

(52) CPC특허분류

A61K 47/549 (2017.08)

A61K 48/00 (2024.01)

A61P 31/20 (2018.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/321 (2013.01)

C12N 2310/322 (2013.01)

C12N 2310/344 (2013.01)

C12N 2310/346 (2013.01)

C12N 2310/351 (2013.01)

(72) 발명자

저지, 아담

캐나다 브이5제이 5제이8 브리티시 컬럼비아주 버너비 글렌리온 파크웨이 100 - 8900

리, 에이미 씨. 에이치.

캐나다 브이5제이 5제이8 브리티시 컬럼비아주 버너비 글렌리온 파크웨이 100 - 8900

마틴, 앨런 디.

캐나다 브이5제이 5제이8 브리티시 컬럼비아주 버너비 글렌리온 파크웨이 100 - 8900

스니드, 니콜라스 마이클

캐나다 브이5제이 5제이8 브리티시 컬럼비아주 버너비 글렌리온 파크웨이 100 - 8900

티, 에밀리 피.

캐나다 브이5제이 5제이8 브리티시 컬럼비아주 버너비 글렌리온 파크웨이 100 - 8900

우드, 마크

캐나다 브이5제이 5제이8 브리티시 컬럼비아주 버너비 글렌리온 파크웨이 100 - 8900

예, 신

캐나다 브이5제이 5제이8 브리티시 컬럼비아주 버너비 글렌리온 파크웨이 100 - 8900

명세서

청구범위

청구항 1

인간을 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 특허 출원은 2017년 6월 26일자로 출원된 미국 출원 시리얼 번호 62/525,071 및 2017년 4월 11일자로 출원된 미국 출원 시리얼 번호 62/484,247의 우선권 이익을 주장하며, 이들 출원은 본 명세서에 참고로 포함된다.

배경 기술

[0003] 다수의 질환은 간, 예를 들어, B형 간염 및 비알코올성 지방간염(NASH)에 특이적이다. 따라서, 살아있는 대상체에서 간, 신장, 심장, 췌장 또는 다른 기관에 주로 표적화될 수 있는 치료적 조성물을 갖는 것이 이로운 것이다.

[0004] siRNA를 비롯한 핵산이 치료제로서 유용하다.

[0005] 현재, 살아있는 대상체에서 치료 핵산, 예컨대, 이중 가닥 siRNA를 전달(예를 들어, 표적화)하는 데 사용될 수 있는 조성물 및 방법이 필요하다.

[0006] [선행기술문헌]

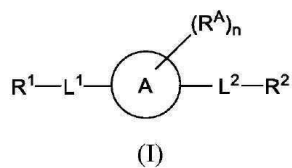
[0007] WO 2016/077321 (2016. 5. 19.)

발명의 내용

[0008] 본 발명은 핵산 분자(예를 들어, 치료적 이중 가닥 siRNA 분자), 뿐만 아니라 이러한 핵산을 (예를 들어, 간에 대해서) 표적화하는 데 사용될 수 있는 화합물, 조성물 및 방법을 제공한다.

[0009] 따라서, 일 양상에서 본 발명은 siRNA 1(서열번호 1 및 2), 2(서열번호 3 및 4), 3(서열번호 5 및 6), 4(서열번호 7 및 8), 5(서열번호 9 및 10), 6(서열번호 11 및 12), 7(서열번호 13 및 14), 8(서열번호 15 및 16), 9(서열번호 17 및 18), 10(서열번호 19 및 20), 11(서열번호 21 및 22), 12(서열번호 23 및 24), 13(서열번호 25 및 26), 14(서열번호 27 및 28), 15(서열번호 29 및 30), 16(서열번호 31 및 32), 17(서열번호 33 및 34), 18(서열번호 35 및 36), 19(서열번호 37 및 38), 20(서열번호 39 및 40), 21(서열번호 41 및 42), 22(서열번호 43 및 44), 23(서열번호 45 및 46), 24(서열번호 47 및 48), 25(서열번호 49 및 50), 26(서열번호 51 및 52), 27(서열번호 53 및 54), 28(서열번호 55 및 56), 29(서열번호 57 및 58), 30(서열번호 59 및 60), 31(서열번호 61 및 62), 32(서열번호 63 및 64), 33(서열번호 65 및 66), 34(서열번호 67 및 68), 35(서열번호 69 및 70), 36(서열번호 71 및 72) 및 37(서열번호 73 및 74)로 이루어진 군으로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자를 제공한다.

[0010] 본 발명의 또 다른 양상은 하기 화학식 I의 화합물 또는 이의 염을 제공한다:



[0011]

[0012] 식 중,

- [0013] R^1 은 표적화 리간드이고;
- [0014] L^1 은 존재하지 않거나 또는 연결기이며;
- [0015] L^2 는 존재하지 않거나 또는 연결기이고;
- [0016] R^2 는 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자이며;
- [0017] 고리 A는 존재하지 않거나, 3 내지 20원의 사이클로알킬, 5 내지 20원의 아릴, 5 내지 20원의 헤테로아릴 또는 3 내지 20원의 헤테로사이클로알킬이고;
- [0018] 각각의 R^A 는 수소, 하이드록시, CN, F, Cl, Br, I, $-C_{1-2}$ 알킬-OR^B, C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알켄일 및 C_{2-10} 알킨일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서 C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알켄일 및 C_{2-10} 알킨일은 할로, 하이드록시 및 C_{1-3} 알콕시로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 선택적으로 치환되고;
- [0019] R^B 은 수소, 보호기, 고체 지지체에 대한 공유 결합 또는 고체 지지체에 결합된 연결기에 대한 결합이며; 그리고
- [0020] n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 양상은 본 명세서에 기술된 siRNA 중 하나를 포함하는 GalNAc 접합체를 제공하며, 여기서 접합체는 본 명세서에 개시된 리간드-링커를 포함하는 접합체로 제한되지 않는다. 예를 들어, 본 발명의 양상은 하기 화학식 X의 GalNAc 접합체를 제공한다:



- [0022] 식 중, A는 표적화 리간드이고;
- [0023] B는 선택적인 링커이며; 그리고
- [0024] C는 본 명세서에 기술된 siRNA 분자이다.
- [0025] 본 명세서에 기술된 치료적 이중 가닥 siRNA, 뿐만 아니라, 이러한 siRNA를 포함하는 화합물 및 조성물은 B형 간염 바이러스 및 B형 간염 바이러스/D형 바이러스를 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명은 또한 화학식 I의 화합물을 제조하는 데 유용한 본 명세서에 개시된 합성 중간체 및 방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 다른 목적, 특징부 및 이점은 하기 상세한 설명 및 도면으로부터 당업자에게 자명할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0029] **도 1:** 화학식 Ie의 중간체 화합물을 도시한 도면(여기서, 표적화 리간드/링커는 고체상 지지체에 결합되고, Pg¹은 보호기 DMTr임).
 - 도 2:** 핵산이 공유 결합된 화학식 Id의 대표적인 화합물을 도시한 도면(여기서, 표적화 리간드는 고체상 지지체에 결합됨).
 - 도 3:** 화학식 Id의 대표적인 화합물을 도시한 도면(여기서, 표적화 리간드-핵산 접합체는 고체상 지지체로부터 절단되고, 탈보호되어 화학식 I의 화합물을 제공함).
- 도면, 실시예 및 반응식을 비롯한, 본 출원에서, 올리고뉴클레오타이드는 표 1에 기술된 바와 같은 이중 가닥 siRNA 분자일 수 있음을 이해해야 한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 하기 용어는 달리 명시되지 않는 한 그에 부여된 의미를 갖는다.
- [0031] 용어 "접합체"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 표적화 리간드에 연결된 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, siRNA 분자)를 포함하는 화학식 (I)의 화합물을 포함한다. 따라서, 용어 화합물 및 접합체는 본 명세서에서 상

호 교환 가능하게 사용될 수 있다.

- [0032] 용어 "작은 간섭 RNA" 또는 "siRNA"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, siRNA가 표적 유전자 또는 서열과 동일한 세포 내에 존재하는 경우, (예를 들어, siRNA 서열에 상보성인 mRNA의 절단을 매개하거나 이의 번역을 저해함으로써) 표적 유전자 또는 서열의 발현을 감소 또는 저해할 수 있는 이중 가닥 RNA(즉, 듀플렉스 RNA)를 지칭한다. siRNA는 표적 유전자 또는 서열과 실질적인 또는 완전한 동일성을 가질 수 있거나, 또는 미스매치의 영역(즉, 미스매치 모티프)을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, siRNA는 약 19 내지 25개 (듀플렉스) 뉴클레오타이드 길이일 수 있고, 바람직하게는 약 20 내지 24개, 21 내지 22개 또는 21 내지 23개 (듀플렉스) 뉴클레오타이드 길이이다. siRNA 듀플렉스는 약 1 내지 약 4개의 뉴클레오타이드 또는 약 2 내지 약 3개의 뉴클레오타이드의 3' 오버행 및 5' 포스페이트 말단을 포함할 수 있다. siRNA의 예는 2개의 개별 가닥 분자로부터 조립된 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드 분자를 비제한적으로 포함하며, 여기서 하나의 가닥은 센스 가닥이고, 나머지는 상보성 안티센스 가닥이다.
- [0033] 특정 실시형태에서, siRNA의 하나의 가닥 또는 두 가닥 상의 5' 및/또는 3' 오버행은 1 내지 4개(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4 개)의 변형된 및/또는 비변형된 데옥시티미딘(t 또는 dT) 뉴클레오타이드, 1 내지 4개(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 변형된 (예를 들어, 2'OMe) 및/또는 비변형된 우리딘(U) 리보뉴클레오타이드, 및/또는 1 내지 4개 (예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 변형된(예를 들어, 2'OMe) 및/또는 비변형된 리보뉴클레오타이드 또는 표적 서열에 상보성을 갖는 데옥시리보뉴클레오타이드(예를 들어, 안티센스 가닥에서 3' 오버행) 또는 이의 상보성 가닥(예를 들어, 센스 가닥에서 3' 오버행)을 포함한다.
- [0034] 바람직하게는, siRNA는 화학적으로 합성된다. siRNA는 또한 이. 콜라이 RNase III 또는 다이서(Dicer)로 더 긴 dsRNA(예를 들어, 약 25개 뉴클레오타이드보다 긴 dsRNA 길이)을 절단함으로써 생성될 수 있다. 이 효소는 dsRNA를 생물학적으로 활성인 siRNA로 가공한다(예를 들어, 문헌[Yang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:9942-9947 (2002); Calegari *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:14236 (2002); Byrom *et al.*, *Ambion TechNotes*, 10(1):4-6 (2003); Kawasaki *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 31:981-987 (2003); Knight *et al.*, *Science*, 293:2269-2271 (2001); 및 Robertson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 243:82 (1968)] 참고). 바람직하게는, dsRNA는 적어도 50개 뉴클레오타이드 내지 약 100, 200, 300, 400, 또는 500개 뉴클레오타이드 길이이다. dsRNA는 1000, 1500, 2000, 5000개 뉴클레오타이드 길이 또는 그 초과 길이일 수 있다. dsRNA는 전체 유전자 전사체 또는 부분적인 유전자 전사체를 암호화할 수 있다. 특정 경우에, siRNA는 플라스미드에 의해 암호화될 수 있다(예를 들어, 자동으로 헤어핀 루프를 갖는 듀플렉스로 접히는 서열로 전사됨).
- [0035] 구 "표적 유전자의 발현을 저해하는"은, 본 발명의 siRNA가 표적 유전자의 발현을 침묵, 감소, 또는 저해하는 능력을 지칭한다. 유전자 침묵의 정도를 조사하기 위해서, 시험 샘플(예를 들어, 표적 유전자를 발현하는 관심 대상 유기체로부터의 생물학적 샘플 또는 표적 유전자를 발현하는 배양물 중의 세포의 샘플)은 표적 유전자의 발현을 침묵, 감소 또는 저해하는 siRNA와 접촉된다. 시험 샘플에서 표적 유전자의 발현을 siRNA와 접촉되지 않은 대조군 샘플(예를 들어, 표적 유전자를 발현하는 관심대상 유기체로부터의 생물학적 샘플 또는 표적 유전자를 발현하는 배양물 중의 세포의 샘플)에서의 표적 유전자의 발현과 비교한다. 대조군 샘플(예를 들어, 표적 유전자를 발현하는 샘플)에 100%의 값이 할당될 수 있다. 특정 실시형태에, 표적 유전자의 발현의 침묵, 저해, 또는 감소는 대조군 샘플(예를 들어, 완충액 단독, 상이한 유전자를 표적화하는 siRNA 서열, 스كر램블드(scrambled) siRNA 서열 등)과 비교할 때 시험 샘플의 값이 약 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% 또는 0%인 경우 달성된다. 적합한 검정은 예를 들어, 닷 블랏(dot blot), 노던 블랏(Northern blot), 현장 혼성화(in situ hybridization), ELISA, 면역침강, 효소 기능 및 당업자에게 공지된 표현형 검정과 같은 당업자에게 공지된 기술을 이용한 단백질 또는 mRNA 수준의 조사를 비제한적으로 포함한다.
- [0036] 용어 "합성 활성화기"는, 원자에 부착되어 그 원자가 또 다른 반응기와 공유 결합을 형성하도록 활성화시킬 수 있는 기를 지칭한다. 합성 활성화기의 특성은 그것이 활성화하는 원자에 좌우될 수 있다고 이해된다. 예를 들어, 합성 활성화기가 산소 원자에 부착되는 경우, 합성 활성화기는 또 다른 반응기와 결합(예를 들어, 에스터, 카바메이트, 또는 에터 결합)을 형성하도록 그 산소 원자를 활성화시킬 기이다. 이러한 활성화기는 공지되어 있다. 산소 원자에 부착될 수 있는 합성 활성화기의 예는 아세테이트, 석신에이트, 트리플레이트 및 메실레이트를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 합성 활성화기가 카복실산의 산소 원자에 부착되는 경우, 합성 활성화기는 공지된 커플링 시약(예를 들어, 공지된 아마이드 커플링 시약)으로부터 유래될 수 있는 기일 수 있다. 이러한 커플링 시약은 공지되어 있다. 이러한 커플링 시약의 예는 N,N'-다이사이클로헥실카보다이미드

(DCC), 하이드록시벤조트라이아졸(HOBt), N-(3-다이메틸아미노프로필)-N'-에틸카보네이트(EDC), (벤조트라이아졸-1-일옥시)트리스(다이메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트(BOP), 벤조트라이아졸-1-일-옥시트라이피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트(PyBOP) 또는 O-벤조트라이아졸-1-일-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(HBTU)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0037] 치료 핵산, 예컨대, siRNA의 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은, 목적하는 효과, 예를 들어, siRNA의 부재 하에서 검출된 정상 발현 수준과 비교하여 표적 서열의 발현의 저해를 생성시키기에 충분한 양이다. 특정 실시형태에, 표적 유전자 또는 표적 서열의 발현의 저해는 대조군(예를 들어, 완충액 단독, 상이한 유전자를 표적화하는 siRNA 서열, 스크램블드 siRNA 서열 등)과 비교할 때 siRNA로 획득된 값이 약 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% 또는 0%인 경우 달성된다. 표적 유전자 또는 표적 서열의 발현을 측정하기에 적합한 검정은 예를 들어, 닷 블랏, 노던 블랏, 현장 혼성화, ELISA, 면역침강, 효소 기능 및 당업자에게 공지된 표현형 검정과 같은 당업자에게 공지된 기술을 이용한 단백질 또는 mRNA 수준의 조사를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0038] 용어 "핵산"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 적어도 2개의 뉴클레오타이드(즉, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드)를 단일- 또는 이중- 가닥 형태로 함유하는 중합체를 지칭하며, DNA 및 RNA를 포함한다. "뉴클레오타이드"는 당 데옥시리보스(DNA) 또는 리보스(RNA), 염기 및 포스페이트기를 함유한다. 뉴클레오타이드는 포스페이트기를 통해 함께 연결된다. "염기"는 천연 화합물 아데닌, 티민, 구아닌, 사이토신, 우라실, 이노신 및 천연 유사체를 추가로 포함하는 퓨린 및 피리미딘, 및 새로운 반응기, 예컨대, 비제한적으로 아민, 알코올, 티올, 카복실레이트, 및 알킬할라이드를 배치하는 변형을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 퓨린 및 피리미딘의 합성 유도체를 포함한다. 핵산은 합성, 자연 발생, 및 비-자연 발생이고, 기준 핵산과 동일한 결합 특성을 갖는 공지된 뉴클레오타이드 유사체 또는 변형된 골격 잔기 또는 링키지를 함유하는 핵산을 포함한다. 이러한 유사체 및/또는 변형된 잔기의 예는 비제한적으로 포스포포티오에이트, 포스포라미데이트, 메틸 포스포네이트, 카이럴-메틸 포스포네이트, 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드 및 펩타이드-핵산(PNA)을 포함한다. 추가로, 핵산은 하나 이상의 UNA 모이어티를 포함할 수 있다.

[0039] 용어 "핵산"은, 일반적으로 올리고뉴클레오타이드라고 지칭되는 60개 이하의 뉴클레오타이드를 함유하는 단편, 및 폴리뉴클레오타이드라고 지칭되는 더 긴 단편을 갖는 임의의 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 데옥시리보올리고뉴클레오타이드는 이러한 당의 5' 및 3' 탄소의 포스페이트에 공유 결합되어 교호하는 분지형 중합체를 형성하는 데옥시리보스라고 지칭되는 5탄당으로 이루어진다. DNA는 예를 들어, 안티센스 분자, 플라스미드 DNA, 사전 축합된 DNA, PCR 산물, 벡터, 발현 카세트, 키메라 서열, 염색체 DNA 또는 이들군의 유도체 및 조합물의 형태일 수 있다. 리보올리고뉴클레오타이드는 5-탄당이 리보스인 유사한 반복 구조로 이루어진다. RNA는 예를 들어, 작은 간섭 RNA(siRNA), 다이스-기질(Dicer-substrate) dsRNA, 작은 헤어핀 RNA(shNA), 비대칭 간섭 RNA(aiRNA), 마이크로RNA(miRNA), mRNA, tRNA, rRNA, tRNA, 바이러스 RNA(vRNA) 및 이의 조합물의 형태일 수 있다. 따라서, 본 발명과 관련하여, 용어 "폴리뉴클레오타이드" 및 "올리 고뉴클레오타이드"는 자연-발생 염기, 당 및 당 간(골격) 링키지로 이루어진 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드 단량체의 중합체 또는 올리고머를 지칭한다. 용어 "폴리뉴클레오타이드" 및 "올리 고뉴클레오타이드"는 또한 유사하게 기능하는 비-자연 발생하는 단량체 또는 이의 부분을 포함하는 중합체 또는 올리고머를 포함한다. 이러한 변형된 또는 치환된 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어, 향상된 세포 흡수, 감소된 면역원성, 및 뉴클레아제의 존재 하에 증가된 안정성과 같은 특성으로 인해서 네이티브 형태보다 종종 선호된다.

[0040] 달리 제시되지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 이의 보존적으로 변형된 변이체(예를 들어, 축퇴 코돈 치환), 대립유전자, 오솔로그(ortholog), SNP 및 상보성 서열뿐만 아니라 명시적으로 나타낸 서열을 내재적으로 포함한다. 구체적으로, 축퇴 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 세 번째 위치가 혼합된-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다(Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)).

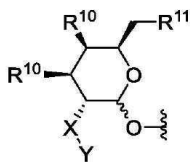
[0041] 용어 "유전자"는 폴리펩타이드 또는 전구체 폴리펩타이드의 생산에 필요한 부분 길이 또는 전체 길이 암호 서열을 포함하는 핵산(예를 들어, DNA 또는 RNA) 서열을 지칭한다.

[0042] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "유전자 산물"은 RNA 전사체 또는 폴리펩타이드와 같은 유전자의 산물을 지칭한다.

- [0043] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "알킬"은 달리 언급하지 않는 한, 그 자체로 또는 또 다른 치환체의 일부로서, 지정된 탄소 원자 수(즉, C₁₋₈은 1 내지 8개의 탄소를 의미함)를 갖는, 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 라디칼을 의미한다. 알킬기의 예는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소-프로필, n-부틸, t-부틸, 이소-부틸, sec-부틸, n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸 등을 포함한다. 용어 "알켄일"은 하나 이상의 이중 결합을 갖는 불포화 알킬 라디칼을 지칭한다. 유사하게, 용어 "알킨일"은 하나 이상의 삼중 결합을 갖는 불포화 알킬 라디칼을 지칭한다. 이러한 불포화 알킬기의 예는 바이닐, 2-프로펜일, 크로틸, 2-아이소펜텐일, 2-(부타다이엔일), 2,4-펜타다이엔일, 3-(1,4-펜타다이엔일), 에틸일, 1- 및 3-프로핀일, 3-부틴일 더 고급 유사체 및 이성질체를 포함한다.
- [0044] 용어 "알킬렌"은 그 자체로서 또는 또 다른 치환기의 일부로서 -CH₂CH₂CH₂CH₂- 및 -CH(CH₃)CH₂CH₂-로 예시된 바와 같은 알칸(선형 및 분지형 알칸 포함)으로부터 유래된 2가 라디칼을 의미한다.
- [0045] 용어 "사이클로알킬", "탄소환식" 또는 "탄소환"은 고리 원자의 전체수가 3 내지 20개인 탄화수소 고리계(예를 들어, 3 내지 20원의 사이클로알킬은 3 내지 20개 고리 원자를 갖는 사이클로알킬이거나, 또는 C₃₋₂₀ 사이클로알킬은 3 내지 20개의 탄소 고리 원자를 갖는 사이클로알킬임)를 지칭하고, 3 내지 5원의 사이클로알킬은 완전히 포화되거나 또는 고리 꼭지점들 사이에 1개 이하의 이중 결합을 갖고, 6원의 사이클로알킬 또는 더 큰 것은 완전히 포화되거나 또는 고리 꼭지점들 사이에 2개 이하의 이중 결합을 갖는다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "사이클로알킬", "탄소환식", 또는 "탄소환"은 또한 이환식, 다환식 및 스파이로사이클릭 탄화수소 고리 시스템, 예를 들어, 바이사이클로[2.2.1]헵탄, 피난, 바이사이클로[2.2.2]옥탄, 아다만탄, 노보렌, 스파이로사이클릭 C₅₋₁₂ 알칸 등을 지칭하는 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어, "알켄일", "알킨일", "사이클로알킬", "탄소환", 및 "탄소환식"은 이의 모노 및 폴리할로겐화된 변이체를 포함하는 것을 의미한다.
- [0046] 용어 "헤테로사이클로알킬", "헤테로환식", 또는 "헤테로사이클"은, 고리 원자로서, N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 10개의 헤테로원자(여기서 질소 및 황 원자는 선택적으로 산화되고, 질소 원자(들)는 선택적으로 4차화됨)를 함유하는 총 3 내지 20개의 고리 원자를 갖는 포화 또는 부분적으로 불포화된 고리 시스템 라디칼을 지칭한다(예를 들어, 3 내지 20원의 헤테로사이클로알킬은 3 내지 20개의 고리 원자를 갖는 헤테로사이클로알킬 라디칼이고, C₂₋₁₉ 헤테로사이클로알킬은 3 내지 10개의 고리 원자를 갖는 헤테로사이클로알킬이고, 2 내지 19개의 고리 원자는 탄소임). 달리 제시되지 않는 한, "헤테로사이클로알킬", "헤테로환식", 또는 "헤테로사이클" 고리는 단환식, 이환식, 스파이로사이클릭 또는 다환식 고리 시스템일 수 있다. "헤테로사이클로알킬", "헤테로환식", 또는 "헤테로사이클" 고리의 비제한적인 예는 피롤리딘, 피페리딘, N-메틸피페리딘, 이미다졸리딘, 피라졸리딘, 부티로락탐, 발레로락탐, 이미다졸리딘온, 히단토인, 다이옥솔란, 프탈이미드, 피페리딘, 피리미딘-2,4(1H,3H)-다이온, 1,4-다이옥산, 모폴린, 티오모폴린, 티오모폴린-S-옥사이드, 티오모폴린-S,S-옥사이드, 피페라진, 피란, 피리돈, 3-피롤린, 티오피란, 피론, 테트라하이드로퓨란, 테트라하이드로티오펜, 퀴누클리딘, 트로판, 2-아자스파이로[3.3]헵탄, (1R,5S)-3-아자바이사이클로[3.2.1]옥탄, (1s,4s)-2-아자바이사이클로[2.2.2]옥탄, (1R,4R)-2-옥사-5-아자바이사이클로[2.2.2]옥탄 등을 포함한다. "헤테로사이클로알킬", "헤테로환식", 또는 "헤테로사이클"기는 하나 이상의 고리 탄소 또는 헤테로원자를 통해서 분자의 잔여부에 부착될 수 있다. "헤테로사이클로알킬", "헤테로환식" 또는 "헤테로사이클"은 이의 모노- 및 폴리-할로겐화된 변이체를 포함할 수 있다.
- [0047] 용어 "알콕시" 및 "알킬티오"는 그들의 통상적인 의미로 사용되며, 산소 원자("옥시") 또는 티오기를 통해서 분자의 잔여부에 부착된 이들 알킬기를 지칭하고, 이 모노- 및 폴리-할로겐화된 변이체를 추가로 포함한다.
- [0048] 용어 "할로" 또는 "할로겐"은, 달리 언급되지 않는 한, 그 자체로 또는 또 다른 치환기의 일부로서, 플루오린, 염소, 브로민, 또는 아이오딘 원자를 의미한다. 용어 "(할로)알킬"은 "알킬" 및 "할로알킬" 치환체 둘 다를 포함하는 것을 의미한다. 추가로, 용어 "할로알킬"은 모노할로알킬 및 폴리할로알킬을 포함하는 것을 의미한다. 예를 들어, 용어 "C₁₋₄ 할로알킬"은 트라이플루오로메틸, 2,2,2-트라이플루오로에틸, 4-클로로부틸, 3-브로모프로필, 다이플루오로메틸 등을 포함하는 것을 의미한다.
- [0049] 용어 "아릴"은 하나 이상의 기에 융합되든 융합되지 않든 6 내지 14개의 탄소 원자를 갖는 탄소환식 방향족기를 의미한다. 달리 제시되지 않는 한 아릴기의 예는 페닐, 나프틸, 바이페닐 등을 포함한다.
- [0050] 용어 "헤테로아릴"은 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 5개의 헤테로 원자를 함유하는 아릴 고리(들)를 지칭하고, 여기서 질소 및 황 원자는 선택적으로 산화되고, 질소 원자(들)은 선택적으로 4차화된다. 헤테로아릴기는

헤테로원자를 통해서 분자의 잔여부에 부착될 수 있다. 헤테로아릴기의 예는 피리딘, 피리다진일, 피라진일, 피리민다이닐, 트리아진일, 퀴놀린일, 퀴놀살린일, 퀴나졸린일, 시놀린일, 프탈라진일, 벤조트리아진일, 퓨린일, 벤즈이미다졸릴, 벤조피라졸릴, 벤조트리아졸릴, 벤즈아이속사졸릴, 이소벤조퓨릴, 이소인돌릴, 인돌리진일, 벤조트리아진일, 티에노피리딘일, 티에노피리미딘일, 피라졸로피리미딘일, 이미다조피리딘, 벤조티아졸릴, 벤조퓨란일, 벤조티엔일, 인돌릴, 퀴놀릴, 아이소퀴놀릴, 아이소티아졸릴, 피라졸릴, 인다졸릴, 프테리딘일, 이미다졸릴, 트리아아졸릴, 테트라졸릴, 옥사졸릴, 아이속사졸릴, 티아디아아졸릴, 피롤릴, 티아졸릴, 퓨릴, 티엔일 등을 포함한다.

[0051] 용어 당류는 단당류, 이당류 및 삼당류를 포함한다. 이 용어는, 글루코스, 수크로스, 프룩토스, 갈락토스뿐만 아니라 데옥시 당, 예컨대, 리보오스, 및 데옥시리보스 및 아미노당, 예컨대 갈락토사민을 포함한다. 당류 유도체는 국제 특허 공개 제WO 96/34005호 및 제97/03995호에 기술된 바와 같이 편리하게 제조될 수 있다. 당류는 에터 결합, 티오에터 결합(예를 들어, S-글리코시드), 아민 질소(예를 들어, N-글리코시드), 또는 탄소-탄소 결합(예를 들어, C-글리코시드)을 통해서 화학식 I의 화합물의 잔여부에 편리하게 연결될 수 있다. 일 실시형태에서 당류는 에터 결합을 통해서 화학식 I의 화합물의 잔여부에 편리하게 연결될 수 있다. 일 실시형태에서 용어 당류는 하기 화학식의 기를 포함한다:



[0052]

[0053] 식 중,

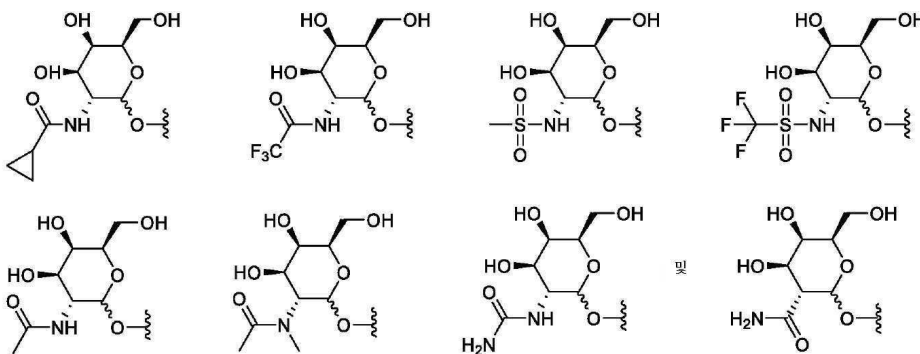
[0054] X는 NR³이고, Y는 -(C=O)R⁴, -SO₂R⁵ 및 -(C=O)NR⁶R⁷로부터 선택되거나; 또는 X는 -(C=O)-이고, Y는 NR⁸R⁹이며;

[0055] R³은 수소 또는 (C₁-C₄)알킬이고;

[0056] R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ 및 R⁹는 각각 수소, 할로, (C₁-C₄)알킬, (C₁-C₄)할로알킬, (C₁-C₄)알콕시 및 (C₁-C₄)할로알콕시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 선택적으로 치환된, (C₁-C₈)알킬, (C₁-C₈)할로알킬, (C₁-C₈)알콕시 및 (C₃-C₆)사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

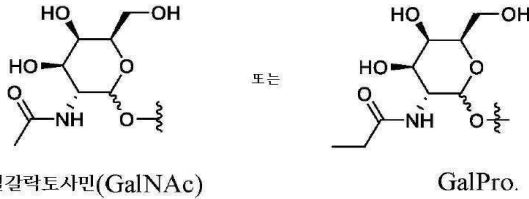
[0057] R¹⁰은 -OH, -NR⁸R⁹ 또는 -F이고; 그리고

[0058] R¹¹은 -OH, -NR⁸R⁹, -F 또는 할로, 하이드록실, 카복실, 아미노, (C₁-C₄)알킬, (C₁-C₄)할로알킬, (C₁-C₄)알콕시 및 (C₁-C₄)할로알콕시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 선택적으로 치환된 5원의 헤테로 사이클이다. 또 다른 실시형태에서 당류는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0059]

[0060] 또 다른 실시형태에서 당류는 하기일 수 있다:



[0061]

[0062] 용어 "동물"은 포유동물 중, 예컨대, 인간, 마우스, 래트, 개, 고양이, 햄스터, 기니피그, 토끼, 가축 등을 포함한다.

[0063] 용어 "지질"은 지방산의 에스터를 포함하지만 이에 제한되지 않고, 물 중에서 불용성이지만 다수의 유기 용매 중에서 가용성인 것을 특징으로 하는 유기 화합물의 군을 지칭한다. 이들은 통상적으로 적어도 3가지 부류로 분류된다: (1) 지방 및 오일뿐만 아니라 왁스를 포함하는 "단순 지질"; (2) 인 지질 및 당지질을 포함하는 "화합물 지질"; 및 (3) "유도 지질", 예컨대, 스테로이드.

[0064] 용어 "지질 입자"는 치료 핵산(예를 들어, siRNA)을 관심대상 표적 부위(예를 들어, 세포, 조직, 기관 등)에 전달하는 데 사용될 수 있는 지질 제형을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 지질 입자는 전형적으로, 양이온성 지질, 비-양이온성 지질(예를 들어, 당지질), 입자의 응집을 방지하는 접합된 지질(예를 들어, PEG-지질) 및 선택적으로 콜레스테롤로부터 형성된다. 전형적으로, 치료 핵산(예를 들어, siRNA)은 입자의 지질 부분 내에 캡슐화되어, 그것은 효소 분해가 방지될 수 있다.

[0065] 용어 "전자 밀도 코어"는 지질 입자를 기술하는 데 사용되는 경우 동결 투과 전자 현미경법("cryoTEM")을 사용하여 가시화될 때, 지질 입자의 내부 부분의 어두운 외관을 지칭한다. 본 발명의 일부 지질 입자는 전자 밀도 코어를 갖고 지질 이중층 구조가 없다. 본 발명의 일부 지질 입자는 전자 밀도 코어를 갖고, 지질 이중층 구조가 없고, 역 육각형 또는 입방 위상 구조를 갖는다. 이론에 얽매이지 않음은 아니지만, 비-이중층 지질 패키징은 내부에 물 및 핵산을 갖는 지질 실린더의 3차원 네트워크, 즉, 본질적으로, 핵산을 함유하는 수성 통로로 관입된 지질 소적을 제공한다고 생각된다.

[0066] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "SNALP"는 안정적인 핵산-지질 입자를 지칭한다. SNALP는 지질(예를 들어, 입자의 응집을 예방하는 양이온성 지질, 비-양이온성 지질 및 접합된 지질)로부터 제조된 입자이고, 여기서 핵산(예를 들어, siRNA)은 지질 내에 완전히 캡슐화된다. 특정 예에서, SNALP는 전신 응용에 특히 유용한데, 그 이유는 그것이 정맥내(i.v.) 주사 이후에 연장된 순환 반감기를 나타낼 수 있고, 그것이 원위 부위(예를 들어, 투여 부위로부터 물리적으로 이격된 부위)에서 축적될 수 있고, 그것이 이의 원위 부위에서 siRNA 발현을 매개할 수 있기 때문이다. 핵산은 PCT 공개 제WO 00/03683호에 언급된 바와 같이 축합제(condensing agent)와 복합체를 이룰 수 있고, SNALP 내에 캡슐화될 수 있으며, 이들의 개시 내용은 모든 목적을 위해서 이들의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0067] 본 발명의 지질 입자(예를 들어, SNALP)는 전형적으로 약 30nm 내지 약 150nm, 약 40nm 내지 약 150nm, 약 50nm 내지 약 150nm, 약 60nm 내지 약 130nm, 약 70nm 내지 약 110nm, 약 70nm 내지 약 100nm, 약 80nm 내지 약 100nm, 약 90nm 내지 약 100nm, 약 70 내지 약 90nm, 약 80nm 내지 약 90nm, 약 70nm 내지 약 80nm, 또는 약 30nm, 35nm, 40nm, 45nm, 50nm, 55nm, 60nm, 65nm, 70nm, 75nm, 80nm, 85nm, 90nm, 95nm, 100nm, 105nm, 110nm, 115nm, 120nm, 125nm, 130nm, 135nm, 140nm, 145nm, 또는 150nm의 평균 직경을 갖고, 실질적으로 비독성이다. 또한, 본 발명의 지질 입자 중에 존재하는 경우, 핵산은 뉴클레아제에 절단에 대해서 수성 용액 중에서 내성이다. 핵산-지질 입자 및 이의 제조 방법은 예를 들어, 미국 특허 공개 제20040142025호 및 제20070042031호에 개시되어 있고, 이들의 개시 내용은 모든 목적을 위해서 이들의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0068] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "캡슐화된 지질"은 완전 캡슐화되거나, 부분 캡슐화되거나 또는 둘 다인 치료 핵산, 예컨대, siRNA를 제공하는 지질 입자를 지칭할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 핵산(예를 들어, siRNA)은 (예를 들어, SNALP 또는 다른 핵산-지질 입자를 형성하기 위해서) 지질 입자 중에 완전 캡슐화된다.

[0069] 용어 "지질 접합체"는 지질 입자의 응집을 저해하는 접합된 지질을 지칭한다. 이러한 지질 접합체는 PEG-지질 접합체, 예를 들어, 다이알킬옥시프로필에 커플링된 PEG(예를 들어, PEG-DAA 접합체), 다이알실글리세롤에 커플링된 PEG(예를 들어, PEG-DAG 접합체), 콜레스테롤에 커플링된 PEG, 포스파티딜에탄올아민에 커플링된 PEG, 세

라마이드에 접합된 PEG(예를 들어, 미국 특허 제5,885,613호 참고), 양이온성 PEG 지질, 폴리옥사졸린(POZ)-지질 접합체, 폴리라마이드 올리고머(예를 들어, ATTA-지질 접합체) 및 이들의 혼합물 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. POZ-지질 접합체의 추가 예는 PCT 공개 제WO 2010/006282호에 기술되어 있다. PEG 또는 POZ는 지질에 직접 접합될 수 있거나 또는 링커 모이어터를 통해서 지질에 연결될 수 있다. 예를 들어, 비-에스터 함유 링커 모이어터 및 에스터-함유 링커 모이어터를 비롯한, PEG 또는 POZ를 지질에 커플링시키는 데 적합한 임의의 링커 모이어터가 사용될 수 있다. 특정 바람직한 실시형태에서, 비-에스터 함유 링커 모이어터, 예컨대, 아마이드 또는 카바메이트가 사용된다. 상기 특허 문헌 각각의 개시 내용은 모든 목적을 위해서 이들의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0070] 용어 "양친매성 지질"은 부분적으로, 지질 물질의 소수성 부분이 소수성 상 내에 배향되는 반면 친수성 부분이 수성 상을 향해 배향되는 임의의 적합한 물질을 지칭한다. 친수성 특징은 극성 또는 하전된 기, 예컨대, 탄수화물, 포스페이트, 카복실, 설페이트, 아미노, 설프하이드릴, 나이트로, 하이드록실 및 다른 유사한 기의 존재에 의해서 유래된다. 소수성은 장쇄의 포화 및 불포화된 지방족 탄화수소기를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 무극성 기, 및 하나 이상의 방향족, 지환족 또는 헤테로환식기(들)에 의해 치환된 이러한 기의 포함에 의해 부여될 수 있다. 양친매성 화합물의 예는 인지질, 아미노지질 스펅고지질을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0071] 인지질의 대표적인 예는 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티드산, 팔미토일올레오일 포스파티딜콜린, 라이소포스파티딜콜린, 라이소포스파티딜에탄올아민, 다이팔미토일 포스파티딜콜린, 다이올레오일포스파티딜콜린, 다이스테아로일포스파티딜콜린 및 다이리놀레오일포스파티딜콜린을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 인이 결합된 다른 화합물, 예컨대, 스펅고지질, 글리코스펅고지질 패밀리, 다이아실글리세롤 및 β -아실옥시산이 양친매성 지질로서 지정된 군에 포함된다. 추가로, 상기에 기술된 양친매성 지질은 트라이글리세리드 및 스테롤을 비롯한 다른 지질과 혼합될 수 있다.

[0072] 용어 "중성 지질"은 선택된 pH에서 하전되지 않은 형태 또는 중성 쓰비터이온성 형태로 존재하는 다수의 지질 종 임의의 것을 지칭한다. 생리 pH에서, 이러한 지질은 예를 들어, 다이아실포스파티딜콜린, 다이아실포스파티딜에탄올아민, 세라마이드, 스펅고미엘린, 세팔린, 콜레스테롤, 세레브로사이드 및 다이아실글리세롤을 포함한다.

[0073] 용어 "비-양이온성 지질"은 임의의 양친매성 지질뿐만 아니라 임의의 다른 중성 지질 또는 음이온성 지질을 지칭한다.

[0074] 용어 "음이온성 지질"은 생리 pH에서 음하전되는 임의의 지질을 지칭한다. 이러한 지질은 포스파티딜글리세롤, 카디오리핀, 다이아실포스파티딜세린, 다이아실포스파티드산, N-도데칸오일 포스파티딜에탄올아민, N-석신일 포스파티딜에탄올아민, N-글루타릴포스파티딜에탄올아민, 라이실포스파티딜글리세롤, 팔미토일올레오일포스파티딜글리세롤(POPG) 및 중성 지질에 결합된 다른 음이온성 변형기를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0075] 용어 "소수성 지질"은 장쇄의 포화 및 불포화된 지방족 탄화수소기를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 무극성 기, 및 하나 이상의 방향족, 지환족 또는 헤테로환식기(들)에 의해 선택적으로 치환된 이러한 기를 갖는 화합물을 지칭한다. 적합한 예는 다이아실글리세롤, 다이알킬글리세롤, N-N-다이알킬아미노, 1,2-다이아실옥시-3-아미노프로판 및 1,2-다이알킬-3-아미노프로판을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0076] 용어 "양이온성 지질" 및 "아미노 지질"은 1개, 2개, 3개 또는 그 초과 지방산 또는 지방 알킬 사슬 및 pH-적정 가능한 아미노 헤드기(예를 들어, 알킬아미노 또는 다이알킬아미노 헤드기)를 갖는 이러한 지질 및 이들의 염을 포함하도록 본 명세서에 상호 교환 가능하게 사용된다. 양이온성 지질은 전형적으로 양이온성 지질의 pK_a 보다 낮은 pH에서 양성자화되고(즉, 양으로 하전되고), 그리고 pK_a 보다 높은 pH에서 실질적으로 중성이다. 본 발명의 양이온성 지질은 또한 적정 가능한 양이온성 지질이라고 지칭될 수 있다. 일부 실시형태에서, 양이온성 지질은 양성자화 가능한 3차 아민(예를 들어, pH-적정 가능한) 헤드기; C_{18} 알킬 쇠(여기서 각각의 알킬 쇠는 독립적으로 0 내지 3개(예를 들어, 0, 1, 2 또는 3개)의 이중 결합을 가짐); 및 헤드기와 알킬 쇠 사이의 에터, 에스터 또는 케탈 링키지를 포함한다. 이러한 양이온성 지질은 DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA, γ -DLinDMA, DLin-K-DMA, DLin-K-C2-DMA(DLin-C2K-DMA, XTC2 및 C2K라고도 공지됨), DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLen-C2K-DMA, γ -DLin-C2K-DMA, DLin-M-C2-DMA(MC2라고도 공지됨), DLin-M-C3-DMA(MC3이라고도 공지됨) 및 (DLin-MP-DMA)(1-B11이라고도 공지됨)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0077] 용어 "알킬아미노"는 화학식 -N(H)R의 기를 포함하고, 식 중 R은 본 명세서에 정의된 바와 같은 알킬이다.

- [0078] 용어 "다이알킬아미노"는 화학식 $-NR_2$ 의 기를 포함하고, 식 중 각각의 R은 독립적으로 본 명세서에 정의된 바와 같은 알킬이다.
- [0079] 용어 "염"은 임의의 음이온성 및 양이온성 복합체, 예를 들면, 양이온성 지질 및 하나 이상의 음이온 사이에 형성된 복합체 등을 포함한다. 음이온의 비제한적인 예는, 무기 음이온 및 유기 음이온, 예를 들어, 하이드라이드, 플루오라이드, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 옥살레이트(예를 들어, 헤미옥살레이트), 포스페이트, 포스포네이트, 하이드로겐 포스페이트, 다이하이드로겐 포스페이트, 옥사이드, 카보네이트, 바이카보네이트, 니트레이트, 니트라이드, 니트라이드, 바이설파이트, 설파이드, 설파이트, 바이설파이트, 설파이트, 티오설파이트, 하이드로겐 설파이트, 보레이트, 폼에이트, 아세테이트, 벤조에이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 아크릴레이트, 폴리아크릴레이트, 퓨마레이트, 말레에이트, 이타네이트, 글리콜레이트, 글루코네이트, 말레이트, 만델레이트, 티글레이트, 아스코르베이트, 살리실레이트, 폴리메타크릴레이트, 퍼클로레이트, 클로레이트, 클로라이드, 하이포클로라이드, 브로메이트, 하이포브로마이트, 아이오테이트, 알킬설포네이트, 아릴설포네이트, 아르세네이트, 아르세나이트, 크로메이트, 다이크로메이트, 사이아나이드, 사이아네이트, 티오사이아네이트, 하이드록사이드, 과산화물, 펄마가네이트 및 이들의 혼합물을 포함한다. 특정한 실시형태에서, 본 명세서에서 개시된 양이온성 지질의 염은 결정성 염이다.
- [0080] 용어 "아실"은 부착점에서 탄소가 하기에 정의된 바와 같이 옥소기로 치환된 임의의 알킬, 알켄일, 또는 알킨일을 포함한다. 하기가 아실기의 비제한적인 예이다: $-C(=O)$ 알킬, $-C(=O)$ 알켄일 및 $-C(=O)$ 알킨일.
- [0081] 용어 "융합성(fusogenic)"은 세포의 막과 융합하는 지질 입자, 예컨대, SNALP의 능력을 지칭한다. 막은 원형질막, 또는 소기관, 예를 들면, 엔도솜, 핵 등을 둘러싸는 막일 수 있다.
- [0082] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "수성 용액"은 물을 전체적으로 또는 부분적으로 포함하는 조성물을 지칭한다.
- [0083] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유기 지질 용액"은 지질을 갖는 유기 용매를 전체적으로 또는 부분적으로 포함하는 조성물을 지칭한다.
- [0084] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "원위 부위"는 물리적으로 분리된 부위를 지칭하는데, 이것은 인접한 모세혈관상에 제한되지 않고, 유기체 전체에서 광범위하게 분포된 부위를 포함한다.
- [0085] 핵산-지질 입자, 예컨대, SNALP와 관련하여 "혈청-안정적인"은 입자가 유리 DNA 또는 RNA를 상당히 분해할 혈청 또는 뉴클레아제 검정에 노출된 후 상당히 분해되지 않는다는 것을 의미한다. 적합한 검정은 예를 들어, 표준 혈청 검정, DNase 검정 또는 RNase 검정을 포함한다.
- [0086] "전신 전달"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 유기체 내에서 활성제, 예컨대, siRNA의 광범위한 생체분포로 이어지는 지질 입자의 전달을 지칭한다. 일부 투여 기술은 특정 작용제의 전신 전달로 이어질 수 있지만, 다른 것은 그렇지 않다. 전신 전달은 유용한 양, 바람직하게는 치료량의 작용제가 신체의 대부분의 부위에 노출된다는 것을 의미한다. 광범위한 생체분포를 획득하기 위해서, 일반적으로, 작용제가 투여 부위에 대해서 원위의 질환 부위에 도달하기 전에, (예컨대, 처음 통과 기관(간, 폐 등)에 의해서 또는 신속한, 비특이적 세포 결합에 의해서) 급속히 분해 또는 제거되지 않도록 하는 혈액 수명을 필요로 한다. 지질 입자의 전신 전달은 예를 들어, 정맥내, 피하 및 복막내를 비롯한 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해서 일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 지질 입자의 전신 전달은 정맥내 전달에 의한 것이다.
- [0087] "국지적 전달"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 활성제, 예를 들면, siRNA를 유기체 내의 표적 부위에 직접 전달하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 작용제는 질환 부위, 다른 표적 부위, 또는 표적 기관, 예컨대, 간, 심장, 췌장, 신장 등 내로 직접 주사에 의해 국지적으로 전달될 수 있다.
- [0088] 지질:siRNA의 비를 기술하는 데 본 명세서에서 사용되는 경우, 용어 "지질"은 입자 중의 총 지질을 지칭한다.
- [0089] 당업자는 카이럴 중심을 갖는 본 발명의 화합물이 광학 활성 형태 및 라세미체 형태로 존재할 수 있고, 단리될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 일부 화합물은 다형성(polymorphism)을 나타낼 수 있다. 본 발명은 본 명세서에 기술된 유용한 특성을 보유하는 본 발명의 화합물의 임의의 라세미체 형태, 광학-활성 형태, 다형성 형태 또는 입체이성질체 형태 또는 이들의 혼합물을 포함한다는 것이 이해되어야 하며, 당업계에 (예를 들어, 라세미체 형태의 분할에 의해서, 재결정화 기술에 의해서, 광학 활성 출발 물질로부터 합성에 의해서, 카이럴 합성에 의해서 또는 카이럴 고정상을 사용한 크로마토그래피 분리에 의해서) 광학 활성 형태를 제조하는 방법이 공지되어

있다.

[0090] 본 명세서에서 화학식의 화합물 내의 결합이 비입체화학적 방식(예를 들어, 평면)으로 도시된 경우, 결합이 부착된 원자는 모든 입체화학 가능성을 포함한다. 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본 명세서에서 화학식의 화합물 내의 결합이 정의된 입체화학 방식(예를 들어, 볼드, 볼드-빼기, 점선 또는 점선-빼기)으로 도시된 경우, 입체화학 결합이 부착된 원자는 도시된 절대 입체이성질체가 풍부함을 이해해야 한다. 일 실시형태에서, 화합물은 적어도 51%의 도시된 절대 입체이성질체일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 화합물은 적어도 60%의 도시된 절대 입체이성질체일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 화합물은 적어도 80%의 도시된 절대 입체이성질체일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 화합물은 적어도 90%의 도시된 절대 입체이성질체일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 화합물은 적어도 95%의 도시된 절대 입체이성질체일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 화합물은 적어도 99%의 도시된 절대 입체이성질체일 수 있다.

[0091] 본 명세서에서 달리 언급되지 않는 한, 용어 "약"은, 값 또는 값의 범위와 관련하여 사용되는 경우, 언급된 값 또는 값의 범위의 ± 5%를 의미한다.

[0092] **siRNA 분자의 생성**

[0093] siRNA는 예를 들어, 하나 이상의 단리된 작은-간접 RNA(siRNA) 듀플렉스로서, 더 긴 이중-가닥 RNA(dsRNA)로서 또는 DNA 플라스미드 내의 전사 카세트로부터 전사된 siRNA 또는 dsRNA로서를 비롯하여, 다양한 형태로 제공될 수 있다. 일부 실시형태에서, siRNA는 효소에 의해서 또는 부분/전체적인 유기 합성에 의해서 생산될 수 있고, 변형된 리보뉴클레오타이드는 시험관내 효소 또는 유기 합성에 의해 도입될 수 있다. 특정 예에서, 각각의 가닥은 화학적으로 제조된다. RNA 분자의 합성 방법은 예를 들어, 문헌[Verma and Eckstein (1998)]에 기술되거나 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 화학적 합성 방법으로 당업계에 공지되어 있다.

[0094] PCR 방법(미국 특허 제4,683,195호 및 제4,683,202호; 문헌[*PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis et al., eds, 1990)] 참고)과 같이, RNA의 단리 방법, RNA의 합성 방법, 핵산의 혼성화 방법, cDNA 라이브러리의 제조 및 스크리닝 방법 및 PCR의 수행 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Gubler and Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983)]; 상기 문헌[Sambrook et al.,]; 상기 문헌[Ausubel et al.] 참고). 발현 라이브러리는 또한 당업자에게 널리 공지되어 있다. 본 발명에 유용한 일반적인 방법을 개시하는 추가 기본 문헌은 문헌[Sambrook et al., *molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); 및 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994)]을 포함한다. 이들 참고문헌의 개시 내용은 모든 목적을 위해서 이들의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0095] 전형적으로, siRNA는 화학적으로 합성된다. 본 발명의 siRNA 분자를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 당업계에 공지된 다양한 기술 중 임의의 것, 예컨대, 문헌[Usman et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987); Scaringe et al., *Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990); Wincott et al., *Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684 (1995); 및 Wincott et al., *Methods Mol. Bio.*, 74:59(1997)]에 기술된 것을 사용하여 합성될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드의 합성은 5'-단부에서 일반적인 핵산 보호기 및 커플링기, 예컨대, 다이메톡시트리틸 및 3'-단부에서 포스포라미다이트를 사용한다. 비제한적인 예로서, 0.2 μmol 규모 프로토콜을 사용하여 Applied Biosystems 합성기에서 작은 규모 합성을 수행할 수 있다. 대안적으로, 0.2 μmol 규모의 합성은 프로토젠 (Protogene)(미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재)으로부터의 96웰 플레이트 합성기에서 수행될 수 있다. 그러나, 더 큰 규모 또는 더 작은 규모의 합성이 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 올리고뉴클레오타이드 합성, RNA 탈보호 방법, RNA 정제 방법에 적합한 시약은 당업자에게 공지되어 있다.

[0096] siRNA 분자는 2개의 상이한 올리고뉴클레오타이드로부터 조립될 수 있고, 여기서 하나의 올리고뉴클레오타이드는 센스 가닥을 포함하고, 나머지는 siRNA의 안티센스 가닥을 포함한다. 예를 들어, 각각의 가닥은 별개로 합성될 수 있고, 합성 및/또는 탈보호 이후에 혼성화 또는 결합과 함께 연결될 수 있다.

[0097] **본 발명의 실시형태**

[0098] 실시예 25의 표 1은 B형 간염 바이러스("HBV"라고 약칭)를 표적으로 하는 일련의 화학적으로 변형된 siRNA 듀플렉스(제시된 센스 및 안티센스 가닥)를 기술한다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, 본 발명의 화합물은 이러한 siRNA(즉, siRNA 1 내지 37)를 포함할 수 있다.

[0099] 따라서, 본 발명의 일 양상은 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7, 서열번호 9, 서열번호 11, 서열번호 13, 서열번호 15, 서열번호 17, 서열번호 19, 서열번호 21, 서열번호 23, 서열번호 25, 서열번호 27, 서

열번호 29, 서열번호 31, 서열번호 33, 서열번호 35, 서열번호 37, 서열번호 39, 서열번호 41, 서열번호 43, 서열번호 45, 서열번호 47, 서열번호 49, 서열번호 51, 서열번호 53, 서열번호 55, 서열번호 57, 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 65, 서열번호 67, 서열번호 69, 서열번호 71 및 서열번호 73로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 분자이다.

[0100] 본 발명의 또 다른 양상은 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 20, 서열번호 22, 서열번호 24, 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 30, 서열번호 32, 서열번호 34, 서열번호 36, 서열번호 38, 서열번호 40, 서열번호 42, 서열번호 44, 서열번호 46, 서열번호 48, 서열번호 50, 서열번호 52, 서열번호 54, 서열번호 56, 서열번호 58, 서열번호 60, 서열번호 62, 서열번호 64, 서열번호 66, 서열번호 68, 서열번호 70, 서열번호 72 및 서열번호 74로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 분자이다.

[0101] 본 발명의 일 양상은 본 명세서에 기술된 핵산 분자 또는 이들의 조합물을 포함하는 조성물이다.

[0102] 본 발명의 일 양상은 siRNA 1(서열번호 1 및 2), 2(서열번호 3 및 4), 3(서열번호 5 및 6), 4(서열번호 7 및 8), 5(서열번호 9 및 10), 6(서열번호 11 및 12), 7(서열번호 13 및 14), 8(서열번호 15 및 16), 9(서열번호 17 및 18), 10(서열번호 19 및 20), 11(서열번호 21 및 22), 12(서열번호 23 및 24), 13(서열번호 25 및 26), 14(서열번호 27 및 28), 15(서열번호 29 및 30), 16(서열번호 31 및 32), 17(서열번호 33 및 34), 18(서열번호 35 및 36), 19(서열번호 37 및 38), 20(서열번호 39 및 40), 21(서열번호 41 및 42), 22(서열번호 43 및 44), 23(서열번호 45 및 46), 24(서열번호 47 및 48), 25(서열번호 49 및 50), 26(서열번호 51 및 52), 27(서열번호 53 및 54), 28(서열번호 55 및 56), 29(서열번호 57 및 58), 30(서열번호 59 및 60), 31(서열번호 61 및 62), 32(서열번호 63 및 64), 33(서열번호 65 및 66), 34(서열번호 67 및 68), 35(서열번호 69 및 70), 36(서열번호 71 및 72) 및 37(서열번호 73 및 74)로 이루어진 군으로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자를 제공한다.

[0103] 본 발명의 또 다른 양상은 본 명세서에 기술된 이중 가닥 siRNA 분자를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0104] 일 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0105] 본 발명의 일 양상은 본 발명의 개요에 제시된 바와 같은 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염이다.

[0106] 화학식 I의 화합물의 일 실시형태에서, R¹은 표적화 리간드이고;

[0107] L¹은 존재하지 않거나 또는 연결기이며;

[0108] L²는 존재하지 않거나 또는 연결기이고;

[0109] R²는 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자이며;

[0110] 고리 A는 존재하지 않거나, 3 내지 20원의 사이클로알킬, 5 내지 20원의 아릴, 5 내지 20원의 헤테로아릴 또는 3 내지 20원의 헤테로사이클로알킬이고;

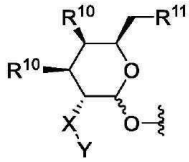
[0111] 각각의 R^A는 수소, 하이드록시, CN, F, Cl, Br, I, -C₁₋₂ 알킬-OR^B 및 C₁₋₈ 알킬(할로, 하이드록시 및 C₁₋₃ 알콕시로 부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 선택적으로 치환됨)로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

[0112] R^B은 수소, 보호기, 고체 지지체에 대한 공유 결합 또는 고체 지지체에 결합된 연결기에 대한 결합이며; 그리고

[0113] n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0114] 일 실시형태에서 R¹은 -C(H)_(3-p)(L³-당류)_p이고, 여기서 각각의 L³은 독립적으로 연결기이고; p는 1, 2 또는 3이며; 당류는 단당류 또는 이당류이다.

[0115] 일 실시형태에서 당류는,



[0116]

[0117]

[0118]

[0119]

[0120]

[0121]

[0122]

[0123]

[0124]

또는 이의 염이고,

식 중,

X는 NR³이고, Y는 -(C=O)R⁴, -SO₂R⁵ 및 -(C=O)NR⁶R⁷로부터 선택되거나; 또는 X는 -(C=O)-이고, Y는 NR⁸R⁹이며;

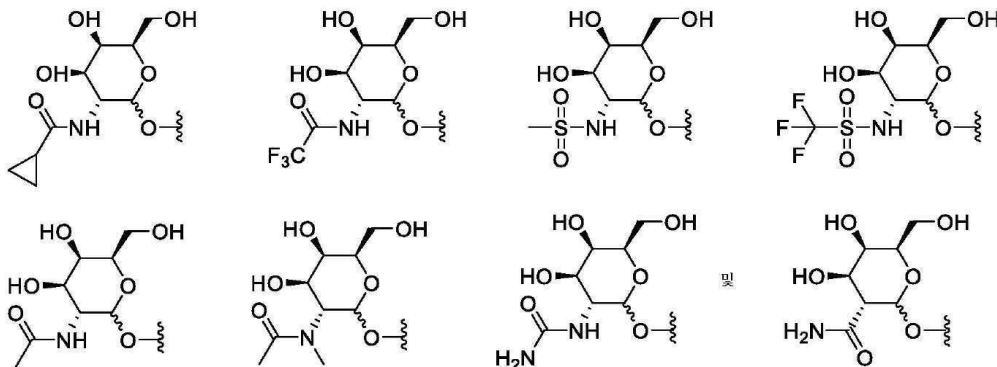
R³은 수소 또는 (C₁-C₄)알킬이고;

R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ 및 R⁹는 각각 수소, 할로, (C₁-C₄)알킬, (C₁-C₄)할로알킬, (C₁-C₄)알콕시 및 (C₁-C₄)할로알콕시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 선택적으로 치환된, (C₁-C₈)알킬, (C₁-C₈)할로알킬, (C₁-C₈)알콕시 및 (C₃-C₆)사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

R¹⁰은 -OH, -NR⁸R⁹ 또는 -F이고; 그리고

R¹¹은 -OH, -NR⁸R⁹, -F 또는 할로, 하이드록실, 카복실, 아미노, (C₁-C₄)알킬, (C₁-C₄)할로알킬, (C₁-C₄)알콕시 및 (C₁-C₄)할로알콕시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 선택적으로 치환된 5원의 헤테로 사이클이다.

일 실시형태에서 당류는,



[0125]

[0126]

[0127]

및 이의 염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

일 실시형태에서 당류는 하기이다:



N-아세틸갈락토사민 (GalNAc)

GalPro

[0128]

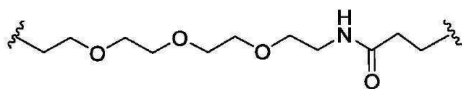
[0129]

일 실시형태에서 각각의 L³은 독립적으로 0 내지 50개의 탄소 원자를 갖는, 2가의 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소 체이고, 여기서 탄화수소 체 내의 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4 개)은 -O-, -NR^X-, -NR^X-C(=O)-, -C(=O)-NR^X- 또는 -S-에 의해서 선택적으로 대체되고, R^X는 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이고, 여기서 탄화수소 체는 (C₁-C₆)알콕시, (C₃-C₆)사이클로알킬, (C₁-C₆)알칸오일, (C₁-C₆)알칸오일옥시,

(C₁-C₆)알콕시카보닐, (C₁-C₆)알킬티오, 아자이드, 사이아노, 나이트로, 할로, 하이드록시, 옥소(=O), 카복시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로아릴 및 헤테로아릴옥시로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 치환체로 선택적으로 치환된다.

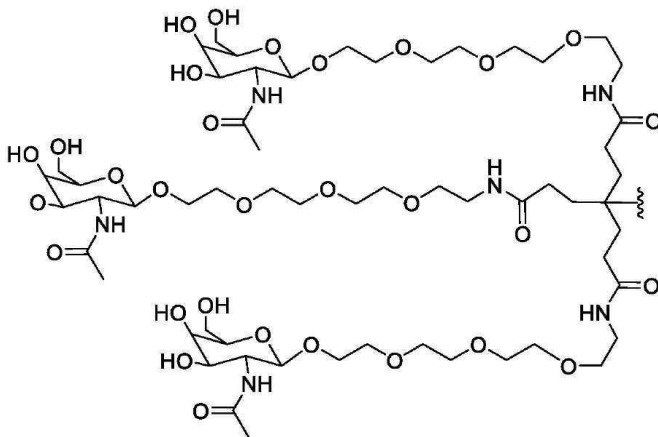
[0130] 일 실시형태에서 각각의 L³은 독립적으로 1 내지 20개의 탄소 원자를 갖는, 2가의 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소쇄이고, 여기서 탄화수소쇄 내의 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)은 -O-, -NR^X-, -NR^X-C(=O)-, -C(=O)-NR^X- 또는 -S-에 의해서 선택적으로 대체되고, R^X는 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이고, 탄화수소쇄는 (C₁-C₆)알콕시, (C₃-C₆)사이클로알킬, (C₁-C₆)알칸오일, (C₁-C₆)알칸오일옥시, (C₁-C₆)알콕시카보닐, (C₁-C₆)알킬티오, 아자이드, 사이아노, 나이트로, 할로, 하이드록시, 옥소(=O), 카복시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로아릴 및 헤테로아릴옥시로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 치환체로 선택적으로 치환된다.

[0131] 일 실시형태에서 L³은



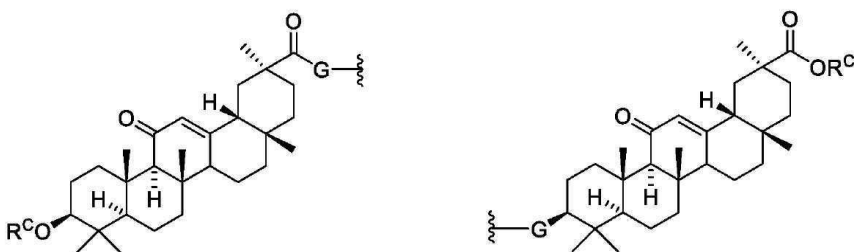
[0132] 또는 이의 염이다.
[0133]

[0134] 일 실시형태에서 R¹은



[0135] 또는 이의 염이다.
[0136]

[0137] 일 실시형태에서 R¹은



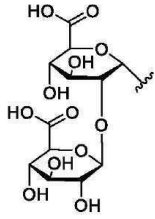
[0138] 또는 이의 염이고,
[0139]

[0140] 식 중, G는 -NH- 또는 -O-이고;

[0141] R^C는 수소, (C₁-C₈)알킬, (C₁-C₈)할로알킬, (C₁-C₈)알콕시, (C₁-C₆)알칸오일, (C₃-C₂₀)사이클로알킬, (C₃-C₂₀)헤테로사이클, 아릴, 헤테로아릴, 단당류, 이당류 또는 삼당류이고; 여기서 사이클로알킬, 헤테로사이클, 아릴, 헤테

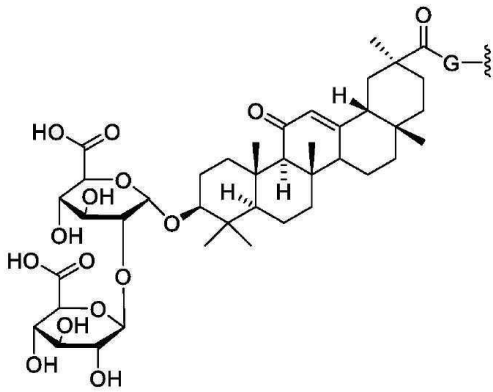
로아릴 및 당류는 할로, 카복실, 하이드록실, 아미노, (C₁-C₄)알킬, (C₁-C₄)할로알킬, (C₁-C₄)알콕시 및 (C₁-C₄)할로알콕시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 선택적으로 치환된다.

[0142] 일 실시형태에서 R^C는 하기이다.



[0143]

[0144] 일 실시형태에서 R¹은 하기이다:



[0145]

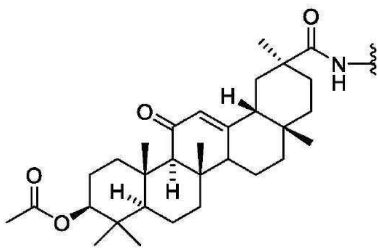
[0146] 일 실시형태에서 R^C는 하기이다:



[0147]

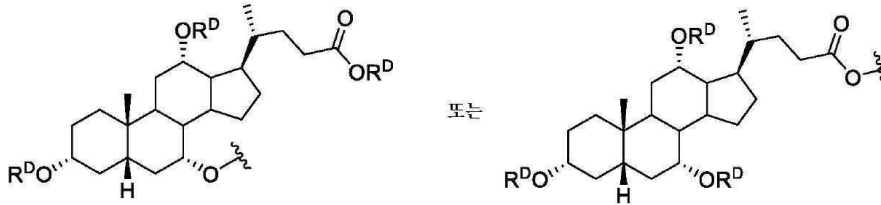
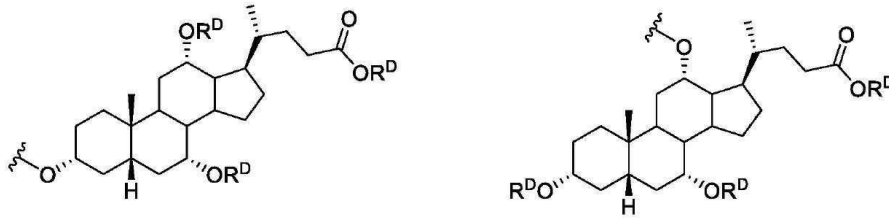
[0148] 일 실시형태에서 G는 -NH-이다.

[0149] 일 실시형태에서 R¹은 하기이다:



[0150]

[0151] 일 실시형태에서 R¹은 하기이다:



[0152]

[0153] 식 중, 각각의 R^D는 수소, (C₁-C₆)알킬, (C₉-C₂₀)알킬실릴, (R^W)₃Si-, (C₂-C₆)알켄일, 테트라하이드로피란일, (C₁-C₆)알칸오일, 벤조일, 아릴(C₁-C₃)알킬, TMTTr(트라이메톡시트리틸), DMTr(다이메톡시트리틸), MMTr(모노메톡시트리틸) 및 Tr(트리틸)로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0154] 각각의 R^W는 (C₁-C₄)알킬 및 아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0155] 일 실시형태에서 연결기 L¹ 및 L²는 독립적으로 1 내지 50개의 탄소 원자를 갖는, 2가의 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소쇄이고, 여기서 탄화수소쇄 내의 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)은 -O-, -NR^X-, -NR^X-C(=O)-, -C(=O)-NR^X- 또는 -S-에 의해서 선택적으로 대체되고, R^X는 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이고, 여기서 탄화수소쇄는 (C₁-C₆)알콕시, (C₃-C₆)사이클로알킬, (C₁-C₆)알칸오일, (C₁-C₆)알칸오일옥시, (C₁-C₆)알콕시카보닐, (C₁-C₆)알킬티오, 아자이드, 사이아노, 나이트로, 할로, 하이드록시, 옥소(=O), 카복시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로아릴 및 헤테로아릴옥시로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 치환체로 선택적으로 치환된다.

[0156] 일 실시형태에서 L¹ 및 L²는 독립적으로 1 내지 20개의 탄소 원자를 갖는, 2가의 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소쇄이고, 여기서 탄화수소쇄 내의 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)은 -O-, -NR^X-, -NR^X-C(=O)-, -C(=O)-NR^X- 또는 -S-에 의해서 선택적으로 대체되고, R^X는 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이고, 여기서 탄화수소쇄는 (C₁-C₆)알콕시, (C₃-C₆)사이클로알킬, (C₁-C₆)알칸오일, (C₁-C₆)알칸오일옥시, (C₁-C₆)알콕시카보닐, (C₁-C₆)알킬티오, 아자이드, 사이아노, 나이트로, 할로, 하이드록시, 옥소(=O), 카복시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로아릴 및 헤테로아릴옥시로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 치환체로 선택적으로 치환된다.

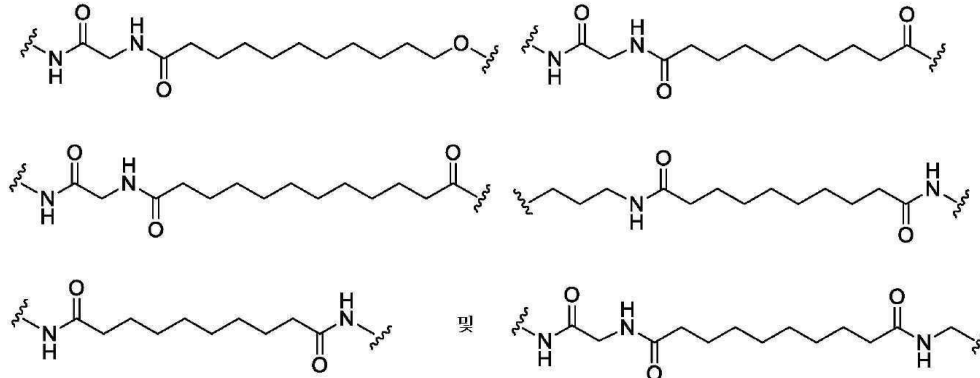
[0157] 일 실시형태에서 L¹ 및 L²는 독립적으로 1 내지 14개의 탄소 원자를 갖는, 2가의 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소쇄이고, 여기서 탄화수소쇄 내의 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)은 -O-, -NR^X-, -NR^X-C(=O)-, -C(=O)-NR^X- 또는 -S-에 의해서 선택적으로 대체되고, R^X는 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이고, 여기서 탄화수소쇄는 (C₁-C₆)알콕시, (C₃-C₆)사이클로알킬, (C₁-C₆)알칸오일, (C₁-C₆)알칸오일옥시, (C₁-C₆)알콕시카보닐, (C₁-C₆)알킬티오, 아자이드, 사이아노, 나이트로, 할로, 하이드록시, 옥소(=O), 카복시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로아릴 및 헤테로아릴옥시로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 치환체로 선택적으로 치환된다.

[0158] 일 실시형태에서 L¹은 -NH-, -O-, -S-, -(C=O)-, -(C=O)-NH-, -NH-(C=O)-, -(C=O)-O-, -NH-(C=O)-NH- 또는

-NH-(SO₂)-를 통해서 R¹에 연결된다.

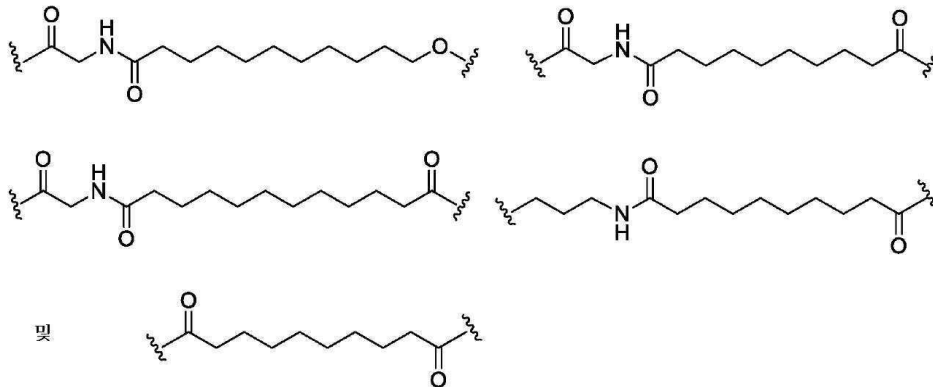
[0159] 일 실시형태에서 L²는 -O-를 통해서 R²에 연결된다.

[0160] 일 실시형태에서 L¹은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0161]

[0162] 일 실시형태에서 L¹은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

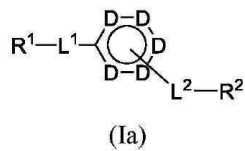


[0163]

[0164] 및 이의 염.

[0165] 일 실시형태에서 L²은 -CH₂-O- 또는 -CH₂-CH₂-O-이다.

