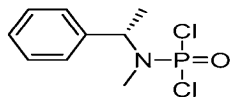


[0512]

[0513] DCM (30 mL) 중에 옥시염화인 (2.83 mL, 30.3 mmol)의 냉각된 (빙/수욕) 용액에 교반하면서 2,6-루티딘 (7.06 mL, 60.6 mmol) 및 (R)-(+)-N,a-디메틸벤질아민(3.73 g, 27.6 mmol)의 DCM 용액을 연속적으로 적가하였다. 5분 후에, 욕을 제거하고 반응 혼합물을 실온으로 가온시켰다. 1시간 후에, 반응 용액을 시트르산 용액 (50 mL x 3, 10 % w/v aq)으로 세척하고, 건조시키고(MgSO₄), SiO₂를 통해 여과시키고 농축시켜 백색 거품으로서 표제 화합물(3.80 g)을 제공하였다. ESI/MS 계산치 1-(4-니트로페닐)피페라진 유도체 C₁₉H₂₅N₄O₄P 404.2, 실측치 m/z = 403.1 (M-1).

[0514] 실시예 7

[0515] (S)-메틸(1-페닐에틸)포스포르아미딕 디클로라이드

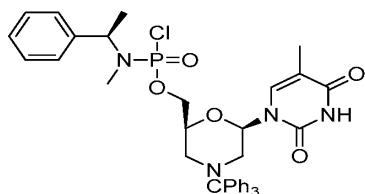


[0516]

[0517] 표제 화합물은 실시예 6에 기술된 것과 유사한 방법으로 합성하여 백색 거품으로서 표제 화합물(3.95 g)을 제공하였다. ESI/MS 계산치 1-(4-니트로페닐)피페라진 유도체 C₁₉H₂₅N₄O₄P 404.2, 실측치 m/z = 403.1 (M-1).

[0518] 실시예 8

[0519] ((2S,6R)-6-(5-메틸-2,4-디옥소-3,4-디하이드로피리미딘-1(2H)-일)-4-트리틸모르폴린-2-일)메틸메틸((R)-1-페닐에틸)포스포르아미도클로리데이트



[0520]

[0521]

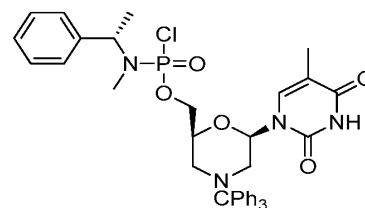
표제 화합물은 실시예 4에 기술된 것과 유사한 방법으로 합성하여 백색 고체로서 표제 클로로포스포로아미데이트 (4.46 g, 수율 28%)를 제공하였다. ESI/MS 계산치 $C_{38}H_{40}ClN_4O_5P$ 698.2, 실측치 $m/z = 697.3$ (M-1).

[0522]

실시예 9

[0523]

((2S,6R)-6-(5-메틸-2,4-디옥소-3,4-디하이드로피리딘-1(2H)-일)-4-트리틸모르폴린-2-일)메틸 메틸((S)-1-페닐 에틸)포스포로아미도클로리데이트



[0524]

[0525]

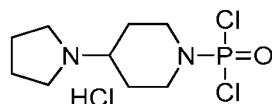
표제 화합물은 실시예 4에 기술된 것과 유사한 방법으로 합성하여 백색 고체로서 표제 클로로포스포로아미데이트 (4.65 g, 수율 23%)를 제공하였다. ESI/MS 계산치: $C_{38}H_{40}ClN_4O_5P$ 698.2, 실측치 $m/z = 697.3$ (M-1).

[0526]

실시예 10

[0527]

(4-(피롤리딘-1-일)피페리딘-1-일)포스포닉디클로라이드 하이드로클로라이드



[0528]

[0529]

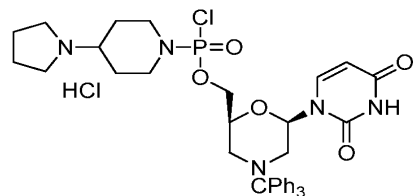
DCM (30 mL) 중에 옥시염화인 (5.70 mL, 55.6 mmol)의 냉각된 (빙/수욕) 용액에 2,6-루티딘 (19.4 mL, 167 mmol) 및 4-(1-피롤리디닐)-피페리딘 (8.58 g, 55.6 mmol)의 DCM 용액 (30 mL)을 첨가하고 1 시간 동안 교반하였다. 현탁액은 여과하고 고체를 과량의 디에틸 에테르로 세척하여 백색 고체로서 표제 피롤리딘 (17.7 g, 수율 91%)을 제공하였다. ESI/MS 계산치 1-(4-니트로페닐)피페라진 유도체 $C_{19}H_{30}N_5O_4P$ 423.2, 실측치 $m/z = 422.2$ (M-1).

[0530]

실시예 11

[0531]

((2S,6R)-6-(5-메틸-2,4-디옥소-3,4-디하이드록시피리미딘-1(2H)-일)-4-트리틸모르폴린-2-일)메틸(4-(피롤리딘-1-일)피페리딘-1-일)포스포노클로리데이트 하이드로클로라이드



[0532]

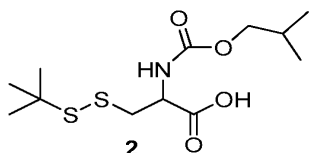
[0533]

DCM (100 mL) 중에 디클로로포스포로아미데이트 8 (17.7 g, 50.6 mmol)의 교반된, 냉각된 (빙/수욕) 용액에 Mo(Tr)T # (24.5 g, 50.6 mmol)의 DCM 용액 (100 mL), 2,6-루티딘 (17.7 mL, 152 mmol), 및 1-메틸이미다졸 (0.401 mL, 5.06 mmol)을 10 분에 걸쳐 적가하였다. 용을 실온으로 가온시키고 현탁액을 교반하였다. 6 시간 후

에, 현탁액은 디에틸에테르(1 L)에 붓고, 15 분간 교반하고, 여과하고 고체를 추가의 에탄올로 세척하여 백색 고체 (45.4 g)를 제공하였다. 조생성물을 크로마토그래피(SiO_2 칼럼 (120 gram), DCM/MeOH 용출물(구배 1:0 내지 6:4))로 정제하고 결합된 분획을 디에틸 에테르(2.5 L)에 붓고, 15 분간 교반하고, 수득된 고체를 추가의 에테르로 세척하여 백색 고체로서 표제 화합물 (23.1 g, 수율 60 %)을 제공하였다. ESI/MS 계산치 1-(4-니트로페닐)피페라진 유도체 $\text{C}_{48}\text{H}_{57}\text{N}_8\text{O}_7\text{P}$ 888.4, 실측치 $m/z = 887.6$ (M-1).

[0534] 실시예 12

[0535] 3-(tert-부틸디설파닐)-2-(이소부톡시카르보닐아미노)프로파노익산

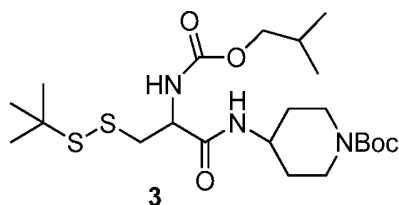


[0536]

[0537] CH_3CN (40mL) 중 *S*-tert-부틸메르캅토-L-시스테인(10g, 47.8mmol)에 H_2O (20mL) 중 K_2CO_3 (16.5g, 119.5mmol)를 첨가하였다. 15 분간 교반한 후에, 이소-부틸클로로포르메이트(9.4mL, 72mmol)를 서서히 주입하였다. 반응은 3 시간 동안 수행하였다. 백색 고체는 셀라이트를 통해 여과하고, 여과물은 농축시켜 CH_3CN 를 제거하였다. 잔사를 에틸 아세테이트(200mL)중에 용해하고, 1N HCl (40mL X 3), 염수 (40 X 1)로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조시켰다, 원하는 생성물(**2**)은 크로마토그래피 (5% MeOH/DCM) 후에 얻었다.

[0538] 실시예 13

[0539] tert-부틸 4-(3-(tert-부틸디설파닐)-2-(이소부톡시카르보닐아미노)프로판아미도)피페리딘-1-카르복실레이트

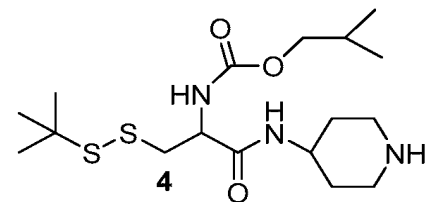


[0540]

[0541] DMF (50mL) 중 산 (실시예 12로부터 화합물 **2**, 6.98g, 22.6mmol)에 HATU (8.58g, 22.6mmol)를 첨가하였다. 30 분후에, Hunig 염기(4.71mL, 27.1mmol) 및 1-Boc-4-아미노 피페리딘(5.43g, 27.1mmol)을 혼합물에 첨가하였다. 반응은 RT에서 3시간 더 계속 교반하였다. DMF을 높은 진공하에 제거하였다. 조 잔사를 EtAc (300mL) 중에 용해하고, H_2O (50mL X 3)로 세척하였다. 최종 생성물 (**3**)을 ISCO 정제 (5% MeOH/DCM) 후에 얻었다.

[0542] 실시예 14

[0543] 이소부틸 3-(tert-부틸디설파닐)-1-옥소-1-(피페리딘-4-일아미노)프로판-2-일카르바메이트

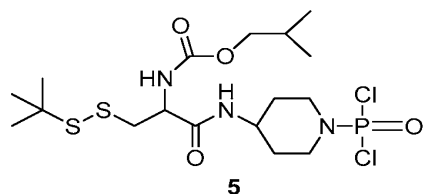


[0544]

[0545] 실시예 13에서 제조된 화합물 **3** (7.085g, 18.12mmol)에 30mL의 4M HCl/디옥산을 첨가하였다. 반응은 실온에서 2 시간 후에 완료하였다. HCl 염 (**4**)은 추가의 정제 없이 다음 단계를 위해 사용하였다.

[0546] 실시예 15

[0547] 이소부틸 3-(tert-부틸디설파닐)-1-(1-(1-(디클로로포스포릴)피페리딘-4-일아미노)-1-옥소프로판-2-일카르바메이트

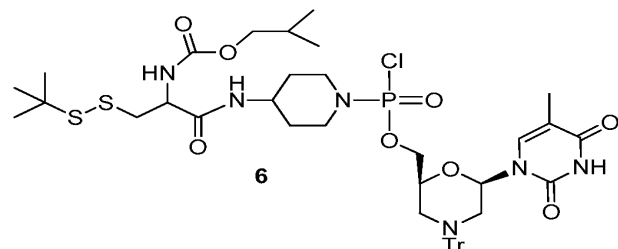


[0548]

[0549] DCM (200ml) 중 실시예 15에서 제조된 화합물 **4** (7.746g, 18.12mmol)에 -78℃에서 아르곤 하에 POCl₃ (1.69ml, 18.12mmol)을 서서히 주입한 다음, Et₃N (7.58ml, 54.36mmol)을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 5 시간 동안 교반하고, 농축시켜 과량의 염기 및 용매를 제거하였다. 생성물(**5**)를 ISCO 정제(50% EtAc/헥산) 후에 제공하였다.

[0550] 실시예 16

[0551] 이소부틸 3-(tert-부틸디설파닐)-1-(1-(1-(클로로(((2S,6R)-6-(5-메틸-2,4-디옥소-3,4-디하이드로피리미딘-1(2H)-일)-4-트리틸모르폴린-2-일)메톡시)포스포릴)피페리딘-4-일아미노)-1-옥소프로판-2-일카르바메이트

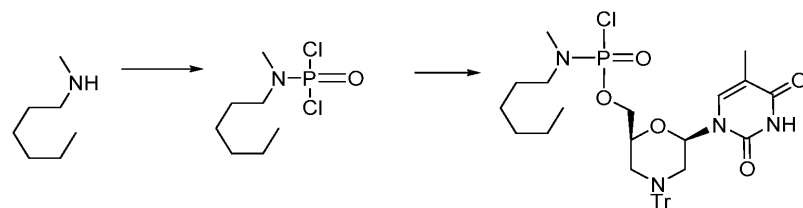


[0552]

[0553] DCM (100ml) 중 1-((2R,6S)-6-(하이드록시메틸)-4-트리틸모르폴린-2-일)-5-메틸피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (moT(Tr)) (5.576g, 10.98mmol)에 0℃에서 루티딘 (1.92ml, 16.47mmol) 및 DMAP (669mg, 5.5mmol)를 첨가한 다음, **4** (6.13g, 12.08mmol)를 첨가하였다. 반응물을 실온에서 18 시간 동안 교반시켰다. 원하는 생성물(**6**)을 ISCO 정제(50% EtAc/헥산) 후에 얻었다.

[0554] 실시예 17

[0555] ((2S,6R)-6-(5-메틸-2,4-디옥소-3,4-디하이드로피리미딘-1(2H)-일)-4-트리틸모르폴린-2-일)메틸 헥실 (메틸)포스포르아미도클로리데이트



[0556]

[0557] N-하이드록시메틸아민(4.85ml, 32mmol)의 DCM (80ml) 용액에 -78℃에서 N₂ 하에 냉각하였다. DCM (10ml)중 염화 포스포릴(2.98ml, 32mmol)의 용액을 서서히 첨가한 다음 DCM (10ml) 중 Et₃N (4.46ml, 32mmol)의 용액을 첨가하였다. 교반을 계속하면서, 반응물을 하룻밤 실온까지 가온시킨다. 원하는 생성물(**1**)은 ISCO 정제 (20% EtAc/헥산) 후에 투명한 오일로서 얻어졌다.

[0558] DCM (100ml)중 moT(Tr) (5.10g, 10.54mmol)에 0℃에서 루티딘(3.68ml, 31.6mmol) 및 DMAP (642mg, 5.27mmol)을 첨가한 다음, **1** (4.89g, 21.08mmol)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 18 시간 동안 교반시켰다. 원하는 생성물(**2**)은 ISCO 정제 (50% EtOAc/헥산) 후에 얻어졌다.

[0559] 실시예 18

[0560] ((2S,6R)-6-(5-메틸-2,4-디옥소-3,4-디하이드로피리미딘-1(2H)-일)-4-트리틸모르폴린-2-일)메틸 도데실(메틸)포스포라미도클로리데이트

[0561]

[0562] 표제 화합물은 실시예 6 및 8에 기술된 일반적 절차에 따라 제조하였다.

[0563] 실시예 19

[0564] ((2S,6R)-6-(5-메틸-2,4-디옥소-3,4-디하이드로피리미딘-1(2H)-일)-4-트리틸모르폴린-2-일)메틸 모르폴리노포스포노클로리데이트

[0565]

[0566] 표제 화합물은 실시예 6 및 8에 기술된 일반적 절차에 따라 제조하였다.

