



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0068245
 (43) 공개일자 2014년06월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) **C07H 21/00** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 **10-2014-7011467**
 (22) 출원일자(국제) **2012년10월03일**
 심사청구일자 **없음**
 (85) 번역문제출일자 **2014년04월28일**
 (86) 국제출원번호 **PCT/US2012/058519**
 (87) 국제공개번호 **WO 2013/052523**
 국제공개일자 **2013년04월11일**
 (30) 우선권주장
 61/542,533 2011년10월03일 미국(US)

(71) 출원인
모더나 세라퓨틱스, 인코포레이티드
 미국 매사추세츠 02139 캠프리지 테크놀로지 스퀘어 200
 (72) 발명자
드 푸제롤레 앙토냉
 미국 매사추세츠주 02446 브록클린 씨밋 애비뉴 66
로이 아타누
 미국 매사추세츠주 02180 스톤햄 힐 스트리트 #9 115
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
장훈

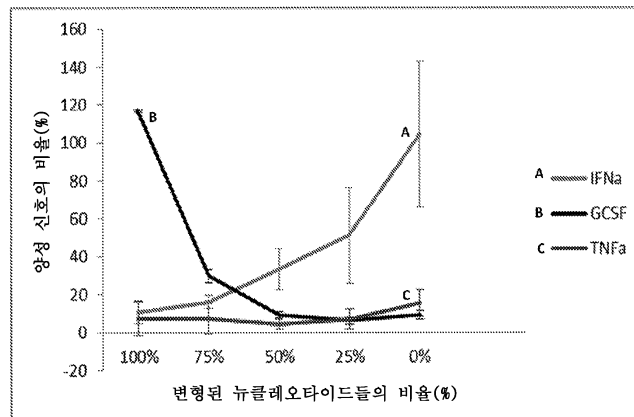
전체 청구항 수 : 총 72 항

(54) 발명의 명칭 **변형된 뉴클레오사이드, 뉴클레오타이드, 및 핵산, 및 이들의 용도**

(57) 요약

본 개시는, 변형된 뉴클레오사이드, 뉴클레오타이드, 및 핵산, 및 이들의 사용 방법을 제공한다.

대표도 - 도10



(72) 발명자

슈림 제이슨 피.

미국 펜실베이니아주 19127 필라델피아 플랫폼 록 로드
4601 에이피티. 417

시디키 수하이브

미국 매사추세츠주 01803 버링턴 유니버시티 애비
뉴 37

하탈라 폴

미국 매사추세츠주 02124 찰스타운 모뉴먼트 스트
리트 #1 26

방셀 스테판

미국 매사추세츠주 02139, 캠프릿지 테크놀로지 스
퀘어 200

특허청구의 범위

청구항 1

목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 상기 단리된 폴리뉴클레오타이드는,

- (a) A, G, U 또는 C 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드의 화학 구조와 비교하여 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드들 또는 뉴클레오타이드들을 포함하는, n개의 연결된 뉴클레오타이드들 또는 뉴클레오타이드들의 서열,
- (b) 하나 이상의 코작(Kozak) 서열을 포함하는 5' UTR,
- (c) 3' UTR, 및
- (d) 하나 이상의 5' 캡 구조(cap structure)

를 포함하는, 목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 폴리-A 테일(tail)을 추가로 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 3

제2항에 있어서, 정제되는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 하나 이상의 5' 캡 구조가, 캡 0, 캡 1, ARCA, 이노신, N1-메틸-구아노신, 2'플루오로-구아노신, 7-데아자-구아노신, 8-옥소-구아노신, 2-아미노-구아노신, LNA-구아노신, 및 2-아지도-구아노신으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

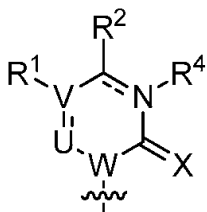
청구항 5

제4항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드의 변형이 뉴클레오타이드 염기 및/또는 뉴클레오타이드의 당 부분에 위치하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

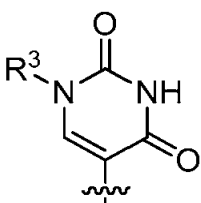
청구항 6

제5항에 있어서, 상기 변형이 뉴클레오타이드 염기에 위치하고, 상기 뉴클레오타이드 염기는 하기 화학식을 갖는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

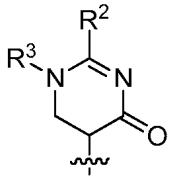
[화학식 XII-a]




[화학식 XII-b]



[화학식 XII-c]



상기 화학식 XII-a 내지 화학식 XIIc에서,

 는 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고;

X는 O 또는 S이며;

U 및 W는 각각 독립적으로 C 또는 N이고;

V는 O, S, C 또는 N이며;


여기서, V가 C인 경우에 R¹은 H, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알케닐, C₁₋₆ 알키닐, 할로, 또는 -OR^c이고, 여기서, C₁₋₂₀ 알킬, C₂₋₂₀ 알케닐, C₂₋₂₀ 알키닐은 각각, -OH, -NR^aR^b, -SH, -C(O)R^c, -C(O)OR^c, -NHC(O)R^c, 또는 -NHC(O)OR^c로 임의로 치환되며;

여기서, V가 O, S, 또는 N인 경우에 R¹은 부재하고;

R²는 H, -OR^c, -SR^c, -NR^aR^b, 또는 할로이거나;

V가 C인 경우에 R¹ 및 R²는, 이들이 부착된 탄소 원자들과 함께, 할로, -OH, -SH, -NR^aR^b, C₁₋₂₀ 알킬, C₂₋₂₀ 알케닐, C₂₋₂₀ 알키닐, C₁₋₂₀ 알콕시, 또는 C₁₋₂₀ 티오알킬로부터 선택되는 1 내지 4개의 치환체들로 임의로 치환된 5- 또는 6-원 환을 형성할 수 있고;

R³은 H 또는 C₁₋₂₀ 알킬이며;

R⁴는 H 또는 C₁₋₂₀ 알킬이고; 여기서,  가 이중 결합을 나타내는 경우에 R⁴는 부재하거나, N-R⁴가 함께, C₁₋₂₀ 알킬로 치환된 양으로 하전된 N을 형성하고;

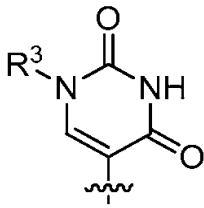
R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 H, C₁₋₂₀ 알킬, C₂₋₂₀ 알케닐, C₂₋₂₀ 알키닐, 또는 C₆₋₂₀ 아릴이며;

R^c는 H, C₁₋₂₀ 알킬, C₂₋₂₀ 알케닐, 페닐, 벤질, 폴리에틸렌 글리콜 그룹, 또는 아미노-폴리에틸렌 글리콜 그룹이다.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 변형이 뉴클레오사이드 염기 내에 위치하고, 상기 뉴클레오사이드 염기가 화학식 XII-b를 갖는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

[화학식 XII-b]



상기 화학식 XII-b에서,

R³은 C₁₋₂₀ 알킬이다.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 R³이 C₁₋₄ 알킬인, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 R³이 CH₃인, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오사이드가 슈도우리딘(Ψ) 또는 5-메틸-사이티딘(m⁵C)이 아닌, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 11

제6항의 단리된 폴리뉴클레오타이드 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 부형제가, 용매, 수성 용매, 비-수성 용매, 분산 매질, 희석제, 분산제, 현탁 보조제, 계면 활성제, 등장성 제제, 증점제 또는 유화제, 방부제, 지질, 리피도이드(lipidoid), 리포솜, 지질 나노입자, 코어-셸 나노입자(core-shell nanoparticle), 중합체, 리포플렉스 펩타이드(lipoplexe peptide), 단백질, 세포, 히알루로니다제, 및 이들의 혼합물로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 13

제6항의 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포유동물 대상체에게 투여함을 포함하는, 포유동물 대상체에서 목적인 폴리펩타이드의 수준을 증가시키는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드가 제형화되는, 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 단리된 폴리뉴클레오타이드가 TNF-알파 또는 IFN-알파에 대해 100 초과인 단백질:사이토카인 비를 갖는, 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 단리된 폴리뉴클레오타이드가 1 μ g 내지 150 μ g의 총 1일 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 투여가 주사에 의해 것인, 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 투여가 피내 또는 피하 또는 근육내인, 방법.

청구항 19

제13항에 있어서, 상기 포유동물의 혈청 내의 목적인 폴리펩타이드의 수준이 투여 후 적어도 2시간째에 50pg/mL 이상인, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 포유동물의 혈청 내의 목적인 폴리펩타이드의 수준이 투여 후 적어도 72시간 동안 50pg/mL 초과로 잔존하는, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 포유동물의 혈청 내의 목적인 폴리펩타이드의 수준이 투여 후 적어도 72시간 동안 60pg/mL 초과로 잔존하는, 방법.

청구항 22

제13항에 있어서, 상기 투여가, 2회 이상의 동등하거나 동등하지 않은 분할 용량들로 이루어지는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 분할 용량들의 폴리펩타이드를 투여함으로써 대상체에 의해 생산된 폴리펩타이드의 수준이, 단일 투여로서 폴리뉴클레오타이드의 동일한 총 1일 용량을 투여함으로써 생산된 수준보다 더 큰, 방법.

청구항 24

제13항에 있어서, 상기 포유동물 대상체가, 목적인 폴리펩타이드의 증가된 수준을 필요로 하는 사람 환자인, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 목적인 폴리펩타이드의 증가된 수준이, 상기 환자의 체액 내에서 검출가능한, 방법.

청구항 26

제53항에 있어서, 상기 체액이, 말초 혈액, 혈청, 혈장, 복수액, 뇨, 뇌척수액(CSF), 객담, 타액, 골수, 윤활액, 수성 체액, 양수, 귀지(cerumen), 모유, 기관지 폐포 세척액, 정액, 전립선액, 쿠퍼액(cowper's fluid) 또는 전-사정액(pre-ejaculatory fluid), 땀, 대변, 모발, 눈물, 낭액(cyst fluid), 흉막액 및 복막액, 심막액, 림프, 미즙(chyme), 암죽(chyle), 담즙, 간질액, 월경, 고름, 피지, 구토, 질 분비액, 점막 분비액, 대변 물, 체액, 비강 세척액, 기관지폐 흡인물들, 배낭강액(blastocyl cavity fluid), 및 체대혈로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 27

제24항에 있어서, 상기 투여가, 시간, 일, 주, 달, 또는 년의 과정에 걸쳐 일어나는 투약 용법(dosing regimen)에 따른 것인, 방법.

청구항 28

제17항에 있어서, 상기 주사가, 다중-니들 주사 시스템, 카테터(catheter) 또는 내강 시스템(lumen system), 및 초음파, 전기 또는 방사선 기반 시스템으로부터 선택되는 하나 이상의 장치들을 사용함으로써 달성되는, 방법.

청구항 29

제22항에 있어서, 임의의 용량으로 투여된 폴리뉴클레오타이드의 양이 실질적으로 동등한, 방법.

청구항 30

제22항에 있어서, 복수 용량들 중 제1 용량, 제2 용량 또는 어느 용량이 실질적으로 동시에 투여되는, 방법.

청구항 31

제13항에 있어서, 상기 투여가 약 10mg/kg 내지 약 500mg/kg의 단일 단위 용량을 포함하는, 방법.

청구항 32

제13항에 있어서, 상기 투여가 약 1.0mg/kg 내지 약 10mg/kg의 단일 단위 용량을 포함하는, 방법.

청구항 33

제13항에 있어서, 상기 투여가 약 0.001mg/kg 내지 약 1.0mg/kg의 단일 단위 용량을 포함하는, 방법.

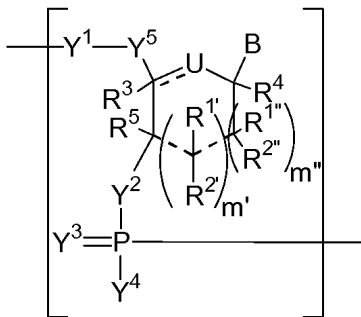
청구항 34

제4항에 있어서, 상기 뉴클레오사이드의 변형이, 피리미딘 핵염기의 원자를 아민, SH, 메틸 또는 에틸, 또는 클로로 또는 플루오로로 대체하거나 치환함을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 35

제1항에 있어서, 상기 n개의 연결된 뉴클레오사이드들이, 하기 화학식 Ia의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

[화학식 Ia]



상기 화학식 Ia에서,

U는 O, S, N(R^u)_{nu}, 또는 C(R^u)_{nu}이고, 여기서, nu는 0 내지 2의 정수이고, 각각의 R^u는 독립적으로 H, 할로, 또는 임의로 치환된 알킬이며;

— — — 는 단일 결합 또는 이중 결합이고;

— · — 는 단일 결합이거나, 부재하며;

각각의 R¹, R², R^{1'}, R^{2'}, R³, R⁴, 및 R⁵는, 존재하는 경우, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알킬닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 하이드록시알콕시, 임의로 치환된 아미노, 아지도, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알킬닐이거나, 부재하고; 여기서, R³과, R¹, R^{1'}, R², R^{2'}, 또는 R⁵ 중 하나 이상과의 조합은 함께 결합하여, 임의로 치환된 알킬렌 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌을 형성할 수 있고, 상기 조합은, 이들이 부착된 탄소들과 함께, 임의로 치환된 헤테로사이클릴을 제공하며; 여기서, R⁵와, R¹, R^{1'}, R², 또는 R^{2'} 중 하나 이상과의 조합은 함께 결합하여, 임의로 치환된 알킬렌 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌을 형성할 수 있으며, 상기 조합은, 이들이 부착된 탄소들과 함께, 임의로 치환된 헤테로사이클릴을 제공하며; 여기서, R⁴와, R¹, R^{1'}, R², R^{2'}, R³, 또는 R⁵ 중 하나 이상과의 조합은 함께 결합하여, 임의로 치환된 알킬렌 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌을 형

성할 수 있으며, 상기 조합은, 이들이 부착된 탄소들과 함께, 임의로 치환된 헥테로사이클릴을 제공하고;

각각의 m' 및 m'' 은 독립적으로 0 내지 3의 정수이고;

각각의 Y^1 , Y^2 , 및 Y^3 은, 독립적으로, 0, S, Se, $-NR^{N1}-$, 임의로 치환된 알킬렌, 또는 임의로 치환된 헥테로알킬렌이며, 여기서, R^{N1} 은 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 아릴이거나, 부재하고;

각각의 Y^4 는, 독립적으로, H, 하이드록시, 티올, 보라닐, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 티오알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이며;

각각의 Y^5 는, 독립적으로, 0, S, Se, 임의로 치환된 알킬렌, 또는 임의로 치환된 헥테로알킬렌이고;

n 은 1 내지 100,000의 정수이며;

B는 핵염기이다.

청구항 36

제35항에 있어서, B가 슈도우리딘(Ψ) 또는 5-메틸-사이티딘(m^5C)가 아닌, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서,

U가 0 또는 $C(R^U)_{nu}$ 이고, 여기서, nu 는 1 내지 2의 정수이고, 각각의 R^U 는, 독립적으로, H, 할로, 또는 임의로 치환된 알킬이고;

각각의 R^1 , $R^{1'}$, $R^{1''}$, R^2 , $R^{2'}$, 및 $R^{2''}$ 은, 존재하는 경우, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 아미노, 아지도, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알키닐이며;

각각의 R^3 및 R^4 는, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 임의로 치환된 알킬, 또는 임의로 치환된 알콕시알콕시이고;

각각의 Y^1 , Y^2 , 및 Y^3 은, 독립적으로, 0, S, Se, $-NR^{N1}-$, 임의로 치환된 알킬렌, 또는 임의로 치환된 헥테로알킬렌이고, 여기서, R^{N1} 은 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 또는 임의로 치환된 알키닐이며;

각각의 Y^4 는, 독립적으로, H, 하이드록시, 티올, 보라닐, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 티오알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이고;

각각의 Y^5 는, 독립적으로 0 또는 임의 치환된 알킬렌이며;

n 은 1 내지 10,000의 정수이다.

청구항 38

제37항에 있어서, 각각의 R^1 , $R^{1'}$ 및 $R^{1''}$ 이, 존재하는 경우, H인, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 39

제38항에 있어서, 각각의 R^2 , $R^{2'}$ 및 $R^{2''}$ 이, 존재하는 경우, 독립적으로 H, 할로, 하이드록시, 임의로 치환된 알콕시, 또는 임의로 치환된 알콕시알콕시인, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 40

제39항에 있어서, 각각의 R^2 , $R^{2'}$ 및 $R^{2''}$ 이, 존재하는 경우, H인, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

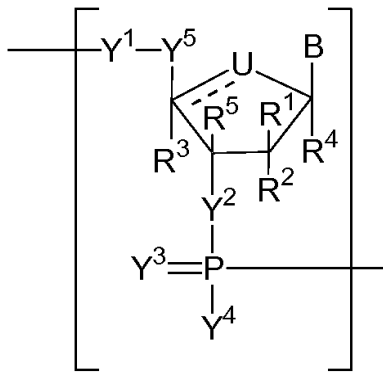
청구항 41

제40항에 있어서, 각각의 R^1 , $R^{1'}$ 및 $R^{1''}$ 이, 존재하는 경우, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 임의로 치환된 알콕시, 또는 임의로 치환된 알콕시알콕시인, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 42

제35항에 있어서, 상기 n개의 연결된 뉴클레오타이드들이 하기 화학식 IIa의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

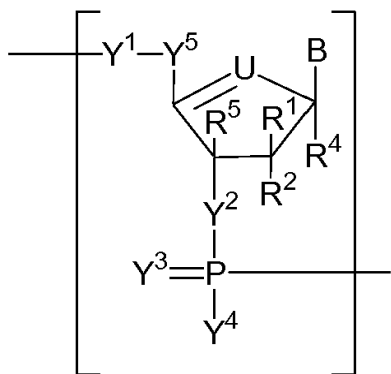
[화학식 IIa]



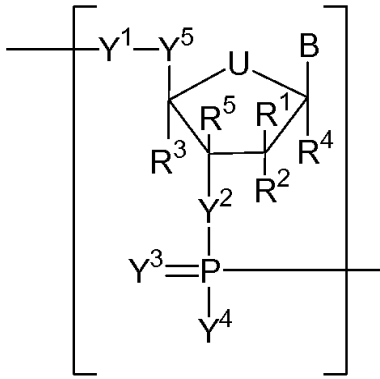
청구항 43

제42항에 있어서, 상기 n개의 연결된 뉴클레오사이드들이 하기 화학식 IIb 또는 화학식 IIc의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

[화학식 IIb]



[화학식 IIc]



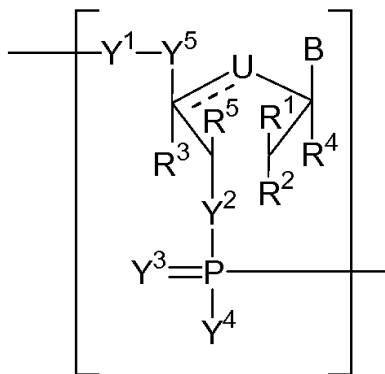
청구항 44

제43항에 있어서, 상기 n개의 연결된 뉴클레오타이드들이 하기 화학식 IIb-1, 화학식 IIb-2, 또는 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-4의 화합물을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 45

제35항에 있어서, 상기 n개의 연결된 뉴클레오타이드들이 하기 화학식 IId의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

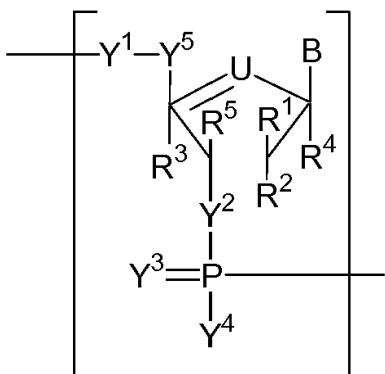
[화학식 IId]



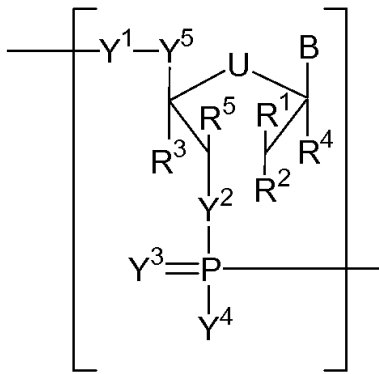
청구항 46

제44항에 있어서, 상기 n개의 연결된 뉴클레오타이드들이 하기 화학식 IIe 또는 화학식 IIf의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

[화학식 IIe]



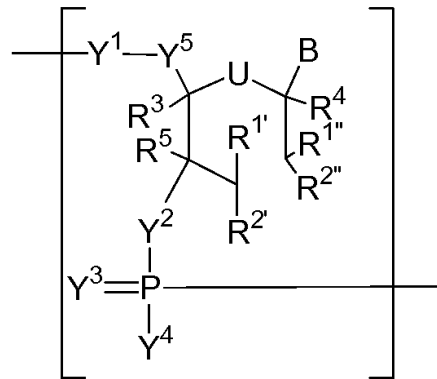
[화학식 II f]



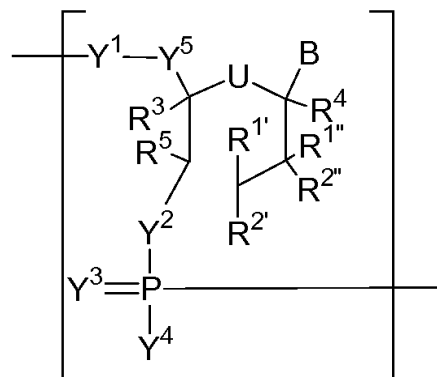
청구항 47

제35항에 있어서, 각각의 상기 연결된 뉴클레오타이드들이 하기 화학식 IIg 내지 화학식 IIj 중 하나의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

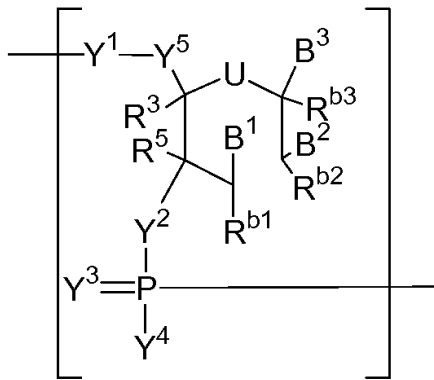
[화학식 IIg]



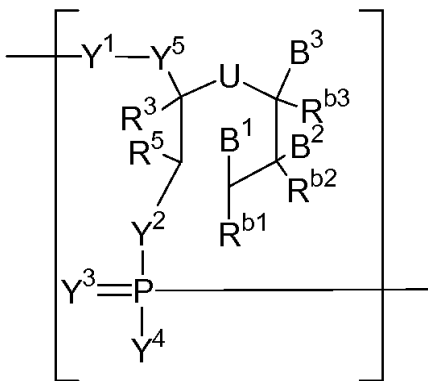
[화학식 IIh]



[화학식 IIIi]



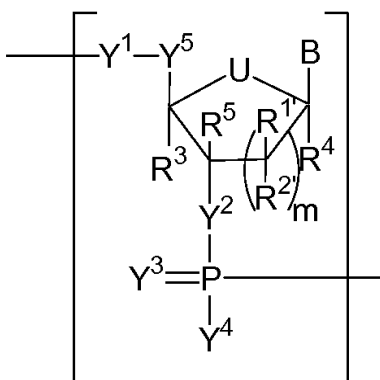
[화학식 IIIj]



청구항 48

제35항에 있어서, 상기 n개의 연결된 뉴클레오사이드들이 화학식 IIIk의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

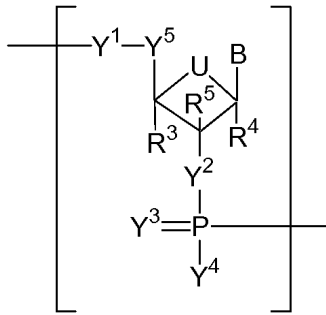
[화학식 IIIk]



청구항 49

제48항에 있어서, 상기 n개의 연결된 뉴클레오사이드들이 하기 화학식 III의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

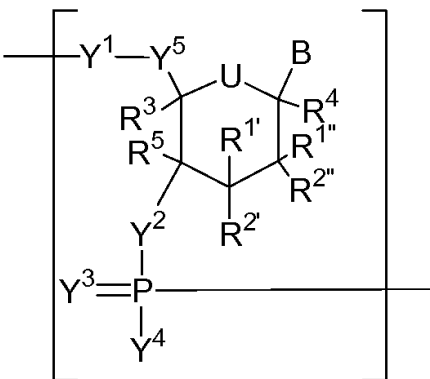
[화학식 III]



청구항 50

제48항에 있어서, 상기 n개의 연결된 뉴클레오사이드들이 하기 화학식 II_m의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

[화학식 II_m]



상기 화학식 II_m에서,

각각의 R^{1'}, R^{1''}, R^{2'}, 및 R^{2''}은, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시이거나, 또는 부재하고; 여기서, R^{2'}과 R³의 조합 또는 R^{2''}과 R³의 조합은 함께, 임의로 치환된 알킬렌 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌을 형성할 수 있다.

청구항 51

제38항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서,

U가 0 또는 C(R^u)_{nu}이고, 여기서, nu는 1 내지 2의 정수이며, 각각의 R^u는, 독립적으로, H, 할로, 또는 임의로 치환된 알킬이고;

각각의 R¹ 및 R²는, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 아미노, 아지도, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알킬닐이며;

각각의 R³ 및 R⁴는, 독립적으로, H 또는 임의로 치환된 알킬이고;

각각의 Y¹, Y², 및 Y³은, 독립적으로, O, S, Se, -NR^{N1}-, 임의로 치환된 알킬렌, 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌이고, 여기서, R^{N1}은 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 또는 임의로 치환된 알키닐이며,

각각의 Y^4 는, 독립적으로, H, 하이드록시, 티올, 보라닐, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알킬닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알킬닐옥시, 임의로 치환된 티오알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이며;

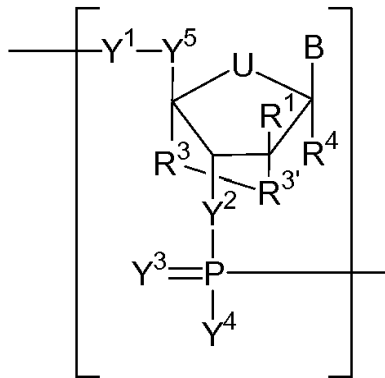
각각의 Y^5 는, 독립적으로, O 또는 임의로 치환된 알킬렌이고;

n은 10 내지 10,000의 정수인, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 52

제35항에 있어서, 상기 n개의 연결된 폴리뉴클레오사이드들이 하기 화학식 II_n의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

[화학식 II_n]



상기 화학식 II_n에서,

U는 O 또는 $C(R^u)_{nu}$ 이고, 여기서, nu는 1 내지 2의 정수이며, 각각의 R^u 는 독립적으로, H, 할로, 또는 임의로 치환된 알킬이고;

각각의 R^1 및 R^4 는, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알킬닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 아미노, 아지도, 임의로 치환된 아틸, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알킬닐이고;

$R^{3'}$ 은 O, S, 또는 $-NR^{N1}$ -이고, 여기서, R^{N1} 은 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알킬닐, 또는 임의로 치환된 아틸이며;

$R^{3''}$ 은 임의로 치환된 알킬렌 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌이고;

각각의 Y^1 , Y^2 , 및 Y^3 는, 독립적으로, O, S, Se, $-NR^{N1}$ -, 임의로 치환된 알킬렌, 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌이고, 여기서, R^{N1} 은 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 또는 임의로 치환된 알킬닐이며;

각각의 Y^4 는, 독립적으로, H, 하이드록시, 티올, 보라닐, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알킬닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알킬닐옥시, 임의로 치환된 티오알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이고;

각각의 Y^5 는, 독립적으로, O, S, 임의로 치환된 알킬렌(예를 들면, 메틸렌), 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌이며;

n은 10 내지 10,000의 정수이다.

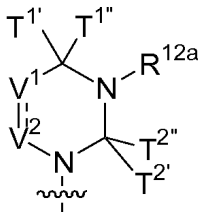
청구항 53

제35항에 있어서, 상기 n개의 연결된 폴리뉴클레오타이드들이 화학식 II-n1 또는 화학식 II-n2의 화합물을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

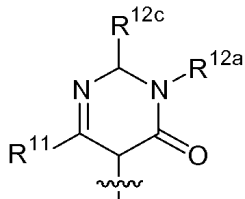
청구항 54

제35항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 B가, 하기 화학식 b1 내지 화학식 b5로부터 선택되는 화학식의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 갖는, 단리된 폴리뉴클레오타이드, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체:

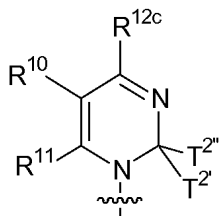
[화학식 b1]



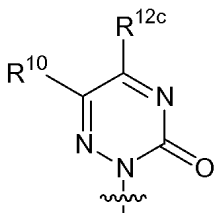
[화학식 b2]



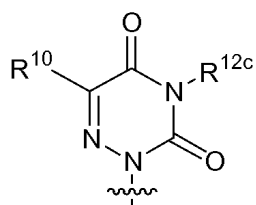
[화학식 b3]



[화학식 b4]



[화학식 b5]



상기 화학식 b1 내지 화학식 b5에서,

--- 는 단일 결합 또는 이중 결합이고;

각각의 T^1 , $T^{1'}$, $T^{2'}$, 및 $T^{2''}$ 은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 또는 임의로 치환된 티오알콕시이거나, 또는 T^1 과 $T^{1'}$ 의 조합이 함께 결합하여 또는 $T^{2'}$ 과 $T^{2''}$ 의 조합이 함께 결합하여(예를 들면, T^2 에서와 같이), O(옥소), S(티오), 또는 Se(셀레노)를 형성하고;

각각의 V^1 및 V^2 는, 독립적으로, O, S, $N(R^{vb})_{nv}$, 또는 $C(R^{vb})_{nv}$ 이고, 여기서, nv 는 0 내지 2의 정수이며, 각각의 R^{vb} 는, 독립적으로, H, 할로, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 할로알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐 옥시, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 아실아미노알킬, 임의로 치환된 알콕시카보닐알킬, 임의로 치환된 알콕시카보닐알케닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알키닐, 또는 임의로 치환된 알콕시카보닐알콕시이며;

R^{10} 은 H, 할로, 임의로 치환된 아미노산, 하이드록시, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알콕시카보닐알킬, 임의로 치환된 알콕시카보닐알케닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알키닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알콕시, 임의로 치환된 카복시알콕시, 임의로 치환된 카복시알킬, 또는 임의로 치환된 카바모일알킬이고;

R^{11} 은 H 또는 임의로 치환된 알킬이며;

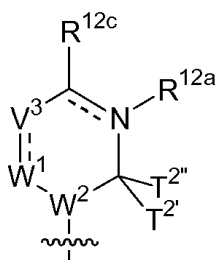
R^{12a} 는 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 카복시알킬, 임의로 치환된 카복시알콕시, 임의로 치환된 카복시아미노알킬, 또는 임의로 치환된 카바모일알킬이고;

R^{12c} 는 H, 할로, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 티오알콕시, 임의로 치환된 아미노, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알키닐이다.

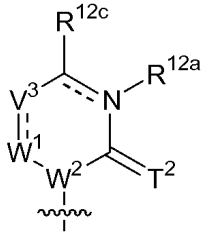
청구항 55

제35항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, B가 하기 화학식 b6 내지 b9의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

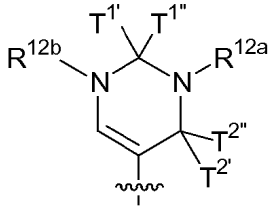
[화학식 b6]



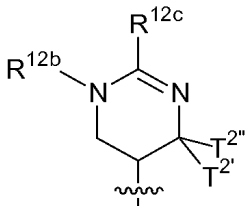
[화학식 b7]



[화학식 b8]



[화학식 b9]



상기 화학식 b6 내지 화학식 b9에서,

\equiv 는 단일 결합 또는 이중 결합이고;

각각의 T^1 , $T^{1''}$, $T^{2'}$, 및 $T^{2''}$ 은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 또는 임의로 치환된 티오알콕시이거나, T^1 과 $T^{1''}$ 의 조합이 함께 결합하여 또는 $T^{2'}$ 과 $T^{2''}$ 의 조합이 함께 결합하여, O(옥소), S(티오), 또는 Se(셀레노)를 형성하거나, 각각의 T^1 및 $T^{2'}$ 는, 독립적으로, O(옥소), S(티오), 또는 Se(셀레노)이며;

각각의 W^1 및 W^2 는, 독립적으로, $N(R^{Wa})_{nw}$ 또는 $C(R^{Wa})_{nw}$ 이고, 여기서, nw 는 0 내지 2의 정수이며, 각각의 R^{Wa} 는, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 또는 임의로 치환된 알콕시이고;

각각의 V^3 는, 독립적으로, O, S, $N(R^{Va})_{nv}$, 또는 $C(R^{Va})_{nv}$ 이며, 여기서, nv 는 0 내지 2의 정수이고 각각의 R^{Va} 는, 독립적으로, H, 할로, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 알크헤테로사이클릴, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 또는 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 아실아미노알킬, 임의로 치환된 알콕시카보닐알킬, 임의로 치환된 알콕시카보닐알케닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알키닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐아실, 임의로 치환된 알콕시카보닐알콕시, 임의로 치환된 카복시알킬, 임의로 치환된 카복시알콕시, 임의로 치환된 카복시아미노알킬, 또는 임의로 치환된 카바모일알킬이고, 여기서, R^{Va} 및 R^{12c} 는 이들이 부착된 탄소 원자들과 함께, 임의로 치환된 사이클로알킬, 임의로 치환된 아릴, 또는 임의로 치환된 헤테로사이클릴을 형성할 수 있고;

R^{12a} 는 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의

로 치환된 카복시알킬, 임의로 치환된 카복시알콕시, 임의로 치환된 카복시아미노알킬, 임의로 치환된 카바모일 알킬이거나, 부재하며;

R^{12b} 는 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 알크아릴, 임의로 치환된 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 알크헤테로사이클릴, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알콕시카보닐아실, 임의로 치환된 알콕시 카보닐알콕시, 임의로 치환된 알콕시카보닐알킬, 임의로 치환된 알콕시카보닐알케닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알키닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알콕시, 임의로 치환된 카복시알킬, 임의로 치환된 카복시알콕시, 임의로 치환된 카복시아미노알킬, 또는 임의로 치환된 카바모일알킬이고,

여기서, R^{12b} 와 $T^{1'}$ 의 조합 또는 R^{12b} 와 R^{12c} 의 조합은 함께 결합하여, 임의로 치환된 헤테로사이클릴을 형성할 수 있고;

R^{12c} 는 H, 할로, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 티오알콕시, 임의로 치환된 아미노, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알키닐이다.

청구항 56

제55항에 있어서, R^{12a} , R^{12b} , R^{12c} , 또는 R^{Va} 가, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$ [여기서, $s1$ 은 1 내지 10의 정수이고, 각각의 $s2$ 및 $s3$ 은, 독립적으로, 0 내지 10의 정수이고, R' 은 H 또는 C_{1-20} 알킬이다]; 또는 $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$ [여기서, $s1$ 은 1 내지 10의 정수이고, 각각의 $s2$ 및 $s3$ 은, 독립적으로, 0 내지 10의 정수이며, 각각의 R^{N1} 은, 독립적으로, 수소 또는 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬이다]로 치환되는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

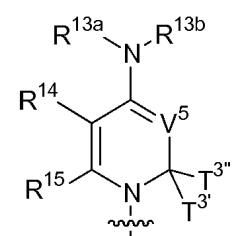
청구항 57

제55항에 있어서, B가 화학식 b28 내지 화학식 b31의 화합물을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

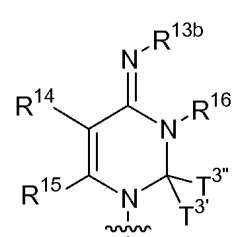
청구항 58

제35항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, B가 하기 화학식 b10 내지 화학식 b14의 화합물, 또는 이의 약체 학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

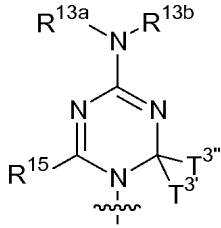
[화학식 b10]



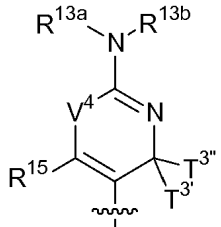
[화학식 b11]



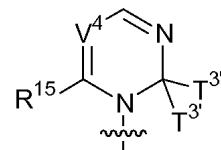
[화학식 b12]



[화학식 b13]



[화학식 b14]



상기 화학식 b10 내지 화학식 b14에서,

각각의 T^{3'} 및 T^{3''}은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 또는 임의로 치환된 티오알콕시이거나, T^{3'}과 T^{3''}의 조합은 함께 결합하여 O(옥소), S(티오), 또는 Se(셀레노)를 형성하고;

각각의 V⁴는, 독립적으로, O, S, N(R^{Vc})_{nv}, 또는 C(R^{Vc})_{nv}이고, 여기서, nv는 0 내지 2의 정수이며, 각각의 R^{Vc}는, 독립적으로, H, 할로, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 알크헤테로사이클릴, 또는 임의로 치환된 알키닐옥시이고, 여기서, R^{13b}와 R^{Vc}의 조합은 함께, 임의로 치환된 헤테로사이클릴을 형성할 수 있고;

각각의 V⁵는, 독립적으로, N(R^{Vd})_{nv}, 또는 C(R^{Vd})_{nv}이며, 여기서, nv는 0 내지 2의 정수이고, 각각의 R^{Vd}는, 독립적으로, H, 할로, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 알크헤테로사이클릴, 또는 임의로 치환된 알키닐옥시이며;

각각의 R^{13a} 및 R^{13b}는, 독립적으로, H, 임의로 치환된 아실, 임의로 치환된 아실옥시알킬, 임의로 치환된 알킬, 또는 임의로 치환된 알콕시이고, 여기서, R^{13b}와 R¹⁴의 조합은 함께, 임의로 치환된 헤테로사이클릴을 형성할 수 있고;

각각의 R¹⁴는, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 티올, 임의로 치환된 아실, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 할로알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 아실옥시알킬, 임의로 치환된 아미노, 아지도, 임의로 치환된 아틸, 임의로 치환된 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 알크헤테로사이클릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환

된 아미노알킬닐이고;

각각의 R^{15} 및 R^{16} 은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 또는 임의로 치환된 알키닐이다.

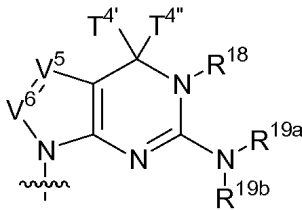
청구항 59

제58항에 있어서, B가 화학식 b32 내지 화학식 b36의 화합물을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

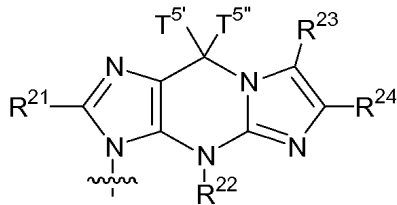
청구항 60

제35항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, B가 다음 화학식 b15 내지 화학식 b17의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

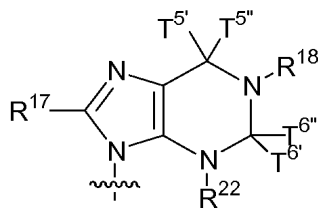
[화학식 b15]



[화학식 b16]



[화학식 b17]



상기 화학식 b15 내지 화학식 b17에서,

각각의 $T^{4'}$, $T^{4''}$, $T^{5'}$, $T^{5''}$, $T^{6'}$ 및 $T^{6''}$ 은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 또는 임의로 치환된 알콕시이고, 여기서, $T^{4'}$ 과 $T^{4''}$ 의 조합 또는 $T^{5'}$ 과 $T^{5''}$ 의 조합이 함께 결합하여 또는 $T^{6'}$ 과 $T^{6''}$ 의 조합이 함께 결합하여, O(옥소), S(티오), 또는 Se(셀레노)를 형성하고;

각각의 V^5 및 V^6 은, 독립적으로, O, S, $N(R^{Vd})_{nv}$, 또는 $C(R^{Vd})_{nv}$ 이고, 여기서, nv 는 0 내지 2의 정수이고, 각각의 R^{Vd} 는, 독립적으로, H, 할로, 티올, 임의로 치환된 아미노산, 시아노, 아미딘, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 티오알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이며;

각각의 R^{17} , R^{18} , R^{19a} , R^{19b} , R^{21} , R^{22} , R^{23} , 및 R^{24} 는, 독립적으로, H, 할로, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 티오알콕시, 임의로 치환된 아미노, 또는 임의로 치환된 아

미노산이다.

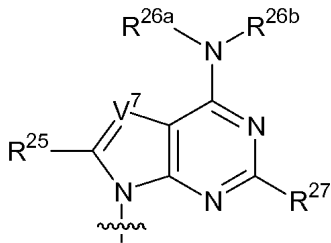
청구항 61

제60항에 있어서, B가 화학식 b37 내지 화학식 b40의 화합물을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

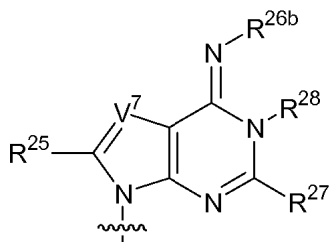
청구항 62

제35항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, B가 화학식 b18 내지 화학식 b20의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

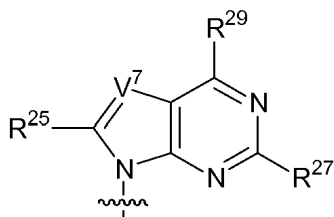
[화학식 b18]



[화학식 b19]



[화학식 b20]



상기 화학식 b18 내지 화학식 b20에서,

각각의 V^7 은, 독립적으로, O, S, $N(R^{Ve})_{nv}$, 또는 $C(R^{Ve})_{nv}$ 이고, 여기서, nv 는 0 내지 2의 정수이며, 각각의 R^{Ve} 는, 독립적으로, H, 할로, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 또는 임의로 치환된 알키닐옥시이고;

각각의 R^{25} 는, 독립적으로, H, 할로, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 티오알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이며;

각각의 R^{26a} 및 R^{26b} 는, 독립적으로, H, 임의로 치환된 아실, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 카바모일알킬, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 또는 폴리에틸렌 글리콜 그룹, 또는 아미노-폴리에틸렌 글리콜 그룹이고;

각각의 R^{27} 은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환

된 알콕시, 임의로 치환된 티오알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이며;

각각의 R²⁸은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 또는 임의로 치환된 알키닐이고;

각각의 R²⁹는, 독립적으로, H, 임의로 치환된 아실, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 카바모일알킬, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이다.

청구항 63

제62항에 있어서, B가 화학식 b41 내지 화학식 b43의 화합물을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

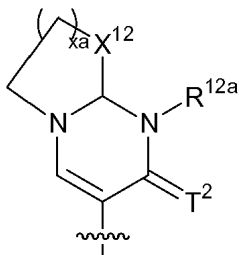
청구항 64

제62항에 있어서, R^{26a}, R^{26b}, 또는 R²⁹가 $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$ (여기서, s1은 1 내지 10의 정수이고, 각각의 s2 및 s3은, 독립적으로, 0 내지 10의 정수이며, R'은 H 또는 C₁₋₂₀ 알킬이다); 또는 $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$ (여기서, s1은 1 내지 10의 정수이고, 각각의 s2 및 s3은, 독립적으로, 0 내지 10의 정수이며, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, 수소 또는 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬이다)로 치환되는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 65

제35항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, B가 하기 화학식 b21의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

[화학식 b21]



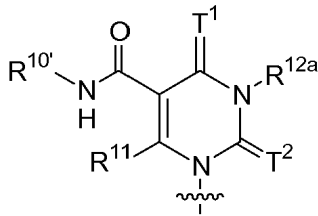
상기 화학식 b21에서,

X¹²는, 독립적으로, O, S, 임의로 치환된 알킬렌, 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌이고, xa는 0 내지 3의 정수이며, R^{12a}는 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐이거나, 또는 부재하고; T²는 O, S, 또는 Se이다.

청구항 66

제35항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, B가 하기 화학식 b22의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

[화학식 b22]



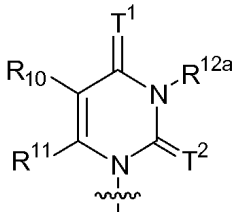
상기 화학식 b22에서,

R^{10'}은, 독립적으로, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알콕시카보닐알킬, 임의로 치환된 알콕시카보닐알케닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알키닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알콕시, 임의로 치환된 카복시알콕시, 임의로 치환된 카복시알킬, 또는 임의로 치환된 카바모일알킬이며; R¹¹은 H 또는 임의로 치환된 알킬이고; R^{12a}는 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐이거나, 또는 부재하며; 각각의 T¹ 및 T²는 독립적으로, O, S 또는 Se이다.

청구항 67

제35항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, B가 하기 화학식 b23의 화합물을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

[화학식 b23]



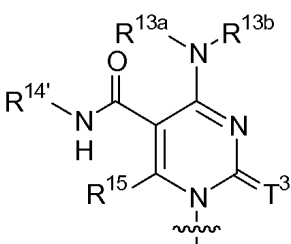
상기 화학식 b23에서,

R¹⁰은 임의로 치환된 헤테로사이클릴 또는 임의로 치환된 아릴이고; R¹¹은 H 또는 임의로 치환된 알킬이며; R^{12a}는 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐이거나, 또는 부재하고; 각각의 T¹ 및 T²는, 독립적으로, O, S, 또는 Se이다.

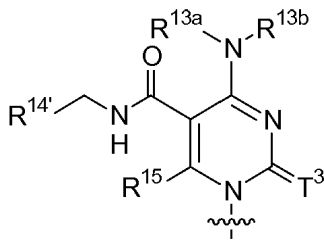
청구항 68

제35항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, B가 하기 화학식 b24 또는 화학식 b25의 화합물을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드:

[화학식 b24]



[화학식 b25]



상기 화학식 b24 또는 화학식 b25에서,

T³은 O, S, 또는 Se이고;

각각의 R^{13a} 및 R^{13b}는, 독립적으로, H, 임의로 치환된 아실, 임의로 치환된 알킬, 또는 임의로 치환된 알콕시이고, 여기서, R^{13b} 및 R¹⁴의 조합은 함께, 임의로 치환된 헤테로사이클릴을 형성할 수 있으며;

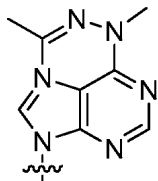
R^{14'}은, 독립적으로, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 알크헤테로사이클릴, 임의로 치환된 알크아릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알콕시카보닐알킬, 임의로 치환된 알콕시카보닐알케닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알키닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알콕시, 임의로 치환된 카복시알콕시, 임의로 치환된 카복시알킬, 또는 임의로 치환된 카바모일알킬이며;

각각의 R¹⁵는, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 또는 임의로 치환된 알키닐이다.

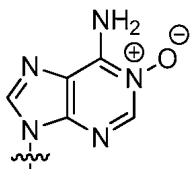
청구항 69

제35항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, B가 하기 화학식 b26 또는 화학식 b27의 화합물을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

[화학식 b26]



[화학식 b27]



청구항 70

제35항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, B가 화학식 b28 내지 화학식 b43의 화합물을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 71

제35항에 있어서, 상기 단리된 폴리뉴클레오타이드가, BB-1 내지 BB-274로부터 선택되는 하나 이상의 빌딩 블록 (building block)들, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체로부터 제조되는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 72

제35항에 있어서, 상기 단리된 폴리뉴클레오타이드가, 화합물 1 내지 50으로부터 선택되는 하나 이상의 빌딩 블록, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체로부터 제조되는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

명세서

기술 분야

[0001] **서열 목록에 대한 참조**

[0002] 본 출원은 전자 양식의 서열 목록과 함께 출원되어 있다. 명칭이 M009SQLST.txt인 서열 목록 파일은 2012년 10월 3일자로 작성되었고, 크기는 9,859 바이트이다. 서열 목록의 전자 양식의 정보는, 이의 전문이 인용에 의해 포함된다.

[0003] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0004] 본 출원은, 2011년 10월 3일자로 출원된 발명의 명칭 Modified Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids, and Uses Thereof의 미국 가특허출원 제61/542,533호에 대해 우선권을 주장하고, 이의 내용은 전문이 인용에 의해 포함된다.

[0005] **기술 분야**

[0006] 본 개시는, 변형된 핵산을 사용하여 세포 기능을 조정하는 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명의 변형된 핵산은 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 다중 단백질을 암호화할 수 있다. 암호화된 분자는 치료제 및/또는 진단제로서 사용될 수 있다.

배경 기술

[0007] **본 발명의 배경**

[0008] 천연 발생 RNA는 4개의 기본 리보뉴클레오타이드들: ATP, CTP, UTP 및 GTP로부터 합성되지만, 전사-후 변형된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 또한, 대략 100개의 상이한 뉴클레오사이드 변형들이 RNA에서 확인되었다 [참조: Rozenski, J, Crain, P, and McCloskey, J.(1999). The RNA Modification Database: 1999 update. Nucl Acids Res 27: 196-197]. 그러나, 번역-자극성 잠재능 및 RNA의 번역 효능에 있어서 뉴클레오사이드 변형의 역할은 명확하지 않다.

[0009] 단백질 발현에 영향을 미치는 선행 방법론에 다수의 문제점들이 존재한다. 예를 들면, 세포 내에 도입된 이중 DNA는 딸 세포들에 의해서(이중 DNA가 염색체 내로 통합되어 있는지의 여부에 관계없이) 또는 자손(offspring)에 의해서 유전될 수 있다. 도입된 DNA는 숙주 세포 게놈 DNA 내로 소정 빈도로 통합되어 숙주 세포 게놈 DNA에 변경 및/또는 손상을 초래할 수 있다. 또한, 단백질이 제조되기 전에 다수의 단계들이 일어나야 한다. 일단 세포 내부에서, DNA는 RNA로 전사되는 핵내로 수송되어야 한다. 이어서, DNA로부터 전사된 RNA는, 이것이 단백질로 번역되는 세포질로 진입되어야 한다. 다중 프로세싱 단계들에 대한 이러한 요구는 목적인 단백질의 생성 전에 이는 지체 시간(lag time)을 생성한다. 또한, 세포 내에서 DNA 발현을 수득하는 것은 어렵고; DNA는 빈번하게 세포 내로 진입하지만 발현되지 않거나 충분한 비율 또는 농도로 발현되지 않는다. 이는, DNA가 원시 세포 또는 변형된 세포주와 같은 세포 내로 도입되는 경우 특히 문제가 될 수 있다.

[0010] 핵산의 세포내 번역의 조정을 해결하기 위한 생물학적 양식(biological modality)에 대한 당해 분야에서의 요구가 존재한다.

발명의 내용

[0011] **본 발명의 요약**

[0012] 본 개시는, 특히, 생체내 및 생체의 둘 다에서, 세포의 집단 내로 도입되는 경우, 감소된 선천적 면역 반응을 나타낼 수 있는, 변형된 뉴클레오사이드, 변형된 뉴클레오타이드, 및 변형된 핵산을 제공한다.

[0013] 본 발명은, 단리되거나 정제될 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 이들 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 목적인 폴리펩타이드들을 암호화할 수 있고, A, G, U 또는 C 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드의 화학 구

조와 비교하여 적어도 하나의 변형된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 포함하는 n개의 연결된 뉴클레오사이드들 또는 뉴클레오타이드들의 서열을 포함한다. 또한, 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 코작(Kozak) 서열을 포함하는 5' UTR, 3' UTR, 및 하나 이상의 5' 캡 구조(cap structure)도 함유할 수 있다. 단리된 폴리뉴클레오타이드는 폴리-A 테일(tail)을 추가로 함유할 수 있고, 정제될 수 있다.

- [0014] 또한, 본 발명의 단리된 폴리뉴클레오타이드는, Cap 0, Cap 1, ARCA, 이노신, N1-메틸-구아노신, 2'플루오로-구아노신, 7-데아자-구아노신, 8-옥소-구아노신, 2-아미노-구아노신, LNA-구아노신, 및 2-아지도-구아노신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 5' Cap 구조도 포함한다.
- [0015] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 변형은, 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오사이드의 뉴클레오사이드 염기 및/또는 당 부분 상에 존재할 수 있다.
- [0016] 일부 실시형태에서, 변형은 핵염기 상에 존재하고, 슈도우리딘(pseudouridine) 또는 N1-메틸슈도우리딘으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0017] 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오사이드는 슈도우리딘(Ψ) 또는 5-메틸-사이티딘(m5C)이 아니다.
- [0018] 일부 실시형태에서, 다중 변형은, 변형된 핵산 내에 또는 하나 이상의 개별 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드 내에 포함된다. 예를 들면, 뉴클레오사이드에 대한 변형은, 핵염기 및 당에 대한 하나 이상의 변형들을 포함할 수 있다.
- [0019] 일부 실시형태에서, 변형된 폴리뉴클레오타이드 및 이들의 합성 및 제조 방법에 대한 신규한 빌딩 블록(building block), 예를 들면, 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드가 제공된다.
- [0020] 또한, 본 발명은, 본원에 기술된 변형된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 또한, 이들은, 용매, 수성 용매, 비-수성 용매, 분산 매질, 희석제, 분산제, 현탁 보조제, 계면 활성제, 등장성 제제, 증점제 또는 유화제, 방부제, 지질, 리피도이드(lipidoid), 리포솜, 지질 나노입자, 코어-셸 나노입자(core-shell nanoparticle), 중합체, 리포플렉스 펩타이드(lipoplexe peptide), 단백질, 세포, 히알루로니다제, 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제들을 추가로 포함할 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 변형된 핵산을 사용하는 방법도 제공된다. 이러한 예에서, 폴리뉴클레오타이드는 당해 분야에 공지되어 있는 임의의 수단에 의해 체형화될 수 있거나, 피내, 피하 또는 근육내 수단에 의한 주사를 포함하는 몇몇의 경로들 중 임의의 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 변형된 핵산의 투여는, 2개 이상의 동등하거나 동등하지 않은 분할 용량들을 통해 이루어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 분할 용량들의 폴리펩타이드를 투여함으로써 대상체에 의해 생산된 폴리펩타이드의 수준은, 단일 투여로서 폴리뉴클레오타이드의 동일한 총 1일 용량을 투여함으로써 생산된 수준보다 더 크다.
- [0023] 변형된 핵산 또는 암호화된 폴리펩타이드의 검출은, 대상체 또는 환자의 체액 내에서 수행될 수 있고, 여기서, 체액은, 말초 혈액, 혈청, 혈장, 복수액, 뇨, 뇌척수액(CSF), 객담, 타액, 골수, 운할액, 수성 체액, 양수, 귀지(cerumen), 모유, 기관지 폐포 세척액, 정액, 전립선액, 쿠퍼액(cowper's fluid) 또는 전-사정액(pre-ejaculatory fluid), 땀, 대변, 모발, 눈물, 낭액(cyst fluid), 흉막액 및 복막액, 심막액, 림프, 미즙(chyme), 암죽(chyle), 담즙, 간질액, 월경, 고름, 피지, 구토, 질 분비액, 점막 분비액, 대변 물, 땀, 비강 세척액, 기관지폐 흡인물, 배낭강액(blastocyl cavity fluid), 및 체대혈로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0024] 일부 실시형태에서, 투여는, 시간, 일, 주, 달, 또는 년의 과정에 걸쳐 발생하는 투약 용법에 따른 것이고, 다중-니들 주사 시스템, 카테터(catheter) 또는 내강 시스템(lumen system), 및 초음파, 전기 또는 방사선 기반 시스템으로부터 선택되는 하나 이상의 장치들을 사용함으로써 달성할 수 있다.
- [0025] 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 방법 및 재료는 본 개시에서 사용하기 위해 본원에 기술되어 있으며; 당해 분야에 공지되어 있는 다른 적합한 방법 및 재료도 또한 사용될 수 있다. 재료, 방법, 및 실시예는 단지 예시적인 것이고, 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 본원에 언급된 모든 공보, 특허출원, 특허, 서열목록, 데이터베이스 조사, 및 다른 참조문헌은, 이들의 전문이 인용에 의해 포함된다. 상충하는 경우에, 정의를 포함하는 본 명세서가 제어할 것이다.
- [0026] 본 개시의 다른 특징 및 이점은 다음의 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용 및 도면, 및 특허청구범위로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 상기 및 다른 목적, 특징 및 이점은, 유사한 참조 특징이 상이한 관점에 걸쳐 동일한 부분을 언급하는 첨부되는 도면에 나타난 바와 같이, 본 발명의 특정 실시형태들의 다음 설명으로부터 명백해질 것이다. 도면은 본 발명의 각종 실시형태들의 원리를 나타내는 대신에 규모를 조정하고 강조하는데 필수적인 것은 아니다.
- 도 1은, N4-Me-CTP(화합물 1의 NTP)에 대한 분석 결과의 스펙트럼 및 그래프를 제공한다. 도 1a는 DMSO에서의 핵 자기 공명(NMR) 스펙트럼을 제공하고, 도 1b는 D₂O에서의 NMR 스펙트럼을 제공하며, 도 1c는 질량 분광법(MS) 결과를 제공하고, 도 1d는 N4-메틸사이티딘(N4-Me-사이티딘, 화합물 1)에 대한 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 결과이다.
- 도 2는 N4-Me-CTP(화합물 1의 NTP)에 대한 HPLC 결과를 나타낸다.
- 도 3은 2'-OMe-N, N-디-Me-CTP(화합물 2의 NTP)에 대한 분석 결과를 제공한다. 도 3a는 NMR 스펙트럼을 제공한다. 도 3b는 MS 결과를 제공한다. 도 3c는 2'-O-메틸-N⁴, N⁴-디메틸사이티딘(2'-OMe-N, N-디-Me-사이티딘, 화합물 2)에 대한 HPLC 결과를 제공한다.
- 도 4는 2'-OMe-N, N-디-Me-CTP(화합물 2의 NTP)에 대한 HPLC 결과를 나타낸다.
- 도 5는 5-메톡시카보닐메톡시-UTP(화합물 3의 NTP)에 대한 HPLC 결과를 제공한다.
- 도 6은 3-메틸 슈도우리딘(화합물 4)에 대한 분석 결과를 제공한다. 도 6a는 3-메틸 슈도우리딘(화합물 4)의 NMR 스펙트럼을 제공하고, 도 6b는 3-메틸 슈도우리딘(화합물 4)에 대한 HPLC 결과를 제공한다.
- 도 7은 5-TBDMS-OCH₂-사이티딘(화합물 6)의 분석 결과를 제공한다. 도 7a는 NMR 스펙트럼을 제공하고, 도 7b는 MS 결과를 제공하며, 도 7c는 5-TBDMS-OCH₂-사이티딘(화합물 6)에 대한 HPLC 결과를 제공한다.
- 도 8은 5-트리플루오로메틸 우리딘(화합물 8)의 분석 결과를 제공한다. 도 8a는 NMR 스펙트럼을 제공하고, 도 8b는 MS 결과를 제공하며, 도 8c는 5-트리플루오로메틸 우리딘(화합물 8)에 대한 HPLC 결과를 제공한다.
- 도 9는 5-(메톡시카보닐)메틸 우리딘(화합물 9)에 대한 NMR 스펙트럼 결과를 제공한다.
- 도 10은, 변형 퍼센트(퍼센트 변형; percent modification)의 함수로서의 단백질(GCSF; 라인 B) 및 사이토카인(인터페론-알파(IFN α); 라인 및 종양 괴사 인자-알파(TNF α); 라인 C) 발현의 가변성을 나타내는 그래프를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] **상세한 설명**
- [0029] 본 개시는, 특히, 세포의 집단 내로 도입되는 경우 감소된 선천적 면역 반응을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 개선된 치료학적 특성을 나타내는 변형된 뉴클레오사이드, 변형된 뉴클레오타이드, 및 변형된 핵산을 제공한다.
- [0030] 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산의 세포내 번역 및 프로세싱의 효과적인 조절을 둘러싼 무수한 장애물들을 다루기 위한 치료학적 양상들(therapeutic modalities)에 대한 요구가 당해 분야에 남아 있으므로, 본 발명자들은, 소정의 변형된 mRNA 서열이 번역 반응을 단지 회피하거나, 모면하거나, 제거하는 것 이상의 이익을 갖는 치료제로서의 가능성을 가짐을 나타내었다.
- [0031] 본 발명은, 목적한 폴리펩타이드(예를 들면, 변형된 mRNA)를 암호화하고 당해 분야에서의 과제들 중 하나 이상을 모면하는 구조적 및/또는 화학적 특징, 예를 들면, 핵산-계 치료제들을 최적화하지만 발현의 한계(threshold)를 극복하고, 발현율들, 반감기 및/또는 단백질 농도를 개선하고, 단백질 국제화를 최적화하고, 면역 반응 및/또는 분해 경로와 같은 유해한 생체-반응들을 모면하는데 유용한 특징을 갖는 핵산계 화합물 또는 폴리뉴클레오타이드를 제공함으로써 이러한 요구를 다루고 있다.
- [0032] 본원에서, 화학적으로 변형되어 조직 내에서 안정성 및/또는 청소율, 수용체 흡수 및/또는 동역학, 조성물들에 의한 세포적 접근, 번역 기구와의 관계(engagement), mRNA 반감기, 번역 효율, 면역 회피, 단백질 생산능, 분비 효능(적용가능한 경우), 순환에 대한 접근성, 단백질 반감기, 및/또는 세포의 상태, 기능 및/또는 활성의 조절 중 하나 이상을 개선시키는, 목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 일부 제공된다.

- [0033] 본원에 교시된 변형들의 조합을 포함하는, 본 발명의 변형된 뉴클레오사이드, 뉴클레오타이드 및 핵산은, 이들을 치료학적 양상으로서 보다 더 적합하도록 하는 우수한 특성들을 갖는다.
- [0034] 당해 분야의 "전부 또는 전무(all or none)" 모델도 변형된 mRNA의 치료학적 유용성과 관련된 생물학적 현상들을 설명하는데 매우 불충분함이 측정되어 왔다. 본 발명자들은, 단백질 생산을 개선하기 위해, 변형 또는 변형들의 조합의 특성인 퍼센트 변형을 고려할 수 있고, 특정 변형된 mRNA의 효능 및 위험 프로파일을 측정하기 위해, 하나 이상의 사이토카인을 측정하거나 계량할 수 있다고 결정하였다.
- [0035] 본 발명의 한 양상에서, 변형되지 않은 mRNA와 비교하여 변형된 mRNA의 효과를 측정하는 방법들은, 이의 발현이 본 발명의 외인성 핵산의 투여에 의해 촉발되는 하나 이상의 사이토카인들의 측정 및 분석을 포함한다. 이들 값들은, 변형되지 않은 핵산의 투여에 대해 또는 사이토카인 반응, PolyIC, R-848 또는 당해 분야에 공지되어 있는 다른 표준물과 같은 표준 계량법에 대해 비교된다.
- [0036] 본원에서 개발된 표준 계량법의 하나의 예는, 변형된 핵산의 투여 또는 변형된 핵산과의 접촉의 결과로서 이의 발현이 세포, 조직 또는 유기체 내에서 촉발되는 사이토카인들 중 하나 이상(또는 패널)의 수준 또는 양에 대해 세포, 조직 또는 유기체 내에 생산된 암호화된 폴리펩타이드(단백질)의 수준 또는 양의 비를 측정하는 것이다. 이러한 비들은 본원에서 단백질:사이토카인 비 또는 "PC" 비로서 언급된다. PC 비가 높을 수록, 변형된 핵산(측정된 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드)가 보다 효율적이다. 본 발명의 사이토카인에 의한 바람직한 PC 비들은 1 초과, 10 초과, 100 초과, 1000 초과, 10,000 이상 초과일 수 있다. 상이하거나 변형되지 않은 작동물(construct)의 변형된 핵산보다 더 높은 PC 비들을 갖는 변형된 핵산들이 바람직하다.
- [0037] PC 비는 폴리뉴클레오타이드내에 존재하는 변형 퍼센트에 의해 추가로 한정될 수 있다. 예를 들면, 100% 변형된 핵산에 대해 표준화하여, 사이토카인의 기능(또는 위험) 또는 사이토카인 프로파일(profile)로서 단백질 생산을 측정할 수 있다.
- [0038] 한 실시형태에서, 본 발명은, 변형된 핵산(폴리뉴클레오타이드)의 PC 비를 비교함으로써 화학물질에 걸쳐, 사이토카인 또는 변형 퍼센트, 임의의 특정 변형된 폴리뉴클레오타이드의 상대적인 효능을 측정하는 방법을 제공한다.
- [0039] 다른 실시형태에서, 화학적으로 변형된 mRNA는 실질적으로 비독성이고 비돌연변이성이다.
- [0040] 한 실시형태에서, 변형된 뉴클레오사이드, 변형된 뉴클레오타이드, 및 변형된 핵산은 주요 그루브 페이스(groove face) 상에서 화학적으로 변형됨으로써 주요 그루브 결합 파트너 상호작용을 방해할 수 있으며, 이는 선천적 면역 반응을 유발할 수 있다. 추가로, 이들 변형된 뉴클레오사이드, 변형된 뉴클레오타이드, 및 변형된 핵산을 사용하여 페이로드(payload), 예를 들면, 검출가능한 또는 치료학적 제제를 생물학적 표적에 전달할 수 있다. 예를 들면, 핵산들을 페이로드에, 예를 들면, 검출가능한 또는 치료학적 제제에, 핵염기 또는 당 모이어티(moiety)에 부착된 링커(linker)를 통하여 공유 결합시킬 수 있다. 본원에 기술된 조성물들 및 방법들은 생체내 및 시험관내에서, 세포외적으로 또는 세포내적으로 둘 다, 및 또한 세포 불포함 검정(cell free assay)과 같은 검정에서 사용될 수 있다.
- [0041] 일부 실시형태에서, 본 개시는, 주요 그루브 상호작용의 결합, 예를 들면, 핵산과의 결합 파트너의 결합을 방해하는 뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 제공하며, 여기서, 당해 뉴클레오타이드는 주요 그루브 상호작용 파트너들에 대한 결합 친화성을 감소시켰다.
- [0042] 다른 양상에서, 본 개시는, 화학적 변형을 함유하는 뉴클레오타이드를 제공하며, 여기서, 당해 뉴클레오타이드는 주요 그루브 상호작용 파트너들에 대한 결합을 변경하였다.
- [0043] 일부 실시형태에서, 화학적 변형은 핵염기의 주요 그루브 페이스 상에 위치하며, 여기서, 화학적 변형은, 피리미딘 핵염기의 원자를 아민, SH, 알킬(예를 들면, 메틸 또는 에틸), 또는 할로(예를 들면, 클로로 또는 플루오로)로 대체하거나 치환함을 포함할 수 있다.
- [0044] 다른 양상에서, 본 개시는, 뉴클레오타이드의 당 모이어티 상에 위치한 화학적 변형을 제공한다.
- [0045] 다른 양상에서, 본 개시는 핵산의 포스페이트 골격 상에 위치한 화학적 변형을 제공한다.
- [0046] 일부 실시형태에서, 화학적 변형들은 핵산의 주요 그루브 페이스 상에서의 전기화학을 변경시킨다.
- [0047] 다른 양상에서, 본 개시는, 화학적 변형들을 함유하는 뉴클레오타이드들을 제공하며, 여기서, 당해 뉴클레오타이드는, 상응하는 변형되지 않은 핵산에 의해 유도된 세포의 선천적 면역과 비교하여 세포의 선천적 면역 반응

을 감소시킨다.

- [0048] 다른 양상에서, 본 개시는 적어도 2개의 뉴클레오타이드들을 포함하는 핵산 서열들을 제공하며, 여기서, 핵산 서열은, 핵산 서열과 주요 그루브 상호작용 파트너의 결합을 방해하는 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서, 뉴클레오타이드는 주요 그루브 결합 파트너에 대한 결합 친화성을 감소시켰다.
- [0049] 다른 양상에서, 본 개시는 본원에 기술된 바와 같은 화합물을 포함하는 조성물들을 제공한다. 일부 실시형태에서, 당해 조성물은 반응 혼합물이다. 일부 실시형태에서, 조성물은 억제학적 조성물이다. 일부 실시형태에서, 조성물은 세포 배양물이다. 일부 실시형태에서, 조성물은 RNA 폴리머라제 및 cDNA 주형을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 아데노신, 사이토신, 구아노신, 및 우라실로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드를 추가로 포함한다.
- [0050] 추가의 양상에서, 본 개시는, 사람 세포들의 제1 집단을 본원에 기술된 방법들에 의해 제조된 억제학적 핵산으로 형질감염시킴을 포함하는, 생리학적으로 활성인 분비된 단백질을 포함하는 억제학적 제형을 제조하는 방법들을 제공하며, 여기서, 분비된 단백질은 사람 세포들의 제2 집단에 대해 활성이다.
- [0051] 일부 실시형태에서, 분비된 단백질은 제2 집단에 존재하는 적어도 하나의 세포의 표면 상의 수용체와 상호작용할 수 있다.
- [0052] 일부 실시형태에서, 분비된 단백질은 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF)이다.
- [0053] 일부 실시형태에서, 제2 집단은 G-CSF 수용체를 발현하는 골수아세포를 함유한다.
- [0054] 특정 실시형태에서, 항체-의존성 세포 독성을 유도하는 단백질과 함께 포유동물 대상체의 면역성을 증강시키는 단백질 또는 단백질들을 암호화하는 번역가능한 영역들을 함유하는 하나 이상의 변형된 핵산들을 함유하는 병용 치료제들이 본원에 제공된다. 예를 들면, 트라스투주마브 및 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF)를 암호화하는 하나 이상의 핵산들을 함유하는 치료제들이 제공된다. 특히, 이러한 병용 치료제들은 트라스투주마브에 대해 유도된 내성으로 발달하는 Her2+ 유방암 환자들에서 유용하다. [참조: 예를 들면, Albrecht, Immunotherapy. 2(6):795-8(2010)].
- [0055] 한 실시형태에서, 본 개시의 화합물들은 안정한 것으로 의도된다. 명확성을 위해, 별도의 실시형태들의 내용에 기술된, 본 개시의 특정 특징들이 또한 단일 실시형태에서 병용으로 제공될 수 있음이 추가로 이해된다. 역으로, 간결성을 위해, 단일 실시형태의 내용에 기술된 본 개시의 각종 특징들도 별도로 또는 임의의 적합한 하위 조합(subcombination)으로 제공될 수 있다.
- [0056] **본 발명의 변형된 뉴레오타이드, 뉴클레오사이드 및 폴리뉴클레오타이드**
- [0057] 본원에서, 뉴클레오타이드, 뉴클레오사이드 또는 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 본 발명의 핵산들, 예를 들면, mRNA 분자)에서, 용어 "변형" 또는 적절하게는 "변형된"은 A, G, U 또는 C 리보뉴클레오타이드들에 관한 변형을 말한다. 일반적으로, 본원에서, 이들 용어들은 천연적으로 발생하는 5'-말단 mRNA 캡 모이어티 내의 리보뉴클레오타이드 변형들을 말하는 것으로 의도되지 않는다. 폴리펩타이드에서, 용어 "변형"은 20개 아미노산들의 정규 세트, 모이어티와 비교한 변형을 말한다.
- [0058] 변형들은 각종의 명백한 변형들일 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산이 mRNA인 경우, 암호화 영역, 플랭킹 영역들(flanking regions) 및/또는 말단 영역들은 1개, 2개, 또는 그 이상의(임의로 상이한) 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드 변형들을 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포에 도입된 변형된 폴리뉴클레오타이드는, 변형되지 않은 폴리뉴클레오타이드와 비교하여, 세포에서 감소된 분해를 나타낼 수 있다.
- [0059] 폴리뉴클레오타이드들은, 당, 핵염기, 또는 뉴클레오사이드간 연결에 대한(예를 들면, 연결 포스페이트에 대한/포스포디에스테르 연결에 대한/포스포디에스테르 골격에 대한) 임의의 유용한 변형을 포함할 수 있다. 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드의 주요 그루브, 또는 핵염기의 주요 그루브 페이스는 하나 이상의 변형들을 포함할 수 있다. 피리딘 핵염기의(예를 들면, 주요 그루브 페이스 상의) 하나 이상의 원자들은, 임의로 치환된 아미노, 임의로 치환된 티올, 임의로 치환된 알킬(예를 들면, 메틸 또는 에틸), 또는 할로(예를 들면, 클로로 또는 플루오로)로 대체되거나 치환될 수 있다. 특정 실시형태에서, 변형들(예를 들면, 하나 이상의 변형들)은 각각의 당 및 뉴클레오사이드간 연결 각각에 존재한다. 본 발명에 따른 변형들은 리보핵산(RNA)의 데옥시리보핵산들(DNA)로의 변형들, 예를 들면, 리보푸라닐실 환의 2'OH의 2'H, 트레오스 핵산(TNA), 글리콜 핵산(GNA), 펩타이드 핵산(PNA), 잠금(locked) 핵산(LNAs) 또는 이들의 하이브리드로의 치환될 수 있다. 추가의 변형들이 본원에 기

술되어 있다.

[0060] 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, mRNA)가 도입된 세포의 선천적 면역 반응을 실질적으로 유도하지 않는다. 유도된 선천적 면역 반응의 특징들로는 1) 염증-촉진성 사이토카인들의 증가된 발현, 2) 세포내 PRR들(RIG-I, MDA5 등)의 활성화, 및/또는 3) 단백질 번역에 있어서의 중결 또는 감소가 포함된다.

[0061] 소정 실시형태에서, 변형된 핵산 분자를 세포내로 도입시켜 세포내적으로 분해되도록 하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 변형된 핵산 분자의 분해는, 단백질 생산의 정확한 시기선택(precise timing)이 요구되는 경우에 바람직할 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 발명은, 세포 내에서의 직접적인 방식으로 작용할 수 있는, 분해 도메인(domain)을 함유하는 변형된 핵산 분자를 제공한다. 다른 양상에서, 본 개시는, 주요 그루브 상호작용의 결합, 예를 들면, 파트너와 폴리뉴클레오타이드의 결합(예를 들면, 변형된 뉴클레오타이드가, 변형되지 않은 뉴클레오타이드와 비교하여, 주요 그루브 상호작용 파트너에 대한 결합 친화성을 감소시킨 경우)을 방해할 수 있는 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드들을 제공한다.

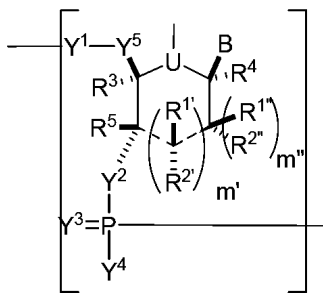
[0062] 폴리뉴클레오타이드들은 다른 제제들[예를 들면, RNAi-유도제, RNAi 제제, siRNA, shRNA, miRNA, 안티센스 RNA, 리보자임, 촉매적 DNA, tRNA, 삼중 나선 형성을 유도하는 RNA, aptamer(압타머), 벡터 등]을 임의로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드들은 하나 이상의 변형된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드들(즉, 변형된 mRNA 분자들)을 갖는 하나 이상의 전령 RNA(mRNA)를 포함할 수 있다. 이들 폴리뉴클레오타이드에 대한 세부사항은 다음과 같다.

[0063] 폴리뉴클레오타이드

[0064] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는, 목적인 폴리펩타이드를 암호화하는 연결된 뉴클레오사이드의 제1 영역, 제1 영역의 5' 말단에 위치한 제1 플랭킹(flanking) 영역, 및 제1 영역의 3' 말단에 위치한 제2 플랭킹 영역을 포함한다.

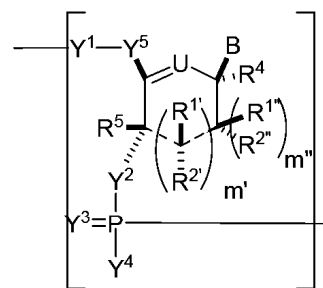
[0065] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)은 하기 화학식 Ia 또는 화학식 Ia-1을 갖는 n개의 연결된 뉴클레오사이드들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하고:

[0066] [화학식 Ia]



[0067]

[0068] [화학식 Ia-1]

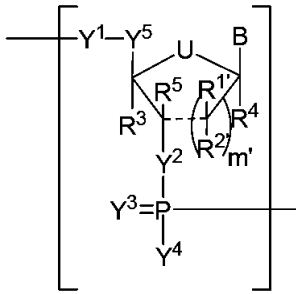


[0069]

[0070] 상기 화학식 Ia 또는 화학식 Ia-1에서, U는 O, S, N(R^u)_{nu}, 또는 C(R^u)_{nu}이고, 여기서, nu는 0 내지 2의 정수이며, 각각의 R^u는 독립적으로, H, 할로, 또는 임의로 치환된 알킬이며;

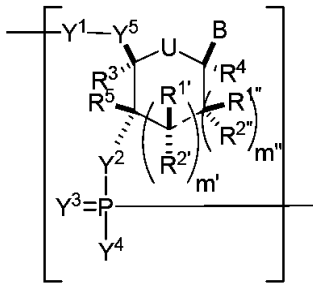
- [0071] R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 는 단일 결합이거나, 부재하고;
- [0072] 각각의 $R^1, R^2, R^1, R^2, R^1, R^2, R^3, R^4$, 및 R^5 는 존재하는 경우, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 하이드록시알콕시, 임의로 치환된 아미노, 아지도, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐이거나, 부재하고; 여기서, R^3 과, R^1, R^1, R^2, R^2 , 또는 R^5 중 하나 이상과의 조합(예를 들면, R^1 과 R^3 의 조합, R^1 과 R^3 의 조합, R^2 과 R^3 의 조합, R^2 과 R^3 의 조합, 또는 R^5 와 R^3 의 조합)은 함께 결합하여, 이들이 부착된 탄소들과 함께, 임의로 치환된 알킬렌 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌을 형성할 수 있고, 상기 조합은, 이들이 부착된 탄소들과 함께, 임의로 치환된 헤테로사이클릴(예를 들면, 비사이클릭, 트리사이클릭, 또는 테트라사이클릭 헤테로사이클릴)을 제공하며; 여기서, R^5 와, R^1, R^1, R^2, R^2 , 또는 R^2 중 하나 이상과의 조합(예를 들면, R^1 과 R^5 의 조합, R^1 과 R^5 의 조합, R^2 과 R^5 의 조합, 또는 R^2 과 R^5 의 조합)은 함께 결합하여, 임의로 치환된 알킬렌 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌을 형성할 수 있으며, 상기 조합은, 이들이 부착된 탄소들과 함께, 임의로 치환된 헤테로사이클릴(예를 들면, 비사이클릭, 트리사이클릭, 또는 테트라사이클릭 헤테로사이클릴)을 제공하며; 여기서, R^4 와, R^1, R^1, R^2, R^2, R^3 , 또는 R^5 중 하나 이상과의 조합은 함께 결합하여, 임의로 치환된 알킬렌 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌을 형성할 수 있으며, 상기 조합은, 이들이 부착된 탄소들과 함께, 임의로 치환된 헤테로사이클릴(예를 들면, 비사이클릭, 트리사이클릭, 또는 테트라사이클릭 헤테로사이클릴)을 제공하고;
- [0073] 각각의 m^1 및 m^2 은 독립적으로 0 내지 3(예를 들면, 0 내지 2, 0 내지 1, 1 내지 3, 또는 1 내지 2)의 정수이고;
- [0074] 각각의 Y^1, Y^2 , 및 Y^3 은, 독립적으로, O, S, Se, $-NR^{N1}-$, 임의로 치환된 알킬렌, 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌이며, 여기서, R^{N1} 은 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 아릴이거나, 부재하고;
- [0075] 각각의 Y^4 는, 독립적으로, H, 하이드록시, 티올, 보라닐, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 티오알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이며;
- [0076] 각각의 Y^5 는, 독립적으로, O, S, Se, 임의로 치환된 알킬렌(예를 들면, 메틸렌), 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌이고;
- [0077] n 은 1 내지 100,000의 정수이며;
- [0078] B는 핵염기(예를 들면, 퓨린, 피리미딘, 또는 이들의 유도체들)이고, 여기서, B와 R^1 의 조합, B와 R^2 의 조합, B와 R^1 의 조합, 또는 B와 R^2 의 조합은, 이들이 부착된 탄소들과 함께, 비사이클릭 그룹(예를 들면, 비사이클릭 헤테로사이클릴)을 임의로 형성하거나, 여기서, B, R^1 및 R^3 의 조합 또는 B, R^2 및 R^3 의 조합은 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 그룹(예를 들면, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 헤테로사이클릴, 예를 들면, 본원의 화학식 IIo 내지 IIp)를 임의로 형성할 수 있다.
- [0079] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는, 변형된 리보스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)는 n 개의, 화학식 Ia-2 내지 화학식 Ia-5의 연결된 뉴클레오사이드들 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함한다:

[0080] [화학식 Ia-2]



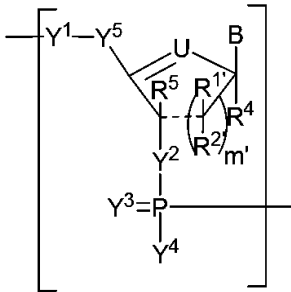
[0081]

[0082] [화학식 Ia-3]



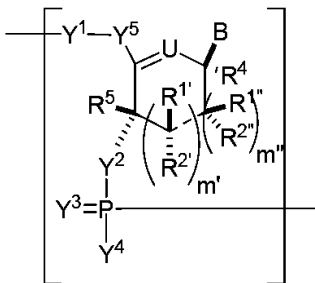
[0083]

[0084] [화학식 Ia-4]



[0085]

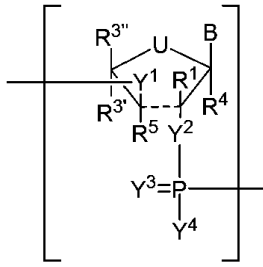
[0086] [화학식 Ia-5]



[0087]

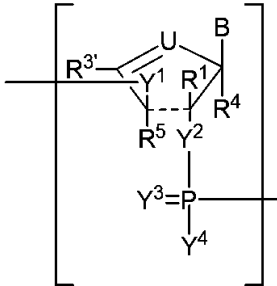
[0088] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)는 n개의, 화학식 Ib 또는 화학식 Ib-1의 연결된 뉴클레오사이드들 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체 이성체를 포함하고:

[0089] [화학식 Ib]



[0090]

[0091] [화학식 Ib-1]



[0092]

[0093] 여기서, U는 O, S, $N(R^{nu})_{nu}$, 또는 $C(R^{nu})_{nu}$ 이고, 여기서, nu는 0 내지 2의 정수이며, 각각의 R^{nu} 는, 독립적으로, H, 할로, 또는 임의로 치환된 알킬이고;

[0094] --- 는 단일 결합이거나, 부재하며;

[0095] 각각의 R^1 , $R^{3'}$, $R^{3''}$, 및 R^4 는, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 하이드록시알콕시, 임의로 치환된 아미노, 아지도, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐이거나, 부재하고; 여기서, R^1 과 $R^{3'}$ 의 조합 또는 R^1 과 $R^{3''}$ 의 조합은 함께, 임의로 치환된 알킬렌 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌을 형성할 수 있고[예를 들면, 잠금(locked) 핵산을 생산할 수 있고];

[0096] 각각의 R^5 는, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시이거나, 부재하며;

[0097] 각각의 Y^1 , Y^2 , 및 Y^3 은, 독립적으로, O, S, Se, NR^{N1} , 임의로 치환된 알킬렌, 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌이고, 여기서, R^{N1} 은 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 또는 임의로 치환된 아릴이며;

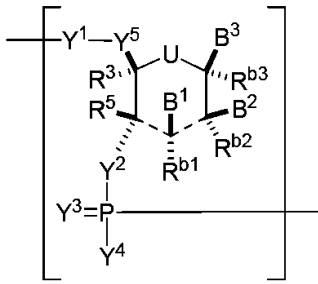
[0098] 각각의 Y^4 는, 독립적으로, H, 하이드록시, 티올, 보라닐, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이고;

[0099] n은 1 내지 100,000의 정수이며;

[0100] B는 핵염기이다.

[0101] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)는 n개의, 화학식 Ic의 연결된 뉴클레오타이드들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하고;

[0102] [화학식 Ic]



[0103]

[0104] 상기 화학식 Ic에서, U는 O, S, N(R^u)_{nu}, 또는 C(R^u)_{nu}이고, 여기서, nu는 0 내지 2의 정수이며, 각각의 R^u는, 독립적으로, H, 할로, 또는 임의로 치환된 알킬이고;

[0105] --- 는 단일 결합이거나, 부재하며;

[0106] 각각의 B¹, B², 및 B³은, 독립적으로, 핵염기(예를 들면, 본원에 기술된 바와 같은, 퓨린, 피리미딘, 또는 이들의 유도체), H, 할로, 하이드록시, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알킬닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 하이드록시알콕시, 임의로 치환된 아미노, 아지도, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알킬닐이고, 여기서, B¹, B², 및 B³ 중 하나 및 단지 하나는 핵염기이고;

[0107] 각각의 R^{b1}, R^{b2}, R^{b3}, R³, 및 R⁵는, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알킬닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 하이드록시알콕시, 임의로 치환된 아미노, 아지도, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알킬닐이며;

[0108] 각각의 Y¹, Y², 및 Y³은, 독립적으로, O, S, Se, -NR^{N1}-, 임의로 치환된 알킬렌, 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌이고, 여기서, R^{N1}은 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알킬닐, 또는 임의로 치환된 아릴이며;

[0109] 각각의 Y⁴는, 독립적으로, H, 하이드록시, 티올, 보라닐, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알킬닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알킬닐옥시, 임의로 치환된 티오알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이고;

[0110] 각각의 Y⁵는, 독립적으로, O, S, Se, 임의로 치환된 알킬렌(예를 들면, 메틸렌), 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌이며;

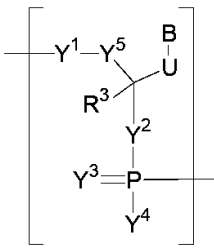
[0111] n은 1 내지 100,000의 정수이고;

[0112] 여기서, U를 포함하는 환은 하나 이상의 이중 결합들을 포함할 수 있다.

[0113] 특정 실시형태에서, U를 포함하는 환은 U-CB^{3b3} 사이에 또는 CB^{3b3}-C^{B2b2} 사이에 이중 결합을 갖지 않는다.

[0114] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)는 n개의, 화학식 Id의 연결된 뉴클레오타이드들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하고;

[0115] [화학식 Id]



[0116]

[0117] 상기 화학식 Id에서, U는 O, S, $N(R^U)_{nu}$, 또는 $C(R^U)_{nu}$ 이고, 여기서, nu는 0 내지 2의 정수이고, 각각의 R^U 는, 독립적으로, H, 할로, 또는 임의로 치환된 알킬이며;

[0118] 각각의 R^3 은, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 하이드록시알콕시, 임의로 치환된 아미노, 아지도, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알키닐이며;

[0119] 각각의 Y^1 , Y^2 , 및 Y^3 는, 독립적으로, O, S, Se, $-NR^{N1}-$, 임의로 치환된 알킬렌, 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌이고, 여기서, R^{N1} 은 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 또는 임의로 치환된 아릴이며;

[0120] 각각의 Y^4 는, 독립적으로, H, 하이드록시, 티올, 보라닐, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 티오알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이고;

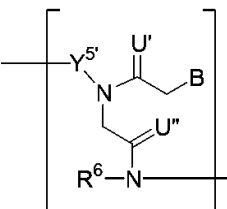
[0121] 각각의 Y^5 는, 독립적으로, O, S, 임의로 치환된 알킬렌(예를 들면, 메틸렌), 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌이며;

[0122] n은 1 내지 100,000의 정수이고;

[0123] B는 핵염기(예를 들면, 퓨린, 피리미딘, 또는 이들의 유도체)이다.

[0124] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)은 n개의, 화학식 Ie의 연결된 뉴클레오사이드들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하고;

[0125] [화학식 Ie]



[0126]

[0127] 상기 화학식 Ie에서, 각각의 U' 및 U''은, 독립적으로, O, S, $N(R^U)_{nu}$, 또는 $C(R^U)_{nu}$ 이고, 여기서, nu는 0 내지 2의 정수이며, 각각의 R^U 는, 독립적으로, H, 할로, 또는 임의로 치환된 알킬이고;

[0128] 각각의 R^6 은, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 하이드록시알콕시, 임의로 치환된 아미노, 아지도, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알키닐이며;

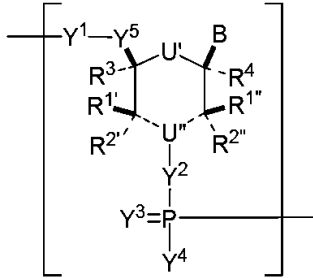
[0129] 각각의 $Y^{5'}$ 은, 독립적으로, O, S, 임의로 치환된 알킬렌(예를 들면, 메틸렌 또는 에틸렌), 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌이고;

[0130] n은 1 내지 100,000의 정수이며;

[0131] B는 핵염기(예를 들면, 퓨린, 피리미딘, 또는 이들의 유도체)이다.

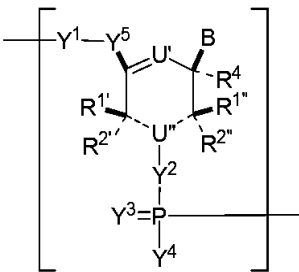
[0132] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)은 n개의, 화학식 If 또는 화학식 If-1의 연결된 뉴클레오사이드들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체 이성체를 포함하고:

[0133] [화학식 If]



[0134]

[0135] [화학식 If-1]



[0136]

[0137] 상기 화학식 If 또는 If-1에서, 각각의 U' 및 U''은, 독립적으로, O, S, N, $N(R^{u'})_{nu}$, 또는 $C(R^{u'})_{nu}$ 이며, 여기서, nu는 0 내지 2의 정수이고, 각각의 $R^{u'}$ 는, 독립적으로, H, 할로, 또는 임의로 치환된 알킬(예를 들면, U'은 O이고, U''은 N이다)이며;

[0138] --- 는 단일 결합이거나, 부재하고;

[0139] 각각의 $R^{1'}$, $R^{2'}$, $R^{1''}$, $R^{2''}$, R^3 , 및 R^4 는, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알킬닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 하이드록시알콕시, 임의로 치환된 아미노, 아지도, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알킬닐이거나, 부재하며; 여기서, $R^{1'}$ 과 R^3 의 조합, $R^{1''}$ 과 R^3 의 조합, $R^{2'}$ 과 R^3 의 조합, 또는 $R^{2''}$ 과 R^3 의 조합은 함께, 임의로 치환된 알킬렌 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌을 형성(예를 들면, 잠금 핵산을 생산)할 수 있으며; 각각의 m' 및 m'' 은, 독립적으로, 0 내지 3(예를 들면, 0 내지 2, 0 내지 1, 1 내지 3, 또는 1 내지 2)의 정수이고;

[0140] 각각의 Y^1 , Y^2 , 및 Y^3 은, 독립적으로, O, S, Se, $-NR^{N1}-$, 임의로 치환된 알킬렌, 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌이며, 여기서, R^{N1} 는 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알킬닐, 임의로 치환된 아릴이거나, 부재하며;

[0141] 각각의 Y^4 는, 독립적으로, H, 하이드록시, 티올, 보라닐, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알킬닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알킬닐옥시, 임의로 치환된

티오알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이고;

- [0142] 각각의 Y^5 는, 독립적으로, O, S, Se, 임의로 치환된 알킬렌(예를 들면, 메틸렌), 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌이며;
- [0143] n은 1 내지 100,000의 정수이고;
- [0144] B는 핵염기(예를 들면, 퓨린, 피리미딘, 또는 이들의 유도체)이다.
- [0145] 폴리뉴클레오타이드들[예를 들면, 화학식 Ia 내지 화학식 Ia-5, 화학식 Ib 내지 화학식 If-1, 화학식 IIa 내지 화학식 IIp, 화학식 IIb-1, 화학식 IIb-2, 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-2, 화학식 IIn-1, 화학식 IIn-2, 화학식 IVa 내지 화학식 IVl, 및 화학식 IXa 내지 화학식 IXr]의 일부 실시형태에서, U를 포함하는 환은 1개 또는 2개의 이중 결합을 갖는다.
- [0146] 폴리뉴클레오타이드들[예를 들면, 화학식 Ia 내지 화학식 Ia-5, 화학식 Ib 내지 화학식 If-1, 화학식 IIa 내지 화학식 IIp, 화학식 IIb-1, 화학식 IIb-2, 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-2, 화학식 IIn-1, 화학식 IIn-2, 화학식 IVa 내지 화학식 IVl, 및 화학식 IXa 내지 화학식 IXr]의 일부 실시형태에서, 각각의 R^1 , $R^{1'}$, 및 $R^{1''}$ 은, 존재하는 경우, H이다. 추가의 실시형태에서, 각각의 R^2 , $R^{2'}$ 및 $R^{2''}$ 은, 존재하는 경우, 독립적으로, H, 할로(예를 들면, 플루오로), 하이드록시, 임의로 치환된 알콕시(예를 들면, 메톡시 또는 에톡시), 또는 임의로 치환된 알콕시알콕시이다. 특정 실시형태에서, 알콕시알콕시는 $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$ 이고, 여기서, $s1$ 은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 $s2$ 및 $s3$ 은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, R' 은 H 또는 C_{1-20} 알킬이다. 일부 실시형태에서, $s2$ 는 0이고, $s1$ 은 1 또는 2이며, $s3$ 은 0 또는 1이고, R' 은 C_{1-6} 알킬이다.
- [0147] 폴리뉴클레오타이드들[예를 들면, 화학식 Ia 내지 화학식 Ia-5, 화학식 Ib 내지 화학식 If-1, 화학식 IIa 내지 화학식 IIp, 화학식 IIb-1, 화학식 IIb-2, 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-2, 화학식 IIn-1, 화학식 IIn-2, 화학식 IVa 내지 화학식 IVl, 및 화학식 IXa 내지 화학식 IXr]의 일부 실시형태에서, 각각의 R^2 , $R^{2'}$, 및 $R^{2''}$ 은, 존재하는 경우, H이다. 추가의 실시형태에서, 각각의 R^1 , $R^{1'}$ 및 $R^{1''}$ 은, 존재하는 경우, 독립적으로, H, 할로(예를 들면, 플루오로), 하이드록시, 임의로 치환된 알콕시(예를 들면, 메톡시 또는 에톡시), 또는 임의로 치환된 알콕시알콕시이다. 특정 실시형태에서, 알콕시알콕시는 $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$ 이고, 여기서, $s1$ 은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 $s2$ 및 $s3$ 은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, R' 은 H 또는 C_{1-20} 알킬이다. 일부 실시형태에서, $s2$ 는 0이고, $s1$ 은 1 또는 2이며, $s3$ 은 0 또는 1이고, R' 은 C_{1-6} 알킬이다.
- [0148] 폴리뉴클레오타이드들[예를 들면, 화학식 Ia 내지 화학식 Ia-5, 화학식 Ib 내지 화학식 If-1, 화학식 IIa 내지 화학식 IIp, 화학식 IIb-1, 화학식 IIb-2, 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-2, 화학식 IIn-1, 화학식 IIn-2, 화학식 IVa 내지 화학식 IVl, 및 화학식 IXa 내지 화학식 IXr]의 일부 실시형태에서, 각각의 R^3 , R^4 , 및 R^5 는, 독립적으로, H, 할로(예를 들면, 플루오로), 하이드록시, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시(예를 들면, 메톡시 또는 에톡시), 또는 임의로 치환된 알콕시알콕시이다. 특정 실시형태에서, R^3 은 H이거나, R^4 는 H이거나, R^5 는 H이거나, R^3 , R^4 , 및 R^5 는 모두 H이다. 특정 실시형태에서, R^3 은 C_{1-6} 알킬이거나, R^4 는 C_{1-6} 알킬이거나, R^5 는 C_{1-6} 알킬이거나, R^3 , R^4 , 및 R^5 는 모두 C_{1-6} 알킬이다. 특정 실시형태에서, R^3 및 R^4 는 둘 다 H이고, R^5 는 C_{1-6} 알킬이다.
- [0149] 폴리뉴클레오타이드들[예를 들면, 화학식 Ia 내지 화학식 Ia-5, 화학식 Ib 내지 화학식 If-1, 화학식 IIa 내지 화학식 IIp, 화학식 IIb-1, 화학식 IIb-2, 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-2, 화학식 IIn-1, 화학식 IIn-2, 화학식 IVa 내지 화학식 IVl, 및 화학식 IXa 내지 화학식 IXr]의 일부 실시형태에서, R^3 과 R^5 는 함께 결합하여, 임의로 치환된 알킬렌 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌을 형성하고, 이들이 부착된 탄소들과 함께, 임의로 치환된 헤테로사이클릴[예를 들면, 비사이클릭, 트리사이클릭, 또는 테트라사이클릭 헤테로사이클릴, 예를 들면, 트랜스-3',4' 유사체, 여기서, R^3 과 R^5 는 함께 결합하여 헤테로알킬렌(예를 들면, $-(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}-$ 를 형

성하고, 여기서, 각각의 b1, b2, 및 b3은, 독립적으로, 0 내지 3의 정수이다]을 제공한다.

[0150] 폴리뉴클레오타이드들[예를 들면, 화학식 Ia 내지 화학식 Ia-5, 화학식 Ib 내지 화학식 If-1, 화학식 IIa 내지 화학식 IIp, 화학식 IIb-1, 화학식 IIb-2, 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-2, 화학식 IIn-1, 화학식 IIn-2, 화학식 IVa 내지 화학식 IVl, 및 화학식 IXa 내지 화학식 IXr]의 일부 실시형태에서, R^3 과, $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$, $R^{2''}$, 또는 R^5 중 하나 이상은 함께 결합하여, 임의로 치환된 알킬렌 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌을 형성하고, 상기 조합은, 이들이 부착된 탄소들과 함께, 임의로 치환된 헤테로사이클릴(예를 들면, 비사이클릭, 트리사이클릭, 또는 테트라사이클릭 헤테로사이클릴)을 제공하고, R^3 과, $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$, $R^{2''}$, 또는 R^5 중 하나 이상은 함께 결합하여 헤테로알킬렌[예를 들면, $-(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}-$, 여기서, 각각의 b1, b2, 및 b3은, 독립적으로, 0 내지 3의 정수이다]을 형성한다.

[0151] 폴리뉴클레오타이드들[예를 들면, 화학식 Ia 내지 화학식 Ia-5, 화학식 Ib 내지 화학식 If-1, 화학식 IIa 내지 화학식 IIp, 화학식 IIb-1, 화학식 IIb-2, 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-2, 화학식 IIn-1, 화학식 IIn-2, 화학식 IVa 내지 화학식 IVl, 및 화학식 IXa 내지 화학식 IXr]의 일부 실시형태에서, R^5 와, $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$, 또는 $R^{2''}$ 중 하나 이상은 함께 결합하여, 임의로 치환된 알킬렌 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌을 형성하고, 상기 조합은, 이들이 부착된 탄소들과 함께, 임의로 치환된 헤테로사이클릴(예를 들면, 비사이클릭, 트리사이클릭, 또는 테트라사이클릭 헤테로사이클릴)을 제공하고, R^5 와, $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$, 또는 $R^{2''}$ 중 하나 이상은 함께 결합하여 헤테로알킬렌[예를 들면, $-(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}-$, 여기서, 각각의 b1, b2, 및 b3은, 독립적으로, 0 내지 3의 정수이다]을 형성한다.

[0152] 폴리뉴클레오타이드들[예를 들면, 화학식 Ia 내지 화학식 Ia-5, 화학식 Ib 내지 화학식 If-1, 화학식 IIa 내지 화학식 IIp, 화학식 IIb-1, 화학식 IIb-2, 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-2, 화학식 IIn-1, 화학식 IIn-2, 화학식 IVa 내지 화학식 IVl, 및 화학식 IXa 내지 화학식 IXr]의 일부 실시형태에서, 각각의 Y^2 는, 독립적으로, O, S, 또는 $-NR^{N1}-$ 이고, 여기서, R^{N1} 은 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 또는 임의로 치환된 아릴이다. 특정 실시형태에서, Y^2 는 $NR^{N1}-$ 이고, 여기서, R^{N1} 은 H 또는 임의로 치환된 알킬(예를 들면, C_{1-6} 알킬, 예를 들면, 메틸, 에틸, 이소프로필, 또는 n-프로필)이다.

[0153] 폴리뉴클레오타이드들[예를 들면, 화학식 Ia 내지 화학식 Ia-5, 화학식 Ib 내지 화학식 If-1, 화학식 IIa 내지 화학식 IIp, 화학식 IIb-1, 화학식 IIb-2, 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-2, 화학식 IIn-1, 화학식 IIn-2, 화학식 IVa 내지 화학식 IVl, 및 화학식 IXa 내지 화학식 IXr]의 일부 실시형태에서, 각각의 Y^3 은, 독립적으로, O 또는 S이다.

[0154] 폴리뉴클레오타이드들[예를 들면, 화학식 Ia 내지 화학식 Ia-5, 화학식 Ib 내지 화학식 If-1, 화학식 IIa 내지 화학식 IIp, 화학식 IIb-1, 화학식 IIb-2, 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-2, 화학식 IIn-1, 화학식 IIn-2, 화학식 IVa 내지 화학식 IVl, 및 화학식 IXa 내지 화학식 IXr]의 일부 실시형태에서, R^1 은 H이고; 각각의 R^2 는, 독립적으로, H, 할로(예를 들면, 플루오로), 하이드록시, 임의로 치환된 알콕시(예를 들면, 메톡시 또는 에톡시), 또는 임의로 치환된 알콕시알콕시[예를 들면, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, 여기서, s1은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, R'은 H 또는 C_{1-20} 알킬이고, 예를 들면, 여기서, s2는 0이고, s1은 1 또는 2이며, s3은 0 또는 1이거나, R'은 C_{1-6} 알킬이다]이고; 각각의 Y^2 는, 독립적으로, O 또는 $-NR^{N1}-$ 이고, 여기서, R^{N1} 은 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 또는 임의로 치환된 아릴[예를 들면, 여기서, R^{N1} 은 H 또는 임의로 치환된 알킬(예를 들면, C_{1-6} 알킬, 예를 들면, 메틸, 에틸, 이소프로필, 또는 n-프로필)이다]이며; 각각의 Y^3 은, 독립적으로, O 또는 S(예를 들면, S)이다. 추가의 실시형태에서, R^3 은 H, 할로(예를 들면, 플루오로), 하이드록시, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시(예를 들면, 메톡시 또는 에톡시), 또는 임의로 치환된 알콕시알콕시이다. 또한 추가의 실시형태에서, 각각의 Y^1 는, 독립적으로, O 또는 $-NR^{N1}-$ 이고, 여기서, R^{N1} 은 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환

된 알케닐, 임의로 치환된 알킬닐, 또는 임의로 치환된 아릴[예를 들면, 여기서, R^{N1} 은 H 또는 임의로 치환된 알킬(예를 들면, C_{1-6} 알킬, 예를 들면, 메틸, 에틸, 이소프로필, 또는 n-프로필)이다]이고; 각각의 Y^4 는, 독립적으로, H, 하이드록시, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 티오알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이다.

[0155] 폴리뉴클레오타이드들[예를 들면, 화학식 Ia 내지 화학식 Ia-5, 화학식 Ib 내지 화학식 If-1, 화학식 IIa 내지 화학식 IIp, 화학식 IIb-1, 화학식 IIb-2, 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-2, 화학식 IIn-1, 화학식 IIn-2, 화학식 IVa 내지 화학식 IVl, 및 화학식 IXa 내지 화학식 IXr]의 일부 실시형태에서, 각각의 R^1 은, 독립적으로, H, 할로(예를 들면, 플루오로), 하이드록시, 임의로 치환된 알콕시(예를 들면, 메톡시 또는 에톡시), 또는 임의로 치환된 알콕시알콕시[예를 들면, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, 여기서, $s1$ 은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 $s2$ 및 $s3$ 은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, R' 은 H 또는 C_{1-20} 알킬, 예를 들면, $s2$ 는 0이고, $s1$ 는 1 또는 2이며, $s3$ 은 0 또는 1이고, R' 은 C_{1-6} 알킬이다]이고; R^2 는 H이며; 각각의 Y^2 는, 독립적으로, 0 또는 $-NR^{N1}$ -이고, 여기서, R^{N1} 은 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알킬닐, 또는 임의로 치환된 아릴[예를 들면, 여기서, R^{N1} 은 H 또는 임의로 치환된 알킬(예를 들면, C_{1-6} 알킬, 예를 들면, 메틸, 에틸, 이소프로필, 또는 n-프로필)이다]이고; 각각의 Y^3 은, 독립적으로, 0 또는 S(예를 들면, S)이다. 추가의 실시형태에서, R^3 은 H, 할로(예를 들면, 플루오로), 하이드록시, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시(예를 들면, 메톡시 또는 에톡시), 또는 임의로 치환된 알콕시알콕시이다. 또한 추가의 실시형태에서, 각각의 Y^1 은, 독립적으로, 0 또는 $-NR^{N1}$ -이고, 여기서, R^{N1} 은 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알킬닐, 또는 임의로 치환된 아릴[예를 들면, 여기서, R^{N1} 은 H 또는 임의로 치환된 알킬(예를 들면, C_{1-6} 알킬, 예를 들면, 메틸, 에틸, 이소프로필, 또는 n-프로필)이다]이고; 각각의 Y^4 는, 독립적으로, H, 하이드록시, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 티오알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이다.

[0156] 폴리뉴클레오타이드들[예를 들면, 화학식 Ia 내지 화학식 Ia-5, 화학식 Ib 내지 화학식 If-1, 화학식 IIa 내지 화학식 IIp, 화학식 IIb-1, 화학식 IIb-2, 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-2, 화학식 IIn-1, 화학식 IIn-2, 화학식 IVa 내지 화학식 IVl, 및 화학식 IXa 내지 화학식 IXr]의 일부 실시형태에서, U를 포함하는 환은 β -D(예를 들면, β -D-리보) 구조(configuration) 내에 있다.

[0157] 폴리뉴클레오타이드들[예를 들면, 화학식 Ia 내지 화학식 Ia-5, 화학식 Ib 내지 화학식 If-1, 화학식 IIa 내지 화학식 IIp, 화학식 IIb-1, 화학식 IIb-2, 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-2, 화학식 IIn-1, 화학식 IIn-2, 화학식 IVa 내지 화학식 IVl, 및 화학식 IXa 내지 화학식 IXr]의 일부 실시형태에서, U를 포함하는 환은 α -L(예를 들면, α -L-리보) 구조 내에 있다.

[0158] 폴리뉴클레오타이드들[예를 들면, 화학식 Ia 내지 화학식 Ia-5, 화학식 Ib 내지 화학식 If-1, 화학식 IIa 내지 화학식 IIp, 화학식 IIb-1, 화학식 IIb-2, 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-2, 화학식 IIn-1, 화학식 IIn-2, 화학식 IVa 내지 화학식 IVl, 및 화학식 IXa 내지 화학식 IXr]의 일부 실시형태에서, 하나 이상의 B는 슈도우리딘(Ψ) 또는 5-메틸-사이티딘(m^5C)이 아니다.

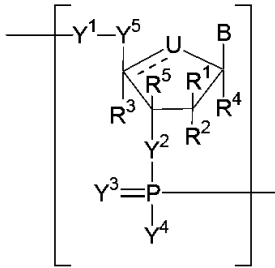
[0159] 일부 실시형태에서, n개의 B 핵염기들 중 약 10% 내지 약 100%는 Ψ 또는 m^5C 이 아니다(예를 들면, n개의 B 중 10% 내지 20%, 10% 내지 35%, 10% 내지 50%, 10% 내지 60%, 10% 내지 75%, 10% 내지 90%, 10% 내지 95%, 10% 내지 98%, 10% 내지 99%, 20% 내지 35%, 20% 내지 50%, 20% 내지 60%, 20% 내지 75%, 20% 내지 90%, 20% 내지 95%, 20% 내지 98%, 20% 내지 99%, 20% 내지 100%, 50% 내지 60%, 50% 내지 75%, 50% 내지 90%, 50% 내지 95%, 50% 내지 98%, 50% 내지 99%, 50% 내지 100%, 75% 내지 90%, 75% 내지 95%, 75% 내지 98%, 75% 내지 99%, 및 75% 내지 100%는 Ψ 또는 m^5C 가 아니다). 일부 실시형태에서, B는 Ψ 또는 m^5C 가 아니다.

[0160] 폴리뉴클레오타이드들[예를 들면, 화학식 Ia 내지 화학식 Ia-5, 화학식 Ib 내지 화학식 If-1, 화학식 IIa 내지

화학식 IIp, 화학식 IIb-1, 화학식 IIb-2, 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-2, 화학식 IIn-1, 화학식 IIn-2, 화학식 IVa 내지 화학식 IVl, 및 화학식 IXa 내지 화학식 IXr]의 일부 실시형태에서, B가, 사이토신, 구아닌, 우라실 및 아데닌으로부터 선택되는 변형되지 않은 핵염기인 경우, Y^1 , Y^2 , 또는 Y^3 중 하나 이상은 O이 아니다.

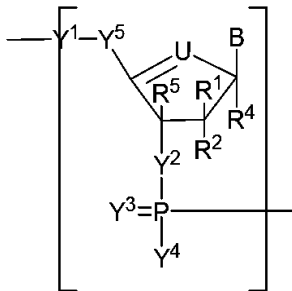
[0161] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는, 변형된 리보스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)는 n개의, 화학식 IIa 내지 화학식 IIc의 연결된 뉴클레오사이드들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함한다:

[0162] [화학식 IIa]



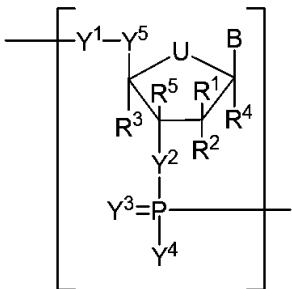
[0163]

[0164] [화학식 IIb]



[0165]

[0166] [화학식 IIc]

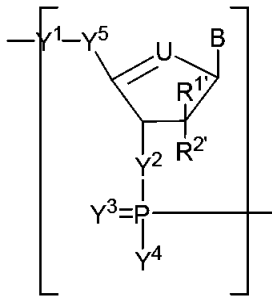


[0167]

[0168] 특정 실시형태에서, U는 0 또는 $C(R^u)_{nu}$ 이고, 여기서, nu는 0 내지 2의 정수이며, 각각의 R^u 는, 독립적으로, H, 할로, 또는 임의로 치환된 알킬(예를 들면, U는 $-CH_2-$ 또는 $-CH-$ 이다)이다. 다른 실시형태에서, 각각의 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , 및 R^5 는, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알킬닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 하이드록시알콕시, 임의로 치환된 아미노, 아지도, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알킬닐이거나, 부재하며(예를 들면, 각각의 R^1 및 R^2 는, 독립적으로 H, 할로, 하이드록시, 임의로 치환된 알킬, 또는 임의로 치환된 알콕시이고; 각각의 R^3 및 R^4 는, 독립적으로, H 또는 임의로 치환된 알킬이며; R^5 는 H 또는 하이드록시이다), ---는 단일결합 또는 이중결합이다.

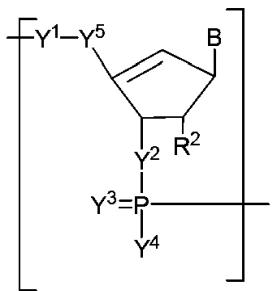
[0169] 특정 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)는 n개의, 화학식 IIb-1 내지 화학식 IIb-2의 연결된 뉴클레오사이드들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함한다:

[0170] [화학식 IIb-1]



[0171]

[0172] [화학식 IIb-2]

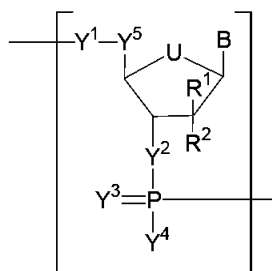


[0173]

[0174] 일부 실시형태에서, U는 0 또는 C(R^u)_{nu}이고, 여기서, nu는 0 내지 2의 정수이며, 각각의 R^u는, 독립적으로, H, 할로, 또는 임의로 치환된 알킬(예를 들면, U는 -CH₂- 또는 -CH-이다)이다. 다른 실시형태에서, 각각의 R¹ 및 R²는, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알킬옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 하이드록시알콕시, 임의로 치환된 아미노, 아지도, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알킬닐이거나, 부재한다(예를 들면, 각각의 R¹ 및 R²는, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 임의로 치환된 알킬, 또는 임의로 치환된 알콕시, 예를 들면, H, 할로, 하이드록시, 알킬, 또는 알콕시이다). 특정 실시형태에서, R²는 하이드록시 또는 임의로 치환된 알콕시(예를 들면, 메톡시, 에톡시, 또는 본원에 기술된 임의의 것)이다.

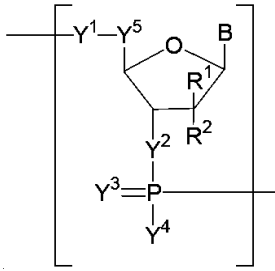
[0175] 특정 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)는 n개의, 화학식 IIc-1 내지 화학식 IIc-4의 연결된 뉴클레오사이드들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함한다:

[0176] [화학식 IIc-1]



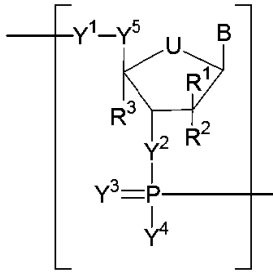
[0177]

[0178] [화학식 IIc-2]



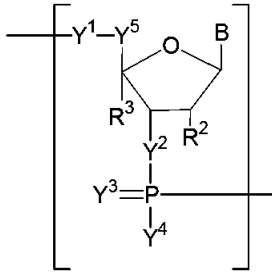
[0179]

[0180] [화학식 IIc-3]



[0181]

[0182] [화학식 IIc-4]

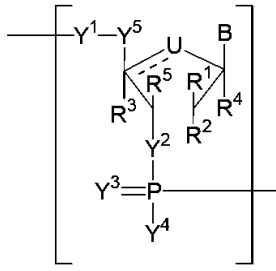


[0183]

[0184] 일부 실시형태에서, U는 O 또는 $C(R^u)_m$ 이고, 여기서, nu는 0 내지 2의 정수이며, 각각의 R^u 는, 독립적으로, H, 할로, 또는 임의로 치환된 알킬(예를 들면, U는 $-CH_2-$ 또는 $-CH-$ 이다)이다. 일부 실시형태에서, 각각의 R^1 , R^2 , 및 R^3 은, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 하이드록시알콕시, 임의로 치환된 아미노, 아지도, 임의로 치환된 아틸, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐이거나, 부재한다(예를 들면, 각각의 R^1 및 R^2 는, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 임의로 치환된 알킬, 또는 임의로 치환된 알콕시, 예를 들면, H, 할로, 하이드록시, 알킬, 또는 알콕시이고; 각각의 R^3 은, 독립적으로, H 또는 임의로 치환된 알킬이다). 특정 실시형태에서, R^2 는 임의로 치환된 알콕시(예를 들면, 메톡시 또는 에톡시, 또는 분원에 기술된 임의의 것)이다. 특정 실시형태에서, R^1 은 임의로 치환된 알킬이고, R^2 는 하이드록시이다. 다른 실시형태에서, R^1 은 하이드록시이고, R^2 는 임의로 치환된 알킬이다. 추가의 실시형태에서, R^3 은 임의로 치환된 알킬이다.

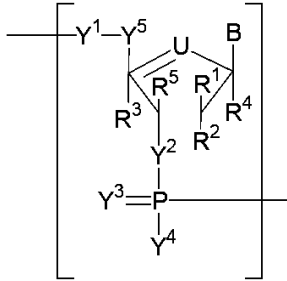
[0185] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 아실 변형된 리보스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)는 n개의, 화학식 IId 내지 화학식 IIf의 연결된 뉴클레오사이드들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함한다.