[0166] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 Ia 또는 이의 염을 갖는다:

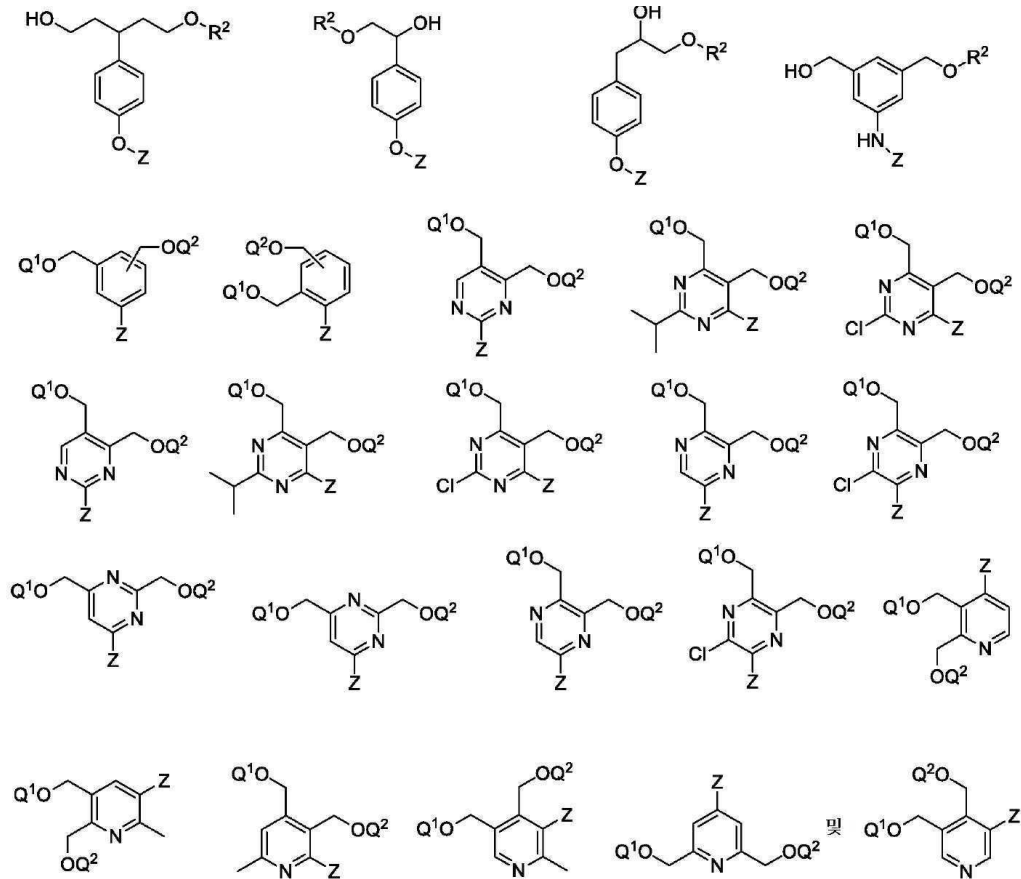


[0167]

[0168] 식 중,

[0169] 각각의 D는 $\begin{matrix} R^A \\ | \\ -C= \end{matrix}$ 및 $-N=$ 으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0170] 일 실시형태에서 화학식 Ia의 화합물은 하기 및 이의 염으로 이루어진 군으로부터 선택된다:



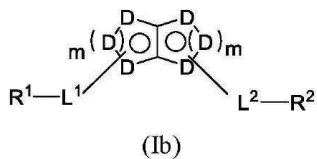
[0171]

[0172] 식 중,

[0173] Q^1 은 수소이고, Q^2 는 R^2 이거나; 또는 Q^1 은 R^2 이고, Q^2 는 수소이며;

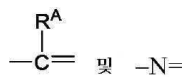
[0174] Z는 $-L^1-R^1$ 이다.

[0175] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 Ib 및 이의 염을 갖는다:



[0176]

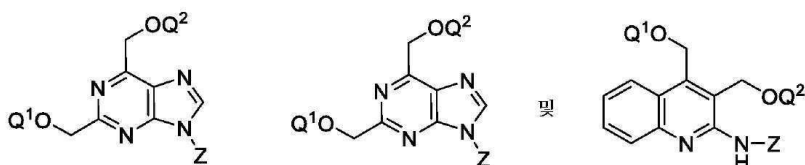
[0177] 식 중,



[0178] 각각의 D는 $-C=$ 및 $-N=$ 으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0179] 각각의 m은 독립적으로 1 또는 2이다.

[0180] 일 실시형태에서 화학식 Ib의 화합물은 하기 및 이의 염으로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0181]

[0182]

식 중,

[0183]

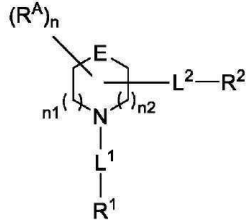
Q^1 은 수소이고, Q^2 는 R^2 이거나; 또는 Q^1 은 R^2 이고, Q^2 는 수소이며;

[0184]

Z는 $-L^1-R^1$ 이다.

[0185]

일 실시형태에서, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 (Ic)의 화합물 또는 이의 염을 갖는다:



(Ic)

[0186]

식 중, E는 $-O-$ 또는 $-CH_2-$ 이고;

[0188]

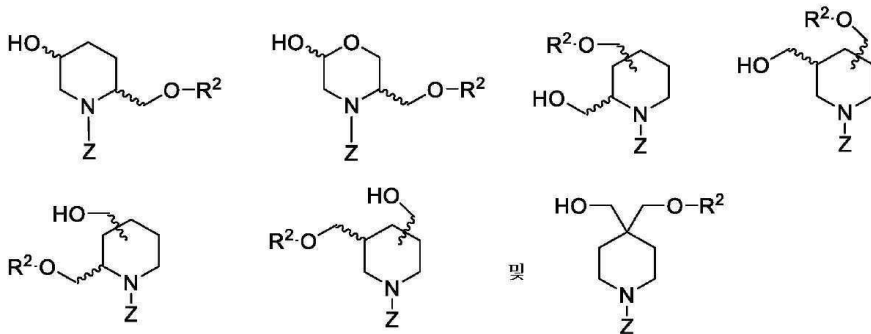
n은 0, 1, 2, 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0189]

n_1 및 n_2 는 각각 0, 1, 2 및 3으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0190]

특정 실시형태에서, 화학식 (Ic)의 화합물은



[0191]

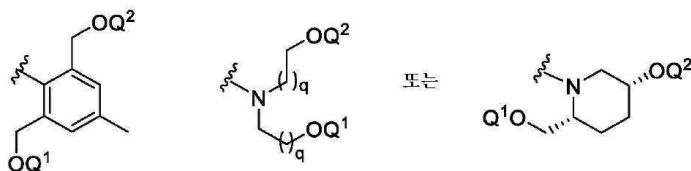
및 이들의 염으로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0193]

식 중, Z는 $-L^1-R^1$ 이다.

[0194]

일 실시형태에서 $-A-L^2-R^2$ 모이어티는



[0195]

또는 이의 염이고, 식 중,

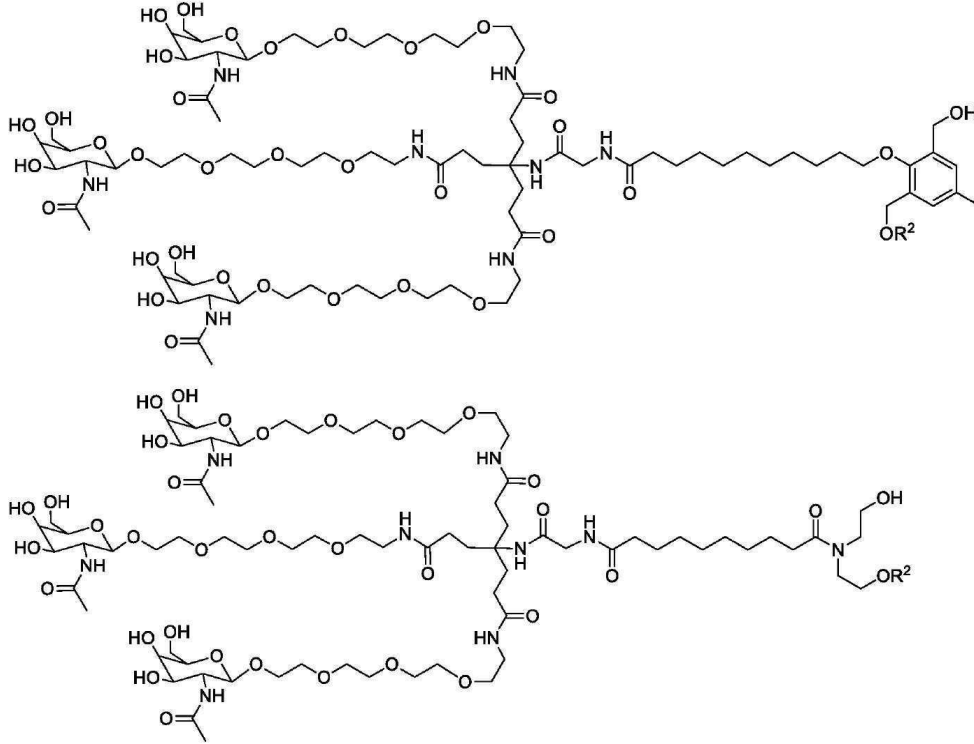
[0197]

Q^1 은 수소이고, Q^2 는 R^2 이거나; 또는 Q^1 은 R^2 이고, Q^2 는 수소이며;

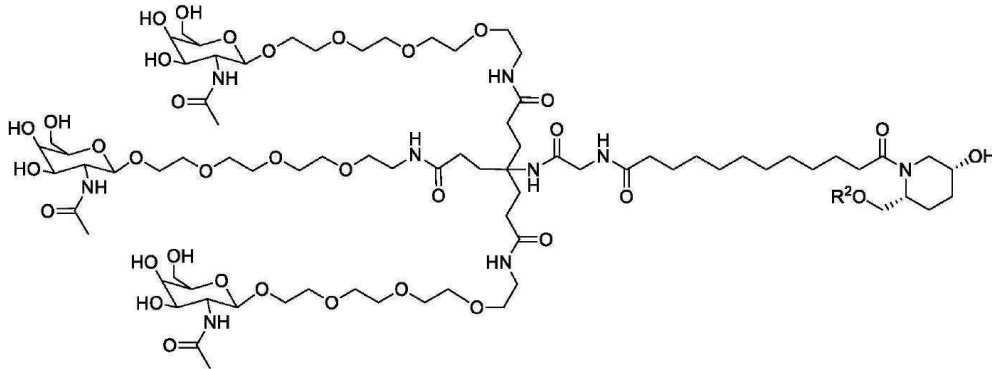
[0198]

각각의 q는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이다.

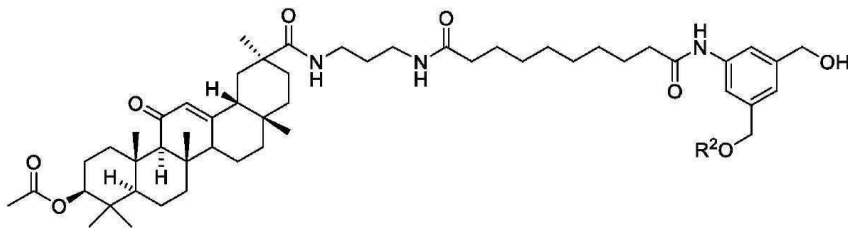
[0199] 일 실시형태에서 화학식 (I)의 화합물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0200]



및

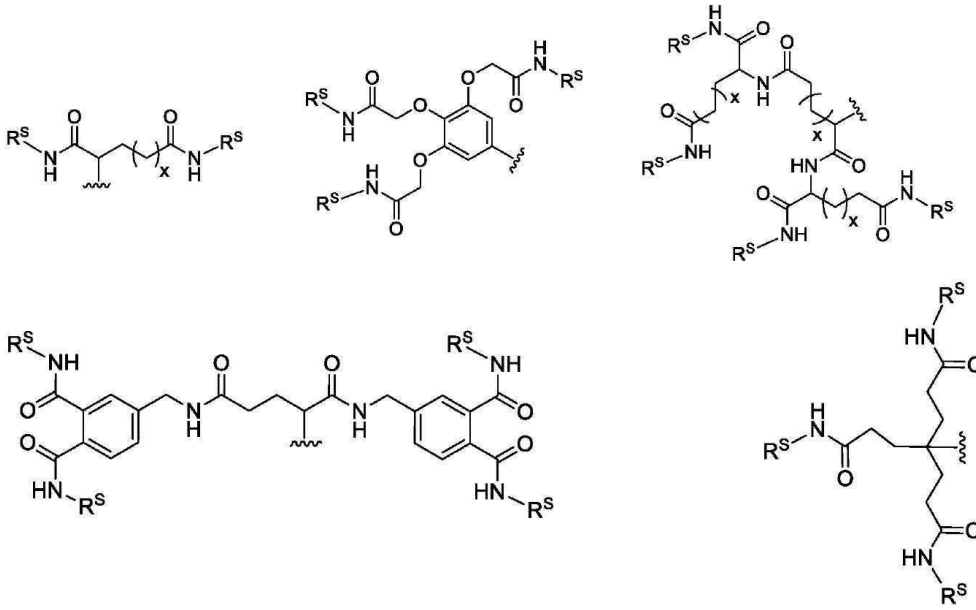


[0201]

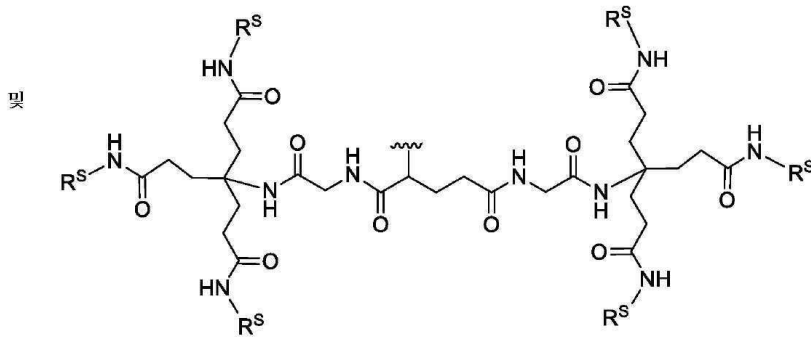
[0202] 및 이들의 염.

[0202]

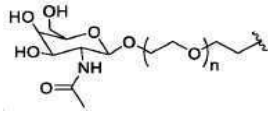
[0203] 일 실시형태에서 R¹은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0204]



[0205]

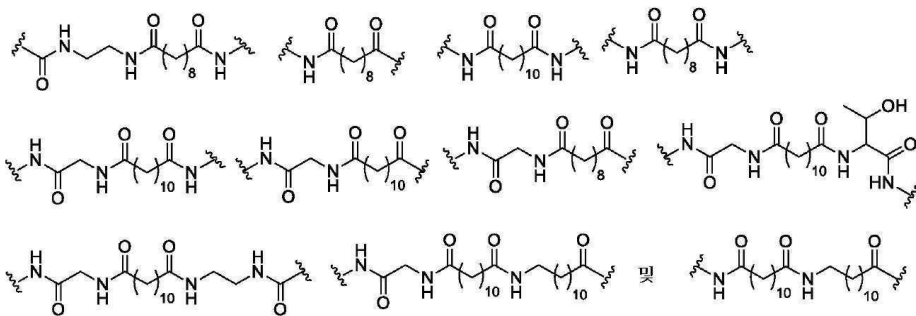


[0206] 식 중, R^S는 이고;

[0207] n은 2, 3 또는 4이며;

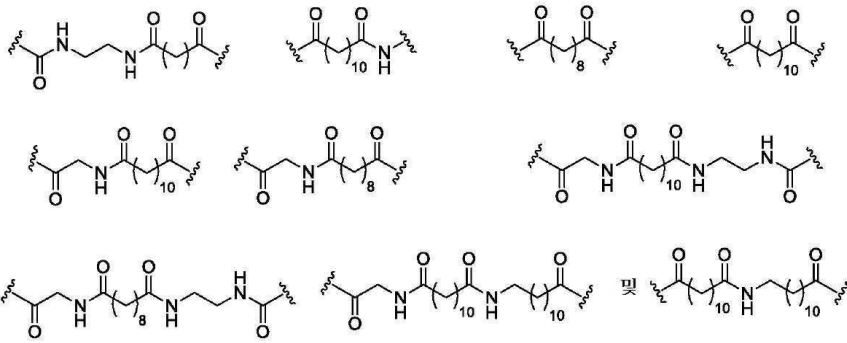
[0208] x는 1 또는 2이다.

[0209] 일 실시형태에서 L¹은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0210]

[0211] 일 실시형태에서 L¹은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0213] 일 실시형태에서 A는 존재하지 않거나, 페닐, 피롤리딘일 또는 사이클로펜틸이다.

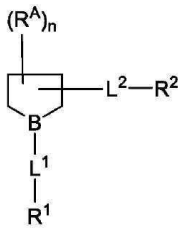
[0214] 일 실시형태에서 L²는 하이드록시로 선택적으로 치환된 C₁₋₄ 알킬렌-O이다.

[0215] 일 실시형태에서 L²는 -CH₂O-, -CH₂CH₂O- 또는 -CH(OH)CH₂O-이다.

[0216] 일 실시형태에서 각각의 R^A는 독립적으로 하이드록시, 또는 하이드록실로 선택적으로 치환된 C₁₋₈ 알킬이다.

[0217] 일 실시형태에서 각각의 R^A는 하이드록시, 메틸 및 -CH₂OH로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0218] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 (Ig) 또는 이의 염을 갖는다:



(Ig)

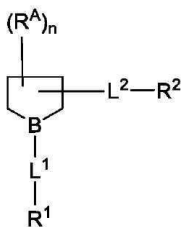
[0219] 식 중, B는 -N- 또는 -CH-이고;

[0221] L¹은 존재하지 않거나 또는 -NH-이며;

[0222] L²는 하이드록실 또는 할로로 선택적으로 치환된 C₁₋₄ 알킬렌-O이며;

[0223] n은 0, 1 또는 2이다.

[0224] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 (Ig) 또는 이의 염을 갖는다:



(Ig)

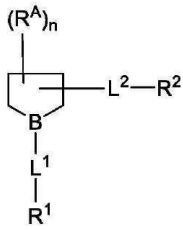
[0225] 식 중, B는 -N- 또는 -CH-이고;

[0227] L¹은 존재하지 않거나 또는 -NH-이며;

[0228] L^2 는 하이드록실 또는 할로로 선택적으로 치환된 C_{1-4} 알킬렌-O-이며;

[0229] n 은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7이다.

[0230] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 (Ig) 또는 이의 염을 갖는다:



(Ig)

[0231]

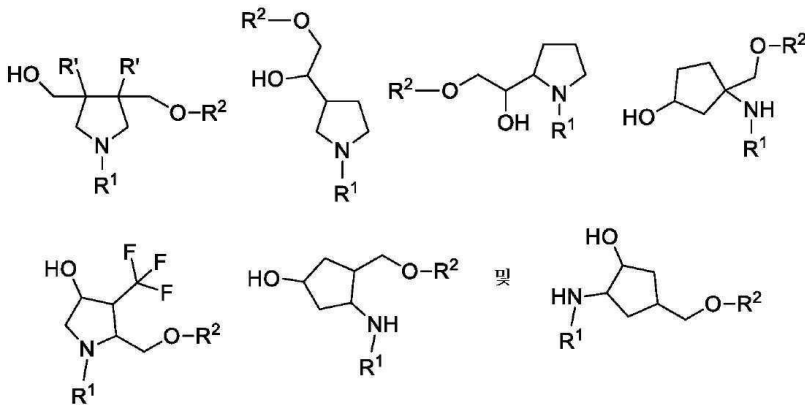
[0232] 식 중, B는 -N- 또는 -CH-이고;

[0233] L^1 은 존재하지 않거나 또는 -NH-이며;

[0234] L^2 는 하이드록실 또는 할로로 선택적으로 치환된 C_{1-4} 알킬렌-O-이며;

[0235] n 은 0, 1, 2, 3 또는 4이다.

[0236] 일 실시형태에서 화학식 Ig의 화합물은

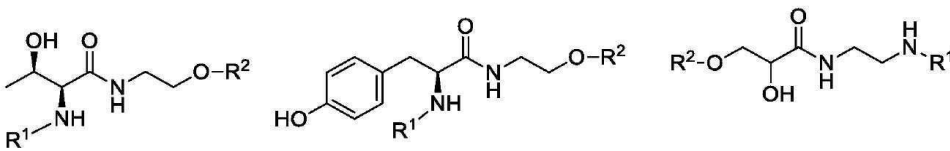


[0237]

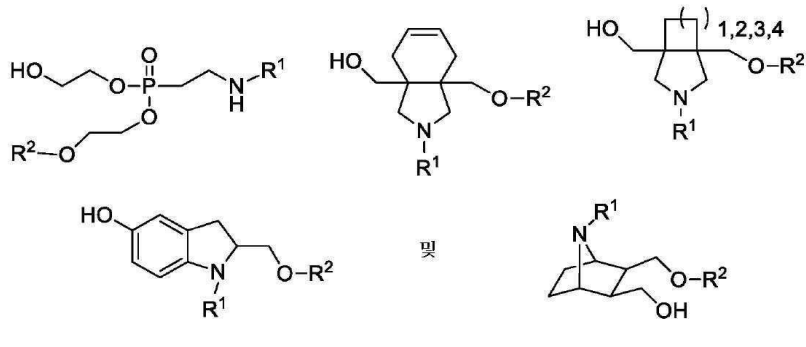
[0238] 이들의 염으로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0239] 식 중, R' 는 C_{1-9} 알킬, C_{2-9} 알켄일 또는 C_{2-9} 알킨일이고; 여기서 C_{1-9} 알킬, C_{2-9} 알켄일 또는 C_{2-9} 알킨일은 할로 또는 하이드록실로 선택적으로 치환된다.

[0240] 일 실시형태에서 화학식 (I)의 화합물은



[0241]



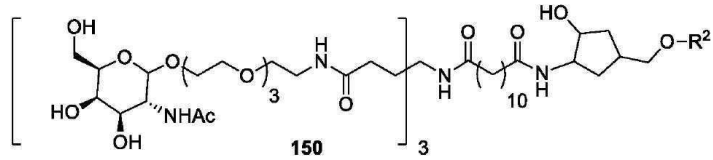
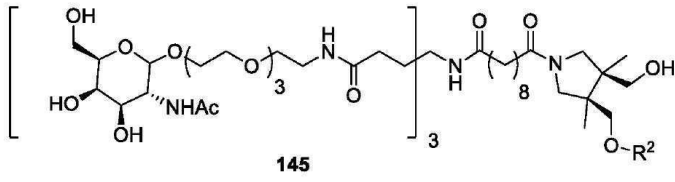
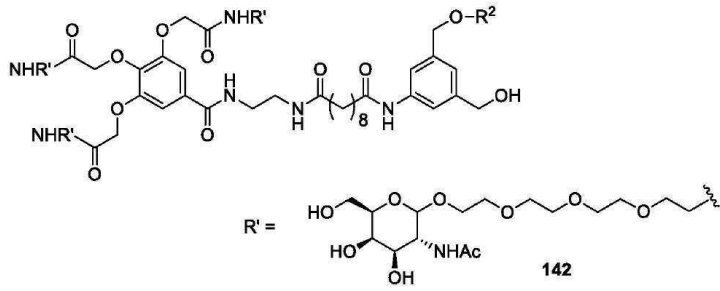
[0242]

[0243]

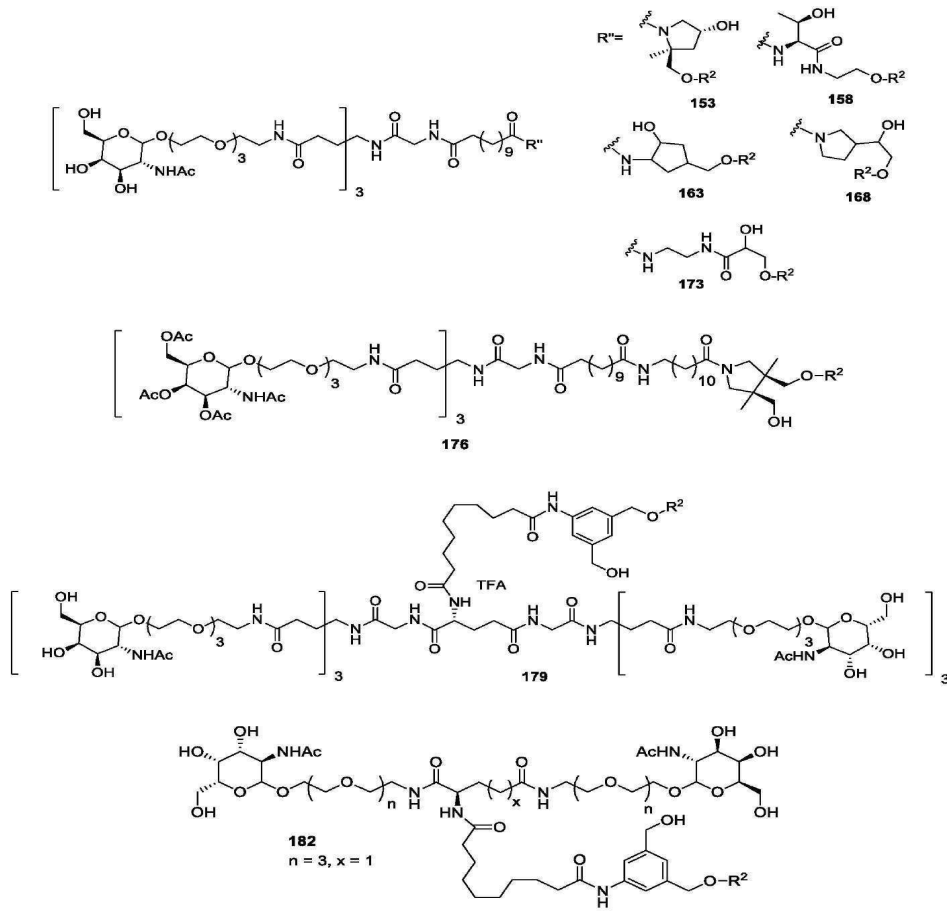
[0244]

및 이들의 염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

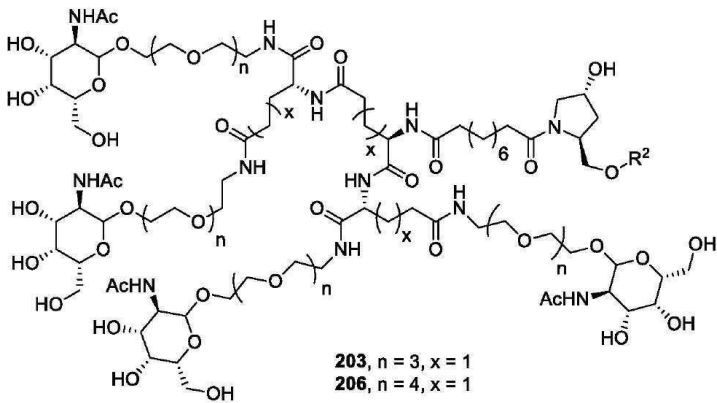
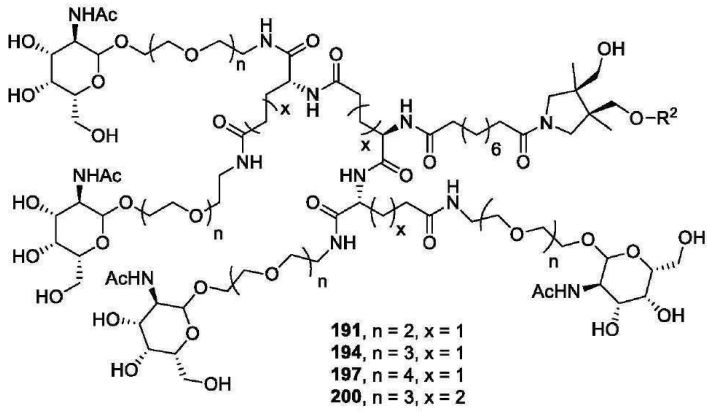
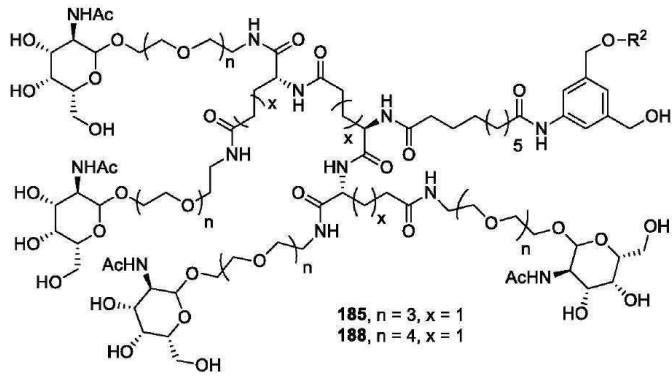
일 실시형태에서 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 염은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



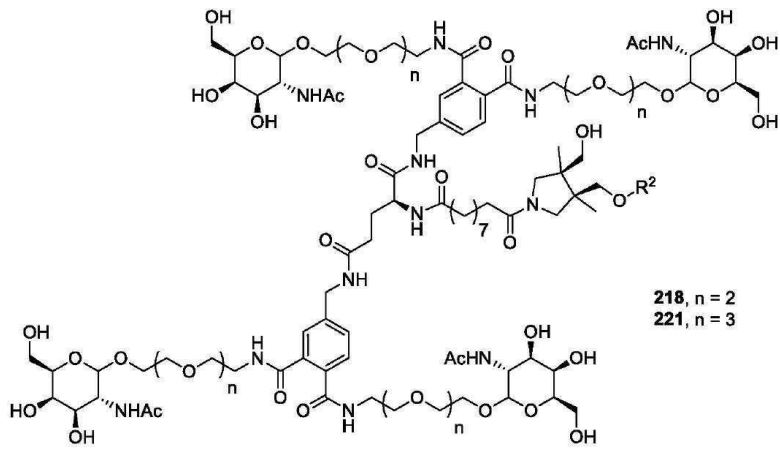
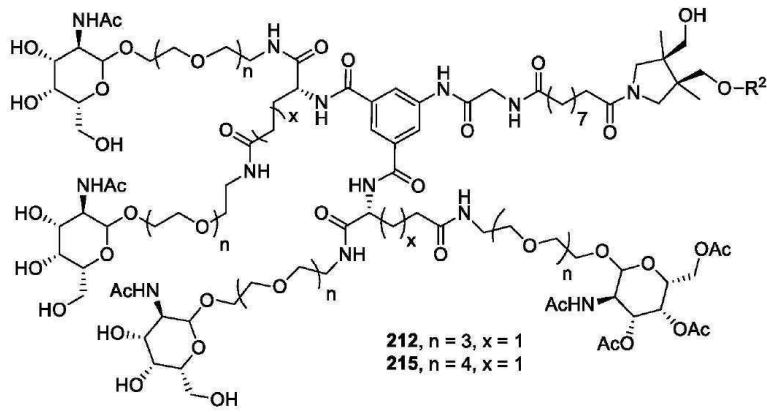
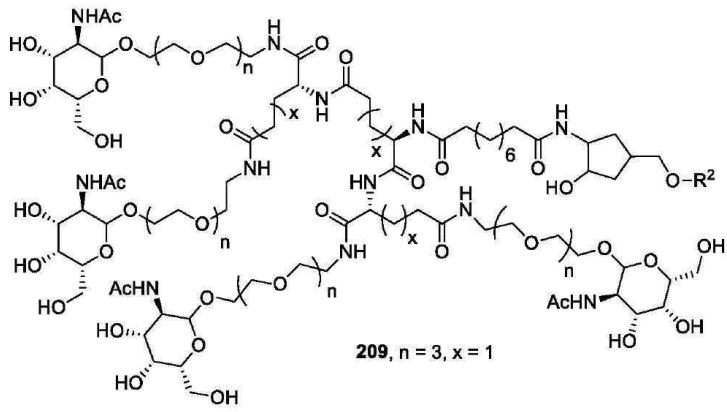
[0245]



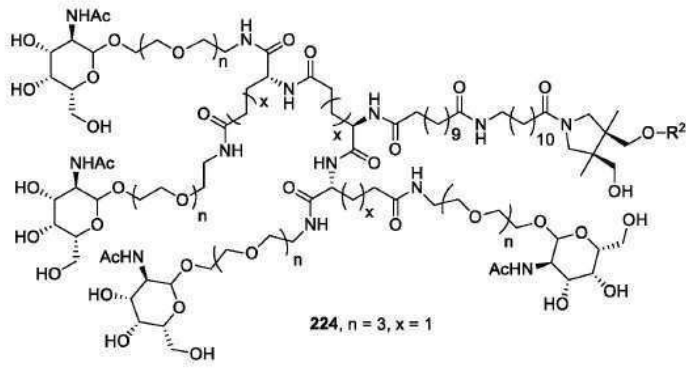
[0246]



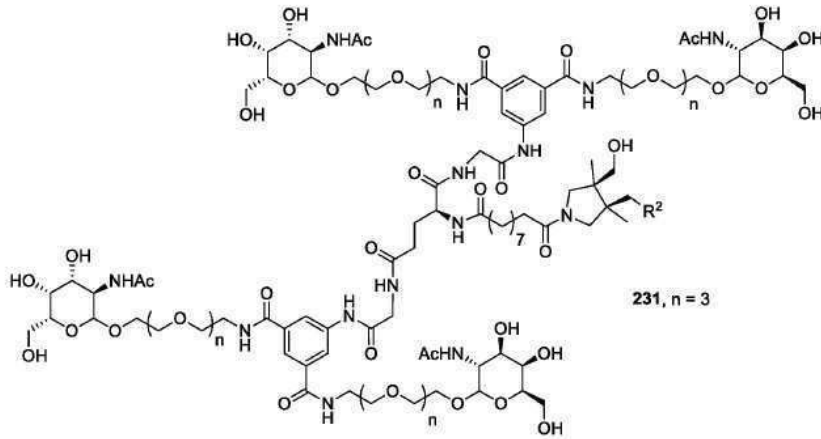
[0247]



[0248]



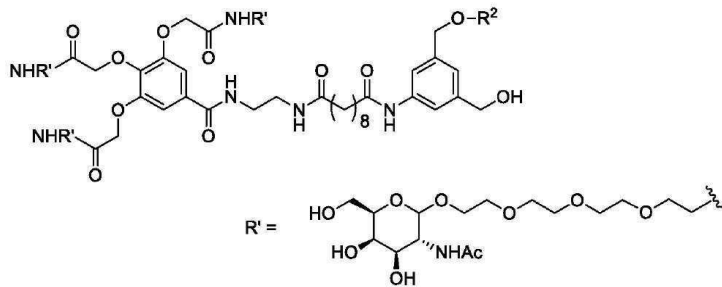
및



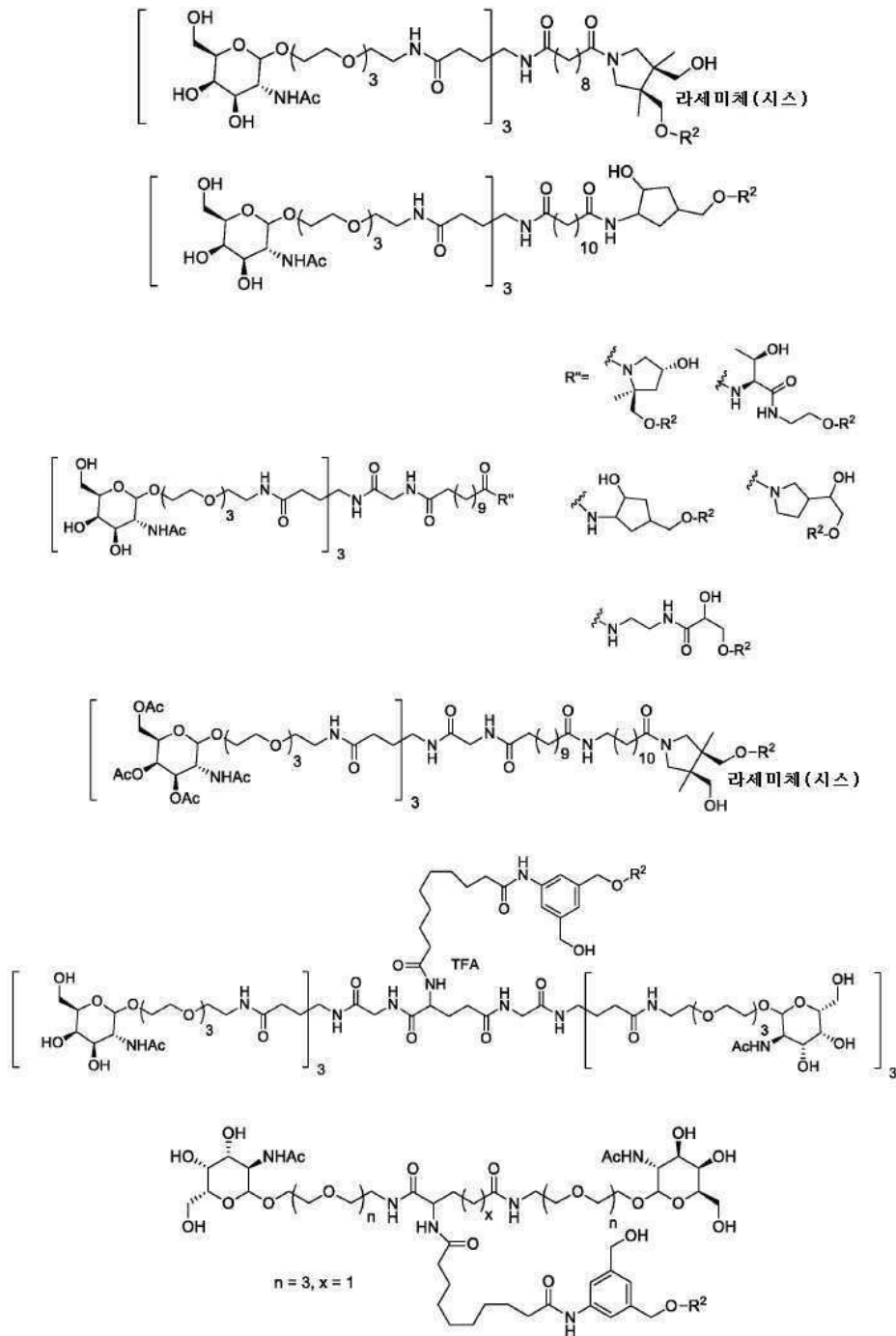
[0249]

[0250]

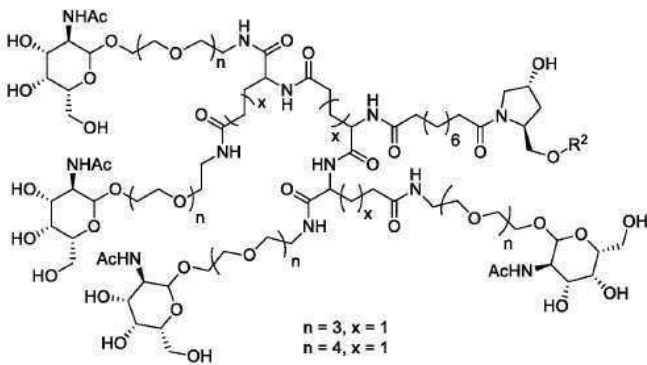
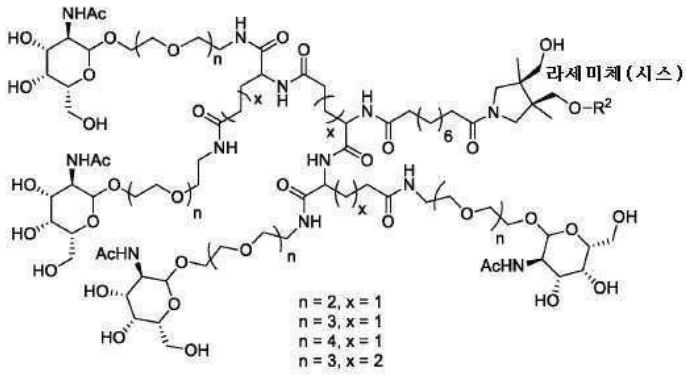
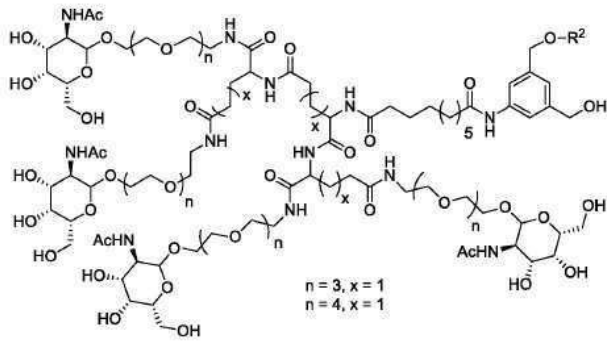
일 실시형태에서 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 염은



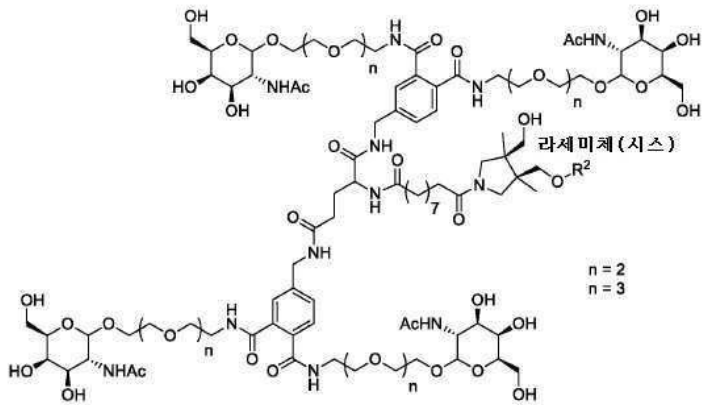
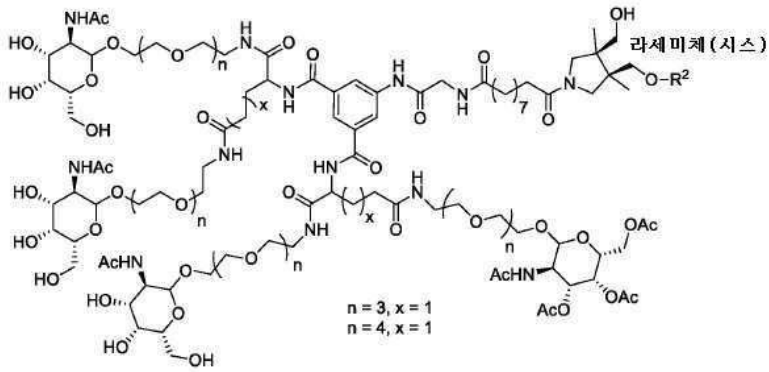
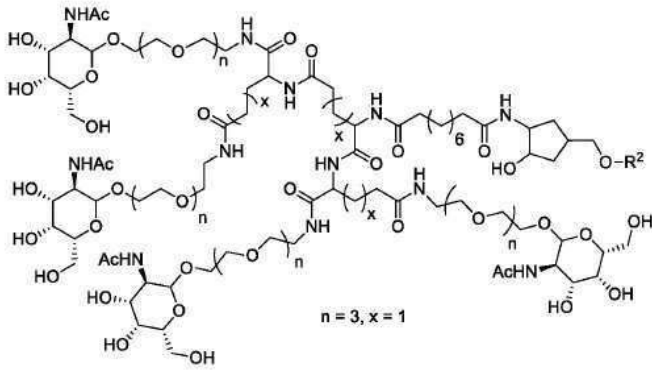
[0251]



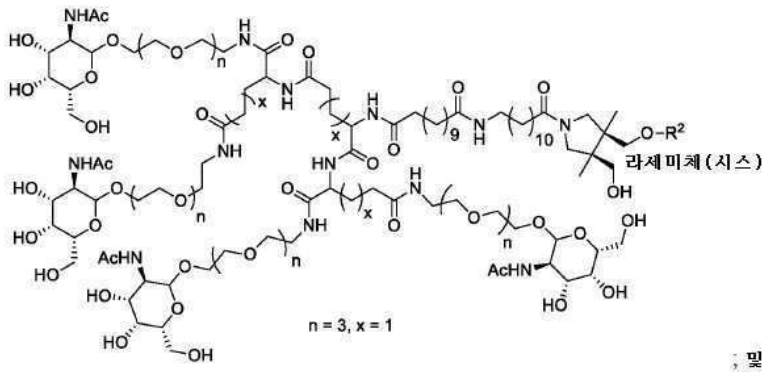
[0252]



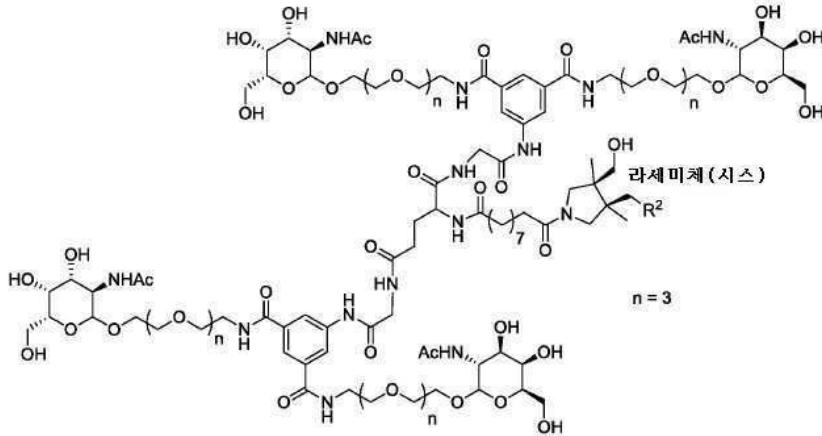
[0253]



[0254]



및



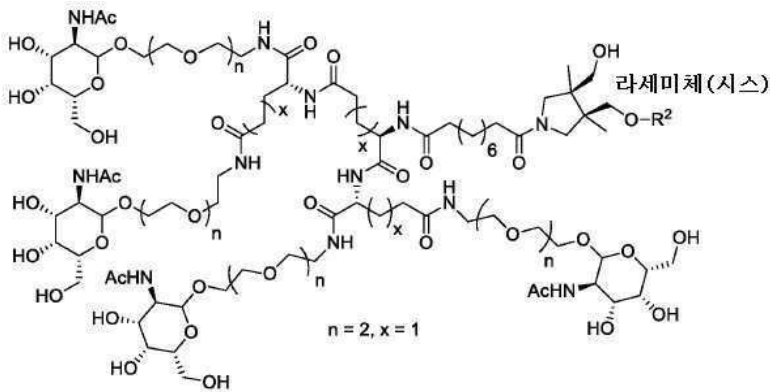
[0255]

[0256]

또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 균으로부터 선택되고, 식 중 R^2 는 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자이다.

[0257]

일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은

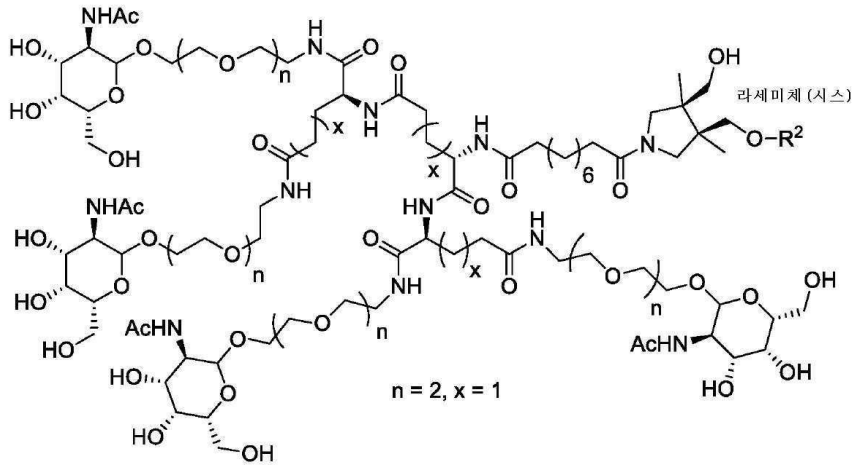


[0258]

[0259]

또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이고, 식 중, R^2 는 이중 가닥 siRNA 분자(예를 들어, 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자)이다.

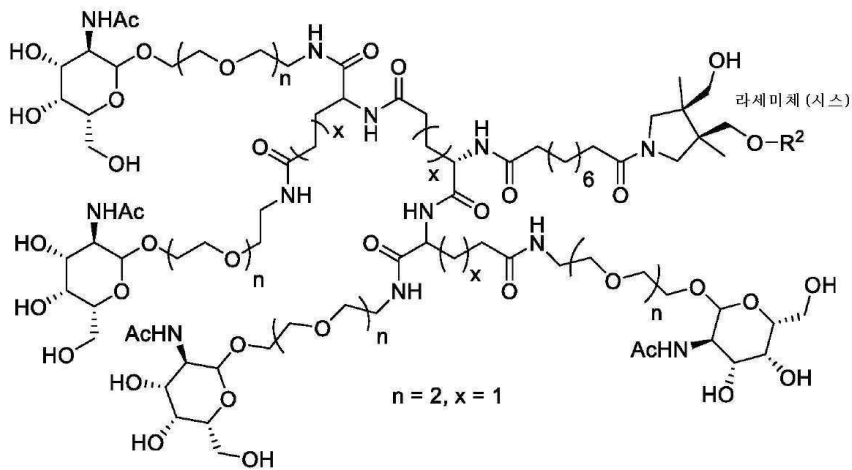
[0260] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0261]

[0262] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이고, 식 중, R^2 는 이중 가닥 siRNA 분자(예를 들어, 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자)이다.

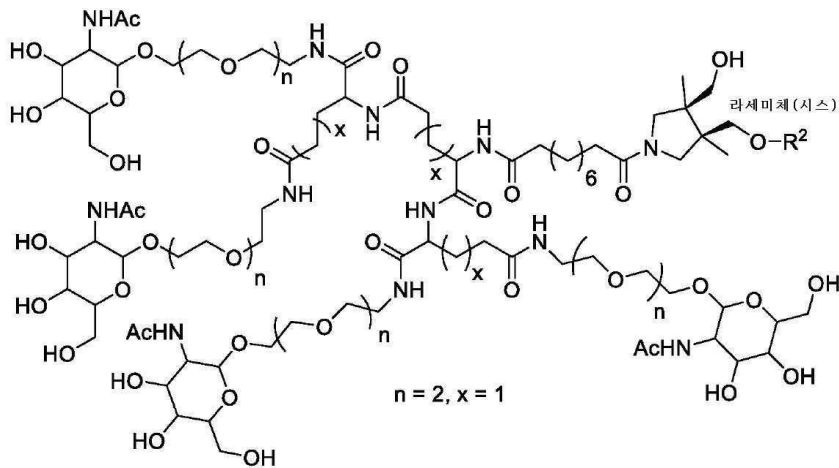
[0263] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0264]

[0265] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이고, 식 중, R^2 는 이중 가닥 siRNA 분자(예를 들어, 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자)이다.

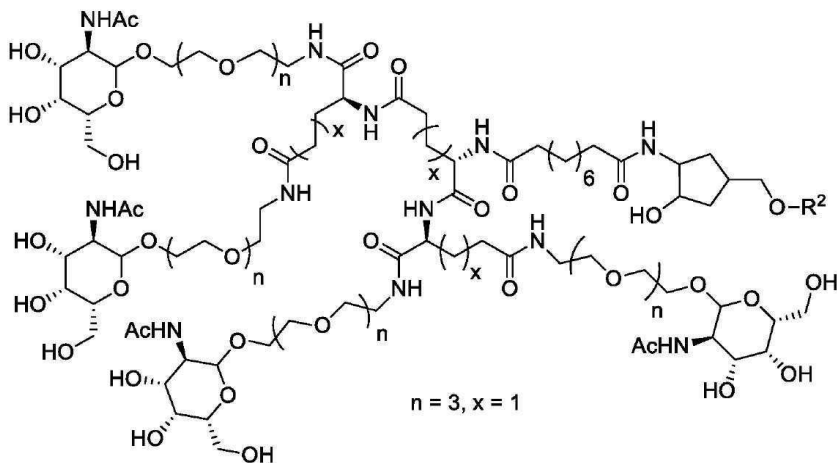
[0266] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0267]

[0268] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이고, 식 중, R^2 는 이중 가닥 siRNA 분자(예를 들어, 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자)이다.

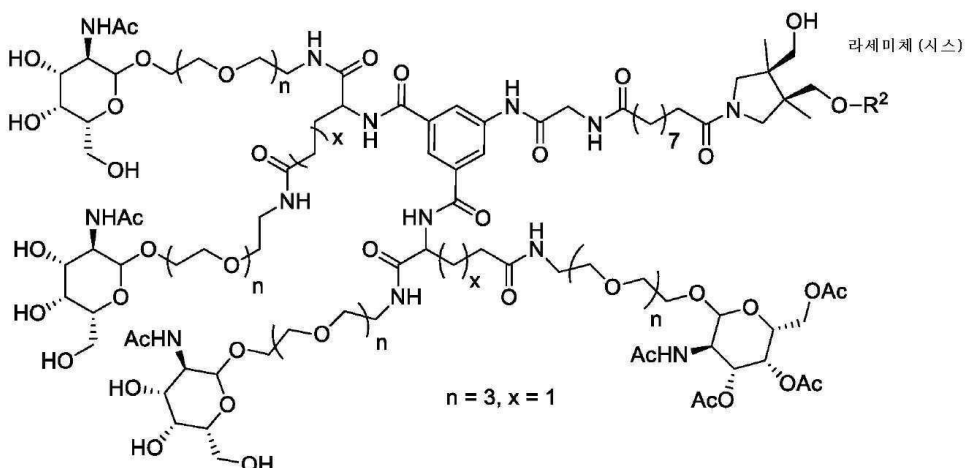
[0269] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0270]

[0271] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이고, 식 중, R^2 는 이중 가닥 siRNA 분자(예를 들어, 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자)이다.

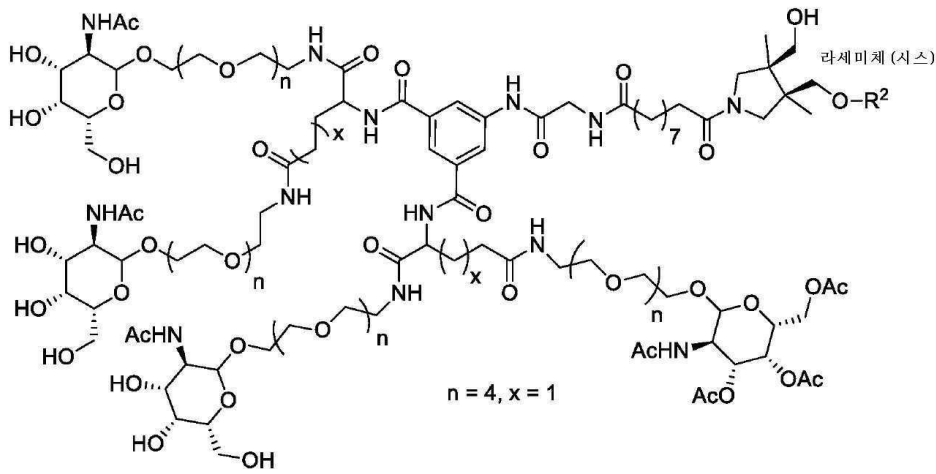
[0272] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0273]

[0274] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이고, 식 중, R^2 는 이중 가닥 siRNA 분자(예를 들어, 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자)이다.

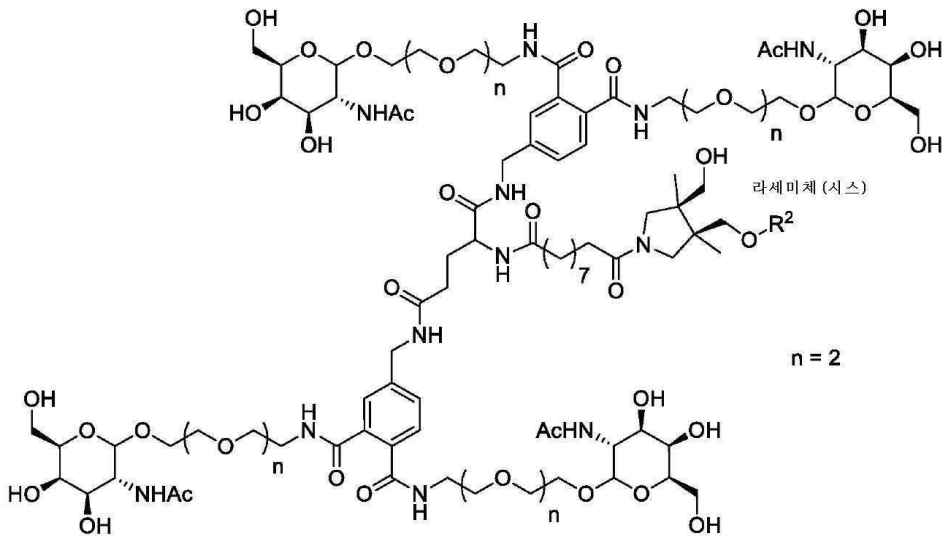
[0275] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0276]

[0277] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이고, 식 중, R^2 는 이중 가닥 siRNA 분자(예를 들어, 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자)이다.

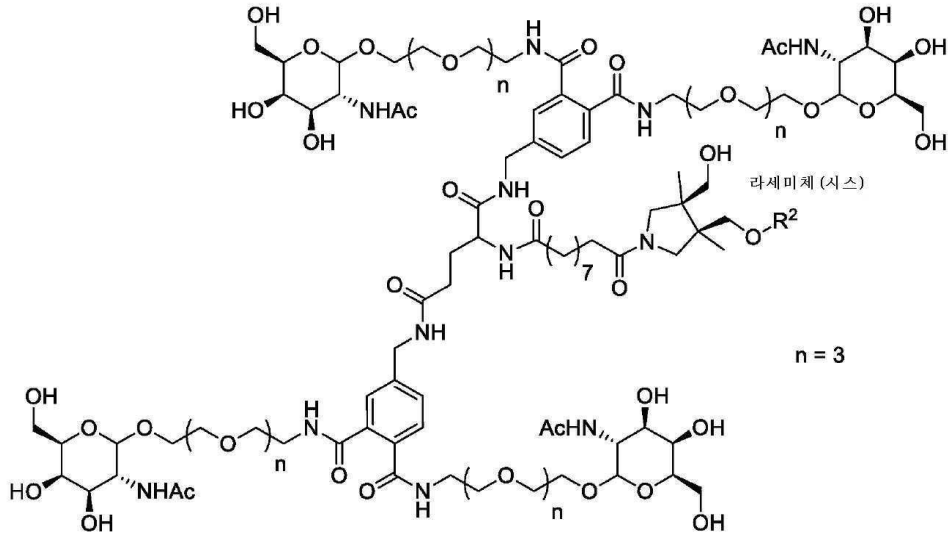
[0278] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0279]

[0280] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이고, 식 중, R^2 는 이중 가닥 siRNA 분자(예를 들어, 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자)이다.

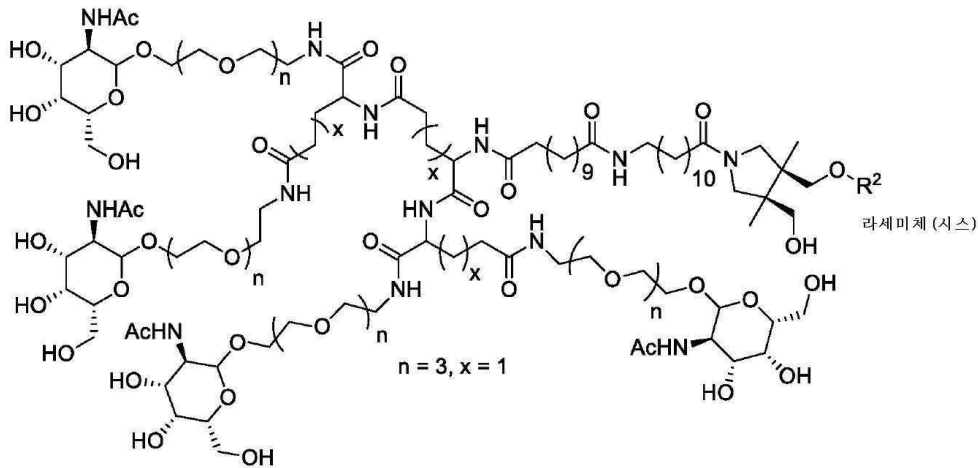
[0281] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0282]

[0283] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이고, 식 중, R²는 이중 가닥 siRNA 분자(예를 들어, 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자)이다.

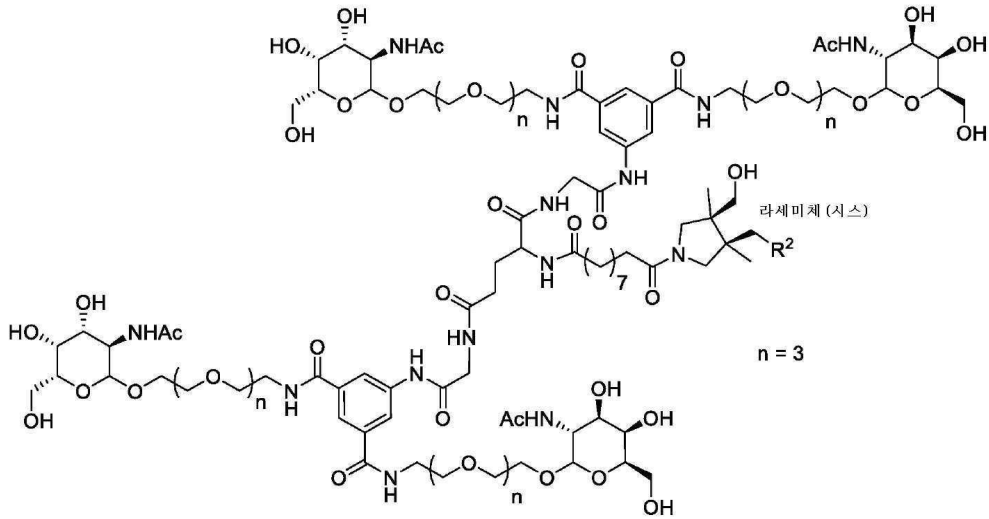
[0284] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0285]

[0286] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이고, 식 중, R²는 이중 가닥 siRNA 분자(예를 들어, 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자)이다.

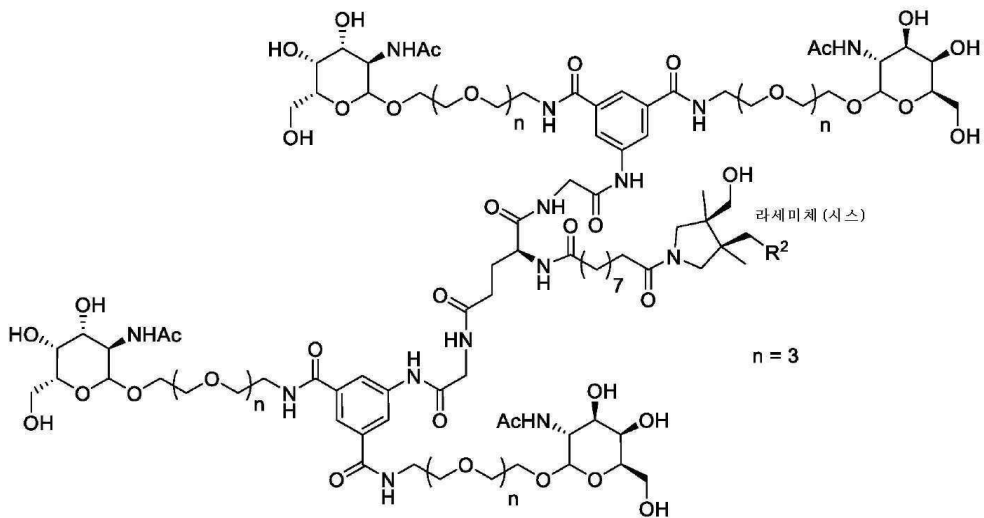
[0287] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0288]

[0289] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이고, 식 중, R²는 이중 가닥 siRNA 분자(예를 들어, 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자)이다.

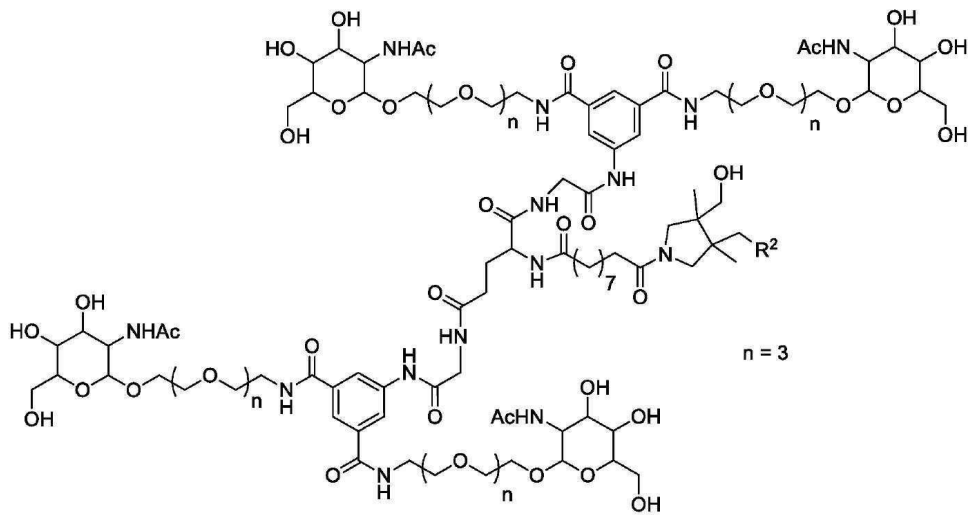
[0290] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0291]

[0292] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이고, 식 중, R²는 이중 가닥 siRNA 분자(예를 들어, 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자)이다.

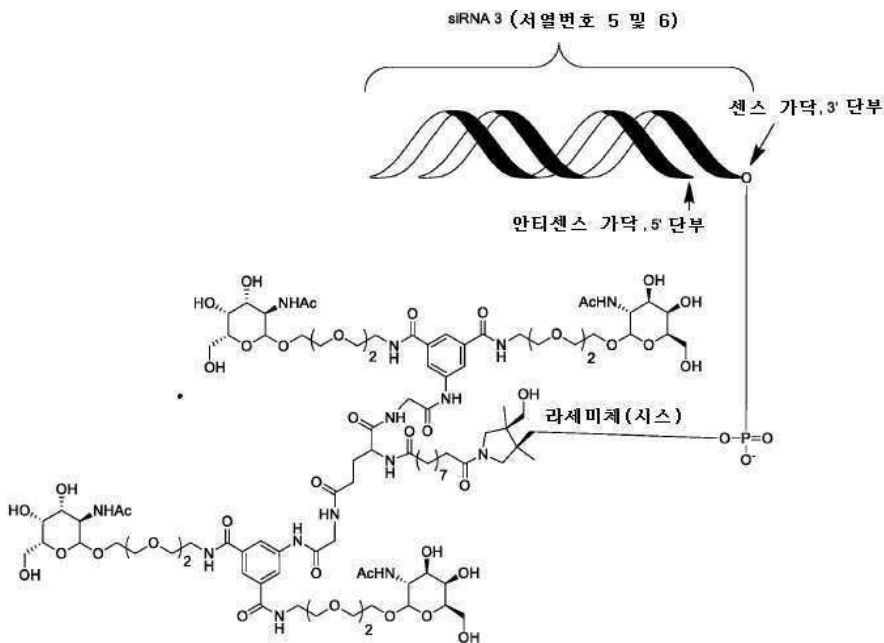
[0293] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0294]

[0295] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이고, 식 중, R^2 는 이중 가닥 siRNA 분자(예를 들어, 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자)이다.

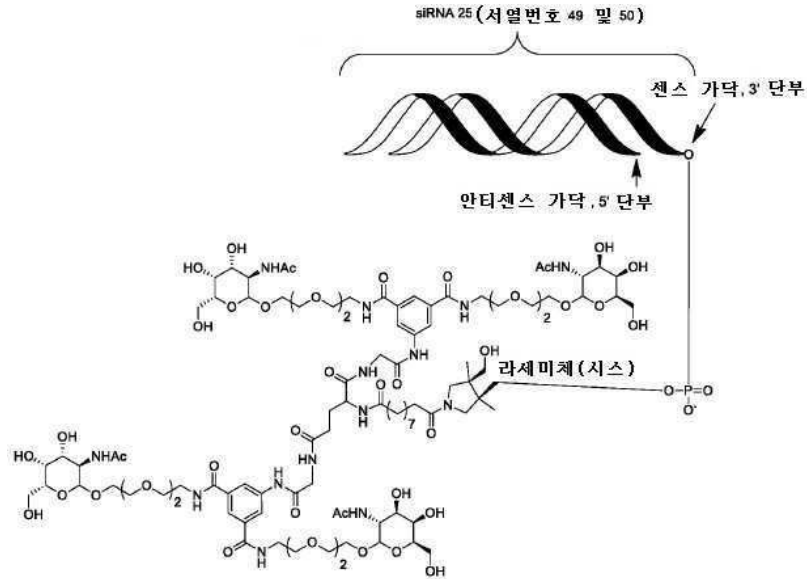
[0296] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0297]

[0298] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다.

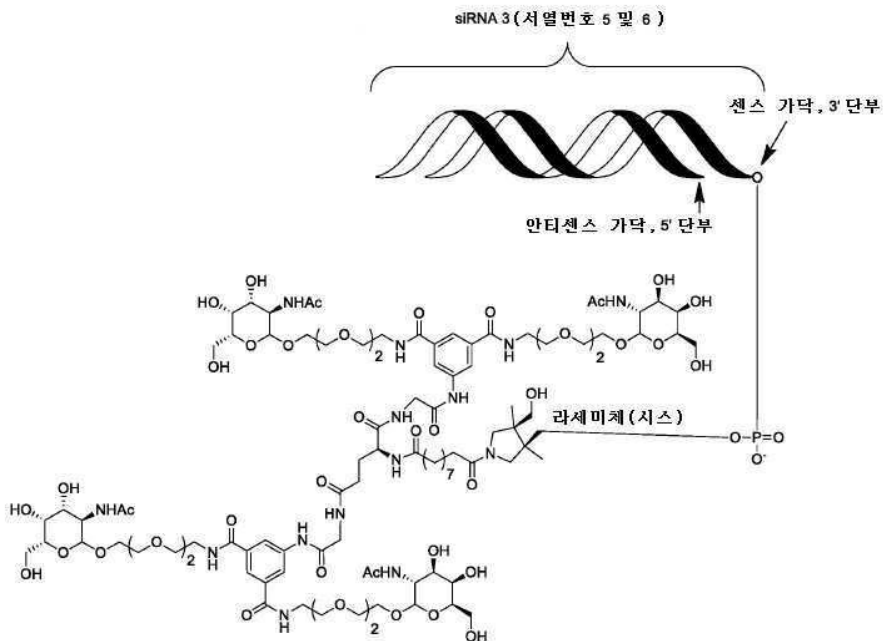
[0299] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0300]

[0301] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다.

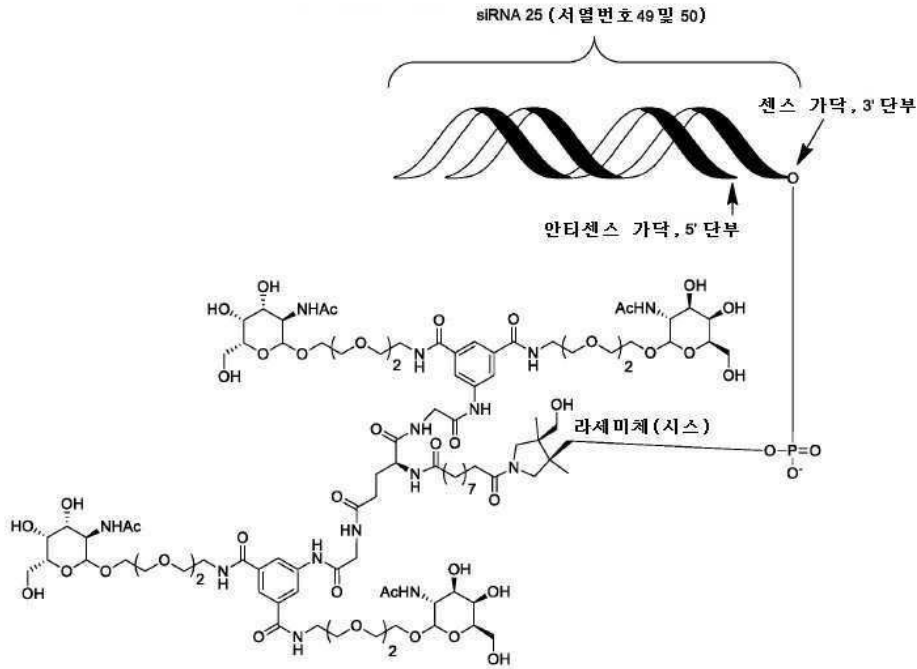
[0302] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0303]

[0304] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다.