[0567] 실시예 20

[0568] ((2S,6R)-6-(5-메틸-2,4-디옥소-3,4-디하이드로피리미딘-1(2H)-일)-4-트리틸모르폴린-2-일)메틸 (S)-2-(메톡시메틸)피롤리딘-1-일포스포노클로리데이트

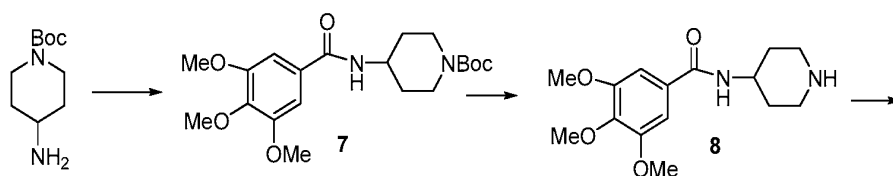
[0569]

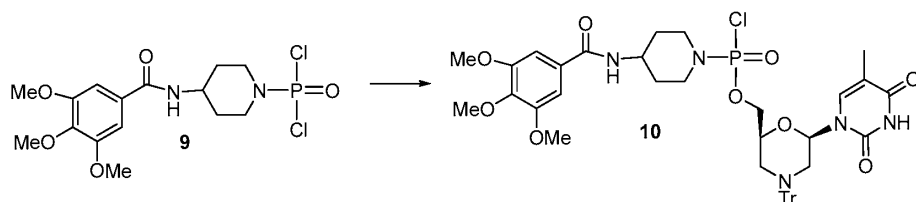
[0570] 표제 화합물은 실시예 6 및 8에 기술된 일반적 절차에 따라 제조하였다.

[0571] 실시예 21

[0572] ((2S,6R)-6-(5-메틸-2,4-디옥소-3,4-디하이드로피리미딘-1(2H)-일)-4-트리틸모르폴린-2-일)메틸 4-(3,4,5-트리메톡시벤즈아미도)피페리딘-1-일포스포노클로리데이트

[0573]





[0574]

[0575]

DCM (20ml) 중 1-Boc-4-피페리딘(1g, 5mmol)에 Hunig 염기(1.74ml, 10mmol)를 가한 다음, 3,4,5-트리메톡시벤조일 클로라이드(1.38g, 6mmol)를 첨가하였다. 반응물은 실온에서 3 시간 동안 수행하고 농축시켜 용매 및 과량의 염기를 제거하였다. 잔사를 EtAc (100ml)중에 용해하고, 0.05N HCl (3 X 15ml), 포화 NaHCO_3 (2 X 15ml)로 세척하고 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 생성물(1)은 ISCO 정제 (5% MeOH/DCM) 후에 얻었다.

[0576]

7에 15ml의 4N HCl/디옥산을 첨가하고, 반응은 4 시간 후에 정지시켰다. 8을 백색 고체로서 얻었다.

[0577]

8 (1.23g, 4.18mmol)의 DCM (20ml) 용액을 N_2 하에 -78°C 로 냉각시켰다. 염화 포스포릴 (0.39ml, 4.18mmol)의 용액에 이어서 DCM (2ml) 중 Et_3N (0.583ml, 4.18mmol)의 용액을 서서히 첨가하였다. 교반을 계속하면서, 반응물을 하룻밤 실온까지 가온시켰다. 원하는 생성물(9)은 ISCO 정제(50% EtAc/헥산)후에 얻었다.

[0578]

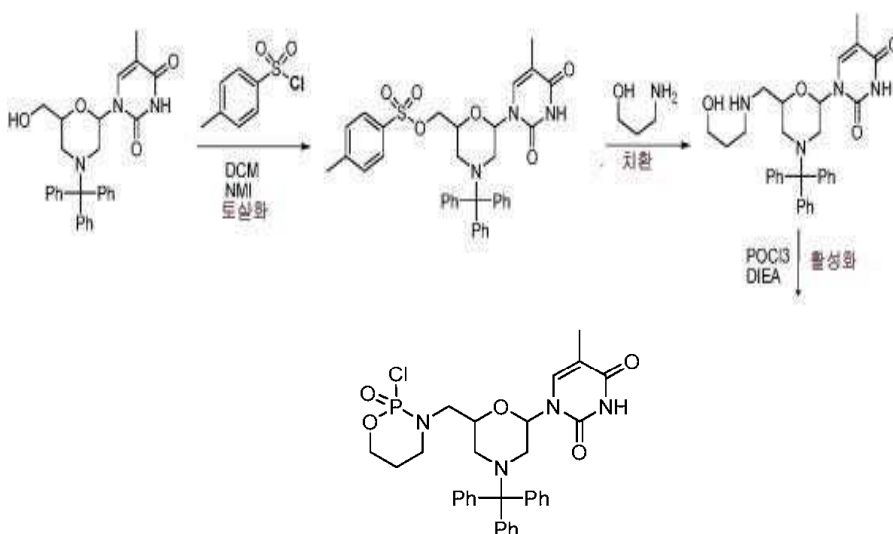
DCM (20ml) 중 moT(Tr) (1.933g, 4.0mmol)에 0°C 에서 루티딘(0.93ml, 8mmol) 및 DMAP (49mg, 0.4mmol)을 첨가한 다음, 9 (1.647g, 4mmol)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 하룻밤 교반하면서 유지시켰다. 원하는 생성물(10)은 ISCO 정제(50% EtAc/헥산) 후에 얻었다.

[0579]

실시예 22

[0580]

사이클로포스포라미드 함유 소단위($^{\text{CP}}$ T)의 합성



[0581]

[0582]

moT 소단위(25 g)는 DCM (175 ml)중에 현탁시키고 NMI (N-메틸이미다졸, 5.94 g, 1.4 당량)을 첨가하여 투명한 용액을 얻었다. 염화토실을 반응 혼합물에 첨가하고 반응 진행을 (약 1 시간) 수행될 때까지 TCL로 모니터링하였다. 수성 워크업(workup)은 0.5 M 시트르산 완충액 (pH=5)에 이어 염수로 세척하였다. 유기층을 분리하고 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 용매는 회전 증발기로 제거하여 조생성물을 얻고 추가의 정제 없이 다음 단계를 위해 사용하였다.

[0583]

상기 제조된 moT 토실레이트는 프로판올아민(1g/10 ml)과 혼합하였다. 이어서 반응 혼합물은 45°C 에서 오븐 속에 하룻밤 넣은 다음 DCM (10 ml)로 희석시켰다. 수성 워크업은 0.5 M 시트르산 완충액(pH=5)에 이어서 염수로 세척하여 수행하였다. 유기층을 분리하고 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 용매는 회전 증발기로 제거하여 조 생성물을 얻었다. 조생성물은 NMR 및 HPLC로 분석 및 측정하여 추가의 정제 없이 다음 단계를 위해 준비하였다.

[0584]

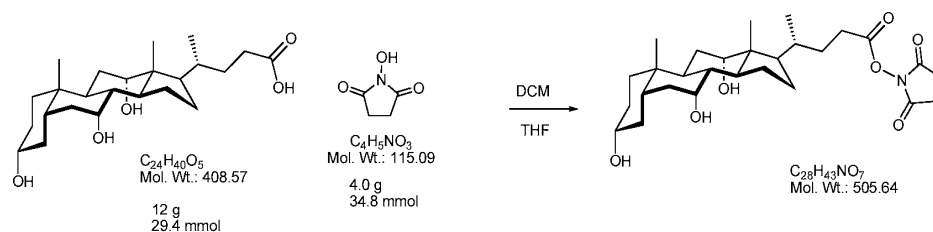
조생성물은 DCM (2.5 ml DCM/g, 1 당량)중에 용해하고 DIEA (3 당량)로 혼합하였다. 이 용액은 드라이 아이스-

아세톤으로 냉각시키고 POCl_3 를 적가하였다 (1.5 당량). 수득된 혼합물은 실온에서 하룻밤 교반하였다. 수성 위크업은 0.5 M 시트르산 완충액 (pH=5)에 이어서 염수로 세척하여 수행하였다. 유기 층을 분리하고 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 용매를 회전증발기로 제거하여 황색 고체로서 생성물을 얻었다. 조생성물은 실리카 겔 크로마토그래피 (조생성물/실리카=1 대 5 비, 구배 DCM 내지 50% EA/DCM)로 정제하고, 분획을 TLC 분석에 따라 풀링(pool)하였다. 용매를 제거하여 부분입체이성체의 혼합물로서 원하는 생성물을 얻었다. 정제된 생성물을 HPLC (NPP 원치) 및 NMR (^1H -1 및 P-31)로 분석하였다.

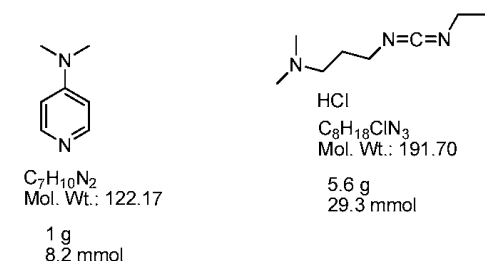
[0585] 부분입체 이성체 혼합물은 다음과 같은 절차에 따라 분석하였다. 혼합물(2.6 g)은 DCM 중에 용해하였다. 이러한 샘플을 RediSepRf 칼럼 (80 g 정규상, Teledyne Isco에서 제조)로 부하시키고 10% EA/DCM 내지 50% EA/DCM로 20 분에 걸쳐 용출시켰다. 분획을 수집하고 TLC로 분석하였다. 분획을 TLC 분석에 따라 모으고 용매를 실온에서 회전증발기로 제거하였다. 모아진 분획의 부분입체 이성체 비는 P-31 NMR 및 NPP-TFA 분석에 의해 측정하였다. 필요에 따라, 상기 절차는 부분입체 이성체 비가 97%에 도달할 때까지 반복하였다.

[0586] 실시예 23

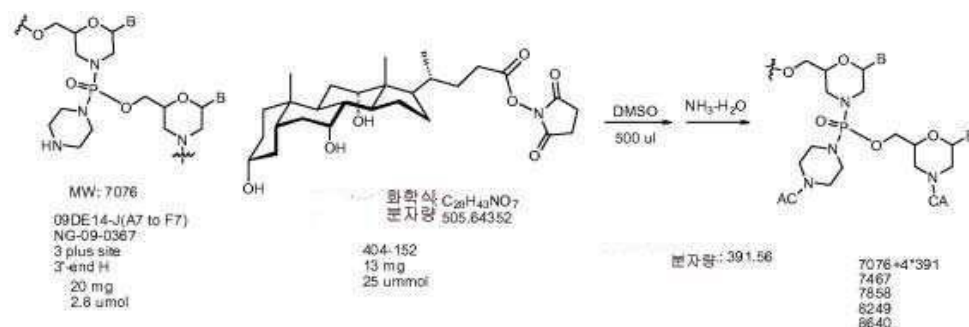
[0587] PMOplus의 글로벌 콜산 (global cholic acid)



[0588]



[0589]



[0590]

[0591] 숙신이미드 활성화 콜산 유도체는 다음과 같은 절차에 따라 제조하였다. 콜산(12 g, 29.4 mmol), N-하이드록시숙신이미드(4.0 g, 34.8 mmol), EDCI (5.6 g, 29.3 mmol), 및 DMAP (1 g, 8.2 mmol)는 둥근 바닥 플라스크에 충전하였다. DCM (400 ml) 및 THF (40 ml)을 첨가하여 용해시켰다. 반응 혼합물은 실온에서 하룻밤 교반시켰다. 이어서 물 (400 ml)을 반응 혼합물에 첨가하고, 유기층을 분리하고 물(2X 400 ml)로 세척한 다음, 포화 NaHCO_3 (300 ml) 및 염수 (300 ml)로 세척하였다. 이어서 유기층을 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 용매를 회전 증발기로 제거하여 백색 고체를 얻었다. 조생성물을 클로로포름(100 ml)중에 용해하고 헵탄(1000 ml)중에 침전시켰다. 고체를 여과 수집하고, HPLC 및 NMR로 분석하고 추가의 정제 없이 사용하였다.

[0592] 적절한 양의 PMOplus (20 mg, 2.8 μmol)는 바이알(4 ml)로 증량하고 DMSO (500 ul)중에 용해시켰다. 활성화 콜레이트 에스테르(13 mg, 25 μmol)는 변형 상태마다 2 당량의 활성화 에스테르의 비에 따라 반응 혼합물에 첨가

한 다음, 실온에서 하룻밤 교반시켰다. 반응 진행은 MALDI 및 HPLC (C-18 또는 SAX)에 따라 결정하였다.

[0593] 반응이 (출발 PMOplus의 소실에 의해 결정된 바와 같이) 완료한 후에, 1ml의 농축 암모니아는 반응이 완료되면 반응혼합물에 첨가하였다. 이어서 반응 바이알은 오븐 (45℃) 속에 하룻밤 (18시간) 넣은 다음, 실온으로 냉각하고 물 (10 ml)속에 1% 암모니아로 희석시켰다. 이러한 샘플을 SPE 칼럼 (2 cm)상에 부하하고 바이알을 1% 암모니아 용액(2X 2ml)으로 행구었다. SPE 칼럼을 물 (3X 6ml) 속에 1% 암모니아로 세척하고, 생성물을 물(6 ml) 속에 1% 암모니아 중 45% 아세트니트릴로 용출시켰다. 올리고머를 함유하는 분획을 UV 광밀도 측정에 의해 동정하였다. 생성물은 동결건조로 분리하였다. 순도 및 동일성은 MALDI 및 HPLC (C-18 및/또는 SAX)에 의해 결정하였다.

[0594] 이러한 동일 절차는 데옥시콜산 활성화 및 PMO⁺에 대한 접합에 적용할 수 있다.

[0595] 실시예 24

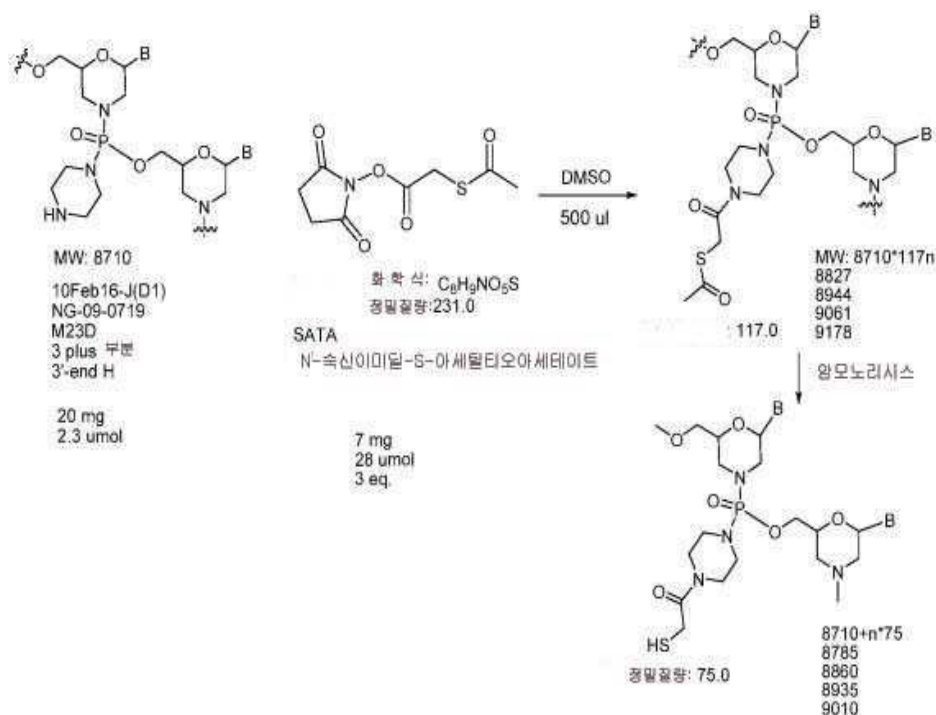
[0596] PMOplus의 글로벌 구아니디닐화

[0597] 적절한 양의 PMOplus (25 mg, 2.8 μmol)를 바이알(6 ml) 내에서 증량하였다. 1H-피로졸-1-카르복사미드 클로라이드 (15 mg, 102 μmol) 및 탄산칼륨(20 mg, 0.15 mmol)을 바이알에 첨가하였다. 물을 첨가하고(500 ul), 반응 혼합물을 실온에서 하룻밤 교반하였다(약 18 시간). 반응 완료는 MALDI로 결정하였다.

