

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0044196
(43) 공개일자 2023년04월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/54 (2017.01) A61K 31/704 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/549 (2017.08)
A61K 31/704 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7002644
(22) 출원일자(국제) 2021년06월23일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년01월20일
(86) 국제출원번호 PCT/NL2021/050394
(87) 국제공개번호 WO 2021/261998
국제공개일자 2021년12월30일
- (30) 우선권주장
2025902 2020년06월24일 네덜란드(NL)
PCT/NL2021/050384 2021년06월18일
네덜란드(NL)
- (71) 출원인
사프렘 테크놀로지스 비.브이.
네덜란드, 빌토번 3721 엠에이, 빌딩 에이12-1,
안토니 반 레벤후클란 9
- (72) 발명자
포스텔, 루벤
네덜란드, 빌토번 3721 엠에이, 빌딩 에이12-1,
안토니 반 레벤후클란 9
허먼스, 가이
네덜란드, 빌토번 3721 엠에이, 빌딩 에이12-1,
안토니 반 레벤후클란 9
- (74) 대리인
특허법인씨엔에스

전체 청구항 수 : 총 35 항

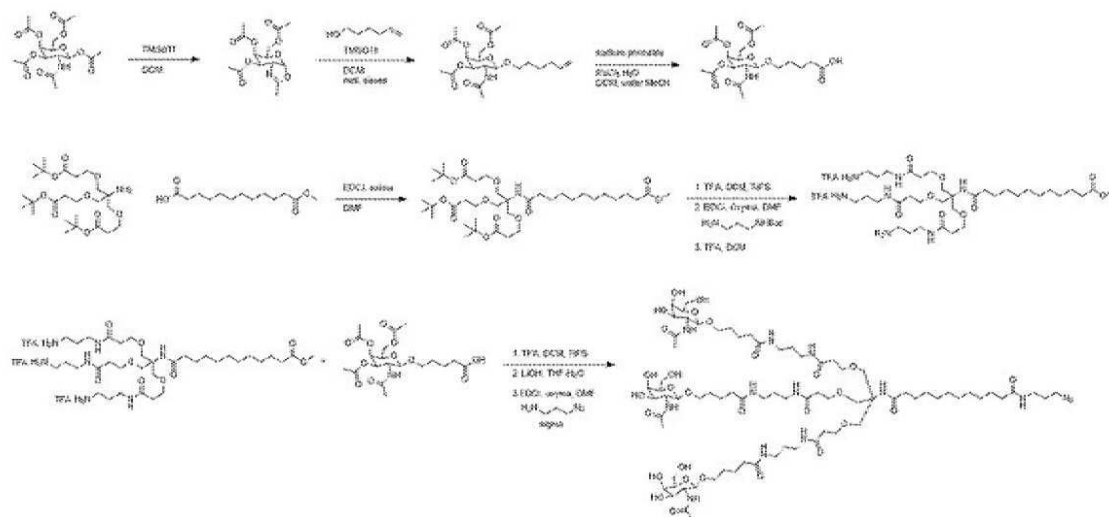
(54) 발명의 명칭 GALNAC-올리고뉴클레오타이드 접합체와 사포닌의 치료적 조합물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 약제학적 조합물에 관한 것으로, 약제학적 조합물은 이펙터 분자 및 ASGPR에 대한 리간드의 접합체(여기서, ASGPR에 대한 리간드는 적어도 하나의 GalNAc 모이어티를 포함함); 및 모노데스모시드 또는 비데스모시드 트리테르펜 글리코시드 유형의 사포닌을 포함한다. 본 발명은 또한 접합체 및 사포닌을 포함하는 약제학적 조성

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 약제로 사용하기 위한, 또는 발현 산물이 apoB, TTR, PCSK9, ALAS1, ATS, GO, CCS, HBV의 X 유전자, HBV의 S 유전자, AAT 및 LDH 중 임의의 하나 이상의 유전자와 관련된 질환 또는 건강 문제의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 및/또는 암, 전염병, 바이러스 감염, 고콜레스테롤혈증, 원발성 고옥살산뇨, 혈우병 A, 혈우병 B, AAT 관련 간 질환, 급성 간 포르피린증, TTR 매개 아밀로이드증, 유전 TTR 아밀로이드증(hATTR), 보체 매개 질환, B형 간염 또는 자가면역 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 약제학적 조합물 또는 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명의 이펙터 분자를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로, 바람직하게는 상기 세포의 세포질액으로 전달하기 위한 시험관 내 또는 생체 외 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 접합체를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로 전달하기 위한 시험관 내 또는 생체 외 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/554 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

약제학적 조합물로서,

- 이펙터 분자 및 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)에 대한 리간드의 접합체로서, ASGPR에 대한 리간드는 적어도 하나의 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티, 바람직하게는 3개 또는 4개의 GalNAc 모이어티를 포함하고, 보다 바람직하게는 ASGPR에 대한 리간드는 (GalNAc)₃Tris를 포함하거나 이로 구성되는 것인, 접합체; 및

- 사포닌으로서, 모노테스모시드 트리테르펜 글리코시드 또는 비테스모시드 트리테르펜 글리코시드인 사포닌을 포함하고,

선택적으로 약제학적으로 허용 가능한 부형제 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 희석제를 포함하는 약제학적 조합물.

청구항 2

제1항에 있어서,

- 접합체를 포함하고 선택적으로 약제학적으로 허용 가능한 부형제 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 희석제를 포함하는 제1 약제학적 조성물; 및

- 사포닌을 포함하고 선택적으로 약제학적으로 허용 가능한 부형제 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 희석제를 포함하는 제2 약제학적 조성물을 포함하는 적어도 2종의 약제학적 조성물의 형태인 약제학적 조합물.

청구항 3

제1항에 있어서, 접합체, 사포닌 및 선택적으로 약제학적으로 허용 가능한 부형제 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 희석제를 포함하는 단일 약제학적 조성물 형태의 약제학적 조합물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 이펙터 분자는 약물 분자와 같은 소분자, 단백질 독소와 같은 독소, BNA와 같은 올리고뉴클레오타이드, 제노 핵산 또는 siRNA, 효소, 펩티드, 단백질, 또는 이들의 임의의 조합 중 적어도 하나를 포함하거나 이로 구성되고, 바람직하게는, 이펙터 분자는 독소, 효소 또는 올리고뉴클레오타이드인 것인, 약제학적 조합물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, ASGPR에 대한 리간드 및 이펙터 분자(바람직하게는 독소 또는 올리고뉴클레오타이드)가, 바람직하게는 적어도 하나의 링커를 통해, 공유 결합을 통해 접합되는 것인, 약제학적 조합물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 이펙터 분자는 다음 중 임의의 하나 이상으로부터 선택되는 올리고뉴클레오타이드인 것인, 약제학적 조합물: 짧은 간섭 RNA(siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 항-헤어핀-형상 마이크로RNA(miRNA), 단일 가닥 RNA, 앵타머 RNA, 이중 가닥 RNA(dsRNA), 항-마이크로RNA(항-miRNA, 항-miR), 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO), mRNA, DNA, 안티센스 DNA, 잠금 핵산(LNA), 가교 핵산(BNA), 2'-O,4'-아미노에틸렌 가교 핵산(BNA^{NC}), BNA 기반 siRNA 및 BNA 기반 안티센스 올리고뉴클레오타이드(BNA-AON).

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 이펙터 분자는 항-miRNA, BNA-AON 또는 siRNA, 예컨대, BNA 기반

siRNA, 바람직하게는 화학적으로 변형된 siRNA, 대사적으로 안정한 siRNA 및 화학적으로 변형되고 대사적으로 안정한 siRNA로부터 선택되는 BNA 기반 siRNA와 같은 siRNA 중 임의의 하나로부터 선택되는 올리고뉴클레오타이드인 것인, 약제학적 조합물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 이펙터 분자는 HSP27, 아포지단백 B(apoB), 트랜스티레틴(TTR), 전단백질 전환효소 서브틸리신/켄신 9형(PCSK9), 델타-아미노레불리네이트 합성효소 1(ALAS1), 안티트롬빈 3(AT3), 글리콜레이트 산화효소(GO), 보체 성분 C5(CC5), B형 간염 바이러스(HBV)의 X 유전자, HBV의 S 유전자, 알파-1 항트립신(AAT) 및 젖산 탈수소효소(LDH)의 유전자 중 임의의 하나를 침묵시킬 수 있고/있거나 비정상적인 miRNA를 표적화할 수 있는 올리고뉴클레오타이드인 것인, 약제학적 조합물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 이펙터 분자는 예를 들어 포유동물 세포 내부에 존재할 때 HSP27, apoB, TTR, PCSK9, ALAS1, AT3, GO, CC5, HBV의 X 유전자의 발현 산물, HBV의 S 유전자의 발현 산물, AAT 및 LDH 단백질 중 임의의 하나의 발현에 관련된 mRNA를 표적화할 수 있거나, 또는 예를 들어, 포유동물 세포 내부에 존재할 때 miRNA 기능을 길항 또는 복원, 예컨대, 종양형성 miRNA(onco-miR)를 억제 또는 onco-miR의 발현 억제를 억제할 수 있는 올리고뉴클레오타이드인 것인, 약제학적 조합물.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 이펙터 분자는 적어도 하나의 단백질성 분자를 포함하거나 이로 구성된 독소이고, 적어도 하나의 단백질성 분자는 바람직하게는 펩티드, 단백질, 효소, 예컨대, 우레아제 및 Cre-재조합효소, 단백질성 독소, 리보솜 불활성화 단백질, 표 A5로부터 선택된 단백질 독소 및/또는 박테리아 독소, 식물 독소 중 임의의 하나 이상으로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 아콕틴과 같은 바이러스 독소; 박테리아 독소, 예컨대, 시가(Shiga) 독소, 시가 유사 독소, 녹농균 외독소(PE) 또는 PE의 외독소 A, 전장 또는 절단된 디프테리아 독소(DT), 콜레라 독소; 진균 독소, 예컨대, 알파-사르신; 리보솜 불활성화 단백질 및 2형 리보솜 불활성화 단백질의 A 사슬을 포함하는 식물 독소, 예컨대, 다이안틴, 예를 들어, 다이안틴-30 또는 다이안틴-32, 사포린, 예를 들어, 사포린-S3 또는 사포린-S6, 부가된 또는 부가된의 탈면역 유도체 데부가닌, 시가 유사 독소 A, 포크워드(pokeweed) 항바이러스 단백질, 리신, 리신 A 사슬, 모데신, 모데신 A 사슬, 아브린, 아브린 A 사슬, 볼켄신, 볼켄신 A 사슬, 비스쿠민, 비스쿠민 A 사슬; 또는 동물 또는 인간 독소, 예컨대, 개구리 RNase, 또는 인간으로부터의 그랜자임 B 또는 안지오게닌, 또는 이의 임의의 단편 또는 유도체 중 임의의 하나 이상으로부터 선택되고; 바람직하게는 단백질 독소는 다이안틴 및/또는 사포린이고/있거나, 리보솜 표적화 독소, 신장 인자 표적화 독소, 튜불린 표적화 독소, DNA 표적화 독소 및 RNA 표적화 독소 중 적어도 하나를 포함하거나 이로 구성되며, 더욱 바람직하게는 엠탄신, 파수도톡스, 메이탄시노이드 유도체 DM1, 메이탄시노이드 유도체 DM4, 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE, 베도틴), 모노메틸 오리스타틴 F(MMAF, 마포도틴), 칼리케아미신, N-아세틸- γ -칼리케아미신, 피롤로벤조디아제핀(PBD) 이량체, 벤조디아제핀, CC-1065 유사체, 듀오카르마이신, 독소루비신, 파클리탁셀, 도세탁셀, 시스플라틴, 시클로포스파미드, 에토포사이드, 도세탁셀, 5-플루오로우라실(5-FU), 미톡산트론, 투볼라이신, 인돌리노벤조디아제핀, AZ13599185, 크립토피신, 리족신, 메토크세이트, 안트라사이클린, 캄프토테신 유사체, SN-38, DX-8951f, 엑사테칸 메실레이트, 절단된 형태의 녹농균 외독소(PE38), 듀오카르마이신 유도체, 아마니틴, α -아마니틴, 스플라이스오스타틴, 타이란스타틴, 오조가미신, 테시린, 엠버스타틴269 및 소라브탄신, 또는 이의 유도체 중 임의의 하나 이상을 포함하거나 이로 구성되는 것인, 약제학적 조합물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 사포닌은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 아글리콘 코어 구조를 포함하고:

2알파-하이드록시 올레아놀산;

16알파-하이드록시 올레아놀산;

헤데라게닌 (23-하이드록시 올레아놀산);

16알파,23-디하이드록시 올레아놀산;

집소게닌;

켈라산;

프로토에시게닌-21(2-메틸부트-2-에노에이트)-22-아세테이트;

23-옥소-바링토게놀 C-21,22-비스(2-메틸부트-2-에노에이트);

23-옥소-바링토게놀 C-21(2-메틸부트-2-에노에이트)-16,22-디아세테이트;

디지토게닌;

3,16,28-트리하이드록시 올레아난-12-엔;

집소젠산,

및

이의 유도체,

바람직하게는 사포닌은 켈라산 및 집소게닌 또는 이의 유도체로부터 선택되는 아글리콘 코어 구조를 포함하고, 보다 바람직하게는 사포닌 아글리콘 코어 구조는 켈라산 또는 이의 유도체인 것인, 약제학적 조합물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

· 사포닌은 하기 그룹 A로부터 선택되는 아글리콘 코어 구조에 결합된 당류 사슬:

GlcA-,

Glc-,

Gal-,

Rha-(1→2)-Ara-,

Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-,

Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-,

Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-,

Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-,

Glc-(1→3)-Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal-,

Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-,

Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,

Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,

Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,

Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,

Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,

Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,

Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,

Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,

Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,

Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,

Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,

Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
 Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
 Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
 Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
 Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-, 및

이의 유도체를 포함하거나,

또는

· 사포닌은 하기 그룹 B로부터 선택되는 아글리콘 코어 구조에 결합된 당류 사슬:

Glc-,

Gal-,

Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-,

Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-,

Ara-,

Xyl-,

Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R1-(→4)]-Fuc- (R1은 4E-메톡시신남산임),

Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R2-(→4)]-Fuc- (R2는 4Z-메톡시신남산임),

Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-,

Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-디-OAc-Fuc-,

Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R3-(→4)]-3-OAc-Fuc- (R3은 4E-메톡시신남산임),

Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-,

Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-,

(Ara- 또는 Xyl-)(1→3)-(Ara- 또는 Xyl-)(1→4)-(Rha- 또는 Fuc-)(1→2)-[4-OAc-(Rha- 또는 Fuc-)(1→4)]-(Rha- 또는 Fuc-),

Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-,

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-,

Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-,

Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-,

Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-,

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R4-(→4)]-Fuc- (R4는 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임),

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R5-(→4)]-Fuc- (R5는 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임),

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-,

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-,

6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-,

Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc--Rha-(1→3)]-Fuc-,

Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-,
 Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-,
 Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-,
 Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-디-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-,
 Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
 6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
 Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
 Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-,
 Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-,
 Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-,
 Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R6-(→4)]-Fuc- (R6은 5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임),
 Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R7-(→4)]-Fuc- (R7은 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임),
 Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R8-(→4)]-Fuc- (R8은 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임),
 Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R9-(→4)]-Fuc- (R9는 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임),
 Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R10-(→4)]-Fuc- (R10은 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임),
 Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R11-(→3)]-Fuc- (R11은 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임),
 Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R12-(→3)]-Fuc- (R12는 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임)
 Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-, 및

이의 유도체를 포함하거나,

또는

· 사포닌은 아글리콘 코어 구조에 결합된 그룹 A로부터 선택된 제1 당류 사슬을 포함하고 아글리콘 코어 구조에 결합된 그룹 B로부터 선택된 제2 당류 사슬을 포함하는 비데스모시드 트리테르펜 글리코시드인 것인, 약제학적 조합물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 사포닌은 켈라자(Quillaja) 수피 사포닌, 덩사코시드 B, 사이코사포닌 A, 사이코사포닌 D, 마크란토이딘 A, 에스쿨렌토시드 A, 피토라카게닌, 에스시네이트, AS6.2, NP-005236, AMA-1, AMR, 알파-헤테린, NP-012672, NP-017777, NP-017778, NP-017774, NP-018110, NP-017772, NP-018109, NP-017888, NP-017889, NP-018108, SA1641, AE X55, NP-017674, NP-017810, AG1, NP-003881, NP-017676, NP-017677, NP-017706, NP-017705, NP-017773, NP-017775, SA1657, AG2, SO1861, GE1741, SO1542, SO1584, SO1658, SO1674, SO1832, SO1862, SO1904, QS-7, QS1861, QS-7 api, QS1862, QS-17, QS-18, QS-21 A-apio, QS-21 A-xylo, QS-21 B-apio, QS-21 B-xylo, 베타-에스신(beta-Aescin), 에스신(Aescin) Ia, 티시드(Teaseed) 사포닌 I, 티시드사포닌 J, 아삼사포닌(Assamsaponin) F, 디지토닌(Digitonin), 프리몰라산(Primula acid) 1 및 AS64R, 이의 입체이성질체, 이의 유도체 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 사포닌은 QS-21, QS-21 유도체, SO1861, SO1861 유도체, SA1641, SA1641 유도체, GE1741, GE1741 유도체 및 이들의

조합으로 구성된 군으로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 사포닌은 QS-21 유도체, S01861 유도체 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되고, 가장 바람직하게는 사포닌은 S01861 유도체인 것인, 약제학적 조합물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 사포닌은 사포닌 유도체이고,

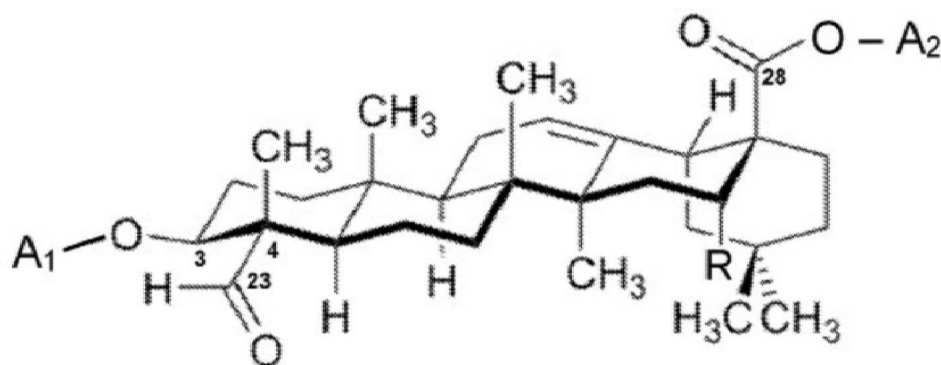
- i. 사포닌 유도체는 유도체화된 알데히드 기를 포함하는 아글리콘 코어 구조를 포함하거나; 또는
- ii. 사포닌 유도체는 당류 사슬, 바람직하게는 제12항에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 포함하고, 당류 사슬은 유도체화된 카르복실 기를 포함하거나; 또는
- iii. 사포닌 유도체는 당류 사슬, 바람직하게는 제12항에서 정의된 바와 같은 그룹 B로부터 선택된 당류 사슬을 포함하고, 당류 사슬은 유도체화된 아세톡시($\text{Me}(\text{CO})\text{O}-$) 기를 포함하거나; 또는
- iv. 유도체화 i., ii. 및 iii.의 임의의 조합이 존재하고, 선택적으로 유도체화 i., ii. 및 iii. 중 2가지 유도체화의 임의의 조합이 존재하는 것인, 약제학적 조합물.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 사포닌은 S01861, SA1657, GE1741, SA1641, QS-21, QS-21A, QS-21 A-api, QS-21 A-xyl, QS-21B, QS-21 B-api, QS-21 B-xyl, QS-7-xyl, QS-7-api, QS-17-api, QS-17-xyl, QS1861, QS1862, 퀴라자사포닌(Quillajasaponin), 사포니넘 알BUM(Saponinum album), QS-18, Quil-A, Gyp1, 집소시드(gypsoside) A, AG1, AG2, S01542, S01584, S01658, S01674, S01832, S01904, 이의 입체 이성질체, 이의 유도체 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 사포닌은 QS-21, QS-21 유도체, S01861, S01861 유도체, SA1641, SA1641 유도체, GE1741, GE1741 유도체 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 사포닌은 QS-21 유도체, S01861 유도체 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되고, 가장 바람직하게는 사포닌은 S01861 유도체인 것인, 약제학적 조합물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 사포닌은 제11항의 퀴라산 또는 집소제닌 사포닌의 사포닌 유도체이고, 분자 1로 표시되고:



(분자 1)

여기서

A_1 은 수소, 단당류 또는 선형 또는 분지형 올리고당을 나타내고, 바람직하게는 A_1 은 제12항에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고, 더욱 바람직하게는 A_1 은 제12항에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택되는 당류 사슬을 나타내고 A_1 은 글루쿠론산 모이어티를 포함하거나 이로 구성되고;

A_2 는 수소, 단당류 또는 선형 또는 분지형 올리고당을 나타내고, 바람직하게는 A_2 는 제12항에서 정의된 바와 같은 그룹 B로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고, 더욱 바람직하게는 A_2 는 제12항에서 정의된 바와 같은 그룹 B로부터 선택되는 당류 사슬을 나타내고 A_2 는 적어도 하나의 아세톡시($\text{Me}(\text{CO})\text{O}-$) 기, 예컨대, 1, 2, 3, 또는 4개의 아세톡시 기를 포함하고, A_1 및 A_2 중 적어도 하나는 수소가 아니고, 바람직하게는 A_1 및 A_2 둘 다 올리고당 사

슬이고;

R은 집소게닌에서 수소이거나 퀴라산에서 하이드록실이고;

사포닌 유도체는 분자 1로 표시되는 사포닌에 상응하며, 다음의 유도체화 중 적어도 하나가 존재하는 것인, 약제학적 조합물:

- i. 퀴라산 또는 집소게닌의 위치 C₂₃의 알데히드 기가 유도체화됨;
- ii. A₁이 제12항에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고 A₁이 글루쿠론산 모이어티를 포함하거나 이로 구성될 때 A₁의 글루쿠론산 모이어티의 카르복실 기가 유도체화됨;
- iii. A₂가 제12항에서 정의된 바와 같은 그룹 B로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고 A₂가 적어도 하나의 아세톡시 시 기를 포함할 때, A₂의 하나의 당류 모이어티 또는 둘 이상의 당류 모이어티 중 하나 이상의, 바람직하게는 모든 아세톡시 기(들)가 유도체화됨.

청구항 17

제16항에 있어서, A₁은 제12항에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고 글루쿠론산 모이어티를 포함하거나 이로 구성되고, A₁의 글루쿠론산 모이어티의 카르복실 기는 유도체화되었고/되었거나, A₂는 제12항에서 정의된 바와 같은 그룹 B로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고 A₂는 적어도 하나의 아세톡시 기를 포함하고, A₂의 적어도 하나의 아세톡시 기는 유도체화된 것인, 약제학적 조합물.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 분자 1로 표시되는 사포닌은 비데스모시드 트리테르펜 사포닌인, 약제학적 조합물.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 사포닌 유도체는 분자 1로 표시되는 사포닌에 상응하며, 다음의 유도체화 중 적어도 하나가 존재하는 것인, 약제학적 조합물:

- i. 퀴라산 또는 집소게닌의 위치 C₂₃의 알데히드 기가 다음에 의해 유도체화됨;
 - 알코올로의 환원; 또는
 - N-ε-말레이미도카프로산 하이드라지드(EMCH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(이에 의해 SO1861-A1d-EMCH 또는 QS-21-A1d-EMCH와 같은 사포닌-A1d-EMCH를 제공하며, EMCH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨); 또는
 - N-[β-말레이미도프로피온산]하이드라지드(BMPH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(BMPH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨); 또는
 - N-[κ-말레이미도운데칸산] 하이드라지드(KMUH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(KMUH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨);
- ii. A₁이 제12항에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고 A₁이 글루쿠론산 모이어티를 포함하거나 이로 구성되는 경우, A₁의 글루쿠론산 모이어티의 카르복실 기가 2-아미노-2-메틸-1,3-프로판디올(AMPD) 또는 N-(2-아미노에틸)말레이미드(AEM)와의 반응을 통한 아미드 결합으로의 변환(이에 의해 사포닌-Glu-AMPD, 예컨대 QS-21-Glu-AMPD 또는 SO1861-Glu-AMPD 또는 사포닌-Glu-AEM, 예컨대 QS-21-Glu-AEM 또는 SO1861-Glu-AEM를 제공함)에 의해 유도체화됨; 및
- iii. A₂가 제12항에서 정의된 바와 같은 그룹 B로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고 A₂가 적어도 하나의 아세톡시 시 기를 포함할 때, A₂의 하나의 당류 모이어티 또는 둘 이상의 당류 모이어티 중 하나 이상의, 바람직하게는 모든 아세톡시 기(들)가 탈아세틸화에 의해 하이드록실 기(HO-)로의 변환에 의해 유도체화됨.

청구항 20

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, A₁은 Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA이고/이거나 A₂는 Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc이고, 바람직하게는 분자 1로 표시되는 사포닌은 3-O-베타-D-갈락토피라노실-(1→2)-[베타-D-자일로피라노실-(1→3)]-베타-D-글루쿠로노피라노실 퀴라산 28-O-베타-D-글루코피라노실-(1→3)-베타-D-자일로피라노실-(1→4)-알파-L-람노피라노실-(1→2)-[베타-D-자일로피라노실-(1→3)-4OAc-베타-D-퀴노보피라노실-(1→4)]-베타-D-푸코피라노시드이고, 보다 바람직하게는 S01861, GE1741, SA1641 및/또는 QS-21, 또는 이의 유도체이고, 가장 바람직하게는 S01861 또는 이의 유도체인 것인, 약제학적 조합물.

청구항 21

제14항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 사포닌은 사포닌 유도체이고,

i. 사포닌 유도체는 다음에 의해 유도체화된 알데히드 기를 포함하는 아글리콘 코어 구조를 포함하거나;

- 알코올로의 환원; 또는

- N-ε-말레이미도카프로산 하이드라지드(EMCH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(이에 의해 S01861-A1d-EMCH 또는 QS-21-A1d-EMCH와 같은 사포닌-A1d-EMCH를 제공하며, EMCH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨); 또는

- N-[β-말레이미도프로피온산]하이드라지드(BMPH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(BMPH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨); 또는

- N-[κ-말레이미도운데칸산] 하이드라지드(KMUH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(KMUH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨); 또는

ii. 사포닌 유도체는 당류 사슬, 바람직하게는 제12항에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 포함하고, 당류 사슬은 카르복실 기, 바람직하게는 2-아미노-2-메틸-1,3-프로판디올(AMPD) 또는 N-(2-아미노에틸)말레이미드(AEM)와의 반응을 통한 아마이드 결합으로의 변환(이에 의해 사포닌-Glu-AMPD, 예컨대 QS-21-Glu-AMPD 또는 S01861-Glu-AMPD 또는 사포닌-Glu-AEM, 예컨대 QS-21-Glu-AEM 또는 S01861-Glu-AEM를 제공함)에 의해 유도체화된 카르복실 기, 바람직하게는 글루쿠론산 모이어티의 카르복실 기를 포함하거나; 또는

iii. 사포닌 유도체는 당류 사슬, 바람직하게는 제12항에서 정의된 바와 같은 그룹 B로부터 선택된 당류 사슬을 포함하고, 당류 사슬은 탈아세틸화에 의해 하이드록실 기(HO-)로의 변환에 의해 유도체화된 아세톡시(Me(CO)O-) 기를 포함하거나; 또는

iv. 사포닌 유도체는 유도체화 i., ii. 및 iii.의 임의의 조합, 선택적으로 i., ii. 및 iii. 중 2가지 유도체화의 임의의 조합을 포함하고;

바람직하게는, 사포닌 유도체는 아글리콘 코어 구조를 포함하고, 아글리콘 코어 구조는 EMCH와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환에 의해 유도체화된 알데히드 기를 포함하고, EMCH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화되는 것인, 약제학적 조합물.