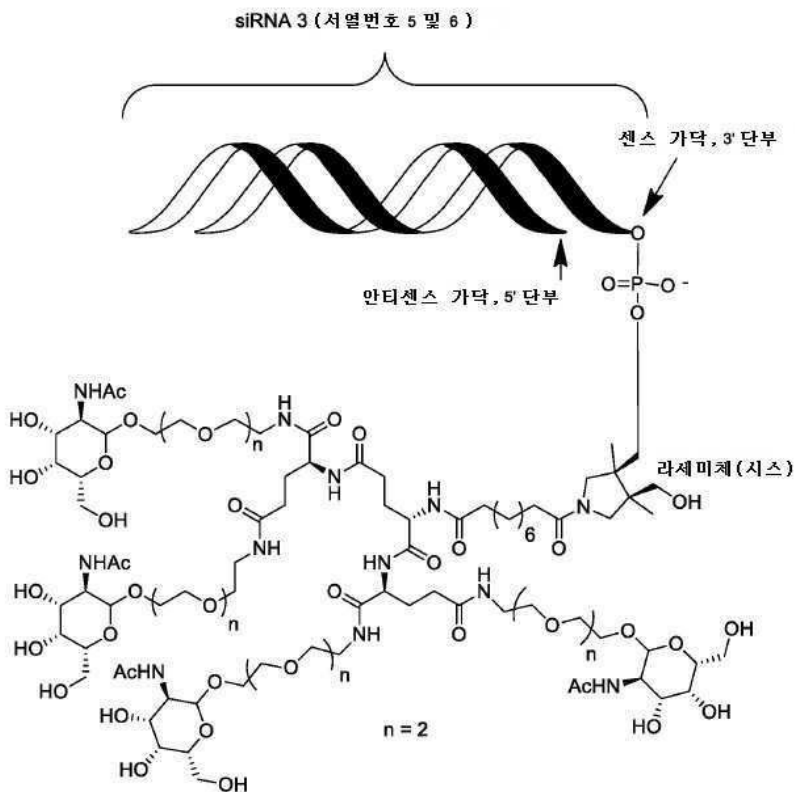
[0305] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0306]

[0307] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다.

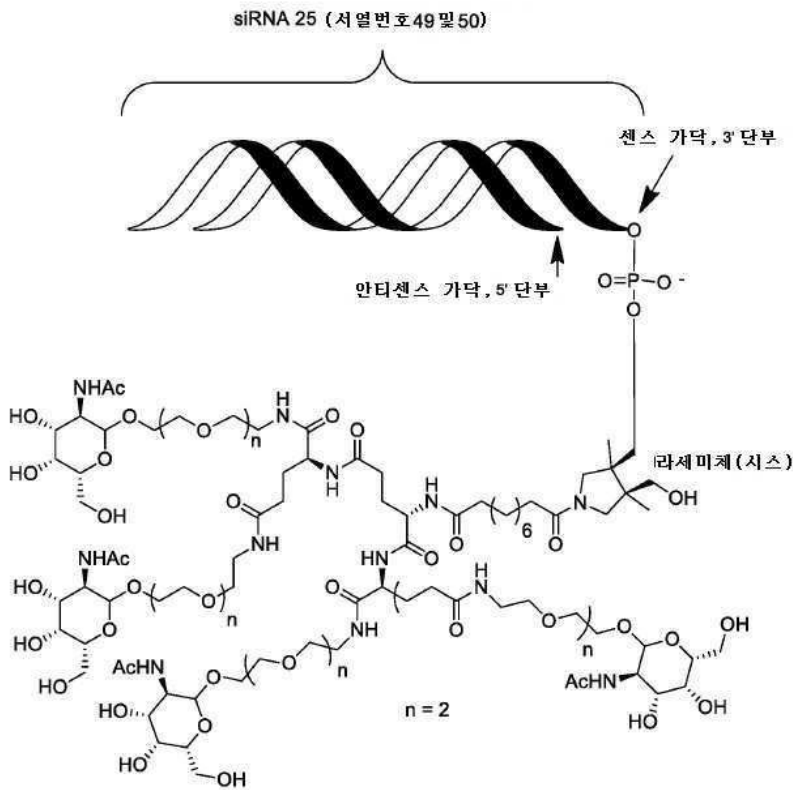
[0308] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0309]

[0310] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다.

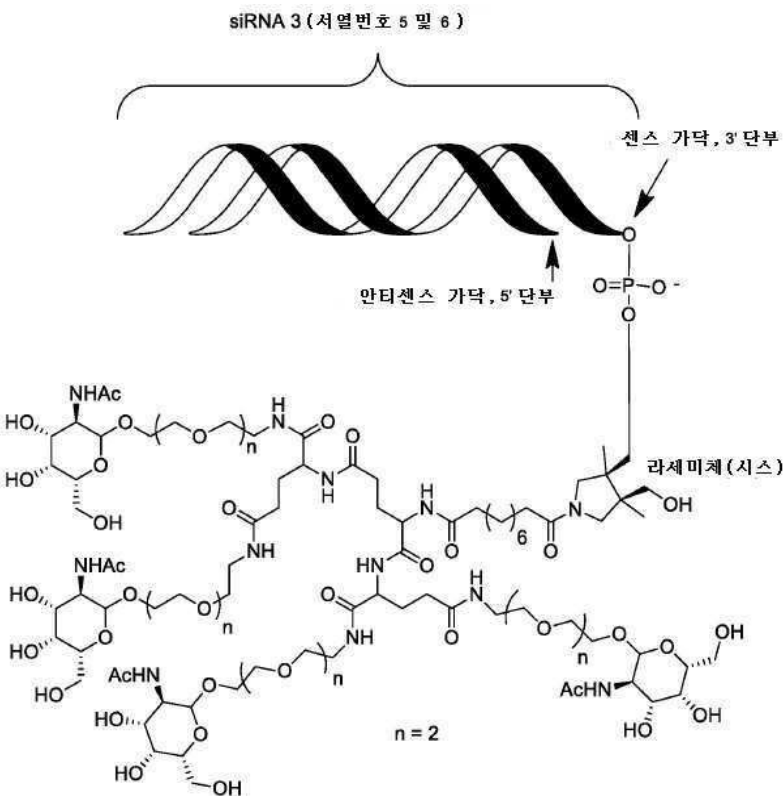
[0311] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0312]

[0313] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다.

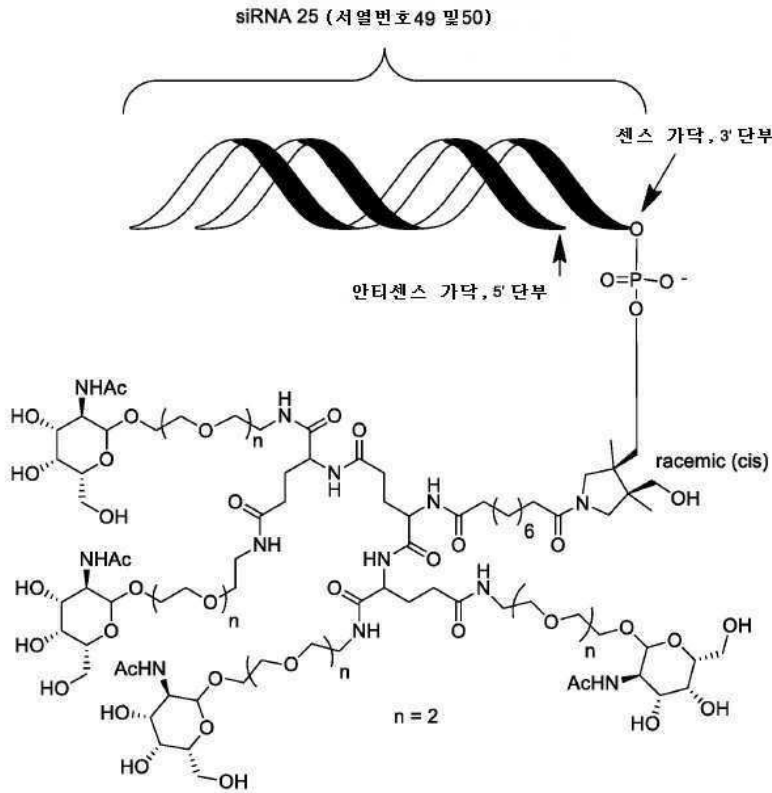
[0314] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0315]

[0316] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다.

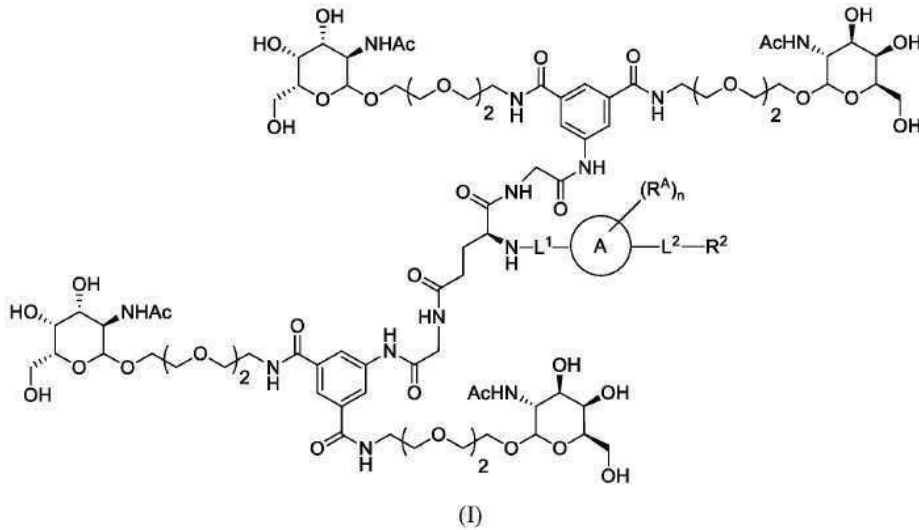
[0317] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은



[0318]

[0319] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다.

[0320] 일 실시형태에서 본 발명은 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 염을 제공한다:



[0321]

[0322] 식 중,

[0323] L^1 은 존재하지 않거나 또는 연결기이며;

[0324] L^2 는 존재하지 않거나 또는 연결기이고;

[0325] R^2 는 헥산이고;

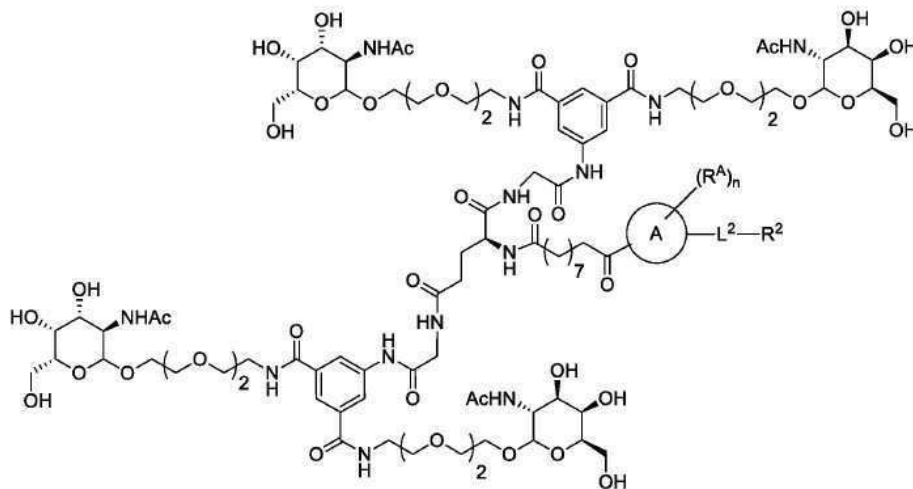
[0326] 고리 A는 존재하지 않거나, 3 내지 20원의 사이클로알킬, 5 내지 20원의 아릴, 5 내지 20원의 헤테로아릴 또는 3 내지 20원의 헤테로사이클로알킬이고;

[0327] 각각의 R^A 는 수소, 하이드록시, CN, F, Cl, Br, I, $-C_{1-2}$ 알킬- OR^B , C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알켄일 및 C_{2-10} 알킨일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서 C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알켄일 및 C_{2-10} 알킨일은 할로, 하이드록시 및 C_{1-3} 알콕시로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 선택적으로 치환되고;

[0328] R^B 는 수소, 보호기, 고체 지지체에 대한 공유 결합 또는 고체 지지체에 결합된 연결기에 대한 결합이며; 그리고

[0329] n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0330] 일 실시형태에서 본 발명은 하기 화학식의 화합물 또는 이의 염을 제공한다:



[0331]

[0332] 식 중,

[0333] L^2 는 존재하지 않거나 또는 연결기이고;

[0334] R^2 는 핵산이고;

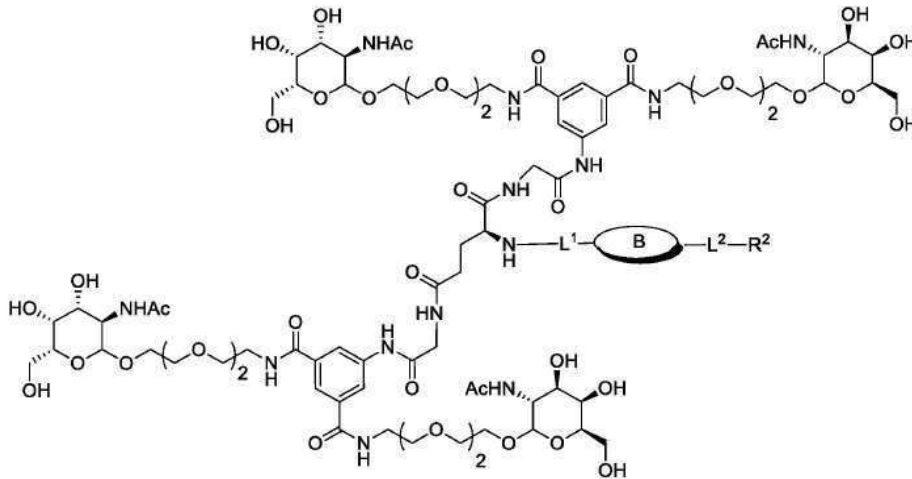
[0335] 고리 A는 존재하지 않거나, 3 내지 20원의 사이클로알킬, 5 내지 20원의 아릴, 5 내지 20원의 헤테로아릴 또는 3 내지 20원의 헤테로사이클로알킬이고;

[0336] 각각의 R^A 는 수소, 하이드록시, CN, F, Cl, Br, I, $-C_{1-2}$ 알킬- OR^B , C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알켄일 및 C_{2-10} 알킨일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서 C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알켄일 및 C_{2-10} 알킨일은 할로, 하이드록시 및 C_{1-3} 알콕시로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 선택적으로 치환되고;

[0337] R^B 는 수소, 보호기, 고체 지지체에 대한 공유 결합 또는 고체 지지체에 결합된 연결기에 대한 결합이며; 그리고

[0338] n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0339] 일 실시형태에서 본 발명은 하기 화학식의 화합물 또는 이의 염을 제공한다:



[0340]

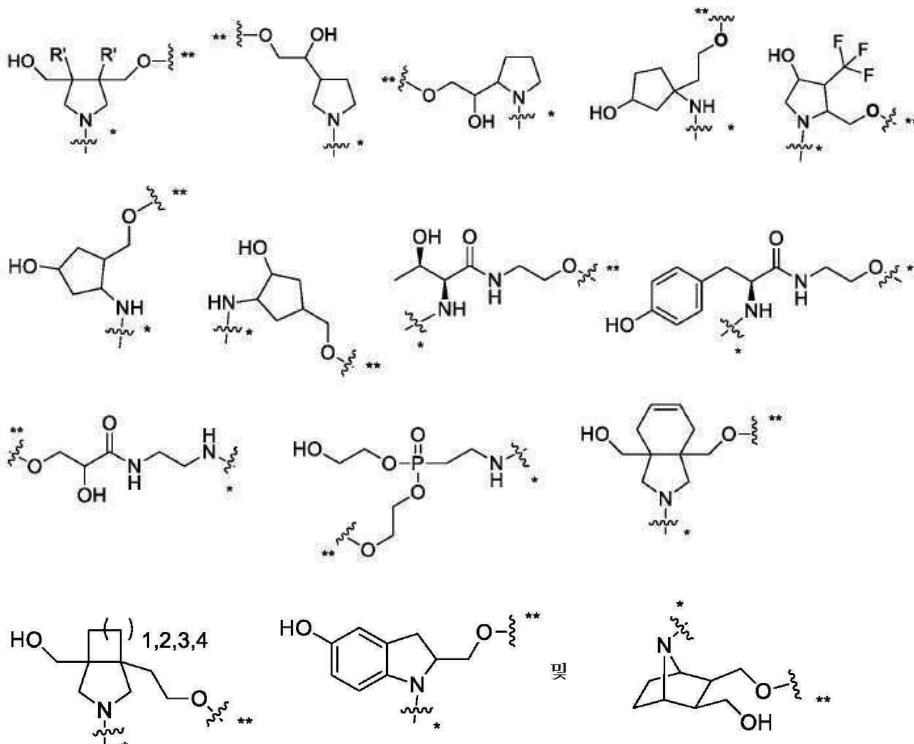
[0341] 식 중,

[0342] L^1 은 존재하지 않거나 또는 연결기이며;

[0343] L^2 는 존재하지 않거나 또는 연결기이고;

[0344] R^2 는 핵산이고;

[0345] B는 2가이고,



[0346]

[0347]

[0348] 로 이루어진 군으로부터 선택되며,

[0349] 식 중,

[0350] 각각의 R' 는 독립적으로 C_{1-9} 알킬, C_{2-9} 알켄일 또는 C_{2-9} 알킨일이고; 여기서 C_{1-9} 알킬, C_{2-9} 알켄일 또는 C_{2-9} 알킨일은 할로 또는 하이드록실로 선택적으로 치환되며;

[0351] *로 표시된 원자가는 L¹에 부착되거나 또는 L¹이 존재하지 않는 경우에는 R¹에 부착되고; 그리고

[0352] **로 표시된 원자가는 L²에 부착되거나 또는 L²가 존재하지 않는 경우에는 R²에 부착된다.

[0353] 일 실시형태에서 L¹ 및 L²는 독립적으로 1 내지 50개의 탄소 원자를 갖는, 2가의 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소쇄이고, 여기서 탄화수소쇄 내의 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4 개)은 -O-, -NR^X-, -NR^X-C(=O)-, -C(=O)-NR^X- 또는 -S-에 의해서 선택적으로 대체되고, R^X는 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이고, 여기서 탄화수소쇄는 (C₁-C₆)알콕시, (C₃-C₆)사이클로알킬, (C₁-C₆)알칸오일, (C₁-C₆)알칸오일옥시, (C₁-C₆)알콕시카보닐, (C₁-C₆)알킬티오, 아자이드, 사이아노, 나이트로, 할로, 하이드록시, 옥소(=O), 카복시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로아릴 및 헤테로아릴옥시로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 선택적으로 치환된다.

[0354] 일 실시형태에서 L¹은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

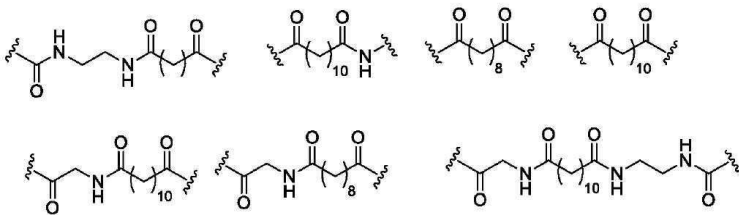


[0355]

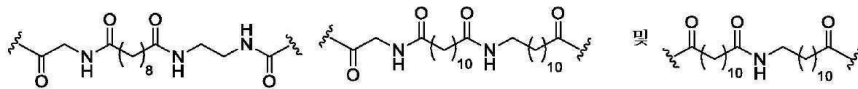
[0356] 또는 이의 염.

[0357] 일 실시형태에서 L¹은 -O-, -S-, -(C=O)-, -(C=O)-NH-, -NH-(C=O), -(C=O)-O-, -NH-(C=O)-NH- 또는 -NH-(SO₂)-로 이루어진 군으로부터 선택된 링키지를 통해서 B¹에 연결된다.

[0358] 일 실시형태에서 L¹은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0359]



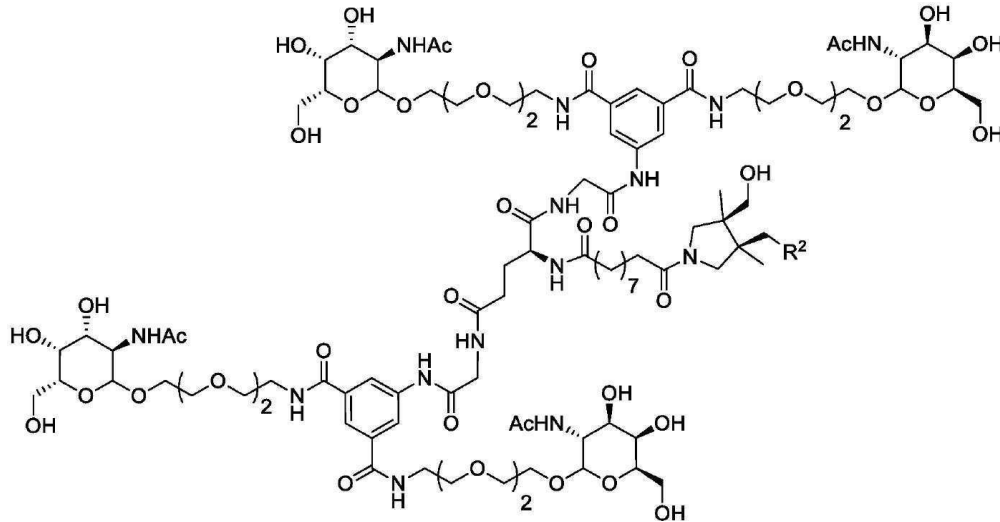
[0360]

[0361] 일 실시형태에서 L²는 -O-를 통해서 R²에 연결된다.

[0362] 일 실시형태에서 L²는 하이드록시로 선택적으로 치환된 C₁₋₄ 알킬렌-O-이다.

[0363] 일 실시형태에서 L²는 존재하지 않는다.

[0364] 일 실시형태에서 본 발명은 하기 화합물



[0365]

[0366] 또는 이들의 염을 제공하며, 식 중 R²는 헥산이다.

[0367] 본 발명의 일 양상은 화학식 I의 화합물 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0368] 본 발명의 또 다른 양상은 화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 이중 가닥 siRNA를 전달하는 방법이다.

[0369] 본 발명의 또 다른 양상은 화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 동물에서 질환 또는 장애(예를 들어, 간 질환 또는 바이러스 감염, 예컨대, B형 간염 바이러스 감염)을 치료하는 방법이다.

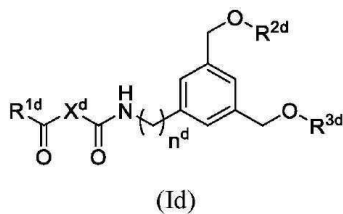
[0370] 본 발명의 특정 실시형태는 의학 요법에서 사용하기 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[0371] 본 발명의 특정 실시형태는 동물에서 질환 또는 장애(예를 들어, 간 질환 또는 바이러스 감염, 예컨대, B형 간염 바이러스 감염)의 예방적 또는 치료적 치료를 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[0372] 본 발명의 특정 실시형태는 동물에서 질환 또는 장애(예를 들어, 간 질환 또는 바이러스 감염, 예컨대, B형 간염 바이러스 감염)를 치료하기 위한 의약의 제조를 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염의 용도를 제공한다.

[0373] 특정 실시형태에서, 동물은 포유동물, 예컨대, 인간(예를 들어, HBV 감염된 환자)이다.

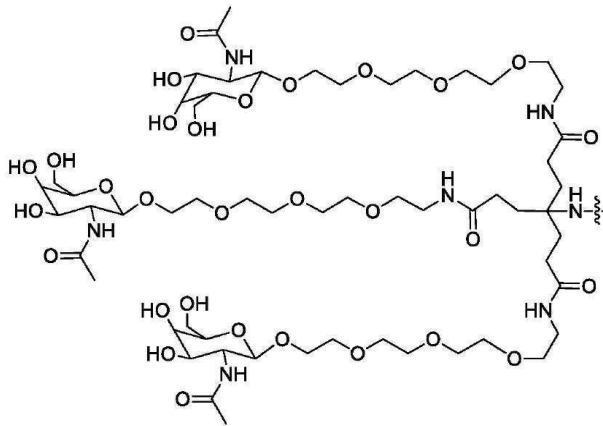
[0374] 일 실시형태에서 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 (Id)를 갖는다:



[0375]

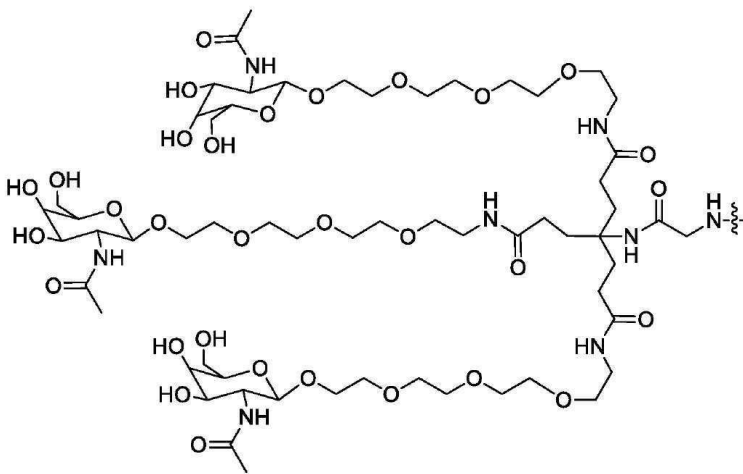
[0376] 식 중,

[0377] R^{1d}는



[0378]

[0379] 및



[0380]

[0381]로부터 선택되고;

[0382] X^d는 C₂₋₁₀ 알킬렌이며;

[0383] n^d는 0 또는 1이며;

[0384] R^{2d}는 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자이며;

[0385] R^{3d}는 H, 보호기, 고체 지지체에 대한 공유 결합 또는 고체 지지체에 결합된 연결기에 대한 결합이다.

[0386] 일 실시형태에서 R^{3d}는 화학식 Id의 화합물의 잔여부를 고체 지지체에 결합하는 연결기를 포함한다. 연결기의 특성은 중요하지 않되, 화합물은 화학식 Id의 화합물의 제조에 적합한 중간체이며, 식 중, R^{2d}는 표 1의 이중 가닥 siRNA로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자이다.

[0387] 일 실시형태에서 R^{3d}에서 링커는 약 20달톤 내지 약 1,000달톤의 분자량을 갖는다.

[0388] 일 실시형태에서 R^{3d}에서 링커는 약 20달톤 내지 약 500달톤의 분자량을 갖는다.

[0389] 일 실시형태에서 R^{3d} 내의 링커는 약 5옹스트롬 내지 약 40옹스트롬(이들 값 포함) 길이에 의해서 화학식 I의 화합물의 잔여부로부터 고체 지지체를 분리한다.

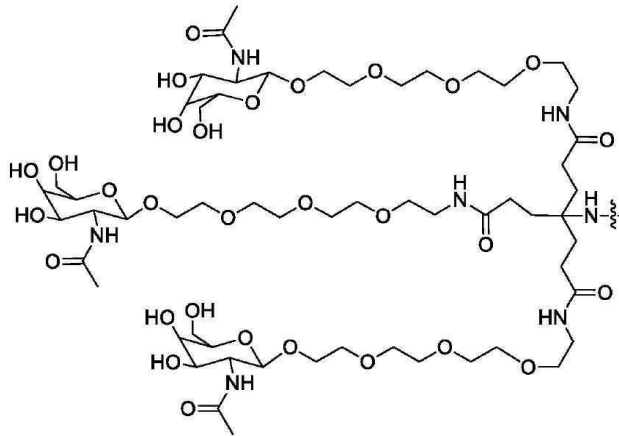
[0390] 일 실시형태에서 R^{3d}는 2 내지 15개의 탄소 원자를 갖는 2가의 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소쇄이고, 여기서 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)은 (-O-) 또는 (-N(H)-)에 의해서 선

택적으로 대체되고, 여기서 쇠는 탄소 상에서 (C₁-C₆)알콕시, (C₃-C₆)사이클로알킬, (C₁-C₆)알칸오일, (C₁-C₆)알칸오일옥시, (C₁-C₆)알콕시카보닐, (C₁-C₆)알킬티오, 아자이드, 사이아노, 나이트로, 할로, 하이드록시, 옥소(=O), 카복시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로아릴 및 헤테로아릴옥시로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4 개)의 치환체로 선택적으로 치환된다.

[0391] 일 실시형태에서 R^{3d}는 2 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 2가의 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소 쇠이고, 여기서 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)은 (-O-) 또는 (-N(H)-)에 의해서 선택적으로 대체되고, 여기서 쇠는 탄소 상에서 (C₁-C₆)알콕시, (C₃-C₆)사이클로알킬, (C₁-C₆)알칸오일, (C₁-C₆)알칸오일옥시, (C₁-C₆)알콕시카보닐, (C₁-C₆)알킬티오, 아자이드, 사이아노, 나이트로, 할로, 하이드록시, 옥소(=O), 카복시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로아릴 및 헤테로아릴옥시로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4 개)의 치환체로 선택적으로 치환된다.

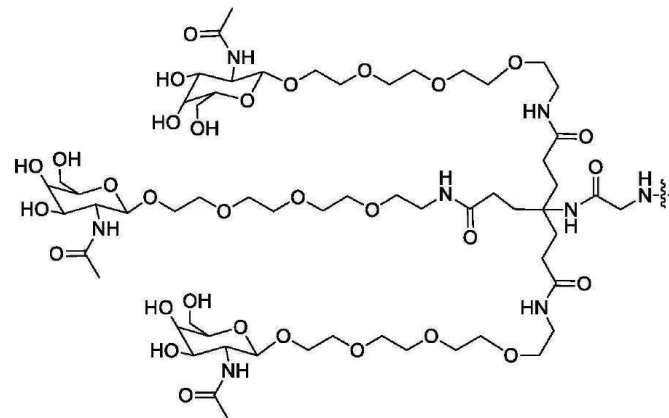
[0392] 일 실시형태에서 R^{3d}에서 링커는 -C(=O)CH₂CH₂C(=O)N(H)-이다.

[0393] 일 실시형태에서 R^{1d}는 하기이다:



[0394]

[0395] 일 실시형태에서 R^{1d}는 하기이다:



[0396]

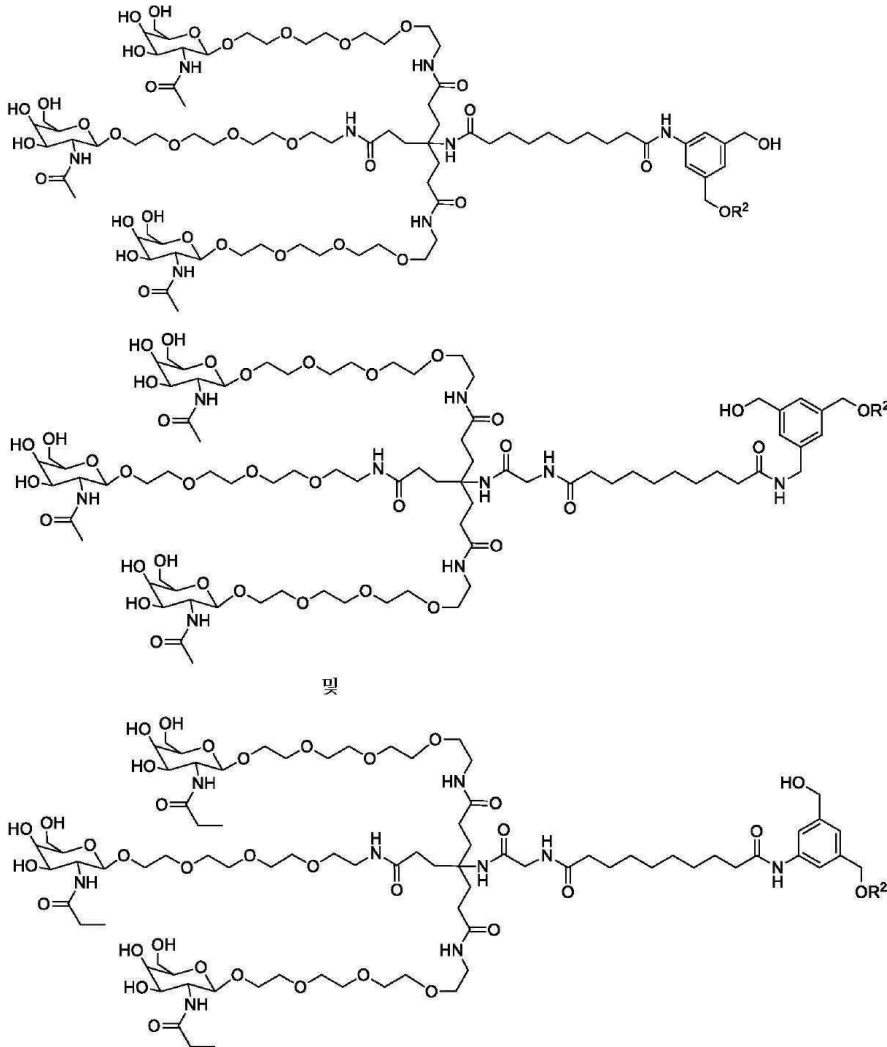
[0397] 일 실시형태에서 X^d는 C₈알킬렌이다.

[0398] 일 실시형태에서 n^d는 0이다.

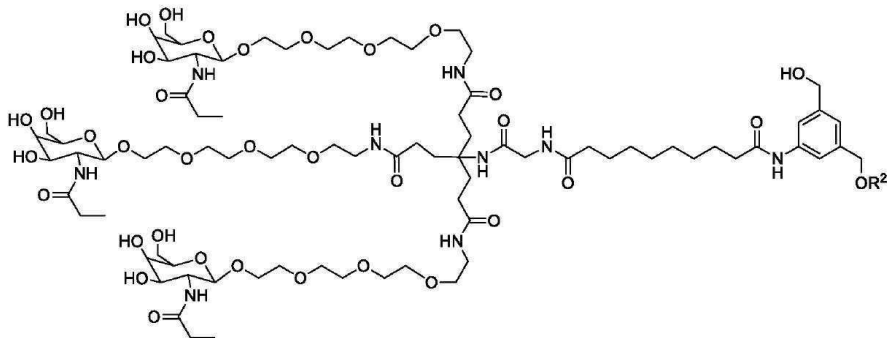
[0399] 일 실시형태에서 R^{2d}는 siRNA이다.

[0400] 일 실시형태에서 R^{3d}는 H이다.

[0401] 또 다른 실시형태에서 화학식 (Id)의 화합물 또는 이의 염은



및



[0402]

[0403] 및 이들의 염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0404]

본 발명의 일 양상은 화학식 (Id)의 화합물 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0405]

본 발명의 일 양상은 화학식 (Id)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 이중 가닥 siRNA를 전달하는 방법이다.

[0406]

본 발명의 또 다른 양상은 화학식 (Id)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 동물에서 질환 또는 장애(예를 들어, 바이러스 감염, 예컨대, B형 간염 바이러스 감염)을 치료하는 방법이다.

[0407]

본 발명의 특정 실시형태는 의학 요법에서 사용하기 위한 화학식 (Id)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[0408]

본 발명의 특정 실시형태는 동물에서 질환 또는 장애(예를 들어, 바이러스 감염, 예컨대, B형 간염 바이러스 감염)의 예방적 또는 치료적 치료를 위한 화학식 (Id)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

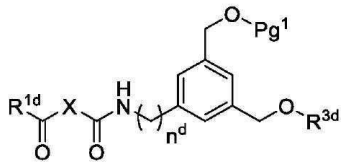
[0409]

본 발명의 특정 실시형태는 동물에서 질환 또는 장애(예를 들어, 바이러스 감염, 예컨대, B형 간염 바이러스 감염)를 치료하기 위한 의약의 제조를 위한 화학식 (Id)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염의 용도를 제공한다.

[0410]

특정 실시형태에서, 동물은 포유동물, 예컨대, 인간(예를 들어, HBV 감염된 환자)이다.

[0411] 본 발명은 또한 화학식 (Id)의 화합물을 제조하는 데 유용한 본 명세서에 개시된 합성 중간체 및 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 하기 화학식 Ie의 중간체 화합물 또는 이의 염을 포함한다:

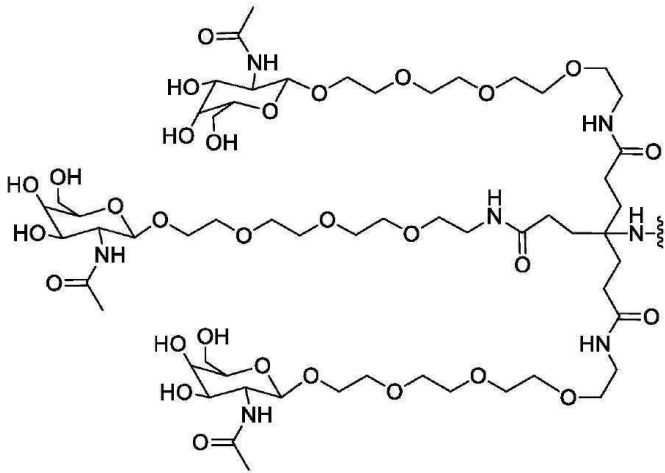


(Ie)

[0412]

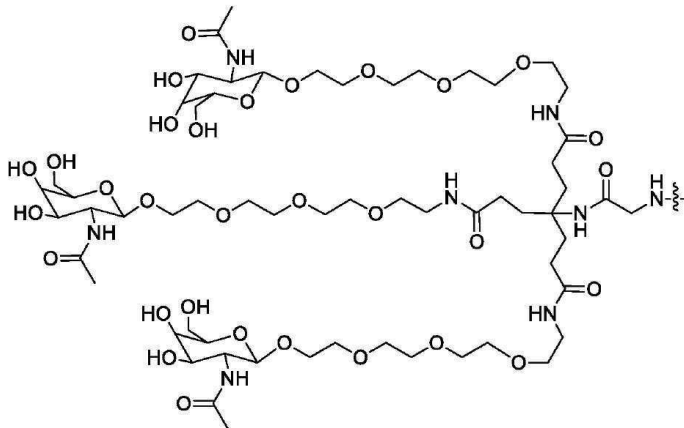
[0413] 식 중,

[0414] R^{1d}는



[0415]

[0416] 및



[0417]

[0418]로부터 선택되고;

[0419] X^d는 C₂₋₈ 알킬렌이고;

[0420] n^d는 0 또는 1이며;

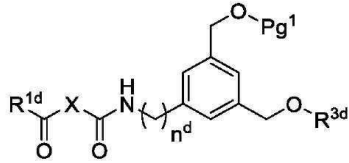
[0421] Pg¹은 H 또는 적합한 보호기이고; 그리고

[0422] R^{3d}는 H, 보호기, 고체 지지체에 대한 공유 결합 또는 고체 지지체에 결합된 연결기에 대한 결합이다. 도 1은 화학식 (Ie)의 대표적인 중간체 화합물을 도시한하고, 여기서, 표적화 리간드/링커는 고체상 지지체에 결합되고,

Pg¹은 보호기 DMTr이다.

[0423] 일 실시형태에서 Pg¹은 TMTTr(트라이메톡시트리틸), DMTr(다이메톡시트리틸), MMTr(모노메톡시트리틸) 또는 Tr(트리틸)이다.

[0424] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 화학식 (Id)의 화합물의 제조 방법을 제공하며, 이 방법은 하기 화학식 (Ie)의 상응하는 화합물을, 고체상 핵산 합성 조건에 적용시켜 화학식 Id(식 중, R^{2d}는 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자임)의 상응하는 화합물을 제공하는 단계를 포함한다:



(Ie)

[0425]

[0426] 식 중,

[0427] X^d는 C₂₋₈ 알킬렌이고;

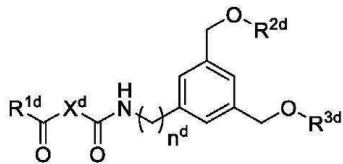
[0428] n^d는 0 또는 1이며;

[0429] Pg¹은 H이고;

[0430] R^{3d}는 고체 지지체에 대한 공유 결합 또는 고체 지지체에 결합된 연결기에 대한 결합이다.

[0431] 일 실시형태에서, 방법은 고체 지지체로부터 화합물을 제거하여 화학식 Id의 상응하는 화합물을 제공하는 단계를 추가로 포함하며, 식 중 R^{3d}는 H이다.

[0432] 일 실시형태에서 화합물은 하기 화학식 Id의 화합물 또는 이의 염이 아니다:

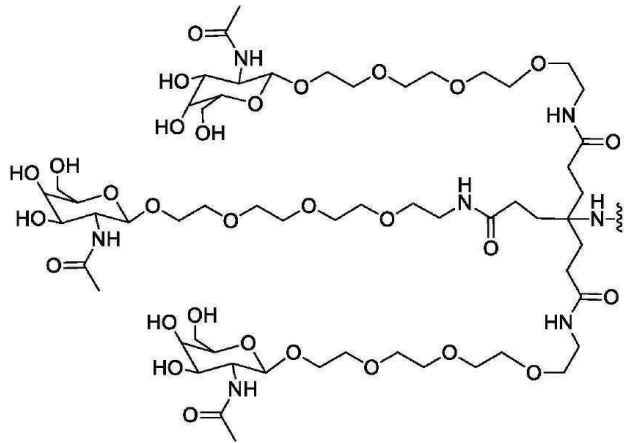


(Id)

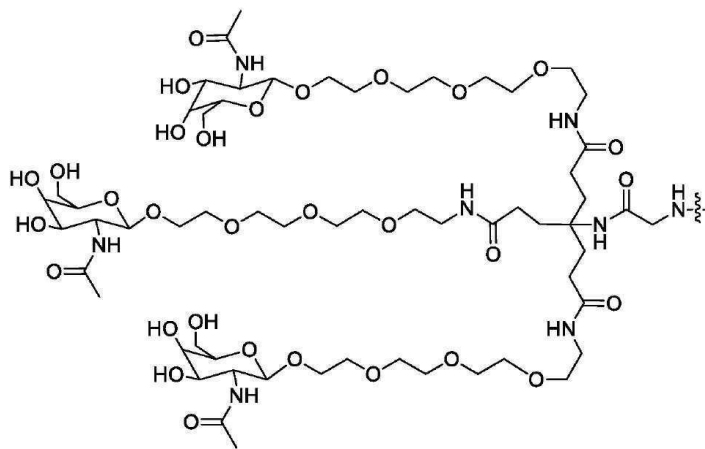
[0433]

[0434] 식 중,

[0435] R^{1d}는



및



[0436]

[0437] 로부터 선택되고;

[0438] X^d는 C₂₋₁₀ 알킬렌이며;

[0439] N^d는 0 또는 1이며;

[0440] R^{2d}는 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자이며;

[0441] R^{3d}는 H, 보호기, 고체 지지체에 대한 공유 결합 또는 고체 지지체에 결합된 연결기에 대한 결합이다.

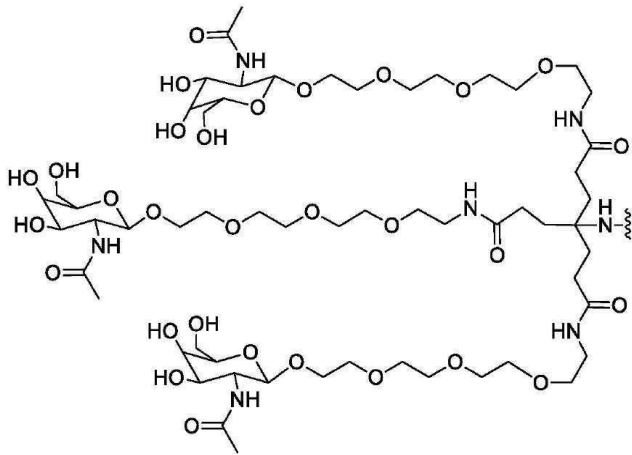
[0442] 일 실시형태에서 화합물은 하기 화학식 Ie의 화합물 또는 이의 염이 아니다:



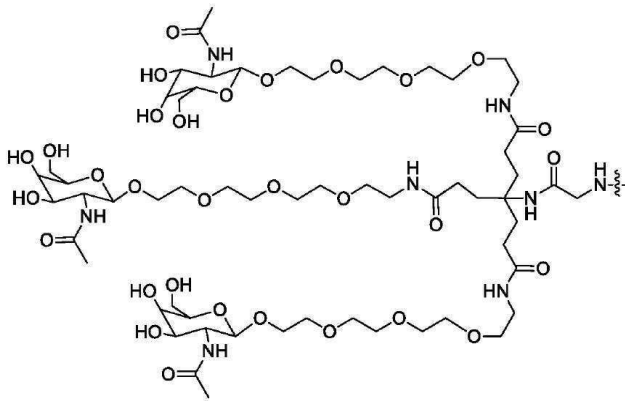
(Ie)

[0443]

[0444] R^{1d}는



및



[0445]

[0446] 로부터 선택되고;

[0447] X^d는 C₂₋₈ 알킬렌이고;

[0448] n^d는 0 또는 1이며;

[0449] Pg¹은 H 또는 적합한 보호기이고; 그리고

[0450] R^{3d}는 H, 보호기, 고체 지지체에 대한 공유 결합 또는 고체 지지체에 결합된 연결기에 대한 결합이다.

[0451] 일 실시형태에서 R^{3d}는 H이다.

[0452] 일 실시형태에서 R^{3d}는 고체 지지체에 대한 공유 결합이다.

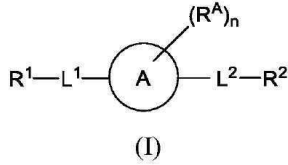
[0453] 일 실시형태에서, R^{3d}는 고체 지지체에 결합된 연결기에 대한 결합이고, 여기서 연결기는 2 내지 15개의 탄소 원자를 갖는 2가의 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소쇄이고, 여기서 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)은 (-O-) 또는 (-N(H)-)에 의해서 선택적으로 대체되고, 여기서 쇠는 탄소 상에서 (C₁-C₆)알콕시, (C₃-C₆)사이클로알킬, (C₁-C₆)알칸오일, (C₁-C₆)알칸오일옥시, (C₁-C₆)알콕시카보닐, (C₁-C₆)알킬티오, 아자이드, 사이아노, 나이트로, 할로, 하이드록시, 옥소(=O), 카복시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로아릴 및 헤테로아릴옥시로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 치환체로 선택적으로 치환된다.

[0454] 일 실시형태에서, R^{3d}는 고체 지지체에 결합된 연결기에 대한 결합이고, 여기서 연결기는 2 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 2가의 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소쇄이고, 여기서 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)은 (-O-) 또는 (-N(H)-)에 의해서 선택적으로 대체되고, 여기서 쇠는 탄소 상에

서 (C₁-C₆)알콕시, (C₃-C₆)사이클로알킬, (C₁-C₆)알칸오일, (C₁-C₆)알칸오일옥시, (C₁-C₆)알콕시카보닐, (C₁-C₆)알킬티오, 아자이드, 사이아노, 나이트로, 할로, 하이드록시, 옥소(=O), 카복시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로아릴 및 헤테로아릴옥시로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 치환체로 선택적으로 치환된다.

[0455] 일 실시형태에서 R^{3d}는 고체 지지체에 결합된 연결기에 대한 결합이고, 식 중, 연결기는 -C(=O)CH₂CH₂C(=O)N(H)-이다.

[0456] 일 실시형태에서 본 발명은 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 염을 제공한다:



[0457]

[0458] 식 중,

[0459] R¹은 H 또는 합성 활성화기이고;

[0460] L¹은 존재하지 않거나 또는 연결기이며;

[0461] L²는 존재하지 않거나 또는 연결기이고;

[0462] R²는 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자이며;

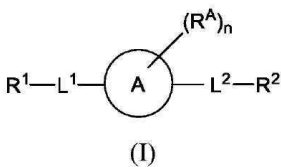
[0463] 고리 A는 존재하지 않거나, 3 내지 20원의 사이클로알킬, 5 내지 20원의 아릴, 5 내지 20원의 헤테로아릴 또는 3 내지 20원의 헤테로사이클로알킬이고;

[0464] 각각의 R^A는 수소, 하이드록시, CN, F, Cl, Br, I, -C₁₋₂ 알킬-OR^B, C₁₋₁₀ 알킬, C₂₋₁₀ 알켄일 및 C₂₋₁₀ 알킨일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서 C₁₋₁₀ 알킬, C₂₋₁₀ 알켄일 및 C₂₋₁₀ 알킨일은 할로, 하이드록시 및 C₁₋₃ 알콕시로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 선택적으로 치환되고;

[0465] R^B는 수소, 보호기, 고체 지지체에 대한 공유 결합 또는 고체 지지체에 결합된 연결기에 대한 결합이며; 그리고

[0466] n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0467] 일 실시형태에서 본 발명은 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 염을 제공한다:



[0468]

[0469] 식 중,

[0470] R¹은 표적화 리간드이고;

[0471] L¹은 존재하지 않거나 또는 연결기이며;

[0472] L²는 존재하지 않거나 또는 연결기이고;

[0473] R²는 H 또는 합성 활성화기이고;

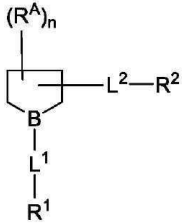
[0474] 고리 A는 존재하지 않거나, 3 내지 20원의 사이클로알킬, 5 내지 20원의 아릴, 5 내지 20원의 헤테로아릴 또는 3 내지 20원의 헤테로사이클로알킬이고;

[0475] 각각의 R^A 는 수소, 하이드록시, CN, F, Cl, Br, I, $-C_{1-2}$ 알킬- OR^B , C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알켄일 및 C_{2-10} 알킨일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서 C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알켄일 및 C_{2-10} 알킨일은 할로, 하이드록시 및 C_{1-3} 알콕시로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 선택적으로 치환되고;

[0476] R^B 는 수소, 보호기, 고체 지지체에 대한 공유 결합 또는 고체 지지체에 결합된 연결기에 대한 결합이며; 그리고

[0477] n 은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0478] 일 실시형태에서 본 발명은 하기 화학식 (Ig)의 화합물 또는 이의 염을 제공한다:



(Ig)

[0479]

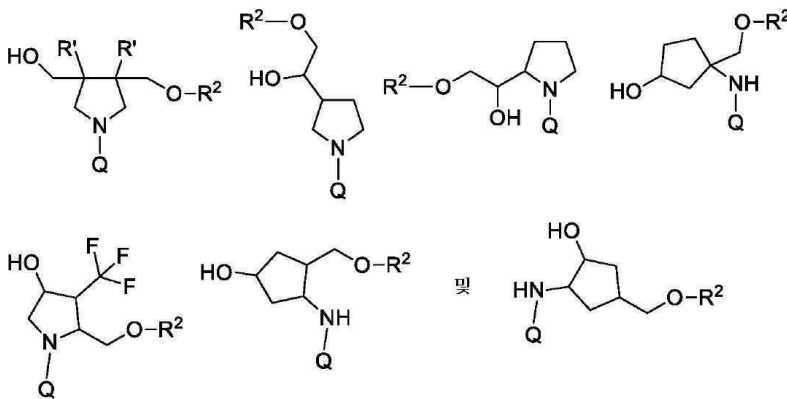
[0480] 식 중,

[0481] B는 $-N-$ 또는 $-CH-$ 이고;

[0482] L^2 는 하이드록실 또는 할로로 선택적으로 치환된 C_{1-4} 알킬렌- $O-$ 이며;

[0483] n 은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7이다.

[0484] 일 실시형태에서 본 발명은



[0485]

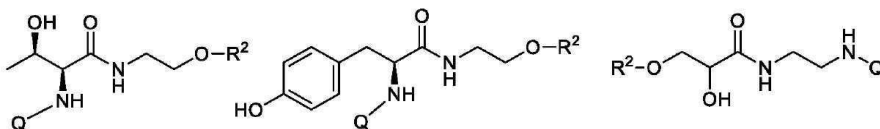
[0486] 및 이들의 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물을 제공하며,

[0487] 식 중,

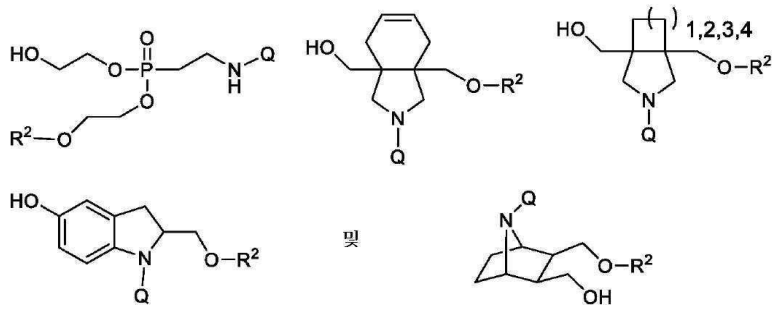
[0488] Q는 $-L^1-R^1$ 이고;

[0489] R^1 는 C_{1-9} 알킬, C_{2-9} 알켄일 또는 C_{2-9} 알킨일이며; C_{1-9} 알킬, C_{2-9} 알켄일 또는 C_{2-9} 알킨일은 할로 또는 하이드록실로 선택적으로 치환된다.

[0490] 일 실시형태에서 본 발명은



[0491]

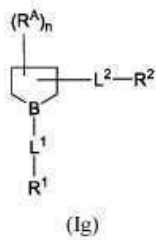


[0492]

[0493] 또는 이의 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물을 제공하며,

[0494] 식 중, Q는 $-L^1-R^1$ 이다.

[0495] 일 실시형태에서 본 발명은 하기 화학식 (Ig)의 화합물 또는 이의 염을 제공한다:



[0496]

[0497] 식 중,

[0498] B는 -N- 또는 -CH-이고;

[0499] L^1 은 존재하지 않거나 또는 연결기이고;

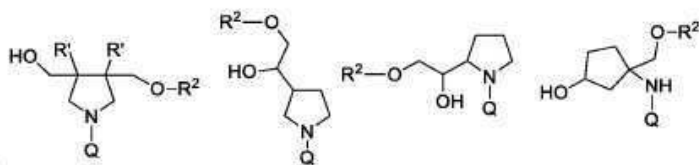
[0500] L^2 는 하이드록실 또는 할로로 선택적으로 치환된 C_{1-4} 알킬렌-O-이며;

[0501] n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7이고;

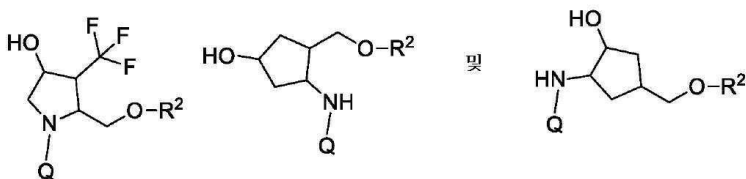
[0502] R^1 은 H 또는 합성 활성화기이고;

[0503] R^2 는 H 또는 합성 활성화기이다.

[0504] 일 실시형태에서 본 발명은



[0505]



[0506]

[0507] 또는 이들의 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물을 제공하며:

[0508] 식 중, Q는 $-L^1-R^1$ 이고;

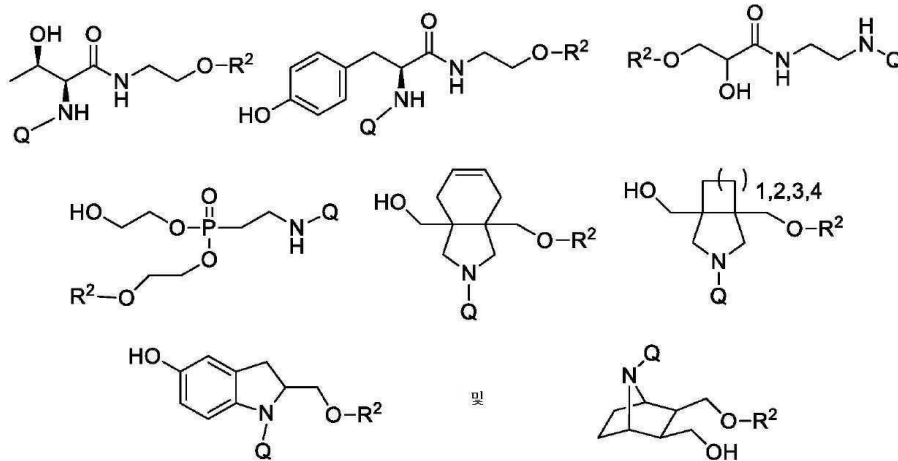
[0509] L¹은 존재하지 않거나 또는 연결기이고;

[0510] R¹은 C₁₋₉ 알킬, C₂₋₉ 알켄일 또는 C₂₋₉ 알킨일이고; 여기서 C₁₋₉ 알킬, C₂₋₉ 알켄일 또는 C₂₋₉ 알킨일은 할로 또는 하이드록실로 선택적으로 치환되며;

[0511] R¹은 H 또는 합성 활성화기이고;

[0512] R²은 H 또는 합성 활성화기이다.

[0513] 일 실시형태에서 본 발명은



[0514] 또는 이들의 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물을 제공하며,
 [0515] 식 중, Q는 -L¹-R¹이고;

[0516] 식 중, Q는 -L¹-R¹이고;

[0517] L¹은 존재하지 않거나 또는 연결기이고;

[0518] R¹은 H 또는 합성 활성화기이고;

[0519] R²은 H 또는 합성 활성화기이다.

[0520] 일 실시형태에서 R¹은 H 또는 DCC, HOBT, EDC, BOP, PyBOP 또는 HBTU로부터 유래된 합성 활성화기이다.

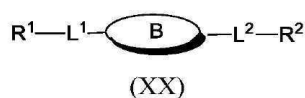
[0521] 일 실시형태에서 R²은 H, 아세테이트, 트리플레이트, 메실레이트 또는 석신에이트이다.

[0522] 일 실시형태에서 R¹은 DCC, HOBT, EDC, BOP, PyBOP 또는 HBTU로부터 유래된 합성 활성화기이다.

[0523] 일 실시형태에서 R²은 아세테이트, 트리플레이트, 메실레이트 또는 석신에이트이다.

[0524] 일 실시형태에서, L¹은 5 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 2가의 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소 채이고, 여기서 탄화수소 내의 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)은 -O-, -NH-, -NH-C(=O)-, -C(=O)-NH- 또는 -S-에 의해서 선택적으로 대체된다.

[0525] 일 실시형태에서 본 발명은 하기 화학식 (XX)의 화합물 또는 이의 염을 제공한다:



[0526] 식 중,
 [0527] 식 중,

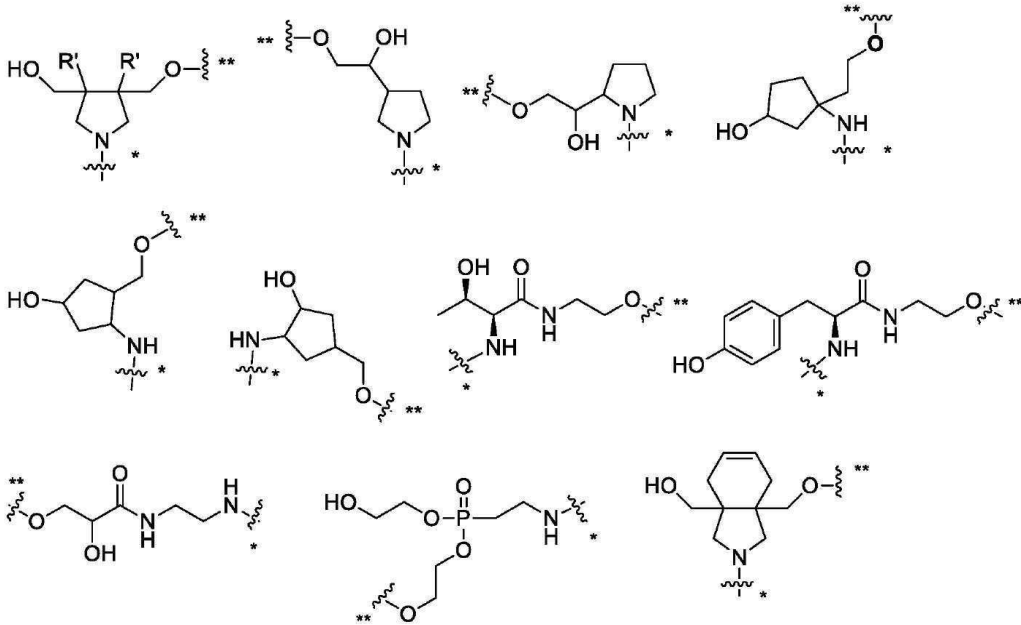
[0528] R¹은 표적화 리간드이고;

[0529] L¹은 존재하지 않거나 또는 연결기이며;

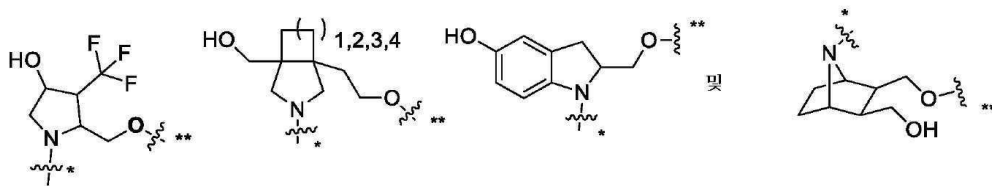
[0530] L²는 존재하지 않거나 또는 연결기이고;

[0531] R²는 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자이며;

[0532] B는 2가이고,



[0533]



[0534]

[0535] 로 이루어진 군으로부터 선택되며,

[0536] 식 중,

[0537] 각각의 R¹는 독립적으로 C₁₋₉ 알킬, C₂₋₉ 알켄일 또는 C₂₋₉ 알킨일이고; 여기서 C₁₋₉ 알킬, C₂₋₉ 알켄일 또는 C₂₋₉ 알킨일은 할로 또는 하이드록실로 선택적으로 치환되며;

[0538] *로 표시된 원자가는 L¹에 부착되거나 또는 L¹이 존재하지 않는 경우에는 R¹에 부착되고; 그리고

[0539] **로 표시된 원자가는 L²에 부착되거나 또는 L²가 존재하지 않는 경우에는 R²에 부착된다.

[0540] 일 실시형태에서 R¹은 2 내지 8개의 당류를 포함한다.

[0541] 일 실시형태에서 R¹은 2 내지 6개의 당류를 포함한다.

[0542] 일 실시형태에서 R¹은 2 내지 4개의 당류를 포함한다.

[0543] 일 실시형태에서 R¹은 3 내지 8개의 당류를 포함한다.

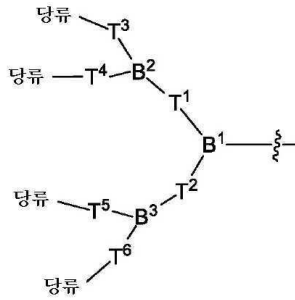
[0544] 일 실시형태에서 R¹은 3 내지 6개의 당류를 포함한다.

[0545] 일 실시형태에서 R¹은 3 내지 4개의 당류를 포함한다.

[0546] 일 실시형태에서 R^1 은 3개의 당류를 포함한다.

[0547] 일 실시형태에서 R^1 은 4개의 당류를 포함한다.

[0548] 일 실시형태에서 R^1 은 하기 화학식을 갖는다:



[0549]

[0550] 식 중,

[0551] B^1 은 약 1 내지 약 20개의 원자를 포함하는 3가 기이고, L^1 , T^1 및 T^2 에 공유 결합되고;

[0552] B^2 는 약 1 내지 약 20개의 원자를 포함하는 3가 기이고, T^1 , T^3 및 T^4 에 공유 결합되고;

[0553] B^3 은 약 1 내지 약 20개의 원자를 포함하는 3가 기이고, T^2 , T^5 및 T^6 에 공유 결합되고;

[0554] T^1 은 존재하지 않거나 또는 연결기이며;

[0555] T^2 는 존재하지 않거나 또는 연결기이고;

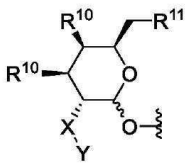
[0556] T^3 은 존재하지 않거나 또는 연결기이며;

[0557] T^4 는 존재하지 않거나 또는 연결기이고;

[0558] T^5 는 존재하지 않거나 또는 연결기이며; 그리고

[0559] T^6 은 존재하지 않거나 또는 연결기이다.

[0560] 일 실시형태에서 각각의 당류는 하기로부터 독립적으로 선택된다:



[0561]

[0562] 식 중,

[0563] X 는 NR^3 이고, Y 는 $-(C=O)R^4$, $-SO_2R^5$ 및 $-(C=O)NR^6R^7$ 로부터 선택되거나; 또는 X 는 $-(C=O)-$ 이고, Y 는 NR^8R^9 이며;

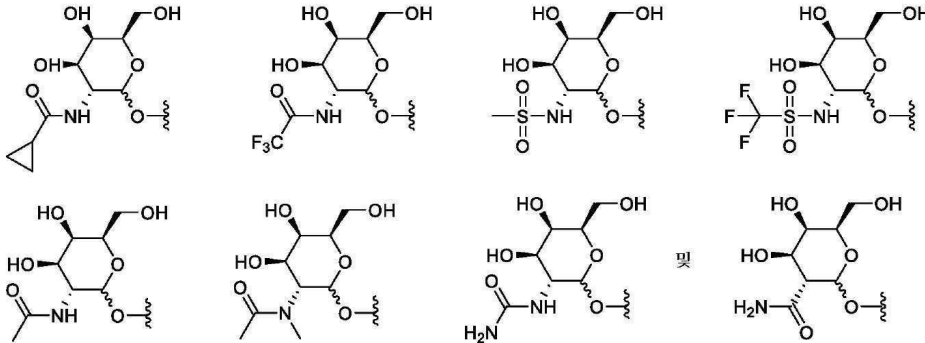
[0564] R^3 은 수소 또는 (C_1-C_4) 알킬이고;

[0565] R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 및 R^9 는 각각 수소, 할로, (C_1-C_4) 알킬, (C_1-C_4) 할로알킬, (C_1-C_4) 알콕시 및 (C_1-C_4) 할로알콕시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 선택적으로 치환된, (C_1-C_8) 알킬, (C_1-C_8) 할로알킬, (C_1-C_8) 알콕시 및 (C_3-C_6) 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

[0566] R^{10} 은 $-OH$, $-NR^8R^9$ 또는 $-F$ 이고; 그리고

[0567] R¹¹은 -OH, -NR⁸R⁹, -F 또는 할로, 하이드록실, 카복실, 아미노, (C₁-C₄)알킬, (C₁-C₄)할로알킬, (C₁-C₄)알콕시 및 (C₁-C₄)할로알콕시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 선택적으로 치환된 5원의 헤테로 사이클이다.

[0568] 일 실시형태에서 각각의 당류는 하기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다:



[0569]

[0570] 일 실시형태에서 각각의 당류는 독립적으로 하기이다:



[0571]

[0572] 일 실시형태에서 T¹ 및 T² 중 하나는 존재하지 않는다.

[0573] 일 실시형태에서 T¹ 및 T² 둘 다는 존재하지 않는다.

[0574] 일 실시형태에서, T¹, T², T³, T⁴, T⁵ 및 T⁶ 각각은 독립적으로 존재하지 않거나, 1 내지 50개의 탄소 원자를 갖는, 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소 체이고, 여기서 탄화수소 체 내의 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)은 -O-, -NR^X-, -NR^X-C(=O)-, -C(=O)-NR^X- 또는 -S-에 의해서 선택적으로 대체되고, R^X는 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이고, 여기서 탄화수소 체는 (C₁-C₆)알콕시, (C₃-C₆)사이클로알킬, (C₁-C₆)알칸오일, (C₁-C₆)알칸오일옥시, (C₁-C₆)알콕시카보닐, (C₁-C₆)알킬티오, 아자이드, 사이아노, 나이트로, 할로, 하이드록시, 옥소(=O), 카복시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로아릴 및 헤테로아릴옥시로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 치환체로 선택적으로 치환된다.

[0575] 일 실시형태에서, T¹, T², T³, T⁴, T⁵ 및 T⁶ 각각은 독립적으로 존재하지 않거나, 1 내지 20개의 탄소 원자를 갖는, 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소 체이고, 여기서 탄화수소 체 내의 상기 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)은 -O-, -NR^X-, -NR^X-C(=O)-, -C(=O)-NR^X- 또는 -S-에 의해서 선택적으로 대체되고, R^X는 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이고, 여기서 탄화수소 체는 (C₁-C₆)알콕시, (C₃-C₆)사이클로알킬, (C₁-C₆)알칸오일, (C₁-C₆)알칸오일옥시, (C₁-C₆)알콕시카보닐, (C₁-C₆)알킬티오, 아자이드, 사이아노, 나이트로, 할로, 하이드록시, 옥소(=O), 카복시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로아릴 및 헤테로아릴옥시로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 치환체로 선택적으로 치환된다.

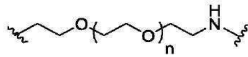
[0576] 실시형태에서, T¹, T², T³, T⁴, T⁵ 및 T⁶ 각각은 독립적으로 존재하지 않거나 또는 1 내지 50개의 탄소 원자를 갖는, 2개의 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소 체 또는 이의 염이고, 여기서 탄화수소 체 내의 상기 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)은 -O- 또는 -NR^X-에 의해서 선택적으로 대체되고, R^X는 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이고, 여기서 탄화수소 체는 할로, 하이드록시 및 옥소(=O)로부터 선택된 하나 이상

(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 치환체로 선택적으로 치환된다.

[0577] 실시형태에서, T¹, T², T³, T⁴, T⁵ 및 T⁶ 각각은 독립적으로 존재하지 않거나 또는 1 내지 20개의 탄소 원자를 갖는, 2가의 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소쇄이되, 여기서 탄화수소쇄 내의 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)은 -O-에 의해서 선택적으로 대체되고, 여기서 탄화수소쇄는 할로, 하이드록시 및 옥소(=O)로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 치환체로 선택적으로 치환된다.

[0578] 실시형태에서, T¹, T², T³, T⁴, T⁵ 및 T⁶ 각각은 독립적으로 존재하지 않거나 또는 1 내지 20개의 탄소 원자를 갖는, 2가의 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소쇄이되, 여기서 탄화수소쇄 내의 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)은 -O-에 의해서 선택적으로 대체되고, 여기서 탄화수소쇄는 할로, 하이드록시 및 옥소(=O)로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 치환체로 선택적으로 치환된다.

[0579] 일 실시형태에서 T³, T⁴, T⁵, 및 T⁶ 중 적어도 하나는 하기이다:

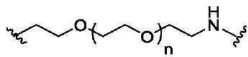


[0580]

[0581] 식 중,

[0582] n은 1, 2, 3이다.

[0583] 일 실시형태에서 T³, T⁴, T⁵, 및 T⁶ 각각은 하기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다:



[0584]

[0585] 식 중,

[0586] n은 1, 2, 3이다.

[0587] 일 실시형태에서 T¹ 및 T² 중 적어도 하나는 글리신이다.

[0588] 일 실시형태에서 T¹ 및 T² 각각은 글리신이다.

[0589] 일 실시형태에서 B¹은 1 내지 15개의 원자를 포함하는 3가 기이고, L¹, T¹, 및 T²에 공유 결합된다.

[0590] 일 실시형태에서 B¹은 1 내지 10개의 원자를 포함하는 3가 기이고, L¹, T¹, 및 T²에 공유 결합된다.

[0591] 일 실시형태에서 B¹은 (C₁-C₆)알킬을 포함한다.

[0592] 일 실시형태에서 B¹은 C₃₋₈ 사이클로알킬을 포함한다.

[0593] 일 실시형태에서 B¹은 실릴기를 포함한다.

[0594] 일 실시형태에서 B¹은 D- 또는 L-아미노산을 포함한다.

[0595] 일 실시형태에서 B¹은 당류를 포함한다.

[0596] 일 실시형태에서 B¹은 포스페이트기를 포함한다.

[0597] 일 실시형태에서 B¹은 포스포네이트기를 포함한다.

[0598] 일 실시형태에서 B¹은 아릴을 포함한다.

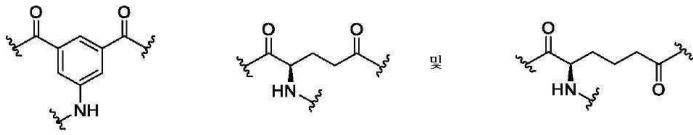
[0599] 일 실시형태에서 B¹은 페닐 고리를 포함한다.

[0600] 일 실시형태에서 B¹은 페닐 고리이다.

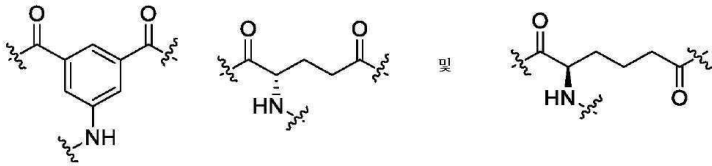
[0601] 일 실시형태에서 B¹은 CH이다.

[0602] 일 실시형태에서 B¹은 헤테로아릴을 포함한다.

[0603] 일 실시형태에서 B¹은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0605] 일 실시형태에서 B¹은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0607] 일 실시형태에서 B²는 1 내지 15개의 원자를 포함하는 3가 기이고, L¹, T¹, 및 T²에 공유 결합된다.

[0608] 일 실시형태에서 B²는 1 내지 10개의 원자를 포함하는 3가 기이고, L¹, T¹, 및 T²에 공유 결합된다.

[0609] 일 실시형태에서 B²는 (C₁-C₆)알킬을 포함한다.

[0610] 일 실시형태에서 B²는 C₃₋₈ 사이클로알킬을 포함한다.

[0611] 일 실시형태에서 B²는 실릴기를 포함한다.

[0612] 일 실시형태에서 B²는 D- 또는 L-아미노산을 포함한다.

[0613] 일 실시형태에서 B²는 당류를 포함한다.

[0614] 일 실시형태에서 B²는 포스페이트기를 포함한다.

[0615] 일 실시형태에서 B²는 포스포네이트기를 포함한다.

[0616] 일 실시형태에서 B²는 아릴을 포함한다.

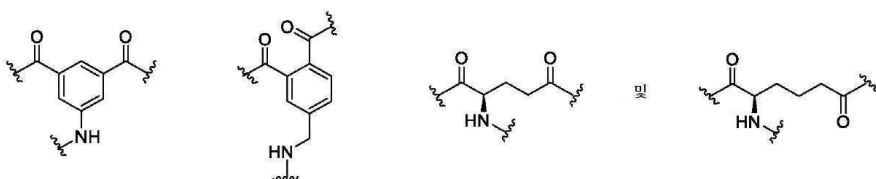
[0617] 일 실시형태에서 B²는 페닐 고리를 포함한다.