[0598] 반응이 완료되면, 반응물은 물 (10 ml) 속에 1% 암모니아로 희석하고 SPE 칼럼(2 cm)상에 부하시켰다. 바이알을 1% 암모니아 용액(2X 2ml)으로 행구고, SPE 칼럼을 물(3X 6ml)중 1% 암모니아로 세척하였다. 생성물은 물 (6ml)중 1% 암모니아 중 45% 아세트니트릴로 용출시켰다. 올리고머를 함유하는 분획을 UV 광밀도 측정에 의해 확인하였다. 생성물은 동결건조에 의해 분리하였다. 순도 및 동일성은 MALDI 및 HPLC (C-18 및/또는 SAX)로 측정하였다.

[0599] 실시예 25

[0600] PMOplus (M23D)의 글로벌 티오아세틸 변형



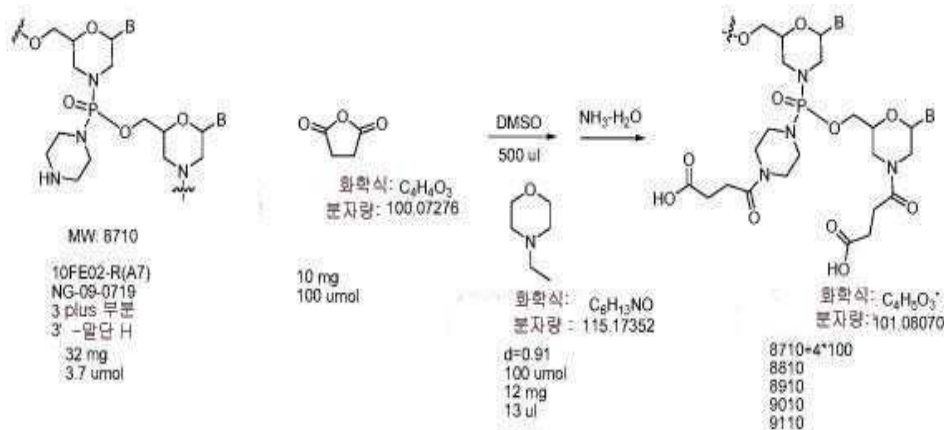
[0601]

[0602] 적절한 양의 PMOplus (20 mg, 2.3 μmol)를 바이알(4 ml)에 증량하고 DMSO (500 ul)중에 용해시켰다. N-숙신이미딜-S-아세틸티오아세테이트(SATA) (7 mg, 28 μmol)를 반응혼합물에 첨가하고, 실온에서 하룻밤 교반시켰다. 반응 진행은 MALDI 및 HPLC로 모니터링 하였다.

[0603] 일단 완료되면, 물 중의 1% 암모니아는 반응 혼합물에 첨가하고, 실온에서 2 시간 동안 교반시켰다. 이 용액을 SPE 칼럼(2 cm)상에 부하시켰다. 바이알을 1% 암모니아 용액(2X 2ml)으로 행구고, SPE 칼럼을 물(3X 6ml) 속의 암모니아로 세척하였다. 생성물을 물 (6 ml) 중 1% 암모니아 중 45% 아세토니트릴로 세척하였다. 올리고머를 함유하는 분획을 UV 광밀도 측정으로 동정하였다. 생성물을 동결건조에 의해 분리하였다. 순도 및 동일성은 MALDI 및 HPLC (C-18 및/또는 SAX)로 결정하였다.

[0604] 실시예 26

[0605] PMOplus의 글로벌 숙신산 변형



[0606]

[0607] 적절한 양의 PMOplus (32 mg, 3.7 μ mol)를 바이알(4 ml)에 증량하고 DMSO (500 ul)중에 용해시켰다. N-에틸 모르폴리노(12 mg, 100 μ mol) 및 숙신산 무수물 (10 mg, 100 μ mol)을 반응 혼합물에 첨가하고, 실온에서 하룻밤 가온시켰다. 반응 진행은 MALDI 및 HPLC로 모니터링하였다.

[0608] 일단 완료되면, 물 속에 1% 암모니아를 반응 혼합물에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반시켰다. 이 용액을 SPE 칼럼(2 cm)상에 부하하였다. 바이알을 1% 암모니아 용액(2X 2ml)으로 행구고, SPE 칼럼을 물(3X 6ml) 중 1% 암모니아로 세척하였다. 생성물을 물 (6ml)중 1% 암모니아중 45% 아세토니트릴로 용출하였다. 올리고머를 함유하는 분획은 UV 광밀도 측정으로 동정하였다. 생성물은 동결건조에 의해 분리하였다. 순도 및 동일성은 MALDI 및 HPLC (C-18 및/또는 SAX)로 측정하였다.

[0609] 상기 절차는 마찬가지로 PMOplus의 글루타르산 (글루타르산 무수물) 및 테트라메틸렌글루타르산 (테트라메틸렌글루타르산 무수물) 변형에 적용할 수 있다.



[0610]

[0611] 실시예 27

[0612] 변형 말단기를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 유사체의 제조

[0613] DMSO (300 μ l) 중 자유 3'-말단 (27.7 mg, 3.226 μ mol)을 함유하는 25-mer PMO의 용액에 브롬화 파네실(1.75 μ l, 6.452 μ mol) 및 디이소프로필에틸아민(2.24 μ l, 12.9 μ mol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 5 시간 동안 교반하였다. 조 반응혼합물을 10 mL의 1% 수성 NH_4OH 로 희석한 다음, 2 mL Amberchrome CG300M 칼럼 상에 부하였다. 이어서 칼럼을 3 칼럼 용적의 물로 행구고, 생성물은 6 mL의 1:1 아세토니트릴 및 물(v/v)로 용출하였다. 이어서 용액을 동결건조시켜 백색 고체로서 표제 화합물을 얻었다.

- [0614] 실시예 28
- [0615] 모르폴리노 올리고머의 제조
- [0616] 트리틸 피페라진 페닐 카르바메이트 35의 제조(도 3 참조): 디클로로메탄 (6 mL/g 11) 중 화합물 11의 냉각된 용액에 물 (4 mL/g 탄산칼륨) 중 탄산칼륨 (3.2 당량)의 용액을 첨가하였다. 이러한 2단계 혼합물에 디클로로메탄 (2 g/g 페닐 클로로포르메이트)중 페닐 클로로포르메이트 (1.03 당량)의 용액을 서서히 첨가하였다. 반응 혼합물을 20℃로 가온하였다. 반응 종료 시((1-2 시간), 층들을 분리하였다. 유기층을 물로 세척하고, 무수 탄산칼륨으로 건조시켰다. 생성물 35는 아세토니트릴로부터 결정화에 의해 분리하였다. 수율 = 80%.
- [0617] 카르바메이트 알코올 36의 제조: 수소화 나트륨(1.2 당량)을 1-메틸-2-피롤리딘은 (32 mL/g 수소화나트륨)중에 현탁시켰다. 이러한 현탁액에 트리에틸렌 글리콜(10.0 당량) 및 화합물 35 (1.0 당량)을 첨가하였다. 수득된 슬러리를 95℃까지 가열하였다. 반응 종료시 (1 내지 2 시간), 혼합물을 20℃로 냉각하였다. 이러한 혼합물에 30% 디클로로메탄/메틸 tert-부틸 에테르(v:v) 및 물을 첨가하였다. 생성물-함유 유기층은 수성 NaOH, 수성 속신산, 및 포화된 수성 염화나트륨으로 연속적으로 세척하였다. 생성물 36은 디클로로메탄/메틸 tert-부틸 에테르/헵탄으로부터 결정화에 의해 분리하였다. 수율 = 90%.
- [0618] 테일산(tail acid) 37의 제조: 테트라하이드로푸란 (7 mL/g 36) 중 화합물 36의 용액에 속신산 무수물(2.0 당량) 및 DMAP (0.5 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 50℃까지 가열하였다. 반응 종료시 (5 시간), 혼합물은 20℃까지 냉각하고 수성 NaHCO₃를 사용하여 pH 8.5로 조절하였다. 메틸 tert-부틸 에테르를 첨가하고, 생성물을 수성층으로 추출하였다. 디클로로메탄을 첨가하고 혼합물을 수성 시트르산을 사용하여 pH 3으로 조절하였다. 생성물-함유 유기층을 pH=3 시트레이트 완충액과 포화된 수성 염화 나트륨의 혼합물로 세척하였다. 37의 이러한 디클로로메탄 용액은 화합물 38의 제조에서 분리 없이 사용하였다.
- [0619] 38의 제조: 화합물 37의 용액에 N-하이드록시-5-노르보르넨-2,3-디카르복실산 이미드 (HONB) (1.02 당량), 4-디메틸아미노피리딘 (DMAP) (0.34 당량), 및 1-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDC) (1.1 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 55℃까지 가열하였다. 반응 완료시(4-5 시간), 혼합물은 20℃까지 냉각하고 1:1 0.2 M 시트르산/염수 및 염수로 연속적으로 세척하였다. 디클로로메탄 용액은 아세톤에 이어서 N,N-디메틸포름아미드로 용매교환을 수행하고 생성물을 포화된 수성 염화 나트륨 중에 아세톤/N,N-디메틸포름아미드로부터 침전에 의해 분리하였다. 조생성물은 물 속에서 여러번 재슬러리화 하여 잔류 N,N-디메틸포름아미드 및 염을 제거하였다. 화합물 36으로부터 38의 수율= 70%. 디설파이드 앵커 수지상에 활성화 테일의 도입은 고체상 합성 중에 소단위의 도입을 위해 사용된 절차에 의해 NMP에서 수행하였다.
- [0620] 모르폴리노 올리고머의 합성을 위한 고체 지지체의 제조:
- [0621] 이 절차는 조경한 다공성(40-60 μ m) 글래스 프리트, 오버헤드 교반기, 및 3-방향 테플론 스톱코크에 의한 실란화, 자켓 펌타이드 용기(미국 NJ, ChemGlass에서 주문제조)에서 수행하여 프리트 또는 진공 추출을 통해 N₂를 거품화시켰다. 온도 조절은 순환 수욕에 의해 반응 용기에서 수행하였다.
- [0622] 다음의 절차에서 수지 처리/세척 단계는 두개의 기본 조작: 수지 유동화 및 용매/용액 추출로 구성된다. 수지 유동화의 경우, 스톱코크를 위치시켜 프리트 및 명시된 수지 처리/세척을 통해 N₂를 유동시키고, 반응기에 첨가하고, 투과시켜 수지를 완전히 습윤시킨다. 이어서 혼합을 개시하고 수지 슬러리는 명시된 시간 동안 혼합하였다. 용매/용액 추출의 경우, 혼합 및 N₂ 유동을 정지하고 진공 펌프를 개시한 다음 스톱코크를 위치시켜 수지 처리/세척하여 찌꺼기를 배출시킨다. 모든 수지처리/세척 용적은 별도로 지시되지 않는 한 수지의 15 mL/g이었다.
- [0623] 실란화 자켓 펌타이드 용기 중에 아미노메틸폴리스티렌 수지(100-200 메쉬; ~1.0 mmol/g N₂ 치환; 75 g, 1 당량, Polymer Labs, UK, 파트 #1464-X799)에 1- 메틸-2-피롤리돈(NMP; 20 ml/g 수지)를 첨가하고 수지를 1-2 시간 동안 혼합하면서 팽윤시켰다. 팽윤된 용매의 배출 후에, 수지는 25% 이소프로판올/디클로로메탄 (2 x 3-4 분) 및 디클로로메탄 (2 x 1-2 분)으로 세척하였다. 최종 세척물의 배출 후에, 수지는 1-메틸-2-피롤리딘은

(0.17 M; 15 mL/g 수지, ~2.5 당량)중 디설파이드 앵커 34의 용액으로 유동화시키고, 수지/시약 혼합물을 45℃에서 60시간 동안 가열하였다. 반응 완료시, 가열은 정지하고 앵커 용액은 배출하고 수지는 1-메틸-2-피롤리딘논 (4 x 3-4 분) 및 디클로로메탄 (6 x 1-2 분)으로 세척하였다. 수지는 디클로로메탄 (16 mL/g; 2 x 5-6 분)중에 10% (v/v) 디에틸 디카르보네이트의 용액으로 처리한 다음 디클로로메탄 (6 x 1-2 분)으로 세척하였다. 수지 39 (도 4 참조)는 N2 흐름하에 1-3 시간 동안 및 다음에 진공하에 일정 중량 ($\pm 2\%$)으로 건조시켰다. 최종 수지 중량의 수율: 110-150%.

[0624] 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지의 부하의 결정:

[0625] 수지의 부하(잠재적으로 이용가능한 반응성 부분의 수)는 수지의 그램 당 트리페닐메틸의 수에 대해 분광계 분석에 의해 측정하였다.

[0626] 공지된 중량의 건조 수지(25 $\pm$ 3 mg)를 실란화 25 ml 용적 플라스크에 옮기고 디클로로메탄 중 ~5 mL의 2% (v/v) 트리플루오로아세트산을 첨가하였다. 내용물을 가볍게 휘저으면서 혼합한 다음 30분 동안 정치시켰다. 용적은 디클로로메탄 중 추가의 2% (v/v) 트리플루오로아세트산으로 25 mL까지 올리고 내용물을 철저히 혼합하였다.

[0627] 용적형 유체 피펫(positive displacement pipette)을 사용하여 분취량의 트리틸-함유 용액 (500 μ l)을 10 mL 용적 플라스크에 옮기고 용적을 메탄설폰산을 사용하여 10 mL까지 올렸다.

[0628] 최종 용액 중에 트리틸 양이온 함량은 431.7 nm에서 UV 흡수에 의해 측정하고 수지 부하는 적절한 용적, 희석, 흡광계수 (ϵ : 41 μ mol $\cdot$ lcm $^{-1}$) 및 수지 중량을 사용하여 그램 수지당 트리틸 기 (μ mol/g) 중에서 계산하였다. 분석은 세 번 수행하고 평균 부하를 계산하였다.

