(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0066588
(43) 공개일자 2023년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/713* (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01) *A61K 47/64* (2017.01)
A61P 21/00 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/0025 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7011808
(22) 출원일자(국제) 2021년09월10일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년04월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/049889
(87) 국제공개번호 WO 2022/056277
국제공개일자 2022년03월17일
(30) 우선권주장
63/077,141 2020년09월11일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
애로우헤드 파마슈티컬스 인코포레이티드
미국 91105 캘리포니아주 파사데나 스위트 700 이스트 콜로라도 불러버드 177
(72) 발명자
리, 샤오카이
미국 53719 위스콘신 매디슨 502 에스. 로사 로드 애로우헤드 파마슈티컬스 인크.
페이, 타오
미국 53719 위스콘신 매디슨 502 에스. 로사 로드 애로우헤드 파마슈티컬스 인크.
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 66 항

(54) 발명의 명칭 **골격근 전달 플랫폼 및 사용 방법**

(57) 요 약

본 개시내용은 생체내에서 페이로드를 대상체 내 골격근 세포에 특이적으로 및 효율적으로 향하게 하는 전달 비히클에 관한 것이다. 본원에 개시된 전달 비히클은 표적화 리간드 (예컨대, 알파-v-베타-6을 포함한 인테그린에 대해 친화도를 갖는 화합물) 및 약동학/약역학 (PK/PD) 조정제를 포함하여, 골격근 세포를 포함한 세포로의 페이로드의 전달을 용이하게 한다. 본원에 개시된 전달 비히클에 사용하기에 적합한 페이로드는 RNAi 작용제를 포함하며, 이는 전달 비히클에 연결 또는 접합될 수 있고, 생체내 전달되는 경우에 골격근 세포에서 유전자 발현의 억제를 제공한다. 골격근 세포 전달 비히클을 포함하는 제약 조성물, 뿐만 아니라 치료 페이로드를 골격근 세포에 전달하는 것이 바람직한 다양한 질환 및 장애의 치료를 위한 사용 방법이 또한 기재된다.

대 표 도

표 A: 실시예 8의 혈청 중 평균 상대 마우스 미오스타틴 단백질

군	제8일		제15일		제21일		제29일		제36일		제43일		제50일		제57일		제64일	
	Avg	Std. Dev.	Avg	Std. Dev.	Avg	Std. Dev.	Avg	Std. Dev.	Avg	Std. Dev.	Avg	Std. Dev.	Avg	Std. Dev.	Avg	Std. Dev.	Avg	Std. Dev.
1	1.018	0.066	0.901	0.138	1.074	0.122	1.033	0.059	1.010	0.134	1.021	0.092	1.029	0.120	0.930	0.079	0.899	0.116
2	0.496	0.037	0.219	0.039	0.153	0.026	0.105	0.014	0.107	0.021	0.126	0.016	0.125	0.022	0.096	0.016	0.092	0.011

(52) CPC특허분류
A61K 47/60 (2017.08)
A61K 47/64 (2017.08)
A61P 21/00 (2018.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)
C12N 2310/315 (2013.01)
C12N 2310/317 (2013.01)
C12N 2310/321 (2013.01)
C12N 2310/322 (2013.01)

(72) 발명자
아이, 텡
미국 53719 위스콘신 매디슨 502 에스. 로사 로드 애로우헤드 파마슈티컬스 인크.
판, 수잔
미국 53719 위스콘신 매디슨 502 에스. 로사 로드 애로우헤드 파마슈티컬스 인크.
라모스-헌터, 수잔
미국 37075 테네시 헨더슨빌 118 머틀우드 레인

(30) 우선권주장
63/214,747 2021년06월24일 미국(US)
63/230,381 2021년08월06일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

골격근 세포에서 발현되는 유전자의 발현을 억제하기 위한 전달 비히클로서,

(a) (i) 17-49개의 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 적어도 15개의 뉴클레오티드가 골격근 세포에서 발현되는 유전자의 mRNA 서열에 상보적인 안티센스 가닥

(ii) 안티센스 가닥에 적어도 부분적으로 상보적인 16-49개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥

을 포함하는 RNAi 작용제;

(b) 골격근 세포의 표면 상에 존재하는 수용체에 대한 친화도를 가지며, 폴리펩티드인 표적화 리간드; 및

(c) PK/PD 조정제

를 포함하고;

여기서 RNAi 작용제는 표적화 리간드 및 PK/PD 조정제에 공유 연결되는 것인

전달 비히클.

청구항 2

제1항에 있어서, 표적화 리간드가 인테그린 수용체에 대해 친화도를 갖는 것인 전달 비히클.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 표적화 리간드가 αvβ6 인테그린 수용체에 대해 친화도를 갖는 것인 전달 비히클.

청구항 4

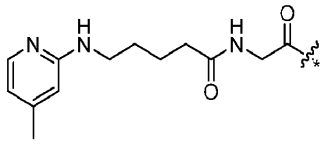
제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 리간드의 폴리펩티드가 화학식 (P)의 폴리펩티드 또는 그의 제약상 허용되는 염인 전달 비히클:

$$Xaa^1G'DLXaa^2Xaa^3L\text{-}Xaa^4Xaa^5L—\{*$$

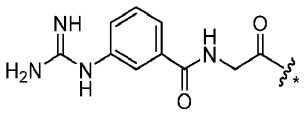
(P)

여기서

Xaa^1은 임의로 N-말단 캡을 갖는 L-아르기닌,



, 또는



이며, 여기서 각각의 $\{*$ 은 G'에 대한 연결 지점을 나타내고;

G'는 L-글리신 또는 N-메틸-L-글리신이고;

D는 L-아스파르트산 (L-아스파르테이트)이고;

L은 L-류신이고;

Xaa^2는 L-α 아미노산, L-β 아미노산 또는 α,α-이치환된 아미노산이고;

Xaa^3은 L-α 아미노산, L-β 아미노산 또는 α,α-이치환된 아미노산이고;

Xaa^4는 L-α 아미노산, L-β 아미노산 또는 α,α-이치환된 아미노산이고;

Xaa^5는 L-α 아미노산, L-β 아미노산 또는 α,α-이치환된 아미노산이고;

≀은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

청구항 5

제4항에 있어서, Xaa^2가 L-알라닌 또는 L-글리신인 전달 비히클.

청구항 6

제4항에 있어서, Xaa^2가 L-알라닌인 전달 비히클.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, Xaa^3이 비-표준 아미노산인 전달 비히클.

청구항 8

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, Xaa^3이 L-알라닌, L-글리신, L-발린, L-류신, L-이소류신 또는 L-α-아미노-부티르산인 전달 비히클.

청구항 9

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, Xaa^3이 L-α-아미노-부티르산인 전달 비히클.

청구항 10

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, Xaa^4가 L-아르기닌, L-시트룰린 또는 L-글루타민인 전달 비히클.

청구항 11

제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, Xaa^4가 L-시트룰린인 전달 비히클.

청구항 12

제4항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, Xaa^5가 L-글리신, L-알라닌, L-발린, L-류신, L-이소류신 또는 α-아미노-이소부티르산인 전달 비히클.

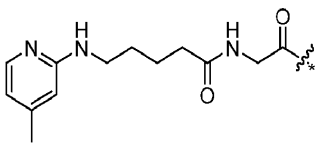
청구항 13

제4항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, Xaa^5가 α-아미노-이소부티르산인 전달 비히클.

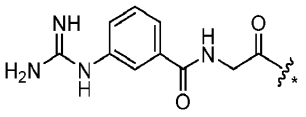
청구항 14

제4항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, Xaa^1이 N-아세틸-L-아르기닌인 전달 비히클.

청구항 15

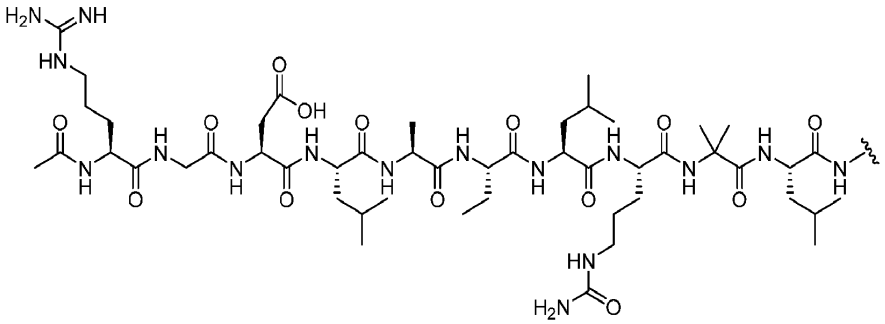
제4항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, Xaa^1이  이고, 여기서 ≀*은 G'에 대한 연결 지점을 나타내는 것인 전달 비히클.

청구항 16

제4항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, Xaa^1이  이고, 여기서 은 G'에 대한 연결 지점을 나타내는 것인 전달 비히클.

청구항 17

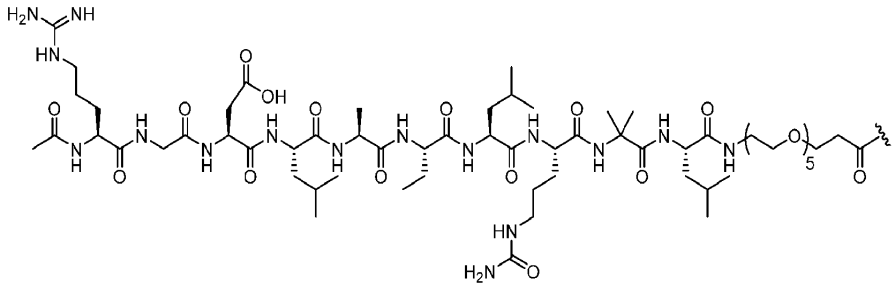
제1항에 있어서, 표적화 리간드가 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염인 전달 비히클:



여기서 은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

청구항 18

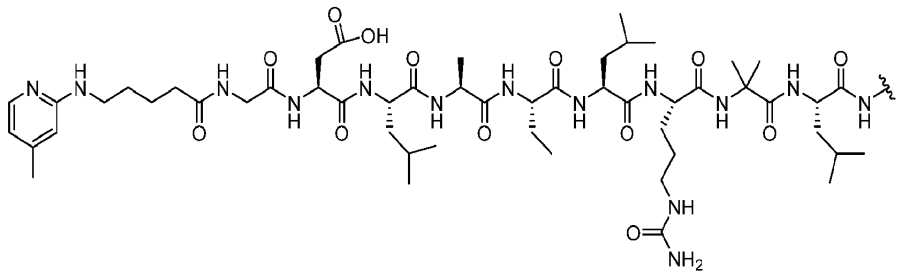
제1항에 있어서, 표적화 리간드가 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염인 전달 비히클:



여기서 은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

청구항 19

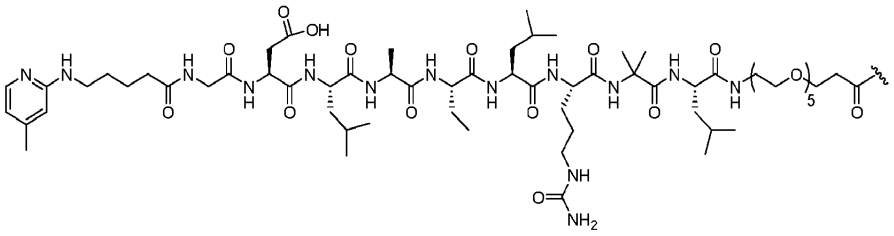
제1항에 있어서, 표적화 리간드가 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염인 전달 비히클:



여기서 은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

청구항 20

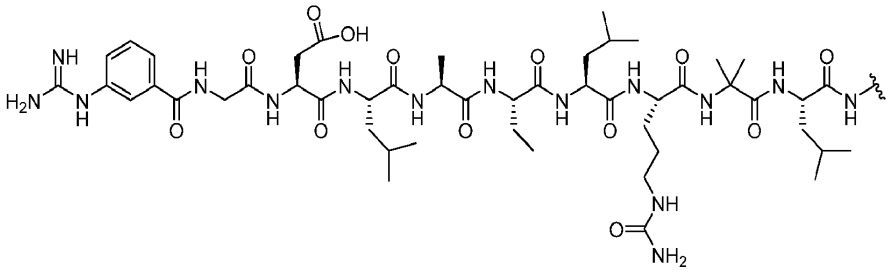
제1항에 있어서, 표적화 리간드가 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염인 전달 비히클:



여기서 ≀은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

청구항 21

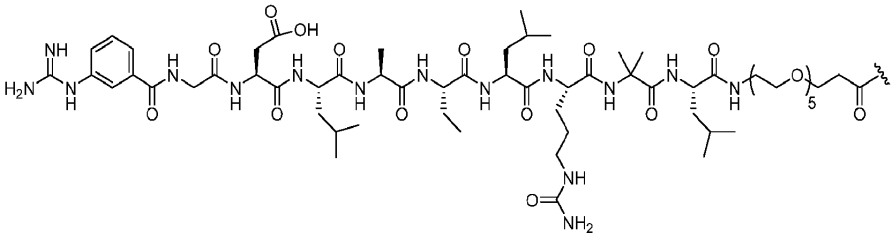
제1항에 있어서, 표적화 리간드가 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염인 전달 비히클:



여기서 ≀은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

청구항 22

제1항에 있어서, 표적화 리간드가 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염인 전달 비히클:



여기서 ≀은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, PK/PD 조정제가 적어도 1개의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 단위를 포함하는 것인 전달 비히클.

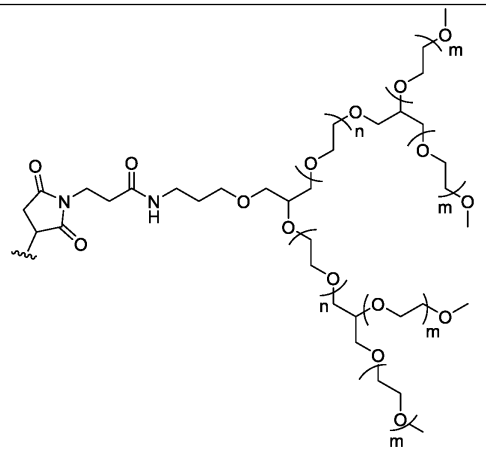
청구항 24

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, PK/PD 조정제가 적어도 10개의 PEG 단위를 포함하는 것인 전달 비히클.

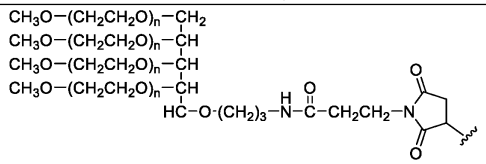
청구항 25

제24항에 있어서, PK/PD 조정제가 하기의 것 또는 이들 PK/PD 조정제 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염인 전

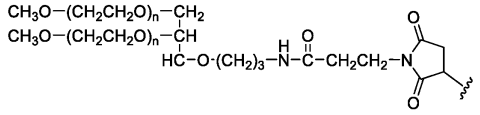
달 비히클:



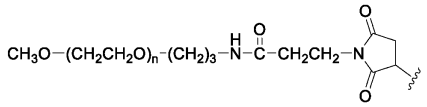
PEG40K (2x2-아암),
여기서 n 및 m은 각각 독립적으로 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 40 킬로달톤임



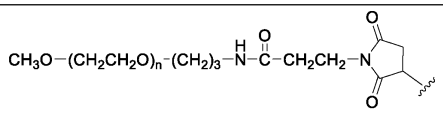
PEG40K (4-아암),
여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 40 킬로달톤임



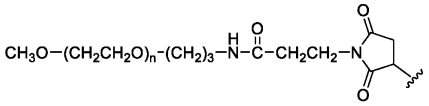
PEG40K (2-아암),
여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 40 킬로달톤임



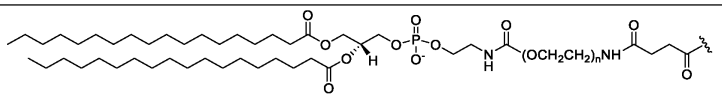
PEG40K,
여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 40 킬로달톤임



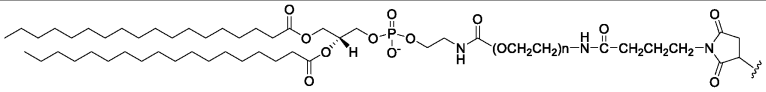
PEG10K,
여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 10 킬로달톤임



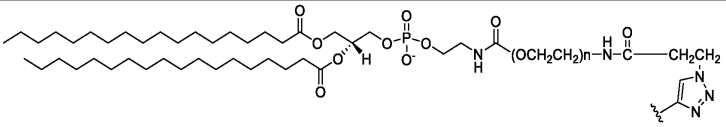
PEG5K,
여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 5 킬로달톤임



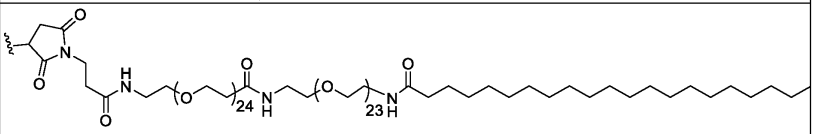
DSPE-PEG5K-NHS
여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 5 킬로달톤임



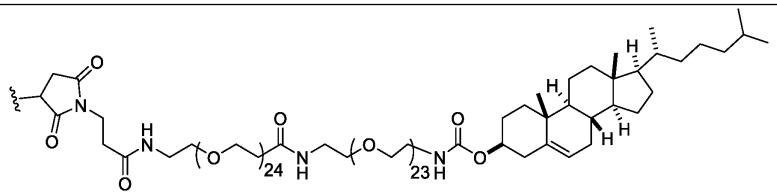
DSPE-PEG5K-MAL
여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 5 킬로달톤임



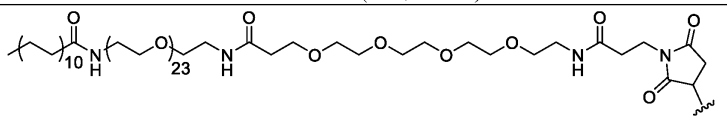
DSPE-PEG5K-N3
여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 5 킬로달톤임



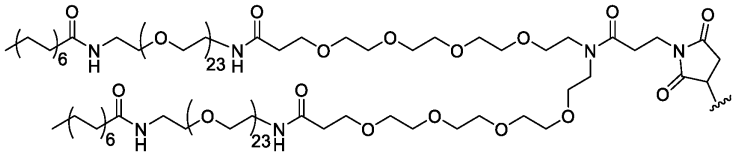
PEG47+C22



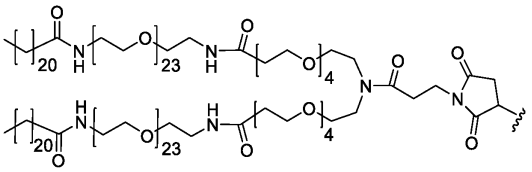
PEG47+CLS (콜레스테롤)



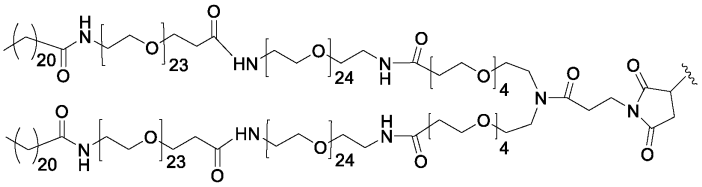
PEG23+C22



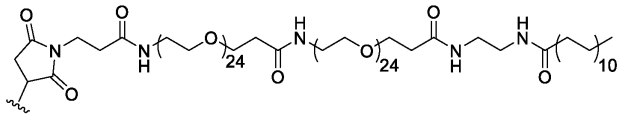
비스(PEG23+C14)



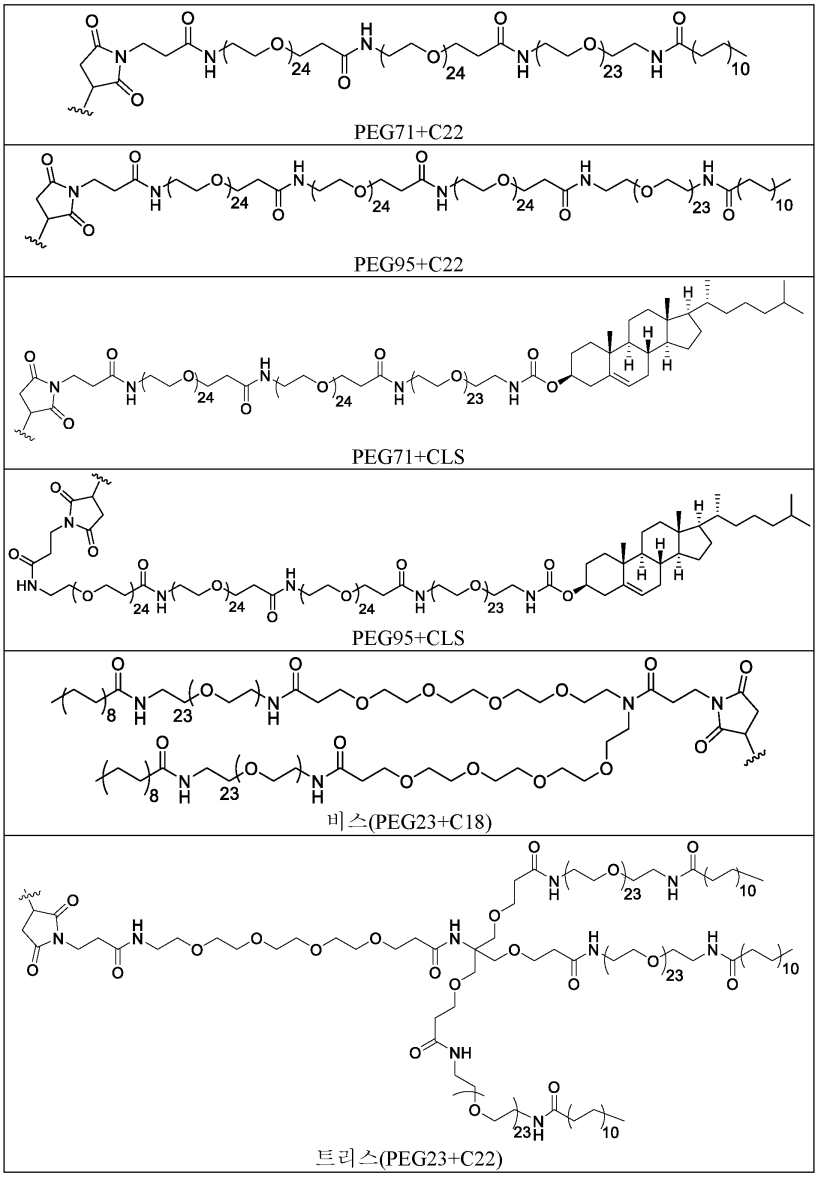
비스(PEG23+C22)

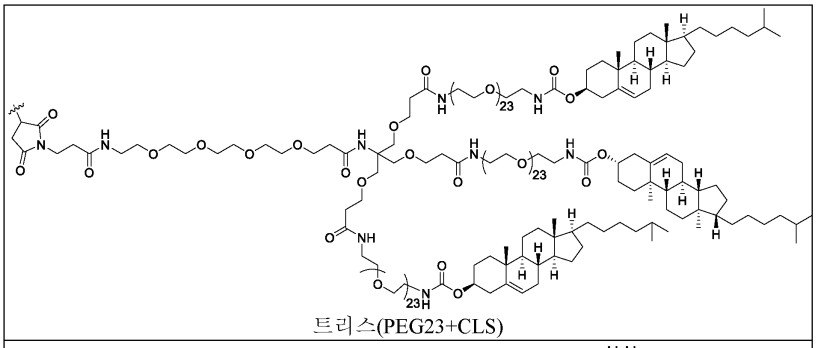


비스(PEG47+C22)

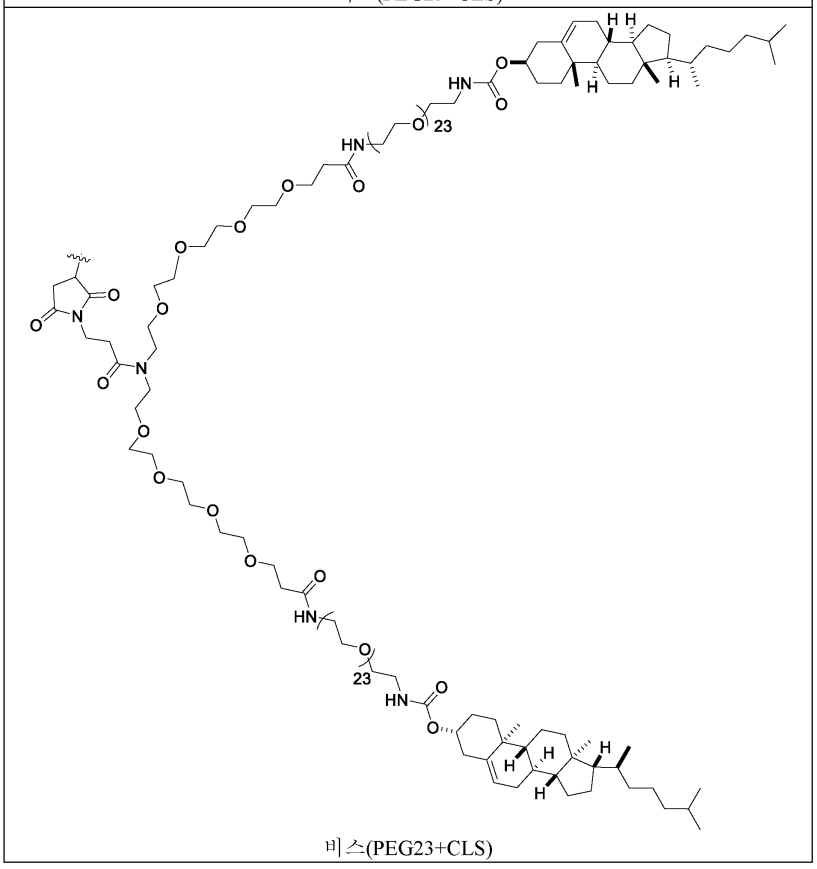


PEG48+C22

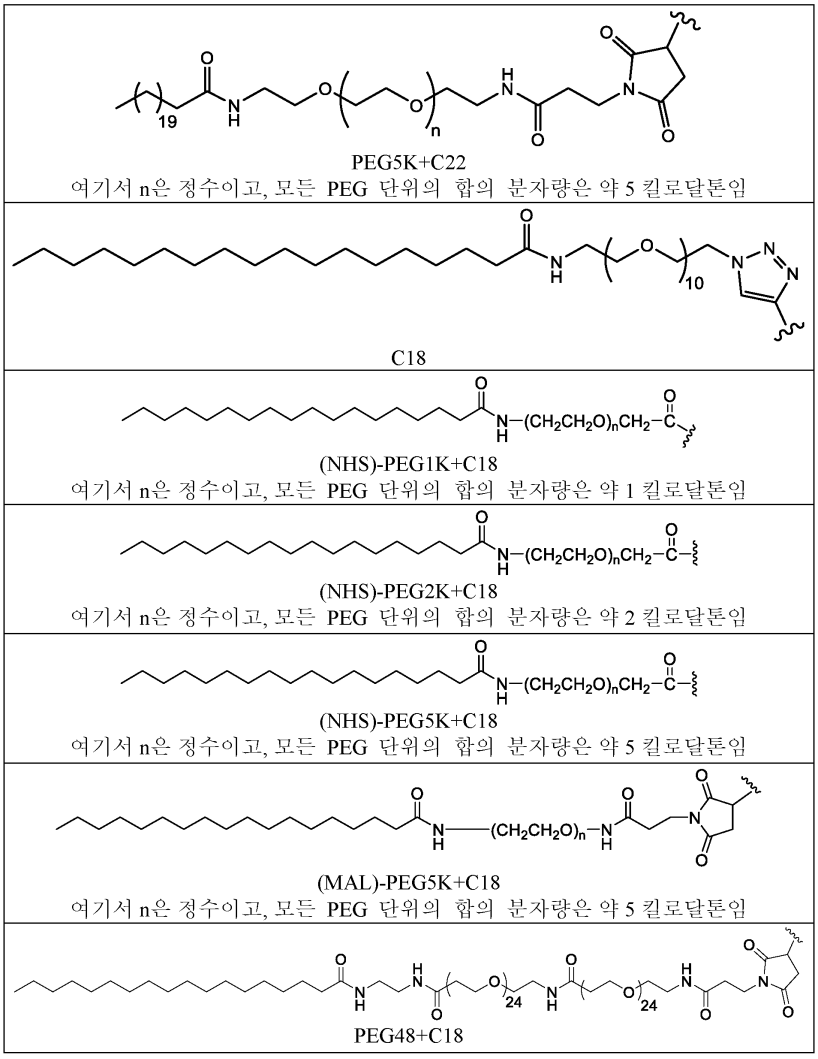

PEG71+C22
PEG95+C22
PEG71+CLS
PEG95+CLS
비스(PEG23+C18)
트리스(PEG23+C22)



트리스(PEG23+CLS)



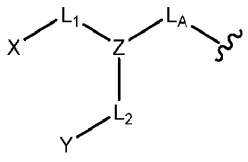
비스(PEG23+CLS)



여기서 ≀은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

청구항 26

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, PK/PD 조정제가 하기 화학식 (I)의 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염인 전달 비히클:



(I)

여기서

L_A는 결합, 또는 Z를 RNAi 작용제에 연결하는 2가 모이어티이고;

Z는 CH, 페닐 또는 N이고;

L_1 및 L_2는 각각 독립적으로 적어도 약 5개의 PEG 단위를 포함하는 링커이고;

X 및 Y는 각각 독립적으로 약 10 내지 약 50개의 탄소 원자를 포함하는 지질이고;

은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

청구항 27

제26항에 있어서, L_1 및 L_2가 각각 독립적으로 약 15 내지 약 100개의 PEG 단위를 포함하는 것인 전달 비히클.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, L_1 및 L_2가 각각 독립적으로 약 20 내지 약 60개의 PEG 단위를 포함하는 것인 전달 비히클.

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, L_1 및 L_2가 각각 독립적으로 약 20 내지 약 30개의 PEG 단위를 포함하는 것인 전달 비히클.

청구항 30

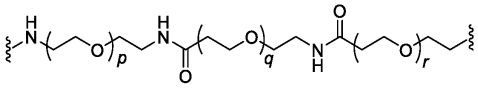
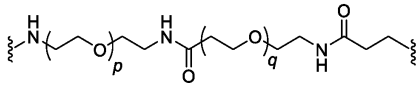
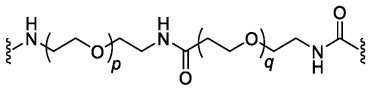
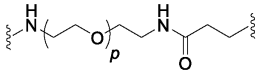
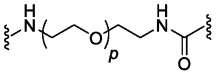
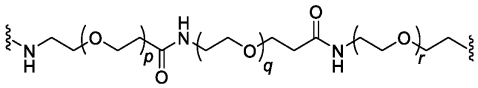
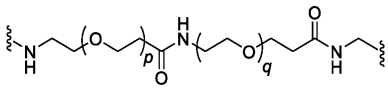
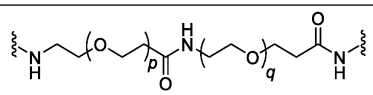
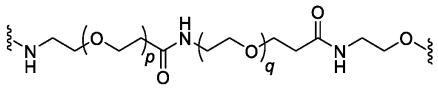
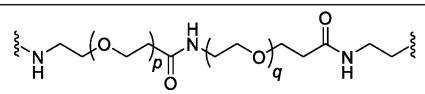
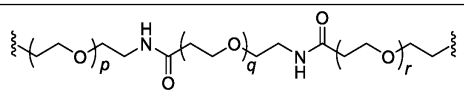
제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, L_1 및 L_2가 각각 독립적으로 약 40 내지 약 60개의 PEG 단위를 포함하는 것인 전달 비히클.

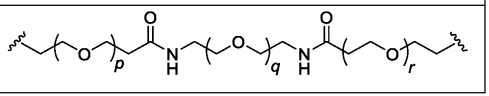
청구항 31

제26항에 있어서, L_1 및 L_2 중 하나가 약 20 내지 약 30개의 PEG 단위를 포함하고, 다른 하나가 약 40 내지 약 60개의 PEG 단위를 포함하는 것인 전달 비히클.

청구항 32

제26항에 있어서, 각각의 L_1 및 L_2가 독립적으로 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 전달 비히클:

명칭	구조
링커 **1**	
링커 **2**	
링커 **3**	
링커 **4**	
링커 **5**	
링커 **6**	
링커 **7**	
링커 **8**	
링커 **9**	
링커 **10**	
링커 **11**	

명칭	구조
링커 **12**	

여기서

각각의 p는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30이고;

각각의 q는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30이고;

각각의 r은 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고;

각각의  은 X, Y 또는 Z에 대한 연결 지점을 나타내고; 단

(i) 링커 1, 6 및 11에서, $p + q + r \geq 5$이고;

(ii) 링커 2, 3, 7, 8, 9 및 10에서, p + q ≥ 5이고;

(iii) 링커 4 및 5에서, p ≥ 5이다.

청구항 33

제32항에 있어서,

각각의 p가 독립적으로 20, 21, 22, 23, 24 또는 25이고;

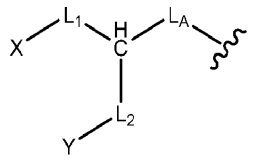
각각의 q는 독립적으로 20, 21, 22, 23, 24 또는 25이고;

각각의 r은 독립적으로 2, 3, 4, 5 또는 6인

전달 비히클.

청구항 34

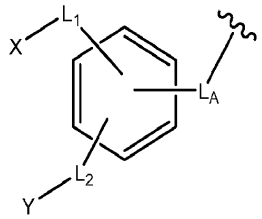
제26항에 있어서, 화학식 (I)의 PK/PD 조정제가 하기 화학식 (Ia)의 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염인 전달 비히클.



(Ia)

청구항 35

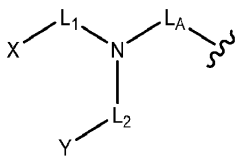
제26항에 있어서, 화학식 (I)의 PK/PD 조정제가 하기 화학식 (Ib)의 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염인 전달 비히클.



(Ib)

청구항 36

제26항에 있어서, 화학식 (I)의 PK/PD 조정제가 하기 화학식 (Ic)의 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염인 전달 비히클.



(Ic)

청구항 37

제26항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, X 및 Y 중 적어도 하나가 불포화 지질인 전달 비히클.

청구항 38

제26항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, X 및 Y 중 적어도 하나가 포화 지질인 전달 비히클.

청구항 39

제26항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, X 및 Y 중 적어도 하나가 분지형 지질인 전달 비히클.

청구항 40

제26항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, X 및 Y 중 적어도 하나가 직쇄 지질인 전달 비히클.

청구항 41

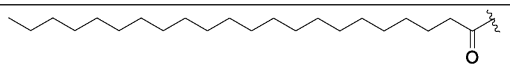
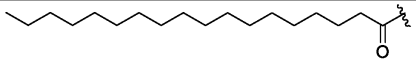
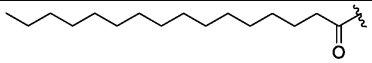
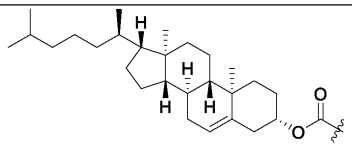
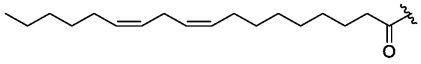
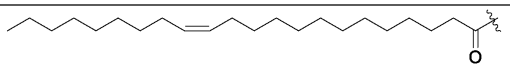
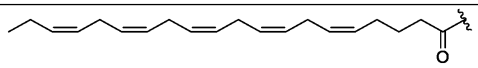
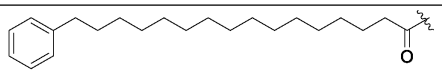
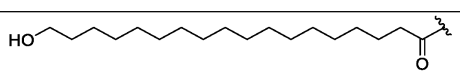
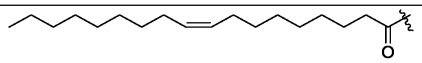
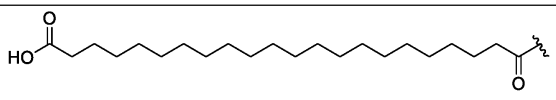
제26항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, X 및 Y 중 적어도 하나가 약 10 내지 약 25개의 탄소 원자를 포함하는 지질인 전달 비히클.

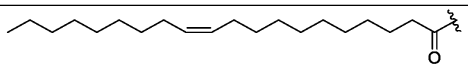
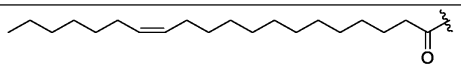
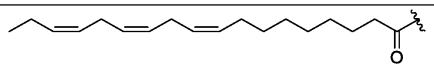
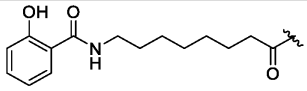
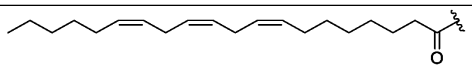
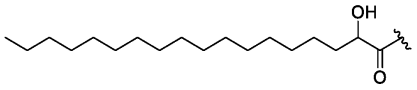
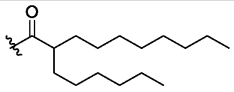
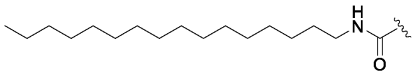
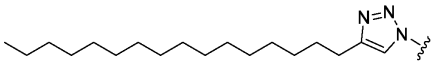
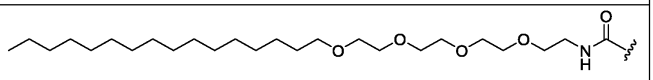
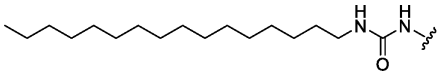
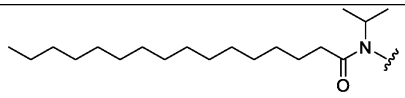
청구항 42

제26항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, X 및 Y 중 적어도 하나가 콜레스테릴인 전달 비히클.

청구항 43

제26항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, X 및 Y 중 적어도 하나가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 전달 비히클:

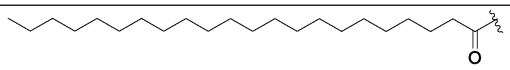
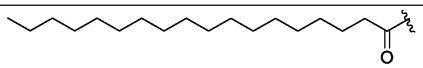
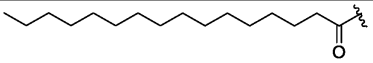
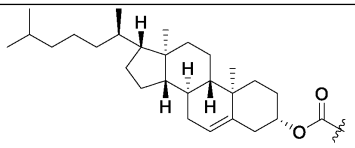
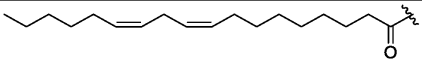
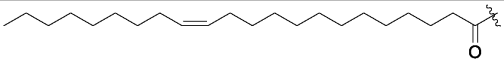
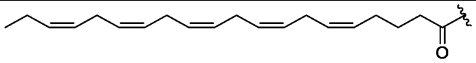
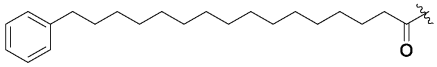
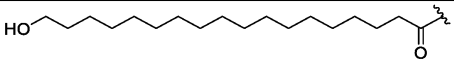
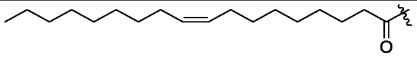
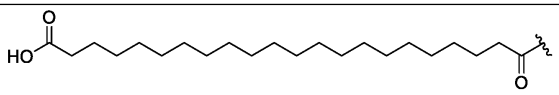
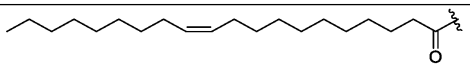
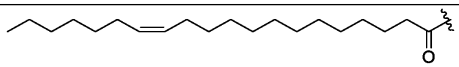
명칭	구조
지질 1	
지질 2	
지질 3	
지질 4	
지질 5	
지질 6	
지질 7	
지질 8	
지질 9	
지질 10	
지질 11	

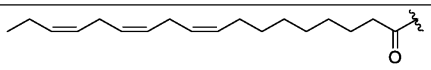
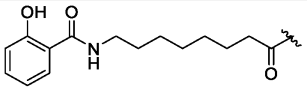
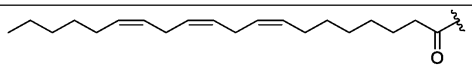
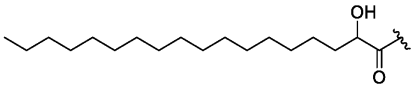
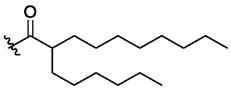
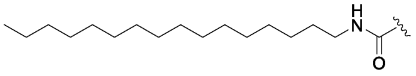
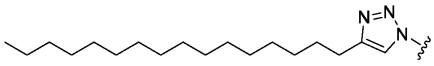
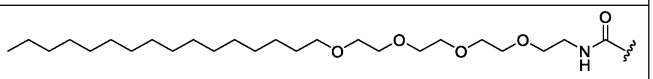
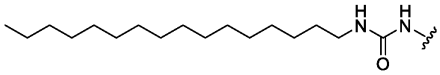
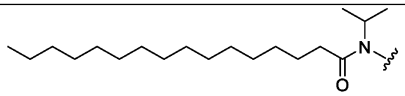
명칭	구조
지질 12	
지질 14	
지질 15	
지질 16	
지질 17	
지질 18	
지질 19	
지질 20	
지질 21	
지질 22	
지질 23	
지질 24	

여기서 은 L_1 또는 L_2에 대한 연결 지점을 나타낸다.

청구항 44

제26항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, X 및 Y가 둘 다 각각 독립적으로 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 전달 비히클:

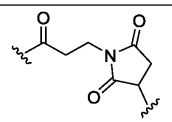
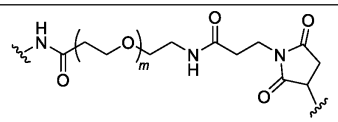
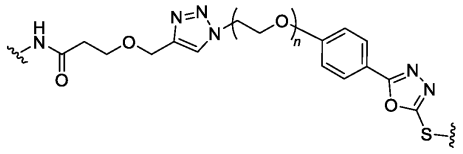
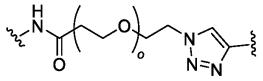
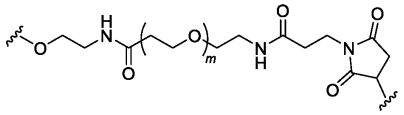
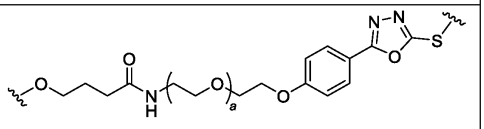
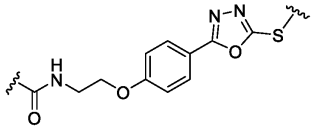
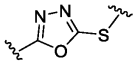
명칭	구조
지질 1	
지질 2	
지질 3	
지질 4	
지질 5	
지질 6	
지질 7	
지질 8	
지질 9	
지질 10	
지질 11	
지질 12	
지질 14	

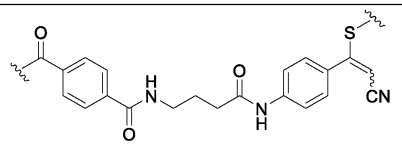
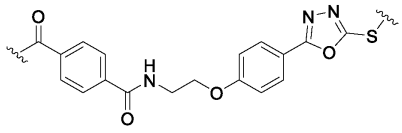
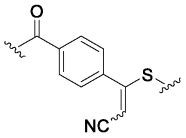
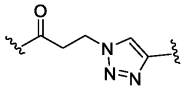
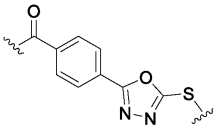
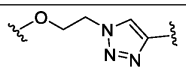
명칭	구조
지질 **15**	
지질 **16**	
지질 **17**	
지질 **18**	
지질 **19**	
지질 **20**	
지질 **21**	
지질 **22**	
지질 **23**	
지질 **24**	

여기서 은 L_1 또는 L_2에 대한 연결 지점을 나타낸다.

청구항 45

제26항에 있어서, L_A가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 전달 비히클:

명칭	구조
테더 **1**	
테더 **2**	
테더 **3**	
테더 **4**	
테더 **5**	
테더 **6**	
테더 **7**	
테더 **8**	

테더 9	
테더 10	
테더 11	
테더 12	
테더 13	
테더 14	

여기서, 각각의 m, n, o 및 a는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30이고, 각각의 은 Z 또는 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

청구항 46

제45항에 있어서,

각각의 m이 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 8, 9, 10, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25이고;

각각의 n은 독립적으로 2, 3, 4 또는 5이고;

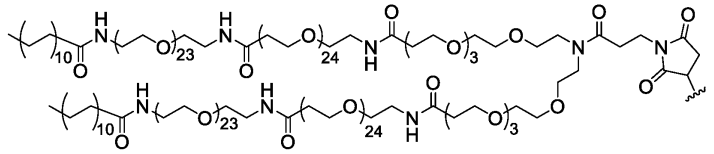
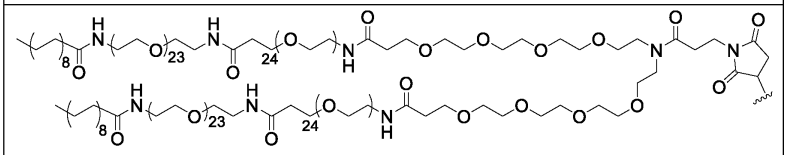
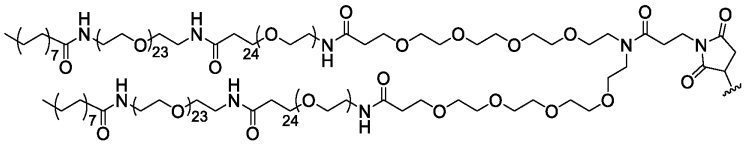
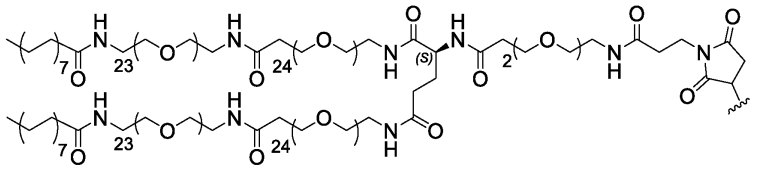
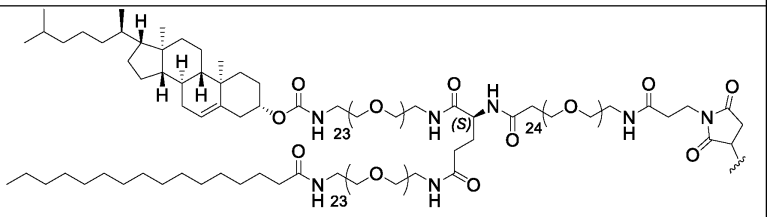
각각의 a는 독립적으로 2, 3 또는 4이고;

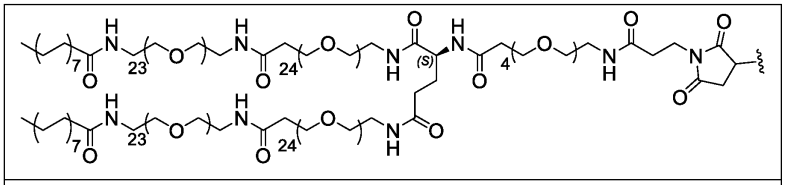
각각의 o는 독립적으로 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13인

전달 비히클.

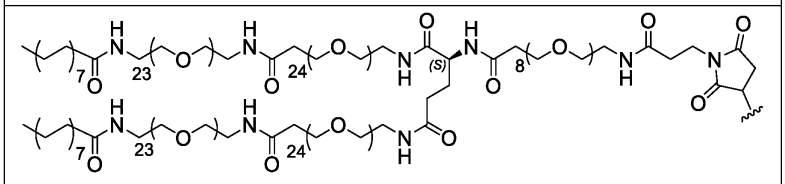
청구항 47

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, PK/PD 조정제가 하기로 이루어진 군 또는 이들 PK/PD 조정제 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염으로부터 선택되는 것인 전달 비히클:

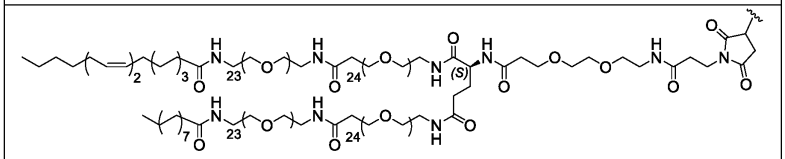
LP 1b

LP 28b

LP 29b

LP 38b

LP 39b

LP 41b



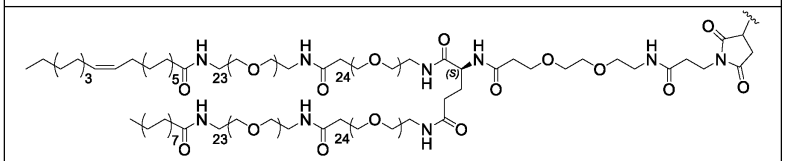
LP 42b



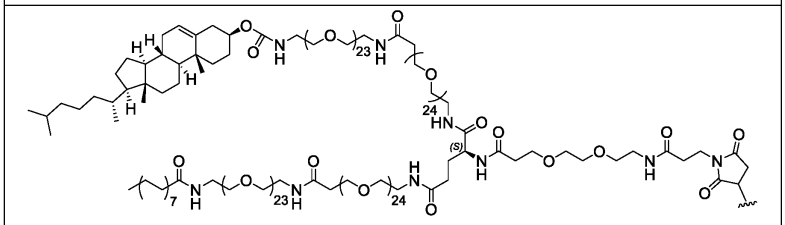
LP 43b



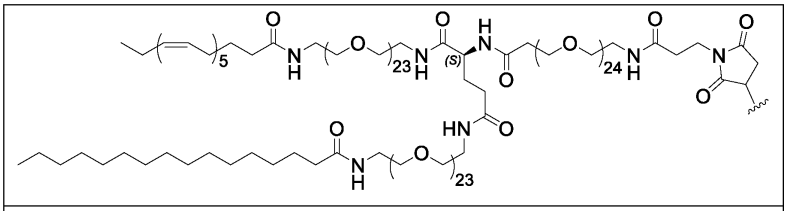
LP 44b



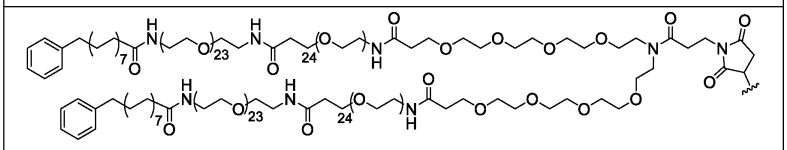
LP 45b



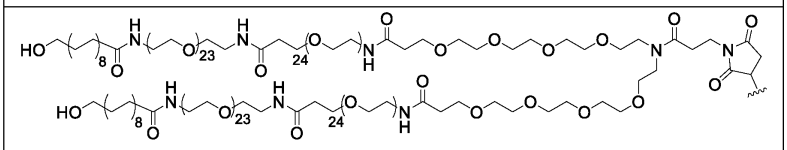
LP 47b



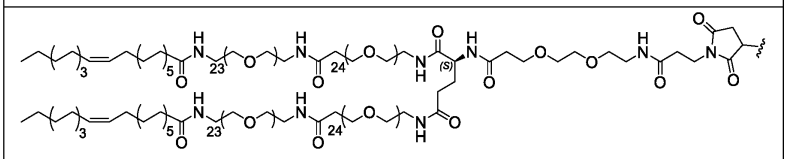
LP 48b



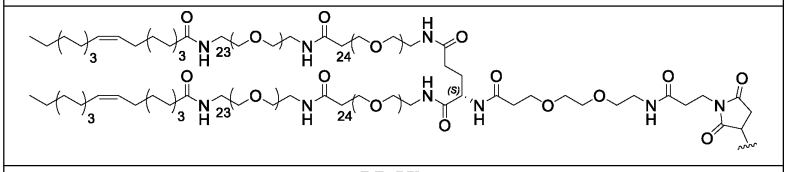
LP 49b



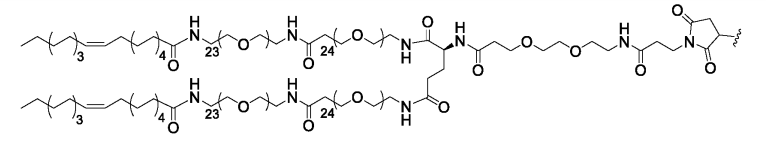
LP 53b



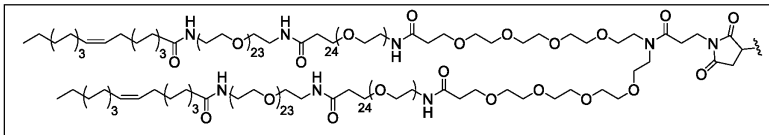
LP 54b



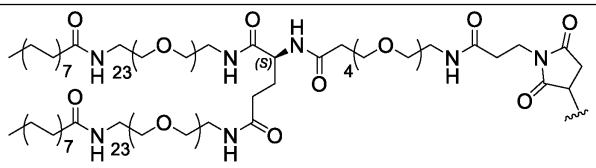
LP 55b



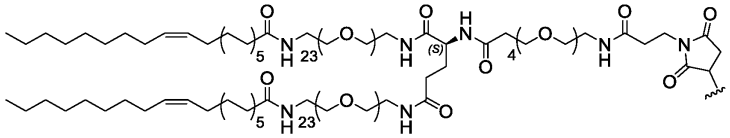
LP 56b



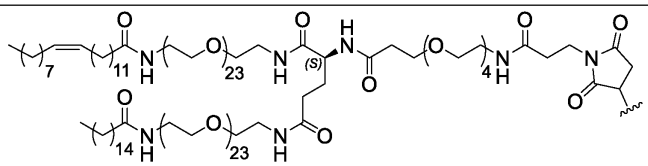
LP 57b



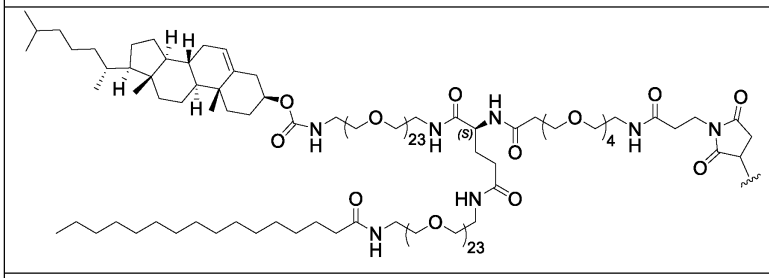
LP 58b



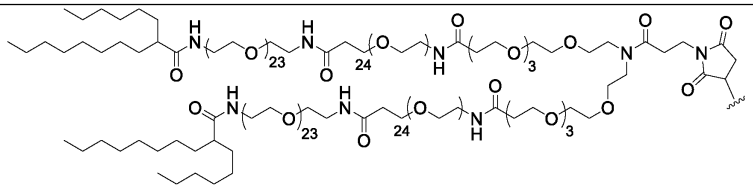
LP 59b



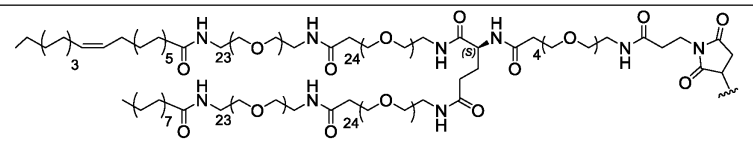
LP 60b



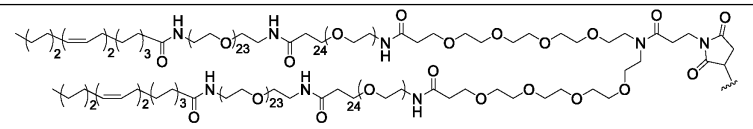
LP 61b



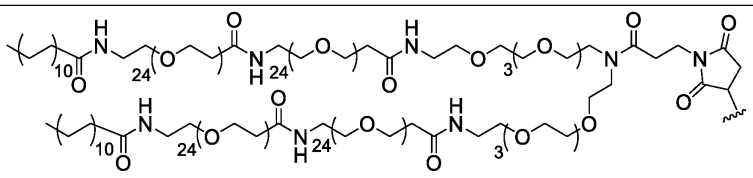
LP 62b



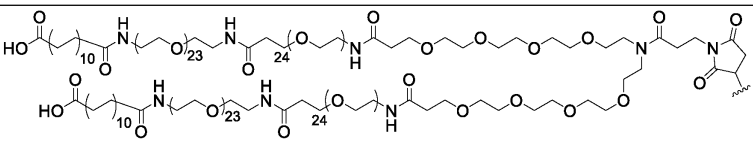
LP 87b



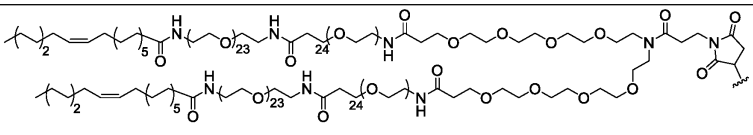
LP 89b



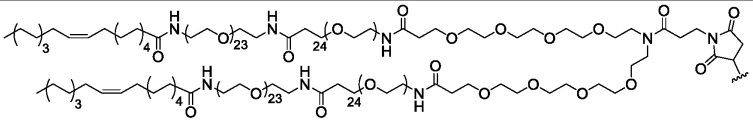
LP 90b



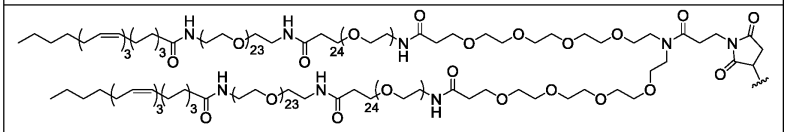
LP 92b



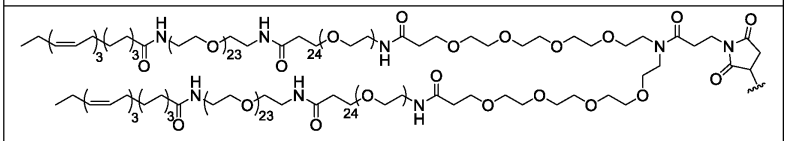
LP 93b



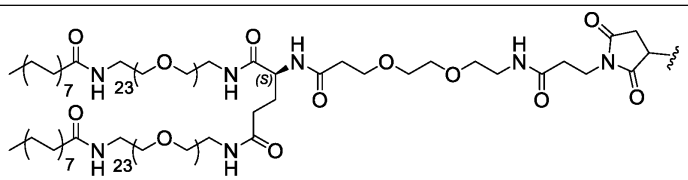
LP 94b



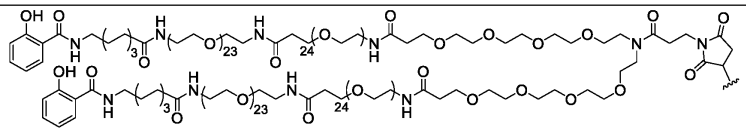
LP 95b



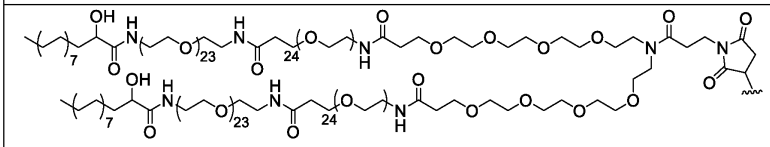
LP 101b



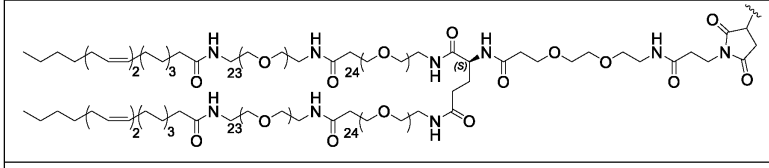
LP 102b



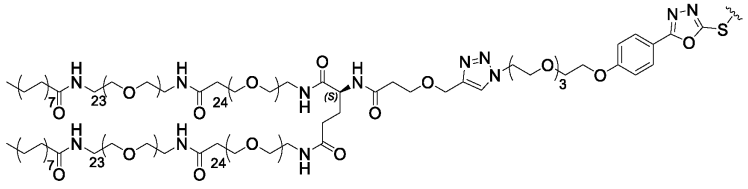
LP 103b



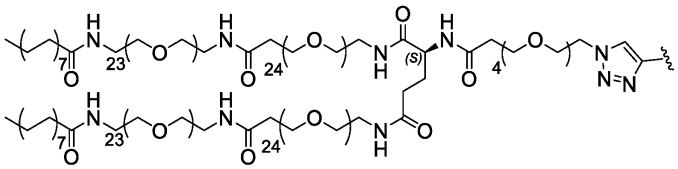
LP 104b



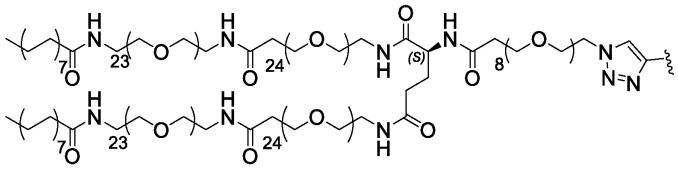
LP 106b



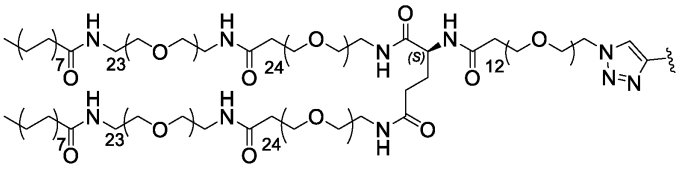
LP 107b



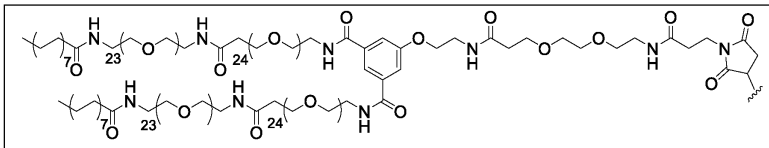
LP 108b



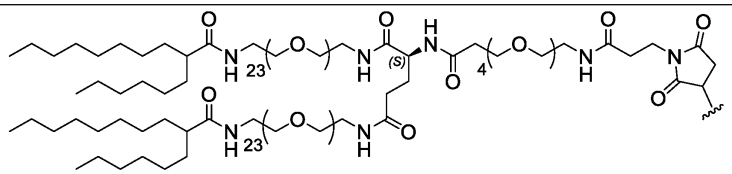
LP 109b



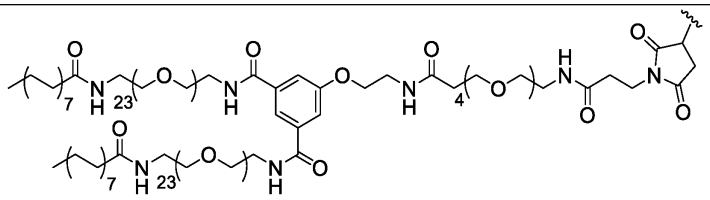
LP 110b



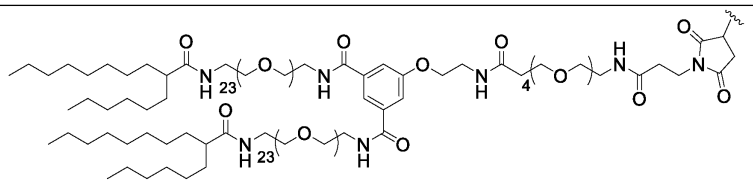
LP 111b



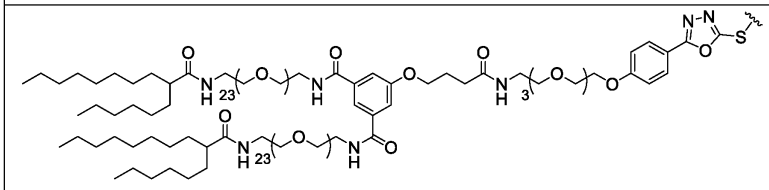
LP 124b



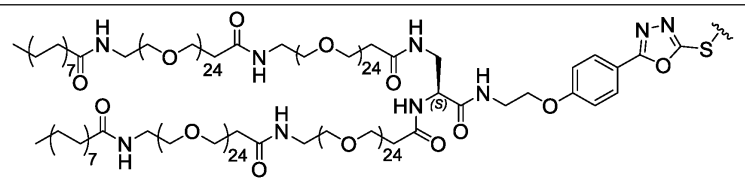
LP 130b



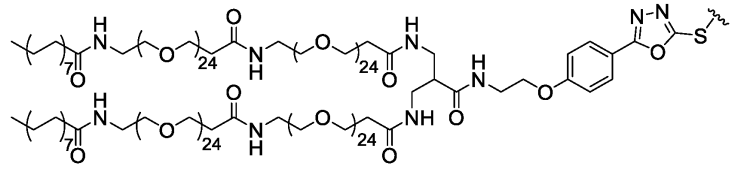
LP 143b



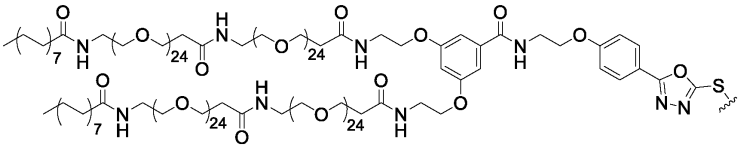
LP 210b



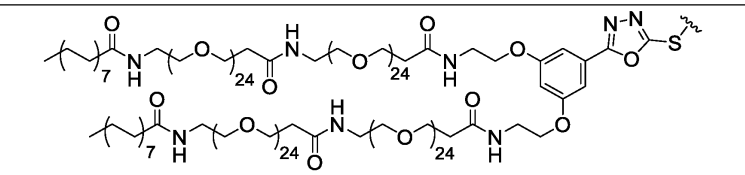
LP 217b



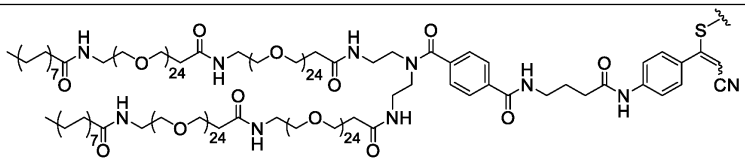
LP 220b



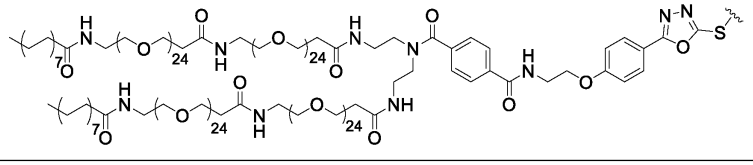
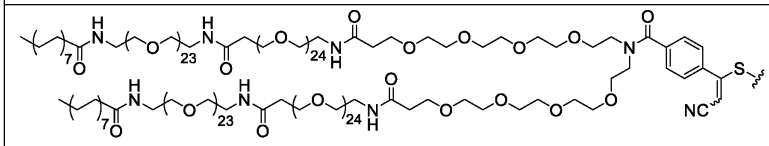
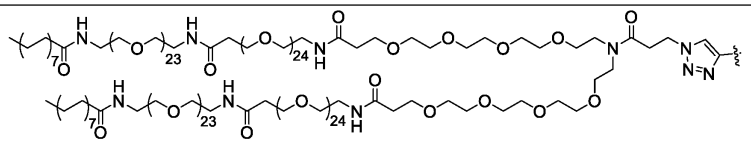
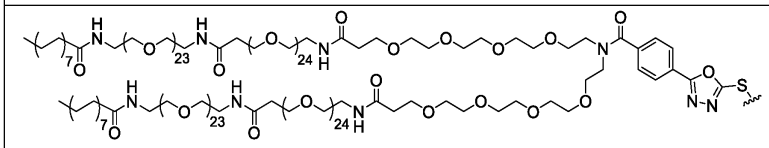
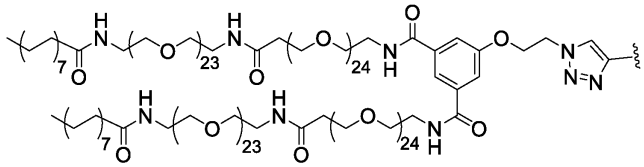
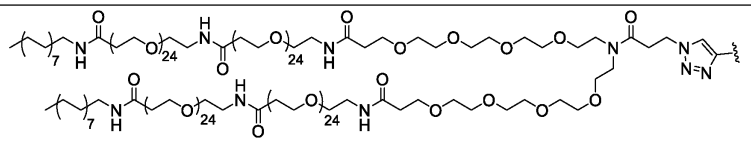
LP 221b

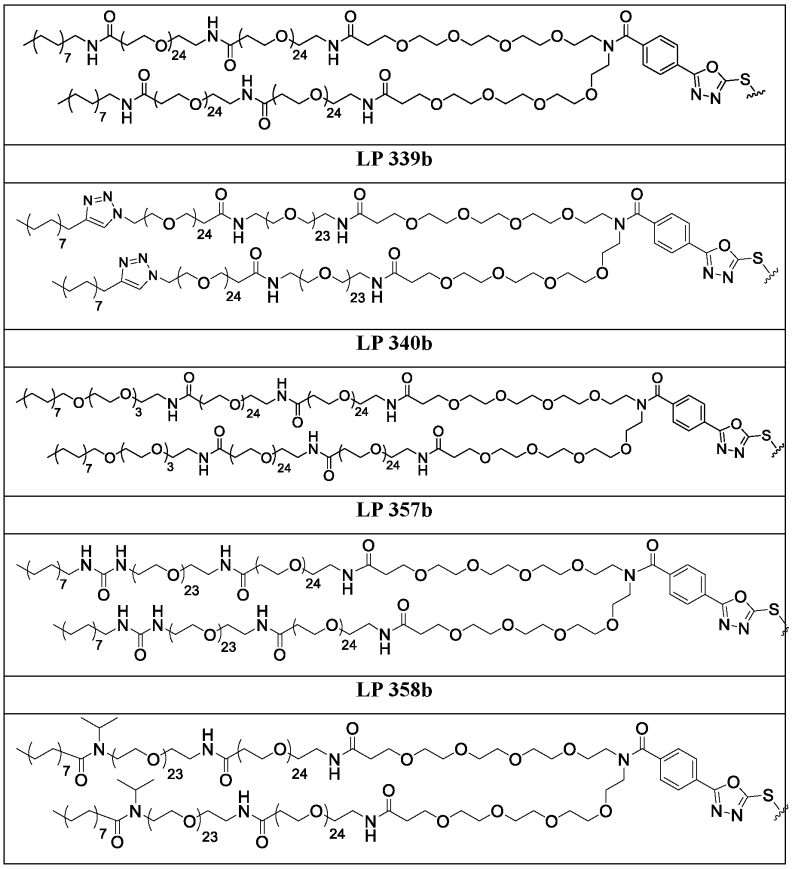


LP 223b



LP 224b


LP 225b

LP 226b

LP 238b

LP 240b

LP 246b

LP 247b



여기서 각각의 ≀ 은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi 작용제가 골격근 세포에서 인간 유전자의 mRNA의 발현을 억제하는 것인 전달 비히클.

청구항 49

제4항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 제약상 허용되는 염이 나트륨 염인 전달 비히클.

청구항 50

제4항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 제약상 허용되는 염이 칼륨 염인 전달 비히클.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항의 전달 비히클을 포함하는 조성물.

청구항 52

제51항의 조성물 및 제약 부형제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 53

제52항에 있어서, 제약 부형제가 주사용수 및 염수 용액으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 54

제53항에 있어서, 제약 부형제가 염수 용액인 제약 조성물.

청구항 55

골격근 세포의 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 제51항의 조성물 또는 제52항 내지 제54항 중 어느 한 항의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 골격근 세포의 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 질환 또는 장애가 근육 이영양증인 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 근육 이영양증이 뒤시엔느 근육 이영양증, 근긴장성 근육 이영양증, 베커 근육 이영양증, 지대 근육 이영양증, 안면견갑상완 근육 이영양증, 선천성 근육 이영양증, 안인두 근육 이영양증, 원위 근육 이영양증 및 에머리-드레이푸스 근육 이영양증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 58

RNAi 작용제를 골격근 세포에 전달하기 위한, 제1항 내지 제50항 중 어느 한 항의 전달 비히클, 제51항의 조성물 또는 제52항 내지 제54항 중 어느 한 항의 제약 조성물의 용도.

청구항 59

제58항에 있어서, 골격근 세포가 대상체 내에 있는 것인 용도.

청구항 60

제59항에 있어서, 대상체가 인간 대상체인 용도.

청구항 61

제58항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi 작용제가 골격근 세포에서의 표적 유전자의 발현을 적어도 약 50% 억제하는 것인 용도.

청구항 62

제61항에 있어서, 표적 유전자가 미오스타틴 (Mstn.)인 용도.

청구항 63

질환 또는 장애의 치료를 위한 의약의 제조를 위한, 제1항 내지 제50항 중 어느 한 항의 전달 비히클, 제51항의 조성물 또는 제52항 내지 제54항 중 어느 한 항의 제약 조성물의 용도.

청구항 64

제63항에 있어서, 질환 또는 장애가 근육 이영양증인 용도.

청구항 65

제64항에 있어서, 근육 이영양증이 뒤시엔느 근육 이영양증, 근긴장성 근육 이영양증, 베커 근육 이영양증, 지대 근육 이영양증, 안면견갑상완 근육 이영양증, 선천성 근육 이영양증, 안인두 근육 이영양증, 원위 근육 이영양증 및 에머리-드레이푸스 근육 이영양증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 66

하기를 포함하는, 제1항 내지 제50항 중 어느 한 항의 전달 비히클의 제조 방법:

(i) 센스 가닥을 합성하는 단계;

(ii) 안티센스 가닥을 합성하는 단계;

(iii) 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 어닐링하는 단계;

(iv) 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 어닐링하기 전 또는 후에, 표적화 리간드를 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에 접합시키는 단계; 및

(v) 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 어닐링하기 전 또는 후에, 및 표적화 리간드를 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에 접합시키기 전 또는 후에, PK/PD 조정제를 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에 접합시키는 단계.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] <관련 출원에 대한 상호 참조>

[0002] 본 PCT 출원은 2020년 9월 11일에 출원된 미국 가출원 번호 63/077,141, 2021년 6월 24일에 출원된 미국 가출원 번호 63/214,747, 및 2021년 8월 6일에 출원된 미국 가출원 번호 63/230,381을 우선권 주장한다. 이들 문헌 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] <기술분야>

[0004] 본 개시내용은 페이로드, 예컨대 RNA 간섭 (RNAi) 작용제, 예를 들어 이중 가닥 RNAi 작용제를 골격근 세포에 생체내 전달하기 위한 전달 비히클에 관한 것이다. 본원에 개시된 전달 비히클을 사용한 RNAi 작용제의 전달은 골격근 세포에서 발현되는 유전자의 억제를 제공한다.

배 경 기 술

[0005] 치료 또는 진단 페이로드를 대상체의 생체내 특정 관심 조직으로 향하게 하는 것은 의약 분야에서 계속 큰 도전과제이다. 이는 다양한 질환 및 장애가 그의 기원을 발견하는 골격근 세포로의 특이적 및 선택적 전달을 달성하는 것을 포함한다. 페이로드, 예컨대 치료 약물 제품을 골격근 세포로 선택적으로 및 효율적으로 전달할 수 없는 것은 많은 질환 및 장애가 적절하게 치료 및 다루어지는 것을 막는다.

[0006] 올리고뉴클레오티드-기반 작용제, 예컨대 예를 들어 안티센스 올리고뉴클레오티드 화합물 (ASO) 및 이중-가닥 RNA 간섭 (RNAi) 작용제는 의약 분야를 혁신시키고 강력한 치유적 치료 옵션을 제공하는 큰 유망성 및 잠재력을 나타냈다. 그러나, 올리고뉴클레오티드-기반 작용제, 및 특히 이중-가닥 치료 RNAi 작용제의 전달은 실행가능한 치료 제약 작용제를 개발하는 데 있어 오랫동안 도전과제였다. 이는 비-간세포, 예컨대 골격근 세포로의 올리고뉴클레오티드-기반 작용제의 특이적 및 선택적 전달을 달성하려고 시도할 때 특히 그러하다.

[0007] 지난 수년에 걸쳐 올리고뉴클레오티드-기반 작용제를 골격근 세포로 유도하기 위한 다양한 시도가 이루어졌지만, 예를 들어 콜레스테롤 접합체 (이는 비-특이적이고, 다양한 바람직하지 않은 조직 및 기관에 분포하는 공지된 단점을 가짐) 및 지질-나노입자 (LNP) (이는 독성 우려를 갖는 것으로 빈번하게 보고되었음)를 사용하여 지금까지 어떠한 것도 적합한 전달을 달성하지 못하였다. 따라서, 올리고뉴클레오티드-기반 작용제, 및 특히 RNAi 작용제를 골격근 세포로 특이적으로 및 효율적으로 향하게 하는 전달 비히클에 대한 필요가 남아 있다.

발명의 내용

[0008] 페이로드, 예컨대 RNA 간섭 (RNAi) 작용제 (본원에서 RNAi 작용제, RNAi 촉발제 또는 촉발제로도 명명됨; 예를 들어, 이중-가닥 RNAi 작용제)를 비롯한 올리고뉴클레오티드-기반 작용제를 골격근 세포로 향하게 하고, 골격근 세포에 존재하는 유전자 발현의 선택적이고 효율적인 억제를 용이하게 하는 전달 비히클이 본원에 개시된다. 표적 유전자의 발현을 억제하기 위한 RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클 및 적어도 하나의 약동학적 및/또는 약역학적 (PK/PD) 조정제를 포함하며, 여기서 RNAi 작용제는 표적 세포 상에 존재하는 세포 수용체에 대해 친화도를 갖는 적어도 하나의 표적화 리간드에 공유 연결된 것인 조성물이 본원에 추가로 개시된다. 본원에 개시된 전달 비히클은 대상체, 예를 들어 인간 또는 동물 대상체에서 표적 유전자의 발현을 선택적으로 및 효율적으로 감소 또는 억제할 수 있다.

[0009] 기재된 전달 비히클은, 예를 들어 뒤시엔느 근육 이영양증, 베커 근육 이영양증, 근긴장성 근육 이영양증 및 안면견갑상완 (FSHD)을 포함한 근육 이영양증을 비롯한, 표적 유전자 발현의 감소에 의해 적어도 부분적으로 매개될 수 있는 상태 및 질환의 치유적 치료 (예방적, 개입 및 방지적 치료 포함)를 위한 방법에 사용될 수 있다. 본원에 개시된 RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클은 대상체의 세포에서 표적 유전자 발현을 선택적으로 감소시킬 수 있다. 본원에 개시된 방법은 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법, 예컨대 정맥내 주입, 정맥내 주사 또는 피하 주사를 사용하여 대상체, 예를 들어 인간 또는 동물 대상체에게 RNAi 작용제를 포함하는 하

나 이상의 전달 비히클을 투여하는 것을 포함한다.

[0010] 또한, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있는 RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클을 포함하며, 적어도 1종의 제약상 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 제약 조성물이 본원에 기재된다. RNAi 작용제를 포함하는 하나 이상의 전달 비히클을 포함하는 제약 조성물은 생체내에서 표적 유전자의 발현을 선택적으로 및 효율적으로 감소 또는 억제할 수 있다. 본원에 기재된 RNAi 작용제를 포함하는 하나 이상의 전달 플랫폼을 포함하는 조성물은, 예를 들어 근육 이영양증을 비롯한 표적 유전자 발현의 감소에 의해 적어도 부분적으로 매개될 수 있는 상태 및 질환의 치료 (예방적 치료 또는 억제 포함)를 위해 대상체, 예컨대 인간 또는 동물 대상체에게 투여될 수 있다.

[0011] 본원에 기재된 한 측면은, 골격근 세포에서 발현되는 유전자의 발현을 억제하기 위한 전달 비히클로서,

[0012] (a) (i) 17-49개의 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 적어도 15개의 뉴클레오티드가 골격근 세포에서 발현되는 유전자의 mRNA 서열에 상보적인 안티센스 가닥 및

[0013] 안티센스 가닥에 적어도 부분적으로 상보적인 16-49개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥

[0014] 을 포함하는 RNAi 작용제;

[0015] (b) 골격근 세포의 표면 상에 존재하는 수용체에 대해 친화도를 가지며, 폴리펩티드인 표적화 리간드; 및

[0016] (c) PK/PD 조정제

[0017] 를 포함하고;

[0018] 여기서 RNAi 작용제는 표적화 리간드 및 PK/PD 조정제에 공유 연결되는 것인 전달 비히클이다.

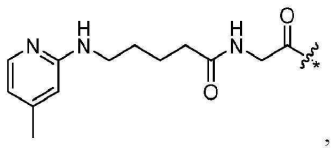
[0019] 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 인테그린 수용체에 대해 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 αvβ6 인테그린 수용체에 대해 친화도를 갖는다.

[0020] 일부 실시양태에서, 표적화 리간드의 폴리펩티드는 화학식 (P)의 폴리펩티드 또는 그의 제약상 허용되는 염이고,

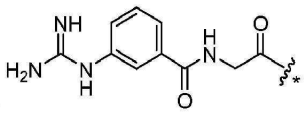
$$Xaa^1G'DLXaa^2Xaa^3L\text{-}Xaa^4Xaa^5L—\{$$

[0021] **(P)**

[0022] 여기서 Xaa^1은 임의로 N-말단 캡을 갖는 L-아르기닌,



, 또는



이며, 여기서 각각의 $\{^*$은 G'에 대한 연결 지점을 나타내고; G'는 L-글리신 또는 N-메틸-L-글리신이고; D는 L-아스파르트산 (L-아스파르테이트)이고; L은 L-류신이고; Xaa^2는 L-α 아미노산, L-β 아미노산 또는 α,α-이치환된 아미노산이고; Xaa^3은 L-α 아미노산, L-β 아미노산 또는 α,α-이치환된 아미노산이고; Xaa^4는 L-α 아미노산, L-β 아미노산 또는 α,α-이치환된 아미노산이고; Xaa^5는 L-α 아미노산, L-β 아미노산 또는 α,α-이치환된 아미노산이고; $\{$는 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0023] 일부 실시양태에서, Xaa^2는 L-알라닌 또는 L-글리신이다. 일부 실시양태에서, Xaa^2는 L-알라닌이다.

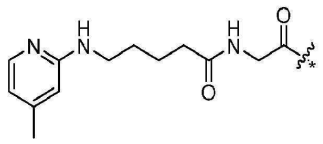
[0024] 일부 실시양태에서, Xaa^3은 비-표준 아미노산이다. 일부 실시양태에서, Xaa^3은 L-알라닌, L-글리신, L-발린, L-류신, L-이소류신 또는 L-α-아미노-부티르산이다. 일부 실시양태에서, Xaa^3은 L-α-아미노-부티르산이다.

[0025] 일부 실시양태에서, Xaa^4는 L-아르기닌, L-시트룰린 또는 L-글루타민이다. 일부 실시양태에서, Xaa^4는 L-시트룰린이다.

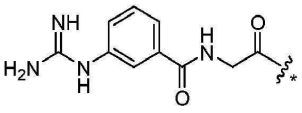
[0026] 일부 실시양태에서, Xaa^5는 L-글리신, L-알라닌, L-발린, L-류신, L-이소류신 또는

α-아미노-이소부티르산이다. 일부 실시양태에서, Xaa^5는 α-아미노-이소부티르산이다.

[0027] 일부 실시양태에서, Xaa^1은 N-아세틸-L-아르기닌이다. 일부 실시양태에서, Xaa^1은

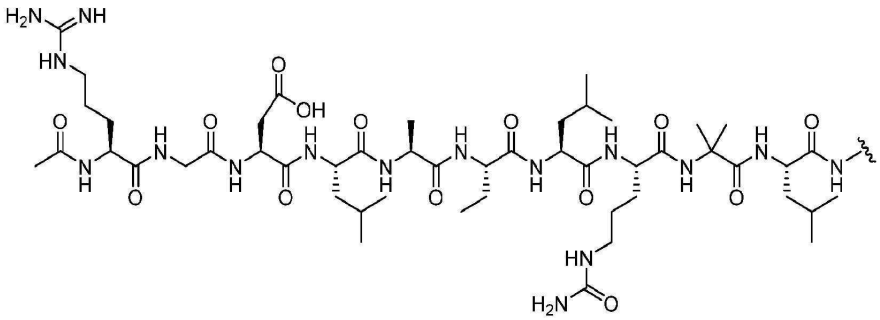


이며, 여기서 $\overset{*}{\sim}$ 은 G'에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, Xaa^1은



이며, 여기서 $\overset{*}{\sim}$ 은 G'에 대한 연결 지점을 나타낸다.

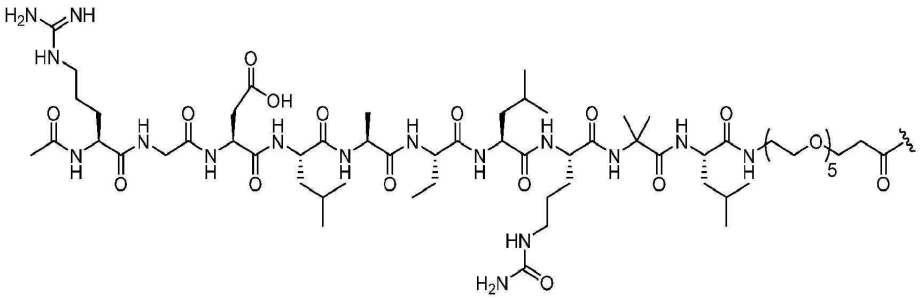
[0028] 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염이고



[0029]

[0030] 여기서 $\sim$ 은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

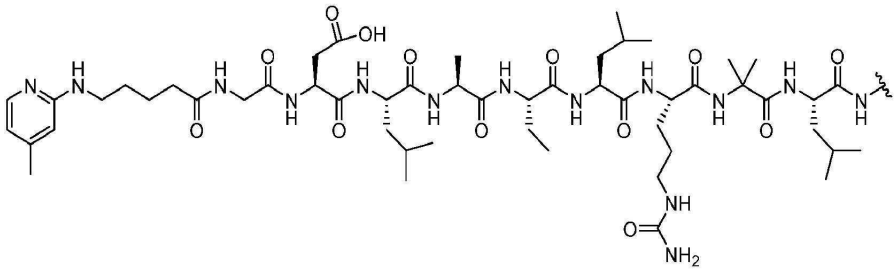
[0031] 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염이고



[0032]

[0033] 여기서 $\sim$ 은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

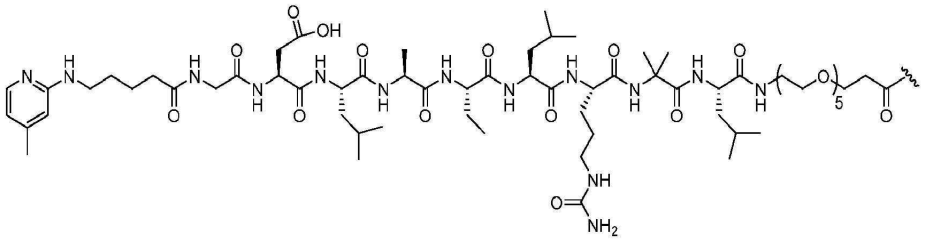
[0034] 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염이고



[0035]

[0036] 여기서 은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

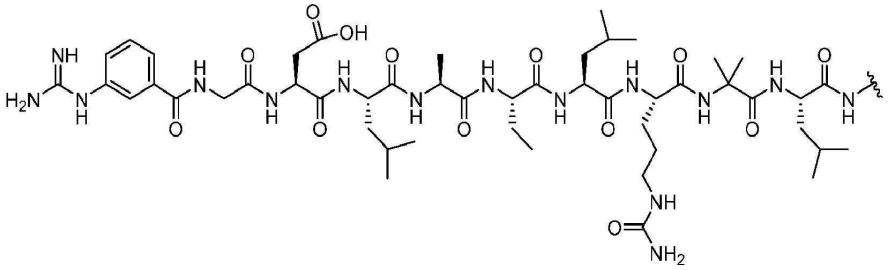
[0037] 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염이고



[0038]

[0039] 여기서 은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

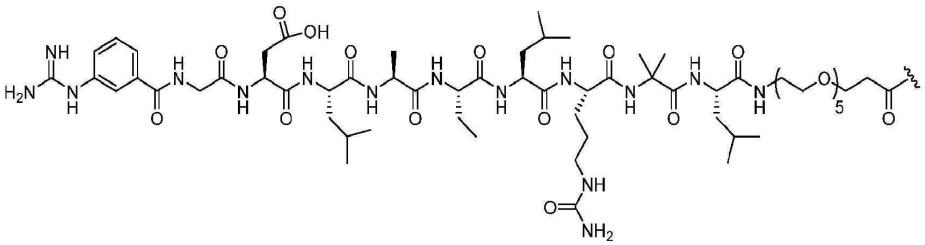
[0040] 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염이고



[0041]

[0042] 여기서 은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0043] 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염이고

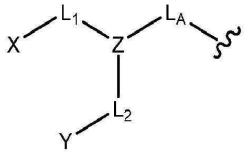


[0044]

[0045] 여기서 은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0046] 일부 실시양태에서, PK/PD 조정제는 적어도 1개의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, PK/PD 조정제는 적어도 10개의 PEG 단위를 포함한다.

[0047] 일부 실시양태에서, PK/PD 조정제는 하기 화학식 (I) 또는 그의 제약상 허용되는 염인 PK/PD 조정제이고



(I)

[0048]

[0049] 여기서 L_A는 결합, 또는 Z를 RNAi 작용제에 연결하는 2가 모이어티이고; Z는 CH, 페닐, 또는 N이고; L_1 및 L_2는 각각 독립적으로 적어도 약 5개의 PEG 단위를 포함하는 링커이고; X 및 Y는 각각 독립적으로 약 10 내지 약 50

개의 탄소 원자를 포함하는 지질이고; ≋은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0050] 일부 실시양태에서, L_1 및 L_2는 각각 독립적으로 약 15 내지 약 100개의 PEG 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, L_1 및 L_2는 각각 독립적으로 약 20 내지 약 60개의 PEG 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, L_1 및 L_2는 각각 독립적으로 약 20 내지 약 30개의 PEG 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, L_1 및 L_2는 각각 독립적으로 약 40 내지 약 60개의 PEG 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, L_1 및 L_2 중 하나는 약 20 내지 약 30개의 PEG 단위를 포함하고, 다른 하나는 약 40 내지 약 60개의 PEG 단위를 포함한다. 각각의 L_1 및 L_2는 독립적으로 표 2에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

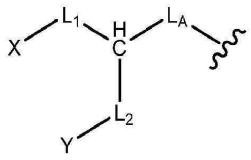
[0051] 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 불포화 지질이다. 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 포화 지질이다. 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 분지형 지질이다. 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 직쇄 지질이다. 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 약 10 내지 약 25개의 탄소 원자를 포함하는 지질이다. 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 콜레스테릴이다. 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 표 4에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 독립적으로 표 4에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0052] 일부 실시양태에서, L_A는 표 5에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0053] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제는 골격근 세포에서 인간 유전자의 mRNA의 발현을 억제한다.

[0054] 일부 실시양태에서, 제약상 허용되는 염은 나트륨 염이다. 일부 실시양태에서, 제약상 허용되는 염은 칼륨 염이다.

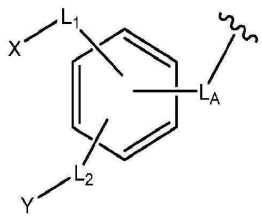
[0055] 일부 실시양태에서, PK/PD 조정제는 하기 화학식 (Ia)의 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염이고

[0056] 

(Ia)

[0057] 여기서 L_A, L_1, L_2, X 및 Y는 화학식 (I)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같고; ≋은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

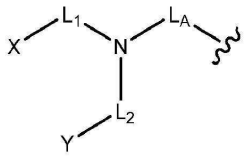
[0058] 일부 실시양태에서, PK/PD 조정제는 하기 화학식 (Ib)의 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염이고

[0059] 

(Ib)

[0060] 여기서 L_A, L_1, L_2, X 및 Y는 화학식 (I) 또는 (Ia)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같고, ≋은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0061] 일부 실시양태에서, PK/PD 조정제는 하기 화학식 (Ic)의 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염이고



(Ic)

[0062]

[0063] 여기서 L_A, L_1, L_2, X 및 Y는 화학식 (I), (Ia) 또는 (Ib)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같고, 은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0064] 일부 실시양태에서, PK/PD 조정제는 표 15에서 확인되는 지질 PK/PD 조정제로 이루어진 군으로부터 선택된 PK/PD 조정제이다. 일부 실시양태에서, PK/PD 조정제는 표 17에서 확인되는 지질 PK/PD 조정제로 이루어진 군으로부터 선택된 PK/PD 조정제이다.

[0065] 본 발명의 또 다른 측면은 전달 비히클 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0066] 본 발명의 또 다른 측면은 대상체에서 골격근 세포의 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0067] 본 발명은 또한 전달 비히클 또는 그의 제약상 허용되는 염을 합성하는 방법을 제공한다.

[0068] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 등가인 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질은 하기 기재된다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 및 다른 참고문헌은 그 전문이 참조로 포함된다. 상충되는 경우, 정의를 포함한 본 명세서가 우선할 것이다. 또한, 물질, 방법 및 예는 단지 예시적이며, 제한적인 것으로 의도되지 않는다.

[0069] 본 발명의 다른 목적, 특색, 측면 및 이점은 하기 상세한 설명, 첨부 도면 및 청구범위로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0070] 하기 도면은 예로서 제공되며, 청구된 발명의 범주를 제한하도록 의도되지 않는다.

도 1은 실시예 8에 따른 혈청 중 평균 상대 마우스 미오스타틴 단백질의 표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 정의

[0072] 본원에 사용된 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "폴리뉴클레오티드"는 각각 독립적으로 변형되거나 또는 비변형될 수 있는 연결된 뉴클레오시드의 중합체를 의미한다.

[0073] 본원에 사용된 "RNAi 작용제" ("RNAi 촉발제"로도 지칭됨)는 서열 특이적 방식으로 표적 메신저 mRNA (mRNA)의 mRNA 전사체를 분해하거나 또는 그의 번역을 억제할 수 있는 (예를 들어, 적절한 조건 하에 그를 분해하거나 또는 그의 번역을 억제하는) RNA 또는 RNA-유사 (예를 들어, 화학적으로 변형된 RNA) 올리고뉴클레오티드 분자를 함유하는 조성물을 의미한다. 본원에 사용된 RNAi 작용제는 RNA 간섭 메카니즘 (즉, 포유동물 세포의 RNA 간섭 경로 기구 (RNA-유도된 침묵 복합체 또는 RISC)와의 상호작용을 통해 RNA 간섭을 유도함)을 통해, 또는 임의의 대안적 메카니즘(들) 또는 경로(들)에 의해 작동할 수 있다. RNAi 작용제는, 그 용어가 본원에 사용된 바와 같이, 주로 RNA 간섭 메카니즘을 통해 작동하는 것으로 여겨지지만, 개시된 RNAi 작용제는 임의의 특정한 경로 또는 작용 메카니즘에 의해 구속되거나 또는 이에 제한되지 않는다. 본원에 개시된 RNAi 작용제는 센스 가닥 및 안티센스 가닥으로 구성되고, 짧은 (또는 작은) 간섭 RNA (siRNA), 이중 가닥 RNA (dsRNA), 마이크로 RNA (miRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 및 다이서 기질을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본원에 기재된 RNAi 작용제의 안티센스 가닥은 표적화되는 mRNA에 적어도 부분적으로 상보적이다. RNAi 작용제는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드 및/또는 하나 이상의 비-포스포디에스테르 연결을 포함할 수 있다.

[0074] 본원에 사용된 용어 "침묵시키다", "감소시키다", "억제하다", "하향-조절하다" 또는 "녹다운시키다"는 주어진 유전자의 발현을 지칭하는 경우, 유전자가 전사되는 세포, 세포 군, 조직, 기관 또는 대상체에서 유전자로부터 전사된 RNA의 수준 또는 mRNA로부터 번역된 폴리펩티드, 단백질 또는 단백질 서브유닛의 수준에 의해 측정된 바와 같은 유전자 발현이, 세포, 세포 군, 조직, 기관 또는 대상체가 본원에 기재된 RNAi 작용제로 처리될 때 그렇게 처리되지 않은 제2 세포, 세포 군, 조직, 기관 또는 대상체와 비교하여 감소된다는 것을 의미한다.

[0075] 본원에 사용된 용어 "서열" 및 "뉴클레오티드 서열"은 표준 명명법을 사용하여 일련의 문자로 기재된 핵염기 또는 뉴클레오티드의 연속 또는 순서를 의미한다.

[0076] 본원에 사용된 "염기", "뉴클레오티드 염기" 또는 "핵염기"는 뉴클레오티드의 성분인 헤테로시클릭 피리미딘 또는 퓨린 화합물이고, 1차 퓨린 염기인 아데닌 및 구아닌, 및 1차 피리미딘 염기인 시토신, 티민 및 우라실을 포함한다. 핵염기는 비제한적으로 범용 염기, 소수성 염기, 혼재성 염기, 크기-확장 염기, 및 플루오린화 염기를 포함하도록 추가로 변형될 수 있다. (예를 들어, 문헌 [Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008] 참조). 이러한 변형된 핵염기 (변형된 핵염기를 포함하는 포스포르아미다이트 화합물 포함)의 합성은 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0077] 본원에 사용되고 달리 나타내지 않는 한, 용어 "상보적"은, 제1 핵염기 또는 뉴클레오티드 서열 (예를 들어, RNAi 작용제 센스 가닥 또는 표적화된 mRNA)을 제2 핵염기 또는 뉴클레오티드 서열 (예를 들어, RNAi 작용제 안티센스 가닥 또는 단일-가닥 안티센스 올리고뉴클레오티드)과 관련하여 기재하는 데 사용되는 경우, 제1 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드가 특정 표준 조건 하에 제2 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드와 혼성화 (포유동물의 생리학적 조건 (또는 시험관내 유사한 조건) 하에 염기 쌍 수소 결합을 형성)하고 듀플렉스 또는 이중 나선 구조를 형성하는 능력을 의미한다. 적어도 상기 혼성화 요건이 충족되는 한, 상보적 서열은 왓슨-크릭 염기 쌍 또는 비-왓슨-크릭 염기 쌍을 포함하고, 천연 또는 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 모방체를 포함한다. 서열 동일성 또는 상보성은 변형과 독립적이다. 예를 들어, 본원에 정의된 바와 같은 a 및 Af는 U (또는 T)에 상보적이고, 동일성 또는 상보성을 결정할 목적으로 A와 동일하다.

[0078] 본원에 사용된 "완벽하게 상보적" 또는 "완전히 상보적"은 핵염기 또는 뉴클레오티드 서열 분자의 혼성화된 쌍에서, 제1 올리고뉴클레오티드의 인접 서열 내의 모든 (100%) 염기가 제2 올리고뉴클레오티드의 인접 서열 내의 동일한 수의 염기와 혼성화할 것임을 의미한다. 인접 서열은 제1 또는 제2 뉴클레오티드 서열의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다.

[0079] 본원에 사용된 "부분적으로 상보적"은 핵염기 또는 뉴클레오티드 서열 분자의 혼성화된 쌍에서, 제1 올리고뉴클레오티드의 인접 서열 내의 염기 모두가 아닌 적어도 70%가 제2 올리고뉴클레오티드의 인접 서열 내의 동일한 수의 염기와 혼성화할 것임을 의미한다. 인접 서열은 제1 또는 제2 뉴클레오티드 서열의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다.

[0080] 본원에 사용된 "실질적으로 상보적"은 핵염기 또는 뉴클레오티드 서열 분자의 혼성화된 쌍에서, 제1 올리고뉴클레오티드의 인접 서열 내의 염기 모두가 아닌 적어도 85%가 제2 올리고뉴클레오티드의 인접 서열 내의 동일한 수의 염기와 혼성화할 것임을 의미한다. 인접 서열은 제1 또는 제2 뉴클레오티드 서열의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다.

[0081] 본원에 사용된 용어 "상보적", "완전히 상보적", "부분적으로 상보적" 및 "실질적으로 상보적"은 RNAi 작용제의 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이, 또는 RNAi 작용제의 안티센스 가닥과 표적 mRNA의 서열 사이의 핵염기 또는 뉴클레오티드 매칭과 관련하여 사용된다.

[0082] 본원에 사용된 "올리고뉴클레오티드-기반 작용제"는 약 10-50개 (예를 들어, 10 내지 48, 10 내지 46, 10 내지 44, 10 내지 42, 10 내지 40, 10 내지 38, 10 내지 36, 10 내지 34, 10 내지 32, 10 내지 30, 10 내지 28, 10 내지 26, 10 내지 24, 10 내지 22, 10 내지 20, 10 내지 18, 10 내지 16, 10 내지 14, 10 내지 12, 12 내지 50, 12 내지 48, 12 내지 46, 12 내지 44, 12 내지 42, 12 내지 40, 12 내지 38, 12 내지 36, 12 내지 34, 12 내지 32, 12 내지 30, 12 내지 28, 12 내지 26, 12 내지 24, 12 내지 22, 12 내지 20, 12 내지 18, 12 내지 16, 12 내지 14, 14 내지 50, 14 내지 48, 14 내지 46, 14 내지 44, 14 내지 42, 14 내지 40, 14 내지 38, 14 내지 36, 14 내지 34, 14 내지 32, 14 내지 30, 14 내지 28, 14 내지 26, 14 내지 24, 14 내지 22, 14 내지 20, 14 내지 18, 14 내지 16, 16 내지 50, 16 내지 48, 16 내지 46, 16 내지 44, 16 내지 42, 16 내지 40, 16 내지 38, 16 내지 36, 16 내지 34, 16 내지 32, 16 내지 30, 16 내지 28, 16 내지 26, 16 내지 24, 16 내지

22, 16 내지 20, 16 내지 18, 18 내지 50, 18 내지 48, 18 내지 46, 18 내지 44, 18 내지 42, 18 내지 40, 18 내지 38, 18 내지 36, 18 내지 34, 18 내지 32, 18 내지 30, 18 내지 28, 18 내지 26, 18 내지 24, 18 내지 22, 18 내지 20, 20 내지 50, 20 내지 48, 20 내지 46, 20 내지 44, 20 내지 42, 20 내지 40, 20 내지 38, 20 내지 36, 20 내지 34, 20 내지 32, 20 내지 30, 20 내지 28, 20 내지 26, 20 내지 24, 20 내지 22, 22 내지 50, 22 내지 48, 22 내지 46, 22 내지 44, 22 내지 42, 22 내지 40, 22 내지 38, 22 내지 36, 22 내지 34, 22 내지 32, 22 내지 30, 22 내지 28, 22 내지 26, 22 내지 24, 24 내지 50, 24 내지 48, 24 내지 46, 24 내지 44, 24 내지 42, 24 내지 40, 24 내지 38, 24 내지 36, 24 내지 34, 24 내지 32, 24 내지 30, 24 내지 28, 24 내지 26, 26 내지 50, 26 내지 48, 26 내지 46, 26 내지 44, 26 내지 42, 26 내지 40, 26 내지 38, 26 내지 36, 26 내지 34, 26 내지 32, 26 내지 30, 26 내지 28, 28 내지 50, 28 내지 48, 28 내지 46, 28 내지 44, 28 내지 42, 28 내지 40, 28 내지 38, 28 내지 36, 28 내지 34, 28 내지 32, 내지 28 내지 30, 30 내지 50, 30 내지 48, 30 내지 46, 30 내지 44, 30 내지 42, 30 내지 40, 30 내지 38, 30 내지 36, 30 내지 34, 30 내지 32, 32 내지 50, 32 내지 48, 32 내지 46, 32 내지 44, 32 내지 42, 32 내지 40, 32 내지 38, 32 내지 36, 32 내지 34, 34 내지 50, 34 내지 48, 34 내지 46, 34 내지 44, 34 내지 42, 34 내지 40, 34 내지 38, 34 내지 36, 36 내지 50, 36 내지 48, 36 내지 46, 36 내지 44, 36 내지 42, 36 내지 40, 36 내지 38, 38 내지 50, 38 내지 48, 38 내지 46, 38 내지 44, 38 내지 42, 38 내지 40, 40 내지 50, 40 내지 48, 40 내지 46, 40 내지 44, 40 내지 42, 42 내지 50, 42 내지 48, 42 내지 46, 42 내지 44, 44 내지 50, 44 내지 48, 44 내지 46, 46 내지 50, 46 내지 48, 또는 48 내지 50개)의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 염기 쌍을 함유하는 뉴클레오티드 서열이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드-기반 작용제는 세포 내의 발현된 표적 핵산 또는 표적 유전자 내의 코딩 서열에 적어도 부분적으로 상보적인 핵염기 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드-기반 작용제는 유전자를 발현하는 세포에 전달 시 기저 유전자의 발현을 억제할 수 있고, 본원에서 "발현-억제 올리고뉴클레오티드-기반 작용제"로 지칭된다. 유전자 발현은 시험관내 또는 생체내에서 억제될 수 있다.

[0083] "올리고뉴클레오티드-기반 작용제"는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드, 단일-가닥 안티센스 올리고뉴클레오티드, 짧은 간섭 RNA (siRNA), 이중-가닥 RNA (dsRNA), 마이크로 RNA (miRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 리보자임, 간섭 RNA 분자 및 다이서 기질을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드-기반 작용제는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드, 예컨대 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드-기반 작용제는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드-기반 작용제는 RNAi 작용제인 이중-가닥 올리고뉴클레오티드이다.

[0084] 본원에 사용된 용어 "표준 아미노산"은 하기 20개의 아미노산을 지칭한다: 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산 (아스파르테이트), 시스테인, 글루타민, 글루탐산 (글루타메이트), 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린.

[0085] 본원에 사용된 용어 "비-표준 아미노산"은 본원에 정의된 바와 같은 "표준 아미노산" 이외의 아미노산을 지칭한다. "비-표준 아미노산"은 셀레노시스테인, 피롤리신, N-포르밀메티오닌, 히드록시프롤린, 셀레노메티오닌, α-아미노-이소부티르산 (Aib), L-α-아미노-부티르산 (Abu), α,γ-디아미노부티르산, 데히드로알라닌, 노르류신, 알로이소류신, t-류신, α-아미노-n-헵탄산, α,β-디아미노프로피온산, β-N-옥살릴-α,β-디아미노프로피온산, 알로트레오닌, 호모시스테인, 호모세린, β-호모-알라닌 (β3-hA), 이소발린, 노르발린 (Nva), 시트룰린 (Cit), 오미틴, α-메틸-아스파르테이트 (αMeD), α-메틸-류신 (αMeL), N-메틸 알라닌, N-메틸-글리신 ($N_{Me}G$), N-메틸 류신 ($N_{Me}L$), O-시클로헥실-알라닌 (Cha), N-에틸 알라닌, N,N-ε-디메틸 리신 ($K_{(Me)2}$), 디메틸 아르기닌 ($R_{(Me)2}$), Dap(Ac), n-알킬화 L-α 아미노산, 및 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 다른 아미노산 유사체 또는 아미노산 모방체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0086] 본원에서 사용되고 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 단위는 화학식 $-(CH_2CH_2O)-$의 반복 단위를 지칭한다. 본원에 개시된 화학 구조에서, PEG 단위는 $-(CH_2CH_2O)-$, $-(OCH_2CH_2)-$, 또는 $-(CH_2OCH_2)-$로서 도시될 수 있는 것으로 인지될 것이다. 또한, 반복 PEG 단위의 수를 나타내는 숫자가 PEG 단위를 도시하는 괄호의 어느 한 쪽에 위치할 수 있음이 이해될 것이다. 말단 PEG 단위는 원자 (예를 들어, 수소 원자) 또는 일부 다른 모이어티에 의해 말단 캡핑될 수 있음이 추가로 이해될 것이다.

[0087] 핵산 서열에 적용된 바와 같은 본원에 사용된 용어 "실질적으로 동일한" 또는 "실질적 동일성"은 뉴클레오티드 서열 (또는 뉴클레오티드 서열의 부분)이 참조 서열과 비교하여 적어도 약 85% 서열 동일성 또는 그 초과, 예를 들어 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 것을 의미한다. 서열 동일성의 백분율은 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교 윈도우에 걸쳐 비교함으로써 결정된다. 백분율은 동일한 유형의 핵산 염기가 양

쪽 서열에서 발생하는 위치의 수를 결정하여 매칭되는 위치의 수를 산출하고, 매칭되는 위치의 수를 비교 윈도우 내의 위치의 총수로 나누고, 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산된다. 본원에 개시된 발명은 본원에 개시된 것들과 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0088] 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료" 등은 대상체에서 질환의 1종 이상의 증상의 완화 또는 그의 수, 중증도 및/또는 빈도의 경감을 제공하기 위해 취해지는 방법 또는 단계를 의미한다. 본원에 사용된 "치료하다" 및 "치료"는 대상체에서 질환의 1종 이상의 증상의 수, 중증도 및/또는 빈도의 방지적 치료, 관리, 예방적 치료, 및/또는 억제 또는 감소를 포함할 수 있다.

[0089] 본원에 사용된 어구 "세포 내로 도입하는"은 RNAi 작용제를 지칭하는 경우에 RNAi 작용제를 세포 내로 기능적으로 전달하는 것을 의미한다. 어구 "기능적 전달"은 RNAi 작용제가 예상된 생물학적 활성, 예를 들어 유전자 발현의 서열-특이적 억제를 갖는 것을 가능하게 하는 방식으로 RNAi 작용제를 세포에 전달하는 것을 의미한다.

[0090] 본원에 사용된 용어 "이성질체"는 동일한 분자식을 갖지만, 그의 원자의 성질 또는 결합 순서 또는 그의 원자의 공간 배열이 상이한 화합물을 지칭한다. 그의 원자의 공간 배열이 상이한 이성질체는 "입체이성질체"로 지칭된다. 서로 거울상이 아닌 입체이성질체는 "부분입체이성질체"로 지칭되고, 비-중첩가능한 거울상인 입체이성질체는 "거울상이성질체" 또는 때때로 광학 이성질체로 지칭된다. 4개의 동일하지 않은 치환기에 결합된 탄소 원자는 "키랄 중심"으로 명명된다.

[0091] 본원에 사용된 바와 같이, 구조에서 특정한 입체형태를 갖는 것으로 구체적으로 확인되지 않는 한, 비대칭 중심이 존재하고 따라서 거울상이성질체, 부분입체이성질체 또는 다른 입체이성질체 배위를 생성하는 각각의 구조에 대해, 본원에 개시된 각각의 구조는 그의 광학적으로 순수한 및 라세미 형태를 포함한 모든 이러한 가능한 이성질체를 나타내는 것으로 의도된다. 예를 들어, 본원에 개시된 구조는 부분입체이성질체의 혼합물 뿐만 아니라 단일 입체이성질체를 포함하도록 의도된다.

[0092] 본원의 청구범위에 사용된 어구 "로 이루어진"은 청구범위에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분을 배제한다. 본원의 청구범위에서 사용될 때, 어구 "로 본질적으로 이루어진"은 청구범위의 범주를 명시된 물질 또는 단계 및 청구된 발명의 기본적이고 신규한 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것으로 제한한다.

[0093] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 개시된 화합물 및 조성물이, 화합물 또는 조성물이 위치하는 환경에 따라, 특정 원자 (예를 들어, N, O, 또는 S 원자)를 양성자화 또는 탈양성자화 상태로 가질 수 있음을 용이하게 이해하고 알 것이다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, 본원에 개시된 구조는 특정 관능기, 예컨대, 예를 들어 OH, SH, 또는 NH가 양성자화 또는 탈양성자화될 수 있음을 고려한다. 본원의 개시내용은, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 이해되는 바와 같이, 개시된 화합물 및 조성물을 환경 (예컨대, pH)에 기초한 그의 양성자화 상태와 무관하게 포괄하는 것으로 의도된다.

[0094] 본원에 사용된 용어 "지질"은 비극성 용매에 가용성인 모이어티 및 분자를 지칭한다. 용어 지질은 극성 수용성 머리기 및 소수성 꼬리를 포함하는 친양쪽성 분자를 포함한다. 지질은 천연 또는 합성 기원일 수 있다. 지질의 비제한적 예는 지방산 (예를 들어, 포화 지방산, 단일불포화 지방산 및 다중불포화 지방산), 글리세롤지질 (예를 들어, 모노아실글리세롤, 디아실글리세롤 및 트리아실글리세롤), 인지질 (예를 들어, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜콜린 및 포스파티딜세린), 스핑고지질 (예를 들어, 스핑고미엘린) 및 콜레스테롤 에스테르를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "포화 지질"은 임의의 불포화가 없는 지질을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "불포화 지질"은 적어도 하나 (1)의 불포화도를 포함하는 지질을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "분지형 지질"은 1개 초과의 선형 쇄를 포함하는 지질을 지칭하며, 여기서 각각의 선형 쇄는 적어도 1개의 다른 선형 쇄에 공유 부착된다. 본원에 사용된 용어 "직쇄 지질"은 임의의 분지화가 없는 지질을 지칭한다.

[0095] 본원에 사용된 용어 "연결된" 또는 "접합된"은 2개의 화합물 또는 분자 사이의 연결을 지칭하는 경우에 2개의 분자가 공유 결합에 의해 연결되거나 또는 비공유 결합 (예를 들어, 수소 결합 또는 이온 결합)을 통해 회합되는 것을 의미한다. 일부 예에서, 용어 "연결된" 또는 "접합된"이 비공유 결합을 통한 2개의 분자 사이의 회합을 지칭하는 경우, 2개의 상이한 분자 사이의 회합은 생리학상 허용되는 완충제 (예를 들어, 완충 염수) 중에서 1×10^{-4} M 미만 (예를 들어, 1×10^{-5} M 미만, 1×10^{-6} M 미만, 또는 1×10^{-7} M 미만)의 K_D를 갖는다. 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 용어 "연결된" 및 "접합된"은 임의의 개재 원자 또는 원자 군을 갖거나 갖지 않는 제1 화합물과 제2 화합물 사이의 연결을 지칭할 수 있다.

[0096] 본원에 사용된 연결기는 하나의 분자 또는 분자의 부분을 또 다른 내지 제2 분자 또는 분자의 제2 부분에 연결

하는 1개 이상의 원자이다. 유사하게, 관련 기술분야에 사용된 용어 스캐폴드는 때때로 연결기와 상호교환가능하게 사용된다. 연결기는 임의의 수의 원자 또는 관능기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 연결기는 임의의 생물학적 또는 제약 반응을 용이하게 하지 않을 수 있고, 단지 2개의 생물학적 활성 분자를 연결하는 역할을 할 수 있다.

[0097] 달리 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 기호  은 본원에 기재된 본 발명의 범주에 따라 임의의 기 또는 기들이 그에 연결될 수 있음을 의미한다.

[0098] 본원에 사용된 용어 "포함한"은 본원에서 어구 "포함하나 이에 제한되지는 않는"을 의미하도록 사용되고, 그와 상호교환가능하게 사용된다. 용어 "또는"은 문맥이 달리 명백하게 나타내지 않는 한, 본원에서 용어 "및/또는"을 의미하도록 사용되고, 그와 상호교환가능하게 사용된다.

[0099] 본원의 청구범위에 사용된 어구 "로 이루어진"은 청구범위에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분을 배제한다. 본원의 청구범위에서 사용될 때, 어구 "로 본질적으로 이루어진"은 청구범위의 범주를 명시된 물질 또는 단계 및 청구된 발명의 기본적이고 신규한 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것으로 제한한다.

[0100] 변형된 뉴클레오티드

[0101] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제는 1개 이상의 변형된 뉴클레오티드를 함유한다. 본원에 사용된 "변형된 뉴클레오티드"는 리보뉴클레오티드 (2'-히드록실 뉴클레오티드) 이외의 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드의 적어도 50% (예를 들어, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%)가 변형된 뉴클레오티드이다. 본원에 사용된 변형된 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 뉴클레오티드 모방체, 무염기성 뉴클레오티드 (본원에서 Ab로 표시됨), 2'-변형된 뉴클레오티드, 3' → 3' 연결 (역전) 뉴클레오티드 (본원에서 invdN, invN, invn으로 표시됨), 변형된 핵염기-포함 뉴클레오티드, 가교된 뉴클레오티드, 펩티드 핵산 (PNA), 2',3'-세코 뉴클레오티드 모방체 (비잠금 핵염기 유사체, 본원에서 N_{UNA} 또는 NUNA로 표시됨), 잠금 뉴클레오티드 (본원에서 N_{LNA} 또는 NLNA로 표시됨), 3'-O-메톡시 (2' 뉴클레오시드간 연결된) 뉴클레오티드 (본원에서 3'-OMen으로 표시됨), 2'-F-아라비노 뉴클레오티드 (본원에서 NfANA 또는 Nf_{ANA}로 표시됨), 5'-Me, 2'-플루오로 뉴클레오티드 (본원에서 5Me-Nf로 표시됨), 모르폴리노 뉴클레오티드, 비닐 포스포네이트 데옥시리보뉴클레오티드 (본원에서 vpdN으로 표시됨), 비닐 포스포네이트 함유 뉴클레오티드, 및 시클로프로필 포스포네이트 함유 뉴클레오티드 (cPrpN)를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 2'-변형된 뉴클레오티드 (즉, 5-원 당 고리의 2' 위치에 히드록실 기 이외의 기가 있는 뉴클레오티드)는 2'-O-메틸 뉴클레오티드 (본원에서 뉴클레오티드 서열에서 소문자 'n'으로 표시됨), 2'-데옥시-2'-플루오로 뉴클레오티드 (본원에서 2'-플루오로 뉴클레오티드로도 지칭되고, 본원에서 Nf로 표시됨), 2'-데옥시 뉴클레오티드 (본원에서 dN으로 표시됨), 2'-메톡시에틸 (2'-O-2-메톡시에틸) 뉴클레오티드 (본원에서 2'-MOE로도 지칭되고, 본원에서 NM으로 표시됨), 2'-아미노 뉴클레오티드, 및 2'-알킬 뉴클레오티드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 주어진 화합물 내의 모든 위치가 균일하게 변형될 필요는 없다. 반대로, 하나 초과의 변형이 단일 RNAi 작용제 또는 심지어 그의 단일 뉴클레오티드에 혼입될 수 있다. RNAi 작용제 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 합성 및/또는 변형될 수 있다. 하나의 뉴클레오티드에서의 변형은 또 다른 뉴클레오티드에서의 변형과 독립적이다.

[0102] 변형된 핵염기는 합성 및 천연 핵염기, 예컨대 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린, (예를 들어, 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실, 또는 5-프로피닐시토신), 5-메틸시토신 (5-me-C), 5-히드록시메틸 시토신, 이노신, 크산틴, 하이포크산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-알킬 (예를 들어, 6-메틸, 6-에틸, 6-이소프로필, 또는 6-n-부틸) 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-알킬 (예를 들어, 2-메틸, 2-에틸, 2-이소프로필, 또는 2-n-부틸) 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민, 2-티오시토신, 5-할로우라실, 시토신, 5-프로피닐 우라실, 5-프로피닐 시토신, 6-아조 우라실, 6-아조 시토신, 6-아조 티민, 5-우라실 (슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-술프히드릴, 8-티오알킬, 8-히드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로 (예를 들어, 5-브로모), 5-트리플루오로메틸, 및 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자아데닌, 3-데아자구아닌, 및 3-데아자아데닌을 포함한다.

[0103] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제의 모든 또는 실질적으로 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다. 본원에 사용된, 존재하는 실질적으로 모든 뉴클레오티드가 변형된 뉴클레오티드인 RNAi 작용제는 센스 가닥 및 안티

센스 가닥 둘 다에서 4개 이하 (즉, 0, 1, 2, 3, 또는 4개)의 뉴클레오티드가 리보뉴클레오티드 (즉, 비변형)인 RNAi 작용제이다. 본원에 사용된 바와 같이, 존재하는 실질적으로 모든 뉴클레오티드가 변형된 뉴클레오티드인 센스 가닥은 센스 가닥에서 2개 이하 (즉, 0, 1, 또는 2개)의 뉴클레오티드가 비변형 리보뉴클레오티드인 센스 가닥이다. 본원에 사용된 바와 같이, 존재하는 실질적으로 모든 뉴클레오티드가 변형된 뉴클레오티드인 안티센스 가닥은 센스 가닥에서 2개 이하 (즉, 0, 1, 또는 2개)의 뉴클레오티드가 비변형 리보뉴클레오티드인 안티센스 가닥이다. 일부 실시양태에서, RNAi 작용제의 1개 이상의 뉴클레오티드는 비변형 리보뉴클레오티드이다.

[0104] 변형된 뉴클레오시드간 연결

[0105] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제의 1개 이상의 뉴클레오티드는 비-표준 연결 또는 백본 (즉, 변형된 뉴클레오시드간 연결 또는 변형된 백본)에 의해 연결된다. 변형된 뉴클레오시드간 연결 또는 백본은 포스포로티오에이트기 (본원에서 소문자 "s"로 표시됨), 키랄 포스포로티오에이트, 티오포스페이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬-포스포트리에스테르, 알킬 포스포네이트 (예를 들어, 메틸 포스포네이트 또는 3'-알킬렌 포스포네이트), 키랄 포스포네이트, 포스피네이트, 포스포르아미데이트 (예를 들어, 3'-아미노 포스포르아미데이트, 아미노알킬포스포르아미데이트, 또는 티오노포스포르아미데이트), 티오노알킬-포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 모르폴리노 연결, 정상 3'-5' 연결을 갖는 보라노포스페이트, 보라노포스페이트의 2'-5' 연결된 유사체, 또는 뉴클레오시드 단위의 인접한 쌍이 3'-5'에서 5'-3'로 또는 2'-5'에서 5'-2'로 연결된 역극성을 갖는 보라노포스페이트를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오시드간 연결 또는 백본은 인 원자가 결여된다. 인 원자가 결여된 변형된 뉴클레오시드간 연결은 단쇄 알킬 또는 시클로알킬 당간 연결, 혼합된 헤테로원자 및 알킬 또는 시클로알킬 당간 연결, 또는 1개 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로시클릭 당간 연결을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오시드간 백본은 실록산 백본, 술피드 백본, 술폭시드 백본, 술폰 백본, 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본, 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본, 알켄-함유 백본, 술파메이트 백본, 메틸렌이미노 및 메틸렌히드라지노 백본, 술포네이트 및 술폰아미드 백본, 아미드 백본, 및 혼합된 N, O, S, 및 CH_2 성분을 갖는 다른 백본을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0106] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제의 센스 가닥은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 포스포로티오에이트 연결을 함유할 수 있거나, RNAi 작용제의 안티센스 가닥은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 포스포로티오에이트 연결을 함유할 수 있거나, 또는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 둘 다는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 포스포로티오에이트 연결을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, RNAi 작용제의 센스 가닥은 1, 2, 3, 또는 4개의 포스포로티오에이트 연결을 함유할 수 있거나, RNAi 작용제의 안티센스 가닥은 1, 2, 3, 또는 4개의 포스포로티오에이트 연결을 함유할 수 있거나, 또는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 둘 다는 독립적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 포스포로티오에이트 연결을 함유할 수 있다.

[0107] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제 센스 가닥은 적어도 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 함유한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결은 센스 가닥의 3' 말단으로부터 위치 1-3의 뉴클레오티드 사이에 있다. 일부 실시양태에서, 1개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결은 센스 가닥의 5' 말단에 있고, 또 다른 포스포로티오에이트 연결은 센스 가닥의 3' 말단에 있다. 일부 실시양태에서, 2개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결은 센스 가닥의 5' 말단에 위치하고, 또 다른 포스포로티오에이트 연결은 센스 가닥의 3' 말단에 있다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 뉴클레오티드 사이에 어떠한 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결도 포함하지 않지만, 5' 및 3' 말단 둘 다 상의 말단 뉴클레오티드와 임의로 존재하는 역전된 무염기성 잔기 말단 캡 사이에 1, 2 또는 3개의 포스포로티오에이트 연결을 함유한다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 포스포로티오에이트 연결을 통해 센스 가닥에 연결된다.

[0108] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제 안티센스 가닥은 4개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 함유한다. 일부 실시양태에서, 4개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결은 안티센스 가닥의 5' 말단으로부터 위치 1-3의 뉴클레오티드 사이 및 5' 단부로부터 위치 19-21, 20-22, 21-23, 22-24, 23-25, 또는 24-26의 뉴클레오티드 사이에 있다. 일부 실시양태에서, 3개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결은 안티센스 가닥의 5' 말단으로부터 위치 1-4 사이에 위치하고, 제4 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결은 안티센스 가닥의 5' 말단으로부터 위치 20-21 사이에 위치한다. 일부 실시양태에서, RNAi 작용제는 안티센스 가닥 내에 대해 적어도 3 또는 4개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 함유한다.

[0109] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제는 1개 이상의 변형된 뉴클레오티드 및 1개 이상의 변형된 뉴클레오시드간 연결을 함유한다. 일부 실시양태에서, 2'-변형된 뉴클레오시드는 변형된 뉴클레오시드간 연결과 조합된다.

[0110] 표적화 리간드 및 표적화 기

[0111] 표적화 기 또는 표적화 모이어티는 이들이 부착되어 있는 접합체 또는 RNAi 작용제의 약동학적 또는 생체분포 특성을 증진시켜 접합체 또는 RNAi 작용제의 세포-특이적 (일부 경우에, 기관 특이적 포함) 분포 및 세포-특이적 (또는 기관 특이적) 흡수를 개선시킨다. 표적화 기는 그것이 지시되는 표적에 대해 1가, 2가, 3가, 4가일 수 있거나, 또는 보다 높은 원자가를 가질 수 있다. 대표적인 표적화 기는 비제한적으로 세포 표면 분자에 대해 친화도를 갖는 화합물, 세포 수용체 리간드, 합텐, 항체, 모노클로날 항체, 항체 단편, 및 세포 표면 분자에 대해 친화도를 갖는 항체 모방체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화 기는 링커, 예컨대 PEG 링커, 또는 일부 경우에 링커로서의 역할을 할 수 있는 1, 2 또는 3개의 무염기성 및/또는 리비톨 (무염기성 리보스) 잔기를 사용하여 RNAi 작용제에 연결된다. 일부 실시양태에서, 표적화 기는 인테그린 표적화 리간드를 포함한다.

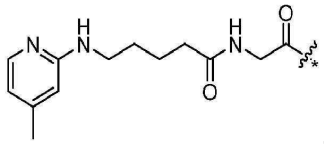
[0112] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 RNAi 작용제는 표적화 기에 접합된다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 관심 세포 상의 특정한 세포 수용체에 결합하는 RNAi 작용제의 능력을 증진시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 RNAi 작용제에 접합된 표적화 리간드는 인테그린 수용체에 대해 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 RNAi 작용제와 함께 사용하기에 적합한 표적화 리간드는 인테그린 알파-v-베타 6에 대해 친화도를 갖는다. 표적화 기는 2개 이상의 표적화 리간드를 포함한다.

[0113] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 RNAi 작용제는 화학식 (P)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는 1개 이상의 인테그린 표적화 리간드에 연결된다:

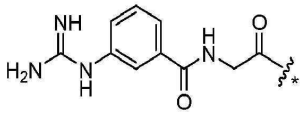
$Xaa^1G'DLXaa^2Xaa^3L\text{-}Xaa^4Xaa^5L$—≀

[0114] **(P)**

[0115] 여기서 Xaa^1은 임의로 N-말단 캡을 갖는 L-아르기닌,



, 또는



이며, 여기서 ≀은 G'에 대한 연결 지점을 나타내고; G'는 L-글리신 또는 N-메틸-L-글리신이고; D는 L-아스파르트산 (L-아스파르테이트)이고; L은 L-류신이고; Xaa^2는 L-α 아미노산, L-β 아미노산 또는 α,α-이치환된 아미노산이고; Xaa^3은 L-α 아미노산, L-β 아미노산 또는 α,α-이치환된 아미노산이고; Xaa^4는 L-α 아미노산, L-β 아미노산 또는 α,α-이치환된 아미노산이고; Xaa^5는 L-α 아미노산, L-β 아미노산 또는 α,α-이치환된 아미노산이고; ≀은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0116] 일부 실시양태에서, Xaa^2는 L-알라닌 또는 L-글리신이다. 일부 실시양태에서, Xaa^2는 L-알라닌이다. 일부 실시양태에서, Xaa^2는 L-글리신이다.

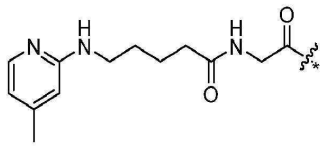
[0117] 일부 실시양태에서, Xaa^3은 비-표준 아미노산이다. 일부 실시양태에서, Xaa^3은 L-알라닌, L-글리신, L-발린, L-류신, L-이소류신 또는 L-α-아미노-부티르산이다. 일부 실시양태에서, Xaa^3은 L-α-아미노-부티르산이다. 일부 실시양태에서, Xaa^3은 L-알라닌이다. 일부 실시양태에서, Xaa^3은 L-글리신이다. 일부 실시양태에서, Xaa^3은 L-발린이다. 일부 실시양태에서, Xaa^3은 L-류신이다. 일부 실시양태에서, Xaa^3은 L-이소류신이다.

[0118] 일부 실시양태에서, Xaa^4는 L-아르기닌, L-시트룰린 또는 L-글루타민이다. 일부 실시양태에서, Xaa^4는 L-시트룰린이다. 일부 실시양태에서, Xaa^4는 L-아르기닌이다. 일부 실시양태에서, Xaa^4는 L-글루타민이다.