[0618] 일 실시형태에서 B²는 페닐 고리이다.

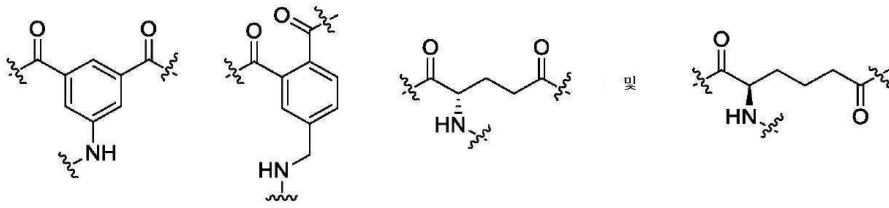
[0619] 일 실시형태에서 B²는 CH이다.

[0620] 일 실시형태에서 B²는 헤테로아릴을 포함한다.

[0621] 일 실시형태에서 B²는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0623] 일 실시형태에서 B²는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0624]

[0625] 또는 이들의 염.

[0626] 일 실시형태에서 B³은 1 내지 15개의 원자를 포함하는 3가 기이고, L¹, T¹, 및 T²에 공유 결합된다.

[0627] 일 실시형태에서 B³은 1 내지 10개의 원자를 포함하는 3가 기이고, L¹, T¹, 및 T²에 공유 결합된다.

[0628] 일 실시형태에서 B³은 (C₁-C₆)알킬을 포함한다.

[0629] 일 실시형태에서 B³은 C₃₋₈ 사이클로알킬을 포함한다.

[0630] 일 실시형태에서 B³은 실릴기를 포함한다.

[0631] 일 실시형태에서 B³은 D- 또는 L-아미노산을 포함한다.

[0632] 일 실시형태에서 B³은 당류를 포함한다.

[0633] 일 실시형태에서 B³은 포스페이트기를 포함한다.

[0634] 일 실시형태에서 B³은 포스포네이트기를 포함한다.

[0635] 일 실시형태에서 B³은 아릴을 포함한다.

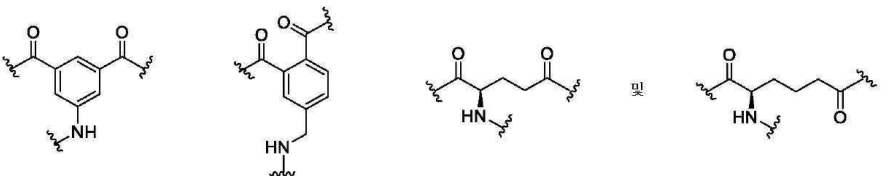
[0636] 일 실시형태에서 B³은 페닐 고리를 포함한다.

[0637] 일 실시형태에서 B³은 페닐 고리이다.

[0638] 일 실시형태에서 B³은 CH이다.

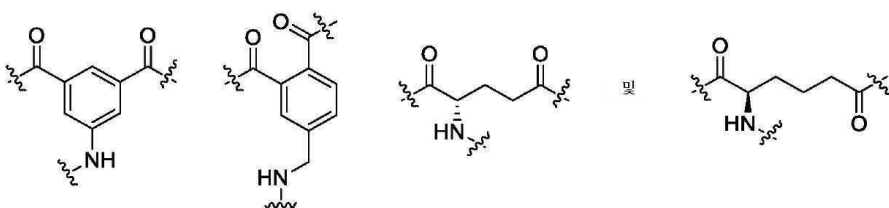
[0639] 일 실시형태에서 B³은 헤테로아릴을 포함한다.

[0640] 일 실시형태에서 B³은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0641]

[0642] 일 실시형태에서 B³은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0643]

[0644] 또는 이들의 염.

[0645] 일 실시형태에서 L^1 및 L^2 는 독립적으로 1 내지 50개의 탄소 원자를 갖는, 2가의 분지형 또는 비분지형인 포화 또는 불포화 탄화수소쇄이고, 여기서 탄화수소쇄 내의 탄소 원자 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)은 $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ 또는 $-S-$ 에 의해서 선택적으로 대체되고, R^X 는 수소 또는 (C_1-C_6) 알킬이고, 여기서 탄화수소쇄는 (C_1-C_6) 알콕시, (C_3-C_6) 사이클로알킬, (C_1-C_6) 알칸오일, (C_1-C_6) 알칸오일옥시, (C_1-C_6) 알콕시카보닐, (C_1-C_6) 알킬티오, 아자이드, 사이아노, 나이트로, 할로, 하이드록시, 옥소(=O), 카복시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로아릴 및 헤테로아릴옥시로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 치환체로 선택적으로 치환된다.

[0646] 일 실시형태에서 L^1 은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

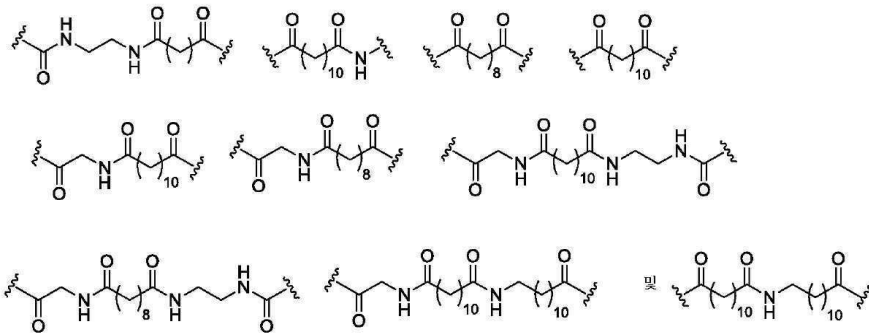


[0647]

[0648] 또는 이들의 염.

[0649] 일 실시형태에서 L^1 은 $-O-$, $-S-$, $-C(=O)-$, $-C(=O)-NH-$, $-NH-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-NH-C(=O)-NH-$ 또는 $-NH-(SO_2)-$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 링키지를 통해서 B^1 에 연결된다.

[0650] 일 실시형태에서 L^1 은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0651]

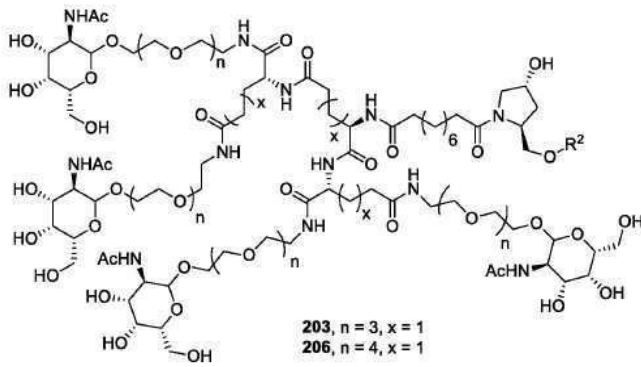
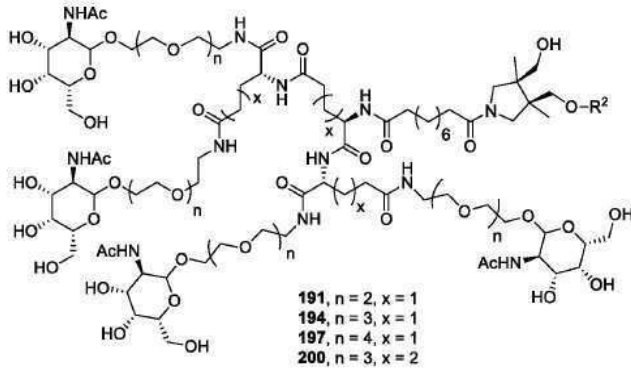
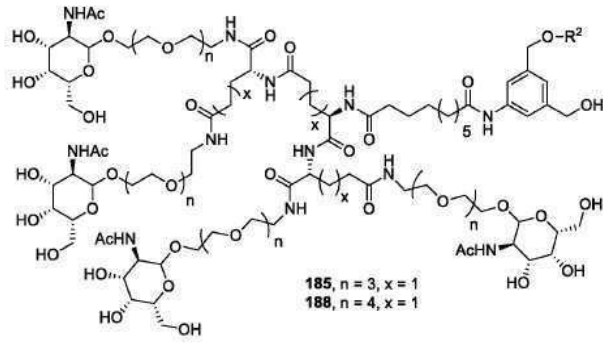
[0652] 일 실시형태에서 L^2 는 $-O-$ 를 통해서 R^2 에 연결된다.

[0653] 일 실시형태에서 L^2 는 하이드록시로 선택적으로 치환된 C_{1-4} 알킬렌- O 이다.

[0654] 일 실시형태에서 L^2 는 $-O-$ 를 통해서 R^2 에 연결된다.

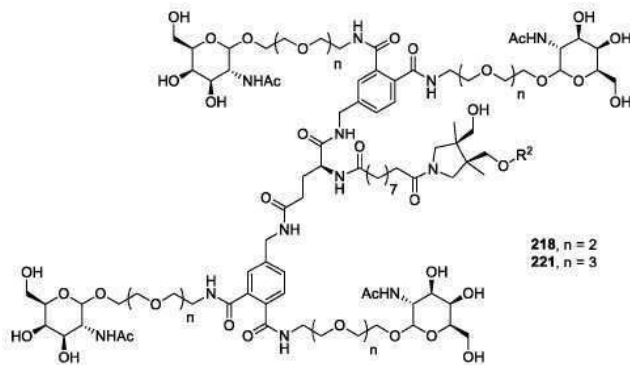
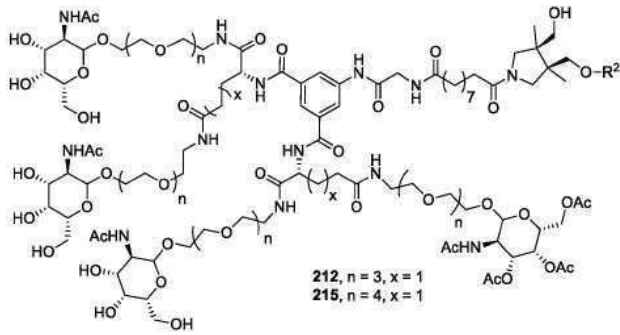
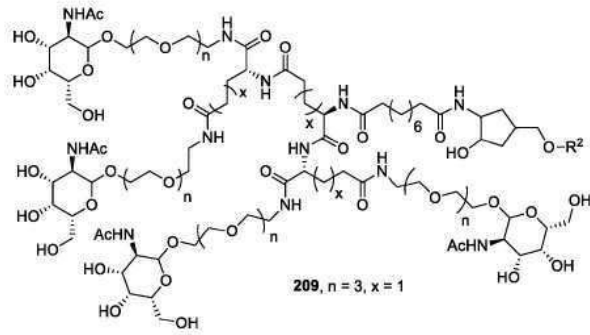
[0655] 일 실시형태에서 L^2 는 존재하지 않는다.

[0656] 일 실시형태에서 본 발명은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물 또는 염 및 이들의 약제학적으로 허용 가능한 염을 제공한다:

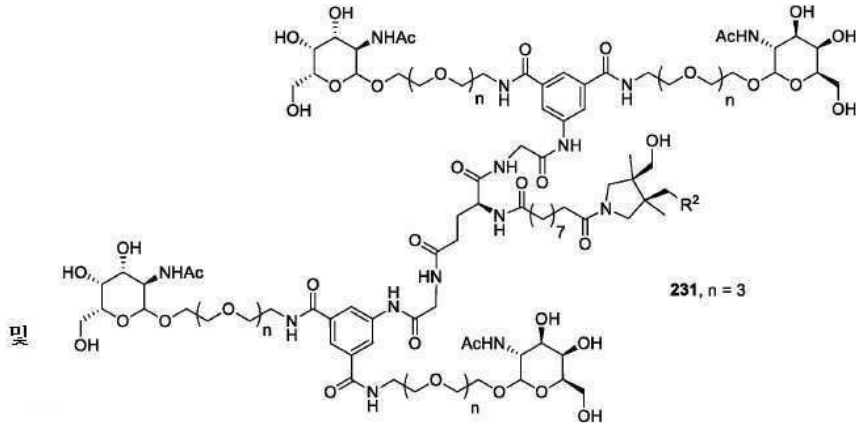
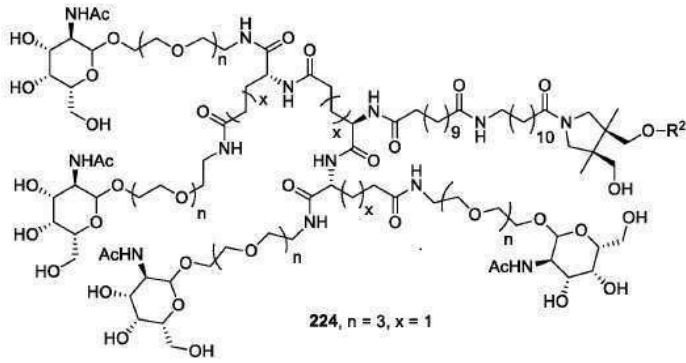


[0657]

;



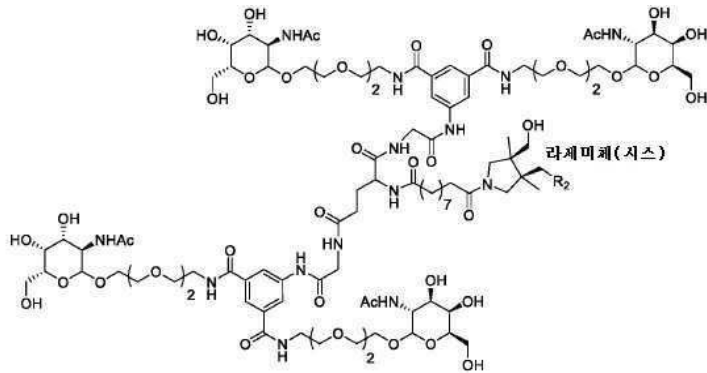
[0658]



[0659]

[0660] 식 중 R^2 는 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 이중 가닥 siRNA 분자이다.

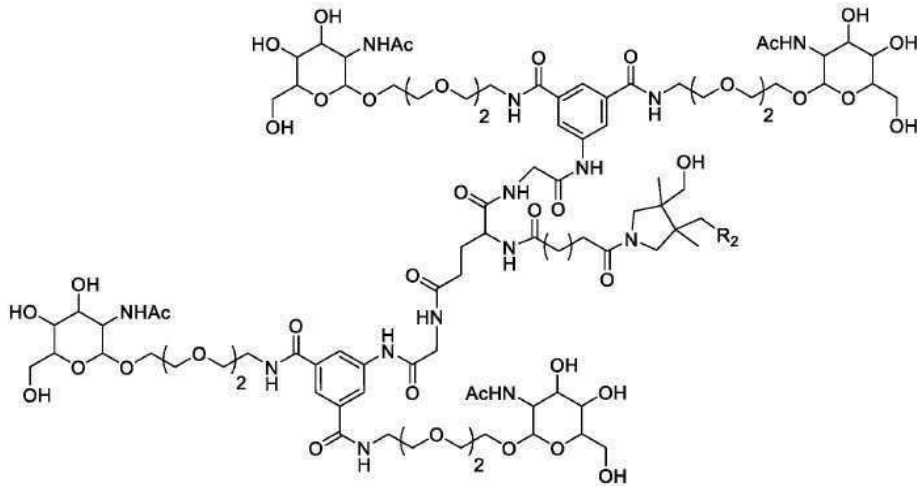
[0661] 일 실시형태에서 본 발명은 하기 화학식의 화합물:



[0662]

[0663] 또는 이의 염을 제공하며, 식 중 R^2 는 핵산이다.

[0664] 일 실시형태에서 본 발명은 하기 화학식의 화합물:



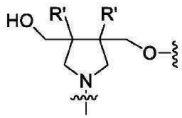
[0665]

[0666] 또는 이의 염을 제공하며, 식 중 R²는 핵산이다.

[0667] 일 실시형태에서, 핵산 분자(예를 들어, siRNA)는 센스 가닥의 3'-단부에서 포스페이트의 산소를 통해서 화합물의 잔여부에 부착된다.

[0668] 일 실시형태에서 화합물 또는 염은 피하로 투여된다.

[0669] 화합물이 하기 화학식의 기를 포함하는 경우:



[0670]

[0671] 고리 상에 가능한 4개의 입체이성질체, 2개의 시스 및 2개의 트랜스가 존재한다. 달리 제시되지 않는 한, 본 발명의 화합물은 그러한 고리에 대해서 4개의 입체이성질체를 포함한다. 일 실시형태에서, 2개의 R'기는 시스 입체배좌로 존재한다. 일 실시형태에서, 2개의 R'기는 트랜스 입체배좌로 존재한다.

[0672] 본 발명의 일 양상은 하기를 포함하는 핵산-지질 입자이다:

[0673] (a) 표 1의 이중 가닥 siRNA 분자로부터 선택된 하나 이상의 이중 가닥 siRNA 분자;

[0674] (b) 양이온성 지질; 및

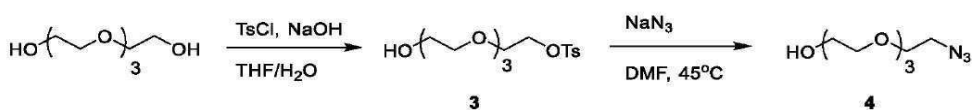
[0675] (c) 비-양이온성 지질.

[0676] **실시예**

[0677] 본 발명은 구체적인 예의 방식으로 보다 상세하게 기술될 것이다. 하기 실시예는 예시의 목적을 위해서 제공되며, 어떠한 방식으로든 본 발명을 제한하도록 의도되지 않는다. 당업자는 변화되거나 변형되어 본질적으로 동일한 결과를 산출할 수 있는 다양한 중요하지 않은 파라미터를 쉽게 인식할 것이다. 일 실시형태에서 올리고뉴클레오타이드는 표 1에 기술된 바와 같은 이중 가닥 siRNA 분자인 것이 이해된다.

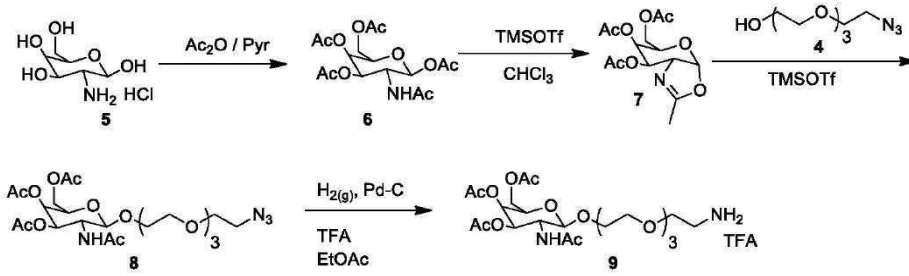
[0678] **실시예 1. 접합체 1의 합성**

[0679] **반응식 1.**



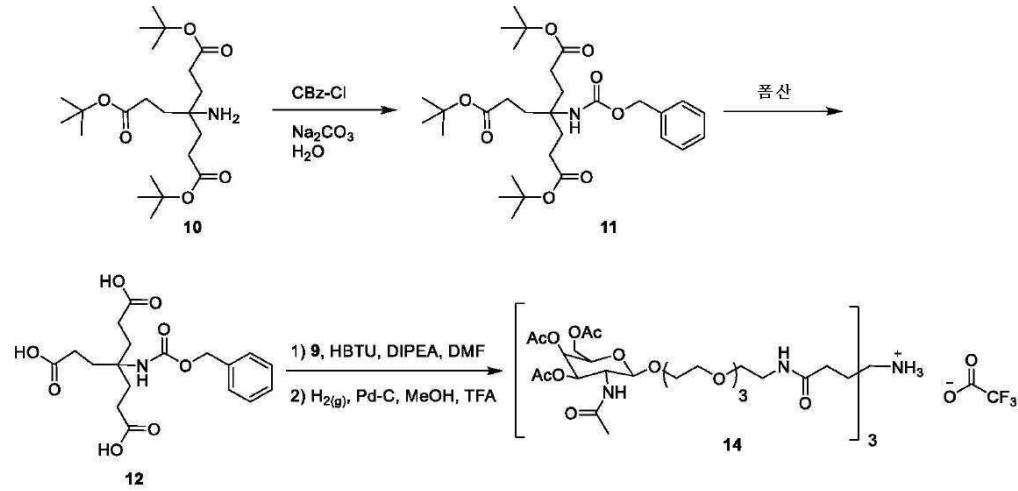
[0680]

[0681] 반응식 2.



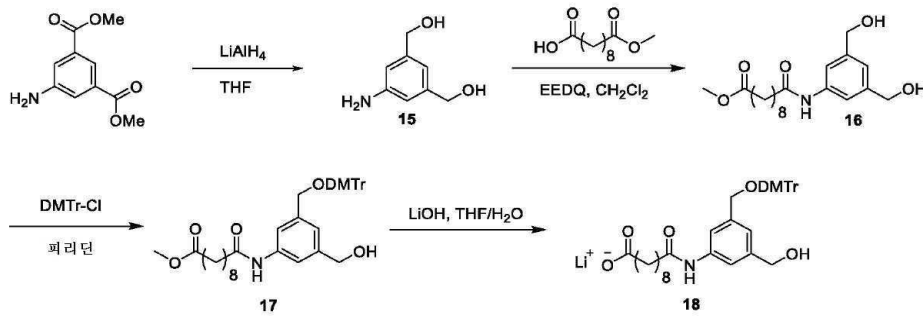
[0682]

[0683] 반응식 3.



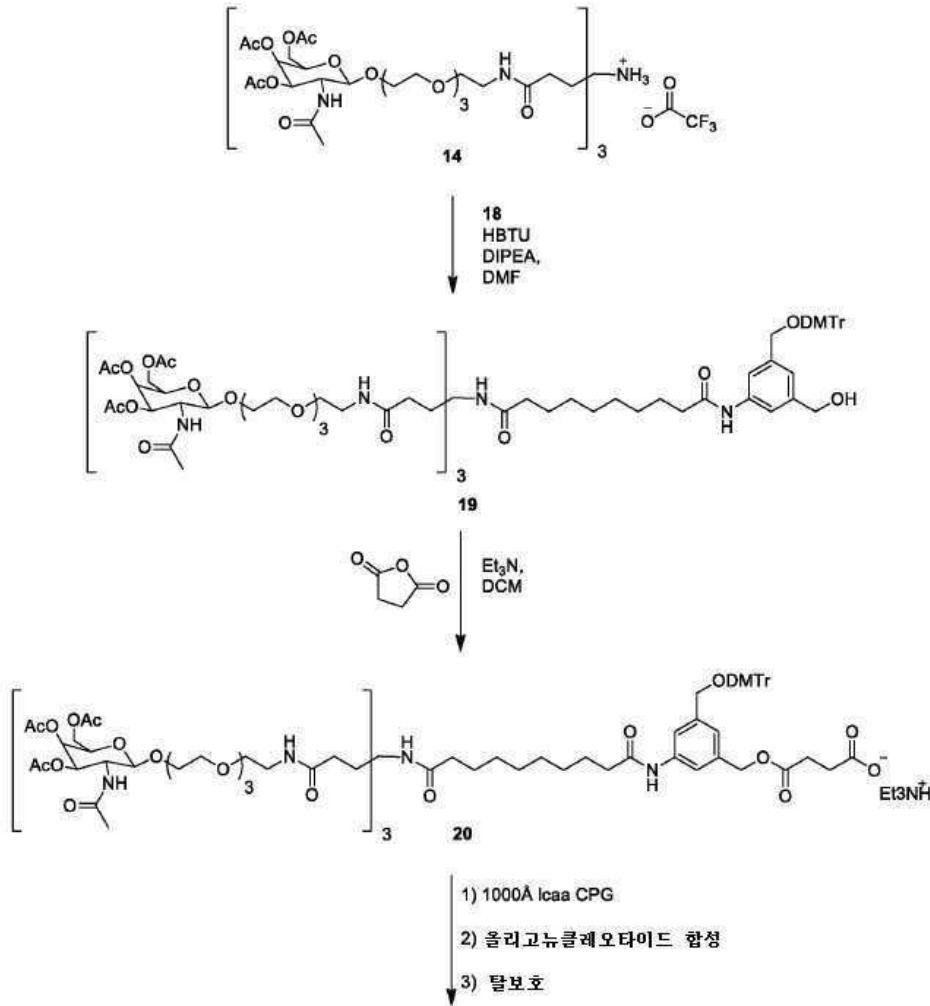
[0684]

[0685] 반응식 4.

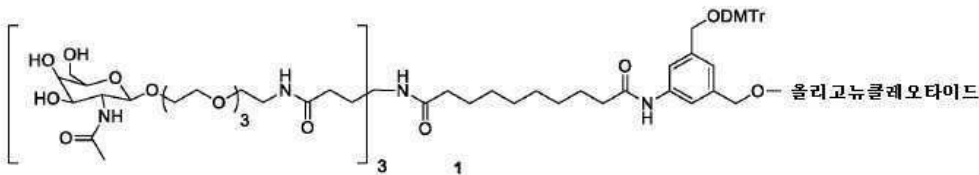


[0686]

[0687] 반응식 5.



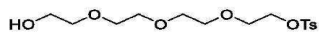
[0688]



[0689]

[0690] 단계 1. 2-(2-(2-(2-하이드록시에톡시)에톡시)에톡시)에틸 4-메틸벤젠설포네이트 3의 제조

[0691]



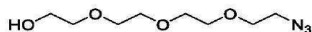
[0692]

THF(175ml) 및 수성 NaOH(5M, 145ml) 중의 테트라틸렌 글리콜(934g, 4.8mol)의 용액을 냉각시키고(0℃), THF(605ml) 중에 용해된 *p*-톨루엔설포닐 클로라이드(91.4g, 480mmol)로 처리하고, 이어서 2시간 동안 교반하였다(0℃). 반응 혼합물을 물(3ℓ)로 희석시키고, CH₂Cl₂로 추출하였다(3×500ml). 합한 추출물을 물 및 염수로 세척하고 이어서 건조시키고(MgSO₄), 여과 및 농축시켜 2-(2-(2-(2-하이드록시에톡시)에톡시)에톡시)에틸 4-메틸벤젠설포네이트 3(140g, 84%)을 연한 황색 오일로서 수득하였다. R_f(0.57, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

[0693]

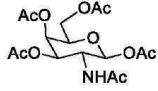
단계 2. 2-(2-(2-(2-아자이도에톡시)에톡시)에톡시)에탄-1-올 4의 제조

[0694]



[0695] DMF(880ml) 중의 **3**(140g, 403mmol)의 용액을 소듐 아자이드(131g, 2.02mol)로 처리하고, 밤새 가열하였다(45℃). 대부분의 DMF를 감압 하에서 제거하고, 잔류물을 CH₂Cl₂(500ml) 중에 용해시키고, 염수로 세척하고(3×500ml), 이어서 건조시키고(MgSO₄), 여과 및 농축시켰다. 잔류물을 짧은 실리카층을 통해 통과시키고(5% MeOH-CH₂Cl₂), 농축시켜 2-(2-(2-(2-아자이드에톡시)에톡시)에톡시)에탄-1-올 **4**(65g, 74%)를 황색 오일로서 수득하였다. R_f(0.56, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

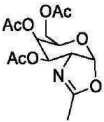
[0696] 단계 3. 피아세틸화된 갈락토사민 **6**의 제조



[0697]

[0698] 피리딘(1.5 l) 중의 D-갈락토사민 염산염 **5**(250g, 1.16mol)를 아세트산 무수물(1.25 l, 13.2mol)로 45분에 걸쳐서 처리하였다. 밤새 교반한 후 반응 혼합물을 3개의 1 l 분획으로 나누었다. 각각의 1 l 분획을 3 l의 빙수 중에 붓고, 1시간 동안 혼합하였다. 혼합한 후 고체를 여과시키고, 합하고, 액체 질소 상에서 동결시키고, 이어서 5 일 동안 동결건조시켜 피아세틸화된 갈락토사민 **6**(369.4g, 82%)을 백색 고체로서 수득하였다. R_f(0.58, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

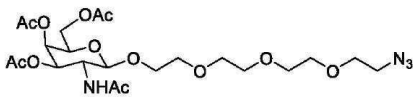
[0699] 단계 4. (3aR,5R,6R,7R,7aR)-5-(아세트옥시메틸)-2-메틸-3a,6,7,7a-테트라하이드로-5H-피라노[3,2-d]옥사졸-6,7-다이일 다이아세테이트 **7**의 제조



[0700]

[0701] CHCl₃(320ml) 중의 피아세틸화된 갈락토사민 **6**(8.45g, 21.7mmol)의 용액을 TMSOTf(4.32ml, 23.9mmol)로 적가로 처리하였다. 교반 후(1.5hr, 40℃) 반응물을 트라이에틸아민(5ml)의 첨가에 의해서 반응정지시키고, 건조물로 농축시켜 화합물 **7**을 연한 황색 유리로서 수득하였다(7.2g, 정량적). 생성물을 추가로 정제하지 않고 사용하였다. R_f(0.59, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

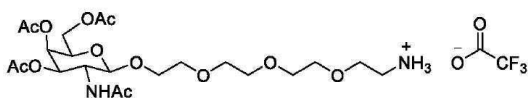
[0702] 단계 5. (2R,3R,4R,5R,6R)-5-아세트아미도-2-(아세트옥시메틸)-6-(2-(2-(2-(2-아자이드에톡시)에톡시)에톡시)에톡시)테트라하이드로-2H-피란-3,4-다이일 다이아세테이트 **8**의 제조



[0703]

[0704] 화합물 **7**(7.2g, 21.7mmol) 및 2-(2-(2-(2-아자이드에톡시)에톡시)에톡시)에탄-1-올 **4**(2.65g, 15.2mmol)을 톨루엔(150ml)으로부터 공비증발시켜(3×) 소량의 물을 제거하였다. 건조된 물질을 1,2-다이클로로에탄(150ml) 중에 용해시키고, 냉각시키고(약 5℃), TMSOTf(784μl, 4.34mmol)로 처리하였다. 밤새 교반한 후 반응물을 트라이에틸아민(5ml)의 첨가에 의해서 반응정지시키고, 농축시켰다. 잔류물을 크로마토그래피(1% → 5% MeOH-CH₂Cl₂)에 의해서 정제시켜 **8**(7.12g, 85%)을 갈색 오일로서 수득하였다. R_f(0.3, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

[0705] 단계 6. 2-(2-(2-(2-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-아세트아미도-4,5-다이아세트옥시-6-(아세트옥시메틸)테트라하이드로-2H-피란-2-일)옥시)에톡시)에톡시)에톡시)에탄-1-아미늄 2,2,2-트라이플루오로아세테이트 **9**의 제조

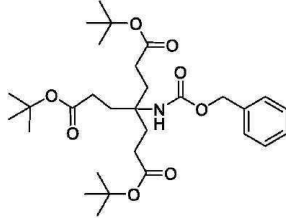


[0706]

[0707] EtOAc(150ml) 및 트라이플루오로아세트산(2ml) 중의 아자이드 **8**(7.12g, 13mmol)의 용액을 차콜 상의 팔라듐(1.5g, 10% w/w 흡윤물 기준)으로 처리하였다. 이어서 반응 혼합물을 수소로 퍼징시키고, 밤새 격렬하게 교반하

였다. 질소로 퍼징시킨 후, MeOH로 헹구면서 혼합물을 셀라이트를 통해서 여과시켰다. 여과액을 농축시키고, 크로마토그래피(5% → 10% → 20% MeOH-CH₂Cl₂)를 통해서 정제시켜 **9**(5.8g, 72%)를 갈색 오일로서 수득하였다. Rf(0.34, 15% MeOH-CH₂Cl₂).

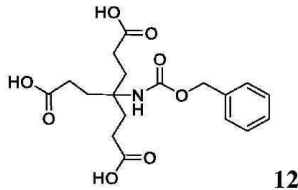
[0708] **단계 7. 다이-tert-부틸 4-(((벤질옥시)카보닐)아미노)-4-(3-(tert-부톡시)-3-옥소프로필)헵탄다이오에이트 11의 제조**



[0709]

[0710] 다이-tert-부틸 4-아미노-4-(3-(tert-부톡시)-3-옥소프로필)헵탄다이오에이트 **10**(13.5g, 33mmol), 25% Na₂CO_{3(aq)}(150ml) 및 다이클로로메탄(300ml)의 용액에 벤질 클로로폼에이트(14ml, 98mmol)를 서서히 첨가하였다. 용액을 실온에서 밤새(16h) 격렬하게 교반하였다. 완결 후, 추가의 다이클로로메탄(100ml)을 첨가하고, 다이클로로메탄 층을 분리하였다. 수성층을 다이클로로메탄(2×100ml)으로 추출하였다. 합한 다이클로로메탄 추출물을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 건조물로 농축시켰다. 생성물 **11**을 무색 오일로서 단리시켰고, 이것은 추가 정제가 필요하지 않았다(15.8g, 88%). Rf(0.7, 1:1 EtOAc-헥산).

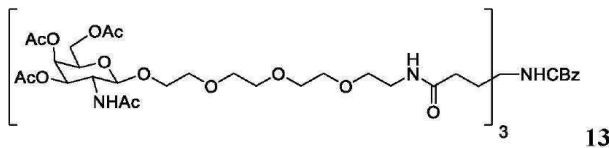
[0711] **단계 8. 4-(((벤질옥시)카보닐)아미노)-4-(2-카복시에틸)헵탄다이산 12의 제조**



[0712]

[0713] 폼산(50ml) 중의 **11**(15.6g, 28.8mmol)의 용액을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 용액을 건조물로 농축시키고, 에틸 아세테이트(약 25ml) 중에 용해시켰다. 정치 후에, 생성물은 무색 고체로서 결정되었다. 고체를 여과시키고, 에틸 아세테이트로 세척하고, 공기 건조시켜 **12**를 무색 고체로서 수득하였다(10.2g, 93%). Rf(0.1, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

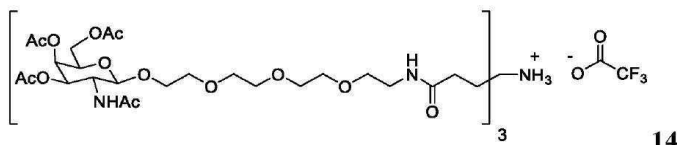
[0714] **단계 9. 화합물 13의 제조**



[0715]

[0716] DMF(50ml) 중의 **12**(793mg, 2.08mmol) 및 **9**(5.8g, 9.36mmol)의 용액을 BOP(3.67g, 8.32mmol), 이어서 N,N-다이아이소프로필에틸아민(4.31ml, 25mmol)로 처리하였다. 밤새 교반한 후 혼합물을 건조물로 농축시키고, 크로마토그래피(1% → 2% → 5% → 10% → 15% MeOH-CH₂Cl₂)에 적용시켜 **13**(5.71 g [조물질], >100% - 다음 단계에 영향을 미치지 않는 커플링 부산물을 함유함)을 수득하였다. Rf(0.45, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

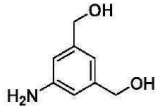
[0717] **단계 10. 화합물 14의 제조**



[0718]

[0719] 화합물 **13**(5.7g)을 MeOH(150ml) 및 TFA(1.5ml) 중에 용해시키고, 차콜 상의 팔라듐(1g, 10% w/w 습윤물 기준)으로 처리하였다. 이어서 반응 혼합물을 수소로 퍼징시키고, 밤새 격렬하게 교반하였다. 질소로 퍼징시킨 후, MeOH로 행구면서 혼합물을 셀라이트를 통해서 여과시켰다. 여과액을 농축시키고, 크로마토그래피(5% → 10% → 20% MeOH-CH₂Cl₂)를 통해서 정제시켜 **14**를 갈색 오일로서 수득하였다(2.15g, 56% 2단계). Rf(0.32, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

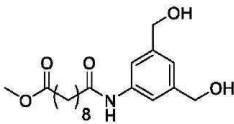
[0720] 단계 11. (5-아미노-1,3-페닐렌)다이메탄올 **15**의 제조



[0721]

[0722] THF(350ml) 중의 다이메틸 5-아미노아이소프탈레이트(20.0g, 96mmol)의 용액을 1시간에 걸쳐서 THF(440ml) 중의 3.75 eq LiAlH₄(13.6g, 358mmol)의 환류 혼합물에 적가로 첨가하였다. 혼합물을 추가 2시간 동안 환류 하에서 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시키고, MeOH(27ml), 이어서 물(40ml)을 주의 깊게 첨가함으로써 반응정지시켰다. 반응정지시킨 혼합물을 2시간 동안 교반한 후, 이것을 여과시키고, 건조물로 농축시켰다. 잔류물을 EtOAc로부터 재결정화시켜(2×) **15**를 갈색-황색 결정으로서 수득하였다(10.2g, 70%).

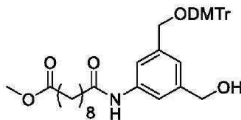
[0723] 단계 12. 메틸 10-((3,5-비스(하이드록시메틸)페닐)아미노)-10-옥소데칸오에이트 **16**의 제조



[0724]

[0725] 2:1 다이클로로메탄/메탄올(200ml) 중의 메틸 세바케이트(3.8g, 17mmol), **15**(2.5g, 17mmol) 및 EEDQ(8.1g, 33mmol)의 용액을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 완결 후 용액을 건조물로 농축시켰다. 수득된 고체를 다이클로로메탄(50ml)으로 배산시키고(triturated), 여과시켰다. 고체를 차가운 다이클로로메탄으로 행구고, 공기 건조시켜 **16**을 무색 고체로서 수득하였다(4.3g, 72%). Rf(0.33, EtOAc).

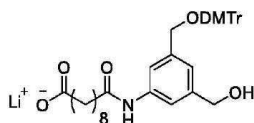
[0726] 단계 13. 메틸 10-((3-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-(하이드록시메틸)페닐)아미노)-10-옥소데칸오에이트 **17**의 제조



[0727]

[0728] 피리딘(50ml) 중의 **16**(4.3g, 12mmol)의 용액에 4,4'-(클로로(페닐)메틸렌)비스(메톡시벤젠)(4.1g, 12mmol)을 첨가하였다. 용액을 질소 하에서 밤새 실온에서 교반하였다. 완결 후 용액을 건조물로 농축시키고, 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(0.5% → 0.75% → 1% → 1.5% MeOH-CH₂Cl₂)에 의해서 정제시켜 **17**을 황색 고체로서 수득하였다(2.9g, 35%). Rf(0.6, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

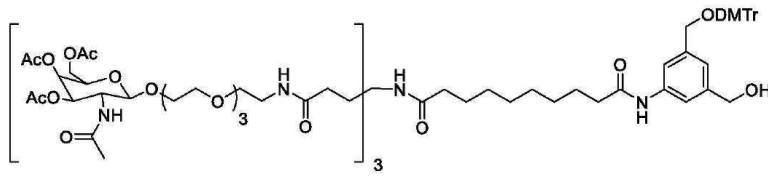
[0729] 단계 14. 리튬 10-((3-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-(하이드록시메틸)페닐)아미노)-10-옥소데칸오에이트 **18**의 제조



[0730]

[0731] THF(60ml) 중의 **17**(2.9g, 4.3mmol)의 용액에 물(15ml) 및 수산화리튬(112mg, 4.7mmol)을 첨가하였다. 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. 완결 후 용액을 농축시켜 THF를 제거하였다. 남아있는 수성 용액을 액체 질소 상에서 플래시 동결시키고, 밤새 동결건조시켜 무색 고체를 수득하였다(2.9g, 정량적). Rf(0.3, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

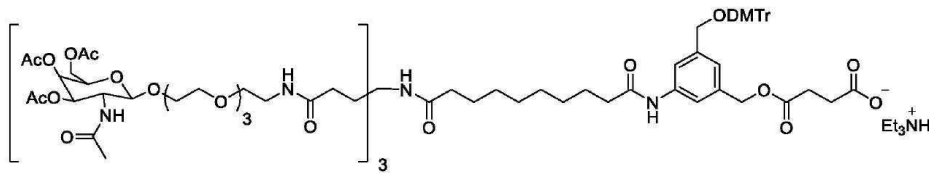
[0732] 단계 15. 화합물 19의 제조



[0733]

[0734] 무수 DMF(25ml) 중의 14(454mg, 0.67mmol), 18(1.25g, 0.67mmol) 및 HBTU(381mg, 1.0mmol)의 용액에 *N,N*-다이아이소프로필에틸아민(0.35ml, 2.0mmol)을 첨가하였다. 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. 완결 후, 용액을 에틸 아세테이트(250ml) 중에 붓고, 염수(3×200ml)로 세척하였다. 에틸 아세테이트 층을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 건조물로 농축시켰다. 칼럼 크로마토그래피(CH₂Cl₂ 중의 5% → 7.5% → 10% → 15% MeOH)에 의한 정제는 19를 연한 주황색 발포체로서 제공하였다(1.5g, 94%). Rf(0.25, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

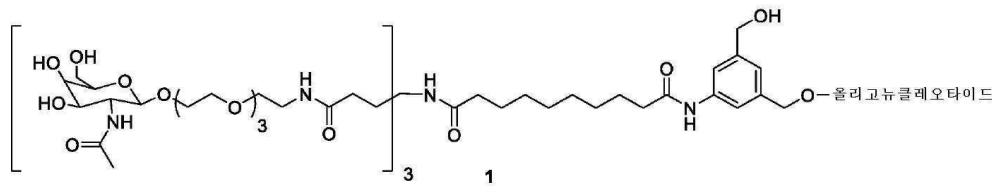
[0735] 단계 16. 화합물 20의 제조



[0736]

[0737] 무수 CH₂Cl₂(50ml) 중의 화합물 19(1.5g, 0.6mmol), 석신산 무수물(120mg, 1.2mmol), DMAP(220mg, 1.8mmol) 및 트라이메틸아민(250μl, 1.8mmol)의 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. 완결 후, 용액을 건조물로 농축시키고, 짧은 실리카층을 통해 여과시켜(CH₂Cl₂ 중의 100% CH₂Cl₂ → 15% MeOH) 생성물 20을 밝은 베이지색 발포체로서 수득하였다(1.1g, 70%). Mass *m/z* (ES-TOF MS) 727.7 [M + 3H - DMTr]⁺, 1091.1 [M + 2H - DMTr]. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.92 (br s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.49-7.47 (m, 3H), 7.41 (br s, 1H), 7.38-7.34 (m, 5H), 7.32-7.26 (m, 4H), 7.24-7.08 (br s, 3H), 7.08 (s, 1H), 6.90-6.80 (m, 7H), 5.31 (d, 3H, *J* = 2.7Hz), 5.12 (s, 2H), 5.06 (dd, 3H, *J* = 11.2, 3.2 Hz), 4.78 (d, 3H, *J* = 8.5 Hz), 4.24-4.08 (m, 12H), 3.95-3.88 (m, 7H), 3.85-3.76 (m, 4H), 3.78 (s, 6H), 3.68-3.56 (m, 34H), 3.54-3.44 (m, 8H), 3.41-3.33 (m, 6H), 2.70-2.60 (m, 4H), 2.52-2.30 (m, 30H), 2.24-2.16 (m, 8H), 2.14 (s, 9H), 2.04 (s, 9H), 2.02-1.96 (m, 6H), 1.98 (s, 9H), 1.96 (s, 9H), 1.74-1.52 (m, 4H), 1.36-1.24 (m, 12H).

[0738] 단계 17. 접합체 1의 제조

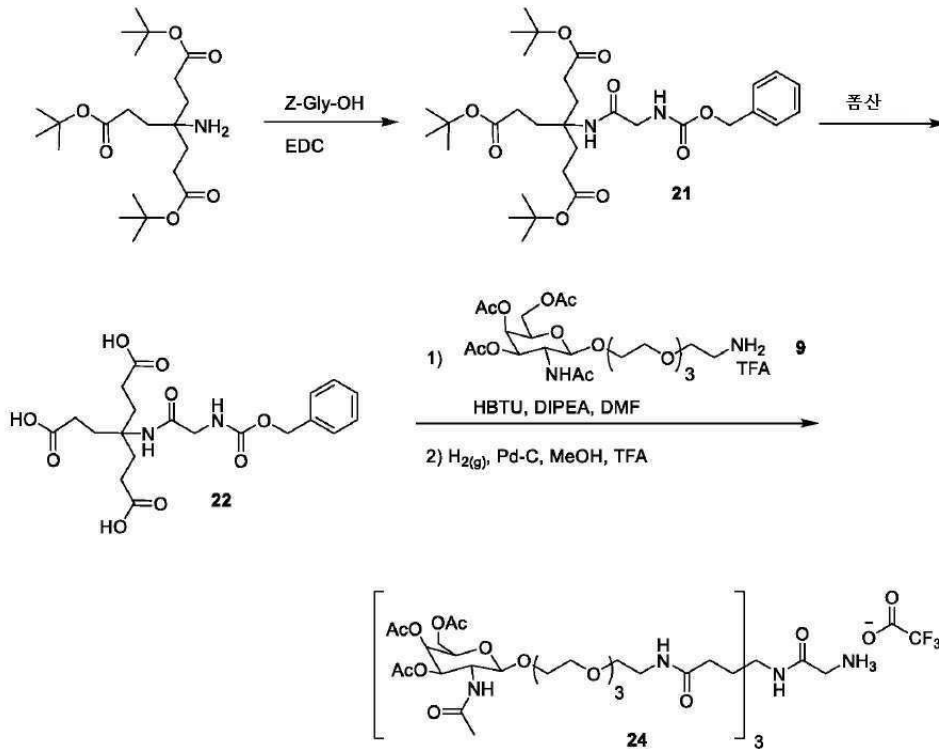


[0739]

[0740] 석신에이트 20을 표준 아마이드 커플링 화합물질을 사용하여 1000 Å LCAA(장쇄 아미노알킬) CPG(컨트롤 포어 유리(control pore glass)) 상에 로딩하였다. 무수 아세트나이트릴(0.3ml) 중의 다이아이소프로필카보다이이미드(52.6 μmol), *N*-하이드록시 석신이미드(0.3mg, 2.6 μmol) 및 피리딘(10μl)의 용액을 무수 다이클로로메탄(0.2ml) 중의 20(20.6mg, 8 μmol)에 첨가하였다. 이 혼합물을 LCAA CPG(183mg)에 첨가하였다. 현탁액을 밤새 실온에서 온화하게 혼합하였다. 20이 사라졌을 때(HPLC), 반응 혼합물을 여과시키고, CPG를 1ml의 각각의 다이클로로메탄, 아세트나이트릴로 세척하고, THF 중의 5% 아세트산 무수물/5% *N*-메틸이미다졸/5% 피리딘의 용액, 이어서 THF, 아세트나이트릴 및 다이클로로메탄으로 세척하였다. 이어서 CPG를 밤새 고 진공 하에서 건조시켰다. UV/Vis(504 nm)에 의한 표준 DMTr 검정에 의해서 로딩은 25 μmol/g인 것으로 결정되었다. 생성된 GaINAc 로딩된 CPG 고체 지지체를 표준 절차를 사용하여 자동화 올리고뉴클레오타이드 합성에서 사용하였다. 뉴클레오타이드 탈보호, 그 다음 (동시 갈락토사민 아세테이트 탈보호와 함께) 고체 지지체로부터의 제거는 대표적인 실시예로서 GaINAc-올리고뉴클레오타이드 접합체 1을 제공하였다.

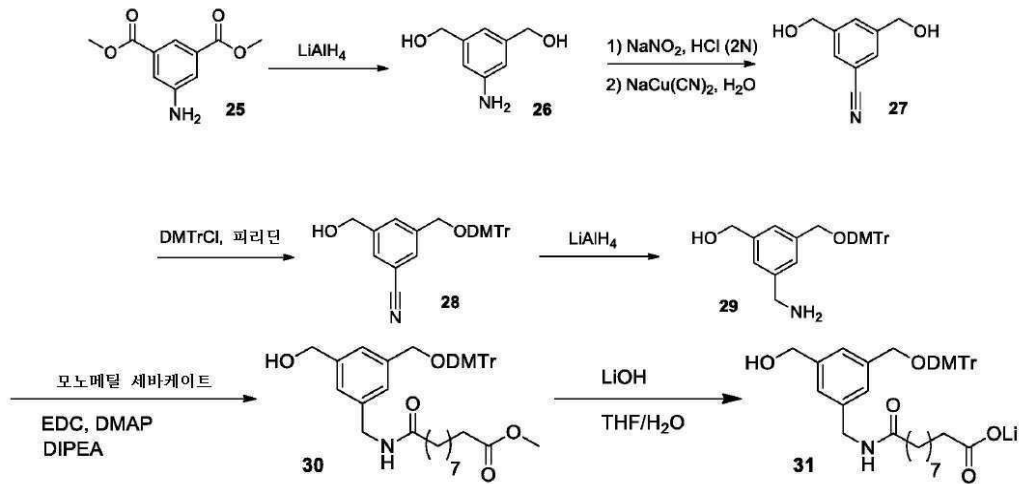
[0741] 실시예 2: 접합체 34의 합성

[0742] 반응식 6.



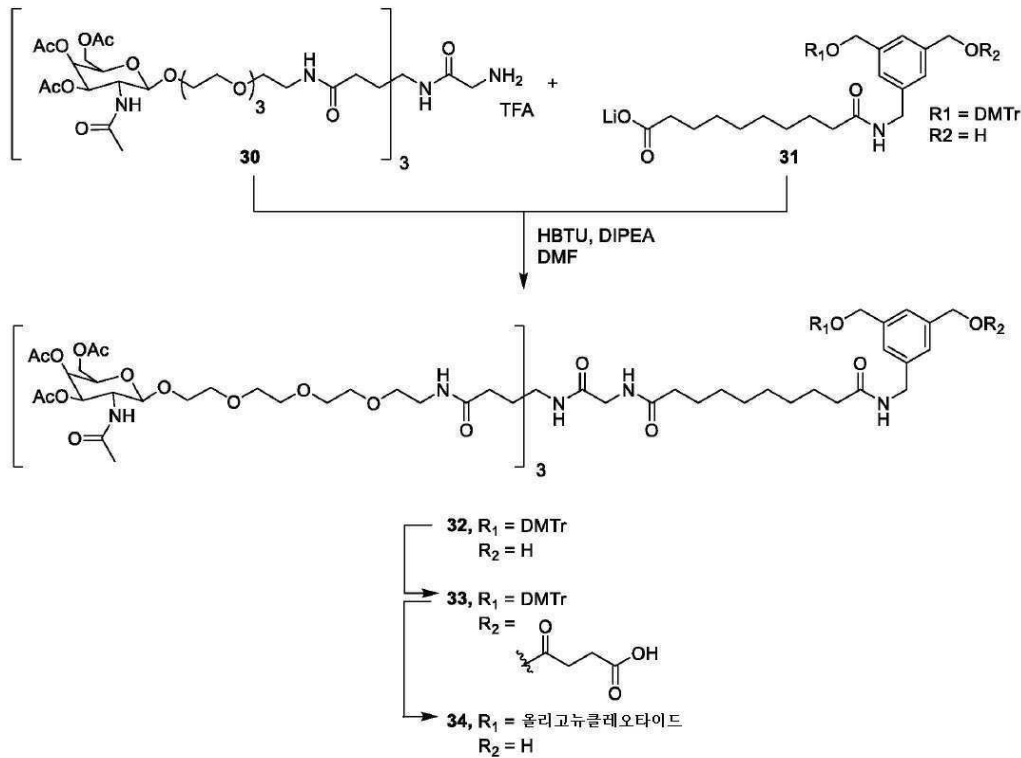
[0743]

[0744] 반응식 7.



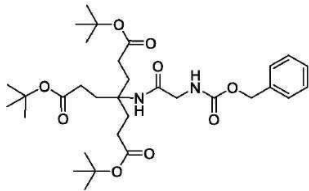
[0745]

[0746] 반응식 8.



[0747]

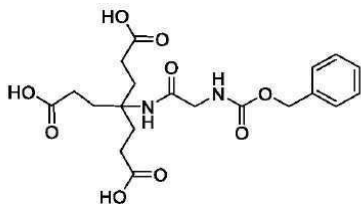
[0748] 단계 1. 다이-tert-부틸 4-(2-(((벤질옥시)카보닐)아미노)아세트아미도)-4-(3-(tert-부톡시)-3-옥소프로필)헵탄다이오에이트 21의 제조



[0749]

[0750] CH₂Cl₂(300ml) 중의 다이-tert-부틸 4-아미노-4-(3-(tert-부톡시)-3-옥소프로필)헵탄다이오에이트(25g, 60mmol) 및 Z-글리신(18.9g, 90.2mmol)의 용액을 EDC(23g, 120mmol), 다이아이소프로필에틸아민(32ml, 180mmol) 및 DMAP(Cat. 17 mg)로 연속적으로 처리하였다. 교반 후(16h) 반응 혼합물을 NaHCO₃(Sat. Aq.) 중에 붓고, CH₂Cl₂로 추출하고, 염수로 세척하고, 건조시키고(MgSO₄), 여과 및 농축시켜 다이-tert-부틸 4-(2-(((벤질옥시)카보닐)아미노)아세트아미도)-4-(3-(tert-부톡시)-3-옥소프로필)헵탄다이오에이트 21를 무정형 고체로서 수득하고, 추가로 가공하지 않고 사용하였다(36g, 정량적). Rf(0.85, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

[0751] 단계 2. 4-(2-(((벤질옥시)카보닐)아미노)아세트아미도)-4-(2-카복시에틸)헵탄다이산 22의 제조

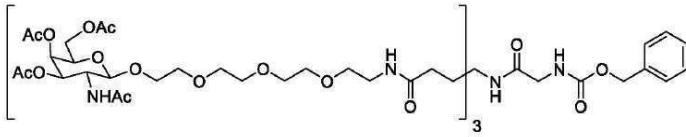


[0752]

[0753] 다이-tert-부틸 4-(2-(((벤질옥시)카보닐)아미노)아세트아미도)-4-(3-(tert-부톡시)-3-옥소프로필)헵탄다이오에이트 21(59.3mmol, 36g)의 용액을 니트 폼산(150ml) 중에서 72시간 동안 교반하였다. 완결 후, 폼산을 감압 하에서 제거하고, 조물질을 고체를 고진공 하에서 밤새 건조시켜 22를 무색 고체로서 수득하였다(15.9g, 61%).

Rf(0.15, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

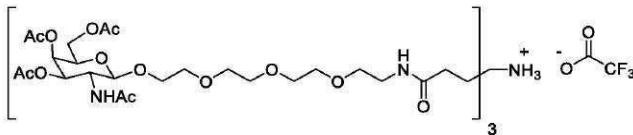
[0754] 단계 3. 화합물 23의 제조



[0755]

[0756] DMF(250ml) 중의 22(6.2g, 14.1mmol) 및 2-(2-(2-(2-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-아세트아미도-4,5-디아세트옥시-6-(아세트옥시메틸)테트라하이드로-2H-피란-2-일)옥시)에톡시)에톡시)에탄-1-아미늄 2,2,2-트라이플루오로아세테이트(35g, 56.5mmol)의 용액을 BOP(25g, 56.5mmol) 이어서 *N,N*-다이아이소프로필에틸아민(29ml, 170mmol)으로 처리하였다. 밤새 교반한 후 혼합물을 건조물로 농축시키고, 크로마토그래피(100% CH₂Cl₂에서 15% MeOH-CH₂Cl₂)에 적용시켜 화합물 23을 수득하였다(24.6g, 89%). Rf(0.55, 15% MeOH-CH₂Cl₂).

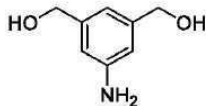
[0757] 단계 4. 화합물 24의 제조



[0758]

[0759] 화합물 23(24.6g)을 MeOH(200ml) 및 TFA(1.5ml) 중에 용해시키고, 질소로 퍼징시켰다. 차콜 상의 팔라듐(1g, 10% w/w 습윤물 기준)을 첨가하고, 이어서 반응 혼합물을 수소로 퍼징시키고, 밤새 격렬하게 교반하였다. 완결 후, 반응물을 질소로 퍼징시키고, 셀라이트를 통해서 여과시키고, MeOH로 행켰다. 여과액을 농축시키고, 실리카 젤 60 상의 칼럼 크로마토그래피(구배: 5% → 10% → 20% MeOH-CH₂Cl₂)에 의해서 정제시켜 24를 연한 갈색 점성 오일로서 수득하였다(23g). Rf(0.32, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

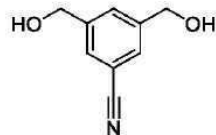
[0760] 단계 5. (5-아미노-1,3-페닐렌)다이메탄올 26의 제조



[0761]

[0762] 무수 테트라하이드로퓨란(450ml) 중의 리튬 알루미늄 하이드라이드(13.6g, 358mmol)의 현탁액을 질소 분위기 하에서 환류시키고, 무수 테트라하이드로퓨란(350ml) 중의 다이메틸-5-아미노아이소프탈레이트 25(20g, 96mmol)의 용액으로 적가하여 처리하였다. 첨가가 완결된 후 혼합물을 추가의 2시간 동안 환류까지 가열하였다. 완결 후, 용액을 실온까지 냉각시키고, MeOH(27ml), 이어서 물(40ml)을 서서히 첨가함으로써 반응정지시켰다. 2시간 동안 교반한 후 혼합물을 여과시키고, 농축시키고, EtOAc로부터 재결정화시켜 (5-아미노-1,3-페닐렌)다이메탄올 26을 회백색 결정으로서 수득하였다(10.2g, 70%). Rf 0.5(15% MeOH-CH₂Cl₂).

[0763] 단계 6. 3,5-비스(하이드록시메틸)벤조나이트릴 27의 제조

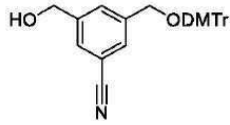


[0764]

[0765] 2N 염산(100ml) 중의 26(5g, 33mmol)의 용액을 0℃까지 냉각시키고, 물(50ml) 중의 아질산나트륨(3.53g, 36mmol)의 차가운 용액으로 처리하였다. 반응 혼합물을 5℃ 이하의 온도에서 30분 동안 유지시키고, 이어서 단일 분획의 물(50ml) 중의 구리(I) 사이아나이드(3.19g, 35.6mmol) 및 소듐 사이아나이드(3.53g, 72mmol)의 용액으로 처리하였다. 실온에서 밤새 교반한 후 혼합물을 여과시키고, 다이클로로메탄(3×100ml)으로 추출하고, 농축시키고, 추가로 정제하지 않고 사용하였다. 다이올, 3,5-비스(하이드록시메틸)벤조나이트릴 27을 황색 고체

로서 수득하였다(2.19g, 41%). Rf 0.75 (15% MeOH-CH₂Cl₂).

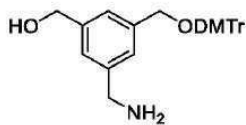
[0766] 단계 7. 3-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-(하이드록시메틸)벤조나이트릴 28의 제조



[0767]

[0768] 피리딘(14ml) 중의 3,5-비스(하이드록시메틸)벤조나이트릴 27(538mg, 3.3mmol)의 용액을 4,4'-다이메톡시트리틸 클로라이드(1.17g, 3.46mmol)로 처리하고, 밤새 실온에서 교반하였다. 완결 후, 혼합물을 농축시키고, 다이에틸 에터(25ml) 중에 분산시키고, 여과 및 농축시켰다. 조 생성물을 실리카젤 60의 칼럼 크로마토그래피(구배: 10%에서 50% EtOAc-헥산)에 의해서 정제시켜 28을 황색 고체로서 수득하였다(725mg, 47%). Rf 0.5(1:1 EtOAc-헥산).

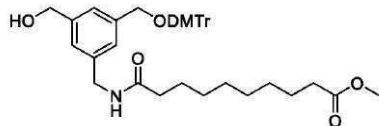
[0769] 단계 8. (3-(아미노메틸)-5-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)페닐)메탄올 29의 제조



[0770]

[0771] 메틸 테트라하이드로퓨란(5ml) 중의 28(100mg, 0.22mmol)의 용액을 0°C까지 냉각시키고, 리튬 알루미늄 하이드라이드(0.64mmol = MeTHF 중의 2.3M 용액 0.28ml)로 서서히 처리하였다. 1시간 동안 교반 후 메탄올(1ml) 이어서 물(0.3ml)에 첨가에 의해서 반응을 반응정지시키고, 30분 동안 교반하였다. 혼합물을 여과 및 농축시켜 (3-(아미노메틸)-5-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)페닐)메탄올 29(78mg, 77%)를 수득하였다. Rf 0.15 (10% MeOH-CH₂Cl₂).

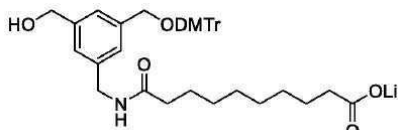
[0772] 단계 9. 메틸 10-((3-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-(하이드록시메틸)벤즈일)아미노)-10-옥소데칸 오에이트 30의 제조



[0773]

[0774] 다이클로로메탄(5ml) 중의 (3-(아미노메틸)-5-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)페닐)메탄올 29(78mg, 0.17mmol) 및 모노메틸 세바케이트(38mg, 0.17mmol)의 용액을 EDC(48mg, 0.25mmol), DMAP(cat., 5 mg) 및 다이아이소프로필에틸아민(57μl, 0.33mmol)으로 연속적으로 처리하였다. 교반 후(3.5hr) 반응 혼합물을 포화 중탄산나트륨 용액(50ml) 중에 부었다. 중탄산나트륨 용액을 다이클로로메탄(3×50ml)으로 추출하고, 염수(50ml)로 세척하고, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 건조물로 농축시켰다. 조물질을 실리카젤 60 상의 칼럼 크로마토그래피(구배: 2%에서 5% MeOH-CH₂Cl₂)에 의해서 정제시켜 메틸 10-((3-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-(하이드록시메틸)벤즈일)아미노)-10-옥소데칸오에이트 30을 황색 오일로서 수득하였다(57mg, 53%). Rf 0.45 (10% MeOH-CH₂Cl₂).

[0775] 단계 10. 리튬 10-((3-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-(하이드록시메틸)벤즈일)아미노)-10-옥소데칸 오에이트 31의 제조



[0776]

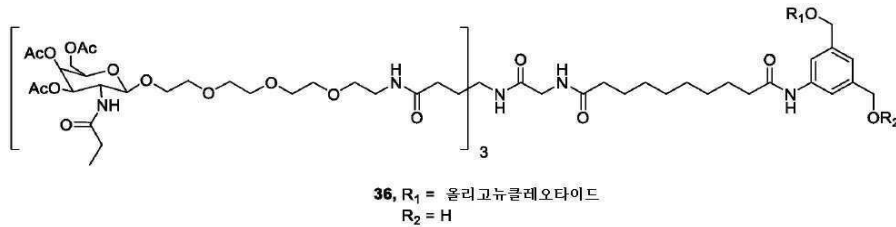
[0777] 화합물 30(188mg, 0.28mmol)을 테트라하이드로퓨란(5ml) 중에 용해시키고, 물(1ml) 중의 LiOH(7mg, 0.30mmol)의 용액으로 처리하였다. 완결 후, 테트라하이드로퓨란을 진공 하에서 제거하고, 남아있는 수성 혼합물을 동결 및

동결건조시켜 리튬 10-((3-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-(하이드록시메틸)벤즈일)아미노)-10-옥소데칸오에이트 **31**을 무색 고체로서 수득하였다(180mg, 99%). Rf 0.45 (10% MeOH-CH₂Cl₂).

[0778] 단계 11. 화합물 **32**, **33** 및 **34**의 제조

[0779] 각각 화합물 **19**, **20**, 및 **1**을 합성하는 데 사용된 동일한 절차에 따라서 화합물 **32**, **33** 및 **34**를 제조하였다.

[0780] 실시예 3. 접합체 **36**의 합성



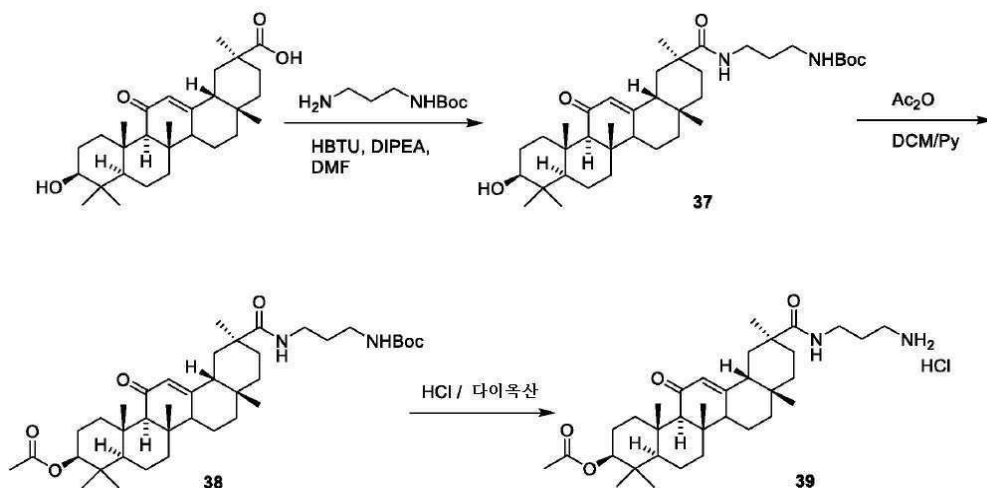
[0781]

[0782] 단계 1. 접합체 **36**의 제조

[0783] 화합물 **34** 및 모든 상응하는 중간체를 합성하는 데 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 접합체 **36**을 제조하였다. 유일한 예외는 프로판산 무수물을 아세트산 무수물 대신에 사용한 화합물 **6**의 합성이다.

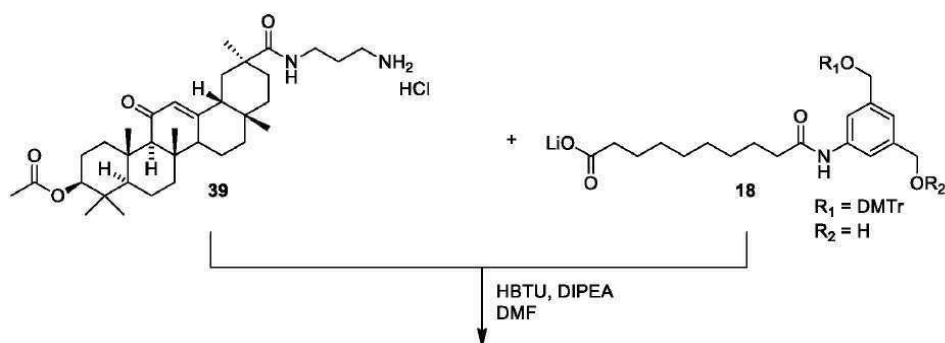
[0784] 실시예 4. 접합체 **42**의 합성

[0785] 반응식 9.

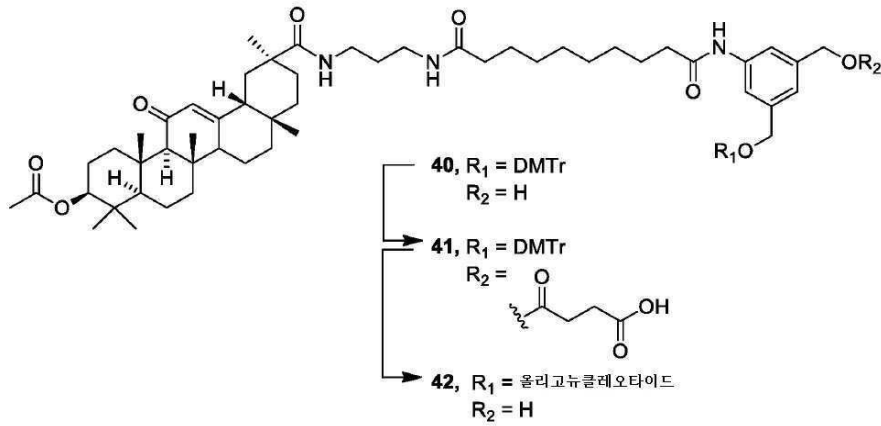


[0786]

[0787] 반응식 10.

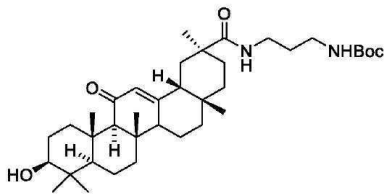


[0788]



[0789]

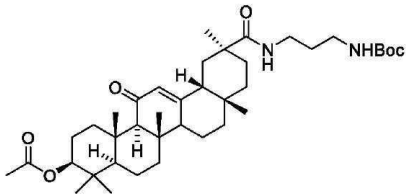
[0790] 단계 1. 화합물 37의 제조



[0791]

[0792] *N,N*-다이메틸폼아마이드(20ml) 중의 18β-글리시레틴산(2.5g, 5.3mmol), *tert*-부틸 (3-아미노프로필)카바메이트 (1.1g, 6.4mmol) 및 HBTU(3.0g, 8.0mmol)의 용액에 다이아이스프로필에틸아민(2.75ml, 15.9mmol)을 첨가하였다. 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. 완결 후, 용액을 진공 하에서 건조물로 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 60 상의 칼럼 크로마토그래피(구배: 2%에서 5% MeOH/CH₂Cl₂)에 의해서 정제시켜 생성물을 무색 고체로서 수득하였다 (2.1g, 63%).

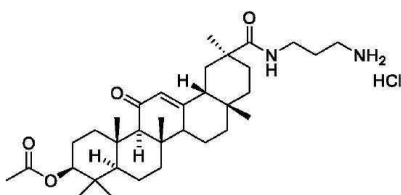
[0793] 단계 2. 화합물 38의 제조



[0794]

[0795] 다이클로로메탄(25ml) 중의 37(2.1g, 3.3mmol) 및 트라이에틸아민(3.5ml, 10mmol)의 용액에 아세트산 무수물(850 μl, 5.3mmol) 및 DMAP(5 mg)를 첨가하였다. 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. 완결 후, 용액을 건조물로 농축시키고, 에틸 아세테이트(100ml) 중에 용해시키고, 물(100ml)로 세척하고, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 건조물로 농축시켜 연한 갈색 발포체를 수득하였다(1.9g, 85%).

[0796] 단계 3. 화합물 39의 제조



[0797]

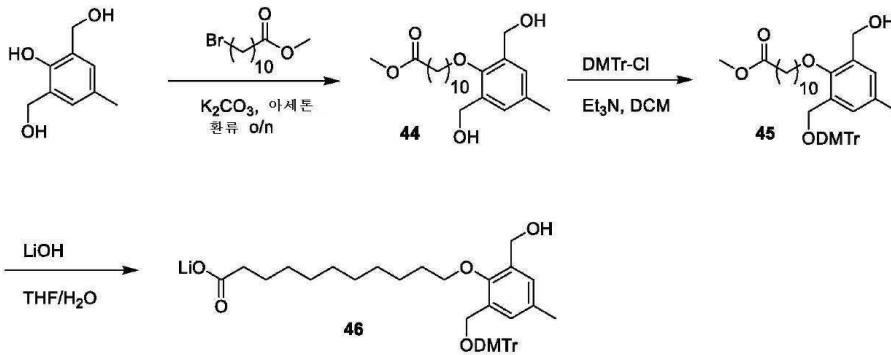
[0798] 무수 다이옥산(25ml) 중의 38(1.5g, 2.3mmol)의 용액에 다이옥산 중의 2M 염화수소(25ml)를 첨가하였다. 용액을 밤새 실온에서 교반하고, 이어서 진공 하에서 건조물로 농축시켜 밝은 갈색 고체를 수득하였다(1.3g, 96%).

[0799] 단계 4. 화합물 40, 41 및 42의 제조

[0800] 각각 화합물 19, 20, 및 1을 합성하는 데 사용된 동일한 절차에 따라서 화합물 40, 41 및 42를 제조하였다.

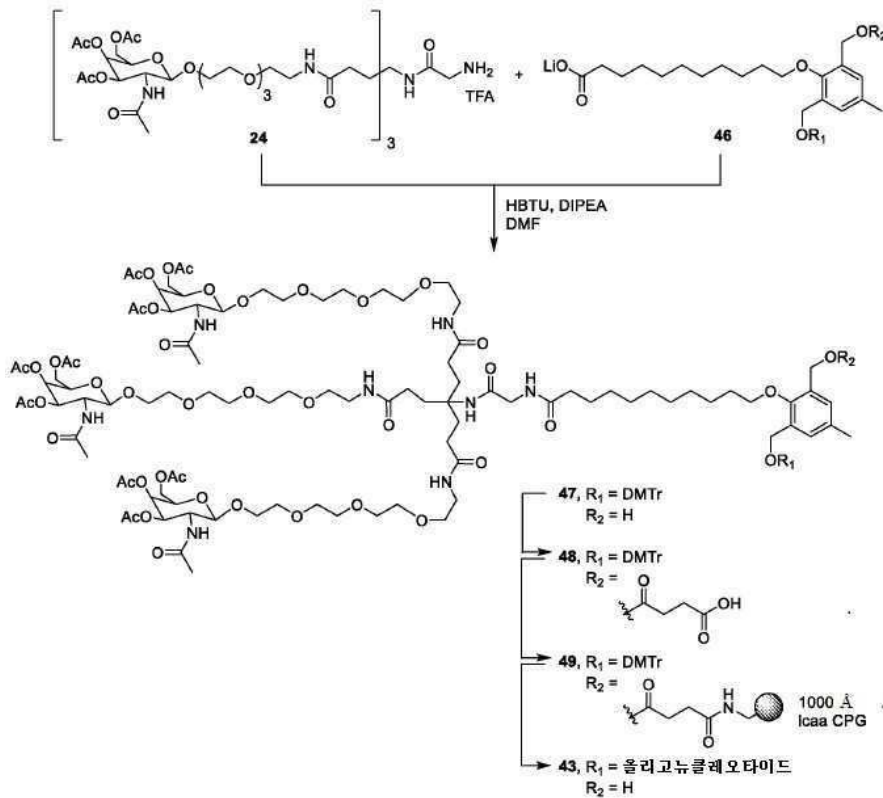
[0801] 실시예 5. 접합체 43의 합성

[0802] 반응식 11.