[0186] [화학식 IIId]



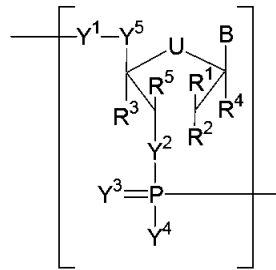
[0187]

[0188] [화학식 IIe]



[0189]

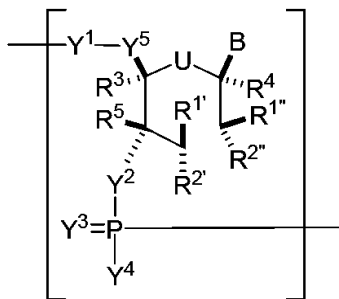
[0190] [화학식 IIf]



[0191]

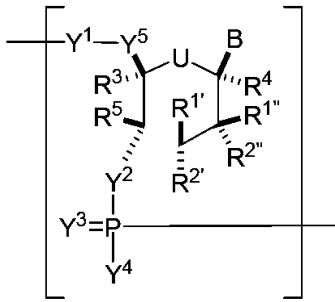
[0192] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 아실 변형된 핵시틀을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)는 n개의, 화학식 IIg 내지 화학식 IIj의 연결된 뉴클레오사이드들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함한다:

[0193] [화학식 IIg]



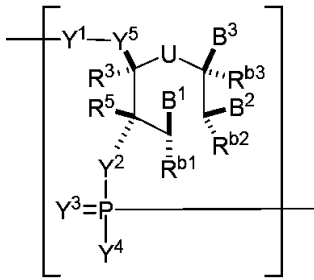
[0194]

[0195] [화학식 IIh]



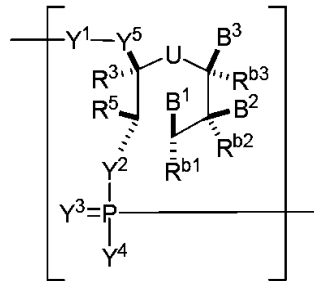
[0196]

[0197] [화학식 IIi]



[0198]

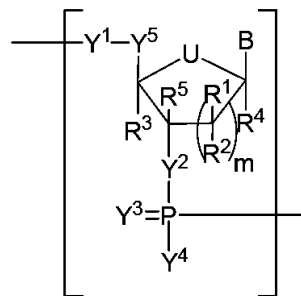
[0199] [화학식 IIj]



[0200]

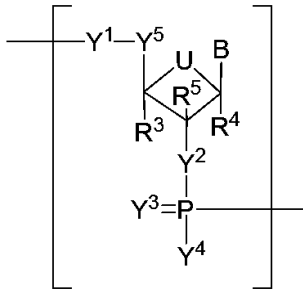
[0201] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 축약되거나 확장된 리보스 환을 갖는 당 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)는 n개의, 화학식 IIk 내지 화학식 IIm의 연결된 뉴클레오타이드들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하고:

[0202] [화학식 IIk]



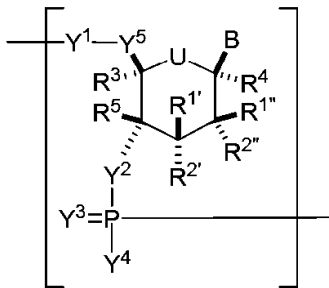
[0203]

[0204] [화학식 III]



[0205]

[0206] [화학식 III_m]

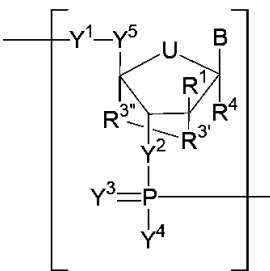


[0207]

[0208] 상기 화학식 III 내지 화학식 III_m에서, 각각의 R^{1'}, R^{1''}, R^{2'} 및 R^{2''}은, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시이거나, 부재하고; 여기서, R^{2'}과 R³의 조합 또는 R^{2''}과 R³의 조합은 함께, 임의로 치환된 알킬렌 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌을 형성할 수 있다.

[0209] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 잠금 변형된 리보스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)은 n개의, 화학식 III_n의 연결된 뉴클레오사이드들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하고:

[0210] [화학식 III_n]

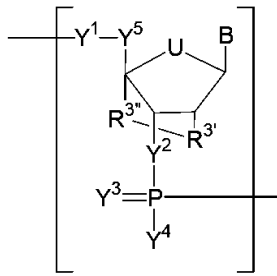


[0211]

[0212] 상기 화학식 III_n에서, R^{3'}은 O, S, 또는 -NR^{N1}-이고, 여기서, R^{N1}은 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 또는 임의로 치환된 아릴이며, R^{3''}은 임의로 치환된 알킬렌(예를 들면, -CH₂-, -CH₂CH₂-, 또는 -CH₂CH₂CH₂-) 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌(예를 들면, -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂OCH₂-, 또는 -CH₂CH₂OCH₂-)[예를 들면, R^{3'}은 O이고 R^{3''}은 임의로 치환된 알킬렌(예를 들면, -CH₂-, -CH₂CH₂-, 또는 -CH₂CH₂CH₂-)이다]이다.

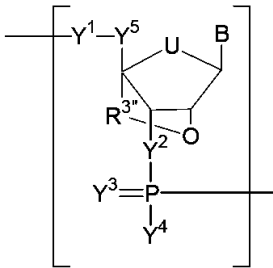
[0213] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)은 n개의, 화학식 III_{n-1} 내지 화학식 III_{n-2}의 연결된 뉴클레오사이드들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하고:

[0214] [화학식 IIIn-1]



[0215]

[0216] [화학식 IIIn-2]

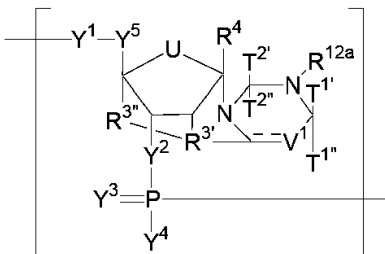


[0217]

[0218] 상기 화학식 IIIn-1 또는 화학식 IIIn2에서, R^{3'}은 O, S, 또는 -NR^{N1}-이고, 여기서, R^{N1}은 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 또는 임의로 치환된 아릴이며, R^{3''}은 임의로 치환된 알킬렌(예를 들면, -CH₂-, -CH₂CH₂-, 또는 -CH₂CH₂CH₂-) 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌(예를 들면, -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂OCH₂-, 또는 -CH₂CH₂OCH₂-)[예를 들면, R^{3'}은 O이고, R^{3''}은 임의로 치환된 알킬렌(예를 들면, -CH₂-, -CH₂CH₂-, 또는 -CH₂CH₂CH₂-)이다]이다.

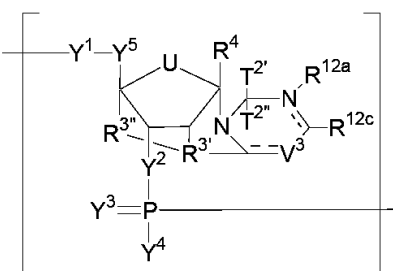
[0219] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 테트라사이클릭 헤테로사이클릴을 형성하는 잠금 변형된 리보스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)는 n개의, 화학식 IIo 또는 화학식 IIp의 연결된 뉴클레오사이드들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함하고:

[0220] [화학식 IIo]



[0221]

[0222] [화학식 IIp]



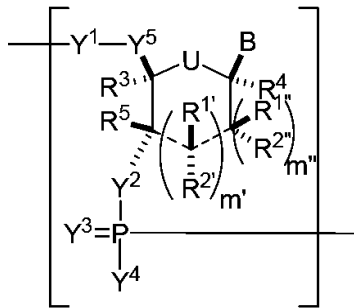
[0223]

[0224] 상기 화학식 IIo 또는 화학식 IIp에서, R^{12a} , R^{12c} , T^1 , $T^{1'}$, $T^{2'}$, $T^{2''}$, V^1 , 및 V^3 은 본원에 기술된 바와 같다.

[0225] 폴리뉴클레오타이드들에 대한 화학식들 중 어느 하나는, 본원에 기술된 하나 이상의 핵염기들[예를 들면, 화학식 b1 내지 화학식 b43]을 포함할 수 있다.

[0226] 한 실시형태에서, 본 발명은, 주요 그루브 상호작용 파트너와 핵산의 결합을 방해하는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 방법을 제공하며, 여기서, 폴리뉴클레오타이드는 본원에 정의된 바와 같은, n개의, 화학식 Ia의 뉴클레오사이드를 포함하며:

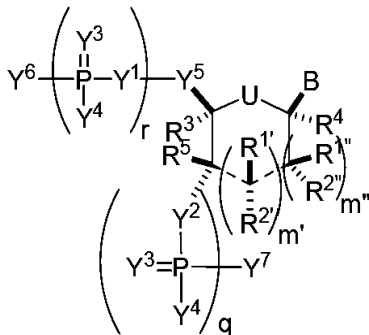
[0227] [화학식 Ia]



[0228]

[0229] 당해 방법은 본원에 정의된 바와 같은 화학식 IIIa의 화합물과, RNA 폴리머라제, 및 cDNA 주형(template)을 반응시킴을 포함한다:

[0230] [화학식 IIIa]

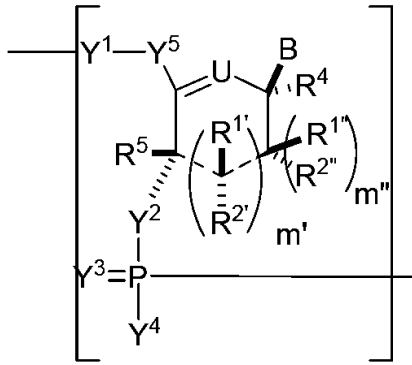


[0231]

[0232] 추가의 실시형태에서, 본 발명은, 주요 그루브 상호작용 파트너와 폴리뉴클레오타이드 서열의 결합을 방해하는 하나 이상의 뉴클레오타이드(예를 들면, 변형된 mRNA 분자)를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 방법을 제공하며, 당해 방법은, 본원에 정의된 바와 같은, 화학식 IIIa의 화합물과, 프라이머, cDNA 주형, 및 RNA 폴리머라제를 반응시킴을 포함한다.

[0233] 한 실시형태에서, 본 발명은, 주요 그루브 상호작용 파트너와 핵산의 결합을 방해하는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 방법을 제공하며, 여기서, 폴리뉴클레오타이드는 본원에 정의된 바와 같은, n개의, 화학식 Ia-1의 뉴클레오사이드들을 포함하고:

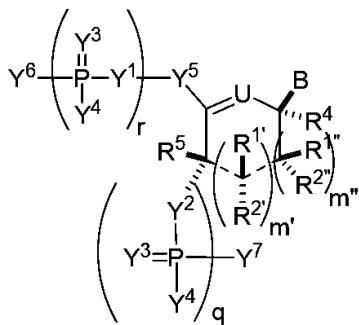
[0234] [화학식 Ia-1]



[0235]

[0236] 당해 방법은 본원에 정의된 바와 같이, 화학식 IIIa-1의 화합물과, RNA 폴리머라제, 및 cDNA 주형을 반응시킴을 포함한다.

[0237] [화학식 IIIa-1]

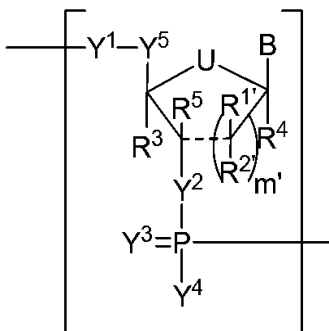


[0238]

[0239] 추가의 실시형태에서, 본 발명은 주요 그루브 결합 파트너와 폴리뉴클레오타이드 서열의 결합을 방해하는 하나 이상의 뉴클레오타이드(예를 들면, 변형된 mRNA 분자)를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 방법들을 제공하며, 당해 방법은 본원에 정의된 바와 같은, 화학식 IIIa-1의 화합물과, 프라이머, cDNA 주형, 및 RNA 폴리머라제를 반응시킴을 포함한다.

[0240] 한 실시형태에서, 본 발명은, 주요 그루브 상호작용 파트너와 핵산 서열의 결합을 방해하는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 방법들을 제공하며, 여기서, 폴리뉴클레오타이드는 본원에 정의된 바와 같은, n개의, 화학식 Ia-2의 뉴클레오사이드를 포함하고:

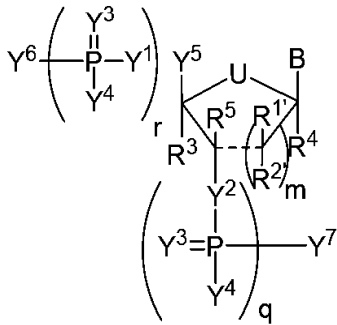
[0241] [화학식 Ia-2]



[0242]

[0243] 당해 방법은, 본원에 정의된 바와 같은 화학식 IIIa-2의 화합물과, RNA 폴리머라제, 및 cDNA 주형을 반응시킴을 포함한다:

[0244] [화학식 IIIa-2]



[0245]

[0246] 추가의 실시형태에서, 본 발명은, 주요 그루브 결합 파트너와 폴리뉴클레오타이드의 결합을 방해하는 하나 이상의 뉴클레오타이드(예를 들면, 변형된 mRNA 분자)를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 방법을 제공하며, 당해 방법은, 본원에 정의된 바와 같은 화학식 IIIa-2의 화합물과, 프라이머, cDNA 주형, 및 RNA 폴리머라제를 반응시킴을 포함한다.

[0247] 일부 실시형태에서, 당해 반응은 1 내지 약 7,000회 반복될 수 있다. 본원의 실시형태들 중의 어느 하나에서, B는 화학식 b1 내지 화학식 b43의 핵염기일 수 있다.

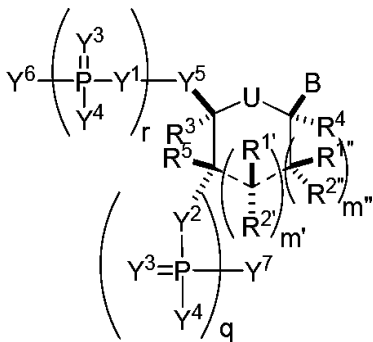
[0248] 폴리뉴클레오타이드들은 본원에 기술된, 5' 및/또는 3' 플랭킹 영역들을 임의로 포함할 수 있다.

[0249] 변형된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오사이드

[0250] 본 발명은, 또한, 빌딩 블록들, 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드들의 변형된 리보뉴클레오사이드들, 변형된 리보뉴클레오타이드들, 예를 들면, 변형된 RNA(또는 mRNA) 분자들을 포함한다. 예를 들면, 이들 빌딩 블록들은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 제조하는데 유용할 수 있다.

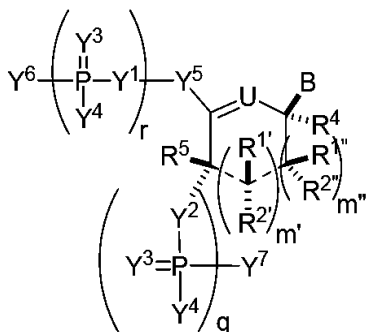
[0251] 일부 실시형태에서, 빌딩 블록 분자는 화학식 IIIa 또는 화학식 IIIa-1의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 가지며:

[0252] [화학식 IIIa]



[0253]

[0254] [화학식 IIIa-1]



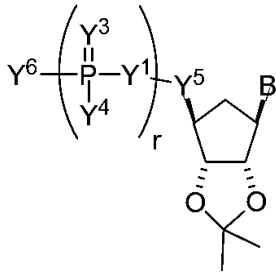
[0255]

[0256] 상기 화학식 IIIa 또는 화학식 IIIa-1에서, 치환체들은 본원에 기술된 바와 같고[예를 들면, 화학식 Ia 및 화학

식 Ia-1의 경우], 여기서, B가, 사이토신, 구아닌, 우라실 및 아데닌으로부터 선택되는 변형되지 않은 핵염기인 경우, Y¹, Y², 또는 Y³ 중 하나 이상은 O가 아니다.

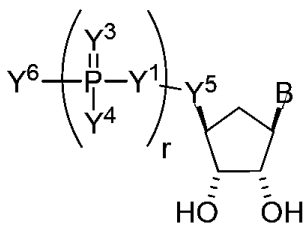
[0257] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는 화학식 IVa 내지 화학식 IVb의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 가지며:

[0258] [화학식 IVa]



[0259]

[0260] [화학식 IVb]



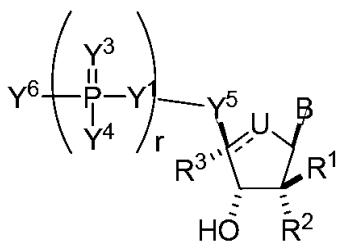
[0261]

[0262] 상기 화학식 IVa 또는 화학식 IVb에서, B는 본원에 기술된 바와 같다[예를 들면, 화학식 b1 내지 화학식 b43 중의 하나의 화합물].

[0263] 특정 실시형태에서, 화학식 IVa 또는 화학식 IVb는, 변형된 우라실[예를 들면, 화학식 b1 내지 화학식 b9, 화학식 b21 내지 화학식 b23, 및 화학식 b28 내지 화학식 b31 중 어느 하나의 화합물, 예를 들면, 화학식 b1, 화학식 b8, 화학식 b28, 화학식 b29, 또는 화학식 b30의 화합물]과 결합된다. 특정 실시형태에서, 화학식 IVa 또는 화학식 IVb는, 변형된 사이토신[예를 들면, 화학식 b10 내지 화학식 b14, 화학식 b24, 화학식 b25, 및 화학식 b32 내지 화학식 b36 중 어느 하나의 화합물, 예를 들면, 화학식 b10 또는 화학식 b32의 화합물]과 결합된다. 특정 실시형태에서, 화학식 IVa 또는 화학식 IVb는, 변형된 구아닌[예를 들면, 화학식 b15 내지 화학식 b17 및 화학식 b37 내지 화학식 b40 중 어느 하나의 화합물]과 결합된다. 특정 실시형태에서, 화학식 IVa 또는 IVb는, 변형된 아데닌[예를 들면, 화학식 b18 내지 화학식 b20 및 화학식 b41 내지 화학식 b43의 화합물]와 결합된다.

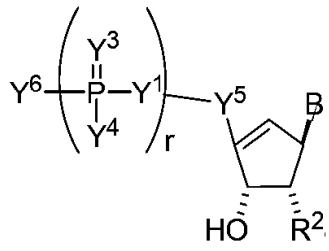
[0264] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는 화학식 IVc 내지 화학식 IVk의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 가지며:

[0265] [화학식 IVc]



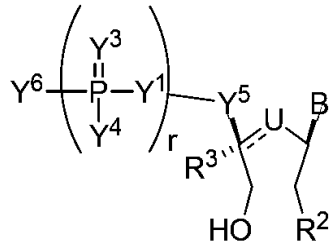
[0266]

[0267] [화학식 IVd]



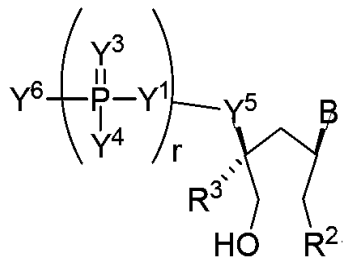
[0268]

[0269] [화학식 IVe]



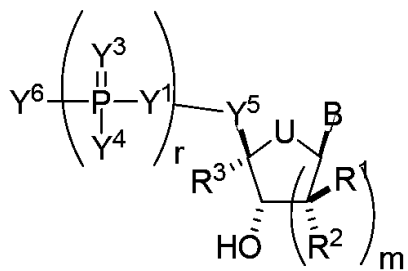
[0270]

[0271] [화학식 IVf]



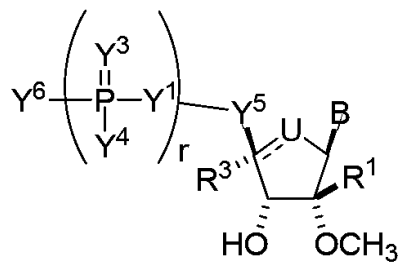
[0272]

[0273] [화학식 IVg]



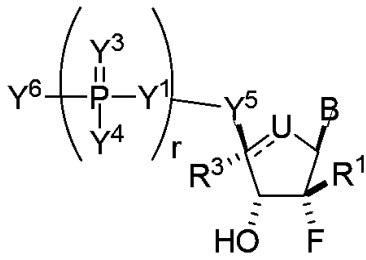
[0274]

[0275] [화학식 IVh]



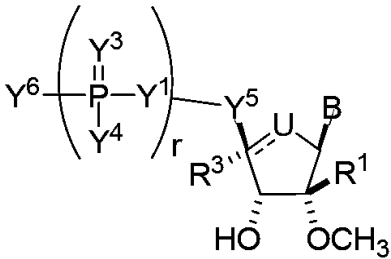
[0276]

[0277] [화학식 IVi]



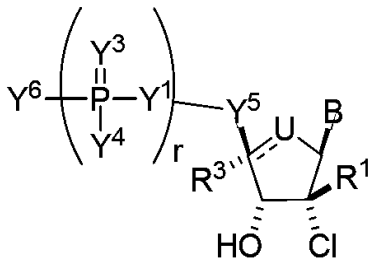
[0278]

[0279] [화학식 IVj]



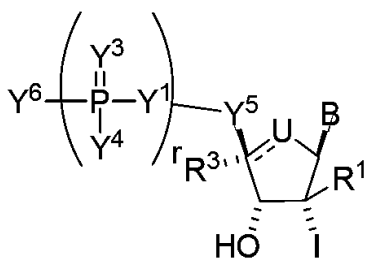
[0280]

[0281] [화학식 IVk]



[0282]

[0283] [화학식 IVl]



[0284]

[0285] 상기 화학식 IVc 내지 화학식 IVl에서, B는 본원에 기술된 바와 같다[예를 들면, 화학식 b1 내지 화학식 b43 중의 어느 하나의 화합물].

[0286] 특정 실시형태에서, 화학식 IVc 내지 화학식 IVk의 화합물 중 하나는, 변형된 우라실[예를 들면, 화학식 b1 내지 화학식 b9, 화학식 b21 내지 화학식 b23, 및 화학식 b28 내지 화학식 b31 중 어느 하나의 화합물, 예를 들면, 화학식 b1, 화학식 b8, 화학식 b28, 화학식 b29, 또는 화학식 b30의 화합물]과 결합한다.

[0287] 특정 실시형태에서, 화학식 IVc 내지 화학식 IVk의 화합물 중 하나는, 변형된 사이토신[예를 들면, 화학식 b10 내지 화학식 b14, 화학식 b24, 화학식 b25, 및 화학식 b32 내지 화학식 b36 중 어느 하나의 화합물, 예를 들면, 화학식 b10 또는 화학식 b32의 화합물]과 결합한다.

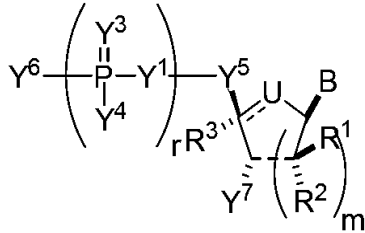
[0288] 특정 실시형태에서, 화학식 IVc 내지 화학식 IVk의 화합물 중 하나는, 변형된 구아닌[예를 들면, 화학식 b15 내지 화학식 b17 및 화학식 b37 내지 화학식 b40 중 어느 하나의 화합물]과 결합한다.

[0289] 특정 실시형태에서, 화학식 IVc 내지 화학식 IVk의 화합물 중 하나는, 변형된 아데닌[예를 들면, 화학식 b18 내

지 화학식 b20 및 화학식 b41 내지 화학식 b43 중 어느 하나의 화합물]과 결합한다.

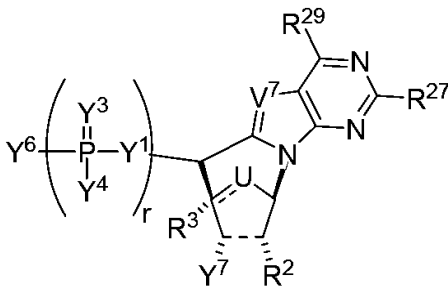
[0290] 다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는 화학식 Va 또는 화학식 Vb의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 가지며, 여기서, B는 본원에 기술된 바와 같다[예를 들면, 화학식 b1 내지 화학식 b43 중 어느 하나의 화합물]:

[0291] [화학식 Va]



[0292]

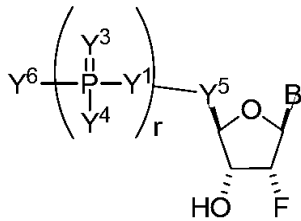
[0293] [화학식 Vb]



[0294]

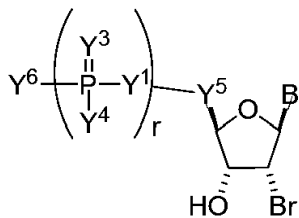
[0295] 다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는 화학식 IXa 내지 화학식 IXd의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 가지며, 여기서, B는 본원에 기술된 바와 같다[예를 들면, 화학식 b1 내지 화학식 b43 중 어느 하나의 화합물]:

[0296] [화학식 IXa]



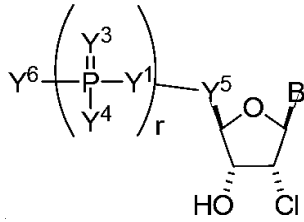
[0297]

[0298] [화학식 IXb]



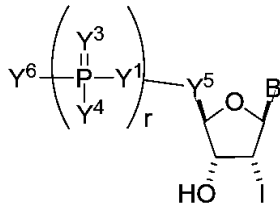
[0299]

[0300] [화학식 IXc]



[0301]

[0302] [화학식 IXd]



[0303]

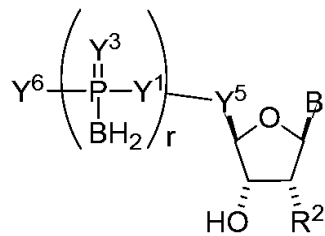
[0304] 특정 실시형태에서, 화학식 IXa 내지 IXd의 화합물 중 하나는, 변형된 우라실[예를 들면, 화학식 b1 내지 화학식 b9, 화학식 b21 내지 화학식 b23, 및 화학식 b28 내지 화학식 b31 중 어느 하나의 화합물, 예를 들면, 화학식 b1, 화학식 b8, 화학식 b28, 화학식 b29, 또는 화학식 b30의 화합물]과 결합된다. 특정 실시형태에서, 화학식 IXa 내지 화학식 IXd의 화합물 중 하나는, 변형된 사이토신[예를 들면, 화학식 b10 내지 화학식 b14, 화학식 b24, 화학식 b25, 및 화학식 b32 내지 화학식 b36 중 어느 하나의 화합물, 예를 들면, 화학식 b10 또는 화학식 b32의 화합물]과 결합한다.

[0305] 특정 실시형태에서, 화학식 IXa 내지 화학식 IXd의 화합물 중 하나는, 변형된 구아닌[예를 들면, 화학식 b15 내지 화학식 b17 및 화학식 b37 내지 화학식 b40 중 어느 하나의 화합물]과 결합한다.

[0306] 특정 실시형태에서, 화학식 IXa 내지 화학식 IXd의 화합물 중 하나는, 변형된 아데닌[예를 들면, 화학식 b18 내지 화학식 b20 및 화학식 b41 내지 화학식 b43의 화합물]과 결합한다.

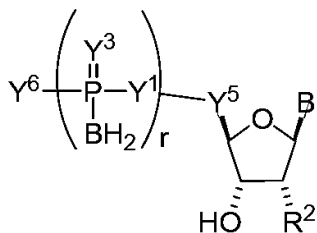
[0307] 다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는 화학식 IXe 내지 화학식 IXg의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 가지며,

[0308] [화학식 IXe]



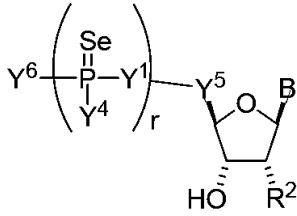
[0309]

[0310] [화학식 IXf]



[0311]

[0312] [화학식 IXg]



[0313]

[0314] 상기 화학식 IXe 내지 화학식 IXg에서, B는 본원에 기술된 바와 같다[예를 들면, 화학식 b1 내지 화학식 b43 중의 어느 하나의 화합물].

[0315] 특정 실시형태에서, 화학식 IXe 내지 화학식 IXg의 화합물 중 하나는, 변형된 우라실[예를 들면, 화학식 b1 내지 화학식 b9, 화학식 b21 내지 화학식 b23, 및 화학식 b28 내지 화학식 b31 중 어느 하나, 예를 들면, 화학식 b1, 화학식 b8, 화학식 b28, 화학식 b29, 또는 화학식 b30의 화합물]과 결합한다.

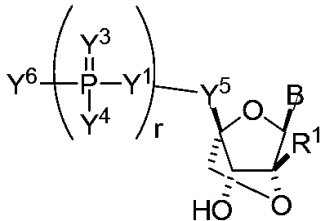
[0316] 특정 실시형태에서, 화학식 IXe 내지 화학식 IXg의 화합물 중 하나는, 변형된 사이토신[예를 들면, 화학식 b10 내지 화학식 b14, 화학식 b24, 화학식 b25, 및 화학식 b32 내지 화학식 b36의 화합물 중 어느 하나, 예를 들면, 화학식 b10 또는 화학식 b32의 화합물]과 결합한다.

[0317] 특정 실시형태에서, 화학식 IXe 내지 화학식 IXg의 화합물 중 하나는, 변형된 구아닌[예를 들면, 화학식 b15 내지 화학식 b17 및 화학식 b37 내지 화학식 b40의 화합물 중 어느 하나]과 결합한다.

[0318] 특정 실시형태에서, 화학식 IXe 내지 화학식 IXg의 화합물 중 하나는, 변형된 아데닌[예를 들면, 화학식 b18 내지 화학식 b20 및 화학식 b41 내지 화학식 b43의 화합물 중 어느 하나]과 결합한다.

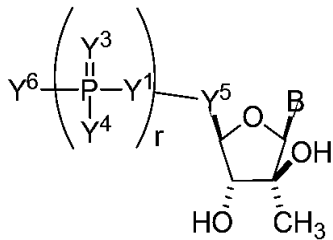
[0319] 다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는 화학식 IXh 내지 화학식 IXk의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 가지며:

[0320] [화학식 IXh]



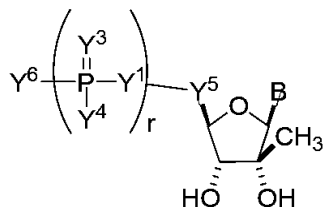
[0321]

[0322] [화학식 IXi]



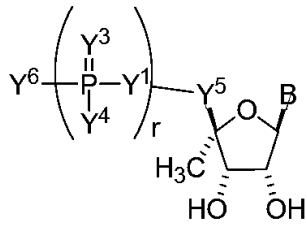
[0323]

[0324] [화학식 IXj]



[0325]

[0326] [화학식 IXk]



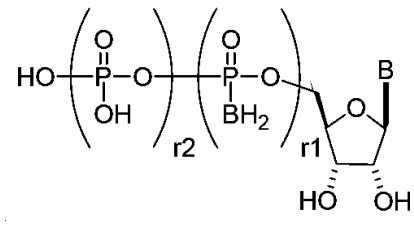
[0327]

[0328] 상기 화학식 IXh 내지 화학식 IXk에서, B는 본원에 기술된 바와 같다[예를 들면, 화학식 b1 내지 화학식 b43의 화합물 중 어느 하나]. 특정 실시형태에서, 화학식 IXh 내지 화학식 IXk의 화합물 중 하나는, 변형된 우라실 [예를 들면, 화학식 b1 내지 화학식 b9, 화학식 b21 내지 화학식 b23, 및 화학식 b28 내지 화학식 b31의 화합물 중 어느 하나, 예를 들면, 화학식 b1, 화학식 b8, 화학식 b28, 화학식 b29, 또는 화학식 b30의 화합물]과 결합한다. 특정 실시형태에서, 화학식 IXh 내지 화학식 IXk의 화합물 중 하나는, 변형된 사이토신[예를 들면, 화학식 b10 내지 화학식 b14, 화학식 b24, 화학식 b25, 및 화학식 b32 내지 화학식 b36의 화합물 중 어느 하나, 예를 들면, 화학식 b10 또는 화학식 b32]과 결합한다.

[0329] 특정 실시형태에서, 화학식 IXh 내지 화학식 IXk의 화합물 중 하나는, 변형된 구아닌[예를 들면, 화학식 b15 내지 화학식 b17 및 화학식 b37 내지 화학식 b40의 화합물 중 어느 하나]과 결합한다. 특정 실시형태에서, 화학식 IXh 내지 화학식 IXk의 화합물 중 하나는, 변형된 아데닌[예를 들면, 화학식 b18 내지 화학식 b20 및 화학식 b41 내지 화학식 b43의 화합물 중 어느 하나]과 결합한다.

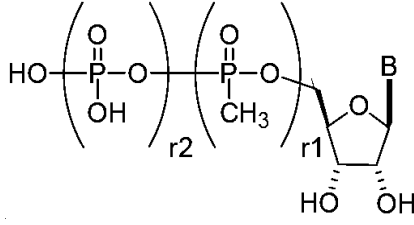
[0330] 다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는 화학식 IXl 내지 화학식 IXr의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 가지며:

[0331] [화학식 IXl]



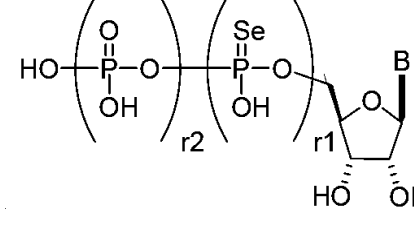
[0332]

[0333] [화학식 IXm]



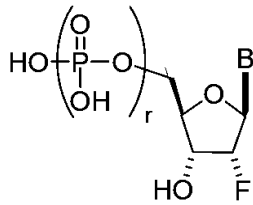
[0334]

[0335] [화학식 IXn]



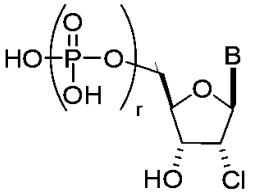
[0336]

[0337] [화학식 IXo]



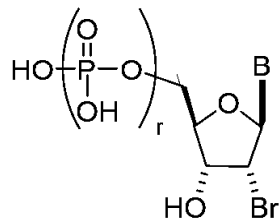
[0338]

[0339] [화학식 IXp]



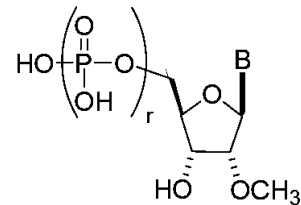
[0340]

[0341] [화학식 IXq]



[0342]

[0343] [화학식 IXr]



[0344]

[0345] 상기 화학식 IX1 내지 화학식 IXr에서, 각각의 r1 및 r2는, 독립적으로, 0 내지 5(예를 들면, 0 내지 3, 1 내지 3, 또는 1 내지 5)의 정수이고, B는 본원에 기술된 바와 같다[예를 들면, 화학식 b1 내지 화학식 b43의 화합물 중 어느 하나].

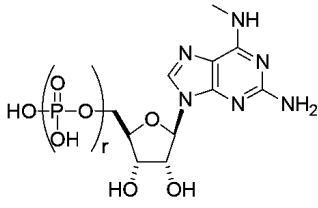
[0346] 특정 실시형태에서, 화학식 IX1 내지 화학식 IXr의 화합물 중 하나는, 변형된 우라실[예를 들면, 화학식 b1 내지 화학식 b9, 화학식 b21 내지 화학식 b23, 및 화학식 b28 내지 화학식 b31의 화합물 중 어느 하나, 예를 들면, 화학식 b1, 화학식 b8, 화학식 b28, 화학식 b29, 또는 화학식 b30의 화합물]과 결합한다.

[0347] 특정 실시형태에서, 화학식 IX1 내지 화학식 IXr의 화합물 중 하나는, 변형된 사이토신[예를 들면, 화학식 b10 내지 화학식 b14, 화학식 b24, 화학식 b25, 및 화학식 b32 내지 화학식 b36의 화합물 중 어느 하나, 예를 들면, 화학식 b10 또는 화학식 b32의 화합물]과 결합한다.

[0348] 특정 실시형태에서, 화학식 IX1 내지 화학식 IXr의 화합물 중 하나는, 변형된 구아닌[예를 들면, 화학식 b15 내지 화학식 b17 및 화학식 b37 내지 화학식 b40의 화합물 중 어느 하나]과 결합한다. 특정 실시형태에서, 화학식 IX1 내지 화학식 IXr의 화합물 중 하나는, 변형된 아데닌[예를 들면, 화학식 b18 내지 화학식 b20 및 화학식 b41 내지 화학식 b43 중 어느 하나]과 결합한다.

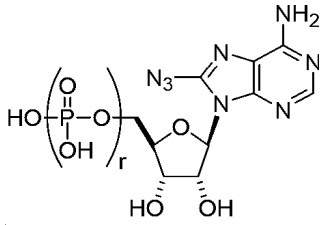
[0349] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는 하기 화학식 BB-1 내지 화학식 BB-12의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다:

[0350] [화학식 BB-1]



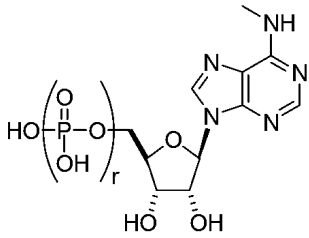
[0351]

[0352] [화학식 BB-2]



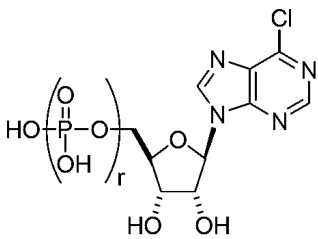
[0353]

[0354] [화학식 BB-3]



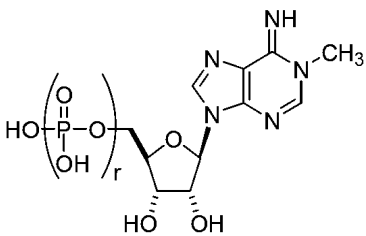
[0355]

[0356] [화학식 BB-4]



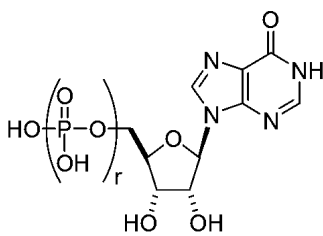
[0357]

[0358] [화학식 BB-5]



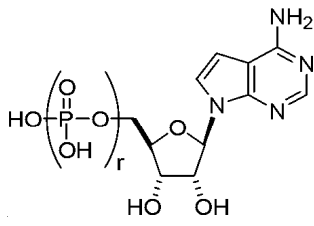
[0359]

[0360] [화학식 BB-6]



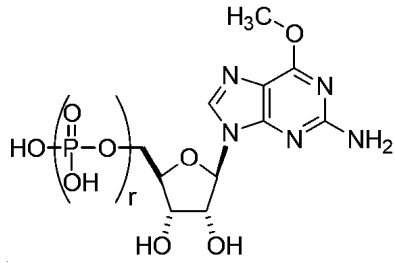
[0361]

[0362] [화학식 BB-7]



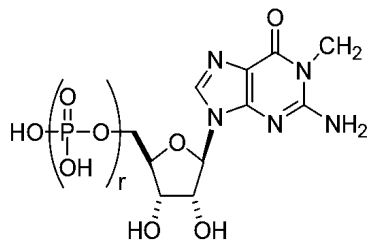
[0363]

[0364] [화학식 BB-8]



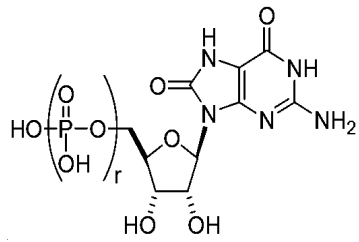
[0365]

[0366] [화학식 BB-9]



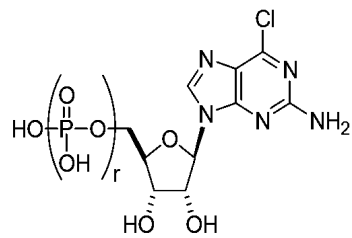
[0367]

[0368] [화학식 BB-10]



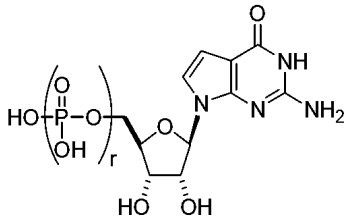
[0369]

[0370] [화학식 BB-11]



[0371]

[0372] [화학식 BB-12]

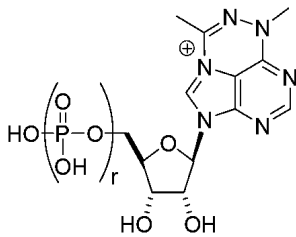


[0373]

[0374] 상기 화학식 BB-1 내지 화학식 BB-12에서, 각각의 r은, 독립적으로, 0 내지 5(예를 들면, 0 내지 3, 1 내지 3, 또는 1 내지 5)의 정수이다.

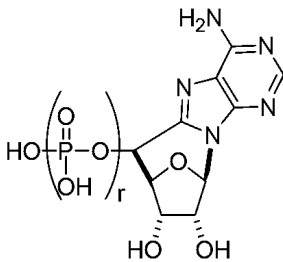
[0375] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는 하기 화학식 BB-13 내지 화학식 BB-20의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다:

[0376] [화학식 BB-13]



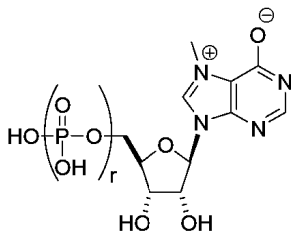
[0377]

[0378] [화학식 BB-14]



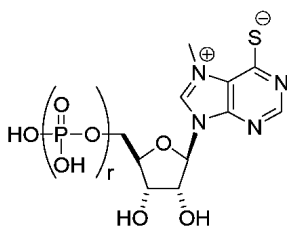
[0379]

[0380] [화학식 BB-15]



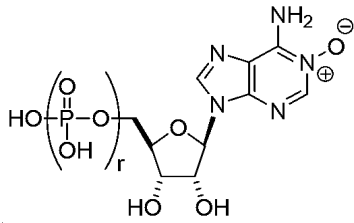
[0381]

[0382] [화학식 BB-16]



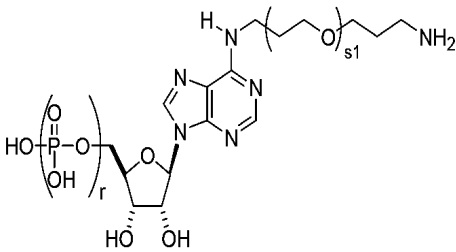
[0383]

[0384] [화학식 BB-17]



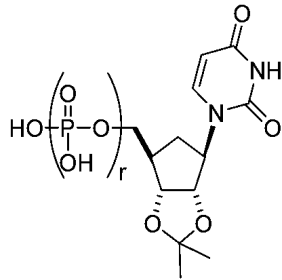
[0385]

[0386] [화학식 BB-18]



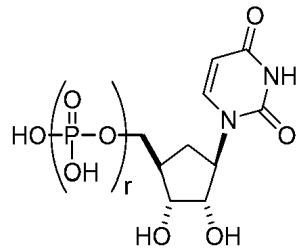
[0387]

[0388] [화학식 BB-19]



[0389]

[0390] [화학식 BB-20]

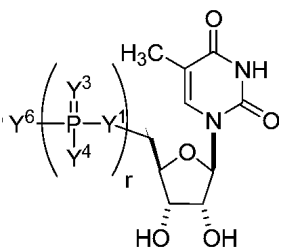


[0391]

[0392] 상기 화학식 BB-13 내지 화학식 BB-20에서, 각각의 r은, 독립적으로, 0 내지 5(예를 들면, 0 내지 3, 1 내지 3, 또는 1 내지 5)의 정수이고, s1은 본원에 기술된 바와 같다.

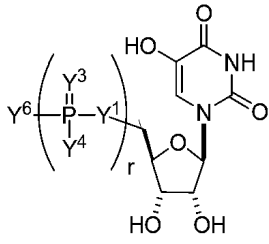
[0393] 일부 실시형태에서, 핵산(예를 들면, RNA, mRNA, 폴리뉴클레오타이드) 내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는, 변형된 유리딘이다[예를 들면, 하기 화학식 BB-21 내지 화학식 BB-125의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다]:

[0394] [화학식 BB-21]



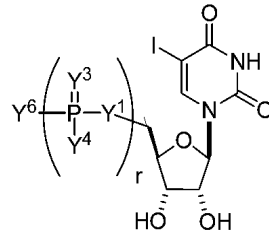
[0395]

[0396] [화학식 BB-22]



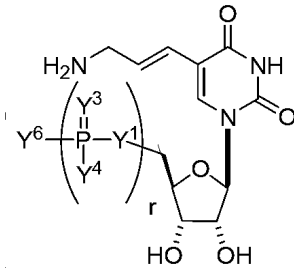
[0397]

[0398] [화학식 BB-23]



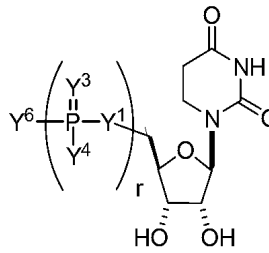
[0399]

[0400] [화학식 BB-24]



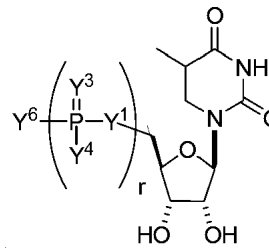
[0401]

[0402] [화학식 BB-25]



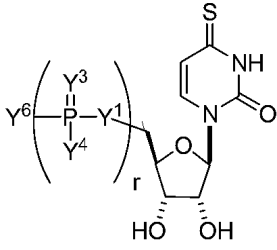
[0403]

[0404] [화학식 BB-26]



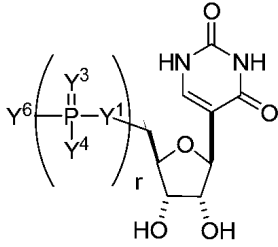
[0405]

[0406] [화학식 BB-27]



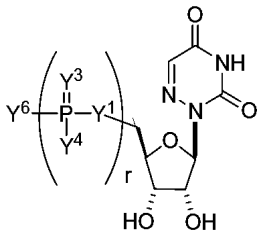
[0407]

[0408] [화학식 BB-28]



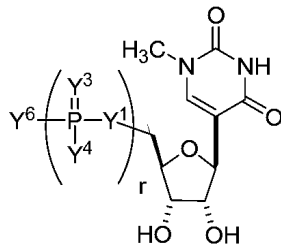
[0409]

[0410] [화학식 BB-29]



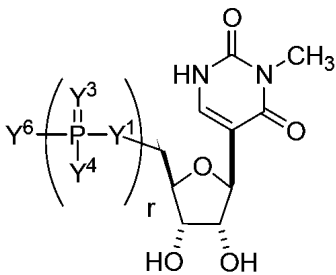
[0411]

[0412] [화학식 BB-30]



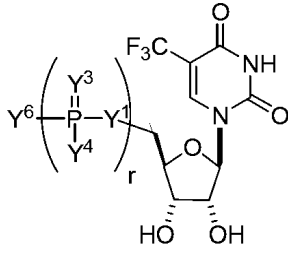
[0413]

[0414] [화학식 BB-31]



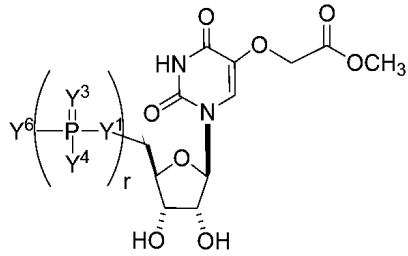
[0415]

[0416] [화학식 BB-32]



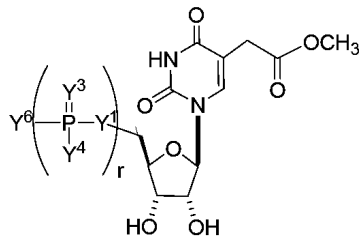
[0417]

[0418] [화학식 BB-33]



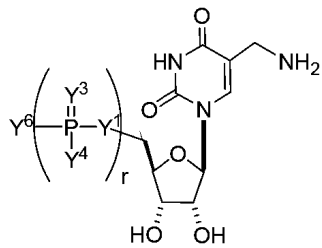
[0419]

[0420] [화학식 BB-34]



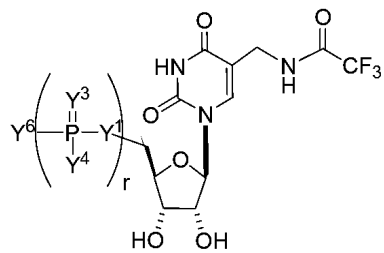
[0421]

[0422] [화학식 BB-35]



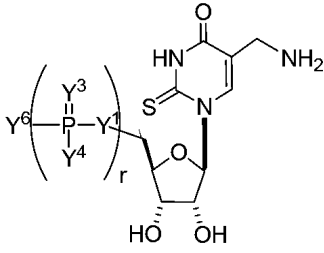
[0423]

[0424] [화학식 BB-36]



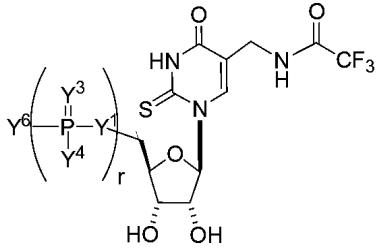
[0425]

[0426] [화학식 BB-37]



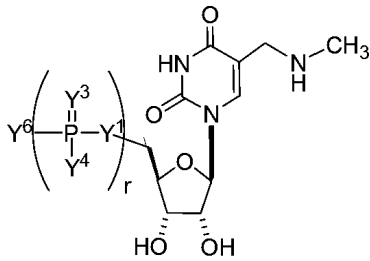
[0427]

[0428] [화학식 BB-38]



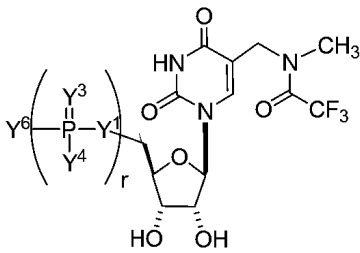
[0429]

[0430] [화학식 BB-39]



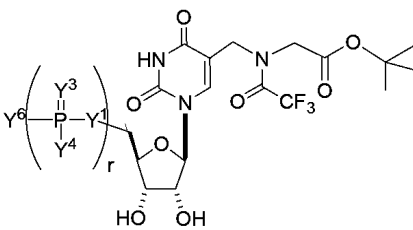
[0431]

[0432] [화학식 BB-40]



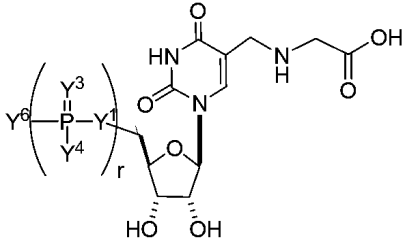
[0433]

[0434] [화학식 BB-41]



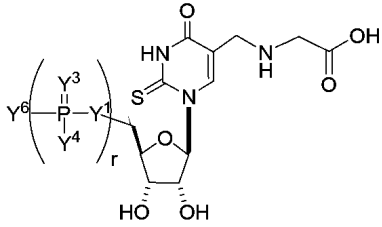
[0435]

[0436] [화학식 BB-42]



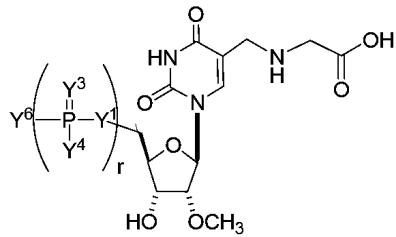
[0437]

[0438] [화학식 BB-43]



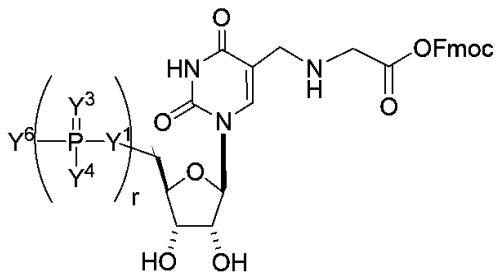
[0439]

[0440] [화학식 BB-44]



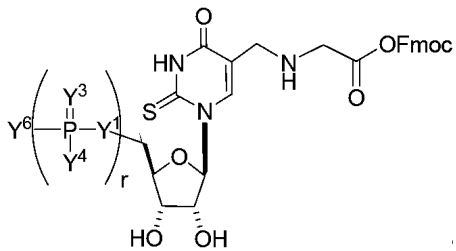
[0441]

[0442] [화학식 BB-45]



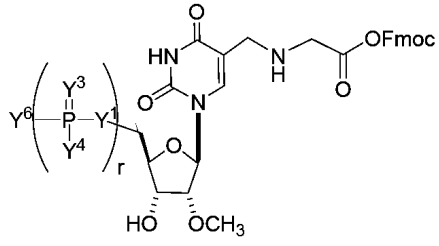
[0443]

[0444] [화학식 BB-46]



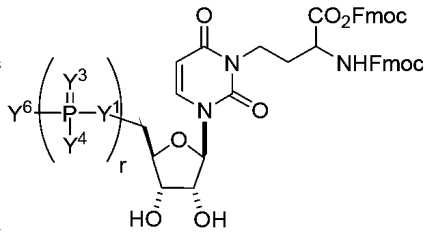
[0445]

[0446] [화학식 BB-47]



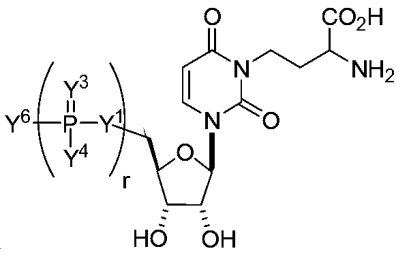
[0447]

[0448] [화학식 BB-48]



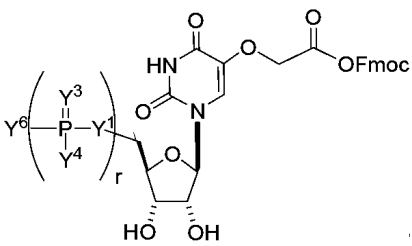
[0449]

[0450] [화학식 BB-49]



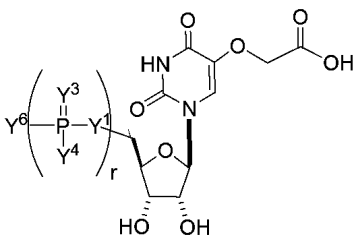
[0451]

[0452] [화학식 BB-50]



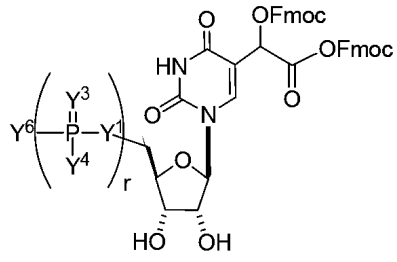
[0453]

[0454] [화학식 BB-51]



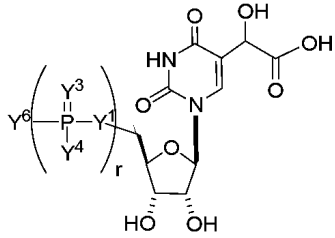
[0455]

[0456] [화학식 BB-52]



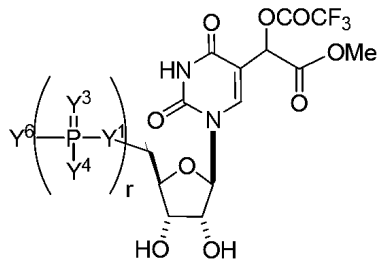
[0457]

[0458] [화학식 BB-53]



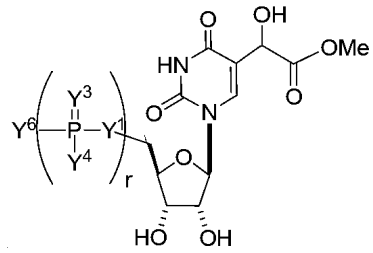
[0459]

[0460] [화학식 BB-54]



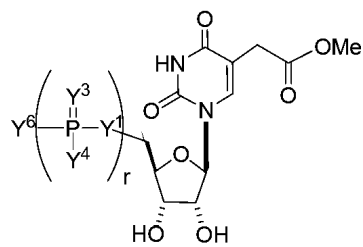
[0461]

[0462] [화학식 BB-55]



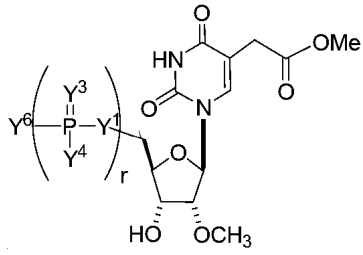
[0463]

[0464] [화학식 BB-56]



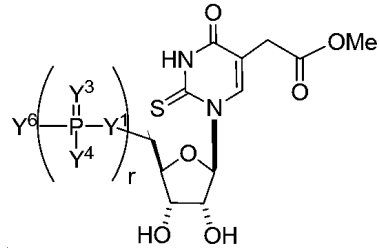
[0465]

[0466] [화학식 BB-57]



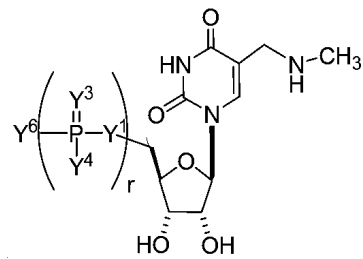
[0467]

[0468] [화학식 BB-58]



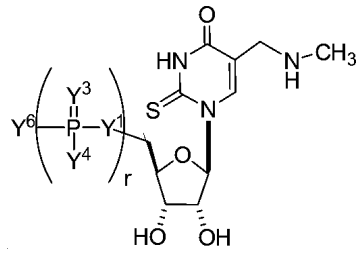
[0469]

[0470] [화학식 BB-59]



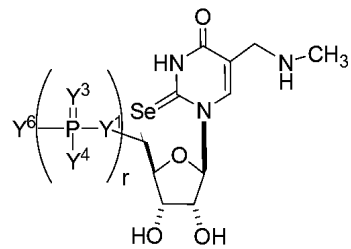
[0471]

[0472] [화학식 BB-60]



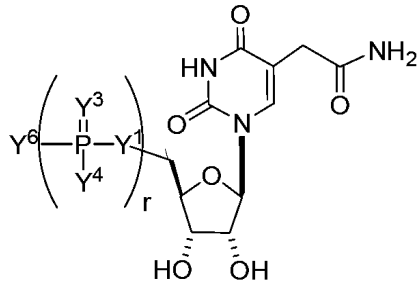
[0473]

[0474] [화학식 BB-61]



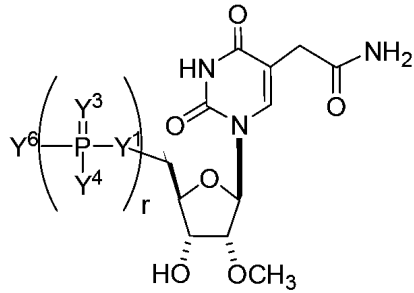
[0475]

[0476] [화학식 BB-62]



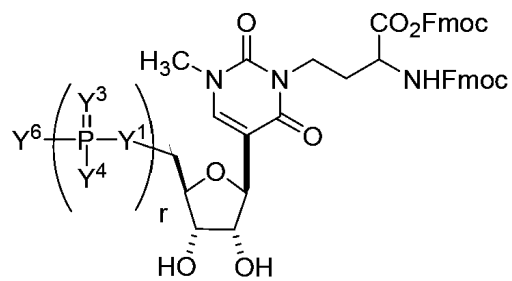
[0477]

[0478] [화학식 BB-63]



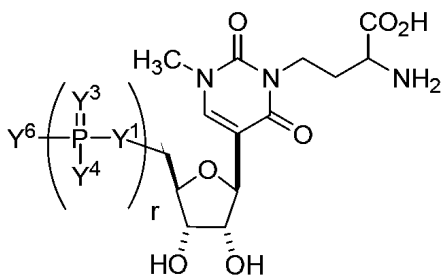
[0479]

[0480] [화학식 BB-64]



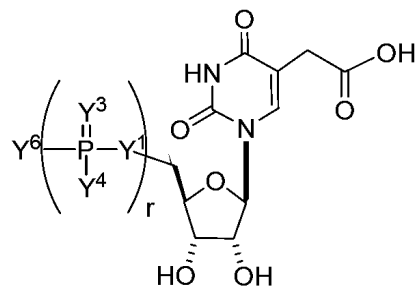
[0481]

[0482] [화학식 BB-65]



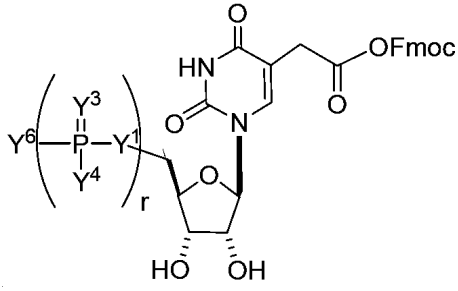
[0483]

[0484] [화학식 BB-66]



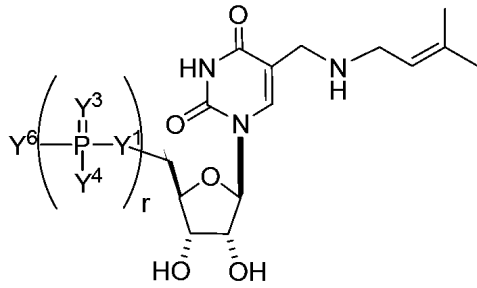
[0485]

[0486] [화학식 BB-67]



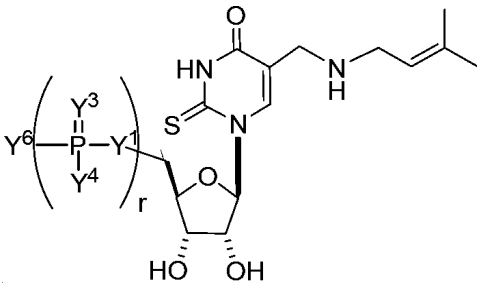
[0487]

[0488] [화학식 BB-68]



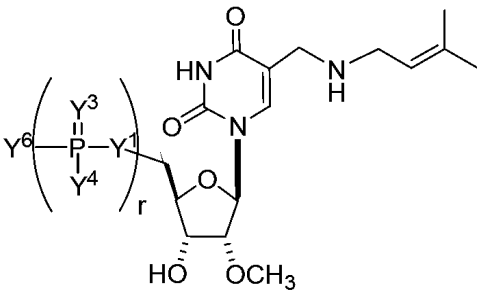
[0489]

[0490] [화학식 BB-69]



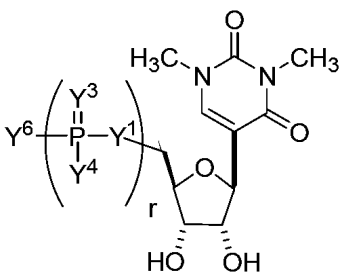
[0491]

[0492] [화학식 BB-70]



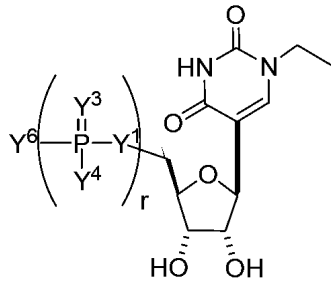
[0493]

[0494] [화학식 BB-71]



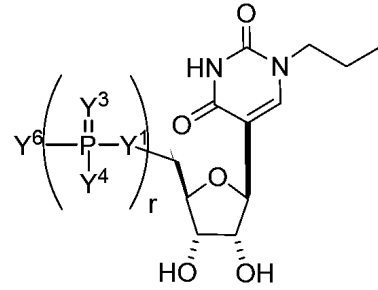
[0495]

[0496] [화학식 BB-72]



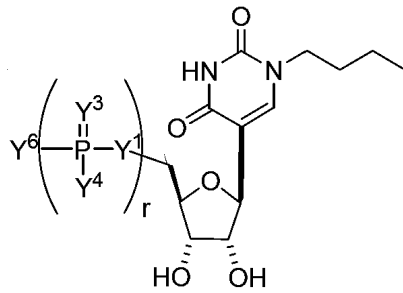
[0497]

[0498] [화학식 BB-73]



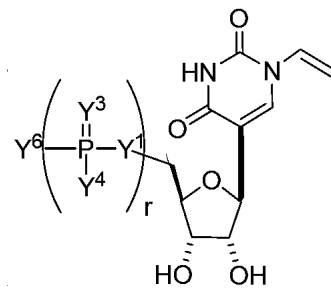
[0499]

[0500] [화학식 BB-74]



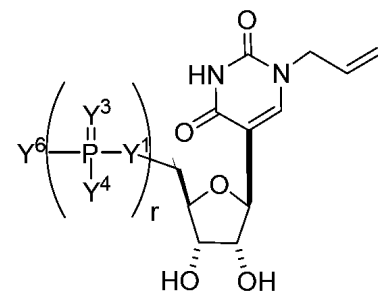
[0501]

[0502] [화학식 BB-75]



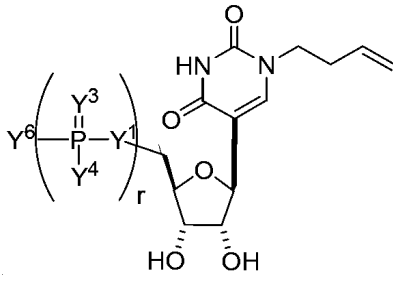
[0503]

[0504] [화학식 BB-76]



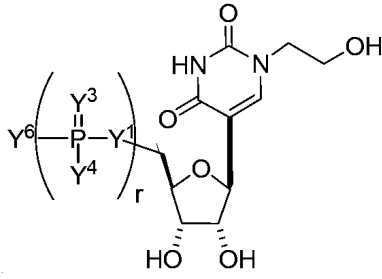
[0505]

[0506] [화학식 BB-77]



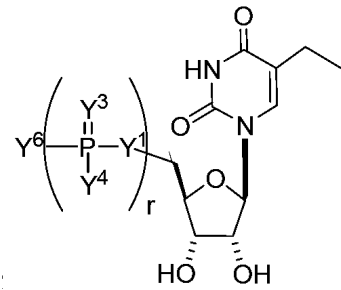
[0507]

[0508] [화학식 BB-78]



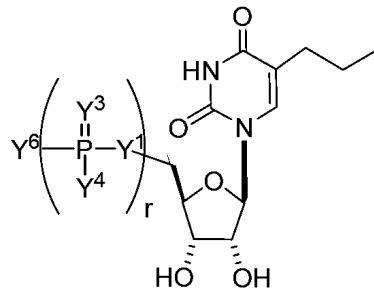
[0509]

[0510] [화학식 BB-79]



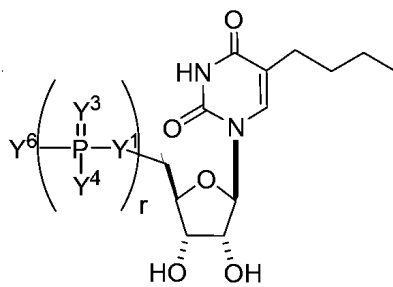
[0511]

[0512] [화학식 BB-80]



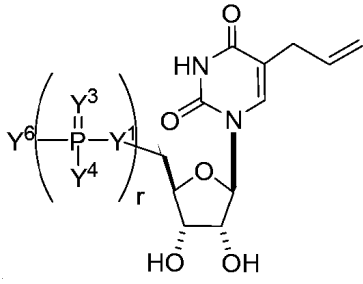
[0513]

[0514] [화학식 BB-81]



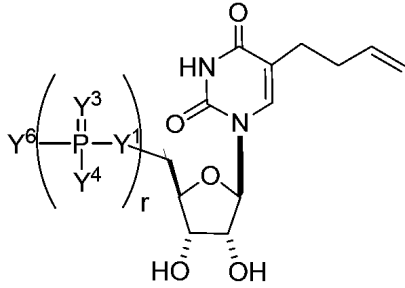
[0515]

[0516] [화학식 BB-82]



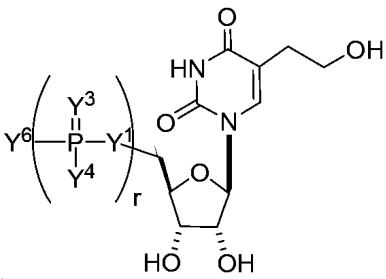
[0517]

[0518] [화학식 BB-83]



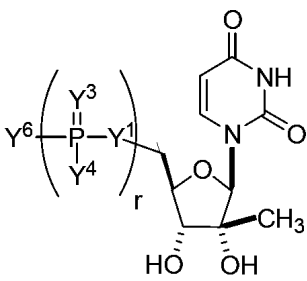
[0519]

[0520] [화학식 BB-84]



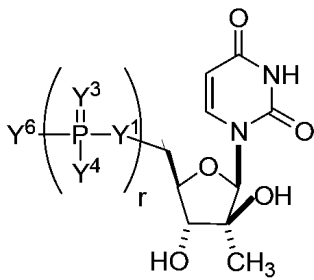
[0521]

[0522] [화학식 BB-85]



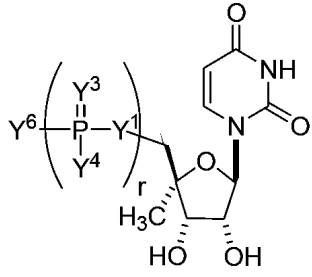
[0523]

[0524] [화학식 BB-86]



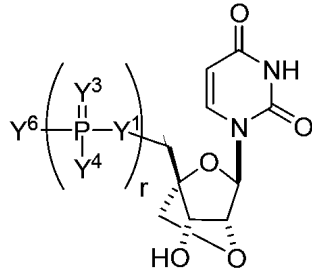
[0525]

[0526] [화학식 BB-87]



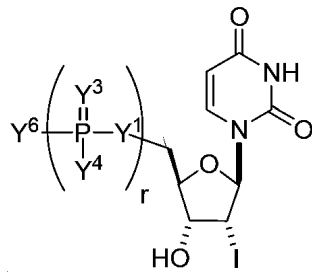
[0527]

[0528] [화학식 BB-88]



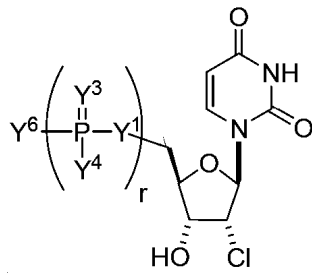
[0529]

[0530] [화학식 BB-89]



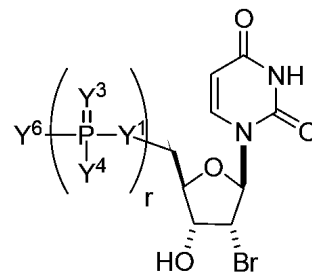
[0531]

[0532] [화학식 BB-90]



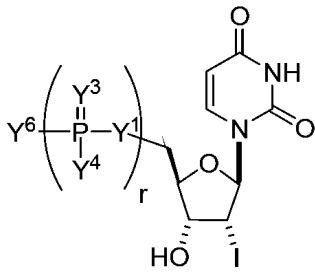
[0533]

[0534] [화학식 BB-91]



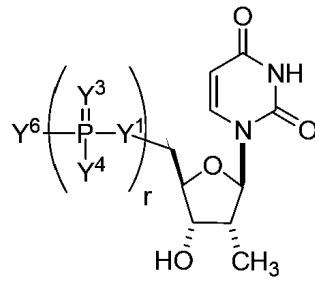
[0535]

[0536] [화학식 BB-92]



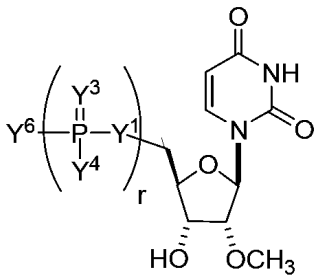
[0537]

[0538] [화학식 BB-93]



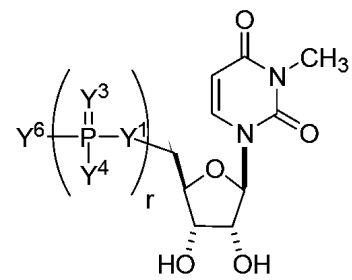
[0539]

[0540] [화학식 BB-94]



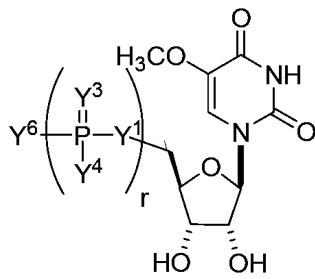
[0541]

[0542] [화학식 BB-95]



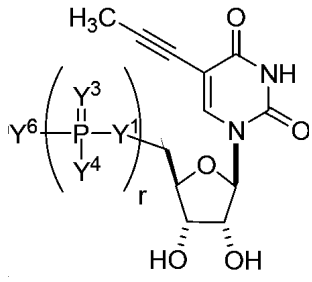
[0543]

[0544] [화학식 BB-96]



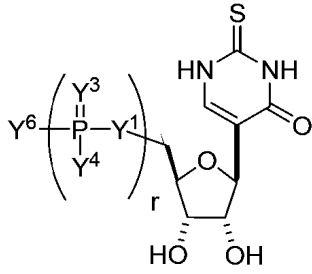
[0545]

[0546] [화학식 BB-97]



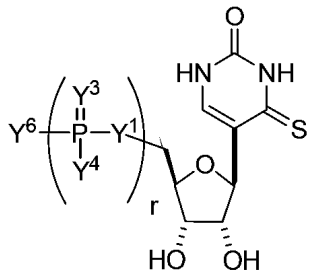
[0547]

[0548] [화학식 BB-98]



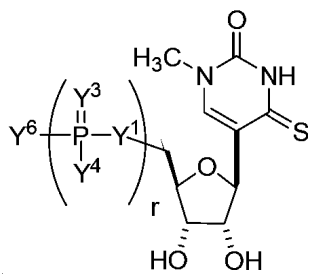
[0549]

[0550] [화학식 BB-99]



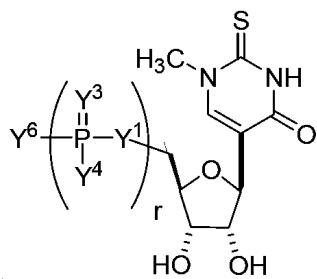
[0551]

[0552] [화학식 BB-100]



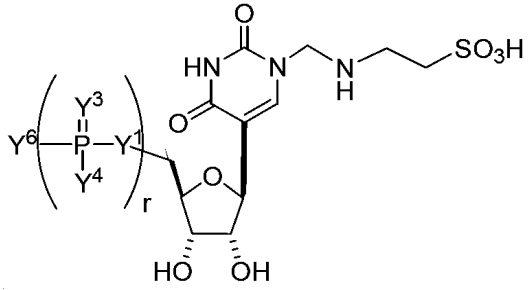
[0553]

[0554] [화학식 BB-101]



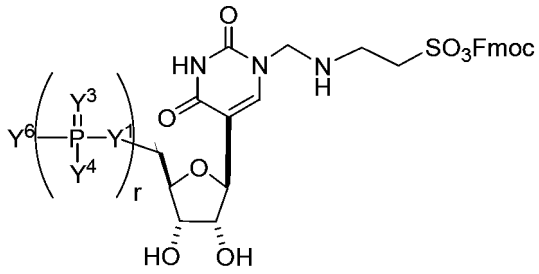
[0555]

[0556] [화학식 BB-102]



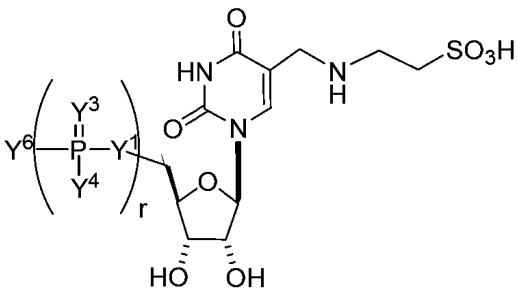
[0557]

[0558] [화학식 BB-103]



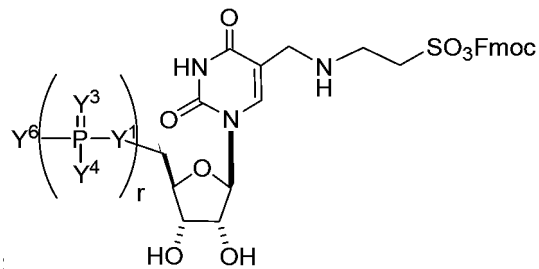
[0559]

[0560] [화학식 BB-104]



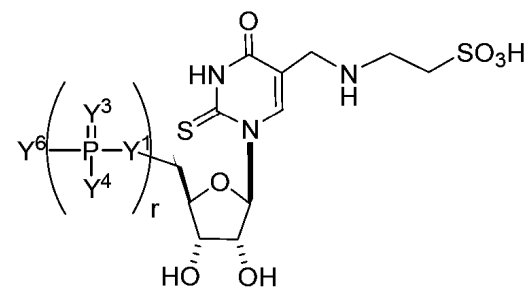
[0561]

[0562] [화학식 BB-105]



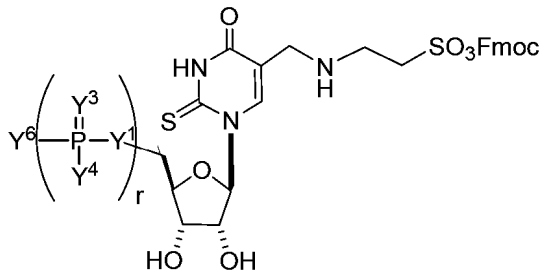
[0563]

[0564] [화학식 BB-106]



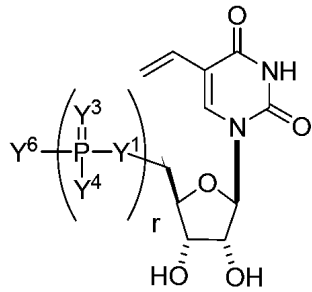
[0565]

[0566] [화학식 BB-107]



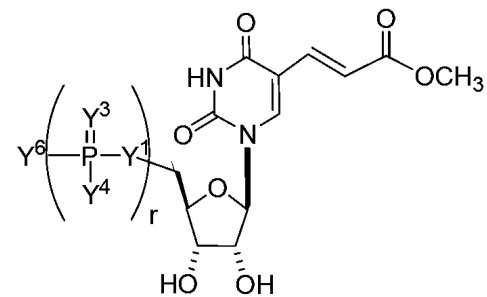
[0567]

[0568] [화학식 BB-108]



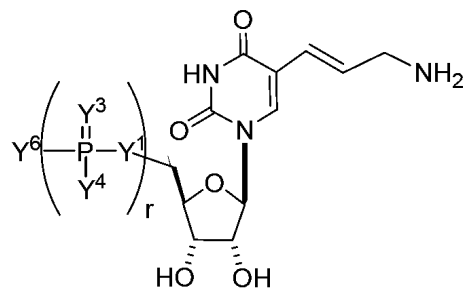
[0569]

[0570] [화학식 BB-109]



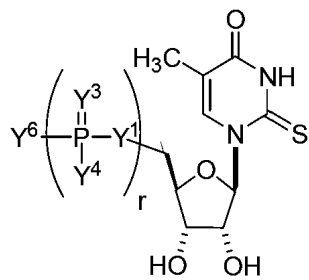
[0571]

[0572] [화학식 BB-110]



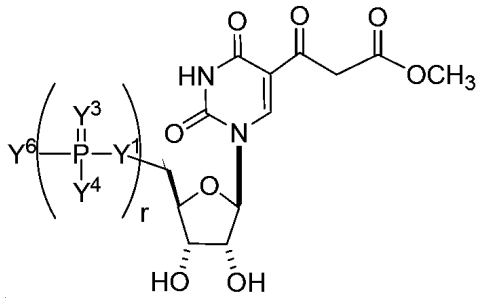
[0573]

[0574] [화학식 BB-111]



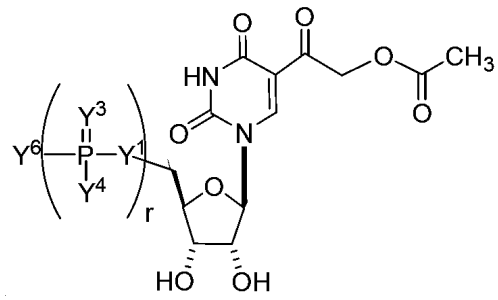
[0575]

[0576] [화학식 BB-112]



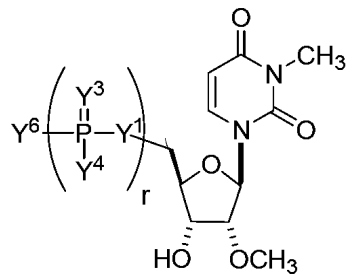
[0577]

[0578] [화학식 BB-113]



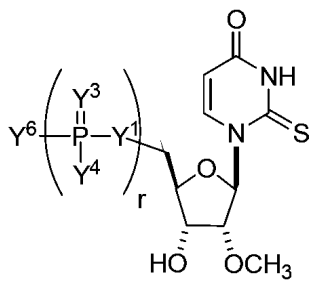
[0579]

[0580] [화학식 BB-114]



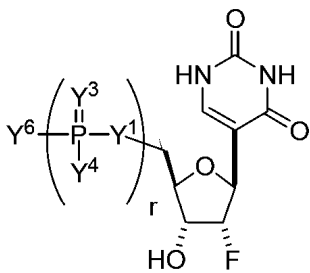
[0581]

[0582] [화학식 BB-115]



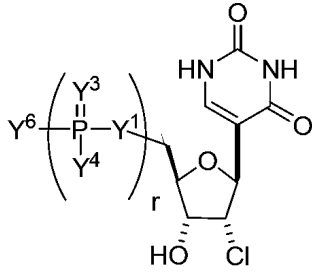
[0583]

[0584] [화학식 BB-116]



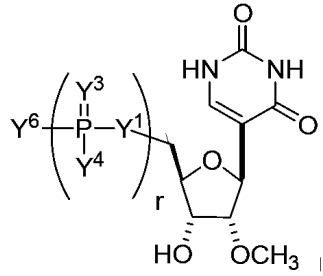
[0585]

[0586] [화학식 BB-117]



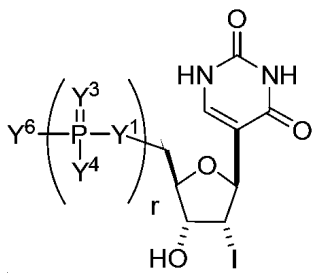
[0587]

[0588] [화학식 BB-118]



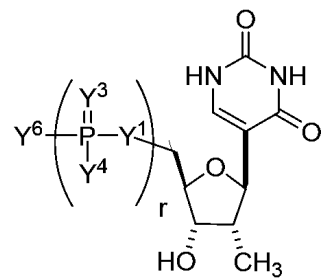
[0589]

[0590] [화학식 BB-119]



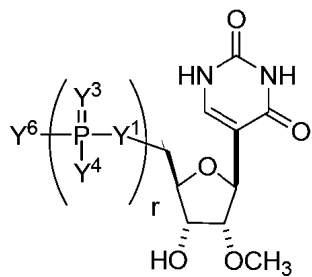
[0591]

[0592] [화학식 BB-120]



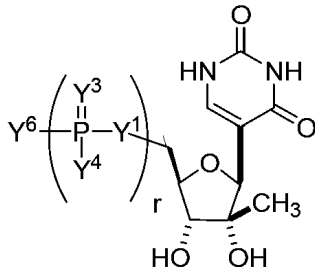
[0593]

[0594] [화학식 BB-121]



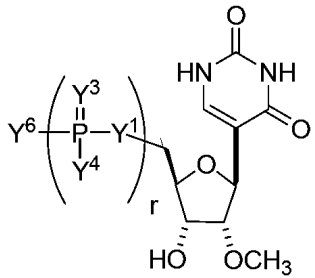
[0595]

[0596] [화학식 BB-122]



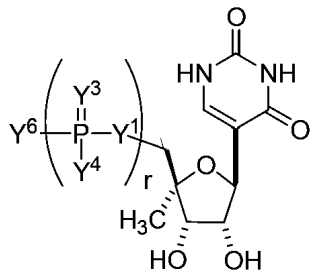
[0597]

[0598] [화학식 BB-123]



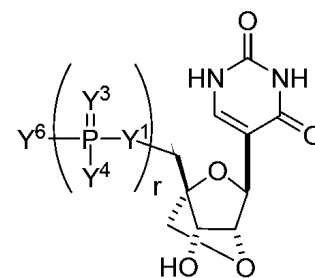
[0599]

[0600] [화학식 BB-124]



[0601]

[0602] [화학식 BB-125]

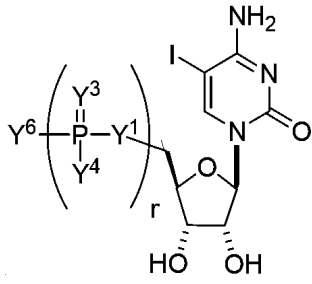


[0603]

[0604] 상기 화학식 BB-21 내지 화학식 BB-125에서, Y¹, Y³, Y⁴, Y⁶, 및 r은 본원에 기술된 바와 같다(예를 들면, 각각의 r은, 독립적으로, 0 내지 5의 정수, 예를 들면, 0 내지 3, 1 내지 3, 또는 1 내지 5의 정수이다).

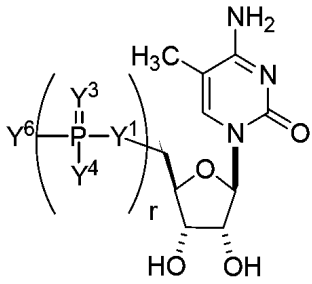
[0605] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는, 변형된 사이티딘이다[예를 들면, 하기 화학식 BB-126 내지 화학식 BB-159의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다]:

[0606] [화학식 BB-126]



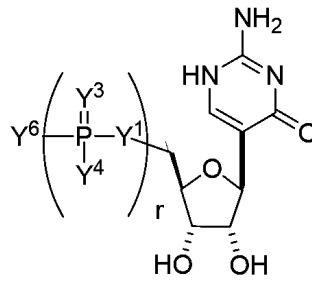
[0607]

[0608] [화학식 BB-127]



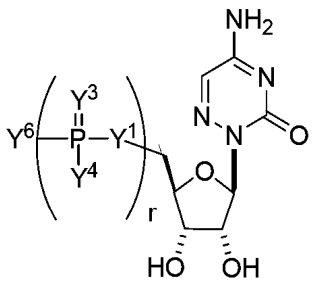
[0609]

[0610] [화학식 BB-128]



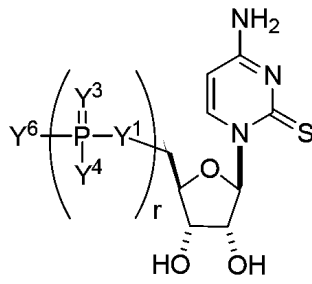
[0611]

[0612] [화학식 BB-129]



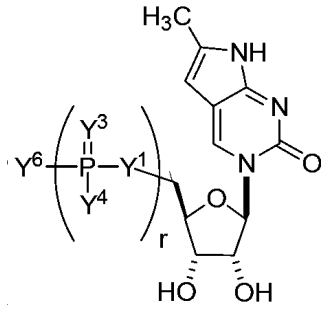
[0613]

[0614] [화학식 BB-130]



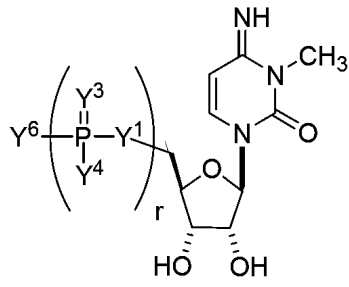
[0615]

[0616] [화학식 BB-131]



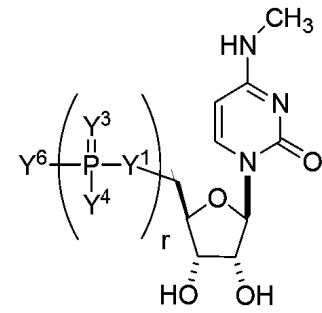
[0617]

[0618] [화학식 BB-132]



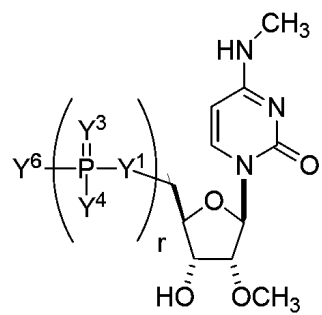
[0619]

[0620] [화학식 BB-133]



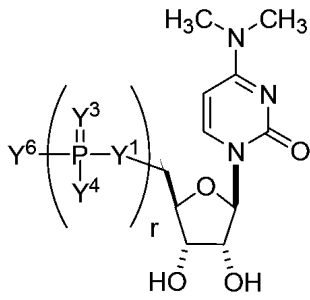
[0621]

[0622] [화학식 BB-134]



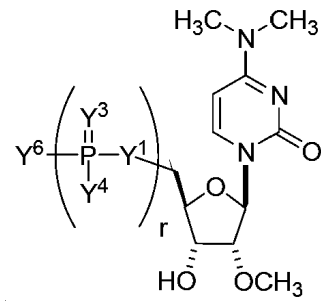
[0623]

[0624] [화학식 BB-135]



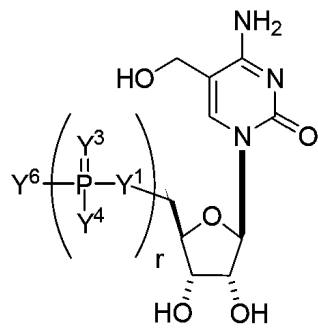
[0625]

[0626] [화학식 BB-136]



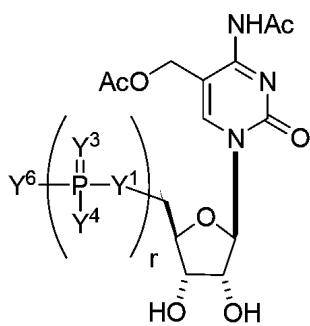
[0627]

[0628] [화학식 BB-137]



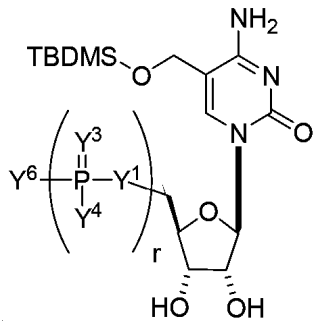
[0629]

[0630] [화학식 BB-138]



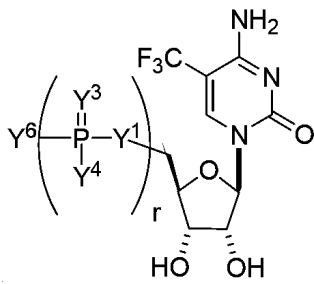
[0631]

[0632] [화학식 BB-139]



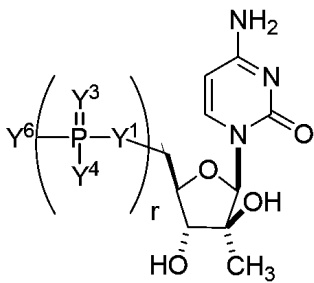
[0633]

[0634] [화학식 BB-140]



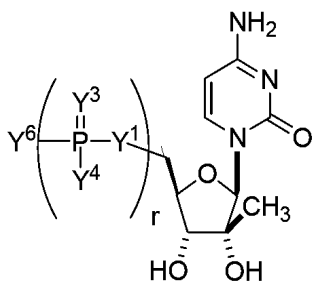
[0635]

[0636] [화학식 BB-141]



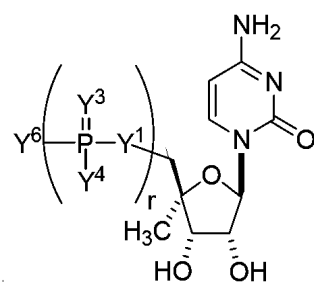
[0637]

[0638] [화학식 BB-142]



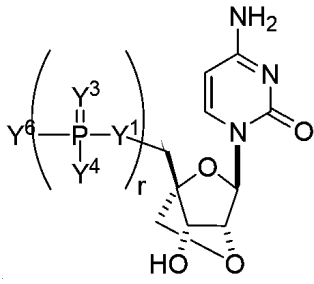
[0639]

[0640] [화학식 BB-143]



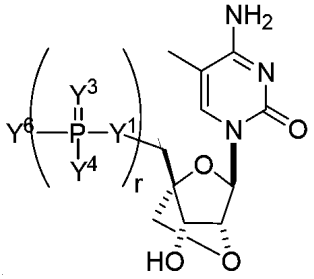
[0641]

[0642] [화학식 BB-144]



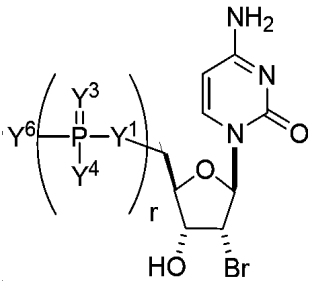
[0643]

[0644] [화학식 BB-145]



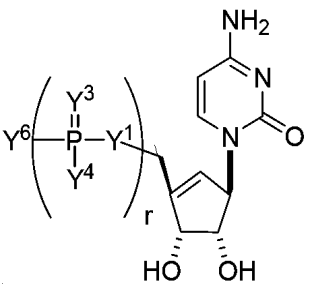
[0645]

[0646] [화학식 BB-146]



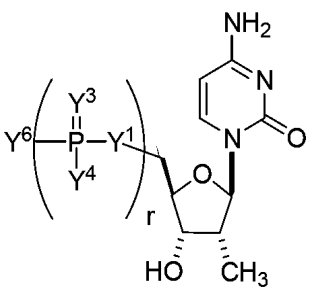
[0647]

[0648] [화학식 BB-147]



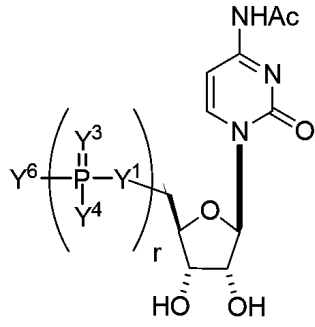
[0649]

[0650] [화학식 BB-148]



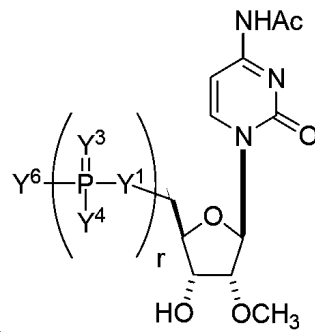
[0651]

[0652] [화학식 BB-149]



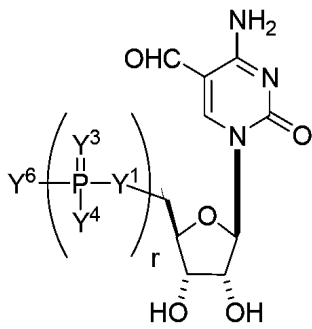
[0653]

[0654] [화학식 BB-150]



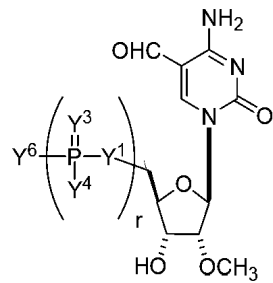
[0655]

[0656] [화학식 BB-151]



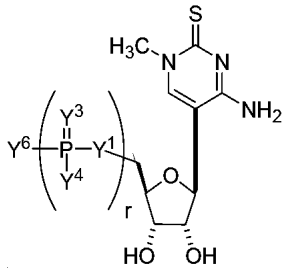
[0657]

[0658] [화학식 BB-152]



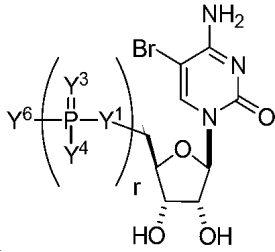
[0659]

[0660] [화학식 BB-153]



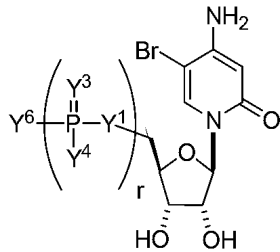
[0661]

[0662] [화학식 BB-154]



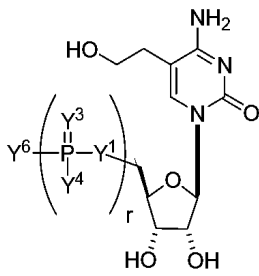
[0663]

[0664] [화학식 BB-155]



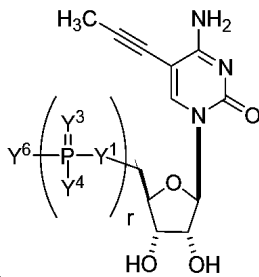
[0665]

[0666] [화학식 BB-156]



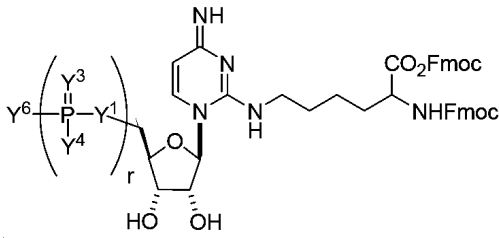
[0667]

[0668] [화학식 BB-157]



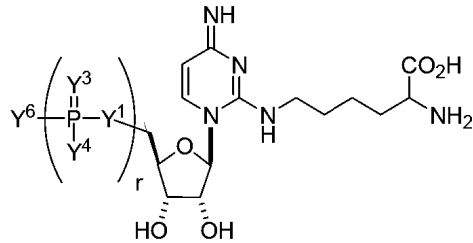
[0669]

[0670] [화학식 BB-158]



[0671]

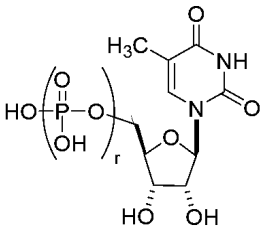
[0672] [화학식 BB-159]



[0673]

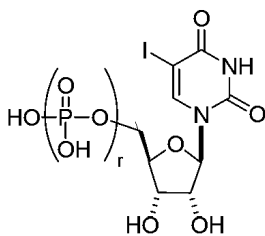
[0674] [상기 화학식 BB-126 내지 화학식 BB-159에서, Y¹, Y³, Y⁴, Y⁶, 및 r은 분원에 기술된 바와 같다(예를 들면, 각각의 r은, 독립적으로, 0 내지 5의 정수, 예를 들면, 0 내지 3, 1 내지 3, 또는 1 내지 5의 정수이다. 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는 하기 화학식 BB-160 또는 화학식 BB-161의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체이다:

[0675] [화학식 BB-160]



[0676]

[0677] [화학식 BB-161]

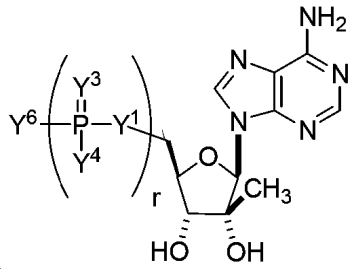


[0678]

[0679] 상기 화학식 BB-160 또는 화학식 BB-161에서, 각각의 r은, 독립적으로, 0 내지 5(예를 들면, 0 내지 3, 1 내지 3, 또는 1 내지 5)의 정수이다.

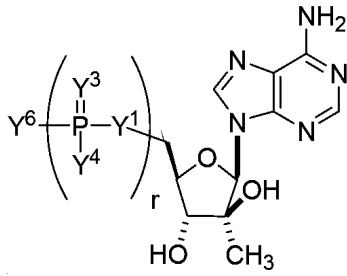
[0680] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는, 변형된 아데노신이다[예를 들면, 하기 화학식 BB-162 내지 화학식 BB-200의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]:

[0681] [화학식 BB-162]



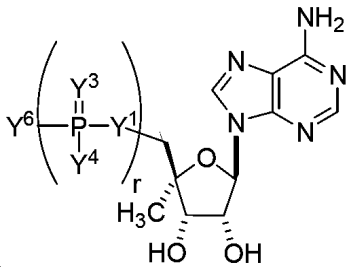
[0682]

[0683] [화학식 BB-163]



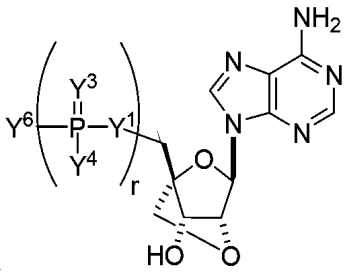
[0684]

[0685] [화학식 BB-164]



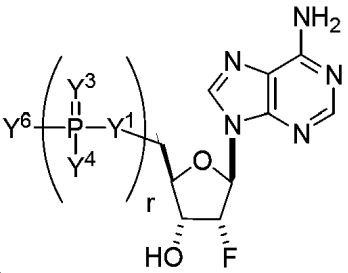
[0686]

[0687] [화학식 BB-165]



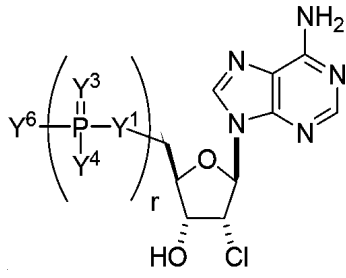
[0688]

[0689] [화학식 BB-166]



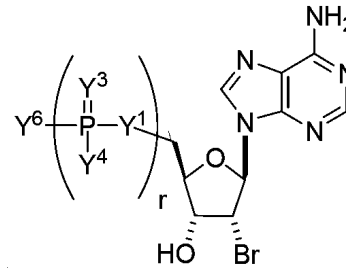
[0690]

[0691] [화학식 BB-167]



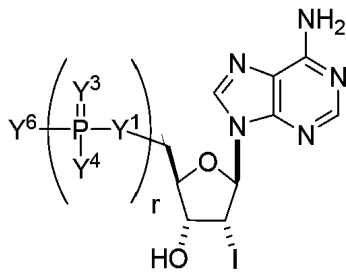
[0692]

[0693] [화학식 BB-168]



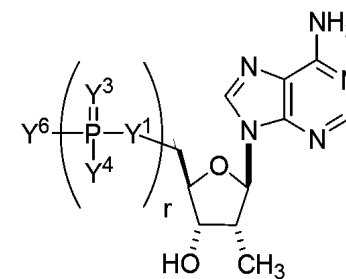
[0694]

[0695] [화학식 BB-169]



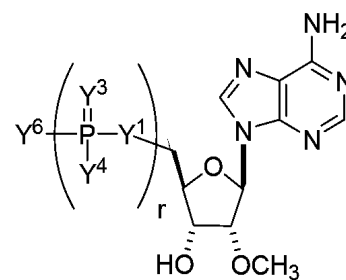
[0696]

[0697] [화학식 BB-170]



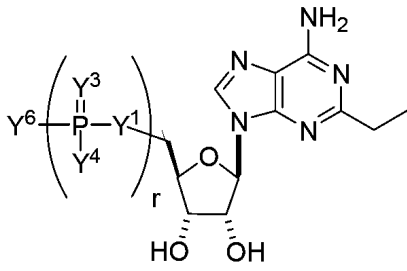
[0698]

[0699] [화학식 BB-171]



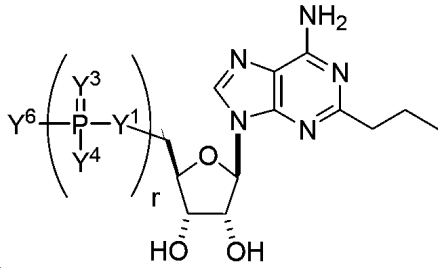
[0700]

[0701] [화학식 BB-172]



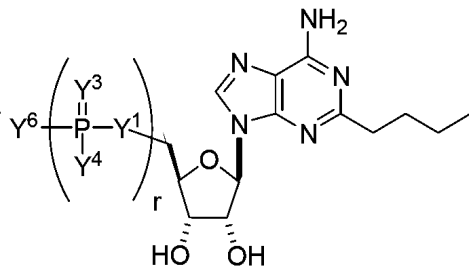
[0702]

[0703] [화학식 BB-173]



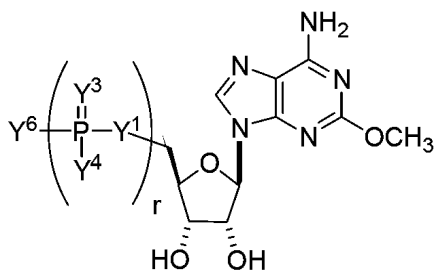
[0704]

[0705] [화학식 BB-174]



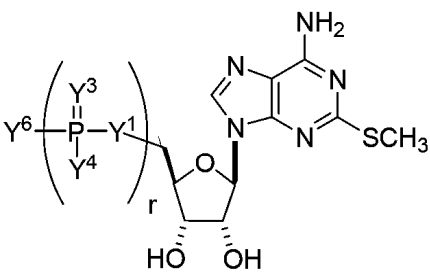
[0706]

[0707] [화학식 BB-175]



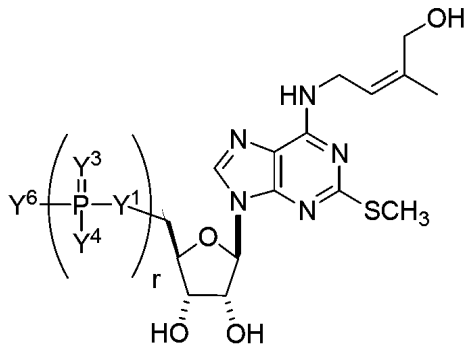
[0708]

[0709] [화학식 BB-176]



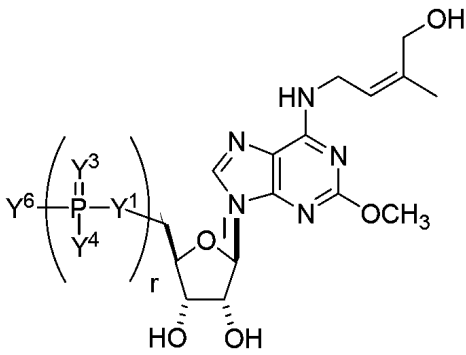
[0710]

[0711] [화학식 BB-177]



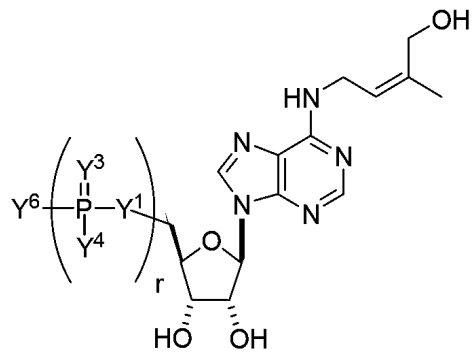
[0712]

[0713] [화학식 BB-178]



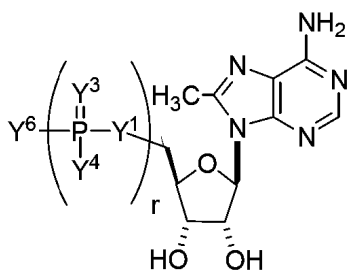
[0714]

[0715] [화학식 BB-179]



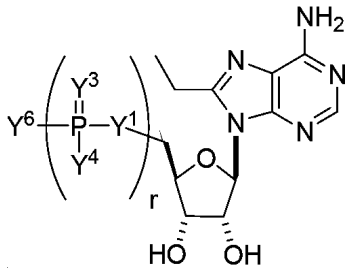
[0716]

[0717] [화학식 BB-180]



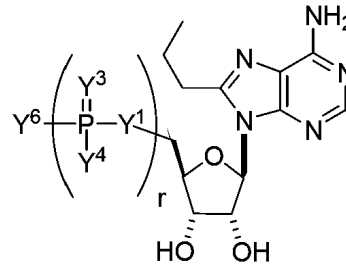
[0718]

[0719] [화학식 BB-181]



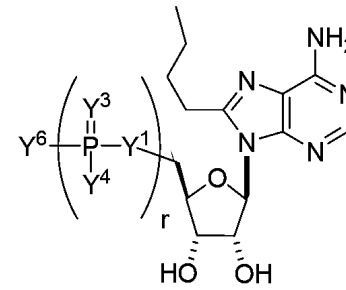
[0720]

[0721] [화학식 BB-182]



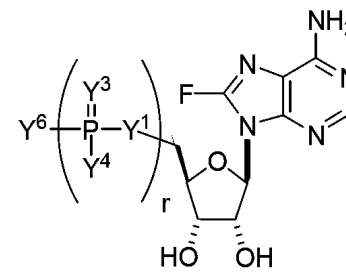
[0722]

[0723] [화학식 BB-183]



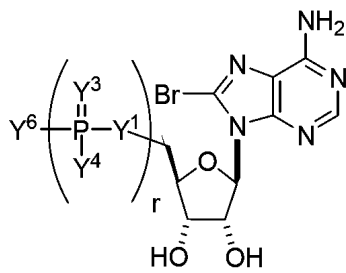
[0724]

[0725] [화학식 BB-184]



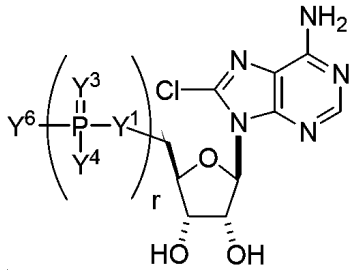
[0726]

[0727] [화학식 BB-185]



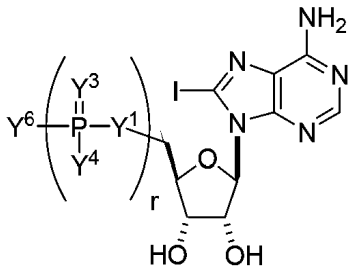
[0728]

[0729] [화학식 BB-186]



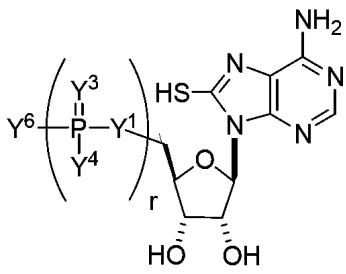
[0730]

[0731] [화학식 BB-187]



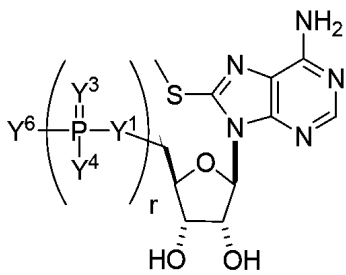
[0732]

[0733] [화학식 BB-188]



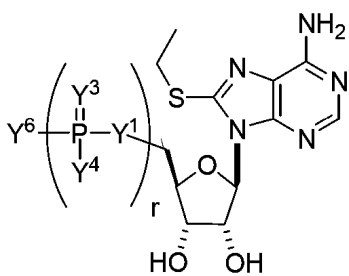
[0734]

[0735] [화학식 BB-189]



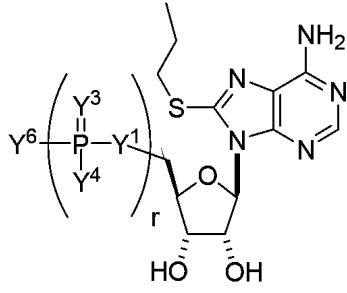
[0736]

[0737] [화학식 BB-190]



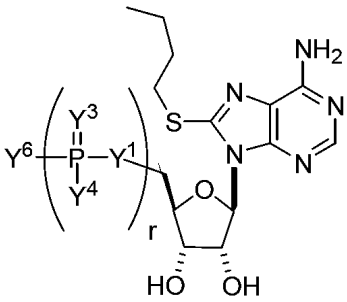
[0738]

[0739] [화학식 BB-191]



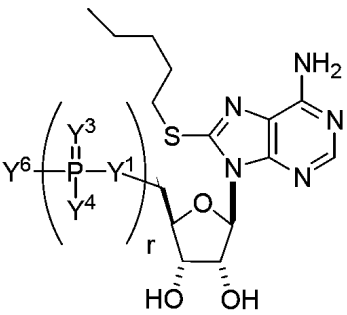
[0740]

[0741] [화학식 BB-192]



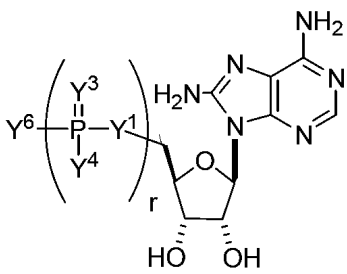
[0742]

[0743] [화학식 BB-193]



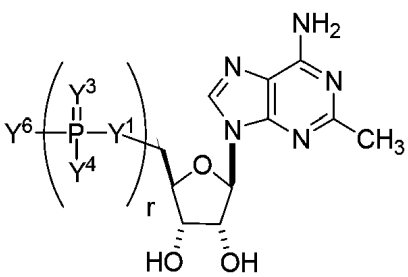
[0744]

[0745] [화학식 BB-194]



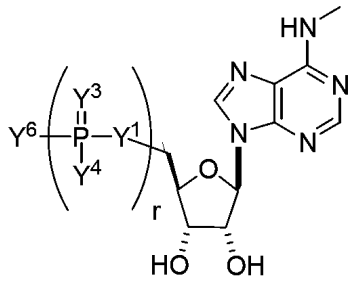
[0746]

[0747] [화학식 BB-195]



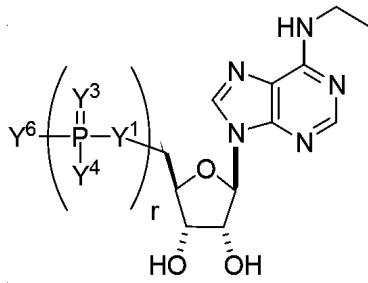
[0748]

[0749] [화학식 BB-196]



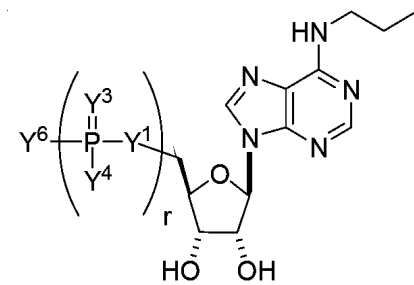
[0750]

[0751] [화학식 BB-197]



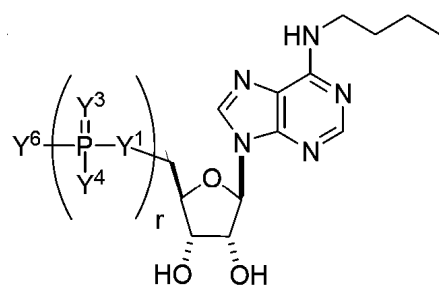
[0752]

[0753] [화학식 BB-198]



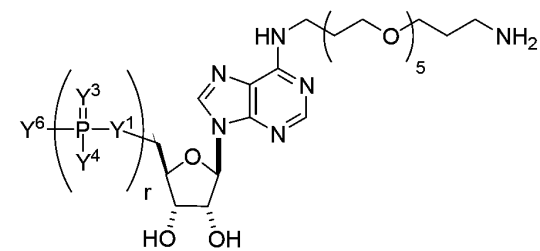
[0754]

[0755] [화학식 BB-199]



[0756]

[0757] [화학식 BB-200]

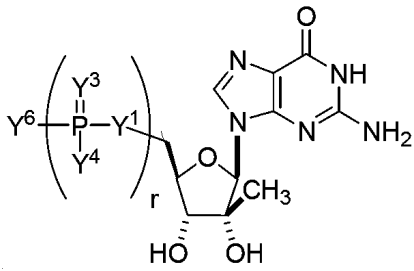


[0758]

[0759] 상기 화학식 BB-162 내지 화학식 BB-200에서, Y¹, Y³, Y⁴, Y⁶, 및 r은 본원에 기술된 바와 같다(예를 들면, 각각의 r은, 독립적으로, 0 내지 5, 예를 들면, 0 내지 3, 1 내지 3, 또는 1 내지 5의 정수이다).