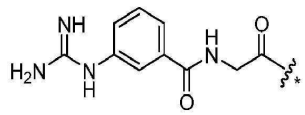
[0119] 일부 실시양태에서, Xaa^5는 L-글리신, L-알라닌, L-발린, L-류신, L-이소류신 또는 α-아미노-이소부티르산이다. 일부 실시양태에서, Xaa^5는 α-아미노-이소부티르산이다. 일부 실시양태에서, Xaa^5는 L-글리신이다. 일부 실시양태에서, Xaa^5는 L-알라닌이다. 일부 실시양태에서, Xaa^5는 L-발린이다. 일

부 실시양태에서, Xaa^5는 L-류신이다. 일부 실시양태에서, Xaa^5는 L-이소류신이다.

[0120] 일부 실시양태에서, Xaa^1은 N-아세틸-L-아르기닌이다. 일부 실시양태에서, Xaa^1은

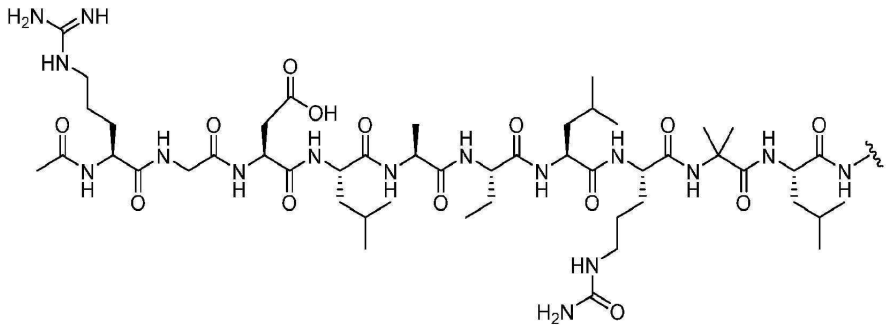


이며, 여기서 ⁎ 은 G'에 대한 연결 지점을 나타낸다. 화학식 P의 일부 실시양태에서, Xaa^1은



이며, 여기서 ⁎ 은 G'에 대한 연결 지점을 나타낸다.

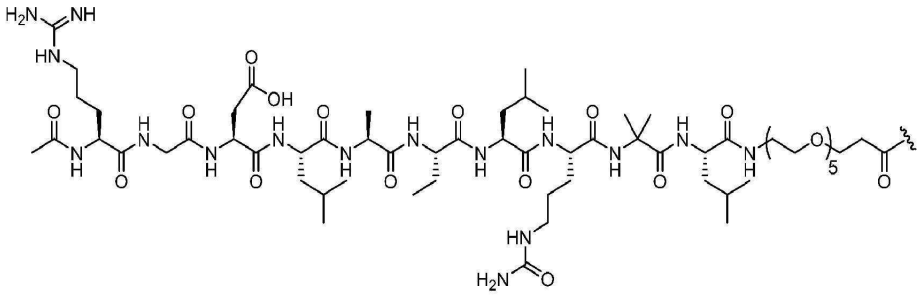
[0121] 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염이고



[0122]

[0123] 여기서 ⁎ 은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

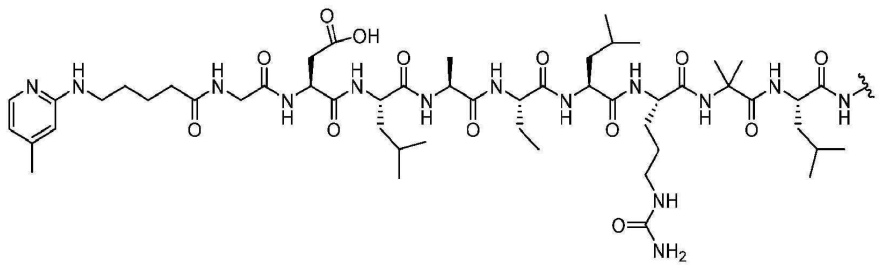
[0124] 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염이고



[0125]

[0126] 여기서 ⁎ 은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

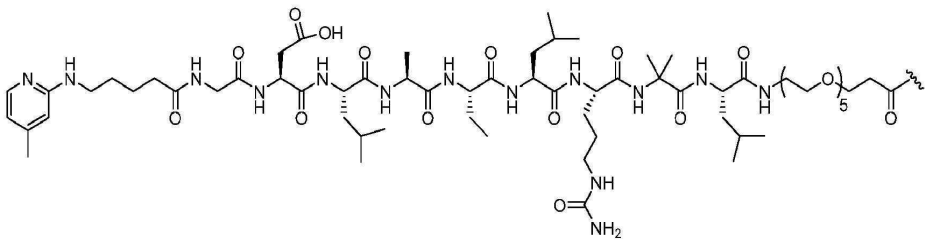
[0127] 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염이고



[0128]

[0129] 여기서 ⁎ 은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

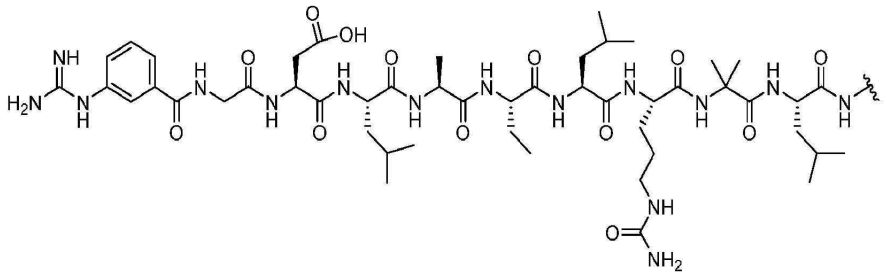
[0130] 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염이고



[0131]

[0132] 여기서 ≋은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

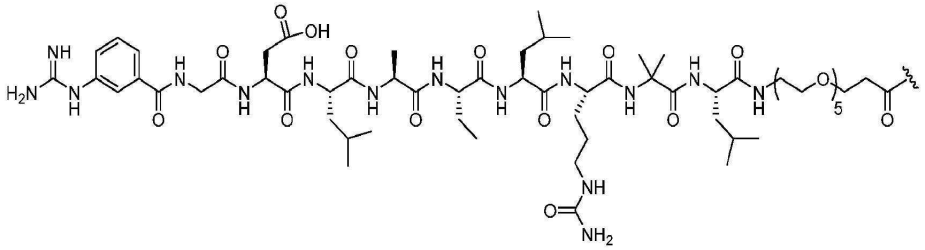
[0133] 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염이고



[0134]

[0135] 여기서 ≋은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0136] 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 하기 화학식을 갖는 것 또는 그의 제약상 허용되는 염이고



[0137]

[0138] 여기서 ≋은 전달 비히클의 나머지에 대한 연결 지점을 나타낸다.

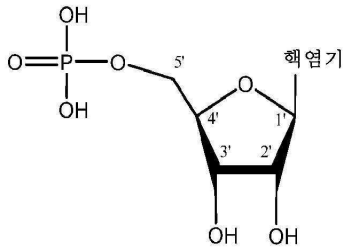
[0139] RNAi 작용제는 1개 초과의 표적화 리간드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, RNAi 작용제는 1-20개의 표적화 리간드를 포함한다. 일부 실시양태에서, RNAi 작용제는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 또는 19개의 표적화 리간드 내지 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 표적화 리간드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 RNAi 작용제의 센스 가닥의 5' 또는 3' 말단에서 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 RNAi 작용제 상의 내부 뉴클레오티드에 접합될 수 있다.

[0140] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제는 2개 이상의 표적화 리간드를 포함하는 표적화 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화 기는 RNAi 작용제의 센스 가닥의 5' 또는 3' 말단에서 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 기는 RNAi 작용제 상의 내부 뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 기는 "두자리" 표적화 기로 지칭되는, 함께 연결된 2개의 표적화 리간드로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 기는 "세자리" 표적화 기로 지칭되는, 함께 연결된 3개의 표적화 리간드로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 기는 "네자리" 표적화 기로 지칭되는, 함께 연결된 4개의 표적화 리간드로 이루어질 수 있다.

[0141] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제는 센스 가닥의 3' 또는 5' 말단에 접합된 표적화 기, 및 추가적으로 내부 뉴클레오티드에 접합된 표적화 리간드 둘 다를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서 세자리 표적화 기는 RNAi 작용

제의 센스 가닥의 5' 말단에 접합되고, 적어도 1개의 표적화 리간드는 센스 가닥의 내부 뉴클레오티드에 접합된다. 추가 실시양태에서, 세자리 표적화 기는 RNAi 작용제의 센스 가닥의 5' 말단에 접합되고, 4개의 표적화 리간드는 센스 가닥의 내부 뉴클레오티드에 접합된다.

[0142] 상기 언급된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 RNAi 작용제는 RNAi 작용제의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 내부 뉴클레오티드 상의 1개 이상의 표적화 리간드 및/또는 1개 이상의 표적화 기에 연결되어 생체내 RNAi 작용제의 전달을 용이하게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드 또는 표적화 기는 RNAi 작용제의 센스 가닥의 하나 이상의 내부 뉴클레오티드에 연결 또는 접합된다. 예를 들어, 표적화 리간드는 리보스 고리의 2' 위치, 리보스 고리의 3' 위치, 리보스 고리의 G 위치에서 개별 뉴클레오티드에, 또는 뉴클레오티드의 핵염기, 리보스 고리의 4' 위치, 뉴클레오티드의 5' 위치에, 또는 리보스 고리 상의 산소 원자에 연결될 수 있다. 하기는 탄소가 넘버링된 가설 리보스 뉴클레오티드를 도시한다:

[0143] 

[0144] 일부 실시양태에서, 내부 뉴클레오티드에 대한 하나 이상의 표적화 리간드 및/또는 표적화 기의 연결을 용이하게 하기 위해, 2'-O-프로파르길 변형된 뉴클레오티드가 뉴클레오티드 서열에 혼입된다 (예를 들어, 표 23 참조). 2'-O-프로파르길 변형된 뉴클레오티드는, 각각의 가닥의 합성 후에, 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 표준 커플링 기술을 사용하여 2' 위치에서 표적화 리간드 및/또는 표적화 기에 연결 또는 접합될 수 있다.

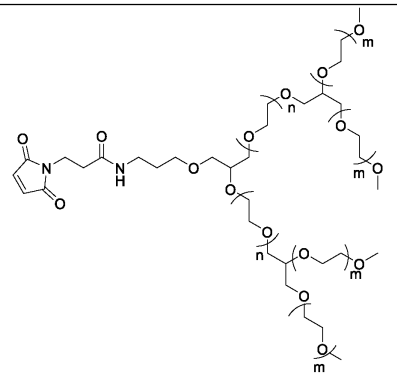
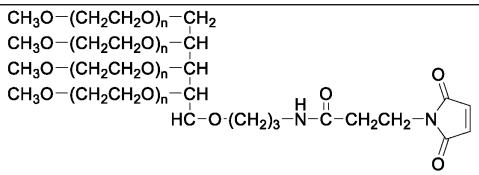
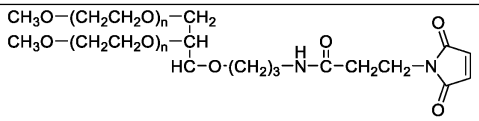
[0145] 약동학적 및/또는 약역학적 조정제

[0146] 본원에 개시된 전달 비히클은 RNAi 작용제의 목적하는 세포 또는 조직으로의 전달을 용이하게 하기 위해 RNAi 작용제에 연결된 약동학적 및/또는 약역학적 (본원에서 "PK/PD"로도 지칭됨) 조정제를 포함한다. 반응성 기, 예컨대 말레이미드 또는 아지도 기를 갖는 PK/PD 조정제 전구체를 합성하여 RNAi 작용제 상의 1개 이상의 연결기에 대한 연결을 용이하게 할 수 있다. 이러한 PK/PD 조정제 전구체를 RNAi 작용제에 연결하는 화학 반응 합성은 일반적으로 관련 기술분야에 공지되어 있다. 용어 "PK/PD 조정제" 및 "지질 PK/PD 조정제"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

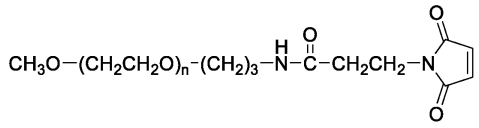
[0147] 일부 실시양태에서, PK/PD 조정제는 지방산, 지질, 알부민-결합제, 항체-결합제, 폴리에스테르, 폴리아크릴레이트, 폴리-아미노산, 및 약 20-2000개의 PEG $-(CH_2CH_2O)-$ 단위를 갖는 선형 또는 분지형 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티인 분자를 포함할 수 있다.

[0148] 표 1은 본원에 개시된 RNAi 작용제에 연결하기 위한 출발 물질로서 사용될 수 있는 특정의 예시적인 PK/PD 조정제 전구체를 나타낸다. PK/PD 조정제 전구체는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 RNAi 작용제에 공유 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 말레이미드-함유 PK/PD 조정제 전구체는 RNAi 작용제의 센스 가닥의 3' 말단에서 디술피드-함유 모이어티와 반응할 수 있다.

[0149] 표 1: RNAi 작용제에 연결하는 데 적합한 예시적인 PK/PD 조정제 전구체.

 PEG40K (2x2-아암), 여기서 n 및 m은 각각 독립적으로 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 40 킬로달톤임 NOF, 선브라이트(Sunbright) ® GL4-400MA
 PEG40K (4-아암), 여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 40 킬로달톤임 NOF, 선브라이트® XY4-400MA
 PEG40K (2-아암), 여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 40 킬로달톤임 NOF, 선브라이트® GL2-400MA

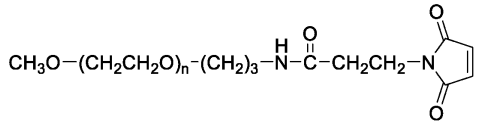
[0150]



PEG40K,

여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 40 킬로달톤임

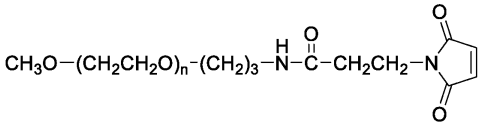
NOF, 선브라이트® ME-400MA



PEG10K,

여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 10 킬로달톤임

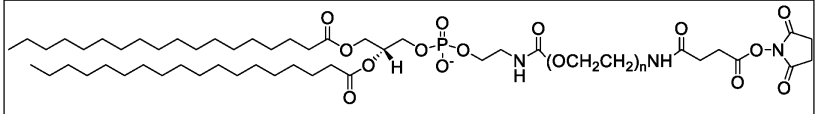
NOF, 선브라이트® ME-100MA



PEG5K,

여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 5 킬로달톤임

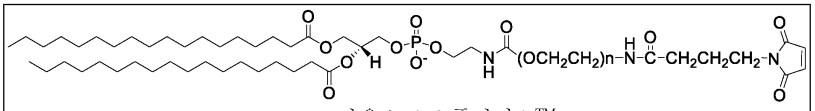
NOF, 선브라이트® ME-050MA



DSPE-PEG5K-NHS (나온소프트 폴리머스(Naonsoft Polymers)™ #SKU 1544)

(1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[숙신이미딜(폴리에틸렌 글리콜)]), 여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 5 킬로달톤임

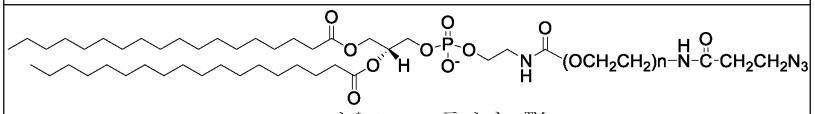
[0151]



DSPE-PEG5K-MAL (나온소프트 폴리머스™ SKU #2049)

1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[말레이미드(폴리에틸렌 글리콜)],

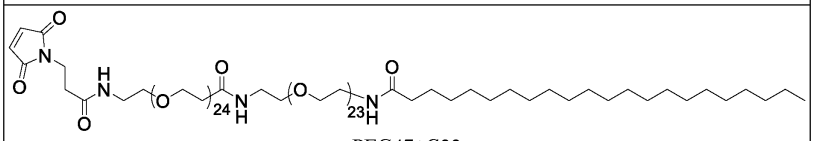
여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 5 킬로달톤임



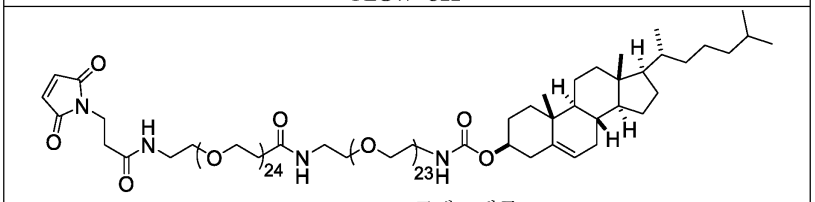
DSPE-PEG5K-N3 (나온소프트 폴리머스™ SKU #2274)

1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아지도(폴리에틸렌 글리콜)],

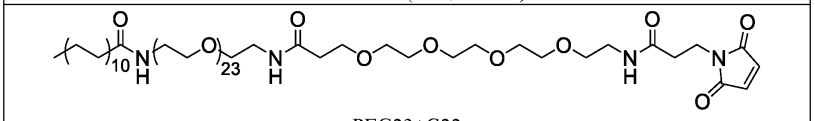
여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 5 킬로달톤임



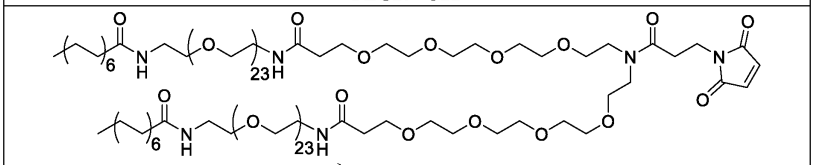
PEG47+C22



PEG47+CLS (콜레스테롤)



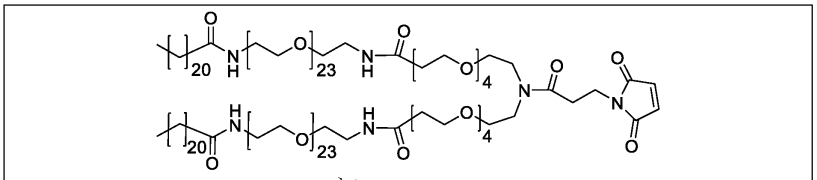
PEG23+C22



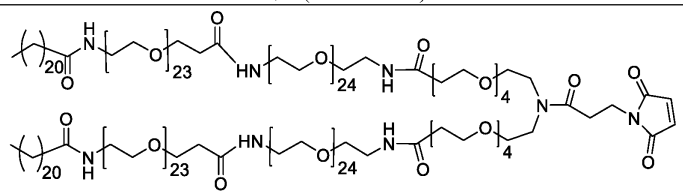
비스(PEG23+C14)

[0152]

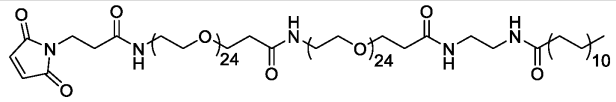
[0153]



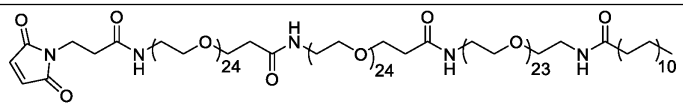
비스(PEG23+C22)



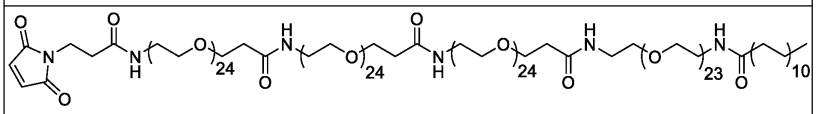
비스(PEG47+C22)



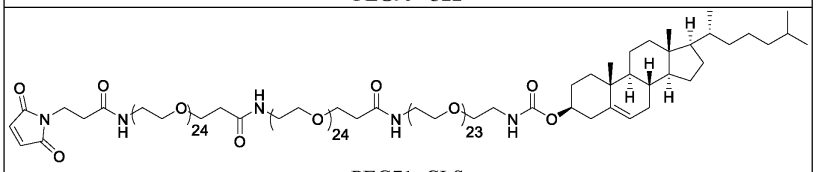
PEG48+C22



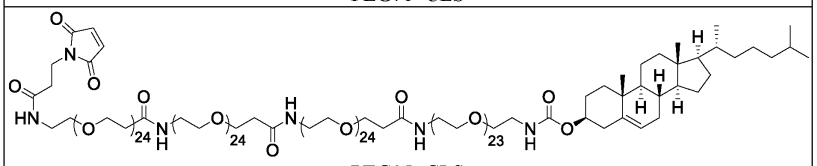
PEG71+C22



PEG95+C22

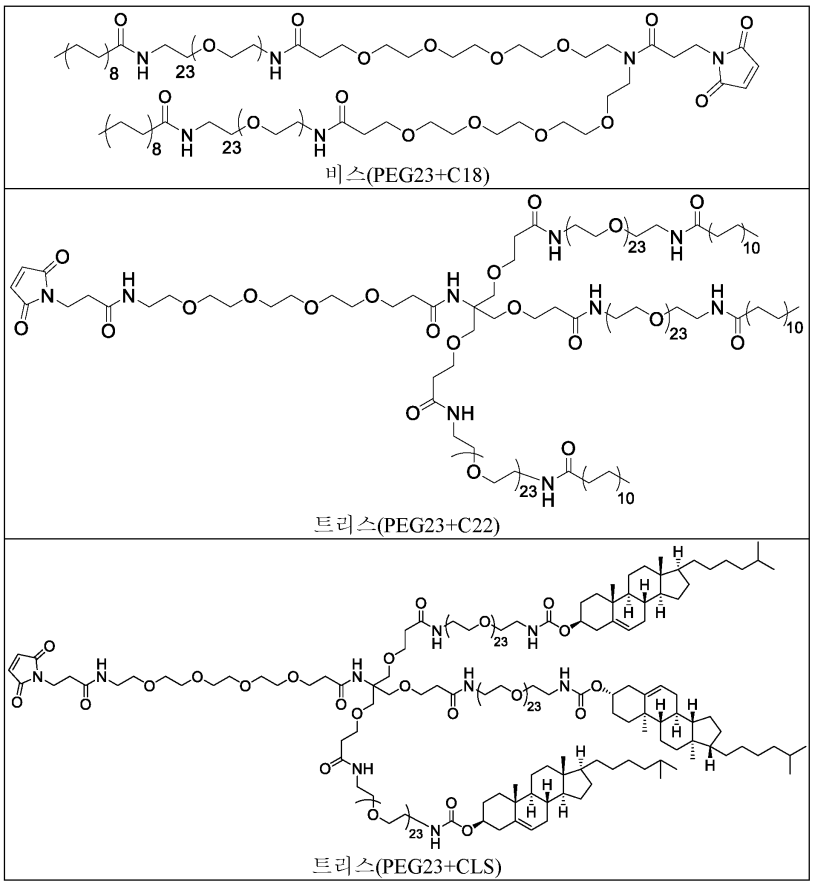


PEG71+CLS

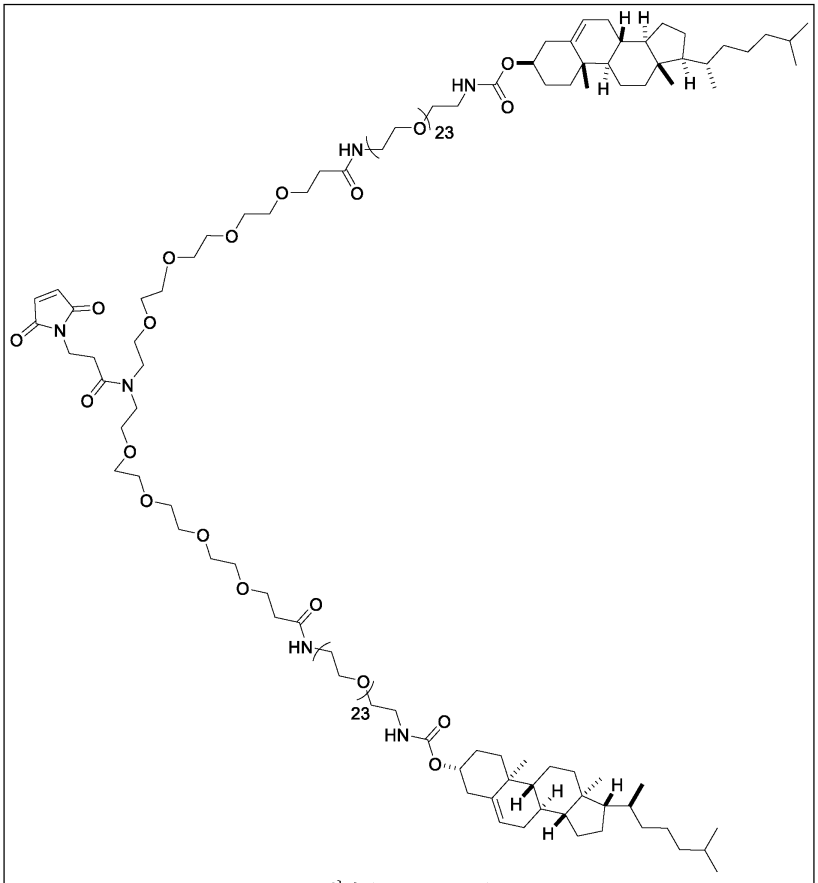


PEG95+CLS

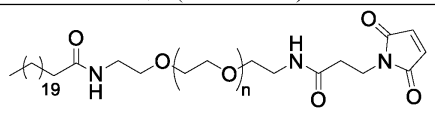
[0154]



[0155]

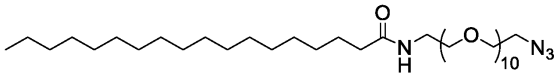


비스(PEG23+CLS)

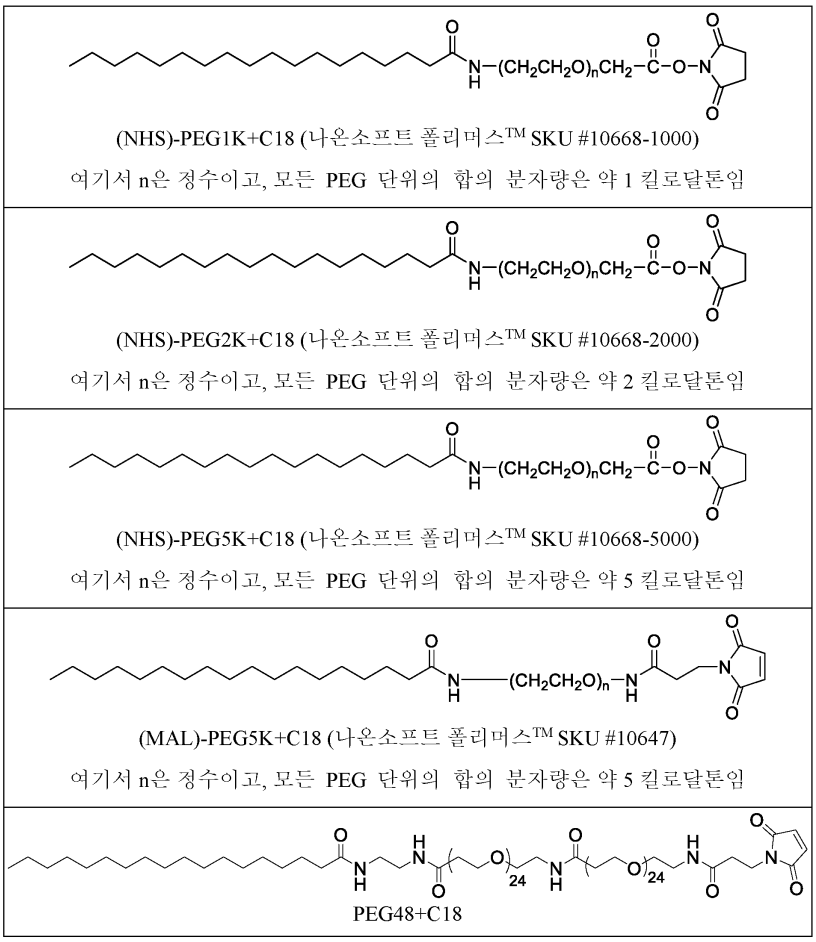


PEG5K+C22

여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 5 킬로달톤임

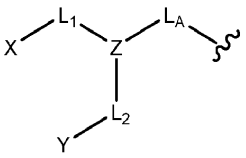


C18



[0156]

[0157] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제는 화학식 (I)의 지질 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염에 접합될 수 있다:



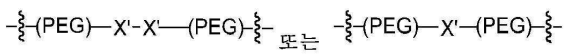
(I)

[0158]

[0159] 여기서 L_A는 결합이거나, 또는 Z를 RNAi 작용제에 연결하는 2가 모이어티이고; Z는 CH, 페닐, 또는 N이고; L_1 및 L_2는 각각 독립적으로 적어도 약 5개의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 단위를 포함하는 링커이고; X 및 Y는 각각 독립적으로 약 10 내지 약 50개의 탄소 원자를 포함하는 지질이고; ≀은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0160] 일부 실시양태에서, L_1 및 L_2는 각각 독립적으로 약 15 내지 약 100개의 PEG 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, L_1 및 L_2는 각각 독립적으로 약 20 내지 약 60개의 PEG 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, L_1 및 L_2는 각각 독립적으로 약 20 내지 약 30개의 PEG 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, L_1 및 L_2는 각각 독립적으로 약 40 내지 약 60개의 PEG 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, L_1 및 L_2 중 하나는 약 20 내지 약 30개의 PEG 단위를 포함하고, 다른 하나는 약 40 내지 약 60개의 PEG 단위를 포함한다. 예를 들어, L_1 및 L_2는 각각 독립적으로 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78,

79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100개의 PEG 단위를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 L_1 및 L_2는 링커 내의 2개의 PEG 단위를 연결하는 하나 이상의 추가의 2가 모이어티 (예를 들어, -C(O)-, -N(H)-, -N(H)-C(O)-, -C(O)-N(H)-, $-S(O)_2-$, -S-, 및 PEG이 아닌 다른 2가 모이어티)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예를 들어, 각각의 L_1 및 L_2는 구조

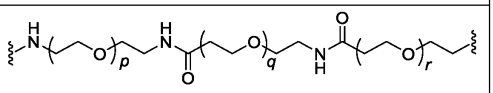
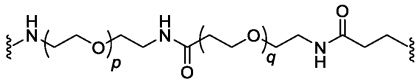
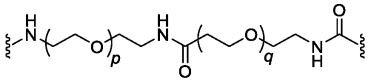
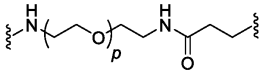
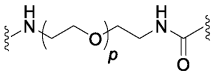
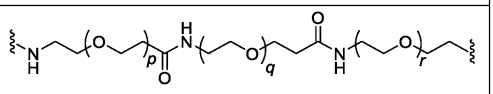
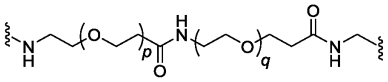
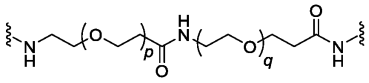
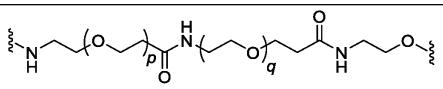
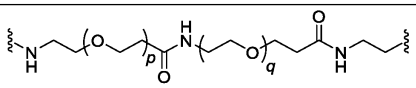
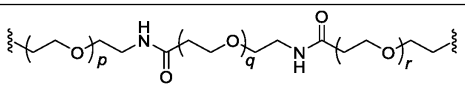
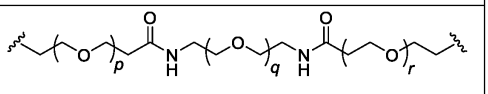


또는

을 포함하며, 여기서 각각의 X'는 독립적으로 PEG 단위 이외의 2가 모이어티이고, 각각의 PEG는 PEG 단위이다.

[0161] 일부 실시양태에서, 각각의 L_1 및 L_2는 표 2에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0162] 표 2: 본 발명의 예시적인 L_1 및 L_2 모이어티.

명칭	구조
링커 1	
링커 2	
링커 3	
링커 4	
링커 5	
링커 6	
링커 7	
링커 8	
링커 9	
링커 10	
링커 11	
링커 12	

[0163]

[0164] 여기서 각각의 p는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30이고; 각각의 q는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30이고; 각각의 r은 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고; 각각의 은 X, Y 또는 Z에 대한 연결 지점을 나타내고, 단:

[0165] (i) 링커 1, 6, 및 11에서, p + q + r ≥ 5이고;

[0166] (ii) 링커 2, 3, 7, 8, 9 및 10에서, p + q ≥ 5이고;

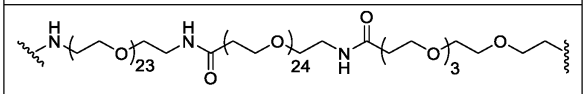
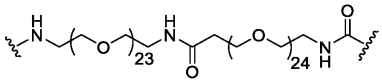
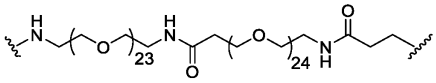
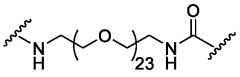
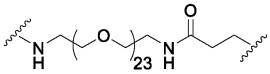
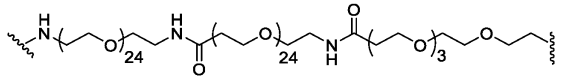
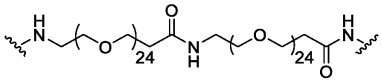
[0167] (iii) 링커 4 및 5에서 p ≥ 5이다.

[0168] 일부 실시양태에서, 각각의 p는 독립적으로 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25이고; 각각의 q는 독립적으로 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25이고; 각각의 r은 독립적으로 2, 3, 4, 5, 또는 6이다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 독립적으로 23 또는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 독립적으로 23 또는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 r은 4이다.

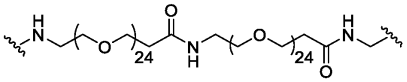
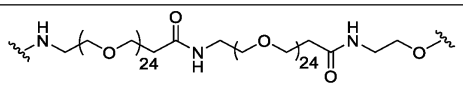
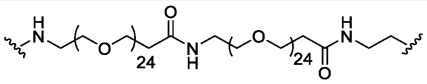
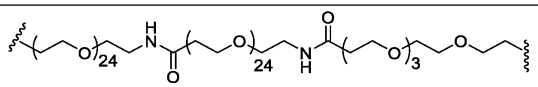
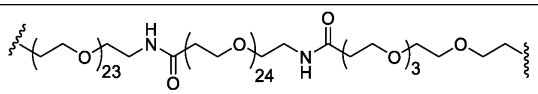
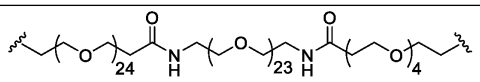
[0169] 일부 실시양태에서, 각각의 L_1 및 L_2는 표 3에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0170] 표 3: 본 발명의 예시적인 L_1 및 L_2 모이어티.

[0171]

구조








[0172]

구조







[0173] 여기서 은 X, Y 또는 Z에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0174] 일부 실시양태에서, L_1 및 L_2는 동일하다. 다른 실시양태에서, L_1 및 L_2는 상이하다.

[0175] 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 불포화 지질이다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 불포화 지질이다. 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 포화 지질이다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 포화 지질이다. 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 분지형 지질이다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 분지형 지질이다. 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 직쇄 지질이다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 직쇄 지질이다. 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 콜레스테릴이다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 콜레스테릴이다. 일부 실시양태에서, X 및 Y는 동일하다. 다른 실시양태에서, X 및 Y는 상이하다.

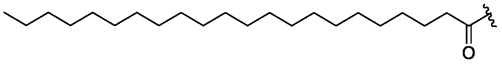
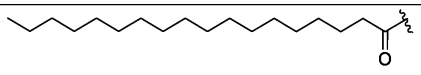
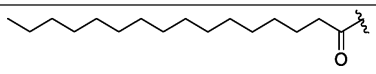
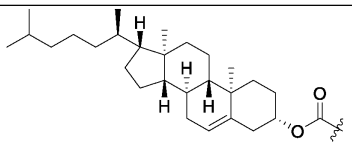
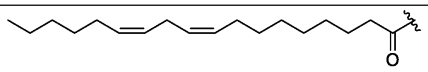
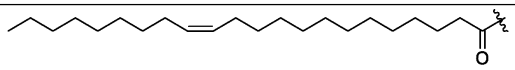
[0176] 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 약 10 내지 약 45개의 탄소 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 약 10 내지 약 40개의 탄소 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 약 10 내지 약 35개의 탄소 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 약 10 내지 약 30개의 탄소 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, X 중 적어도 하나는 약 10 내지 약 25개의 탄소 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 약 10 내지 약 20개의 탄소 원자를 포함한다.

[0177] 일부 실시양태에서, X 및 Y는 각각 독립적으로 약 10 내지 약 45개의 탄소 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, X 및 Y는 각각 독립적으로 약 10 내지 약 40개의 탄소 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, X 및 Y는 각각 독립적으로 약 10 내지 약 35개의 탄소 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, X 및 Y는 각각 독립적으로 약 10 내지 약 30개의 탄소 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, X 및 Y는 각각 독립적으로 약 10 내지 약 25개의 탄소 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, X 및 Y는 각각 독립적으로 약 10 내지 약 20개의 탄소 원자를 포함한다. 예를 들어, X 및 Y는 각각 독립적으로 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

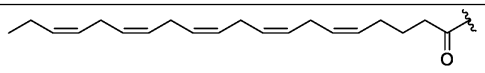
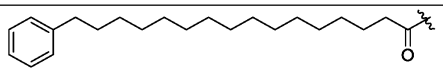
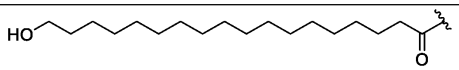
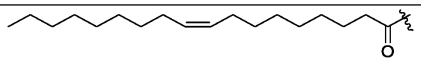
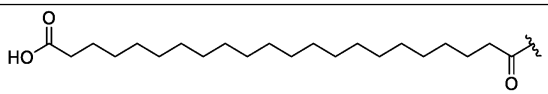
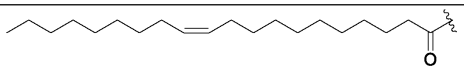
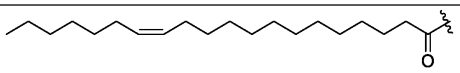
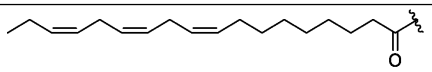
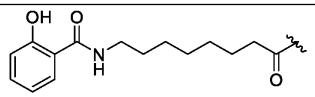
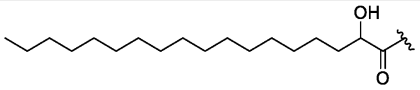
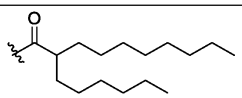
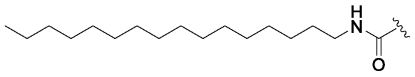
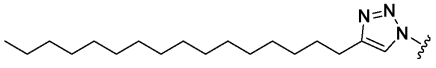
[0178] 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 표 4에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 독립적으로 표 4에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0179] 표 4: 본 발명의 예시적인 X 및 Y 모이어티.

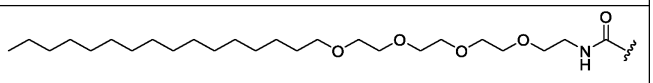
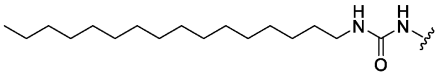
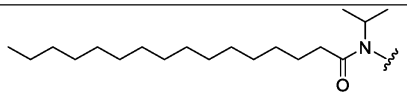
[0180]

명칭	구조
지질 1	
지질 2	
지질 3	
지질 4 (콜레스테릴)	
지질 5	
지질 6	

[0181]

명칭	구조
지질 7	
지질 8	
지질 9	
지질 10	
지질 11	
지질 12	
지질 14	
지질 15	
지질 16	
지질 17	
지질 18	
지질 19	
지질 20	
지질 21	

[0182]

명칭	구조
지질 22	
지질 23	
지질 24	

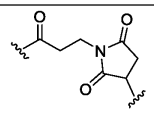
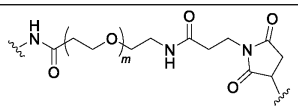
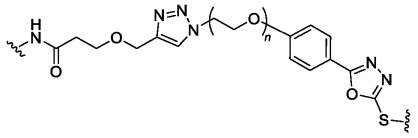
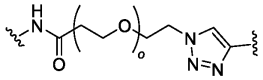
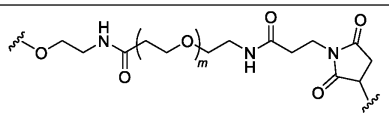
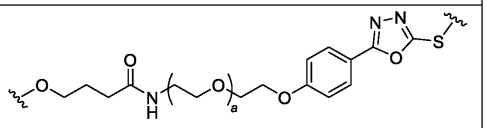
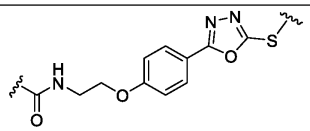
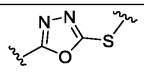
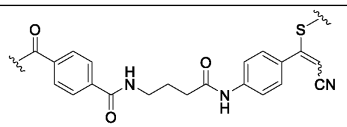
[0183] 여기서 은 L_1 또는 L_2에 대한 연결 지점을 나타낸다.

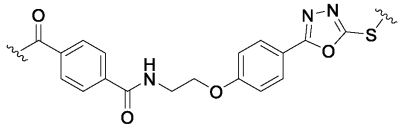
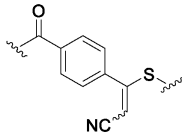
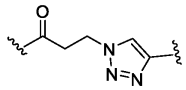
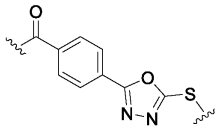
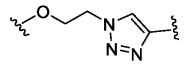
[0184] 일부 실시양태에서, L_A는 적어도 1개의 PEG 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, L_A는 어떠한 PEG 단위도 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, L_A는 -C(O)-, -C(O)N(H)-, 임의로 치환된 알콕시, 또는 임의로 치환된 알킬렌헤테로시클릴을 포함한다. 일부 실시양태에서, L_A는 결합이다.

[0185] 일부 실시양태에서, L_A는 표 5에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0186] 표 5: 본 발명의 예시적인 L_A 모이어티.

[0187]

명칭	구조
테더 1	
테더 2	
테더 3	
테더 4	
테더 5	
테더 6	
테더 7	
테더 8	
테더 9	

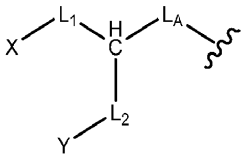
명칭	구조
테더 10	
테더 11	
테더 12	
테더 13	
테더 14	

[0188]

[0189] 여기서, 각각의 m, n, o 및 a는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30이고, 각각의 은 Z 또는 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0190] 일부 실시양태에서, 각각의 m은 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 21, 22, 23 또는 25이고; 각각의 n은 독립적으로 2, 3, 4 또는 5이고; 각각의 a는 독립적으로 2, 3 또는 4이고; 각각의 o는 독립적으로 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13이다. 일부 실시양태에서, 각각의 m은 독립적으로 2, 4, 8, 또는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 n은 3이다. 일부 실시양태에서, 각각의 o는 독립적으로 4, 8, 또는 12이다. 일부 실시양태에서, 각각의 a는 3이다.

[0191] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (Ia)의 지질 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



(Ia)

[0192]

[0193] 여기서 L_A, L_1, L_2, X, 및 Y는 화학식 (I)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같고; 은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

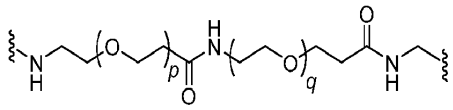
[0194] 일부 실시양태에서, X 및 Y는 각각 독립적으로 표 4에 제시된 바와 같은 지질 3, 지질 4, 지질 5, 지질 6, 지질 7, 지질 10, 지질 12, 및 지질 19로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 은 L_1 또는 L_2에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0195] 일부 실시양태에서, 각각의 L_1 및 L_2는 표 2에 제시된 바와 같은 링커 2, 링커 3, 링커 4, 및 링커 5로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, 여기서 각각의 은 화학식 (Ia)의 X, Y, 또는 CH에 대한 연결 지점을 나타낸

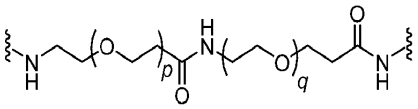
다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 23이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 24이다.

[0196] 일부 실시양태에서, L_A는 표 5에 제시된 바와 같은 테더 2, 테더 3 및 테더 4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 각각의 m은 독립적으로 2, 4, 8, 또는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 n은 4이다. 일부 실시양태에서, 각각의 o는 독립적으로 4, 8, 또는 12이다.

[0197] 일부 실시양태에서, L_1 및 L_2는 독립적으로

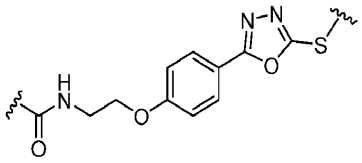


및



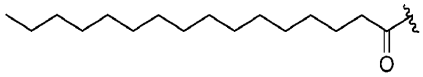
으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기서 각각의 p는 독립적으로 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25이고; 각각의 q는 독립적으로 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25이고; 각각의 ≈은 화학식 (Ia)의 X, Y, 또는 CH에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 24이다.

[0198] 일부 실시양태에서, L_A는



이고, 각각의 ≈은 화학식 (Ia)의 RNAi 작용제 또는 CH에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0199] 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는

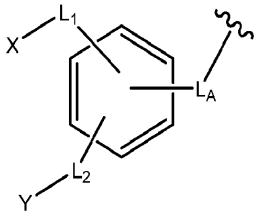


이고; 여기서 ≈은 L_1 또는 L_2에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0200] 일부 실시양태에서, 화학식 (Ia)의 지질 PK/PD 조정제는 표 15에 제시된 바와 같은 LP 210a 또는 LP 217a, 또는 이들 지질 PK/PD 조정제 중 어느 하나의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 각각의 L_{AA}는 RNAi 작용제를 지질 PK/PD 조정제의 나머지에 연결하는 결합 또는 2가 모이어티이고, 각각의 ≈은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0201] 일부 실시양태에서, 화학식 (Ia)의 지질 PK/PD 조정제는 표 17에 제시된 바와 같은 LP 210b 및 LP 217b 또는 이들 지질 PK/PD 조정제 중 어느 하나의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 각각의 ≈은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0202] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (Ib)의 지질 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



(Ib)

[0203]

[0204] 여기서 L_A, L_1, L_2, X, 및 Y는 화학식 (I) 또는 (Ia)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같

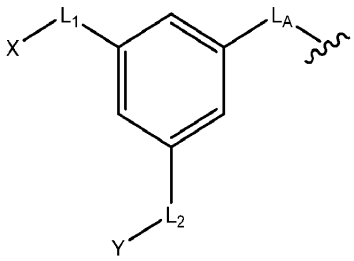
고, ≈ 은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0205] 일부 실시양태에서, X 및 Y는 각각 독립적으로 표 4에 제시된 바와 같은 지질 3 및 지질 19로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 ≈ 은 L_1 또는 L_2에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, X 및 Y는 각각 지질 3이다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 각각 지질 19이다.

[0206] 일부 실시양태에서, 각각의 L_1 및 L_2는 표 2에 제시된 바와 같은 링커 3, 링커 5, 및 링커 9로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, 여기서 각각의 ≈ 은 X, Y, 또는 화학식 (Ib)의 페닐 고리에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 23 또는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 24이다.

[0207] 일부 실시양태에서, L_A는 표 5에 제시된 바와 같은 테더 5, 테더 6, 테더 7, 테더 8 및 테더 14로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 각각의 ≈ 은 RNAi 작용제 또는 화학식 (Ib)의 페닐 고리에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 각각의 m은 2 또는 4이다. 일부 실시양태에서, 각각의 a는 3이다.

[0208] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (Ib1)의 지질 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:

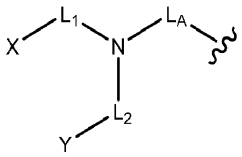


(Ib1)

[0209]

[0210] 여기서 L_A, L_1, L_2, X, 및 Y는 화학식 (I), (Ia), 또는 (Ib)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같고, ≈ 은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0211] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (Ic)의 지질 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



(Ic)

[0212]

[0213] 여기서 L_A, L_1, L_2, X, 및 Y는 화학식 (I), (Ia), (Ib), 또는 (Ib1)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같고, ≈ 은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

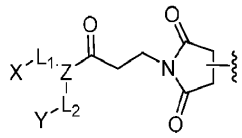
[0214] 일부 실시양태에서, X 및 Y는 각각 독립적으로 표 4에 제시된 바와 같은 지질 1, 지질 2, 지질 3, 지질 5, 지질 8, 지질 9, 지질 11, 지질 12, 지질 14, 지질 15, 지질 16, 지질 17, 지질 18, 지질 19, 지질 20, 지질 21, 지질 22, 지질 23, 및 지질 24로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 ≈ 은 L_1 및 L_2에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 지질 1, 지질 2, 지질 3, 지질 5, 지질 8, 지질 9, 지질 11,

지질 12, 지질 14, 지질 15, 지질 16, 지질 17, 지질 18, 지질 19, 지질 20, 지질 21, 지질 22, 지질 23 또는 지질 24이다.

[0215] 일부 실시양태에서, 각각의 L_1 및 L_2는 표 2에 제시된 바와 같은 링커 1, 링커 6, 링커 10, 링커 11, 및 링커 12로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 각각의 ≋은 화학식 (Ic)의 X, Y, 또는 N에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 독립적으로 23 또는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 독립적으로 23 또는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 r은 4이다.

[0216] 일부 실시양태에서, L_A는 표 5에 제시된 바와 같은 테더 1, 테더 9, 테더 10, 테더 11, 테더 12, 및 테더 13으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 ≋은 RNAi 작용제 또는 화학식 Ic의 N에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0217] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (Id)의 지질 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:

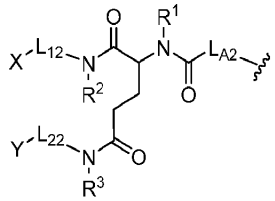


(Id)

[0218]

[0219] 여기서 Z, L_1, L_2, X, 및 Y는 화학식 (I), (Ia), (Ib) (Ib1), 또는 (Ic)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같고, ≋은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0220] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



(II)

[0221]

[0222] 여기서 X 및 Y는 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), 또는 (Id)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같고; L_{12}는 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), 또는 (Id)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_1이고; L_{22}는 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), 또는 (Id)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_2이고; L_{A2}는 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), 또는 (Ic)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_A이고; R^1, R^2 및 R^3은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬이고; ≋은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

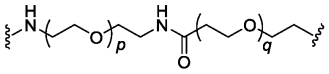
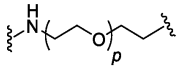
[0223] 일부 실시양태에서, L_{A2}는 RNAi 작용제를 -C(O)-에 연결하는 결합 또는 2가 모이어티이고; R^1, R^2 및 R^3은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬이고; L_{12} 및 L_{22}는 각각 독립적으로 적어도 약 5개의 PEG 단위를 포함하는 링커이고; X 및 Y는 각각 독립적으로 약 10 내지 약 50개의 탄소 원자를 포함하는 지질이고; ≋은 RNAi 작용제에 대한

연결 지점을 나타낸다.

[0224] 일부 실시양태에서, 각각의 L_{12} 및 L_{22}는 표 6에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0225] 표 6: 본 발명의 예시적인 L_{12} 및 L_{22} 모이어티.

[0226]

명칭	구조
링커 **1-2**	
링커 **2-2**	

[0227] 여기서 p 및 q는 각각 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30이고; 각각의 은 X, Y, $-NR^2-$ 또는 $-NR^3-$에 대한 연결 지점을 나타내고, 단:

[0228] (i) 링커 1-2에서, $p + q \geq 5$이고;

[0229] (ii) 링커 2-2에서, $p \geq 5$이다.

[0230] 일부 실시양태에서, 각각의 p는 독립적으로 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 독립적으로 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25이다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 독립적으로 23 또는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 23이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 24이다.

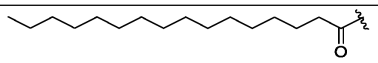
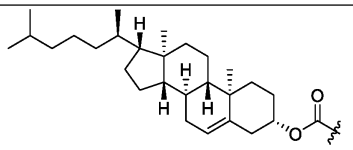
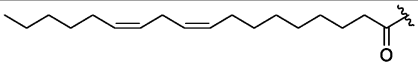
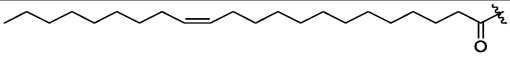
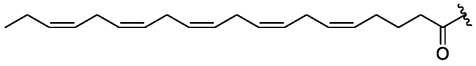
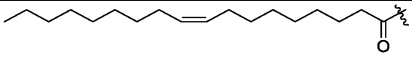
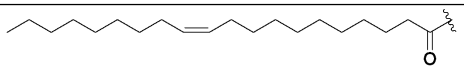
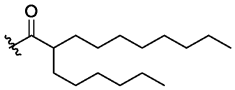
[0231] 일부 실시양태에서, L_{12} 및 L_{22}는 동일하다. 다른 실시양태에서, L_{12} 및 L_{22}는 상이하다.

[0232] 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 표 4에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 은 L_{12} 또는 L_{22}에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 독립적으로 표 4에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 은 L_{12} 또는 L_{22}에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0233] 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 표 7에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 독립적으로 표 7에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0234] 표 7: 화학식 II의 지질 PK/PD 조정제의 예시적인 X 및 Y 모이어티.

[0235]

명칭	구조
지질 3	
지질 4	
지질 5	
지질 6	
지질 7	
지질 10	
지질 12	
지질 19	

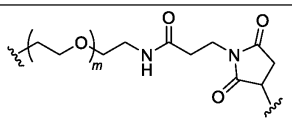
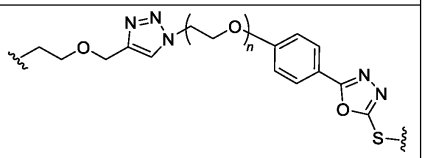
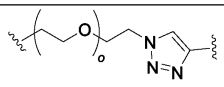
[0236] 여기서 은 L_{21} 또는 L_{22}에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0237] 일부 실시양태에서, L_{A2}는 1개 이상의 PEG 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, L_{A2}는 어떠한 PEG 단위도 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, L_{A2}는 -C(O)-, -C(O)NH-, 임의로 치환된 알콕시, 또는 임의로 치환된 알킬렌 헤테로시클릴을 포함한다. 일부 실시양태에서, L_{A2}는 결합이다.

[0238] 일부 실시양태에서, L_{A2}는 표 8에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0239] 표 8: 본 발명의 예시적인 L_{A2} 모이어티.

[0240]

명칭	구조
테더 1-2	
테더 2-2	
테더 3-2	

[0241] 여기서 각각의 m, n, 및 o는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30이고, 각각의 은 RNAi 작용제 또는 -C(O)-에 대한 연결 지점을 나타낸다.

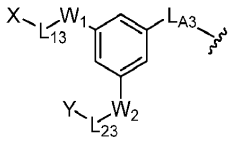
[0242] 일부 실시양태에서, m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 21, 22, 23, 또는 25이다. 일부 실시양태에서, m은 2, 4, 8, 또는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 n은 2, 3, 4, 또는 5이다. 일부 실시양태에서, n은 4이다. 일부 실시양태에서, o는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13이다. 일부 실시양태에서, o는 4, 8, 또는 12이다.

[0243] 일부 실시양태에서, 각각의 R^1, R^2 및 R^3은 독립적으로 수소 또는 C_{1-3} 알킬이다. 일부 실시양태에서, 각각의 R^1, R^2 및 R^3은 수소이다.

[0244] 일부 실시양태에서, 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제는 표 15에 제시된 바와 같은 LP 38a, LP 39a, LP 43a, LP 44a, LP 45a, LP 47a, LP 53a, LP 54a, LP 55a, LP 57a, LP 58a, LP 59a, LP 62a, LP 101a, LP 104a 및 LP 111a, 또는 이들 지질 PK/PD 조정제 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 각각의 L_{AA}는 RNAi 작용제를 지질 PK/PD 조정제의 나머지에 연결하는 결합 또는 2가 모이어티이고, 각각의 ≋은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0245] 일부 실시양태에서, 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제는 표 17에 제시된 바와 같은 LP 38b, LP 39b, LP 41b, LP 42b, LP 43b, LP 44b, LP 45b, LP 47b, LP 53b, LP 54b, LP 55b, LP 57b, LP 58b, LP 59b, LP 60b, LP 62b, LP 101b, LP 104b, LP 106b, LP 107b, LP 108b, LP 109b, 및 LP 111b, 또는 이들 지질 PK/PD 조정제 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 각각의 ≋은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0246] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (III)의 지질 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



(III)

[0247]

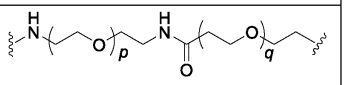
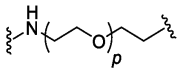
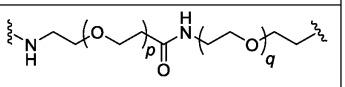
[0248] 여기서 X 및 Y는 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id) 또는 (II)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같고; L_{13}은 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), 또는 (Id)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_1이거나, 또는 L_{13}은 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_{12}이고; L_{23}은 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), 또는 (Id)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_2이거나, 또는 L_{23}은 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_{22}이고; W_1은 -C(O)NR_1- 또는 -$OCH_2CH_2NR_1C(O)$-이고, 여기서 R_1은 수소 또는 C_{1-6} 알킬이고; W_2는 -C(O)NR_2- 또는 -$OCH_2CH_2NR_2C(O)$-이고, 여기서 R_2는 수소 또는 C_{1-6} 알킬이고; L_{A3}은 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), 또는 (Ic)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_A이거나, 또는 L_{A3}은 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_{A2}이고; ≋은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0249] 일부 실시양태에서, L_{A3}은 결합, 또는 RNAi 작용제를 페닐 고리에 연결하는 2가 모이어티이고; W_1은 -C(O)NR_1- 또는 -$OCH_2CH_2NR_1C(O)$-이고, 여기서 R_1은 수소 또는 C_{1-6} 알킬이고; W_2는 -C(O)NR_2- 또는 -$OCH_2CH_2NR_2C(O)$-이고, 여기서 R_2는 수소 또는 C_{1-6} 알킬이고; L_{13} 및 L_{23}은 각각 독립적으로 적어도 약 5개의 PEG 단위를 포함하는 링커이고; X 및 Y는 각각 독립적으로 약 10 내지 약 50개의 탄소 원자를 포함하는 지질이고; ≋은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0250] 일부 실시양태에서, 각각의 L_{13} 및 L_{23}은 표 9에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0251] 표 9: 본 발명의 예시적인 L_{13} 및 L_{23} 모이어티.

[0252]

명칭	구조
링커 **1-3**	
링커 **2-3**	
링커 **3-3**	

[0253] 여기서, p 및 q는 각각 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30이고; 각각의 은 X, Y, W_1, 또는 W_2에 대한 연결 지점을 나타내고; 단:

[0254] (i) 링커 1-3 및 링커 3-3에서, p + q ≥ 5이고;

[0255] (ii) 링커 2-3에서, p ≥ 5이다.

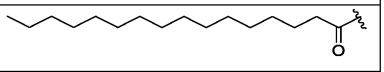
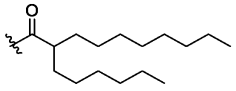
[0256] 일부 실시양태에서, 각각의 p는 독립적으로 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25이다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 독립적으로 23 또는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 23이다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 독립적으로 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 24이다.

[0257] 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 표 4에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 은 L_{13} 또는 L_{23}에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 독립적으로 표 4에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 은 L_{13} 또는 L_{23}에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0258] 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 표 10에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 독립적으로 표 10에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0259] 표 10: 화학식 (III)의 지질 PK/PD 조정제의 예시적인 X 및 Y 모이어티.

[0260]

명칭	구조
지질 **3**	
지질 **19**	

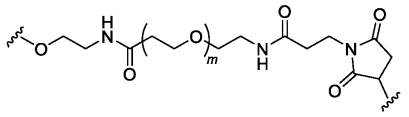
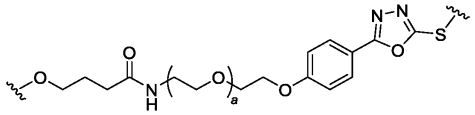
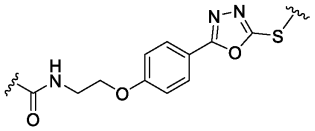
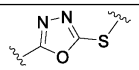
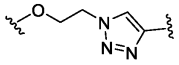
[0261] 여기서 은 L_{13} 또는 L_{23}에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0262] 일부 실시양태에서, L_{A3}은 1개 이상의 PEG 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, L_{A3}은 어떠한 PEG 단위도 함유

하지 않는다. 일부 실시양태에서, L_{A3}은 -C(O)-, -C(O)NH-, 임의로 치환된 알콕시, 또는 임의로 치환된 알킬렌 헤테로시클릴을 포함한다. 일부 실시양태에서, L_{A3}은 결합이다.

[0263] 일부 실시양태에서, L_{A3}은 표 11에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0264] 표 11: 본 발명의 예시적인 L_{A3} 모이어티.

명칭	구조
테더 **1-3**	
테더 **2-3**	
테더 **3-3**	
테더 **4-3**	
테더 **5-3**	

[0265]

[0266] 여기서 각각의 m 및 a는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30이고, 각각의 은 RNAi 작용제 또는 화학식 (III)의 페닐 고리에 대한 연결 지점을 나타낸다.

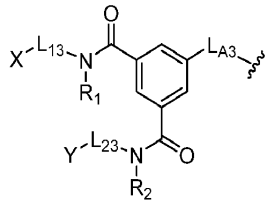
[0267] 일부 실시양태에서, m은 1, 2, 3, 4, 5, 20, 21, 22, 23, 또는 25이다. 일부 실시양태에서, m은 1, 2, 3, 4, 또는 5이다. 일부 실시양태에서, m은 2 또는 4이다. 일부 실시양태에서, a는 2, 3, 4, 또는 5이다. 일부 실시양태에서, a는 3이다.

[0268] 일부 실시양태에서, 각각의 R^1 및 R^2는 독립적으로 수소 또는 C_{1-3} 알킬 (예를 들어, 메틸, 에틸, 또는 n-프로필)이다. 일부 실시양태에서, R^1 및 R^2 둘 다는 수소이다.

[0269] 일부 실시양태에서, 화학식 (III)의 지질 PK/PD 조정제는 표 15에 제시된 바와 같은 LP 110a, LP 124a, LP 130a 및 LP 220a 또는 임의의 이들 지질 PK/PD 조정제의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 각각의 L_{AA}는 RNAi 작용제를 지질 PK/PD 조정제의 나머지에 연결하는 결합 또는 2가 모이어티이고; 각각의 은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0270] 일부 실시양태에서, 화학식 (III)의 지질 PK/PD 조정제는 표 17에 제시된 바와 같은 LP 110b, LP 124b, LP 130b, LP 143b, LP 220b, LP 221b 및 LP 240b, 또는 이들 지질 PK/PD 조정제 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 각각의 은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0271] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (IIIa)의 지질 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



(IIIa)

[0272]

[0273] 여기서 X 및 Y는 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), 또는 (III)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같고; L_{13}은 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), 또는 (Id)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_1이고, L_{13}은 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_{12}이거나, 또는 L_{13}은 화학식 (III)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같고; L_{23}은 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), 또는 (Id)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_2이거나, L_{23}은 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_{22}이거나, 또는 L_{13}은 화학식 (III)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같고; L_{A3}은 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), 또는 (Ic)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_A이거나, L_{A3}은 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_{A2}이거나, 또는 L_{A3}은 화학식 (III)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같고; 각각의 R_1 및 R_2는 화학식 (II) 또는 (III)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같고;



는 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0274] 일부 실시양태에서, L_{A3}은 RNAi 작용제를 페닐 고리에 연결하는 결합 또는 2가 모이어티이고; R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬 (예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, n-부틸, 또는 n-펜틸)이고; L_{13} 및 L_{23}은 각각 독립적으로 적어도 약 5개의 PEG 단위를 포함하는 링커이고; X 및 Y는 각각 독립적으로 약 10 내지 약 50개의 탄소 원자를 포함하는 지질이고;

은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0275] 일부 실시양태에서, 각각의 L_{13} 및 L_{23}은 표 9에 제시된 바와 같은 링커 1-3 및 링커 2-3으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의

은 화학식 (IIIa)에서 X, Y, $-NR_1-$, 또는 $-NR_2-$에 대한 연결 지점을 나타내고, 단:

[0276] (i) 링커 1-3에서, $p + q \geq 5$이고;

[0277] (ii) 링커 2-3에서, $p \geq 5$이다.

[0278] 일부 실시양태에서, L_{13} 및 L_{23} 중 하나는 링커 1-3이고, 다른 하나는 링커 2-3이다. 일부 실시양태에서, 각각의 L_{13} 및 L_{23}은 링커 1-3이다. 일부 실시양태에서, 각각의 L_{13} 및 L_{23}은 링커 2-3이다.

[0279] 일부 실시양태에서, 각각의 p는 독립적으로 23 또는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 23이다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 24이다. 일부 실시양태에서, q는 24이다.

[0280] 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 표 10에 제시된 바와 같은 지질 3 및 지질 19로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의

은 화학식 (IIIa)에서 L_{13} 또는 L_{23}에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 독립적으로 지질 3 및 지질 19로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서,

X 및 Y 중 하나는 지질 3이고, 다른 것은 지질 19이다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 지질 3이다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 지질 19이다.

[0281] 일부 실시양태에서, L_{A3}은 표 11에 제시된 바와 같은 테더 1-3, 테더 2-3 및 테더 5-3으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 ≈은 RNAi 작용제 또는 화학식 (IIIa)의 페닐 고리에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, L_{A3}은 테더 1-3이다. 일부 실시양태에서, L_{A3}은 테더 2-3이다. 일부 실시양태에서, L_{A3}은 테더 5-3이다.

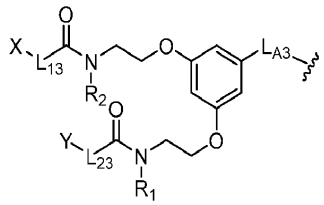
[0282] 일부 실시양태에서, m은 1, 2, 3, 4, 5, 20, 21, 22, 23, 또는 25이다. 일부 실시양태에서, m은 1, 2, 3, 4, 또는 5이다. 일부 실시양태에서, m은 2 또는 4이다. 일부 실시양태에서, a는 2, 3, 4, 또는 5이다. 일부 실시양태에서, a는 3이다.

[0283] 일부 실시양태에서, 각각의 R^1 및 R^2는 독립적으로 수소 또는 C_{1-3} 알킬이다. 일부 실시양태에서, 각각의 R^1 및 R^2는 수소이다.

[0284] 일부 실시양태에서, 화학식 (IIIa)의 지질 PK/PD 조정제는 표 15에 제시된 바와 같은 LP 110a, LP 124a 및 LP 130a 또는 임의의 이들 지질 PK/PD 조정제의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 각각의 L_{AA}는 RNAi 작용제를 지질 PK/PD 조정제의 나머지에 연결하는 결합 또는 2가 모이어티이고; 각각의 ≈은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0285] 일부 실시양태에서, 화학식 (IIIa)의 지질 PK/PD 조정제는 표 17에 제시된 바와 같은 LP 110b, LP 124b, LP 130b, LP 143b 및 LP 240b, 또는 이들 지질 PK/PD 조정제 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 각각의 ≈은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0286] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (IIIb)의 지질 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



(IIIb)

[0287]

[0288] 여기서 X 및 Y는 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), 또는 (IIIa)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같고; L_{13}은 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), 또는 (Id)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_1이고, L_{13}은 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_{12}이거나, 또는 L_{13}은 화학식 (III) 또는 (IIIa)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같고; L_{23}은 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), 또는 (Id)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_2이고, L_{23}은 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_{22}이거나, 또는 L_{13}은 화학식 (III) 또는 (IIIa)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같고; L_{A3}은 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), 또는 (Ic)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_A이고, L_{A3}은 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_{A2}이거나, 또는 L_{A3}은 화학식 (III) 또는 (IIIa)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같고; 각각의 R_1 및 R_2는 화학식 (II), (III), 또는 (IIIa)의 지질 PK/PD 조

정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같고; ≀은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0289] 일부 실시양태에서, L_{A3}은 결합, 또는 RNAi 작용제를 페닐 고리에 연결하는 2가 모이어티이고; R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬로부터 선택되고; L_{13} 및 L_{23}은 각각 독립적으로 적어도 약 5개의 PEG 단위를 포함하는 링커이고; X 및 Y는 각각 독립적으로 약 10 내지 약 50개의 탄소 원자를 포함하는 지질이고; ≀은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0290] 일부 실시양태에서, 각각의 L_{13} 및 L_{23}은 표 9에 제시된 바와 같은 링커 3-3이고, 여기서 각각의 ≀은 X, Y, 또는 -C(O)-에 대한 연결 지점을 나타내고, 단 링커 3-3에서, $p + q \geq 5$이다.

[0291] 일부 실시양태에서, p는 23 또는 24이다. 일부 실시양태에서, p는 23이다. 일부 실시양태에서, p는 24이다. 일부 실시양태에서, q는 24이다.

[0292] 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 표 10에 제시된 바와 같은 지질 3이고, 여기서 각각의 ≀은 L_{13} 또는 L_{23}에 대한 연결 지점을 나타낸다.

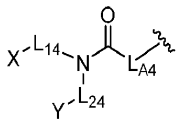
[0293] 일부 실시양태에서, L_{A3}은 표 11에 제시된 바와 같은 테더 3-3 및 테더 4-3으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 ≀은 RNAi 작용제 또는 화학식 (IIIb)의 페닐 고리에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, L_{A3}은 테더 3-3이다. 일부 실시양태에서, L_{A3}은 테더 4-3이다.

[0294] 일부 실시양태에서, 각각의 R^1 및 R^2는 독립적으로 수소 또는 C_{1-3} 알킬이다. 일부 실시양태에서, 각각의 R^1 및 R^2는 수소이다.

[0295] 일부 실시양태에서, 화학식 (IIIb)의 지질 PK/PD 조정제는 표 15에 제시된 바와 같은 LP 220a 또는 그의 제약상 허용되는 염이고, 여기서 L_{AA}는 RNAi 작용제를 지질 PK/PD 조정제의 나머지에 연결하는 결합 또는 2가 모이어티이고; ≀은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0296] 일부 실시양태에서, 화학식 (IIIb)의 지질 PK/PD 조정제는 표 17에 제시된 바와 같은 LP 220b 및 LP 221b 또는 이들 지질 PK/PD 조정제 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 각각의 ≀은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0297] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (IV)의 지질 PK/PD 조정제 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



(**IV**)

[0298]

[0299] 여기서 X 및 Y는 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), 또는 (IIIb)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같고; L_{14}는 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), 또는 (Id)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_1이고, L_{14}는 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_{12}이거나, 또는 L_{14}는 화학식 (III), (IIIa), 또는 (IIIb)

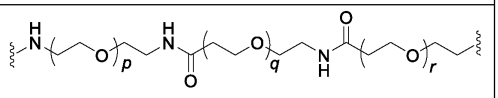
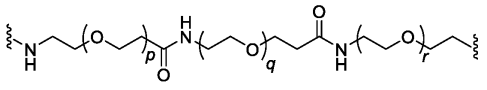
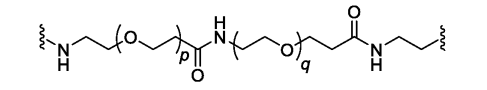
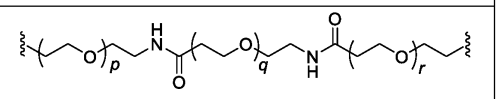
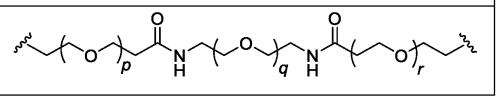
의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_{13}이고; L_{24}는 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), 또는 (Id)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_2이고, L_{24}는 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_{22}이거나, 또는 L_{24}는 화학식 (III), (IIIa), 또는 (IIIb)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_{23}이고: L_{A4}는 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), 또는 (Ic)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_A이고, L_{A4}는 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_{A2}이거나, 또는 L_{A4}는 화학식 (III), (IIIa), 또는 (IIIb)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같은 L_{A3}이고; 은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0300] 일부 실시양태에서, L_{A4}는 RNAi 작용제를 -C(O)-에 연결하는 결합 또는 2가 모이어티이고; L_{14} 및 L_{24}는 각각 독립적으로 적어도 약 5개의 PEG 단위를 포함하는 링커이고; X 및 Y는 각각 독립적으로 약 10 내지 약 50개의 탄소 원자를 포함하는 지질이고; 은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0301] 일부 실시양태에서, 각각의 L_{14} 및 L_{24}는 독립적으로 표 12에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0302] 표 12: 본 발명의 예시적인 L_{14} 및 L_{24} 모이어티.

[0303]

명칭	구조
링커 1-4	
링커 2-4	
링커 3-4	
링커 4-4	
링커 5-4	

[0304] 여기서 각각의 p는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30이고; 각각의 q는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30이고; 각각의 r은 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고; 각각의 은 화학식 (IV)의 X, Y 또는 에 대한 연결 지점을 나타내고, 여기서 각각의 *는 L_{14} 또는 L_{24}에 대한 부착 지점을 나타내고; 단:

[0305] (i) 링커 1-4, 링커 2-4, 및 링커 4-4에서, $p + q + r \geq 5$이고;

[0306] (ii) 링커 3-4에서, $p + q \geq 5$이다.

[0307] 일부 실시양태에서, 각각의 p는 독립적으로 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25이다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 독립적으로 23 또는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 23이다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 독립적으로 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 독립적으로 23 또는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 23이다.

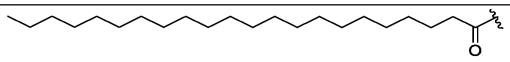
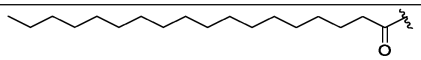
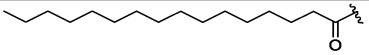
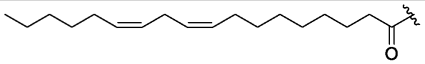
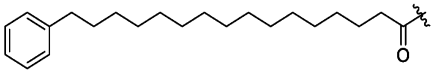
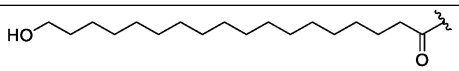
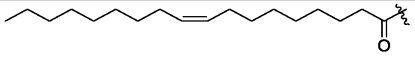
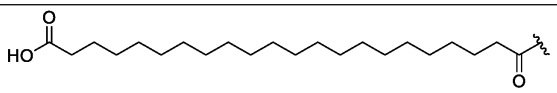
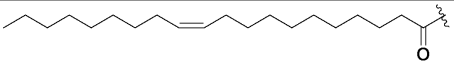
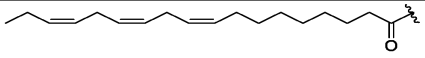
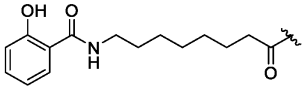
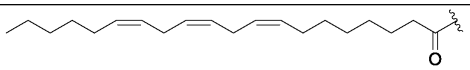
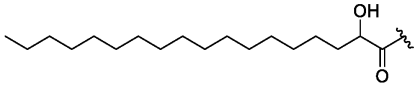
일부 실시양태에서, r은 2, 3, 4, 5, 또는 6이다. 일부 실시양태에서, 각각의 r은 4이다.

[0308] 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 표 4에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 ~ 은 L_{14} 또는 L_{24}에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 독립적으로 표 4에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 ~ 은 L_{14} 또는 L_{24}에 대한 연결 지점을 나타낸다.

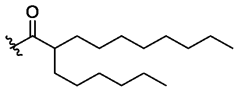
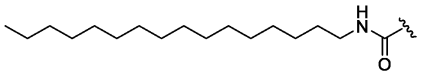
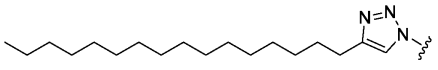
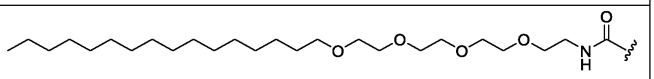
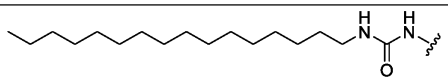
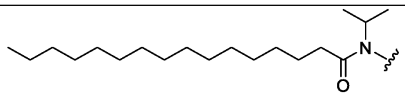
[0309] 일부 실시양태에서, X 및 Y 중 적어도 하나는 표 13에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 독립적으로 표 13에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0310] 표 13: 화학식 (IV)의 지질 PK/PD 조정제의 예시적인 X 및 Y 모이어티.

[0311]

명칭	구조
지질 1	
지질 2	
지질 3	
지질 5	
지질 8	
지질 9	
지질 10	
지질 11	
지질 12	
지질 15	
지질 16	
지질 17	
지질 18	

[0312]

명칭	구조
지질 19	
지질 20	
지질 21	
지질 22	
지질 23	
지질 24	

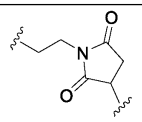
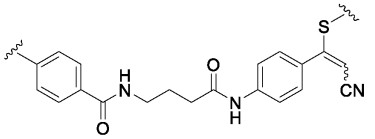
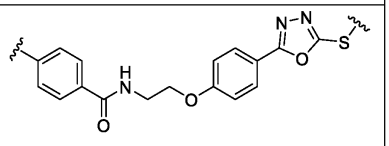
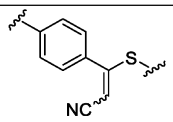
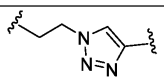
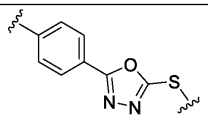
[0313] 여기서  은 L_{14} 또는 L_{24}에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0314] 일부 실시양태에서, L_{A4}는 1개 이상의 PEG 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, L_{A4}는 어떠한 PEG 단위도 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, L_{A4}는 -C(O)-, -C(O)NH-, 임의로 치환된 알콕시, 또는 임의로 치환된 알킬렌 헤테로시클릴을 포함한다. 일부 실시양태에서, L_{A4}는 결합이다.

[0315] 일부 실시양태에서, L_{A4}는 표 14에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0316] 표 14: 본 발명의 예시적인 L_{A4} 모이어티.

[0317]

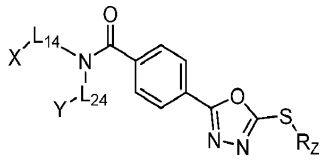
명칭	구조
테더 1-4	
테더 2-4	
테더 3-4	
테더 4-4	
테더 5-4	
테더 6-4	

[0318] 여기서 각각의 은 RNAi 작용제 또는 화학식 (IV)의 -C(O)-에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0319] 일부 실시양태에서, 화학식 (IV)의 지질 PK/PD 조정제는 표 15에 제시된 바와 같은 LP 1a, LP 28a, LP 29a, LP 48a, LP 49a, LP 56a, LP 61a, LP 87a, LP 89a, LP 90a, LP 92a, LP 93a, LP 94a, LP 95a, LP 102a, LP 103a, LP 223a, LP 225a, LP 246a, LP 339a, LP 340a, LP 357a 및 LP 358a, 또는 이들 지질 PK/PD 조정제 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 각각의 L_{AA}는 RNAi 작용제를 지질 PK/PD 조정제의 나머지에 연결하는 결합 또는 2가 모이어티이고; 각각의 은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0320] 일부 실시양태에서, 화학식 (IV)의 지질 PK/PD 조정제는 표 17에 제시된 바와 같은 LP 1b, LP 28b, LP 29b, LP 48b, LP 49b, LP 56b, LP 61b, LP 87b, LP 89b, LP 90b, LP 92b, LP 93b, LP 94b, LP 95b, LP 102b, LP 103b, LP 223b, LP 224b, LP 225b, LP 226b, LP 238b, LP 246b, LP 247b, LP 339b, LP 340b, LP 357b, 및 LP 358b, 또는 이들 지질 PK/PD 조정제 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 각각의 은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0321] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (IVa)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:

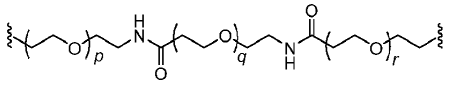
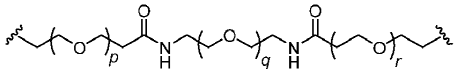


(IVa)

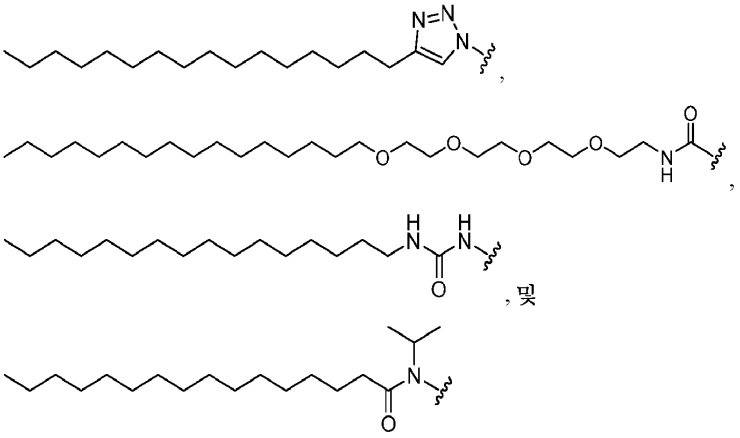
[0322]

[0323] 여기서 X 및 Y는 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (II), (III), (IIIa), (IIIb), 또는 (IV)의 화합물의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같고; L_{14} 및 L_{24}는 화학식 (IV)의 화합물의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같고; R_Z는 올리고뉴클레오티드-기반 작용제를 포함한다.

[0324] 일부 실시양태에서, R_Z는 올리고뉴클레오티드-기반 작용제를 포함하고; 각각의 L_{14} 및 L_{24}는 독립적으로

 및 

으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 은 화학식 (IVa)의 X, Y, 또는  에 대한 연결 지점을 나타내고, 각각의 *는 L_{14} 또는 L_{24}에 대한 부착 지점을 나타내고, 각각의 p는 독립적으로 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25이고, 각각의 q는 독립적으로 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25이고, 각각의 r은 독립적으로 2, 3, 4, 5, 또는 6이고; 각각의 X 및 Y는 독립적으로



[0325]

[0326] 으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 은 L_{14} 또는 L_{24}에 대한 연결 지점을 나타낸다.

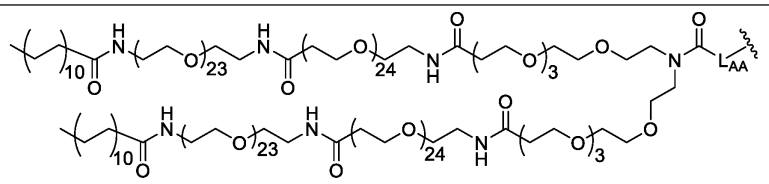
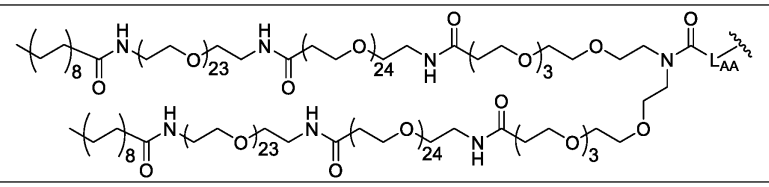
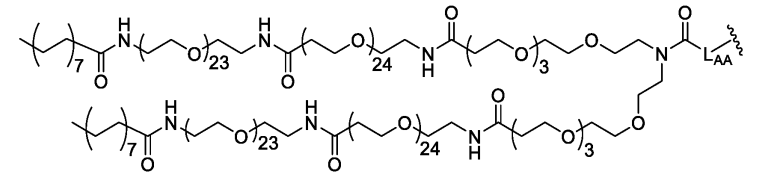
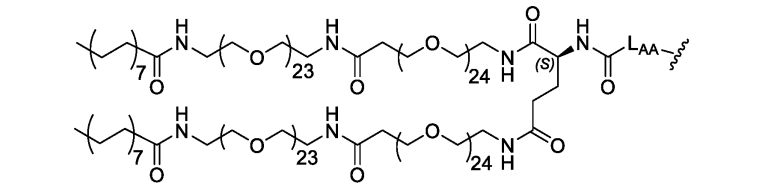
[0327] 일부 실시양태에서, 각각의 p는 독립적으로 23 또는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 23이다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 독립적으로 23 또는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 23이다. 일부 실시양태에서, 각각의 r은 4이다.

[0328] 일부 실시양태에서, 화학식 (IVa)의 화합물은 표 16에 제시된 바와 같은 LP 339b, LP 340b, LP 357b 및 LP 358b로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 임의의 이들 화합물의 제약상 허용되는 염이고, 여기서 각각의 R_Z는 올리고뉴클레오티드-기반 작용제를 포함한다.

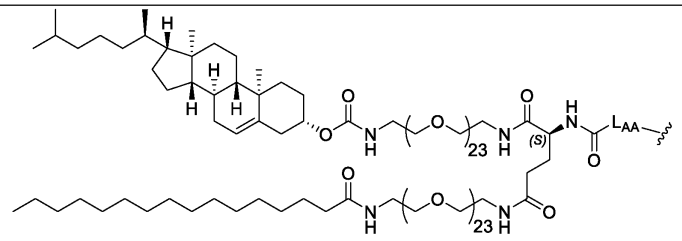
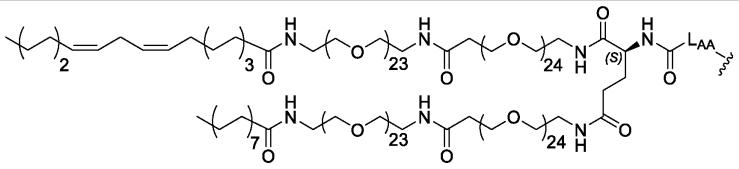
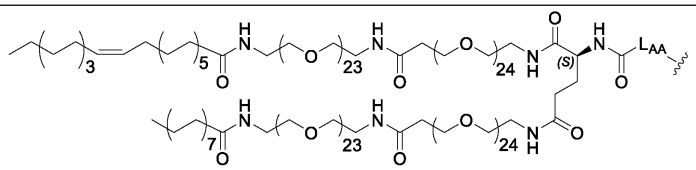
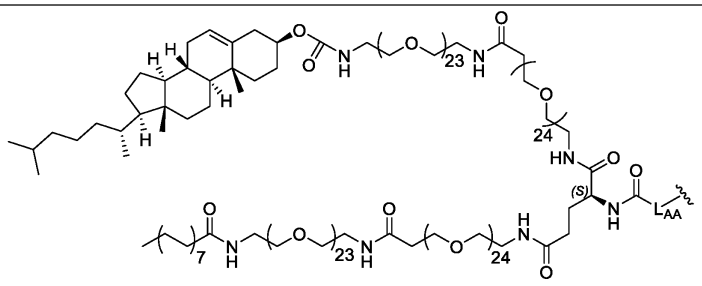
[0329] 본 발명의 또 다른 측면에서, RNAi 작용제는 표 15에서 확인되는 지질 PK/PD 조정제로 이루어진 군으로부터 선택된 지질 PK/PD 조정제에 접합될 수 있다.

[0330] 표 15: 본 발명의 예시적인 지질 PK/PD 조정제 (화합물 번호는 구조 앞에 나타냄).

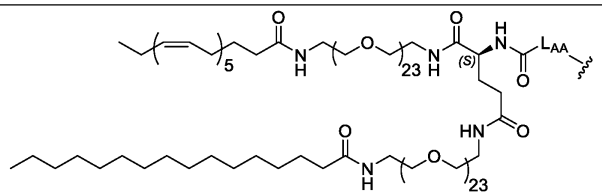
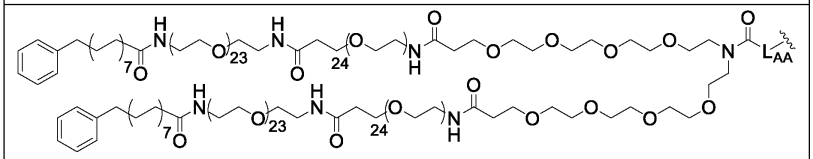
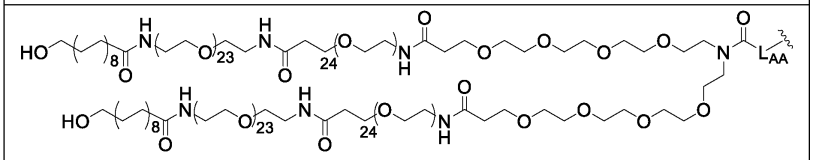
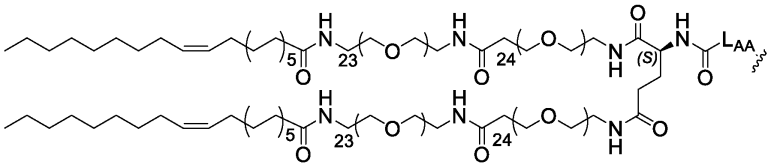
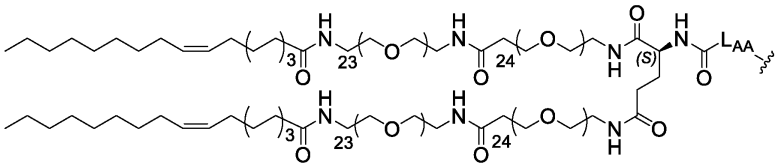
[0331]

LP 1a

LP 28a

LP 29a

LP 38a


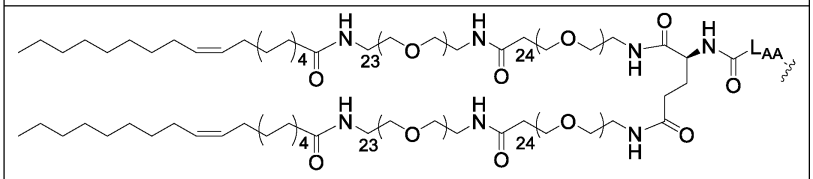
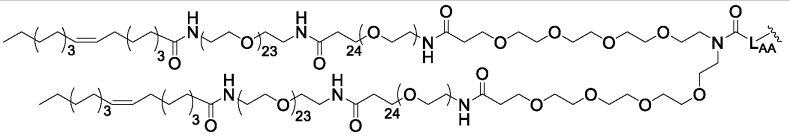
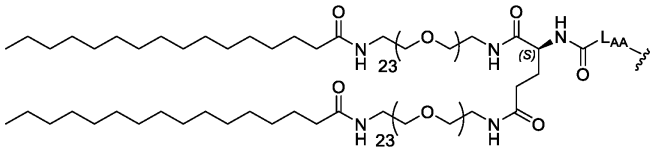
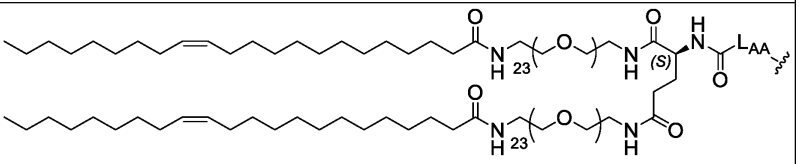
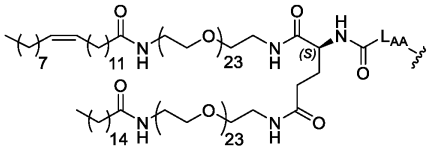
[0332]

LP 39a

LP 43a

LP 44a

LP 45a


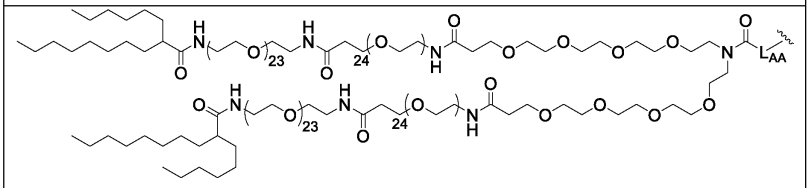
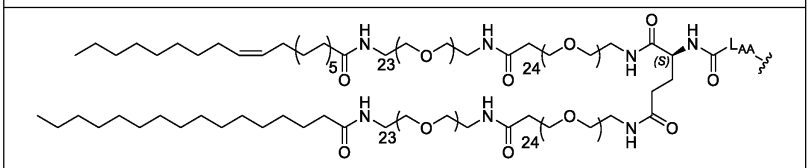
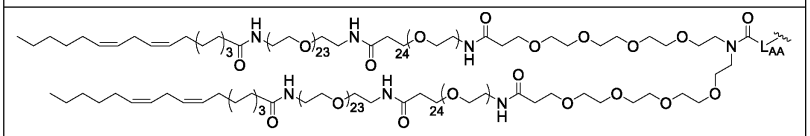
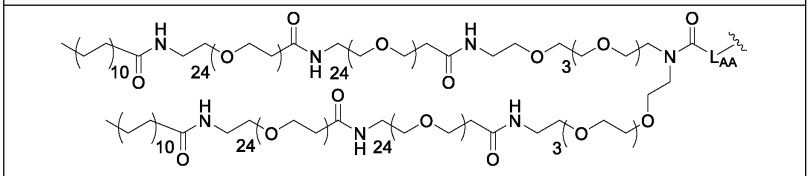
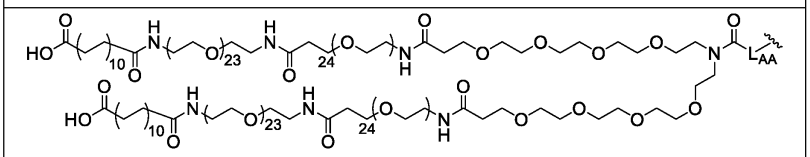
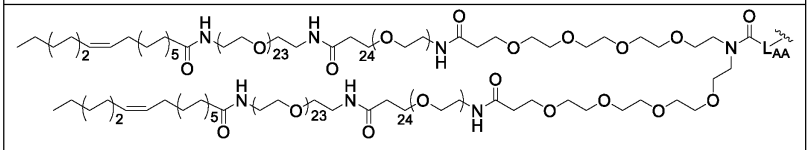
[0333]

LP 47a

LP 48a

LP 49a

LP 53a

LP 54a


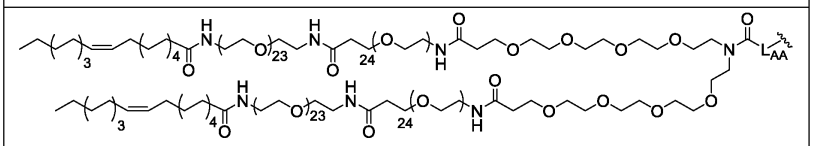
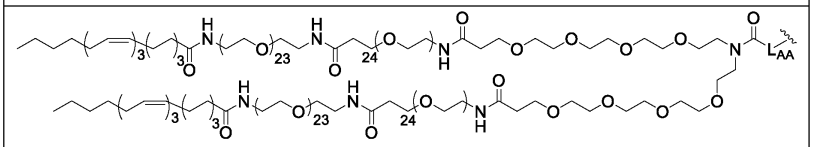
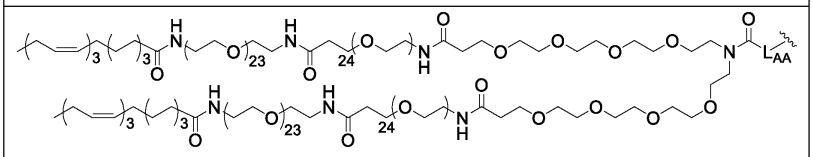
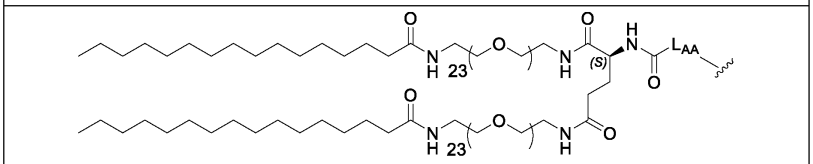
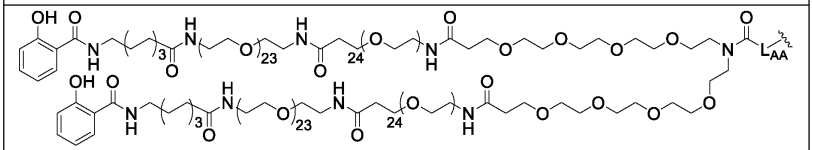
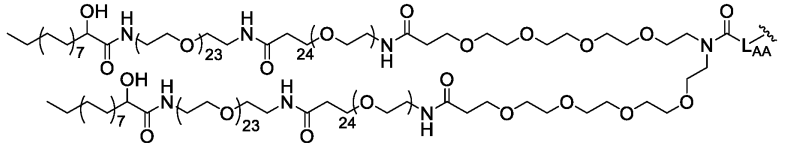
[0334]

LP 55a

LP 56a

LP 57a

LP 58a

LP 59a


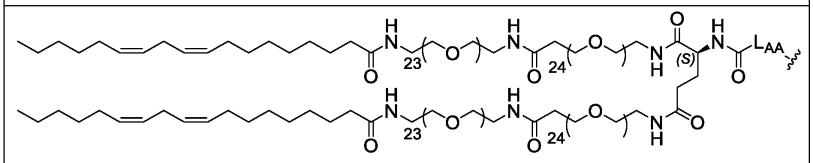
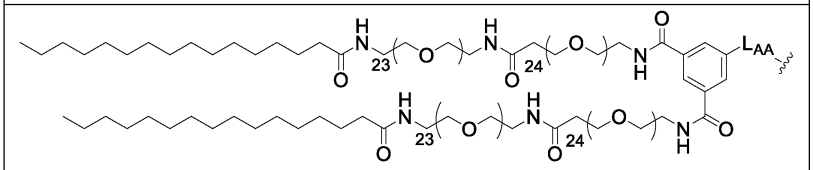
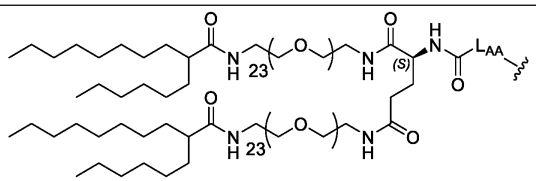
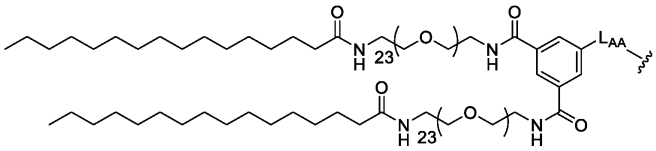
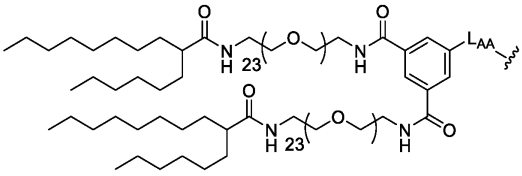
[0335]

LP 61a

LP 62a

LP 87a

LP 89a

LP 90a

LP 92a


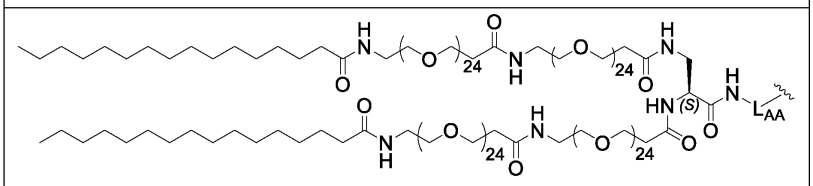
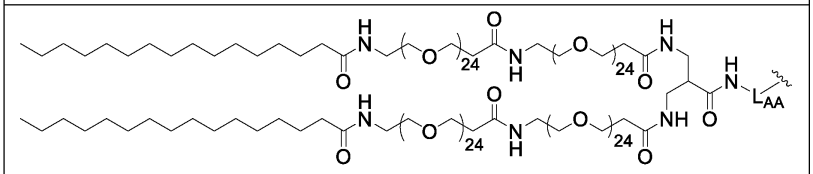
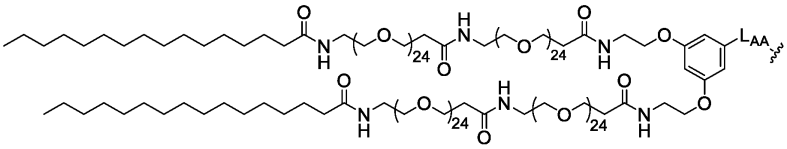
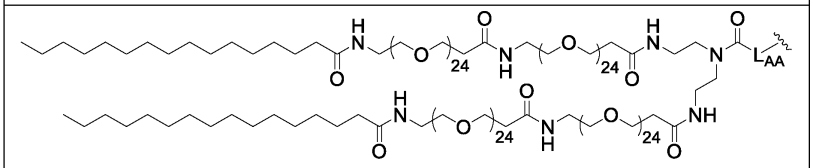
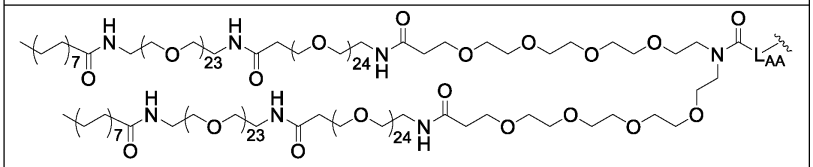
[0336]

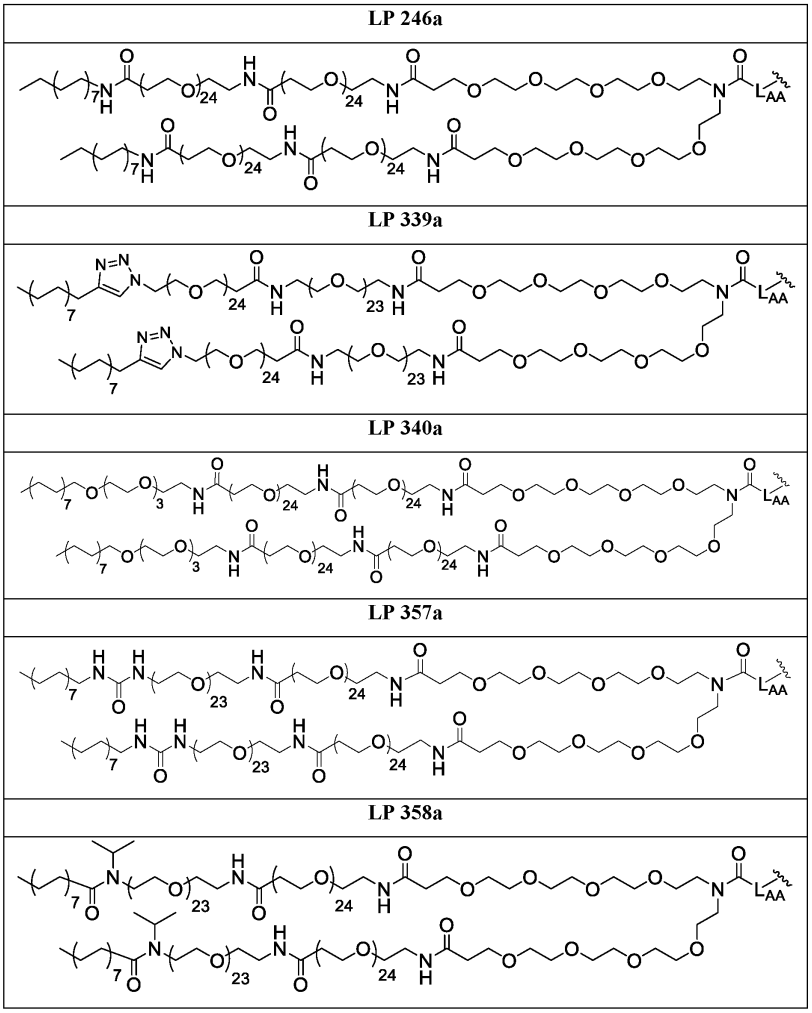
LP 93a

LP 94a

LP 95a

LP 101a

LP 102a

LP 103a


[0337]

LP 104a

LP 110a

LP 111a

LP 124a

LP 130a


[0338]

LP 210a

LP 217a

LP 220a

LP 223a

LP 225a




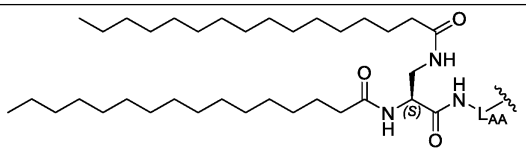
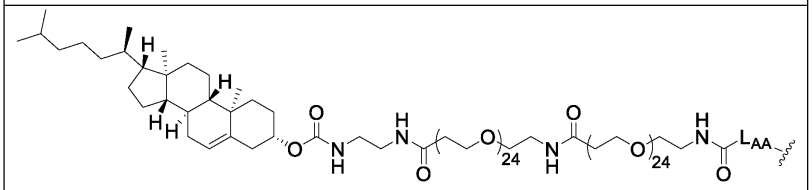
[0339]

[0340] 또는 임의의 이들 지질 PK/PD 조정제의 제약상 허용되는 염, 여기서 각각의 L_{AA}는 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 L_A이거나, L_{AA}는 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 L_{A2}이거나, L_{AA}는 화학식 (III), (IIIa), 또는 (IIIb)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 L_{A3}이거나, 또는 L_{AA}는 화학식 (IV)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 L_{A4}이고; 각각의 ≀ 은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0341] 일부 실시양태에서, 각각의 L_{AA}는 RNAi 작용제를 나머지 지질 PK/PD 조정제에 연결하기 위한 결합 또는 2가 모이어티이고; 각각의 ≀ 은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0342] 본 발명의 또 다른 측면에서, RNAi 작용제는 표 16에서 확인되는 지질 PK/PD 조정제로 이루어진 군으로부터 선택된 지질 PK/PD 조정제에 접합될 수 있다.

[0343] 표 16: 본 발명의 예시적인 지질 PK/PD 조정제 (화합물 번호는 구조 전에 나타남).

LP 5a

LP 33a


[0344]

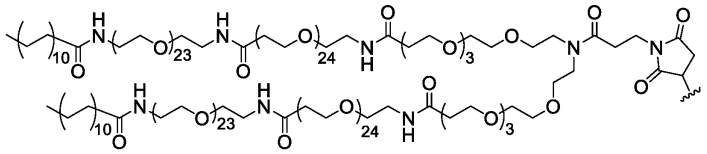
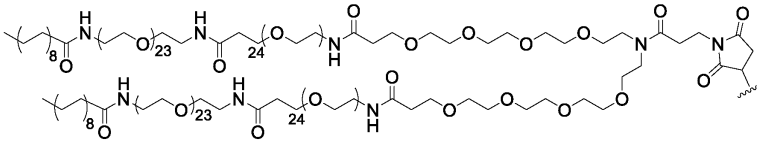
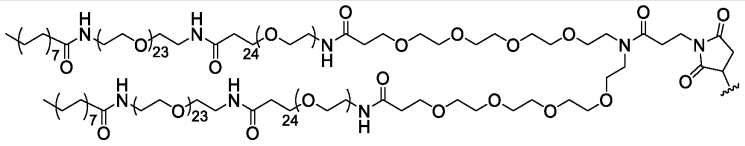
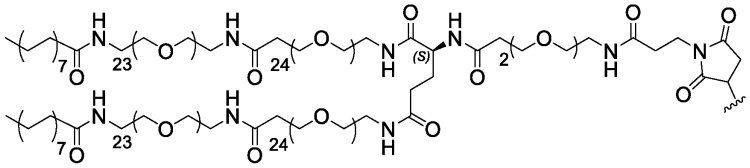
[0345] 또는 임의의 이들 지질 PK/PD 조정제의 제약상 허용되는 염, 여기서 각각의 L_{AA}는 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 L_A이거나, L_{AA}는 화학식 (II)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 L_{A2}이거나, L_{AA}는 화학식 (III), (IIIa), 또는 (IIIb)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 L_{A3}이거나, 또는 L_{AA}는 화학식 (IV)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 L_{A4}이고; 각각의 은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0346] 일부 실시양태에서, 각각의 L_{AA}는 RNAi 작용제를 나머지 지질 PK/PD 조정제에 연결하기 위한 결합 또는 2가 모이어티이고; 각각의 은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

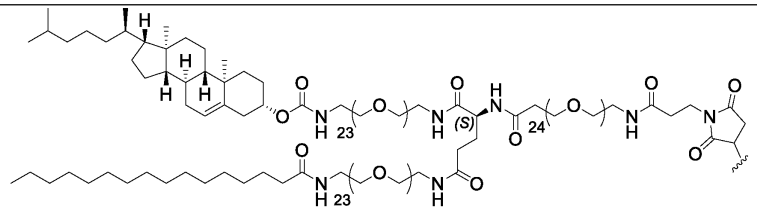
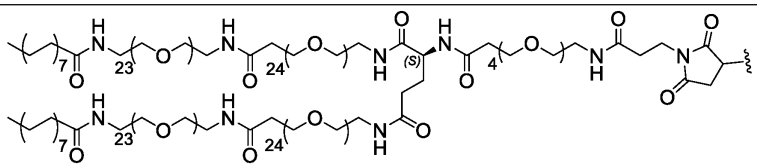
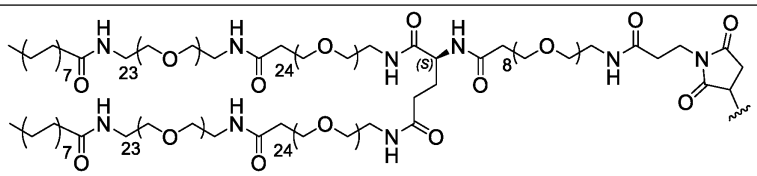
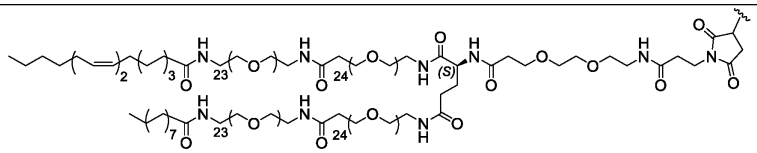
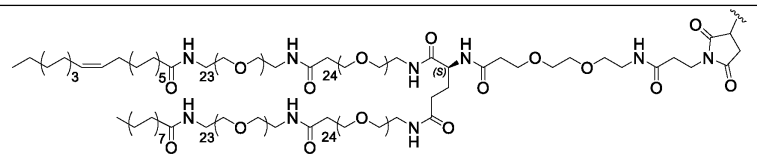
[0347] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제는 표 17에서 확인되는 지질 PK/PD 조정제로 이루어진 군으로부터 선택된 지질 PK/PD 조정제에 접합될 수 있다.

[0348] 표 17: 본 발명의 예시적인 지질 PK/PD 조정제 (화합물 번호는 구조 앞에 나타냄).

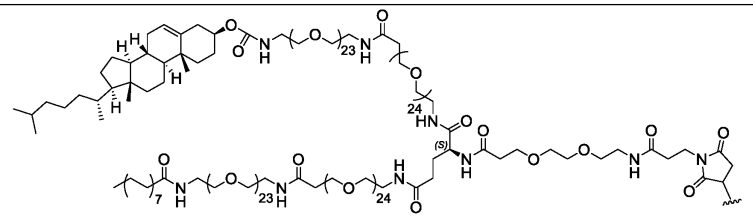
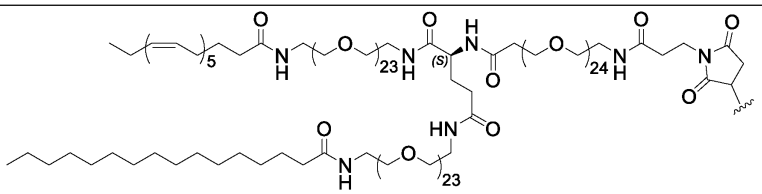
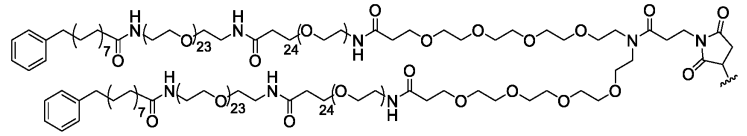
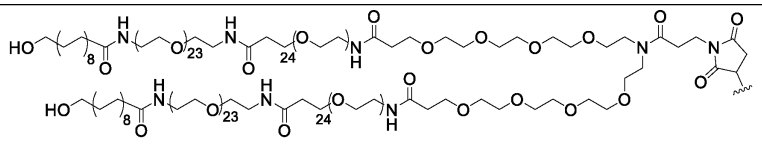
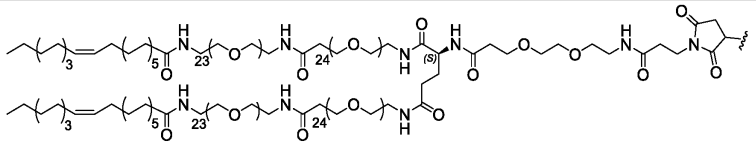
[0349]

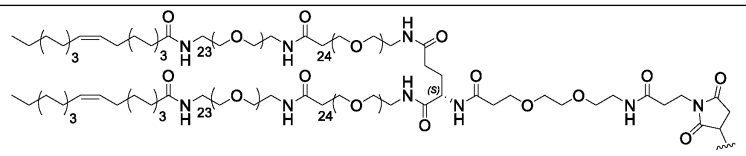
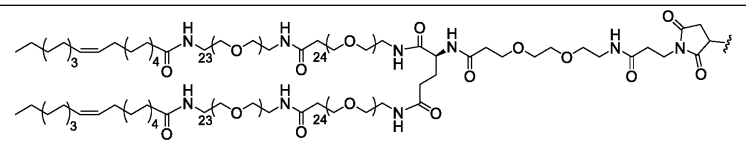
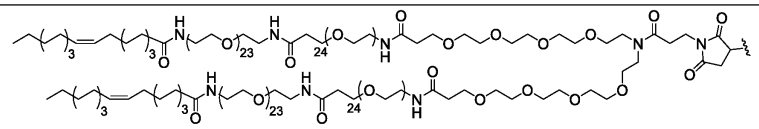
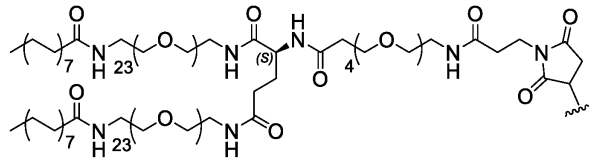
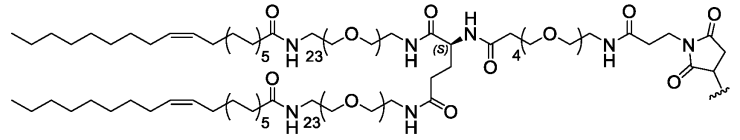
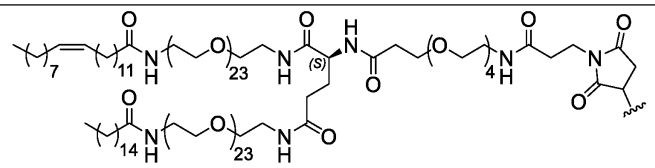
LP 1b

LP 28b

LP 29b

LP 38b


[0350]

LP 39b

LP 41b

LP 42b

LP 43b

LP 44b


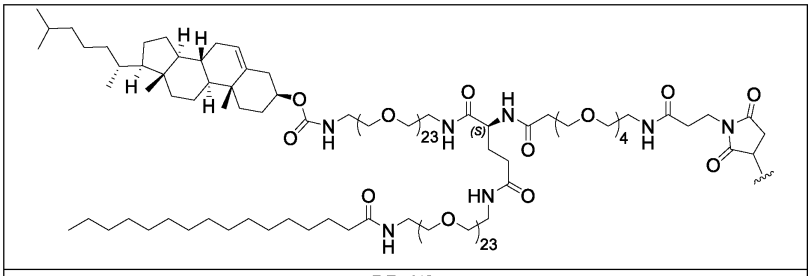
[0351]

LP 45b

LP 47b

LP 48b

LP 49b

LP 53b


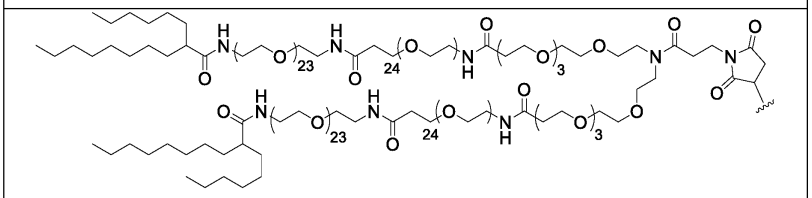
LP 54b

LP 55b

LP 56b

LP 57b

LP 58b

LP 59b

LP 60b

[0352]

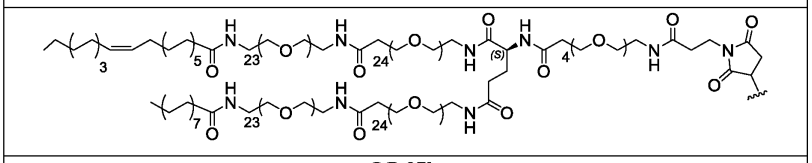
[0353]



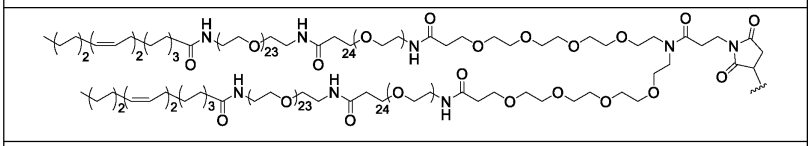
LP 61b



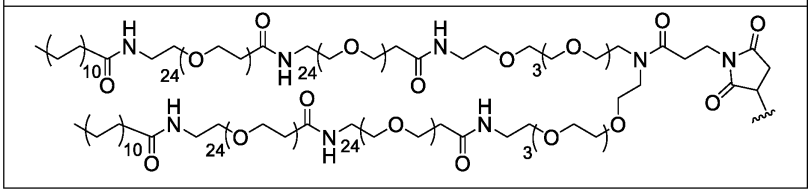
LP 62b



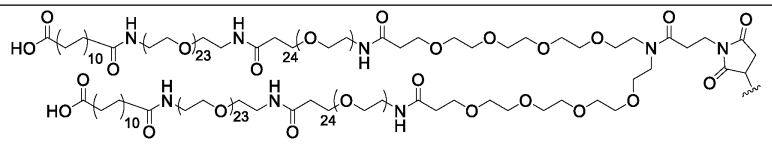
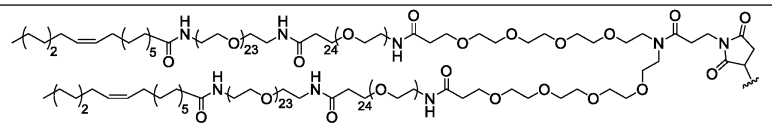
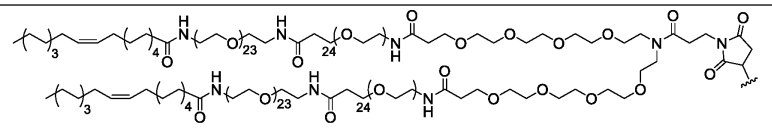
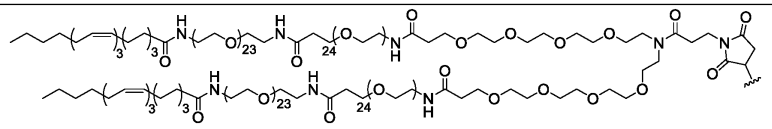
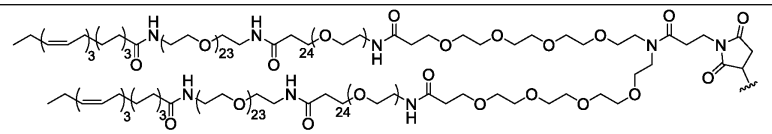
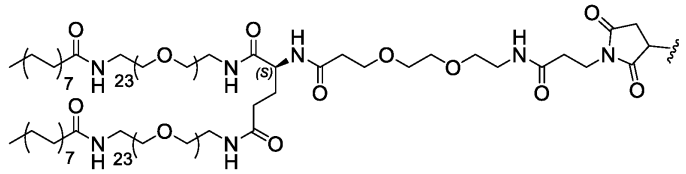
LP 87b



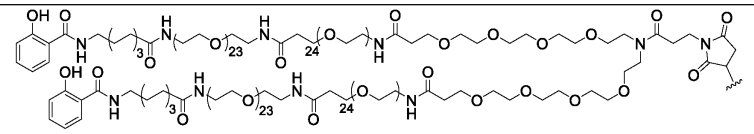
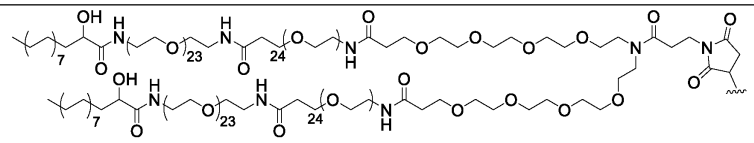
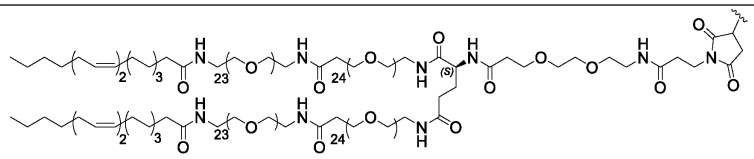
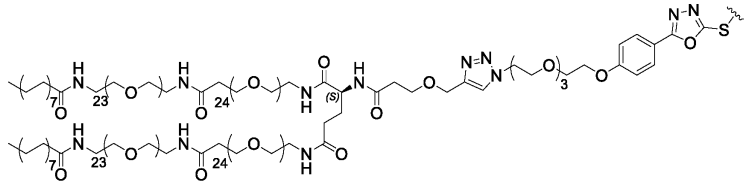
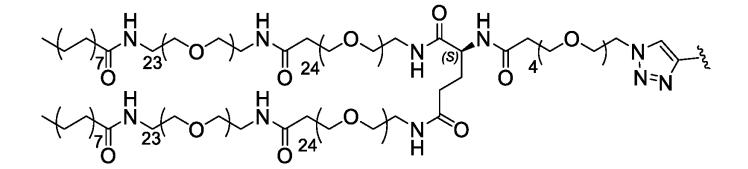
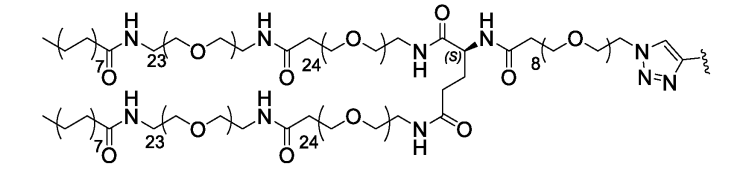
LP 89b



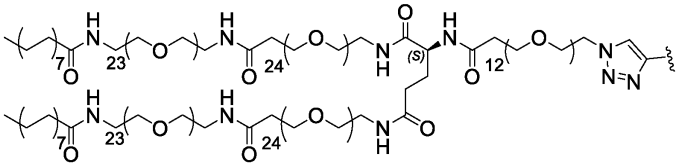
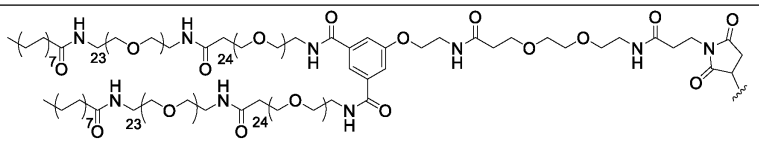
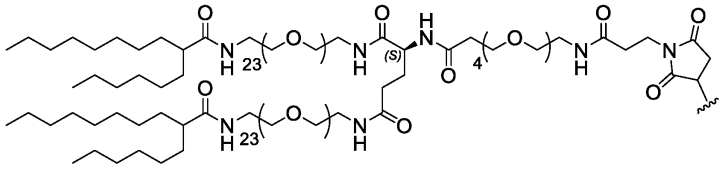
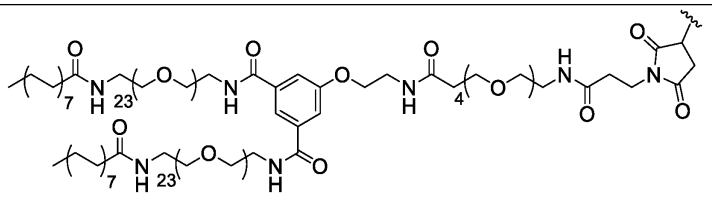
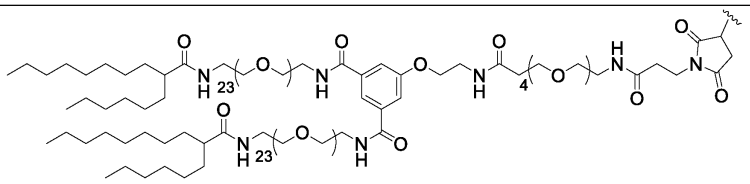
[0354]

LP 90b

LP 92b

LP 93b

LP 94b

LP 95b

LP 101b


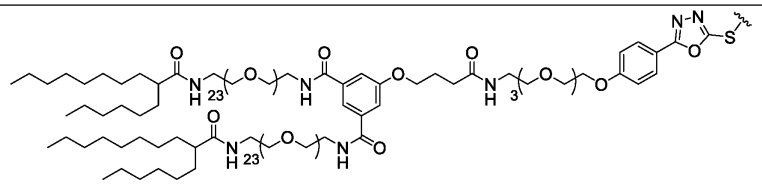
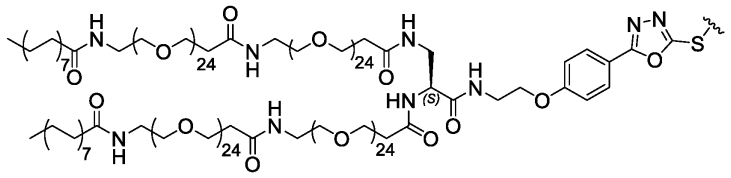
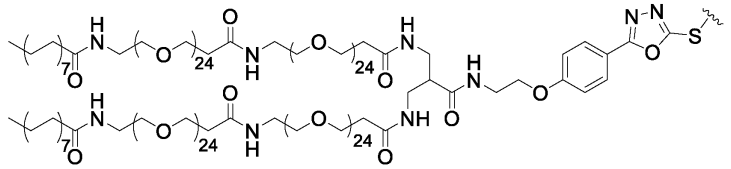
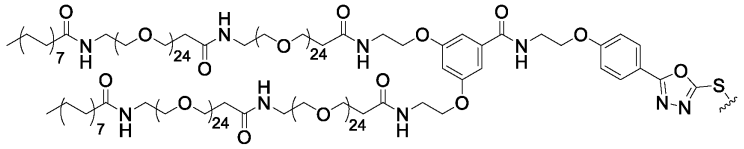
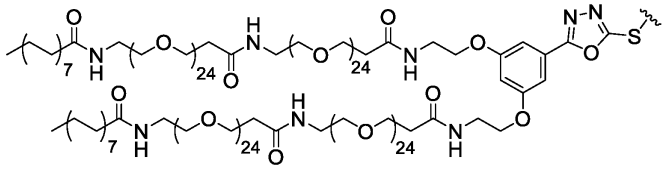
[0355]

LP 102b

LP 103b

LP 104b

LP 106b

LP 107b

LP 108b


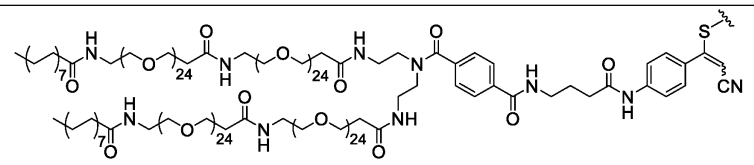
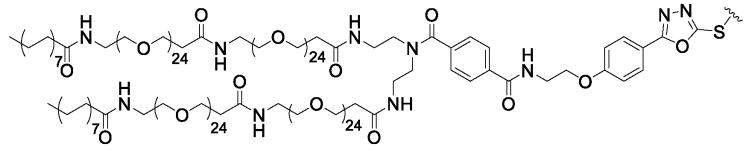
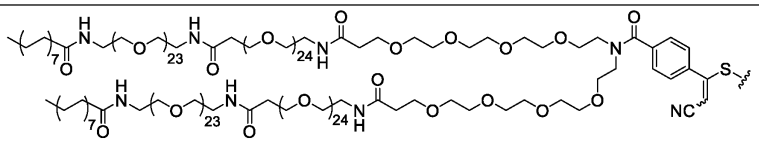
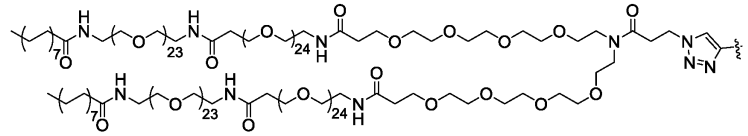
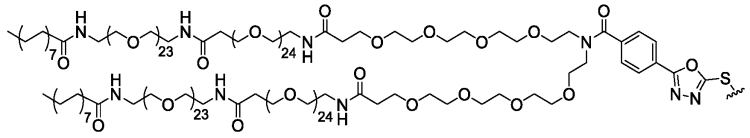
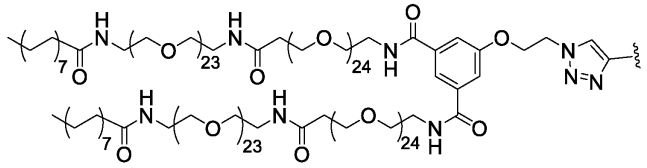
[0356]

LP 109b

LP 110b

LP 111b

LP 124b

LP 130b


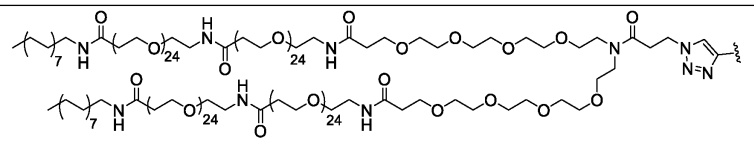
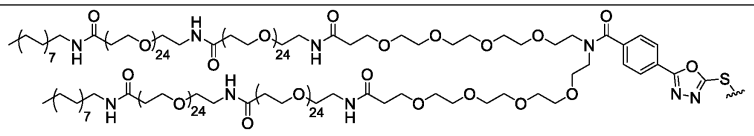
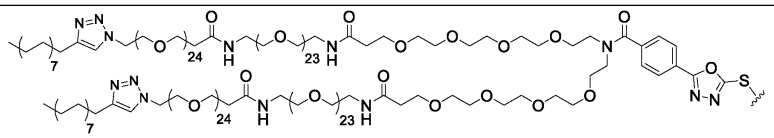
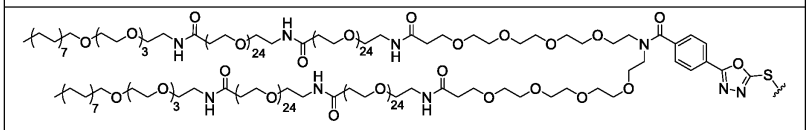
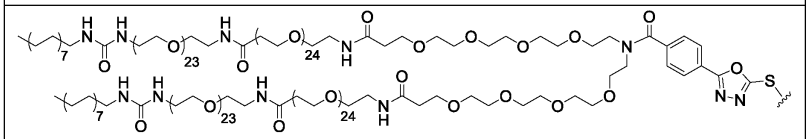
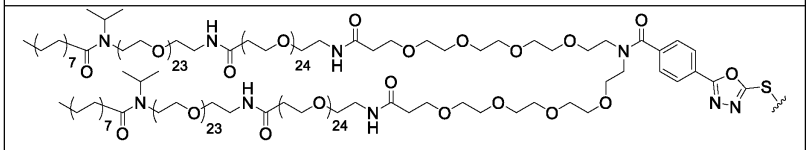
[0357]

LP 143b

LP 210b

LP 217b

LP 220b

LP 221b


[0358]

LP 223b

LP 224b

LP 225b

LP 226b

LP 238b

LP 240b


[0359]

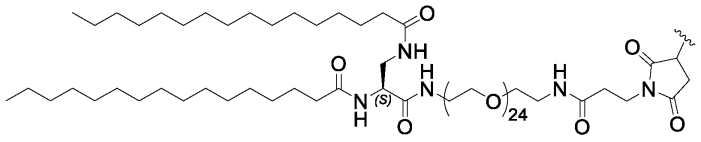
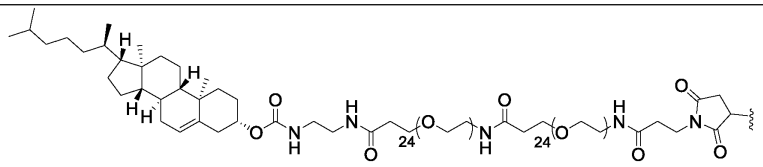
LP 246b

LP 247b

LP 339b

LP 340b

LP 357b

LP 358b


[0360] 또는 임의의 이들 지질 PK/PD 조정제의 제약상 허용되는 염, 여기서 각각의 ⌇은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0361] 본 발명의 또 다른 측면에서, RNAi 작용제는 표 18에서 확인되는 지질 PK/PD 조정제로 이루어진 군으로부터 선택된 지질 PK/PD 조정제에 접합될 수 있다.