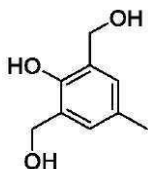
[0803]

[0804] 반응식 12.



[0805]

[0806] 단계 1. 메틸 11-(2,6-비스(하이드록시메틸)-4-메틸페녹시)운데칸오에이트 44의 제조

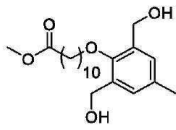


[0807]

[0808] 아세톤(100ml) 중의 2,6-비스(하이드록시메틸)-p-크레졸(2.7g, 16.3mmol), 메틸 11-브로모운데칸오에이트(5.0g, 17.9mmol) 및 탄산칼륨(4.5g, 32.6mmol)의 용액을 16시간 동안 환류시켰다. 완결 후 용액을 진공 하에서 건조물로 농축시키고, 에틸 아세테이트(150ml) 중에 현탁시키고, 물($2 \times 100ml$) 및 염수(100ml)로 세척하였다. 에틸 아세테이트 층을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에서 건조물로 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔

60 상의 칼럼 크로마토그래피(구배 100% Hex → 50% EtOAc/Hex)에 의해서 정제시켜 메틸 11-(2,6-비스(하이드록시메틸)-4-메틸페녹시)운데칸오에이트 **44**를 무색 오일로서 수득하였다(1.6g, 27%).

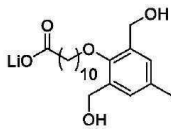
[0809] 단계 2. 메틸 11-(2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-6-(하이드록시메틸)-4-메틸페녹시)운데칸오에이트 **45**의 제조



[0810]

[0811] 무수 피리딘(20ml) 중의 메틸 11-(2,6-비스(하이드록시메틸)-4-메틸페녹시)운데칸오에이트 **44**(1.5g, 4.1mmol)의 용액에 4,4'-다이메톡시트리틸 클로라이드(1.4g, 4.1mmol)를 첨가하였다. 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. 완결 후 용액을 진공 하에서 건조물로 농축시키고, 실리카젤 60 상의 칼럼 크로마토그래피(CH₂Cl₂ 중의 0.5에서 1% MeOH)에 의해서 정제시켜 메틸 11-(2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-6-(하이드록시메틸)-4-메틸페녹시)운데칸오에이트 **45**를 연한 황색 고체로서 수득하였다(1.1g, 40%).

[0812] 단계 3. 리튬 11-(2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-6-(하이드록시메틸)-4-메틸페녹시)운데칸오에이트 **46**의 제조



[0813]

[0814] 무수 테트라하이드로퓨란(40ml) 및 물(10ml) 중의 메틸 11-(2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-6-(하이드록시메틸)-4-메틸페녹시)운데칸오에이트 **45**(1.1g, 1.7mmol)의 용액에 수산화리튬(44mg, 1.8mmol)을 첨가하였다. 용액을 진공 하에서 농축시켜 모든 테트라하이드로퓨란을 제거하였다. 남아있는 수성 용액을 액체 질소 상에서 플래시 동결시키고, 이어서 밤새 동결건조시켜 리튬 11-(2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-6-(하이드록시메틸)-4-메틸페녹시)운데칸오에이트 **46**을 연한 분홍색 고체로서 수득하였다(1.1g, 94%).

[0815] 단계 4. 화합물 **47**의 제조

[0816] *N,N*-다이메틸폼아마이드(25ml) 중의 **10**(1.33g, 0.66mmol), **46**(0.5g, 0.73mmol), HBTU(400mg, 1mmol)의 용액에 다이아이소프로필에틸아민(0.35ml, 2mmol)을 첨가하였다. 용액을 밤새(18시간) 실온에서 교반하였다. 완결 후, 용매를 진공 하에서 제거하고, 잔류물을 실리카젤 상의 칼럼 크로마토그래피(구배: 100% CH₂Cl₂ - CH₂Cl₂ 중의 5% - 10% - 15% MeOH)에 의해서 정제시켜 **47**를 무색 고체로서 수득하였다(710mg, 41%).

[0817] 단계 5. 화합물 **48**의 제조

[0818] 다이클로로메탄(15ml) 중의 **47**(0.71g, 0.3mmol), 트라이에틸아민(0.4ml, 3.0mmol) 및 폴리스타이렌-DMAP(3mmol/g 로딩, 200mg, 0.6mmol)의 용액에 석신산 무수물(60mg, 0.6mmol)을 첨가하였다. 용액을 밤새 실온에서 교반하고, 완결 후 여과하고, 진공 하에서 건조물로 농축시켰다. 잔류물을 실리카젤 60 상의 칼럼 크로마토그래피(구배 CH₂Cl₂ 중의 5%에서 20% MeOH)에 의해서 정제시켜 **48**을 연한 황색 고체로서 수득하였다(570mg, 70%). ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 7.91 (m, 1H), 7.86-7.76 (m, 6H), 7.45-7.40 (m, 2H), 7.36-7.14 (m, 10H), 7.10 (s, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.9 Hz, 4H), 5.21 (d, *J* = 3.3 Hz, 3H), 5.01 (s, 2H), 4.97 (dd, *J* = 11.2, 3.4 Hz, 3H), 4.56 (d, *J* = 8.5 Hz, 3H), 4.06-3.98 (m, 11H), 3.93-3.84 (m, 3H), 3.81-3.72 (m, 3H), 3.74 (s, 6H), 3.65-3.46 (m, 38H), 3.40-3.35 (m, 6H), 3.20-3.16 (m, 6H), 2.56-2.44 (m, 4H), 2.33 (s, 3H), 2.15-2.08 (m, 2H), 2.10 (s, 9H), 2.04-1.96 (m, 6H), 1.89 (s, 9H), 1.82-1.76 (m, 4H), 1.77 (s, 9H), 1.54-1.34 (m, 4H), 1.28-1.10 (m, 12H),

[0819] 단계 6. 화합물 **49**의 제조

[0820] 다이클로로메탄(2ml) 및 아세트나이트릴(3ml) 중의 **48**(100mg, 40 μmol), *N*-하이드록시석신이미드(아세트나이트릴 중의 30mg/ml 용액, 50 μl, 13 μmol), *N,N*-다이아이소프로필카보다이이미드(40 μl, 264 μmol) 및 피리딘(50 μl)의 용액에 1000 Å Ica CPG(프라임 합성, 920mg)를 첨가하였다. 용액을 밤새 실온에서 오비탈 진탕기 상에서 교반

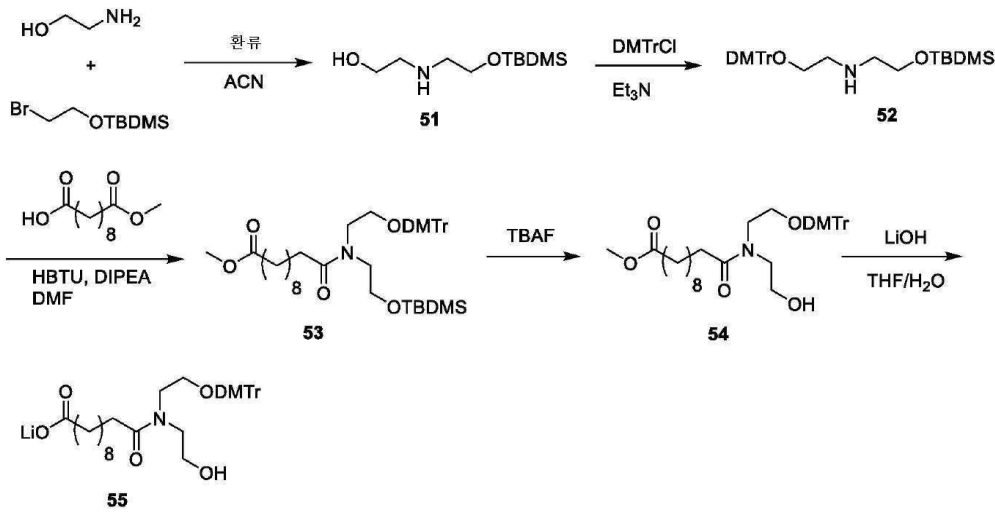
하였다. 반응 용액의 TLC 분석은 활성화된 *N*-하이드록시석신산 에스터의 단지 부분적인 소모를 나타내었고, 따라서 추가의 CPG(500mg)를 첨가하였다. 용액을 밤새 다시 교반하였다. 완결 후, CPG를 여과시키고, 다이클로로메탄(25ml), 아세트나이트릴(25ml) 및 테트라하이드로퓨란(25ml)으로 세척하였다. 아세트나이트릴(3ml) 중의 아세트산 무수물 및 테트라하이드로퓨란(3ml) 중의 10% *N*-메틸이미다졸/10% 피리딘의 1:1 용액을 첨가함으로써 CPG 상의 미반응 아민 잔류물을 아세틸화시켰다(캡핑시켰다). 현탁액을 2시간 동안 정치시키고, 이어서 여과시키고, 동일 부의 테트라하이드로퓨란(25ml), 아세트나이트릴(25ml) 및 다이클로로메탄(25ml)으로 행겼다. 로딩된 CPG 49를 고 진공 하에서 밤새 건조시켰다. 리간드 로딩 효율은 표준 DMT 로딩 검정(CH₂Cl₂ 중의 3% 트라이클로로아세트산, UV-VIS, A₅₀₄)을 사용하여 22 μmole/g인 것으로 결정되었다.

[0821] 단계 7. 접합체 43의 제조

[0822] 생성된 GaINAc 로딩된 CPG 고체 지지체 49를 표준 절차를 사용하여 자동화 올리고뉴클레오타이드 합성에서 사용하였다. 뉴클레오타이드 탈보호, 그 다음 (동시 갈락토사민 아세테이트 탈보호와 함께) 고체 지지체로부터의 제거는 GaINAc-올리고뉴클레오타이드 접합체 43을 제공하였다.

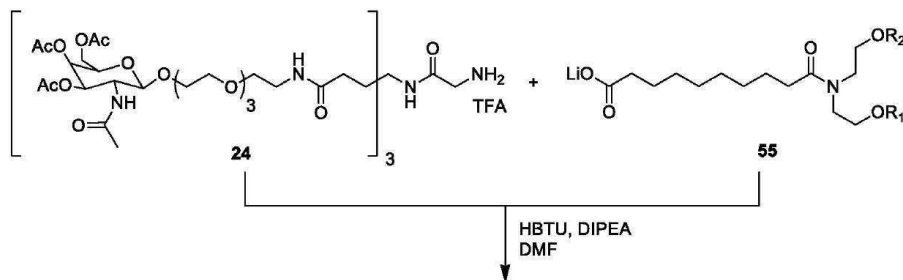
[0823] 실시예 6. 접합체 50의 합성

[0824] 반응식 13.

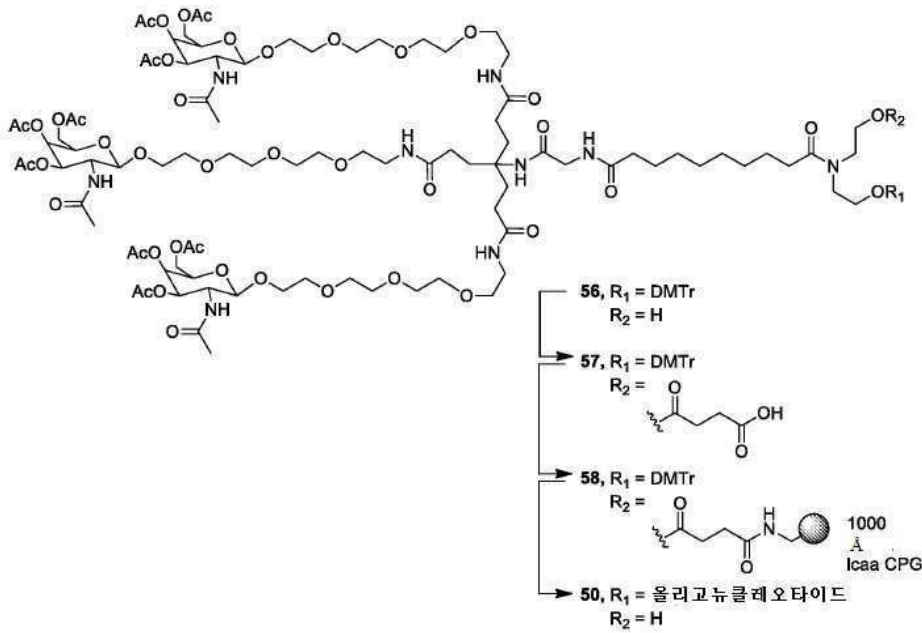


[0825]

[0826] 반응식 14.



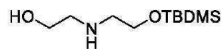
[0827]



[0828]

[0829] 단계 1. 2-((2-((tert-부틸다이메틸실릴)옥시)에틸)아미노)에탄-1-올 51의 제조

[0830]



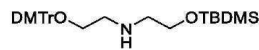
[0831]

무수 아세트나이트릴(200ml) 중의 에탄올아민(77ml, 1.25mol) 및 (2-브로모에톡시)-tert-부틸 다이메틸실란(15g, 62.7mmol)의 용액을 3시간 동안 환류시켰다. 완결 후 반응물을 실온까지 냉각시키고, 물(400ml)로 희석시키고, 에틸 아세테이트(3×150ml)로 추출하였다. 합한 에틸 아세테이트 추출물을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에서 건조물로 농축시켰다. 잔류물을 먼저 50% 에틸 아세테이트/헥산, 이어서 50% MeOH/EtOAc를 사용하여 실리카 패드를 통한 여과에 의해서 정제시켜 51을 연한 황색 오일로서 수득하였다(14g, 100%).

[0832]

단계 2. 2-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)-N-(2-((tert-부틸다이메틸실릴)옥시)에틸)에탄-1-아민 52의 제조

[0833]



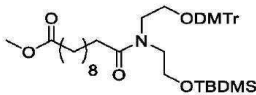
[0834]

무수 다이클로로메탄(250ml) 중의 2-((2-((tert-부틸다이메틸실릴)옥시)에틸)아미노)에탄-1-올 51(14g, 64mmol) 및 트라이에틸아민(17.5ml, 128mmol)의 용액에 4,4'-다이메톡시트리틸 클로라이드(24g, 70mmol)를 첨가하였다. 용액을 밤새 실온에서 교반하고, 이어서 진공 하에서 건조물로 농축시켰다. 잔류물을 에틸 아세테이트(300ml) 중에 용해시키고, 물(250ml) 및 염수(250ml)로 세척하였다. 에틸 아세테이트를 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에서 건조물로 농축시켰다. 실리카젤 60 상에서의 칼럼 크로마토그래피(CH₂Cl₂ 중의 1%에서 5% MeOH)에 의한 정제는 52를 연한 황색 점성 오일로서 제공하였다(13g, 39%).

[0835]

단계 3. 메틸 10-((2-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)에틸)(2-((tert-부틸다이메틸실릴)옥시)에틸)아미노)-10-옥소데칸오에이트 53의 제조

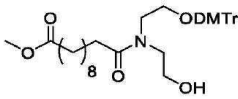
[0836]



[0837]

N,N-다이메틸폼아마이드(100ml) 중의 2-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)-N-(2-((tert-부틸다이메틸실릴)옥시)에틸)에탄-1-아민 52(5.4g, 10.3mmol), 모노메틸 세바케이트(2.2g, 10.3g), HBTU(4.9g, 12.9mmol), DIPEA(5.3 ml, 30.9mmol)의 용액을 3시간 동안 실온에서 교반하였다. 완결 후, 용액을 물(400ml) 중에 붓고, 에틸 아세테이트(1×500ml)로 추출하였다. 에틸 아세테이트 추출물을 염수(2×250ml)로 세척하고, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에서 건조물로 농축시켰다. 실리카젤 60 상에서의 칼럼 크로마토그래피(헥산 중의 10%에서 25% 에틸 아세테이트)에 의한 정제는 53을 점성 황색 오일로서 제공하였다(6.5g, 87%).

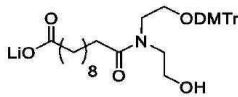
[0838] 단계 4. 메틸 10-((2-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)에틸)(2-하이드록시에틸)아미노)-10-옥소데칸오에이트 54의 제조



[0839]

[0840] 무수 테트라하이드로푸란(20ml) 중의 메틸 10-((2-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)에틸)(2-((tert-부틸다이메틸실릴)옥시)에틸)아미노)-10-옥소데칸오에이트 53(2.0g, 2.8mmol) 및 트라이에틸아민(1ml)의 용액에 TBAF(THF 중의 1M, 3.4ml, 3.3mmol)를 첨가하였다. 용액을 6시간 동안 교반하였지만, 단지 부분적인 전환이 TLC(CH₂Cl₂ 중의 5% MeOH)에 의해서 관찰되었다. 추가의 1.7ml의 TBAF를 첨가하고, 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. 완결 후, 용액을 진공 하에서 농축시키고, 실리카젤 60 상의 칼럼 크로마토그래피(헥산 중의 10%에서 50% EtOAc, 이어서 100% EtOAc)에 의해서 정제시켜 54를 점성 무색 오일로서 수득하였다(0.5g, 29%).

[0841] 단계 5. 리튬 10-((2-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)에틸)(2-하이드록시에틸)아미노)-10-옥소데칸오에이트 55의 제조



[0842]

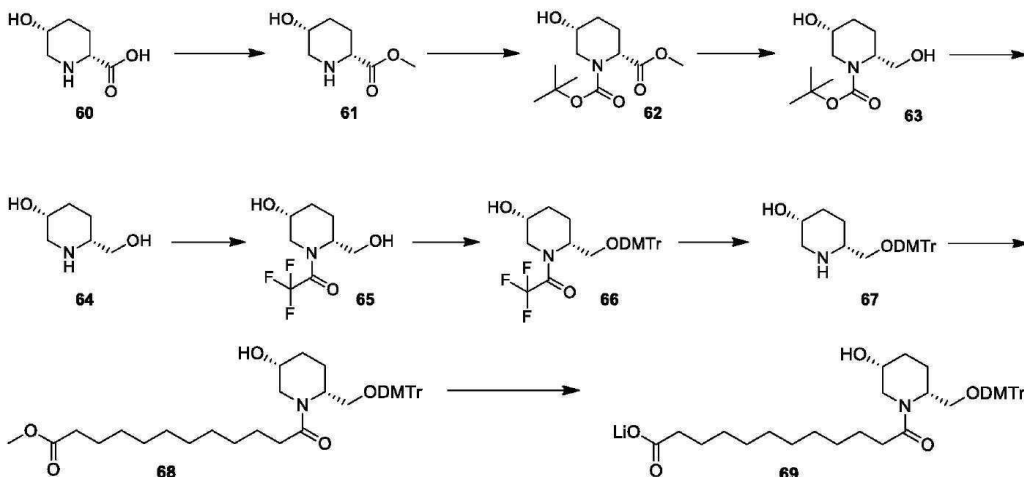
[0843] THF(40ml) 중의 메틸 10-((2-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)에틸)(2-하이드록시에틸)아미노)-10-옥소데칸오에이트 54(0.5g, 0.83mmol)의 용액에 물(10ml) 및 수산화리튬(24mg, 1.0mmol)을 첨가하였다. 용액을 밤새 실온에서 교반하고, 이어서 진공 하에서 농축시켜 THF를 제거하였다. 남아있는 수성 용액을 액체 질소 상에서 플래시 동결시키고, 동결건조시켜 55를 무색 고체로서 수득하였다(485mg, 95%).

[0844] 단계 6. 화합물 56, 57, 58 및 50의 제조

[0845] 각각 화합물 47, 48, 49 및 43을 합성하는 데 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 56, 57, 58 및 50을 제조하였다.

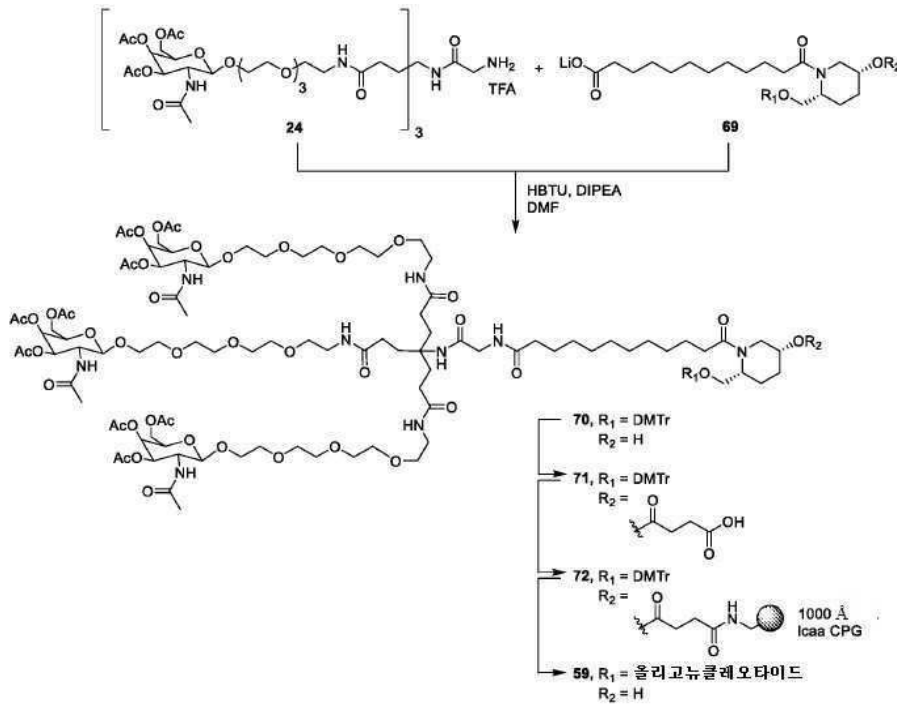
[0846] 실시예 7. 접합체 59의 합성

[0847] 반응식 15.



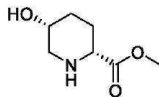
[0848]

[0849] 반응식 16.



[0850]

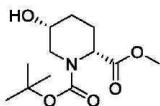
[0851] 단계 1. 메틸 (2R,5R)-5-하이드록시피페리딘-2-카복실레이트 61의 제조



[0852]

[0853] (2R,5R)-5-하이드록시피페리딘-2-카복실산 60(3.5g, 24.1mmol)을 MeOH(50ml) 중에서 교반하였다. HCl(g)을 용액을 통해서 2분 동안 버블링시키고, 반응물을 환류 하에서 1.5h 동안 교반하였다. 반응물을 진공 하에서 농축시켜 메틸 (2R,5R)-5-하이드록시피페리딘-2-카복실레이트 61을 정량적 수율로 제공하였고, 이것을 추가로 정제하지 않고 사용하였다.

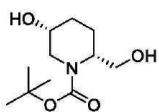
[0854] 단계 2. 1-(tert-부틸) 2-메틸 (2R,5R)-5-하이드록시피페리딘-1,2-다이카복실레이트 62의 제조



[0855]

[0856] 메틸 (2R,5R)-5-하이드록시피페리딘-2-카복실레이트 61(24.1mmol) 및 TEA(7.2ml, 53.02mmol)를 DCM(100ml) 중에서 RT에서 교반하였다. 다이-tert-부틸-다이-카보네이트(5.7g, 26.5mmol)를 나누어 첨가하고, 반응물을 2h 동안 교반하였다. 반응물을 DCM(100ml)으로 희석시키고, 순차적으로 1M HCl(2×75ml), 포화 NaHCO₃(2×75ml), H₂O(2×75ml) 및 포화 NaCl 용액(2×75ml)으로 세척하였다. 유기물을 분리하고, 건조시키고(Na₂SO₄), 진공 하에서 농축시켜 1-(tert-부틸) 2-메틸 (2R,5R)-5-하이드록시피페리딘-1,2-다이카복실레이트 62(5.53g, 88%)를 제공하였고, 이것을 추가로 정제하지 않고 사용하였다.

[0857] 단계 3. tert-부틸 (2R,5R)-5-하이드록시-2-(하이드록시메틸)피페리딘-1-카복실레이트 63의 제조

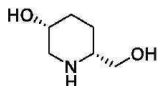


[0858]

[0859] (2R,5R)-1-(tert-부톡시카보닐)-5-하이드록시피페리딘-2-카복실산 62(5.53g, 21.4mmol)를 THF 중에서 0°C에서

교반하였다. LiBH_4 (THF 중의 3.0M 용액)(8.9ml, 27.7mmol)를 1hr에 걸쳐서 적가하였다. 반응물을 RT까지 가운시키고, 16h동안 교반을 계속하였다. 반응물을 1M NaOH로 반응정지시키고, THF를 진공 하에서 제거하고, 수성 물질 만을 EtOAc(10x100ml)로 추출하였다. 합한 유기물을 H_2O (50ml), 포화 NaCl 용액(2x50ml)으로 세척하고, 건조시키고(Na_2SO_4), 진공 하에서 농축시켜 *tert*-부틸 (2R,5R)-5-하이드록시-2-(하이드록시메틸)피페리딘-1-카복실레이트 **63**(2.4g, 49.0%)을 제공하였고, 이것을 추가로 정제하지 않고 사용하였다.

[0860] 단계 4. (3R,6R)-6-(하이드록시메틸)피페리딘-3-올 **64**의 제조



[0861]

tert-부틸 (2R,5R)-5-하이드록시-2-(하이드록시메틸)피페리딘-1-카복실레이트 **63**(2.4g, 10.4mmol)을 Et₂O 중에서 RT에서 교반하였다. HCl(g)을 45초 동안 버블링시키고, 반응물을 RT에서 45분 동안 교반하였다. 반응물을 진공 하에서 농축시키고, 고진공 하에서 건조시켜 (3R,6R)-6-(하이드록시메틸)피페리딘-3-올 **64**를 수득하였다. 생성물을 추가로 정제하지 않고 사용하였다.

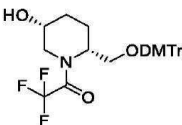
[0863] 단계 5. 2,2,2-트라이플루오로-1-((2R,5R)-5-하이드록시-2-(하이드록시메틸)피페리딘-1-일)에탄-1-온 **65**의 제조



[0864]

RT에서 상기 반응물로부터의 조물질 (3R,6R)-6-(하이드록시메틸)피페리딘-3-올 **64**를 TEA(3.5ml, 25.2mmol)를 함유하는 MeCN(50ml) 중에서 교반하였다. 에틸 트라이플루오로아세테이트(3ml, 25.2mmol)를 첨가하고, 반응물을 RT에서 16hr 동안 교반하고, 이어서 진공 하에서 농축시켜 2,2,2-트라이플루오로-1-((2R,5R)-5-하이드록시-2-(하이드록시메틸)피페리딘-1-일)에탄-1-온 **65**를 제공하였다. 생성물을 추가로 정제하지 않고 사용하였다.

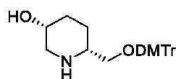
[0866] 단계 6. 1-((2R,5R)-2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-하이드록시피페리딘-1-일)-2,2,2-트라이플루오로에탄-1-온 **66**의 제조



[0867]

상기 반응물로부터의 조물질 2,2,2-트라이플루오로-1-((2R,5R)-5-하이드록시-2-(하이드록시메틸)피페리딘-1-일)에탄-1-온 **65**를 RT에서 TEA(50ml)를 함유한 DCM 중에서 교반하였다. 4,4'-다이메톡시트리틸 클로라이드(DMTrCl)(3.87g, 11.44mmol)를 한번에 첨가하고, 반응물을 RT에서 3시간 동안 교반하였다. 반응물을 DCM(50ml)으로 희석시키고, 포화 NaHCO_3 (2x75ml), H_2O (2x75ml) 및 포화 NaCl 용액(2x75ml)으로 순차적으로 세척하였다. 유기물을 분리하고, 건조시키고(Na_2SO_4), 진공 하에서 농축시키고, 칼럼 크로마토그래피(100% 헥산 - 60% EtOAc/헥산(0.1% TEA)에 의해서 정제시켜 1-((2R,5R)-2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-하이드록시피페리딘-1-일)-2,2,2-트라이플루오로에탄-1-온 **66**(3.14g, 57%)을 제공하였다.

[0869] 단계 7. (3R,6R)-6-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-피페리딘-3-올 **67**의 제조

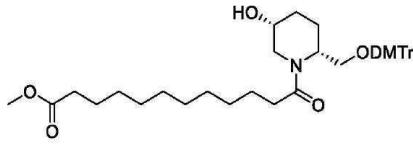


[0870]

1-((2R,5R)-2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-하이드록시피페리딘-1-일)-2,2,2-트라이플루오로에탄-1-온 **66**(3.14g, 6.0mmol)을 MeOH(50ml) 중에서 RT에서 교반하였다. KOH(672mg, 12mmol)를 첨가하고, 반응물을 RT에서 16시간 동안 교반하였다. 추가의 KOH(300mg, 6mmol)를 첨가하고, 추가의 24h 동안 교반을 계속하였다. 반응물을 진공 하에서 농축시키고, DCM(150ml) 중에 취하고, H_2O (4x50ml)로 세척하고, 건조시키고(Na_2SO_4) 및 진공

하에서 농축시켜 (3R,6R)-6-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)피페리딘-3-올 **67**(2.34g, 90%)을 제공하였고, 이것을 추가로 정제하지 않고 사용하였다.

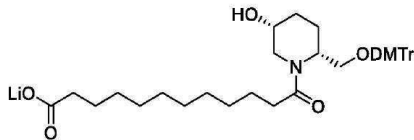
[0872] 단계 8. 메틸 12-((2R,5R)-2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-하이드록시피페리딘-1-일)-12-옥소도데칸오에이트 **68**의 제조



[0873]

[0874] (3R,6R)-6-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)피페리딘-3-올 **67**(2.34g, 5.34mmol)을 DCM(75ml) 중에서 RT에서 교반하였다. 트라이에틸아민(2.2ml, 16.2mmol), HATU(3.5g, 9.2mmol) 및 12-메톡시-12-옥소도데칸산(1.32g, 5.4mmol)을 첨가하고, 반응물을 RT에서 3h 동안 교반하였다. 생성된 고체 침전물을 여과에 의해서 분리하고, 여과액 진공 하에서 농축시키고, 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(2.5%MeOH/DCM, 0.1% TEA)에 의해서 정제시켜 메틸 12-((2R,5R)-2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-하이드록시피페리딘-1-일)-12-옥소도데칸오에이트 **68**을 정량적 수율로 제공하였다.

[0875] 단계 9. 리튬 12-((2R,5R)-2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-하이드록시피페리딘-1-일)-12-옥소도데칸오에이트 **69**의 제조



[0876]

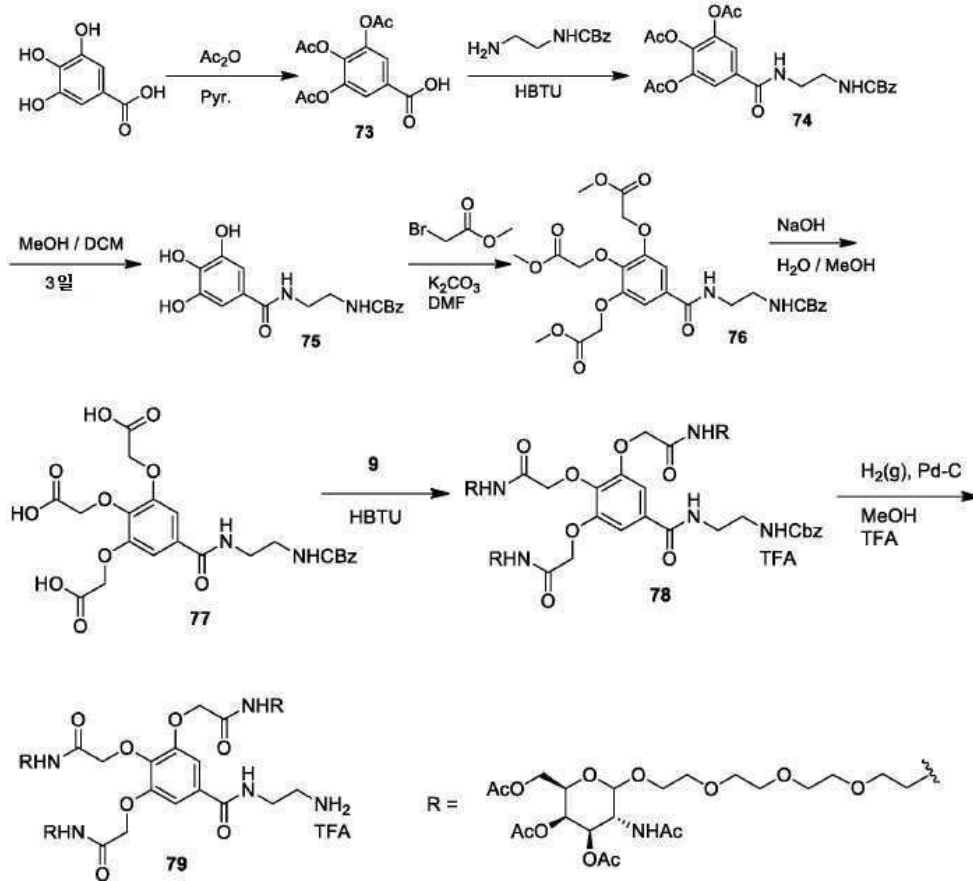
[0877] 메틸 12-((2R,5R)-2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-하이드록시피페리딘-1-일)-12-옥소도데칸오에이트 **68** (5.4mmol) 및 LiOH(140mg, 5.94mmol)를 THF:H₂O(1:1, 100ml) 중에서 RT에서 48h 동안 교반하였다. THF를 진공 하에서 제거하고, 수성 물질을 동결 및 동결건조시켜 리튬 12-((2R,5R)-2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-하이드록시피페리딘-1-일)-12-옥소도데칸오에이트 **69**(3.2g, 91%)를 제공하였다. 이것을 추가로 정제하지 않고 후속 반응에 사용하였다.

[0878] 단계 10. 화합물 **70**, **71**, **72** 및 **59**의 제조

[0879] 각각 화합물 **47**, **48**, **49** 및 **43**을 합성하는 데 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 **70**, **71**, **72** 및 **59**를 제조하였다.

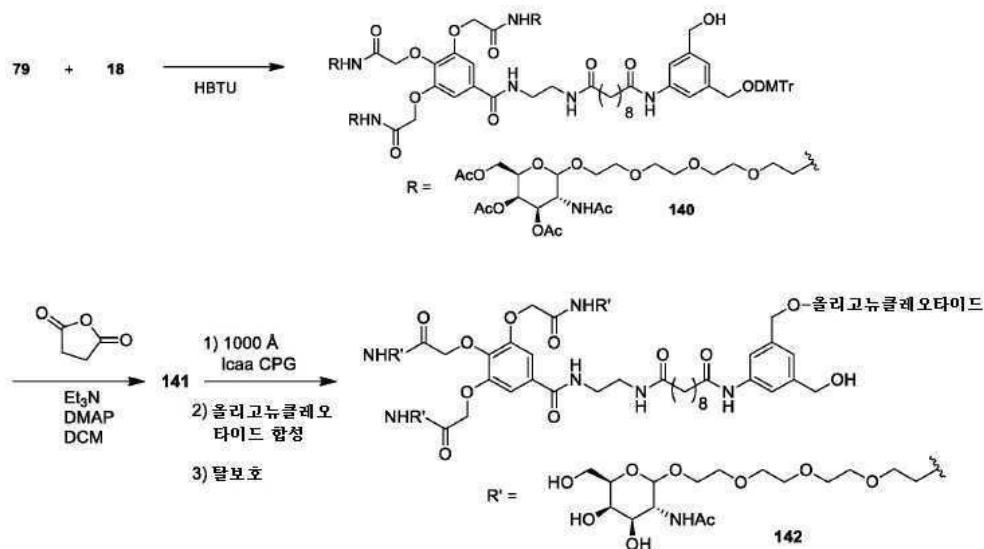
[0880] 실시예 8. 접합체 **142**의 합성

[0881] 반응식 17.



[0882]

[0883] 반응식 18.



[0884]

[0885] 단계 1. 3,4,5-트리아세트옥시벤조산 73의 제조

[0886] 피리딘(50ml) 중의 갈산(20g)의 용액에 아세트산 무수물(50ml)을 첨가하였다. 용액을 밤새 실온에서 교반하고, 이어서 빙수(1ℓ) 중에 부었다. 용액을 진한 염산으로 산성으로 만들었고, 이 때 무색 고체가 침전되었다. 고체를 여과를 통해서 수집하고, 물(5×100ml)로 세척하였다. 젖은 고체를 액체 질소 상에서 동결시키고, 동결 건조시켜 3,4,5-트리아세트옥시벤조산(26g, 75%)을 수득하였다.

- [0887] **단계 2. 5-((2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)에틸)카바모일)벤젠-1,2,3-트라이일 트리아아세테이트 74의 제조**
- [0888] DMF(200ml) 중의 3,4,5-트리아아세트옥시벤조산(10g, 33.8mmol), N-카보벤즈옥시-1,2-다리아미노에탄 염산염(5.3g, 33.8mmol) 및 HBTU(13.5g, 35.5mmol)의 용액에 DIPEA(17.5ml, 101mmol)를 첨가하였다. 용액을 16시간 동안 교반하고, 이어서 에틸 아세테이트(250ml)로 희석시키고, 염수(3×200ml)로 세척하고, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에서 건조물로 농축시켰다. 조 생성물을 실리카겔 상의 칼럼 크로마토그래피(구배 DCM 중의 1%에서 5% MeOH)에 의해서 정제시켜 5-((2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)에틸)카바모일)벤젠-1,2,3-트라이일 트리아아세테이트를 회백색 고체로서 수득하였다(5.5g).
- [0889] **단계 3. 3,4,5-트라이하이드록시-N-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)에틸)벤즈아마이드 75의 제조**
- [0890] 1:1 MeOH/CH₂Cl₂(100ml) 중의 5-((2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)에틸)카바모일)벤젠-1,2,3-트라이일 트리아아세테이트(5g, 1.1mmol)의 용액을 3일 동안 실온에서 교반하였다. 완결 후 용매를 제거하여, 3,4,5-트라이하이드록시-N-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)에틸)벤즈아마이드를 무색 고체로서 수득하였다(4g, 정량적).
- [0891] **단계 4. 트라이메틸 2,2',2''-((5-((2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)에틸)카바모일)벤젠-1,2,3-트라이일)트리스(옥시))트리아아세테이트 76의 제조**
- [0892] DMF(100ml) 중의 3,4,5-트라이하이드록시-N-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)에틸)벤즈아마이드(4g, 11.6mmol), 메틸 브로모아세테이트(7.7g, 46.4mmol) 및 탄산칼륨(9.6g, 69.4mmol)의 용액을 밤새 60℃에서 교반하였다. 완결 후 용액을 실온까지 냉각시키고, 에틸 아세테이트(200ml)로 희석시키고, 물(200ml), 염수(3×100ml)로 세척하고, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에서 건조물로 농축시켰다. 조 생성물을 실리카겔 상의 칼럼 크로마토그래피(구배 DCM 중의 2%에서 10% MeOH)에 의해서 정제시켜 트라이메틸 2,2',2''-((5-((2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)에틸)카바모일)벤젠-1,2,3-트라이일)트리스(옥시))-트리아아세테이트를 베이지색 고체로서 수득하였다(5g, 79%).
- [0893] **단계 5. 2,2',2''-((5-((2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)에틸)-카바모일)벤젠-1,2,3-트라이일)트리스(옥시))트리아아세트산 77의 제조**
- [0894] 메탄올(100ml) 중의 트라이메틸 2,2',2''-((5-((2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)에틸)-카바모일)벤젠-1,2,3-트라이일)트리스(옥시))트리아아세테이트(5g, 9.2mmol) 및 1M NaOH(30ml)의 용액을 2시간 동안 실온에서 교반하였다. 완결 후 반응물을 농축시켜 메탄올을 제거하고, 물(75ml)로 희석시켰다. 혼합물을 0℃까지 냉각시키고, 2M HCl로 산성화시키고, 에틸 아세테이트(5×150ml)추출하였다. 합한 에틸 아세테이트 추출물을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에서 건조물로 농축시켜 2,2',2''-((5-((2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)에틸)카바모일)벤젠-1,2,3-트라이일)트리스(옥시))트리아아세트산을 무색 고체로서 수득하였다(2.3g, 50%).
- [0895] **단계 6. 화합물 78의 제조**
- [0896] 화합물 13에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 9(2.75g, 4.3mmol) 및 77(0.5g, 0.96mmol)로부터 화합물 78을 제조하였다. 수율: 600mg.
- [0897] **단계 7. 화합물 79의 제조**
- [0898] 화합물 14에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 78(0.6g)로부터 화합물 79를 제조하였다. 수율: 500mg.
- [0899] **단계 8. 화합물 140의 제조**
- [0900] 화합물 19에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 79(500mg, 0.25mmol) 및 화합물 18(175mg, 0.25mmol)로부터 화합물 140을 제조하였다. 수율: 250mg, 44%.

[0901] 단계 9. 화합물 141의 제조

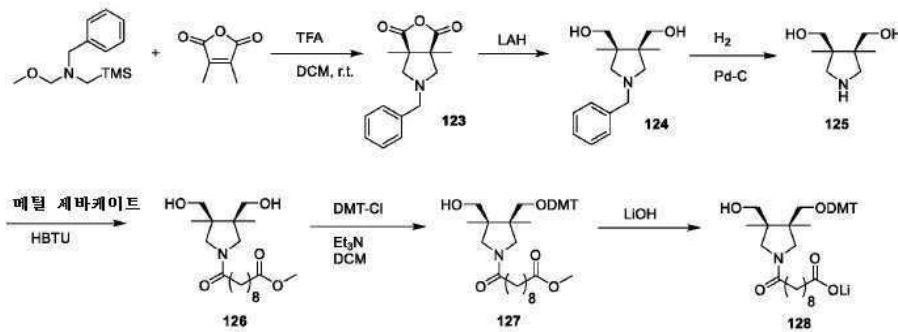
[0902] 화합물 20에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 140(250mg, 0.11mmol)로부터 화합물 141을 제조하였다. 수율: 200mg.

[0903] 단계 10. 접합체 142의 제조

[0904] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 141(200 mg) 및 1000A Icaa CPG(1.8g)로부터 접합체 142를 제조하였다. 수율: 1.9g, 22 μmol/g CPG 로딩. 생성된 GalNAc 로딩된 CPG 고체 지지체를 표준 절차를 사용하여 자동화 올리고뉴클레오타이드 합성에서 사용하였다. 뉴클레오타이드 탈보호, 그 다음 (동시 갈락토사민 아세테이트 탈보호와 함께) 고체 지지체로부터의 제거는 GalNAc-올리고뉴클레오타이드 접합체 142를 제공하였다.

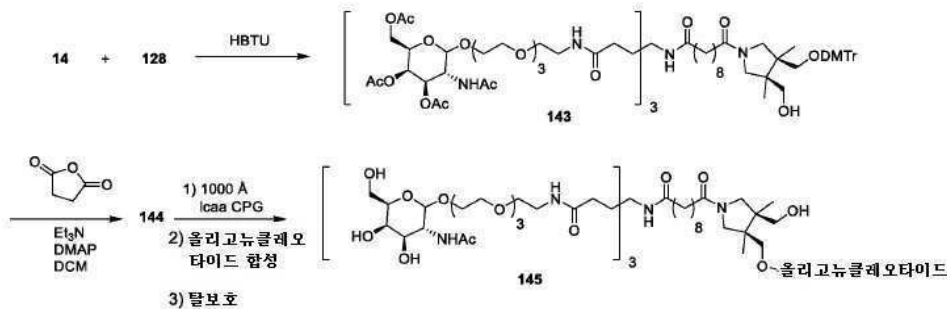
[0905] 실시예 9. 접합체 145의 합성

[0906] 반응식 19.



[0907]

[0908] 반응식 20.



[0909]

[0910] 단계 1. 라세미체 (시스) 5-벤질-3a,6a-다이메틸테트라하이드로-1H-퓨로[3,4-c]피롤-1,3(3aH)-다이온 123의 제조

[0911] 다이클로로메탄(75ml) 중의 3,4-다이메틸퓨란-2,5-다이온(3g, 24mmol) 및 N-벤질-1-메톡시-N-((트라이메틸실릴)메틸)메탄아민(7g, 29.8mmol)의 냉각된 용액(0°C)에 트라이플루오로아세트산(75μl)을 서서히 첨가하였다. 밤새 교반하여 병용이 녹으면서 용액이 서서히 실온까지 가온되게 하였다. 반응 혼합물을 건조물로 농축시키고, 에틸 아세테이트(100ml) 중에 용해시키고, 포화 중탄산나트륨(2×100ml)으로 세척하고, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 건조물로 농축시켰다. 실리카젤 상의 칼럼 크로마토그래피(구배: 헥산 중의 20% 에틸 아세테이트에서 100% 에틸 아세테이트)에 의한 정제는 라세미체 (시스) 5-벤질-3a,6a-다이메틸테트라하이드로-1H-퓨로[3,4-c]피롤-1,3(3aH)-다이온을 황색 오일로서 제공하였다(3.5g, 56%).

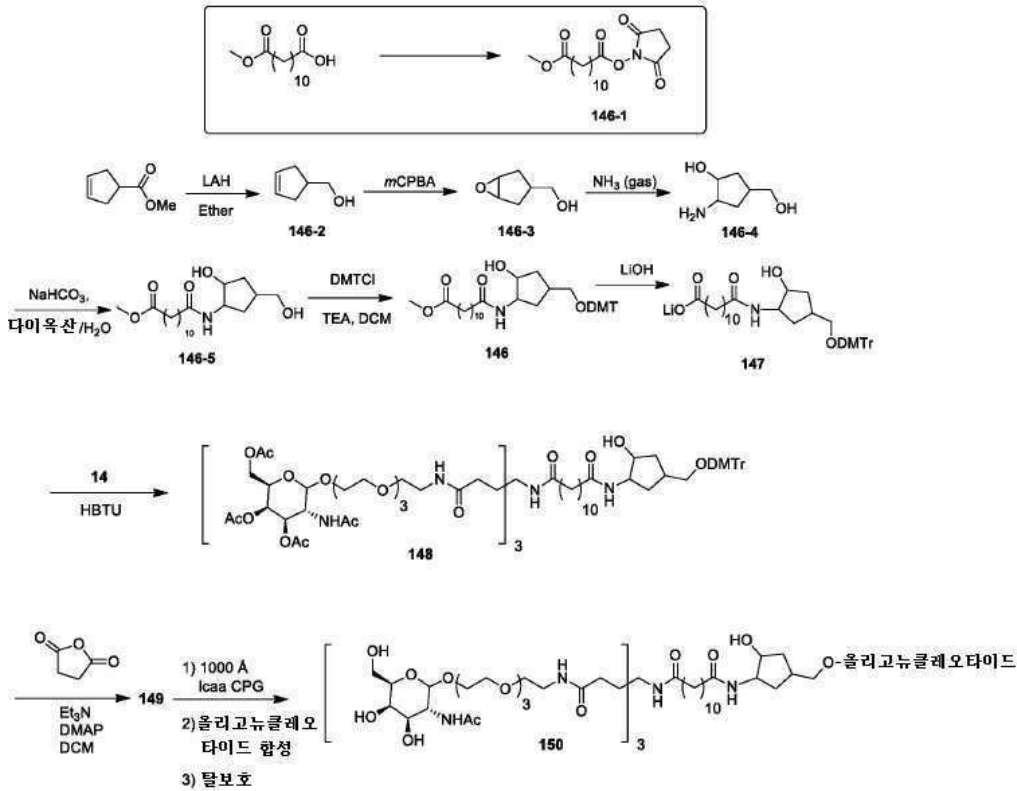
[0912] 단계 2. 라세미체 (시스) 1-벤질-3,4-다이메틸피롤리딘-3,4-다이일)다이메탄을 124의 제조

[0913] 무수 다이에틸 에터(50ml) 중의 (3aR,6aS)-5-벤질-3a,6a-다이메틸테트라하이드로-1H-퓨로[3,4-c]피롤-1,3(3aH)-다이온(3.5g, 13.4mmol)의 냉각된(0°C) 용액에 리튬 알루미늄 하이드라이드 펠릿(1.5g, 40mmol)을 3개의 분획으로 서서히 첨가하였다. 용액을 밤새 교반하여 병용이 녹으면서 실온까지 가온되게 하였다. 완결 후, 반응물을 0°C까지 냉각시키고, 1.5ml의 5M NaOH, 그 다음 1.5ml의 물로 매우 서서히 반응정지시켰다. 30분 동안 교반하고, 이어서 황산마그네슘을 첨가하고, 여과시켰다. 여과액을 농축시켜 라세미체 (시스) 1-벤질-3,4-다이

메틸피롤리딘-3,4-다이일)다이메탄올을 무색 오일로서 수득하였다(2.7g).

- [0914] **단계 3. 라세미체 (시스) 3,4-다이메틸피롤리딘-3,4-다이일)다이메탄올 125의 제조**
- [0915] 메탄올(10ml) 중의 ((3R,4S)-1-벤질-3,4-다이메틸피롤리딘-3,4-다이일)다이메탄올(10g, 40mmol)의 용액에 차콜 상의 10% 팔라듐, 습식(1g)을 첨가하였다. 용액을 수소 분위기 하에서 16시간 동안 격렬하게 교반하였다. 완결 후 용액을 셀라이트를 통해서 여과시키고, 건조물로 농축시켜 라세미체 (시스) 3,4-다이메틸피롤리딘-3,4-다이일)다이메탄올을 무색 고체로서 수득하였다(5.5g, 86%).
- [0916] **단계 4. 라세미체 (시스) 메틸 10-(3,4-비스(하이드록시메틸)-3,4-다이메틸피롤리딘-1-일)-10-옥소데칸오에이트 126의 제조**
- [0917] 화합물 17에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 125(1.3g, 8.2mmol) 및 모노메틸 세바케이트 (1.8g, 8.2mmol)로부터 화합물 126을 제조하였다. 수율: 1.8g, 61%.
- [0918] **단계 5. 라세미체 (시스) 메틸 10-(3-((비스(4-메톡시페닐)-(페닐)메톡시)-메틸)-4-(하이드록시메틸)-3,4-다이메틸피롤리딘-1-일)-10-옥소데칸오에이트 127의 제조**
- [0919] 화합물 18에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 126(1.8g, 5.0mmol) 및 4,4'-다이메톡시트리틸 클로라이드(1.7g, 5.0mmol)로부터 화합물 127을 제조하였다. 수율: 1.4g, 42%.
- [0920] **단계 6. 라세미체 (시스) 리튬 10-(3-((비스(4-메톡시페닐)-(페닐)메톡시)-메틸)-4-(하이드록시메틸)-3,4-다이메틸피롤리딘-1-일)-10-옥소데칸오에이트 128의 제조**
- [0921] THF(50ml) 및 물(50ml) 중의 화합물 127(3.0g, 4.6mmol)의 용액에 수산화리튬(121mg, 5.0mmol)을 첨가하였다. 용액을 4시간 실온에서 교반하고, 이어서 농축시켜 THF를 제거하였다. 남아있는 수성 용액을 밤새 동결 건조시켜 연한 분홍색 고체를 수득하였다(2.9g, 정량적).
- [0922] **단계 7. 화합물 143의 제조**
- [0923] 화합물 19에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 128(270mg, 0.42mmol) 및 화합물 14(800mg, 0.42mmol)로부터 화합물 143을 제조하였다. 수율: 900mg, 87%.
- [0924] **단계 8. 화합물 144의 제조**
- [0925] 화합물 20에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 143(500mg, 0.2mmol)으로부터 화합물 144를 제조하였다. 수율: 200mg.
- [0926] **단계 9. 접합체 145의 제조**
- [0927] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 144(200 mg) 및 1000A lcaa CPG(1.8g)로부터 접합체 145를 제조하였다. 수율: 1.9g, 20 μmol/g CPG 로딩. 생성된 GalNAc 로딩된 CPG 고체 지지체를 표준 절차를 사용하여 자동화 올리고뉴클레오타이드 합성에서 사용하였다. 뉴클레오타이드 탈보호, 그 다음 (동시 갈락토사민 아세테이트 탈보호와 함께) 고체 지지체로부터의 제거는 GalNAc-올리고뉴클레오타이드 접합체 145를 제공하였다.
- [0928] **실시예 10. 접합체 150의 합성**

[0929] 반응식 21.



[0930]

[0931] 단계 1. 146-1의 제조

[0932]

다이클로로메탄(300ml) 중의 도데칸다이산의 모노 메틸 에스터(12.2g, 50.0mmol)의 용액에 N-하이드록시석신이미드(6.10g, 53.0mmol) 및 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)카보다이이미드 염산염(EDC)(10.52g, 55.0mmol)을 첨가하였다. 탁한 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였고, 반응물은 투명한 용액이 되었다. TLC는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 유기물을 포화 NH₄Cl(300ml) 및 염수(100ml)로 세척하였다. 유기층을 분리하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 건조물로 농축시켜 순수한 1-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 12-메틸 도데칸다이오에이트 146-1을 백색 고체로서 수득하였다(16.7g, 97.8%).

[0933]

단계 2. 사이클로펜트-3-엔-1-일메탄올 146-2의 제조

[0934]

0℃에서 질소 하에서 무수 에터(1ℓ) 중의 리튬 알루미늄 하이드라이드(15.2g, 0.40mol)의 현탁액에 에터(300ml) 중의 메틸 사이클로펜트-3-엔카복실레이트(50g, 0.40mol)의 용액을 5시간에 적가하였다. 현탁액을 실온에서 밤새 교반하였다. TLC가 반응의 완결을 나타내었다. 반응물을 0℃까지 재냉각시켰다. Na₂SO₄(32ml)의 포화 용액을 적가하여 반응을 반응정지시켰다. 첨가가 완결된 후, 혼합물을 또 다른 3시간 동안 교반하고, 셀라이트 패드를 통해서 여과시켰다. 용매의 증발은 사이클로펜트-3-엔일메탄올 146-2(37.3g, 95%)을 무색 액체로서 제공하였다.

[0935]

단계 3. (6-옥사바이사이클로[3.1.0]헥산-3-일)메탄올 146-3의 제조

[0936]

0℃에서 다이클로로메탄(150ml) 중의 사이클로펜트-3-엔일메탄올 146-2(4.0g, 41mmol)의 용액에 3-클로로포벤조산(10g, 45mmol, 77% 순도)을 분획으로 첨가하였다. 반응물을 밤새 교반하였다. 다이클로로메탄(150ml)을 첨가하였다. 유기물을 티오황산나트륨(10ml 물 중의 12g), 그 다음 포화 NaHCO₃(40ml)로 세척하였다. 남아있는 모든 3-클로로포벤조산이 세척될 때까지 이것을 반복하였다. 유기물을 MgSO₄ 상에서 건조시켰다. 용매의 증발은시스- 및 트랜스-6-옥사바이사이클로[3.1.0]헥산-3-일메탄올 146-3의 혼합물(2.6g, 57%)을 황색 오일로서 제공하였다. GC-MS: *m/z* 114 (5) (M⁺), 95 (15), 88 (100), 81 (15).

[0937]

단계 4. 2-아미노-4-(하이드록시메틸)사이클로펜탄-1-올 146-4의 제조

[0938]

0℃에서 메탄올(20ml) 중의 6-옥사바이사이클로[3.1.0]헥산-3-일메탄올 146-3(2.0g, 17.6mmol)의 용액에 암모니아 기체를 10분 동안 퍼징시켰다. 반응물을 실온에서 밤새 교반하였다. TLC가 반응의 미완결을 나타내었다. 메

탄올을 제거하고, NH₃·H₂O(50ml)를 첨가하고, 이것을 실온에서 1주일에 걸쳐서 교반하였다. TLC가 반응의 완결을 나타내었다. 에탄올과의 공비 증발에 의해서 물을 제거하여 2-아미노-4-(하이드록시메틸)사이클로펜탄올 146-4(2.1g, 91%)를 황색 오일로서 수득하였다.

[0939] **단계 5. 메틸 12-(2-하이드록시-4-(하이드록시메틸)사이클로펜틸아미노)-12-옥소도데칸오에이트 146-5의 제조**

[0940] 12-(2-(*tert*-부톡시카보닐아미노)에틸아미노)-12-옥소도데칸오에이트(3-2)의 합성에 기술된 것과 동일한 절차를 사용하여, 2-아미노-4-(하이드록시메틸)사이클로펜탄올 146-4 및 1-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 12-메틸 도데칸다이오에이트 146-1로부터 화합물 146-5를 제조하였다. 메틸 12-(2-하이드록시-4-(하이드록시메틸)사이클로펜틸아미노)-12-옥소도데칸오에이트 146-5를 87.4% 수율로 희박색 고체로서 수득하였다.

[0941] **단계 6. 화합물 147의 제조**

[0942] 화합물 18에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 146(1.4g, 2.33mmol)으로부터 화합물 147을 정량적으로 제조하였다.

[0943] **단계 7. 화합물 148의 제조**

[0944] 화합물 19에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 147(150mg, 0.23mmol) 및 화합물 14(431mg, 0.23mmol)로부터 화합물 148을 제조하였다. 수율: 460mg, 84%.

[0945] **단계 8. 화합물 149의 제조**

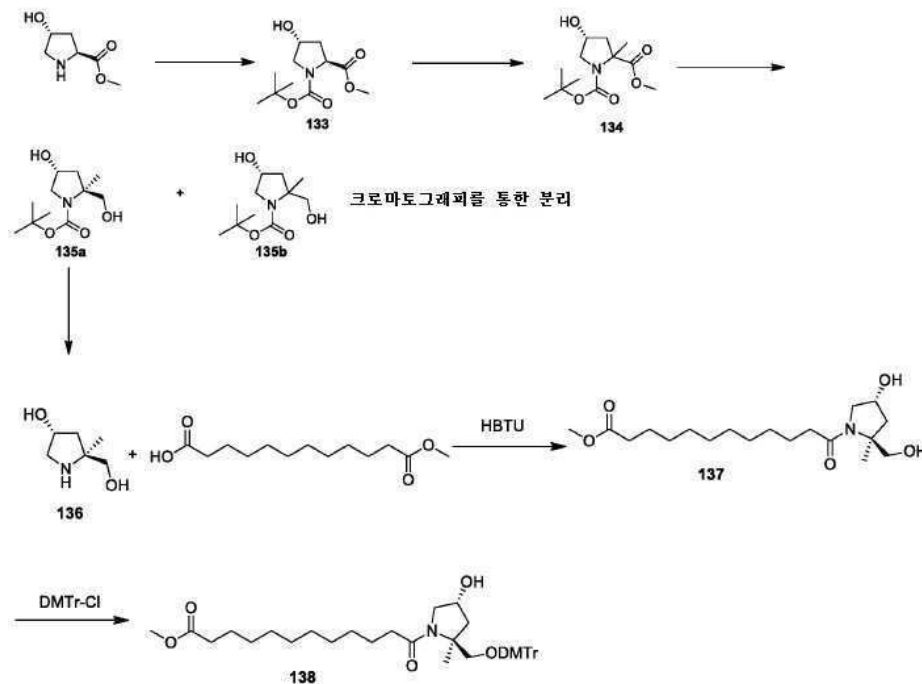
[0946] 화합물 20에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 148(460mg, 0.19mmol)로부터 화합물 149를 제조하였다. 수율: 436mg, 91%.

[0947] **단계 9. 접합체 150의 제조**

[0948] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 149(436mg) 및 1000A lcaa CPG (2.62g)로부터 화합물 150을 제조하였다. 수율: 2.7g, 21.3 μmol/g CPG 로딩. 생성된 GalNAc 로딩된 CPG 고체 지지체를 표준 절차를 사용하여 자동화 올리고뉴클레오타이드 합성에서 사용하였다. 뉴클레오타이드 탈보호, 그 다음 (동시 갈락토사민 아세테이트 탈보호와 함께) 고체 지지체로부터의 제거는 GalNAc-올리고뉴클레오타이드 접합체 150을 제공하였다.

[0949] **실시예 11. 접합체 153, 158, 163, 168 및 173의 합성**

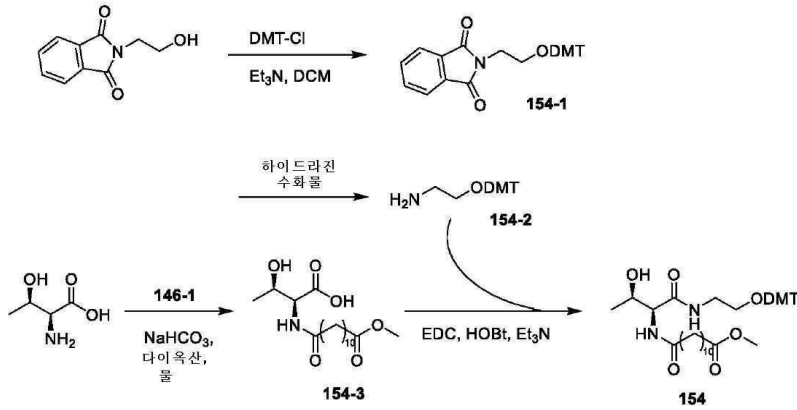
[0950] **반응식 22.**



[0951]

- [0952] **단계 1. 1-(tert-부틸) 2-메틸 (2S,4R)-4-하이드록시피롤리딘-1,2-다이카복실레이트(133)의 제조**
- [0953] 메틸 (2S,4R)-4-하이드록시피롤리딘-2-카복실레이트(25.9g, 46mmol), BOC 무수물(65.9g, 302.5mmol) 및 TEA(42ml, 302.5mmol)을 DCM 중에서 RT에서 16h 동안 교반하였다. 유기물을 1M HCl(×2), 포화 NaHCO₃(×2), H₂O 및 염수로 순차적으로 세척하고, 건조시키고, 진공 하에서 농축시켜 1-(tert-부틸) 2-메틸 (2S,4R)-4-하이드록시피롤리딘-1,2-다이카복실레이트(133)(58.1g, 85%)를 제공하였다.
- [0954] **단계 2. 1-(tert-부틸) 2-메틸 (4R)-4-하이드록시-2-메틸피롤리딘-1,2-다이카복실레이트(134)의 제조**
- [0955] 1-(tert-부틸) 2-메틸 (2S,4R)-4-하이드록시피롤리딘-1,2-다이카복실레이트(133)(5g, 20.4mmol) 및 MeI(12g, 84.5mmol)를 무수 THF 중에서 -40℃에서 교반하였다. LDA(THF 중의 2.0M 용액)(37.5ml, 75mmol)을 적가하였다. 반응물을 RT까지 가온시키고, 4h 동안 교반하고, 이어서 포화 NH₄Cl로 반응정지시켰다. 반응물을 EtOAc로 추출하고, H₂O 및 염수로 세척하고, 건조시키고(Na₂SO₄), 진공 하에서 농축시켰다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피 50:50 EtOAc//헥산에 의해서 정제시켜 1-(tert-부틸) 2-메틸 (4R)-4-하이드록시-2-메틸피롤리딘-1,2-다이카복실레이트(134)를 라세미체 혼합물로서 제공하였다(3.6g, 68%).
- [0956] **단계 3. tert-부틸 (2S,4R)-4-하이드록시-2-(하이드록시메틸)-2-메틸피롤리딘-1-카복실레이트(135a)의 제조**
- [0957] 1-(Tert-부틸) 2-메틸 (4R)-4-하이드록시-2-메틸피롤리딘-1,2-다이카복실레이트(134)(19g, 73.5mmol)를 무수 THF 중에서 N₂ 하에서 교반하였다. LiBH₄ 용액(48ml, 96mmol)을 적가하고, 반응물을 RT에서 48h 동안 교반하였다. 반응물을 1M NaOH로 반응정지시키고, THF를 진공 하에서 제거하고, 잔류물을 EtOAc(4x100ml)로 추출하였다. 유기물을 H₂O 및 염수로 세척하고, 건조시키고(Na₂SO₄), 진공 하에서 농축시켰다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(5% MeOH/DCM)에 의해서 정제시켜 tert-부틸 (2S,4R)-4-하이드록시-2-(하이드록시메틸)-2-메틸피롤리딘-1-카복실레이트(135a)를 주요 생성물(8g, 47%)로서 제공하였다. 구조를 문헌에 따라서 배정하였다.
- [0958] **단계 4. (3R,5S)-5-(하이드록시메틸)-5-메틸피롤리딘-3-올 염산염(136)의 제조**
- [0959] tert-부틸 (2S,4R)-4-하이드록시-2-(하이드록시메틸)-2-메틸피롤리딘-1-카복실레이트(135a)(8g, 34.6mmol)를 EtOAc 중에서 RT에서 교반하고, 기체 HCl를 대략 2분 동안 적용하였다. 반응물을 1시간 동안 교반하고, 이어서 진공 하에서 농축시키고, 고 진공 하에서 건조시켜 (3R,5S)-5-(하이드록시메틸)-5-메틸피롤리딘-3-올 염산염(136)을 정량적 방식으로 제공하였다.
- [0960] **단계 5. 메틸 12-((2S,4R)-4-하이드록시-2-(하이드록시메틸)-2-메틸피롤리딘-1-일)-12-옥소도데칸오에이트(137)의 제조**
- [0961] (3R,5S)-5-(하이드록시메틸)-5-메틸피롤리딘-3-올 염산염(136)(7.9g, 47.4mmol), 12-메톡시-12-옥소도데칸산(11.5g, 47.4mmol), HBTU(36g, 76mmol) 및 TEA 20ml, 142.2mmol)을 DCM 중에서 RT에서 16h 동안 교반하였다. 침전물을 여과에 의해서 분리하고, 유기물을 1M HCl(×2), 포화 NaHCO₃(×2), H₂O 및 염수로 세척하였다. 건조 후, 유기물을 진공 하에서 농축시키고, 칼럼 크로마토그래피(5% MeOH/DCM)에 의해서 정제시켜 메틸 12-((2S,4R)-4-하이드록시-2-(하이드록시메틸)-2-메틸피롤리딘-1-일)-12-옥소도데칸오에이트(137)(3.1g, 18.3%)를 제공하였다.
- [0962] **단계 6. 메틸 12-((2S,4R)-2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)-메틸)-4-하이드록시-2-메틸피롤리딘-1-일)-12-옥소도데칸오에이트(138)의 제조**
- [0963] 메틸 12-((2S,4R)-4-하이드록시-2-(하이드록시메틸)-2-메틸피롤리딘-1-일)-12-옥소도데칸오에이트(137)(3.1g, 9.0mmol), DMTr-Cl(2.8g, 8.2mmol) 및 TEA(1.1ml, 8.2mmol)를 DC 중에서 RT 미만의 온도에서 16h 동안 교반하였다. 반응물을 진공 하에서 농축시키고, 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(5% MeOH/DCM, 0.1%TEA)에 의해서 정제시켜 메틸 12-((2S,4R)-2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)-메틸)-4-하이드록시-2-메틸피롤리딘-1-일)-12-옥소도데칸오에이트(138)(2.7g, 45.5mmol)를 제공하였다.

[0964] 반응식 23



[0965]

[0966] 단계 7. 화합물 154-1의 제조

[0967] 0°C에서 질소 하에서 다이클로로메탄(200ml) 중의 *N*-(2-하이드록시에틸)프탈이미드(4.80g, 25.0mmol) 및 4,4'-다이메톡시트리틸 클로라이드(8.8g, 26.0mmol)의 용액에 트라이에틸아민(10.4ml, 74.6mmol)을 적가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3hr 동안 교반하였다. TLC가 반응의 완결을 나타내었다. 유기층을 염수(100ml)로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 건조물로 농축시켰다. 이것을 정제하지 않고 다음 반응을 위해서 직접 사용하였다.

[0968] 단계 8. 화합물 154-2의 제조

[0969] 에탄올(100ml) 중의 상기에서 수득된 2-(2-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)에틸)아이소인돌린-1,3-다이온(154-1) 및 하이드라진 일수화물(3.6ml, 74mmol)을 밤새 실온에서 교반하였다. TLC가 반응의 완결을 나타내었다. 침전물을 여과시켰다. 여과액을 증발시켰다. 잔류물을 에틸 아세테이트(100ml) 중에 취했다. 유기 용액을 10% NaOH, 물 및 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시켰다. 용매의 증발은 2-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)에탄아민(154-2)을 황색 액체(8.11g, 2단계에 걸친 89.3% 수율)로서 제공하였다. 이것을 추가로 정제하지 않고 다음 반응을 위해서 사용하였다.

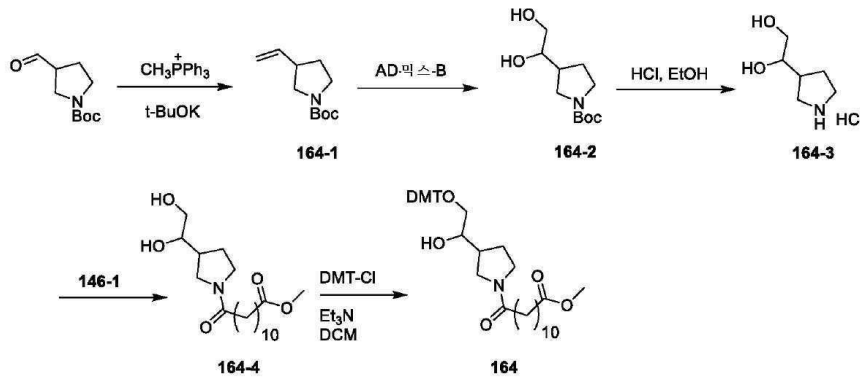
[0970] 단계 9. 화합물 154-3의 제조

[0971] 물(20ml) 및 다이옥산(10ml) 중의 L-트레오닌(1.19g, 10.0mmol) 및 NaHCO₃(2.3g, 27mmol)의 용액에, 다이옥산(10ml) 중의 1-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 12-메틸 도데칸다이오에이트 146-1(3.1g, 9.1mmol)을 적가로 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 4N HCl(10ml)을 첨가하였다. 침전물을 여과에 의해서 수집하고, 물(3×10ml)로 세척하였다. 고체를 데시케이터 내에서 P₂O₅ 상에서 건조시켜 (2S,3R)-3-하이드록시-2-(12-메톡시-12-옥소도데칸아미도)부탄산 154-3을 회백색 고체(2.84g, 82.2%)로서 수득하였다. LC-MS (ESI): *m/z*: 346(100), (M + H⁺).

[0972] 단계 10. 화합물 154의 제조

[0973] (2S,3R)-3-하이드록시-2-(12-메톡시-12-옥소도데칸아미도)부탄산 154-3(2.47g, 7.15mmol), 2-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)에탄아민 154-2(2.60g, 7.15mmol), EDC(1.64g, 8.58mmol), 1-하이드록시벤조트리아졸 (HOBt)(1.16g, 8.58mmol) 및 TEA(2.4ml, 17.2mmol)를 다이클로로메탄(72ml) 중에서 실온에서 2hr 동안 교반하였다. 물(30ml)을 첨가하였다. 유기층을 분리하고, 염수(2×30ml)로 세척하였다. 용매의 증발, 그 다음 칼럼 크로마토그래피(30% 에틸 아세테이트/헥산 -50% 에틸 아세테이트/헥산)는 메틸 12-((2S,3R)-1-(2-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)에탄아미노)-3-하이드록시-1-옥소부탄-2-일아미노)-12-옥소도데칸오에이트 154를 왁스 같은 황색 반고체로서 제공하였다(2.60g, 52.6%). ¹HNMR (400MHz, 아세톤-d₆, ppm): δ 7.51 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.45-7.49 (m, 2H), 7.28-7.36 (m, 6H), 7.21 (tt, J = 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.88 (dt, J = 8.9, 2.5 Hz, 4H), 4.39 (dd, J = 8.2, 3.0 Hz, 1H), 4.20-4.27 (m, 1H), 3.78 (s, 6H), 3.60 (s, 1H), 3.35-3.52 (m, 2H), 3.07-3.16 (m, 2H), 2.23-2.37 (m, 4H), 1.53-1.65 (m, 4H), 1.23-1.36 (m, 12H), 1.10 (d, J = 6.4 Hz, 3H).

[0974] 반응식 24



[0975]

[0976] 단계 11. 화합물 164-1의 제조

[0977]

THF(120ml)/에터(360ml) 중의 포타슘 *t*-부톡사이드(14.6g, 130mmol)의 현탁액에 메틸트라이페닐포스포늄 브로마이드(46.6g, 130mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 2hr 동안 환류시키고, 이어서 0℃까지 냉각시켰다. 에터(50ml) 중의 *tert*-부틸 2-폼일피롤리딘-1-카복실레이트(13.0g, 65.2mmol)를 적가하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 교반하고, 이어서 물(250ml)을 첨가하여 반응정지시켰다. 유기층을 분리하고, 수성층을 에터(250ml)로 추출하였다. 합한 추출물을 MgSO₄ 상에서 건조시켰다. 용매의 증발, 그 다음 칼럼 크로마토그래피 정제(5% 에틸 아세테이트/헥산)는 *tert*-부틸 3-바이닐피롤리딘-1-카복실레이트 164-1(11.5g, 89.4%)를 무색 액체로서 제공하였다. GC-MS: *m/z*: 197 (2) (M⁺), 141 (40), 124 (30), 57 (100).