청구항 22

제21항에 있어서, 사포닌은 사포닌 유도체이고,

i. 사포닌 유도체는 N-ε-말레이미도카프로산 하이드라지드(EMCH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(이에 의해 S01861-A1d-EMCH 또는 QS-21-A1d-EMCH와 같은 사포닌-A1d-EMCH를 제공함)에 의해 유도체화된 알데히드 기를 포함하는 아글리콘 코어 구조를 포함하거나;

ii. 사포닌은 당류 사슬, 바람직하게는 제12항에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 포함하고, 당류 사슬은 카르복실 기, 바람직하게는 N-(2-아미노에틸)말레이미드(AEM)와의 반응을 통한 아마이드 결합으로의 변환(이에 의해 사포닌-Glu-AEM, 예컨대 QS-21-Glu-AEM 또는 S01861-Glu-AEM를 제공함)에 의해 유도체화된 카르복실 기, 바람직하게는 글루쿠론산 모이어티의 카르복실 기를 포함하거나;

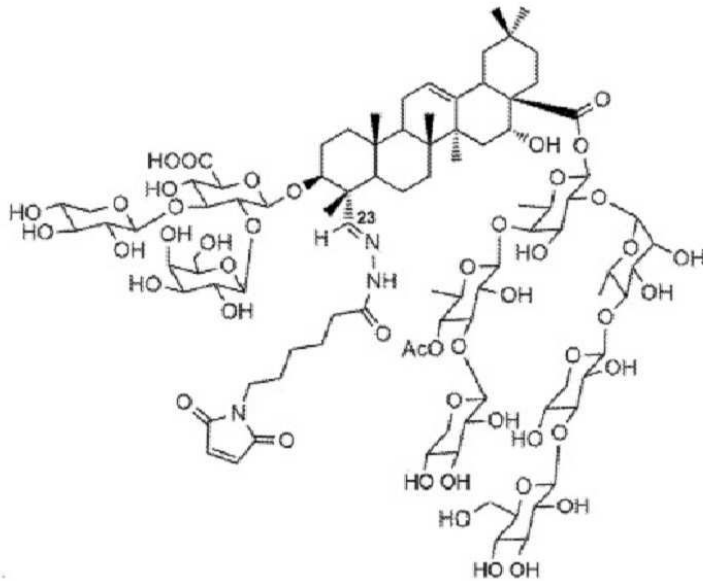
iii. 사포닌 유도체는 유도체화 i. 및 ii.의 조합을 포함하는 것인, 약제학적 조합물.

청구항 23

제21항에 있어서, 사포닌 유도체는 아글리콘 코어 구조를 포함하고, 아글리콘 코어 구조는 알데히드 기를 포함하고, 사포닌 유도체는 당류 사슬, 바람직하게는 제12항에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 포함하고, 당류 사슬은 카르복실 기, 바람직하게는 글루쿠론산 모이어티의 카르복실 기를 포함하고, 글루쿠론산 모이어티는 N-(2-아미노에틸)말레이미드(AEM)와의 반응을 통한 아미드 결합으로의 변환에 의해 유도체화된 것인, 약제학적 조합물.

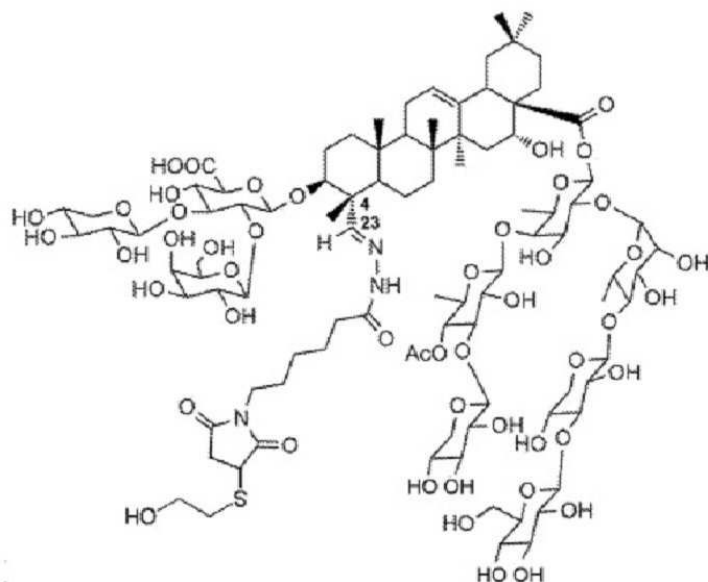
청구항 24

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 사포닌은 분자 2로 표시되는 사포닌 유도체인거나:



(분자 2)

사포닌 유도체는 분자 3으로 표시되는 사포닌 유도체인 것인, 약제학적 조합물:



(분자 3).

청구항 25

약제로 사용하기 위한 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 약제학적 조합물.

청구항 26

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 종속적인 범위 내의, 제1항 내지 제9항 또는 제11항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 산물이 다음의 임의의 하나 이상의 유전자와 관련된 질환 또는 건강 문제의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것인, 약제학적 조합물: apoB, HSP27, TTR, PCSK9, ALAS1, AT3, GO, CC5, HBV의 X 유전자, HBV의 S 유전자, AAT 및 LDH.

청구항 27

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 종속적인 범위 내의, 제1항 내지 제9항 또는 제11항 내지 제24항 중 어느 한 항의 약제학적 조합물, 또는 제25항의 용도를 위한 약제학적 조합물로서, 암, 전염병, 바이러스 감염, 고콜레스테롤혈증, 원발성 고옥살산뇨, 혈우병 A, 혈우병 B, AAT 관련 간 질환, 급성 간 포르피린증, TTR 매개 아밀로이드증, 유전 TTR 아밀로이드증(hATTR), 보체 매개 질환, B형 간염, HSP27 발현과 관련된 질환 또는 장애, 또는 자가면역 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것인, 약제학적 조합물.

청구항 28

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적 조합물은 제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 기재된 바와 같은 것인, 약제학적 조합물.

청구항 29

제1항 및 제5항 내지 제10항 중 어느 한 항의 이펙터 분자를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로, 바람직하게는 상기 세포의 세포질액으로 전달하기 위한 시험관 내 또는 생체 외 방법으로서,

- 표면에 ASGPR, 바람직하게는 ASGPR1을 발현하는 세포, 바람직하게는 간 세포, 바이러스 감염된 세포 및 암 세포로부터 선택되는 세포를 제공하는 단계;
- 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 접합체를 제공하는 단계, 여기서, 접합체는 전달되는 이펙터 분자를 포함하는 것인, 단계;
- 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 사포닌을 제공하는 단계;
- 단계 a)의 세포를 단계 b)의 접합체 및 단계 c)의 사포닌과 시험관 내 또는 생체 외 접촉시키고, 이와 함께 이펙터 분자를 포함하는 상기 접합체를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로 전달하고, 상기 접합체를 전달함으로써 이펙터 분자를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로, 바람직하게는 상기 세포의 세포질액으로 전달하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 30

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 접합체를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로, 바람직하게는 상기 세포의 세포질액으로 전달하기 위한 시험관 내 또는 생체 외 방법으로서,

- 표면에 ASGPR, 바람직하게는 ASGPR1을 발현하는 세포, 바람직하게는 간 세포, 바이러스 감염된 세포 및 암 세포로부터 선택되는 세포를 제공하는 단계;
- 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 접합체를 제공하는 단계;
- 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 사포닌을 제공하는 단계;
- 단계 a)의 세포를 단계 b)의 접합체 및 단계 c)의 사포닌과 시험관 내 또는 생체 외 접촉시키고, 이와 함께 접합체를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로 전달하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, ASGPR에 대한 리간드는 적어도 하나의 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티, 바람직하게는 3개 또는 4개의 GalNAc 모이어티를 포함하고, 보다 바람직하게는 ASGPR에 대한 리간드는 (GalNAc)₃Tris를 포함하거나 이로 구성되고/되거나, 이펙터 분자는 항-miRNA, BNA-AON 또는 siRNA, 예컨대, BNA 기반 siRNA, 바람직하게는 화학적으로 변형된 siRNA, 대사적으로 안정한 siRNA 및 화학적으로 변형되고 대사적으로 안정한 siRNA로부터 선택되는 BNA 기반 siRNA와 같은 siRNA 중 어느 하나로부터 선택되는 올리고뉴클레오타이드인 것인, 방법.

청구항 32

제29항 또는 제30항에 있어서, 이펙터 분자는 약물 분자와 같은 소분자, 단백질 독소와 같은 독소, BNA와 같은 올리고뉴클레오타이드, 제노 핵산 또는 siRNA, 효소, 펩티드, 단백질, 또는 이들의 임의의 조합 중 적어도 하나를 포함하거나 이로 구성되고, 바람직하게는, 이펙터 분자는 독소, 효소 또는 올리고뉴클레오타이드이고, 바람직하게는 독소는 사포린 또는 다이안틴인, 방법.

청구항 33

제29항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 사포린은 제19항에 따른 유도체화된 SO1861 및/또는 유도체화된 QS-21이고, 바람직하게는 SO1861-Glu-AEM 또는 SO1861-Ald-EMCH 또는 QS-21-Glu-AEM 또는 QS-21-Ald-EMCH인, 방법.

청구항 34

제29항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 이펙터 분자는 예를 들어, 포유동물 세포 내부에 존재할 때 아포 지단백 B(apoB), HSP27, 트랜스티레틴(TTR), 전단백질 전환효소 서브틸리신/켄신 9형(PCSK9), 텔타-아미노레블리네이트 합성효소 1(ALAS1), 안티트롬빈 3(AT3), 글리콜레이트 산화효소(GO), 보체 성분 C5(CC5), B형 간염 바이러스(HBV)의 X 유전자, HBV의 S 유전자, 알파-1 항트립신(AAT) 및 젓산 탈수소효소(LDH)의 유전자 중 임의의 하나를 침묵시킬 수 있고/있거나, 예를 들어, 포유동물 세포 내부에 존재할 때 비정상적인 miRNA를 표적화할 수 있는 올리고뉴클레오타이드이고/이거나, 예를 들어, 포유동물 세포 내부에 존재할 때 올리고뉴클레오타이드는 HSP27, apoB, TTR, PCSK9, ALAS1, AT3, GO, CC5, HBV의 X 유전자의 발현 산물, HBV의 S 유전자의 발현 산물, AAT 및 LDH 단백질 중 임의의 하나의 발현에 관련된 mRNA를 표적화할 수 있거나, 예를 들어, 포유동물 세포 내부에 존재할 때 miRNA 기능을 길항 또는 복원, 예컨대, 종양형성 miRNA(onco-miR)를 억제 또는 onco-miR의 발현 억제를 억제할 수 있는 것인, 방법.

청구항 35

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 약제학적 조합물 또는 제2항, 제4항 내지 제24항 중 어느 한 항의 제2 약제학적 조성물, 및 제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 상기 약제학적 조합물 또는 제2 약제학적 조성물의 사용을 위한 설명서 또는 제29항 내지 제34항 중 어느 한 항에 따른 방법에 사용하기 위한 설명서를 포함하는 부품 키트.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

본 발명은 약제학적 조합물에 관한 것으로, 약제학적 조합물은 이펙터 분자 및 ASGPR에 대한 리간드의 집합체(여기서, ASGPR에 대한 리간드는 적어도 하나의 GalNAc 모이어티를 포함함); 및 모노데스모시드 또는 비데스모시드 트리테르펜 글리코시드 유형의 사포린을 포함한다. 본 발명은 또한 집합체 및 사포린을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 약제로 사용하기 위한, 또는 발현 산물이 apoB, TTR, PCSK9, ALAS1, ATS, GO, CCS, HBV의 X 유전자, HBV의 S 유전자, AAT 및 LDH 중 임의의 하나 이상의 유전자와 관련된 질환 또는 건강 문제의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 및/또는 암, 전염병, 바이러스 감염, 고콜레스테롤혈증, 원발성 고옥살산뇨, 혈우병 A, 혈우병 B, AAT 관련 간 질환, 급성 간 포르피린증, TTR 매개 아밀로이드증, 유전 TTR 아밀로이드증(hATTR), 보체 매개 질환, B형 간염 또는 자가면역 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 약제학적 조합물 또는 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명의 이펙터 분자를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로, 바람직하게는 상기 세포의 세포질액으로 전달하기 위한 시험관 내 또는 생체 외 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 집합체를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로 전달하기 위한 시험관 내 또는 생체 외 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

인간이나 병원체에서 단백질의 기능을 억제하는 능력은 신약 발견의 필수적인 부분이다. 기존의 소분자 약물과 항체는 사용 가능한 표적의 하위 집합으로 엄격하게 제한된다. 소분자는 주로 보조인자 부위 또는 전달자 부위, 사실상 소분자를 수용하도록 설계된 부위에 결합한다. 항체는 더 다양한 단백질에 결합할 수 있지만 일반적으로

세포의 표적으로 제한된다.

- [0003] 올리고뉴클레오타이드 요법은 유전자 전사 및 번역 경로를 직접 조작함으로써 소분자 약물 또는 항체 약물이 직면하는 많은 문제를 극복하는 것을 목표로 하는 상대적으로 역사가 짧고 빠르게 발전하는 분야이다. 올리고뉴클레오타이드의 효과와 다양성, 특히 고전적인 소분자 약물에 의해 '약물이 될 수 없는' 단백질을 암호화하는 유전자를 억제할 수 있다는 가능성은 이들을 매력적인 약물 후보로 만든다. 최초의 올리고뉴클레오타이드 약물은 단일 가닥 핵산 분자가 상보적인 mRNA 표적과 서열 특이성을 갖고 결합하여 RNase H 시스템에 의해 이중체(duplex)의 분해를 유발하는 안티센스 기술을 기반으로 했다.
- [0004] 1998년 Andrew Fire와 Craig Mello는 RNA 간섭(RNAi)이라고 명명한 현상인 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)에서의 전사 후 유전자 침묵화(post-transcriptional gene silencing, PTGS)의 원인 물질로서 이중 가닥 RNA(dsRNA)를 확인하는 중대한 논문을 발표했다. RNAi의 발견은 식물과 균류의 유전자 침묵에 대한 당혹스러운 관찰을 설명했고 결국 비암호화 RNA가 다세포 유기체에서 유전자 발현의 중심 조절자임을 보여주는 생물학의 혁명을 일으켰다. 그 직후 작은 dsRNA(일반적으로 15~30 bp)가 비특이적 인터페론 반응을 유도하지 않고 포유동물 세포에서 RNAi 침묵을 촉매적으로 유도할 수 있음이 발견되었다. 작은 간섭 RNA(siRNA) 및 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)와 같은 작은 dsRNA를 통한 RNAi 경로를 표적으로 하는 것은 특히 더 효율적이고(촉매적) 유전자 발현의 더 긴 억제를 제공하는 안티센스에 비해 몇 가지 이론적 이점이 있다. 이것은 덜 빈번한 투약과 함께 더 낮은 용량과 더 낮은 비용으로 해석될 수 있다. 낮은 노출은 또한 siRNA에 대한 독성 문제가 적다는 것을 의미할 수 있다.
- [0005] 그러나 siRNA는 생체 내에서 표적에 도달하기 전에 RNA 유도성 침묵화 복합체(RNA-Induced Silencing Complex, RISC) 기구에 대한 경로를 차단하는 다수의 중요한 장벽에 직면한다. 혈류에 들어가면 siRNA는 작은 크기와 높은 음이온 특성으로 인해 내인성 뉴클레아제에 의한 분해 및 신장 배설에 취약하다. 또한 표적 세포에 도달하기 전에 siRNA는 혈관의 치밀한 내피 접합부를 탐색하고 세포외 매트릭스를 통해 확산되어야 한다. 수많은 음전하로 인해 siRNA는 세포막에 쉽게 결합하거나 세포막을 통과하지 못하며 일단 세포 내부에 들어가면 세포 내 단백질 표적과 상호 작용하기 위해 엔도솜에서 탈출해야 한다.
- [0006] 따라서, 올리고뉴클레오타이드(예컨대, siRNA) 치료의 성공 여부는 세포 외부에서 세포질로의 약물의 효과적인 전달에 크게 좌우된다. 결과적으로, 올리고뉴클레오타이드(예컨대, siRNA) 전달을 개선하는 전달 시스템 개발에 많은 관심이 쏠리고 있다. 바이러스 전달 외에도, 세포로의 siRNA(또는 다른 올리고뉴클레오타이드) 전달을 향상시키기 위해 사용되는 주요 방법은 리포솜, 세포 투과 펩티드(CPP) 및 이들의 모방체 또는 나노입자를 사용한다(Gooding, Matt, *et al.* Chemical biology & drug design 80.6 (2012): 787-809). 삽입 돌연변이 유발 및 면역 유발 가능성과 같은 안전성 문제가 바이러스 접근법의 장래성을 제한하는 것으로 여겨진다.
- [0007] 리포솜은 올리고뉴클레오타이드가 지질 이중층 내에 캡슐화되는 siRNA와 같은 올리고뉴클레오타이드에 가장 일반적으로 사용되는 전달 벡터이다. 산소 라디칼 매개 독성(양이온성 리포솜에 일반적임), 세포 독성, 유전자 조절에 대한 영향 및 염증 반응과 같은 리포솜 올리고뉴클레오타이드 전달에는 몇 가지 문제가 있다. 또한, 지질을 사용한 생체 내 전달은 주로 간과 비장을 표적으로 하는 것으로 보인다.
- [0008] 단백질 형질도입 도메인이라고도 하는 세포 투과 펩티드(CPP)는 세포막을 통과할 수 있는 특이한 특성을 가진 짧은 펩티드(일반적으로 30개 미만의 아미노산 잔기 길이)이다. 올리고뉴클레오타이드에 대한 공유 결합 또는 올리고뉴클레오타이드와의 비공유 복합체 형성을 통해 CPP는 올리고뉴클레오타이드의 세포 흡수를 향상시킬 수 있다. CPP 매개 올리고뉴클레오타이드 전달 분야는 성숙 기술과는 거리가 먼 두 분야인 올리고뉴클레오타이드 기술과 펩티드 기술에 의해 제기되는 문제들을 단일 약물에서 대응해야 하기 때문에 매우 복잡하다. 올리고뉴클레오타이드 관련 문제를 제외하고, CPP에 대해 직면하는 일반적인 문제는 펩티드 사슬의 생체 내 안정성(부족)과 관련이 있으며, 종종 합성하기 복잡하고/하거나 감소된 세포 침투 활성을 나타낼 수 있는 비천연 펩티드 유도체의 사용이 필요로 한다.
- [0009] 향상된 세포 전달에도 불구하고 엔도솜에 의한 포획을 극복하는 것은 효율적인 CPP 및 기타 수송 시스템 설계에 대한 주요 과제 중 하나이다(Gooding *et al.*).
- [0010] 나노입자 및 나노전달체는 일반적으로 중합체, 생물학적 안정제 및 올리고뉴클레오타이드와 복합된 세포 표적 리간드로 구성된 나노스케일의 올리고뉴클레오타이드 전달 시스템이다. 예시적인 siRNA 나노전달체 시스템은 siRNA 동적 다중접합체(dynamic poly-conjugate)라는 이름으로 알려져 있다. 이 시스템은 생물학적 안정제로서 폴리에틸렌 글리콜(PEG)에 연결된 양친매성 중합체와 간세포 표적 리간드를 기반으로 하며, siRNA는 이황화 결합에 의

해 중합체에 공유 결합된다. 표적화 모이어티와 PEG 모이어티는 말레메이트(maleamate) 결합을 통해 중합체에 부착되어 혈청 단백질에 결합하지 않는 음전하를 띤 나노입자를 형성한다. 엔도사이토시스에 의한 내재화 후, 말레메이트 결합은 엔도솜의 산성화 시 쉽게 가수분해되어 중합체의 양이온성 아민 기를 노출시키고 양성자 스폰지 효과를 통해 엔도솜 탈출을 유도한다. 나노전달체는 또한 폴리에틸렌이민(PEI)(때때로 사이클로덱스트린과 결합됨)과 같은 양이온성 중합체의 형태로 알려져 있으며, 이는 siRNA와 같은 올리고뉴클레오타이드와 정전 복합체를 형성하여 분해로부터 보호하고 내재화를 돕는다. 그러나 막 파괴 및 세포자멸사 유도로 인한 고농도에서의 독성은 치료 전달체로서 양이온 중합체의 적용을 제한할 수 있다. 나노입자와 나노운반체의 복잡한 제조 외에도, 이들의 장기적인 안정성은 상업적으로 실행 가능한 사용에 대한 주요 장애물이다.

[0011] 이러한 전달 시스템 중 일부에 의해 달성될 수 있는 세포로의 올리고뉴클레오타이드(예컨대, siRNA)의 개선된 전달에도 불구하고, 엔도솜 탈출은 RNAi 기반 치료제와 같은 올리고뉴클레오타이드 기반 치료제의 적용에 대한 주요 장애물로 남아 있다. 세포 내 이입된 올리고뉴클레오타이드의 극히 일부만이 의도된 기능을 발휘할 수 있는 세포질 공간으로 탈출하는 반면, 대다수는 식작용 구획에 포획되어 비활성 상태로 남아 있다. 최근 문헌에서는 0.01% 미만의 수동 siRNA 탈출률을 시사한다(Setten, Ryan L., *et al.* Nature Reviews Drug Discovery 18.6 (2019): 421-446). 또한, 올리고뉴클레오타이드를 기능적으로 내재화하여 표적 효과(예컨대, 녹다운)를 생성하는 세포의 능력은 세포가 벌크 올리고뉴클레오타이드를 내재화하는 정도와 무관해 보이는 것으로 나타났다. 이러한 관찰은 분리된 '생산적' 및 '비생산적' 자유 흡수 경로에 대한 가설로 이어졌지만, 이러한 경로를 구별하는 분자 메커니즘은 여전히 모호하다(Setten, Ryan L., John J. Rossi, and Si-ping Han. Nature Reviews Drug Discovery 18.6 (2019): 421-446).

[0012] 대체로, 기본 메커니즘(개선된 엔도솜 탈출, 증가된 '생산적' 경로 흡수, 또는 다른 메커니즘)과 관계 없이, 증가된 효능(예를 들어, 표적 녹다운 더 적은 독성 및/또는 더 적은 표적외(off-target) 효과를 초래하는 올리고뉴클레오타이드의 개선된 전달 시스템에 대한 필요성이 상당히 남아있다.

[0013] 떠오르는 전략은 올리고뉴클레오타이드 효능 및 선택된 조직에 대한 분포를 증가시키기 위해 수용체 리간드에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)의 접합을 수반한다. 예를 들어, 3가지 안테나형(triantennary) N-아세틸갈락토사민(GalNAc)을 올리고뉴클레오타이드 치료제에 접합하면 단리된 간세포와 생체 내 간에서 10~30배 증가된 효능을 얻을 수 있다. GalNAc는 펜던트 올리고당에서 말단 시알산 잔기가 손실된 손상된 당단백질에서 발견된다. 간은 간세포 표면에서 삼량체 아시알로당단백질 수용체(ASGPR), 바람직하게는 ASGPR1을 매우 높은 수준(세포당 $10^5 \sim 10^6$ 개 정도)으로 발현하여 전신 순환계에서 이러한 단백질을 제거하는 기능을 한다. ASGPR은 혈액에서 순환하는 거대분자의 엔도사이토시스를 위해 중성 pH에서 GalNAc에 특이적으로 결합하고 초기 엔도솜에서 피전달체 전달을 위해 산성 pH(약 5~6)에서 GalNAc를 방출한다. 유리된 ASGPR은 재사용을 위해 세포 표면으로 다시 재활용된다. 현재 임상 시험 중인 RNAi 약물의 약 1/3은 ASGPR을 표적으로 하는 다가 GalNAc 리간드에 접합된 단일 분자, 화학적으로 변형된 RNAi 트리거이다. 간의 적절한 생리학, ASGPR의 고유한 특성, GalNAc 리간드의 무독성 특성 및 GalNAc-siRNA 접합체의 단순성으로 인해 이는 간세포로의 전신 RNAi 전달을 위한 매력적인 접근법이다.

[0014] 그러나 ASGPR 표적화된 올리고뉴클레오타이드 시스템(예를 들어, GalNAc-올리고뉴클레오타이드 접합체)의 효능을 추가로 증가시키고/시키거나, 독성을 감소시키고/시키거나 표적외 효과를 감소시키는 개선된 전달 시스템에 대한 필요성은 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0015] 본 발명의 제1 양태는 약제학적 조합물에 관한 것으로, 약제학적 조합물은

[0016] - 이펙터 분자 및 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)에 대한 리간드의 접합체로서, ASGPR에 대한 리간드는 적어도 하나의 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티, 바람직하게는 3개 또는 4개의 GalNAc 모이어티를 포함하고, 보다 바람직하게는 ASGPR에 대한 리간드는 (GalNAc)₃Tris를 포함하거나 이로 구성되는 것인, 접합체; 및

[0017] - 사포닌으로서, 모노데스모시드 트리테르펜 글리코시드 또는 비데스모시드 트리테르펜 글리코시드인 사포닌을 포함하고,

[0018] 선택적으로 약제학적으로 허용 가능한 부형제 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 희석제를 포함한다.