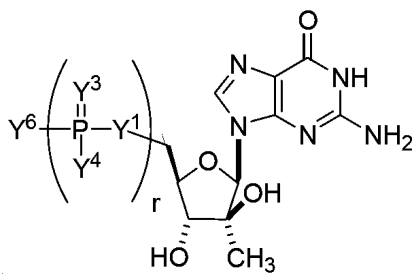
[0760] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는, 변형된 구아노신이다[예를 들면, 하기 화학식 BB-201 내지 화학식 BB-237의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]:

[0761] [화학식 BB-201]



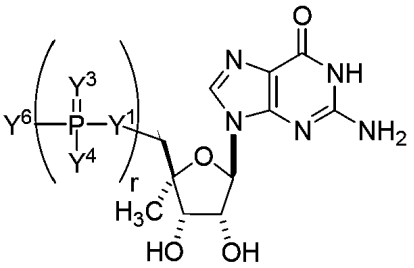
[0762]

[0763] [화학식 BB-202]



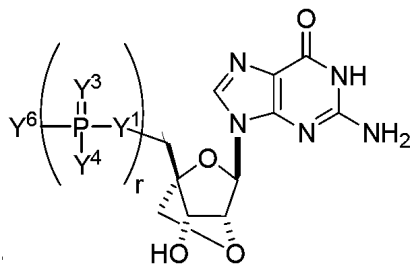
[0764]

[0765] [화학식 BB-203]



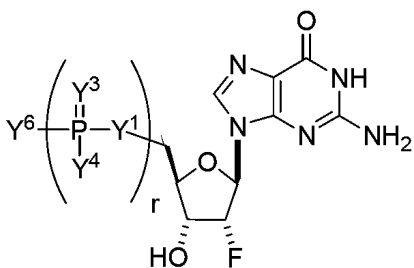
[0766]

[0767] [화학식 BB-204]



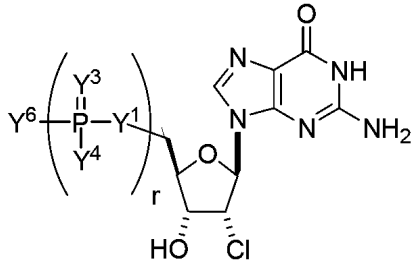
[0768]

[0769] [화학식 BB-205]



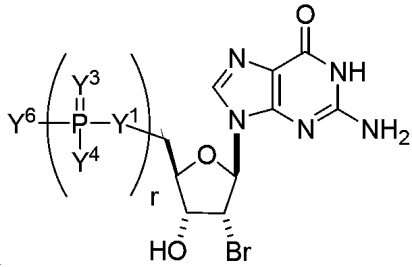
[0770]

[0771] [화학식 BB-206]



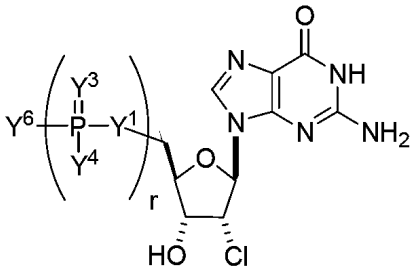
[0772]

[0773] [화학식 BB-207]



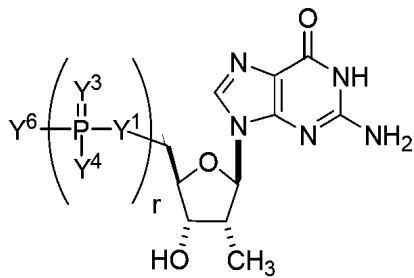
[0774]

[0775] [화학식 BB-208]



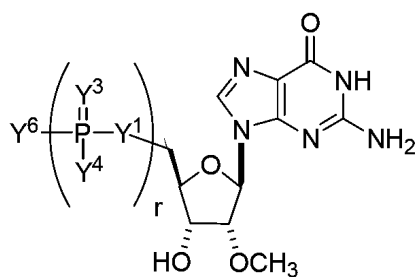
[0776]

[0777] [화학식 BB-209]



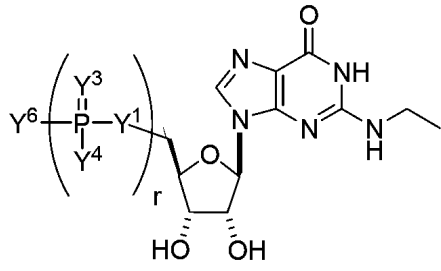
[0778]

[0779] [화학식 BB-210]



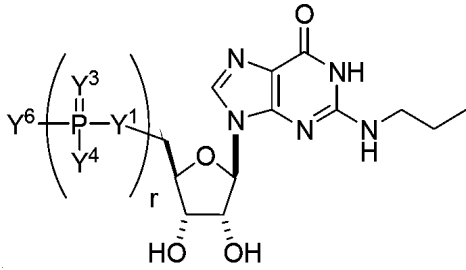
[0780]

[0781] [화학식 BB-211]



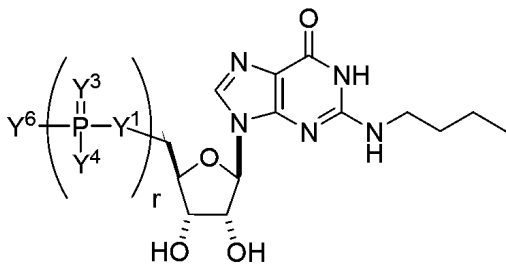
[0782]

[0783] [화학식 BB-212]



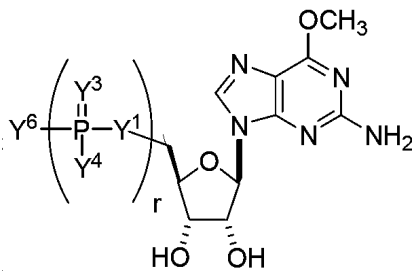
[0784]

[0785] [화학식 BB-213]



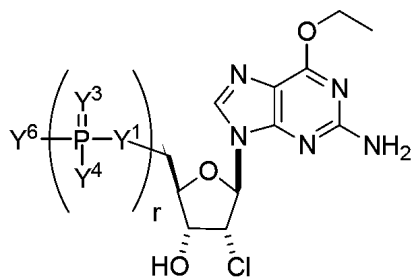
[0786]

[0787] [화학식 BB-214]



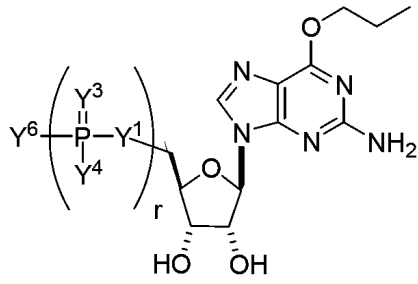
[0788]

[0789] [화학식 BB-215]



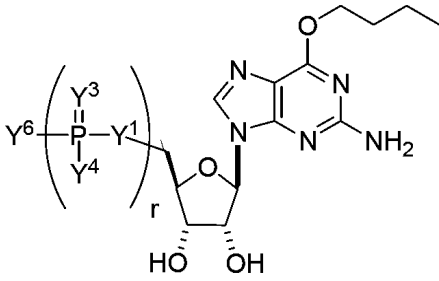
[0790]

[0791] [화학식 BB-216]



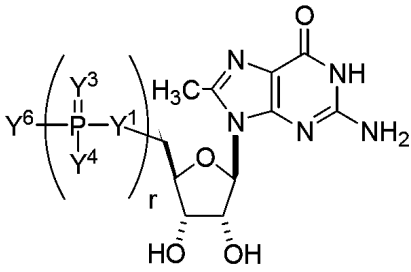
[0792]

[0793] [화학식 BB-217]



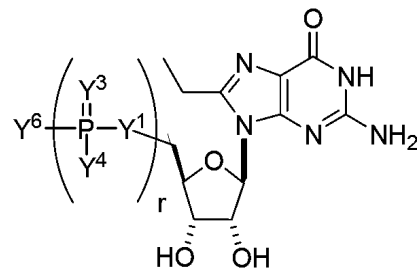
[0794]

[0795] [화학식 BB-218]



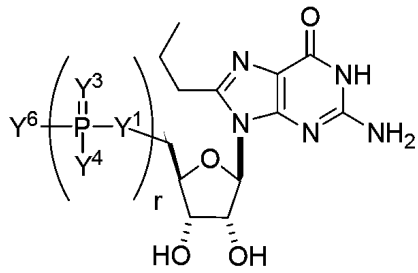
[0796]

[0797] [화학식 BB-219]



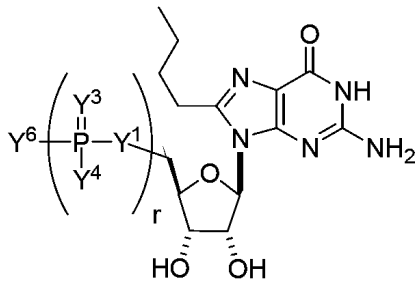
[0798]

[0799] [화학식 BB-220]



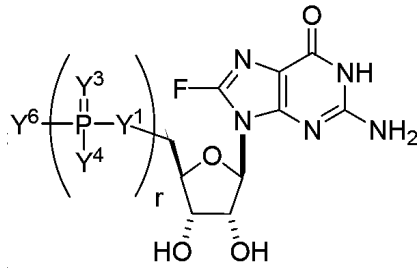
[0800]

[0801] [화학식 BB-221]



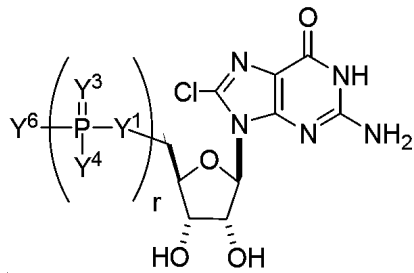
[0802]

[0803] [화학식 BB-222]



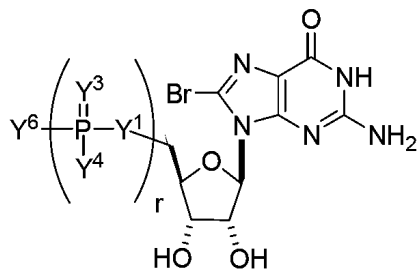
[0804]

[0805] [화학식 BB-223]



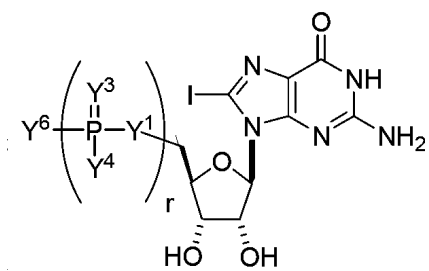
[0806]

[0807] [화학식 BB-224]



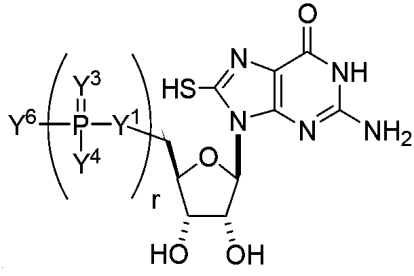
[0808]

[0809] [화학식 BB-225]



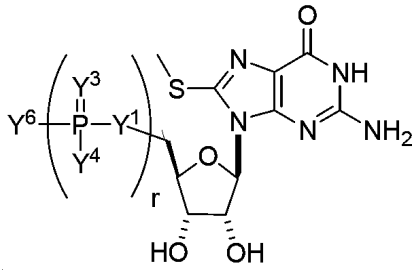
[0810]

[0811] [화학식 BB-226]



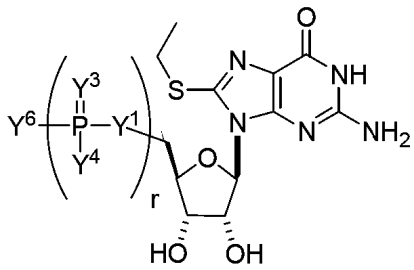
[0812]

[0813] [화학식 BB-227]



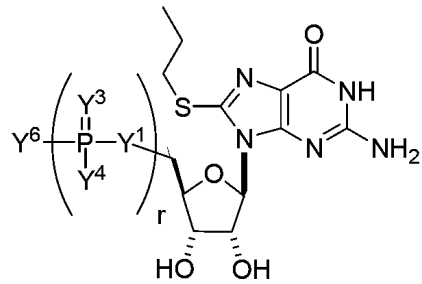
[0814]

[0815] [화학식 BB-228]



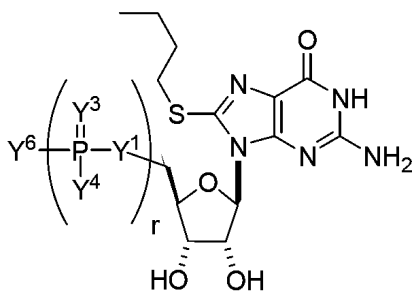
[0816]

[0817] [화학식 BB-229]



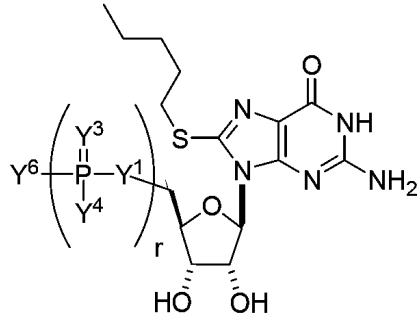
[0818]

[0819] [화학식 BB-230]



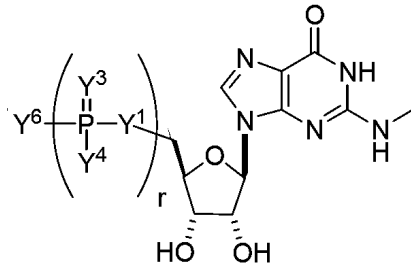
[0820]

[0821] [화학식 BB-231]



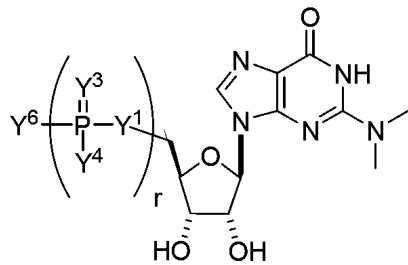
[0822]

[0823] [화학식 BB-232]



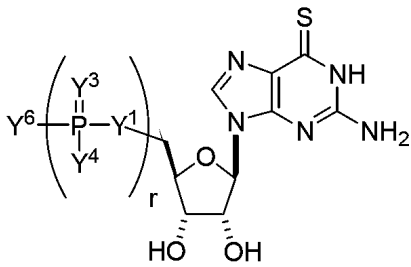
[0824]

[0825] [화학식 BB-233]



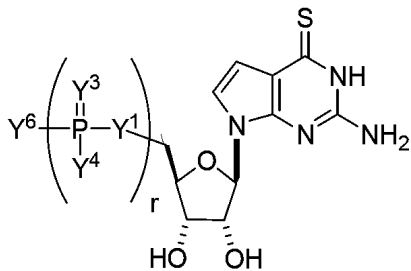
[0826]

[0827] [화학식 BB-234]



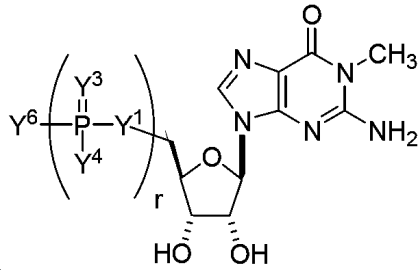
[0828]

[0829] [화학식 BB-235]



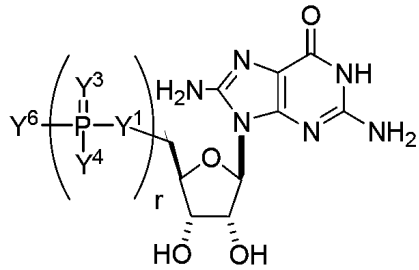
[0830]

[0831] [화학식 BB-236]



[0832]

[0833] [화학식 BB-237]

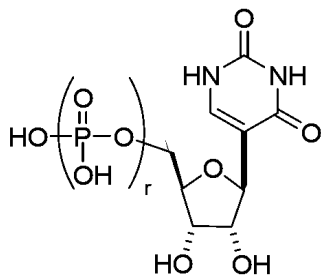


[0834]

[0835] 상기 화학식 BB-201 내지 화학식 BB-237에서, Y^1 , Y^3 , Y^4 , Y^6 , 및 r 은 본원에 기술된 바와 같다(예를 들면, 각각의 r 은, 독립적으로, 0 내지 5, 예를 들면, 0 내지 3, 1 내지 3, 또는 1 내지 5의 정수이다).

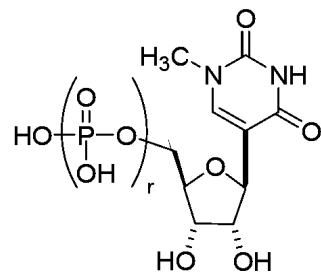
[0836] 일부 실시형태에서, 주요 그루브 화학적 변형은 환의 C-5에서 C 그룹(예를 들면, 사이토신 또는 우라실과 같은 피리미딘 뉴클레오사이드의 경우)의 N으로의 대체[예를 들면, C-5에서 >CH 그룹의 >NR^{N1} 그룹(여기서, R^{N1}는 H 또는 임의로 치환된 알킬이다)으로의 대체]를 포함할 수 있다. 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는 하기 화학식 BB-238 내지 화학식 BB-241의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체일 수 있다:

[0837] [화학식 BB-238]



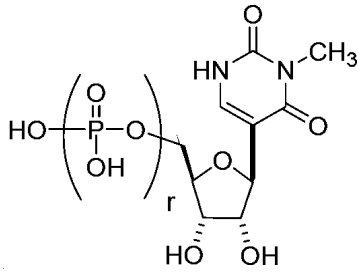
[0838]

[0839] [화학식 BB-239]



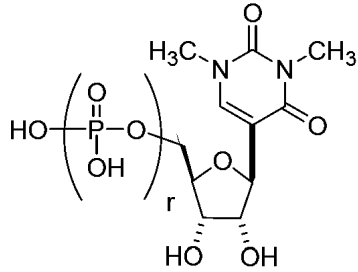
[0840]

[0841] [화학식 BB-240]



[0842]

[0843] [화학식 BB-241]

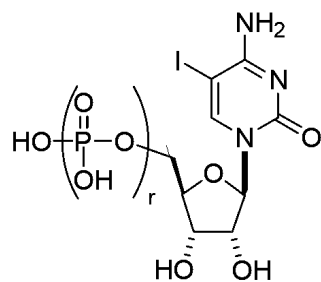


[0844]

[0845] 상기 화학식 BB-238 내지 화학식 BB-241에서, 각각의 r 은, 독립적으로, 0 내지 5(예를 들면, 0 내지 3, 1 내지 3, 또는 1 내지 5)의 정수이다.

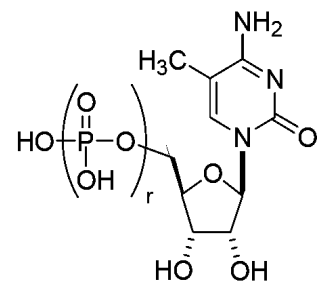
[0846] 다른 실시형태에서, 주요 그루브 화학적 변형은, 사이토신의 C-5에서 할로(예를 들면, Br, Cl, F, 또는 I)로의 대체 또는 임의로 치환된 알킬(예를 들면, 메틸)로의 대체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는 하기 화학식 BB-242 내지 화학식 BB-245의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체일 수 있다:

[0847] [화학식 BB-242]



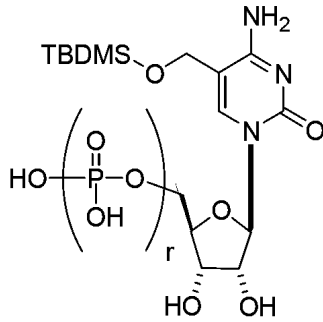
[0848]

[0849] [화학식 BB-243]



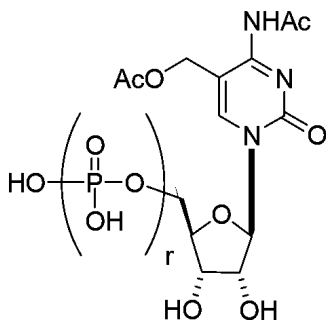
[0850]

[0851] [화학식 BB-244]



[0852]

[0853] [화학식 BB-245]

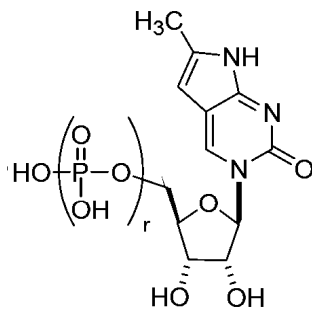


[0854]

[0855] 상기 화학식 BB-242 내지 화학식 BB-245에서, 각각의 r은, 독립적으로, 0 내지 5(예를 들면, 0 내지 3, 1 내지 3, 또는 1 내지 5)의 정수이다.

[0856] 또한 추가의 실시형태에서, 주요 그루브 화학적 변형은, C-4 위치에서 NH₂ 및 C-5 위치에서 탄소 원자에 의해 형성된 융합 환을 포함할 수 있다. 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있는 빌딩 블록 분자는 하기 화학식 BB-246의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체일 수 있다:

[0857] [화학식 BB-246]



[0858]

[0859] 상기 화학식 BB-246에서, 각각의 r은, 독립적으로, 0 내지 5(예를 들면, 0 내지 3, 1 내지 3, 또는 1 내지 5)의 정수이다.

[0860] 당에 대한 변형

[0861] 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, RNA 또는 mRNA, 본원에 기술된 바와 같음) 내로 혼입될 수 있는, 변형된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드(예를 들면, 빌딩 블록 분자)는 리보핵산의 당 상에서 변형될 수 있다. 예를 들면, 2' 하이드록실 그룹(OH)은 다수의 상이한 치환체들로 변형되거나 대체될 수 있다. 2'-위치에서의 예시적인 치환체로는, H, 할로, 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬; 임의로 치환된 C₁₋₆ 알콕시; 임의로 치환된 C₆₋₁₀ 아릴옥시; 임의로 치환된 C₃₋₈ 사이클로알킬; 임의로 치환된 C₃₋₈ 사이클로알콕시; 임의로 치환된 C₆₋₁₀ 아릴옥시; 임의로 치환된 C₆₋₁₀ 아릴-C₁₋₆ 알콕시, 임의로 치환된 C₁₋₁₂(헤테로사이클릴)옥시; 당(예를 들면, 리보스, 펜토스, 또는 본원에 기술된 임의의 것); 폴리에틸렌글리콜(PEG), -O(CH₂CH₂)_nCH₂CH₂OR(여기서, R은 H 또는 임의로 치환된 알킬이고, n은 0 내지 20의 정수(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 8, 0 내지 10, 0 내지 16, 1 내지 4, 1 내지 8, 1 내지 10,

1 내지 16, 1 내지 20, 2 내지 4, 2 내지 8, 2 내지 10, 2 내지 16, 2 내지 20, 4 내지 8, 4 내지 10, 4 내지 16, 및 4 내지 20의 정수); 2'-하이드록실이 C₁₋₆ 알킬렌 또는 C₁₋₆ 헤테로알킬렌 브릿지에 의해 동일한 리보스 당의 4'-탄소에 연결된 "잠금" 핵산(LNA)(여기서, 예시적인 브릿지들은 메틸렌, 프로필렌, 에테르, 또는 아미노 브릿지들을 포함하였다); 본원에 정의된 바와 같은 아미노알킬; 본원에 정의된 바와 같은 아미노알콕시; 본원에 정의된 바와 같은 아미노; 및 본원에 정의된 바와 같은 아미노산이 포함되지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0862] 일반적으로, RNA는, 산소를 갖는 5-원 환인 당 그룹 리보스를 포함한다. 예시적인, 비-제한적인 변형된 뉴클레오타이드는 리보스 내의 산소의 (예를 들면, S, Se, 또는 알킬렌, 예를 들면, 메틸렌 또는 에틸렌으로의) 대체; 이중 결합의 첨가(예를 들면, 리보스를 사이클로펜테닐 또는 사이클로헥세닐로 대체시키기 위함); 리보스의 환 축약(예를 들면, 사이클로부탄 또는 옥세탄의 4-원 환을 형성시키기 위함); 리보스의 환 확장(예를 들면, 추가의 탄소 또는 헤테로 원자, 예를 들면, 안하이드로헥시톨, 알트리톨, 만니톨, 사이클로헥사닐, 사이클로헥세닐, 및 포스포아미데이트 골격도 갖는 모르폴리노를 갖는 6- 또는 7-원 환을 형성하기 위함); 다환 형태[예를 들면, 트리사이클로; 및 "잠금되지 않은(unlocked)" 형태, 예를 들면, 글리콜 핵산(GNA)(예를 들면, R-GNA 또는 S-GNA, 여기서, 리보스는 포스포디에스테르 결합에 부착된 글리콜 단위로 대체된다), 트레오스 핵산(TNA, 여기서, 리보스는 α-L-트레오파라노실-(3'→2')로 대체된다)], 및 펩타이드 핵산(PNA, 여기서, 2-아미노-에틸-글리신 연결들은 리보스 및 포스포디에스테르 골격을 대체한다)을 포함한다. 당 그룹은 또한 리보스 내에 상응하는 탄소의 입체화학적 입체배치보다 반대의 입체화학적 입체배치를 지닌 하나 이상의 탄소들을 함유할 수 있다. 따라서, 폴리뉴클레오타이드 분자는, 예를 들면, 당으로서 아라비노스를 함유하는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0863] 핵염기 상에서의 변형

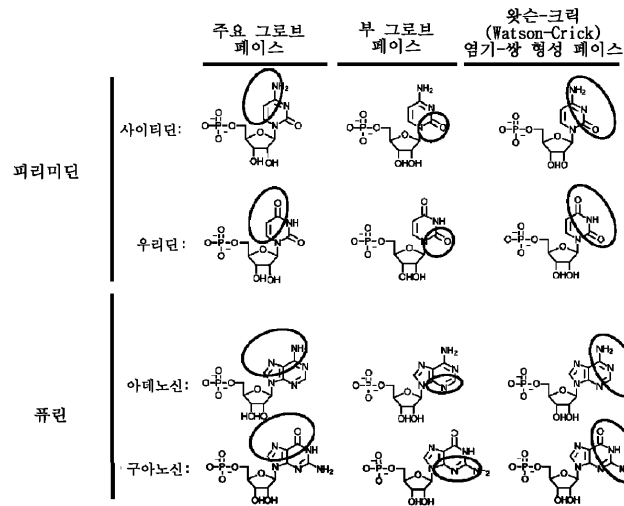
[0864] 본 개시는, 변형된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드를 제공한다. 본원에 기술된 바와 같은 "뉴클레오사이드"는, 유기 염기(예를 들면, 퓨린 또는 피리미딘) 또는 이의 유도체(본원에서 "핵염기"로서도 언급됨)와 조합하여 당 분자(예를 들면, 펜토스 또는 리보스)를 함유하는 화합물 또는 이의 유도체로서 정의된다. 본원에 기술된 바와 같은 "뉴클레오타이드"는, 포스페이트 그룹을 포함하는 뉴클레오사이드로 정의된다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드는 일반적으로 주요 그루브 페이스 상에서 화학적으로 변형된다. 예시적인 비-제한적 변형들은 아미노 그룹, 티올 그룹, 알킬 그룹, 할로 그룹, 또는 본원에 기술된 임의의 것을 포함한다. 변형된 뉴클레오타이드들은 본원에 기술된 바와 같은 임의의 유용한 방법에 의해 (예를 들면, 하나 이상의 변형된 또는 비-천연의 뉴클레오사이드들을 포함하도록 화학적으로, 효소적으로, 또는 제조 합적으로) 합성될 수 있다.

[0865] 변형된 뉴클레오타이드 염기 쌍 형성은 표준 아데노신-티미딘, 아데노신-우라실, 또는 구아노신-사이토신 염기 쌍뿐만 아니라, 뉴클레오타이드 및/또는 비-표준 또는 변형된 염기를 포함하는 변형된 뉴클레오타이드들 사이에 형성된 염기 쌍도 포함하며, 여기서, 수소 결합 공여체들과 수소 결합 수용체들의 배열은 비-표준 염기와 표준 염기 사이에 또는 2개의 상보적인 비-표준 염기 구조들 사이에 수소 결합을 허용한다. 이러한 비-표준 염기 쌍 형성 중 한 예는, 변형된 뉴클레오타이드 이노신과 아데노신, 사이토신 또는 우라실 사이의 염기 쌍 형성이다.

[0866] 변형된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드는 변형된 핵염기를 포함할 수 있다. RNA에서 발견된 핵염기의 예로는, 아데닌, 구아닌, 사이토신, 및 우라실이 포함되지만 이들에 한정되지 않는다. DNA에서 발견된 핵염기의 예로는 아데닌, 구아닌, 사이토신, 및 티민이 포함되지만 이들에 한정되지 않는다. 이들 핵염기들은 변형되거나 전체적으로 대체되어 특성들, 예를 들면, 뉴클레아제들에 대한 내성, 안전성이 향상된 폴리뉴클레오타이드 분자들을 제공하며, 이들 특성들은 주요 그루브 결합 파트너의 결합의 파괴를 통해 나타날 수 있다. 예를 들면, 기술된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드는 주요 그루브 페이스 상에서 화학적으로 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 주요 그루브 화학적 변형들은 아미노 그룹, 티올 그룹, 알킬 그룹, 또는 할로 그룹을 포함할 수 있다.

[0867] 하기 표 1은 각각의 정규 뉴클레오타이드의 화학적 측면들을 확인한다. 원(circle)들은, 각각의 화학적 영역들을 포함하는 원자들을 확인한다.

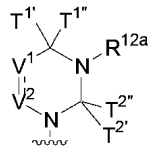
표 1



[0868]

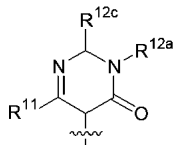
[0869] 일부 실시형태에서, B는, 변형된 우라실이다. 예시적인 변형된 우라실로는 화학식 b1 내지 화학식 b5를 갖는 화합물들, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체가 포함된다:

[0870] [화학식 b1]



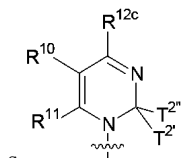
[0871]

[0872] [화학식 b2]



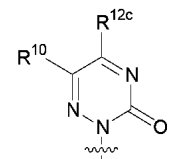
[0873]

[0874] [화학식 b3]



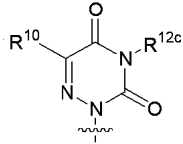
[0875]

[0876] [화학식 b4]



[0877]

[0878] [화학식 b5]



[0879]

[0880] 상기 화학식 b1 내지 화학식 b5에서,

[0881] ≡는 단일 결합 또는 이중 결합이고;

[0882] 각각의 T^{1'}, T^{1''}, T^{2'}, 및 T^{2''}은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 또는 임의로 치환된 티오알콕시이거나, T^{1'}과 T^{1''}의 조합이 함께 결합하여 또는 T^{2'}과 T^{2''}의 조합이 함께 결합하여(예를 들면, T²에서와 같음), O(옥소), S(티오), 또는 Se(셀레노)를 형성하고;

[0883] 각각의 V¹ 및 V²는, 독립적으로, O, S, N(R^{vb})_{nv}, 또는 C(R^{vb})_{nv}이고, 여기서, nv는 0 내지 2의 정수이며, 각각의 r^{vb}는, 독립적으로, H, 할로, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 할로알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 아미노알킬(예를 들면, N-보호 그룹, 예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것, 예를 들면, 트리플루오로아세틸로 치환됨), 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 아실아미노알킬(예를 들면, N-보호 그룹, 예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것, 예를 들면, 트리플루오로아세틸로 치환됨), 임의로 치환된 알콕시카보닐알킬, 임의로 치환된 알콕시카보닐알케닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알키닐, 또는 임의로 치환된 알콕시카보닐알콕시(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 치환체, 예를 들면, 알킬의 경우 (1) 내지 (21)로부터 선택되는 것들로 임의로 치환됨)이며;

[0884] R¹⁰은 H, 할로, 임의로 치환된 아미노산, 하이드록시, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알콕시카보닐알킬, 임의로 치환된 알콕시카보닐알케닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알키닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알콕시, 임의로 치환된 카복시알콕시, 임의로 치환된 카복시알킬, 또는 임의로 치환된 카바모일알킬이고;

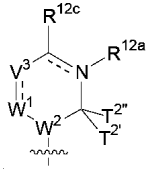
[0885] R¹¹은 H 또는 임의로 치환된 알킬이며;

[0886] R^{12a}는 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 카복시알킬(예를 들면, 하이드록시로 임의로 치환됨), 임의로 치환된 카복시알콕시, 임의로 치환된 카복시아미노알킬, 또는 임의로 치환된 카바모일알킬이고;

[0887] R^{12c}는 H, 할로, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 티오알콕시, 임의로 치환된 아미노, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알키닐이다.

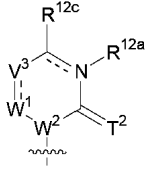
[0888] 다른 예시적인 변형된 우라실로는 화학식 b6 내지 화학식 b9의 화합물들, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체가 포함된다:

[0889] [화학식 b6]



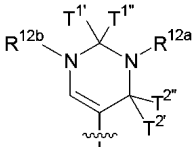
[0890]

[0891] [화학식 b7]



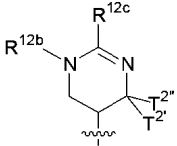
[0892]

[0893] [화학식 b8]



[0894]

[0895] [화학식 b9]



[0896]

[0897] 상기 화학식 b6 내지 화학식 b9에서,

[0898] ≡는 단일 결합 또는 이중 결합이고;

[0899] 각각의 T^{1'}, T^{1''}, T^{2'}, 및 T^{2''}은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 또는 임의로 치환된 티오알콕시이거나, T^{1'}과 T^{1''}의 조합이 함께 결합하여(예를 들면, T¹에서와 같이) 또는 T^{2'}과 T^{2''}의 조합이 함께 결합하여(예를 들면, T²에서와 같이), O(옥소), S(티오), 또는 Se(셀레노)를 형성하거나, 각각의 T¹ 및 T²는, 독립적으로, O(옥소), S(티오), 또는 Se(셀레노)이며;

[0900] 각각의 W¹ 및 W²는, 독립적으로, N(R^{Wa})_{nw} 또는 C(R^{Wa})_{nw}이고, 여기서, nw는 0 내지 2의 정수이며, 각각의 R^{Wa}는, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 또는 임의로 치환된 알콕시이고;

[0901] 각각의 V³는, 독립적으로, O, S, N(R^{Va})_{nv}, 또는 C(R^{Va})_{nv}이며, 여기서, nv는 0 내지 2의 정수이고, 각각의 R^{Va}는, 독립적으로, H, 할로, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 알크헤테로사이클릴, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 또는 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알킬(예를 들면, N-보호 그룹, 예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것, 예를 들면, 트리플루오로아세틸, 또는 설포알킬로 치환됨), 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 아실아미노알킬(예를 들면, N-보호 그룹, 예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것, 예를 들면, 트리플루오로아세틸로 치환됨), 임의로 치환된 알콕시카보닐알킬, 임의로 치환된 알콕시카보닐알케닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알키닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐아실, 임의로 치환된 알콕시카보닐알콕시, 임의로 치환된 카복시알킬(예를 들면, 하이드록시 및/또는 O-보호 그룹으로 임의로 치환됨), 임의로 치환된 카복시알콕시, 임의로 치환된 카복시아미노알킬, 또는 임의로 치환된 카바모일알킬(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 치환체, 예를 들면, 알킬의 경우 (1) 내지 (21)로부터 선택되는 것들로 임의로 치환됨)이고, 여기

서, R^{Va} 및 R^{12c}는 이들이 부착된 탄소 원자들과 함께, 임의로 치환된 사이클로알킬, 임의로 치환된 아릴, 또는 임의로 치환된 헤테로사이클릴(예를 들면, 5- 또는 6-원 환)을 형성하고;

[0902] R^{12a}는 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 카복시알킬(예를 들면, 하이드록시 및/또는 O-보호 그룹으로 임의로 치환됨), 임의로 치환된 카복시알콕시, 임의로 치환된 카복시아미노알킬, 임의로 치환된 카바모일알킬이거나, 부재하며;

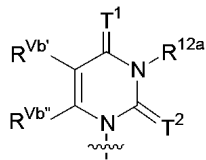
[0903] R^{12b}는 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 알코아릴, 임의로 치환된 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 알크헤테로사이클릴, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알콕시카보닐아실, 임의로 치환된 알콕시카보닐알콕시, 임의로 치환된 알콕시카보닐알킬, 임의로 치환된 알콕시카보닐알케닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알키닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알콕시, 임의로 치환된 카복시알킬(예를 들면, 하이드록시 및/또는 O-보호 그룹으로 임의로 치환됨), 임의로 치환된 카복시알콕시, 임의로 치환된 카복시아미노알킬, 또는 임의로 치환된 카바모일알킬이고,

[0904] 여기서, R^{12b}와 T¹의 조합 또는 R^{12b}와 R^{12c}의 조합은 함께 결합하여, 임의로 치환된 헤테로사이클릴을 형성하고;

[0905] R^{12c}는 H, 할로, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 티오알콕시, 임의로 치환된 아미노, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알키닐이다.

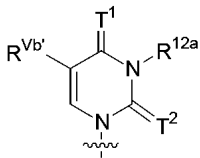
[0906] 추가의 예시적인 변형된 우라실로는 화학식 b28 내지 화학식 b31의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체가 포함되며:

[0907] [화학식 b28]



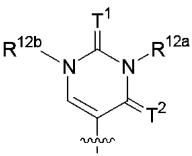
[0908]

[0909] [화학식 b29]



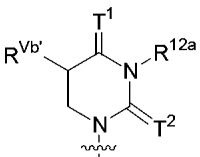
[0910]

[0911] [화학식 b30]



[0912]

[0913] [화학식 b31]



[0914]

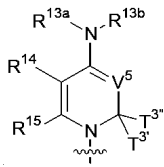
[0915] 상기 화학식 b28 내지 화학식 b31에서,

- [0916] 각각의 T^1 및 T^2 는, 독립적으로, O(옥소), S(티오), 또는 Se(셀레노)이고;
- [0917] 각각의 $r^{vb'}$ 및 $R^{vb''}$ 은, 독립적으로, H, 할로, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 할로 알킬, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알킬(예를 들면, N-보호 그룹, 예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것, 예를 들면, 트리플루오로아세틸, 또는 설포알킬로 치환됨), 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 아실아미노알킬(예를 들면, N-보호 그룹, 예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것, 예를 들면, 트리플루오로아세틸로 치환됨), 임의로 치환된 알콕시카보닐알킬, 임의로 치환된 알콕시카보닐알케닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알키닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐아실, 임의로 치환된 알콕시카보닐알콕시, 임의로 치환된 카복시알킬(예를 들면, 하이드록시 및/또는 O-보호 그룹으로 임의로 치환됨), 임의로 치환된 카복시알콕시, 임의로 치환된 카복시아미노알킬, 또는 임의로 치환된 카바모일알킬(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 치환체, 예를 들면, 알킬의 경우 (1) 내지 (21)로부터 선택되는 것들로 임의로 치환됨)(예를 들면, $R^{vb'}$ 은 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알킬이며, 예를 들면, N-보호 그룹, 예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것, 예를 들면, 트리플루오로아세틸, 또는 설포알킬로 치환된다)이고;
- [0918] R^{12a} 는 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 카복시아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알킬(예를 들면, 예를 들면, N-보호 그룹, 예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것, 예를 들면, 트리플루오로아세틸, 또는 설포알킬로 치환됨), 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알키닐이며;
- [0919] R^{12b} 는 H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐(예를 들면, 예를 들면, N-보호 그룹, 예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것, 예를 들면, 트리플루오로아세틸, 또는 설포알킬로 치환됨), 임의로 치환된 알콕시카보닐아실, 임의로 치환된 알콕시카보닐알콕시, 임의로 치환된 알콕시카보닐알킬, 임의로 치환된 알콕시카보닐알케닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알키닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알콕시, 임의로 치환된 카복시알콕시, 임의로 치환된 카복시알킬, 또는 임의로 치환된 카바모일알킬이다.
- [0920] 특정 실시형태에서, T^1 은 O(옥소)이고, T^2 는 S(티오) 또는 Se(셀레노)이다. 다른 실시형태에서, T^1 은 S(티오)이고, T^2 는 O(옥소) 또는 Se(셀레노)이다. 일부 실시형태에서, $R^{vb'}$ 은 H, 임의로 치환된 알킬, 또는 임의로 치환된 알콕시이다.
- [0921] 다른 실시형태에서, 각각의 R^{12a} 및 R^{12b} 는, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 또는 임의로 치환된 하이드록시알킬이다. 특정 실시형태에서, R^{12a} 는 H이다. 다른 실시형태에서, R^{12a} 와 R^{12b} 둘 다는 H이다.
- [0922] 일부 실시형태에서, 각각의 R^{12b} 의 $R^{vb'}$ 은, 독립적으로, 임의로 치환된 아미노알킬(예를 들면, N-보호 그룹, 예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것, 예를 들면, 트리플루오로아세틸, 또는 설포알킬로 치환됨), 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 또는 임의로 치환된 아실아미노알킬(예를 들면, N-보호 그룹, 예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것, 예를 들면, 트리플루오로아세틸로 치환됨)이다. 일부 실시형태에서, 임의로 치환된 아미노알킬의 아미노 및/또는 알킬은, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 설포알킬, 임의로 치환된 카복시(예를 들면, O-보호 그룹으로 치환됨), 임의로 치환된 하이드록시(예를 들면, O-보호 그룹으로 치환됨), 임의로 치환된 카복시알킬(예를 들면, O-보호 그룹으로 치환됨), 임의로 치환된 알콕시카보닐알킬(예를 들면, O-보호 그룹으로 치환됨), 또는 N-보호 그룹 중 하나 이상으로 치환된다. 일부 실시형태에서, 임의로 치환된 아미노알킬은 임의로 치환된 설포알킬 또는 임의로 치환된 알케닐로 치환된다. 특정 실시형태에서, R^{12a} 및 $R^{vb''}$ 은 둘 다 H이다. 특정 실시형태에서, T^1 은 O(옥소)이고, T^2 는 S(티오) 또는 Se(셀레노)이다.
- [0923] 일부 실시형태에서, $R^{vb'}$ 은, 임의로 치환된 알콕시카보닐알킬 또는 임의로 치환된 카바모일알킬이다.

[0924] 특정 실시형태에서, R^{12a} , R^{12b} , R^{12c} , 또는 R^{Va} 에 대한 임의의 치환체는 폴리에틸렌 글리콜 그룹[예를 들면, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$ 이고, 여기서, $s1$ 은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이며, 각각의 $s2$ 및 $s3$ 은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, R' 은 H 또는 C_{1-20} 알킬이다]; 또는 아미노-폴리에틸렌 글리콜 그룹[예를 들면, $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$ 이고, 여기서, $s1$ 은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 $s2$ 및 $s3$ 은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, 각각의 R^{N1} 은, 독립적으로, 수소 또는 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬이다)이다.

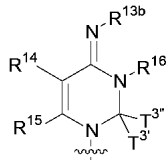
[0925] 일부 실시형태에서, B는, 변형된 사이토신이다. 예시적인 변형된 사이토신으로는 화학식 b10 내지 화학식 b14의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체가 포함된다:

[0926] [화학식 b10]



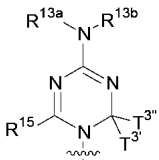
[0927]

[0928] [화학식 b11]



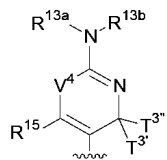
[0929]

[0930] [화학식 b12]



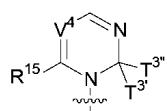
[0931]

[0932] [화학식 b13]



[0933]

[0934] [화학식 b14]



[0935]

[0936] 상기 화학식 b10 내지 화학식 b14에서,

[0937] 각각의 $T^{3'}$ 및 $T^{3''}$ 은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 또는 임의로 치환된 티오알콕시이거나, $T^{3'}$ 과 $T^{3''}$ 의 조합이 함께 결합하여(예를 들면, T^3 에서와 같이), O(옥소), S(티오), 또는 Se(셀레노)를 형성하고;

[0938] 각각의 V^4 는, 독립적으로, O, S, $N(R^{Vc})_{nv}$, 또는 $C(R^{Vc})_{nv}$ 이고, 여기서, nv 는 0 내지 2의 정수이며, 각각의 R^{Vc} 는,

독립적으로, H, 할로, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 알크헤테로사이클릴, 또는 임의로 치환된 알키닐옥시(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 치환체, 예를 들면, 알킬의 경우 (1) 내지 (21)로부터 선택되는 것들로 임의로 치환됨)이고, 여기서, R^{13b}와 R^{Vc}의 조합은 함께, 임의로 치환된 헤테로사이클릴을 형성할 수 있고;

[0939] 각각의 V⁵는, 독립적으로, N(R^{Vd})_{nv}, 또는 C(R^{Vd})_{nv}이며, 여기서, nv는 0 내지 2의 정수이고, 각각의 R^{Vd}는, 독립적으로, H, 할로, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 알크헤테로사이클릴, 또는 임의로 치환된 알키닐옥시(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 치환체, 예를 들면, 알킬의 경우 (1) 내지 (21)로부터 선택되는 것들로 임의로 치환됨)(예를 들면, V⁵는 -CH 또는 N이다)이며;

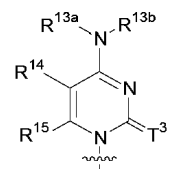
[0940] 각각의 R^{13a} 및 R^{13b}는, 독립적으로, H, 임의로 치환된 아실, 임의로 치환된 아실옥시알킬, 임의로 치환된 알킬, 또는 임의로 치환된 알콕시이고, 여기서, R^{13b}와 R¹⁴의 조합은 함께, 임의로 치환된 헤테로사이클릴을 형성할 수 있고;

[0941] 각각의 R¹⁴는, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 티올, 임의로 치환된 아실, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 할로알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 하이드록시알킬(예를 들면, O-보호 그룹으로 치환됨), 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 아실옥시알킬, 임의로 치환된 아미노(예를 들면, -NHR, 여기서, R은 H, 알킬, 아릴, 또는 포스포릴이다), 아지도, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 알크헤테로사이클릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알키닐이고;

[0942] 각각의 R¹⁵ 및 R¹⁶은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 또는 임의로 치환된 알키닐이다.

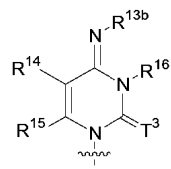
[0943] 추가의 예시적인 변형된 사이토신으로는 화학식 b32 내지 화학식 b35의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체가 포함되며:

[0944] [화학식 b32]



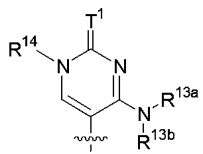
[0945]

[0946] [화학식 b33]



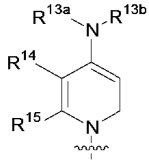
[0947]

[0948] [화학식 b34]



[0949]

[0950] [화학식 b35]



[0951]

[0952] 상기 화학식 b32 내지 화학식 b35에서,

[0953] 각각의 T¹ 및 T³은, 독립적으로, O(옥소), S(티오), 또는 Se(셀레노)이고;

[0954] 각각의 R^{13a} 및 R^{13b}는, 독립적으로, H, 임의로 치환된 아실, 임의로 치환된 아실옥시알킬, 임의로 치환된 알킬, 또는 임의로 치환된 알콕시이며, 여기서, R^{13b}와 R¹⁴의 조합은 함께, 임의로 치환된 헤테로사이클릴을 형성할 수 있고;

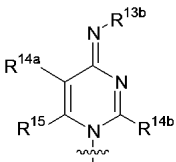
[0955] 각각의 R¹⁴는, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 티올, 임의로 치환된 아실, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 할로알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 하이드록시알킬(예를 들면, O-보호 그룹으로 치환됨), 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 아실옥시알킬, 임의로 치환된 아미노(예를 들면, -NHR, 여기서, R은 H, 알킬, 아릴, 또는 포스포릴이다), 아지도, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 알크헤테로사이클릴, 임의로 치환된 아미노알킬(예를 들면, 하이드록시알킬, 알킬, 알케닐, 또는 알키닐), 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알키닐이며;

[0956] 각각의 R¹⁵ 및 R¹⁶은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 또는 임의로 치환된 알키닐(예를 들면, R¹⁵는 H이고, R¹⁶은 H 또는 임의로 치환된 알킬이다)이다.

[0957] 일부 실시형태에서, R¹⁵는 H이고, R¹⁶은 H 또는 임의로 치환된 알킬이다. 특정 실시형태에서, R¹⁴는 H, 아실, 또는 하이드록시알킬이다. 일부 실시형태에서, R¹⁴는 할로이다. 일부 실시형태에서, R¹⁴ 및 R¹⁵는 둘 다 H이다. 일부 실시형태에서, R¹⁵ 및 R¹⁶은 둘 다 H이다. 일부 실시형태에서, 각각의 R¹⁴ 및 R¹⁵ 및 R¹⁶은 H이다. 추가의 실시형태에서, 각각의 R^{13a} 및 R^{13b}는 독립적으로, H 또는 임의로 치환된 알킬이다.

[0958] 변형된 사이토신들의 추가의 비-제한적인 예들은 화학식 b36의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함한다:

[0959] [화학식 b36]



[0960]

[0961] 상기 화학식 b36에서,

[0962] 각각의 R^{13b}는, 독립적으로, H, 임의로 치환된 아실, 임의로 치환된 아실옥시알킬, 임의로 치환된 알킬, 또는 임의로 치환된 알콕시이고, 여기서, R^{13b}와 R^{14b}의 조합은 함께, 임의로 치환된 헤테로사이클릴을 형성할 수 있고;

[0963] 각각의 R^{14a} 및 R^{14b}는, 독립적으로, H, 할로, 하이드록시, 티올, 임의로 치환된 아실, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 할로알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 하이드록시알킬(예를 들면, O-보호 그룹으로 치환됨), 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시, 임의로 치환된 아미노알콕시, 임의로 치환된 알콕시알콕시, 임의로 치환된 아실옥시알킬, 임의로 치환된 아미노(예를 들면, -NHR, 여기서, R은 H, 알킬, 아릴, 포스포

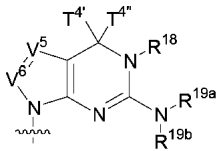
릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 또는 임의로 치환된 카복시아미노알킬이다), 아지도, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헥테로사이클릴, 임의로 치환된 알크헥테로사이클릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 또는 임의로 치환된 아미노알키닐이고;

[0964] 각각의 R¹⁵는, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 또는 임의로 치환된 알키닐이다.

[0965] 특정 실시형태에서, R^{14b}는 임의로 치환된 아미노산(예를 들면, 임의로 치환된 라이신)이다. 일부 실시형태에서, R^{14a}는 H이다.

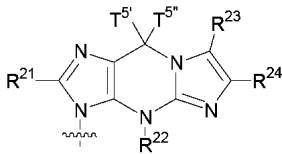
[0966] 일부 실시형태에서, B는, 변형된 구아닌이다. 예시적인 변형된 구아닌으로는 화학식 b15 내지 화학식 b17의 화합물들, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체를 포함한다:

[0967] [화학식 b15]



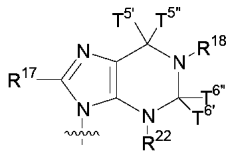
[0968]

[0969] [화학식 b16]



[0970]

[0971] [화학식 b17]



[0972]

[0973] 상기 화학식 b15 내지 b17에서,

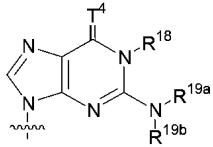
[0974] 각각의 T^{4'}, T^{4''}, T^{5'}, T^{5''}, T^{6'} 및 T^{6''}은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 또는 임의로 치환된 알콕시이고, 여기서, T^{4'}과 T^{4''}의 조합(예를 들면, T⁴에서와 같이) 또는 T^{5'}과 T^{5''}의 조합(예를 들면, T⁵에서와 같이) 또는 T^{6'}과 T^{6''}의 조합이 함께 결합하여(예를 들면, T⁶에서와 같이), O(옥소), S(티오), 또는 Se(셀레노)를 형성하고;

[0975] 각각의 V⁵ 및 V⁶은, 독립적으로, O, S, N(R^{Vd})_{nv}, 또는 C(R^{Vd})_{nv}이고, 여기서, nv는 0 내지 2의 정수이며, 각각의 R^{Vd}는, 독립적으로, H, 할로, 티올, 임의로 치환된 아미노산, 시아노, 아미딘, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 임의로 치환된 알키닐옥시(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 치환체, 예를 들면, 알킬의 경우 (1) 내지 (21)의 화합물로부터 선택되는 것들로 임의로 치환된다), 임의로 치환된 티오알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이며;

[0976] 각각의 R¹⁷, R¹⁸, R^{19a}, R^{19b}, R²¹, R²², R²³, 및 R²⁴는, 독립적으로, H, 할로, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 티오알콕시, 임의로 치환된 아미노, 또는 임의로 치환된 아미노산이다.

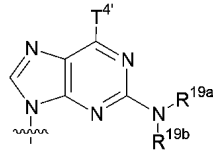
[0977] 예시적인 변형된 구아노신으로는 화학식 b37 내지 화학식 b40의 화합물들, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체가 포함된다:

[0978] [화학식 b37]



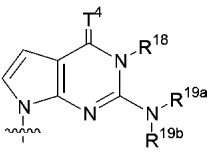
[0979]

[0980] [화학식 b38]



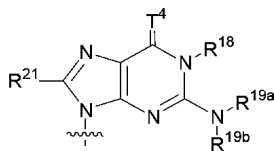
[0981]

[0982] [화학식 b39]



[0983]

[0984] [화학식 b40]



[0985]

[0986] 상기 화학식 b37 내지 화학식 b40에서,

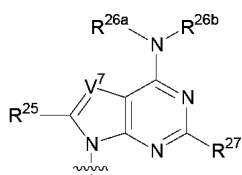
[0987] 각각의 T⁴은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 또는 임의로 치환된 알콕시이고, 각각의 T⁴는, 독립적으로, O(옥소), S(티오), 또는 Se(셀레노)이며;

[0988] 각각의 R¹⁸, R^{19a}, R^{19b}, 및 R²¹은, 독립적으로, H, 할로, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 티오알콕시, 임의로 치환된 아미노, 또는 임의로 치환된 아미노산이다.

[0989] 일부 실시형태에서, R¹⁸은 H 또는 임의로 치환된 알킬이다. 추가의 실시형태에서, T⁴는 옥소이다. 일부 실시형태에서, 각각의 R^{19a} 및 R^{19b}는, 독립적으로, H 또는 임의로 치환된 알킬이다.

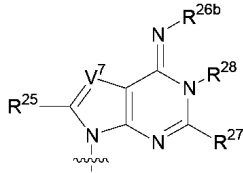
[0990] 일부 실시형태에서, B는, 변형된 아데닌이다. 예시적인 변형된 아데닌으로는 화학식 b18 내지 화학식 b20의 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체가 포함된다:

[0991] [화학식 b18]



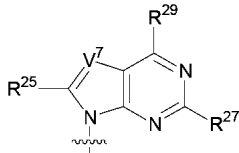
[0992]

[0993] [화학식 b19]



[0994]

[0995] [화학식 b20]



[0996]

[0997] 상기 화학식 b18 내지 화학식 b20에서,

[0998] 각각의 V^7 은, 독립적으로, O, S, $N(R^{Ve})_{nv}$, 또는 $C(R^{Ve})_{nv}$ 이고, 여기서, nv 는 0 내지 2의 정수이며, 각각의 R^{Ve} 는, 독립적으로, H, 할로, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알케닐옥시, 또는 임의로 치환된 알키닐옥시[예를 들면, 본원에 기술된 임의의 치환체, 예를 들면, 알킬의 경우 (1) 내지 (21)의 화합물로부터 선택되는 것들로 임의로 치환된다]이고;

[0999] 각각의 R^{25} 는, 독립적으로, H, 할로, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 티오알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이며;

[1000] 각각의 R^{26a} 및 R^{26b} 는, 독립적으로, H, 임의로 치환된 아실, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 카바모일알킬, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 또는 폴리에틸렌 글리콜 그룹[예를 들면, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$ 이고, 여기서, $s1$ 은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이며, 각각의 $s2$ 및 $s3$ 은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, R' 은 H 또는 C_{1-20} 알킬이다]; 또는 아미노-폴리에틸렌 글리콜 그룹[예를 들면, $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$ (여기서, $s1$ 은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 $s2$ 및 $s3$ 은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, 각각의 R^{N1} 은, 독립적으로, 수소 또는 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬이다)]이며;

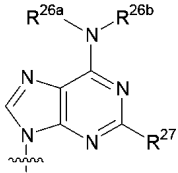
[1001] 각각의 R^{27} 은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 티오알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이며;

[1002] 각각의 R^{28} 은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 또는 임의로 치환된 알키닐이고;

[1003] 각각의 R^{29} 은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 아실, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 카바모일알킬, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이다.

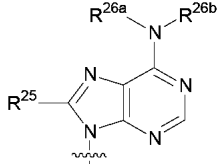
[1004] 예시적인 변형된 아데닌으로는 화학식 b41 내지 화학식 b43의 화합물들, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체가 포함된다:

[1005] [화학식 b41]



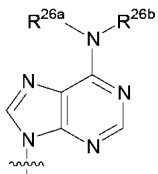
[1006]

[1007] [화학식 b42]



[1008]

[1009] [화학식 b43]



[1010]

[1011] 상기 화학식 b41 내지 화학식 b43에서,

[1012] 각각의 R²⁵는, 독립적으로, H, 할로, 티올, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 티오알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이고;

[1013] 각각의 R^{26a} 및 R^{26b}는, 독립적으로, H, 임의로 치환된 아실, 임의로 치환된 아미노산, 임의로 치환된 카바모일알킬, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 하이드록시알케닐, 임의로 치환된 하이드록시알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 또는 폴리에틸렌 글리콜 그룹[예를 들면, -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', 여기서, s1은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, R'은 H 또는 C₁₋₂₀ 알킬이다]; 또는 아미노-폴리에틸렌 글리콜 그룹[예를 들면, -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, 여기서, s1은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, 수소 또는 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬이다]이고;

[1014] 각각의 R²⁷은, 독립적으로, H, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 티오알콕시, 또는 임의로 치환된 아미노이다.

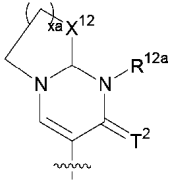
[1015] 일부 실시형태에서, R^{26a}는 H이고, R^{26b}는 임의로 치환된 알킬이다. 일부 실시형태에서, 각각의 R^{26a} 및 R^{26b}는, 독립적으로, 임의로 치환된 알킬이다. 특정 실시형태에서, R²⁷은 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 또는 임의로 치환된 티오알콕시이다. 다른 실시형태에서, R²⁵는 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 또는 임의로 치환된 티오알콕시이다.

[1016] 특정 실시형태에서, R^{26a}, R^{26b}, 또는 R²⁷에 대한 임의의 치환체는 폴리에틸렌 글리콜 그룹[예를 들면, -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', 여기서, s1은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, R'은 H 또는 C₁₋₂₀ 알킬이다]; 또는 아미노-폴리에틸렌 글리콜 그룹[예를 들면,

$-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, 여기서, $s1$ 은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 $s2$ 및 $s3$ 은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, 각각의 R^{N1} 은, 독립적으로, 수소 또는 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬이다]이다.

[1017] 일부 실시형태에서, B는 화학식 b21의 화합물을 가질 수 있고:

[1018] [화학식 b21]

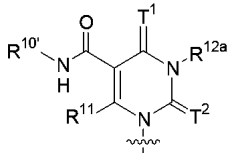


[1019]

[1020] 상기 화학식 b21에서, X^{12} 는, 독립적으로, O, S, 임의로 치환된 알킬렌(예를 들면, 메틸렌), 또는 임의로 치환된 헤테로알킬렌이고, xa 는 0 내지 3의 정수이며, R^{12a} 및 T^2 는 본원에 기술된 바와 같다.

[1021] 일부 실시형태에서, B는 화학식 b22를 가질 수 있고:

[1022] [화학식 b22]

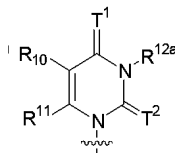


[1023]

[1024] 상기 화학식 b22에서, $R^{10'}$ 은, 독립적으로, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알콕시카보닐알킬, 임의로 치환된 알콕시카보닐알케닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알키닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알콕시, 임의로 치환된 카복시알콕시, 임의로 치환된 카복시알킬, 또는 임의로 치환된 카바모일알킬이며, R^{11} , R^{12a} , T^1 , 및 T^2 는 본원에 기술된 바와 같다.

[1025] 일부 실시형태에서, B는 화학식 b23을 가질 수 있고:

[1026] [화학식 b23]

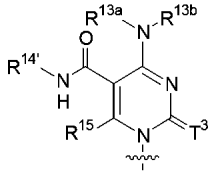


[1027]

[1028] 상기 화학식 b23에서, R^{10} 은 임의로 치환된 헤테로사이클릴(예를 들면, 임의로 치환된 푸릴, 임의로 치환된 티에닐, 또는 임의로 치환된 피롤릴), 임의로 치환된 아릴(예를 들면, 임의로 치환된 페닐 또는 임의로 치환된 나프틸), 또는 본원에 기술된 임의의 치환체(예를 들면, R^{10} 의 경우)이고; 여기서, R^{11} (예를 들면, H 또는 본원에 기술된 임의의 치환체), R^{12a} (예를 들면, H 또는 본원에 기술된 임의의 치환체), T^1 (예를 들면, 옥소 또는 본원에 기술된 임의의 치환체), 및 T^2 (예를 들면, 옥소 또는 본원에 기술된 임의의 치환체)는 본원에 기술된 바와 같다.

[1029] 일부 실시형태에서, B는 화학식 b24를 가질 수 있고:

[1030] [화학식 b24]

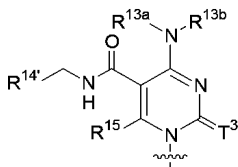


[1031]

[1032] 상기 화학식 b24에서, R^{14'}은, 독립적으로, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 알크아릴, 임의로 치환된 알크헤테로사이클릴, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 아미노알케닐, 임의로 치환된 아미노알키닐, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 알콕시카보닐알킬, 임의로 치환된 알콕시카보닐알케닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알키닐, 임의로 치환된 알콕시카보닐알콕시, 임의로 치환된 카복시알콕시, 임의로 치환된 카복시알킬, 또는 임의로 치환된 카바모일알킬이며, R^{13a}, R^{13b}, R¹⁵, 및 T³은 본원에 기술된 바와 같다.

[1033] 일부 실시형태에서, B는 화학식 b25를 가질 수 있고:

[1034] [화학식 b25]

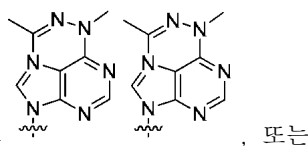


[1035]

[1036] 상기 화학식 b25에서, R^{14'}은, 임의로 치환된 헤테로사이클릴(예를 들면, 임의로 치환된 푸릴, 임의로 치환된 티에닐, 또는 임의로 치환된 피롤릴), 임의로 치환된 아릴(예를 들면, 임의로 치환된 페닐 또는 임의로 치환된 나프틸), 또는 본원에 기술된 어떠한 치환체(예를 들면, R¹⁴ 또는 R^{14'}의 경우)이며; 여기서, R^{13a}(예를 들면, H 또는 본원에 기술된 임의의 치환체), R^{13b}(예를 들면, H 또는 본원에 기술된 임의의 치환체), R¹⁵(예를 들면, H 또는 본원에 기술된 임의의 치환체), 및 T³(예를 들면, 옥소 또는 본원에 기술된 임의의 치환체)는 본원에 기술된 바와 같다.

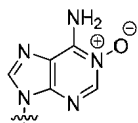
[1037] 일부 실시형태에서, B는 사이토신, 구아닌, 아데닌, 및 우라실로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵염기이다. 일부 실시형태에서, B는:

[1038] [화학식 b26]



[1039]

[1040] [화학식 b27]



[1041] 일 수 있다.

[1042] 일부 실시형태에서, 변형된 핵염기는, 변형된 우라실이다. 변형된 우라실을 갖는 예시적인 핵염기 및 뉴클레오사이드는, 슈도우리딘(Ψ), 피리딘-4-온 리보뉴클레오사이드, 5-아자-우리딘, 6-아자-우리딘, 2-티오-5-아자-우리딘, 2-티오-우리딘(s^2U), 4-티오-우리딘(s^4U), 4-티오-슈도우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 5-하이드록시-우리딘(ho^5U), 5-아미노알릴-우리딘, 5-할로-우리딘(예를 들면, 5-요오도-우리딘 또는 5-브로모-우리딘), 3-메틸-우리딘(m^3U), 5-메톡시-우리딘(mo^5U), 우리딘 5-옥시아세트산(cmo^5U), 우리딘 5-옥시아세트산 메틸 에스테르

(mcm⁵U), 5-카복시메틸-우리딘(cm⁵U), 1-카복시메틸-슈도우리딘, 5-카복시하이드록시메틸-우리딘(chm⁵U), 5-카복시하이드록시메틸-우리딘 메틸 에스테르(mchm⁵U), 5-메톡시카보닐메틸-우리딘(mcm⁵U), 5-메톡시카보닐메틸-2-티오-우리딘(mcm⁵s²U), 5-아미노메틸-2-티오-우리딘(nm⁵s²U), 5-메틸아미노메틸-우리딘(mnm⁵U), 5-메틸아미노메틸-2-티오-우리딘(mnm⁵s²U), 5-메틸아미노메틸-2-셀레노-우리딘(mnm⁵se²U), 5-카바모일메틸-우리딘(ncm⁵U), 5-카복시메틸아미노메틸-우리딘(cmm⁵U), 5-카복시메틸아미노메틸-2-티오-우리딘(cmm⁵s²U), 5-프로피닐-우리딘, 1-프로피닐-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-우리딘(τ m⁵U), 1-타우리노메틸-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-2-티오-우리딘(τ m⁵s²U), 1-타우리노메틸-4-티오-슈도우리딘, 5-메틸-우리딘(m⁵U, 즉, 핵염기 테옥시티미딘을 갖는 것), 1-메틸-슈도우리딘(m¹ Ψ), 5-메틸-2-티오-우리딘(m⁵s²U), 1-메틸-4-티오-슈도우리딘(m¹s⁴ Ψ), 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 3-메틸-슈도우리딘(m³ Ψ), 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 디하이드로우리딘(D), 디하이드로슈도우리딘, 5,6-디하이드로우리딘, 5-메틸-디하이드로우리딘(m⁵D), 2-티오-디하이드로우리딘, 2-티오-디하이드로슈도우리딘, 2-메톡시-우리딘, 2-메톡시-4-티오-우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 3-(3-아미노-3-카복시프로필)우리딘(acp³U), 1-메틸-3-(3-아미노-3-카복시프로필)슈도우리딘(acp³ Ψ), 5-(이소펜테닐아미노메틸)우리딘(inm⁵U), 5-(이소펜테닐아미노메틸)-2-티오-우리딘(inm⁵s²U), α -티오-우리딘, 2'-O-메틸-우리딘(UM), 5,2'-O-디메틸-우리딘(m⁵Um), 2'-O-메틸-슈도우리딘(Ψ m), 2-티오-2'-O-메틸-우리딘(s²Um), 5-메톡시카보닐메틸-2'-O-메틸-우리딘(mcm⁵Um), 5-카바모일메틸-2'-O-메틸-우리딘(ncm⁵Um), 5-카복시메틸아미노메틸-2'-O-메틸-우리딘(cmm⁵Um), 3,2'-O-디메틸-우리딘(m³Um), 및 5-(이소펜테닐아미노메틸)-2'-O-메틸-우리딘(inm⁵Um), 1-티오-우리딘, 테옥시티미딘, 2'-F-아라-우리딘, 2'-F-우리딘, 2'-OH-아라-우리딘, 5-(2-카보메톡시비닐)우리딘, 및 5-[3-(1-E-프로피닐아미노)우리딘을 포함한다.

[1043] 일부 실시형태에서, 변형된 핵염기는, 변형된 사이토신이다. 변형된 사이토신을 갖는 예시적인 핵염기 및 뉴클레오사이드로는, 5-아자-사이티딘, 6-아자-사이티딘, 슈도이소사이티딘, 3-메틸-사이티딘(m³C), N4-아세틸-사이티딘(ac⁴C), 5-포르밀-사이티딘(f⁵C), N4-메틸-사이티딘(m⁴C), 5-메틸-사이티딘(m⁵C), 5-할로-사이티딘(예를 들면, 5-요오도-사이티딘), 5-하이드록시메틸-사이티딘(hm⁵C), 1-메틸-슈도이소사이티딘, 피롤로-사이티딘, 피롤로-슈도이소사이티딘, 2-티오-사이티딘(s²C), 2-티오-5-메틸-사이티딘, 4-티오-슈도이소사이티딘, 4-티오-1-메틸-슈도이소사이티딘, 4-티오-1-메틸-1-데아자-슈도이소사이티딘, 1-메틸-1-데아자-슈도이소사이티딘, 제블라린, 5-아자-제블라린, 5-메틸-제블라린, 5-아자-2-티오-제블라린, 2-티오-제블라린, 2-메톡시-사이티딘, 2-메톡시-5-메틸-사이티딘, 4-메톡시-슈도이소사이티딘, 4-메톡시-1-메틸-슈도이소사이티딘, 라이시딘(k₂C), α -티오-사이티딘, 2'-O-메틸-사이티딘(Cm), 5,2'-O-디메틸-사이티딘(m⁵Cm), N4-아세틸-2'-O-메틸-사이티딘(ac⁴Cm), N4,2'-O-디메틸-사이티딘(m⁴Cm), 5-포르밀-2'-O-메틸-사이티딘(f⁵Cm), N4,N4,2'-O-트리메틸-사이티딘(m⁴₂Cm), 1-티오-사이티딘, 2'-F-아라-사이티딘, 2'-F-사이티딘, 및 2'-OH-아라-사이티딘이 포함된다.

[1044] 일부 실시형태에서, 변형된 핵염기는, 변형된 아데닌이다. 변형된 아데닌을 갖는 예시적인 핵염기 및 뉴클레오사이드로는, 2-아미노-퓨린, 2, 6-디아미노퓨린, 2-아미노-6-할로-퓨린(예를 들면, 2-아미노-6-클로로-퓨린), 6-할로-퓨린(예를 들면, 6-클로로-퓨린), 2-아미노-6-메틸-퓨린, 8-아지도-아데노신, 7-데아자-아데닌, 7-데아자-8-아자-아데닌, 7-데아자-2-아미노-퓨린, 7-데아자-8-아자-2-아미노-퓨린, 7-데아자-2,6-디아미노퓨린, 7-데아자-8-아자-2,6-디아미노퓨린, 1-메틸-아데노신(m¹A), 2-메틸-아데닌(m²A), N6-메틸-아데노신(m⁶A), 2-메틸티오-N6-메틸-아데노신(ms²m⁶A), N6-이소펜테닐-아데노신(i⁶A), 2-메틸티오-N6-이소펜테닐-아데노신(ms²i⁶A), N6-(시스-하이드록시이소펜테닐)아데노신(io⁶A), 2-메틸티오-N6-(시스-하이드록시이소펜테닐)아데노신(ms²io⁶A), N6-글리시닐카바모일-아데노신(g⁶A), N6-트레오닐카바모일-아데노신(t⁶A), N6-메틸-N6-트레오닐카바모일-아데노신(m⁶t⁶A), 2-메틸티오-N6-트레오닐카바모일-아데노신(ms²g⁶A), N6,N6-디메틸-아데노신(m⁶₂A), N6-하이드록시노르발

틸카바모일-아데노신(hn⁶A), 2-메틸티오-N6-하이드록시노르발릴카바모일-아데노신(ms²hn⁶A), N6-아세틸-아데노신(ac⁶A), 7-메틸-아데닌, 2-메틸티오-아데닌, 2-메톡시-아데닌, α-티오-아데노신, 2'-O-메틸-아데노신(Am), N6,2'-O-디메틸-아데노신(m⁶Am), N6,N6,2'-O-트리메틸-아데노신(m⁶₂Am), 1,2'-O-디메틸-아데노신(m¹Am), 2'-O-리보실아데노신(포스페이트)(Ar(p)), 2-아미노-N6-메틸-퓨린, 1-티오-아데노신, 8-아지도-아데노신, 2'-F-아라-아데노신, 2'-F-아데노신, 2'-OH-아라-아데노신, 및 N6-(19-아미노-퀸타옥사노나데실)-아데노신을 포함한다.

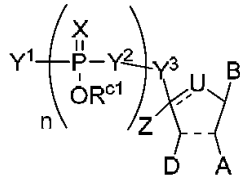
[1045] 일부 실시형태에서, 변형된 핵염기는, 변형된 구아닌이다. 변형된 구아닌을 갖는 예시적인 핵염기 및 뉴클레오사이드로는 이노신(I), 1-메틸-이노신(m¹I), 와이오신(imG), 메틸와이오신(mimG), 4-데메틸-와이오신(imG-14), 이소와이오신(imG2), 와이부토신(yW), 피옥시와이부토신(o₂yW), 하이드록시와이부토신(OHyW), 변형중인(undermodified) 하이드록시와이부토신(OHyW^{*}), 7-테아자-구아노신, 쿠에우오신(Q), 에폭시쿠에우오신(oQ), 갈락토실-쿠에우오신(galQ), 만노실-쿠에우오신(manQ), 7-시아노-7-테아자-구아노신(preQ₀), 7-아미노메틸-7-테아자-구아노신(preQ₁), 아르카에오신(G⁺), 7-테아자-8-아자-구아노신, 6-티오-구아노신, 6-티오-7-테아자-구아노신, 6-티오-7-테아자-8-아자-구아노신, 7-메틸-구아노신(m⁷G), 6-티오-7-메틸-구아노신, 7-메틸-이노신, 6-메톡시-구아노신, 1-메틸-구아노신(m¹G), N2-메틸-구아노신(m²G), N2,N2-디메틸-구아노신(m²₂G), N2,7-디메틸-구아노신(m^{2,7}G), N2, N2,7-디메틸-구아노신(m^{2,2,7}G), 8-옥소-구아노신, 7-메틸-8-옥소-구아노신, 1-메틸-6-티오-구아노신, N2-메틸-6-티오-구아노신, N2,N2-디메틸-6-티오-구아노신, α-티오-구아노신, 2'-O-메틸-구아노신(Gm), N2-메틸-2'-O-메틸-구아노신(m²Gm), N2,N2-디메틸-2'-O-메틸-구아노신(m²₂Gm), 1-메틸-2'-O-메틸-구아노신(m¹Gm), N2,7-디메틸-2'-O-메틸-구아노신(m^{2,7}Gm), 2'-O-메틸-이노신(Im), 1,2'-O-디메틸-이노신(m¹Im), 2'-O-리보실구아노신(포스페이트)(Gr(p)), 1-티오-구아노신, O6-메틸-구아노신, 2'-F-아라-구아노신, 및 2'-F-구아노신이 포함된다.

[1046] 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드는 주요 그루브 페이스 상에서 변형될 수 있다. 예를 들면, 이러한 변형은, 우라실 또는 사이토신의 C-5 상의 수소를 알킬(예를 들면, 메틸) 또는 할로로 대체함을 포함한다.

[1047] 뉴클레오타이드의 핵염기는, 퓨린, 피리미딘, 퓨린 또는 피리미딘 유사체로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 예를 들면, 핵염기는 아데닌, 사이토신, 구아닌, 우라실, 또는 하이포크산틴으로부터 각각 독립적으로 선택될 수 있다. 다른 실시형태에서, 핵염기는 또한 예를 들면, 염기의 자연 발생 및 합성 유도체, 예를 들면, 아데닌 및 구아닌의 피라졸로[3,4-d]피리미딘, 5-메틸사이토신(5-me-C), 5-하이드록시메틸 사이토신, 크산틴, 하이포크산틴, 2-아미노아데닌, 6-메틸 및 다른 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오사이토신, 5-프로피닐 우라실 및 사이토신, 6-아조 우라실, 사이토신 및 티민, 5-우라실(슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로(예를 들면, 8-브로모), 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 사이토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 테아자구아닌, 7-테아자구아닌, 3-테아자구아닌, 테아자아데닌, 7-테아자아데닌, 3-테아자아데닌, 피라졸로[3,4-d]피리미딘, 이미다조[1,5-a]1,3,5 트리아진, 9-테아자퓨린, 이미다조[4,5-d]피라진, 티아졸로[4,5-d]피리미딘, 피라진-2-온, 1,2,4-트리아진, 피리다진; 및 1,3,5 트리아진을 또한 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드들을 단축된 A, G, C, T 또는 U를 사용하여 나타내는 경우, 각각의 문자는 대표적인 염기 및/또는 이의 유도체를 말하며, 예를 들면, A는 아데닌 또는 아데닌 유사체, 예를 들면, 7-테아자 아데닌을 포함한다.

[1048] 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 화학식 XI의 화합물이다:

[1049] [화학식 XI]



[1050]

[1051] 상기 화학식 XI에서,

[1052] = 는 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고;

[1053] --- 는 임의의 단일 결합을 나타내며;

[1054] U는, = 가 단일 결합을 나타내는 경우에 O, S, $-\text{NR}^a$, 또는 $-\text{CR}^a\text{R}^b$ -이거나, 또는 U는, = 가 이중 결합을 나타내는 경우에 $-\text{CR}^a$ -이고;

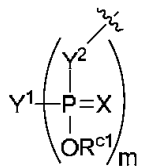
[1055] Z는 H, C_{1-12} 알킬, 또는 C_{6-20} 아릴이거나, 또는 Z는, = 가 이중 결합을 나타내는 경우에 부재하고;

[1056] Z는 $-\text{CR}^a\text{R}^b$ -일 수 있고 A와 결합을 형성할 수 있으며;

[1057] A는 H, OH, NHR이고, 여기서, R은 알킬 또는 아릴 또는 포스포릴, 설페이트, $-\text{NH}_2$, N_3 , 아지도, $-\text{SH}$, N 아미노산, 또는 1 내지 12개의 아미노산들을 포함하는 펩타이드이고;

[1058] D는 H, OH, NHR(여기서, R은 알킬 또는 아릴 또는 포스포릴, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, 아미노산, 1 내지 12개의 아미노산들을 포함하는 펩타이드이다), 또는 화학식 XII의 그룹이거나;

[1059] [화학식 XII]



[1060]

[1061] A 및 D는 이들이 부착된 탄소 원자들과 함께 5-원 환을 형성하고;

[1062] X는 O 또는 S이며;

[1063] 각각의 Y^1 은 $-\text{OR}^{a1}$, $-\text{NR}^{a1}\text{R}^{b1}$, 및 $-\text{SR}^{a1}$ 로부터 독립적으로 선택되고;

[1064] 각각의 Y^2 및 Y^3 은 O, $-\text{CR}^a\text{R}^b$, NR^c , S, 또는 C, O, N, 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 원자들을 포함하는 링커로부터 독립적으로 선택되며;

[1065] n은 0, 1, 2, 또는 3이고;

[1066] m은 0, 1, 2 또는 3이며;

[1067] B는 핵염기이고;

[1068] R^a 및 R^b 는 각각 독립적으로 H, C_{1-12} 알킬, C_{2-12} 알케닐, C_{2-12} 알키닐, 또는 C_{6-20} 아릴이며;

[1069] R^c 는 H, C_{1-12} 알킬, C_{2-12} 알케닐, 페닐, 벤질, 폴리에틸렌 글리콜 그룹, 또는 아미노-폴리에틸렌 글리콜 그룹이고;

[1070] R^{a1} 및 R^{b1} 는 각각 독립적으로 H 또는 반대이온이며;

[1071] $-OR^{c1}$ 은 약 1의 pH에서 OH이거나 $-OR^{c1}$ 은 생리학적 pH에서 O^- 이고;

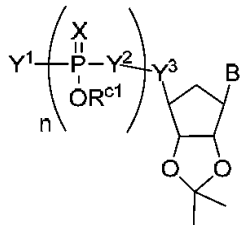
[1072] 단, 변수들 A, B, D, U, Z, Y^2 및 Y^3 을 포함하는 환은 리보스일 수 없다.

[1073] 일부 실시형태에서, B는 사이토신, 구아닌, 아데닌, 및 우라실로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵염기이다.

[1074] 일부 실시형태에서, 핵염기는 피리미딘 또는 이의 유도체이다.

[1075] 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드들은 화학식 XI-a의 화합물이다:

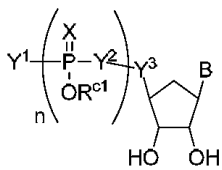
[1076] [화학식 XI-a]



[1077]

[1078] 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드들은 화학식 XI-b의 화합물이다:

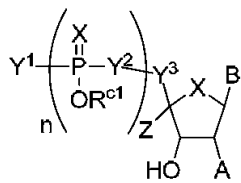
[1079] [화학식 XI-b]



[1080]

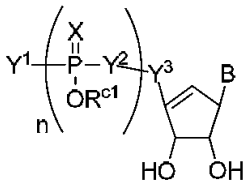
[1081] 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드들은 화학식 XI-c1, XI-c2, 또는 XI-c3의 화합물이다:

[1082] [화학식 XI-c1]



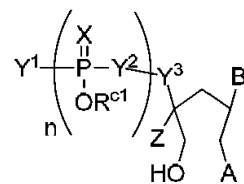
[1083]

[1084] [화학식 XI-c2]



[1085]

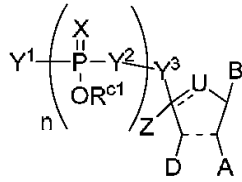
[1086] [화학식 XI-c3]



[1087]

[1088] 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드들은 화학식 XI의 화합물이다:

[1089] [화학식 XI]



[1090]

[1091] 상기 화학식 XI에서,

[1092] --- 는 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고;

[1093] --- 는 임의의 단일 결합을 나타내며;

[1094] U는, --- 가 단일 결합을 나타내는 경우에 O, S, $-\text{NR}^a$ -, 또는 $-\text{CR}^a\text{R}^b$ -이거나, 또는 U는, --- 가 이중 결합을 나타내는 경우에 $-\text{CR}^a$ -이고;

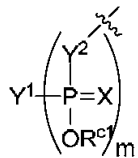
[1095] Z는 H, C_{1-12} 알킬, 또는 C_{6-20} 아릴이거나, 또는 Z는, --- 가 이중 결합인 경우 부재하고;

[1096] Z는 $-\text{CR}^a\text{R}^b$ -일 수 있고 A와 결합을 형성할 수 있으며;

[1097] A는 H, OH, 설페이트, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, 아미노산, 또는 1 내지 12개의 아미노산들을 포함하는 펩타이드이고;

[1098] D는 H, OH, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, 아미노산, 1 내지 12개의 아미노산들을 포함하는 펩타이드, 또는 화학식 XII의 그룹이거나:

[1099] [화학식 XII]



[1100]

[1101] A 및 D는, 이들이 부착된 탄소 원자들과 함께 5-원 환을 형성하고;

[1102] X는 O 또는 S이며;

[1103] 각각의 Y^1 은 $-\text{OR}^{a1}$, $-\text{NR}^{a1}\text{R}^{b1}$, 및 $-\text{SR}^{a1}$ 로부터 독립적으로 선택되고;

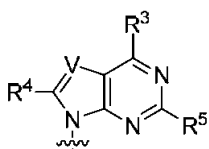
[1104] 각각의 Y^2 및 Y^3 은, O, $-\text{CR}^a\text{R}^b$ -, NR^c , S, 또는 C, O, N, 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 원자들을 포함하는 링커로부터 독립적으로 선택되며;

[1105] n은 0, 1, 2, 또는 3이고;

[1106] m은 0, 1, 2 또는 3이며;

[1107] B는 화학식 XIII의 핵염기이고:

[1108] [화학식 XIII]



[1109]

[1110] 상기 화학식 XIII에서,

[1111] V는 N 또는 양으로 하전된 NR^c이고;

[1112] R³은 NR^cR^d, -OR^a, 또는 -SR^a이며;

[1113] R⁴는 H이거나 Y³과의 결합을 임의로 형성할 수 있고;

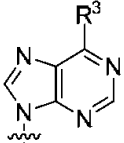
[1114] R⁵는 H, -NR^cR^d, 또는 -OR^a이며;

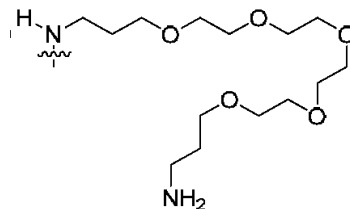
[1115] R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 H, C₁₋₁₂ 알킬, C₂₋₁₂ 알케닐, C₂₋₁₂ 알키닐, 또는 C₆₋₂₀ 아릴이고;


[1116] R^c는 H, C₁₋₁₂ 알킬, C₂₋₁₂ 알케닐, 페닐, 벤질, 폴리에틸렌 글리콜 그룹, 또는 아미노-폴리에틸렌 글리콜 그룹이며;

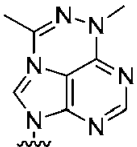
[1117] R^{a1} 및 R^{b1}는 각각 독립적으로 H 또는 반대이온이고;

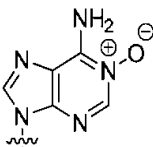
[1118] -OR^{c1}은 약 1의 pH에서 OH이거나, 또는 -OR^{c1}은 생리학적 pH에서 O⁻이다.

[1119] 일부 실시형태에서, B는  이고,



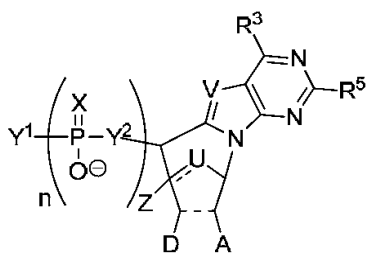
[1120] 여기서, R³은 -OH, -SH, 또는  이다.

[1121] 일부 실시형태에서, B는  이다.

[1122] 일부 실시형태에서, B는  이다.

[1123] 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드들은 화학식 I-d의 화합물이다:

[1124] [화학식 I-d]

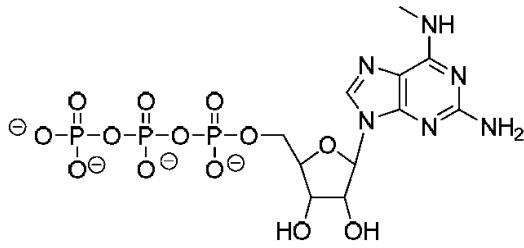


[1125]

[1126] 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드들은 하기 화학식 BB-247 내지 화학식 BB-258로 이루어진 그룹으로부터

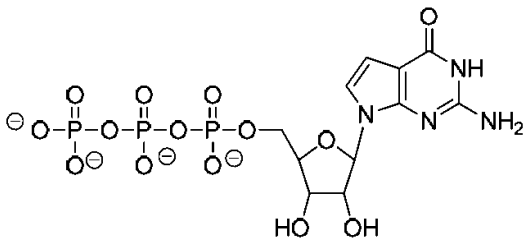
터 선택되는 화합물들, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:

[1127] [화학식 BB-247]



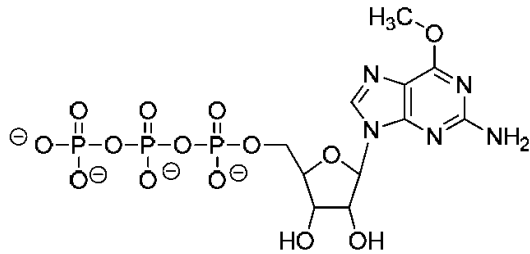
[1128]

[1129] [화학식 BB-248]



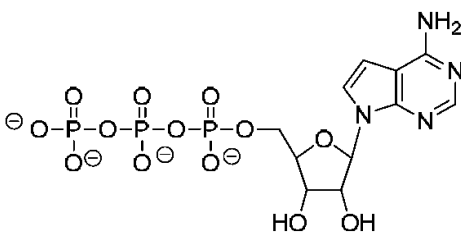
[1130]

[1131] [화학식 BB-249]



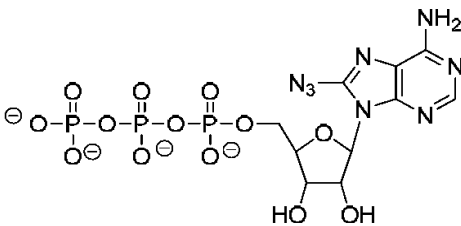
[1132]

[1133] [화학식 BB-250]



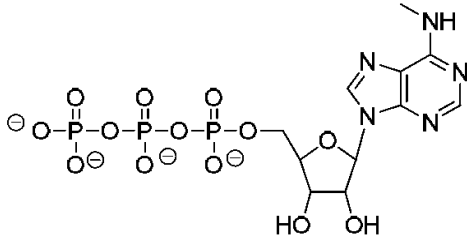
[1134]

[1135] [화학식 BB-251]



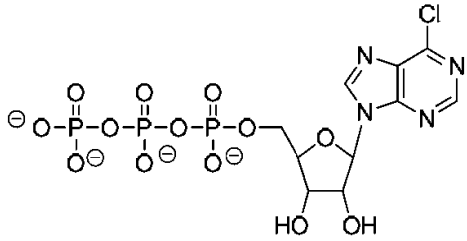
[1136]

[1137] [화학식 BB-252]



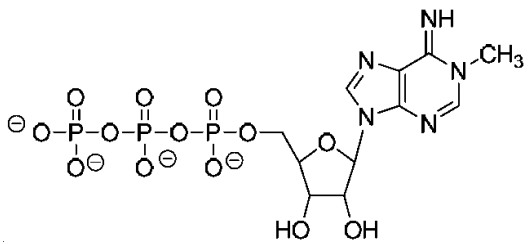
[1138]

[1139] [화학식 BB-253]



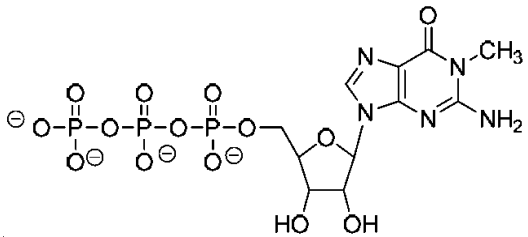
[1140]

[1141] [화학식 BB-254]



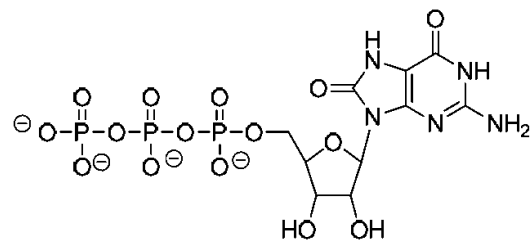
[1142]

[1143] [화학식 BB-255]



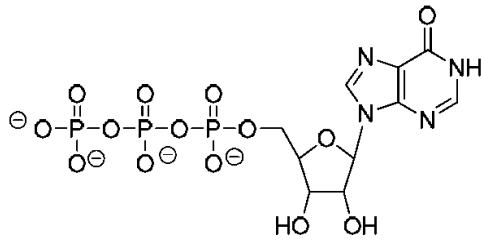
[1144]

[1145] [화학식 BB-256]



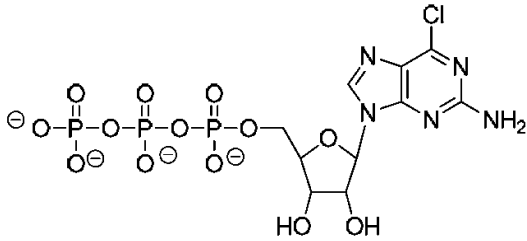
[1146]

[1147] [화학식 BB-257]



[1148]

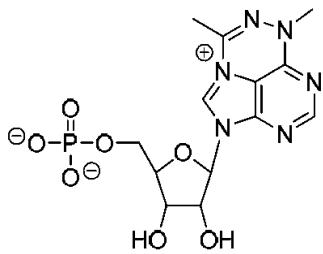
[1149] [화학식 BB-258]



[1150]

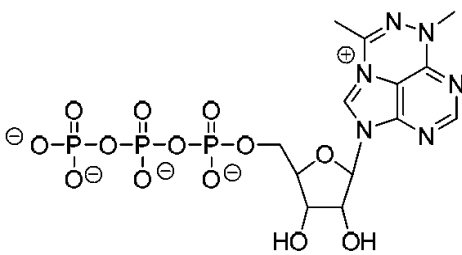
[1151] 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드들은 하기 화학식 BB-259 내지 화학식 BB-274로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 화합물들, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:

[1152] [화학식 BB-259]



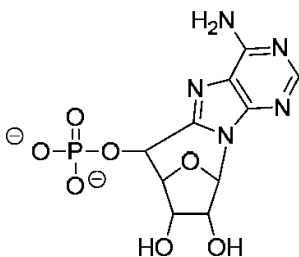
[1153]

[1154] [화학식 BB-260]



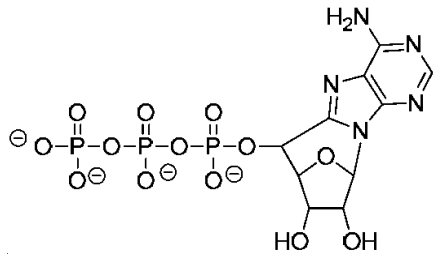
[1155]

[1156] [화학식 BB-261]



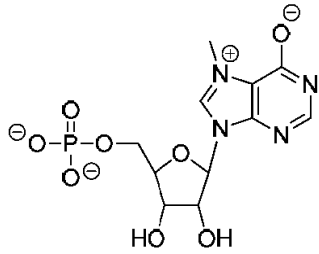
[1157]

[1158] [화학식 BB-262]



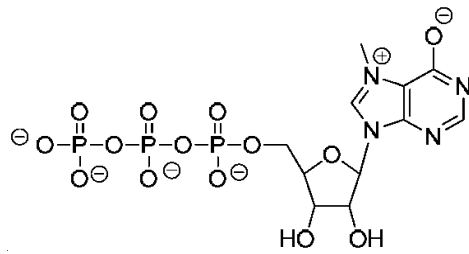
[1159]

[1160] [화학식 BB-263]



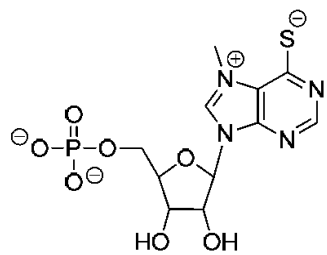
[1161]

[1162] [화학식 BB-264]



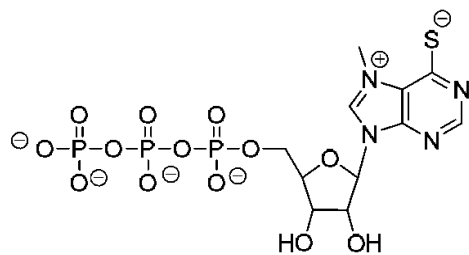
[1163]

[1164] [화학식 BB-265]



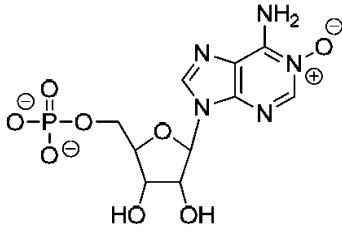
[1165]

[1166] [화학식 BB-266]



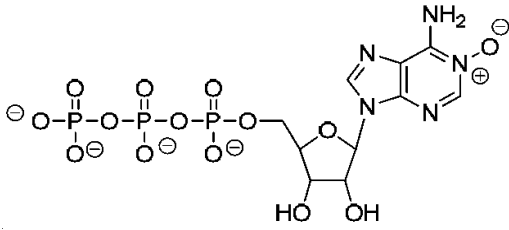
[1167]

[1168] [화학식 BB-267]



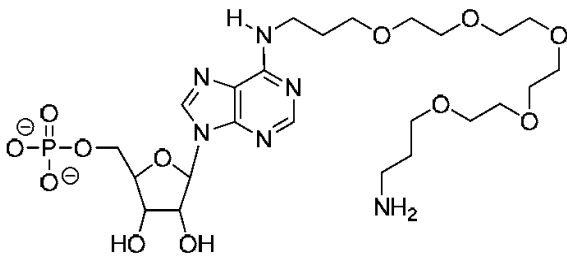
[1169]

[1170] [화학식 BB-268]



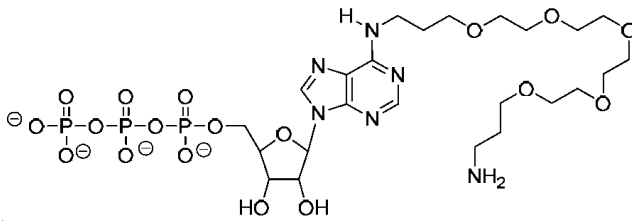
[1171]

[1172] [화학식 BB-269]



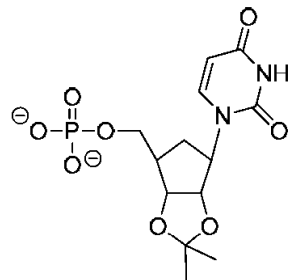
[1173]

[1174] [화학식 BB-270]



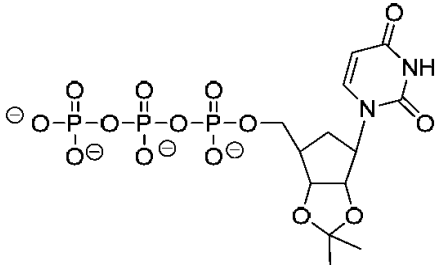
[1175]

[1176] [화학식 BB-271]



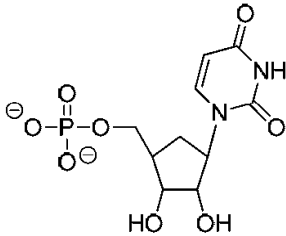
[1177]

[1178] [화학식 BB-272]



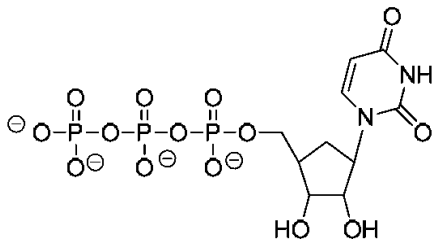
[1179]

[1180] [화학식 BB-273]



[1181]

[1182] [화학식 BB-274]



[1183]

[1184] 뉴클레오사이드간 연결(linkage)에 있어서의 변형들

[1185] 폴리뉴클레오타이드 분자 내로 혼입될 수 있는 변형된 뉴클레오타이드들은 뉴클레오사이드간 연결(예를 들면, 포스페이트 골격) 상에서 변형될 수 있다. 여기서, 폴리뉴클레오타이드 골격과 관련하여, 어구들 "포스페이트" 및 "포스포디에스테르"는 상호교환적으로 사용된다. 골격 포스페이트 그룹들은 하나 이상의 산소 원자들을 상이한 치환체로 대체시킴으로써 변형시킬 수 있다. 추가로, 변형된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드들은 변형되지 않은 포스페이트 잔기를 본원에 기술된 바와 같은 다른 뉴클레오사이드간 결합으로 대규모로 대체시킴을 포함할 수 있다. 변형된 포스페이트 그룹들의 예는 포스포로티오에이트, 포스포로셀레네이트들, 보라노포스페이트들, 보라노포스페이트 에스테르들, 수소 포스포네이트들, 포스포르아미데이트들, 포스포로디아미데이트들, 알킬 또는 아릴 포스포네이트들, 및 포스포트리에스테르들을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 포스포로디티오에이트들은 둘다 황으로 대체된 연결되지 않은 산소들을 갖는다. 포스포로디티오에이트들은 둘다 황으로 대체된 연결되지 않은 산소들을 갖는다. 포스페이트 링커들은 결합 산소를 질소(브릿지된 포스포르아미데이트들), 황(브릿지된 포스포로티오에이트들), 및 탄소(브릿지된 메틸렌-포스포네이트들)로 대체시킴으로써 또한 변형시킬 수 있다.

[1186] α-티오 치환된 포스페이트 잔기는 RNA 및 DNA 중합체들에 대해 비천연의 포스포로티오에이트 골격 연결들을 통해 안정성을 부여하기 위해 제공된다. 포스포로티오에이트 DNA 및 RNA는, 뉴클레아제 내성이 증가되어 있으며 결과적으로 세포 환경에서 반감기가 더 길다. 이론에 얽매이려는 것은 아니지만, 포스포로티오에이트 연결된 폴리뉴클레오타이드 분자들은 또한 세포의 선천적인 면역 분자들의 보다 약한 결합/활성화를 통해 선천적 면역 반응을 감소시키는 것으로 또한 예측된다.

[1187] 구체적인 실시형태에서, 변형된 뉴클레오사이드는 알파-티오-뉴클레오사이드(예를 들면, 5'-0-(1-티오포스페이트)-아데노신, 5'-0-(1-티오포스페이트)-사이티딘 (α-티오-사이티딘), 5'-0-(1-티오포스페이트)-구아노신, 5'-0-(1-티오포스페이트)-우리딘, 또는 5'-0-(1-티오포스페이트)-슈도우리딘)을 포함한다.

[1188] 인 원자를 함유하지 않는 뉴클레오사이드간 연결들을 포함하는, 본 발명에 따라 사용될 수 있는 다른 뉴클레오

사이드간 연결들은 본원에서 하기에 기술되어 있다.

[1189] **변형된 당들, 핵염기들, 및 뉴클레오사이드간 연결들의 조합들**

[1190] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 당, 핵염기, 및/또는 뉴클레오사이드간 연결에 대한 변형들의 조합을 포함할 수 있다. 이들 조합들은 본원에 기술된 하나 이상의 변형들을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본원에서 화학식들 (Ia), (Ia-1) 내지 (Ia-3), (Ib) 내지 (If), (IIa) 내지 (IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1) 내지 (IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa) 내지 (IV1), 및 (IXa) 내지 (IXr)에 기술된 뉴클레오타이드들 중 임의의 것도 본원에 기술된 핵염기들 중 임의의 것(예를 들면, 화학식 (b1) 내지 (b43) 또는 본원에 기술된 다른 임의의 것)과 조합될 수 있다.

[1191] **폴리뉴클레오타이드 분자들의 합성**

[1192] 본 발명에 따라 사용하기 위한 폴리뉴클레오타이드 분자들은 본원에 기술된 바와 같은 어떠한 유용한 기술에 따라서도 제조할 수 있다. 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드 분자들의 합성에 사용된 변형된 뉴클레오사이드들 및 뉴클레오타이드들은 다음의 일반적인 방법들 및 과정들을 사용하여 용이하게 이용가능한 출발 물질들로부터 제조할 수 있다. 대표적이거나 바람직한 공정 조건들(예를 들면, 반응 온도들, 시간들, 반응물들의 몰비들, 용매들, 압력들 등)이 제공되는 경우, 숙련가는 추가의 공정 조건들을 최적화하여 개발할 수 있을 것이다. 최적의 반응 조건들은 사용된 특수한 반응물들 또는 용매에 따라 변할 수 있지만 이러한 조건들은 통상의 최적화 과정들에 의해 당해 분야의 숙련가에 의해 측정될 수 있다.

[1193] 본원에 기술된 공정들은 당해 분야에 공지된 어떠한 적합한 방법에 따라서도 모니터링할 수 있다. 예를 들면, 생성물 형성은 분광학적 수단들, 예를 들면, 핵 자기 공명 분광법(예를 들면, ¹H 또는 ¹³C) 적외선 분광법, 분광 측정법(예를 들면, UV-가시광), 또는 질량 분석법에 의해서, 또는 크로마토그래피, 예를 들면, 고 성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 또는 박층 크로마토그래피에 의해 모니터링될 수 있다.

[1194] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 분자들의 제조는 다양한 화학 그룹들의 보호 및 탈보호를 포함할 수 있다. 적절한 보호 그룹들의 보호 및 탈보호, 및 선택에 대한 필요성은 당해 분야의 숙련가에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 보호 그룹들의 화학은, 예를 들면, 이의 전문이 참조로 본원에 혼입된 문헌(참조: Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., Wiley & Sons, 1991)에서 찾을 수 있다.

[1195] 본원에 기술된 과정들의 반응들은 유기 합성의 분야에서의 숙련가에 의해 용이하게 선택될 수 있는, 적합한 용매들 속에서 수행할 수 있다. 적합한 용매들은 출발 물질들(반응물들), 중간체들, 또는 생성물들과, 반응들이 수행되는 온도들, 즉, 용매의 동결 온도 내지 용매의 비등 온도 범위일 수 있는 온도에서 실질적으로 비반응성일 수 있다. 주어진 반응은 하나의 용매 또는 하나 이상의 용매의 혼합물에서 수행할 수 있다. 특정 반응 단계에 따라서, 특수한 반응 단계에 적합한 용매들을 선택할 수 있다.

[1196] 변형된 폴리뉴클레오타이드들 또는 핵산들(예를 들면, 폴리뉴클레오타이드들 또는 변형된 mRNA 분자들)의 라세믹 혼합물들의 분해는 당해 분야에 공지된 다수의 방법들 중 임의의 것으로도 수행할 수 있다. 예시적인 방법은 광학적으로 활성인, 염-형성 유기 산인 "키랄 분해산"을 사용한 분별 재결정을 포함한다. 분별 재결정 방법들용으로 적합한 분해제들은 예를 들면, 광학적으로 활성인 산들, 예를 들면, 타르타르산, 디아세틸타르타르산, 디벤조일타르타르산, 만델산, 말산, 락트산 또는 다양한 광학적으로 활성인 캄포르설포산들의 D 및 L 형태들이다. 라세믹(racemic) 혼합물들의 분해는 또한 광학적으로 활성인 분해제(예를 들면, 디니트로벤조일페닐글리신)로 채워진 컬럼위에서 용출시켜 수행할 수 있다. 적합한 용출 용매 조성물은 당해 분야의 숙련가에 의해 결정될 수 있다.

[1197] 변형된 뉴클레오사이드들 및 뉴클레오타이드들(예를 들면, 빌딩 블록 분자들)은, 각각이 이들의 전문이 본원에 참조로 혼입된, 문헌[참조: Ogata et al., *J. Org. Chem.* 74:2585-2588(2009); Purmal et al., *Nucl. Acids Res.* 22(1): 72-78, (1994); Fukuhara et al., *Biochemistry*, 1(4): 563-568(1962); 및 Xu et al., *테트라hedron*, 48(9): 1729-1740 (1992)]에 기술된 합성 방법들에 따라 제조할 수 있다.

[1198] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 분자의 전체 길이에 따라 균일하게 변형되거나 변형되지 않을 수 있다. 예를 들면, 뉴클레오타이드(예를 들면, 퓨린 또는 피리미딘, 또는 A, G, U, C 중 어느 하나 이상 또는 모두) 중 하나 이상 또는 모든 유형들은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드내에서, 또는 이의 제공된 예정 서열 영역내에서 균일하게 변형되거나 변형되지 않을 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(또는 이의 제공된 서열 영역)내 모든 뉴클레오타이드 X는 변형되며, 여기서, X는 뉴클레오타이드들 A, G, U, C 중 어느 하나, 또

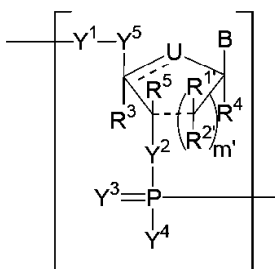
는 A+G, A+U, A+C, G+U, G+C, U+C, A+G+U, A+G+C, G+U+C 또는 A+G+C의 조합들 중 어느 하나일 수 있다.

[1199] 상이한 당 변형들, 뉴클레오타이드 변형들, 및/또는 뉴클레오사이드간 연결들(예를 들면, 골격 구조들)이 폴리뉴클레오타이드의 다양한 위치들내에서 존재할 수 있다. 당해 분야에서 통상의 지술자는, 이러한 뉴클레오타이드 동족체들 또는 다른 변형(들)이 폴리뉴클레오타이드의 어떠한 위치(들)에도 위치하여 폴리뉴클레오타이드의 기능이 실질적으로 감소되지 않도록 할 수 있음을 인식할 것이다. 변형은 또한 5' 또는 3' 말단 변형일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 약 1% 내지 약 100%의 변형된 뉴클레오타이드들(전체 뉴클레오타이드 함량과 관련하여, 또는 뉴클레오타이드의 하나 이상의 유형들, 즉, A, G, U 또는 C 중 어느 하나 이상과 관련하여) 또는 어떠한 개재 퍼센트(예를 들면, 1% 내지 20%, 1% 내지 25%, 1% 내지 50%, 1% 내지 60%, 1% 내지 70%, 1% 내지 80%, 1% 내지 90%, 1% 내지 95%, 10% 내지 20%, 10% 내지 25%, 10% 내지 50%, 10% 내지 60%, 10% 내지 70%, 10% 내지 80%, 10% 내지 90%, 10% 내지 95%, 10% 내지 100%, 20% 내지 25%, 20% 내지 50%, 20% 내지 60%, 20% 내지 70%, 20% 내지 80%, 20% 내지 90%, 20% 내지 95%, 20% 내지 100%, 50% 내지 60%, 50% 내지 70%, 50% 내지 80%, 50% 내지 90%, 50% 내지 95%, 50% 내지 100%, 70% 내지 80%, 70% 내지 90%, 70% 내지 95%, 70% 내지 100%, 80% 내지 90%, 80% 내지 95%, 80% 내지 100%, 90% 내지 95%, 90% 내지 100%, 및 95% 내지 100%)를 함유할 수 있다.

[1200] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는, 변형된 피리미딘(예를 들면, 변형된 우라실/우리딘/U 또는 변형된 사이토신/사이티딘/C)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 분자내 우라실 또는 우리딘(일반적으로: U)은 약 1% 내지 약 100%의 변형된 우라실 또는 변형된 우리딘(예를 들면, 1% 내지 20%, 1% 내지 25%, 1% 내지 50%, 1% 내지 60%, 1% 내지 70%, 1% 내지 80%, 1% 내지 90%, 1% 내지 95%, 10% 내지 20%, 10% 내지 25%, 10% 내지 50%, 10% 내지 60%, 10% 내지 70%, 10% 내지 80%, 10% 내지 90%, 10% 내지 95%, 10% 내지 100%, 20% 내지 25%, 20% 내지 50%, 20% 내지 60%, 20% 내지 70%, 20% 내지 80%, 20% 내지 90%, 20% 내지 95%, 20% 내지 100%, 50% 내지 60%, 50% 내지 70%, 50% 내지 80%, 50% 내지 90%, 50% 내지 95%, 50% 내지 100%, 70% 내지 80%, 70% 내지 90%, 70% 내지 95%, 70% 내지 100%, 80% 내지 90%, 80% 내지 95%, 80% 내지 100%, 90% 내지 95%, 90% 내지 100%, 및 95% 내지 100%의 변형된 우라실 또는 변형된 우리딘)으로 대체될 수 있다. 변형된 우라실 또는 우리딘은 단일의 유일한 구조를 갖는 화합물에 의해 또는 상이한 구조들(예를 들면, 본원에 기술된 바와 같은 2, 3, 4 이상의 유일한 구조들)을 갖는 다수의 화합물들에 의해 대체될 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 분자내 사이토신 또는 사이티딘(일반적으로: C)는 약 1% 내지 약 100%의 변형된 사이토신 또는 변형된 사이티딘(예를 들면, 1% 내지 20%, 1% 내지 25%, 1% 내지 50%, 1% 내지 60%, 1% 내지 70%, 1% 내지 80%, 1% 내지 90%, 1% 내지 95%, 10% 내지 20%, 10% 내지 25%, 10% 내지 50%, 10% 내지 60%, 10% 내지 70%, 10% 내지 80%, 10% 내지 90%, 10% 내지 95%, 10% 내지 100%, 20% 내지 25%, 20% 내지 50%, 20% 내지 60%, 20% 내지 70%, 20% 내지 80%, 20% 내지 90%, 20% 내지 95%, 20% 내지 100%, 50% 내지 60%, 50% 내지 70%, 50% 내지 80%, 50% 내지 90%, 50% 내지 95%, 50% 내지 100%, 70% 내지 80%, 70% 내지 90%, 70% 내지 95%, 70% 내지 100%, 80% 내지 90%, 80% 내지 95%, 80% 내지 100%, 90% 내지 95%, 90% 내지 100%, 및 95% 내지 100%의 변형된 사이토신 또는 변형된 사이티딘)에 의해 대체될 수 있다. 변형된 사이토신 또는 사이티딘은 하나의 유일한 구조를 갖는 화합물 또는 상이한 구조들(예를 들면, 본원에 기술된 바와 같은 2, 3, 4 이상의 구조들)을 갖는 다수의 화합물들에 의해 대체될 수 있다.

[1201] 일부 실시형태에서, 본 개시는 하기 화학식 (Ia-1)를 갖는 n개의 연결된 뉴클레오사이드들을 포함하는 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 제1 영역, 제1 플랭킹 영역, 또는 제2 플랭킹 영역)를 합성하는 방법들을 제공하며::

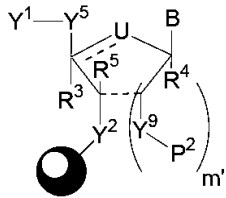
[1202] [화학식 Ia-1]



[1203] .
 [1204] 당해 방법들은:

[1205] a) 화학식 (IV-1)의 뉴클레오타이드:

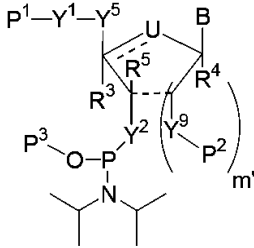
[1206] [화학식 IV-1]



[1207]

[1208] 를 화학식 (V-1)의 포스포르아미디트 화합물:

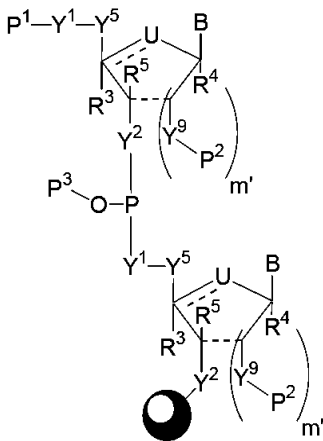
[1209] [화학식 V-1]



[1210]

[1211] [여기서, Y⁹는 H, 하이드록시, 포스포릴, 피로포스페이트, 설페이트, 아미노, 티올, 임의로 치환된 아미노산, 또는 펩타이드(예를 들면, 2 내지 12개의 아미노산들 포함)이며; 각각의 P¹, P², 및 P³은, 독립적으로, 적합한 보호 그룹이고; 는 고체 지지체이다]의 포스포르아미디트 화합물과 반응시켜 화학식 (VI-1):

[1212] [화학식 VI-1]

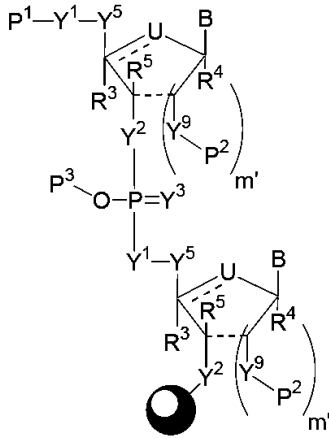


[1213]

[1214] 의 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계, 및

[1215] b) 화학식 (V)의 폴리뉴클레오타이드를 산화시키거나 황화시켜 화학식 (VII-1):

[1216] [화학식 VII-1]



[1217]

[1218] 의 폴리뉴클레오타이드를 수득하는 단계, 및

[1219] c) 보호 그룹들을 제거하여 화학식 (Ia)의 폴리뉴클레오타이드를 수득하는 단계를 포함한다.

[1220] 일부 실시형태에서, 단계 a) 및 b)는 1 내지 약 10,000회 반복된다. 일부 실시형태에서, 당해 방법은 A, C, G 및 U 아데노신, 사이토신, 구아노신, 및 우라실로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵염기는 피리미딘 또는 이의 유도체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 번역가능하다.

[1221] 폴리뉴클레오타이드들의 다른 성분들은 임의적이며 일부 실시형태에서 유리하다. 예를 들면, 5' 번역되지 않은 영역(UTR) 및/또는 3'UTR이 제공되며, 여기서, 각각의 영역 또는 둘 다는 하나 이상의 상이한 뉴클레오타이드 변형들을 독립적으로 함유할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 뉴클레오타이드 변형들은 또한 번역가능한 영역 내에 존재할 수 있다. 또한, 코작 서열을 함유하는 폴리뉴클레오타이드들이 제공된다.

[1222] **뉴클레오타이드들의 조합들**

[1223] 변형된 뉴클레오타이드들 및 변형된 뉴클레오타이드 조합들의 추가의 예들이 하기 표 2에 제공된다. 이들 변형된 뉴클레오타이드들의 변형들을 사용하여 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 형성할 수 있다. 달리 나타내지 않는 한, 변형된 뉴클레오타이드들은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 천연 뉴클레오타이드들에 대해 완전히 치환될 수 있다. 비-제한적인 예로서, 천연의 뉴클레오타이드 우리딘은 본원에 기재된 변형된 뉴클레오타이드로 치환될 수 있다. 다른 비-제한적인 예에서, 천연의 뉴클레오타이드 우리딘은 본원에 기재된 변형된 뉴클레오타이드 중 적어도 하나와 부분적으로 치환될 수 있다(예를 들면, 약 0.1%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99.9%).

표 2

변형된 뉴클레오타이드	변형된 뉴클레오타이드 조합
α-티오사이티딘	α-티오사이티딘/5-요오도-우리딘
	α-티오사이티딘/N1-메틸-슈도우리딘
	α-티오사이티딘/α-티오-우리딘
	α-티오사이티딘/5-메틸-우리딘
	α-티오사이티딘/슈도우리딘
	약 50%의 사이토신들이 α-티오사이티딘이다
슈도이소사이티딘	슈도이소사이티딘/5-요오도-우리딘
	슈도이소사이티딘/N1-메틸-슈도우리딘
	슈도이소사이티딘/α-티오-우리딘
	슈도이소사이티딘/5-메틸-우리딘
	슈도이소사이티딘/슈도우리딘
	약 25%의 사이토신들이 슈도이소사이티딘이다
	슈도이소사이티딘/약 50%의 우리딘들이 N1-메틸-슈도우리딘이고 약 50%의 우리딘들이 슈도우리딘이다
	슈도이소사이티딘/약 25%의 우리딘들이 N1-메틸-슈도우리딘이고 약 25%의 우리딘들이 슈도우리딘이다 (예를 들면, 25% N1-메틸-슈도우리딘/75% 슈도우리딘)
피롤로사이티딘	피롤로사이티딘/5-요오도-우리딘
	피롤로사이티딘/N1-메틸-슈도우리딘
	피롤로사이티딘/α-티오-우리딘
	피롤로사이티딘/5-메틸-우리딘
	피롤로사이티딘/슈도우리딘
	약 50%의 사이토신들이 피롤로사이티딘이다
5-메틸사이티딘	5-메틸사이티딘/5-요오도-우리딘
	5-메틸사이티딘/N1-메틸-슈도우리딘
	5-메틸사이티딘/α-티오-우리딘
	5-메틸사이티딘/5-메틸-우리딘
	5-메틸사이티딘/슈도우리딘
	약 25%의 사이토신들이 5-메틸사이티딘이다
	약 50%의 사이토신들이 5-메틸사이티딘이다
	5-메틸사이티딘/5-메톡시-우리딘
	5-메틸사이티딘/5-브로모-우리딘
	5-메틸사이티딘/2-티오-우리딘
	5-메틸사이티딘/약 50%의 우리딘들이 2-티오-우리딘이다
	약 50%의 우리딘들이 5-메틸사이티딘이다/ 약 50%의 우리딘들이 2-티오-우리딘이다
N4-아세틸사이티딘	N4-아세틸사이티딘 /5-요오도-우리딘
	N4-아세틸사이티딘 /N1-메틸-슈도우리딘
	N4-아세틸사이티딘 / α-티오-우리딘
	N4-아세틸사이티딘 /5-메틸-우리딘
	N4-아세틸사이티딘 /슈도우리딘
	약 50%의 사이토신들이 N4-아세틸사이티딘이다
	약 25%의 사이토신들이 N4-아세틸사이티딘이다
	N4-아세틸사이티딘 /5-메톡시-우리딘
	N4-아세틸사이티딘 /5-브로모-우리딘
	N4-아세틸사이티딘 /2-티오-우리딘
	약 50%의 사이토신들이 N4-아세틸사이티딘이다/ 약 50%의 우리딘들이 2-티오-우리딘이다

[1224]

[1225]

특정의 변형된 뉴클레오타이드들 및 뉴클레오타이드 조합들이 본 발명자들에 의해 실험되어 왔다. 이들 발견들은 가공된 핵산들 및 이의 사용 방법들이라는 명칭으로 2010년 10월 1일자로 출원된 미국 가특허원 제 61/404,413호, 변형된 뉴클레오타이드들, 및 핵산들, 및 이의 용도들이라는 명칭으로 2011년 10월 3일자로 출원되어 현재 포기된 미국 특허원 제13/251,840호, 변형된 뉴클레오타이드들, 및 핵산들, 및 이들의 용도들이라는 명칭으로 2012년 5월 25일자로 출원된 미국 특허원 제13/481,127호, 변형된 뉴클레오타이드들, 뉴클레오타이드들, 및 핵산들, 및 이의 용도들이라는 명칭으로 2011년 10월 3일자로 출원된 국제 특허 공보 제W02012045075호, 가공된 핵산들 및 이의 사용 방법이라는 명칭으로 2011년 10월 3일자로 출원된 미국 특허공보 제US20120237975호, 및 국제 특허 공보 제W02012045082호에 기술되어 있으며, 이들은, 이들의 전문이 참조로 혼입되어 있다.