[0362] 표 18: 본 발명의 예시적인 지질 PK/PD 조정제 (화합물 번호는 구조 앞에 나타냄).

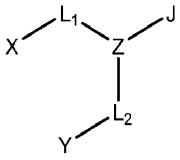
[0363]

LP 5b

LP 33b


[0364] 또는 임의의 이들 지질 PK/PD 조정제의 제약상 허용되는 염, 여기서 각각의 ⌇은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을

나타낸다.

[0365] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제에 연결하기에 적합한 지질 PK/PD 조정제 전구체는 화학식 (V)의 지질 PK/PD 조정제 전구체 또는 그의 제약상 허용되는 염일 수 있다:



(V)

[0366]

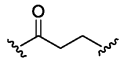
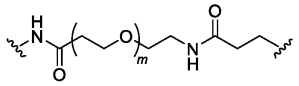
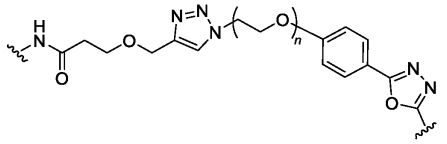
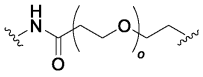
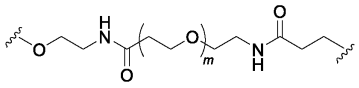
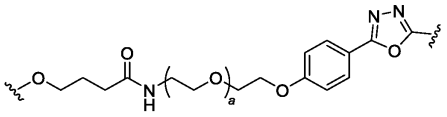
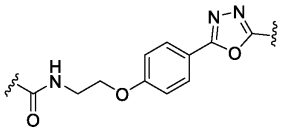
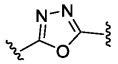
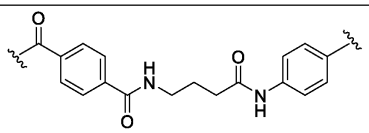
[0367] 여기서 Z, L_1, L_2, X, 및 Y는 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), 또는 (Ic)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에 대해 정의된 바와 같고; J는 L_{A5}-R_X이고; L_{A5}는 결합, 또는 R_X를 Z에 연결하는 2가 모이어티이고: R_X는 RNAi 작용제와의 접합을 위한 반응성 모이어티이다.

[0368] 일부 실시양태에서, J는 L_{A5}-R_X이고; L_{A5}는 결합, 또는 R_X를 Z에 연결하는 2가 모이어티이고; R_X는 RNAi 작용제와의 접합을 위한 반응성 모이어티이고; Z는 CH, 페닐 또는 N이고; L_1 및 L_2는 각각 독립적으로 적어도 약 5개의 PEG 단위를 포함하는 링커이고; X 및 Y는 각각 독립적으로 약 10 내지 약 50개의 탄소 원자를 포함하는 지질이다.

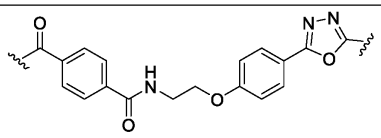
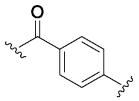
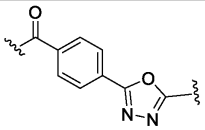
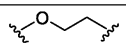
[0369] 일부 실시양태에서, L_{A5}는 화학식 (I), (Ia), (Ib), (Ib1), 또는 (Ic)의 지질 PK/PD 조정제의 임의의 실시양태에서 정의된 바와 같은 L_A이다. 일부 실시양태에서, L_{A5}는 표 19에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0370] 표 19: 본 발명의 예시적인 L_{A5} 모이어티.

[0371]

명칭	구조
테더 1-5	
테더 2-5	
테더 3-5	
테더 4-5	
테더 5-5	
테더 6-5	
테더 7-5	
테더 8-5	
테더 9-5	

[0372]

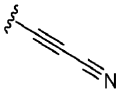
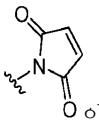
테더 10-5	
테더 11-5	
테더 12-5	
테더 13-5	

[0373] 여기서 각각의 m, n, o, 및 a는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30이고, 각각의 은 Z 또는 R_X에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0374] 일부 실시양태에서, 각각의 m은 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 21, 22, 23 또는 25이고; 각각의 n은 독립적으로 2, 3, 4 또는 5이고; 각각의 a는 독립적으로 2, 3 또는 4이고; 각각의 o는 독립적으로 2,

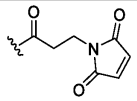
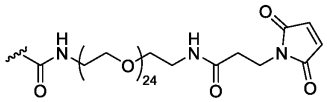
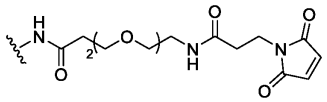
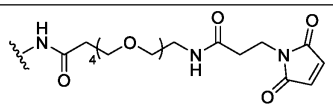
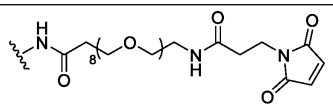
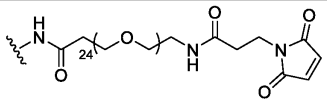
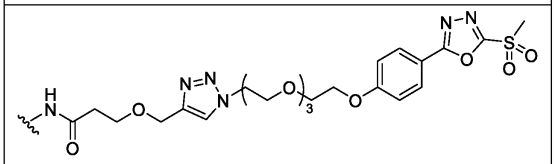
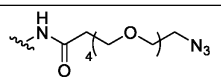
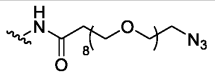
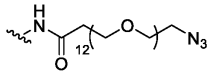
3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13이다.

[0375] 일부 실시양태에서, 각각의 m은 독립적으로 2, 4, 8, 또는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 n은 4이다. 일부 실시양태에서, 각각의 o는 독립적으로 4, 8, 또는 12이다. 일부 실시양태에서, 각각의 a는 3이다.

[0376] 일부 실시양태에서, R_X는 , , , 및 으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 각각의 은 L_{A5}에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, R_X는 이다. 일부 실시양태에서, R_X는 이다. 일부 실시양태에서, R_X는 이다. 일부 실시양태에서, R_X는 이다.

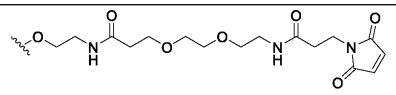
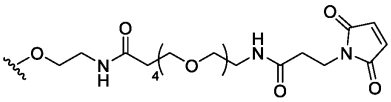
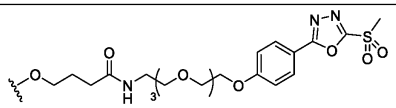
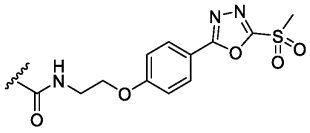
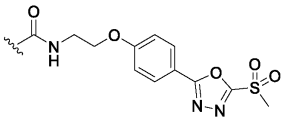
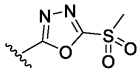
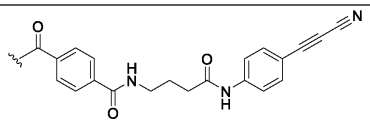
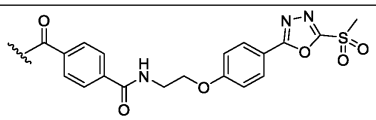
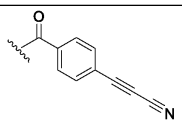
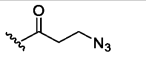
[0377] 일부 실시양태에서, J는 표 20에서 확인되는 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0378] 표 20: 본 발명의 예시적인 J 모이어티.

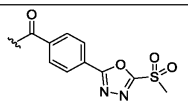
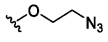
구조











[0379]

[0380]

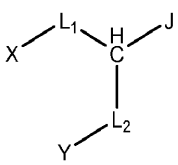
구조











[0381]

구조



[0382] 여기서 각각의  은 Z에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0383] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (Va)의 지질 PK/PD 조정제 전구체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



(Va)

[0384]

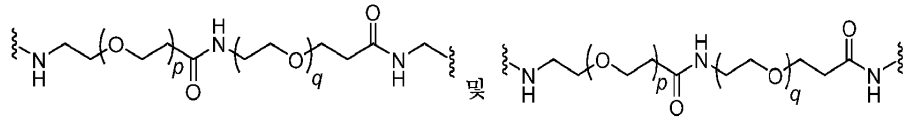
[0385] 여기서 J, L_1, L_2, X, 및 Y는 화학식 (V)의 지질 PK/PD 조정제 전구체의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같다.

[0386] 일부 실시양태에서, X 및 Y는 각각 독립적으로 표 4에 제시된 바와 같은 지질 3, 지질 4, 지질 5, 지질 6, 지질 7, 지질 10, 지질 12, 및 지질 19로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 ≈은 L_1 또는 L_2에 대한 연결 지점을 나타낸다.

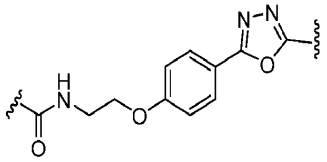
[0387] 일부 실시양태에서, 각각의 L_1 및 L_2는 표 2에 제시된 바와 같은 링커 2, 링커 3, 링커 4, 및 링커 5로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, 여기서 각각의 ≈은 화학식 (Va)의 X, Y, 또는 CH에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 23이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 24이다.

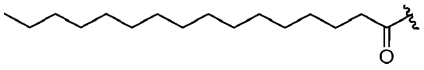
[0388] 일부 실시양태에서, L_{A5}는 표 19에 제시된 바와 같은 테더 2-5, 테더 3-5, 및 테더 4-5로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 ≈은 화학식 (Va)의 R_X 또는 CH에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, m은 2, 4, 8, 또는 24이다. 일부 실시양태에서, n은 4이다. 일부 실시양태에서, o는 4, 8, 또는 12이다.

[0389] 일부 실시양태에서, 각각의 L_1 및 L_2는 독립적으로



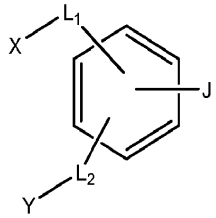
으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기서 각각의 p는 독립적으로 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25이고; 각각의 q는 독립적으로 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25이고; 각각의 ≈은 화학식 (Va)의 X, Y, 또는 CH에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 각각의 p는 24이다. 일부 실시양태에서, 각각의 q는 24이다.

[0390] 일부 실시양태에서, L_{A5}는  이고; 여기서 각각의 ≈은 화학식 (Va)의 R_X 또는 CH에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0391] 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는  이고, 여기서 ≈은 L_1 또는 L_2에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0392] 일부 실시양태에서, 화학식 (Va)의 지질 PK/PD 조정제 전구체는 표 21에 제시된 바와 같은 LP210-p 또는 LP217-p, 또는 이들 지질 PK/PD 조정제 전구체 중 어느 하나의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0393] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (Vb)의 지질 PK/PD 조정제 전구체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.



(Vb)

[0394]

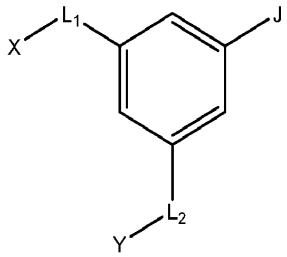
[0395] 여기서 J, L_1, L_2, X, 및 Y는 화학식 (V) 또는 (Va)의 지질 PK/PD 조정제 전구체의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같다.

[0396] 일부 실시양태에서, X 및 Y는 각각 독립적으로 표 4에 제시된 바와 같은 지질 3 및 지질 19로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 ~ 은 L_1 또는 L_2에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, X 및 Y는 각각 지질 3이다. 일부 실시양태에서, X 및 Y는 각각 지질 19이다.

[0397] 일부 실시양태에서, 각각의 L_1 및 L_2는 표 2에 제시된 바와 같은 링커 3, 링커 5, 및 링커 9로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, 여기서 각각의 ~ 은 X, Y, 또는 화학식 (Vb)의 페닐 고리에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, p는 23 또는 24이다. 일부 실시양태에서, q는 24이다.

[0398] 일부 실시양태에서, L_{A5}는 표 19에 제시된 바와 같은 테더 5-5, 테더, 6-5, 테더 7-5, 테더 8-5 및 테더 13-5로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 ~ 은 R_X 또는 화학식 (Vb)의 페닐 고리에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, m은 2 또는 4이다. 일부 실시양태에서, a는 3이다.

[0399] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (Vb1)의 지질 PK/PD 조정제 전구체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:

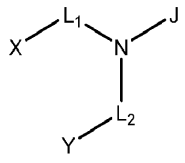


(Vb1)

[0400]

[0401] 여기서 J, L_1, L_2, X, 및 Y는 화학식 (V), Va 또는 Vb의 지질 PK/PD 조정제 전구체의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같다.

[0402] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (Vc)의 지질 PK/PD 조정제 전구체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



(Vc)

[0403]

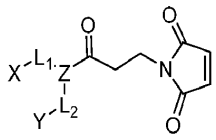
[0404] 여기서 J, L_1, L_2, X, 및 Y는 화학식 (V), (Va), (Vb) 또는 (Vb1)의 지질 PK/PD 조정제 전구체의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같다.

[0405] 일부 실시양태에서, X 및 Y는 각각 독립적으로 표 4에 제시된 바와 같은 지질 1, 지질 2, 지질 3, 지질 5, 지질 8, 지질 9, 지질 11, 지질 12, 지질 14, 지질 15, 지질 16, 지질 17, 지질 18, 지질 19, 지질 20, 지질 21, 지질 22, 지질 23, 및 지질 24로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 ~ 은 L_1 및 L_2에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 각각의 X 및 Y는 지질 1, 지질 2, 지질 3, 지질 5, 지질 8, 지질 9, 지질 11, 지질 12, 지질 14, 지질 15, 지질 16, 지질 17, 지질 18, 지질 19, 지질 20, 지질 21, 지질 22, 지질 23 또는 지질 24이다.

[0406] 일부 실시양태에서, 각각의 L_1 및 L_2는 표 2에 제시된 바와 같은 링커 1, 링커 6, 링커 10, 링커 11, 및 링커 12로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 각각의 ≋은 화학식 (Vc)의 X, Y, 또는 N에 대한 연결 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, p는 23 또는 24이다. 일부 실시양태에서, q는 24이다. 일부 실시양태에서, r은 4이다.

[0407] 일부 실시양태에서, L_{A5}는 표 19에 제시된 바와 같은 테더 1-5, 테더 9-5, 테더 10-5, 테더 11-5 또는 테더 12-5로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 ≋은 RNAi 작용제 또는 화학식 (Vc)의 N에 대한 연결 지점을 나타낸다.

[0408] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (Vd)의 지질 PK/PD 조정제 전구체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:

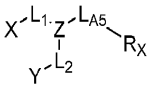


(Vd)

[0409]

[0410] 여기서 Z, L_1, L_2, X, 및 Y는 화학식 (V), Va, Vb, Vb1, 또는 Vc의 지질 PK/PD 조정제 전구체의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같다.

[0411] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (Ve)의 지질 PK/PD 조정제 전구체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:

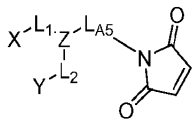


(Ve)

[0412]

[0413] 여기서 Z, L_1, L_2, R_X, L_{A5}, X, 및 Y는 화학식 (V), (Va), (Vb) (Vb1), (Vc) 또는 (Vd)의 지질 PK/PD 조정제 전구체의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같다.

[0414] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (Ve1)의 지질 PK/PD 조정제 전구체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:

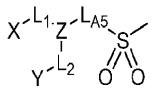


(Ve1)

[0415]

[0416] 여기서 Z, L_1, L_2, L_{A5}, X, 및 Y는 화학식 (V), (Va), (Vb) (Vb1), (Vc), (Vd), 또는 (Ve)의 지질 PK/PD 조정제 전구체의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같다.

[0417] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (Ve2)의 지질 PK/PD 조정제 전구체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



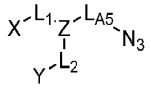
(Ve2)

[0418]

[0419] 여기서 Z, L_1, L_2, L_{A5}, X, 및 Y는 화학식 (V), (Va), (Vb) (Vb1), (Vc), (Vd), (Ve), 또는 (Ve1)의 지질 PK/PD

조정제 전구체의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같다.

[0420] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (Ve3)의 지질 PK/PD 조정제 전구체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:

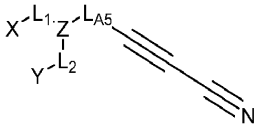


(Ve3)

[0421]

[0422] 여기서 Z, L_1, L_2, L_{A5}, X, 및 Y는 화학식 (V), (Va), (Vb) (Vb1), (Vc), (Vd), (Ve), (Ve1), 또는 (Ve2)의 지질 PK/PD 조정제 전구체의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같다.

[0423] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (Ve4)의 지질 PK/PD 조정제 전구체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



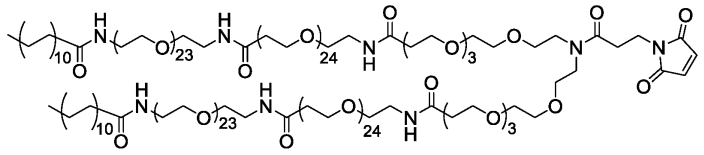
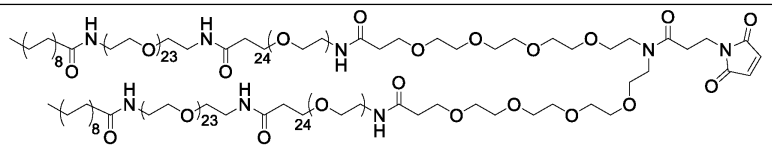
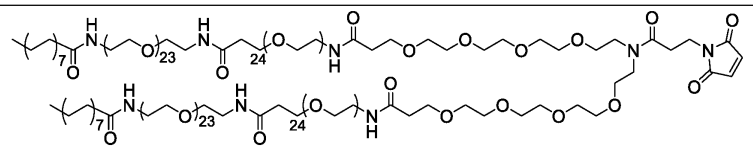
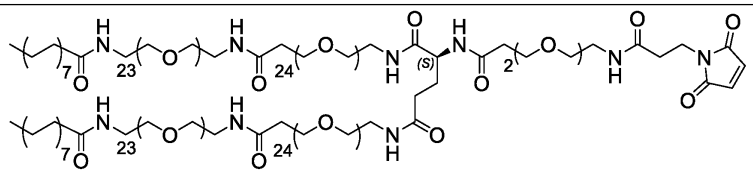
(Ve4)

[0424]

[0425] 여기서 Z, L_1, L_2, L_{A5}, X, 및 Y는 화학식 (V), (Va), (Vb) (Vb1), (Vc), (Vd), (Ve), (Ve1), (Ve2), 또는 (Ve3)의 지질 PK/PD 조정제 전구체의 임의의 실시양태에 정의된 바와 같다.

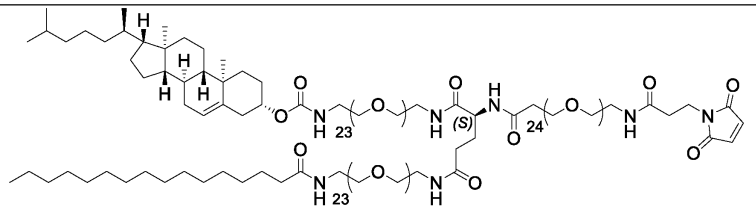
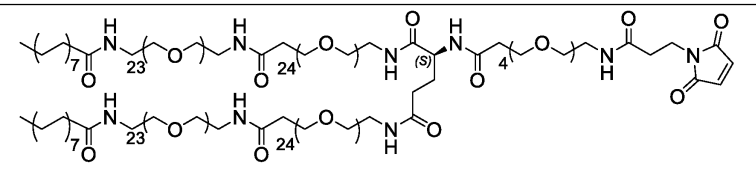
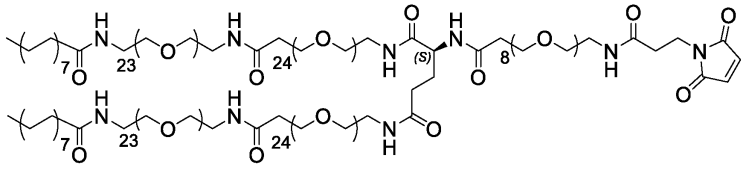
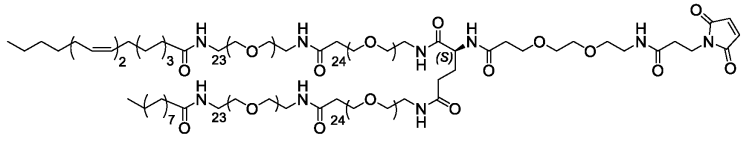
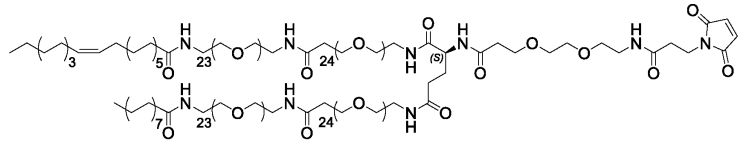
[0426] 일부 실시양태에서, 지질 PK/PD 조정제 전구체는 표 21에서 확인되는 지질 PK/PD 조정제 전구체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0427] 표 21: 본 발명의 예시적인 지질 PK/PD 조정제 전구체 (화합물 번호는 구조 앞에 나타냄).

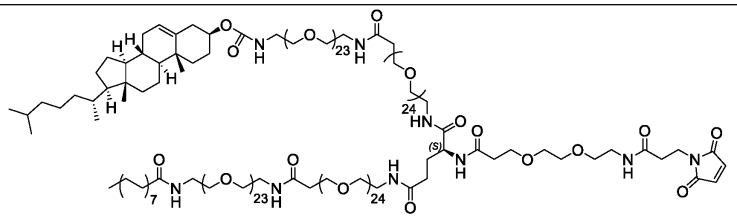
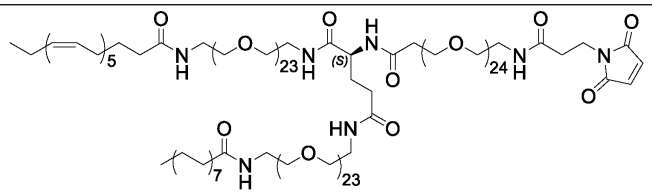
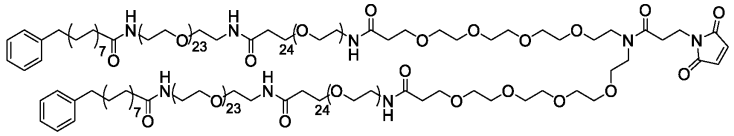
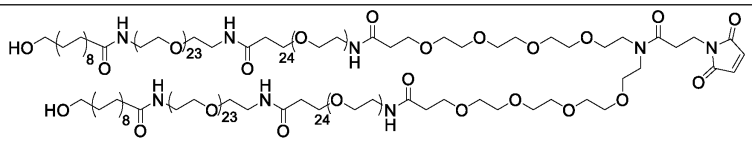
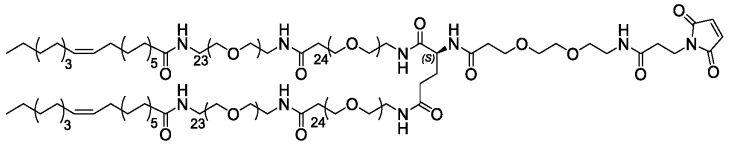
LP1-p

LP28-p

LP29-p

LP38-p


[0428]

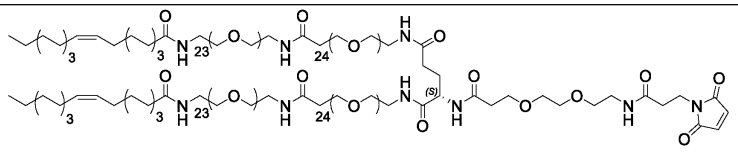
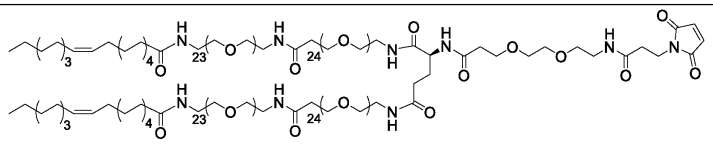
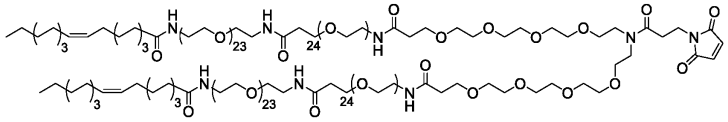
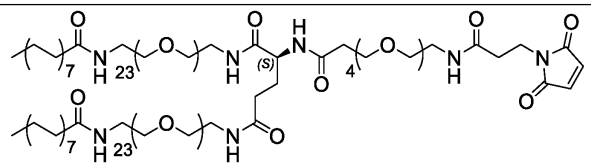
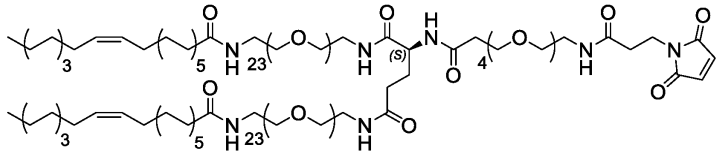
[0429]

LP39-p

LP41-p

LP42-p

LP43-p

LP44-p


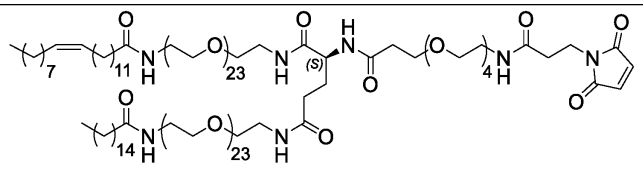
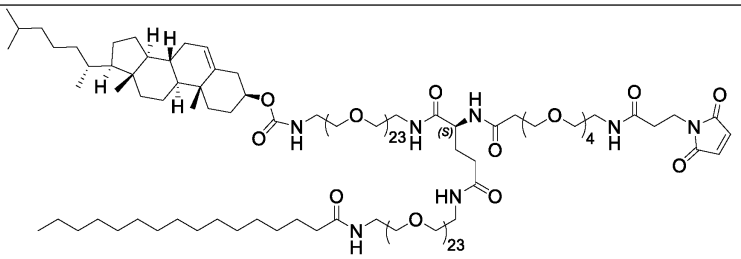
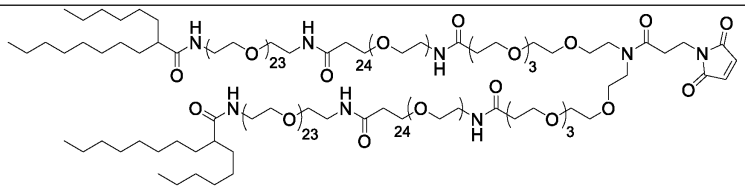
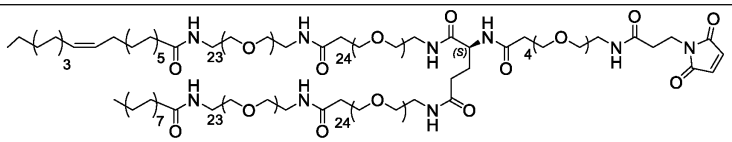
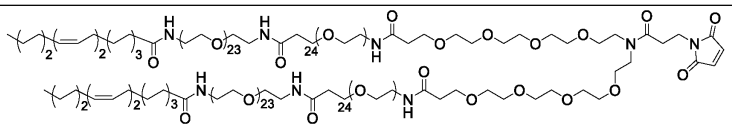
[0430]

LP45-p

LP47-p

LP48-p

LP49-p

LP53-p


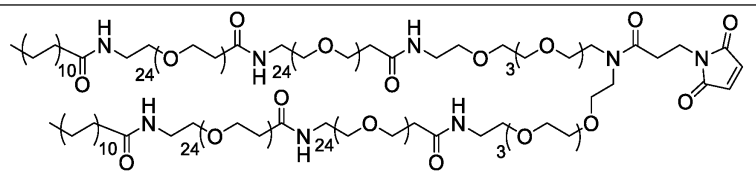
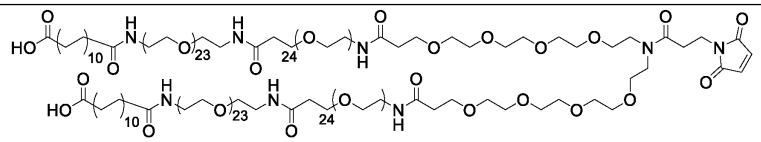
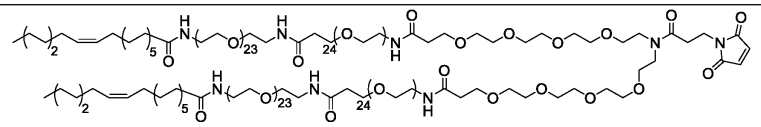
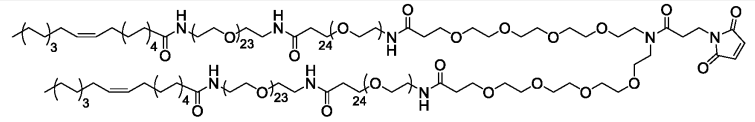
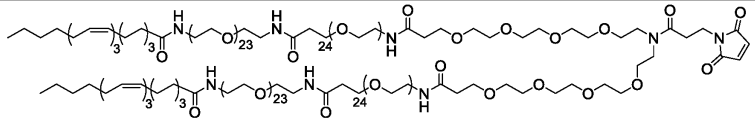
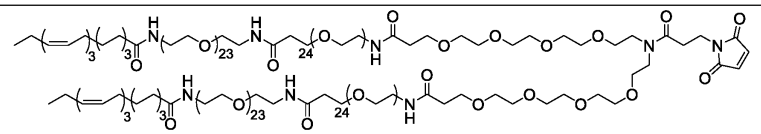
[0431]

LP54-p

LP55-p

LP56-p

LP57-p

LP58-p


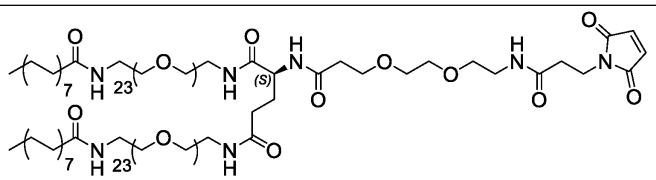
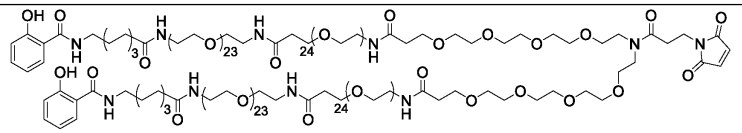
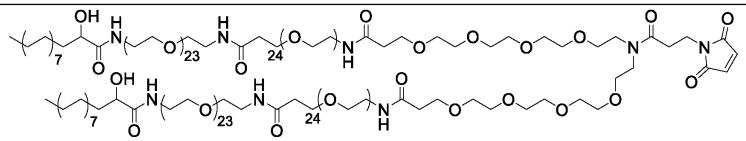
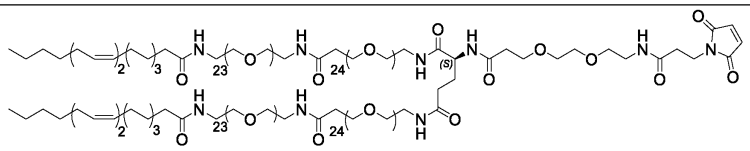
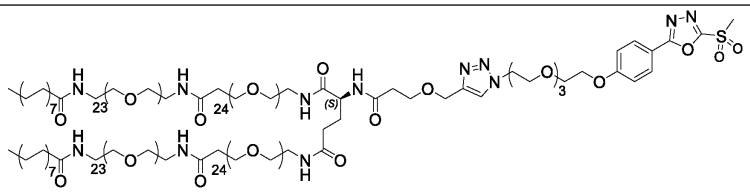
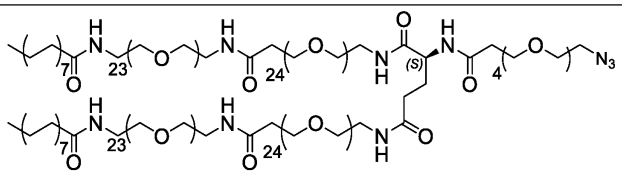
[0432]

LP59-p

LP60-p

LP61-p

LP62-p

LP87-p


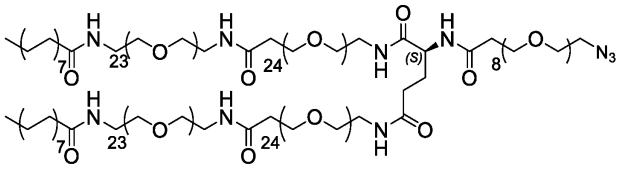
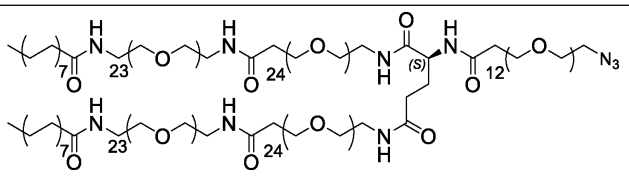
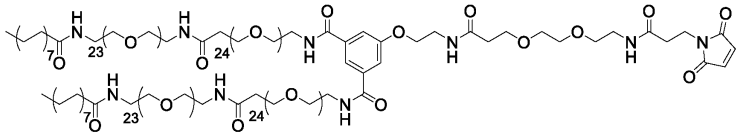
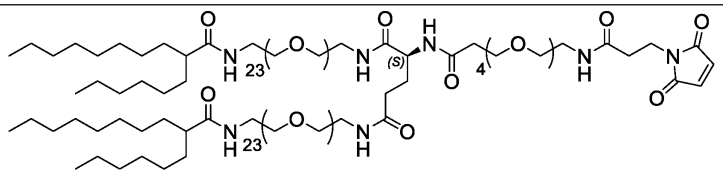
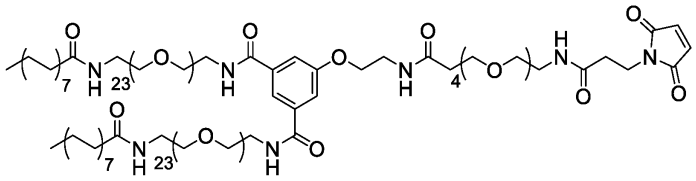
[0433]

LP89-p

LP90-p

LP92-p

LP93-p

LP94-p

LP95-p


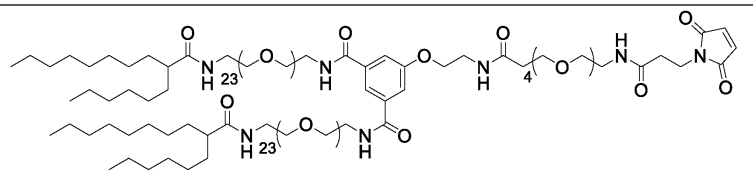
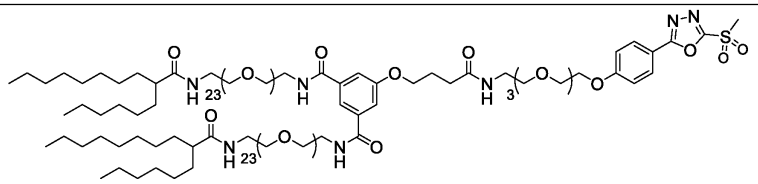
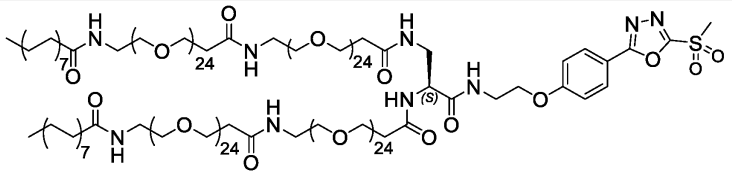
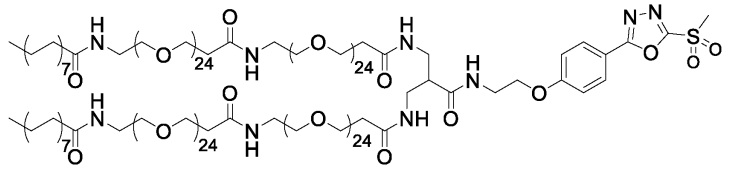
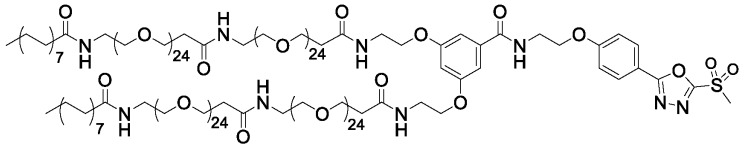
[0434]

LP101-p

LP102-p

LP103-p

LP104-p

LP106-p

LP107-p


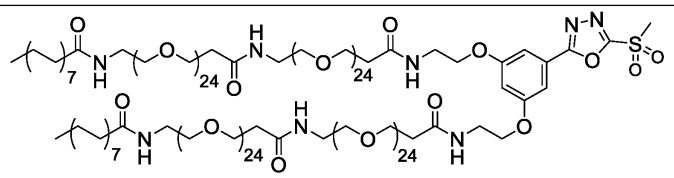
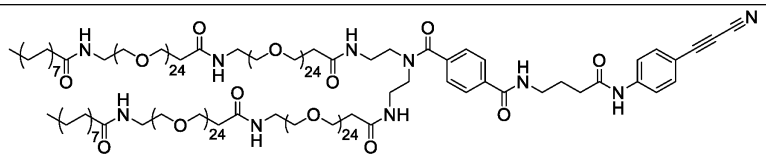
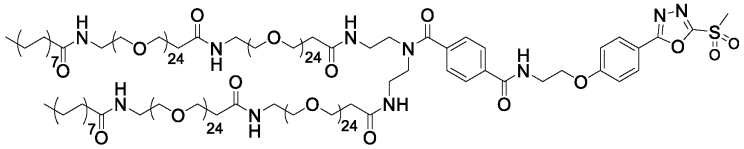
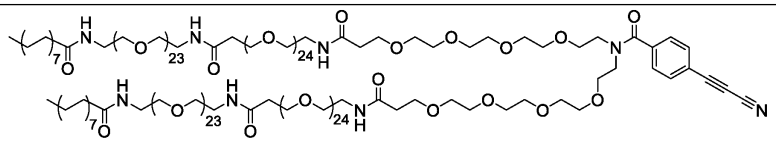
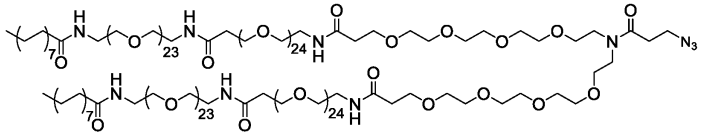
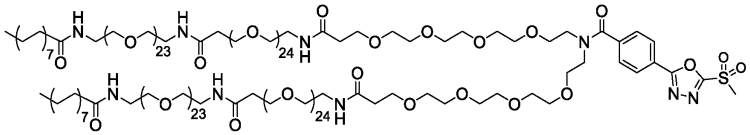
[0435]

LP108-p

LP109-p

LP110-p

LP111-p

LP124-p


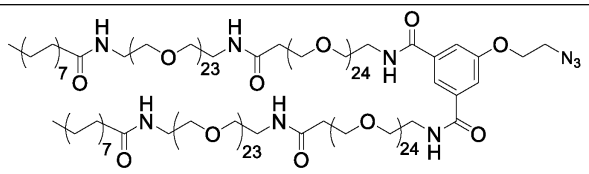
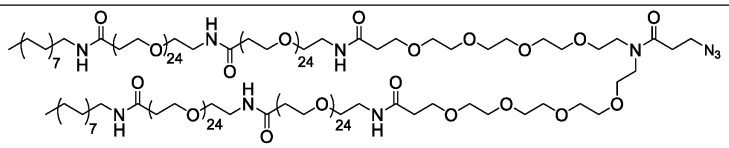
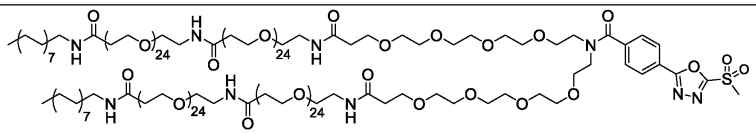
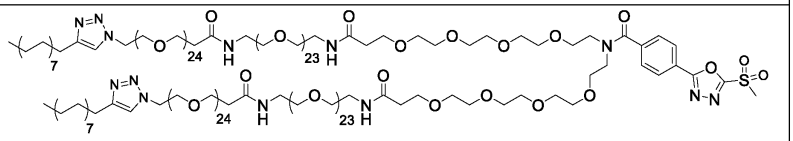
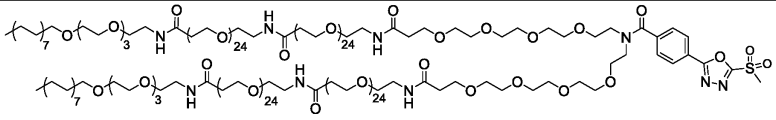
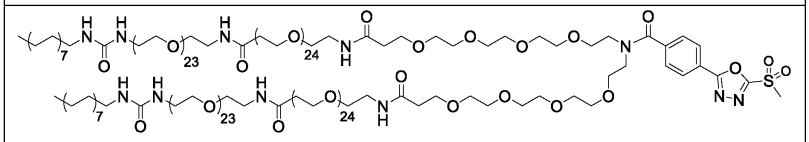
[0436]

LP130-p

LP143-p

LP210-p

LP217-p

LP220-p


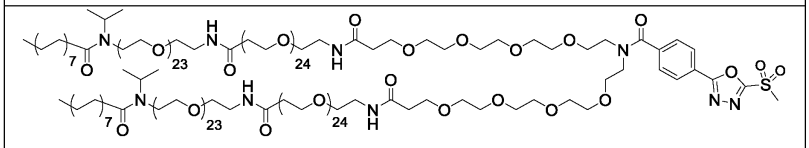
[0437]

LP221-p

LP223-p

LP224-p

LP225-p

LP226-p

LP238-p


[0438]

LP240-p

LP246-p

LP247-p

LP339-p

LP340-p

LP357-p


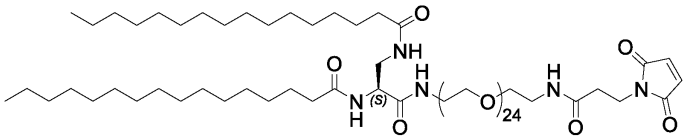
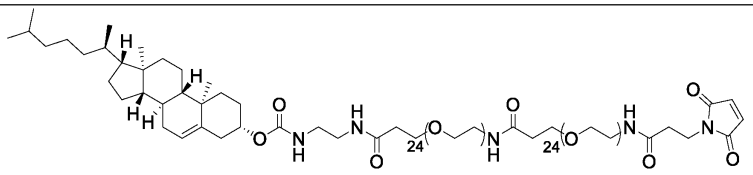
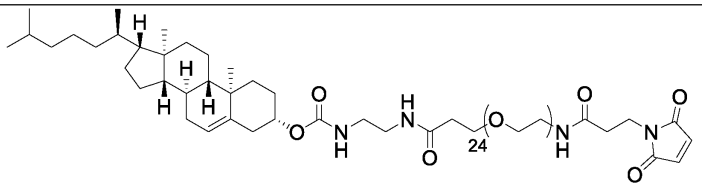
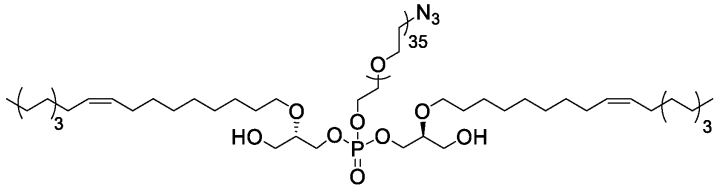
[0439]

LP358-p


[0440] 또는 임의의 이들 지질 PK/PD 조정제 전구체의 제약상 허용되는 염.

[0441] 본 발명의 또 다른 측면에서, 지질 PK/PD 조정제 전구체는 표 22에서 확인되는 지질 PK/PD 조정제 전구체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0442] 표 22: 본 발명의 예시적인 지질 PK/PD 조정제 전구체 (화합물 명칭은 구조 앞에 나타냄).

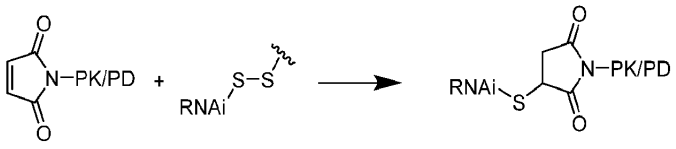
LP5-p

LP33-p

LP81-p

LP105-p


[0443]

[0444] 또는 임의의 이들 지질 PK/PD 조정제 전구체의 제약상 허용되는 염.

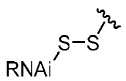
[0445] 일부 실시양태에서, 전달 비히클은 하나 이상의 PK/PD 조정제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 전달 비히클은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7종 또는 그 초과의 PK/PD 조정제를 포함한다.

[0446] PK/PD 조정제 전구체는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 RNAi 작용제에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 말레이미드 모이어티를 포함하는 PK/PD 조정제 전구체는 디술피드 연결을 포함하는 RNAi 작용제와 반응하여, RNAi 작용제에 접합된 PK/PD 조정제를 포함하는 화합물을 형성할 수 있다. 디술피드는 환원되고, 마이클-첨가 반응에 의해 말레이미드에 첨가될 수 있다. 예시적인 반응식을 하기에 나타낸다:

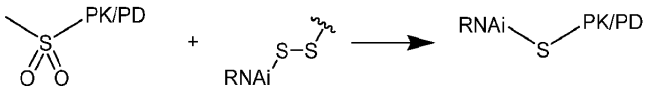


화합물 A

[0447]

[0448] 여기서 화합물 A는 말레이미드 모이어티를 포함하는 PK/PD 조정제 전구체이고, RNAi는 RNAi 작용제를 포함하고, ≀은 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 기에 대한 연결 지점을 나타낸다. 상기 반응식의 일부 실시양태에서,  은 알킬 기, 예컨대 헥실 (C_6H_{13})에 부착된다.

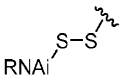
[0449] 일부 실시양태에서, PK/PD 조정제 전구체는 술폰 모이어티를 포함할 수 있고, 디술피드와 반응할 수 있다. 예시적인 반응식을 하기에 나타낸다:



화합물 B

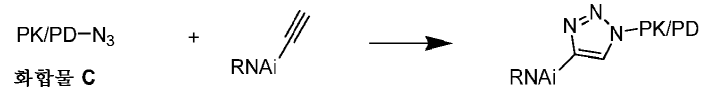
[0450]

[0451] 여기서 화합물 B는 술폰 모이어티를 포함하는 PK/PD 조정제 전구체이고, RNAi는 RNAi 작용제를 포함하고, ≀은 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 기에 대한 연결 지점을 나타낸다. 상기 반응식의 일부 경우에,



은 알킬 기, 예컨대 헥실 (C_6H_{13})에 부착된다.

[0452] 일부 실시양태에서, PK/PD 조정제 전구체는 아지드 모이어티를 포함할 수 있고, 하기 반응식에 따라 알킨을 포함하는 RNAi 작용제와 반응하여, RNAi 작용제에 접합된 PK/PD 조정제를 포함하는 화합물을 형성할 수 있다:

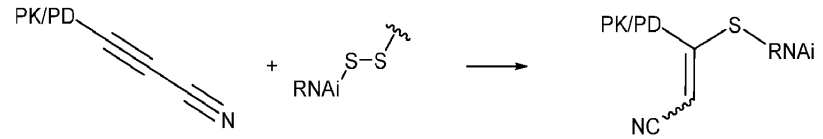


화합물 C

[0453]

[0454] 여기서 화합물 C는 아지드 모이어티를 포함하는 PK/PD 조정제 전구체이고, RNAi는 RNAi 작용제를 포함한다.

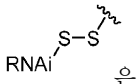
[0455] 일부 실시양태에서, PK/PD 조정제 전구체는 알킨 모이어티를 포함할 수 있고, 하기 반응식에 따라 디술피드를 포함하는 RNAi 작용제와 반응하여 RNAi 작용제에 접합된 PK/PD 조정제를 포함하는 화합물을 형성할 수 있다:



화합물 D

[0456]

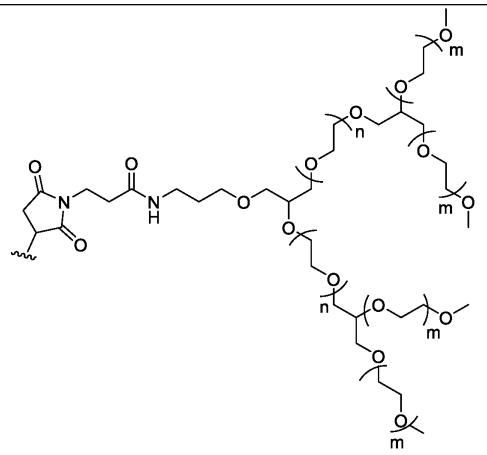
[0457] 여기서 화합물 D는 알킨을 포함하는 PK/PD 조정제 전구체이고, RNAi는 RNAi 작용제를 포함하고, ≀은 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 기에 대한 연결 지점을 나타낸다. 상기 반응식의 일부 경우에,



은 알킬 기, 예컨대 헥실 (C_6H_{13})에 부착된다.

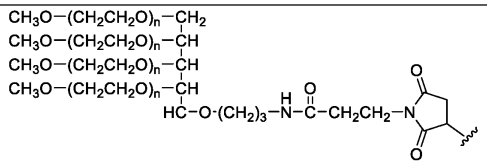
[0458] 일부 실시양태에서, PK/PD 조정제는 센스 또는 안티센스 가닥의 5' 말단, 센스 또는 안티센스 가닥의 3' 말단, 또는 RNAi 작용제의 내부 뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, RNAi 작용제는 센스 가닥의 3' 말단에서 디술피드-함유 모이어티와 함께 합성되고, PK/PD 조정제 전구체는 상기 제시된 임의의 적절한 일반적 합성 반응식을 사용하여 센스 가닥의 3' 말단에 접합될 수 있다.

[0459] RNAi 작용제에 공유 연결되는 예시적인 PK/PD 조정제를 하기에 나타낸다:



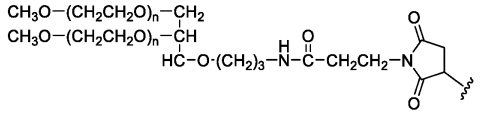
PEG40K (2x2-아암),

여기서 n 및 m은 각각 독립적으로 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 40 킬로달톤임



PEG40K (4-아암),

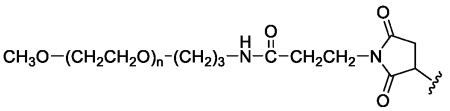
여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 40 킬로달톤임



PEG40K (2-아암),

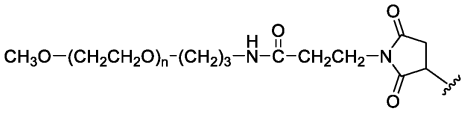
여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 40 킬로달톤임

[0460]



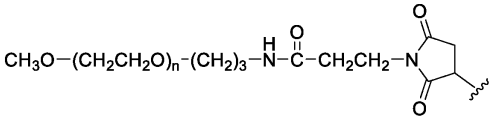
PEG40K,

여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 40 킬로달톤임



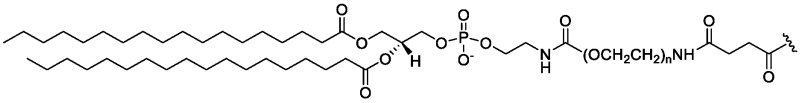
PEG10K,

여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 10 킬로달톤임



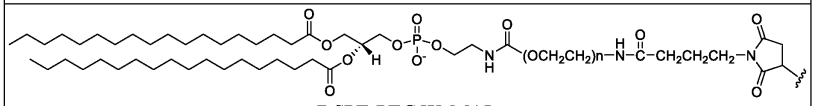
PEG5K,

여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 5 킬로달톤임



DSPE-PEG5K-NHS

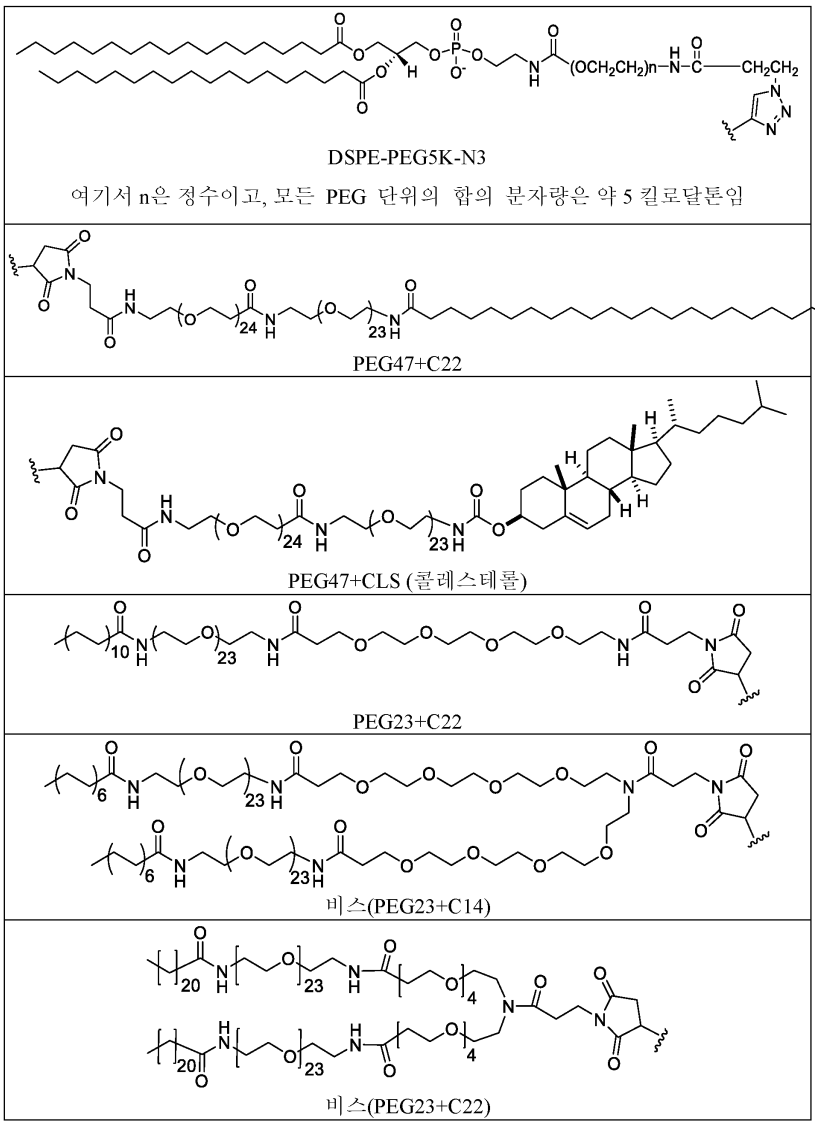
여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 5 킬로달톤임



DSPE-PEG5K-MAL

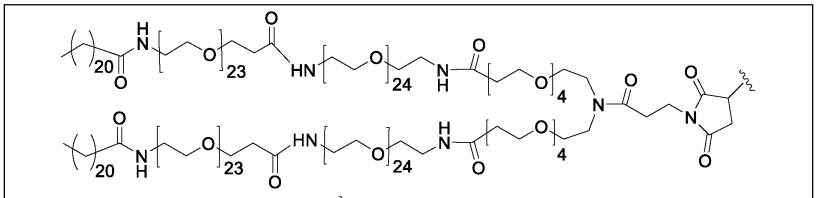
여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 5 킬로달톤임

[0461]

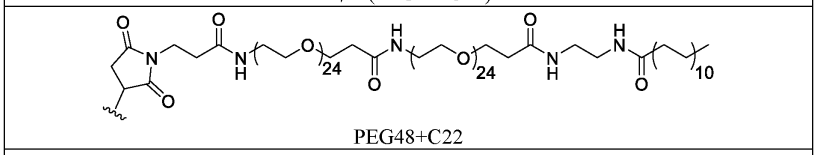

DSPE-PEG5K-N3
여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 5 킬로달톤임
PEG47+C22
PEG47+CLS (콜레스테롤)
PEG23+C22
비스(PEG23+C14)
비스(PEG23+C22)

[0462]

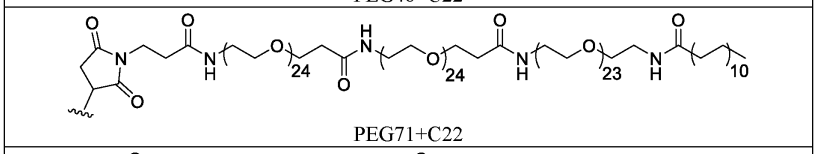
[0463]



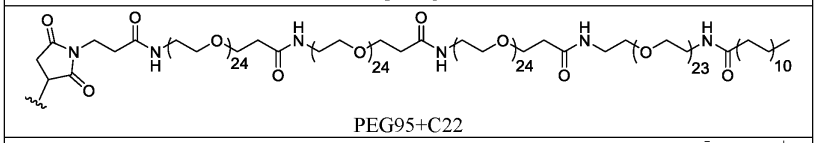
비스(PEG47+C22)



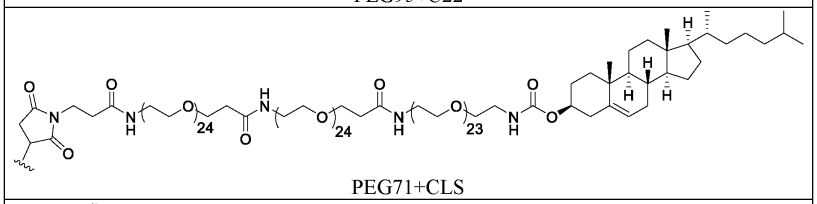
PEG48+C22



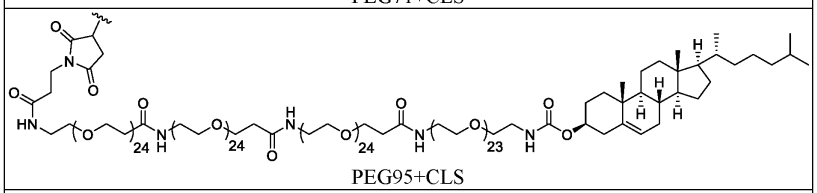
PEG71+C22



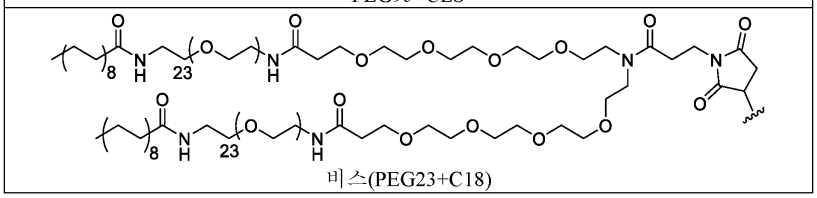
PEG95+C22



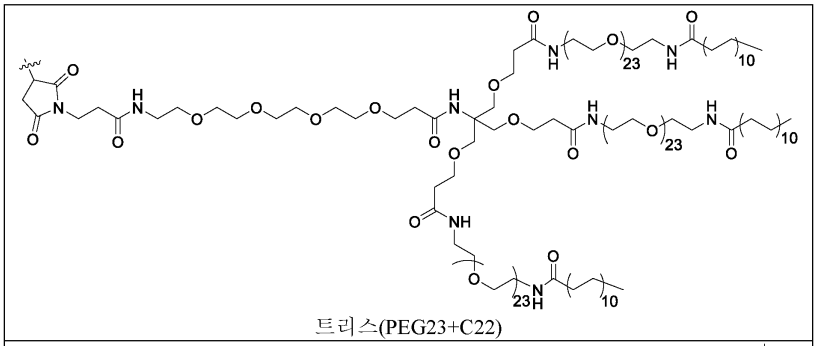
PEG71+CLS



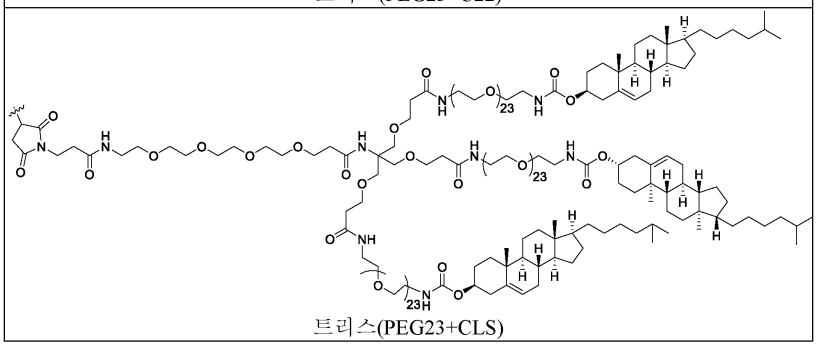
PEG95+CLS



비스(PEG23+C18)

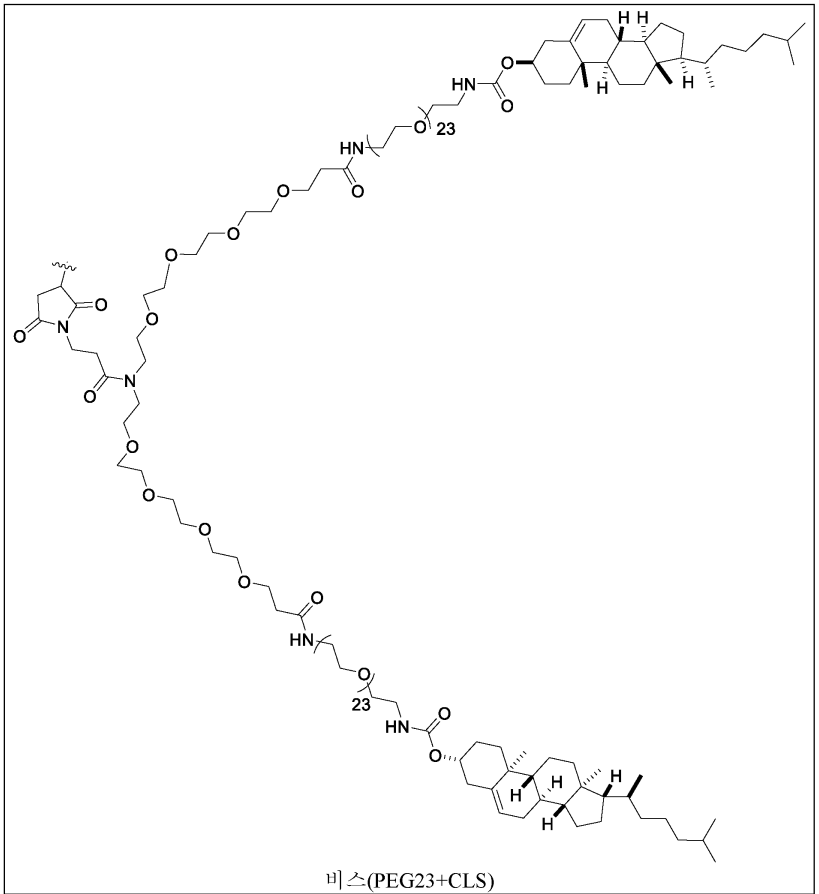


트리스(PEG23+C22)

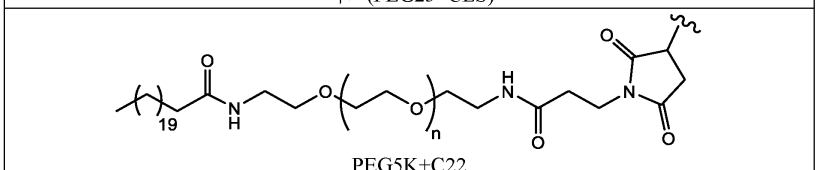


트리스(PEG23+CLS)

[0464]



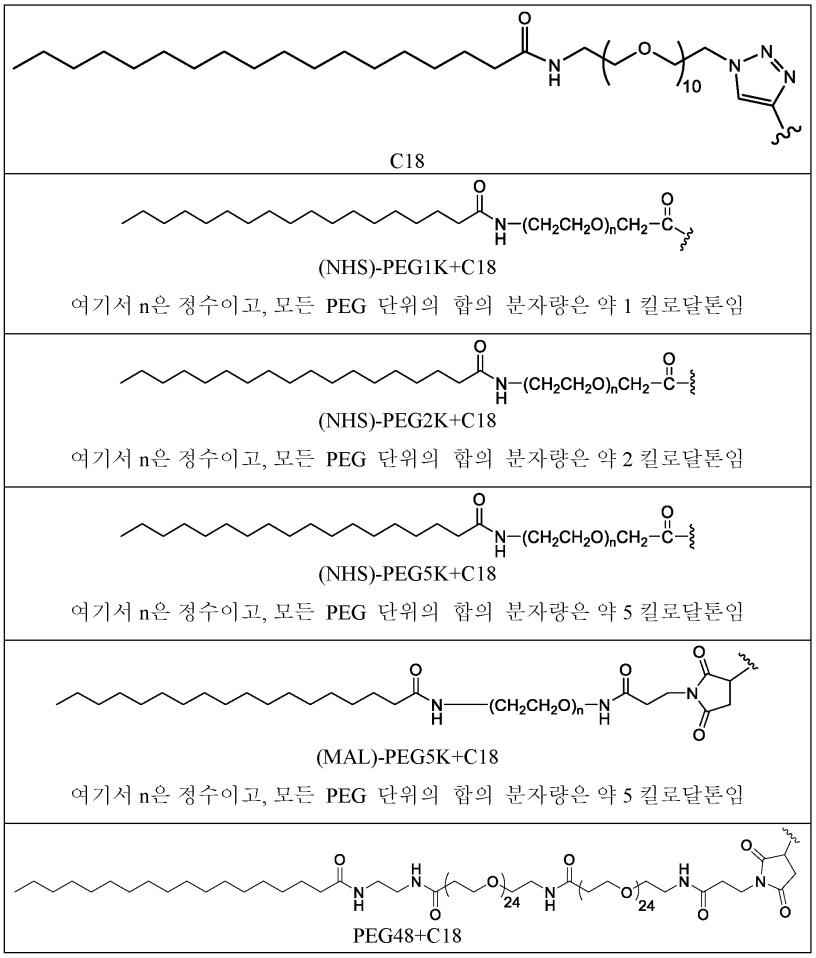
비스(PEG23+CLS)



PEG5K+C22

여기서 n은 정수이고, 모든 PEG 단위의 합의 분자량은 약 5 킬로달톤임

[0465]



[0466]

[0467] 또는 임의의 이들 PK/PD 조정제의 제약상 허용되는 염, 여기서 ≀은 RNAi 작용제에 대한 연결 지점을 나타냄.

[0468] 연결기 및 전달 작용제

[0469] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제는 연결기 또는 전달 작용제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 1개 이상의 비-뉴클레오티드 기를 함유하거나 또는 그에 접합된다. 비-뉴클레오티드 기는 RNAi 작용제의 표적화, 전달 또는 부착을 증진시킬 수 있다. 연결기의 예는 표 23에 제공된다. 비-뉴클레오티드 기는 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 3' 및/또는 5' 말단에 공유 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, RNAi 작용제는 센스 가닥의 3' 및/또는 5' 단부에 연결된 비-뉴클레오티드 기를 함유한다. 일부 실시양태에서, 비-뉴클레오티드 기는 RNAi 작용제 센스 가닥의 5' 말단에 연결된다. 비-뉴클레오티드 기는 링커/연결기를 통해 RNAi 작용제에 직접적으로 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-뉴클레오티드 기는 불안정성, 절단성 또는 가역적 결합 또는 링커를 통해 RNAi 작용제에 연결된다.

[0470] 일부 실시양태에서, 비-뉴클레오티드 기는 그것이 부착된 RNAi 작용제 또는 접합체의 약동학적 또는 생체분포 특성을 증진시켜 접합체의 세포- 또는 조직-특이적 분포 및 세포-특이적 흡수를 개선시킨다. 일부 실시양태에서, 비-뉴클레오티드 기는 RNAi 작용제의 세포내이입을 증진시킨다.

[0471] 5'-말단 및/또는 3'-말단에 반응성 기, 예컨대 아미노 기 (본원에서 아민으로도 지칭됨)를 갖는 본원에 기재된 RNAi 작용제가 합성될 수 있다. 반응성 기는 후속적으로 관련 기술분야에 전형적인 방법을 사용하여 표적화 모이어티를 부착시키는 데 사용될 수 있다.

[0472] 예를 들어, 일부 실시양태에서, RNAi 작용제의 센스 가닥의 5'-말단에 NH_2-C_6 기를 갖는 본원에 개시된 RNAi 작용제가 합성된다. 후속적으로 말단 아미노 기를 반응시켜, 예를 들어 하나 이상의 인테그린 (즉, 인테그린 표적화 리간드) 또는 PK/PD 조정제에 대해 친화도를 갖는 화합물을 포함하는 기와 접합체를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 RNAi 작용제는 RNAi 작용제의 센스 가닥의 5'-말단에 1개 이상의 알킨 기를 갖도록 합성된다. 후속적으로 말단 알킨 기(들)를 반응시켜, 예를 들어 표적화 리간드를 포함하는 기와 접합체를

형성할 수 있다.

[0473] 일부 실시양태에서, 표적화 기는 인테그린 표적화 리간드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 인테그린 표적화 리간드는 인테그린 알파-v-베타 6에 대해 친화도를 갖는 화합물을 포함한다. 인테그린 표적화 리간드의 사용은 그의 각각의 표면 상에 각각의 인테그린을 갖는 세포에 대한 세포-특이적 표적화를 용이하게 할 수 있고, 인테그린 표적화 리간드의 결합은 그것이 연결된 RNAi 작용제의 세포, 예컨대 골격근 세포 내로의 진입을 용이하게 할 수 있다. 표적화 리간드, 표적화 기, 및/또는 PK/PD 조정제는 관련 기술분야에 일반적으로 공지된 방법을 사용하여 RNAi 작용제의 3' 및/또는 5' 말단에, 및/또는 RNAi 작용제 상의 내부 뉴클레오티드에 부착될 수 있다. 표적화 리간드 및 표적화 기, 예컨대 인테그린 αvβ6의 제조는 하기 실시예 3에 기재되어 있다.

[0474] 본 개시내용의 실시양태는 RNAi 작용제를 골격근 세포에 생체내 전달하기 위한 제약 조성물을 포함한다. 이러한 제약 조성물은, 예를 들어 인테그린 αvβ6에 대해 친화도를 갖는 인테그린 표적화 리간드를 포함하는 표적화 기에 접합된 RNAi 작용제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 인테그린 αvβ6에 대해 친화도를 갖는 화합물로 구성된다.

[0475] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 RNAi 작용제는 다음 조직 중 하나 이상에서 유전자 발현을 감소시킬 수 있다: 삼두근, 이두근, 사두근, 비복근, 가자미근, EDL (장지신근), TA (전경골근) 및/또는 횡경막.

[0476] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제는 연결기가 존재하도록 합성되고, 이는 이어서 표적화 리간드, 표적화 기, PK/PD 조정제, 또는 또 다른 유형의 전달 중합체 또는 전달 비히클에 대한 RNAi 작용제의 공유 연결을 용이하게 할 수 있다. 연결기는 RNAi 작용제 센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 3' 및/또는 5' 말단에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 연결기는 RNAi 작용제 센스 가닥에 연결된다. 일부 실시양태에서, 연결기는 RNAi 작용제 센스 가닥의 5' 또는 3' 말단에 접합된다. 일부 실시양태에서, 연결기는 RNAi 작용제 센스 가닥의 5' 말단에 접합된다. 연결기의 예는 Alk-SMPT-C6, Alk-SS-C6, DBCO-TEG, Me-Alk-SS-C6, 및 C6-SS-Alk-Me, 반응성 기, 예컨대 1급 아민 및 알킨, 알킬 기, 무염기성 잔기/뉴클레오티드, 아미노산, 트리알킨 관능화 기, 리비톨, 및/또는 PEG 단위를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

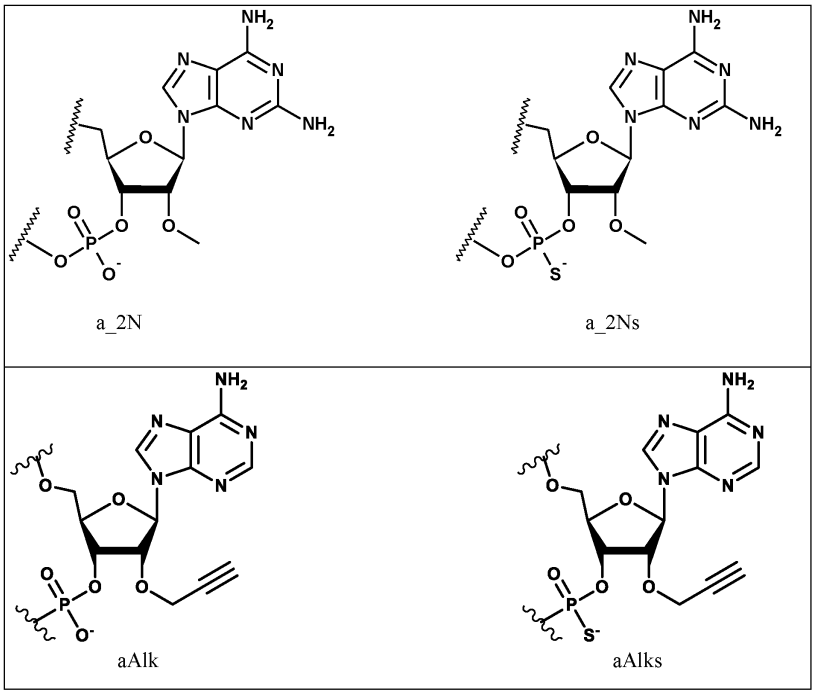
[0477] 링커 또는 연결기는 1개의 화학적 기 (예컨대, RNAi 작용제) 또는 관심 절편을 또 다른 화학적 기 (예컨대, 표적화 리간드, 표적화 기, PK/PD 조정제, 또는 전달 작용제) 또는 관심 절편에 1개 이상의 공유 결합을 통해 연결하는 2개의 원자 사이의 2가 연결이다. 불안정성 연결은 불안정성 결합을 함유한다. 연결은 2개의 결합된 원자 사이의 거리를 증가시키는 스페이서를 임의로 포함할 수 있다. 스페이서는 연결에 가요성 및/또는 길이를 추가로 부가할 수 있다. 스페이서는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 아릴 기, 아르알킬 기, 아르알케닐 기 및 아르알키닐 기를 포함하나 이에 제한되지는 않으며; 이들 각각은 1개 이상의 헤테로원자, 헤테로사이클, 아미노산, 뉴클레오티드 및 사카라이드를 함유할 수 있다. 스페이서 기는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 상기 목록은 설명의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0478] 일부 실시양태에서, 표적화 기는 추가의 링커의 사용 없이 RNAi 작용제에 연결된다. 일부 실시양태에서, RNAi 작용제에 대한 연결을 용이하게 하기 위해 링커가 용이하게 존재하는 표적화 기가 설계된다. 일부 실시양태에서, 2종 이상의 RNAi 작용제가 조성물에 포함되는 경우, 2종 이상의 RNAi 작용제는 동일한 링커를 사용하여 그의 각각의 표적화 기에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 2종 이상의 RNAi 작용제가 조성물에 포함되는 경우, 2종 이상의 RNAi 작용제는 상이한 링커를 사용하여 그의 각각의 표적화 기에 연결된다.

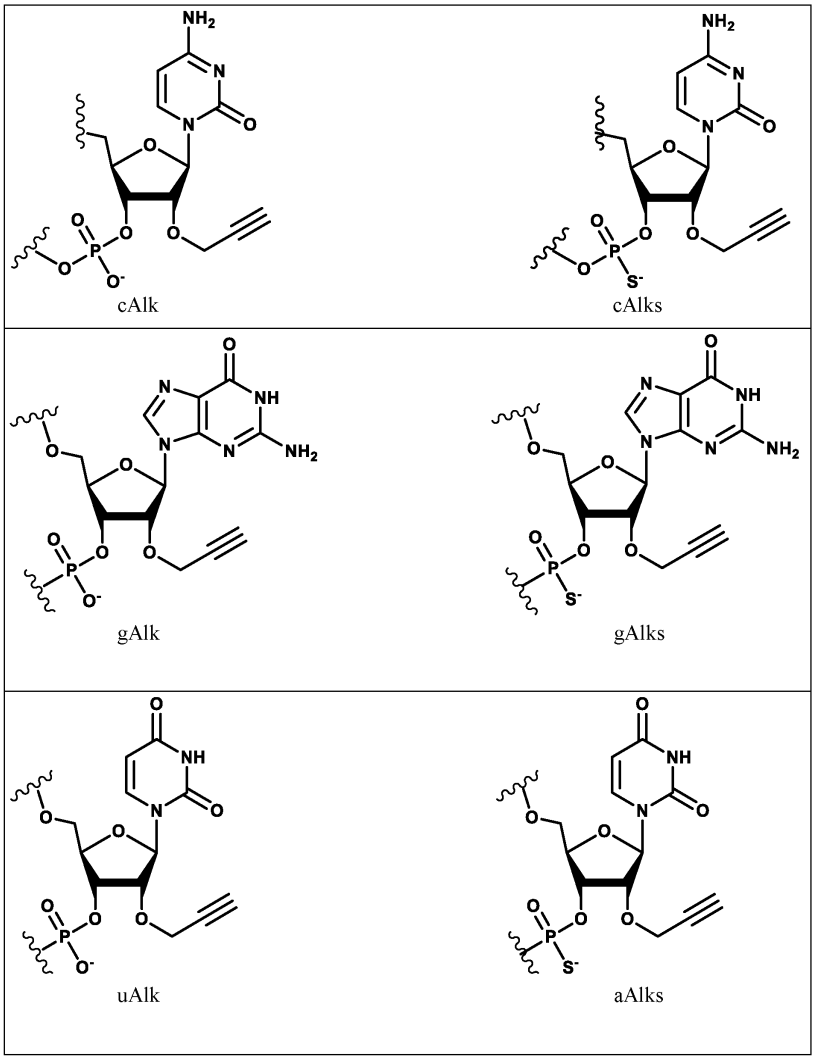
[0479] 일부 실시양태에서, 연결기는 본원에 기재된 RNAi 작용제의 센스 가닥의 5' 또는 3' 말단에 합성적으로 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 연결기는 RNAi 작용제의 센스 가닥의 5' 말단에 합성적으로 접합된다. 일부 실시양태에서, RNAi 작용제에 접합된 연결기는 트리알킨 연결기일 수 있다.

[0480] 특정 변형된 뉴클레오티드 및 연결기의 예가 표 23에서 제공된다.

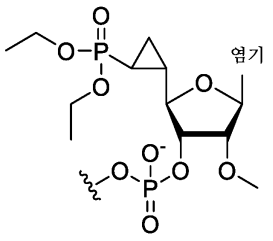
[0481] 표 23. 다양한 변형된 뉴클레오티드 및 연결기를 나타내는 구조



[0482]

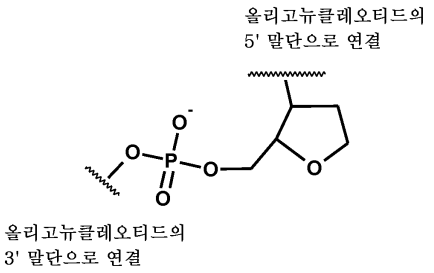


[0483]



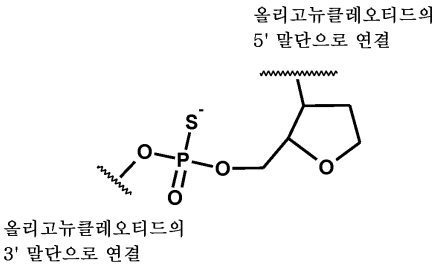
cPrp

올리고뉴클레오티드 내부에 위치하는 경우:



(invAb)

올리고뉴클레오티드 내부에 위치하는 경우:

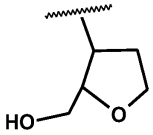


(invAb)s

[0484]

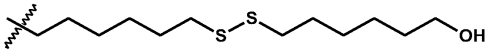
올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 위치하는 경우:

올리고뉴클레오티드의
5' 말단으로 연결



(invAb)

올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 위치하는 경우:

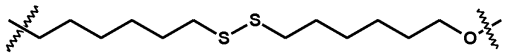


(C6-SS-C6)

올리고뉴클레오티드 내부에 위치하는 경우:

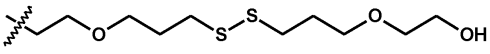
올리고뉴클레오티드의
5' 말단으로 연결

올리고뉴클레오티드의
3' 말단으로 연결



(C6-SS-C6)

올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 위치하는 경우:

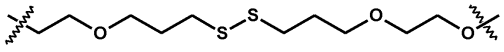


(6-SS-6)

올리고뉴클레오티드 내부에 위치하는 경우:

올리고뉴클레오티드의
5' 말단으로 연결

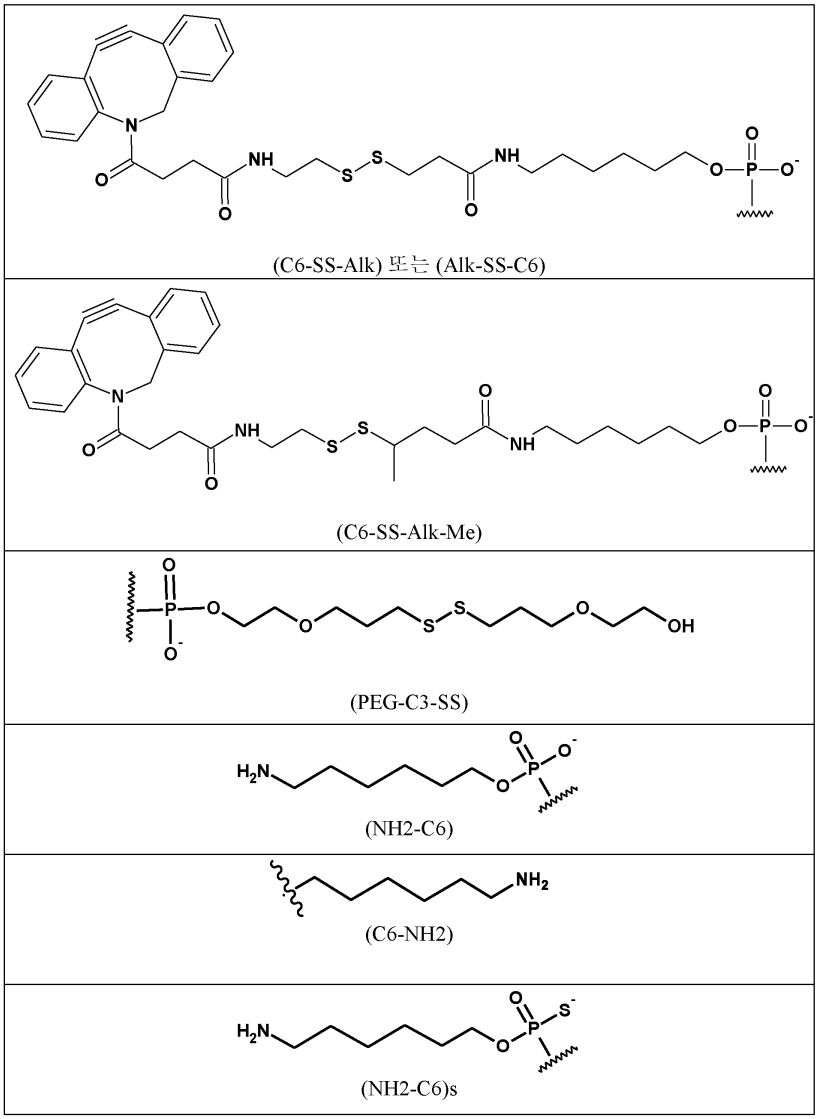
올리고뉴클레오티드의
3' 말단으로 연결



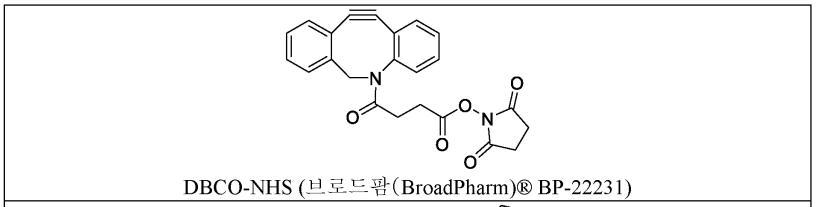
(6-SS-6)

[0485]

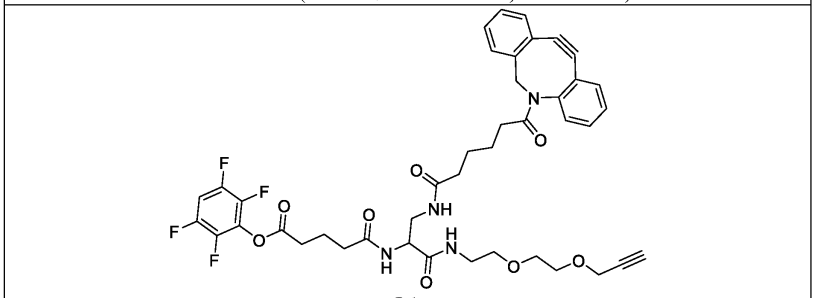
[0486]



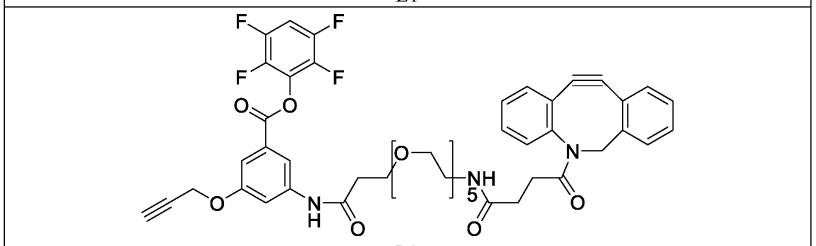
[0487]



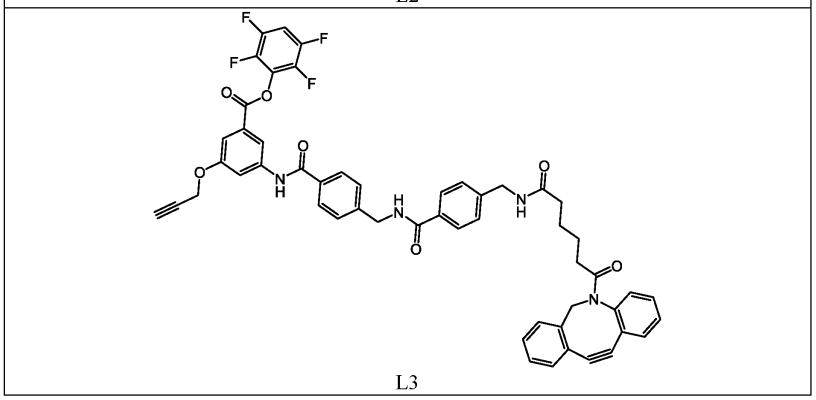
DBCO-NHS (브로드팜(BroadPharm)® BP-22231)



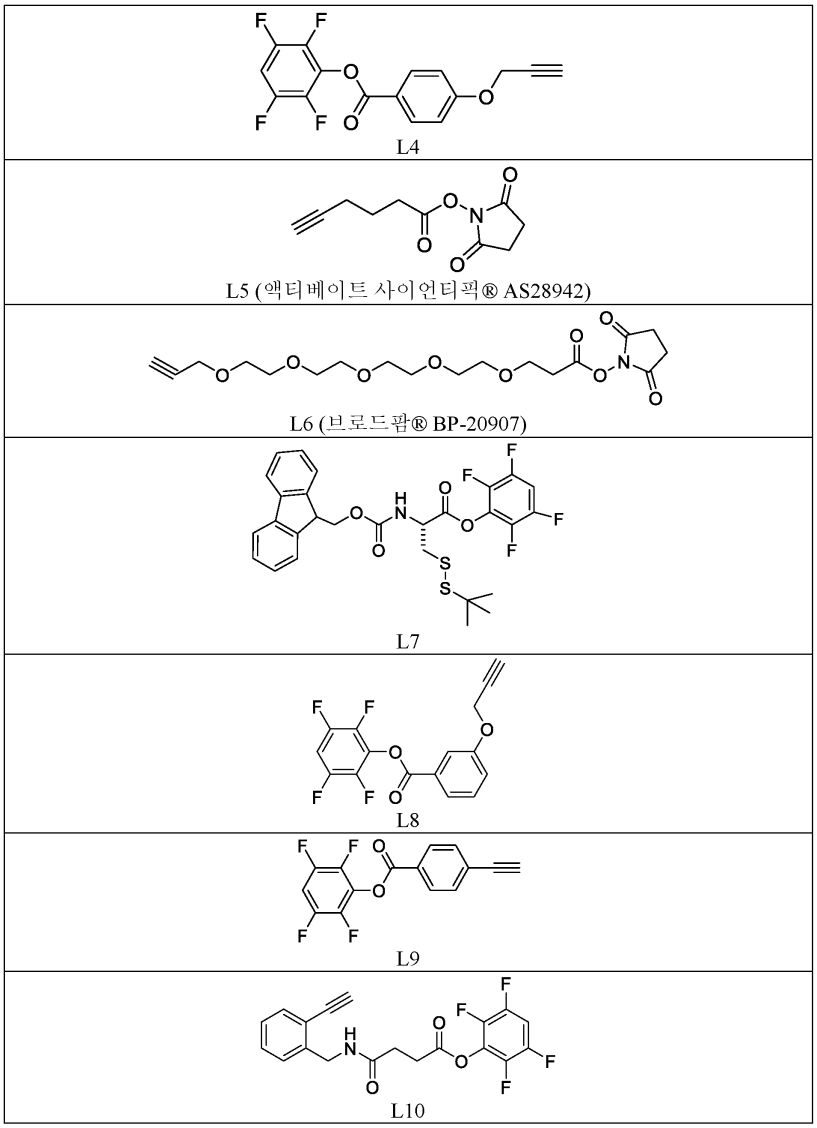
L1



L2



L3



[0488]

[0489] 대안적으로, 관련 기술분야에 공지된 다른 연결기가 사용될 수 있다.

[0490] RNAi 작용제를 하나 이상의 표적화 리간드, 표적화 기 및/또는 PK/PD 조정제에 연결하는 것에 추가로 또는 다르게는, 일부 실시양태에서, 전달 작용제는 RNAi 작용제를 세포 또는 조직에 전달하는 데 사용될 수 있다. 전달 작용제는 RNAi 작용제의 세포 또는 조직으로의 전달을 개선시킬 수 있는 화합물이고, 중합체, 예컨대 양친매성 중합체, 막 활성 중합체, 펩티드, 멜리틴 펩티드, 멜리틴-유사 펩티드 (MLP), 지질, 가역적으로 변형된 중합체 또는 펩티드, 또는 가역적으로 변형된 막 활성 폴리아민을 포함할 수 있거나 또는 그로 이루어질 수 있지만 이에 제한되지는 않는다.

[0491] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제는 지질, 나노입자, 중합체, 리포솜, 미셀, DPC 또는 관련 기술분야에서 이용가능한 다른 전달 시스템과 조합할 수 있다. RNAi 작용제는 또한 표적화 기, 지질 (콜레스테롤 및 콜레스테릴 유도체를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 나노입자, 중합체, 리포솜, 미셀, DPC (예를 들어, WO 2000/053722, WO 2008/022309, WO 2011/104169, 및 WO 2012/083185, WO 2013/032829, WO 2013/158141 참조, 이들 각각은 본원에 참조로 포함됨), 또는 관련 기술분야에서 이용가능한 다른 전달 시스템에 화학적으로 접합될 수 있다.

[0492] 제약 조성물

[0493] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클 중 하나 이상을 포함하거나, 그로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진 제약 조성물을 제공한다.

[0494] 본원에 사용된 "제약 조성물"은 약리학상 유효량의 활성 제약 성분 (API), 및 임의로 1종 이상의 제약상 허용되는 부형제를 포함한다. 제약상 허용되는 부형제 (부형제)는 약물 전달 시스템에 의도적으로 포함되는 활성 제약 성분 (API, 치료 제품) 이외의 물질이다. 부형제는 의도된 투여량에서 치료 효과를 발휘하지 않거나 또는

발휘하도록 의도되지 않는다. 부형제는 a) 제조 동안 약물 전달 시스템의 가공을 보조하고/거나, b) API의 안정성, 생체이용률 또는 환자 허용성을 보호, 지지 또는 증진시키고/거나, c) 제품 식별을 보조하고/거나, d) 저장 또는 사용 동안 API의 전반적인 안전성, 유효성 또는 전달의 임의의 다른 속성을 증진시키는 작용을 할 수 있다. 제약상 허용되는 부형제는 불활성 물질일 수 있거나 또는 아닐 수 있다.

[0495] 부형제는 흡수 증진제, 부착방지제, 소포제, 항산화제, 결합제, 완충제, 담체, 코팅제, 착색제, 전달 증진제, 전달 중합체, 덱스트란, 덱스트로스, 희석제, 붕해제, 유화제, 증량제, 충전제, 향미제, 활택제, 함습제, 윤활제, 오일, 중합체, 보존제, 염수, 염, 용매, 당, 현탁화제, 지속 방출 매트릭스, 감미제, 증점제, 장성 작용제, 비히클, 발수제 및 습윤제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0496] 본원에 기재된 제약 조성물은 제약 조성물에서 통상적으로 발견되는 다른 추가의 성분을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가의 성분은 제약 활성 물질이다. 제약 활성 물질은 항소양제, 수렴제, 국부 마취제 또는 항염증제 (예를 들어, 항히스타민제, 디펜히드라민 등), 소분자 약물, 항체, 항체 단편, 압타머 및/또는 백신을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0497] 제약 조성물은 또한 보존제, 가용화제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 감미제, 착색제, 부취제, 삼투압의 변동을 위한 염, 완충제, 코팅제 또는 항산화제를 함유할 수 있다. 이들은 또한 공지된 치료 이익을 갖는 다른 작용제를 함유할 수 있다.

[0498] 제약 조성물은 국부 또는 전신 치료가 바람직한지 여부 및 치료될 영역에 따라 다수의 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 관련 기술분야에 통상적으로 공지된 임의의 방식, 예컨대 비제한적으로 국소 (예를 들어, 경피 패치에 의함), 폐 (예를 들어, 네뷸라이저, 기관내, 비강내에 의한 것을 포함한 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 취입에 의함), 표피, 경피, 경구 또는 비경구에 의해 이루어질 수 있다. 비경구 투여는 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 주사 또는 주입; 피하 (예를 들어, 이식된 장치를 통해), 두개내, 실질내, 척수강내 및 뇌실내 투여를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 제약 조성물은 피하 주사에 의해 투여된다. 제약 조성물은 경구로, 예를 들어 정제, 코팅된 정제, 당의정, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐, 용액, 에멀젼 또는 현탁액의 형태로 투여될 수 있다. 투여는 또한, 예를 들어 좌제를 사용하여 직장으로; 예를 들어 연고, 크림, 겔 또는 용액을 사용하여 국부로 또는 경피로; 또는 예를 들어 주사가능한 용액을 사용하여 비경구로 수행될 수 있다.

[0499] 주사용으로 적합한 제약 조성물은 멸균 수용액 (수용성인 경우) 또는 분산액, 및 멸균 주사가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여를 위해, 적합한 담체는 생리 염수, 정균수, 크레모포르(Cremophor)® EL (바스프(BASF), 뉴저지주 파시파니) 또는 포스페이트 완충 염수를 포함한다. 이는 제조 및 저장 조건 하에 안정해야 하고, 미생물, 예컨대 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜), 및 그의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어 코팅, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우에는 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에, 조성물에 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 및 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가능한 조성물의 지속 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 달성될 수 있다.

[0500] 멸균 주사가능한 용액은 요구되는 양의 활성 화합물을 상기 열거된 성분 중 하나 또는 그의 조합과 함께 적절한 용매 중에 혼입시킨 후, 필요에 따라, 여과 멸균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 그의 이전에 멸균-여과된 용액으로부터 활성 성분 + 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결-건조를 포함한다.

[0501] 관절내 투여에 적합한 제제는 미세결정질 형태, 예를 들어 수성 미세결정질 현탁액 형태일 수 있는 본원에 기재된 임의의 리간드의 멸균 수성 제제의 형태일 수 있다. 리포솜 제제 또는 생분해성 중합체 시스템이 또한 관절내 및 안과적 투여 둘 다를 위한 본원에 기재된 임의의 리간드를 제공하는 데 사용될 수 있다.

[0502] 활성 화합물은 신체로부터의 급속한 제거에 대해 화합물을 보호할 담체, 예컨대 이식물 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 비롯한 제어 방출 제제와 함께 제조될 수 있다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러

한 제제의 제조 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 리포솜 현탁액은 또한 제약상 허용되는 담체로서 사용될 수 있다. 이들은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법에 따라, 예를 들어 미국 특허 번호 4,522,811에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0503] 제약 조성물은 제약 조성물에서 통상적으로 발견되는 다른 추가의 성분을 함유할 수 있다. 이러한 추가의 성분은 항소양제, 수렴제, 국부 마취제 또는 항염증제 (예를 들어, 항히스타민제, 디펜히드라민 등)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본원에 사용된 "약리학상 유효량", "치료 유효량" 또는 간단히 "유효량"은 약리학적, 치료적 또는 예방적 결과를 생성하는 제약 활성제의 양을 지칭한다.

[0504] RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클을 함유하는 의약이 또한 본 발명의 목적이며, RNAi 작용제를 함유하는 하나 이상의 전달 비히클, 및 원하는 경우에 공지된 치료 이익을 갖는 하나 이상의 다른 물질을 제약상 허용되는 형태로 만드는 것을 포함하는, 이러한 의약의 제조 방법도 마찬가지이다.

[0505] RNAi 작용제를 포함하는 기재된 전달 비히클 및 본원에 개시된 RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클을 포함하는 제약 조성물은 키트, 용기, 팩 또는 분배기에 포장되거나 포함될 수 있다. RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클 및 RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클을 포함하는 제약 조성물은 사전-충전된 시린지 또는 바이알에 포장될 수 있다.

[0506] 치료 방법 및 발현의 억제

[0507] 본원에 개시된 RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클은 RNAi 작용제의 투여로부터 이익을 얻을 질환 또는 장애를 갖는 대상체 (예를 들어, 인간 또는 다른 포유동물)를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클은 mRNA의 발현 및/또는 표적 단백질 수준의 감소 및/또는 억제로부터 이익을 얻을 대상체 (예를 들어, 인간), 예를 들어 근육 이영양증과 관련된 증상으로 진단되었거나 이를 앓고 있는 대상체를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0508] 일부 실시양태에서, 대상체에게 치료 유효량의 본원에 개시된 RNAi 작용제를 포함하는 하나 이상의 전달 비히클이 투여된다. 대상체의 치료는 치유적 및/또는 예방적 치료를 포함할 수 있다. 대상체는 인간, 환자, 또는 인간 환자일 수 있다. 대상체는 성인, 청소년, 소아 또는 유아일 수 있다. 본원에 기재된 제약 조성물의 투여는 인간 또는 동물에게 이루어질 수 있다.

[0509] 본원에 기재된 RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클은 표적 유전자와 관련된 질환 또는 장애를 갖거나 또는 표적 유전자의 발현에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 질환 또는 장애를 갖는 대상체에서 적어도 1종의 증상을 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클은 표적 mRNA의 감소로부터 이익을 얻거나 또는 표적 mRNA의 감소에 의해 적어도 부분적으로 매개될 질환 또는 장애를 갖는 대상체의 임상 제시를 치료 또는 관리하는 데 사용된다. 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기재된 RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클 또는 전달 비히클을 포함하는 조성물 중 하나 이상을 투여한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법은 본원에 기재된 RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클을 포함하는 조성물을 치료될 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 예방 유효량의 임의의 하나 이상의 기재된 RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클이 투여되고, 이에 의해 적어도 1종의 증상을 예방 또는 억제함으로써 대상체를 치료한다.

[0510] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 표적 유전자 발현에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 질환, 장애, 상태 또는 병리학적 상태의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된 임의의 RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서 상기 질환, 장애, 상태 또는 병리학적 상태를 치료하는 방법을 제공한다.

[0511] 일부 실시양태에서, 전달 비히클이 투여되는 대상체에서의 표적 유전자의 유전자 발현 수준 및/또는 mRNA 수준이 전달 비히클이 투여되기 전의 대상체 또는 전달 비히클을 받지 않은 대상체에 비해 적어도 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 99% 초과만큼 감소된다. 대상체에서의 유전자 발현 수준 및/또는 mRNA 수준은 대상체의 세포, 세포 군, 및/또는 조직에서 감소될 수 있다.

[0512] 일부 실시양태에서, 전달 비히클이 투여된 대상체에서의 단백질 수준은 전달 비히클이 투여되기 전의 대상체 또는 전달 비히클을 받지 않은 대상체에 비해 적어도 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 99% 초과만큼 감소된다. 대상체에서의 단백질 수준은 대상체의 세포, 세포 군, 조직, 혈액 및/또는 다른 유체에서 감소될 수 있다.

[0513] mRNA 수준 및 단백질 수준의 감소는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 평가될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, mRNA 수준 및/또는 단백질 수준의 감소 또는 축소는 집합적으로 본원에서 표적 유전자의 감소 또는 축소 또는 표적 유전자 발현의 억제 또는 감소로 지칭된다. 본원에 기재된 실시예는 유전자 발현의 억제를 평가하기 위한 공지된 방법을 제시한다.

[0514] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클은 적어도 부분적으로 표적 유전자 발현에 의해 매개되는 질환, 장애 또는 증상의 치료에 사용하기 위한 제약 조성물의 제조에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 유전자 발현에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 질환, 장애 또는 증상은 근육 이영양증이다.

[0515] 일부 실시양태에서, 대상체를 치료하는 방법은 대상체의 체중에 좌우된다. 일부 실시양태에서, RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클은 약 0.05 mg/kg 내지 약 40.0 mg/kg 대상체의 체중의 용량으로 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클은 대상체의 체중의 약 5 mg/kg 내지 약 20 mg/kg 대상체의 체중의 용량으로 투여될 수 있다.

[0516] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클은 분할 용량으로 투여될 수 있으며, 이는 2회 용량이 짧은 (예를 들어, 24시간 미만) 시간 주기로 대상체에게 제공됨을 의미한다. 일부 실시양태에서, 목적하는 1일 양의 약 절반은 초기 투여로 투여되고, 목적하는 1일 양의 나머지 약 절반은 초기 투여의 대략 4시간 후에 투여된다.

[0517] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클은 1주 1회 (즉, 매주) 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클은 격주로 (격주에 1회) 투여될 수 있다.

[0518] 일부 실시양태에서, RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클 또는 RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클을 함유하는 조성물은 적어도 부분적으로 표적 유전자 발현에 의해 매개되는 질환, 장애 또는 증상의 치료에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 유전자 발현에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 질환, 장애 또는 증상은 근육 이영양증이다.

[0519] 세포, 조직 및 비-인간 유기체

[0520] 본원에 기재된 RNAi 작용제 중 적어도 하나를 포함하는 세포, 조직 및 비-인간 유기체가 고려된다. 세포, 조직 또는 비-인간 유기체는 RNAi 작용제를 관련 기술분야에서 이용가능한 임의의 수단에 의해 세포, 조직 또는 비-인간 유기체에 전달함으로써 제조된다. 일부 실시양태에서, 세포는 인간 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는 포유동물 세포이다.

[0521] 상기 제공된 실시양태 및 항목은 이제 하기 비제한적 실시예로 예시된다.

[0522] <실시예>

[0523] 하기 실시예는 본원에 개시된 특정 실시양태를 제한하지 않고 예시하도록 의도된다.

[0524] 달리 명백하게 언급되지 않는 한, 주어진 실시예 및/또는 반응식의 화합물을 지칭하는 데 사용된 숫자는 단지 그 특정한 실시예 및/또는 반응식을 참조하며, 본원에 개시된 임의의 다른 실시예 및/또는 반응식을 참조하지 않는다. 예를 들어, 실시예 4에서의 "LP1-p의 합성"의 화합물 1은 실시예 4에서의 "LP-5p의 합성"의 화합물 1과 상이하며, 이를 지칭하지 않는다. 유사하게, 본원에 개시된 특정한 화합물은 상이한 실시예 및/또는 반응식에서 상이한 숫자에 의해 확인될 수 있는 것으로 인지될 것이다. 예를 들어, 실시예 4에서의 "LP223-p의 합성"의 화합물 12는 실시예 4에서의 "LP224-p의 합성"의 화합물 3과 동일하다.

[0525] 표 24: 실시예에 사용된 일부 공통 약어.

명칭	약어
트리에틸아민	TEA, NEt_3
디클로로메탄	DCM, CH_2Cl_2
에틸 아세테이트	EA, EtOAc
헥산	Hex
메탄올	MeOH
아세톤니트릴	ACN, MeCN
트리플루오로아세트산	TFA
아세트산	AcOH
플루오레닐메틸옥시카르보닐	FMOC
tert-부틸옥시카르보닐	BOC
디메틸포름아미드	DMF
톨루엔	PhMe, Tol.
1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드	EDC
트리이소프로필실란	TIS, TIPS
2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸아미늄 테트라플루오로보레이트	TBTU
N,N-디이소프로필에틸아민	DIPEA, DIEA, *i*-Pr_2NEt
2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트	HBTU
1-시아노-2-에톡시-2-옥소에틸리덴아미노옥시)디메틸아미노-모르폴리노-카르베늄 헥사플루오로포스페이트	COMU

[0526]

1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리디늄 3-옥시드 헥사플루오로포스페이트,\	HATU
N-히드록시숙신이미드	NHS
디벤조시클로옥틴	DBCO
트리(2-푸릴)포스핀	TFP
테트라히드로푸란	THF
염산	HCl
메틸 아이오다이드	MeI, CH_3I
4-디메틸아미노피리딘	DMAP
메타-클로로퍼옥시벤조산	*m*CPBA
이황화탄소	CS_2
수산화나트륨	NaOH
당량	Eq, Equiv
무수	Anhyd
수성	Aq

[0527]

[0528] 달리 명백하게 언급되지 않는 한, 본원의 실시예에서 용어 "EDC"의 사용은 상업적으로 입수가능한 EDC 히드로클

로라이드 염을 지칭하는 것으로 인지될 것이다.

[0529] 실시예 1. RNAi 작용제 및 조성물의 합성.

[0530] 하기는 본원에 제시된 비제한적 실시예에 예시된 특정 RNAi 작용제 및 그의 접합체의 합성을 위한 일반적 절차를 기재한다.

[0531] RNAi 작용제의 합성. RNAi 작용제는 관련 기술분야에 일반적으로 공지된 방법을 사용하여 합성될 수 있다. 본원에 제시된 실시예 세트에 예시된 RNAi 작용제의 합성을 위해, RNAi 작용제의 센스 및 안티센스 가닥을 올리고뉴클레오티드 합성에 사용되는 고체 상 포스포르아미다이트 기술에 따라 합성하였다. 규모에 따라, 머메이드(MerMade)96E® (바이오오토메이션(Bioautomation)), 머메이드12® (바이오오토메이션), 또는 올리고파일롯(Oligopilot) 100 (지이 헬스케어(GE Healthcare))을 사용하였다. 제어된 세공 유리 (CPG, 500 Å 또는 600 Å, 미국 펜실베니아주 아스톤 소재의 프라임 신테시스(Prime Synthesis)로부터 수득됨) 또는 폴리스티렌 (미국 캘리포니아주 오션사이드 소재의 키노베이트(Kinovate)로부터 수득됨)으로 제조된 고체 지지체 상에서 합성을 수행하였다. 모든 RNA 및 2'-변형된 RNA 포스포르아미다이트는 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific) (미국 위스콘신주 밀워키), 켐진스(ChemGenes) (미국 매사추세츠주 윌밍톤) 또는 홍진 바이오테크(Hongene Biotech) (미국 노스캐롤라이나주 모리스빌)로부터 구입하였다. 구체적으로, 사용된 하기 2'-O-메틸 포스포르아미다이트는 다음을 포함한다: (5'-O-디메톡시트리틸-N^6-(벤조일)-2'-O-메틸-아데노신-3'-O-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필아미노) 포스포르아미다이트, 5'-O-디메톡시-트리틸-N^4-(아세틸)-2'-O-메틸-시티딘-3'-O-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필-아미노) 포스포르아미다이트, (5'-O-디메톡시트리틸-N^2-(이소부티릴)-2'-O-메틸-구아노신-3'-O-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필아미노) 포스포르아미다이트, 및 5'-O-디메톡시트리틸-2'-O-메틸-우리딘-3'-O-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필아미노) 포스포르아미다이트. 2'-데옥시-2'-플루오로-포스포르아미다이트 및 2'-O-프로파르길 포스포르아미다이트는 2'-O-메틸 포스포르아미다이트와 동일한 보호기를 보유하였다. 5'-디메톡시트리틸-2'-O-메틸-이노신-3'-O-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필아미노) 포스포르아미다이트는 글렌 리서치(Glen Research) (버지니아)로부터 구입하였다. 역전된 무염기성 (3'-O-디메톡시트리틸-2'-데옥시리보스-5'-O-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필아미노) 포스포르아미다이트는 켐진스로부터 구입하였다. 사용된 하기 UNA 포스포르아미다이트는 다음을 포함하였다: 5'-(4,4'-디메톡시트리틸)-N6-(벤조일)-2',3'-세코-아데노신, 2'-벤조일-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-(4,4'-디메톡시트리틸)-N-아세틸-2',3'-세코-시토신, 2'-벤조일-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소-프로필)]-포스포르아미다이트, 5'-(4,4'-디메톡시트리틸)-N-이소부티릴-2',3'-세코-구아노신, 2'-벤조일-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트, 및 5'-(4,4'-디메톡시-트리틸)-2',3'-세코-우리딘, 2'-벤조일-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소-프로필)]-포스포르아미다이트. 포스포로티오에이트 연결을 도입하기 위해, 무수 아세토니트릴 중 3-페닐 1,2,4-디티아졸린-5-온 (POS, 미국 매사추세츠주 레오민스터 소재의 폴리오르그, 인크.(PolyOrg, Inc.)로부터 입수함)의 100 mM 용액 또는 피리딘 중 크산탄 히드라이드 (TCI 아메리카(TCI America), 미국 오리건주 포틀랜드 소재)의 200 mM 용액을 사용하였다.

[0532] 또한 (NH2-C6) 반응성 기 링커를 도입하기 위해 TFA 아미노연결 포스포르아미다이트를 상업적으로 구입하였다(써모피셔). TFA 아미노연결 포스포르아미다이트를 무수 아세토니트릴 (50 mM) 중에 용해시키고, 분자체 (3 Å)를 첨가하였다. 5-벤질티오-1H-테트라졸 (BTT, 아세토니트릴 중 250 mM) 또는 5-에틸티오-1H-테트라졸 (ETT, 아세토니트릴 중 250 mM)을 활성화제 용액으로서 사용하였다. 커플링 시간은 10분 (RNA), 90초 (2' O-Me), 및 60초 (2' F)였다. 트리알킨-함유 포스포르아미다이트를 합성하여 각각의 (TriAlk#) 링커를 도입하였다. 본원의 특정 실시예에 제시된 RNAi 작용제와 관련하여 사용되는 경우, 트리알킨-함유 포스포르아미다이트는 무수 디클로로메탄 또는 무수 아세토니트릴 (50 mM) 중에 용해시키는 한편, 모든 다른 아미다이트는 무수 아세토니트릴 (50 mM) 중에 용해시키고, 분자체 (3Å)를 첨가하였다. 5-벤질티오-1H-테트라졸 (BTT, 아세토니트릴 중 250 mM) 또는 5-에틸티오-1H-테트라졸 (ETT, 아세토니트릴 중 250 mM)을 활성화제 용액으로서 사용하였다. 커플링 시간은 10분 (RNA), 90초 (2' O-Me), 및 60초 (2' F)였다.

[0533] 일부 RNAi 작용제의 경우, 링커, 예컨대 C6-SS-C6 또는 6-SS-6 기를 센스 가닥의 3' 말단 단부에 도입하였다. 각각의 링커를 갖는 사전-로딩된 수지는 상업적으로 획득하였다. 대안적으로, 일부 센스 가닥에 대해, dT 수지를 사용한 다음, 각각의 링커를 표준 포스포르아미다이트 합성을 통해 첨가하였다.

[0534] 지지체 결합된 올리고머의 절단 및 탈보호. 고체 상 합성의 종료 후에, 건조된 고체 지지체를 1:1 부피의 물 중 40 중량(wt.)% 메틸아민 용액 및 28% 내지 31% 수산화암모늄 용액 (알드리치)으로 1.5시간 동안 30℃에서 처

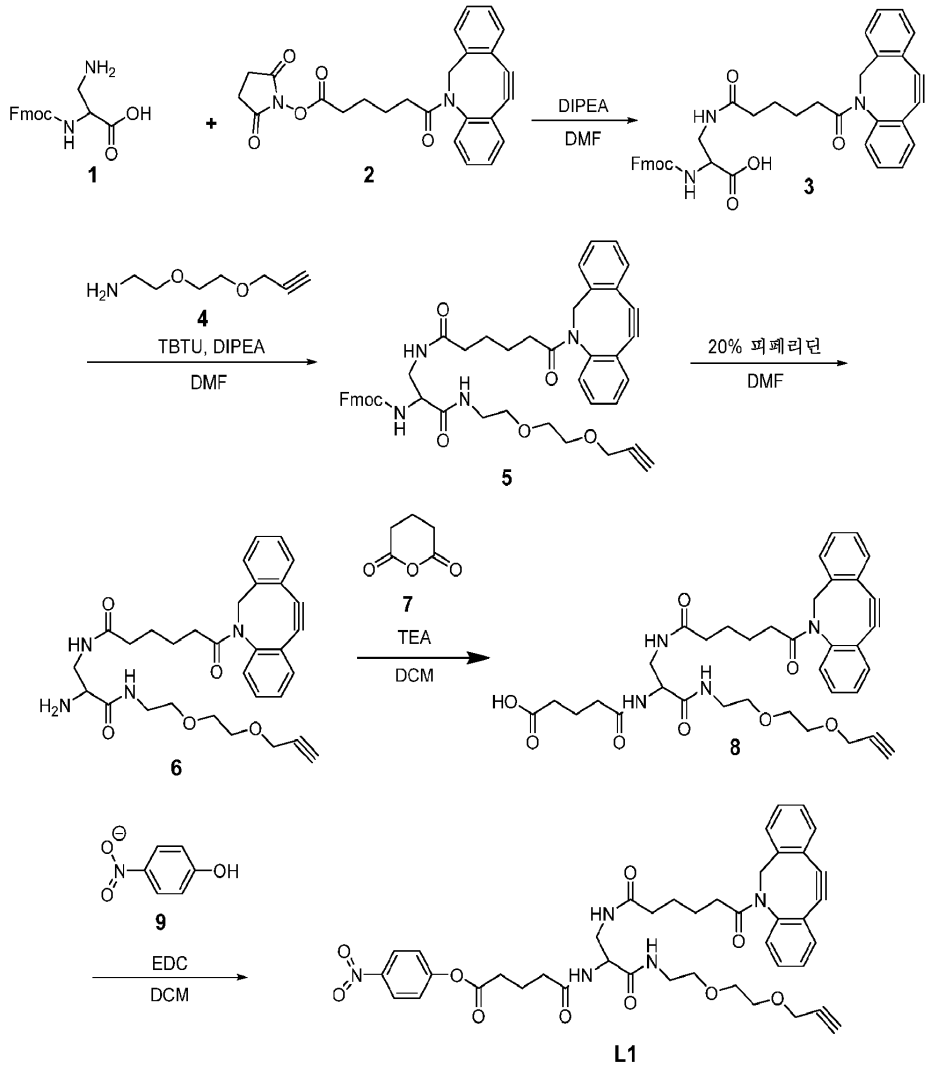
리하였다. 용액을 증발시키고, 고체 잔류물을 물 중에 재구성하였다 (하기 참조).

[0535] 정제. 조 올리고머를 TSK겔® 슈퍼Q-5PW 13 μm 칼럼(토소 바이오사이언시스(Tosoh Biosciences)로부터 입수가능함) 및 시마즈 LC-8 시스템을 사용하여 음이온 교환 HPLC에 의해 정제하였다. 완충제 A는 20 mM 트리스, 5 mM EDTA, pH 9.0이고, 20% 아세토니트릴을 함유하였고, 완충제 B는 1.5 M 염화나트륨이 첨가된 완충제 A와 동일하였다. 260 nm에서의 UV 트레이스를 기록하였다. 적절한 분획을 풀링한 다음, 100 mM 중탄산암모늄, pH 6.7 및 20% 아세토니트릴 또는 여과된 물의 구동 완충제와 함께 세파덱스® G25 파인으로 패킹된 지이 헬스케어 XK 16/40 칼럼을 사용하여 크기 배제 HPLC 상에서 실행시켰다.

[0536] 어닐링. 1x PBS (포스페이트-완충 염수, 1x, 코닝®, 셀그로®) 중 등몰량의 RNA 용액 (센스 및 안티센스)을 조합함으로써 상보적 가닥들을 혼합하여 RNAi 작용제를 형성하였다. 일부 RNAi 작용제를 동결건조시키고, -15 내지 -25℃에서 저장하였다. 1x PBS 중에서 UV-Vis 분광계 상에서 용액 흡광도를 측정함으로써 듀플렉스 농도를 결정하였다. 이어서, 260 nm에서의 용액 흡광도에 전환 인자 및 희석 배율을 곱하여 듀플렉스 농도를 결정하였다. 사용된 전환 인자는 0.037 mg/(mL·cm)이거나 또는 실험적으로 결정된 흡광 계수로부터 계산되었다.

[0537] 실시예 2. 연결기의 합성

[0538] L1의 합성



[0539]

[0540] 화합물 1 (423mg) 및 화합물 2 (516mg)를 DMF 중에서 함께 혼합하고, DIPEA (0.26ml)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 생성물을 정상 칼럼 크로마토그래피를 통해 단리시켜 화합물 3 450mg를 수득하였다.

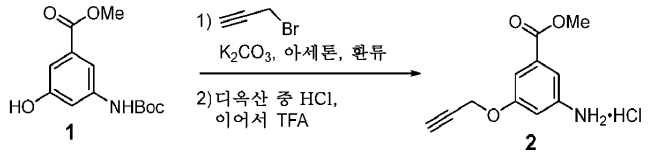
[0541] 화합물 3 (450mg, 1당량) 및 화합물 4 (0.12ml, 1.2당량), TBTU (248mg, 1.1당량), 및 DIPEA (0.183ml, 1.5 당량)를 DMF 중에서 함께 혼합하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 생성물을 정상 칼럼 크로마토그래피를

통해 단리시켜 화합물 5를 수득하였다.

[0542] 화합물 5를 DMF 중 20% 피페리딘으로 30분 동안 처리하였다. 생성물을 정상 칼럼 크로마토그래피를 통해 단리시켜 화합물 6을 수득하였다.

[0543] 화합물 6 (93mg, 1당량) 및 7 (25.9mg, 1.3당량), TEA (0.045ml, 2 당량)를 DCM 중에서 함께 혼합하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 이 혼합물에 화합물 9 (57mg) 및 EDC (72mg)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 생성물을 정상 칼럼 크로마토그래피를 통해 단리시켜 화합물 L1 (100mg)을 수득하였다.

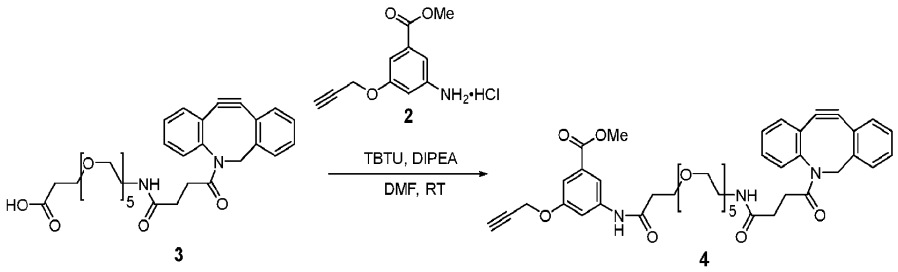
[0544] L2의 합성



[0545]

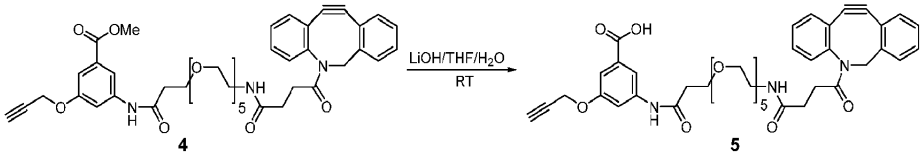
[0546] 아세톤 (50 mL) 중 화합물 1 (1.69 g, 6.3 mmol) 및 프로파르길 브로마이드 (1.499 g, 1.4 mL, d = 1.57 g/mL, 12.6 mmol)의 용액에 실온에서 K_2CO_3 (3.477 g, 25.2 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 환류 하에 3시간 (hr) 동안 교반하였다. 출발 물질의 소모 시, 반응 혼합물을 진공 하에 농축시키고, EA/헥산/DCM (각각 30 mL)으로 용해시키고, 여과하였다. 모액을 농축시키고, 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 정제하고, 헥산 중 EtOAc (0-50%)의 구배로 용리시켰다. 생성물의 수율: 0.438 g (23%). [M-H] 계산치 $C_{16}H_{18}NO_5$: 304.12, 실측치: 304.46.

[0547] 상기 반응의 생성물 (438 mg)을 디옥산 중 4 M HCl 중에 실온에서 5시간 동안 용해시키고, 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 단지 50% 전환율로 모니터링하였다. 혼합물을 회전 침강시키고, 여과하였다. 이어서 TFA 2 mL을 고체에 첨가하고, 출발 물질을 LC-MS에 의해 모니터링하면서 2시간 후에 소모하였다. 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 화합물 2의 수율: 333 mg, 고체, 96%. [M+H] 계산치 $C_{11}H_{12}NO_3$: 206.08, 실측치: 206.26.



[0548]

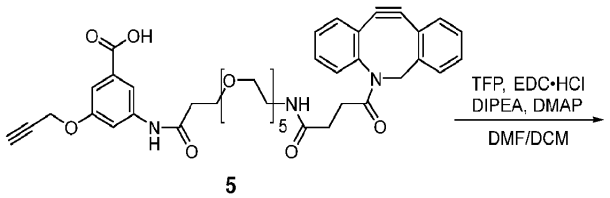
[0549] DMF (0.8 mL) 중 TBTU (22.5 mg, 0.07 mmol), DBCO-PEG5-산 3 (50 mg, 0.084 mmol), N,N-디이소프로필에틸아민 (27 mg, 36 μL, d = 0.742 g/mL, 0.21 mmol)의 용액에 2 (16.8 mg, 0.07 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 모든 출발 물질이 LC-MS에 의해 소모되었음을 확인한 후, 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ 수용액 2 mL에 의해 켄칭하고, 에틸 아세테이트 (10 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 HCl (수성) 및 염수로 순차적으로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을 실리카 칼럼 상에 로딩하고, 정제하여 (MPA: DCM, MPB: DCM 중 10% MeOH, 30분 (min) 내 0-30% 경사) 화합물 4를 수득하였다. 수율: 76.5 mg, 99%. [M+H] 계산치 $C_{43}H_{50}N_3O_{11}$: 784.34, 실측치: 784.83.



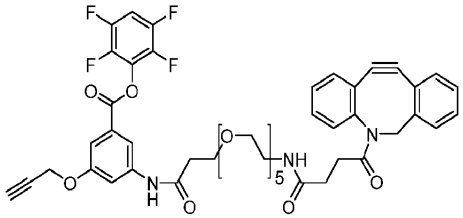
[0550]

[0551] 화합물 4를 THF/H_2O (2:1 v/v) 0.3 mL 중에 용해시키고, LiOH 55.6 mg를 반응 혼합물에 첨가하였다. 실온에서 밤새 교반한 후, 반응 혼합물을 실리카 겔의 짧은 패드를 통해 여과하였다. 여과물을 수집하고, 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을 실리카 칼럼 상에 로딩하고, 정제 (MPA: DCM, MPB: DCM 중 10% MeOH, 30분 내 0-50%

경사)하여 생성물을 수득하였다. 수율: 42.9 mg. [M+H] 계산치 $C_{42}H_{48}N_3O_{11}$: 770.33, 실측치: 770.91.



5

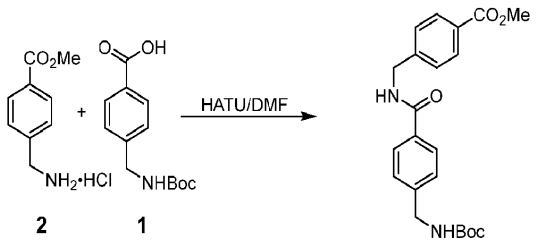


L2

[0552]

[0553] DCM (2 mL) 중 5 (43 mg, 0.056 mmol), 2,3,5,6-테트라플루오로페놀 (46.5 mg, 0.28 mmol), 및 N,N-디이소프로필에틸아민 (144.5 mg, 0.19 mL, d = 0.742 g/mL, 1.12 mmol)의 용액에 EDC 히드로클로라이드 (53.5 mg, 0.28 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. LC-MS에 의해 모든 출발 물질이 소모되었음을 확인한 후, 반응 혼합물을 동결건조에 의해 농축시키고, 실리카 칼럼 상에 로딩하고, 정제하여 (MPA: DCM, MPB: DCM 중 20% MeOH, 30분 내 0-30% 경사) 생성물 L2를 수득하였다. 수율: 12 mg, 23%. [M+H] 계산치 $C_{48}H_{48}F_4N_3O_{11}$: 918.32, 실측치: 918.89.