[0629] 이 실시예에서 수지 부하는 수지에 대략 500 μ mol/g의 부하를 제공한다. 300-400 μ mol/g의 부하는 디설파이드 앵커 도입 단계가 실온에서 24 시간 동안 수행되는 경우에 얻어졌다.

[0630] 테일 부하(tail loading): 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지의 제조를 위한 동일한 셋업 및 용적을 사용하여, 테일은 분자 내에 도입될 수 있다. 커플링 단계의 경우, NMP 함유 4-에틸모르폴린(NEM, 0.4 M)중 38 (0.2 M)의 용액은 디설파이드 앵커 용액 대신에 사용하였다. 45℃에서 2 시간 후에, 수지 39는 25% 이소프로판올/디클로로메탄 중 5% 디이소프로필에틸아민으로 두 번 세척하고 또한 DCM으로 한번 세척하였다. 수지에 벤조산 무수물 (0.4 M) 및 NEM (0.4 M)의 용액을 첨가하였다. 25 분후에 반응 자켓은 실온으로 냉각시키고, 수지는 25% 이소프로판올/디클로로메탄중 5% 디이소프로필에틸아민으로 두번 및 DCM으로 한 번 세척하였다. 수지 40을 초과하고 높은 진공하에 건조시켰다. 수지 40에 대한 부하는 테일 부하에서 사용된 최초의 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지 39의 부하인 것으로 정의된다.

[0631] 고체상 합성: 모르폴리노 올리고머는 2 mL 길손 폴리프로필렌 반응 칼럼 (Part # 3980270)중 Gilson AMS-422 자동화 펩타이드 합성기상에서 제조하였다. 물 유동용 채널을 갖는 알루미늄 블록은 이들이 합성기상에 고정되기 때문에 칼럼 주위에 위치시킨다. AMS-422는 시약/세척 용액을 교대로 첨가하고, 지정된 시간 동안 유지시키고, 진공을 사용하여 칼럼을 배출시킨다.

[0632] 길이 최대 약 25 소단위 범위의 올리고머의 경우, 수지의 500 μ mol/g 부근의 부하를 갖는 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지가 바람직하다. 더 큰 올리고머의 경우, 수지의 300-400 μ mol/g의 부하를 갖는 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지가 바람직하다. 5'-테일을 갖는 분자가 바람직한 경우, 테일로 부하된 수지가 동일한 부하 가이드라인으로 선택된다.

[0633] 다음과 같은 시약 용액들을 제조하였다:

[0634] 탈트리틸화 용액: 4:1 디클로로메탄/아세토니트릴중 10% 시아노아세트산 (w/v); 중화용액: 3:1 디클로로메탄/이소프로판올 중 5% 디이소프로필에틸아민; 커플링 용액: 원하는 염기 및 결합 유형의 0.18 M (또는 20 소단위보다 더 길게 성장된 올리고머의 경우 0.24 M) 활성화 모르폴리노 소단위, 및 1,3-디메틸이미다졸리딘 중 0.4 M N 에틸 모르폴린. 디클로로메탄(DCM)은 상이한 시약 용액 세척물을 분리하는 중간 세척물로서 사용하였다.

[0635] 합성기 상에서, 42℃로 고정된 블록을 사용하여, 30 mg의 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지 (또는 테일 수지)를 함유하는 각각의 칼럼에 2 mL의 1-메틸-2-피롤리딘논을 첨가하고 실온에서 30 분동안 정치시켰다. 2 mL의 디클로로메탄으로 두 번 세척한 후, 다음의 합성 사이클을 사용하였다:

[0636]	단계	용적	전달	지속시간
[0637]	탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
[0638]	탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
[0639]	탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
[0640]	탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
[0641]	탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
[0642]	탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
[0643]	DCM	1.5 mL	매니폴드	30 초
[0644]	중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
[0645]	중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
[0646]	중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
[0647]	중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
[0648]	중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
[0649]	중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
[0650]	DCM	1.5 mL	매니폴드	30 초
[0651]	커플링	350 uL-500 uL	시린지	40 분
[0652]	DCM	1.5 mL	매니폴드	30 초
[0653]	중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
[0654]	중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
[0655]	DCM	1.5 mL	매니폴드	30 초
[0656]	DCM	1.5 mL	매니폴드	30 초
[0657]	DCM	1.5 mL	매니폴드	30 초
[0658]	개개 올리고머의 서열은 각각의 칼럼이 적절한 서열 중에 적절한 커플링 용액(A,C,G,T,I)을 접수하도록 합성기에서 프로그램화하였다. 칼럼 내의 올리고머가 그의 최종 소단위의 도입을 완료하였을 때 칼럼은 블록으로부터 제거하였으며 또한 최종 사이클은 0.89M 4-에틸모르폴린을 함유하는 4-메톡시트리페닐메틸 클로라이드 (DMI 중 0.32 M)로 구성된 커플링 용액으로 수동으로 수행하였다.			
[0659]	수지로부터 절단 및 염기 및 골격 보호기의 제거: 메톡시트리틸화 후에, 수지는 2 mL 1-메틸-2-피롤리디논으로 8번 세척하였다. 1-메틸-2-피롤리디논 중 0.1 M 1,4-디티오프레이톨 (DTT) 및 0.73 M 트리에틸아민으로 구성된 1 mL의 절단용액을 첨가하고, 칼럼을 캐핑하고, 실온에서 30분 동안 정치시켰다. 그 후에, 용액은 12 mL Wheaton 바이얼 내로 배출하였다. 크게 수축된 수지는 300 μ L의 절단 용액으로 두번 세척하였다. 용액에 4.0 mL 농축 수성 암모니아(-20℃에서 저장)를 첨가하고, 바이알을 (테프론 라인 스크류 캡으로) 단단하게 캐핑하고, 혼합물을 휘저어서 용액을 섞었다. 바이알을 45℃ 오븐속에 16-24 시간 동안 위치시켜 염기 및 골격 보호기의 절단을 수행하였다.			
[0660]	초기 올리고머 분리: 바이알 암모노리시스 용액을 오븐으로부터 제거하고 실온까지 냉각하였다. 용액을 20 mL의 0.28% 수성 암모니아로 희석하고 Macroprep HQ 수지 (BioRad)를 함유하는 2.5x10 cm 칼럼에 통과시켰다. 염 구배(A: B와의 0.28% 암모니아: 0.28% 암모니아 중 1 M 염화나트륨; 0-100% B 60 분)를 사용하여 메톡시트리틸 함유 피크를 용출시켰다. 결합된 분획을 모으고 원하는 생성물에 따라 추가로 처리하였다.			
[0661]	모르폴리노 올리고머의 탈메톡시트리틸화: Macroprep 정제로부터 모아진 분획은 1 M H3PO4로 처리하여 pH를 2.5로 낮추었다. 초기 혼합 후, 샘플을 실온에서 4 분 동안 정치시키고, 이때 이들은 2.8% 암모니아/물로 pH			

10-11로 중화시켰다. 생성물을 고체 상 추출(SPE)로 정제하였다.

- [0662] Amberchrome CG-300M (Rohm and Haas; Philadelphia, PA) (3 mL)를 20 mL 프릿화 칼럼(BioRad Econo-Pac Chromatography Columns (732-1011))에 포장하고 수지를 다음 시약의 3 ml로 행구었다: 0.28% NH₄OH/80% 아세토니트릴; 0.5M NaOH/20% 에탄올; 물; 50 mM H₃PO₄/80% 아세토니트릴; 물; 0.5 NaOH/20% 에탄올; 물; 0.28% NH₄OH.
- [0663] 탈메톡시트리틸화로부터 용액은 칼럼상에 부하시키고 수지를 3-6 mL 0.28% 수성 암모니아로 세번 행구었다. 휘턴 바이알 (12 mL)을 칼럼상에 놓고 생성물은 0.28% 수성 암모니아 중 2 mL의 45% 아세토니트릴를 사용하여 두 번 세척으로 용출하였다. 용액을 건조 얼음으로 냉동시키고 바이알을 냉동 건조기에 넣어 습기같은 백색 분말을 생성하였다. 샘플을 물 속에 용해하고, 시린지를 사용하여 0.22 마이크론 여과기 (Pall Life Sciences, Acrodisc 25 mm 시린지 필터, 0.2 마이크론 HT Tuffryn 막을 가짐)를 통해 여과하고 광밀도(OD)를 UV 분광계상에서 측정하여 존재하는 올리고머의 OD 단위는 물론 분석용 분산 샘플을 결정하였다. 이어서 용액은 동결건조를 위해 휘턴 바이알에 다시 넣었다.
- [0664] 모르폴리노 올리고머의 분석: MALDI-TOF 질량 분광계를 사용하여 정제에서 분획의 조성을 결정할 뿐만 아니라 올리고머의 동일성 (분자량)에 대한 증거를 제공한다. 샘플은 매트릭스로서 3,5-디메톡시-4-하이드록시신남산(신나핀산), 3,4,5-트리하이드록시아세토폰(THAP) 또는 알파-시아노-4-하이드록시신남산(HCCA)의 용액을 사용하여 희석한 후에 수행하였다.
- [0665] 양이온 교환 (SCX) HPLC는 25 mM pH=5 초산나트륨 25% 아세토니트릴 (완충액A) 및 25 mM pH=5 초산나트륨 25% 아세토니트릴 1.5 M 염화칼륨 (완충액 B) (구배10-100% B in 15 min) 또는 pH=3.5에서 25 mM KH₂PO₄ 25% 아세토니트릴 (완충액 A) 및 1.5 M 염화칼륨을 갖는 pH 3.5에서 25 mM KH₂PO₄ 25% 아세토니트릴 (완충액 B) (구배 0-35% B in 15 min)를 사용하는 Dionex ProPac SCX-10, 4x250mm 칼럼 (Dionex Corporation; Sunnyvale, CA)를 사용하여 수행하였다. 전자의 시스템은 부착된 펩타이드를 갖지 않는 양성 하전된 올리고머를 위해 사용되는 반면, 후자의 시스템은 펩타이드 접합체를 위해 사용하였다.
- [0666] 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 모르폴리노 올리고머의 정제:
- [0667] 샘플을 20 mM 초산 나트륨, pH=4.5 (완충액 A)중에 용해하고 소스 30 양이온 교환수지 칼럼 (GE Healthcare)에 적용시키고 20 mM 초산 나트륨 및 40% 아세토니트릴, pH=4.5 (완충액 B)중 0.5 M 염화나트륨의 구배로 용출시켰다. 생성물을 함유하는 모아진 분획을 농축 수성 암모니아로 중화하고 Amberchrome SPE 칼럼에 적용시켰다. 생성물을 용출하고, 냉동시키고, 상기와 같이 동결건조시켰다.
- [0668] 실시예 29
- [0669] 예시적 접합체의 제조
- [0670] 펩타이드 서열 AcR₆G은 당해 분야에 알려진 표준 펩타이드 합성방법에 따라 제조하였다. DMSO (3 mL) 중 PMO (NG-05-0225, 3'-H: M23D : 5'-EG3, mdx 마우스의 엑손 23에 결합하기 위한 서열, 350 mg, 1 당량), AcR₆G (142 mg, 2 eq), HATU (31 mg, 2 당량)의 용액에 실온에서 디이소프로필에틸아민(36 μ l, 5 당량)을 첨가하였다. 1 시간 후에, 반응물을 위크업하고 원하는 펩타이드-올리고머 접합체는 SCX 크로마토그래피 (A: 25% 아세토니트릴/H₂O 중 20 mM NaH₂PO₄, pH 7.0; B: 25% 아세토니트릴/H₂O중 1.5 M 구아니딘 HCl 및 20 mM NaH₂PO₄, pH 7.0의 구배로 용출)로 정제하였다. 결합된 분획은 고체상 추출(1M NaCl, 이어서 물 용출)로 처리하였다. 접합체는 동결건조 후에 백색 분말 (257 mg, 수율 65.5%)로서 얻었다.
- [0671] 실시예 30
- [0672] 본 발명의 예시적 접합체의 MDX 마우스의 처리
- [0673] MDX 마우스는 디스트로핀 유전자의 엑손 23에서 변이를 포함하는 듀센형 근이영양증(DMD)에 대해 허용되고 잘 특징화된 동물모델이다. M23D 안티센스 서열(서열번호:15)는 기능성 디스트로핀 발현의 엑손 23 스킵핑 및 복원을 유도하는 것으로 알려져 있다. MDX 마우스는 다음 접합체중의 하나로 꼬리 정맥 주사에 의해 한번 투여하였다 (50 mg/kg):

[0674] 1. 5'-EG3-M23D-BX(RXRRBR)₂ (AVI5225);

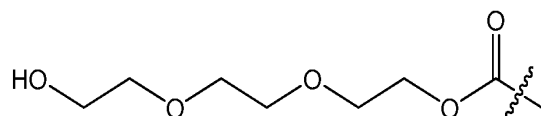
[0675] 2. 5'-EG3-M23D-G(R)₅ (NG-11-0045);

[0676] 3. 5'-EG3-M23D-G(R)₆ (NG-11-0009);

[0677] 4. 5'-EG3-M23D-G(R)₇ (NG-11-0010); 또는

[0678] 5. 5'-EG3-M23D-G(R)₈ (NG-11-0216)

[0679] 여기서 M23D는 서열 GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT를 갖는 모르폴린 올리고뉴클레오타이드이며 또한 "EG3"은 펩타이드 링커를 통해 올리고머의 5' 말단에 연결된 다음 구조식(XXIX)를 갖는다:



[0680]

[0681] 일주일 주사 후, MDX 마우스를 희생시키고 RNA를 다양한 근육 조직으로부터 추출하였다. 엔드-포인트 PCR을 사용하여 안티센스-유도성 엑손 스킵핑으로 인하여 엑손 23이 없는 mRNA 및 엑손 23을 함유하는 디스트로핀 mRNA의 상대 존재량을 측정하였다. 퍼센트 엑손 23 스킵핑은 생체내에서 안티센스 활성의 측정이다. 도 5 및 6은 각각 일주일 처리후, 사두근 (QC, 도 5A 및 6A), 횡격막 (DT, 도 5B 및 6B) 및 심장 (HT, 도 5C 및 6C)로부터의 결과를 나타낸다. AVI-5225와 다른 접합체 사이의 용량 반응은 유사하였다. 아르기닌 계열 중에서, R₆G 펩타이드는 사두근 및 가로막에서 최고 효능을 가지며 또한 심장에서 다른 아르기닌 계열과 유사하였다.

