



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년06월23일
(11) 등록번호 10-1750640
(24) 등록일자 2017년06월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) C07H 21/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/11 (2013.01)
C07H 21/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7016899(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2008년05월21일
심사청구일자 2015년07월23일
- (85) 번역문제출일자 2015년06월24일
- (65) 공개번호 10-2015-0080027
- (43) 공개일자 2015년07월08일
- (62) 원출원 특허 10-2009-7024222
원출원일자(국제) 2008년05월21일
심사청구일자 2013년05월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2008/064417
- (87) 국제공개번호 WO 2008/147824
국제공개일자 2008년12월04일
- (30) 우선권주장
PA200700751 2007년05월22일 덴마크(DK)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2003037909 A1*
WO2005089287 A1
WO2006085987 A1
Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol. 3,
No. 1, pp. 19-28, 1995
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
아크투루스 켈라퓨틱스, 인크.
미국, 캘리포니아 92121, 샌 디에고, 스위트 200,
사이언스 센터 드라이브 10628
- (72) 발명자
웬젤, 제스퍼
덴마크 디케이-5000 오펜스 씨 에스디알. 볼르바
드 44.3.
- (74) 대리인
양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 17 항

심사관 : 김정희

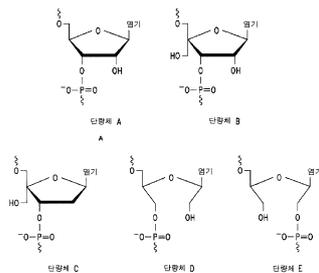
(54) 발명의 명칭 **치료제를 위한 올리고머**

(57) 요약

본 발명은 1개 이상의, 임의로는 1개 초과와 히드록시메틸 치환된 뉴클레오티드 단량체(들)를 포함하는 RNA 올리고뉴클레오티드 또는 RNA 올리고뉴클레오티드 복합체 (본원에서 RNA 복합체로도 기재됨)에 관한 것이다. (비치환되거나, 예컨대 연결기로 O-치환되거나, 또는 임의로 치환 또는 연결화된 아미노메틸기로 전환될 수 있는) 히드

(뒷면에 계속)

대표도



록시메틸기를 포함하는 뉴클레오티드 단량체는 히드록시메틸 치환된 뉴클레오티드 단량체로 간주된다. 상기 히드록시메틸기는 뉴클레오티드간 결합 형성에 참여하지 않으며 천연 RNA 단량체의 히드록시메틸기 (5'-히드록시기를 포함함)가 아니다. 본 발명의 RNA 복합체는 치료학적 용도, 진단학적 용도 또는 연구 용도에 유용할 수 있다. 상기 복합체에는 안티센스 가닥 및 연속적 또는 불연속적 패신저 가닥 ('센스 가닥')을 포함하며 유전자 발현을 조절할 수 있는 단형 간섭 RNA 복합체 (siRNA 이중 가닥)가 포함된다. 1개 이상의 상기 가닥, 가능하게는 1개 초과인 상기 가닥은 3'-말단에, 5'-말단에 또는 내부에 위치할 수 있는 1개 이상의 본 발명의 히드록시메틸 치환된 뉴클레오티드 단량체(들)를 이용하여 개질된다. 본 발명의 RNA 복합체는 또한 1개 이상의, 임의로는 1개 초과인 히드록시메틸 치환된 뉴클레오티드 단량체(들)로 개질된 단일 가닥 RNA 올리고뉴클레오티드 ('RNA 가닥')일 수 있다. 본원에서 용어 RNA 복합체가 사용되는 경우에는 항상 상기 단일 가닥 RNA 가닥이 포함되는 것으로 간주되어야 한다. 본 발명의 복합체는 전부 천연 RNA 단량체로 이루어진 상응하는 복합체에 비해 핵융해성 분해에 대한 강화된 안정성을 나타낸다.

(30) 우선권주장

PA200701718	2007년11월30일	덴마크(DK)
PA200701785	2007년12월14일	덴마크(DK)
PA200800534	2008년04월11일	덴마크(DK)

명세서

청구범위

청구항 1

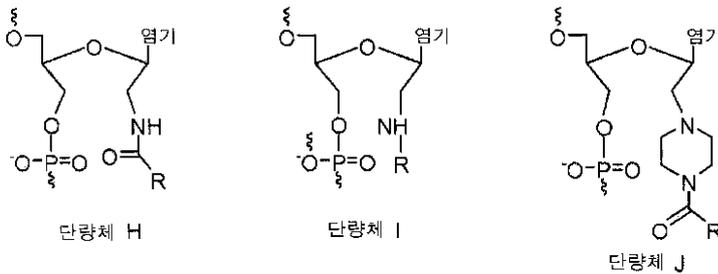
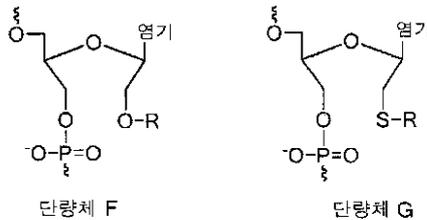
표적 mRNA에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 1개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 상기 올리고뉴클레오티드는 비환형(acyclic) 2'-3'-세코(seco)-뉴클레오티드 단량체를 포함하며, 표적 mRNA의 발현을 감소시키는 것인, RNA 이중 가닥(duplex).

청구항 2

제1항에 있어서, 비환형 2'-3'-세코-뉴클레오티드 단량체가 2'-히드록시 기를 갖는 비환형 2'-3'-세코-뉴클레오티드 단량체로서, 2'-히드록시 기가 아미노, 아실화된 아미노, 알킬화된 아미노, 디알킬화된 아미노, 카르바모일화된 아미노, 피페라지노, 아실화된 피페라지노, 알킬화된 피페라지노, 카르바모일화된 피페라지노, 머캅토, 아실화된 머캅토, 알킬화된 머캅토, 디설피드, 아실화된 히드록시, 알킬화된 히드록시, 또는 카르바모일화된 히드록시 기로 치환된 것인, RNA 이중 가닥.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 비환형 2'-3'-세코-뉴클레오티드 단량체가 하기 단량체 F, G, H, I, 및 J로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 RNA 이중 가닥.



상기 식에서, R은 H, 알킬, 콜레스테롤 유도체, 플루오로포어(fluorophore), 폴리아민, 지방산, 아미노산, 당류 또는 폴리펩티드이다.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 비환형 2'-3'-세코-뉴클레오티드 단량체가 안티센스(antisense) 가닥의 시드(seed) 영역에 위치하는 것인 RNA 이중 가닥.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 비환형 2'-3'-세코-뉴클레오티드 단량체 및 15 내지 40개의 뉴클레오티드 단량체를 포함하는 1개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 RNA 이중 가닥.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 1 내지 5개의 비환형 2'-3'-세코-뉴클레오티드 단량체를 포함하는 1개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 RNA 이중 가닥.

고뉴클레오티드를 포함하는 RNA 이중 가닥.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 비환형 2'-3'-세코-뉴클레오티드 단량체 및 4개 미만의 연속적 DNA 단량체를 포함하는 1개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 RNA 이중 가닥.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 비환형 2'-3'-세코-뉴클레오티드 단량체 및 50% 초과 RNA 단량체를 포함하는 1개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 RNA 이중 가닥.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 1개 이상의 비환형 2'-3'-세코-뉴클레오티드 단량체, 및 2'-O-알킬-RNA 단량체, 2'-아미노-DNA 단량체, 2'-플루오로-DNA 단량체, LNA 단량체, PNA 단량체, HNA 단량체, ANA 단량체, FANA 단량체, CeNA 단량체, ENA 단량체, DNA 단량체 및 INA 단량체로부터 선택되는 1개 이상의 뉴클레오티드 유사체를 포함하는 1개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 RNA 이중 가닥.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 비환형 2'-3'-세코-뉴클레오티드 단량체 및 2개 이상의 LNA 뉴클레오티드 유사체를 포함하는 1개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 RNA 이중 가닥.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 비환형 2'-3'-세코-뉴클레오티드 단량체, 및 포스포로티오에이트 결합 또는 보라노 포스페이트(boranophosphate) 결합을 포함하는 1개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 RNA 이중 가닥.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 올리고뉴클레오티드에 상보적인 표적 mRNA의 RISC(RNA 유도성 침묵화 복합체, RNA Induced Silencing Complex) 의존성 번역 저해 또는 분해를 매개할 수 있는 것인 RNA 이중 가닥.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 15 내지 40개의 다수 염기쌍을 포함하는 RNA 이중 가닥.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 1개 이상의 오버행(overhang)을 포함하고, 상기 오버행이 1 내지 14개 뉴클레오티드 길이를 갖는 것인 RNA 이중 가닥.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 1개 이상의 비환형 2'-3'-세코-뉴클레오티드 단량체를 포함하는 1개 이상의 오버행을 포함하는 RNA 이중 가닥.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 1개 이상의 둔단(blunt end)을 포함하는 RNA 이중 가닥.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

제1항 또는 제2항의 RNA 이중 가닥, 및 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 보조제를 포함하는, 세포에서 표적 mRNA의 발현 수준을 감소시키기 위한 억제학적 조성물.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

발명의 설명

배경 기술

- [0001] RNA 간섭 (RNAi)은 표적 유전자의 발현을 침묵시키기 위한 수단을 제공함에 따라 최근 몇 년 사이에 상당한 관심을 불러일으켰다. 이는 유전학적 및 생화학적 경로의 연구 방법을 이용한 기초 연구, 및 각 유전자 및 유전자 생성물의 기능을 제공한다. 따라서 RNA 간섭은 제약 산업에 있어 표적 확인을 위한 중요한 도구가 되고 있다. 또한, 약물로 사용될 수 있는 RNA 간섭 복합체를 매개할 수 있는 RNA 복합체를 개발하고자 하는 목표에 관하여 상당한 투자가 이루어져 왔다.
- [0002] 치료 용도에 관한 RNAi의 장점은 이의 민감성 및 서열 특이성에 있다. 그러나 서열 특이성에 관련하여 문제가 발생하였는데, 예컨대 RNA 복합체의 잘못된 가닥은 잘못된 표적 핵산에의 반응을 지시할 수 있기 때문이다. 아울러, 특정한 크기의 RNA 복합체는 비특이적인 인터페론 의존성 반응을 유도하며, 이것도 또한 바람직하지 않다.
- [0003] 특허 출원 US2003/0108923은 안티센스 (antisense) 가닥 및 패신저 (passenger) 가닥을 포함하는 RNAi를 매개할 수 있는 RNA 복합체에 대해 기재하며, 이때 상기 가닥은 뉴클레오티드 21 내지 23개의 길이이다. 상기 RNA 복합체를 치료학적 용도로 사용하는 것이 제안되어 있다.
- [0004] 유사하게는, 특허 출원 US2005/0234007은 안티센스 가닥 및 패신저 가닥을 포함하는 RNAi를 매개할 수 있는 RNA 복합체에 대해 기재하며, 이때 상기 복합체는 3'-오버행 (overhang)을 포함한다. 상기 RNA 복합체를 치료학적 용도로 사용하는 것이 제안되어 있다.

[0005] W02005/073378은 안티센스 가닥 및 패신저 가닥을 포함하는 RNAi를 매개할 수 있는, 화학적으로 개질된 뉴클레오티드를 포함하는 RNAi 복합체에 대해 기재한다. 상기 명세서에 기재된 RNA 복합체는 LNA 잔기를 포함하며, 한 가닥의 5' 말단 근처에의 LNA 잔기의 도입을 통해 어떤 가닥이 RISC 복합체에 도입될 것인지 제어될 수 있는데, 이는 상기 5' 말단에서 가장 약한 염기쌍을 형성하는 가닥이 RISC 복합체 내로 도입되기 때문이다.

[0006] RNAi는 본 발명의 RNA 복합체를 포함하여 올리고뉴클레오티드를 이용해 유전자 발현의 저해를 매개하기 위한 여러 전략들 중 하나일 뿐이다. RNase H 매개성 RNA 절단, 입체 블록 RNA 결합, DNA자임 (DNAzyme) 또는 리보자임 매개성 RNA 절단 및 siRNA 접근법을 포함하는 이러한 다양한 전략들은 생물학적 활성과 호환되는 선택된 화학적 개질 뉴클레오티드들의 특성과 함께 문헌에 기재된 바 있다 [J. Kurreck, Eur. J. Biochem. 2003, 270, 1628].

[0007] 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체 B 내지 E가 DNA 가닥 내에 도입됨에 따라 DNA/RNA 자동 합성에 관하여 그들의 포스포라미디트 형성 블록의 제조 절차가 보고된 바 있다 [K. D. Nielsen et al., Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 1493; H. Thrane et al., Tetrahedron 1995, 51, 10389; P. Nielsen et al., Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 19]. DNA 가닥 내에 도입된 것은 티민 단량체 뿐이다. 지금까지 히드록시메틸 치환된 단량체가 RNA 가닥 내에 도입된 적은 없었다.

[0008] 한 보고에 따르면, 1 또는 2개의 2'-세코우리딘이 DNA 올리고뉴클레오티드 내에 도입됨으로써 RNase H 매개성 RNA 분해에 대한 긍정적인 효과가 관찰되었다 (Mangos MM, Min KL, Viazovkina E, Galarneau A, Elzagheid MI, Parniak MA, Damha MJ., J Am Chem Soc. 2003 Jan 22; 125(3):654-61.).

발명의 내용

[0009] [발명의 요약]

[0010] 본 발명은 RNA 유도성 유전자 조절 또는 유전자 분석에 관하여 사용되는 RNA 가닥 내에 도입된 1개 이상의 히드록시메틸 치환된 단량체를 가지는 RNA 복합체, 특히 RNA 간섭을 제공한다. 따라서, 본 발명의 목적은 일반적으로 사용되는 RNA 복합체에 비해 감소된 오프 타겟 효과를 가지는 RNA 복합체를 제공하는 것이다. 다른 목적은 인터페론 반응 감소를 유발하는 RNA 복합체를 제공하는 것이다. 또 다른 목적은 세포 배양 내 또는 생체 내 (in vivo)에서 효소성 분해에 대한 안정성에 관하여 개선된 특성을 가지는 RNA 복합체를 제공하는 것이다. 또 다른 목적은 비개질 RNA 복합체에 관하여 세포 배양 내 또는 생체 내에서 강화된 유전자 조절 기능, 예컨대 유전자 침묵화 효과를 나타내는 RNA 복합체를 제공하는 것이다. 또 다른 목적은 특정의 기관 또는 조직에 대하여 표적화되어 세포막을 침투할 수 있는 RNA 복합체를 제공하는 것이다. 본 발명은 또한 히드록시메틸 치환된 단량체를 올리고뉴클레오티드 내에 도입하는 데 적절한 단량체 및 이의 합성 방법을 제공한다.

[0011] [발명의 상세한 설명]

[0012] 본 발명의 한 양상에 기재된 특성은 본 발명의 다른 양상에도 또한 적용된다. 예컨대, 제1양상의 RNA 복합체에 관하여 기재된 특성들은 적절한 경우 제9양상의 올리고뉴클레오티드 및 제10양상의 RNA 이중 가닥에도 또한 적용된다.

[0013] 제1양상, RNA 복합체

[0014] siRNA 이중 가닥 또는 단일 가닥 RNA 형태의 RNA 복합체는 세포 내에서 표적 핵산의 다양한 개질화를 매개할 수 있다. 이 과정에서 상기 복합체의 안티센스 가닥이 가이드 (guide)로서 작용하는데, 이는 안티센스 가닥이 자신에 대한 서열 상보성 범위를 가지는 표적 핵산에 부합될 수 있기 때문이다.

[0015] 표적 핵산을 표적화하기 전에 안티센스 가닥은 종종 표적 핵산에 작용할 수 있는 RNA 유도성 단백질 복합체 (RNA-Guided Protein Complex; RGPC) 내로 도입된다. RNA 유도성 단백질 복합체의 한 예시는 RNA 유도성 침묵화 복합체 (RNA Induced Silencing Complex; RISC)이다. 다른 상기 RGPC들이 존재하며 또한 본 발명의 RNA 복합체는 이러한 다른 RGPC와 함께 사용되는 경우에 또는 임의의 RGPC와의 상호작용 없이도 유리하게 작용할 것이라고 간주된다.

[0016] 본 발명의 한 목적은 생물학적 매질 (혈청, 생체 내, 세포 배양 내) 중 핵용해성 분해에 대하여 RNA 복합체를 안정시키는 것이다.

[0017] 본 발명의 다른 목적은 이중 가닥 RNA 복합체의 유전자 침묵화 효과를 개선시키는 것이다. 이러한 개선은, 예컨대 비개질된 천연 RNA 복합체에 비하여 증가된 효능, 감소된 오프 타겟 효과, 감소된 면역 자극, 증가된 보관 안정성, 혈청 등과 같은 생물학적 매질 내에서의 증가된 안정성, 증가된 활성 지속 시간 및 향상된 약역학적 특

성을 의미할 수 있다.

- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 단일 가닥 RNA 올리고뉴클레오타이드의 유전자 침묵화 효과를 개선시키는 것이다. 이러한 개선은, 예컨대 비개질된 천연 RNA 복합체에 비하여 증가된 효능, 감소된 오프 타겟 효과, 감소된 면역 자극, 증가된 보관 안정성, 혈청 등과 같은 생물학적 매질 내에서의 증가된 안정성, 증가된 활성 지속 시간 및 향상된 약역학적 특성을 의미할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 목적은 본 발명의 siRNA 복합체에 있어 안티센스 가닥만이 표적 핵산의 개질화를 매개하며 패신저 가닥은 그러하지 않을 것임을 확인하는 것이다. 이러한 목적이 달성되면 RNA 복합체에 있어 오프 타겟 효과가 감소할 것이다
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은 생물학적 매질 내에서의 RNA 복합체의 충분한 안정성을 확보하는 것이다. 따라서 세포 배양 내 또는 생체 내에서 비개질된 RNA 복합체에 비하여 강화된 유전자 조절 기능, 예컨대 유전자 침묵화 효과를 나타내는 RNA 복합체를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0021] 본 발명의 기초적인 아이디어는 1개 이상의 히드록시메틸 치환된 단량체를 본 발명의 RNA 복합체 내로 도입하는 것이다. 이는 siRNA의 경우 복합체의 한 가닥만을 RISC에 선별적으로 도입함으로써 야기될 수 있다. 1개 이상의 히드록시메틸 치환된 단량체를 RNA 복합체의 1개 (또는 수개)의 RNA 가닥(들) 내에 도입함으로써 생물학적 매질 내 및 생체 내에서의 RNA 복합체의 수명이 향상되고, 그리하여 개선된 생물학적 활성, 예컨대 개선된 유전자 조절 활성이 야기될 것이다.
- [0022] 본 발명의 RNA 복합체의 RNA 가닥은 천연 RNA 뉴클레오타이드, 유전자 침묵화 활성과 호환되는 것으로 공지되어 있는 RNA 개질화 [Nawrot and Sipa, Curr. Topics Med. Chem. 2006, 6, 913-925], 및 히드록시메틸 치환된 단량체 (도 1)를 포함할 수 있다. 포스포르디에스테르 결합이 각각의 단량체들을 연결시킬 수 있으나, 포스포로티오에이트 결합과 같은 개질된 결합 및 당업자에게 공지된 기타 결합들 [Nawrot and Sipa, Curr. Topics Med. Chem. 2006, 6, 913-925]이 대신 사용될 수도 있다. RNA 복합체는 안티센스 가닥 (본원에서 안티센스 가닥은 가이드 가닥으로도 기재됨) 및 패신저 가닥 (본원에서 패신저 가닥은 센스 가닥으로도 기재됨)으로 이루어진 siRNA 이중 가닥을 함께 구성하는 2개의 가닥을 포함할 수 있으나, 단일 가닥 마이크로RNA 모방 분자도 또한 예컨대 마이크로RNA를 표적화하는 데 유용한 단일 가닥 안티센스 분자와 마찬가지로 본원에서 본 발명의 RNA 복합체로 간주된다.
- [0023] 본 발명의 구현예들에서, RNA 복합체는 1개 이상의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오타이드 단량체(들)를 포함한다 (도 1 참조). 그러한 한 가지 예는 비환형 뉴클레오타이드 단량체, 보다 바람직하게는 단량체 D 내지 J로 이루어진 군으로부터 선택되는 비환형 단량체이다. 따라서 히드록시메틸 개질된 뉴클레오타이드 단량체에 관하여 제1양상에 기재된 구현예들은 비환형 뉴클레오타이드 단량체에 관한 다른 구현예들에도 적용될 것이다.
- [0024] 히드록시메틸 개질된 뉴클레오타이드 단량체의 사용은 여러 이유로 인해 유리할 수 있다. 이는 예컨대 RNA 복합체의 유전자 침묵화 효과를 증가시키는 데 사용될 수 있고, 1개 이상의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오타이드 단량체(들)의, 예컨대 RNA 복합체의 말단 근처에의 도입은 핵융해성 분해에 대한 상당한 안정성을 유발한다. 이는 또한 siRNA 복합체의 패신저 가닥의 유전자 침묵화 효과를 감소시켜 오프 타겟 효과의 정도를 감소시키는 데 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 한 바람직한 구현예에서, 1개 이상의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오타이드 단량체(들)를 포함하는 RNA 복합체는 단일 가닥 RNA 구성체이다.
- [0026] 본 발명의 한 바람직한 구현예에서, 1개 이상의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오타이드 단량체(들)를 포함하는 RNA 복합체는 단일 가닥 안티센스 분자로서 작용함으로써 유전자 발현을 저해할 수 있는 단일 가닥 RNA 구성체이다.
- [0027] 본 발명의 한 바람직한 구현예에서, 1개 이상의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오타이드 단량체(들)를 포함하는 RNA 복합체는 마이크로RNA를 기능적으로 모방하는 단일 가닥 RNA 구성체이다.
- [0028] 본 발명의 한 바람직한 구현예에서, 1개 이상의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오타이드 단량체(들)를 포함하는 RNA 복합체는 siRNA 구성체이다.
- [0029] 따라서, 한 구현예에서 siRNA 구성체의 안티센스 가닥은 1개 이상의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오타이드 단량체(들)를 포함한다.
- [0030] 다른 구현예에서, siRNA 구성체의 패신저 가닥은 1개 이상의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오타이드 단량체(들)를

포함한다. 또 다른 구현예에서, siRNA 구성체의 닉(nick)을 낸 패신저 가닥의 제1 및 제2 RNA 분자는 각각 1개 이상의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체(들)를 포함한다.

- [0031] 본 발명의 한 구현예에서, 안티센스 가닥 내의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체의 수는 10개이다. 본 발명의 다른 구현예들에서, 안티센스 가닥 내의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체(들)의 수는 각각 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개이다.
- [0032] 다른 구현예에서, 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오티드는 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체이다.
- [0033] 바람직한 구현예에서, 안티센스 가닥 내의 모든 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체는 1 내지 8번 자리에 존재하며, 이때 상기 자리는 5' 말단으로부터 정해진다. 보다 바람직하게는, 안티센스 가닥 내의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체는 마이크로RNA의 소위 시드 (seed) 영역에 상응하는 2 내지 7번 자리에 존재한다. 따라서 상기 영역 내의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체의 존재는 안티센스 가닥이 마이크로RNA로서 작용하는 것을 방지할 것이며, 이는 안티센스 가닥이 siRNA로 기능함을 목적으로 하는 경우 오프 타겟 효과를 저감시킨다.
- [0034] 바람직한 구현예에서, 1개 이상의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체는 9 내지 16번 자리에 존재하며, 이때 상기 자리는 5' 말단으로부터 정해진다. 보다 바람직하게는 2, 3, 4, 5 또는 6개의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체가 9 내지 16번 자리에 존재하며, 또 다른 구현예에서 안티센스 가닥 내의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체는 9 내지 16번의 모든 자리에 존재한다. 한 구현예에서, 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체는 9 내지 16번 영역 내에만 존재하며 안티센스 가닥의 나머지 부분에는 존재하지 않는다.
- [0035] 더욱 바람직하게는, 안티센스 가닥 내의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체는 9 내지 11번 자리에 존재하며 바람직하게는 올리고뉴클레오티드의 나머지 부분에는 존재하지 않는다. 상기 영역 내의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체의 존재는 안티센스 가닥이 마이크로RNA로서 작용하도록 유발할 것이다, 즉 siRNA 효과가 최소화되고 마이크로RNA 효과가 훨씬 증가하도록 할 것이다. 이러한 효과는 또한 비환형 히드록시메틸 치환된 단량체, 예컨대 단량체 D의 존재에 의해 야기되는 친화도 감소로 인해 전 구간 결합의 경향이 감소한 것으로부터 유래한다.
- [0036] 아울러, 본 발명의 또다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 패신저 가닥 내의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체의 수는 10개이다. 본 발명의 다른 구현예들에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 패신저 가닥 내의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체의 수는 각각 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개이다.
- [0037] 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 패신저 가닥의 모든 뉴클레오티드는 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체이다.
- [0038] 한 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 안티센스 가닥 및 패신저 가닥은 둘 모두 1개 이상의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체(들)를 포함한다.
- [0039] 한 양상에서, 본 발명은 표적 핵산의 핵산 개질화를 매개할 수 있는 RNA 복합체를 제공한다. 상기 RNA 복합체는, 예컨대 siRNA, 마이크로RNA 또는 마이크로RNA 전구체 (프리-마이크로RNA)일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 siRNA 복합체의 RNA 복합체는 안티센스 가닥 및 안티센스 가닥에 부합되는 패신저 가닥을 포함하는 코어 이중 가닥 영역을 포함한다.
- [0041] 본원에 기재된 표적 핵산은 복합체의 안티센스 가닥에 상당한 상보성을 가지는 핵산이다. 바람직하게는, 상보성은 수개의 뉴클레오티드의 범위에 걸쳐 완전하다.
- [0042] 그리하여 한 구현예에서, 상보성은 25개의 뉴클레오티드의 범위에 걸쳐 완전하다.
- [0043] 다른 구현예들에서, 상보성은 각각 24개의 뉴클레오티드, 23개의 뉴클레오티드, 22개의 뉴클레오티드, 21개의 뉴클레오티드, 20개의 뉴클레오티드, 19개의 뉴클레오티드, 18개의 뉴클레오티드, 17개의 뉴클레오티드, 16개의 뉴클레오티드, 15개의 뉴클레오티드, 14개의 뉴클레오티드, 13개의 뉴클레오티드, 12개의 뉴클레오티드, 11개의 뉴클레오티드, 10개의 뉴클레오티드, 9개의 뉴클레오티드, 8개의 뉴클레오티드, 7개의 뉴클레오티드 또는 6개의 뉴클레오티드의 범위에 걸쳐 완전하다.
- [0044] 한 구현예에서, 상보성의 범위는 1개의 미스매치를 포함한다. 다른 구현예들에서, 상보성의 범위는 각각 2개의 미스매치, 3개의 미스매치 또는 4개의 미스매치를 포함한다. 1개의 미스매치는 염기쌍이 형성될 수 없는 경우, 예컨대 G가 A와 대응하는 경우의 상보성 범위 내의 한 영역이다. 보다 많은 미스매치가 존재하는 경우, 이는 서

로 이웃할 있거나 또는 상보성 범위의 다른 영역에 위치할 수 있다.