[1226]

변형된 뉴클레오타이드 조합들의 추가의 예들은 하기 표 3에 제공된다. 변형된 뉴클레오타이드들의 이들 조합

들을 사용하여 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 형성할 수 있다.

표 3

변형된 뉴클레오타이드	변형된 뉴클레오타이드 조합
하나 이상의 화학식 b10의 핵염기들을 갖는 변형된 사이티딘	화학식 b10을 갖는 변형된 사이티딘/슈도우리딘
	화학식 b10을 갖는 변형된 사이티딘/N1-메틸-슈도우리딘
	화학식 b10을 갖는 변형된 사이티딘/5-메톡시-우리딘
	화학식 b10을 갖는 변형된 사이티딘/5-메틸-우리딘
	화학식 b10을 갖는 변형된 사이티딘/5-브로모-우리딘
	화학식 b10을 갖는 변형된 사이티딘/2-티오-우리딘
하나 이상의 화학식 b32의 핵염기들을 갖는 변형된 사이티딘	변형된 사이티딘 (화학식 b10)으로 치환된 약 50%의 사이티딘/약 50%의 우리딘은 2-티오-우리딘이다
	화학식 b32를 갖는 변형된 사이티딘/슈도우리딘
	화학식 b32를 갖는 변형된 사이티딘/N1-메틸-슈도우리딘
	화학식 b32를 갖는 변형된 사이티딘/5-메톡시-우리딘
	화학식 b32를 갖는 변형된 사이티딘/5-메틸-우리딘
	화학식 b32를 갖는 변형된 사이티딘/5-브로모-우리딘
하나 이상의 화학식 b1의 핵염기들을 갖는 변형된 우리딘	화학식 b32를 갖는 변형된 사이티딘/2-티오-우리딘
	변형된 사이티딘 (화학식 b32)으로 치환된 약 50%의 사이티딘/약 50%의 우리딘은 2-티오-우리딘이다
하나 이상의 화학식 b1의 핵염기들을 갖는 변형된 우리딘	화학식 b1을 갖는 변형된 우리딘/N4-아세틸-사이티딘
하나 이상의 화학식 b8의 핵염기들을 갖는 변형된 우리딘	화학식 b1을 갖는 변형된 우리딘/5-메틸-사이티딘
하나 이상의 화학식 b28의 핵염기들을 갖는 변형된 우리딘	화학식 b8을 갖는 변형된 우리딘/N4-아세틸-사이티딘
	화학식 b8을 갖는 변형된 우리딘/5-메틸-사이티딘
하나 이상의 화학식 b29의 핵염기들을 갖는 변형된 우리딘	화학식 b28을 갖는 변형된 우리딘/N4-아세틸-사이티딘
	화학식 b28을 갖는 변형된 우리딘/5-메틸-사이티딘
하나 이상의 화학식 b30의 핵염기들을 갖는 변형된 우리딘	화학식 b29를 갖는 변형된 우리딘/N4-아세틸-사이티딘
	화학식 b29를 갖는 변형된 우리딘/5-메틸-사이티딘
하나 이상의 화학식 b30의 핵염기들을 갖는 변형된 우리딘	화학식 b30을 갖는 변형된 우리딘/N4-아세틸-사이티딘
	화학식 b30을 갖는 변형된 우리딘/5-메틸-사이티딘

[1227]

[1228]

일부 실시형태에서, 사이토신들 중의 적어도 25%는 화학식 (b10) 내지 (b14), (b24), (b25), 또는(b32) 내지 (b35)의 화합물[예를 들면, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%의, 예를 들면, 화학식 (b10) 또는 (b32)의 화합물]로 대체된다.

[1229]

일부 실시형태에서, 우라실들 중의 적어도 25%는 화학식 b1 내지 화학식 b9, 화학식 b21 내지 화학식 b23, 또는 화학식 b28 내지 화학식 b31의 화합물[예를 들면, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%의, 예를 들면, 화학식 (b1), (b8), (b28), (b29), 또는 (b30)의 화합물]로 대체된다.

[1230]

일부 실시형태에서, 사이토신들 중의 적어도 25%는 화학식 (b10) 내지 (b14), (b24), (b25), 또는 (b32) 내지 (b35)의 화합물[예를 들면, 화학식 (b10) 또는 (b32)의 화합물]로 대체되고, 우라실들 중의 적어도 25%는 화학식 b1 내지 화학식 b9, 화학식 b21 내지 화학식 b23, 또는 화학식 b28 내지 화학식 b31의 화합물[예를 들면, 화학식 (b1), (b8), (b28), (b29), 또는 (b30)의 화합물](예를 들면, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%)로 대체된다.

[1231]

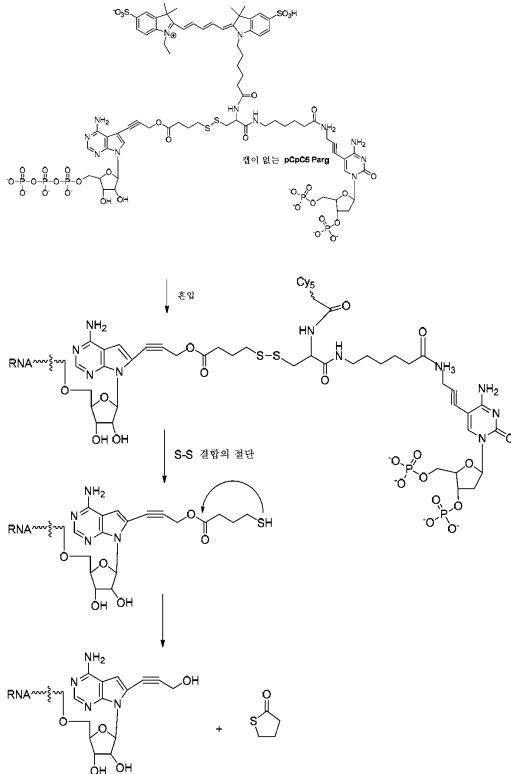
링커 및 페이로드(페이로드)를 포함하는 변형들

[1232]

뉴클레오타이드의 핵염기는 어떠한 화학적으로 적절한 위치에서 페이로드, 예를 들면, 검출가능한 제제 또는 치료제에 공유결합적으로 연결될 수 있다. 예를 들면, 핵염기는 테아자-아데노신 또는 테아자-구아노신일 수 있으며 링커는 테아자-아데노신 또는 테아자-구아노신의 C-7 또는 C-8 위치들에 부착될 수 있다. 다른 실시형태에서, 핵염기는 사이토신 또는 우라실일 수 있으며 링커는 사이토신 또는 우라실의 N-3 또는 C-5 위치들에 부착될 수 있다. 하기 반응식 1은 예시적인 변형된 뉴클레오타이드를 묘사하며, 여기서, 핵염기, 아데닌은 7-테아자 아데닌의 C-7 탄소에서 링커에 부착된다. 또한, 반응식 1은 mRNA의 3' 말단 위에 혼입된 링커와 페이로드,

예를 들면, 검출가능한 제제를 지닌 변형된 뉴클레오타이드를 나타낸다. 이황화물 절단 및 프로파르길 에스테르 상으로 티올 그룹의 1,2-첨가는 검출가능한 제제를 방출한다. 나머지 구조(예를 들면, 반응식 1에서 pApC5Parg로 나타냄)는 억제제이다. 변형된 뉴클레오타이드들의 구조에 대한 해석은, 테셔드(tethered) 억제제가, 제2 염기를 혼입시키는 폴리머라제의 능력을 입체적으로 방해한다는 것이다. 따라서, 테셔(tether)가 이러한 기능에 영향을 미치도록 충분히 길어야 하고 억제제가 성장하는 폴리뉴클레오타이드 쇄내로 제2의 및 후속하는 뉴클레오타이드들을 억제하거나 금지하는 입체화학적 배향으로 존재하는 것이 중요하다.

[1233] [반응식 1]



[1234]

[1235] **링커**

[1236] 본원에 사용된 것으로서 용어 "링커"는 원자들, 예를 들며, 10 내지 1,000개의 원자들의 그룹을 말하며, 탄소, 아미노, 알킬아미노, 산소, 황, 설펍사이드, 설포닐, 카보닐, 및 이민과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 원자들 또는 그룹들로 구성될 수 있다. 링커는 제1 말단에서 핵염기 또는 당 모이어티 위의 변형된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드에, 및 제2 말단에서 페이로드, 예를 들면, 검출가능한 제제 또는 치료제에 부착될 수 있다. 링커는 핵산 서열내로의 혼입을 방해하지 않을 정도의 충분한 길이이다.

[1237] 링커내로 혼입될 수 있는 화학 그룹들의 예들은 알킬, 알켄, 알킨, 아미도, 에테르, 티오에테르, 또는 에스테르 그룹을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 링커 쇄는 또한 폴리사이클릭 및 헤테로방향족 환들을 포함하는 포화되거나, 불포화되거나, 또는 방향족인 환의 일부를 포함할 수 있으며, 여기서, 헤테로방향족 환은 1 내지 4개의 헤테로원자들, N, O 또는 S를 함유하는 아릴 그룹이다. 링커들의 구체적인 예들은 불포화된 알칸들, 폴리에틸렌 글리콜들, 및 텍스트란 중합체들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[1238] 예를 들면, 링커는 에틸렌 또는 프로필렌 글리콜 단량체 단위들, 예를 들면, 디에틸렌 글리콜, 디프로필렌 글리콜, 트리에틸렌 글리콜, 트리프로필렌 글리콜, 테트라에틸렌 글리콜, 또는 테트라에틸렌 글리콜을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 2가 알킬, 알케닐, 및/또는 알키닐 잔기를 포함할 수 있다. 링커는 에스테르, 아미드, 또는 에테르 잔기를 포함할 수 있다.

[1239] 다른 예들은 링커내에 절단가능한 잔기들, 예를 들면, 이황화물 결합(-S-S-) 또는 아조 결합(-N=N-)을 포함하며, 이는 환원제 또는 광분해를 사용하여 절단시킬 수 있다. 링커내로 혼입되고 변형된 뉴클레오타이드에 부착된 절단가능한 결합은, 절단 시, 뉴클레오타이드 상에 예를 들면, 짧은 "스카(Scar)" 또는 화학적 변형을 생성한다. 예를 들면, 절단 후, 변형된 뉴클레오타이드의 일부를 형성하고, 폴리뉴클레오타이드 쇄내로 혼

입된, 뉴클레오타이드 염기 상에 수득되는 스카는 비반응성이며 화학적으로 중화시킬 필요가 없다. 이는, 후속적인 뉴클레오타이드가 핵산 중합체 주형의 서열분석 동안 혼입될 수 있는 용이성을 증가시킨다. 예를 들면, 조건들은 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP), 디티오프레이톨(DTT) 및/또는 이황화물 결합의 절단을 위한 다른 환원제들의 사용을 포함한다. 아미도 결합을 포함하는 선택적으로 절단가능한 결합은 예를 들면, TCEP 또는 다른 환원제들을 사용하고/하거나 광분해에 의해 절단시킬 수 있다. 에스테르 결합을 포함하는 선택적으로 절단가능한 결합은 예를 들면, 산성 또는 염기성 가수분해에 의해 절단시킬 수 있다.

[1240] **페이로드**

[1241] 본원에 기술된 방법들 및 조성물들은 페이로드를 생물학적 표적에 전달하는데 유용하다. 페이로드는 예를 들면, 표지화(예를 들면, 검출가능한 제제, 예를 들면, 플루오로포어), 또는 치료학적 목적들(예를 들면, 세포독소 및 다른 치료제)을 위해 사용할 수 있다.

[1242] *페이로드: 치료제들*

[1243] 일부 실시형태에서 페이로드는 세포독소, 방사활성 이온, 화학치료제, 또는 다른 치료제와 같은 치료제이다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포들에 유해한 어떠한 제제도 포함한다. 예들은 탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블리스틴, 콜치신, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드들, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프로놀롤, 푸로마이신, 마이탄시노이드들, 예를 들면, 마이탄시놀(참조: 미국 특허 제5,208,020호), CC-1065(참조: 미국 특허 제5,475,092호, 제5,585,499호, 제5,846,545호) 및 이의 유사체들 또는 동족체들을 포함한다. 방사활성 이온들은 요오드(예를 들면, 요오드 125 또는 요오드 131), 스트론튬 89, 인, 팔라듐, 세슘, 이리듐, 포스페이트, 코발트, 이트륨 90, 사마륨 153 및 프라세오듐을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 다른 치료제들은 항대사제들(예를 들면, 메토타렉세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 사이타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제들(예를 들면, 메클로르에타민, 티오에프 클로람부실, CC-1065, 멜팔란, 카르무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 사이클로포스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 플라티늄(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린들(예를 들면, 다우노루비신(이전에는 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제들(예를 들면, 닥티노마이신(이전에는 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신(AMC)), 및 항-유사분열제들(예를 들면, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 탁솔 및 마이탄시노이드들)을 포함한다.

[1244] *페이로드: 검출가능한 제제들*

[1245] 검출가능한 물질들의 예들은 각종 유기 소 분자들, 무기 화합물들, 나노입자들, 효소들 또는 효소 기질들, 형광 물질들, 발광 물질들, 생물발광성 물질들, 화학발광성 물질들, 방사활성 물질들, 및 조영제들을 포함한다. 이러한 광학적으로 검출가능한 표지들은 예를 들면, 4-아세트아미도-4'-이소티오시아네이트스틸벤-2,2'-디선포산; 아크리딘 및 유도체들: 아크리딘, 아크리딘 이소티오시아네이트; 5-(2'-아미노에틸)아미노나프탈렌-1-선포산(EDANS); 4-아미노-N-[3-비닐선포닐]페닐]나프탈아미드-3,5 디선포네이트; N-(4-아닐리노-1-나프틸)말레이미드; 안트라닐아미드; BODIPY; 브릴리언트 옐로우(Brilliant Yellow); 코우마린 및 유도체들, 코우마린, 7-아미노-4-메틸코우마린(AMC, 코우마린 120), 7-아미노-4-트리플루오로메틸코울루아린(코우마린 151); 시아닌 염료들; 시아노신; 4',6-디아미니디노-2-페닐인돌(DAPI); 5'5"-디브로모피로갈롤-선포나프탈레인(브로모피로갈롤 레드); 7-디에틸아미노-3-(4'-이소티오시아네이트페닐)-4-메틸코우마린; 디에틸렌트리아민 펜타아세테이트; 4,4'-디이소티오시아네이트디하이드로-스틸벤-2,2'-디선포산; 4,4'-디이소티오시아네이트스틸벤-2,2'-디선포산; 5-[디메틸아미노]-나프탈렌-1-선포닐 클로라이드(DNS, 단선포클로라이드); 4-디메틸아미노페닐아조페닐-4'-이소티오시아네이트(DABITC); 에오신 및 유도체들; 에오신, 에오신 이소티오시아네이트, 에리트로신 및 유도체들; 에리트로신 B, 에리트로신, 이소티오시아네이트; 에티디움; 플루오레세인 및 유도체들; 5-카복시플루오레세인(FAM), 5-(4,6-디클로로트리아진-2-일)아미노플루오레세인(DTAF), 2',7'-디메톡시-4'5'-디클로로-6-카복시플루오레세인, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, QFITC, (XRITC); 플루오레스카민; IR144; IR1446; 말라키트 그린(Malachite Green) 이소티오시아네이트; 4-메틸옴벨리페론오르토 크레솔프탈레인; 니트로타이로신; 파라로사닐린; 페놀 레드; B-피코에리트린; o-프탈디알데하이드; 피렌 및 유도체들: 피렌, 피렌 부티레이트, 석신이미드 1-피렌; 부티레이트 퀀텀 도트들(butyrate quant μM dots); 반응성 레드(Reactive Red) 4(Cibacron™ 브릴리언트 레드(Brilliant Red) 3B-A) 로다민 및 유도체들: 6-카복시-X-로다민(ROX), 6-카복시로다민(R6G), 리쓰아민 로다민 B 선포닐 클로라이드 로다르닌(Rhod), 로다민 B, 로다민 123, 로다민 X 이소티오시아네이트, 설펠로다민 B, 설펠로다민 101, 설펠로다민 101의 설펠닐 클로라이드 유도체[텍사스 레드(Texas Red)]; N,N,N',

N' 테트라메틸-6-카복시로다민(TAMRA); 테트라메틸 로다민; 테트라메틸 로다민 이소티오시아네이트(TRITC); 리보 플라빈; 로솔산; 테르븀 킬레이트 유도체들; 시아닌-3(Cy3); 시아닌-5(Cy5); 시아닌-5.5(Cy5.5), 시아닌-7(Cy7); IRD 700; IRD 800; 알렉사(Alexa) 647; 라 졸타 블루(La Jolta Blue); 프탈로시아닌; 및 나프탈로시아닌을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 검출가능한 표지는 형광성 염료, 예를 들면, Cy5 및 Cy3이다.

[1246] 발광성 물질의 예들은 루미놀을 포함하며; 생물발광성 물질들의 예들은 루시페라제, 루시페린, 및 에쿠오린을 포함한다.

[1247] 적합한 방사활성 물질의 예들은 ¹⁸F, ⁶⁷Ga, ^{81m}Kr, ⁸²Rb, ¹¹¹In, ¹²³I, ¹³³Xe, ²⁰¹Tl, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, 또는 ³H, ^{99m}Tc(예를 들면, 직접 또는 간접적으로 페르테크네테이트(테크네테이트(VII), TcO₄⁻)로서, 또는 방사선방출(radioemission)의 직접적인 계수에 의해 또는 신틸레이션 카운팅(scintillation counting)에 의해 검출가능한 다른 방사선동위원소를 포함한다.

[1248] 또한, 조영제들, 예를 들면, MRI 또는 NMR용, X-선 CT, 라만 영상(Raman imaging), 광간섭단층촬영장치, 흡수 영상, 초음파 영상, 또는 열 영상용 조영제를 사용할 수 있다. 예시적인 조영제들은 금(예를 들면, 금 나노입자들), 가돌리늄(예를 들면, 킬레이트된 Gd), 철 산화물들(예를 들면, 초상자성 산화철(SP10), 단일결정성 산화철 나노입자들(MIONs), 및 미세 초상자성 산화철(USP10)), 망간 킬레이트제(예를 들면, Mn-DPDP), 황산바륨, 요오드처리된 조영 매질(이오핵술), 미세버블들(microbubbles), 또는 퍼플루오로탄소들을 또한 사용할 수 있다.

[1249] 일부 실시형태에서, 검출가능한 제제는 활성화시 검출가능하게 되는 비-검출가능한 전구체이다. 예들은 형광원 테트라진-형광단 구조물들(예를 들면, 테트라진-BODIPY FL, 테트라진-오레곤 그린(테트라진-Oregon Green) 488, 또는 테트라진-BODIPY TMR-X) 또는 효소 활성화가능한 형광성 제제들[예를 들면, PROSENSE(제조원: 비스엔 메디칼(VisEn Medical))]을 포함한다.

[1250] 화합물들이 예를 들면, 서양고추냉이 피옥시다제, 알칼린 포스포타제, 또는 루시페라제로 효소적으로 표지되는 경우, 효소 표지는 적절한 기질의, 생성물로의 전환을 측정하여 검출한다.

[1251] 이들 조성물들이 사용될 수 있는 시험관내 검정들은 효소 연결된 면역흡착 검정들(ELISAs), 면역침전들, 면역형광성, 효소 면역검정(EIA), 방사면역검정(RIA), 및 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)을 포함한다.

[1252] 본원에 기술된 것들 이외의 표지들, 예를 들면, 다른 광학적으로-검출가능한 표지들이 본 개시에 의해 고려된다. 표지들은 본 개시의 변형된 뉴클레오타이드에 어떠한 위치에서도 표준 화학들을 사용하여 부착시킴으로써 표지가 절단가능한 링커의 절단 시 혼입된 염기로부터 제거될 수 있도록 할 수 있다.

[1253] *페이지로드: 세포 침투성 페이지로드들*

[1254] 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드들 및 변형된 핵산들은 또한 조성물들의 세포내 전달을 향상시키는 세포 침투성 잔기 또는 제제를 포함할 수 있다. 예를 들면, 조성물들은 세포내 공간으로의 전달을 촉진시키는 세포-침투성 펩타이드 서열, 예를 들면, HIV-기원한 TAT 펩타이드, 페너트라틴들, 트랜스포르탄들, 또는 hCT 기원한 세포-침투성 펩타이드들을 포함할 수 있다[참조: 예를 들면, Caron et al., (2001) Mol Ther. 3(3):310-8; Lanquel, Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications(CRC Press, Boca Raton FL 2002); El-Andaloussi et al., (2005) Curr Pharm Des. 11(28):3597-611; 및 Deshayes et al., (2005) Cell Mol Life Sci. 62(16):1839-49]. 당해 조성물들은 또한 세포 침투제, 예를 들면, 세포간 공간으로 조성물들의 전달을 향상시키는 리포솜들을 포함하도록 제형화될 수 있다.

[1255] *페이지로드: 생물학적 표적들*

[1256] 본원에 기술된 변형된 뉴클레오타이드들 및 변형된 핵산들을 사용하여 페이지로드를 특이적인 리간드가 존재하거나 생성될 수 있는 어떠한 생물학적 표적으로도 전달할 수 있다. 리간드는 생물학적 표적에 공유결합적으로 또는 비-공유결합적으로 결합할 수 있다.

[1257] 예시적인 생물학적 표적들은 생물중합체들, 예를 들면, 항체들, RNA 및 DNA와 같은 핵산들, 단백질들, 효소들을 포함하며; 예시적인 단백질들은 효소들, 수용체들, 및 이온 채널들(ion channels)을 포함한다. 일부 실시형태에서 표적은 조직- 또는 세포-유형 특이적인 마커, 예를 들면, 선택된 조직 또는 세포 유형에서 특이적으로 발현되는 단백질이다. 일부 실시형태에서, 표적은 수용체, 예를 들면, 혈장막 수용체들 및 핵 수용체들이나, 이에 한정되지 않으며; 보다 구체적인 예들은 G-단백질-커플링된 수용체들, 세포 공극 단백질들, 트랜스포터 단백질

질들(transporter 단백질들), 표면-발현된 항체들, HLA 단백질들, MHC 단백질들 및 성장 인자 수용체들을 포함한다.

[1258] **변형된 뉴클레오타이드들의 합성**

[1259] 본원에 기재된 변형된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드들은 다음의 일반적인 방법들 및 과정들을 사용하여 용이하게 이용가능한 출발 물질들로부터 제조할 수 있다. 대표적이고 바람직한 공정 조건들(즉, 반응 온도들, 시간들, 반응제들의 몰 비들, 용매들, 압력들 등)이 제공된 경우; 달리 기술하지 않는 한 다른 공정 조건들 또한 사용될 수 있음이 이해된다. 최적의 반응 조건들은 사용된 특수한 반응물들 또는 용매를 사용하여 변경시킬 수 있으나, 이러한 조건들은 정규의 최적화 과정들에 의해 당해 분야의 숙련가에 의해 결정될 수 있다.

[1260] 본원에 기술된 과정들은 당해 분야에 공지된 어떠한 적합한 방법에 따라서도 모니터링될 수 있다. 예를 들면, 생성물 형성은 분광분석 수단, 예를 들면, 핵 자기 공명 분광분석법(예를 들면, ¹H 또는 ¹³C) 적외선 분광분석법, 분광광도법(예를 들면, UV-가시광), 또는 질량분광법에 의해, 또는 크로마토그래피, 예를 들면, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 또는 박층 크로마토그래피에 의해 모니터링할 수 있다.

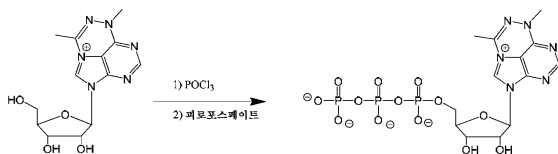
[1261] 변형된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드들의 제조는 각종 화학 그룹들의 보호 및 탈보호를 포함할 수 있다. 적절한 보호 그룹들의 보호 및 탈보호, 및 선택에 대한 필요성은 당해 분야의 숙련가에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 보호 그룹들의 화학은 예를 들면, 이의 전문이 참조로 본원에 혼입된 문헌(참조: Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., Wiley & Sons, 1991)에서 찾을 수 있다.

[1262] 본원에 기술된 공정들의 반응들은 유기 합성 분야에서의 기술자에 의해 용이하게 선택될 수 있는 적합한 용매들 속에서 수행할 수 있다. 적합한 용매들은 출발 물질들(반응물들), 중간체들, 또는 생성물들과, 반응들이 수행되는 온도들, 즉, 용매의 동결 온도 내지 용매의 비등 온도 범위일 수 있는 온도들에서 실질적으로 비반응성일 수 있다. 제공된 반응은 하나의 용매 또는 하나 이상의 용매의 혼합물 속에서 수행할 수 있다. 특수한 반응 단계에 따라, 특수한 반응 단계용으로 적합한 용매들을 선택할 수 있다.

[1263] 변형된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드들의 분해는 당해 분야에 공지된 다수의 방법들 중 임의의 것에 의해서도 수행될 수 있다. 예시적인 방법은 광학적으로 활성인, 염-형성 유기 산인 "키랄 분해성 산"을 사용하는 분별 재결정을 포함한다. 분별 재결정 방법들용으로 적합한 분해제들은, 예를 들면, 광학적으로 활성인 산들, 예를 들면, 타르타르산, 디아세틸타르타르산, 디벤조일타르타르산, 만델산, 말산, 락트산 또는 각종의 광학적으로 활성인 캄포르설폰산들의 D 및 L 형태들이다. 라세믹 혼합물들의 분해는 광학적으로 활성인 분해제(예를 들면, 디니트로벤조일페닐글리신)이 채워진 컬럼 상에서의 용출에 의해 또한 수행될 수 있다. 적합한 용출 용매 조성물은 당해 분야의 기술자에 의해 결정될 수 있다.

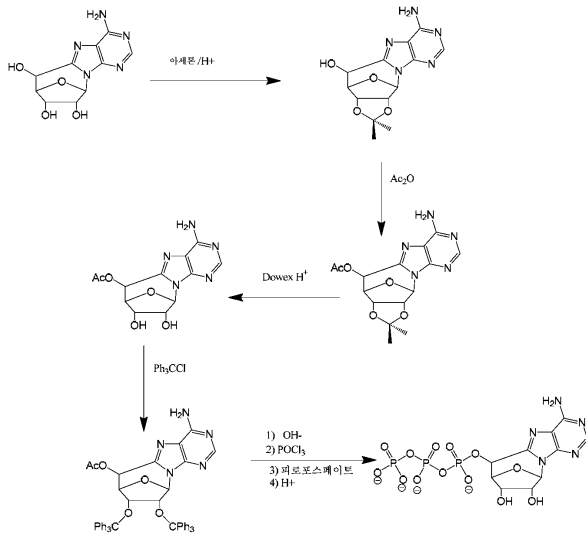
[1264] 폴리뉴클레오타이드들, 예를 들면, RNA 또는 mRNA내로 혼입되는, 변형된 뉴클레오타이드들의 예시적인 합성들은 하기 반응식 2 내지 반응식 12에 제공된다. 반응식 2는, 변형된 뉴클레오사이드들을 포함하는, 뉴클레오사이드들의 포스포릴화를 위한 일반적인 방법을 제공한다.

[1265] [반응식 2]



[1266] 각종 보호 그룹들을 사용하여 반응을 조절할 수 있다. 예를 들면, 반응식 3은 2' 및 3' 하이드록실 그룹들보다는 오히려, 당의 5' 위치에서 포스포릴화를 촉진하기 위한 다수의 보호 및 탈보호 단계들의 사용을 제공한다.

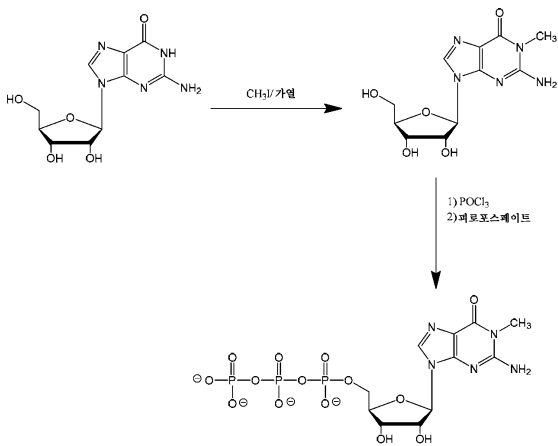
[1268] [반응식 3]



[1269]

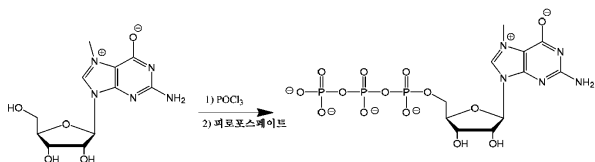
[1270] 변형된 뉴클레오타이드들은 어떠한 유용한 방식으로도 합성할 수 있다. 반응식들 4, 5, 및 8은 변형된 퓨린 핵 염기를 갖는 변형된 뉴클레오타이드들을 합성하는 예시적인 방법을 제공하며; 반응식들 6 및 7은 변형된 슈도우리딘 또는 슈도이소사이티딘을 갖는 변형된 뉴클레오타이드들 각각을 합성하는 예시적인 방법들을 제공한다.

[1271] [반응식 4]



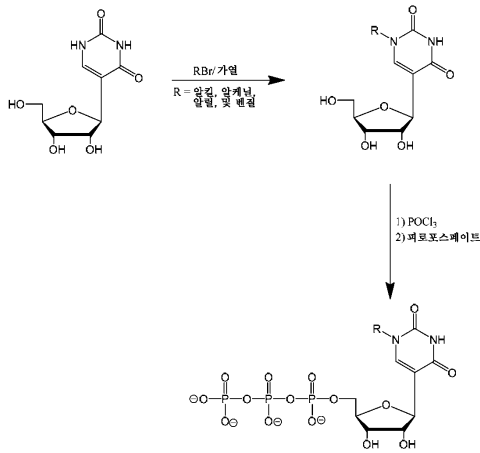
[1272]

[1273] [반응식 5]



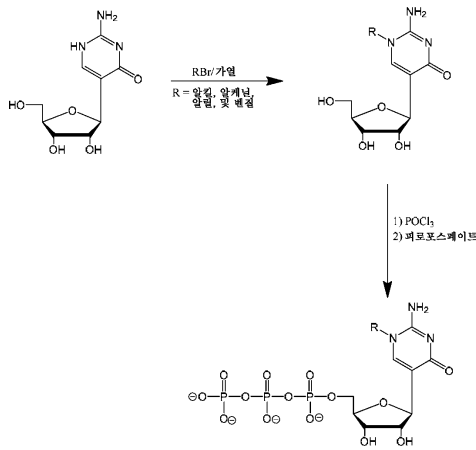
[1274]

[1275] [반응식 6]



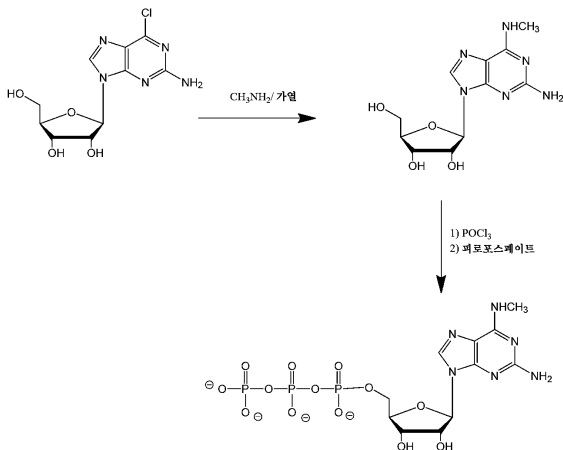
[1276]

[1277] [반응식 7]



[1278]

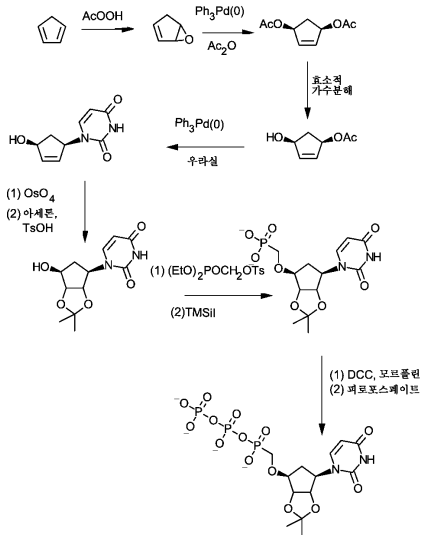
[1279] [반응식 8]



[1280]

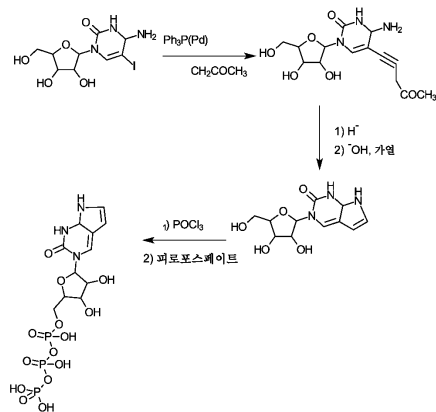
[1281] 반응식들 9 및 10은 변형된 뉴클레오타이드들의 예시적인 합성을 제공한다. 반응식 11은 뉴클레오타이드들을 생산하기 위한 비-제한적인 생물축매 방법을 제공한다.

[1282] [반응식 9]



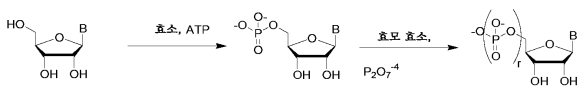
[1283]

[1284] [반응식 10]



[1285]

[1286] [반응식 11]

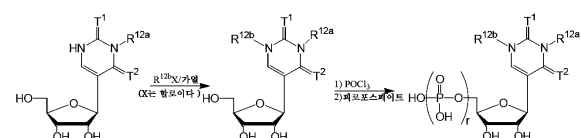


[1287]

[1288]

반응식 12는, 변형된 우라실의 예시적인 합성을 제공하며, 여기서, 주요 그루브 페이스 위에서 N1 위치는 어느 곳에 제공된 것으로서 R^{12b}로 변형되고, 리보스의 5'-위치는 포스포릴화된다. T¹, T², R^{12a}, R^{12b}, 및 r은 본원에 제공된 바와 같다. 당해 합성, 및 또한 이의 최적화된 버전들을 사용하여 피리미딘 핵염기들 및 퓨린 핵염기들의 주요 그루브 페이스를 변형[참조: 예를 들면, 화학식들 (b1) 내지 (b43)]시키고/시키거나 하나 이상의 포스페이트 그룹들을 설치할 수 있다(예를 들면, 당의 5' 위치에서). 이러한 알킬화 반응을 또한 사용하여 본원에 기술된 어떠한 핵염기내 어떠한 반응성 그룹(예: 아미노 그룹)[예를 들면, 사이토신, 우라실, 아데닌, 및 구아닌에 대한 왓슨-크릭 염기-쌍 형성 페이스(Watson-Crick base-pairing face)] 내에서 하나 이상의 임의로 치환된 알킬 그룹을 포함할 수 있다

[1289] [반응식 12]



[1290]

[1291] 변형된 뉴클레오사이드들 및 뉴클레오타이드들은, 또한 각각 이들의 전문이 참조로 혼입된 문헌[참조: Ogata et

al. *Journal of Organic Chemistry* 74:2585-2588, 2009; Purmal et al. *Nucleic Acids Research* 22(1): 72-78, 1994; Fukuhara et al. *Biochemistry* 1(4): 563-568, 1962; 및 Xu et al. *테트라hedron* 48(9): 1729-1740, 1992]에 기술된 합성 방법들에 따라 제조할 수 있다.

[1292] **변형된 핵산들**

[1293] 본 개시는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드들("변형된 핵산들"로 명명됨) 또는 뉴클레오타이드들을 함유하는 mRNA와 같은 RNA들을 포함하는 핵산들(또는 폴리뉴클레오타이드들)을 제공하며, 이들은, mRNA가 도입되는 세포의 선천적 면역 반응의 실질적인 유도의 결여를 포함하는 유용한 특성들을 갖는다. 이들 변형된 핵산들은 단백질 생산 효율, 핵산들의 세포내 보유, 및 접촉한 세포들의 생존능을 향상시키고, 감소된 면역원성을 지니므로, 이들 특성들을 가진 이들 핵산들은 또한 본원에서 "향상된 핵산들"로 명명된다.

[1294] 또한, 본 개시는 주요 그루브 상호작용, 예를 들면, 결합하는 파트너에 대한 결합 친화성이 감소된, 핵산들을 제공한다. 예를 들면, 핵산들은 본원에 기술된 바와 같은 주요 그루브 페이스 위에서 화학적으로 변형된 적어도 하나의 뉴클레오타이드로 이루어진다.

[1295] 용어 "핵산"은, 이의 광의적인 의미에서, 올리고뉴클레오타이드 쇠이거나 당해 쇠내로 혼입될 수 있는 어떠한 화합물 및/또는 물질도 포함한다. 이와 관련하여, 용어 핵산은 폴리뉴클레오타이드와 동의어로 사용된다. 본 개시에 따라 사용하기 위한 예시적인 핵산들은 본원에 상세히 기술된 바와 같은, DNA, 전령 mRNA(mRNA)를 포함하는 RNA, 이의 하이브리드들, RNAi-유도제들, RNAi 체제들, siRNA들, shRNA들, miRNA들, 안티센스 RNA들, 리보자임들, 촉매적 DNA, 삼중 나선 형성을 유도하는 RNA들, 압타머들(aptamers), 벡터들 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[1296] 번역가능한 영역 및 1개, 2개, 또는 2개 이상의 상이한 뉴클레오타이드 변형들을 함유하는 변형된 핵산들이 제공된다. 일부 실시형태에서, 변형된 핵산은, 핵산이 도입되는 세포내에서, 상응하는 변형되지 않은 핵산과 비교하여 감소된 분해를 나타낸다. 예시적인 핵산들은 리보핵산들(RNAs), 데옥시리보핵산들(DNAs), 트레오스 핵산들(TNAs), 글리콜 핵산들(GNAs), 또는 이의 하이브리드를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 핵산은 전령 RNA들(mRNA들)을 포함한다. 본원에 기술된 바와 같이, 본 개시의 핵산들은, mRNA가 도입되는 세포내에서의 선천적 면역 반응을 실질적으로 유도하지 않는다.

[1297] 특정 실시형태에서, 예를 들면, 단백질 생산의 정밀한 시기조절이 요구되는 경우, 세포내로 도입된 변형된 핵산을 세포내적으로 분해하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 개시는 세포내에서 지시된 방식으로 작용할 수 있는, 분해 도메인을 함유하는 변형된 핵산을 제공한다.

[1298] 핵산의 다른 성분들은 임의적이며, 일부 실시형태에서 유리하다. 예를 들면, 5' 번역되지 않은 영역(UTR) 및/또는 3' UTR이 제공되며, 여기서, 이들 각각 또는 둘 다는 하나 이상의 상이한 뉴클레오타이드 변형들을 함유할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 뉴클레오타이드 변형들은 또한 번역가능한 영역내에 존재할 수 있다. 또한 코작 서열을 함유하는 핵산들이 제공된다.

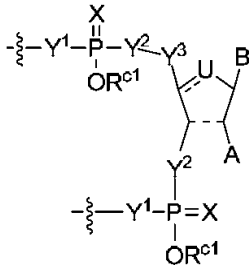
[1299] 추가로, 핵산으로부터 제거될 수 있는 하나 이상의 인트론(intronic) 뉴클레오타이드 서열들을 함유하는 핵산들이 제공된다.

[1300] 추가로, 내부 리보솜 도입 부위(IRES)를 함유하는 핵산들이 제공된다. IRES는 mRNA의 단독의 리보솜 결합 부위로서 작용할 수 있거나, mRNA의 다수의 리보솜 결합 부위들 중 하나로 제공될 수 있다. 하나 이상의 기능성 리보솜 결합 부위를 함유하는 mRNA는 리보솜들에 의해 독립적으로 번역되는 수개의 펩타이드들 또는 폴리펩타이드들을 암호화할 수 있다["다중시스트론성(multicistronic) mRNA"]. 핵산들이 IRES와 함께 제공되는 경우, 제2의 번역가능한 영역이 또한 임의로 제공된다. 본 개시에 따라 사용될 수 있는 IRES 서열들의 예는 피코르나바이러스들(picornaviruses)(예를 들면, FMDV), 해충 바이러스들(pest viruses)(CFV), 소아마비 바이러스들(PV), 뇌척수심근염 바이러스들(ECMV), 수족구병 바이러스들(foot-and-mouth 질병 viruses)(FMDV), C형 간염 바이러스들(HCV), 전통적인 돼지 콜레라 바이러스들(swine fever viruses)(CSFV), 쥐 백혈병 바이러스(MLV), 원숭이 면역 결핍성 바이러스들(SIV) 또는 귀뚜라미 마비 바이러스들(CrPV)로부터의 것들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[1301] 다른 양상에서, 본 개시는 적어도 2개의 뉴클레오타이드들을 포함하는 핵산 서열들을 제공하며, 당해 핵산 서열은 주요 그루브 결합 파트너와 핵산 서열의 결합을 방해하는 하나의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서, 뉴클레오타이드는, 주요 그루브 결합 파트너에 대한 결합 친화성이 감소되어 있다.

[1302] 일부 실시형태에서, 핵산은 화학식 XI-a의 화합물이다:

[1303] [화학식 XI-a]



[1304]

[1305] 여기서:

[1306] 는 임의의 이중 결합을 나타내고;

[1307] 는 임의의 단일 결합을 나타내며;

[1308] U는, 가 단일 결합을 나타내는 경우 O, S, -NR^a-, 또는 -CR^aR^b-이거나, 또는 가 이중 결합을 나타내는 경우 U는 -CR^a-이며;

[1309] A는 H, OH, 포스포릴, 피로포스페이트, 설페이트, -NH₂, -SH, 아미노산, 2 내지 12개의 아미노산들을 포함하는 펩타이드이고;

[1310] X는 O 또는 S이며;

[1311] 각각의 Y¹는 -OR^{a1}, -NR^{a1}R^{b1}, 및 -SR^{a1} 중에서 독립적으로 선택되고;

[1312] 각각의 Y² 및 Y³은 O, -CR^aR^b-, NR^c, S, 또는 C, O, N 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 원자들을 포함하는 링커이며;

[1313] R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 H, C₁₋₁₂ 알킬, C₂₋₁₂ 알케닐, C₂₋₁₂ 알키닐, 또는 C₆₋₂₀ 아릴이고;

[1314] R^c는 H, C₁₋₁₂ 알킬, C₂₋₁₂ 알케닐, 페닐, 벤질, 폴리에틸렌 글리콜 그룹, 또는 아미노-폴리에틸렌 글리콜 그룹이며;

[1315] R^{a1} 및 R^{b1}는 각각 독립적으로 H 또는 반대이온이고;

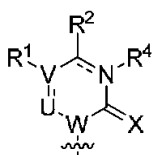
[1316] -OR^{c1}은 약 1의 pH에서 OH이거나 또는 -OR^{c1}는 생리학적 pH에서 O⁻이며;

[1317] B는 핵염기이고;

[1318] 단 변수들 A, B, D, U, Z, Y² 및 Y³을 포함하는 환은 리보스일 수 없다.

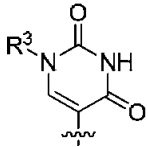
[1319] 일부 실시형태에서, B는 화학식 XII-a, XII-b, 또는 XII-c의 핵염기이고:

[1320] [화학식 XII-a]



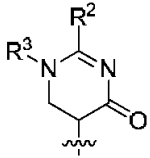
[1321]

[1322] [화학식 XII-b]



[1323]

[1324] [화학식 XII-c]



[1325]

[1326] 여기서:

[1327] 는 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고;

[1328] X는 O 또는 S이며;

[1329] U 및 W는 각각 독립적으로 C 또는 N이고;

[1330] V는 O, S, C 또는 N이며;

[1331] 여기서, V가 C인 경우 R¹은 H, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알케닐, C₁₋₆ 알키닐, 할로, 또는 -OR^c이고, 여기서, C₁₋₂₀ 알킬, C₂₋₂₀ 알케닐, C₂₋₂₀ 알키닐은 -OH, -NR^aR^b, -SH, -C(O)R^c, -C(O)OR^c, -NHC(O)R^c, 또는 -NHC(O)OR^c로 임의로 치환되며;

[1332] 여기서, V가 O, S, 또는 N인 경우 R¹은 부재하고;

[1333] R²는 H, -OR^c, -SR^c, -NR^aR^b, 또는 할로이거나;

[1334] V가 C인 경우 R¹ 및 R²는 이들이 부착된 탄소 원자들과 함께 할로, -OH, -SH, -NR^aR^b, C₁₋₂₀ 알킬, C₂₋₂₀ 알케닐, C₂₋₂₀ 알키닐, C₁₋₂₀ 알콕시, 또는 C₁₋₂₀ 티오알킬로부터 선택되는 1 내지 4개의 치환체들로 임의로 치환된 5- 또는 6-원 환을 형성할 수 있고;

[1335] R³은 H 또는 C₁₋₂₀ 알킬이며;

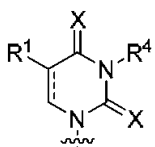
[1336] R⁴는 H 또는 C₁₋₂₀ 알킬이고; 여기서, 가 이중 결합을 나타내는 경우 R⁴는 부재하거나, N-R⁴가 함께, C₁₋₂₀ 알킬로 치환된 양으로 하전된 N을 형성하고;

[1337] R^a 및 R^b 는 각각 독립적으로 H, C₁₋₂₀ 알킬, C₂₋₂₀ 알케닐, C₂₋₂₀ 알키닐, 또는 C₆₋₂₀ 아릴이며;

[1338] R^c는 H, C₁₋₂₀ 알킬, C₂₋₂₀ 알케닐, 페닐, 벤질, 폴리에틸렌 글리콜 그룹, 또는 아미노-폴리에틸렌 글리콜 그룹이다.

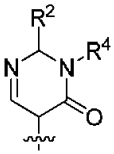
[1339] 일부 실시형태에서, B는 화학식 XII-a1, XII-a2, XII-a3, XII-a4, 또는 XII-a5의 핵염기이다:

[1340] [화학식 XII-a1]



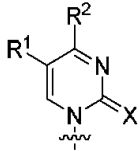
[1341]

[1342] [화학식 XII-a2]



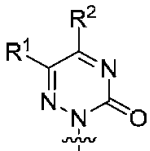
[1343]

[1344] [화학식 XII-a3]



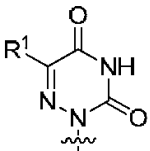
[1345]

[1346] [화학식 XII-a4]



[1347]

[1348] [화학식 XII-a5]



[1349]

[1350] 일부 실시형태에서, 핵염기는 피리미딘 또는 이의 유도체이다.

[1351] 일부 실시형태에서, 핵산은 화학식 XI-a의 구조적으로 유일한 화합물들 다수를 함유한다.

[1352] 일부 실시형태에서, 사이토신들 중의 적어도 25%는 화학식 XI-a의 화합물(예를 들면, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%)로 대체된다.

[1353] 일부 실시형태에서, 우라실들 중의 적어도 25%는 화학식 XI-a의 화합물(예를 들면, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%)로 대체된다.

[1354] 일부 실시형태에서, 사이토신들 중의 적어도 25% 및 우라실들 중의 25%는 화학식 XI-a의 화합물(예를 들면, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%)로 대체된다.

[1355] 일부 실시형태에서, 핵산은 번역가능하다.

[1356] 일부 실시형태에서, 핵산이 예를 들면, 본원에 기술된 바와 같이, 링커 및 페이로드로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 경우, 링커 및 페이로드로 변형된 뉴클레오타이드는 핵산의 3' 말단 위에 존재한다.

[1357] **주요 그루브 상호작용 파트너들**

[1358] 본원에 기술된 바와 같은, 어구 "주요 그루브 상호작용 파트너"는 상호작용들, 예를 들면, 뉴클레오타이드 또는 핵산의 주요 그루브 페이스와의 결합을 통해 RNA 리간드들을 검출하고 반응하는 RNA 인지 수용체들을 말한다. 이와 같이, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 뉴클레오타이드들 또는 핵산들을 포함하는 RNA 리간드들은 주요 그

루브 결합 파트너들과의 상호작용들을 감소시킴으로써 염증성 사이토카인들의 선천성 면역 반응, 또는 발현 및 분비, 또는 둘 다를 감소시킨다.

[1359] 주요 그루브 상호작용, 예를 들면, 결합 파트너들의 예는 다음의 뉴클레아제 및 헬리카제들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 막들내에서, TLRs[톨-유사 수용체들(Toll-like Receptors)] 3, 7, 및 8은 단일- 및 이중-가닥 RNA들에 반응할 수 있다. 세포질내에서, DEX(D/H) 헬리카제들 및 ATP아제들의 상과 제2 부류의 구성원들은 RNAs를 감지하여 항바이러스 반응들을 개시할 수 있다. 이들 헬리카제들은 RIG-I[레티노산-유도성 유전자(retinoic acid-inducible gene) I] 및 MDA5[흑색종 분화-관련 유전자(melanoma differentiation-associated gene) 5]을 포함한다. 다른 예들은 유전학 및 생리학 2의 실험실(laboratory of genetics and physiology 2)(LGP2), 단백질들, 또는 헬리카제-도메인 함유 단백질들을 함유하는HIN-200 도메인을 포함한다.

[1360] **선천성 세포 면역 반응의 예방 또는 감소**

[1361] 용어 "선천성 면역 반응"은 사이토카인 발현 및 방출, 특히 인터페론들의 유도, 및 세포 사멸을 포함하는, 일반적으로 바이러스 또는 세균 기원의 외인성 일분쇄 핵산들(exogenous single stranded nucleic acids)에 대한 세포 반응을 포함한다. 단백질 합성은 또한 선천성 세포 면역 반응 동안 감소한다. 외인성 핵산들의 유도에 의해 개시되는 세포내 선천성 면역 반응을 제거하는 것이 유리하다고 해도, 본 개시는 인터페론 신호전달을 포함하는 면역 반응을 전체적으로 제거하지 않고, 실질적으로 감소시키는 mRNA들과 같은 변형된 핵산들을 제공한다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 상응하는 변형되지 않은 핵산에 의해 유도된 면역 반응과 비교하여 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99.9%, 또는 99.9% 이상까지 감소된다. 이러한 감소는 제1형 인터페론들의 발현 또는 활성 수준에 의해 또는 톨-유사 수용체들(예를 들면, TLR7 및 TLR8)과 같은 인터페론-조절된 유전자들의 발현에 의해 측정될 수 있다. 선천성 면역 반응의 유도의 감소 또는 결여는 세포 집단 에 변형된 RNA들을 1회 이상 투여한 후 감소된 세포 사멸에 의해 측정될 수 있는데, 예를 들면, 세포 사멸은 상응하는 변형되지 않은 핵산으로 관찰된 세포 사멸 빈도의 10%, 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 95%, 또는 95% 이상 더 적다. 더욱이, 세포 사멸은 변형된 핵산들과 접촉된 세포들의 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1%, 0.1%, 0.01% 또는 0.01%보다 더 적게 영향을 미칠 수 있다.

[1362] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 mRNA 분자들을 포함하는 변형된 핵산들은 수용체 세포 또는 기관에 의한 면역 반응을 유도시키지 않거나, 단지 최소로 유도시키는 방식으로 변형된다. 면역 반응 시발점(trigger) 및 활성화의 이러한 방지 또는 회피는 본 발명의 변형된 폴리뉴클레오타이드들의 신규 특징이다.

[1363] 본 개시는 예를 들면, 시험관내, 생체외, 또는 생체내에서 변형된 핵산들의 표적 세포 집단내로의 반복된 도입(예를 들면, 형질감염)을 제공한다. 세포 집단을 접촉시키는 단계는 1회 이상(예를 들면, 2, 3, 4 또는 5회 이상) 반복될 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포 집단과 변형된 핵산들을 접촉시키는 단계는 세포 집단내 단백질 번역의 예정된 효능이 달성되도록 하기에 충분한 회수들을 반복한다. 핵산 변형들에 의해 제공된 표적 세포 집단의 세포독성이 감소되면, 이러한 반복된 형질감염들은 시험관내 및/또는 생체내에서 세포 유형들의 다양한 배열로 달성될 수 있다.

[1364] **폴리펩타이드 변이체들**

[1365] 참조 폴리펩타이드 서열과 특성의 동일성(identity)을 갖는 변이체 폴리펩타이드들을 암호화하는 핵산들이 제공된다. 당해 분야에 공지된 것으로서, 용어 "동일성"은 서열들을 비교하여 측정된 것으로서, 2개 이상의 펩타이드들의 서열들 사이의 관계를 말한다. 당해 분야에서, "동일성"은 또한 2개 이상의 아미노산 잔기들의 스트링(string)들 사이의 매치들(matches)의 수로써 측정된 것으로서, 펩타이드들 사이의 서열 관련성의 정도를 의미한다. "동일성"은 특수한 수학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램(즉, "알고리즘들")에 의해 초점이 맞추어진 갭 정렬들(gap alignments)(존재하는 경우)을 지닌 보다 작은 2개 이상의 서열들 사이의 동일한 매치들의 퍼센트를 측정한다. 이러한 방법들은 문헌[참조: Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of 서열 Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., 사랍 Press, New Jersey, 1994; 서열 Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 서열 Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; and Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073(1988)]에 기술된 것들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[1366] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드 변이체는 참조 폴리펩타이드와 동일하거나 유사한 활성을 갖는다. 달리는,

변이체는 참조 폴리펩타이드에 대해 변경된 활성(예를 들면, 증가되거나 감소된)을 갖는다. 일반적으로, 본 개시의 특수한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 변이체들은 본원에 기술되고 당해 분야의 숙련가에게 공지된 서열 정렬 프로그램들 및 매개변수들에 의해 측정된 것으로서 x특별한 참조 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드에 대해 적어도 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 가질 것이다.

[1367] 당해 분야의 숙련가가 인식하는 바와 같이, 단백질 단편들, 기능적 단백질 도메인들 및 동족 단백질들이 본 개시의 범위 내에 속하는 것으로 고려된다. 예를 들면, 길이가 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100개 또는 100개 이상의 아미노산들인 참조 단백질(참조 폴리펩타이드 서열보다 더 짧지만 기타의 경우 동일한 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 폴리펩타이드 서열을 의미한다)의 특정 단백질 단편이 본원에 제공된다. 다른 예로서, 본원에 기술된 서열 중 임의의 것에 대해 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 100% 동일한, 약 20, 약 30, 약 40, 약 50, 또는 약 100개 아미노산들의 신장(stretch)을 포함하는 어떠한 단백질도 본 개시에 따라 활용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 개시에 따라 활용될 단백질 서열은 본원에서 제공되거나 참조된 서열들 중 임의의 것에 나타낸 바와 같은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 돌연변이들을 포함한다.

[1368] **폴리펩타이드 라이브러리들**

[1369] 뉴클레오사이드 변형들을 함유하는 폴리뉴클레오타이드 라이브러리들이 또한 제공되며, 여기서, 폴리뉴클레오타이드들은 항체, 단백질 결합 파트너, 스캐폴드 단백질(scaffold protein), 및 당해 분야에 공지된 다른 폴리펩타이드들과 같은 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 핵산 서열을 개별적으로 함유한다. 바람직하게는, 폴리뉴클레오타이드들은 표적 숙주 세포내로 직접적인 도입되어, 최종적으로 암호화된 폴리펩타이드를 합성하는데 적합한 형태의 mRNA이다.

[1370] 특정 실시형태에서, 각각 상이한 아미노산 변형(들)을 갖는, 단백질의 다중 변이체들이 생산되어 시험됨으로써 약동학, 안정성, 생물적합성, 및/또는 발현 수준과 같은 생물학적 활성의 측면에서 가장 우수한 변이체를 측정한다. 이러한 라이브러리는 10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 또는 10^9 초과 가능한 변이체들(하나 이상의 잔기들의 치환들, 결실들, 및 하나 이상의 잔기들의 삽입을 포함)을 함유할 수 있다.

[1371] **폴리펩타이드-핵산 복합체들**

[1372] 적절한 단백질 번역은 mRNA와 관련된 다수의 폴리펩타이드들 및 핵산들의 물리적 응집을 포함한다. 본 개시에 의해 하나 이상의 뉴클레오사이드 변형들(예를 들면, 적어도 2개의 상이한 뉴클레오사이드 변형들), 및 mRNA에 결합된 하나 이상의 폴리펩타이드들을 갖는 번역가능한 mRNA를 함유하는 단백질-핵산 복합체들이 제공된다. 일반적으로, 단백질들은, 복합체가 도입되는 세포의 선천성 면역 반응을 예방하거나 감소시키기에 효과적인 양으로 제공된다.

[1373] **번역불가능한 변형된 핵산들**

[1374] 본원에 기술된 바와 같이, 실질적으로 번역불가능한 서열들을 갖는 mRNA들이 제공된다. 이러한 mRNA는 포유동물 대상체에게 투여되는 경우 백신으로서 효과적이다.

[1375] 또한 하나 이상의 비암호화 영역들을 함유하는 변형된 핵산들이 제공된다. 이러한 변형된 핵산들은 일반적으로 번역되지 않으나 리보솜 단백질 또는 트랜스퍼 RNA(tRNA)와 같은 하나 이상의 번역 기구 성분들에 결합하여 봉쇄(sequester)함으로써 세포내에서 단백질 발현을 효과적으로 감소시킬 수 있다. 변형된 핵산은 작은 핵 RNA(sno-RNA), 마이크로(micro) RNA(miRNA), 작은 간섭(small interference) RNA(siRNA) 또는 피위-상호작용(Piwi-interacting) RNA(piRNA)를 함유할 수 있다.

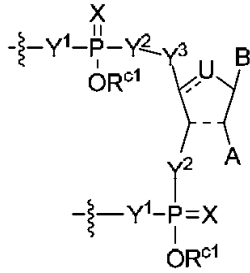
[1376] **변형된 핵산들의 합성**

[1377] 본 개시에 따라 사용하기 위한 핵산들은 일반적으로 시험관내 전사, 보다 긴 전구체의 효소적 또는 화학적 절단 등으로 명명되는, 화학적 합성, 효소적 합성을 포함하나, 이에 한정되지 않는 어떠한 이용가능한 기술에 따라 제조될 수 있다. RNA들을 합성하는 방법들은 당해 분야에 공지되어 있다[참조: 예를 들면, Gait, M.J.(ed.) *Oligonucleotide synthesis: practical approach*, Oxford [Oxfordshire], Washington, DC: IRL Press, 1984; 및 Herdewijn, P.(ed.) *Oligonucleotide synthesis: methods and applications*, Methods in Molecular Biology, v. 288(Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005; 이들 둘 다는 참조로 본원에 혼입된다].

- [1378] 변형된 핵산들은 분자의 전체 길이에 따라 균일하게 변형될 필요가 없다. 상이한 뉴클레오타이드 변형들 및/또는 골격 구조들이 핵산내 다양한 위치들에 존재할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는, 뉴클레오타이드 동족체들 또는 다른 변형(들)이 핵산의 어떠한 위치(들)에 위치함으로써 핵산의 기능이 실질적으로 감소되지 않음을 인지할 것이다. 변형은 또한 5' 또는 3' 말단 변형일 수 있다. 핵산들은 최소 1 및 최대 100%의 변형된 뉴클레오타이드들, 또는 어떠한 개재 퍼센트(intervening percentage), 예를 들면, 적어도 5% 변형된 뉴클레오타이드들, 적어도 10% 변형된 뉴클레오타이드들, 적어도 25% 변형된 뉴클레오타이드들, 적어도 50% 변형된 뉴클레오타이드들, 적어도 80% 변형된 뉴클레오타이드들, 또는 적어도 90% 변형된 뉴클레오타이드들을 함유할 수 있다. 예를 들면, 핵산들은 변형된 피리미딘, 예를 들면, 우라실 또는 사이토신을 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산 중의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 100%가 변형된 우라실로 대체된다. 변형된 우라실은 단일의 유일한 구조를 갖는 화합물로 대체될 수 있거나 상이한 구조들(예를 들면, 2, 3, 4개 이상의 유일한 구조들)을 갖는 다수의 화합물들로 대체될 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산 중의 사이토신의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 100%는 변형된 사이토신으로 대체된다. 변형된 사이토신은 단일의 유일한 구조를 갖는 화합물로 대체될 수 있거나, 또는 상이한 구조들(예를 들면, 2, 3, 4개 이상의 유일한 구조들)을 갖는 다수의 화합물들로 대체될 수 있다.
- [1379] 일반적으로, 본 개시의 변형된 mRNA의 가장 짧은 길이는 디펩타이드를 암호화하기에 충분한 길이의 mRNA 서열일 수 있다. 다른 실시형태에서, mRNA 서열의 길이는 트리펩타이드를 암호화하기에 충분하다. 다른 실시형태에서, mRNA 서열의 길이는 테트라펩타이드를 암호화하기에 충분하다. 다른 실시형태에서, mRNA 서열의 길이는 펜타펩타이드를 암호화하기에 충분하다. 다른 실시형태에서, mRNA 서열의 길이는 헥사펩타이드를 암호화하기에 충분하다. 다른 실시형태에서, mRNA 서열의 길이는 헵타펩타이드를 암호화하기에 충분하다. 다른 실시형태에서, mRNA 서열의 길이는 옥타펩타이드를 암호화하기에 충분하다. 다른 실시형태에서, mRNA 서열의 길이는 노나펩타이드를 암호화하기에 충분하다. 다른 실시형태에서, mRNA 서열의 길이는 데카펩타이드를 암호화하기에 충분하다.
- [1380] 변형된 핵산 서열들이 암호화할 수 있는 디펩타이드들의 예들은 카르노신 및 안세린을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [1381] 추가의 실시형태에서, mRNA는, 길이가 30개 이상인 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, RNA 분자는, 길이가 35개 이상인 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 40개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 45개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 55개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 60개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 80개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 90개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 100개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 120개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 140개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 160개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 180개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 200개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 250개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 300개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 350개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 400개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 450개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 500개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 600개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 700개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 800개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 900개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 1000개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 1100개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 1200개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 1300개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 1400개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 1500개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 1600개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 1800개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 2000개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 2500개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 3000개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 4000개 뉴클레오타이드들이다. 다른 실시형태에서, 길이는 적어도 5000개 뉴클레오타이드들 또는 5000개 이상의 뉴클레오타이드들이다.
- [1382] 예를 들면, 본원에 기술된 변형된 핵산들은 핵산 합성 분야에서 숙련가에게 공지된 방법들을 사용하여 제조할 수 있다.

[1383] 일부 실시형태에서, 본 개시는 주요 그루브 결합 파트너와 핵산 서열의 결합을 방해하는 뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 서열을 제조하는, 예를 들면, 효소적 방법들을 제공하며, 여기서, 핵산 서열은 화학식 XI-a의 화합물을 포함하고:

[1384] [화학식 XI-a]



[1385]

[1386] [여기서:

[1387] 뉴클레오타이드는 주요 그루브 결합 파트너에 대한 결합 친화성이 감소되어 있고;

[1388] 는 임의의 이중 결합을 나타내며;

[1389] 는 임의의 단일 결합을 나타내고;

[1390] U는, 이 단일 결합을 나타내는 경우 O, S, -NR^a, 또는 -CR^aR^b-이거나, 또는 이 이중 결합을 나타내는 경우 U는 -CR^a-이며;

[1391] A는 H, OH, 포스포릴, 피로포스페이트, 설페이트, -NH₂, -SH, 아미노산, 2 내지 12개의 아미노산들을 포함하는 펩타이드이고;

[1392] X는 O 또는 S이며;

[1393] 각각의 Y¹은 -OR^{a1}, -NR^{a1}R^{b1}, 및 -SR^{a1} 중에서 독립적으로 선택되고;

[1394] 각각의 Y² 및 Y³는 O, -CR^aR^b-, NR^c, S, 또는 C, O, N 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 원자들을 포함하는 링커 중에서 독립적으로 선택되며;

[1395] R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 H, C₁₋₁₂ 알킬, C₂₋₁₂ 알케닐, C₂₋₁₂ 알키닐, 또는 C₆₋₂₀ 아릴이고;

[1396] R^c는 H, C₁₋₁₂ 알킬, C₂₋₁₂ 알케닐, 페닐, 벤질, 폴리에틸렌 글리콜 그룹, 또는 아미노-폴리에틸렌 글리콜 그룹이고;

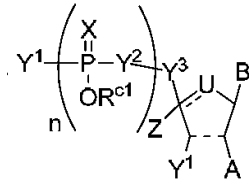
[1397] R^{a1} 및 R^{b1}는 각각 독립적으로 H 또는 반대이온이고;

[1398] -OR^{c1}은 약 1의 pH에서 OH이거나 또는 -OR^{c1}은 생리학적 pH에서 O⁻이며;

[1399] B는 핵염기이고;

[1400] 단, 변수들 A, B, D, U, Z, Y² 및 Y³을 포함하는 환은 리보스일 수 없다], 당해 방법은 화학식 XIII:

[1401] [화학식 XIII]



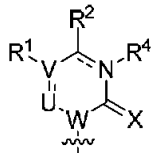
[1402]

[1403] 의 화합물을 RNA 폴리머라제, 및 cDNA 주형과 반응시킴을 포함한다.

[1404] 일부 실시형태에서, 당해 반응은 1 내지 약 7,000회 반복된다.

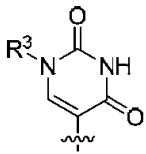
[1405] 일부 실시형태에서, B는 화학식 XII-a, XII-b, 또는 XII-c의 핵염기이다:

[1406] [화학식 XII-a]



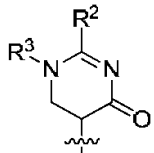
[1407]

[1408] [화학식 XII-b]




[1409]

[1410] [화학식 XII-c]



[1411]

[1412] 여기서:

[1413]  는 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고;

[1414] X는 O 또는 S이며;

[1415] U 및 W 는 각각 독립적으로 C 또는 N이고;

[1416] V는 O, S, C 또는 N이며;

[1417] 여기서, V가 C인 경우 R¹은 H, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알케닐, C₁₋₆ 알키닐, 할로, 또는 -OR^c이고, 여기서, C₁₋₂₀ 알킬, C₂₋₂₀ 알케닐, C₂₋₂₀ 알키닐은 각각, -OH, -NR^aR^b, -SH, -C(O)R^c, -C(O)OR^c, -NHC(O)R^c, 또는 -NHC(O)OR^c로 임의로 치환되며;

[1418] 여기서, V가 O, S, 또는 N인 경우 R¹은 부재하고;

[1419] R²는 H, -OR^c, -SR^c, -NR^aR^b, 또는 할로이거나;

[1420] V가 C인 경우 R¹ 및 R²는, 이들이 부착된 탄소 원자들과 함께 할로, -OH, -SH, -NR^aR^b, C₁₋₂₀ 알킬, C₂₋₂₀ 알케닐, C₂₋₂₀ 알키닐, C₁₋₂₀ 알콕시, 또는 C₁₋₂₀ 티오알킬로부터 선택되는 1 내지 4개의 치환체들로 임의로 치환된 5- 또는 6-원 환을 형성할 수 있고;

[1421] R^3 은 H 또는 C_{1-20} 알킬이며;

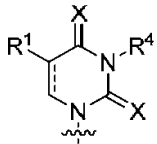
[1422] R^4 는 H 또는 C_{1-20} 알킬이고; 여기서, 이 이중 결합을 나타내는 경우 R^4 는 부재하거나, $N-R^4$ 가 함께, C_{1-20} 알킬로 치환된 양으로 하전된 N을 형성하며;

[1423] R^a 및 R^b 는 각각 독립적으로 H, C_{1-20} 알킬, C_{2-20} 알케닐, C_{2-20} 알키닐, 또는 C_{6-20} 아릴이고;

[1424] R^c 는 H, C_{1-20} 알킬, C_{2-20} 알케닐, 페닐, 벤질, 폴리에틸렌 글리콜 그룹, 또는 아미노-폴리에틸렌 글리콜 그룹이다.

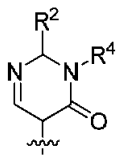
[1425] 일부 실시형태에서, B는 화학식 XII-a1, XII-a2, XII-a3, XII-a4, 또는 XII-a5의 핵염기이다:

[1426] [화학식 XII-a1]



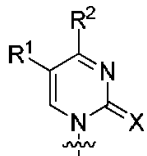
[1427]

[1428] [화학식 XII-a2]



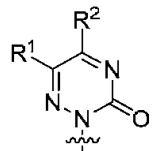
[1429]

[1430] [화학식 XII-a3]



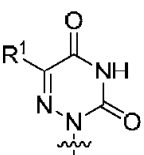
[1431]

[1432] [화학식 XII-a4]



[1433]

[1434] [화학식 XII-a5]



[1435]

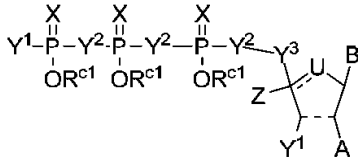
[1436] 일부 실시형태에서, 당해 방법들은 아데노신, 사이토신, 구아노신, 및 우라실로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드를 추가로 포함한다.

[1437] 일부 실시형태에서, 핵염기는 피리미딘 또는 이의 유도체이다.

[1438] 다른 양상에서, 본 개시는 주요 그루브 결합 파트너와 핵산 서열의 결합을 방해하는 뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 서열을 증폭시키는 방법들을 제공하며, 당해 방법은 하기 화학식 XI-d의 화합물과, 프라이머, cDNA 주형,

및 RNA 폴리머라제를 반응시킴을 포함한다:

[1439] [화학식 XI-d]



[1440]

[1441]

여기서:

[1442]

뉴클레오타이드는 주요 그루브 결합 파트너에 대한 결합 친화성이 감소되어 있고;

[1443]

--- 는 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고;

[1444]

--- 는 임의의 단일 결합을 나타내며;

[1445]

U는, --- 이 단일 결합을 나타내는 경우 O, S, $-\text{NR}^a$, 또는 $-\text{CR}^a\text{R}^b$ -이거나, 또는 U는, --- 이 이중 결합을 나타내는 경우 $-\text{CR}^a$ -이고;

[1446]

Z는 H, C_{1-12} 알킬, 또는 C_{6-20} 아릴이거나, 또는 Z는, --- 이 이중 결합을 나타내는 경우 부재하고;

[1447]

Z는 $-\text{CR}^a\text{R}^b$ -일 수 있고 A와 결합을 형성하며;

[1448]

A는 H, OH, 포스포릴, 피로포스페이트, 설페이트, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, 아미노산, 또는 1 내지 12개의 아미노산들을 포함하는 펩타이드이고;

[1449]

X는 O 또는 S이며;

[1450]

각각의 Y^1 는 $-\text{OR}^{a1}$, $-\text{NR}^{a1}\text{R}^{b1}$, 및 $-\text{SR}^{a1}$ 중에서 독립적으로 선택되고;

[1451]

각각의 Y^2 및 Y^3 은 O, $-\text{CR}^a\text{R}^b$, NR^c , S, 또는 C, O, N 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 원자들을 포함하는 링커이며;

[1452]

n은 0, 1, 2, 또는 3이고;

[1453]

m은 0, 1, 2 또는 3이며;

[1454]

B는 핵염기이고;

[1455]

R^a 및 R^b 는 각각 독립적으로 H, C_{1-12} 알킬, C_{2-12} 알케닐, C_{2-12} 알키닐, 또는 C_{6-20} 아릴이며;

[1456]

R^c 는 H, C_{1-12} 알킬, C_{2-12} 알케닐, 페닐, 벤질, 폴리에틸렌 글리콜 그룹, 또는 아미노-폴리에틸렌 글리콜 그룹이고;

[1457]

R^{a1} 및 R^{b1} 는 각각 독립적으로 H 또는 반대이온이고;

[1458]

$-\text{OR}^{c1}$ 은 약 1의 pH에서 OH이거나 또는 $-\text{OR}^{c1}$ 은 생리학적 pH에서 O^- 이고;

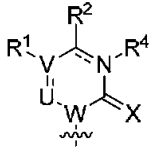
[1459]

단, 변수들 A, B, D, U, Z, Y^2 및 Y^3 을 포함하는 환은 리보스일 수 없다.

[1460]

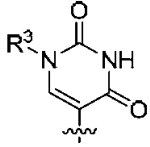
일부 실시형태에서, B는 화학식 XII-a, XII-b, 또는 XII-c의 핵염기이다:

[1461] [화학식 XII-a]



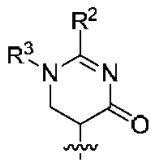
[1462]

[1463] [화학식 XII-b]



[1464]

[1465] [화학식 XII-c]



[1466]

[1467] 여기서:

[1468] 는 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고;

[1469] X는 O 또는 S이며;

[1470] U 및 W 는 각각 독립적으로 C 또는 N이고;

[1471] V는 O, S, C 또는 N이며;

[1472] 여기서, V가 C인 경우 R¹은 H, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알케닐, C₁₋₆ 알키닐, 할로, 또는 -OR^c이고, 여기서, C₁₋₂₀ 알킬, C₂₋₂₀ 알케닐, C₂₋₂₀ 알키닐은 각각, -OH, -NR^aR^b, -SH, -C(O)R^c, -C(O)OR^c, -NHC(O)R^c, 또는 -NHC(O)OR^c로 임의로 치환되고;

[1473] 여기서, V가 O, S, 또는 N인 경우 R¹은 부재하고;

[1474] R²는 H, -OR^c, -SR^c, -NR^aR^b, 또는 할로이거나;

[1475] V가 C인 경우 R¹ 및 R²는, 이들이 부착된 탄소 원자들과 함께 할로, -OH, -SH, -NR^aR^b, C₁₋₂₀ 알킬, C₂₋₂₀ 알케닐, C₂₋₂₀ 알키닐, C₁₋₂₀ 알콕시, 또는 C₁₋₂₀ 티오알킬로부터 선택되는 1 내지 4개의 치환체들로 임의로 치환된 5- 또는 6-원 환을 형성할 수 있고;

[1476] R³은 H 또는 C₁₋₂₀ 알킬이며;

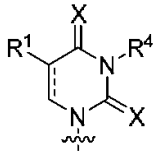
[1477] R⁴는 H 또는 C₁₋₂₀ 알킬이고; 여기서, 이 이중 결합을 나타내는 경우 R⁴는 부재하거나, N-R⁴가 함께, C₁₋₂₀ 알킬로 치환된 양으로 하전된 N을 형성하고;

[1478] R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 H, C₁₋₂₀ 알킬, C₂₋₂₀ 알케닐, C₂₋₂₀ 알키닐, 또는 C₆₋₂₀ 아릴이며;

[1479] R^c는 H, C₁₋₂₀ 알킬, C₂₋₂₀ 알케닐, 페닐, 벤질, 폴리에틸렌 글리콜 그룹, 또는 아미노-폴리에틸렌 글리콜 그룹이다.

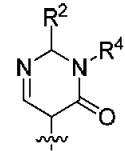
[1480] 일부 실시형태에서, B는 화학식 XII-a1, XII-a2, XII-a3, XII-a4, 또는 XII-a5의 핵염기이다:

[1481] [화학식 XII-a1]



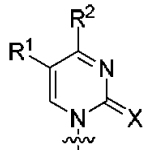
[1482]

[1483] [화학식 XII-a2]



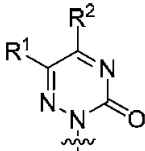
[1484]

[1485] [화학식 XII-a3]



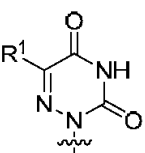
[1486]

[1487] [화학식 XII-a4]



[1488]

[1489] [화학식 XII-a5]



[1490]

[1491] 일부 실시형태에서, 당해 방법들은 아데노신, 사이토신, 구아노신, 및 우라실로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드를 추가로 포함한다.

[1492] 일부 실시형태에서, 핵염기는 피리미딘 또는 이의 유도체이다.

[1493] 일부 실시형태에서, 본 개시는

[1494] a) 목적인 억제학적 단백질을 암호화하는 상보성 데옥리보핵산(cDNA)을 제공하는 단계;

[1495] b) 주요 그루브 결합 파트너와 핵산의 결합을 방해하는 것으로 알려지고, 주요 그루브 결합 파트너에 대한 결합 친화성이 감소되어 있는 뉴클레오타이드를 선택하는 단계; 및

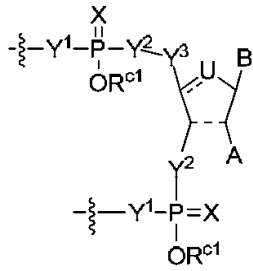
[1496] c) 제공된 cDNA와 선택된 뉴클레오타이드를 RNA 폴리머라제와 억제학적 핵산이 합성되는 조건들 하에서 접촉시키는 단계를 포함하여, 억제학적 핵산을 합성하는 방법들이 제공된다.

[1497] 추가의 실시형태에서, 억제학적 핵산은 리보핵산(RNA)이다.

[1498] 본 개시의 여전히 추가의 양상에서, 변형된 핵산들은 고체상 합성 방법들을 사용하여 제조할 수 있다.

[1499] 일부 실시형태에서, 본 개시는 하기 화학식 XI-a의 화합물을 포함하는 핵산을 합성하는 방법들을 제공하며:

[1500] [화학식 XI-a]



[1501]

[1502] [여기서:

[1503] 는 임의의 이중 결합을 나타내고;

[1504] 는 임의의 단일 결합을 나타내며;

[1505] U는, 이 단일 결합을 나타내는 경우 O, S, $-NR^a$, 또는 $-CR^aR^b$ 이거나, 또는 U는, 이 이중 결합을 나타내는 경우 $-CR^a$ -이고;

[1506] A는 H, OH, 포스포릴, 피로포스페이트, 설페이트, $-NH_2$, $-SH$, 아미노산, 2 내지 12개의 아미노산들을 포함하는 펩타이드이며;

[1507] X는 O 또는 S이고;

[1508] 각각의 Y^1 는 $-OR^{a1}$, $-NR^{a1}R^{b1}$, 및 $-SR^{a1}$ 중에서 독립적으로 선택되고;

[1509] 각각의 Y^2 및 Y^3 은 O, $-CR^aR^b$, NR^c , S, 또는 C, O, N 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 원자들을 포함하는 링커 중에서 독립적으로 선택되며;

[1510] R^a 및 R^b 는 각각 독립적으로 H, C_{1-12} 알킬, C_{2-12} 알케닐, C_{2-12} 알키닐, 또는 C_{6-20} 아릴이고;

[1511] R^c 는 H, C_{1-12} 알킬, C_{2-12} 알케닐, 페닐, 벤질, 폴리에틸렌 글리콜 그룹, 또는 아미노-폴리에틸렌 글리콜 그룹이며;

[1512] R^{a1} 및 R^{b1} 는 각각 독립적으로 H 또는 반대이온이고;

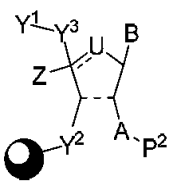
[1513] $-OR^{c1}$ 은 약 1의 pH에서 OH이거나 또는 $-OR^{c1}$ 은 생리학적 pH에서 O^- 이고;

[1514] B는 핵염기이며;

[1515] 단, 변수들 A, B, U, Z, Y^2 및 Y^3 을 포함하는 환은 리보스일 수 없다]; 당해 방법은:

[1516] a) 화학식 XIII-a의 뉴클레오타이드:

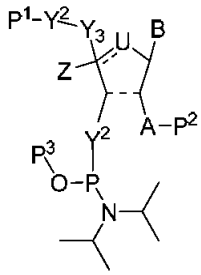
[1517] [화학식 XIII-a]




[1518]

[1519] 를 화학식 XIII-b의 포스포르아미디트 화합물:

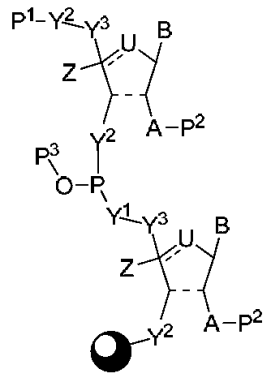
[1520] [화학식 XIII-b]



[1521]

[1522] (여기서:  는 고체 지지체를 나타내고; P¹, P² 및 P³ 는 각각 독립적으로 적합한 보호 그룹들을 나타낸다) 과 반응시켜 화학식 XIV-a:

[1523] [화학식 XIV-a]

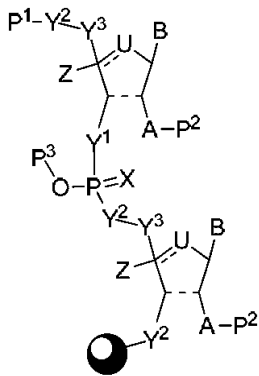


[1524]

[1525] 의 핵산을 제공하는 단계;

[1526] b) 화학식 XIV-a의 핵산을 산화시키거나 황화시켜 화학식 XIVb:

[1527] [화학식 XIV-b]



[1528]

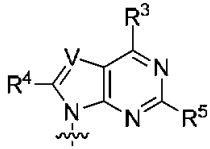
[1529] 의 핵산을 수득하는 단계; 및

[1530] c) 보호 그룹들을 제거하여 화학식 XI-a의 핵산을 수득하는 단계를 포함한다.

[1531] 일부 실시형태에서, 당해 방법은 아데노신, 사이토신, 구아노신, 및 우라실로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드를 추가로 포함한다.

[1532] 일부 실시형태에서, B는 화학식 XIII의 핵염기이다:

[1533] [화학식 XIII]



[1534]

[1535] 여기서:

[1536] V는 N 또는 양으로 하진된 NR^c이고;

[1537] R³은 NR^cR^d, -OR^a, 또는 -SR^a이며;

[1538] R⁴는 H이거나 Y³과 임의로 결합을 형성할 수 있고;

[1539] R⁵는 H, -NR^cR^d, 또는 -OR^a이며;

[1540] R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 H, C₁₋₁₂ 알킬, C₂₋₁₂ 알케닐, C₂₋₁₂ 알키닐, 또는 C₆₋₂₀ 아릴이고;

[1541] R^c는 H, C₁₋₁₂ 알킬, C₂₋₁₂ 알케닐, 페닐, 벤질, 폴리에틸렌 글리콜 그룹, 또는 아미노-폴리에틸렌 글리콜 그룹이다.

[1542] 일부 실시형태에서, 단계들 a) 및 b)는 1 내지 약 10,000회 반복된다.

[1543] **변형된 핵산들의 용도들**

[1544] *치료학적 제제들*

[1545] 본원에 기술된 변형된 핵산들은 치료학적 제제들로 사용될 수 있다. 예를 들면, 본원에 기술된 변형된 핵산은 동물 또는 피검자에게 투여될 수 있으며, 여기서, 변형된 핵산은 생체내에서 번역되어 동물 또는 피검자내에서 치료학적 펩타이드를 생산한다. 따라서, 사람들 및 다른 동물들에서의 질병 또는 상태들을 치료하거나 예방하기 위한 조성물들, 방법들, 키트들, 및 시약들이 본원에 제공된다. 본 개시의 활성 치료학적 제제들은 변형된 핵산들, 변형된 핵산들 또는 변형된 핵산들로부터 번역된 폴리펩타이드들을 함유하는 세포들, 변형된 핵산들로부터 번역된 폴리펩타이드들, 변형된 핵산들 또는 변형된 핵산들로부터 번역된 폴리펩타이드들과 접촉된 세포들, 변형된 핵산들을 함유하는 세포들을 함유하는 조직들 및 변형된 핵산들을 함유하는 세포들을 함유하는 조직들을 함유하는 기관들을 포함한다.

[1546] 합성 또는 재조합체 폴리뉴클레오타이드의 번역을 유도함으로써 본원에 기술된 변형된 핵산들을 사용하여 세포 집단 속에서 폴리펩타이드를 생산하는 방법들이 제공된다. 이러한 번역은 생체내, 생체외, 배양물 속, 또는 시험관내의 것일 수 있다. 세포 집단은 적어도 하나의 뉴클레오사이드 변형, 및 폴리펩타이드를 암호화하는 번역 가능한 영역을 갖는 핵산을 함유하는 조성물의 유효량과 접촉된다. 당해 집단은, 핵산이 세포 집단의 하나 이상의 세포들내로 국제화되고 재조합체 폴리펩타이드가 핵산으로부터 세포내로 번역되도록 하는 조건들하에서 접촉된다.

[1547] 유효량의 조성물은 적어도 부분적으로, 표적 조직, 표적 세포 유형, 투여 수단, 핵산의 생리학적 특성들(예를 들면, 변형된 뉴클레오사이드들의 크기, 및 정도), 및 다른 결정인자들을 기본으로 하여 제공된다. 일반적으로, 유효량의 조성물은 세포내에서 효율적인 단백질 생산을 제공하며, 바람직하게는 상응하는 변형되지 않은 핵산을 함유하는 조성물보다 더 효율적이다. 증가된 효능은 증가된 세포 형질감염(즉, 핵산으로 형질감염된 세포들의 퍼센트), 핵산으로부터의 증가된 단백질 번역, 감소된 핵산 분해(예를 들면, 변형된 핵산으로부터 단백질 번역의 증가된 지속에 의해 입증됨), 또는 숙주 세포의 감소된 선천성 면역 반응 또는 개선된 치료학적 활용에 의해 입증될 수 있다.

[1548] 본 개시의 양상들은 이를 필요로 하는 포유동물 대상체내에서 재조합체 폴리펩타이드의 생체내 번역을 유도하는 방법들에 관한 것이다. 여기서, 적어도 하나의 뉴클레오사이드 변형 및 폴리펩타이드를 암호화하는 번역 가능한 영역을 갖는 핵산을 함유하는 유효량의 조성물은 본원에 기술된 전달 방법들을 사용하여 대상체에게 투여된다. 핵산은, 당해 핵산이 대상체의 세포 또는 세포들내로 국제화되고 재조합체 폴리펩타이드가 핵산으로부터 세포내

에서 번역되는 다른 조건들하에서 및 양으로 제공된다. 핵산이 국제화되는 세포, 또는 세포가 존재하는 조직은 핵산 투여의 1회 또는 1회 이상의 라운드들로 표적화될 수 있다.

[1549] 본 개시의 다른 양상들은 포유동물 대상체에게 변형된 핵산들을 함유하는 세포들의 이식(transplantation)시키는 것에 관한 것이다. 포유동물 대상체에게 세포들을 투여하는 것은, 약제학적으로 허용되는 담체 속에 세포들의 제형이 존재하므로, 국소 이식(local implantation)(예를 들면, 국소 또는 피하 투여), 기관 전달 또는 전신계 주사(예를 들면, 정맥내 주사 또는 흡입)과 같이, 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 변형된 핵산들을 함유하는 조성물들은 근육내, 경동맥으로, 복강내로, 정맥내로, 비강내로, 피하로, 내시경적으로(endoscopically), 경피로, 또는 척수내로 투여하기 위해 제형화된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 연장된 방출을 위해 제형화된다.

[1550] 치료학적 제제가 투여되는 대상체는 질병, 질환, 또는 위험항 상태로 고생하거나 진행될 위험이 있다. 임상적 진단, 생물마커 수준들, 전장유전체 연관 연구(genome-wide association studies: GWAS), 및 당해 분야에 공지된 다른 방법들을 포함할 수 있는, 이들 염기들에 있어서 대상체들을 확인하고, 진단하며, 분류하는 방법들이 제공된다.

[1551] 특정 실시형태에서, 투여된 변형된 핵산은, 재조합체 폴리펩타이드가 번역되는 세포내에 실질적으로 부재하는 기능적 활성을 제공하는 하나 이상의 재조합체 폴리펩타이드들의 생산을 지시한다. 예를 들면, 기능적 활성을 상실하는 것은 특성상 효소적, 구조적 또는 유전자 조절성일 수 있다.

[1552] 기타 실시형태에서, 투여된 변형된 핵산은, 재조합체 폴리펩타이드가 번역되는 세포내에 실질적으로 부재하는 폴리펩타이드(또는 다수의 폴리펩타이드)를 대체하는 하나 이상의 재조합체 폴리펩타이드들의 생산을 지시한다. 이러한 부재는 암호화 유전자 또는 이의 조절 경로의 유전적 돌연변이에 기인할 수 있다. 다른 실시형태에서, 투여된 변형된 핵산은, 재조합체 폴리펩타이드가 번역되는 세포내에 존재하는 폴리펩타이드(또는 다수의 폴리펩타이드들)의 양을 보충하기 위한 하나 이상의 재조합체 폴리펩타이드들의 생산을 지시한다. 달리, 재조합체 폴리펩타이드는 세포내에, 세포의 표면 상에 존재하거나, 또는 세포로부터 분비된 내인성 단백질의 활성을 길항하기 위해 기능한다. 일반적으로, 내인성 단백질의 활성은 예를 들면, 변경된 활성 또는 국제화를 생성하는 내인성 단백질의 돌연변이로 인하여, 대상체에 대해 유해하다. 추가로, 재조합체 폴리펩타이드는 세포내에, 세포의 표면에 존재하거나, 또는 세포로부터 분비된 생물학적 잔기의 활성을 직접 또는 간접적으로 길항한다. 길항된 생물학적 잔기들의 예들은 지질들(예를 들면, 콜레스테롤), 지단백질(예를 들면, 저 밀도 지단백질), 핵산, 탄수화물, 또는 소 분자 독소를 포함한다.

[1553] 본원에 기술된 재조합체 단백질들은 세포, 잠재적으로는 핵과 같은 특수한 구획 속에 국제화시키기 위해 가공되거나, 세포로부터의 분비 또는 세포의 혈장막으로의 전좌를 위해 가공된다.

[1554] 본원에 기술된 바와 같이, 본 개시의 변형된 핵산들의 유용한 특징은 외인성 핵산에 대한 세포의 선천성 면역 반응을 감소시키거나, 기피하거나, 모면하거나 제거하는 능력이다. 세포 또는 세포들의 집단에서 면역 반응의 적정, 감소 또는 제거를 수행하는 방법들이 제공된다. 일부 실시형태에서, 세포는 번역 영역 및 적어도 하나의 뉴클레오사이드 변형을 포함하는 제1의 외인성 핵산의 제1 용량을 함유하는 제1의 조성물과 접촉되며, 제1의 외인성 핵산에 대한 세포의 선천성 면역 반응의 수준이 측정된다. 후속적으로, 세포는, 제1의 용량과 비교하여 제1의 외인성 핵산의 보다 적은 양을 함유하는 제2의 용량의 제1의 외인성 핵산을 포함하는 제2의 조성물과 접촉된다. 달리, 세포는 제2의 외인성 핵산의 제1의 용량과 접촉된다. 제2의 외인성 핵산은, 제1의 외인성 핵산과 동일하거나 상이할 수 있는 하나 이상의 변형된 뉴클레오사이드들을 함유할 수 있거나, 달리, 제2의 외인성 핵산은 변형된 뉴클레오사이드들을 함유하지 않을 수 있다. 세포를 제1의 조성물 및/또는 제2의 조성물과 접촉시키는 단계들은 1회 이상 반복될 수 있다. 추가로, 세포속에서 단백질 생산(예를 들면, 단백질 번역)의 효능은 임의로 측정되며, 세포는, 표적 단백질 생산 효능이 달성될 때까지 반복적으로 제1의 및/또는 제2의 조성물로 재-형질감염될 수 있다.

[1555] *질병 및 상태들의 치료*

[1556] 비정상적인 단백질 활성을 손실시킴으로써, 손실된 단백질 활성을 대체시킴으로써 또는 비정상적인 단백질 활성을 극복함으로써 특징화된 질병들의 증상을 치료하거나 예방하는 방법들이 제공된다. 바이러스 DNA 백터들과 비교한 것으로서, 변형된 mRNA들의 도입 후 단백질 생산의 신속한 개시로 인하여, 본 개시의 화합물들은 패혈증, 뇌졸중, 및 심근경색과 같은 급성 질병들을 치료하는 데 있어서 특히 유리하다. 더욱이, 본 개시의 변형된 mRNA들의 전사적 조절의 기여는, 단백질 생산의 정밀한 적정이 달성된다는 점에서 유리하다. 다수의 질병

들은 단백질 활성을 손실하는 것(또는 실질적으로 약해짐으로써 적절한 단백질 기능이 일어나지 않는 것)을 특징으로 한다. 이러한 단백질들은 존재하지 않을 수 있거나, 매우 적은 양들로 존재하거나 필수적으로 비-기능성이다. 본 개시는, 본원에 제공된 핵산, 또는 변형된 핵산들을 함유하는 세포-계 치료제들을 도입함으로써 대상체에서 이러한 상태들 또는 질병들을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서, 변형된 핵산들은 대상체의 표적 세포들로부터 손실된 단백질 활성을 대체하는 단백질을 암호화한다.

[1557] 기능이상 또는 비정상적인 단백질 활성으로 특징화되는 질병들은 암 및 증식성 질병들, 유전적 질병들(예를 들면, 낭성 섬유증), 자가면역병들, 당뇨병들, 신경변성병들, 심혈관 질병들, 및 대사 질병들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 개시는 본원에 제공된 핵산, 또는 변형된 핵산들을 함유하는 세포-계 치료제들을 도입함으로써 대상체내에서 이러한 상태들 또는 질병들을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서, 변형된 핵산들은 대상체의 세포속에 존재하는 비정상적인 단백질을 길항하거나 달리는 극복하는 단백질을 암호화한다.

[1558] 기능장애 단백질의 구체적인 예들은 낭성 섬유증을 유발하는, CFTR 단백질의 각각 기능이상 또는 비기능성 단백질 변이체를 생산하는, 낭성 섬유증 막관통 전도 조절인자(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: CFTR)의 미스센스(missense) 또는 넌센스(nonsense) 돌연변이 변이체들이다.

[1559] 따라서, 대상체의 세포와, 기능적 CFTR 폴리펩타이드를 암호화하는 번역가능한 영역을 갖는 변형된 핵산을, CFTR 폴리펩타이드의 유효량이 세포속에 존재하도록 하는 조건들하에 접촉시킴으로써 포유 대상체내에서 낭성 섬유증을 치료하는 방법들이 제공된다. 바람직한 표적 세포들은 상피 세포들, 예를 들면, 폐이며, 투여 방법들은 표적 조직, 즉, 폐 전달의 측면에서 결정되고, RNA 분자들은 흡입에 의한 투여를 위해 제형화된다.

[1560] 다른 실시형태에서, 본 개시는 대상체의 세포 집단내로 게놈 연구들에 의해 최근에 특성화된 단백질인, 소르틸린을 암호화함으로써 대상체내에서 과지질혈증을 완화시키는 변형된 mRNA 분자를 도입시킴으로써, 대상체에서 고지질혈증을 치료하는 방법들을 제공한다. 당해 *SORT1* 유전자는 소르틸린이라고 명명된 트랜스-골지 네트워크(trans-Golgi network: TGN) 막관통 단백질을 암호화한다. 유전 연구들은, 5명의 개인들 중 한명이 이들을 낮은 수준들의 저-밀도 지단백질(LDL) 및 초-저-밀도 지단백질(VLDL)을 갖도록 하는 *SORT1* 유전자의 1p13 유전자 자리(locus)내에서 단일의 뉴클레오타이드 다형성, rs12740374를 가짐을 밝혔다. 사람들 중 약 30%에서 존재하는, 마이너 대립형질(minor allele)의 각각의 카피는 LDL 콜레스테롤을 8 mg/dL까지 변경시키는 반면, 집단의 약 5%로 존재하는 마이너 대립형질의 2개의 카피들은 LDL 콜레스테롤을 16 mg/dL로 저하시킨다. 마이너 대립형질의 담체들은 또한 심근경색의 약 40% 감소된 위험을 갖는 것으로 밝혀졌다. 마우스들에서 기능적 생체내 연구들은, 마우스 간 조직내에서 *SORT1*의 과발현이 유의적으로 보다 낮은, 즉, 80% 만큼 더 낮은 LDL-콜레스테롤 수준들을 가져왔으며, 사일런싱(silencing) *SORT1*은 LDL 콜레스테롤을 대략 200% 증가시켰음을 기술한다(참조: Musunuru K et al. From noncoding variant to phenotype via *SORT1* at the 1p13 cholesterol locus. *Nature* 2010; 466: 714-721).

[1561] 세포 핵산 전달의 방법들

[1562] 본 개시의 방법들은 생체내, 생체외, 또는 배양물 속에서 세포 집단내로 핵산 전달을 향상시킨다. 예를 들면, 다수의 숙주 세포들(예를 들면, 효모 및 포유동물 세포들과 같은 진핵 세포들)을 함유하는 세포 배양물을 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변형, 및 임의로, 번역가능한 영역을 갖는 향상된 핵산을 함유하는 조성물과 접촉시킨다. 당해 조성물은 또한 숙주 세포들내로 향상된 핵산 흡수의 효능을 증가시키는 형질감염 시약 또는 다른 화합물을 일반적으로 함유한다. 향상된 핵산은 상응하는 변형되지 않은 핵산에 비해, 세포 집단내에서 향상된 보유를 나타낸다. 향상된 핵산의 보유는 변형되지 않은 핵산의 보유보다 더 크다. 일부 실시형태에서, 이는 변형되지 않은 핵산의 보유보다 적어도 약 50%, 75%, 90%, 95%, 100%, 150%, 200% 또는 200% 이상이다. 이러한 보유 이점은 향상된 핵산을 사용한 1회 라운드의 형질감염으로 달성될 수 있거나, 형질감염의 반복된 라운드들 후 획득될 수 있다.

[1563] 일부 실시형태에서, 향상된 핵산은 하나 이상의 추가의 핵산들을 갖는 표적 세포 집단내에 전달된다. 이러한 전달은 동시에 이루어질 수 있거나, 향상된 핵산은 하나 이상의 추가의 핵산들의 전달 전에 전달된다. 추가의 하나 이상의 핵산들은 변형된 핵산들 또는 변형되지 않는 핵산들일 수 있다. 향상된 핵산들의 초기의 존재는 세포 집단의 선천성 면역 반응을 실질적으로 유도하지 않으며, 더욱이, 선천성 면역 반응은 변형되지 않은 핵산들의 이후 존재에 의해 활성화되지 않을 것임이 이해된다. 이와 관련하여, 표적 세포 집단 속에 존재하는 것이 바람직한 단백질이 변형되지 않은 핵산들로부터 번역되는 경우, 향상된 핵산은 자체로 번역가능한 영역을 함유하지 않을 수 있다.

[1564] 표적화 잔기들

[1565] 본 개시의 실시형태에서, 변형된 핵산들은 구체적인 조직 공간에 대해 세포를 표적화시키기 위해 또는 생체내 또는 시험관내에서 특이적인 잔기와 상호작용하기 위해 기능하는, 세포의 표면 위에 단백질-결합 파트너 또는 수용체를 발현하기 위해 제공된다. 적합한 단백질-결합 파트너들은 항체들 및 이의 기능성 단편들, 스캐폴드 단백질들, 또는 펩타이드들을 포함한다. 추가로, 변형된 핵산들을 사용하여 지질들, 탄수화물들, 또는 다른 생물학적 잔기들의 합성 및 세포의 국제화를 지시할 수 있다.

[1566] 영구적인 유전자 발현 사일런싱(Silencing)

[1567] 포유동물 대상체내에서 유전자 발현을 후성적으로 사일런싱시키는 방법은, 번역가능한 영역이 서열-특이적인 히스톤 H3 메틸화를 지시하여 헤테로크로마틴 형성을 개시하고 유전자를 사일런싱할 목적으로 구체적인 유전자들 주변에 유전자 전사를 감소시킬 수 있는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들을 암호화하는 핵산을 포함한다. 예를 들면, 자누스 키나제(Janus Kinase) 2 유전자내 기능 획득(gain-of-function) 돌연변이는 골수증식 질환들의 계열에 관여한다.

[1568] 검출가능한 제제 또는 치료학적 제제의 생물학적 표적으로의 전달

[1569] 본원에 기술된 변형된 뉴클레오사이드, 변형된 뉴클레오타이드, 및 변형된 핵산은, 생물학적 표적으로의 물질 ("페이로드")의 전달, 예를 들면, 표적의 검출을 위한 검출가능한 물질들의 전달, 또는 치료학적 제제의 전달이 바람직한 다수의 상이한 시나리오들에서 사용될 수 있다. 검출 방법들은 시험관내 및 생체내 영상 방법들 둘다의 영상, 예를 들면, 면역조직화학, 생물방광 영상(BLI), 자기 공명 영상(MRI), 양전자 방사 단층촬영(PET), 전자 현미경, X-선 컴퓨터처리된 단층촬영(X-ray computed tomography), 라만 영상, 공간섭 단층촬영(optical coherence tomography), 흡수 영상, 열 영상, 형광 반사 영상, 형광 현미경, 형광성 분자 단층촬영 영상 (fluorescence molecular tomographic imaging), 핵 자기 공명 영상, X-선 영상, 초음파 영상, 광음향 영상, 실험실 검정들(lab assays), 또는 태그화(tagging)/염색/영상이 요구되는 어떠한 상황도 포함한다.

[1570] 예를 들면, 본원에 기술된 변형된 뉴클레오사이드, 변형된 뉴클레오타이드, 및 변형된 핵산은 유도된 다능성 줄기 세포들(iPS 세포들)을 재프로그램하는데 사용될수 있으며, 당해 줄기 세포들은 이후 사용되어 집단내에서 전체 세포들과 비교하여 형질감염된 세포들을 직접 추적할 수 있다. 다른 예에서, 링커를 통해 변형된 핵산에 부착되고 형광적으로 표지된 약물을 사용하여 약물을 생체내에서, 예를 들면, 세포내적으로 추적할 수 있다. 다른 예들은 세포들내로의 가역성 약물 전달에 있어 변형된 핵산의 사용을 포함한다.

[1571] 본원에 기술된 변형된 뉴클레오사이드, 변형된 뉴클레오타이드, 및 변형된 핵산은 페이로드, 예를 들면, 검출가능한 제제 또는 치료학적 제제들을 구체적인 세포기관으로 세포내 표적화하는데 사용될 수 있다. 예시적인 세포내 표적들은 억제제를 포함하는 mRNA에 연결된 핵 국제화 서열(NLS), 또는 진진된 mRNA 프로세싱을 위한 핵 국제화를 포함할 수 있다.

[1572] 또한, 본원에 기재된 변형된 뉴클레오사이드, 변형된 뉴클레오타이드, 및 변형된 핵산을 사용하여 치료학적 제제들을 세포들 또는 조직들로, 예를 들면, 살아있는 동물들에서 전달할 수 있다. 예를 들면, 본원에 기술된 변형된 뉴클레오사이드, 변형된 뉴클레오타이드, 및 변형된 핵산을 사용하여 고도로 극성인 화학치료학적 제제들을 전달하여 암 세포들을 사멸할 수 있다. 링커를 통해 치료학적 제제들에 부착된 변형된 핵산들은 구성원 침투를 촉진시켜 치료학적 제제가 세포내로 이동하도록 함으로써 세포내 표적에 도달하도록 할 수 있다.

[1573] 다른 예에서, 변형된 뉴클레오사이드, 변형된 뉴클레오타이드, 및 변형된 핵산을 절단가능한 링커를 통해 바이러스 억제성 펩타이드(VIP)에 부착시킬 수 있다. 절단가능한 링커는 VIP 및 염료를 세포내로 방출할 것이다. 다른 예에서, 변형된 뉴클레오사이드, 변형된 뉴클레오타이드, 및 변형된 핵산은 링커를 통해 콜레라 독소, 디프테리아 독소, 및 백일해 독소와 같은 일부 세균 독소들의 작용들에 관여하는 ADP-리보실레이트에 부착시킬 수 있다. 이들 독소 단백질들은 사람 세포들 속에서 표적 단백질들을 변형시키는 ADP-리보실트랜스퍼라제들이다. 예를 들면, 콜레라 독소는 G 단백질을 ADP-리보실화시켜 소장의 내층(lining)으로부터 거대한 유액 분비를 유발하여 생명을 위협하는 설사를 일으킨다.

[1574] **약제학적 조성물들**

[1575] 본 개시는, 변형된 mRNA들로부터 생성된 단백질들을 제공한다. 약제학적 조성물들은 하나 이상의 추가의 치료학적으로 활성인 물질들을 임의로 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에 따라서, 이를 필요로 하는 대상체에게 전달될 하나 이상의 단백질들을 암호화하는 변형된 핵산들을 포함하는 약제학적 조성물들을 투여하는 방법이 제

공된다. 일부 실시형태에서, 조성물들은 사람들에게 투여된다. 본 개시의 목적을 위해, 어구 "활성 성분"은 일반적으로 본원에 기술된 바와 같은 단백질, 단백질 암호화 또는 단백질-함유 복합체를 말한다.

- [1576] 본원에 제공된 약제학적 조성물들의 기술들이 원칙적으로 사람들에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물들에 관한 것이라고 해도, 당해 분야의 숙련가는, 이러한 조성물들이 일반적으로 모든 종류의 동물들에게 투여하기 적합함을 이해할 것이다. 조성물들이 다양한 동물들에 투여하기에 적합하도록 하기 위해서 사람들에게 투여하기 적합한 약제학적 조성물들을 변형시키는 것은 잘 이해되며, 통상의 숙련된 기술을 가진 가축 약리학자는 단지 통상의, 경우에 따라, 실험을 설계하고/하거나 수행할 수 있다. 약제학적 조성물들의 투여가 고려되는 대상체들은 사람 및/또는 다른 영장류들; 소, 돼지들, 말들, 양, 고양이들, 개들, 마우스들, 및/또는 랫트들과 같은 시판되는 관련 포유동물들; 및/또는 닭들, 오리들, 거위들 및/또는 칠면조들과 같은 시판되는 관련 조류들을 포함하는 조류들을 포함하는 포유동물들을 포함하나, 이에 한정되지 않는 것으로 고려된다.
- [1577] 본원에 기술된 약제학적 조성물들의 제형들은 약리학 분야에서 공지되거나 이후 개발된 어떠한 방법에 의해서도 제조할 수 있다. 일반적으로, 이러한 제조 방법들은 활성 성분을 부형제 및/또는 하나 이상의 다른 보조 성분들과 연합시키는 단계, 및 이후에, 필요할 경우 및/또는 바람직할 경우, 생성물을 바람직한 단일- 또는 다중-용량 단위로 성형(shaping)하고/하거나 포장하는 단계를 포함한다.
- [1578] 본 개시에 따르는 약제학적 조성물은 단일 단위 용량으로서, 및/또는 다수의 단위 단위 용량들로서 벌크(bulk)로 제조되고/되거나, 포장되고/되거나 시판될 수 있다. 본원에 사용된 것으로서, "단위 용량"은 소정의 양의 활성 성분을 포함하는 약제학적 조성물의 별개의 양이다. 활성 성분의 양은 일반적으로 대상체에게 투여될 수 있는 활성 성분의 용량과 동일하고/하거나 예를 들면, 이러한 용량의 1/2 또는 1/3과 같이, 이러한 용량의 편리한 분획이다.
- [1579] 본 개시에 따른 약제학적 조성물 중의 활성 성분, 약제학적으로 허용되는 부형제, 및/또는 어떠한 추가의 성분들의 상대적인 양들은 치료된 대상체의 실체, 크기 및/또는 상태에 따라서 및 추가로 당해 조성물이 투여되는 경로에 따라서 변할 것이다.
- [1580] 약제학적 제형들은 본원에 사용된 것으로서 바람직한 특정 용량형에 적합한 것으로서, 어떠한 및 모든 용매들, 분산 매질들, 희석제들, 또는 다른 액체 비히클들, 분산제들, 현탁 보조제들, 표면 활성제들, 등장성 제제들, 증점제들, 유화제들, 방부제들, 고체 결합제들, 율활제들 등을 포함한다. 문헌[참조: Remington's *The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition, A. R. Gennaro(Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; 본원에 참조로 혼입됨]은 약제학적 조성물들을 제형화하는데 사용되고 이의 제조를 위한 공지된 기술들에서 사용된 각종 부형제들을 기재하고 있다. 어떠한 통상의 부형제 매질이 어떠한 바람직하지 않은 생물학적 효과를 생산하거나 또는 달리는 약제학적 조성물의 어떠한 다른 성분(들)과 유해한 방식으로 상호작용함에 의한 것과 같이, 물질 또는 이의 유도체와 비혼화성인 것을 제외하고는, 이의 용도는 본 개시의 범위 내에 있는 것으로 고려된다.
- [1581] 일부 실시형태에서, 약제학적으로 허용되는 부형제는 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 순수하다. 일부 실시형태에서, 부형제는 사람용으로 및 수의학용으로 승인되어 있다. 일부 실시형태에서, 부형제는 미국 식품의약국(United States Food and Drug Administration)에 의해 승인되어 있다. 일부 실시형태에서, 부형제는 약제학적 등급이다. 일부 실시형태에서, 부형제는 미국 약전(USP), 유럽 약전(EP), 영국 약전, 및/또는 국제 약전의 표준들을 충족한다.
- [1582] 약제학적 조성물들의 제조 시 사용된 약제학적으로 허용되는 부형제들은 불활성 희석제들, 분산 및/또는 과립화제들, 표면 활성제들 및/또는 유화제들, 봉해제들, 결합제들, 방부제들, 완충제들, 율활제들, 및/또는 오일들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 부형제들은 약제학적 제형들 속에 임의로 포함될 수 있다. 코코아 버터 및 좌제 왁스들과 같은 부형제들, 착색제들, 피복제들, 감미제들, 풍미제들 및/또는 향미제들은 제형업자들의 판단에 따라서, 조성물 속에 존재할 수 있다.
- [1583] 예시적인 희석제들은 탄산칼슘, 탄산나트륨, 인산칼슘, 인산이칼슘, 황산칼슘, 인산수소칼슘, 인산나트륨 락토즈, 슈크로즈, 셀룰로즈, 미세결정성 셀룰로즈, 카올린, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 염화나트륨, 무수 전분, 옥수수 전분, 분말화된 당 등, 및/또는 이들의 조합들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [1584] 예시적인 과립화제 및/또는 분산제들은 감자 전분, 옥수수 전분, 타피오카 전분, 나트륨 전분 글리콜레이트, 점토들, 알긴산, 구아 검, 감귤 펄프(citrus pulp), 한천, 벤토나이트, 셀룰로즈 및 나무 제품들, 천연 스폰지, 양이온-교환 수지들, 탄산칼슘, 실리카이트들, 탄산나트륨, 가교결합된 폴리(비닐-피롤리돈)(크로스포비돈), 나

트륨 카복시메틸 전분(나트륨 전분 글리콜레이트), 카복시메틸 셀룰로즈, 가교결합된 나트륨 카복시메틸 셀룰로즈(크로스카멜로즈), 메틸셀룰로즈, 예비젤라틴화된 전분(전분 1500), 미세결정성 전분, 수 불용성 전분, 칼슘 카복시메틸 셀룰로즈, 마그네슘 알루미늄 실리케이트[비굵(Veeg μM)], 나트륨 라우릴 설페이트, 4급 암모늄 화합물들 등, 및/또는 이들의 조합들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[1585] 예시적인 표면 활성제들 및/또는 유화제들은 천연 유화제들(예를 들면, 아카시아, 한천, 알긴산, 알긴산나트륨, 트라가칸트, 콘드릭스(chondrux), 콜레스테롤, 크산탄, 펙틴, 젤라틴, 난황, 카제인, 모 지방, 콜레스테롤, 왁스, 및 레시틴), 콜로이드 점도들(예를 들면, 벤토나이트[알루미늄 실리케이트] 및 Veeg μM[®][마그네슘 알루미늄 실리케이트]), 장쇄 아미노산 유도체들, 고분자량 알코올들(예를 들면, 스테아릴 알코올, 세틸 알코올, 올레일 알코올, 트리아세틴 모노스테아레이트, 에틸렌 글리콜 디스테아레이트, 글리세릴 모노스테아레이트, 및 프로필렌 글리콜 모노스테아레이트, 폴리비닐 알코올), 카보머들(예를 들면, 카복시 폴리메틸렌, 폴리아크릴산, 아크릴산 중합체, 및 카복시비닐 중합체), 카라기난, 셀룰로즈성 유도체들(예를 들면, 카복시메틸셀룰로즈 나트륨, 분말화된 셀룰로즈, 하이드록시메틸 셀룰로즈, 하이드록시프로필 셀룰로즈, 하이드록시프로필 메틸셀룰로즈, 메틸셀룰로즈), 소르비탄 지방산 에스테르들(예를 들면, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트[Tween[®]20], 폴리옥시에틸렌 소르비탄 [Tween[®]60], 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트[Tween[®]80], 소르비탄 모노팔미테이트[Span[®]40], 소르비탄 모노스테아레이트[Span[®]60], 소르비탄 트리스테아레이트[Span[®]65], 글리세릴 모노올레이트, 소르비탄 모노올레이트[Span[®]80]), 폴리옥시에틸렌 에스테르들(예를 들면, 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트 [Myrj[®]45], 폴리옥시에틸렌 수소화된 피마자 오일, 폴리에톡실화된 피마자 오일, 폴리옥시메틸렌 스테아레이트, 및 Solutol[®]), 슈크로즈 지방산 에스테르들, 폴리에틸렌 글리콜 지방산 에스테르들(예를 들면, Cremophor[®], 폴리옥시에틸렌 에테르들, (예를 들면, 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르[Brij[®]30]), 폴리(비닐-피롤리돈), 디에틸렌 글리콜 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트, 나트륨 올레이트, 칼륨 올레이트, 에틸 올레이트, 올레산, 에틸 라우레이트, 나트륨 라우릴 설페이트, Pluronic[®] F 68, Poloxamer[®] 188, 브롬화세 트리모늄, 염화세틸피리디늄, 염화벤즈알코늄, 도쿠세이트 나트륨 등 및/또는 이들의 조합들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[1586] 예시적인 결합제들은 전분(예를 들면, 옥수수 전분 및 전분 페이스트; 젤라틴; 당들(예를 들면, 슈크로즈, 글루코즈, 텍스트로즈, 텍스트린, 몰라세스, 락토즈, 락티톨, 만니톨); 천연 및 합성 검들(예를 들면, 아카시아, 알긴산나트륨, 아일랜드 이끼(Irish moss)의 추출물, 판와 검(panwar gum), 가티 검(ghatti gum), 이사폴 후스크들(isapol husks)의 점액, 카복시메틸셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 에틸셀룰로즈, 하이드록시에틸셀룰로즈, 하이드록시프로필 셀룰로즈, 하이드록시프로필 메틸셀룰로즈, 미세결정성 셀룰로즈, 셀룰로즈 아세테이트, 폴리(비닐-피롤리돈), 알긴산마그네슘 실리케이트(Veeg μM[®]), 및 라크 아라보갈락탄; 알기네이트들; 폴리에틸렌 옥사이드; 폴리에틸렌 글리콜; 무기 칼슘 염들; 규산; 폴리메타크릴레이트들; 왁스들; 물; 알코올; 등; 및 이의 조합들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[1587] 예시적인 방부제들은 항산화제들, 킬레이팅제들, 항미생물 방부제들, 항진균 방부제들, 알코올 방부제들, 산성 방부제들, 및/또는 다른 방부제들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 항산화제들은 알파 토크페롤, 아스코르브산, 아코르빌 팔미테이트, 부틸화된 하이드록시아니솔, 부틸화된 하이드록시톨루엔, 모노티오글리세롤, 칼륨 메타비스설파이트, 프로피온산, 프로필 갈레이트, 아스코르브산나트륨, 아황산수소나트륨, 나트륨 메타비스설파이트, 및/또는 아황나트륨을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 킬레이트제들은 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 시트르산 일수화물, 이나트륨 에테데이트, 이칼륨 에테데이트, 에테트산, 푸마르산, 말산, 인산, 나트륨 에테데이트, 타르타르산, 및/또는 삼나트륨 에테데이트를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 항미생물 방부제들은 벤즈알코늄 클로라이드, 벤조늄 클로라이드, 벤질 알코올, 브로노폴, 세트리마이드, 세틸피리듐 클로라이드, 클로르헥시딘, 클로부탄올, 클로로크레졸, 클로로크실레놀, 크레졸, 에틸 알코올, 글리세린, 헥세티딘, 이미두레아, 페놀, 페녹시에탄올, 페닐에틸 알코올, 페닐머큐릭 니트레이트, 프로필렌 글리콜, 및/또는 티메로살을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 항진균 방부제들은 부틸 파라벤, 메틸 파라벤, 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 벤조산, 하이드록시벤조산, 칼륨 벤조에이트, 칼륨 소르베이트, 나트륨 벤조에이트, 나트륨 프로피오네이트, 및/또는 소르브산을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 알코올 방부제들은 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 페놀, 페놀성 화합물들, 비스페놀, 클로로부탄올, 하이드록시벤조에이트, 및/또는 페닐에틸 알코올을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 산성 방부제들은 비타민 A, 비

타민 C, 비타민 E, 베타-카로틴, 시트르산, 아세트산, 데하이드로아세트산, 아스코르브산, 소르브산, 및/또는 파이트산을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 다른 방부제들은 토코페롤, 토코페롤 아세테이트, 데테록심 메실레이트, 세트리마이드, 부틸화된 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화된 하이드록시톨루엔(BHT), 에틸렌디아민, 나트륨라우릴 설페이트(SLS), 나트륨라우릴 에테르 설페이트(SLES), 아황산수소나트륨, 나트륨 메타비설페이트, 아황산칼륨, 칼륨 메타비설페이트, Glydant Plus[®], Phenonip[®], 메틸파라벤, Germall[®] 115, Germaben[®] II, Neolone[™], Kathon[™], 및/또는 Euxyl[®]을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[1588] 예시적인 완충제들은 시트레이트 완충제 용액들, 아세테이트 완충액 용액들, 포스파이트 완충제 용액들 염화암모늄, 탄산칼슘, 염화칼슘, 시트르산칼슘, 칼슘글루비오네이트, 칼슘 글루세이트, 칼슘 글루코네이트, d-글루콘산, 칼슘 글리세로포스페이트, 칼슘 락테이트, 프로파노산, 칼슘 레블리네이트, 펜타노산, 이염기성 칼슘 포스페이트, 인산, 삼염기성 칼슘 포스페이트, 칼슘 하이드록사이드 포스페이트, 아세트산칼륨, 염화칼륨, 칼륨 글루코네이트, 칼륨 혼합물들, 이염기성 인산칼륨, 일염기성 인산칼륨, 인산칼륨 혼합물들, 아세트산나트륨, 중탄산나트륨, 염화나트륨, 시트르산나트륨, 락트산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 일염기성 인산나트륨, 인산나트륨 혼합물들, 트로메타민, 수산화마그네슘, 수산화알루미늄, 알긴산, 발열물이 없는 물, 등장성 염수, 링거액(Ringer's solution), 에틸 알코올 등, 및/또는 이들의 조합들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[1589] 예시적인 윤활제들은 스테아르산마그네슘, 스테아르산칼슘, 스테아르산, 실리카, 활석, 맥아, 글리세릴 베헤네이트, 수소화된 야채 오일들, 폴리에틸렌 글리콜, 벤조산나트륨, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 루이신, 마그네슘라우릴 설페이트, 나트륨라우릴 설페이트 등, 및 이들의 조합들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[1590] 예시적인 오일들은 알몬드, 핵인(apricot kernel), 아보카도, 바바쭈(babassu), 베르가못(bergamot), 블랙 커런트 종자(black current seed), 서양지치, 두송(cade), 카모밀레(camomile), 카놀라, 캐러웨이(caraway), 카르나우바(carnauba), 피마자, 신나몬, 코코아 버터, 코코넛, 대구 간, 커피, 옥수수, 면화씨, 에뮤(emu), 유칼립투스, 달맞이꽃, 어류, 아마씨, 게라니올(geraniol), 박, 포도씨, 개암(hazel nut), 히속폴(hyssop), 이소프로필 미리스테이트, 호호바(jojoba), 쿠쿠이 너트(kukui nut), 라반딘(lavandin), 라벤더, 레몬, 리트세아 쿠베바(litsea cubeba), 마카데미아 견과(macademia nut), 아욱, 망고 종자, 메도우폼 종자(meadowfoam seed), 민크, 육두구(nutmeg), 올리브, 오렌지, 오렌지 러피(orange roughy), 야자, 야자핵, 복숭아 핵, 땅콩, 양귀비 종자, 호박 종자, 평지씨, 쌀겨, 로즈마리, 잇꽃, 백단, 사스쿠아나(sasquana), 사보우리(savoury), 산자나무, 참깨, 시어 버터(shea butter), 실리콘, 대두, 해바라기꽃, 차 나무, 영경귀, 동백, 베티베르폴(vetiver), 호두, 및 맥아 오일들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 오일들은 부틸 스테아레이트, 카프릴릭 트리글리세라이드, 카프릭 트리글리세라이드, 사이클로메티콘, 디에틸 세바케이트, 디메티콘 360, 이소프로필 미리스테이트, 광 오일, 옥틸도데카놀, 올레일 알코올, 실리콘 오일, 및/또는 이들의 조합들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[1591] 경구 및 비경구 투여용의 액체 용량형들은 약제학적으로 허용되는 유제들, 미세유제들, 액체들, 현탁제들, 시럽들, 및/또는 엘릭서들(elixirs)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 활성 성분들 외에, 액체 용량형들은 예를 들면, 물 또는 다른 용매들, 가용화제들, 및 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일들(특히, 목화씨, 땅콩(groundnut), 옥수수, 미생물(germ), 올리브, 피마자, 및 참깨 오일들), 글리세롤, 테트라하이드로푸르푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜들 및 소르비탄의 지방산 에스테르들, 및 이들의 혼합물들과 같은 유화제들과 같이 당해 분야에서 일반적으로 사용된 불활성 희석제들을 포함할 수 있다. 불활성 희석제들 외에, 경구 조성물들은 습윤제들, 유화 및 현탁화제들, 감미제, 풍미제 및/또는 향미제와 같은 보조제들을 포함할 수 있다. 비경구 투여용의 특정 실시형태에서, 조성물들은 Cremophor[®], 알코올들, 오일들, 변형된 오일들, 글리콜들, 폴리소르베이트들, 사이클로텍스트린들, 중합체들, 및/또는 이의 조합들과 같은 가용화제들과 혼합된다.