[0682] 실시예 31

[0683] 예시적 접합체로 처리된 마우스의 BUN 수준 및 생존율

[0684] 마우스는 실시예 30에 기술된 접합체로 처리하고, KIM-1 수준, BUN 수준 및 생존율을 하기 실시예 32에 기술되고 당해 분야에 알려진 일반적 절차에 따라 측정하였다. 놀랍게도, 도 7A는 모든 글리신 결합 접합체가 XB 결합 접합체 (AVI-5225)보다 현저하게 더 낮은 BUN 수준을 가졌음을 보여준다. 그 외에, 글리신 결합 접합체로 처리된 마우스는 XB 결합 접합체보다 더 높은 투여량에서 더 오래 동안 생존하였으며 (도 7B), R₆G 접합체는 아르기닌 고분자의 최소 내성이다. R₆G 접합체(NG-11-0009)로 처리된 모든 마우스는 최대 400mg/kg의 투여량에 생존하였다(데이터 도시안함).

[0685] 글리신 결합 접합체로 처리된 마우스의 KIM-1 (도 8A) 및 클러스테린 (도 8B)은 AVI-5225로 처리된 마우스보다 현저하게 더 낮았다. 이러한 데이터는 본 발명의 접합체가 선행기술 접합체보다 더 낮은 독성을 가진다는 것을 나타내며, 또한 실시예 30에서 상기 나타난 바와 같이 접합체의 효능은 감소되지 않는다. 따라서 본 접합체는 다른 공지된 접합체보다 더 양호한 치료 창을 가지며 또한 잠재적으로 더 양호한 약물 후보이다.

[0686] 실시예 32

[0687] 예시적 접합체의 독성학

[0688] 본 발명의 4개의 예시적 접합체는 마우스에서 이들의 독성학에 대해 시험하였다. 접합체는 다음과 같았다:

[0689] 1. 5'-EG3-M23D-BX(RXRRBR)₂ (AVI5225);

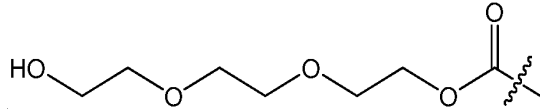
[0690] 2. 5'-EG3-M23D-G(RXRRBR)₂ (NG-11-0654);

[0691] 3. 5'-EG3-M23D-BX(R)₆ (NG-11-0634); 및

[0692] 4. 5'-EG3-M23D-G(R)₆ (NG-11-0009)

[0693] 여기서 M23D는 서열 GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT을 갖는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드이며 또한 "EG3"은 피

페라진 링커를 통해 올리고머의 5'말단에 연결된 다음 구조식 (즉 구조식 XXIX)을 갖는다:



8주령 수컷 마우스(C57/BL6; Jackson Laboratories, 18-22 그램)를 염수 중에 제형화된 상기 접합체로 처리하였다. 마우스는 실험 절차의 개시 전에 최소 5일 동안 순응시켰다.

동물은 증명된 접촉 침구를 갖는 투명한 폴리카보네이트 마이크로이슬레이터 케이지 속에서 케이지당 최대 3마리 사육하였다. 케이지는 동물 보호법(모든 개정 포함) 및 실험실 동물의 케어 및 사용 가이드, National Academy Press, Washington, D.C., 2010에 기술된 표준으로 동정하였다.

동물은 하기 표에 명시된 케이지 중량을 기본으로 처리 그룹으로 무작위로 순서를 정하였다. 그룹 할당은 시험 기록으로 문서화하였다.

표 8. 독성학 시험 설계

그룹 n=3	올리고	주사당 용량 (mg/kg)	요법	투여경로
1	NG-11-0654	50	단일 주사	꼬리정맥, i.v. 200 μ l
2	NG-11-0654	100		
3	NG-11-0654	150		
4	NG-11-0654	200		
5	NG-11-0634	50		
6	NG-11-0634	100		
7	NG-11-0634	150		
8	NG-11-0634	200		
9	NG-11-0009	50		
10	NG-11-0009	100		
11	NG-11-0009	150		
12	NG-11-0009	200		
13	AVI-5225	25		
14	AVI-5225	50		
15	AVI-5225	100		
16	부형제	0		

본 시험에 대한 투여일은 시험일 1로 지정하였다. 접합체는 느린 푸시 덩어리로서 꼬리 정맥에 투여하였다 (~5 초). 모든 동물은 2일에 걸쳐 투여하였다. 그룹 1 내지 8은 첫 날에 투여하였고 그룹 9 내지 16은 둘째 날에 투여하였다. 처리 그룹 (TG) 13-16는 하기 표에 따라 투여하였다. 이들 TG로부터 결과는 다른 TG의 진행에 영향을 미치지 않았다. 각각의 접합체의 첫 번째 2 TG는 상기 표에 따라 투여하였다. 100mg/kg 그룹에서 모든 동물이 사망한 경우에는, 상기 시험물의 나머지 TG는 투여하지 않고 본 시험을 끝냈다. 적어도 한 마리의 동물이 100mg/kg 그룹에서 2시간 투여 후 생존하였고, 이어서 150mg/kg 그룹을 투여하였다. 다음에 150mg/kg 그룹에서 모든 동물이 사망한 경우에는 상기 시험물의 나머지 TG는 투여하지 않고 시험을 끝냈다. 적어도 한 마리의 동물이 150mg/kg 그룹에서 2시간 투여 후 생존하였고, 이어서 200mg/kg 그룹을 투여하였다.

동물은 매일 한번 빈사 및 사망물을 관찰하였다. 고통의 신호를 보여주는 임의 동물은, 특히 사망이 임박한 경우, 뉴미라(Numira) 바이오사이언스 표준 처리 절차에 따라 인도적으로 안락시켰다. 체중은 도착 일, 투여일 및 부검일에 기록하였다. 상세한 임상적 관찰을 수행하고, 투여의 내용성을 평가하기 위하여 0분, 15분 및 2시간 투여후에 기록하였다.

혈액 샘플 (최대 용적, 대략 1mL)은 부검 전에 3일 투여후 심장천자를 통하여 모든 동물로부터 얻었다. 혈액 샘플은 적색 튜브 마이크로테이너 튜브내에 수집하고 실온에서 30분 동안 그러나 원심분리 전 10분 이내에 유지시켰다. 샘플은 대략 1500-2500 rpm에서 15-20분 동안 원심분리하여 혈청을 얻었다.

다음 계획된 관찰까지 생존하지 않을 것 같은 동물은 증량하고 안락사시켰다. 사망으로 발견된 동물을 증량하고

사망 시간은 가능하면 밀접하게 평가하였다. 혈액 및 조직 샘플은 수집하지 않았다.

[0704] 3 일 (투여후 2일), 모든 동물은 이산화 탄소로 인도적으로 안락사시켰다. 안락사는 2007년 6월, 안락사에 대한 승인된 미국 수의 의학협회 (AVMA) 가이드라인에 따라 수행하였다.

[0705] 부분 전체 부검은 발견들의 검사 및 문서화를 포함하였다. 모든 외부 표면 및 구멍은 평가하였다. 조직의 수집 중에 관찰된 모든 이상들은 완전하게 기술하고 기록하였다. 추가의 조직은 취하지 않았다.

[0706] 우측 및 좌측 신장을 수집하였다. 조직은 안락사의 15 분 또는 그 이내에 수집하였다. 사용된 모든 기구 및 도구는 처리 그룹 사이에 변화하였다. 모든 조직은 급속 냉동하고 수집 후 가능하면 빨리 -70°C 에서 저장하였다.

[0707] 신장 손상 마커는 다음과 같이 얻었다. 마우스 신장조직으로부터 RNA는 Quick Gene Mini80 Tissue Kit SII (후지필름)를 사용하여 정제하였다. 간략하게, 대략 40 mg의 조직을 MagnaLyser 그린 비드 바이알 (Roche) 중에 0.5 ml 용해 완충액 (0.5 ml 용해 완충액중 $5\mu\text{l}$ 2-머캅토에탄올)에 첨가하고, 2 세트의 3x 3800 RPM 및 3 세트의 1x 6500 RPM을 갖는 MagNA Lyser (Roche)를 사용하여 균질화시켰다. 샘플을 각각의 저속 세트 사이에 및 각각의 고속 수행 사이에 어림 3-4 분에 냉각하였다. 균질액은 실온에서 400 x g에서 5분 동안 원심분리하였다. 균질액은 Quick Gene Mini80 프로토콜에 따라 RNA 정제를 위해 즉시 처리하였다. 샘플은 5분 동안 DNase I (Qiagen)로 온-칼럼 DNA 소화를 수행하였다. 총 RNA는 NanoDrop 2000 분광계(Thermo Scientific)로 정량화하였다.

[0708] qRT-PCR은 어플라이드 바이오사이언스 시약(1 단계 RT-PCR)을 사용하여 수행하고 프라이머/프로브 세트(ACTB, GAPDH, KIM-1, Clusterin-FAM 리포터)를 미리 설계하였다.

시약	회사	Cat. No.
1 단계 PCR 키트	어플라이드 바이오시스템스	4309169
GAPDH 마우스 프라이머/프로브 세트	어플라이드 바이오시스템스	4352932E
KIM-1 마우스 프라이머/프로브 세트	어플라이드 바이오시스템스	Mm00506686_m1

[0709]

각각의 반응은 다음을 함유하였다(총 30 μl):

[0710]

ABI One-Step Kit로부터 15 μl 2x qRT-PCR 완충액

[0711]

1.5 μl 프라이머/프로브 믹스

[0712]

8.75 μl 핵산분해효소가 없는 물

[0713]

0.75 μl 40x 멀티스크립트 + RNase 억제제

[0714]

4 μl RNA 템플레이트 (100 ng/ μl)

[0715]

qRT 1단계 프로그램은 다음과 같이 수행하였다:

[0716]

1. 30분 동안 48C

[0717]

2. 10분 동안 95C

[0718]

3. 15초 동안 95C

[0719]

4. 1분 동안 60C

[0720]

5. 반복 단계 3-4 총 40 사이클 동안 39회

[0721]

[0722] 샘플은 3개의 웰에서 수행하고 추가의 분석을 위해 평균하였다. 분석은 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 방법을 사용하여 수행하였다. 요컨대, 실험적 ΔCt [$\text{Ct}(\text{표적}) - \text{Ct}(\text{참조})$]는 대조 ΔCt [$\text{Ct}(\text{표적}) - \text{Ct}(\text{참조})$]= $\Delta\Delta\text{Ct}$ 로 감산하였다. 폴드 변화 범위는 다음과 같이 계산하였다: $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct}+\text{SD})}$ 내지 $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct}-\text{SD})}$. 대조= 부형제 처리 동물 그룹 (모아짐), 표적=KIM-1; 참조=GAPDH; SD= $\text{Sqrt}[(\text{SD}_{\text{표적}}^2)+(\text{SD}_{\text{ref}}^2)]$.

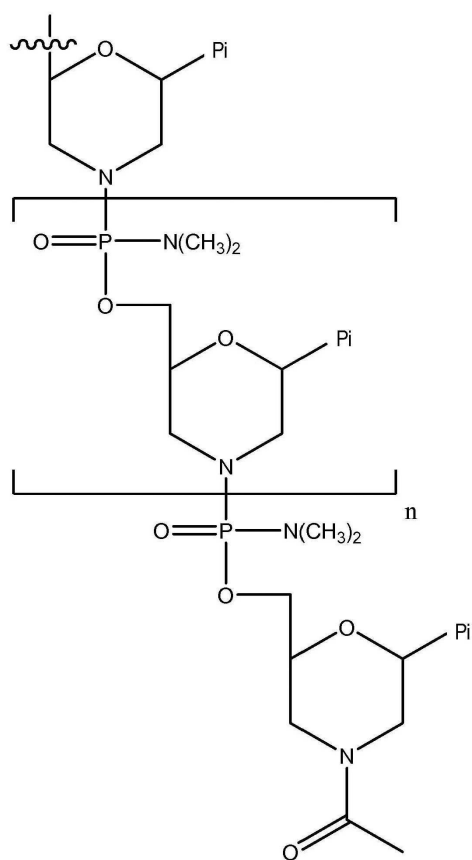
[0723] KIM 데이터의 결과는 도 10에 나타낸다. 말단 글리신을 갖는 캐리어 펩타이드를 포함하는 접합체는 최하값을 갖

는 R₆G 펩타이드를 사용하여 낮은 KIM 농도를 갖는다. 말단 G 및 비천연 아미노산 (아미노헥사노익산)의 존재는 접합체의 독성에서 역할을 하는 것으로 보인다.