[0019] 일 구현예는 적어도 2종의 약제학적 조성물 형태의 본 발명의 약제학적 조합물로서,

- [0020] - 접합체를 포함하고 선택적으로 약제학적으로 허용 가능한 부형제 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 희석제를 포함하는 제1 약제학적 조성물; 및
- [0021] - 사포닌을 포함하고 선택적으로 약제학적으로 허용 가능한 부형제 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 희석제를 포함하는 제2 약제학적 조성물을 포함한다.
- [0022] 일 구현예는 접합체, 사포닌 및 선택적으로 약제학적으로 허용 가능한 부형제 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 희석제를 포함하는 단일 약제학적 조성물 형태의 본 발명의 약제학적 조합물이다.
- [0023] 본 발명의 제2 양태는 약제로 사용하기 위한 본 발명의 약제학적 조합물에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명의 제3 양태는 본 발명의 약제학적 조합물에 관한 것으로, 발현 산물이 다음의 임의의 하나 이상의 유전자와 관련된 질환 또는 건강 문제의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것이다: apoB, TTR, PCSK9, ALAS1, AT3, GO, CC5, HBV의 X 유전자, HBV의 S 유전자, AAT 및 LDH. 일 구현예는 본 발명에 따른 용도를 위한 약제학적 조합물로서, 상기 용도는 암, 전염병, 바이러스 감염, 고콜레스테롤혈증, 원발성 고옥살산뇨, 혈우병 A, 혈우병 B, AAT 관련 간 질환, 급성 간 포르피린증, TTR 매개 아밀로이드증, 유전 TTR 아밀로이드증(hATTR), 보체 매개 질환, B형 간염 또는 자가면역 질환의 치료 또는 예방에 있다.
- [0025] 본 발명의 제4 양태는 본 발명의 이펙터 분자를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로, 바람직하게는 상기 세포의 세포질액으로 전달하기 위한 시험관 내 또는 생체 외 방법에 관한 것으로, 방법은
- [0026] a) 표면에 ASGPR, 바람직하게는 ASGPR1을 발현하는 세포, 바람직하게는 간 세포, 바이러스 감염된 세포 및 암 세포로부터 선택되는 세포를 제공하는 단계;
- [0027] b) 본 발명의 접합체를 제공하는 단계, 여기서, 접합체는 전달되는 이펙터 분자를 포함하는 것인, 단계;
- [0028] c) 본 발명의 사포닌을 제공하는 단계;
- [0029] d) 단계 a)의 세포를 단계 b)의 접합체 및 단계 c)의 사포닌과 시험관 내 또는 생체 외 접촉시키고,
- [0030] 이와 함께 이펙터 분자를 포함하는 상기 접합체를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로 전달하고, 상기 접합체를 전달함으로써 이펙터 분자를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로, 바람직하게는 상기 세포의 세포질액으로 전달하는 단계를 포함한다.
- [0031] 본 발명의 제5 양태는 본 발명의 접합체를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로, 바람직하게는 상기 세포의 세포질액으로 전달하기 위한 시험관 내 또는 생체 외 방법에 관한 것으로, 방법은
- [0032] a) 표면에 ASGPR, 바람직하게는 ASGPR1을 발현하는 세포, 바람직하게는 간 세포, 바이러스 감염된 세포 및 암 세포로부터 선택되는 세포를 제공하는 단계;
- [0033] b) 본 발명의 접합체를 제공하는 단계;
- [0034] c) 본 발명의 사포닌을 제공하는 단계;
- [0035] d) 단계 a)의 세포를 단계 b)의 접합체 및 단계 c)의 사포닌과 시험관 내 또는 생체 외 접촉시키고,
- [0036] 이와 함께 접합체를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로 전달하는 단계를 포함한다.
- [0037] 본 발명의 제6 양태는 본 발명의 약제학적 조합물 또는 본 발명의 제2 약제학적 조성물, 및 본 발명에 따른 상기 약제학적 조합물 또는 제2 약제학적 조성물의 사용을 위한 또는 본 발명에 따른 시험관 내 또는 생체 외 방법에 사용하기 위한 설명서를 포함하는 부품 키트에 관한 것이다.
- [0038] 정의
- [0039] "GalNAc"이라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 N-아세틸갈락토사민 및 다음의 IUPAC 명칭을 지칭한다: 2-(아세틸아미노)-2-데옥시-D-갈락토스.
- [0040] "(GalNAc)₃Tris"라는 용어는 예를 들어 siRNA 기반 치료 분야에서 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 바람직하게는 적어도 하나의 링커를 통해, 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(Tris)(IUPAC 명칭: 2-아미노-2-(하이드록시메틸) 프로판-1,3-디올)의 하이드록실 기에 각각 개별적으로 공유 결합된 세 개의 GalNAc 단위를 포함하는 모이어티를 지칭한다. (GalNAc)₃Tris는 유리 아민 포함 분자로 존재할 수 있거나, 예를 들어 본원에 기

재된 (GalNAc)₃Tris-모이어티 포함 접합체를 형성하기 위해 나머지 아민 결합 부위를 통해 추가로 기능화될 수 있다.

[0041] "올리고뉴클레오타이드"라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 2개 이상의 뉴클레오타이드의 스트링을 의미한다. 즉, 올리고뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드로 구성된 짧은 올리고머이다. 예는 핵산, 예컨대, RNA 및 DNA, 그리고 잠금 핵산(LNA) 또는 2'-O,4'-C-아미노에틸렌 또는 2'-O,4'-C-아미노메틸렌 가교 핵산(BNA^{NC})으로도 알려진 가교 핵산(BNA)과 같은 뉴클레오타이드 유사체를 포함하는 핵산의 스트링과 같은 임의의 변형된 RNA 또는 DNA이고, 여기서 뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드이다.

[0042] "RNAi 매개 유전자 표적화"라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 유전자의 전사에 관여하는 mRNA를 표적으로 하는 작은 이중 가닥 RNA 분자와 같은 올리고뉴클레오타이드를 세포로 전달함으로써 상기 세포에서 유전자의 기능에 영향을 미치는 생체 내, 생체 외 또는 시험관 내 접근법을 지칭한다: 예를 들어, 작은 이중 가닥 RNA 분자는 특정 유전자의 RNAi 침묵을 효율적으로 유발할 수 있다.

[0043] "가교된 핵산" 또는 간단히 "BNA" 또는 "잠금 핵산" 또는 간단히 "LNA" 또는 2'-O,4'-C-아미노에틸렌 또는 2'-O,4'-C-아미노메틸렌 가교된 핵산(BNA^{NC})이라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 변형된 RNA 뉴클레오타이드를 의미한다. BNA는 '계약된 RNA 분자' 또는 '접근할 수 없는 RNA 분자'라고도 한다. BNA 단량체는 "고정된" C₃'-엔도 슈가 퍼커링이 있는 5원, 6원 또는 심지어 7원 가교 구조를 포함할 수 있다. 가교는 리보스의 2', 4'-위치에서 합성적으로 통합되어 2', 4'-BNA 단량체를 제공한다. BNA 단량체는 당업계에 공지된 표준 포스포라미다이트 화학을 사용하여 올리고뉴클레오타이드 중합체 구조에 혼입될 수 있다. BNA는 결합 친화력과 안정성이 증가된 구조적으로 단단한 올리고뉴클레오타이드이다.

[0044] 안티센스 올리고뉴클레오타이드라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며 설명에서 간단히 "AON" 또는 "ASO"로 표시될 수 있다.

[0045] "BNA 기반 안티센스 올리고뉴클레오타이드" 또는 간단히 "BNA-AON"이라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 적어도 하나의 뉴클레오타이드가 BNA인 안티센스 뉴클레오타이드의 스트링을 의미한다.

[0046] "단백질성"이라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 분자가 어느 정도 단백질의 물리화학적 특성을 갖는다는 의미에서 단백질과 유사한, 단백질의, 단백질과 관련된, 단백질을 포함하는, 단백질에 속하는, 단백질로 구성되는, 단백질과 비슷한, 또는 단백질인 분자를 의미한다. 예를 들어 '단백질성 분자'에서 사용되는 "단백질성"이라는 용어는 단백질과 유사하거나 단백질인 분자의 적어도 일부의 존재를 의미하며, '단백질'은 적어도 2개 잔기 길이의 아미노산 잔기의 사슬을 포함하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질 및 단백질 또는 단백질 도메인의 조립체를 포함한다. 단백질성 분자에서, 적어도 2개의 아미노산 잔기는 예를 들어 아미드 결합(들), 예컨대 펩티드 결합(들)을 통해 연결된다. 단백질성 분자에서 아미노산 잔기는 천연 아미노산 잔기 및/또는 변형된 천연 아미노산 잔기와 같은 인공 아미노산 잔기이다. 바람직한 구현예에서, 단백질성 분자는 적어도 2개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 2 내지 약 2,000개의 아미노산 잔기를 포함하는 분자이다. 일 구현예에서, 단백질성 분자는 2 내지 20개(펩티드에 전형적임) 아미노산을 포함하는 분자이다. 일 구현예에서, 단백질성 분자는 21 내지 1,000개 아미노산(폴리펩티드, 단백질, 단백질 도메인, 예컨대, 항체, 단일 도메인 항체, Fab, scFv, 수용체에 대한 리간드, 예컨대, EGF에 전형적임)을 포함하는 분자이다. 바람직하게는, 아미노산 잔기는 (전형적으로) 펩티드 결합(들)을 통해 연결된다. 본 발명에 따르면, 상기 아미노산 잔기는 (변형된) (비)천연 아미노산 잔기이거나 이를 포함한다.

[0047] "이펙터 분자" 또는 "이펙터 모이어티"라는 용어는 예를 들어 공유 접합체의 일부로서 이펙터 분자를 지칭할 때 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 예를 들어 다음의 임의의 하나 이상의 표적 분자: 단백질, 펩티드, 탄수화물, 당류, 예컨대, 글리칸, (포스포)지질, 핵산, 예컨대, DNA, RNA, 효소에 선택적으로 결합할 수 있고 이러한 하나 이상의 표적 분자(들)의 생물학적 활성을 조절하는 분자를 지칭한다. 이펙터 분자는 예를 들어 약물 분자와 같은 소분자, 단백질 독소와 같은 독소, BNA와 같은 올리고뉴클레오타이드, 제노 핵산 또는 siRNA, 효소, 펩티드, 단백질, 또는 이들의 임의의 조합 중 임의의 하나 이상으로부터 선택된 분자이다. 따라서, 예를 들어, 이펙터 분자 또는 이펙터 모이어티는 약물 분자와 같은 소분자, 단백질 독소와 같은 독소, BNA와 같은 올리고뉴클레오타이드, 제노 핵산 또는 siRNA, 효소, 펩티드, 단백질 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된 분자 또는 모이어티로서, 다음의 임의의 하나 이상의 표적 분자: 단백질, 펩티드, 탄수화물, 당류, 예컨대, 글리칸, (포스포)지질, 핵산, 예컨대, DNA, RNA, 효소에 선택적으로 결합할 수 있고 표적 분자에 결합 시, 이러한 하나

이상의 표적 분자(들)의 생물학적 활성을 조절하는 분자 또는 모이어티를 지칭한다. 전형적으로, 이펙터 분자는 인간 세포와 같은 포유동물 세포와 같은 세포 내부, 예컨대 상피 세포의 세포질액에서 생물학적 효과를 발휘할 수 있다. 따라서 전형적인 이펙터 분자는 약물 분자, 플라스미드 DNA, 항체-약물 접합체(ADC)에 포함된 독소와 같은 독소, 올리고뉴클레오타이드, 예컨대, siRNA, BNA, 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체(AOC)에 포함된 핵산이다. 예를 들어, 이펙터 분자는 (세포내) 효소 활성, 유전자 발현 또는 세포 신호전달을 증가 또는 감소시킬 수 있는 리간드로 작용할 수 있는 분자이다.

- [0048] "건강 문제"라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 건강한 대상체의 신체 또는 이의 일부의 상태와 비교했을 때 최적이지 아니어서 대상체의 적절한 기능 및/또는 웰빙을 방해하는, 예를 들어, 인체의 정상적인 기능을 손상시키는, 인간 환자와 같은 대상체의 신체 또는 이의 일부, 기관, 근육, 정맥, 동맥, 피부, 사지, 혈액, 세포 등의 임의의 상태를 지칭한다.
- [0049] "GalNAc-장식된 올리고뉴클레오타이드 약물"이라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 유전자의 전사를 방해하기 위한 올리고뉴클레오타이드를 지칭하며, 하나 이상의 GalNAc 단위는 예를 들어 적어도 하나의 링커를 통해 올리고뉴클레오타이드에 커플링된다.
- [0050] "잠금 핵산", 간단히 "LNA"라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 당업계에 공지된 바와 같이, 추가 메틸렌 가교가 C3'-엔드 형태(베타-D-LNA) 또는 C2'-엔드(알파-L-LNA) 형태에서 리보스 모이어티를 고정하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 빌딩 블록을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0051] "가교된 핵산 NC", 간단히 "BNA^{NC}"라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 당업계에 공지된 바와 같이, 추가 2'-O,4'-C-아미노에틸렌 가교된 핵산이 포함되어 있으며 N 원자에 상이한 치환(이 중 메틸 기가 현재까지 가장 일반적으로 사용됨)을 갖는 하나 이상의 뉴클레오타이드 빌딩 블록을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0052] "화학적으로 변형되고 대사적으로 안정한 siRNA"라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 변형된 siRNA 분자가 대사 분해, 소화, 효소 분해 등에 대해 더 저항성이 있도록, 즉, 더 안정적이도록, 자연 발생 뉴클레오타이드로 구성된 RNA 올리고뉴클레오타이드와 비교하여, 화학적 변형을 포함하는 siRNA 분자를 의미한다.
- [0053] "사포닌"이라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며, 본원에서는 사포게닌인 친유성 아글리콘 코어와 결합된 하나 이상의 친수성 글리콘 모이어티를 포함하는 양친매성 글리코시드의 그룹을 나타낸다. 사포닌은 자연 발생 또는 합성(즉 비자연 발생)일 수 있다. "사포닌"이라는 용어는 자연 발생 사포닌, 자연 발생 사포닌의 유도체 및 화학적 및/또는 생명공학적인 합성 경로를 통해 새로 합성된 사포닌을 포함한다.
- [0054] 용어 "사포닌 유도체"("변형된 사포닌"이라고도 알려짐)는 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서 작용기의 산화, 작용기의 환원 및/또는 다른 분자와의 공유 결합 형성("접합" 또는 "공유 접합"이라고도 지칭됨)과 같은 하나 이상의 화학적 변형에 의해 유도된 자연 발생 사포닌에 해당하는 화합물을 의미한다. 바람직한 변형은 아글리콘 코어의 알데히드 기; 당류 사슬의 카르복실 기 또는 당류 사슬의 아세톡시 기의 유도체화를 포함한다. 전형적으로, 사포닌 유도체는 천연 대응물을 갖지 않는다. 즉, 사포닌 유도체는 예를 들어, 식물이나 나무에 의해 자연적으로 생성되지 않는다. "사포닌 유도체"라는 용어는 자연 발생 사포닌의 유도체화에 의해 수득된 유도체 뿐만 아니라 하나 이상의 화학적 변형에 의해 유도체화된 천연 사포닌에 상응하는 화합물을 생성하는 화학적 및/또는 생명공학적 합성 경로를 통해 새롭게 합성된 유도체를 포함한다.
- [0055] "아글리콘 코어 구조"라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며, 본원에서는 하나 또는 두 개의 탄수화물 안테나 또는 당류 사슬(글리칸, 글리콘)이 결합되지 않은 사포닌의 아글리콘 코어, 또는 아글리콘을 지칭한다. 예를 들어, 퀴라산은 S01861, QS-7 및 QS-21의 아글리콘 코어 구조이다.
- [0056] "당류 사슬"이라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며, 본원에서는 글리칸, 탄수화물 안테나, 글리콘, 단일 당류 모이어티(단당류) 또는 다중 당류 모이어티(올리고당, 다당류)를 포함하는 사슬 중 임의의 것을 나타낸다. 당류 사슬은 당류 모이어티로만 구성될 수 있거나, 또는 예를 들어 QS-21에 존재하는 것과 같은, 4E-메톡시신남산, 4Z-메톡시신남산 및 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산) 중 어느 하나와 같은 추가의 모이어티도 포함할 수 있다.
- [0057] 당류 사슬의 이름과 관련하여 "Api/Xyl-" 또는 "Api- 또는 Xyl-"이라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 아피오스(Api) 모이어티를 포함하거나 자일로스(Xyl) 모이어티를 포함하는 당류를 지칭한다.

- [0058] "항체-약물 접합체" 또는 "ADC"라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며, 본원에서는 항체, 예컨대, IgG, Fab, scFv, 단일 도메인 항체, 면역글로불린, 면역글로불린 단편, 하나 또는 다수의 Vh 도메인 등과 인간 환자와 같은 대상체의 세포와 접촉했을 때 치료 효과를 발휘할 수 있는 임의의 분자, 예컨대, 활성 약제학적 성분, 독소, 올리고뉴클레오타이드, 효소, 소분자 약물 화합물 등의 임의의 접합체를 지칭한다.
- [0059] "항체-올리고뉴클레오타이드 접합체" 또는 "AOC"라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며, 본원에서는 항체, 예컨대, IgG, Fab, 단일 도메인 항체, scFv, 면역글로불린, 면역글로불린 단편, 하나 또는 다수의 Vh 도메인 등과 인간 환자와 같은 대상체의 세포와 접촉했을 때 치료 효과를 발휘할 수 있는 임의의 올리고뉴클레오타이드 분자, 예컨대, BNA, 대립 유전자 특이적 올리고뉴클레오타이드, 짧은거나 작은 간섭 RNA(siRNA; 침묵 RNA), 안티센스 DNA, 안티센스 RNA 등과 같은 단일 가닥 분자 또는 이중 가닥 분자로 존재하는, DNA, 변형된 DNA, RNA, 변형된 RNA, 합성 핵산을 포함하는 핵산들의 자연 또는 합성 스트링으로부터 선택된 올리고뉴클레오타이드의 임의의 접합체를 지칭한다.
- [0060] "접합체"라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 적어도 제2 분자에 화학 결합(들)을 통해 공유 결합되어 제1 분자 및 제2 분자를 포함하거나 이들로 구성된 공유 결합 조립체를 형성하는 적어도 제1 분자를 의미한다. 일반적인 접합체는 (GalNAc)₃트리스 - siRNA, ADC, AOC 및 SO1861-EMCH(사포닌의 아글리콘 코어 구조의 알데히드 기에 연결된 EMCH)이다.
- [0061] GalNAc - 이펙터 분자 접합체 또는 링커를 포함하는 구축물에서와 같이 사용되는 'S'라는 용어는 엔도솜 및 세포질액에 온전하게 남아 있는 '안정한 링커'를 나타낸다.
- [0062] 항체-사포닌 접합체 또는 링커를 포함하는 구축물에서와 같이 사용되는 'L'라는 용어는 엔도솜에서 약산성 조건 하에서 절단되는 '불안정한 링커'를 나타낸다.
- [0063] "모이어티"라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 추가 분자, 링커, 분자의 조립체 등에 결합, 연결, 접합되어 더 큰 분자, 접합체, 분자들의 조립체의 일부를 형성하는 분자를 의미한다. 전형적으로, 모이어티는 제1 분자 상에 초기에 존재하고 제2 분자 상에 존재하는 하나 이상의 화학 기를 포함하는, 제2 분자에 공유 결합된 제1 분자이다. 예를 들어, 사포린은 전형적인 분자이며 이펙터 분자의 예이다. 항체-약물 접합체의 일부인 사포린은 ADC의 전형적인 이펙터 모이어티이다. 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체의 일부인 BNA 또는 siRNA는 AOC의 전형적인 이펙터 모이어티이다.
- [0064] "DAR"이라는 용어는 일반적으로 약물 항체 비율을 나타내며 항체 약물 접합체(ADC)의 주어진 제제에 대한 평균 약물 대 항체 비율을 말하며, 본원에서는 접합체 분자와 관련하여, 결합된 SO1861 모이어티 또는 SPT001, 또는 결합된 ApoBBNA의 양의 비율을 의미한다.
- [0065] 설명 및 청구범위에서 첫 번째, 두 번째, 세 번째 등의 용어는 예를 들어 구성 내의 유사한 요소, 조성, 구성 요소, 또는 개별적인 방법 단계를 구별하는 데 사용되며, 반드시 순차적 순서 또는 연대순으로 설명할 필요는 없다. 용어들은 적절한 상황에서 상호교환 가능하며, 본 발명의 구현에는 달리 명시되지 않는 한, 본원에 설명되거나 예시된 것과 다른 순서로 작동될 수 있다.
- [0066] 본원에 기재된 본 발명의 구현에는 달리 명시되지 않는 한 조합 및 협력하여 작동될 수 있다.
- [0067] 또한, "바람직한" 또는 "예컨대" 또는 "예를 들어" 또는 "특히" 등으로 지칭되지만 다양한 구현에는 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니라 본 발명이 구현될 수 있는 예시적인 방식으로 해석되어야 한다.
- [0068] 청구범위에서 사용되는 "포함하는"이라는 용어는 예를 들어 이후에 나열된 구성의 요소 또는 방법 단계 또는 구성 요소로 제한되는 것으로 해석되어서는 안 되며, 특정 구성의 다른 요소나 방법 단계 또는 구성 요소를 배제하지 않는다. 언급된 특징, 정수, (방법) 단계 또는 구성요소의 존재를 명시하는 것으로 해석되어야 하지만, 하나 이상의 다른 특징, 정수, 단계 또는 구성요소, 또는 이들의 집단의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다. 따라서, "단계 A 및 B를 포함하는 방법"이라는 표현의 범위는 단계 A 및 B로만 구성된 방법으로 제한되어서는 안 되며, 오히려 본 발명과 관련하여 방법의 단지 열거된 단계가 A 및 B일 뿐이며, 또한 청구범위는 이러한 방법 단계의 증가물을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, "성분 A 및 B를 포함하는 조성물"이라는 표현의 범위는 성분 A 및 B로만 구성된 조성물로 제한되어서는 안 되며, 오히려 본 발명과 관련하여 조성물의 단지 열거된 성분이 A 및 B일 뿐이며, 또한 청구범위는 이들 구성요소의 증가물을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0069] 또한, 부정관사 "하나의(a 또는 an)"에 의해 요소 또는 구성요소에 대한 언급은 문맥상 요소 또는 구성요소 중 유일한 한 가지만 존재함을 분명히 요구하지 않는 한, 요소 또는 구성요소 중 하나 이상이 존재할 가능성을 배

제하지 않는다. 따라서, 부정관사 "하나의(a 또는 an)"는 일반적으로 "적어도 하나"를 의미한다.

도면의 간단한 설명

도 1: 3가-GalNAc의 합성.

도 2: S01861-DBCO의 합성.

도 3: 1가-GalNAc-S01861의 합성.

도 4: 3가-GalNAc-S01861의 합성.

도 5: 1가-GalNAc-BNA의 합성.

도 6: 3가-GalNAc-BNA의 합성.

도 7: 3가-GalNAc-BNA의 합성.

도 8a 및 8b: 3가 GalNAc의 합성.

도 9a 및 9b: HepG2(a) 및 Huh7(b) 세포주에 대한 GalNAc-S01861 및 3가-GalNAc-S01861의 세포 생존능(MTS). 도 9b 옆에 표시된 범례는 도 9a에도 적용된다.

도 10a 및 10b: 세포 생존능 검정(MTS) HepG2(a) 및 Huh7(b) 세포주. 도 10b 옆에 표시된 범례는 도 10a에도 적용된다.

도 11a 및 11b: HepG2(a) 및 Huh7(b) 세포주에 대한 유전자 발현 분석.

도 12a 및 12b: HepG2(a) 및 Huh7(b) 세포주에 대한 유전자 발현 분석. 도 12b 옆에 표시된 범례는 도 12a에도 적용된다.

도 13a 및 13b: HepG2(a) 및 Huh7(b) 세포주에 대한 세포 생존능 검정. 도 13b 옆에 표시된 범례는 도 13a에도 적용된다.

도 14a 및 b: HepG2(a) 및 Huh7(b) 세포주에 대한 유전자 발현 분석. 도 14b 옆에 표시된 범례는 도 14a에도 적용된다.

도 15a 및 b: HepG2(a) 및 Huh7(b) 세포주에 대한 세포 생존능 검정. 도 15b 옆에 표시된 범례는 도 15a에도 적용된다.

도 16a 및 b: HepG2(a) 및 Huh7(b) 세포주에 대한 유전자 발현 분석. 도 16b 옆에 표시된 범례는 도 16a에도 적용된다.

도 17a 및 b: HepG2(a) 및 Huh7(b) 세포주에 대한 유전자 발현 분석. 도 17b 옆에 표시된 범례는 도 17a에도 적용된다.

도 18a 및 b: 인간 1차 간세포에 대한 ApoB RNA 발현 분석 및 세포 생존능 검정.

도 19a 및 b: 인간 1차 간세포에 대한 ApoB RNA 발현 분석 및 세포 생존능 검정.

도 20a 및 b: 마우스 1차 간세포에 대한 ApoB RNA 발현 분석 검정.

도 21: (GalNAc)3-Ls-S01861 합성, 중간체 22, 23.

도 22: (GalNAc)3-Ls-BNA 합성, 중간체 25, 26.

도 23: (GalNAc)3-Ls-BNA 합성.

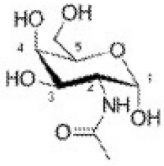
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명의 제1 목표는 표적 세포 외부로부터 상기 세포 내로의 전달이 고려되거나, 또는 보다 특별하게는 상기 표적 세포의 세포질액 내 이펙터 분자의 전달이 고려될 때 ASGPR, 특히 ASGPR1에 대한 리간드, 예컨대, GalNAc 포함 리간드에 커플링된 이펙터 분자의 전달을 위한 개선된 치료적 조합물 또는 개선된 약제학적 조성물을 제공하는 것이다. 본 발명의 제2 목표는 이펙터 분자 및 ASGPR에 대한 리간드를 포함하는 접합체로 치료되는 질환을 앓는 (인간) 환자의 개선된 치료 방법을 제공하는 것이다.