- [0045] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 RNA 복합체는 실질적으로 이중 가닥 영역인 코어 이중 가닥 영역을 포함한다. RNA 복합체 내의 단일 가닥 영역은 주로 복합체의 오버행과 연관된다.
- [0046] 그리하여 한 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 이중 가닥 영역은 1개의 미스매치를 포함한다. 다른 구현예들에서, 이중 가닥 영역은 각각 2개의 미스매치, 3개의 미스매치 및 4개의 미스매치를 포함한다.
- [0047] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "표적 핵산"은 안티센스 가닥에 의해 유발되는 조정, 예컨대 표적화된 절단 또는 입체적 블록 형성에 종속적인 임의의 RNA/DNA를 포함한다. 표적 RNA/DNA는, 예컨대 게놈 DNA, 게놈 바이러스 성 RNA, mRNA, 프리-mRNA, 또는 비암호화 RNA일 수 있다.
- [0048] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "표적 핵산 개질화"는 표적 핵산에 대한 임의의 개질화를 의미하며, 이는 표적 핵산의 구조에 영향을 미치지 않고 표적 핵산의 활성화에 영향을 미치는 것들을 포함한다.
- [0049] 본 발명의 바람직한 표적 핵산은 mRNA이다. 이에 따라, 한 구현예에서 RNA 복합체에 의해 매개되는 핵산 개질화는 RNA 간섭 (RNAi)이다. 바람직한 구현예에서, RNAi는 mRNA의 분해를 매개한다. 또 다른 바람직한 구현예에서, RNAi는 mRNA의 번역 저해를 매개한다. 다른 구현예에서, RNAi는 mRNA의 번역 저해 및 분해 둘 모두를 매개한다.
- [0050] 다른 바람직한 구현예들에서, 표적 핵산은 비암호화 RNA, 예컨대 tRNA, miRNA, snRNA, snRNA 또는 rRNA이다.
- [0051] 또 다른 구현예에서, 표적 핵산은 게놈 DNA이다. 이러한 구현예에서, 바람직한 핵산 개질화에는 DNA 메틸화 및 DNA 결실이 포함된다.
- [0052] 본 발명의 RNA 복합체의 크기는 본 발명의 1가지 이상의 목적을 달성하는 범위 내에서 변경될 수 있다. 예컨대, 이는 정해진 목적이 오프 타겟 효과 감소인 경우에 적용된다.
- [0053] 따라서 본 발명의 siRNA 복합체의 코어 이중 가닥 영역은 염기쌍 10개, 염기쌍 11개, 염기쌍 12개, 염기쌍 13개, 염기쌍 14개, 염기쌍 15개, 염기쌍 16개, 염기쌍 17개, 염기쌍 18개, 염기쌍 19개, 염기쌍 20개, 염기쌍 21개, 염기쌍 22개, 염기쌍 23개, 염기쌍 24개 및 염기쌍 25개, 염기쌍 26개, 염기쌍 27개, 염기쌍 28개, 염기쌍 29개, 염기쌍 30개, 염기쌍 35개, 염기쌍 40개, 염기쌍 42개, 염기쌍 45개, 염기쌍 50개, 염기쌍 55개, 염기쌍 60개 또는 염기쌍 62개로 이루어진 군으로부터 선택되는 수의 염기쌍을 포함할 수 있다.
- [0054] 한 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 코어 이중 가닥 영역은 15 내지 40 개의 염기쌍을 포함한다.
- [0055] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 코어 이중 가닥 영역은 18 내지 22개의 염기쌍을 포함한다.
- [0056] 일부 세포에 있어 장형 (longer) 이중 가닥 RNA 복합체를 도입하면 인터페론 의존성 비특이적 반응이 유발될 수 있다는 것이 공지되어 있기는 하나, 한 구현예에서 본 발명의 siRNA 복합체의 코어 이중 가닥 영역은 염기쌍 40 개보다 훨씬 더 길다. 이러한 한 구현예에서, 상기 복합체는 RGPC에 관여하기 전에 단형 (shorter) 이중 가닥 RNA 복합체로 가공되는 것으로 간주된다. RNase III, 예컨대 다이서 (Dicer)와 같은 효소가 가공을 수행할 수 있다. 다이서는 또한 염기쌍 40 개 미만 길이의 이중 가닥 RNA를 가공하며, 상기 RNA 복합체 (다이서 기질을 의미함)는 가공 없이 RISC로 도입된 siRNA에 비해 여러 장점들을 가진다. 따라서 한 구현예에서, 본 발명의 RNA 복합체는 다이서 기질이다.
- [0057] 다른 구현예에서, RNA 복합체는 단일 가닥이며 이중 가닥 영역을 가지지 않는다.
- [0058] 또 다른 구현예에서, RNA 복합체는 단일 가닥이나 1개 이상의 이중 가닥 영역을 포함하도록 접힌다. 이러한 구현예는, 예컨대 마이크로RNA 및 그의 기능을 모방하는 데 유용하다.
- [0059] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 코어 이중 가닥 영역은 염기쌍 10개 미만의 길이로서, 염기쌍 1 내지 9개를 포함한다.
- [0060] 본 발명의 한 구현예에서, RNA 복합체의 코어 이중 가닥 영역은 2개 초과 RNA 가닥으로 이루어진다.
- [0061] 본 발명의 한 구현예에서, RNA 복합체의 코어 이중 가닥 영역은 3개의 RNA 가닥으로 이루어진다.
- [0062] 본 발명의 다른 구현예에서, RNA 복합체의 코어 이중 가닥 영역은 4개 이상의 RNA 가닥으로 이루어진다.
- [0063] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체는 오버행을 포함한다. 본원에서 사용된 오버행은 이중 가닥 영역의 뒤를 잇는 짧은 단일 가닥 영역을 의미한다.

- [0064] 한 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 안티센스 가닥은 3'-오버행을 포함한다.
- [0065] 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 패신저 가닥은 3'-오버행을 포함한다.
- [0066] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 안티센스 가닥은 5'-오버행을 포함한다.
- [0067] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 패신저 가닥은 5'-오버행을 포함한다.
- [0068] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 안티센스 가닥 및 패신저 가닥은 둘 모두 3'-오버행을 포함한다.
- [0069] 본 발명의 siRNA 복합체의 오버행은 복합체의 기본적인 기능을 손상시키지 않으면서 다양한 길이로 존재할 수 있다. 따라서 한 구현예에서, 오버행은 뉴클레오티드 1개, 뉴클레오티드 2개, 뉴클레오티드 3개, 뉴클레오티드 4개, 뉴클레오티드 5개, 뉴클레오티드 6개, 뉴클레오티드 7개 및 뉴클레오티드 8개의 길이를 갖는 오버행들로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0070] 본 발명의 siRNA 복합체의 가장 바람직한 오버행들은 각각 뉴클레오티드 1, 2 및 3개의 길이를 갖는 오버행이다.
- [0071] 한 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 안티센스 가닥의 오버행은 패신저 가닥의 오버행과 길이가 같다.
- [0072] 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 안티센스 가닥의 오버행은 패신저 가닥의 오버행과 길이가 같지 않다.
- [0073] 본 발명의 siRNA 복합체의 또 다른 구현예에서, RNA 복합체는 1개 이상의 둔단 (鈍端; blunt end)을 포함한다. "둔단"은 이중 가닥 핵산의 말단을 의미하며, 이는 임의의 돌출된 뉴클레오티드를 가지지 않는다. 즉, 이중 가닥 핵산의 두 가닥 모두 같은 자리에서 끝난다.
- [0074] 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체는 두 말단 모두 둔단이다.
- [0075] 본 발명의 바람직한 RNA 복합체는 장형 이중 가닥 RNA 복합체를 다이스서 가공한 생성물과 전체적인 구조에 있어 유사하다. 다른 구현예에서, 본 발명의 RNA 복합체는 상기한 바와 같은 다이스서 기질이다.
- [0076] 본 발명은 다른 바람직한 RNA 복합체는 코어 이중 가닥 영역이 18 내지 22개의 염기쌍을 포함하는 복합체로서, 이때 안티센스 가닥 및 패신저 가닥은 각각 뉴클레오티드 1 내지 3개의 3'-오버행을 포함한다.
- [0077] 본 발명의 RNA 복합체의 안티센스 가닥은 복합체의 기능을 손상시키지 않으면서 다양한 길이를 가질 수 있다. 따라서 바람직한 구현예들에서, 안티센스 가닥은 각각 8-mer, 9-mer, 10-mer, 11-mer, 12-mer, 13-mer, 14-mer, 15-mer, 16-mer, 17-mer, 18-mer, 19-mer, 20-mer, 21-mer, 22-mer, 23-mer, 24-mer, 25-mer, 26-mer, 27-mer, 28-mer, 29-mer, 30-mer, 31-mer, 32-mer, 33-mer, 34-mer, 35-mer, 36-mer, 37-mer, 38-mer, 39-mer, 40-mer, 41-mer, 42-mer, 43-mer, 44-mer, 45-mer, 46-mer, 47-mer, 48-mer, 49-mer, 50-mer, 51-mer, 52-mer, 53-mer, 54-mer, 55-mer, 56-mer, 57-mer, 58-mer, 59-mer, 60-mer, 61-mer 또는 62-mer이다. 예컨대, 19-mer는 단량체 19개, 즉 뉴클레오티드 19개의 안티센스 가닥인 것으로 간주된다.
- [0078] 또 다른 바람직한 구현예에서, RNA 복합체의 안티센스 가닥은 다음의 안티센스 가닥 군으로부터 선택된다: 15-mer, 16-mer, 17-mer, 18-mer, 19-mer, 20-mer, 21-mer, 22-mer 및 23-mer. 한 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 패신저 가닥은 불연속적이다. 본 발명의 siRNA 복합체의 한 구현예에서, 패신저 가닥은 수개의 분리된 RNA 분자들을 포함한다. RNA 분자의 수는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개일 수 있다.
- [0079] 한 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 패신저 가닥의 각 RNA 분자의 길이는 단량체 4개 초과이다. 다른 구현예들에서, 패신저 가닥의 각 RNA 분자의 길이는 각각 단량체 5개, 단량체 6개, 단량체 7개, 단량체 8개, 단량체 9개, 단량체 10개, 단량체 11개 및 단량체 12개 초과이다.
- [0080] 다른 구현예들에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 패신저 가닥의 각 RNA 분자의 길이는 각각 단량체 5개, 단량체 6개, 단량체 7개, 단량체 8개, 단량체 9개, 단량체 10개, 단량체 11개 및 단량체 12개 미만이다.
- [0081] 본 발명의 한 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 불연속적 패신저 가닥은 불연속적 패신저 가닥을 함께 형성하는 제1 및 제2 RNA 분자를 포함하며, 이때 제1 RNA 분자는 안티센스 가닥의 아래쪽 부분과 부합되고 제2 RNA 분자는 안티센스 가닥의 위쪽 부분과 부합된다.
- [0082] 한 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 안티센스 가닥은 불연속적이다. 안티센스 가닥의 바람직한 불연속적

은 패신저 가닥의 바람직한 불연속점과 동일하다.

- [0083] 본 발명의 siRNA 복합체의 가닥 중 하나의 불연속점은 닉일 수 있다. 닉은 포스포디에스테르 결합의 손실에 의해 야기되는 이중 가닥 핵산의 한 가닥 내의 불연속점으로 간주되며, 이때 이중 가닥 핵산이 뉴클레오티드를 잃는 것은 아니다. 따라서 닉에 대응하는 염기는 여전히 닉이 있는 가닥 상의 염기에 부합될 것이다.
- [0084] 본 발명의 siRNA 복합체의 가닥 중 하나의 다른 불연속점은 대체 닉으로서, 이는 당-포스페이트 골격 내에서 1개 이상의 결합 (포스포디에스테르 결합 제외)의 손실에 의해 야기되는 이중 가닥 핵산 중 한 가닥 내의 불연속점으로 간주되며, 이때 이중 가닥 핵산이 핵염기를 잃는 것은 아니다. 따라서 닉에 대응하는 염기는 여전히 닉이 있는 가닥 상의 염기에 부합될 것이다.
- [0085] 본원에 사용된 용어 갭 (gap)은 본 발명의 RNA 복합체의 RNA 가닥이 이중 가닥 핵산에서 1개 이상의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드, 또는 1개의 핵염기가 손실된 불연속점을 가지는 것으로 기재될 수 있다.
- [0086] 바람직하게는, RNA 복합체의 5'-말단은 인산화되어 있거나 인산화될 가능성이 있다. 인산화될 가능성은, 예컨대 5'-히드록시기가 인산화되지 못하도록 하는 5' 히드록시기 근처의 다른 기들과의 직접적 연결 또는 다른 연결에 의해 5'-히드록시기가 차단되지 않았음을 의미한다.
- [0087] 따라서, 본 발명의 바람직한 구현예에서, RNA 복합체의 RNA 분자(들)는 5'-말단 포스페이트 및 3'-히드록시기를 포함한다.
- [0088] 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 제2 RNA 분자는 5'-말단 포스페이트 및 3'-히드록시기를 포함한다.
- [0089] 또 다른 구현예에서, 안티센스 가닥은 5'-말단 포스페이트 및 3'-히드록시기를 포함한다.
- [0090] 본 발명의 일부 구현예들에서, RNA 복합체는 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 이외의 뉴클레오티드 유사체를 포함하는 것이 바람직하다. 상기와 같은 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 이외의 뉴클레오티드 유사체는 "대안적으로 개질된 뉴클레오티드"로 하기되어 있다.
- [0091] 대안적으로 개질된 뉴클레오티드의 사용은 여러 이유로 인해 유리할 수 있다. 예컨대, 이는 본 발명의 siRNA 복합체의 코어 이중 가닥 영역의 녹는점을 상승시키는 데 사용될 수 있다.
- [0092] 대안적으로 개질된 뉴클레오티드의 사용은 안티센스 가닥과 표적 핵산 사이에 형성된 이중 가닥 구조의 녹는점을 상승시키는 데 유리할 수 있다.
- [0093] 따라서 한 구현예에서, 안티센스 가닥은 대안적으로 개질된 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0094] 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 패신저 가닥은 대안적으로 개질된 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0095] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 패신저 가닥의 제1 및 제2 RNA 분자는 각각 대안적으로 개질된 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0096] 본 발명의 한 구현예에서, RNA 복합체 내의 대안적으로 개질된 뉴클레오티드의 수는 10개이다. 본 발명의 다른 구현예들에서, RNA 복합체 내의 뉴클레오티드 유사체의 수는 각각 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개이다.
- [0097] 본 발명의 한 구현예에서, 안티센스 가닥 내의 대안적으로 개질된 뉴클레오티드의 수는 10개이다. 본 발명의 다른 구현예들에서, 안티센스 가닥 내의 뉴클레오티드 유사체의 수는 각각 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개이다.
- [0098] 다른 구현예에서, 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오티드는 대안적으로 개질된 뉴클레오티드, 또는 대안적으로 개질된 뉴클레오티드와 히드록시메틸 치환된 뉴클레오티드의 조합이다.
- [0099] 아울러, 본 발명의 또 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 패신저 가닥 내의 뉴클레오티드 유사체의 수는 10개이다. 본 발명의 다른 구현예들에서, 패신저 가닥 내의 뉴클레오티드 유사체의 수는 각각 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개이다.
- [0100] 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 패신저 가닥의 모든 뉴클레오티드는 뉴클레오티드 유사체, 또는 대안적으로 개질된 뉴클레오티드와 히드록시메틸 치환된 뉴클레오티드의 조합이다.
- [0101] 한 구현예에서, 본 발명의 siRNA 복합체의 안티센스 가닥 및 패신저 가닥은 둘 모두 대안적으로 개질된 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0102] 한 구현예에서, RNA 복합체의 대안적으로 개질된 뉴클레오티드는 동일하다. 즉, 이는 예컨대 모두 LNA이거나 모

두 2'-O-Me-RNA이다. 다른 구현예에서, 다양한 대안적으로 개질된 뉴클레오티드가 동일한 RNA 복합체 내에 사용된다.

- [0103] 한 구현예에서, RNA 복합체는 포스포로티오에이트 결합을 포함한다.
- [0104] 다른 구현예에서, RNA 복합체는 천연 포스포르디에스테르 결합 및 포스포로티오에이트 결합의 혼합을 포함한다.
- [0105] 본 발명의 바람직한 뉴클레오티드 유사체는 2'-O-알킬-RNA 단량체, 2'-아미노-DNA 단량체, 2'-플루오로-DNA 단량체, LNA 단량체, HNA 단량체, ANA 단량체, FANA 단량체, DNA 단량체, PNA 단량체 및 INA 단량체로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 유사체이나, 다른 단량체들도 또한 사용될 수 있다 [Nawrot and Sipa, Curr. Topics Med. Chem. 2006, 6, 913-925].
- [0106] 한 구현예에서, 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 히드록시메틸 치환기는 연결기에 의해 기능화된다. 연결기는 본 발명의 RNA 복합체의 특성을 변화, 확대 또는 개선시키는 것으로 당업자에게 공지되어 있는 기이다. 상기 기는 세포 분포, 기관 분포, 조직 분포, 이중 가닥 녹는점, 표적 친화도, 생물학적 안정성, 부합화 신호 등을 조정하는 데 유용할 수 있다.
- [0107] 한 구현예에서, 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 히드록시메틸 치환기는 연결기와 히드록시메틸 치환기의 메틸렌기 사이의 에테르 결합에 의해 기능화된다. 도 2를 참조하도록 한다 (단량체 F).
- [0108] 한 구현예에서, 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 히드록시메틸 치환기는 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 본 발명의 RNA 복합체로의 도입 전에 티오에테르 작용기로 전환된다. 도 2를 참조하도록 한다 (단량체 G).
- [0109] 다른 구현예에서, 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 히드록시메틸 치환기는 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 본 발명의 RNA 복합체로의 도입 전에 머캡토메틸 작용기로 전환된다. 도 2를 참조하도록 한다 (단량체 G, R = H). 상기머캡토 작용기는 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 RNA 합성 중에 예컨대 그것의 아세틸 유도체로서 적절히 보호된다.
- [0110] 한 구현예에서, 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 히드록시메틸 치환기는 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 본 발명의 RNA 복합체로의 도입 전에 아민 작용기로 전환된다. 도 2를 참조하도록 한다 (단량체 I, R = H). 상기 아민 작용기는 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 RNA 합성 중에 예컨대 그것의 트리플루오로아세틸 또는 Fmoc 유도체로서 적절히 보호된다.
- [0111] 한 구현예에서, 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 히드록시메틸 치환기는 아미드 결합성 연결기의 부착을 위한 도구로서 작용한다. 이는 예컨대 상기된 바와 같은 히드록시메틸 치환기의 히드록실 단위체의 아민 단위체로의 전환, 및 추가로는 당업자에게 공지된 방법을 사용한 아미드 결합 형성에 의한 예컨대 연결기에 의한 상기 아미노기의 유도체화를 수반한다. 이는 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 RNA 합성 전에 또는 RNA 합성 후에 일어날 수 있다 (도 2, 단량체 H)
- [0112] 한 구현예에서, 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 히드록시메틸 치환기는 아미노 결합성 연결기의 부착을 위한 도구로서 작용한다. 이는 예컨대 상기된 바와 같은 히드록시메틸 치환기의 히드록실 단위체의 아민 단위체로의 전환, 및 추가로는 당업자에게 공지된 방법을 사용한 아민 결합 형성에 의한 예컨대 연결기에 의한 상기 아미노기의 유도체화를 수반한다. 이는 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 RNA 합성 전에 또는 RNA 합성 후에 일어날 수 있다 (도 2, 단량체 I).
- [0113] 다른 한 구현예에서, 연결화에 사용되는 아민기는 아미노기, 피페라지노기 또는 디아미노 알킬기이다. 이러한 단량체는 아민 유도체화된 단량체라 불린다. 상기 기들은 각각 추가로 유도체화 또는 연결화될 수 있다 (도 2, 단량체 J).
- [0114] 한 구현예에서, 본 발명의 RNA 복합체는 천연 RNA 복합체에 비해 감소된 오프 타겟 효과를 가진다.
- [0115] 한 바람직한 구현예에서, RNA 복합체는 안티센스 가닥 내에 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체를 1개 이상 포함한다.
- [0116] 다른 바람직한 구현예에서, RNA 복합체는 안티센스 가닥의 소위 시드 영역 주위에, 즉 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 1 내지 12번 자리 중 하나 이상에 도입된 1개 이상의 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함한다.

- [0117] 또 다른 바람직한 구현예에서, RNA 복합체는 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 2 내지 10번 자리 중 하나 이상에 도입된 1개 이상의 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함한다.
- [0118] 또 다른 바람직한 구현예에서, RNA 복합체는 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 3 내지 8번 자리 중 하나에 도입된 1개의 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함한다.
- [0119] 또 다른 바람직한 구현예에서, RNA 복합체는 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 7 또는 8번 자리 중 하나에 도입된 1개의 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함한다.
- [0120] 또 다른 바람직한 구현예에서, RNA 복합체는 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 7번 자리에 도입된 1개의 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함한다.
- [0121] 또 다른 바람직한 구현예에서, RNA 복합체는 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 9 내지 16번 자리에 도입된 1개의 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함한다.
- [0122] 또 다른 바람직한 구현예에서, RNA 복합체는 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 9 내지 11번 자리에 도입된 1개의 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함한다.
- [0123] 또 다른 바람직한 구현예에서, RNA 복합체는 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 9 내지 10번 자리에 도입된 1개의 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함한다.
- [0124] 다른 구현예에서, 본 발명의 RNA 복합체는 천연 RNA 복합체에 비해 감소된 면역 반응을 나타낸다.
- [0125] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 RNA 복합체는 천연 RNA 복합체에 비해 연장된 효과를 나타낸다.
- [0126] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 RNA 복합체는 천연 RNA 복합체에 비해 증대된 효과를 나타낸다. 따라서 바람직한 구현예에서, RNA 복합체는 예컨대 표적 mRNA의 보다 효율적인 분해 또는 표적 mRNA의 보다 효율적인 번역 저해에 의해 천연 RNA 복합체보다 더 효과적으로 RNAi를 매개한다.
- [0127] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 RNA 복합체는 인간 또는 동물의 특정 기관 또는 조직에 효율적으로 전달된다.
- [0128] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 RNA 복합체는 효율적으로 세포막에 침투할 수 있다.
- [0129] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 RNA 복합체는 천연 RNA 복합체보다 더 효율적으로 세포막에 침투할 수 있다.
- [0130] 한 구현예에서, 본 발명의 RNA 복합체는 인체 내에서 RNA 복합체의 보유력을 증가시키는 혈장 단백질에 결합할 수 있다.
- [0131] **제2양상, RNA 복합체의 제조**
- [0132] 본 발명의 또 다른 양상은, 코어 이중 가닥 영역을 포함하는 RNA 복합체가 형성되고 상기 RNA 복합체가 상응하는 세포 RNA의 RNA 간섭을 매개할 수 있는 조건 하에 안티센스 가닥을 패신저 가닥과 함께 인큐베이션하는 것을 포함하는 본 발명의 이중 가닥 RNA 복합체의 제조 방법이다.
- [0133] 본 양상의 다른 구현예들에서, RNA 복합체는 본 발명의 RNA 이중 가닥으로 대체된다 (제10양상).
- [0134] **제3양상, 핵산 개질화의 매개 방법**
- [0135] 본 발명의 또 다른 양상은 세포 또는 유기체 내에서 표적 핵산의 핵산 개질화를 매개하는 방법으로서 하기 단계들을 포함하는 방법이다:
- [0136] a. 표적 핵산의 개질화가 일어날 수 있는 조건 하에 본 발명의 RNA 복합체와 세포 또는 유기체를 접촉시키는 것;
- [0137] b. 그럼으로써 표적 핵산의 개질화를 매개하는 것.
- [0138] 바람직한 구현예들에서, 표적 핵산의 핵산 개질화를 매개하는 방법은 시험관 내(in vitro)에서 수행된다.
- [0139] 바람직한 구현예들에서, 표적 핵산의 핵산 개질화를 매개하는 방법은 생체 내에서, 즉 동물 내, 인간 내 또는 인간 외 동물 내에서 수행된다.
- [0140] 바람직한 구현예들에서, 표적 핵산의 핵산 개질화를 매개하는 방법은 세포 배양 내에서 수행된다.
- [0141] 또 다른 구현예에서, 상기 방법은 분리된 세포 상에서 수행된다.

- [0142] 바람직한 구현예에서, 상기 방법의 핵산 개질화는 RNA 간섭, 바람직하게는 표적 mRNA의 분해 또는 표적 mRNA의 번역 저해, 또는 다른 유형의 RNA, 예컨대 비암호화 RNA의 저해이다.
- [0143] 다른 구현예에서, 핵산 개질화는 DNA 메틸화이다.
- [0144] 본 양상의 다른 구현예들에서, RNA 복합체는 본 발명의 올리고뉴클레오티드 (제9양상) 또는 본 발명의 RNA 이중가닥 (제10양상)으로 대체된다.
- [0145] **제4양상, 유전자 기능의 조사 방법**
- [0146] 본 발명의 또 다른 양상은 세포 또는 유기체 내에서 유전자의 기능을 조사하는 방법으로서 하기를 포함하는 방법이다:
- [0147] a. 상기 유전자에 상응하는 본 발명의 RNA 복합체를 세포 또는 유기체 내에 도입함으로써, 시험 세포 또는 시험 유기체를 생성하는 것;
- [0148] b. 표적 핵산의 개질화가 일어날 수 있는 조건 하에 시험 세포 또는 시험 유기체를 유지시키는 것;
- [0149] c. 단계 b에서 생성된 시험 세포 및 유기체의 표현형을 관찰하고 임의로는 상기 관찰된 표현형을 적절한 대조 세포 또는 대조 유기체의 표현형과 비교함으로써, 유전자의 기능에 대한 정보를 제공하는 것.
- [0150] 본 발명의 RNA 복합체는 하기 실시예에 약술된 바와 같이 트랜스펙션 (transfection)을 사용하여 세포 내에 도입될 수 있다.
- [0151] 유기체 또는 세포의 표현형은 예컨대 단백질 수준을 평가하기 위한 프로테오믹스를 사용하여 또는 RNA 수준을 평가하기 위한 마이크로어레이를 사용하여 관찰할 수 있다. 또한 보다 명백한 표현형, 예컨대 하나의 특정 유전자의 발현이 사용될 수 있다.
- [0152] 유전자의 기능에 대해 획득된 정보는 유전자 생성물이 특정 질환과 관련하여 치료학적 중재에 적절한 표적인지 여부를 결정하는 데 사용될 수 있다. 따라서 특정의 유전자 생성물이 예컨대 특정 아류형의 암에서 영향을 받는 것으로 공지되어 있는 특정의 생화학적 경로에 작용하는 것으로 기재되어 있는 경우, 상기 유전자 생성물은 상기된 아류형의 암의 치료를 위한 치료학적 중재에 적절한 표적일 수 있다.
- [0153] 세포 또는 유기체 내에서 유전자의 기능을 조사하는 방법의 바람직한 구현예에서, 상기 방법의 핵산 개질화는 RNA 간섭, 바람직하게는 표적 mRNA의 분해 또는 표적 RNA의 번역 저해이다.
- [0154] 다른 구현예에서, 핵산 개질화는 DNA 메틸화이다.
- [0155] 세포 또는 유기체 내에서 유전자의 기능을 조사하는 방법의 바람직한 구현예들에서, 상기 방법은 세포 배양 내, 시험관 내 또는 생체 내에서 수행된다.
- [0156] 또 다른 구현예에서, 상기 방법은 분리된 세포 상에서 수행된다.
- [0157] 본 양상의 다른 구현예들에서, RNA 복합체는 본 발명의 올리고뉴클레오티드 (제9양상) 또는 본 발명의 RNA 이중가닥 (제10양상)으로 대체된다.
- [0158] **제5양상, 제제의 평가 방법**
- [0159] 본 발명의 또 다른 양상은 제제가 유전자 생성물에 작용하는지 여부를 평가하는 방법으로서 하기 단계들을 포함하는 방법이다:
- [0160] a. 상기 유전자에 상응하는 본 발명의 RNA 복합체를 세포 또는 유기체 내에 도입함으로써 시험 세포 또는 시험 유기체를 생성하는 것;
- [0161] b. 표적 핵산의 개질화가 일어나는 조건 하에 시험 세포 또는 시험 유기체를 유지시키는 것;
- [0162] c. 제제를 시험 세포 또는 시험 유기체 내에 도입하는 것;
- [0163] d. 단계 c에서 생성된 시험 세포 또는 유기체의 표현형을 관찰하고 임의로는 상기 관찰된 표현형을 적절한 대조 세포 또는 대조 유기체의 표현형과 비교함으로써, 제제가 유전자 생성물에 작용하는지 여부에 대한 정보를 제공하는 것.
- [0164] 단계 d에서의 바람직한 대조군은 단계 a에서 도입된 RNA 복합체를 포함하지 않는 시험 세포 또는 시험 유기체이

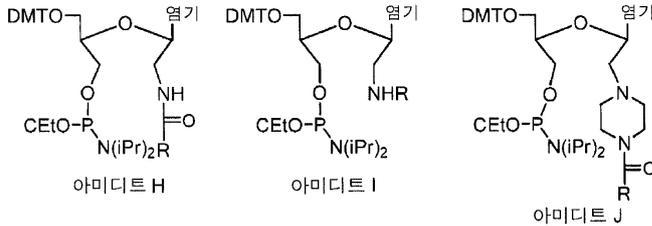
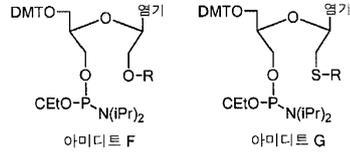
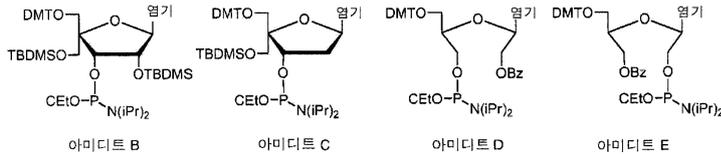
다.