[0978]

단계 12. 화합물 164-2의 제조

[0979]

t-BuOH(140ml) 및 물(70ml)의 혼합물에 AD-믹스-β(47.4g) 및 메탄설폰아마이드(2.89g, 30.4mmol)를 충전시켰다. 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하고, 이어서 0℃까지 냉각시켰다. *tert*-부틸 3-바이닐피롤리딘-1-카복실레이트 164-1(6.00g, 30.4mmol)을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 0℃까지 냉각시켰다. 티오황산나트륨 이수화물(96g, 387mmol)을 첨가하고, 온도를 실온까지 가온시켰다. 물(700ml)을 첨가하고, 혼합물을 에틸 아세테이트(500ml)로 추출하였다. 추출물을 물(2×50ml) 및 염수(50ml)로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시켰다. 용매의 증발, 그 다음 칼럼 크로마토그래피(2% 메탄올/다이클로로메탄 - 7% 메탄올/다이클로로메탄)는 *tert*-부틸 3-(1,2-다이하이드록시에틸)피롤리딘-1-카복실레이트 164-2(5.4g, 77%)를 밝은 갈색 오일로서 제공하였다.

[0980]

단계 13. 화합물 164-3의 제조

[0981]

에탄올(10ml) 중의 *tert*-부틸 3-(1,2-다이하이드록시에틸)피롤리딘-1-카복실레이트 164-2(3.1g, 13.4mmol)의 용액에 3N HCl(30ml, 90mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. TLC가 반응의 완결을 나타내었다. 에탄올을 증발시켰다. 톨루엔을 첨가하고, 증발시켰다. 이것을 3회 반복하여 1-(피롤리딘-3-일)에탄-1,2-다이올 염산염 164-3(2.0g, 89%)을 갈색 오일로서 제공하였다. LC-MS (ESI): *m/z*: 132(100), (M + H⁺, 유리 아민).

[0982]

단계 14 화합물 164-4의 제조

[0983]

물(30ml) 중의 1-(피롤리딘-3-일)에탄-1,2-다이올 염산염 164-2(2.0g, 12mmol)의 용액에 NaHCO₃(3.7g, 44mmol)를 분획으로 첨가하였다. 이어서 다이옥산(20ml)을 첨가하였다. 상기 용액에 다이옥산(30ml) 중의 1-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 12-메틸 도데칸다이오에이트 146-1(3.7g, 11mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 이것을 에틸 아세테이트(3 x100ml)로 추출하였다. 합한 추출물을 0.5N HCl(50ml) 및 염수(50ml)로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시켰다.

[0984]

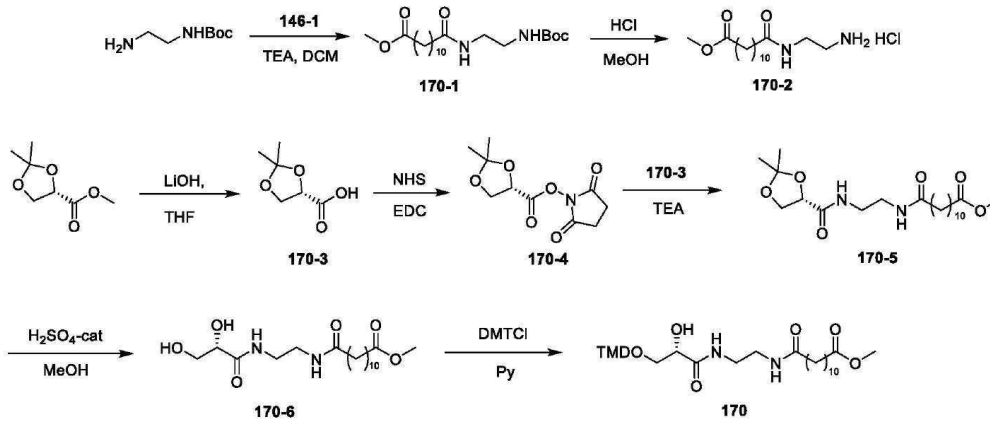
단계 15. 화합물 164의 제조

[0985]

2-(2-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)에틸)아이소인돌린-1,3-다이온 138의 합성에 기술된 것과 동일한 절차를 사용하여 메틸 12-(3-(1,2-다이하이드록시에틸)피롤리딘-1-일)-12-옥소도데칸오에이트 164-4 및 4,4-다이메톡시

트리틸 클로라이드(1eq)로부터 이 물질을 제조하였다. 생성물을 칼럼 크로마토그래피(1.5% 메탄올/다이클로로메탄)에 의해서 정제시켰다. 메틸 12-(3-(2-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)-1-하이드록시에틸)피롤리딘-1-일)-12-옥소도데칸오에이트 **164**를 51% 수율로 황색 오일로서 수득하였다. ¹HNMR (400MHz, 아세톤-d₆, ppm): δ 7.49-7.54 (m, 2H), 7.35-7.40 (m, 4H), 7.28-7.34 (m, 2H), 7.19-7.25 (m, 1H), 6.86-6.91 (m, 4H), 4.11-4.20 (m, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.68-3.77 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.29-3.59 (m, 3H), 3.06-3.20 (m, 3H), 2.33-2.55 (m, 1H), 2.29 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.19 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.65-2.0 (m, 2H), 1.51-1.62 (m, 4H), 1.26-1.35 (m, 12H).

[0986] 반응식 25



[0987]

[0988] 단계 16. 화합물 170-1의 제조

[0989] 다이클로로메탄(100ml) 중의 *tert*-부틸 2-아미노에틸카바메이트(2.88g, 18.0mmol) 및 트라이에틸아민(2.98g, 29.4mmol)의 용액에, 다이클로로메탄(50ml) 중의 1-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 12-메틸 도데칸다이오에이트 (**146-1**)(5.09g, 14.9mmol)를 실온에서 적가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하였고, TLC가 반응의 완결을 나타내었다. 100 ml 염수를 첨가하고, 유기층을 분리하였다. 유기층을 0.5N HCl(150ml), 염수(2×100ml)로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시켰다. 용매의 증발은 순수한 메틸 12-(2-(*tert*-부톡시카보닐아미노)에틸아미노)-12-옥소도데칸오에이트 **170-1**(5.85g 100%)을 백색 고체로서 제공하였다.

[0990] 단계 17. 화합물 170-2의 제조

[0991] 0℃에서 메탄올(100ml) 중의 12-(2-(*tert*-부톡시카보닐아미노)에틸아미노)-12-옥소도데칸오에이트 **170-1**(5.55g, 14.4mmol)의 용액에 티오닐 클로라이드(3.3ml, 45.5mmol)를 적가하였다. 이어서 반응물을 실온에서 밤새 교반하였다. TLC가 반응의 완결을 나타내었다. 용매 및 휘발성 유기물을 증발시켰다. 이어서 잔류물을 헵탄과 함께 2회 공증발시켜 메틸 12-(2-아미노에틸아미노)-12-옥소도데칸오에이트 염산염 **170-2**를 정량적으로 백색 고체로서 제공하였다. LC-MS (ESI): *m/z*: 287(100), (M + H⁺, 유리 아민).

[0992] 단계 18. 화합물 170-3의 제조

[0993] THF(50ml) 및 물(50ml) 중의 (-)-메틸 (S)-2,2-다이메틸-1,3-다이옥솔란-4-카복실레이트(5.01g, 31.2mmol) 및 LiOH·H₂O(2.55g, 60.8mmol)를 밤새 교반하였다. TLC가 반응의 완결을 나타내었다. THF를 증발시키고, 수성물질을 1N HCl로 pH = 1로 산성화시켰다. 이것을 에틸 아세테이트(5×50ml)로 추출하였다. 합한 추출물을 MgSO₄ 상에서 건조시켰다. 용매의 증발은 (S)-2,2-다이메틸-1,3-다이옥솔란-4-카복실산 **170-3**(2.93g, 64.3%)을 밝은 황색 액체로서 제공하였다.

[0994] 단계 19. 화합물 170-4의 제조

[0995] 1-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 12-메틸 도데칸다이오에이트 **146-1**의 합성에 기술된 것과 동일한 절차를 사용하여 (S)-2,2-다이메틸-1,3-다이옥솔란-4-카복실산 **170-3** 및 N-하이드록시석신이미드로부터 86% 수율로 화합물 **170-4**를 합성하였다. (S)-2,5-다이옥소피롤리딘-1-일 2,2-다이메틸-1,3-다이옥솔란-4-카복실레이트 **170-4**를 86% 수율로 백색 고체로서 수득하였다.

[0996] 단계 20. 화합물 170-5의 제조

[0997] 다이클로로메탄(100ml) 중의 메틸 12-(2-(2-아미노에틸아미노)-12-옥소도데칸오에이트 염산염 170-2(14.4mmol) 및 (S)-2,5-다이옥소피롤리딘-1-일 2,2-다이메틸-1,3-다이옥솔란-4-카복실레이트 170-4(3.80g, 15.6mmol)의 현탁액에 다이클로로메탄(25ml) 중의 트라이에틸아민(6ml, 43.0mmol)을 4hr에 걸쳐서 0°C에서 첨가하였다. 이어서 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. LC-MS는 출발 물질 170-2가 완전히 전환되었음을 나타내었다. 유기층을 염수(50ml), 1N HCl(50ml), 염수(50ml)로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 건조물로 농축시켜 (S)-메틸 12-(2-(2,2-다이메틸-1,3-다이옥솔란-4-카복스아미도)에틸아미노)-12-옥소도데칸오에이트 170-5(5.93g, 99.3%)를 백색 고체로서 수득하였다.

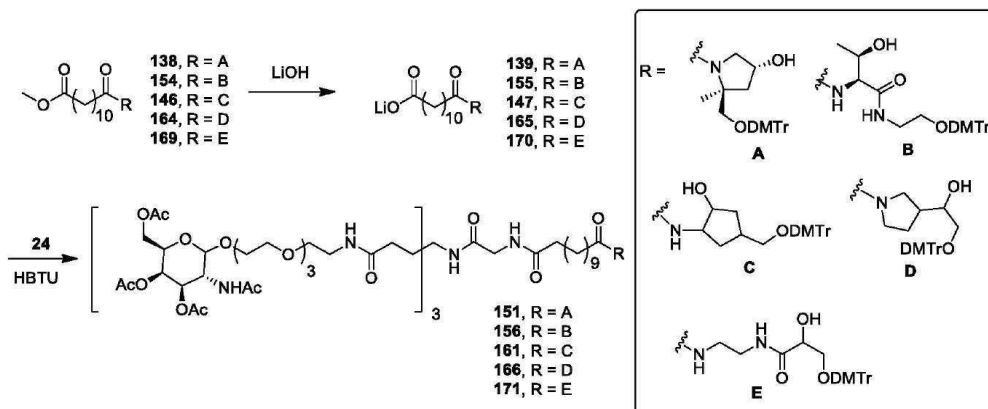
[0998] 단계 21. 화합물 170-6의 제조

[0999] (S)-메틸 12-(2-(2,2-다이메틸-1,3-다이옥솔란-4-카복스아미도)에틸아미노)-12-옥소도데칸오에이트 170-5(5.93g, 14.3mmol)의 용액에 진한 황산 1방울을 첨가하였다. 이것을 6hr 동안 환류시키고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. 고체를 여과를 통해서 수집하고, 차가운 메탄올로 2회 세척하였다. 고체를 공기 중에서 건조시켰다(3.32g). 모액체로부터 제2 크롭(0.42g)을 수득하여 (S)-메틸 12-(2-(2,3-다이하이드록시프로판아미도)에틸아미노)-12-옥소도데칸오에이트 170-6(총 3.74g, 69.4%)을 백색 결정으로서 수득하였다. LC-MS (ESI): *m/z*: 375(100), (M + H)⁺. ¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 7.79 (br, 2H), 5.49 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 4.66 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 3.83-3.88 (m, 1H), 3.55-3.61 (m, 4H), 3.41-3.47 (m, 1H), 3.05-3.15 (m, 4H), 2.29 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.03 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.42-1.52 (m, 4H), 1.18-1.29 (m, 12H).

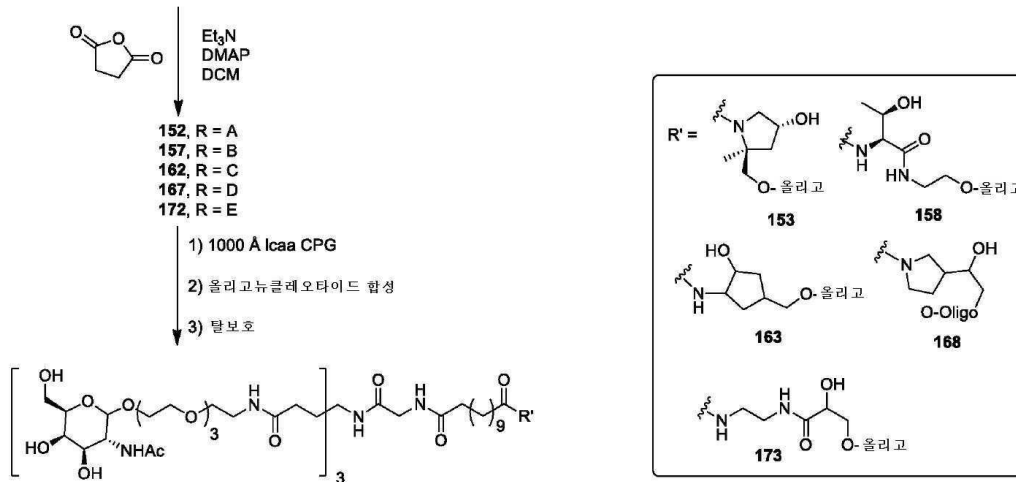
[1000] 단계 22. 화합물 170의 제조

[1001] 질소 하에서 무수 피리딘(57.5ml) 중의 (S)-메틸 12-(2-(2,3-다이하이드록시프로판아미도)에틸아미노)-12-옥소도데칸오에이트 170-6(2.99g, 7.99mmol)의 용액에 4,4'-다이메톡시트리틸 클로라이드(2.84g, 8.38mmol)를 한 번에 첨가하였다. 반응물을 실온에서 2일 동안 교반하였다. 메탄올(5ml)을 첨가하여 반응을 반응정지시켰다. 피리딘을 증발시켰다. 톨루엔을 첨가하고, 이어서 증발시켰다. 이것을 3회 반복하였다. 물(100ml)을 첨가하고, 이것을 에틸 아세테이트(5×250ml)로 추출하였다. 추출물을 합하고, MgSO₄ 상에서 건조시켰다. 용매의 증발, 그 다음 칼럼 크로마토그래피(1%메탄올/다이클로로메탄-3% 메탄올/다이클로로메탄)는 (S)-메틸 12-(2-(3-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)-2-하이드록시프로판아미도)-에틸아미노)-12-옥소도데칸오에이트 170(1.70g, 31.4%)을 점성 오일로서 제공하였다. ¹HNMR (400MHz, 아세톤-d₆, ppm): δ 7.64-7.70 (br, 1H), 7.47-7.51 (m, 2H), 7.33-7.37 (m, 4H), 7.26-7.32 (m, 2H), 7.20 (dt, J = 7.3, 2.1 Hz, 1H), 7.11 (br, 1H), 6.86 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 4.84 (br, 1H), 4.21 (dd, J = 5.1, 3.8 Hz, 1H), 3.78 (s, 6H), 3.60 (s, 1H), 3.25-3.42 (m, 6H), 2.28 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.48-1.62 (m, 4H), 1.21-1.34 (m, 12H).

[1002] 반응식 26.



[1003]



[1004]

[1005] 단계 23. 화합물 139, 155, 160, 165 및 170의 제조

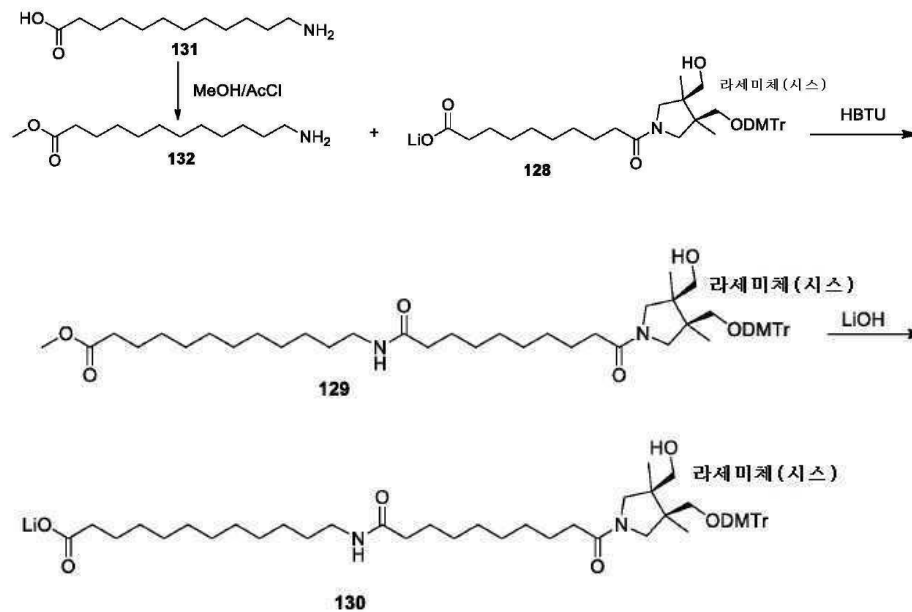
[1006] 화합물 18에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 138, 154, 159, 164 및 169로부터 화합물 139, 155, 160, 165 및 170을 제조하였다.

[1007] 단계 24. 접합체 153, 158, 163, 168 및 173의 제조

[1008] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 139, 154, 159, 164 및 169로부터 접합체 153, 158, 163, 168 및 173을 제조하였다.

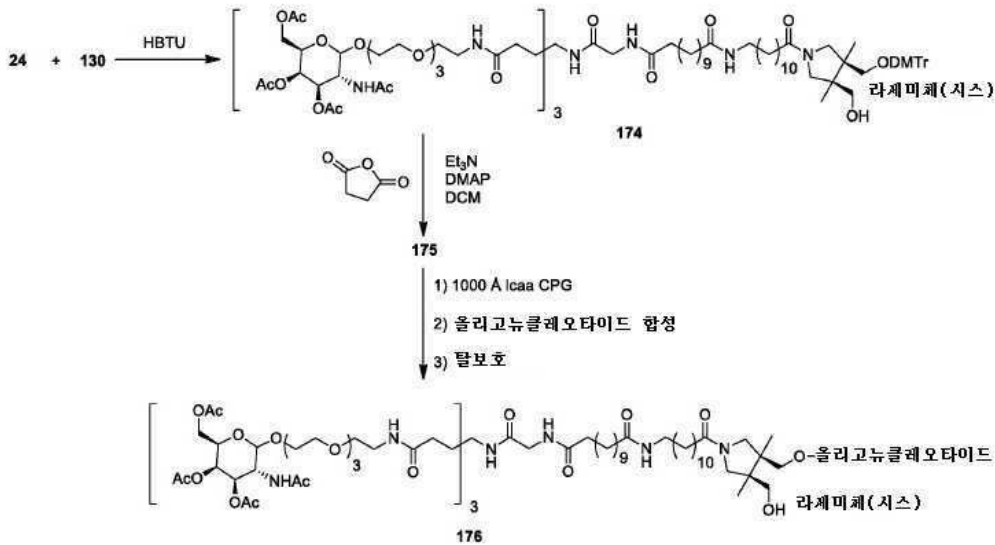
[1009] 실시예 12. 접합체 176의 합성

[1010] 반응식 27.



[1012]

[1013] 반응식 28.



[1014]

[1015] 단계. 1. 메틸 12-아미노도데칸오에이트 132의 제조

[1016] 12-아미노도데칸산(131)(10g, 4.64mmol)을 MeOH 중에서 RT에서 교반하였다. 아세트 클로라이드(856 μ l, 12mmol)를 적가하고, 반응물을 1.5hr 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에서 제거하고, 잔류물을 MTBE 중에 취하고, 냉장에서 밤새 급랭시켰다. 생성된 침전물을 여과에 의해서 수집하고, 얼음 냉각된 MTBE로 세척하고, 고 진공 하에서 건조시켜 메틸 12-아미노도데칸오에이트 132를 수득하였다.

[1017] 단계 2. 라세미체 (시스) 메틸 12-(12-(10-(3-((비스(4-메톡시페닐)-(페닐)메톡시)메틸)-4-(하이드록시메틸)-3,4-다이메틸피롤리딘-1-일)-10-옥소데칸아미도)도데칸아미도)도데칸오에이트 129의 제조

[1018] 리튬 라세미체 (시스) 10-(3-((비스(4-메톡시페닐)-(페닐)메톡시)메틸)-4-(하이드록시메틸)-3,4-다이메틸피롤리딘-1-일)-10-옥소데칸오에이트(128)(2g, 3.1mmol), 메틸 12-아미노도데칸오에이트(132)(778mg, 3.1mmol), HBTU(1.2g, 3.1mmol) 및 TEA(1.4ml, 10mmol)를 DCM 중에서 RT에서 O/N 동안 교반하였다. 침전물을 여과에 의해서 분리하고, 여과액 진공 하에서 농축시키고, 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(5% MeOH, DCM)에 의해서 정제시켰다. TLC는 동일한 질량을 갖는 2개의 유사한 전개 스팟을 나타내었고, 이것은 기하 이성질체로서 배정되었고, 이것을 함께 풀링시켜 메틸 12-(12-(10-((3R,4S)-3-((비스(4-메톡시페닐)-(페닐)메톡시)메틸)-4-(하이드록시메틸)-3,4-다이메틸피롤리딘-1-일)-10-옥소데칸아미도)도데칸아미도)도데칸오에이트(129)를 정량적 방식으로 제공하였다.

[1019] 단계 3. 라세미체 (시스) 리튬 12-(12-(10-(3-((비스(4-메톡시페닐)-(페닐)메톡시)메틸)-4-(하이드록시메틸)-3,4-다이메틸피롤리딘-1-일)-10-옥소데칸아미도)-도데칸아미도)도데칸오에이트 130의 제조

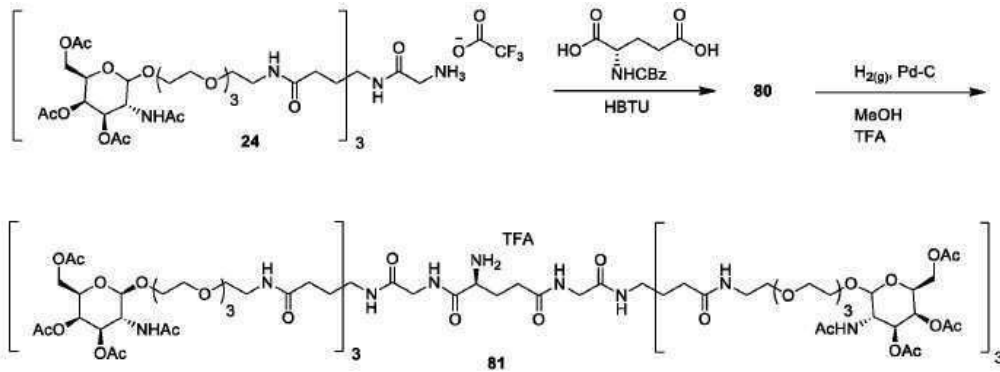
[1020] 라세미체 (시스) 메틸 12-(12-(10-(3-((비스(4-메톡시페닐)-(페닐)메톡시)메틸)-4-(하이드록시메틸)-3,4-다이메틸피롤리딘-1-일)-10-옥소데칸아미도)도데칸아미도)도데칸오에이트(129)(3.1mmol)를 THF:H₂O(50:50) 중에서 LiOH(88mg, 3.7mmol)와 함께 RT에서 O/N 동안 교반하였다. 반응물은 TLC에 의해서 확인하였고, THF를 진공 하에서 제거하였다. 수성 용액을 액체 N₂ 중에서 동결시키고, 48시간 동안 동결건조시켜 라세미체 (시스) 리튬 12-(12-(10-(3-((비스(4-메톡시페닐)-(페닐)메톡시)메틸)-4-(하이드록시메틸)-3,4-다이메틸피롤리딘-1-일)-10-옥소데칸아미도)-도데칸아미도)도데칸오에이트 130을 정량적으로 제공하였다.

[1021] 단계 4. 접합체 176의 제조

[1022] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 24 및 130으로부터 접합체 176을 제조하였다.

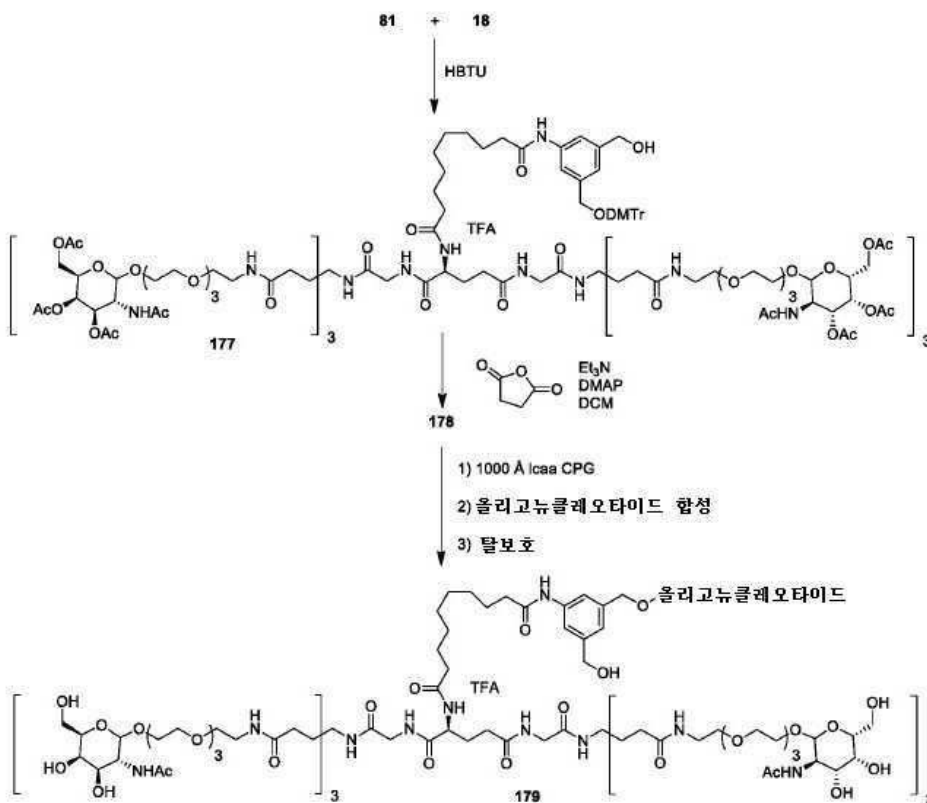
[1023] 실시예 13. 접합체 179의 합성

[1024] 반응식 29.



[1025]

[1026] 반응식 30.



[1027]

[1028] 단계 1. 화합물 80의 제조

[1029] 화합물 24(2g, 0.86mmol), N-카보벤즈옥시-L-글루탐산(120mg, 0.43mmol), HBTU(326mg, 0.86mmol) 및 TEA(353 μ l, 2.6mmol)를 DCM 중에서 RT에서 O/N 동안 교반하였다. 혼합물을 진공 하에서 농축시키고, 칼럼 크로마토그래피에 의해서 정제시켜 화합물 80(2.88g, 83%)을 제공하였다.

[1030] 단계 2. 화합물 81의 제조

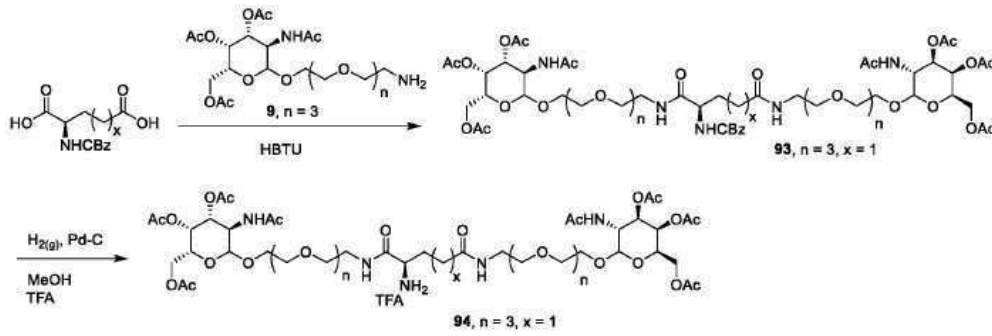
[1031] 화합물 14에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 80(670mg, 0.17mmol)으로부터 화합물 81을 제조하였다. 화합물을 후속 반응에서 조물질로서 사용하였고, 수율은 정량적이었다.

[1032] 단계 3. 접합체 179의 제조

[1033] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 18 및 81로부터 접합체 179를 제조하였다.

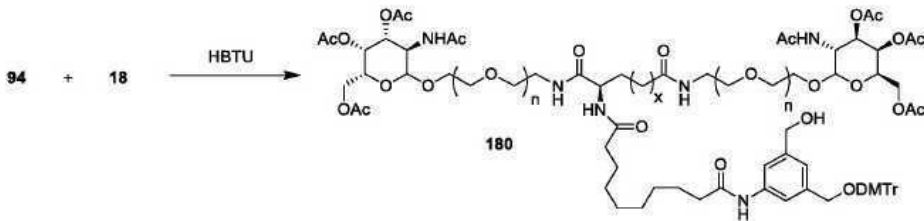
[1034] 실시예 14. 접합체 182의 합성

[1035] 반응식 31.

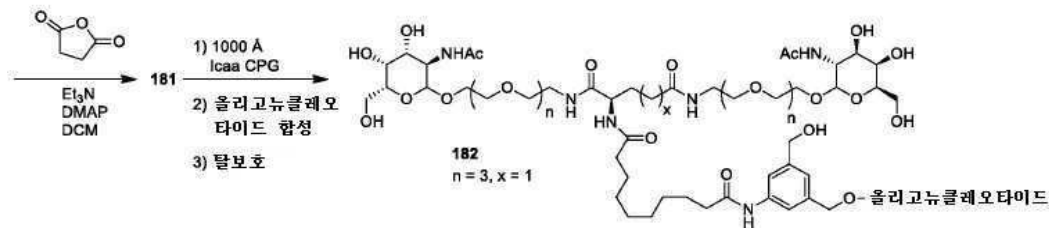


[1036]

[1037] 반응식 32.



[1038]



[1039]

[1040] 단계 1. 화합물 93의 제조

[1041] 화합물 89에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 (2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)-D-글루탐산(2.25g, 8.1mmol) 및 9(13g, 21mmol)로부터 화합물 93을 제조하였다. 수율: 11.2g.

[1042] 단계 2. 화합물 94의 제조

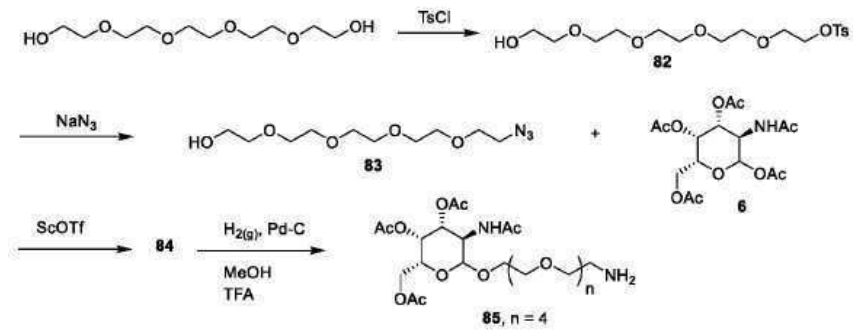
[1043] 화합물 90에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 93(11.1g)으로부터 화합물 94를 제조하였다. 수율: 10.2g.

[1044] 단계 3. 접합체 182의 제조

[1045] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 18 및 94로부터 접합체 182를 제조하였다.

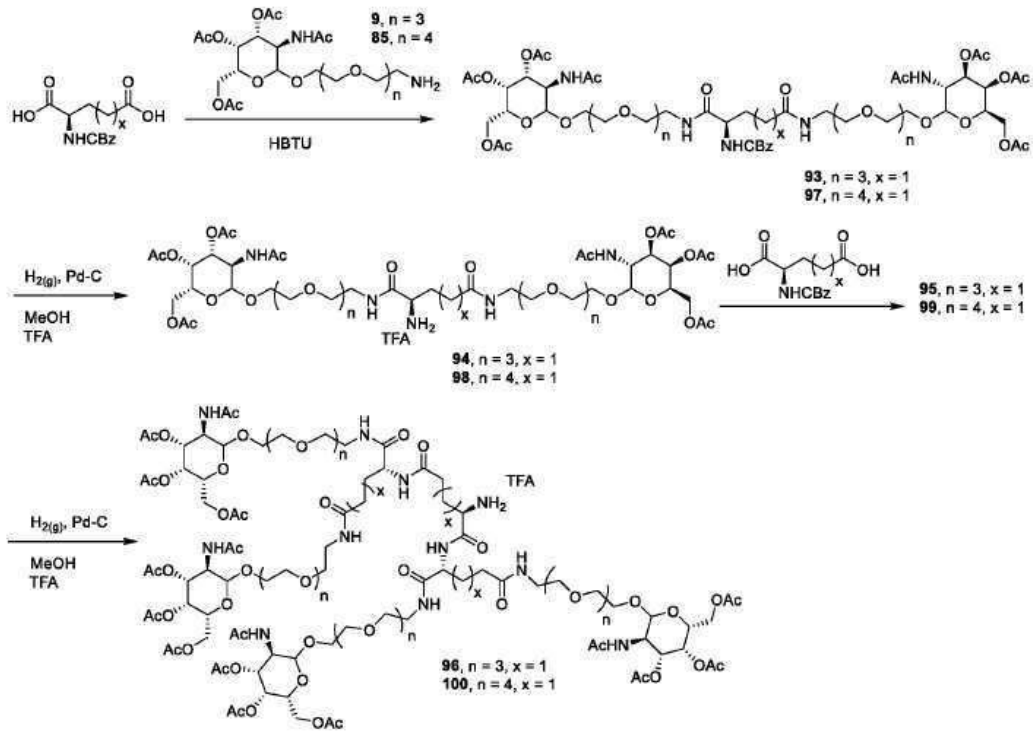
[1046] 실시예 15. 접합체 185 및 188의 합성

[1047] 반응식 33.



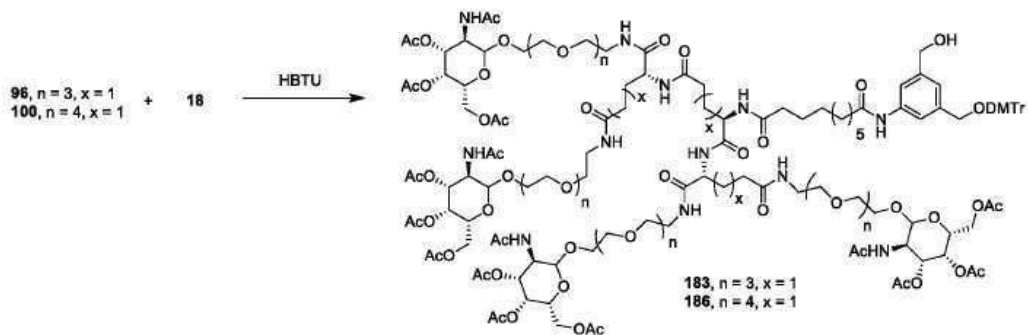
[1048]

[1049] 반응식 34.

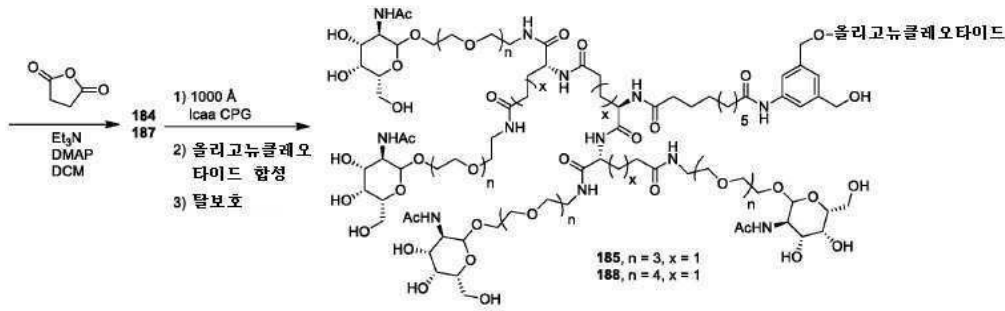


[1050]

[1051] 반응식 35.



[1052]



[1053]

[1054] 단계 1. 14-하이드록시-3,6,9,12-테트라옥사테트라데실 4-메틸벤젠설포네이트 82의 제조

[1055] CH₂Cl₂(600ml) 중의 펜타틸렌 글리콜(35g, 147mmol), TEA(41ml, 294mmol) 및 트라이메틸아민-HCl(1.4g, 14.7mmol)의 용액을 토실 클로라이드(29.4g, 154mmol)로 처리하였다. 교반 후(18h) 반응 혼합물을 H₂O-염수(1:1)로 세척하고, 건조시키고(MgSO₄), 여과시키고, 농축시키고, 크로마토그래피에 적용시켜 82(24.6g, 43%)를 연한 황색 오일로서 수득하였다. Rf 0.8 (10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

[1056] 단계 2. 14-아자이드-3,6,9,12-테트라옥사테트라데칸-1-올 83

[1057] 화합물 4에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 82(24.6g, 62.7mmol) 및 소듐 아자이드(7.13g, 110mmol)로부터 14-아자이드-3,6,9,12-테트라옥사테트라데칸-1-올(83)을 제조하였다. 수율: 14.8g, 90%.

[1058] 단계 3. 화합물 84의 제조

[1059] 1,2-다이클로로에탄(150ml) 중의 GalNAc 6(12.2g, 31.4mmol) 및 HO-PEG-N₃ 83(9.2g, 35mmol)의 용액을 Sc(OTf)₃(771mg, 1.6mmol)로 처리하였다. 교반 후(85°C, 2hr) 반응물을 냉각시키고(RT), TEA(40ml)의 첨가에 의해서 반응정지시키고, 농축시켰다. 조물질을 크로마토그래피에 적용시켜 84(11.16g, 60%)를 연한 황색 발포체로서 수득하였다. Rf 0.7 (10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

[1060] 단계 4. 화합물 85의 제조

[1061] EtOAc(120ml) 중의 84(11.16g, 18.8mmol) 및 Pd/C(1.1g, 10% - 습식 지지체)의 용액을 TFA(4.32ml, 56.5mmol)로 처리하고, H₂로 퍼징시켰다. 격렬하게 교반한 후(4.5h), 반응물을 N₂로 퍼징시키고, 셀라이트를 통해서 여과시키고, 농축시켰다. 조물질을 크로마토그래피에 적용시켜 85(5.77g, 45%)를 무색 발포체로서 수득하였다. Rf 0.5(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

[1062] 단계 5. 화합물 95의 제조

[1063] 화합물 91에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 (2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)-D-글루탐산(1.04g, 3.7mmol) 및 화합물 94(10.2g)로부터 화합물 95를 제조하였다. 수율: 7.2g.

[1064] 단계 6. 화합물 96의 제조

[1065] 화합물 92에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 95(11.1g)로부터 화합물 96을 제조하였다. 수율: 6.5g.

[1066] 단계 7. 화합물 97의 제조

[1067] 화합물 89에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 (2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)-D-글루탐산(2g, 7.1mmol) 및 85(12.1g, 17.8mmol)로부터 화합물 97을 제조하였다. 수율: 10g, 정량적.

[1068] 단계 8. 화합물 98의 제조

[1069] 화합물 90에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 97(10g, 7.2mmol)로부터 화합물 98을 제조하였다. 수율: 3.5g, 36%.

[1070] 단계 9. 화합물 99의 제조

[1071] 화합물 91에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 (2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)-D-글루탐산(350mg, 1.25mmol) 및 화합물 98(2.86mg, 2.5mmol)로부터 화합물 99를 정량적으로 제조하였다.

[1072] 단계 10. 화합물 100의 제조

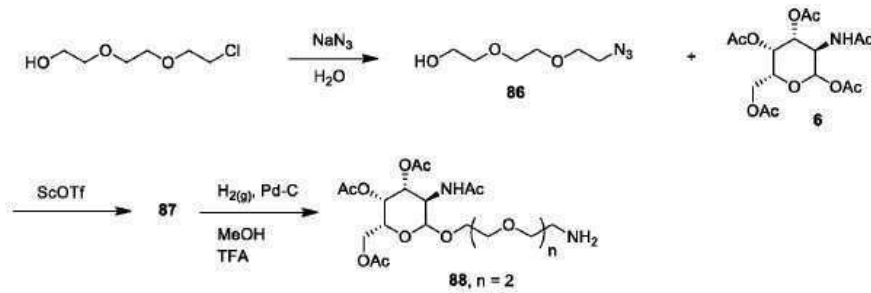
[1073] 화합물 92에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 99(3.2g, 1.25mmol)로부터 화합물 100을 정량적으로 제조하였다.

[1074] 단계 11. 접합체 185 및 188의 제조

[1075] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 18 및 96 또는 18 및 100으로부터 접합체 185 및 188을 제조하였다.

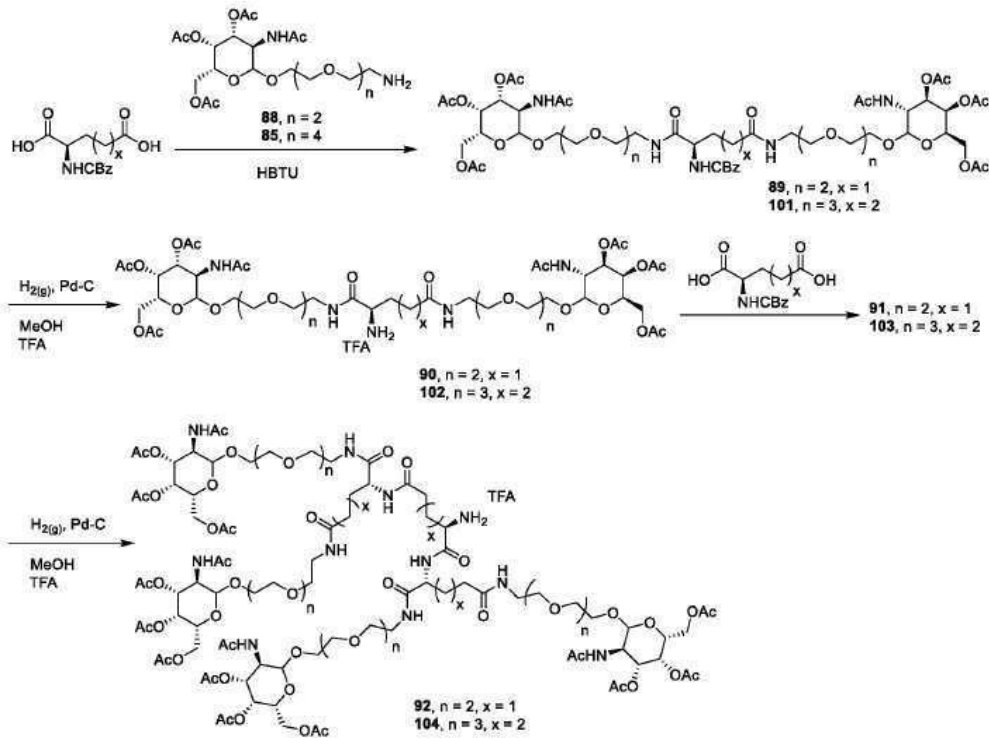
[1076] 실시예 16. 접합체 191, 194, 197 및 200의 합성

[1077] 반응식 36



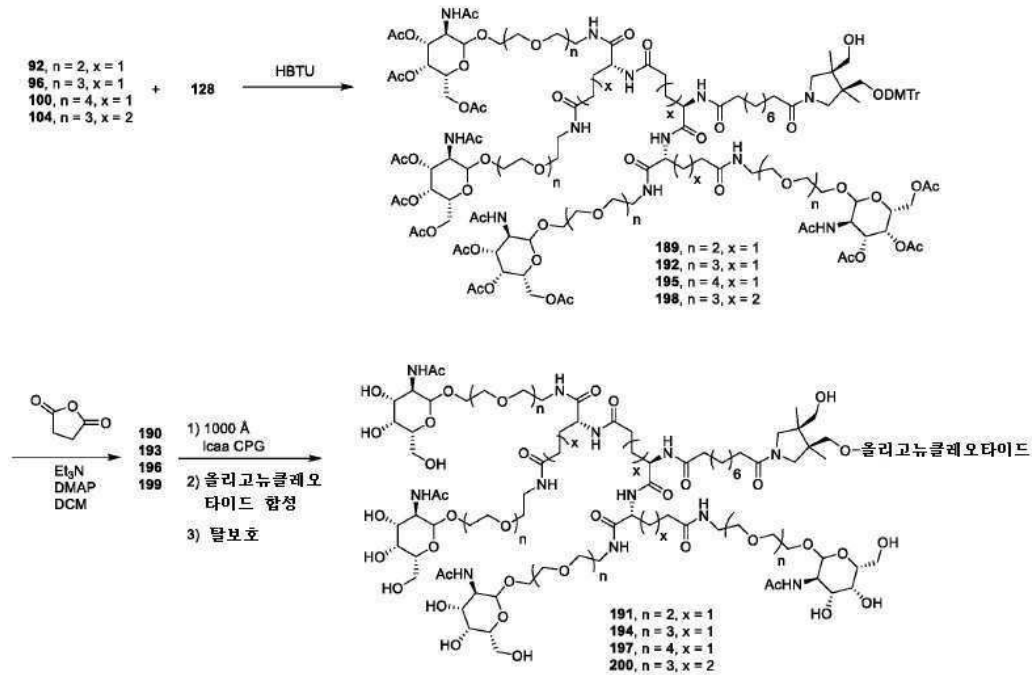
[1078]

[1079] 반응식 37.



[1080]

[1081] 반응식 38.



[1082]

[1083] 단계 1. 2-(2-(2-아자이도에톡시)에톡시)에탄-1-올 86의 제조

[1084] 물(200ml) 중의 2-(2-(2-클로로에톡시)에톡시)에탄-1-올(13g, 77mmol)의 용액에 소듐 아자이드(10g, 154mmol)를 첨가한다. 반응물을 100℃까지 18시간 가열하였다. 반응물을 실온까지 냉각시키고, 1ℓ 분리 깔때기에 붓고, 다이클로로메탄(3×200ml)으로 추출한다. 합한 다이클로로메탄 추출물을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 건조물로 농축시켜 2-(2-(2-아자이도에톡시)에톡시)에탄-1-올을 무색 오일로서 수득한다(11.7g).

[1085] 단계 2. 화합물 87의 제조

[1086] 화합물 84에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 86(4.95g, 28.3mmol) 및 6(10g, 25.7mmol)으로부터 화합물 87을 제조한다. 수율: 10g, 77%.

[1087] 단계 3. 화합물 88의 제조

[1088] 화합물 85에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 87(10g, 19.8mmol)로부터 화합물 88을 제조하였다. 수율: 7.63g, 65%.

[1089] 단계 4. 화합물 89의 제조

[1090] CH₂Cl₂(50ml) 중의 88(2g, 3.38mmol) 및 Z-글루탐산(427mg, 1.52mmol)의 용액을 HBTU(1.41g, 3.7mmol) 및 휴닉 염기(1.77ml, 10.1mmol)로 처리한다. 교반 후(18h), 혼합물을 농축시키고, 크로마토그래피에 적용시켜 89(871mg, 48%)를 무색 발포체로서 수득한다. Rf 0.5(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

[1091] 단계 5. 화합물 90의 제조

[1092] EtOAc(10ml) 중의 89(870mg, 0.72mmol) 및 Pd/C(90mg, 10% - 습식 지지체)의 용액을 TFA(84μl, 1.1mmol)로 처리하고, H₂로 퍼징시킨다. 격렬하게 교반한 후(2h), 반응물을 N₂로 퍼징시키고, 셀라이트를 통해서 여과시키고, 농축시킨다. 조물질을 추가로 가공하지 않고 사용하고, 90(850mg, 정량적)을 무색 발포체로서 수득한다. Rf 0.25(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

[1093] 단계 6. 화합물 91의 제조

[1094] CH₂Cl₂(10ml) 중의 90(850mg, 0.72mmol) 및 Z-글루탐산(91mg, 0.32mmol)의 용액을 HBTU(300mg, 0.79mmol) 및 휴닉 염기(502μl, 2.9mmol)로 처리한다. 교반 후(1.5h), 혼합물을 CH₂Cl₂로 희석시키고, NaHCO₃(Sat. Aq.)로 세척하고, 건조시키고(MgSO₄), 여과 및 농축시킨다. 조물질을 크로마토그래피에 적용시켜 91(590mg, 76%)을 무

색 발포체로서 수득한다. Rf 0.5(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

[1095] **단계 7. 화합물 92의 제조**

[1096] CH₃OH(30ml) 중의 **91**(590mg, 0.25mmol) 및 Pd/C(100mg, 10% - 습식 지지체)의 용액을 TFA(29μl, 0.37mmol)로 처리하고, H₂로 퍼징시킨다. 교반한 후(3h), 혼합물을 N₂로 퍼징시키고, 이어서 셀라이트를 통해서 여과시키고, 농축시킨다. 조물질을 추가로 가공하지 않고 사용하고, **92**(600mg, 정량적)을 무색 발포체로서 수득한다. Rf 0.1(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

[1097] **단계 8. 화합물 101의 제조**

[1098] 화합물 **89**에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 (R)-2-((2-옥소-2-페닐-112-에틸)아미노)헥산다이산(2.51g, 8.6mmol) 및 **9**(11g, 17.2mmol)로부터 화합물 **101**을 제조한다. 수율: 4.2g, 37%.

[1099] **단계 9. 화합물 102의 제조**

[1100] 화합물 **90**에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 **101**(4.2g, 3.2mmol)로부터 화합물 **102**를 제조한다. 수율: 2.1g, 47%.

[1101] **단계 10. 화합물 103의 제조**

[1102] 화합물 **91**에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 (R)-2-((2-옥소-2-페닐-112-에틸)아미노)헥산다이산(265mg, 0.9mmol) 및 화합물 **102**(2.1g, 1.8mmol)로부터 화합물 **103**을 제조한다. 수율: (560mg, 24%).

[1103] **단계 11. 화합물 104의 제조**

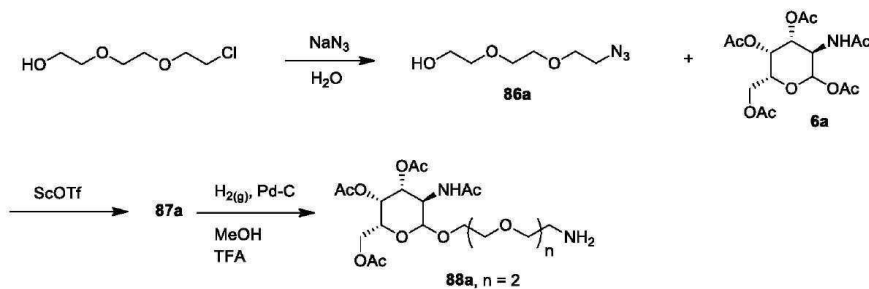
[1104] 화합물 **92**에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 **103**(560 mg)으로부터 화합물 **104**를 정량적으로 제조한다. 화합물을 정제하지 않고 사용한다.

[1105] **단계 12. 접합체 191, 194 및 197의 제조**

[1106] 화합물 **1**에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 **128** 및 **92**, **96**, 및 **100**으로부터 접합체 **191**, **194** 및 **197**을 제조하였다.

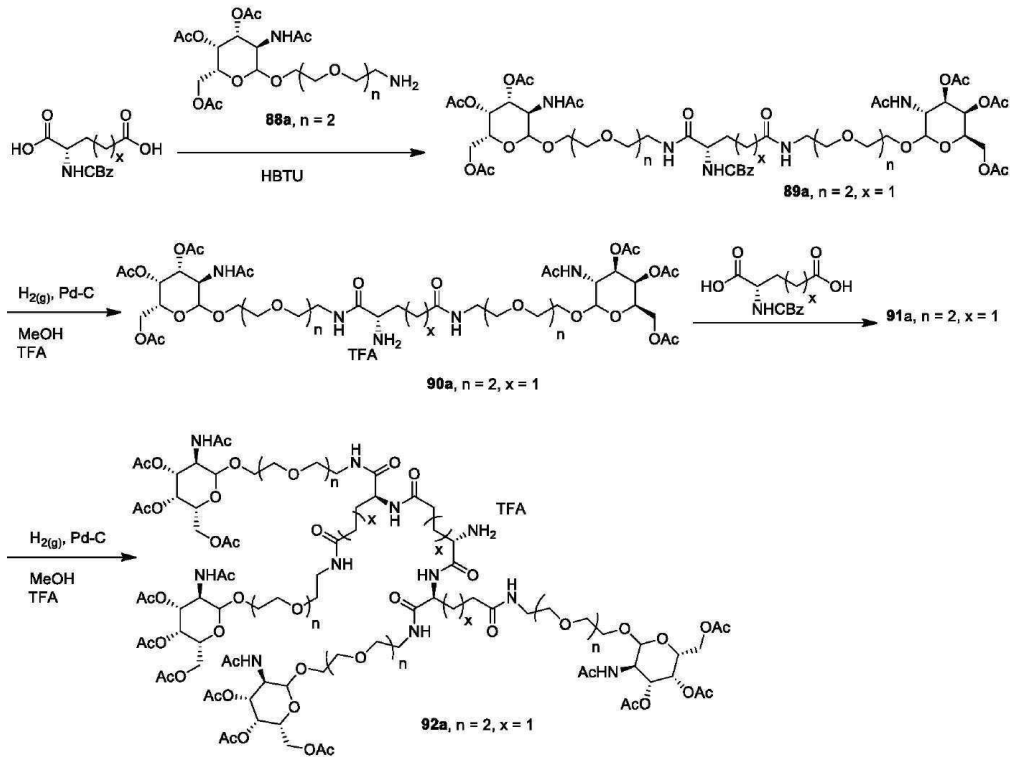
[1107] **실시예 16a. 접합체 191a의 합성**

[1108] **반응식 36a**



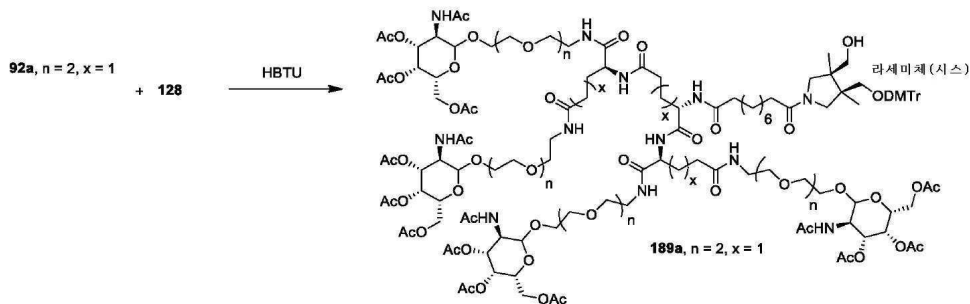
[1109]

[1110] 반응식 37a.

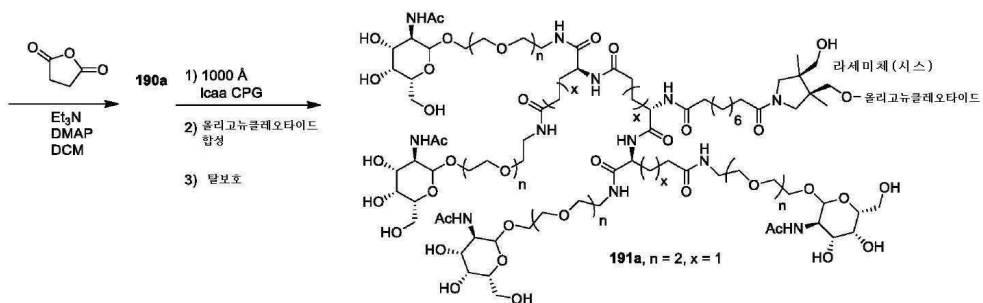


[1111]

[1112] 반응식 38a.



[1113]



[1114]

[1115] 단계 1. 2-(2-(2-아자이드에톡시)에톡시)에탄-1-올 86a의 제조

[1116] 물(200ml) 중의 2-(2-(2-클로로에톡시)에톡시)에탄-1-올(13g, 77mmol)의 용액에 소듐 아자이드(10g, 154mmol)를 첨가하였다. 반응물을 100℃까지 18시간 가열하였다. 반응물을 실온까지 냉각시키고, 1ℓ 분리 깔때기에 붓고, 다이클로로메탄(3×200ml)으로 추출하였다. 합한 다이클로로메탄 추출물을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 건조물로 농축시켜 2-(2-(2-아자이드에톡시)에톡시)에탄-1-올을 무색 오일로서 수득하였다(11.7g).

[1117] 단계 2. 화합물 87a의 제조

[1118] 화합물 84에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 86a(4.95g, 28.3mmol) 및 6a(10g, 25.7mmol)로부터 화합물 87a를 제조하였다. 수율: 10g, 77%.

[1119] **단계 3. 화합물 88a의 제조**

[1120] 화합물 85에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 87a(10g, 19.8mmol)로부터 화합물 88a를 제조하였다. 수율: 7.63g, 65%.

[1121] **단계 4. 화합물 89a의 제조**

[1122] CH₂Cl₂(50ml) 중의 88a(2g, 3.38mmol) 및 Z-L-글루탐산(427mg, 1.52mmol)의 용액을 HBTU(1.41g, 3.7mmol) 및 휴닉 염기(1.77ml, 10.1mmol)로 처리하였다. 교반 후(18h), 혼합물을 농축시키고, 크로마토그래피에 적용시켜 89a(871mg, 48%)를 무색 발포체로서 수득하였다. Rf 0.5(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

[1123] **단계 5. 화합물 90a의 제조**

[1124] EtOAc(10ml) 중의 89a(870mg, 0.72mmol) 및 Pd/C(90mg, 10% - 습식 지지체)의 용액을 TFA(84μl, 1.1mmol)로 처리하고, H₂로 퍼징시켰다. 격렬하게 교반한 후(2h), 반응물을 N₂로 퍼징시키고, 셀라이트를 통해서 여과시키고, 농축시켰다. 조물질을 추가로 가공하지 않고 사용하였고, 90a(850mg, 정량적)를 무색 발포체로서 수득하였다. Rf 0.25(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

[1125] **단계 6. 화합물 91a의 제조**

[1126] CH₂Cl₂(10ml) 중의 90a(850mg, 0.72mmol) 및 Z-글루탐산(91mg, 0.32mmol)의 용액을 HBTU(300mg, 0.79mmol) 및 휴닉 염기(502μl, 2.9mmol)로 처리하였다. 교반 후(1.5h), 혼합물을 CH₂Cl₂로 희석시키고, NaHCO₃(Sat. Aq.)로 세척하고, 건조시키고(MgSO₄), 여과 및 농축시켰다. 조물질을 크로마토그래피에 적용시켜 91a(590mg, 76%)를 무색 발포체로서 수득하였다. Rf 0.5(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

[1127] **단계 7. 화합물 92a의 제조**

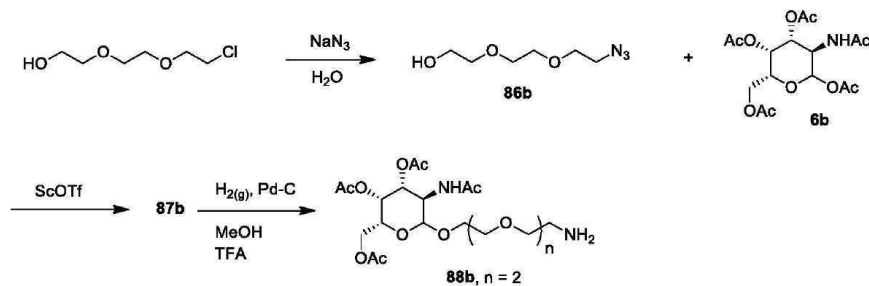
[1128] CH₃OH(30ml) 중의 91a(590mg, 0.25mmol) 및 Pd/C(100mg, 10% - 습식 지지체)의 용액을 TFA(29μl, 0.37mmol)로 처리하고, H₂로 퍼징시켰다. 교반한 후(3h), 혼합물을 N₂로 퍼징시키고, 이어서 셀라이트를 통해서 여과시키고, 농축시켰다. 조물질을 추가로 가공하지 않고 사용하였고, 92a(600mg, 정량적)를 무색 발포체로서 수득하였다. Rf 0.1(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

[1129] **단계 8. 접합체 191a의 제조,**

[1130] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 128 및 화합물 92a로부터 접합체 191a를 제조하였다.

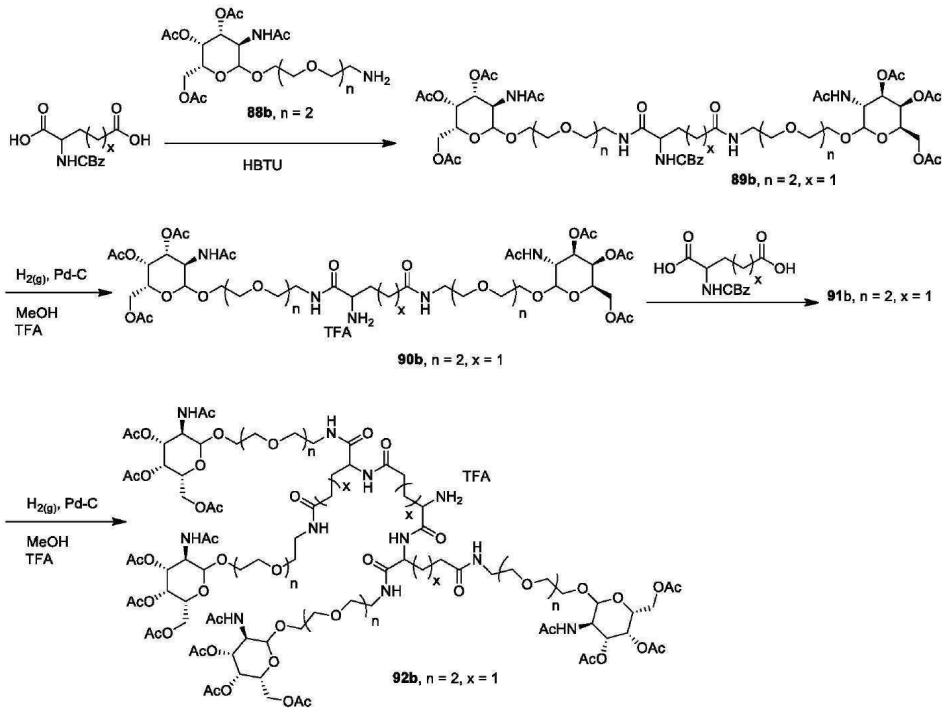
[1131] **실시예 16b. 접합체 191b의 합성**

[1132] **반응식 36b**



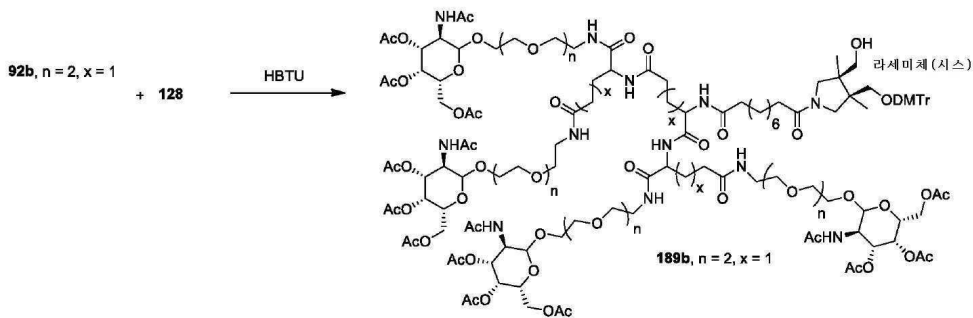
[1133]

[1134] 반응식 37b.

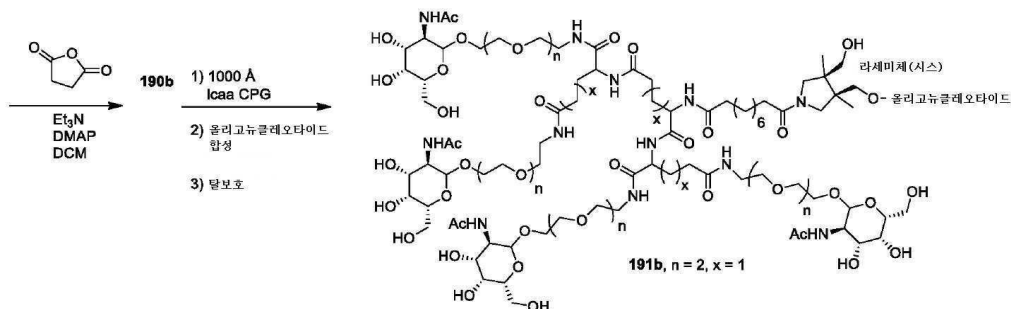


[1135]

[1136] 반응식 38b.



[1137]



[1138]

[1139] 단계 1. 2-(2-(2-아자이도에톡시)에톡시)에탄-1-올 86b의 제조

[1140] 물(200ml) 중의 2-(2-(2-클로로에톡시)에톡시)에탄-1-올(13g, 77mmol)의 용액에 소듐 아자이드(10g, 154mmol)를 첨가한다. 반응물을 100°C까지 18시간 가열하였다. 반응물을 실온까지 냉각시키고, 1 l 분리 깔때기에 붓고, 다이클로로메탄(3×200ml)으로 추출하였다. 합한 다이클로로메탄 추출물을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 건조물로 농축시켜 2-(2-(2-아자이도에톡시)에톡시)에탄-1-올을 무색 오일로서 수득하였다(11.7g).

[1141] 단계 2. 화합물 87b의 제조

[1142] 화합물 84에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 86b(4.95g, 28.3mmol) 및 6b(10g, 25.7mmol)로부터 화합물 87a를 제조한다. 수율: 10g, 77%.

[1143] **단계 3. 화합물 88b의 제조**

[1144] 화합물 85에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 87b(10g, 19.8mmol)로부터 화합물 88a를 제조한다. 수율: 7.63g, 65%.

[1145] **단계 4. 화합물 89b의 제조**

[1146] CH₂Cl₂(50ml) 중의 88b(2g, 3.38mmol) 및 라세미체 Z-글루탐산(427mg, 1.52mmol)의 용액을 HBTU(1.41g, 3.7mmol) 및 휴닉 염기(1.77ml, 10.1mmol)로 처리한다. 교반 후(18h), 혼합물을 농축시키고, 크로마토그래피에 적용시켜 89b(871mg, 48%)를 무색 발포체로서 수득하였다. Rf 0.5(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

[1147] **단계 5. 화합물 90b의 제조**

[1148] EtOAc(10ml) 중의 89b(870mg, 0.72mmol) 및 Pd/C(90mg, 10% - 습식 지지체)의 용액을 TFA(84μl, 1.1mmol)로 처리하고, H₂로 퍼징시킨다. 격렬하게 교반한 후(2h), 반응물을 N₂로 퍼징시키고, 셀라이트를 통해서 여과시키고, 농축시킨다. 조물질을 추가로 가공하지 않고 사용하고, 90b(850mg, 정량적)를 무색 발포체로서 수득한다. Rf 0.25(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

[1149] **단계 6. 화합물 91b의 제조**

[1150] CH₂Cl₂(10ml) 중의 90b(850mg, 0.72mmol) 및 Z-글루탐산(91mg, 0.32mmol)의 용액을 HBTU(300mg, 0.79mmol) 및 휴닉 염기(502μl, 2.9mmol)로 처리한다. 교반 후(1.5h), 혼합물을 CH₂Cl₂로 희석시키고, NaHCO₃(Sat. Aq.)로 세척하고, 건조시키고(MgSO₄), 여과 및 농축시킨다. 조물질을 크로마토그래피에 적용시켜 91b(590mg, 76%)를 무색 발포체로서 수득한다. Rf 0.5(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

[1151] **단계 7. 화합물 92b의 제조**

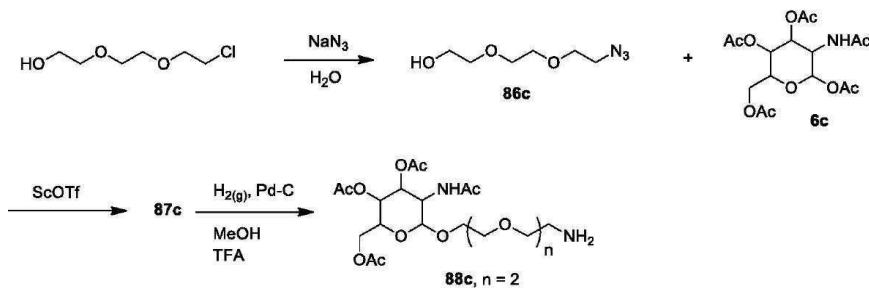
[1152] CH₃OH(30ml) 중의 91b(590mg, 0.25mmol) 및 Pd/C(100mg, 10% - 습식 지지체)의 용액을 TFA(29μl, 0.37mmol)로 처리하고, H₂로 퍼징시킨다. 교반한 후(3h), 혼합물을 N₂로 퍼징시키고, 이어서 셀라이트를 통해서 여과시키고, 농축시킨다. 조물질을 추가로 가공하지 않고 사용하고, 92b(600mg, 정량적)를 무색 발포체로서 수득한다. Rf 0.1(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

[1153] **단계 8. 접합체 191b의 제조**

[1154] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 128 및 화합물 92b로부터 접합체 191b를 제조한다.

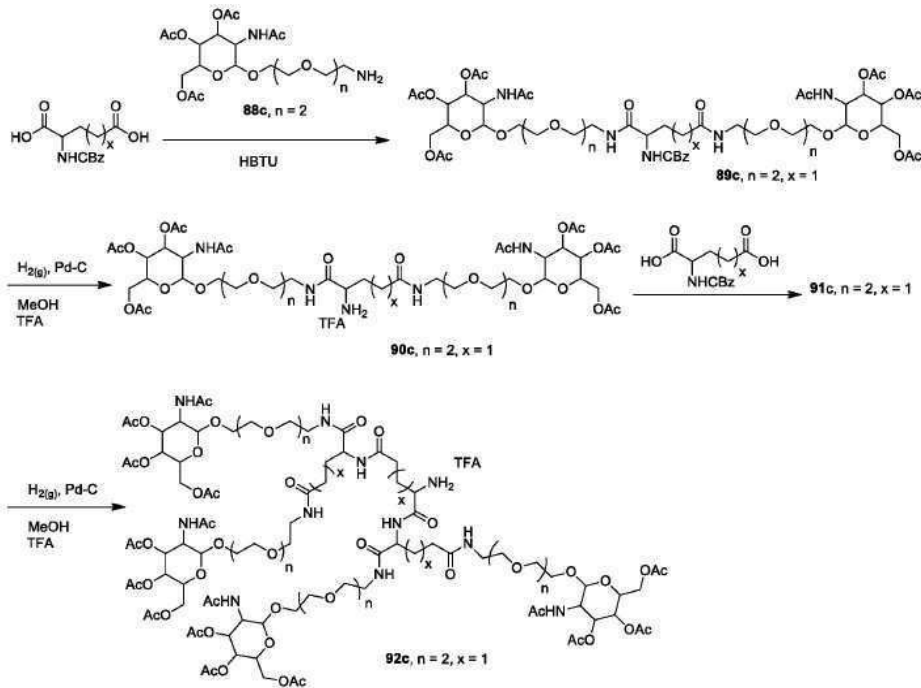
[1155] **실시예 16c. 접합체 191c의 합성**

[1156] **반응식 36c**



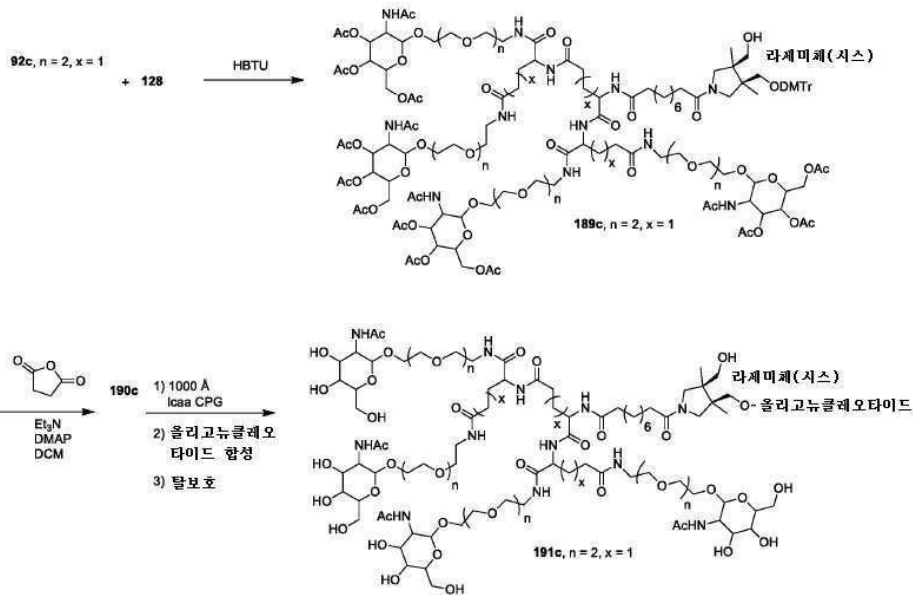
[1157]

[1158] 반응식 37c.



[1159]

[1160] 반응식 38c.



[1161]

[1162] 단계 1. 2-(2-(2-아자이드에톡시)에톡시)에탄-1-올 86c의 제조

[1163] 물(200ml) 중의 2-(2-(2-클로로에톡시)에톡시)에탄-1-올(13g, 77mmol)의 용액에 소듐 아자이드(10g, 154mmol)를 첨가한다. 반응물을 100℃까지 18시간 가열하였다. 반응물을 실온까지 냉각시키고, 1 l 분리 깔때기에 붓고, 다이클로로메탄(3×200ml)으로 추출하였다. 합한 다이클로로메탄 추출물을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 건조물로 농축시켜 2-(2-(2-아자이드에톡시)에톡시)에탄-1-올을 무색 오일로서 수득하였다(11.7g).