- [0072] 본 발명의 목적은 이펙터 분자에 대한 분자 표적을 포함하는 표적 세포 내부로 전달되면 생물학적 효과를 발휘할 수 있는 이펙터 분자에 공유 결합된 ASGPR에 대한 리간드의 접합체를 포함하는 치료적 조성물 또는 예를 들어, 2종의 치료적 조성물의 치료적 조합물을 제공하는 것으로, 표적 세포를 보유하는 이 접합체는, 이를 필요로 하는 (인간) 환자에게 투여될 경우, 접합체에 대해 현재 요구되는 용량보다 낮은 용량으로 개선된 치료 효과 또는 충분한 효과를 갖는다. 이로써, 접합체의 치료 장이 효과적으로 넓어진다.
- [0073] 상기 목적 중 적어도 하나는 적어도 2종의 약제학적 조성물의 치료적 조합물 또는 본 발명의 약제학적 조성물을 제공함으로써 달성된다.
- [0074] 본 발명은 특정 구현예와 관련하여 설명될 것이지만 본 발명은 이에 제한되지 않고 청구범위에 의해서만 제한된다.
- [0075] 본 발명의 제1 양태는 약제학적 조합물에 관한 것으로, 약제학적 조합물은
- [0076] - 이펙터 분자 및 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)에 대한 리간드의 접합체로서, ASGPR에 대한 리간드는 적어도 하나의 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티, 바람직하게는 3개 또는 4개의 GalNAc 모이어티를 포함하고, 보다 바람직하게는 ASGPR에 대한 리간드는 (GalNAc)₃Tris를 포함하거나 이로 구성되는 것인, 접합체; 및
- [0077] - 사포닌으로서, 모노데스모시드 트리테르펜 글리코시드 또는 비데스모시드 트리테르펜 글리코시드인 사포닌을 포함하고,
- [0078] 선택적으로 약제학적으로 허용 가능한 부형제 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 희석제를 포함한다.
- [0079] 일 구현예는 적어도 2종의 약제학적 조성물 형태의 본 발명의 약제학적 조합물로서,
- [0080] - 접합체를 포함하고 선택적으로 약제학적으로 허용 가능한 부형제 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 희석제를 포함하는 제1 약제학적 조성물; 및
- [0081] - 사포닌을 포함하고 선택적으로 약제학적으로 허용 가능한 부형제 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 희석제를 포함하는 제2 약제학적 조성물을 포함한다.
- [0082] 일 구현예는 접합체, 사포닌 및 선택적으로 약제학적으로 허용 가능한 부형제 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 희석제를 포함하는 단일 약제학적 조성물 형태의 본 발명의 약제학적 조합물이다.
- [0083] 본 발명자들은 놀랍게도 표면에서 ASGPR, 특히 ASGPR1을 발현하는 세포가 ASGPR에 대한 리간드 및 이펙터 분자를 포함하는 접합체 및 트리테르펜 글리코시드 유형의 사포닌, 전형적으로 비데스모시드 테르페노이드 유형의 사포닌과 접촉될 때, 이러한 접합체의 개선된 흡수를 나타낸다는 것을 발견하였다. 예를 들어, HSP27 침묵화를 위한, 유전자 침묵화 BNA와 같은 올리고뉴클레오티드와 공유 결합된, 예를 들어, ASGPR1에 대한 GalNAc 기반 리간드, 예컨대 (GalNAc)₃Tris 접합체는 사포닌의 존재 하에서 이러한 개선된 흡수를 나타낸다. 이와 함께, 본 발명자들은 이제 예를 들어, 올리고뉴클레오티드로 처리되는 표적 세포의 외부로부터 상기 세포 내부로 이러한 올리고뉴클레오티드의 전달 효능을 개선하고자 하는, 특히, 표면에 ASGPR1을 발현하는 표적 세포의 세포질액으로의 올리고뉴클레오티드, 예컨대, BNA 및/또는 siRNA의 세포 내 전달을 개선하고자 하는 오래도록 느꼈던 필요성에 대한 해결책을 제공한다. 본 발명에 따르면 적용된 사포닌은, 표적 세포가 이러한 사포닌 및 독소와 접촉될 경우, 예를 들어, 단백질 독소의 엔도솜 탈출을 증진시키는 능력이 알려져 있으며, 독소는 예를 들어, 항체-약물 접합체(ADC)의 일부이다. 또한, 본 발명자들은 이제 이러한 사포닌의 특정 유도체가, 사포닌 및 이펙터 분자가 세포 내부, 즉 엔도솜에 공동 국소화될 때 엔도솜 및 리소솜으로부터 세포질액으로의 이펙터 분자의 탈출을 증진시키는 능력을 유지한다는 것을 규명하였다. 놀랍게도, 이러한 사포닌 유도체는 접합체에 포함된 이펙터 분자를 ASGPR1을 보유하는 표적 세포로 전달하는 것을 증진시킬 수 있는 반면, 이러한 사포닌 유도체의 세포독성 및 용혈 활성은 (자연 발생) 비변형 사포닌에 대해 관찰된 것보다 낮다. 이러한 사포닌 유도체는 본원에서 보다 상세하게 설명된다.
- [0084] **접합체 - 도입**
- [0085] 본 발명의 약제학적 조합물 및 특정 약제학적 조성물은 아시알로당단백질 수용체(ASGPR), 예컨대, ASGPR1, 및 바람직하게는 ASGPR1에 대한 리간드 및 이펙터 분자의 접합체를 포함한다. 이펙터 분자가 접합체의 나머지 부분에 결합될 때 이는 본원에서 "이펙터 모이어티"로 지칭된다. ASGPR 리간드는 적어도 하나의 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티를 포함한다. 본 발명의 구현예에 따르면, 각각의 GalNAc 모이어티는 화학식 I에 나타난 바와 같이 위치 "1" 상의 산소에 대한 공유 결합을 통해, ASGPR 리간드의 나머지 부분에 결합되거나 또는 - ASGPR 리

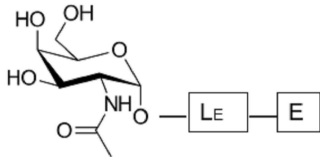
간드가 단일 GalNAc 모이어티로 구성되는 경우 - 이펙터 모이어티에 결합된다:

[화학식 I]



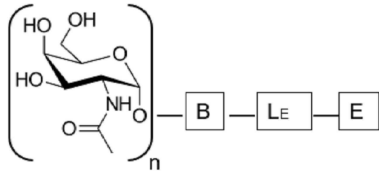
화학식 II에 나타난 바와 같이, ASGPR 리간드는 바람직하게는 이펙터 모이어티 링커 L_E 를 통해, 이펙터 모이어티 E에 결합된 단일 GalNAc 모이어티로 구성된다:

[화학식 II]



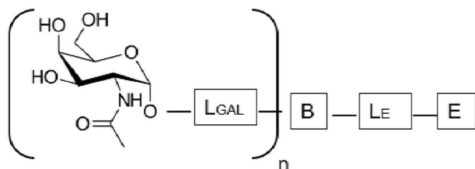
ASGPR 리간드는 2, 3, 4, 5 또는 6개의 GalNAc 모이어티, 바람직하게는 3 또는 4개의 GalNAc 모이어티, 보다 바람직하게는 3개의 GalNAc 모이어티와 같은 1개 초과 GalNAc 모이어티를 포함할 수 있다. 이러한 경우, GalNAc 모이어티가 각각 개별적으로 위치 "1" 상의 산소를 통해 중심 가교 모이어티 B에 공유 결합되는 것이 바람직하며, 이는 GalNAc 모이어티와 이펙터 모이어티 사이에, 바람직하게는 이펙터 모이어티 링커 L_E 를 통해, 가교를 효과적으로 형성한다. GalNAc 모이어티는 화학식 III에 나타난 바와 같이 가교 모이어티 B에 직접 결합될 수 있다:

[화학식 III]



여기서 n 은 3 또는 4 이상의 정수이고, 바람직하게는 n 은 3이고, L_E 는 이펙터 모이어티 링커이고 E는 이펙터 모이어티이다. 보다 바람직하게는, GalNAc 모이어티는 화학식 IV에 나타난 바와 같이 GalNAc 링커 L_{GAL} 을 통해 가교 모이어티 B에 결합된다:

[화학식 IV]



여기서 n 은 3 또는 4 이상의 정수이고, 바람직하게는 n 은 3이고, L_E 는 이펙터 모이어티 링커이고 E는 이펙터 모이어티이다. 각각의 L_{GAL} 의 발생은 독립적으로 선택될 수 있지만, 당업자는 각각의 L_{GAL} 의 발생이 동일한 모이어티를 나타내는 경우 집합체의 합성이 단순화됨을 이해할 것이다.

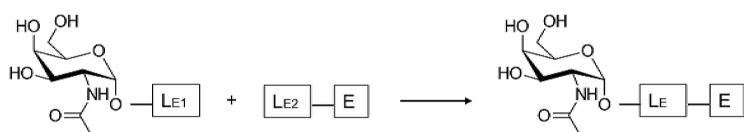
집합체 - 링커 L_E

이펙터 모이어티 링커 L_E 는 화학식 II에서와 같이 GalNAc에 또는 화학식 III 및 IV에서와 같이 가교 모이어티 B

에 이펙터를 공유 결합시키기에 적합한 임의의 화학 모이어티를 나타낸다. 링커의 정체 및 크기는 특별히 제한되지 않으며, 화학식 II에서와 같이 GalNAc에 또는 화학식 III 및 IV에서와 같이 가교 모이어티 B에 이펙터 분자를 공유 결합시키는 것은 '일반적인' 화학 작용기(예컨대, 에테르 결합)에 의해서뿐만 아니라, 예를 들어, 10개 초과 또는 20개 초과 탄소 원자를 포함하는 링커 L_E 를 생성하는, 일반적으로 긴 사슬 길이를 갖는 "클릭 화학" 유형 링커를 통해 이루어질 수 있다. 적합한 이펙터 모이어티 링커 L_E 및 연관된 커플링 반응은 핸드북 [Hermanson, Greg T. *Bioconjugate techniques*. Academic press, 2013]에 기재되어 있다.

[0100] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 이펙터 모이어티 링커 L_E 는 전형적으로 GalNAc 또는 가교 모이어티 B에 공유 결합된 적어도 제1 전구체 L_{E1} 과 이펙터 모이어티에 공유 결합된 제2 전구체 L_{E2} 사이의 커플링 반응(예를 들어, "클릭 화학" 유형)의 결과일 것이다. 이 원리는 화학식 II의 화합물에 대한 하기 반응식에 설명되어 있다:

[0101] [화학식 V] [화학식 VI] [화학식 II]

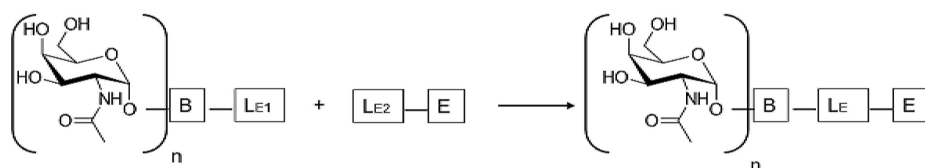


[0102]

[0103] 여기서 L_E 는 이펙터 모이어티 링커이고, L_{E1} 은 GalNAc에 공유 결합된 이펙터 모이어티 링커 L_E 의 전구체이고, L_{E2} 는 이펙터 모이어티에 공유 결합된 이펙터 모이어티 링커 L_E 의 전구체이고, E 는 이펙터 모이어티이다.

[0104] 화학식 III의 화합물에 대한 상응하는 반응식은 다음과 같다:

[0105] [화학식 VII] [화학식 VI] [화학식 III]

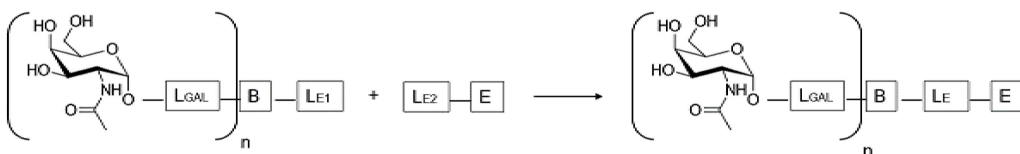


[0106]

[0107] 여기서 L_E 는 이펙터 모이어티 링커이고, L_{E1} 은 GalNAc에 공유 결합된 이펙터 모이어티 링커 L_E 의 전구체이고, L_{E2} 는 이펙터 모이어티에 공유 결합된 이펙터 모이어티 링커 L_E 의 전구체이고, n 은 3 또는 4 이상의 정수이고, 바람직하게는 n 은 3이고, B 는 가교 모이어티이고, E 는 이펙터 모이어티이다.

[0108] 화학식 IV의 화합물에 대한 상응하는 반응식은 다음과 같다:

[0109] [화학식 VIII] [화학식 VI] [화학식 IV]



[0110]

[0111] 여기서 L_E 는 이펙터 모이어티 링커이고, L_{E1} 은 GalNAc에 공유 결합된 이펙터 모이어티 링커 L_E 의 전구체이고, L_{E2} 는 이펙터 모이어티에 공유 결합된 이펙터 모이어티 링커 L_E 의 전구체이고, n 은 3 또는 4 이상의 정수이고, 바람직하게는 n 은 3이고, E 는 이펙터 모이어티이고, L_{GAL} 은 GalNAc 링커이고, B 는 가교 모이어티이다.

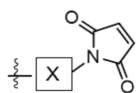
[0112] 이펙터 모이어티 링커 L_E 는 GalNAc 또는 가교 모이어티에 공유 결합된 적어도 제1 전구체 L_{E1} 과 이펙터 모이어티에 공유 결합된 제2 전구체 L_{E2} 사이의 커플링 반응의 결과일 수 있고, 커플링 반응은 예를 들어 아지드-알킨 고리첨가, 티올 말레이미드 커플링, staudinger 반응, 변형된 헥테로사이클릭 친전자체(예컨대, 아지리딘, 에폭사이드, 사이클릭 설페이트, 아지리디늄 이온, 에피설포늄 이온)의 친핵성 개환, 비알돌 유형의 카르보닐 반응(예컨대, 우레아, 티오우레아, 하이드라존, 옥심 에테르, 아마이드 또는 방향족 헥테로사이클 형성) 또는 탄소-탄소 이중 결합에 대한 첨가(예컨대, 에폭시화, 아지리딘화, 디하이드록실화, 설펜틸 할라이드 첨가, 니트로실 할라

이드 첨가 또는 마이클 첨가)이고, 바람직하게는 커플링 반응은 아지드-알킨 고리첨가, 티올 말레이미드 커플링, staudinger 반응, 변형된 헤테로사이클릭 친전자체의 친핵성 개환이고, 보다 바람직하게는 커플링 반응은 아지드-알킨 고리첨가 또는 티올 말레이미드 커플링이다.

[0113] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 이펙터 모이어티 링커 L_E 는 석신이미드 티오에테르 모이어티를 포함한다. 이러한 석신이미드 티오에테르는 예를 들어 N-치환된 말레이미드와 티올 또는 설프하이드릴 함유 화합물 사이의 티올 말레이미드 커플링의 결과이다. 이 티올 말레이미드 커플링은 생체접합 분야에서 일반적으로 알려진 '클릭' 화학 도구이며 예를 들어 문헌[Hermanson, Greg T. *Bioconjugate techniques*. Academic press, 2013, 289페이지]에 기재되어 있다. 결과적으로, 이펙터 모이어티 링커 L_E 는 GalNAc 또는 가교 모이어티에 공유 결합된 제1 전구체 L_{E1} (이는 N-치환된 말레이미드를 포함함); 및 이펙터 모이어티에 공유 결합된 제2 전구체 L_{E2} (이는 티올 또는 이의 전구체를 포함함) 사이의 커플링 반응의 결과인 것이 바람직하다. 적합한 티올 전구체는 디설파이드이고, 이는 상응하는 티올로의 환원을 통해 (예를 들어, 제자리에서) 절단될 수 있다.

[0114] 화학식 V, VII 또는 VIII의 화합물에 존재하는 전구체 L_{E1} 에 대한 바람직한 구조는 하기 말단 N-치환된 말레이미드이다:

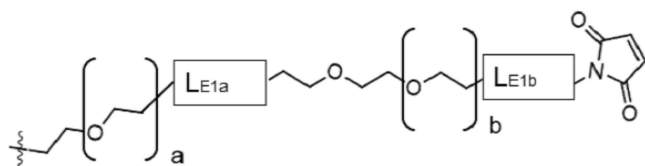
[0115] [화학식 IX]



[0116] 여기서 X는 말단 N-치환 말레이미드를 GalNAc 또는 가교 모이어티 B에 공유 결합시키기에 적합한 임의의 링커를 나타낸다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, X는 GalNAc 또는 가교 모이어티에 공유 결합된 제1 모이어티 및 말레이미드에 공유 결합된 제2 모이어티 사이의 커플링 반응의 결과일 수 있다. X는 하이드라존 및/또는 1,2,3-트리아졸을 포함할 수 있다. 본 출원의 링커와 관련하여 1,2,3-트리아졸을 언급할 때마다 이는 바람직하게는 1H-1,2,3-트리아졸을 의미한다.

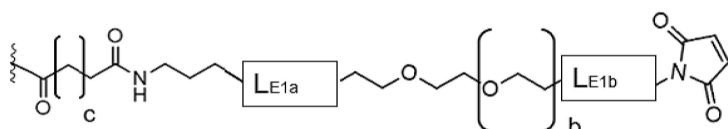
[0118] 화학식 V, VII 또는 VIII의 화합물에 존재하는 전구체 L_{E1} 에 대한 구조의 구현예는 기 말단 N-치환된 말레이미드이다:

[0119] [화학식 X]



[0120] 여기서 a 및 b는 각각 독립적으로 0 이상의 정수를 나타내고, 바람직하게는 a 및 b는 각각 독립적으로 0, 1, 2 및 3으로부터 선택된 정수를 나타내고, 보다 바람직하게는 a 및 b는 2를 나타내고, L_{E1a} 는 하이드라존 및/또는 1,2,3-트리아졸을 나타내고, 바람직하게는 1,2,3-트리아졸이고, L_{E1b} 는 하이드라존 및/또는 1,2,3-트리아졸을 나타내고, 바람직하게는 하이드라존을 나타내고;

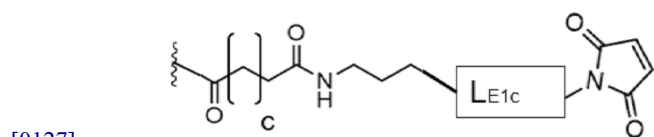
[0122] [화학식 XI]



[0123] 여기서 b 및 c는 각각 독립적으로 0 이상의 정수를 나타내고, 바람직하게는 b는 0, 1, 2 및 3로부터 선택된 정수를 나타내고 c는 5~15 범위의 정수를 나타내고, 보다 바람직하게는 b는 2를 나타내고, c는 9를 나타내고, L_{E1a} 는 하이드라존 및/또는 1,2,3-트리아졸을 나타내고, 바람직하게는 1,2,3-트리아졸을 나타내고, L_{E1b} 는 하이드라존 및/또는 1,2,3-트리아졸을 나타내고, 바람직하게는 하이드라존을 나타내고;

[0125] 및

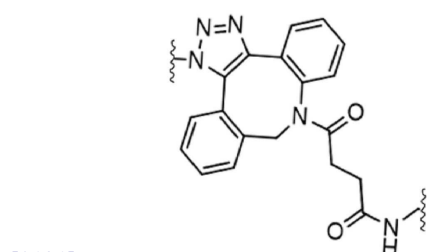
[0126] [화학식 XII]



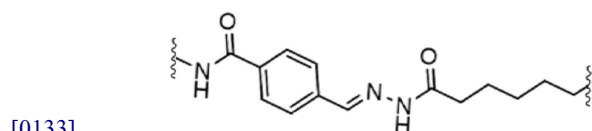
[0128] 여기서 c는 0 이상의 정수를 나타내고, 바람직하게는 c는 5 내지 15 범위의 정수를 나타내고, 보다 바람직하게는 c는 9를 나타내고, L_{E1c}는 하이드라존 및/또는 1,2,3-트리아졸을 나타내고, 바람직하게는 1,2,3-트리아졸을 나타낸다.

[0129] L_{E1a}, L_{E1b} 및 L_{E1c}는 각각 바람직하게는 20개 미만의 탄소 원자를 포함하고, 더욱 바람직하게는 L_{E1a}, L_{E1b} 및 L_{E1c}는 각각 독립적으로 화학식 XIII, XIV 또는 XV에 따른 모이어티를 나타내고, 바람직하게는 L_{E1a}는 화학식 XIII의 1,2,3-트리아졸이고, L_{E1b}는 화학식 XIV의 하이드라존이고, L_{E1c}는 화학식 XV의 1,2,3-트리아졸이다:

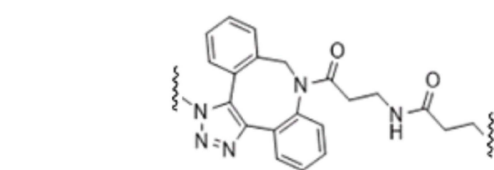
[0130] [화학식 XIII]



[0132] [화학식 XIV]



[0134] [화학식 XV]



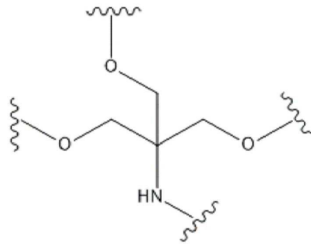
[0136] 따라서, 일부 구현예에서 접합체는 본원에 기재된 바와 같은 화학식 II, III 또는 IV의 화합물이고, 이펙터 모이어티 링커 L_E는 화학식 V, VII 또는 VIII의 화합물과 화학식 VI의 화합물 사이의 커플링 반응의 결과이고, 제 1 전구체 L_{E1}은 화학식 X, XI 또는 XII의 말단 N-치환된 말레이미드이고, L_{E1a}는 예를 들어 화학식 XIII의 1,2,3-트리아졸이고, L_{E1b}는 예를 들어 화학식 XIV의 하이드라존이고, L_{E1c}는 예를 들어 화학식 XV의 1,2,3-트리아졸이다.

[0137] 접합체 - 가교 모이어티 B

[0138] 화학식 III 또는 IV의 화합물에 존재하는 가교 모이어티 B는 2개 이상의 GalNAc 모이어티, 바람직하게는 3개의 GalNAc 모이어티 및 이펙터 모이어티 링커 L_E를 공유 결합시키기에 적합한 임의의 모이어티를 나타낸다.

[0139] 바람직한 구현예에 따르면, 가교 모이어티 B는 화학식 XV의 화합물이다:

[0140] [화학식 XV]



[0141]

[0142] 여기서 화학식 XV의 화합물의 산소 원자는 GalNAc(화학식 III의 화합물에 상응함) 또는 GalNAc 링커 L_{GAL} (화학식 IV의 화합물에 상응함)에 결합되고, 화학식 XV의 화합물의 질소 원자는 이펙터 모이어티 링커 L_E 에 결합된다.

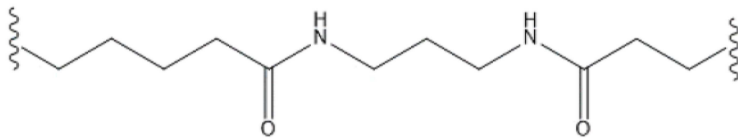
[0143] 당업자는 가교 모이어티 B가 화학식 XV의 화합물인 화학식 III 또는 IV의 이러한 화합물이 접합체에 상응하고, 여기서 ASGPR 리간드는 (GalNAc)₃Tris로 구성된다는 점을 이해할 것이다.

[0144] *접합체 - 링커 L_{GAL}*

[0145] GalNAc 링커 L_{GAL} 은 화학식 IV에서와 같이 GalNAc을 가교 모이어티에 공유적으로 결합시키기에 적합한 임의의 화학적 모이어티를 나타낸다. 링커의 정체 및 크기는 특별히 제한되지 않는다.

[0146] 구현예에 따르면, GalNAc 링커 L_{GAL} 은 각각 2~25개의 탄소 원자, 바람직하게는 7~15개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 11개의 탄소 원자를 포함한다. 바람직하게는 GalNAc 링커 L_{GAL} 은 적어도 하나, 바람직하게는 2개의 아미드 모이어티를 포함한다. 특히 바람직한 GalNAc 링커 L_{GAL} 은 화학식 XVI에 따른 화합물이다:

[0147] [화학식 XVI]



[0148]

[0149] *접합체 - 이펙터 모이어티*

[0150] 일 구현예는 본 발명의 억제학적 조합물로서, 이펙터 분자는 약물 분자와 같은 소분자, 단백질 독소와 같은 독소, BNA와 같은 올리고뉴클레오타이드, 제노 핵산 또는 siRNA, 효소, 펩티드, 또는 이들의 임의의 조합 중 적어도 하나를 포함하거나 이로 구성되고, 바람직하게는, 이펙터 분자는 독소, 효소 또는 올리고뉴클레오타이드이다. 본 발명에 따르면, 이펙터 분자는 표면에 ASGPR을 발현하는 세포 내부에서 생물학적 효과를 발휘할 수 있고, 이펙터 분자가 일단 세포 내부, 바람직하게는 세포질액 내부, 즉 이펙터 분자에 대한 표적이 존재하는 세포 내부의 위치에 전달되면 생물학적 효과를 발휘할 수 있도록 세포 내부에, 예를 들어, 상기 세포의 세포질액에 이펙터 분자에 대한 결합 파트너를 포함하는 분자이다.

[0151] 일 구현예는 본 발명의 억제학적 조합물로서, ASGPR에 대한 리간드, 특히 ASGPR1에 대한 리간드 및 이펙터 분자(바람직하게는 독소 또는 올리고뉴클레오타이드)는, 바람직하게는 적어도 하나의 링커를 통해, 공유 결합을 통해 접합된다. ASGPR에 대한 리간드, 예컨대, (GalNAc)₃Tris의 이펙터 분자, 예컨대, BNA 또는 siRNA 또는 단백질 독소 등에 대한 커플링에 적합한 이러한 링커는 본원의 위에서 상술되어 있다.

[0152] 일 구현예는 본 발명의 억제학적 조합물로서, 이펙터 분자는 다음 중 임의의 하나 이상으로부터 선택되는 올리고뉴클레오타이드이다: 짧은 간섭 RNA(siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 항-헤어핀-형상 마이크로RNA(miRNA), 단일 가닥 RNA, 앵타머 RNA, 이중 가닥 RNA(dsRNA), 항-마이크로RNA(항-miRNA, 항-miR), 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO), mRNA, DNA, 안티센스 DNA, 잠금 핵산(LNA), 가교 핵산(BNA), 2'-O,4'-아미노에틸렌 가교 핵산(BNA^{NC}), BNA 기반 siRNA 및 BNA 기반 안티센스 올리고뉴클레오타이드(BNA-AON). 전술한 바와 같이, 표적 결합 파트너가 본 발명의 접합체에 포함된 리간드에 대한 수용체, 즉 ASGPR을 발현하는 세포 내부에 존재하는 임의의 이펙터 분자는, 본 발명의 접합체 내로의 혼입을 위해 적합하게 선택된다. 따라서, 예를 들어 표면에서 ASGPR을

노출하는 세포에 존재하는 유전자, mRNA 등을 표적화할 수 있는 ASO, siRNA 또는 BNA는 본 발명의 집합체에 혼입하기에 적합한 후보이다.

[0153] 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물로서, 이펙터 분자는 다음 중 임의의 하나로부터 선택되는 올리고뉴클레오타이드이다: 항-miRNA, BNA-AON 또는 siRNA, 예컨대, BNA 기반 siRNA, 바람직하게는 화학적으로 변형된 siRNA, 대사적으로 안정한 siRNA 및 화학적으로 변형되고 대사적으로 안정한 siRNA로부터 선택되는 BNA 기반 siRNA와 같은 siRNA. 이러한 화학적으로 변형된 및/또는 대사적으로 안정한 siRNA 모이어티는 당해 분야에 공지되어 있고, ASGPR에 대한 리간드에 대한 커플링에 적합하다.