[1592] 주사가 가능한 제제들, 예를 들면, 멸균 주사가 가능한 수성 또는 유성 현탁액들은 적합한 분산제들, 습윤제들, 및/또는 현탁제들을 사용하여 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사가 가능한 제제들은, 예를 들면, 1,3-부탄디올 중 용액으로서 비독성의 비경구적으로 허용되는 희석제들 및/또는 용매들 중의 멸균 주사가 가능한 액체들, 현탁제들, 및/또는 유제들일 수 있다. 사용될 수 있는 허용되는 비히클들 및 용매들 중에는, 물, 링거액, U.S.P., 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 멸균성의, 고정 오일들은 용매 또는 현탁 매질로서 편리하게 사용된다. 당해 목적을 위해 합성 모노- 또는 디글리세라이드들을 포함하는 어떠한 배합물 고정된 오일도 사용될 수 있다. 올레산과 같은 지방산들도 주사가 가능한 제제에서 사용될 수 있다.

- [1593] 주사가능한 제형들은 예를 들면, 세균 보유 여과기를 통한 여과에 의해, 및/또는 사용 전에 멸균수 또는 다른 멸균 주사가능한 매질 속에 용해되거나 분산될 수 있는 멸균 고체 조성물들의 형태인 멸균화제들을 혼입시킴으로써 멸균시킬 수 있다.
- [1594] 활성 성분의 효과를 연장시키기 위하여, 피하 또는 근육내 주사로부터 활성 성분의 흡수를 늦추는 것이 흔히 바람직하다. 이는 수 용해도가 불량한 결정성 또는 무정형 물질의 액체 현탁액의 사용으로 달성할 수 있다. 이후에, 약물의 흡수율은 최종적으로 결정 크기 및 결정성 형태에 의존할 수 있는, 이의 용해율에 의존한다. 달리는, 비경구적으로 투여된 약물 형태의 지연된 흡수는 약물을 오일 비히클(oil vehicle) 속에 용해시키거나 현탁시킴으로써 달성한다. 주사가능한 데포트 형태(depot form)들은 약물의 미세봉입 매트릭스(microencapsule matrix)들을 폴리락타이드-폴리글리콜라이드와 같은 생분해성 중합체들 속에 형성시킴으로써 제조된다. 중합체에 대한 약물의 비 및 사용된 특정 중합체의 특성에 따라, 약물 방출의 비가 조절될 수 있다. 다른 생분해가능한 중합체들의 예들은 폴리(오르토에스테르들) 및 폴리(무수물들)을 포함한다. 데포트 주사가능한 제형들은 약물을 체조직들과 혼화성인 리포솜들 또는 미세유체들 속에 포괄(entrapping)시켜 제조한다.
- [1595] 직강 또는 질 투여용 조성물들은 대표적으로 조성물들을 적합한 비-자극성 부형제들, 예를 들면, 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜 또는 주위 온도에서 고체이지만 체온에서는 액체여서 직강 또는 질강 속에서 용융되어 활성 성분을 방출하는 좌제 왁스와 같은 적합한 비-자극성 부형제들과 혼합시켜 제조할 수 있는 좌제들이다.
- [1596] 경구 투여용의 고체 용량형들은 캡셀제들, 정제들, 환제들, 산제들, 및 입제들(granules)을 포함한다. 이러한 고체 용량 형들에서, 활성 성분은 적어도 하나의 불활성의, 약제학적으로 허용되는 부형제, 예를 들면, 시트르산나트륨 또는 인산이칼슘 및/또는 충전제들 또는 증량제들(예를 들면, 전분들, 락토즈, 슈크로즈, 글루코즈, 만니톨, 및 실리카), 결합제들(예를 들면, 카복시메틸셀룰로오스, 알기네이트들, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 슈크로즈, 및 아카시아), 습윤제들(예를 들면, 글리세롤), 봉해제들(예를 들면, 한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정의 실리케이이트들, 및 탄산나트륨), 용액 지연제들(예를 들면, 파라핀), 흡수 가속화제들(예를 들면, 4급 암모늄 화합물들), 습윤제들(예를 들면, 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트), 흡수제들(예를 들면, 카올린 및 벤토나이트 점토), 및 운환제들(예를 들면, 활석, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글리콜들, 나트륨 라우릴 설페이트), 및 이들의 혼합물들과 혼합된다. 캡셀제, 정제들 및 환제들의 경우에, 용량형은 완충제들을 포함할 수 있다.
- [1597] 유사한 유형의 고체 조성물들은 락토즈 또는 유당 및 또한 고 분자량 폴리에틸렌 글리콜들 등과 같은 부형제들을 사용하여 연결- 및 경질-충전된 젤라틴 캡셀제들 속에 충전제들로서 사용될 수 있다. 정제들, 당의정제들, 캡셀제들, 환제들, 및 입제들의 고체 용량형들은 장용성 피복물들 및 약제학적 제형 분야에 잘 공지된 다른 피복물들과 같은 피복물들 및 셸(shell)들을 사용하여 제조할 수 있다. 이들은 불투명화제들을 임의로 포함할 수 있으며, 이들이 활성성분(들)만을, 우선적으로는, 장관의 특정 부분에서, 임의로 지연된 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 봉매 조성물(embedding composition)의 예들은 중합체성 물질들 및 왁스들을 포함한다. 유사한 유형의 고체 조성물들은 락토즈 또는 유당 및 또한 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제들을 사용하여 연결 및 경질-충전된 젤라틴 캡셀들 속에 충전제들로서 사용될 수 있다.
- [1598] 조성물의 국소 및/또는 경피 투여의 용량형들은 연고제들, 페이스트제들, 크림제들, 로션제들, 겔제들, 산제들, 액제들, 스프레이들, 흡입제들 및/또는 패취제들을 포함할 수 있다. 일반적으로, 활성 성분은 필요할 수 있는 약제학적으로 허용되는 부형제 및/또는 어떠한 필요한 방부제들 및/또는 완충제들과 멸균 조건들하에 혼합한다. 추가로, 본 기재내용은 경피 패취들의 사용을 고려하며, 이는 흔히 체내로 화합물의 조절된 전달을 제공하는 추가된 장점을 갖는다. 이러한 용량형들은 예를 들면, 화합물을 적절한 매질 속에 용해시키고/시키거나 분산시켜 제조할 수 있다. 달리는 또는 추가로, 비는 비 조절 막을 제공하고/하거나 화합물을 중합체 매트릭스 및/또는 겔 속에 분산시켜 조절할 수 있다.
- [1599] 본원에 기술된 경피 약제학적 조성물들을 전달하는데 사용하기에 적합한 장치들은 미국 특허들 제4,886,499호; 제5,190,521호; 제5,328,483호; 제5,527,288호; 제4,270,537호; 제5,015,235호; 제5,141,496호; 및 제5,417,662호에 기술된 것들과 같은 짧은 바늘 장치들(short needle devices)을 포함한다. 경피 조성물들은 PCT 공보 제WO 99/34850호에 기술된 것들 및 이의 기능성 등가물들과 같은, 피부내로의 침의 효과적인 침투깊이를 제한하는 장치들에 의해 투여될 수 있다. 액체 조성물들을 액체 제트 주사기(jet injector) 및/또는 각질층을 뚫는 침을 통해 피부에 전달하고 피부에 도달하는 제트를 생산하는 제트 주사 장치들이 적합하다. 제트 주사 장치들은 예를 들면, 미국 특허들 제5,480,381호; 제5,599,302호; 제5,334,144호; 제5,993,412호; 제5,649,912호; 제5,569,189호; 제5,704,911호; 제5,383,851호; 제5,893,397호; 제5,466,220호; 제5,339,163호;

제5,312,335호; 제5,503,627호; 제5,064,413호; 제5,520,639호; 제4,596,556호; 제4,790,824호; 제4,941,880호; 제4,940,460호; 및 PCT 공보들 제WO 97/37705호 및 제WO 97/13537호에 기술되어 있다. 압축 가스를 사용하여 분말 형의 백신을 피부(skin)의 외부 층들을 통해 진피(dermis)로 가속화시키는 탄도 분말(Ballistic powder)/입자 전달 장치가 적합하다. 달리는 또는 추가로, 통상의 주사기들을 피내 투여의 전통적인 망투 방법(mantoux method)에서 사용할 수 있다.

[1600] 국소 투여에 적합한 제형들은 연고제, 로션제, 수중유 및/또는 유중수 유액들, 예를 들면, 크림제들, 연고제들 및/또는 페이스트제들, 및/또는 액체들 및/또는 현탁제들과 같은 액체 및/또는 반액체 제제들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 국소 투여가능한 제형들은, 활성 성분의 농도가 용매 속에서 활성 성분의 용해도 한계와 같이 높을 수 있다고 해도, 예를 들면, 약 1% 내지 약 10%(w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있다. 국소 투여용 제형들은 본원에 기술된 추가의 성분들 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[1601] 약제학적 조성물은 볼 내강(buccal cavity)을 통해 폐 투여용으로 적합한 제형 속에서 제조되고/되거나, 포장되고/되거나 시판될 수 있다. 이러한 제형은 활성 성분을 포함하고 직경이 약 0.5 nm 내지 약 7 nm 또는 약 1 nm 내지 약 6 nm 범위인 무수 입자들을 포함할 수 있다. 이러한 조성물들은 편리하게는, 추진제의 스트림(stream)이 분말을 분산하도록 지시하는 무수 분말 저장기(reservoir)를 포함하는 장치를 사용하고/하거나 밀봉된 용기 속에서 저-비등 추진제 속에 용해되고/되거나 현탁된 활성 성분을 포함하는 장치와 같은 자가 추진 용매/분말 분산 용기를 사용하는 투여용 무수 분말들의 형태로 존재한다. 이러한 분말들은, 입자들의 적어도 98 중량%가 0.5 nm 이상의 직경을 갖고 입자들의 적어도 95 수 %(% by number)가 7 nm 미만의 직경을 갖는 입자들을 포함한다. 달리는, 적어도 입자들의 95 중량%가, 직경이 1 nm 이상이고 입자들의 적어도 90 수 %가, 직경이 6 nm 미만이다. 무수 분말 조성물들은 당과 같은 고체 미세 분말 희석제를 포함할 수 있으며 편리하게는 단위 용량 형태로 제공된다.

[1602] 저 비등 추진제들은 일반적으로, 대기압에서 비점이 65°F 이하인 액체 추진제들을 포함한다. 일반적으로 추진제는 조성물의 50% 내지 99.9%(w/w)를 구성할 수 있으며, 활성 성분은 조성물의 0.1% 내지 20%(w/w)를 구성할 수 있다. 추진제는 액체 비-이온성 및/또는 고체 음이온성 표면활성제 및/또는 고체 희석제(이는 활성 성분을 포함하는 입자들과 동일한 정도의 입자크기를 가질 수 있다)와 같은 추가의 성분들을 또한 포함할 수 있다.

[1603] 폐 전달용으로 제형화된 약제학적 조성물들은 액체 및/또는 현탁제의 소적(droplet)들 형태의 활성 성분을 제공할 수 있다. 이러한 제형들은 활성 성분을 포함하는, 임의로 멸균된 수성 및/또는 희석 알코올성 액체들 및/또는 현탁제들로서 제조되고/되거나, 포장되고/되거나 시판될 수 있으며, 편리하게는 어떠한 분무 및/또는 미립자화 장치를 사용하여 투여될 수 있다. 이러한 제형들은 사카린 나트륨, 휘발성 오일, 완충제, 표면 활성제, 및/또는 메틸하이드록시벤조에이트와 같은 방부제와 같은 풍미제를 포함하나, 이에 한정되지 않는 하나 이상의 추가의 성분들을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 투여 경로에 의해 제공된 소적들은, 평균 직경이 약 0.1 nm 내지 약 200 nm의 범위일 수 있다.

[1604] 폐 전달용으로 유용한 본원에 기술된 제형들은 약제학적 조성물의 비강 전달용으로 유용하다. 비강 투여용으로 적합한 다른 제형은 활성 성분을 포함하고 평균 입자 크기가 약 0.2 μm 내지 500 μm인 조악한 분말이다. 이러한 제형은, 코가 취하는 방식, 즉, 코에 근접하게 유지된 분말의 용기로부터 비강 통로를 통한 신속한 흡입에 의해 투여된다.

[1605] 비강 투여용으로 적합한 제형들은 예를 들면, 0.1%(w/w)로 적은 및 100%(w/w)로 많은 활성 성분을 포함할 수 있으며, 본원에 기술된 하나 이상의 추가의 성분들을 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 볼내 투여용으로 적합한 제형으로 제조되고/되거나, 포장되고/되거나 시판된다. 이러한 제형들은 예를 들면, 통상의 방법들을 사용하여 제조된 정제들 및/또는 로젠지제들(lozenges)의 형태일 수 있고, 경구적으로 용해가능하고/하거나 분해가능한 조성물, 및 임의로 본원에 기술된 하나 이상의 추가의 성분들을 균형량으로 포함하는, 예를 들면, 0.1% 내지 20%(w/w)의 활성 성분일 수 있다. 달리는, 볼 투여용으로 적합한 제형들은 활성 성분을 포함하는 산제 및/또는 에어로졸화되고/되거나 미립자화된 용액 및/또는 현탁액을 포함할 수 있다. 이러한 분말화되고/되거나, 에어로졸화되고/되거나 에어로졸화된 제형들은, 분산되는 경우, 평균 입자 크기 및/또는 소적 크기가 약 0.1 nm 내지 약 200 nm의 범위일 수 있고, 본원에 기술된 어떠한 추가의 성분들 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[1606] 약제학적 조성물은 안과 투여용으로 적합한 제형으로 제조되고/되거나, 포장되고/되거나 시판될 수 있다. 이러한 제형들은 예를 들면, 수성 또는 유성 액체 부형제 속의 활성 성분의 0.1/1.0%(w/w) 용액 및/또는 현탁액을 포함하는 눈 점적제들의 형태일 수 있다. 이러한 점적제들은 완충제들, 염들, 및/또는 본원에 기술된 하나 이

상의 다른 어떠한 추가의 성분들을 추가로 포함할 수 있다. 유용한 다른 안과적으로 투여가능한 제형들은 미세 결정성 형태 및/또는 리포솜 제제들 속에 활성 성분을 포함하는 것들을 포함한다. 귀 점적제 및/또는 눈 점적 제들이 본 개시의 범위 내에 있는 것으로 고려된다.

[1607] 제형 및/또는 약제학적 제제들의 제조에 있어서 일반적인 고려사항들은 예를 들면, 문헌[참조: *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005(본원에 참조로 혼입된)]에서 찾을 수 있다.

[1608] 투여

[1609] 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에게 본 개시에 따른 단백질들 또는 복합체들을 투여함을 포함하는 방법들을 제공한다. 단백질들 또는 복합체들, 또는 이들의 약제학적, 영상, 진단, 또는 예방학적 조성물들은 질병, 질환, 및/또는 상태(예를 들면, 작업 기억 결손들과 관련된 질병, 질환, 및/또는 상태)를 예방하거나, 치료하거나, 진단하거나, 영상화하는데 효과적인 어떠한 투여 경로 및 어떠한 양을 사용하여 대상체에게 투여될 수 있다. 요구되는 정확한 양은 대상체의 종들, 연령, 및 일반적인 상태, 질병의 중증도, 특정 조성물, 이의 투여 방식, 이의 활성 방식 등에 따라, 대상체마다 변할 것이다. 본 개시에 따른 조성물들은 용량의 투여 및 균일성을 용이하게 하기 위한 용량 단위 형태로 전형적으로 제형화된다. 그러나, 본 개시의 조성물들의 전체 1일 사용은 건전한 의학적 판단(sound medical judgment)의 영역내에서 주치의에 의해 결정될 것이다. 어떠한 특정 환자에 대한 구체적인 치료학적으로 효과적이거나, 예방학적으로 효과적이거나, 또는 적절한 영상 용량 수준은 치료되는 질환 및 질환의 중증도; 사용된 구체적인 화합물의 활성; 사용된 구체적인 조성물; 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별 및 식이; 투여 시간, 투여 경로; 및 사용된 구체적인 화합물의 배출율; 치료 기간; 사용된 구체적인 화합물과 함께 또는 동시에 사용된 약물들; 및 의학 분야에 잘 공지된 유사 인자들을 포함하는 각종 인자들에 의존할 것이다.

[1610] 전달될 단백질들 및/또는 이들의 약제학적, 예방학적, 또는 영상 조성물들은 포유동물들(예를 들면, 사람들, 애완 동물들, 고양이들, 개들, 마우스들, 랫트들 등)과 같은 동물들에게 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이들의 약제학적, 예방학적, 진단학적, 또는 영상 조성물들은 사람들에게 투여된다.

[1611] 본 개시에 따라서 전달될 단백질들 및/또는 이들의 약제학적, 예방학적, 진단학적, 또는 영상 조성물들은 어떠한 경로에 의해서도 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 단백질들 및/또는 이들의 약제학적, 예방학적, 진단학적, 또는 영상 조성물들은 경구, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 동맥내, 피하, 심실내, 경피, 피내, 직장, 질내, 복강내, 국소(예를 들면, 산제들, 연고제들, 크림제들, 겔제들, 로션제들, 및/또는 점적제들에 의해), 점막, 비강, 볼내, 장내, 유리체내, 종양내, 설하를 포함하는 각종 경로들 중 하나 이상에 의해; 기관내 설치(intratracheal instillation), 기관지 설치(bronchial instillation), 및/또는 흡입에 의해; 경구 스프레이, 비강 스프레이 및/또는 에어로졸로서, 및/또는 문맥 카테테르(portal vein catheter)를 통해 투여된다. 일부 실시형태에서, 단백질들 또는 복합체들, 및/또는 이들의 약제학적, 예방학적, 진단학적, 또는 영상 조성물들은 전신계 정맥내 주사에 의해 투여된다. 구체적인 실시형태에서, 단백질들 또는 복합체들 및/또는 이들의 약제학적, 예방학적, 진단학적, 또는 영상 조성물들은 정맥내로 및/또는 경구적으로 투여된다. 구체적인 실시형태에서, 단백질들 또는 복합체들, 및/또는 이들의 약제학적, 예방학적, 진단학적, 또는 영상 조성물들은, 단백질 또는 복합체가 혈액-뇌 장벽, 혈관 장벽, 또는 다른 상피 장벽을 횡단하도록 하는 방식으로 투여될 수 있다.

[1612] 그러나, 본 개시는, 단백질들 또는 복합체들, 및/또는 이들의 약제학적, 예방학적, 진단학적, 또는 영상 조성물들이 약물 전달 과학들에서 그럴듯하게 진보한 것으로 고려되는 어떠한 적절한 경로에 의해 전달되는 것을 포함한다

[1613] 일반적으로, 가장 적절한 투여 경로는 전달될 적어도 하나의 제제과 관련된 단백질들 또는 단백질들을 포함하는 복합체의 특성(예를 들면, 위장관의 환경에서의 이의 안전성, 혈류 등), 환자의 상태(예를 들면, 환자가 특정한 투여 경로들을 견딜 수 있는지의 여부) 등을 포함하는 각종의 인자들에 의존할 것이다. 본 개시는 약물 전달 과학들에서 진전된 것으로 고려되는 어떠한 적절한 경로에 의한 약제학적, 예방학적, 진단학적, 또는 영상 조성물들의 전달을 포함한다.

[1614] 특정 실시형태에서, 본 기내내용에 따른 조성물들은 1일에 대상체의 체중 당 약 0.0001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 40 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 1 mg/kg 내지 약 25 mg/kg를 전달하기에 충분한 용량 수준들에서 하루에 1회 이상 투여함으로써 바람직한 치료학적, 진단학적, 예방학적, 또는 영상

효과를 수득할 수 있다. 바람직한 용량은 1일에 3회, 1일에 2회, 1일에 1회, 격일로, 매 3일마다, 매주, 매 2주마다, 매 3주마다, 또는 매 4주마다 전달될 수 있다. 특정 실시형태에서, 바람직한 용량은 다수의 투여들(예를 들면, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 11회, 12회, 13회, 14회 이상의 투여들)을 사용하여 전달될 수 있다.

[1615] 단백질들 또는 복합체들은 하나 이상의 다른 치료학적, 예방학적, 진단학적, 또는 영상 제제들과 함께 사용할 수 있다. "과 함께"는, 이들 전달 방법들이 본 기내내용의 범위 내에 있다고 해도, 제제들이 동일한 시간에 투여되어야만 하고/하거나 함께 전달하기 위해 제형화되어야 함을 함시하고자 하는 것은 아니다. 조성물들은 하나 이상의 다른 바람직한 치료제들 또는 의학 과정들과 동시에, 전에, 또는 후속적으로 투여될 수 있다. 일반적으로, 각각의 제제는 이러한 제제에 대해 결정된 용량 및/또는 시간 계획으로 투여될 것이다. 일부 실시형태에서, 본 기내내용은 이들의 생이용능을 개선시키고/시키거나, 이들의 대사를 감소시키고/시키거나 변형시키고, 이들의 배출을 억제하고/하거나 체내 이들의 분포를 변형시키는 제제들과 함께 약제학적, 예방학적, 진단학적, 또는 영상 조성물들의 전달을 포함한다.

[1616] 함께 사용될 치료학적으로, 예방학적으로, 진단학적으로, 또는 영상 활성 제제들은 단일 조성물로 함께 투여되거나 상이한 조성물들 속에 별도로 투여될 수 있음이 또한 이해될 것이다. 일반적으로, 제제들은, 이들이 개별적으로 활용된 수준들을 초과하지 않는 수준들에서 이용되는 조합으로 활용됨이 예상된다. 일부 실시형태에서, 함께 활용될 수준들은 개별적으로 활용된 것들보다 낮을 것이다.

[1617] 조합 치료요법에서 사용하기 위한 치료제들(치료제들 또는 과정들)의 특정 조합은 바람직한 치료제들 및/또는 과정들 및 달성될 바람직한 치료 효과의 혼용성을 고려할 것이다. 사용된 치료요법은 동일한 질환에 대해 바람직한 효과를 달성할 수 있거나(예를 들면, 본 기내내용에 따라 암을 치료하는데 유용한 조성물은 화학치료제와 동시에 투여될 수 있다), 이들은 상이한 효과들(예를 들면, 어떠한 부작용들의 조절)을 달성할 수 있음이 또한 이해될 것이다.

[1618] **키트들(kits)**

[1619] 본 개시는 본 기내내용의 방법들을 편리하게 및/또는 효과적으로 수행하기 위한 각종 키트들을 제공한다. 전형적으로 키트들은, 사용자가 대상체(들)의 다중치료를 수행하도록 하고/하거나 다중 실험들을 수행하도록 하기 위해 충분한 양 및/또는 수의 성분들을 포함할 것이다.

[1620] 한 양상에서, 본 개시는 번역가능한 영역 및 핵산 변형을 포함하는 제1의 분리된 핵산, 및 포장재 및 지시들을 포함하는, 단백질 생산용 키트들을 제공하며, 여기서, 핵산은, 제1의 분리된 핵산이 도입되는 세포의 선천성 면역 반응의 유도를 모면하거나 피할 수 있다.

[1621] 한 양상에서, 당해 개시는: 번역가능한 영역을 포함하는 제1의 분리되고 변형된 핵산(단, 표적 세포내로 도입되는 경우 번역가능한 영역에 의해 암호화된 단백질의 바람직한 양을 생산하기에 효과적인 양으로 제공된다); 억제성 핵산을 포함하는 제2의 핵산(단, 세포의 선천성 면역 반응을 실질적으로 억제하는데 효과적인 양으로 제공된다); 및 포장재 및 지시들을 포함하는, 단백질 생산용 키트들을 제공한다.

[1622] 한 양상에서, 본 개시는 번역가능한 영역 및 뉴클레오사이드 변형을 포함하는 제1의 분리된 핵산(여기서, 당해 핵산은 세포 뉴클레아제에 의한 감소된 분해를 나타낸다), 및 포장재 및 지시들을 포함하는, 단백질 생산용 키트들을 제공한다.

[1623] 한 양상에서, 본 개시는 번역가능한 영역 및 적어도 2개의 상이한 뉴클레오사이드 변형들을 포함하는 제1의 분리된 핵산(여기서, 당해 핵산은 세포 뉴클레아제에 의한 감소된 분해를 나타낸다), 및 포장재 및 지시들을 포함하는, 단백질 생산용 키트들을 제공한다.

[1624] 한 양상에서, 본 개시는 번역가능한 영역 및 적어도 하나의 뉴클레오사이드 변형들을 포함하는 제1의 분리된 핵산(여기서, 당해 핵산은 세포 뉴클레아제에 의한 감소된 분해를 나타낸다); 억제성 핵산을 포함하는 제2의 핵산; 포장재 및 지시들을 포함하는 단백질 생산용 키트들을 제공한다.

[1625] 일부 실시형태에서, 제1의 분리된 핵산은 전령 RNA(mRNA)를 포함한다. 일부 실시형태에서 mRNA는 피리딘-4-온 리보뉴클레오사이드, 5-아자-우리딘, 2-티오-5-아자-우리딘, 2-티오우리딘, 4-티오-슈도우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 5-하이드록시우리딘, 3-메틸우리딘, 5-카복시메틸-우리딘, 1-카복시메틸-슈도우리딘, 5-프로피닐-우리딘, 1-프로피닐-슈도우리딘, 5-타우리노메틸우리딘, 1-타우리노메틸-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-2-티오-우리딘, 1-타우리노메틸-4-티오-우리딘, 5-메틸-우리딘, 1-메틸-슈도우리딘, 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-슈

도우리딘, 1-메틸-1-테아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-1-테아자-슈도우리딘, 디하이드로우리딘, 디하이드로슈도우리딘, 2-티오-디하이드로우리딘, 2-티오-디하이드로슈도우리딘, 2-메톡시우리딘, 2-메톡시-4-티오-우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘 또는 본원에 기재된 임의의 것으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 뉴클레오사이드를 포함한다.

[1626] 일부 실시형태에서, mRNA는 5-아자-사이티딘, 슈도이소사이티딘, 3-메틸-사이티딘, N4-아세틸사이티딘, 5-포르밀사이티딘, N4-메틸사이티딘, 5-하이드록시메틸사이티딘, 1-메틸-슈도이소사이티딘, 피롤로-사이티딘, 피롤로-슈도이소사이티딘, 2-티오-사이티딘, 2-티오-5-메틸-사이티딘, 4-티오-슈도이소사이티딘, 4-티오-1-메틸-슈도이소사이티딘, 4-티오-1-메틸-1-테아자-슈도이소사이티딘, 1-메틸-1-테아자-슈도이소사이티딘, 제볼라린, 5-아자-제볼라린, 5-메틸-제볼라린, 5-아자-2-티오-제볼라린, 2-티오-제볼라린, 2-메톡시-사이티딘, 2-메톡시-5-메틸-사이티딘, 4-메톡시-슈도이소사이티딘, 4-메톡시-1-메틸-슈도이소사이티딘 또는 본원에 기재된 임의의 것으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 뉴클레오사이드를 포함한다.

[1627] 일부 실시형태에서, mRNA는 2-아미노퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 7-테아자-아데닌, 7-테아자-8-아자-아데닌, 7-테아자-2-아미노퓨린, 7-테아자-8-아자-2-아미노퓨린, 7-테아자-2,6-디아미노퓨린, 7-테아자-8-아자-2,6-디아미노퓨린, 1-메틸아데노신, N6-메틸아데노신, N6-이소펜테닐아데노신, N6-(시스-하이드록시이소펜테닐)아데노신, 2-메틸티오-N6-(시스-하이드록시이소펜테닐) 아데노신, N6-글리시닐카바모일아데노신, N6-트레오닐카바모일아데노신, 2-메틸티오-N6-트레오닐 카바모일아데노신, N6,N6-디메틸아데노신, 7-메틸아데닌, 2-메틸티오-아데닌, 2-메톡시-아데닌 또는 본원에 기재된 임의의 것으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 뉴클레오사이드를 포함한다.

[1628] 일부 실시형태에서, mRNA는 이노신, 1-메틸-이노신, 와리오신, 와이부토신, 7-테아자-구아노신, 7-테아자-8-아자-구아노신, 6-티오-구아노신, 6-티오-7-테아자-구아노신, 6-티오-7-테아자-8-아자-구아노신, 7-메틸-구아노신, 6-티오-7-메틸-구아노신, 7-메틸이노신, 6-메톡시-구아노신, 1-메틸구아노신, N2-메틸구아노신, N2,N2-디메틸구아노신, 8-옥소-구아노신, 7-메틸-8-옥소-구아노신, 1-메틸-6-티오-구아노신, N2-메틸-6-티오-구아노신, N2,N2-디메틸-6-티오-구아노신 또는 본원에 기재된 임의의 것으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 뉴클레오사이드를 포함한다.

[1629] 다른 양상에서, 본 개시는 번역가능한 영역 및 뉴클레오사이드 변형을 포함하는 제1의 분리된 핵산, 및 제1의 핵산의 번역가능한 영역의 번역에 적합한 포유동물 세포를 포함하는, 단백질 생산용 조성물들을 제공하며, 여기서, 핵산은 세포 뉴클레아제에 의한 감소된 분해를 나타낸다.

[1630] **정의들**

[1631] 본 명세서에서의 다양한 위치들에서, 본 개시의 화합물들의 치환체들은 그룹들 또는 범위들로 기재되어 있다. 본 개시는 이러한 그룹들 및 범위들의 구성원들의 각각의 및 모든 개개 소조합을 포함하는 것으로 구체적으로 의도된다. 예를 들면, 용어 "C₁₋₆ 알킬"은 메틸, 에틸, C₃ 알킬, C₄ 알킬, C₅ 알킬, 및 C₆ 알킬을 개별적으로 기재하는 것으로 구체적으로 의도된다.

[1632] 약: 본원에 사용된 것으로서, 용어 "약"은 언급된 값의 +/- 10%를 의미한다.

[1633] **함께 투여된:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "함께 투여된" 또는 "조합된 투여"는, 2개 이상의 제제들이 대상체에게 동시에 또는 환자에서 각각의 제제의 효과가 오버랩(overlap)될 수 있도록 하는 간격내에서 투여됨을 의미한다. 일부 실시형태에서, 이들은 서로 약 60, 30, 15, 10, 5, 또는 1분내에 투여된다. 일부 실시형태에서, 제제들의 투여들은 함께 충분히 근접하게 간격을 두어 조합(예를 들면, 상승) 효과가 달성되도록 한다.

[1634] **동물:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "동물"은 동물계의 어떠한 구성원을 말한다. 일부 실시형태에서, "동물"은 발달의 어느 단계에서의 사람들을 말한다. 일부 실시형태에서, "동물"은 발달의 어느 단계에서의 비-사람 동물들을 말한다. 특정의 실시형태에서, 비-사람 동물은 포유동물(예를 들면, 설치류, 마우스, 랫트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 양, 소, 영장류, 또는 돼지)이다. 일부 실시형태에서, 동물들은 포유동물들, 조류들, 파충류들, 양서류들, 어류, 및 벌레들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 동물은 유전자삽입 동물, 일반적으로-가공된 동물, 또는 클론(clone)이다.

[1635] **목적한 항원들 또는 바람직한 항원들:** 본원에 사용된 것으로서, 용어들 "목적한 항원들" 또는 "바람직한 항원들"은 본원에 기술된 항체들 및 단편들, 돌연변이체들, 변이체들, 및 이의 변형들에 의해 면역특이적으로 결합된 본원에 제공된 단백질들 및 다른 생물분자들을 포함한다. 목적한 항원들의 예들은 인슐린, 인슐린-유사

성장 인자, hGH, tPA, 사이토카인들, 예를 들면, 인터루킨들(IL), 예를 들면, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, 인터페론(IFN) 알파, IFN 베타, IFN 감마, IFN 오메가 또는 IFN 타우(tau), 종양 괴사 인자(TNF), 예를 들면, TNF 알파 및 TNF 베타, TNF 감마, TRAIL; G-CSF, GM-CSF, M-CSF, MCP-1 및 VEGF를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[1636] **대략적으로:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 목적인 하나 이상의 값들에 적용된 것으로서 "대략적으로" 또는 "약"은 기술된 참조 값과 유사한 값을 말한다. 특정 실시형태에서, 용어 "대략적으로" 또는 "약"은 달리 또한 기술되지 않거나 내용으로부터 다른 증거가 없는 한(이러한 수가 가능한 값의 100%를 초과할 수 있는 경우는 제외) 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 이하내에 속하는 값들의 범위를 말한다.

[1637] **와 관련된:** 본원에 사용된 것으로서, 용어들 "과 관련된", "접합된", "연결된", "부착된" 및 "테셔드(TETHERED)"는 2개 이상의 잔기들과 관련하여 사용되는 경우, 당해 잔기들이 직접적으로 또는 연결체로서 제공되는 하나 이상의 추가의 잔기들을 통해 물리적으로 연합되거나 연결됨으로써, 당해 잔기들이 당해 구조가 사용되는 조건들, 예를 들면, 생리학적 조건들하에서 물리적으로 연합되어 잔존하도록 하기에 충분히 안정한 구조를 형성함을 의미한다. "연합"은 직접적인 공유결합적 화학 결합을 통해 엄격할 필요는 없다. 이온성 또는 수소 결합 또는 하이브리드화 계 연결성이 충분히 안정하여 "연합된" 실체들이 생리학적으로 연합되어 잔존함이 또한 제안될 수 있다.

[1638] **생체적합성:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "생체적합성"은 손상, 독성 또는 면역 시스템에 의한 거부의 위험이 거의 없거나 없으면서 살아있는 세포들, 조직들, 기관들 또는 시스템들과 혼화성임을 의미한다.

[1639] **생물분해성:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "생물분해성"은 살아있는 것들의 작용에 의해 무해한 생성물들로 분해될 수 있음을 의미한다.

[1640] **생물학적으로 활성인:** 본원에 사용된 것으로서, 어구 "생물학적으로 활성인"은 생물학적 시스템 및/또는 기관 내에서 활성을 갖는 특정 물질의 특성을 말한다. 예를 들어, 기관에 투여되는 경우, 당해 유기체에서 생물학적 효과를 갖는 물질은 생물학적으로 활성인 것으로 고려된다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 뉴클레오타이드는, 폴리뉴클레오타이드 중의 일부가 생물학적으로 활성이거나 또는 생물학적으로 관련된 것으로 고려된 활성을 모사하는 경우에도 생물학적으로 활성인 것으로 고려될 수 있다.

[1641] **화학적 용어들:** 다음은 "아실"로부터 "티올"까지의 다양한 화학적 용어들의 정의를 제공한다.

[1642] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "아실"은, 본원에 정의된 바와 같은 카보닐 그룹을 통해 모 분자 그룹에 부착된, 본원에 정의된 것으로서, 수소 또는 알킬 그룹(예를 들면, 할로알킬 그룹)을 나타내며 포르밀(즉, 카복시알데하이드 그룹), 아세틸, 트리플루오로아세틸, 프로피오닐, 부타노일 등으로 예시된다. 예시적인 치환되지 않은 아실 그룹들은 1 내지 7, 1 내지 11, 또는 1 내지 21 탄소들을 포함한다. 일부 실시형태에서, 알킬 그룹은 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들로 추가로 치환된다.

[1643] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "아실아미노"는, 본원에 정의된 바와 같은 아미노 그룹[즉, $N(R^{N1})-C(O)-R$, 여기서, R is H 또는 임의로 치환된 C_{1-6} , C_{1-10} , 또는 C_{1-20} 알킬 그룹(예를 들면, 할로알킬)이고 R^{N1} 는 본원에 정의된 바와 같다]을 통해 모 분자 그룹에 부착된, 본원에 정의된 바와 같은, 아실 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 아실아미노 그룹들은 1 내지 41개의 탄소들(예를 들면, 1 내지 7, 1 내지 13, 1 내지 21, 2 내지 7, 2 내지 13, 2 내지 21, 또는 2 내지 41개의 탄소들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 알킬 그룹은 본원에 기술된 바와 같은, 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들로 추가로 치환되고/되거나 아미노 그룹은 $-NH_2$ 또는 $-NHR^{N1}$ 이고, 여기서, R^{N1} 는, 독립적으로, OH, NO_2 , NH_2 , NR^{N2}_2 , SO_2OR^{N2} , SO_2R^{N2} , SOR^{N2} , 알킬, 아릴, 아실(예를 들면, 아세틸, 트리플루오로아세틸, 또는 본원에 기술된 다른 것들), 또는 알콕시카보닐알킬이며, 각각의 R^{N2} 는 H, 알킬, 또는 아릴일 수 있다.

[1644] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "아실아미노알킬"은, 본원에 정의된 바와 같은 알킬 그룹[즉, $-알킬-N(R^{N1})-C(O)-R$, 여기서, R은 H 또는 임의로 치환된 C_{1-6} , C_{1-10} , 또는 C_{1-20} 알킬 그룹(예를 들면, 할로알킬)이고 R^{N1} 은 본원에 정의된 바와 같다]을 통해 모 분자 그룹에 최종적으로 부착된 아미노 그룹에 부착된, 본원에 정의된 바와 같은, 아실 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 아실아미노 그룹들은 1 내지 41개의 탄소들(예를 들면, 1 내지

7, 1 내지 13, 1 내지 21, 2 내지 7, 2 내지 13, 2 내지 21, 또는 2 내지 41개의 탄소들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 알킬 그룹은 본원에 기술된 바와 같은, 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들로 추가로 치환되고/되거나 아미노 그룹은 -NH₂ 또는 -NHR^{N1} [여기서, R^{N1}는, 독립적으로, OH, NO₂, NH₂, NR^{N2}, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, 알킬, 아릴, 아실(예를 들면, 아세틸, 트리플루오로아세틸, 또는 본원에 기술된 다른 것들), 또는 알콕시카보닐 알킬이고, 각각의 R^{N2}은 H, 알킬, 또는 아릴일 수 있다]이다.

[1645] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "아실옥시"는 산소 원자(즉, -O-C(O)-R, 여기서, R은 H 또는 임의로 치환된 C₁₋₆, C₁₋₁₀, 또는 C₁₋₂₀ 알킬 그룹이다)를 통해 모 분자 그룹에 부착된, 본원에 정의된 바와 같은, 아실 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 아실옥시 그룹들은 1 내지 21개의 탄소들(예를 들면, 1 내지 7 또는 1 내지 11개의 탄소들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 알킬 그룹은 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들로 추가로 치환된다.

[1646] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "아실옥시알킬"은 알킬 그룹(즉, -알킬-O-C(O)-R, 여기서, R은 H 또는 임의로 치환된 C₁₋₆, C₁₋₁₀, 또는 C₁₋₂₀ 알킬 그룹이다)을 통해 모 분자 그룹에 최종적으로 부착된 산소 원자에 부착된, 본원에 정의된 바와 같은, 아실 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 아실옥시알킬 그룹들은, 1 내지 21개의 탄소들(예를 들면, 1 내지 7개 또는 1 내지 11개)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 알킬 그룹은 독립적으로, 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들에 의해 추가로 치환된다.

[1647] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "알크아릴"은 본원에 정의된 바와 같은 알킬렌 그룹을 통해 모 분자 그룹에 부착된, 본원에 정의된 바와 같은, 아릴 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 알크아릴 그룹들은, 탄소수가 7 내지 30(예를 들면, 탄소수 7 내지 16 또는 7 내지 20, 예를 들면, C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴, C₁₋₁₀ 알크-C₆₋₁₀ 아릴, 또는 C₁₋₂₀ 알크-C₆₋₁₀ 아릴)이다. 일부 실시형태에서, 알킬렌 및 아릴 각각은 각각의 그룹들에 대해 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다. 접두사 "알크-"는 이러한 방식으로 정의되며, 여기서, "알크"는 달리 나타내지 않는 한, C₁₋₆ 알킬렌을 나타내며, 부착된 화학 구조식은 본원에 정의된다.

[1648] 용어 "알크사이클로알킬"은 본원에 정의된 바와 같은 알킬렌 그룹(예를 들면, 탄소수 1 내지 4, 1 내지 6, 1 내지 10, 또는 1 내지 20의 알킬렌 그룹)을 통해 모 분자 그룹에 부착된, 본원에 정의된 바와 같은, 사이클로알킬 그룹을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 알킬렌 및 사이클로알킬 각각은 각각의 그룹에 대해 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다.

[1649] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "알케닐"은 달리 정의하지 않는 한, 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합들을 함유하는 탄소수 2 내지 20(예를 들면, 탄소수 2 내지 6 또는 탄소수 2 내지 10)의 1가의 직쇄 또는 측쇄 그룹들을 나타내며 에테닐, 1-프로페닐, 2-프로페닐, 2-메틸-1-프로페닐, 1-부테닐, 2-부테닐 등을 나타낸다. 알케닐들은 시스 및 트랜스 이성체들 둘 다를 포함한다. 알케닐 그룹들은 본원에 정의된 바와 같은, 아미노, 아릴, 사이클로알킬, 또는 헤테로사이클릴(예를 들면, 헤테로아릴), 또는 본원에 기술된 예시적인 알킬 치환체 그룹들 중 임의의 것 중에서 독립적으로 선택된 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 임의로 치환될 수 있다.

[1650] 용어 "알케닐옥시"는 달리 나타내지 않는 한, 화학식 -OR [여기서, R은 C₂₋₂₀ 알케닐 그룹(예를 들면, C₂₋₆ 또는 C₂₋₁₀ 알케닐)이다]의 화학적 치환체를 나타낸다. 예시적인 알케닐옥시 그룹들은 에테닐옥시, 프로페닐옥시 등을 포함한다. 일부 실시형태에서, 알케닐 그룹은 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹(예를 들면, 하이드록시 그룹)들로 추가로 치환될 수 있다.

[1651] 용어 "알크헤테로아릴"은 본원에 정의된 바와 같은 알킬렌 그룹을 통해 모 분자 그룹에 부착된, 본원에 정의된 바와 같은, 헤테로아릴 그룹을 말한다. 예시적인 치환되지 않은 알크헤테로아릴 그룹들은, 탄소수가 2 내지 32(예를 들면, 2 내지 22, 2 내지 18, 2 내지 17, 2 내지 16, 3 내지 15, 2 내지 14, 2 내지 13, 또는 2 내지 12 탄소들, 예를 들면, C₁₋₆ 알크-C₁₋₁₂ 헤테로아릴, C₁₋₁₀ 알크-C₁₋₁₂ 헤테로아릴, 또는 C₁₋₂₀ 알크-C₁₋₁₂ 헤테로아릴)이다. 일부 실시형태에서, 알킬렌 및 헤테로아릴 각각은 각각의 그룹에 대해 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다. 알크헤테로아릴 그룹들은 알크헤테로사이클릴 그룹들의 소세트이다.

[1652] 용어 "알크헤테로사이클릴"은 본원에 정의된 바와 같은, 알킬렌 그룹을 통해 모 분자 그룹에 부착된, 본원에 정

의된 바와 같은, 헤테로사이클릴 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 알크헤테로사이클릴 그룹들은, 탄소수가 2 내지 32(예를 들면, 2 내지 22, 2 내지 18, 2 내지 17, 2 내지 16, 3 내지 15, 2 내지 14, 2 내지 13, 또는 2 내지 12 탄소들, 예를 들면, C₁₋₆ 알크-C₁₋₁₂ 헤테로사이클릴, C₁₋₁₀ 알크-C₁₋₁₂ 헤테로사이클릴, 또는 C₁₋₂₀ 알크-C₁₋₁₂ 헤테로사이클릴)이다. 일부 실시형태에서, 알킬렌 및 헤테로사이클릴 각각은 각각의 그룹에 대해 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다.

[1653] 용어 "알콕시"는 달리 나타내지 않는 한, 화학식 -OR[여기서, R은 C₁₋₂₀ 알킬 그룹(예를 들면, C₁₋₆ 또는 C₁₋₁₀ 알킬이다)이다]의 화학적 치환체를 나타낸다. 예시적인 알콕시 그룹들은 메톡시, 에톡시, 프로폭시(예를 들면, n-프로폭시 및 이소프로폭시), t-부톡시 등을 포함한다. 일부 실시형태에서, 알킬 그룹은 본원에 정의된 바와 같은, 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들(예를 들면, 하이드록시 또는 알콕시)로 추가로 치환될 수 있다.

[1654] 용어 "알콕시알콕시"는 알콕시 그룹으로 치환된 알콕시 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 알콕시알콕시 그룹들은, 탄소수가 2 내지 40(예를 들면, 탄소수 2 내지 12 또는 2 내지 20, 예를 들면, C₁₋₆ 알콕시-C₁₋₆ 알콕시, C₁₋₁₀ 알콕시-C₁₋₁₀ 알콕시, 또는 C₁₋₂₀ 알콕시-C₁₋₂₀ 알콕시)이다. 일부 실시형태에서, 각각의 알콕시 그룹은 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다.

[1655] 용어 "알콕시알킬"은 알콕시 그룹으로 치환된 알킬 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 알콕시알킬 그룹들은, 2 내지 40개의 탄소들(예를 들면, 2 내지 12 또는 2 내지 20개의 탄소들, 예를 들면, C₁₋₆ 알콕시-C₁₋₆ 알킬, C₁₋₁₀ 알콕시-C₁₋₁₀ 알킬, 또는 C₁₋₂₀ 알콕시-C₁₋₂₀ 알킬)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 알킬 및 알콕시는 각각 각각의 그룹에 대해 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환된다.

[1656] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "알콕시카보닐"은 카보닐 원자(예를 들면, -C(O)-OR, 여기서, R은 H 또는 임의로 치환된 C₁₋₆, C₁₋₁₀, 또는 C₁₋₂₀ 알킬 그룹이다)를 통해 모 분자 그룹에 부착된, 본원에 정의된 바와 같은, 알콕시를 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 알콕시카보닐은 1 내지 21개의 탄소들(예를 들면, 1 내지 11 또는 1 내지 7 탄소들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 알콕시 그룹은 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들로 추가로 치환될 수 있다.

[1657] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "알콕시카보닐아실"은 본원에 정의된 바와 같은 알콕시카보닐 그룹(예를 들면, -C(O)-알킬-C(O)-OR, 여기서, R은 임의로 치환된 C₁₋₆, C₁₋₁₀, 또는 C₁₋₂₀ 알킬 그룹이다)으로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은, 아실 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 알콕시카보닐아실은 3 내지 41개의 탄소들(예를 들면, 3 내지 10, 3 내지 13, 3 내지 17, 3 내지 21, 또는 3 내지 31개의 탄소들, 예를 들면, C₁₋₆ 알콕시카보닐-C₁₋₆ 아실, C₁₋₁₀ 알콕시카보닐-C₁₋₁₀ 아실, 또는 C₁₋₂₀ 알콕시카보닐-C₁₋₂₀ 아실)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 각각의 알콕시 및 알킬 그룹은 각각의 그룹에 대해 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들(예를 들면, 하이드록시 그룹)으로 추가로 독립적으로 치환된다.

[1658] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "알콕시카보닐알콕시"는 본원에 정의된 바와 같은 알콕시카보닐 그룹(예를 들면, -O-알킬-C(O)-OR, 여기서, R은 임의로 치환된 C₁₋₆, C₁₋₁₀, 또는 C₁₋₂₀ 알킬 그룹이다)로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은, 알콕시 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 알콕시카보닐알콕시는 3 내지 41개의 탄소들(예를 들면, 3 내지 10, 3 내지 13, 3 내지 17, 3 내지 21, 또는 3 내지 31개의 탄소들, 예를 들면, C₁₋₆ 알콕시카보닐-C₁₋₆ 알콕시, C₁₋₁₀ 알콕시카보닐-C₁₋₁₀ 알콕시, 또는 C₁₋₂₀ 알콕시카보닐-C₁₋₂₀ 알콕시)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 각각의 알콕시 그룹은 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들(예를 들면, 하이드록시 그룹)로 추가로 독립적으로 치환된다.

[1659] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "알콕시카보닐알킬"은 본원에 정의된 바와 같은 알콕시카보닐 그룹(예를 들면, -알킬-C(O)-OR, 여기서, R은 임의로 치환된 C₁₋₂₀, C₁₋₁₀, 또는 C₁₋₆ 알킬 그룹이다)으로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은, 알킬 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 알콕시카보닐알킬은 3 내지 41개의 탄소들(예를 들면, 3 내지 10, 3 내지 13, 3 내지 17, 3 내지 21, 또는 3 내지 31개의 탄소들, 예를 들면, C₁₋₆ 알콕시카보닐-C₁₋₆ 알킬, C₁₋₁₀ 알콕시카보닐-C₁₋₁₀ 알킬, 또는 C₁₋₂₀ 알콕시카보닐-C₁₋₂₀ 알킬)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 각각의 알킬 및 알콕시 그룹은 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들(예를 들면, 하이

드록시 그룹)로 추가로 독립적으로 치환된다.

[1660] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "알콕시카보닐알케닐"은 본원에 정의된 바와 같은 알콕시카보닐 그룹(예를 들면, -알케닐-C(O)-OR, 여기서, R은 임의로 치환된 C₁₋₂₀, C₁₋₁₀, 또는 C₁₋₆ 알킬 그룹이다)으로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은, 알케닐 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 알콕시카보닐알케닐은 4 내지 41개의 탄소들(예를 들면, 4 내지 10, 4 내지 13, 4 내지 17, 4 내지 21, 또는 4 내지 31개의 탄소들, 예를 들면, C₁₋₆ 알콕시카보닐-C₂₋₆ 알케닐, C₁₋₁₀ 알콕시카보닐-C₂₋₁₀ 알케닐, 또는 C₁₋₂₀ 알콕시카보닐-C₂₋₂₀ 알케닐)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 각각의 알킬, 알케닐, 및 알콕시 그룹은 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들(예를 들면, 하이드록시 그룹)로 추가로 독립적으로 치환된다.

[1661] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "알콕시카보닐알키닐"은 본원에 정의된 바와 같은 알콕시카보닐 그룹(예를 들면, -알키닐-C(O)-OR, 여기서, R은 임의로 치환된 C₁₋₂₀, C₁₋₁₀, 또는 C₁₋₆ 알킬 그룹이다)으로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은, 알키닐 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 알콕시카보닐알키닐은 4 내지 41개의 탄소들(예를 들면, 4 내지 10, 4 내지 13, 4 내지 17, 4 내지 21, 또는 4 내지 31개의 탄소들, 예를 들면, C₁₋₆ 알콕시카보닐-C₂₋₆ 알키닐, C₁₋₁₀ 알콕시카보닐-C₂₋₁₀ 알키닐, 또는 C₁₋₂₀ 알콕시카보닐-C₂₋₂₀ 알키닐)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 각각의 알킬, 알키닐, 및 알콕시 그룹은 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들(예를 들면, 하이드록시 그룹)로 추가로 독립적으로 치환된다.

[1662] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "알킬"은, 달리 나타내지 않는 한, 탄소수 1 내지 20(예를 들면, 1 내지 10 또는 1 내지 6)의 직쇄 또는 측쇄의 포화된 그룹들 둘 다를 포함한다. 알킬 그룹들은 메틸, 에틸, n- 및 이소-프로필, n-, 2급-, 이소- 및 3급-부틸, 네오펜틸 등으로 예시되며, (1) C₁₋₆ 알콕시; (2) C₁₋₆ 알킬설퍼닐; (3) 본원에 정의된 바와 같은, 아미노[예를 들면, 치환되지 않은 아미노(즉, -NH₂) 또는 치환된 아미노(즉, -N(R^{N1})₂, 여기서, R^{N1}는 아미노에 대해 정의된 바와 같다]; (4) C₆₋₁₀ 아릴-C₁₋₆ 알콕시; (5) 아지도; (6) 할로; (7)(C₂₋₉ 헤테로사이클릴)옥시; (8) O-보호 그룹으로 임의로 치환된 하이드록시; (9) 니트로; (10) 옥소(예를 들면, 카복시 알데하이드 또는 아실); (11) C₁₋₇ 스피로사이클릴; (12) 티오알콕시; (13) 티올; (14) O-보호 그룹으로 임의로 치환된 -CO₂R^{A'} {여기서, R^{A'}은 (a) C₁₋₂₀ 알킬(예를 들면, C₁₋₆ 알킬), (b) C₂₋₂₀ 알케닐(예를 들면, C₂₋₆ 알케닐), (c) C₆₋₁₀ 아릴, (d) 수소, (e) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴, (f) 아미노-C₁₋₂₀ 알킬, (g) -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR' [여기서, s1은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, R'은 H 또는 C₁₋₂₀ 알킬이다]의 폴리에틸렌 글리콜, 및 (h) -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1} [여기서, s1은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, 수소 또는 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬이다]의 아미노-폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 그룹으로부터 선택된다}; (15) -C(O)NR^{B'}R^{C'} [여기서, 각각의 R^{B'} 및 R^{C'}은, 독립적으로, (a) 수소, (b) C₁₋₆ 알킬, (c) C₆₋₁₀ 아릴, 및 (d) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]; (16) -SO₂R^{D'} [여기서, R^{D'}는 (a) C₁₋₆ 알킬, (b) C₆₋₁₀ 아릴, (c) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴, 및 (d) 하이드록시로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]; (17) -SO₂NR^{E'}R^{F'} [여기서, 각각의 R^{E'} 및 R^{F'}은, 독립적으로, (a) 수소, (b) C₁₋₆ 알킬, (c) C₆₋₁₀ 아릴 및 (d) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]; (18) -C(O)R^{G'} {여기서, R^{G'}은 (a) C₁₋₂₀ 알킬(예를 들면, C₁₋₆ 알킬), (b) C₂₋₂₀ 알케닐(예를 들면, C₂₋₆ 알케닐), (c) C₆₋₁₀ 아릴, (d) 수소, (e) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴, (f) 아미노-C₁₋₂₀ 알킬, (g) -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR' [여기서, s1은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, R'은 H 또는 C₁₋₂₀ 알킬이다]의 폴리에틸렌 글리콜, 및 (h) -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1} [여기서, s1은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, 수소 또는 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬이다]의 아미노-폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 그룹으로부터 선택된다};

6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, 수소 또는 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬이다]의 아미노-폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 그룹으로부터 선택된다}; (19) -NR^{H'}(O)R^{I'}{여기서, R^{H'}은 (a1) 수소 및 (b1) C₁₋₆ 알킬로 이루어진 그룹 중에서 선택되고, R^{I'}은 (a2) C₁₋₂₀ 알킬(예를 들면, C₁₋₆ 알킬), (b2) C₂₋₂₀ 알케닐(예를 들면, C₂₋₆ 알케닐), (c2) C₆₋₁₀ 아릴, (d2) 수소, (e2) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴, (f2) 아미노-C₁₋₂₀ 알킬, (g2) -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR'[여기서, s1은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, R'은 H 또는 C₁₋₂₀ 알킬이다]의 폴리에틸렌 글리콜, 및 (h2) -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}[여기서, s1은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, 수소 또는 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]의 아미노-폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 그룹으로부터 선택된다}; (20) -NR^{J'}C(O)OR^{K'}{여기서, R^{J'}은 (a1) 수소 및 (b1) C₁₋₆ 알킬로 이루어진 그룹 중에서 선택되고, R^{K'}은 (a2) C₁₋₂₀ 알킬(예를 들면, C₁₋₆ 알킬), (b2) C₂₋₂₀ 알케닐(예를 들면, C₂₋₆ 알케닐), (c2) C₆₋₁₀ 아릴, (d2) 수소, (e2) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴, (f2) 아미노-C₁₋₂₀ 알킬, (g2) -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR'[여기서, s1은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, R'은 H 또는 C₁₋₂₀ 알킬이다]의 폴리에틸렌 글리콜, 및 (h2) -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}[여기서, s1은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, 수소 또는 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬이다];로 이루어진 그룹으로부터 선택된다}; 및 (21) 아미디노로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1, 2, 3개, 또는 탄소수 2 이상의 알킬 그룹들의 경우에 4개의 치환체들로 임의로 치환될 수 있다. 일부 실시형태에서, 각각의 이들 그룹들은 본원에 기술된 바와 같이 추가로 치환될 수 있다. 예를 들면, C₁-알크아릴의 알킬렌 그룹은 옥소 그룹으로 추가로 치환되어 각각의 아릴로일 치환체를 생성한다.

[1663] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "알킬렌" 및 접두사 "알크-"는, 2개의 수소 원자들의 제거에 의해 직쇄 또는 측쇄의 포화된 탄화수소로부터 기원한 포화된 2가 탄화수소 그룹을 나타내며, 메틸렌, 에틸렌, 이소프로필렌 등으로 예시된다. 용어 "C_{x-y} 알킬렌" 및 접두사 "C_{x-y} 알크-"는 x와 y 사이에 탄소들을 갖는 알킬렌 그룹들을 나타낸다. x에 대한 예시적인 값들은 1, 2, 3, 4, 5, 및 6이고, y에 대한 예시적인 값들은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 또는 20(예를 들면, C₁₋₆, C₁₋₁₀, C₂₋₂₀, C₂₋₆, C₂₋₁₀, 또는 C₂₋₂₀ 알킬렌)이다. 일부 실시형태에서, 알킬렌은 알킬 그룹에 대해 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다.

[1664] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "알킬설피닐"은 -S(O)- 그룹을 통해 모 분자 그룹에 부착된 알킬 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 알킬설피닐 그룹들은, 탄소수가 1 내지 6, 1 내지 10, 또는 1 내지 20이다. 일부 실시형태에서, 알킬 그룹은 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다.

[1665] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "알킬설피닐알킬"은 알킬설피닐 그룹으로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은 알킬 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 알킬설피닐알킬 그룹들은, 탄소수가 2 내지 12, 2 내지 20, 또는 2 내지 40이다. 일부 실시형태에서, 각각의 알킬 그룹은 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다.

[1666] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "알킬닐"은, 탄소-탄소 삼중 결합을 함유하는 탄소수가 2 내지 20(예를 들면, 2 내지 4, 2 내지 6, 또는 2 내지 10)인 1가의 직쇄 또는 측쇄 그룹들을 나타내며 에틸닐, 1-프로피닐 등으로 예시될 수 있다. 알킬닐 그룹들은 본원에 정의된 바와 같은, 아릴, 사이클로알킬, 또는 헤테로사이클릴(예를 들

면, 헤테로아릴), 또는 본원에 기술된 예시적인 알킬 치환체 그룹들 중의 어느 하나 중에서 독립적으로 선택된, 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 임의로 치환될 수 있다.

[1667] 용어 "알킬닐옥시"는 화학식 -OR[여기서, R은 달리 나타내지 않는 한, C₂₋₂₀ 알킬닐 그룹(예를 들면, C₂₋₆ 또는 C₂₋₁₀ 알킬닐)이다]의 화학적 치환체를 나타낸다. 예시적인 알킬닐옥시 그룹들은 에틸닐옥시, 프로피닐옥시 등을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 알킬닐 그룹은 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들(예를 들면, 하이드록시 그룹)로 추가로 치환될 수 있다.

[1668] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "아미딘"은 -C(=NH)NH₂ 그룹을 나타낸다.

[1669] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "아미노"는 -N(R^{N1})₂[여기서, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, H, OH, NO₂, N(R^{N2})₂, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, N-보호 그룹, 알킬, 알케닐, 알킬닐, 알콕시, 아릴, 알크아릴, 사이클로알킬, 알크사이클로알킬, 카복시알킬(예를 들면, O-보호 그룹으로 임의로 치환됨, 예를 들면, 임의로 치환된 아릴알콕시카보닐 그룹들 또는 본원에 기술된 임의의 것), 설포알킬, 아실(예를 들면, 아세틸, 트리플루오로아세틸, 또는 본원에 기술된 다른 것들), 알콕시카보닐알킬(예를 들면, O-보호 그룹임의 치환됨, 예를 들면, 임의로 치환된 아릴알콕시카보닐 그룹들 또는 본원에 기술된 임의의 것), 헤테로사이클릴(예를 들면, 헤테로아릴), 또는 알크헤테로사이클릴(예를 들면, 알크헤테로아릴)이며, 여기서, 각각의 이들 언급된 R^{N1} 그룹들은 각각의 그룹에 대해 본원에 정의된 바와 같이 임의로 치환될 수 있거나; 또는 2개의 R^{N1}은 결합하여 헤테로사이클릴 또는 N-보호 그룹을 형성하고, 여기서, 각각의 R^{N2}는, 독립적으로, H, 알킬, 또는 아릴이다]을 나타낸다. 본 발명의 아미노 그룹들은 치환되지 않은 아미노(즉, -NH₂) 또는 치환된 아미노(즉, -N(R^{N1})₂)일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 아미노는 -NH₂ 또는 -NHR^{N1}[여기서, R^{N1}는, 독립적으로, OH, NO₂, NH₂, NR^{N2}₂, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, 알킬, 카복시알킬, 설포알킬, 아실(예를 들면, 아세틸, 트리플루오로아세틸, 또는 본원에 기술된 다른 것들), 알콕시카보닐알킬(예를 들면, t-부톡시카보닐알킬) 또는 아릴이고, 각각의 R^{N2}는 H, C₁₋₂₀ 알킬(예를 들면, C₁₋₆ 알킬), 또는 C₆₋₁₀ 아릴일 수 있다]이다.

[1670] 본원에 기술된 바와 같은, 용어 "아미노산"은 측쇄, 아미노 그룹, 및 산 그룹(예를 들면, -CO₂H의 카복시 그룹 또는 -SO₃H의 설포 그룹)을 갖는 분자를 말하고, 아미노산은 측쇄, 아미노 그룹, 또는 산 그룹(예를 들면, 측쇄)에 의해 모 분자 그룹에 부착된다. 일부 실시형태에서, 아미노산은 카보닐 그룹에 의해 모 분자 그룹에 부착되고, 여기서, 측쇄 또는 아미노 그룹은 카보닐 그룹에 부착된다. 예시적인 측쇄들은 임의로 치환된 알킬, 아릴, 헤테로사이클릴, 알크아릴, 알크헤테로사이클릴, 아미노알킬, 카바모일알킬, 및 카복시알킬을 포함한다. 예시적인 아미노산들은 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 하이드록시노르발린, 이소류이신, 류이신, 라이신, 메티오닌, 노르발린, 오르티딘, 페닐알라닌, 피롤린, 피롤라이신, 셀레노시스테인, 세린, 타우린, 트레오닌, 트립토판, 타이로신 및 발린을 포함한다. 아미노산 그룹들은: (1) C₁₋₆ 알콕시; (2) C₁₋₆ 알킬설피닐; (3) 본원에 정의된 바와 같은 아미노(예를 들면, 치환되지 않은 아미노(즉, -NH₂) 또는 치환된 아미노(즉, -N(R^{N1})₂(여기서, R^{N1}은 아미노에 대해 정의된 바와 같다)); (4) C₆₋₁₀ 아릴-C₁₋₆ 알콕시; (5) 아지도; (6) 할로; (7)(C₂₋₉ 헤테로사이클릴)옥시; (8) 하이드록시; (9) 니트로; (10) 옥소(예를 들면, 카복시알데하이드 또는 아실); (11) C₁₋₇ 스피로사이클릴; (12) 티오알콕시; (13) 티올; (14) -CO₂R^{A'}[여기서, R^{A'}은 (a) C₁₋₂₀ 알킬(예를 들면, C₁₋₆ 알킬), (b) C₂₋₂₀ 알케닐(예를 들면, C₂₋₆ 알케닐), (c) C₆₋₁₀ 아릴, (d) 수소, (e) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴, (f) 아미노-C₁₋₂₀ 알킬, (g) -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR'[여기서, s1은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3, 독립적으로 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, R'은 H 또는 C₁₋₂₀ 알킬이다]의 폴리에틸렌 글리콜, 및 (h) -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}[여기서, s1은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, 수소 또는 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬로 이루어

진 그룹으로부터 선택된다]의 아미노-폴리에틸렌 글리콜; (15) $-C(O)NR^{B'}C'$ [여기서, 각각의 $R^{B'}$ 및 $R^{C'}$ 은, 독립적으로, (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{6-10} 아릴, 및 (d) C_{1-6} 알크- C_{6-10} 아릴로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]; (16) $-SO_2R^{D'}$ [여기서, $R^{D'}$ 은 (a) C_{1-6} 알킬, (b) C_{6-10} 아릴, (c) C_{1-6} 알크- C_{6-10} 아릴, 및 (d) 하이드록시로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]; (17) $-SO_2NR^{E'}F'$ [여기서, 각각의 $R^{E'}$ 및 $R^{F'}$ 은, 독립적으로, (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{6-10} 아릴 및 (d) C_{1-6} 알크- C_{6-10} 아릴로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]; (18) $-C(O)R^{G'}$ {여기서, $R^{G'}$ 은 (a) C_{1-20} 알킬(예를 들면, C_{1-6} 알킬), (b) C_{2-20} 알케닐(예를 들면, C_{2-6} 알케닐), (c) C_{6-10} 아릴, (d) 수소, (e) C_{1-6} 알크- C_{6-10} 아릴, (f) 아미노- C_{1-20} 알킬, (g) $-(CH_2)_{s_2}(OCH_2CH_2)_{s_1}(CH_2)_{s_3}OR'$ [여기서, s_1 은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s_2 및 s_3 은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, R' 은 H 또는 C_{1-20} 알킬이다]의 폴리에틸렌 글리콜, 및 (h) $-NR^{N_1}(CH_2)_{s_2}(CH_2CH_2O)_{s_1}(CH_2)_{s_3}NR^{N_1}$ [여기서, s_1 은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s_2 및 s_3 은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, 각각의 N^{N_1} 은, 독립적으로, 수소 또는 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]의 아미노-폴리에틸렌 글리콜; (19) $-NR^{H'}(O)R^{I'}$ [여기서, $R^{H'}$ 은 (a1) 수소 및 (b1) C_{1-6} 알킬로 이루어진 그룹 중에서 선택되고, $R^{I'}$ 은 (a2) C_{1-20} 알킬(예를 들면, C_{1-6} 알킬), (b2) C_{2-20} 알케닐(예를 들면, C_{2-6} 알케닐), (c2) C_{6-10} 아릴, (d2) 수소, (e2) C_{1-6} 알크- C_{6-10} 아릴, (f2) 아미노- C_{1-20} 알킬, (g2) $-(CH_2)_{s_2}(OCH_2CH_2)_{s_1}(CH_2)_{s_3}OR'$ [여기서, s_1 은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s_2 및 s_3 은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, R' 은 H 또는 C_{1-20} 알킬이다]의 폴리에틸렌 글리콜, 및 (h2) $-NR^{N_1}(CH_2)_{s_2}(CH_2CH_2O)_{s_1}(CH_2)_{s_3}NR^{N_1}$ [여기서, s_1 은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s_2 및 s_3 은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, 각각의 N^{N_1} 은, 독립적으로, 수소 또는 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]의 아미노-폴리에틸렌 글리콜; (20) $-NR^{J'}(O)OR^{K'}$ [여기서, $R^{J'}$ 은 (a1) 수소 및 (b1) C_{1-6} 알킬로 이루어진 그룹 중에서 선택되고, $R^{K'}$ 은 (a2) C_{1-20} 알킬(예를 들면, C_{1-6} 알킬), (b2) C_{2-20} 알케닐(예를 들면, C_{2-6} 알케닐), (c2) C_{6-10} 아릴, (d2) 수소, (e2) C_{1-6} 알크- C_{6-10} 아릴, (f2) 아미노- C_{1-20} 알킬, (g2) $-(CH_2)_{s_2}(OCH_2CH_2)_{s_1}(CH_2)_{s_3}OR'$ [여기서, s_1 은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s_2 및 s_3 은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, R' 은 H 또는 C_{1-20} 알킬이다]의 폴리에틸렌 글리콜, 및 (h2) $-NR^{N_1}(CH_2)_{s_2}(CH_2CH_2O)_{s_1}(CH_2)_{s_3}NR^{N_1}$ [여기서, s_1 은 1 내지 10(예를 들면, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s_2 및 s_3 은, 독립적으로, 0 내지 10(예를 들면, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이며, 각각의 N^{N_1} 은, 독립적으로, 수소 또는 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]의 아미노-폴리에틸렌 글리콜; 및 (21) 아미딘으로 이루어진 그룹 중에서 독립적으로 선택된 1개, 2개, 3개, 또는 탄소수가 2 이상인 아미노산 그룹들의 경우에 4개의 치환체들로 임의로 치환될 수 있다. 일부 실시형태에서, 각각의 이들 그룹들은 본원에 기술된 바와 같이 추가로 치환될 수 있다.

[1671] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "아미노알콕시"는 본원에 정의된 바와 같은, 아미노 그룹으로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은, 알콕시 그룹을 나타낸다. 알킬 및 아미노 각각은 각각의 그룹[예를 들면, $CO_2R^{A'}$ (여기서, $R^{A'}$ 은 (a) C_{1-6} 알킬, (b) C_{6-10} 아릴, (c) 수소, 및 (d) C_{1-6} 알크- C_{6-10} 아릴, 예를 들면, 카복시로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]에 대해 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 치환될 수 있다.

[1672] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "아미노알킬"은 본원에 정의된 바와 같은 아미노 그룹으로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은, 알킬 그룹을 나타낸다. 알킬 및 아미노 각각은 각각의 그룹[예를 들면, $CO_2R^{A'}$ (여기서, $R^{A'}$ 은 (a)

C₁₋₆ 알킬, (b) C₆₋₁₀ 아릴, (c) 수소, 및 (d) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴, 예를 들면, 카복시, 및/또는 N-보호 그룹으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]에 대해 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다.

[1673] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "아미노알케닐"은 본원에 정의된 바와 같은 아미노 그룹에 의해 치환된, 본원에 정의된 바와 같은 알케닐 그룹을 나타낸다. 알케닐 및 아미노 각각은 각각의 그룹[예를 들면, CO₂R^{A'} (여기서, R^{A'}은 (a) C₁₋₆ 알킬, (b) C₆₋₁₀ 아릴, (c) 수소, 및 (d) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴, 예를 들면, 카복시, 및/또는 N-보호 그룹으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다)]에 대해 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다.

[1674] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "아미노알킬닐"은 본원에 정의된 바와 같은 아미노 그룹에 의해 치환된, 본원에 정의된 바와 같은 알킬닐 그룹을 나타낸다. 알킬닐 및 아미노 각각은 각각의 그룹[예를 들면, CO₂R^{A'} (여기서, R^{A'}은 (a) C₁₋₆ 알킬, (b) C₆₋₁₀ 아릴, (c) 수소, 및 (d) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴, 예를 들면, 카복시, 및/또는 N-보호 그룹으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다)]에 대해 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다.

[1675] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "아릴"은 1개 또는 2개의 방향족 환들을 갖는 모노-, 비사이클릭, 또는 다사이클릭 카보사이클릭 환 시스템을 나타내며 페닐, 나프틸, 1,2-디하이드로나프틸, 1,2,3,4-테트라하이드로나프틸, 안트라세닐, 페난트레닐, 플루오레닐, 인다닐, 인테닐 등으로 예시되며, (1) C₁₋₇ 아실(예를 들면, 카복시알데하이드); (2) C₁₋₂₀ 알킬(예를 들면, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시-C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알킬설퍼닐-C₁₋₆ 알킬, 아미노-C₁₋₆ 알킬, 아지도-C₁₋₆ 알킬, (카복시알데하이드)-C₁₋₆ 알킬, 할로-C₁₋₆ 알킬(예를 들면, 퍼플루오로알킬), 하이드록시-C₁₋₆ 알킬, 니트로-C₁₋₆ 알킬, 또는 C₁₋₆ 티오알콕시-C₁₋₆ 알킬); (3) C₁₋₂₀ 알콕시(예를 들면, C₁₋₆ 알콕시, 예를 들면, 퍼플루오로알콕시); (4) C₁₋₆ 알킬설퍼닐; (5) C₆₋₁₀ 아릴; (6) 아미노; (7) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴; (8) 아지도; (9) C₃₋₈ 사이클로알킬; (10) C₁₋₆ 알크-C₃₋₈ 사이클로알킬; (11) 할로; (12) C₁₋₁₂ 헤테로사이클릴(예를 들면, C₁₋₁₂ 헤테로아릴); (13) (C₁₋₁₂ 헤테로사이클릴)옥시; (14) 하이드록시; (15) 니트로; (16) C₁₋₂₀ 티오알콕시(예를 들면, C₁₋₆ 티오알콕시); (17) -(CH₂)_qCO₂R^{A'} [여기서, q는 0 내지 4의 정수이고 R^{A'}은 (a) C₁₋₆ 알킬, (b) C₆₋₁₀ 아릴, (c) 수소, 및 (d) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]; (18) -(CH₂)_qCONR^{B'C'} [여기서, q는 0 내지 4의 정수이고, 여기서, R^{B'} 및 R^{C'}은 (a) 수소, (b) C₁₋₆ 알킬, (c) C₆₋₁₀ 아릴, 및 (d) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴로 이루어진 그룹 중에서 독립적으로 선택된다]; (19) -(CH₂)_qSO₂R^{D'} {여기서, q는 0 내지 4의 정수이고 여기서, R^{D'}은 (a) 알킬, (b) C₆₋₁₀ 아릴, 및 (c) 알크-C₆₋₁₀ 아릴로 이루어진 그룹으로부터 선택된다}; (20) -(CH₂)_qSO₂NR^{E'F'} [여기서, q는 0 내지 4의 정수이고, 여기서, 각각의 R^{E'} 및 R^{F'}은 (a) 수소, (b) C₁₋₆ 알킬, (c) C₆₋₁₀ 아릴, 및 (d) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴로 이루어진 그룹 중에서 독립적으로 선택된다]; (21) 티올; (22) C₆₋₁₀ 아릴옥시; (23) C₃₋₈ 사이클로알콕시; (24) C₆₋₁₀ 아릴-C₁₋₆ 알콕시; (25) C₁₋₆ 알크-C₁₋₁₂ 헤테로사이클릴(예를 들면, C₁₋₆ 알크-C₁₋₁₂ 헤테로아릴); (26) C₂₋₂₀ 알케닐; 및 (27) C₂₋₂₀ 알킬닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 치환체들로 임의로 치환될 수 있다. 일부 실시형태에서, 각각의 이들 그룹들은 본원에 기술된 바와 같이 추가로 치환될 수 있다. 예를 들면, C₁-알크아릴 또는 C₁-알크헤테로사이클릴의 알킬렌 그룹은 옥소 그룹으로 추가로 치환되어 각각의 아릴로일 및 (헤테로사이클릴)로일 치환체 그룹을 생성할 수 있다.

[1676] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "아릴알콕시"는 산소 원자를 통해 모 분자 그룹에 부착된, 본원에 정의된 바와 같은 알크아릴 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 아릴알콕시 그룹들은 7 내지 30개의 탄소들(예를 들면, 7 내지 16 또는 7 내지 20개의 탄소들, 예를 들면, C₆₋₁₀ 아릴-C₁₋₆ 알콕시, C₆₋₁₀ 아릴-C₁₋₁₀ 알콕시, 또는 C₆₋₁₀ 아릴-C₁₋₂₀ 알콕시)을 함유한다. 일부 실시형태에서, 당해 아릴알콕시 그룹은 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들로 치환될 수 있다.

- [1677] 본원에 사용된 것으로서, "아릴알콕시카보닐"은 카보닐(예를 들면, $-C(O)-O-$ 알킬-아릴)을 통해 모 분자 그룹에 부착된, 본원에 정의된 바와 같은 아릴알콕시 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 아릴알콕시 그룹들은 8 내지 31개의 탄소들(예를 들면, 8 내지 17 또는 8 내지 21 탄소들, 예를 들면, C_{6-10} 아릴- C_{1-6} 알콕시-카보닐, C_{6-10} 아릴- C_{1-10} 알콕시-카보닐, 또는 C_{6-10} 아릴- C_{1-20} 알콕시-카보닐)을 함유한다. 일부 실시형태에서, 당해 아릴알콕시카보닐 그룹은 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들로 치환될 수 있다.
- [1678] 용어 "아릴옥시"는 화학식 $-OR'$ (여기서, R' 은, 달리 나타내지 않는 한, 탄소수 6 내지 18의 아릴 그룹이다)의 화학적 치환체를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 아릴 그룹은 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들로 치환될 수 있다.
- [1679] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "아릴로일"은 카보닐 그룹을 통해 모 분자 그룹에 부착된, 본원에 정의된 바와 같은 아릴 그룹을 나타낸다. 예시적인 치환되지 않은 아릴로일 그룹들은, 탄소수가 7 내지 11이다. 일부 실시형태에서, 아릴 그룹은 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들로 치환될 수 있다.
- [1680] 용어 "아지도"는 $-N_3$ 그룹을 나타내며, 이는 또한 $-N=N=N$ 로서 나타낼 수 있다.
- [1681] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "비사이클릭"은 방향족 또는 비-방향족일 수 있는, 2개의 환들을 갖는 구조를 말한다. 비사이클릭 구조들은 본원에 정의된 바와 같은 스피로사이클릭 그룹들, 및 하나 이상의 브릿지(bridge)들을 공유하는 2개의 환들을 포함하며, 여기서, 이러한 브릿지들은 1개의 원자 또는 2개, 3개 이상의 원자들을 포함하는 채를 포함할 수 있다. 예시적인 비사이클릭 그룹들은 비사이클릭 카보사이클릭 그룹을 포함하며, 여기서, 제1 및 제2의 환들은 본원에 정의된 바와 같은 카보사이클릭 그룹들; 비사이클릭 아릴 그룹들(여기서, 제1 및 제2의 환들은 본원에 정의된 바와 같은 아릴 그룹들이다); 비사이클릭 헤테로사이클릭 그룹들(여기서, 제1의 환은 헤테로사이클릭 그룹이고 제2의 환은 카보사이클릭(예를 들면, 아릴) 또는 헤테로사이클릭(예를 들면, 아릴) 그룹이다); 및 비사이클릭 헤테로아릴 그룹들(여기서, 제1의 환은 헤테로아릴 그룹이고 제2의 환은 카보사이클릭(예를 들면, 아릴) 또는 헤테로사이클릭(예를 들면, 헤테로아릴) 그룹이다)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 비사이클릭 그룹은 사이클로알킬, 헤테로사이클릭, 및 아릴 그룹들에 대해 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들로 치환될 수 있다.
- [1682] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "보라닐"은 $-B(R^{B1})_3$ (여기서, 각각의 R^{B1} 은, 독립적으로, H 및 임의로 치환된 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택된다)을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 보라닐 그룹은 알킬에 대해 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들로 치환될 수 있다.
- [1683] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "카보사이클릭" 및 "카보사이클릭"은 임의로 치환된 C_{3-12} 모노사이클릭, 비사이클릭, 또는 트리사이클릭 구조를 말하며, 여기서, 방향족 또는 비-방향족일 수 있는 환들은 탄소 원자들에 의해 형성된다. 카보사이클릭 구조들은 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 및 아릴 그룹들을 포함한다.
- [1684] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "카보닐"은 $-C(O)-N(R^{N1})_2$ (여기서, 각각의 N^{N1} 의 의미는 본원에 제공된 "아미노"의 정의에서 발견된다)을 나타낸다.
- [1685] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "카바모일알킬"은 본원에 정의된 바와 같은 카바모일 그룹으로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은 알킬 그룹을 나타낸다. 알킬 그룹은 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 치환될 수 있다.
- [1686] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "카바밀"은 구조 $-NR^{N1}C(=O)OR$ 또는 $-OC(=O)N(R^{N1})_2$ (여기서, 각각의 N^{N1} 의 의미는 본원에 제공된 "아미노"의 정의에서 발견되며 R 은 본원에 정의된 바와 같은 알킬, 사이클로알킬, 알크사이클로알킬, 아릴, 알크아릴, 헤테로사이클릭(예를 들면, 헤테로아릴), 또는 알크헤테로사이클릭(예를 들면, 알크헤테로아릴)이다)를 갖는 카바메이트 그룹을 말한다.
- [1687] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "카보닐"은 $C(O)$ 그룹을 나타내며, 이는 또한 $C=O$ 로 나타낼 수 있다.
- [1688] 용어 "카복시알데하이드"는 구조 $-CHO$ 를 갖는 아실 그룹을 나타낸다.
- [1689] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "카복시"는 $-CO_2H$ 를 나타낸다.
- [1690] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "카복시알콕시"는, 본원에 정의된 바와 같은 카복시 그룹으로 치환된, 본원에 정

의된 바와 같은 알콕시 그룹을 나타낸다. 알콕시 그룹은 알킬 그룹에 대해 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있으며, 카복시 그룹은 하나 이상의 *O*-보호 그룹들로 임의로 치환될 수 있다.

[1691] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "카복시알킬"은 본원에 정의된 바와 같은 카복시 그룹으로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은 알킬 그룹을 나타낸다. 알킬 그룹은 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있고, 카복시 그룹은 하나 이상의 *O*-보호 그룹들로 임의로 치환될 수 있다.

[1692] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "카복시아미노알킬"은 본원에 정의된 바와 같은, 카복시로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은 아미노알킬 그룹을 나타낸다. 카복시, 알킬, 및 아미노 각각은 대표적인 그룹[예를 들면, CO₂R^{A'} (여기서, R^{A'}은 (a) C₁₋₆ 알킬, (b) C₆₋₁₀ 아릴, (c) 수소, 및 (d) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴, 예를 들면, 카복시, 및/또는 *N*-보호 그룹, 및/또는 *O*-보호 그룹으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다)]에 대해 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다.

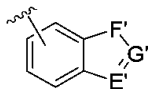
[1693] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "시아노"는 -CN 그룹을 나타낸다.

[1694] 용어 "사이클로알콕시"는 화학식 -OR(여기서, R은 달리 나타내지 않는 한, 본원에 정의된 바와 같은 C₃₋₈ 사이클로알킬 그룹이다)의 화학적 치환체를 나타낸다. 사이클로알킬 그룹은 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다. 예시적인 치환되지 않은 사이클로알콕시 그룹들은 탄소수는 3 내지 8이다. 일부 실시형태에서, 사이클로알킬 그룹은 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다.

[1695] 본원에 사용된 것으로서 용어 "사이클로알킬"은 달리 나타내지 않는 한 탄소수 3 내지 8의 1가의 포화되거나 불포화된 비-방향족 사이클릭 탄화수소 그룹을 나타내며, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸, 비사이클 헵틸 등으로 예시된다. 사이클로알킬 그룹이 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 경우, 당해 사이클로알킬 그룹은 "사이클로알케닐" 그룹으로 언급될 수 있다. 예시적인 사이클로알케닐 그룹들은 사이클로펜테닐, 사이클로헥세닐 등을 포함한다. 본 발명의 사이클로알킬 그룹들은: (1) C₁₋₇ 아실(예를 들면, 카복시알데하이드); (2) C₁₋₂₀ 알킬(예를 들면, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시-C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알킬설피닐-C₁₋₆ 알킬, 아미노-C₁₋₆ 알킬, 아지도-C₁₋₆ 알킬, (카복시알데하이드)-C₁₋₆ 알킬, 할로-C₁₋₆ 알킬(예를 들면, 퍼플루오로알킬), 하이드록시-C₁₋₆ 알킬, 니트로-C₁₋₆ 알킬, 또는 C₁₋₆ 티오알콕시-C₁₋₆ 알킬); (3) C₁₋₂₀ 알콕시(예를 들면, C₁₋₆ 알콕시, 예를 들면, 퍼플루오로알콕시); (4) C₁₋₆ 알킬설피닐; (5) C₆₋₁₀ 아릴; (6) 아미노; (7) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴; (8) 아지도; (9) C₃₋₈ 사이클로알킬; (10) C₁₋₆ 알크-C₃₋₈ 사이클로알킬; (11) 할로; (12) C₁₋₁₂ 헤테로사이클릴(예를 들면, C₁₋₁₂ 헤테로아릴); (13) (C₁₋₁₂ 헤테로사이클릴)옥시; (14) 하이드록시; (15) 니트로; (16) C₁₋₂₀ 티오알콕시(예를 들면, C₁₋₆ 티오알콕시); (17) -(CH₂)_qCO₂R^{A'} [여기서, q는 0 내지 4의 정수이고, R^{A'}은 (a) C₁₋₆ 알킬, (b) C₆₋₁₀ 아릴, (c) 수소, 및 (d) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]; (18) -(CH₂)_qCONR^{B'}C^{C'} [여기서, q는 0 내지 4의 정수이고, 여기서, R^{B'} 및 R^{C'}은 (a) 수소, (b) C₆₋₁₀ 알킬, (c) C₆₋₁₀ 아릴, 및 (d) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴로 이루어진 그룹 중에서 독립적으로 선택된다]; (19) -(CH₂)_qSO₂R^{D'} [여기서, q는 0 내지 4의 정수이고, 여기서, R^{D'}은 (a) C₆₋₁₀ 알킬, (b) C₆₋₁₀ 아릴, 및 (c) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]; (20) -(CH₂)_qSO₂NR^{E'F'} [여기서, q는 0 내지 4의 정수이고, 여기서, 각각의 R^{E'} 및 R^{F'}은, (a) 수소, (b) C₆₋₁₀ 알킬, (c) C₆₋₁₀ 아릴, 및 (d) C₁₋₆ 알크-C₆₋₁₀ 아릴로 이루어진 그룹 중에서 독립적으로 선택된다]; (21) 티올; (22) C₆₋₁₀ 아릴옥시; (23) C₃₋₈ 사이클로알콕시; (24) C₆₋₁₀ 아릴-C₁₋₆ 알콕시; (25) C₁₋₆ 알크-C₁₋₁₂ 헤테로사이클릴(예를 들면, C₁₋₆ 알크-C₁₋₁₂ 헤테로아릴); (26) 옥소; (27) C₂₋₂₀ 알케닐; 및 (28) C₂₋₂₀ 알킬닐로 임의로 치환될 수 있다. 일부 실시형태에서, 각각의 이들 그룹들은 본원에 기술된 바와 같이 추가로 치환될 수 있다. 예를 들면, C₁-알크아릴 또는 C₁-알크헤테로사이클릴의 알킬렌 그룹은 옥소 그룹으로 추가로 치환되어 각각의 아릴로일 및 (헤테로사이클릴)로일 치환체 그룹을 생성한다.

- [1696] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "부분입체이성체"는 서로 거울 상들이 아니고 서로 겹쳐지지 않는(non-super imposable) 입체이성체들을 의미한다.
- [1697] 본원에 사용된 것으로서, 용어 제제의 "유효량"은, 유리하거나 바람직한 결과들, 예를 들면, 임상 결과들을 달성하기에 충분한 양이며, 이와 같이, "유효량"은, 이것이 적용되는 내용에 의존한다. 예를 들면, 암을 치료하는 제제를 투여하는 것과 관련하여, 제제의 유효량은, 예를 들면, 제제의 투여없이 수득된 반응과 비교한 것으로서, 암의 본원에 정의된 바와 같은, 치료를 달성하기에 충분한 양이다.
- [1698] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "거울상이성체"는 광학적 순도 또는 적어도 80%(즉, 적어도 90%의 하나의 거울상이성체 및 대부분 10%의 다른 거울상이성체), 바람직하게는 적어도 90% 및 보다 바람직하게는 적어도 98%의 거울상이성체성 과량(당해 분야에 표준 방법들로 측정된 것으로서)을 갖는, 본 발명의 화합물의 각각 개개의 광학적으로 활성인 형태를 의미한다.
- [1699] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "할로"는 브롬, 염소, 요오드, 또는 불소로부터 선택되는 할로젠을 나타낸다.
- [1700] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "할로알콕시"는 할로젠 그룹(즉, F, Cl, Br, 또는 I)으로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은 알콕시 그룹을 나타낸다. 할로알콕시는 1개, 2개, 3개, 또는 탄소수가 2 이상인 알킬 그룹들의 경우에, 4개의 할로젠들로 치환될 수 있다. 할로알콕시 그룹들은 퍼플루오로알콕시들(예를 들면, $-OCF_3$), $-OCHF_2$, $-OCH_2F$, $-OCCl_3$, $-OCH_2CH_2Br$, $-OCH_2CH(CH_2CH_2Br)CH_3$, 및 $-OCHICH_3$ 을 포함한다. 일부 실시형태에서, 할로알콕시 그룹은 알킬 그룹들의 경우 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다.
- [1701] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "할로알킬"은 할로젠 그룹(즉, F, Cl, Br, 또는 I)으로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은 알킬 그룹을 나타낸다. 할로알킬은 1개, 2개, 3개, 또는 탄소수가 2 이상인 알킬 그룹들의 경우에 4개의 할로젠들로 치환될 수 있다. 할로알킬 그룹들은 퍼플루오로알킬들(예를 들면, $-CF_3$), $-CHF_2$, $-CH_2F$, $-CCl_3$, $-CH_2CH_2Br$, $-CH_2CH(CH_2CH_2Br)CH_3$, 및 $-CHICH_3$ 을 포함한다. 일부 실시형태에서, 할로알킬 그룹은 알킬 그룹들에 대해 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다.
- [1702] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "헤테로알킬렌"은 본원에 정의된 바와 같은 알킬렌 그룹을 말하며, 여기서, 치환체 탄소 원자들 중 1개 또는 2개는 각각 질소, 산소, 또는 황으로 대체되어 있다. 일부 실시형태에서, 헤테로알킬렌 그룹은 알킬렌 그룹들의 경우 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다.
- [1703] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "헤테로아릴"은 방향족인, 본원에 정의된 바와 같은 헤테로사이클릴들의 소세트를 나타내는데: 즉, 이들은 모노- 또는 다중사이클릭 환 시스템내에 $4m+2$ pi 전자들을 함유한다. 예시적인 치환되지 않은 헤테로아릴 그룹들은 탄소수가 1 내지 12(예를 들면, 1 내지 11, 1 내지 10, 1 내지 9, 2 내지 12, 2 내지 11, 2 내지 10, 또는 2 내지 9)이다. 일부 실시형태에서, 헤테로아릴은 헤테로사이클릴그룹에 대해 정의된 바와 같이 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들 그룹들로 치환된다.
- [1704] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "헤테로사이클릴"은 달리 명시하지 않는 한, 질소, 산소, 및 황으로 이루어진 그룹 중에서 독립적으로 선택된. 1개, 2개, 3개 또는 4개의 헤테로원자들을 함유하는 5-, 6- 또는 7-원 환을 나타낸다. 5-원 환은 0 내지 2개의 이중 결합들을 가지며, 6- 및 7-원 환들은 0 내지 3개의 이중 결합들을 가진다. 예시적인 치환되지 않은 헤테로사이클릴 그룹들은, 탄소수가 1 내지 12(예를 들면, 1 내지 11, 1 내지 10, 1 내지 9, 2 내지 12, 2 내지 11, 2 내지 10, 또는 2 내지 9)이다. 용어 "헤테로사이클릴"은 또한, 하나 이상의 탄소들 및/또는 헤테로원자들이 모노사이클릭 환, 예를 들면, 퀴누클리디닐 그룹의 2개의 인접하지 않은 구성원들을 브릿지하는 브릿지된 다중사이클릭 구조를 갖는 헤테로사이클릭 화합물을 나타낸다. 용어 "헤테로사이클릴"은 비사이클릭, 트리사이클릭, 및 테트라사이클릭 그룹들을 포함하며, 여기서, 상기 헤테로사이클릭 환들 중의 어느 하나는 1개, 2개, 또는 3개의 카보사이클릭 환들, 예를 들면, 아릴 환, 사이클로헥산 환, 사이클로헥센 환, 사이클로펜탄 환, 사이클로펜텐 환, 또는 다른 모노사이클릭 헤테로사이클릭 환, 예를 들면, 인돌릴, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 테트라하이드로퀴놀릴, 벤조푸릴, 벤조티에닐 등에 융합된 비사이클릭, 트리사이클릭, 및 테트라사이클릭 그룹들을 포함한다. 융합된 헤테로사이클릴들의 예는 트로판 및 1,2,3,5,8a-헥사하이드로인돌리진을 포함한다. 헤테로사이클릴들은 피롤릴, 피롤리닐, 피롤리디닐, 피라졸릴, 피라졸리닐, 피라졸리디닐, 이미다졸릴, 이미다졸리닐, 이미다졸리디닐, 피리딜, 피페리디닐, 호모피페리디닐, 피라지닐, 피페라지닐, 피리미디닐, 피리다지닐, 옥사졸릴, 옥사졸리디닐, 이속사졸릴, 이속사졸리디닐, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 티아졸

릴, 티아졸리디닐, 이소티아졸릴, 이소티아졸리디닐, 인돌릴, 인다졸릴, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 퀴놀살리닐, 디하이드로퀴놀살리닐, 퀴나졸리닐, 신놀리닐, 프탈라지닐, 벤즈이미다졸릴, 벤조티아졸릴, 벤족사졸릴, 벤조티아디아졸릴, 푸릴, 티에닐, 티아졸리디닐, 이소티아졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴(예를 들면, 1,2,3-옥사디아졸릴), 푸리닐, 티아디아졸릴(예를 들면, 1,2,3-티아디아졸릴), 테트라하이드로푸라닐, 디하이드로푸라닐, 테트라하이드로티에닐, 디하이드로티에닐, 디하이드로인돌릴, 디하이드로퀴놀릴, 테트라하이드로퀴놀릴, 테트라하이드로이소퀴놀릴, 디하이드로이소퀴놀릴, 피라닐, 디하이드로피라닐, 디티아졸릴, 벤조푸라닐, 이소벤조푸라닐, 벤조티에닐 등, 예를 들면, 이의 디하이드로 및 테트라하이드로 형태들을 포함하며, 여기서, 하나 이상의 이중 결합들은 환원되고 수소들로 대체된다. 여전히 다른 예시적인 헤테로사이클릴들은 2,3,4,5-테트라하이드로-2-옥소-옥사졸릴; 2,3-디하이드로-2-옥소-1H-이미다졸릴; 2,3,4,5-테트라하이드로-5-옥소-1H-피라졸릴(예를 들면, 2,3,4,5-테트라하이드로-2-페닐-5-옥소-1H-피라졸릴); 2,3,4,5-테트라하이드로-2,4-디옥소-1H-이미다졸릴(예를 들면, 2,3,4,5-테트라하이드로-2,4-디옥소-5-메틸-5-페닐-1H-이미다졸릴); 2,3-디하이드로-2-티옥소-1,3,4-옥사디아졸릴(예를 들면, 2,3-디하이드로-2-티옥소-5-페닐-1,3,4-옥사디아졸릴); 4,5-디하이드로-5-옥소-1H-트리아졸릴(예를 들면, 4,5-디하이드로-3-메틸-4-아미노 5-옥소-1H-트리아졸릴); 1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소피리디닐(예를 들면, 1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소-3,3-디에틸피리디닐); 2,6-디옥소-피페리디닐(예를 들면, 2,6-디옥소-3-에틸-3-페닐피페리디닐); 1,6-디하이드로-6-옥소피리미디닐; 1,6-디하이드로-4-옥소피리미디닐(예를 들면, 2-(메틸티오)-1,6-디하이드로-4-옥소-5-메틸피리미딘-1-일); 1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소피리미디닐(예를 들면, 1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소-3-에틸피리미디닐); 1,6-디하이드로-6-옥소-피리다지닐(예를 들면, 1,6-디하이드로-6-옥소-3-에틸피리다지닐); 1,6-디하이드로-6-옥소-1,2,4-트리아지닐(예를 들면, 1,6-디하이드로-5-이소프로필-6-옥소-1,2,4-트리아지닐); 2,3-디하이드로-2-옥소-1H-인돌릴(예를 들면, 3,3-디메틸-2,3-디하이드로-2-옥소-1H-인돌릴 및 2,3-디하이드로-2-옥소-3,3'-스피로프로판-1H-인돌-1-일); 1,3-디하이드로-1-옥소-2H-이소-인돌릴; 1,3-디하이드로-1,3-디옥소-2H-이소-인돌릴; 1H-벤조피라졸릴(예를 들면, 1-(에톡시카보닐)-1H-벤조피라졸릴); 2,3-디하이드로-2-옥소-1H-벤즈이미다졸릴(예를 들면, 3-에틸-2,3-디하이드로-2-옥소-1H-벤즈이미다졸릴); 2,3-디하이드로-2-옥소-벤족사졸릴(예를 들면, 5-클로로-2,3-디하이드로-2-옥소-벤족사졸릴); 2,3-디하이드로-2-옥소-벤족사졸릴; 2-옥소-2H-벤조피라닐; 1,4-벤조디옥사닐; 1,3-벤조디옥사닐; 2,3-디하이드로-3-옥소, 4H-1,3-벤조티아지닐; 3,4-디하이드로-4-옥소-3H-퀴나졸리닐(예를 들면, 2-메틸-3,4-디하이드로-4-옥소-3H-퀴나졸리닐); 1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소-3H-퀴나졸릴(예를 들면, 1-에틸-1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소-3H-퀴나졸릴); 1,2,3,6-테트라하이드로-2,6-디옥소-7H-푸리닐(예를 들면, 1,2,3,6-테트라하이드로-1,3-디메틸-2,6-디옥소-7H-푸리닐); 1,2,3,6-테트라하이드로-2,6-디옥소-1H-푸리닐(예를 들면, 1,2,3,6-테트라하이드로-3,7-디메틸-2,6-디옥소-1H-푸리닐); 2-옥소벤즈[c,d]인돌릴; 1,1-디옥소-2H-나프트[1,8-c,d]이소티아졸릴; 및 1,8-나프틸렌디카복스미도를 포함한다. 추가의 헤테로사이클릭 그룹들은 3,3a,4,5,6,6a-헥사하이드로-피롤로[3,4-b]피롤-(2H)-일, 및 2,5-디아자비사이클로[2.2.1]헵탄-2-일, 호모피페라지닐(또는 디아제파닐), 테트라하이드로피라닐, 디티아졸릴, 벤조푸라닐, 벤조티에닐, 옥세파닐, 티에파닐, 아조카닐, 옥세카닐, 및 티오카닐을 포함한다. 헤테로사이클릭 그룹들은 또한 하기 화학식의 그룹들을 포함하며:



- [1705]
- [1706] 여기서
- [1707] E'은 -N- 및 -CH-로 이루어진 그룹 중에서 선택되고;
- [1708] F'은 -N=CH-, -NH-CH₂-, -NH-C(O)-, -NH-, -CH=N-, -CH₂-NH-, -C(O)-NH-, -CH=CH-, -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂O-, -OCH₂-, -O-, 및 -S-로 이루어진 그룹 중에서 선택되며;
- [1709] G'은 -CH- 및 -N-으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 본원에 언급된 헤테로사이클릴 그룹들 중의 임의의 것도 : (1) C₁₋₇ 아실(예를 들면, 카복시알데하이드); (2) C₁₋₂₀ 알킬(예를 들면, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시-C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알킬설퍼닐-C₁₋₆ 알킬, 아미노-C₁₋₆ 알킬, 아지도-C₁₋₆ 알킬, (카복시알데하이드)-C₁₋₆ 알킬, 할로-C₁₋₆ 알킬(예를 들면, 퍼플루오로알킬), 하이드록시-C₁₋₆ 알킬, 니트로-C₁₋₆ 알킬, 또는 C₁₋₆ 티오알콕시-C₁₋₆ 알킬); (3) C₁₋₂₀ 알콕시(예를 들면, C₁₋₆ 알콕시, 예를 들면, 퍼플루오로알콕시); (4) C₁₋₆ 알킬설퍼닐; (5) C₆₋₁₀ 아릴;

(6) 아미노; (7) C₁₋₆ 알킬-C₆₋₁₀ 아릴; (8) 아지도; (9) C₃₋₈ 사이클로알킬; (10) C₁₋₆ 알킬-C₃₋₈ 사이클로알킬; (11) 할로; (12) C₁₋₁₂ 헤테로사이클릴(예를 들면, C₂₋₁₂ 헤테로아릴); (13) (C₁₋₁₂ 헤테로사이클릴)옥시; (14) 하이드록시; (15) 니트로; (16) C₁₋₂₀ 티오알콕시(예를 들면, C₁₋₆ 티오알콕시); (17) -(CH₂)_qCO₂R^{A'} [여기서, q는 0 내지 4의 정수이고, R^{A'}은 (a) C₁₋₆ 알킬, (b) C₆₋₁₀ 아릴, (c) 수소, 및 (d) C₁₋₆ 알킬-C₆₋₁₀ 아릴로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]; (18) -(CH₂)_qCONR^{B'C'} [여기서, q는 0 내지 4의 정수이고 여기서, R^{B'} 및 R^{C'}은 (a) 수소, (b) C₁₋₆ 알킬, (c) C₆₋₁₀ 아릴, 및 (d) C₁₋₆ 알킬-C₆₋₁₀ 아릴로 이루어진 그룹 중에서 독립적으로 선택된다]; (19) -(CH₂)_qSO₂R^{D'} [여기서, q는 0 내지 4의 정수이고 여기서, R^{D'}은 (a) C₁₋₆ 알킬, (b) C₆₋₁₀ 아릴, 및 (c) C₁₋₆ 알킬-C₆₋₁₀ 아릴로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]; (20) -(CH₂)_qSO₂NR^{E'F'} [여기서, q는 0 내지 4의 정수이고, 여기서, 각각의 R^{E'} 및 R^{F'}은, 독립적으로, (a) 수소, (b) C₁₋₆ 알킬, (c) C₆₋₁₀ 아릴, 및 (d) C₁₋₆ 알킬-C₆₋₁₀ 아릴로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]; (21) 티올; (22) C₆₋₁₀ 아릴옥시; (23) C₃₋₈ 사이클로알콕시; (24) 아릴알콕시; (25) C₁₋₆ 알킬-C₁₋₁₂ 헤테로사이클릴(예를 들면, C₁₋₆ 알킬-C₁₋₁₂ 헤테로아릴); (26) 옥소; (27)(C₁₋₁₂ 헤테로사이클릴)이미노; (28) C₂₋₂₀ 알케닐; 및 (29) C₂₋₂₀ 알키닐로 이루어진 그룹 중에서 독립적으로 선택된 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 치환체들로 임의로 치환될 수 있다. 일부 실시형태에서, 각각의 이들 그룹들은 본원에 기술된 바와 같이 추가로 치환될 수 있다. 예를 들면, C₁-알킬아릴 또는 C₁-알킬헤테로사이클릴의 알킬렌 그룹은 옥소 그룹을 추가로 치환되어 각각의 아릴로일 및 (헤테로사이클릴)로일 치환체 그룹을 생성할 수 있다.

- [1710] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "(헤테로사이클릴)이미노"는 이미노 그룹을 통해 모 분자 그룹에 부착된, 본원에 정의된 바와 같은 헤테로사이클릴 그룹을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 헤테로사이클릴 그룹은 본원에 정의된 바와 같은, 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 치환될 수 있다.
- [1711] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "(헤테로사이클릴)옥시"는 산소 원자를 통해 모 분자 그룹에 부착된, 본원에 정의된 바와 같은 헤테로사이클릴 그룹을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 헤테로사이클릴 그룹은 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 치환될 수 있다.
- [1712] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "(헤테로사이클릴)로일"은 카보닐 그룹을 통해 모 분자 그룹에 부착된, 본원에 정의된 바와 같은 헤테로사이클릴 그룹을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 헤테로사이클릴 그룹은 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 치환될 수 있다.
- [1713] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "탄화수소"는 탄소 및 수소 원자들만으로 이루어진 그룹을 나타낸다.
- [1714] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "하이드록시"는 -OH 그룹을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 하이드록시 그룹은 알킬에 대해 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들(예를 들면, O-보호 그룹들)로 치환될 수 있다.
- [1715] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "하이드록시알케닐"은 1 내지 3개의 하이드록시 그룹들로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은 알케닐 그룹을 나타내며, 단 1개 이하의 하이드록시 그룹은 알킬 그룹의 단일 탄소 원자에 부착될 수 있으며, 디하이드록시프로페닐, 하이드록시이소펜테닐 등으로 예시된다. 일부 실시형태에서, 하이드록시알케닐 그룹은 알킬에 대해 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들(예를 들면, O-보호 그룹들)로 치환될 수 있다.
- [1716] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "하이드록시알킬"은 1 내지 3개의 하이드록시 그룹들로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은 알킬 그룹을 나타내며, 단 1개 이하의 하이드록시 그룹은 알킬 그룹의 단일 탄소 원자에 부착될 수 있으며 하이드록시메틸, 디하이드록시프로필 등으로 예시된다. 일부 실시형태에서, 하이드록시알킬 그룹은 알킬에 대해 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들(예를 들면, O-보호 그룹들)로 치환될 수 있다.
- [1717] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "하이드록시알키닐"은 1 내지 3개의 하이드록시 그룹들로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은 알키닐 그룹을 나타내며, 단, 1개 이하의 하이드록시 그룹은 알킬 그룹의 단일 탄소 원자에 부착될 수 있다. 일부 실시형태에서, 하이드록시알키닐 그룹은 알킬에 대해 본원에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개,

또는 4개의 치환체 그룹들(예를 들면, *O*-보호 그룹들)로 치환될 수 있다.

- [1718] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "이성체"는 본 발명의 어떠한 화합물의 어떠한 토포머, 입체이성체, 거울상이성체, 또는 부분입체이성체를 의미한다. 본 발명의 화합물들은 하나 이상의 키랄 중심들 및/또는 이중 결합들을 가질 수 있으므로, 이중-결합 이성체들(즉, 기하학적 E/Z 이성체들) 또는 부분입체이성체들(예를 들면, 거울상이성체들[즉, (+) 또는 (-)] 또는 시스/트랜스 이성체들]로 존재할 수 있다. 본 발명에 따라서, 본원에 나타낸 화학 구조들, 및 따라서 본 발명의 화합물들은 모든 상응하는 입체이성체들, 즉, 입체이성체적으로 순수한 형태(예를 들면, 기하학적으로 순수한, 거울상이성체적으로 순수한, 또는 부분입체이성체적으로 순수한) 및 거울상이성체성 및 입체이성체성 혼합물들, 예를 들면, 라세메이트들 둘 다를 포함한다. 본 발명의 화합물들의 거울상이성체성 및 입체이성체성 혼합물들은 잘 공지된 방법들, 예를 들면, 키랄-상 가스 크로마토그래피, 키랄-상 고 성능 액체 크로마토그래피, 키랄 염 복합체로서의 화합물의 결정화, 또는 키랄성 용매 속의 화합물의 결정화에 의해 이들의 성분 거울상이성체들 또는 입체이성체들로 전형적으로 분해될 수 있다. 거울상이성체들 및 입체이성체들은 또한 입체이성체적으로 또는 거울상이성체적으로 순수한 중간체들, 반응제들, 및 촉매들로부터 잘-공지된 비대칭 합성 방법들에 의해 수득될 수 있다.
- [1719] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "*N*-보호된 아미노"는, 여기에 본원에 정의된 바와 같은 1개 또는 2개의 *N*-보호 그룹들이 부착된, 본원에 정의된 바와 같은 아미노 그룹을 말한다.
- [1720] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "*N*-보호 그룹"은 합성 과정들 동안 바람직하지 않은 반응들에 대해 아미노 그룹을 보호하도록 의도된 그룹들을 나타낸다. 일반적으로 사용된 *N*-보호 그룹들은 문헌[참조: Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis" 3rd Edition(John Wiley & Sons, New York, 1999), 이는 참조로 본원에 혼입된다]에 기재되어 있다. *N*-보호 그룹들은 아실, 아릴로일, 또는 카바밀 그룹들, 예를 들면, 포르밀, 아세틸, 프로피오닐, 피발로일, *t*-부틸아세틸, 2-클로로아세틸, 2-브로모아세틸, 트리플루오로아세틸, 트리클로로아세틸, 프탈릴, *o*-니트로페녹시아세틸, α -클로로부틸릴, 벤조일, 4-클로로벤조일, 4-브로모벤조일, 4-니트로벤조일, 및 키랄성 보조제들, 예를 들면, 보호되거나 보호되지 않은 D, L 또는 D, L-아미노산들, 예를 들면, 알라닌, 루이신, 페닐알라닌 등; 설포닐-함유 그룹들 예를 들면, 벤젠설포닐, *p*-톨루엔설포닐 등; 카바메이트 형성 그룹들, 예를 들면, 벤질옥시카보닐, *p*-클로로벤질옥시카보닐, *p*-메톡시벤질옥시카보닐, *p*-니트로벤질옥시카보닐, 2-니트로벤질옥시카보닐, *p*-브로모벤질옥시카보닐, 3,4-디메톡시벤질옥시카보닐, 3,5-디메톡시벤질옥시카보닐, 2,4-디메톡시벤질옥시카보닐, 4-메톡시벤질옥시카보닐, 2-니트로-4,5-디메톡시벤질옥시카보닐, 3,4,5-트리메톡시벤질옥시카보닐, 1-(*p*-비페닐릴)-1-메틸에톡시카보닐, α , α -디메틸-3,5-디메톡시벤질옥시카보닐, 벤즈하이드릴옥시 카보닐, *t*-부틸옥시카보닐, 디이소프로필메톡시카보닐, 이소프로필옥시카보닐, 에톡시카보닐, 메톡시카보닐, 알릴옥시카보닐, 2,2,2,-트리클로로에톡시카보닐, 페녹시카보닐, 4-니트로페녹시 카보닐, 플루오레닐-9-메톡시카보닐, 사이클로펜틸옥시카보닐, 아다만틸옥시카보닐, 사이클로헥실옥시카보닐, 페닐티오카보닐 등, 알킬아릴 그룹들, 예를 들면, 벤질, 트리페닐메틸, 벤질옥시메틸 등 및 실릴 그룹들, 예를 들면, 트리메틸실릴 등을 포함한다. 바람직한 *N*-보호 그룹들은 포르밀, 아세틸, 벤조일, 피발로일, *t*-부틸아세틸, 알라닌, 페닐설포닐, 벤질, *t*-부틸옥시카보닐(Boc), 및 벤질옥시카보닐(Cbz)을 포함한다.
- [1721] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "니트로"는 -NO₂ 그룹을 나타낸다.
- [1722] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "*O*-보호 그룹"은 합성 과정들 동안에 바람직하지 않은 반응들에 대해 산소 함유(예를 들면, 페놀, 하이드록실, 또는 카보닐) 그룹을 보호하도록 의도된 그룹들을 나타낸다. 일반적으로 사용된 *O*-보호 그룹들은 문헌[참조: Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3rd Edition(John Wiley & Sons, New York, 1999), 이는 참조로 본원에 인용된다]에 기재되어 있다. 예시적인 *O*-보호 그룹들은 아실, 아릴로일, 또는 카바밀 그룹들, 예를 들면, 포르밀, 아세틸, 프로피오닐, 피발로일, *t*-부틸아세틸, 2-클로로아세틸, 2-브로모아세틸, 트리플루오로아세틸, 트리클로로아세틸, 프탈릴, *o*-니트로페녹시아세틸, α -클로로부틸릴, 벤조일, 4-클로로벤조일, 4-브로모벤조일, *t*-부틸디메틸실릴, 트리-*i*/소-프로필실릴옥시메틸, 4,4'-디메톡시트리틸, 이소부틸릴, 페녹시아세틸, 4-이소프로필페녹시아세틸, 디메틸포름아미디노, 및 4-니트로벤조일; 알킬카보닐 그룹들, 예를 들면, 아실, 아세틸, 프로피오닐, 피발로일 등; 임의로 치환된 아릴카보닐 그룹들, 예를 들면, 벤조일; 실릴 그룹들, 예를 들면, 트리메틸실릴(TMS), 3급-부틸디메틸실릴(TBDMS), 트리-*i*/소-프로필실릴옥시메틸(TOM), 트리-*i*/소-프로필실릴(TIPS) 등; 하이드록실과의 에테르-형성 그룹들, 예를 들면, 메틸, 메톡시메틸, 테트라하이드로피라닐, 벤질, *p*-메톡시벤질, 트리틸 등; 알콕시카보닐들, 예를 들면, 메톡시카보닐, 에톡시카보닐, 이소프로폭시카보닐, *n*-이소프로폭시카보닐, *n*-부틸옥시카보닐, 이소부틸옥시카보닐, *sec*-부틸옥시카보닐, *t*-부틸옥시카보닐, 2-에틸헥실옥시카보닐, 사이클로헥실옥시카보닐, 메틸옥시카보닐 등; 알콕시알콕시

카보닐 그룹들, 예를 들면, 메톡시메톡시카보닐, 에톡시메톡시카보닐, 2-메톡시에톡시카보닐, 2-에톡시에톡시카보닐, 2-부톡시에톡시카보닐, 2-메톡시에톡시메톡시카보닐, 알릴옥시카보닐, 프로파르길옥시카보닐, 2-부텐옥시카보닐, 3-메틸-2-부텐옥시카보닐 등; 할로알콕시카보닐들, 예를 들면, 2-클로로에톡시카보닐, 2-클로로에톡시카보닐, 2,2,2-트리클로로에톡시카보닐 등; 임의로 치환된 아릴알콕시카보닐 그룹들, 예를 들면, 벤질옥시카보닐, p-메틸벤질옥시카보닐, p-메톡시벤질옥시카보닐, p-니트로벤질옥시카보닐, 2,4-디니트로벤질옥시카보닐, 3,5-디메틸벤질옥시카보닐, p-클로로벤질옥시카보닐, p-브로모벤질옥시-카보닐, 플루오레닐메틸옥시카보닐 등; 및 임의로 치환된 아릴옥시카보닐 그룹들, 예를 들면, 페녹시카보닐, p-니트로페녹시카보닐, o-니트로페녹시카보닐, 2,4-디니트로페녹시카보닐, p-메틸-페녹시카보닐, m-메틸페녹시카보닐, o-브로모페녹시카보닐, 3,5-디메틸페녹시카보닐, p-클로로페녹시카보닐, 2-클로로-4-니트로페녹시-카보닐 등); 치환된 알킬, 아릴, 및 알크아릴 에테르들(예를 들면, 트리틸; 메틸티오메틸; 메톡시메틸; 벤질옥시메틸; 실록시메틸; 2,2,2,-트리클로로에톡시메틸; 테트라하이드로피라닐; 테트라하이드로푸라닐; 에톡시에틸; 1-[2-(트리메틸실릴)에톡시]에틸; 2-트리메틸실릴에틸; t-부틸 에테르; p-클로로페닐, p-메톡시페닐, p-니트로페닐, 벤질, p-메톡시벤질, 및 니트로벤질); 실릴 에테르들(예를 들면, 트리메틸실릴; 트리에틸실릴; 트리아이소프로필실릴; 디메틸이소프로필실릴; t-부틸디메틸실릴; t-부틸디페닐실릴; 트리벤질실릴; 트리페닐실릴; 및 디페닐메틸실릴); 탄산염들(예를 들면, 메틸, 메톡시메틸, 9-플루오레닐메틸; 에틸; 2,2,2-트리클로로에틸; 2-(트리메틸실릴)에틸; 비닐, 알릴, 니트로페닐; 벤질; 메톡시벤질; 3,4-디메톡시벤질; 및 니트로벤질); 카보닐-보호 그룹들(예를 들면, 아세탈 및 케날 그룹들, 예를 들면, 디메틸 아세탈, 1,3-디옥솔란 등; 아실랄 그룹들; 및 디티안 그룹들, 예를 들면, 1,3-디티안들, 1,3-디티올란 등); 카복실산-보호 그룹들(예를 들면, 에스테르 그룹들, 예를 들면, 메틸 에스테르, 벤질 에스테르, t-부틸 에스테르, 오르토에스테르들 등; 및 옥사졸린 그룹들을 포함한다.