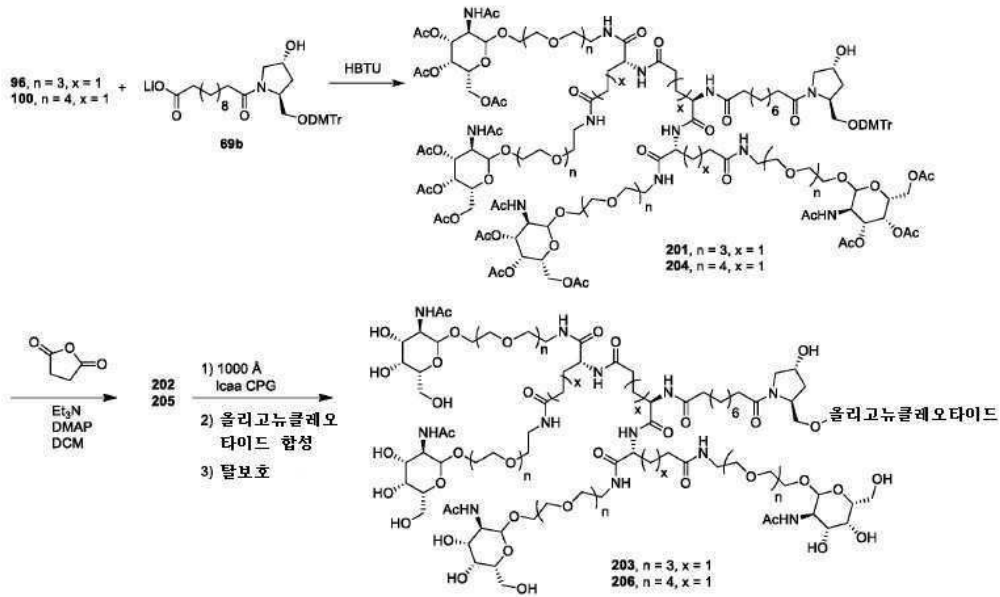
[1164] 단계 2. 화합물 87c의 제조

[1165] 화합물 84에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 86c(4.95g, 28.3mmol) 및 6c(10g, 25.7mmol)로부터 화합물 87c를 제조한다. 수율: 10g, 77%.

[1166] 단계 3. 화합물 88c의 제조

- [1167] 화합물 85에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 87c(10g, 19.8mmol)로부터 화합물 88c를 제조한다. 수율: 7.63g, 65%.
- [1168] **단계 4. 화합물 89c의 제조**
- [1169] CH₂Cl₂(50ml) 중의 88c(2g, 3.38mmol) 및 라세미체 Z-글루탐산(427mg, 1.52mmol)의 용액을 HBTU(1.41g, 3.7mmol) 및 휴닉 염기(1.77ml, 10.1mmol)로 처리한다. 교반 후(18h), 혼합물을 농축시키고, 크로마토그래피에 적용시켜 89c(871mg, 48%)를 무색 발포체로서 수득하였다. Rf 0.5(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).
- [1170] **단계 5. 화합물 90c의 제조**
- [1171] EtOAc(10ml) 중의 89c(870mg, 0.72mmol) 및 Pd/C(90mg, 10% - 습식 지지체)의 용액을 TFA(84μl, 1.1mmol)로 처리하고, H₂로 퍼징시킨다. 격렬하게 교반한 후(2h), 반응물을 N₂로 퍼징시키고, 셀라이트를 통해서 여과시키고, 농축시킨다. 조물질을 추가로 가공하지 않고 사용하고, 90c(850mg, 정량적)를 무색 발포체로서 수득한다. Rf 0.25(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).
- [1172] **단계 6. 화합물 91c의 제조**
- [1173] CH₂Cl₂(10ml) 중의 90c(850mg, 0.72mmol) 및 Z-글루탐산(91mg, 0.32mmol)의 용액을 HBTU(300mg, 0.79mmol) 및 휴닉 염기(502μl, 2.9mmol)로 처리한다. 교반 후(1.5h), 혼합물을 CH₂Cl₂로 희석시키고, NaHCO₃(Sat. Aq.)로 세척하고, 건조시키고(MgSO₄), 여과 및 농축시킨다. 조물질을 크로마토그래피에 적용시켜 91c(590mg, 76%)를 무색 발포체로서 수득한다. Rf 0.5(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).
- [1174] **단계 7. 화합물 92c의 제조**
- [1175] CH₃OH(30ml) 중의 91c(590mg, 0.25mmol) 및 Pd/C(100mg, 10% - 습식 지지체)의 용액을 TFA(29μl, 0.37mmol)로 처리하고, H₂로 퍼징시킨다. 교반한 후(3h), 혼합물을 N₂로 퍼징시키고, 이어서 셀라이트를 통해서 여과시키고, 농축시킨다. 조물질을 추가로 가공하지 않고 사용하고, 92c(600mg, 정량적)를 무색 발포체로서 수득한다. Rf 0.1(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).
- [1176] **단계 8. 접합체 191c의 제조**
- [1177] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 128 및 화합물 92c로부터 접합체 191c를 제조한다.
- [1178] **실시예 17. 접합체 203 및 206의 합성**

[1179] 반응식 39.



[1180]

[1181] 단계 1. 화합물 69b의 제조

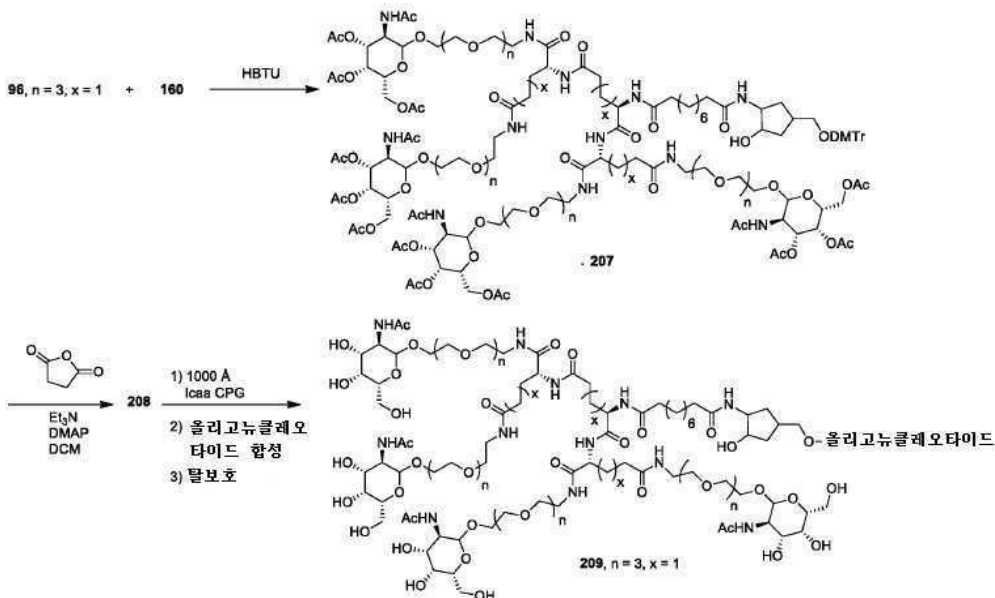
[1182] 화합물 69에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 (2S,4R)-4-하이드록시피롤리딘-2-카복실산으로부터 화합물 69b를 제조하였다.

[1183] 단계 2. 접합체 203 및 206의 제조

[1184] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 96 및 100으로부터 접합체 203 및 206을 제조하였다.

[1185] 실시예 18. 접합체 209의 합성

[1186] 반응식 40.



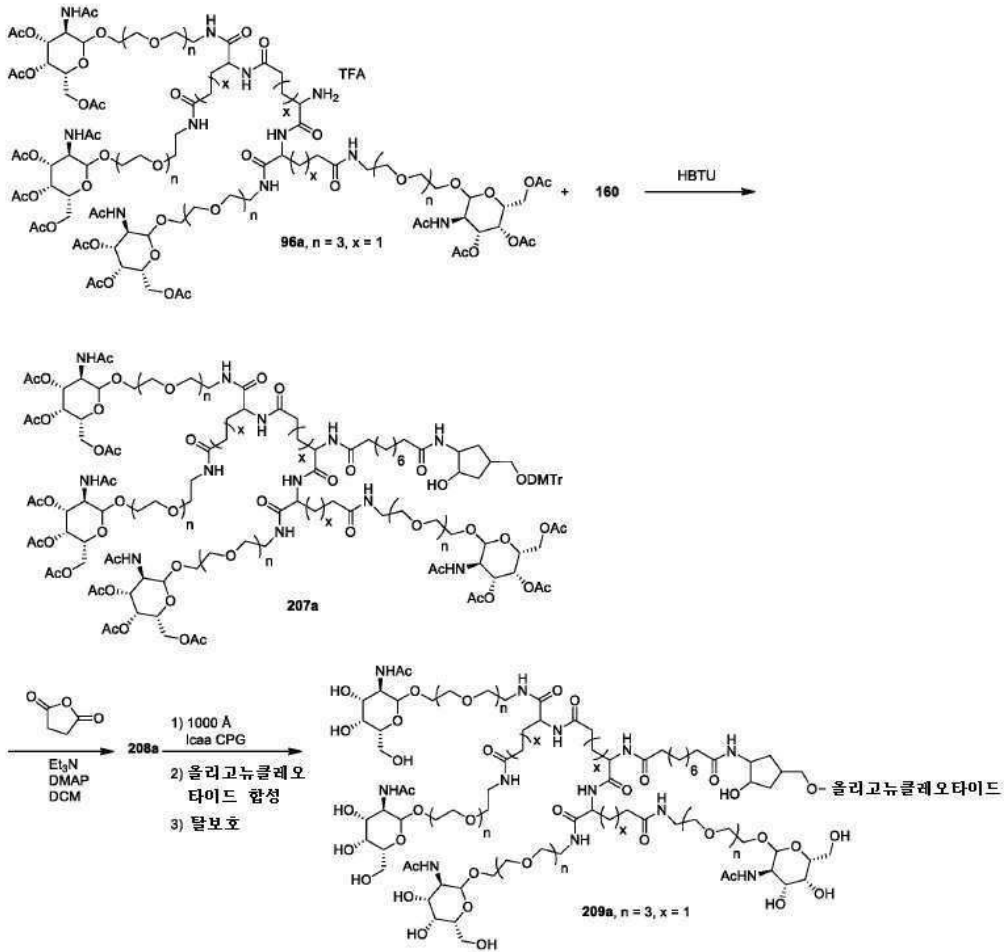
[1187]

[1188] 단계 1. 접합체 209의 제조

[1189] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 96 및 160으로부터 접합체 209를 제조하였다.

[1190] 실시예 18a. 접합체 209a의 합성

[1191] 반응식 40a.



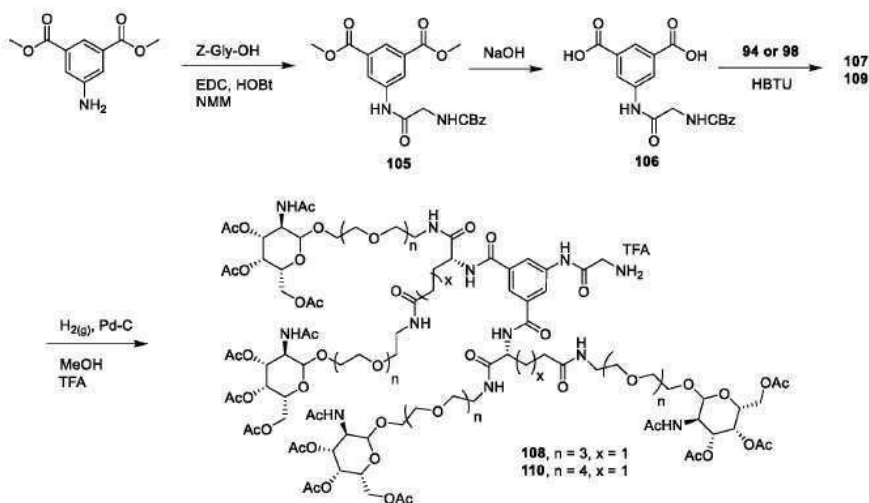
[1192]

[1193] 단계 1. 접합체 209a의 제조

[1194] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 96a 및 화합물 160으로부터 접합체 209a를 제조한다.

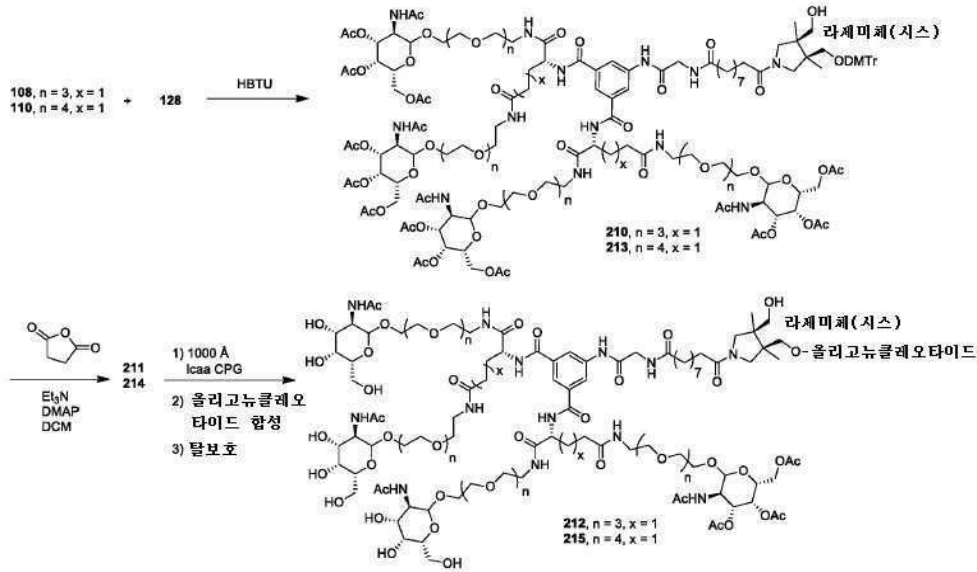
[1195] 실시예 19. 접합체 212 및 215의 합성

[1196] 반응식 41.



[1197]

[1198] 반응식 42.



[1199]

[1200] 단계 1. 다이메틸 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)-아이소프탈레이트 105의 제조

[1201] DMF(50ml) 중의 다이메틸 5-아미노아이소프탈레이트(5g, 24mmol), Z-Gly-OH(5g, 24mmol), EDC(5g, 26.3mmol), HOBt(3.6g, 26.3mmol), NMM(2.9ml, 26.3mmol)의 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. 완결 후, 반응 혼합물을 에틸 아세테이트(250ml)로 희석시키고, 각각 1M HCl(2×100ml), 포화 중탄산나트륨(1×100ml) 및 염수(2×100ml)로 세척하였다. 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 건조물로 농축시켜 다이메틸 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)아이소프탈레이트를 무색 고체로서 수득하였다(7.2g, 79%).

[1202] 단계 2. 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)아이소프탈산 106의 제조

[1203] 메탄올(25ml) 및 THF(25ml) 중의 메틸 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)아이소프탈레이트 (7.2g)의 용액에 1M NaOH(25ml)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 2시간 동안 교반하고, 이어서 농축시켜 THF 및 MeOH를 제거하였다. 남아있는 수성 용액을 물(75ml)로 희석시키고, 빙수욕에서 냉각시키고, 6M HCl을 사용하여 pH = 1로 산성화시켰다. 고체를 여과시키고, 물(3×100ml)로 세척하였다. 고체를 동결 건조시켜 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)아이소프탈산(6.9g, 정량적)을 수득하였다.

[1204] 단계 3. 화합물 107의 제조

[1205] 화합물 95에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)아이소프탈산 106(200mg, 0.54mmol) 및 94(1.7g, 1.3mmol)로부터 화합물 107을 제조하였다. 수율: 600mg.

[1206] 단계 4. 화합물 108의 제조

[1207] 화합물 96에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 107(600 mg)로부터 화합물 108을 제조하였다. 수율: 650mg, 정량적.

[1208] 단계 5. 화합물 109의 제조

[1209] 화합물 99에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)아이소프탈산 106(180mg, 0.48mmol) 및 98(1.5g, 1.1mmol)로부터 화합물 109를 제조하였다. 수율: 900mg.

[1210] 단계 6. 화합물 110의 제조

[1211] 화합물 100에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 109(900 mg)로부터 화합물 110을 제조하였다. 수율:

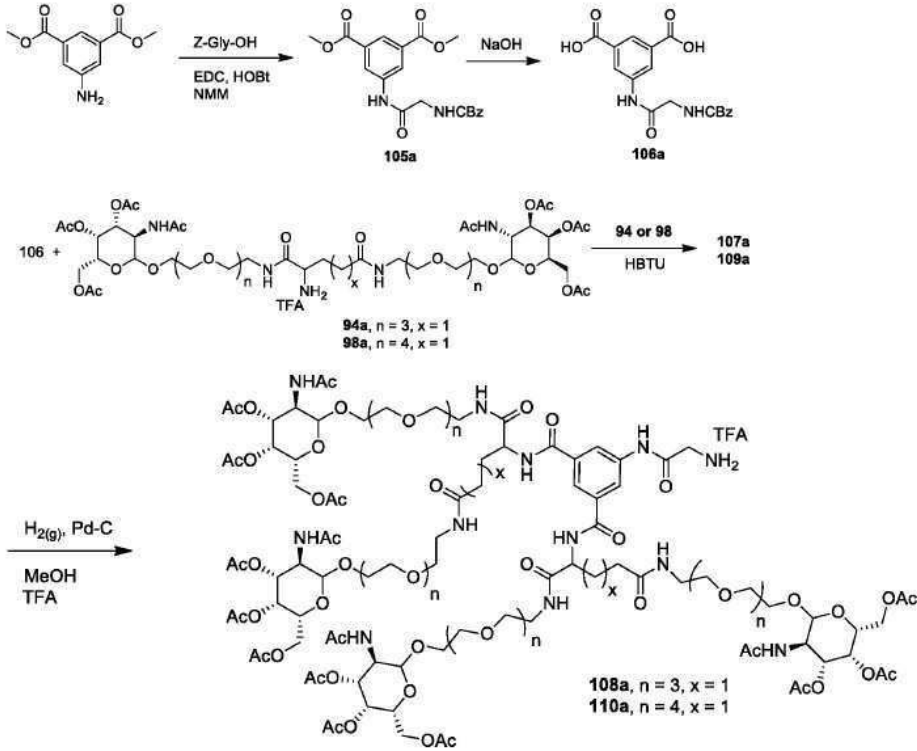
920mg, 정량적.

[1212] 단계 7. 접합체 212 및 215의 제조

[1213] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 128 및 108 또는 110으로부터 접합체 212 및 215를 제조하였다.

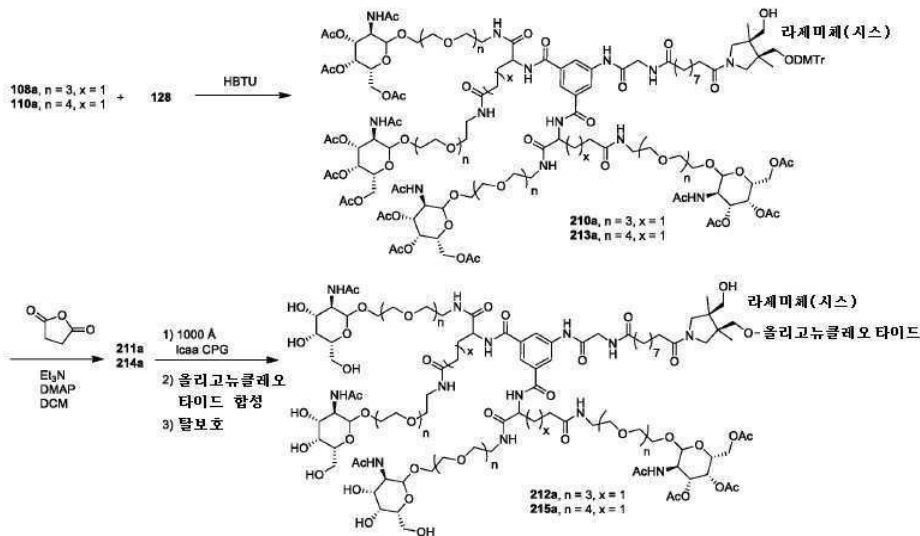
[1214] 실시예 19a. 접합체 212a 및 215a의 합성

[1215] 반응식 41a.



[1216]

[1217] 반응식 42a.



[1218]

[1219] 단계 1. 다이메틸 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)-아이소프탈레이트 105a의 제조

[1220] DMF(50ml) 중의 다이메틸 5-아미노아이소프탈레이트(5g, 24mmol), Z-Gly-OH(5g, 24mmol), EDC(5g, 26.3mmol), HOBT(3.6g, 26.3mmol), NMM(2.9ml, 26.3mmol)의 용액을 밤새 실온에서 교반한다. 완결 후, 반응 혼합물을 에틸

아세테이트(250ml)로 희석시키고, 각각 1M HCl(2×100ml), 포화 중탄산나트륨(1×100ml) 및 염수(2×100ml)로 세척한다. 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 건조물로 농축시켜 다이메틸 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)아이소프탈레이트를 무색 고체로서 수득하였다(7.2g, 79%).

[1221] **단계 2. 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)아이소프탈산 106a의 제조**

[1222] 메탄올(25ml) 및 THF(25ml) 중의 메틸 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)아이소프탈레이트 (7.2g)의 용액에 1M NaOH(25ml)를 첨가한다. 용액을 실온에서 2시간 동안 교반하고, 이어서 농축시켜 THF 및 MeOH를 제거한다. 남아있는 수성 용액을 물(75ml)로 희석시키고, 빙수욕에서 냉각시키고, 6M HCl을 사용하여 pH = 1로 산성화시킨다. 고체를 여과시키고, 물(3×100ml)로 세척한다. 고체를 동결 건조시켜 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)-아이소프탈산(6.9g, 정량적)을 수득한다.

[1223] **단계 3. 화합물 107a의 제조**

[1224] 화합물 95에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)아이소프탈산 106a(200mg, 0.54mmol) 및 94a(1.7g, 1.3mmol)로부터 화합물 107a를 제조한다. 수율: 600mg.

[1225] **단계 4. 화합물 108a의 제조**

[1226] 화합물 96a에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 107a(600 mg)로부터 화합물 108a를 제조한다. 수율: 650mg, 정량적.

[1227] **단계 5. 화합물 109a의 제조**

[1228] 화합물 99에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)아이소프탈산 106a(180mg, 0.48mmol) 및 9a8(1.5g, 1.1mmol)로부터 화합물 109a를 제조한다. 수율: 900mg.

[1229] **단계 6. 화합물 110a의 제조**

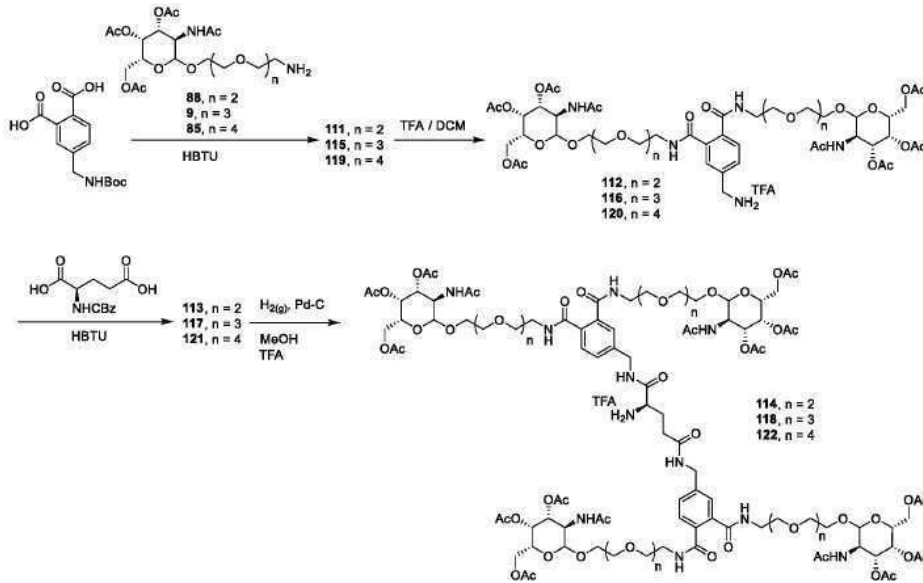
[1230] 화합물 100에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 109(900 mg)로부터 화합물 110a를 제조한다. 수율: 920mg, 정량적.

[1231] **단계 7. 접합체 212a 및 215a의 제조**

[1232] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 128 및 화합물 108a 또는 110a로부터 접합체 212a 및 21a5를 제조한다.

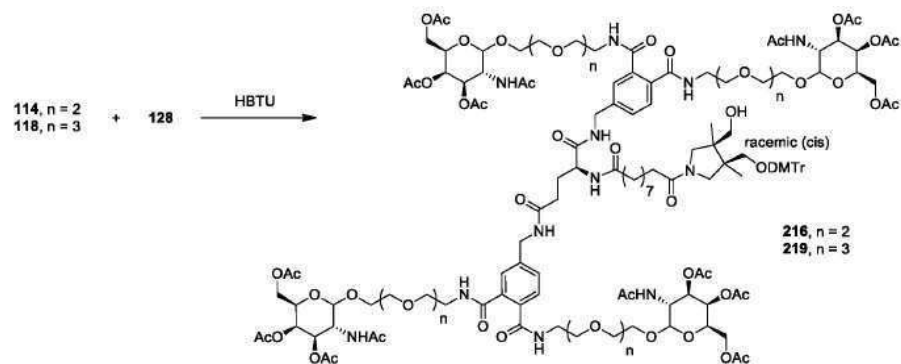
[1233] **실시예 20. 접합체 218 및 221의 합성**

[1234] 반응식 43.

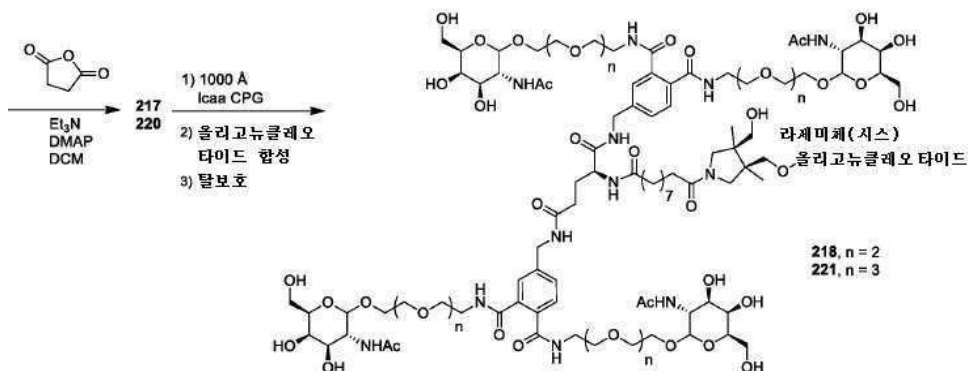


[1235]

[1236] 반응식 44.



[1237]



[1238]

[1239] 단계 1. 화합물 111의 제조

[1240] 화합물 89에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 4-(((tert-부톡시카보닐)아미노)메틸)프탈산(1.13g, 3.84mmol) 및 88(5g, 8.44mmol)로부터 화합물 111을 제조하였다. 수율: 2.21g, 49%.

[1241] 단계 2. 화합물 112의 제조

[1242] CH₂Cl₂(40ml) 중의 111(2.21g, 1.87mmol)의 용액을 서서히 TFA(5ml)로 처리하였다. 교반 후(2h), 혼합물을 농축시키고, 크로마토그래피에 적용시켜 112(1.08g, 47%)를 무색 발포체로서 수득하였다. Rf 0.1(10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

[1243]

단계 3. 화합물 113의 제조

[1244]

화합물 91에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 112(1.08g, 0.88mmol) 및 (2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)-D-글루탐산(112mg, 0.39mmol)으로부터 화합물 113을 제조하였다. 수율: 600mg, 62%.

[1245]

단계 4. 화합물 114의 제조

[1246]

화합물 92에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 113으로부터 화합물 114를 제조하였다.

[1247]

단계 5. 화합물 115의 제조

[1248]

화합물 93에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 4-(((tert-부톡시카보닐)아미노)메틸)프탈산(3.94g, 13.3mmol) 및 9(18.2g, 29.4mmol)로부터 화합물 115를 제조하였다. 수율: 9.02g, 53%.

[1249]

단계 6. 화합물 116의 제조

[1250]

화합물 112에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 115(8g, 6.3mmol)로부터 화합물 116을 제조하였다. 수율: 3.23g, 39%.

[1251]

단계 7. 화합물 117의 제조

[1252]

화합물 95에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 116(3.23g, 2.45mmol) 및 (2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)-D-글루탐산(192mg, 1.1mmol)으로부터 화합물 117을 제조하였다. 수율: 2.22g, 34%.

[1253]

단계 8. 화합물 118의 제조

[1254]

화합물 96에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 117(2.22g, 0.84mmol)로부터 화합물 118을 제조하였다. 수율: 2.02g, 91%.

[1255]

단계 9. 접합체 218 및 221의 제조

[1256]

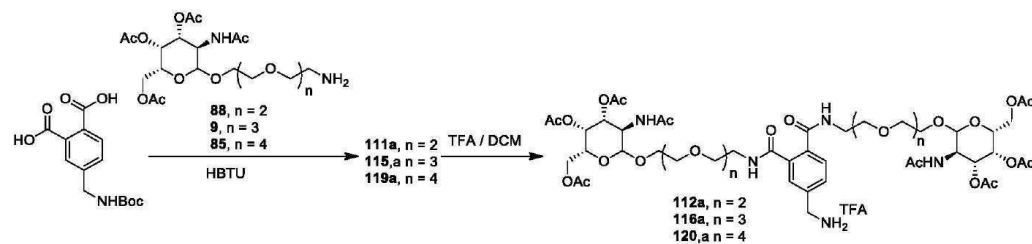
화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 128 및 114 또는 118로부터 접합체 218 및 221을 제조하였다.

[1257]

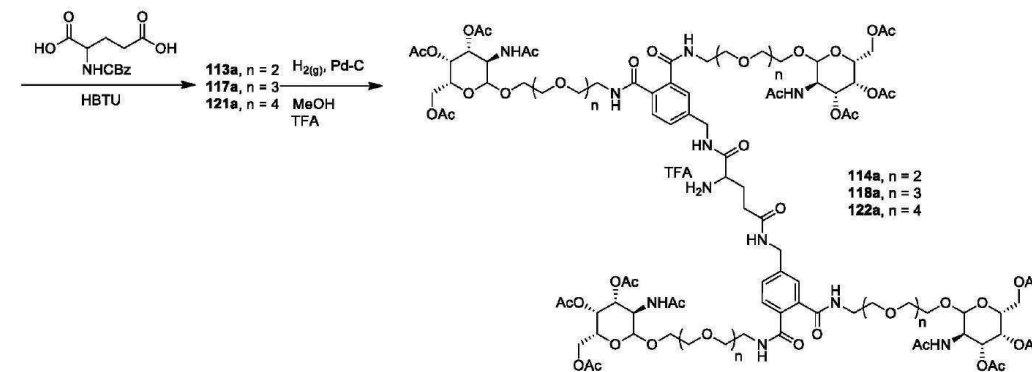
실시예 20a. 접합체 218a 및 221a의 합성

[1258]

반응식 43a.

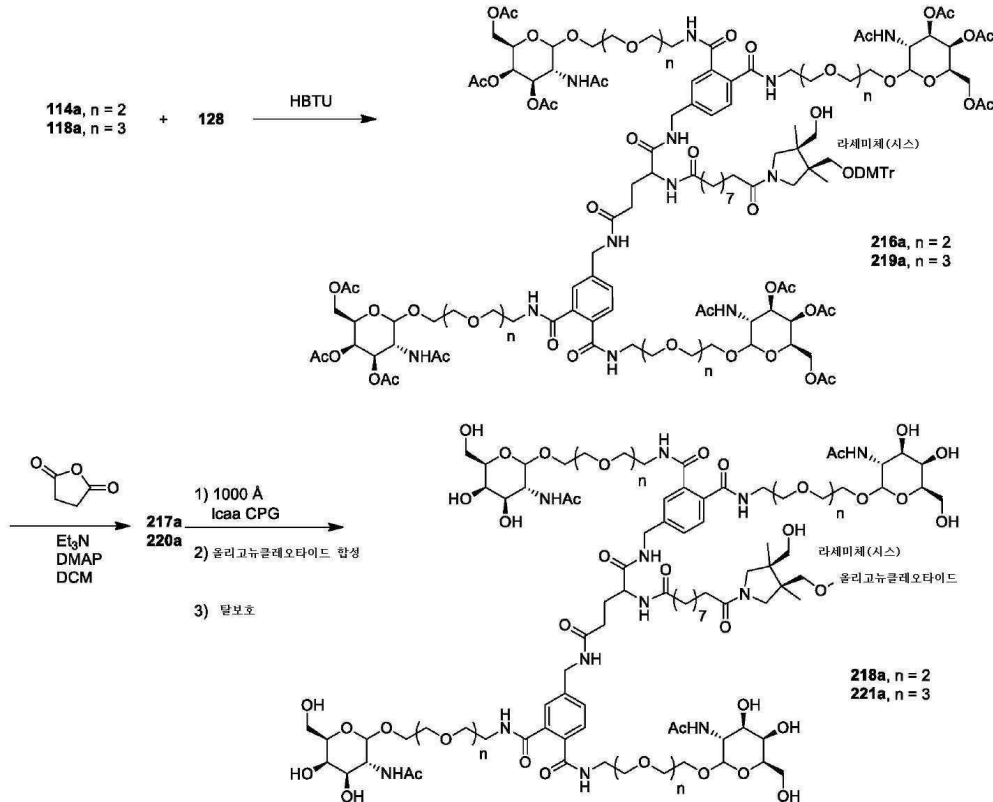


[1259]



[1260]

[1261] 반응식 44a.



[1262]

[1263] 단계 1. 화합물 111a의 제조

[1264] 화합물 89에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 4-(((tert-부톡시카보닐)아미노)메틸)프탈산(1.13g, 3.84mmol) 및 88(5g, 8.44mmol)로부터 화합물 111a를 제조한다. 수율: 2.21g, 49%.

[1265] 단계 2. 화합물 112a의 제조

[1266] CH_2Cl_2 (40ml) 중의 111a(2.21g, 1.87mmol)의 용액을 서서히 TFA(5ml)로 처리한다. 교반 후(2h), 혼합물을 농축시키고, 크로마토그래피에 적용시켜 112a(1.08g, 47%)를 무색 발포체로서 수득한다. Rf 0.1(10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

[1267] 단계 3. 화합물 113a의 제조

[1268] 화합물 91에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 112a(1.08g, 0.88mmol) 및 (2-옥소-2-페닐-1 λ^2 -에틸)-D-글루탐산(112mg, 0.39mmol)으로부터 화합물 113a를 제조한다. 수율: 600mg, 62%.

[1269] 단계 4. 화합물 114a의 제조

[1270] 화합물 92에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 113a로부터 화합물 114a를 제조한다.

[1271] 단계 5. 화합물 115a의 제조

[1272] 화합물 93에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 4-(((tert-부톡시카보닐)아미노)메틸)프탈산(3.94g, 13.3mmol) 및 9(18.2g, 29.4mmol)로부터 화합물 115a를 제조한다. 수율: 9.02g, 53%.

[1273] 단계 6. 화합물 116a의 제조

[1274] 화합물 11a에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 115a(8g, 6.3mmol)로부터 화합물 116a를 제조한다. 수율: 3.23g, 39%.

[1275] 단계 7. 화합물 117a의 제조

[1276] 화합물 95에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 116a(3.23g, 2.45mmol) 및 (2-옥소-2-페닐-1 λ^2

²-에틸)글루탐산(192mg, 1.1mmol)으로부터 화합물 117a를 제조한다. 수율: 2.22g, 34%.

[1277] 단계 8. 화합물 118a의 제조

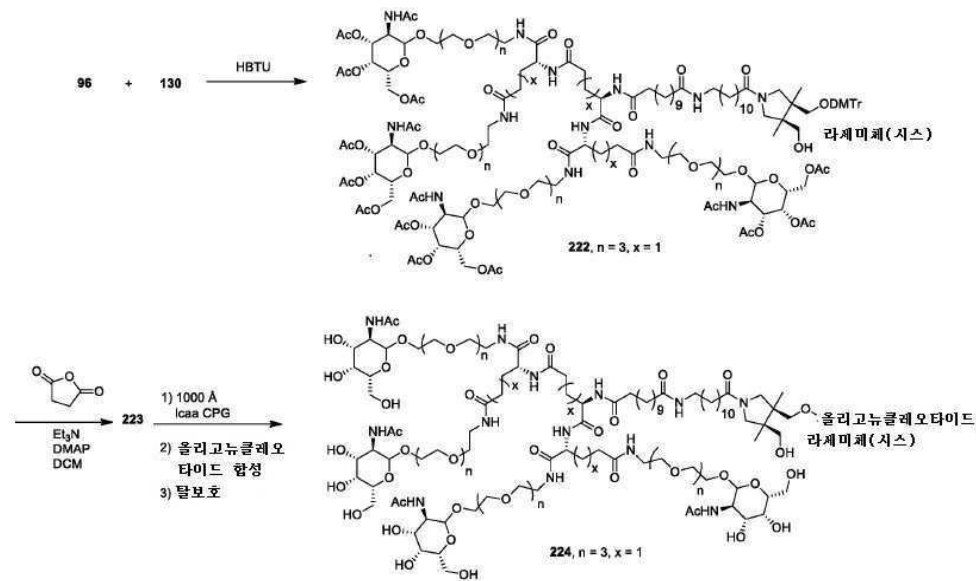
[1278] 화합물 96에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 117a(2.22g, 0.84mmol)로부터 화합물 118a를 제조한다. 수율: 2.02g, 91%.

[1279] 단계 9. 접합체 21a8 및 221a의 제조

[1280] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 128 및 114a 또는 118a로부터 접합체 218a 및 221a를 제조한다.

[1281] 실시예 21. 접합체 224의 합성

[1282] 반응식 45.



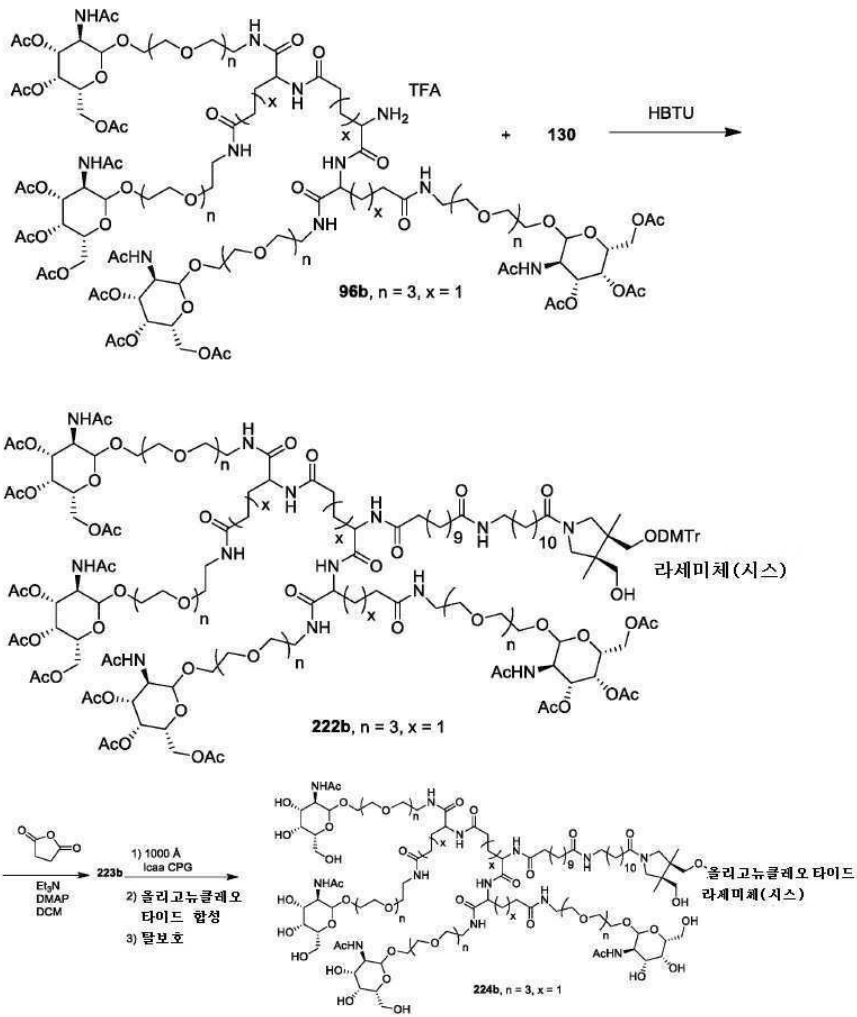
[1283]

[1284] 단계 1. 화합물 224의 제조

[1285] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 96 및 130으로부터 접합체 224를 제조하였다.

[1286] 실시예 21a. 접합체 224b의 합성

[1287] 반응식 45a.



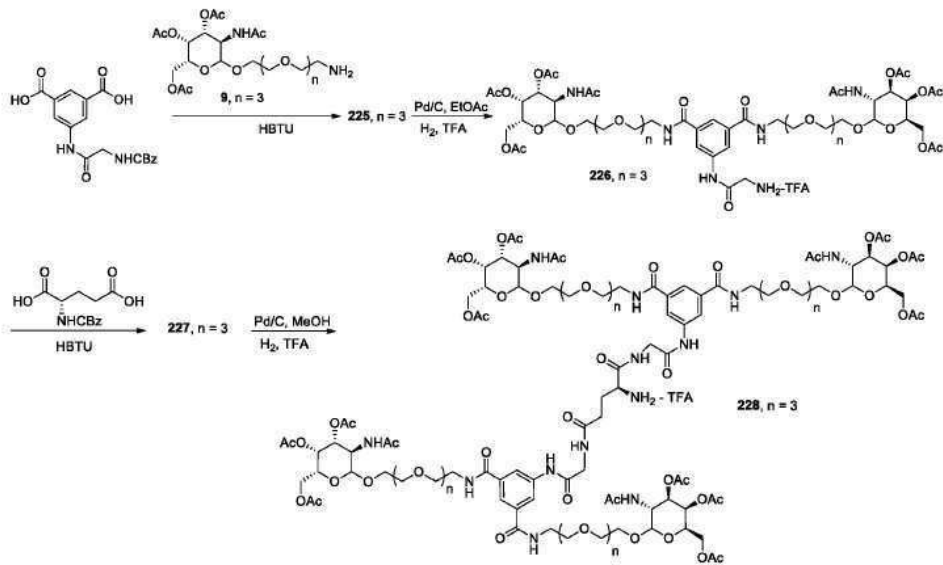
[1288]

[1289] 단계 1. 화합물 224b의 제조

[1290] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 96b 및 화합물 130으로부터 접합체 224b를 제조한다.

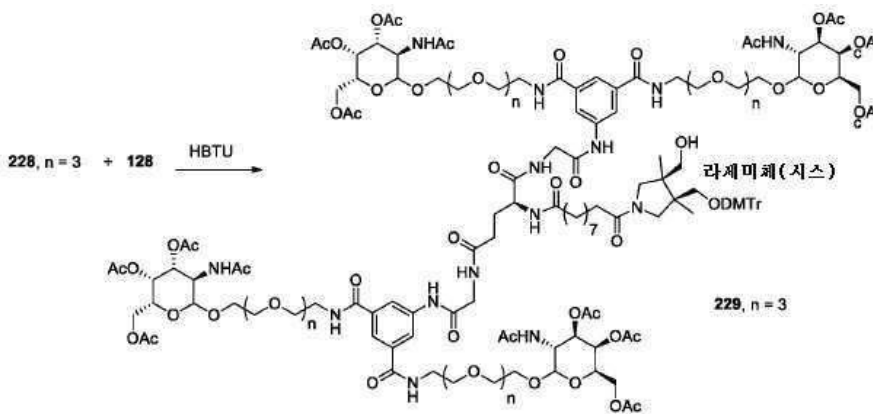
[1291] 실시예 22 접합체 231의 합성

[1292] 반응식 46

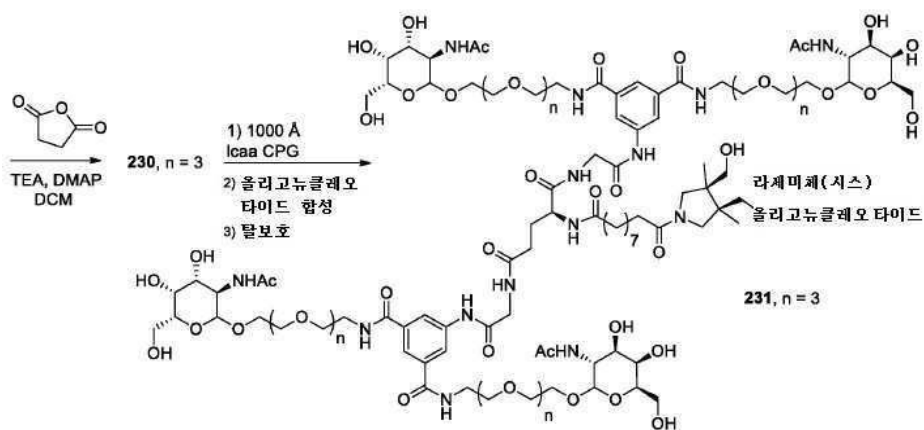


[1293]

[1294] 반응식 47



[1295]



[1296]

[1297] 단계 1 화합물 225의 제조

[1298] 화합물 89에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 5-(2-아미노아세트아미도)아이소프탈산 106(560mg, 1.5mmol) 및 9(2.24g, 3.6mmol)로부터 화합물 225를 제조하였다. 수율 1.6g, 80%.

[1299] 단계 2 화합물 226의 제조

[1300] 14와 동일한 방식으로 화합물 226을 제조하였다. 수율 1.22g, 78%.

[1301] 단계 3 화합물 227의 제조

[1302] 89와 동일한 방식으로 Z-글루탐산(108mg, 0.38mmol) 및 226(1.22g, 0.92mmol)으로부터 화합물 227을 제조하였다. 수율 471mg, 45%.

[1303] 단계 4 화합물 228의 제조

[1304] 14와 동일한 방식으로 화합물 228을 제조하였다. 수율 460mg, 정량적.

[1305] 단계 5 화합물 229의 제조

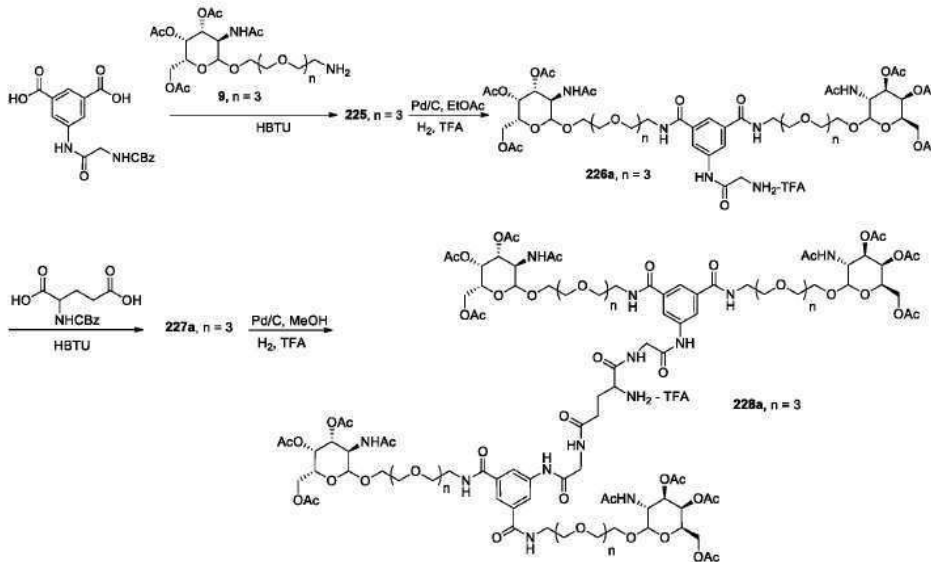
[1306] 89와 동일한 방식으로 228(460mg, 0.17mmol) 및 128(125mg, 0.19mmol)로부터 화합물 229를 제조하였다. 수율 365mg, 66%.

[1307] 단계 6 화합물 231의 제조

[1308] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 접합체 231을 제조하였다.

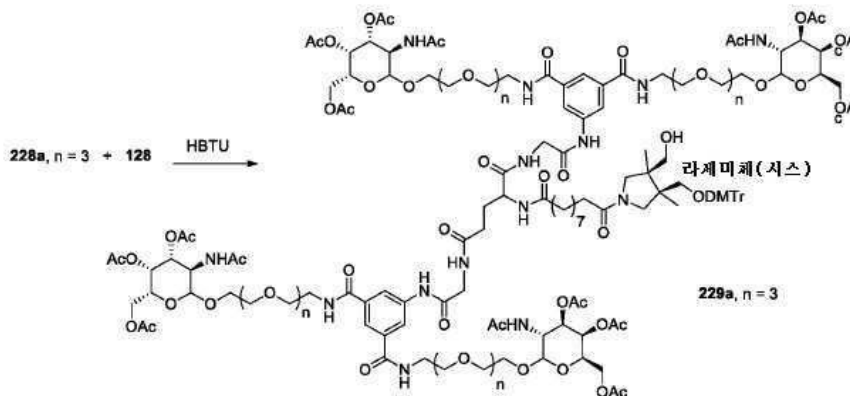
[1309] 실시예 22a 접합체 231a의 합성

[1310] 반응식 46a

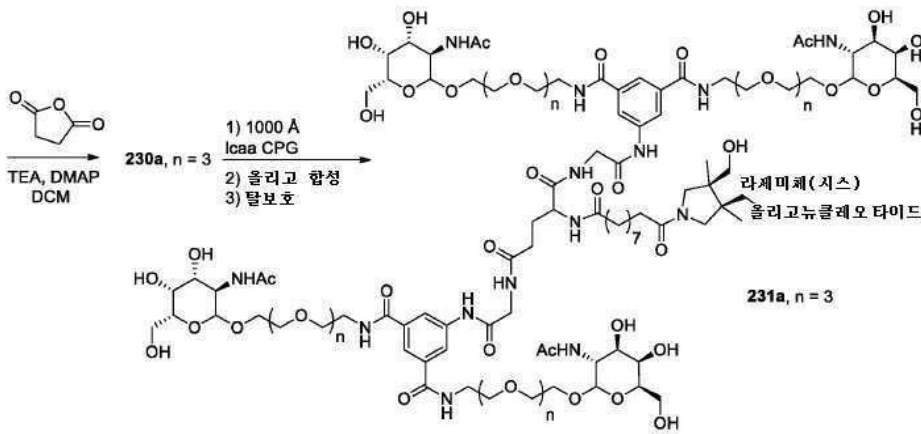


[1311]

[1312] 반응식 47a



[1313]



[1314]

[1315] 단계 1 화합물 225a의 제조

[1316] 화합물 89에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 5-(2-아미노아세트아미도)아이소프탈산 106(560mg, 1.5mmol) 및 9(2.24g, 3.6mmol)로부터 화합물 225a를 제조한다. 수율 1.6g, 80%.

[1317] 단계 2 화합물 226a의 제조

[1318] 14와 동일한 방식으로 화합물 226a를 제조한다. 수율 1.22g, 78%.

[1319] 단계 3 화합물 227a의 제조

[1320] 89와 동일한 방식으로 Z-글루탐산(108mg, 0.38mmol) 및 226a(1.22g, 0.92mmol)으로부터 화합물 227a를 제조한다. 수율 471mg, 45%.

[1321] 단계 4 화합물 228a의 제조

[1322] 14와 동일한 방식으로 화합물 228a를 제조한다. 수율 460mg, 정량적.

[1323] 단계 5 화합물 229a의 제조

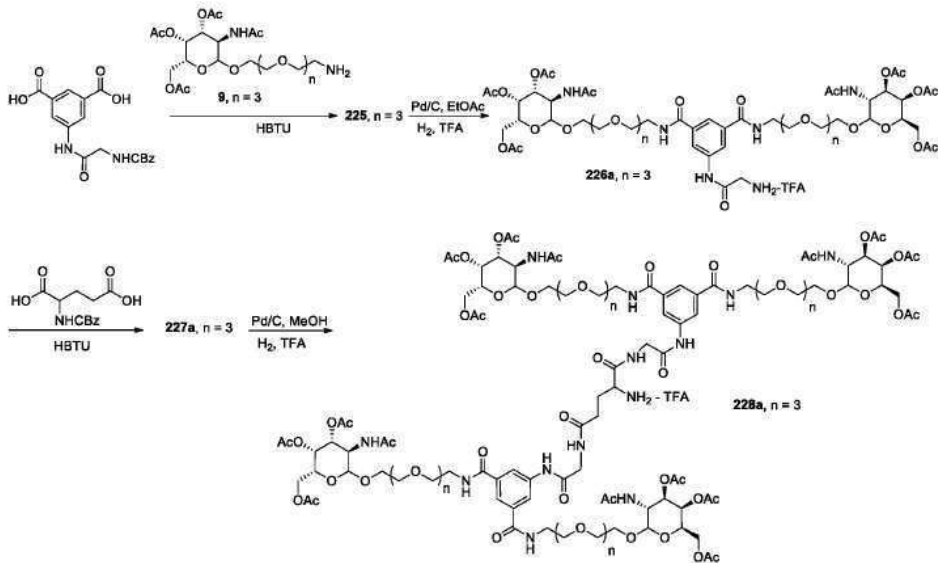
[1324] 89와 동일한 방식으로 228a(460mg, 0.17mmol) 및 128(125mg, 0.19mmol)로부터 화합물 229a를 제조한다. 수율 365mg, 66%.

[1325] 단계 6 화합물 231a의 제조

[1326] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 접합체 231a를 제조한다.

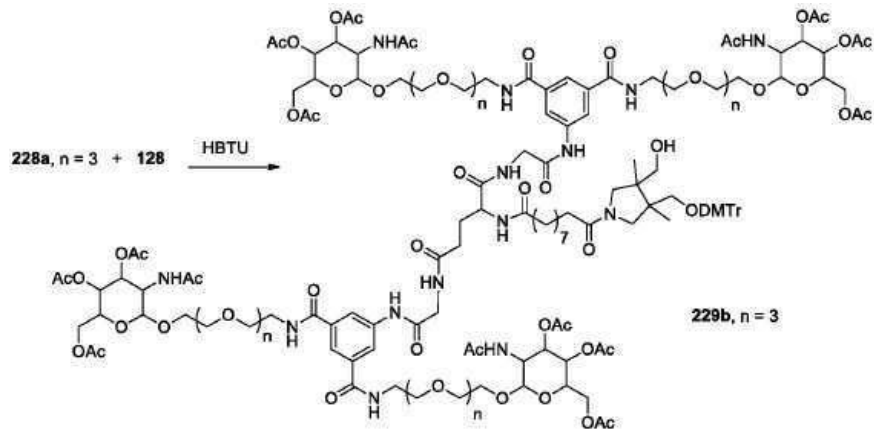
[1327] 실시예 22b 접합체 231b의 합성

[1328] 반응식 46b

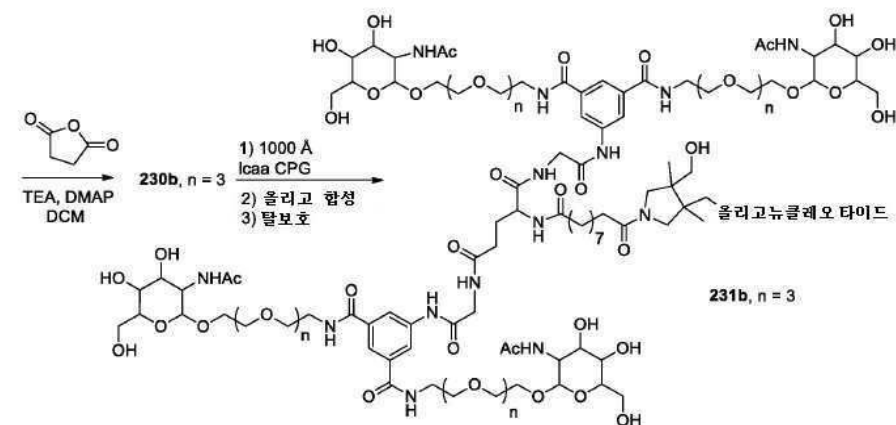


[1329]

[1330] 반응식 47b



[1331]



[1332]

[1333] 단계 1 화합물 225b의 제조

[1334] 화합물 89에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 5-(2-아미노아세트아미도)아이소프탈산 106(560mg, 1.5mmol) 및 9(2.24g, 3.6mmol)로부터 화합물 225b를 제조한다. 수율 1.6g, 80%.

[1335] 단계 2 화합물 226b의 제조

[1336] 14와 동일한 방식으로 화합물 **226b**를 제조한다. 수율 1.22g, 78%.

[1337] 단계 3 화합물 **227b**의 제조

[1338] 89와 동일한 방식으로 Z-글루탐산(108mg, 0.38mmol) 및 **226b**(1.22g, 0.92mmol)으로부터 화합물 **227b**를 제조한다. 수율 471mg, 45%.

[1339] 단계 4 화합물 **228b**의 제조

[1340] 14와 동일한 방식으로 화합물 **228b**를 제조한다. 수율 460mg, 정량적.

[1341] 단계 5 화합물 **229b**의 제조

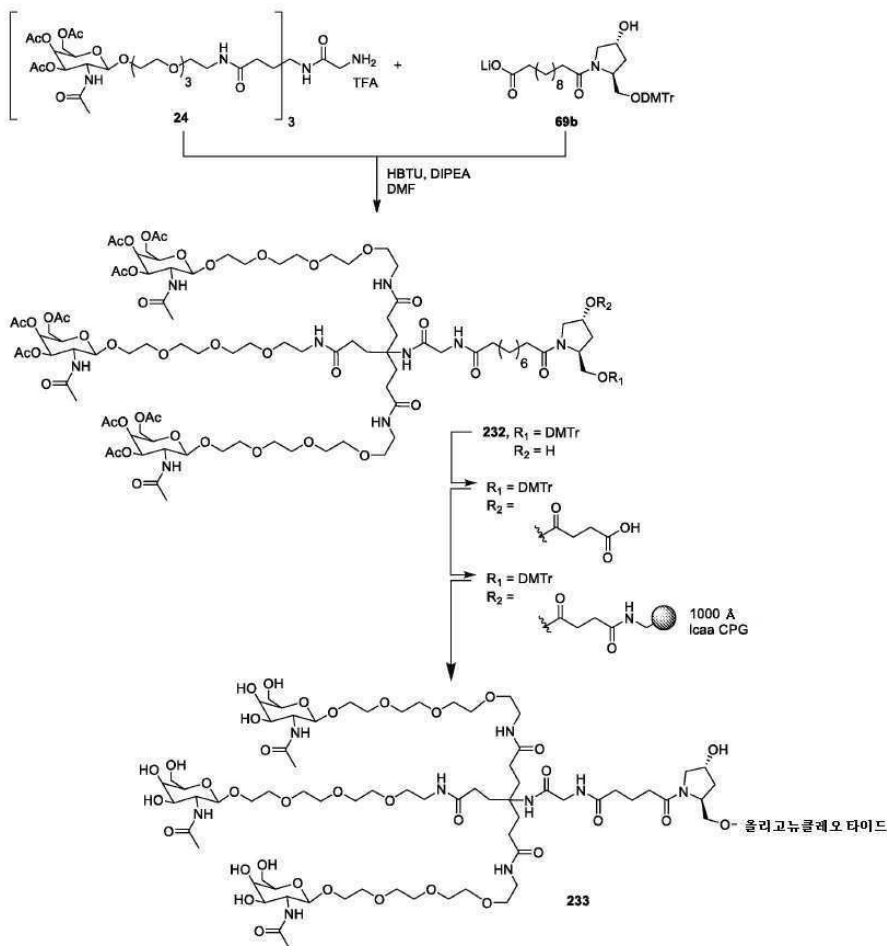
[1342] 89와 동일한 방식으로 **228b**(460mg, 0.17mmol) 및 **128**(125mg, 0.19mmol)로부터 화합물 **229b**를 제조한다. 수율 365mg, 66%.

[1343] 단계 6 화합물 **231b**의 제조

[1344] 화합물 **1**에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 접합체 **231b**를 제조한다.

[1345] 실시예 23. 접합체 **233**의 합성

[1346] 반응식 48



[1347]

[1348] 단계 1. 화합물 **232**의 제조

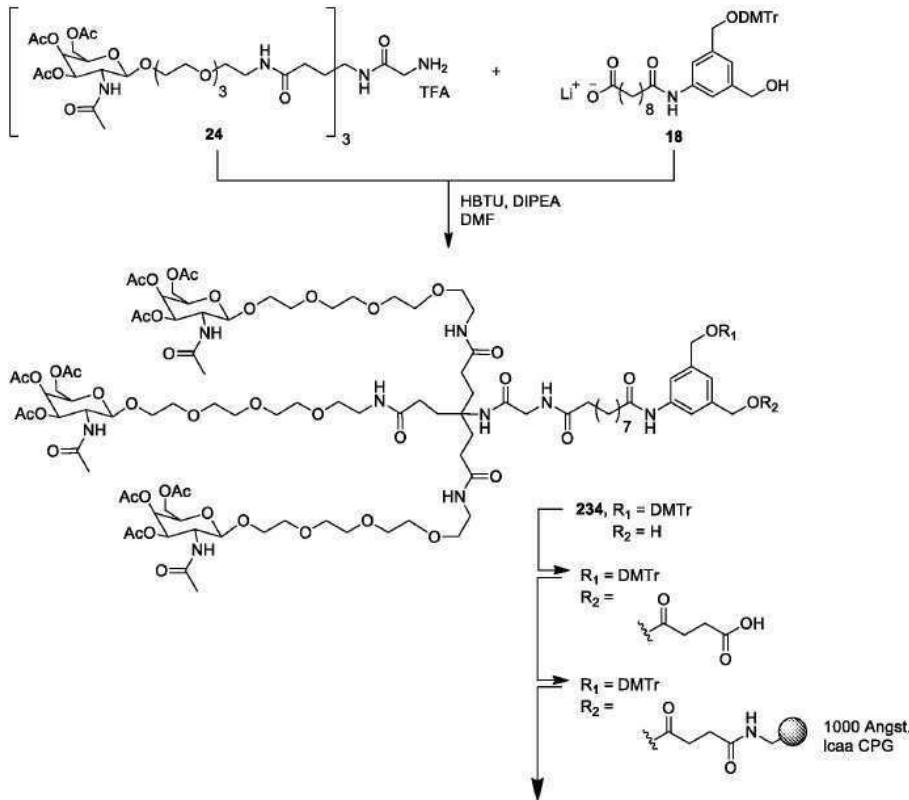
[1349] 화합물 **19**에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 **24**(650mg, 0.33mmol) 및 화합물 **69b**(175mg, 0.33mmol)로부터 화합물 **232**를 제조하였다. 수율: 380mg, 47%.

[1350] 단계 2. 화합물 **233**의 제조

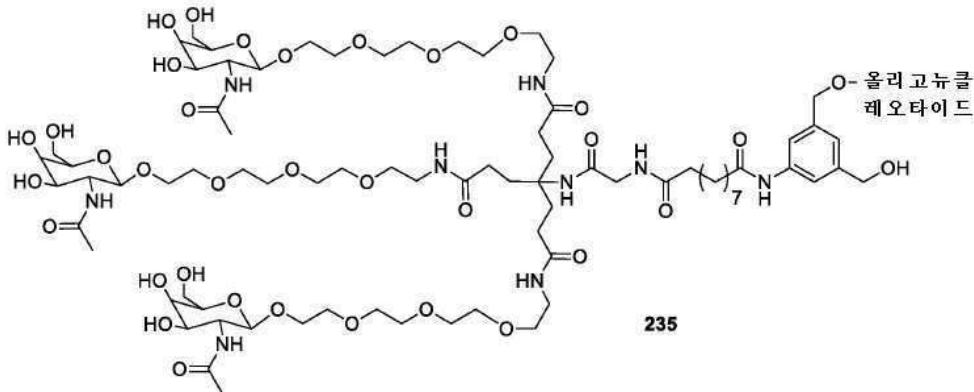
[1351] 화합물 **1**에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 **232**로부터 화합물 **233**을 제조하였다.

[1352] 실시예 24. 접합체 235의 합성

[1353] 반응식 49



[1354]



[1355]

[1356] 단계 1. 화합물 234의 제조

[1357] 화합물 19에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 24(1.1g, 0.55mmol) 및 화합물 18(175mg, 0.33mmol)로부터 화합물 234를 제조하였다. 수율: 685mg, 51%.

[1358] 단계 2. 화합물 235의 제조

[1359] 화합물 1에 대해서 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 화합물 234로부터 화합물 235를 제조하였다.

[1360] 실시예 25. HBV siRNA 접합체의 생체내 시험

[1361] 만성 HBV 감염은 간에 점진적인 손상을 갖는 전 세계적인 질환이다. 사용 가능한 현재 치료제는 바이러스 DNA를 감소시킬 수 있지만, 질환 진행에 상당히 기여하는 바이러스 항원에 거의 효과를 갖지 않았다. 따라서, 바이러스 항원을 감소시키기 위해서 HBV를 표적으로 하는 siRNA는 설계되지 않았다.

[1362] GalNAc 리간드에 접합된 표 1에 기술된 화학적으로 변형된 HBV siRNA를 HBV 감염의 확립된 마우스 모델에서 생

체내 활성도에 대해서 시험하였다. AAV-HBV1.2 C57BL/6 마우스 모델에서, HBV의 게놈 초과 길이 서열을 암호화하는 아데노 연관 바이러스(AAV) 벡터의 주사 이후에 안정적인 HBV 발현이 달성되며, 이것은 HBV RNA 및 단백질의 간 발현 및 혈액으로의 바이러스 및 서브-바이러스 입자의 분비로 이어진다.

- [1363] 본 연구에서 사용되는 AAV-HBV1.2 작제물은 문헌[Dion, S., et al., Journal of Virology, 2013, 87(10): 5554-5563]에 상세하게 제공된 것을 기반으로 하였다. 모든 동물-관련 절차는 동물 관리 기준(Good Animal Practice)에 관한 캐나다 동물 관리 협회(Canadian Council on Animal Care: CCAC) 가이드라인에 따라서 서면 운영 절차에 따라서 수행하였고, 지역 실험 동물 운영 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC)에 의해서 승인되었다.
- [1364] 각각의 동물을 AAV-HBV1.2 벡터의 1E11 벡터 게놈(VG)으로 접종하였다. 처리 전에, 모든 동물을 시험 채혈하고, 개별 동물에 대해서 혈청 HBsAg 수준을 결정하여 확립된 HBV 발현을 확인하였다.
- [1365] siRNA 처리: 마우스의 군(전형적으로 n = 5)에게 단일 3mg/kg 용량의 HBV siRNA 접합체를 0일에 1회(동물당 1회 용량) 견갑골 영역 내의 피하 주사를 통해서 투여하였다. 동물 중 하나의 군에 대조군으로서 제공되는 비히클 단독(염수)을 투여하였다.
- [1366] 수집: 모든 마우스를 처리 전, 0일에 그리고 시험품 투여 후 정의된 시간 지점(예를 들어, 시험일 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 및 70일)에 시험 채혈하여 혈청 HBsAg 수준의 최대 감소 및 약리학적 활성의 기간을 결정하였다.
- [1367] 분석: 혈청 샘플 중의 HBsAg 수준을 바이오래드(Biorad) EIA GS HBsAg 3.0 키트(바이오래드, 카탈로그 번호 32591)를 사용하여 제조사의 설명서에 따라서 결정하였다. 각각의 처리군으로부터의 풀링된 혈청을 사용하여 개별 시간 지점에서 군 평균 HBsAg 수준을 결정하였다. 데이터를 분석하고, 처리전 기준선에 상대적인 HBsAg 수준(0일에 상대적인 %)으로서 표현하였다.
- [1368] 결과: 표 1에 기술된 화학적으로 변형된 HBV siRNA 각각의 시험으로부터의 결과를 표 2에 제공한다. 처리 후 7, 14, 21, 28, 42, 49, 56 및 70일에 값을 (0일 기준선에 상대적인) HBsAg 수준 %로서 나타낸다.