[0154] 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물로서, 이펙터 분자는 HSP27, 아포지단백 B(apoB), 트랜스티레틴(TTR), 전단백질 전환효소 서브틸리신/켄신 9형(PCSK9), 델타-아미노레불리네이트 합성효소 1(ALAS1), 안티트롬빈 3(AT3), 글리콜레이트 산화효소(GO), 보체 성분 C5(CC5), B형 간염 바이러스(HBV)의 X 유전자, HBV의 S 유전자, 알파-1 항트립신(AAT) 및 젓산 탈수소효소(LDH)의 유전자 중 임의의 하나를 침묵시킬 수 있고/있거나 비정상적인 miRNA를 표적화할 수 있는 올리고뉴클레오타이드이다. 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물로서, 이펙터 분자는 세포 내부에 존재할 때 아포지단백 B(apoB), 트랜스티레틴(TTR), 전단백질 전환효소 서브틸리신/켄신 9형(PCSK9), 델타-아미노레불리네이트 합성효소 1(ALAS1), 안티트롬빈 3(AT3), 글리콜레이트 산화효소(GO), 보체 성분 C5(CC5), B형 간염 바이러스(HBV)의 X 유전자, HBV의 S 유전자, 알파-1 항트립신(AAT) 및 젓산 탈수소효소(LDH)의 유전자 중 임의의 하나를 침묵시킬 수 있는 올리고뉴클레오타이드이고/있거나, 이펙터 분자는 세포 내부에 존재할 때 비정상적인 miRNA를 표적화할 수 있다. 본 발명에 따르면, 세포 표면에서 ASGPR을 발현하는 세포에 존재하는 임의의 유전자 또는 mRNA는 본 발명의 집합체에 포함된 이펙터 분자에 의해 효과적으로 표적화될 수 있으며, 여기서 이펙터 분자는 예를 들어, 본 발명에 따른 사포닌과 함께 유전자, mRNA 발현(수준), 유전자의 침묵화 등의 변형을 필요로 하는 대상체에게 공동 투여될 때 예를 들어, BNA, siRNA, ASO 등이다. 사포닌의 영향 하에서, 이펙터 분자 및 ASGPR에 대한 리간드를 포함하는 집합체의 치료 창이 넓어져, 표적 세포가 사포닌 또는 사포닌 유도체의 부재 하에 집합체에 노출될 때 달성되는 것보다 더 낮은 유효 용량에서, 표적 세포 내부에서 이펙터 분자의 더 강한 생물학적 효과를 초래하고/하거나 이펙터의 생물학적 효과를 초래한다. 본 발명에 따르면, ASGPR을 발현하는 표적 세포를 사포닌 또는 사포닌 유도체와 함께 ASGPR에 대한 리간드 및 이펙터 분자를 포함하는 집합체와 접촉시키는 것은 이펙터 분자의 세포내 활성에 관한 역치를 극복하게 할 수 있다. 예를 들어, 사포닌의 부재 하에 표적 세포의 세포질액에서 충분히 많은 양의 이펙터 분자에 도달하는 데 필요한 집합체의 용량은 이펙터 분자를 이용한 이러한 치료를 필요로 하는 환자에게 안전하게 투여하기에는 너무 높을 수 있다. 사포닌의 존재 하에, 이펙터 분자는 더 낮은 용량에서 ASGPR을 발현하는 표적 세포의 세포질액에서 생물학적 효과를 이미 발휘할 수 있으며, 이러한 낮은 용량은 사포닌의 부재 하에서 표적 세포가 이러한 낮은 용량에 노출될 때 세포 내부에 어떠한 영향도 미치지 않는다. 예를 들어, (첨부된 실시예 2 및 도 11에 도시된 바와 같이) (간) 세포에서 HSP27을 침묵시키기 위한 BNA는 ASGPR에 대한 GalNAc 리간드와 BNA의 집합체가 ASGPR 보유 세포와 접촉되었을 때 ASGPR 보유 세포 내부에서 HSP27을 침묵시키지 않은 반면, 사포닌 또는 사포닌 유도체, 예를 들어, 사포닌의 아글리콘에서 알데히드기에 접합된 링커 EMCH를 갖는 사포닌의 존재 하에, 동일한 세포가 동일하거나 더 낮은 용량의 집합체와 접촉되었을 때, HSP27은 표적 세포에서 효과적으로 침묵화되었다. 따라서, 본 발명자들은 이제 분자, 약제학적 조합물, 약제학적 조성물 및 이러한 분자, 조합물 및 조성물로 (인간) 대상체를 치료하는 방법을 제공하여, 이펙터 분자가 이를 필요로 하는 환자에게 더 낮은 용량으로 투여될 수 있도록 하거나, 개선된 치료 창을 갖는 이펙터 분자가 투여되어, 이펙터 분자가 본 발명에 따른 집합체에 대한 표적 세포에서 세포내 표적에 도달하면 개선된 치료 효과를 야기할 수 있게 한다.

[0155] 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물로서, 이펙터 분자는 예를 들어 포유동물 세포 내부에 존재할 때 HSP27, apoB, TTR, PCSK9, ALAS1, AT3, GO, CC5, HBV의 X 유전자의 발현 산물, HBV의 S 유전자의 발현 산물, AAT 및 LDH 단백질 중 임의의 하나의 발현에 관련된 mRNA를 표적화할 수 있거나, 또는 예를 들어, 포유동물 세포 내부에 존재할 때 miRNA 기능을 길항 또는 복원, 예컨대, 종양형성 miRNA(onco-miR)를 억제 또는 onco-miR의 발현 억제를 억제할 수 있는 올리고뉴클레오타이드이다. 이러한 단백질은 일반적으로 예를 들어, 이러한 단백질의 발현에 관여하는 유전자의 침묵화가 사포닌 및, ASGPR에 대한 리간드 및 이러한 단백질 중 임의의 하나의 발현에 관여하는 mRNA를 표적화할 수 있는 이펙터 분자를 포함하는 집합체의 조합으로 치료된 환자의 이익에 대해 질환 또는 질환 증상의 완화를 초래하는 질환에 관여한다. 따라서, 사포닌을 포함하는 본 발명의 조합물 및 조성물이 RNAi 기반 치료 요법에 포함시키기에 적합하다는 점은 본 발명의 일부이다. RNAi는 mRNA를 절단하거나 mRNA 번역을 억제하여 표적 유전자 침묵화를 가능하게 한다. 사포닌은 RNAi 요법을 위해 선택되고 ASGPR을 발현하는 표적 세포가 본원에 기재된 바와 같은 집합체 및 사포닌과 접촉될 때 이펙터 분자의 세포질액 전달을 개선함으로써

써 유전자 침묵화 이펙터 분자를 강화하는 데 도움을 준다.

[0156] 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물이며, 이펙터 분자는 적어도 하나의 단백질성 분자를 포함하거나 이로 구성된 독소이고, 적어도 하나의 단백질성 분자는 바람직하게는 펩티드, 단백질, 효소, 예컨대, 우레아제 및 Cre-재조합효소, 단백질성 독소, 리보솜 불활성화 단백질, 표 A5로부터 선택된 단백질 독소 및/또는 박테리아 독소, 식물 독소 중 임의의 하나 이상으로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 아폴틴과 같은 바이러스 독소; 박테리아 독소, 예컨대, 시가(Shiga) 독소, 시가 유사 독소, 녹농균 외독소(PE) 또는 PE의 외독소 A, 전장 또는 절단된 디프테리아 독소(DT), 콜레라 독소; 진균 독소, 예컨대, 알파-사르신; 리보솜 불활성화 단백질 및 2형 리보솜 불활성화 단백질의 A 사슬을 포함하는 식물 독소, 예컨대, 다이안틴, 예를 들어, 다이안틴-30 또는 다이안틴-32, 사포린, 예를 들어, 사포린-S3 또는 사포린-S6, 부가닌 또는 부가닌의 탈면역 유도체 테부가닌, 시가 유사 독소 A, 포크위드(pokeweed) 항바이러스 단백질, 리신, 리신 A 사슬, 모데신, 모데신 A 사슬, 아브린, 아브린 A 사슬, 볼켄신, 볼켄신 A 사슬, 비스쿠민, 비스쿠민 A 사슬; 또는 동물 또는 인간 독소, 예컨대, 개구리 RNase, 또는 인간으로부터의 그랜자임 B 또는 안지오게닌, 또는 이의 임의의 단편 또는 유도체 중 임의의 하나 이상으로부터 선택되고; 바람직하게는 단백질 독소는 다이안틴 및/또는 사포린이고/이거나, 리보솜 표적화 독소, 신장 인자 표적화 독소, 튜불린 표적화 독소, DNA 표적화 독소 및 RNA 표적화 독소 중 적어도 하나를 포함하거나 이로 구성되며, 더욱 바람직하게는 엠탄신, 파수도독소, 메이탄시노이드 유도체 DM1, 메이탄시노이드 유도체 DM4, 모노메틸 올리스타틴 E(MMAE, 베도틴), 모노메틸 올리스타틴 F(MMAF, 마포도틴), 칼리케아미신, N-아세틸- γ -칼리케아미신, 피롤로벤조디아제핀(PBD) 이량체, 벤조디아제핀, CC-1065 유사체, 듀오카르마이신, 독소루비신, 파클리탁셀, 도세탁셀, 시스플라틴, 시클로포스파미드, 에토포사이드, 도세탁셀, 5-플루오로우라실(5-FU), 미톡산트론, 투볼라이신, 인돌리노벤조디아제핀, AZ13599185, 크립토피신, 리족신, 메토타렉세이트, 안트라사이클린, 캄프토테신 유사체, SN-38, DX-8951f, 엑사테칸 메실레이트, 절단된 형태의 녹농균 외독소(PE38), 듀오카르마이신 유도체, 아마니틴, α -아마니틴, 스플라이스오스타틴, 타일란스타틴, 오조가미신, 테시린, 엠버스타틴269 및 소라브탄신, 또는 이의 유도체 중 임의의 하나 이상을 포함하거나 이로 구성된다. 본 발명자들은 펩티드 및 단백질과 같은 이펙터 분자의 세포질액 전달에 대해서라면, 접합체의 일부인 이러한 이펙터 분자가 사포닌 또는 사포닌 유도체의 존재 하에 ASGPR을 발현하는 표적 세포와 접촉될 때, 본 발명의 조합물 및 본 발명의 조성물이 ASGPR 리간드 및 이펙터 분자의 접합체에 포함될 때 핵산 기반 이펙터 분자의 개선된 전달에 동등하게 적합하다는 것을 규명하였다. 예를 들어, 본 발명에 따라, 이펙터 분자, 즉 단백질 독소 및 ASGPR 용 리간드를 포함하는 접합체 및 사포닌과 표적 세포를 접촉시킬 때 단백질 독소에 대한 치료 창이 넓어진다. 독소는 표적 세포가 사포닌 및 독소를 포함하는 접합체에 노출될 때, 사포닌 또는 사포닌 유도체의 부재 하에서 동일한 독소 용량에서 또는 동일한 더 낮은 독소 용량에서 달성되는 세포내 효과에 비해, 더 높은 정도로 또는 더 낮은 용량에서 세포내 효과를 발휘한다.

[0157] 사포닌

[0158] 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물로서, 사포닌은 다음으로 구성된 군(본원에서 '그룹 C'로 지칭됨)으로부터 선택된 아글리콘 코어 구조를 포함한다:

[0159] 2알파-하이드록시 올레아놀산;

[0160] 16알파-하이드록시 올레아놀산;

[0161] 헤데라게닌 (23-하이드록시 올레아놀산);

[0162] 16알파,23-디하이드록시 올레아놀산;

[0163] 집소게닌;

[0164] 퀴라산;

[0165] 프로토에시게닌-21(2-메틸부트-2-에노에이트)-22-아세테이트;

[0166] 23-옥소-바링토게놀 C-21,22-비스(2-메틸부트-2-에노에이트);

[0167] 23-옥소-바링토게놀 C-21(2-메틸부트-2-에노에이트)-16,22-디아세테이트;

[0168] 디지토게닌;

[0169] 3,16,28-트리하이드록시 올레아난-12-엔;

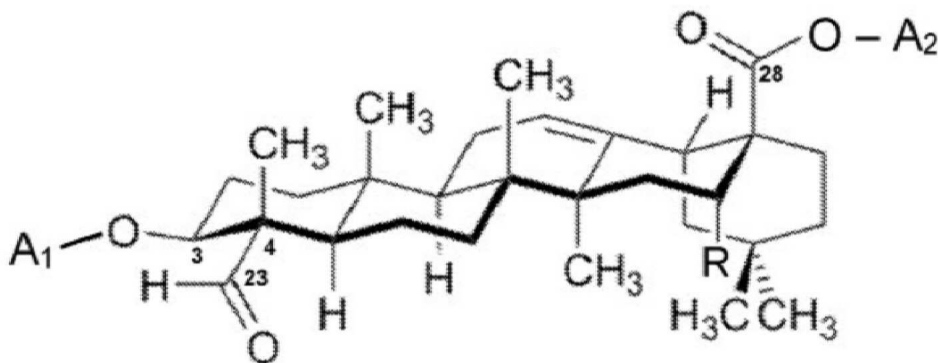
- [0170] 집소겐산,
- [0171] 및
- [0172] 이의 유도체,
- [0173] 바람직하게는 사포닌은 켈라산 및 집소겐산 또는 이의 유도체로부터 선택되는 아글리콘 코어 구조를 포함하고, 보다 바람직하게는 사포닌 아글리콘 코어 구조는 켈라산 또는 이의 유도체이다. 이러한 바람직한 아글리콘은 C-4 원자에서 알데히드 기를 포함한다. 임의의 이론에 구애받지 않으면서, 이러한 알데히드 기, 또는 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같은 이의 유도체는 그룹 C로부터 선택된 아글리콘, 특히 켈라지산 및 집소겐산을 포함하는 트리테르펜 글리코시드 유형의 사포닌의 엔도솜 탈출 증진 활성화에 기여한다.
- [0174] 일 구현예는 본 발명의 사포닌 접합체이고, 적어도 하나의 사포닌은 위치 C-4에 알데히드 기를 갖는 12,13-데하이드로올레아난 유형에 속하고 선택적으로 사포닌의 C-3베타-OH 기에서 탄수화물 치환체 내의 글루쿠론산 기를 포함하는 모노-데스모시드 또는 비-데스모시드 트리테르펜 사포닌이고, 바람직하게는 위치 C-4에 알데히드 기를 갖는 12,13-데하이드로올레아난의 유형에 속하고 사포닌의 C-3베타-OH 기에서 탄수화물 치환체 내의 글루쿠론산 기를 포함하는 비-데스모시드 트리테르펜 사포닌이다.
- [0175] 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물로서,
- [0176] · 사포닌은 하기 그룹 A로부터 선택되는 아글리콘 코어 구조에 결합된 당류 사슬을 포함한다:
- [0177] GlcA-,
- [0178] Glc-,
- [0179] Gal-,
- [0180] Rha-(1→2)-Ara-,
- [0181] Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-,
- [0182] Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-,
- [0183] Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-,
- [0184] Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-,
- [0185] Glc-(1→3)-Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal-,
- [0186] Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-,
- [0187] Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
- [0188] Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
- [0189] Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
- [0190] Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
- [0191] Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
- [0192] Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
- [0193] Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
- [0194] Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
- [0195] Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
- [0196] Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
- [0197] Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
- [0198] Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
- [0199] Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,

- [0200] Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
- [0201] Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
- [0202] Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-, 및
- [0203] 이의 유도체,
- [0204] 또는
- [0205] · 사포닌은 하기 그룹 B로부터 선택되는 아글리콘 코어 구조에 결합된 당류 사슬을 포함한다:
- [0206] Glc-,
- [0207] Gal-,
- [0208] Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-,
- [0209] Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-,
- [0210] Ara-,
- [0211] Xyl-,
- [0212] Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R1-(→4)]-Fuc- (R1은 4E-메톡시신남산임),
- [0213] Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R2-(→4)]-Fuc- (R2는 4Z-메톡시신남산임),
- [0214] Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-,
- [0215] Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-디-OAc-Fuc-,
- [0216] Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R3-(→4)]-3-OAc-Fuc- (R3은 4E-메톡시신남산임),
- [0217] Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-,
- [0218] Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-,
- [0219] (Ara- 또는 Xyl-)(1→3)-(Ara- 또는 Xyl-)(1→4)-(Rha- 또는 Fuc-)(1→2)-[4-OAc-(Rha- 또는 Fuc-)(1→4)]-(Rha- 또는 Fuc-),
- [0220] Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-,
- [0221] Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
- [0222] Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
- [0223] Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
- [0224] Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-,
- [0225] Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R4-(→4)]-Fuc- (R4는 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임),
- [0226] Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R5-(→4)]-Fuc- (R5는 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임),
- [0227] Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-,
- [0228] Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-,
- [0229] 6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-,
- [0230] Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-,
- [0231] Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-,
- [0232] Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-,

- [0233] $\text{Glc}-(1\rightarrow3)\text{-Xyl}-(1\rightarrow4)\text{-Rha}-(1\rightarrow2)\text{-[Xyl}-(1\rightarrow3)\text{-4-OAc-Qui}-(1\rightarrow4)]\text{-Fuc-}$,
- [0234] $\text{Xyl}-(1\rightarrow3)\text{-Xyl}-(1\rightarrow4)\text{-Rha}-(1\rightarrow2)\text{-[3,4-디-OAc-Qui}-(1\rightarrow4)]\text{-Fuc-}$,
- [0235] $\text{Glc}-(1\rightarrow3)\text{-[Xyl}-(1\rightarrow4)]\text{-Rha}-(1\rightarrow2)\text{-Fuc-}$,
- [0236] $6\text{-OAc-Glc}-(1\rightarrow3)\text{-[Xyl}-(1\rightarrow4)]\text{-Rha}-(1\rightarrow2)\text{-Fuc-}$,
- [0237] $\text{Glc}-(1\rightarrow3)\text{-[Xyl}-(1\rightarrow3)\text{-Xyl}-(1\rightarrow4)]\text{-Rha}-(1\rightarrow2)\text{-Fuc-}$,
- [0238] $\text{Xyl}-(1\rightarrow3)\text{-Xyl}-(1\rightarrow4)\text{-Rha}-(1\rightarrow2)\text{-[Xyl}-(1\rightarrow3)\text{-4-OAc-Qui}-(1\rightarrow4)]\text{-Fuc-}$,
- [0239] $\text{Api/Xyl}-(1\rightarrow3)\text{-Xyl}-(1\rightarrow4)\text{-[Glc}-(1\rightarrow3)]\text{-Rha}-(1\rightarrow2)\text{-[Rha}-(1\rightarrow3)]\text{-4OAc-Fuc-}$,
- [0240] $\text{Api}-(1\rightarrow3)\text{-Xyl}-(1\rightarrow4)\text{-[Glc}-(1\rightarrow3)]\text{-Rha}-(1\rightarrow2)\text{-[Rha}-(1\rightarrow3)]\text{-4OAc-Fuc-}$,
- [0241] $\text{Api/Xyl}-(1\rightarrow3)\text{-Xyl}-(1\rightarrow4)\text{-[Glc}-(1\rightarrow3)]\text{-Rha}-(1\rightarrow2)\text{-[R6}-(\rightarrow4)]\text{-Fuc-}$ (R6은 5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임),
- [0242] $\text{Api/Xyl}-(1\rightarrow3)\text{-Xyl}-(1\rightarrow4)\text{-[Glc}-(1\rightarrow3)]\text{-Rha}-(1\rightarrow2)\text{-[R7}-(\rightarrow4)]\text{-Fuc-}$ (R7은 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임),
- [0243] $\text{Api/Xyl}-(1\rightarrow3)\text{-Xyl}-(1\rightarrow4)\text{-[Glc}-(1\rightarrow3)]\text{-Rha}-(1\rightarrow2)\text{-[R8}-(\rightarrow4)]\text{-Fuc-}$ (R8은 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임),
- [0244] $\text{Api}-(1\rightarrow3)\text{-Xyl}-(1\rightarrow4)\text{-Rha}-(1\rightarrow2)\text{-[R9}-(\rightarrow4)]\text{-Fuc-}$ (R9는 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임),
- [0245] $\text{Xyl}-(1\rightarrow3)\text{-Xyl}-(1\rightarrow4)\text{-Rha}-(1\rightarrow2)\text{-[R10}-(\rightarrow4)]\text{-Fuc-}$ (R10은 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임),
- [0246] $\text{Api}-(1\rightarrow3)\text{-Xyl}-(1\rightarrow4)\text{-Rha}-(1\rightarrow2)\text{-[R11}-(\rightarrow3)]\text{-Fuc-}$ (R11은 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임),
- [0247] $\text{Xyl}-(1\rightarrow3)\text{-Xyl}-(1\rightarrow4)\text{-Rha}-(1\rightarrow2)\text{-[R12}-(\rightarrow3)]\text{-Fuc-}$ (R12는 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산임)
- [0248] $\text{Glc}-(1\rightarrow3)\text{-[Glc}-(1\rightarrow6)]\text{-Gal-}$, 및
- [0249] 이의 유도체,
- [0250] 또는
- [0251] · 사포닌은 아글리콘 코어 구조에 결합된 그룹 A로부터 선택된 제1 당류 사슬을 포함하고 아글리콘 코어 구조에 결합된 그룹 B로부터 선택된 제2 당류 사슬을 포함하는 비테스모시드 트리테르펜 글리코시드이다.
- [0252] 이러한 사포닌은, 표적 세포가 사포닌 및 이펙터 분자, 예를 들어, 이펙터 분자 및 ASGPR1에 대한 리간드, 예컨대, $(\text{GalNAc})_3\text{Tris}$ 를 포함하는 본 발명에 따른 접합체의 일부인 이펙터 분자와 접촉될 때, 전형적인 엔도솜 탈출 증진 효과를 나타낸다. 그룹 C로부터 선택된 1개 또는 2개의 당류를 포함하는 이러한 선택된 사포닌의 영향 하에서, 접합체 내의 이펙터 분자는 표적 세포 내부의 이펙터 분자의 생물학적 활성이 확립되거나 증가되도록 세포내 역치 수준에 도달하거나, 또는 이펙터 분자의 활성은 사포닌의 부재 하에 동일한 수준의 활성에 필요한 용량보다 낮은 용량으로 확립될 수 있다. 표 1에 이러한 엔도솜 탈출 증진 활성을 갖는 사포닌이 요약되어 있다. 이러한 사포닌은 그룹 C의 열거된 아글리콘 코어 구조를 포함하고, 그룹 A 및/또는 그룹 B의 단당류 또는 다당류를 포함하며, 표적 세포가 이펙터 분자와 사포닌 둘 다에 노출될 때 이펙터 분자를 강화하거나, 이러한 엔도솜 탈출 증진 활성이 확인된 사포닌과 높은 구조적 유사성을 갖는 것으로 나타났다.
- [0253] 따라서, 일 구현에는 본 발명의 약제학적 조합물로서, 사포닌은 켈라자(Quillaja) 수피 사포닌, 덤사코시드 B, 사이코사포닌 A, 사이코사포닌 D, 마크란토이딘 A, 에스쿨렌토시드 A, 피토라카게닌, 에스시네이트, AS6.2, NP-005236, AMA-1, AMR, 알파-헤테린, NP-012672, NP-017777, NP-017778, NP-017774, NP-018110, NP-017772, NP-018109, NP-017888, NP-017889, NP-018108, SA1641, AE X55, NP-017674, NP-017810, AG1, NP-003881, NP-017676, NP-017677, NP-017706, NP-017705, NP-017773, NP-017775, SA1657, AG2, SO1861, GE1741, SO1542, SO1584, SO1658, SO1674, SO1832, SO1862, SO1904, QS-7, QS1861, QS-7 api, QS1862, QS-17, QS-18, QS-21 A-

apio, QS-21 A-xylo, QS-21 B-apio, QS-21 B-xylo, 베타-에스신(beta-Aescin), 에스신(Aescin) Ia, 티시드(Teaseed) 사포닌 I, 티시드사포닌 J, 아삼사포닌(Assamsaponin) F, 디지토닌(Digitonin), 프리물라산(Primula acid) 1 및 AS64R, 이의 입체이성질체, 이의 유도체 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 사포닌은 QS-21, QS-21 유도체, S01861, S01861 유도체, SA1641, SA1641 유도체, GE1741, GE1741 유도체 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 사포닌은 QS-21 유도체, S01861 유도체 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되고, 가장 바람직하게는 사포닌은 S01861 유도체이다. 본 발명자들은 이러한 유도체가 본원에 기재된 바와 같은 이펙터 분자를 포함하는 접합체와 함께 사용될 때 개선된 강화 효과를 갖는다는 것을 발견하였다. 즉, 유도체는 비유도체화된 사포닌과 유사한 엔도솜 탈출 증진 효과를 나타내면서도 더 낮은 세포 독성 및 더 낮은 용혈 활성을 나타낸다. 본 발명의 맥락에서 적합한 사포닌 유도체의 보다 상세한 구조적 세부사항은 하기에 제공된다.