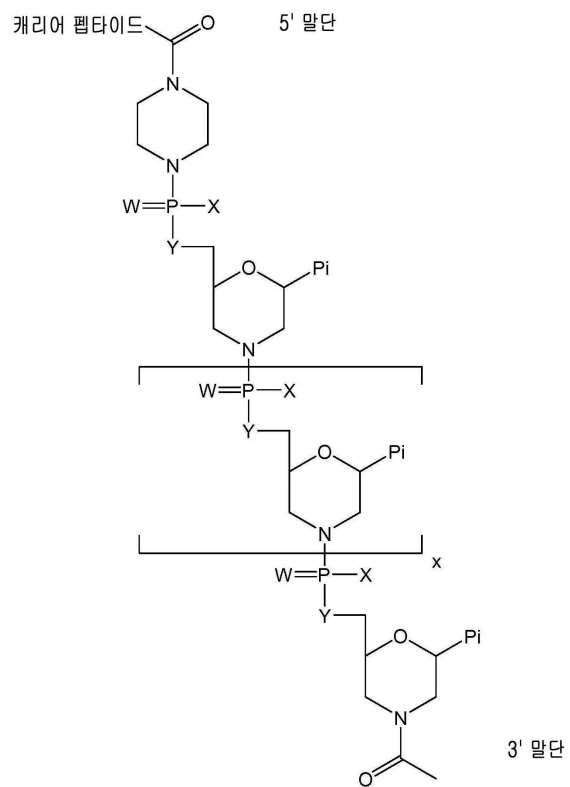
- [0724] 냉동된 혈청 샘플은 처리를 위해 IDEXX 실험실(West Sacramento, CA)에 드라이 아이스로 보냈다. 혈청 희석은 필요에 따라 IDEXX 표준 처리 절차(SOP)에 따라 수행하였다. 혈액 화학결과를 분석하였다. 혈뇨 질소 수준은 도 11에 나타낸다. 다시, G-결합 접합체는 낮은 BUN 수준을 가졌으며 또한 말단 G와 전체 펩타이드 서열은 둘 다 접합체의 독성학 프로파일에서 역할을 하는 것으로 보인다.
- [0725] 신장 조직(대략 150 mg)은 세라믹 비드로 부분적으로 충전된 2 mL 스크류 캡 바이알 속에서 정확하게 평량하였다. 10 U/mL 단백질 분해효소 K (시그마)를 함유하는 5 용적부 Tissue PE LB 완충액(G Biosciences)은 1부 조직에 첨가하였다. 샘플은 Roche MagnaLyser (4 x 40 sec @ 7,000 rpm, 수행들 사이에 냉각)으로 균질화하고, 40℃에서 30분 동안 배양하였다. 필요한 경우, 조직 균질액은 BSAsal (3mg/mL BSA + 20mM NaCl)로 희석하여 교정 범위내로 높은 샘플 농도를 가져왔다.
- [0726] 교정 샘플은 공지량의 적절한 분석 참조 표준을 사용하여 20 mM NaCl 중 3 mg/mL 의 BSA 용액을 스파이킹하여 제조하였다. 8개 샘플의 두 세트를 각각 제조하였다. ULOQ은 40 µg/mL이고 LLOQ는 0.065536 µg/mL이었다. 내부 표준(NG-07-0775)은 이중 블랭크 (약물 없음, 내부 표준 없음)으로 지정된 일부 블랭크 샘플을 제외하고는 모든 샘플에 첨가하였다. 샘플은 3 용적의 메탄올로 100 µL 분취량을 휘저어서 추출하였다.
- [0727] 원심분리 (15 분, 14,000 rpm) 후 상청액을 새로운 튜브에 옮기고 Speedvac에서 건조시켰다. 건조된 샘플은 [10 mM 트리스 pH 8.0 + 1 mM EDTA + 100 mM NaCl]-아세트오니트릴(75-25)중 적절한 양의 FDNA (5' d FAM-ATTCAGGTAAGCCGAGGTTTGCC 3')로 재구성하였다.
- [0728] 샘플은 음이온 교환 크로마토그래피 (Dionex DNAPac 4x250 mm 칼럼)을 사용하여 Dionex UltiMate 3000 HPLC 상에서 수행하였다. 주사 용적은 5 µL이었다. 이동상은 20% 아세트오니트릴 및 25 mM Tris pH 8.0을 함유하는 80% 물 및 증가하는 NaCl 농도의 구배로 구성하였다. 유동속도는 1 mL/min이었고, 수행회수는 샘플 당 10 분이었다. 형광 검출기는 EX 494 nm 및 EM 520 nm로 고정하였다. 피크 동정은 보유 시간에 기초하였다. 피크 높이 비(분석물:내부 표준)는 정량화를 위해 사용하였다. 검정 곡선은 두 개의 검점 샘플의 평균 반응 인자를 기초로 계산하였다 (배치의 초기에 한 세트 수행, 및 배치의 끝에 다른 세트 수행). 1/x 평량 인자에 부합한 선형 곡선을 사용하였다. 블랭크 샘플(참조 화합물을 첨가하지 않는 검점 샘플) 및 두개의 블랭크 샘플 (첨가된 내부 표준)을 사용하여 분석 특이성 및 잔품의 부존재를 보장하였다.
- [0729] 도 12는 신장 농도는 시험된 접합체중에서 유사한 것을 보여준다.
- [0730] 상기 데이터는 본 발명의 접합체가 다른 접합체에 비하여 유사한 효능 및 개선된 독성을 갖는다는 것을 보여준다. 도 9A-D는 R₆G 접합체 (NG-11-0009)에 대하여 이들 결과를 요약한다.
- [0731] 상기에 기술된 다양한 실시형태들을 조합하여 추가의 실시형태를 제공할 수 있다. 본 명세서에 인용되고 및/또는 출원 데이터 쉬트에 나열되는 모든 미국특허, 미국특허출원 공보, 외국특허, 외국특허출원, 및 비특허공보는 본 명세서에서 전부 참고로 인용된다. 실시형태의 양상은 필요에 따라 변형하여 더욱 추가의 실시형태를 제공하기 위한 다양한 특허, 출원 및 공보의 개념을 사용할 수 있다. 상기에 상세한 기술내용으로 보아 실시형태에 대한 이들 및 다른 변화들이 이루어질 수 있다. 일반적으로, 다음의 특허청구범위에서 사용된 용어들은 특허청구범위를 본 명세서 및 특허청구범위에 기술된 구체적인 실시형태로 제한하는 것으로 해석해서는 아니되지만, 이러한 청구범위가 주제로 하는 균등물의 모든 범위와 함께 모든 가능한 실시형태를 포함하는 것으로 해석해야 한다. 따라서 특허청구범위는 기술내용으로 제한되지 않는다.

도면

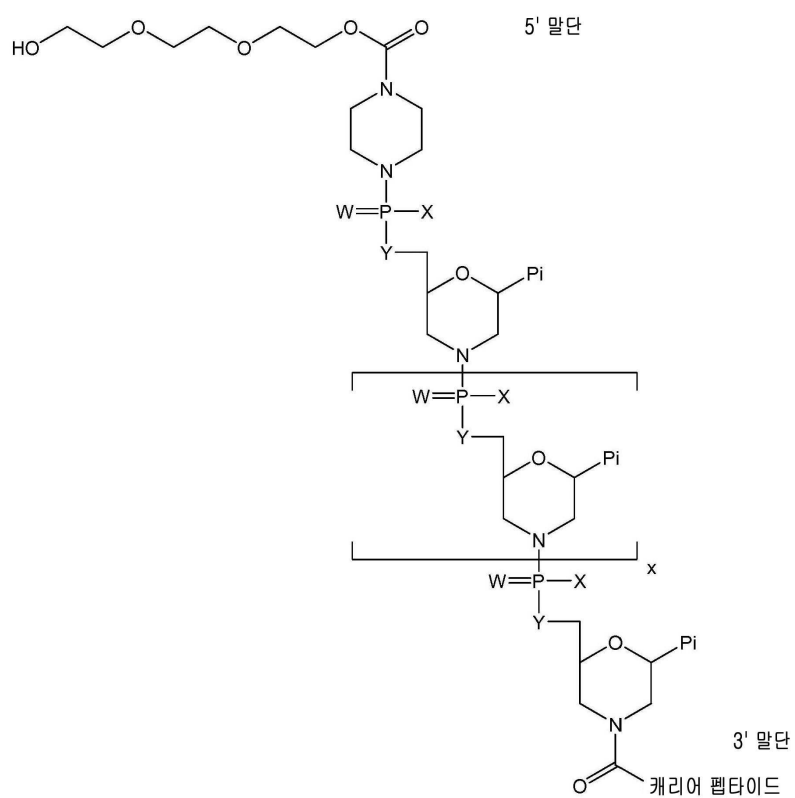
도면1a



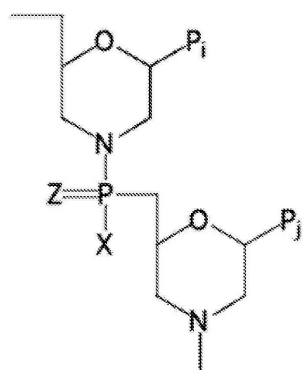
도면1b



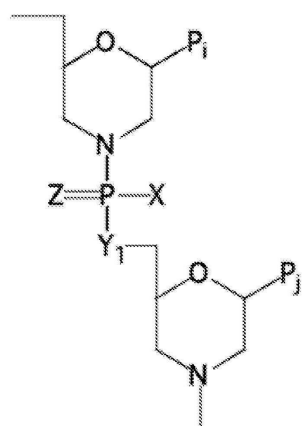
도면1c



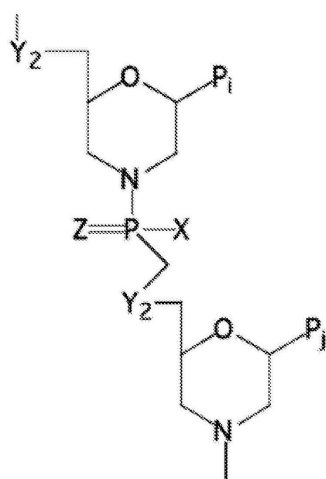
도면1d



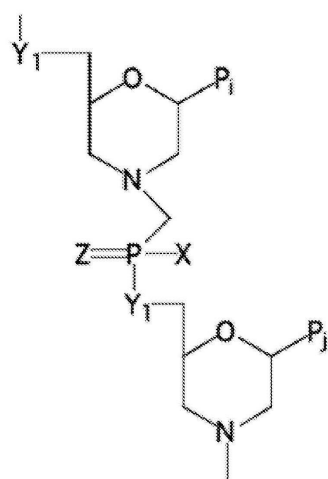
도면1e



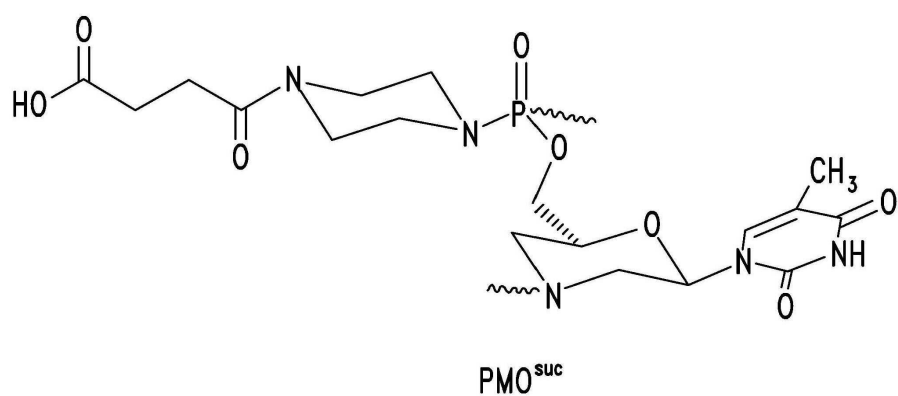
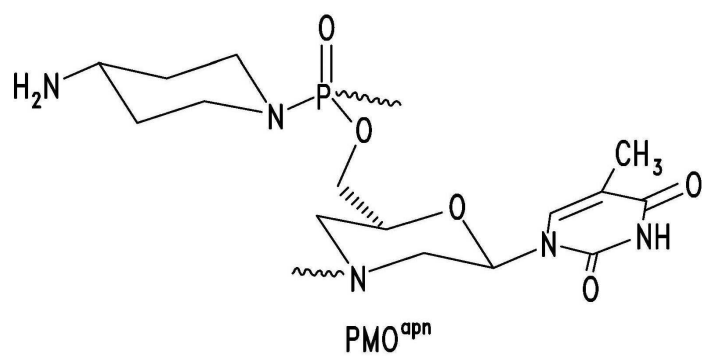
도면1f