- [0165] 제제가 유전자 또는 유전자 생성물에 작용하는지 여부를 평가하는 방법의 바람직한 구현예에서, 상기 방법의 핵산 개질화는 RNA 간섭, 바람직하게는 표적 RNA의 분해 또는 표적 RNA의 번역 저해이다. 다른 구현예에서, 핵산 개질화는 DNA 메틸화이다.
- [0166] 제제가 유전자 생성물에 작용하는지 여부를 평가하는 방법의 바람직한 구현예들에서, 상기 방법은 세포 배양 내, 시험관 내 또는 생체 내에서 수행된다.
- [0167] 또 다른 구현예에서, 상기 방법은 분리된 세포 상에서 수행된다.
- [0168] 본 양상의 다른 구현예들에서, RNA 복합체는 본 발명의 올리고뉴클레오티드 (제9양상) 또는 본 발명의 RNA 이중 가닥 (제10양상)으로 대체된다.
- [0169] **제6양상, 약제학적 조성물**
- [0170] 본 발명의 또 다른 양상은 RNA 복합체 및 약학적으로 허용 가능한 희석제, 담체 또는 보조제이다. 본 발명의 RNA 복합체가 특정의 유전자 및 유전자 생성물을 표적화하도록 설계될 수 있음은 당업자에게 자명하다. 상기 RNA 복합체는 DNA 서열 또는 RNA 서열을 표적화하나 단백질을 표적화하지는 않을 것으로 간주된다. 그러나 단백질과 같은 유전자 생성물의 수준은, 만일 그것의 mRNA 또는 비암호화 RNA가 예컨대 RNA 분해 또는 번역 저해에 의해 개질되는 경우 간접적으로 영향을 받을 수 있다. 또한 단백질을 암호화하는 유전자의 발현은 예컨대 DNA 메틸화로 인해 영향받을 수 있다.
- [0171] 본 양상의 다른 구현예들에서, RNA 복합체는 본 발명의 올리고뉴클레오티드 (제9양상) 또는 본 발명의 RNA 이중 가닥 (제10양상)으로 대체된다.
- [0172] **제7양상, 약제로서의 사용**
- [0173] 그리하여, 또 다른 양상은 약제로서 사용하기 위한 본 발명의 RNA 복합체이다. 치료학적 표적이 확인되면, 당업자는 상기 표적의 수준 및 활성에 영향을 미치는 RNA 복합체를 설계할 수 있는데, 이는 RNA 복합체의 특이성이 안티센스 가닥의 서열 내에만 존재하기 때문이다. 연속적 패신저 가닥을 가지는 천연 RNA 복합체의 경우, 패신저 가닥이 가이드 서열로서 작용함에 따라 오프 타겟 효과가 동반된다는 문제가 있다.
- [0174] 본 양상의 다른 구현예들에서, RNA 복합체는 본 발명의 올리고뉴클레오티드 (제9양상) 또는 본 발명의 RNA 이중 가닥 (제10양상)으로 대체된다.
- [0175] **제8양상, 단량체**
- [0176] 본 발명의 한 양상은 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 도입에 적절한 단량체 및 이를 용이하게 입수 가능한 개시 물질로부터 제조하는 방법이다. 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 티민-1-일 유도체가 DNA 가닥 내에 도입되었고, DNA/RNA 자동 합성에 관하여 그것의 포스포라미디트 형성 블록을 제조하는 절차가 보고되었다 [K. D. Nielsen et al., Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 1493; H. Thrane et al., Tetrahedron 1995, 51, 10389; P. Nielsen et al., Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 19].
- [0177] 본 발명의 RNA 복합체는 당업자에 공지된 올리고뉴클레오티드 자동 합성에 의해 가장 자주 제조될 것이다.
- [0178] 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체를 본 발명의 RNA 복합체 내에 도입하는 것은 a) RNA 자동 합성기에서의 RNA 합성, b) RNA 워크업 (work-up), c) RNA 정제, 및 d) RNA 분리에 관한 표준 방법을 따른다 [F. Eckstein, Oligonucleotides and Analogues, IRL Press, Oxford University Press, 1991]. 히드록시메틸 치환된 RNA 올리고뉴클레오티드 (= RNA 가닥) 및 RNA 복합체는 RNA 합성에 관한 표준 기술을 이용하여 포스포라미디트 유도체를 사용해 합성될 수 있다.
- [0179] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 포스포라미디트 유도체의 제조 방법은 염기 아데닌, 구아닌, 시토신 및 5-메틸시토신에 관하여 염기 보호기, 예컨대, 벤조일, 이소부틸릴, 아세틸, 페녹시아세틸, tert-부틸페녹시아세틸 또는 당업자에게 공지된 기타 표준 염기 보호기를 포함하는 리보뉴클레오시드, 예컨대 리보뉴클레오시드의 05'-DMT 보호 유도체로부터 개시된다.
- [0180] 바람직한 구현예에서, 본 발명은 2',3'-분열성 탄소-탄소 결합 (리보뉴클레오시드 명명법)을 가지는 단량체 D 및 E의 도입에 적절한 단량체성 형성 블록의 제조 방법을 포함한다.
- [0181] 다른 바람직한 구현예들에서, 본 발명은 2',3'-분열성 탄소-탄소 결합을 가지며 추가로 예컨대 그것의 2'-탄소

원자 (리보뉴클레오시드 명명법)에 히드록시기 이외의 작용기 또는 기를 가지는 F 내지 J와 같은 단량체의 도입에 적절한 단량체성 형성 블록의 제조 방법을 포함한다.

- [0182] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 단량체 D의 포스포라미디트 유도체의 제조 방법은 주요 단계들 중에 2',3'-글리콜 절단, 수득된 중간 생성물의 환원, 선택적인 02'-보호 및 03'-아인산화를 포함한다.
- [0183] 바람직한 구현예에서, 2',3'-글리콜 절단은 시약으로서 예컨대 과요오드산 나트륨을 이용하는 산화성 절단을 사용하여 수행된다.
- [0184] 다른 바람직한 구현예에서, 과요오드산 나트륨 절단 후의 중간 생성물은 예컨대 보로수소화나트륨에 의해 야기된 상응하는 디올로 환원된다.
- [0185] 단량체 D의 본 발명의 RNA 복합체 내로의 도입에 있어서는, 2'-히드록시기 (리보뉴클레오시드 명명법)를 보호하는 것이 필요하다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 이는 벤조일화에 의해 수행된다. 보호의 선택성, 즉 03'-벤조일화에 대한 02'-벤조일화의 양을 최적화하기 위해서는 벤조일화 시약 (벤조일 염화물 또는 예컨대 벤조일 무수물)을 1당량보다 약간만 더 사용하는 것이 유리할 수 있다. 한 바람직한 구현예에서, 벤조일화는 실온 미만에서 수행된다. 다른 유용한 구현예에서, 벤조일화는 0°C 미만에서, 또는 더욱 유용하게는 -50°C 미만에서 수행된다.
- [0186] 다른 바람직한 구현예에서, 02'-보호는 아세틸화에 의해, 또는 유기 합성의 당업자에게 공지된 아실화 시약을 사용한 아실화를 수행함으로써 이루어진다.
- [0187] 다른 바람직한 구현예에서, 02'-보호는 유기 합성의 당업자에게 공지된 실릴화 시약 및 방법을 사용한 실릴화에 의해 이루어진다. 바람직한 실릴화 보호기는 tert-부틸디메틸실릴이다.
- [0188] 바람직한 구현예에서, 이어지는 아인산화 반응은 소위 "PC1" 시약 [PCl(OCH₂CH₂CN)(N(iPr)₂)] 또는 소위 "비스-아미디트" 시약 [P(OCH₂CH₂CN)(N(iPr)₂)₂]을 사용하여 수행된다.
- [0189] 단량체 D의 포스포라미디트 유도체의 제조 방법의 바람직한 구현예에서, 개시 물질은 염기 아데닌, 구아닌, 시토신 및 5-메틸시토신에 관하여 염기 보호기, 예컨대, 벤조일, 이소부틸릴, 아세틸, 페녹시아세틸, tert-부틸페녹시아세틸 또는 당업자에게 공지된 기타 표준 염기 보호기를 포함하는 리보뉴클레오시드, 예컨대 리보뉴클레오시드의 05'-DMT 보호 유도체이다.
- [0190] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명은 단량체 E의 포스포라미디트 유도체의 제조 방법을 제공한다.
- [0191] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 단량체 E의 포스포라미디트 유도체의 제조 방법은 주요 단계들 중에 2',3'-글리콜 절단, 수득된 중간 생성물의 환원, 선택적인 03'-보호 및 02'-아인산화를 포함한다. 03'-보호는 예컨대 실릴화 또는 아실화에 의해, 또는 02'-벤조일화, 이어지는 03'-실릴화, 이어지는 02'-탈벤조일화의 조합에 의해 수행될 수 있다. 당업자에게 명백한 다른 보호기들도 또한 적용될 수 있다.
- [0192] 다른 바람직한 구현예들에서, 2',3'-분열성 탄소-탄소 결합을 가지며 추가로는 그것의 2'-탄소 원자 (리보뉴클레오시드 명명법)에 히드록시기 이외의 작용기를 포함하는 F 내지 J와 같은 단량체의 도입에 적절한 단량체성 형성 블록의 제조 방법은 리보뉴클레오시드 (예컨대, 05'-DMT 보호 리보뉴클레오시드)로부터 개시되는 주요 단계들 중에 2',3'-글리콜 절단, 수득된 중간 생성물의 환원, 선택적인 03'-보호, 2'-히드록시기의 전환, 03'-탈보호 및 03'-아인산화를 포함한다. 03'-보호는 예컨대 실릴화 또는 아실화에 의해, 또는 02'-벤조일화, 이어지는 03'-실릴화, 및 이어지는 02'-탈벤조일화와 같은 조합에 의해 수행될 수 있다. 당업자에게 명백한 다른 보호기들도 또한 적용될 수 있다. 2'-히드록시기의 아미노, 아실화된 아미노, 알킬화된 아미노, 디알킬화된 아미노, 카르바모일화된 아미노, 피페라지노, 아실화된 피페라지노, 알킬화된 피페라지노, 카르바모일화된 피페라지노, 머캡토, 아실화된 머캡토, 알킬화된 머캡토, 디설폭시드, 아실화된 히드록시, 알킬화된 히드록시, 카르바모일화된 히드록시 등과 같은 다른 기로의 전환, 또는 상기 기들의 치환 및/또는 보호된 유도체에 의한 전환은 유기 합성의 당업자에게 공지된 방법 및 절차를 사용하여 수행될 수 있다. 상기 방법 및 절차는 2'-히드록시기의 활성화된 유도체 상의 치환 반응, 또는 아실화 또는 카르바모일화 반응을 포함한다. 상기 방법 및 절차는 또한 02'-알킬화 반응 및 아미노 또는 머캡토와 같은 다른 C2' 부착기의 도입 이후의 알킬화 반응을 포함한다. 또 다른 가능성은 예컨대 친핵체와의 반응에 의해 추가로 개질될 수 있는 알데히드 작용기를 수득하기 위해, 또는 카르복시 작용기의 활성화 에스테르와 같은 활성화 유도체로의 전환 이후 예컨대 친핵체와의 반응에 의해 추가로 개질될 수 있는 카르복시 작용기를 수득하기 위해 2'-히드록시기를 산화시키는 것이다.

- [0193] 본 발명의 또 다른 구현예에서, F 내지 J와 같은 단량체의 도입에 적절하나 "전도" (inversion) (단량체 D 및 E와 같이 "전도된" 것으로 간주될 수 있음)되어 O2' 원자가 아인산화되고 C3' 원자가 히드록시기 이외의 작용기에 연결되도록 3'-히드록시기가 다른 기로 전환된 단량체성 형성 블록의 제조 방법은, 리보뉴클레오시드 (예컨대, O5'-DMT 보호 리보뉴클레오시드)로부터 개시되는 주요 단계들 중에 2',3'-글리콜 절단, 수득된 중간 생성물의 환원, 선택적인 O2'-보호, 3'-히드록시기의 전환, O2'-탈보호 및 O2'-아인산화를 포함한다. O2'-보호는 예컨대 실릴화 또는 아실화에 의해, 또는 둘의 조합에 의해 수행될 수 있다. 당업자에게 명백한 다른 보호기들도 또한 적용될 수 있다. 3'-히드록시기의 아미노, 아실화된 아미노, 알킬화된 아미노, 디알킬화된 아미노, 카르바모일화된 아미노, 피페라지노, 아실화된 피페라지노, 알킬화된 피페라지노, 카르바모일화된 피페라지노, 머캡토, 아실화된 머캡토, 알킬화된 머캡토, 디설폭시드, 아실화된 히드록시, 알킬화된 히드록시, 카르바모일화된 히드록시 등과 같은 다른 기로의 전환, 또는 상기 기들의 치환 및/또는 보호 유도체에 의한 전환은 유기 합성의 당업자에게 공지된 방법 및 절차를 사용하여 수행될 수 있다. 상기 방법 및 절차는 3'-히드록시기의 활성화된 유도체 상의 치환 반응, 또는 아실화 또는 카르바모일화 반응을 포함한다. 상기 방법 및 절차는 또한 O3'-알킬화 반응 및 아미노 또는 머캡토와 같은 다른 C3' 부착기의 도입 이후의 알킬화 반응을 포함한다. 또 다른 가능성은 예컨대 친핵체와의 반응에 의해 추가로 개질될 수 있는 알데히드 작용기를 수득하기 위해, 또는 카르복시 작용기의 활성화 에스테르와 같은 활성화된 유도체로의 전환 이후 예컨대 친핵체와의 반응에 의해 추가로 개질될 수 있는 카르복시 작용기를 수득하기 위해, 3'-히드록시기를 산화시키는 것이다.
- [0194] 한 구현예에서, 2'-C-피페라지노 유도체는 2'-히드록시기를 이탈기 (예컨대, 메실레이트 유도체)로 전환시킨 후 과량의 피페라진과 반응시켜 제조된다. 이는 예컨대 아미디트 J 구조 (하기의 도면 참조)의 포스포라미디트의 합성 단계로서 수행될 수 있다.
- [0195] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 C1' 원자 (리보뉴클레오시드 명명법)에 천연 핵염기와는 다른 기 또는 작용기를 포함하는 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 도입에 적절한 단량체성 형성 블록을 제조하는 방법을 포함한다. 상기 기 또는 작용기는 보호기를 포함할 수 있으며, 천연 핵염기를 제외하고 예컨대 피렌, 페틸렌, 플루오로포어, 수소, 알킬, 반응성기 및 헤테로고리를 포함한다.
- [0196] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 포스포라미디트 유도체 대신 H-포스포네이트 유도체로 이루어진 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 도입에 적절한 단량체성 형성 블록을 제조하는 방법을 포함한다.
- [0197] 포스포라미디트 (=아미디트) 형성 블록에 관하여 본 발명의 몇몇 바람직한 구현예들의 구조의 예시들은 하기된 바와 같다 (DMT = 4,4'-디메톡시트리틸; 염기 = 천연 핵염기; CEtO = 시아노에톡시):



R = 알킬, 콜레스테릴 유도체, 플루오로포어, 폴리아민, 지방산, 아미노산, 당류 또는 폴리펩티드 등

[0198]

[0199]

제9양상, 비환형 올리고뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드

[0200]

본 발명의 제9양상은 비환형 뉴클레오티드 단량체를 포함하는 올리고뉴클레오티드이다. 발명의 상세한 설명 및 실시예 항목에서 확인되는 바와 같이, 상기 올리고뉴클레오티드는 여러 용도 및 장점을 가진다.

[0201]

바람직한 구현예에서, 비환형 뉴클레오티드 단량체는 2'-3'-세코-뉴클레오티드 단량체이다. 비환형 뉴클레오티드 단량체를 포함하는 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 놀랍게도 RNAi 기작의 세포성 효소의 기질인 것으로 밝혀졌고, 일부 실시예에서 상기 올리고뉴클레오티드는 비환형 뉴클레오티드 단량체를 갖지 않는 동등한 올리고뉴클레오티드보다 훨씬 더 좋은 기질이다.

[0202]

바람직하게는, 비환형 뉴클레오티드 단량체는 단량체 E, F, G, H, I 또는 J (도 1 참조)로 이루어진 군으로부터 선택된다. G, F, H, I 및 J가 모두 단량체 D의 합성 전구체로부터 제조될 수 있음은 당업자에게 자명하다. 도 2에 나타난 바와 같이, 비환형 단량체는 콜레스테릴 유도체, 알킬, 플루오로포어, 폴리아민, 아미노산, 당류, 폴리펩티드 등과 같은 연결기를 포함하는 유도체로 변환될 수 있다. 상기 연결기는 예컨대 올리고뉴클레오티드가 세포, 기관 또는 유기체 내에서 표적 mRNA의 활성을 조정하기 위해 사용되는 경우 보다 우수한 생물학적 안정성 및/또는 생물학적 분포가 나타나도록 하는 데 유용할 수 있다.

[0203]

올리고뉴클레오티드의 길이는 바람직하게는 뉴클레오티드 단량체 10 내지 40개이다. 보다 바람직하게는, 뉴클레오티드 단량체 18 내지 30개의 길이이다.

[0204]

바람직한 구현예에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 5개 미만의 비환형 뉴클레오티드 단량체를 포함한다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 비환형 뉴클레오티드 단량체 이외의 뉴클레오티드 단량체 5개 당 비환형 뉴클레오티드 단량체 1개만을 포함한다. 보다 바람직하게는, 비환형 뉴클레오티드 단량체 이외의 뉴클레오티드 단량체 8개당 비환형 단량체 1개이다. 비환형 뉴클레오티드 단량체의 수가 증가할수록, 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 상보적 핵산에 대한 결합 친화도는 저하된다.

[0205]

그리하여 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 1 내지 5개의 비환형 뉴클레오티드 단량체를 포함한다.

[0206]

바람직한 구현예에서, 비환형 뉴클레오티드 단량체는 올리고뉴클레오티드의 1 내지 8번 자리, 보다 바람직하게는 2 내지 7번 자리 중 하나 이상에만 존재한다. 상기 자리는 올리고뉴클레오티드의 5'-말단으로부터 정해진다. 상기 영역 내의 비환형 뉴클레오티드 단량체는 올리고뉴클레오티드가 마이크로RNA로서 작용하는 것을 저감 또는

역제시킬 것인데, 이는 상기 자리들이 마이크로RNA의 소위 시드 영역에 상응하기 때문이다. 이는 예컨대 올리고뉴클레오티드가 siRNA의 가이드 가닥으로서 기능하도록 하고자 하는 경우에 관련된다.

- [0207] 바람직한 구현예에서, 안티센스 가닥 내의 모든 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체는 9 내지 16번 자리에 존재하며, 이때 상기 자리는 5'-말단으로부터 정해진다. 보다 바람직하게는, 안티센스 가닥 내의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체는 9 내지 11번 자리에 존재한다. 그리하여, 상기 영역 내의 히드록시메틸 개질된 뉴클레오티드 단량체의 존재는 안티센스 가닥이 마이크로RNA로서 작용하도록 유발할 것이다. 즉, siRNA 효과가 최소화되고 마이크로RNA 효과가 훨씬 더 커지도록 할 것이다. 또한 이러한 효과는 비환형 히드록시메틸 치환된 단량체, 예컨대 단량체 D의 존재에 의해 야기되는 친화도 감소로 인해 전 구간 결합의 경향이 감소한 것으로부터 유래한다.
- [0208] 바람직한 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 8개 초과와 연속적 DNA 단량체의 DNA 서열을 포함하지 않는다. 보다 바람직하게는 6개의 연속적 DNA 단량체, 가장 바람직하게는 4개의 연속적 DNA 단량체이다. 연속적 DNA 단량체는 일반적으로 올리고뉴클레오티드로 하여금 상보적 RNA에 결합된 경우 RNA 분해를 유발하는 RNase를 활성화시킬 수 있도록 할 것이다. 본 발명의 일부 구현예들에서, 이는 바람직하지 않다. 그리하여 추가의 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 임의의 DNA 단량체를 전혀 포함하지 않는다.
- [0209] 다른 구현예들에서, RNase H 활성화가 바람직하며, 올리고뉴클레오티드가 4개 초과와 연속적 DNA 단량체, 보다 바람직하게는 6개 초과와 DNA 단량체, 가장 바람직하게는 8개 초과와 DNA 단량체를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0210] 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 50% 초과와 RNA 단량체를 포함한다. 고수준의 RNA 단량체는 예컨대 RISC와 같은 세포성 효소에 대한 기질 또는 가이드 (또는 공인자)로서 기능함으로써 RNA 상호작용 단백질과의 상호작용을 촉진할 것이다.
- [0211] 그리하여 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 단량체 중 80% 초과가 RNA 단량체인 것이 바람직하다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 단량체 중 90% 초과가 RNA 단량체인 것이 바람직하다.
- [0212] 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 단량체 유사체를 포함할 수 있음이 자명하다. 이러한 한 구현예에서, 비환형 뉴클레오티드 단량체 및 RNA 단량체는 모든 뉴클레오티드 단량체의 80% 초과를 차지한다. 다른 구현예에서, 비환형 단량체 및 RNA 단량체는 모든 뉴클레오티드 단량체의 90% 초과를 차지한다.
- [0213] 올리고뉴클레오티드가 뉴클레오티드 단량체 유사체를 포함하는 경우, 이는 2'-O-알킬-RNA 단량체, 2'-아미노-DNA 단량체, 2'-플루오로-DNA 단량체, LNA 단량체, PNA 단량체, HNA 단량체, ANA 단량체, FANA 단량체, CeNA 단량체, ENA 단량체, DNA 단량체 및 INA 단량체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 뉴클레오티드 유사체는 일반적으로 결합 친화도를 조정하고, 생물학적 안정성을 증가시키고, 대체로 올리고뉴클레오티드가 보다 많은 약물 유사 특성을 가지게 하는 데 사용된다.
- [0214] 한 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 2개 이상의 LNA 뉴클레오티드 유사체를 포함한다. 비환형 뉴클레오티드 단량체는 일반적으로 상보적 핵산과 염기쌍을 이룬 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 녹는점 (즉, 결합 친화도)를 감소시키고, LNA 뉴클레오티드 단량체는 이러한 녹는점 감소를 저지하는 데 사용될 수 있다. 즉, 한 구현예에서 비환형 뉴클레오티드 단량체의 수는 LNA 뉴클레오티드 단량체의 수와 동일하다.
- [0215] 바람직한 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 비환형 단량체 및 RNA 단량체만을 포함한다.
- [0216] 다른 바람직한 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 비환형 뉴클레오티드 단량체, RNA 단량체, 및 LNA 뉴클레오티드 유사체만을 포함한다.
- [0217] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 결합, 보라노포스페이트 결합, 에틸 포스포네이트 결합, 포스포라미데이트 결합 및 포스포르트리에스테르 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 결합(들)을 포함한다. 포스포로티오에이트 결합 및/또는 보라노포스페이트 결합이 가장 바람직하다. 상기 결합은 올리고뉴클레오티드의 생물학적 안정성을 향상시키며, 또한 올리고뉴클레오티드의 생물학적 분포에 대해 긍정적인 효과를 나타내는 것으로 확인된 바 있다. 바람직한 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 50% 초과, 보다 바람직하게는 75% 초과와 상기 뉴클레오티드간 결합을 포함한다. 한 구현예에서, 뉴클레오티드간 결합은 모두 상기 유형의 것들이다.
- [0218] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 상보적 올리고뉴클레오티드와 염기쌍을 이루지 않는다. 즉, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥이다.

- [0219] 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드에 상보적인 표적 mRNA의 RISC 의존적인 번역 저해 또는 분해를 매개할 수 있다. 당업자라면 RISC가 RNA 유발성 침묵화 복합체임을 인지할 것이며, 상기 구현예에서 올리고뉴클레오티드가 RISC에 대한 가이드 서열로 작용함으로써 본 발명의 올리고뉴클레오티드에 대해 부분적인 또는 완전한 상보성을 나타내는 RNA 올리고뉴클레오티드, 일반적으로 mRNA로 RISC를 유도할 것임을 이해할 것이다. 올리고뉴클레오티드가 RISC를 부분적인 상보성을 갖는 mRNA 표적으로 유도하는 경우 상기 올리고뉴클레오티드는 마이크로RNA 모방자로 확인될 수 있고, 올리고뉴클레오티드가 RISC를 완전한 상보성을 갖는 mRNA 표적으로 유도하는 경우 이는 단일 또는 이중 가닥 siRNA로 확인될 수 있다.
- [0220] RISC 의존성은 세포주 내에서 RISC 성분을 암호화하는 mRNA에 대응하는 siRNA를 사용해 RISC 성분을 파괴한 후 상기 손상된 세포주 내에서의 올리고뉴클레오티드의 활성을 측정함으로써 평가될 수 있다. 상기 실험들은 당업자에게 널리 공지되어 있다.
- [0221] **제10양상, 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 RNA 이중 가닥**
- [0222] 본 발명의 제10양상은 본 발명에 따른 제1 올리고뉴클레오티드 및 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는 RNA 이중 가닥이다.
- [0223] 바람직한 구현예에서, RNA 이중 가닥의 제2 올리고뉴클레오티드도 또한 본 발명의 올리고뉴클레오티드이다.
- [0224] 제1양상에서 본 발명의 RNA 복합체에 관하여 기재된 많은 특성들이 제10양상의 RNA 이중 가닥에도 또한 적용 가능함은 자명하다
- [0225] 바람직하게는, 본 발명의 RNA 이중 가닥은 15 내지 40개의 염기쌍을 포함하고, 바람직한 구현예에서는 염기쌍 18개, 염기쌍 19개, 염기쌍 20개, 염기쌍 21개, 염기쌍 22개 및 염기쌍 23개로 이루어진 군으로부터 선택되는 수의 염기쌍을 포함한다.
- [0226] 또 다른 구현예에서, RNA 이중 가닥은 25 내지 30개, 보다 바람직하게는 26 내지 28개, 가장 바람직하게는 27개의 염기쌍을 포함한다. 상기 RNA 이중 가닥은 다이스 기질 RNA로 기재될 수도 있다.
- [0227] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 RNA 이중 가닥은 오버행을 포함한다.
- [0228] 다른 구현예에서, RNA 이중 가닥은 2개의 오버행을 포함한다.
- [0229] 또 다른 구현예에서, 제1 올리고뉴클레오티드는 3'-오버행을 포함한다.
- [0230] 또 다른 구현예에서, 제2 올리고뉴클레오티드는 3'-오버행을 포함한다.
- [0231] 바람직하게는 오버행의 길이는 뉴클레오티드 1 내지 8개이고, 보다 바람직하게는 오버행의 길이는 뉴클레오티드 1개, 뉴클레오티드 2개 및 뉴클레오티드 3개의 길이를 가지는 오버행으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0232] 다른 구현예에서, RNA 이중 가닥은 1개 이상의 둔단을 포함한다.
- [0233] 다른 구현예에서, RNA 이중 가닥은 양 말단이 모두 둔단이다.
- [0234] 바람직한 구현예에서, RNA 이중 가닥은 염기쌍 18 내지 22개의 이중 가닥 영역을 포함하며, 이때 제1 올리고뉴클레오티드 및 제2 올리고뉴클레오티드는 각각 뉴클레오티드 1 내지 3개의 3'-오버행을 포함한다. 상기 RNA 이중 가닥은 일반적인 siRNA (단형 간섭 RNA)로 인지될 것이다.
- [0235] 한 구현예에서, RNA 이중 가닥의 한 가닥은 제1양상에 상세히 기재된 바와 같이 불연속적이다.
- [0236] 한 구현예에서, RNA 이중 가닥은 RNA 이중 가닥의 제1 또는 제2 올리고뉴클레오티드에 상보적인 표적 mRNA의 번역 저해 또는 분해를 매개할 수 있다. 즉, RNA 이중 가닥은 예컨대 siRNA, 마이크로RNA 또는 프리-마이크로RNA로서 기능할 것이다.
- [0237] 한 구현예에서, RNA 이중 가닥은 표적 mRNA의 번역 저해 또는 분해를 매개하는 한편 비환형 단량체 대신 RNA 단량체를 가지는 동등한 RNA 이중 가닥에 비해 감소된 오프 타겟 효과를 유도할 수 있다. 감소된 오프 타겟 효과는 감소된 결합 친화도 때문에, 아울러 제1 또는 제2 올리고뉴클레오티드가 RISC에 관한 가이드 가닥으로 기능하지 못하도록 개질될 수 있기 때문에 달성될 수 있다. 즉, 이는 RNA 이중 가닥 중 어떤 올리고뉴클레오티드가 패신저 가닥 (센스 가닥)으로 기능하고 어떤 것이 가이드 가닥 (안티센스 가닥)으로 기능할지에 따라 제어될 수 있다.
- [0238] 다른 구현예에서, RNA 이중 가닥은 표적 mRNA의 번역 저해 또는 분해를 매개하는 한편 비환형 단량체가 siRNA

이중 가닥의 가이드 (안티센스) 가닥 내의 5 내지 10번 자리에 특이적으로 위치하는 경우에 오프 타겟 효과 감소를 유발할 수 있으며, 이때 상기 자리는 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단으로부터 정해진다.