- [0254] 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물로서, 사포닌은 사포닌 유도체이고,
- [0255] i. 사포닌 유도체는 유도체화된 알데히드 기를 포함하는 아글리콘 코어 구조를 포함하거나; 또는
- [0256] ii. 사포닌 유도체는 당류 사슬, 바람직하게는 본원에서 위에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 포함하고, 당류 사슬은 유도체화된 카르복실 기를 포함하거나; 또는
- [0257] iii. 사포닌 유도체는 당류 사슬, 바람직하게는 본원에서 위에서 정의된 바와 같은 그룹 B로부터 선택된 당류 사슬을 포함하고, 당류 사슬은 유도체화된 아세톡시(Me(CO)O-) 기를 포함하거나; 또는
- [0258] iv. 유도체화 i., ii. 및 iii.의 임의의 조합이 존재하고, 선택적으로 유도체화 i., ii. 및 iii. 중 2가지 유도체화의 임의의 조합이 존재한다.
- [0259] 본 발명자들은 특히 자연 발생 사포닌에 존재하는 단일 화학 기 또는 이러한 화학 기들 중 2개와 관련하여 유도체화된 사포닌이 충분한 이펙터 분자 강화 활성을 유지하면서도, 이러한 모노-유도체화 및 바이(bi)-유도체화된 사포닌의 세포독성 및 용혈 활성이 이러한 사포닌 유도체의 자연 발생 비변형 대응물의 세포독성 및 용혈 활성에 비해 크게 감소됨을 규명하였다. 본 발명에 따르면, 사포닌 및 이펙터 분자를 포함하는 접합체가 표면에서 ASGPR1을 노출하는 표적 세포와 접촉될 때 이펙터 분자 강화 효과가 확립되는 자연 발생 사포닌도 적합하다.
- [0260] 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물로서, 사포닌은 S01861, SA1657, GE1741, SA1641, QS-21, QS-21A, QS-21 A-api, QS-21 A-xyl, QS-21B, QS-21 B-api, QS-21 B-xyl, QS-7-xyl, QS-7-api, QS-17-api, QS-17-xyl, QS1861, QS1862, 퀴라자사포닌(Quillajasaponin), 사포니넘 알BUM(Saponinum album), QS-18, Quil-A, Gyp1, 집소시드(gypsoside) A, AG1, AG2, S01542, S01584, S01658, S01674, S01832, S01904, 이의 입체 이성질체, 이의 유도체 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 사포닌은 QS-21, QS-21 유도체, S01861, S01861 유도체, SA1641, SA1641 유도체, GE1741, GE1741 유도체 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 사포닌은 QS-21 유도체, S01861 유도체 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되고, 가장 바람직하게는 사포닌은 S01861 유도체이다.
- [0261] 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물로서, 사포닌은 본원에서 위에서 열거된 바와 같은 그룹 C의 퀴라산 또는 집소게닌 사포닌의 사포닌 유도체이고, 분자 1로 표시된다:



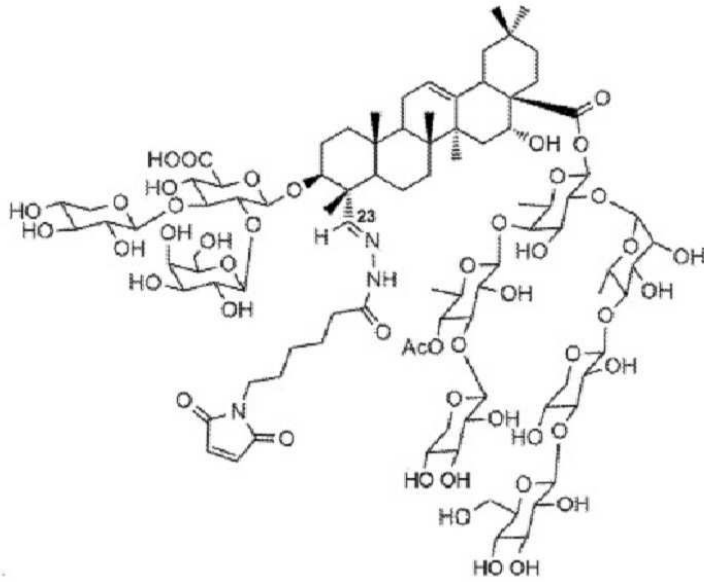
- [0262]
- [0263] (분자 1)
- [0264] 여기서

- [0265] A₁은 수소, 단당류 또는 선행 또는 분지형 올리고당을 나타내고, 바람직하게는 A₁은 본원에서 위에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고, 더욱 바람직하게는 A₁은 본원에서 위에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택되는 당류 사슬을 나타내고 A₁은 글루쿠론산 모이어티를 포함하거나 이로 구성되고;
- [0266] A₂는 수소, 단당류 또는 선행 또는 분지형 올리고당을 나타내고, 바람직하게는 A₂는 본원에서 위에서 정의된 바와 같은 그룹 B로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고, 더욱 바람직하게는 A₂는 본원에서 위에서 정의된 바와 같은 그룹 B로부터 선택되는 당류 사슬을 나타내고 A₂는 적어도 하나의 아세톡시(Me(CO)O-) 기, 예컨대, 1, 2, 3, 또는 4개의 아세톡시 기를 포함하고, A₁ 및 A₂ 중 적어도 하나는 수소가 아니고, 바람직하게는 A₁ 및 A₂ 둘 다 올리고당 사슬이고;
- [0267] R은 집소계닌에서 수소이거나 켈라산에서 하이드록실이고;
- [0268] 사포닌 유도체는 분자 1로 표시되는 사포닌에 상응하며, 다음의 유도체화 중 적어도 하나가 존재한다:
- [0269] i. 켈라산 또는 집소계닌의 위치 C₂₃의 알데히드 기가 유도체화됨;
- [0270] ii. A₁이 본원에서 위에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고 A₁이 글루쿠론산 모이어티를 포함하거나 이로 구성될 때 A₁의 글루쿠론산 모이어티의 카르복실 기가 유도체화됨;
- [0271] iii. A₂가 본원에서 위에서 정의된 바와 같은 그룹 B로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고 A₂가 적어도 하나의 아세톡시 기를 포함할 때, A₂의 하나의 당류 모이어티 또는 둘 이상의 당류 모이어티 중 하나 이상의, 바람직하게는 모든 아세톡시 기(들)가 유도체화됨.
- [0272] 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물이고, A₁은 본원에서 위에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고 글루쿠론산 모이어티를 포함하거나 이로 구성되고, A₁의 글루쿠론산 모이어티의 카르복실 기는 유도체화되었고/되었거나, A₂는 본원에서 위에서 정의된 바와 같은 그룹 B로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고 A₂는 적어도 하나의 아세톡시 기를 포함하고, A₂의 적어도 하나의 아세톡시 기는 유도체화되었다.
- [0273] 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물이고, 분자 1로 표시되는 사포닌은 비데스모시드 트리테르펜 사포닌, 즉, 비데스모시드 트리테르펜 글리코시드 유형의 사포닌이다.
- [0274] 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물이고, 사포닌 유도체는 분자 1로 표시되는 사포닌에 상응하며, 다음의 유도체화 중 적어도 하나가 존재한다:
- [0275] i. 켈라산 또는 집소계닌의 위치 C₂₃의 알데히드 기가 다음에 의해 유도체화됨;
- [0276] - 알코올로의 환원; 또는
- [0277] - N-ε-말레이미도카프로산 하이드라지드(EMCH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(이에 의해 SO1861-Ald-EMCH 또는 QS-21-Ald-EMCH와 같은 사포닌-Ald-EMCH를 제공하며, EMCH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨); 또는
- [0278] - N-[β-말레이미도프로피온산]하이드라지드(BMPH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(BMPH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨); 또는
- [0279] - N-[κ-말레이미도운데칸산] 하이드라지드(KMUH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(KMUH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨);
- [0280] ii. A₁이 본원에서 위에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고 A₁이 글루쿠론산 모이어티를 포함하거나 이로 구성되는 경우, A₁의 글루쿠론산 모이어티의 카르복실 기가 2-아미노-2-메틸-1,3-프로판디올(AMPD) 또는 N-(2-아미노에틸)말레이미드(AEM)와의 반응을 통한 아마이드 결합으로의 변환(이에 의해 사포닌-Glu-AMPD, 예컨대 QS-21-Glu-AMPD 또는 SO1861-Glu-AMPD 또는 사포닌-Glu-AEM, 예컨대 QS-21-Glu-AEM 또는 SO1861-Glu-AEM를 제공함)에 의해 유도체화됨; 및

- [0281] iii. A_2 가 본원에서 위에서 정의된 바와 같은 그룹 B로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고 A_2 가 적어도 하나의 아세톡시 기를 포함할 때, A_2 의 하나의 당류 모이어티 또는 둘 이상의 당류 모이어티 중 하나 이상의, 바람직하게는 모든 아세톡시 기(들)가 탈아세틸화에 의해 하이드록실 기($HO-$)로의 변환에 의해 유도체화됨.
- [0282] 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물이고, A_1 은 $Gal-(1\rightarrow2)-[Xyl-(1\rightarrow3)]-GlcA$ 이고/이거나 A_2 는 $Glc-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[Xyl-(1\rightarrow3)-4-OAc-Qui-(1\rightarrow4)]-Fuc$ 이고, 바람직하게는 분자 1로 표시되는 사포닌은 3-O-베타-D-갈락토피라노실-(1 $\rightarrow$ 2)-[베타-D-자일로피라노실-(1 $\rightarrow$ 3)]-베타-D-글루쿠로노피라노실 킬라산 28-O-베타-D-글루코피라노실-(1 $\rightarrow$ 3)-베타-D-자일로피라노실-(1 $\rightarrow$ 4)-알파-L-람노피라노실-(1 $\rightarrow$ 2)-[베타-D-자일로피라노실-(1 $\rightarrow$ 3)-4OAc-베타-D-키노보피라노실-(1 $\rightarrow$ 4)]-베타-D-푸코피라노시드이고, 보다 바람직하게는 S01861, GE1741, SA1641 및/또는 QS-21, 또는 이의 유도체이고, 가장 바람직하게는 S01861 또는 이의 유도체이다.
- [0283] 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물로서, 사포닌은 사포닌 유도체이고,
- [0284] i. 사포닌 유도체는 다음에 의해 유도체화된 알데히드 기를 포함하는 아글리콘 코어 구조를 포함하거나:
- [0285] - 알코올로의 환원; 또는
- [0286] - N- ϵ -말레이미도카프로산 하이드라지드(EMCH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(이에 의해 S01861-A1d-EMCH 또는 QS-21-A1d-EMCH와 같은 사포닌-A1d-EMCH를 제공하며, EMCH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨); 또는
- [0287] - N-[β -말레이미도프로피온산]하이드라지드(BMPH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(BMPH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨); 또는
- [0288] - N-[κ -말레이미도운데칸산] 하이드라지드(KMUH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(KMUH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨); 또는
- [0289] ii. 사포닌 유도체는 당류 사슬, 바람직하게는 본원에서 위에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 포함하고, 당류 사슬은 카르복실 기, 바람직하게는 2-아미노-2-메틸-1,3-프로판디올(AMPD) 또는 N-(2-아미노에틸)말레이미드(AEM)와의 반응을 통한 아미드 결합으로의 변환(이에 의해 사포닌-Glu-AMPD, 예컨대 QS-21-Glu-AMPD 또는 S01861-Glu-AMPD 또는 사포닌-Glu-AEM, 예컨대 QS-21-Glu-AEM 또는 S01861-Glu-AEM를 제공함)에 의해 유도체화된 카르복실 기, 바람직하게는 글루쿠론산 모이어티의 카르복실 기를 포함하거나; 또는
- [0290] iii. 사포닌 유도체는 당류 사슬, 바람직하게는 본원에서 위에서 정의된 바와 같은 그룹 B로부터 선택된 당류 사슬을 포함하고, 당류 사슬은 탈아세틸화에 의해 하이드록실 기($HO-$)로의 변환에 의해 유도체화된 아세톡시($Me(CO)O-$) 기를 포함하거나; 또는
- [0291] iv. 사포닌 유도체는 유도체화 i., ii. 및 iii.의 임의의 조합, 선택적으로 i., ii. 및 iii. 중 2가지 유도체화의 임의의 조합을 포함하고;
- [0292] 바람직하게는, 사포닌 유도체는 아글리콘 코어 구조를 포함하고, 아글리콘 코어 구조는 EMCH와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환에 의해 유도체화된 알데히드 기를 포함하고, EMCH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화된다.
- [0293] 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물로서, 사포닌은 사포닌 유도체이고,
- [0294] i. 사포닌 유도체는 N- ϵ -말레이미도카프로산 하이드라지드(EMCH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(이에 의해 S01861-A1d-EMCH 또는 QS-21-A1d-EMCH와 같은 사포닌-A1d-EMCH를 제공함)에 의해 유도체화된 알데히드 기를 포함하는 아글리콘 코어 구조를 포함하거나;
- [0295] ii. 사포닌은 당류 사슬, 바람직하게는 본원에서 위에서 정의된 바와 같은 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 포함하고, 당류 사슬은 카르복실 기, 바람직하게는 N-(2-아미노에틸)말레이미드(AEM)와의 반응을 통한 아미드 결합으로의 변환(이에 의해 사포닌-Glu-AEM, 예컨대 QS-21-Glu-AEM 또는 S01861-Glu-AEM를 제공함)에 의해 유도체화된 카르복실 기, 바람직하게는 글루쿠론산 모이어티의 카르복실 기를 포함하거나;
- [0296] iii. 사포닌 유도체는 유도체화 i. 및 ii.의 조합을 포함한다.
- [0297] 일 구현예는 본 발명의 약제학적 조합물이고, 사포닌 유도체는 아글리콘 코어 구조를 포함하고, 아글리콘 코어 구조는 알데히드 기를 포함하고, 사포닌 유도체는 당류 사슬, 바람직하게는 본원에서 위에서 정의된 바와 같은

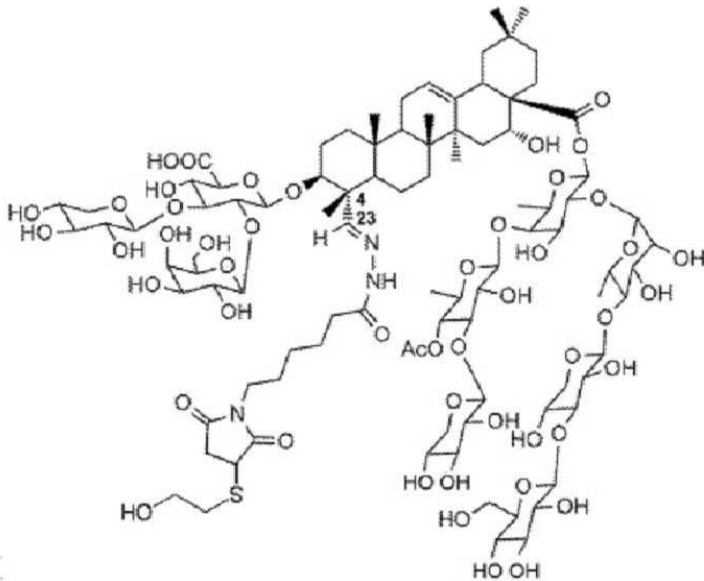
그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 포함하고, 당류 사슬은 카르복실 기, 바람직하게는 글루쿠론산 모이어티의 카르복실 기를 포함하고, 글루쿠론산 모이어티는 N-(2-아미노에틸)말레이미드(AEM)와의 반응을 통한 아미드 결합으로의 변환에 의해 유도체화되었다.

[0298] 일 구현에는 본 발명의 약제학적 조합물로서, 사포닌 유도체는 분자 2로 표시되는 사포닌 유도체이거나:



(분자 2)

[0299]
[0300] 사포닌 유도체는 분자 3으로 표시되는 사포닌 유도체이다:



(분자 3).

[0301]

표 A1. (후기) 엔도솜/리소좀 탈출 증진 활성을 나타내는 사포닌 및 (후기) 엔도솜/리소좀 탈출 증진 활성을 나타내는 이러한 사포닌을 연상시키는 구조를 포함하는 사포닌			
사포닌 명칭	아글리콘 코어	C-3 베타-OH 기에서의 탄수화물 치환체	C-28-OH 기에서의 탄수화물 치환체
NP-005236	2 알파-하이드록시올레아놀산	GlcA-	Glc/Gal-
AMA-1	16 알파-하이드록시올레아놀산	Glc-	Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-
AMR	16 알파-하이드록시올레아놀산	Glc-	Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-
알파-헤 데린	헤데라게닌 (23-하이드록시올레아놀산)	Rha-(1→2)-Ara-	-
NP-012672	16 알파, 23-디하이드록시올레아놀산	Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-Glc/Gal-(1→2)-Rha/Fuc-(1→2)-GlcA-	Ara/Xyl-

[0302]

NP-017777	집소계닌	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 4E-페톡시신남산)
NP-017778	집소계닌	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 4Z-페톡시신남산)
NP-017774	집소계닌	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-018110 ² , NP-017772 ²	집소계닌	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-di-OAc-Fuc-
NP-018109	집소계닌	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-3-OAc-Fuc- (R = 4E-페톡시신남산)
NP-017888	집소계닌	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-017889	집소계닌	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-018108	집소계닌	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Ara/Xyl-(1→3)-Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-[4-OAc-Rha/Fuc-(1→4)]-Rha/Fuc-
SA1641*, AE X55 ²	집소계닌	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
NP-017674	펄라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
NP-017810	펄라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
AGI	펄라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
NP-003881	펄라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-
NP-017676	펄라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산)
NP-017677	펄라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산)
NP-017706	펄라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-

NP-017705	켈라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
NP-017773	켈라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-
NP-017775	켈라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-
SA1657	켈라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
AG2	켈라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
S01861	켈라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
GE1741	켈라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-Ep-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
S01542	켈라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
S01584	켈라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
S01658	집소게닌	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
S01674	켈라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
S01832	켈라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
QS-7 (QS1861 이라고도 함)	켈라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
QS-7 (QS1862 이라고도 함)	api	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
QS-17	켈라산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(1→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일]-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산)

QS-18	키파산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-(R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일])-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산)
QS-21 A-apio	키파산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-(R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일])-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산)
QS-21 A-xylo	키파산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-(R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일])-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산)
QS-21 B-apio	키파산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc-(R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일])-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산)
QS-21 B-xylo	키파산	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc-(R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥타노일])-3,5-디하이드록시-6-메틸-옥탄산)
베타-에스친(설명: 에스친 Ia)	프로토매시게닌-21(2-메틸부트-2-에노에이트)-22-아세테이트	Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-	-
티시드 사포닌 I	23-옥소-바링토게놀 C - 21,22-비스(2-메틸부트-2-에노에이트)	Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	-
티시드사포닌 J	23-옥소-바링토게놀 C - 21,22-비스(2-메틸부트-2-에노에이트)	Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	-
아삼사포닌 F	23-옥소-바링토게놀 C - 21(2-메틸부트-2-에노에이트)-16,22-디아세테이트	Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	-
디지토닌	디지토게닌	Glc-(1→3)-Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal-	-
프리몰라산 1	3,16,28-트리하이드록시올레아난-12-엔	Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-	-
AS64R	집소겐산	-	Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-
		C-23-OH 기에서의 탄수화물 치환체	
AS6.2	집소겐산	Gal-	Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-
a, b: 상이한 명칭은 동일한 구조의 상이한 분리물을 나타냄 c, d: 상이한 명칭은 동일한 구조의 상이한 분리물을 나타냄			

[0303]

본 발명의 제2 양태는 약제로 사용하기 위한 본 발명의 약제학적 조합물에 관한 것이다. 본 발명자들이 아는 바로는, 예를 들어, siRNA 또는 BNA 기반 치료법의 효능을 개선하기 위한 본 발명의 약제학적 조합물을 제공한 것은 본 발명자들이 최초이다. 본 발명의 약제학적 조합물의 사용은 ASGPR1에 대한 리간드를 포함하는 접합체에 포함된 이펙터 분자의 세포내 효과를 강화시킨다. 이 약제는 ASGPR1을 발현하는 비정상적인 간 세포와 관련된

질환 또는 비정상의 치료에 특히 적합하다. 비정상적인 간 세포는 예를 들어, 발현 산물이 다음의 임의의 하나 이상의 유전자와 관련된 임의의 질환 또는 건강 문제를 앓는 환자의 세포이다: HSP27, apoB, TTR, PCSK9, ALAS1, AT3, GO, CC5, HBV의 X 유전자, HBV의 S 유전자, AAT 및 LDH. 이러한 질환은 예를 들어, 암, 전염병, 바이러스 감염, 고콜레스테롤혈증, 원발성 고옥살산뇨, 혈우병 A, 혈우병 B, AAT 관련 간 질환, 급성 간 포르피린증, TTR 매개 아밀로이드증, 유전 TTR 아밀로이드증(hATTR), 보체 매개 질환, B형 간염, HSP27 발현과 관련된 질환 또는 장애, 또는 자가면역 질환 중 임의의 것이다.

[0304] 본 발명의 제3 양태는 본 발명의 약제학적 조합물에 관한 것으로, 발현 산물이 다음의 임의의 하나 이상의 유전자와 관련된 질환 또는 건강 문제의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것이다: HSP27, apoB, TTR, PCSK9, ALAS1, AT3, GO, CC5, HBV의 X 유전자, HBV의 S 유전자, AAT 및 LDH.

[0305] 일 구현에는 암, 전염병, 바이러스 감염, 고콜레스테롤혈증, 원발성 고옥살산뇨, 혈우병 A, 혈우병 B, AAT 관련 간 질환, 급성 간 포르피린증, TTR 매개 아밀로이드증, 유전 TTR 아밀로이드증(hATTR), 보체 매개 질환, B형 간염, HSP 발현에 관련된 질환 또는 장애, 또는 자가면역 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 본 발명의 용도를 위한 약제학적 조합물 또는 약제학적 조성물이다.

[0306] 일 구현에는 본 발명에 따라 사용하기 위한 약제학적 조합물로서, 약제학적 조합물은 다음을 포함한다:

[0307] · 사포닌 유도체, 여기서, 사포닌 유도체는 분자 1로 표시되는 사포닌에 상응하며, 다음의 유도체화 중 적어도 하나가 존재하는 것인, 사포닌 유도체:

[0308] i. 켈라산 또는 집소게닌의 위치 C₂₃의 알데히드 기가 다음에 의해 유도체화됨;

[0309] - 알코올로의 환원; 또는

[0310] - N-ε-말레이미도카프로산 하이드라지드(EMCH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(이에 의해 S01861-A1d-EMCH 또는 QS-21-A1d-EMCH와 같은 사포닌-A1d-EMCH를 제공하며, EMCH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨); 또는

[0311] - N-[β-말레이미도프로피온산]하이드라지드(BMPH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(BMPH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨); 또는

[0312] - N-[κ-말레이미도운데칸산] 하이드라지드(KMUH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(KMUH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨);

[0313] ii. A₁이 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고 A₁이 글루쿠론산 모이어티를 포함하거나 이로 구성되는 경우, A₁의 글루쿠론산 모이어티의 카르복실 기가 2-아미노-2-메틸-1,3-프로판디올(AMPD) 또는 N-(2-아미노에틸)말레이미드(AEM)와의 반응을 통한 아미드 결합으로의 변환(이에 의해 사포닌-Glu-AMPD, 예컨대 QS-21-Glu-AMPD 또는 S01861-Glu-AMPD 또는 사포닌-Glu-AEM, 예컨대 QS-21-Glu-AEM 또는 S01861-Glu-AEM를 제공함)에 의해 유도체화됨; 및

[0314] iii. A₂가 그룹 B로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고 A₂가 적어도 하나의 아세톡시 기를 포함할 때, A₂의 하나의 당류 모이어티 또는 둘 이상의 당류 모이어티 중 하나 이상의, 선택적으로 모든 아세톡시 기(들)가 탈아세틸화에 의해 하이드록실 기(HO-)로의 변환에 의해 유도체화됨; 또는

[0315] · 분자 1에 따른 사포닌, 여기서, A₁은 Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA이고/이거나 A₂는 Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc이고, 바람직하게는 분자 1로 표시되는 사포닌은 3-O-베타-D-갈락토피라노실-(1→2)-[베타-D-자일로피라노실-(1→3)]-베타-D-글루쿠로피라노실 켈라산 28-O-베타-D-글루코피라노실-(1→3)-베타-D-자일로피라노실-(1→4)-알파-L-람피라노실-(1→2)-[베타-D-자일로피라노실-(1→3)-40Ac-베타-D-퀴노피라노실-(1→4)]-베타-D-푸코피라노시드이고, 보다 바람직하게는 S01861, GE1741, SA1641 및/또는 QS-21, 또는 이의 유도체이고, 가장 바람직하게는 S01861 또는 이의 유도체인, 사포닌; 또는

[0316] · 사포닌 유도체, 여기서

[0317] i. 사포닌 유도체는 다음에 의해 유도체화된 알데히드 기를 포함하는 아글리콘 코어 구조를 포함하거나:

[0318] - 알코올로의 환원; 또는

[0319] - N-ε-말레이미도카프로산 하이드라지드(EMCH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(이에 의해

SO1861-A1d-EMCH 또는 QS-21-A1d-EMCH와 같은 사포닌-A1d-EMCH를 제공하며, EMCH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨); 또는

[0320] - N-[β-말레이미도프로피온산]하이드라지드(BMPH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(BMPH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨); 또는

[0321] - N-[κ-말레이미도운데칸산] 하이드라지드(KMUH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(KMUH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨);

[0322] ii. 사포닌 유도체는 당류 사슬, 바람직하게는 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 포함하고, 당류 사슬은 카르복실기, 바람직하게는 2-아미노-2-메틸-1,3-프로판디올(AMPD) 또는 N-(2-아미노에틸)말레이미드(AEM)와의 반응을 통한 아미드 결합으로의 변환(이에 의해 사포닌-Glu-AMPD, 예컨대 QS-21-Glu-AMPD 또는 SO1861-Glu-AMPD 또는 사포닌-Glu-AEM, 예컨대 QS-21-Glu-AEM 또는 SO1861-Glu-AEM를 제공함)에 의해 유도체화된 카르복실기, 바람직하게는 글루쿠론산 모이어티의 카르복실기를 포함하거나;

[0323] iii. 사포닌 유도체는 당류 사슬, 바람직하게는 그룹 B로부터 선택된 당류 사슬을 포함하고, 당류 사슬은 탈아세틸화에 의해 하이드록실기(HO-)로의 변환에 의해 유도체화된 아세톡시(Me(CO)O-)기를 포함하거나; 또는

[0324] iv. 사포닌 유도체는 유도체화 i., ii. 및 iii.의 임의의 조합, 선택적으로 i., ii. 및 iii. 중 2가지 유도체화의 임의의 조합을 포함하고;

[0325] 바람직하게는, 사포닌 유도체는 아글리콘 코어 구조를 포함하고, 아글리콘 코어 구조는 EMCH와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환에 의해 유도체화된 알데히드기를 포함하고, EMCH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화되는 것인, 사포닌 유도체; 또는

[0326] · 사포닌 유도체, 여기서

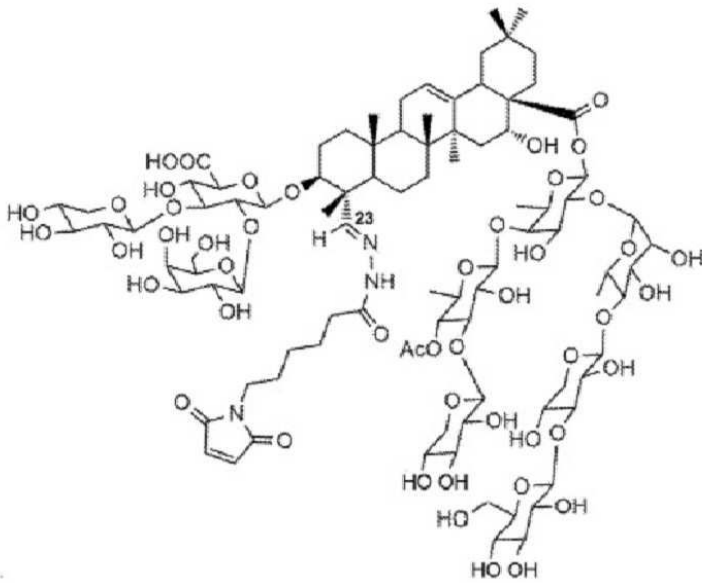
[0327] i. 사포닌 유도체는 N-ε-말레이미도카프로산 하이드라지드(EMCH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(이에 의해 SO1861-A1d-EMCH 또는 QS-21-A1d-EMCH와 같은 사포닌-A1d-EMCH를 제공함)에 의해 유도체화된 알데히드기를 포함하는 아글리콘 코어 구조를 포함하거나;

[0328] ii. 사포닌은 당류 사슬, 바람직하게는 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 포함하고, 당류 사슬은 카르복실기, 바람직하게는 N-(2-아미노에틸)말레이미드(AEM)와의 반응을 통한 아미드 결합으로의 변환(이에 의해 사포닌-Glu-AEM, 예컨대 QS-21-Glu-AEM 또는 SO1861-Glu-AEM를 제공함)에 의해 유도체화된 카르복실기, 바람직하게는 글루쿠론산 모이어티의 카르복실기를 포함하거나;

[0329] iii. 사포닌 유도체는 유도체화 i. 및 ii.의 조합을 포함하는 것인, 사포닌 유도체; 또는

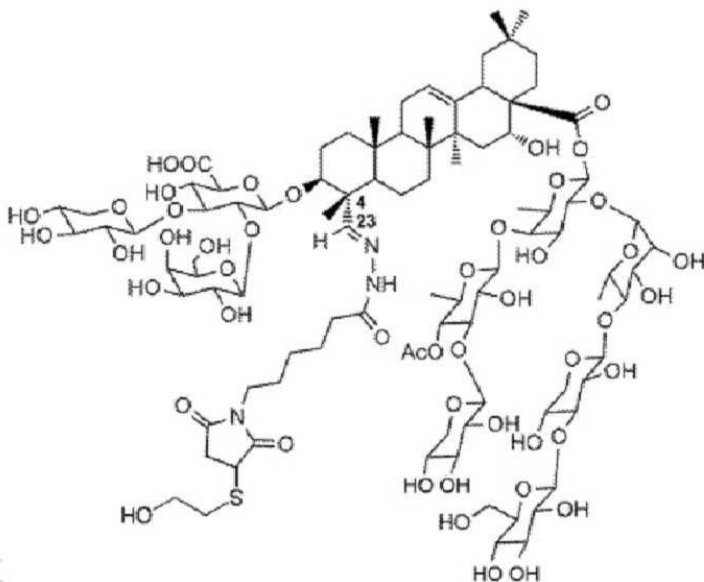
[0330] · 아글리콘 코어 구조를 포함하는 사포닌 유도체, 여기서, 아글리콘 코어 구조는 알데히드기를 포함하고, 사포닌 유도체는 당류 사슬, 바람직하게는 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 포함하고, 당류 사슬은 카르복실기, 바람직하게는 글루쿠론산 모이어티의 카르복실기를 포함하고, 글루쿠론산 모이어티는 N-(2-아미노에틸)말레이미드(AEM)와의 반응을 통한 아미드 결합으로의 변환에 의해 유도체화된 것인, 사포닌 유도체; 또는

[0331] · 분자 2로 표시되는 사포닌 유도체:



(분자 2)

또는 분자 3으로 표시되는 사포닌 유도체:



(분자 3).