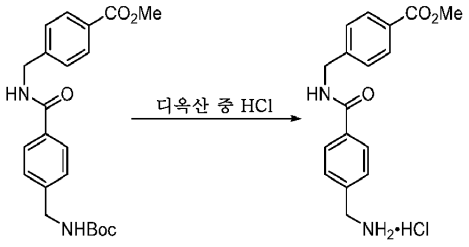
[0554] L3의 합성



2 1 3

[0555]

[0556] DMF (4 mL) 중 산 1 (1.2461 g, 4.9591 mmol), HATU (2.2613 g, 5.9509 mmol), 및 DIPEA (2.3030 g, 3.1 mL, d = 0.742 g/mL, 17.8527 mmol, 3 당량)의 용액에 아민 2 (1 g, 4.9591 mmol)/DMF (1 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. LC-MS에 의해 모든 출발 물질이 소모되었음을 확인한 후, 반응 혼합물을 동결건조에 의해 농축시키고, 실리카 칼럼 상에 로딩하고, 정제하여 (MPA: DCM, MPB: DCM 중 10% MeOH, 30분 내 0-30% 경사) 화합물 3을 수득하였다. 수율: 1.3269 g, 67%. [M+H] 계산치 $C_{22}H_{27}N_2O_5$: 399.19, 실측치: 399.39.

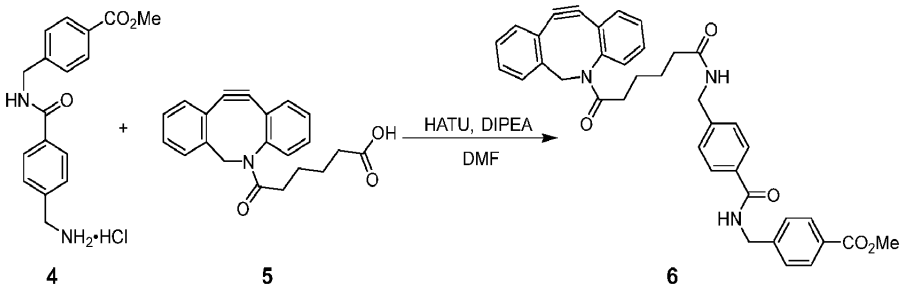


3 4

[0557]

[0558] 디옥산 중 4 M HCl의 용액에 화합물 3 (1.3269 g)을 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 교반한 후, 출발 물질이 완전히 소모되었다. 화합물 4를 단순 여과에 의해 백색 고체로서 수득하였다. 수율, 630 mg, 63%. [M+H] 계

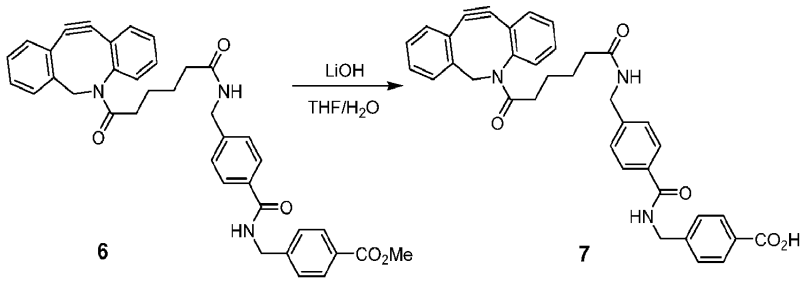
산치 $C_{17}H_{19}N_2O_3$: 299.14, 실측치: 299.34.



4 5 6

[0559]

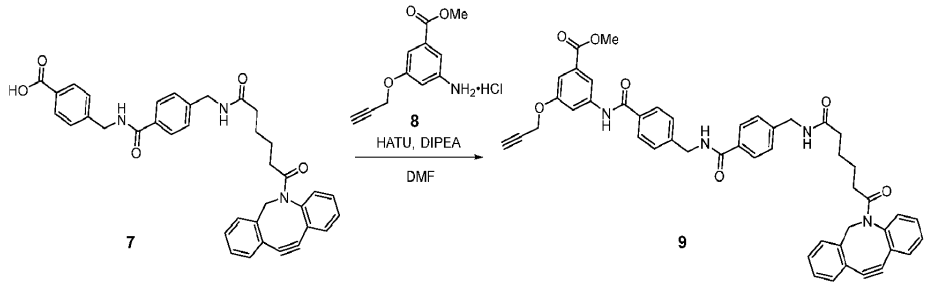
[0560] DMF (0.3 mL) 중 DBCO-산 5 (0.1993 g, 0.5979 mmol), HATU (0.2726 g, 0.7175 mmol, 1.2 당량), DIPEA (0.1851 g, 0.249 mL, d = 0.742 g/mL, 1.435 mmol, 2 당량)의 용액에 화합물 4 (0.2 g, 0.5979 mmol)/DMF (0.3 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. LC-MS에 의해 모든 출발 물질이 소모되었음을 확인한 후, 반응 혼합물을 동결건조 하에 농축시키고, 실리카 칼럼 상에 로딩하고, 정제하여 (MPA: DCM, MPB: DCM 중 20% MeOH, 30분 내 0-30% 경사) 화합물 6을 수득하였다. 수율: 0.3297 g, 90%. [M+H] 계산치 $C_{38}H_{36}N_3O_5$: 614.26, 실측치: 614.51.



6 7

[0561]

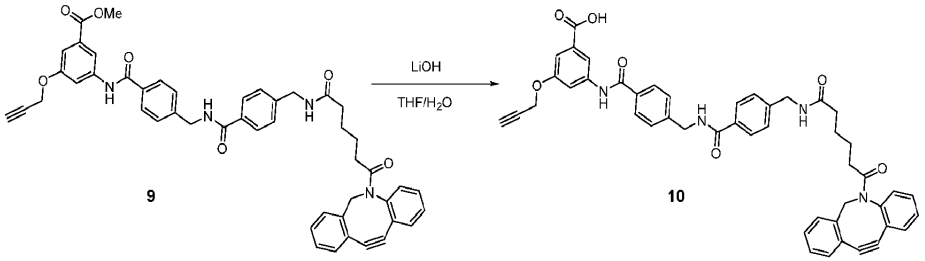
[0562] THF/물 (4 mL, 1:1 v/v) 중 화합물 6의 용액에 LiOH (0.0387 g, 1.6117 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. LC-MS에 의해 모든 출발 물질이 소모되었음을 확인한 후, 디옥산 중 HCl (1.6 mmol, 4M, 0.4 mL)을 첨가하여 염기를 중화시켰다. 반응 혼합물을 동결건조에 의해 농축시키고, 실리카 칼럼 상에 로딩하고, 정제하여 (MPA: DCM, MPB: DCM 중 10% MeOH, 30분 내 0-50% 경사) 화합물 7을 수득하였다. 수율: 0.2575 g, 80%. [M+H] 계산치 $C_{37}H_{34}N_3O_5$: 600.25, 실측치: 600.46.



7 9

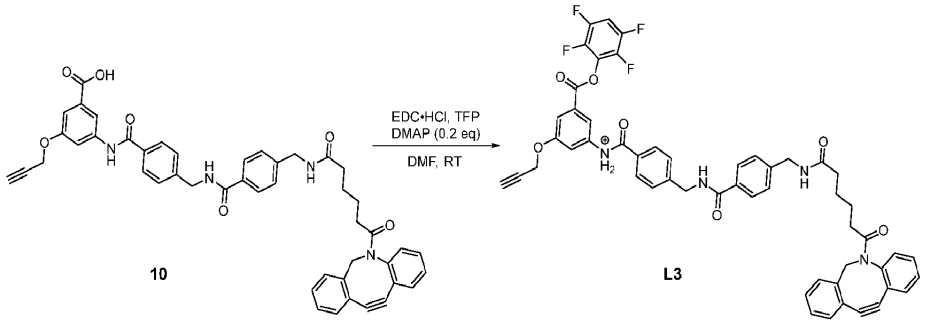
[0563]

[0564] DMF (1.5 mL) 중 산 7 (0.1241 g, 0.2069 mmol), 아민 8 (0.05 g, 0.2069 mmol), 및 DIPEA (0.0961 g, 0.129 mL, 0.7448 mmol, 3 당량, d = 0.742 g/mL)의 용액에 HATU (0.0943 g, 0.2483 mmol)/DMF (0.5 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 출발 물질의 소모 시, 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. DMF를 제거한 후, 조 생성물을 5 mL DCM 중에 용해시키고, 고정상으로서 실리카 겔을 갖는 칼럼 상에 로딩하였다 (MPA: DCM; MPB: 20% MeOH/DCM; 30분 내 0-100% 경사). 화합물 9의 수율: 0.1109 g, 68%. [M+H] 계산치 $C_{48}H_{43}N_4O_7$: 787.31, 실측치: 787.44.



[0565]

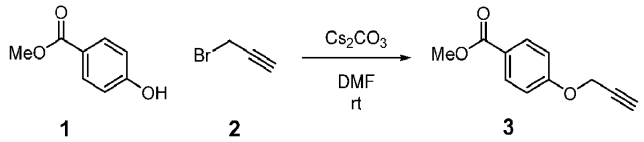
[0566] THF/물 (1 mL, 1:1 v/v) 중 DBCO-에스테르 9의 용액에 LiOH (0.0169 g, 0.7047 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 출발 물질이 완전히 소모된 후, 잔류물을 HCl (수성)로 중화시키고, 진공 하에 농축시켰다. 콤비플래쉬®에 의해 정제하여 화합물 10 (MPA: DCM; MPB: 20% MeOH/DCM; 30분 내 0-100% 경사)을 수득하였다. 수율: 0.0321 g, 고체, 29%. [M+H] 계산치 $C_{47}H_{41}N_4O_7$: 773.30, 실측치: 773.49.



[0567]

[0568] DMF (0.5 mL) 중 산 10 (0.0321 g, 0.0415 mmol), TFP (0.0103 g, 1.5 당량, 0.0623 mmol), 및 DMAP (3 mg, 0.0249 mmol)의 용액에 EDC · HCl (0.0239 g, 0.1246 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 출발 물질의 소모 시, 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. DMF를 제거한 후, 조 생성물을 5 mL DCM 중에 용해시키고, 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 칼럼 상에 로딩하였다. (MPA: DCM; MPB: 20% MeOH/DCM; 30분 내 0-100% 경사). L3의 수율: 20 mg, 오일, 50%. [M+H] 계산치 $C_{53}H_{41}F_4N_4O_7$: 921.29, 실측치: 921.85.

[0569] L4의 합성



[0570]

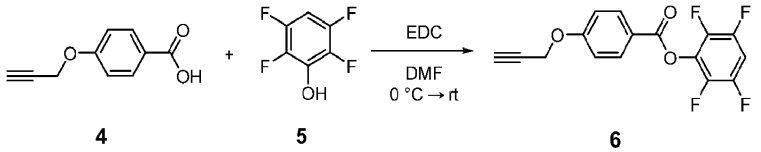
[0571] DMF 중 화합물 1 (3.00 g)의 용액에 실온에서 Cs_2CO_3 (7.71 g)를 첨가하였다. 이어서 화합물 2 (1.85 mL)를 천천히 첨가하였다. 생성된 반응 혼합물을 N_2 (g) 하에 밤새 교반하였다. 이어서 LC-MS에 의해 목적 생성물로의 대략 완전한 전환을 확인하였다. 반응 혼합물을 $NaHCO_3$ (10 mL)로 켄칭하였다. 생성물을 EtOAc (5 x 10 mL)로 추출한 다음, 물 (3 x 8 mL) 및 염수 (8 mL)로 세척하였다. 합한 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 헥산에서 EtOAc (0-30%)의 구배로 정제하였으며, 여기서 생성물은 14% B에서 용리되었다. 화합물 3을 진공 하에 농축시켜 백색 고체를 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 191.06 m/z, 관찰치 191.23 m/z.



[0572]

[0573] 1:1 THF/물 중 화합물 3 (2.87 g)의 용액에 정상 분위기 하에 실온에서 LiOH (1.08 g)를 첨가하였다. 반응 혼

합물을 LC-MS에 의해 화합물 3의 완전한 전환이 관찰될 때까지 교반하였다. 잔류 출발 물질을 EtOAc를 통해 추출한 다음, 수성 상을 6 N HCl을 사용하여 ~3의 pH로 산성화시켰다. 화합물 4를 백색 고체로서 분쇄하고, 진공 상에서 여과하고, 물로 세척하였다. 그의 습윤/점착성 성질로 인해, 용매를 필요로 하여 고체를 둥근 바닥 플라스크로 옮기고; 물질을 MeOH 및 DCM을 통해 옮겼다. 용매 및 조합물 중 불량한 용매화로 인해, 물질을 Na_2SO_4 상에서 건조시킬 수 없었다. 화합물 4를 진공 하에 농축시켜 백색의 솜털모양 결정질 고체를 수득하였으며, 이를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 177.05 m/z, 관찰치 177.19 m/z.

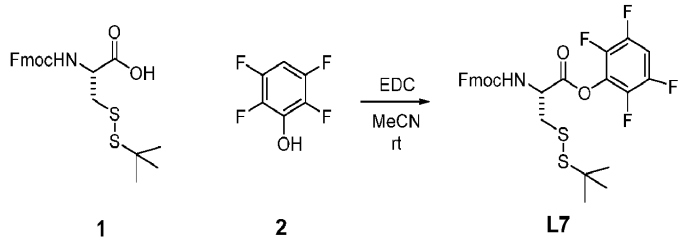


4 5 6

[0574]

[0575] N_2(g) 하에 DMF (10.0 mL) 중 화합물 4 (1.00 g) 및 5 (1.04 g)의 용액에 실온에서 EDC (1.20 g)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 교반되도록 하였다. 밤새 교반한 후 생성물을 성공적으로 관찰할 수 없기 때문에, 반응 혼합물을 $NaHCO_3$로 켄칭하였다. 생성된 침전물을 LC-MS를 통해 출발 물질을 함유하는 것으로 확인하고, 진공 하에 여과하고, MeOH/DCM 중에 재현탁되도록 시도한 다음, 진공 하에 농축시켰다. 이어서 혼합물을 DMF 중에 재용매화시키고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 진공 하에 여과하고, DMF로 헹구었다. EDC를 DMF 중 여과물 (즉, 화합물 4 및 5)에 재첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 하였다. 반응 혼합물을 직접 농축시키고, 단리를 위해 MeOH 및 PhMe와 공비혼합하였다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 정제하고, DCM 중 0-20% MeOH로 용리시켰다. L4를 0% B에서 용리시켜 백색 고체를 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 325.04 m/z, 관찰치 325.35 m/z.

[0576] L7의 합성

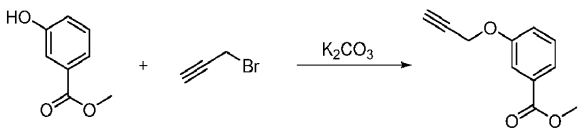


1 2 L7

[0577]

[0578] DMF 중 화합물 1 (0.300 g) 및 2 (0.231 g)의 용액에 주위 조건 하에 EDC (0.160 g)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 2시간 동안 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 헥산에서 EtOAc (0-30%)의 구배로 정제하였으며, 여기서 생성물은 10% B에서 용리되었다. 생성물-함유 분획을 진공 하에 농축시켜 L7을 백색 유성 잔류물로서 수득하였다. 수율: 0.329 g (81.6%) LC-MS: 계산치 [M+H]+ 580.12 m/z, 관찰치 580.56 m/z.

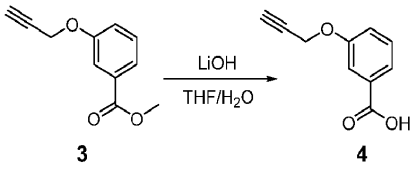
[0579] L8의 합성



1 2 3

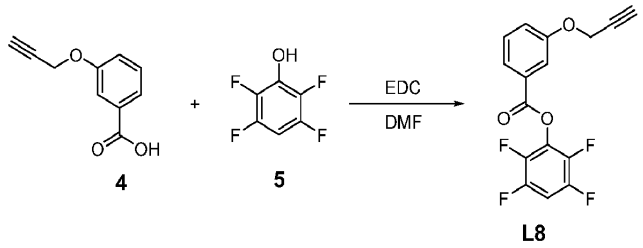
[0580]

[0581] 무수 아세톤 (5 mL) 중 화합물 1 (500 mg, 3.286 mmol, 1.0 당량), 및 탄산칼륨 (908 mg, 6.572 mmol, 2.0 당량)의 용액에 실온에서 화합물 2 (0.549 mL, 4.929 mmol, 1.5 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 50℃에서 3시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 포화 중탄산나트륨 용액 (5 mL)으로 켄칭하였다. 수성 상을 에틸 아세테이트 (3 x 5 mL)로 추출하였다. 합한 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 생성물 3을 콤비플래쉬®에 의해 헥산 중 5-10% 에틸 아세테이트로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 191.06, 실측치 191.19.



[0582]

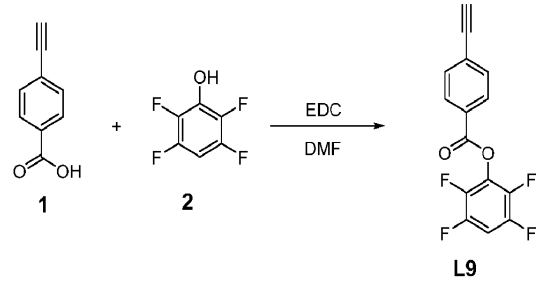
[0583] THF (5 mL) 및 물 (5 mL) 중 화합물 3 (584 mg, 3.070 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 수산화리튬 (220 mg, 9.211 mmol, 3.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 40℃에서 1시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 HCl 용액으로 켄칭하고, pH를 3.0으로 조정하였다. 수성 상을 에틸 아세테이트 (3 x 10 mL)로 추출하였다. 합한 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 생성물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 177.17, 실측치 177.37.



[0584]

[0585] 무수 DMF (2 mL) 중 화합물 4 (185 mg, 1.050 mmol, 1.0 당량), 화합물 5 (218 mg, 1.312 mmol, 1.25 당량)의 용액에 실온에서 EDC HCl (251 mg, 1.312 mmol, 1.25 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 포화 중탄산나트륨 용액 (5 mL)으로 켄칭하였다. 수성 상을 에틸 아세테이트 (3 x 5 mL)로 추출하였다. 합한 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 생성물 L8을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 헥산 중 5-10% 에틸 아세테이트로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 325.04, 실측치 325.26.

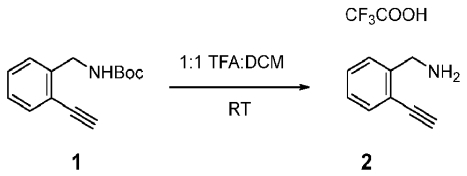
[0586] L9의 합성



[0587]

[0588] 무수 DMF (2 mL) 중 화합물 1 (200 mg, 1.368 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (284 mg, 1.710 mmol, 1.25 당량)의 용액에 실온에서 EDC HCl (327 mg, 1.710 mmol, 1.25 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 포화 중탄산나트륨 용액 (5 mL)으로 켄칭하였다. 수성 상을 에틸 아세테이트 (3 x 5 mL)로 추출하였다. 합한 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 생성물 L9를 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 헥산 중 5-10% 에틸 아세테이트로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 295.03, 실측치 294.69.

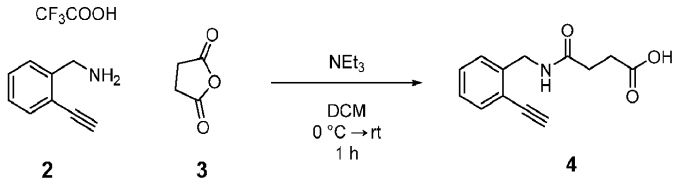
[0589] L10의 합성



[0590]

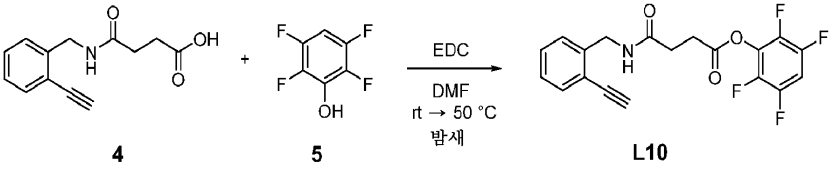
[0591] DCM 중 화합물 1 (0.200 g)의 용액에 실온에서 TFA (1.99 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완

전한 전환이 관찰될 때까지 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 PhMe와 공비혼합하고, 진공 하에 농축시켜 2를 갈색 오일로서 수득하였다. 수율: 0.309 g (146%). LC-MS: 계산치 [M+H]+ 132.07 m/z, 관찰치 132.10 m/z.



[0592]

[0593] DCM 중 화합물 2 (0.212 g)의 용액에 0℃에서 3 (0.0865 g)을 첨가하였다. 혼합물을 1.5시간 동안 교반한 다음, 실온으로 가온하여 교반하였다. 0.5시간 후, NEt_3를 첨가하고, 0.5시간 내에, 완전한 전환을 LC-MS에 의해 확인하였다. 반응 혼합물을 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 정제하고, DCM에서 DCM 중 20% MeOH (0-25% B)의 구배로 용리시켰다. 생성물을 9% B. 농축에서 용리시켜 4를 자주색 고체로서 수득하였다. 수율: 0.171 g (85.5%) LC-MS: 계산치 [M+H]+ 232.09 m/z, 관찰치 232.28 m/z.

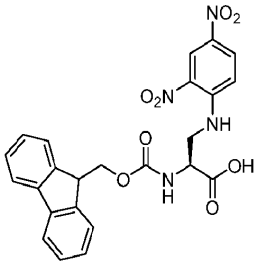


[0594]

[0595] DMF 중 화합물 4 (0.0400 g) 및 5 (0.0316 g)의 용액에 실온에서 EDC (0.0398 g)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 1시간 동안 교반하였다. 1시간 후, LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰되었다. 반응 혼합물을 $NaHCO_3$ (15 mL)로 켄칭하였다. 생성물을 EtOAc (3 x 8 mL)로 추출하고, 물 (3 x 8 mL)로 세척하였다. 합한 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 정제하고, DCM에서 20% MeOH/DCM (0-25% B)의 구배로 용리시켰다. 생성물을 6% B에서 용리시켜 L10을 백색 고체로서 수득하였다. 수율: 0.0255 g (38.9%) LC-MS: 계산치 [M+H]+ 380.08 m/z, 관찰치 380.35 m/z.

[0596] 실시예 3. 표적화 리간드의 합성

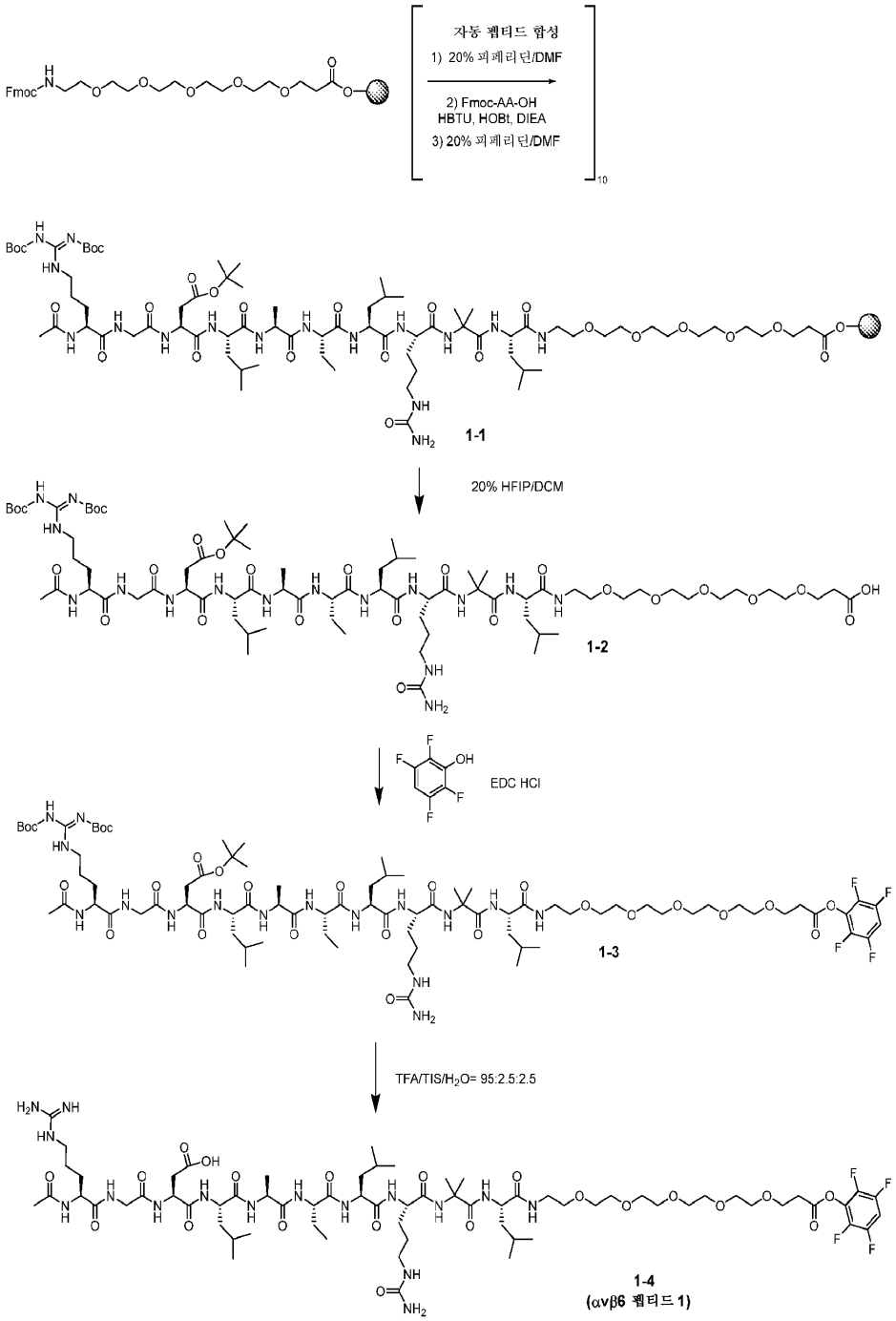
[0597] 본 실시예에서의 펩티드는 표준 펩티드 합성을 사용하여 합성하였다. 켐매트릭스® 링크 아미드 수지를 프릿 폴리프로필렌 시린지에 넣고, 사용 전에 DCM 중에서 30분 동안 교반하였다. 하기 표준 고체 상 펩티드 합성 조건을 사용하였다. Fmoc 탈보호를 수지 1 mmol당 피페리딘:DMF 용액 (20:80 v/v) 40 ml로 20분 동안 침지시킴으로써 수행하였다. 수지를 DMF 중 Fmoc-아미노산의 0.1 M 농도에서 DMF 중 4 몰 당량 Fmoc-아미노산, 4 몰 당량 HBTU 및 10 몰 당량 디이소프로필에틸아민으로 40분 동안 침지시킴으로써 아미드 커플링을 수행하였다. Fmoc-Dap(DNP)-OH를 사용하여 DNP 발색단을 수지에 부착시키고, 펩티드를 Dap α-아민으로부터 합성하였다. 수지로부터의 절단을 TFA 용액 중에서 2시간 동안 수행하였다. 용매를 가압 공기를 통해 10% 원래 부피로 감소시키고, Et_2O를 사용하여 침전시켰다. TFA를 통한 마이크로절단 및 분석용 HPLC-MS에 의해 생성물의 정체를 확인하였다. 이어서 수펠코 디스커버리 (Supelco Discovery)® BIO 와이드 포어 (wide pore) C18 칼럼 (25 cm x 21 mm, 10 μm 입자, 시그마 알드리치 (Sigma Aldrich)로부터 입수가능함)을 사용하여 대략 1 ml/분의 선형 구배로 용리시켜 정제용 규모 시마즈 (Shimadzu) HPLC 상에서 펩티드를 > 95% 순도로 정제하였다. 순도는 워터스® 엑스브리지 BEH130 C18 칼럼 (250 mm x 6.6 mm, 5 μm 입자)이 장착된 분석용 시마즈 HPLC를 사용하여 10-90% B 용매를 사용하여 50분에 걸쳐 평가하였다. 용매는 H_2O:F_3CCO_2H 100:0.1 v/v를 나타내고, B 용매는 CH_3CN:F_3CCO_2H 100:0.1 v/v를 나타낸다.



Fmoc-Dap(DNP)-OH

[0598]

[0599] αvβ6 펩티드 1의 합성



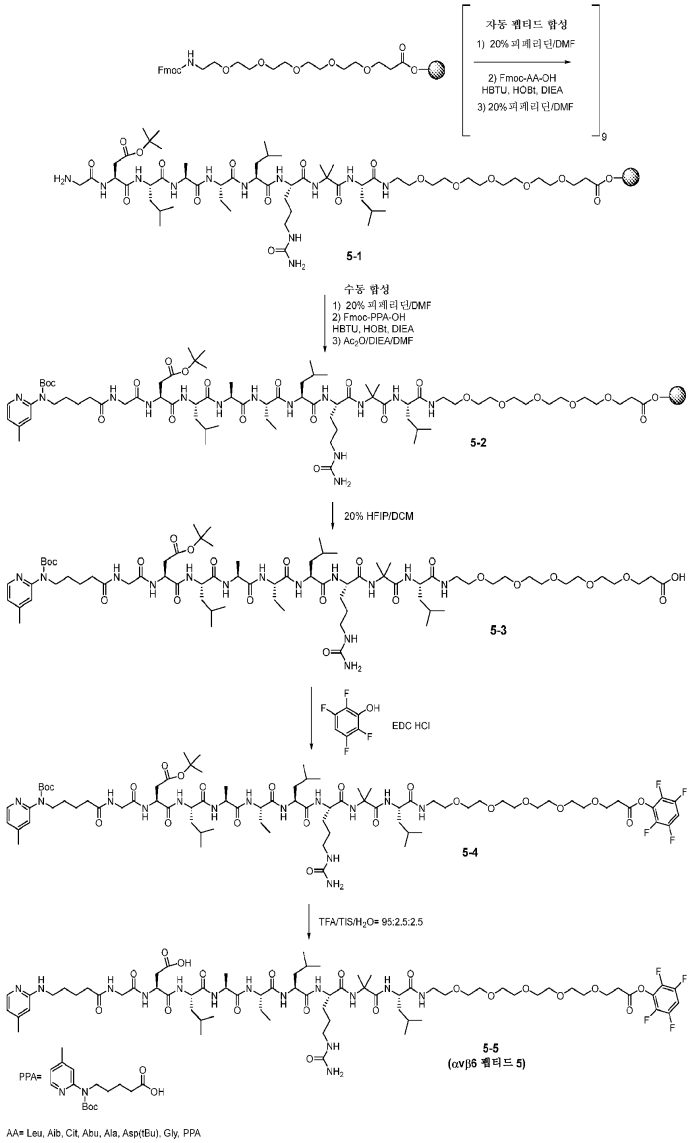
[0600]

[0601] αvβ6 펩티드 1을, 상기 기재된 바와 같이 4.1 mmol 규모로 (0.79 mmol/g) 상에 Fmoc-Peg_5-CO_2H 사전로딩된 2-Cl-Trt 수지를 이용하여 CS 바이오 펩티드 합성기 상에서 일반적 Fmoc 펩티드 화학을 사용하여 수득한 Arg-Gly-

Asp(tBu)-Leu-Ala-Abu-Leu-Cit-Aib-Leu-Peg_5-CO_2-2-Cl-Trt 수지 1-1의 변형에 의해 제조하였다. 수지로부터의 절단 후, 펩티드 1-2를 테트라플루오로페닐 에스테르 1-3으로 전환시키고, 조 생성물을 후속 단계에 정제 없이 사용하였다.

[0602] 조 펩티드 1-3을 탈보호 칵테일 TFA/TIS/H_2O= 90:5:5 (80 mL)로 1.5시간 동안 처리하여 최종 탈보호를 수행하였다. 반응 혼합물을 메틸 tert-부틸 에테르 (700 mL)에 적가하고, 생성된 침전물을 원심분리에 의해 수집하였다. 펠릿을 추가의 메틸 tert-부틸 에테르 (500 mL)로 세척하였다. 잔류물을 역상 (RP)-HPLC (페노메넥스 제미니 C18 250 x 50 mm, 10 마이크로미터, 60 mL/분, 0.1% TFA를 함유하는 물 중 30-45% ACN 구배, 실행당 대략 1 그램의 조 물질)에 의해 정제하여 순수한 펩티드 1-4 (αvβ6 펩티드 1) 4.25 g를 수득하였다.

[0603] αvβ6 펩티드 5의 합성



[0604]

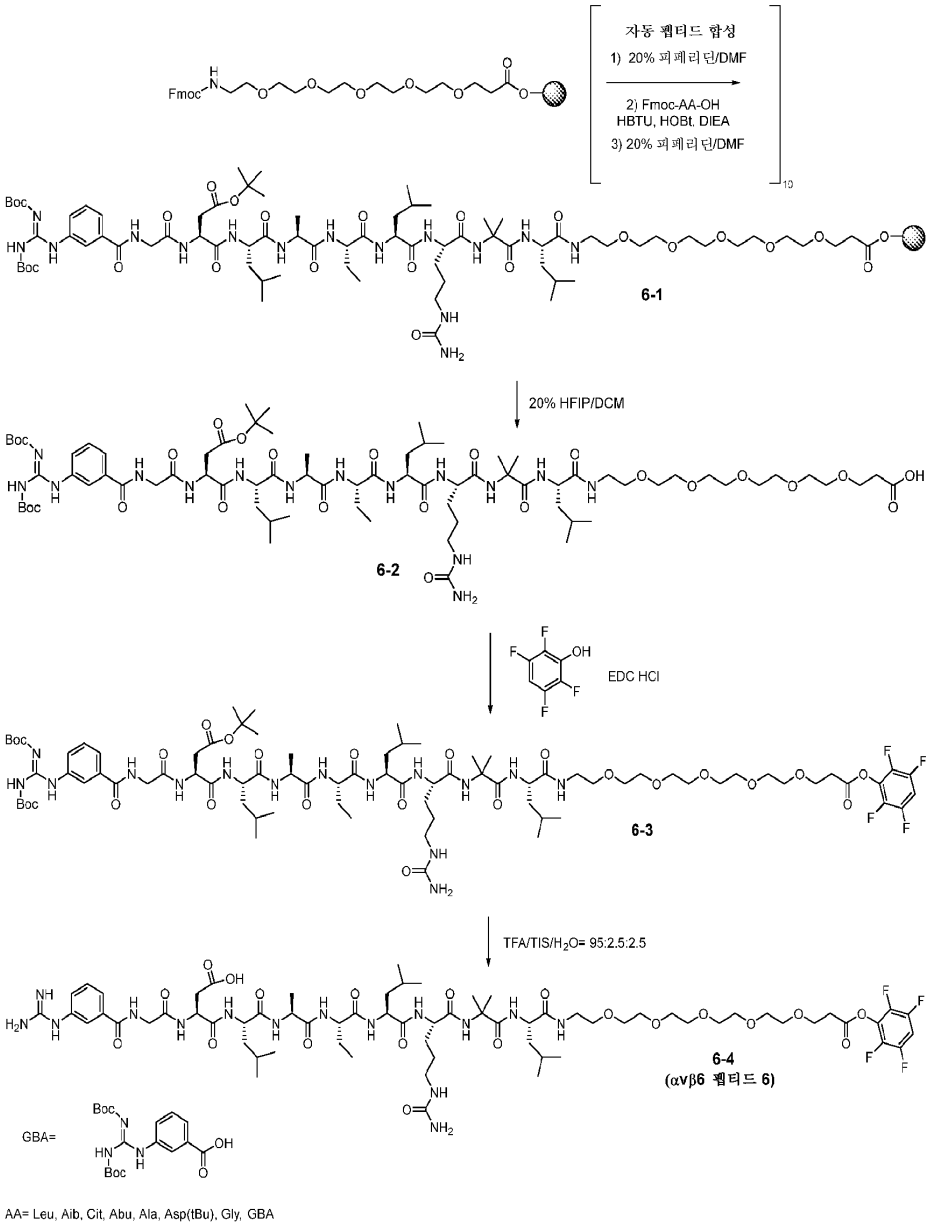
[0605] αvβ6 펩티드 5를 H-Gly-Asp(tBu)-Leu-Ala-Abu-Leu-Cit-Aib-Leu-Peg_5-CO_2-2-Cl-Trt 수지 5-1의 변형에 의해 제조하였으며, 이는 0.2 mmol 규모로 (0.85 mmol/g) Fmoc-Peg_5-CO_2H 사전로딩된 2-Cl-Trt 수지를 이용하는 심포니 펩티드 합성기 상에서 일반적 Fmoc 펩티드 화학을 사용하여 수득하였다. 커플링 단계는 수지를 3 당량의 Fmoc-AA-OH, 3 당량의 HBTU, 및 6 당량의 DIEA로 2시간 동안 처리하여 수행하였다. 탈보호 단계에서, 수지를 DMF 중 20% 피페리딘으로 5분 및 20분 동안 연속적으로 처리하였다. 자동 합성의 완료 시, 펩티드-수지 5-1을 수동 변형을 위해 심포니 반응 용기로부터 SPPS 용기로 옮기고, DMF (6 mL - 1분 x 4회)로 세척하고, 단계 1, 반응식 2에 대해 상기 기재된 표준 커플링 절차를 사용하여 5-(N-Boc-아미노)-5-(4-메틸피리드-2-일)펜탄산과 커플링시켰다.

[0606] 생성된 펩티드-수지 5-2를 절단 용액 (DCM 중 20% 헥사플루오르 이소프로판올 (HFIP), 6 ml)의 3 부분으로 15분 동안 3회 처리하였다. 절단된 보호된 펩티드 5-3의 용액을 톨루엔 20 ml로 희석하고, 농축시키고, 진공 하에 건조시켰다. 잔류 HFIP를 생성물로부터 톨루엔의 추가의 증발에 의해 제거하고, 생성물을 진공 하에 2시간 동안 건조시켰다.

[0607] 조 펩티드 5-3 (133 mg)의 부분을 DCM (4 mL) 중에 용해시키고, 0℃로 냉각시켰다. 테트라플루오로페놀 (22 mg, 0.133 mmol), 및 EDC 히드로클로라이드 (26 mg, 0.133 mmol)를 첨가하고, 냉각 조를 제거하고, 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, 진공 하에 건조시키고, 조 펩티드를 콤비플래쉬® 상에서 시스템 DCM: DCM 중 20% MeOH, 구배 0-100%, 25분을 사용하여 정제하여 순수한 펩티드 5-4 74 mg를 수득하였다.

[0608] 정제된 펩티드 5-4를 탈보호 칵테일 TFA/TIS/H_2O=95:2.5:2.5 (4 mL)로 1.5시간 동안 처리하여 최종 탈보호를 수행하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, 진공 하에 건조시켰다. 잔류 톨루엔을 톨루엔과의 공증발에 의해 제거하였다. 조 펩티드 5-5 (αvβ6 펩티드 5)를 HPLC에 의해 칼럼: 신크로니스™ aQ 250 x 20 (써모 사이언티픽), 25분 내 H_2O (TFA 0.1%) 중 ACN (TFA 0.1%) 20-30%, 조건: H_2O (TFA 0.1%) 중 ACN (TFA 0.1%) 35-60%, 25분을 사용하여 정제하였다. 수율 55 mg. 계산된 분자량 (MW) 1556.81, 1/2M=778.40. 실측치: MS (ES, pos): 1557.52 $[M+1]^+$; 780.39 $[M+2]^{2+}$.

[0609] αvβ6 펩티드 6의 합성



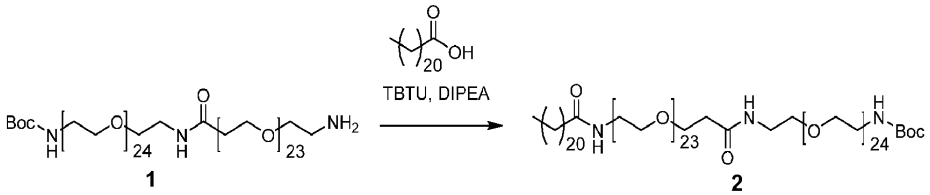
[0610] AA= Leu, Aib, Cit, Abu, Ala, Asp(tBu), Gly, GBA

[0611] αvβ6 펩티드 6을, 상기 기재된 바와 같이 0.2 mmol 규모로 (0.85 mmol/g) 상에 Fmoc-Peg_5-CO_2H 사전로딩된 2-Cl-Trt 수지를 이용하는 심포니 펩티드 합성기 상에서 일반적 Fmoc 펩티드 화학을 사용하여 수득한 GBA-Gly-Asp(tBu)-Leu-Ala-Abu-Leu-Cit-Aib-Leu-Peg_5-CO_2-2-Cl-Trt 수지 6-1의 변형에 의해 제조하였다. 수지로부터의 절단 후, 펩티드 6-2를 테트라플루오로페닐 에스테르 6-3으로 전환시키고, 콤비플래쉬® 상에서 시스템 DCM:DCM 중 20% MeOH, 구배 15-100%, 25분을 사용하여 정제하여 순수한 펩티드 6-3 160 mg를 수득하였다. 조 펩티드 6-3을 탈보호 칵테일 TFA/TIS/H_2O= 90:5:5 (80 mL)로 1.5시간 동안 처리하여 최종 탈보호를 수행하였다. 반응 혼합물을 메틸 tert-부틸 에테르 (700 mL)에 적가하고, 생성된 침전물을 원심분리에 의해 수집하였다. 펠릿을 추가의 메틸 tert-부틸 에테르 (500 mL)로 세척하였다. 잔류물을 HPLC 정제에 의해 다음 조건을 사용하여 정제하였다: H_2O (TFA 0.1%) 중 ACN (TFA 0.1%) 27-57%, 25분. 수율 94 mg. 계산치 MW 1527.76, 1/2M=763.88. 실측치: MS (ES, pos): 1529.48 $[M+1]^+$; 765.39 $[M+2]^{2+}$.

[0612] 실시예 4. PK/PD 조정제 전구체의 합성

[0613] 표 1의 PK/PD 조정제 전구체의 일부는 표 1에 나타낸 바와 같이 상업적 공급업체로부터 구입하였다. 하기 절차를 사용하여 나머지 PK/PD 조정제 전구체를 제조하였다.

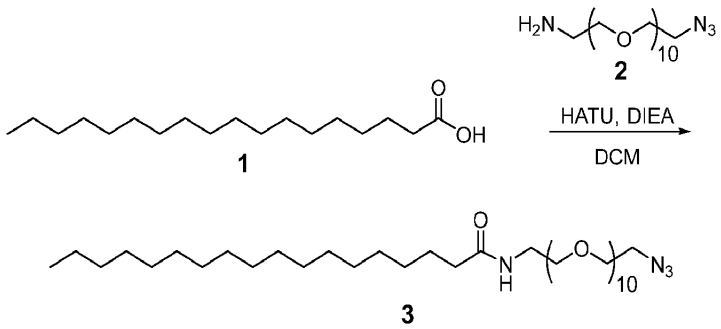
[0614] 비스(PEG47+C22)의 합성



[0615]

[0616] 고체 TBTU (1.68 g, 5.22 mmol)를 베헨산 (1.486 g, 4.36 mmol), Boc-보호된 PEG-아민 1 (퀀타 바이오디자인 리미티드, 10 g, 4.35 mmol) 및 DIPEA (2.27 mL, 13.03 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 초음파처리하여 고체를 용해시키고, 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 물 (3 mL)을 첨가하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성된 잔류물을 클로로포름 (300 mL) 중에 용해시키고, $NaHCO_3$ (2 x 75 mL), 및 염수 (50 mL)로 세척하였다. 생성물 2를 건조시키고 (Na_2SO_4), 진공 하에 농축시키고, 콤비플래쉬® 상에서 시스템 DCM: DCM 중 20% MeOH, 구배 0-80%, 25분을 사용하여 정제하였다. 수율 10 g (88 %). 계산치 MW 2623.72, (M +2 x 18)/2=1329.86, (M +3H)/3=875.57 실측치: MS (ES, pos): 1330.58 $[M+2NH_4]^{2+}$, 875.93 $[M+3H]^{3+}$

[0617] C18의 합성

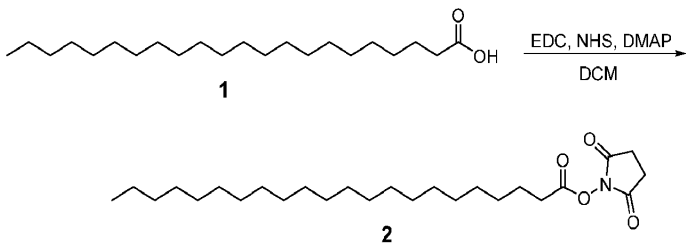


[0618]

[0619] 화합물 1 (시그마 S4751) (0.125 g)을 DCM (2.0 mL) 중에 용해시켰다. 이어서 HATU (0.249 g) 및 DIEA (0.263 mL)를 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 15분 동안 교반되도록 하고, 0.265 g의 화합물 2 (브로드팜® BP-22226)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 1시간 동안 교반되도록 하였다.

[0620] 이어서 반응 혼합물을 DCM (40mL)으로 희석하고, H_2O (2 x 7mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축시켰다. 유기 층을 DCM 2 mL 중에 두고, 칼럼 (콤비플래쉬®, DCM : 20% MeOH 함유 DCM, 레디셉 rf 골드® 칼럼; 0-40% 이동상 B, 30분에 걸침)에 의해 정제하였다. 생성물을 함유하는 분획을 수집하고, 진공 하에 농축시켜 화합물 3을 수득하였다. 수율 223 mg (56%).

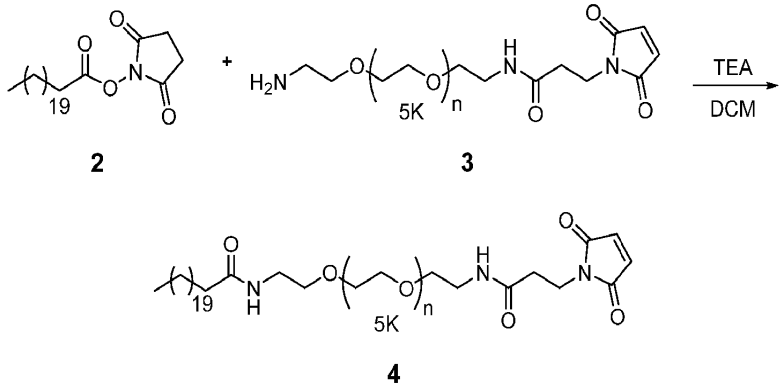
[0621] C22-PEG5K-Mal의 합성



[0622]

[0623] 화합물 1 (시그마-알드리치® 216941) (0.300 g)을 DCM 4.5 mL 중에 용해시켰다. 이어서 EDC (오크우드 케미칼 024810) (0.211 g)를 용액에 첨가하였다. 이어서 NHS (시그마-알드리치® 130672) (0.203 g)를 용액에 첨가하였다. 최종적으로, DMAP (시그마-알드리치® 107700) (0.0215 g)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반되도록 하였다. 용액을 DCM 40 mL로 희석하고, 산성 H_2O (3 x 7 mL)로 세척하고, Na_2SO_4로 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축시켰다. 농축된 생성물을 (이동상 A:이동상 B) Hex:EtOAc 0->50%에서 12 G 레디-셉 rf 골드

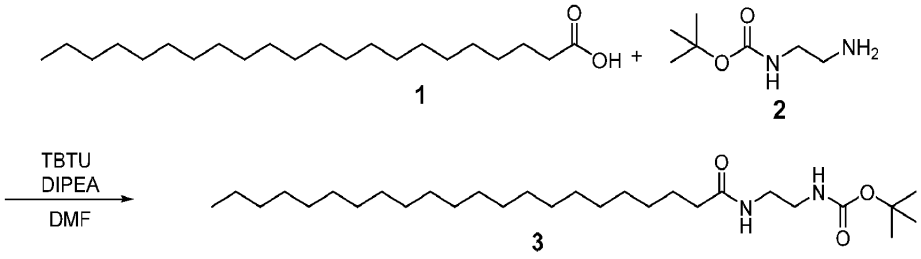
® 칼럼 상에 25분에 걸쳐 건조 로딩하였다 (실리카 3 mL). 생성물 2를 함유하는 분획을 수집하고, 농축시켰다. 수율 283 g (73%).



[0624]

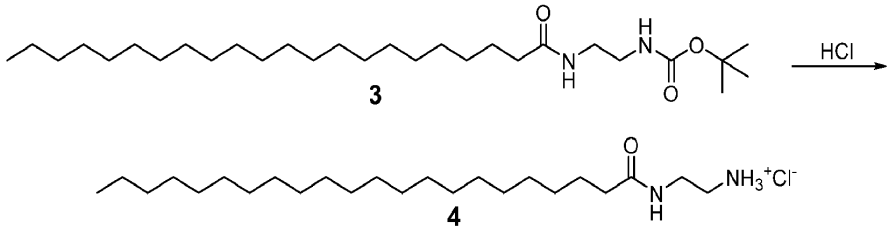
[0625] 화합물 3 (크리에이티브 피이지워크스 PHB-942) (0.100 g)을 2 mL의 DCM에 용해시켰다. 이어서 화합물 2 (0.0438 g)를 첨가하였다. 이어서 TEA 0.042 mL을 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 2시간 동안 교반되도록 하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 이어서 농축물을 DCM 1 mL 중에 두고, DCM:DCM (20% MeOH 함유) 0->100%에서 4 G 레디-셉 rf 골드® 칼럼 상에 20분에 걸쳐 로딩하였다. 생성물 4를 함유하는 분획을 수집하고, 회전 증발기 상에서 농축시켰다. 수율 41 mg (38%).

[0626] PEG48+C22의 합성



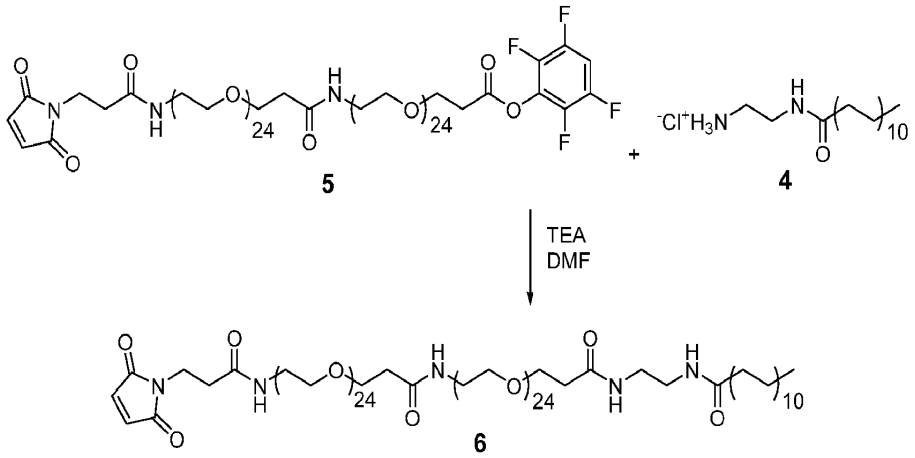
[0627]

[0628] 무수 DMF (3 mL) 중 화합물 1 (350 mg, 1.027 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (181 mg, 1.130 mmol, 1.1 당량) 및 DIPEA (0.537 mL, 3.082 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (396 mg, 1.233 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ 수용액 (20 mL)으로 켄칭하고, 수성 상을 디클로로메탄 (3 x 10 mL)으로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 생성물 3을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 4-5% 메탄올로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 483.44, 실측치 483.67.



[0629]

[0630] 무수 1,4-디옥산 (1 mL) 중 화합물 3 (290 mg, 0.600 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 디옥산 중 HCl 용액 (0.751 mL, 3.003 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 383.39, 실측치 383.57.

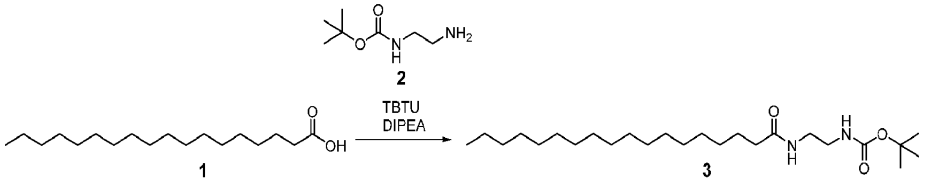


5 + 4 → 6

[0631]

[0632] 무수 DMF (2 mL) 중 화합물 5 (83 mg, 0.0322 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 4 (13.5 mg, 0.322 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 TEA (0.014 mL, 0.0967 mmol, 3.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물 6을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 10-15% 메탄올로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+4H]+/4 698.18, 실측치 698.49, 계산치 [M+3H]+/3 930.58, 실측치 930.61.

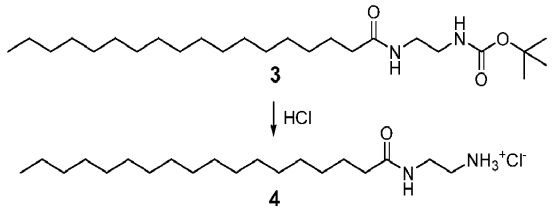
[0633] PEG48+C18의 합성



1 + 2 → 3

[0634]

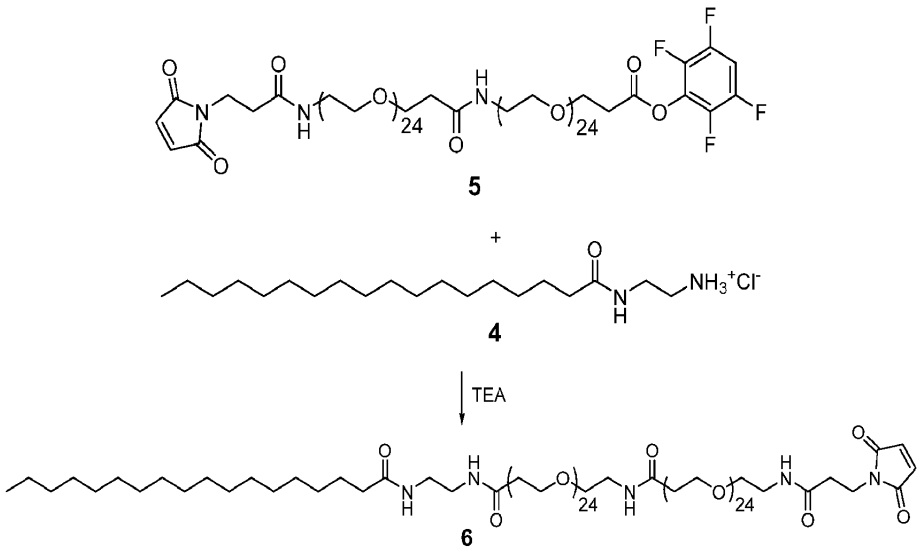
[0635] 무수 DMF (10 mL) 중 화합물 1 (1437 mg, 5.051 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (890 mg, 5.556 mmol, 1.1 당량) 및 DIPEA (2.639 mL, 15.154 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (1946 mg, 6.061 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ 수용액 (20 mL)으로 켄칭하고, 수성 상을 디클로로메탄 (3 x 10 mL)으로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 생성물 3을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 4-5% 메탄올로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 427.38, 실측치 427.74.



3 → 4

[0636]

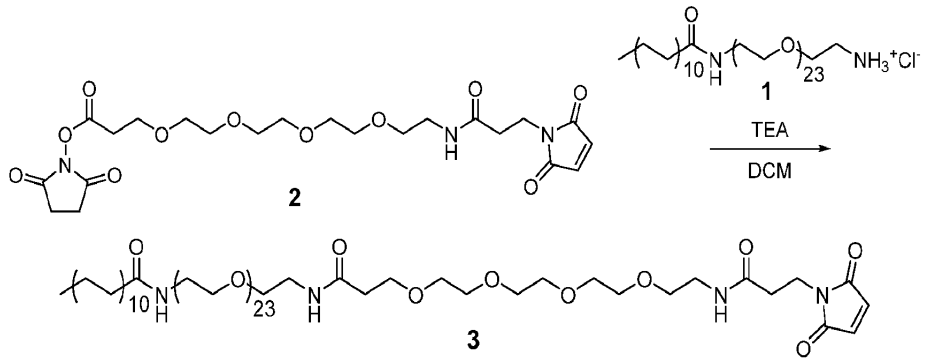
[0637] 무수 1,4-디옥산 (1 mL) 중 화합물 3 (445 mg, 1.042 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 디옥산 중 HCl 용액 (1.304 mL, 5.214 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 327.33, 실측치 327.48.



[0638]

[0639] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 5 (90 mg, 0.035 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 4 (13.3 mg, 0.0367 mmol, 1.05 당량)의 용액에 실온에서 TEA (0.015 mL, 0.104 mmol, 3.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물 6을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 12-18% 메탄올로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+3H]+/3 911.90, 실측치 912.65, [M+4H]+/4 684.17, 실측치 685.21.

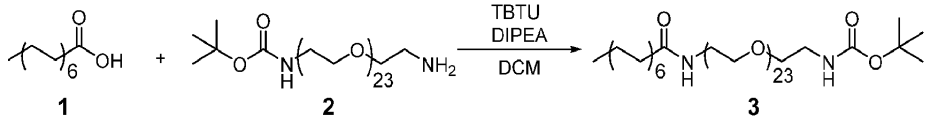
[0640] PEG23+C22의 합성



[0641]

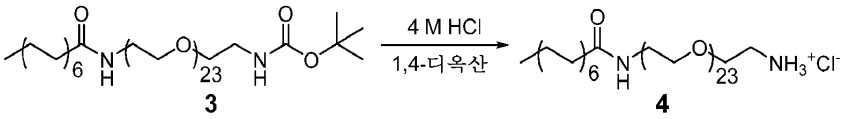
[0642] DCM 중 화합물 1 (0.0700 g)의 용액에 실온에서 화합물 2 (0.0251 g) 및 TEA (0.0148 g)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완전한 전환이 확인될 때까지 0.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 정제하고, DCM에서 DCM 중 20% MeOH (0-100% B)의 구배로 용리시켰다. 생성물을 60% B. 농도로 용리시켜 3을 백색 고체로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1794.16 m/z, 관찰치 898.01 (+2/2) m/z. 수율: 0.0784 g (89.4%)

[0643] 비스(PEG23+C14)의 합성



[0644]

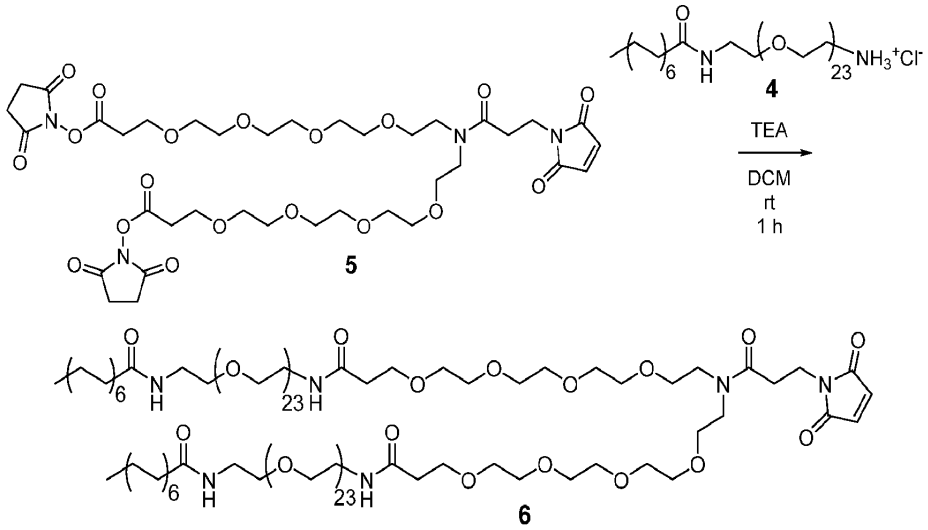
[0645] DCM 중 화합물 1 (0.0430 g) 및 2 (0.221 g)의 용액에 실온에서 TBTU (0.0725 g)에 이어서 DIPEA (0.098 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 1시간 동안 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 DCM에서 DCM 중 20% MeOH (0-100%)의 구배로 정제하였으며, 여기서 생성물은 31% B에서 용리되었다. 생성물 3을 진공 하에 농축시켜 백색 고체를 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1383.92 m/z, 관찰치 693.02 (+2/2) m/z. 수율: 0.253 g (97.0%).



3 4

[0646]

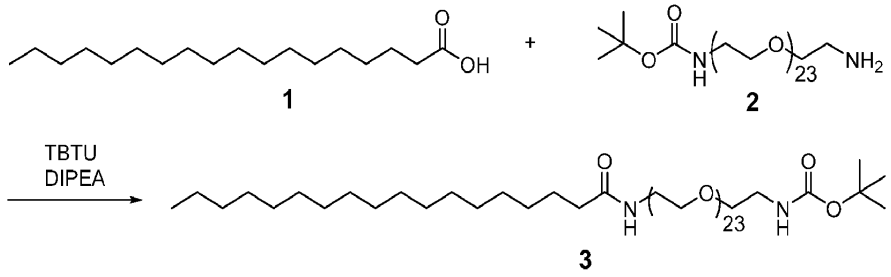
[0647] 화합물 3 (0.253 g)에 실온에서 1,4-디옥산 중 4 M HCl (2.74 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켜 4 백색 고체를 수득하였다. 추가의 정제는 필요하지 않았다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1319.85 m/z, 관찰치 642.97 (+2/2) m/z. 수율: 0.241 g (99.7%).



[0648]

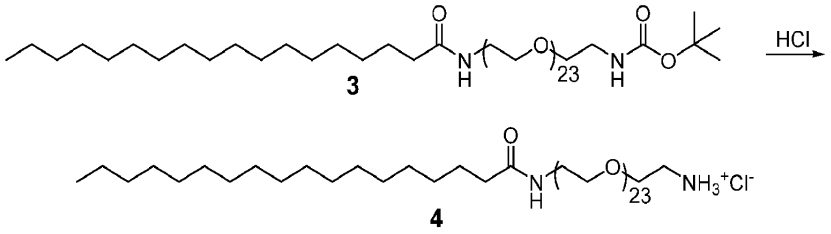
[0649] DCM 중 화합물 4 (0.169 g)의 용액에 실온에서 화합물 5 (0.0500)에 이어서 TEA (0.049 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 LC-MS에 의해 완전한 전환이 확인될 때까지 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 정제하고, DCM에서 DCM 중 20% MeOH (0-100% B)의 구배로 용리시켰다. 생성물을 95% B. 농축에서 용리시켜 6을 백색 고체로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 3195.02 m/z, 관찰치 800.43 (+4/4) m/z. 수율 0.0674 (36.2%)

[0650] 비스(PEG23+C18)의 합성



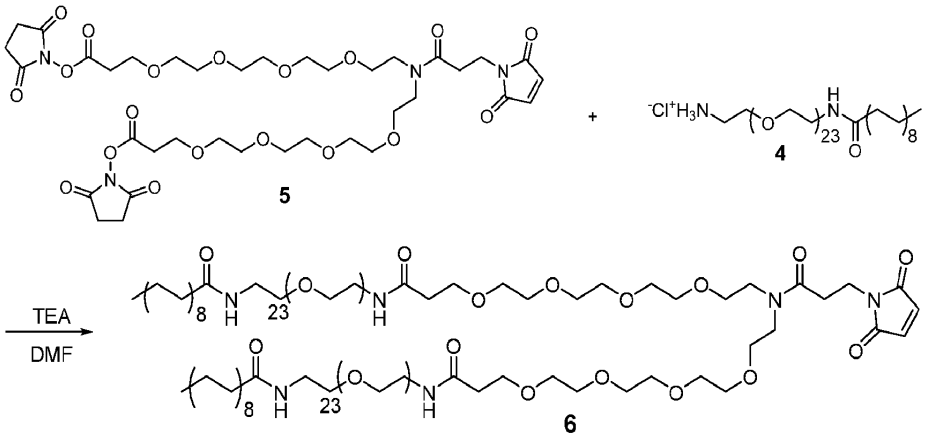
[0651]

[0652] 무수 DMF (3 mL) 중 화합물 1 (130 mg, 0.457 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (536 mg, 0.457 mmol, 1.0 당량), 및 디이소프로필에틸아민 (0.239 mL, 1.370 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (176 mg, 0.548 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ 수용액 (5 mL)으로 켄칭하고, 수성 상을 에틸 아세테이트 (6 x 5 mL)로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 생성물을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 4-8% 메탄올로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1439.99, 실측치 1440.53.



[0653]

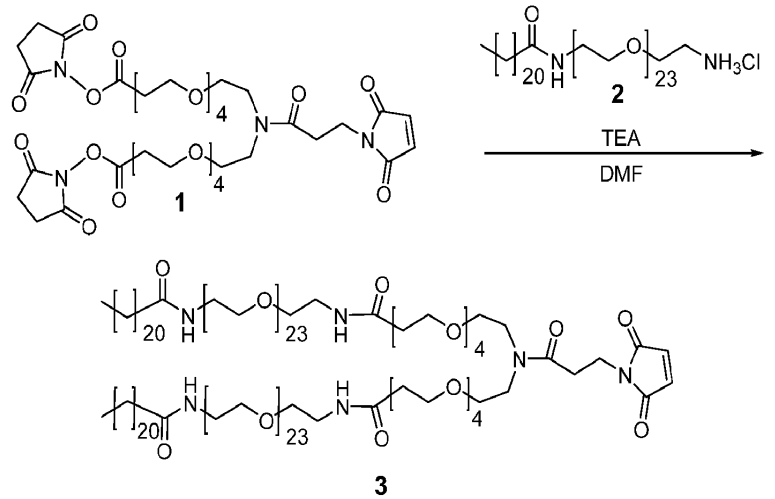
[0654] 무수 1,4-디옥산 (1 mL) 중 화합물 3 (445 mg, 0.309 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 디옥산 중 HCl 용액 (0.386 mL, 1.545 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+2H]+/2 670.46, 실측치 670.93.



[0655]

[0656] 무수 DMF (5 mL) 중 화합물 1 (100 mg, 0.116 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 2 (352 mg, 0.256 mmol, 2.2 당량)의 용액에 실온에서 TEA (0.082 mL, 0.582 mmol, 5.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 10-17% 메탄올로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+4H]+/4 827.53, 실측치 828.16, 계산치 [M+3H]+/3 1103.05, 실측치 1104.21.

[0657] 비스(PEG23+C22)의 합성

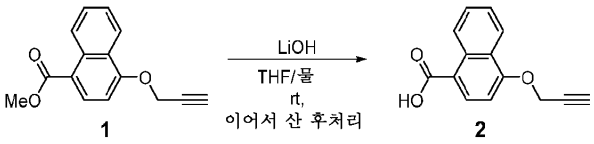


[0658]

[0659] DMF (5 mL) 중 C22-PEG23-아민 히드로클로라이드 (2) (퀀타 바이오디자인 리미티드, 183 mg, 0.128 mmol) 및 비스-NHS 에스테르 1 (브로드팜, 50 mg, 0.058 mmol)의 용액을 TEA (50 uL, 0.35 mmol)의 존재 하에 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, 진공 하에 건조시켰다. 잔류 DMF를 진공 하에 톨루엔의 공증발에 의해 제거하고, 생성물 3을 콤비플래쉬® 상에서 시스템 DCM: DCM 중 20% MeOH, 구배 15-80%, 25분을

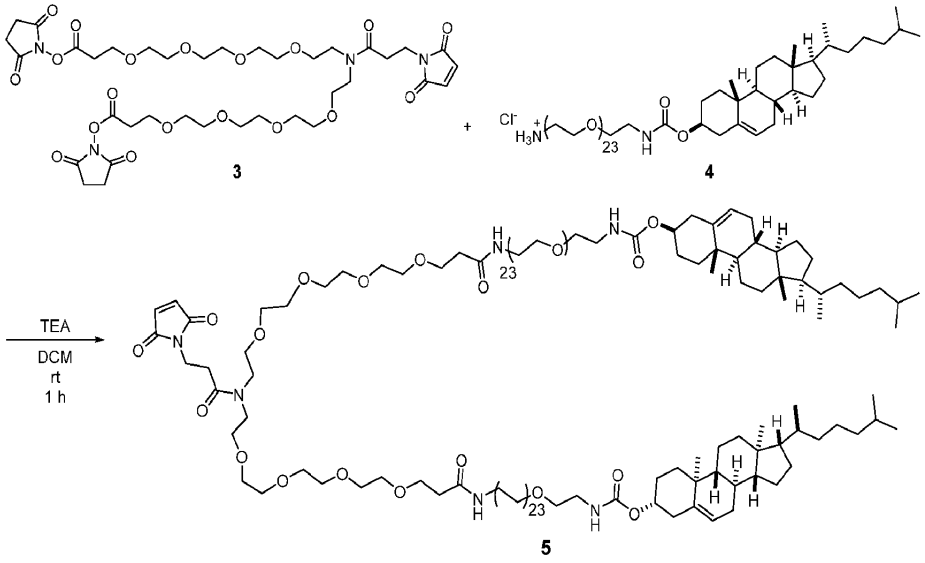
사용하여 정제하였다. 수율 84 mg (45%). 계산치 MW 3419.28, 1/2M=1709.64, (M +2 x 18)/2=1727.64, (M +18+2)/3=1146.42. 실측치: MS (ES, pos): 1727.73 $[M+2NH_4]^{2+}$, 1146.94 $[M+NH_4 + 2H]^{3+}$.

[0660] 비스(PEG23+CLS)의 합성



[0661]

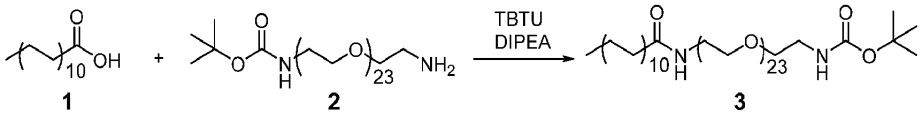
[0662] 1:1 THF/물 중 화합물 1 (0.158 g)의 용액에 정상 분위기 하에 실온에서 LiOH (0.0473 g)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반한 다음, 50℃로 가열하고, LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 6 N HCl을 사용하여 대략 3의 pH로 산성화시켰다. 생성물을 EtOAc (3 x 5 mL)로 추출하였다. 합한 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시켜 2를 백색 고체로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 227.06 m/z, 관찰치 227.06 m/z. 수율: 152 mg (102%)



[0663]

[0664] DCM 중 화합물 4 (0.0709 g)의 용액에 실온에서 화합물 3 (0.0200 g)에 이어서 TEA (0.019 mL)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 확인될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 정제하고, DCM에서 DCM 중 20% MeOH (0-100% B)의 구배로 용리시켰다. 82% B. 농도에서 용리된 생성물은 5를 백색 고체로서 제공하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 3599.30 m/z, 관찰치 1200.23 (+3/3) m/z. 수율 0.0211 g (25.2%)

[0665] 트리스(PEG23+C22)의 합성



[0666]

[0667] 무수 DMF (3 mL) 중 화합물 1 (290 mg, 0.851 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (999 mg, 0.851 mmol, 1.0 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (0.445 mL, 2.554 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (328 mg, 1.021 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ 수용액 (10 mL)으로 켄칭하고, 수성 상을 디클로로메탄 (3 x 10 mL)으로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 생성물 3을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 7-16% 메탄올로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1496.05, 실측치 1496.59.



[0668]

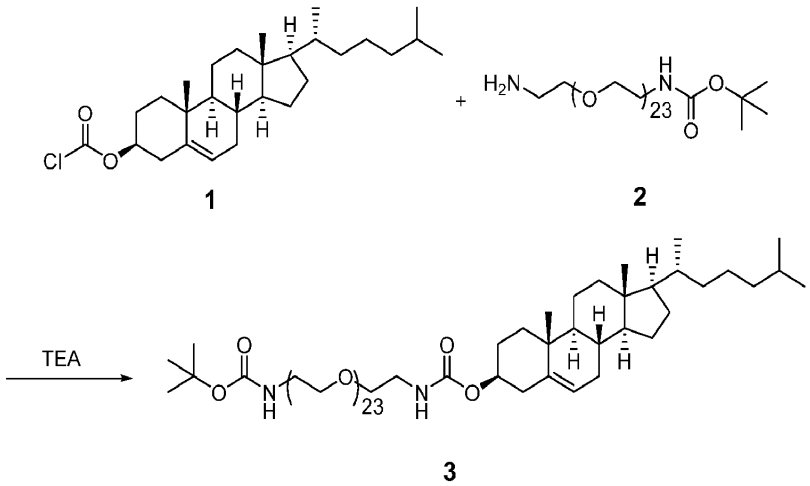
[0669] 무수 1,4-디옥산 (0.5 mL) 중 화합물 1 (642 mg, 0.429 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 디옥산 중 HCl 용액 (2.146 mL, 8.582 mmol, 20 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물을 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+H]+ 계산치 1396.00, 실측치 1396.60.



[0670]

[0671] 무수 DMF (2 mL) 중 화합물 5 (24 mg, 0.0203 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 4 (94 mg, 0.062 mmol, 3.05 당량)의 용액에 실온에서 TEA (0.014 mL, 0.101 mmol, 5.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물 6을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 13-16% 메탄올로 용리시켰다. LC-MS: [M+5H]/5 계산치 974.25, 실측치 975.18.

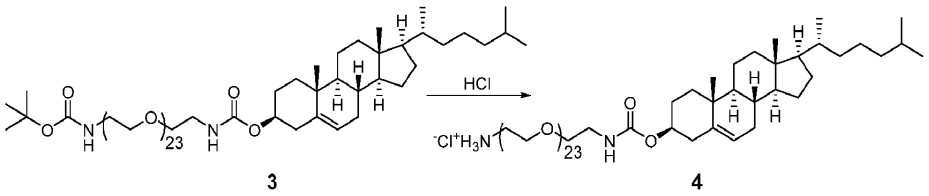
[0672] 트리스(PEG23+CLS)의 합성



[0673]

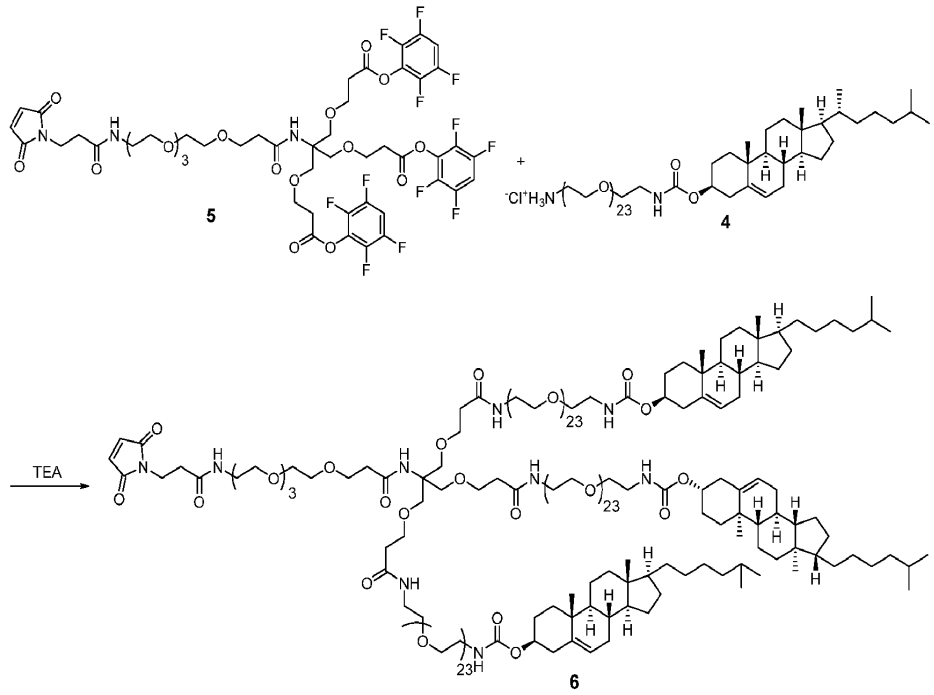
[0674] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 1 (100 mg, 0.222 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 2 (274 mg, 0.233 mmol, 1.05 당량)의 용액에 실온에서 TEA (0.094 mL, 0.668 mmol, 3.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지한 다음, 진공 하에 농축시켰다. 생성물 3을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 8-15% 메탄

올로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+H2O]+ 1603.17, 실측치 1603.18.



[0675]

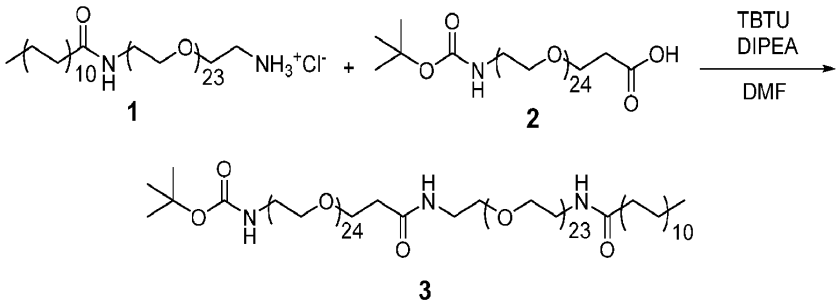
[0676] 무수 1,4-디옥산 (0.5 mL) 중 화합물 3 (353 mg, 0.222 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 디옥산 중 HCl 용액 (1.11 mL, 4.451 mmol, 20 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1486.01, 실측치 1486.50.



[0677]

[0678] 무수 DMF (2 mL) 중 화합물 5 (24 mg, 0.0203 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 4 (94 mg, 0.062 mmol, 3.05 당량)의 용액에 실온에서 TEA (0.014 mL, 0.101 mmol, 5.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물 6을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 13-16% 메탄올로 용리시켰다.

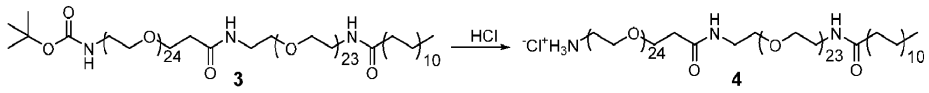
[0679] PEG95+C22의 합성



[0680]

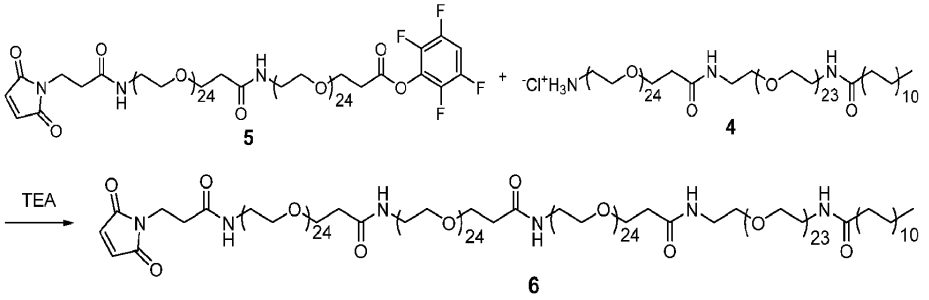
[0681] 무수 DMF (3 mL) 중 화합물 1 (60 mg, 0.0419 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (52 mg, 0.0419 mmol, 1.0 당량), 및 DIPEA (0.022 mL, 0.125 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (16 mg, 0.0503 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 농축시켰다. 생성물을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 6-8% 메탄올로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+4H]+/4 656.66, 실측치

656.17. 수율: 0.063 g (57.3%)



[0682]

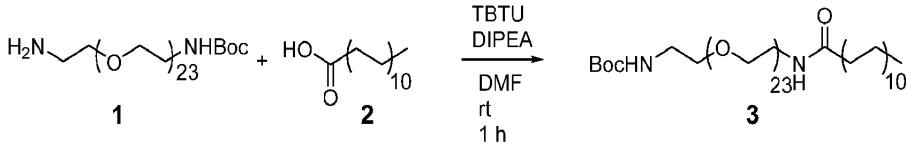
[0683] 무수 1,4-디옥산 (0.5 mL) 중 화합물 1 (60 mg, 0.0229 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 디옥산 중 HCl 용액 (0.286 mL, 1.143 mmol, 50 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물을 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+3H]+/3 841.88, 실측치 841.48, 계산치 [M+4H]+/4 631.66, 실측치 632.41.



[0684]

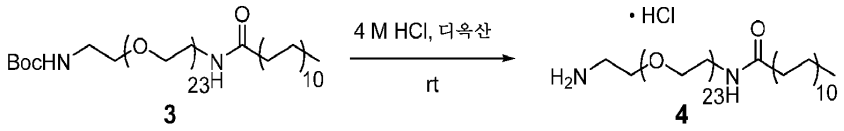
[0685] 무수 DMF (2 mL) 중 화합물 5 (55 mg, 0.0214 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 4 (54.7 mg, 0.0214 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 TEA (0.009 mL, 0.0641 mmol, 3.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물 6을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 15-20% 메탄올로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+5H]+/5 986.80, 실측치 987.19, 계산치 [M+6H]+/6 822.50, 실측치 822.64.

[0686] PEG47+C22의 합성



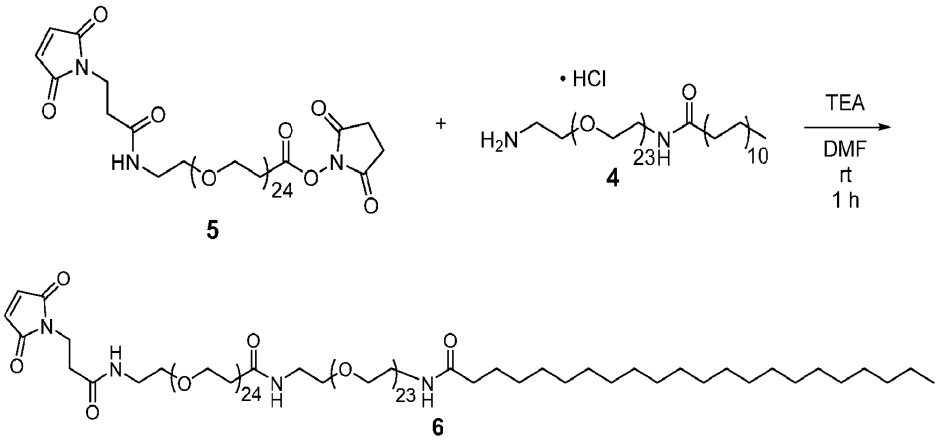
[0687]

[0688] DMF 중 화합물 1 (0.200 g) 및 2 (0.0580 g)의 용액에 실온에서 TBTU (0.0657 g)에 이어서 DIPEA (0.089 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 DCM에서 DCM 중 20% MeOH (0-50%)의 구배로 정제하였으며, 여기서 생성물은 83% B에서 용리되었다. 생성물을 진공 하에 농축시켜 3을 투명한 무색 오일로서 수득하였다. 수율: 0.161 g (63.0%). LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1495.05 m/z, 관찰치 1494.30 m/z.



[0689]

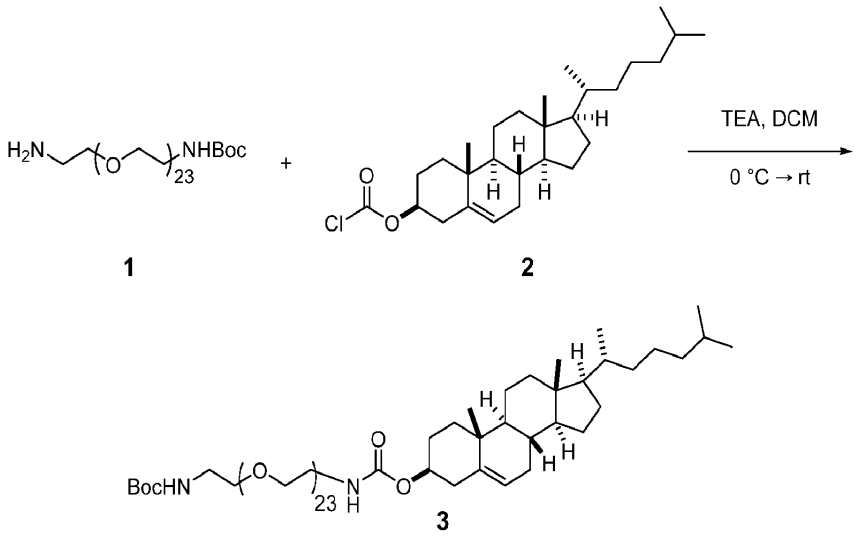
[0690] 화합물 1 (0.161 g)에 실온에서 디옥산 중 4 M HCl (0.805 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 10분 후, 완전한 전환을 LC-MS를 통해 확인하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켜 생성물을 백색 고체로서 수득하였다. 추가의 정제는 필요하지 않았다. 수율: 0.156 g (101%.) LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1396.00 m/z, 관찰치 1396.48 m/z.



[0691]

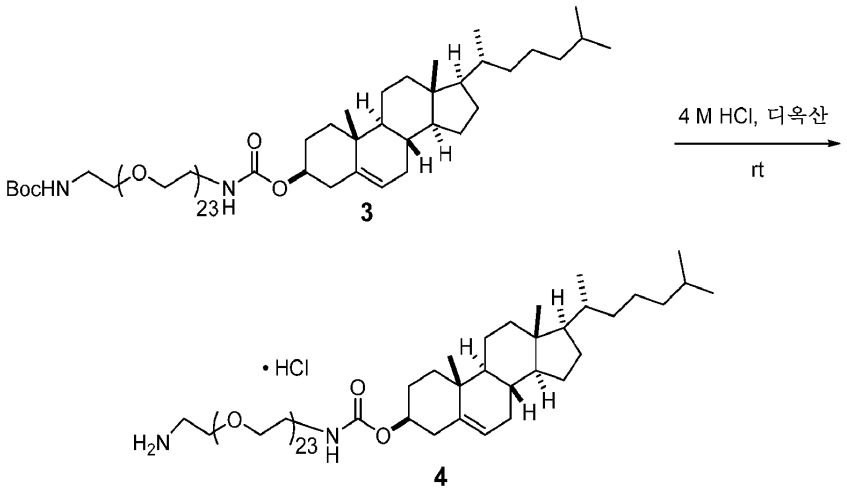
[0692] DMF 중 화합물 5 (0.152 g) 및 4 (0.156 g)의 용액에 실온에서 TEA (0.046 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 1.5시간 후, 완전한 전환을 LC-MS에 의해 확인하였다. 반응 혼합물을 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 정제하고, DCM에서 DCM 중 20% MeOH (0-100% B)의 구배로 용리시켰다. 생성물을 100% B. 분획의 농축으로 용리시켜 6을 백색 고체로서 수득하였다. 수율: 0.216 g (74.0%). LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2674.69 m/z, 687.67 m/z (물 부가물); 관찰치 686.89 m/z.

[0693] PEG47+CLS의 합성



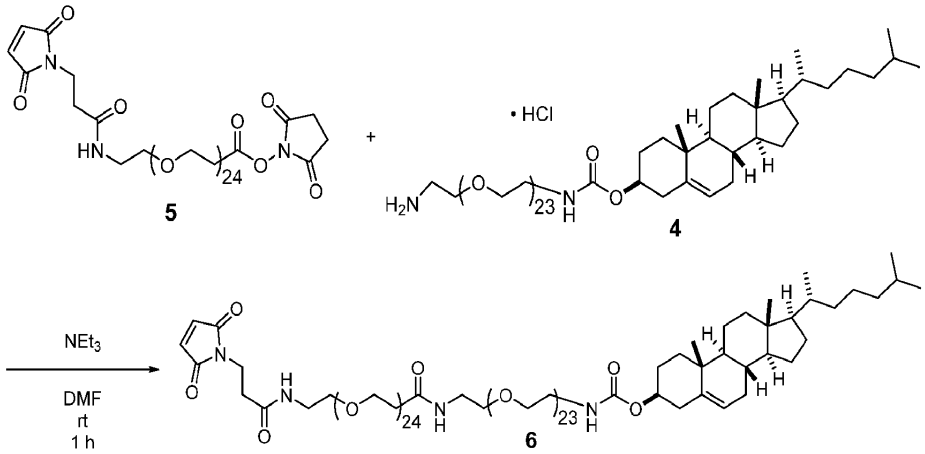
[0694]

[0695] 빙수조에서 0℃에서 DCM 중 화합물 1 (0.200 g) 및 2 (0.0765 g)의 용액에 정상 분위기 하에 TEA를 첨가하였다. 반응 혼합물을 빙수조에서 10분 동안 교반한 다음, LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 단리를 위해 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 DCM에서 20% MeOH/DCM (0-50%)의 구배로 정제하였으며, 여기서 생성물은 23% B에서 용리되었다. 생성물 3을 진공 하에 농축시켜 백색 고체를 수득하였다. 수율: 0.156 g (57.8%) LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1586.06 m/z, 관찰치 1604.14 m/z.



[0696]

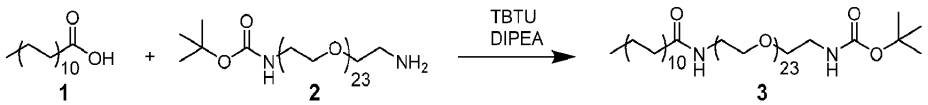
[0697] 화합물 3 (0.161 g)에 실온에서 디옥산 중 4 M HCl (0.759 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 10분 후, 완전한 전환을 LC-MS를 통해 확인하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켜 4를 백색 고체로서 수득하였다. 추가의 정제는 필요하지 않았다. 수율: 0.157 g (102%). LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1486.01 m/z, 관찰치 1487.58 m/z.



[0698]

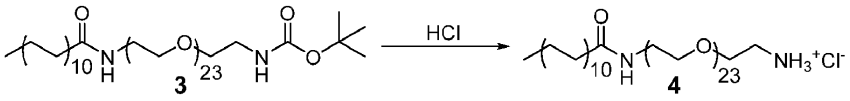
[0699] DMF 중 화합물 5 (0.144 g) 및 4 (0.157 g)의 용액에 실온에서 NEt_3 (0.043 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 1.5시간 후, 완전한 전환을 LC-MS에 의해 확인하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 정제하고, DCM에서 DCM 중 20% MeOH (0-100% B)의 구배로 용리시켰다. 생성물을 37% B. 분획의 농축으로 용리시켜 6을 백색 고체로서 수득하였다. 수율: 0.225 g (79.0%). LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2764.70 m/z, 710.17 m/z (물 부가물); 관찰치 709.46 m/z.

[0700] PEG71+C22의 합성



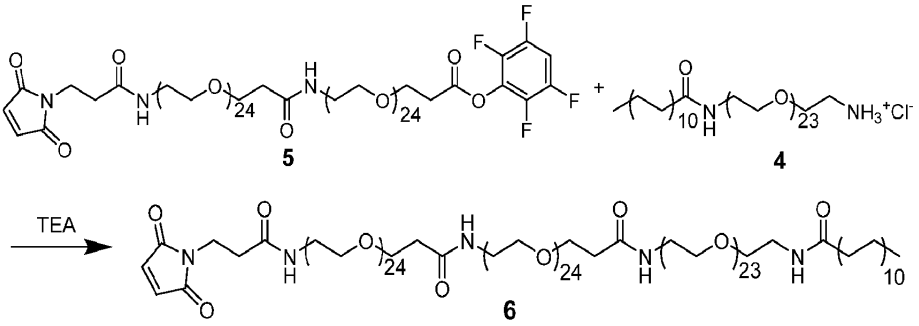
[0701]

[0702] 무수 DMF (3 mL) 중 화합물 1 (50 mg, 0.146 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (172 mg, 0.146 mmol, 1.0 당량), 및 디이소프로필에틸아민 (0.077 mL, 0.440 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (56 mg, 0.176 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ 수용액 (10 mL)으로 켄칭하고, 수성 상을 디클로로메탄 (3 x 10 mL)으로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 생성물을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 6-8% 메탄올로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1496.05, 실측치 1496.23.



[0703]

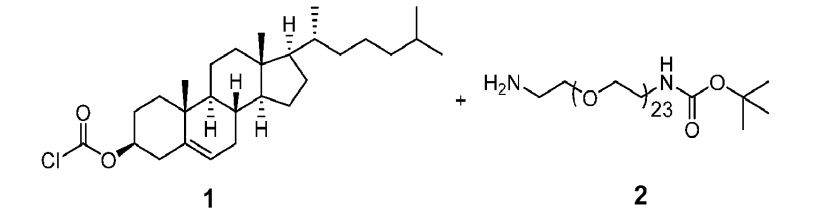
[0704] 무수 1,4-디옥산 (0.5 mL) 중 화합물 1 (120 mg, 0.0802 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 디옥산 중 HCl 용액 (1.00 mL, 4.010 mmol, 50 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물을 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1396.00, 실측치 1396.60.

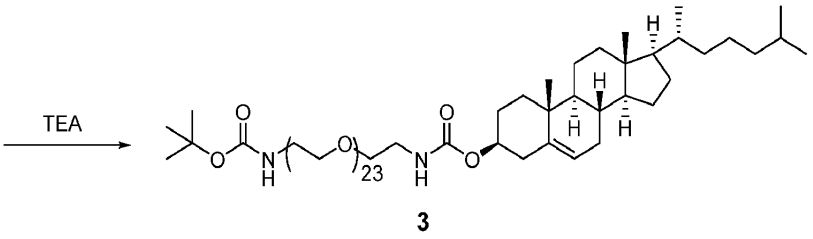


[0705]

[0706] 무수 DMF (5 mL) 중 화합물 5 (98 mg, 0.0381 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 4 (54.5 mg, 0.0381 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 TEA (0.016 mL, 0.114 mmol, 3.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물 6을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 15-20% 메탄올로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+4H]+/4 951.25, 실측치 952.14, 계산치 [M+5H]+/5 761.20, 실측치 761.67.

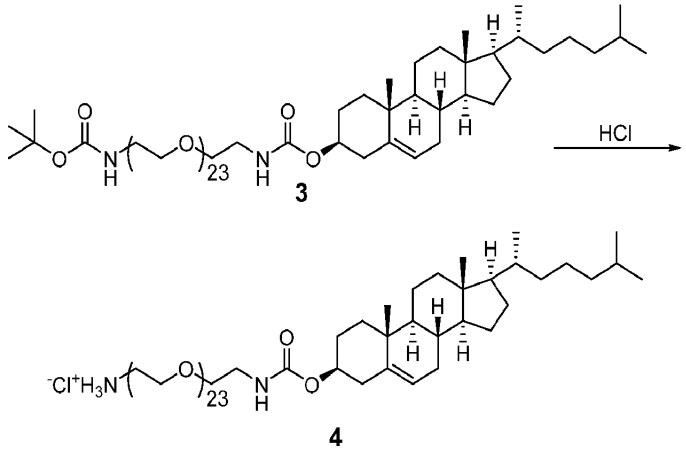
[0707] PEG71+CLS의 합성





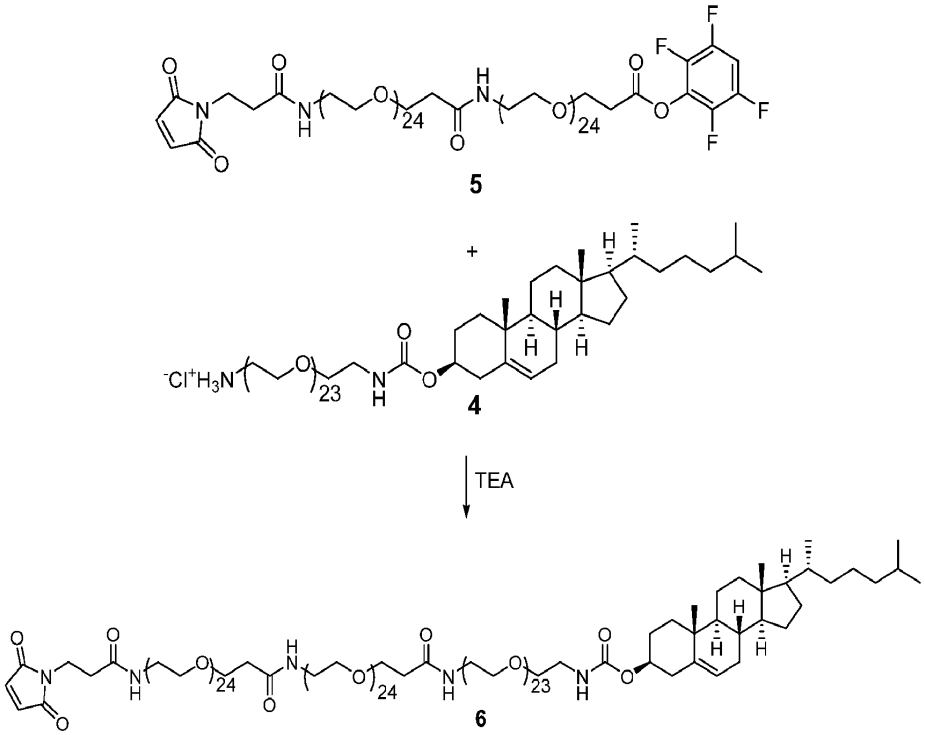
[0708]

[0709] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 1 (100 mg, 0.222 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 2 (274 mg, 0.233 mmol, 1.05 당량)의 용액에 실온에서 TEA (0.094 mL, 0.668 mmol, 3.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하고, 반응 혼합물을 농축시켰다. 생성물 3을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 8-15% 메탄올로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+H_2O]+ 1603.17, 실측치 1603.18.



[0710]

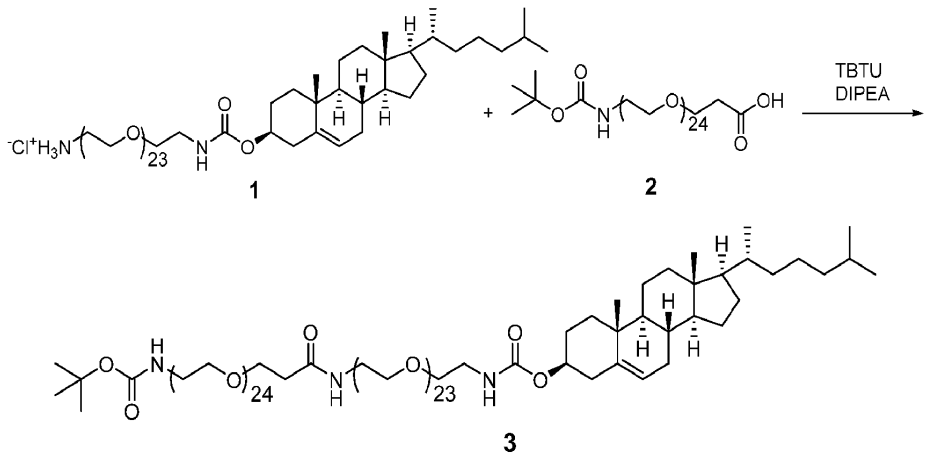
[0711] 무수 1,4-디옥산 (0.5 mL) 중 화합물 3 (353 mg, 0.222 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 디옥산 중 HCl 용액 (1.11 mL, 4.451 mmol, 20 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 유지한 다음, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1486.01, 실측치 1486.50.



[0712]

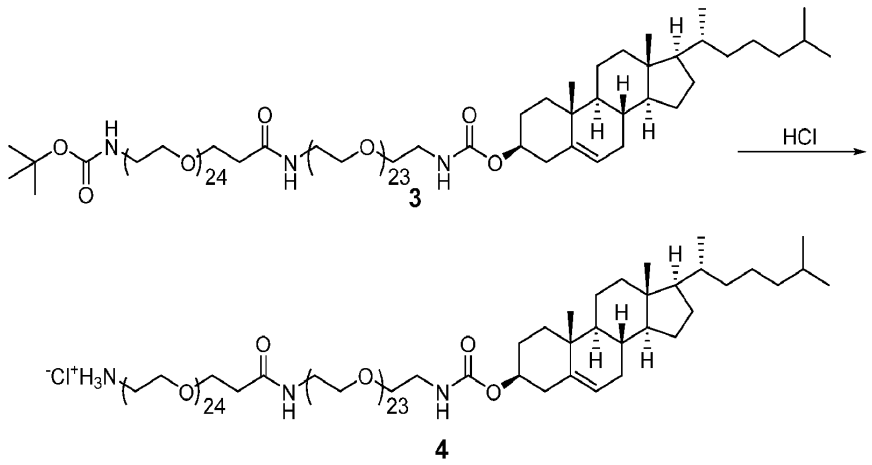
[0713] 무수 DMF (2 mL) 중 화합물 5 (70 mg, 0.0272 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 4 (41.4 mg, 0.0272 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 TEA (0.012 mL, 0.0816 mmol, 3.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지한 다음, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물 6을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 13-19% 메탄올로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+4H]+/4 973.84, 실측치 974.58, [M+5H]+/5 779.27, 실측치 779.79.

[0714] PEG95+CLS의 합성



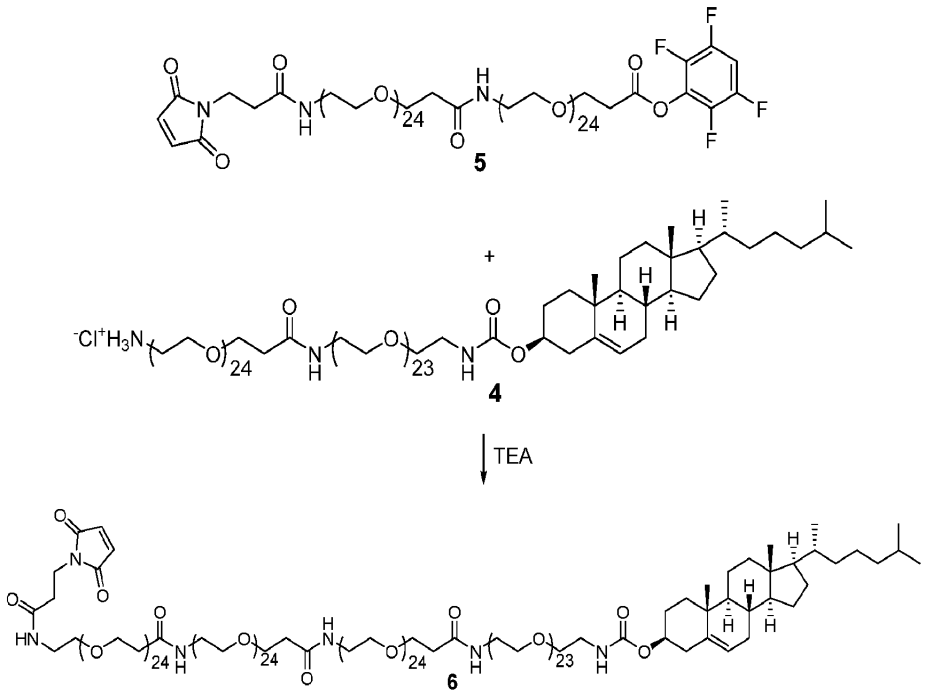
[0715]

[0716] 무수 DMF (3 mL) 중 화합물 1 (60 mg, 0.0419 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (52 mg, 0.0419 mmol, 1.0 당량) 및 DIPEA (0.022 mL, 0.125 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (16 mg, 0.0503 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하였다. 이어서 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 생성물 3을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 12-18% 메탄올로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+4H]+/4 679.18, 실측치 679.93, [M+3H]+/3 905.24, 실측치 905.81. 수율: 0.082 g (76.7%)



[0717]

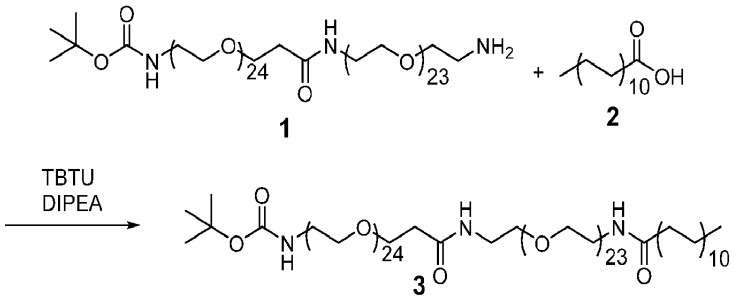
[0718] 무수 1,4-디옥산 (0.3 mL) 중 화합물 3 (85 mg, 0.0313 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 디옥산 중 HCl 용액 (0.391 mL, 1.565 mmol, 50 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+3H]+/3 871.89, 실측치 871.72, [M+4H]+/4 654.17, 실측치 654.97.



[0719]

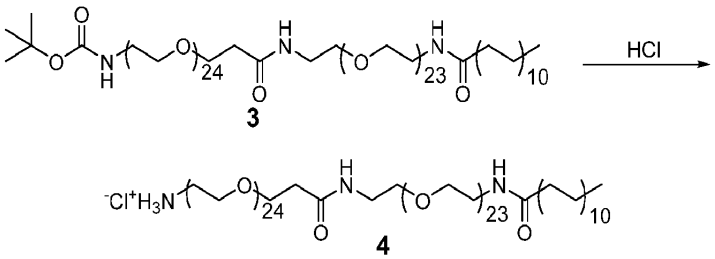
[0720] 무수 DMF (2 mL) 중 화합물 5 (80 mg, 0.0311 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 4 (82 mg, 0.0311 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 TEA (0.013 mL, 0.0932 mmol, 3.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지한 다음, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물 6을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 디클로로메탄 중 13-19% 메탄올로 용리시켰다. LC-MS: 계산치 [M+4H]+/4 1255.76, 실측치 1255.57, [M+5H]+/5 1004.81, 실측치 1005.79.

[0721] LP1-p의 합성



[0722]

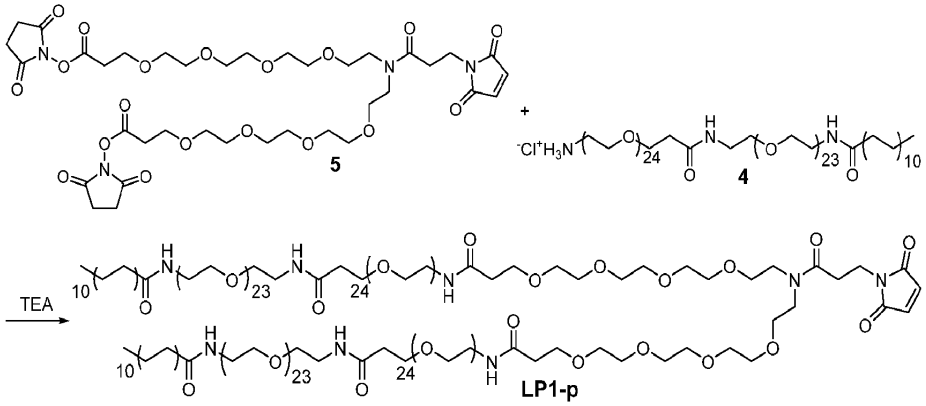
[0723] 무수 DMF (10 mL) 중 화합물 1 (2630 mg, 1.142 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (428 mg, 1.256 mmol, 1.1 당량), 및 디이소프로필에틸아민 (0.597 mL, 3.427 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (440 mg, 1.371 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 3을 콤비플래쉬®에 의해 DCM 중 12-17% MeOH로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+4H]+/4 656.66, 실측치 656.65.



[0724]

[0725] 화합물 3의 고체 (1150 mg, 0.438 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 HCl 용액 (5.478 mL, 21.910 mmol,

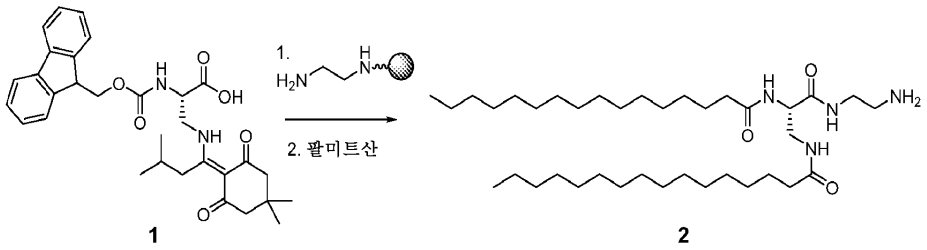
50 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+3H]+/3 841.88, 실측치 842.56, 계산치 [M+4H]+/4 631.66, 실측치 632.41.



[0726]

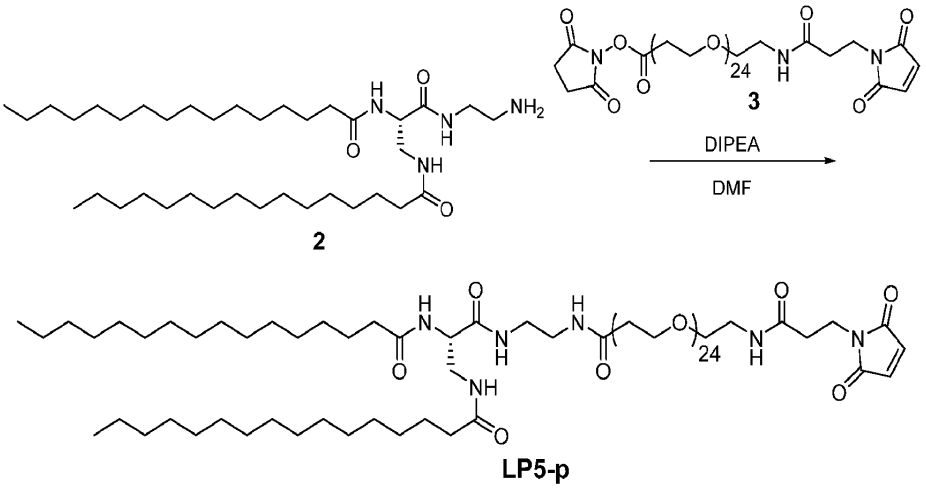
[0727] 무수 DCM (10 mL) 중 화합물 5 (175 mg, 0.203 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 4 (1095 mg, 0.427 mmol, 2.1 당량)의 용액에 실온에서 TEA (0.144 mL, 1.018 mmol, 5.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. LP1-p를 콤비플래쉬®에 의해 DCM 중 10-17% MeOH로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+6H]+/6 946.60, 실측치 947.10, 계산치 [M+7H]+/7 811.51, 실측치 811.35.

[0728] LP5-p의 합성



[0729]

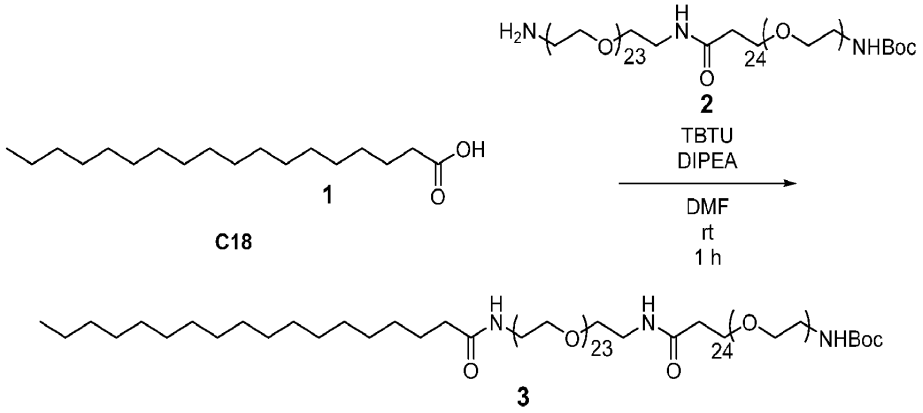
[0730] DMF 중 화합물 1 (105 mg, 0.198 mmol)을 TBTU (4 당량)로 처리하고, 5분 동안 교반하였다. DIEA (8 당량)를 후속적으로 첨가하고, 혼합물을 사전-팽윤된 2-클로로트리틸 수지 상의 에틸아민 디아민 1 몰 당량에 첨가하였다. 30분 동안 교반한 후, 수지를 DMF로 3회 세척한 다음, DMF 중 2% 히드라진으로 10분 동안 처리하였다. 화합물 1의 커플링과 동일한 절차를 사용하여 팔미트산 (202 mg, 0.789 mmol)의 커플링을 반복하였다. 완결된 후, 수지를 DCM의 3 부분으로 세척하고, DCM 중 TFA의 1% 용액으로 10분 동안 처리하였다. TFA 처리를 반복하고, 수지를 DCM의 3 부분으로 세척하였다. 모든 휘발물을 제거하고, 조 화합물 2를 추가 정제 없이 사용하였다. 수율 126 mg (81%).



[0731]

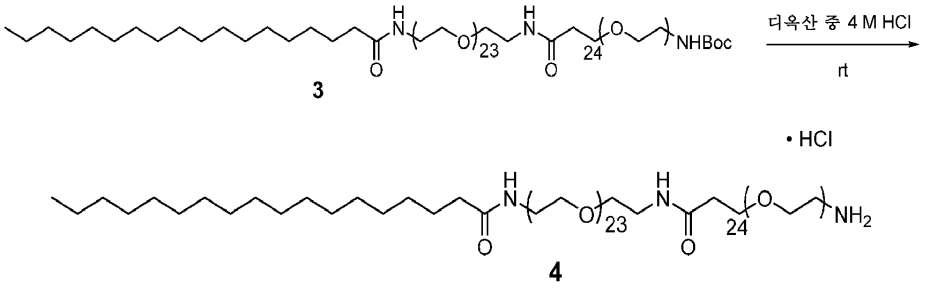
[0732] DMF (1 mL) 중 화합물 2 (23 mg, 37 μmol) 및 DIEA (14.1 uL, 81 μmol)를 함유하는 혼합물에 NHS-PEG24-MAL (화합물 3, 61.5 mg, 0.0441 mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 완결된 후, 조 LP5-p를 실리카 상에 건조 로딩하고, DCM 중 MeOH의 구배로 용리시키면서 단리하였다. 수율 15 mg (21%).

[0733] LP28-p의 합성



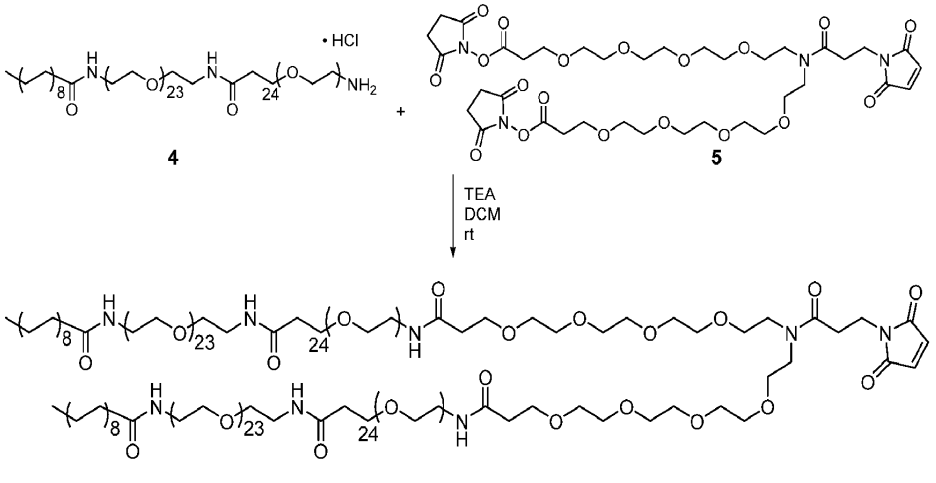
[0734]

[0735] DMF 중 화합물 1 (80 mg) 및 2 (60.2 mg)의 용액에 실온에서 TBTU (90.3 mg)에 이어서 DIPEA (0.147 mL)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 20-30분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (0-80%, 등용매에 이어서 100%까지)의 구배로 정제하였으며, 여기서 화합물 3은 68% B에서 용리되었다. 화합물 3을 진공 하에 농축시켜 백색 유성 잔류물을 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2567.65 m/z, 관찰치 1301.78 (+2/2, +H_2O) m/z.



[0736]

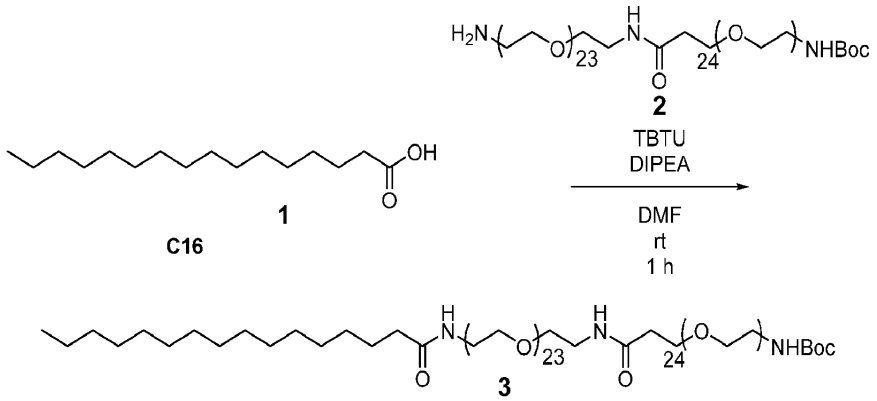
[0737] 화합물 3 (100.4 mg)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 (14.3 mg)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 PhMe와 공비혼합하고, 진공 하에 밤새 농축시켜 화합물 4를 오일로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2467.60 m/z, 관찰치 1243.32 m/z.



[0738]

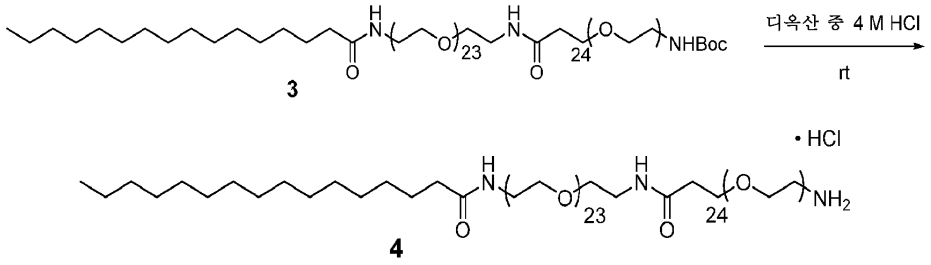
[0739] 무수 DCM 중 화합물 4 (97.9 mg) 및 TEA (0.016 mL)의 용액을 제조하고, 폭기 질소 분위기 하에 교반하였다. 이어서 화합물 5 (15.8 mg)를 반응 혼합물에 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 정제하고, DCM 중 0-20% MeOH (0-100% B)의 구배로 용리시켰다. LP28-p는 67% B에서 용리되었다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 5562.48 m/z, 관찰치 1409.68 (+4/4, +H_2O) m/z.

[0740] LP29-p의 합성



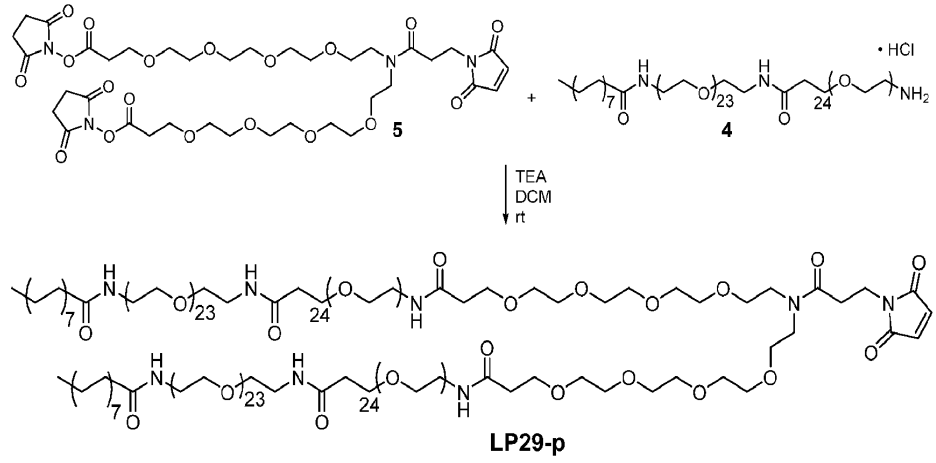
[0741]

[0742] DMF 중 화합물 1 (40 mg) 및 2 (334 mg)의 용액에 실온에서 TBTU (50.1 mg)에 이어서 DIPEA (0.082 mL)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 20-30분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (0-80%)의 구배로 정제하였으며, 여기서 화합물 3은 71% B에서 용리되었다. 화합물 3을 진공 하에 농축시켜 백색 유성 잔류물을 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2539.62 m/z, 관찰치 1288.21 (+2/2, +H_2O) m/z.



[0743]

[0744] 화합물 3 (147 mg)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 (21.2 mg)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 PhMe와 공비혼합하고, 진공 하에 밤새 농축시켜 화합물 4를 오일로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2439.57 m/z, 관찰치 611.16 (+4/4) m/z.

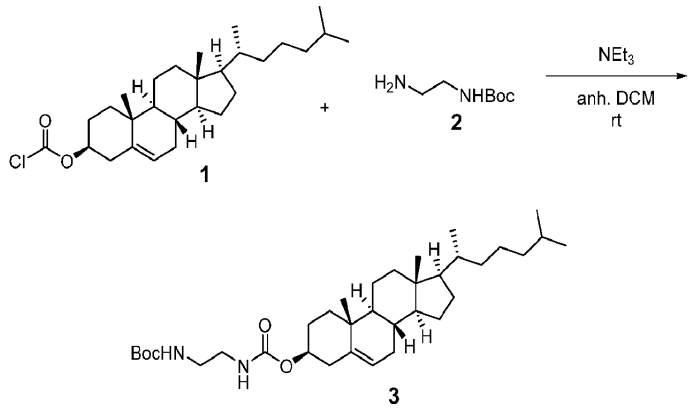


[0745]

[0746] 무수 DCM 중 화합물 4 (143 mg) 및 TEA (0.024 mL)의 용액을 제조하고, 폭기 질소 분위기 하에 교반하였다. 이어서 화합물 5 (23.4 mg)를 반응 혼합물에 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다.

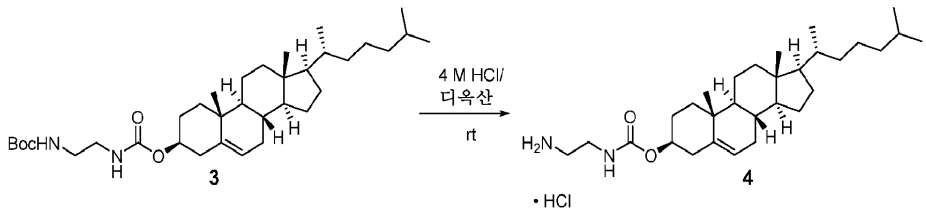
[0747] 이어서 반응 혼합물을 직접 사용하였다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하고 DCM 중 0-20% MeOH (0-100% B)의 구배로 용리시키면서 정제하였다. LP29-p가 54% B에서 용리되었다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 5506.42 m/z, 관찰치 1854.41 (+3/3, $+H_2O$) m/z.

[0748] LP33-p의 합성



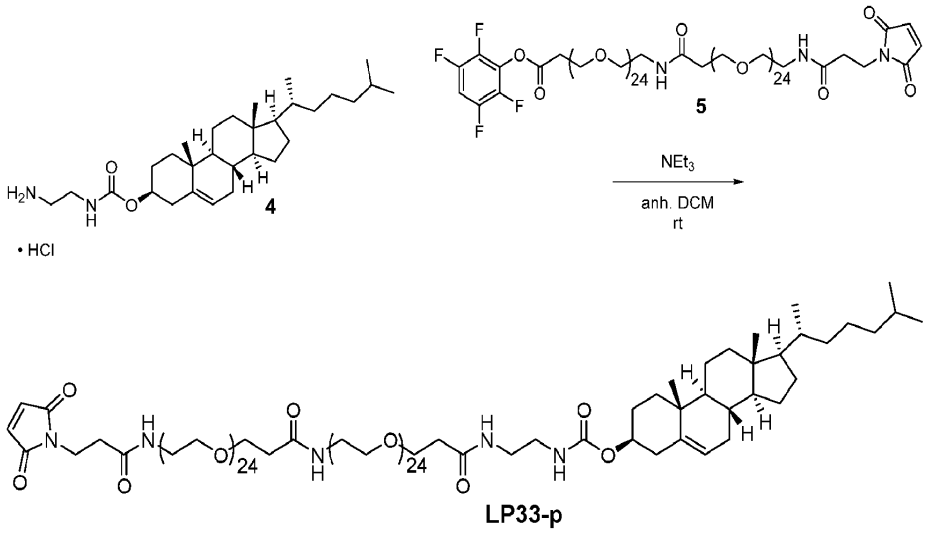
[0749]

[0750] 무수 DCM 중 화합물 1 (2.00 g, 4.45 mmol) 및 2 (1.07 g, 6.68 mmol)의 용액에, NEt_3 (1.86 mL, 13.4 mmol)를 실온에서 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응물을 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 45분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (0-100%)의 구배로 정제하였으며, 여기서 화합물 3은 8% B에서 용리되었다. 화합물 3을 농축시켜 백색 고체를 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 573.46 m/z, 관찰치 573.60 m/z.



[0751]

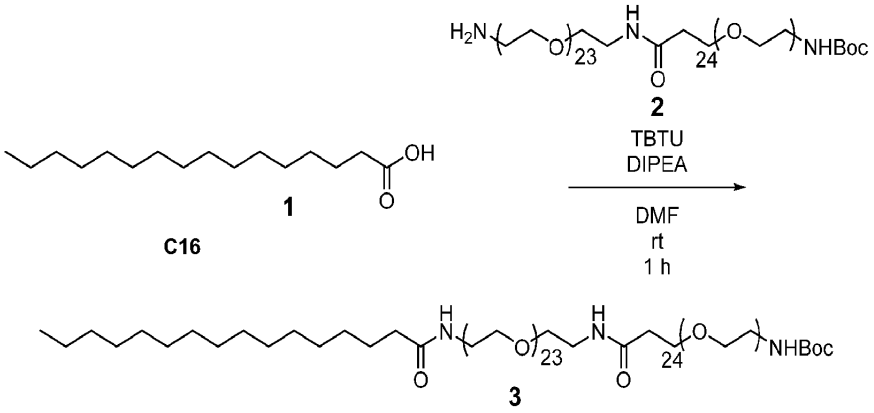
[0752] 화합물 3 (317 mg, 0.553 mmol)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 (1.383 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 고진공 하에 밤새 농축시켜 화합물 4를 투명한 무색의 기름진 잔류물로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 473.40 m/z, 관찰치 473.58 m/z.



[0753]

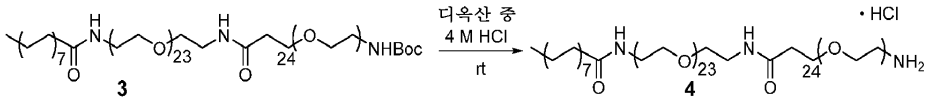
[0754] N_2(g) 하에 무수 DCM 중 화합물 4 (282 mg, 0.553 mmol) 및 5 (1.35 g, 0.526 mmol)의 용액에 NEt_3 (0.386 mL)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 DCM 중 0-20% MeOH (0-100%)의 구배로 45분에 걸쳐 정제하였고, 여기서 LP33-p는 46% B에서 용리되었다. LP33-p를 농축시켜 백색 고체를 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2879.76 m/z, 관찰치 960.98 (+3/3) m/z.

[0755] LP38-p의 합성



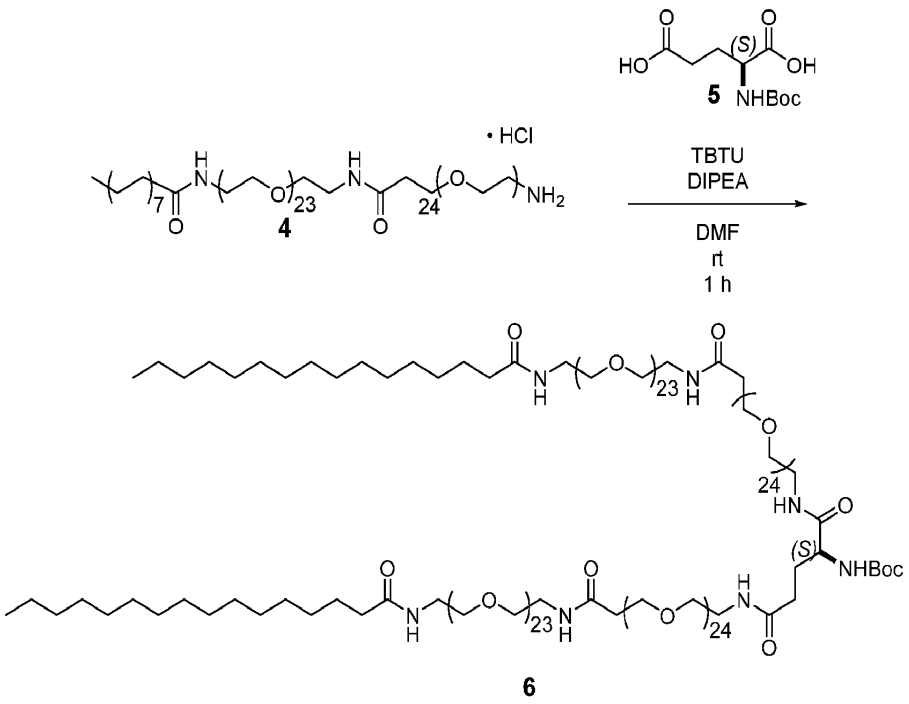
[0756]

[0757] DMF 중 화합물 1 (35 mg) 및 2 (299 mg)의 용액에 실온에서 TBTU (43.8 mg)에 이어서 DIPEA (0.071 mL)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 20-30분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (0-100%)의 구배로 정제하였으며, 여기서 화합물 3은 56% B에서 용리되었다. 화합물 3을 진공 하에 농축시켜 백색 유성 잔류물을 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2539.62 m/z, 관찰치 1288.07 (+2/2, +H_2O) m/z.