- [0239] 다른 구현예에서, RNA 이중 가닥은 표적 mRNA의 번역 저해 또는 분해를 매개하는 한편 비환형 단량체가 siRNA 이중 가닥의 가이드 (안티센스) 가닥 내의 6 내지 8번 자리에 특이적으로 위치하는 경우에 감소된 오프 타겟 효과를 유발할 수 있다. 결합 친화도의 감소는 가이드 가닥의 마이크로RNA형 효과 유발 능력을 감소시키는 비환형 단량체의 상기 자리에의 존재에 의해 유발되는 것으로 간주되나, 이론에 구속되는 것은 아니다. 즉, 비환형 단량체는 정확히 자리잡는 경우, siRNA 활성보다 마이크로RNA 활성에 관하여 더 중요할 것으로 가정되는 소위 시드 영역 결합을 감소시킨다.
- [0240] 한 구현예에서, RNA 이중 가닥은 비환형 단량체 대신 RNA 단량체를 갖는 동등한 RNA 이중 가닥에 비해 증가된 효능을 이용하여 RNA 표적화, 예컨대 유전자 침묵화 또는 RNA 간섭을 매개할 수 있다. 증가된 효능은 RISC 반응의 절단 생성물의 오프율(off-rate) 증가로 인해 달성될 수 있다. 오프율은 결합 친화도 감소로 인해 증가될 수 있다. 또한 기질의 증가된 유동성은 가수분해 속도를 증가시킬 수 있다. 아울러 상기 증가된 유동성은 가이드 가닥을 RISC 내로 로딩하기 전에 RNA 이중 가닥의 풀림을 용이하게 할 수 있다.
- [0241] 한 구현예에서, RNA 이중 가닥은 비환형 단량체 대신 RNA 단량체를 갖는 동등한 RNA 이중 가닥에 비해 연장된 효능을 이용하여 표적 mRNA의 번역 저해 또는 분해를 매개할 수 있다. 연장된 효능은 예컨대 RNA 이중 가닥의 올리고뉴클레오타이드 및 이중 가닥 자체가 엑소 및 엔도뉴클레아제에 대한 열등한 기질임에 따라 올리고뉴클레오타이드 및 이중 가닥의 안정성이 증가되기 때문에 달성될 수 있다.
- [0242] 한 구현예에서, RNA 이중 가닥은 표적 mRNA의 번역 저해 또는 분해를 매개할 수 있으며, 이때 상기 RNA 이중 가닥은 비환형 단량체 대신 RNA 단량체를 갖는 동등한 RNA 이중 가닥에 비해 향상된 생물학적 안정성을 가진다.
- [0243] 또 다른 구현예에서, RNA 이중 가닥은 표적 mRNA의 번역 저해 또는 분해를 매개할 수 있으며, 이때 RNA 이중 가닥은 비환형 단량체 대신 RNA 단량체를 갖는 동등한 RNA 이중 가닥에 비해 감소된 면역 자극을 가진다. 면역 자극의 한 원인은 외래 올리고뉴클레오타이드를 인식하는 톨 (Toll) 유사 수용체와의 상호 작용이다. 본 발명의 RNA 이중 가닥은 비천연성이므로 톨 유사 수용체에 의해 검출하기 더 어려울 것이다.
- [0244] **참고문헌**
- [0245] US2003/0108923
- [0246] US2005/0234007
- [0247] WO2005/073378
- [0248] J. Kurreck, Eur. J. Biochem. 2003, 270, 1628
- [0249] K. D. Nielsen et al., Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 1493
- [0250] H. Thrane et al., Tetrahedron 1995, 51, 10389
- [0251] P. Nielsen et al., Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 19
- [0252] Nawrot and Sipa, Curr. Topics Med. Chem. 2006, 6, 913-925
- [0253] F. Eckstein, Oligonucleotides and Analogues, IRL Press, Oxford University Press, 1991
- [0254] M. Petersen and J. Wengel, Trends Biotechnol. 2003, 21, 74-81
- [0255] Pfundheller, Sørensen, Lomholt, Johansen, Koch and Wengel, J. "Locked Nucleic Acid Synthesis", Methods Mol. Biol. 2004, vol. 288 (Oligonucleotide Synthesis), 127-145., P. Herdewijn, Ed., Humana Press Inc.
- [0256] Furniss, Hannaford, Smith and Tatchell, Vogel's Textbook of Organic Chemistry, 1989, John Wiley & Sons
- [0257] Bryld, Højland and Wengel, Chem. Commun. 2004, 1064
- [0258] Mokhir, Tetzlaff, Herzberger, Mosbacher and Richart, J. Comb. Chem. 2001, 3, 374
- [0259] Mangos MM, Min KL, Viazovkina E, Galarneau A, Elzagheid MI, Parniak MA, Damha MJ., J Am Chem Soc. 2003 Jan 22; 125(3):654-61

도면의 간단한 설명

도 1

RNA 복합체 내에 도입된 히드록시메틸 치환된 뉴클레오티드의 다양한 구조의 예시들이 제시되어 있다. 단량체 A는 비교를 위해 제시된 것으로 리보오스 스캐폴드 (scaffold)를 가지는 천연 RNA 단량체이다. 본 발명의 RNA 복합체 내에 포함된 단량체 B 내지 E는 히드록시메틸기 ("자유 히드록시메틸기")인 치환기를 포함하는 것을 특징으로 하며, 그리하여 본 발명의 명칭은 "히드록시메틸 치환된 RNA 올리고뉴클레오티드 및 RNA 복합체"이다. 자유 히드록시메틸기는 예컨대 환형 리보오스 스캐폴드의 C4' 원자 또는 비환형 리보오스 기반 스캐폴드의 C1' 원자에 부착된다. 본 발명의 히드록시메틸 치환된 뉴클레오티드는, 각각 인 원자에 부착되어 뉴클레오티드간 결합 형성에 참여하는 다른 산소 원자들을 포함한다 (도 1 참조). 이러한 1개 이상의 다른 산소 원자들은 1개 이상의 본 발명의 RNA 복합체의 히드록시메틸 치환된 뉴클레오티드가 RNA 가닥의 3'- 또는 5'-말단에 위치하는 경우 히드록시기의 일부일 수 있다. 1개의 본 발명의 RNA 복합체의 히드록시메틸 치환된 뉴클레오티드가 RNA 가닥의 3'-말단 및/또는 5'-말단에 위치하는 경우, 상기 단량체의 히드록실기는 임의의 말단 위치의 천연 RNA 단량체의 경우와 마찬가지로 인산화될 수 있다. 본 발명의 히드록시메틸 치환된 뉴클레오티드에는 우라실, 티민, 시토신, 5-메틸시토신, 아데닌, 구아닌 또는 임의의 다른 공지의 천연 또는 합성 핵염기와 같은 핵염기 또는 핵염기 유사체 (도 1에서 "염기"로 명명됨)가 부착된다.

도 2

히드록시메틸 치환된 단량체의 유도체화, 기능화 및 연결화된 변이체들이 제시되어 있다. 예시로는 히드록시메틸 치환된 2',3'-세코-RNA 단량체 D의 유도체화, 기능화 및 연결화된 변이체가 제시되어 있다 (도 1 참조). 단량체 F는 에테르 결합에 의해 연결된 R기를 포함한다. 단량체 G는 티오에테르 결합에 의해 연결된 R기를 포함한다. 단량체 H는 아마이드 결합에 의해 연결된 R기를 포함한다. 단량체 I는 아미노 결합에 의해 연결된 R기를 포함한다. 단량체 J는 피페라지노 단위체에 의해 연결된 R기를 포함한다. 1개 또는 수개의 상기 단량체를 본 발명의 RNA 복합체 내에 도입함으로써, 상기 RNA 복합체의 특성들을 조정할 수 있다. 예컨대, 생물학적 안정성 증가, RNA 표적화 능력 또는 특이적 전달성 증가가 나타날 수 있으며, 검출 목적을 위해 형광기가 부착될 수 있다.

도 3

올리고뉴클레오티드 또는 RNA 복합체의 단량체일 수 있는 2개의 히드록시메틸 치환된 단량체 (단량체 C 및 단량체 D)의 구조.

도 4

유전자 침묵화의 결과, "단량체 X" (즉, 2',3'-세코-RNA 단량체 D)를 포함하는 본 발명의 siRNA 복합체가 생겼다. 이러한 결과는 핵염기로서 우라실을 가지는 단량체 D (W130 센스 가닥 내에서 "X"로 표시됨)를 포함하는 W130 센스 가닥 (뉴클레오티드 서열에 관하여는 도 4 참조)을 이용해 획득된 것이다. 상기 연구에 사용된 안티센스 가닥의 핵산 서열은 당해 도면의 아래쪽에 기재되어 있다 (안티센스 서열 내의 모든 X 단량체는 핵염기로서 우라실을 가지는 단량체 D임). 위첨자 "L"을 가지는 단량체는 잠금 핵산을 의미한다 (예컨대, TL은 티민 잠금 핵산 또는 LNA를 의미함).

도 5

유전자 침묵화의 결과, "단량체 X" (즉, 2',3'-세코-RNA 단량체 D)를 포함하는 본 발명의 siRNA 복합체가 생겼다. 이러한 결과는 핵염기로서 우라실을 가지는 단량체 D (W131 센스 가닥 내에서 "X"로 표시됨)를 포함하는 W131 센스 가닥 (뉴클레오티드 서열에 관하여는 도 5 참조)을 이용해 획득된 것이다. 상기 연구에 사용된 안티센스 가닥의 핵산 서열은 도 4의 아래쪽에 기재되어 있다 (안티센스 서열 내의 모든 X 단량체는 핵염기로서 우라실을 가지는 단량체 D임).

도 6

유전자 침묵화의 결과, "단량체 X" (즉, 2',3'-세코-RNA 단량체 D)를 포함하는 본 발명의 siRNA 복합체가 생겼다. 이러한 결과는 핵염기로서 시토신 (sC, W282 서열의 5'-말단으로부터 첫 번째 X), 아데닌 (sA, W282 서열의 5'-말단으로부터 두 번째 X) 및 시토신 (sC, W282 서열의 3'-말단으로부터 마지막 X)을 가지는 단량체 D를 포함하는 W282 센스 가닥 (뉴클레오티드 서열에 관하여는 도 6 참조)을 이용해 획득된 것이다. 상기 연구에 사용된

안티센스 가닥의 핵산 서열은 도 4의 아래쪽에 기재되어 있다 (안티센스 서열 내의 모든 X 단량체는 핵염기로서 우라실을 가지는 단량체 D임).

도 7

유전자 침묵화의 결과, "단량체 X" (즉, 2',3'-세코-RNA 단량체 D)를 포함하는 본 발명의 siRNA 복합체가 생겼다. 이러한 결과는 W194 센스 가닥 (뉴클레오티드 서열에 관하여는 도 7 참조)을 이용해 획득된 것이다. 상기 연구에 사용된 안티센스 가닥의 핵산 서열은 도 4의 아래쪽에 기재되어 있다 (안티센스 서열 내의 모든 X 단량체는 핵염기로서 우라실을 가지는 단량체 D임). 위첨자 "L"을 가지는 단량체는 잠금 핵산을 의미한다 (예컨대, TL은 티민 잠금 핵산 또는 LNA를 의미함).

도 8

유전자 침묵화의 결과, "단량체 X" (즉, 2',3'-세코-RNA 단량체 D)를 포함하는 본 발명의 siRNA 복합체가 생겼다. 이러한 결과는 W181 센스 가닥 (뉴클레오티드 서열에 관하여는 도 8 참조)을 이용해 획득된 것이다. 상기 연구에 사용된 안티센스 가닥의 핵산 서열은 도 4의 아래쪽에 기재되어 있다 (안티센스 서열 내의 모든 X 단량체는 핵염기로서 우라실을 가지는 단량체 D임). 위첨자 "L"을 가지는 단량체는 잠금 핵산을 의미한다 (예컨대, TL은 티민 잠금 핵산 또는 LNA를 의미함).

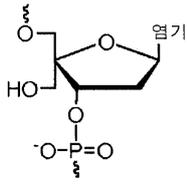
도 9

유전자 침묵화의 결과, "단량체 X" (즉, 2',3'-세코-RNA 단량체 D)를 포함하는 본 발명의 siRNA 복합체가 생겼다. 이러한 결과는 핵염기로서 우라실을 가지는 단량체 D (W129 센스 가닥 내에서 "X"로 표시됨)를 포함하는 W129 센스 가닥 (뉴클레오티드 서열에 관하여는 도 9 참조)을 이용하여 획득된 것이다. 상기 연구에 사용된 안티센스 가닥의 핵산 서열은 도 4의 아래쪽에 기재되어 있다 (안티센스 서열 내의 모든 X 단량체는 핵염기로서 우라실을 가지는 단량체 D임). 위첨자 "L"을 가지는 단량체는 잠금 핵산을 의미한다 (예컨대, TL은 티민 잠금 핵산 또는 LNA를 의미함).

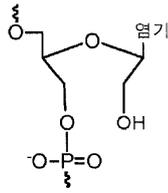
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예 1. 본 발명의 RNA 복합체의 합성.

- [0261] 실시예 1. 본 발명의 RNA 복합체의 합성.
- [0262] 본 발명의 RNA 복합체의 히드록시메틸 치환된 단량체의 DNA/RNA 자동 합성에 관한 포스포라미디트 형성 블록의 제조 절차가 보고된 바 있다 [thymine derivatives; K. D. Nielsen et al., Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 1493; H. Thrane et al., Tetrahedron 1995, 51, 10389; P. Nielsen et al., Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 19]. 아데닌, 구아닌, 시토신 및 우라실의 예시 포스포라미디트 유도체의 제조 절차에 관한 기재는 실시예 11을 참조하도록 한다.
- [0263] 상기 히드록시메틸 치환된 단량체의 본 발명의 RNA 복합체 내로의 도입은 a) RNA 자동 합성기에서의 RNA 합성, b) RNA 워크업, c) RNA 정제 및 d) RNA 분리에 관한 표준 방법을 따른다 [F. Eckstein, Oligonucleotides and Analogues, IRL Press, Oxford University Press, 1991]. 이는 히드록시메틸 치환된 RNA 올리고뉴클레오티드 (= RNA 가닥) 및 RNA 복합체가 RNA 합성에 관한 표준 기술을 이용해 공지의 포스포라미디트 유도체를 사용하여 합성될 수 있음을 의미한다.
- [0264] LNA는 1개 이상의 2'-O,4'-C-메틸렌-결합된 리보뉴클레오티드 (LNA 뉴클레오티드)를 포함하는 올리고뉴클레오티드이다 [M. Petersen and J. Wengel, Trends Biotechnol. 2003, 21, 74-81]. LNA-개질된 siRNA는 1개 이상의 LNA 단량체를 포함하는 siRNA 구성체이다. 시판 중인 LNA 포스포라미디트를 사용하여 LNA 뉴클레오티드를 본 발명의 RNA 복합체 내에 도입하는 데는 공지의 방법들이 사용될 수 있다 [Pfundheller, Sørensen, Lomholt, Johansen, Koch and Wengel, J. "Locked Nucleic Acid Synthesis", Methods Mol. Biol. 2004, vol. 288 (Oligonucleotide Synthesis), 127-145., P. Herdewijn, Ed., Humana Press Inc.].
- [0265] 히드록시메틸 치환된 siRNA (히드록시메틸 치환된 소형 간섭 RNA)는 1개 이상의 히드록시메틸 치환된 뉴클레오티드 단량체를 포함하는 siRNA 구성체이다 (히드록시메틸 치환된 뉴클레오티드 단량체의 구조에 관하여는 도 1 참조). 단량체의 예시는 하기된 바와 같다:



단량체 C (C, I)



단량체 D (X)

[0266]

올리고뉴클레오타이드 - siRNA 구성체 내의 선택된 안티센스 가닥:

천연 RNA	5'-ACU UGU GGC CGU UUA CGU CGC U (서열 번호: 1)
JW1103	5'-ACU UGU GGC CGU UUA CGU CG^LC^{MeL} U (서열 번호: 2)
JW1186	5'-ACU UG I GGC CGU UUA CGU CG^LC^{MeL} U (서열 번호: 3)
JW1187	5'-AC I UG I GGC CGU UTA CG I CG^LC^{MeL} U (서열 번호: 4)
W123	5'-ACU UG X GGC CGU UUA CGU CG^LC^{MeL} U (서열 번호: 5)
W124	5'-AC X UGU GGC CGU UUA CGU CG^LC^{MeL} U (서열 번호: 6)
W125	5'-ACU UGU GGC CGU UUA CG X CG^LC^{MeL} U (서열 번호: 7)
W126	5'-ACU UGU GGC CG X UUA CGU CG^LC^{MeL} U (서열 번호: 8)
W127	5'-ACU UGU GGC CGU UUA CGT CG X U (서열 번호: 9)
W128	5'-AC X UGU GGC CGU UUA CGT CG X U (서열 번호: 10)

[0267]

올리고뉴클레오타이드 - siRNA 구성체 내의 선택된 센스 가닥:

천연 RNA	5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG UUC U (서열 번호: 11)
JW1104	5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG U T^LC^{MeL} U (서열 번호: 12)
JW1106	5'-GAC ^{MeL} GUA AAC ^{MeL} GGC CAC ^{MeL} AAG U T^LC^{MeL} U (서열 번호: 13)
JW1188	5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG TTC (서열 번호: 14)
W043	5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG U TIC U (서열 번호: 15)
W044	5'-GAC GTA AAC CAC AAG U TIC U (서열 번호: 16)
JW1189	5'-GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC (서열 번호: 17)
W129	5'-GAC G XA AAC GGC CAC AAG U T^LC^{MeL} U (서열 번호: 18)
W130	5'-GAC G XA AAC XGGC CAC AAG U T^LC^{MeL} U (서열 번호: 19)
W131	5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG U UX U (서열 번호: 20)
W132	5'-GAC G XA AAC GGC CAC AAG U UX U (서열 번호: 21)

[0268]

합성된 기타 히드록시메틸 치환된 RNA 가닥:

5'-ACU UGU GGC CGU UUA CGU CGC U (서열 번호: 22)
5'-GAC GTA AAC G (서열 번호: 23)
5'-GC CAC AAG U TIC U (서열 번호: 24)

[0269]

[0270]

- 위첨자 "L"은 잔기가 LNA 뉴클레오타이드임을 나타낸다.

[0271]

- 위첨자 "MeL"은 잔기가 5-메틸시토신 염기를 가지는 LNA 뉴클레오타이드임을 나타낸다.

[0272]

- 굵은 글씨의 밑줄친 T는 히드록시메틸 치환된 뉴클레오타이드 단량체이다. 당해 실시예에서 이는 C4'-분지형 RNA 단량체 C의 티민-1-일 유도체이다 (도 1 참조).

[0273]

- 굵은 글씨의 밑줄친 C는 히드록시메틸 치환된 뉴클레오타이드 단량체이다. 당해 실시예에서 이는 C4'-분지형 RNA 단량체 C의 5-메틸시토신-1-일 유도체이다 (도 1 참조).

- [0274] - 짧은 글씨의 밑줄친 X는 히드록시메틸 치환된 비환형 뉴클레오티드 단량체이다. 상기 서열에서 이는 2',3'-세코-RNA 단량체 D의 우라실-1-일 유도체이다 (도 1 참조). 다른 실시예 및 도면에서는 우라실 외의 염기 변환체가 포함된다.
- [0275] 연구된 추가의 서열들에 관하여는 실시예 9 및 10을 참조하도록 한다.
- [0276] 세포 연구 (EGFP를 발현하는 폐암 세포주)들이 수행되었다. 본 발명을 예증하기 위한 예시로는 2 또는 3개의 뉴클레오티드 오버행을 포함하는 siRNA 이중 가닥이 사용된다. 이러한 예시 설계는 단지 예증을 위한 것이며, 다수의 다른 구성체들이 본 발명에 포함되고 유사하게 작용한다. 그리하여 예컨대 단단형 siRNA 이중 가닥, 예시된 것보다 짧거나 긴 단단형 siRNA 이중 가닥, 및 단일 가닥 안티센스 가닥이 포함된다. 아울러 안티센스 가닥 및 불연속적 패신저 가닥 ("패신저 가닥"은 또한 "센스 가닥"으로 기재될 수 있음)을 포함하는 RNA 복합체가 포함된다.
- [0277] **실시예 2. 본 발명의 siRNA 복합체에 대한 어닐링 (annealing) 및 트랜스펙션 절차.**
- [0278] 세포를 6-웰 플레이트에 배치하고 40-60%의 점유율로 성장시켰다. 트랜스펙션 직전에, 세포를 웰 당 1 ml의 완전 성장 배지 내에 재배치하였다. 각각 농도 20 μ M의 어닐링 완충액 (10 mM 트리스-HCl, pH 7.3, 50 mM NaCl)에 혼합된 센스 및 안티센스 가닥을 95°C에서 1분 동안, 및 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 6-웰 플레이트의 웰 당, 다음의 용액을 준비하였다: 무혈청 RPMI 배지 150 μ l 중 TransIT-TKO 4 μ l. 어닐링된 siRNA 복합체를 첨가하고, 주의하여 혼합한 다음, 실온에서 20분 동안 인큐베이션한 후, 세포 위에 따랐다. 최종 RNA 복합체 농도는 50 nM이었다. 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션 한 후, 배지를 교체하고 37°C에서 24시간 동안 추가로 세포를 인큐베이션하였다. 세포를 트립신화에 의해 제거한 다음, 뒤이은 RNA 및 유동 분석을 위해 반으로 분리시켰다.
- [0279] 유전자 침묵화가 달성되면 (하기 참조), 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함하는 본 발명의 RNA 복합체가 표준 트랜스펙션 조건 하에 세포막에 침투할 수 있는 것으로 보인다.
- [0280] **실시예 3. 유전자 침묵화**
- [0281] mRNA 및 단백질 정량 절차. eGFP 단백질의 발현을 유동 세포계량 분석에 의해 분석하였다. 웨스턴 블랏을 다음과 같이 수행하였다: 세포를 PBS 중에서 2회 세정하고 동량의 세포를 90°C에서 2 x 10 분 동안 부드러운 피펫팅에 의해 분리된 2 x SDS 샘플 완충액 [4% 나트륨 도데실-설페이트 (SDS), 20% 글리세롤, 125 mM 트리스/HCl pH 6.8, 0.01 mg/ml 브롬페놀 블루, 10% 2-머캅토에탄올] 중에 용해시켰다. 단백질을 8% SDS-아크릴아미드 겔 중에 분리하고, 밤새 PVDF 막 (Immobilon) 상에 전기 블랏팅하였다. 필터를 10% w/v 우유를 포함하는 PBS를 이용해 1시간 동안 차단하였다. 래빗 다클론성 EGFP 항체 (Santa Cruz Biotechnology)의 1:1000 희석을 사용해 EGFP 단백질을 검출하였다. 마우스 hnRNP C1 항체는 Seraphin Pinol-Roma 제품이었다. 시각화를 위해 호스레디쉬 과산화효소 (hrp) 연결형 2차 항체 (DAKO)를 ECL 시약 (Amersham Biosciences)과 함께 사용하였다. eGFP mRNA는 표준 절차에 따른 노던 블랏에 의해 분석하였다.
- [0282] 다음은 50 nM의 siRNA 복합체 농도에서 수행된 유전자 침묵화 실험의 결과 목록이다. 결과는 미스매치된 대조 siRNA 이중 가닥 (100%로 세팅)을 이용해 취득된 유전자 발현 수준에 관하여 퍼센트로 제시된다:

엔트리	센스/안티센스	평균 GFP	EGFP mRNA
1	RNA / RNA	13%	16%
2	JW1104 / JW1103	13%	28%
3	JW1188 / JW1103	7%	13%
4	JW1189 / JW1103	6%	15%
5	W043 / JW1103		~13%
6	W044 / JW1103		~19%
7	JW1104 / JW1186	22%	31%
8	JW1104 / JW1187	62%	90%
9	W131 / W127	27%	
10	W132 / W128	86%	
11	W131 / W128	68%	
12	W132 / W127	47%	
13	W129 / JW1103	36%	
14	W130 / JW1103	39%	
15	JW1106 / W123	24%	
16	JW1106 / W127	51%	
17	JW1106 / W125	34%	
18	JW1106 / W126	22%	

[0283]

엔트리 1번은 비개질 siRNA 복합체가 GFP 유전자를 효율적으로 침묵시킴을 나타낸다.

[0284]

엔트리 2번은 LNA-개질된 siRNA 복합체가 GFP 유전자를 효율적으로 침묵시킴을 나타낸다. 이 구성체는 2개의 RNA 가닥의 3'-말단 근처에 2회의 LNA 개질화를 포함한다.

[0285]

엔트리 3 내지 8번의 유전자 침묵화 실험예에서는 구조 T/C (도 3)의 C4'-분지형 RNA 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함하는 siRNA 복합체가 연구되었다.

[0286]

엔트리 3번은 센스 가닥의 3'-말단으로부터 2 및 3번 자리에 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함하는 본 발명의 siRNA 복합체가 GFP 유전자를 침묵화하는 데 매우 기능적임을 나타낸다.

[0287]

엔트리 3번의 예와 더불어 엔트리 4, 5, 6, 13 및 14번의 예에서도 예시된 안티센스 가닥은 LNA-개질된 RNA 가닥이나, 비개질 RNA 안티센스 가닥 또는 완전히 또는 부분적으로 개질된 RNA 안티센스 가닥도 또한 기능적일 것이다. 수득된 결과는 LNA 단량체와 같은 대안적으로 개질된 단량체가 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체와 완전히 호환됨을 나타낸다.

[0288]

엔트리 4번은 센스 가닥 내에 히드록시메틸 치환된 단량체 T/C를 포함하는 본 발명의 siRNA 복합체가 유전자 침묵화를 매개하는 데 매우 효율적임을 나타낸다.

[0289]

엔트리 5 및 6번은 센스 가닥 내에 히드록시메틸 치환된 단량체 T/C를 포함하는 본 발명의 siRNA 복합체가 유전자 침묵화를 매개하는 데 매우 효율적임을 나타낸다.

[0290]

상기 결과에 따르면 매우 효율적인 유전자 침묵화는 센스 가닥 내로 도입된 히드록시메틸 치환된 단량체를 가지는 본 발명의 siRNA 복합체를 이용해 달성된 것으로 나타난다. 데이터에 따르면 비개질 siRNA 또는 LNA-개질된 siRNA를 이용해 달성된 유전자 침묵화와 비교할 때 대체로 훨씬 개선된 유전자 침묵화가 본 발명의 RNA 복합체를 이용해 달성된다는 놀라운 결과가 확인된다. 아울러 침묵화는 코어 영역을 형성하는 이중 가닥 중심부에 수 개의 히드록시메틸 치환된 단량체와 함께 센스 RNA 가닥을 포함하는 RNA 복합체를 이용할 때 훨씬 효율적이다 (예컨대, 엔트리 W044).

[0291]

엔트리 7 및 8번은 복합체의 안티센스 가닥 내에 히드록시메틸 치환된 단량체 T/C를 포함하는 본 발명의 siRNA 복합체가 유전자 침묵화를 매개할 수 있음을 나타낸다. 안티센스 가닥 내에 도입되는 히드록시메틸 치환된 단량체 T/C가 많을수록 유전자 침묵화 활성은 낮아지는 것으로 보인다.

[0292]

엔트리 7, 8, 15, 16, 17 및 18번의 예에서 예시로서 LNA-개질된 센스 가닥을 사용하였으나, 비개질 RNA 센스 가닥 또는 완전히 또는 부분적으로 개질된 RNA 센스 가닥도 또한 기능적일 것이다. 수득된 결과는 LNA 단량체와 같은 대안적으로 개질된 단량체가 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체와 완전히 호환됨을 나타낸다.