- [1723] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "옥소"는 =O를 나타낸다.
- [1724] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "퍼플루오로알킬"은 본원에 정의된 바와 같은 알킬 그룹을 나타내며, 여기서, 알킬 그룹에 결합된 각각의 수소 라디칼은 불화물 라디칼로 대체되어 있다. 퍼플루오로알킬 그룹들은 트리플루오로메틸, 펜타플루오로에틸 등으로 예시된다.
- [1725] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "퍼플루오로알콕시"는 본원에 정의된 바와 같은 알콕시 그룹을 나타내며, 여기서, 알콕시 그룹에 결합된 각각의 수소 라디칼은 불화물 라디칼로 대체되어 있다. 퍼플루오로알콕시 그룹들은 트리플루오로메톡시, 펜타플루오로에톡시 등으로 예시된다.
- [1726] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "스피로사이클릴"은, 이의 말단들 둘다가 모 그룹의 동일한 탄소 원자에 결합하여 스피로사이클릭 그룹을 형성하는 C₂₋₇ 알킬렌 디라디칼, 및 또한 이의 말단들 둘다가 동일한 원자에 결합한 C₁₋₆ 헤테로알킬렌 디라디칼을 나타낸다. 스피로사이클릴 그룹을 형성하는 헤테로알킬렌 라디칼은 질소, 산소, 및 황으로 이루어진 그룹 중에서 독립적으로 선택된 1개, 2개, 3개 또는 4개의 헤테로원자들을 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 스피로사이클릴 그룹은 1 내지 7개의 탄소들을 포함하며, 디라디칼이 부착된 탄소 원자는 배제된다. 본 발명의 스피로사이클릴 그룹들은 사이클로알킬 및/또는 헤테로사이클릴 그룹들에 대한 임의의 치환체들로서 본원에 제공된 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체들로 임의로 치환된다.
- [1727] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "입체이성체"는 모든 가능한 상이한 이성체 및 또한, 화합물이 소유할 수 있는 구조적 형태들(예를 들면, 본원에 기술된 어떠한 화학식의 화합물), 특히 기본 분자 구조의 모든 가능한 입체화학적으로 및 구조적으로 이성체인 형태들, 모든 부분입체이성체들, 거울상이성체들 및/또는 이형태체들(conformers)을 말한다. 본 발명의 일부 화합물들은 상이한 토우토머 형태들로 존재할 수 있으며, 이들 형태들 모두는 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [1728] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "설포알킬"은 -SO₃H의 설포 그룹으로 치환된, 본원에 정의된 바와 같은 알킬 그룹을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 알킬 그룹은 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있으며, 설포 그룹은 하나 이상의 O-보호 그룹들(예를 들면, 본원에 기술된 바와 같은)로 추가로 치환될 수 있다.
- [1729] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "설포닐"은 -S(O)₂- 그룹을 나타낸다.
- [1730] 본원에 사용된 것으로서, "티오알크아릴"은 화학식 -SR(여기서, R은 알크아릴 그룹이다)의 화학적 치환체를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 알크아릴 그룹은 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 치환된다.

- [1731] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "티오알크테테로사이클릴"은 화학식 -SR(여기서, R은 알크테테로사이클릴 그룹이다)의 화학적 치환체를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 알크테테로사이클릴 그룹은 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다.
- [1732] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "티오알콕시"는 화학식 -SR(여기서, R은 본원에 정의된 바와 같은 알킬 그룹이다)의 화학적 치환체를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 알킬 그룹은 본원에 기술된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 그룹들로 추가로 치환될 수 있다.
- [1733] *화합물*; 본원에 사용된 것으로서, 용어 "화합물"은 나타난 구조식들의 모든 입체이성체들, 기하학적 이성체들, 토우토머들, 및 동위 원소들을 포함함을 의미한다.
- [1734] 본원에 기술된 화합물들은 비대칭(예를 들면, 1개 또는 2개의 입체중심들을 갖는)일 수 있다. 달리 나타내지 않는 한, 모든 입체이성체들, 예를 들면, 거울상이성체들 및 부분입체이성체들이 의도된다. 비대칭적으로 치환된 탄소 원자들을 함유한 본 개시의 화합물들은 광학적으로 활성이거나 라세미 형태들로 분리될 수 있다. 광학적으로 활성인 출발 물질들로부터 광학적으로 활성인 형태들을 제조하는 방법들은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, 라세미 혼합물들의 분해 또는 입체선택적 합성에 의한다. 올레핀들의 많은 기하학적 이성체들, C=N 이중 결합들 등이 또한 본원에 기술된 화합물들에 존재할 수 있으며, 모든 이러한 이성체들은 본 개시에서 고려된다. 본 개시의 화합물들의 시스 및 트랜스 기하학적 이성체들이 기술되어 있으며 이성체들의 혼합물로서 또는 분리된 이성체 형태들로서 분리될 수 있다.
- [1735] 본 개시의 화합물들은 토우토머 형태들을 또한 포함한다. 토우토머 형태들은 인접한 이중 결합과 단일 결합의 스와핑(swapping) 및 양성자의 동시 이주로부터 생성된다. 토우토머 형태들은 동일한 실험식 및 총 전하를 갖는 이성체성 양성자화 상태들인 양성자성 토우토머들을 포함한다. 양성자성 토우토머들의 예들은 케톤-에놀 쌍들, 아미드-이미드산 쌍들, 락탐-락탐 쌍들, 아미드-이미드산 쌍들, 에나민-이민 쌍들, 및 고리 모양 형태들을 포함하며, 여기서, 양성자는 헤테로사이클릭 시스템의 2개 이상의 위치들, 예를 들면, 1H- 및 3H-이미다졸, 1H-, 2H- 및 4H-1,2,4-트리아졸, 1H- 및 2H- 이소인돌, 및 1H- 및 2H-피라졸을 점유할 수 있다. 토우토머 형태들은 평형일 수 있거나 적절한 치환에 의해 1개 형태로 입체적으로 잠금(locking)된다.
- [1736] 본 개시의 화합물들은 중간체 또는 최종 화합물들 속에 존재하는 원자들의 동위원소들 모두를 또한 포함한다. "동위원소들"은 동일한 원자수를 가지지만 핵내 중성자들의 상이한 수로 초래되는 상이한 질량수들을 갖는 원자들을 말한다. 예를 들면, 수소의 동위원소들은 삼중수소 및 중수소를 포함한다.
- [1737] 본 개시의 화합물들 및 염들은 용매 또는 물 분자들과 함께 제조되어 통상의 방법들에 의해 용매화물들 및 수화물들을 형성할 수 있다.
- [1738] *보존된*: 본원에 사용된 것으로서, 용어 "보존된"은 비교하는 2개 이상의 서열들의 동일한 부위내에서 변경되지 않는 것들인 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 폴리펩타이드 서열의 뉴클레오타이드들 또는 아미노산 잔기들 각각을 말한다. 비교적 보존된 뉴클레오타이드들 또는 아미노산들은 서열들내 어디에서도 존재하는 뉴클레오타이드들 또는 아미노산들보다 더 관련된 서열들 중에서 보존된 것들이다.
- [1739] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 서열들은, 이들이 서로 100% 동일한 경우, "완전히 보존된" 것으로 일컬어진다. 일부 실시형태에서, 2개 이상의 서열들은, 이들이 서로에 대해 적어도 70% 동일하거나, 적어도 80% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 또는 적어도 95% 동일한 경우, "고도로 보존된"으로 일컬어진다. 일부 실시형태에서, 2개 이상의 서열들은, 이들이 서로에 대해 약 70% 동일하거나, 약 80% 동일하거나, 약 90% 동일하거나, 약 95%, 약 98%, 또는 약 99% 동일한 경우, "고도로 보존된"으로 일컬어진다. 일부 실시형태에서, 2개 이상의 서열들은, 이들이 서로에 대해 적어도 30% 동일하거나, 적어도 40% 동일하거나, 적어도 50% 동일하거나, 적어도 60% 동일하거나, 적어도 70% 동일하거나, 적어도 80% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 또는 적어도 95% 동일한 경우, "보존된"으로 일컬어진다. 일부 실시형태에서, 2개 이상의 서열들은, 이들이 서로에 대해 약 30% 동일하거나, 약 40% 동일하거나, 약 50% 동일하거나, 약 60% 동일하거나, 약 70% 동일하거나, 약 80% 동일하거나, 약 90% 동일하거나, 약 95% 동일하거나, 약 98% 동일하거나, 또는 약 99% 동일한 경우, "보존된"으로 일컬어진다. 서열의 보존은 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 전체 길이에 적용될 수 있거나 이의 일부, 영역 또는 특징에 적용될 수 있다.
- [1740] *사이클릭 또는 폐환된*: 본원에 사용된 것으로서, 용어 "사이클릭"은 연속된 루프(loop)의 존재를 말한다. 사이클릭 분자들은 원형일 필요가 없으며, 단지 결합하여 소단위들의 깨지지 않은 쇄를 형성한다. 본 발명의 mRNA와 같은 사이클릭 분자들은 단일 단위들 또는 다합체들(multimer)일 수 있거나 복합체의 하나 이상의 성분 또

는 보다 높은 차수의 구조를 포함한다.

- [1741] 세포정지성: 본원에 사용된 것으로서, "세포정지성"은 세포[예를 들면, 포유동물 세포(예를 들면, 사람 세포)], 세균, 바이러스, 진균, 원생동물, 기생충, 프리온(prion), 또는 이의 조합의 성장, 분할, 또는 증식을 억제하거나, 감소시키거나, 제어함을 말한다.
- [1742] 세포독성: 본원에 사용된 것으로서, "세포독성"은 세포[예를 들면, 포유동물 세포(예를 들면, 사람 세포)], 세균, 바이러스, 진균, 원생동물, 기생충, 프리온(prion), 또는 이의 조합의 사멸, 또는 손상, 독성, 또는 치명적인 효과를 유발함을 말한다.
- [1743] 전달: 본원에 사용된 것으로서, "전달"은 화합물, 물질, 실체, 잔기, 카르고(cargo) 또는 페이로드를 전달하는 작용 또는 방식을 말한다.
- [1744] 전달제: 본원에 사용된 것으로서, "전달제"는 표적된 세포들로 폴리뉴클레오타이드의 생체내 전달을 적어도 부분적으로 촉진하는 특정 물질을 말한다.
- [1745] 탈안정화됨: 본원에 사용된 것으로서, 용어 "탈안정화", "탈안정화하다", 또는 "탈안정화 영역"은 동일한 영역 또는 분자의 출발, 야생형 또는 천연 형태보다 덜 안정한 영역 또는 분자를 의미한다.
- [1746] 검출가능한 표지: 본원에 사용된 것으로서, "검출가능한 표지"는 방사선촬영, 형광성, 화학발광성, 효소 활성, 흡광도 등을 포함하는 당해 분야에 공지된 방법들로 용이하게 검출되는 다른 실체와 함께 부착되거나, 혼입되거나 연합된 하나 이상의 마커들, 신호들, 또는 잔기들을 말한다. 검출가능한 표지들은 방사선동위원소들, 형광단들, 발색단들, 효소들, 염료들, 금속 이온들, 리간드들, 예를 들면, 바이오틴, 아비딘, 스트렙타비딘 및 합텐들, 양자점들 등을 포함한다. 검출가능한 표지들은 본원에 기재된 펩타이드들 또는 단백질들의 어떠한 위치에도 위치할 수 있다. 이들은 아미노산들, 펩타이드들, 또는 단백질들내에 존재할 수 있거나, N- 또는 C- 말단에 위치할 수 있다.
- [1747] 소화(하다): 본원에 사용된 것으로서, 용어 "소화(하다)"는 보다 작은 조각들 또는 성분들로 파괴됨을 의미한다. 폴리펩타이드들 또는 단백질들을 언급하는 경우, 소화는 펩타이드들의 생산을 초래한다.
- [1748] 먼(distal): 본원에 사용된 것으로서, 용어 "먼"은 목적인 지점 또는 영역으로부터 멀거나 중심으로부터 멀리 위치함을 의미한다.
- [1749] 암호화된 단백질 절단 신호: 본원에 사용된 것으로서, "암호화된 단백질 절단 신호"는 단백질 절단 신호를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 말한다.
- [1750] 가공됨: 본원에 사용된 것으로서, 본 발명의 실시형태들은, 출발점, 야생형 또는 천연 분자로부터 변하는 구조 또는 화학물질에 상관없이, 특징 또는 특성을 갖도록 설계되는 경우 "가공됨"이다.
- [1751] 발현: 본원에 사용된 것으로서, 핵산 서열의 "발현"은 다음 현상들 중의 하나 이상을 말한다: (1) DNA 서열로부터 RNA 주형의 생산(예를 들면, 전사에 의한); (2) RNA 전사체의 프로세싱[예를 들면, 스플라이싱(splicing), 에디팅(editing), 5' 캡(cap) 형성, 및/또는 3' 말단 프로세싱에 의한]; (3) RNA의 폴리펩타이드 또는 단백질내로의 번역; 및 (4) 폴리펩타이드 또는 단백질의 번역후 변형.
- [1752] 특징: 본원에 사용된 것으로서, "특징"은 특징, 특성 또는 명백한 요소를 말한다.
- [1753] 제형: 본원에 사용된 것으로서, "제형"은 적어도 폴리뉴클레오타이드 및 전달제를 포함한다.
- [1754] 단편: 본원에 사용된 것으로서, "단편"은 부위를 말한다. 예를 들면, 단백질들의 단편들은 배양된 세포들로부터 분리된 완전한 길이의 단백질을 분해하여 수득된 폴리펩타이드들을 포함할 수 있다.
- [1755] 기능적: 본원에 사용된 것으로서, "기능적" 생물학적 분자는, 이것이 특징화된 특성 및/또는 활성을 나타내는 형태의 생물학적 분자이다.
- [1756] 상동성: 본원에 사용된 것으로서, 용어 "상동성"은 중합체 분자들, 예를 들면, 핵산 분자들(예를 들면, DNA 분자들 및/또는 RNA 분자들) 사이의 및/또는 폴리펩타이드 분자들 사이의 전체적인 관련성을 말한다. 일부 실시 형태에서, 중합체 분자들은, 이들의 서열들이 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일하거나 또는 유사한 경우 서로에 대해 "상동성"인 것으로 고려된다. 용어 "상동성"은 필수적으로 적어도 2개의 서열들(폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열들) 사이의 비교를 말한다. 본 발명에 따라서, 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열들은, 이들이 암호화하는 폴리펩타이드들이 적어

도 약 20개 아미노산들의 적어도 하나의 신장에 대해 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 심지어 99%인 경우 상동성인 것으로 고려된다. 일부 실시형태에서, 상동성 폴리뉴클레오타이드 서열들은 적어도 4 내지 5개의 유일하게 명시된 아미노산들의 신장을 암호화하는 능력으로 특징화된다. 길이가 60개 미만의 뉴클레오타이드인 폴리뉴클레오타이드 서열들의 경우, 상동성은 적어도 4 내지 5개의 유일하게 명시된 아미노산들의 신장을 암호화하는 능력으로 측정된다. 본 발명에 따라서, 2개의 단백질 서열들은, 단백질들이 적어도 약 20개 아미노산들의 적어도 하나의 신장에 대해 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 동일한 경우 상동성인 것으로 고려된다.

[1757] **동일성:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "동일성"은 중합체 분자들, 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드 분자들 (예를 들면, DNA 분자들 및/또는 RNA 분자들) 및/또는 폴리펩타이드 분자들 사이의 전체 관련성을 말한다. 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열들의 동일성 퍼센트의 계산은, 예를 들면, 최적의 비교 목적들을 위해 2개 서열들을 정렬함으로써 수행할 수 있다(예를 들면, 갭(gap)들을 최적의 정렬을 위해 제1의 및 제2의 핵산 서열들 중 하나 또는 둘 다내로 도입시킬 수 있고 동일하지 않은 서열들은 비교 목적들을 위해 무시할 수 있다). 특정 실시형태에서, 비교 목적들을 위해 정렬된 서열의 길이는 참조 서열의 길이의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%이다. 상응하는 뉴클레오타이드 위치들에서 뉴클레오타이드들을 이후 비교한다. 제1의 서열내 위치가 제2의 서열내 상응하는 위치로서 동일한 뉴클레오타이드에 의해 점유되는 경우, 분자는 당해 위치에서 동일하다. 2개의 서열들 사이의 동일성 퍼센트는 2개의 서열들의 최적의 정렬을 위해 도입될 필요가 있는, 각각의 갭의 길이, 및 갭들의 수를 고려하여, 서열들에 의해 공유된 동일한 위치들의 수의 기능이다. 서열들의 비교 및 2개 서열들 사이의 동일성 퍼센트의 측정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성할 수 있다. 예를 들면, 2개의 뉴클레오타이드 서열들 사이의 동일성 퍼센트는 문헌(참조: Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., 사람a Press, New Jersey, 1994; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; 이들 각각은 참조로 본원에 인용된다)에 기술된 것들과 같은 방법들을 사용하여 측정할 수 있다. 예를 들면, 2개의 뉴클레오타이드 서열들 사이의 동일성 퍼센트는 PAM120 중량 잔기 표, 12의 갭 길이 패널티 및 4의 갭 패널티를 사용하는 ALIGN 프로그램(버전 2.0)내로 혼입된, 메이어스(Meyers) 및 밀러(Miller)의 문헌(참조: CABIOS, 1989, 4:11-17)의 알고리즘을 사용하여 측정할 수 있다. 달리, 2개의 뉴클레오타이드 서열들 사이의 동일성 퍼센트는 NWSgapdna.CMP 매트릭스를 사용하는 GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램을 사용하여 측정할 수 있다. 서열들 사이의 동일성 퍼센트를 측정하기 위해 일반적으로 사용된 방법들은 본원에 참조로 혼입된 문헌 [참조: Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48:1073(1988)]에 기재된 것들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 동일성을 측정하기 위한 기술들은 공공 이용가능한 컴퓨터 프로그램들에서 암호화되어 있다. 2개의 서열들 사이의 상동성을 측정하기 위한 예시적인 컴퓨터 소프트웨어는 GCG 프로그램 패키지[참조: Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1), 387(1984)], BLASTP, BLASTN, 및 FASTA Altschul S. F. et al., J. Molec. Biol., 215, 403(1990)]를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[1758] **유전자의 발현을 억제하다:** 본원에 사용된 것으로서, 어구 "유전자의 발현을 억제하다"는 유전자의 발현 생성물의 양에 있어서의 감소를 유발함을 의미한다. 발현 생성물은 유전자로부터 전사된 RNA(예를 들면, mRNA) 또는 유전자로부터 전사된 mRNA로부터 번역된 폴리펩타이드일 수 있다. 전형적으로 mRNA의 수준에 있어서의 감소는 이로부터 번역된 폴리펩타이드 수준에 있어서의 감소를 생성한다. 발현 수준은 mRNA 또는 단백질을 측정하기 위한 표준 기술들을 사용하여 측정할 수 있다.

[1759] **시험관내:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "시험관내"는 유기체(예를 들면, 동물, 식물 또는 미생물)내가 아닌 인공 환경, 예를 들면, 시험 튜브 또는 반응 용기, 세포 배양물, 페트리 디쉬(petri dish) 등에서 발생하는 현상들을 말한다.

[1760] **생체내:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "생체내"는 유기체(예를 들면, 동물, 식물, 또는 미생물 또는 이의 세포 또는 조직)내에서 발생하는 현상들을 말한다.

[1761] **분리된:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "분리된"은, 이것이 관련되었던(천연 또는 실험 셋팅에 상관없이) 성분들 중 적어도 일부로부터 분리된 물질 또는 실체를 말한다. 분리된 물질들은, 이들이 초기에 관련되었던 다른 성분들 중 적어도 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 이상으로부터 분리될 수 있다. 일부 실시형태에서, 분리된 제제들은 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약

94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 이상, 또는 약 99% 이상 순수하다. 본원에 사용된 것으로서, 물질은, 다른 성분들을 실질적으로 함유하지 않는 경우 "순수"하다.

- [1762] **실질적으로 순수한:** "실질적으로 순수한"은, 화합물이 형성되거나 검출되었던 환경으로부터 실질적으로 분리됨을 의미한다. 부분 분리는 예를 들면, 본 개시의 화합물 속에 풍부한 조성물을 포함할 수 있다. 실질적인 분리는 본 개시의 화합물을 적어도 약 50 중량%, 적어도 약 60중량%, 적어도 약 70중량%, 적어도 약 80중량%, 적어도 약 90중량%, 적어도 약 95중량%, 적어도 약 97중량%, 또는 적어도 약 99중량 함유하는 조성물들을 포함할 수 있다. 화합물들 및 이들의 염들을 분리하는 방법들은 당해 분야에서 통상적이다.
- [1763] **링커:** 본원에 사용된 것으로서, 링커는 원자들, 예를 들면, 10 내지 1,000개의 원자들의 그룹을 말하며, 탄소, 아미노, 알킬아미노, 산소, 황, 설펍사이드, 설포닐, 카보닐, 및 이민과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 원자들 또는 그룹들을 포함할 수 있다. 링커는 제1 말단에서 핵염기 또는 당 모이어티 상의 변형된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드, 및 제2 말단에서 페이로드, 예를 들면, 제2의 검출가능한 제제 또는 치료학적 제제에 부착될 수 있다. 링커는 핵산 서열내로의 혼입을 방해하지 않기에 충분한 길이일 수 있다. 링커는 어떠한 유용한 목적, 예를 들면, 본원에 기술된 바와 같이, 다량체들(예를 들면, 2개 이상의 폴리뉴클레오타이드들의 연결을 통해) 또는 접합체들을 형성하기 위해, 및 페이로드를 투여하기 위해 사용될 수 있다. 링커내로 혼입시킬 수 있는 화학 그룹들의 예들은 알킬, 알케닐, 알키닐, 아미도, 아미노, 에테르, 티오에테르, 에스테르, 알킬렌, 헤테로알킬렌, 아릴, 또는 헤테로사이클릴을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 이들 각각은 본원에 기술된 바와 같이 임의로 치환된다. 링커들의 예들은 불포화된 알칸들, 폴리에틸렌 글리콜들(예를 들면, 에틸렌 또는 프로필렌 글리콜 단량체 단위들, 예를 들면, 디에틸렌 글리콜, 디프로필렌 글리콜, 트리에틸렌 글리콜, 트리프로필렌 글리콜, 테트라에틸렌 글리콜, 또는 테트라에틸렌 글리콜), 및 텍스트란 중합체들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 다른 예들은 예를 들면, 이황화물 결합(-S-S-) 또는 아조 결합(-N=N-)과 같은, 링커내 절단가능한 잔기들을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 이들은 환원제 또는 광분해로 분해할 수 있다. 선택적으로 절단가능한 결합의 비-제한적 예들은 예를 들면, 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP), 또는 다른 환원제들, 및/또는 광분해의 사용에 의해 절단될 수 있는 아미도 결합을 포함하고, 에스테르 결합은 예를 들면, 산성 또는 염기성 가수분해에 의해 절단될 수 있다.
- [1764] **변형된:** 본원에 사용된 것으로서 "변형된"은 본 발명의 분자의 변화된 상태 또는 구조를 말한다. 분자들은 화학적으로, 구조적으로, 및 기능적으로 포함하는 많은 방식들로 변형될 수 있다. 한 실시형태에서, 본 발명의 mRNA 분자들은 비-천연 뉴클레오사이드들 및/또는 뉴클레오타이드들의 도입으로 변형되는데, 예를 들어, 이들은 천연 리보뉴클레오타이드들 A, U, G, 및 C에 관한 것이기 때문이다. 비캐노니칼(Noncanonical) 뉴클레오타이드들, 예를 들어, 캡 구조들은, A, C, G, U 리보뉴클레오타이드들의 화학 구조와는 상이하다고 해도, "변형된" 것으로 고려되지 않는다.
- [1765] **천연적으로 존재하는:** 본원에 사용된 것으로서, "천연적으로 존재하는"은 인공 보조제없이 천연에 존재함을 의미한다.
- [1766] **비-사람 척추동물:** 본원에 사용된 것으로서, "비 사람 척추동물"은 야생 종들 및 사육된 종들을 포함하는, 호모 사피엔스(*Homo sapiens*)를 제외한 모든 척추동물들을 포함한다. 비-사람 척추동물들의 예들은 알파카(alpaca), 반탱(banteng), 비손(bison), 낙타, 고양이, 소, 사슴, 개, 당나귀, 가얄(gayal), 염소, 기니아 피그, 말, 라마(llama), 노새, 돼지, 토끼, 순록, 양, 물소(sheep water buffalo), 및 야크(yak)와 같은 포유동물들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [1767] **오프-표적(off-target):** 본원에 사용된 것으로서, "오프 표적"은 하나 이상의 표적, 유전자, 또는 세포 전사체 상에서 어떠한 의도되지 않은 효과를 말한다.
- [1768] **개방 관독 프레임(open reading frame):** 본원에 사용된 것으로서, "개방 관독 프레임" 또는 "ORF"은 제공된 관독 프레임내에서 정지 코돈을 함유하지 않는 서열을 말한다.
- [1769] **작동적으로 연결된:** 본원에 사용된 것으로서, 어구 "작동적으로 연결된"은 2개 이상의 분자들, 작제물들, 전사체들, 실체들, 잔기들 등의 사이의 기능적 연결을 말한다.
- [1770] **파라토프(Paratope):** 본원에 사용된 것으로서, "파라토프"는 항체의 항원-결합 부위를 말한다.
- [1771] **환자:** 본원에 사용된 것으로서, "환자"는 치료를 추구할 수 있거나 치료가 요구되거나, 치료를 필요로 하거나, 치료를 받는 중이거나, 치료를 받을 예정인 대상체, 또는 특수한 질병 또는 상태에 대해 숙련된 전문가에 의한

관리하에 있는 대상체를 말한다.

- [1772] 임의로 치환된: 본원에서 형태 "임의로 치환된 X"의 어구(예를 들면, 임의로 치환된 알킬)은 "X, 여기서, X는 임의로 치환된"(예를 들면, "알킬, 여기서, 당해 알킬은 임의로 치환된다")과 동등한 것으로 의도된다. 특정 "X"(예를 들면, 알킬) 자체는 임의적인 것을 의미하는 것으로 의도되지 않는다.
- [1773] 펩타이드: 본원에 사용된 것으로서, "펩타이드"는 50개 이하의 아미노산 길이, 예를 들면, 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50 아미노산들의 길이이다.
- [1774] 약제학적으로 허용되는: 어구 "약제학적으로 허용되는"은 본원에서, 이상적인 이익/위험 비와 비례하게, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제점 또는 합병증 없이 사람들 및 동물들의 조직들과 접촉해서 사용하기에 적합한, 건전한 의학적 판단의 영역내에 있는 화합물들, 물질들, 조성물들 및/또는 용량 형태들을 말한다.
- [1775] 약제학적으로 허용되는 부형제: 본원에 사용된 것으로서, 어절 "약제학적으로 허용되는 부형제"는 본원에 기술된 화합물들 이외의 어떠한 성분(예를 들면, 활성 화합물을 현탁시키거나 용해시킬 수 있는 비히클)을 말하며 환자에서 실질적으로 무독성이고 비-염증성인 특성들을 갖는다. 부형제들은, 예를 들면: 항부착제들, 항산화제들, 결합제들, 피복제들, 압착 보조제들, 봉해제들, 염료들(착색제들), 유연제들, 유화제들, 충전제들(회색제들), 필름 형성제들 또는 피복제들, 풍미제들, 향수들, 활주제들(유동 증진제들), 윤활제들, 방부제들, 인쇄 잉크들, 흡수제들, 현탁제들, 분산화제들, 감미제들, 및 수화용 수(waters of hydration)를 말한다. 예시적인 부형제들은 부틸화된 하이드록시톨루엔(BHT), 탄산칼슘, 인산칼슘(이염기성), 스테아르산칼슘, 크로스카멜로즈, 가교결합된 폴리비닐 피롤리돈, 시트르산, 크로스포비돈, 시스테인, 에틸셀룰로즈, 젤라틴, 하이드록시프로필 셀룰로즈, 하이드록시프로필 메틸셀룰로즈, 락토즈, 스테아르산마그네슘, 만티톨, 만니톨, 메티오닌, 메틸셀룰로즈, 메틸 파라벤, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 피롤리돈, 포비돈, 예비 젤라틴화된 전분, 프로필 파라벤, 레티닐 팔미테이트, 셀락, 이산화규소, 나트륨 카복시메틸 셀룰로즈, 시트르산나트륨, 나트륨 전분 글리콜레이트, 소르비톨, 전분(옥수수), 스테아르산, 슈크로즈, 활석, 이산화티탄, 비타민 A, 비타민 E, 비타민 C, 및 크실리톨을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [1776] 약제학적으로 허용되는 염들: 본 개시는 또한 본원에 기술된 화합물들의 약제학적으로 허용되는 염들을 포함한다. 본원에 사용된 것으로서, "약제학적으로 허용되는 염들"은 기재된 화합물들의 유도체들을 말하며, 여기서, 모 화합물은 존재하는 산 또는 염기 잔기를 이의 염 형태로 전환시킴으로써(예를 들면, 유리 염기 그룹을 적합한 유기 산과 반응시킴으로써) 변형시킨다. 약제학적으로 허용되는 염들의 예들은 아민들과 같은 염기성 잔기들의 광산 또는 유기산 염들; 카복실산과 같은 산성 잔기들의 알칼리 또는 유기 염들; 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 대표적인 산 부가 염들은 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스코르베이트, 아스파테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 비셀페이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르설포네이트, 시트레이트, 사이클로헥탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설페이트, 에탄설포네이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵토네이트, 핵산오에이트, 하이드로브로마이드, 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 하이드로요오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 락토비오네이트, 락테이트, 라우릴 설페이트, 말레이트, 말로네이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올레에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼셀페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 석시네이트, 설페이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 툴루엔설포네이트, 운데카노에이트, 발러레이트 염들 등을 포함한다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리 토금속 염들은 나트륨, 리튬, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등, 및 또한 무독성 암모늄, 4급 암모늄, 및 아민 양이온들, 예를 들면, 암모늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 에틸아민 등을 포함한다. 본 개시의 약제학적으로 허용되는 염들은 형성된 모 화합물, 예를 들면, 무-독성 무기 또는 유기 산들로부터의 통상적인 무-독성 염들을 포함한다. 본 개시의 약제학적으로 허용되는 염들은 통상의 화학적 방법들에 의해 염기성 또는 산성 잔기를 함유하는 모 화합물로부터 합성될 수 있다. 일반적으로, 이러한 염들은 이들 화합물들의 유리 산 또는 염기 형태들을 화학량론적 양의 적절한 염기 또는 산과 물 또는 유기 용매, 또는 2개의 혼합물 속에서 반응시켜 제조할 수 있으며; 일반적으로 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판올, 또는 아세토니트릴과 같은 비수성 매질들이 바람직하다. 적합한 염들의 목록들은 문헌[참조: Remington *Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P.H. Stahl and C.G. Wermuth(eds.), Wiley-VCH, 2008, 및 Berge et al., *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 1-19(1977), 이들 각각은 참조로 본원에 인용된다]에서 발견된다.

- [1777] **약동학:** 본원에 사용된 것으로서, "약동학"은 살아있는 유기체에 투여된 물질의 수명의 측정과 관련되므로, 분자 또는 화합물의 어떠한 하나 이상의 특성들을 말한다. 약동학은 흡수, 분포, 물질대사 및 분비의 정도 및 속도를 포함하는, 수개의 영역들로 나누어진다. 이는 일반적으로 ADME으로 언급되며, 여기서: (A) 흡수는 물질이 혈류로 도입되는 공정이며; (D) 분포는 신체의 유액들 및 조직들을 통한 물질들의 분산 또는 보급을 말하고; (M) 물질대사(또는 생물전환)은 모 화합물들의 딸 대사산물들로의 비가역적인 변환이고; (E) 배출(제거)는 신체로부터 물질들의 제거를 말한다. 드문 경우들에서, 일부 약물들은 체 조직 속에 비가역적으로 축적된다.
- [1778] **약제학적으로 허용되는 용매화물:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "약제학적으로 허용되는 용매화물"은, 적합한 용매의 분자들이 결정 격자내에 혼입된 본 발명의 화합물을 의미한다. 적합한 용매는 투여된 용량에서 생리학적으로 내성이다. 예를 들면, 용매화물들은 유기 용매들, 물, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 용액으로부터 결정화, 재결정화, 또는 침전에 의해 제조될 수 있다. 적합한 용매들의 예들은 에탄올, 물(예를 들면, 일-, 이-, 및 삼-수화물들), *N*-메틸피롤리딘(NMP), 디메틸 설펝사이드(DMSO), *N,N'*-디메틸포름아미드(DMF), *N,N'*-디메틸아세트아미드(DMAC), 1,3-디메틸-2-이미다졸리딘(DMEU), 1,3-디메틸-3,4,5,6-테트라하이드로-2-(1H)-피리미디논(DMPU), 아세토니트릴(ACN), 프로필렌 글리콜, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 2-피롤리돈, 벤질 벤조에이트 등이다. 물이 용매인 경우, 용매화물은 "수화물"로서 언급된다.
- [1779] **생화학적:** 본원에 사용된 것으로서, "생화학적"은 물리적 및/또는 화학적 특성과 관련됨을 의미한다.
- [1780] **예방하는:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "예방하는"은 감염, 질병, 질환 및/또는 상태의 발병을 부분적으로 또는 완전히 지연시키고/시키거나; 특수한 감염, 질병, 질환, 및/또는 상태의 하나 이상의 증상들, 특징들, 또는 임상적 만연들이 발병을 부분적으로 또는 완전히 지연시키고/시키거나; 특수한 감염, 질병, 질환, 및/또는 상태의 하나 이상의 증상들, 특징들, 또는 만연들이 발병을 부분적으로 또는 완전히 지연시키고/시키거나; 감염, 특수한 질병, 질환, 및/또는 상태로부터의 진행을 부분적으로 또는 완전히 지연시키고/시키거나; 감염, 질병, 질환, 및/또는 상태와 관련된 병리학의 발전 위험성을 감소시킴을 말한다.
- [1781] **전구약물(prodrug):** 본 개시는 또한 본원에 기술된 화합물들의 전구약물들을 포함한다. 본원에 사용된 것으로서, "전구약물들"은 화학적 또는 물리적 변경 시 치료제로서 작용하기 위한 물질, 분자 또는 실체에 대해 예견된 형태의 어떠한 물질, 분자 또는 실체를 말한다. 전구약물들은 일부 방식으로 공유결합적으로 결합되거나 분쇄될 수 있으며, 이는 포유동물 대상체에게 투여되기 전, 투여 시 또는 투여 후에 활성 약물 잔기로 방출되거나 전환된다. 전구약물들은, 변형들이 통상의 조작 또는 시험관내에서 모 화합물들로 절단되는 방식으로 화합물들 속에 존재하는 기능성 그룹들을 변경시킴으로써 제조할 수 있다. 전구약물들은, 하이드록실, 아미노, 설펝하이드릴, 또는 카복실 그룹들이 포유동물 대상체에게 투여되는 경우, 하이드록실, 아미노, 설펝하이드릴, 또는 카복실 그룹이 없는 형태로 절단되는 어떠한 그룹에도 결합되는 화합물들을 포함한다. 전구약물들의 제조 및 용도는 문헌[참조: T. Higuchi and V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, 및 in *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, 이들 둘 다는, 이들의 전문이 참조로 본원에 혼입되어 있다]에 논의되어 있다.
- [1782] **증식하다:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "증식하다"는 성장하거나, 확장하거나 또는 신속하게 증가하거나 성장하도록, 확장하도록 또는 증가하도록 함을 의미한다. "증식성"은 증식하는 능력을 가짐을 의미한다. "항-증식성"은 증식성 특성들에 반대되거나 적절하지 않은 특성들을 가짐을 의미한다.
- [1783] **단백질 절단 부위:** 본원에 사용된 것으로서, "단백질 절단 부위"는, 아미노산 쇄의 조절된 절단이 화학적, 효소적 또는 광화학적 수단들에 의해 달성될 수 있는 부위를 말한다.
- [1784] **단백질 절단 신호:** 본원에 사용된 것으로서, "단백질 절단 신호"는 절단용 폴리펩타이드를 플래그(flag)하거나 표시하는 적어도 하나의 아미노산을 말한다.
- [1785] **목적한 단백질:** 본원에 사용된 것으로서, 용어들 "목적한 단백질들" 또는 "바람직한 단백질들"은 본원에 제공된 것들 및 이들의 단편들, 돌연변이체들, 변이체들, 및 변형들을 포함한다.
- [1786] **근접한:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "근접한"은 중심 또는 목적한 지점 또는 영역에 대해 가장 가까이 위치함을 의미한다.
- [1787] **정제된:** 본원에 사용된 것으로서, "정제하다", "정제된", "정제"는 원치않은 성분들, 물질 오염, 혼합물 또는 결합으로부터 실질적으로 순수하게 하거나 청소함을 의미한다.

- [1788] **샘플:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 이의 조직들, 세포들 또는 성분 부분들(예를 들면, 혈액, 점액, 림프액, 관절 낭액, 뇌 척수액, 타액, 양수, 양막제대혈, 뇨, 질액 및 정액을 포함하는 체액들)의 소세트를 말한다. 샘플은 또한 전체 유기체 또는 이의 조직들, 세포들 또는 성분 부분들의 소세트, 또는 예를 들면, 혈장, 혈청, 척수액, 림프액, 피부, 호흡기, 창자, 및 비노생식기관들의 외부 단면들을 포함하나, 이에 한정되지 않는 이의 분획 또는 부위로부터의 분해물 또는 추출물, 눈물, 타액, 유액, 혈액 세포들, 종양들, 기관들을 포함할 수 있다. 샘플들은 또한 영양 브로쓰(nutrient broth) 또는 겔과 같은 배지를 말하며, 이는 단백질들 또는 핵산 분자와 같은 세포 성분들을 함유할 수 있다.
- [1789] **신호 서열들:** 본원에 사용된 것으로서, 어구 "신호 서열들"은 단백질의 수송 또는 국제화를 지시할 수 있는 서열을 말한다.
- [1790] **유의적인 또는 유의적으로:** 본원에 사용된 것으로서, 용어들 "유의적인" 또는 "유의적으로"는 용어 "실질적으로"과 동의어로 사용된다.
- [1791] **단일 단위 용량:** 본원에 사용된 것으로서, "단일 단위 용량"은 1회 용량/1회로/단일 경로/ 단일 접촉점, 즉, 단일 투여 현상으로 투여된 어떠한 치료제의 용량이다.
- [1792] **유사성:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "유사성"은 중합체 분자들 사이, 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드 분자들(예를 들면, DNA 분자들 및/또는 RNA 분자들) 사이 및/또는 폴리펩타이드 분자들 사이의 전체적인 관련성을 말한다. 서로에 대한 중합체 분자들의 유사성 퍼센트의 계산은, 유사성 퍼센트의 계산이 당해 분야에 이해되는 바와 같이 보존적 치환들을 고려하는 것을 제외하고는, 동일성 퍼센트의 계산과 동일한 방식으로 수행할 수 있다.
- [1793] **분할 용량:** 본원에 사용된 것으로서, "분할 용량"은 단일 단위 용량 또는 총 1일 용량의 2회 이상의 용량들로의 분할이다.
- [1794] **안정한:** 본원에 사용된 것으로서 "안정한"은 반응 혼합물로부터 유용한 정도의 순도로의 분리에 건디기에 충분히 강하고, 바람직하게는 유효한 치료제로 제형화될 수 있는 화합물을 말한다.
- [1795] **안정화된:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "안정화하다", "안정화된", "안정화된 영역"은 안정하게 만들거나 안정화됨을 의미한다.
- [1796] **대상체:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "대상체" 또는 "환자"는, 본 발명에 따르는 조성물이 예를 들면, 실험적, 진단적, 예방적 및/또는 치료학적 목적들을 위해 투여될 수 있는 어떠한 유기체를 말한다. 대표적인 대상체들은 동물들(예를 들면, 마우스들, 랫트들, 토끼들, 비-사람 영장류들, 및 사람들) 및/또는 식물들을 포함한다.
- [1797] **실질적으로:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "실질적으로"는 목적인 특징 또는 특성의 전체 또는 전체에 근접한 한도 또는 정도를 나타내는 정성적 상태를 말한다. 생물학적 분야에서 통상의 기술자는, 생물학적 및 화학적 현상이 설사 드물게 완성으로 완료되고/되거나 진행되는 경우 또는 절대적인 결과를 달성하거나 피하는 것으로 이해할 것이다. 용어 "실질적으로"는 따라서 많은 생물학적 및 화학적 현상들에서 고유한 완성도의 잠재적인 결여를 포착하기 위해 사용된다.
- [1798] **실질적으로 동일함:** 본원에 사용된 것으로서, 이는 용량들 사이에 시간 차이들에 관한 것이므로, 당해 용어는 +/- 2%를 의미한다.
- [1799] **실질적으로 동시에:** 본원에 사용된 것으로서 및 이것이 다수의 용량들에 관련되므로, 당해 용어는 2초내를 의미한다.
- [1800] **로 고생하는:** 질병, 질환, 및/또는 상태 "로 고생하는" 개인은 질병, 질환, 및/또는 상태의 하나 이상의 증상들을 지닌 것으로 진단되거나 나타낸다.
- [1801] **에 대해 민감한:** 질병, 질환, 및/또는 상태에 대해 민감한 개인은 질병, 질환, 및/또는 상태를 지닌 것으로 진단되지 않고/않거나 이들의 증상들을 나타내지 않을 수 있다. 일부 실시형태에서, 질병, 질환, 및/또는 상태(예를 들면, 암)에 대해 민감한 개인은 다음 중의 하나 이상으로 특성화될 수 있다: (1) 질병, 질환, 및/또는 상태와 관련된 유전적 돌연변이; (2) 질병, 질환, 및/또는 상태와 관련된 유전적 다형태; (3) 질병, 질환, 및/또는 상태와 관련된 단백질 및/또는 핵산의 증가되고/되거나 감소된 발현 및/또는 활성; (4) 질병, 질환, 및/또는 상태의 발달과 고나련된 습관들 및/또는 생활방식들; (5) 질병, 질환, 및/또는 상태의 가계 이력(family

history); 및 (6) 질병, 질환, 및/또는 상태의 발달과 관련된 미생물에 대한 노출 및/또는 이의 감염. 일부 실시형태에서, 질병, 질환, 및/또는 상태에 대해 민감한 개인은 질병, 질환, 및/또는 상태로 진행될 것이다. 일부 실시형태에서, 질병, 질환, 및/또는 상태에 대해 민감한 개인은 질병, 질환, 및/또는 상태로 진행되지 않을 것이다.

- [1802] **합성:** 용어 "합성"은 사람의 손으로 생산되고/되거나, 제조되고/되거나, 제작됨을 의미한다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 또는 다른 분자의 합성은 화학적 또는 효소적일 수 있다.
- [1803] **표적화된 세포들:** 본원에 사용된 것으로서, "표적화된 세포들"은 특정의 목적인 하나 이상의 세포들을 말한다. 당해 세포들은 시험관내, 생체내, 반응계내 또는 유기체의 조직 또는 기관내에서 발견될 수 있다. 유기체는 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 사람 및 가장 바람직하게는 환자일 수 있다.
- [1804] **치료제:** 용어 "치료제"는, 대상체에게 투여되는 경우, 치료학적, 진단적, 및/또는 예방적 효과를 가지고/가지거나 바람직한 생물학적 및/또는 약리학적 효과를 유발하는 어떠한 제제도 말한다.
- [1805] **치료학적 유효량:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "치료학적 유효량"은 감염, 질병, 질환, 및/또는 상태로 고생하거나 이에 대해 민감한 대상체에게 투여시 감염, 질병, 질환, 및/또는 상태를 치료하고/하거나, 이의 증상을 개선시키고/시키거나 이의 발병을 진단하고/하거나, 예방하고/하거나 지연시키기에 충분한 전달될 제제(예를 들면, 핵산, 약물, 치료제, 진단제, 예방제 등)의 양을 의미한다.
- [1806] **치료학적으로 효과적인 결과:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "치료학적으로 효과적인 결과"는 감염, 질병, 질환, 및/또는 상태로 고생하거나 이에 대해 민감한 대상체내에서 감염, 질병, 질환, 및/또는 상태를 치료하고/하거나 이의 증상을 개선시키고/시키거나, 진단하고/하거나, 예방하고/하거나 이의 발병을 지연시키기에 충분한 결과를 의미한다.
- [1807] **총 1일 용량:** 본원에 사용된 것으로서, "총 1일 용량"은 24시간내에 제공되거나 처방된 양이다. 이는 단일 단위 용량으로 투여될 수 있다.
- [1808] **전사 인자:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "전사 인자"는 예를 들면, 전사의 활성화 또는 회귀에 의해, DNA의 RNA로의 전사를 조절하는 DNA-결합 단백질을 말한다. 일부 전사 인자들은 전사만을 조절하는 반면, 다른 것들은 다른 단백질과 관련하여 작용한다. 일부 전사 인자는 특정 조건들하에서 전사를 활성화하고 억제(repress)하는 것들 둘 다를 할 수 있다. 일반적으로, 전사 인자들은 표적 유전자의 조절 영역내에서 특이적인 콘센스 서열(consensus sequence)과 매우 유사한 특이적인 표적 서열 또는 서열들에 결합한다. 전사 인자들은 표적 유전자만의 전사를 조절하거나 다른 분자들과의 복합체로 조절할 수 있다.
- [1809] **치료하는:** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "치료하는"은 특수한 감염, 질병, 질환, 및/또는 상태의 하나 이상의 증상들 또는 특징들의 발병을 부분적으로 또는 완전히 완화시키고/시키거나, 개선시키고/시키거나, 경감시키고/시키거나, 지연시키고/시키거나, 이의 진행을 억제하고/하거나, 이의 중증도를 감소시키고/시키거나, 이의 발생을 감소시킴을 말한다. 예를 들어, 암을 "치료하는"은 종양의 생존, 성장, 및/또는 확산을 억제함을 말할 수 있다. 치료는 질병, 질환, 및/또는 상태의 신호들을 나타내지 않는 대상체 및/또는 질병, 질환, 및/또는 상태와 관련된 병리학으로 진행될 위험을 감소시킬 목적으로 질병, 질환, 및/또는 상태의 조기 신호들만을 나타내는 대상체에게 투여될 수 있다.
- [1810] **변형되지 않은:** 본원에 사용된 것으로서, "변형되지 않은"은 어떠한 방식으로든 변화되기 전의 어떠한 물질, 화합물 또는 분자를 말한다. 변형되지 않은은 항상은 아니지만, 생물분자의 야생형 또는 천연형을 말한다. 분자들은 일련의 변형들을 겪음으로써 각각의 변형된 분자가 후속적인 변형에 대한 "변형되지 않은" 출발 분자로서 제공될 수 있다.
- [1811] **등가물들 및 범위**
- [1812] 당해 분야의 숙련가들은 통상적인 실험, 본원에 기술된 본 발명에 따른 구체적인 실시형태들에 대한 많은 등가물들을 사용하여 인식하거나, 추정할 수 있을 것이다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명으로 제한되는 것으로 의도되지 않지만, 오히려 첨부된 특허청구범위에 설정된다.
- [1813] 특허청구범위에서, 단수형 "하나"("a", "an") 및 "그"("the")와 같은 정관사는, 반대로 나타내거나 달리 내용으로부터 명백하지 않는 한, 하나 이외의 하나 이상을 의미할 수 있다. 그룹의 하나 이상의 구성원들 사이에 "또는"을 포함하는 특허청구범위 또는 설명들은, 그 그룹 구성원들 중의 하나, 하나 이상, 또는 모두가, 달리 나타내지 않는 한 또는 내용으로부터 명백하지 않는 한, 제공된 생성물 또는 공정에 사용되거나, 달리는 이와 관련된

는 경우 만족되는 것으로 고려된다. 본 발명은, 그룹의 정확히 하나의 구성원이 제공된 생성물 또는 공정에, 또는 달리는 이와 관련하여 존재하는 실시형태들을 포함한다. 본 발명은, 그룹 구성원들의 하나 이상, 또는 모두가 제공된 생성물 또는 공정에 존재하거나, 사용되거나, 또는 달리는 이와 관련되는 실시형태들을 포함한다.

[1814] 용어 "포함하는"은 추가의 성분들 또는 단계들의 포괄을 개방하고 허용하지만 필요로 하지는 않는 것으로 의도된다. 용어 "포함하는"이 본원에 사용된 경우, 용어 "로 이루어진"은 따라서, 또한 포함되고 기재된다.

[1815] 범위들이 제공된 경우, 종점들이 포함된다. 또한, 달리 나타내거나 달리는 당해 분야의 통상의 기술자의 이해 및 내용으로부터 명백한 경우를 제외하고, 범위들로 나타낸 값들은, 내용이 달리 명확하게 나타내지 않는 한, 본 발명의 상이한 실시형태에서 기술된 범위들내에서 어떠한 구체적인 값 또는 소범위 내지 그 범위의 하한치의 단위의 10분의 1까지 추정할 수 있다.

[1816] 또한, 당해 분야에 속하는 본 발명의 어떠한 특정 실시형태도 특허청구범위 중 어느 하나 이상으로부터 명확하게 배제될 수 있음이 이해되어야 한다. 이러한 실시형태들은 당해 분야의 통상의 기술자에게 공지된 것으로 고려되므로, 이들은, 배제가 본원에 명확하게 설정되지 않는 경우에도, 배제될 수 있다. 본 발명의 조성물들의 어느 특수항 실시형태(예를 들면, 이에 의해 암호화된 어떠한 핵산 또는 단백질; 어떠한 생산 방법; 어떠한 사용 방법 등)은 어떠한 하나 이상의 특허청구범위로부터 어떠한 이유에서도, 선행 기술의 존재와의 관련 여부와 상관없이 배제될 수 있다.

[1817] 모든 인용된 공급원들, 예를 들면, 본원에 인용된 참조문헌들, 공보들, 데이터베이스들, 데이터베이스 실체들, 및 기술은, 심지어 인용에서 표현하여 기술되지 않는 경우에도, 참조로 본 출원에 혼입된다. 인용된 공급원과 본 출원의 기술들이 상충되는 경우에, 본 출원의 기술이 조절할 것이다.

[1818] **실시예들**

[1819] 본 개시는, 하기의 실시예들에서 추가로 기술되고, 이는, 특허청구범위에 기술된 본 개시의 범위를 제한하지 않는다.

[1820] **실시에 1. 변형된 mRNA 시험관내 전사**

[1821] **A. 재료 및 방법**

[1822] 뉴클레오타이드 혼합물이, 변형된 뉴클레오타이드를 함유하는 것을 제외하고는 본 발명에 따라 변형된 mRNA는 시험관내 전사를 위한 표준 실험실 방법 및 재료를 사용하여 제조한다. 목적인 유전자의 개방 관독 프레임(ORF), 강력한 코작 번역 개시 신호를 함유하는 5' 번역되지 않는 영역(UTR) 및 아데노신 유사체들이 혼입되지 않은 mRNA들을 위한 폴리A 테일(polyA tail)의 주형화된 첨가를 위해 올리고(dT) 서열로 종결되는 알파-글로빈 3' UTR로 플랭킹(flanking)한다. 아데노신-함유 mRNA들을 올리고(dT) 서열의 부재 하에 합성하여 전사-후 폴리(A) 폴리머라제 폴리-(A) 테일링(tailing)을 가능하게 한다.

[1823] 변형된 mRNA는, 세포의 선천성 면역 반응을 감소시키기 위해 변형될 수 있다. 세포 반응을 감소시키기 위한 변형들은 슈도우리딘(Ψ) 및 5-메틸-사이티딘(5mC, 5mc 또는 m⁵C)을 포함할 수 있다. [참조: Kariko K et al. Immunity 23:165-75(2005), Kariko K et al. Mol Ther 16:1833-40(2008), Anderson BR et al. NAR(2010); 본원에 참조로 혼입됨].

[1824] ORF는 또한 다양한 상류(upstream) 또는 하류(downstream) 첨가물들(예를 들면, β -글로빈, 태그 등)을 포함할 수 있으며, DNA2.0(캘리포니아주 멘로 파크 소재)와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 최적화 서비스로부터 주문할 수 있고, XbaI 인식을 가질 수 있는 다중 클로닝 부위들을 함유할 수 있다. 작제물의 수령 시, 이는 재구성되어 화학적으로 적격성(competent)인 이. 콜라이(*E. coli*) 내로 형질전환될 수 있다.

[1825] 본 발명의 경우, NEB DH5-알파 적격성인 이. 콜라이가 사용된다. 형질전환들은 100 ng의 플라스미드를 사용하는 NEB 지시들에 따라 수행된다. 프로토콜은 하기와 같다.

[1826] NEB 5-알파 적격성인 이. 콜라이 세포들의 튜브를 빙상에서 10분 동안 해동시킨다.

[1827] 1pg 내지 100 ng의 플라스미드 DNA를 함유하는 1 내지 5 μ l를 세포 혼합물에 가한다. 튜브를 4 내지 5회 조심스럽게 뒤져서 세포들과 DNA를 혼합한다. 와동시키지 않는다.

[1828] 혼합물을 빙상에 30분 동안 둔다. 혼합하지 않는다.

- [1829] 42°C에서 정확히 30분 동안 열 쇼크(heat shock)시킨다. 혼합하지 않는다.
- [1830] 빙상에 5분 동안 둔다. 혼합하지 않는다.
- [1831] 실온의 950 μl의 SOC를 혼합물 내로 피펫팅한다.
- [1832] 37°C에서 60분 동안 둔다. 격렬하게(250rpm) 진탕시키거나 회전시킨다.
- [1833] 선택 플레이트들을 37°C로 가온한다.
- [1834] 튜브를 뒤집고 뒤집어서 세포들을 완전히 혼합한다.
- [1835] 50 내지 100 μl의 각각의 희석물을 선택 플레이트 상에 분무하고 37°C에서 밤새 항온배양한다. 대안으로, 30°C에서 24 내지 36 시간 동안 또는 25°C에서 48시간 동안 항온배양한다.
- [1836] 이어서, 단일 콜로니를 사용하여 적절한 항생제를 사용하는 5 ml의 LB 성장 배지에 접종한 후 5시간 동안 성장 (250RPM, 37°C)하도록 한다. 이어서, 이를 사용하여 200 ml의 배양 배지에 접종하고 동일한 조건 하에 밤새 성장시킨다.
- [1837] 플라스미드(850 μg 이하)를 분리하기 위해, 제조업자의 지침에 따라 인비트로젠 퓨어링크 하이퓨어 맥시프렙 키트(Invitrogen PURELINK™ HiPure Maxiprep Kit)(캘리포니아주 칼스바드 소재)를 사용하여 맥시 프렙(maxi prep)을 수행한다.
- [1838] 시험관내 전사(IVT)를 위한 cDNA를 생성시키기 위해, 플라스미드(이의 예는 도 3에 나타낸다)를 우선 XbaI와 같은 제한 효소를 사용하여 선형화한다. XbaI를 사용한 전형적인 제한 분해는 다음을 포함할 것이다: 플라스미드 1.0 μg; 10x 완충액 1.0 μl; XbaI 1.5 μl; 10 μl 이하의 dH₂O; 37°C에서 1시간 동안 항온배양함. 실험실 규모 (<5 μg)에서 수행하는 경우, 반응물을 인비트로젠(Invitrogen)의 PURELINK™ PCR 마이크로 키트(캘리포니아주 칼스바드 소재)를 사용하여 제조업자의 지침에 따라 세정한다. 보다 큰 규모의 정제는 인비트로젠의 표준 PURELINK™ PCR 키트(캘리포니아주 칼스바드 소재)와 같은 보다 큰 부하 용량을 갖는 제품을 사용하여 수행하는 것이 필요할 수 있다. 세정 후, 선형화된 벡터를 NanoDrop을 사용하여 정량화하고 분석하여 아가로스 겔 전기영동을 사용한 선형화를 확인한다.
- [1839] **B. 변형된 mRNA의 아가로스 겔 전기영동**
- [1840] 개개의 변형된 mRNA들(20 μl의 용적 중 200 내지 400ng)을 웰(well) 내로 변성되지 않은 1.2% 아가로스 E-겔[제조원: 인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아주 칼스바드 소재] 상에 로딩하고 제조업자의 프로토콜에 따라서 12 내지 15분 동안 이동시켰다.
- [1841] **C. RT-PCR 생성물들의 아가로스 겔 전기영동**
- [1842] 개개의 역 전사된-PCR 생성물들(200 내지 400ng)을 변성되지 않은 1.2% 아가로스 E-겔(제조원: 인비트로젠, 캘리포니아주 칼스바드 소재)의 웰 내로 로딩하고 제조업자의 프로토콜에 따라서 12 내지 15분 동안 이동시켰다.
- [1843] **D. 미량소적(Nanodrop) 변형된 mRNA 정량화 및 UV 스펙트럼 데이터**
- [1844] TE 완충액(1 μl) 중의 변형된 mRNA들을 미량소적 UV 흡광도 판독들에 사용하여 시험관내 전사 반응(UV 흡광도 자취들(traces)은 나타내지 않음)으로부터 각각의 변형된 mRNA의 수율을 정량화한다.
- [1845] **실시예 2. 변형된 mRNA 형질감염**
- [1846] **A. 역 형질감염**
- [1847] 24-웰 콜라겐-피복된 조직 배양 플레이트 내에서 수행된 실험들에 대해, 케라틴세포(Keratinocyte)들을 1×10^5 의 세포 밀도로 식종(seeding)하였다. 96-웰 콜라겐-피복된 조직 배양 플레이트 내에서 수행된 실험들에 대해, 케라틴세포들을 0.5×10^5 의 세포 밀도로 식종하였다. 형질감염될 각각의 변형된 mRNA를 위해, 변형된 mRNA: RNAIMAX™을 기술한 바와 같이 제조하고, 세포들이 조직 배양 플레이트에 부착하기 전에 세포 식종 6시간 이내에 다중-웰 플레이트내의 세포들과 혼합하였다.
- [1848] **B. 전방 형질감염**

- [1849] 24-웰의 콜라겐-피복된 조직 배양 플레이트에서, 케라틴세포들을 0.7×10^5 의 세포 밀도로 식중한다. 96-웰 콜라겐-피복된 조직 배양 플레이트에서 수행된 실험들에 대해 케라틴세포들을 0.3×10^5 의 세포 밀도로 식중한다. 이어서, 케라틴세포들을 24시간에 걸쳐 >70%의 합치성(confluency)까지 성장시킨다. 형질감염될 각각의 변형된 mRNA에 대해, 변형된 mRNA: RNAIMAX™을 기술한 바와 같이 제조하고, 세포 식중 및 조직 배양 플레이트에 대한 부착 후 24시간에 걸쳐 다중-웰 플레이트 속에서 세포 상에 형질감염시킨다.
- [1850] **C. 변형된 mRNA 번역 스크린: G-CSF ELISA**
- [1851] 케라틴세포들을 보충물 S7(제조원: 인비트로젠)을 갖는 에피라이프(EpiLife) 배지에서 >70%의 합치성으로 성장시킨다. 케라틴세포들을 RNAIMAX™(제조원: 인비트로젠)과 복합체화된 300 ng의 표시된 화학적으로 변형된 mRNA를 사용하여 역 형질감염시킨다. 대안으로, 케라틴세포들을 RNAIMAX™(제조원: 인비트로젠)과 복합체화된 300 ng의 변형된 mRNA를 사용하여 전방 형질감염시킨다. RNA: RNAIMAX™ 복합체는, 우선 RNA를, 보충물이 포함되어 있지 않은 EPILIFE® 배지와 함께 5X 용적의 희석물 중에서 10분 동안 실온에서 항온배양함으로써 형성된다.
- [1852] 제2 바이알(vial)에서, RNAIMAX™ 시약을 보충물 불포함 EPILIFE® 배지와 함께 10X 용적의 희석물 중에서 10분 동안 실온에서 항온배양하였다. 이어서, RNA 바이알을 RNAIMAX™ 바이알과 혼합하고 20 내지 30분 동안 실온에서 항온배양한 후 세포에 적가 방식으로 가한다. 배양물 배지 중의 분비된 huG-CSF 농도는, 각각의 화학적으로 변형된 mRNA들에 대해 형질감염 후 18시간째에 3회 측정한다. 형질감염된 사람 케라틴세포들로부터의 사람 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF)의 분비는, 제조업자의 추천된 지침에 따라서, [제조원: 인비트로젠 또는 R&D 시스템스(R&D Systems)(미네소타주 미네아폴리스 소재)]로부터의 ELISA 키트를 사용하여 정량화한다.
- [1853] **D. 변형된 mRNA 용량 및 지속기간: G-CSF ELISA**
- [1854] 케라틴세포들을 보충물 S7(제조원: 인비트로젠)을 갖는 EPILIFE® 배지 중에서 >70%의 합치성으로 성장시킨다. 케라틴세포들을 0ng, 46.875ng, 93.75ng, 187.5ng, 375ng, 750ng, 또는 1500ng의, RNAIMAX™(제조원: 인비트로젠)과 복합체화된 변형된 mRNA로 역 형질감염시킨다. 변형된 mRNA: RNAIMAX™ 복합체가 기술된 바와 같이 형성된다. 배양 배지 중에 분비된 huG-CSF 농도는 각각의 변형된 mRNA의 각각의 농도에 대해 형질감염 후 0, 6, 12, 24, 및 48 시간째에 3회 측정된다. 형질감염된 사람 케라틴세포들로부터의 사람 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF)의 분비는 제조업자의 추천된 지침에 따라서 인비트로젠 또는 R&D 시스템스로부터의 ELISA 키트를 사용하여 정량화한다.
- [1855] **실시예 3. 변형된 핵산에 대한 세포의 선천적 면역 반응: IFN-베타 ELISA 및 TNF-알파 ELISA**
- [1856] 시험관내-형질감염된 사람 케라틴세포 세포들로부터 분비된 사람 종양 괴사 인자- α (TNF- α), 사람 인터페론- β (IFN- β) 및 사람 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF)에 대한 효소-연결된 면역흡착 검정(ELISA)을 세포 선천적 면역 반응의 검출에 대해 시험한다.
- [1857] 케라틴세포들은, 인비트로젠으로부터의 하이드로코르티손의 부재 하에 사람 케라틴세포 성장 보충물을 갖는 EPILIFE® 배지 중에서 >70%의 합치성으로 성장시킨다. 케라틴세포들은 기술한 바와 같이 0ng, 93.75ng, 187.5ng, 375ng, 750ng, 1500ng 또는 3000ng의, RNAIMAX™(제조원: 인비트로젠)과 복합체화된 표시된(indicated) 화학적으로 변형된 mRNA로 3회 역 형질감염시킨다. 배양 배지에 분비된 TNF- α 를 각각의 화학적으로 변형된 mRNA들에 대해 형질감염 후 24시간째에 ELISA 키트(제조원: 인비트로젠)를 사용하여 제조업자의 프로토콜들에 따라서 측정한다.
- [1858] 분비된 IFN- β 를, 각각의 화학적으로 변형된 mRNA들에 대해 형질감염 후 24시간째에 ELISA 키트(제조원: 인비트로젠)를 사용하여 제조업자의 프로토콜들에 따라서 측정한다. 분비된 hu-G-CSF 농도는 형질감염 후 24시간째에 각각의 화학적으로 변형된 mRNA들에 대해 측정한다. 형질감염된 사람 케라틴세포들로부터의 사람 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF)의 분비를, ELISA 키트[제조원: 인비트로젠 또는 R&D 시스템스(미네소타주 미네아폴리스 소재)]를 사용하여 제조업자들의 추천된 지침에 따라서 정량화한다. 이들 데이터는, 예시적인 제1형 사이토카인들 TNF-알파 및 IFN-베타를 측정함으로써 변형된 mRNA가 천연 및 다른 화학적으로 변형된 폴리뉴클레오타이드들

또는 참조 화합물들과 비교하여, 감소된 세포 선천성 면역 반응을 유발시킬 수 있음을 나타낸다.

[1859] **실시예 4. 사람 과립구-콜로니 자극 인자-변형된 mRNA-유도된 세포 증식 검정**

[1860] 사람 케라틴세포들을 보충물 S7(제조원: 인비트로젠)을 갖는 EPILIFE® 배지 중에서 >70%의 합치성으로 24-웰 콜라겐-피복된 TRANSWELL® [제조원: 코닝(Corning), 매사추세츠주 로웰 소재] 공동-배양 조직 배양 플레이트에서 성장시킨다. 케라틴세포들을 기술한 바와 같이 RNAIMAX™(제조원: 인비트로젠)과 복합체화된 750ng의 표시된 화학적으로 변형된 mRNA로 3회 역 형질감염시킨다. 변형된 mRNA: RNAIMAX™ 복합체를 기술한 바와 같이 형성시킨다. 케라틴세포 배지를 형질감염 후 6 내지 8 시간째에 교환한다. 형질감염 후 42시간째에, 0.4µm-공극 반-투과성 폴리에스테르 막을 갖는 24-웰 TRANSWELL® 플레이트 삽입물을 hu-G-CSF 변형된 mRNA-형질감염된 케라틴세포 함유 배양 플레이트 내에 둔다.

[1861] 사람 골수아세포 세포들, Kasumi-1 세포들 또는 KG-1(0.2 x 10⁵ 세포들)을 삽입물 웰 내로 식종하고, 세포 증식을 공동-배양 개시 후 42시간째에 CyQuant Direct Cell Proliferation Assay(제조원: 인비트로젠)를 사용하여 100 내지 120 µl의 용적으로 96-웰 플레이트 중에서 정량화한다. 변형된 mRNA를 암호화하는 hu-G-CSF-유도된 골수아세포 세포 증식은 형질감염되지 않은 케라틴세포/골수아세포 공동-배양 대조군 웰들에 대해 표준화된 세포 증식 퍼센트로 나타낸다. 케라틴세포 및 골수아세포 삽입물 공동-배양 웰들 둘 다의 내에 분비된 hu-G-CSF 농도를 각각의 변형된 mRNA에 대해 공동-배양 개시 후 42시간째에 2회 측정한다. 사람 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF)의 분비는 ELISA 키트(제조원: 인비트로젠)를 사용하여 제조업자의 추천된 지침에 따라서 정량화한다.

[1862] 사람 케라틴세포 공급기 세포들 및 형질감염되지 않은 사람 골수아세포 세포들 속에서 형질감염된 hu-G-CSF 변형된 mRNA를 RT-PCR로 검출한다. 샘플 세포들로부터 총 RNA를 추출하고 RNEASY® 키트[제조원: 퀴아젠(Qiagen), 캘리포니아주 발렌시아가 소재]를 사용하여 제조업자의 지침에 따라 분해한다. 추출된 총 RNA를 변형된 mRNA-G-CSF의 특이적인 증식을 위해 PROTOSCRIPT® M-MuLV Taq RT-PCR 키트[제조원: 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England BioLabs), 매사추세츠주 입스위치 소재]를 사용하여 hu-G-CSF-특이적인 프라이머들과 함께 제조업자의 지침에 따라서 RT-PCR에 제공한다. RT-PCR 생성물들을 1.2% 아가로스 겔 전기영동에 의해 가시화한다.

[1863] **실시예 5. 세포독성 및 아포토시스(Apoptosis)**

[1864] 당해 실험은, 명확하게 변형된 mRNA-시험관내 형질감염된 사람 케라틴세포 세포들에 대한 세포 생존능, 세포독성 및 아포토시스를 입증한다. 케라틴세포들을 사람 케라틴세포 성장 보충물을 갖는 EPILIFE® 배지에서 하이드로코르티손(제조원: 인비트로젠)의 부재 하에 >70%의 합치성으로 성장시킨다. 케라틴세포들을 0ng, 46.875ng, 93.75ng, 187.5ng, 375ng, 750ng, 1500ng, 3000ng, 또는 6000ng의, RNAIMAX™ (제조원: 인비트로젠)으로 복합체화된 변형된 mRNA로 역 형질감염시킨다. 변형된 mRNA: RNAIMAX™ 복합체가 형성된다. 배양 배지 속에 분비된 hu-G-CSF 농도는 각각의 변형된 mRNA의 각각의 농도에 대해 형질감염 후 0, 6, 12, 24, 및 48 시간째에 3회 측정한다. 형질감염된 사람 케라틴세포들로부터의 사람 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF)의 분비는 ELISA 키트(제조원: 인비트로젠 또는 R&D 시스템스)를 사용하여 제조업자의 추천된 지침에 따라서 정량화한다. 세포 생존능, 세포독성 및 아포토시스를 형질감염 후 0, 12, 48, 96, 및 192시간째에 APOTOX-GLO™ 키트[제조원: 프로메가(Promega), 위스콘신주 매디슨 소재]를 사용하여 제조업자의 지침에 따라 측정한다.

[1865] **실시예 6. 공동-배양 환경**

[1866] 사람 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF)를 암호화하는 화학적으로-명확히 변형된 뉴클레오타이드들로 구성된 변형된 mRNA는, 공동-배양 환경 속에서 형질감염 비적격 세포의 세포 증식을 자극시킬 수 있다. 공동-배양물은 사람 케라틴세포 및 형질감염 비적격 세포 유형, 예를 들면, 백혈구 세포(WBC)와 같은 고도로 형질감염될 수 있는 세포 유형을 포함한다. G-CSF를 암호화하는 변형된 mRNA를, 고도로 형질감염될 수 있는 세포 내로 형질감염시켜 G-CSF 단백질의 생산 및 세포의 환경으로의 분비를 가능하게 할 수 있으며, 여기서, G-CSF는 췌장-유사 방식으로 작용하여 G-CSF 수용체를 발현하는 백혈구를 자극하여 증식한다. 증가된 WBC 집단을 사용하여 면역-약화된 환자들을 치료하거나 면역억제된 환자들의 WBC 집단을 부분적으로 재구성함으로써 기회 감염의 위험을 감소시킬 수 있다.

[1867] 다른 예에서, 섬유아세포와 같은 고도로 형질감염될 수 있는 세포를 소정 성장 인자들로 형질감염시켜 불량하게

형질감염될 수 있는 배아 줄기 세포들의 성장, 유지, 또는 분화를 지지하고 자극하거나 다능성 줄기 세포들을 유도할 수 있다.

[1868] **실시예 7. 변형된 핵산(변형된 mRNA)에 대한 5'-구아노신 캡핑(Capping)**

[1869] **A. 재료 및 방법**

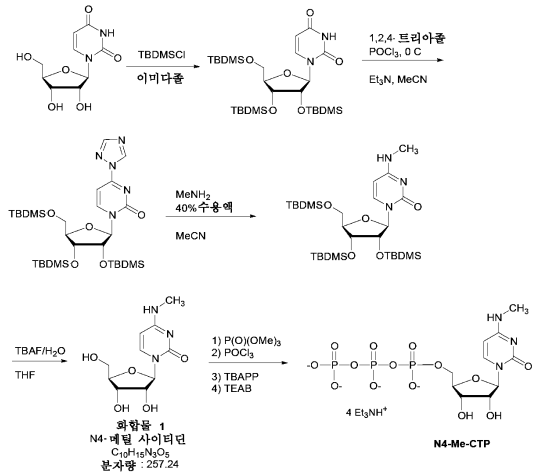
[1870] 클로닝, 유전자 합성 및 벡터 서열분석을 DNA2.0 Inc.(캘리포니아주 멘로 파크 소재)에 의해 수행하였다. ORF를 XbaI를 사용하여 제한 분해하고 테일드(tailed)- 또는 테일이 없는(tail-less)-PCR을 사용하는 cDNA 합성에 사용하였다. 테일드-PCR cDNA 생성물은, 25mM의 각각의 변형된 뉴클레오타이드 혼합물[모든 변형된 뉴클레오타이드들은 통상적으로 합성되었거나 트리링크 바이오테크(TriLink Biotech)(캘리포니아주 샌 디에고 소재)로부터 구매하였으며, 단, 피롤로-C 트리포스페이트는 글렌 리서치(Glen Research)(버지니아주 스티어링 소재)로부터 구매하였고; 변형되지않은 뉴클레오타이드들은 에피센터 바이오테크놀로지스(Epicenter Biotechnologies)(위스콘신주 매디슨 소재)로부터 구매하였다] 및 Cellcript MEGASCRIPTM[제조원: 에피센터 바이오테크놀로지스(Epicenter Biotechnologies), 위스콘신주 매디슨 소재] 완전 mRNA 합성 키트를 사용하는 변형된 mRNA 합성 반응을 위한 주형으로 사용하였다. 시험관내 전사 반응을 37°C에서 4시간 동안 수행하였다. 아데노신 유사체들을 혼입하는 변형된 mRNA들은 효모 폴리(A) 폴리머라제[제조원: 아피메트릭스(Affymetrix), 캘리포니아주 산타 클라라 소재]를 사용하여 폴리(A) 테일화하였다. PCR 반응물은 HiFi PCR 2X MASTER MIXTM[제조원: 카파 바이오시스템스(Kapa Biosystems), 매사추세츠주 워번 소재]를 사용하였다. 변형된 mRNA들을 재조합체 백시니아 바이러스 캡핑 효소(제조원: 뉴잉글랜드 바이오랩스, 매사추세츠주 입스위치 소재) 및 재조합체 2'-o-메틸트랜스퍼라제(제조원: 에피센터 바이오테크놀로지스, 위스콘신주 매디슨 소재)를 사용하여 후-전사적으로 캡핑하여 5'-구아노신 캡 1 구조를 생성하였다. 캡 2 구조 및 캡 2 구조들은 추가의 2'-o-메틸트랜스퍼라제들을 사용하여 생성시킬 수 있다. 시험관내 전사된 mRNA 생성물을 아가로스 겔 상에 이동시키고 가시화하였다. 변형된 mRNA를 암비온(Ambion)/어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems)(텍사스주 오스틴 소재) MEGAClear RNATM 정제 키트를 사용하여 정제하였다. PCR은 PURELINKTM PCR 정제 키트(제조원: 인비트로젠, 캘리포니아주 칼스바드 소재)를 사용하였다. 생성물을 NANODROPTM UV 흡광도[제조원: 써모피셔(ThermoFisher), 매사추세츠주 왈탐 소재] 상에서 정량화하였다. 생성물의 품질, UV 흡광도 품질 및 가시화를 1.2% 아가로스 겔 상에서 수행하였다. 생성물을 TE 완충액 중에 재현탁시켰다.

[1871] **B. 5' 캡핑 변형된 핵산(mRNA) 구조**

[1872] 변형된 mRNA의 5' 캡핑은, 다음의 화학적 RNA 캡 유사체들을 사용하는 시험관내 전사 반응 동안 동시 완료시켜 제조업자의 프로토콜들에 따라 5'-구아노신 캡 구조를 생성시킬 수 있다: 3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G(ARCA cap); G(5')ppp(5')A; G(5')ppp(5')G; m⁷G(5')ppp(5')A; m⁷G(5')ppp(5')G(제조원: 뉴 잉글랜드 바이오랩스, 매사추세츠주 입스위치 소재). 변형된 mRNA의 5'-캡핑을 백시니아 바이러스 캡핑 효소를 사용하여 후-전사적으로 완료시켜 "캡 0" 구조: m⁷G(5')ppp(5')G(제조원: 뉴 잉글랜드 바이오랩스, 매사추세츠주 입스위치 소재)를 생성시킬 수 있다. 캡 1 구조는 백시니아 바이러스 캡핑 효소 및 2'-O 메틸-트랜스퍼라제 둘 다를 사용하여 생성시켜 m⁷G(5')ppp(5')G-2'-O-메틸을 생성시킬 수 있다. 캡 2 구조는, 2'-O 메틸-트랜스퍼라제를 사용하여 캡 1 구조로부터, 5'-뒤에서 세번째 뉴클레오타이드를 2'-o-메틸화시킨 후 생성시킬 수 있다. 캡 3 구조는 캡 2 구조로부터 5'-뒤에서 세번째 전(preantepenultimate) 뉴클레오타이드를 2'-O 메틸-트랜스퍼라제를 사용하여 2'-O-메틸화시킨 후 생성하였다. 효소들은 바람직하게는 재조합체 공급원으로부터 유도된다.

[1873] 포유동물 세포들 내로 형질감염된 경우, 변형된 mRNA들은 12 내지 18 시간 또는 18시간 이상, 예를 들면, 24, 36, 48, 60, 72 또는 72 시간 이상의 안정성을 갖는다.

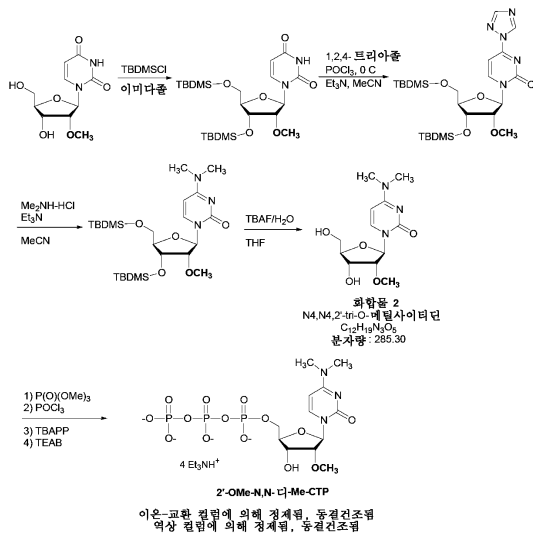
[1874] **실시예 8. N4-메틸 사이티딘(화합물 1) 및 N4-메틸 CTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



[1875]

[1876] 우리딘을 실릴화하여 트리실릴화된 화합물을 제공하였고, 이를 컬럼에 의해 정제하였고, 재-증류된 $POCl_3$ /트리아졸을 사용하여 무수 조건 하에 활성화시킨 후, 40% 메틸아민 수용액을 사용한 친핵 치환시켰다. 따라서, N4-메틸-2',3',5'-트리-O-TBDMS-사이티딘은 크로마토그래피 정제 후 수득하였다. 수득되는 생성물을 TBAF로 탈보호시킨 후 에탄올-에틸 아세테이트(3:1) 용매 시스템으로 정제하여 화합물 1을 수득하였다. 최종 생성물을 (DMSO 중의) NMR로 특징확인하였다; MS: $258(M + H)^+$, $280(M + Na)^+$, 및 $296(M + K)^+$; 및 HPLC: 순도, 99.35%(도 1a 내지 도 1d). HPLC, 순도 98%(도 2).

[1877] **실시예 9. 2'-OMe-N,N-디-Me-사이티딘(화합물 2) 및 2'-OMe-N,N-디-Me-CTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**

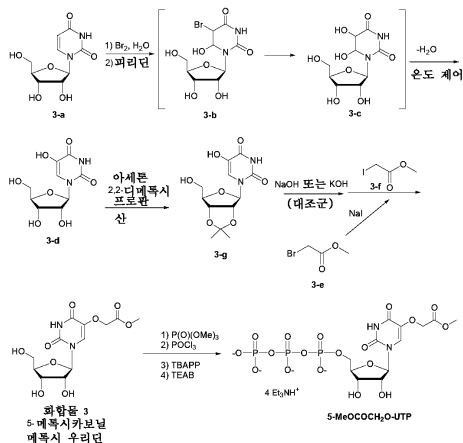


[1878]

[1879] 2'-O-메틸우리딘을 실릴화하여 디-실릴화 화합물을 수득하였다. 정제된 2'-O-메틸-3',5'-디-O-TBDMS 우리딘을 재-증류된 $POCl_3$ 및 이미다졸을 사용하여 무수 조건 하에 활성화시킨 후, 트리에틸아민 환경 하에 디메틸아민 하이드로클로라이드를 사용하여 친핵성 치환시켜 HCl을 트랩(trap)하였다. 중간체 화합물 N4,N4,2'-트리-O-메틸-3',5'-비스-O-TBDMS 우리딘을 섬광 크로마토그래피에 의해 정제하여 백색 발포체로서 수득하였다. 수득된 화합물을 TBAF로 탈보호시킨 후 정제하여 약 400mg의 최종 생성물 화합물 2를 백색 발포체로서 제공하였다. ES MS: m/z $308(M + Na)^+$, $386(M + H)^+$; HPLC: 순도, 99.49%(도 3a 내지 도 3c).

[1880] 상응하는 NTP를 합성하기 위해, 70mg의 뉴클레오사이드 화합물 2를 이온-교환 및 역상 컬럼들을 통한 정제 후 23mg의 2'-OMe-N,N-디-Me-CTP를 제공하였다. HPLC: 순도, 95%(도 4).

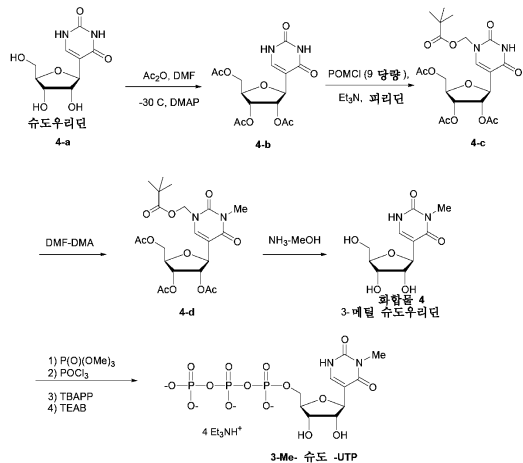
[1881] **실시예 10. 5-메톡시카보닐메톡시 우리딘(화합물 3) 및 5-메톡시카보닐메톡시-UTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



[1882] 물 중의 우리딘 3-a를 과량의 브롬으로 처리한 후 공기로 플러싱(flushing)하여 브롬을 제거하였다. 반응 혼합물을, 제어된 속도 및 온도에서 피리딘으로 처리하였다. 반응 동안, 불안정한 브로모-중간체 3-b는 디-하이드록실 중간체 3-c로 서서히 전환되었으며, 이는 아마도 안정한 5-하이드록시우리딘 3-d로 탈수되었다. 이어서, 5-하이드록시우리딘을 2',3'-이소프로필리덴 그룹으로 보호하여 화합물 3-g를 제공하였다. 화합물 3-f와 반응시켜 화합물 3을 제공하였다.

[1884] 60 내지 70 mg의 뉴클레오사이드는 2회의 HPLC 컬럼 정제 및 2회의 동결건조 단계들 후에 >21 mg의 바람직한 트리포스페이트를 제공하였다. HPLC: 순도, 98%(도 5).

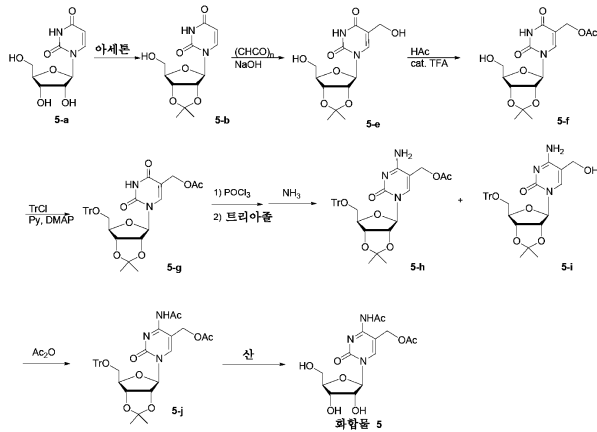
[1885] **실시예 11. 3-메틸 슈도우리딘(화합물 4) 및 3-메틸 슈도-UTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



[1887] 슈도우리딘 4-a를 Ac₂O와 반응시켜 아세틸-보호된 슈도우리딘 4-b를 제공하였다. 이어서, N1을 POM으로 선택적으로 보호하여 화합물 4-c를 제공하였다. N3의 메틸화에 이어서, 탈보호 후, 화합물 4(약 400mg)를 제공하였다. 분자식: C₁₀H₁₄N₂O₆, 분자량: 258.23g/mol; 외형: 백색 고체; 저장 조건: 25℃에서 저장; HPLC: 순도, 98.51%; ¹H NMR(DMSO-d₆): δ 11.17(d, 1H, J = 3.0 Hz), 7.56(d, 1H, J = 3.6 Hz), 4.91(d, 1H, J = 3.6 Hz), 4.79(t, 1H, J = 4.2Hz), 4.70(d, 1H, J = 4.2Hz), 4.49(d, 1H, J = 3.0Hz), 3.82-3.88(m, 2H), 3.66-3.67(m, 1H), 3.57-3.61(m, 1H), 3.40-3.47(m, 1H), 3.09(s, 3H); MS: 281(M + Na)⁺(도 6a 및 도 6b).

[1888] 대안의 경로들을 적용하여 화합물 4를 수득할 수 있었다. 예를 들면, 슈도우리딘은 O-보호 그룹(예를 들면, 본원에 기술된 바와 같음, 예를 들면, TMS)과 반응시키고 N-보호 그룹(예를 들면, 본원에 기술된 바와 같음, 예를 들면, N1에서 아세틸)과 반응시킬 수 있다. 이어서, 핵염기의 N3를 알킬화제(예를 들면, 디메틸아민/디메톡시메틸)와 반응시켜 N- 및 O-보호 그룹들을 갖는 화합물 4를 제공할 수 있었다. 최종적으로, 수득된 화합물을 탈보호시켜(예를 들면, 염기성 조건 하에, 예를 들면, NH₃/MeOH 하에) 화합물 4를 제공할 수 있다.

[1889] **실시예 12. N-Ac, 5-Ac-OCH₂-사이티딘(화합물 5)의 합성**



[1890]

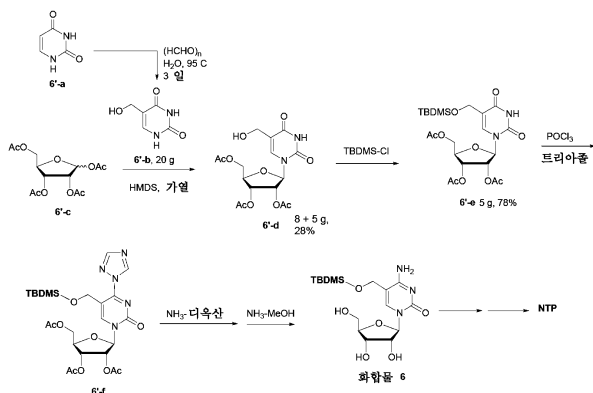
[1891] 우리딘 5-a를 보호시켜 이소프로필리덴 화합물 5-b를 획득하였고, 이를 (CHCO)_n과 반응시켰다. 촉매량의 TFA를 갖는 아세트산을 사용하여 바람직한 선택적으로 아실화된 화합물 5-f(30% 수율)을 획득하였다. 5'-OH 그룹의 추가의 트리실릴화로 바람직한 직교형으로 보호된 화합물 5-g를 생성시켰다.

[1892] 화합물 5-g를 POCl₃ 및 트리야졸로 처리하여 화합물 5-h를 탈-아실화된 화합물 5-i와 함께 제공하였다. 이들 2개 화합물들의 아세틸화는 디-아실화된, 완전히 보호된 화합물 5-j를 제공하였다. 가열 조건 하에 화합물 5-j를 아세트산으로 탈보호시켜 3개의 생성물들을 생성시켰으며, 이들 중 하나는 화합물 5이었다.

[1893] 상응하는 NTP를 획득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있었다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, Sephadex DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[1894] 대안의 경로들을 적용하여, 예를 들면, 출발 물질로서 사이티딘으로 시작함으로써 화합물 5를 획득할 수 있었다. 이러한 방법들에서, 5-위치는 할로겐 또는 할로겐화제(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것, 예를 들면, I₂/메타-클로로퍼옥시벤조산)와 반응시킬 수 있었으며, 이는 알킬화제로 대체시킬 수 있다. 또한, 이러한 방법들은 하나 이상의 N- 또는 O-보호 그룹들(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것, 예를 들면, 실릴화 또는 아세틸화)을 사용하여 당 모이어티의 사이티딘 및/또는 하이드록실 그룹들의 아미노 그룹을 보호할 수 있었다.

[1895] **실시예 13. 5-TBDMS-OCH₂-사이티딘(화합물 6)의 합성**

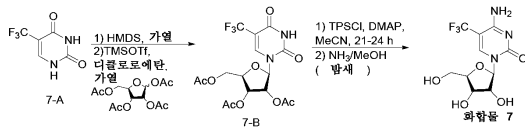


[1896]

[1897] 5-하이드록시우라실 화합물 'b를 글리코실화시켜 화합물 6'-d(28% 수율)을 획득하였고, 이를 실릴화하여 화합물 6'-e를 제공하였다. 보호된 우리딘의 활성화로 추가의 아민화 및 탈보호(800mg의 최종 화합물) 후 목적인 화합물 6을 제공하였다. 분자식: C₁₆H₂₉N₃O₆Si; 분자량: 387.50g/mol; 외형: 백색 고체; 저장 조건: 25°C에서 저장됨; HPLC: 순도, 97.57%; ¹H NMR(CDC₁₃): δ 7.81(s, 1H), 7.40(bs, 1H), 6.49(bs, 1H), 5.79(d, 1H, J = 2.4 Hz), 5.3-5.32(m, 1H), 5.00-5.07(m, 2H), 4.30-4.45(m, 2H), 3.90-3.94(m, 2H), 3.80-3.83(m, 1H), 3.50-3.70(m, 2H), 0.87(s, 9H), 0.05(s, 6H); MS: 388(M + H)⁺, 410(M + Na)⁺(도 7a 내지 도 7c).

[1898] 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있었다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 (예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용하여) 정제하거나, 동결건조시키거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[1899] **실시예 14. 5-트리플루오로메틸 사이티딘(화합물 7)의 합성**

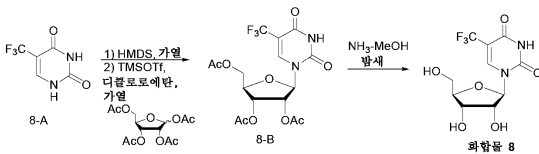


[1900]

[1901] 화합물 7-A를 글리코실화하여 화합물 7-B를 제공하였고, 이를 2,4,6-트리이소프로필벤젠 설포닐 클로라이드 (TPSCI)로 처리하여 카보닐 그룹을 활성화시키고 환원성 아민화를 촉진하였다. 탈보호로 화합물 7을 제공하였다. 대안의 활성화제들을 TPSCI 대신에, 예를 들면, 2,4,6-트리메틸벤젠 설포닐 클로라이드를 사용할 수 있다.

[1902] 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[1903] **실시예 15. 5-트리플루오로메틸 우리딘(화합물 8)의 합성**

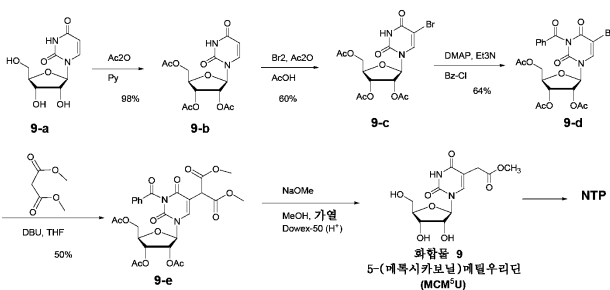


[1904]

[1905] 5-트리플루오로메틸우라실 8-A를 테트라-O-아세틸 리보스로 글리코실화하였고, 목적인 3보호된 5-트리플루오로메틸우리딘 8-B를 우수한 수율로 수득하였다. 추가의 탈보호로 바람직한 화합물 8을 제공하였고, 이는 NMR, MS 및 HPLC 결과들로 특징확인하였다. MS: 313(M + H)⁺, 335(M + Na)⁺; HPLC: 순도, 98.87%, (도 8a 내지 도 8c).

[1906] 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[1907] **실시예 16. 5-(메톡시카보닐)메틸 우리딘(화합물 9)의 합성**

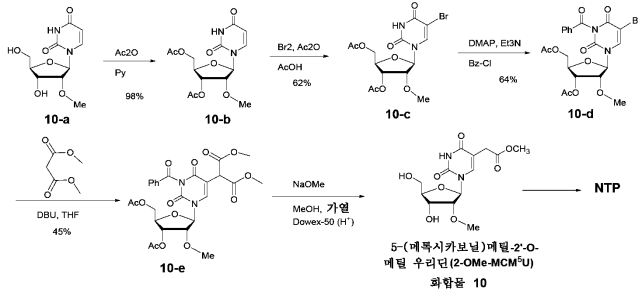


[1908]

[1909] 우리딘 9-a를 보호하여 화합물 9-b(98% 수율)를 제공하였다. 당해 화합물을 과량의 브롬으로 아세트산 무수물 및 아세트산의 존재 하에 브롬화하였다. 5-브로모 유사체 9-c를 수득하였고(60% 수율) 추가로 벤조일화하여 바람직한 화합물 9-d(64% 수율)를 제공하였다. 5-브로모 화합물 9-d를 염기성 조건 하에 디메틸 말로네이트로 농축시켜 아릴화된 말로네이트 및 완전히 보호된 디에스테르 9-e(50% 수율)를 수득하였다. 탈-카복실화 및 탈보호 후, 화합물 9를 수득하였고 NMR(도 9)로 확인하였다.

[1910] 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[1911] **실시예 17. 5-(메톡시카보닐)메틸-2'-O-메틸 우리딘(2-OMe-MCM5U)(화합물 10)의 합성**



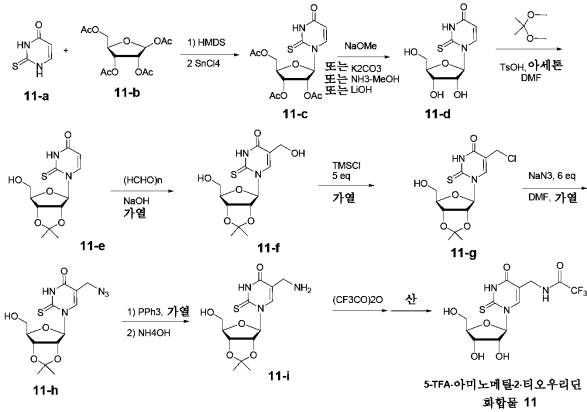
[1912]

[1913] 상기 화합물 9의 합성과 유사한 전략으로, 2'-O-메틸우리딘 10-a를 아실화하고 브롬화하여 화합물 10-c를 수득하였다. 추가의 벤조일화로 5-브로모 유사체 10-d를 제공하였고, 이를 디메틸 말로네이트로 농축시켜 목적한 생성물 10-e(45% 수율)를 제공하였다. 탈카복실화 및 탈보호하여 화합물 10을 제공하였다.

[1914]

상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP를 정제하거나(예를 들면, 세파티크스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[1915] **실시예 18. 5-트리플루오로아세틸-아미노메틸-2-티오우리딘(화합물 11)의 합성**



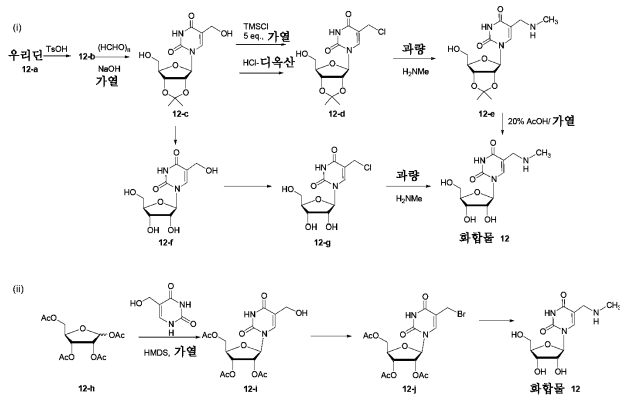
[1916]

[1917] 2-티오우리딘 11-a를 글리코실화하여 화합물 11-c를 제공하였고, 이는 임의의 유용한 탈보호제로 탈보호할 수 있다. 특히, LiOH는 바람직한 생성물 11-d(80 내지 90%의 수율)를 제공하였다. 이소프로필리덴 보호로 화합물 11-e(90% 수율)를 제공하였다. 추가의 5-하이드록실메틸화로 화합물 11-f를 제공하였다. 염소화, 아지드화, 및 추가의 환원으로 메틸아민 화합물 11-i를 제공하였고, 이를 아세틸화하여 화합물 11을 제공하였다.

[1918]

상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP를 정제하거나(예를 들면, 세파티크스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

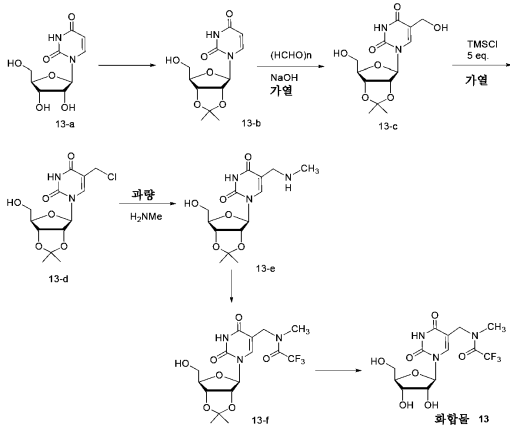
[1919] **실시예 19. 5-메틸아미노메틸-2-우리딘(화합물 12)의 합성**



[1920]

[1921] 화합물 12는 임의의 유용한 방법(예를 들면, 상기 반응식 (i) 및 반응식 (ii) 참조)으로 수득할 수 있다. 예를 들면, 보호된 우라실을 글리코실화하고 후속적으로 아민화하여 화합물 12를 제공할 수 있었다. 추가의 보호, 탈보호, 및 활성화 단계들을 필요에 따라 수행할 수 있다. 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[1922] **실시예 20. 5-TFA-메틸아미노메틸-2-우리딘 (화합물 13)의 합성**

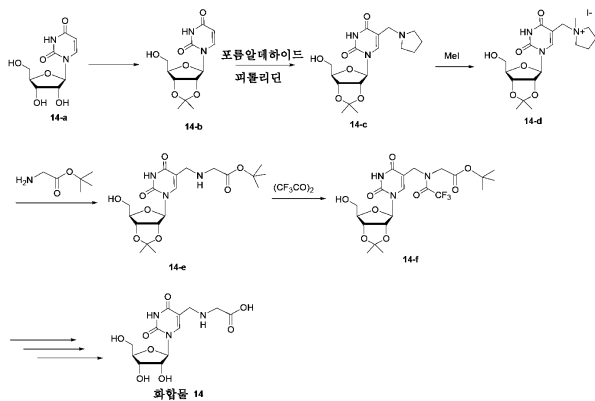


[1923]

[1924] 우리딘 13-a를 이소프로필리덴으로 보호하여 화합물 13-b를 제공한 후 5-하이드록시메틸화하여 화합물 13-c를 제공하였다. 염소화 및 후속적인 아민화로 화합물 13-e를 제공하였고, 이를 보호하여 13-f를 제공할 수 있다. 후속적인 탈보호로 화합물 13을 제공하였다.

[1925] 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

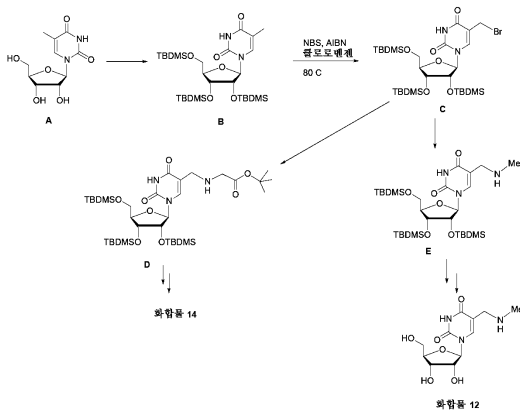
[1926] **실시예 21. 5-카복시메틸아미노메틸 우리딘(화합물 14)의 합성**



[1927]

[1928] 우리딘 14-a를 이소프로필리덴으로 보호하여 화합물 14-b를 제공한 후 만니히(Mannich) 반응으로 5-아미노알킬 화하여 화합물 14-c를 제공하였다. 메틸화하여 4급 아민 14-d를 제공하였다. 후속적인 아민화 및 탈보호 단계들을 사용하여 화합물 14를 제공할 수 있다. 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[1929] **실시예 22. 5-메틸아미노메틸-2-우리딘(화합물 12) 및 5-카복시메틸아미노메틸-2-우리딘(화합물 14)의 대안의 합성**



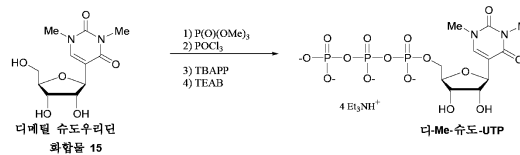
[1930]

[1931]

화합물 12 및 화합물 14에 대해 상기 제공된 전략들 이외에, 다음의 전략도 시행할 수 있다. 5-메틸우리딘 A를 실릴화하여 화합물 B를 제공할 수 있다. 라디칼 일브롬화 후, 수득된 중간체 브로마이드 C를 화합물 12 및 화합물 14 유사체들의 제조에 사용할 수 있다. 브로마이드 화합물 C의 후속적인 알킬화로 화합물 D 및 화합물 E를 제공하고, 이를 탈보호시켜 화합물 14 및 화합물 12를 각각 제공할 수 있다. 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파렉스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[1932]

실시예 23. 디메틸-슈도우리딘(화합물 15) 및 디메틸-슈도-UTP(상기 화합물의 NTP)의 합성



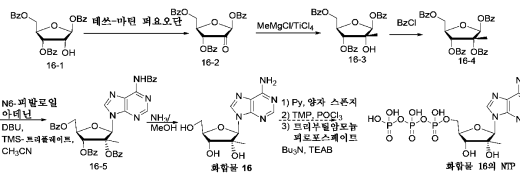
[1933]

[1934]

뉴클레오사이드는 임의의 유용한 방법에 의해 포스포릴화할 수 있다. 예를 들면, 상기에 나타난 바와 같이, 뉴클레오사이드들을 옥시염화 인과 반응시키고, 후속적으로 모노포스페이트 중간체와 비스(트리부틸암모늄)피로포스페이트(TBAPP)로 처리하여 트리포스페이트를 수득할 수 있다.

[1935]

실시예 24. 2'-C-메틸 아데노신(화합물 16) 및 2'-C-메틸 ATP(상기 화합물의 NTP)의 합성



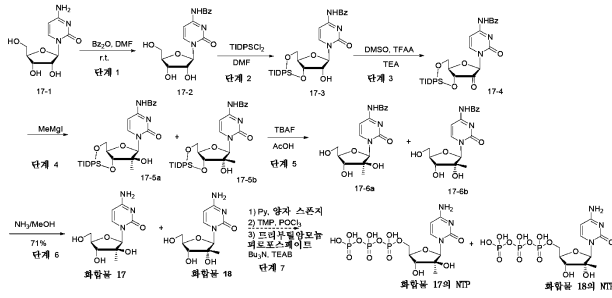
[1936]

[1937]

약 5g의 화합물 16-2를 5g의 화합물 16-1로부터 데스-마틴 퍼요오단 반응(Dess-Martin periodane reaction)을 통해 제조하였다. 화합물 16-2를 MeMgI/TiCl4/-78°C와 반응시켜 화합물 16-3을 제공하였고, 조 화합물 16-3(6g)을 벤질클로라이드와 직접 반응시켜 화합물 16-4를 제조하였다. 핵염기와 반응시키고 탈보호하여 화합물 16(0.56g)을 제공하였다.

[1938]

실시예 25. 2'-C-메틸-사이티딘 이성체(화합물 17 및 화합물 18) 및 2'-C-메틸 UTP(상기 화합물들의 NTP)의 합성



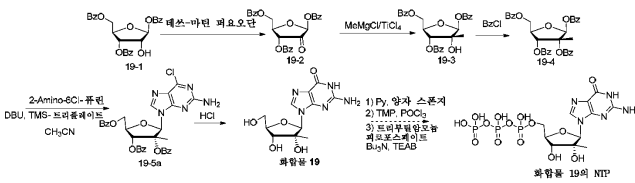
[1939]

[1940]

약 17.4g의 화합물 17-3을 20g의 화합물 17-1로부터 제조하였다. 이어서, 2'-산화 및 MeMgI를 사용한 알킬화로 300mg의 화합물 17-5a 및 80mg의 화합물 17-5b를 제조하였다. 약 9g의 화합물 17-5a(약 90% 순수) 및 2.1g의 화합물 17-5b(순수)를 17.4g의 화합물 17-3으로부터 2개 배치(batch)에서 제조하였다. N- 및 O-탈보호로 화합물 17 및 화합물 18을 제조하였다.

[1941]

실시예 26. 2'-C-메틸 구아노신(화합물 19) 및 2'-C-메틸 GTP(상기 화합물의 NTP)의 합성



[1942]

[1943]

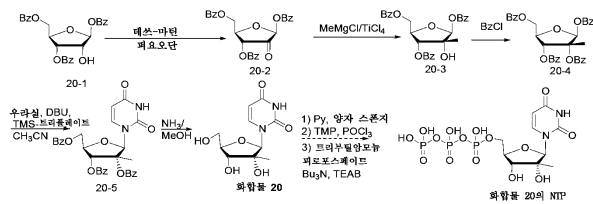
보호된 리보스 19-1의 2'-산화 및 MeMgCl을 사용한 후속적인 알킬화로 화합물 19-3을 제조하였다. 수득된 화합물을 추가로 보호하여 화합물 19-4를 제조하였고, 1.56g의 화합물 19-5a를 3.1g의 화합물 19-4로부터 제조하였다. 후속적인 산화 및 탈보호로 화합물 19(약 90% 순수, 50mg)를 제조하였다.

[1944]

상용하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[1945]

실시예 27. 2'-C-메틸 우리딘(화합물 20) 및 2'-C-메틸 UTP(상기 화합물의 NTP)의 합성



[1946]

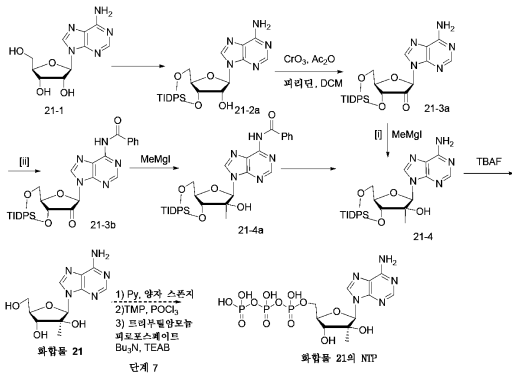
[1947]

보호된 리보스 20-1의 2'-산화 및 MeMgCl를 사용한 후속적인 알킬화로 화합물 20-3을 제조하였다. 수득된 화합물을 추가로 보호하여 화합물 20-4를 제조하였다. 우리실과의 반응 및 탈보호로 순수한 화합물 20(50mg)을 제조하였다.

[1948]

상용하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[1949] **실시예 28. (S)-2'-C-메틸 아데노신(화합물 21) 및 (S)-2'-C-메틸 ATP(상기 화합물의 NTP)의 합성**

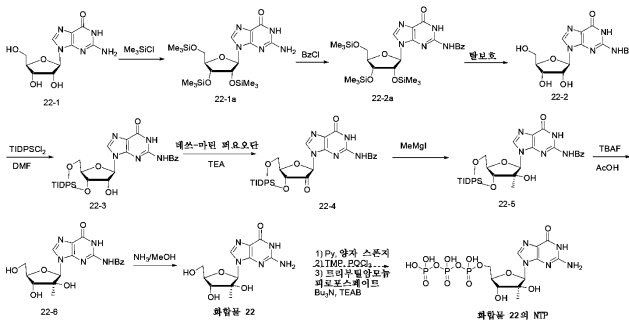


[1950]

[1951] 화합물 21-1(5g)을 보호하여 화합물 21-2a를 형성하였고, 크롬 산화로 화합물 21-3a를 제공하였다. 경로 [i](-50℃에서 에테르 중의 5당량 MeMgI)를 통한 알킬화로 화합물 21-4를 제공하였다. 임의로, 수율은 경로 [ii]를 통해 아미노 그룹을 보호함으로써 개선시켜 화합물 21-3b를 제공한 후 2'-C 위치에서 알킬화하여 화합물 21-4a를 제공할 수 있었다. 화합물 21-3a를 알킬화하여 조 화합물 21-4(3g, 당해 조 생성물 중 20%의 화합물 3a)를 제공하였으며, 여기서, 당해 생성물은 임의로 정제할 수 있다. 화합물 21-4를 탈보호시켜 화합물 21(50% 수율)을 수득하였다.

[1952] 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 걸름을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[1953] **실시예 29. (S)-2'-C-메틸 구아노신(화합물 22) 및 (S)-2'-C-메틸 GTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**

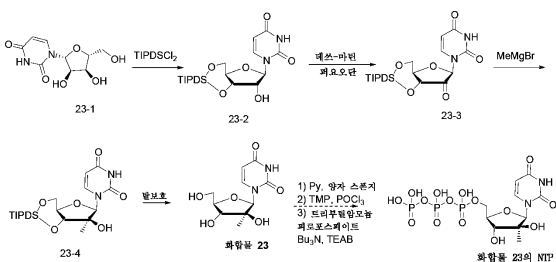


[1954]

[1955] 약 30g의 화합물 22-1을 실릴화하여 화합물 22-2를 3개의 단계들로 제공하였다. 추가의 보호로 화합물 22-3을 제공하였고, 데스-마틴 피요오단 산화로 화합물 22-4(1.6g)를 2개의 배치들로 제공하였다. 2'-C 알킬화(에테르 중의 5당량의 MeMgI, -50℃ 내지 RT)로 화합물 22-5를 제공하였고, 추가로 탈보호 단계들로 화합물 22를 제공하였다.

[1956] 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 걸름을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[1957] **실시예 30. (S)-2'-C-메틸 우리딘(화합물 23) 및 (S)-2'-C-메틸 UTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**

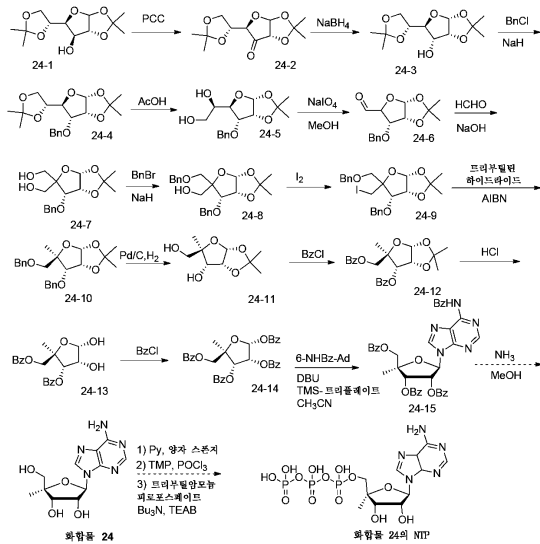


[1958]

[1959] 우리딘 23-1(2.0g)을 TIPDSCl₂ (1,3-디클로로-1,1,3,3-테트라이소프로필디실록산)으로 보호하여 화합물 23-2를 제공하였다. 산화시켜 화합물 23-3을 제공하고, 2'-C 알킬화로 화합물 23-4를 제공하였으며, 이를 다음 단계 전에 프랩(Prep)-HPLC로 임의로 정제할 수 있었다. 이어서, 탈보호로 바람직한 화합물 23을 제공하였다.

[1960] 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

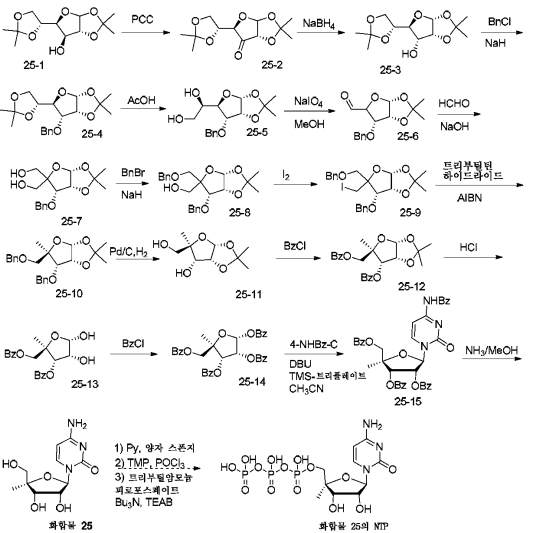
[1961] **실시예 31. 4'-C-메틸 아데노신(화합물 24) 및 4'-C-메틸 ATP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



[1962] 1,2:5,6-디-O-이소프로필리덴- α -D-글루코푸라노스 24-1을 순차적인 산화, 환원, 및 보호 단계들을 통해 전환시켜 화합물 24-4를 제공하였다. 화합물 24-2를 제공하는 제1 산화 단계는, 임의의 유용한 시약들, 예를 들면, 0.75당량의 피리디늄 디크로메이트(PDC)와 1당량의 Ac₂O 또는 1.2당량의 데스-마틴 퍼요오단을 이용하여 수행할 수 있다. 후속적인 탈보호, 포르밀화, 및 환원으로 화합물 24-7를 제공하였고, 이를 보호 및 탈산화 단계들을 수행하여 화합물 24-10을 제공하였다. 약 0.4g의 화합물 24-14를 1g의 화합물 24-10으로부터 순차적인 보호 및 탈보호 단계들을 통해 제조하였다. N6-벤조일아데닌의 첨가 및 후속적인 탈보호로 화합물 24를 제공하였다.

[1964] 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[1965] **실시예 32. 4'-C-메틸 사이티딘(화합물 25) 및 4'-C-메틸 CTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**

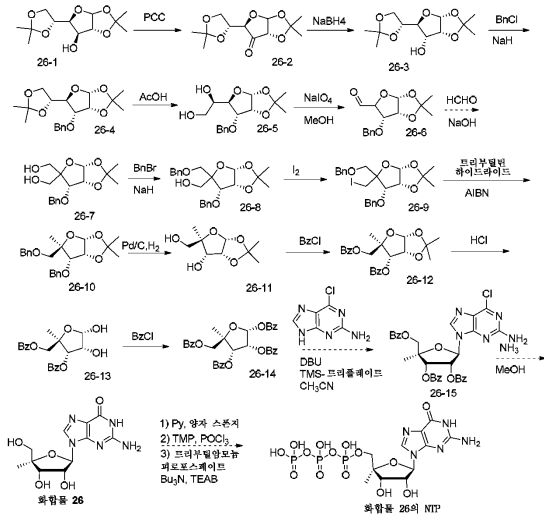


[1966]

[1967] 화합물 24에 대해 상기 제공된 전략과 유사하게, 화합물 25-14를 화합물 25-1로 제조하였다. 사이티딘의 첨가 및 후속적인 탈보호로 화합물 25를 제공하였다.