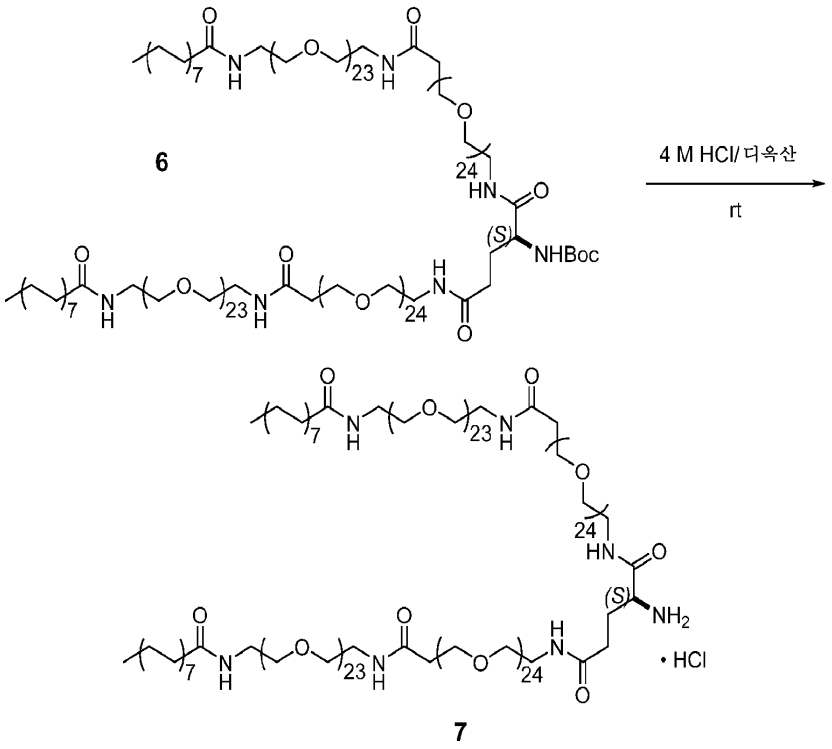
[0758]

[0759] 화합물 3 (186 mg)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 (26.7 mg)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 PhMe와 공비혼합하고, 진공 하에 밤새 농축시켜 화합물 4를 오일로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2439.57 m/z, 관찰치 1220.97 (+2/2) m/z.



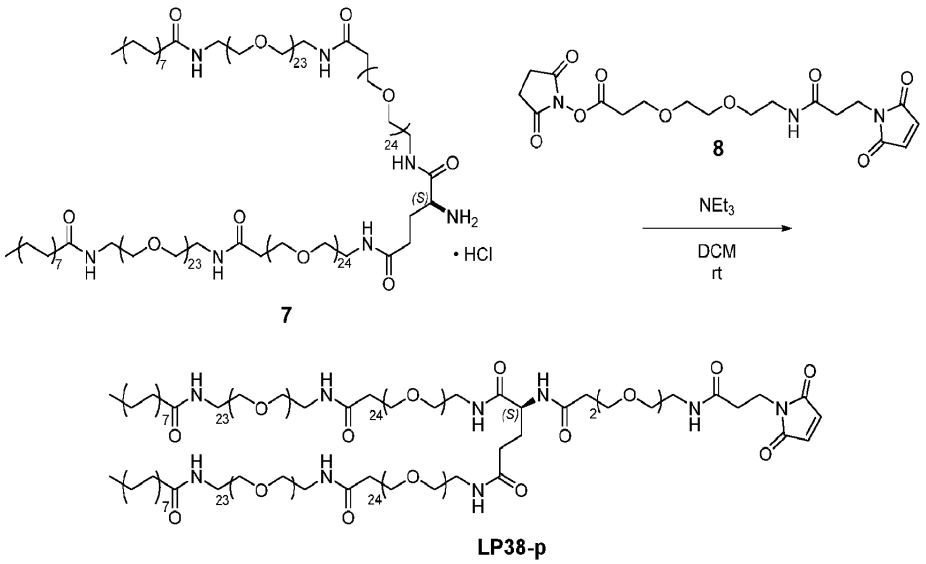
[0760]

[0761] DMF 중 화합물 4 (181 mg), TBTU (24 mg), 및 DIEA (0.033 mL)의 용액에 실온에서 화합물 5 (8.7 mg)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응물을 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 20-30분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (0-100%)의 구배로 정제하였으며, 여기서 화합물 6은 65% B에서 용리되었다. 화합물 6을 진공 하에 농축시켜 백색 유성 잔류물을 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 5089.22 m/z, 관찰치 1036.24 (+5/5, +H_2O) m/z.



[0762]

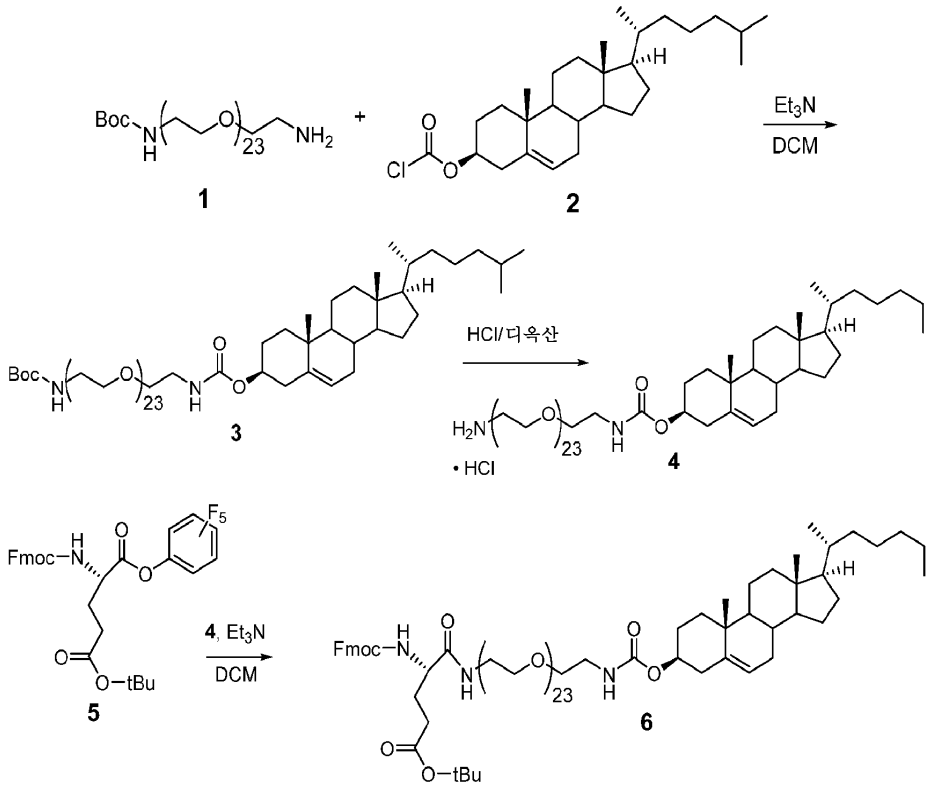
[0763] 화합물 6 (130 mg)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 (9.3 mg)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 PhMe와 공비혼합하고, 진공 하에 밤새 농축시켜 화합물 7을 오일로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 4989.17m/z, 관찰치 1248.58 (+4/4) m/z.



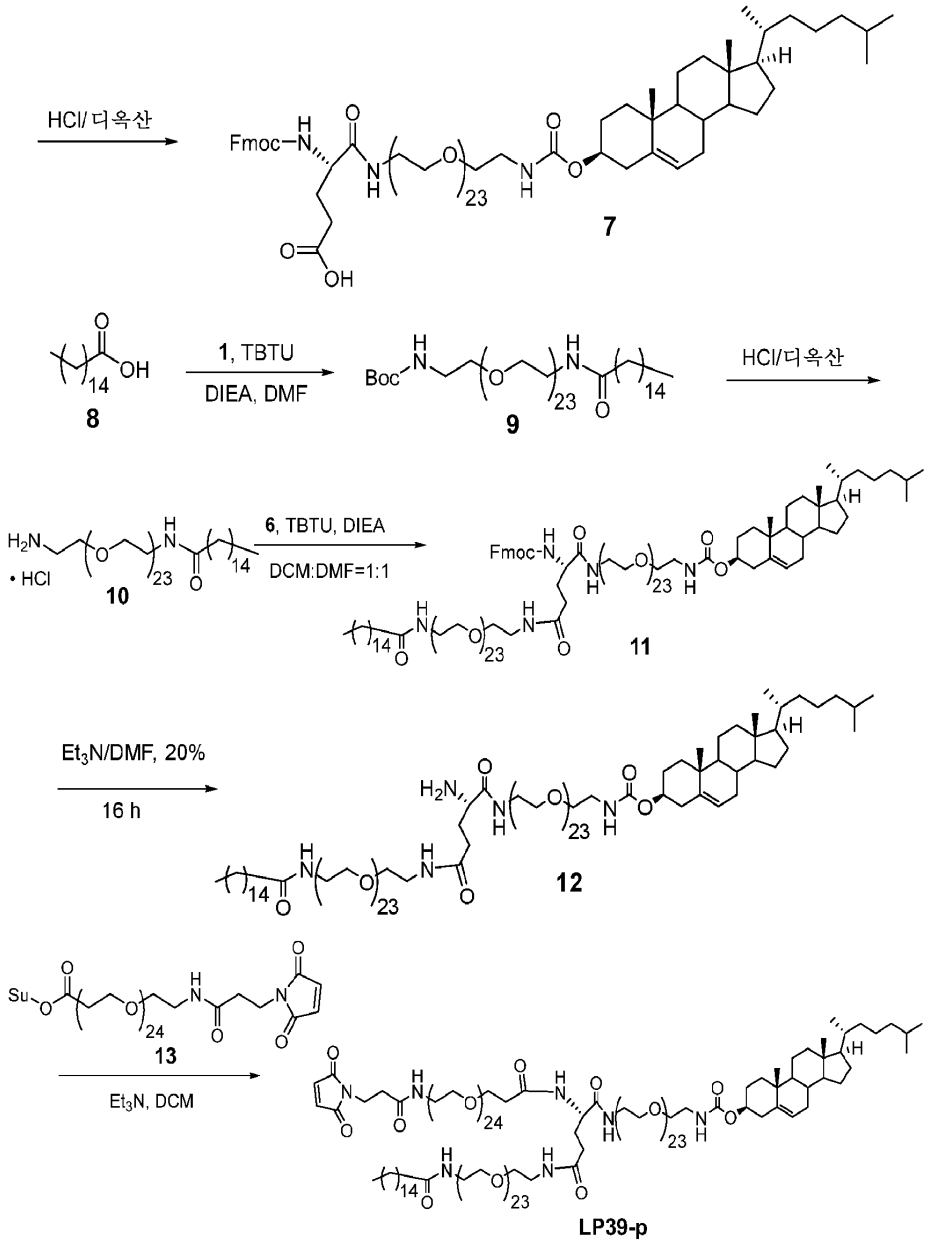
[0764]

[0765] N_2(g)를 살포하면서 무수 DCM 중 화합물 7 (128 mg) 및 NEt_3 (0.018 mL)의 용액을 실온에서 제조하였다. 이어서 화합물 8 (10.3 mg)을 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 교반되도록 하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카겔을 사용하여 30분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (0-100%)의 구배로 정제하고, 여기서 LP38-p를 100% B에서 용리시켰다. LP38-p를 농축시켜 백색 고체를 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 5299.28 m/z, 관찰치 1786.62 (+3/3, $+H_2O$) m/z.

[0766] LP39-p의 합성



[0767]



[0768]

[0769] Boc-보호된 PEG_{23}-아민 1 (퀸타 바이오디자인 리미티드, 200 mg, 0.17 mmol)을 DCM 5 mL 중 콜레스테롤 클로로포르메이트 2 (77 mg, 0.17 mmol) 및 Et_3N (48 uL, 0.341 mmol)과 함께 1.5시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 잔류물을 SiO_2 (1 g)와 혼합하고, 콤비플래쉬® 상에 로딩하였다. 화합물 3을 DCM 중 0-20% MeOH, 구배 0-80%, 40분의 시스템을 사용하여 정제하였다. 계산치 MW 1586.09, M + 18=1604.09, (M +2 x 18)/2=811.05 실측치: MS (ES, pos): 1603.55 $[M^{+}NH_4]^{+}$, 811.07 $[M^{+2}NH_4]^{2+}$.

[0770] 생성물 3을 Boc-탈보호하고, 생성된 히드로클로라이드 염 4 (62 mg, 0.04 mmol)를 DCM (5 mL) 중 펜타플루오로페닐 에스테르 5 (24 mg, 0.04 mmol) 및 Et_3N (14 uL, 0.1 mmol)과 함께 1.5시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 잔류물을 SiO_2 (400 mg)와 혼합하고, 콤비플래쉬® 상에 로딩하였다. 생성물 6을 DCM 중 0-20% MeOH, 구배 0-70%, 30분의 시스템을 사용하여 정제하였다. 수율 57 mg. 계산치 MW 1893.44, M + 18=1911.44, (M +2 x 18)/2=964.72 실측치: MS (ES, pos): 1911.00 $[M+NH_4]^{+}$, 964.46 $[M+2NH_4]^{2+}$.

[0771] 생성물 6을 디옥산 중 4M HCl (10 mL)로 실온에서 4시간 동안 처리하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 톨루엔을 잔류물로부터 2회 증발시키고, 생성물 7을 건조시키고, 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0772] 고체 TBTU (50 mg, 0.156 mmol)를 DMF (9 mL) 중 Boc-보호된 PEG_{23}-아민 1 (퀀타 바이오디자인 리미티드, 152 mg, 0.13 mmol), 팔미트산 8 (33 mg, 0.13 mmol) 및 DIEA (68 μl, 0.39 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 초음파처리하여 고체를 용해시키고, 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 톨루엔을 잔류물로부터 2회 증발시키고, 잔류물을 클로로포름 (50 mL) 중에 용해시키고, $NaHCO_3$ (2 x 10 mL) 및 염수 (10 mL)로 세척하였다. 화합물 9를 건조시키고 (Na_2SO_4), 진공 하에 농축시키고, 콤비플래쉬® (SiO_2) 상에서 시스템 DCM: DCM 중 20% MeOH, 구배 0-80%, 20분을 사용하여 정제하였다. 계산치 MW 1411.85, M + 18=1429.85, (M +1+ 18)/2=715.43 실측치: MS (ES, pos): 1429.24 $[M+NH_4]^+$, 715.41 $[M+H+NH_4]^{2+}$.

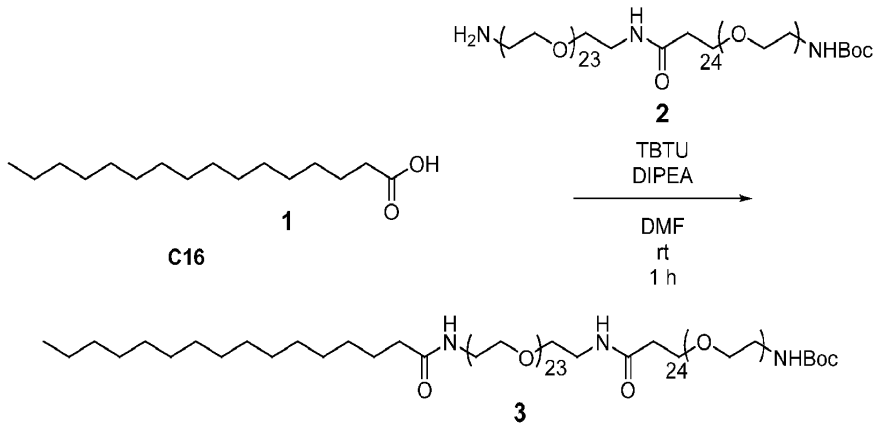
[0773] 9를 HCl/디옥산 용액으로 Boc-탈보호하고, 화합물 10을 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0774] 유도체 7 (60 mg, 0.028 mmol)을 DCM:DMF= 1:1 (8 mL) 중 히드로클로라이드 염 10 (42 mg, 0.03 mmol), TBTU (11 mg, 0.034 mmol) 및 DIEA (18 uL, 0.1 mmol)와 함께 3시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 톨루엔을 잔류물로부터 2회 증발시키고, 고체를 $CHCl_3$ (50 mL) 중에 현탁시켰다. 현탁액을 2% $NaHCO_3$ 및 염수로 2회 세척하였다. 진공 하에 농축시킨 후, 생성물 11을 콤비플래쉬® (DCM 중 0-20% MeOH, 구배 0-70%, 35분) 상에서 정제하였다.

[0775] 생성물 11 (51 mg, 0.0162 mmol)을 DMF 중 Et_3N (20%, 3 mL)과 함께 16시간 동안 교반하고, 용매를 Et_3N과 함께 진공 하에 제거하고, 톨루엔을 잔류물로부터 3회 증발시켜 탈보호된 아민 12를 수득하였다. 계산치 MW 2908.81, (M +1+18)/2=1463.91, (M +1+18 x 2)/3=981.94 실측치: MS (ES, pos): 1463.69 $[M+H+NH_4]^{2+}$, 981.99 $[M+H+2NH_4]^{3+}$.

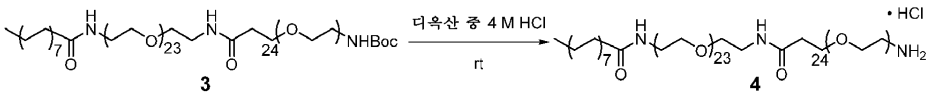
[0776] 아민 12 (47 mg, 0.0162 mmol)를 DCM (4 mL) 중 NHS 에스테르 13 (21 mg, 0.0147 mmol) 및 Et_3N (6 uL, 0.041 mmol)의 혼합물과 함께 16시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 생성물 LP39-p를 콤비플래쉬® 상에서 DCM 중 시스템 0-20% MeOH, 구배 0-100%, 40분을 사용하여 정제하였다. 계산치 MW 4188.28, (M +2+18)/3=1402.76, (M +3+18 x 2)/4=1052.32 실측치: MS (ES, pos): 1402.71 $[M+2H+NH_4]^{3+}$, 1052.32 $[M+3H+NH_4]^{4+}$.

[0777] LP41-p의 합성



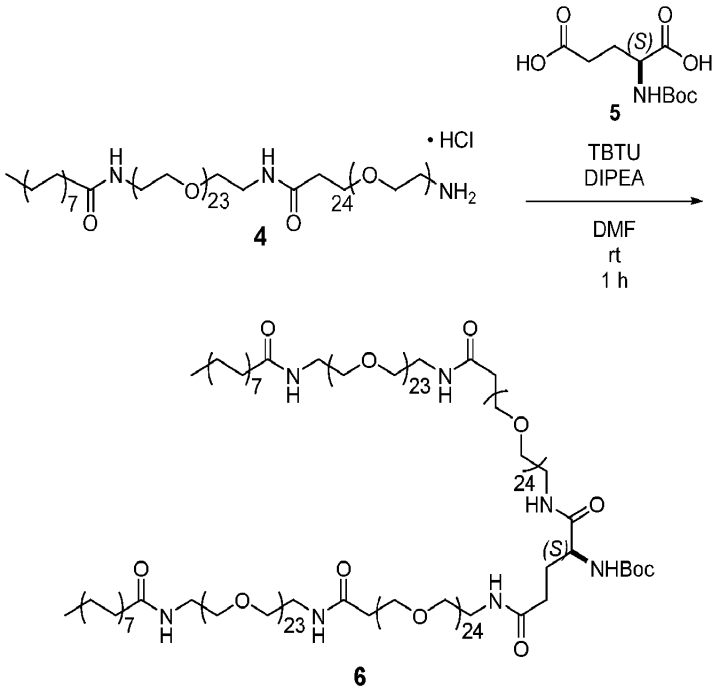
[0778]

[0779] DMF 중 화합물 1 (40.0 mg), TBTU (50.1 mg), 및 DIEA (0.098 mL)의 용액에 실온에서 화합물 2 (298 mg)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 20-30분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (10-100% B)의 구배로 정제하였으며, 여기서 화합물 3은 43% B에서 용리되었다. 화합물 3을 진공 하에 농축시켜 백색 유성 잔류물을 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2539.62 m/z, 관찰치 1287.83 (+2/2, +H20) m/z.



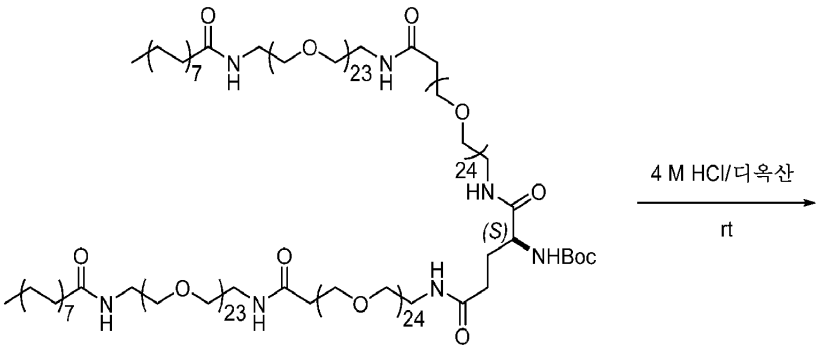
[0780]

[0781] 화합물 1 (260 mg)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 (37.4 mg)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 PhMe와 공비혼합하고, 진공 하에 밤새 농축시켜 화합물 4를 오일로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2439.57 m/z, 관찰치 1220.61 (+2/2) m/z.

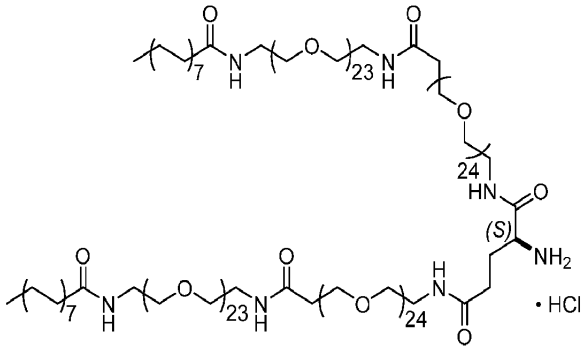


[0782]

[0783] DMF 중 화합물 4 (253 mg), TBTU (36.1 mg), 및 DIEA (0.045 mL)의 용액에 실온에서 화합물 5 (11.9 mg)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 30분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (10-30, 35에 이어서 100%)의 구배로 정제하였으며, 여기서 화합물 6은 35% B에서 용리되었다. 화합물 6을 진공 하에 농축시켜 백색 유성 잔류물을 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 5089.22 m/z, 관찰치 1715.43 (+3/3, +H2O) m/z.



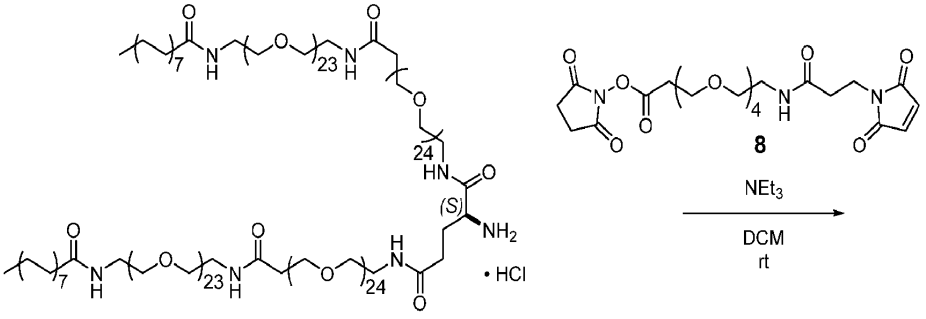
6



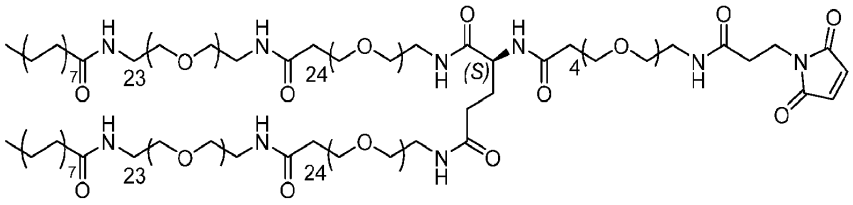
7

[0784]

[0785] 화합물 6 (35.4 mg)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 (2.5 mg)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 PhMe/MeOH와 공비 혼합하고, 고진공 하에 밤새 농축시켜 화합물 7을 오일로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 4989.17 m/z, 관찰치 1676.42 (+HCl, +3/3) m/z.



7



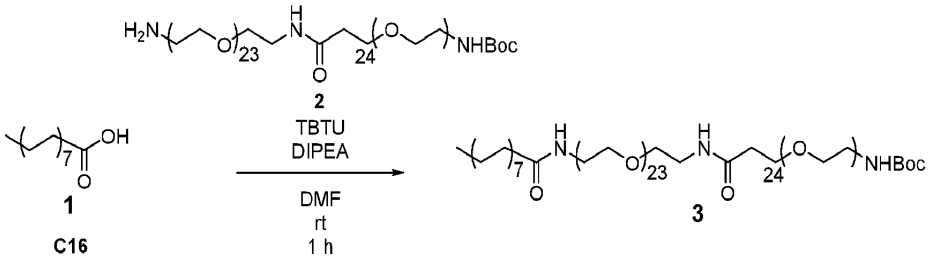
LP41-p

[0786]

[0787] N_2(g)를 살포하면서 무수 DCM 중 화합물 7 (35 mg) 및 NEt_3 (0.005 mL)의 용액을 실온에서 제조하였다. 이어서 화합물 8 (3.2 mg)을 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 교반되도록 하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 30분에 걸쳐 0-20% MeOH/DCM (10에서 30%, 40%, 50%, 70% 이어서 100% B)의 구배로 정제하였으며, 여

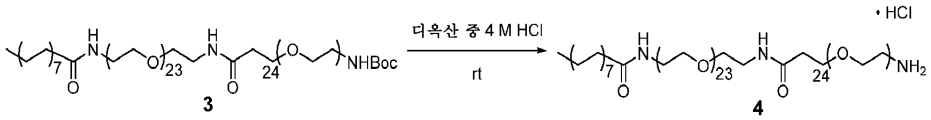
기서 LP41-p는 100% B에서 용리되었다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 5837.84 m/z, 관찰치 1079.90 (+5/5) m/z.

[0788] LP42-p의 합성



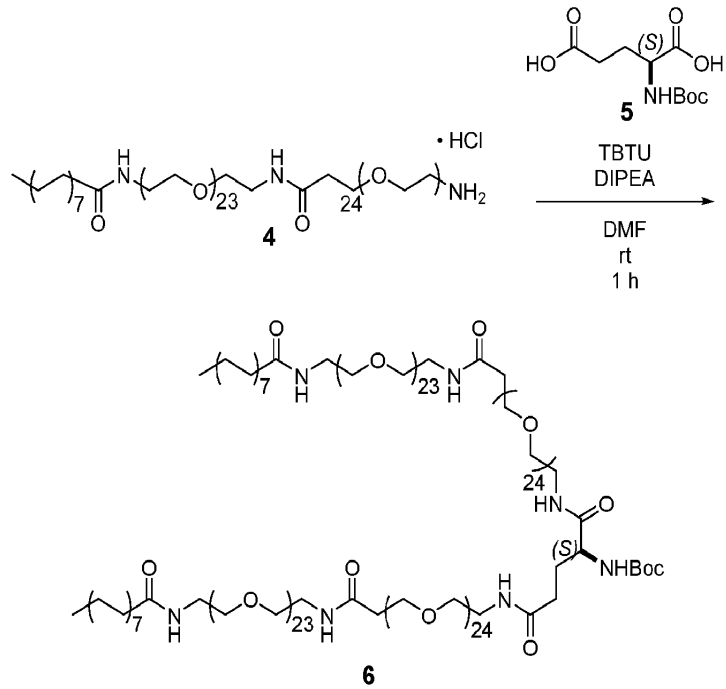
[0789]

[0790] DMF 중 화합물 1 (40 mg), TBTU (50.1 mg), 및 DIEA (0.098 mL)의 용액에 실온에서 화합물 2 (298 mg)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 20-30분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (10-100% B)의 구배로 정제하였으며, 여기서 화합물 3은 43% B에서 용리되었다. 화합물 3을 진공 하에 농축시켜 백색 유성 잔류물을 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2539.62 m/z, 관찰치 1287.83 (+2/2, +H_2O) m/z.



[0791]

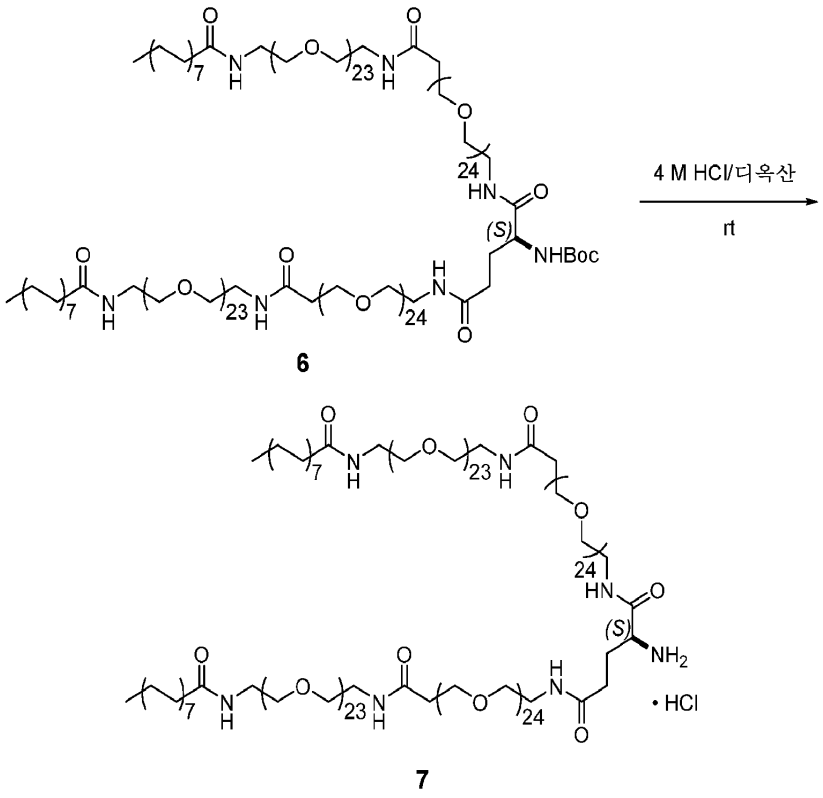
[0792] 화합물 3 (260 mg)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 (37.4 mg)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 반응물을 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 PhMe와 공비혼합하고, 진공 하에 밤새 농축시켜 화합물 4를 오일로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2439.57 m/z, 관찰치 1220.61 (+2/2) m/z.



[0793]

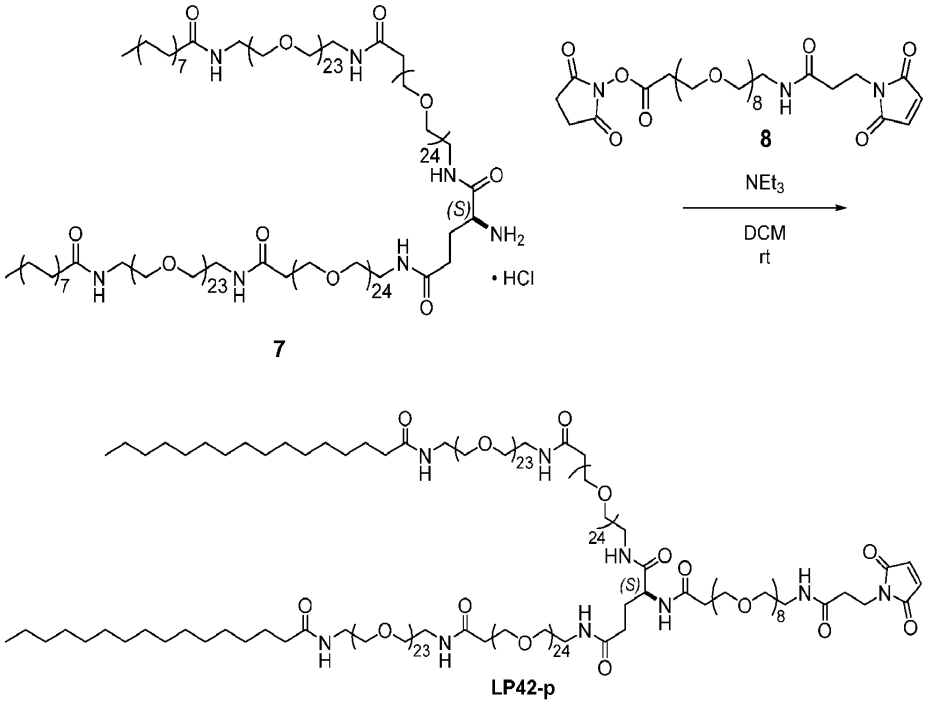
[0794] DMF 중 화합물 4 (253 mg), TBTU (36.1 mg), 및 DIEA (0.045 mL)의 용액에 실온에서 화합물 5 (11.9 mg)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 30분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (10-30, 35에 이어서 100%)의 구배로 정제하였으며, 여기서 화합물 6은 35% B에서 용리되었다. 화합물 6을 진공 하에 농축시켜 백색 유성 잔류물을 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 5089.22 m/z, 관찰치 1715.43

(+3/3, +H_2O) m/z.



[0795]

[0796] 화합물 6 (28.2 mg)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 (2.0 mg)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 PhMe/MeOH와 공비 혼합하고, 고진공 하에 밤새 농축시켜 오일을 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 4989.17 m/z, 관찰치 1000.21 (+5/5) m/z.

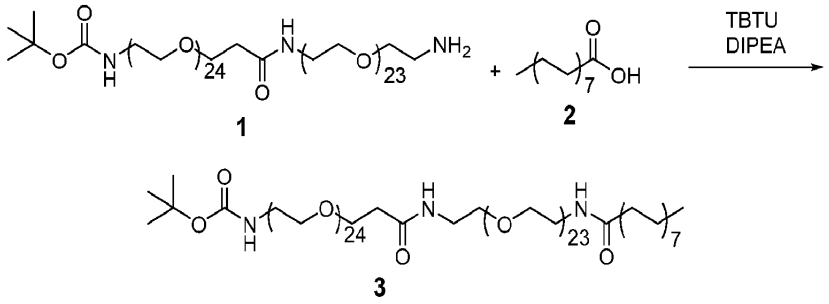


[0797]

[0798] N_2(g)를 살포하면서 무수 DCM 중 화합물 7 (27.9 mg) 및 NEt_3 (0.004 mL)의 용액을 실온에서 제조하였다. 이어서 화합물 8 (3.4 mg)을 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 교반되

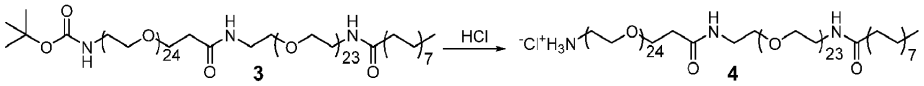
도록 하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 30분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (25에서 50%, 이어서 100% B)의 구배로 정제하였으며, 여기서 LP42-p는 100% B에서 5분 후 100% B에서 용리되었다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 5563.44 m/z, 관찰치 946.45 (+6/6, +물) m/z.

[0799] LP43-p의 합성



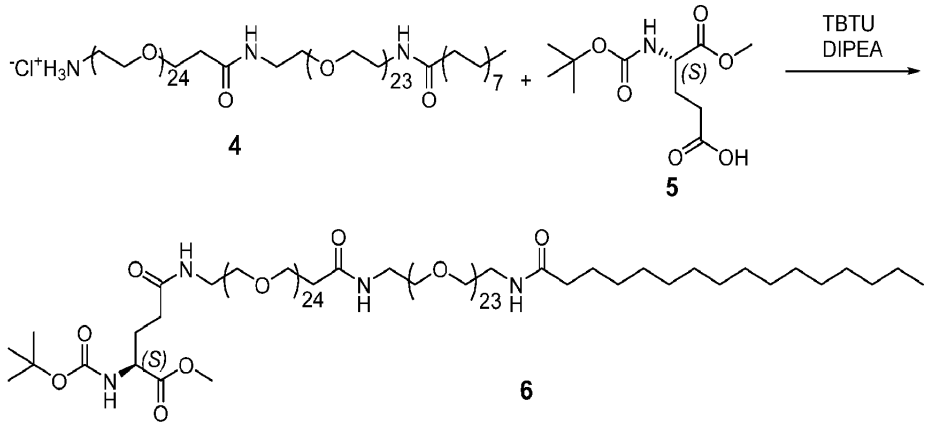
[0800]

[0801] DMF (20 mL) 중 화합물 1 (3.0 g, 1.303 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (0.401 g, 1.564 mmol, 1.2 당량), 및 디이소프로필에틸아민 (0.681 mL, 3.91 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (0.502 g, 1.564 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 농축시켰다. 화합물 3을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-18% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. 구조를 H-NMR에 의해 확인하였다.



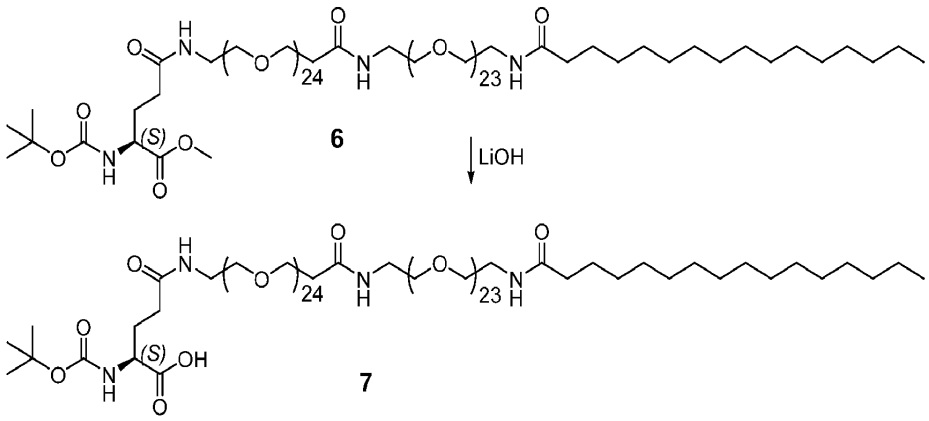
[0802]

[0803] 화합물 3의 고체 (2060 mg, 0.811 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 HCl 용액 (4.055 mL, 16.219 mmol, 20 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 화합물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. 구조를 H-NMR에 의해 확인하였다.



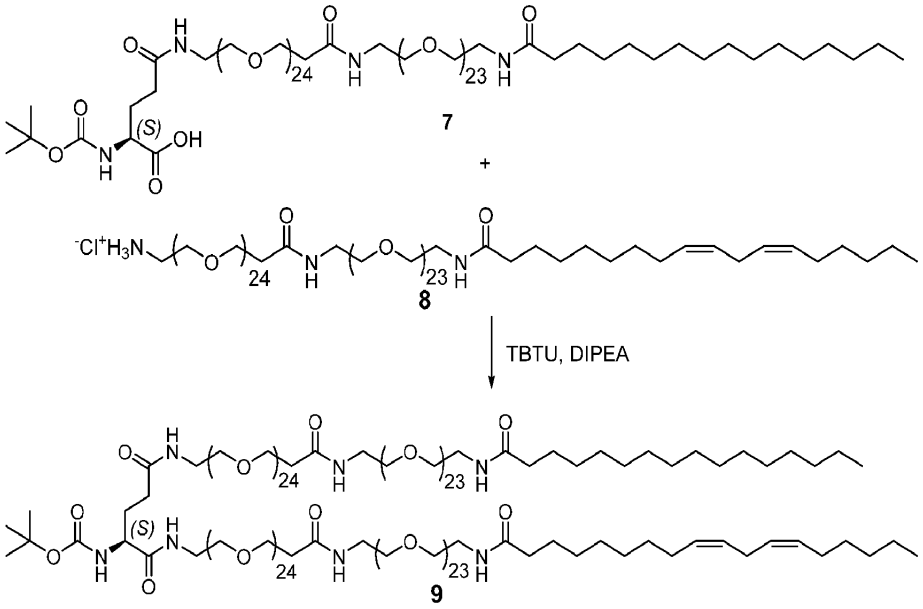
[0804]

[0805] 무수 DMF (10 mL) 중 화합물 4 (2030 mg, 0.819 mmol, 1.0 당량), 화합물 5 (257 mg, 0.983 mmol, 1.2 당량), 및 디이소프로필에틸아민 (0.428 mL, 2.459 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (315 mg, 0.983 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하였다. 반응 혼합물을 농축시켰다. 화합물 6을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-20% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+2H]/2, 계산치 1341.84, 실측치 1342.69.



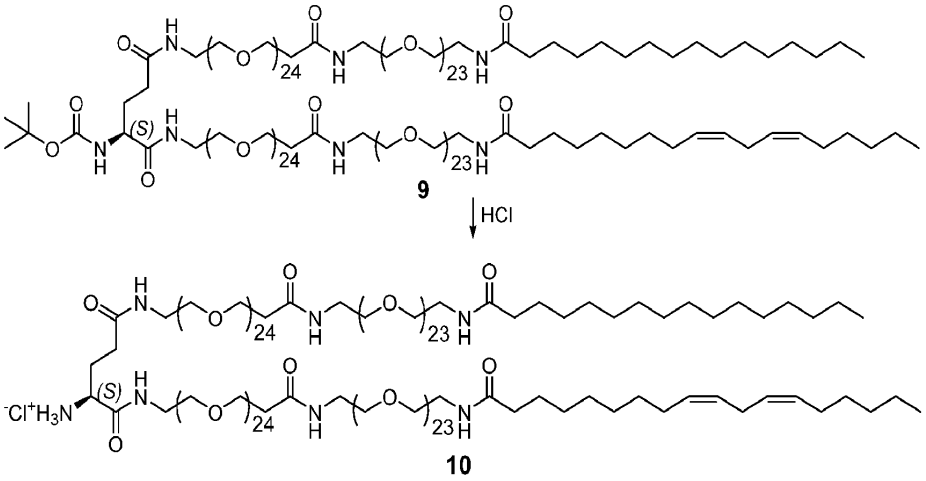
[0806]

[0807] THF (20 mL) 및 물 (20 mL) 중 화합물 6 (1430 mg, 0.530 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 수산화리튬 (63.8 mg, 2.664 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 HCl 용액으로 켄칭하고, pH를 3.0으로 조정하였다. 수성 상을 DCM (3 x 20 mL)으로 추출하였다. 합한 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 화합물 7을 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+2H]/2 계산치 1334.83, 실측치 1335.49.



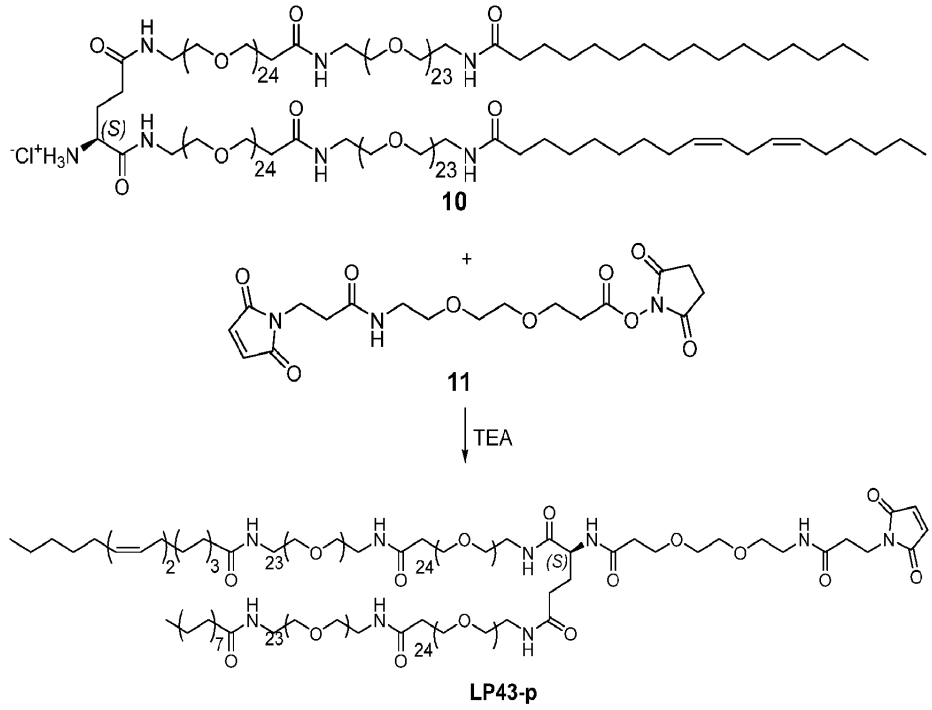
[0808]

[0809] DMF (2 mL) 중 화합물 7 (110 mg, 0.0412 mmol, 1.0 당량), 화합물 8 (103 mg, 0.0412 mmol, 1.00 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (0.022 mL, 0.123 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (15.9 mg, 0.0495 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 9를 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 16-20% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+5H]/5 계산치 1023.44, 실측치 1024.00.



[0810]

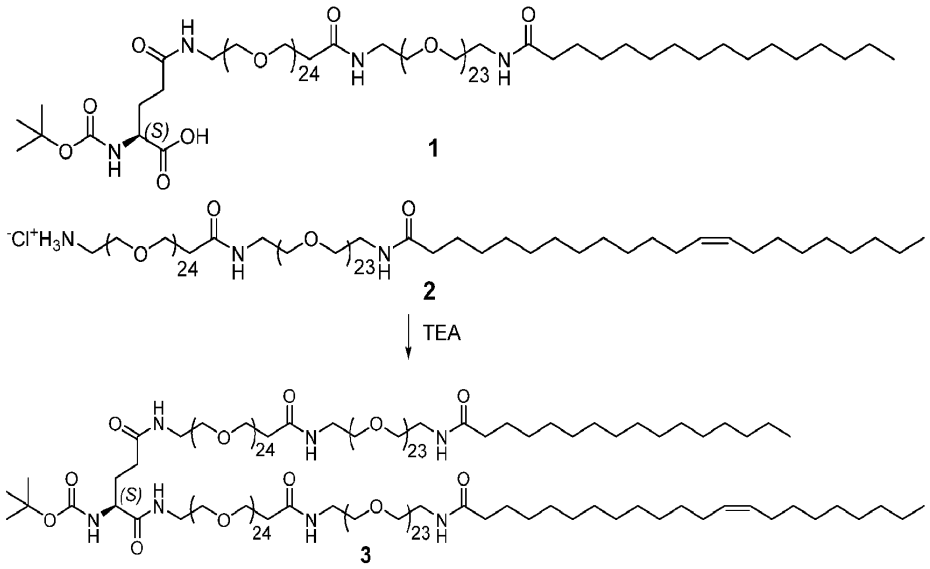
[0811] 화합물 9 (84 mg, 0.0164 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 4M HCl (0.205 mL, 0.0821 mmol, 50 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 10을 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+5H]/5 계산치 1003.44, 실측치 1004.07.



[0812]

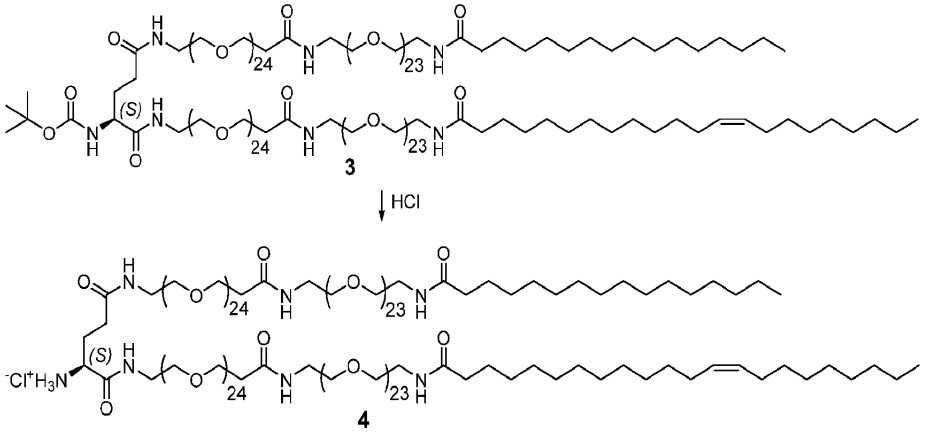
[0813] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 10 (125 mg, 0.0247 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 11 (116 mg, 0.0272 mmol, 1.10 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (0.017 mL, 0.123 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지한 다음, 농축시켰다. LP43-p를 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 18-20% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+5H]/5 계산치 1065.46, 실측치 1066.13.

[0814] LP44-p의 합성



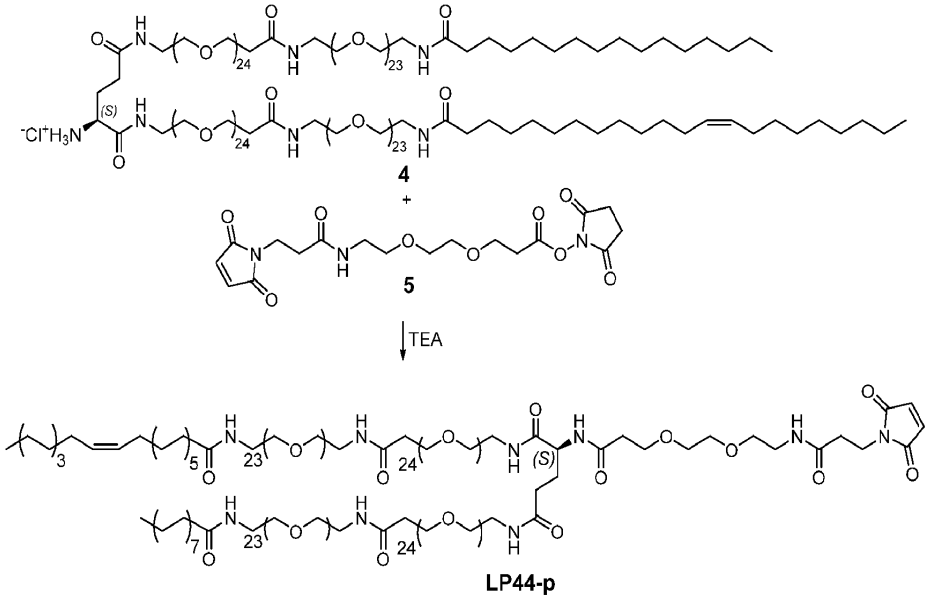
[0815]

[0816] 화합물 1을 상기 LP43-p의 합성의 단계에 제시된 바와 같이 합성하였다 (LP43-p의 합성에서의 화합물 7). DMF (2 mL) 중 화합물 1 (135 mg, 0.0506 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (129 mg, 0.0506 mmol, 1.00 당량), 및 디이소프로필에틸아민 (0.026 mL, 0.151 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (19.5 mg, 0.0607 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 3을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-20% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+5H]/5 계산치 1035.06, 실측치 1035.40.



[0817]

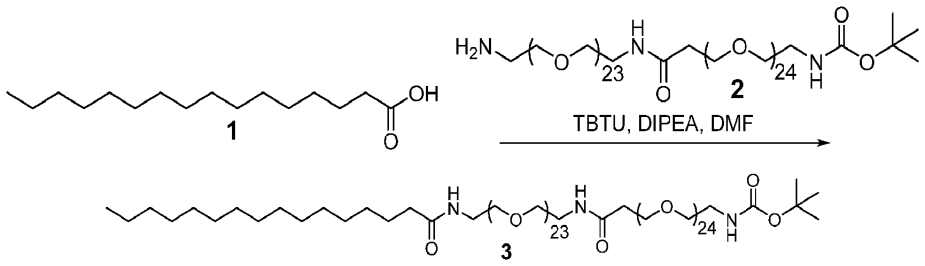
[0818] 화합물 3 (100 mg, 0.0193 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 4M HCl (0.242 mL, 0.966 mmol, 50 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+5H]/5 계산치 1015.05, 실측치 1015.71.



[0819]

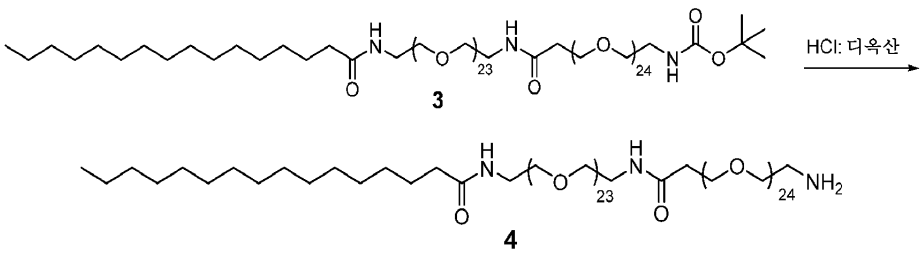
[0820] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 4 (95 mg, 0.0186 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 5 (8 mg, 0.0186 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (0.013 mL, 0.0930 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지한 다음, 용매를 진공 하에 제거하였다. LP44-p를 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-20% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+5H]/5 1077.74, 실측치 1079.

[0821] LP45-p의 합성



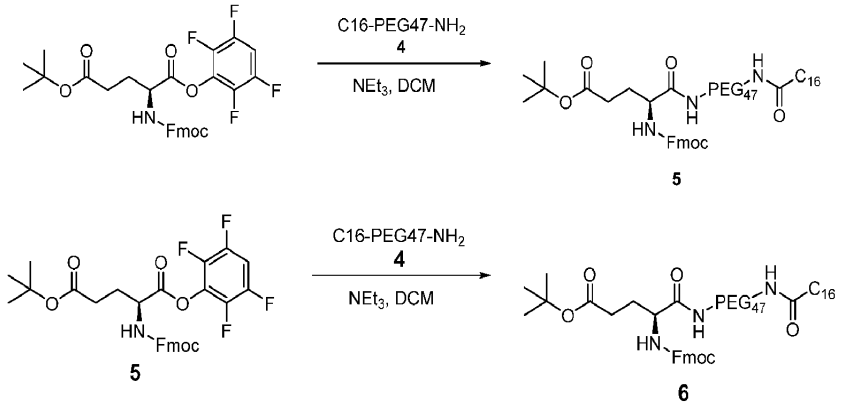
[0822]

[0823] Boc-PEG_{47}-NH_2 2 (269 mg, 0.1170 mmol)를 갖는 DMF (2.0 mL)의 용액 중 팔미트산 1 (30 mg, 0.1170 mmol)에 TBTU (45.1 mg, 0.1404 mmol) 및 DIPEA (60 uL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반한 후, 물을 첨가하고, 화합물 3을 DCM:20% TFE를 사용하여 추출하고, Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 용매를 진공 하에 제거하여 건조시키고, 화합물 3을 플래쉬 크로마토그래피 (DCM:20% MeOH)에 의해 정제하였다.



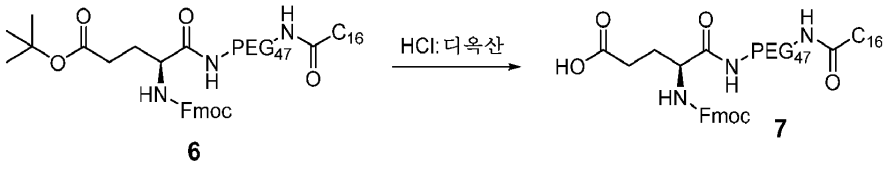
[0824]

[0825] 화합물 3에 4N HCl:디옥산 2mL을 첨가하고, 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완결된 것으로 결정될 때까지 무수 조건 하에 교반하였다: C_{16}-PEG_{47}-NH_2 2301 m/z에 대한 계산치 [M+H]+, 실측치 2302.



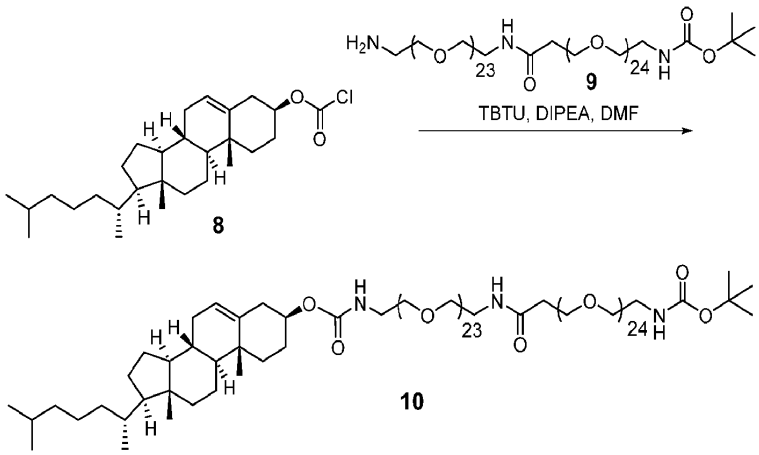
[0826]

[0827] C_{16}-PEG_{47}-NH_2 4 (206 mg, 0.0.0845 mmol)의 용액 중 Fmoc-Glu(OtBu)-Opfp 5 (50 mg, 0.0845 mmol)에 NEt_3 (29 uL)를 DCM (5.0 mL) 중에서 교반하면서 첨가하였다. 반응 혼합물이 완결된 것으로 결정되었을 때, 용매를 진공 하에 제거하여 건조시키고, 조 화합물 6을 플래쉬 크로마토그래피 (DCM:20% MeOH)에 의해 정제하였다.



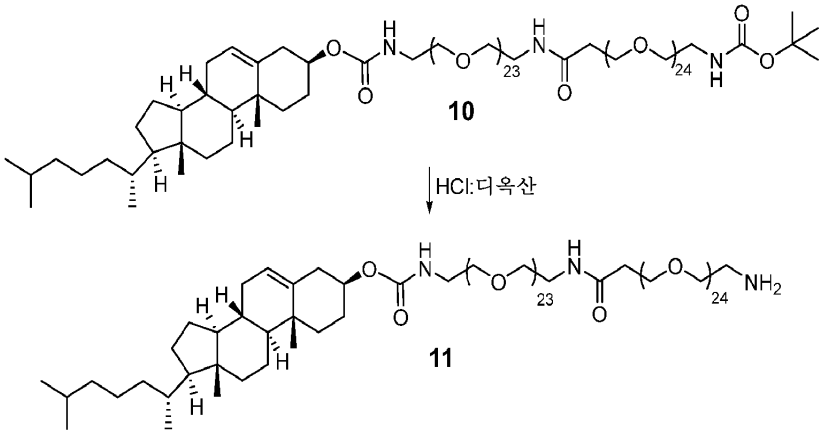
[0828]

[0829] 화합물 6에 4N HCl:디옥산 2mL을 첨가하고, LC-MS에 의해 완결이 결정될 때까지 무수 조건 하에 교반하였다: 계산치 2866.0 [M+H]+ 실측치 2867.



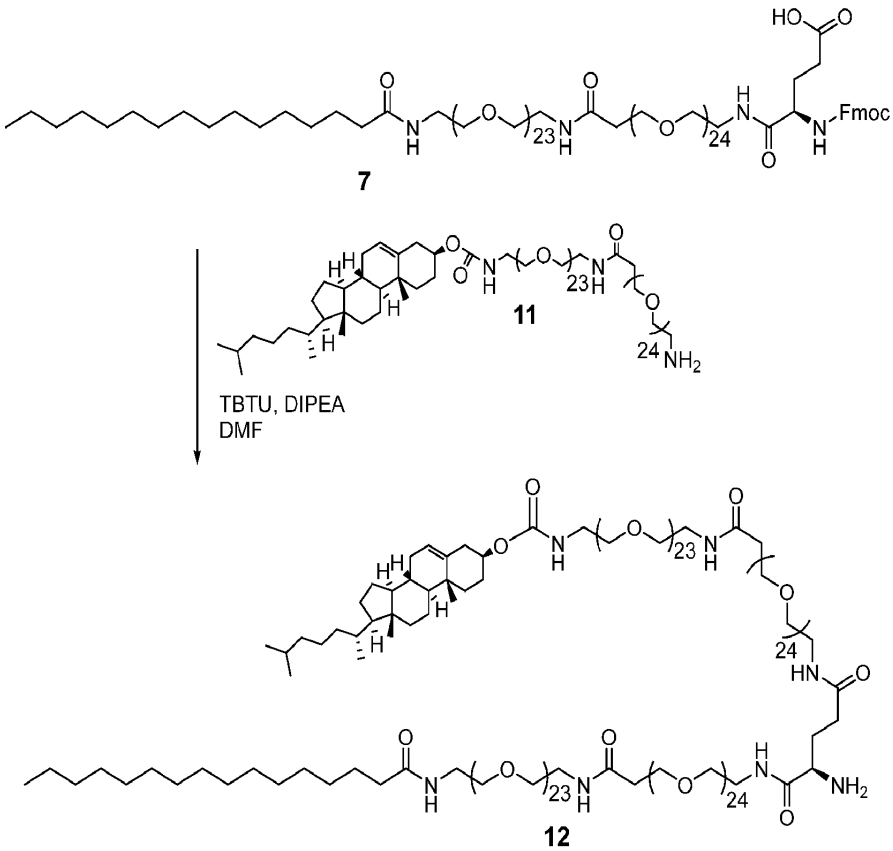
[0830]

[0831] DMF (2.0mL) 중에서 교반하면서 Boc-PEG_{47}-NH_2 9 (269mg, 0.1170mmol)와 TBTU (45.1mg, 0.1404mmol) 및 DIPEA (60uL)의 용액에 화합물 8 (30mg, 0.1170mmol)을 첨가하였다. 생성된 현탁액을 밤새 교반한 후, 물을 첨가하고, 생성물을 DCM:20%TFE를 사용하여 추출하고, Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 용매를 진공 하에 제거하여 건조시키고, 화합물 10을 플래쉬 크로마토그래피 (DCM:20% MeOH)에 의해 정제하였다. 계산치 [M+H]+ 2614.32 m/z, 실측치 2615.32.



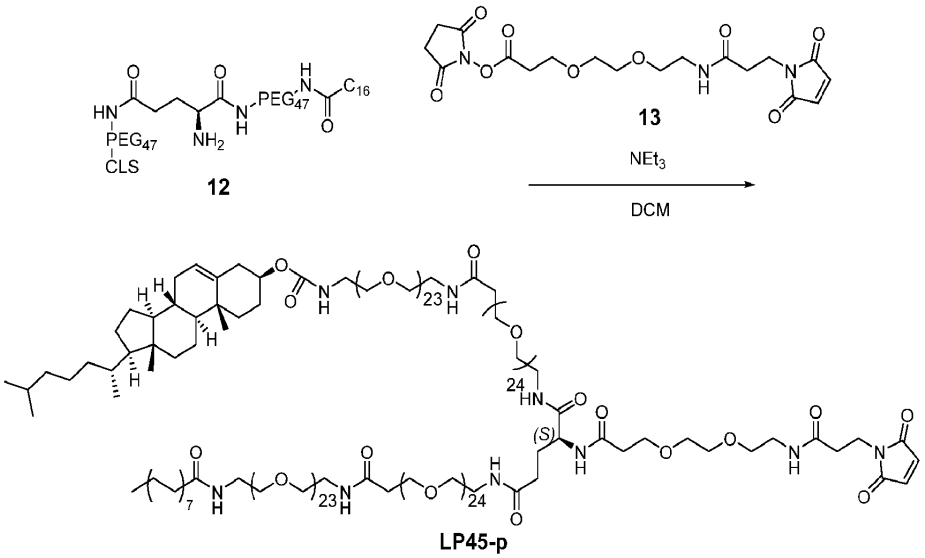
[0832]

[0833] 화합물 10에 2mL의 4N HCl:디옥산을 첨가하였다. 반응 혼합물을 완결된 것으로 결정될 때까지 무수 조건 하에 교반하였다. 생성물 11을 후속 단계에 추가 정제 없이 사용하였다.



[0834]

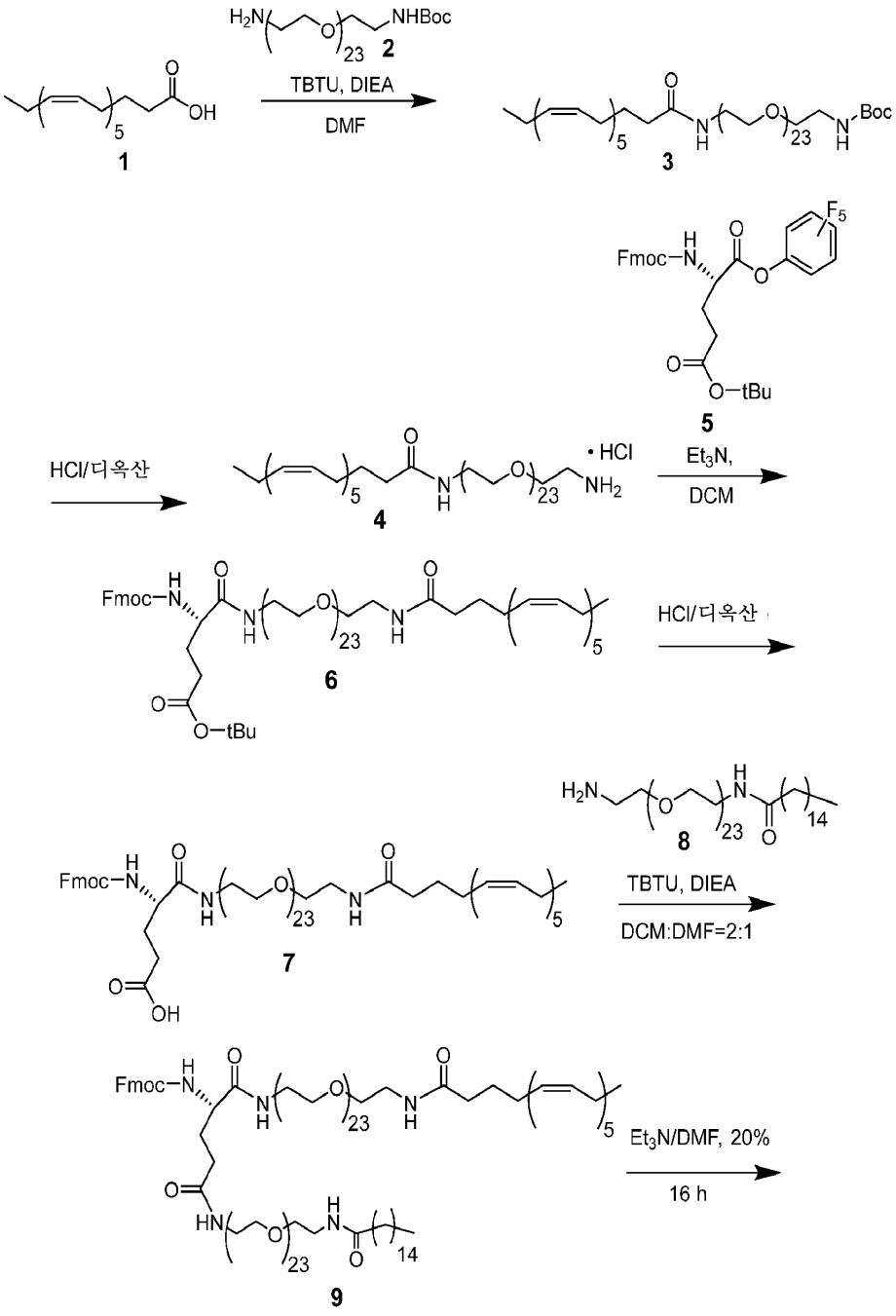
[0835] 화합물 11 (98mg, 0.1914mmol)을 함유하는 DMF (5.0mL)의 용액 중 화합물 7 (100mg, 0.0375mmol)에 TBTU (14.4mg, 0.045mmol) 및 DIPEA (20uL)를 첨가하였다. 생성된 현탁액을 밤새 교반한 후, 물을 첨가하고, DCM:20%TFE를 사용하여 추출하고, Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 용매를 진공 하에 제거하여 건조시키고, 정제물을 플래쉬 크로마토그래피 (DCM:20% MeOH)에 의해 정제하였다. 여기에 4N HCl:디옥산 2mL을 첨가하고, 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완결된 것으로 결정될 때까지 무수 조건 하에 교반하여 화합물 12를 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 5134.26 m/z, 실측치 5135.



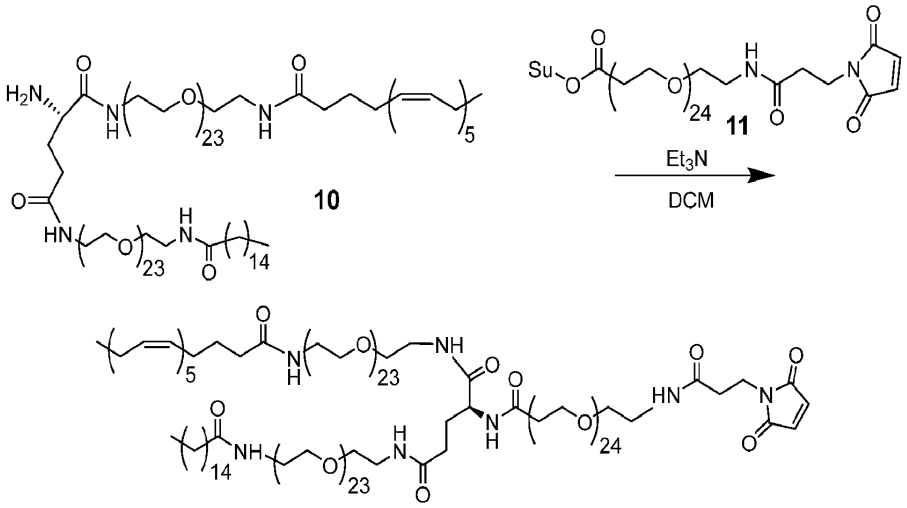
[0836]

[0837] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 13 (10mg, 0.0235 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 12 (120 mg, 0.0235 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (17 uL, 0.1175 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. LP45-p를 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 10-17% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+6H]+ 5474.38, 실측치 5475.01.

[0838] LP47-p의 합성



[0839]



LP47-p

[0840]

[0841] 고체 TBTU (50 mg, 0.156 mmol)를 DMF (9 mL) 중 Boc-보호된 Peg23-아민 2 (퀀타 바이오디자인 리미티드, 150 mg, 0.13 mmol), 에이코사펜타엔산 1 (39 mg, 0.13 mmol) 및 DIEA (68 μL mL, 0.39 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 초음파처리하여 고체를 용해시키고, 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 톨루엔을 잔류물로부터 2회 증발시키고, 잔류물을 클로로포름 (50 mL) 중에 용해시키고, $NaHCO_3$ (2 x 10 mL) 및 염수 (10 mL)로 세척하였다. 생성물을 건조시키고 (Na_2SO_4), 진공 하에 농축시키고, 콤비플래쉬® (SiO_2) 상에서 시스템 DCM 중 0-20% MeOH, 구배 0-80%, 20분을 사용하여 정제하였다. Boc 기를 디옥산 중 HCl의 4M 용액으로 제거하여 히드로클로라이드 염 4를 수득하였다. 계산치 MW 1357.76, (M +2)/2=679.88 실측치: MS (ES, pos): 1358.29 [M+H]+, 679.77 [M+2H]2+.

[0842] 히드로클로라이드 염 4 (167 mg, 0.123 mmol)를 DCM (5 mL) 중 펜타플루오로페닐 에스테르 5 (73 mg, 0.123 mmol) 및 Et_3N (43 uL, 0.31 mmol)과 함께 2시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 잔류물을 SiO_2 (1 g)와 혼합하고, 콤비플래쉬® 상에 로딩하였다. 생성물 6을 DCM 중 0-20% MeOH, 구배 0-50%, 25분의 시스템을 사용하여 정제하였다. 수율 169 mg. 계산치 MW 1765.23, M +18=1783.23, (M +1+18)/2=892.12 실측치: MS (ES, pos): 1782.78 [M+NH4]+, 891.97 [M+H +NH4]2+.

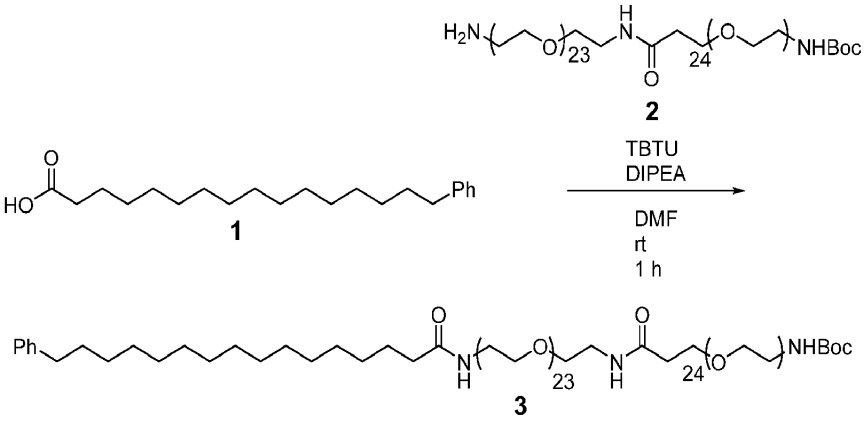
[0843] 생성물 6을 디옥산 중 HCl로 처리하여 유리 산 7을 수득하고, 직접 후속 단계에 사용하였다. 계산치 MW 3002.84, (M +2 x 18)/2=1519.42, (M +3 x 18)/3=1018.95. 실측치: MS (ES, pos): 1519.39 [M+2NH_4]2+, 1019.17 [M+H +2NH4]3+.

[0844] 유도체 7 (47 mg, 0.028 mmol)을 DCM:DMF= 1:1 (8 mL) 중 히드로클로라이드 8 (42 mg, 0.03 mmol), TBTU (11 mg, 0.034 mmol) 및 DIEA (18 uL, 0.1 mmol)와 함께 3시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 톨루엔을 잔류물로부터 2회 증발시키고, 고체를 $CHCl_3$ (50 mL) 중에 현탁시켰다. 현탁액을 2% $NaHCO_3$ 및 염수로 2회 세척하였다. 진공 하에 농축시킨 후, 생성물 9를 콤비플래쉬® (DCM 중 0-20% MeOH, 구배 0-70%, 35분) 상에서 정제하였다.

[0845] 생성물 9 (49 mg, 0.0162 mmol)를 DMF 중 Et_3N (20%, 3 mL)과 함께 16시간 동안 교반하고, 용매를 Et_3N과 함께 진공 하에 제거하고, 톨루엔을 잔류물로부터 3회 증발시켜 탈보호된 아민 10을 수득하였으며, 이를 직접 후속 단계에 사용하였다.

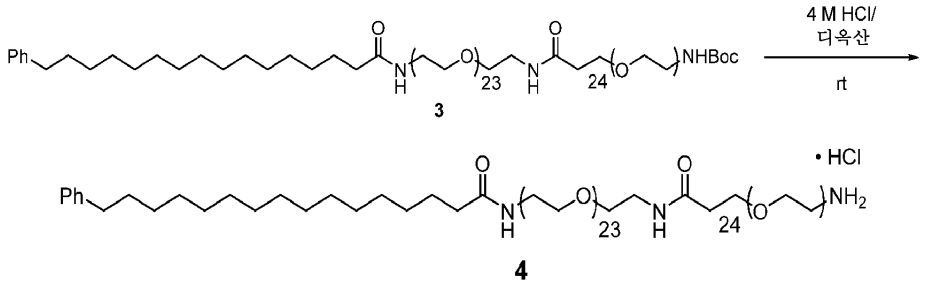
[0846] 아민 10 (45 mg, 0.0162 mmol)을 DCM (4 mL) 중 NHS 에스테르 11 (21 mg, 0.0147 mmol) 및 Et_3N (6 uL, 0.041 mmol)의 혼합물과 함께 16시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 생성물 LP47-p를 콤비플래쉬® 상에서 시스템 DCM: DCM 중 20% MeOH, 구배 0-100%, 40분을 사용하여 정제하였다. 계산치 MW 4060.07, (M +3 x 18)/3=1371.36, (M +4 x 18)/4=1033.02 실측치: MS (ES, pos): 1371.76 $[M+3NH_4]^{3+}$, 1033.70 $[M+4NH_4]^{4+}$.

[0847] LP48-p의 합성



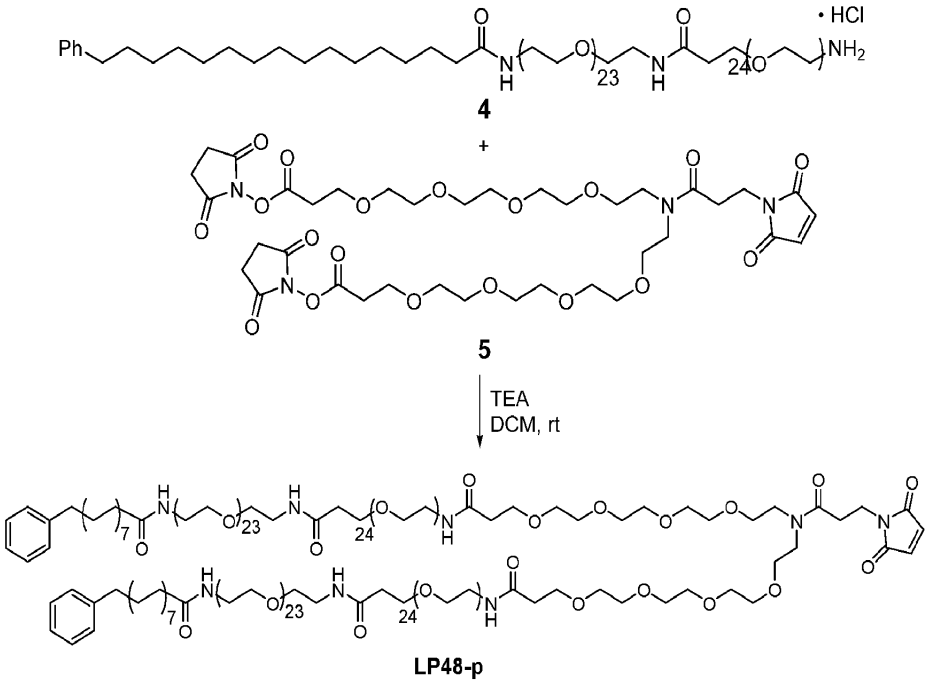
[0848]

[0849] DMF 중 화합물 1 (27.5 mg), TBTU (26.6 mg), 및 DIEA (0.022 mL)의 용액에 실온에서 화합물 2 (173 mg)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔의 12-g 칼럼을 사용하여 20분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (10-100%)의 구배로 정제하였으며, 여기서 화합물 3은 66% B에서 용리되었다. 화합물 3을 진공 하에 농축시켜 백색 유성 잔류물을 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2615.65 m/z, 관찰치 1326.52 (+2/2, $+H_2O$) m/z.



[0850]

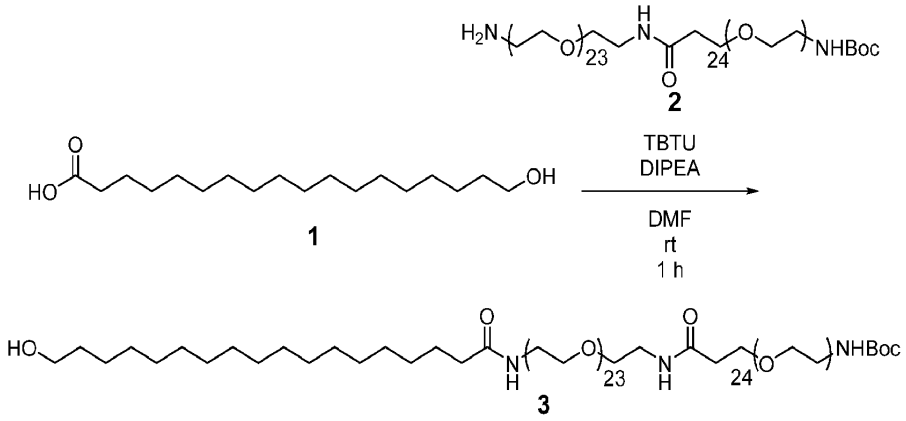
[0851] 화합물 3 (56.7 mg)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 (7.9 mg)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 반응물을 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 PhMe/MeOH와 공비혼합하고, 고진공 하에 밤새 농축시켜 화합물 4를 백색 고체로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2515.60 m/z, 관찰치 1259.91 (+2/2) m/z.



[0852]

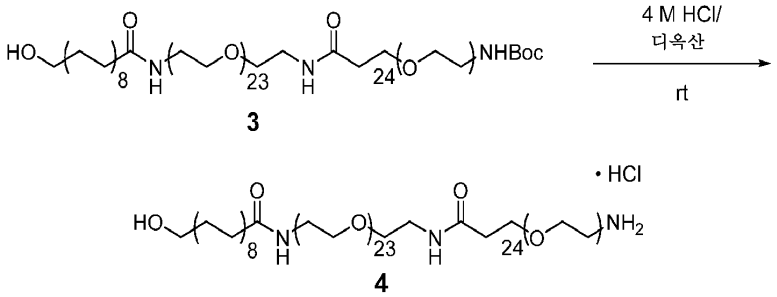
[0853] N_2(g)를 살포하면서 무수 DCM 중 화합물 4 (55.4 mg) 및 NEt_3 (0.015 mL)의 용액을 실온에서 제조하였다. 이어서 화합물 5 (8.9 mg)를 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 교반되도록 하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔의 4-g 칼럼을 통해 20분에 걸쳐 0-20% MeOH/DCM (10% B에서 100% B)의 구배로 정제하였으며, 여기서 LP48-p는 100% B에서 용리되었다. LP48-p를 농축시켜 백색 유성 잔류물을 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 5558.48 m/z, 관찰치 1152.98 (+5/5, +H_2O) m/z.

[0854] LP49-p의 합성



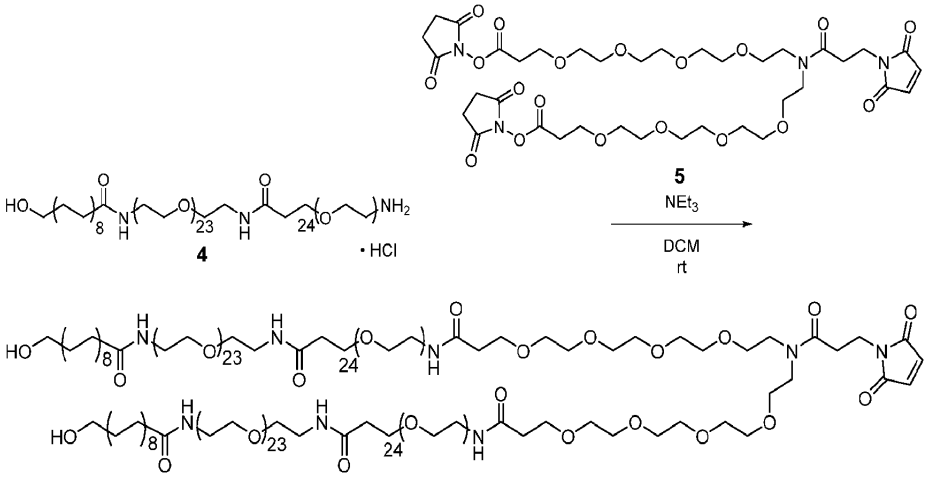
[0855]

[0856] DMF 중 화합물 1 (31.3 mg), TBTU (33.4 mg), 및 DIEA (0.023 mL)의 용액에 실온에서 화합물 2 (199 mg)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 30분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (10-100%)의 구배로 정제하였으며, 여기서 화합물 3은 57% B에서 용리되었다. 화합물 3을 진공 하에 농축시켜 백색 유성 잔류물을 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2583.65 m/z, 관찰치 1311.03 (+2/2, +H_2O) m/z.



[0857]

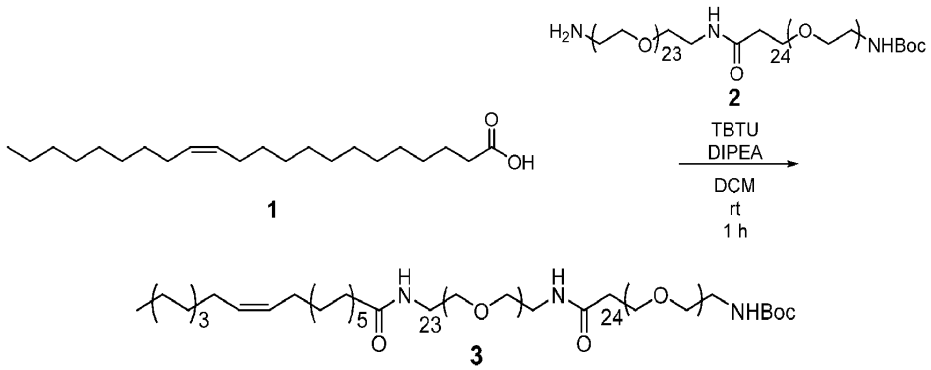
[0858] 화합물 3 (70 mg)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 (9.9 mg)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 PhMe와 공비혼합하고, 진공 하에 밤새 농축시켜 화합물 4를 오일로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2483.59 m/z, 관찰치 841.32 (+2/2, +H_2O) m/z.



[0859]

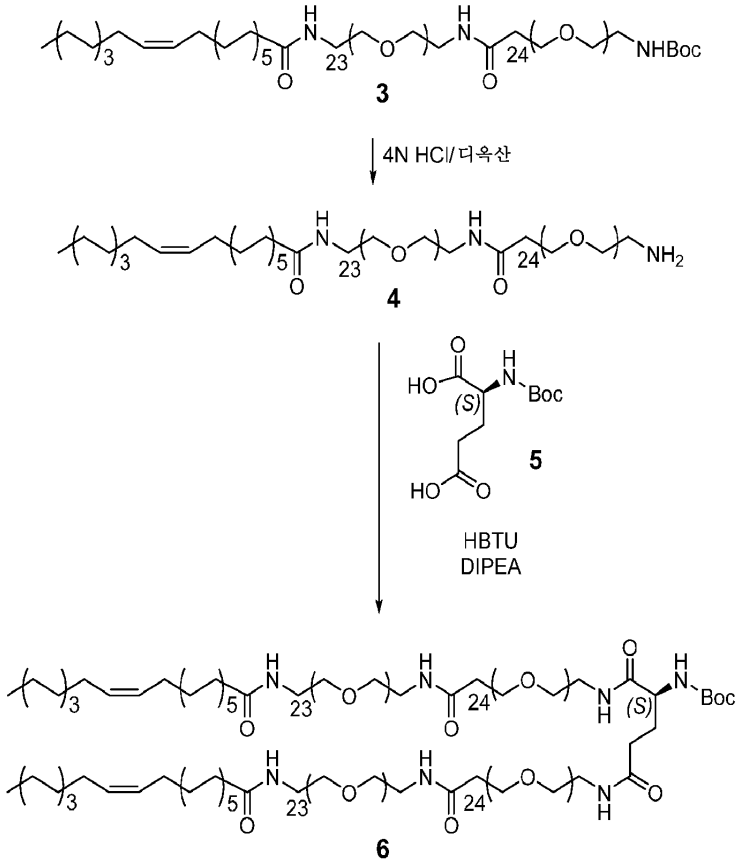
[0860] N_2(g)를 살포하면서 무수 DCM 중 화합물 4 (68.3 mg) 및 NEt_3 (13.7 mg)의 용액을 실온에서 제조하였다. 이어서 화합물 5 (11.2 mg)를 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 교반되도록 하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카겔의 4-g 칼럼을 통해 20분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (10% B에서 100% B)의 구배로 정제하였고, 여기서 LP49-p는 100% B에서 용리되었다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 5594.97 m/z, 관찰치 1418.68 (+4/4, +H_2O) m/z.

[0861] LP53-p의 합성



[0862]

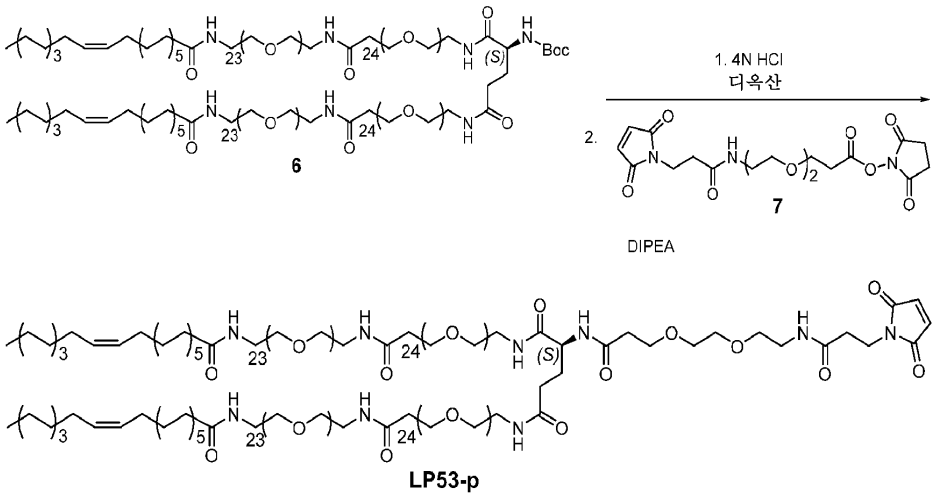
[0863] DCM 중 화합물 1 (706 mg) 및 2 (4.00 g)의 용액에 실온에서 TBTU (670 mg)에 이어서 DIPEA (0.908 mL)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 단리를 위해 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 40분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (0-100%)의 구배로 액체 주입을 사용하여 정제하였다. 화합물 3을 진공 하에 농축시켜 백색 유성 잔류물을 수득하였다.



[0864]

[0865] 화합물 3 (4.00 g)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 25mL을 첨가하였다. LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 DCM 중에 용해시킨 다음, 화합물 5 (189 mg), HBTU (588 mg), 및 DIPEA (0.797 mL)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다.

[0866] 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 DCM 중 0-20% MeOH (0-100% B)의 구배로 정제하여 화합물 6을 수득하였다.



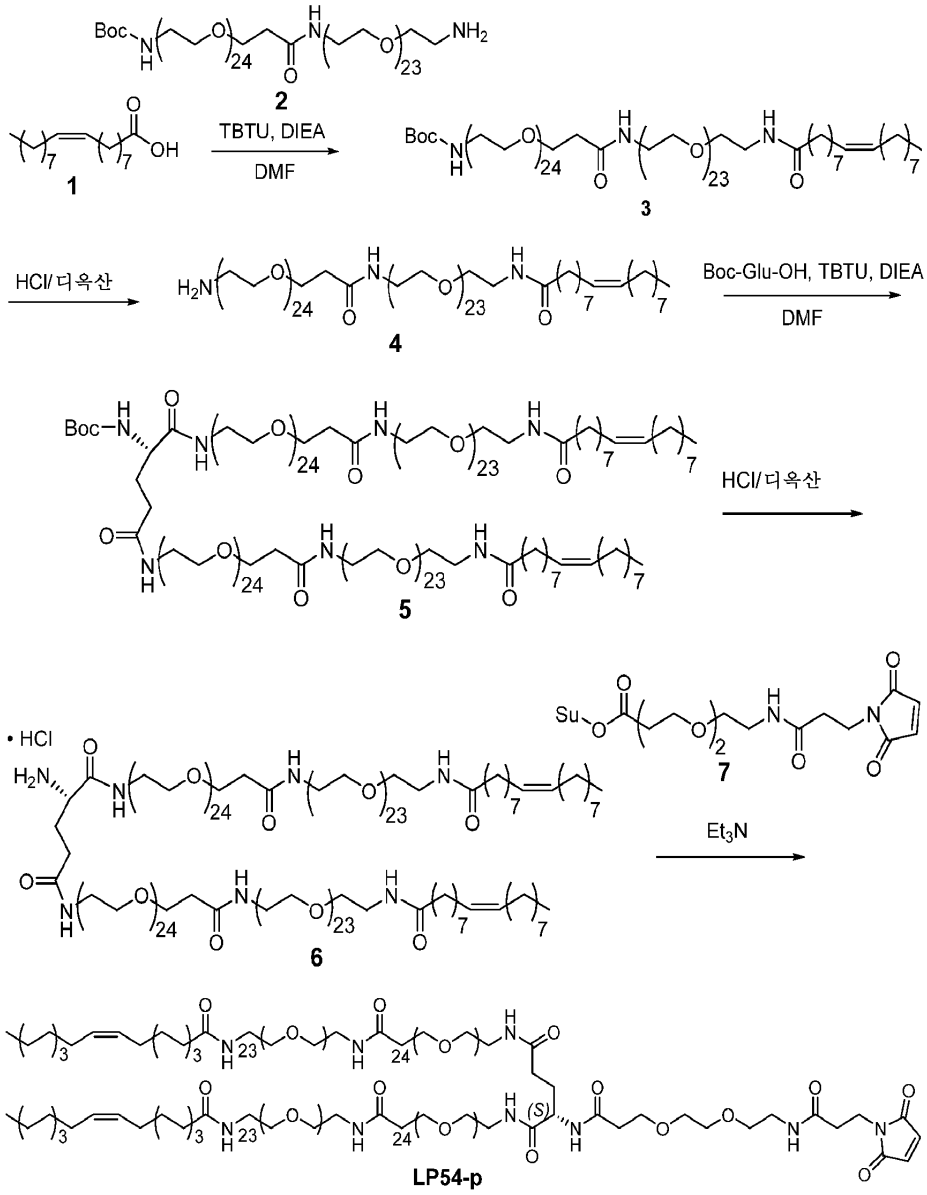
[0867]

[0868] 화합물 6 (2.00 g)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 20mL을 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 DCM 중에 용해시킨 다음, 화합물 7 (170 mg) 및 DIPEA (148 mg)를 첨가하였다. TLC에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다.

[0869] 생성물 LP53-p를 표준 후처리 (1N HCl, 포화 $NaHCO_3$, 염수)에 의해 추출하였다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해

고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 DCM 중 0-20% MeOH (0-100% B)의 구배로 정제하였다.

[0870] LP54-p의 합성



[0871]

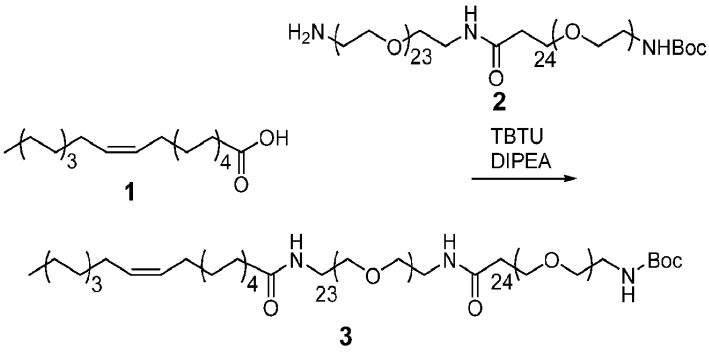
[0872] 올레산 1 (491 mg, 1.736 mmol)을 DMF (50 mL) 중 Boc-아미노-PEG_{47} 유도체 2, TBTU (670 mg, 2.086 mmol) 및 DIEA (908 uL, 5.21 mmol)와 함께 4시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 톨루엔을 잔류물로부터 3회 증발시키고, 잔류물을 $CHCl_3$ (150 mL) 중에 현탁시켰다. 생성된 현탁액을 H_2O, 2% $NaHCO_3$, 염수로 2회 세척하고, 무수 Na_2SO_4로 처리하였다. 혼합물을 농축시켜 생성물 3을 수득하였으며, 이를 진공 하에 건조시켰다. 수율 4.391 g. 계산치 MW 2566.24, (M +2 x 18)/2=1301.12, (M +3 x 18)/3=873.41 실측치: MS (ES, pos): 1301.79 $[M+2NH4]^{2+}$, 874.08 $[M+3NH4]^{3+}$.

[0873] 화합물 3을 빙냉 4M HCl/디옥산 용액 (5 mL)으로 처리한 다음, 실온에서 1시간 동안 교반함으로써 아민 히드로클로라이드 4로 전환시켰다. 반응 혼합물을 농축시키고, 진공 하에 건조시키고, 잔류 HCl을 생성물로부터 톨루엔의 2회 증발에 의해 제거하였다. 생성된 아민 히드로클로라이드 4를 DMF:DCM=1:1 (60 mL) 중 Boc-Glu-OH (197 mg, 0.796 mmol), TBTU (594 mg, 1.85 mmol), 및 DIEA (1 mL, 5.74 mmol)와 함께 16시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 톨루엔을 잔류물로부터 3회 증발시키고, 잔류물을 $CHCl_3$ (300 mL) 중에 현탁시켰다. 현탁액을 H_2O, 2% $NaHCO_3$, 염수로 2회 세척하고, 무수 Na_2SO_4로 건조시켰다. 생성물 5를 콤비플래쉬® 상에서 시스템 DCM 중 0-20% MeOH, 구배 0-100%, 45분을 사용하여 정제하였다. 수율 2.72 g. 계산

치 MW 5143.46, (M +3 x 18)/3=1732.49, (M +4 x 18)/4=1303.87 실측치: MS (ES, pos): 1733.46 $[M+3NH_4]^{3+}$, 1304.55 $[M+4NH_4]^{4+}$.

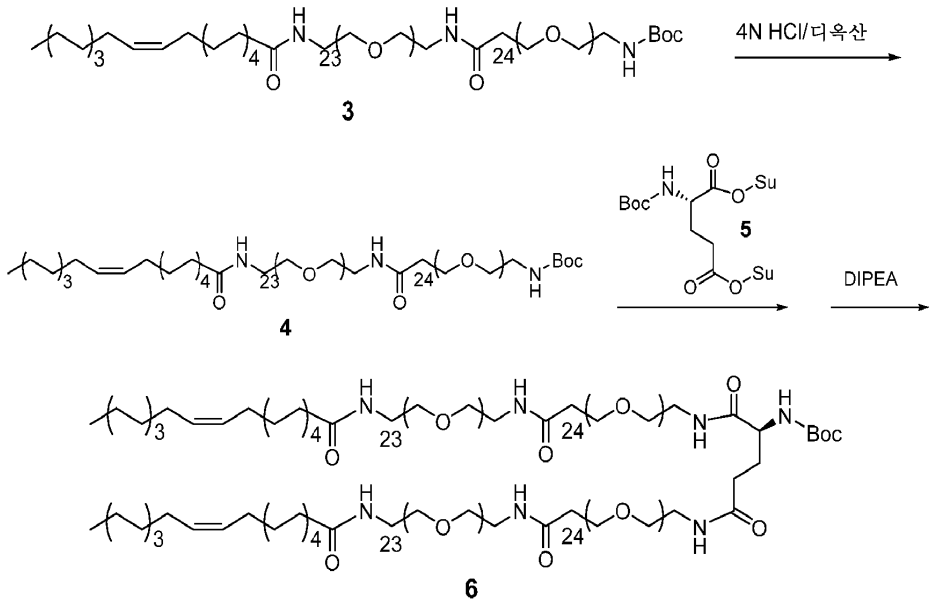
[0874] 화합물 5 (2.72 g, 0.529 mmol)를 4M HCl/디옥산 용액 (30 mL) 중에서 1시간 동안 교반하고, 용매를 진공 하에 제거하고, 톨루엔을 잔류물로부터 2회 증발시키고, 생성된 건조 히드로클로라이드 염 6을 NHS-에스테르 7 (212 mg, 0.5 mmol) 및 DCM 중 Et_3N (45 mL)과 함께 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 $CHCl_3$로 3회 희석하고, H_2O 및 염수로 세척하고, 건조시키고 (Na_2SO_4), 농축시키고, 생성물 LP54-p를 콤비플래쉬® 상에서 시스템 DCM 중 0-20% MeOH, 구배 0-100%, 55분을 사용하여 정제하였다. 수율 440 mg. 계산치 MW 5353.65, (M +3 x 18)/3=1802.55, (M +4 x 18)/4=1356.41 실측치: MS (ES, pos): 1803.19 $[M+3NH_4]^{3+}$, 1357.24 $[M+4NH_4]^{4+}$.

[0875] LP55-p의 합성



[0876]

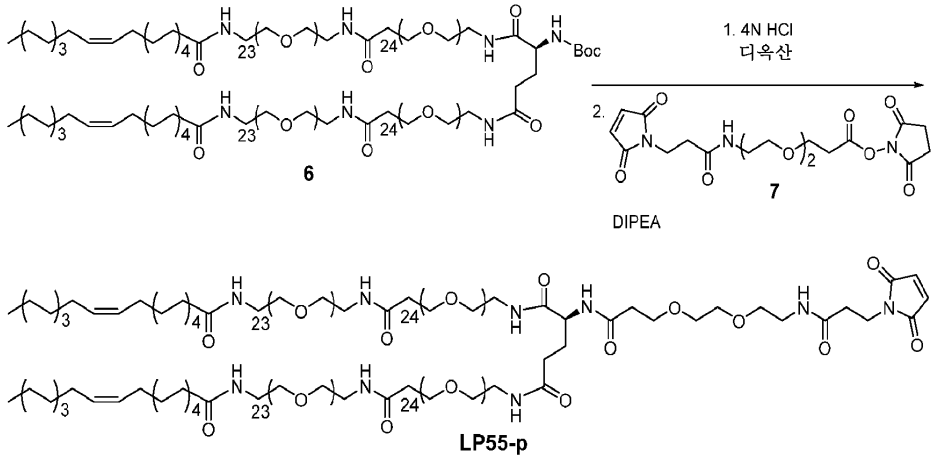
[0877] DCM 중 화합물 1 (297 mg) 및 2 (2.00 g)의 용액에 실온에서 TBTU (307 mg)에 이어서 DIPEA (0.454 mL)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 생성물을 표준 후처리 (1N HCl, 포화 $NaHCO_3$, 염수 세척)에 의해 추출하고, Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 조 화합물 3을 직접 후속 단계에 사용하였다.



[0878]

[0879] 화합물 3 (2.00 g)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 20mL을 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 DCM 중에 용해시킨 다음, DIPEA (0.0403 mL)를 첨가하였다. 이어서 시린지 펌프를 사용하여 화합물 5 (DCM 중 160 mg)를 천천히 (2-3시간 내에) 첨가하였다. TLC에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다.

[0880] 생성물을 표준 후처리 (1N HCl, 포화 $NaHCO_3$, 염수)를 사용하여 추출하였다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 DCM 중 0-20% MeOH (0-100% B)의 구배로 정제하여 화합물 6을 수득하였다.

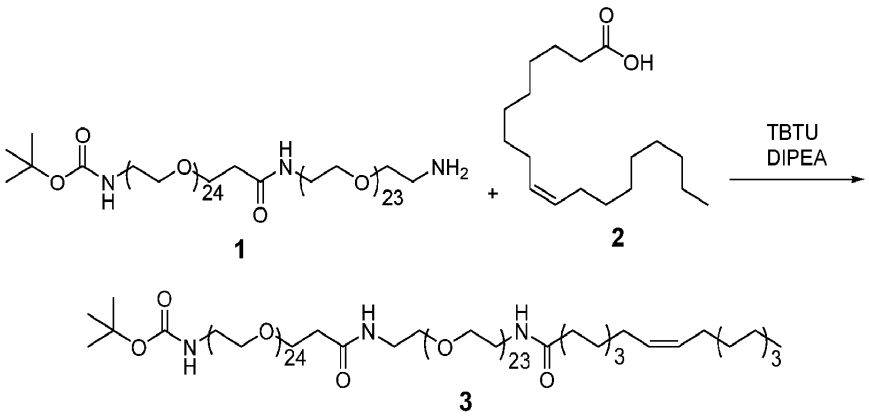


[0881]

[0882] 화합물 6 (1.22 g)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 10mL을 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 DCM 중에 용해시킨 다음, 화합물 7 (105 mg) 및 DIPEA (148 mg)를 첨가하였다. TLC에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다.

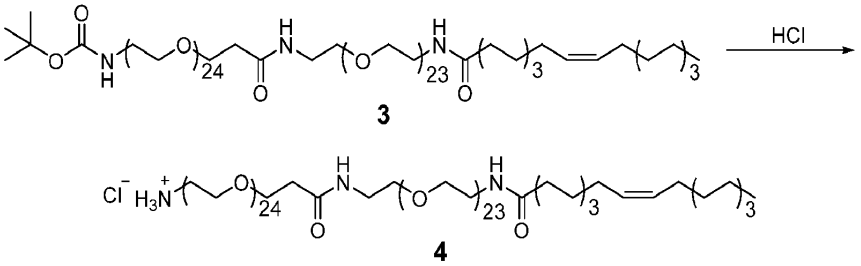
[0883] 생성물 LP55-p를 표준 후처리 (1N HCl, 포화 $NaHCO_3$, 염수)를 사용하여 추출하였다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 DCM 중 0-20% MeOH (0-100% B)의 구배로 정제하였다.

[0884] LP56-p의 합성



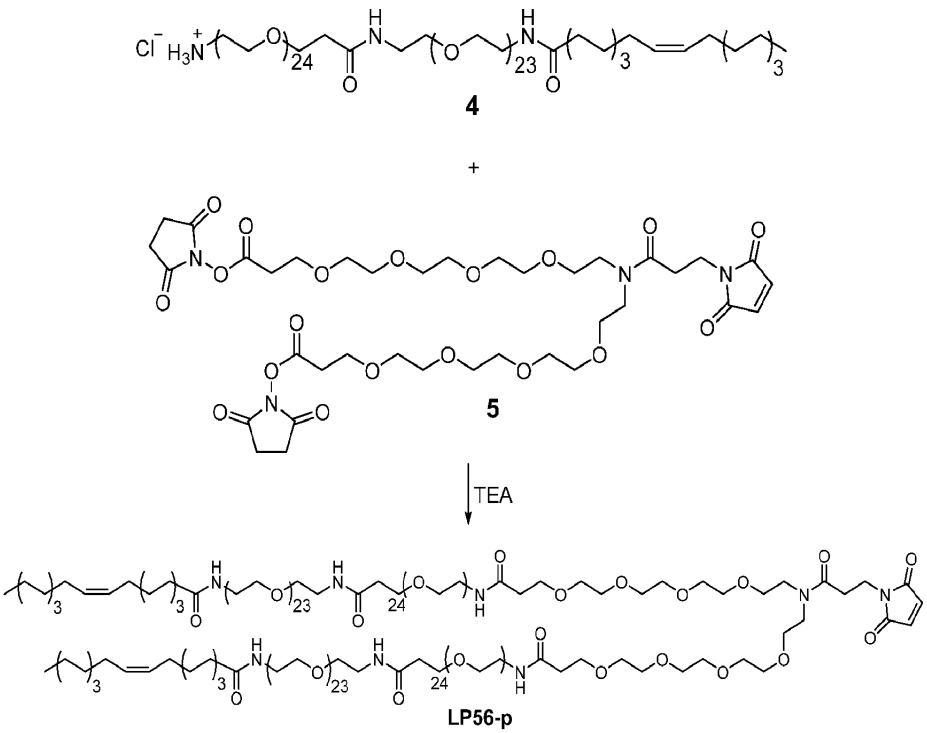
[0885]

[0886] 무수 DMF (3 mL) 중 화합물 1 (150 mg, 0.0652 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (20 mg, 0.0717 mmol, 1.1 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (0.034 mL, 0.195 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (25.1 mg, 0.0782 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 3을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-18% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+2H]+/2 1283.32, 실측치 1283.87.



[0887]

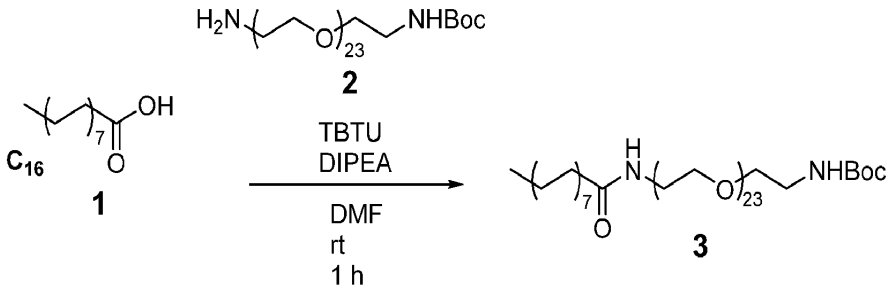
[0888] 화합물 3의 고체 (82 mg, 0.0320 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 HCl 용액 (0.4 mL, 1.597 mmol, 50 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 화합물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+2H]+/2 1233.29, 실측치 1233.69.



[0889]

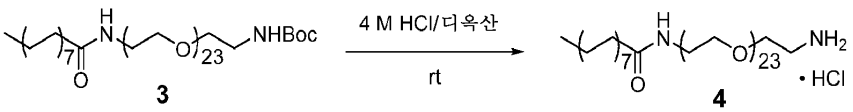
[0890] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 5 (13 mg, 0.0151 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 4 (77.7 mg, 0.0310 mmol, 2.05 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (0.011 mL, 0.0757 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하고, 용매를 농축시켰다. LP56-p를 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-18% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+5H]+/5 1112.49, 실측치 1112.34, 계산치 [M+6H]+/6 927.24, 실측치 927.97.

[0891] LP57-p의 합성



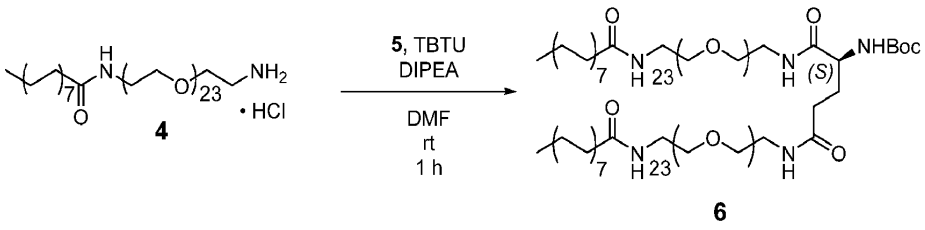
[0892]

[0893] DMF 중 화합물 1 (787 mg), TBTU (985 mg), 및 DIEA (662 mg)의 용액에 실온에서 화합물 2 (3.06 g)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 밤새 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 $NaHCO_3$로 세척하고, 20% 트리플루오로에탄올/DCM으로 추출하였다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔의 80-g 칼럼을 사용하여 DCM에서 DCM 중 20% MeOH (0-100%)의 구배로 45분에 걸쳐 정제하였으며, 여기서 화합물 3은 28% B에서 용리되었다. 화합물 3을 진공 하에 농축시켜 백색 유성 잔류물을 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1411.95 m/z, 관찰치 724.80 (+2/2, $+H_2O$) m/z.



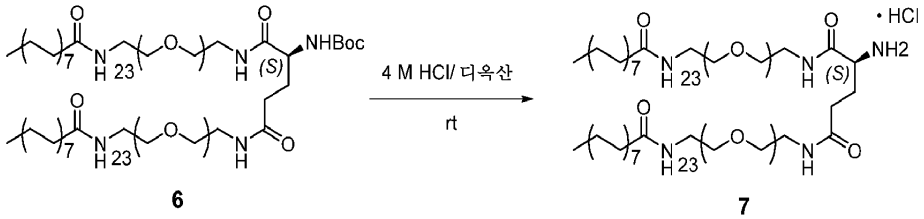
[0894]

[0895] 화합물 3 (1.27 g)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 (329 mg)을 첨가하였다. LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 PhMe/MeOH와 공비혼합하고, 고진공 하에 밤새 농축시켜 화합물 4를 백색 고체로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1311.90 m/z, 관찰치 657.59 (+2/2) m/z.



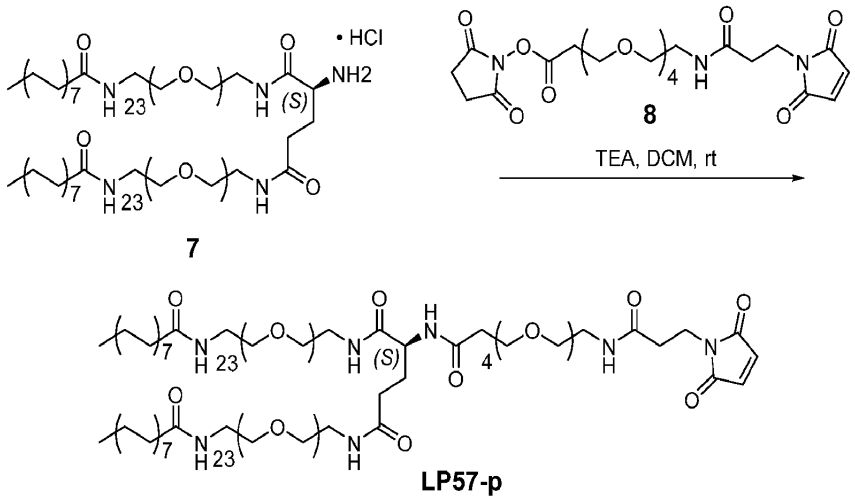
[0896]

[0897] DMF 중 화합물 4 (1.22 g), TBTU (348 mg), 및 DIEA (0.3825 mL)의 용액에 실온에서 화합물 5 (109 mg)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 $NaHCO_3$로 세척하고, 20% 2,2,2-트리플루오로에탄올 (TFE)/DCM으로 추출하고, NH_4Cl 용액으로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 30분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (0-100%)의 구배로 정제하고, 여기서 화합물 6은 51% B에서 용리되었다. 깨끗한 및 불순한 분획을 수집하고, 농축시켰다. 불순한 분획을 DCM을 통해 20% MeOH/DCM (0-100% B)으로 재단리하였으며, 여기서 화합물 6은 54% B에서 용리되었고, 이를 수집하고, 순수한 분획으로 농축시켰다. 진공 하에 농축시켜 화합물 6을 백색 유성 잔류물로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2833.89 m/z, 관찰치 727.56 (+4/4, +H_2O) m/z.



[0898]

[0899] 화합물 6 (130 mg)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 (16.7 mg)을 첨가하였다. LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 PhMe/MeOH와 공비혼합하고, 고진공 하에 밤새 농축시켜 화합물 7을 백색 고체로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 2769.81 m/z, 관찰치 694.07 (+ HCl, +4/4) m/z.

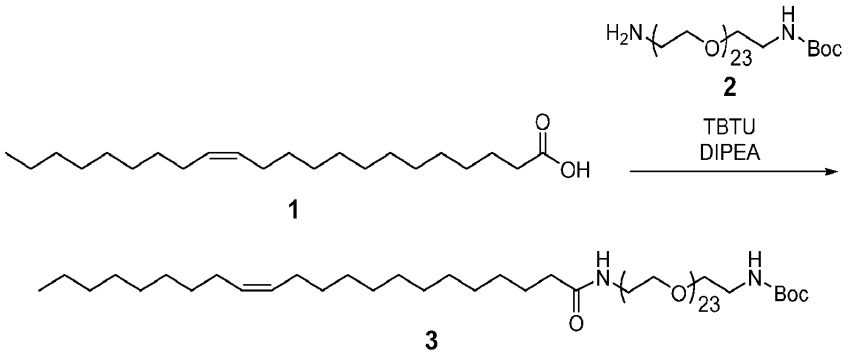


[0900]

[0901] N_2(g)를 살포하면서 무수 DCM 중 화합물 7 (127 mg) 및 TEA (0.026 mL)의 용액을 실온에서 제조하였다. 이어서 화합물 8 (24.8 mg)을 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 교반되도록 하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔의 12-g 칼럼을 통해 20분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (0% B에서 100% B)의 구배로 정제하였고, 여기서 LP57-p는

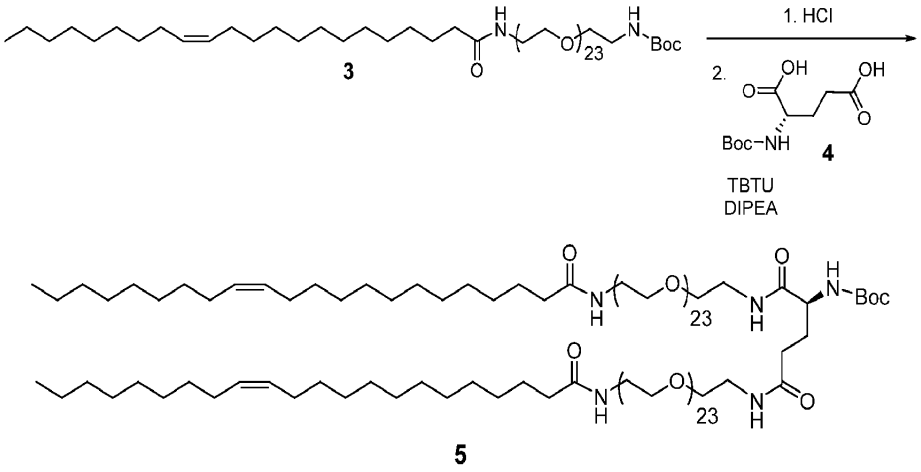
100% B에서 용리되었다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 3132.00 m/z, 관찰치 1584.89 (+3/3, +H_2O) m/z.

[0902] LP58-p의 합성



[0903]

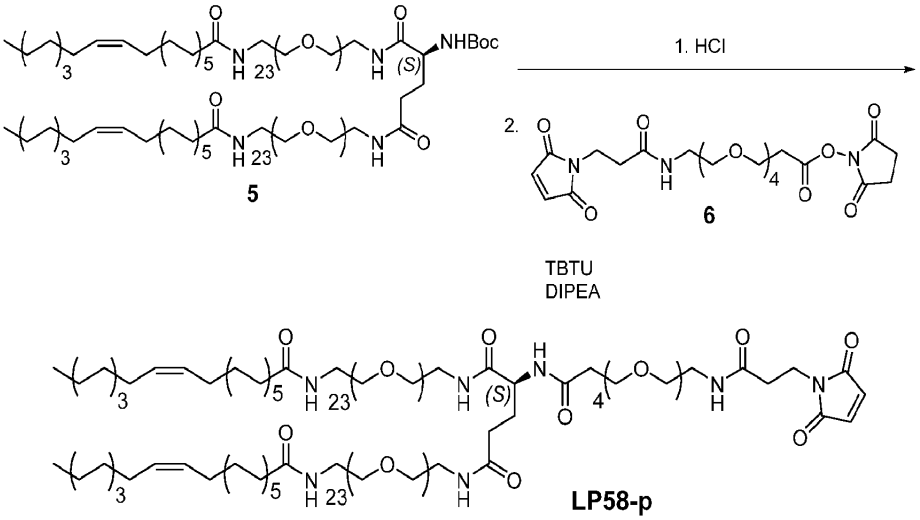
[0904] DCM 중 화합물 1 (606 mg) 및 2 (2.00 g)의 용액에 실온에서 TBTU (657 mg)에 이어서 DIPEA (0.891 mL)를 첨가하였다. LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 40분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (0-100%)의 구배로 액체 주입을 사용하여 정제하였다. 화합물 3을 진공 하에 농축시켜 백색 유성 잔류물을 수득하였다.



[0905]

[0906] 화합물 3 (2.20 g)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 5 mL을 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 DCM 중에 용해시킨 다음, 화합물 4 (171 mg), TBTU (567 mg) 및 DIPEA (0.770 mL)를 첨가하였다. TLC에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다.

[0907] 생성물을 표준 후처리 (1N HCl, 포화 $NaHCO_3$, 염수)를 사용하여 추출하였다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 DCM 중 0-20% MeOH (0-100% B)의 구배로 정제하였다.

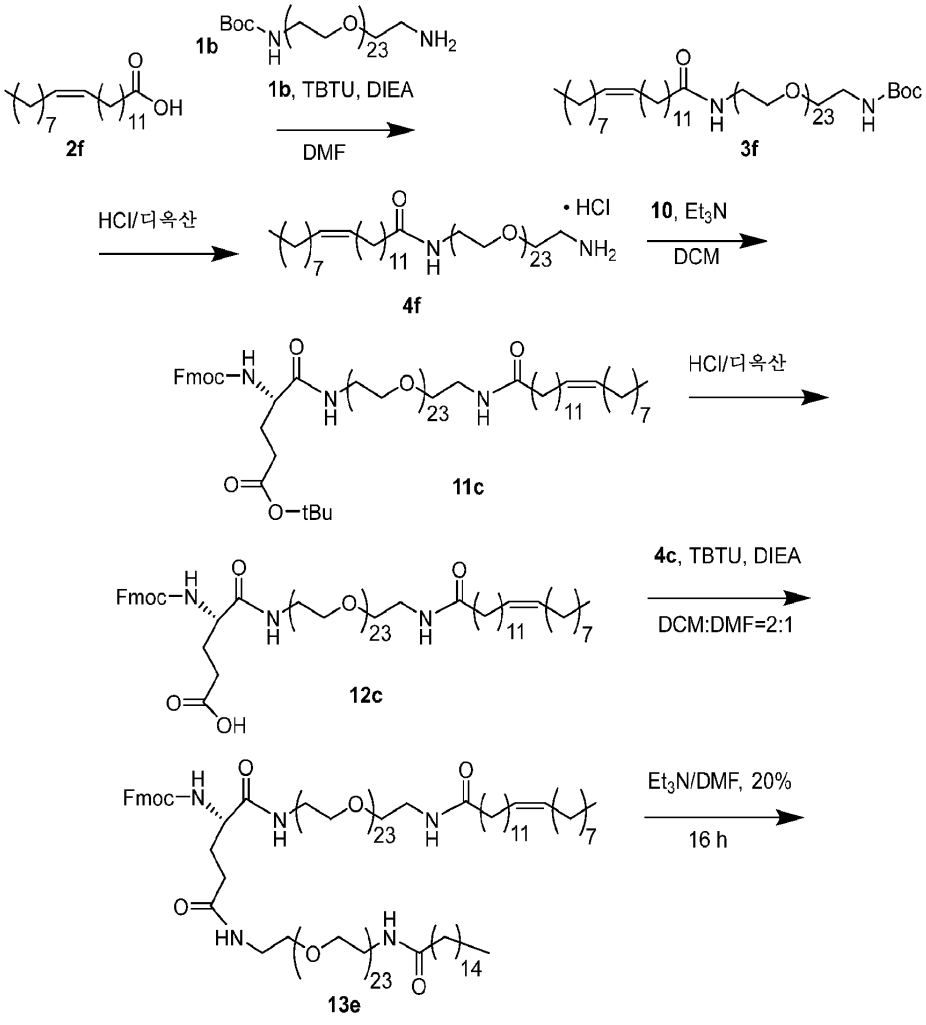


[0908]

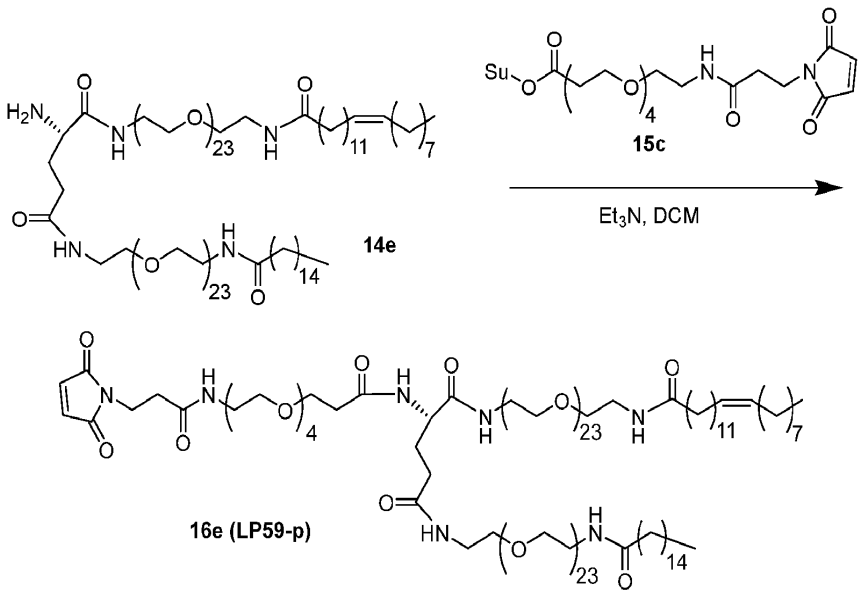
[0909] 화합물 5 (1.34 g)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 10mL을 첨가하였다. LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 DCM 중에 용해시킨 다음, 화합물 6, TBTU (172 mg), 및 DIPEA (0.234 mL)를 첨가하였다. TLC에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다.

[0910] 생성물 LP58-p를 표준 후처리 (1N HCl, 포화 $NaHCO_3$, 염수)를 사용하여 추출하였다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 DCM 중 0-20% MeOH (0-100% B)의 구배로 정제하였다.

[0911] LP59-p의 합성



[0912]



[0913]

[0914] 에루스산 2f (587 mg, 1.736 mmol)를 DMF (50 mL) 중 Boc-아미노peg47 유도체 1b, TBTU (670 mg, 2.086 mmol) 및 DIEA (908 uL, 5.21 mmol)와 함께 4시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 톨루엔을 잔류물로부터 3회 증발시키고, 잔류물을 $CHCl_3$ (150 mL) 중에 현탁시켰다. 생성된 현탁액을 H_2O, 2% $NaHCO_3$, 염수로 2회 세척하고, 무수 Na_2SO_4로 처리하였다. 생성물 3f를 단리시키고, 농축시키고, 진공 하에 건조시켰다. 수율

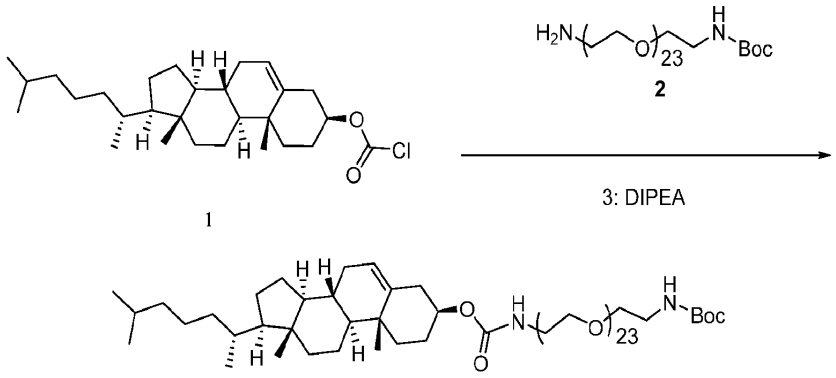
4.391 g. 계산치 MW 1494.00, M +18=1512.00, (M +2 x 18)/2=765.00. 실측치: MS (ES, pos): 1512.53 $[M+NH_4]^+$, 765.72 $[M+2NH_4]^{2+}$.

[0915] Boc 보호기를 디옥산 중 HCl의 4M 용액으로 제거하여 히드로클로라이드 염 4f (1.192 g, 0.834 mmol)를 수득하였으며, 이를 직접 후속 단계에 정제 없이 사용하였다. DCM (30 mL) 중 펜타플루오로페닐 에스테르 10 (493 mg, 0.834 mmol) 및 Et_3N (290 uL, 2.084 mmol)을 히드로클로라이드 염 4f와 혼합하였다. 2시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 $CHCl_3$ (150 mL)로 희석하고, H_2O, 수성 3% $NaHCO_3$, 및 염수로 세척하였다. 건조 생성물 11c 1.539 g를 다음 단계에서 직접 사용하였다.

[0916] 화합물 11c (1.539 g, 0.834 mmol)를 4M HCl/디옥산 용액 (20 mL) 중에서 4시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 톨루엔을 잔류물로부터 2회 증발시켜 건조 탈보호된 산 12c (1.52 g, 0.827 mmol)를 수득하였다. 이러한 산을 DCM:DMF=1:2의 혼합물 (30 mL) 중 아민 히드로클로라이드 4c (1.114 g, 0.827 mmol, 상기 LP39에 대한 합성에 제시된 바와 같이 합성함), TBTU (318.6 mg, 0.992 mmol), 및 DIEA (532 uL, 3.05 mmol)와 함께 16시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 잔류 DMF를 톨루엔의 3회의 추가의 증발로 제거하였다. 잔류물을 $CHCl_3$ (150 mL) 중에 현탁시키고, H_2O, 3% $NaHCO_3$로 2회, 및 염수로 세척하였다. Na_2SO_4로 건조시킨 후, 생성물 13e를 농축시키고, 콤비플래쉬® 상에서 시스템 DCM: DCM 중 20% MeOH, 구배 0-100%, 55분을 사용하여 정제하였다. 수율 1.429 g. 계산치 MW 3038.96, (M +2 x 18)/2=1537.48, (M +3 x 18)/3=1030.99 실측치: MS (ES, pos): 1537.97 $[M+2NH_4]^{2+}$, 1031.66 $[M+3NH_4]^{3+}$.

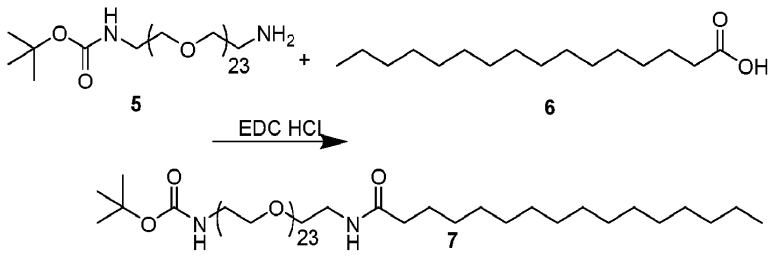
[0917] 생성물 13e를 상기 LP39에 대한 절차에 기재된 바와 같이 Fmoc-탈보호하였다. 생성물 14e를 건조시키고, 상기 LP39에 대한 절차에 기재된 바와 같이 NHS-에스테르 15c와 반응시켰다. 생성물 16e (LP59-p)를 콤비플래쉬® 정제를 이용하여 단리하였다. 계산치 MW 3215.13, (M +2 x 18)/2=1625.57, (M +3 x 18)/4=1089.71. 실측치: MS (ES, pos): 1626.30 $[M+2NH_4]^{2+}$, 1090.58 $[M+3NH_4]^{3+}$.