[0293]

엔트리 9 내지 18번의 유전자 침묵화 실험예에서는 도 3에 제시된 구조 X의 2',3'-세코-RNA 히드록시메틸 치환

[0294]

된 단량체를 포함하는 본 발명의 siRNA 복합체가 연구된다.

- [0295] 엔트리 9번은 2개의 RNA 가닥 각각 내에 (두 가닥의 3'-말단 근처에) 1개의 히드록시메틸 치환된 단량체 X를 포함하는 본 발명의 siRNA 복합체가 비개질 siRNA와 동등한 수준의 매우 효율적인 유전자 침묵화를 매개함을 나타낸다. 이는 히드록시메틸 치환된 단량체 X의 리보오스 단위체의 비환형 특성을 고려할 때 놀라운 것이다.
- [0296] RNA 복합체의 두 가닥 각각에 추가의 X 단량체가 있는 경우, 유전자 침묵화 효율은 비효율적이다 (엔트리 10).
- [0297] 엔트리 10번과 더불어 엔트리 11번은 안티센스 가닥의 5'-말단 근처에 히드록시메틸 치환된 단량체 X를 도입하면 siRNA 복합체의 유전자 침묵화 효율이 감소함을 나타낸다.
- [0298] 엔트리 12번은 센스 가닥의 5'-말단 근처에 히드록시메틸 치환된 단량체 X를 도입하고 센스 가닥의 3'-말단 내에 단량체 X를 추가로 도입한 경우 siRNA 복합체의 유전자 침묵화 효율이 감소함을 나타낸다.
- [0299] 엔트리 13 및 14번은 센스 가닥의 5'-말단 근처에 히드록시메틸 치환된 단량체 X를 도입하면 siRNA 복합체의 유전자 침묵화 효율이 감소함을 나타낸다. 상기 결과는 siRNA 구성체의 센스 가닥의 중심부에 히드록시메틸 치환된 단량체 X를 도입하면 유전자 침묵화 활성이 향상되지도 감소하지도 않음을 나타낸다.
- [0300] 엔트리 15 내지 18번은 1개의 히드록시메틸 치환된 단량체 X를 가지는 LNA-개질된 RNA 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 본 발명의 siRNA 복합체를 이용한 유전자 침묵화 실험의 결과를 나타낸 것이다
- [0301] 상기 결과에 따르면 안티센스 가닥, 예컨대 W126 및 W123의 중심 영역에 히드록시메틸 치환된 단량체 X를 포함하는 본 발명의 siRNA 복합체는 매우 효율적인 유전자 침묵화를 매개하는 것으로 확인된다. 놀랍게도, W131과 함께 하는 경우 매우 효율적인 유전자 침묵화를 매개하는 W127은 LNA-개질된 RNA 센스 가닥 JW1106과 함께 하는 경우에는 보통 수준의 유전자 침묵화를 유발할 뿐이다. 이는 두 RNA 가닥 각각에 (두 가닥의 3'-말단 근처에) 1개의 히드록시메틸 치환된 단량체 X를 포함하는 본 발명의 siRNA 복합체가 비개질 siRNA와 동등한 수준의 매우 효율적인 유전자 침묵화를 매개한다는 놀라운 관찰 양상 (엔트리 9)을 뒷받침하는 것이다.
- [0302] 우라실, 티민 또는 5-메틸시토신 이외의 핵염기를 가지는 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함하는 본 발명의 RNA 복합체를 이용하여 상기된 것과 유사한 결과들이 수득될 수 있다. 예컨대, 핵염기로서 아데닌, 시토신 또는 구아닌을 가지는 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함하는 본 발명의 RNA 복합체에 관하여 유사한 프로토콜을 사용하는 동등한 유전자 침묵화 활성이 수득될 수 있다.
- [0303] **실시예 4. 면역 자극.**
- [0304] 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함하는 본 발명의 RNA 복합체는 상응하는 비개질 RNA 복합체와 비교할 때 화학적으로 개질된 것이므로 상응하는 비개질 RNA 복합체보다 작은 면역 자극 활성을 나타낼 것이다.
- [0305] **실시예 5. 오프 타겟 효과.**
- [0306] 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함하는 본 발명의 RNA 복합체는 안티센스 가닥 개질된 siRNA 복합체가 비활성이 되도록 조정될 수 있으므로, 감소된 오프 타겟 효과를 갖는 유전자 침묵화가 본 발명에 의해 달성될 수 있다. 중요한 것은 센스 가닥이 안티센스 가닥으로서 기능할 수 없도록 히드록시메틸 치환된 단량체를 이용해 센스 가닥을 개질시키는 것이다. 이는 예컨대 센스 가닥의 5'-말단 근처에 히드록시메틸 치환된 단량체를 도입함으로써 달성될 수 있다.
- [0307] 비환형 단량체 X를 이용하는 경우, 오프 타겟 효과 감소는 안티센스 가닥 내에, 가장 바람직하게는 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 6 내지 8번 자리 근처에, 예컨대 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 7번 자리에 단량체 X를 도입함으로써 달성될 수 있다.
- [0308] **실시예 6. 기능화 및 연결화된 히드록시메틸 단량체를 포함하는 본 발명의 RNA 복합체의 합성.**
- [0309] 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 히드록시메틸 치환기는 연결기에 의해 기능화된다. 본원에서 연결기는 본 발명의 RNA 복합체의 화학적, 생물물리적 또는 생물학적 특성을 조정, 확대 또는 개선하는 기로서 정의된다. 상기 기는 세포 분포, 기관 분포, 조직 분포, 녹는점, 표적 친화도, 생물학적 안정성, 부합화 신호 등을 조정하는 데 유용할 수 있다.
- [0310] 히드록시메틸 치환기를 다양한 화학적 유도체로 전환하는 데에는 공지된 방법들이 사용될 수 있다 [Furniss, Hannaford, Smith and Tatchell, Vogel's Textbook of Organic Chemistry, 1989, John Wiley & Sons]. 이는 뉴클레오사이드 수준에서, 즉 DNA 자동 합성기에서의 RNA 자동 합성에 유용한 포스포라미디트 유도체로의 전환 이

전에 달성될 수 있다. 히드록시메틸기의 유용한 유도체로의 전환 이후, RNA 자동 합성에 필요한 포스포라미디트 유도체를 표준 방법을 사용하여 합성한 다음, 표준 방법을 사용하여 유도체화 또는 연결화된 단량체를 RNA 올리고뉴클레오티드 (가닥) 내에 도입한다 (실시예 1 참조).

- [0311] 에테르 결합에 의한 연결화. 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 히드록시메틸 치환기는 친핵성 치환 반응에 의한 연결기와 히드록시메틸 치환기의 메틸렌기 간의 에테르 결합에 의해 기능화된다. 이 반응은 예컨대 메실화 또는 할라이드로의 변환에 의해 히드록시메틸 치환기의 히드록시기를 좋은 이탈기로 전환하는 것, 및 뒤이은 알콜 또는 알콕시드 유도체에 의한 친핵성 첨가를 수반한다.
- [0312] 티오에테르 결합에 의한 연결화. 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 히드록시메틸 치환기는 친핵성 치환 반응에 의한 연결기와 히드록시메틸 치환기의 메틸렌기 간의 티오에테르 결합에 의해 기능화된다. 이 반응은 예컨대 메실화 또는 할라이드로의 변환에 의해 히드록시메틸 치환기의 히드록시기를 좋은 이탈기로 전환하는 것, 및 뒤이은 알킬티올 또는 티오알콕시드 유도체에 의한 친핵성 첨가를 수반한다. 다르게는 친핵체가 SH-인 경우, 예컨대 아세틸화에 의한 보호는 머캡토 (SH)기의 본 발명의 RNA 복합체 내로의 도입에 유용한 포스포라미디트 유도체를 야기한다. 머캡토 작용기를 RNA 복합체 내에 도입하기 위한 다른 절차로는 디설피드 함유 모이어티와의 연결화가 사용될 수 있다. 디설피드 함유 RNA 복합체의 환원 이후 머캡토기 기능화된 RNA 복합체가 수득된다.
- [0313] 아미노메틸기로의 유도체화. 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 히드록시메틸 치환기는 아미노메틸기로 전환될 수 있다. 이 반응은 예컨대 메실화 또는 할라이드로의 변환에 의해 히드록시메틸 치환기의 히드록시기를 좋은 이탈기로 전환하는 것, 및 이어서 암모니아 또는 이후 (예컨대, RNA 합성 이후) 탈보호되는 보호형 아민 유도체 (예컨대, 프탈이미드)에 의한 친핵성 첨가를 수반하여 원하는 아미노 유도체를 수득시킨다. 트리플루오로아세틸 또는 Fmoc 보호기는 표준 올리고뉴클레오티드 탈보호 이후 자유 아미노기의 유리를 이용한, RNA 자동 합성 시의 아미노 보호에 관한 대안이다.
- [0314] 아미드 결합에 의한 연결화. 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 히드록시메틸 치환기는 아미드 결합성 연결기의 부착을 위한 도구로서 작용한다. 이는 예컨대 상기된 바와 같은 히드록시메틸 치환기의 히드록시 단위체의 아민 단위체로의 전환, 및 추가로는 공지의 방법을 사용한 아미드 결합 형성을 통한, 예컨대 연결기에 의한 상기 아미노기의 유도체화를 수반한다. 이는 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 RNA 합성 이전 또는 RNA 합성 이후에 일어날 수 있다 [Bryld, Højland and Wengel, Chem. Commun. 2004, 1064; Mokhir, Tetzlaff, Herzberger, Mosbacher and Richart, J. Comb. Chem. 2001, 3, 374].
- [0315] 아미노 결합에 의한 연결화. 본 발명의 히드록시메틸 치환된 단량체의 히드록시메틸 치환기도 또한 아미노 결합성 연결기의 부착을 위한 도구로서 작용한다. 이는 예컨대 상기된 바와 같은 히드록시메틸 치환기의 히드록시 단위체의 아민 단위체로의 전환 및, 추가로는 공지의 반응인 환원성 아민화 반응에 의한, 예컨대 알데히드 작용기를 포함하는 연결기에 의한 상기 아미노기의 유도체화를 수반한다 [Furniss, Hannaford, Smith and Tatchell, Vogel's Textbook of Organic Chemistry, 1989, John Wiley & Sons]. 이는 RNA 합성 이전 또는 RNA 합성 이후에 일어날 수 있다.
- [0316] 피페라지노기 또는 선형 디아미노 알킬기를 통한 연결화. 피페라지노기 또는 선형 디아미노 알킬기도 또한 개시된 반응들의 수행에 의한 유도체화에 사용된다 [Bryld, Højland and Wengel, Chem. Commun. 2004, 1064-5]. 다른 연결기들은 RNA 올리고뉴클레오티드 합성 이전 또는 이후에, 예컨대 아미드 결합 형성 또는 환원성 아민화 반응에 의해 예컨대 피페라지노기의 말단 질소 원자 (도 2 참조, 단량체 J)에 부착될 수 있으므로, 상기 기들은 유용할 것이다 [Bryld, Højland and Wengel, Chem. Commun. 2004, 1064; Mokhir, Tetzlaff, Herzberger, Mosbacher and Richart, J. Comb. Chem. 2001, 3, 374]. 이러한 방법으로 예컨대 콜레스테릴 또는 지방산 단위체가 피페라지노-메틸 치환기를 통해 본 발명의 RNA 복합체에 연결될 수 있다.
- [0317] 상기 절차들을 사용하여, 예컨대 모두 히드록시메틸 치환기의 메틸렌기를 통해 본 발명의 RNA 복합체에 연결되는 콜레스테릴 단위체, 알킬 단위체, 지방산 단위체, 폴리아민 유도체, 티오 유도체, 아미노산, 폴리펩티드, 당당류 유도체, 다당류 유도체 또는 플루오로포어를 포함하는 본 발명의 RNA 복합체를 제조할 수 있다. 상기된 기들은 상기 절차들을 사용하여 부착될 수 있는 기의 예시일 뿐이다. 연결화된 단량체의 구조적 예시에 관하여는 도 2를 참조하도록 한다.
- [0318] **실시예 7. 기능화 및 연결화된 히드록시메틸 단량체를 포함하는 본 발명의 RNA 복합체에 의한 유전자 침묵화.**
- [0319] 유전자 침묵화는 기능화 및 연결화된 히드록시메틸 단량체 (예컨대, 도 2 또는 실시예 6 참조)를 포함하는 본

발명의 RNA 복합체를 이용할 때 효율적이다.

- [0320] 효율적인 유전자 침묵화는 상기 기능화 및 연결화된 히드록시메틸 단량체가 siRNA 복합체의 두 가닥의 3'-말단에 또는 그 근처에 위치하는 경우에 달성된다.
- [0321] 또한 효율적인 유전자 침묵화는 상기 기능화 및 연결화된 히드록시메틸 단량체가 siRNA 복합체의 센스 가닥의 3'-말단 및 5'-말단에 또는 그 근처에 위치하는 경우에 달성된다.
- [0322] 효율적인 유전자 침묵화는 특히 상기 기능화 및 연결화된 히드록시메틸 단량체가 siRNA 복합체의 센스 가닥의 3'-말단에 또는 그 근처에 위치하는 경우에 달성된다.
- [0323] 또한 효율적인 유전자 침묵화는 상기 기능화 및 연결화된 히드록시메틸 단량체가 단일 가닥 안티센스 RNA 올리고뉴클레오티드 내에 위치하는 경우에 달성된다.
- [0324] 약역학적 특성의 조정은 본 발명의 RNA 복합체의 기 (도 2에서의 R)가 콜레스테릴 유도체인 경우 효율적인 유전자 침묵화와 함께 달성된다. 이는 예컨대 조직 분포 및 세포성 섭취의 개선, 및 생물학적 안정성의 증가를 야기한다.
- [0325] 약역학적 특성의 조정은 본 발명의 RNA 복합체의 기 (도 2에서의 R)가 티오 유도체인 경우 효율적인 유전자 침묵화와 함께 달성된다. 이는 인체 내에서의 순환 시간의 개선, 즉 신장에 의한 청소의 감소를 야기한다.
- [0326] 약역학적 특성의 조정은 본 발명의 RNA 복합체의 기 (도 2에서의 R)가 아미노기를 포함하는 경우 효율적인 유전자 침묵화와 함께 달성된다. 이는 조직 분포의 개선을 야기한다.
- [0327] **실시예 8. 히드록시메틸 치환된 RNA 복합체의 생물학적 안정성.**
- [0328] 안정성 분석에 관한 실험 절차. 히드록시메틸 치환된 RNA 복합체를 D-MEM (Gibco)에 희석된 10% 소 태아 혈청 (Gibco) 내에서 37°C에서 인큐베이션하였다. 지시된 시간점에 5µl의 샘플을 수집한 직후, 15µl의 1.33 x TBE/10% 글리세롤 로딩 완충액 중 드라이아이스 상에서 동결시킨 다음, 15% 겔 상의 비변성 PAGE를 실시하였다. RNA를 SYBR 골드 (Invitrogen)를 이용해 시각화하였다.
- [0329] 상기 실험은 히드록시메틸 치환된 RNA 복합체의 안정성이 천연 (또는 "비개질") 대조 RNA 복합체에 비해 개선된 생물학적 매질 내에서의 안정성을 나타냄을 보여준다. 따라서 히드록시메틸 치환된 siRNA는 10% 혈청 내에서 통상의 siRNA보다 훨씬 더 안정적이다. 따라서 1시간 초과 인큐베이션 시간에 걸쳐 히드록시메틸 치환된 siRNA 크기의 매우 작은 감소가 관찰될 것으로 예상할 수 있다. 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함하는 본 발명의 RNA 복합체가 세포 내, 동물 내 및 인간 내에서 매우 안정적이며 이러한 특징이 매우 효율적인 유전자 침묵화 특성에 공헌한다는 결론을 내렸다. 상기된 생물학적 안정성으로 인해, 히드록시메틸 치환된 단량체를 포함하는 본 발명의 RNA 복합체는 그것의 비개질 대응 부분에 비해 긴 시간 동안 유전자 침묵화를 나타낸다.
- [0330] **실시예 9. 유전자 침묵화에 관한 구조 D의 단량체의 강한 효능을 확인하는 일련의 유전자 침묵화 실험.**
- [0331] 이전 실험들에 기재된 절차들을 사용하여 상기된 서열 및 추가적인 서열 (당해 실시예의 연구에 포함된 서열에 관하여는 도 4 내지 9를 참조)의 siRNA 이중 가닥을 사용한 유전자 침묵화 연구들을 수행하였다. 이러한 실험들은 단량체 X의 1회 이상의 도입을 포함하는 서열들을 포함하였다 (단량체 X에 대한 설명에 관하여는 실시예 1 참조). 이때 단량체 X는 예시 구조로 사용된 것에 불과하며, 예컨대 단량체 E, 단량체 F, 단량체 G, 단량체 I 및 단량체 J (도 1 및 도 2 참조)와 같은 유도체들에 관해 유사한 결과들이 예상된다. 위치자 L를 가지는 굵은 글씨의 밑줄친 단량체는 LNA 단량체이다. 당해 실시예에서, 도 4 내지 9는 $C^L = \frac{C^{MeL}}{C} = 5$ - 메틸시토신-1-일 LNA 단량체를 포함한다.
- [0332] 도 4에 결과가 도시된 실험들은 모두 2회의 단량체 X의 도입을 포함하는 센스 가닥 (W130)을 수반한다. 이를 통해 하기가 확인된다:
- [0333] - 유전자 침묵화 작용기를 가지는 히드록시메틸 치환된 단량체 및 LNA 단량체 둘 모두를 포함하는 가닥으로 이루어진 siRNA 이중 가닥을 설계하는 것이 가능하다;
- [0334] - 유전자 침묵화 작용기를 가지는 센스 가닥 내에 미스매치형 단량체 X를 포함하는 가닥으로 이루어진 siRNA 이중 가닥을 설계하는 것이 가능하다;
- [0335] - RNA 안티센스 가닥 전체 (3'-말단 근처의 2개의 LNA 단량체는 제외)가 잘 용인된다;

- [0336] - 1개의 단량체 X가 안티센스 가닥 (W123, W125 또는 W126) 내에 잘 용인된다;
- [0337] - 여러 개의 단량체 X가 용인되나, 안티센스 가닥으로서 W123, W125 또는 W126을 이용할 때보다 186 및 W187을 이용할 때 덜 효율적인 유전자 침묵화가 관찰된다;
- [0338] - W188은 6개의 LNA 단량체를 포함하나 이 안티센스 가닥을 이용하는 경우 상당한 유전자 침묵화 활성이 관찰되며, 이는 안티센스 가닥 내의 중심부에 위치하는 단량체 X는 단량체 X가 상응하는 RNA 단량체로 대체된 상황에 비해 유전자 침묵화를 향상시킬 수 있음을 나타내는 것이다.
- [0339] 도 5에 결과가 도시된 실험들은 모두 3'-말단 근처에 위치한 1개의 단량체 X를 포함하는 센스 가닥 (W131)을 수반한다. 이를 통해 하기가 확인된다:
- [0340] - RNA 안티센스 가닥 전체 (3'-말단 근처의 2개의 LNA 단량체 제외)가 잘 용인된다;
- [0341] - 1개의 단량체 X가 안티센스 가닥 (W123) 내에 잘 용인될 수 있다;
- [0342] - 1개의 단량체 X가 비개질 대조군 (siRNA-EGFP)과 비교할 때 동등한 또는 더욱 개선된 유전자 침묵화를 야기할 수 있다 (W125 또는 W126);
- [0343] - 여러 개의 단량체 X가 비교적 잘 용인된다 (안티센스 가닥으로서 W186, W187 또는 W281);
- [0344] - W188은 6개의 LNA 단량체를 포함하나 이 안티센스 가닥을 이용하는 경우 상당한 유전자 침묵화 활성이 관찰되며, 이는 안티센스 가닥 내의 중심부에 위치한 단량체 X는 단량체 X가 상응하는 RNA 단량체로 대체된 상황에 비해 유전자 침묵화를 향상시킬 수 있음을 나타낸다;
- [0345] - LNA 단량체가 공존하지 않는 상황에서 안티센스 가닥 내의 단량체 X를 수회 교체한 경우 상당한 유전자 침묵화가 관찰된다 (W281).
- [0346] 도 6에 결과가 도시된 실험들은 모두 센스 가닥을 따라 분산된 3개의 단량체 X를 포함하는 센스 가닥 (W282)을 수반한다. 이를 통해 하기가 확인된다:
- [0347] - RNA 안티센스 가닥 전체 (3'-말단 근처의 2개의 LNA 단량체 제외)가 잘 용인된다;
- [0348] - 1개의 단량체 X가 안티센스 가닥 내에, 보다 명확하게는 3'-말단 근처에 잘 용인될 수 있으며, 이때 비개질 대조군 (siRNA-EGFP)과 비교할 때 동등한 또는 보다 향상된 유전자 침묵화가 관찰되었다 (W123, W125, W126);
- [0349] - 여러 개의 단량체 X가 비교적 잘 용인된다 (안티센스 가닥으로서 W186, W187 또는 W281);
- [0350] - W188은 6개의 LNA 단량체를 포함하나 이 안티센스 가닥을 이용하는 경우 상당한 유전자 침묵화 활성이 관찰되며, 이는 안티센스 가닥 내의 중심부에 위치한 단량체 X는 단량체 X가 상응하는 RNA 단량체로 대체된 상황에 비해 유전자 침묵화를 향상시킬 수 있음을 나타내며 상기 센스 가닥이 여러 개의 단량체 X를 포함하는 경우도 마찬가지이다;
- [0351] - LNA 단량체가 공존하지 않는 상황에도 안티센스 가닥 내의 단량체 X를 수회 교체한 경우 유전자 침묵화가 관찰된다 (W281).
- [0352] 도 7에 결과가 도시된 실험들은 모두 단량체 X가 없는 센스 가닥 (W194)을 수반한다. 이를 통해 하기가 확인된다
- [0353] - 1개의 단량체 X가 안티센스 가닥 (W123) 내에 잘 용인될 수 있다;
- [0354] - 1개의 단량체 X가 비개질 대조군 (siRNA-EGFP)과 비교할 때 동등한 또는 보다 향상된 유전자 침묵화를 야기할 수 있다 (W125 또는 W126);
- [0355] - 여러 개의 단량체 X가 비교적 잘 용인된다 (안티센스 가닥으로서 W186, W187 또는 W281);
- [0356] - W188은 6개의 LNA 단량체를 포함하나 이 안티센스 가닥을 이용하는 경우 상당한 유전자 침묵화 활성이 관찰되며, 이는 안티센스 가닥 내의 중심부에 위치한 단량체 X는 단량체 X가 상응하는 RNA 단량체로 대체된 상황에 비해 유전자 침묵화를 향상시킬 수 있음을 나타낸다;
- [0357] - LNA 단량체가 공존하지 않는 상황에도 안티센스 가닥 내의 단량체 X를 수회 교체한 경우 유전자 침묵화가 관찰된다 (W281).

- [0358] 도 8에 결과가 도시된 실험들은 모두 단량체 X를 가지지 않으나 이중 가닥 형성 단편 내에 도입된 4개의 LNA 단량체 (및 3'-말단 내의 2개의 LNA 단량체)를 가지는 센스 가닥 (W181)을 수반한다. 이를 통해 하기가 확인된다;
- [0359] - 1개의 단량체 X가 안티센스 가닥 (W123, W125 또는 W126) 내에 잘 용인된다;
- [0360] - 여러 개의 X 단량체가 비교적 잘 용인된다 (안티센스 가닥으로서 W186, W187 또는 W281);
- [0361] - W188은 6개의 LNA 단량체를 포함하나 이 안티센스 가닥을 이용하는 경우 상당한 유전자 침묵화 활성이 관찰되며, 이는 안티센스 가닥 내의 중심부에 위치한 단량체 X는 단량체 X가 상응하는 RNA 단량체로 대체된 상황에 비해 유전자 침묵화를 향상시킬 수 있음을 나타낸다;
- [0362] - LNA 단량체가 공존하지 않는 상황에도 안티센스 가닥 내의 단량체 X를 수회 교체한 경우 유전자 침묵화가 관찰된다 (W281).
- [0363] 도 9에 결과가 도시된 실험들은 모두 가닥의 5'-말단 근처에 위치한 1개의 단량체 X를 포함하는 센스 가닥 (W129)을 수반한다. 이를 통해 하기가 확인된다:
- [0364] - RNA 안티센스 가닥 전체 (3'-말단 근처의 2개의 LNA 단량체 제외)가 잘 용인된다;
- [0365] - 1개의 단량체 X가 안티센스 가닥 내에 잘 용인될 수 있으며 비개질 대조군 (siRNA-EGFP)에 비해 향상된 유전자 침묵화를 야기할 수 있다 (W123, W125 또는 W126);
- [0366] - 여러 개의 단량체 X가 비교적 잘 용인된다 (안티센스 가닥으로서 W186, W187 또는 W281);
- [0367] - W188은 6개의 LNA 단량체를 포함하나 이 안티센스 가닥을 이용하는 경우 상당한 유전자 침묵화 활성이 관찰되며, 이는 안티센스 가닥 내의 중심부에 위치한 단량체 X는 단량체 X가 상응하는 RNA 단량체로 대체된 상황에 비해 유전자 침묵화를 향상시킬 수 있음을 나타낸다;
- [0368] - LNA 단량체가 공존하지 않는 상황에서 안티센스 가닥 내의 단량체 X를 수회 교체한 경우 유전자 침묵화가 관찰된다 (W281).
- [0369] 하기된 데이터는 히드록시메틸 치환된 단량체가 sisiRNA 접근법과 호환됨을 나타낸다. 예컨대, W123 안티센스 가닥 + (W004+W005) 센스 가닥의 3분자 조합의 사용은 효율적인 유전자 침묵화 (즉, siRNA 효과가 0.24인 경우 "siRNA 효과"는 낮은 값을 가짐)을 야기하며, 이는 단량체 X가 sisiRNA 복합체의 안티센스 가닥 내에 위치할 수 있음을 나타내는 것이다 (1.0으로 설정한 대조군과 비교). 비개질 siRNA에 관한 데이터 또한 제시된다. W186 안티센스 가닥 + (W004+W005) 센스 가닥의 조합이 유전자 침묵화 효과를 유발할 수 없는 경우, 안티센스 가닥을 설계하는 것이 중요하다. 이는 히드록시메틸 치환된 단량체 (예컨대, 단량체 D)의 수가 낮아야 하며 가장 바람직하게는 단량체 1개 (안티센스 가닥의 오버행 내의 임의의 히드록시메틸 치환된 단량체는 제외)로 제한되어야 함을 나타낸다. 도 9에 도시된 연구에 포함된 기타 RNA 복합체들은 유전자 침묵화에 관하여 동등하게 효율적이다.

안티센스 가닥	siRNA 효과
W123	0.24
W125	0.26
W126	0.23
W186	1.12
siRNA	0.11
대조군	1.0

[0370]

[0371] **실시예 10. 오프 타겟 효과를 감소시키는 시드 개질화.**

[0372] 농도 50 nM에서 siRNA 이중 가닥 내에 안티센스 가닥 W124, 및 센스 가닥 W207 (5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG **UT^LC^{MeL}**) (서열 번호: 25)을 사용하여, 단량체 X는 안티센스 가닥 내의 소위 시드 영역에 존재하는 경우 오프 타겟 효과의 감소를 야기하는 효과를 강화하는 선택성을 가짐을 확인하였다. 따라서 실험 구성에는 siRNA 효과 (가닥 절단을 이용한 유전자 침묵화)와 miRNA 효과 (번역 저해; 시드 영역 매치만으로 이루어진 4개의 표적 영역을 포함하는 플라스미드 기반 오프 타겟 센서) 간의 차이를 고려하였다. 상기 조합을 사용한 결과, siRNA 효과는 비개질 siRNA 대조군의 경우와 동일한 반면, miRNA 효과는 상당히 감소하였다. siDharma (안티센스 가닥의

5'-말단으로부터 2번 자리에 도입된 2'-O-Me-RNA 단량체를 포함하는 시판품)에 관하여 유사한 효과가 수득되었다. 상기된 바와 같이 이는 안티센스 가닥의 소위 시드 영역에 존재하는 히드록시메틸 치환된 단량체 (예컨대, 단량체 D)가 바람직한 효과 (즉, 오프 타겟 효과의 감소 또는 소멸)를 야기함을 나타낸다. 따라서, RNA 복합체의 오프 타겟 효과를 감소 또는 소멸시키는 방법은, RNA 복합체에 1개 이상의 히드록시메틸 치환된 단량체 (예컨대, 단량체 D)를 도입시키는 것 또는 1개 이상의 히드록시메틸 치환된 단량체 (예컨대, 단량체 D)를 포함하는 RNA 복합체를 제조하는 것을 포함한다. 유전자 침묵화 효과 (즉, "siRNA 효과") 및 오프 타겟 효과 (즉, "miRNA 효과")에 관한 결과는 이하의 표를 참조하도록 한다. 이 데이터는 1개 이상의 히드록시메틸 치환된 단량체 (예컨대, 단량체 D)를 포함하는 RNA 복합체가 오프 타겟 효과를 최소화하는 반면 표적의 발현을 감소시킴을 나타낸다.