[1968] 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[1969] **실시예 33. 4'-C-메틸 구아노신(화합물 26) 및 4'-C-메틸 GTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**

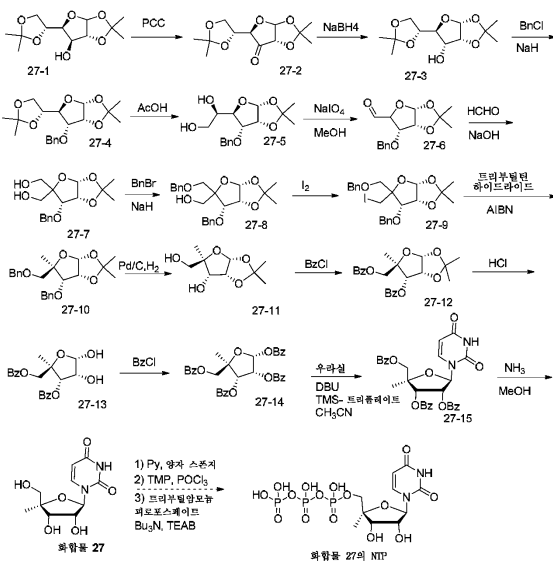


[1970]

[1971] 화합물 24에 대해 상기 제공된 전략과 유사하게, 화합물 26-14를 화합물 26-1을 사용하여 제조하였다. 2-아미노-6-클로로퓨린의 첨가, 후속적인 산화, 및 이어서 탈보호로 화합물 26을 제공하였다.

[1972] 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[1973] **실시예 34. 4'-C-메틸 우리딘(화합물 27) 및 4'-C-메틸 UTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**

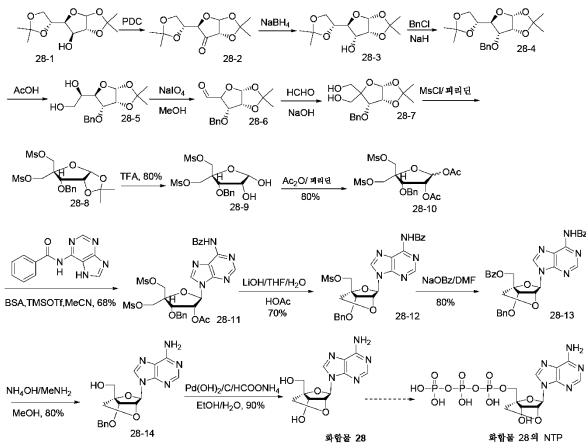


[1974]

[1975] 화합물 24에 대해 상기 제공된 전략과 유사하게, 화합물 27-14를 화합물 27-1로 제조하였다. 우라실의 첨가 및 후속적인 탈보호로 화합물 27을 제공하였다.

[1976] 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

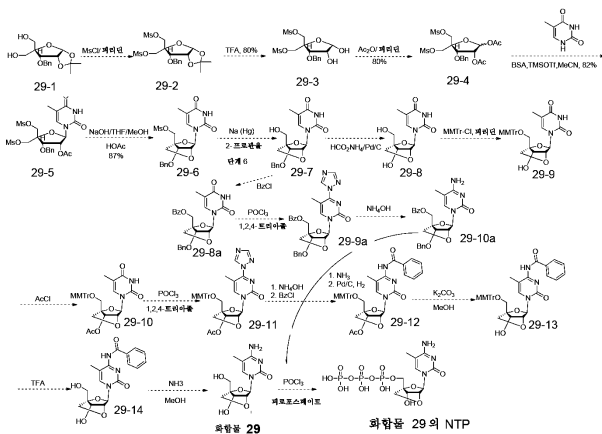
[1977] **실시예 35. 2'-0,4'-C-메틸렌 아데노신(화합물 28) 및 2'-0,4'-C-메틸렌 ATP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



[1978]

[1979] 화합물 24에 대해 상기 제공된 전략과 유사하게, 화합물 28-7을 화합물 28-1로 제조하였다. 후속적인 메실화, 탈보호, 및 아세틸화로 화합물 28-10을 제공하였고, 그 후 N6-벤조일아데닌을 첨가하였고, 후속적으로 내부 폐환시켰다. 다양한 보호 및 탈보호 단계로 화합물 28을 제공하였다.

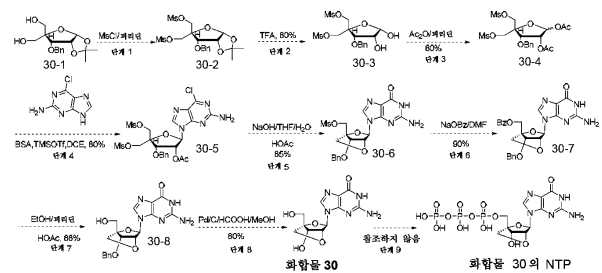
[1980] **실시예 36. 5-메틸-2'-0,4'-C-메틸렌 사이티딘(화합물 29) 및 5-메틸-2'-0,4'-C-메틸렌 CTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



[1981]

[1982] 알도푸라노스 화합물 29-1을 각종 보호 단계들을 통해 반응시킨 후, 5-메틸우라실을 가하여 화합물 29-5를 제공하였다. 후속적인 내부 폐환, 탈보호, 보호, 및 아민화 단계들로 화합물 29를 제공하였다.

[1983] **실시예 37. 2'-0,4'-C-메틸렌 구아노신(화합물 30) 및 2'-0,4'-C-메틸렌 GTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**

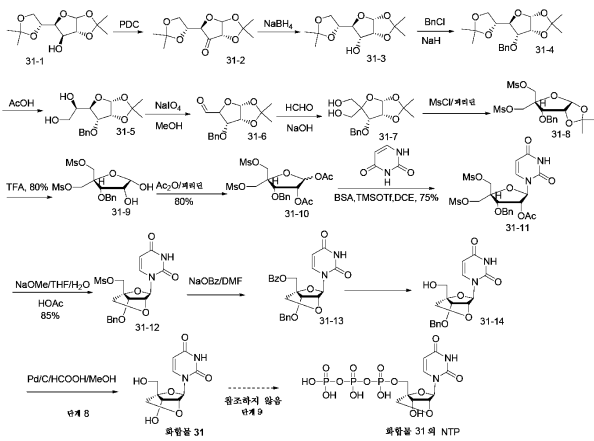


[1984]

[1985] 화합물 29에 대해 상기 제공된 전략과 유사하게, 알도푸라노스 화합물 30-1을 각종 보호 단계들을 통해 반응시킨 후, 2-아미노-6-클로로퓨린을 가하여 화합물 30-5를 제공하였다. 후속적인 내부 폐환, 아민화, 및 탈보호 단계들로 화합물 30을 제공하였다.

[1986] 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

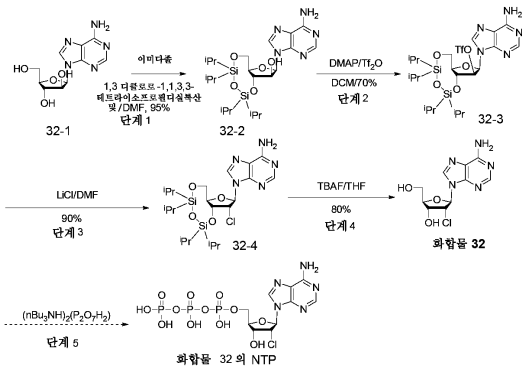
[1987] **실시예 38. 2'-O,4'-C-메틸렌 우리딘(화합물 31) 및 2'-O,4'-C-메틸렌 UTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



[1988]

[1989] 화합물 24에 대해 상기 제공된 전략과 유사하게, 화합물 31-7을 화합물 31-1로 제조하였다. 후속적인 메실화, 탈보호, 및 아세틸화로 화합물 30-10을 제공하였다. 우라실의 첨가 및 후속적인 내부 폐환으로 화합물 31-12를 제공하였고, 각종 보호 및 탈보호 단계들로 화합물 31을 제공하였다. 후속적인 트리포스페이트 반응(예를 들면, 본원에 기술된 바와 같은)으로 화합물 31의 NTP를 제공하였고, 이를 임의로 정제(예를 들면, HPLC 사용)할 수 있다.

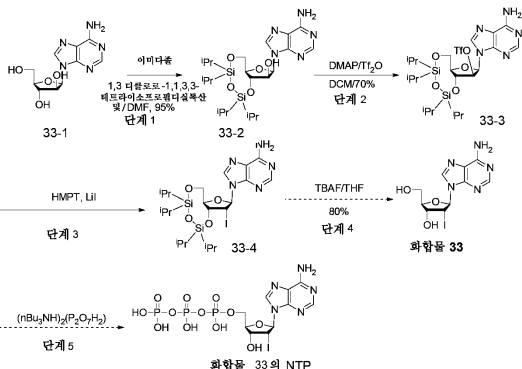
[1990] **실시예 39. 2'-클로로 아데노신(화합물 32) 및 2'-클로로 ATP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



[1991]

[1992] 아라비노아데노신 32-1을 단계 1 및 단계 2를 통해 보호한 후 염소화하여 화합물 32-4를 제공하였다. 후속적인 탈보호로 화합물 32를 제공하였고, 트리포스페이트 반응으로 화합물 32의 NTP를 제공하였다.

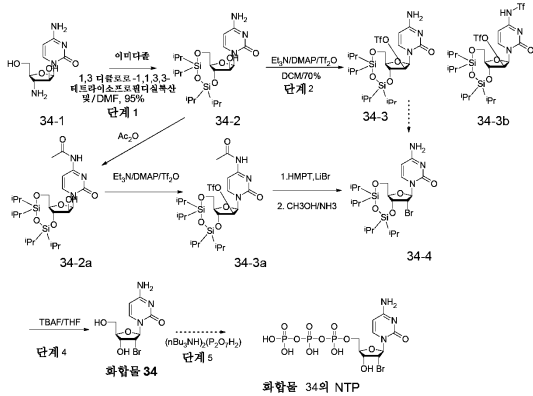
[1993] **실시예 40. 2'-요오도 아데노신(화합물 33) 및 2'-요오도 ATP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



[1994]

[1995] 아라비노아데노신 33-1을 단계 1 및 단계 2를 통해 보호한 후 요오드화시켜 화합물 33-4를 제공하였다. 후속적인 탈보호로 화합물 33을 제공하였고, DMF 중의 트리포스페이트 반응으로 화합물 33의 NTP를 제공하였다.

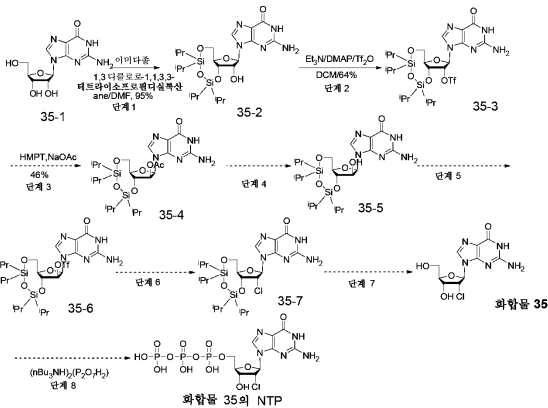
[1996] **실시예 41. 2'-브로모 사이티딘(화합물 34) 및 2'-브로모 CTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



[1997]

[1998] 아라비노사이티딘 34-1을 각종 조건 하에 보호한 후 브롬화하여 화합물 34-4를 제공하였다. 임의로, 반응은 화합물 34-3a를 통해 (i) DCM(10mL) 중 1.5당량의 Et₃N, 1당량의 DMAP, 1.2당량의 TfCl; (ii) DCM(15mL) 중 3당량의 DMAP, 1.2당량의 TfCl; 또는 (iii) DCM(15mL) 중 15당량의 DMAP, 1.5당량의 Tf₂O 하에 -10°C 내지 0°C에서 2시간 동안과 같은 임의의 유용한 보호 반응들 하에 화합물 34-4를 제공할 수 있다. 특히, 55mg의 화합물 34-3a를 반응 조건 (iii)으로부터 수득하였다. 후속적인 탈보호로 화합물 34를 제공하였고, DMF 중 트리포스페이트 반응으로 화합물 34의 NTP를 제공하였다. 조 생성물 34는 포스포릴화 전에 임의로 정제시킬 수 있었다.

[1999] **실시예 42. 2'-클로로 구아노신(화합물 35) 및 2'-클로로 GTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**

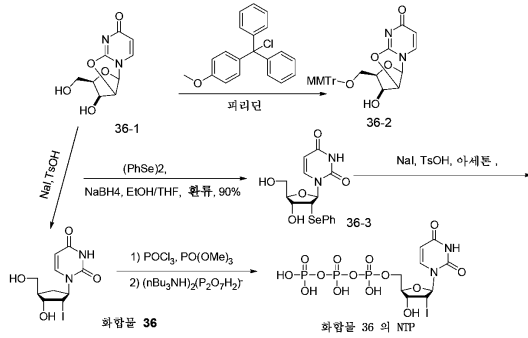


[2000]

[2001] 구아노신 35-1을 각종 조건들 하에 보호한 후 아세틸화하여 화합물 35-4를 제공하였다. 화합물 35-2로부터 화합물 35-3으로의 반응을 1,2-디클로로에탄(10mL) 중 2당량의 DMAP, 2당량의 Et₃N, 3당량의 Tf₂O로 40°C에서 4시간 동안 수행하였다. 정제 후, 약 55mg의 화합물 35-3을 수득하였다.

[2002] 바람직한 화합물 35는 임의의 유용한 방법으로도 수득할 수 있다. 예를 들면, 상기 나타낸 바와 같이, 화합물 35-4를 후속적인 보호, 염소화, 및 탈보호 단계들로 처리하여 화합물 35를 제공하였다. 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

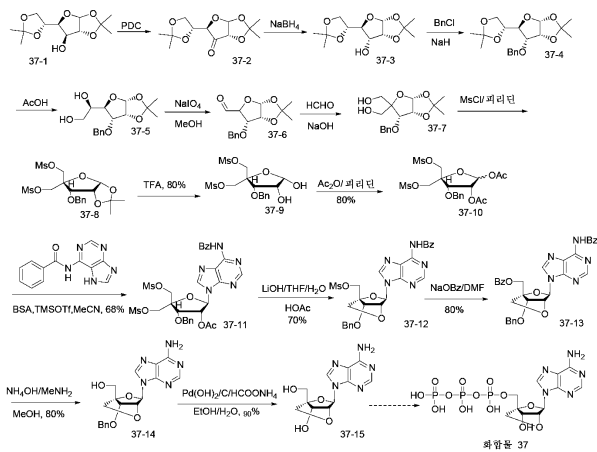
[2003] **실시예 43. 2'-요오도 우리딘(화합물 36) 및 2'-요오도 UTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



[2004]

[2005] 0², 2'-사이클로우리딘 36-1을 보호하여 화합물 36-2를 제공하였다. 셀레늄과 임의로 매개된 후속적인 요오드화로 화합물 36을 제공하였다. 트리포스페이트 반응을 수행하여 화합물 36의 NTP를 제공하였다. 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

[2006] **실시예 44. 2'-0,4'-C-메틸렌 아데노신(화합물 37) 및 2'-0,4'-C-메틸렌 ATP(상기 화합물의 NTP)의 합성**

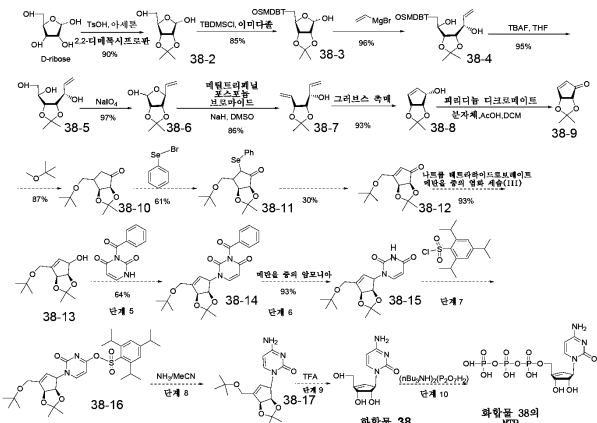


[2007]

[2008] 화합물 24에 대해 상기 제공된 전략과 유사하게, 화합물 37-7을 화합물 37-1로 제조하였다. 후속적인 메실화, 탈보호, 및 아세틸화로 화합물 37-10을 제공하였다. 우라실의 첨가 및 후속적인 내부 폐환으로 화합물 37-12를 제공하였다. 각종 보호 및 탈보호 단계들로 화합물 37을 제공하였다.

[2009] 상응하는 NTP를 수득하기 위하여, 트리포스페이트 반응을 수행할 수 있다(예를 들면, 본원에 기술된 임의의 것). 임의로, NTP는 정제하거나(예를 들면, 세파텍스 DEAE-A25 컬럼을 사용), 동결건조하거나, 또는 증발(예를 들면, EtOH로부터)시킬 수 있다.

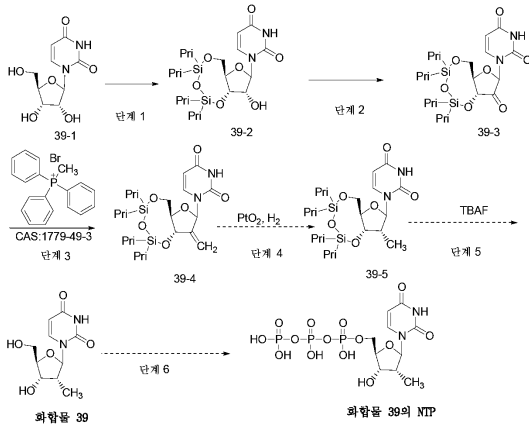
[2010] **실시예 45. 사이클로펜텐 디올 사이티딘(화합물 38) 및 사이클로펜텐 디올 CTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



[2011]

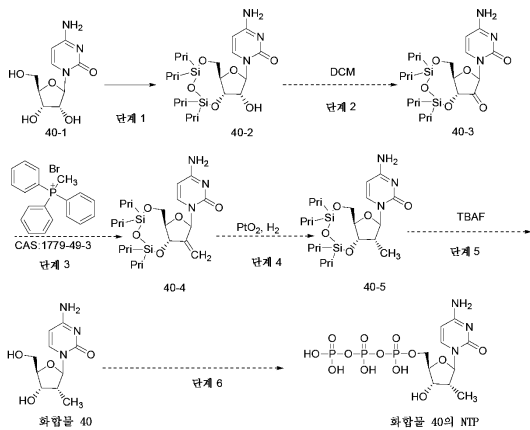
[2012] D-리보스를 보호한 후 알릴화하여 화합물 38-4를 제공하였고, 이를 후속적으로 폐환시키고 환원시켜 화합물 38-7을 제공하였다. 올레핀 전이 및 후속적인 산화로 화합물 38-9를 제공하였고, 추가의 환원 반응들 및 N-벤조일 우라실의 첨가로 화합물 38-14를 제공하였다. 추가의 탈보호 및 보호 반응들로 화합물 38을 제공하였고, 트리포스페이트 반응(예를 들면, 임의의 유용한 반응 조건, 예를 들면, 본원에 기술된 것들 또는 본원에 참조로 혼입된 미국 특허 제7,893,227호에 기술된 것들)으로 화합물 38의 NTP를 제공하였다.

[2013] **실시예 46. 2'-메틸 우리딘(화합물 39) 및 2'-메틸 UTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



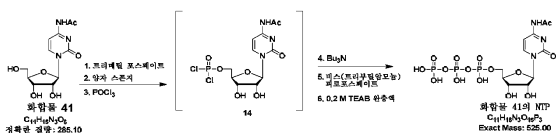
[2014] [2015] 우리딘 39-1을 보호한 후 2당량의 데스-마틴 퍼요오단으로 산화하여 화합물 39-3을 제공하였다. 후속적인 비티히 반응(Wittig reaction), 수소화, 및 탈보호 단계들로 화합물 39를 제공하였다.

[2016] **실시예 47. 2'-메틸 사이티딘(화합물 40) 및 2'-메틸 CTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



[2017] [2018] 사이티딘 40-1을 보호한 후 산화시켜 화합물 40-3을 제공하였다. 후속적인 비티히 반응, 수소화, 및 탈보호 단계들로 화합물 40을 제공하였다.

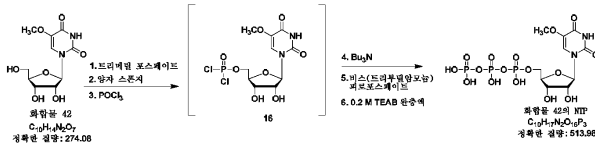
[2019] **실시예 48. N-아세틸 사이티딘(화합물 41) 및 N-아세틸 CTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



[2020] [2021] N-아세틸-사이티딘(화합물 41)(103.0mg, 0.36mmol)의 용액을 1.0mL의 트리메틸포스페이트(TMP) 및 1.0mL의 무수 테트라하이드로푸란(THF) 중 양자 스폰지(115.72mg, 0.54mmol, 1.50당량)에 가하였다. 당해 용액을 0°C에서 10분 동안 교반하였다. 옥시염화 인(POCl₃)(67.2 μl 0.72mmol, 2.0당량)을 당해 용액에 적가한 후 2시간 동안 N₂ 대기 하에 계속 교반하였다. 2시간 후, 당해 용액을 2.5mL의 디메틸포름아미드 중 비스트리부틸암모늄 피로포스페이트(TBAPP 또는 (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇)(1.28g, 2.34mmol, 6.5당량) 및 트리부틸아민(350.0 μl 1.45mmol, 4.0당량)의 혼합물과 반응시켰다. 대략 15분 후, 반응물을 24.0mL의 0.2M 트리에틸암모늄 중탄산염(TEAB)으로 쿨

칭(quenching)시켰고, 투명한 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 밤새 동결건조시켰고, 조 반응 혼합물을 HPLC(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18 분취용 컬럼, 250 x 21.20 mm, 10.0 마이크론; 구배: 3.0분 동안 100% A, 이후에 1% B/분, A = 100 mM TEAB 완충액, B = ACN; 유속: 10.0mL/분; 보유 시간: 16.81 내지 17.80분)에 의해 정제하였다. 목적인 화합물을 함유하는 분획들을 혼주(pooling)하고 동결건조시켜 화합물 41의 NTP를 제조하였다. 트리포스포릴화 반응들을 화염-건조시킨 2-목 플라스크 속에서 N₂ 대기 하에 수행하였다. 뉴클레오사이드 및 단백질 스폰지를 사용하기 전에 밤새 진공 하에 P₂O₅에 걸쳐 건조시켰다. 모노포스페이트의 형성은 LCMS에 의해 모니터링하였다.

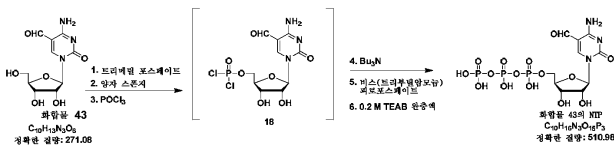
[2022] **실시예 49. 5-메톡시 우리딘(화합물 42) 및 5-메톡시 UTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



[2023]

[2024] 5-메톡시 우리딘(화합물 42)(69.0mg, 0.25mmol, 가열하여 이를 용해시킴)을 0.7mL의 트리메틸포스페이트(TMP) 중 양자 스폰지(80.36mg, 0.375mmol, 1.50당량)에 가하고 0°C에서 10분 동안 교반하였다. 옥시염화 인(POCl₃)(46.7 μl 0.50mmol, 2.0당량)을 용액에 적가한 후 2시간 동안 N₂ 대기 하에 계속해서 교반하였다. 2시간 후, 용액을 2.0ml의 디메틸포름아미드 중 비스트리부틸암모늄 피로포스페이트(TBAPP 또는 (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇)(894.60mg, 1.63mmol, 6.50당량) 및 트리부틸아민(243.0 μl 1.00mmol, 4.0당량)의 혼합물과 반응시켰다. 대략 15분 후, 반응물을 17.0ml의 0.2M 트리에틸암모늄 중탄산염(TEAB)으로 퀀칭시키고 투명한 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 밤새 동결건조시키고 조 반응 혼합물을 HPLC(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18 분취용 컬럼, 250 x 21.20 mm, 10.0 마이크론; 구배: 3.0분 동안 100% A, 이후에 1% B/분, A = 100 mM TEAB 완충액, B = ACN; 유속: 10.0 mL/분; 보유 시간: 16.57 내지 17.51분)에 의해 정제하였다. 목적인 화합물을 함유하는 분획들을 혼주시키고 동결건조시켜 화합물 42의 NTP를 제조하였다. 트리포스포릴화 반응들을 화염 건조시킨 2-목 플라스크에서 N₂ 대기 하에 수행하였다. 뉴클레오사이드 및 단백질 스폰지를 사용하기 전에 밤새 진공 하에 P₂O₅에 걸쳐 건조시켰다. 모노포스페이트의 형성을 LCMS에 의해 모니터링하였다.

[2025] **실시예 50. 5-포르밀 사이티딘(화합물 43) 및 5-포르밀 CTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



[2026]

[2027] 5-포르밀 사이티딘(화합물 43)(48.4mg, 0.18mmol, 가열하여 이를 용해시킴)의 용액을 0.7mL 트리메틸포스페이트(TMP) 중 단백질 스폰지(57.86mg, 0.27mmol, 1.50당량)에 가하고 0°C에서 10분 동안 교반하였다. 옥시염화 인(POCl₃)(33.6 μl 0.36mmol, 2.0당량)을 용액에 적가한 후 2시간 동안 N₂ 대기 하에 계속 교반하였다. 2시간 후, 당해 용액을 1.7ml의 디메틸포름아미드 중 비스트리부틸암모늄 피로포스페이트(TBAPP 또는 (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇)(642.0mg, 1.17mmol, 6.50당량) 및 트리부틸아민(175.0 μl 0.72mmol, 4.0당량)의 혼합물과 반응시켰다. 대략 15분 후, 반응물을 12.0ml의 0.2M 트리에틸암모늄 중탄산염(TEAB)으로 퀀칭시켰고, 투명한 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 밤새 동결건조시키고 조 반응 혼합물을 HPLC(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18 분취용 컬럼, 250 x 21.20mm, 10.0 마이크론; 구배: 3.0분 동안 100% A, 이후 1% B/분, A = 100mM TEAB 완충액, B = ACN; 유속: 10.0mL/분; 보유 시간: 17.04 내지 17.87 분)로 정제하였다. 목적인 화합물을 함유하는 분획들을 혼주시키고 동결건조시켜 화합물 43의 NTP를 제공하였다. 트리포스포릴화 반응들을 화염-건조시킨 2목 플라스크에서 N₂ 대기 하에 수행하였다. 뉴클레오사이드 및 단백질 스폰지를 사용하기 전에 밤새 진공 하에 P₂O₅에 걸쳐 건조시켰다. 모노포스페이트들의 형성을 LCMS에 의해 모니터링하였다.

[2028] **실시예 51. 3-메틸 우리딘(화합물 44) 및 3-메틸 UTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**

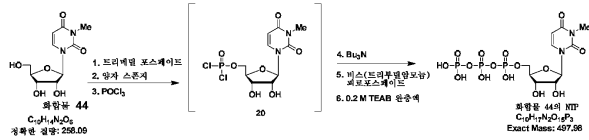
[2029]

[2030]

[2031]

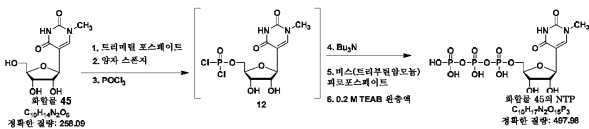
[2032]

[2033]



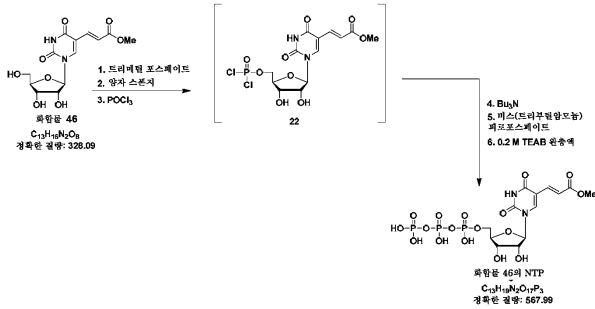
3-메틸 우리딘(화합물 44)(45.80mg, 0.18mmol)의 용액을 0.5mL의 트리메틸포스페이트(TMP) 중 양자 스폰지(57.86mg, 0.27mmol, 1.50당량)에 가하고 0°C에서 10분 동안 교반하였다. 옥시염화 인(POCl₃)(33.6 μl 0.36mmol, 2.0당량)을 용액에 적가한 후 2시간 동안 N₂ 대기 하에 계속 교반하였다. 2시간 후, 용액을 1.3ml의 디메틸포름아미드 중 비스트리부틸암모늄 피로포스페이트(TBAPP 또는 (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇)(652.0mg, 1.19mmol, 6.60당량) 및 트리부틸아민(175.0 μl 0.72mmol, 4.0당량)의 혼합물과 반응시켰다. 대략 15분 후, 반응물을 12.0ml의 0.2M 트리에틸암모늄 중탄산염(TEAB)으로 퀀칭시키고, 투명한 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 밤새 동결건조시키고 조 반응 혼합물을 HPLC(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18 분취용 컬럼, 250 x 21.20 mm, 10.0 마이크로; 구매: 3.0분 동안 100% A, 이후에 1% B/분, A = 100 mM TEAB 완충액, B = ACN; 유속: 10.0 mL/분; 보유 시간: 18.52 내지 19.57분)에 의해 정제하였다. 목적한 화합물을 함유하는 분획들을 혼주시키고 동결건조시켜 화합물 44의 NTP를 제공하였다. 트리포스포릴화 반응들을 화염-건조시킨 2목 플라스크 속에서 N₂ 대기 하에 수행하였다. 뉴클레오사이드 및 단백질 스폰지를 사용하기 전에 밤새 진공 하에 P₂O₅에 걸쳐 건조시켰다. 모노포스페이트의 형성을 LCMS에 의해 모니터링하였다.

실시예 52. N1-메틸 슈도우리딘(화합물 45) 및 N1-메틸 슈도우리딘(상기 화합물의 NTP)의 합성



N1-메틸 슈도우리딘(화합물 45)(96.6mg, 0.374mmol, 가열하여 이를 용해시킴)의 용액을 0.8mL 트리메틸포스페이트(TMP) 중의 양자 스폰지(120.0mg, 0.56mmol, 1.50당량)에 가하였고, 0°C에서 10분 동안 교반하였다. 옥시염화 인(POCl₃)(70.0 μl 0.75mmol, 2.0당량)을 용액에 적가한 후 2시간 동안 N₂ 대기 하에 계속 교반하였다. 2시간 후, 용액을 2.5ml의 디메틸포름아미드 중의 비스트리부틸암모늄 피로포스페이트(TBAPP 또는 (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇)(1.36g, 2.47mmol, 6.60당량) 및 트리부틸아민(362.0 μl 1.5mmol, 4.0당량)의 혼합물과 반응시켰다. 대략 15분 후, 반응물을 17.0ml의 0.2M 트리에틸암모늄 중탄산염(TEAB)으로 퀀칭시키고 투명한 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 밤새 동결건조시키고 조 반응 혼합물을 HPLC(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18 분취용 컬럼, 250 x 21.20 mm, 10.0 마이크로; 구매: 3.0분 동안 100% A, 이어서 1% B/분, A = 100mM TEAB 완충액, B = ACN; 유속: 10.0 mL/분; 보유 시간: 15.91 내지 17.01분)에 의해 정제하였다. 목적한 화합물을 함유하는 분획들을 혼주시키고 동결건조시켜 트리포스포릴화 반응에 적용시킴으로써 화합물 45의 NTP를 제공하였다. 트리포스포릴화 반응들을 화염-건조시킨 2목 플라스크에서 N₂ 대기 하에 교반하였다. 뉴클레오사이드 및 단백질 스폰지를 사용하기 전에 밤새 진공 하에 P₂O₅에 걸쳐 건조시켰다. 모노포스페이트들의 형성을 LCMS에 의해 모니터링하였다.

[2034] **실시예 53. 5-메톡시카보닐에테닐 우리딘(화합물 46) 및 5-메톡시카보닐에테닐 UTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



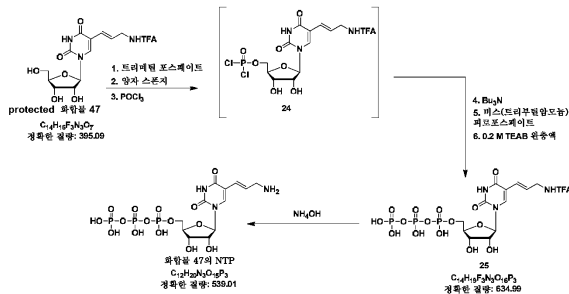
[2035]

[2036]

5-메톡시카보닐에테닐 우리딘(화합물 46)(102.0mg, 0.31mmol)의 용액을 0.8mL의 트리메틸포스페이트(TMP) 중 양자 스펀지(99.65mg, 0.46mmol, 1.50당량)에 가하고 0°C에서 10분 동안 교반하였다. 옥시염화 인(POCl₃)(57.8 μl 0.62mmol, 2.0당량)을 당해 용액에 적가한 후 2시간 동안 N₂ 대기 하에 교반하였다. 2시간 후, 당해 용액을 2.5ml의 디메틸포름아미드 중 비스(트리부틸암모늄) 피로포스페이트(TBAPP 또는 (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇)(1.12g, 2.05mol, 6.60당량) 및 트리부틸아민(300.0 μl 1.24mmol, 4.0당량)의 혼합물과 반응시켰다. 대략 15분 후, 반응물을 20.0ml의 0.2M 트리에틸암모늄 중탄산염(TEAB)으로 퀴칭시켰고 투명한 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 밤새 동결건조시키고 조 반응 혼합물을 HPLC(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18 분취용 컬럼, 250 x 21.20mm, 10.0 마이크론; 구배: 3.0분 동안 100% A, 이후에 1% B/분, A = 100mM TEAB 완충액, B = ACN; 유속: 10.0 mL/분; 보유 시간: 21.56 내지 23.21분)에 의해 정제하였다. 목적인 화합물을 함유하는 분획들을 혼주시키고 동결건조시켜 화합물 46의 NTP를 제공하였다. 트리포스포틸화 반응들을 화염-건조시킨 2목 플라스크에서 N₂ 대기 하에 수행하였다. 뉴클레오사이드 및 단백질 스펀지를 사용하기 전에 밤새 진공 하에 P₂O₅에 걸쳐 건조시켰다. 모노포스페이트들의 형성을 LCMS에 의해 모니터링하였다.

[2037]

실시예 54. 5-아미노프로페닐 우리딘(화합물 47) 및 5-아미노프로페닐 UTP(상기 화합물의 NTP)의 합성

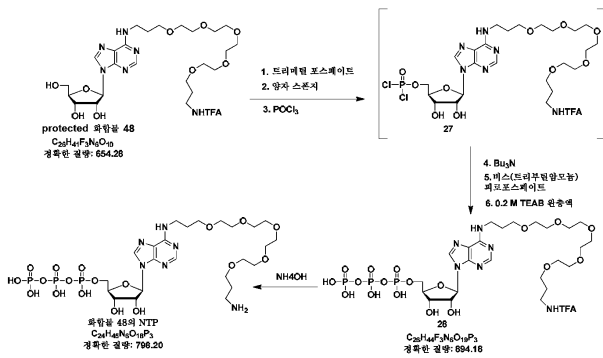


[2038]

[2039]

5-아미노프로페닐 우리딘 47을 보호하고 보호된 화합물 47(86.0 mg, 0.22 mmol)의 용액을 0.7mL의 트리메틸포스페이트(TMP) 중 양자 스펀지(70.7mg, 0.33mmol, 1.50당량)에 가하고 0°C에서 10분 동안 교반하였다. 옥시염화 인(POCl₃)(41.1 μl 0.44mmol, 2.0당량)을 당해 용액에 적가한 후 2시간 동안 N₂ 대기 하에 교반하였다. 2시간 후, 용액을 1.6ml의 디메틸포름아미드 중 비스(트리부틸암모늄) 피로포스페이트(TBAPP 또는 (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇)(784.6mg, 1.43mmol, 6.50당량) 및 트리부틸아민(213.0 μl 0.88mmol, 4.0당량)의 혼합물과 반응시켰다. 대략 15분 후, 반응물을 15.0ml의 0.2M 트리에틸암모늄 중탄산염(TEAB)으로 퀴칭시키고 투명한 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 18.0ml의 농축된 수산화 암모늄을 반응 혼합물에 가하여 트리플루오로아세틸 그룹을 제거하였다. 이어서, 이를 밤새 교반하면서 저장하였다. 반응 혼합물을 밤새 동결건조시키고 조 반응 혼합물을 HPLC(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18 분취용 컬럼, 250 x 21.20 mm, 10.0 마이크론; 구배: 3.0분 동안 100% A, 이후에 1% B/분, A = 100 mM TEAB 완충액, B = ACN; 유속: 10.0 mL/분; 보유 시간: 16.14-17.02 분)에 의해 정제하였다. 목적인 화합물을 함유하는 분획들을 혼주시키고 동결건조시켜 화합물 47의 NTP를 제공하였다. 트리포스포틸화 반응들을 화염-건조시킨 2목 플라스크 속에서 N₂ 대기 하에 수행하였다. 뉴클레오사이드 및 단백질 스펀지를 사용하기 전에 밤새 진공 하에 P₂O₅에 걸쳐 건조시켰다. 모노포스페이트들의 형성을 LCMS에 의해 모니터링하였다.

[2040] **실시예 55. N-PEG 아데노신(화합물 48) 및 N-PEG ATP(상기 화합물의 NTP)의 합성**



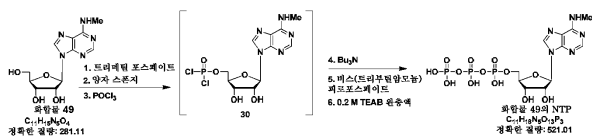
[2041]

[2042]

N-PEG 아데노신 48을 보호하고 보호된 화합물 48(100.0 mg, 0.15 mmol)의 용액을 0.65mL의 트리메틸포스페이트 (TMP) 중 양자 스펀지(49.3mg, 0.23mmol, 1.50당량)에 가하고 0°C에서 10분 동안 교반하였다. 옥시염화 인 (POCl₃)(28.0 μl 0.3mmol, 2.0당량)을 당해 용액에 적가한 후 2시간 동안 N₂ 대기 하에 교반하였다. 2시간 후, 당해 용액을 1.2ml의 디메틸포름아미드 중 비스트리부틸암모늄 피로포스페이트(TBAPP 또는 (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇)(537.7mg, 0.98mmol, 6.50당량) 및 트리부틸아민(146.0 μl 0.6mmol, 4.0당량)의 혼합물과 반응시켰다. 대략 15분 후, 반응물을 10.0ml의 0.2M 트리에틸암모늄 중탄산염(TEAB)으로 퀀칭시키고 투명한 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 18.0 ml의 농축된 수산화 암모늄을 반응 혼합물에 가하여 트리플루오로아세틸 그룹을 제거하였다. 이어서, 이를 밤새 교반하면서 저장하였다. 반응 혼합물을 밤새 동결건조시키고 조 반응 혼합물을 HPLC(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18 분취용 컬럼, 250 x 21.20 mm, 10.0 마이크론; 구매: 3.0분 동안 100% A, 이후에 1% B/분, A = 100 mM TEAB 완충액, B = ACN; 유속: 10.0 mL/분; 보유 시간: 24.5-25.5 분)에 의해 정제하였다. 목적한 화합물을 함유하는 분획들을 혼주시키고 동결건조시켜 화합물 48의 NTP를 제공하였다. 트리포스포릴화 반응들을 화염-건조시킨 2목 플라스크 속에서 N₂ 대기하에 수행하였다. 뉴클레오사이드 및 단백질 스펀지를 사용하기 전에 밤새 진공 하에 P₂O₅에 걸쳐 건조시켰다. 모노포스페이트들의 형성을 LCMS에 의해 모니터링하였다.

[2043]

실시예 56. N-메틸 아데노신(화합물 49) 및 N-메틸 ATP(상기 화합물의 NTP)의 합성



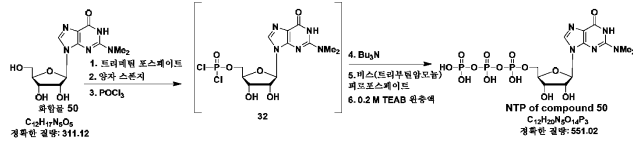
[2044]

[2045]

N-메틸 아데노신(화합물 49)(70.0mg, 0.25mmol)의 용액을 0.7 mL 트리메틸포스페이트(TMP) 중 양자 스펀지 (79.29mg, 0.37mmol, 1.50당량)에 가하고 0°C에서 10분 동안 교반하였다. 옥시염화 인(POCl₃)(46.66 μl 0.50mmol, 2.0당량)을 당해 용액에 적가한 후 2시간 동안 N₂ 대기 하에 교반하였다. 2시간 후, 용액을 1.3ml의 디메틸포름아미드 중 비스트리부틸암모늄 피로포스페이트(TBAPP 또는 (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇)(888.85mg, 1.62mmol, 6.50당량) 및 트리부틸아민(241.0 μl 1.0mmol, 4.0당량)의 혼합물과 반응시켰다. 대략 15분 후, 반응물을 16.0 ml의 0.2 M 트리에틸암모늄 중탄산염(TEAB)으로 퀀칭시키고 투명한 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 밤새 동결건조시키고 조 반응 혼합물을 HPLC(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18 분취용 컬럼, 250 x 21.20 mm, 10.0 마이크론; 구매: 3.0분 동안 100% A, 이후에 1% B/분, A = 100 mM TEAB 완충액, B = ACN; 유속: 10.0 mL/분; 보유 시간: 19.62 내지 20.14분)에 의해 정제하였다. 목적한 화합물을 함유하는 분획들을 혼주시키고 동결건조시켜 화합물 49의 NTP를 제공하였다. 트리포스포릴화 반응들을 화염-건조시킨 2목 플라스크 속에서 N₂ 대기하에 수행하였다. 뉴클레오사이드 및 단백질 스펀지를 사용하기 전에 밤새 진공 하에 P₂O₅에 걸쳐 건조시켰다. 모노포스페이트들의 형성을 LCMS에 의해 모니터링하였다.

[2046] **실시예 57. N,N-디메틸 구아노신(화합물 50) 및 N,N-디메틸 GTP(상기 화합물의 NTP)의 합성**

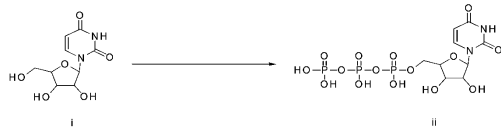
[2047]



[2048] N,N-디메틸 구아노신(화합물 50)(65.8mg, 0.21mmol)의 용액을 0.7 mL의 트리메틸포스페이트(TMP) 중 양자 스폰지(68.58mg, 0.32mmol, 1.50당량)에 가하고 0℃에서 10분 동안 교반하였다. 옥시염화 인(POCl₃)(39.20 μl 0.42mmol, 2.0당량)을 용액에 적가한 후 2시간 동안 N₂ 대기 하에 교반하였다. 2시간 후, 용액을 1.5ml의 디메틸포름아미드 중 비스트리부틸암모늄 피로포스페이트(TBAPP 또는 (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇)(751.67mg, 1.37mmol, 6.50당량) 및 트리부틸아민(204.0 μl 0.84mmol, 4.0당량)의 혼합물과 반응시켰다. 대략 15분 후, 반응물을 14.0ml의 0.2M 트리에틸암모늄 중탄산염(TEAB)으로 퀀칭시키고 투명한 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 밤새 동결건조시키고 조 반응 혼합물을 HPLC(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18 분취용 컬럼, 250 x 21.20 mm, 10.0 마이크론; 구배: 3.0분 동안 100% A, 이후에 1% B/분, A = 100 mM TEAB 완충액, B = ACN; 유속: 10.0 mL/분; 보유 시간: 19.27 내지 19.95분)에 의해 정제하였다. 목적한 화합물을 함유하는 분획들을 혼주시키고 동결건조시켜 화합물 50의 NTP를 제공하였다. 트리포스포릴화 반응들을 화염-건조시킨 2목 플라스크에서 N₂ 대기 하에 수행하였다. 뉴클레오사이드 및 단백질 스폰지를 사용하기 전에 밤새 진공 하에 P₂O₅에 걸쳐 건조시켰다. 모노포스페이트들의 형성을 LCMS에 의해 모니터링하였다.

[2049] **실시예 58. NTPS의 트리포스페이트 합성을 위한 일반적인 방법**

[2050]



[2051] 뉴클레오사이드 i는 임의의 유용한 방법에 의해 포스포릴화시켜 트리포스페이트 화합물 ii를 제공할 수 있다. 예를 들면, 뉴클레오사이드를 양자 스폰지 및 트리메틸포스페이트(TMP)에 가하고 냉각시킬 수 있다(예를 들면, -40℃까지). 옥시염화 인(POCl₃)을 적가한 후 비스트리부틸암모늄 피로포스페이트(TBAPP 또는 (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇) 및 트리부틸아민과 반응시킬 수 있다. 이어서, 반응물을 트리에틸암모늄 중탄산염(TEAB)으로 신속하게 퀀칭시켰다. 예시적인 조건들은 미국 특허 제7,893,227호에 제공되며, 이는 인용에 의해 본원에 포함된다.

[2052] 포스포릴화 반응 후, 반응 혼합물을 임의로 동결건조하거나, 정제(예를 들면, 이온-교환 크로마토그래피 및/또는 HPLC에 의해)하거나, 또는 (예를 들면, MeOH에 용해시키고 아세톤 중 나트륨 퍼클로레이트에 용해시킴으로써) 나트륨염으로 전환시킬 수 있다.

[2053] **실시예 59: cDNA 생산을 위한 PCR**

[2054] cDNA의 제조를 위한 PCR 절차들을 2x KAPA HIFI™ HotStart ReadyMix[제조원: 카파 바이오시스템스(Kapa Biosystems), 매사추세츠주 워번 소재]를 사용하여 수행한다. 당해 시스템은 2x KAPA ReadyMix 12.5 μl; 전방 프라이머(10 μM) 0.75 μl; 역 프라이머(10 μM) 0.75 μl; 주형 cDNA 100ng; 및 25.0 μl로 희석된 dH₂O를 포함한다. 반응 조건들은 95℃에서 5분 동안 및 98℃에서 20초 동안, 이어서, 58℃에서 15초 동안, 이어서, 72℃에서 45초 동안, 이어서, 72℃에서 5분 동안, 이어서, 4℃에서 종결하는 것이다.

[2055] 본 발명의 역 프라이머는 mRNA에 폴리-A₁₂₀를 위한 폴리-T₁₂₀를 혼입한다. 보다 길거나 보다 짧은 폴리-T 트랙트(tract)를 갖는 다른 역 프라이머들을 사용하여 mRNA 중 폴리-A 테일의 길이를 조절할 수 있다.

[2056] 반응물을 인비트로젠의 PURELINK™ PCR Micro Kit(캘리포니아주 칼스바드 소재)를 사용하여 제조업자의 지침(5μg 이하)에 따라 세정하였다. 보다 긴 반응은 용량이 보다 큰 생성물을 사용한 세정을 필요로 할 것이다. 세정에 이어서, cDNA를 NanoDrop을 사용하여 정량화하고, 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하여 cDNA가 예측된 크기임을 확인한다. 이어서, cDNA를 서열 분석을 위해 제공한 후 시험관내 전사 반응을 진행한다.

[2057] **실시예 60. 시험관내 전사(IVT)**

[2058] 시험관내 전사 반응은, 변형된 뉴클레오타이드들 또는 변형된 RNA를 함유하는 mRNA를 생성한다. 도입 뉴클레오타이드 트리포스페이트(NTP) 혼합물은 천연 및 비-천연 NTP들을 사용하여 내부적으로 제조한다.

[2059] 전형적인 시험관내 전사 반응은 하기를 포함한다:

주형 cDNA	1.0 µg
10x 전사 완충액(400 mM 트리스-HCl pH 8.0, 190 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT, 10 mM Spermidine)	2.0 µl
통상의 NTP들(각각 25mM)	7.2 µl
RNase 억제제	20 U
T7 RNA 폴리머라제	3000 U
dH ₂ O	20.0 µl가 되도록 하는 양

[2060]

[2061] 37°C에서 3 내지 5시간 동안 항온배양한다.

[2062] 조 IVT 혼합물을 다음날 세정을 위해 4°C에서 밤새 저장할 수 있다. 이어서, 1U의 RNase-불포함 DNase을 사용하여 원래의 주형을 분해한다. 37°C에서 15분의 항온배양 후, mRNA를 Ambion의 MEGACLEAR™ 키트(텍사스주 오스틴 소재)를 사용하여 제조업자의 지침에 따라서 정제한다. 당해 키트는 500µg 이하의 RNA를 정제할 수 있다. 세정 후, RNA를 NanoDrop을 사용하여 정량화하고 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하여 RNA가 적절한 크기임을, 그리고 RNA의 분해가 일어나지 않았음을 확인한다.

[2063] T7 RNA 폴리머라제는, T7 RNA 폴리머라제, T3 RNA 폴리머라제, 및 대안의 프로모터들을 인식하는 돌연변이체 폴리머라제들(예를 들면, 변형된 NTP들을 혼입시킬 수 있는 신규 폴리머라제들 및 또한 류(Liu)의 문헌[참조: Esvelt *et al.*(Nature(2011) 472(7344):499-503 및 미국 공보 제20110177495호), 2'-O-메틸 RNA를 전사시키기 위한 T7 RNA 폴리머라제 변이체를 기술하는 엘링톤(Ellington)의 문헌[참조: Chelliserrykattil and Ellington, Nature Biotechnology (2004) 22(9):1155-1160] 및 T7 RNA 폴리머라제 이중 돌연변이체를 기술하는 소우사(Sousa)의 문헌[참조: Padilla and Sousa, Nucleic Acids Research (2002) 30(24): e128]에 기재된 폴리머라제들로부터 선택될 수 있지만, 이들에 한정되지 않고; 이들 문헌의 전문은 인용에 의해 본원에 포함된다.

[2064] **실시예 61. mRNA의 효소적 캡핑**

[2065] mRNA의 캡핑은 다음과 같이 수행하며, 여기서, 혼합물은 다음을 포함한다: IVT RNA 60µg 내지 180µg 및 72 µl 이하의 dH₂O. 혼합물을 65°C에서 5분 동안 항온배양하여 RNA를 변성시킨 후, 빙상으로 즉시 이동시킨다.

[2066] 이어서, 프로토콜은, 10x 캡핑 완충액(0.5M 트리스-HCl(pH 8.0), 60mM KCl, 12.5mM MgCl₂)(10.0 µl); 20mM GTP(5.0 µl); 20mM S-아데노실 메티오닌(2.5 µl); RNase 억제제(100U); 2'-O-메틸트랜스퍼라제(400U); 백시니아 캡핑 효소(구아닐릴 트랜스퍼라제)(40U); dH₂O(28 µl 이하)의 혼합; 및 60µg의 RNA의 경우 37°C에서 30분 동안 또는 180µg의 RNA의 경우 2시간 이하의 항온배양을 포함한다.

[2067] 이어서, mRNA를 Ambion의 MEGACLEAR™ 키트(텍사스주 오스틴 소재)를 사용하여 제조업자의 지침에 따라서 정제한다. 세정 후, RNA를 NANODROP™ [제조원: 써모피셔(ThermoFisher), 매사추세츠주 왈탐 소재]을 사용하여 정제하고, 아가로스 겔 전기영동으로 분석하여 RNA가 적절한 크기임을, 그리고 RNA의 분해가 일어나지 않았음을 확인한다. 또한, RNA 생성물을 역-전사-PCR에 이동시켜 서열분석함으로써 서열분석용 cDNA를 생성할 수 있다.

[2068] **실시예 62. 폴리A 테일링 반응**

[2069] cDNA 중 폴리-T의 부재 하에, 폴리-A 테일링 반응은 최종 생성물의 세정 전에 수행하여야 한다. 이는 캡핑된 IVT RNA(100 µl); RNase 억제제 (20U); 10x 테일링 완충액(0.5M 트리스-HCl(pH 8.0), 2.5M NaCl, 100mM MgCl₂)(12.0 µl); 20mM ATP(6.0 µl); 폴리-A 폴리머라제(20U); 123.5 µl 이하의 dH₂O의 혼합 및 37°C에서 30분 동안 항온배양으로 수행한다. 폴리-A 테일이 전사체 내에 이미 존재하는 경우, 테일링 반응을 생략하고 직접 Ambion의 MEGACLEAR™ 키트(텍사스주 오스틴 소재)(500µg 이하)로 진행할 수 있다. 폴리-A 폴리머라제는 바람직하게는 효모 내에서 발현된 재조합체 효소이다.

[2070] 본원에서 수행되고 기술된 연구들의 경우, 폴리-A 테일은 IVT 주형에 암호화되어 길이가 160인 뉴클레오타이드들을 포함한다. 그러나, 폴리-A 테일링 반응의 진행성 또는 통합성은 항상 정확하게 160개 뉴클레오타이드들을 생성하지는 않는다. 따라서, 대략 160개 뉴클레오타이드들, 예를 들면, 약 150 내지 165, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164 또는 165개의 폴리-A 테일들이 본 발명의 범위 내이다.

[2071] **실시예 63. 단백질 발현을 위한 스크리닝 방법**

[2072] **A. 전자분무 이온화**

[2073] 대상체에게 투여된 변형된 RNA에 의해 암호화된 단백질들을 함유할 수 있는 생물학적 샘플들을 제조하여 1, 2, 3 또는 4개의 질량 분석기들을 사용하여 전자분무 이온화(ESI)용 제조업자 프로토콜에 따라 분석한다. 또한, 생물학적 샘플을 탄뎀(tandem) ESI 질량 분광분석법 시스템을 사용하여 분석할 수 있다.

[2074] 단백질 단편들, 또는 전체 단백질들의 패턴들을, 제공된 단백질에 대해 공지된 대조군들과 비교하고 동일성을 비교에 의해 측정한다.

[2075] **B. 매트릭스-보조된 레이저 탈착/이온화**

[2076] 대상체에게 투여된 변형된 RNA에 의해 암호화된 단백질들을 함유할 수 있는 생물학적 샘플을 제조하여 매트릭스-보조된 레이저 탈착/이온화(MALDI)를 위한 제조업자 프로토콜에 따라 분석한다.

[2077] 단백질 단편들, 또는 전체 단백질들의 패턴들은, 제공된 단백질에 대한 공지된 대조군들과 비교하고 동일성을 비교에 의해 측정한다.

[2078] **C. 액체 크로마토그래피-질량 분광분석법-질량 분광분석법**

[2079] 변형된 RNA에 의해 암호화된 단백질들을 함유할 수 있는 생물학적 샘플을 트립신 효소로 처리하여 이들 내에 함유된 단백질들을 분해할 수 있다. 수득된 펩타이드를 액체 크로마토그래피-질량 분광분석법-질량 분광분석법(LC/MS/MS)으로 분석한다. 펩타이드를 질량 분광분석계에서 단편화하여 컴퓨터 알고리즘을 통해 단백질 서열 데이터베이스에 매칭될 수 있는 진단 패턴을 수득한다. 분해된 샘플을 회석하여 1ng 이하의 출발 물질을 제공된 단백질에 대해 달성할 수 있다. 단순한 완충액 배경(예를 들면, 물 또는 휘발성 염들)을 함유하는 생물학적 샘플들을 용액 내 분해를 지시할 수 있으며; 보다 복잡한 배경들(예를 들면, 세제, 비-휘발성 염들, 글리세롤)은 샘플 분석을 촉진시키기 위한 추가의 세정을 필요로 한다.

[2080] 단백질 단편들, 또는 전체 단백질들의 패턴을, 제공된 단백질에 대한 공지된 대조군들과 비교하고 동일성을 비교에 의해 측정한다.

[2081] **실시예 64. 사이토카인 연구: PBMC**

[2082] **A. PBMC 단리 및 배양**

[2083] 2명의 공여자들로부터의 50 ml의 사람 혈액을 나트륨 헤파린 튜브들 속의 Research Blood Components(로트 KP30928 및 KP30931)로부터 제공받았다. 각각의 공여자에 대해, 혈액을 혼주시키고 DPBS(SAFC Bioscience 59331C, 로트 071M8408)를 사용하여 70 mL로 희석시키고 2개의 50mL 원뿔형 튜브들에 균일하게 나누었다. 10ml의 피콜 파크(Ficoll Paque)(GE Healthcare 17-5442-03, 로트 10074400)를 혈액층 아래에 균일하게 분배하였다. 튜브들을 2000rpm에서 30분 동안 낮은 가속 및 브레이킹(braking)으로 원심분리하였다. 튜브들을 제거하고 버피 코트(buffy coat) PBMC 층들을 신선한 50 mL 원뿔형 튜브에 이동시키고 DPBS로 세척하였다. 튜브들을 1450rpm으로 10분 동안 원심분리하였다.

[2084] 상청액을 흡인하고 PBMC 펠렛들을 재현탁시키고 50 ml의 DPBS 속에서 세척하였다. 당해 튜브들을 1250rpm으로 10분 동안 원심분리하였다. 당해 세척 단계를 반복하고, PBMC 펠렛들을 19 ml의 Optimem I(Gibco 11058, 로트 1072088)에 재현탁하여 계수하였다. 세포 현탁액을 3.0×10^6 개 세포들/mL의 생 세포들의 농도로 조절하였다.

[2085] 이어서, 이들 세포들을 공여자당 5개의 96 웰 조직 배양물로 처리된 환저 플레이트들(Costar 3799) 상에 웰당 50 μ L로 플레이팅하였다. 30분내에, 형질감염 혼합물들을 각각의 웰에 웰당 50 μ L의 용적으로 가하였다. 형질감염 후 4시간째에, 배지에 10 μ L의 소 태아 혈청(Gibco 10082, 로트 1012368)을 보충하였다.

[2086] **B. 형질감염 제제**

[2087] 사람 G-CSF를 암호화하는 변형된 mRNA(서열번호 1에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리A 테일은 서열에 나타나 있지 않다; 5' 캡, 캡 1) [(1) 천연의 NTP, (2) 5-메틸 사이티딘 및 슈도우리딘을 사용한 100% 치환, 또는 (3) 5-메틸 사이티딘 및 N1-메틸 슈도우리딘을 사용한 100% 치환; 루시페라제(서열번호 2에 나타난 IVT cDNA 서열; 서열번호 3에 나타난 mRNA 서열, 대략 160개 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열 내에 나타나 있지 않음, 5' 캡, 캡 1, 각각의 사이토신에서 5-메틸사이토신으로 완전하게 변형됨, 및 각각의 우리딘 부위에서의 슈도우리딘 대체)를 암호화하는 mRNA를 함유][(1) 천연 NTP 또는 (2) 5-메틸 사이티딘 및 슈도우

리딘을 사용한 100% 치환) 및 TLR 효능제 R848(Invivogen tlr1-r848)를 함유]을 2500 μL의 Optimem I의 최종 용적으로 38.4 ng/μL로 희석하였다.

[2088] 별도로, 110 μL의 Lipofectamine 2000(Invitrogen 11668-027, 로트 1070962)을 6.76mL Optimem I으로 희석시켰다. 96 웰 플레이트에서 135 μL의 각각의 mRNA, 양성 대조군(R-848) 또는 음성 대조군(Optimem I)의 9개 분취량들을 135 μL의 희석된 리포펙타민 2000에 가하였다. 형질감염될 물질을 함유하는 플레이트를 20분 동안 항온 배양하였다. 이어서, 형질감염 혼합물들을 각각의 사람 PBMC 플레이트들에 웰당 50 μL로 이동시켰다. 이어서, 플레이트들을 37°C에서 항온배양하였다. 2, 4, 8, 20, 및 44시간째에, 각각의 플레이트를 항온배양기로부터 제거하였고, 상청액들을 동결시켰다.

[2089] 마지막 플레이트를 제거한 후, 상청액들을 사람 G-CSF ELISA 키트(Invitrogen KHC2032) 및 사람 IFN-알파 ELISA 키트(Thermo Scientific 41105-2)를 사용하여 분석하였다. 각각의 조건을 2회 수행하였다.

[2090] **C. 단백질 및 선천적 면역 반응 분석**

[2091] 암호화된 단백질을 생산하는 변형되지 않은 mRNA 및 변형된 mRNA의 능력을, 인터페론-알파 생산에 의해 측정된 것으로서 선천적 면역 인식을 촉발하는 mRNA의 능력으로서 시간에 걸쳐 평가(G-CSF 생산)하였다. 시험관내 PBMC 배양물들의 사용은 올리고뉴클레오타이드들의 면역자극성 잠재능을 측정하기 위한 허용된 방법이다(참조: Robbins et al., Oligonucleotides 2009 19:89-102).

[2092] 결과들은 각각의 ELISA 플레이트의 표준 곡선에 대해 4개의 매개변수 산정 곡선 피트(logistic curve fit)를 사용하여 보간하였다. 표 4 및 표 5에, 특이적인 ELISA에 측정된 것으로서 시간에 따른 G-CSF, 인터페론-알파 (IFN-알파) 및 종양 괴사 인자 알파(TNF-알파) 생산에 대한 3명의 별도의 PBMC 공여자로부터의 평균을 나타낸다.

[2093] G-CSF ELISA에서, 리포펙타민 2000(LF2000) 처리되지 않은 조건으로부터의 배경 신호를 각각의 시점에서 감하였다. 데이터는, 사람 말초 혈액 단핵에 의한 사람 G-CSF 단백질의 특이적인 생산이 천연의 NTP들, 5-메틸 사이티딘 및 슈도우리딘을 사용한 100% 치환, 또는 5-메틸 사이티딘 및 N1-메틸 슈도우리딘을 사용한 100% 치환을 함유하는 G-CSF mRNA로 관찰됨을 입증하였다. G-CSF의 생산은 5-메틸 사이티딘 및 슈도우리딘 변형된 mRNA에 비해 5-메틸 사이티딘 및 N1-메틸 슈도우리딘 변형된 mRNA의 사용을 통해 유의적으로 증가하였다.

[2094] 선천적 면역 인식과 관련하여, 변형된 mRNA 화학물질들이 IFN-알파 및 TNF-알파 생산을 양성 대조군들(R848, p(I)p(C))과 비교하여 크게 방지하지만, 유의적인 차이들이 화학물질들 사이에서 존재하였다. 5-메틸 사이티딘 및 슈도우리딘 변형된 mRNA는 낮지만 검출가능한 수준의 IFN-알파 및 TNF-알파 생산을 초래하고, 한편, 5-메틸 사이티딘 및 N1-메틸 슈도우리딘 변형된 mRNA는 검출가능한 IFN-알파 및 TNF-알파 생산을 초래하지 않았다.

[2095] 결과적으로, 선천적 면역 반응의 활성화의 하나 이상의 사이토카인 마커를 관찰하기 위한 필요성 외에, 변형들의 조합들이 상이한 수준들의 세포 반응(단백질 생산 및 면역 활성화)를 제공함이 놀랍게도 밝혀졌다. 당해 연구에서, 변형, N1-메틸 슈도우리딘은 다른 것들로 실험된 5-메틸사이티딘/슈도우리딘의 표준 조합보다 추가된 보호를 전달하여 2배로 많은 단백질 및 면역 활성화(TNF-알파)에 있어서 거의 150배 감소를 생성함이 밝혀졌다.

[2096] PBMC는 선천적 면역 RNA 인식 센서들의 큰 배열을 함유하며 또한 단백질 번역을 할 수 있다는 점에서, 이들 2개 경로들과의 상호의존성을 시험하기 위한 유용한 시스템을 제공한다. mRNA 번역은 이러한 선천적 면역 경로들의 활성화에 의해 부정적으로 영향받을 수 있음이 알려져 있다[참조: Kariko et al. Immunity (2005) 23:165-175; Warren et al. Cell Stem Cell (2010) 7:618-630]. 시험관내 검정 시스템에서와 같은 PBMC를 사용하여 번역(이 경우 G-CSF 단백질 생산) 및 사이토카인 생산(이 경우 IFN-알파 및 TNF-알파 단백질 생산으로 예시됨) 사이의 관계를 확립할 수 있다. 보다 우수한 단백질 생산은 선천적 면역 활성화 경로의 보다 낮은 유도과 상호관련되어 있으며, 신규한 화학물질들은 당해 비를 기준으로 양호하게 판단될 수 있다(표 6).

[2097] 당해 연구에서, 2개의 화학적 변형들, 슈도우리딘 및 N1-메틸 슈도우리딘 둘다와 5-메틸 사이토신에 대한 PC 비는 사이토카인 IFN-알파에 대한 9944/1=9944와 비교하여 4742/141=34이었다. 사이토카인, TNF-알파의 경우, 2개의 화학물질들은 각각 153 및 1243의 PC 비들을 가졌으며, 이는 각각 사이토카인, N1-메틸슈도우리딘이 우수한 변형임을 제안한다. 표 4 및 표 5에서 "NT"는 시험되지 않음을 의미한다.

표 4

G-CSF

G-CSF: 3 명의 공여자 평균 (pg/ml)	
G-CSF 5-메틸 사이토신/ 슈도우리딘	4742
G-CSF 5-메틸사이토신/ N1-메틸슈도우리딘	9944
루시피라제	18
LF2000	16

[2098]

표 5

IFN-알파 및 TNF-알파

	IFN-알파: 3 명의 공여자 평균 (pg/ml)	TNF-알파: 3 명의 공여자 평균 (pg/ml)
G-CSF 5-메틸 사이토신/ 슈도우리딘	141	31
G-CSF 5-메틸사이토신/ N1-메틸슈도우리딘	1	8
P(I)P(C)	1104	NT
R-848	NT	1477
LF2000	17	25

[2099]

표 6

G-CSF 대 사이토카인 비

	G-CSF/ IFN-알파 (비)		G-CSF/TNF-알파 (비)	
	5-메틸 사이토신/ 슈도우리딘	5-메틸사이토신/ N1-메틸슈도우리딘	5-메틸 사이토신/ 슈도우리딘	5-메틸사이토신/N1- 메틸슈도우리딘
PC 비	34	9944	153	1243

[2100]

실시예 65. 변형된 mRNA의 화학적 변형 범위

[2101]

[2102] 이들에 한정되지 않지만 5-메틸사이토신 및 슈도우리딘과 같은 화학적 변형들, 변형된 뉴클레오타이드들은, 선천적 면역 반응을 저하시키며 포유동물 세포들내에서 RNA의 발현을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 놀랍게도 및 이미 알려져 있지 않은, 이들 화학적 변형들에 의해 나타난 당해 효과들은, 특정 뉴클레오타이드의 화학적 변형의 양이 100% 미만인 경우 적정될 수 있다. 앞서, 화학적 변형의 이점은 변형된 뉴클레오타이드의 완전한 대체 미만을 사용하여 유도시킬 수 있는 것으로 여겨졌으며, 발표된 보고서들은, 변형된 뉴클레오타이드를 사용한 치환 수준이 50% 미만일 때까지 이점의 손실이 없음을 제안한다[참조: Kariko et al., Immunity (2005) 23:165-175].

[2103]

[2103] 그러나, 본 발명에 이르러, 화학적 변형의 이점들이 화학적 변형의 정도와 직접 상호관련되며 면역 반응의 단일 척도 이상의 관점에서 고려되어야 함이 밝혀졌다. 이러한 이점들은 향상된 단백질 생산 또는 mRNA 번역 및 사이토카인 프로파일들 및 면역 반응 촉발인자들의 계량법들에 의해 측정된 것으로서 선천적 면역 반응의 감소된 자극 또는 자극 회피를 포함한다.

[2104]

[2104] 향상된 mRNA 번역 및 감소된 또는 결핍된 선천적 면역 자극은, 변형된 뉴클레오타이드를 사용한 100% 치환으로 관찰된다. 보다 낮은 퍼센트들의 치환은 mRNA 번역을 거의 생성하지 않으며, 보다 더 선천적 면역 자극을 생성하며, 변형되지 않은 mRNA는 최저의 번역 및 최대의 선천적 면역 자극을 나타낸다.

[2105]

시험관내 PBMC 연구들: 변형 퍼센트

[2106] 5-메틸사이토신(5mC) 및 슈도우리딘(pseudoU)으로 변형된 또는 변형되지 않은 G-CSF mRNA로 변형된 480 ng의 G-CSF mRNA를 0.4 μL의 리포펙타민 2000을 사용하여 3명의 정상 혈액 공여자들(D1, D2, 및 D3)로부터의 말초 혈액 단핵 세포들(PBMC)로 형질감염시켰다. G-CSF mRNA(서열 1; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다 5'캡, 캡 1)를 5mC 및 pseudo로 변형시키거나(100% 변형), 5mC 및 pseudo로 변형시키지 않거나(0% 변형) 또는 5mC 및 pseudoU로 부분 변형시켜 mRNA가 75% 변형, 50% 변형 또는 25% 변형을 함유할 수 있도록 하였다. 루시퍼라제(서열 3에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1; 완전히 변형된 5mC 및 pseudo)를 G-CSF 발현에 대해 분석하였다. 리포펙타민2000의 TNF-알파 및 IFN-알파 대조군 샘플들의 경우, LPS, R-848, 루시퍼라제(서열 3에 나타낸 mRNA; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1; 완전히 변형된 5mC 및 pseudo), 및 P(I)P(C)를 또한 분석하였다. 상청액을 수거하고 형질감염 후 22시간 후에 ELISA로 이동시켜 단백질 발현을 측정하였다. G-CSF의 발현은 표 7에 나타내며 IFN-알파 및 TNF-알파의 발현은 표 8에 나타낸다. IFN-알파 및 TNF-알파의 발현은 G-CSF mRNA의 형질감염으로부터의 부차적인 효과일 수 있다. 표 7, 8 및 도 10은, G-CSF, 인터페론 알파(IFN-알파) 및 종양 괴사 인자-알파(TNF-알파)의 화학적 변형의 양이, mRNA가 완전히 변형되지 않은 경우 적정될 수 있으며, 적정가능한 경향은 각각의 표적에 대해 동일하지 않음을 나타낸다.

[2107] 위에서 나타낸 바와 같이, 시험관내 검정 시스템에서 PBMC를 사용하여 번역(이 경우 G-CSF 단백질 생산)과 사이토카인 생산(이 경우 IFN-알파 단백질 생산으로 예시) 사이에 상관관계를 확립하는 것이 가능하다. 보다 우수한 단백질 생산은 선천적 면역 활성화 경로의 보다 낮은 유도과 관련되며, 화학물질의 변형 퍼센트는 당해 비를 기준으로 양호하게 판단할 수 있다(표 9). 표 7 및 8로부터 계산되고 표 9에 나타낸 바와 같이, 5-메틸사이티딘 및 슈도우리딘을 사용한 완전한 변형은 어떠한 변형(천연의 G-CSF mRNA)의 부재하에 훨씬 더 우수한 비의 단백질/사이토카인생산을 나타낸다(IFN-알파의 경우 100배 및 TNF-알파의 경우 27배). 부분적인 변형은 증가되거나 적은 변형이 낮은 단백질/사이토카인 비를 생성하는 선형 관계를 나타낸다.

표 7

G-CSF 발현

	G-CSF 발현 (pg/ml)		
	D1	D2	D3
100% 변형	1968.9	2595.6	2835.7
75% 변형	566.7	631.4	659.5
50% 변형	188.9	187.2	191.9
25% 변형	139.3	126.9	102.0
0% 변형	194.8	182.0	183.3
루시퍼라제	90.2	0.0	22.1

[2108]

표 8

IFN-알파 및 TNF-알파 발현

	IFN-알파 발현 (pg/ml)			TNF-알파 발현 (pg/ml)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
100% 변형	336.5	78.0	46.4	115.0	15.0	11.1
75% 변형	339.6	107.6	160.9	107.4	21.7	11.8
50% 변형	478.9	261.1	389.7	49.6	24.1	10.4
25% 변형	564.3	400.4	670.7	85.6	26.6	19.8
0% 변형	1421.6	810.5	1260.5	154.6	96.8	45.9
LPS	0.0	0.6	0.0	0.0	12.6	4.3
R-848	0.5	3.0	14.1	655.2	989.9	420.4
P(I)P(C)	130.8	297.1	585.2	765.8	2362.7	1874.4
지질만	1952.2	866.6	855.8	248.5	82.0	60.7

[2109]

표 9

PC 비 및 변형 비율(%)의 효과

변형 %	평균 G-CSF (pg/ml)	평균 IFN-a (pg/ml)	평균 TNF-a (pg/ml)	G-CSF/ IFN-알파 (PC 비)	G-CSF/TNF-알파 (PC 비)
100	2466	153	47	16	52
75	619	202	47	3.1	13
50	189	376	28	0.5	6.8
25	122	545	44	0.2	2.8
0	186	1164	99	0.16	1.9

[2110]

[2111]

실시예 66. PBMC에서 형질감염된 변형된 RNA

[2112]

5-메틸사이토신(5mC) 및 슈도우리딘(pseudoU)으로 변형된 500ng의 G-CSF mRNA 또는 변형되지 않은 G-CSF mRNA를 0.4 μL의 리포펙타민 2000을 사용하여 3명의 정상 혈액 공여자들(D1, D2, 및 D3)로부터의 말초 혈액 단핵 세포들(PBMC)로 형질감염시켰다. G-CSF mRNA(서열 1; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1)를 5mC 및 pseudo로 변형시키거나(100% 변형), 5mC 및 pseudo로 변형시키지 않거나(0% 변형) 또는 5mC 및 pseudoU로 부분 변형시켜 mRNA가 50% 변형, 25% 변형, 10% 변형, 5% 변형, 1% 변형 또는 0.1% 변형을 함유할 수 있도록 하였다. mCherry의 대조군 샘플(서열 6에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1; 완전히 변형된 5mC 및 슈도우리딘) 및 5-메틸사이토신 및 슈도우리딘으로 완전히 변형시킨 G-CSG(대조군 G-CSF)를 G-CSF 발현에 대해 분석하였다. 리포펙타민 2000의 중앙-괴사 인자(TNF-알파) 및 인터페론-알파(IFN-알파) 대조군 샘플들의 경우, LPS, R-848, 루시퍼라제(서열 3에 나타낸 mRNA 서열 3; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1; 완전히 변형된 5mC 및 pseudo), 및 P(I)P(C)를 또한 분석하였다. 상정액을 형질감염 후 6시간 및 18시간째에 수거하고 ELISA로 이동시켜 단백질 발현을 측정하였다. 공여자 1에 대한 G-CSF, IFN-알파, 및 TNF-알파의 발현은 표 10에 나타내며, 공여자 2는 표 11에 나타내고 공여자 3은 표 12에 나타낸다.

[2113]

5-메틸사이티딘 및 슈도우리딘을 사용한 완전한 100% 변형은 대부분 단백질 번역(G-CSF)을 생성하였으며 최저량의 사이토카인이 모든 3명의 사람 PBMC 공여자들에 따라 생산되었다. 변형의 감소하는 양들은 보다 많은 사이토카인 생산(IFN-알파 및 TNF-알파)을 생성하므로, 사이토카인들을 감소시키고 단백질 번역을 개선시키기 위한 완전한 변형의 중요성을 추가로 강조한다(본원에서 G-CSF 생산으로 입증됨).

표 10

공여자 1

	G-CSF (pg/mL)		IFN-알파 (pg/mL)		TNF-알파 (pg/mL)	
	6 시간	18 시간	6 시간	18 시간	6 시간	18 시간
100% Mod	1815	2224	1	13	0	0
75% Mod	591	614	0	89	0	0
50% Mod	172	147	0	193	0	0
25% Mod	111	92	2	219	0	0
10% Mod	138	138	7	536	18	0
1% Mod	199	214	9	660	18	3
0.1% Mod	222	208	10	597	0	6
0 % Mod	273	299	10	501	10	0
대조군 G-CSF	957	1274	3	123	18633	1620
mCherry	0	0	0	10	0	0
치료되지 않음	N/A	N/A	0	0	1	1

[2114]

표 11

공여자 2

	G-CSF (pg/mL)		IFN-알파 (pg/mL)		TNF-알파 (pg/mL)	
	6 시간	18 시간	6 시간	18 시간	6 시간	18 시간
100% Mod	2184	2432	0	7	0	11
75% Mod	935	958	3	130	0	0
50% Mod	192	253	2	625	7	23
25% Mod	153	158	7	464	6	6
10% Mod	203	223	25	700	22	39
1% Mod	288	275	27	962	51	66
0.1% Mod	318	288	33	635	28	5
0 % Mod	389	413	26	748	1	253
대조군 G-CSF	1461	1634	1	59	481	814
mCherry	0	7	0	1	0	0
치료되지 않음	N/A	N/A	1	0	0	0

[2115]

표 12

공여자 3

	G-CSF (pg/mL)		IFN-알파 (pg/mL)		TNF-알파 (pg/mL)	
	6 시간	18 시간	6 시간	18 시간	6 시간	18 시간
100% Mod	6086	7549	7	658	11	11
75% Mod	2479	2378	23	752	4	35
50% Mod	667	774	24	896	22	18
25% Mod	480	541	57	1557	43	115
10% Mod	838	956	159	2755	144	123
1% Mod	1108	1197	235	3415	88	270
0.1% Mod	1338	1177	191	2873	37	363
0 % Mod	1463	1666	215	3793	74	429
대조군 G-CSF	3272	3603	16	1557	731	9066
mCherry	0	0	2	645	0	0
치료되지 않음	N/A	N/A	1	1	0	8

[2116]

[2117] 실시예 67. 변형들의 microAMES 역 돌연변이 스크린(Microames Reverse Mutation Screen)

[2118] 배경 및 방법들

[2119] microAMES 스크린은 완전한 Ames 예비항온배양 검정의 버전이다. 이는 프레임쉬프트(frameshift) 및 염기-쌍 치환 변형들 둘다를 4개의 살모넬라(*Salmonella*) 테스터 균주들(TA97a, TA98, TA100 및 TA1535) 및 하나의 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 균주(WP2 *uvrA* pKM101)를 사용하여 검출한다. 균주들 TA97a 및 TA98은 프레임쉬프트 돌연변이들을 검출하며, TA100, TA1535 및 WP2 *uvrA* pKM101은 염기-쌍 치환 돌연변이들을 검출한다. 이러한 규모가 축소된(scaled-down) Ames 시험은 최소 화합물을 사용하며 대사 활성화(S9 분획)의 존재 및 부재하에 수행되고 다중웰 플레이트들을 사용한다. 당해 시험은 시험 화합물들의 돌연변이유발원성 잠재능을 검출하는 미생물 검정이다.

[2120] 5-메틸사이티딘, 슈도우리딘 또는 N'-메틸슈도우리딘 시험 제품에 대한 microAMES 스크린을 균주들 TA97a, TA98, TA100, TA1535 및 WP2 *uvrA* pKM101을 사용하여 대사 활성화 시스템(랫트 간 S9 마이크로솜 분획으로 유도된 AROCLOR™ 1254)의 존재 또는 부재하에 0.25, 2.5, 12.5, 25, 75, 및 250µg/웰에서 2회 시험하였다. 양성 대조군 화합물들을 4개의 상이한 농도들에서 사용하여 검정 시스템이 공지된 돌연변이유발원성 화합물들에 대해 민감하도록 보증하였다. DMSO는 비히클 대조군으로서 사용하였다. 양성 및 비히클 대조군들은 예측된 결과를 생성하였으며, 이는 microAMES 스크린이 돌연변이유발원들에 대해 충분히 민감함을 입증한다.

[2121] 결과들

[2122] 5-메틸사이티딘의 경우, 침전물들은 대사 활성화의 존재 또는 부재하에 어떠한 테스터 균주로 관측되지 않았다. 세포독성[배경 론(background lawn)에서의 감소 및/또는 복귀돌연변이체(revertant)들의 수]은 대사 활성화의 존재 또는 부재하에서 어떠한 균주에서도 관측되지 않았다. 대사 활성화의 존재 또는 부재하에서 어떠한 균주

에서도 비히클 대조군과 비교하여 복귀돌연변이체 콜로니들의 수에 있어서 증가는 없었다. 따라서, 5-메틸사이티딘은 microAMES 스크린 상태하에 7규균주들 TA97a, TA98, TA100, TA1535 및 WP2 uvrA pKM101에서 250 μ g/웰까지 돌연변이성이 아니었다.

[2123] 침전물들은 대사 활성화의 존재 또는 부재하에 어떠한 테스트 균주로 관측되지 않았다. 세포독성(복귀돌연변이체들의 수에 있어서의 감소)은 대사 활성화의 부재하에서 균주 TA100으로 관찰되었다. 세포독성(배경 론에서의 감소 및/또는 복귀돌연변이체들의 수)은 대사 활성화의 존재 또는 부재하에 어떠한 다른 균주에서도 관측되지 않았다. 대사 활성화의 존재 또는 부재하에서 어떠한 균주에서도 비히클 대조군과 비교하여 복귀돌연변이체 콜로니들의 수에 있어서 증가는 없었다. 따라서, 슈도우리딘은 대사 활성화의 부재하에 균주 TA100 속에서 75 μ g/웰까지 및 microAMES 스크린 상태하에 대사 활성화의 부재하에 균주들 TA97a, TA98, TA100, TA1535 and WP2 uvrA pKM101에서 250 μ g/웰까지 돌연변이성이 아니었다.

[2124] 변형의 경우, N1-메틸슈도우리딘 침전물들은 대사 활성화의 존재 또는 부재하에서 어떠한 테스트 균주로도 관측되지 않았다. 세포독성(배경 론에서의 감소 및/또는 복귀돌연변이체들의 수)은 대사 활성화의 존재 또는 부재하에서 어떠한 균주에서도 관측되지 않았다. 대사 활성화의 존재 또는 부재하에서 어떠한 균주에서도 비히클 대조군과 비교하여 복귀돌연변이체 콜로니들의 수에 있어서 증가는 없었다. N1-메틸슈도우리딘은 당해 microAMES의 스크린 상태하에 대사 활성화의 존재 또는 부재하에서 균주들 TA97a, TA98, TA100, TA1535 및 WP2 uvrA pKM101에서 250 μ g/웰까지 돌연변이성이 아니었다.

[2125] 5 메틸 사이티딘, 슈도우리딘, 및 N1-메틸슈도우리딘의 당해 microAMES 시험에서의 비교는 이들이 일반적으로 돌연변이유발원성이 아님을 나타낸다. 그러나, 특히, 슈도우리딘과 N1-메틸슈도우리딘 사이의 차이에 주목하며, 여기서, 슈도우리딘은 하나의 세균 균주에서 세포독성 반응을 나타내지 않았고, 여기서, N1-메틸슈도우리딘은 그렇지 않았다. 이들 microAMES 시험들은 화합물 안전성의 전-임상 평가의 일부로서 통상적으로 사용되며 N1-메틸슈도우리딘과 슈도우리딘 사이의 중요한 차이를 강조한다.

[2126] **실시예 68. 뉴클레오사이드 트리포스페이트들(NTPs)의 독성**

[2127] 천연 및 변형된 뉴클레오사이드 트리포스페이트들(NTPs) 단독 또는 다른 염기들과의 조합의 세포독성을 사람 배아 신장 293(HEK293) 세포들 속에서 형질감염 시약의 부재하에 분석하였다. HEK293 세포들을 96-웰 플레이트들 위에 웰당 0.75 μ L의 RNAiMAX™ (제조원: 인비트로젠, 캘리포니아주 칼스바드 소재)를 갖는 웰당 30,000개 세포들의 밀도에서 100 μ L의 총 웰 용적으로 식종하였다. 표 12에 요약한 10 μ L의 NTPs를 10 μ L의 지질 희석액과 합하고 30분 동안 항온배양하여 복합체를 형성시킨 후 80 μ L의 HEK293 세포 현탁액을 NTP 복합체에 가하였다.

[2128] 천연 및 변형된 NTPs를 2.1 nM, 21 nM, 210 nM, 2.1 μ M, 21 μ M, 210 μ M 또는 2.1 mM의 농도에서 형질감염시켰다. 조합물 중 NTPs를 8.4 nM, 84 nM, 840 nM, 8.4 μ M, 84 μ M, 840 μ M 및 8.4 mM의 NTPs의 총 농도에서 형질감염시켰다. 대조군으로서 변형된 G-CSF mRNA(서열 1; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1; 완전히 변형된 5-메틸사이토신 및 슈도우리딘)를 HEK293 세포들 속에서 8.4 nM의 농도로 형질감염시켰다. NTP들 및 변형된 G-CSF mRNA의 세포독성을 HEK293 세포들의 첨가 후 4, 24, 48 및 72시간째에 CYTO TOX-GLO™ 검정[제조원: 프로메가(Promega), 위스콘신주 매디슨 소재)을 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 검정하였으며, 단 플레이트들을 와동(shaking)시키는 대신 세포들을 분해시키기 위해 피펫팅(pipetting)을 사용하여 검정하였다.

[2129] 표 13 및 14는 시험한 각각의 NTPs, NTP 조합들 및 대조군들에 대한 생존하는 세포들의 존재를 나타낸다. 처리되지 않은 세포들과 비교하여 개개의 NTPs를 사용하는 경우 독성은 관찰되지 않았다. 이들 데이터는, 5-메틸사이티딘, 슈도우리딘, 및 N1-메틸슈도우리딘을 포함하는 개개의 NTPs를 포유동물 세포들내로 도입시키는 것은 변형된 mRNA로서 도입되는 경우 유효 용량의 1,000,000배의 용량에서 독성이 아님을 입증한다.

표 13

개별 NTP의 세포독성

개별 NTP 세포독성								
	시간	용량						
		2.1 mM	210 uM	21 uM	2.1 uM	210 nM	21 nM	2.1 nM
아데닌	4 hr	90.03	85.97	91.20	90.23	90.36	93.21	93.48
	24 hr	88.42	87.31	86.86	86.81	86.94	87.19	86.44
	48 hr	93.71	90.55	89.94	89.80	89.17	91.13	92.12
	72 hr	97.49	94.81	93.83	94.58	92.22	93.88	95.74
사이토신	4 hr	90.51	89.88	91.41	90.49	88.95	93.11	93.34
	24 hr	86.92	86.33	85.72	86.70	86.12	86.16	85.78
	48 hr	94.23	87.81	87.28	87.73	85.36	88.95	88.99
	72 hr	97.15	92.34	92.22	88.93	88.22	91.80	94.22
구아닌	4 hr	90.96	90.14	91.36	90.60	90.00	92.84	93.33
	24 hr	86.37	85.86	85.93	86.13	86.35	85.50	85.41
	48 hr	93.83	87.05	88.18	87.89	85.31	87.92	89.57
	72 hr	97.04	91.41	92.39	92.30	92.19	92.55	93.72
우라실	4 hr	90.97	89.60	91.95	90.90	91.05	92.90	93.15
	24 hr	87.68	86.48	85.89	86.75	86.52	87.23	87.63
	48 hr	94.39	88.98	89.11	89.44	88.33	88.89	91.28
	72 hr	96.82	93.45	93.63	94.60	94.50	94.53	95.51
슈도우리딘	4 hr	92.09	92.37	91.35	92.02	92.84	91.96	92.26
	24 hr	88.38	86.68	86.05	86.75	85.91	87.59	87.31
	48 hr	88.62	87.79	87.73	87.66	87.82	89.03	91.99
	72 hr	96.87	89.82	94.23	93.54	92.37	94.26	94.25
5-메틸 사이토신	4 hr	92.01	91.54	91.16	91.31	92.31	91.40	92.23
	24 hr	87.97	85.76	84.72	85.14	84.71	86.37	86.35
	48 hr	87.29	85.94	85.74	86.18	86.44	87.10	88.18
	72 hr	96.08	88.10	92.26	90.92	89.97	92.10	91.93
N1-메틸 슈도우리딘	4 hr	92.45	91.43	91.48	90.41	92.15	91.44	91.89
	24 hr	88.92	86.48	85.17	85.72	85.89	86.85	87.79
	48 hr	89.84	86.02	87.52	85.85	87.38	86.72	87.81
	72 hr	96.80	93.03	93.83	92.25	92.40	92.84	92.98
치료되지 않음	4 hr	92.77	--	--	--	--	--	--
	24 hr	87.52	--	--	--	--	--	--
	48 hr	92.95	--	--	--	--	--	--
	72 hr	96.97	--	--	--	--	--	--

[2130]

표 14

NTP 조합 세포독성								
	시간	용량						
		8.4 mM	840 uM	84 uM	8.4 uM	840 nM	84 nM	8.4 nM
슈도우리딘/ 5-메틸사이토신/ 아데닌/ 구아닌	4 hr	92.27	92.04	91.47	90.86	90.87	91.10	91.50
	24 hr	88.51	86.90	86.43	88.15	88.46	86.28	87.51
	48 hr	88.30	87.36	88.58	88.13	87.39	88.72	90.55
N1-메틸 슈도우리딘/ 5-메틸사이토신/ 아데닌/ 구아닌	4 hr	92.31	91.71	91.36	91.15	91.30	90.86	91.38
	24 hr	88.19	87.07	86.46	87.70	88.13	85.30	87.21
	48 hr	87.17	86.53	87.51	85.85	84.69	87.73	86.79
G-CSF 변형된 mRNA	4 hr	na	na	na	na	na	na	92.63
	24 hr	na	na	na	na	na	na	87.53
	48 hr	na	na	na	na	na	na	91.70
	72 hr	na	na	na	na	na	na	96.36

[2131]

[2132] 실시예 69. BJ 섬유아세포들에서 선천적 면역 반응 연구

[2133] 사람 원시 포피 섬유아세포들(BJ 섬유아세포들)을 아메리칸 타입 컬처 컬렉션[American Type Culture

Collection(ATCC)(제품 번호 CRL-2522)에서 입수하여 10% 태아 송아지 혈청이 보충된 이글 최소 필수 배지 (Eagle's Minimum Essential Medium(ATCC, 제품 번호 30-2003)] 속에서 37°C로 5% CO₂하에 성장시켰다. BJ 섬유아세포들을 24-웰 플레이트 위에 웰당 300,000 세포들의 밀도로 0.5 ml의 배양 배지 속에서 식중하였다. 5-메틸사이토신 및 슈도우리딘(Gen1)으로 완전히 변형되거나 또는 캡 0, 캡 1을 갖거나 또는 캡을 갖지 않는 5-메틸사이토신 및 N1-메틸슈도우리딘(Gen2)으로 완전히 변형된 250 ng의 변형된 G-CSF mRNA(서열 1에 나타난 mRNA 서열 1; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1)를 리포펙 타민 2000(제조원: 인비트로젠, 제품 번호 11668-019)으로 제조업자의 프로토콜에 따라 형질감염시켰다. 폴리 I:C(PIC), 리포펙타민 2000(Lipo), 천연의 루시퍼라제 mRNA(서열 3에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레 오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1) 및 천연의 G-CSF mRNA를 또한 형질감염시켰 다. 세포들을 18시간 후 수거하고, 총 RNA를 분리하고 DNASE[®]을 RNeasy 마이크로 키트(제품 번호74004)를 사 용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 처리하였다. 100 ng의 총 RNA를 cDNA 합성에 고 용량(capacity) cDNA 역전 사 키트(제품 번호4368814)를 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 사용하였다. 이후에, cDNA를 선천적 면역 반응 유전자들의 발현에 대해 바이오라드(Biorad) CFX 384 장치 속에서 SybrGreen을 사용하는 정량적 실시간 PCR 의해 제조업자의 프로토콜에 따라 분석하였다. 표 15는 하우스-키퍼 유전자(house-keeping gene) HPRT(하 이포크산틴 포스포리보실트랜스퍼라제)에 대해 상대적인 선천적 면역 반응 전사체들의 발현 수준을 나타내며 HPRT에 대해 배-유도(fold-induction)로 나타낸다. 표에서, 표준 계량법들의 패널은 다음을 포함한다: RIG-I은 레티노산 유도성 유전자 1이고, IL6은 인터루킨-6이며, OAS-1은 올리도아데닐레이트 신타제 1이고, IFN β 는 인터 페론-베타이며, AIM2는 흑색종-2에서 부재하며, IFIT-1은 테트라트리코캡타이드 반복체들 1을 지닌 인터페론-유 도된 단백질이고, PKR는 단백질 키나제 R이며, TNF α 는 종양 괴사 인자 알파이고 IFN α 는 인터페론 알파이다.

표 15

선천적 면역 반응 전사 수준

제형	RIG-I	IL6	OAS-1	IFN β	AIM2	IFIT-1	PKR	TNF α	IFN α
천연 루시퍼라제	71.5	20.6	20.778	11.404	0.251	151.218	16.001	0.526	0.067
천연 G-CSF	73.3	47.1	19.359	13.615	0.264	142.011	11.667	1.185	0.153
PIC	30.0	2.8	8.628	1.523	0.100	71.914	10.326	0.264	0.063
G-CSF Gen1-UC	0.81	0.22	0.080	0.009	0.008	2.220	1.592	0.090	0.027
G-CSF Gen1-캡 0	0.54	0.26	0.042	0.005	0.008	1.314	1.568	0.088	0.038
G-CSF Gen1-캡 1	0.58	0.30	0.035	0.007	0.006	1.510	1.371	0.090	0.040
G-CSF Gen2-UC	0.21	0.20	0.002	0.007	0.007	0.603	0.969	0.129	0.005
G-CSF Gen2-캡 0	0.23	0.21	0.002	0.0014	0.007	0.648	1.547	0.121	0.035
G-CSF Gen2-캡 1	0.27	0.26	0.011	0.004	0.005	0.678	1.557	0.099	0.037
Lipo	0.27	0.53	0.001	0	0.007	0.954	1.536	0.158	0.064

[2134]

[2135]

실시예 70. 선천적 면역 반응의 시험관내 검출

[2136]

생체내 단백질 생산 및 생체내 사이토카인 반응에 있어서 mRNA의 상이한 화학적 변형의 중요성을 구별하기 위한 노력에서, 암컷 BALB/C 마우스들(n=5)에게 표 16에 나타난 바와 같이, 캡 1의 5'캡을 지닌 G-CSF mRNA(GCSF mRNA unmod)(서열 1에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다), 5-메틸사이토신 및 슈도우리딘(GCSF mRNA 5mc/pU)으로 완전히 변형된 G-CSF mRNA, 5'캡을 지니거나 (GCSF mRNA 5mc/N1pU) 또는 지니지 않은(GCSF mRNA 5mc/N1 pU no cap) 5-메틸사이토신 및 N1-메틸슈도우리딘으로 완전히 변형된 G-CSF mRNA, 또는 R848 또는 5% 슈크로즈의 대조군을 근육내 주사한다.

표 16

투약 차트

제형	경로	용량 (µg/마우스)	용량 (µl)
변형되지 않은(unmod) GCSF mRNA	I.M.	200	50
GCSF mRNA 5mc/pU	I.M.	200	50
GCSF mRNA 5mc/N1pU	I.M.	200	50
GCSF mRNA 5mc/N1pU no cap	I.M.	200	50
R848	I.M.	75	50
5% 슈크로스	I.M.	-	50
치료되지 않음	I.M.	-	-

[2137]

[2138]

혈액을 투여 후 8시간째에 수집한다. ELISA를 사용하여 G-CSF, TNF-알파 및 IFN-알파의 단백질 수준들을 ELISA로 측정한다. 투여후 8시간째에, 근육을 주사 부위로부터 수집하고 정량적인 실시간 폴리머라제 쇠 반응(QPCR)을 사용하여 근육내 RIG-I, PKR, AIM-2, IFIT-1, OAS-2, MDA-5, IFN-베타, TNF-알파, IL-6, G-CSF, CD45의 mRNA 수준을 측정한다.

[2139]

실시예 71. 선천적 면역 반응 연구의 생체내 검출

[2140]

암컷 BALB/C 마우스들(n=5)에게 표 17에 나타난 바와 같이, 캡 1의 5'캡을 지닌 G-CSF mRNA(GCSF mRNA unmod) (서열 1에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다), 5-메틸사이토신 및 슈도우리딘으로 완전히 변형된 G-CSF mRNA(GCSF mRNA 5mc/pU), 5'캡을 지닌(GCSF mRNA 5mc/N1pU) 또는 지니지 않은(GCSF mRNA 5mc/N1 pU no cap) 5-메틸사이토신 및 N1-메틸슈도우리딘으로 완전히 변형된 G-CSF mRNA, 또는 R848 또는 5% 슈크로스의 대조군을 근육내 주사하였다. 혈액을 투여 후 8시간째에 수집하고 ELISA를 사용하여 G-CSF 및 인터페론-알파(IFN-알파)의 단백질 수준들을 ELISA로 측정하여 표 17에 나타낸다.

[2141]

표 17에 나타난 바와 같이, 변형되지 않은, 5mc/pU, 및 5mc/N1pU 변형된 G-CSF mRNA는 마우스 혈청 속에서 사람 G-CSF 발현을 생성하였다. 캡핑되지 않은 5mc/N1pU 변형된 G-CSF mRNA는 혈청에서 사람 G-CSF 발현을 나타내지 않았으며, 이는 단백질 번역을 위한 5' 캡을 갖는 것의 중요성을 강조한다.

[2142]

예측한 바와 같이, 사람 G-CSF 단백질은 R848, 5% 슈크로스만에서, 및 처리되지 않은 그룹들에서 발현되지 않았다. 중요하게도, 유의적인 차이들이 혈청 속에서 마우스 IFN-알파에 의해 측정된 것으로서 사이토카인 생산에서 관찰되었다. 예측한 바와 같이, 변형되지 않은 G-CSF mRNA는, 생체내 풍부한 사이토카인 반응(R848 양성 대조군보다 훨씬 큼)을 입증하였다. 5mc/pU의 변형된 G-CSF mRNA는 생체내에서 낮지만 검출가능한 사이토카인 반응을 나타낸 반면, 5mc/N1pU 변형된 mRNA는 혈청속에서 검출가능한 IFN-알파를 나타내지 않았다(및 비히클 또는 처리되지 않은 동물들에서와 동일).

[2143]

또한, 5mc/N1pU의 변형된 mRNA의 반응은, 이것이 캡핑되어 있는지의 여부에 상관없이 동일하였다. 이들 생체내 결과들은 1) 변형되지 않은 mRNA가 풍부한 선천적 면역 반응을 생성하고, 2) 이는 5mc/pU의 변형의 100% 혼입들 통해 감소하지만, 소멸되지는 않고, 3) 5mc/N1pU 변형들의 혼입은 검출가능한 사이토카인 반응을 생성하지 않는다는 결론을 강화한다.

[2144]

최종적으로, 이들 주사들이 5% 슈크로스(이는 자체로서는 효과가 없다) 속에 존재한다는 점에서, 이들 결과는 이들 변형들의 면역자극 효능을 정확하게 반영하여야 한다.

[2145]

당해 데이터로부터 N1pU 변형된 분자들이 보다 많은 단백질을 생산하지만 동시에 IFN-알파 발현에 있어 효과는 거의 없거나 전혀 없음이 명백하다. 캡핑이 이러한 화학적 변형을 위한 단백질 생산에 요구됨은 또한 명백하다. 변형되지 않은 mRNA(PC=9)에 대한 PC 비와 비교한 것으로서 748의 단백질 : 사이토카인의 비는, 당해 화학적 변형이 IFN-알파와 관련된 효과들 또는 생물학적 영향들과 관련된 바와 같이 훨씬 우수함을 의미한다.

표 17

혈청 중의 사람 G-CSF 및 마우스 IFN-알파

제형	경로	용량 (μg /마우스)	용량 (μl)	G-CSF 단백질 (pg/ml)	IFN-알파 발현 (pg/ml)	PC 비
변형되지 않은 GCSF mRNA	I.M.	200	50	605.6	67.01	9
GCSF mRNA 5mc/pU	I.M.	200	50	356.5	8.87	40
GCSF mRNA5mc/N1pU	I.M.	200	50	748.1	0	748
GCSF mRNA5mc/N1pU no cap	I.M.	200	50	6.5	0	6.5
R848	I.M.	75	50	3.4	40.97	.08
5% 슈크로스	I.M.	-	50	0	1.49	0
치료되지 않음	I.M.	-	-	0	0	0

[2146]

[2147]

실시예 72: 리포플렉스들을 사용한 생체내 전달

[2148]

A. 사람 G-CSF 변형된 RNA

[2149]

변형된 사람 G-CSF mRNA(서열 1에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타나지 않는다; 5' 캡, Cap1) (5-메틸사이토신 및 슈도우리딘(G-CSF)으로 완전히 변형된 G-CSF 또는 5-메틸사이토신 및 N1-메틸-슈도우리딘(G-CSF-N1)으로 완전히 변형된 G-CSF)의 2개의 버전들 중 하나를 100 μg 함유하는 제형을 30 용적%의 RNAiMAXTM으로 리포플렉싱(lipoplexing)하고 150 μL 로 근육내(I.M.) 및 225 μL 로 정맥내(I.V.)로 C57/BL6 마우스들에게 전달하였다.

[2150]

이들 대조군 그룹들에게 100 μg 의 변형된 루시퍼라제 mRNA(서열 2에 나타난 IVT cDNA 서열; 서열 3에 나타난 mRNA 서열, 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타나지 않는다; 5' 캡, 캡 1, 각각의 사이토신에서 5-메틸사이토신으로 및 각각의 우리딘 부위에서 슈도우리딘 대체로 완전히 변형됨)를 근육내로(Luc-unsp I.M.) 또는 150 μg 의 변형된 루시퍼라제 mRNA를 정맥내로(Luc-unsp I.V.) 또는 150 μL 의 제형 완충액을 근육내로(완충액 I.M.) 투여하였다. 제형의 투여 후 6시간 후에 혈청을 수집하여 사람 G-CSF ELISA에 의해 마우스 혈청 속에서 사람 G-CSF 단백질의 양을 측정하고 결과들을 표 18에 나타낸다.

[2151]

이들 결과들은, 5-메틸사이토신/슈도우리딘 및 5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘 변형된 사람 G-CSF mRNA 둘다 리포플렉스 제형으로 I.V. 또는 I.M. 투여 경로로 전달되는 경우 혈청 속에서 특이적인 사람 G-CSF 단백질 발현을 생성할수 있음을 입증한다.

표 18

혈청 중의 사람 G-CSF(I.M. 및 I.V. 주사 경로)

제형	경로	G-CSF (pg/ml)
G-CSF	I.M.	85.6
G-CSF-N1	I.M.	40.1
G-CSF	I.V.	31.0
G-CSF-N1	I.V.	6.1
Luc-unsp	I.M.	0.0
Luc-unsp	I.V.	0.0
완충액	I.M.	0.0

[2152]

[2153]

B. 사람 G-CSF 변형된 RNA 비교

[2154]

5-메틸사이토신(5mc) 및 슈도우리딘(Ψ) 변형들을 지닌 30 용적%의 RNAiMAXTM으로 리포플렉싱된 변형된 사람 G-CSF mRNA(G-CSF-Gen1-리포플렉스), 염수 속에 5mc 및 Ψ 변형을 지닌 변형된 사람 G-CSF mRNA (G-CSF-Gen1-염수), 30 용적%의 RNAiMAXTM로 리포플렉싱된 N1-5-메틸사이토신(N1-5mc) 및 Ψ 변형을 지닌 변형된 사람 G-CSF mRNA(G-CSF-Gen2-리포플렉스), 염수 속에 N1-5mc 및 Ψ 변형을 지닌 변형된 사람 G-CSF mRNA(G-CSF-Gen2-염수), 30 용적%의 RNAiMAXTM으로 리포플렉싱된 5mc 및 Ψ 변형을 지닌 변형된 루시퍼라제(Luc-리포플렉스), 또는 염수 속에 5mc 및 Ψ 변형들로 완전히 변형된 루시퍼라제 mRNA(Luc-염수) 100 μg 을 함유하는 제형을 근육내(I.M.) 또는 피하(S.C.)로 전달하고 각각의 투여 방법에 대한 대조군 그룹에서 80 μL 용량의 제형 완충액(F. 완

충액)을 C57/BL6 마우스들에게 제공하였다. 주입 후 13시간 제에, 주사 부위로부터 혈청 및 조직을 각각의 마우스로부터 수집하고 G-CSF ELISA로 분석하여 사람 G-CSF 단백질 수준들을 비교하였다. 근육내 투여 및 피하 투여 결과들로부터 마우스 혈청중 사람 G-CSF 단백질의 결과들을 표 19에 나타낸다.

[2155] 이들 결과들은, 5-메틸사이토신/슈도우리딘 및 5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘 변형된 사람 G-CSF mRNA가 염수 제형 또는 리포플렉스 제형에 상관없이 I.M. 또는 S.C. 투여 경로로 전달되는 경우 혈청속에서 특이적인 사람 G-CSF 단백질 발현을 생성시킬 수 있음을 입증한다. 표 19에 나타낸 바와 같이, 5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘 변형된 사람 G-CSF mRNA는 5-메틸사이토신/슈도우리딘 변형된 사람 G-CSF mRNA와 비교하여 일반적으로 증가된 사람 G-CSF 단백질 생산을 입증한다.

표 19

마우스 혈청 중의 사람 G-CSF 단백질

제형	G-CSF (pg/ml)	
	I.M. 주사 경로	S.C. 주사 경로
G-CSF-Gen1-리포플렉스	13.988	42.855
GCSF-Gen1-염수	9.375	4.614
GCSF-Gen2-리포플렉스	75.572	32.107
GCSF-Gen2-염수	20.190	45.024
Luc 리포플렉스	0	3.754
Luc 염수	0.0748	0
F. 완충액	4.977	2.156

[2156]

[2157] **실시예 73. 다중-부위 투여: 근육내 및 피하**

[2158] Gen1 또는 Gen2로서 변형된[5-메틸사이토신(5mc) 및 슈도우리딘(Ψ) 변형, G-CSF-Gen1; 또는 N1-5-메틸사이토신(N1-5mc) 및 Ψ 변형, G-CSF-Gen2]으로서 변형되고 염수 속에 제형화된 사람 G-CSF 변형된 mRNA(서열 1에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타나지 않는다; 5'캡, 캡 1)을 마우스들에게 근육내(IM) 또는 피하(SC) 주사로 전달하였다. 1일에 4개 용량들 또는 2x 50 μ g(2개 부위들)을 3일 동안(24시간 간격) 수행하였다. 4번째 용량을 혈액 수집 및 CBC 분석 전 6시간째에 투여하였다. 대조군들은 루시퍼라제(서열 2에 나타낸 IVT의 cDNA 서열; 서열 3에 나타낸 mRNA 서열, 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타나지 않는다; 5'캡, 캡 1, 각각의 사이토신에서 5-메틸사이토신으로 완전히 변형되고 각각의 우리딘 부위에서 슈도우리딘 대체됨) 또는 제형 완충액(F.완충액)을 포함하였다. 마우스들을 제1의 mRNA 주사 후 72시간째에(마지막 mRNA 용량 후 6시간째)에 방혈시켜 호중구 수에 있어서 mRNA-암호화된 사람 G-CSF의 효과를 측정하였다. 투여 용법은 수득되는 호중구 수들(수천/ μ L)에서와 같이 표 20에 나타낸다. 표 20에서, 별표(*)들은 p<0.05에서의 통계적 유의성을 나타낸다.

[2159] 근육내 투여의 경우, 데이터는 Gen1 G-CSF mRNA의 경우 3일째에 호중구 수에 있어서 상기 대조군보다 4배 증가를 나타내고 Gen2 G-CSF mRNA의 경우 2배 증가를 나타낸다. 피하 투여의 경우, 당해 데이터는 호중구 수에 있어서 상기 대조군보다 2배 증가를 나타낸다.

[2160] 이들 데이터는, 5-메틸사이티딘/슈도우리딘 및 5-메틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘-변형된 mRNA 둘 다가 혈액 호중구 수들에 있어서 구체적인 증가들로 증명되는 바와 같이, 생물학적으로 활성일 수 있음을 입증한다.

표 20

투약 용법

그룹	치료	경로	N =	용량 (µg/마우스)	용량 용적 (µl/마우스)	투약 비히클	호중구 수천개/µl
1	G-CSF (Gen1)	I.M	5	2x50µg (4 회 용량들)	50	F. 완충액	840*
2	G-CSF (Gen1)	S.C	5	2x50µg (4 회 용량들)	50	F. 완충액	430
3	G-CSF (Gen2)	I.M	5	2x50µg (4 회 용량들)	50	F. 완충액	746*
4	G-CSF (Gen2)	S.C	5	2x50µg (4 회 용량들)	50	F. 완충액	683
5	Luc (Gen1)	I.M.	5	2x50µg (4 회 용량들)	50	F. 완충액	201
6	Luc (Gen1)	S.C.	5	2x50µg (4 회 용량들)	50	F. 완충액	307
7	Luc (Gen2)	I.M	5	2x50µg (4 회 용량들)	50	F. 완충액	336
8	Luc (Gen2)	S.C	5	2x50µg (4 회 용량들)	50	F. 완충액	357
9	F. 완충액	I.M	4	0 (4 회 용량들)	50	F. 완충액	245
10	F. 완충액	S.C.	4	0 (4 회 용량들)	50	F. 완충액	509
11	치료되지 않음	-	4			-	312

[2161]

[2162]

실시예 74. 정맥내 투여

[2163]

5-메틸사이토신(5mc) 및 슈도우리딘(Ψ) 변형(Gen1)으로 변형되거나; 또는 변형들을 갖지 않고 10% 리포플렉스(RNAIMAX™) 속에 제형화된 사람 G-CSF 변형된 mRNA(서열 1에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1)를 마우스들에게 50µg의 RNA의 용량 및 100 µL의 용적으로 정맥내(IV) 주사를 통해 0, 2 및 4일째에 전달하였다. 호중구들을 1, 5 및 8일째에 측정하였다. 대조군들은 비-특이적인 포유동물 RNA 또는 제형 완충액 만(F.완충액)을 포함하였다. 마우스들을 1, 5 및 8일째에 방혈시켜 mRNA-암호화된 사람 G-CSF가 호중구 수를 증가시키는 효과를 측정하였다. 용량 용법은 수득되는 호중구 수들에서와 같이 표 21에 나타낸다(수천/µL; K/µL).

[2164]

정맥내 투여의 경우, 당해 데이터는 G-CSF 변형된 mRNA를 사용하는 경우 5일째에 호중구 수에 있어서 상기 대조군의 4 내지 5배 증가를 나타내지만 변형되지 않은 G-CSF mRNA 또는 비-특이적인 대조군들의 경우에는 그렇지 않았다. 혈액 수는 최종 주사 후 4일째에 기본선으로 복귀하였다. 백혈구 집단들에 있어서 다른 변화들은 관찰되지 않았다.

[2165]

표 21에서, 별표(*)는 완충액과 비교하여 p<0.001에서 통계적인 유의성을 나타낸다.

[2166]

이들 데이터는, 리포플렉스-제형화된 5-메틸사이티딘/슈도우리딘-변형된 mRNA가 혈액 호중구 수들에 있어서의 구체적인 증가들로 입증되는 바와 같이, 정맥내 투여 경로를 통해 전달되는 경우, 생물학적으로 활성일 수 있음을 입증한다. 다른 세포 소세트들은 유의적으로 변형되지 않았다. 유사하게 투여된 변형되지 않은 G-CSF mRNA는 호중구 수들에 있어서 약리학적 효과를 나타내지 않았다.

표 21

투약 용법

그룹	치료	N	용량 용적 (μ l/마우스)	투약 비히클	호중구 K/ μ l
1	G-CSF (Gen1) 1 일간	5	100	10% 리포플렉스	2.91
2	G-CSF (Gen1) 5 일간	5	100	10% 리포플렉스	5.32*
3	G-CSF (Gen1) 8 일간	5	100	10% 리포플렉스	2.06
4	G-CSF (변형 없음) 1 일간	5	100	10% 리포플렉스	1.88
5	G-CSF (변형 없음) 5 일간	5	100	10% 리포플렉스	1.95
6	G-CSF (변형 없음) 8 일간	5	100	10% 리포플렉스	2.09
7	RNA 대조군 1 일간	5	100	10% 리포플렉스	2.90
8	RNA 대조군 5 일간	5	100	10% 리포플렉스	1.68
9	RNA 대조군 8 일간	4	100	10% 리포플렉스	1.72
10	F. 완충액 1 일간	4	100	10% 리포플렉스	2.51
11	F. 완충액 5 일간	4	100	10% 리포플렉스	1.31
12	F. 완충액 8 일간	4	100	10% 리포플렉스	1.92

[2167]

[2168]

실시예 75: 투여 경로들

[2169]

연구들을 수행하여 상이한 투여 경로들을 사용한 분할 용량을 시험하였다. 1회 시점에서 다중 피하 또는 근육 내 주사 부위들을 활용하는 연구들을 설계하고 수행하여 변형된 mRNA 약물 노출을 증가시키고 단백질 생산을 개선시키기 위한 방법들을 조사하였다. 발현된 단백질 생성물의 검출 외에, 단백질들의 생리학적 기능의 평가는 또한 시험한 동물로부터의 샘플들의 분석을 통해 측정하였다.

[2170]

놀랍게도, 변형된 mRNA의 분할 용량은 단일 단위 용량 또는 다중-용량 개략도들에 의해 생산된 것들보다도 더 큰 단백질 생산 및 표현형적 반응들을 생성함이 측정되었다.

[2171]

분할 용량 실험의 설계는 단지 완충액 속에서 투여되거나 30% 리포플렉스(RNAIMAX™)와 함께 제형화된 사람 에리트로포이에틴(EPO) 변형된 mRNA(서열 5에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타나지 않는다; 5' 캡, 캡 1) 또는 루시페라제 변형된 mRNA(서열 3에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타나지 않는다; 5' 캡, 캡 1)을 사용함을 포함하였다. 투여 비히클(완충액)은 150mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM Na⁺-포스페이트(1.4mM 일염기성 나트륨 포스페이트; 0.6mM 이염기성 나트륨 포스페이트), 및 0.5 mM EDTA, pH 6.5로 이루어진다. pH는 수산화나트륨을 사용하여 조절하였으며 최종 용액을 멸균기 여과하였다. mRNA는 각각의 사이토신에서 5메틸C(5meC)로 변형되고 각각의 우리딘 부위에서 슈도우리딘 대체되었다.

[2172]

그룹당 4마리의 마우스들에게 표 22에 요약한 투약 차트에 의해 근육내(I.M.), 정맥내(I.V.) 또는 피하내(S.C.) 투여하였다. 혈청을 13시간 후 모든 마우스들로부터 수집하고, 조직은 근육내 및 피하 그룹으로부터의 주사 부위에서 수집하였으며 비장, 간 및 신장들을 정맥내 그룹으로부터 수집하였다. 근육내 그룹 및 피하 그룹으로부터의 결과들을 표 23에 나타낸다.

표 22

투약 차트

그룹	치료	경로	변형된 mRNA 의 용량	총 용량	투약 비히클
1	리포플렉스-사람 EPO 변형된 mRNA	I.M.	4 x 100 µg + 30% 리포플렉스	4x70 µl	리포플렉스
2	리포플렉스-사람 EPO 변형된 mRNA	I.M.	4 x 100 µg	4x70 µl	완충액
3	리포플렉스-사람 EPO 변형된 mRNA	S.C.	4 x 100 µg + 30% 리포플렉스	4x70 µl	리포플렉스
4	리포플렉스-사람 EPO 변형된 mRNA	S.C.	4 x 100 µg	4x70 µl	완충액
5	리포플렉스-사람 EPO 변형된 mRNA	I.V.	200 µg + 30% 리포플렉스	140 µl	리포플렉스
6	리포플렉스-루시페라제 변형된 mRNA	I.M.	100 µg + 30% 리포플렉스	4x70 µl	리포플렉스
7	리포플렉스-루시페라제 변형된 mRNA	I.M.	100 µg	4x70 µl	완충액
8	리포플렉스-루시페라제 변형된 mRNA	S.C.	100 µg + 30% 리포플렉스	4x70 µl	리포플렉스
9	리포플렉스-루시페라제 변형된 mRNA	S.C.	100 µg	4x70 µl	완충액
10	리포플렉스-사람 EPO 변형된 mRNA	I.V.	200 µg + 30% 리포플렉스	140 µl	리포플렉스
11	제형 완충액	I.M.	4x 다중 투약	4x70 µl	완충액

[2173]

표 23

마우스 혈청 중의 사람 EPO 단백질 (I.M. 주사 경로)

제형	EPO (pg/ml)	
	I.M. 주사 경로	S.C. 주사 경로
Epo-리포플렉스	67.1	2.2
Luc-리포플렉스	0	0
Epo-염수	100.9	11.4
Luc-염수	0	0
제형 완충액	0	0

[2174]

[2175]

실시예 76: 다양한 지질 비들을 사용한 생체내 전달

[2176]

변형된 mRNA를 C57/BL6 마우스들에게 전달하여 다양한 지질 비들 및 수득되는 단백질 발현을 평가하였다. 10%, 30% 또는 50% RNAIMAX™로 리포플렉싱된 변형된 사람 EPO mRNA(서열 5에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5' 캡, 캡 1; 5-메틸사이토신 및 슈도우리딘으로 완전히 변형됨) 100µg, 10%, 30% 또는 50% RNAIMAX™ 또는 제형 완충액으로 리포플렉싱된 변형된 루시페라제 mRNA(서열 2에 나타낸 IVT cDNA 서열; 서열 3에 나타낸 mRNA 서열, 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5' 캡, 캡 1, 각각의 사이토신에서 5-메틸사이토신으로 완전히 변형되고 각각의 우리딘 부위에서 슈도우리딘 대체로 변형됨) 100µg의 제형을 마우스들에게 단일의 70 µl 용량으로 근육내 투여하였다. 주사 후 13시간째에 혈청을 수집하여 사람 EPO ELISA를 수행함으로써 각각의 마우스내에서 사람 EPO 단백질 수준을 측정하였다. 표 24에 나타낸, 사람 EPO ELISA의 결과들은, 근육내에서 발현된 변형된 사람 EPO가 RNAIMAX™의 상이한 퍼센트 각각에 대해 혈청내로 분비됨을 나타낸다.