[0918] LP60-p의 합성



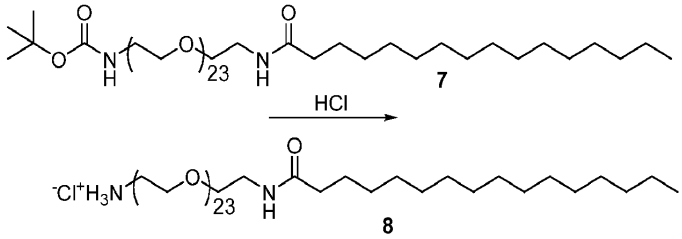
[0919]

[0920] DCM 중 화합물 1 (278 mg) 및 2 (1.00 g)의 용액에 화합물 3 (DIPEA, 0.223 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 TLC에 의해 2의 완전한 전환이 관찰될 때까지 교반하였다. 생성물을 표준 후처리 (1N HCl, 포화 $NaHCO_3$, 염수)를 사용하여 추출하고, Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 조 화합물 4를 직접 후속 단계에 사용하였다.



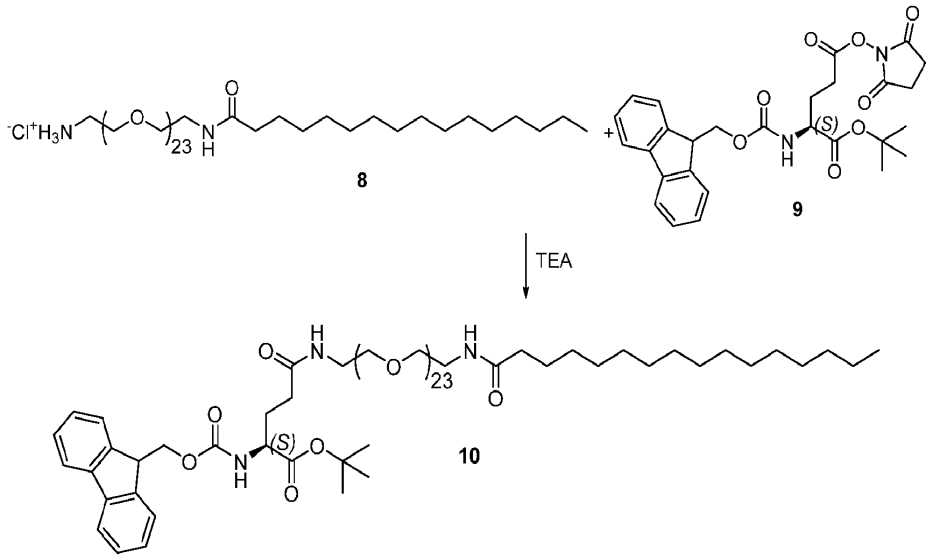
[0921]

[0922] 무수 DCM (10 mL) 중 화합물 5 (2500 mg, 2.130 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 6 (655 mg, 2.556 mmol, 1.2 당량)의 용액에 실온에서 EDC HCl (630 mg, 3.195 mmol, 1.5 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하였다. 반응 혼합물을 농축시켰다. 생성물을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-20% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1411.95, 실측치 1413.64.



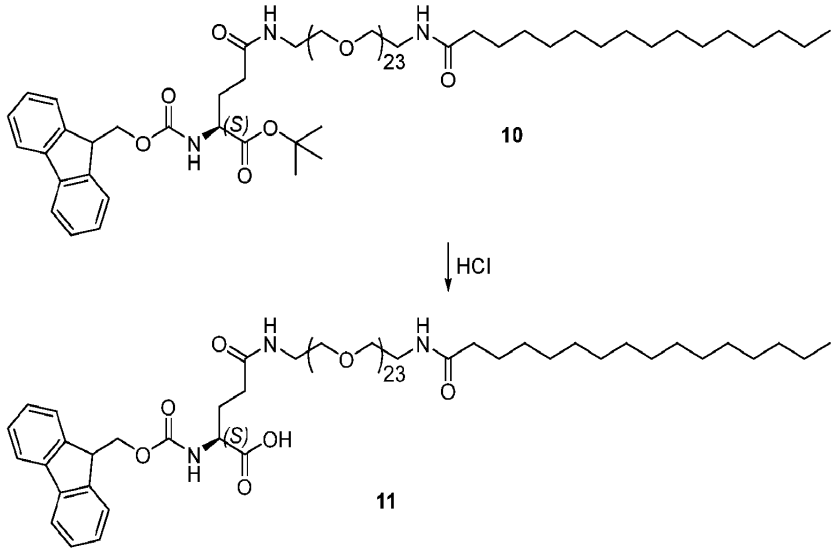
[0923]

[0924] 화합물 7의 고체 (2100 mg, 1.487 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 HCl 용액 (7.438 mL, 29.75 mmol, 20 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하고, 용매를 농축시켰다. 화합물 8을 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1311.90, 실측치 1312.95.



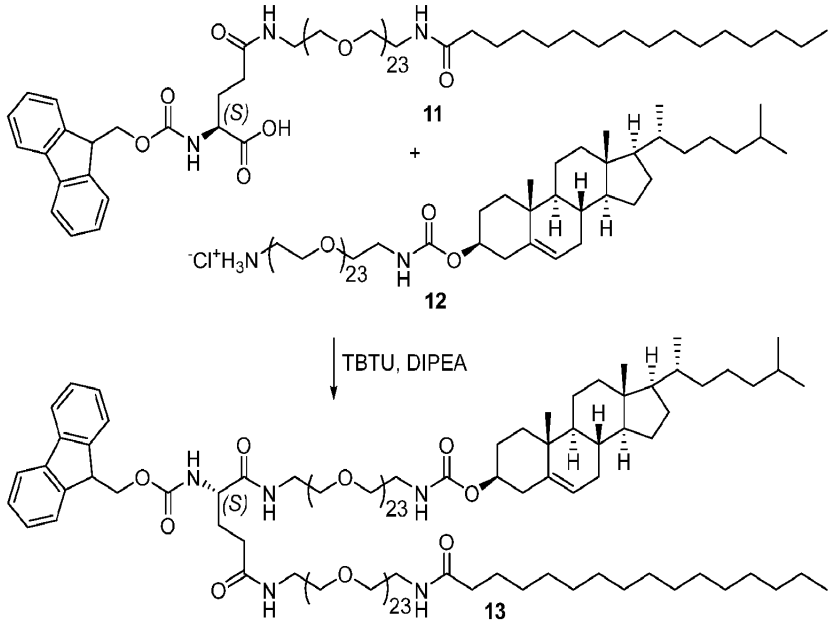
[0925]

[0926] 무수 DCM (10 mL) 중 화합물 8 (1210 mg, 0.897 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 9 (539 mg, 1.032 mmol, 1.15 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (0.381 mL, 2.692 mmol, 3.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하였다. 유기 상을 포화 NH_4Cl 및 포화 $NaHCO_3$ 수용액으로 세척하였다. 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 화합물 10을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-20% 메탄올로 용리시키면서 분리하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1719.07, 실측치 1719.42.



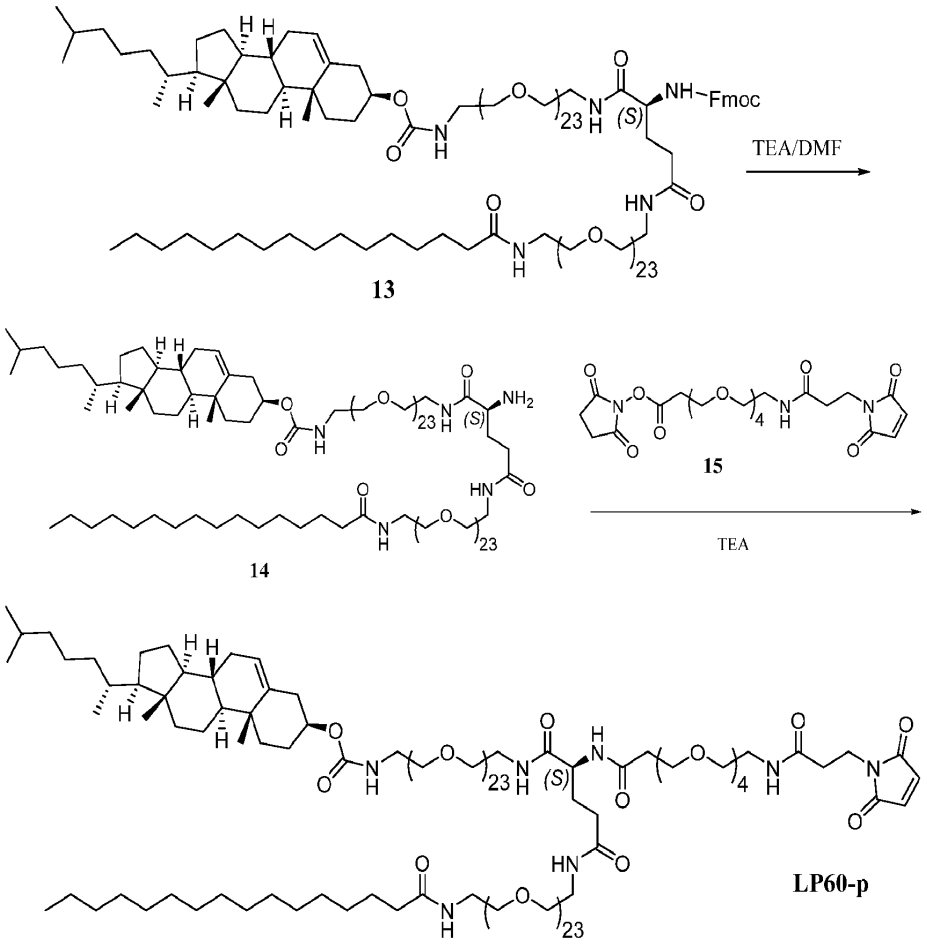
[0927]

[0928] 화합물 10 (1100 mg, 0.639 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 4M HCl (3.199 mL, 12.796 mmol, 20 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 8시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 농축시켰다. 화합물 11을 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+H]+ 계산치 1663.01, 실측치 1664.00.



[0929]

[0930] DMF (10 mL) 중 화합물 11 (1060 mg, 0.637 mmol, 1.0 당량), 화합물 12 (970 mg, 0.637 mmol, 1.00 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (0.444 mL, 2.549 mmol, 4.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (245 mg, 0.764 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 농축시켰다. 잔류물을 포화 염화암모늄 및 중탄산나트륨 수용액으로 세척하였다. 화합물 13을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 10-20% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+2H]/2 계산치 1565.50, 실측치 1567.13.

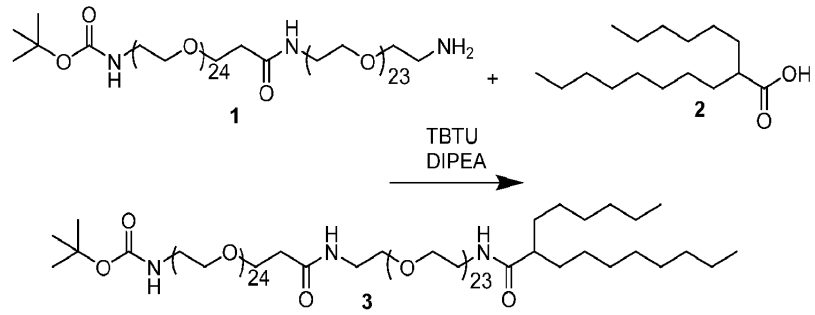


[0931]

[0932] DMF 4 mL 중 화합물 13 (1.05 g)의 용액에 TEA 1 mL을 실온에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하고, 용매를 진공 하에 제거하여 화합물 14를 수득하였다. 화합물 14를 추가 정제 없이 사용하였다.

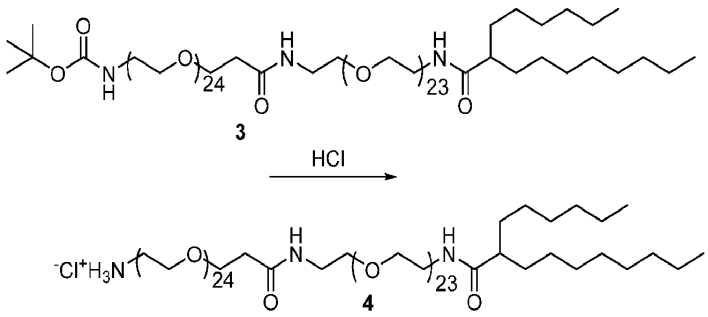
[0933] 6 mL DCM 중 화합물 14 (585 mg)의 용액에 실온에서 화합물 15 (124 mg) 및 TEA (0.085 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 생성물을 표준 후처리 (1N HCl, 포화 $NaHCO_3$, 염수)를 사용하여 추출하고, Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. LP60-p를 칼럼 크로마토그래피에 의해 추가로 정제하였다.

[0934] LP61-p의 합성



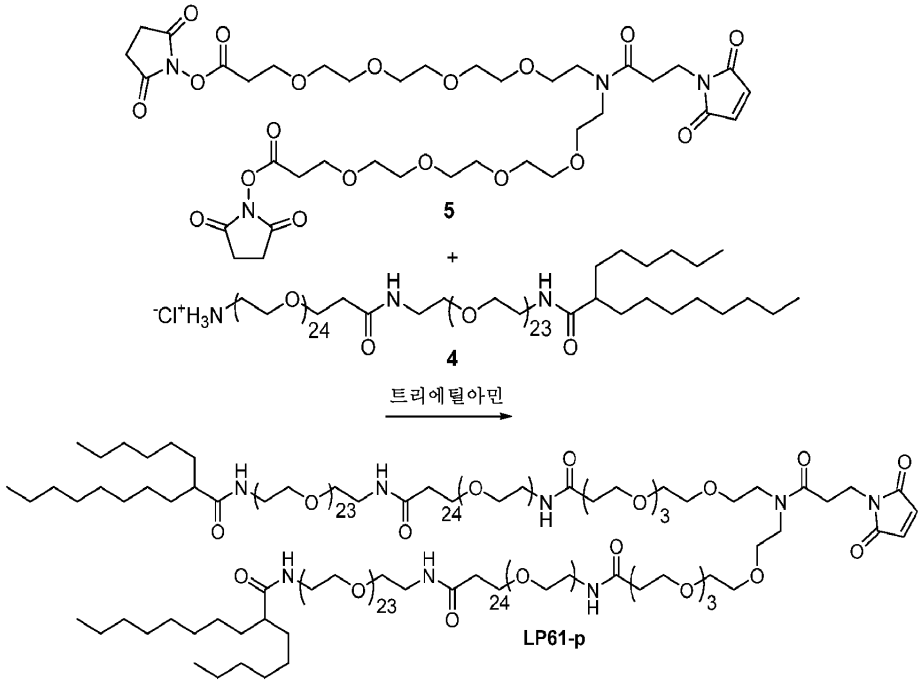
[0935]

[0936] 무수 DMF (2 mL) 중 화합물 1 (124 mg, 0.0539 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (19.5 mg, 0.0646 mmol, 1.2 당량), 및 디이소프로필에틸아민 (0.028 mL, 0.161 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (20.8 mg, 0.0646 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 포화 중탄산나트륨 수용액으로 켄칭하였다. 수성 상을 DCM (3 x 10 mL)으로 추출하고, 합한 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 화합물 3을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 10-12% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+2H]+/2 1270.31, 실측치 1269.15.



[0937]

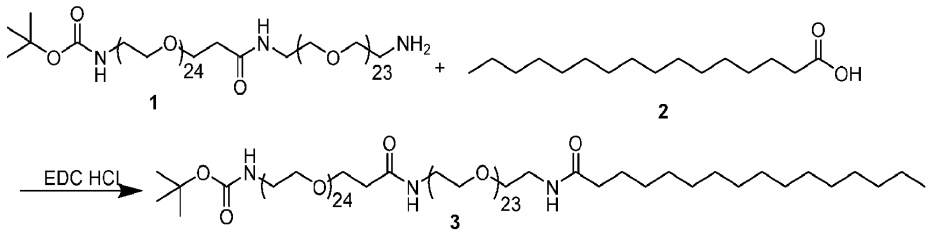
[0938] 화합물 3 (56 mg, 0.0220 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 4M HCl (0.276 mL, 1.102 mmol, 50 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+2H]/2 계산치 1220.28, 실측치 1221.63.



[0939]

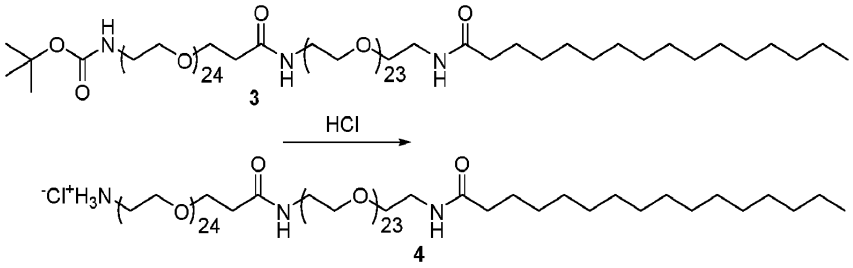
[0940] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 5 (10 mg, 0.0116 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 6 (59.1 mg, 0.0239 mmol, 2.05 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (0.008 mL, 0.0931 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 4시간 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. LP61-p를 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-15% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+6H]+/6 918.57, 실측치 919.69.

[0941] LP62-p의 합성



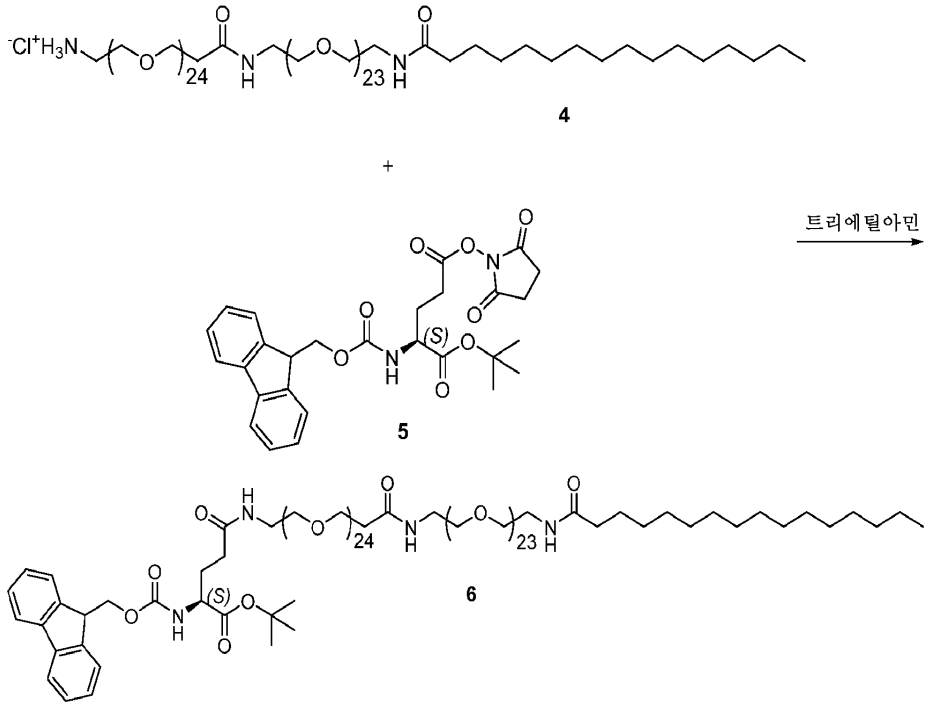
[0942]

[0943] 무수 DCM (10 mL) 중 화합물 1 (1500 mg, 0.6517 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 2 (200 mg, 0.782 mmol, 1.2 당량)의 용액에 실온에서 EDC HCl (192 mg, 0.997 mmol, 1.5 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 3을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-20% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+2H]+/2 1270.31, 실측치 1271.43.



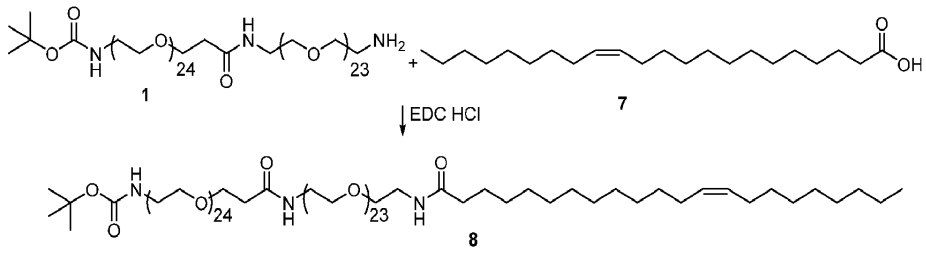
[0944]

[0945] 화합물 3 (1300 mg, 0.511 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 4M HCl (6.397 mL, 25.588 mmol, 50 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+2H]/2 계산치 1220.28, 실측치 1221.87.



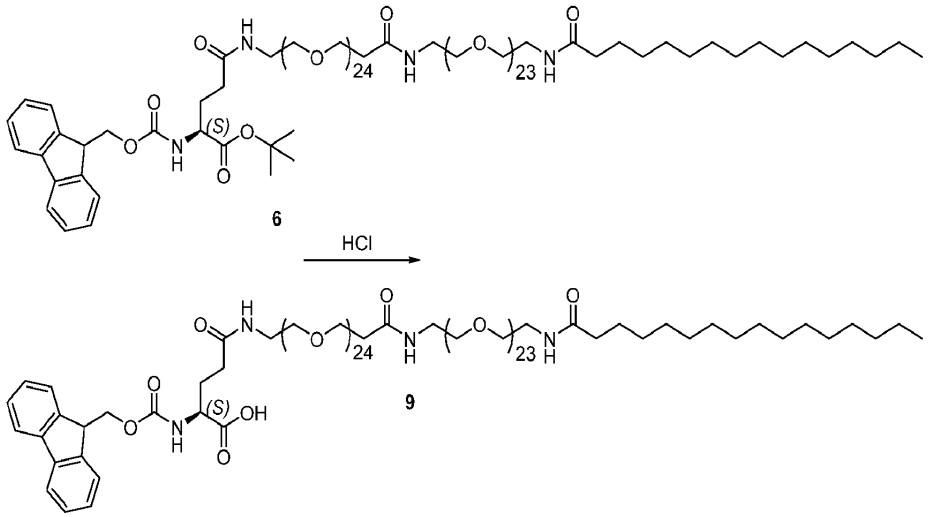
[0946]

[0947] 무수 DCM (10 mL) 중 화합물 4 (1350 mg, 0. mmol, 1.0 당량) 및 화합물 5 (327 mg, 0.626 mmol, 1.15 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (0.231 mL, 1.625 mmol, 3.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 6을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-20% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+3H]/3 949.58, 실측치 950.77.



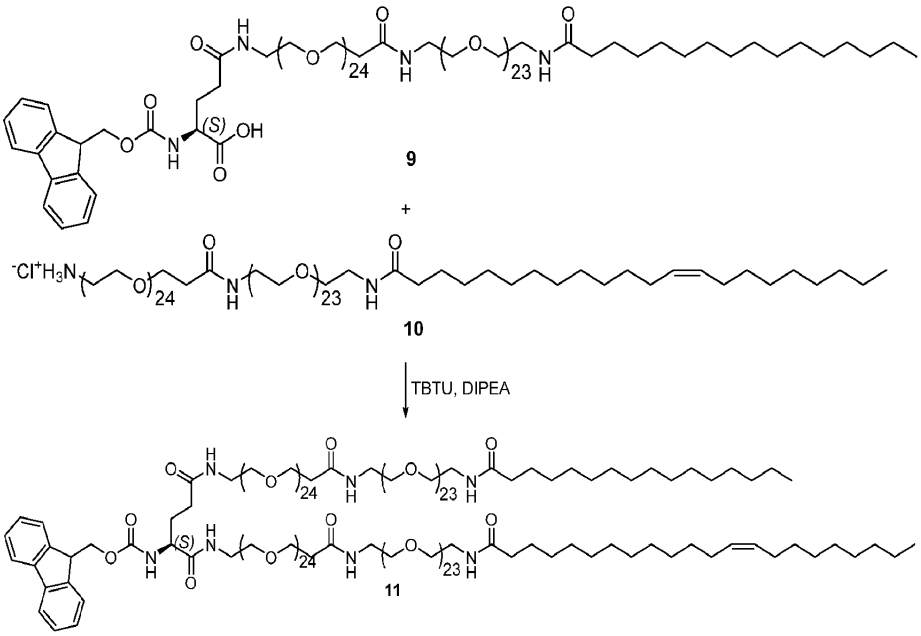
[0948]

[0949] 무수 DCM (10 mL) 중 화합물 1 (1500 mg, 0.6517 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 7 (265 mg, 0.782 mmol, 1.2 당량)의 용액에 실온에서 EDC HCl (192 mg, 0.997 mmol, 1.5 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 생성물 화합물 8을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-20% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+2H]+/2 1311.35, 실측치 1311.87.



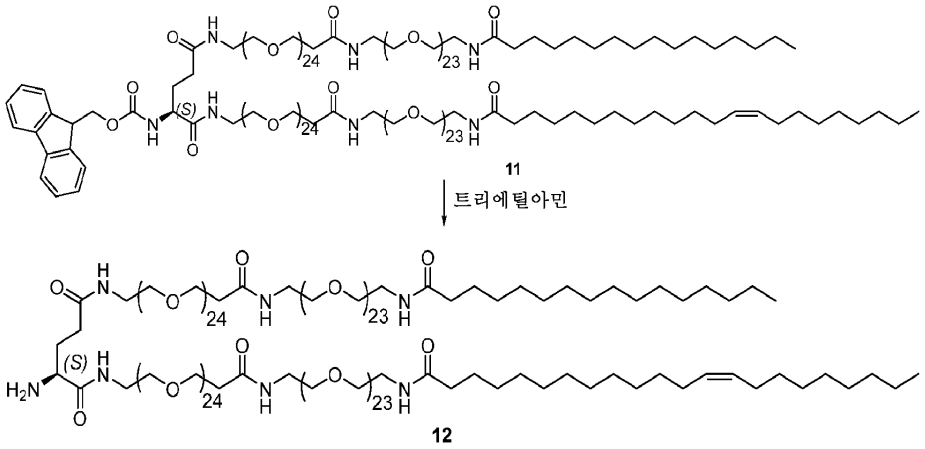
[0950]

[0951] 화합물 6 (1220 mg, 0.428 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 4M HCl (2.142 mL, 8.568 mmol, 20 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 5시간 동안 유지하였다. 이어서 반응 혼합물을 농축시켰다. 화합물 9를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+3H]/3 계산치 930.89, 실측치 932.29.



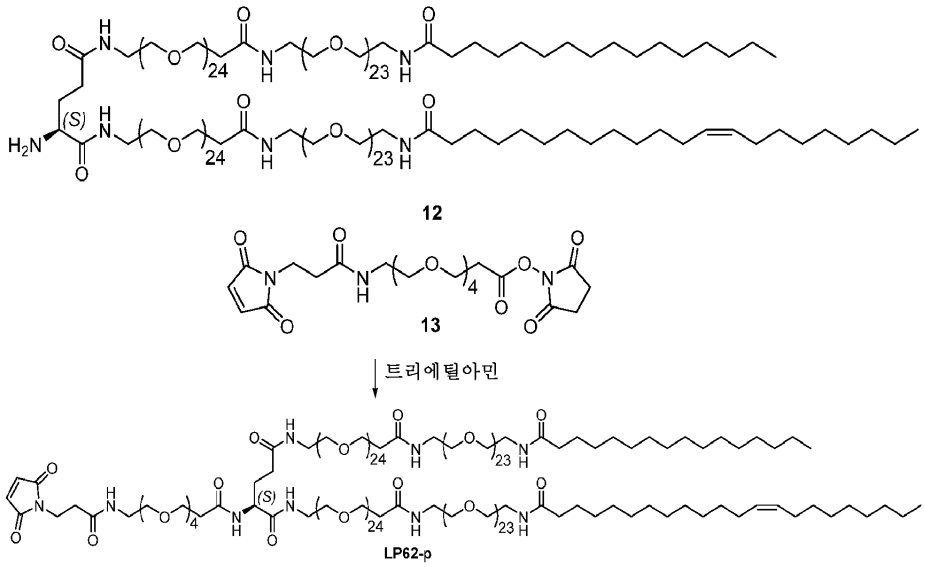
[0952]

[0953] DMF (10 mL) 중 화합물 9 (800 mg, 0.286 mmol, 1.0 당량), 화합물 10 (화합물 8로부터 통상의 탈보호 조건 하에 제조됨; 733 mg, 0.286 mmol, 1.00 당량), 및 디이소프로필에틸아민 (0.150 mL, 0.859 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (110 mg, 0.344 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하였다. 이어서 반응 혼합물을 농축시켰다. 화합물 11을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 10-20% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+5H]/5 계산치 1059.46, 실측치 1060.94.



[0954]

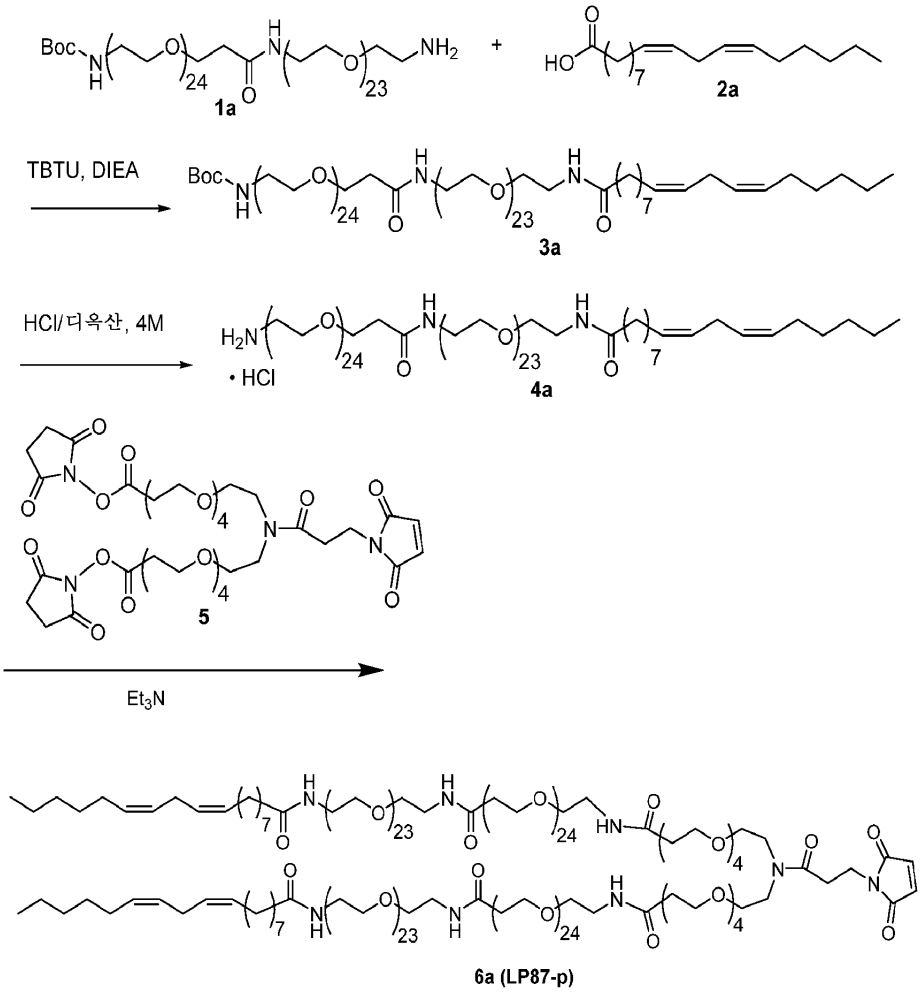
[0955] 무수 DMF (4 mL) 중 화합물 11 (914 mg, 0.172 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (1 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 화합물 12를 직접 추가 정제 없이 사용하였다. LC-MS: [M+5H]/5 계산치 1015.05, 실측치 1016.41.



[0956]

[0957] 무수 DCM (20 mL) 중 화합물 12 (875 mg, 0.172 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 13 (97.5 mg, 0.189 mmol, 1.1 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (0.073 mL, 0.517 mmol, 3.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하고, 용매를 농축시켰다. LP62-p를 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-20% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+5H]/5 1094.68, 실측치 1095.98.

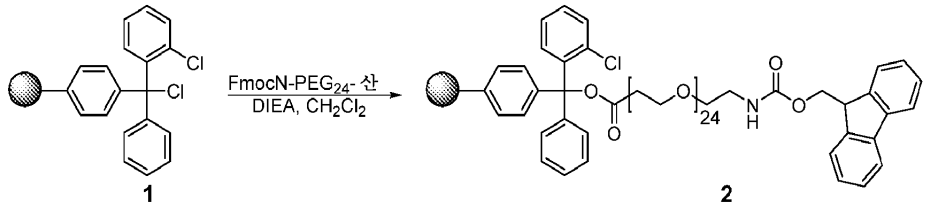
[0958] LP87-p의 합성



[0959]

[0960] 고체 TBTU (50 mg, 0.156 mmol)를 DMF (9 mL) 중 Boc-보호된 PEG_{47}-아민 1a (퀀타 바이오디자인 리미티드, 300 mg, 0.13 mmol), 리놀레산 2a (37 mg, 0.13 mmol) 및 DIEA (68 μL mL, 0.39 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 초음파처리하여 고체를 용해시키고, 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 톨루엔을 잔류물로부터 2회 증발시켰다. 잔류물을 클로로포름 (50 mL) 중에 용해시키고, $NaHCO_3$ (2 x 10 mL) 및 염수 (10 mL)로 세척하였다. 생성물을 건조시키고 (Na_2SO_4), 진공 하에 농축시키고, 콤비플래쉬® (SiO_2) 상에서 시스템 DCM 중 0-20% MeOH, 구배 0-80%, 20분을 사용하여 정제하였다. 계산치 MW 2564.22, (M +2 x 18)/2=1300.1, (M +3 x 18)/3=872.74 실측치: MS (ES, pos): 1299.74 $[M+2NH_4]^{2+}$, 873.04 $[M+3NH_4]^{3+}$. 화합물 3a (195 mg, 0.0764 mmol)를 빙냉 4M HCl/디옥산 용액 (5 mL)으로 처리한 다음, 실온에서 1시간 동안 교반하여 아민 히드로클로라이드 4b로 전환시켰다. 반응 혼합물을 농축시키고, 진공 하에 건조시키고, 잔류 HCl을 생성물로부터 톨루엔의 2회 증발에 의해 제거하였다. 건조 아민 히드로클로라이드 염을 무수 DMF (5 mL) 중에 용해시키고, 비스-NHS 에스테르 5 (28 mg, 0.033mmol) 및 Et_3N (28 uL, 0.198 mmol)을 첨가하고, 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 톨루엔을 잔류물로부터 2회 증발시키고, 생성물 6a (LP87-p)를 콤비플래쉬® 상에서 시스템 DCM 중 0-20% MeOH, 구배 0-100%, 30분을 사용하여 정제하였다. 계산치 MW 5556.9, (M +3 x 18)/3=1870.50, (M +4 x 18)/4=1407.23 실측치: MS (ES, pos): 1870.50 $[M+3NH_4]^{3+}$, 1407.40 $[M+4NH_4]^{4+}$.

[0961] LP89-p의 합성



[0962]

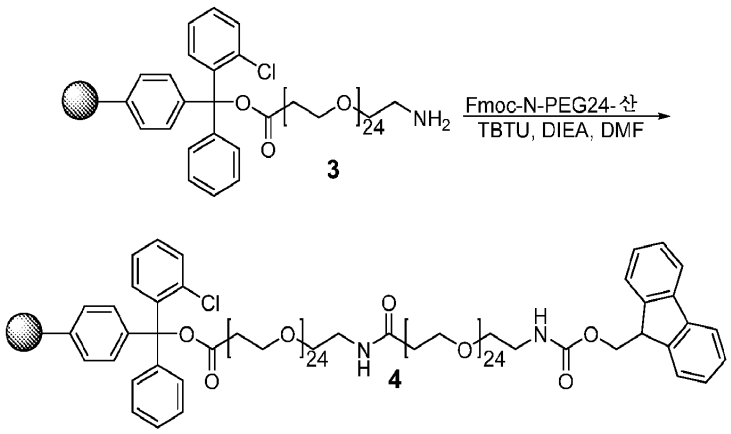
[0963] 25 mL 소결 펩티드 합성 용기에 2-클로로트리틸 클로라이드 수지 1 (0.4589 g, 1.46 mmol/g, 0.670 mmol)을 첨가하였다. 수지를 DCM 중에서 팽윤시키고, 배수시킨 후, Fmoc-N-아미도-PEG_{24}-산 (0.9170 g, 0.670 mmol, 1 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (DIEA) (0.584 mL, 3.35 mmol, 5 당량)을 첨가하였다. 플라스크를 1시간 동안 요동시킨 후, 메탄올 (0.367 mL, 0.8 mL/g 수지)을 첨가하여 임의의 잔류 트리틸 수지를 캡핑하였다. 40분 후, 플라스크를 배수시키고, DCM으로 3회, DMF로 2회, DCM으로 2회, 및 MeOH로 3회 (각 세척당 대략 5 mL) 세척하였다. 수지를 고진공 하에 밤새 건조시켰다.

[0964] 수지 로딩: 수지 11.5 mg를 0.8 mL DMF 중에 현탁시키고, 15분 동안 팽윤시켰다. 0.2 mL 피페리딘을 첨가하고, 혼합물을 15분 동안 정치하였다. 10x 희석물을 DMF에 녹이고, UV-vis 스펙트럼을 수득하였다, A = 2.66 (대략). 0.273 mmol의 규모에 대해 수지 로딩은 0.297 mmol/g인 것으로 계산되었고, 수지는 총 919 mg였다.



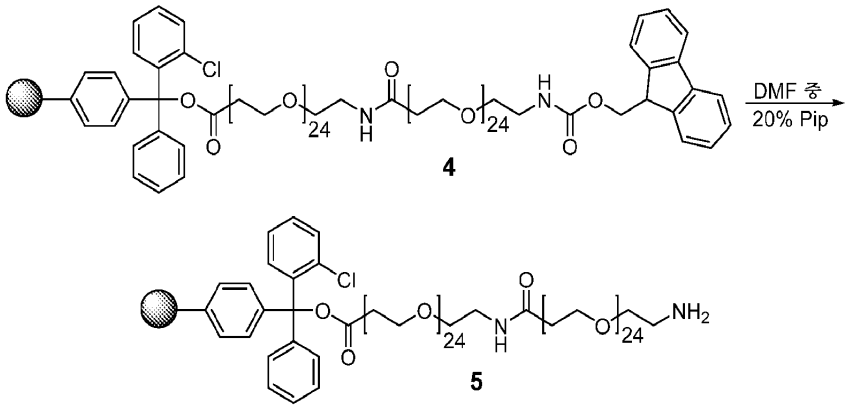
[0965]

[0966] 수지 2를 DCM/DMF/피페리딘 1:1:2, 9.6 mL 중에 현탁시켰다. 30분 동안 진탕시킨 후, 용액을 배수시키고, 수지를 DMF (4 x 9.2 mL)로 세척하였다.



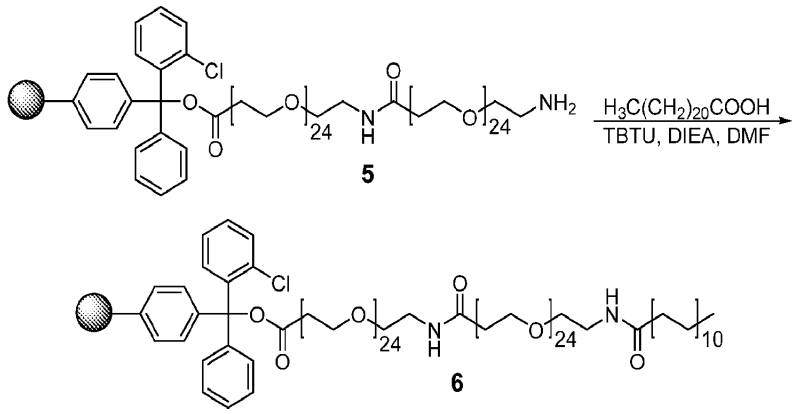
[0967]

[0968] Fmoc-N-아미도-PEG24-산 (0.7473 g, 0.5460 mmol, 2 당량), TBTU (0.1753 g, 0.5460 mmol, 2 당량), 및 DIEA (0.190 mL, 1.092 mmol, 4 당량)를 DMF (7.6 mL) 중에서 합하고, 2-3분 동안 혼합한 후, 용액을 합성 플라스크 내의 수지에 첨가하였다. 플라스크를 1시간 동안 진탕시킨 후, 황색빛 오렌지색 용액을 오렌지색 수지로부터 배출하였다. 수지를 DMF 및 MeOH (각각 3 x 8.6 mL)로 세척한 다음, 고진공 하에 밤새 건조시켰다. 1.277 g 수지, 이론치 1.227 g. 생성물 질량을 마이크로절단 후 LC-MS에 의해 관찰하였다.



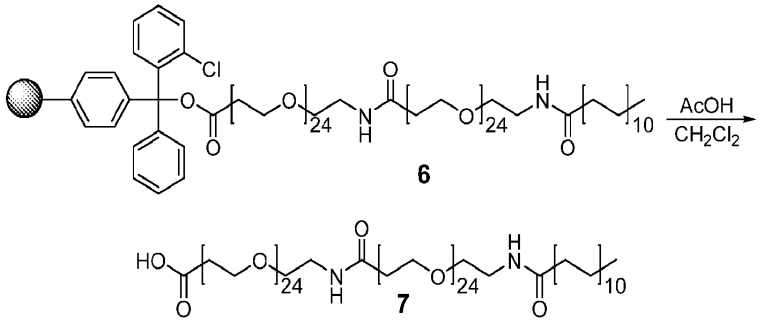
[0969]

[0970] 수지를 DMF 중 20% 피페리딘 (12.3 mL)으로 30분 동안 처리한 다음, DMF (4 x 12.3 mL)로 세척하였다.



[0971]

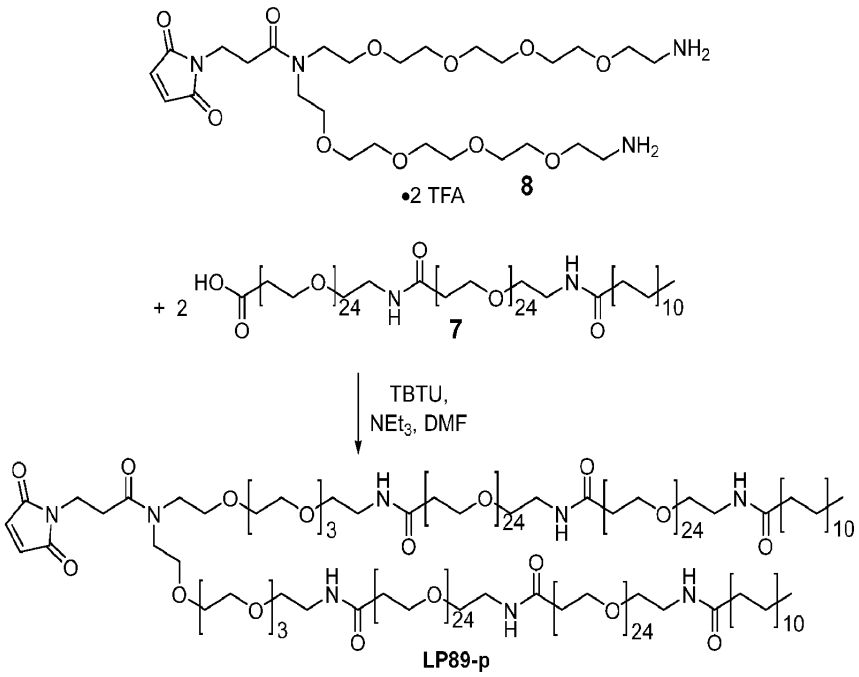
[0972] 베헨산 (0.186 g, 0.546 mmol, 2.0 당량), TBTU (0.175 g, 0.546 mmol, 2 당량) 및 DIEA (0.190 mL, 1.092 mmol, 4 당량)를 DMF (10.7 mL) 중에 용해시켰다. 용액을 수지에 첨가하였다. 용액 바이알을 DMF로 헹구고, 수지 (2 x 1 mL)에 첨가하였다. 혼합물을 75분 동안 진탕시킨 다음, 배수시키고, DMF, THF, 및 MeOH (각각 3 x 13 mL)로 세척하였다. 수지를 고진공 하에 건조시켰다 (90분). 1.351 g 수득됨, 이론치 1.254 g. 생성물 질량 (및 출발 물질 질량 없음)을 마이크로절단 후 LC-MS에서 관찰하였다.



[0973]

[0974] 수지를 DCM (11 mL) 및 AcOH (1.1 mL)로 30분 동안 처리한 다음, 배수시켰다. 이 절단을 총 4회 반복한 다음, 수지를 8 mL CH_2Cl_2, 1 mL AcOH, 및 1 mL 2,2,2-트리플루오로에탄올로 처리하고, 30분 동안 진탕시키고, 배수시켰다. 이러한 절단을 재차 반복하였다. 모든 절단으로부터의 용액을 합하고, 농축시켜 530.8 mg를 수득하였으며, 이를 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

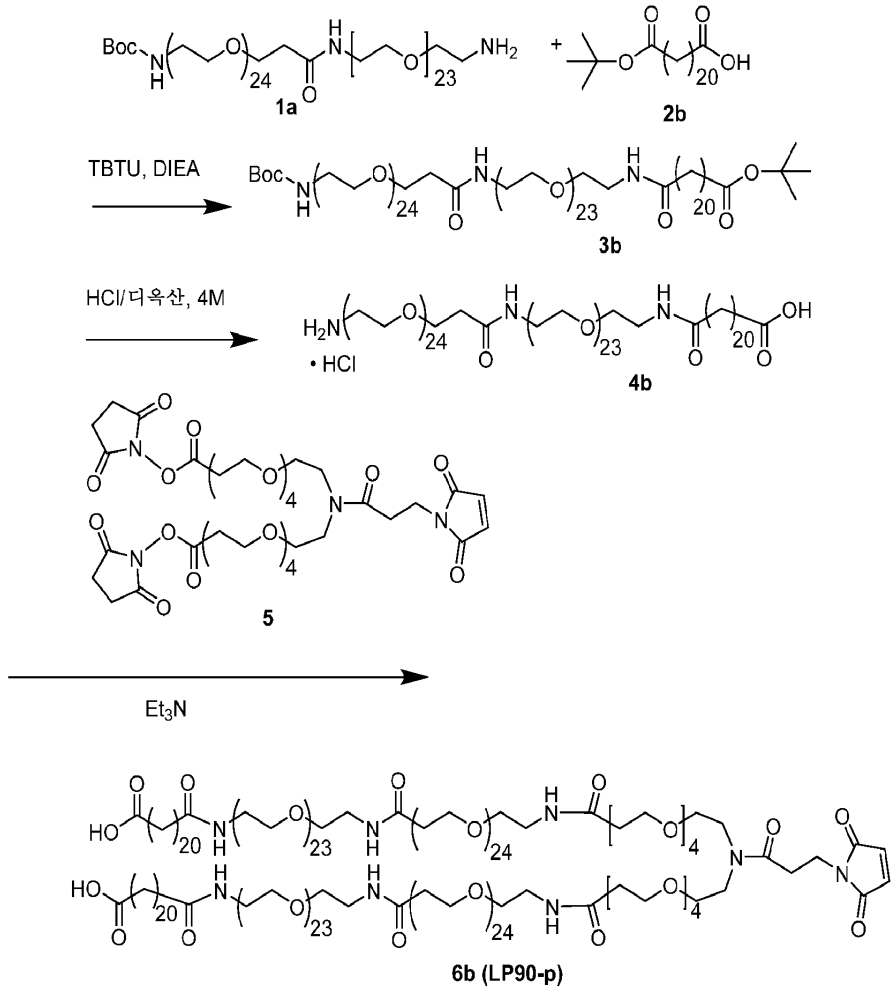
[0975] 조 화합물을 실리카 칼럼 (24 g) 상에 로딩하고, CH_2Cl_2 중 0-20% MeOH로 용리시켰다. 깨끗한 분획을 합하여 목적 화합물 69.9 mg를 수득하였다.



[0976]

[0977] 바이알에 N-말-N-비스(PEG4)아민 TFA 염 (10.7 mg, 0.0128 mmol, 1 당량), 산-PEG_{24}-아미도-PEG_{24}-C_{22} (69.9 mg, 0.0269 mmol, 2.1 당량), TBTU (10.3 mg, 0.0320 mmol, 2.5 당량), NEt_3 (5.4 uL, 0.0385 mmol, 3 당량), 및 CH2C12 (1 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 24시간 동안 교반한 다음, NEt_3 (5.4 uL, 0.0385 mmol, 3 당량)를 첨가하였다. 대략 50시간 후, 반응 혼합물을 농축시키고, 칼럼 크로마토그래피, DCM 중 0-30% MeOH에 의해 정제하여 LP89-p (44%) 32.8 mg를 수득하였다.

[0978] LP90-p의 합성



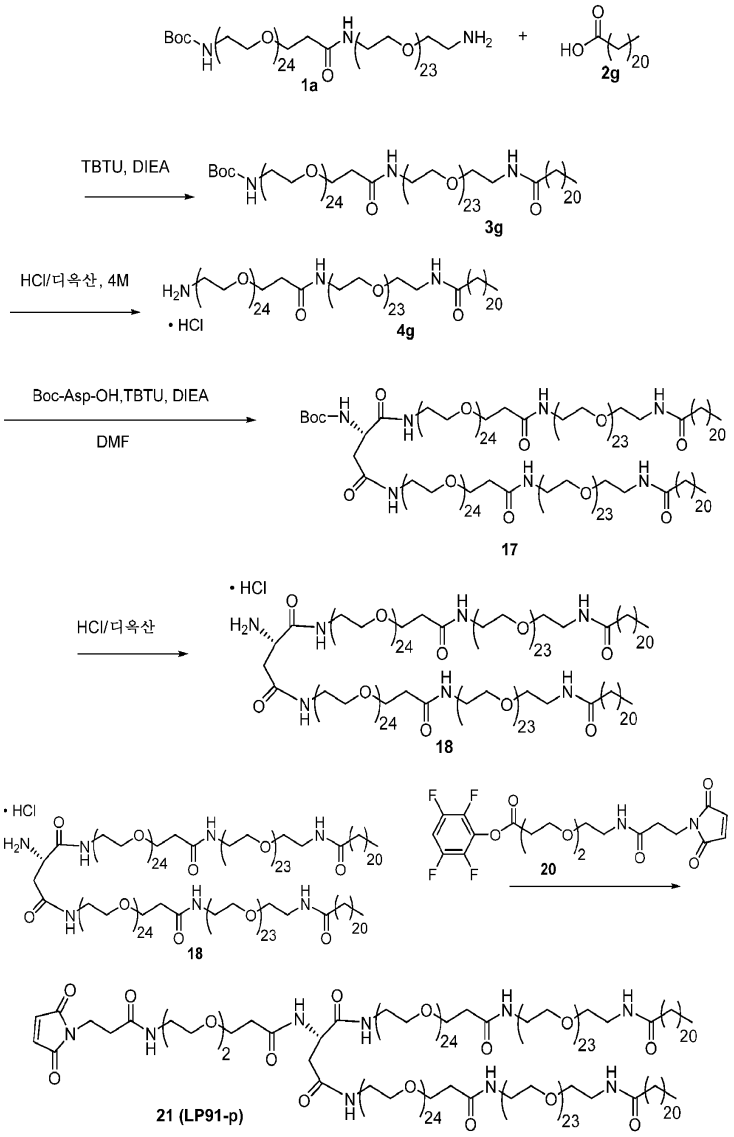
[0979]

[0980] 고체 TBTU (50 mg, 0.156 mmol)를 DMF (9 mL) 중 Boc-보호된 PEG-아민 1a (퀀타 바이오디자인 리미티드, 300 mg, 0.13 mmol), 모노-보호된 도코산디오산 2b (56 mg, 0.13 mmol), 및 DIEA (68 μL mL, 0.39 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 톨루엔을 잔류물로부터 3회 증발시켰다. 잔류물을 DCM 30 (mL)에 녹이고, SiO_2 (1.6 g)와 혼합하고, 콤비플래쉬® 상에 로딩하였다. 생성물을 시스템 DCM 중 0-20% MeOH, 구배 0-100%, 45분을 사용하여 정제하였다. 계산치 MW 2710.45, (M +2 x 18)/2=1373.22, (M +3 x 18)/3=921.48 실측치: MS (ES, pos): 1373.18 $[M+2NH_4]^{2+}$, 921.37 $[M+3NH_4]^{3+}$.

[0981] 화합물 3b (238 mg, 0.088 mmol)를 빙냉 4M HCl/디옥산 용액 (6 mL)으로 처리하고, 이어서 실온에서 4시간 동안 교반하여 아미노산 히드로클로라이드 4b로 전환시켰다. 반응 혼합물을 농축시키고, 진공 하에 건조시키고, 톨루엔의 2회 증발에 의해 잔류 HCl을 잔류물로부터 제거하였다.

[0982] 건조 아민 히드로클로라이드 염 4b를 무수 DCM (5 mL) 중에 용해시키고, 비스-NHS 에스테르 5 (34.2 mg, 0.04 mmol) 및 Et_3N (55 uL, 0.4 mmol)을 첨가하고, 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 생성물 6b (LP90-p)를 콤비플래쉬® 상에서 시스템 DCM 중 0-20% MeOH, 구배 0-100%, 40분을 사용하여 정제하였다. 계산치 MW 5737.13, (M +3 x 18)/3=1930.38, (M +4 x 18)/4=1452.28 실측치: MS (ES, pos): 1930.45 $[M+3NH_4]^{3+}$, 1452.29 $[M+4NH_4]^{4+}$.

[0983] LP91-p의 합성



[0984]

[0985] 고체 TBTU (335 mg, 1.043 mmol)를 DMF (16 mL) 중 Boc-보호된 PEG_{47}-아민 1a (2 g, 0.869 mmol), 베헨산 2 g (296 mg, 0.87 mmol) 및 DIEA (454 μL mL, 2.067 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 초음파처리하여 고체를 용해시키고, 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 톨루엔을 잔류물로부터 2회 증발시켰다. 잔류물을 클로로포름 (150 mL) 중에 용해시키고, $NaHCO_3$ (2 x 30 mL) 및 염수 (30 mL)로 세척하였다. 생성물 3 g를 건조시키고 (Na_2SO_4), 진공 하에 농축시키고, 콤비플래쉬® (SiO2) 상에서 DCM 중 시스템 0-20% MeOH, 구배 0-80%, 35분을 사용하여 정제하였다. 계산치 MW 2624.36, (M +2 x 18)/2=1330.18, (M +3 x 18)/4=892.79. 실측치: MS (ES, pos): 1330.58 $[M+2NH_4]^{2+}$, 893.21 $[M+3NH_4]^{3+}$.

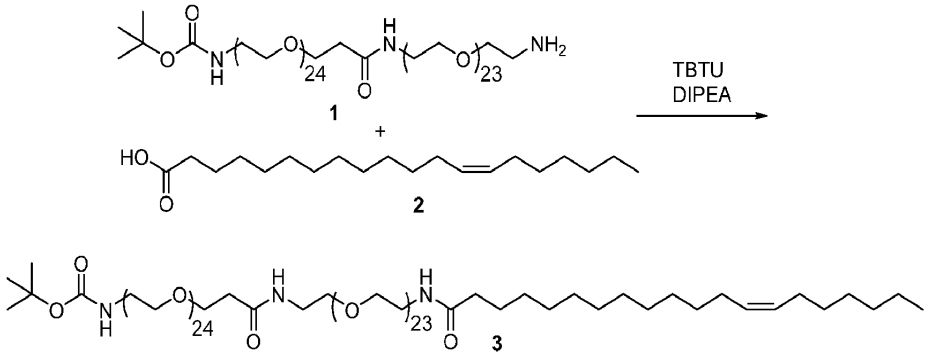
[0986] 화합물 3 g (1.862 g)를 상기 LP39-p에 대한 절차에 기재된 바와 같이 디옥산 중 4 M HCl 용액 (10 mL)으로 처리하여 아민 히드로클로라이드 4 g로 전환시켰다.

[0987] 건조 염 4 g의 분취물 (227 mg, 0.089 mmol))을 LP54-p의 제조에 기재된 바와 같이 Boc-Asp-OH (10 mg, 0.043 mmol), TBTU (32 mg, 0.099 mmol), 및 DIEA (96 uL, 0.55 mmol)와 합하여 화합물 17, 수율 152 mg (0.029 mmol)을 수득하였다. 이 생성물을 상기 LP54-p의 합성에 기재된 바와 같이 14c의 제조에서와 같이 HCl/디옥산 용액으로 처리하여 히드로클로라이드 염 18 (수율 100%)을 수득하였으며, 이를 직접 하기 단계에 사용하였다. 계산치 MW 5145.57, (M +3)/3=1716.19, (M +4)/4=1287.23. 실측치: MS (ES, pos): 1715.91 $[M+3H]^{3+}$,

1287.23 $[M+4H]^{4+}$.

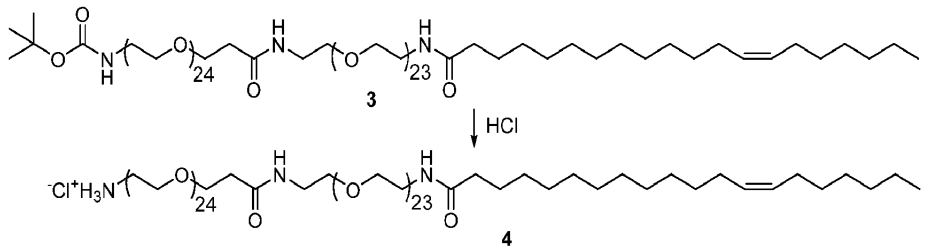
[0988] 히드로클로라이드 염 18 (0.029 mmol)을 상기 LP54-p의 합성에서 16c에 대해 기재된 바와 같이 테트라플루오로페닐 에스테르 20 (퀀타 바이오디자인, 15 mg, 0.032 mmol) 및 Et_3N (12 uL, 0.087 mmol)과 합하였다. 생성물 21 (LP91-p)을 콤비플래쉬® 상에서 정제하였다. 수율 40 mg. 계산치 MW 5455.87, (M +4)/4=1364.97, (M +5)/5=1092.17. 실측치: MS (ES, pos): 1364.66 $[M+4H]^{4+}$, 1092.05 $[M+4H]^{4+}$.

[0989] LP92-p의 합성



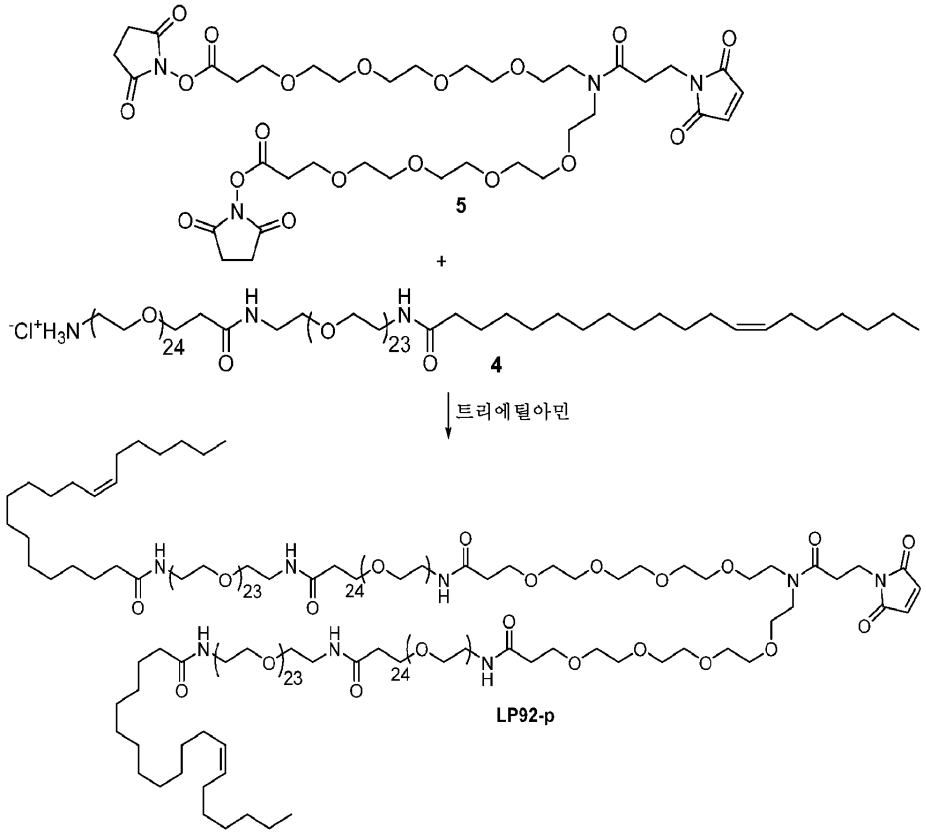
[0990]

[0991] 무수 DMF (3 mL) 중 화합물 1 (140 mg, 0.0608 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (20.8 mg, 0.0669 mmol, 1.1 당량), 및 디이소프로필에틸아민 (0.032 mL, 0.182 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (23.4 mg, 0.073 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 농축시켰다. 화합물 3을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-18% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+2H]+/2 1297.33, 실측치 1297.19.



[0992]

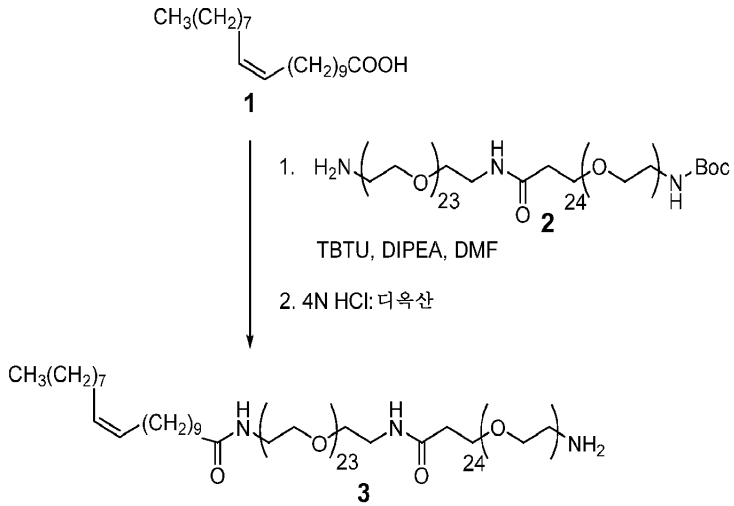
[0993] 화합물 3의 고체 (90 mg, 0.0347 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 HCl 용액 (0.434 mL, 1.734 mmol, 50 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+2H]+/2 1247.30, 실측치 1247.98.



[0994]

[0995] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 5 (14 mg, 0.0163 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 4 (84.6 mg, 0.0334 mmol, 2.05 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (0.012 mL, 0.0815 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. LP92-p를 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-18% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+5H]+/5 1123.70, 실측치 1124.10, 계산치 [M+6H]+/6 936.58, 실측치 937.22.

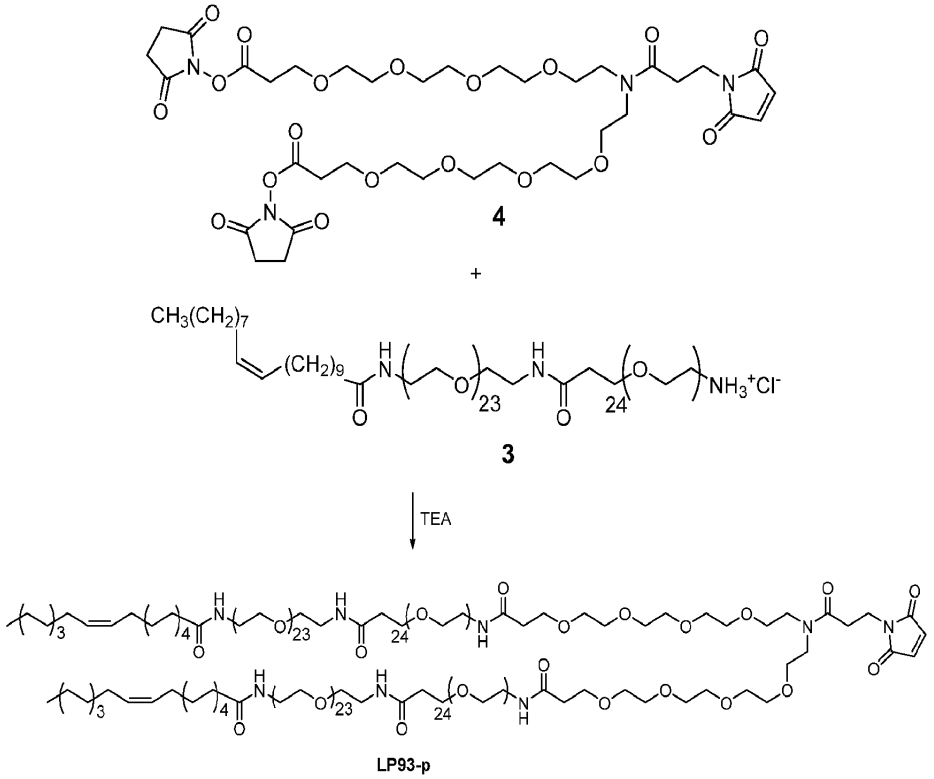
[0996] LP93-p의 합성



[0997]

[0998] DMF (2.0mL) 중 Boc-PEG47-NH2 2 (223mg, 0.1mmol)의 용액 중 시스-11-에이코센산 1 (30mg, 0.0979mmol)에 TBTU (37.2mg, 0.115mmol) 및 DIPEA (50uL)를 첨가하였다. 생성된 현탁액을 밤새 교반한 후, 물을 첨가하였다. 혼합물을 DCM:20%TFE를 사용하여 추출하고, 합한 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 용매를 진공 하에 제거하여 건조시키고, 조 생성물을 플래쉬 크로마토그래피 (DCM 중 20% MeOH)에 의해 정제하였다. 생성물에 탈보호가 LC-MS에 의해 완결된 것으로 결정될 때까지 무수 조건 하에 4N HCl:디옥산 2 mL

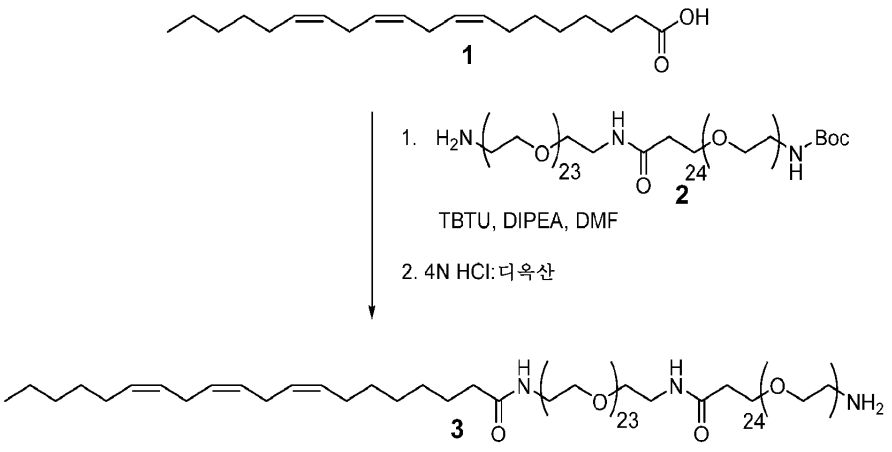
을 첨가하였다: 2550.28 m/z에 대한 계산치 [M+H]+, 실측치 2551.



[0999]

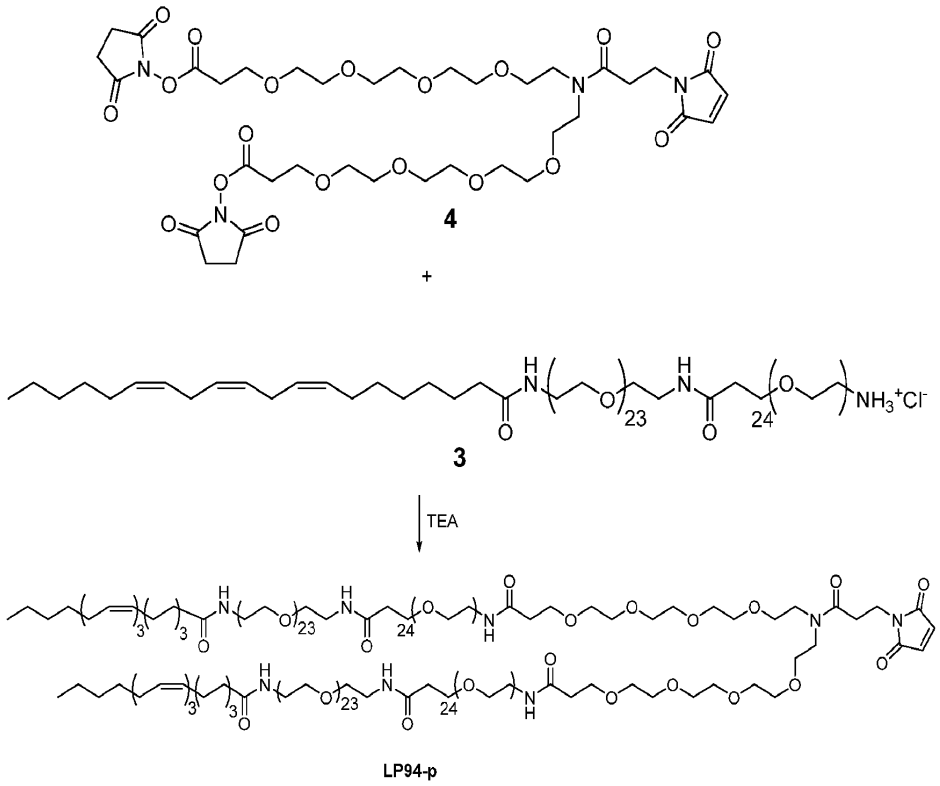
[1000] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 4 (19mg, 0.0221 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 3 (16 mg, 0.0454 mmol, 2.05 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (16 uL, 0.1106 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. LP93-p를 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 10-17% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다.

[1001] LP94-p의 합성



[1002]

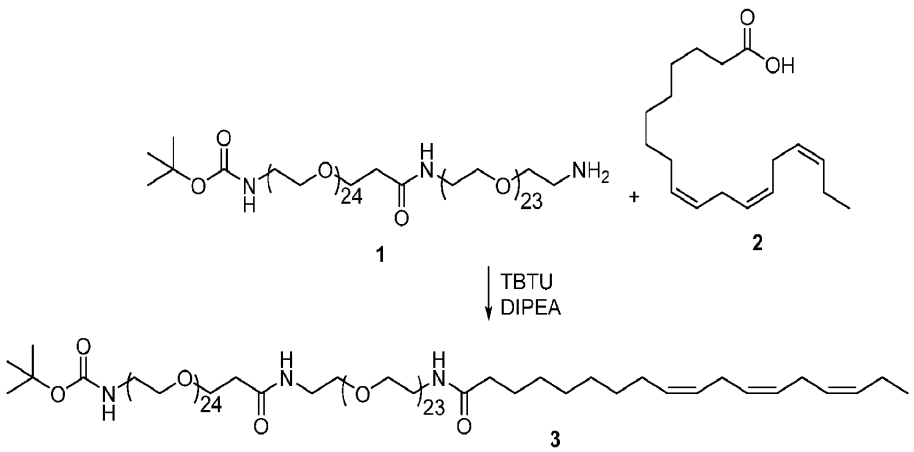
[1003] DMF (2.0mL)의 용액 중 디호모-γ-리놀렌산 1 (30mg, 0.0979mmol)에 Boc-PEG_{47}-NH_2 2 (225mg, 0.1mmol), TBTU (37.7mg, 0.117mmol) 및 DIPEA (50uL)를 첨가하였다. 생성된 현탁액을 밤새 교반한 후, 물을 첨가하였다. 혼합물을 DCM:20%TFE를 사용하여 추출하고, 합한 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 용매를 농축 건조시키고, 조 생성물을 플래쉬 크로마토그래피 (DCM:20% MeOH)에 의해 정제하였다. 생성물에 탈보호가 LC-MS에 의해 완결된 것으로 결정될 때까지 무수 조건 하에 4N HCl:디옥산 2mL을 첨가하였다: 2560.28 m/z에 대한 계산치 [M+H]+, 실측치 2561.01.



[1004]

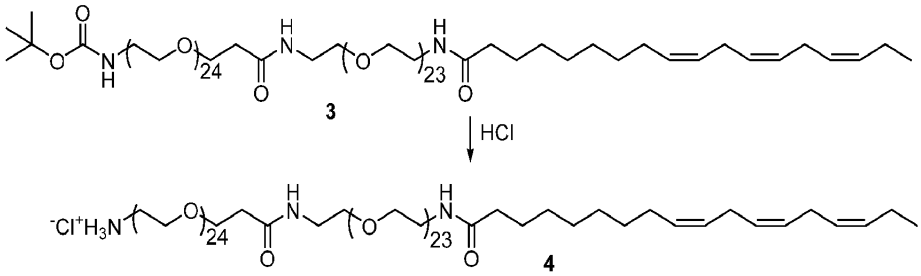
[1005] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 4 (19mg, 0.0221 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 3 (112 mg, 0.0454 mmol, 2.05 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (16 uL, 0.1106 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. LP94-p를 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 10-17% 메탄올로 용리시키면서 분리하였다.

[1006] LP95-p의 합성



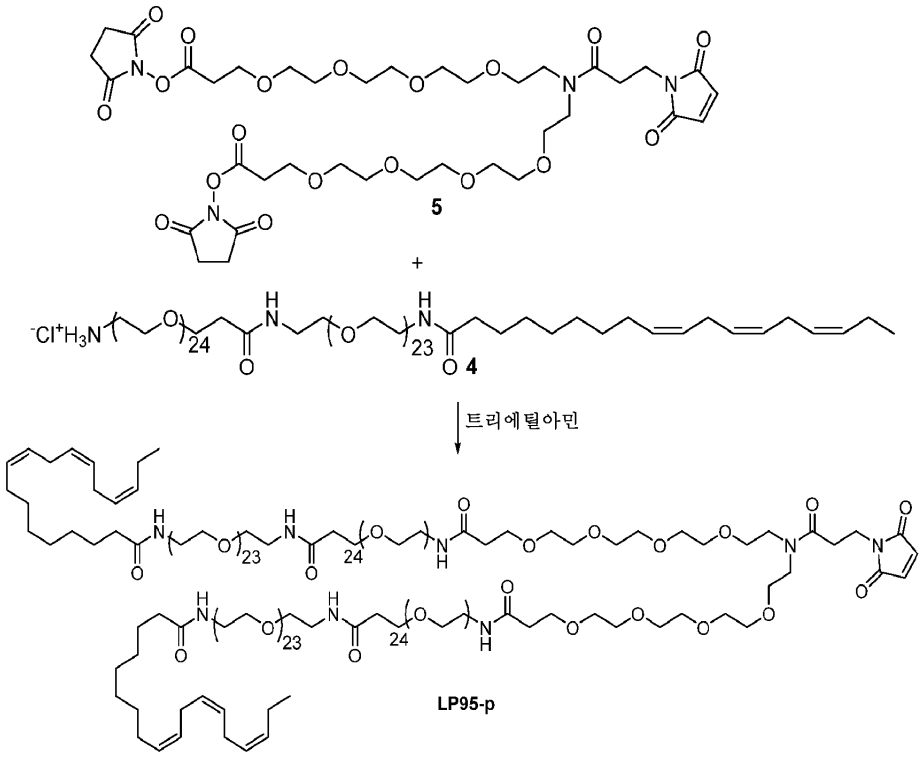
[1007]

[1008] 무수 DMF (3 mL) 중 화합물 1 (150 mg, 0.0652 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (20 mg, 0.0717 mmol, 1.1 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (0.034 mL, 0.195 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (25.1 mg, 0.0782 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하였다. 이어서 반응 혼합물을 농축시켰다. 화합물 3을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-18% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+2H]+/2 1281.30, 실측치 1281.71.



[1009]

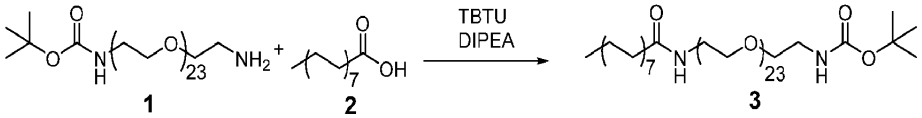
[1010] 화합물 3 (80 mg, 0.0312 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 HCl 용액 (0.390 mL, 1.561 mmol, 50 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 화합물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+2H]+/2 1231.27, 실측치 1231.65.



[1011]

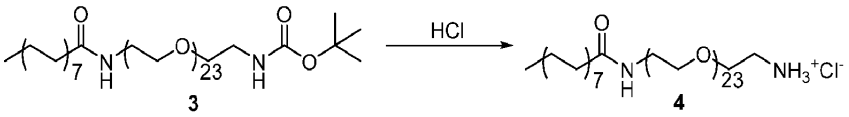
[1012] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 5 (13 mg, 0.0151 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 4 (77.5 mg, 0.0310 mmol, 2.05 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (0.011 mL, 0.0757 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. LP95-p를 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-18% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+5H]+/5 1110.88, 실측치 1111.62, 계산치 [M+6H]+/6 925.90, 실측치 926.41.

[1013] LP101-p의 합성



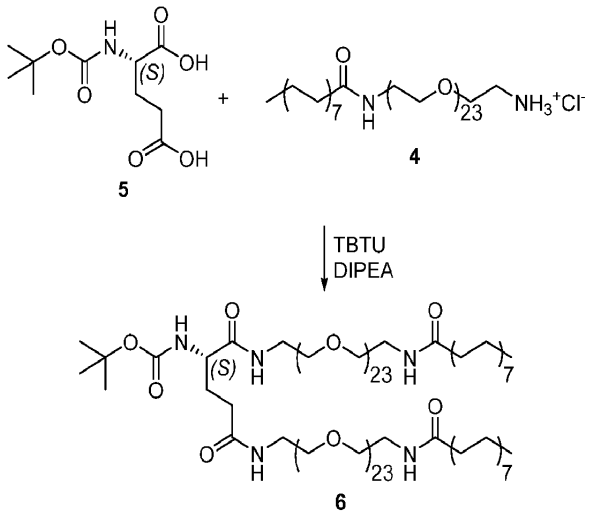
[1014]

[1015] 무수 DMF (3 mL) 중 화합물 1 (250 mg, 0.213 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (65 mg, 0.255 mmol, 1.20 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (0.111 mL, 0.629 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (102 mg, 0.319 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하였다. 화합물 3을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 6-12% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1411.95, 실측치 1411.95.



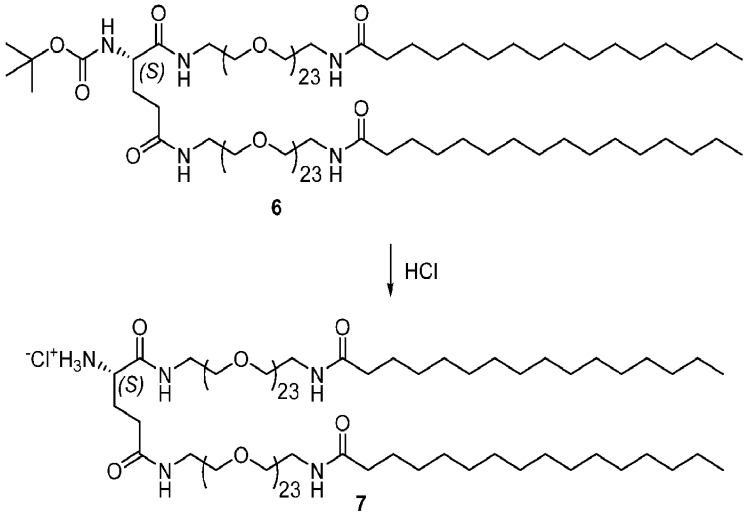
[1016]

[1017] 화합물 3의 고체 (200 mg, 0.141 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 HCl 용액 (0.708 mL, 2.833 mmol, 20 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 생성물을 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1311.90, 실측치 1312.32.



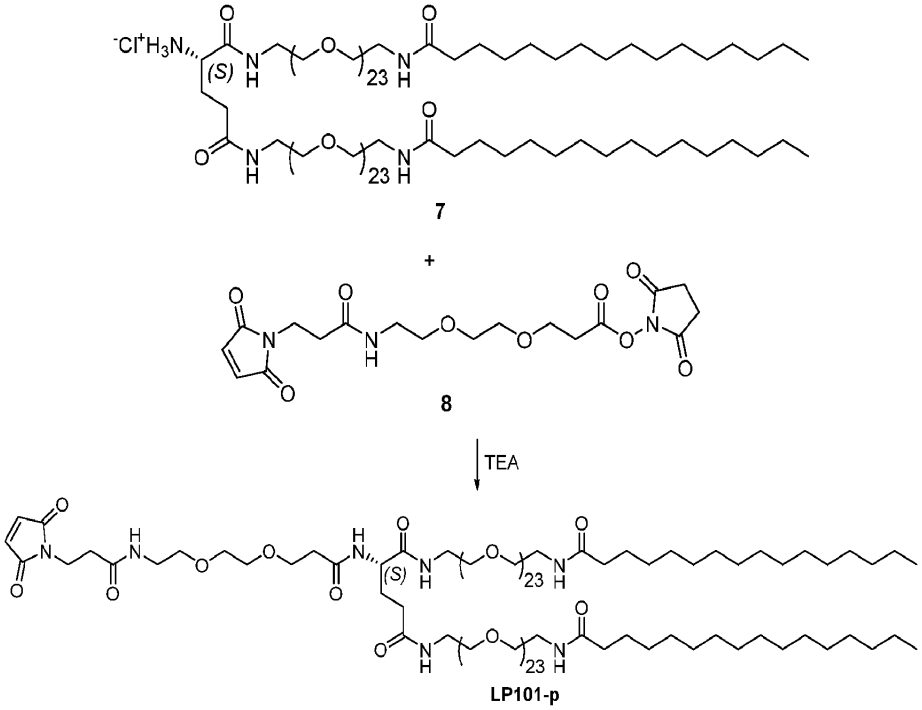
[1018]

[1019] 무수 DMF (3 mL) 중 화합물 5 (100 mg, 0.0404 mmol, 1.0 당량), 화합물 4 (111 mg, 0.0829 mmol, 2.05 당량), 및 디이소프로필에틸아민 (35 mL, 0.202 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (32.5 mg, 0.101 mmol, 2.5 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 6을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 6-10% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+2H]+/2 1417.44, 실측치 1418.19.



[1020]

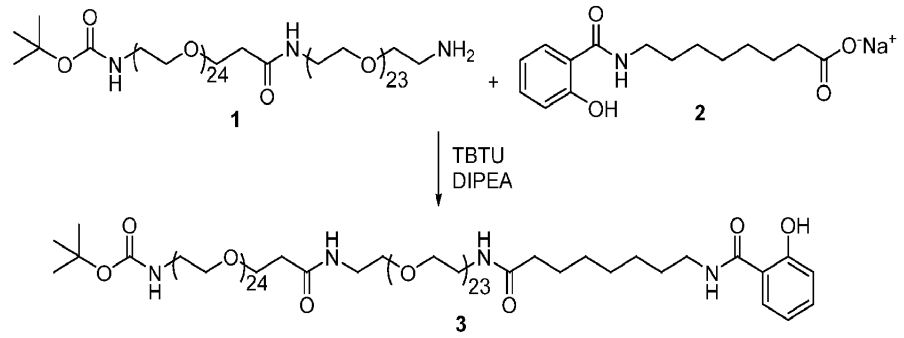
[1021] 화합물 6 (80 mg, 0.0282 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 4M HCl (0.353 mL, 1.411 mmol, 50 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 7을 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+2H]/2 계산치 1367.41, 실측치 1368.26.



[1022]

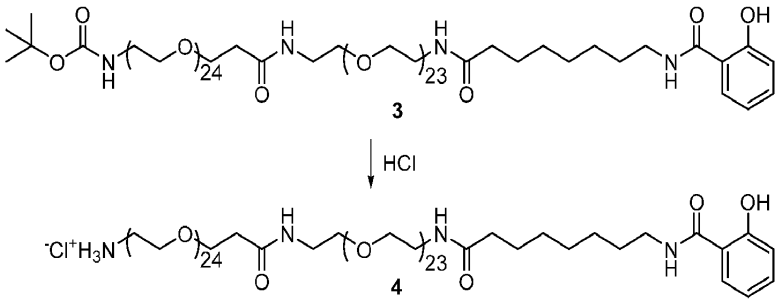
[1023] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 7 (78 mg, 0.0281 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 8 (12 mg, 0.0281 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (0.020 mL, 0.140 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하고, 용매를 농축시켰다. LP101-p를 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-20% 메탄올로 용리시키면서 분리하였다. LC-MS: 계산치 [M+3H]/3 1015.31, 실측치 1015.71.

[1024] LP102-p의 합성



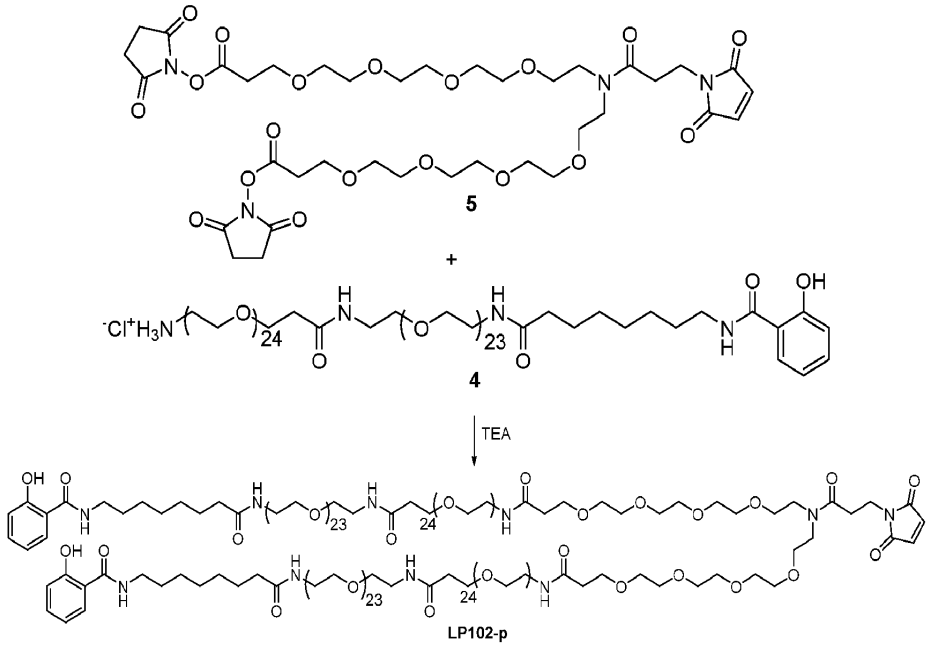
[1025]

[1026] 무수 DMF (2 mL) 중 화합물 1 (124 mg, 0.0539 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (19.5 mg, 0.0646 mmol, 1.2 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (0.028 mL, 0.161 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (20.8 mg, 0.0646 mmol, 1.2 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 포화 중탄산나트륨 수용액으로 켄칭하였다. 수성 상을 DCM (3 x 10 mL)으로 추출하고, 합한 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 화합물 3을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 10-12% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+2H]+/2 1281.76, 실측치 1282.19.



[1027]

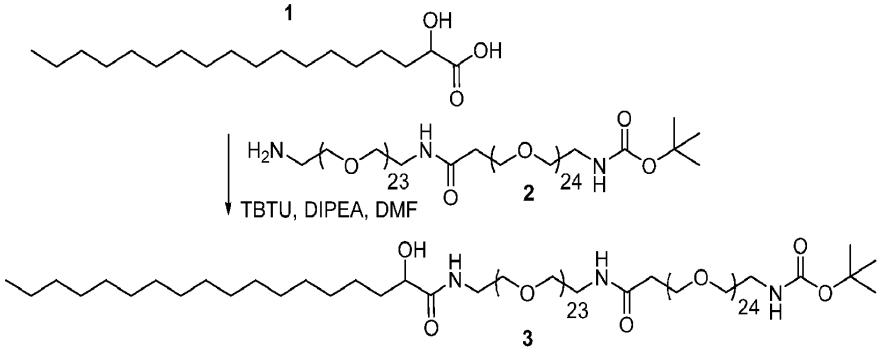
[1028] 화합물 3 (66 mg, 0.0257 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 4M HCl (0.322 mL, 1.287 mmol, 50 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+2H]/2 계산치 1231.75, 실측치 1232.01.



[1029]

[1030] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 5 (11 mg, 0.0128 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 4 (64 mg, 0.0256 mmol, 2.00 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (0.009 mL, 0.064 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하고, 용매를 농축시켰다. LP102-p를 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-18% 메탄올로 용리시키면서 분리하였다. LC-MS: 계산치 [M+6H]+/6 926.20, 실측치 926.41.

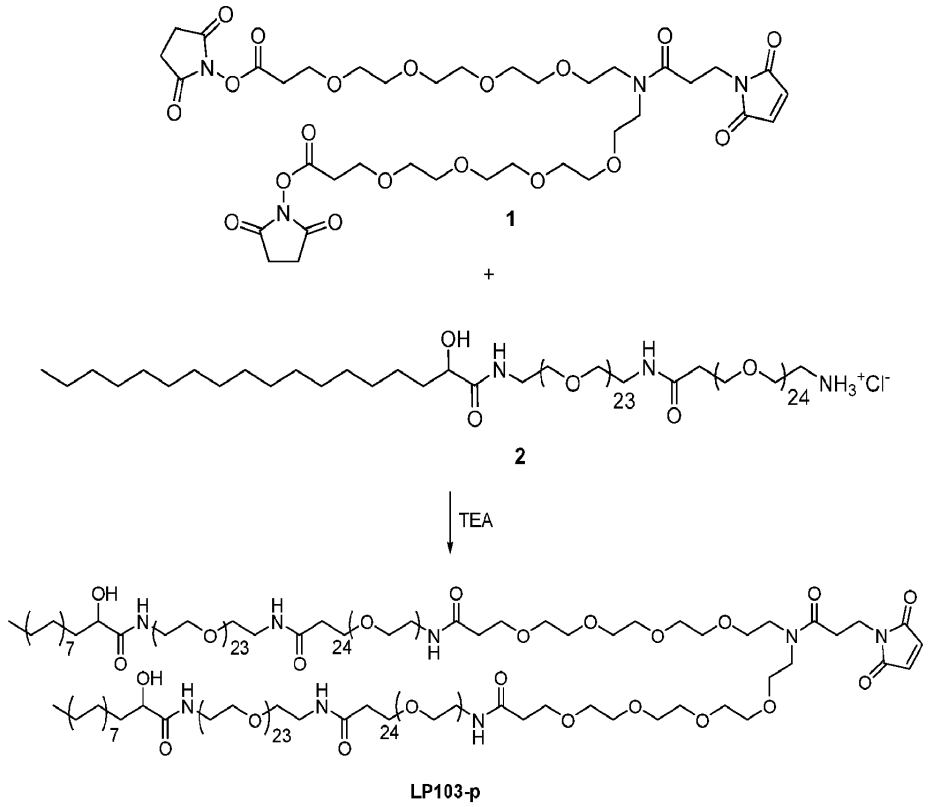
[1031] LP103-p의 합성



[1032]

[1033] DMF (2.0mL)의 용액 중 화합물 1 (35 mg, 0.1170mmol)에 Boc-PEG_{47}-NH_2 2 (269mg, 0.1170mmol), TBTU (45.1mg, 0.1404mmol) 및 DIPEA (60uL)를 첨가하였다. 생성된 현탁액을 밤새 교반한 후, 물을 첨가하였다. 혼합물을

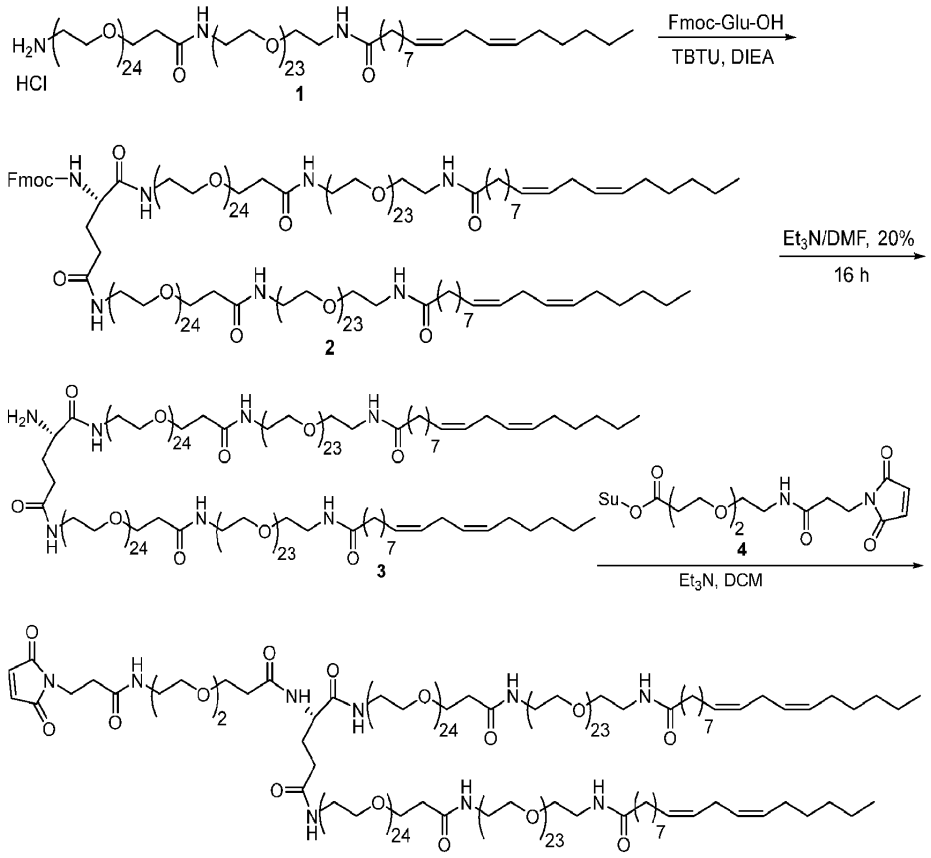
DCM:20%TFE를 사용하여 추출하고, 합한 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 용매를 진공 하에 제거하여 건조시키고, 조 화합물 3을 플래쉬 크로마토그래피 (DCM:20% MeOH)에 의해 정제하였다. 생성물에 탈보호가 LC-MS에 의해 완결된 것으로 결정될 때까지 무수 조건 하에 4N HCl:디옥산 2mL을 첨가하였다: 2483.59 m/z에 대한 계산치 [M+H]+, 실측치 2484.01.



[1034]

[1035] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 4 (10mg, 0.0116 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 5 (59.3 mg, 0.0239 mmol, 2.05 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (8 uL, 0.0582 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. LP103-p를 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 10-17% 메탄올로 용리시키면서 분리하였다. LC-MS: 계산치 [M+6H]+/6 933, 실측치 934, 계산치 [M+7H]+/7 800, 실측치 801.

[1036] LP104-p의 합성



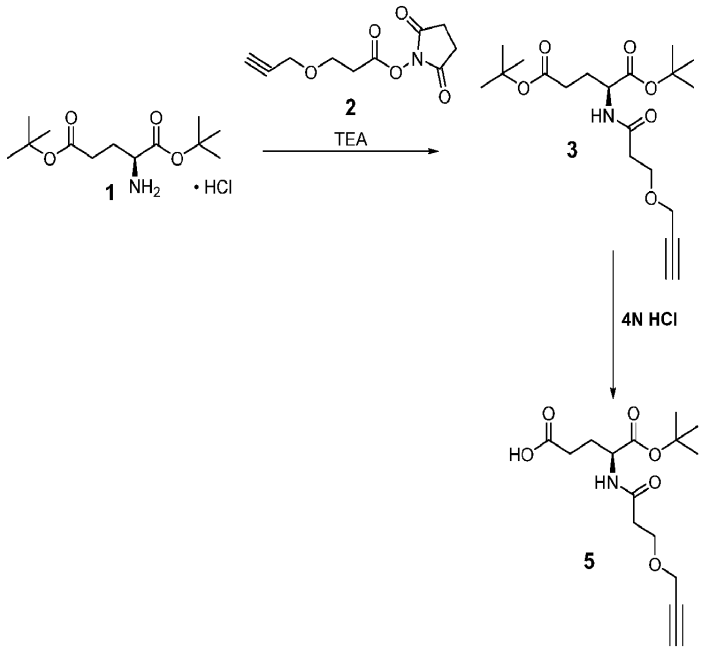
LP104-p

[1037]

[1038] 화합물 1 (상기 LP87에 대한 절차에 제시된 합성)을 상기 LP54-p에 대한 절차에 기재된 바와 같이 Fmoc-Glu-OH와 접합시켰다. 계산치 MW 5261.56, (M +3 x 18)/3=1771.86, (M +4 x 18)/4=1333.39 실측치: MS (ES, pos): 1771.98 $[M+3NH_4]^{3+}$, 1333.57 $[M+4NH_4]^{4+}$.

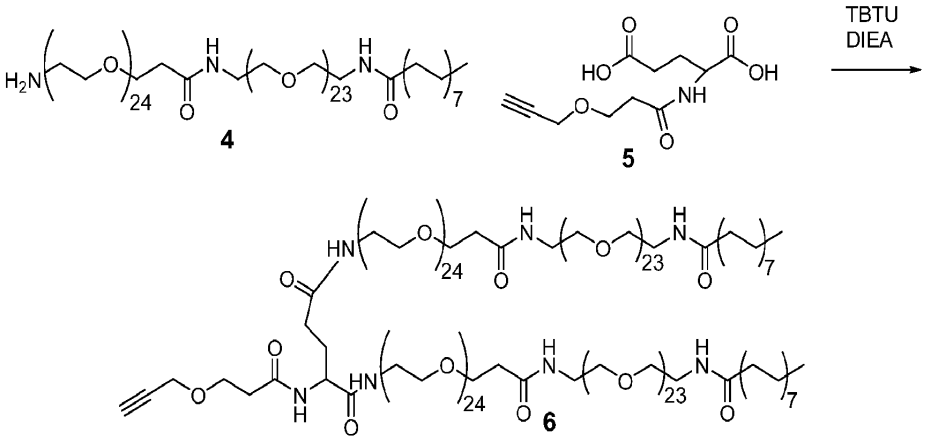
[1039] 화합물 2를 상기 LP39-p의 합성에서 화합물 11에 대해 기재된 바와 같이 Fmoc-탈보호하였다. 생성된 생성물 3을 상기 LP39-p를 합성하기 위한 절차에 기재된 바와 같이 활성화된 에스테르 화합물 4와 접합시켰다. LP104-p를 콤비플래쉬® 정제 후에 단리하였다. 계산치 MW 5349.62, (M +3 x 18)/3=1801.21, (M +4 x 18)/4=1355.41. 실측치: MS (ES, pos): 1801.87 $[M+3NH_4]^{3+}$, 1355.92 $[M+4NH_4]^{4+}$.

[1040] LP106-p의 합성



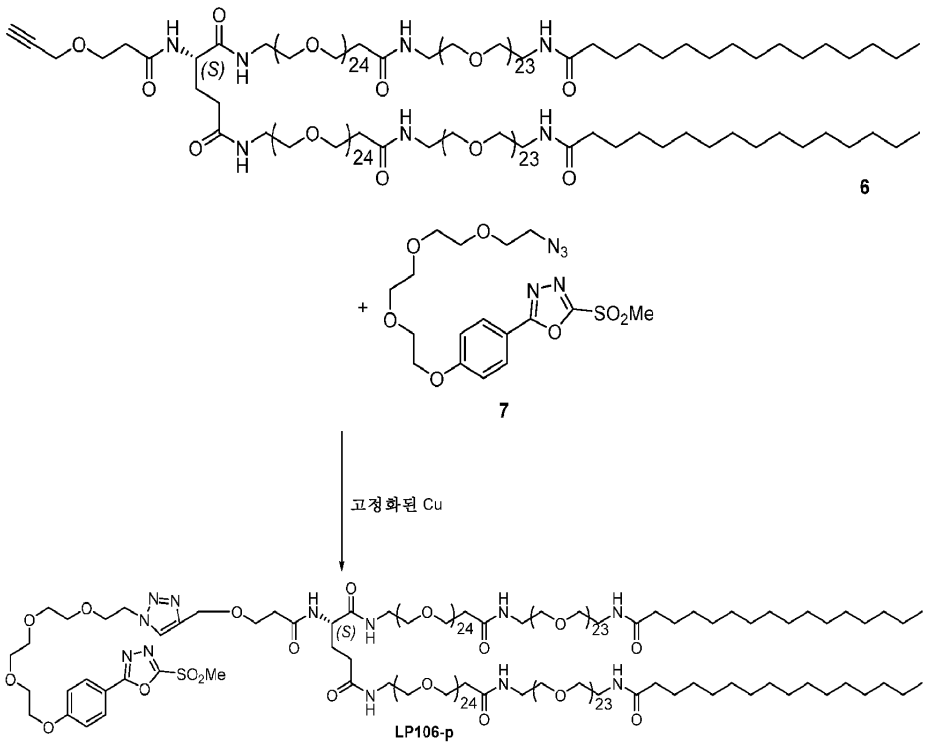
[1041]

[1042] DCM (4 mL) 중 화합물 1 (200 mg, 0.676 mmol)에 TEA (218 uL, 1.56 mmol)에 이어서 화합물 2 (198 mg, 0.879 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 완결 시 모든 휘발물을 제거하고, 조 화합물 3을 4N HCl을 사용하여 탈보호하여 산 5를 수득하였으며, 이를 후속적으로 추가 정제 없이 사용하였다.



[1043]

[1044] 조 화합물 5 (60 mg, 0.1014 mmol로 추정됨)를 DMF (1 mL) 중에 용해시키고, TBTU (71.6 mg, 0.223 mmol)로 처리하고, 5분 동안 교반하였다. DMF (1 mL) 중 화합물 4 (668 mg, 0.273 mmol) 및 DIEA (91.8 uL, 0.527 mmol)를 후속적으로 첨가하고, 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반되도록 하였다. 완결된 후, 모든 휘발물을 제거하고, 화합물 6을 페노메넥스 C18 제미니® 칼럼 (10u, 50 mm x 250 mm)을 사용하여 물 (0.1% TFA) 중 MeOH (0.1% TFA)의 구배로 용리시키면서 단리하였다.

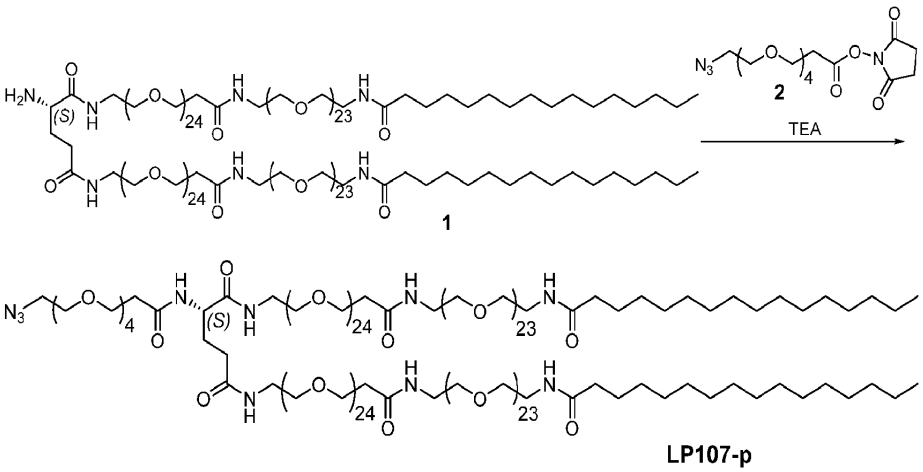


[1045]

[1046] 화합물 6 (23.5 mg, 0.0532 mmol) 및 화합물 7 (29.9 mg, 0.0586 mmol)을 12.0 mL DMF 중에 용해시키고, 용기를 N_2로 5분 동안 폭기하였다. 이어서 고정된 구리 (337 mg, 0.0532 mmol) 및 아스코르브산나트륨 (31.6 mg, 0.1597 mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물을 40℃에서 밤새 교반하였다.

[1047] 수지 및 다른 고체를 여과하였다. 여과물을 진공 하에 농축시키고, HPLC에 의해 정제하여 LP106-p를 수득하였다.

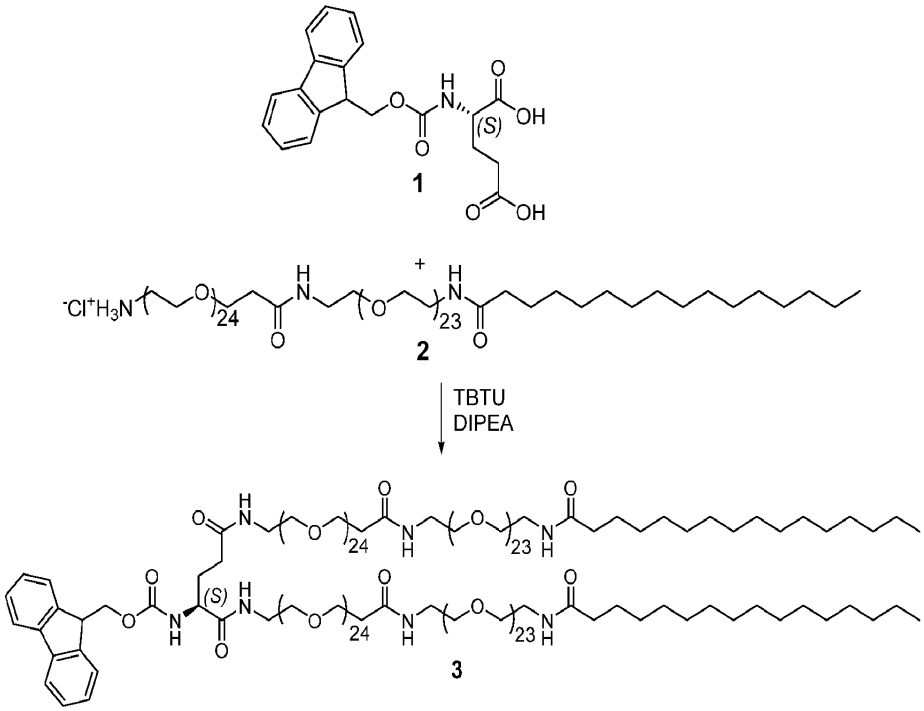
[1048] LP107-p의 합성



[1049]

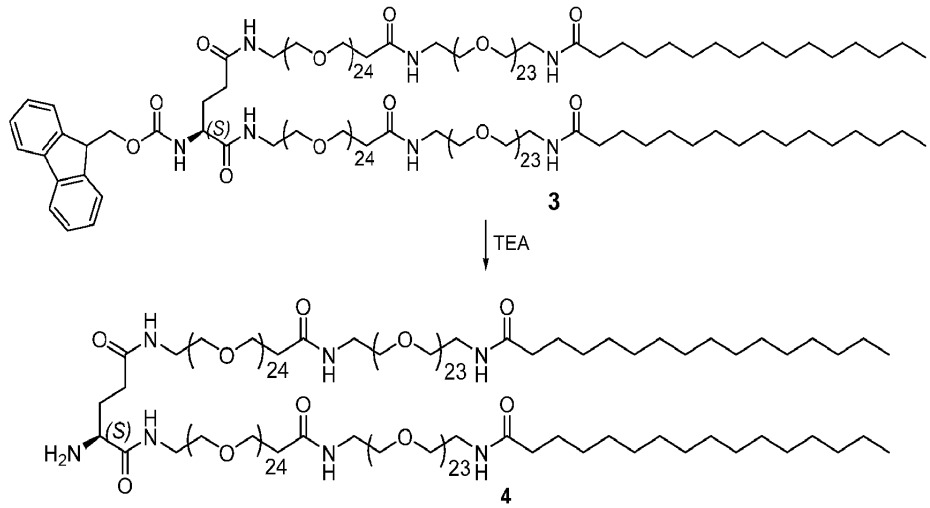
[1050] 화합물 1 (982 mg, 상기 LP38-p에 대한 절차에 제시된 바와 같이 합성함)을 10 mL DCM 중에 용해시켰다. 화합물 2 (90 mg) 및 트리에틸아민 (0.081 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 완결될 때까지 실온에서 5-8시간 동안 교반하였다. 생성물을 1N HCl에 이어서 포화 $NaHCO_3$를 사용하여 추출한 다음, 염수로 세척하고, 최종적으로 Na_2SO_4로 건조시켰다. LP107-p를 칼럼 크로마토그래피를 사용하여 추가로 정제하였다.

[1051] LP108-p의 합성



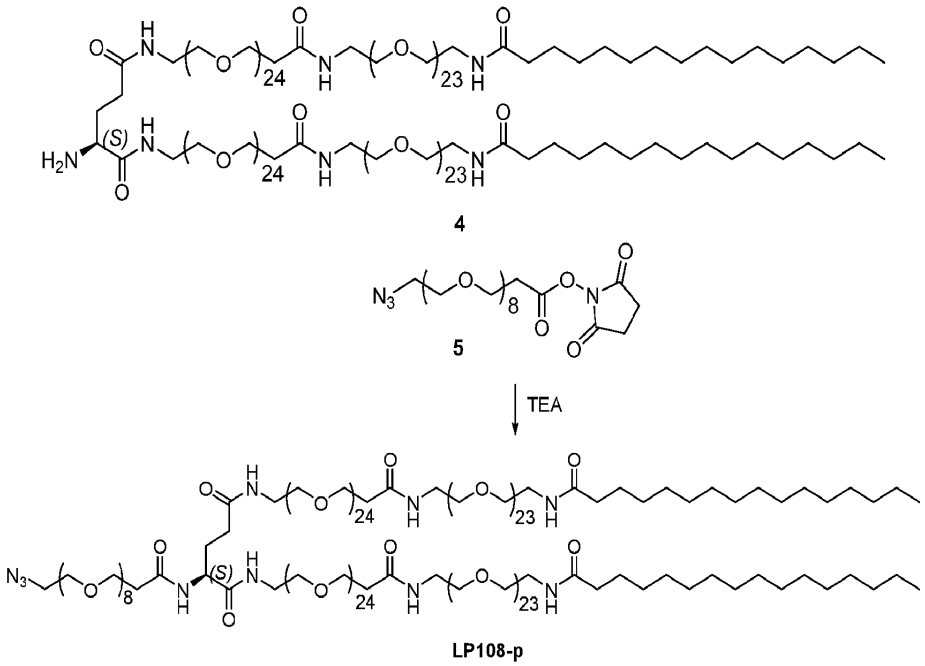
[1052]

[1053] 무수 DMF (100 mL) 중 화합물 1 (595 mg, 1.610 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (8377 mg, 3.382 mmol, 2.10 당량), 및 디이소프로필에틸아민 (1.122 mL, 6.443 mmol, 4.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (1241 mg, 3.865 mmol, 2.4 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하였다. 이어서 반응 혼합물을 농축시켰다. 잔류물을 포화 염화암모늄 및 중탄산나트륨 수용액으로 세척하였다. 화합물 3을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-20% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+5H]/5, 계산치 1043.05, 실측치 1044.38.



[1054]

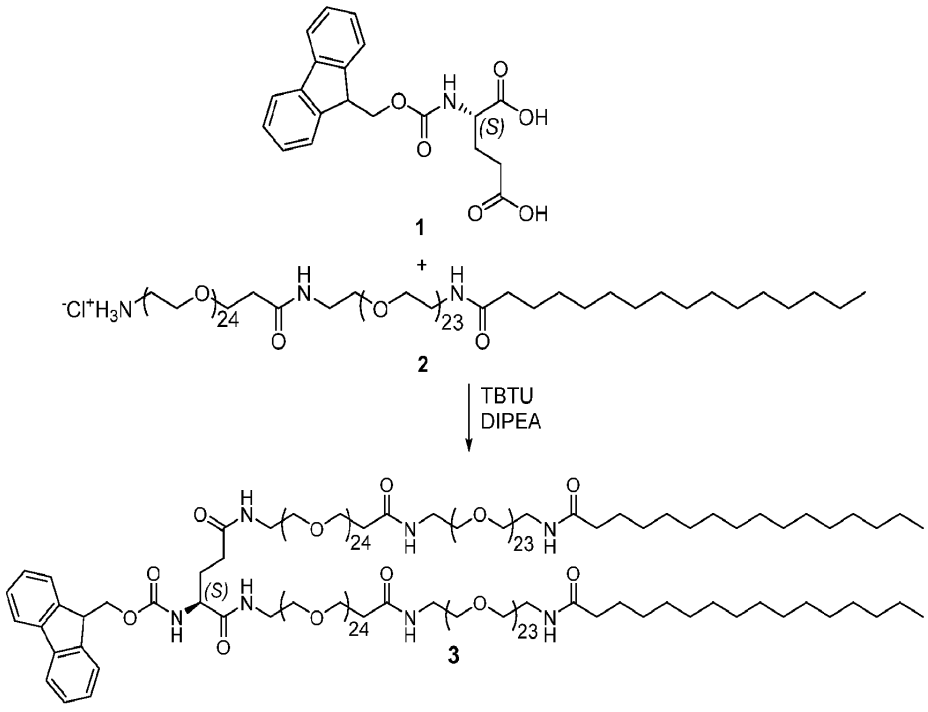
[1055] 무수 DMF (1.6 mL) 중 화합물 1 (104 mg, 0.0199 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 TEA (0.4 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 화합물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+5H]/5 계산치 998.63, 실측치 999.97.



[1056]

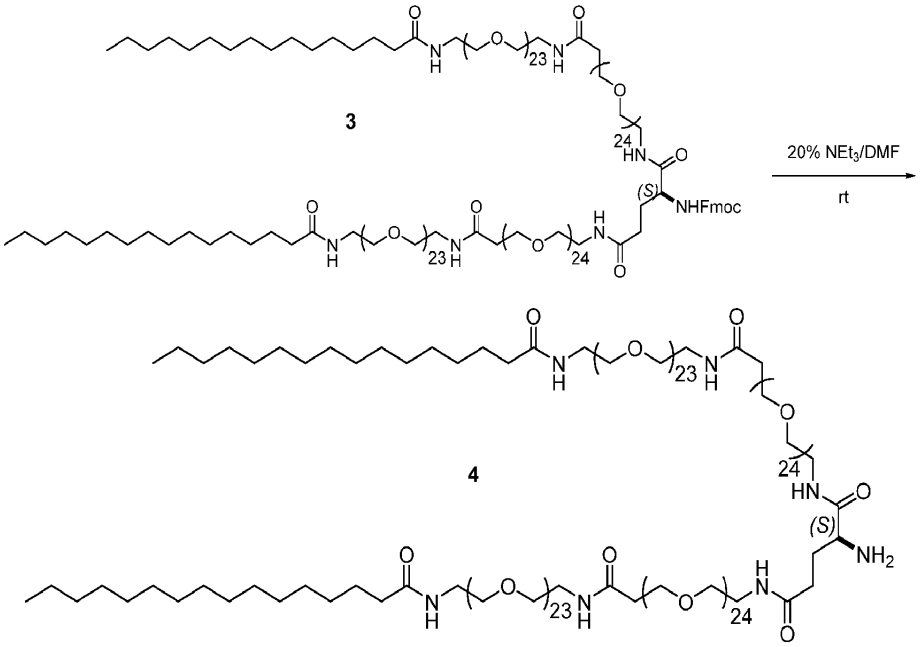
[1057] 무수 DCM (3 mL) 중 화합물 4 (99 mg, 0.198 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 5 (134 mg, 0.238 mmol, 1.2 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (0.006 mL, 0.0397 mmol, 2.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. LP108-p를 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-20% 메탄올로 용리시키면서 분리하였다. LC-MS: 계산치 [M+5H]/5 1088.48, 실측치 1089.86.

[1058] LP109-p의 합성



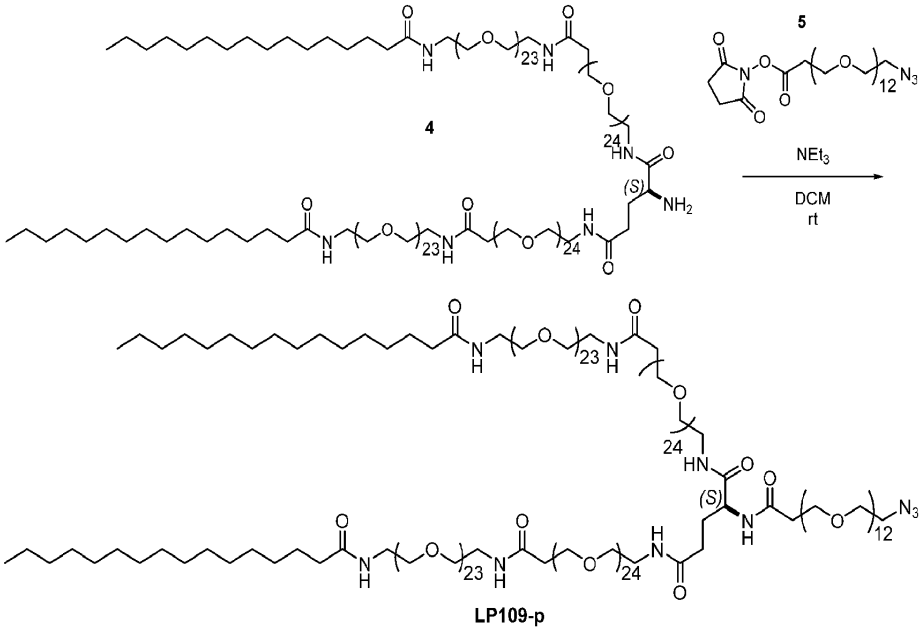
[1059]

[1060] 무수 DMF (100 mL) 중 화합물 1 (595 mg, 1.610 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (8377 mg, 3.382 mmol, 2.10 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (1.122 mL, 6.443 mmol, 4.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (1241 mg, 3.865 mmol, 2.4 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하였다. 이어서 반응 혼합물을 농축시켰다. 잔류물을 포화 염화암모늄 및 중탄산나트륨 수용액으로 세척하였다. 화합물 3을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 12-20% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+5H]/5, 계산치 1043.05, 실측치 1044.38.



[1061]

[1062] 화합물 3 (100 mg)에 실온에서 DMF 중 20% NEt_3 (0.053 mL)를 첨가하였다. LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 PhMe/MeOH와 공비혼합하고, 고진공 하에 밤새 농축시켜 조 화합물 4를 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 4989.17 m/z, 관찰치 1262.31 (+4/4, +H_2O) m/z.

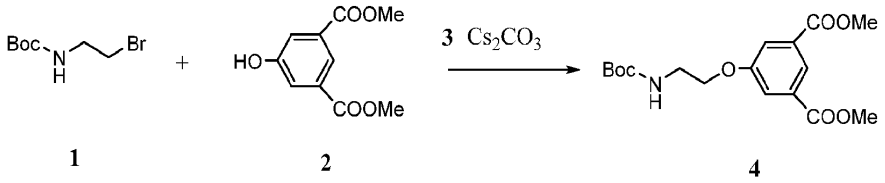


LP109-p

[1063]

[1064] N_2(g)를 살포하면서 무수 DCM (0.008 mL) 중 화합물 4 (95.7 mg) 및 NEt_3의 용액을 실온에서 제조하였다. 이어서 화합물 5 (14.2 mg)를 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 교반되도록 하였다. 이어서 반응 혼합물을 직접 농축시켰다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카겔의 12-g 칼럼을 통해 20분에 걸쳐 DCM 중 0-20% MeOH (0% B에서 100% B)의 구배를 사용하여 정제하였으며, 여기서 LP109-p는 100% B에서 용리되어 깨끗하고 불순한 분획을 수득하였다. 2개의 깨끗한 분획을 수집하고, 농축시켰다. 불순한 분획을 농축시키고, 반응 조건에 재적용하여 추가의 전환을 진행시켰다. DCM 중 0-20% MeOH의 구배 (0% B에서 100% B)를 통한 단리는 88% B에서 개선되었지만 다소 불순한 LP109-p 용리를 제공하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+5614.51 m/z, 관찰치 1422.64 (+4/4, +H_2O) m/z.

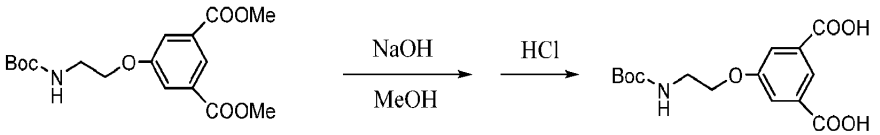
[1065] LP110-p의 합성



1 2 4

[1066]

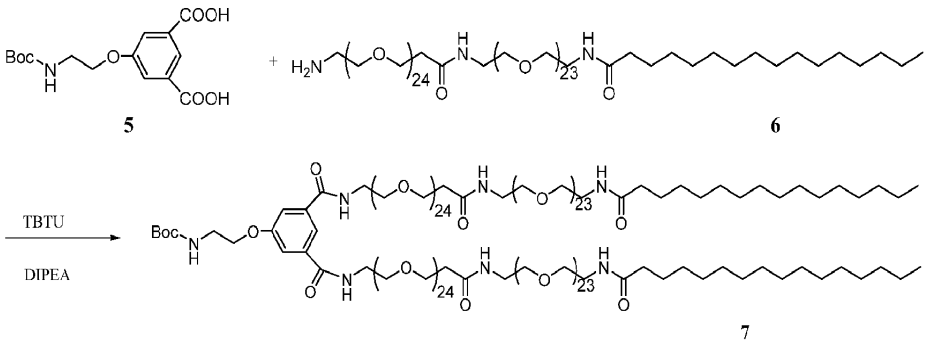
[1067] 20 mL DMF 중 화합물 1 (4.00 g)의 용액에 실온에서 화합물 2 (4.50 g) 및 3 (11.6 g)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 생성물을 표준 후처리 (1N NaOH, 염수)에 의해 추출하고, Na_2SO_4로 건조시켰다. TLC는 화합물 2가 NaOH에 의해 제거되었음을 나타내었다. 화합물 4를 직접 후속 단계에 사용하였다.



4 5

[1068]

[1069] 100mL MeOH 중 화합물 4 (3.04 g)의 용액에 실온에서 NaOH (1.03 g) 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시켜 MeOH를 제거하였다. 수성 상을 에틸 아세테이트로 추출하여 임의의 미반응 출발 물질을 제거하였다. 혼합물을 pH 3으로 산성화시킨 다음, 에틸 아세테이트로 추출하고, Na_2SO_4를 사용하여 건조시키고, 농축시켜 화합물 5를 백색 고체로서 수득하였다. 화합물 5를 직접 후속 단계에 사용하였다.

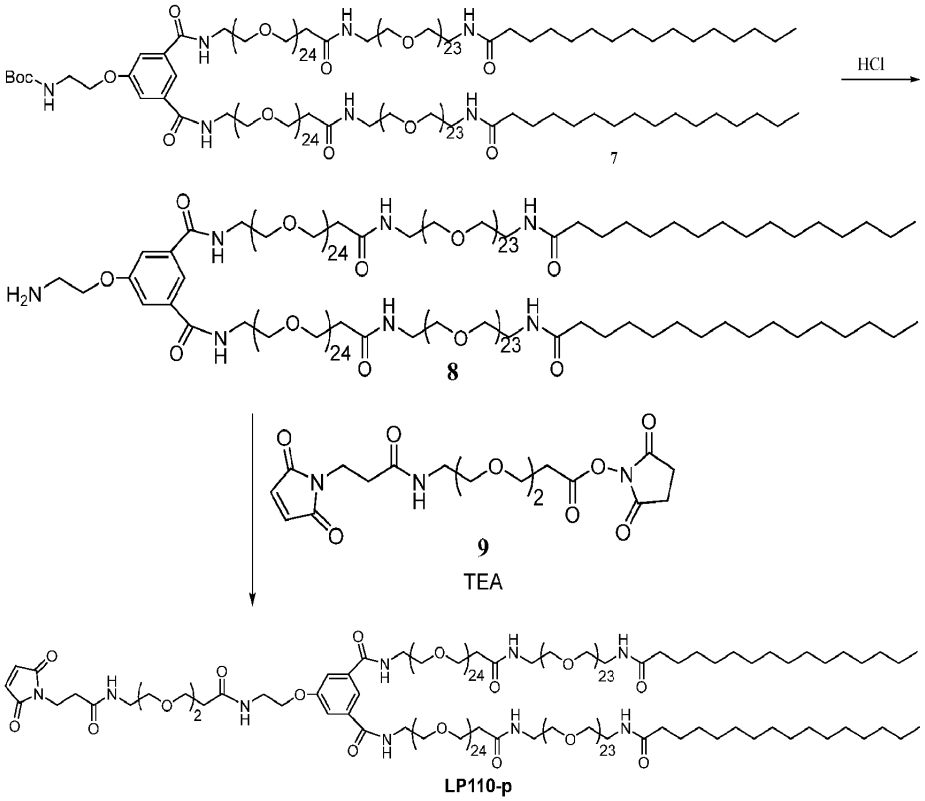


5 6 7

[1070]

[1071] DCM 중 화합물 1 (2.9 mg)에 실온에서 2 당량의 DIPEA (0.006 mL)를 첨가하였다. 화합물 6 (45 mg), TBTU (6.3 mg), 및 2 당량의 DIPEA (0.006 mL)를 실온에서 30분 동안 교반하였다. PEG 용액에 대한 활성화된 산 혼합물의 느린 첨가를 시린지 펌프를 사용하여 달성하였다 (2-3시간 내에). 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. TLC에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지.

[1072] 생성물을 표준 후처리 (1N HCl, 포화 $NaHCO_3$, 염수)를 사용하여 추출하였다. 잔류물을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 DCM 중 0-20% MeOH (0-100% B)의 구배로 정제하였다.

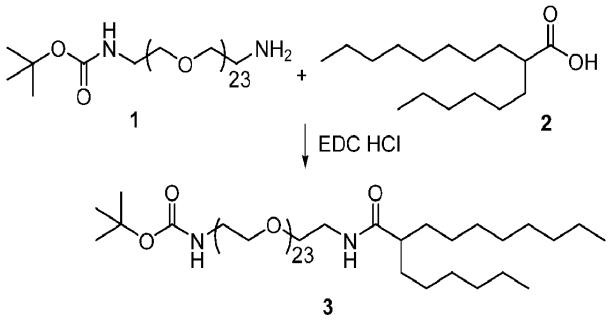


[1073]

[1074] 화합물 7 (27 mg)에 실온에서 1.5mL 4 M HCl/디옥산을 첨가하였다. 반응 혼합물을 LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 조 화합물 8을 DCM 중에 용해시키고, 화합물 9 (2.7 mg) 및 TEA (1.1 mg)를 첨가하였다. TLC에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다.

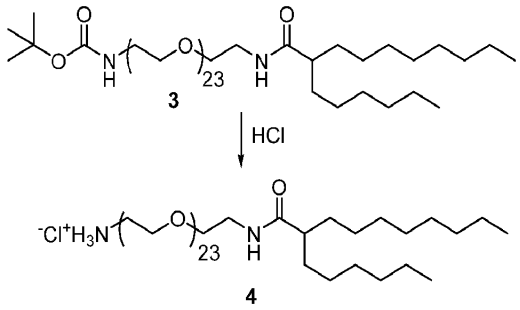
[1075] LP110-p를 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 DCM에서 DCM 중 20% MeOH (0-100% B)의 구배로 정제하였다.

[1076] LP111-p의 합성



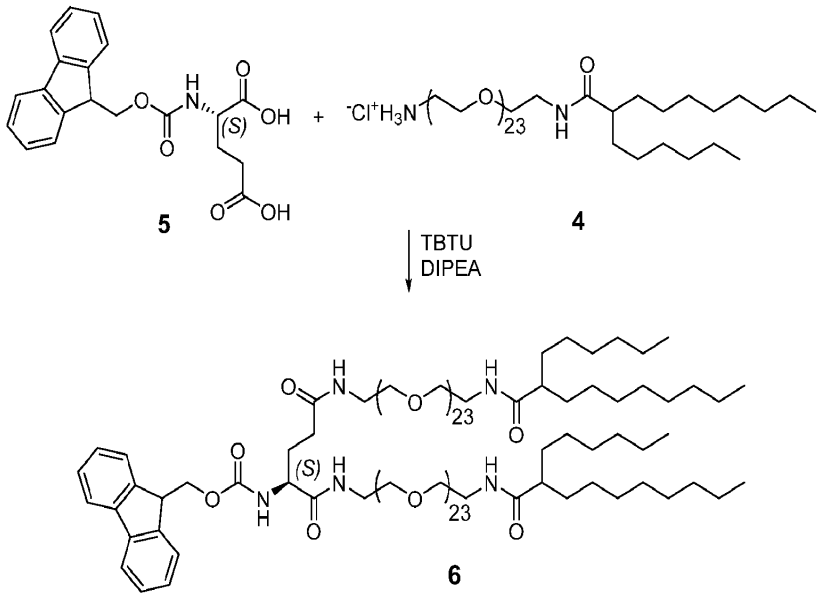
[1077]

[1078] 무수 DCM (10 mL) 중 화합물 1 (2500 mg, 2.130 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 2 (655 mg, 2.556 mmol, 1.2 당량)의 용액에 실온에서 EDC HCl (630 mg, 3.195 mmol, 1.5 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하였다. 반응 혼합물을 농축시켰다. 화합물 3을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 8-18% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 1411.95, 실측치 1412.80.