안티센스 가닥	siRNA 효과	miRNA 효과
W124	0.12	0.38
W125	0.04	0.19
SiRNA	0.06	0.15
siDharma	0.08	0.37
대조군	1.0	1.0

[0373]

추가된 시드 워크 연구를 위해, RNA 단량체 (rA, rC, rG 및 rU) 및 히드록시메틸 개질된 단량체 (단량체 D; 아데닌-9-일, 시토신-1-일, 구아닌-9-일 및 우라실-1-일 유도체에 관하여 각각 sA, sC, sG 및 sU로 라벨링됨)로 이루어진 이하의 서열들을 제조하였다. 단량체 X는 핵염기를 가지는 단량체 D를 의미한다:

[0374]

하기된 처음 9개의 올리고뉴클레오티드의 번호는 다음과 같다 (앞에서부터 1번 내지 9번):

[0375]

W313; W314; W315; W316; W317; W123; W318; W319 및 W320

[0376]

																				시열 번호		
sA	rC	rU	rU	rG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	sG	sU	rU	26
rA	sC	rU	rU	rG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	sG	sU	rU	27
rA	rC	sU	rU	rG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	sG	sU	rU	28
rA	rC	rU	rU	sG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	sG	sU	rU	29
rA	rC	rU	rU	rG	sU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	sG	sU	rU	30
rA	rC	rU	rU	rG	rU	sG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	sG	sU	rU	31
rA	rC	rU	rU	rG	rU	sG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	sG	sU	rU	32
rA	rC	rU	rU	rG	rU	rG	sG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	sG	sU	rU	33
rA	rC	rU	rU	rG	rU	rG	rG	sC	rC	rC	rG	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	sG	sU	rU	34
																				35		
sA	rC	rU	rU	rG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	35
rA	sC	rU	rU	rG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	36
rA	rC	sU	rU	rG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	37
rA	rC	rU	sU	rG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	38
rA	rC	rU	rU	sG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	39
rA	rC	rU	rU	rG	sU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	40
rA	rC	rU	rU	rG	rU	sG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	41
rA	rC	rU	rU	rG	rU	rG	sG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	42
rA	rC	rU	rU	rG	rU	rG	rG	sC	rC	rC	rG	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	43

[0377]

안티센스 가닥으로서 올리고머 W313; W314; W315; W316; W317; W123; W318; W319 및 W320, 그리고 센스 가닥으로서 올리고머 JW1104을 이용하고 상기 실시예에 기재된 것과 유사한 실험 기술들을 사용한 유전자 침묵화 실험에서, 히드록시메틸 치환된 단량체 D를 포함하는 siRNA 구성체의 효능은 비개질 siRNA 또는 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 2번 자리에 2'-O-Me-RNA 단량체를 포함하는 화학적으로 개질된 siRNA 시판품 (Dharma)에 비해 향상될 수 있음이 확인되었다. 아울러, 2',3'-세코-RNA 단량체 D를 포함하는 siRNA 복합체는 이 단량체가 siRNA 구성체에 도입되면 오프 타겟 효과 (miRNA 효과)가 대조군 비개질 siRNA (SiRNA)에 비해 감소할 수 있음을 나타낸다. 1 nM, 10 nM 및 100 nM의 RNA 복합체에 관한 결과는 이하에 표 형식으로 기재되어 있다 (대조군; 데이터

[0378]

가 1.0으로 조정됨). siRNA 및 miRNA (마이크로RNA) 효과에 의한 유전자 침묵화는 표시된 바와 같이 다양한 siRNA 이중 가닥의 여러 농도에서 연구되었다. RNA 및 비환형 2',3'-세코-RNA 단량체만을 포함하는 상기 9개의 가닥과 같은 가닥들로부터 유사한 결과가 예상된다.

[0379] 안티센스 가닥 개질물로서의 히드록시메틸 개질된 단량체 D는 오프 타겟 효과를 감소시키고 유전자 침묵화의 효능을 증가시킨다.

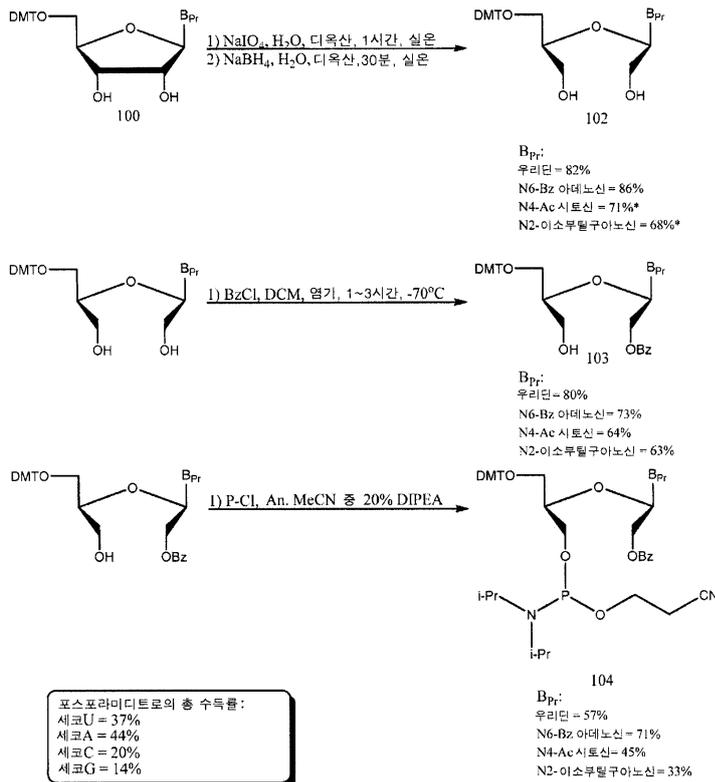
	SiRNA 효과			miRNA 효과	
	1 nm	10 nm	100 nm	1 nm	10 nm
W313	0.45	0.76	0.81	0.52	0.67
W314	0.58	0.96	0.88	0.72	0.64
W315	0.48	0.82	0.85	0.62	0.64
W316	0.46	0.75	0.78	0.85	0.97
W317	0.26	0.32	0.92	0.39	0.52
W318	0.17	0.18	0.45	0.46	0.62
W319	0.34	0.50	0.66	0.23	0.29
W320	0.87	0.96	0.97	0.13	0.12
Dharma	0.52	0.47	0.89	0.37	0.40
SiRNA	0.23	0.24	0.54	0.12	0.14
대조군	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

[0380] 설계가 중요하며, siRNA 효과에 있어 상기된 일련의 올리고머들 중 가장 효능이 강한 것은 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 7번 자리에 히드록시메틸 치환된 단량체 D를 포함하는 W318이다. W318는 또한 비개질 siRNA 또는 시판품 (Dharma)에 비하여 바람직하게 낮은 오프 타겟 (miRNA) 효과를 야기한다. 일반적으로 히드록시메틸 치환된 단량체 D가 도입된 상기 안티센스 가닥의 사용은 바람직하게 낮은 오프 타겟 (miRNA) 효과를 야기한다. 중요하고도 놀랍게도, 높은 효능 및 낮은 오프 타겟 효과는 히드록시메틸 치환된 단량체 D를 포함하는 안티센스 가닥을 가지는 구성체를 사용함으로써 동시에 달성될 수 있다 (상기 표 참조). 특히, W318의 설계는 히드록시메틸 치환된 단량체 D가 바람직하게는 안티센스 가닥의 소위 시드 영역의 경계 근처에, 가장 바람직하게는 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 5 내지 10번 자리 근처에, 예컨대 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 7번 자리에 도입될 수 있음을 바람직하게 나타낸다. 두 가닥 내에는 1개 이상의 히드록시메틸 치환된 단량체 D가 추가로 도입될 수 있다.

[0382] 아울러 단량체 X가 안티센스 가닥 내의 9 내지 16번 자리 근처에 위치하는 경우 (이때, 자리는 5'-말단으로부터 정해짐) 상기 효과는 역행할 수 있음이 확인될 수 있다. 예컨대 안티센스 가닥 내에서 단량체 X가 안티센스 가닥의 5'-말단으로부터 9번 자리에 존재하는 경우, 안티센스 가닥 및 이중 가닥은 마이크로RNA로서 작용한다 (siRNA 효과는 최소화되고 마이크로RNA 효과는 훨씬 강해질 것임). 이러한 효과는 비환형 히드록시메틸 치환된 단량체 X (= 단량체 D)의 존재에 의해 야기되는 친화도 감소로 인해 전 구간 결합의 경향이 감소한 것으로부터 유래한 것으로 보인다.

[0383] 실시예 11. 포스포라미디트 단량체성 형성 블록의 합성

[0384] 하기 도표는 단량체성 아미디트 (=포스포라미디트) 형성 블록의 합성을 예시하기 위해 수행된 절차를 나타낸 것이다:



[0385]

[0386]

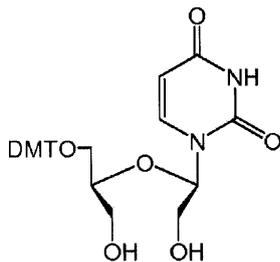
*세코G 및 세코C를 수득하기 위한 고리 열림 단계는 DMT 보호 이후 정제 없이 수행되었고, 이에 따라 상기 수득물은 두 단계의 수득물의 총합이다.

[0387]

화합물 100은 리보뉴클레오시드 개시 물질이다. 화합물 102는 산화성 절단 반응 후 환원에 의해 제조된 디올이다. 화합물 103은 화합물 102의 02'-히드록시기의 선택적 벤조일화에 의해 제조된 02'-벤조일화 유도체이다. 화합물 104은 화합물 103의 03'-히드록시기의 03'-인산화에 의해 제조된 아미디트 (=포스포라미디트)이다. 하기는 예시 절차로서 포함된 상세 절차 및 특성 데이터이다.

[0388]

5'-0-(4,4'-디메톡시트리틸)-2',3'-세코우리딘 (102-U)



[0389]

[0390]

뉴클레오시드 100-U (5'-0-(4,4'-디메톡시트리틸)우리딘; 10.35 g, 18.94 mmol)을 디옥산 (250 mL) 및 물 (50 mL)에 용해하였다. NaIO₄ (4.47 g, 20.90 mmol)을 물 (50 mL)에 용해한 후, 상기 용해된 뉴클레오시드에 첨가하였다. 그 혼합물을 백색 침전물이 형성되는 1시간 동안 교반하였다. 추가의 디옥산 (200 mL)을 첨가하고 그 현탁액을 15분 동안 교반한 다음, 현탁액을 유리 필터를 통해 여과시켜 필터 케이크를 디옥산 (100 mL)으로 세정하였다. 여과액을 혼합하고 NaBH₄ (797 mg, 21.1 mmol)를 첨가한 후, 반응 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 완충액 (피리딘:AcOH 1:1, v/v, ~10 mL)으로 중화하였다. 혼합물을 약 150 mL까지 증발시킨 후, CH₂Cl₂ (100 mL)를 첨가하고 그 혼합물을 NaHCO₃ 포화 수용액 (2 x 100 mL)으로 세정하였다. 유기상을 분리하여 Na₂SO₄로 건조시키고 증발 건조시킨 후, 수득된 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (석유 에테르 중 40% 아세톤)로 정제한 후 용매를 증발시켜 원하는 뉴클레오시드 102-U를 백색 폼 (foam)으로 수득하였다.

[0391]

수득량: 8.53 g (82%).

[0392] R_f : 0.2 (CH_2Cl_2 중 10% MeOH).

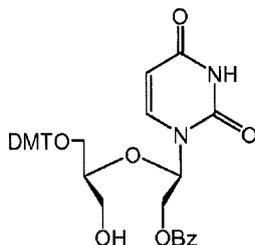
$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): δ 11.34 (br s, NH), 7.62 (d, 1H, $J=8.05$ Hz, H6), 7.45-7.15 (m, 9H, ar), 6.85 (d, 4H, ar), 5.80 (t, 1H, $J=6.2$ Hz, H1'), 5.52 (d, 1H, $J=8.05$ Hz, H5), 5.12 (t, 1H, $J=5.86$ Hz, 2'OH), 4.74 (t, 1H, $J=5.49$ Hz, 3'OH), 3.72 (s, 6H, OCH_3), 3.55-3.47 (m, 3H, H2'/H4'), 3.40 (t, 2H, $J=5.13$ Hz, H3'), 3.01-2.90 (m, 2H, H5').

$^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): δ 163.2, 157.9, 151.4, 144.8, 141.1 (C5), 135.4, 129.5 (ar), 127.7, 127.5 (ar), 126.5 (ar), 113.0, 101.6 (C6), 85.3, 83.6 (C1'), 79.3 (C2'/C4'), 63.5 (C5'), 61.1, 60.5 (C2'/C4'), 54.9 (- OCH_3).

ESI-HiRes ($m\text{Na}^+$): m/z : 571.1743 calc.: 571.2051.

[0393]

[0394] 2'-0-벤조일-5'-0-(4,4'-디메톡시트리틸)-2',3'-세코우리딘 (103-U)



[0395]

[0396] 뉴클레오시드 102-U (3.01 g, 5.50 mmol)를 an. 톨루엔 (15 mL)으로 공증발시켰다. 수득된 잔여물을 an. Pyr. (4.4 mL)와 함께 an. DCM (150 mL)에 용해한 후, 그 혼합물을 -70°C 로 냉각시켰다. 반응 혼합물에 벤조일 클로라이드 (700 μL , 6 mmol)를 천천히 첨가한 후, -70°C 에서 1시간 동안 교반하였다. 용액에 EtOH (5 mL)를 첨가한 다음 실온에 이르게 하였다. 반응 혼합물을 NaHCO_3 포화 수용액 (3 x 100 mL) 및 식염수 (100 mL)로 세정하였다. 혼합된 수성상을 CH_2Cl_2 (100 mL)로 역추출하였다. 유기상을 혼합하여 증발시켰다. 수득된 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (DCM 중 3.5% MeOH)로 정제한 후 용매를 증발시켜 생성물 103-U를 백색 폼으로 수득하였다.

[0397] 수득량: 3.44 g (79%).

[0398] R_f : 0.3 (CH_2Cl_2 중 5% MeOH).

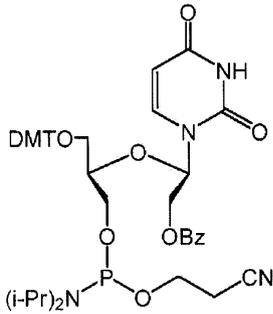
$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): δ 11.43 (s, 1H, NH, ex), 7.93-7.87 (m, 2H, ar), 7.80 (d, 1H, $J = 8.05$ Hz, H6), 7.70-7.63 (m, 1H), 7.56-7.48 (m, 2H, ar), 7.35-7.17 (m, 10H, ar), 6.89-6.81 (m, 4H, ar), 6.20 (t, 1H, $J = 5.49$ Hz, H1'), 5.56 (d, 1H, $J = 8.05$ Hz, H5), 4.83 (t, 1H, OH-3', ex), 4.58 (dq, 2H, H2'), 3.73 (s, 7H, - OCH_3), 3.70-3.62 (m, 1H, H4'), 3.45 (t, 2H, H3'), 3.11-2.96 (m, 2H, H5').

$^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): δ 164.92, 162.98, 157.89, 151.00, 144.67, 140.51, 135.45, 135.35, 133.54, 129.49, 129.45, 129.13, 129.02, 128.92, 128.74, 128.61, 127.65, 127.51, 126.49, 113.16, 113.01, 102.06, 85.35, 80.84, 79.57, 71.8, 71.8, 63.4, 60.5, 54.9, 54.8.

ESI-HiRes ($m\text{Na}^+$): m/z : 675.1949 calc.: 675.2313.

[0399]

[0400] 2'-0-벤조일-3'-0-(2-시아노에톡시(디이소프로필아미노)포스피노)-5'-0-(4,4'-디메톡시트리틸)-2',3'-세코우리딘 (104-U)



[0401]

[0402] 뉴클레오시드 103-U (679 mg, 1.04 mmol)를 DCE (3 x 6 mL)로 공증발시킨 후 진공 중에 12시간 동안 건조시켰다. 잔여물을 MeCN 중 20% DIPEA (6.5 mL)에 용해한 후 그 혼합물을 교반시켰다. 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필클로로포스파미디트 [P(Cl)(OCH₂CH₂CN)(N(iPr)₂): 0.66 mL, 3.02 mmol]를 반응 혼합물에 첨가하고 40분 동안 교반을 계속하였다. 그 반응 혼합물을 DCE (10 mL)에 따르고 NaHCO₃ 포화 수용액 (10 mL)으로 세정한 후 수상을 DCE (10 mL)로 역추출시켰다. 유기상을 모아 증발시켜 백색 폼을 수득하였다. 미정제 생성물을 컬럼 크로마토그래피 (톨루엔 중 0-20% EtOAc)로 정제한 후 용매를 증발시켜 뉴클레오시드 104-U를 백색 고체 물질로서 수득하였다.

[0403] 수득량: 600 mg (68%).

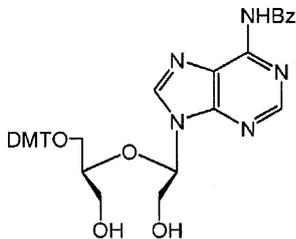
[0404] R_f: 0.6 (톨루엔 중 50% EtOAc).

³¹P NMR (MeCN): δ 147.8.

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 875.2946 calc.: 875.3391.

[0405]

[0406] 6-N-벤조일-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2',3'-세코아데노신 (102-A)



[0407]

[0408] 6-N-벤조일-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)아데노신 (100-A; 7.02 g, 10.42 mmol)을 디옥산 (150 mL) 및 물 (25 mL)에 용해하였다. NaIO₄ (2.73 g, 11.77 mmol)을 물 (25 mL)에 용해하고 상기 용해된 뉴클레오시드에 첨가하였다. 그 혼합물을 백색 침전물이 형성되는 1시간 동안 교반하였다. 추가의 디옥산 (100 mL)을 첨가하고 그 현탁액을 15분 동안 교반한 후, 현탁액을 유리 필터를 통해 여과하여 필터 케이크를 디옥산 (50 mL)으로 세정하였다. 여과액을 혼합하고, NaBH₄ (435 mg, 11.5 mmol)를 첨가한 후, 그 반응 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 이어서 아세톤을 첨가하여 잔여 NaBH₄를 제거하였다. 반응 혼합물을 완충액 (피리딘:AcOH 1:1, v/v, ~10 mL)으로 중화하였다. 반응 혼합물을 약 100 mL까지 감소시킨 후 CH₂Cl₂ (100 mL)를 첨가하고 그 혼합물을 NaHCO₃ 포화 수용액 (2 x 100 mL)으로 세정하였다. 유기상을 분리하고 Na₂SO₄로 건조시키고 증발 건조시킨 후, 수득된 잔여물을 DCM 및 i-PrOH를 사용한 컬럼 크로마토그래피로 정제한 후 용매를 증발시켜 백색 고체 물질로서 생성물을 수득하였다.

[0409] 수득량: 6.07 g (86%).

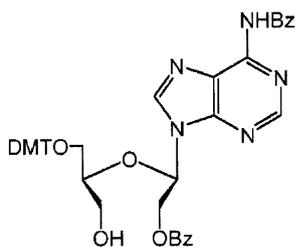
[0410] R_f: 0.22 (DCM 중 5% i-PrOH).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 11.23 (br s, 1H, N6H), 8.76 (s, 1H, 아데닌 C8/C2), 8.68 (s, 1H, 아데닌 C8/C2), 8.07 (d, 2H, J = 6.96 Hz, Ar), 7.69-7.50 (m, 3H, Ar), 7.25-6.91 (m, 9H, Ar), 6.79 (dd, 4H, Ar), 6.06 (t, 1H, H1'), 5.29 (t, 1H, 2'OH), 4.84 (t, 1H, 3'OH), 4.19-4.02 (m, 2H, H2'), 3.90-3.80 (m, 1H, H4'), 3.69 (s, 6H, 2 × -OCH₃), 3.49 (t, 2H, H3'), 2.93-2.74 (m, 2H, H5').

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 165.6, 157.9, 152.8, 151.6 (아데닌 CH), 150.2, 144.6, 143.1 (아데닌 CH), 135.7, 135.4, 132.4 (Ar), 129.4 (Ar), 128.5 (Ar), 128.4 (Ar), 127.7 (Ar), 127.5 (Ar), 126.4 (Ar), 125.2, 113.0 (Ar), 85.0, 84.5 (1'C), 79.6 (4'C), 63.6 (5'C), 61.4 (2'C), 60.9 (3'C), 54.9 (-OCH₃).

[0411]

[0412] 6-N-벤조일-2'-O-벤조일-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2',3'-세코아데노신 (103-A)



[0413]

[0414] 뉴클레오시드 102-A (2.01 g, 2.98 mmol)를 an. MeCN (2 x 30 mL)로 공중발시킨 후 밤새 건조시켰다. 수득된 잔여물을 an. DBU (900 mg, 5.96 mmol)와 함께 an. DCM (150 mL)에 용해한 후, 그 혼합물을 -70°C로 냉각시켰다. 반응 혼합물에 0.5 M 벤조일 클로라이드 용액 (6.56 mL, 3.28 mmol)을 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물을 -70°C에서 1시간 동안 교반한 다음, 실온에 이르게 한 후 EtOH (5 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 NaHCO₃ 포화 수용액 (3 x 150 mL) 및 식염수 (150 mL)로 세정하였다. 혼합된 수성상을 CH₂Cl₂ (100 mL)로 역추출하였다. 유기상을 혼합하여 증발시켰다. 수득된 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (석유 에테르 중 0-100% EtOAc)로 정제한 후 용매를 증발시켜 생성물 뉴클레오시드 103-A를 백색 폼으로 수득하였다.

[0415] 수득량: 1.69 g (73%).

[0416] R_f: 0.49 (EtOAc).

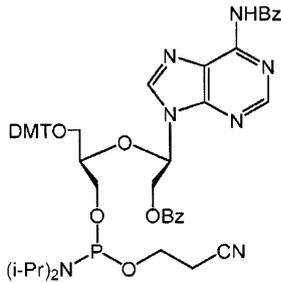
¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 11.28 (s, 1H, NH), 8.82 (s, 1H, 아데닌 CH), 8.76 (s, 1H, 아데닌 CH), 8.06 (d, 2H, Ar), 7.79 (d, 2H, Ar), 7.55-7.40 (m, 6H, Ar), 7.25-6.89 (m, 10, Ar), 6.77 (dd, 4H, Ar), 6.51 (t, 1H, H1'), 4.99 (m, 2H, H2'), 4.91 (t, 1H, 3'OH), 3.89 (ap. s, 1H, H4'), 3.72 (s, 6H, 2 × -OCH₃), 3.54 (m, 2H, H3'), 2.81 (m, 2H, H5').

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 165.0, 157.9, 152.4, 150.5, 144.6, 142.9 (아데닌 CH), 135.6, 133.6 (Ar), 132.4 (Ar), 129.0 (Ar), 128.8 (Ar), 128.4 (Ar), 127.5 (Ar), 125.2 (Ar), 113.0 (Ar), 85.1, 81.5 (C1'), 79.9 (C4'), 63.8 (C2'), 63.5, 54.9 (-OCH₃).

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 802.2848 calc.: 802.2847.

[0417]

[0418] 6-N-벤조일-2'-O-벤조일-3'-O-(2-시아노에톡시(디이소프로필아미노)포스피노)-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2',3'-세코아데노신 (104-A)



[0419]

[0420]

뉴클레오시드 103-A (1.69 g, 2.17 mmol)를 an. MeCN (2 x 20 mL)로 공증발시킨 후, 진공 중에 12시간 동안 건조시켰다. 잔여물을 MeCN 중 20% DIPEA (40 mL)에 용해한 후, 수득된 혼합물을 교반하였다. 반응 혼합물에 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필클로로포스포라미드트 [P(Cl)(OCH₂CH₂CN)(N(iPr)₂); 1.0 mL]를 첨가하고 40분 동안 교반하였다. 추가의 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필클로로포스포라미드트 (0.2 mL)를 첨가하여 수득된 혼합물을 3시간 동안 교반하였다. EtOH (5 mL)를 첨가하고 그 혼합물을 NaHCO₃ 포화 수용액 (3 x 50 mL)으로 세정한 후, 수성상을 DCM (50 mL)으로 역추출하였다. 유기상을 모아 증발시켰다. 미정제 생성물을 컬럼 크로마토그래피 (석유 에테르 중 0-100% EtOAc)로 정제한 후 용매를 증발시켜 백색 품을 수득하였다.

[0421]

수득량: 1.52 g (71%).

[0422]

R_f: 0.75 (DCM 중 5% MeOH).

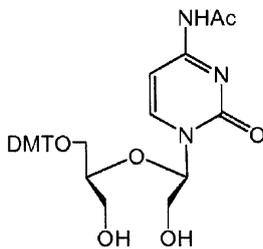
³¹P NMR (MeCN): δ 148.9.

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 1002.3885 calc.: 1002.3926.

[0423]

[0424]

4-N-아세틸-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2',3'-세코시티딘 (102-C)



[0425]

[0426]

4-N-아세틸시티딘 (11.75 g, 41.18 mmol)을 an. pyr (50 mL)으로 공증발시켰다. 수득된 잔여물을 an. pyr (160 mL)에 용해하였다. DMT-Cl (4,4'-디메톡시트리틸클로라이드; 16.76 g, 49.42 mmol)를 고체 물질로서 첨가한 후, 수득된 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 그 반응 혼합물을 NaHCO₃ 포화 수용액 (3 x 50 mL)으로 세정하고 유기상을 증발시켜 건조된 백색 품을 수득하였다. 이 잔여물을 디옥산 (500 mL) 및 물 (100 mL)에 용해하였다. NaIO₄ (10.62 g, 49.5 mmol)를 물 (100 mL)에 용해한 후 상기 용해된 뉴클레오시드에 첨가하였다. 그 혼합물을 백색 침전물이 형성되는 1시간 동안 교반하였다. 추가의 디옥산 400 mL를 첨가하고 15분 동안 교반을 계속하였다. 침전물을 여과하고 디옥산 (200 mL)으로 세정하였다. 여과액을 혼합하고 NaBH₄ (1720 mg, 45.5 mmol)를 첨가한 후, 30분 동안 교반을 계속하였다. 반응 혼합물을 중화하기 위해, pH 7에 도달할 때까지 완충액 (10 mL, 1:1 -AcOH:피리딘)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 300 mL까지 증발시킨 후 EtOAc (150 mL)로 추출하였다. 유기상을 NaHCO₃ 포화 수용액 (3 x 200 mL)으로 세정한 후 증발시켰다. 잔여물을 EtOAc 중 MeOH의 구배를 이용한 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제한 후 용매를 증발시켜 생성물을 백색 고체 물질로서 수득하였다.

[0427]

수득량: 17.24g (71%).

[0428]

R_f: 0.19 (CHCl₃ 중 5% MeOH).

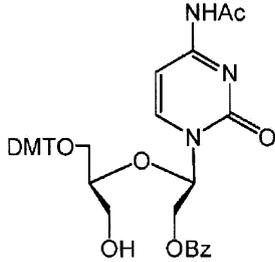
¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 10.94 (s, 1H, NH), 8.08 (d, 1H, J=7.32 Hz, 시티딘 CH), 7.31-7.12 (m, 12H, Ar/ 시티딘 CH), 6.85 (d, 4H, Ar), 5.96 (t, 1H, H1'), 5.13 (t, 1H, 2'OH), 4.74 (t, 1H, 3'OH), 3.73 (s, 6H, 2 × -OCH₃), 3.63 (m, 3H, H2'/H4'), 3.43 (m, 2, H3'), 3.00 (m, 2H, H5'), 2.13 (s, 3H, -CH₃).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 170.9, 162.3, 158.0, 155.4, 146.1 (시티딘 C5/C6), 144.6, 135.6, 129.6 (ar), 127.7 (ar), 126.6 (ar), 113.1 (ar), 95.4 (시티딘 C5/C6), 85.5, 84.7 (C1'), 79.4 (C2'/C4'), 63.8 (C5'), 61.7 (C2'/C4'), 60.5 (C3'), 55.0 (-OCH₃), 24.3 (-CH₃).