표 1

화학적으로 변형된 HBV siRNA 듀플렉스

siRNA 번호	센스 가닥 서열번호	센스 가닥 5'-3'	안티센스 가닥 서열번호	안티센스 가닥 5'-3'
1	서열번호 1	cs ^s gs ^g ug ^{Ca} CUUcgc ^{uu} ac ^{ccu}	서열번호 2	as ^G s ^g ug ^{Aa} GC ^G aa ^g Ug ^C ac ^{ac} gs ^u UU
2	서열번호 3	us ^g sc ^a CUUcgc ^{uu} ac ^{ccu}	서열번호 4	as ^G s ^g ug ^{Aa} GC ^G aa ^g Ug ^C ac ^{ac} cs ^g U
3	서열번호 5	us ^g sc ^a CUUcgc ^{uu} ac ^{ccu}	서열번호 6	as ^G s ^g uga ^{ag} cg ^{aa} gUg ^C ac ^{ac} cs ^g U
4	서열번호 7	us ^g sc ^a CUUcgc ^{uu} ac ^{ccu}	서열번호 8	as ^G s ^g ug ^{Aa} g ^c g ^{aa} gUg ^C ac ^{ac} cs ^g U
5	서열번호 9	C ^s cs ^g u ^G u ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 10	gs ^G s ^U g ^{Aa} G ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} G ^s usc
6	서열번호 11	cs ^s cs ^g u ^G u ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 12	gs ^G s ^U g ^{Aa} g ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} g ^s usc
7	서열번호 13	cs ^s cs ^g u ^G u ^G c ^{Ac} U ^c gc ^{uu} ac ^c	서열번호 14	gs ^G s ^U g ^{Aa} g ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} g ^s usc
8	서열번호 15	cs ^s cs ^g u ^G u ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 16	gs ^G s ^U g ^{Aa} g ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} G ^s usc
9	서열번호 17	cs ^s cs ^g u ^G u ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 18	gs ^G s ^U g ^{Aa} g ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} g ^s usc
10	서열번호 19	cs ^s cs ^g u ^G u ^G c ^{ac} u ^c gc ^{uu} ac ^c	서열번호 20	gs ^G s ^U g ^{Aa} g ^c g ^A agu ^{Gc} ac ^{ac} g ^s usc
11	서열번호 21	C ^s cs ^g u ^G u ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 22	gs ^G s ^U g ^{Aa} G ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} G ^s uscUU
12	서열번호 23	cs ^s cs ^g u ^G u ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 24	gs ^G s ^U g ^{Aa} g ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} g ^s uscUU
13	서열번호 25	cs ^s cs ^g u ^G u ^G c ^{Ac} U ^c gc ^{uu} ac ^c	서열번호 26	gs ^G s ^U g ^{Aa} g ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} g ^s uscUU
14	서열번호 27	cs ^s cs ^g u ^G u ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 28	gs ^G s ^U g ^{Aa} g ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} G ^s uscUU
15	서열번호 29	G ^s us ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 30	gs ^G s ^U g ^{Aa} G ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} G ^s gU
16	서열번호 31	G ^s us ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 32	gs ^G s ^U g ^{Aa} G ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} G ^s g
17	서열번호 33	G ^s us ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 34	gs ^G s ^U g ^{Aa} G ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} G ^s g
18	서열번호 35	C ^s cs ^g u ^G u ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 36	us ^G s ^U g ^{Aa} G ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} G ^s usc
19	서열번호 37	C ^s cs ^g u ^G u ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 38	us ^G s ^U g ^{Aa} G ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} G ^s uscUU
20	서열번호 39	cs ^s cs ^g u ^G u ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 40	us ^G s ^U g ^{Aa} g ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} g ^s uscUU
21	서열번호 41	cs ^s cs ^g u ^G u ^G c ^{Ac} U ^c gc ^{uu} ac ^c	서열번호 42	us ^G s ^U g ^{Aa} g ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} g ^s uscUU
22	서열번호 43	cs ^s cs ^g u ^G u ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 44	us ^G s ^U g ^{Aa} g ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} G ^s uscUU
23	서열번호 45	cs ^s cs ^g u ^G u ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 46	us ^G s ^U g ^{Aa} g ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} g ^s uscUU
24	서열번호 47	g ^s us ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 48	us ^G s ^U g ^{Aa} g ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} g ^s gU
25	서열번호 49	g ^s us ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 50	us ^G s ^U g ^{Aa} g ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} g ^s gU
26	서열번호 51	g ^s us ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 52	us ^G s ^U g ^{Aa} g ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} g ^s gU

[1369]

siRNA 번호	센스 가닥 서열번호	센스 가닥 5'-3'	안티센스 가닥 서열번호	안티센스 가닥 5'-3'
27	서열번호 53	G ^s us ^G c ^{ACU} uc ^G cu ^c ac ^c	서열번호 54	us ^G s ^U g ^{Aa} G ^c g ^A agu ^{Gc} Ac ^{Ac} G ^s g
28	서열번호 55	us ^c sc ^g cu ^{Ca} CCUcgc ^{ac} g ^{uc} g	서열번호 56	cs ^G s ^{ac} g ^{Ug} CAg ^{agg} Ug ^A ag ^c gas ^{as} gUU
29	서열번호 57	us ^c sc ^g cu ^{Ca} CCUcgc ^{ac} g ^{uc} a	서열번호 58	us ^G s ^{ac} g ^{Ug} CAg ^{agg} Ug ^A ag ^c gas ^{as} gUU
30	서열번호 59	us ^c sc ^g U ^u Ca ^{Cc} U ^c gc ^{ac} g ^{uc} a	서열번호 60	us ^G s ^{ac} g ^{Ug} CAg ^{agg} Ug ^A ag ^c gas ^{as} gUU
31	서열번호 61	us ^u sc ^a CCUcgc ^{ac} g ^{uc} a	서열번호 62	us ^G s ^{ac} g ^{Ug} CAg ^{agg} Ug ^A ag ^c gs ^a U
32	서열번호 63	us ^u sc ^a CCUcgc ^{ac} g ^{uc} a	서열번호 64	us ^G s ^{ac} g ^{Ug} cag ^{agg} Ug ^A ag ^c gs ^a U
33	서열번호 65	us ^u sc ^a CCUcgc ^{ac} g ^{uc} a	서열번호 66	us ^G s ^{ac} g ^{Ug} cag ^{agg} Ug ^A ag ^c gs ^a U
34	서열번호 67	us ^u su ^a Cu ^{Ag} UG ^C caU ^{uu} gu ^{uc} a	서열번호 68	us ^G s ^{Aa} Ca ^A au ^G g ^{ca} Cu ^{Ag} U ^a A ^{asc} su
35	서열번호 69	us ^u su ^a Cu ^{Ag} UG ^C caU ^{uu} gu ^{uc} a	서열번호 70	us ^G s ^{Aa} Ca ^A au ^G g ^{ca} Cu ^{Ag} U ^a A ^{asc} suUU
36	서열번호 71	us ^u su ^a cu ^{Ag} UG ^C cauu ^{uu} gu ^{uc} a	서열번호 72	us ^G s ^{aac} A ^a A ^U gg ^{ca} Cu ^{Ag} ua ^{asc} suUU
37	서열번호 73	us ^u su ^a Cu ^{Ag} UG ^C cauu ^{uu} gu ^{uc} a	서열번호 74	us ^G s ^{aac} A ^a A ^U gg ^{ca} Cu ^{Ag} ua ^{asc} suUU

2'-O-메틸 뉴클레오타이드 = 소문자; 2'-플루오로 뉴클레오타이드 = 대문자;
 포스포로티오에이트 링커 = s; 비변형된 = 대문자

[1370]

표 2

표 1로부터의 GalNAc 접합된 siRNA 의 단회 피하투여(3mg/kg) 후 마우스에서의 혈청 HBsAg 수준

HBsAg 데이터는 기준선(0 일) 값의 백분율로서 나타냄

siRNA 번호	리간드 Cpd #	7일	14일	21일	28일	42일	49일	56일	70일
염수		95.7	118.6	101.0	111.4	115.3		112.2	106.5
1	145	3.1	1.0	22.8	1.3		3.2		7.3
2	145	1.3	0.5	0.4	0.7		3.4		6.5
5	235	12.7	7.0	9.6	21.3	59.7		74.6	98.8
5	233	16.6	8.2	11.0	12.6	24.4		32.2	60.3
5	145	4.3	1.2	1.7	2.4		11.9		24.5
6	233	20.1	10.4	10.9	13.5	30.8		46.0	67.5
7	233	20.7	12.4	10.5	13.6	24.9		46.2	77.0
8	233	18.1	10.5	11.5	12.1	26.0		37.6	64.9
9	145	10.0	2.7	2.0	3.6		6.8		17.0
10	145	16.7	16.7	16.0	16.7		74.4		97.3
11	233	20.5	14.8	16.0	23.9	65.2		80.2	
12	233	18.4	11.6	12.2	14.1	23.6		67.1	72.6
12	145	5.1	1.1	1.2	1.0	2.2		4.5	8.2
13	233	20.7	10.1	11.6	13.2	21.1		39.9	72.3
14	233	16.5	8.0	11.0	11.8	28.8		48.0	90.0
15	145	6.3	3.5	8.4	11.4		89.7		83.1
16	145	4.0	3.4	9.7	14.8		85.1		88.9
17	145	2.4	0.6	0.7	1.1		6.3		15.1
18	233	2.5	1.0	1.3	2.6	11.2		24.5	55.6
19	233	1.9	0.8	1.5	2.6	6.5		12.9	23.4
19	145	1.7	0.6	0.7	1.4	3.8		7.3	15.0
19	200	1.8	0.9	1.4	2.2	5.4		10.2	27.5
19	197	2.0	0.8	1.4	2.1	3.1		8.4	14.2
19	194	2.8	1.8	2.2	4.0	10.7		26.0	37.3
20	145	2.7	0.5	0.7	1.0	4.7		9.3	11.3
20	215	3.4	1.5	1.7	1.7	1.9		4.5	6.2
20	194	1.4	0.5	0.3	0.7	1.2		3.0	6.0

[1371]

siRNA 번호	리간드 Cpd #	7일	14일	21일	28일	42일	49일	56일	70일
20	197	3.4	0.6	1.0	1.3	2.1		4.9	8.2
20	212	3.2	0.8	1.0	1.9	2.4		4.9	7.5
20	191	3.3	1.4	1.4	2.1	1.9		1.2	3.4
21	215	2.5	1.1	1.9	2.6	3.8		7.8	9.8
22	233	2.5	2.0	3.1	6.1	12.2		30.4	61.9
23	215	1.6	0.3	0.3	0.3	0.4		1.0	1.7
24	197	1.9	0.4	0.4	0.4	0.8		1.7	3.2
25	197	2.1	2.2	0.9	0.5	0.9		2.0	2.2
27	145	0.3	0.3	1.6	7.4		71.1		100.1
28	145	11.4	6.7	7.1	9.6	20.8		27.1	36.7
29	145	2.9	1.7	2.1	3.3	7.9		21.4	18.2
30	145	10.0	3.8	3.5	5.9	13.7		19.0	28.8
34	233	13.2	7.4	8.9	16.8	55.2		60.5	
35	233	11.6	8.5	14.0	19.5	58.4		82.0	
36	145	11.3	8.5	11.6	12.5	36.6		49.7	64.7
37	145	27.8	21.6	25.9	31.1	49.9		43.3	64.5

표 2는 시험된 HBV siRNA 접합체에 대한 화합물 번호(칼럼 2) 및 상응하는 올리고뉴클레오타이드(칼럼 1)를 식별한다.

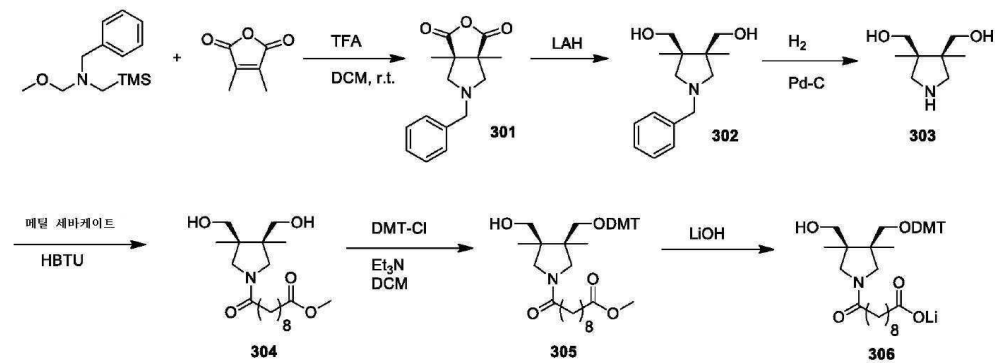
[1372]

실시예 26 접합체 320의 합성

[1373]

[1374]

반응식 50 활성화된 링커의 제조



[1375]

[1376]

단계 1. 라세미체 (시스) 5-벤질-3a,6a-다이메틸테트라하이드로-1H-피로[3,4-c]피롤-1,3(3aH)-다이온 301의 제조

[1377]

다이클로로메탄(75ml) 중의 3,4-다이메틸피롤란-2,5-다이온(3g, 24mmol) 및 N-벤질-1-메톡시-N-((트라이메틸실릴)메틸)메탄아민(7g, 29.8mmol)의 냉각된 용액(0℃)에 트라이플루오로아세트산(75μl)을 서서히 첨가하였다. 밤새 교반하여 병육이 녹으면서 용액이 서서히 실온까지 가온되게 하였다. 반응 혼합물을 건조물로 농축시키고, 에틸 아세테이트(100ml) 중에 용해시키고, 포화 중탄산나트륨(2×100ml)으로 세척하고, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 건조물로 농축시켰다. 실리카젤 상의 칼럼 크로마토그래피(구배: 헥산 중의 20% 에틸 아세테이트에서 100% 에틸 아세테이트)에 의한 정제는 (3aR,6aS)-5-벤질-3a,6a-다이메틸테트라하이드로-1H-피로[3,4-c]피롤-1,3(3aH)-다이온을 황색 오일(3.5g, 56%)로서 제공하였다.

[1378]

단계 2. 라세미체 (시스) (1-벤질-3,4-다이메틸피롤리딘-3,4-다이일)다이메탄올 302의 제조

[1379]

무수 다이에틸 에터(50ml) 중의 (3aR,6aS)-5-벤질-3a,6a-다이메틸테트라하이드로-1H-피로[3,4-c]피롤-1,3(3aH)-다이온(3.5g, 13.4mmol)의 냉각된(0℃) 용액에 리튬 알루미늄 하이드라이드 펠릿(1.5g, 40mmol)을 3개의 분획으로 서서히 첨가하였다. 용액을 밤새 교반하여 병수육이 녹으면서 실온까지 가온되게 하였다. 완결 후, 반응물을 0℃까지 냉각시키고, 1.5ml의 5M NaOH, 그 다음 1.5ml의 물로 매우 서서히 반응정지시켰다. 30분 동안 교반하고, 이어서 황산마그네슘을 첨가하고, 여과시켰다. 여과액을 농축시켜 ((3R,4S)-1-벤질-3,4-다이메틸피롤

리딘-3,4-다이일)다이메탄올을 무색 오일로서 수득하였다(2.7g).

[1380] 단계 3. 라세미체 (시스) (3,4-다이메틸피롤리딘-3,4-다이일)다이메탄올 303의 제조

[1381] 메탄올(10ml) 중의 ((3R,4S)-1-벤질-3,4-다이메틸피롤리딘-3,4-다이일)다이메탄올(10g, 40mmol)의 용액에 차콜 상의 10% 팔라듐, 습식(1g)을 첨가하였다. 용액을 수소 분위기 하에서 16시간 동안 격렬하게 교반하였다. 완결 후 용액을 셀라이트를 통해서 여과시키고, 건조물로 농축시켜 ((3R,4S)-3,4-다이메틸피롤리딘-3,4-다이일)다이메탄올을 무색 고체로서 수득하였다(5.5g, 86%).

[1382] 단계 4. 라세미체 (시스) 메틸 10-(3,4-비스(하이드록시메틸)-3,4-다이메틸피롤리딘-1-일)-10-옥소데칸오에이트 304의 제조

[1383] CH₂Cl₂(100ml) 중의 3(1.3g, 8.2mmol) 및 모노메틸 세바케이트(1.8g, 8.2mmol)의 용액을 HBTU(3.41g, 9.02mmol) 및 휴닉 염기(5.71ml, 32.8mmol)로 처리하였다. 밤새 교반한 후 혼합물을 NaHCO₃(sat. aq.), 물 및 염수로 세척하고, 이어서 건조시키고(MgSO₄), 여과 및 농축시켰다. 조물질을 크로마토그래피(구배: 0% CH₃OH-CH₂Cl₂에서 20%)에 적용시켜 4(1.8g, 61%)를 수득하였다.

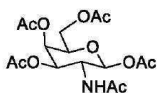
[1384] 단계 5. 라세미체 (시스) 메틸 10-(3-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)-메톡시)메틸)-4-(하이드록시메틸)-3,4-다이메틸피롤리딘-1-일)-10-옥소데칸오에이트 305의 제조

[1385] 피리딘(180ml) 중의 304(1.8g, 5.0mmol) 및 4,4'-다이메톡시트리틸 클로라이드(1.7g, 5.0mmol)의 용액을 밤새 교반하였다. 이어서 피리딘을 감압 하에서 제거하고, 조물질을 크로마토그래피(구배: 0% CH₃OH-CH₂Cl₂에서 10%)에 적용시켜 5(1.4g, 42%)를 황색 오일로서 수득하였다.

[1386] 단계 6. 라세미체 (시스) 리튬 10-(3-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)-메톡시)메틸)-4-(하이드록시메틸)-3,4-다이메틸피롤리딘-1-일)-10-옥소데칸오에이트 306의 제조

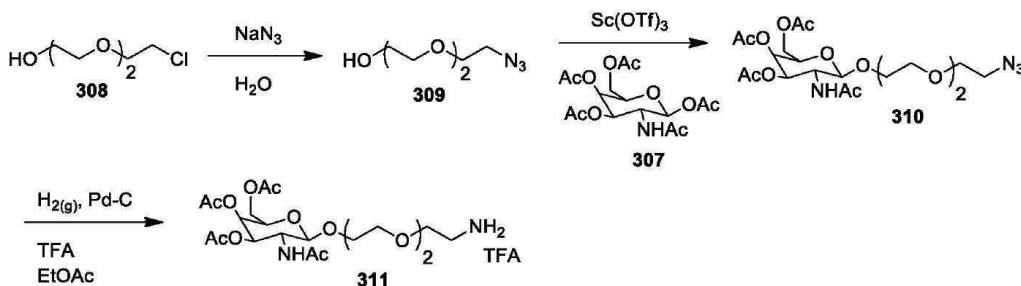
[1387] THF(50ml) 및 물(50ml) 중의 화합물 305(3.0g, 4.6mmol)의 용액에 수산화리튬(121mg, 5.0mmol)을 첨가하였다. 용액을 4시간 실온에서 교반하고, 이어서 농축시켜 THF를 제거하였다. 남아있는 수성 용액을 밤새 동결 건조시켜 연한 분홍색 고체를 수득하였다(2.9g, 정량적). 화합물 306을 2개의 시스-부분입체이성질체의 혼합물로서 제조하였다.

[1388] 반응식 51 피아세틸화된 갈락토사민 307의 합성



[1389] 피리딘(1.5L) 중의 D-갈락토사민 염산염(250g, 1.16mol)을 아세트산 무수물(1.25L, 13.2mol)로 45분에 걸쳐서 처리하였다. 밤새 교반한 후 반응 혼합물을 3개의 1 l 분획으로 나누었다. 각각의 1 l 분획을 3 l의 빙수 중에 붓고, 1시간 동안 혼합하였다. 혼합한 후 고체를 여과시키고, 합하고, 액체 질소 상에서 동결시키고, 이어서 5일 동안 동결건조시켜 피아세틸화된 갈락토사민 7(369.4g, 82%)을 백색 고체로서 수득하였다. Rf(0.58, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

[1391] 반응식 52 GalNAc 단량체의 합성



[1392] 단계 1 화합물 309의 제조

[1394] 물(1 l) 중의 2-[2-(2-클로로에톡시)]에탄올 **308**(100g, 593mmol)의 용액을 NaN_3 (77g, 1.19mol)로 처리하고, 가열하였다(90℃). 교반 후(72시간) 용액을 냉각시키고(RT), CH_2Cl_2 로 추출하였다(4×). 합한 유기물을 염수로 세척하고, 건조시키고(MgSO_4), 여과시키고, 농축시키고, 추가 가공 없이 사용하였다. 화합물 **9**(88.9g, 86%)를 연한 황색 오일로서 수득하였다.

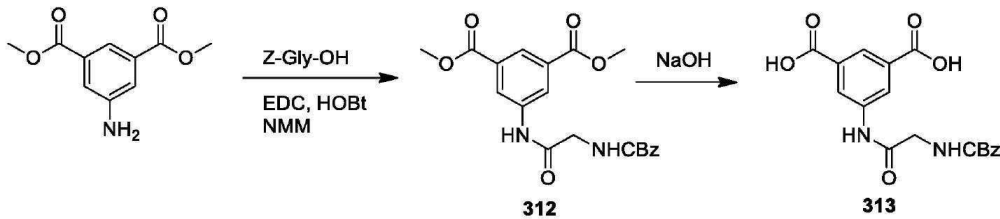
[1395] **단계 2 화합물 310의 제조**

[1396] 1,2-다이클로로에탄(40ml) 중의 **7**(2.76g, 7.1mmol) 및 **309**(1.37g, 7.8mmol)의 용액을 $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ (174mg, 0.36mmol)로 처리하고, 가열하였다(85℃). 교반 후(2시간) 혼합물을 냉각시키고(RT), TEA(4ml)의 첨가에 의해서 반응정지시키고, 농축시켰다. 조물질을 크로마토그래피에 적용시켜 **310**(3.03g, 85%)을 연한 황색 발포체로서 수득하였다.

[1397] **단계 3 화합물 311의 제조**

[1398] EtOAc(30ml) 중의 **310**(3.02g, 5.99mmol) 및 Pd/C(300mg, 10% Pd 로딩 - 습식 지지체)의 용액을 TFA(576μl, 7.5mmol)로 처리하였다. 반응 혼합물을 수소 기체로 퍼징시키고(45분), 이어서 질소 기체로 퍼징시키고(10분), 이어서 셀라이트를 통해서 여과시켰다. 여과액을 농축시키고, 이어서 크로마토그래피에 적용시켜 **311**(2.67g, 75%)을 갈색 발포체로서 수득하였다.

[1399] **반응식 53 방향족 코어의 합성**



[1400]

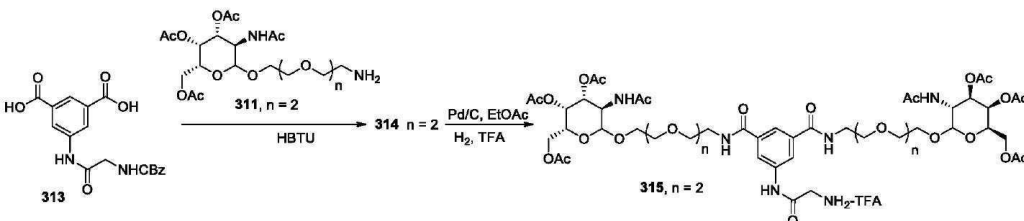
[1401] **단계 1. 다이메틸 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)-아이소프탈레이트 312의 제조**

[1402] DMF(50ml) 중의 다이메틸 5-아미노아이소프탈레이트(5g, 24mmol), Z-Gly-OH(5g, 24mmol), EDC(5g, 26.3mmol), HOBt(3.6g, 26.3mmol), NMM(2.9ml, 26.3mmol)의 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. 완결 후, 반응 혼합물을 에틸 아세테이트(250ml)로 희석시키고, 각각 1M HCl(2×100ml), 포화 중탄산나트륨(1×100ml) 및 염수(2×100ml)로 세척하였다. 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 건조물로 농축시켜 다이메틸 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)-아세트아미도)아이소프탈레이트를 무색 고체로서 수득하였다(7.2g, 79%).

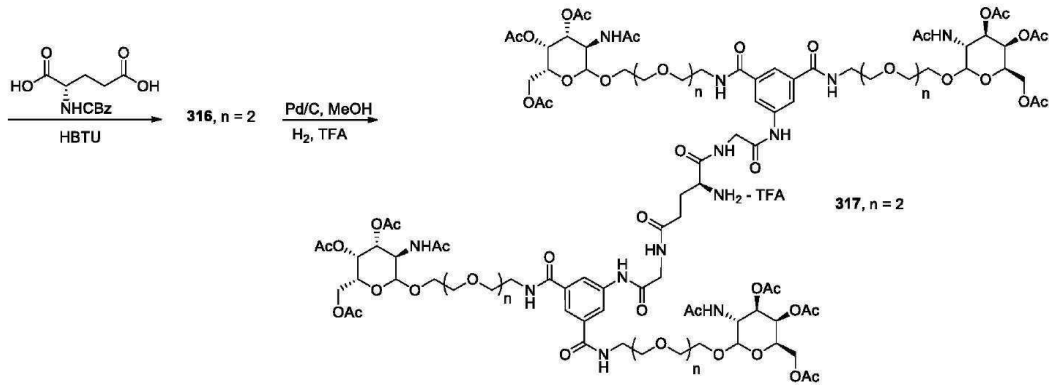
[1403] **단계 2. 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)아이소프탈산 313의 제조**

[1404] 메탄올(25ml) 및 THF(25ml) 중의 메틸 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)아이소프탈레이트(7.2g)의 용액에 1M NaOH(25ml)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 2시간 동안 교반하고, 이어서 농축시켜 THF 및 MeOH를 제거하였다. 남아있는 수성 용액을 물(75ml)로 희석시키고, 빙수욕에서 냉각시키고, 6M HCl을 사용하여 pH = 1로 산성화시켰다. 고체를 여과시키고, 물(3×100ml)로 세척하였다. 고체를 동결 건조시켜 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)-아이소프탈산(6.9g, 정량적)을 수득하였다.

[1405] **반응식 54: 사랑체의 제조**



[1406]



[1407]

[1408]

단계 1 화합물 314의 제조

[1409]

CH₂Cl₂(150mℓ) 중의 **313**(2.09g, 5.6mmol) 및 **311**(8.34g, 14.07mmol)의 용액을 HBTU(6.4g, 16.9mmol) 및 휴닉 염기 (7.35mℓ, 42.2mmol)로 처리하였다. (밤새) 교반한 후 반응 혼합물을 NaHCO₃(sat. aq.) 중에 붓고, 이어서 물 및 염수로 세척하고, 건조시키고(MgSO₄), 여과 및 농축시켰다. 조물질을 크로마토그래피(구배 1에서 12%의 CH₃OH-CH₂Cl₂)에 적용시켜 6(3.97g, 55%)을 연한 황색 발포체로서 수득하였다.

[1410]

단계 2 화합물 315의 제조

[1411]

화합물 **314**(3.92g, 3.07mmol), Pd/C (400mg, 10% 로딩 - 습식 지지체) 및 트라이플루오로아세트산(308μℓ, 4mmol)을 H₂로 퍼징시켰다. H₂ 하에서 교반한 후(밤새), 혼합물을 N₂로 퍼징시키고(15 내지 20분), 이어서 셀라이트를 통해서 여과시키고, 농축시켰다. 조물질을 크로마토그래피에 적용시켜 7(3.36g, 86%)을 백색에서 크림색 발포체로서 수득하였다.

[1412]

단계 3 화합물 316의 제조

[1413]

314와 동일한 방식으로 Z-글루탐산(306mg, 1.09mmol) 및 **315**(3.3g, 2.6mmol)로부터 화합물 **316**을 제조하였다. 수율 1.66g, 60%.

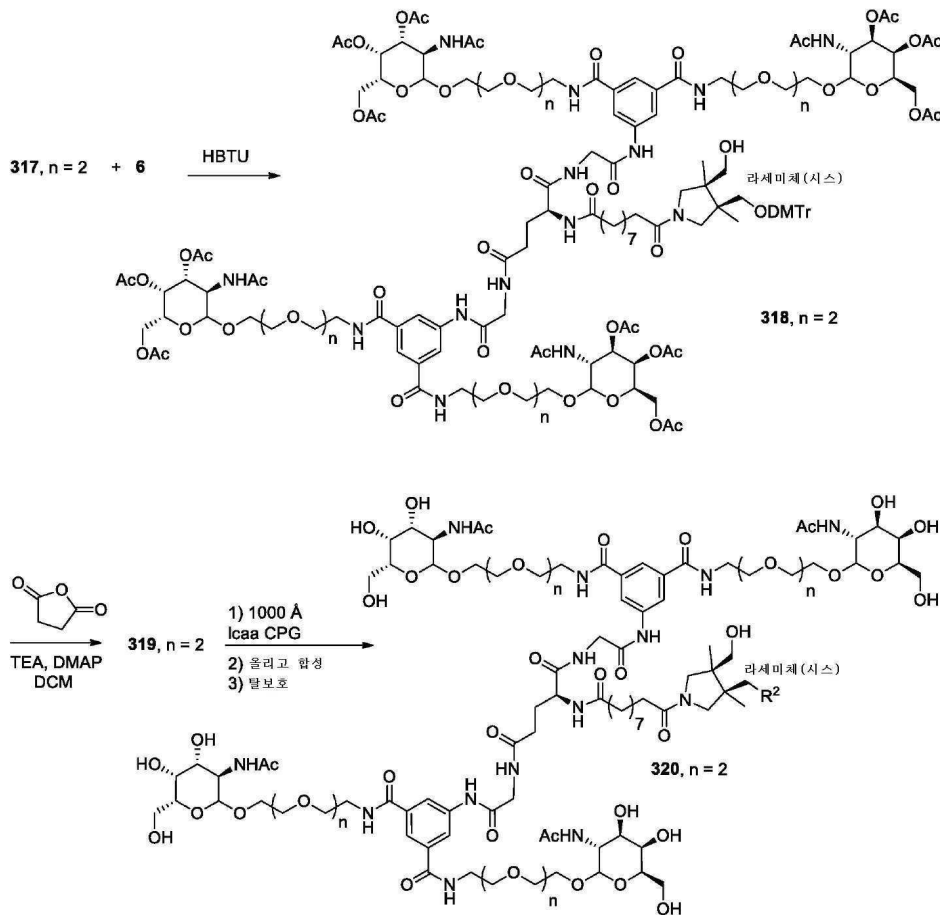
[1414]

단계 4 화합물 317의 제조

[1415]

315와 동일한 방식으로 화합물 **317**을 제조하였다. 수율 1.65g, 정량적.

[1416] 반응식 55 완전한 접합체의 제조



[1417]

[1418] 단계 1 화합물 318의 제조

[1419] CH_2Cl_2 (100ml) 중의 **317**(1.91g, 0.75mmol)의 용액을 먼저 휴닉 염기(392 μl , 2.25mmol), 이어서 **6**(2개의 시스-부분 입체이성질체의 혼합물, 509mg, 0.79mmol), 그 다음 HBTU(356mg, 0.94mmol)로 처리하였다. (밤새) 교반한 후 용액을 NaHCO_3 (sat. aq.) 중에 붓고, 이어서 물 및 염수로 세척하고, 건조시키고(MgSO_4), 여과 및 농축시켰다. 조물질을 크로마토그래피에 적용시켜 **318**(1.19g, 52%)을 백색 발포체로서 수득하였다.

[1420] 단계 2 화합물 319의 제조

[1421] 1,2-다이클로로에탄(100ml) 중의 **318**(1.19g, 0.39mmol)의 용액을 TEA(542 μl , 3.9mmol), DMAP(238mg, 1.95mmol) 및 석신산 무수물(195mg, 1.95mmol)로 처리하고, 가열하였다(85 $^\circ\text{C}$). 교반한 후(2.5시간) 용액을 열로부터 제거하고, CH_3OH (10ml)로 처리하고, 교반하였다(1시간). 교반 후 혼합물을 NaHCO_3 (sat. aq.) 중에 붓고, 이어서 염수로 세척하고, 건조시키고(MgSO_4), 여과 및 농축시켰다. 수득된 잔류물을 추가로 가공하지 않고 사용하였다. 수율 = 1.4g, 정량적.

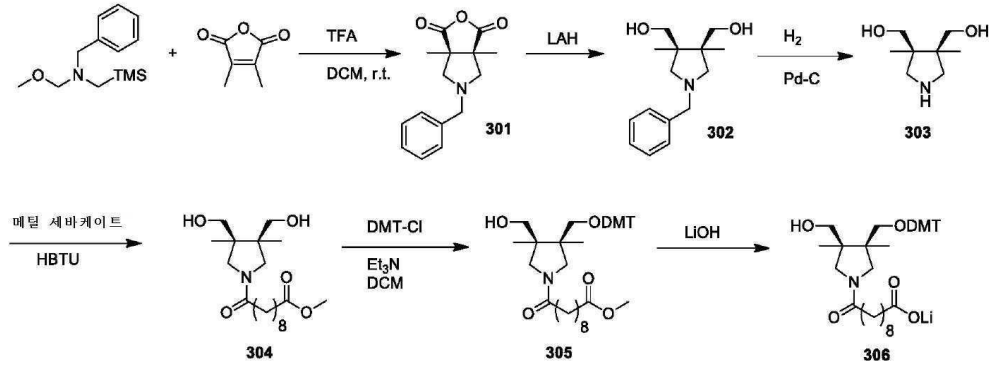
[1422] 단계 3 접합체 320의 제조

[1423] 석신에이트 **319**를 표준 아미드 커플링 화합물질을 사용하여 1000 Å LCAA(장쇄 아미노알킬) CPG(컨트롤 포어 유리) 상에 로딩하였다. 무수 아세트나이트릴(0.3ml) 중의 다이아이소프로필카보다이이미드(52.6 μmol), N-하이드록시 석신에이트(0.3mg, 2.6 μmol) 및 피리딘(10 μl)의 용액을 무수 다이클로로메탄(0.2ml) 중의 **319**(20.6mg, 8 μmol)에 첨가하였다. 이 혼합물을 LCAA CPG(183mg)에 첨가하였다. 현탁액을 밤새 실온에서 온화하게 혼합하였다. **319**가 사라졌을 때(HPLC), 반응 혼합물을 여과시키고, CPG를 1ml의 각각의 다이클로로메탄, 아세트나이트릴로 세척하고, THF 중의 5% 아세트산 무수물/5% N-메틸이미다졸/5% 피리딘의 용액, 이어서 THF, 아세트나이트릴 및 다이클로로메탄으로 세척하였다. 이어서 CPG를 밤새 고 진공 하에서 건조시켰다. UV/Vis(504nm)에 의한 표준 DMTr 검정에 의해서 로딩은 19 $\mu\text{mol/g}$ 인 것으로 결정되었다. 생성된 Ga1Nac 로딩된 CPG 고체 지지체를

표준 절차를 사용하여 자동화 올리고뉴클레오타이드 합성에서 사용하였다. 뉴클레오타이드 탈보호, 그 다음 (동시 갈락토사민 아세테이트 탈보호와 함께) 고체 지지체로부터의 제거는 GalNAc-올리고뉴클레오타이드 접합체 320을 제공하였다.

[1424] 실시예 27접합체 520의 합성

[1425] 반응식 56활성화된 링커의 제조



[1426]

[1427] 단계 1. 라세미체 (시스) 5-벤질-3a,6a-다이메틸테트라하이드로-1H-피로[3,4-c]피롤-1,3(3aH)-다이온 301의 제조

[1428] 다이클로로메탄(75ml) 중의 3,4-다이메틸피란-2,5-다이온(3g, 24mmol) 및 N-벤질-1-메톡시-N-((트라이메틸실릴)메틸)메탄아민(7g, 29.8mmol)의 냉각된 용액(0℃)에 트라이플루오로아세트산(75μl)을 서서히 첨가하였다. 밤새 교반하여 빙옥이 녹으면서 용액이 서서히 실온까지 가온되게 하였다. 반응 혼합물을 건조물로 농축시키고, 에틸 아세테이트(100ml) 중에 용해시키고, 포화 중탄산나트륨(2×100ml)으로 세척하고, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 건조물로 농축시켰다. 실리카젤 상의 칼럼 크로마토그래피(구배: 헥산 중의 20% 에틸 아세테이트에서 100% 에틸 아세테이트)에 의한 정제는 (3aR,6aS)-5-벤질-3a,6a-다이메틸테트라하이드로-1H-피로[3,4-c]피롤-1,3(3aH)-다이온을 황색 오일(3.5g, 56%)로서 제공하였다.

[1429] 단계 2. 라세미체 (시스) (1-벤질-3,4-다이메틸피롤리딘-3,4-다이일)다이메탄올 302의 제조

[1430] 무수 다이에틸 에터(50ml) 중의 (3aR,6aS)-5-벤질-3a,6a-다이메틸테트라하이드로-1H-피로[3,4-c]피롤-1,3(3aH)-다이온(3.5g, 13.4mmol)의 냉각된(0℃) 용액에 리튬 알루미늄 하이드라이드 펠릿(1.5g, 40mmol)을 3개의 분획으로 서서히 첨가하였다. 용액을 밤새 교반하여 빙수욕이 녹으면서 실온까지 가온되게 하였다. 완결 후, 반응물을 0℃까지 냉각시키고, 1.5ml의 5M NaOH, 그 다음 1.5ml의 물로 매우 서서히 반응정지시켰다. 30분 동안 교반하고, 이어서 황산마그네슘을 첨가하고, 여과시켰다. 여과액을 농축시켜 ((3R,4S)-1-벤질-3,4-다이메틸피롤리딘-3,4-다이일)다이메탄올을 무색 오일로서 수득하였다(2.7g).

[1431] 단계 3. 라세미체 (시스) (3,4-다이메틸피롤리딘-3,4-다이일)다이메탄올 303의 제조

[1432] 메탄올(10ml) 중의 ((3R,4S)-1-벤질-3,4-다이메틸피롤리딘-3,4-다이일)다이메탄올(10g, 40mmol)의 용액에 차콜 상의 10% 팔라듐, 습식(1g)을 첨가하였다. 용액을 수소 분위기 하에서 16시간 동안 격렬하게 교반하였다. 완결 후 용액을 셀라이트를 통해서 여과시키고, 건조물로 농축시켜 ((3R,4S)-3,4-다이메틸피롤리딘-3,4-다이일)다이메탄올을 무색 고체로서 수득하였다(5.5g, 86%).

[1433] 단계 4. 라세미체 (시스) 메틸 10-(3,4-비스(하이드록시메틸)-3,4-다이메틸피롤리딘-1-일)-10-옥소데칸오에이트 304의 제조

[1434] CH₂Cl₂(100ml) 중의 3(1.3g, 8.2mmol) 및 모노메틸 세바케이트(1.8g, 8.2mmol)의 용액을 HBTU(3.41g, 9.02mmol) 및 휴닉 염기(5.71ml, 32.8mmol)로 처리하였다. 밤새 교반한 후 혼합물을 NaHCO₃(sat. aq.), 물 및 염수로 세척하고, 이어서 건조시키고(MgSO₄), 여과 및 농축시켰다. 조물질을 크로마토그래피(구배: 0% CH₃OH-CH₂Cl₂에서 20%)에 적용시켜 4(1.8g, 61%)를 수득하였다.

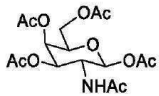
[1435] 단계 5. 라세미체 (시스) 메틸 10-(3-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)-메톡시)메틸)-4-(하이드록시메틸)-3,4-다이메틸피롤리딘-1-일)-10-옥소데칸오에이트 305의 제조

[1436] 피리딘(180ml) 중의 **304**(1.8g, 5.0mmol) 및 4,4'-다이메톡시트리틸 클로라이드(1.7g, 5.0mmol)의 용액을 밤새 교반하였다. 이어서 피리딘을 감압 하에서 제거하고, 조물질을 크로마토그래피(구배: 0% CH₃OH-CH₂Cl₂에서 10%)에 적용시켜 **5**(1.4g, 42%)를 황색 오일로서 수득하였다.

[1437] **단계 6. 라세미체 (시스) 리튬 10-(3-((비스(4-메톡시페닐)-(페닐)메톡시)메틸)-4-(하이드록시메틸)-3,4-다이메틸피롤리딘-1-일)-10-옥소데칸오에이트 306의 제조**

[1438] THF(50ml) 및 물(50ml) 중의 화합물 **305**(3.0g, 4.6mmol)의 용액에 수산화리튬(121mg, 5.0mmol)을 첨가하였다. 용액을 4시간 실온에서 교반하고, 이어서 농축시켜 THF를 제거하였다. 남아있는 수성 용액을 밤새 동결 건조시켜 연한 분홍색 고체를 수득하였다(2.9g, 정량적). 화합물 **306**을 2개의 시스-부분입체이성질체의 혼합물로서 제조하였다.

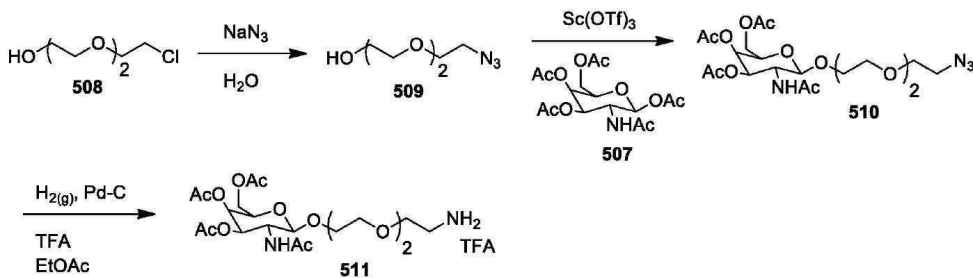
[1439] **반응식 57 피아세틸화된 갈락토사민 507의 합성**



[1440]

[1441] 피리딘(1.5 l) 중의 갈락토사민 염산염(250g, 1.16mol)을 아세트산 무수물(1.25 l, 13.2mol)로 45분에 걸쳐서 처리한다. 밤새 교반한 후 반응 혼합물을 3개의 1 l 분획으로 나눈다. 각각의 1 l 분획을 3 l의 빙수 중에 붓고, 1시간 동안 혼합한다. 혼합한 후 고체를 여과시키고, 합하고, 액체 질소 상에서 동결시키고, 이어서 5일 동안 동결건조시켜 피아세틸화된 갈락토사민 **507**(369.4g, 82%)을 백색 고체로서 수득한다. Rf(0.58, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

[1442] **반응식 58 GalNAc 단량체의 합성**



[1443]

[1444] **단계 1 화합물 509의 제조**

[1445] 물(1 l) 중의 2-[2-(2-클로로에톡시)]에탄올 **508**(100g, 593mmol)의 용액을 NaN₃(77g, 1.19mol)로 처리하고, 가열시킨다(90℃). 교반 후(72시간) 용액을 냉각시키고(RT), CH₂Cl₂로 추출한다(4). 합한 유기물을 염수로 세척하고, 건조시키고(MgSO₄), 여과시키고, 농축시키고, 추가 가공 없이 사용한다. 화합물 **509**(88.9g, 86%)를 연한 황색 오일로서 수득한다.

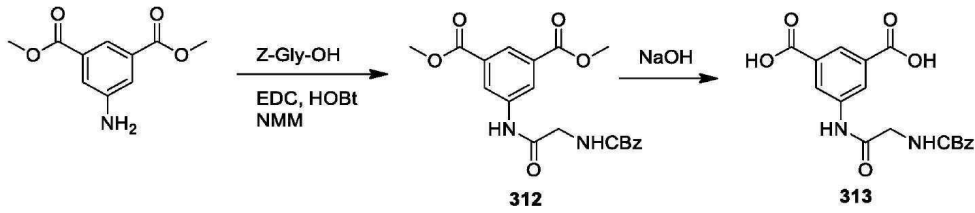
[1446] **단계 2 화합물 510의 제조**

[1447] 1,2-다이클로로에탄(40ml) 중의 **507**(2.76g, 7.1mmol) 및 **509**(1.37g, 7.8mmol)의 용액을 Sc(OTf)₃(174mg, 0.36mmol)로 처리하고, 가열시킨다(85℃). 교반 후(2시간) 혼합물을 냉각시키고(RT), TEA(4ml)의 첨가에 의해서 반응정지시키고, 농축시킨다. 조물질을 크로마토그래피에 적용시켜 **510**(3.03g, 85%)을 연한 황색 발포체로서 수득한다.

[1448] **단계 3 화합물 511의 제조**

[1449] EtOAc(30ml) 중의 **510**(3.02g, 5.99mmol) 및 Pd/C(300mg, 10% Pd 로딩 - 습식 지지체)의 용액을 TFA(576μl, 7.5mmol)로 처리한다. 반응 혼합물을 수소 기체로 퍼징시키고(45분), 이어서 질소 기체로 퍼징시키고(10분), 이어서 셀라이트를 통해서 여과한다. 여과액을 농축시키고, 이어서 크로마토그래피에 적용시켜 **511**(2.67g, 75%)을 갈색 발포체로서 수득한다.

[1450] 반응식 59방향족 코어의 합성



[1451]

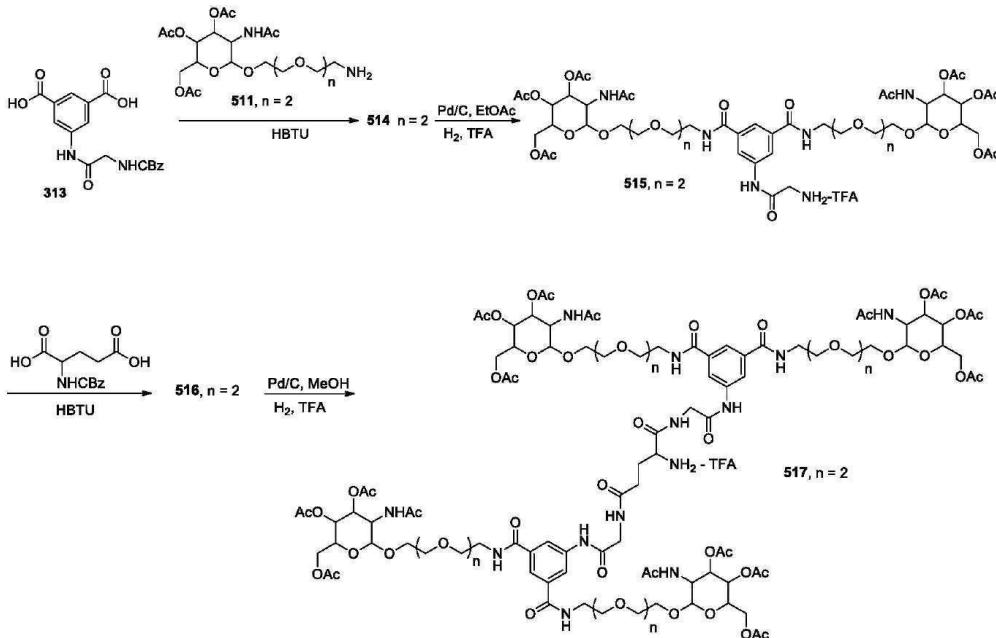
[1452] 단계 1. 다이메틸 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)-아이소프탈레이트 312의 제조

[1453] DMF(50ml) 중의 다이메틸 5-아미노아이소프탈레이트(5g, 24mmol), Z-Gly-OH(5g, 24mmol), EDC(5g, 26.3mmol), HOBt(3.6g, 26.3mmol), NMM(2.9ml, 26.3mmol)의 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. 완결 후, 반응 혼합물을 에틸 아세테이트(250ml)로 희석시키고, 각각 1M HCl(2×100ml), 포화 중탄산나트륨(1×100ml) 및 염수(2×100ml)로 세척하였다. 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 건조물로 농축시켜 다이메틸 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)-아세트아미도)아이소프탈레이트를 무색 고체로서 수득하였다(7.2g, 79%).

[1454] 단계 2. 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)아이소프탈산 313의 제조

[1455] 메탄올(25ml) 및 THF(25ml) 중의 메틸 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)아이소프탈레이트 (7.2g)의 용액에 1M NaOH(25ml)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 2시간 동안 교반하고, 이어서 농축시켜 THF 및 MeOH를 제거하였다. 남아있는 수성 용액을 물(75ml)로 희석시키고, 빙수욕에서 냉각시키고, 6M HCl을 사용하여 pH = 1로 산성화시켰다. 고체를 여과시키고, 물(3×100ml)로 세척하였다. 고체를 동결 건조시켜 5-(2-((2-옥소-2-페닐-1λ²-에틸)아미노)아세트아미도)-아이소프탈산(6.9g, 정량적)을 수득하였다.

[1456] 반응식 60: 사랑체의 제조



[1457]

[1458] 단계 1 화합물 514의 제조

[1459] CH₂Cl₂(150ml) 중의 313(2.09g, 5.6mmol) 및 511(8.34g, 14.07mmol)의 용액을 HBTU(6.4g, 16.9mmol) 및 휴닉 염기 (7.35ml, 42.2mmol)로 처리한다. (밤새) 교반한 후 반응물을 혼합물 is 중에 부었다 NaHCO₃ (sat. aq.) 이어서 물 및 염수로 세척하고, 건조시키고(MgSO₄), 여과 및 농축시킨다. 조물질을 크로마토그래피(구배 1에서 12%의 CH₃OH-CH₂Cl₂)에 적용시켜 6(3.97g, 55%)을 연한 황색 발포체로서 수득한다.

[1460] 단계 2 화합물 515의 제조

[1461] 화합물 514(3.92g, 3.07mmol), Pd/C (400mg, 10% 로딩 - 습식 지지체) 및 트라이플루오로아세트산(308 μ l, 4mmol)을 H₂로 퍼징시킨다. H₂ 하에서 교반한 후(밤새), 혼합물을 N₂로 퍼징시키고(15 내지 20분), 이어서 셀라이트를 통해서 여과시키고, 농축시킨다. 조물질을 크로마토그래피에 적용시켜 7(3.36g, 86%)을 백색에서 크림색 발포체로서 수득한다.

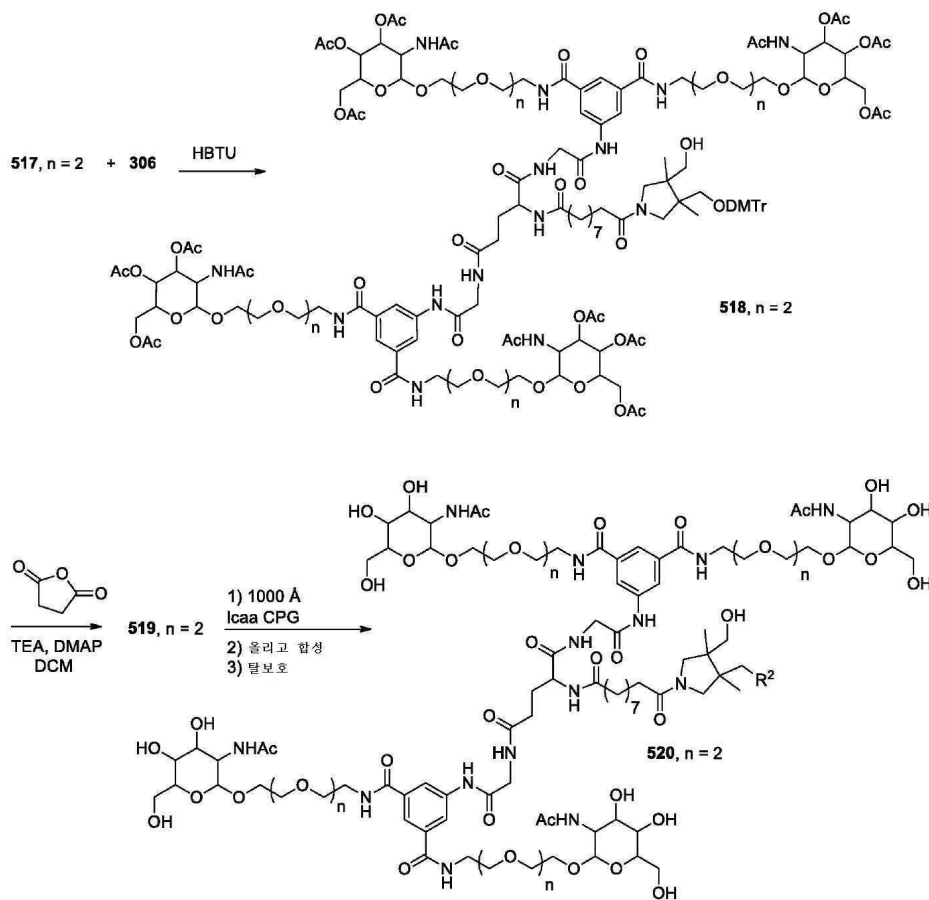
[1462] 단계 3 화합물 516의 제조

[1463] 514와 동일한 방식으로 Z-글루탐산(306mg, 1.09mmol) 및 515(3.3g, 2.6mmol)로부터 화합물 516을 제조한다. 수율 1.66g, 60%.

[1464] 단계 4 화합물 517의 제조

[1465] 515와 동일한 방식으로 화합물 517을 제조한다. 수율 1.65g, 정량적.

[1466] 반응식 61 완전한 접합체의 제조



[1467]

[1468] 단계 1 화합물 518의 제조

[1469] CH₂Cl₂(100ml) 중의 517(1.91g, 0.75mmol)의 용액을 먼저 휴닉 염기(392 μ l, 2.25mmol), 이어서 306(2개의 시스-부분입체이성질체의 혼합물, 509mg, 0.79mmol), 그 다음 HBTU(356mg, 0.94mmol)로 처리한다. (밤새) 교반한 후 용액을 NaHCO₃(sat. aq.) 중에 붓고, 이어서 물 및 염수로 세척하고, 건조시키고(MgSO₄), 여과 및 농축시켰다. 조물질을 크로마토그래피에 적용시켜 518(1.19g, 52%)을 백색 발포체로서 수득한다.

[1470] 단계 2 화합물 519의 제조

[1471] 1,2-다이클로로에탄(100ml) 중의 518(1.19g, 0.39mmol)의 용액을 TEA(542 μ l, 3.9mmol), DMAP(238mg, 1.95mmol) 및 석신산 무수물(195mg, 1.95mmol)로 처리하고, 가열시킨다(85°C). 교반한 후(2.5시간) 용액을 열로부터 제거하고, CH₃OH(10ml)로 처리하고, 교반한다(1시간). 교반 후 혼합물을 NaHCO₃(sat. aq.) 중에 붓고, 이어서 염수로 세척

하고, 건조시키고(MgSO₄), 여과 및 농축시킨다. 수득된 잔류물을 추가로 가공하지 않고 사용한다. 수율 = 1.4g, 정량적.

[1472] 단계 3 접합체 520의 제조

[1473] 석신에이트 519를 표준 아마이드 커플링 화학물질을 사용하여 1000 Å LCAA(장쇄 아미노알킬) CPG(컨트롤 포어 유리) 상에 로딩한다. 무수 아세트나이트릴(0.3ml) 중의 다이아이소프로필카보다이이미드(52.6 μmol), N-하이드록시 석신에이트(0.3mg, 2.6 μmol) 및 피리딘(10 μl)의 용액을 무수 다이클로로메탄(0.2ml) 중의 519(20.6mg, 8 μmol)에 첨가한다. 이 혼합물을 LCAA CPG(183mg)에 첨가한다. 현탁액을 밤새 실온에서 온화하게 혼합하였다. 519가 사라졌을 때(HPLC), 반응 혼합물을 여과시키고, CPG를 1ml의 각각의 다이클로로메탄, 아세트나이트릴로 세척하고, THF 중의 5% 아세트산 무수물/5% N-메틸이미다졸/5% 피리딘의 용액, 이어서 THF, 아세트나이트릴 및 다이클로로메탄으로 세척한다. 이어서 CPG를 밤새 고 진공 하에서 건조시킨다. UV/Vis(504nm)에 의한 표준 DMTr 검정에 의해서 로딩은 19 μmol/g인 것으로 결정되었다. 생성된 GalNAc 로딩된 CPG 고체 지지체를 표준 절차를 사용하여 자동화 올리고뉴클레오타이드 합성에서 사용한다. 뉴클레오타이드 탈보호, 그 다음 (동시 갈락토사민 아세테이트 탈보호와 함께) 고체 지지체로부터의 제거는 GalNAc-올리고뉴클레오타이드 접합체 520을 제공한다.

[1474] 실시예 28. TTR siRNA 접합체의 생체내 시험

[1475] 화합물 320(식 중, R²는 표 3에 기술된 변형된 TTR siRNA를 포함함)을 TTR 녹다운의 야생형 마우스 모델에서 생체내 활성도에 대해서 시험하였다. 본 실시예에서, 화합물 320(식 중, R²는 변형된 TTR siRNA를 포함함)은 TTR(트란스타이레틴(Transthyretin)) 아밀로이드증의 희귀 질환(orphan disease)을 위한 가능한 치료제로서 입증된다. 이 질환을 앓고 있는 환자에서, 트란스타이레틴 단백질의 미스폴딩 및 응집이 질환 진행과 연관된다. 이러한 siRNA-GalNAc 접합체를 사용함으로써, 환자에서 미스폴딩된/응집된 단백질의 양이 감소될 수 있고, 그 결과 질환의 진행을 중단시킬 가능성이 있다. 따라서, 특정 실시형태는 화합물 320(식 중, R²는 변형된 TTR siRNA를 포함함) 및 트란스타이레틴 아밀로이드증을 치료하기 위한 이의 용도를 제공한다.

표 3

화학적으로 변형된 TTR siRNA 듀플렉스

siRNA 번호	센스 가닥 서열번호	센스 가닥 5'-3'	안티센스 가닥 서열번호	안티센스 가닥 5'-3'
40	서열번호 75	AsasCaGuGuUCUuGcUcUaUaA	서열번호 76	usUsaUaGaGcAagaAcAcUgUususu

2'-O-메틸 뉴클레오타이드 = 소문자; 2'-플루오로 뉴클레오타이드 = 대문자
포스포로티오에이트 링커 = s; 비변형된 = 대문자

[1476]

[1477] TTR siRNA 서열 및 동물 모델 모두는 문헌[Nair et al., J. Am. Chem. Soc., 36(49),16958-16961(2014)]에 기술되어 있다. 모든 동물-관련 절차는 동물 관리 기준에 관한 캐나다 동물 관리 협회(CCAC) 가이드라인에 따라서 서면 운영 절차에 따라서 수행하였고, 지역 실험 동물 운영 위원회(IACUC)에 의해서 승인되었다.

[1478] siRNA 처리: 암컷 C57BL/6 마우스(n = 4)에게 단일 2mg/kg 용량의 화합물 320(R²는 변형된 TTR siRNA를 포함함)을 0일에 1회(동물당 1회 용량) 견갑골 영역 내의 피하 주사를 통해서 투여하였다. 동물 중 하나의 군에 대조군으로서 제공되는 비히클 단독(PBS)을 투여하였다.

[1479] 수집: 모든 동물을 시험품 처리 후에 정의된 시간 지점(2, 4, 7, 9, 14 및 21일)에 시험 채혈하여 혈청 TTR 수준의 최대 감소 및 약리학적 활성의 기간을 결정하였다.

[1480] 분석: 혈장 샘플 중의 TTR 단백질 수준을 Abnova Prealbumin(마우스) ELISA 키트(세다 레인(Cedar Lane), 카달로그 번호KA2070)를 사용하여 제조사의 설명서에 따라서 결정하였다. TTR 혈장 단백질 값을 개별 혈장 샘플에 대해서 계산하고, 각각의 군의 평균을 결정하였다. 이들 평균으로부터, 대조군에 상대적인 TTR 단백질 수준(PBS 처리된 동물에 상대적인 %)을 결정하였다.

[1481] 결과: 시험 결과를 하기 표 4에 제공한다. 처리 후 2, 4, 7, 9, 14 및 21일에 값을 (PBS 대조군에 상대적인) TTR 단백질 수준 %로서 나타낸다.

표 4

표 3 으로부터의 GaINAc 접합된 siRNA 의 단회 피하투여(2mg/kg) 후 마우스에서의 혈청 TTR 단백질 수준. TTR 단백질 데이터를 PBS 처리된 마우스 값의 백분율로서 나타냄.

siRNA 번호	리간드 Cpd #	2일	4일	7일	9일	14일	21일
40	320	36.6	15.7	17.2	17.7	36.9	59.2

[1482]

[1483]

결론: 화합물 320(식 중, R⁹는 표 3에 기술된 변형된 TTR siRNA를 포함함)으로 처리된 동물은, 표적 mRNA 및 단백질의 현저한 억감을 나타내었고, TTR 단백질의 최대 억감은 피하 주사 후 4일 내지 9일에 일어났다.

[1484]

실시예. 29. HBV siRNA 접합체의 생체내 시험

[1485]

GaINAc 리간드에 접합된 실시예 25의 표 1에 기술된 화학적으로 변형된 HBV siRNA를 HBV 감염의 확립된 마우스 모델에서 생체내 활성도에 대해서 시험하였다. AAV-HBV1.2 C57BL/6 마우스 모델에서, HBV의 게놈 초과 길이 서열을 암호화하는 아데노 연관 바이러스(AAV) 벡터의 주사 이후에 안정적이고 지속적인 HBV 발현이 달성되며, 이것은 HBV RNA 및 단백질의 간 발현 및 혈액으로의 바이러스 및 서브-바이러스 입자의 분비로 이어진다.

[1486]

본 연구에서 사용되는 AAV-HBV1.2 작제물은 문헌[Dion *et al.*, *Journal of Virology*, 87(10), 5554-5563 (2013)]에 상세하게 제공된 것을 기반으로 하였다. 모든 동물-관련 절차는 동물 관리 기준에 관한 캐나다 동물 관리 협회(CCAC) 가이드라인에 따라서 서면 운영 절차에 따라서 수행하였고, 지역 실험 동물 운영 위원회(IACUC)에 의해서 승인되었다.

[1487]

각각의 동물을 AAV-HBV1.2 벡터의 1E11 벡터 게놈(VG)으로 접종하였다. 처리 전에, 모든 동물을 시험 채혈하고, 개별 동물에 대해서 혈청 HBsAg 수준을 결정하여 확립된 HBV 발현을 확인하였다.

[1488]

siRNA 처리: 마우스의 군(전형적으로 n = 5)에게 단일 3mg/kg 용량의 HBV siRNA 접합체를 0일에 1회(동물당 1회 용량) 견갑골 영역 내의 피하 주사를 통해서 투여하였다. 동물 중 하나의 군에 대조군으로서 제공되는 비히클 단독(염수)을 투여하였다.

[1489]

수집: 모든 마우스를 처리 전, 0일에 그리고 시험품 투여 후 정의된 시간 지점(예를 들어, 시험일 7, 14, 21, 28, 42, 56 및 70일)에 시험 채혈하여 혈청 HBsAg 수준의 최대 감소 및 약리학적 활성의 기간을 결정하였다.

[1490]

분석: 혈청 샘플 중의 HBsAg 수준을 바이오래드(Biorad) EIA GS HBsAg 3.0 키트(바이오래드, 카달로그 번호 32591)를 사용하여 제조사의 설명서에 따라서 결정하였다. 각각의 처리군으로부터의 풀링된 혈청을 사용하여 개별 시간 지점에서 군 평균 HBsAg 수준을 결정하였다. 데이터를 분석하고, 처리전 기준선에 상대적인 HBsAg 수준(0일에 상대적인 %)으로서 표현하였다.

[1491]

결과: 표 1에 기술된 화학적으로 변형된 HBV siRNA 각각의 시험으로부터의 결과를 표 5에 제공한다. 처리 후 7, 14, 21, 28, 42, 56 및 70일에 값을 (0일 기준선에 상대적인) HBsAg 수준 %로서 나타낸다.

표 5

실시에 25의 표 1로부터의 GaINAc 접합된 siRNA의 단회 피하 투여(3mg/kg) 후
 마우스에서의 혈청 HBsAg 수준
 HBsAg 데이터는 기준선(0일) 값의 백분율로서 나타냄

siRNA 번호	리간드 Cpd #	7일	14일	21일	28일	42일	56일	70일
2	194	7.0	4.1	4.2	5.6	10.1	17.2	29.5
3	194	5.8	2.4	1.8	2.3	4.6	10.6	12.9
3	191a	1.7	0.3	0.3	0.3	0.5	0.9	2.3
3	320	3.1	0.5	0.5	0.5	0.8	1.6	3.6
4	194	5.5	3.1	3.2	4.4	6.0	9.5	16.2
20	231	5.3	2.2	1.9	3.4	4.8	9.8	17.4
20	320	2.6	1.0	1.1	1.3	3.1	6.4	
25	191a	1.9	0.2	0.2	0.3	0.5	1.1	1.8
25	320	1.1	0.1	0.3	0.4	1.4	2.9	3.5
26	194	10.4	3.2	2.7	3.0	4.0	6.3	12.3
31	194	13.3	7.0	8.0	11.7	17.7	25.6	36.7
32	194	13.7	5.7	8.2	11.6	16.6	25.0	46.5
33	194	14.4	8.0	10.8	14.4	24.3	41.8	65.2

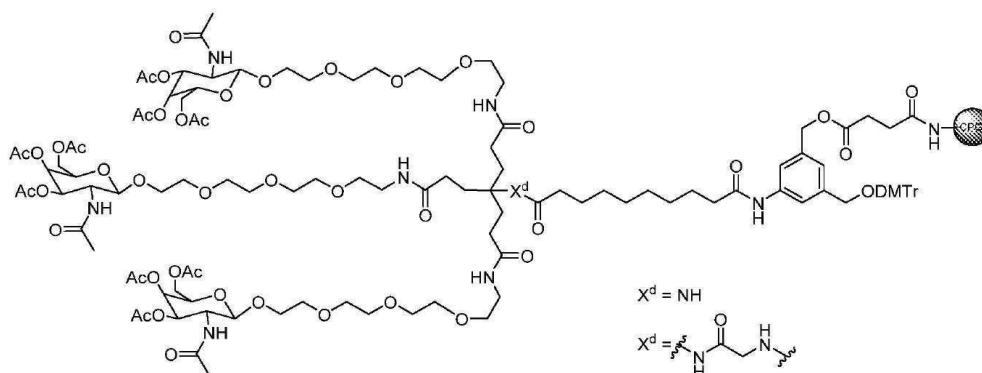
[1492]

[1493]

시험된 13종의 화합물 각각은 피하 투여된 치료제의 단일 용량 이후에 혈청 HBV 표면 항원 감소를 유발하였고, 14일 또는 21일에 최대 효과가 획득되었다. 최대 감소를 나타낸 4종의 화합물은 화합물 191a(여기서, 올리고뉴클레오타이드는 siRNA 3 또는 25를 포함함), 및 화합물 320(여기서, R²는 siRNA 3 또는 25를 포함함)이었다. 이들 4종의 화합물은 제1 시간 지점(7일)에서 보다 신속한 감소(97% 이상), 더 큰 최대 감소(99% 이상) 및 보다 지속되는 감소 효과(56일, 투여 8주 후에 여전히 97% 이상)가 주목되었다.

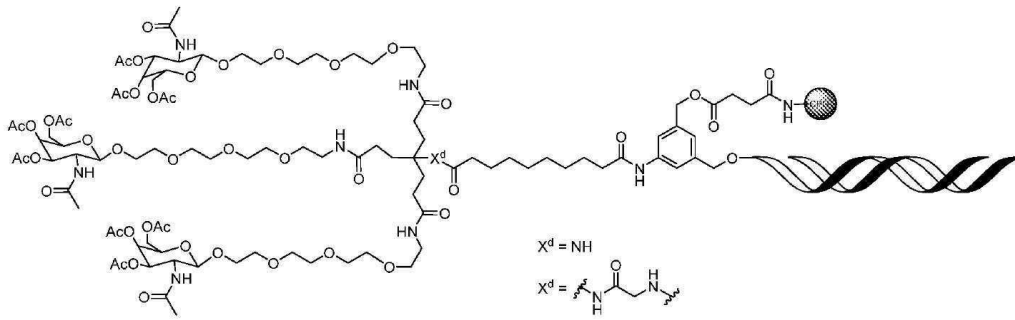
도면

도면1



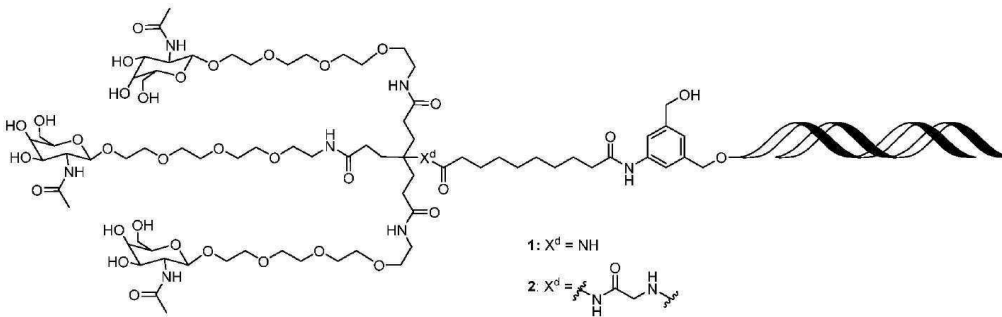
도 1: 화학식 1c의 중간체 화합물, 여기서, 표적화 리간드/링커는 교체상 지지체에 결합되고, Pg^1 은 보호기 DMTr임.

도면2



도 2: 올리고뉴클레오타이드가 공유 결합된 화학식 Id의 대표적인 화합물, 여기서, 표적화 리간드는 교체상 지지체에 결합됨

도면3



도 3: 화학식 Id의 대표적인 화합물, 여기서, 표적화 리간드-올리고 뉴클레오타이드 접합체는 교체상 지지체로부터 절단되고, 탈보호되어 있음.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ARBUTUS BIOPHARMA CORPORATION

<120> TARGETED COMPOSITIONS

<130> WO/2018/191278

<140> PCT/US2018/026918

<141> 2018-04-10

<150> US 62/525,071

<151> 2017-06-26

<150> US 62/484,247

<151> 2017-04-11

<160> 76

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223>

> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 1

cgugugcacu ucgcuucacc u

21

<210> 2

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 2
 aggugaagcg aagugcacac gguuu
 <210> 3
 <211> 17

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 3
 ugcacuucgc uucaccu

17

<210> 4
 <211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222>

(3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(20)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 4

aggugaagcg aagugcacac gu

22

<210> 5

<211> 17

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 5
 ugcacuucgc uucaccu

 <210> 6
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222
 > (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"

17

<220><221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220>
><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"

 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 6
 aggugaagcg aagugcacac gu
 <210> 7
 <211> 17

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 7
 ugcacuucgc uucaccu
 <210> 8
 <211> 22
 <212> RNA

17

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 8
 aggugaagcg aagugcacac gu

22

<210> 9
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base
<222>
(3)..(3)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<
<222> (10)..(10)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221>
 > modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 9
 ccgugugcac uucgcuucac c
 <210> 10
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

21

<220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base

 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"

 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 10
 ggugaagcga agugcacacg guc 23
 <210> 11
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base

 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221
 > modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

<222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)

<223>

2'-O-Methyl nucleotide

<400> 11

ccgugugcac uucgcuucac c

21

<210> 12

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 12

ggugaagcga agugcacacg guc

23

<210> 13
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base

<222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <
 220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223>
 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 13
 ccgugugcac uucgcuucac c
 <210> 14
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

21

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<220><221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220>
><221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(22)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (22)..(22)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(23)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 14

ggugaagcga agugcacacg guc

23

<210> 15

<211> 21

<212>

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 15

ccguggcac uucgcuac c

21

<210> 16

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)

 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 16
 ggugaagcga agugcacacg guc 23
 <210> 17
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base

<222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base

<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (21)..(21)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<400> 17
ccgugugcac uucgcuucac c

21

<210> 18
<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222

> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220>
<221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)

```

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (21)..(21)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (21)..(22)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223>
> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (23)..(23)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<400> 18
ggugaagcga agugcacacg guc
<210> 19
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<220><221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature
<222> (1)..(2)

```

23

<223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223>
 > 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222>
 (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><
 221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 19
 ccguggcac uucgcuucac c
 <210> 20

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <
 220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 20
 ggugaagcga agugcacacg guc
 <210> 21
 <211> 21
 <212
 > RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature

23

<222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide

 <220><221> modified_base

<222> (11)..(11)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 21
 ccgugugcac uucgcuucac c

<210> 22
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)

<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-Fluoro nucleotide


```

<220><221
> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (21)..(21)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (21)..(22)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (23)..(23)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<400> 22
ggugaagcga agugcacacg gucuu
<210> 23
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<220><221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

```

25

<220><221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (21)..(21)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<400> 23

ccgugugcac uucgcuucac c

21

<210> 24

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222

> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220>
<221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223>
 > 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 24
 ggugaagcga agugcacacg gucuu
 <210> 25
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)

25

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223>

2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 25
 ccgugugcac uucgcuucac c 21
 <210> 26
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"

 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 26

ggugaagcga agucacacg gucuu

25

<210> 27

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base

<222> (10)..(10)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base

 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220
 ><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

```

<222> (21)..(21)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<400> 27
ccgugugcac uucgcuucac c
<210> 28
<211> 25
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<220><221> modified_base
<222>
> (1)..(1)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220>
<221> modified_base

```

21

<222> (6)..(6)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(22)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (22)..(22)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(23)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 28

ggugaagcga agugcacacg gucuu

25

<210> 29

<211> 17

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222

> (3)..(3)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 29

gugcacuucg cuucacc

<210> 30

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

17

<220><221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221>
 > modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 30

ggugaagcga agugcacacg gu

22

<210> 31

<211> 17

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220
><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 31
 ggcacauug cuucacc
 <210> 32
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)

17

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221>

> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(20)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 32

ggugaagcga agugcacacg g

21

<210> 33

<211> 17

<212> RNA

<

213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 33
 gugcacuucg cuucacc

17

<210> 34
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature

 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221>
 > modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base

<222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223>
 > /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 34
 ggugaagcga agugcacacg g
 <210> 35
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature

21

<222> (2)..(3)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 35

ccgugugcac uucgcuucac a

21

<210> 36

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222

> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221

> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(22)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (22)..(22)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(23)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 36

ugugaagcga agugcacacg guc

23

<210> 37

<211> 21

<212>

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 37

ccguggcac uucgcuucac a

21

<210> 38

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221>
> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)

 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 38
 ugugaagcga agugcacacg gucuu
 <210> 39
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base

25

<222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base

<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (21)..(21)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<400> 39
ccgugugcac uucgcuucac a

21

<210> 40
<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222

> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223>
 > 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 40
 ugugaagcga agugcacacg gucuu
 <210> 41
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)

25

<223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223>
 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (21)..(21)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<400> 41
ccguggcac uucgcuucac a
<210> 42

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(22)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (22)..(22)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(23)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 42

ugugaagcga agugcacacg gucuu

25

<210> 43

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220

><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 43

ccgugucac uucgcuucac a

<210> 44
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222>
 > (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 44

ugugaagcga agugcacacg gucuu

25

<210> 45

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222>
 > (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base

 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 45

ccgugugcac uucgcuucac a

<210> 46

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220>
<221> modified_base

<222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223>
 > /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 46
 ugugaagcga agugcacacg gucuu
 <210> 47
 <211> 17
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)

25

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)

<223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 47
 ggcacauug cuucaca
 <210> 48
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base

 <222> (1)..(1)

17

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <
 220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(20)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 48
 ugugaagcga agugcacacg gu
 <210> 49
 <211> 17
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

22

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 49
 gugcacuucg cuucaca

17

<210> 50
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222>
 > (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)

 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 50
 ugugaagcga agugcacacg gu
 <210> 51
 <211> 17
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base

22

<222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

<222> (10)..(10)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 51
 gugcacuucg cuucaca
 <210> 52
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)

17

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220>
 ><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(20)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 52

ugugaagcga agugcacacg gu

22

<210> 53

<211> 17

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220>
<221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 53

gugcacuucg cuucaca

17

<210> 54

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 54
 ugugaagcga agugcacacg g

21

<210> 55
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base

<222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222>
 > (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base

<222> (10)..(10)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220>
<221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 55

ucgcuucacc ucugcagcuc g

21

<210> 56

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

```

<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (21)..(21)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (21)..(22)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223>
> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (23)..(23)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<400> 56
cgacgugcag aggugaagcg aaguu
<210> 57
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

```

25

<220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223>

2'-O-Methyl nucleotide

<400> 57

ucgcuucacc ucugcaguc a 21

<210> 58

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 58

ugacgugcag aggugaagcg aaguu

25

<210> 59

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"
 <220><221> modified_base

 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)

<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)

<223>

2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 59
 ucgcuucacc ucugcaguc a 21
 <210> 60
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 60
 ugacgugcag aggugaagcg aaguu
 <210> 61
 <211> 17
 <212
 > RNA
 <213> Artificial Sequence

25

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

<222> (9)..(9)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223>
 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 61
 uucaccucug cacguca
 <210> 62
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

17

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 62

ugacgugcag aggugaagcg au

22

<210> 63

<211> 17

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 63

uucaccucug cacguca

17

<210> 64

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<
<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)

<223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 64
 ugacgucgag aggugaagcg au
 <210> 65
 <211> 17
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

22

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<400> 65
uucaccucug caguca

17

<210> 66
<211> 22
<212> RNA
<213> Artificial Sequence


```

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      oligonucleotide"
<220><221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222>
> (3)..(3)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

```

<222> (9)..(9)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature

<222> (19)..(20)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)

 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 66
 ugacgucgag aggugaagcg au
 <210> 67
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base

22

<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)

<223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

<222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

<222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

<222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

<222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 67

uuuacuagug ccuuuguuc a

21

<210> 68
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222
 > (3)..(3)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)

<223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221
 > modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 68

ugaacaaaug gcacuaguaa acu

23

<210> 69

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 69

uuuacuagug ccauuuguuc a

21

<210> 70

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base

 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base

 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

<222> (10)..(10)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221
> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(22)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (22)..(22)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(23)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 70

ugaacaaaug gcacuaguua acuuu

25

<210> 71

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <
 220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 71
 uuuacuagug ccuuuguuc a
 <210> 72
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

21

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<

220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 72
 ugaacaaaug gcacuaguaa acuuu

25

<210> 73
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222>
 > (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base

 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

<222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220>
 ><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 73
 uuuacuagug ccuuuguuc a
 <210> 74
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

21

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<220><221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> /note="Phosphorothioate linker"
<220><221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)

<223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base

 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223>
 > /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (23)..(23)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <400> 74
 ugaacaaaug gcacuaguaa acuuu
 <210> 75
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)

25

<223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide

 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide

<400> 75
 aacaguguuc uugcucuaua a

21

<210> 76
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> misc_feature

 <222> (2)..(3)
 <223> /note="Phosphorothioate linker"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221>

> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-Fluoro nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-Fluoro nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (21)..(21)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (21)..(22)
<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> /note="Phosphorothioate linker"

<220><221> modified_base
<222> (23)..(23)
<223> 2'-O-Methyl nucleotide

<400> 76

uuauagagca agaacacugu uuu

23