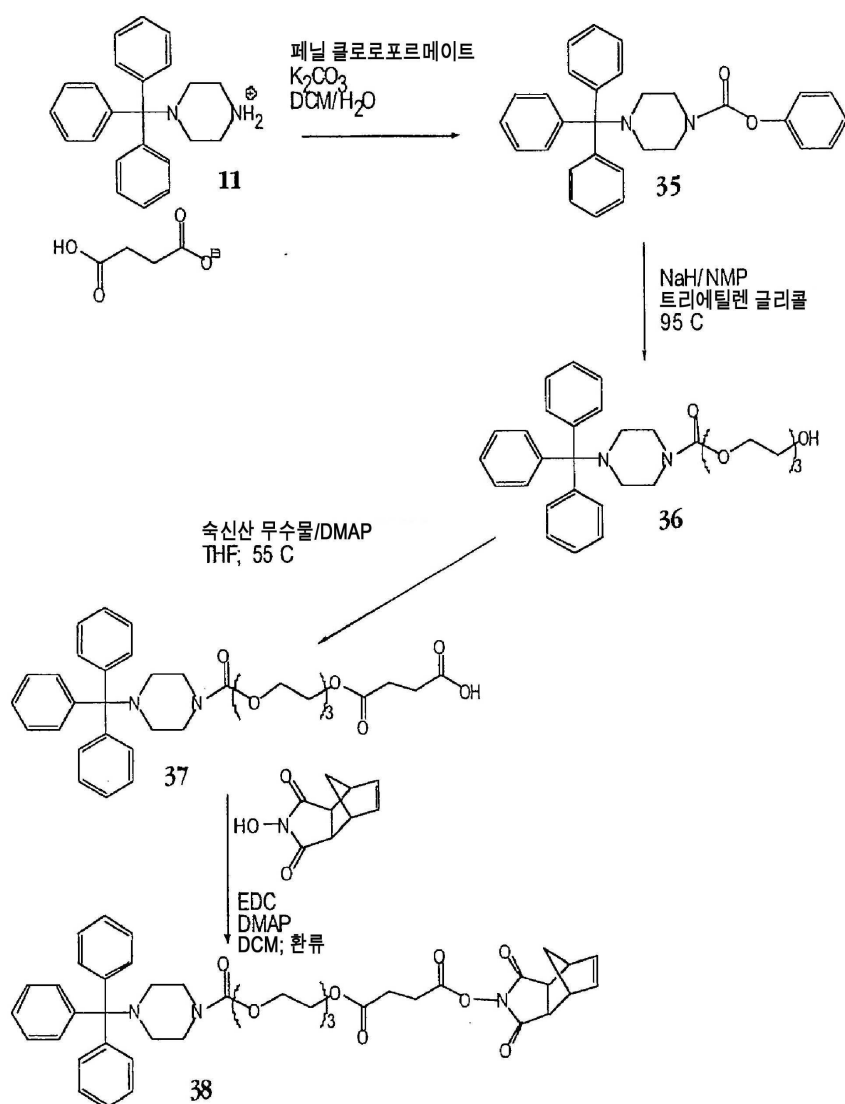
도면1g



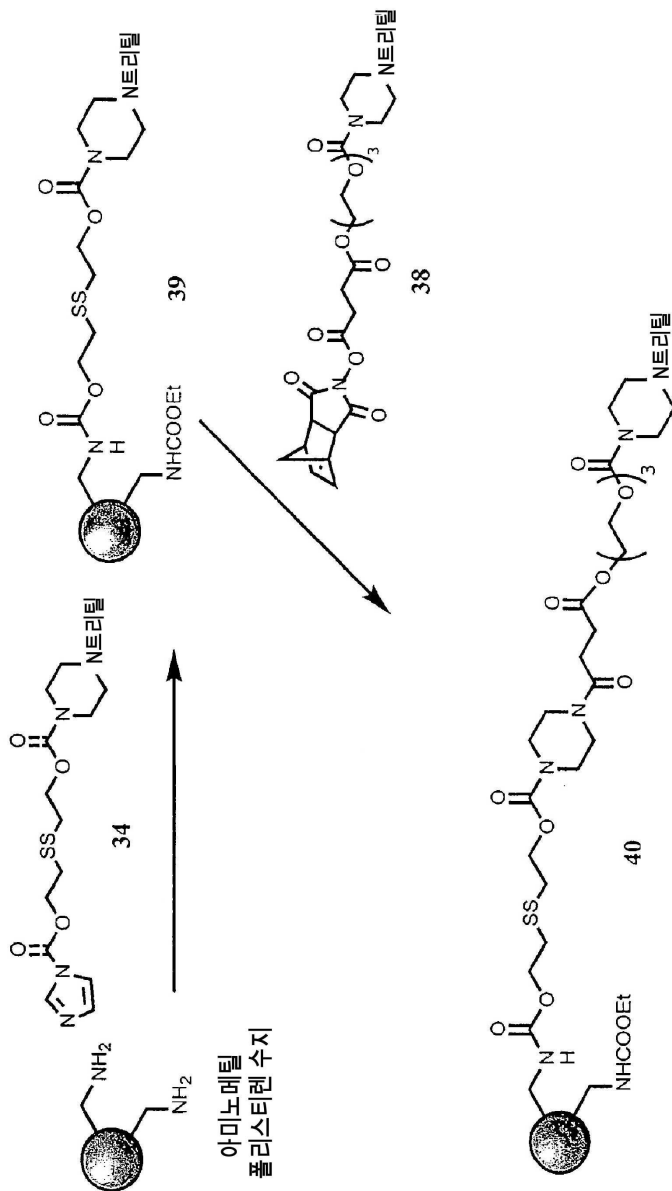
도면2



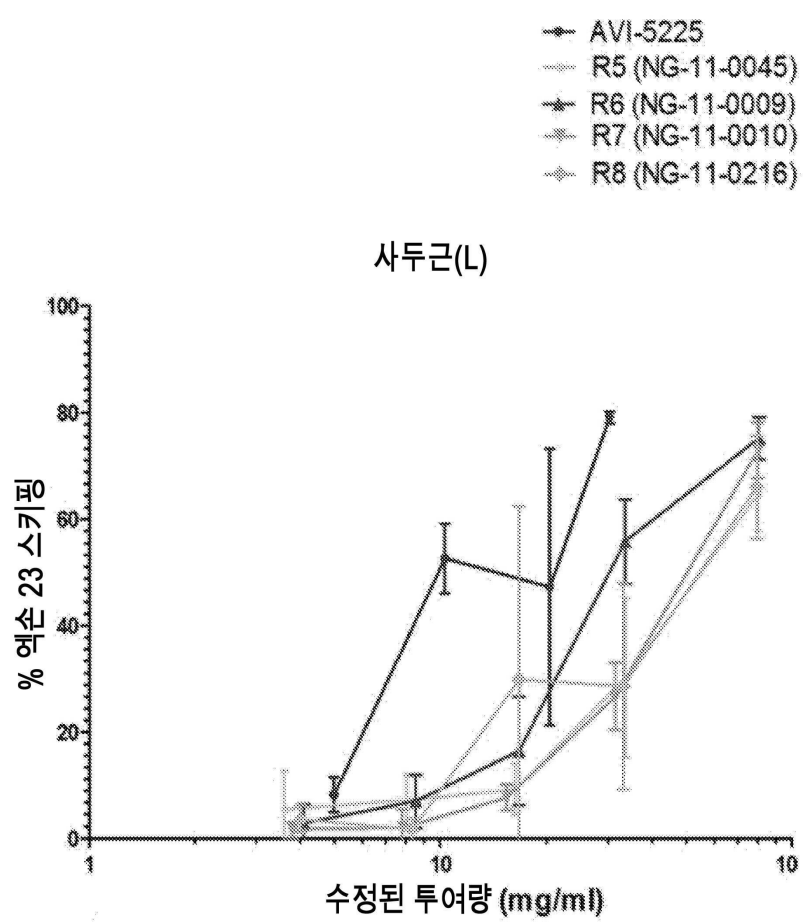
도면3



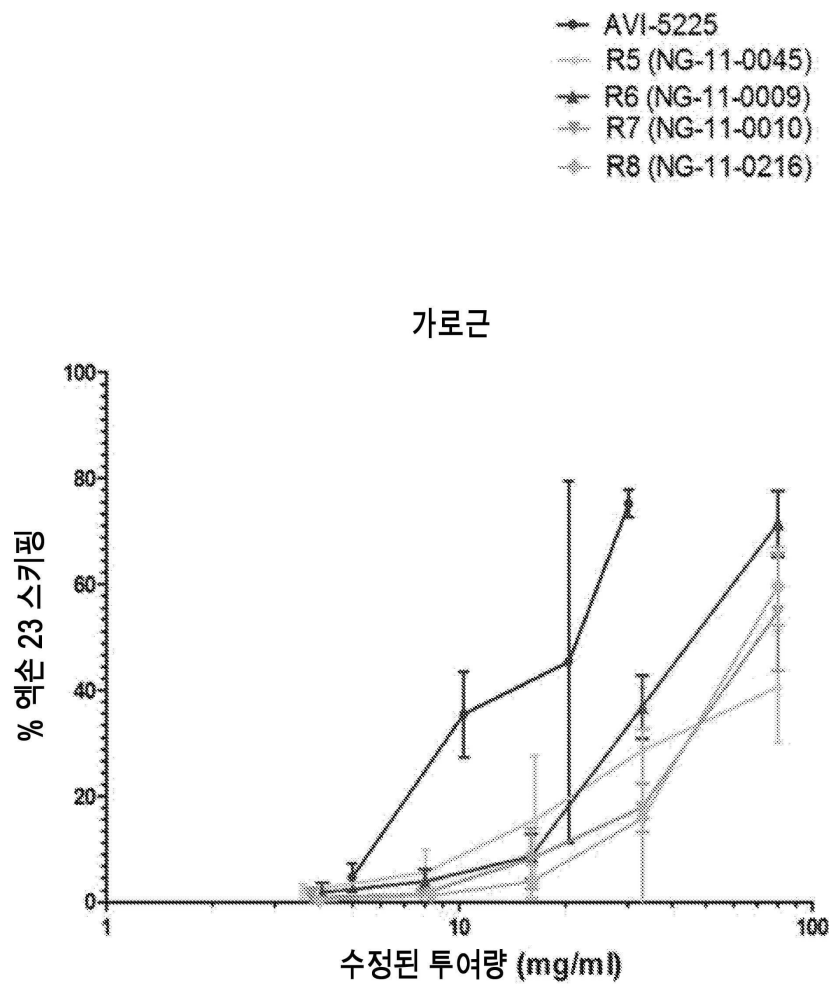
도면4



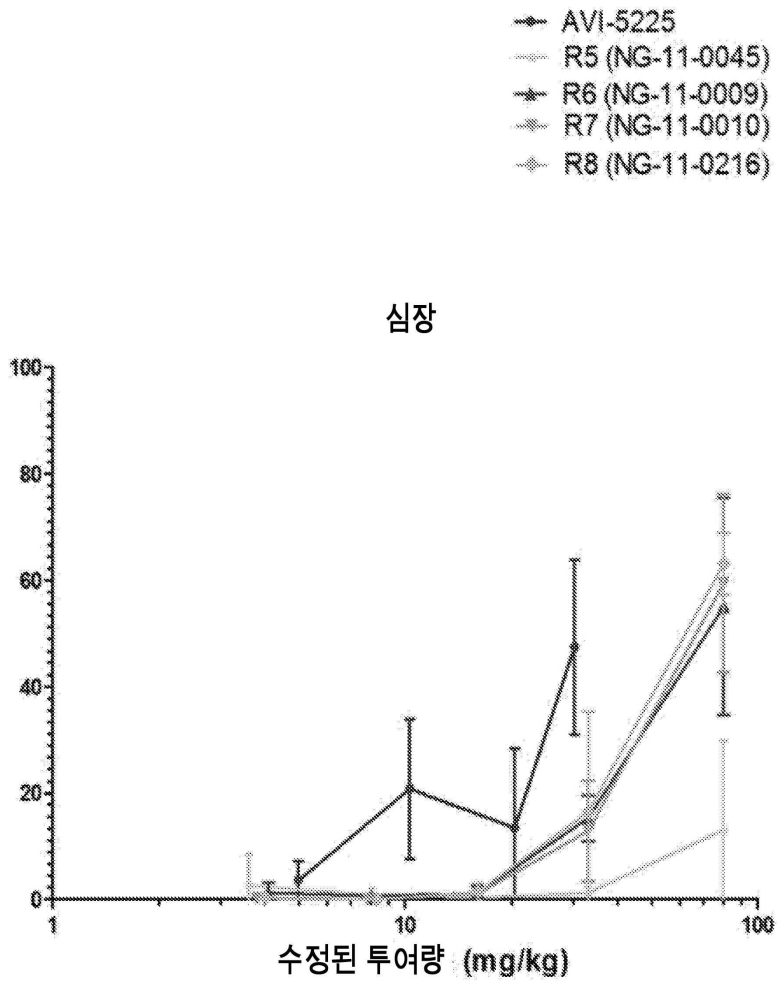
도면5a



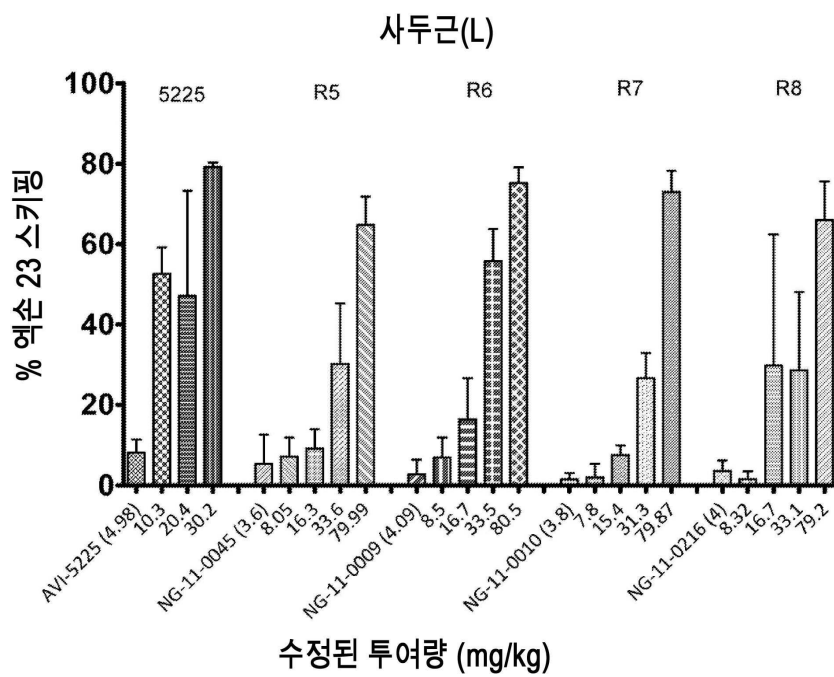
도면5b



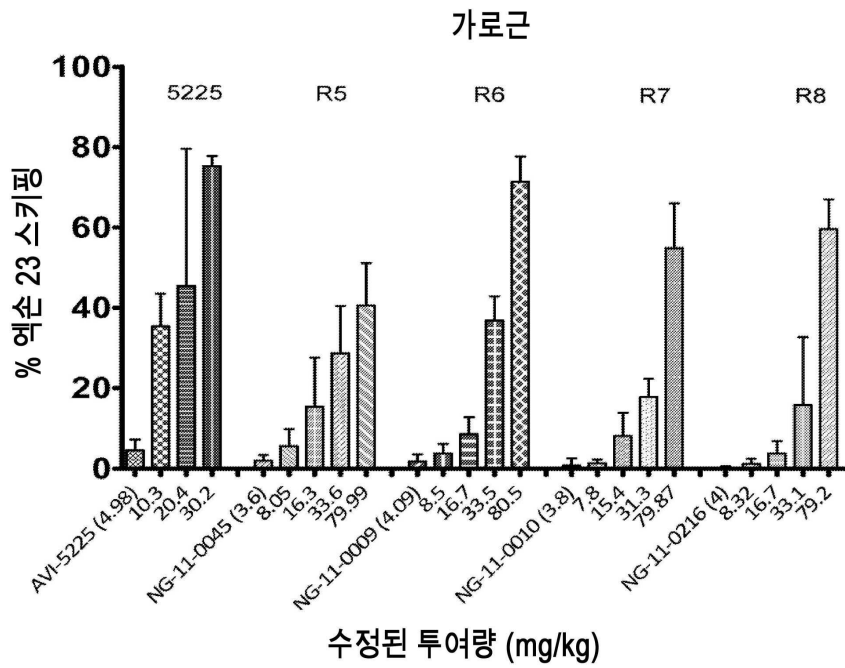
도면5c



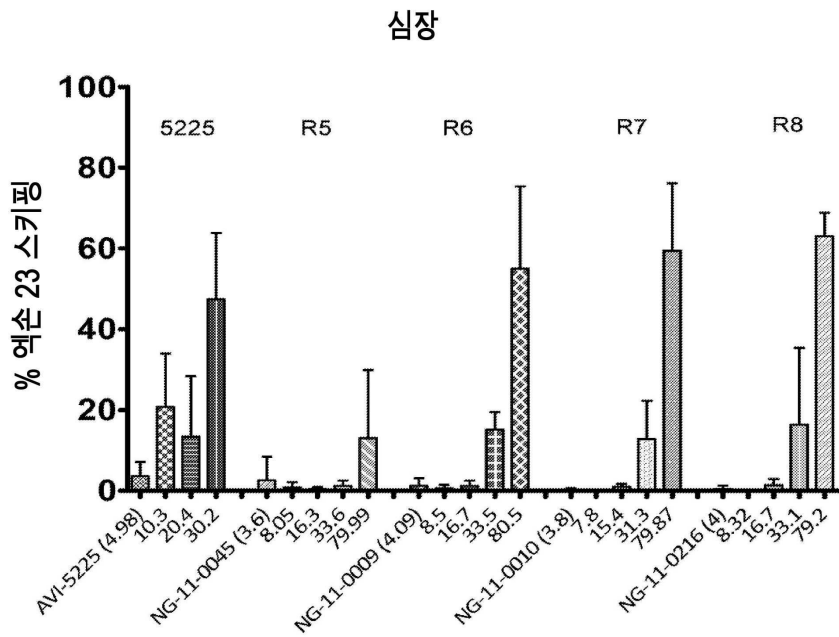
도면6a



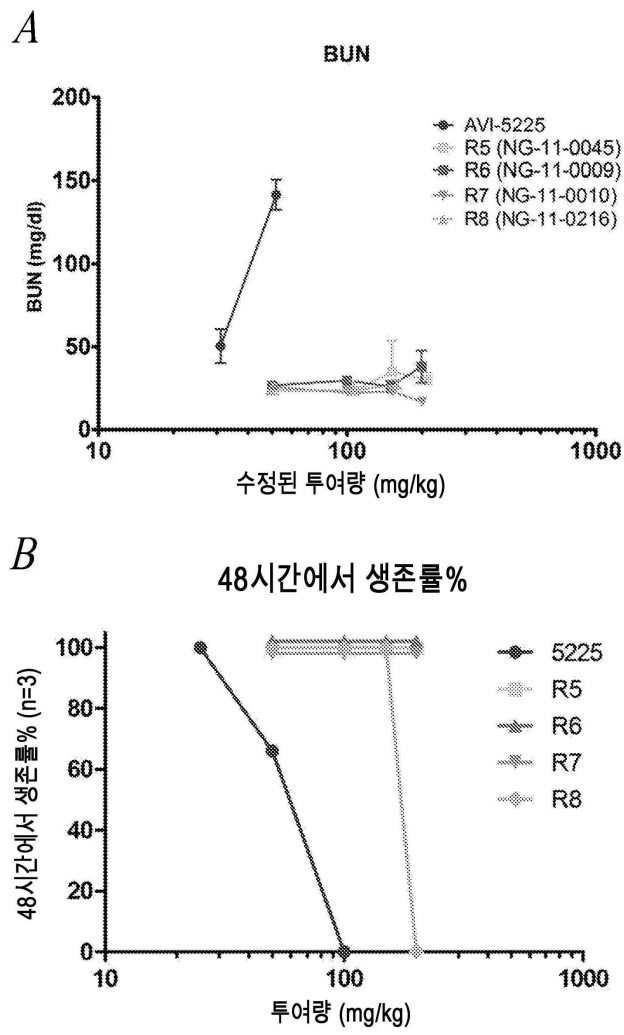