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 612.2298 calc.: 612.2316.

[0429]

[0430] 4-N-아세틸-2'-O-벤조일-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2',3'-세코시티딘 (103-C)



[0431]

[0432] 뉴클레오사이드 102-C (3.03 g, 5.14 mmol)를 an. 톨루엔 (2 x 30 mL)으로 공중발시킨 후 진공 중에 12시간 동안 건조시켰다. 수득된 잔여물을 an. DBU (1.5 mL, 10.3 mmol)와 함께 an. DCM (150 mL)에 용해한 후, 수득된 혼합물을 -70°C로 냉각시켰다. 반응 혼합물에 벤조일 클로라이드 (6.56 mL, 5.65 mmol)를 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물을 -70°C에서 1시간 동안 교반한 다음, 실온에 이르게 한 후 EtOH (4 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 NaHCO₃ 포화 수용액 (2 x 150 mL)으로 세정하였다. 유기상을 혼합하여 증발시켰다. 수득된 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (CHCl₃ 중 0-5% MeOH)로 정제한 후 용매를 증발시켜 생성물 뉴클레오사이드 103-C를 백색 폼으로서 수득하였다.

[0433]

수득량: 2.08 g (64%).

[0434]

R_f: 0.24 (CHCl₃ 중 5% MeOH).

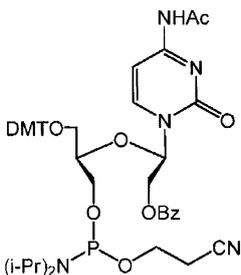
¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 10.97 (s, 1H, NH), 8.25 (d, 1H, 시티딘 CH), 7.91 (d, 2H, Ar), 7.65 (ap. t, 1H, Ar) 7.32-7.12 (m, 12H, Ar/ 시티딘 CH), 6.83 (d, 4H, Ar), 6.34 (t, 1H, H1'), 4.84 (t, 1H, 3'OH), 4.58 (dq, 2H, H2'), 3.74 (s, 6H, 2 × -OCH₃), 3.70-3.64 (m, 1H, H4'), 3.48 (m, 2H, H3'), 3.07 (m, 2H, H5'), 2.14 (s, 3H, -CH₃).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 171.0, 165.0, 162.5, 157.1, 145.5 (시티딘 C5/C6), 144.6, 135.48, 133.6, 129.6 (Ar), 128.8 (Ar), 127.7 (Ar), 127.6 (Ar), 126.6 (Ar), 113.1 (Ar), 95.8 (시티딘 C5/C6), 85.6, 82.0 (C1'), 79.6 (C4'), 79.2 63.9 (C2'), 63.7, 60.5 (C3'), 54.9 (-OCH₃), 24.3 (-CH₃).

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 716.2589 calc.: 716.2759.

[0435]

[0436] 4-N-아세틸-2'-O-벤조일-3'-O-(2-시아노에톡시(디이소프로필아미노)포스포노)-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2',3'-세코시티딘 (104-C)



[0437]

[0438] 뉴클레오시드 103-C (1.49 g, 2.15 mmol)를 an. MeCN (2 x 20 mL)로 공증발시켰다. 잔여물을 MeCN 중 20% DIPEA (20 mL)에 용해한 후, 그 혼합물을 교반하였다. 혼합물에 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필클로로포스포라미디트 [P(Cl)(OCH₂CH₂CN)(N(iPr)₂); 0.8 mL]를 첨가한 후 40분 동안 교반을 계속하였다. 추가의 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필클로로포스포라미디트 (0.4 mL)를 첨가한 후 3시간 동안 교반을 계속하였다. EtOH (5 mL)를 첨가한 후 수득된 혼합물을 NaHCO₃ 포화 수용액 (3 x 50 mL)으로 세정하고 수성상을 DCM (50 mL)으로 역추출하였다. 유기상을 모아 증발시켰다. 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (석유 에테르 중 0-100% EtOAc)로 정제한 후 용매를 증발시켜 뉴클레오시드 104-C를 백색 폼으로서 수득하였다.

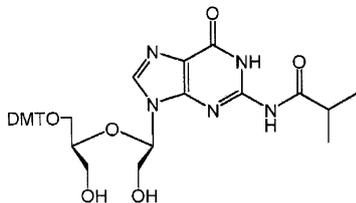
[0439] 수득량: 940 mg (44%).

[0440] R_f: 0.42 (DCM 중 5% MeOH).

³¹P NMR (MeCN): δ 148.8.

[0441] **ESI-HiRes (mNa⁺):** m/z: 916.3622 calc.: 916.3657.

[0442] 5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2-N-이소부틸릴-2',3'-세코구아노신 (102-G)



[0443]

[0444] 2-N-이소부틸릴구아노신 (11.68 g, 17.8 mmol)을 an. pyr (50 mL)로 공증발시켰다. 수득된 잔여물을 an. pyr (100 mL)에 용해하였다. DMT-Cl (4,4'-디메톡시트리틸클로라이드; 7.26 g, 21.46 mmol)를 고체 물질로서 첨가한 후, 그 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. DMAP (50 mg, 0.40 mmol)를 첨가한 후 수득된 혼합물을 추가로 12시간 동안 교반하였다. 이어서 그 반응 혼합물을 NaHCO₃ 포화 수용액 (3 x 50 mL)으로 세정하고 유기상을 증발시켜 백색 폼을 수득하였다. 이 잔여물을 디옥산 (250 mL) 및 물 (50 mL)에 용해하였다. NaIO₄ (4.57 g, 21.3 mmol)를 물 (50 mL)에 용해한 후 상기 용해된 뉴클레오시드에 첨가하였다. 그 혼합물을 백색 침전물이 형성되는 1시간 동안 교반하였다. 추가의 디옥산 200 mL를 첨가하고 15분 동안 교반을 계속하였다. 침전물을 여과하고 디옥산 (100 mL)으로 세정하였다. 여과액을 모으고 NaBH₄ (748 mg, 19.77 mmol)를 첨가한 후 수득된 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 중화를 위해 pH 7에 도달할 때까지 완충액 (10 mL, 1:1 -AcOH: 피리딘)을 첨가하였다. 수득된 혼합물의 부피를 150 mL까지 감소시킨 후 EtOAc (150 mL)를 사용하여 추출을 수행하였다. 유기상을 NaHCO₃ 포화 수용액 (3 x 100 mL)으로 세정하고 증발시킨 후, 잔여물을 DCM 중 0-10% (1:1 MeOH: i-PrOH)의 구배를 사용한 컬럼 크로마토그래피로 정제한 후 용매를 증발시켜 생성물을 백색 고체 물질로서 수득하였다.

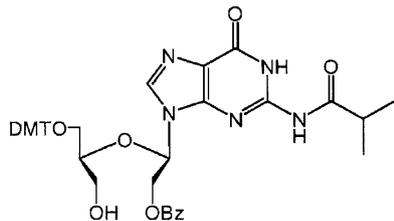
[0445] 수득량: 8.02g (68%).

[0446] R_f: 0.24 (CH₂Cl₂ 중 7% MeOH).

¹³C NMR (DMSO-d₆): δ 180.2, 157.9, 154.9, 147.8, 144.7, 135.4, 129.3 (Ar), 127.5 (Ar), 127.4 (Ar), 126.4 (Ar), 120.4, 113.0 (Ar), 85.2, 85.1 (C1'), 79.9 (C4'), 63.5 (C5'), 61.7 (C2'), 61.1 (C3'), 54.9 (-OCH₃), 34.7 (4차 i-Pr), 18.9 (i-Pr), 18.8 (i-Pr).

[0447] **MALDI-HiRes (mNa⁺):** m/z: 680.2679 calc.: 680.2691.

[0448] 2'-O-벤조일-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2-N-이소부틸릴-2',3'-세코구아노신 (103-G)



[0449]

[0450] 뉴클레오시드 102-G를 an. 톨루엔 (2 x 30 mL)에 현탁시킨 후 증발시켰다. 수득된 잔여물을 진공 중에 12시간 동안 증발시켰다. 잔여물을 an. DBU (0.9 mL, 6.1 mmol)와 함께 an. DCM (100 mL)에 용해한 후, 수득된 혼합물을 -70°C로 냉각시켰다. 반응 혼합물에 벤조일 클로라이드 (390 μ L, 3.36 mmol)를 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물을 -70°C에서 1시간 동안 교반한 다음, 실온에 이르러 한 후 EtOH (4 mL)를 첨가하였다. 수득된 혼합물을 NaHCO₃ 포화 수용액 (2 x 100 mL)으로 세정하고, 유기상을 혼합하여 증발시켰다. 수득된 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (CHCl₃ 중 0-5% MeOH)로 정제한 후 용매를 증발시켜 뉴클레오시드 103-G를 백색 폼으로서 수득하였다.

[0451] 수득량: 1.49 g (63%).

[0452] R_f: 0.47 (CH₂Cl₂ 중 7% MeOH).

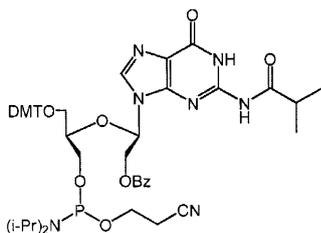
¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 12.10 (s, 1H, NH), 11.72 (s, 1H, NH), 8.32 (s, 1H, 구아닌 H8), 7.85-7.79 (m, 2H, Ar), 7.65-7.63 (m, 1H, Ar), 7.51-7.45 (m, 2H, Ar), 7.26-6.97 (m, 11H, Ar), 6.79 (m, 4H, Ar), 6.18 (t, 1H, H1'), 5.04-4.82 (m, 3H, H2'/3'OH), 3.82 (m, 1H, H4'), 3.72 (s, 6H, 2 x -OCH₃), 3.49 (t, 2H, H3'), 3.03-2.74 (m, 3H, H5'/ 4차 i-Pr), 1.11 (ap. t, 6H, 2 x -CH₃).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 180.1, 164.9, 157.8, 154.8, 148.6, 147.9, 144.6, 138.4, 135.5, 135.3, 133.6, 129.3 (Ar), 129.0 (ar), 128.8 (ar), 128.7 (ar), 127.6 (ar), 127.4 (ar), 126.3 (ar), 120.6, 112.9 (ar), 85.1, 82.0 (C1'), 80.1 (C4'), 63.7, 63.3 (C5'), 61.0 (C3'), 54.8 (-OCH₃), 34.6 (4차 i-Pr), 18.8 (-CH₃), 18.6 (-CH₃).

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 784.2943 calc.: 784.2953.

[0453]

[0454] 2'-O-벤조일-3'-O-(2-시아노에톡시(디이소프로필아미노)포스포노)-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2-N-이소부틸릴-2',3'-세코구아노신 (104-G)



[0455]

[0456] 뉴클레오시드 103-G (1.45 g, 1.9 mmol)를 an. MeCN (2 x 20 mL)로 공증발시켰다. 잔여물을 MeCN 중 20% DIPEA (20 mL)에 용해한 후 수득된 혼합물을 교반시켰다. 반응 혼합물에 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필클로로포스포라미드 [P(Cl)(OCH₂CH₂CN)(N(iPr)₂); 0.65 mL]를 첨가한 후 40분 동안 교반을 계속하였다. EtOH (5 mL)를 첨가한 후 수득된 혼합물을 NaHCO₃ 포화 수용액 (3 x 50 mL)으로 세정하고, 수성상을 DCM (50 mL)으로 역추출하였다. 유기상을 모아 증발시켰다. 잔여물을 EtOAc의 석유 에테르 중 용액으로부터 침전시킨 후 건조시켜 아미드 104-G를 백색 고체 물질로서 수득하였다.

[0457] 수득량: 607 mg (33%).

[0458] R_f : 0.3 (1:3 아세톤:톨루엔).

^{31}P NMR (MeCN): δ 148.6.

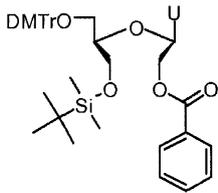
ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 984.4028 calc.: 984.4031.

[0459]

[0460] 실시예 12. 피페라지노-기능화된 단량체성 형성 블록의 합성

[0461] 당해 실시예는 뉴클레오시드 103-U로부터 출발하여 화합물 105, 106, 107, 108, 109 및 110을 거치는, 단량체의 C2'-자리에 부착된 아미노 작용기를 포함하는 단량체성 아미디트 형성 블록의 합성, 즉 C2'-피페라지노-기능화된 단량체성 형성 블록 111 (아미디트 J; 염기 = 우라실)의 합성을 예증하기 위해 수행된 절차에 관하여 기재한다.

[0462] 2'-0-벤조일-3'-0-tert-부틸디메틸실릴-5'-0-(4,4'-디메톡시트리틸)-2',3'-세코우리딘 (105)



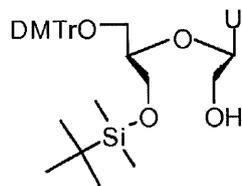
[0463]

[0464] 뉴클레오시드 103-U (328 mg, 0.50 mmol)를 an. 피리딘 (2 mL)에 용해한 후 실온에서 교반하였다. 19시간 동안 교반한 반응 혼합물에 TBDMSCl (113 mg, 0.75 mmol)를 첨가하였다. 이어서 물 (1 mL)을 첨가하고 추가로 15분 동안 교반을 계속한 다음, 반응 혼합물을 DCM (50 mL)로 희석하고 NaHCO₃ 포화 수용액 (2x25 mL) 및 식염수 (25 mL)로 세정하였다. 유기상을 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과시킨 후 감압 하에 건조 증발시켰다. 잔여물을 용리액으로서 DCM 중 MeOH (0-8%)를 사용한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 뉴클레오시드 105를 백색 고체 물질로서 수득하였다. 수득량: 294 mg (78%).

^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.46 (s, 1H, NH), 7.95-7.79 (m, 3H), 7.71-7.63 (m, 1H), 7.57-7.48 (m, 2H), 7.37-7.13 (m, 9H), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H), 6.22 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H1'), 5.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H5), 4.69-4.45 (m, 2H, H2'), 3.80- 3.64 (m, 8H, 2xOMe and H4'), 3.54 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H, H3'), 3.09-2.97 (m, 2H, H5'), 0.73 (s, 9H, 3xMe), -0.07 and -0.09 (2xs, 6H, 2xMe). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.0, 163.1, 158.0, 151.1, 144.7, 140.6, 135.5, 135.4, 133.7, 129.6, 129.1, 129.0, 128.8, 127.8, 127.6, 126.6, 113.1, 102.3, 85.5, 81.1, 79.2, 63.4, 63.1, 62.1, 55.0, 25.6, 17.7, 2x-5.7. ESI-HRMS: m/z 789.3147 ([M+Na]⁺, C₄₃H₅₀N₂O₉Si·Na calc. 789.3178).

[0465]

[0466] 3'-0-tert-부틸디메틸실릴-5'-0-(4,4'-디메톡시트리틸)-2',3'-세코우리딘 (106)



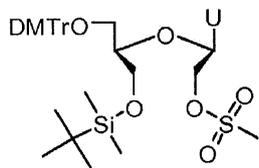
[0467]

[0468] NaOH (845 mg, 21.1 mmol)를 an. MeOH (200 mL)와 혼합한 후 수득된 혼합물을 0°C로 냉각시켰다. 뉴클레오시드 105 (3.10 g, 4.05 mmol)를 an. MeOH (40 mL)에 용해한 후 수득된 혼합물을 상기 혼합물에 첨가하고 수득된 반응 혼합물을 2.5시간 동안 교반하였다. NH₄Cl 포화 수용액 (10 mL)을 첨가하고 추가로 10분 동안 교반을 계속한 다음, 물 (100 mL)을 첨가하고 DCM (4 x 200 mL)을 사용하여 추출을 수행하였다. 유기상을 감압 하에 건조 증발시킨 다음, 잔여물을 an. 피리딘 (10 mL)으로 공증발시켰다. 잔여물을 용리액으로서 DCM 중 MeOH (5-10%)을 사용한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 뉴클레오시드 106을 백색 고체 물질로서 수득하였다. 수득량 2.54 g (95%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.35 (s, 1H, NH), 7.66 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H₆), 7.33-7.14 (m, 9H), 6.88-6.82 (m, 4H), 5.82 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_{1'}), 5.53 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H₅), 5.11 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, 2'-OH), 3.73 (s, 6H, 2×OMe), 3.69-3.45 (m, 5H, H_{2'}, H_{4'} and H_{3'}), 3.01-2.93 (m, 2H, H_{5'}), 0.76 (s, 9H, 3×Me), -0.03 and -0.05 (2×s, 6H, 2×Me). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.2, 158.0, 151.6, 144.8, 135.6, 135.4, 129.6, 127.7, 127.6, 126.6, 113.1, 101.8, 85.4, 83.5, 78.5, 63.3, 61.8, 61.0, 55.0, 25.6, 17.7, 2×-5.6. ESI-HRMS: *m/z* 685.2885 ([M+Na]⁺, C₃₆H₄₆N₂O₈Si·Na calc. 685.2916).

[0469]

3'-0-tert-부틸디메틸실릴-5'-0-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-0-메탄설포닐-2',3'-세코우리딘 (107)



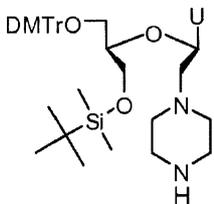
[0471]

뉴클레오시드 106 (927 mg, 1.40 mmol)을 an. 피리딘 (20 mL)에 용해한 후 수득된 혼합물을 0°C에서 교반하였다. MsCl (220 μL, 2.83 mmol)을 적가한 후 수득된 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. EtOH (2 mL)를 첨가하고 추가로 10분 동안 교반을 계속하였다. 이어서 그 혼합물을 건조 증발시킨 후 잔여물을 용리액으로 DCM 중 MeOH (0-7%)를 사용한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 뉴클레오시드 107을 백색 폼으로서 수득하였다. 수득량 834 mg (81%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.49 (s, 1H, NH), 7.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₆), 7.35-7.14 (m, 9H), 6.86 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H), 6.11 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H_{1'}), 5.60 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₅), 4.49 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H_{2'}), 3.77-3.48 (m, 9H, 2×OMe, H_{4'} and H_{3'}), 3.22 (s, 3H, Me), 3.10-2.89 (m, 2H, H_{5'}), 0.77 (s, 9H, 3×Me), -0.02 and -0.04 (2×s, 6H, 2×Me). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.1, 158.0, 151.7, 144.7, 140.5, 135.5, 135.3, 129.6, 127.8, 127.6, 126.6, 113.1, 102.4, 85.5, 80.6, 79.1, 67.8, 63.1, 61.8, 55.0, 36.8, 25.6, 17.7, -5.6, -5.7. ESI-HRMS: *m/z* 763.2662 ([M+Na]⁺, C₃₇H₄₈N₂O₁₀SSi·Na calc. 763.2692).

[0473]

3'-0-tert-부틸디메틸실릴-2'-데옥시-5'-0-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-피페라지노-2',3'-세코우리딘 (108)



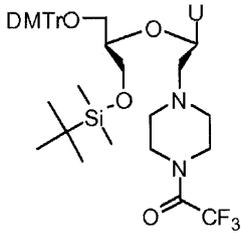
[0475]

뉴클레오시드 107 (276 mg, 0.373 mmol)을 an. 피리딘 (3 mL)에 용해한 후 피페라진 (3.21 g, 37.3 mmol)을 실온에서 교반 하에 첨가하였다. 이어서 그 반응 혼합물을 150°C로 가열하고 1시간 동안 교반한 후 실온으로 냉각시켰다. 반응 혼합물을 NaHCO₃ 포화 수용액 (200 mL)으로 희석한 다음, 클로로포름 (7 x 100 mL)을 사용하여 추출을 수행하였다. 유기상을 Na₂SO₄로 건조시키고 여과한 후 건조 증발시켰다. 잔여물을 용리액 시스템으로서 DCM 중 MeOH (0-5%), 이어서 DCM 중 반포화 메탄올성 암모니아 (5%)를 사용한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 뉴클레오시드 108을 백색 고체 물질로서 수득하였다. 수득량 182 mg (67%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.64 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₆), 7.34-7.13 (m, 9H), 6.85 (d, *J* = 7.8 Hz, 4H), 5.98 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_{1'}), 5.53 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₅), 3.72 (s, 6H, 2×OMe), 3.68-3.51 (m, 3H, H_{4'} and H_{3'}), 3.04-2.90 (m, 2H, H_{5'}), 2.77-2.54 (m, 6H, H_{2'}, 피페라지노), 2.48-2.27 (m, 4H, 피페라지노), 0.77, (s, 9H, 3×Me), -0.02 and -0.04 (2×s, 6H, 2×Me). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.2, 158.0, 151.3, 144.8, 141.1(C6), 135.6, 135.4, 129.5, 127.7, 127.6, 126.6, 113.1, 113.1, 101.8 (C5), 85.4, 81.3 (C1'), 78.3, 63.1, 62.1, 60.1, 55.0 (OMe), 55.0(OMe), 53.8, 45.3, 25.7 (Me), 17.8, -5.5 (Me), -5.6 (Me). ESI-HRMS: *m/z* 731.3859 ([M+H]⁺, C₄₀H₅₄N₄O₇Si·H calc. 731.3834).

[0477]

[0478] 3'-O-tert-부틸디메틸실릴-2'--데옥시-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-(4-N-트리플루오로아세틸)피페라지노-2',3'-세코우리딘 (109)



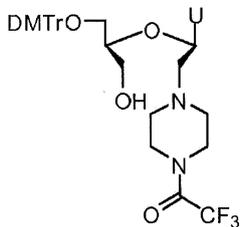
[0479]

[0480] 뉴클레오시드 108 (102 mg, 0.14 mmol)을 an. MeOH (2 mL)에 용해한 후 수득된 혼합물을 실온에서 교반하였다. DMAP (10 mg, 0.08 mmol) 및 에틸 트리플루오로아세테이트 (22 μ L, 0.184 mmol)를 첨가한 후 16시간 동안 교반을 계속하였다. 혼합물을 감압 하에 건조 증발시킨 후, 잔여물을 용리액으로서 DCM 중 MeOH (0-2%)를 사용한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 뉴클레오시드 109를 백색 고체 물질로서 수득하였다. 수득량 100 mg (86%).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 11.37 (s, 1H, NH), 7.66 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H6), 7.38-7.12 (m, 9H), 6.93-6.80 (m, 4H), 6.00 (t, J = 5.9 Hz, 1H, H1'), 5.54 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H5), 3.73 (s, 6H, 2 \times OMe), 3.70-3.40 (m, 7H, H3', H4' and 피페라지노), 3.08-2.92 (m, 2H, H5'), 2.90-2.52 (m, 6H, H2' and 피페라지노), 0.77 (s, 9H, 3 \times Me), 0.00 and -0.04 (2 \times s, 6H, 2 \times Me). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 163.2, 158.0, 151.3, 144.8, 140.8, 135.6, 135.4, 129.5, 127.7, 127.6, 126.6, 113.1, 102.0, 85.5, 81.0, 78.2, 63.1, 62.0, 58.9, 55.0, 52.6, 52.0, 45.4, 43.0, 25.6, 17.8, -5.6, -5.6. ESI-HRMS: m/z 849.3452 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, $\text{C}_{42}\text{H}_{53}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_8\text{Si}\cdot\text{Na}$ calc. 849.3477).

[0481]

[0482] 2'-데옥시-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-(N-트리플루오로아세틸)피페라지노-2',3'-세코우리딘 (110)



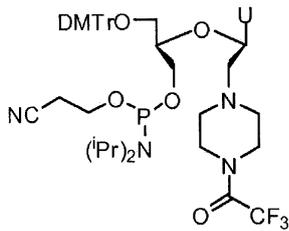
[0483]

[0484] 뉴클레오시드 109 (251 mg, 0.304 mmol)를 an. THF (2 \times 5 mL)로 공증발시킨 다음, an. THF (10 mL)에 용해하였다. 그 혼합물에 THF 중 1M TBAF (606 μ L, 0.606 mmol)를 실온에서 1시간 동안 교반 하에 적가한 후, 21시간 동안 실온에서 교반을 계속하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 건조 증발시킨 후, 잔여물을 EtOAc (40 mL)에 용해하였다. 수득된 혼합물을 NaHCO_3 포화 수용액 (3 \times 10 mL) 및 물 (3 \times 10 mL)로 세정한 다음, 분리된 유기상을 Na_2SO_4 로 건조시키고 여과한 후 감압 하에 건조 증발시켰다. 잔여물을 용리액으로서 석유 에테르 중 EtOAc (60-100%)을 사용한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 뉴클레오시드 110을 백색 고체 물질로서 수득하였다. 수득량 111 mg (51%).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 11.36 (s, 1H, NH), 7.66 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H6), 7.34-7.27 (m, 4H), 7.24-7.14 (m, 5H), 6.92-6.82 (m, 4H), 5.98 (t, J = 6.1 Hz, 1H, H1'), 5.53 (d, J = 7.3 Hz, 1H, H5), 4.80 (t, J = 5.3 Hz, 1H, 3'-OH), 3.73 (s, 6H, 2 \times OMe), 3.63-3.38 (m, 8H, H4', H3' and 피페라지노), 3.07-2.89 (m, 2H, H5'), 2.77 (t, J = 5.8 Hz, 2H, H2'), 2.66-2.54 (m, 3H, 피페라지노). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 163.2, 158.0, 151.2, 144.8, 140.9, 135.6, 135.5, 129.6, 129.6, 127.8, 127.6, 126.6, 113.1, 101.9, 85.4, 81.3, 79.2, 63.5, 60.7, 59.1, 55.0, 52.7, 52.1, 45.4, 42.9. ESI-HRMS: m/z 735.2585 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, $\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_8\cdot\text{Na}$ calc. 735.2612).

[0485]

[0486] 3'-(2-시아노에톡시(디이소프로필아미노)포스포노)-2'-데옥시-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-(N-트리플루오로아세틸)피페라지노-2',3'-세코우리딘 (111)



[0487]

[0488] 뉴클레오시드 110 (91 mg, 0.128 mmol)을 an. DCM (2x5 mL)으로 공증발시킨 후 an. DCM (2.5 mL)에 용해하였다. 그 혼합물에 DIPEA (111 μL, 0.64 mol)를 실온에서 교반 하에 첨가한 다음, 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필포스포라미도클로리드 (57 μL, 0.256 mmol)를 적가하였다. 실온에서 1시간 동안 교반을 계속한 다음, EtOH (0.5 mL)를 첨가한 후 추가로 10분 동안 교반하였다. DCM (40 mL)을 첨가한 후 NaHCO₃ 포화 수용액 (20 mL)으로 세정하였다. 분리된 유기상을 Na₂SO₄로 건조시키고 여과한 후 감압 하에 건조 증발시켰다. 잔여물을 용리액으로서 석유 에테르 중 EtOAc (60-80%)을 사용한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 아미디트 111을 백색 고체 물질로서 수득하였다. 수득량 106 mg (91%).

[0489]

³¹P NMR (CDCl₃) δ 150.0 and 149.5. ESI-HRMS: m/z 913.3841 ([M+H]⁺, C₄₅H₅₆F₃N₆O₉P·H calc. 913.3871).

[0490]

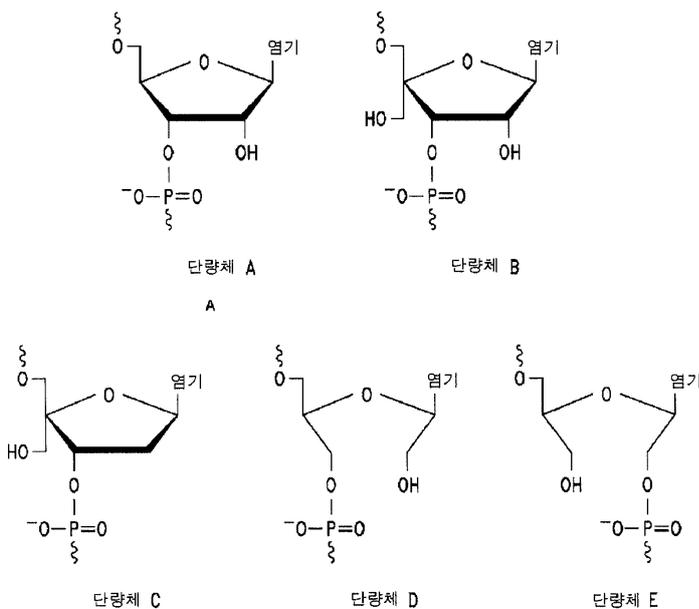
실시에 13. 피페라지노-기능화된 단량체성 형성 블록을 포함하는 올리고뉴클레오티드의 합성.