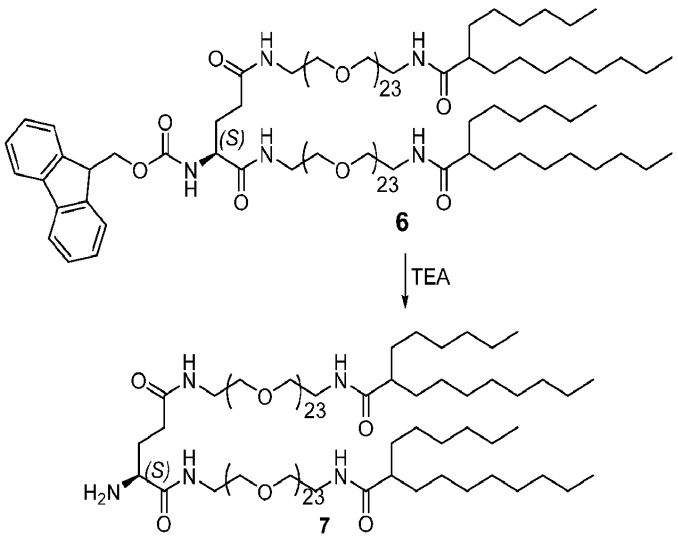
[1079]

[1080] 화합물 3 (2400 mg, 1.699 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 4M HCl (8.499 mL, 33.997 mmol, 20 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+H]/+ 계산치 1311.90, 실측치 1312.95.



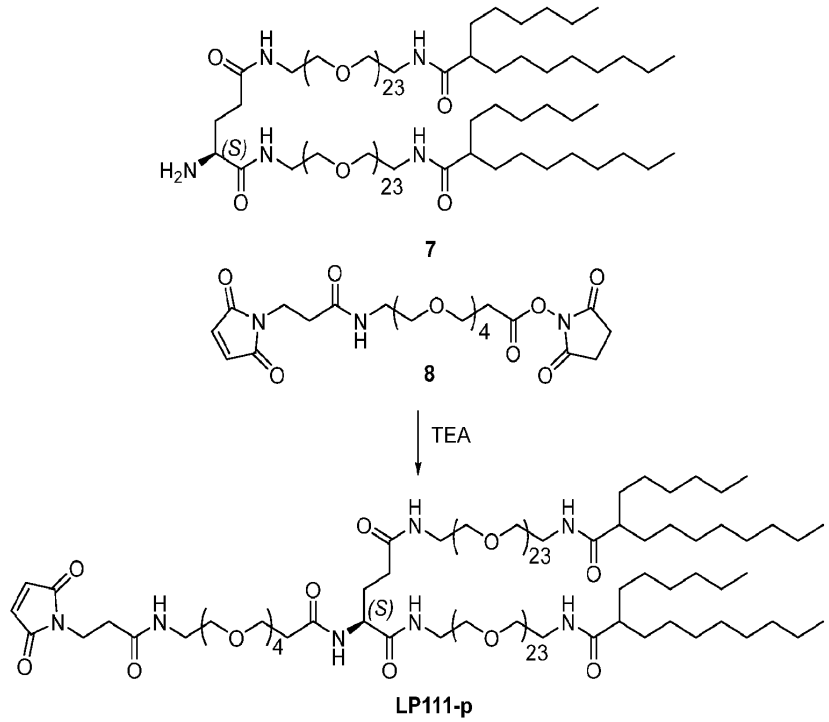
[1081]

[1082] 무수 DMF (10 mL) 중 화합물 5 (300 mg, 0.812 mmol, 1.0 당량), 화합물 4 (2.299 g, 1.705 mmol, 2.10 당량), 및 디이소프로필에틸아민 (0.566 mL, 3.248 mmol, 4.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (625 mg, 1.949 mmol, 2.4 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하였다. 이어서 반응 혼합물을 농축시켰다. 잔류물을 포화 염화암모늄 및 중탄산나트륨 수용액으로 세척하였다. 화합물 6을 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 10-18% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+2H]/2, 계산치 1478.45, 실측치 1479.89.



[1083]

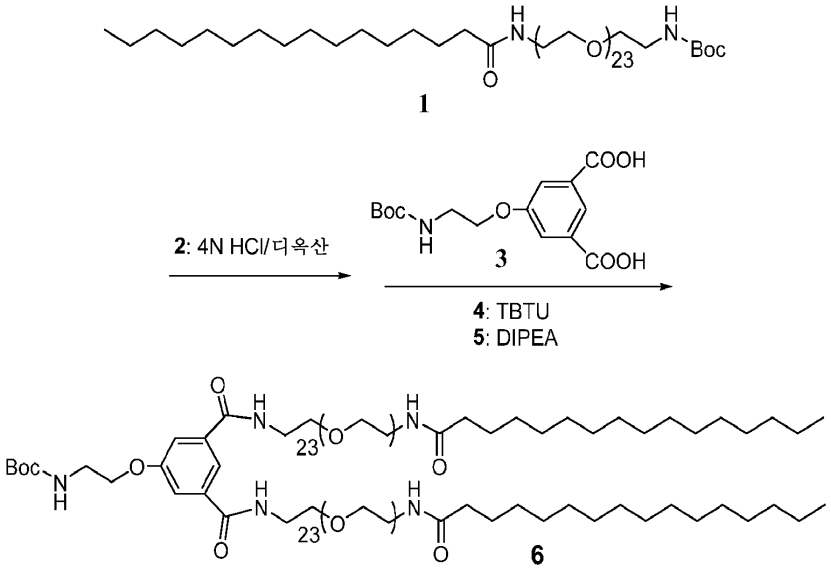
[1084] 무수 DMF (8 mL) 중 화합물 6 (1690 mg, 0.571 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 트리에틸아민 (2 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 화합물 7을 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+2H]/2 계산치 1367.41, 실측치 1368.88.



[1085]

[1086] 무수 DCM (10 mL) 중 화합물 7 (1563 mg, 0.571 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 2 (381 mg, 0.743 mmol, 1.3 당량)의 용액에 실온에서 TEA (0.162 mL, 1.143 mmol, 2.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. LP111-p를 콤비플래쉬®에 의해 디클로로메탄 중 8-16% 메탄올로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: 계산치 [M+3H]/3 1044.67, 실측치 1046.18.

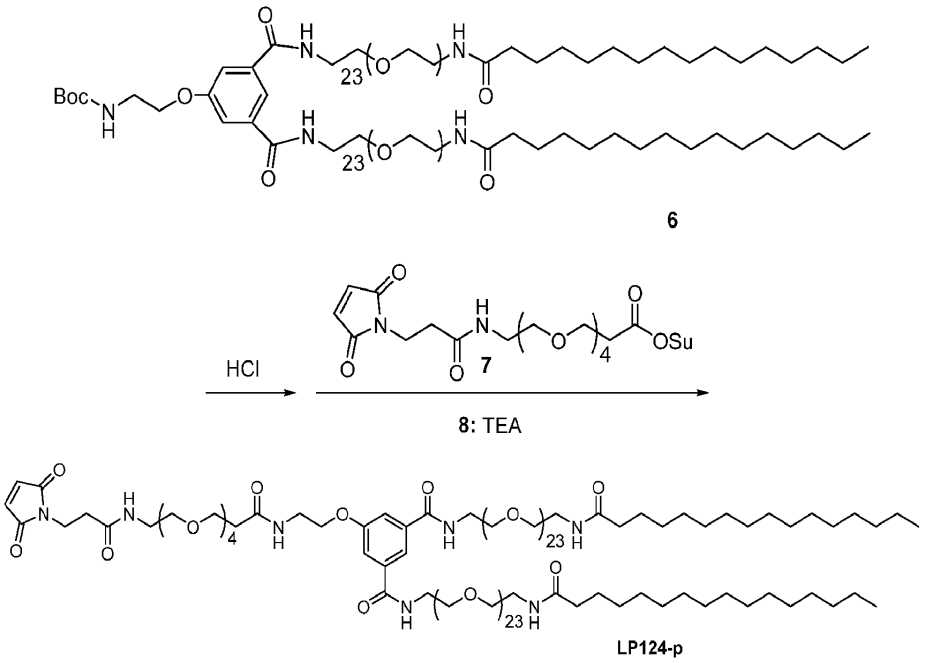
[1087] LP124-p의 합성



[1088]

[1089] 화합물 1 (760 mg)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 2 mL을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 반응 혼합물을 1.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 DCM 중에 용해시키고, 화합물 3 (84.1 mg), 4 (207 mg), 및 5 (0.281 mL)를 첨가하였다. TLC에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다.

[1090] 생성물을 표준 후처리 (1N HCl, 포화 $NaHCO_3$, 염수)에 의해 추출하였다. 화합물 6을 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 DCM 중 0-20% MeOH (0-100% B)의 구배로 정제하였다.

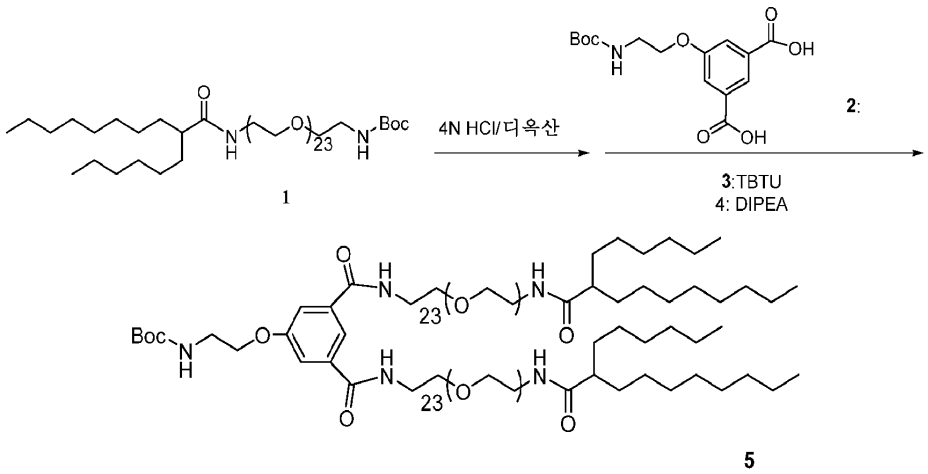


[1091]

[1092] 화합물 6 (250 mg)에 4 M HCl/디옥산 4 mL을 실온에서 첨가하였다. LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 DCM 중에 용해시킨 다음, 화합물 7 (52.9 mg) 및 8 (0.036 mL)을 첨가하였다. TLC에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다.

[1093] LP124-p를 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 DCM 중 0-20% MeOH (0-100% B)의 구배로 정제하였다.

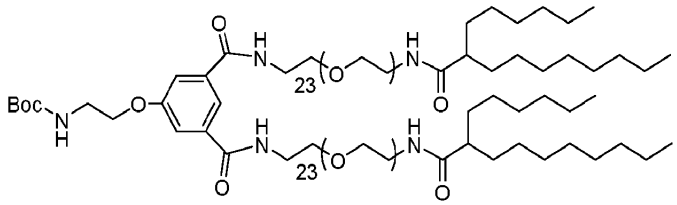
[1094] LP130-p의 합성



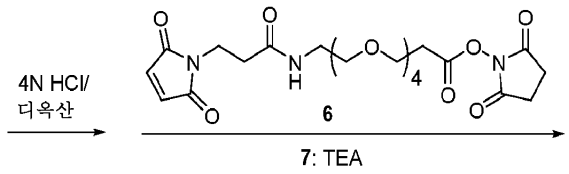
[1095]

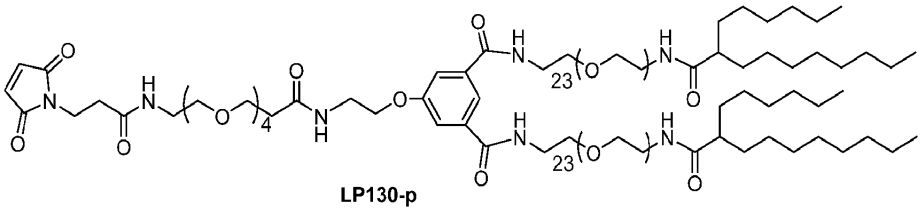
[1096] 화합물 1 (1.89 g)에 실온에서 4 M HCl/디옥산 5 mL을 첨가하였다. LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 DCM 중에 용해시키고, 화합물 2 (209 mg), 3 (516 mg) 및 4 (0.70 mL)를 첨가하였다. TLC에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다.

[1097] 생성물을 표준 후처리 (1N HCl, 포화 $NaHCO_3$, 염수)에 의해 추출하였다. 화합물 5를 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 DCM 중 0-20% MeOH (0-100% B)의 구배로 정제하였다.



5





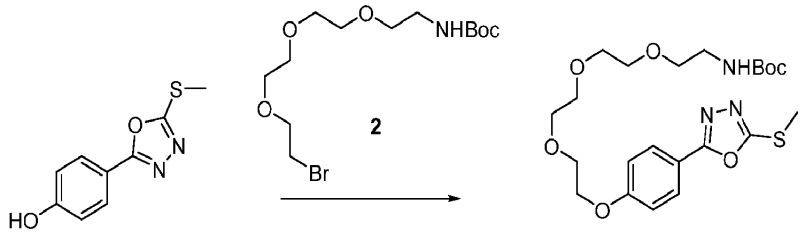
LP130-p

[1098]

[1099] 화합물 5 (800 mg)에 실온에서 4 N HCl/디옥산 5 mL을 첨가하였다. LC-MS를 통해 완전한 전환이 확인될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 DCM 중에 용해시킨 다음, 화합물 2 (169 mg) 및 3 (0.116 mL)을 첨가하였다. TLC에 의해 완전한 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다.

[1100] LP130-p를 콤비플래쉬®에 의해 고정상으로서 실리카 겔을 사용하여 DCM에서 DCM 중 20% MeOH (0-100% B)의 구배로 정제하였다.

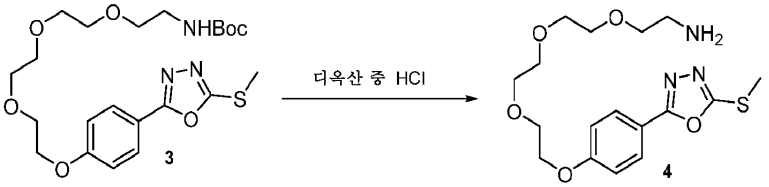
[1101] LP143-p의 합성



1 2 3

[1102]

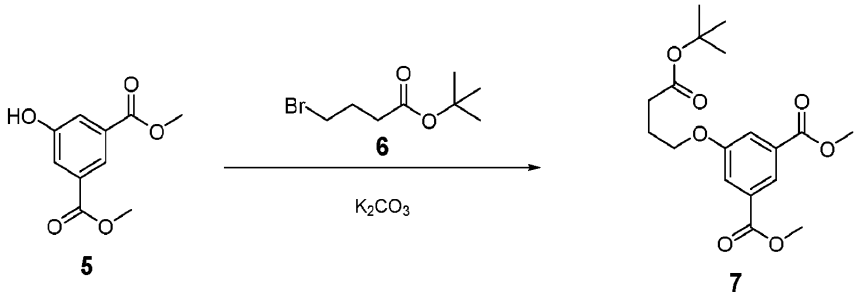
[1103] 화합물 1 (500 mg)을 압력 용기에서 10 mL 무수 THF 중에 용해시키고, K_2CO_3 (398 mg)를 첨가하였다. 화합물 2 (983 mg)를 최소량의 DMF 중 용액으로서 첨가하고, 용기를 마개를 막고, 반응 혼합물을 40℃에서 밤새 교반되도록 하였다. 이어서 반응 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하였다. 고체를 여과하고, 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 화합물 3을 플래쉬 크로마토그래피를 사용하여 헥산 중 0-100% EtOAc로 용리시키면서 정제하였다.



3 4

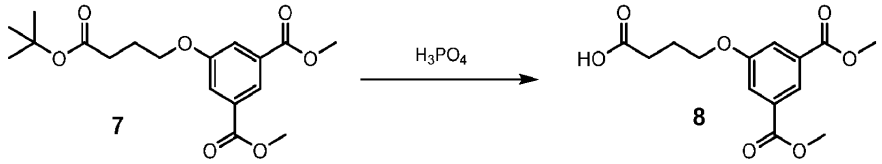
[1104]

[1105] 화합물 3 (1070 mg)을 디옥산 중 4 M HCl 4 mL 중에 용해시키고, 모든 Boc가 제거될 때까지 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 농축시켰다. 화합물 4를 플래쉬 크로마토그래피를 사용하여 DCM 중 0-20% MeOH로 용리시키면서 정제하였다.



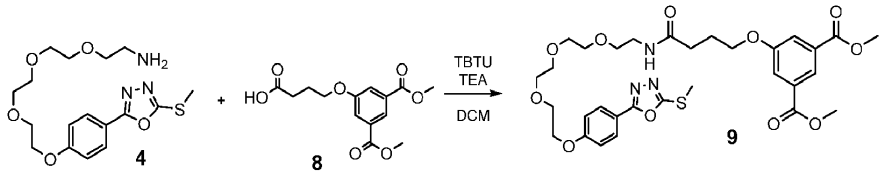
[1106]

[1107] 화합물 5 (1000 mg)를 압력 용기에서 무수 DMF 5 mL 중에 용해시키고, K_2CO_3 (1.315 g)를 첨가하였다. 이어서 화합물 6 (850 mg)을 최소량의 DMF 중에 첨가하고, 반응 혼합물을 마개를 막고, 40℃에서 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하였다. 고체를 여과한 다음, 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 화합물 7을 플래쉬 크로마토그래피를 사용하여 헥산 중 0-100% EtOAc로 용리시키면서 정제하였다.



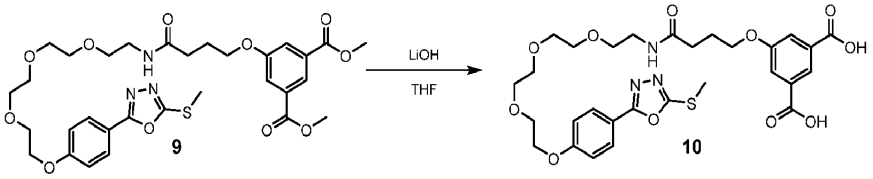
[1108]

[1109] H_3PO_4 (0.594 mL)를 톨루엔 20 mL 중 화합물 7 (900 mg)의 교반 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 물 (30 mL)로 희석하고, 에틸 아세테이트 (30 mL)로 3회 세척하였다. 합한 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켰다.



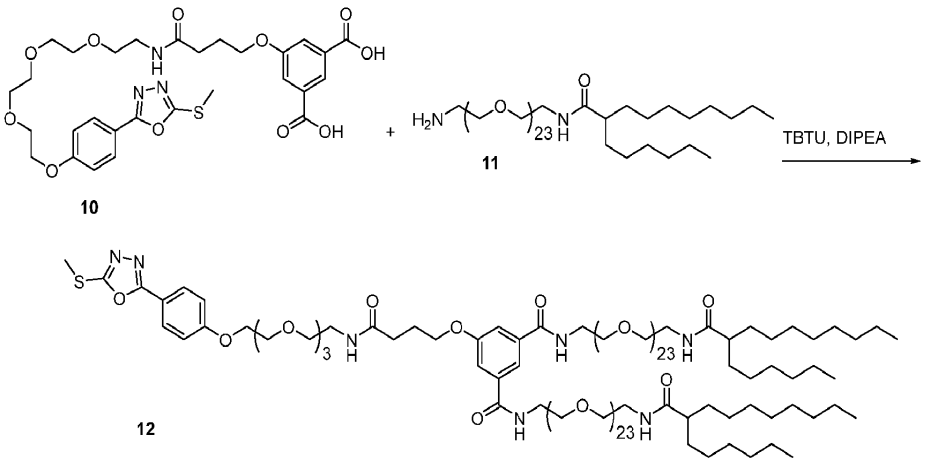
[1110]

[1111] 화합물 8 (100 mg) 및 TBTU (149 mg)를 2mL DMF 중에 용해시키고, 5분 동안 교반하였다. 이어서 TEA (0.152 mL) 및 화합물 4 (142 mg)를 혼합물에 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트 (10 mL)로 희석하고, 포화 염화암모늄 (3x 10 mL)으로 세척하였다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 화합물 9를 플래쉬 크로마토그래피를 사용하여 0-100% 헥산-에틸 아세테이트에 이어서 DCM/MeOH 0-20%로 용리시키면서 정제하였다.



[1112]

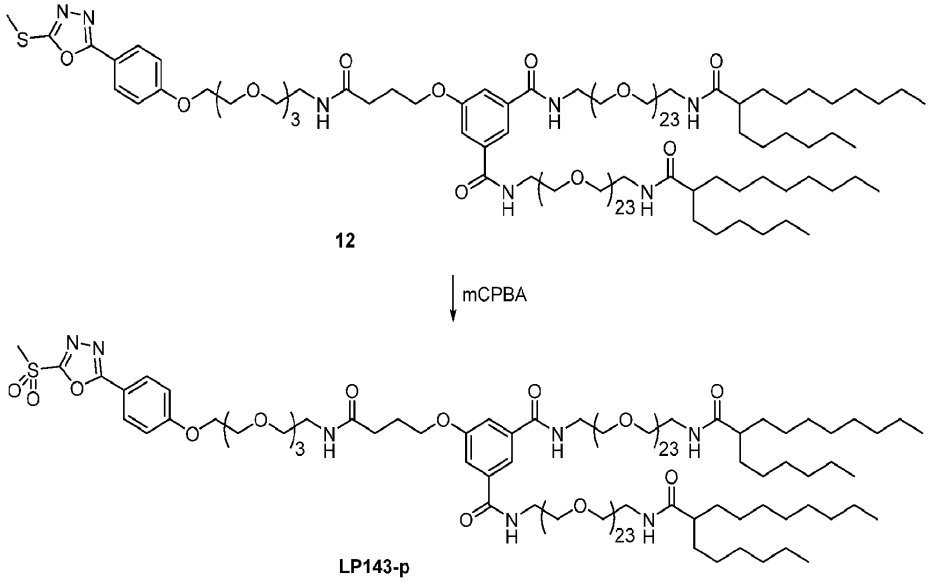
[1113] 화합물 9 (197 mg)를 4 mL THF 중에 용해시켰다. 이어서 LiOH (43 mg) 및 물 (0.4 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 탈보호가 LC-MS에 의해 확인될 때까지 교반하였다. 반응 혼합물을 앰버리스트® 15로 켄칭하였다. 앰버리스트를 여과하고, 반응 혼합물을 농축시켰다. 화합물 10을 0.1% HOAc 첨가제를 함유하는 헥산 중 0-100% 에틸 아세테이트로 용리하는 플래쉬 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.



10 11 12

[1114]

[1115] 화합물 10 (380 mg)을 DMF 4 mL 중 TBTU (424 mg)와 5분 동안 혼합하였다. 이어서 화합물 11 (2.12 g)을 첨가하고, 이어서 DIPEA (0.542 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하고, 키커를 하기와 같이 첨가하였다: 2시간에 50% TBTU 및 50% DIPEA, 3시간에 25% TBTU 및 50% DIPEA, 4시간에 50% DIPEA, 5시간에 50% DIPEA. 6.5시간 후에 반응 혼합물을 켄칭하였다. 반응 혼합물을 DCM 중 20% TFE (15 mL)로 희석하고, 포화 염화암모늄으로 2회 (15 mL) 세척하였다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 이어서 화합물 12를 HPLC에 의해 정제하였다.

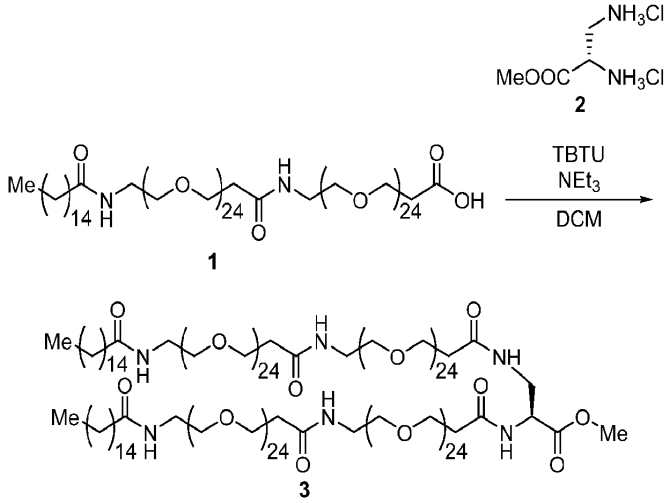


12 LP143-p

[1116]

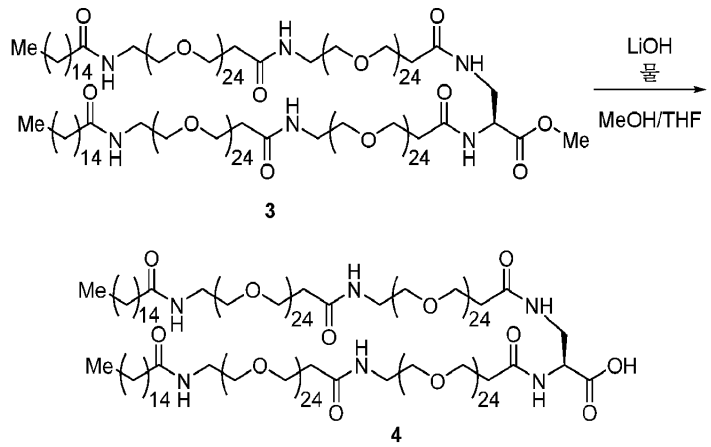
[1117] mCPBA (70% 순도, 12 mg)를 0℃에서 1 mL DCM 중 화합물 12 (28 mg)의 교반 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하면서 실온으로 가온되도록 하고, LCMS를 통해 모니터링하였다. 혼합물을 DCM 중 20% TFE (5 mL)로 희석한 다음, 포화 아황산나트륨 (2 X 5 mL)으로 세척하고, 포화 중탄산나트륨 (5 mL)으로 1회 세척하였다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시켰다. LP143-p의 정확한 질량을 LC-MS에 의해 확인하였다.

[1118] LP210-p의 합성



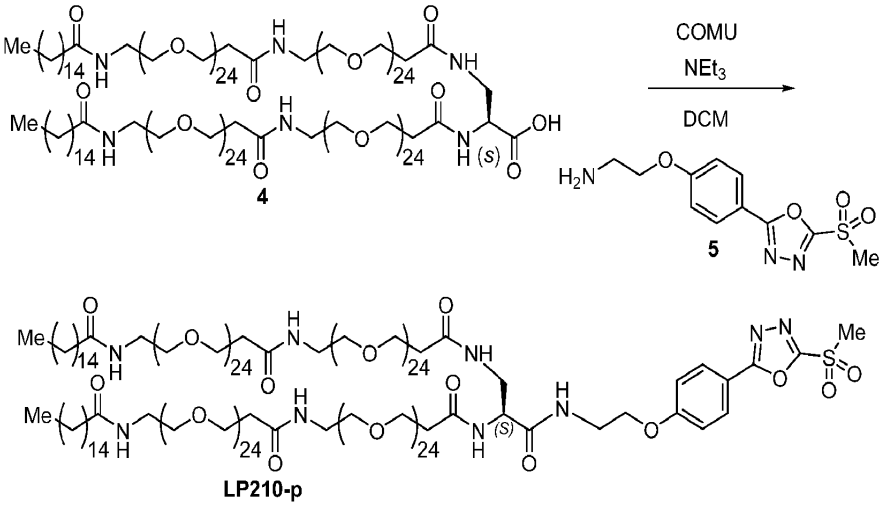
[1119]

[1120] 화합물 1 (0.2 g, 0.08 mmol) 및 TBTU (0.0542 g, 0.735 mmol)를 DCM (5 mL) 중에 용해시키고, NEt_3 (0.0244 mL, 0.175 mmol)을 첨가하였다. 분리형 바이알에서, 화합물 2 (0.007 g, 0.037 mmol) 및 NEt_3 (0.0244 mL, 0.175 mmol)을 DCM (1 mL) 중에서 함께 교반하였다. 생성된 용액을 10분 동안 교반하였다. 10분 후, 화합물 2의 용액을 화합물 1의 용액에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 90분 동안 교반한 다음, LC-MS에 의해 체크하였다. 반응 혼합물을 물 5 mL로 켄칭하고, 5분 동안 교반하였다. 층을 분리하고, 유기 층을 포화 $NaHCO_3$(수성) (2 x 20 mL), 물 (20 mL), 포화 NH_4Cl (수성) (2 x 20 mL), 포화 NaCl (수성) (2 x 20 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켜 조 화합물 3을 왁스상 회백색 고체 (약 200 mg)로서 수득하였다. 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 DCM 중 0-20% MeOH로 용리시키면서 정제하였다. 순수한 분획을 합하여 50 (27% 수율)의 화합물 3을 백색 고체로서 수득하였다.



[1121]

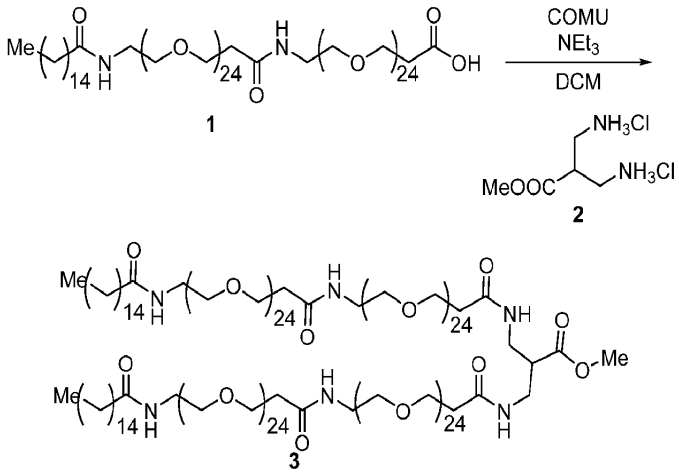
[1122] 화합물 3 (0.05 g, 0.010 mmol)을 1:1 MeOH/THF (5 mL) 중에 용해시키고, LiOH (0.042 g, 1.74 mmol) 및 물 (100 μL, 5.55 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하고, LC-MS에 의해 체크하였다. 유기부를 증발시키고, 생성된 현탁액을 물 대략 10 mL로 희석하였다. 생성된 현탁액을 3 M HCl (수성)을 사용하여 pH 1로 산성화시키고, DCM (3 x 25 mL)으로 추출하였다. 합한 유기부를 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시키고, 진공 하에 건조시켜 화합물 4 49 mg (98% 수율)을 회백색 고체로서 수득하였다. 생성물을 추가 정제 없이 사용하였다.



[1123]

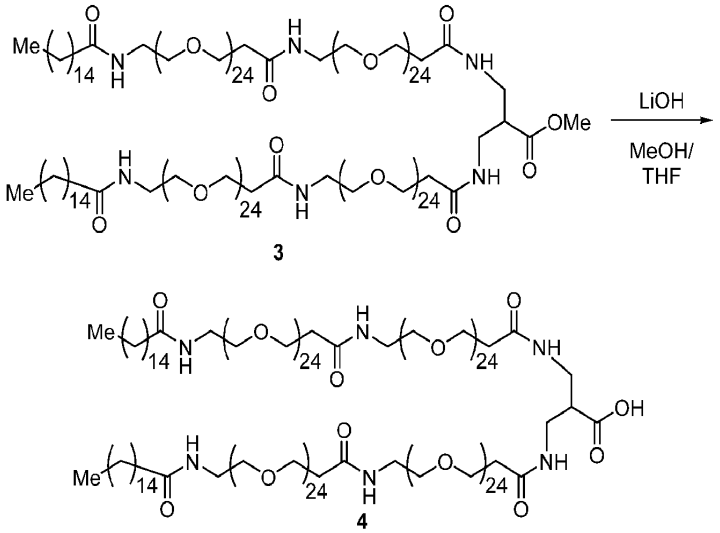
[1124] 화합물 4 (0.05 g, 0.010 mmol) 및 COMU (0.0063 g, 0.015 mmol)를 DCM (1 mL) 중에 용해시키고, NEt_3 (13.7 μL, 0.098 mmol)을 첨가하고, 생성된 용액을 10분 동안 교반하였다. 개별 바이알에서, 화합물 5를 DCM (0.3 mL) 중에 용해시켰다. 10분 후, 화합물 5의 용액을 1807-019를 함유하는 용액에 첨가하였다. 생성된 용액을 2 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 1 M HCl (수성) (10 mL)로 켄칭하고, 유기 층을 10 mL DCM으로 희석하였다. 층을 분리하고, 유기 층을 추가로 1 M HCl (수성) (20 mL), 포화 $NHCO_3$(수성) (1 x 20 mL), 포화 NaCl (수성) (1 x 20 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시키고, 진공 하에 건조시켜 조 LP210-p를 회백색 고체 94 mg으로서 수득하였다. 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 DCM 중 0-20% MeOH로 용리시키면서 정제하였다. 순수한 LP210-p를 함유하는 분획을 합하고, 농축시켜 7 mg (13.3% 수율)을 수득하였다.

[1125] LP217-p의 합성



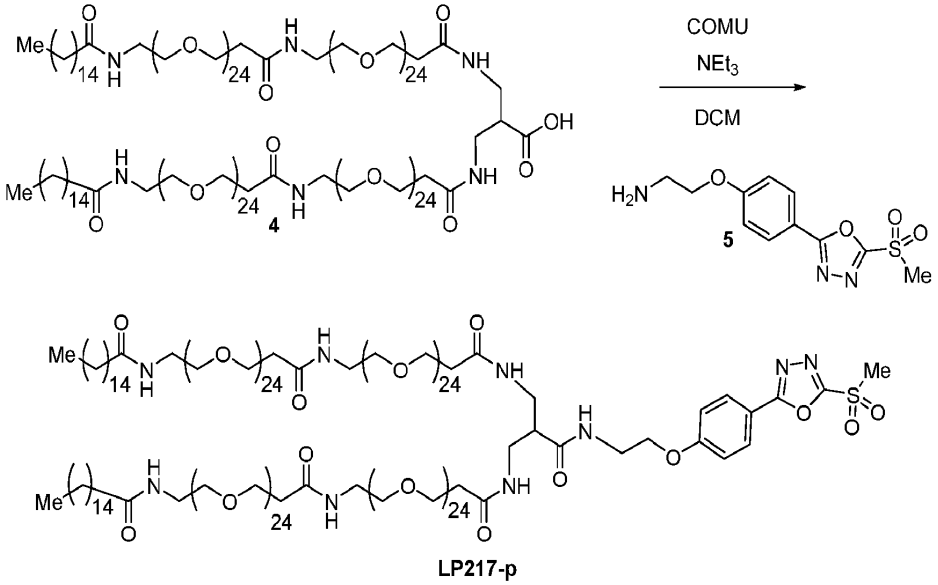
[1126]

[1127] 화합물 1 (0.265 g, 0.105 mmol) 및 COMU (0.0542 g, 0.735 mmol)를 DCM (5 mL) 중에 용해시키고, NEt_3 (0.1 mL, 0.74 mmol)을 첨가하였다. 생성된 용액을 10분 동안 교반하였다. 10분 후, 화합물 2 (0.010 g, 0.049 mmol)를 반응물에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 밤새 교반하고, LC-MS에 의해 체크하였다. 반응 혼합물을 물 5 mL로 켄칭하고, 5분 동안 교반하였다. 층을 분리하고, 유기 층을 포화 $NaHCO_3$(수성) (2 x 20 mL), 물 (20 mL), 2 M HCl (수성) (2 x 20 mL), 포화 NaCl (수성) (20 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켜 조 화합물 3을 왁스상 회백색 고체 (약 350 mg)로서 수득하였다. 조 화합물 3을 실리카 겔 크로마토그래피 (DCM 중 2-20% MeOH)에 의해 정제하였다. 화합물 3을 함유하는 분획을 합하여 89 mg (36% 수율)을 회백색 고체로서 수득하였다.



[1128]

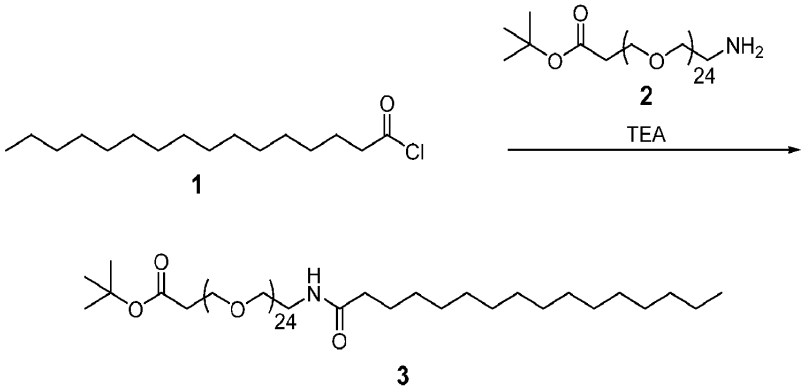
[1129] 화합물 3 (0.089 g, 0.017 mmol)을 1:1 MeOH/THF (5 mL) 및 LiOH (0.042 g, 1.74 mmol) 중에 용해시키고, 물 (180 μL, 9.85 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하고, LC-MS에 의해 체크하였다. 유기 부를 증발시키고, 생성된 현탁액을 물 대략 10 mL로 희석하였다. 현탁액을 3 M HCl (수성)을 사용하여 pH 1로 산성화시키고, DCM (3 x 25 mL)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시키고, 진공 하에 건조시켜 화합물 4 81 mg (91% 수율)을 회백색 고체로서 수득하였다. 생성물을 추가 정제 없이 사용하였다.



[1130]

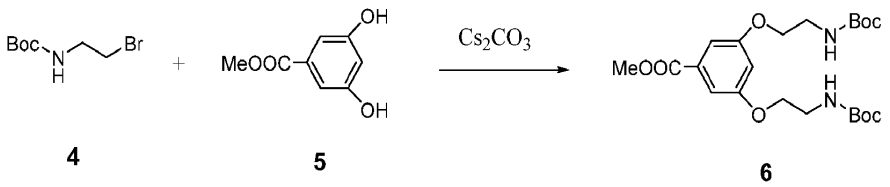
[1131] 화합물 4 (0.081 g, 0.016 mmol) 및 COMU (0.010 g, 0.024 mmol)를 DCM (1 mL) 중에 용해시키고, NEt_3 (44.2 μL, 0.32 mmol)을 첨가하였다. 생성된 용액을 10분 동안 교반하였다. 개별 바이알에서, 화합물 5를 DCM (0.3 mL) 중에 용해시켰다. 10분 후, 화합물 5의 용액을 화합물 4를 함유하는 용액에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 1 M HCl (수성) (10 mL)로 켄칭하고, 유기 층을 10 mL DCM으로 희석하였다. 층을 분리하고, 유기 층을 추가로 1 M HCl (수성) (20 mL), 포화 $NHCO_3$(수성) (1 x 20 mL), 포화 NaCl (수성) (1 x 20 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시키고, 진공 하에 건조시켜 조 LP217-p를 회백색 고체 94 mg으로서 수득하였다. 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피 (DCM 중 0-20% MeOH)에 의해 정제하였다. 순수한 LP217-p를 함유하는 분획을 합하고, 농축시켜 24 mg (28% 수율)을 수득하였다.

[1132] LP220-p의 합성



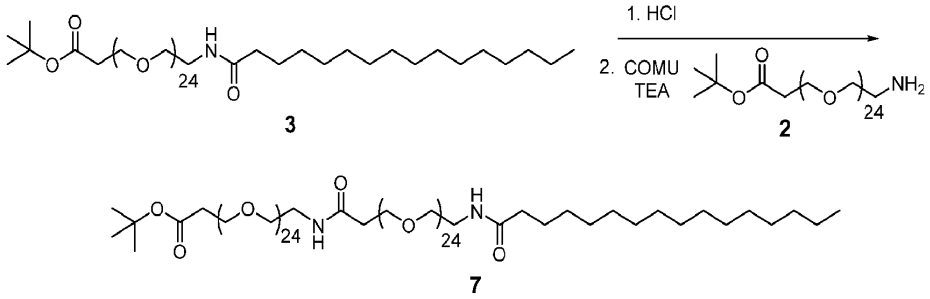
[1133]

[1134] DCM 중 화합물 2 (3.3381 mmol, 4.0140 g) 및 TEA (4.0058 mmol, 0.4054 g, 0.558 mL)의 용액에 화합물 1 (3.5050 mmol, 0.9634 g, 1.059 mL)을 첨가하였다. LC-MS에 의해 화합물 2의 완전 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 잔류물을 표준 후처리 (1 N HCl, 포화 $NaHCO_3$, 염수 세척, 및 Na_2SO_4 상에서 건조)에 의해 정제하였다. 화합물 3을 추가 정제 없이 사용하였다. 수율: 4.5 g.



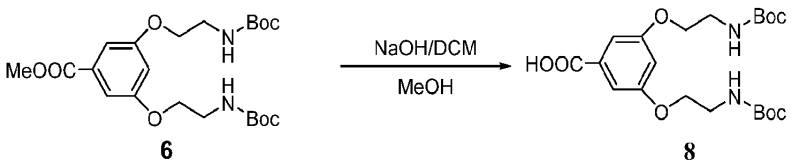
[1135]

[1136] 50 mL DMF 중 화합물 5 (29.7354 mmol, 5.0000 g)의 용액에 실온에서 화합물 4 (65.4178 mmol, 13.7502 g) 및 Cs_2CO_3 (118.9414 mmol, 38.7535 g)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 60℃에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 표준 후처리 (1 N NaOH, 염수 세척, 및 Na_2SO_4 상에서 건조)에 의해 정제하였다. 화합물 6을 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하고, 농축시켜 6.0 g을 수득하였다.



[1137]

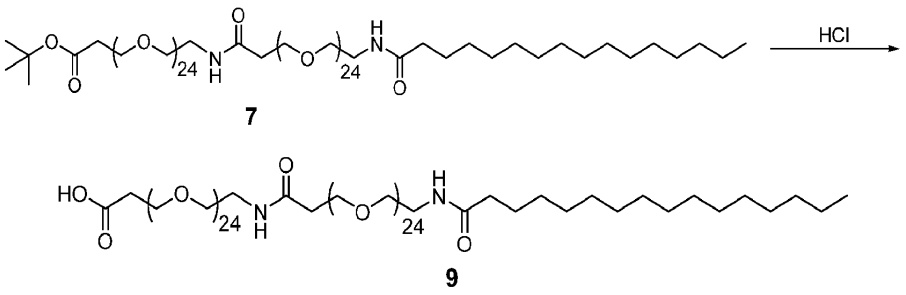
[1138] 화합물 3 (1.0500 mmol, 1.5129 g)을 4 N HCl/디옥산 8 mL 중에 용해시키고, 실온에서 5시간 동안 교반하였다. HCl을 제거한 후, DCM 중 화합물 2 (1.0000 mmol, 1.2020 g), COMU (1.2000 mmol, 0.5139 g), 및 TEA (3.0000 mmol, 0.3035 g, 0.418 mL)를 첨가하였다. TLC에 의해 화합물 2의 완전 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 잔류물을 표준 후처리 (1 N HCl, 포화 $NaHCO_3$, 염수 세척, 및 Na_2SO_4 상에서 건조)에 의해 정제하였다. 화합물 7을 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하고, 농축시켜 2.28 g을 수득하였다.



[1139]

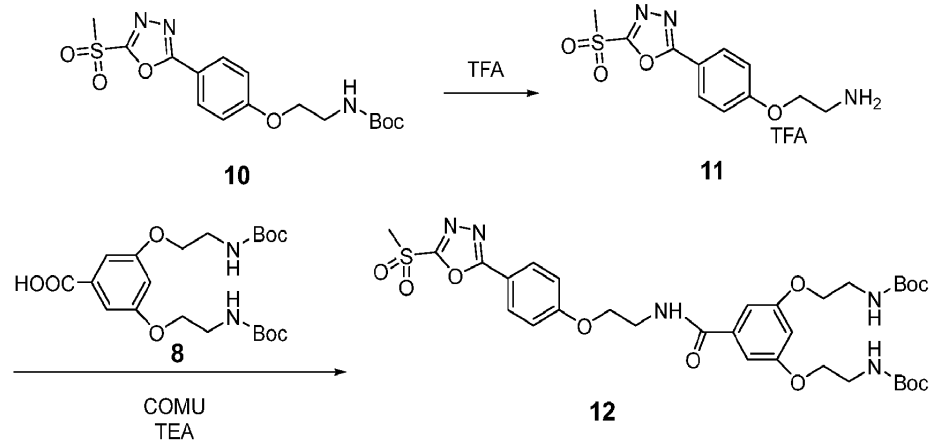
[1140] 5 mL MeOH 중 NaOH의 용액에 실온에서 20 mL DCM 중 화합물 6 (1.0000 mmol, 0.4545 g)을 첨가하였다. 반응

혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 pH 3으로 산성화시켰다. 생성물을 Na_2SO_4로 건조시켜 0.200 g의 화합물 8을 수득하고 이를 추가 정제 없이 사용하였다.



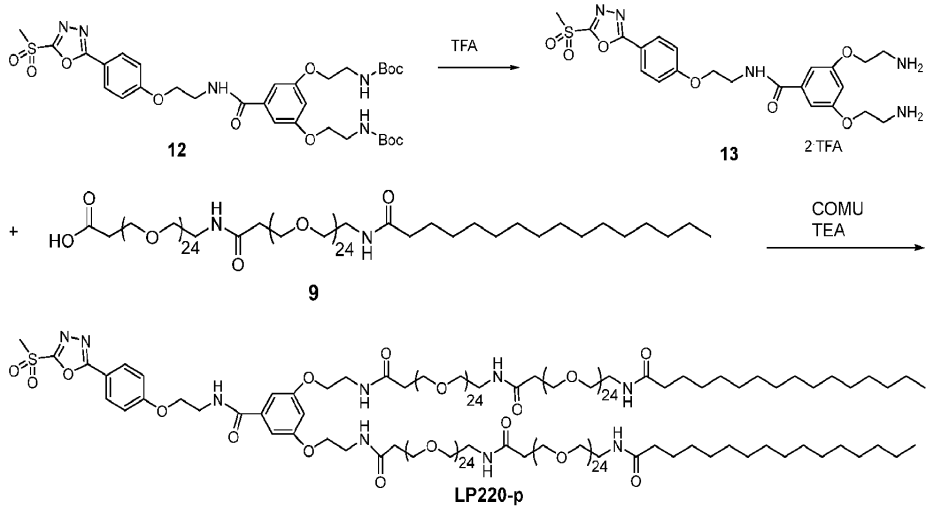
[1141]

[1142] 화합물 7 (0.7707 mmol, 1.9800 g)을 실온에서 밤새 4 N HCl/디옥산 10 mL 중에 용해시켰다. 용매를 제거하고, 생성물을 진공 하에 2시간 동안 두어 1.50 g의 화합물 9를 수득하고, 이를 추가 정제 없이 사용하였다.



[1143]

[1144] 화합물 10 (0.0782 mmol, 0.0300 g)을 1 mL DCM 중에 용해시키고, 0.5 mL TFA를 첨가하고, 혼합물을 2시간 동안 교반하였다. TFA를 제거하고, 화합물 11을 진공 하에 1시간 동안 건조시켰다. 화합물 8 (0.0822 mmol, 0.0362 g), COMU (0.0939 mmol, 0.0402 g), 및 TEA (0.2347 mmol, 0.0237 g, 0.033 mL)를 5 mL DCM 중에 5분 동안 용해시킨 다음, DCM 중 화합물 11을 첨가하였다. TLC에 의해 화합물 11의 완전 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 화합물 12를 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 0.0135 g을 수득하였다.

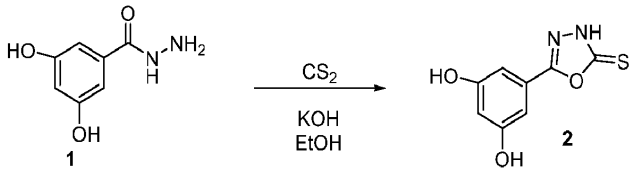


[1145]

[1146] 화합물 12 (0.0191 mmol, 0.0135 g)를 DCM 1 mL 중에 용해시키고, TFA 0.5 mL를 첨가하고, 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. TFA를 제거하고, 화합물 13을 진공 하에 1시간 동안 건조시켰다. 화합물 9 (0.0398 mmol, 0.1000 g), COMU (0.0477 mmol, 0.0204 g), 및 TEA (0.1194 mmol, 0.0121 g, 0.017 mL)를 DCM 3 mL 중에 5분

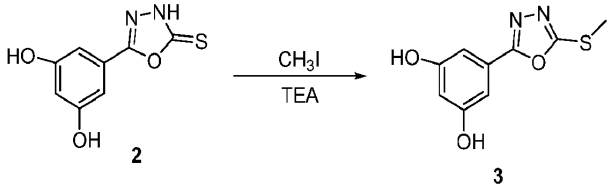
동안 용해시킨 다음, DCM 중 화합물 13을 첨가하였다. TLC에 의해 화합물 13의 완전 전환이 관찰될 때까지 혼합물을 교반하였다. LP220-p를 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 0.0400 g을 수득하였다.

[1147] LP221-p의 합성



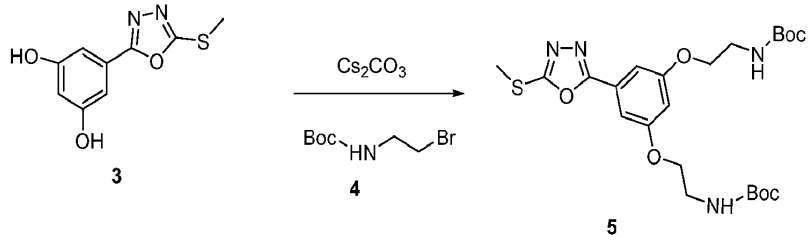
[1148]

[1149] 이황화탄소 (75.0045 mmol, 5.7101 g, 4.532 mL)를 EtOH (150 mL) 중 화합물 1 (25 mmol, 4.20 g) 및 수산화칼륨의 용액에 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물을 24시간 동안 환류하였다. 완료 시, 용매를 감압 하에 증발시키고, 잔류물을 물 중에 용해시켰다. 수용액을 HCl을 사용하여 pH 2로 산성화시켰다. 생성물을 EtOAc로 추출하고, 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 EtOAc/헥산을 사용하여 정제하였다. 정제 후, 3.5 g의 화합물 2를 오렌지색 고체로서 수득하였다.



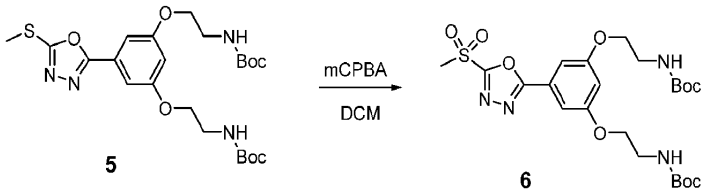
[1150]

[1151] THF (40 mL) 중 화합물 2 (10.0000 mmol, 2.1021 g)를 0℃로 냉각시켰다. CH_3I (11.0000 mmol, 1.5609 g, 0.685 mL)를 첨가하고, 이어서 TEA (10.1000 mmol, 1.0221 g, 1.408 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 4시간 동안 교반하였다. 완료 시, 용매를 NH_4Cl에 의해 켄칭하였다. 유기 상을 염수로 세척하고, 건조시키고, 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 3 1.5 g을 수득하였다.



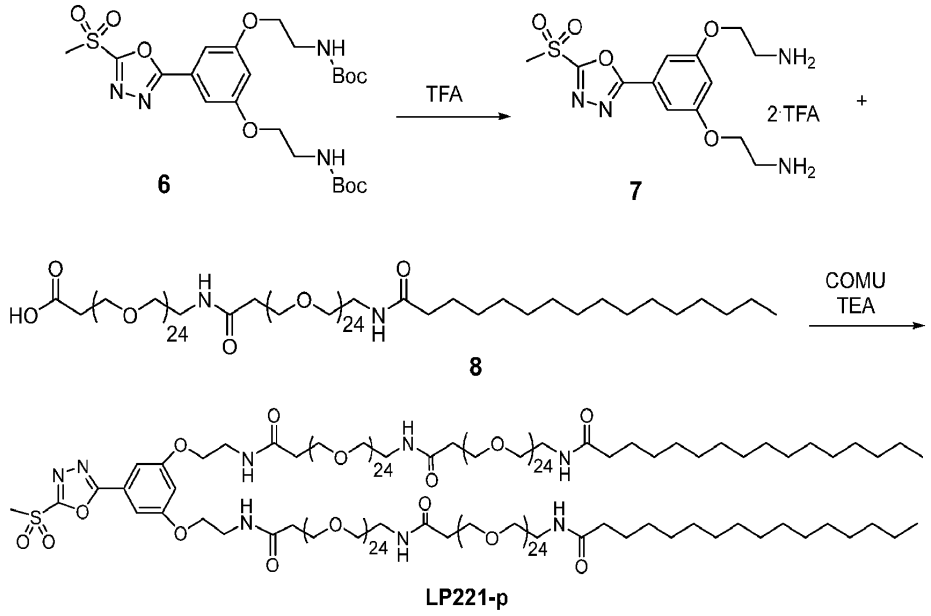
[1152]

[1153] 10 mL DMF 중 화합물 4 (6.8679 mmol, 1.5391 g)의 용액에 실온에서 화합물 3 (3.1218 mmol, 0.7000 g) 및 Cs_2CO_3 (9.3654 mmol, 3.0514 g)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 60℃에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 표준 후처리 (1 N NaOH, 염수 세척, 및 Na_2SO_4 상에서 건조시킴) 및 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 5 1.0 g을 수득하였다.



[1154]

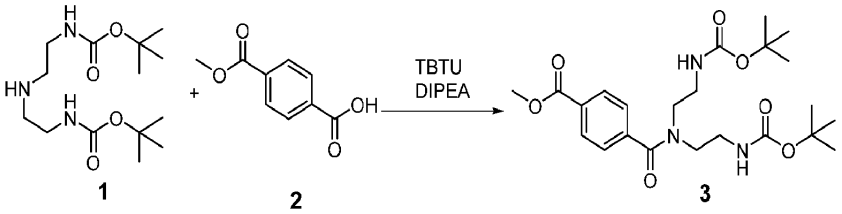
[1155] TLC에 의해 mCPBA의 완전 전환이 관찰될 때까지 DCM 중 화합물 5 (0.2000 mmol, 0.1021 g) 및 mCPBA (0.9998 mmol, 0.1725 g)의 혼합물을 교반하였다. 반응 혼합물을 표준 후처리 (1 N HCl, 포화 $NaHCO_3$, 염수 세척, 및 Na_2SO_4 상에서 건조시킴) 및 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 6 0.05 g을 수득하였다.



[1156]

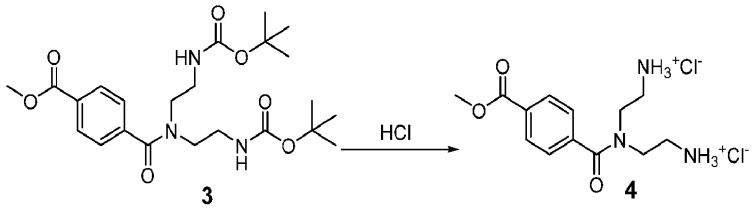
[1157] 화합물 6 (0.0191 mmol, 0.0104 g)을 1 mL DCM 중에 용해시키고, TFA 0.5 mL를 첨가하고, 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. 모든 TFA를 제거하고, 화합물 7을 진공 하에 1시간 동안 건조시켰다. 화합물 8 (0.0398 mmol, 0.1000 g), COMU (0.0477 mmol, 0.0204 g), 및 TEA (0.1990 mmol, 0.0201 g, 0.028 mL)를 DCM 3 mL 중에 5분 동안 용해시킨 다음, DCM 중 화합물 7을 첨가하였다. TLC에 의해 화합물 7의 완전 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 잔류물을 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 LP221-p 0.016 g을 수득하였다.

[1158] LP223-p의 합성



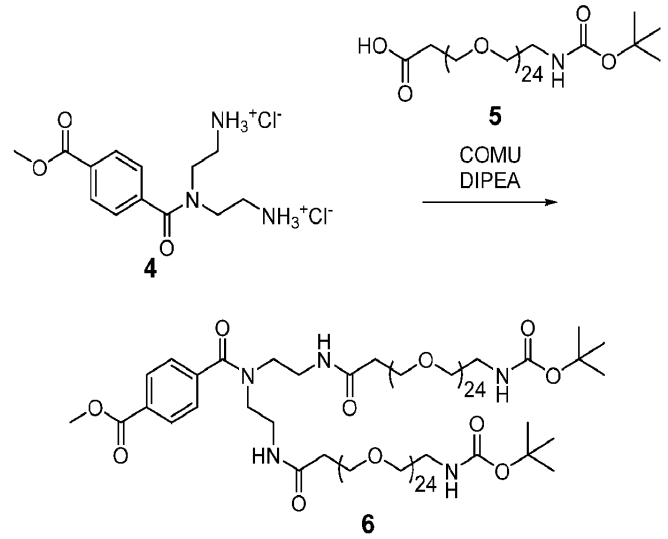
[1159]

[1160] 무수 DMF (10 mL) 중 화합물 1 (741 mg, 2.442 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (528 mg, 2.930 mmol, 1.20 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (1.276 mL, 7.327 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 TBTU (980 mg, 3.052 mmol, 1.25 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하였다. 유기 상을 포화 중탄산나트륨 수용액 (10 mL)으로 켄칭하고, EtOAc (2 x 10 mL)로 추출하였다. 유기 상을 합하고, 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 화합물 3을 콤비플래쉬®에 의해 정제하고, 헥산 중 40-80% EtOAc로 용리시켰다. LC-MS: [M+H]+, 계산치 466.25, 실측치 466.72.



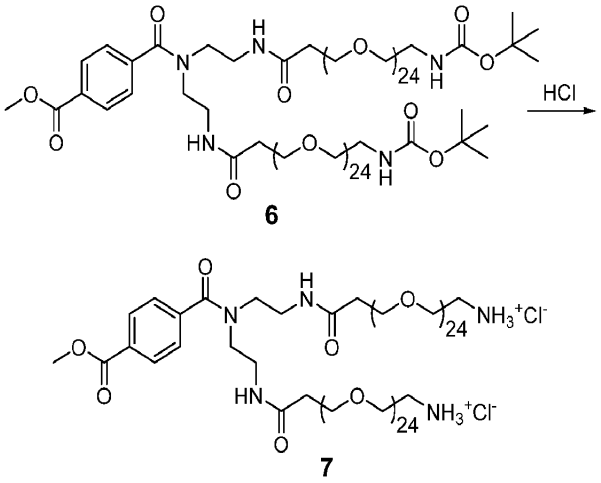
[1161]

[1162] 화합물 3 (990 mg, 2.126 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 4 M HCl (6.38 mL, 25.518 mmol, 12 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+H]/+ 계산치 266.14, 실측치 266.43.



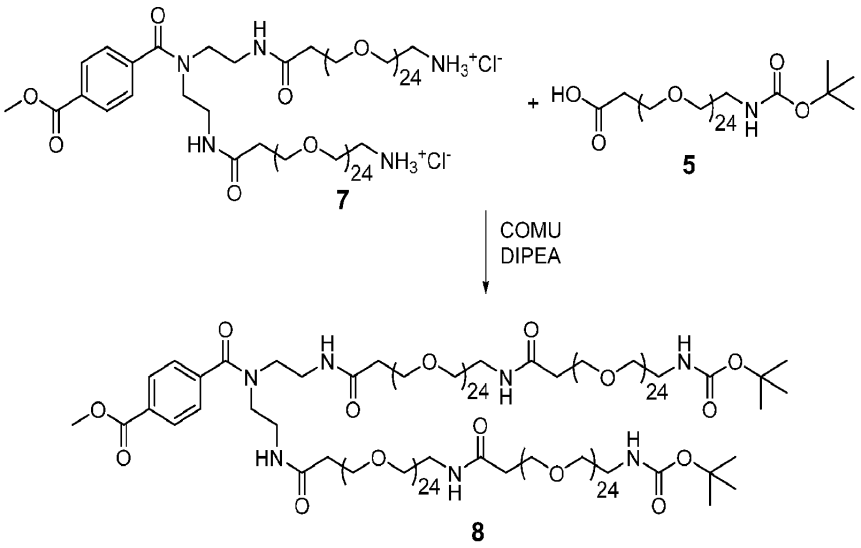
[1163]

[1164] 무수 DCM (10 mL) 중 화합물 4 (100 mg, 0.295 mmol, 1.0 당량), 화합물 5 (755 mg, 0.606 mmol, 2.05 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (0.257 mL, 0.025 mmol, 5.0 당량)의 용액에 실온에서 COMU (278 mg, 0.650 mmol, 2.20 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 포화 염화암모늄 (10 mL) 및 중탄산나트륨 수용액 (10 mL)으로 세척하였다. 유기 상을 무수 Na2SO4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 화합물 6을 콤비플래쉬®에 의해 DCM 중 8-18% MeOH로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+3H]/3, 계산치 907.86, 실측치 907.61.



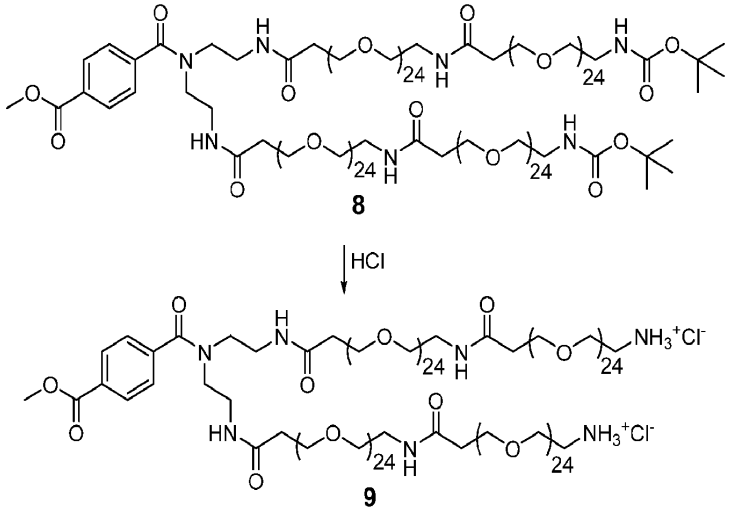
[1165]

[1166] 화합물 6 (550 mg, 0.202 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 4 M HCl (1.01 mL, 4.040 mmol, 20 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 7을 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+H]/+ 계산치 841.16, 실측치 842.20.



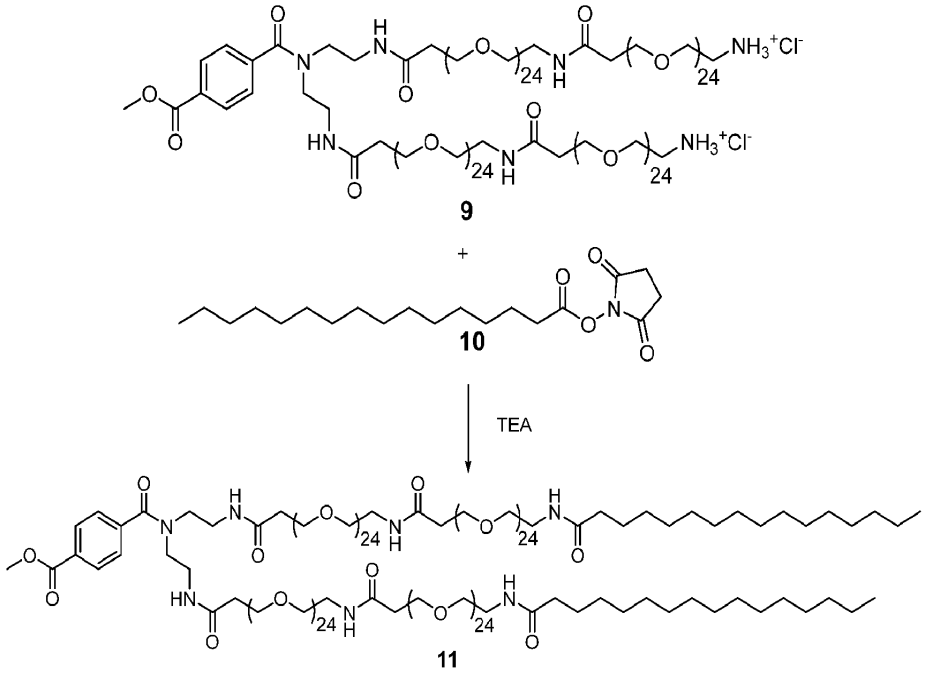
[1167]

[1168] 무수 DCM (10 mL) 중 화합물 1 (490 mg, 0.188 mmol, 1.0 당량), 화합물 5 (482 mg, 0.387 mmol, 2.05 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (0.164 mL, 0.944 mmol, 5.0 당량)의 용액에 실온에서 COMU (177 mg, 0.415 mmol, 2.20 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 포화 염화암모늄 (10 mL) 및 중탄산나트륨 수용액 (10 mL)으로 세척하였다. 유기 상을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 화합물 8을 콤비플래쉬®에 의해 DCM 중 8-20% MeOH로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+5H]/5, 계산치 960.18, 실측치 961.74.



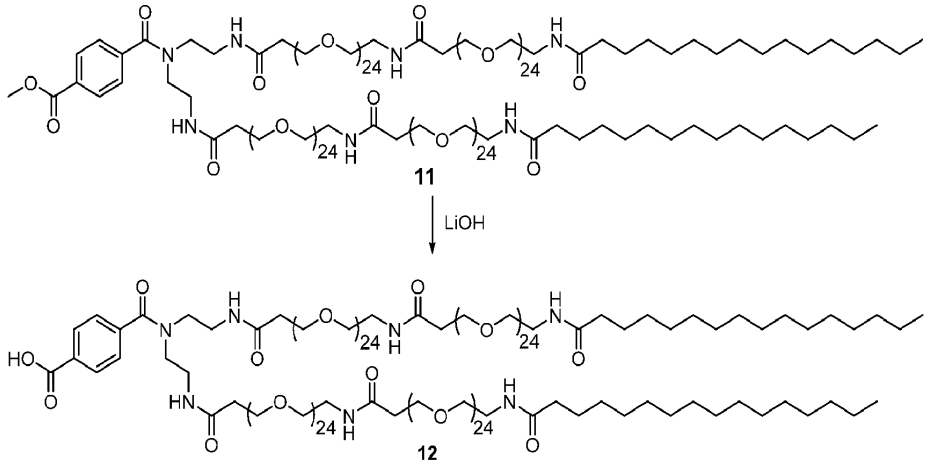
[1169]

[1170] 화합물 1 (670 mg, 0.134 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 4 M HCl (0.673 mL, 2.691 mmol, 20 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 9를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+5H]/5 계산치 956.16, 실측치 957.66.



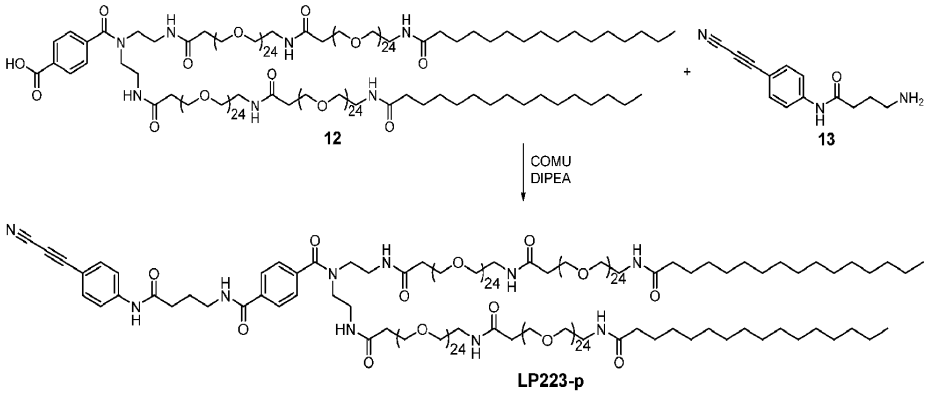
[1171]

[1172] 무수 DCM (20 mL) 중 화합물 9 (650 mg, 0.134 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 10 (106 mg, 0.301 mmol, 2.25 당량)의 용액에 실온에서 TEA (0.095 mL, 0.669 mmol, 5.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하고, 용매를 농축시켰다. 화합물 11을 콤비플래쉬®에 의해 DCM 중 8-20% MeOH로 용리시키면서 분리하였다. LC-MS: 계산치 [M+5H]/5 1051.45, 실측치 1053.44.



[1173]

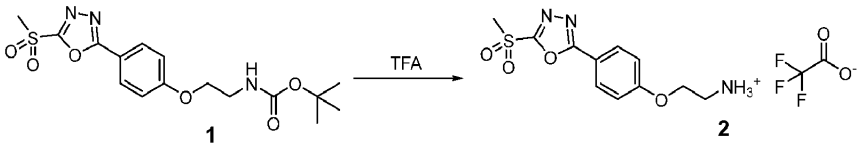
[1174] THF (5 mL) 및 물 (5 mL) 중 화합물 11 (460 mg, 0.0875 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 LiOH (10.5 mg, 0.437 mmol, 5.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물 pH를 HCl을 첨가하여 3.0으로 조정하고, DCM (2 x 10 mL)으로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 화합물 12를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+5H]+/5 1048.65, 실측치 1050.68.



[1175]

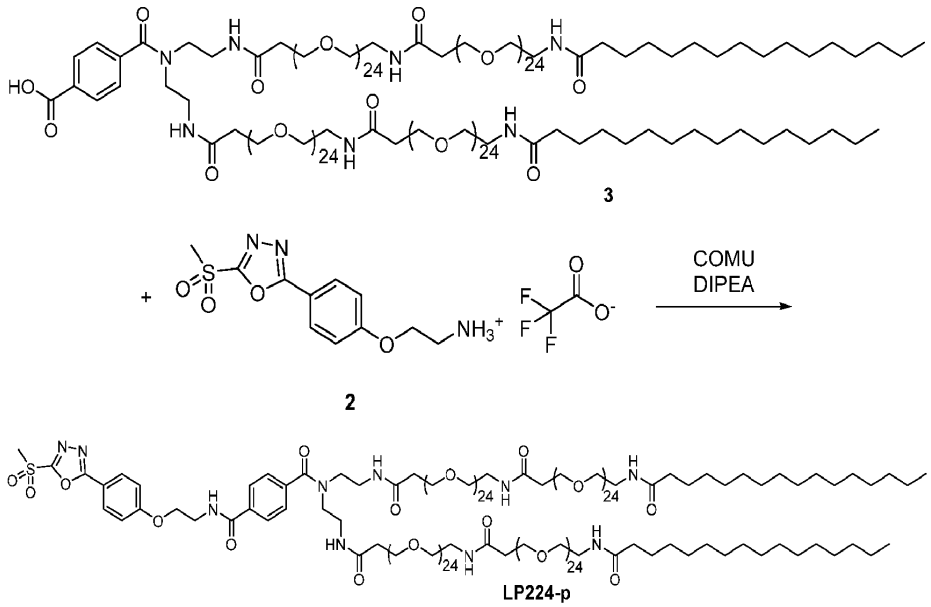
[1176] 무수 DCM (3 mL) 중 화합물 12 (100 mg, 0.0191 mmol, 1.0 당량), 화합물 13 (4.8 mg, 0.021 mmol, 1.1 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (0.010 mL, 0.0572 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 COMU (10.2 mg, 0.0238 mmol, 1.25 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 포화 중탄산나트륨 수용액 (5 mL)으로 세척하였다. 유기 상을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. LP223-p를 콤비플래쉬®에 의해 DCM 중 8-20% MeOH로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+5H]/5, 계산치 1090.47, 실측치 1091.85.

[1177] LP224-p의 합성



[1178]

[1179] DCM (1 mL) 중 화합물 1 (12 mg, 0.0313 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 TFA (0.5 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 2를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+H]+ 계산치 284.06, 실측치 284.26.

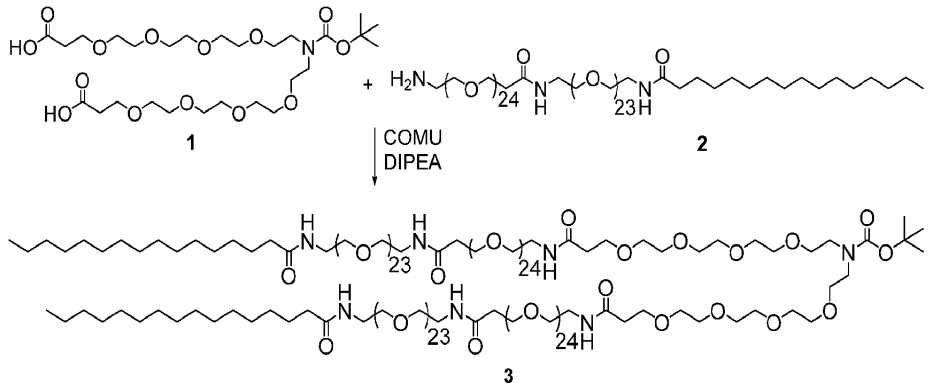


[1180]

[1181] 무수 DCM (3 mL) 중 화합물 3 (150 mg, 0.0286 mmol, 1.0 당량, LP223-p 합성으로부터의 화합물 12), 화합물 2 (12.5 mg, 0.0315 mmol, 1.1 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (0.015 mL, 0.0859 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 COMU (15.3 mg, 0.0358 mmol, 1.25 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 포화 중탄산나트륨 수용액 (5 mL)으로 세척하였다. 유기 상을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키

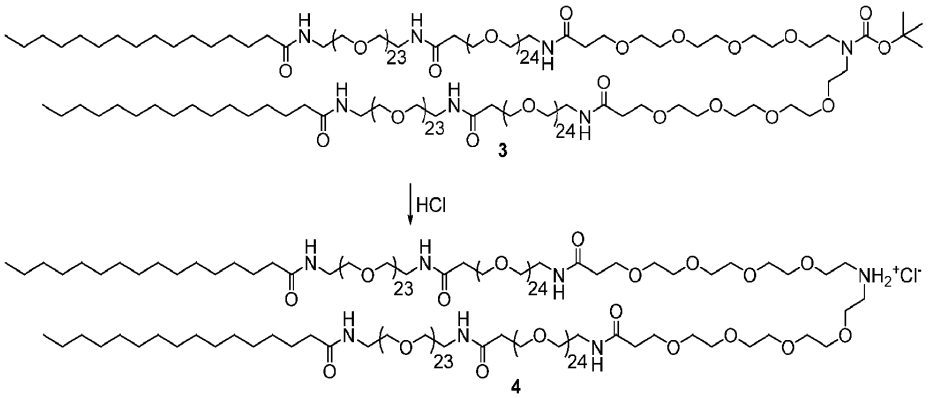
고, 농축시켰다. LP224-p를 콤비플래쉬®에 의해 DCM 중 8-16% MeOH로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+5H]/5, 계산치 1101.66, 실측치 1103.13.

[1182] LP225-p의 합성



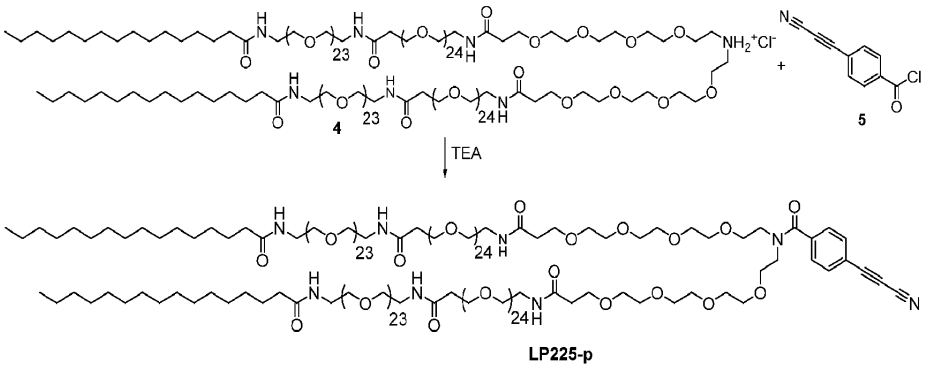
[1183]

[1184] 무수 DCM (10 mL) 중 화합물 1 (80 mg, 0.130 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (652 mg, 0.267 mmol, 2.05 당량), 및 디이소프로필에틸아민 (0.068 mL, 0.391 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 COMU (134 mg, 0.312 mmol, 2.40 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하였다. 화합물 3을 콤비플래쉬®에 의해 DCM 중 8-16% MeOH로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+5H]/5, 계산치 1091.89, 실측치 1093.41.



[1185]

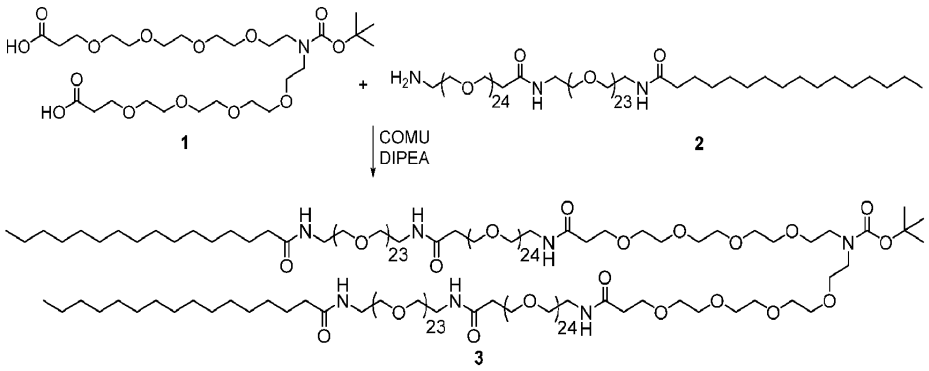
[1186] 화합물 3 (340 mg, 0.0623 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 4 M HCl (0.311 mL, 1.245 mmol, 20 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+5H]/5 계산치 1071.88, 실측치 1073.36.



[1187]

[1188] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 4 (100 mg, 0.0185 mmol, 1.0 당량) 및 화합물 5 (3.9 mg, 0.0204 mmol, 1.10 당량)의 용액에 실온에서 TEA (0.008 mL, 0.0556 mmol, 3.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 유지하고, 용매를 농축시켰다. LP225-p를 콤비플래쉬®에 의해 DCM 중 13-20% MeOH로 용리시키면서 분리하였다. LC-MS: 계산치 [M+5H]/5 1102.48, 실측치 1104.45.

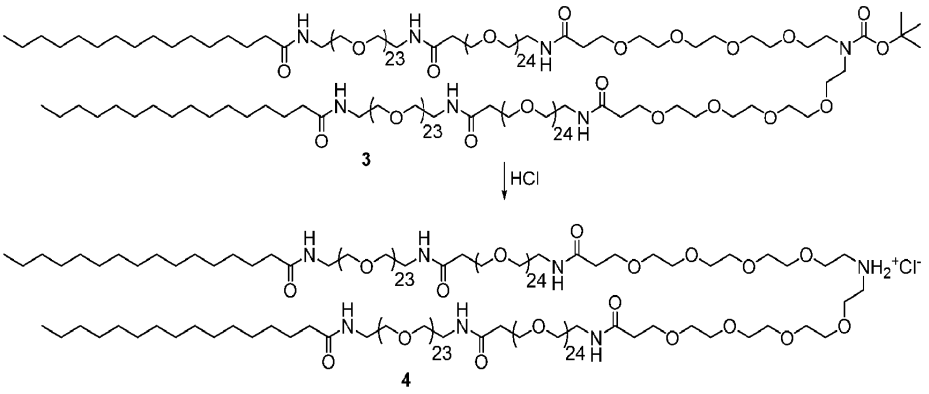
[1189] LP226-p의 합성



1 2 3

[1190]

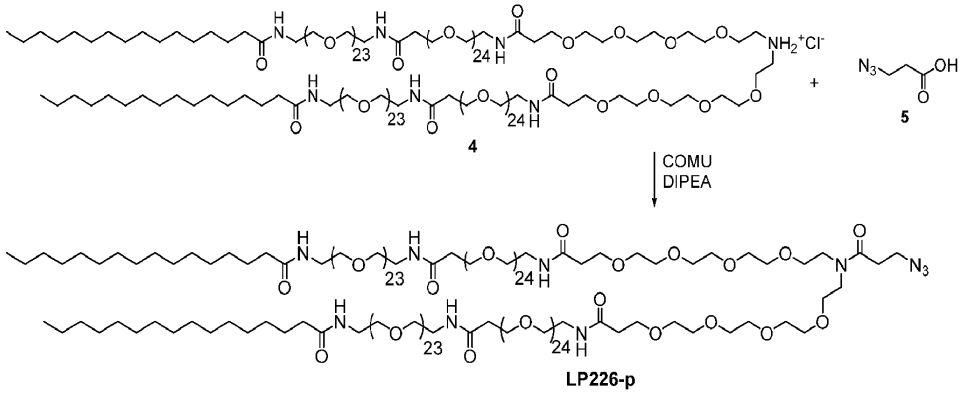
[1191] 무수 DCM (10 mL) 중 화합물 1 (80 mg, 0.130 mmol, 1.0 당량), 화합물 2 (652 mg, 0.267 mmol, 2.05 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (0.068 mL, 0.391 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 COMU (134 mg, 0.312 mmol, 2.40 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하였다. 화합물 3을 콤비플래쉬®에 의해 DCM 중 8-16% MeOH로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+5H]/5, 계산치 1091.89, 실측치 1093.41.



3 4

[1192]

[1193] 화합물 3 (340 mg, 0.0623 mmol, 1.0 당량)에 실온에서 디옥산 중 4 M HCl (0.311 mL, 1.245 mmol, 20 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지한 다음, 농축시켰다. 화합물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+5H]/5 계산치 1071.88, 실측치 1073.36.

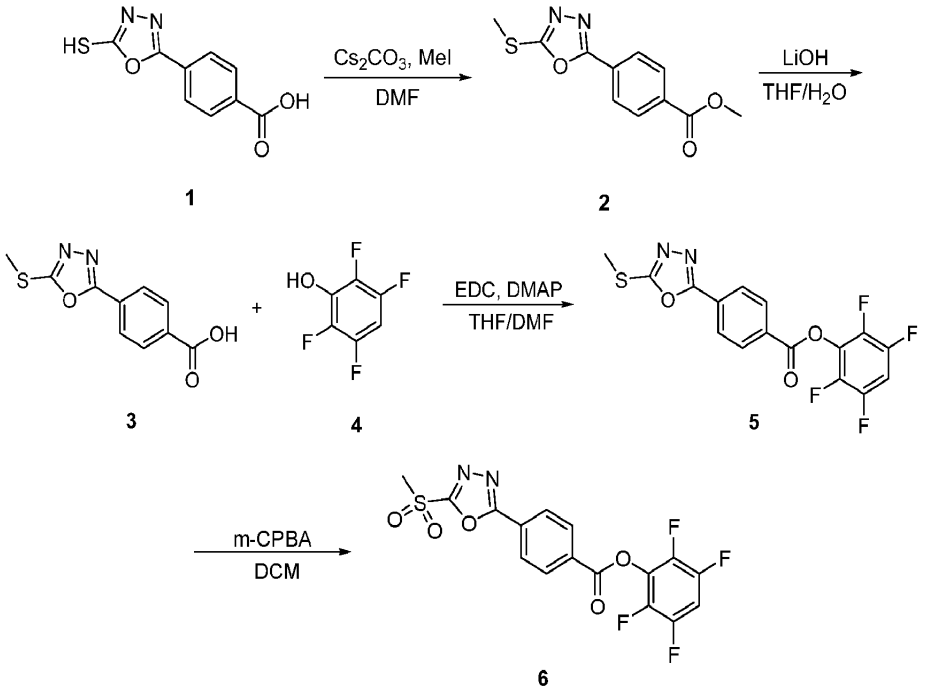


4 5 LP226-p

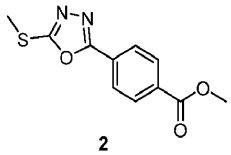
[1194]

[1195] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 4 (80 mg, 0.0148 mmol, 1.0 당량), 화합물 5 (1.9 mg, 0.0163 mmol, 1.1 당량), 및 디이소프로필에틸아민 (0.008 mL, 0.0445 mmol, 3.0 당량)의 용액에 실온에서 COMU (7.9 mg, 0.0185 mmol, 1.25 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 포화 중탄산나트륨 수용액 (5 mL)으로 세척하였다. 유기 상을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. LP226-p를 콤비플래쉬®에 의해 DCM 중 15-20% MeOH로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+5H]/5, 계산치 1091.28, 실측치 1093.41.

[1196] LP238-p의 합성

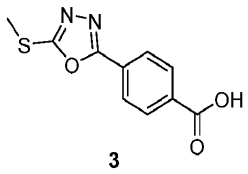


[1197]



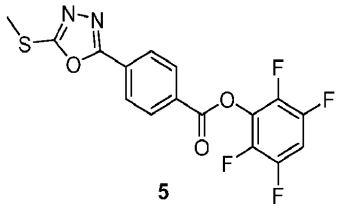
[1198]

[1199] 무수 DMF (80 mL) 중 화합물 1 (5.00 g, 22.50 mmol) 및 Cs_2CO_3 (25.66 g, 78.75 mmol)의 현탁액에 메틸 아이오다이드 (4.20 mL, 67.50 mmol)를 실온에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 48시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물 (200 mL)로 켄칭하고, 혼합물을 EtOAc (3 x 100 mL)로 추출하였다. 유기 상을 합하고, 물 및 염수로 세척하였다. 유기 층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 화합물 2를 담황색 고체, 5.41 g, 96%로서 수득하였다. 화합물 2를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+H]계산치 251.05, 실측치 251.18.



[1200]

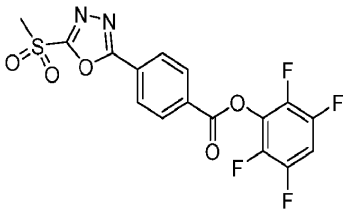
[1201] THF/H2O (50 mL/50 mL) 중 화합물 2 (5.41 g, 21.62 mmol)의 용액에 실온에서 LiOH (2.59 g, 108.08 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 진공 하에 THF를 제거한 후, pH를 [C] HCl에 의해 ~2로 조정하였다. 이어서, EtOAc (3 x 60 mL)를 사용하여 추출하였다. 유기 층을 합하고, 염수로 세척한 다음, 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 화합물 3을 회백색 고체, 5 g, 98%로서 수득하였다. 화합물 3을 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]237.03, 실측치 237.26.



5

[1202]

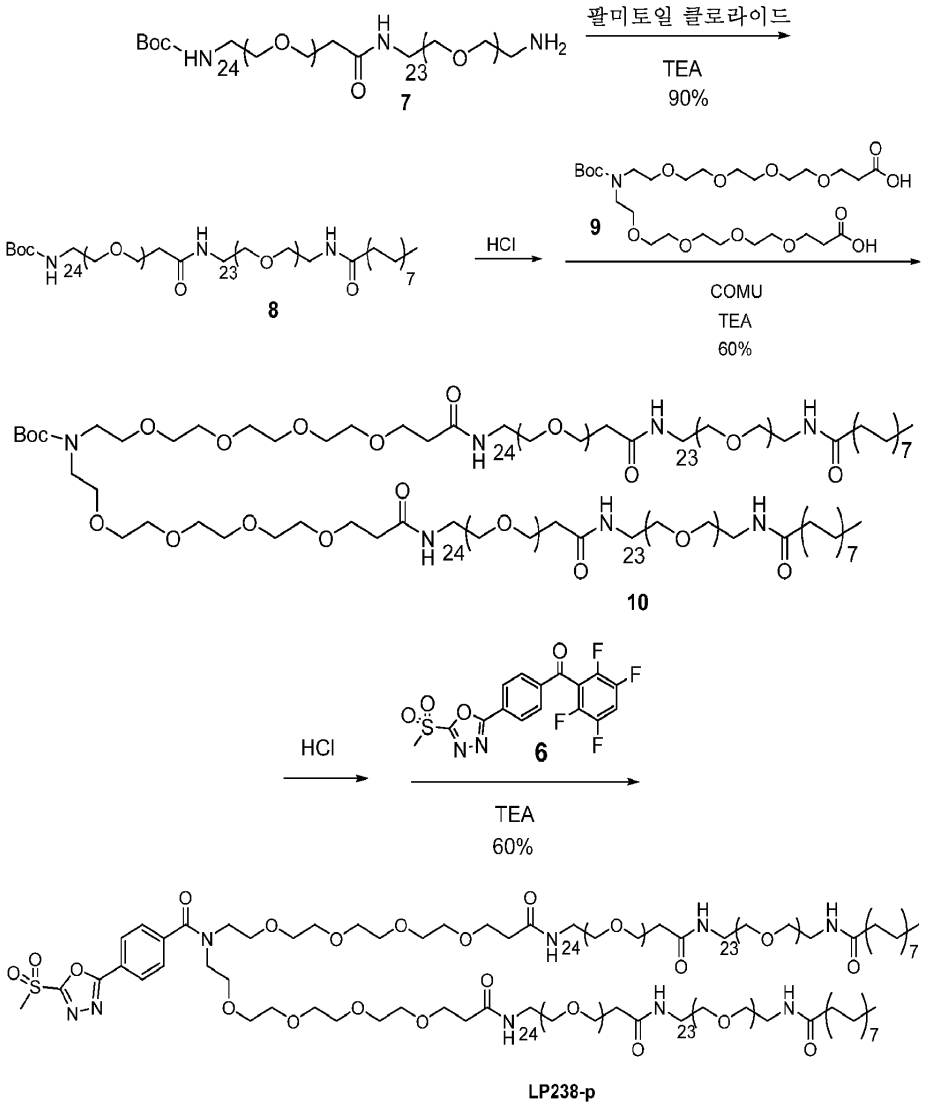
[1203] THF/DMF (80 mL/20 mL) 중 화합물 3 (5.81 g, 24.60 mmol)의 용액에 실온에서 EDC (7.07 g, 36.90 mmol), DMAP (0.30 g, 2.46 mmol) 및 화합물 4 (6.13 g, 36.90 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거한 후, 잔류물을 120 g 칼럼 상에 로딩하고, 화합물 5를 헥산 중 0-50% EtOAc로 용리시켰다. 화합물 5를 백색 고체, 9.36 g, 99%로서 수득하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]385.03, 실측치 385.46.



6

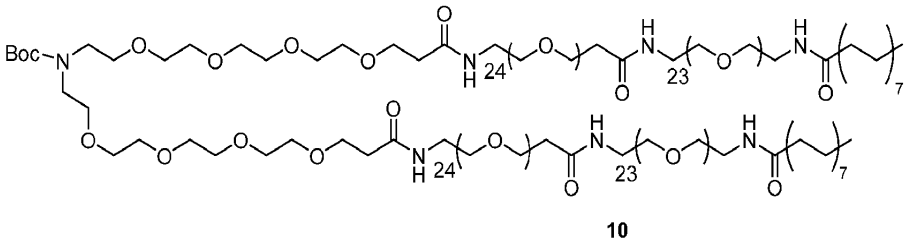
[1204]

[1205] DCM (110 mL) 중 화합물 5 (2.29 g, 5.96 mmol)의 용액에 0℃에서 70% m-CPBA (5.14 g, 27.79 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 또 다른 1.8 g의 m-CPBA를 실온에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 여과 후, 용매를 진공 하에 제거하였다. 잔류물을 DCM/EtOAc (50 mL/50 mL)로부터 2회 재결정화하였다. 화합물 6을 백색 침상 결정으로서 수득하였다 (1.93 g, 78%). LC-MS: 계산치 [M+H]417, 실측치 417.



[1206]

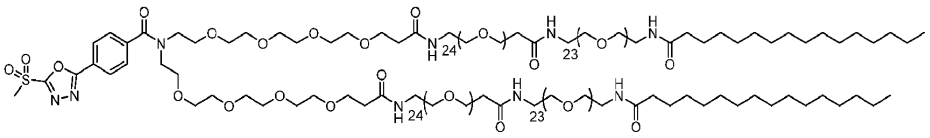
[1207] DCM (100 mL) 중 화합물 7 (10.00 g, 4.34 mmol)의 용액에 0℃에서 팔미토일 클로라이드 (1.31 g, 4.78 mmol) 및 TEA를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반한 다음, 용매를 진공 하에 제거하였다. 잔류물을 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 DCM 중 0-20% MeOH를 사용하여 정제하였다. 화합물 8을 백색 고체, 10.0 g, 90%로서 수득하였다.



10

[1208]

[1209] 화합물 8 (9.56 g, 3.76 mmol)을 4 N HCl/디옥산 25 mL 중에 용해시키고, 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 모든 용매를 제거하고, 잔류물을 진공 하에 2시간 동안 건조시켰다. 잔류물을 150 mL DCM 중에 재용해시키고, TEA를 첨가하고, 이어서 화합물 9 (1.10 g, 1.79 mmol), 및 COMU (1.69 g, 3.94 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 표준 후처리 (1 N HCl, 포화 비카르브, 염수 세척) 후, DCM을 제거하였다. 화합물 10을 120 g 칼럼에 의해 DCM 중 0-20% MeOH를 사용하여 정제하여 5.90 g, 60%를 수득하였다.

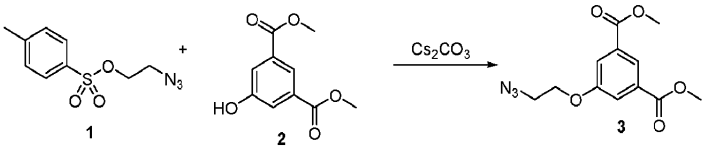


LP238-p

[1210]

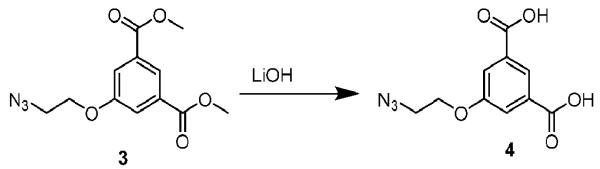
[1211] 화합물 10 (4.50 g, 0.82 mmol)을 4 N HCl/디옥산 20 mL 중에 용해시키고, 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 모든 용매를 제거하고, 잔류물을 진공 하에 2시간 동안 건조시켰다. 잔류물을 100 mL DCM 중에 재용해시키고, TEA를 첨가하고, 이어서 화합물 6 (0.69 g, 1.65 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. TEA를 1H HCl 세척에 의해 제거하고, 유기 층을 농축시켰다. 조 LP238-p를 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 DCM 중 0-20% MeOH를 사용하여 정제하였다. LP238-p 2.80 g (60%)을 담황색 고체로서 수득하였다.

[1212] LP240-p의 합성



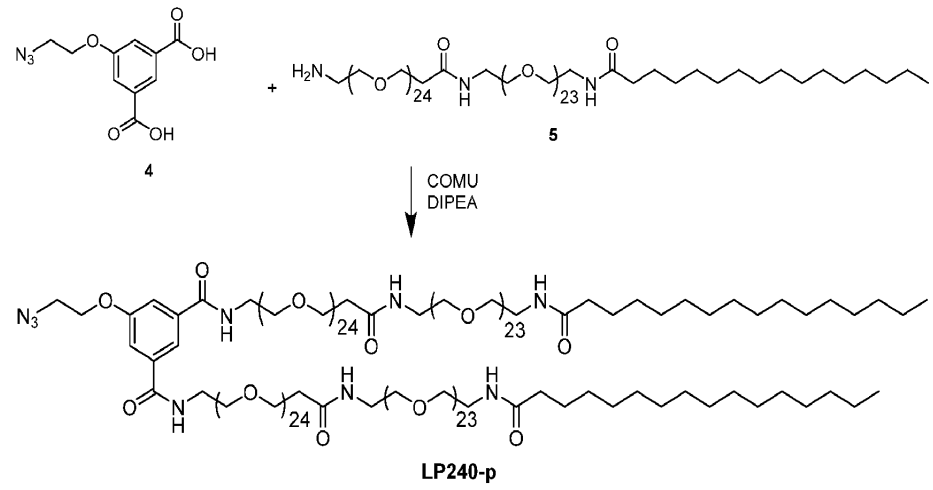
[1213]

[1214] 무수 DMF (10 mL) 중 화합물 1 (880 mg, 3.647 mmol, 1.0 당량) 및 Cs_2CO_3 (1.782 g, 5.471 mmol, 1.50 당량)의 현탁액에 실온에서 화합물 2 (0.843 g, 4.012 mmol, 1.10 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 물 (20 mL)로 켄칭하고, 혼합물을 에틸 아세테이트 (2 x 10 mL)로 추출하였다. 합한 유기 상을 염수 (1 x 20 mL) 및 물 (1 x 20 mL)로 세척하였다. 유기 상을 무수 Na_2SO_4를 통해 건조시키고, 농축시켰다. 화합물 3을 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: [M+H]+ 계산치 280.09, 실측치 280.39.



[1215]

[1216] THF (10 mL) 및 물 (10 mL) 중 화합물 3 (1000 mg, 3.581 mmol, 1.0 당량)의 용액에 실온에서 LiOH (686 mg, 19.978 mmol, 8.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물 pH를 HCl을 첨가하여 1.0으로 조정하였다. 생성물을 에틸 아세테이트 (2 x 10 mL)로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 화합물 4를 추가 정제 없이 직접 사용하였다. LC-MS: 계산치 [M+H]+ 252.05, 실측치 251.31.

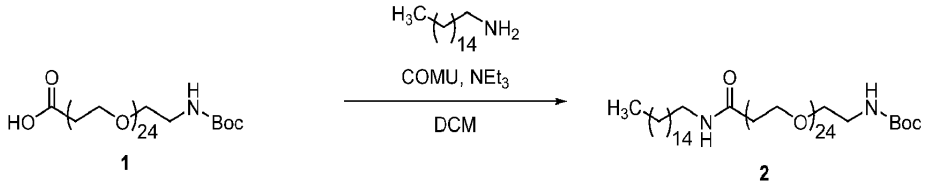


LP240-p

[1217]

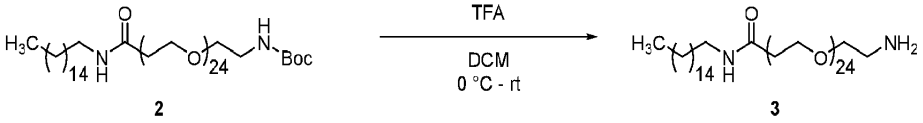
[1218] 무수 DCM (2 mL) 중 화합물 4 (5 mg, 0.0199 mmol, 1.0 당량), 화합물 5 (100 mg, 0.0408 mmol, 2.05 당량), 및 디이소프로필에틸아민 (0.017 mL, 0.0995 mmol, 5.0 당량)의 용액에 실온에서 COMU (20.5 mg, 0.0478 mmol, 2.40 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지하였다. LP240-p를 콤비플래쉬®에 의해 DCM 중 8-20% MeOH로 용리시키면서 정제하였다. LC-MS: [M+5H]/5, 계산치 1019.43, 실측치 1020.79.

[1219] LP246-p의 합성



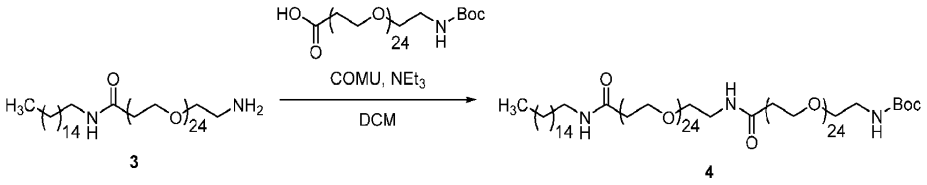
[1220]

[1221] 화합물 1 (0.5 g, 0.401 mmol) 및 COMU (0.206 g, 0.481 mmol)를 DCM (10 mL) 중에 용해시키고, NEt_3 (0.168 mL, 1.2 mmol)을 첨가하였다. 생성된 용액을 10분 동안 교반하였다. 10분 후, 1-아미노헥사데칸 (0.102 g, 0.42 mmol)을 화합물 1 및 COMU의 용액에 첨가하였다. 생성된 용액을 90분 동안 교반한 다음, LC-MS에 의해 체크하였다. 반응 혼합물을 물 5 mL로 켄칭하고, 5분 동안 교반하였다. 층을 분리하고, 유기 층을 1 M HCl $_{(수성)}$ (2 x 15 mL), 포화 $NaHCO_{3(수성)}$ (2 x 20 mL), 물 (20 mL), 포화 NaCl $_{(수성)}$ (2 x 20 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켜 발포성 담황색 고체를 수득하였다. 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피 (DCM 중 0-20% MeOH)에 의해 정제하였다. 화합물 2의 순수한 분획을 합하여 515 mg (87% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.



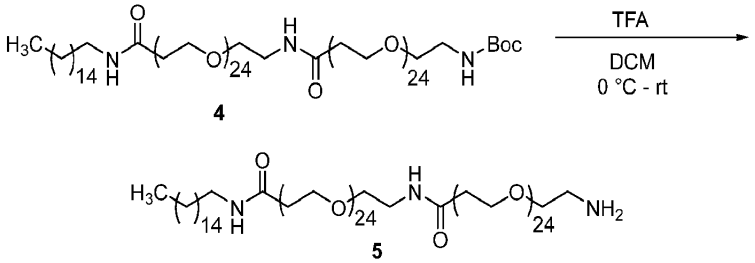
[1222]

[1223] 화합물 2 (0.515 g, 0.35 mmol)를 DCM (4 mL) 중에 용해시키고, 0℃로 냉각시키고, TFA (1 mL, 13 mmol)를 첨가하였다. TFA를 첨가한 후, 반응 혼합물을 실온으로 가온되도록 하였다. 생성된 용액을 90분 동안 교반한 다음, LC-MS에 의해 분석하였다. 발포가 관찰되지 않을 때까지 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_{3(수성)}$의 첨가로 켄칭하고, 5분 동안 교반하였다. 층을 분리하고, 유기 층을 포화 $NaHCO_{3(수성)}$ (2 x 20 mL), 물 (20 mL), 포화 NaCl $_{(수성)}$ (20 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켜 화합물 3을 발포성 백색 고체 0.4674 g (97.4% 수율)으로서 수득하였다.



[1224]

[1225] ^{t}Boc-아미도-PEG_{24}-COOH (0.524 g, 0.42 mmol) 및 COMU (0.180 g, 0.42 mmol)를 DCM (10 mL)에 용해시키고, NEt_3 (0.488 mL, 3.5 mmol)을 첨가하였다. 생성된 용액을 10분 동안 교반하였다. 10분 후, 화합물 3 (0.480 g, 0.35 mmol)을 tBoc-아미도-PEG_{24}-COOH의 용액에 첨가하였다. 생성된 용액을 1시간 동안 교반하고, LC-MS로 체크하였다. 반응 혼합물을 물 5 mL로 켄칭하고, 5분 동안 교반하였다. 층을 분리하고, 유기 층을 1 M HCl (1 x 15 mL), 포화 $NaHCO_{3(수성)}$ (2 x 20 mL), 물 (20 mL), 1 M HCl (1 x 20 mL), 포화 NaCl $_{(수성)}$ (2 x 20 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켜 발포성 담황색 고체 (약 900 mg)를 수득하였다. 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피 (DCM 중 0-20% MeOH)에 의해 정제하였다. 화합물 4를 DCM 중 4% MeOH로 용리시켰다. 화합물 4의 순수한 분획을 합하여 0.780 g (85.7%)을 담분홍색 고체로서 수득하였다.

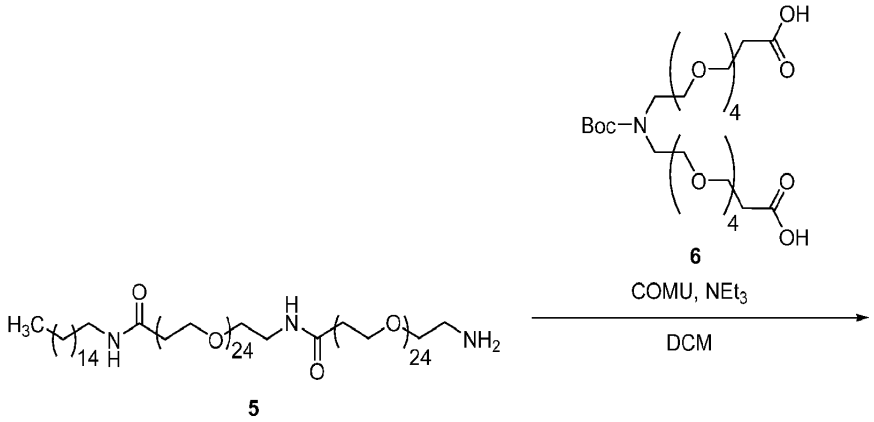


4

5

[1226]

[1227] 화합물 4 (0.78 g, 0.3 mmol)를 DCM (4 mL) 중에 용해시키고, 0℃로 냉각시키고, TFA (1 mL, 13 mmol)를 첨가하였다. TFA를 첨가한 후, 반응 혼합물을 실온으로 가온되도록 하였다. 생성된 용액을 3시간 동안 교반하고, LC-MS에 의해 체크하였다. 발포가 관찰되지 않을 때까지 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_{3(수성)}$의 첨가로 켄칭하고, 5분 동안 교반하였다. 층을 분리하고, 유기 층을 포화 $NaHCO_{3(수성)}$ (2 x 20 mL), 물 (20 mL), 포화 NaCl $_{(수성)}$ (20 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켜 화합물 5를 발포성 백색 고체 0.741 g (98.9% 수율)으로서 수득하였다. 화합물 5를 추가 정제 없이 후속 단계에서 사용하였다.



6

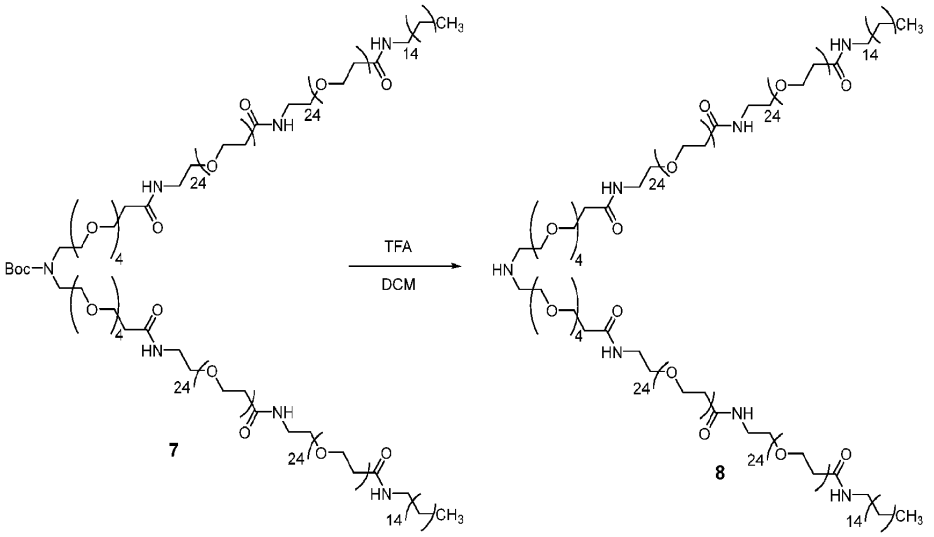
5

7

[1228]

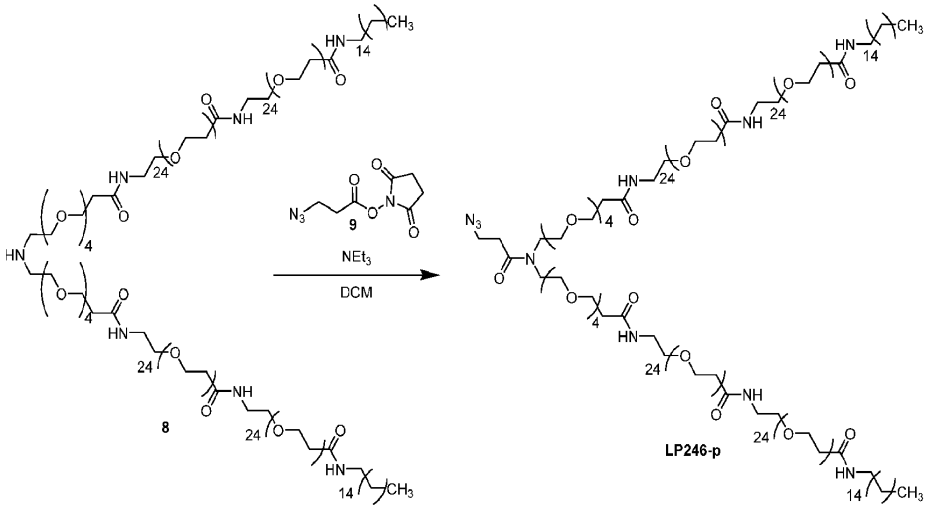
[1229] N-Boc-N-비스-PEG_4-산 (화합물 6, 0.0339 g, 0.055 mmol) 및 COMU (0.0473 g, 0.11 mmol)를 DCM (3 mL) 중에 용해시키고, NEt_3 (0.167 mL, 1.20 mmol)을 첨가하였다. 생성된 용액을 10분 동안 교반하였다. 10분 후, 화합

물 5 (0.30 g, 0.12 mmol)를 화합물 6의 용액에 첨가하였다. 생성된 용액을 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, 정제를 위해 실리카 겔 칼럼 상에 직접 로딩하였다. 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피 (DCM 중 0-20% MeOH)에 의해 정제하였다. 화합물 7을 DCM 중 6% MeOH로 용리하기 시작하였다. 대부분의 순수한 화합물 7은 DCM 중 12% MeOH로 용리되었다. 화합물 7의 순수한 분획을 합하여 264 mg (86% 수율)을 회백색 고체로서 수득하였다.



[1230]

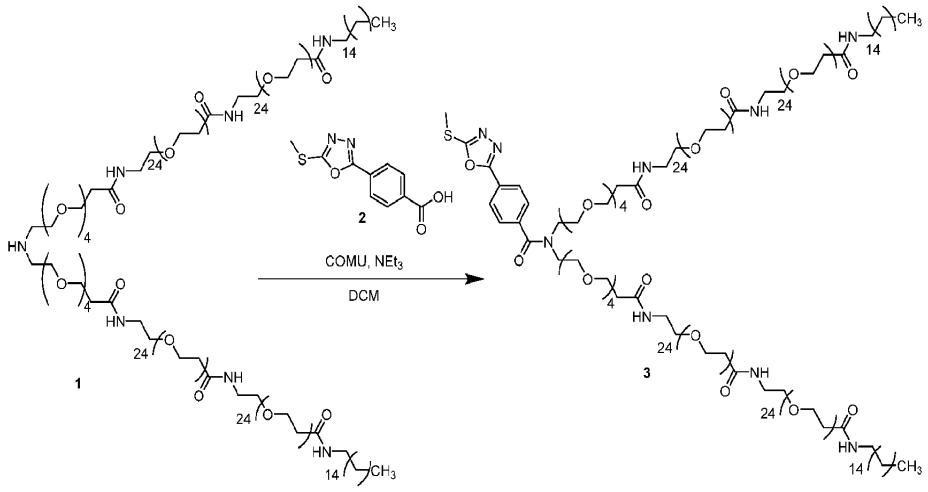
[1231] 화합물 7 (100 mg, 0.041 mmol)을 DCM (2 mL) 중에 용해시키고, TFA (1 mL, 8.64 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 2시간 동안 교반하고, LC-MS에 의해 체크하였다. 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_{3(수성)}$으로 켄칭하고, DCM으로 희석하였다. 층을 분리하고, 유기 층을 포화 NaCl $_{(수성)}$ (20 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켜 화합물 8 0.09 g을 담황색 고체 (86% 수율)로서 수득하였다. 화합물 8을 추가 정제 없이 후속 단계에서 직접 사용하였다.



[1232]

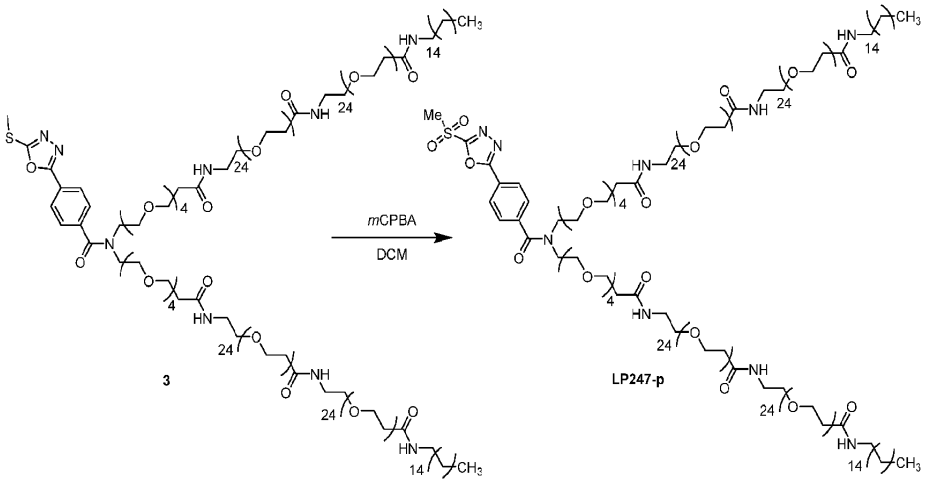
[1233] 화합물 8 (0.090 g, 0.016 mmol)을 DCM (3 mL) 중에 용해시키고, NEt_3 (22.9 μL, 0.164 mmol)을 첨가하고, 이어서 3-아지도 프로피포네이트 NHS-에스테르 (화합물 9, 0.0174 g, 0.082 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 4시간 동안 교반하고, LC-MS에 의해 체크하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, 정제를 위해 실리카 겔 칼럼 상에 직접 로딩하였다. 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피 (4 g 레디셉 rf 골드® 칼럼) DCM 중 0-20% MeOH에 의해 정제하였다. LP246-p를 DCM 중 16% MeOH로 용리시켰다. LP246-p의 순수한 분획을 합하여 회백색 고체 0.019 g (20.7% 수율)을 수득하였다.

[1234] LP247-p의 합성



[1235]

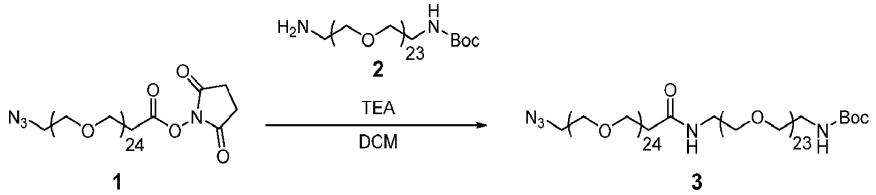
[1236] 화합물 2 (11.2 mg, 0.047 mmol) 및 COMU (20 mg, 0.047 mmol)를 DCM (3 mL) 중에 용해시키고, NEt_3 (16.7 μL, 0.12 mmol)을 첨가하였다. 생성된 용액을 10분 동안 교반하였다. 10분 후, DCM (2 mL) 중 화합물 1 (130 mg, 0.024 mmol, LP246-p의 합성으로부터의 화합물 8)의 용액을 화합물 2/COMU의 용액에 첨가하였다. 생성된 용액을 1시간 동안 교반하고, LC-MS에 의해 체크하였다. 반응 혼합물을 물 5 mL로 켄칭하고, 5분 동안 교반하였다. 층을 분리하고, 유기 층을 1 M HCl (수성) (1 x 15 mL), 포화 $NaHCO_{3(수성)}$ (3 x 20 mL), 포화 NaCl (수성) (20 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켜 투명한 액체를 수득하였다. 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피 (4 g 레디셉 rf 골드® 칼럼) DCM 중 0-20% MeOH에 의해 정제하였다. 화합물 3을 DCM 중 12% MeOH로 용리시켰다. 화합물 3의 순수한 분획을 합하여 0.086 g (63.6% 수율)을 회백색 고체로서 수득하였다.



[1237]

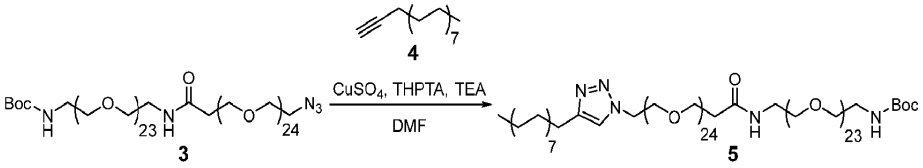
[1238] 화합물 3 (0.086 g, 0.015 mmol)을 DCM (3 mL) 중에 용해시키고, mCPBA (0.0131 g, 0.076 mmol)를 첨가하였다. 생성된 용액을 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, 실리카 겔 칼럼 상에 직접 로딩하였다. 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피 (4 g 레디셉 rf 골드® 칼럼) DCM 중 0-20% MeOH에 의해 정제하였다. LP247-p를 DCM 중 12% MeOH로 용리시켰다. LP247-p의 순수한 분획을 합하여 0.041 mg (47.4% 수율)을 회백색 고체로서 수득하였다.

[1239] LP339-p의 합성



[1240]

[1241] Boc-아미도-PEG_{23}-아민 2 (8.00 g, 6.82 mmol)를 DCM (250 mL)에 용해시키고, 트리에틸아민 (2.85 mL, 20.45 mmol)을 첨가한 후, 아지도-PEG_{24}-NHS 에스테르 1 (9.95 g, 7.84 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 2시간 후, LC-MS에 의해 결정된 바와 같이 출발 물질은 남아있지 않았다. 반응 혼합물을 농축시키고, 정제를 위해 실리카 겔 칼럼 상에 직접 로딩하였다. 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피 2% MeOH:98% DCM→20% MeOH:80% DCM에 의해 정제하였다. 생성물을 함유하는 분획을 합하여 화합물 3 14.3 그램 (90% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.



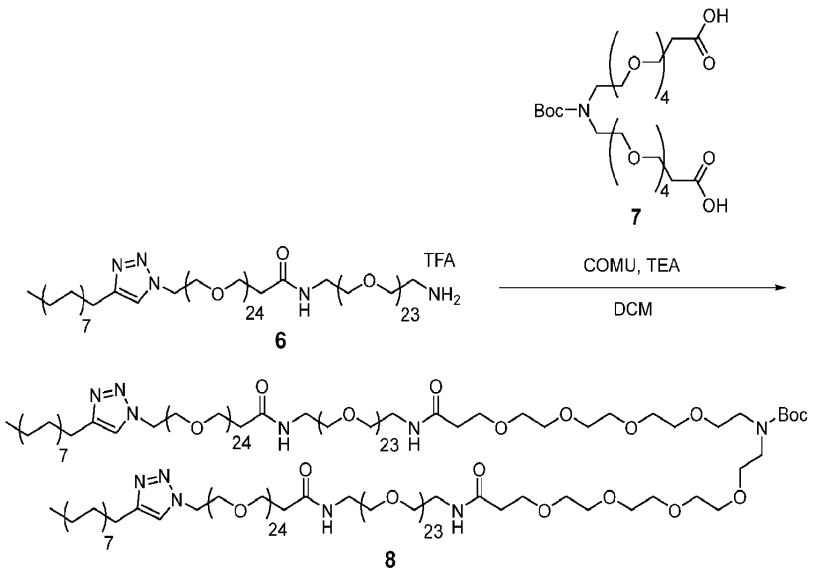
[1242]

[1243] N-Boc-PEG_{23}-아미도-PEG_{24}-아지드 3 (10.0 g, 4.296 mmol), 1-옥타데신 4 (1.183 g, 4.726 mmol), 황산구리 5수화물 (0.268 g, 1.074 mmol), 트리스((1-히드록시-프로필-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)메틸)아민 (THPTA) (0.653 g, 1.504 mmol), 및 아스코르브산나트륨 (1.872 g, 9.451 mmol)을 DMF (500 mL)에 용해시키고, 트리에틸아민 (0.290 mL, 2.148 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 60℃로 가열하였다. 2시간 후, LC-MS에 의해 출발 물질이 관찰되지 않았다. 반응 혼합물을 농축시키고, 잔류물을 디클로로메탄으로 희석하고, 소결 깔때기를 통해 여과하였다. 여과물을 농축시키고, 정제를 위해 실리카 겔 칼럼 상에 직접 로딩하였다. 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피 0% MeOH:100% DCM→20% MeOH:80% DCM에 의해 정제하였다. 생성물을 8% MeOH/92% DCM으로 용리시켰다. 순수한 분획을 합하여 화합물 5 9.5 g (86% 수율)을 담황색 고체로서 수득하였다.



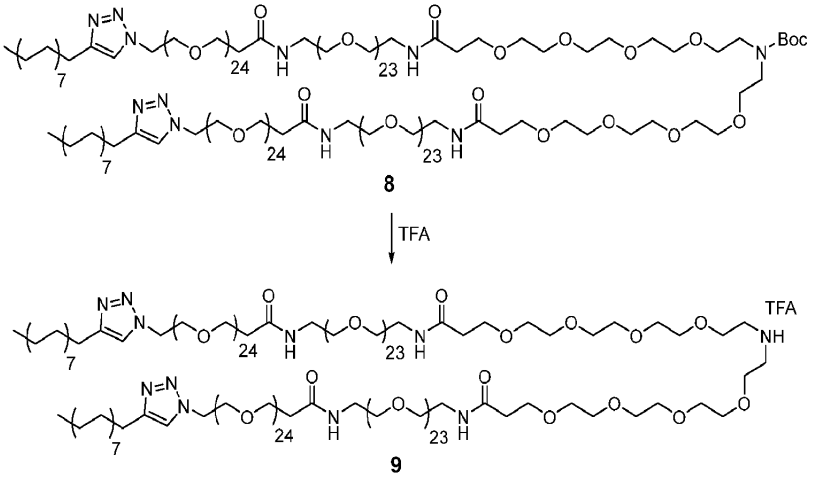
[1244]

[1245] N-Boc-PEG_{23}-아미도-PEG_{24}-트리아졸-C_{16} 5 (0.358 g, 0.139 mmol)를 DCM (4 mL)에 용해시키고, 트리플루오로아세트산 (0.9 mL, 11.8 mmol)을 첨가하였다. 1시간 후, LC-MS에 의해 출발 물질이 관찰되지 않았다. 반응 혼합물을 농축시키고, 진공 하에 수시간 동안 건조시켜 화합물 6 0.325 mg (90.9% 수율)을 담황색 고체로서 수득하였다. 생성물을 추가 정제 없이 후속 반응에 직접 사용하였다.



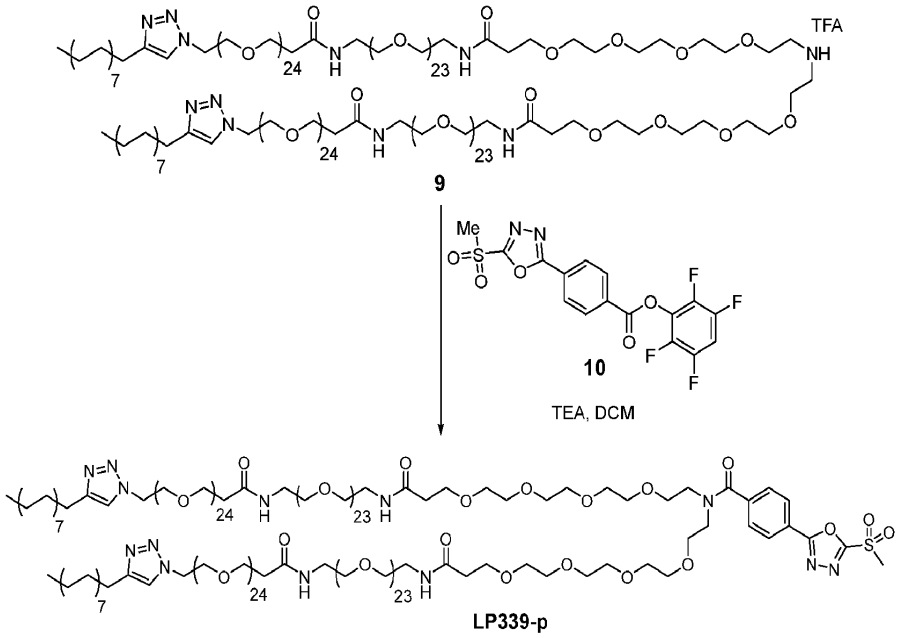
[1246]

[1247] N-Boc-N-비스-PEG_4-산 7 (0.0372 g, 0.061 mmol) 및 COMU (0.052 g, 0.121 mmol)를 DCM (5 mL) 중에 용해시키고, TEA (0.395 mL, 2.84 mmol)를 첨가하였다. 생성된 용액을 10분 동안 교반하였다. 개별 바이알에서, DCM (5 mL) 및 TEA (0.5 mL, 3.60 mmol) 중 아미노-PEG_{23}-아미도-PEG_{24}-트리아졸-C_{16} 6의 TFA 염 (0.325 g, 0.126 mmol)의 용액을 교반하였다. N-Boc-N-비스-PEG_4-산 7의 용액을 아미노-PEG_{23}-아미도-PEG_{24}-트리아졸-C_{16} 6의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, 정제를 위해 실리카 겔 칼럼 상에 직접 로딩하였다. 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피 4% MeOH:96% DCM→20% MeOH:80% DCM에 의해 정제하였다. 순수한 분획을 합하여 화합물 8 89 mg (26.5% 수율)을 담황색 고체로서 수득하였다.



[1248]

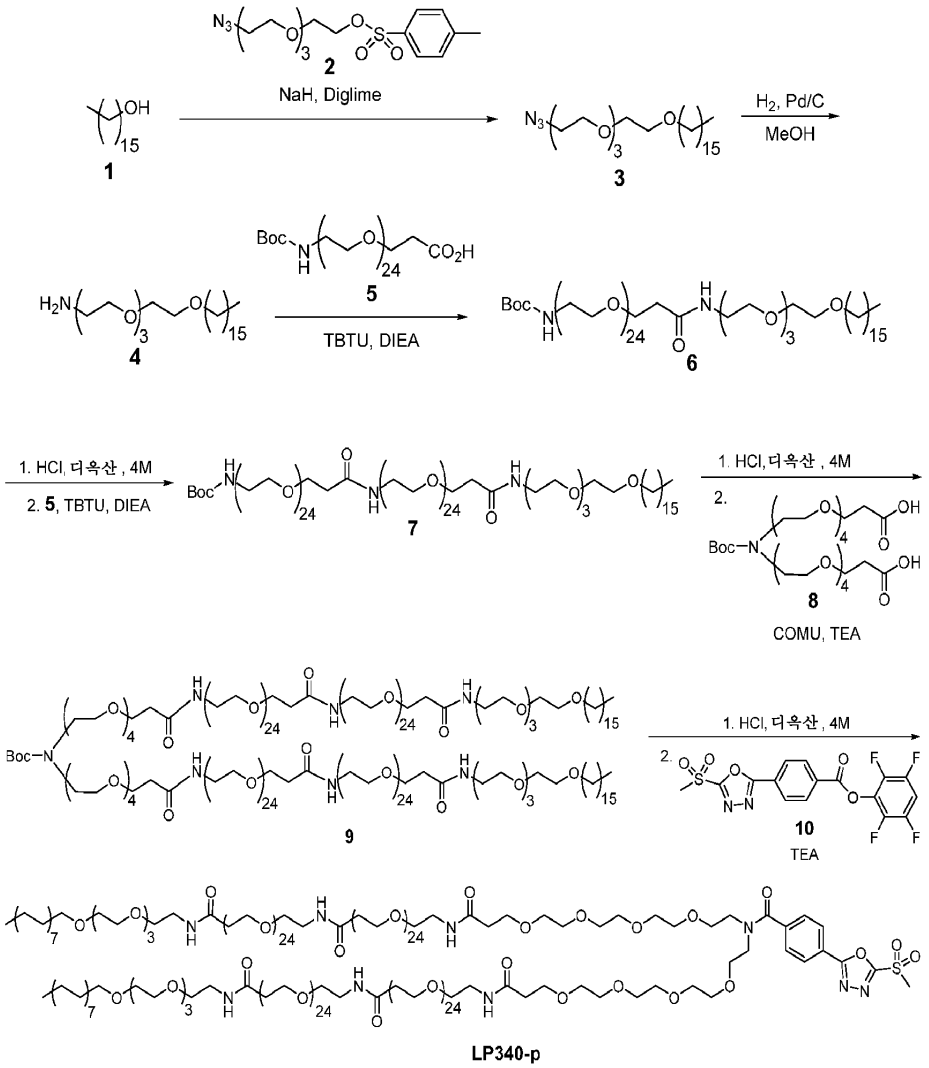
[1249] N-Boc-비스-PEG_4-아미도-PEG_{23}-아미도-PEG_{24}-트리아졸-C_{16} 8 (5.9 g, 1.066 mmol)을 DCM (100 mL)에 용해시키고, TFA (20 mL, 262.3 mmol)를 첨가하였다. 2시간 후, LC-MS에 의해 출발 물질이 관찰되지 않았다. 반응 혼합물을 농축시켜 화합물 9를 농후한 황색 액체로서 수득하였다. 화합물 9를 추가 정제 없이 후속 단계에서 직접 사용하였다.