표 24

마우스 혈청 중의 사람 EPO 단백질 (IM 주사 경로)

제형	EPO (pg/ml)
Epo + 10% RNAiMAX	11.4
Luc + 10% RNAiMAX	0
Epo + 30% RNAiMAX	27.1
Luc + 30% RNAiMAX	0
Epo + 50% RNAiMAX	19.7
Luc + 50% RNAiMAX	0
F. 완충액	0

[2177]

[2178]

실시예 77: 랫트들에서 변형된 RNA의 생체내 전달

[2179]

변형된 mRNA의 단백질 생산은 변형된 G-CSF mRNA 또는 변형된 인자 IX mRNA를 암컷 스프라그 다울리 랫트들 (Sprague Dawley rats)(n=6)에 전달함으로써 평가하였다. 랫트들에게, 5-메틸사이토신 및 슈도우리딘(G-CSF Gen1)으로 완전히 변형된 G-CSF mRNA(서열 1에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1), 5% 슈크로즈 속에서 동결건조된 형태로부터 재구성된 5-메틸사이토신 및 N1-메틸슈도우리딘(G-CSF Gen2)으로 완전히 변형된 G-CSF mRNA 또는 5-메틸사이토신 및 슈도우리딘(인자 IX Gen1)으로 완전히 변형된 인자 IX mRNA(서열 6에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1) 100 μL 중 400μg으로 주사하였다. 혈액을 주사 후 8시간째에 수집하여 혈청 중 G-CSF 단백질 수준을 ELISA로 측정하였다. 표 25는 8시간 후 혈청 속에서 G-CSF 단백질 수준들을 나타낸다.

[2180]

이들 결과들은, G-CSF Gen 1 및 G-CSF Gen 2 변형된 mRNA 둘 다가 단일이 근육내 주사 후 랫트내에서 사람 G-CSF 단백질을 생산할 수 있으며, 사람 G-CSF 단백질 생산이 Gen 2 화학물질을 사용하는 경우 Gen 1 화학물질보다 개선됨을 입증한다.

표 25

랫트 혈청 중의 G-CSF 단백질(I.M. 주사 경로)

제형	G-CSF 단백질 (pg/ml)
G-CSF Gen1	19.37
G-CSF Gen2	64.72
인자 IX Gen 1	2.25

[2181]

[2182]

실시예 78. 화학적 변형: 시험관내 연구들

[2183]

A. PBMC 속에서 시험관내 스크리닝

[2184]

표 26 및 27에 요약된 화학적 변형으로 완전히 변형된 500 ng의 G-CSF(서열 1에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1) mRNA를 0.4 μL의 리포펙타민 2000과 함께 3명의 정상 공여자들로부터의 말초 혈액 단핵 세포들(PBMC)내로 형질감염시켰다. LPS, R848, P(I)P(C) 및 mCherry(서열 4에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1; 5-메틸사이토신 및 슈도우리딘으로 완전히 변형됨)의 대조군 샘플들을 또한 분석하였다. 상청액을 수거하고 ELISA로 분석하여 G-CSF 단백질 발현, 및 사이토카인들 인터페론-알파(IFN-α 및 중앙 괴사 인자 알파(TNF-α)의 유도를 측정할 때까지 동결시켜 저장하였다. G-CSF의 단백질 발현은 표 26에 나타내며, IFN-α 및 TNF-α의 발현은 표 27에 나타낸다.

[2185]

표 26의 데이터는, 많은, 그러나 전부는 아닌, 화학적 변형들을 사용하여 PBMC 속에서 사람 G-CSF를 생산적으로 생산할 수 있음을 입증한다. 중요하게도, 100%의 N1-메틸슈도우리딘 치환은 최고 수준의 사람 G-CSF 생산(슈도우리딘 자체보다 거의 10배 더 높음)을 입증한다. N1-메틸슈도우리딘이 5-메틸사이티딘과 함께 사용되는 경우, 높은 수준의 사람 G-CSF 단백질이 또한 생산된다(이는, 또한 슈도우리딘이 5 메틸사이티딘과 함께 사용되는 경우보다 더 높다).

[2186]

PBMC 속에서 단백질 생산과 사이토카인 생산 사이의 역 관계를 고려할 때, 유사한 경향을 또한 표 27에서 알 수

있으며, 여기서, N1-메틸슈도우리딘으로의 100% 치환은 사이토카인 유도를 생성하지 않으며(대조군들만으로는 형질감염과 유사) 슈도우리딘은 배경보다 높은 검출가능한 사이토카인 생산을 나타낸다.

[2187] N6-메틸아데노신 및 α-티오사이티딘과 같은 다른 변형들도 사이토카인 자극을 증가시키는 것으로 여겨진다.

표 26

화학적 변형 및 G-CSF 단백질 발현

화학적 변형	G-CSF 단백질 발현 (pg/ml)		
	공여자 1	공여자 2	공여자 3
슈도우리딘	2477	1,909	1,498
5-메틸우리딘	318	359	345
N1-메틸슈도우리딘	21,495	16,550	12,441
2-티오우리딘	932	1,000	600
4-티오우리딘	5	391	218
5-메톡시우리딘	2,964	1,832	1,800
5-메틸사이토신 및 슈도우리딘 (1 st 세트)	2,632	1,955	1,373
5-메틸사이토신 및 N1-메틸슈도우리딘 (1 st 세트)	10,232	7,245	6,214
2'플루오로구아노신	59	186	177
2'플루오로우리딘	118	209	191
5-메틸사이토신 및 슈도우리딘 (2 nd 세트)	1,682	1,382	1,036
5-메틸사이토신 및 N1-메틸슈도우리딘 (2 nd 세트)	9,564	8,509	7,141
5-브로모우리딘	314	482	291
5-(2-카보메톡시비닐)우리딘	77	286	177
5-[3(1-E-프로페닐아미노)우리딘	541	491	550
α-티오사이티딘	105	264	245
5-메틸사이토신 및 슈도우리딘 (3 rd 세트)	1,595	1,432	955
N1-메틸아데노신	182	177	191
N6-메틸아데노신	100	168	200
5-메틸사이티딘	291	277	359
N4-아세틸사이티딘	50	136	36
5-포르밀사이티딘	18	205	23
5-메틸사이토신 및 슈도우리딘 (4 th 세트)	264	350	182
5-메틸사이토신 및 N1-메틸슈도우리딘 (4 th 세트)	9,505	6,927	5,405
LPS	1,209	786	636
mCherry	5	168	164
R848	709	732	636
P(I)P(C)	5	186	182

[2188]

표 27

화학적 변형 및 사이토카인 발현

화학적 변형	IFN- α 발현 (pg/ml)			TNF- α 발현 (pg/ml)		
	공여자 1	공여자 2	공여자 3	공여자 1	공여자 2	공여자 3
슈도우리딘	120	77	171	36	81	126
5-메틸우리딘	245	135	334	94	100	157
N1-메틸슈도우리딘	26	75	138	101	106	134
2-티오우리딘	100	108	154	133	133	141
4-티오우리딘	463	258	659	169	126	254
5-메톡시우리딘	0	64	133	39	74	111
5-메틸사이토신 및 슈도우리딘 (1 st 세트)	88	94	148	64	89	121
5-메틸사이토신 및 N1-메틸슈도우리딘 (1 st 세트)	0	60	136	54	79	126
2'플루오로구아노신	107	97	194	91	94	141
2'플루오로우리딘	158	103	178	164	121	156
5-메틸사이토신 및 슈도우리딘 (2 nd 세트)	133	92	167	99	111	150
5-메틸사이토신 및 N1-메틸슈도우리딘 (2 nd 세트)	0	66	140	54	97	149
5-브로모우리딘	95	86	181	87	106	157
5-(2-카보메톡시비닐)우리딘	0	61	130	40	81	116
5-[3(1-E-프로페닐아미노)우리딘	0	58	132	71	90	119
α -티오사이티딘	1,138	565	695	300	273	277
5-메틸사이토신 및 슈도우리딘 (3 rd 세트)	88	75	150	84	89	130
N1-메틸아데노신	322	255	377	256	157	294
N6-메틸아데노신	1,935	1,065	1,492	1,080	630	857
5-메틸사이티딘	643	359	529	176	136	193
N4-아세틸사이티딘	789	593	431	263	67	207
5-포르밀사이티딘	180	93	88	136	30	40
5-메틸사이토신 및 슈도우리딘 (4 th 세트)	131	28	18	53	24	29
5-메틸사이토신 및 N1-메틸슈도우리딘 (4 th 세트)	0	0	0	36	14	13
LPS	0	67	146	7,004	3,974	4,020
mCherry	100	75	143	67	100	133
R848	674	619	562	11,179	8,546	9,907
P(I)P(C)	470	117	362	249	177	197

[2189]

[2190] B. HeLa 세포들 속에서 시험관내 스크리닝

[2191]

형질감염 전날에, 20,000개의 HeLa 세포들(ATCC 제CCL-2호; 버지니아주 마나사스 소재)를 트립신-EDTA 용액[제조원: 라이프테크놀로지스(LifeTechnologies), 뉴욕주 그랜드 아이슬랜드 소재]으로 처리하여 수거하고 96-웰 세포 배양 플레이트[제조원: 코닝(Corning), 버지니아주 마나사스 소재] 중 웰 당 100 μ L의 총 용적의 EMEM 배지(10%의 FCS 및 1x 글루타막스가 보충됨)에 식종하였다. 세포들을 37°C에서 5% CO₂ 대기 속에서 밤새 성장시켰다. 다음날, 표 28에 기술된 화학적 변형을 지닌 루시페라제 변형된 83 ng의 RNA(서열 3에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1)을 10 μ L의 최종 용적의 OPTI-MEM(제조원: 라이프테크놀로지스, 뉴욕주 그랜드 아이슬랜드 소재) 속에서 희석시켰다. 리포펙타

민 2000(제조원: 라이프테크놀로지스, 뉴욕주 그랜드 아이슬랜드 소재)를 형질감염제로 사용하였으며 0.2 μl를 10 μl의 최종 용적의 OPTI-MEM으로 희석시켰다. 실온에서 5분간 항온배양 후, 용액들 둘다를 합하여 추가로 15분 동안 실온에서 항온배양하였다. 이후에, 20 μl의 합한 용액을 HeLa 세포들을 함유하는 100 μL의 세포 배양 배지에 가하고 실온에서 항온배양하였다.

[2192] 항온배양한 지 18 내지 22 시간 후, 루시퍼라제를 함유하는 세포들을 100 μl의 수동 분해 완충액(Passive Lysis buffer)(제조원: 프로메가, 위스콘신주 매디슨 소재)으로 제조업자의 지침에 따라 분해하였다. 분취량들의 분해물들을 백색의 불투명한 폴리스티렌 96-웰 플레이트들(제조원: 코닝, 버지니아주 마나사스 소재)에 이전시키고 100 μl의 완전 루시퍼라제 검정 용액(제조원: 프로메가, 위스콘신주 매디슨 소재)과 합하였다. 분해물 용적들을 웰 당 2 mio 이하의 상대적인 광 단위들(RLU)이 가장 강력한 신호 생산 샘플들에 대해 검출될 때까지 조절하거나 희석시키고 시험한 각각의 화학물질들에 대한 RLU들을 표 28에 나타낸다. 플레이트 판독기는 BioTek Synergy H1[제조원: 바이오테크(BioTek), 버몬트주 위누스키 소재]이었다. 시약이 들어있지 않은 플레이트들의 배경 신호는 웰당 약 200개의 상대적인 광 단위들이었다.

[2193] 이들 결과들은, 많은, 그러나 모두가 아닌, 화학적 변형들을 사용하여 HeLa 세포들 속에서 사람 G-CSF를 생산적으로 생산할 수 있음을 입증한다. 중요하게도, 100%의 N1-메틸슈도우리딘 치환은 최고 수준의 사람 G-CSF 생산을 입증한다.

표 28

루시퍼라제의 상대적인 광 단위

화학적 변형	RLU
N6-메틸아데노신 (m6a)	534
5-메틸사이티딘 (m5c)	138,428
N4-아세틸사이티딘 (ac4c)	235,412
5-포르밀사이티딘 (f5c)	436
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 A1	48,659
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 A1	190,924
슈도우리딘	655,632
1-메틸슈도우리딘 (m1u)	1,517,998
2-티오우리딘 (s2u)	3387
5-메톡시우리딘 (mo5u)	253,719
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 B1	317,744
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 B1	265,871
5-브로모-우리딘	43,276
5 (2 카보비닐) 우리딘	531
5 (3-IE 프로페닐 아미노) 우리딘	446
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 A2	295,824
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 A2	233,921
5-메틸우리딘	50,932
4-티오-사이티딘	26,358
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 B2	481,477
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 B2	271,989
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 A3	438,831
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 A3	277,499
변형되지 않은 루시퍼라제	234,802

[2194]

C. 토끼 망상적혈구 분해물들 속에서 시험관내 스크리닝

[2195]

[2196]

루시퍼라제 mRNA(서열 3에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5' 캡, 캡 1)를 표 29에 나열한 화학적 변형으로 변형시키고 멸균 뉴클레아제-유리된 물 속에서 10 μl 중 250 ng의 최종 양으로 희석시켰다. 희석된 루시퍼라제를 40 μl의 새로이 제조된 토끼 망상적혈구 분해물에게 가하고 시험관내 번역 반응을 표준 1.5mL의 폴리프로필렌 반응 튜브[제조원: 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific), 매사추세츠주 왈탐 소재] 속에서 30°C로 무수 가열 블록내에서 수행하였다. 번역 검정은 토끼 망상적혈구 분해물(뉴클레아제-처리된) 키트(제조원: 프로메가, 위스콘신주 매디슨 소재)를 사용하여 제조업자의 지침에 따라 수행하였다. 반응 완충액을 루이신 또는 메티오닌이 제거된 제공된 아미노산 스톡 용액(stock solution)들의 1-대-1 배합물로 보충하여 충분한 양의 아미노산들 둘다를 함유하는 반응 혼합물이 생성

되도록 함으로써 시험관내 번역이 효과적이도록 하였다.

[2197] 항온배양한 지 60분 후, 반응 튜브들을 빙상에 두어 반응을 중지시켰다. 루시퍼라제 변형된 RNA를 함유하는 시험관내 번역 반응물의 분취량들을 백색의 불투명한 폴리스티렌 96-웰 플레이트들(제조원: 코닝, 버지니아주 마나사스 소재)에 이전시키고 100 μ L의 완전 루시퍼라제 검정 용액(제조원: 프로메가, 위스콘신주 매디슨 소재)과 혼합하였다. 시험관내 번역 반응물들의 용적들은, 웰 당 2 mio 이하의 상대적인 광 단위들(RLU)이 가장 강력한 신호 생산 샘플들에 대해 검출될 때까지 조절하거나 희석시키고 시험한 각각의 화학물질에 대한 RLU들을 표 29에 나타낸다. 플레이트 판독기는 BioTek Synergy H1(제조원: 바이오테크, 버몬트주 위누스키 소재)이었다. 시약이 들어있지 않은 플레이트들의 배경 신호는 웰당 약 200개의 상대적인 광 단위들이었다.

[2198] 이들 세포-유리된 번역 결과들은 시스템들 둘 다에서 일반적으로 작업하거나 작업하지 않는 동일한 변형들을 지닌, HeLa 속에서의 단백질 생산 결과들과 매우 우수하게 관련된다. 한가지 주목할만한 예외는, 5-포르밀사이티딘 변형된 루시퍼라제 mRNA가 세포-유리된 번역 시스템에서 작업하지만 HeLa 세포-계 형질감염 시스템에서는 작업하지 않는다는 것이다. 2개 검정들 사이의 유사한 차이가 또한 5-포르밀사이티딘 변형된 G-CSF mRNA의 사용시 관찰되었다.

표 29

루시퍼라제의 상대적인 광 단위

화학적 변형	RLU
N6-메틸아데노신 (m6a)	398
5-메틸사이티딘 (m5c)	152,989
N4-아세틸사이티딘 (ac4c)	60,879
5-포르밀사이티딘 (f5c)	55,208
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 A1	349,398
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 A1	205,465
슈도우리딘	587,795
1-메틸슈도우리딘 (m1u)	589,758
2-티오우리딘 (s2u)	708
5-메톡시우리딘 (mo5u)	288,647
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 B1	454,662
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 B1	223,732
5-브로모-우리딘	221,879
5 (2 카보비닐) 우리딘	225
5 (3-IE 프로페닐 아미노) 우리딘	211
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 A2	558,779
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 A2	333,082
5-메틸우리딘	214,680
4-티오-사이티딘	123,878
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 B2	487,805
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 B2	154,096
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 A3	413,535
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 A3	292,954
변형되지 않은 루시퍼라제	225,986

[2199]

[2200] **실시예 79. 화학적 변형: 생체내 연구들**

[2201] **A. G-CSF 변형된 mRNA의 생체내 스크리닝**

[2202] Balb-C 마우스들(n=4)의 각각의 다리에 표 30에 요약한 화학적 변형들로 완전히 변형시키고 1x PBS 속에 제형화시킨, 변형된 G-CSF mRNA(서열 1에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1)를 근육내 주사한다. 루시퍼라제 변형된 mRNA(서열 3에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1; 슈도우리딘 및 5-메틸사이토신으로 완전히 변형됨)의 대조군 및 PBS의 대조군을 또한 시험한다. 8시간 후 혈청을 수집하여 G-CSF 단백질 수준들 사이토카인 수준들을 ELISA로 측정한다.

표 30

G-CSF

mRNA	화학적 변형들
G-CSF	슈도우리딘
G-CSF	5-메틸우리딘
G-CSF	2-티오우리딘
G-CSF	4-티오우리딘
G-CSF	5-메톡시우리딘
G-CSF	2'-플루오로우리딘
G-CSF	5-브로모우리딘
G-CSF	5-[3(1-E-프로페닐아미노)우리딘]
G-CSF	알파-티오-사이티딘
G-CSF	5-메틸사이티딘
G-CSF	N4-아세틸사이티딘
G-CSF	슈도우리딘 및 5-메틸사이토신
G-CSF	N1-메틸슈도우리딘 및 5-메틸사이토신
루시퍼라제	슈도우리딘 및 5-메틸사이토신
PBS	없음

[2203]

[2204]

A. 루시퍼라제 변형된 mRNA의 생체내 스크리닝

[2205]

Balb-C 마우스들(n=4)에게, 표 31에 요약된 화학적 변형들로 완전히 변형시키고 1xPBS 속에 제형화시킨 42 내지 103µg의 변형된 루시퍼라제 mRNA(서열 3에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5' 캡, 캡 1)를 함유하는 200 µl를 피하 주사하였다. PBS의 대조군을 또한 시험하였다. 변형된 루시퍼라제 mRNA의 용량들을 또한 표 31에 요약한다. 투여 후 8 시간째에 마우스들을 영상화하여 루시퍼라제 발현을 측정하였다. 영상화하기 20분 전에, 마우스들에게 D-루시페린 용액을 150 mg/kg으로 복강내 주사하였다. 동물들을 이후에 마취시키고 영상들을 IVIS Lumina II 영상 시스템(제조사: 퍼킨 엘머)으로 획득하였다. 생물발광은 전체 마우스의 총 플럭스(양성자들/초)로서 측정하였다.

[2206]

표 31에서 입증되는 바와 같이, 모든 루시퍼라제 mRNA 변형된 화합물질들은, 2'-플루오로우리딘을 제외하고는 생체내 활성을 입증하였다. 또한, 1-메틸슈도우리딘 변형된 mRNA는 루시퍼라제의 매우 높은 발현(슈도우리딘 함유 mRNA보다 5-배 더 높은 발현)을 입증하였다.

표 31

루시퍼라제 스크리닝

mRNA	화학적 변형들	mRNA의 투여량 (µg)	투여량 용적 (ml)	루시퍼라제 발현 (광자/초)
루시퍼라제	5-메틸사이티딘	83	0.72	1.94E+07
루시퍼라제	N4-아세틸사이티딘	76	0.72	1.11E07
루시퍼라제	슈도우리딘	95	1.20	1.36E+07
루시퍼라제	1-메틸슈도우리딘	103	0.72	7.40E+07
루시퍼라제	5-메톡시우리딘	95	1.22	3.32E+07
루시퍼라제	5-메틸우리딘	94	0.86	7.42E+06
루시퍼라제	5-브로모우리딘	89	1.49	3.75E+07
루시퍼라제	2'-플루오로구아노신	42	0.72	5.88E+05
루시퍼라제	2'-플루오로사이티딘	47	0.72	4.21E+05
루시퍼라제	2'-플루오로우리딘	59	0.72	3.47E+05
PBS	없음	-	0.72	3.16E+05

[2207]

[2208] 실시예 80. 조합 루시퍼라제 변형된 mRNA의 생체내 스크리닝

[2209] Balb-C 마우스들(n=4)에게 표 32에 요약된 화학적 변형들로 완전히 변형시키고, 1x PBS 속에 제형화시킨 100 μ g의 변형된 루시퍼라제 mRNA(서열 3에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5' 캡, 캡 1) 200 μ l를 피하 주사하였다. PBS의 대조군을 또한 시험하였다. 변형된 루시퍼라제 mRNA의 용량들은 또한 표 29에 요약한다. 투여한 지 8 시간 후, 마우스들을 영상화하여 루시퍼라제 발현을 측정하였다. 영상화 20분 전에, 마우스들에게 D-루시페린 용액을 150 mg/kg으로 복강내 주사하였다. 동물들을 이후에 마취시키고 영상들을 IVIS Lumina II 영상 시스템(제조사: 퍼킨 엘머)으로 획득하였다. 생물발광은 전체 마우스의 총 플럭스(양성자들/초)로서 측정하였다.

[2210] 표 32에서 입증되는 바와 같이, 모든 루시퍼라제 mRNA 변형된 화학물질들(조합된)은, 생체내 활성을 입증하였다. 또한, 변형된 mRNA(N4-아세틸사이티딘 또는 5 메틸사이티딘을 지닌) 속에서 N1-메틸슈도우리딘의 존재는, 슈도우리딘을 사용하여 시험한 동일한 조합물질들의 경우보다 더 높은 발현을 입증하였다. 이를 함께 고려할 때, 이들 데이터는, N1-메틸슈도우리딘 함유 루시퍼라제 mRNA가 단독으로 사용되는 경우(표 31) 또는 다른 변형된 뉴클레오타이드들과 함께 사용되는 경우(표 32)에 상관없이 개선된 단백질 발현을 생성함을 입증한다.

표 32

루시퍼라제 스크리닝 조합

mRNA	화학적 변형	루시퍼라제 발현 (광자/초)
루시퍼라제	N4-아세틸사이티딘/슈도우리딘	4.18E+06
루시퍼라제	N4-아세틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	2.88E+07
루시퍼라제	5-메틸사이티딘/5-메톡시우리딘	3.48E+07
루시퍼라제	5-메틸사이티딘/5-메틸우리딘	1.44E+07
루시퍼라제	5-메틸사이티딘/여기서 우리딘의 50%는 2-티오우리딘으로 대체된다	2.39E+06
루시퍼라제	5-메틸사이티딘/슈도우리딘	2.36E+07
루시퍼라제	5-메틸사이티딘/N1-메틸-슈도우리딘	4.15E+07
PBS	없음	3.59E+05

[2211]

[2212] 실시예 81. 변형된 RNA의 안정성

[2213] A. 변형된 RNA의 저장

[2214] 안정성 실험들을 수행하여 변형된 RNA의 통합성을 유지하기 위한 저장 조건들의 보다 우수한 이해를 수득하였다. 변형되지 않은 G-CSF mRNA(서열 1에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5' 캡, 캡 1), 5-메틸사이토신 및 슈도우리딘으로 완전히 변형된 G-CSF mRNA 및 0.75 용적%의 RNAiMAXTM으로 리포플렉싱된 슈도우리딘 및 5-메틸사이토신으로 완전히 변형된 G-CSF mRNA를 50 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C, 4 $^{\circ}$ C 또는 -20 $^{\circ}$ C에서 저장하였다. mRNA를 0시간, 2시간, 6시간, 24시간, 48시간, 5일 및 14일 동안 저장한 후, mRNA를 겔 전기영동에 의해 Bio-Rad EXPERIONTM 시스템을 사용하여 분석하였다. 변형된, 변형되지 않은 및 리포플렉싱된 G-CSF mRNA를 또한 RNASABLE[®][제조사: 바이오매트리카, 인코포레이션 (Biomatrica, Inc), 캘리포니아주 샌 디에고 소재] 속에 40 $^{\circ}$ C에서 또는 물 속에 -80 $^{\circ}$ C 또는 40 $^{\circ}$ C에서 35일 동안 저장한 후 겔 전기영동으로 분석하였다.

[2215] 안정화제의 부재하에서 모든 mRNA 샘플들은 4 $^{\circ}$ C 또는 -20 $^{\circ}$ C에서 저장 2주 후에 안정하였다. 리포플렉스를 지니거나 지니지 않은 변형된 G-CSF mRNA는 25 $^{\circ}$ C(5일 대 48시간까지 안정), 37 $^{\circ}$ C(24시간 대 6시간까지 안정) 및 50

℃(6시간 대 2시간까지 안정)에서 저장 시 변형되지 않은 G-CSF보다 더 안정하였다. 변형되지 않은 G-CSF mRNA, 리포플렉스를 지니거나 지니지 않은 변형된 G-CSF mRNA는 12회 동결/해동 주기들을 견뎠다.

[2216] 40℃에서 안정화기 속에 저장된 mRNA 샘플들은 35일 후 -80℃에서 물 속에 저장된 mRNA 샘플들과 유사한 안정성을 나타내었지만 40℃에서 물 속에 저장된 mRNA는 18일 후 큰 분해를 나타내었다.

[2217] **실시예 82. BJ 섬유아세포들에서 세포 생존능**

[2218] 사람 원시 포피 섬유아세포들(BJ 섬유아세포들)을 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC)(제품 번호 CRL-2522)으로부터 취득하여 10% 태아 송아지 혈청이 보충된 이글 최소 필수 배지(ATCC, 제품 번호 30-2003) 속에서 37℃로, 5% CO₂하에 성장시켰다. BJ 섬유아세포들을 24-웰 플레이트에 웰 당 130,000개 세포들의 밀도에서 0.5 ml의 배양 배지 속에 식중하였다. 5-메틸사이토신 및 슈도우리딘(Gen1)으로 완전히 변형시키거나 5-메틸사이토신 및 N1-메틸슈도우리딘(Gen2)으로 완전히 변형시킨 250ng의 변형된 G-CSF mRNA(서열 1에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타나지 않는다; 5'캡, 캡 1)을 리포펙타민 2000(제조원: 인비트로젠, 제품 번호 11668-019)을 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 형질감염시켰다. 리포펙타민 2000(LF2000) 및 변형되지 않은 G-CSF mRNA의 대조군 샘플들을 또한 형질감염시켰다. 변형된 mRNA 또는 대조군 샘플들을 4일 동안 매일 형질감염시켰다. 형질감염 후 세포들의 생존능을 제1의 형질감염 후 6 시간 및 24 시간째에(T1, 6 시간 또는 T1, 24 시간), 및 제2의 형질감염 후 24 시간째에(T2, 24 시간) 및 제4의 형질감염 후 24 시간째에(T4, 24 시간) 평가하였다.

[2219] 세포 생존능을 평가하기 위해, 배양 배지를 완전히 제거하고 세포들을 Ca²⁺/Mg²⁺[제조원: 기브코/라이프 테크놀로지스(Gibco/Life Technologies), 버지니아주 마나사스 소재]가 들어있지 않은 600 μl의 멸균 PBS로 1회 세척하여 느슨하게 부착된 세포들을 세정하여 제거하였다. PBS를 제거하고 버렸다. 각각의 웰 속의 세정된 섬유아세포들에게 220 μl의 희석된 CELL TITER GLO[®](제조원: 프로메가, 제품 번호 G7570) 스톱 용액(당해 CELL TITER GLO[®] 스톱 용액을 동량의 멸균 PBS로 1:1 추가 희석하였다)으로 처리하였다. 멸균 피펫 팁을 사용하여 플레이트에서 세포들을 긁어내어 분해 공정을 가속화시켰다.

[2220] 2개의 시간 간격들, T1, 24시간 및 T2, 24 시간에 대해, 대안의 프로토콜을 적용하였다. 세포들을 위에서 기술한 바와 같이, PBS로 세척하고, 후속적으로 트립신/EDTA 용액(기브코/라이프 테크놀로지스, 버지니아주 마나사스 소재)으로 트립신처리하였다. 세포들을 탈착시키고 트립신 억제제를 함유하는 500 μL의 배지 속에 수집하였다. 세포들을 1200 rcf에서 5분 동안 원심분리로 수거하였다. 세포 펠렛을 500 μl의 PBS속에 재현탁시켰다. 당해 세포 현탁액을 빙수에 유지시키고, 이의 100 μl를 100 μl의 희석되지 않은 세포 역가 Glo 용액과 혼합하였다.

[2221] 모든 CELL TITER GLO[®] 분해물들을 이후에 실온에서 20분 동안 항온배양하였다. 20 μl의 분해물들을 백색의 불투명한 폴리스티렌 96-웰 플레이트(제조원: 코닝, 버지니아주 마나사스 소재)로 이전시키고 100 μl의 희석된 CELL TITER GLO[®] 용액과 혼합하였다. 사용된 플레이트 판독기는 BioTek Synergy H1(제조원: 바이오테크, 버몬트주 위누스키 소재)이었으며, 절대값들을 100% 세포 생존능에 대한 처리되지 않은 BJ 섬유아세포들의 신호에 대해 표준화하였다. BJ 섬유아세포들에 대한 생존능 퍼센트는 표 33에 나타난다.

[2222] 중요하게도, 이들 실험들 모두는 어떠한 인터페론 또는 다른 사이토카인 억제제들의 부재하에 수행되므로 상이한 mRNA의 세포독성의 정밀한 척도를 나타낸다.

[2223] 이들 결과들은, 변형되지 않은 mRNA를 사용한 BJ 섬유아세포들의 반복된 형질감염이 제1 형질감염 후 24시간째(T1, 24 시간)로 일찍이 나타나는 세포 생존능의 손실을 초래하며 후속적인 시점들에서 지속적으로 명백해지고 더 현저해짐을 입증한다.

[2224] 제4의 매일 형질감염 후 24시간째(T4, 24 시간)에 명백해지는 5메틸사이티딘 및 슈도우리딘 변형된 mRNA 반복된 형질감염으로 생존능이 또한 손실된다. 당해 실험의 과정에 걸친 세포 생존능의 손실은 5메틸사이티딘 및 N1-메틸슈도우리딘 변형된 mRNA의 사용으로 관찰되지 않는다. 이들 결과들은, 5메틸사이티딘 및 N1-메틸슈도우리딘 함유 mRNA가 반복된 형질감염하에 분석되는 경우 개선된 세포 생존능을 가짐을 입증한다. 변형된 mRNA를 반복적으로 투여하기 위한 능력은 대부분의 치료학적 적용들에서 중요하며, 이와 같이, 세포 독성의 부재하에 이를 수행하는 이러한 능력 또한 중요하다. 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, 단일의 형질감염 후 반응 유전자들은 단백질 생산, 사이토카인 유도에 있어서 감소, 및 궁극적으로 세포 생존능의 손실을 초래할 수 있다.

이들 결과들은 변형되지 않은 mRNA 및 슈도우리딘-변형된 mRNA 둘다와 비교하여 이러한 측면에서 개선된 프로파일을 나타내는 N1-메틸슈도우리딘-함유 mRNA와 일치한다.

표 33

생존률 (%)

	T1, 6 시간	T1, 24 시간	T2, 24 시간	T4, 24 시간
Gen 1 G-CSF	81	108	91	65
Gen 2 G-CSF	99	102	128	87
변형되지 않은 G-CSF	101	72	74	42
LF2000	99	80	114	106
치료되지 않음	100	100	100	100

[2225]

[2226]

실시예 83. BJ 섬유모세포들에서 선천적 면역 반응

[2227]

사람 원시 포피 섬유모세포들(BJ 섬유모세포들)을 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC)(제품 번호 CRL-2522)에서 입수하여 10% 태아 송아지 혈청이 보충된 이글 최소 필수 배지(Eagle's Minimum Essential Medium(ATCC, 제품 번호 30-2003)) 속에서 37°C로 5% CO₂하에 성장시켰다. BJ 섬유아세포들을 24-웰 플레이트 위에 웰당 130,000 세포들의 밀도로 0.5 ml의 배양 배지 속에서 식종하였다. 5-메틸사이토신 및 슈도우리딘(Gen1)으로 완전히 변형되거나 또는 5-메틸사이토신 및 N1-메틸슈도우리딘(Gen2)으로 완전히 변형된, 250 ng의 변형된 G-CSF mRNA(서열 1에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1)를 리포펙타민 2000(제조원: 인비트로젠, 제품 번호 11668-019)을 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 형질감염시킨다. 리포펙타민 2000 및 변형되지 않은 G-CSF mRNA(천연의 G-CSF)의 대조군 샘플들을 또한 형질감염시킨다. 당해 세포들을 5회 연속일 동안 형질감염시킨다. 당해 형질감염 복합체들을 형질감염의 각각의 라운드 후 4시간째에 제거한다.

[2228]

배양물 상청액을 분비된 GCSF(R&D 시스템스, 제품 번호 DCS50), 종양 괴사 인자-알파(TNF-알파) 및 인터페론 알파(IFN-알파)에 대해 ELISA로 형질감염 후 매일 제조업자의 프로토콜들에 따라 검정한다. 당해 세포들을 CELL TITER GLO[®](프로메가, 제품 번호 G7570)을 사용하여 제1의 형질감염 라운드 후 6시간 및 18시간째에 및 이후 매 격일로 생존능에 대해 분석하였다. 수거된 세포들로부터 동일한 시간에, 전체 RNA를 분리하여 DNASE[®]로 RNAEASY 마이크로 키트(제품 번호 74004)를 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 처리하였다. 100 ng의 전체 RNA를 cDNA 합성을 위해 고 용량 cDNA 역전사 키트(제조원: 어플라이드 바이오시스템스, 제품 번호 4368814)를 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 사용한다. 이후에 cDNA를 제조업자의 프로토콜에 따라 바이오라드 CFX 384 장치 속에서 SybrGreen을 사용하는 정량적인 실시간 PCR에 의해 선천적 면역 반응 유전자들의 발현에 대해 분석한다.

[2229]

실시예 84. 야생형 T7 폴리머라제를 사용한 시험관내 전사

[2230]

루시퍼라제 mRNA(서열 3에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1) 및 G-CSF mRNA(서열 1에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1)을 앞서 기술한 바와 같이 야생형 T7 폴리머라제를 사용하여 표 34 내지 37에 나타낸 상이한 화합물질들 및 화학 조합들로 완전히 변형시켰다.

[2231]

면역 반응들의 수율을 분광광도계적 측정(OD260)으로 측정하고 루시퍼라제에 대한 수율은 표 34에 나타내며 G-CSF에 대한 수율은 표 36에 나타낸다.

[2232]

루시퍼라제 및 G-CSF 변형된 mRNA를 또한 효소적 캡핑 반응에 적용시키고 각각의 변형된 mRNA 캡핑 반응을 분광광도계적 측정(OD260)에 의해 수율에 대해 평가하였고 정확한 크기를 생물분석기를 사용하여 평가하였다. 루시퍼라제에 대한 캡핑 반응으로부터의 수율은 표 35에 나타내고 G-CSF에 대한 수율은 표 37에 나타낸다.

표 34

루시퍼라제에 대한 시험관내 전사 화학물질

화학적 변형	수율 (mg)
N6-메틸아데노신	0.99
5-메틸사이티딘	1.29
N4-아세틸사이티딘	1.0
5-포르밀사이티딘	0.55
슈도우리딘	2.0
N1-메틸슈도우리딘	1.43
2-티오우리딘	1.56
5-메톡시우리딘	2.35
5-메틸우리딘	1.01
α -티오-사이티딘	0.83
5-Br-우리딘 (5Bru)	1.96
5 (2 카보메톡시비닐) 우리딘	0.89
5 (3-IE 프로페닐 아미노) 우리딘	2.01
N4-아세틸사이티딘/슈도우리딘	1.34
N4-아세틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	1.26
5-메틸사이티딘/5-메톡시우리딘	1.38
5-메틸사이티딘/5-브로모우리딘	0.12
5-메틸사이티딘/5-메틸우리딘	2.97
5-메틸사이티딘/우리딘의 반은 2-티오우리딘으로 변형된다	1.59
5-메틸사이티딘/2-티오우리딘	0.90
5-메틸사이티딘/슈도우리딘	1.83
5-메틸사이티딘/N1 메틸 슈도우리딘	1.33

[2233]

표 35

캠핑 화학물질 및 루시퍼라제 변형된 mRNA 에 대한 수율

화학적 변형	수율 (mg)
5-메틸사이티딘	1.02
N4-아세틸사이티딘	0.93
5-포르밀사이티딘	0.55
슈도우리딘	2.07
N1-메틸슈도우리딘	1.27
2-티오우리딘	1.44
5-메톡시우리딘	2
5-메틸우리딘	0.8
α -티오-사이티딘	0.74
5-Br-우리딘 (5Bru)	1.29
5 (2 카보메톡시비닐) 우리딘	0.54
5 (3-IE 프로페닐 아미노) 우리딘	1.39
N4-아세틸사이티딘/슈도우리딘	0.99
N4-아세틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	1.08
5-메틸사이티딘/5-메톡시우리딘	1.13
5-메틸사이티딘/5-메틸우리딘	1.08
5-메틸사이티딘/우리딘들의 반은 2-티오우리딘으로 변형된다	1.2
5-메틸사이티딘/2-티오우리딘	1.27
5-메틸사이티딘/슈도우리딘	1.19
5-메틸사이티딘/N1 메틸 슈도우리딘	1.04

[2234]

표 36

시험관내 전사 화학물질 및 G-CSF 변형된 mRNA 에 대한 수율

화학적 변형	수율 (mg)
N6-메틸아데노신	1.57
5-메틸사이티딘	2.05
N4-아세틸사이티딘	3.13
5-포르밀사이티딘	1.41
슈도우리딘	4.1
N1-메틸슈도우리딘	3.24
2-티오우리딘	3.46
5-메톡시우리딘	2.57
5-메틸우리딘	4.27
4-티오우리딘	1.45
2'-F-우리딘	0.96
α-티오-사이티딘	2.29
2'-F-구아노신	0.6
N-1-메틸아데노신	0.63
5-Br-우리딘 (5Bru)	1.08
5 (2 카보메톡시비닐) 우리딘	1.8
5 (3-IE 프로페닐 아미노) 우리딘	2.09
N4-아세틸사이티딘/슈도우리딘	1.72
N4-아세틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	1.37
5-메틸사이티딘/5-메톡시우리딘	1.85
5-메틸사이티딘/5-메틸우리딘	1.56
5-메틸사이티딘/ 우리딘들의 반은 2-티오우리딘으로 변형됨	1.84
5-메틸사이티딘/2-티오우리딘	2.53
5-메틸사이티딘/슈도우리딘	0.63
N4-아세틸사이티딘/2-티오우리딘	1.3
N4-아세틸사이티딘/5-브로모우리딘	1.37
5-메틸사이티딘/N1 메틸 슈도우리딘	1.25
N4-아세틸사이티딘/슈도우리딘	2.24

[2235]

표 37

캡핑 화학물질 및 G-CSF 변형된 mRNA 에 대한 수율

화학적 변형	수율 (mg)
N6-메틸아데노신	1.04
5-메틸사이티딘	1.08
N4-아세틸사이티딘	2.73
5-포르밀사이티딘	0.95
슈도우리딘	3.88
N1-메틸슈도우리딘	2.58
2-티오우리딘	2.57
5-메톡시우리딘	2.05
5-메틸우리딘	3.56
4-티오우리딘	0.91
2'-F-우리딘	0.54
α-티오-사이티딘	1.79
2'-F-구아노신	0.14
5-Br-우리딘 (5Bru)	0.79
5 (2 카보메톡시비닐) 우리딘	1.28
5 (3-IE 프로페닐 아미노) 우리딘	1.78
N4-아세틸사이티딘/슈도우리딘	0.29
N4-아세틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	0.33
5-메틸사이티딘/5-메톡시우리딘	0.91
5-메틸사이티딘/5-메틸우리딘	0.61
5-메틸사이티딘/ 우리딘들의 반은 2-티오우리딘으로 변형됨	1.24
5-메틸사이티딘/슈도우리딘	1.08
N4-아세틸사이티딘/2-티오우리딘	1.34
N4-아세틸사이티딘/5-브로모우리딘	1.22
5-메틸사이티딘/N1 메틸 슈도우리딘	1.56

[2236]

[2237] **실시예 85. 돌연변이체 T7 폴리머라제를 사용한 시험관내 전사**

[2238] 루시퍼라제 mRNA(서열 3에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5' 캡, 캡 1) 및 G-CSF mRNA(서열 1에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5' 캡, Cap1)를 표 38 내지 41에 나열한 상이한 화학물질들 및 화학물질 조합들로 돌연변이체 T7 폴리머라제(Durascribe[®] T7 전사 키트(제품 번호 DS010925)(Epicentre[®] 위스콘신주 매디슨 소재)를 사용하여 완전히 변형시켰다.

[2239] 번역 반응들의 수율을 분광광도계적 측정(OD260)으로 측정하고 루시퍼라제에 대한 수율은 표 38에 나타내며 G-CSF에 대한 수율은 표 40에 나타낸다.

[2240] 루시퍼라제 및 G-CSF 변형된 mRNA를 또한 효소적 캡핑 반응에 적용시키고 각각의 변형된 mRNA 캡핑 반응을 분광광도계적 측정(OD260)에 의해 수율에 대해 평가하고 정확한 크기를 생물분석기로 평가하였다. 루시퍼라제에 대한 캡핑 반응으로부터의 수율은 표 39에 나타내고 G-CSF는 표 41에 나타낸다.

표 38

시험관내 전사 화학물질 및 루시퍼라제 변형된 mRNA 에 대한 수율

화학적 변형	수율 (µg)
2'플루오로사이토신	71.4
2'플루오로우리딘	57.5
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 A	26.4
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 A	73.3
N1-아세틸사이티딘/2-플루오로우리딘	202.2
5-메틸사이티딘/2-플루오로우리딘	131.9
2-플루오로사이토신/슈도우리딘	119.3
2-플루오로사이토신/N1-메틸슈도우리딘	107.0
2-플루오로사이토신/2-티오우리딘	34.7
2-플루오로사이토신/5-브로모우리딘	81.0
2-플루오로사이토신/2-플루오로우리딘	80.4
2-플루오로구아닌/5-메틸사이토신	61.2
2-플루오로구아닌/5-메틸사이토신/슈도우리딘	65.0
2-플루오로구아닌/5-메틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	41.2
2-플루오로구아닌/슈도우리딘	79.1
2-플루오로구아닌/N1-메틸슈도우리딘	74.6
5-메틸사이티딘/슈도우리딘, 시험 B	91.8
5-메틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘, 시험 B	72.4
2'플루오로아데노신	190.98

[2241]

표 39

캡핑 화학물질 및 루시퍼라제 변형된 mRNA 에 대한 수율

화학적 변형	수율 (µg)
2'플루오로사이토신	19.2
2'플루오로우리딘	16.7
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 A	7.0
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 A	21.5
N1-아세틸사이티딘/2-플루오로우리딘	47.5
5-메틸사이티딘/2-플루오로우리딘	53.2
2-플루오로사이토신/슈도우리딘	58.4
2-플루오로사이토신/N1-메틸슈도우리딘	26.2
2-플루오로사이토신/2-티오우리딘	12.9
2-플루오로사이토신/5-브로모우리딘	26.5
2-플루오로사이토신/2-플루오로우리딘	35.7
2-플루오로구아닌/5-메틸사이토신	24.7
2-플루오로구아닌/5-메틸사이토신/슈도우리딘	32.3
2-플루오로구아닌/5-메틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	31.3
2-플루오로구아닌/슈도우리딘	20.9
2-플루오로구아닌/N1-메틸슈도우리딘	29.8
5-메틸사이티딘/슈도우리딘, 시험 B	58.2
5-메틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘, 시험 B	44.4

[2242]

표 40

시험관내 전사 화학물질 및 G-CSF 변형된 mRNA 에 대한 수율

화학적 변형	수율 (μg)
2'플루오로사이토신	56.5
2'플루오로우리딘	79.4
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 A	21.2
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 A	77.1
N1-아세틸사이티딘/2-플루오로우리딘	168.6
5-메틸사이티딘/2-플루오로우리딘	134.7
2-플루오로사이토신/슈도우리딘	97.8
2-플루오로사이토신/N1-메틸슈도우리딘	103.1
2-플루오로사이토신/2-티오우리딘	58.8
2-플루오로사이토신/5-브로모우리딘	88.8
2-플루오로사이토신/2-플루오로우리딘	93.9
2-플루오로구아닌/5-메틸사이토신	97.3
2-플루오로구아닌/5-메틸사이토신/슈도우리딘	96.0
2-플루오로구아닌/5-메틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	82.0
2-플루오로구아닌/슈도우리딘	68.0
2-플루오로구아닌/N1-메틸슈도우리딘	59.3
5-메틸사이티딘/슈도우리딘, 시험 B	58.7
5-메틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘, 시험 B	78.0

[2243]

표 41

캡핑 화학물질 및 G-CSF 변형된 mRNA 에 대한 수율

화학적 변형	수율 (μg)
2'플루오로사이토신	16.9
2'플루오로우리딘	17.0
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 A	10.6
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 A	22.7
N1-아세틸사이티딘/2-플루오로우리딘	19.9
5-메틸사이티딘/2-플루오로우리딘	21.3
2-플루오로사이토신/슈도우리딘	65.2
2-플루오로사이토신/N1-메틸슈도우리딘	58.9
2-플루오로사이토신/2-티오우리딘	41.2
2-플루오로사이토신/5-브로모우리딘	35.8
2-플루오로사이토신/2-플루오로우리딘	36.7
2-플루오로구아닌/5-메틸사이토신	36.6
2-플루오로구아닌/5-메틸사이토신/슈도우리딘	37.3
2-플루오로구아닌/5-메틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	30.7
2-플루오로구아닌/슈도우리딘	29.0
2-플루오로구아닌/N1-메틸슈도우리딘	22.7
5-메틸사이티딘/슈도우리딘, 시험 B	60.4
5-메틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘, 시험 B	33.0

[2244]

[2245] 실시예 86. 2'0-메틸 및 2'플루오로 화합물들

[2246] 루시퍼라제 mRNA(서열 3에 나타난 mRNA 서열 3; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타나지 않는다; 5'캡, 캡 1)를 표 42에서의 화학물질들로 완전히 변형된 버전들로서 생산하고 돌연변이체 T7 폴리머라제(Durascribe® T7 전사 키트(제품번호 DS010925)(Epicentre® 위스콘신주 매디슨 소재)를 사용하여 전사하였다. 2'플루오로-함유 mRNA를 Durascribe T7을 사용하여 제조하였으나, 2'0메틸-함유 mRNA는 Durascribe T7을 사용하여 전사시킬 수 없었다.

[2247] 2'0메틸 변형된 mRNA의 혼입은 다른 돌연변이체 T7 폴리머라제들을 사용하여 가능하게 달성할 수 있었다[참조: Nat Biotechnol.(2004) 22:1155-1160; Nucleic Acids Res.(2002) 30:e138]. 달리, 2'OMe 변형들은 효소적 수단들을 사용하여 후-전사적으로 도입시킬 수 있었다.

- [2248] 당의 2' 그룹 위에서 변형들의 도입은 많은 잠재적인 장점들을 갖는다. 2'플루오로 치환들과 같이, 2'OMe 치환들은 뉴클레아제들에 대해 보호하며 또한 siRNA 및 안티-센스와 같은 다른 핵산들내로 혼입되는 경우 선천적 면역 인식을 무효화시키는 것으로 밝혀졌다(참조: 이의 전문이 혼입되어 있는, Crooke, ed. Antisense Drug Technology, 2nd edition; Boca Raton: CRC press).
- [2249] 2'플루오로-변형된 mRNA를 이후에 HeLa 세포들내로 형질감염시켜 세포 측면에서 단백질 생산을 평가하고 동일한 mRNA를 세포-유리된 토끼 망상적혈구 시스템 속에서 평가하였다. 변형되지 않은 루시퍼라제(천연 루시퍼라제) 대조군을 전사 실험들 둘다에 사용하였으며, 처리되지 않은 대조군 및 형질감염된 모형(mock)(리포펙타민 2000 단독)을 또한 HeLa 형질감염에 대해 분석하고 RNA가 없는 대조군을 토끼 망상적혈구들에 대해 분석하였다.
- [2250] HeLa 형질감염 실험들의 경우, 형질감염 전날에, 20,000개의 HeLa 세포들(ATCC 제CCL-2호; 버지니아주 마나사스 소재)를 트립신-EDTA 용액(라이프테크놀로지, 뉴욕주 그랜드 아이슬랜드 소재)으로 처리하여 수거하고 웰당 100 μ l의 총 용적의 EMEM 배지(10% FCS 및 1x 글루타믹스가 보충됨)를 96-웰 세포 배양 플레이트(제조원: 코닝, 버지니아주 마나사스 소재) 속에서 식중하였다. 세포들을 37°C에서 5% CO₂ 대기하에 밤새 성장시켰다. 다음날, 표 42에 기술된 화학적 변형을 지닌 83 ng의 2'플루오로-함유 루시퍼라제 변형된 RNA(서열 3에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1)을 10 μ l의 최종 용적의 OPTI-MEM(라이프테크놀로지, 뉴욕주 그랜드 아이슬랜드 소재) 속에서 희석시켰다. 리포펙타민 2000(라이프테크놀로지, 뉴욕주 그랜드 아이슬랜드 소재)을 형질감염 시약으로서 사용하고 0.2 μ l를 10 μ l의 최종 용적의 OPTI-MEM 속에서 희석시켰다. 실온에서 5분의 항온배양 후, 용액들 둘다를 합하여 추가로 15분 동안 실온에서 항온배양하였다. 이후에, 20 μ l의 합해진 용액을 HeLa 세포들을 함유하는 100 μ l의 세포 배양 배지에 가하고 실온에서 항온배양하였다. 18 내지 22 시간의 항온배양 후 루시퍼라제를 발현하는 세포들을 100 μ l의 수동적 분해 완충액(제조원: 프로메가, 위스콘신주 매디슨 소재)으로 제조업자의 지침에 따라 분해하였다. 분취량들의 분해물들을 백색의 불투명한 폴리스티렌 96-웰 플레이트들(제조원: 코닝, 버지니아주 마나사스 소재)에 이전시키고 100 μ l의 완전 루시퍼라제 검정 용액(제조원: 프로메가, 위스콘신주 매디슨 소재)과 합하였다. 분해물 용적들을 웰 당 2 μ l 이하의 상대적인 광 단위들(RLU)이 가장 강력한 신호 생산 샘플들에 대해 검출될 때까지 조절하거나 희석시키고 시험한 각각의 화학물질들에 대한 RLU들을 표 42에 나타낸다. 플레이트 판독기는 BioTek Synergy H1[제조원: 바이오테크(BioTek), 버몬트주 위누스키 소재)이었다. 시약이 들어있지 않은 플레이트들의 배경 신호는 웰당 약 200개의 상대적인 광 단위들이었다.
- [2251] 토끼 망상적혈구 분해물 검정을 위해, 2'-플루오로-함유 루시퍼라제 mRNA를 멸균 뉴클레아제-유리된 물 속에서 10 μ l중 250 ng의 최종 양으로 희석시키고 40 μ l의 새로이 제조된 토끼 망상적혈구 분해물에 가하고 시험관내 번역 반응을 표준 1.5mL의 폴리프로필렌 반응 튜브(제조원: 씨모피서 사이언티픽, 매사추세츠주 왈탐 소재) 속에서 30°C로 무수 가열 블록 속에서 수행하였다. 번역 검정은 토끼 망상적혈구 분해물(뉴클레아제-처리된) 키트(제조원: 프로메가, 위스콘신주 매디슨 소재)를 사용하여 제조업자의 지침에 따라 수행하였다. 반응 완충액을 루이신 또는 메티오닌이 제거된 제공된 아미노산 스톱 용액들의 1-대-1 배합물로 보충하여 충분한 양의 아미노산들 둘 다를 함유하는 반응 혼합물이 생성되도록 함으로써 시험관내 번역이 효과적이도록 하였다. 배양한 지 60분 후에, 반응물을 빙상에 위치시켜서 반응을 중지시켰다.
- [2252] 루시퍼라제 변형된 RNA를 함유하는 시험관내 번역 반응물의 분취량들을 백색의 불투명한 폴리스티렌 96-웰 플레이트들(제조원: 코닝, 버지니아주 마나사스 소재)에 이전시키고 100 μ l의 완전한 루시퍼라제 검정 용액(제조원: 프로메가, 위스콘신주 매디슨 소재)과 합하였다. 시험관내 번역 반응물들의 용적들은, 웰 당 2 μ l 이하의 상대적인 광 단위들(RLU)이 가장 강력한 신호 생산 샘플들에 대해 검출될 때까지 조절하거나 희석시키고 시험한 각각의 화학물질들에 대한 RLU들을 표 43에 나타낸다. 플레이트 판독기는 BioTek Synergy H1(제조원: 바이오테크, 버몬트주 위누스키 소재)이었다. 시약이 들어있지 않은 플레이트들의 배경 신호는 웰당 약 160개의 상대적인 광 단위들이었다.
- [2253] 표 42 및 43에서 알 수 있는 바와 같이, 다수의 2'플루오로-함유 화합물들은 시험관내에서 활성이며 루시퍼라제 단백질을 생산한다.

표 42

HeLa 세포

화학적 변형	농도 (µg/ml)	용적 (µl)	수율 (µg)	RLU
2'플루오로아데노신	381.96	500	190.98	388.5
2'플루오로사이토신	654.56	500	327.28	2420
2'플루오로구아닌	541,795	500	270.90	11,705.5
2'플루오로우리딘	944.005	500	472.00	6767.5
천연 루시페라제	N/A	N/A	N/A	133,853.5
모형	N/A	N/A	N/A	340
치료되지 않음	N/A	N/A	N/A	238

[2254]

표 43

토끼 망상적혈구

화학적 변형	RLU
2'플루오로아데노신	162
2'플루오로사이토신	208
2'플루오로구아닌	371,509
2'플루오로우리딘	258
천연 루시페라제	2,159,968
RNA 없음	156

[2255]

[2256] 실시예 87. 변형들의 조합을 사용한 HeLa 세포들 속의 루시페라제

[2257] 다른 변형과 함께 2'플루오로-변형된 mRNA를 사용하는 것을 평가하기 위하여, 일련의 mRNA를 야생형 T7 폴리머라제(플루오로-비함유 화합물들) 또는 돌연변이체 T7 폴리머라제들(플루오로-함유 화합물들)을 실시예 86에 기술된 바와 같이 전사시켰다. 모든 변형된 mRNA를 시험관내 형질감염으로 HeLa 세포들내에서 시험하였다.

[2258] 형질감염 전날에, 20,000개의 HeLa 세포들(ATCC 제CCL-2호; 버지니아주 마나사스 소재)를 트립신-EDTA 용액[제조원: 라이프테크놀로지스(LifeTechnologies), 뉴욕주 그랜드 아이슬랜드 소재]으로 처리하여 수거하고 96-웰 세포 배양 플레이트(제조원: 코닝, 버지니아주 마나사스 소재) 중 웰 당 100 µl의 총 용적의 EMEM 배지(10%의 FCS 및 1x 글루타믹스가 보충됨)에 식중하였다. 세포들을 37°C에서 5% CO₂ 대기 속에서 밤새 성장시켰다. 다음날, 표 44에 기술된 화학적 변형을 지닌 83 ng의 루시페라제 변형된 RNA(서열 3에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5' 캡, 캡 1)을 10 µl의 최종 용적의 OPTI-MEM(제조원: 라이프테크놀로지스, 뉴욕주 그랜드 아이슬랜드 소재) 속에서 희석시켰다. 리포펙타민 2000(제조원: 라이프테크놀로지스, 뉴욕주 그랜드 아이슬랜드 소재)를 형질감염제로 사용하였으며 0.2 µl를 10 µl의 최종 용적의 OPTI-MEM으로 희석시켰다. 실온에서 5분간 항온배양한 후, 용액들 둘다를 합하여 추가로 15분 동안 실온에서 항온배양하였다. 이후에, 20 µl의 합한 용액을 HeLa 세포들을 함유하는 100 µl의 세포 배양 배지에 가하고 실온에서 항온배양하였다.

[2259] 항온배양한 지 18 내지 22 시간 후, 루시페라제를 발현하는 세포들을 100 µl의 수동 분해 완충액(제조원: 프로메가, 위스콘신주 매디슨 소재)으로 제조업자의 지침에 따라 분해하였다. 분취량들의 분해물들을 백색의 불투명한 폴리스티렌 96-웰 플레이트들(제조원: 코닝, 버지니아주 마나사스 소재)에 이전시키고 100 µl의 완전한 루시페라제 검정 용액(제조원: 프로메가, 위스콘신주 매디슨 소재)과 합하였다. 분해물 용적들을 웰 당 2 µl 이하의 상대적인 광 단위들(RLU)가 가장 강력한 신호 생산 샘플들에 대해 검출될 때까지 조절하거나 희석시키고 시험한 각각의 화학물질들에 대한 RLU들을 표 44에 나타낸다. 플레이트 판독기는 BioTek Synergy H1(제조원: 바이오테크, 버몬트주 위누스키 소재)이었다. 시약이 들어있지 않은 플레이트들의 배경 신호는 웰당 약 200개의 상대적인 광 단위들이었다.

[2260] 표 44에서 입증되는 바와 같이, 모든 플루오로-비함유 화합물들 및 2'플루오로 변형들을 함유하는 많은 조합물들을 포함하는, 변형들의 대부분의 조합들은 기능성 루시페라제 단백질을 생산한 mRNA를 생성하였다.

표 44

루시퍼라제

화학적 변형	RLU
N4-아세틸사이티딘/슈도우리딘	113,796
N4-아세틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	316,326
5-메틸사이티딘/5-메톡시우리딘	24,948
5-메틸사이티딘/5-메틸우리딘	43,675
5-메틸사이티딘/우리딘들의 반은 50% 2-티오우리딘으로 변형됨	41,601
5-메틸사이티딘/2-티오우리딘	1,102
5-메틸사이티딘/슈도우리딘	51,035
5-메틸사이티딘/N1 메틸 슈도우리딘	152,151
N4-아세틸사이티딘/2'플루오로우리딘 트리포스페이트	288
5-메틸사이티딘/2'플루오로우리딘 트리포스페이트	269
2'플루오로사이토신 트리포스페이트 /슈도우리딘	260
2'플루오로사이토신 트리포스페이트 /N1-메틸슈도우리딘	412
2'플루오로사이토신 트리포스페이트/2-티오우리딘	427
2'플루오로사이토신 트리포스페이트/5-브로모우리딘	253
2'플루오로사이토신 트리포스페이트 /2'플루오로우리딘 트리포스페이트	184
2'플루오로구아닌 트리포스페이트/5-메틸사이티딘	321
2'플루오로구아닌 트리포스페이트/5-메틸사이티딘/슈도우리딘	207
2'플루오로구아닌 /5-메틸사이티딘/N1 메틸슈도우리딘	235
2'플루오로구아닌/슈도우리딘	218
2'플루오로구아닌/N1-메틸슈도우리딘	247
5-메틸사이티딘/슈도우리딘, 시험 A	13,833
5-메틸사이티딘/N-메틸슈도우리딘, 시험 A	598
2'플루오로사이토신 트리포스페이트	201
2'플루오로우리딘 트리포스페이트	305
5-메틸사이티딘/슈도우리딘, 시험 B	115,401
5-메틸사이티딘/N-메틸슈도우리딘, 시험 B	21,034
천연 루시퍼라제	30,801
치료되지 않음	344
모형	262

[2261]

[2262] 실시예 88. G-CSF 시험관내 전사

[2263] 제2의 개방 관독 프레임과 관련하여 본 발명자들의 상이한 화학적 변형들 모두의 활성을 평가하기 위하여, 본 발명자들은 사람 G-CSF mRNA를 지닌 루시퍼라제 mRNA를 사용하여 실험들을 미리 반복하였다. G-CSF mRNA(서열 1에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5' 캡, 캡 1)를 표 45 및 46에 나타낸 화학물질들로 야생형 T7 폴리머라제(모든 플루오로-비함유 화합물들의 경우) 또는 돌연변이체 T7 폴리머라제(모든 플루오로-함유 화합물들의 경우)를 사용하여 완전히 변형시켰다. 돌연변이체 T7 폴리머라제는 상업적으로 수득하였다(Durascribe® T7 전사 키트(제품 번호 DS010925)(Epicentre®, 위스콘신주 매디슨 소재),

[2264] 표 45 및 46에서 변형된 RNA를 HeLa 세포들 속에서 시험관내 형질감염시키거나 토끼 망상적혈구들(250ng의 변형된 mRNA)에 나타낸 바와 같이 가하였다. 치료되지 않은, 대조군, 형질감염된 모형(형질감염 시약 단독), 5-메틸사이토신 및 N1-메틸슈도우리딘으로 완전히 변형된 G-CSF, 또는 5-메틸사이토신 및 N1-메틸슈도우리딘으로 완전히 변형된 루시퍼라제 대조군(서열 3에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5' 캡, 캡 1)을 또한 분석하였다. G-CSF 단백질의 발현은 ELISA로 측정하였으며, 값들은 표 45 및 46에 나타낸다. 표 45에서 "NT"는 시험되지 않았음을 의미한다.

[2265] 표 45에 나타낸 바와 같이, 많은, 그러나 전부는 아닌, 화학적 변형들은 사람 G-CSF 단백질을 생산을 생성하였다. 세포-계 및 세포-유리된 번역 시스템들로부터의 이들 결과들은 시스템들 둘 다에서 일반적으로 작업하거나 작업하지 않는 동일한 변형들과 매우 우수하게 연관된다. 한 가지 주목할만한 예외는 세포-유리된 번역 시스템 속에서 작업하지만 HeLa 세포-계 형질감염 시스템에서는 작업하지 않는 5-포르밀사이티딘 변형된 G-CSF mRNA이다. 2개의 검정들 사이의 유사한 차이가 또한 5-포르밀사이티딘 변형된 루시퍼라제 mRNA에서 관찰되었다.

[2266] 표 46에서 입증되는 바와 같이, 많은, 그러나 모두가 아닌, G-CSF mRNA 변형된 화학물질들(함께 사용되는 경우)는 생체내 활성을 입증하였다. 또한, 변형된 mRNA(N4-아세틸사이티딘 또는 5 메틸사이티딘으로)내 N1-메틸

슈도우리딘의 존재는, 슈도우리딘을 사용하여 시험된 동일한 조합들의 경우보다 더 높은 발현을 입증하였다. 함께 고려하는 경우, 이들 데이터는, N1-메틸슈도우리딘 함유 G-CSF mRNA가 시험관내에서 개선된 단백질 발현을 생성함을 입증한다.

표 45

G-CSF 발현

화학적 변형	G-CSF 단백질 (pg/ml) HeLa 세포	G-CSF 단백질 (pg/ml) 토끼망상적혈구 세포
슈도우리딘	1,150,909	147,875
5-메틸우리딘	347,045	147,250
2-티오우리딘	417,273	18,375
N1-메틸슈도우리딘	NT	230,000
4-티오우리딘	107,273	52,375
5-메톡시우리딘	1,715,909	201,750
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 A	609,545	119,750
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 A	1,534,318	110,500
2'-플루오로-구아노신	11,818	0
2'-플루오로-우리딘	60,455	0
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 B	358,182	57,875
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 B	1,568,636	76,750
5-브로모-우리딘	186,591	72,000
5-(2 카보메톡시비닐) 우리딘	1,364	0
5-[3(1-E-프로페닐아미노) 우리딘	27,955	32,625
4-티오-사이티딘	120,455	42,625
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 C	882,500	49,250
N1-메틸-아데노신	4,773	0
N6-메틸-아데노신	1,591	0
5-메틸-사이티딘	646,591	79,375
N4-아세틸사이티딘	39,545	8,000
5-포르밀-사이티딘	0	24,000
5-메틸사이토신/슈도우리딘, 시험 D	87,045	47,750
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 시험 D	1,168,864	97,125
모형	909	682
치료되지 않음	0	0
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 대조군	1,106,591	NT
루시페라제 대조군	NT	0

[2267]

표 46

HeLa 세포 중의 화학물질의 조합

화학적 변형	G-CSF 단백질 (pg/ml) HeLa 세포들
N4-아세틸사이티딘/슈도우리딘	537,273
N4-아세틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	1,091,818
5-메틸사이티딘/5-메톡시우리딘	516,136
5-메틸사이티딘/5-브로모우리딘	48,864
5-메틸사이티딘/5-메틸우리딘	207,500
5-메틸사이티딘/2-티오우리딘	33,409
N4-아세틸사이티딘/5-브로모우리딘	211,591
N4-아세틸사이티딘/2-티오우리딘	46,136
5-메틸사이토신/슈도우리딘	301,364
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘	1,017,727
N4-아세틸사이티딘/2'플루오로우리딘 트리포스페이트	62,273
5-메틸사이티딘/2'플루오로우리딘 트리포스페이트	49,318
2'플루오로사이토신 트리포스페이트/슈도우리딘	7,955
2'플루오로사이토신 트리포스페이트/N1-메틸슈도우리딘	1,364
2'플루오로사이토신 트리포스페이트/2-티오우리딘	0
2'플루오로사이토신 트리포스페이트/5-브로모우리딘	1,818
2'플루오로사이토신 트리포스페이트/2'플루오로우리딘 트리포스페이트	909
2'플루오로구아닌 트리포스페이트/5-메틸사이티딘	0
2'플루오로구아닌 트리포스페이트/5-메틸사이티딘/슈도우리딘	0
2'플루오로구아닌 트리포스페이트 /5-메틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	1,818
2'플루오로구아닌 트리포스페이트/슈도우리딘	1,136
2'플루오로구아닌 트리포스페이트/2'플루오로사이토신 트리포스페이트/N1-메틸슈도우리딘	0
5-메틸사이티딘/슈도우리딘	617,727
5-메틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	747,045
5-메틸사이티딘/슈도우리딘	475,455
5-메틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	689,091
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 대조군 1	848,409
5-메틸사이토신/N1-메틸슈도우리딘, 대조군 2	581,818
모형	682
처리되지 않음	0
루시퍼라제 2'플루오로사이토신 트리포스페이트	0
루시퍼라제 2'플루오로우리딘 트리포스페이트	0

[2268]

[2269] 실시예 89. 화학물질들의 스크리닝

[2270] 하기 나열한 표들(표 47 내지 49)은, 앞서의 실시예들에 나타난 상이한 화합물들을 사용한 시험관내 및 생체내 스크리닝 데이터 중 많은 것을 요약한다. 우수한 상관관계가 세포-계와 세포-유리된 번역 검정들 사이에 존재한다. 동일한 화학물질 치환들은, 루시퍼라제 또는 G-CSF mRNA와 관련하여 시험하는 것에 상관없이 우수한 일치를 일반적으로 나타낸다. 마지막으로, N1-메틸슈도우리딘 함유 mRNA는 시험관내 및 생체내에서 거의 검출가능하지 않거나 검출불가능한 사이토카인 자극을 사용한 단백질 발현의 매우 높은 수준을 나타내며 시험관내 및 생체내 둘 다에서 슈도우리딘을 함유하는 mRNA보다 더 우수하다.

[2271] 루시퍼라제 mRNA(서열 3에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1) 및 G-CSF mRNA(서열 1에 나타난 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1)을 표 47 및 48에 기술된 천연적으로 및 비-천연적으로 존재하는 화학물질들 또는 표 48에 기술된 조합 화학물질들로 변형시키고 본원에 기술된 방법들을 사용하여 시험하였다.

[2272] 표 47 및 48에서, "*"는 돌연변이체 T7 폴리머라제(제조원: Durascribe® T7 전사 키트(제품 번호 DS010925)(Epicentre®, 위스콘신주 매디슨 소재)를 사용한 시험관내 전사 반응을 말하며; "**"은 돌연변이체 T7 폴리머라제(Durascribe® T7 전사 키트(Cat. No. DS010925)(Epicentre®, 위스콘신주 매디슨 소재)을 사용한 제2의 결과인 시험관내 전사 반응을 말하고; "****"은 세포 유리된 번역물들(토끼 망상적혈구 분해물들)에서 관찰된

생산을 말하며; HeLa의 단백질 생산은 "+", "+/-" 및 "-"로 판단하며; G-CSF PBMC를 언급하는 경우, "++++"은 6,000 pg/ml 초과 G-CSF를 의미하고, "+++은 3,000pg/ml 초과 G-CSF를 의미하며, "++"은 1,500pg/ml 초과 G-CSF를 의미하고, "+"은 300pg/ml 초과 G-CSF를 의미하며, "+/-"은 150 내지 300pg/ml의 G-CSF를 의미하고; 배경은 약 110pg/ml을 의미하며; 사이토카인 PBMC를 언급하는 경우 "++++"은 1,000pg/ml 초과 인터페론-알파(IFN-알파)를 의미하고, "+++은 600pg/ml 초과 IFN-알파를 의미하며, "++"은 300pg/ml 초과 IFN-알파를 의미하고; "+"은 100pg/ml 초과 IFN-알파를 의미하며, "-"은 100pg/ml 미만을 의미하고 배경은 약 70 pg/ml이었으며 "NT"는 시험되지 않았음을 의미한다. 표 48에서, 단백질 생산은 돌연변이체 T7 폴리머라제 (Durascribe® T7 전사 키트(제품 번호 DS010925)(제조원: Epicentre®, 위스콘신주 매디슨 소재)을 사용하여 평가하였다.

표 47

천연 발생

일반명 (기호)	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	단백질 (Luc; HeLa)	단백질 (G-CSF; HeLa)	단백질 (G-CSF; PBMC)	사이토킨들 (G-CSF; PBMC)	생체내 단백질 (Luc)	생체내 단백질 (G-CSF)
1-메틸아데노신 (m ¹ A)	실패	통과	NT	-	+/-	++	NT	NT
N ⁶ -메틸아데노신 (m ⁶ A)	통과	통과	-	-	+/-	++++	NT	NT
2'-O-메틸아데노신 (Am)	실패*	수행되지 않음	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-메틸사이티딘 (m ⁵ C)	통과	통과	+	+	+	++	+	NT
2'-O-메틸사이티딘 (Cm)	실패*	수행되지 않음	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2-티오사이티딘 (s ² C)	실패	실패	NT	NT	NT	NT	NT	NT
N ⁴ -아세틸사이티딘 (ac ⁴ C)	통과	통과	+	+	+/-	+++	+	NT
5-포르밀사이티딘 (f ⁵ C)	통과	통과	-.***	-.***	-	+	NT	NT
2'-O-메틸구아노신 (Gm)	실패*	수행되지 않음	NT	NT	NT	NT	NT	NT
이노신 (I)	실패	실패	NT	NT	NT	NT	NT	NT
슈도우리딘 (Y)	통과	통과	+	+	++	+	+	NT
5-메틸우리딘 (m ⁵ U)	통과	통과	+	+	+/-	+	NT	NT
2'-O-메틸우리딘 (Um)	실패*	수행되지 않음	NT	NT	NT	NT	NT	NT
1-메틸슈도우리딘 (m ¹ Y)	통과	통과	+	수행되지 않음	++++	-	+	NT
2-티오우리딘 (s ² U)	통과	통과	-	+	+	+	NT	NT
4-티오우리딘 (s ⁴ U)	실패	통과	-	+	+/-	++	NT	NT
5-메톡시우리딘 (mo ⁵ U)	통과	통과	+	+	++	-	+	NT
3-메틸우리딘 (m ³ U)	실패	실패	NT	NT	NT	NT	NT	NT

[2273]

표 48

비-천연 발생

일반명	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	단백질 (Luc; HeLa)	단백질 (G-CSF; HeLa)	단백질 (G-CSF; PBMC)	사이토킨들 (G-CSF; PBMC)	생체내 단백질 (Luc)	생체내 단백질 (G-CSF)
2'-F-아라-구아노신	실패	실패	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-아라-아데노신	실패	실패	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-아라-사이티딘	실패	실패	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-아라-우리딘	실패	실패	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-구아노신	실패/ 통과**	통과/ 실패**	***	+/-	-	+	+	NT
2'-F-아데노신	실패/ 통과**	실패/ 실패**	**	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-사이티딘	실패/ 통과**	실패/ 통과**	***	NT	NT	NT	+	NT
2'-F-우리딘	실패/ 통과**	통과/ 통과**	***	+	+/-	+	-	NT
2'-OH-아라-구아노신	실패	실패	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-아라-아데노신	수행 되지 않음	수행되 지 않음	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-아라-사이티딘	실패	실패	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-아라-우리딘	실패	실패	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-Br-우리딘	통과	통과	+	+	+	+	+	
5-(2-카보메톡시비닐)우리딘	통과	통과	-	-	+/-	-		
5-[3-(1-E-프로페닐아미노)우리딘 [알카 캄(aka Chem) 5]]	통과	통과	-	+	+	-		
N6-(19-아미노-펜타옥사노나데실) A	실패	실패	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2-디메틸아미노 구아노신	실패	실패	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-아자-사이티딘	실패	실패	NT	NT	NT	NT	NT	NT
a-티오-사이티딘	통과	통과	+	+	+/-	+++	NT	NT
슈도-이소사이티딘	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-요오도-우리딘	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
a-티오-우리딘	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-아자-우리딘	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
데옥시-티미딘	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
a-티오구아노신	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
8-옥소-구아노신	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
O6-메틸-구아노신	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
7-데아자-구아노신	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-클로로-퓨린	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
a-티오-아데노신	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
7-데아자-아데노신	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-요오도-사이티딘	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

[2274]

[2275]

표 49에서, HeLa의 단백질 생산은 "+", "+/-" 및 "-"로 판단하며, G-CSF PBMC를 언급하는 경우, "++++"은 6,000 pg/ml 초과인 G-CSF를 의미하고, "+++ "은 3,000pg/ml 초과인 G-CSF를 의미하며, "++"은 1,500pg/ml 초과인 G-CSF를 의미하고, "+"은 300pg/ml 초과인 G-CSF를 의미하며, "+/-"은 150 내지 300pg/ml의 G-CSF를 의미하고; 배경은 약 110pg/ml을 의미하며; 사이토카인 PBMC를 언급하는 경우 "++++"은 1,000pg/ml 초과인 인터페론-알파(IFN-알파)를 의미하고, "+++ "은 600pg/ml 초과인 IFN-알파를 의미하며, "++"은 300pg/ml 초과인 IFN-알파를 의미하고; "+"은 100pg/ml 초과인 IFN-알파를 의미하며, "-"은 100pg/ml 미만을 의미하고 배경은 약 70 pg/ml이었으며; "WT"는 야생형 T7 폴리머라제를 말하고, "MT"는 돌연변이체 T7 폴리머라제(Durascribe® T7 전사 키트(제품 번호 DS010925)(제조사: Epicentre®, 위스콘신주 매디슨 소재)을 말하며 "NT"은 시험되지 않았음을 의미한다.

표 49

조합 화학물질

사이티딘 유사체	우리딘 유사체	퓨린	IVT Luc	IVT (G-CSF)	단백질 (Luc; HeLa)	단백질 (G-CSF; HeLa)	단백질 (G-CSF; PBMC)	사이토킨들 (G-CSF; PBMC)	생체내 단백질 (Luc)
N4-아세틸사이티딘	슈도우리딘	A,G	통과 WT	통과 WT	+	+	NT	NT	+
N4-아세틸사이티딘	N1-메틸슈도우리딘	A,G	통과 WT	통과 WT	+	+	NT	NT	+
5-메틸사이티딘	5-메톡시우리딘	A,G	통과 WT	통과 WT	+	+	NT	NT	+
5-메틸사이티딘	5-브로모우리딘	A,G	통과 WT	통과 WT	수행되지 않음	+	NT	NT	
5-메틸사이티딘	5-메틸우리딘	A,G	통과 WT	통과 WT	+	+	NT	NT	+
5-메틸사이티딘	50% 2-티오우리딘; 50% 우리딘	A,G	통과 WT	통과 WT	+	NT	NT	NT	+
5-메틸사이티딘	100% 2-티오우리딘	A,G	통과 WT	통과 WT	-	+	NT	NT	
5-메틸사이티딘	슈도우리딘	A,G	통과 WT	통과 WT	+	+	++	+	+
5-메틸사이티딘	N1-메틸슈도우리딘	A,G	통과 WT	통과 WT	+	+	+++	-	+
N4-아세틸사이티딘	2-티오우리딘	A,G	수행되지 않음	통과 WT	수행되지 않음	+	NT	NT	NT
N4-아세틸사이티딘	5-브로모우리딘	A,G	수행되지 않음	통과 WT	수행되지 않음	+	NT	NT	NT
N4-아세틸사이티딘	2-플루오로우리딘 트리포스페이트	A,G	통과	통과	-	+	NT	NT	NT
5-메틸사이티딘	2-플루오로우리딘	A,G	통과	통과	-	+	NT	NT	NT

[2276]

	트리포스페이트								
2	플루오로사이토신 트리포스페이트	슈도우리딘 A,G	통과	통과	-	+	NT	NT	NT
2	플루오로사이토신 트리포스페이트	N1-메틸슈도우리딘 A,G	통과	통과	-	+/-	NT	NT	NT
2	플루오로사이토신 트리포스페이트	2-티오우리딘 A,G	통과	통과	-	-	NT	NT	NT
2	플루오로사이토신 트리포스페이트	5-브로모우리딘 A,G	통과	통과	-	+/-	NT	NT	NT
2	플루오로사이토신 트리포스페이트	2-플루오로우리딘 트리포스페이트 A,G	통과	통과	-	+/-	NT	NT	NT
5-메틸사이티딘	우리딘	A,2 플루오로 GTP	통과	통과	-	-	NT	NT	NT
5-메틸사이티딘	슈도우리딘	A,2 플루오로 GTP	통과	통과	-	-	NT	NT	NT
5-메틸사이티딘	N1-메틸슈도우리딘	A,2 플루오로 GTP	통과	통과	-	+/-	NT	NT	NT
2	플루오로사이토신 트리포스페이트	슈도우리딘 A,2 플루오로 GTP	통과	통과	-	+/-	NT	NT	NT
2	플루오로사이토신 트리포스페이트	N1-메틸슈도우리딘 A,2 플루오로 GTP	통과	통과	-	-	NT	NT	NT

[2277]

[2278]

[2279]

[2280]

실시예 90. PBMC에서 2'플루오로 화학물질들

면역 반응을 선천적으로 개시하는 G-CSF 변형된 mRNA(서열 1에 나타낸 mRNA 서열; 대략 160개의 뉴클레오타이드들의 폴리 A 테일은 서열에 나타내지 않는다; 5'캡, 캡 1)의 능력은 인터페론-알파(IFN-알파) 및 종양 괴사 인자-알파(TNF-알파) 생산을 측정함으로써 측정하였다. 시험관내 PBMC 배양물들의 사용은 올리고뉴클레오타이드들의 면역자극성 잠재능을 측정하는 허용된 방법이고(참조: Robbins et al., Oligonucleotides 2009 19:89-102) 형질감염 방법들은 본원에 기술되어 있다. 표 50에는 특이적인 ELISA로 측정된 것으로서 시간에 따른 인터페론-알파(IFN-알파) 및 종양 괴사 인자 알파(TNF-알파) 생산의 2 또는 3명의 별도의 PBMC 공여자들로부터의 평균이다. R848, P(I)P(C), LPS 및 리포펙타민 2000(L2000)의 대조군들을 또한 분석하였다.

선천적 면역 인식과 관련하여, 변형된 mRNA 화학물질들 둘다가 양성 대조군들(R848, P(I)P(C))에 비해 IFN-알파 및 TNF-알파 생산을 크게 방지하였지만, 2'플루오로 화학물질들은 사이토카인 프로파일을 상승시킨 다른 조합들 및 N4-아세틸사이티딘 조합들보다 훨씬 더 낮게 IFN-알파 및 TNF-알파 생산을 감소시킨다.

표 50

IFN-알파 및 TNF-알파

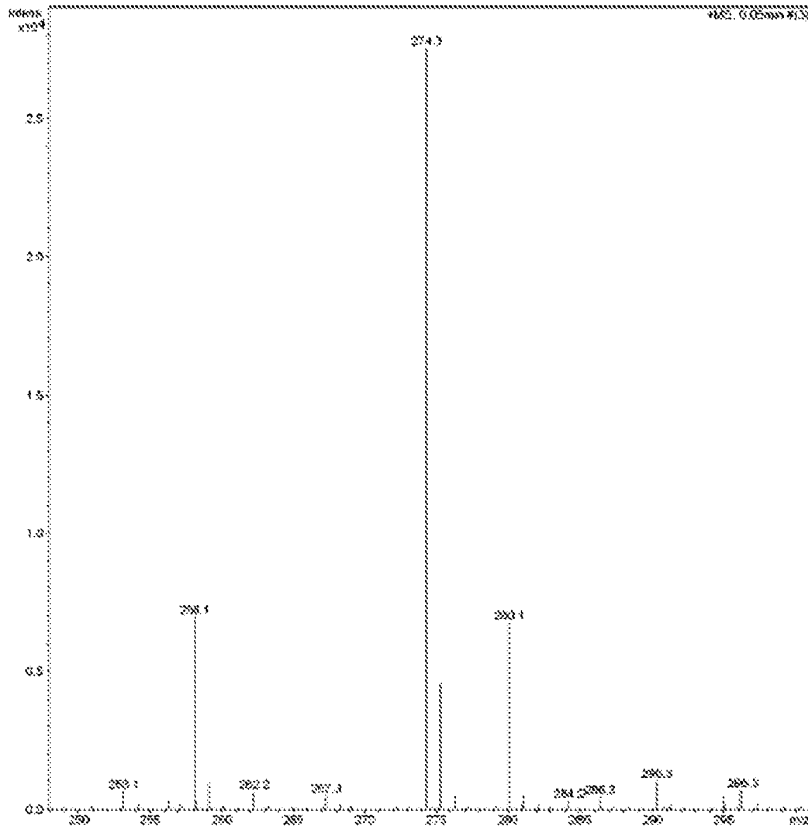
	IFN-알파: 3 명의 공여자 평균 (pg/ml)	TNF-알파: 2 명의 공여자 평균 (pg/ml)
L2000	1	361
P(I)P(C)	482	544
R848	45	8,235
LPS	0	6,889
N4-아세틸사이티딘/슈도우리딘	694	528
N4-아세틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	307	283
5-메틸사이티딘/5-메톡시우리딘	0	411
5-메틸사이티딘/5-브로모우리딘	0	270
5-메틸사이티딘/5-메틸우리딘	456	428
5-메틸사이티딘/2-티오우리딘	274	277
N4-아세틸사이티딘/2-티오우리딘	0	285
N4-아세틸사이티딘/5-브로모우리딘	44	403
5-메틸사이티딘/슈도우리딘	73	332
5-메틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	31	280
N4-아세틸사이티딘/2'플루오로우리딘 트리포스페이트	35	32
5-메틸사이토신/2'플루오로우리딘 트리포스페이트	24	0
2'플루오로사이티딘 트리포스페이트/N1- 메틸슈도우리딘	0	11
2'플루오로사이티딘 트리포스페이트/2- 티오우리딘	0	0
2'플루오로사이티딘/ 트리포스페이트 5- 브로모우리딘	12	2
2'플루오로사이티딘 트리포스페이트/2'플루오로우리딘 트리포스페이트	11	0
2'플루오로사이티딘 트리포스페이트/5- 메틸사이티딘	14	23
2'플루오로사이티딘 트리포스페이트/5- 메틸사이티딘/슈도우리딘	6	21
2'플루오로사이티딘 트리포스페이트/5- 메틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	3	15
2'플루오로사이티딘 트리포스페이트/슈도우리딘	0	4
2'플루오로사이티딘 트리포스페이트/N1- 메틸슈도우리딘	6	20
5-메틸사이티딘/슈도우리딘	82	18
5-메틸사이티딘/N1-메틸슈도우리딘	35	3

[2281]

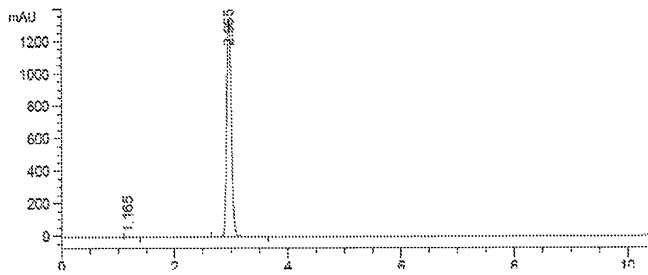
[2282] 다른 실시형태들

[2283] 본 개시는 이의 상세한 설명과 함께 기술되었지만, 앞선 설명은 첨부된 특허청구범위의 범위에 의해 정의되는, 앞서의 기술은 본 개시의 범위를 나열하는 것이며 제한하지 않는 것으로 의도된다. 다른 양상들, 이점들, 및 변형들은 다음의 특허청구범위의 범위 내에 있다.

도면1c

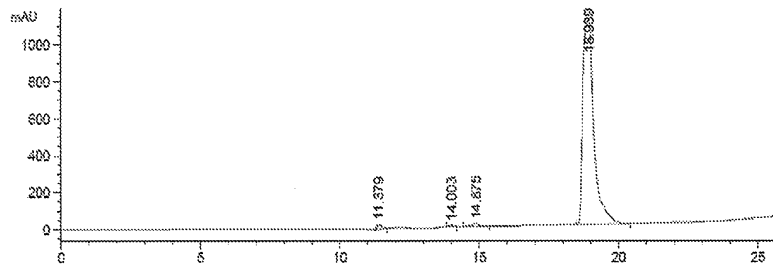


도면1d



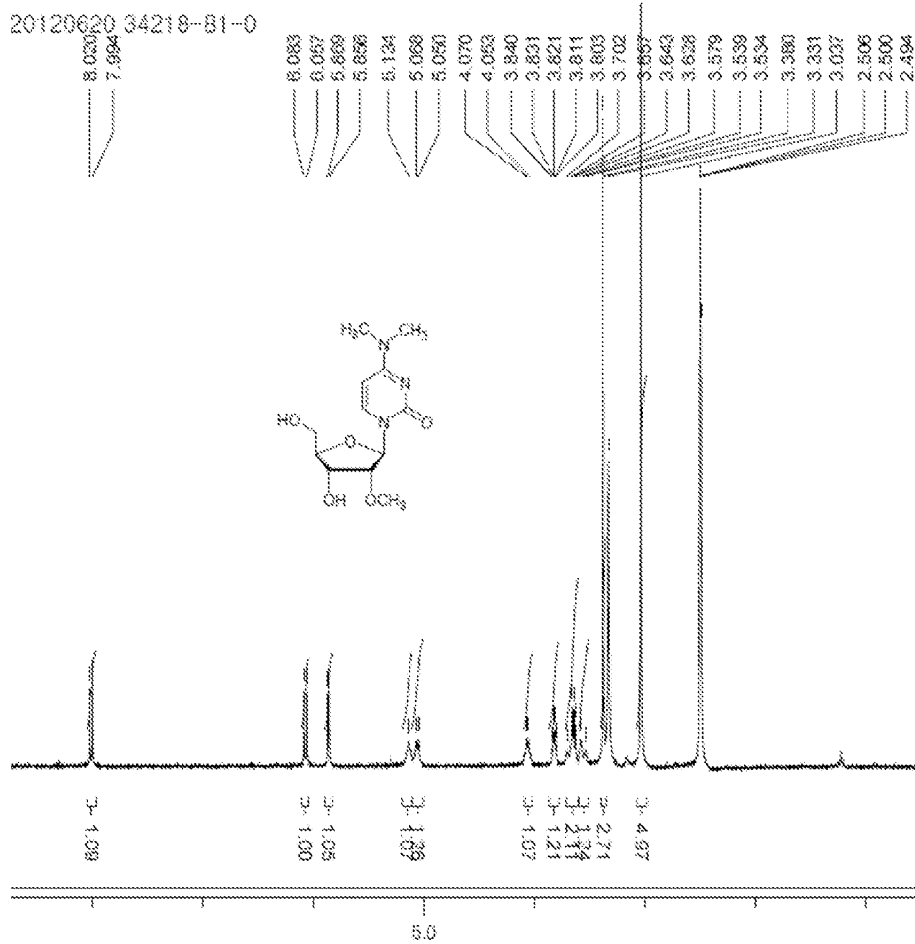
피크 #	Retention Time (분)	유형	Retention Time (분)	면적 (mAU)	높이 (mAU)	면적 (%)
1	1.165	BB	0.0854	49.0038	7.90421	0.6403
2	2.965	BB	0.0880	7603.66650	1340.77930	99.3597

도면2

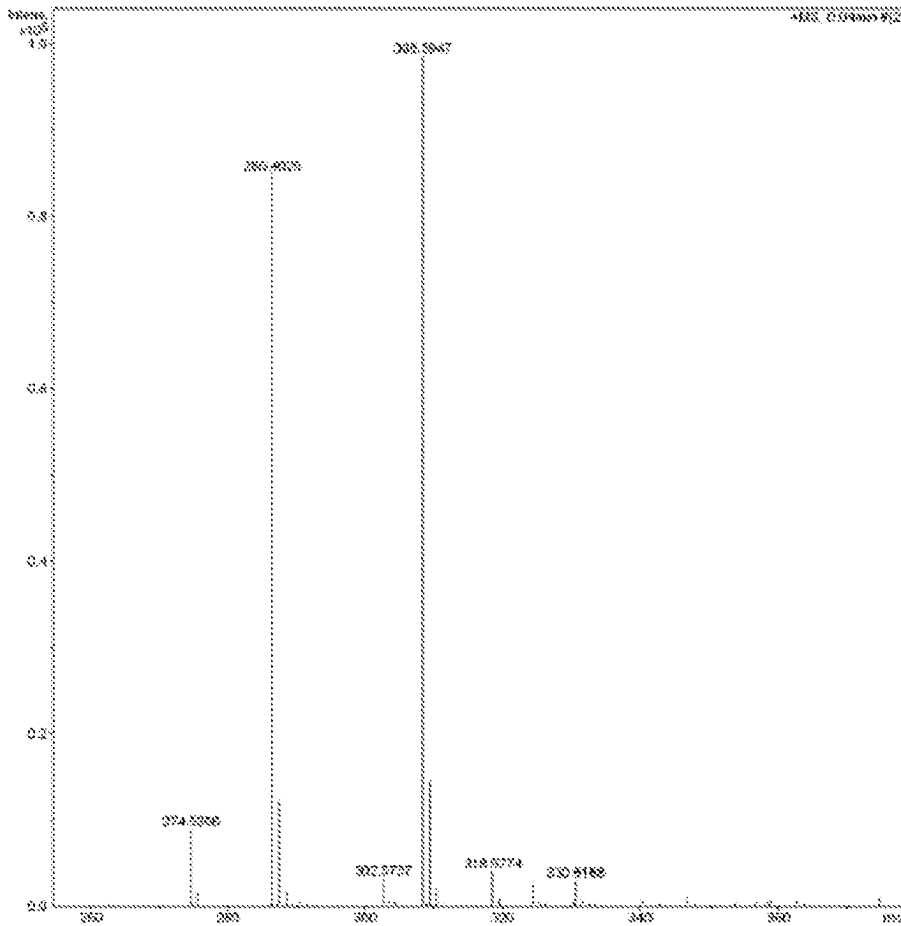


피크 #	Retention Time [분]	유형	너비 [분]	면적 mAU	면적 %	높이 [mAU]	면적 %
1	11.379	BB	0.1425	300.16064	0.9734	27.69099	0.9734
2	14.003	BB	0.1065	71.24556	0.2311	10.35608	0.2311
3	14.875	BB	0.2088	222.77209	0.7225	15.20542	0.7225
4	18.939	BB	0.3630	3.02414e4	98.0731	1115.21118	98.0731
합계 :				3.08355e4		1168.46368	

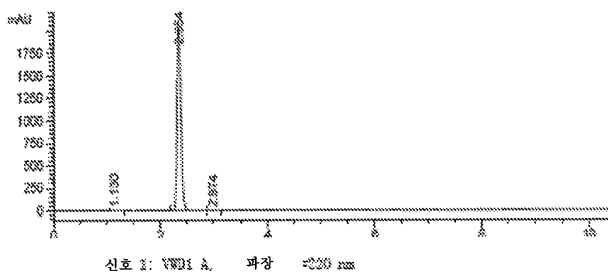
도면3a



도면3b

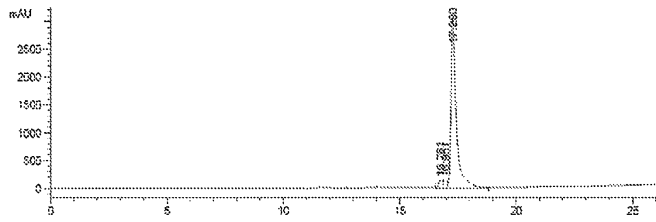


도면3c



피크 #	Retention Time [분]	유형	너비 [분]	면적 [mAU]	높이 [mAU]	면적 %
1	1.130	SS	0.0061	37.51456	0.03561	0.3573
2	2.354	SS	0.0769	1.04566e4	2102.88633	99.4993
3	2.974	SS	0.0923	15.14040	2.58082	0.1441

도면4

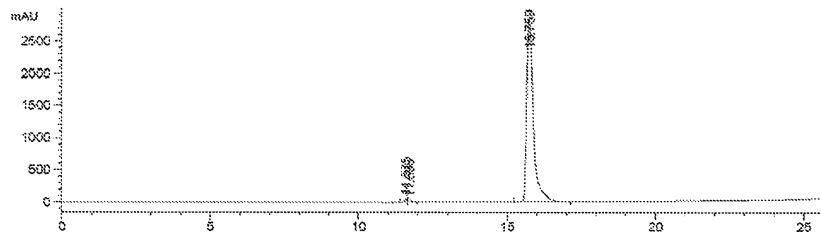


신호 1: VWD1 A, 파장=230 nm

피크 #	Retention Time [분]	Retention Type	Area [분]	Area [mAU * s]	Height [mAU]	Area %
1	16.761	BV	0.1576	1363.03906	131.20972	2.5836
2	16.951	VV	0.1547	1269.82593	122.70110	2.4448
3	17.290	VB	0.2391	5.01047e4	3093.80176	94.9716

합계 : 5.27575e4 3337.71257

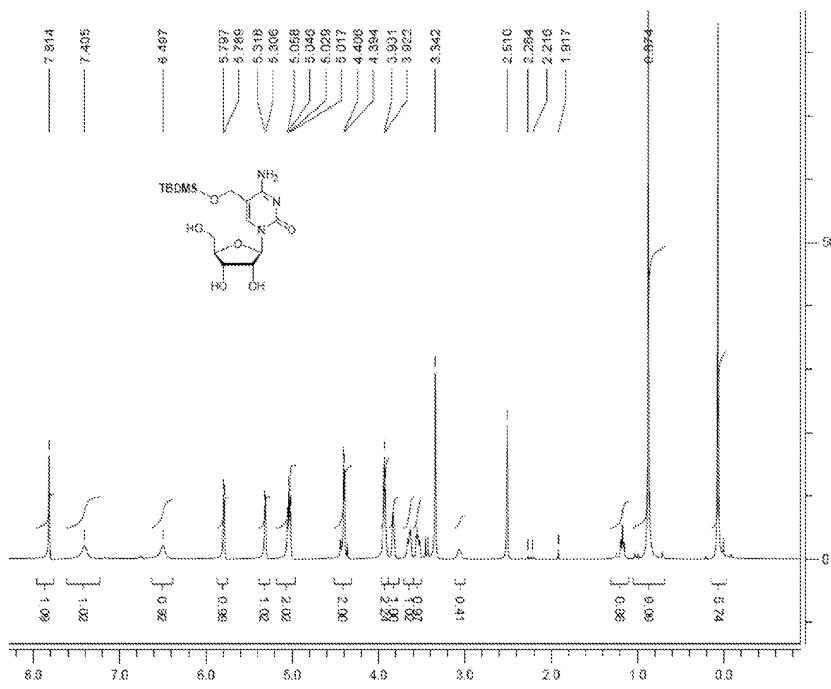
도면5



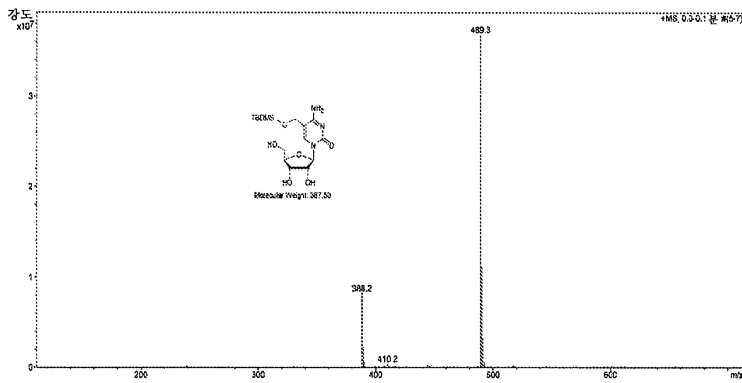
피크 #	Retention Time [분]	Retention Type	Area [분]	Area [mAU * s]	Height [mAU]	Area %
1	11.575	BV	0.0803	323.32678	57.39472	0.7124
2	11.698	VB	0.1234	239.96255	29.24231	0.8287
3	15.759	EB	0.2395	4.48198e4	2839.09004	98.7588

합계 : 4.52831e4 2926.33308

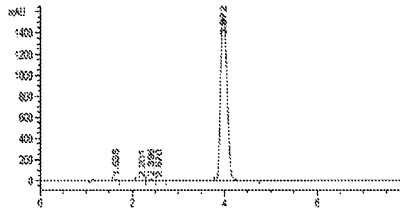
도면7a



도면7b



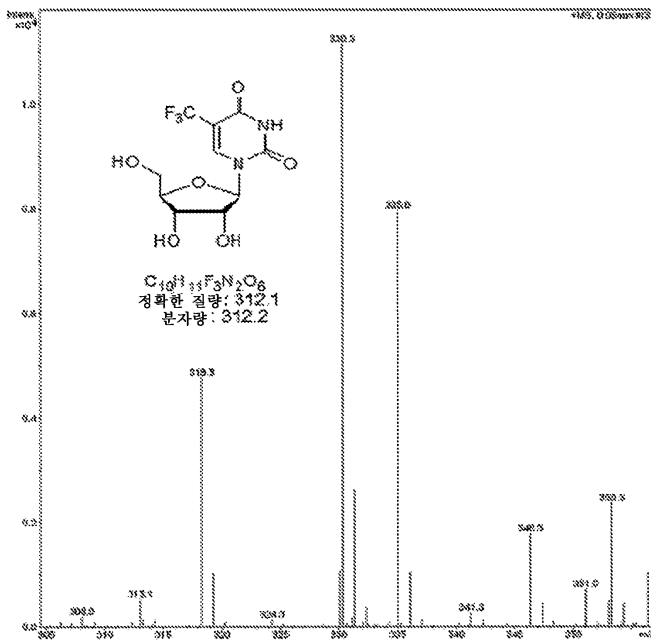
도면8b



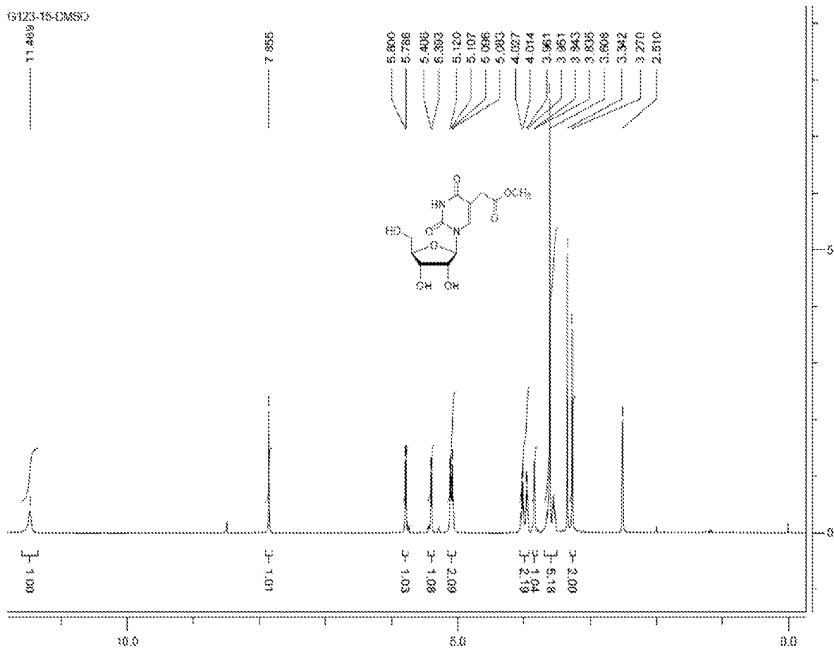
피크 #	Retention Time [분]	유형	면적 [분]	면적 %	높이 [a.u.]	면적 %
1	1.635	BB	0.0557	40.34452	12.01330	0.2667
2	2.201	BY	0.0317	20.59230	8.88561	0.1968
3	2.336	YY	0.1650	92.96643	14.01738	0.6145
4	2.970	VB	0.0038	18.71305	3.05516	0.1365
5	3.972	BB	0.1558	1.49871e4	1377.24438	98.8715

합계 : 1.51279e4 1609.71336

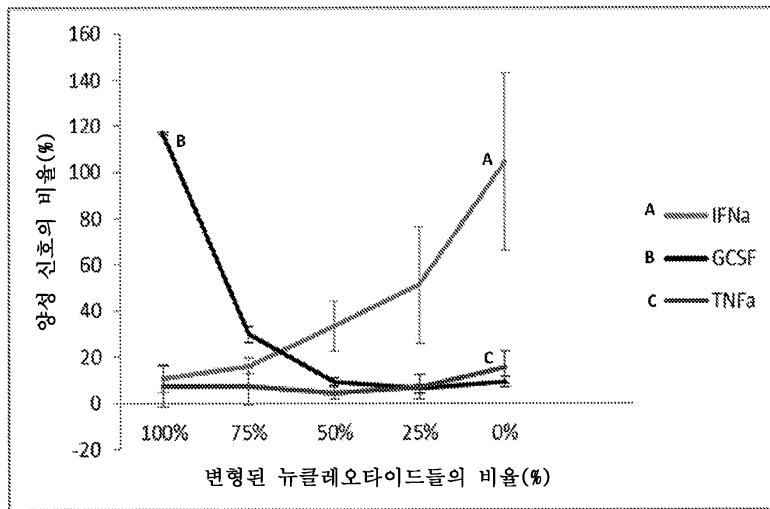
도면8c



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> MODERNA THERAPEUTICS, INC.
- <120> MODIFIED NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES, AND NUCLEIC ACIDS, AND USES THEREOF
- <130> M009.20/2030.1009PCT
- <150> US 61/542,533
- <151> 2011-10-03
- <160> 6

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 758

<212> RNA

<213> Homo Sapiens

<400> 1

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaaag agccaccaug gccggucccg 60
 cgacccaaag cccaugaaa cuuauggccc ugcaguugcu gcuuuggcac ucggcccucu 120
 ggacagucca agaagcgacu ccucucggac cugccucauc guugccgcag ucauuccuuu 180

 ugaagugucu ggagcaggug cgaaagauuc agggcgauug agccgcacuc caagagaagc 240
 ucugcgcgac auacaaacuu ugccauccecg aggagcucgu acugcucggg cacagcuugg 300
 ggauucccug ggcuccucuc ucguccuguc cgucgcaggc uuugcaguug gcagggugcc 360
 uuucccagcu ccacuccggu uuguucuugu aucagggacu gcugcaagcc cuugagggaa 420
 ucucgccaga auugggcccg acgcuggaca cguugcagcu cgacuggcg gauuucgcaa 480
 caaccaucug gcagcagaug gaggaacugg ggauggcacc cgcgcugcag cccacgcagg 540
 gggcaaugcc ggccuuugcg uccgcguuuc agcgcagggc ggguggaguc cucguagcga 600
 gccaccuuca aucauuuuug gaagucucgu accgggugcu gagacaucuu gcgcagccgu 660

 gaagcgcugc cuucucggg gcuugccuuc uggccaugcc cuucuucucu cccuugcacc 720
 uguaccuuu ggucuuugaa uaaagccuga guaggaag 758

<210> 2

<211> 1838

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 2

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
 caccatggaa gatgcaaga acatcaagaa gggacctgcc ccgttttacc ctttgagga 120
 cggtagcga ggagaacagc tccacaagc gatgaaacgc tacgccctgg tccccggaac 180
 gattgcgttt accgatgcac atattgaggt agacatcaca tacgcagaat acttcgaaat 240
 gtcggtgagg ctggcgaag cgatgaagag atatggtctt aactaatac accgcatcgt 300

 ggtgtgttcg gagaactcat tgcagtttt catgccggtc cttggagcac ttttcacgg 360
 ggtcgcagtc gcgccagcga acgacatcta caatgagcgg gaactcttga atagcatggg 420
 aatctccag ccgacggtcg tgtttgtctc caaaaagggg ctgcagaaaa tcctcaacgt 480

cgagaagaag ctccccatta ttcaaaagat catcattatg gatagcaaga cagattacca 540
 agggttccag tcgatgtata cctttgtgac atcgcatTTG cccccagggt ttaacgagta 600
 tgacttcgtc cccgagtcat ttgacagaga taaaaccatc gcgctgatta tgaattcctc 660
 gggtagcacc ggtttgccaa aggggggtggc gttgccccac cgcactgctt gtgtgcggtt 720
 ctgcacgct agggatccta tctttggtaa tcagatcatt cccgacacag caatcctgtc 780

cgTggTacct tttcatcacg gttttggcat gttcacgact ctcggctatt tgatttgcgg 840
 tttcagggtc gtacttatgt atcggttcga ggaagaactg tttttgagat ccttgcaaga 900
 ttacaagatc cagtccggccc tccttTgtcc aacgcttttc tcattctttg cgaatcgac 960
 acttattgat aagtatgacc tttccaatct gcatgagatt gcctcagggg gagcgcgct 1020
 tagcaaggaa gtcggggagg cagtggccaa gcgcttccac cttcccggaa ttcggcaggg 1080
 atacgggctc acggagacaa catcccgat ccttatcacg cccgagggtg acgataagcc 1140
 ggagcgcgtc ggaaaagTgg tccccttctt tgaagccaag gtcgtagacc tcgacacggg 1200
 aaaaaccctc ggagtgaacc agaggggcga gctctgcgtg agagggccga tgatcatgtc 1260

aggttacgtg aataaccctg aagcgcagaa tgcgctgac gacaaggatg ggtggttGca 1320
 ttcgggagac attgcctatt gggatgagga tgagcacttc tttatcgtag atcgactta 1380
 gagcttgatc aaatacaaag gctatcaggt agcgcctgcc gagctcgagt caatcctgct 1440
 ccagcacccc aacattttcg acgccggagt ggccgggttg cccgatgacg acgcgggtga 1500
 gctgccagcg gccgtggtag tctcgaaca tgggaaaaca atgaccgaaa aggagatcgt 1560
 ggactacgta gcatcacaag tgacgactgc gaagaaactg aggggagggg tagtctttgt 1620
 ggacgaggtc ccgaaaggct tgactgggaa gcttgacgct cgcaaaatcc gggaaatcct 1680
 gattaaggca aagaaaggcg ggaaaatcgc tgtctgataa gctgccttct gcggggcttg 1740

ccttctggcc atgcccttct tctctccctt gcacctgtac ctcttggctt ttgaataaag 1800
 cctgagtagg aaggcggccg ctcgagcatg catctaga 1838

<210> 3
 <211> 1796
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaag agccaccaug gaagaugcga 60
 agaacaucaa gaagggaccu gccccuuuu acccuuugga ggacgguaca gcaggagaac 120
 agcuccacaa ggcgaugaaa cgcuacgcc uggucgccg aacgauugcg uuuaccgaug 180
 cacauuuga gguagacauc acauacgcag aaacuucga aaugucggug aggcuggcgg 240

aagcgaugaa gagauauggu cuaaacacua aucaccgcac cguggugugu ucggagaacu 300

cauugcaguu uuucaugccg guccuuggag cacuuuucau cggggucgca gucgcgccag 360
cgaacgacau cuacaauagag cgggaacucu ugaauagcau gggaaucucc cagccgacgg 420
ucguguuugu cucaaaaag gggcugcaga aaauccucaa cgugcagaag aagcucacca 480
uuauucaaaa gaucaucauu auggauagca agacagauua ccaagguuc cagucgaugu 540
auaccuuugu gacaucgcac uugccgccag gguuuacga guaugacuuc guccccgagu 600
cauuugacag agauaaaacc aucgcgcuga uuauaauuc cucggguagc accgguuugc 660
caaagggggu ggcguugccc caccgcacug cuugugugcg guucucgcac gcuaaggauc 720
cuauuuugg uaaucagauc auucccgaca cagcauccu guccguggua ccuuuucac 780

acgguuuugg cauguucacg acucucggcu auuugauuug cgguuucagg gucguacuua 840
uguaucgguu cgaggaagaa cuguuuuuga gauccuugca agauuacaag auccagucgg 900
ccucuuugu gccaacgcuu uucucauucu uugcgaauc gacacuuuu gauaaguaug 960
accuuuccaa ucugcaugag auugccucag ggggagcggc gcuuagcaag gaagucgggg 1020
aggcaguggc caagcgcuu caccuuccg gaaucggca gggauacggg cucacggaga 1080
caaacuccgc gauccuuuac acgcccagg gugacgauaa gccgggagcc gucggaaaag 1140
uggucuccuu cuuugaagcc aaggucguag accucgacac gggaaaaacc cucggaguga 1200
accagagggg cgagcucugc gugagagggc cgaugaucu gucagguuac gugaauaacc 1260

cugaagcgac gaaugcgug aucgacaagg augggugguu gcauucggga gacauugccu 1320
auugggauga ggaugagcac uucuuuauuc uagaucgacu uaagagcuug aucaaaauaca 1380
aaggcuauca gguagcgcg gccgagcug agucaauccu gcuccagcac cccaacauuu 1440
ucgacgccg aguggccggg uugcccgaug acgacgaggg ugagcugcca gcggccgugg 1500
uagucccga acaugggaaa acauagaccg aaaaggagau cguggacuac guagcaucac 1560
aagugacgac ugcgaagaaa cugaggggag gguuagucuu uguggacgag gucccgaag 1620
gcuugacugg gaagcuugac gcucgcaaaa uccgggaaau ccugauuaag gcaaagaaag 1680
gcgggaaaau cgugucuga uaagcugccu ucugcggggc uugccuucg gccaugccu 1740

ucuucucucc cuugcaccug uaccucuugg ucuuugaaua aagccugagu aggaag 1796

<210> 4

<211> 854

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gggaaaauag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaag agccaccaug guauccaagg 60
 gggaggagga caacauggcg aucaucaagg aguucaugcg auucaaggug cacauggaag 120
 guucgguca cggacacgaa uuugaaaucg aaggagaggg ugaaggaagg ccuauugaag 180
 ggacacagac cgcgaaacuc aaggucacga aagggggacc acuuccuuc gccugggaca 240
 uucuuucgcc ccaguuuau uacgggucca aagcauau guagcaucc gccgauauuc 300
 cugacuauuc gaaacucagc uuucccgagg gauucaagug ggagcggguc augaacuuug 360

 aggacggggg uguagucacc guaaccacag acucaagccu ccaagacggc gaguucacu 420
 acaaggucaa acugcggggg acuaacuuuc cgucggauug gccggugaug cagaagaaaa 480
 cgaugggag ggaagcgua ucggagagga uguaccaga agauggugca uugaaggggg 540
 agaucaagca gagacugaag uugaaagau ggggacauua ugaugccgag gugaaaacga 600
 cauacaaagc gaaaagccg gucgagcuuc ccggagcgua uaaugugaau aucaaguug 660
 auuuuacuuc acacaauag gacuacacaa uugucgaaca guacgaacgc gcugagggua 720
 gacacucgac gggaggcaug gacgaguugu aaaaugaua agcugccuuc ugcggggcuu 780
 gccuucuggc caugcccuuc uucucuccu ugcaccgua ccucuugguc uuugaauaaa 840

gccugaguag gaag 854

<210> 5

<211> 725

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gggaaaauag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaag agccaccaug ggagucacg 60
 aguguccgc gugguuggg uugcugcugu cgcucuugag ccuccacug ggacugccug 120
 ugcugggggc accaccaga uugaucugcg acucacgggu acuugagagg uaccuucuug 180
 aagcaaaga agccgaaac aucacaaccg gaugcgccga gcacugcucc cucaaugaga 240
 acuuuacugu accggauaca aaggucauu ucuaugcaug gaagagaug gaaguaggac 300
 agcaggccgu cgaagugug caggggcucg cgcuuuuguc ggagcggug ugcgggguc 360

 aggccuccu cguaacuca ucacagccgu gggagcccu ccaacuuc au gucgauaaag 420
 cggugcggg gcuccgcagc uugacgacgu ugcucgggc ucuggcgca caaaaggagg 480
 cuuuucgcc gccugacgcg gccuccgagg caccuccg aacgaucacc gcggacacgu 540
 uuaggaagcu uuuuagagug uacagcauu uccuccgagg aaagcugaaa uuguauacug 600
 gugaagcgug uaggacagg gaucgugau aagcugccu cugcggggcu ugccuucugg 660
 ccaugcccu cuucucucc ugcaccgu accucuuggu cuuugaaua agccugagua 720

ggaag 725

<210> 6

<211> 1536

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaag agccaccaau gcagcgcguc 60

aacaugauua uggccgaauc gccgggacuc aucacaaucu gccucuuggg uuaucucuug 120

ucggcagaau guaccguguu cuuggaucac gaaaacgcga acaaaauucu uaaucgcccg 180

aagcgguaa acuccgggaa acuugaggag uuugucagg gcaaucuuga acgagaguc 240

auggaggaga aaugcuccuu ugaggaggcg agggaagugu uugaaaacac agagcgaaca 300

acggaguuuu ggaagcaaua cguagauggg gaccagugug agucgaauc gugccucaa 360

gggggaucau guaaagauga caucaauagc uaugaauvcu ggugcccguu ugguuuugaa 420

gggaagaacu gugagcugga ugugacguc acaucaaaa acggacgcug ugagcaguuu 480

uguaagaacu cggcugacaa uaagguagua ugcucgugca cagagggaua ccggcuggcg 540

gagaacaaa aaucgugcga gcccgcaguc ccguuccuu gugggaggu gagcgugua 600

cagacuagca aguugacgag agcggagacu guauucccg acguggacua cgucaacagc 660

accgaagccg aaacaauccu cgauaacauc acgcagagca cucaguccuu caaugacuuu 720

acgagggucg uaggugguga ggacgcgaaa cccggucagu ucccuggca ggugguuug 780

aacggaaaag ucgaugccuu uuguggaggu uccauugua acgagaagug gauugucaca 840

gcggcacacu gcguagaac aggagugaaa aucacgguag uggcgggaga gcuaacauu 900

gaagagacag agcacacgga acaaaagcga aaugucauca gaaucauucc acaccuaac 960

uuaacgcgg caucaauaa guacaaucau gacaucgac uuuuggagcu ugacgaaccu 1020

uuggugcuua auucguacgu caccuuuuu uguuuugcg acaaagagua uacaaacauc 1080

uuuugaaau ucggcuccgg guacguaucg ggucggggca gaguguuca uaagguuga 1140

uccgcacugg uguugcaaua ccucagggug cccucgugg aucgagccac uugucgagg 1200

uccaccaau ucacaauca caacaauaug uucugucgg gauuccauga aggugggaga 1260

gauagcugcc agggagacuc agggggucc cagugacgg aagucgagg gacgucuuu 1320

cugacgggaa uuaucucaug gggagaggaa ugugcgauga aggggaaaua uggaucucac 1380

acuaaagugu cacgguaugu caauuggauc aaggaaaaga cgaaacucac gugaucagcc 1440

agcgcugccu ucugcggggc uugccuucug gccaugccu ucuucucucc cuugcaccug 1500

uaccucuugg ucuuugaaua aagccugagu aggaag

1536