본 발명의 제4 양태는 본 발명에 따른 ASGPR에 대한 리간드를 포함하는 접합체에 포함된 이펙터 분자를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로, 바람직하게는 상기 세포의 세포질액으로 전달하기 위한 시험관 내 또는 생체 외 방법에 관한 것으로, 방법은

a) 표면에 ASGPR, 바람직하게는 ASGPR1을 발현하는 세포, 바람직하게는 간 세포, 바이러스 감염된 세포 및 암 세포로부터 선택되는 세포를 제공하는 단계;

b) 본 발명의 접합체를 제공하는 단계, 여기서, 접합체는 전달되는 이펙터 분자를 포함하는 것인, 단계;

c) 본 발명에 따른 사포닌을 제공하는 단계;

d) 단계 a)의 세포를 단계 b)의 접합체 및 단계 c)의 사포닌과 시험관 내 또는 생체 외 접촉시키고, 이와 함께 이펙터 분자를 포함하는 상기 접합체를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로 전달하고, 상기 접합체를 전달함으로써 이펙터 분자를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로, 바람직하게는 상기 세포의 세포질액으로 전달하는 단계를 포함한다.

본 발명의 제5 양태는 본 발명의 접합체를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로 전달하기 위한 시험관 내 또는 생

체 외 방법에 관한 것으로, 방법은

- [0341] a) 표면에 ASGPR, 바람직하게는 ASGPR1을 발현하는 세포, 바람직하게는 간 세포, 바이러스 감염된 세포 및 암 세포로부터 선택되는 세포를 제공하는 단계;
- [0342] b) 본 발명의 접합체를 제공하는 단계;
- [0343] c) 본 발명의 사포닌을 제공하는 단계;
- [0344] d) 단계 a)의 세포를 단계 b)의 접합체 및 단계 c)의 사포닌과 시험관 내 또는 생체 외 접촉시키고, 이와 함께 접합체를 세포 외부로부터 상기 세포 내부로 전달하는 단계를 포함한다.
- [0345] 일 구현예는 본 발명의 두 방법 중 임의의 것으로, ASGPR에 대한 리간드는 적어도 하나의 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 모이어티, 바람직하게는 3개 또는 4개의 GalNAc 모이어티를 포함하고, 보다 바람직하게는 ASGPR에 대한 리간드는 (GalNAc)₃Tris를 포함하거나 이로 구성되고/되거나, 이펙터 분자는 항-miRNA, BNA-AON 또는 siRNA, 예컨대, BNA 기반 siRNA, 바람직하게는 화학적으로 변형된 siRNA, 대사적으로 안정한 siRNA 및 화학적으로 변형되고 대사적으로 안정한 siRNA로부터 선택되는 BNA 기반 siRNA와 같은 siRNA 중 어느 하나로부터 선택되는 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0346] 일 구현예는 본 발명의 두 방법 중 임의의 것으로, 이펙터 분자는 약물 분자와 같은 소분자, 단백질 독소와 같은 독소, BNA와 같은 올리고뉴클레오타이드, 제노 핵산 또는 siRNA, 효소, 펩티드, 단백질, 또는 이들의 임의의 조합 중 적어도 하나를 포함하거나 이로 구성되고, 바람직하게는, 이펙터 분자는 독소, 효소 또는 올리고뉴클레오타이드이고, 바람직하게는 독소는 사포린 또는 다이안틴이다.
- [0347] 일 구현예는 본 발명의 두 방법 중 임의의 것으로, 사포닌은 본 발명의 이전의 구현예에 따른 유도체화된 S01861 및/또는 유도체화된 QS-21이고, 바람직하게는 S01861-Glu-AEM 또는 S01861-Ald-EMCH 또는 QS-21-Glu-AEM 또는 QS-21-Ald-EMCH이다.
- [0348] 일 구현예는 본 발명의 두 방법 중 임의의 것으로, 사포닌은 분자 1로 표시되는 사포닌에 상응하는 사포닌 유도체로서, 다음의 유도체화 중 적어도 하나가 존재한다:
- [0349] i. 퀴라산 또는 집소게닌의 위치 C₂₃의 알데히드 기가 다음에 의해 유도체화됨;
- [0350] - 알코올로의 환원; 또는
- [0351] - N-ε-말레이미도카프로산 하이드라지드(EMCH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(이에 의해 S01861-Ald-EMCH 또는 QS-21-Ald-EMCH와 같은 사포닌-Ald-EMCH를 제공하며, EMCH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨); 또는
- [0352] - N-[β-말레이미도프로피온산]하이드라지드(BMPH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(BMPH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨); 또는
- [0353] - N-[κ-말레이미도운데칸산] 하이드라지드(KMUH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환(KMUH의 말레이미드 기는 메르캅토에탄올과의 티오에테르 결합의 형성에 의해 선택적으로 유도체화됨);
- [0354] ii. A₁이 그룹 A로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고 A₁이 글루쿠론산 모이어티를 포함하거나 이로 구성되는 경우, A₁의 글루쿠론산 모이어티의 카르복실 기가 2-아미노-2-메틸-1,3-프로판디올(AMPD) 또는 N-(2-아미노에틸) 말레이미드(AEM)와의 반응을 통한 아마이드 결합으로의 변환(이에 의해 사포닌-Glu-AMPD, 예컨대 QS-21-Glu-AMPD 또는 S01861-Glu-AMPD 또는 사포닌-Glu-AEM, 예컨대 QS-21-Glu-AEM 또는 S01861-Glu-AEM를 제공함)에 의해 유도체화됨; 및
- [0355] iii. A₂가 그룹 B로부터 선택된 당류 사슬을 나타내고 A₂가 적어도 하나의 아세톡시 기를 포함할 때, A₂의 하나의 당류 모이어티 또는 둘 이상의 당류 모이어티 중 하나 이상의, 바람직하게는 모든 아세톡시 기(들)가 탈아세틸화에 의해 하이드록실 기(HO-)로의 변환에 의해 유도체화됨.
- [0356] 일 구현예는 본 발명의 두 방법 중 임의의 것으로, 이펙터 분자는 예를 들어, 포유동물 세포 내부에 존재할 때 아포지단백 B(apoB), 트랜스티레틴(TTR), 전단백질 전환효소 서브틸리신/췌신 9형(PCSK9), 델타-아미노레블리네이트 합성효소 1(ALAS1), 안티트롬빈 3(AT3), 글리콜레이트 산화효소(GO), 보체 성분 C5(C5), B형 간염 바이러스(HBV)의 X 유전자, HBV의 S 유전자, 알파-1 항트립신(AAT) 및 젖산 탈수소효소(LDH)의 유전자 중 임의의 하나

를 침묵시킬 수 있고/있거나, 예를 들어, 포유동물 세포 내부에 존재할 때 비정상적인 miRNA를 표적화할 수 있는 올리고뉴클레오타이드이고/이거나, 예를 들어, 포유동물 세포 내부에 존재할 때 올리고뉴클레오타이드는 apoB, TTR, PCSK9, ALAS1, AT3, GO, CC5, HBV의 X 유전자의 발현 산물, HBV의 S 유전자의 발현 산물, AAT 및 LDH 단백질 중 임의의 하나의 발현에 관련된 mRNA를 표적화할 수 있거나, 예를 들어, 포유동물 세포 내부에 존재할 때 miRNA 기능을 길항 또는 복원, 예컨대, 종양형성 miRNA(onco-miR)를 억제 또는 onco-miR의 발현 억제를 억제할 수 있다.

[0357] 본 발명의 제6 양태는 본 발명의 억제학적 조합물 또는 본 발명의 제2 억제학적 조성물, 및 본 발명에 따른 상기 억제학적 조합물 또는 제2 억제학적 조성물의 사용을 위한 또는 본 발명에 따른 방법에 사용하기 위한 설명서를 포함하는 부품 키트에 관한 것이다.

[0358] 본 발명이 여러 구현예의 관점에서 설명되었지만, 본 명세서를 읽고 도면을 연구하면 당업자에게 대안, 수정, 치환 및 등가물이 명백해질 것이라고 생각된다. 본 발명은 예시된 구현예에 어떠한 방식으로든 제한되지 않는다. 첨부된 청구범위에 의해 정의된 범위를 벗어나지 않고 변경이 이루어질 수 있다.

[0359] 본 발명은 다수의 예시적인 구현예를 참조하여 위에서 설명되었다. 수정이 가능하며 첨부된 청구범위에 정의된 보호 범위에 포함된다. 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이는 본 발명을 어떤 식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0360] 실시예 및 예시적인 구현예

[0361] **실시예 1.** CD71-사포린 + 4000 nM 3가-GalNAc-L-SO1861

[0362] 3가-GalNAc는 간세포 상의 ASGPR1 수용체를 인식하고 결합하는 표적 리간드이다. 3가 GalNAc을 생성하였고(도 1 및 도 8), SO1861-EMCH를 3가 GalNAc에 접합시켰고(불안정, 비유도체화 SO1861에 대해 도 2 및 도 4에 기재된 바와 유사한 방식으로, 여기서 SPT001은 SO1861과 동의어임), 결합된 SO1861에 대해 DAR = 1이었다(3가-GalNAc-SO1861, (GalNAc)₃-SO1861으로도 지칭됨). SO1861-EMCH는 알데히드 기가 N-ε-말레이미도카프로산 하이드라지드(EMCH)와의 반응을 통한 하이드라존 결합으로의 변환에 의해 유도체화되어, SO1861-Aldehyde-EMCH를 제공하는 SO1861을 지칭한다. 도 1 및 도 8에 도시된 '3가-GalNAc'은 이펙터 분자 또는 사포린에 커플링하기에 적합한 전형적인 (GalNAc)₃Tris 접합체이다. 대조군으로서 SO1861-EMCH를 또한 결합된 SO1861에 대해 DAR = 1로, 1가-GalNAc(도 3)에 접합시켰다(불안정)(GalNAc-SO1861). HepG2(ASGPR1⁺; CD71⁺, 표 A3) 및 Huh7(ASGPR1^{+/+}; CD71⁺, 표 A3) 세포를 10 pM CD71-사포린(단백질 독소 사포린에 접합된 CD71을 표적으로 하는 단일클론 항체 OKT-9)의 존재 및 부재 하에 다양한 농도의 3가-GalNAc-L-SO1861 및 GalNAc-L-SO1861로 처리하였다. CD71-사포린 부재 하의 세포 처리는 단일 화합물로서 3가-GalNAc-L-SO1861(또는 3가-GalNAc, 또는 (GalNAc)₃으로도 지칭됨)이 15000 nM까지 독성이 없음을 보여준다(도 9).

[0363] HepG2 및 Huh7 세포를 또한 1000 nM 또는 4000 nM의 고정 농도의 3가-GalNAc-SO1861(결합된 SO1861에 대해 DAR = 1)((GalNAc)₃-SPT로도 지칭됨)과 함께 다양한 농도의 CD71-사포린(CD71-SPRN으로도 지칭됨)으로 처리하였다. ASGPR1/CD71 발현 세포(HepG2 및 Huh7)의 표적화된 단백질 독소 매개 세포 살상을 결정하였다. 이는 두 세포주에서 낮은 농도의 CD71-사포린(IC50=1 pM)에서 강력한 세포 살상을 나타냈지만, 증가 농도의 CD71-사포린, CD71-사포린 + 1000 nM 3가-GalNAc 또는 CD71-사포린 + 4000 nM 3가-GalNAc는 두 세포주에서 고농도 CD71-사포린(IC50 = 100 pM)에서만 세포 살상을 유도할 수 있었다(도 10).

[0364] 이상은 모두 3가-GalNAc-SO1861이 낮은 농도의 CD71-사포린과 조합하여 ASGPR1/CD71 발현 세포에서 효과적으로 세포 살상을 유도함을 보여준다. 따라서 3가-GalNAc-SO1861은 ASGPR1 발현 세포에서 단백질 독소의 엔도솜 탈출을 효과적으로 유도한다.

[0365] **실시예 2** 3가-GalNAc-L/S-BNA + SO1861-EMCH

[0366] HSP27BNA를 3가-GalNAc(도 6-7)에 접합시키고, HepG2(ASGPR1⁺) 세포 또는 Huh7(ASGPR1^{+/+})을 다양한 농도의 3가-GalNAc-L-HSP27BNA(불안정한 접합, 도 6) 또는 3가-GalNAc-S-HSP27BNA(안정한 접합, 도 7)을 4000 nM의 고정 농도의 SO1861-EMCH(또는 SPT-EMCH로 지칭됨)와 조합하여 처리하였다. HepG2 및 Huh7 세포에서 HSP27 유전자 침묵을 결정하였다. 4000 nM SO1861-EMCH와 조합한 경우에만 HEPG2 및 Huh7 세포에서 저농도의 3가-GalNAc-L-HSP27BNA(HepG2: IC50 = 0,1 nM; Huh7: IC50 = 3 nM) 또는 3가-GalNAc-S-HSP27BNA(HepG2: IC50 = 0,1 nM; Huh7: IC50 = 3 nM)에서 효과적인 유전자 침묵이 관찰된 반면, 증가 농도의 3가-GalNAc-L-HSP27BNA(HepG2/Huh7: IC50 > 2000 nM) 또는 3가-GalNAc-S-HSP27BNA(HepG2/Huh7: IC50 > 2000 nM)는 HepG2 및

Huh7 세포주에서 유전자 침묵 활성을 나타내지 않았다(도 11).

[0367] 다음으로, ApoBBNA를 3가-GalNAc에 유사한 방식으로 접합시키고(도 6~7), HepG2(ASGPR1⁺) 세포 또는 Huh7(ASGPR1^{+/-})에 다양한 농도의 3가-GalNAc-L-ApoBBNA(불안정한 접합, 도 6, 도 12, 도 13) 또는 3가 GalNAc-S-ApoBBNA(안정한 접합, 도 7, 도 14, 도 15) 또는 3가 GalNAc-L-ApoB_{scrambled}BNA 또는 3가 GalNAc-S-ApoB_{scrambled}BNA(여기서 스캐램블된 ApoBBNA는 ApoB mRNA에 결합하지 않는 안티센스 스캐램블된 올리고 서열임; 표적외 대조군 BNA임)을 4000 nM의 고정 농도의 SO1861-EMCH와 조합하여 처리하였다. HepG2(ASGPR1⁺) 세포 또는 Huh7(ASGPR1^{+/-}) 세포에서 ApoB 유전자 침묵을 결정하였다. 4000 nM SO1861-EMCH와 조합한 경우에만 HepG2 세포에서 낮은 농도의 3가-GalNAc-L-ApoBBNA(IC₅₀ = 10 nM) 또는 3가-GalNAc-S-ApoBBNA(IC₅₀ = 10 nM)에서 효과적인 유전자 침묵이 관찰된 반면, 증가 농도의 3가-GalNAc-L-ApoBBNA(IC₅₀ > 2000 nM) 또는 3가-GalNAc-S-ApoBBNA(IC₅₀ > 2000 nM)는 HepG2 세포에서 유전자 침묵 활성을 나타내지 않았다(도 12, 도 14). 처리는 세포주의 생존능에 영향을 미치지 않았다(도 13, 도 15). 'L'은 '불안정한' 링커를 말하며, 이는 링커가 세포 내에서, 즉 엔도솜과 리소솜에서 명백한 pH에서 절단됨을 나타낸다. 대조적으로, 'S'는 '안정한' 링커를 의미하며, 이는 링커가 세포 내에서, 즉 엔도솜과 리소솜에서 명백한 pH에서 절단되지 않음을 나타낸다. 따라서, 접합체를 형성하거나 접합체에 포함된 임의의 두 분자 사이에 불안정한 결합을 포함하는 접합체는 불안정한 링커의 위치에서 절단될 것이고, 그로 인해 2개의 연결되거나 결합된 분자가 해리될 것이다. 예는 인간 세포와 같은 포유동물 세포의 엔도솜 및 리소솜에서 명백한 산성 조건 하에서의 하이드라존 결합의 절단이다.

[0368] 이상은 모두 SO1861-EMCH가 2개의 독립적인 유전자 표적에 대해 3가-GalNAc-L-BNA 또는 3가-GalNAc-S-BNA의 엔도솜 탈출 및 표적 유전자 침묵을 증진시킬 수 있음을 보여준다. 유전자 침묵은 Huh7 세포에 비해 HepG2 세포에서 더 효율적이며, 이는 세포의 원형질막에서 더 높은 수준의 ASGPR1 발현이 GalNAc-BNA 접합체의 증가된 흡수를 촉진한다는 것을 시사한다.

[0369] **실시예 3 3가-GalNAc-L/S-BNA + 3가-GalNAc-L-SO1861**

[0370] SO1861-EMCH를 3가-GalNAc에 접합시켰고(불안정, 비유도체화 SO1861에 대해 도 2 및 도 4에 기재된 바와 유사한 방식으로), DAR은 결합된 SO1861에 대해 1이었다(3가-GalNAc-SO1861). HepG2(ASGPR1⁺) 세포 또는 Huh7(ASGPR1^{+/-}) 세포에 다양한 농도의 3가-GalNAc-L-ApoBBNA(불안정한 접합 도 16), 3가-GalNAc-S-ApoBBNA(안정한 접합(도 17) 또는 스캐램블된 표적외 대조군 접합체(3가-GalNAc-L-ApoB_{scrambled}BNA 또는 3가-GalNAc-S-ApoB_{scrambled}BNA)를 4000 nM의 고정 농도의 3가-GalNAc-L-SO1861(결합된 SO1861에 대해 DAR = 1)과 조합하여 처리하였다. HepG2(ASGPR1⁺) 세포 및 Huh7(ASGPR1^{+/-}) 세포에서 ApoB 유전자 침묵을 결정하였다. 4000 nM 3가-GalNAc-L-SO1861과 조합한 경우에만 HepG2 세포(ASGPR1⁺)에서 낮은 농도의 3가-GalNAc-L-ApoBBNA(IC₅₀ = 50 nM) 또는 3가-GalNAc-S-ApoBBNA(IC₅₀ = 50 nM)에서 효과적인 유전자 침묵이 관찰되었다. Huh7 세포(ASGPR1^{+/-})에서 두 가지 조합 처리는 덜 효과적인 유전자 침묵을 보여주었다(3가-GalNAc-L-ApoBBNA: IC₅₀ = 700 nM; 3가-GalNAc-S-ApoBBNA: IC₅₀ = 700 nM). 증가 농도의 3가-GalNAc-L-ApoBBNA(HepG2/Huh7: IC₅₀ > 1000 nM) 또는 3가-GalNAc-S-ApoBBNA(HepG2/Huh7: IC₅₀ > 1000 nM)는 HepG2 및 Huh7 세포주에서 유전자 침묵 활성을 나타내지 않았고, 4000 nM 3가-GalNAc-L-SO1861도 스캐램블된 3가-GalNAc-L-ApoB_{scrambled}BNA + (HepG2/Huh7: IC₅₀ > 1000 nM) 또는 스캐램블된 3가-GalNAc-S-ApoB_{scrambled}BNA(HepG2/Huh7: IC₅₀ > 1000 nM)의 유전자 침묵을 유도/증진시키지 않았다(도 16). 처리는 두 세포주의 생존능에 영향을 미치지 않았다(도 17).

[0371] 이상은 모두 3가-GalNAc-L-SO1861과 조합하여 매우 낮은 농도의 3가-GalNAc-L-HSP27BNA 또는 3가-GalNAc-S-HSP27BNA가 ASGPR1 발현 세포에서 유전자 침묵을 효과적으로 유도하며, ASGPR1 발현이 더 높은 세포에서 다시 더 강한 효과가 나타남을 보여준다.

[0372] **실시예 4 인간 1차 간세포에서 (GalNAc)3-BNA + SO1861-EMCH**

[0373] ApoBBNA(ApoBBNA#01, 인간 ApoB mRNA를 표적화함)를 3가-GalNAc((GalNAc)3)에 접합시키고(도 6), 1차 간세포(ASGPR1⁺)에 2000 nM SO1861의 첨가와 함께 및 첨가 없이 다양한 농도의 (GalNAc)3-ApoBBNA#01을 처리하였다. 1차 간세포(ASGPR1⁺)에서 ApoB 유전자 침묵을 결정하였다. 2000 nM의 SO1861-EMCH와 조합한 경우에만 1차 간세포

에서 낮은 농도의 (GalNAc)3-ApoBBNA#01(IC50 = 8 nM)에서 효과적인 유전자 침묵이 관찰된 반면, (GalNAc)3-ApoBBNA#01 단독은 (GalNAc)3-ApoBBNA#01 초과 IC50을 나타냈다(도 18a). 다음으로, 이러한 처리의 세포 생존능에 대한 효과를 결정하였고, 이는 (GalNAc)3-ApoBBNA#01의 IC50이 10000 nM 초과이고, (GalNAc)3-ApoBBNA + SO1861-EMCH의 IC50이 약 500 nM임을 밝혀냈다(도 18b). 이상은 모두 SO1861-EMCH가 인간 1차 간세포에서 올리고뉴클레오타이드 페이로드의 (GalNAc)3 표적화된 전달을 강력하게 증진시킬 수 있음을 보여준다.

실시예 5 인간 1차 간세포에서 (GalNAc)3-BNA + SO1861-EMCH

ApoB-서열(마우스 및 인간 ApoB RNA를 둘 다 표적화함) BNA, 더욱 구체적으로 ApoB#02 BNA^{NC}, 또는 ApoB#02 또는 ApoBBNA#02 또는 티올13-ApoB BNA를, 결합된 ApoB#02에 대해 DAR = 1로, (GalNAc)3-ApoB#02를 드러내는 링커('Ls')에 접합시켰다(도 21~23).

인간 1차 간세포(ASGPR1⁺)에 2000 nM SO1861-EMCH와 함께 및 SO1861-EMCH 없이 다양한 농도의 (GalNAc)3-ApoB#02 BNA를 처리하였다. 1차 간세포(ASGPR1⁺)에서 ApoB 유전자 침묵을 결정하였다. 2000 nM SO1861-EMCH와 조합한 경우에만 매우 낮은 농도의 (GalNAc)3-ApoBBNA#02(IC50 < 0.01 nM)에서 효과적인 유전자 침묵이 관찰된 반면, 증가 농도의 ApoBBNA#02(IC50 = 200 nM), (GalNAc)3-ApoBBNA#02(IC50 = 5 nM), 또는 ApoBBNA#02 RNAiMAX 형질감염(IC50 = 5 nM)은 덜 강력하였다(도 19a). ApoBBNA#02 RNAiMAX의 점선은 독성 및 세포 사멸이 발생하는 농도를 나타낸다. 다음으로, 이러한 처리의 세포 생존능에 대한 효과를 결정하였고, 이는 ApoBBNA#02의 IC50이 10000 초과이고, (GalNAc)3-ApoBBNA#02의 IC50이 10000 nM 초과이고, (GalNAc)3-ApoBBNA#02 + SO1861-EMCH의 IC50이 5000 nM이고, ApoBBNA#02 + RNAiMAX의 IC50 = 100 nM임을 밝혀냈다(도 18b). 이상은 모두 SO1861-EMCH가 인간 1차 간세포에서 올리고뉴클레오타이드 페이로드의 (GalNAc)3 표적화된 전달을 강력하게 증진시킬 수 있음을 보여준다.

실시예 6 1차 마우스 간세포에서 (GalNAc)3-BNA + SO1861-EMCH

뮤린 ApoB 서열 표적화 BNA, 더 구체적으로 ApoB#02 BNA^{NC}, 또는 ApoB#02 또는 ApoBBNA#02 또는 티올13-ApoB BNA를, 결합된 ApoB#02에 대해 DAR = 1로, (GalNAc)3-ApoB#02를 드러내는 링커('Ls')에 접합시켰다(도 21~23).

1차 마우스 간세포에 다양한 농도의 ApoB#02 BNA, (GalNAc)3-ApoB#02, 또는 (GalNAc)3-ApoB#02 + 2000 nM SO1861-EMCH를 처리하고, ApoB RNA 발현을 72시간 인큐베이션 후 qPCR에 의해 결정하였다. 유전자 발현 억제는 2000 nM SO1861-EMCH와 조합한 낮은 농도의 (GalNAc)3-ApoB#02 BNA(IC50 약 0.03 nM)에서 관찰되었다(도 20). ApoB#02 단독 처리는 ApoB RNA 하향 조절에서 약 100~667배 덜 강력했지만(ApoB#02: IC50 = 20 nM), 약 2 nM의 IC50의 ApoB#02와 조합한 (GalNAc)3-ApoB#02는 약 10~67배 덜 강력했다(도 20).

이는 (GalNAc)3-SO1861 또는 SO1861-EMCH와 조합할 때만 매우 낮은 농도의 (GalNAc)3-ApoB#02 BNA가 ApoB RNA 하향 조절, 즉 뮤린 1차 간세포에서 유전자 침묵을 효과적으로 유도한다는 것을 보여준다.