[1250]

[1251] 아미노-비스-PEG_4-아미도-PEG_{23}-아미도-PEG_{24}-트리아졸-C_{16} 9의 TFA 염 (5.89 g, 1.066 mmol)을 THF (100 mL) 및 TEA (1.5 mL, 10.66 mmol)에 용해시키고, TFP-술폰 10 (1.33 g, 3.20 mmol)을 첨가하였다. 22시간 후, LC-MS는 생성물로의 95% 전환을 나타냈다. 반응 혼합물을 농축시키고, 톨루엔 중에 재현탁시키고, 정제 전에 다시 농축시켰다. 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피 5% MeOH:95% DCM→20% MeOH:80% DCM에 의해 정제하였다. 생성물을 8% MeOH:92% DCM으로 용리시켰다. 순수한 분획을 합하고, 3.000 g (49.5% 수율)의 LP339-p를 베이지색 고체로서 수득하였다.

[1252] LP340-p의 합성



[1253]

[1254] 수소화나트륨, 미네랄 오일 중 60% 분산액 (1.93 g, 48.21 mmol)을 건조 1 L 둥근 바닥 플라스크에 로딩하고, MTBE로 세척하고, 무수 디옥산 (200 mL) 중에 현탁시켰다. 헥사데칸올 1 (11.2 g, 46.2 mmol)을 건조 첨가하고, 50℃에서 1시간 동안 교반하였다. Peg3-토실레이트 2 (15 g, 40.17 mmol)를 첨가하고, 반응 혼합물을 105℃에서 17시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 빙조에서 냉각시키고, H_2O (125 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 MTBE로 추출하고, 유기 층을 H_2O, 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 화합물 3을 콤비플래쉬® 상에서 220 g SiO_2 칼럼을 사용하여 정제하였다 (용리액: 용매 A - 헥산, 용매 B - EtOAc; B = 0 - 30%, 50분 수율, 11.1 g, 64%). 계산치 MW 443.67 실측치: MS (ES, pos): 444.67 $[M+H]^+$, 461.5 $[M+NH_4]^+$, 466.54 $[M+Na]^+$.

[1255] 아지드 3 (11.1 g, 25 mmol)을 MeOH (70 mL) 중 Pd/C, 10% (1 g)와 함께 수소 분위기 하에 1 기압에서 17시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 농축시키고, 진공 하에 건조시켰다. 화합물 4를 콤비플래쉬® 상에서 80 g SiO_2 칼럼을 사용하여 정제하였다 (용리액: 용매 A - DCM, 용매 B - DCM 중 20% MeOH; B = 50분 내 0 - 50%). 수율 4.66 g. 계산치: MW 417.7. 실측치: MS (ES, pos): 418.1 $[M+H]^+$.

[1256] TBTU (4.8 g, 14.9 mmol)를 DMF (100 mL) 중 아민 4 (5.94 g, 14.2 mmol), Boc-(Peg 24)-산 5 (16.95 g, 13.6 mmol) 및 DIEA (7.1 mL, 40.8 mmol)의 현탁액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 3시간 동안 교반하고, 농축시키고, 잔류 DMF를 톨루엔과의 3회 공증발에 의해 제거하였다. 조 화합물 6을 $CHCl_3$ (500 mL) 중에 용해시키고, 1% HCl, $NaHCO_3$, 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 추가 정제 없이 후속 단계에서 직접 사용하였다. 계

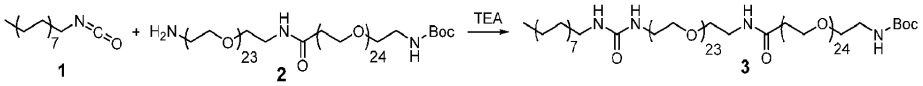
산치: MW 1646.14. 실측치: MS (ES, pos): 1646.99 $[M+H]^{+}$, 1664.99 $[M+NH_4]^{+}$.

[1257] 화합물 6 (10.14 g, 6.16 mmol)을 4 M HCl 디옥산 용액 (45 mL) 중에서 50분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, 잔류물을 톨루엔과의 2회 공증발에 의해 건조시켰다. 생성된 탈보호된 Peg-아민 히드로클로라이드를 DMF (60 ml) 중에 용해시키고, 이어서 DIEA (4.29 mL, 24.6 mmol) 및 산 5 (7.674 g, 6.157 mmol)를 첨가하고, 이어서 TBTU (2.175 g, 6.77 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 4시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, 잔류물을 톨루엔과의 3회 공증발에 의해 건조시켰다. 생성물인 화합물 7을 $CHCl_3$ (500 mL)에 용해시키고, 1% HCl, $NaHCO_3$, 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 화합물 7을 추가 정제 없이 후속 단계에서 직접 사용하였다. 계산치: MW 2774.49. 실측치: MS (ES, pos): 1405.24 $[M+2NH_4]^{2+}$, 1397.20 $[M+H+Na]^{2+}$, 1388.67 $[M+2H]^{2+}$.

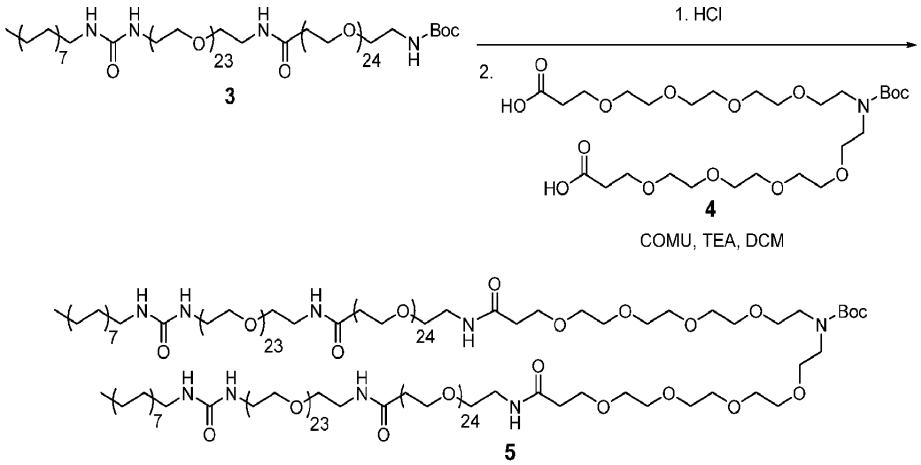
[1258] 화합물 7 (15.22 g, 5.49 mmol)을 4 M HCl 디옥산 용액 (55 mL) 중에서 50분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, 잔류물을 톨루엔과의 2회 공증발에 의해 건조시켰다. 생성된 탈보호된 Peg-아민 히드로클로라이드를 DCM (100 mL) 중에 용해시켰다. Boc-아미노-비스(Peg4-산) 8 (1.68 g, 2.74 mmol)을 TEA (2.2 mL, 15.8 mmol) 및 COMU (2.47 g, 5.76 mmol)와 함께 DCM (15 mL) 중에서 3분 동안 교반한 다음, 탈보호된 Peg-아민 히드로클로라이드의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 3시간 동안 교반하고, 용매를 제거하였다. 잔류물을 클로로포름 (300 mL) 중에 용해시키고, 1% HCl, $NaHCO_3$, 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 화합물 9를 콤비플래쉬® 상에서 SiO_2 칼럼 (220 g), 용리액 용매 A - DCM, 용매 B - DCM 중 20% MeOH; B = 50분 내 0 - 100%를 사용하여 정제하였다. 수율 9.75 g, (60%). 계산치: MW 5926.42. 실측치: MS (ES, pos): 1483.26 $[M+3H+NH_4]^{4+}$, 1458.53.74 $[M+4H]^{4+}$, 1186.91 $[M+5H]^{+5}$.

[1259] 화합물 9 (9.75 g, 1.644 mmol)를 4 M HCl 디옥산 용액 (60 mL) 중에서 50분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, 잔류물을 톨루엔과의 2회 공증발에 의해 건조시켰다. 생성된 아민 히드로클로라이드를 THF (150 mL) 중에 용해시키고, TEA (1.38 mL, 9.86 mmol), 및 이어서 술폰-TFP 에스테르 10 (1.711 g, 4.11 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 16시간 동안 교반하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 잔류물을 클로로포름 (300 mL) 중에 용해시키고, 1% HCl, 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. LP340-p를 콤비플래쉬® 상에서 SiO_2 칼럼 (120 g), 용리액 용매 A - DCM, 용매 B - DCM 중 20% MeOH; B = 60분 내에 0 - 100%를 사용하여 정제하였다. 수율 7.58 g, (75%). 계산치: MW 6077.54. 실측치: MS (ES, pos): 1534.03 $[M+H+Na+2NH_4]^{4+}$, 1227.47 $[M+2H+Na+2NH_4]^{5+}$.

[1260] LP357-p의 합성

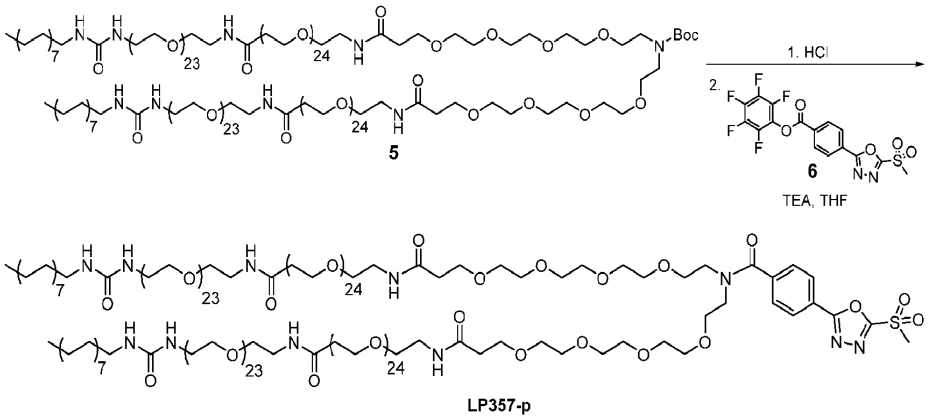
[1261] 

[1262] Boc-PEG47-NH2 2 (1 g, 0.435 mmol, 1.0 당량)를 20 mL DCM에 용해시켰다. 헥사데실 이소시아네이트 1 (140 mg, 0.522 mmol, 1.2 당량) 및 TEA (2.0 당량)를 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. DCM을 제거하고, 화합물 3 0.967 g (86.5%)을 이동상으로서 0-20% MeOH/DCM을 사용하여 24g 칼럼 정제를 통해 정제하였다.



[1263]

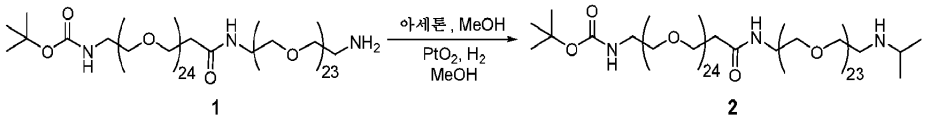
[1264] 화합물 3 (0.967 g, 0.376 mmol)을 4 N HCl/디옥산 15 mL 중에 용해시키고, 실온에서 1시간 동안 교반하였다. HCl/디옥산을 제거하고, 생성된 탈보호된 아민을 DCM 중에 용해시켰다. 화합물 4 (110 mg, 0.179 mmol), COMU (169 mg, 0.394 mmol) 및 TEA (10.0 당량)를 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하였다. 화합물 5 (0.8 g, 80.9% 수율)를 이동상으로서 0-20% MeOH/DCM을 사용하여 24g 칼럼에 의해 정제하였다.



[1265]

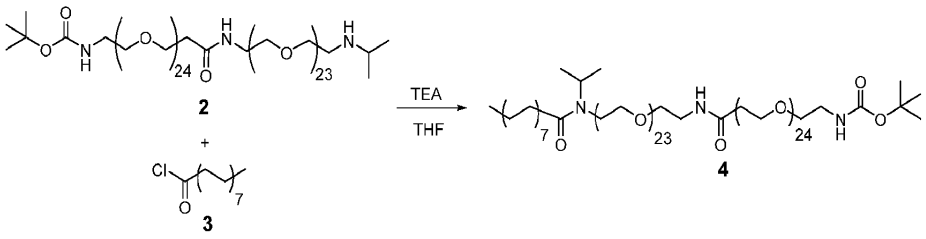
[1266] 화합물 5 (0.95 g, 0.172 mmol)를 4 N HCl/디옥산 15 mL 중에 용해시키고, 실온에서 1시간 동안 교반하였다. HCl/디옥산을 진공 하에 제거하였다. 생성된 탈보호된 아민을 THF 중에 용해시킨 다음, 화합물 6 (0.15 g, 0.345 mmol) 및 TEA (10.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하였다. LP357-p (0.6 g, 61%)를 24g 칼럼에 의해 이동상으로서 0-20% MeOH/DCM을 사용하여 정제하였다.

[1267] LP358-p의 합성



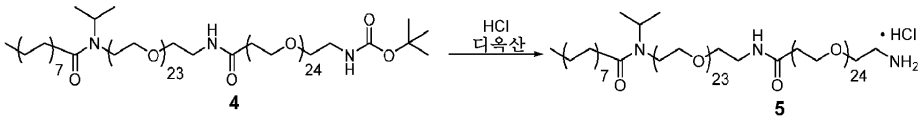
[1268]

[1269] PtO_2 (0.3986 g)를 무수 MeOH 및 아세톤 중 화합물 1 (4.00 g)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 수소 분위기 하에 2일 동안 교반하였다. 백금 촉매를 셀라이트® 및 실리카를 사용하여 여과하였다. 이어서, 용액을 진공 하에 농축시켜 화합물 2를 수득하고, 이를 정제 없이 후속 단계에서 직접 사용하였다. 수율: 3.99 g.



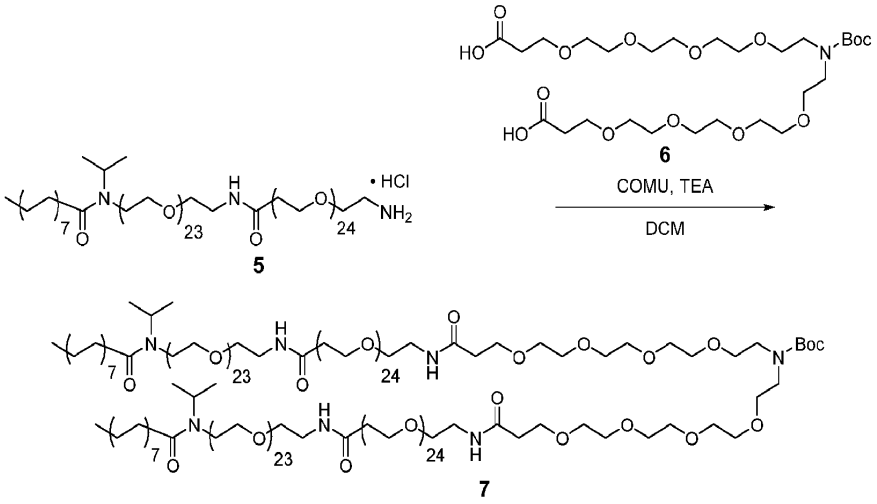
[1270]

[1271] 화합물 2 (4.07 g)를 THF 중 화합물 3 (0.53 g) 및 TEA (0.53 g)의 용액에 첨가하였다. LC-MS 및/또는 TLC에 의해 2의 완전 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 반응 혼합물을 MeOH로 켄칭하였다. 조 생성물을 콤비플래쉬® 시스템 상에서 DCM 액체-로드 (80 g 칼럼, DCM (A)→20% MeOH (B) 용매계, 구배: 60분에 걸쳐 5% B→100% B)를 통해 정제하였다. 화합물 4는 25% B에서 용리되었다. 수율: 2.92 g.



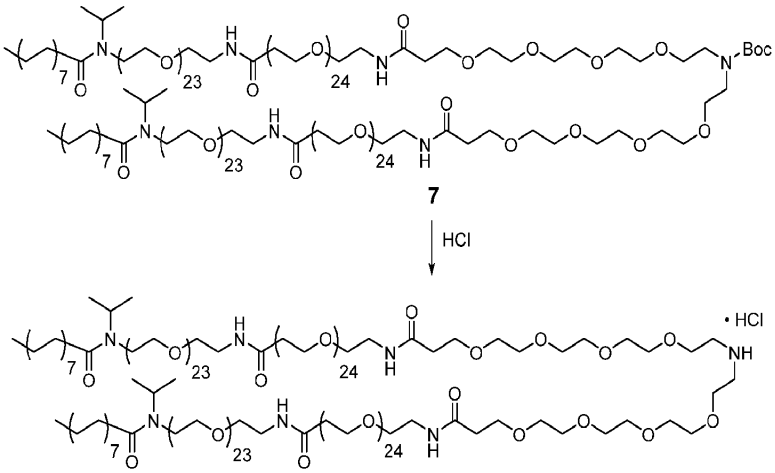
[1272]

[1273] 화합물 4 (2.92 g)를 실온에서 디옥산 중 HCl의 용액 (4 M) (24.9 mL) 중에 용해시켰다. LCMS를 통해 화합물 4의 완전 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켜 화합물 5를 백색 분말로서 수득하였다. 화합물 5를 추가 정제 없이 후속 단계에서 직접 사용하였다.



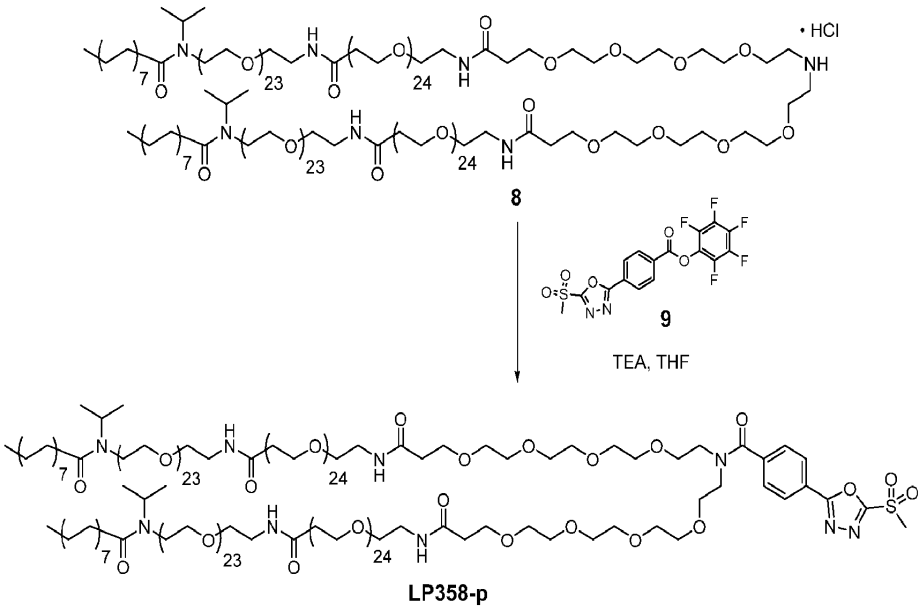
[1274]

[1275] 화합물 6 (0.32 g) 및 5 (2.81 g), COMU (1.07 g), 및 TEA (2.08 mL)를 DCM 중에서 실온에서 밤새 교반하였다. pH를 모니터링하여 HCl이 중화되고 반응 혼합물이 염기성으로 남아있음을 보장하였다. 반응 혼합물을 1 N HCl, 포화 $NaHCO_3$, 및 염수로 세척하고, DCM을 진공 하에 제거하였다. 화합물 7을 80 g 칼럼 (용매계: DCM (A) 및 20% MeOH (B), 구배: 5분 동안 5% B, 60분에 걸쳐 5% B→100% B)을 통해 정제하였다. 화합물 7은 45% B에서 용리되었다. 수율 2.26 g.



[1276]

[1277] 화합물 7 (2.26 g)을 실온에서 디옥산 중 HCl의 용액 (4 M) (25.5 mL) 중에 용해시켰다. LCMS를 통해 화합물 7의 완전 전환이 관찰될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켜 화합물 8을 백색 분말로서 수득하였다. 화합물 8을 추가 정제 없이 후속 단계에서 직접 사용하였다.



[1278]

[1279] 화합물 8 (2.22 g) 및 TEA (1.42 mL)를 무수 THF 50 mL 중에 용해시키고, 화합물 9 (0.35 g)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 12시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, 조 LP358-p를 실리카에 의해 2개의 파트 (12 및 24 그램 칼럼)로 2종의 용매계 (EtOAc/헥산, 및 이어서 MeOH/DCM, 제1 구배 (EtOAc/헥산): 3분 동안 0% B, 10분에 걸쳐 0% B→100% B, 제2 구배 (DCM/MeOH): 5분 동안 5% B, 5분 동안 15% B, 20분에 걸쳐 15% B→100% B)를 사용하여 정제하였다. 생성물, LP358-p는 제2 구배 동안 30% B에서 용리되었다. 술폰 시약 (즉, 화합물 9)을 제1 구배 동안 회수하였다. 수율 1.92 g.

[1280] 실시예 5. RNAi 작용제에 대한 링커 및 표적화 리간드의 접합

[1281] A. 활성화된 에스테르 링커의 접합

[1282] 하기 절차를 사용하여 상기 표 23에 나타낸 바와 같은 DBCO-NHS 또는 L1-L10의 구조를 갖는 연결기를 상기 표 23에 나타낸된 바와 같은 아민-관능화된 센스 가닥, 예컨대 C6-NH2, NH2-C6, 또는 (NH2-C6)s를 갖는 RNAi 작용제에 접합시켰다. 동결건조에 의해 건조된 어닐링된 RNAi 작용제를 DMSO 및 10% 물 (v/v%) 중에 25 mg/mL로 용해시켰다. 이어서, 50-100 당량의 TEA 및 3 당량의 활성화된 에스테르 링커를 용액에 첨가하였다. 용액이 1-2 시간 동안 반응되도록 하면서, RP-HPLC-MS (워터스™ 엑스브리지 C18 칼럼 (워터스 코포레이션) 상에서 이동상 A 100 mM HFIP, 14 mM TEA; 이동상 B: 아세토니트릴)에 의해 모니터링하였다.

[1283] 이어서, 12 mL 아세토니트릴 및 0.4 mL PBS를 첨가하고, 고체를 펠릿으로 원심분리함으로써 생성물을 침전시켰다. 이어서, 펠릿을 0.4 mL의 1XPBS 및 12 mL의 아세토니트릴 중에 재용해시켰다. 생성된 펠릿을 고진공 하에 1시간 동안 건조시켰다.

[1284] B. DBCO 링커에 대한 표적화 리간드의 접합

[1285] 하기 절차를 사용하여 아지드-관능화된 표적화 리간드를 DBCO-관능화된 링커, 예컨대 DBCO-NHS, L1 또는 L2에 연결하였다. 절차는 표적화 리간드가 프로파르길 기와 반응하지 않도록 L1 또는 L2에 대한 링커의 DBCO 부분을 선택적으로 표적화한다.

[1286] 공유-연결된 DBCO 모이어티를 갖는 RNAi 작용제를 포함하는 고체 RNAi 펠릿을 50/50 DMSO/물 중에 50 mg/mL로 용해시켰다. 이어서, DBCO 모이어티당 1.5 당량의 아지드 리간드를 첨가하였다. 반응 혼합물이 30-60분 동안 진행되도록 하였다. 반응 혼합물을 RP-HPLC-MS (워터스™ 엑스브리지 C18 칼럼 (워터스 코포레이션) 상에서 이동상 A 100 mM HFIP, 14 mM TEA; 이동상 B: 아세토니트릴)에 의해 모니터링하였다. 생성물을 12 mL 아세토니트릴, 0.4 mL PBS를 첨가함으로써 침전시키고, 고체를 펠릿으로 원심분리하였다. 펠릿을 0.4 mL 1XPBS 중에 재용해시킨 다음, 12 mL의 아세토니트릴을 첨가하였다. 펠릿을 고진공 하에 건조시켰다.

[1287] C. 프로파르길 링커에 대한 표적화 리간드의 접합

[1288] 어닐링 전 또는 후에, 5' 또는 3' 세자리 알킨 관능화된 센스 가닥을 αvβ6 인테그린 리간드에 접합시킨다. 하기 실시예는 어닐링된 듀플렉스에 대한 αvβ6 인테그린 리간드의 접합을 기재한다: 0.5 M 트리스(3-히드록시프로필트리아졸릴메틸)아민 (THPTA), 0.5 M의 Cu(II) 술페이트 5수화물 ($Cu(II)SO_4 \cdot 5\ H_2O$) 및 아스코르브산나트륨의 2 M 용액의 원액을 탈이온수 중에서 제조하였다. DMSO 중 αvβ6 인테그린 리간드의 75 mg/mL 용액을 제조하였다. 트리-알킨 관능화 듀플렉스 (3 mg, 75 μL, 탈이온수 중 40 mg/mL, 대략 15,000 g/mol)를 함유하는 1.5 mL 원심분리 튜브에 25 μL의 1 M Hepes pH 8.5 완충제를 첨가하였다. 볼텍싱한 후, DMSO 35 μL를 첨가하고, 용액을 볼텍싱하였다. αvβ6 인테그린 리간드를 반응물 (6 당량/듀플렉스, 2 당량/알킨, 대략 15 μL)에 첨가하고, 용액을 볼텍싱하였다. pH 시험지를 사용하여, pH를 점검하고, 대략 pH 8인 것으로 확인되었다. 별도의 1.5 mL 원심분리 튜브에서, 0.5 M THPTA 50 μL를 0.5 M $Cu(II)SO_4 \cdot 5\ H_2O$ 10 μL와 혼합하고, 볼텍싱하고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 5분 후, THPTA/Cu 용액 (7.2 μL, 6 당량 5:1 THPTA:Cu)을 반응 바이알에 첨가하고, 볼텍싱하였다. 그 직후에, 2 M 아스코르베이트 (5 μL, 듀플렉스당 50 당량, 알킨당 16.7)를 반응 바이알에 첨가하고, 볼텍싱하였다. 반응이 완료되면 (전형적으로 0.5-1시간 내에 완료됨), 반응 혼합물을 비-변성 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 즉시 정제하였다.

[1289] D. 아민-관능화된 센스 가닥에 대한 표적화 리간드의 접합

[1290] 하기 절차를 사용하여 표 23에 나타낸 바와 같이 활성화된 에스테르-관능화된 표적화 리간드, 예컨대 αvβ6 펩티드 1, 펩티드 5 또는 펩티드 6을 아민, 예컨대 C6-NH2, NH2-C6 또는 (NH2-C6)s를 포함하는 아민 관능화된 RNAi 작용제에 접합시킬 수 있다.

[1291] 어닐링된 동결건조된 RNAi 작용제를 DMSO 및 10% 물 (v/v%) 중에 25 mg/mL로 용해시켰다. 이어서, 50-100 당량 TEA 및 3 당량의 활성화된 에스테르 표적화 리간드를 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 1-2시간 동안 교반되도록 하면서 RP-HPLC-MS (이동상 A: 100 mM HFIP, 14 mM TEA; 이동상 B: 아세토니트릴; 칼럼: 워터스™ 엑스브리지 C18)에 의해 모니터링하였다. 반응 혼합물이 완료된 후, 아세토니트릴 12 mL, 및 이어서 PBS 0.4 mL를 첨가한 다음, 혼합물을 원심분리하였다. 고체 펠릿을 수집하고, 1xPBS 0.4 mL 중에 용해시킨 다음, 아세토니트릴 12 mL를 첨가하였다. 생성된 펠릿을 수집하고, 진공 하에 1시간 동안 건조시켰다.

[1292] 실시예 6. PK/PD 조정제 전구체의 접합

[1293] 어닐링 전 또는 후 및 하나 이상의 표적화 리간드의 접합 전 또는 후에, 하나 이상의 PK/PD 조정제 전구체가 본원에 개시된 RNAi 작용제에 연결될 수 있다. 하기는 PK/PD 조정제 전구체를 본원에 도시된 실시예에 제시된 구축물에 연결하는 데 사용되는 일반적 접합 과정을 기재한다.

[1294] A. 말레이미드-함유 PK/PD 조정제의 접합

[1295] 하기는 디술피드의 디티오트레이톨 환원, 및 이어서 각각의 말레이미드-함유 PK/PD 조정제 전구체의 티올-마이클 첨가를 수행함으로써 말레이미드-함유 PK/PD 조정제 전구체를 RNAi 작용제의 (C6-SS-C6) 또는 (6-SS-6) 관능화된 센스 가닥에 연결하는 데 사용되는 일반적 방법을 기재한다: 바이알에서, 관능화된 센스 가닥을 멸균수 중

에 50 mg/mL로 용해시켰다. 이어서, 20 당량의 각각의 0.1 M Hepes pH 8.5 완충제 및 디티오트레이톨을 첨가하였다. 혼합물이 1시간 동안 반응되도록 한 다음, 접합체를 아세토니트릴 및 PBS 중에 침전시키고, 고체를 펠릿으로 원심분리하였다.

[1296] 펠릿을 30 mg/mL의 고체 농도로 DMSO/물의 70/30 혼합물에 넣었다. 이어서, 말레이미드-함유 PK/PD 조정제 전구체를 1.5 당량으로 첨가하였다. 혼합물이 30분 동안 반응되도록 하였다. 생성물을 AEX-HPLC (이동상 A: 25 mM 트리스 pH=7.2, 1 mM EDTA, 50% 아세토니트릴; 이동상 B: 25 mM 트리스 pH=7.2, 1 mM EDTA, 500 mM NaBr, 50% 아세토니트릴; 고체 상 TSK겔®-30; 1.5 cmx10 cm) 상에서 정제하였다. 용매를 회전 증발기에 의해 제거하고, 멸균수로 2 x 10 mL 교환을 사용하여 3K 스핀 칼럼으로 탈염시켰다. 고체 생성물을 동결건조를 사용하여 건조시키고, 추후 사용을 위해 저장하였다.

[1297] B. 술폰-함유 PK/PD 조정제 전구체의 접합

[1298] 바이알에서, 관능화된 센스 가닥을 멸균수 중에 50 mg/mL로 용해시켰다. 이어서, 20 당량의 각각의 0.1 M Hepes pH 8.5 완충제 및 디티오트레이톨을 첨가하였다. 혼합물이 1시간 동안 반응되도록 한 다음, 접합체를 아세토니트릴 및 PBS 중에 침전시키고, 고체를 펠릿으로 원심분리하였다.

[1299] 펠릿을 30 mg/mL의 고체 농도로 DMSO/물의 70/30 혼합물에 넣었다. 이어서, 술폰-함유 PK/PD 조정제 전구체를 1.5 당량으로 첨가하였다. 바이알을 N_2로 퍼징하고, 교반하면서 40℃로 가열하였다. 혼합물이 1시간 동안 반응되도록 하였다. 생성물을 AEX-HPLC (이동상 A: 25 mM 트리스 pH=7.2, 1 mM EDTA, 50% 아세토니트릴; 이동상 B: 25 mM 트리스 pH=7.2, 1 mM EDTA, 500 mM NaBr, 50% 아세토니트릴; 고체 상 TSK겔®-30; 1.5 cmx10 cm) 상에서 정제하였다. 용매를 회전 증발기에 의해 제거하고, 멸균수로 2x10 mL 교환을 사용하여 3K 스핀 칼럼으로 탈염시켰다. 고체 생성물을 동결건조를 사용하여 건조시키고, 추후 사용을 위해 저장하였다.

[1300] C. 아지드-함유 PK/PD 조정제 전구체의 접합

[1301] Cu(I)가 로딩된 TG-TBTA 수지 1 몰 당량을 유리 바이알로 칭량하였다. 바이알을 N_2로 15분 동안 퍼징하였다. 이어서, 관능화된 센스 가닥을 개별 바이알에서 멸균수 중에 100 mg/mL의 농도로 용해시켰다. 이어서, 2 당량의 아지드-함유 PK/PD 조정제 전구체 (DMF 중 50 mg/mL)를 바이알에 첨가하였다. 이어서, TEA, DMF 및 물을 최종 반응 조건이 33 mM TEA, 60% DMF, 및 접합된 생성물 20 mg/mL가 될 때까지 첨가하였다. 이어서, 용액을 시린지를 통해 수지를 함유한 바이알로 옮겼다. N_2 퍼지를 제거하고, 바이알을 밀봉하고, 40℃에서 교반 플레이트로 이동시켰다. 혼합물이 16시간 동안 반응되도록 하였다. 수지를 0.45 μm 필터를 사용하여 여과하였다.

[1302] 생성물을 AEX 정제 (이동상 A: 25 mM 트리스 pH=7.2, 1 mM EDTA, 50% 아세토니트릴; 이동상 B: 25 mM 트리스 pH=7.2, 1 mM EDTA, 500 mM NaBr, 50% 아세토니트릴 고체 상 TSK겔®-30; 1.5 cmx10 cm)를 사용하여 정제하였다. 아세토니트릴을 회전 증발기를 사용하여 제거하고, 멸균수로 2x10 mL 교환을 사용하여 3K 스핀 칼럼으로 탈염시켰다. 고체 생성물을 동결건조를 사용하여 건조시키고, 추후 사용을 위해 저장하였다.

[1303] D. 알킨-함유 PK/PD 조정제 전구체의 접합

[1304] 다음은 디술피드의 디티오트레이톨 환원, 및 이어서 알킨-함유 PK/PD 조정제 전구체로의 첨가를 수행함으로써 활성화된 알킨-함유 지질 PK/PD 조정제 전구체를 RNAi 작용제의 (C6-SS-C6) 또는 (6-SS-6) 관능화된 센스 가닥에 연결하는 데 사용되는 일반적 방법을 기재한다: 바이알에서, (C6-SS-C6) 또는 (6-SS-6) 관능화된 센스 가닥을 포함하는 siRNA 10 mg을 멸균수 중에 50 mg/mL로 용해시켰다. 이어서, 20 당량의 각각의 0.1 M Hepes pH 8.5 완충제 및 디티오트레이톨 (멸균수 중 1 M)을 첨가하였다. 혼합물이 1시간 동안 반응되도록 한 다음, 워터스™ 엑스브리지 BEH C4 칼럼 상에서 100 mM HFIP, 14 mM, 및 TEA의 이동상 A, 및 아세토니트릴의 이동상 B를 사용하여 하기 식을 사용하여 정제하고, 여기서 %B는 이동상 B의 양을 나타내고, 나머지는 이동상 A이다.

[1305]

시간	%B
0	3
8	70
10	90
11	90
11.1	3
13	3

[1306] 12 mL의 아세토니트릴 및 0.4 mL 1XPBS를 첨가함으로써 생성물을 1회 침전시키고, 생성된 고체를 펠릿으로 원심분리하였다. 펠릿을 0.4 mL 1XPBS 및 12 mL의 아세토니트릴 중에 재용해시켰다. 펠릿을 고진공 하에 1시간 동안 건조시켰다.

[1307] 펠릿을 바이알에서 30 mg/mL의 고체 농도로 DMSO/물의 70/30 혼합물에 넣었다. 이어서, 알킨-함유 지질 PK/PD 조정제 전구체를 siRNA에 대해 2 당량으로 첨가하였다. 이어서, 10 당량의 TEA를 첨가하였다. 바이알을 N2를 사용하여 퍼징하고, 반응 혼합물을 교반하면서 40℃로 가열하였다. 혼합물이 1시간 동안 반응되도록 하였다. 생성물을 25 mM 트리스 pH=7.2, 1 mM EDTA, 50% 아세토니트릴의 이동상 A, 및 25 mM 트리스 pH=7.2, 1 mM EDTA, 500 mM NaBr, 50% 아세토니트릴의 이동상 B를 사용하는 TSK겔®-30 패킹된 칼럼 (토소 바이오사이언스), 1.5 cm x 10 cm를 사용하는 음이온-교환 HPLC를 사용하여 하기 식을 사용하여 정제하고, 여기서 %B는 이동상 B의 양을 나타내고, 나머지는 이동상 A이다.

[1308]

시간	%B
4	10
7	80
10.5	80
11	10
14	10

[1309] 생성물을 함유하는 분획을 수집하고, 아세토니트릴을 회전 증발기를 사용하여 제거하였다. 생성물을 멸균수로 2 x 10 mL 교환을 사용하여 3K 스핀 칼럼으로 탈염시켰다. 이어서, 생성물을 동결건조를 사용하여 건조시키고, 추후 사용을 위해 저장하였다.

[1310] 실시예 7. RNAi의 생체내 투여는 시노몰구스 원숭이에서 MSTN을 표적화하는 것을 촉발함

[1311] 하기 실시예는 본 발명의 전달 비히클의 유용성을 나타낸다. 하기 실시예는 미오스타틴의 억제를 위한 RNAi 작용제를 포함하는 전달 비히클을 포함하지만, 전달 비히클은 골격근 세포에 존재하는 다른 관심 유전자를 녹다운시키는 데 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[1312] 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 미오스타틴 RNAi 작용제를 본원의 실시예 1에 제시된 바와 같이 관련 기술분야에 공지되고 올리고뉴클레오티드 합성에 통상적으로 사용되는 일반적 절차에 따라 고체 상 상에서 포스포르아미다이트 기술에 따라 합성하였다. 본 실시예 및 하기 실시예에서 사용된 RNAi 작용제는 하기 표 25에 나타낸 바와 같은 구조를 갖는다.

[1313] 표 25: 하기 실시예에서 사용된 듀플렉스.

[1314]

듀플렉스 명칭	구조 (5'->3')	서열 식별 번호
AD06568	AS: usGfsusUfaCfagcaaGfaUfcAfuGfaCfsc	1
	SS: (NH2-C6)s(invAb)sggucaugaUfCfUfugcuguaacas(invAb)(C6-SS-C6)dT	2
AD06570	AS: usCfsasUfcUfuCfcAfaAfgAfgCfcAfuCfsg	3
	SS: (NH2-C6)s(invAb)scgauggcuCfUfUfuggaagaugas(invAb)(C6-SS-C6)dT	4
AD06326	AS: usGfsusUfaCfagcaaGfaUfcAfuGfgCfsc	5
	SS: (NH2-C6)s(invAb)sggccaugaUfCfUfugcuguaacas(invAb)(C6-SS-C6)dT	6

[1315] 상기 표 25에서 a, c, g, i, 및 u는 각각 2'-O-메틸 아데노신, 시티딘, 구아노신, 이노신, 및 우리딘을 나타내고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 각각 2'-플루오로 아데노신, 시티딘, 구아노신, 및 우리딘을 나타내고; s는 포스포로티오에이트 연결을 나타내고; (invAb)는 역전 무염기성 데옥시리보스 잔기를 나타내고 (표 23 참조); dT는 2'-데옥시티미딘-3'-포스페이트를 나타내고; (C6-SS-C6)은 표 23 참조; (NH2-C6)s는 표 23 참조.

[1316] 연구 제1일에, 시노몰구스 마카크 (마카카 파시쿨라리스) 영장류 (본원에서 "시노"로 지칭됨)에 등장성 염수 (비히클 대조군) 또는 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 10 mg/kg (mpk)를 하기 투여 군에 따라 주사하였다:

[1317] 표 26. 실시예 7의 시노에 대한 투여 군.

군	**RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량**	**투여 요법**
1	등장성 염수	제1일에 단일 주사
2	αvβ6 펩티드 1-Mstn(AD6568)-PEG40K (2x2-아암)	제1일에 단일 주사
3	αvβ6 펩티드 1-Mstn(AD6570)-PEG40K (2x2-아암)	제1일에 단일 주사

[1318]

[1319] MSTN 유전자를 표적화하도록 지시된 뉴클레오티드 서열을 갖는 실시예 7의 RNAi 작용제를 합성하였고, 이는 소분자 표적화 리간드 αvβ6펩티드 1에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단 단부에 관능화된 아민 반응성 기 (NH_2-C_6)s를 포함하였다. 미오스타틴 RNAi 작용제는 PK/PD 조정제 전구체에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 3' 말단 단부에 디술피드 관능기 (C6-SS-C6)를 추가로 포함하였다. 다양한 PK/PD 조정제를 상기 표 26에 명시된 바와 같이 센스 가닥의 3' 말단에 연결시켰다.

[1320] 각 군에서 3마리의 시노에게 투여하였다 (n=3). 제14일, 제7일 및 제1일 (투여전)에 혈청 샘플을 채취하였다. 이어서, 원숭이에게 표 26에 제시된 바와 같은 각각의 군에 따라 투여하였다. 이어서, 제8일, 제15일, 제22일 및 제29일에 혈청을 수집하였다. 혈청 샘플 상에서 ELISA 검정을 수행하여 혈청 중 시노 미오스타틴의 양을 결정하였다. 혈청 샘플 내 평균 미오스타틴을 하기 표 27에 나타낸다.

[1321] 표 27. 제1일에 대해 정규화된, 실시예 7의 혈청 내 평균 시노 미오스타틴 단백질.

	제8일		**제15일**		**제22일**		**제29일**	
군 ID	**Avg Mstn**	**Std Dev (+/-)**	**Avg Mstn**	**Std Dev (+/-)**	**Avg Mstn**	**Std Dev (+/-)**	**Avg Mstn**	**Std Dev (+/-)**
군 1, 동물 1	1.038	0.005	0.914	0.009	1.090	0.019	0.845	0.002
군 1, 동물 2	0.908	0.005	0.795	0.042	0.828	0.006	0.862	0.002
군 1, 동물 3	0.936	0.018	0.866	0.060	0.739	0.025	0.813	0.012
군 2, 동물 1	0.701	0.014	0.720	0.051	0.785	0.005	0.738	0.010
군 2, 동물 2	0.859	0.024	0.966	0.054	0.830	0.037	0.865	0.017
군 2, 동물 3	0.684	0.020	0.709	0.041	0.805	0.005	0.756	0.022
군 3, 동물 1	0.770	0.005	0.800	0.043	0.748	0.006	0.685	0.031
군 3, 동물 2	0.745	0.021	0.675	0.038	0.649	0.002	0.723	0.010
군 3, 동물 3	0.927	0.007	0.813	0.029	0.824	0.012	0.814	0.008

[1322]

[1323] 실시예 8. RNAi의 생체내 투여는 마우스에서 Mstn을 표적화하는 것을 촉발함

[1324] 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 미오스타틴 RNAi 작용제를 본원의 실시예 1에 제시된 바와 같이 관련 기술분야에 공지되고 올리고뉴클레오티드 합성에 통상적으로 사용되는 일반적 절차에 따라 고체 상 상에서 포스포르아미다이트 기술에 따라 합성하였다. 연구 제1일, 제8일, 제15일 및 제43일에, 마우스에게 등장성 염수 (비히클 대조군) 또는 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 3 mg/kg (mpk)를 하기 투여 군에 따라 주사하였다:

[1325] 표 28. 실시예 8의 마우스에 대한 투여 군.

군	**RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량**	투여 요법
1	등장성 염수 (IV)	제1일, 제8일, 제15일 및 제43일에 주사
2.	펩티드 1-AD06326-PEG40K (4-아암) (IV)	제1일, 제8일, 제15일 및 제43일에 주사

[1326]

[1327] 표 28에 나타낸 바와 같이, 군 1 및 2는 정맥내로 투여하였다. MSTN 유전자를 표적화하도록 지시된 뉴클레오티드 서열을 갖는 실시예 8의 RNAi 작용제를 합성하였고, 이는 αvβ6 펩티드 1에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단 단부에 관능화된 아민 반응성 기 (NH_2-C_6)를 포함하였다. 미오스타틴 RNAi 작용제는 센스 가닥의 3' 말단에 연결된 PEG 40K (4-아암) PK/PD 조정제를 추가로 포함하였다.

[1328] 각 군에서 4마리의 마우스에게 투여하였다 (n=4). 제1일, 제8일, 제15일, 제21일, 제29일, 제36일, 제43일, 제50일, 제57일 및 제64일에 마우스를 채혈하고, 혈청을 단리하였다. ELISA 검정을 수행하여 각각의 혈청 샘플 중 미오스타틴의 상대량을 결정하였다. 혈청 샘플 내 평균 미오스타틴을 도 1의 표 A에 나타낸다.

[1329] 실시예 9. RNAi의 생체내 투여는 마우스에서 Mstn을 표적화하는 것을 촉발함

[1330] 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 미오스타틴 RNAi 작용제를 본원의 실시예 1에 제시된 바와 같이 관련 기술분야에 공지되고 올리고뉴클레오티드 합성에 통상적으로 사용되는 일반적 절차에 따라 고체 상 상에서 포스포르아미다이트 기술에 따라 합성하였다. 연구 제1일에, 마우스에게 등장성 염수 (비히클 대조군) 또는 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 3 mg/kg (mpk)를 하기 투여 군에 따라 주사하였다:

[1331] 표 29. 실시예 9의 마우스에 대한 투여 군.

군	**RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량**	투여 요법
1	비히클 대조군	제1일에 단일 주사
2.	Pep1-AD06326-PEG40K (4-아암)	제1일에 단일 주사

[1332]

[1333] MSTN 유전자를 표적화하도록 지시된 뉴클레오티드 서열을 갖는 실시예 9의 RNAi 작용제를 합성하였고, 이는 avB6 펩티드 1에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단 단부에 관능화된 아민 반응성 기 (NH_2-C_6)를 포함하였다. 미오스타틴 RNAi 작용제는 PEG40K (4-아암) PK/PD 조정제를 추가로 포함하였고, 이는 실시예 6에 기재된 방법을 사용하여 센스 가닥의 3' 말단에 연결되었다.

[1334] 각 군에서 4마리의 마우스에게 투여하였다 (n=4). 제8일, 제15일, 및 제22일에 마우스를 채혈하고, 이어서 혈청을 수집하였다. 혈청 샘플 상에서 ELISA 검정을 수행하여 혈청 중 마우스 미오스타틴의 양을 결정하였다. 혈청 샘플 내 평균 미오스타틴을 하기 표 30에 나타낸다.

[1335] 표 30. 실시예 9의 군에 대한 혈청 내 평균 상대 MSTN.

군	설명	제8일		제15일		제22일	
		Avg.	Std. Dev.	Avg.	Std. Dev.	Avg.	Std. Dev.
1	비히클 대조군	1.133	0.083	1.292	0.068	1.213	0.093
2	Pep1-AD06326-PEG40K (4-아암)	0.539	0.066	0.380	0.039	0.302	0.006

[1336]

[1337] 실시예 10. RNAi의 생체내 투여는 마우스에서 MSTN을 표적화하는 것을 촉발함

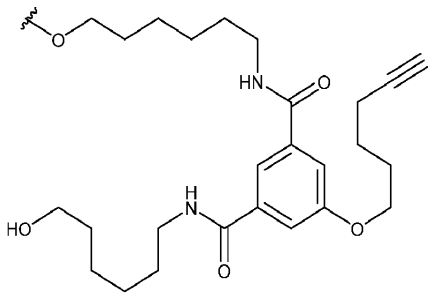
[1338] 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 미오스타틴 RNAi 작용제를 본원의 실시예 1에 제시된 바와 같이, 관련 기술분야에 공지되고 올리고뉴클레오티드 합성에 통상적으로 사용되는 일반적 절차에 따라 고체 상 상에서 포스포르아미다이트 기술에 따라 합성하였다. 본 실시예 및 하기 실시예에서 사용된 RNAi 작용제는 하기 표 31에 나타낸 바와 같은 구조를 갖는다.

[1339] 표 31: 하기 실시예에서 사용된 듀플렉스.

듀플렉스 명칭	구조 (5'->3')	서열 식별 번호
AD06569	AS: cPrpusGfsusUfaCfagcaaGfaUfcAfuGfaCfsc	7
	SS: (NH2-C6)s(invAb)sggucaugaUfCfUfugcuguaacas(invAb)(C6-SS-C6)dT	8
AD07724	AS: cPrpusGfsusUfaCfagcaaGfaUfcAfuGfaCfsc	9
	SS: (NH2-C6)s(invAb)sggucaugaUfCfUfugcuguaacas(invAb)uAlkdT	10
AD07909	AS: cPrpusGfsusUfaCfagcaaGfaUfcAfuGfaCfsc	11
	SS: (NH2-C6)s(invAb)sggucaugaUfCfUfugcuguaacas(invAb)uAlk	12
AD07910	AS: cPrpusGfsusUfaCfagcaaGfaUfcAfuGfaCfsc	13
	SS: (NH2-C6)s(invAb)sggucaugaUfCfUfugcuguaacaAlks(invAb)	14
AD08257	AS: cPrpusGfuUfacagcaaGfaUfcsAfsusGfsasCfsc	15
	SS: (NH2-C6)s(invAb)sggucaugaUfCfUfugcuguaacas(invAb)(LA2)	16

[1340]

[1341] 상기 표 31에서, AS는 안티센스 가닥을 나타내고, SS는 센스 가닥을 나타내고; a, c, g, i, 및 u는 각각 2'-O-메틸 아데노신, 시티딘, 구아노신, 이노신, 및 우리딘을 나타내고; Af, Cf, Gf, 및 Uf는 각각 2'-플루오로 아데노신, 시티딘, 구아노신, 및 우리딘을 나타내고; s는 포스포로티오에이트 연결을 나타내고; (invAb)는 역전 무염기성 데옥시리보스 잔기 (표 23 참조)를 나타내고; dT는 2'-데옥시티미딘-3'-포스페이트를 나타내고; cPrp는 시클로프로필 포스포네이트 (표 23 참조)를 나타내고; aAlk는 2'-O-프로파르길아데노신-3'-포스페이트 (표 23 참조)를 나타내고; cAlk는 2'-O-프로파르길시티딘-3'-포스페이트 (표 23 참조)를 나타내고; gAlk는 2'-O-프로파르길구아노신-3'-포스페이트 (표 23 참조)를 나타내고; tAlk는 2'-O-프로파르길-5-메틸우리딘-3'-포스페이트 (표 23 참조)를 나타내고; uAlk는 2'-O-프로파르길우리딘-3'-포스페이트 (표 23 참조)를 나타내고; (C6-SS-C6) (표 23 참조); (NH2-C6)s (표 23 참조)를 나타내고; LA2는 하기 구조를 갖는다:



[1342] (여기서, ≀은 RNAi 작용제의 나머지 부분에 대한 연결 지점을 나타냄).

[1343] 연구 제1일에, 마우스에게 하기 투여 군에 따라 등장성 염수 (비히클 대조군) 또는 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 2 mg/kg (mpk)을 주사하였으며, 여기서 AD06569는 상기 표 31에 제시된 구조를 갖는다:

[1344] 표 32: 실시예 10의 마우스에 대한 투여 군.

군	**RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량**	투여 요법
1	염수	제1일에 단일 주사
2	2 mpk AD06569-LP1	제1일에 단일 주사
4	2 mpk avb6-Pep1-AD06569-nEm	제1일에 단일 주사
5	2 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP1b	제1일에 단일 주사
6	2 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP29b	제1일에 단일 주사
7	2 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP33b	제1일에 단일 주사

[1345]

[1346] MSTN 유전자에 표적화된 뉴클레오티드 서열을 갖는 RNAi 작용제 AD06569를 합성하였고, 이는 표적화 리간드 avB6 펩티드 1에의 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단에 관능화된 아민 반응성 기 (NH2-C6)를 포함하였다. 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용이하게 하기 위해 3' 말단에 (C6-SS-C6) 기를 갖는 RNAi 작용제를 또한 합성하였다.

[1347] 군 4-7은 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 1을 포함한다. 각각의 군 2 및 4-7은 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 3' 말단에 접합된, 상기 제시된 바와 같은 구조를 갖는 지질 PK/PD 조정제를 포함한다.

[1348] 각각의 군에서 4마리의 마우스에게 투여하였다 (n=4). 제1일, 제8일, 제15일 및 제22일에 마우스에서 채혈하여 혈청을 수집하였다. 마우스를 연구 제22일에 희생시키고, 총 미오스타틴 mRNA를 비복근 및 삼두근으로부터 단리하였다. 삼두근을 우측 앞다리로부터 수거하였다. 각각의 샘플을 퍼셀리스 튜브에서 급속-동결시키고, 검정이 완료될 때까지 -80℃ 동결기에 저장하였다. 상대 MSTN 발현을 혈청 중 마우스 미오스타틴에 대한 ELISA 검정에 의해 결정하였다. 혈청에서의 평균 상대 미오스타틴 발현은 하기 표 33에 제시된다.

[1349] 표 33: 실시예 10의 마우스에 대한 혈청으로부터의 평균 상대 MSTN 발현.

군	**제8일**		**제15일**		**제22일**	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
1. 염수	0.795	0.126	0.893	0.108	0.940	0.058
2. AD06569-LP1b	0.620	0.074	0.435	0.028	0.417	0.033
4. avb6-Pep1-AD06569-nEm	0.725	0.033	0.677	0.041	0.754	0.092
5. avb6-Pep1-AD06569-LP1b	0.370	0.031	0.261	0.021	0.247	0.028
6. avb6-Pep1-AD06569-LP29b	0.435	0.101	0.304	0.075	0.326	0.043
7. avb6-Pep1-AD06569-LP33b	0.456	0.042	0.271	0.021	0.296	0.031

[1350]

[1351] 비복근 및 삼두근으로부터 수집된 조직을 택맨 검정에 사용하여 이들 조직에서의 MSTN의 상대량을 결정하였다. 하기 표 34는 검정의 결과를 나타낸다.

[1352] 표 34: 실시예 10의 투여 군에서의 삼두근 및 비복근에서의 상대 발현.

군	삼두근			비복근		
	상대 발현	낮은 오차	높은 오차	상대 발현	낮은 오차	높은 오차
1. 염수	1.000	0.105	0.118	1.000	0.092	0.101
2. AD06569-LP1b	0.171	0.067	0.110	0.175	0.041	0.053
4. avb6-Pep1-AD06569-nEm	0.462	0.041	0.046	0.446	0.063	0.073
5. avb6-Pep1-AD06569-LP1b	0.118	0.020	0.023	0.099	0.017	0.021
6. avb6-Pep1-AD06569-LP29b	0.174	0.034	0.042	0.126	0.045	0.070
7. avb6-Pep1-AD06569-LP33b	0.132	0.035	0.049	0.119	0.026	0.033

[1353]

[1354] 실시예 11. RNAi의 생체내 투여는 마우스에서 Mstn을 표적화하는 것을 촉발함

[1355] 연구 제1일에, 마우스에게 하기 투여 군에 따라 등장성 염수 (비히클 대조군) 또는 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 2 mg/kg (mpk)을 주사하였으며, 여기서 AD06569는 상기 표 31에 제시된 구조를 갖는다:

[1356] 표 35: 실시예 11의 마우스에 대한 투여 군.

군	**RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량**	투여 요법
1	염수	제1일에 단일 주사
2	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP38b	제1일에 단일 주사
3	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP101b	제1일에 단일 주사
4	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP41b	제1일에 단일 주사
5	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP104b	제1일에 단일 주사
6	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP53b	제1일에 단일 주사
7	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP43b	제1일에 단일 주사
8	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP44b	제1일에 단일 주사
9	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP102b	제1일에 단일 주사
10	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP103b	제1일에 단일 주사

[1357]

[1358] MSTN 유전자에 표적화된 뉴클레오티드 서열을 갖는 RNAi 작용제 AD06569를 합성하였고, 이는 표적화 리간드에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단에 관능화된 아민 반응성 기 (NH2-C6)를 포함하였다. 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용이하게 하기 위해 3' 말단에 (C6-SS-C6) 기를 갖는 RNAi 작용제를 또한 합성하였다.

[1359] 군 2-10은 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 1을 포함한다. 각각의 군 2-10은 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 3' 말단에 접합된, 상기 제시된 바와 같은 구조를 갖는 지질 PK/PD 조정제를 포함한다.

[1360] 각각의 군에서 4마리의 마우스에게 투여하였다 (n=4). 제1일, 제8일, 제15일 및 제22일에 마우스에서 채혈하여 혈청을 수집하였다. 마우스를 연구 제22일에 희생시키고, 총 미오스타틴 mRNA를 비복근 및 삼두근으로부터 단리하였다. 삼두근을 우측 앞다리로부터 수거하였다. 각각의 샘플을 퍼셀리스 튜브에서 급속-동결시키고, 검정이 완료될 때까지 -80℃ 동결기에 저장하였다. 상대 MSTN 발현을 혈청 중 마우스 미오스타틴에 대한 ELISA 검정에 의해 결정하였다. 혈청에서의 평균 상대 미오스타틴 발현은 하기 표 36에 제시된다.

[1361] 표 36: 실시예 11의 마우스에 대한 혈청으로부터의 평균 상대 MSTN 발현.

군	제8일		제15일		제22일	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
1. 염수	0.978	0.132	1.220	0.077	1.035	0.112
2. Avb6-Pep1-AD06569-LP38b	0.462	0.016	0.378	0.048	0.278	0.011
3. Avb6-Pep1-AD06569-LP101b	0.413	0.022	0.344	0.050	0.245	0.053
4. Avb6-Pep1-AD06569-LP41b	0.375	0.052	0.316	0.041	0.231	0.013
5. Avb6-Pep1-AD06569-LP104b	0.339	0.028	0.289	0.040	0.186	0.028
6. Avb6-Pep1-AD06569-LP53b	0.422	0.016	0.374	0.022	0.256	0.045
7. Avb6-Pep1-AD06569-LP43b	0.356	0.056	0.316	0.067	0.209	0.042
8. Avb6-Pep1-AD06569-LP44b	0.369	0.014	0.315	0.037	0.233	0.014
9. Avb6-Pep1-AD06569-LP102b	0.623	0.016	0.660	0.032	0.473	0.019
10. Avb6-Pep1-AD06569-LP103b	0.382	0.022	0.340	0.062	0.211	0.032

[1362]

[1363] 비복근 및 삼두근으로부터 수집된 조직을 택맨 검정에 사용하여 이들 조직에서의 MSTN의 상대량을 결정하였다. 하기 표 37은 검정의 결과를 나타낸다.

[1364] 표 37: 실시예 11의 투여 군에서의 삼두근 및 비복근에서의 상대 발현.

군	삼두근			비복근		
	상대 발현	낮은 오차	높은 오차	상대 발현	낮은 오차	높은 오차
1. 염수	1.000	0.140	0.162	1.000	0.082	0.089
2. Avb6-Pep1-AD06569-LP38b	0.306	0.093	0.134	0.215	0.059	0.082
3. Avb6-Pep1-AD06569-LP101b	0.288	0.043	0.050	0.130	0.020	0.023
4. Avb6-Pep1-AD06569-LP41b	0.238	0.042	0.051	0.140	0.037	0.051
5. Avb6-Pep1-AD06569-LP104b	0.187	0.034	0.042	0.126	0.017	0.019
6. Avb6-Pep1-AD06569-LP53b	0.249	0.042	0.051	0.123	0.028	0.036
7. Avb6-Pep1-AD06569-LP43b	0.196	0.040	0.051	0.111	0.036	0.054
8. Avb6-Pep1-AD06569-LP44b	0.238	0.037	0.044	0.144	0.009	0.010
9. Avb6-Pep1-AD06569-LP102b	0.526	0.076	0.089	0.326	0.024	0.026
10. Avb6-Pep1-AD06569-LP103b	0.239	0.050	0.064	0.133	0.012	0.013

[1365]

[1366] 실시예 12. RNAi의 생체내 투여는 마우스에서 Mstn을 표적화하는 것을 촉발함

[1367] 연구 제1일에, 마우스에게 하기 투여 군에 따라 등장성 염수 (비히클 대조군) 또는 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 2 mg/kg (mpk)을 주사하였으며, 여기서 AD06569는 상기 표 31에 제시된 구조를 갖는다:

[1368] 표 38: 실시예 12의 마우스에 대한 투여 군.

군	**RNAi** 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량	투여 요법
1	염수	제1일에 단일 주사
2	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP38b	제1일에 단일 주사
3	2 mpk Avb6-Pep5-AD06569-LP38b	제1일에 단일 주사
4	2 mpk Avb6-Pep6-AD06569-LP38b	제1일에 단일 주사
5	2 mpk Avb6-Pep6-AD06569-LP33b	제1일에 단일 주사
6	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP54b	제1일에 단일 주사
7	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP93b	제1일에 단일 주사

[1369]

[1370] MSTN 유전자에 표적화된 뉴클레오티드 서열을 갖는 RNAi 작용제 AD06569를 합성하였고, 이는 표적화 리간드에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단에 관능화된 아민 반응성 기 (NH2-C6)를 포함하였다. 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용이하게 하기 위해 3' 말단에 (C6-SS-C6) 기를 갖는 RNAi 작용제를 또한 합성하였다.

[1371] 군 2 및 6-7은 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 1을 포함한다. 군 3은 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 5를 포함한다. 군 4 및 5는 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 6을 포함한다. 각각의 군 2-7은 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 3' 말단에 접합된, 상기 제시된 바와 같은 구조를 갖는 지질 PK/PD 조정제를 포함한다.

[1372] 각각의 군에서 4마리의 마우스에게 투여하였다 (n=4). 제1일, 제8일, 제15일 및 제22일에 마우스에서 채혈하여 혈청을 수집하였다. 마우스를 연구 제22일에 희생시키고, 총 미오스타틴 mRNA를 비복근 및 삼두근으로부터 단리하였다. 삼두근을 우측 앞다리로부터 수거하였다. 각각의 샘플을 퍼셀리스 튜브에서 급속-동결시키고, 검정이 완료될 때까지 -80℃ 동결기에 저장하였다. 상대 MSTN 발현을 혈청 중 마우스 미오스타틴에 대한 ELISA 검정에 의해 결정하였다. 혈청에서의 평균 상대 미오스타틴 발현은 하기 표 39에 제시된다.

[1373] 표 39: 실시예 12의 마우스에 대한 혈청으로부터의 평균 상대 MSTN 발현.

군	**제8일**		**제15일**		**제22일**	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
1. 염수	1.017	0.062	0.950	0.062	1.064	0.086
2. Avb6-Pep1-AD06569-LP38b	0.432	0.061	0.280	0.036	0.303	0.029
3. Avb6-Pep5-AD06569-LP38b	0.412	0.083	0.300	0.044	0.365	0.073
4. Avb6-Pep6-AD06569-LP38b	0.371	0.061	0.260	0.019	0.274	0.035
5. Avb6-Pep6-AD06569-LP33b	0.345	0.055	0.198	0.028	0.223	0.018
6. Avb6-Pep1-AD06569-LP54b	0.468	0.053	0.274	0.034	0.266	0.011
7. Avb6-Pep1-AD06569-LP93b	0.550	0.256	0.388	0.217	0.352	0.060

[1374]

[1375] 비복근 및 삼두근으로부터 수집된 조직을 택맨 검정에 사용하여 이들 조직에서의 MSTN의 상대량을 결정하였다. 하기 표 40은 검정의 결과를 나타낸다.

[1376] 표 40: 실시예 12의 투여 군에서의 삼두근 및 비복근에서의 상대 발현.

군	삼두근			비복근		
	상대 발현	낮은 오차	높은 오차	상대 발현	낮은 오차	높은 오차
1. 염수	1.000	0.145	0.169	1.000	0.106	0.119
2. Avb6-Pep1-AD06569-LP38b	0.296	0.038	0.043	0.186	0.017	0.019
3. Avb6-Pep5-AD06569-LP38b	0.224	0.027	0.031	0.132	0.018	0.021
4. Avb6-Pep6-AD06569-LP38b	0.193	0.017	0.019	0.117	0.015	0.017
5. Avb6-Pep6-AD06569-LP33b	0.177	0.018	0.020	0.091	0.011	0.012
6. Avb6-Pep1-AD06569-LP54b	0.217	0.030	0.035	0.145	0.024	0.029
7. Avb6-Pep1-AD06569-LP93b	0.291	0.040	0.046	0.196	0.040	0.050

[1377]

[1378] 실시예 13. RNAi의 생체내 투여는 마우스에서 Mstn을 표적화하는 것을 촉발함

[1379] 연구 제1일에, 마우스에게 하기 투여 군에 따라 등장성 염수 (비히클 대조군) 또는 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 2 mg/kg (mpk)을 주사하였으며, 여기서 AD06569는 상기 표 31에 제시된 구조를 갖는다:

[1380] 표 41: 실시예 13의 마우스에 대한 투여 군.

군	**RNAi** 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량	투여 요법
1	염수	제1일에 단일 주사
2	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP38b	제1일에 단일 주사
3	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP42b	제1일에 단일 주사
4	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP61b	제1일에 단일 주사
5	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP48b	제1일에 단일 주사
6	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP49b	제1일에 단일 주사
7	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP47b	제1일에 단일 주사
8	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP45b	제1일에 단일 주사

[1381]

[1382] MSTN 유전자에 표적화된 뉴클레오티드 서열을 갖는 RNAi 작용제 AD06569를 합성하였고, 이는 표적화 리간드에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단에 관능화된 아민 반응성 기 (NH2-C6)를 포함하였다. 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용이하게 하기 위해 3' 말단에 (C6-SS-C6) 기를 갖는 RNAi 작용제를 또한 합성하였다.

[1383] 군 2-8은 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 1을 포함한다. 각각의 군 2-8은 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 3' 말단에 접합된, 상기 제시된 바와 같은 구조를 갖는 지질 PK/PD 조정제를 포함한다.

[1384] 각각의 군에서 4마리의 마우스에게 투여하였다 (n=4). 제1일, 제8일, 제15일 및 제22일에 마우스에서 채혈하여 혈청을 수집하였다. 마우스를 연구 제22일에 희생시키고, 총 미오스타틴 mRNA를 비복근 및 삼두근으로부터 단리하였다. 삼두근을 우측 앞다리로부터 수거하였다. 각각의 샘플을 퍼셀리스 튜브에서 급속-동결시키고, 검정이 완료될 때까지 -80℃ 동결기에 저장하였다. 상대 MSTN 발현을 혈청 중 마우스 미오스타틴에 대한 ELISA 검정에 의해 결정하였다. 혈청에서의 평균 상대 미오스타틴 발현은 하기 표 42에 제시된다.

[1385] 표 42: 실시예 13의 마우스에 대한 혈청으로부터의 평균 상대 MSTN 발현.

군	제8일		제15일		제22일	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
1. 염수	0.949	0.058	0.916	0.086	1.118	0.117
2. Avb6-Pep1-AD06569-LP38b	0.441	0.050	0.320	0.017	0.289	0.036
3. Avb6-Pep1-AD06569-LP42b	0.508	0.064	0.354	0.020	0.372	0.045
4. Avb6-Pep1-AD06569-LP61b	0.299	0.060	0.220	0.030	0.203	0.031
5. Avb6-Pep1-AD06569-LP48b	0.378	0.039	0.298	0.021	0.295	0.020
6. Avb6-Pep1-AD06569-LP49b	0.344	0.038	0.244	0.014	0.236	0.021
7. Avb6-Pep1-AD06569-LP47b	0.408	0.038	0.335	0.043	0.336	0.060
8. Avb6-Pep1-AD06569-LP45b	0.357	0.047	0.280	0.016	0.244	0.021

[1386]

[1387] 비복근 및 삼두근으로부터 수집된 조직을 택맨 검정에 사용하여 이들 조직에서의 MSTN의 상대량을 결정하였다. 하기 표 43은 검정의 결과를 나타낸다.

[1388] 표 43: 실시예 13의 투여 군에서의 삼두근 및 비복근에서의 상대 발현.

군	삼두근			비복근		
	상대 발현	낮은 오차	높은 오차	상대 발현	낮은 오차	높은 오차
1. 염수	1.000	0.093	0.103	1.000	0.200	0.250
2. Avb6-Pep1-AD06569-LP38b	0.194	0.017	0.019	0.150	0.015	0.016
3. Avb6-Pep1-AD06569-LP42b	0.216	0.016	0.018	0.189	0.022	0.024
4. Avb6-Pep1-AD06569-LP61b	0.115	0.019	0.023	0.104	0.023	0.029
5. Avb6-Pep1-AD06569-LP48b	0.166	0.024	0.028	0.125	0.008	0.009
6. Avb6-Pep1-AD06569-LP49b	0.111	0.013	0.014	0.107	0.009	0.010
7. Avb6-Pep1-AD06569-LP47b	0.171	0.028	0.033	0.148	0.023	0.027
8. Avb6-Pep1-AD06569-LP45b	0.131	0.025	0.031	0.086	0.014	0.017

[1389]

[1390] 실시예 14. RNAi의 생체내 투여는 마우스에서 Mstn을 표적화하는 것을 촉발함

[1391] 연구 제1일에, 마우스에게 하기 투여 군에 따라 등장성 염수 (비히클 대조군) 또는 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 1.5 mg/kg (mpk)을 주사하였으며, 여기서 AD06569는 상기 표 31에 제시된 구조를 갖는다:

[1392] 표 44: 실시예 14의 마우스에 대한 투여 군.

군	**RNAi** 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량	투여 요법
1	염수	제1일에 단일 주사
3	1.5 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP33b	제1일에 단일 주사
4	1.5 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP39b	제1일에 단일 주사
5	1.5 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP41b	제1일에 단일 주사
6	1.5 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP57b	제1일에 단일 주사
7	1.5 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP58b	제1일에 단일 주사
8	1.5 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP59b	제1일에 단일 주사
9	1.5 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP60b	제1일에 단일 주사
10	1.5 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP62b	제1일에 단일 주사

[1393]

[1394] MSTN 유전자에 표적화된 뉴클레오티드 서열을 갖는 RNAi 작용제 AD06569를 합성하였고, 이는 표적화 리간드에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단에 관능화된 아민 반응성 기 (NH2-C6)를 포함하였다. 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용이하게 하기 위해 3' 말단에 (C6-SS-C6) 기를 갖는 RNAi 작용제를 또한 합성하였다.

[1395] 군 3-10은 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 1을 포함한다. 각각의 군 2-10은 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 3' 말단에 접합된, 상기 제시된 바와 같은 구조를 갖는 지질 PK/PD 조정제를 포함한다.

[1396] 각각의 군에서 4마리의 마우스에게 투여하였다 (n=4). 제1일, 제8일, 제15일 및 제22일에 마우스에서 채혈하여 혈청을 수집하였다. 마우스를 연구 제22일에 희생시키고, 총 미오스타틴 mRNA를 비복근 및 삼두근으로부터 단리하였다. 삼두근을 우측 앞다리로부터 수거하였다. 각각의 샘플을 퍼셀리스 튜브에서 급속-동결시키고, 검정이 완료될 때까지 -80℃ 동결기에 저장하였다. 상대 MSTN 발현을 혈청 중 마우스 미오스타틴에 대한 ELISA 검정에 의해 결정하였다. 혈청에서의 평균 상대 미오스타틴 발현은 하기 표 45에 제시된다.

[1397] 표 45: 실시예 14의 마우스에 대한 혈청으로부터의 평균 상대 MSTN 발현.

군	**제8일**		**제15일**		**제22일**	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
1. 염수	1.177	0.088	1.174	0.178	1.023	0.065
3. mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP33b	0.443	0.056	0.287	0.048	0.269	0.056
4. mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP39b	0.557	0.182	0.466	0.229	0.410	0.245
5. mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP41b	0.523	0.072	0.396	0.073	0.343	0.075
6. mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP57b	0.508	0.030	0.409	0.041	0.343	0.026
7. mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP58b	0.452	0.043	0.313	0.030	0.288	0.013
8. mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP59b	0.466	0.043	0.278	0.033	0.252	0.026
9. mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP60b	0.535	0.018	0.319	0.018	0.292	0.029
10. mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP62b	0.435	0.052	0.346	0.045	0.258	0.042

[1398]

[1399] 비복근 및 삼두근으로부터 수집된 조직을 택맨 검정에 사용하여 이들 조직에서의 MSTN의 상대량을 결정하였다. 하기 표 46은 검정의 결과를 나타낸다.

[1400] 표 46: 실시예 14의 투여 군에서의 삼두근 및 비복근에서의 상대 발현.

군	삼두근			비복근		
	상대 발현	낮은 오차	높은 오차	상대 발현	낮은 오차	높은 오차
1. 염수	1.000	0.040	0.042	1.000	0.042	0.044
3. mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP33b	0.259	0.055	0.070	0.129	0.034	0.045
4. mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP39b	0.539	0.149	0.206	0.311	0.081	0.109
5. mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP41b	0.425	0.030	0.032	0.235	0.043	0.053
6. mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP57b	0.442	0.039	0.043	0.241	0.021	0.023
7. mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP58b	0.244	0.045	0.055	0.160	0.033	0.041
8. mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP59b	0.259	0.040	0.047	0.138	0.022	0.026
9. mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP60b	0.334	0.046	0.054	0.179	0.022	0.025
10. mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP62b	0.297	0.050	0.060	0.193	0.050	0.068

[1401]

[1402] 실시예 15. RNAi의 생체내 투여는 마우스에서 Mstn을 표적화하는 것을 촉발함

[1403] 연구 제1일에, 마우스에게 하기 투여 군에 따라 등장성 염수 (비히클 대조군) 또는 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 2 mg/kg (mpk)을 주사하였으며, 여기서 AD06569는 상기 표 31에 제시된 구조를 갖는다:

[1404] 표 47: 실시예 15의 마우스에 대한 투여 군.

군	**RNAi** 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량	투여 요법
1	염수	제1일에 단일 주사
2	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP41b	제1일에 단일 주사
3	2 mpk Avb6-Pep6-AD06569-LP41b	제1일에 단일 주사
4	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP106b	제1일에 단일 주사
5	2 mpk Avb6-Pep6-AD06569-LP106b	제1일에 단일 주사

[1405]

[1406] MSTN 유전자에 표적화된 뉴클레오티드 서열을 갖는 RNAi 작용제 AD06569를 합성하였고, 이는 표적화 리간드에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단에 관능화된 아민 반응성 기 (NH2-C6)를 포함하였다. 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용이하게 하기 위해 3' 말단에 (C6-SS-C6) 기를 갖는 RNAi 작용제를 또한 합성하였다.

[1407] 군 2 및 4는 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 1을 포함한다. 군 3 및 5는 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 6을 포함한다. 군 2 및 4는 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 3' 말단에 접합된 상기 구조를 갖는 지질 PK/PD 조정제를 포함한다.

[1408] 각각의 군에서 4마리의 마우스에게 투여하였다 (n=4). 제1일, 제8일, 제15일 및 제22일에 마우스에서 채혈하여 혈청을 수집하였다. 마우스를 연구 제22일에 희생시키고, 총 미오스타틴 mRNA를 비복근 및 삼두근으로부터 단리하였다. 삼두근을 우측 앞다리로부터 수거하였다. 각각의 샘플을 퍼셀리스 튜브에서 급속-동결시키고, 검정이 완료될 때까지 -80℃ 동결기에 저장하였다. 상대 MSTN 발현을 혈청 중 마우스 미오스타틴에 대한 ELISA 검정에 의해 결정하였다. 혈청에서의 평균 상대 미오스타틴 발현은 하기 표 48에 제시된다.

[1409] 표 48: 실시예 15의 마우스에 대한 혈청으로부터의 평균 상대 MSTN 발현.

군	제8일		제15일		제22일	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
1. 염수	1.020	0.048	1.358	0.040	1.412	0.082
2. Avb6-Pep1-AD06569-LP41b	0.535	0.297	0.594	0.354	0.552	0.424
3. Avb6-Pep6-AD06569-LP41b	0.411	0.069	0.407	0.037	0.319	0.035
4. Avb6-Pep1-AD06569-LP106b	0.413	0.022	0.419	0.038	0.341	0.027
5. Avb6-Pep6-AD06569-LP106b	0.418	0.043	0.454	0.039	0.327	0.058

[1410]

[1411] 비복근 및 삼두근으로부터 수집된 조직을 택맨 검정에 사용하여 이들 조직에서의 MSTN의 상대량을 결정하였다. 하기 표 49는 검정의 결과를 나타낸다.

[1412] 표 49: 실시예 15의 투여 군에서의 삼두근 및 비복근에서의 상대 발현.

군	삼두근			비복근		
	상대 발현	낮은 오차	높은 오차	상대 발현	낮은 오차	높은 오차
1. 염수	1.000	0.180	0.219	1.000	0.109	0.123
2. Avb6-Pep1-AD06569-LP41b	0.260	0.123	0.233	0.188	0.107	0.250
3. Avb6-Pep6-AD06569-LP41b	0.194	0.019	0.021	0.103	0.013	0.015
4. Avb6-Pep1-AD06569-LP106b	0.203	0.020	0.022	0.122	0.015	0.017
5. Avb6-Pep6-AD06569-LP106b	0.210	0.037	0.045	0.117	0.018	0.021

[1413]

[1414] 실시예 16. RNAi의 생체내 투여는 마우스에서 Mstn을 표적화하는 것을 촉발함

[1415] 연구 제1일에, 마우스에게 하기 투여 군에 따라 등장성 염수 (비히클 대조군) 또는 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 2 mg/kg (mpk)을 주사하였으며, 여기서 AD06569는 상기 표 31에 제시된 구조를 갖는다:

[1416] 표 50: 실시예 16의 마우스에 대한 투여 군.

군	**RNAi** 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량	투여 요법
1	염수	제1일에 단일 주사
2	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP38b	제1일에 단일 주사
3	2 mpk Avb6-Pep1-AD07724-LP107b	제1일에 단일 주사
4	2 mpk Avb6-Pep1-AD07724-LP108b	제1일에 단일 주사
5	2 mpk Avb6-Pep1-AD07724-LP109b	제1일에 단일 주사
6	2 mpk Avb6-Pep6-AD06569-LP33b	제1일에 단일 주사
7	2 mpk Avb6-Pep6-AD06569-LP81b	제1일에 단일 주사
8	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP110b	제1일에 단일 주사
9	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP111b	제1일에 단일 주사

[1417]

[1418] MSTN 유전자에 표적화된 뉴클레오티드 서열을 갖는 RNAi 작용제 AD06569 및 AD07724를 합성하였고, 표적화 리간드에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단에 관능화된 아민 반응성 기 (NH2-C6)를 포함하였다. AD06569를 또한 3' 말단에 (C6-SS-C6) 기를 갖도록 합성하여, 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용이하게 하였다. AD07724를 말단 uAlk (표 23 참조) 잔기를 갖도록 합성하여 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용

이하게 하였다.

[1419] 군 2-9는 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 1을 포함한다. 각각의 군 2-9는 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 3' 말단에 접합된, 상기 제시된 바와 같은 구조를 갖는 지질 PK/PD 조정제를 포함한다.

[1420] 각각의 군에서 4마리의 마우스에게 투여하였다 (n=4). 제1일, 제8일, 제15일 및 제22일에 마우스에서 채혈하여 혈청을 수집하였다. 마우스를 연구 제22일에 희생시키고, 총 미오스타틴 mRNA를 비복근 및 삼두근으로부터 단리하였다. 삼두근을 우측 앞다리로부터 수거하였다. 각각의 샘플을 퍼셀리스 튜브에서 급속-동결시키고, 검정이 완료될 때까지 -80℃ 동결기에 저장하였다. 상대 MSTN 발현을 혈청 중 마우스 미오스타틴에 대한 ELISA 검정에 의해 결정하였다. 혈청에서의 평균 상대 미오스타틴 발현은 하기 표 51에 제시된다.

[1421] 표 51: 실시예 16의 마우스에 대한 혈청으로부터의 평균 상대 MSTN 발현.

군	제8일		제15일		제22일	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
1. 염수	1.071	0.061	0.988	0.086	1.170	0.088
2. Avb6-Pep1-AD06569-LP38b	0.500	0.017	0.254	0.026	0.315	0.026
3. Avb6-Pep1-AD07724-LP107b	0.804	0.026	0.595	0.061	0.753	0.008
4. Avb6-Pep1-AD07724-LP108b	0.877	0.052	0.626	0.041	0.732	0.053
5. Avb6-Pep1-AD07724-LP109b	0.859	0.100	0.610	0.059	0.709	0.079
6. Avb6-Pep6-AD06569-LP33b	0.326	0.040	0.187	0.025	0.207	0.034
7. Avb6-Pep6-AD06569-LP81b	0.352	0.013	0.218	0.025	0.235	0.014
8. Avb6-Pep1-AD06569-LP110b	0.476	0.045	0.306	0.023	0.317	0.040
9. Avb6-Pep1-AD06569-LP111b	0.422	0.021	0.220	0.028	0.250	0.039

[1422]

[1423] 비복근 및 삼두근으로부터 수집된 조직을 택맨 검정에 사용하여 이들 조직에서의 MSTN의 상대량을 결정하였다. 하기 표 52는 검정의 결과를 나타낸다.

[1424] 표 52: 실시예 16의 투여 군에서의 삼두근 및 비복근에서의 상대 발현.

군	삼두근			비복근		
	상대 발현	낮은 오차	높은 오차	상대 발현	낮은 오차	높은 오차
1. 염수	1.000	0.031	0.032	1.000	0.216	0.276
2. Avb6-Pep1-AD06569-LP38b	0.193	0.028	0.032	0.109	0.008	0.008
3. Avb6-Pep1-AD07724-LP107b	0.506	0.045	0.050	0.347	0.047	0.055
4. Avb6-Pep1-AD07724-LP108b	0.441	0.046	0.052	0.269	0.049	0.060
5. Avb6-Pep1-AD07724-LP109b	0.447	0.057	0.065	0.284	0.066	0.086
6. Avb6-Pep6-AD06569-LP33b	0.101	0.017	0.020	0.064	0.011	0.013
7. Avb6-Pep6-AD06569-LP81b	0.103	0.014	0.017	0.062	0.009	0.011
8. Avb6-Pep1-AD06569-LP110b	0.193	0.023	0.026	0.105	0.015	0.017
9. Avb6-Pep1-AD06569-LP111b	0.129	0.024	0.029	0.094	0.016	0.019

[1425]

[1426] 실시예 17. RNAi의 생체내 투여는 마우스에서 Mstn을 표적화하는 것을 촉발함

[1427] 연구 제1일에, 마우스에게 하기 투여 군에 따라 등장성 염수 (비히클 대조군) 또는 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 2 mg/kg (mpk)을 주사하였으며, 여기서 AD06569는 상기 표 31에 제시된 구조를 갖는다.

[1428] 표 53: 실시예 17의 마우스에 대한 투여 군.

군	**RNAi** 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량	투여 요법
1	염수	제1일에 단일 주사
2	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP38b	제1일에 단일 주사
3	2 mpk Avb6-Pep1-AD07724-LP108b	제1일에 단일 주사
4	2 mpk Avb6-Pep1-AD07909-LP108b	제1일에 단일 주사
5	2 mpk Avb6-Pep1-AD07910-LP108b	제1일에 단일 주사
6	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP143b	제1일에 단일 주사
7	2 mpk Avb6-Pep6-AD06569-LP143b	제1일에 단일 주사
8	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP57b	제1일에 단일 주사
9	2 mpk Avb6-Pep6-AD06569-LP130b	제1일에 단일 주사
10	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP124b	제1일에 단일 주사

[1429]

[1430] MSTN 유전자에 표적화된 뉴클레오티드 서열을 갖는 RNAi 작용제 AD06569, AD07724, AD07909 및 AD07910을 합성하였고, 이는 표적화 리간드에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단에 관능화된 아민 반응성 기 (NH2-C6)를 포함하였다. AD06569를 또한 3' 말단에 (C6-SS-C6) 기를 갖도록 합성하여, 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용이하게 하였다. AD07724, AD07909, 및 AD07910을 말단 알킨-함유 뉴클레오티드를 갖도록 합성하여 (표 23 참조), 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용이하게 하였다.

[1431] 군 2-6, 8 및 10은 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 1을 포함한다. 군 7 및 9는 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 6을 포함한다. 각각의 군 2-10은 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 3' 말단에 접합된, 상기 제시된 바와 같은 구조를 갖는 지질 PK/PD 조정제를 포함한다.

[1432] 각각의 군에서 4마리의 마우스에게 투여하였다 (n=4). 제1일, 제8일, 제15일 및 제22일에 마우스에서 채혈하여 혈청을 수집하였다. 마우스를 연구 제22일에 희생시키고, 총 미오스타틴 mRNA를 비복근 및 삼두근으로부터 단리하였다. 삼두근을 우측 앞다리로부터 수거하였다. 각각의 샘플을 퍼셀리스 튜브에서 급속-동결시키고, 검정이 완료될 때까지 -80℃ 동결기에 저장하였다. 상대 MSTN 발현을 혈청 중 마우스 미오스타틴에 대한 ELISA 검정에 의해 결정하였다. 혈청에서의 평균 상대 미오스타틴 발현은 하기 표 54에 제시된다.

[1433] 표 54: 실시예 17의 마우스에 대한 혈청으로부터의 평균 상대 MSTN 발현.

군	제8일		제15일		제22일	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
1. 염수	1.087	0.059	1.011	0.075	1.036	0.095
2. Avb6-Pep1-AD06569-LP38b	0.453	0.020	0.317	0.030	0.272	0.018
3. Avb6-Pep1-AD07724-LP108b	0.833	0.029	0.574	0.056	0.586	0.057
4. Avb6-Pep1-AD07909-LP108b	0.792	0.108	0.587	0.062	0.543	0.077
5. Avb6-Pep1-AD07910-LP108b	0.585	0.022	0.347	0.035	0.347	0.070
6. Avb6-Pep1-AD06569-LP143b	0.495	0.060	0.331	0.043	0.283	0.054
7. Avb6-Pep6-AD06569-LP143b	0.406	0.003	0.286	0.024	0.255	0.048
8. Avb6-Pep1-AD06569-LP57b	0.437	0.064	0.265	0.037	0.241	0.022
9. Avb6-Pep6-AD06569-LP130b	0.443	0.032	0.269	0.010	0.212	0.008
10. Avb6-Pep1-AD06569-LP124b	0.406	0.040	0.257	0.027	0.212	0.026

[1434]

[1435] 비복근 및 삼두근으로부터 수집된 조직을 택맨 검정에 사용하여 이들 조직에서의 MSTN의 상대량을 결정하였다. 하기 표 55는 검정의 결과를 나타낸다.

[1436] 표 55: 실시예 17의 투여 군에서의 삼두근 및 비복근에서의 상대 발현.

군	삼두근			비복근		
	상대 발현	낮은 오차	높은 오차	상대 발현	낮은 오차	높은 오차
1. 염수	1.000	0.124	0.141	1.000	0.109	0.122
2. Avb6-Pep1-AD06569-LP38b	0.263	0.035	0.040	0.175	0.014	0.015
3. Avb6-Pep1-AD07724-LP108b	0.435	0.021	0.022	0.317	0.023	0.025
4. Avb6-Pep1-AD07909-LP108b	0.477	0.044	0.049	0.328	0.037	0.041
5. Avb6-Pep1-AD07910-LP108b	0.229	0.029	0.033	0.130	0.037	0.051
6. Avb6-Pep1-AD06569-LP143b	0.228	0.045	0.056	0.170	0.032	0.039
7. Avb6-Pep6-AD06569-LP143b	0.194	0.042	0.053	0.135	0.031	0.041
8. Avb6-Pep1-AD06569-LP57b	0.156	0.012	0.013	0.084	0.019	0.024
9. Avb6-Pep6-AD06569-LP130b	0.183	0.046	0.061	0.112	0.035	0.052
10. Avb6-Pep1-AD06569-LP124b	0.166	0.031	0.039	0.100	0.019	0.023

[1437]

[1438] 실시예 18. RNAi의 생체내 투여는 마우스에서 Mstn을 표적화하는 것을 촉발함

[1439] 연구 제1일에, 마우스에게 표 56에 기재된 하기 투여 군에 따라 등장성 염수 (비히클 대조군) 또는 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 1 mg/kg (mpk)을 주사하였으며, 여기서 AD06569는 상기 표 31에 제시된 구조를 갖는다.

[1440] 표 56: 실시예 18의 마우스에 대한 투여 군.

군	**RNAi** 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량	투여 요법
1	염수	제1일에 단일 주사
2	1 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	제1일에 단일 주사
3	1 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP217b	제1일에 단일 주사
4	1 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP220b	제1일에 단일 주사
5	1 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP221b	제1일에 단일 주사
6	1 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP223b	제1일에 단일 주사
7	1 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP224b	제1일에 단일 주사
8	1 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP225b	제1일에 단일 주사
9	1 mpk Avb6-Pep1-AD08257-LP226b	제1일에 단일 주사

[1441]

[1442] MSTN 유전자에 표적화된 뉴클레오티드 서열을 갖는 RNAi 작용제 AD06569 및 AD08257을 합성하였다. AD0659는 표적화 리간드에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단에 관능화된 아민 반응성 기 (NH2-C6)를 포함하였다. AD06569를 또한 3' 말단에 (C6-SS-C6) 기를 갖도록 합성하여, 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용이하게 하였다. AD08257은 표적화 리간드에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단에 (NH2-C6)s 기를 포함하였다. AD08257을 또한 3' 말단에 LA2 기를 갖도록 합성하여, 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용이하게 하였다.

[1443] 군 2-9는 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 1을 포함한다. 각각의 군 2-9는 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 3' 말단에 접합된, 상기 제시된 바와 같은 구조를 갖는 지질 PK/PD 조정제를 포함한다.

[1444] 각각의 군에서 4마리의 마우스에게 투여하였다 (n=4). 제1일, 제8일, 제15일 및 제22일에 마우스에서 채혈하여 혈청을 수집하였다. 마우스를 연구 제22일에 희생시키고, 총 미오스타틴 mRNA를 삼두근으로부터 단리하였다. 삼두근을 우측 앞다리로부터 수거하였다. 각각의 샘플을 퍼셀리스 튜브에서 급속-동결시키고, 검정이 완료될 때까지 -80℃ 동결기에 저장하였다. 상대 MSTN 발현을 혈청 중 마우스 미오스타틴에 대한 ELISA 검정에 의해 결정하였다. 혈청에서의 평균 상대 미오스타틴 발현은 하기 표 57에 제시된다.

[1445] 표 57: 실시예 18의 마우스에 대한 혈청으로부터의 평균 상대 MSTN 발현.

군	제8일		제15일		제22일	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
1. 염수	0.902	0.078	0.989	0.071	0.969	0.100
2. Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	0.468	0.070	0.314	0.032	0.265	0.016
3. Avb6-Pep1-AD06569-LP217b	0.457	0.029	0.366	0.054	0.298	0.027
4. Avb6-Pep1-AD06569-LP220b	0.453	0.018	0.330	0.011	0.277	0.035
5. Avb6-Pep1-AD06569-LP221b	0.619	0.039	0.567	0.072	0.443	0.067
6. Avb6-Pep1-AD06569-LP223b	0.490	0.027	0.353	0.022	0.273	0.017
7. Avb6-Pep1-AD06569-LP224b	0.467	0.074	-	-	0.298	0.021
8. Avb6-Pep1-AD06569-LP225b	0.445	0.023	-	-	0.233	0.070
9. Avb6-Pep1-AD08257-LP226b	0.527	0.042	0.444	0.067	0.356	0.074

[1446]

[1447] 삼두근으로부터 수집된 조직을 택맨 검정에 사용하여 이들 조직에서의 MSTN의 상대량을 결정하였다. 하기 표 58은 검정의 결과를 나타낸다.

[1448] 표 58: 실시예 18의 투여 군에서의 삼두근에서의 상대 발현.

군	삼두근		
	상대 발현	낮은 오차	높은 오차
1. 염수	1.000	0.047	0.050
2. Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	0.239	0.038	0.045
3. Avb6-Pep1-AD06569-LP217b	0.310	0.041	0.047
4. Avb6-Pep1-AD06569-LP220b	0.264	0.022	0.024
5. Avb6-Pep1-AD06569-LP221b	0.410	0.070	0.084
6. Avb6-Pep1-AD06569-LP223b	0.265	0.037	0.043
7. Avb6-Pep1-AD06569-LP224b	0.314	0.052	0.062
8. Avb6-Pep1-AD06569-LP225b	0.281	0.044	0.052
9. Avb6-Pep1-AD08257-LP226b	0.243	0.044	0.054

[1449]

[1450] 실시예 19. RNAi의 생체내 투여는 마우스에서 Mstn을 표적화하는 것을 촉발함

[1451] 연구 제1일에, 마우스에게 표 59에 기재된 투여 군에 따라 등장성 염수 (비히클 대조군), 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 0.75 mg/kg (mpk)의 본 발명의 전달 비히클, 또는 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 2 mpk의 본 발명의 전달 비히클을 주사하였으며, 여기서 AD06569는 상기 표 31에 제시된 구조를 갖는다.

[1452] 표 59: 실시예 19의 마우스에 대한 투여 군.

군	**RNAi** 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량	투여 요법
1	염수	제1일에 단일 주사
2	0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	제1일에 단일 주사
3	0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP210b	제1일에 단일 주사
4	0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP220b	제1일에 단일 주사
5	0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP238b	제1일에 단일 주사
6	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	제1일에 단일 주사
7	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP210b	제1일에 단일 주사
8	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP220b	제1일에 단일 주사
9	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP238b	제1일에 단일 주사

[1453]

[1454] MSTN 유전자에 표적화된 뉴클레오티드 서열을 갖는 RNAi 작용제 AD06569를 합성하였고, 이는 표적화 리간드에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단에 관능화된 아민 반응성 기 (NH2-C6)를 포함하였다. AD06569를 또한 3' 말단에 (C6-SS-C6) 기를 갖도록 합성하여, 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용이하게 하였다.

[1455] 군 2-9는 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 1을 포함한다. 각각의 군 2-9는 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 3' 말단에 접합된, 상기 제시된 바와 같은 구조를 갖는 지질 PK/PD 조정제를 포함한다.

[1456] 각각의 군에서 4마리의 마우스에게 투여하였다 (n=4). 제1일, 제8일, 제15일 및 제22일에 마우스에서 채혈하여 혈청을 수집하였다. 마우스를 연구 제22일에 희생시키고, 총 미오스타틴 mRNA를 비복근 및 삼두근으로부터 단리하였다. 삼두근을 우측 앞다리로부터 수거하였다. 각각의 샘플을 퍼셀리스 튜브에서 급속-동결시키고, 검정이 완료될 때까지 -80℃ 동결기에 저장하였다. 상대 MSTN 발현을 혈청 중 마우스 미오스타틴에 대한 ELISA 검정에 의해 결정하였다. 혈청에서의 평균 상대 미오스타틴 발현은 하기 표 60에 제시된다.

[1457] 표 60: 실시예 19의 마우스에 대한 혈청으로부터의 평균 상대 MSTN 발현.

군	**제8일**		**제15일**		**제22일**	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
1. 염수	0.966	0.094	0.903	0.033	1.065	0.089
2. 0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	0.518	0.048	0.398	0.049	0.391	0.039
3. 0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP210b	0.478	0.093	0.421	0.023	0.444	0.008
4. 0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP220b	0.447	0.050	0.343	0.059	0.323	0.055
5. 0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP238b	0.510	0.034	0.373	0.029	0.412	0.044
6. 2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	0.479	0.028	0.329	0.031	0.310	0.023
7. 2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP210b	0.444	0.026	0.305	0.049	0.295	0.033
8. 2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP220b	0.453	0.055	0.296	0.023	0.285	0.028
9. 2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP238b	0.410	0.073	0.304	0.027	0.290	0.021

[1458]

[1459] 비복근 및 삼두근으로부터 수집된 조직을 택맨 검정에 사용하여 이들 조직에서의 MSTN의 상대량을 결정하였다.

하기 표 61은 검정의 결과를 나타낸다.

[1460] 표 61: 실시예 19의 투여 군에서의 삼두근 및 비복근에서의 상대 발현.

군	삼두근			비복근		
	상대 발현	낮은 오차	높은 오차	상대 발현	낮은 오차	높은 오차
1. 염수	1.000	0.034	0.036	1.000	0.034	0.035
2. 0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	0.350	0.091	0.122	0.251	0.070	0.096
3. 0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP210b	0.278	0.049	0.059	0.199	0.027	0.031
4. 0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP220b	0.211	0.023	0.026	0.155	0.017	0.019
5. 0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP238b	0.304	0.024	0.027	0.214	0.015	0.017
6. 2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	0.170	0.046	0.063	0.119	0.023	0.028
7. 2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP210b	0.223	0.055	0.073	0.149	0.041	0.056
8. 2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP220b	0.208	0.023	0.026	0.136	0.023	0.028
9. 2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP238b	0.225	0.029	0.033	0.138	0.027	0.033

[1461]

[1462] 실시예 20. RNAi의 생체내 투여는 마우스에서 Mstn을 표적화하는 것을 촉발함

[1463] 연구 제1일에, 마우스에게 표 62에 기재된 투여 군에 따라 등장성 염수 (비히클 대조군), 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 0.75 mg/kg (mpk)의 본 발명의 전달 비히클, 또는 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 2 mpk의 본 발명의 전달 비히클을 주사하였으며, 여기서 AD06569는 상기 표 31에 제시된 구조를 갖는다.

[1464] 표 62: 실시예 20의 마우스에 대한 투여 군.

군	**RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량**	투여 요법
1	염수	제1일에 단일 주사
2	0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	제1일에 단일 주사
3	0.75 mpk Avb6-Pep1-AD08257-LP240b	제1일에 단일 주사
4	0.75 mpk Avb6-Pep1-AD08257-LP246b	제1일에 단일 주사
5	0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP247b	제1일에 단일 주사
6	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	제1일에 단일 주사
7	2 mpk Avb6-Pep1-AD08257-LP240b	제1일에 단일 주사
8	2 mpk Avb6-Pep1-AD08257-LP246b	제1일에 단일 주사
9	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP247b	제1일에 단일 주사

[1465]

[1466] MSTN 유전자에 표적화된 뉴클레오티드 서열을 갖는 RNAi 작용제 AD06569 및 AD08257을 합성하였다. AD0659는 표적화 리간드에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단에 관능화된 아민 반응성 기 (NH2-C6)를 포함하였다. AD06569를 또한 3' 말단에 (C6-SS-C6) 기를 갖도록 합성하여, 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용이하게 하였다. AD08257은 표적화 리간드에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단에 (NH2-C6)s 기를 포함하였다. AD08257을 또한 3' 말단에 LA2 기를 갖도록 합성하여, 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용이하게 하였다.

[1467] 군 2-9는 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 1을 포함한다. 각각의 군 2-9는 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 3' 말단에 접합된, 상기 제시된 바와 같은 구조를 갖는 지질 PK/PD 조정제를 포함한다.

[1468] 각각의 군에서 4마리의 마우스에게 투여하였다 (n=4). 제1일, 제8일, 제15일 및 제22일에 마우스에서 채혈하여 혈청을 수집하였다. 마우스를 연구 제22일에 희생시키고, 총 미오스타틴 mRNA를 비복근 및 삼두근으로부터 단리하였다. 삼두근을 우측 앞다리로부터 수거하였다. 각각의 샘플을 퍼셀리스 튜브에서 급속-동결시키고, 검정이 완료될 때까지 -80℃ 동결기에 저장하였다. 상대 MSTN 발현을 혈청 중 마우스 미오스타틴에 대한 ELISA 검정에 의해 결정하였다. 혈청에서의 평균 상대 미오스타틴 발현은 하기 표 63에 제시된다.

[1469] 표 63: 실시예 20의 마우스에 대한 혈청으로부터의 평균 상대 MSTN 발현.

군	제8일		제15일		제22일	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
1. 염수	1.112	0.078	1.193	0.044	1.204	0.084
2. 0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	0.642	0.078	0.440	0.039	0.408	0.042
3. 0.75 mpk Avb6-Pep1-AD08257-LP240b	0.662	0.121	0.488	0.028	0.444	0.070
4. 0.75 mpk Avb6-Pep1-AD08257-LP246b	0.614	0.082	0.479	0.078	0.418	0.051
5. 0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP247b	0.612	0.051	0.460	0.060	0.447	0.019
6. 2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	0.449	0.033	0.332	0.034	0.285	0.012
7. 2 mpk Avb6-Pep1-AD08257-LP240b	0.482	0.061	0.398	0.037	0.355	0.050
8. 2 mpk Avb6-Pep1-AD08257-LP246b	0.558	0.038	0.427	0.041	0.382	0.019
9. 2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP247b	0.555	0.071	0.407	0.027	0.370	0.033

[1470]

[1471] 비복근 및 삼두근으로부터 수집된 조직을 택맨 검정에 사용하여 이들 조직에서의 MSTN의 상대량을 결정하였다. 하기 표 64는 검정의 결과를 나타낸다.

[1472] 표 64: 실시예 20의 투여 군에서의 삼두근 및 비복근에서의 상대 발현.

군	삼두근			비복근		
	상대 발현	낮은 오차	높은 오차	상대 발현	낮은 오차	높은 오차
1. 염수	1.000	0.102	0.114	1.000	0.118	0.134
2. 0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	0.272	0.055	0.069	0.220	0.043	0.053
3. 0.75 mpk Avb6-Pep1-AD08257-LP240b	0.358	0.055	0.065	0.256	0.041	0.049
4. 0.75 mpk Avb6-Pep1-AD08257-LP246b	0.280	0.080	0.113	0.206	0.063	0.091
5. 0.75 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP247b	0.271	0.032	0.037	0.189	0.023	0.027
6. 2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	0.196	0.014	0.015	0.135	0.019	0.022
7. 2 mpk Avb6-Pep1-AD08257-LP240b	0.210	0.033	0.040	0.135	0.034	0.046
8. 2 mpk Avb6-Pep1-AD08257-LP246b	0.228	0.034	0.041	0.163	0.045	0.062
9. 2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP247b	0.183	0.024	0.028	0.138	0.035	0.047

[1473]

[1474] 실시예 21. RNAi의 생체내 투여는 마우스에서 Mstn을 표적화하는 것을 촉발함

[1475] 연구 제1일에, 마우스에게 하기 투여 군에 따라 등장성 염수 (비히클 대조군), 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 2 mg/kg (mpk), 또는 등장성 염수 중에 제제화된 대조군 전달 비히클 2 mpk를 주사하였으며, 여기서 AD06569는 상기 표 31에 제시된 구조를 갖는다:

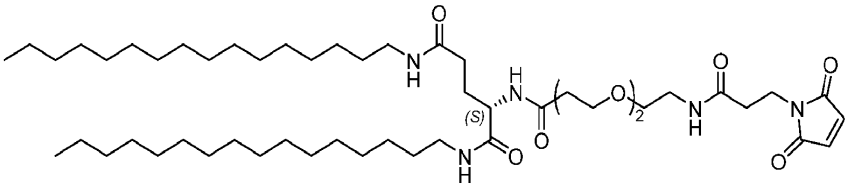
[1476] 표 65: 실시예 21의 마우스에 대한 투여 군.

군	**RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량**	투여 요법
1	염수	제1일에 단일 주사
2	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	제1일에 단일 주사
3	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-nEm	제1일에 단일 주사
4	2 mpk AD06569	제1일에 단일 주사
5	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-비스-C16	제1일에 단일 주사
6	2 mpk Avb6-Pep1-AD06569-비스-PEG47	제1일에 단일 주사

[1477]

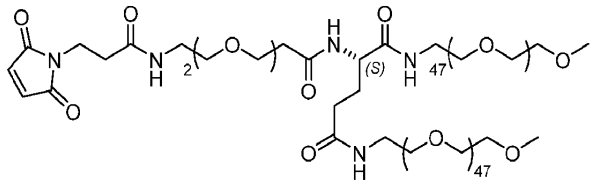
[1478] MSTN 유전자에 표적화된 뉴클레오티드 서열을 갖는 RNAi 작용제 AD06569를 합성하였고, 이는 표적화 리간드에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단에 관능화된 아민 반응성 기 (NH_2-C_6)를 포함하였다. AD06569를 또한 3' 말단에 (C6-SS-C6) 기를 갖도록 합성하여, 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용이하게 하였다.

[1479] 군 2, 3, 5 및 6은 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 1을 포함하였다. 군 2는 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 3' 말단에 접합된, 상기 제시된 바와 같은 구조를 갖는 PK/PD 조정제를 포함하였다. 군 3은 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 3' 말단에 접합된 캡핑된 말레이미드를 포함하였다. 군 4는 표적화 리간드 또는 PK/PD 조정제가 없는 RNAi 작용제를 포함하였다. 군 5는 지질에 인접한 PEG 모이어티를 갖지 않는 비스-C16을 갖는 PK/PD 조정제를 포함하였다. 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 군 5의 RNAi 작용제의 센스 가닥의 3' 말단을 하기 구조를 갖는 말레이미드-함유 PK/PD 조정제 전구체에 접합시켰다:



[1480]

[1481] 군 6은 지질 부분이 없는 PK/PD 조정제, 및 비스-PEG47 모이어티를 포함하였다. 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 군 6의 RNAi 작용제의 센스 가닥의 3' 말단을 하기 구조를 갖는 말레이미드-함유 PK/PD 조정제 전구체에 접합시켰다:



[1482]

[1483] 각각의 군에서 4마리의 마우스에게 투여하였다 (n=4). 제1일, 제8일, 제15일 및 제22일에 마우스에서 채혈하여 혈청을 수집하였다. 마우스를 연구 제22일에 희생시켰다. 상대 MSTN 발현을 혈청 중 마우스 미오스타틴에 대한 ELISA 검정에 의해 결정하였다. 혈청에서의 평균 상대 미오스타틴 발현은 하기 표 66에 제시된다.

[1484] 표 66: 실시예 21의 마우스에 대한 혈청으로부터의 평균 상대 MSTN 발현.

군	제8일		제15일		제22일	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
1. 염수	1.091	0.177	1.200	0.052	1.001	0.075
2. Avb6-Pep1-AD06569-LP29b	0.492	0.073	0.353	0.055	0.289	0.026
3. Avb6-Pep1-AD06569-nEm	0.857	0.182	0.634	0.123	0.587	0.087
4. AD06569	1.361	0.226	1.276	0.039	1.211	0.197
5. Avb6-Pep1-AD06569-비스-C16	0.634	0.060	0.470	0.091	0.379	0.072
6. Avb6-Pep1-AD06569-비스-PEG47	0.752	0.059	0.585	0.094	0.516	0.082

[1485]

[1486] 표 66에 제시된 바와 같이, 군 2의 지질 모이어티 (즉, LP 29b)에 인접한 비스-PEG 모이어티는 군 3의 캡핑된 말레이미드, 군 4의 "네이키드" RNAi 작용제, 군 5의 PEG가 없는 PK/PD 조정제, 및 군 6의 지질이 없는 PK/PD 조정제에 비해 개선된 MSTN 녹다운을 나타낸다.

[1487] 실시예 22. RNAi의 생체내 투여는 시노몰구스 원숭이에서 MSTN을 표적화하는 것을 촉발함

[1488] 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 미오스타틴 RNAi 작용제를 본원의 실시예 1에 제시된 바와 같이, 관련 기술분야에 공지되고 올리고뉴클레오티드 합성에 통상적으로 사용되는 일반적 절차에 따라 고체 상 상에서 포스포르아미다이트 기술에 따라 합성하였다. 연구 제1일, 제7일 및 제28일에, 시노몰구스 마카크 (마카카 파시쿨라리스) 영장류 (본원에서 "시노"로 지칭됨)에게 하기 투여 군에 따라 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 10 mg/kg (mpk)을 주사하였다:

[1489] 표 67: 실시예 22의 시노에 대한 투여 군.

군	**RNAi** 작용제 또는 대조군을 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량	투여 요법
1	10 mpk αvβ6 펩티드 1-Mstn(AD06569)-LP29b	제1일, 제7일, 및 제28일에 주사

[1490]

[1491] MSTN 유전자를 표적화하도록 지시된 뉴클레오티드 서열을 갖는 실시예 22의 RNAi 작용제를 합성하였고, 이는 표적화 리간드 αvβ6 펩티드 1에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단에 관능화된 아민 반응성 기 (NH_2-C_6)를 포함하였다. RNAi 작용제는 상기 제시된 구조 LP 29b의 PK/PD 조정제에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 3' 말단에 디술피드 관능기 (C6-SS-C6)를 추가로 포함하였다.

[1492] 각각의 군에서 2마리의 시노에게 투여하였다 (n=2). 제28일, 제21일, 제14일, 제7일 및 제1일 (투여전)에 혈청 샘플을 채취하였다. 이어서 원숭이에게 표 22에 제시된 바와 같은 각각의 군에 따라 투여하였다. 이어서 제8일, 제15일, 제22일, 제29일, 제36일, 제43일, 제50일, 제57일, 제64일, 제71일, 제78일, 제85일, 제99일, 제113일, 및 제134일에 혈청을 수집하였다. 혈청 샘플 상에서 ELISA 검정을 수행하여 혈청 중 시노 미오스타틴의 양을 결정하였다. 군 1에 대한 혈청 샘플 내의 평균 미오스타틴이 하기 표 68에서 제시된다.

[1493] 표 68: 제1일에 정규화된, 실시예 22의 군 1에서의 혈청 중 평균 시노 미오스타틴 단백질.

[1494]

제28일		제21일		제14일		제7일		제1일	
Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
1.160	0.041	1.135	0.064	1.045	0.051	1.085	0.056	1.000	0.000
제8일		**제15일**		**제22일**		**제29일**		**제36일**	
Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
0.891	0.006	0.620	0.192	0.385	0.126	0.321	0.074	0.281	0.083
제43일		**제50일**		**제57일**		**제64일**		**제71일**	
Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
0.231	0.058	0.250	0.033	0.213	0.020	0.282	0.042	0.228	0.018
제78일		**제85일**		**제99일**		**제113일**		**제134일**	
Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
0.256	0.038	0.255	0.045	0.356	0.053	0.322	0.037	0.542	0.072

[1495] 표 68에 제시된 바와 같이, 표적 유전자의 강건하고 장기간-지속되는 녹다운은 본원에 기재된 화합물을 사용하여 달성될 수 있다.

[1496] 실시예 23. RNAi의 생체내 투여는 시노몰구스 원숭이에서 MSTN을 표적화하는 것을 촉발함

[1497] 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 미오스타틴 RNAi 작용제를 본원의 실시예 1에 제시된 바와 같이, 관련 기술분야에 공지되고 올리고뉴클레오티드 합성에 통상적으로 사용되는 일반적 절차에 따라 고체 상 상에서 포스포르아미다이트 기술에 따라 합성하였다. 연구 제1일에, 시노몰구스 마카크 (마카카 파시쿨라리스) 영장류 (본원에서 "시노"로 지칭됨)에게 하기 투여 군에 따라 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 전달 비히클 5 mg/kg, 10 mg/kg (mpk) 또는 20 mg/kg (mpk)을 주사하였다:

[1498] 표 69: 실시예 23의 시노에 대한 투여 군.

[1499]

군	**RNAi 작용제 또는 대조군을 포함하는 본 발명의 전달 비히클 및 용량**	**투여 요법**
1	5 mpk αvβ6 펩티드 1-Mstn(AD06569)-LP29b	제1일에 단일 주사
2	10 mpk αvβ6 펩티드 1-Mstn(AD06569)-LP29b	제1일에 단일 주사
3	20 mpk αvβ6 펩티드 1-Mstn(AD06569)-LP29b	제1일에 단일 주사

[1500] MSTN 유전자를 표적화하도록 지시된 뉴클레오티드 서열을 갖는 실시예 21에서의 RNAi 작용제를 합성하였고, 이는 표적화 리간드 αvβ6 펩티드 1에 대한 접합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 5' 말단에 관능화된 아민 반응성 기 (NH_2-C_6)를 포함하였다. 미오스타틴 RNAi 작용제는 상기 제시된 구조 LP29b의 PK/PD 조정제에 대한 접

합을 용이하게 하기 위해 센스 가닥의 3' 말단에 디술피드 관능기 (C6-SS-C6)를 추가로 포함하였다.

[1501] 각각의 군에서 2마리의 시노에게 투여하였다 (n=2). 제14일, 제7일 및 제1일 (투여전)에 혈청 샘플을 채취하였다. 이어서 원숭이에게 표 24에 제시된 바와 같은 각각의 군에 따라 투여하였다. 이어서 제8일, 제15일, 제22일, 제29일, 제36일, 제43일, 제50일, 제57일, 제64일, 제71일, 제92일, 제106일 및 제120일에 혈청을 수집하였다. 혈청 샘플 상에서 ELISA 검정을 수행하여 혈청 중 시노 미오스타틴의 양을 결정하였다. 혈청 샘플 내의 평균 미오스타틴이 하기 표 70에서 제시된다.

[1502] 표 70: 제1일에 정규화된, 실시예 23의 투여 군에 대한 혈청 중 평균 시노 미오스타틴 단백질.

	제14일		**제7일**		**제1일**		**제8일**	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
군 1 (5 mpk)	1.079	0.003	1.002	0.008	1.000	0.000	0.886	0.283
군 2 (10 mpk)	0.668	0.049	0.890	0.217	1.000	0.000	0.614	0.106
군 3 (20 mpk)	0.950	0.101	0.868	0.161	1.000	0.000	0.474	0.046
	제15일		**제22일**		**제29일**		**제36일**	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
군 1 (5 mpk)	0.842	0.014	0.856	0.035	0.706	0.183	0.791	0.035
군 2 (10 mpk)	0.700	0.175	0.542	0.165	0.620	0.032	0.500	0.072
군 3 (20 mpk)	0.540	0.150	0.328	0.027	0.298	0.053	0.227	0.023
	제43일		**제50일**		**제57일**		**제64일**	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
군 1 (5 mpk)	0.811	0.120	0.575	0.109	0.866	0.003	0.922	0.037
군 2 (10 mpk)	0.545	0.001	0.539	0.029	0.661	0.037	0.635	0.035
군 3 (20 mpk)	0.308	0.061	0.263	0.017	0.343	0.035	0.319	0.009
	제71일		**제92일**		**제106일**		**제120일**	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
군 1 (5 mpk)	0.717	0.090	0.922	0.196	1.033	0.281	0.772	0.163
군 2 (10 mpk)	0.462	0.036	0.553	0.052	0.801	0.021	0.559	0.085
군 3 (20 mpk)	0.316	0.001	0.471	0.026	0.510	0.057	0.353	0.014

[1503]

[1504] 표 70에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 전달 비히클의 투여량 증가에 대해 용량-반응 효과를 알 수 있다.

[1505] 실시예 24. RNAi의 생체내 투여는 래트에서 MSTN을 표적화하는 것을 촉발함

[1506] 연구 제1일에, 래트에게 하기 투여 군에 따라 등장성 염수 (비히클 대조군) 또는 등장성 염수 중에 제제화된 본원에 기재된 바와 같은 RNAi 작용제를 포함하는 본 발명의 화합물 1 mg/kg (mpk)을 주사하였으며, 여기서 AD06569는 상기 표 31에 제시된 구조를 갖는다.

[1507] 표 71. 실시예 24의 래트에 대한 투여 군.

군	**RNAi** 작용제를 포함하는 본 발명의 화합물 및 용량	투여 요법
1	염수	제1일에 단일 주사
2	1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP238b	제1일에 단일 주사
3	1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP357b	제1일에 단일 주사
4	1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP358b	제1일에 단일 주사
5	1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP241b	제1일에 단일 주사
6	1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP339b	제1일에 단일 주사
7	1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP340b	제1일에 단일 주사
8	1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP247b	제1일에 단일 주사
9	1 mpk avb6-Pep1-AD06569-nEm	제1일에 단일 주사

[1508]

[1509] MSTN 유전자를 표적으로 하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 RNAi 작용제 AD06569를 합성하였고, 이는 센스 가닥의 5' 말단에 관능화된 아민 반응성 기 (NH2-C6)를 포함하여 소분자 표적화 리간드 화합물 45b에 대한 접합을 용이하게 하였다. 지질 PK/PD 조정제 전구체에의 접합을 용이하게 하기 위해 3' 말단에 (C6-SS-C6) 기를 갖는 RNAi 작용제를 또한 합성하였다.

[1510] 군 2-9는 상기 실시예 5에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 5' 말단에 접합된 αvβ6 인테그린 리간드 펩티드 1을 포함하였다. 각각의 군 2-8은 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 3' 말단에 접합된, 상기 제시된 바와 같은 구조를 갖는 지질 PK/PD 조정제를 포함한다. 군 3은 상기 실시예 6에 기재된 절차에 따라 센스 가닥의 3' 말단에 접합된 캡핑된 말레이미드를 포함하였다.

[1511] 각각의 군에서 4마리의 래트에게 투여하였다 (n=4). 제1일, 제8일, 제15일 및 제22일에 래트에서 채혈하여 혈청을 수집하였다. 래트를 연구 제22일에 희생시키고, 총 미오스타틴 mRNA를 비복근 및 삼두근으로부터 단리하였다. 삼두근을 우측 앞다리로부터 수거하였다. 각각의 샘플을 퍼셀리스 튜브에서 급속-동결시키고, 검정이 완료될 때까지 -80℃ 동결기에 저장하였다. 상대적인 MSTN 발현을 혈청 중 래트 미오스타틴에 대한 ELISA 검정에 의해 결정하였다. 혈청에서의 평균 상대 미오스타틴 발현은 하기 표 72에 제시된다.

[1512] 표 72: 실시예 24의 래트에 대한 혈청으로부터의 평균 상대 MSTN 발현.

군	제8일		제15일		제22일	
	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev	Avg	Std Dev
1. 염수	1.000	0.068	1.000	0.038	1.000	0.087
2. 1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP238b	0.804	0.012	0.679	0.129	0.785	0.017
3. 1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP357b	0.665	0.061	0.718	0.024	0.814	0.031
4. 1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP358b	0.683	0.063	0.747	0.143	0.792	0.104
5. 1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP241b	0.723	0.052	0.826	0.066	0.862	0.086
6. 1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP339b	0.749	0.044	0.898	0.082	0.889	0.054
7. 1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP340b	0.764	0.184	0.726	0.129	0.729	0.155
8. 1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP247b	0.803	0.082	0.709	0.091	0.691	0.050
9. 1 mpk avb6-Pep1-AD06569-nEm	0.825	0.086	0.778	0.124	0.836	0.110

[1513]

[1514] 비복근 및 삼두근으로부터 수집된 조직을 택맨 검정에 사용하여 이들 조직에서의 MSTN의 상대량을 결정하였다. 하기 표 73은 검정의 결과를 나타낸다.

[1515] 표 73: 실시예 24의 투여 군에서의 삼두근 및 비복근에서의 상대 발현.

군	삼두근			비복근		
	상대 발현	낮은 오차	높은 오차	상대 발현	낮은 오차	높은 오차
1. 염수	1.000	0.884	7.639	1.000	0.109	0.123
2. 1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP238b	2.650	1.962	7.558	0.709	0.073	0.081
3. 1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP357b	1.055	0.826	3.809	0.768	0.164	0.208
4. 1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP358b	1.603	1.249	5.654	0.740	0.140	0.173
5. 1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP241b	3.585	2.698	10.907	0.927	0.107	0.121
6. 1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP339b	7.246	1.597	2.049	0.710	0.134	0.165
7. 1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP340b	7.104	1.987	2.759	0.708	0.124	0.150
8. 1 mpk avb6-Pep1-AD06569-LP247b	5.038	0.471	0.520	0.719	0.103	0.121
9. 1 mpk avb6-Pep1-AD06569-nEm	5.698	1.786	2.602	0.676	0.141	0.178

[1516]

[1517] 등가물 및 범위

[1518] 청구범위에서, 단수형은 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥으로부터 명백하지 않는 한 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 군의 1개 이상의 구성원들 사이에 "또는"을 포함하는 청구범위 또는 설명은 달리 나타내지 않는 한 또는 문맥으로부터 달리 명백하지 않는 한, 군 구성원 중 하나, 하나 초과, 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 사용되거나, 또는 그와 달리 관련되는 경우에 충족된 것으로 간주된다. 본 발명은 군의 정확히 하나의 구성원이 주어진 생성물 또는 방법에 존재하거나, 사용되거나, 또는 달리 관련되는 실시양태를 포함한다. 본 발명은 군 구성원 중 하나 초과 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 사용되거나, 또는 달리 관련되는 실시양태를 포함한다.

[1519] 또한, 본 발명은 열거된 청구항 중 하나 이상으로부터의 하나 이상의 제한, 요소, 조항 및 서술적 용어가 또 다른 청구항에 도입되는 모든 변형, 조합 및 순열을 포괄한다. 예를 들어, 또 다른 청구항에 종속항인 임의의 청구항은 동일한 기재 청구항에 종속항인 임의의 다른 청구항에서 발견되는 하나 이상의 제한을 포함하도록 변형될 수 있다. 요소가 목록으로서, 예를 들어 마쿠쉬 (Markush) 군 포맷으로 제시되는 경우에, 요소의 각각의 하위군이 또한 개시되고, 임의의 요소(들)는 군으로부터 제거될 수 있다. 일반적으로, 본 발명 또는 본 발명의 측면이 특정한 요소 및/또는 특색을 포함하는 것으로 언급되는 경우에, 본 발명 또는 본 발명의 측면의 특정 실시양태는 이러한 요소 및/또는 특색으로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어지는 것으로 이해되어야 한다. 간략화를 위해, 이들 실시양태를 본원에서 이들 용어로써 구체적으로 기재하지 않았다. 또한, 용어 "포함하는" 및 "함유하는"은 개방적인 것으로 의도되고, 추가의 요소 및 단계의 포함을 허용한다는 것을 주목한다. 범위가 주어지는 경우, 종점이 포함된다. 또한, 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥 및 관련 기술분야의 통상의 기술자의 이해로부터 명백하지 않는 한, 범위로서 표현된 값은 본 발명의 상이한 실시양태에서 언급된 범위 내의 임의의 구체적 값 또는 하위-범위를, 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 범위의 하한치 단위의 1/10까지 가정할 수 있다.

[1520] 본 출원은 다양한 허여된 특허, 공개 특허 출원, 학술지 논문 및 다른 공개물을 언급하며, 이들 모두는 본원에 참조로 포함된다. 임의의 포함된 참고문헌과 본 명세서 사이에 모순이 존재하는 경우, 본 명세서가 우선할 것이다. 또한, 선행 기술에 속하는 본 발명의 임의의 특정한 실시양태는 청구항 중 어느 하나 이상으로부터 명시적으로 배제될 수 있다. 이러한 실시양태는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 것으로 간주되기 때문

에, 이들은 배제가 본원에 명백하게 제시되지 않더라도 배제될 수 있다. 선행 기술에 존재하는 것과 관련된 것이든 아니든, 어떤 이유로도, 본 발명의 임의의 특정한 실시양태가 임의의 청구항으로부터 배제될 수 있다.

[1521] 다른 실시양태

[1522] 본 발명이 그의 상세한 설명과 함께 기재되었지만, 상기 기재는 첨부된 청구범위의 범주에 의해 정의되는 본 발명의 범주를 예시하고자 하는 것이지 제한하고자 하는 것이 아님을 이해해야 한다. 다른 측면, 이점 및 변형은 하기 청구범위의 범주 내에 있다.

도면

도면1

표 A: 실시예 8의 혈청 중 평균 상대 마우스 미오스타틴 단백질

군		제8일		제15일		제21일		제29일		제36일		제43일		제50일		제57일		제64일	
		Avg	Std. Dev.	Avg	Std. Dev.	Avg	Std. Dev.	Avg	Std. Dev.	Avg	Std. Dev.	Avg	Std. Dev.	Avg	Std. Dev.	Avg	Std. Dev.	Avg	Std. Dev.
1		1.018	0.066	0.901	0.138	1.074	0.122	1.033	0.059	1.010	0.134	1.021	0.092	1.029	0.120	0.930	0.079	0.899	0.116
2		0.496	0.037	0.219	0.039	0.153	0.026	0.105	0.014	0.107	0.021	0.126	0.016	0.125	0.022	0.096	0.016	0.092	0.011

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Arrowhead Pharmaceuticals Inc.

<120> SKELETAL MUSCLE DELIVERY PLATFORMS AND METHODS OF USE THEREOF

<130> 267602-496700

<150> 63/077,141

<151> 2020-09-11

<150> 63/214,747

<151> 2021-06-24

<150> 63/230,381

<151> 2021-08-06

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AD06568 Antisense Strand

<220><221> modified_base

<222> (1)..(4)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base
<222> (7)..(11)
<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside
<220><221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside
<220><221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside
<220><221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside
<220><221> modified_base
<222> (16)..(16)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside
<220><221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside
<220><221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside
<220><221> modified_base
<222> (20)..(21)
<223> phosphorothioate linked nucleoside
<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220>

<221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<400> 1

uguuacagca agaucaugac c 21

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AD06568 Sense Strand

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5' end (NH2-C6) modification with phosphorothioate linkage

<220><221> modified_base

<222

> (1)..(1)

<223> inverted abasic deoxyribose residue

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n is a, c, g, t or u

<220><221> modified_base

<222> (2)..(9)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (10)..(12)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (13)..(22)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (22)..(23)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221

> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> inverted abasic deoxyribose residue

<220><221> modified_base

<222> (23)..(24)

<223> C6-SS-C6 linked nucleoside

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> n is a, c, g, t or u

<220><221> modified_base

<222> (24)..(24)

<223> 2'-deoxythymidine-3'-phosphate

<400> 2

nggucaugau cuugcuguaa cant 24

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AD06570 Antisense Strand

<220><221> modified_base

<222> (1)..(4)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<

223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<400

> 3

ucaucuucca aagagccauc g 21

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AD06570 Sense Strand

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5' end (NH2-C6) modification with phosphorothioate linkage

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> inverted abasic deoxyribose residue

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n is a, c, g, t or u

<220><221> modified_base

<222> (2)..(9)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (10)..(12)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (13)..(22)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (22)..(23)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> inverted abasic deoxyribose residue

<220><221> modified_base

<222> (23)..(24)

<223> C6-SS-C6 linked nucleoside

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> n is a, c, g, t or u

<220><221> modified_base

<222> (24)..(24)

<223> 2'-deoxythymidine-3'-phosphate

<400> 4

ncgauggcuc uuuggaagau gant 24

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AD06326 Antisense Strand

<220><221> modified_base

<222> (1)..(4)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221>

modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (7)..(11)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220>

<221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<400> 5

uguuacagca agaucauggc c 21

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AD06326 Antisense Strand

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> inverted abasic deoxyribose residue

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223>

5' end (NH2-C6) modification with phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n is a, c, g, t or u

<220><221> modified_base

<222> (2)..(9)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (10)..(12)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (13)..(22)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (22)..(23)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220>

<221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> inverted abasic deoxyribose residue

<220><221> modified_base

<222> (23)..(24)

<223> C6-SS-C6 linked nucleoside

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> n is a, c, g, t or u

<220><221> modified_base

<222> (24)..(24)

<223> 2'-deoxythymidine-3'-phosphate

<400> 6

nggccaugau cuugcuguaa cant 24

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AD06569 Antisense Strand

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5' end cyclopropyl phosphonate

<220><221> modified_base

<222> (1)..(4)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (7)..(11)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223

> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221

> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<400> 7

uguuacagca agaucaugac c 21

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AD06569 Sense Strand

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5' end (NH2-C6) modification with phosphorothioate linkage

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> inverted abasic deoxyribose residue

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n is a, c, g, t or u

<220><221> modified_base

<222> (2)..(9)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (10)..(12)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (13)..(22)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (22)..(23)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> inverted abasic deoxyribose residue

<220><221> modified_base

<222> (23)..(24)

<223> C6-SS-C6 linked nucleoside

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> n is a, c, g, t or u

<220><221> modified_base

<222> (24)..(24)

<223> 2'-deoxythymidine-3'-phosphate

<400> 8

nggucaugau cuugcuguaa cant 24

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AD07724 Antisense Strand

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5' end cyclopropyl phosphonate

<220><221> modified_base

<222> (1)..(4)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223>

2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (7)..(11)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<400> 9

uguuacagca agaucaugac c 21

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AD07724 Sense Strand

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5' end (NH2-C6) modification with phosphorothioate linkage

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> inverted abasic deoxyribose residue

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n is a, c, g, t or u

<220><221> modified_base

<222> (2)..(9)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (13)..(22)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (22)..(23)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> inverted abasic deoxyribose residue

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> n is a, c, g, t or u

<220><221> modified_base

<222> (24)..(24)

<223> 2'-O-propargyluridine-3'-phosphate

<220><221> modified_base

<222> (25)..(25)

<223> 2'-deoxythymidine-3'-phosphate

<400>

10

nggucaugau cuugcuguaa canut 25

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AD07909 Antisense Strand

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5' end cyclopropyl phosphonate

<220><221> modified_base

<222> (1)..(4)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (7)..(11)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<400> 11

uguuacagca agaucaugac c 21

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AD07909 Sense Strand

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5' end (NH2-C6) modification with phosphorothioate linkage

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> inverted abasic deoxyribose residue

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n is a, c, g, t or u

<220><221> modified_base

<222> (2)..(9)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (10)..(12)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (13)..(22)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (22)..(23)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> inverted abasic deoxyribose residue

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> n is a, c, g, t or u

<220><221> modified_base

<222> (24)..(24)

<223> 2'-O-propargyluridine-3'-phosphate

<400> 12

nggucaugau cuugcuguaa canu 24

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AD07910 Antisense Strand

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5' end cyclopropyl phosphonate

<220><221> modified_base

<222> (1)..(4)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223>

2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (7)..(11)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<400> 13

uguuacagca agaucaugac c 21

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AD07910 Sense Strand

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5' end (NH2-C6) modification with phosphorothioate linkage

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> inverted abasic deoxyribose residue

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n is a, c, g, t or u

<220><221> modified_base

<222> (2)..(9)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (10)..(12)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (13)..(21)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (22)..(23)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (22)..(22)

<223> 2'-O-propargyladenosine-3'-phosphate

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> inverted abasic deoxyribose residue

<220

><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> n is a, c, g, t or u

<400> 14

nggucaugau cuugcuguaa can 23

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AD08257 Antisense Strand

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5' end cyclopropyl phosphonate

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (5)..(11)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (15)..(21)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<

223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<400> 15

uguuacagca agaucaugac c 21

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AD08257 Sense Strand

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5' end (NH2-C6) modification with phosphorothioate linkage

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> inverted abasic deoxyribose residue

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n is a, c, g, t or u

<220><221> modified_base

<222> (2)..(9)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (10)..(12)

<223

> 2'-fluoro corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (13)..(22)

<223> 2'-O-methyl corresponding nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (22)..(23)

<223> phosphorothioate linked nucleoside

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> inverted abasic deoxyribose residue

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> 3' end LA2 modification

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> n is a, c, g, t or u

<400> 16

nggucaugau cuugcuguaa can 23