도면6b



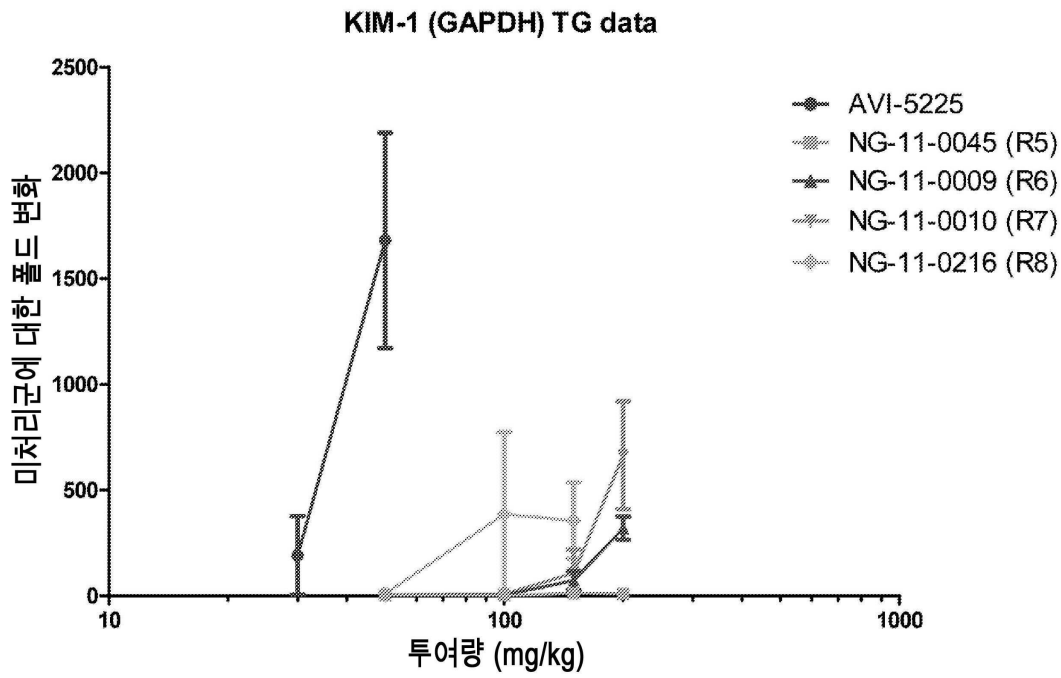
도면6c



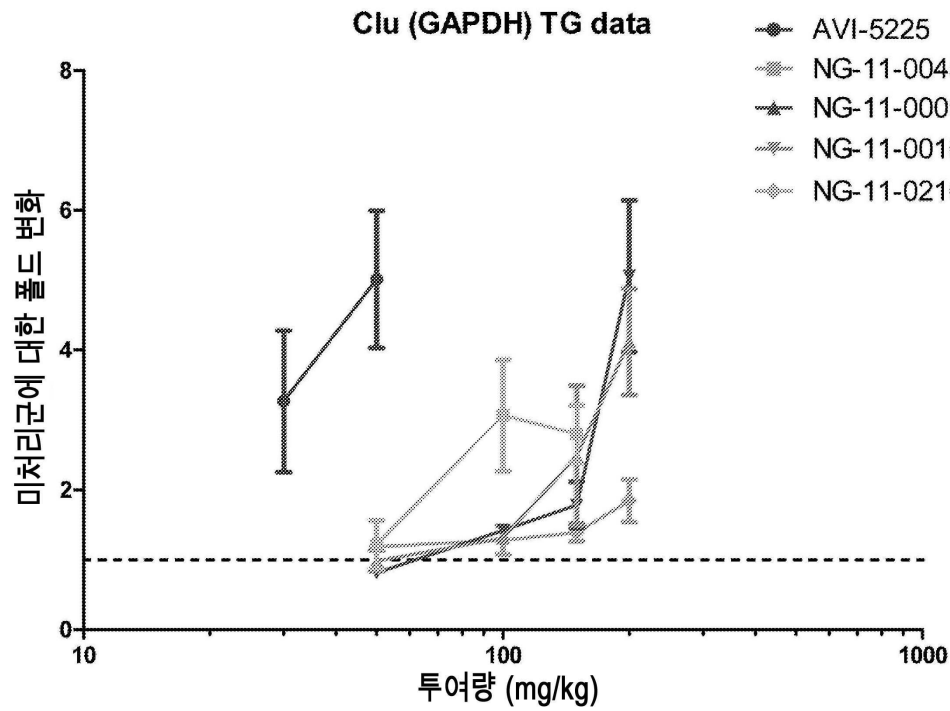
도면7



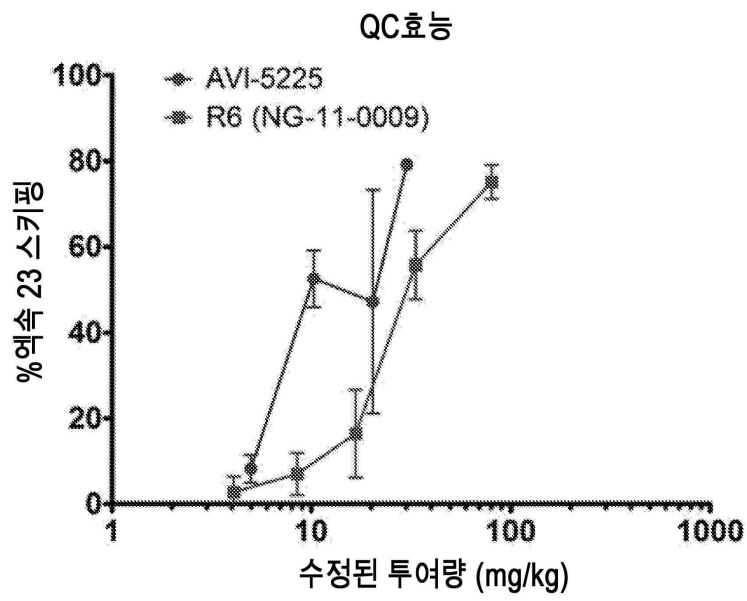
도면8a



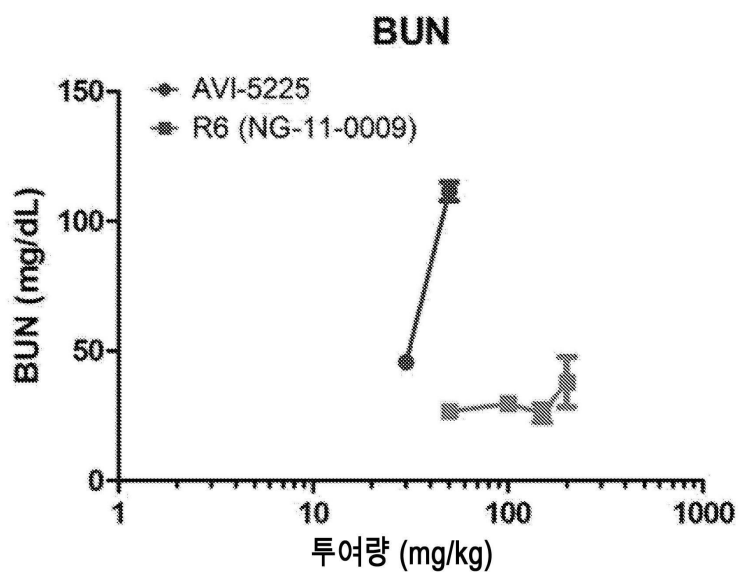
도면8b



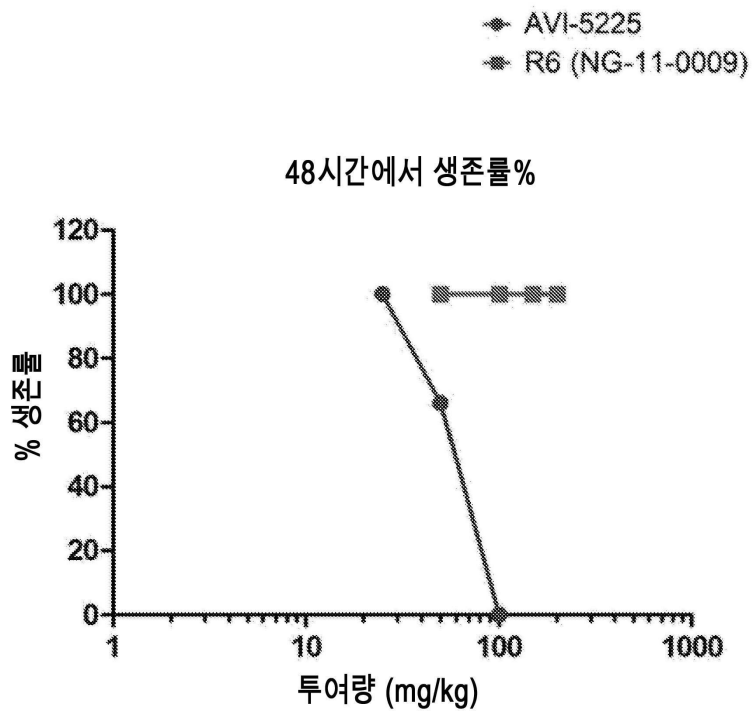
도면9a



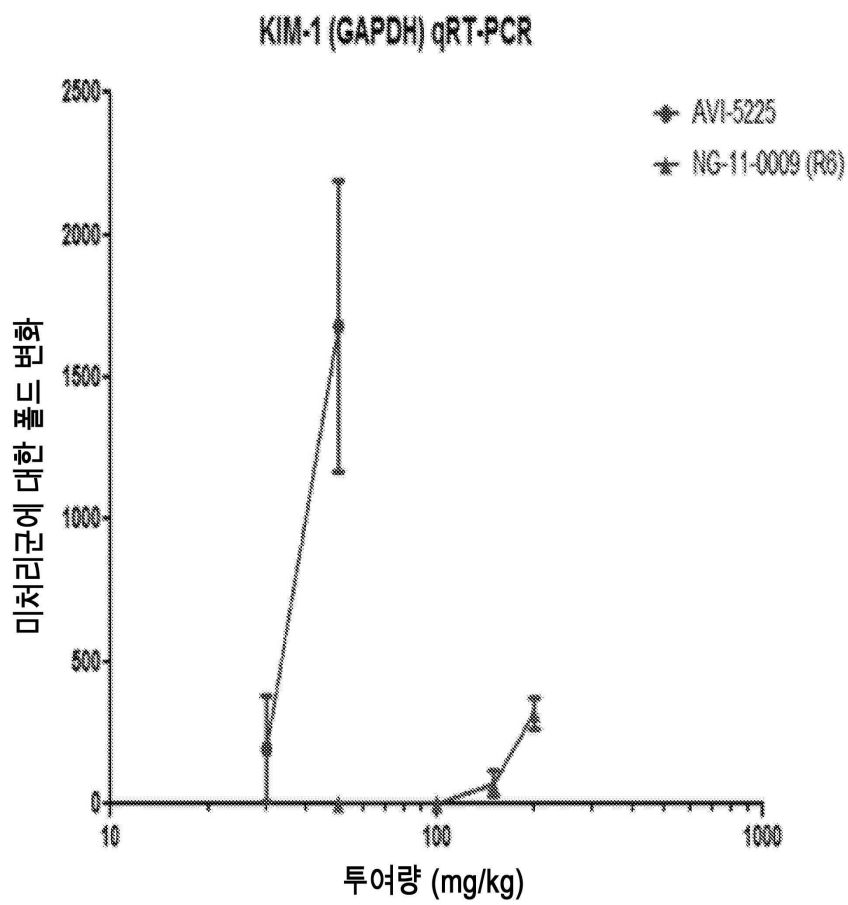
도면9b



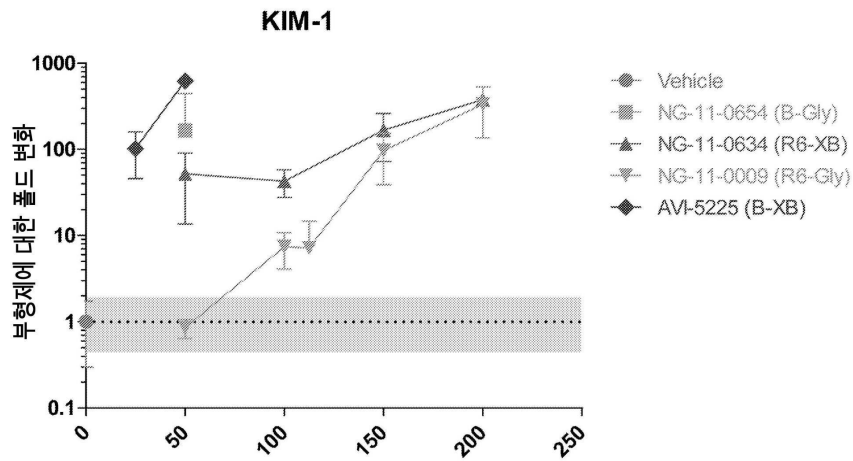
도면9c



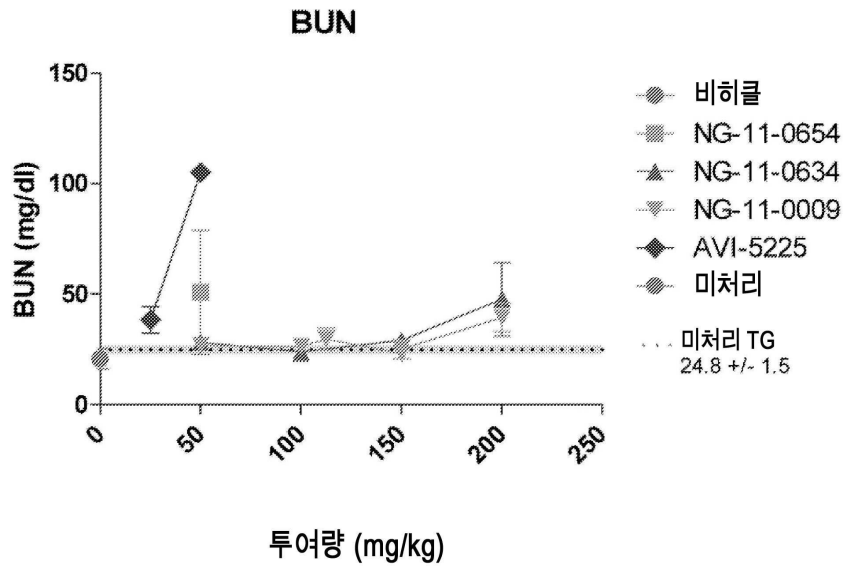
도면9d



도면10



도면11



도면12