[0491]

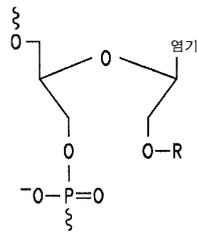
실시에 1에 기재된 방법들을 사용함으로써, RNA 아미디트 및 아미디트 111을 사용하여 피페라지노 모이어티 내에 자유 말단 NH를 가지는 단량체 J를 효율적으로 도입하였다. 이러한 아미디트의 커플링 수득률은 95%가 넘었다.

도면

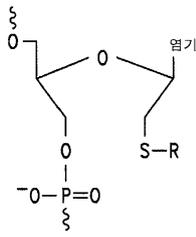
도면1



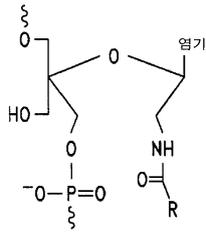
도면2



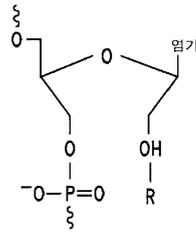
단량체 F



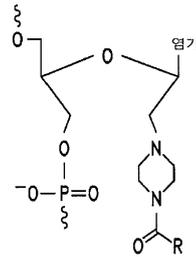
단량체 G



단량체 H



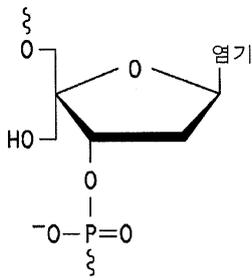
단량체 I



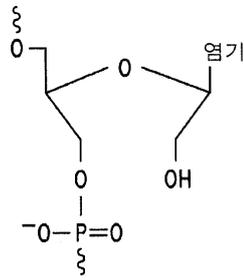
단량체 J

R = 수소, 알킬, 콜레스테릴 유도체, 플루오로포어, 폴리아민, 지방산, 아미노산, 당류, 또는 폴리펩티드

도면3

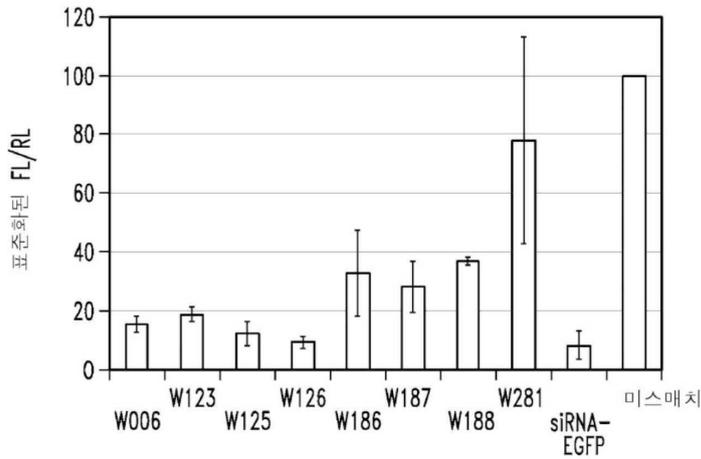


단량체 C



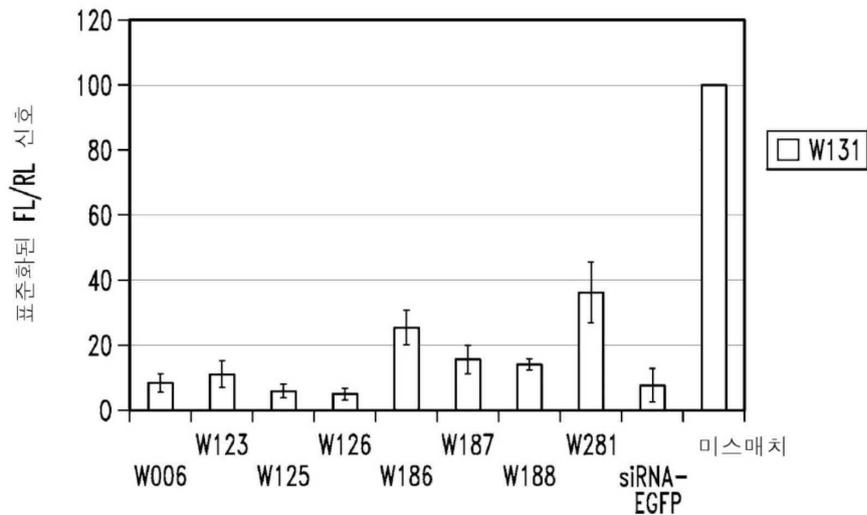
단량체 D

도면4



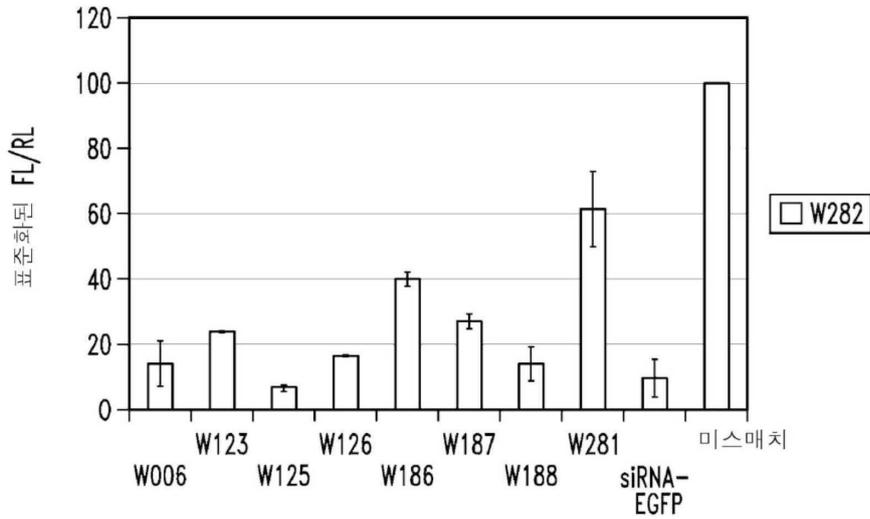
- 안티센스 가닥 W006: 5' - ACUUGUGGCCGUUUACGUC $\underline{\text{G}}^{\text{L}}\text{C}^{\text{L}}\text{U}$ (서열 번호 : 44)
 안티센스 가닥 W123: 5' - ACUUGXGGCCGUUUACGUC $\underline{\text{G}}^{\text{L}}\text{C}^{\text{L}}\text{U}$ (서열 번호 : 45)
 안티센스 가닥 W125: 5' - ACUUGUGGCCGUUUACGXC $\underline{\text{G}}^{\text{L}}\text{C}^{\text{L}}\text{U}$ (서열 번호 : 46)
 안티센스 가닥 W126: 5' - ACUUGUGGCCGXUUACGUC $\underline{\text{G}}^{\text{L}}\text{C}^{\text{L}}\text{U}$ (서열 번호 : 47)
 안티센스 가닥 W186: 5' - ACUUGXGGCCGXUUACGXC $\underline{\text{G}}^{\text{L}}\text{C}^{\text{L}}\text{U}$ (서열 번호 : 48)
 안티센스 가닥 W187: 5' - ACUUGXGGCCGXUUACGUC $\underline{\text{G}}^{\text{L}}\text{C}^{\text{L}}\text{U}$ (서열 번호 : 49)
 안티센스 가닥 W188: 5' - ACT $\underline{\text{L}}\text{UGT}^{\text{L}}$ GGCCGXU $\underline{\text{T}}^{\text{L}}$ CACG $\underline{\text{T}}^{\text{L}}$ C $\underline{\text{G}}^{\text{L}}$ C $\underline{\text{L}}\text{U}$ (서열 번호 : 50)
 안티센스 가닥 W281: 5' - ACUUGUXGCCGUUUUCGUCGXU (서열 번호 : 51)
 센스 가닥 W130: 5' - GACXAAACXGCCACAAGGUT $\underline{\text{L}}\text{C}^{\text{L}}\text{U}$ (서열 번호 : 52)

도면5



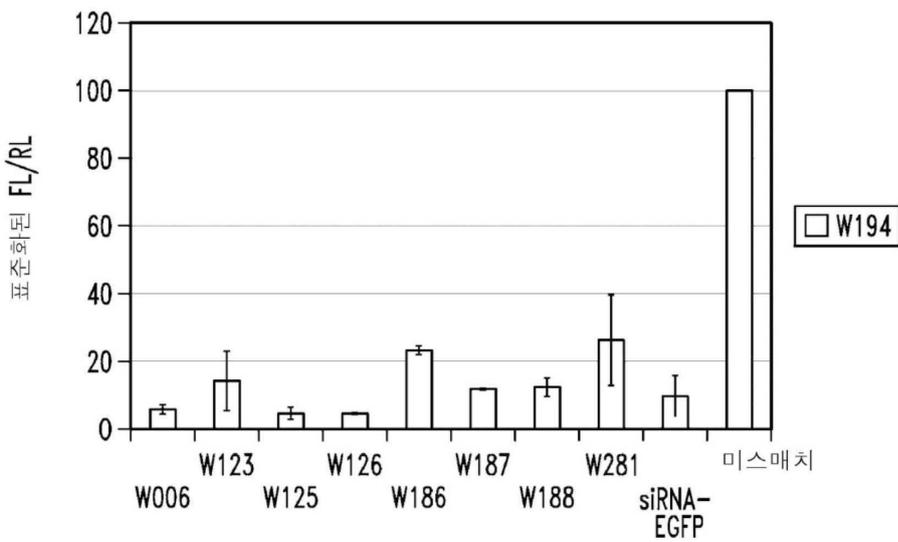
- 센스 가닥 W131: 5' - ACGUAAACGGCCACAAGUUXU (서열 번호 : 53)

도면6



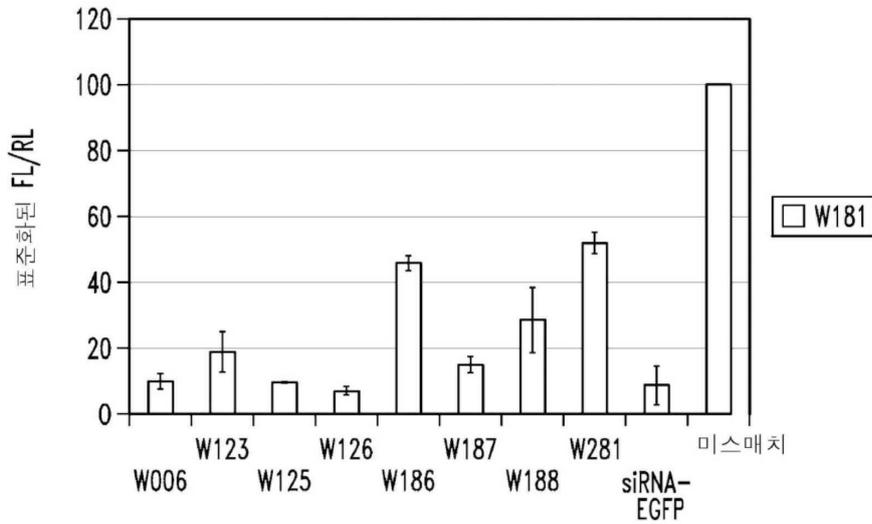
센스 가닥 W282: 5' - GAXGUAACGGCCACAXGUUXU (서열 번호 : 54)

도면7



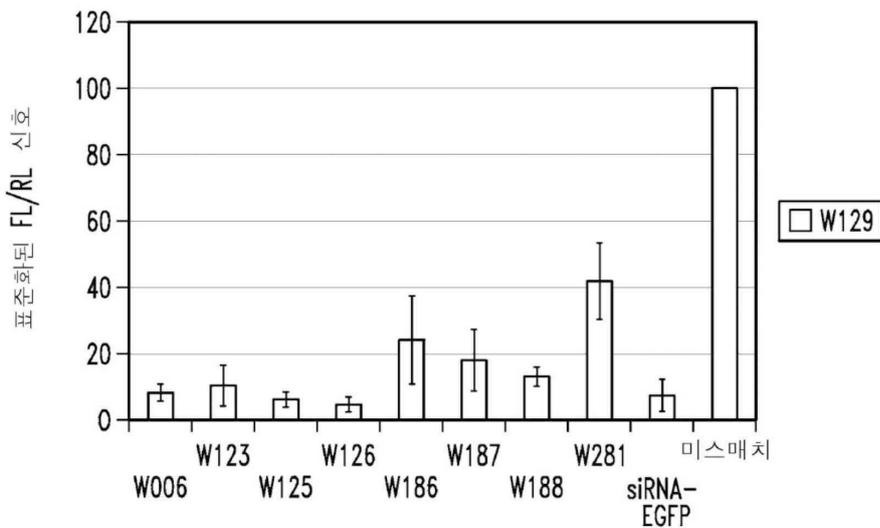
센스 가닥 W194: 5' - GACGUAACGGCCACAAGGUT^L C^LU (서열 번호 : 55)

도면8



센스 가닥 W181: 5' - GAC^L-GUAAC^L-GGCC^L-AC^L-AAGGUT^L-C^L (서열 번호 : 56)

도면9



센스 가닥 W129: 5' - GACGXAAACGGCCACAAGUT^L-C^L-U (서열 번호 : 57)

서열 목록

- <110> NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC.
- <120> HYDROXYMETHYL SUBSTITUTED RNA OLIGONUCLEOTIDES AND RNA COMPLEXES
- <130> 8006
- <150> DK PA200700751
- <151> 2007-05-22
- <150> DK PA200701718
- <151> 2007-11-30
- <150> DK PA200701785

<151> 2007-12-14
 <150> DK PA200800534
 <151> 2008-04-11
 <160> 57
 <170> KopatentIn 1.7
 <210> 1
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 1
 acuugggcc guuuacgucg cu 22
 <210> 2
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked hydroxymethyl guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked hydroxymethyl 5-methylcytosine

<400> 2
 acuugggcc guuuacgucg cu 22

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (6)
 <223> Hydroxymethyl thymidine
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked hydroxymethyl guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked hydroxymethyl 5-methylcytosine

<400> 3
 acuugtggcc guuuacgucg cu 22
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)
 <223> Hydroxymethyl thymidine
 <220><221> modified_base
 <222> (6)
 <223> Hydroxymethyl thymidine

<220><221> modified_base
 <222> (14)
 <223> Hydroxymethyl thymidine
 <220><221> modified_base
 <222> (18)
 <223> Hydroxymethyl thymidine

<220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked hydroxymethyl guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked hydroxymethyl 5-methylcytosine
 <400> 4
 actugtggcc guutacgtcg cu 22
 <210> 5
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220
 ><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (6)
 <223> Hydroxymethyl substituted acyclic nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked hydroxymethyl guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked hydroxymethyl 5-methylcytosine
 <400> 5
 acuugnggcc guuuacgucg cu 22
 <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> (3)

<223> Hydroxymethyl substituted acyclic nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked hydroxymethyl guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked hydroxymethyl 5-methylcytosine
 <400> 6
 acnugggcc guuuacgucg cu 22
 <210
 > 7
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (18)
 <223> Hydroxymethyl substituted acyclic nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked hydroxymethyl guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked hydroxymethyl 5-methylcytosine
 <400> 7
 acuugggcc guuuacgncg cu 22
 <210> 8
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base

<222> (12)
 <223> Hydroxymethyl substituted acyclic nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked hydroxymethyl guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked hydroxymethyl 5-methylcytosine
 <400> 8
 acuuguggcc gnuuacgucg cu 22

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Hydroxymethyl substituted acyclic nucleotide
 <400> 9
 acuuguggcc guuuacgtcg nu 22

<210> 10
 <211> 22
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)

<223> Hydroxymethyl substituted acyclic nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Hydroxymethyl substituted acyclic nucleotide
 <400> 10
 acnugggcc guuuacgtcg nu 22

 <210> 11
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <400> 11
 gacguaaacg gccacaaguu cu 22

 <210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"

 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked hydroxymethyl thymidine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked hydroxymethyl 5-methylcytosine
 <400> 12
 gacguaaacg gccacaagut cu 22

 <210> 13
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"

 <220><221> modified_base
 <222> (3)
 <223> Locked hydroxymethyl 5-methylcytosine
 <220><221> modified_base
 <222> (9)
 <223> Locked hydroxymethyl 5-methylcytosine
 <220><221> modified_base
 <222> (15)
 <223> Locked hydroxymethyl 5-methylcytosine
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked hydroxymethyl thymidine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked hydroxymethyl 5-methylcytosine
 <400> 13
 gacguaaacg gccacaagut cu 22

<210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(20)
 <223> Hydroxymethyl thymidine

<400> 14
gacguaaacg gccacaagtt c 21
<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213>
> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
<220><221> source
<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"
<220><221> modified_base
<222> (20)
<223> Hydroxymethyl thymidine
<220><221> modified_base
<222> (21)
<223> Hydroxymethyl cytosine
<400> 15
gacguaaacg gccacaagut cu 22
<210> 16
<211>
> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
<220><221> source
<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"
<220><221> modified_base
<222> (3)
<223> Hydroxymethyl cytosine
<220><221> modified_base
<222> (5)
<223> Hydroxymethyl thymidine
<220><221> modified_base

<222> (9)
 <223> Hydroxymethyl cytosine
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (13)
 <223> Hydroxymethyl cytosine
 <220><221> modified_base
 <222> (15)
 <223> Hydroxymethyl cytosine
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Hydroxymethyl thymidine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Hydroxymethyl cytosine
 <400> 16
 gacgtaaagc gccacaagut cu 22
 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (5)
 <223> Hydroxymethyl thymidine
 <220><221> modified_base
 <222> (19)..(20)
 <223> Hydroxymethyl thymidine
 <400> 17
 gacgtaaagc gccacaagtt c 21
 <210> 18

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (5)
 <223> Hydroxymethyl substituted acyclic nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked hydroxymethyl thymidine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked hydroxymethyl 5-methylcytosine
 <400> 18
 gacgnaaacg gccacaagut cu 22
 <210> 19
 <211> 23

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (5)
 <223> Hydroxymethyl substituted acyclic nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (10)
 <223> Hydroxymethyl substituted acyclic nucleotide
 <220><221> modified_base

<222> (21)
 <223
 > Locked hydroxymethyl thymidine
 <220><221> modified_base
 <222> (22)
 <223> Locked hydroxymethyl 5-methylcytosine
 <400> 19
 gacgnaaacn ggccacaagu tcu 23
 <210> 20
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Hydroxymethyl substituted acyclic nucleotide
 <400> 20

 gacguaaacg gccacaaguu nu 22
 <210> 21
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (5)
 <223> Hydroxymethyl substituted acyclic nucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Hydroxymethyl substituted acyclic nucleotide
 <400> 21
 gacgnaaacg gccacaaguu nu 22

<210> 22
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (19)
 <223> Hydroxymethyl cytosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Hydroxymethyl cytosine
 <400> 22

acuuguggcc guuuacgucg cu 22

<210> 23
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221>
 > source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)
 <223> Hydroxymethyl cytosine
 <220><221> modified_base
 <222> (5)
 <223> Hydroxymethyl thymidine
 <220><221> modified_base
 <222> (9)
 <223> Hydroxymethyl cytosine
 <400> 23

gacgtaaacg 10

<210> 24
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)
 <223> Hydroxymethyl cytosine
 <220><221> modified_base
 <222> (5)
 <223> Hydroxymethyl cytosine
 <220><221> modified_base
 <222> (10)
 <223> Hydroxymethyl thymidine

 <220><221> modified_base
 <222> (11)
 <223> Hydroxymethyl cytosine
 <400> 24
 gccacaagut cu 12
 <210> 25
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked hydroxymethyl thymidine

<220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked hydroxymethyl 5-methylcytosine
 <400> 25
 gacguaaacg gccacaagut c 21
 <210> 26
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)
 <223> Hydroxymethyl adenin-9-yl
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked guanosine

 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked cytosine
 <400> 26
 acuugggcc guuuacgucg cu 22
 <210> 27
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (2)
 <223> Hydroxymethyl cytosin-1-yl
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked guanosine

<220><221> modified_base

<222> (21)

<223> Locked cytosine

<400> 27

acuuguggcc guuuacgucg cu 22

<210> 28

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> modified_base

<222> (3)

<223> Hydroxymethyl uracil-1-yl

<220><221> modified_base

<222> (20)

<223> Locked guanosine

<220><221> modified_base

<222> (21)

<223> Locked cytosine

<400> 28

acuuguggcc guuuacgucg cu 22

<210> 29

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> modified_base

<222> (4)

<223> Hydroxymethyl uracil-1-yl

<220><221> modified_base

<222> (20)

<223> Locked guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked cytosine

 <400> 29
 acuuguggcc guuuacgucg cu 22
 <210> 30
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (5)
 <223> Hydroxymethyl guanin-9-yl
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked cytosine
 <400> 30

 acuuguggcc guuuacgucg cu 22
 <210> 31
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (6)
 <223> Hydroxymethyl uracil-1-yl
 <220><221> modified_base

<222> (20)
 <223> Locked guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked cytosine
 <400> 31
 acuuguggcc guuuacgucg cu 22

<210> 32
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (7)
 <223> Hydroxymethyl guanin-1-yl
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked cytosine
 <400> 32
 acuuguggcc guuuacgucg cu 22

<210> 33
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (8)
 <223> Hydroxymethyl guanin-1-yl

<220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked cytosine
 <400> 33
 acuuguggcc guuuacgucg cu 22
 <210> 34
 <211> 22

 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (9)
 <223> Hydroxymethyl cytosin-1-yl
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked cytosine
 <400> 34
 acuuguggcc guuuacgucg cu 22
 <210> 35
 <211> 22
 <212> RNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)

<223> Hydroxymethyl adenin-1-yl
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Hydroxymethyl uracil-1-yl
 <400> 35
 acuuguggcc guuuacgucg uu 22
 <210> 36
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <220><221> modified_base
 <222> (2)
 <223> Hydroxymethyl cytosin-1-yl
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Hydroxymethyl uracil-1-yl
 <400> 36
 acuuguggcc guuuacgucg uu 22
 <210> 37
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)
 <223> Hydroxymethyl uracil-1-yl

 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Hydroxymethyl uracil-1-yl
 <400> 37

acuuguggcc guuuacgucg uu 22

<210> 38

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> modified_base

<222> (4)

<223> Hydroxymethyl uracil-1-yl

<220><221> modified_base

<222> (21)

<223> Hydroxymethyl uracil-1-yl

<400> 38

acuuguggcc guuuacgucg uu 22

<210> 39

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> modified_base

<222> (5)

<223> Hydroxymethyl guanin-1-yl

<220><221> modified_base

<222> (21)

<223> Hydroxymethyl uracil-1-yl

<400> 39

acuuguggcc guuuacgucg uu 22

<210> 40

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (6)
 <223> Hydroxymethyl uracil-1-yl
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Hydroxymethyl uracil-1-yl
 <400> 40
 acuuguggcc guuuacgucg uu 22
 <210> 41
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (7)
 <223> Hydroxymethyl guanin-1-yl
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Hydroxymethyl uracil-1-yl
 <400> 41
 acuuguggcc guuuacgucg uu 22
 <210> 42
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (8)
 <223> Hydroxymethyl guanin-1-yl

<220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Hydroxymethyl uracil-1-yl
 <400> 42
 acuuguggcc guuuacgucg uu 22
 <210> 43
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (9)
 <223> Hydroxymethyl cytosin-1-yl

 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Hydroxymethyl uracil-1-yl
 <400> 43
 acuuguggcc guuuacgucg uu 22
 <210> 44
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked hydroxymethyl guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked 5-methylcytosin-1-yl

 <400> 44
 acuuguggcc guuuacgucg cu 22

<210> 45
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (6)
 <223> 2',3'-seco-uracil
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked hydroxymethyl guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked 5-methylcytosin-1-yl

<400> 45
 acuuguggcc guuuacgucg cu 22

<210> 46
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (18)
 <223> 2',3'-seco-uracil
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked hydroxymethyl guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked 5-methylcytosin-1-yl

<400> 46

acuuguggcc guuuacgucg cu 22

<210> 47

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> modified_base

<222> (12)

<223> 2',3'-seco-uracil

<220><221> modified_base

<222> (20)

<223> Locked hydroxymethyl guanosine

<220><221> modified_base

<222> (21)

<223> Locked 5-methylcytosin-1-yl

<400> 47

acuuguggcc guuuacgucg cu 22

<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> (6)

<223> 2',3'-seco-uracil

<220><221> modified_base

<222> (12)

<223> 2',3'-seco-uracil

<220><221> modified_base

<222> (18)

<223> 2',3'-seco-uracil

<220><221> modified_base

<222> (20)

<223> Locked hydroxymethyl guanosine

<220><221> modified_base

<222> (21)

<223> Locked 5-methylcytosin-1-yl

<400> 48

acuugggcc guuuacgucg cu

22

<210> 49

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> modified_base

<222> (6)

<223> 2',3'-seco-uracil

<220><221> modified_base

<222> (12)

<223> 2',3'-seco-uracil

<220><221> modified_base

<222> (20)

<223> Locked hydroxymethyl guanosine

<220><221> modified_base

<222> (21)

<223> Locked 5-methylcytosin-1-yl

<400> 49

acuugggcc guuuacgucg cu

22

<210> 50

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> source
 <
 223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)
 <223> Locked hydroxymethyl thymidine
 <220><221> modified_base
 <222> (6)
 <223> Locked hydroxymethyl thymidine
 <220><221> modified_base
 <222> (12)
 <223> 2',3'-seco-uracil
 <220><221> modified_base
 <222> (14)
 <223> Locked hydroxymethyl thymidine
 <220><221> modified_base
 <222> (19)
 <223> Locked hydroxymethyl thymidine
 <220>
 ><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked hydroxymethyl guanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (22)
 <223> Locked 5-methylcytosin-1-yl
 <400> 50
 actugtggcc guutcacgtc gcu
 <210> 51
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base

23

<222> (7)

<223> 2',3'-seco-uracil

<220><221> modified_base

<222> (15)

<223> 2',3'-seco-uracil

<220><221> modified_base

<222> (21)

<223> 2',3'-seco-uracil

<400> 51

acuuguugcc guuuucgucg uu

22

<210> 52

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (5)

<223> 2',3'-seco-uracil

<220><221> modified_base

<222> (10)

<223> 2',3'-seco-uracil

<220><221> modified_base

<222> (21)

<223> Locked hydroxymethyl thymidine

<220><221> modified_base

<222> (22)

<223> Locked 5-methylcytosin-1-yl

<400> 52

gacguaaacu gccacaaggu tcu

23

<210> 53

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <
 223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> 2',3'-seco-uracil
 <400> 53
 acguaaacgg ccacaaguuu u 21
 <210> 54
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (3)
 <223> 2',3'-seco-uracil
 <220><221> modified_base
 <222> (17)
 <223> 2',3'-seco-uracil
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> 2',3'-seco-uracil
 <400> 54
 gauguaaacg gccacauguu uu 22
 <210> 55
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base

 <222> (21)
 <223> Locked hydroxymethyl thymidine
 <220><221> modified_base
 <222> (22)
 <223> Locked 5-methylcytosin-1-yl
 <400> 55
 gacguaaacg gccacaaggu tcu 23
 <210> 56
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"

 <220><221> modified_base
 <222> (3)
 <223> Locked 5-methylcytosin-1-yl
 <220><221> modified_base
 <222> (9)
 <223> Locked 5-methylcytosin-1-yl
 <220><221> modified_base
 <222> (13)
 <223> Locked 5-methylcytosin-1-yl
 <220><221> modified_base
 <222> (15)
 <223> Locked 5-methylcytosin-1-yl
 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked hydroxymethyl thymidine

<220><221> modified_base
 <222> (22)
 <223> Locked 5-methylcytosin-1-yl
 <400>
 > 56
 gacguaaacg gccacaaggu tc 22
 <210> 57
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (5)
 <223> 2',3'-seco-uracil
 <220><221> modified_base
 <222> (20)
 <223> Locked hydroxymethyl thymidine

 <220><221> modified_base
 <222> (21)
 <223> Locked 5-methylcytosin-1-yl
 <400> 57
 gacguaaacg gccacaagut cu 22