재료 및 방법

약어

AEM N-(2-아미노에틸)말레이미드 트리플루오로아세트이트 염

AMPD 2-아미노-2-메틸-1,3-프로판디올

BOP (벤조트리아졸-1-일옥시)트리스(디메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트

DIPEA N,N-디이소프로필에틸아민

DMF N,N-디메틸포름아미드

EDCI.HCl 3-((에틸이미노)메틸렌아미노)-N,N-디메틸프로판-1-아미늄 클로라이드

EMCH.TFA N-(ε-말레이미도카프로산)하이드라지드, 트리플루오로아세트산 염

HATU 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리딘-3-옥시드 헥사플루오로포스페이트

min 분

NMM 4-메틸모르폴린

- [0393] r.t. 채류 시간
- [0394] TCEP 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 염산염
- [0395] Temp 온도
- [0396] TFA 트리플루오로아세트산
- [0397] 분석 방법
- [0398] LC-MS 방법 1
- [0399] 기구: Waters IClass; Bin. 펌프: UPIBSM, SM: SO가 있는 UPISMFTN; UPCMA, PDA: UPPDATC, 210-320 nm, SQD: ACQ-SQD2 ESI, 생성물의 분자량에 따른 질량 범위:
- [0400] 1500~2400 또는 2000~3000 범위 내에서 neg 또는 neg/pos; ELSD: 기체압력 40 psi, 드리프트 튜브 온도: 50℃; 컬럼: Acquity C18, 50×2.1 mm, 1.7 μm 온도: 60℃, 유속: 0.6 mL/min, lin. 생성물의 극성에 따른 구배:
- [0401] ^A t₀ = 2% A, t_{5.0min} = 50% A, t_{6.0min} = 98% A
- [0402] ^B t₀ = 2% A, t_{5.0min} = 98% A, t_{6.0min} = 98% A
- [0403] 사후 시간: 1.0 min, 용리제 A: 아세토니트릴, 용리제 B: 물 중 10 mM 중탄산암모늄(pH=9.5).
- [0404] LC-MS 방법 2
- [0405] 기구: Waters IClass; Bin. 펌프: UPIBSM, SM: SO가 있는 UPISMFTN; UPCMA, PDA: UPPDATC, 210-320 nm, SQD: ACQ-SQD2 ESI, 생성물의 분자량에 따른 질량 범위: pos/neg 100~800 또는 neg 2000~3000; ELSD: 기체압력 40 psi, 드리프트 튜브 온도: 50℃; 컬럼: Waters XSelectTM CSH C18, 50×2.1 mm, 2.5 μm, 온도: 25℃, 유속: 0.5 mL/min, 구배: t_{0min} = 5% A, t_{2.0min} = 98% A, t_{2.7min} = 98% A, 사후 시간: 0.3 min, 용리제 A: 아세토니트릴, 용리제 B: 물 중 10 mM 중탄산암모늄(pH=9.5).
- [0406] LC-MS 방법 3
- [0407] 기구: Waters IClass; Bin. 펌프: UPIBSM, SM: SO가 있는 UPISMFTN; UPCMA, PDA: UPPDATC, 210-320 nm, SQD: ACQ-SQD2 ESI, 생성물의 분자량에 따른 질량 범위 pos/neg 105~800, 500~1200 또는 1500~2500; ELSD: 기체압력 40 psi, 드리프트 튜브 온도: 50℃; 컬럼: Waters XSelectTM CSH C18, 50×2.1mm, 2.5 μm, 온도: 40℃, 유속: 0.5 mL/min, 구배: t_{0min} = 5% A, t_{2.0min} = 98% A, t_{2.7min} = 98% A, 사후 시간: 0.3 min, 용리제 A: 아세토니트릴 중 0.1% 포름산, 용리제 B: 물 중 0.1% 포름산.
- [0408] LC-MS 방법 4
- [0409] 기구: Waters IClass; Bin. 펌프: UPIBSM, SM: SO가 있는 UPISMFTN; UPCMA, PDA: UPPDATC, 210-320 nm, SQD: ACQ-SQD2 ESI, 생성물의 분자량에 따른 질량 범위: pos/neg 100~800 또는 neg 2000~3000; ELSD: 기체압력 40 psi, 드리프트 튜브 온도: 50℃ 컬럼: Waters Acquity Shield RP18, 50×2.1mm, 1.7 μm, 온도: 25℃, 유속: 0.5 mL/min, 구배: t_{0min} = 5% A, t_{2.0min} = 98% A, t_{2.7min} = 98% A, 사후 시간: 0.3 min, 용리제 A: 아세토니트릴, 용리제 B: 물 중 10 mM 중탄산암모늄(pH=9.5).
- [0410] 분취용 방법
- [0411] 분취용 MP-LC 방법 1
- [0412] 기기 유형: RevelerisTM prep MPLC; 컬럼: Waters XSelectTM CSH C18, 145×25 mm, 10 μm, 유속: 40 mL/min; 컬럼 온도: 실온; 용리제 A: 물 중 10 mM 중탄산암모늄 pH = 9.0); 용리제 B: 99% 아세토니트릴 + 1% 물 중 10 mM 중탄산암모늄; 구배:
- [0413] ^A t_{0min} = 5% B, t_{1min} = 5% B, t_{2min} = 10% B, t_{17min} = 50% B, t_{18min} = 100% B, t_{23min} = 100% B

- [0414] $t_{0min}^A = 5\%$ B, $t_{1min} = 5\%$ B, $t_{2min} = 20\%$ B, $t_{17min} = 60\%$ B, $t_{18min} = 100\%$ B, $t_{23min} = 100\%$ B
- [0415] ; 검출 UV: 210, 235, 254 nm 및 ELSD.
- [0416] 분취용 MP-LC 방법 2
- [0417] 기기 유형: Reveleris™ prep MPLC; 컬럼: Phenomenex LUNA C18(3) (150×25 mm, 10 μm); 유속: 40 mL/min; 컬럼 온도: 실온; 용리제 A: 물 중 0.1% (v/v) 포름산, 용리제 B: 아세트오니트릴 중 0.1% (v/v) 포름산; 구배:
- [0418] $t_{0min}^A = 5\%$ B, $t_{1min} = 5\%$ B, $t_{2min} = 20\%$ B, $t_{17min} = 60\%$ B, $t_{18min} = 100\%$ B, $t_{23min} = 100\%$ B
- [0419] $t_{0min}^B = 2\%$ B, $t_{1min} = 2\%$ B, $t_{2min} = 2\%$ B, $t_{17min} = 30\%$ B, $t_{18min} = 100\%$ B, $t_{23min} = 100\%$ B
- [0420] $t_{0min}^C = 5\%$ B, $t_{1min} = 5\%$ B, $t_{2min} = 10\%$ B, $t_{17min} = 50\%$ B, $t_{18min} = 100\%$ B, $t_{23min} = 100\%$ B
- [0421] $t_{0min}^D = 5\%$ B, $t_{1min} = 5\%$ B, $t_{2min} = 5\%$ B, $t_{17min} = 40\%$ B, $t_{18min} = 100\%$ B, $t_{23min} = 100\%$ B
- [0422] ; 검출 UV: 210, 235, 254 nm 및 ELSD.
- [0423] 분취용 LC-MS 방법 3
- [0424] MS 기기 유형: Agilent Technologies G6130B Quadrupole; HPLC 기기 유형: Agilent Technologies 1290 분취용 LC; 컬럼: Waters XSelect™ CSH (C18, 150×19 mm, 10 μm); 유속: 25 ml/min; 컬럼 온도: 실온; 용리제 A: 100% 아세트오니트릴; 용리제 B: 물 중 10 mM 중탄산암모늄 pH = 9.0; 구배:
- [0425] $t_0^A = 20\%$ A, $t_{2.5min} = 20\%$ A, $t_{11min} = 60\%$ A, $t_{13min} = 100\%$ A, $t_{17min} = 100\%$ A
- [0426] $t_0^B = 5\%$ A, $t_{2.5min} = 5\%$ A, $t_{11min} = 40\%$ A, $t_{13min} = 100\%$ A, $t_{17min} = 100\%$ A
- [0427] ; 검출: DAD (210 nm); 검출: MSD (ESI pos/neg) 질량 범위: 100 ~ 800; DAD 기반 분획 수집.
- [0428] 분취용 LC-MS 방법 4
- [0429] MS 기기 유형: Agilent Technologies G6130B Quadrupole; HPLC 기기 유형: Agilent Technologies 1290 분취용 LC; 컬럼: Waters XBridge Protein (C4, 150×19mm, 10 μm); 유속: 25 ml/min; 컬럼 온도: 실온; 용리제 A: 100% 아세트오니트릴; 용리제 B: 물 중 10 mM 중탄산암모늄 pH=9.0; 구배:
- [0430] $t_0^A = 2\%$ A, $t_{2.5min} = 2\%$ A, $t_{11min} = 30\%$ A, $t_{13min} = 100\%$ A, $t_{17min} = 100\%$ A
- [0431] $t_0^B = 10\%$ A, $t_{2.5min} = 10\%$ A, $t_{11min} = 50\%$ A, $t_{13min} = 100\%$ A, $t_{17min} = 100\%$ A
- [0432] $t_0^C = 5\%$ A, $t_{2.5min} = 5\%$ A, $t_{11min} = 40\%$ A, $t_{13min} = 100\%$ A, $t_{17min} = 100\%$ A
- [0433] ; 검출: DAD (210 nm); 검출: MSD (ESI pos/neg) 질량 범위: 100 ~ 800; DAD 기반 분획 수집
- [0434] 플래시 크로마토그래피
- [0435] Grace Reveleris X2® C-815 플래시; 용매 전달 시스템: 자동 프레이밍이 있는 3-피스톤 펌프, 단일 실행에서 최대 4개의 용매가 있는 4개의 독립 채널, 용매 고갈 시 라인 자동 전환; 최대 펌프 유속 250 mL/min; 최대 압력 50 bar(725 psi); 검출: UV 200~400 nm, 최대 4개의 UV 신호 조합 및 전체 UV 범위 스캔, ELSD; 컬럼 크기: 기기에서 4~330 g, 루어(luer) 유형, 750 g ~ 3000 g(옵션 홀더 포함).
- [0436] **S01861-EMCH 합성 (S01861-EMCH는 S01861-A1d-EMCH라고도 함)**
- [0437] S01861(121 mg, 0.065 mmol) 및 EMCH.TFA(110 mg, 0.325 mmol)에 메탄올(추가 건조, 3.00 mL) 및 TFA(0.020 mL, 0.260 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 1.5시간 후 반응 혼합물을 분취용 MP-LC에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(120 mg,

90%)을 백색 솜털형 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 96%.

[0438] LRMS (m/z): 2069 $[M-1]^{1-}$

[0439] LC-MS r.t. (min): 1.08⁴

[0440] **S01861-EMCH-메르캅토에탄올 (S01861-EMCH (차단))**

[0441] S01861-EMCH(0.1 mg, 48 nmol)에 200 μ L 메르캅토에탄올(18 mg, 230 μ mol)을 첨가하고 용액을 ThermoMixer C(Eppendorf)에서 800 rpm 및 실온에서 1시간 동안 진탕하였다. 1시간 동안 진탕한 후, 용액을 메탄올로 희석하고 MWCO가 1 kDa인 재생 셀룰로스 멤브레인 튜브(Spectra/Por 7)를 사용하여 메탄올에 대해 광범위하게 4시간 동안 투석하였다. 투석 후, 분취량을 취하여 MALDI-TOF-MS를 통해 분석하였다.

[0442] MALDI-TOF-MS(RP 모드): m/z 2193 Da ($[M+K]^+$, S01861-EMCH-메르캅토에탄올), m/z 2185 Da ($[M+K]^+$, S01861-EMCH-메르캅토에탄올), m/z 2170 Da ($[M+Na]^+$, S01861-EMCH-메르캅토에탄올).

[0443] **3가 GalNAc-아지드 합성**

[0444] 중간체 1:

[0445] **tert-부틸 1-아지도-17,17-비스((3-(tert-부톡시)-3-옥소프로폭시)메틸)-15-옥소-3,6,9,12,19-펜타옥사-16-아자도코산-22-오에이트**

[0446] 디-tert-부틸 3,3'-((2-아미노-2-((3-(tert-부톡시)-3-옥소프로폭시)메틸)프로판-1,3-디일)비스(옥시))디프로피오네이트(1.27 g, 2.51 mmol)에 DMF(10 mL) 중의 3-아지도(peg4)프로피온산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르(977 mg, 2.51 mmol) 용액을 첨가하였다. 다음으로, DIPEA(657 μ L, 3.77mmol)를 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 진공에서 증발시키고 잔류물을 에틸 아세테이트(100 mL)에 용해시켰다. 생성된 용액을 0.5 N 중황산칼륨 용액(2 x 100 mL) 및 염수(100 mL)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고, 진공에서 증발시켰다. 잔류물을 플래시 크로마토그래피(DCM - DCM 중 10% 메탄올 (v/v) 구배 100:0에서 0:100으로 상승)로 정제하여 표제 화합물(1.27 g, 65%)을 무색 오일로 얻었다. LC-MS 기반 순도 100% (ELSD).

[0447] LRMS (m/z): 780 $[M+1]^{1+}$

[0448] LC-MS r.t. (min): 2.10²

[0449] 중간체 2:

[0450] **1-아지도-17,17-비스((2-카르복시에톡시)메틸)-15-옥소-3,6,9,12,19-펜타옥사-16-아자도코산-22-오산**

[0451] DCM(5.0 mL) 중의 tert-부틸 1-아지도-17,17-비스((3-(tert-부톡시)-3-옥소프로폭시)메틸)-15-옥소-3,6,9,12,19-펜타옥사-16-아자도코산-22-오에이트(1.27 g, 1.63 mmol)의 용액에 TFA(5.0 mL, 65 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 1.5시간 후 반응 혼합물을 진공에서 증발시키고 톨루엔(3 x 10 mL) 및 DCM(3 x 10 mL)과 함께 공동 증발시켜 조 표제 생성물을 무색 오일로 얻었다.

[0452] LRMS (m/z): 611 $[M+1]^{1+}$

[0453] 중간체 3:

[0454] **디-tert-부틸 (10-(1-아지도-3,6,9,12-테트라옥사펜타데칸-15-아미도)-10-(13,13-디메틸-5,11-디옥소-2,12-디옥사-6,10-디아자테트라데실)-5,15-디옥소-8,12-디옥사-4,16-디아자노나데칸-1,19-디일)디카르바메이트**

[0455] 1-아지도-17,17-비스((2-카르복시에톡시)메틸)-15-옥소-3,6,9,12,19-펜타옥사-16-아자도코산-22-오산(997 mg, 1.63 mmol), 옥시마 퓨어(Oxyima Pure)(1.04 g, 7.35 mmol) 및 EDCI.HCl(1.17 g, 6.12 mmol)을 DMF(10.0 mL)에 용해시켰다. 다음으로, DIPEA(1.99 mL, 11.4 mmol)를 첨가한 후 DMF(10.0 mL) 중 N-BOC-1,3-프로판디아민(1.07 g, 6.12 mmol) 용액을 직접 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 진공에서 증발시키고 잔류물을 에틸 아세테이트(100 mL)에 용해시켰다. 생성된 용액을 0.5 N 중황산칼륨 용액(100 mL), 포화 중탄산나트륨 용액(2 x 100 mL) 및 염수(100 mL)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고, 진공에서 증발시켰다. 잔류물을 플래시 크로마토그래피(DCM - DCM 중 10% 메탄올 (v/v) 구배 0:100에서 100:0까지 상승, 생성

물이 용출될 때까지 100:0에서 유지)로 정제하여 표제 화합물(1.16 g, 66%)을 황색을 띠는 점성 오일로 얻었다. LC-MS 99% (ELSD).

[0456] LRMS (m/z): 1080 [M+1]¹⁺

[0457] LC-MS r.t. (min): 1.51³

[0458] 중간체 4:

[0459] 3,3'-((2-((3-((3-아미노프로필)아미노)-3-옥소프로폭시)메틸)-2-(1-아지도-3,6,9,12-테트라옥사펜타데칸-15-아미도)프로판-1,3-디일)비스(옥시))비스(N-(3-아미노프로필)프로판아미드) 트리스(2,2,2-트리플루오로아세테이트) 합성

[0460] DCM(10 mL) 중 di-tert-부틸 (10-(1-아지도-3,6,9,12-테트라옥사펜타데칸-15-아미도)-10-(13,13-디메틸-5,11-디옥소-2,12-디옥사-6,10-디아자테트라데실)-5,15-디옥소-8,12-디옥사-4,16-디아자노나데칸-1,19-디일)디카르바메이트(1.16 g, 1.08 mmol)의 용액에 TFA(10 mL, 131 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 2시간 후 반응 혼합물을 진공에서 증발시키고 톨루엔(3 x 10 mL) 및 DCM(3 x 10 mL)과 함께 공동 증발시켜 조 표제 생성물을 황색을 띠는 점성 오일로 얻었다.

[0461] LRMS (m/z): 260 [M+3]³⁺, 390 [M+2]²⁺, 780 [M+1]¹⁺,

[0462] 중간체 5:

[0463] (2R,3R,4R,5R,6R)-5-아세트아미도-2-(아세톡시메틸)-6-((5-((2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시)-5-옥소펜틸)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4-디일 디아세테이트

[0464] 5-((2R,3R,4R,5R,6R)-3-아세트아미도-4,5-디아세톡시-6-(아세톡시메틸)테트라하이드로-2H-피란-2-일)옥시)펜탄산(문헌[J. Am. Chem Soc., 2014, 136, 16958-16961]에 따라 수득, 3.00 g, 6.70 mmol) 및 N-하이드록시숙신이미드(926 mg, 8.05 mmol)를 DCM(50 mL)에 용해시켰다. 다음으로, EDCI.HCl(1.54 g, 8.05 mmol) 및 4-(디메틸아미노)피리딘(82 mg, 0.67 mmol)을 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 DCM으로 희석하고 생성된 용액을 0.5 N 중황산칼륨 용액(150 mL), 포화 중탄산나트륨 용액(150 mL) 및 염수(150 mL)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고, 진공에서 증발시켜 표제 화합물(3.60 g, 99%)을 백색 포말로서 수득하였다. LC-MS 기반 순도 99% (ELSD).

[0465] LRMS (m/z): 545 [M+1]¹⁺

[0466] LC-MS r.t. (min): 1.07³

[0467] 중간체 6:

[0468] [(3R,6R)-3,4-비스(아세틸옥시)-6-{4-[(3-{3-[2-(1-아지도-3,6,9,12-테트라옥사펜타데칸-15-아미도)-3-(2-{[3-(5-{[(2R,5R)-4,5-비스(아세틸옥시)-6-[(아세틸옥시)메틸]-3-아세트아미도옥산-2-일]옥시}펜탄아미도)프로필]카르바모일}에톡시)-2-[(2-{[3-(5-{[(2R,5R)-4,5-비스(아세틸옥시)-6-[(아세틸옥시)메틸]-3-아세트아미도옥산-2-일]옥시}펜탄아미도)프로필]카르바모일}에톡시)메틸]프로폭시]프로판아미도)프로필]카르바모일]부톡시}-5-아세트아미도옥산-2-일]메틸 아세테이트

[0469] 3,3'-((2-((3-((3-아미노프로필)아미노)-3-옥소프로폭시)메틸)-2-(1-아지도-3,6,9,12-테트라옥사펜타데칸-15-아미도)프로판-1,3-디일)비스(옥시))비스(N-(3-아미노프로필)프로판아미드) 트리스(2,2,2-트리플루오로아세테이트)(1.21 g, 1.08 mmol)를 DMF(10 mL) 및 DIPEA(1.69 mL, 9.70 mmol)의 혼합물에 용해시켰다. 다음으로, (2R,3R,4R,5R,6R)-5-아세트아미도-2-(아세톡시메틸)-6-((5-((2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시)-5-옥소펜틸)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4-디일 디아세테이트(2.20 g, 4.04 mmol)를 첨가하고 반응 혼합물을 주말 동안 실온에서 교반하였다. 다음으로, 반응 혼합물을 진공에서 증발시키고 잔류물을 플래시 크로마토그래피(DCM - DCM 중 30% 메탄올 (v/v) 구배 0:100에서 100:0으로 상승)로 정제하여 표제 화합물(1.84 g, 83%)을 황색을 띠는 포말로서 수득하였다. LC-MS 95% (ELSD).

[0470] LRMS (m/z): 2068 [M+1]¹⁺

- [0471] LC-MS r.t. (min): 1.18³
- [0472] 중간체 7:
- [0473] **3가 GalNAc-아지드**
- [0474] [(3R,6R)-3,4-비스(아세틸옥시)-6-{4-[(3-{3-[2-(1-아지도-3,6,9,12-테트라옥사펜타데칸-15-아미도)-3-(2-{[3-(5-{[(2R,5R)-4,5-비스(아세틸옥시)-6-[(아세틸옥시)메틸]-3-아세트아미도옥산-2-일]옥시}펜탄아미도)프로필]카르바모일}에톡시)-2-[(2-{[3-(5-{[(2R,5R)-4,5-비스(아세틸옥시)-6-[(아세틸옥시)메틸]-3-아세트아미도옥산-2-일]옥시}펜탄아미도)프로필]카르바모일}에톡시)메틸]프로폭시]프로판아미도)프로필]카르바모일}부톡시)-5-아세트아미도옥산-2-일]메틸 아세테이트(300 mg, 0.145 mmol)를 트리에틸아민(2.00 mL, 14.4 mmol), 메탄올(2.00 mL) 및 물(2.00 mL)의 혼합물에 용해시키고, 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 2시간 후 반응 혼합물을 진공에서 증발시켰다. 잔류물을 정제용 MP-LC^{2B}로 정제하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(164 mg, 67%)을 백색 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 97%.
- [0475] LRMS (m/z): 1688 [M-1]¹⁻
- [0476] LC-MS r.t. (min): 1.99^{1A}
- [0477] **3가-GalNAc-SO1861 및 GalNAc-SO1861 합성(도 2, 4)**
- [0478] 중간체 8:
- [0479] **SO1861-NH₂**
- [0480] SO1861-아지드(6.89 mg, 3.20 μmol)를 32 mM 탄산칼륨(150 μL, 4.80 μmol)과 아세토니트릴(150 μL)의 혼합물에 용해시켰다. 그 직후, THF(32 μL, 32 μmol) 중 1.0 M 트리메틸포스핀 용액을 첨가하고 생성된 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 30분 후, 반응 혼합물을 정제용 MP-LC에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(5.30 mg, 78%)을 백색 솜털형 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 94%.
- [0481] LRMS (m/z): 1062 [M-2]²⁻
- [0482] LC-MS r.t. (min): 2.51^{1B}
- [0483] 중간체 9:
- [0484] **SO1861-DBCO**
- [0485] DIPEA(5.98 μL, 34.3 μmol) 및 DMF(2.0 mL)의 용액에 SO1861-아민(48.6 mg, 22.9 μmol) 및 DBCO-NHS(13.0 mg, 32.4 μmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 4시간 후, 반응 혼합물을 50 mM 중탄산나트륨 용액(1.00 mL, 50 μmol)으로 희석하였다. 생성된 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 30분 후, 반응 혼합물을 분취용 MP-LC^{1B}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(16.9 mg, 31%)을 백색 솜털형 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 94%.
- [0486] LRMS (m/z): 2412 [M-1]¹⁻
- [0487] LC-MS r.t. (min): 2.45^{1B}
- [0488] **SO1861-L-3가 GalNAc 합성**
- [0489] SO1861-DBCO(7.50 mg, 3.11 μmol) 및 3가 GalNAc-아지드(5.31 mg, 3.14 μmol)를 물/아세토니트릴(2:1, v/v, 0.90 mL)의 혼합물에 용해시켰다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 2시간 후, 반응 혼합물을 분취용 LC-MS^{3B}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(9.60 mg, 75%)을 백색 솜털형 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 99%.
- [0490] LRMS (m/z): 2050 [M-2]²⁻

- [0491] LC-MS r.t. (min): 2.04^{1B}
- [0492] **S01861-L-GalNAc 합성**
- [0493] S01861-DBCO(1.75 mg, 0.73 μ mol) 및 GalNAc-PEG3-아지드(0.82 mg, 2.18 μ mol)를 물/아세트니트릴(1:1, v/v, 1.00 mL)의 혼합물에 용해시켰다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 2시간 후, 반응 혼합물을 분취용 LC-MS^{3B}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(1.63 mg, 81%)을 백색 솜털형 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 100%.
- [0494] LRMS (m/z): 2790 [M-1]¹⁻
- [0495] LC-MS r.t. (min): 2.15^{1B}
- [0496] **3가 GalNAc-BNA 올리고 합성(도 6, 7)**
- [0497] 중간체 10:
- [0498] 4-{2-아자트리시클로[10.4.0.0^{4,9}]헥사데카-1(12),4(9),5,7,13,15-헥사엔-10-인-2-일}-N-[2-(2-{2-[2-({4-[(E)-{[6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥산아미도]이미노}메틸}페닐}포름아미도)에톡시]에톡시)에톡시)에틸]-4-옥소부탄아미드
- [0499] 4-{2-아자트리시클로[10.4.0.0^{4,9}]헥사데카-1(12),4(9),5,7,13,15-헥사엔-10-인-2-일}-N-{2-[2-(2-{2-[(4-포르밀페닐}포름아미도)에톡시]에톡시)에톡시]에틸]-4-옥소부탄아미드(25.0 mg, 40.9 μ mol) 및 EMCH.TFA(20.8 mg, 61.3 μ mol)를 메탄올(추가 건조, 2.00 mL)에 용해시켰다. 다음으로, TFA(9.39 μ L, 123 μ mol)를 첨가했다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 밤새 실온에 방치하였다. 반응 혼합물을 분취용 MP-LC^{1B}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(16.2 mg, 48%)을 백색 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 91%.
- [0500] LRMS (m/z): 410.2 [M+2]²⁺
- [0501] LC-MS r.t. (min): 1.41²
- [0502] 중간체 11:
- [0503] **3가 GalNAc-L-말레이미드**
- [0504] 3가 GalNAc-아지드(20.3 mg, 12.0 μ mol) 및 4-{2-아자트리시클로[10.4.0.0^{4,9}]헥사데카-1(12),4(9),5,7,13,15-헥사엔-10-인-2-일}-N-[2-(2-{2-[2-({4-[(E)-{[6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥산아미도]이미노}메틸}페닐}포름아미도)에톡시]에톡시]에톡시)에틸]-4-옥소부탄아미드(11.8 mg, 14.4 μ mol)를 물/아세트니트릴(2:1, v/v, 0.90 mL)의 혼합물에 용해시켰다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 2시간 후, 반응 혼합물을 분취용 MP-LC^{2C}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(25.6 mg, 85%)을 백색 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 88%.
- [0505] LRMS (m/z): 2101 [M-405]¹⁻, 2304 [M-202]¹⁻, 2507 [M-1]¹⁻
- [0506] LC-MS r.t. (min): 1.90^{1B}(이성질체로 인한 이중 피크)
- [0507] 중간체 12:
- [0508] **3가 GalNAc-S-말레이미드**
- [0509] 3가 GalNAc-아지드(20.3 mg, 12.0 μ mol) 및 DBCO-말레이미드(10.3 mg, 24.0 μ mol)를 물/아세트니트릴(2:1, v/v, 0.90 mL)의 혼합물에 용해시켰다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 2시간 후, 반응 혼합물을 분취용 MP-LC^{2D}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(22.2 mg, 87%)을 백색 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 85%. 가수분해된 말레이미드 10% 함유.

- [0510] LRMS (m/z): 2115 [M-1]¹⁻
- [0511] LC-MS r.t. (min): 1.60^{1B} (이성질체로 인한 이중 피크)
- [0512] **3가 GalNAc-S-ApoB (또는 HSP27) BNA 올리고 합성**
- [0513] ApoB BNA 올리고 디설파이드(5.00 mg, 0.686 μ mol)에 2.5 mM TCEP(1.00 mL, 2.5 μ mol)를 포함하는 20 mM 중탄산암모늄 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 1시간 후, 반응 혼합물을 분자량 컷오프가 3000 Da인 원심 여과기를 사용하여 여과했다(30분 동안 5000 x g, 2 x 0.50 mL). 다음으로, 잔류물 용액을 2.5 mM TCEP(0.50 mL)를 포함하는 20 mM 중탄산암모늄 용액으로 2회 세척하였고, 매번 상기 기재된 동일한 조건 하에서 여과하였다. 다음으로, 잔류물 용액을 20 mM 중탄산암모늄/아세트니트릴(3:1, v/v, 1.00 mL)로 희석하고 생성된 용액을 3가 GalNAc-S-말레이미드(3.02 mg, 1.43 μ mol)에 직접 첨가했다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 1.5시간 후, 반응 혼합물을 분취용 LC-MS^{4A}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(6.75 mg, quant.)을 백색 숨털형 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 94% (매우 넓은 피크).
- [0514] LRMS (m/z): 2318 [M-4]⁴⁻
- [0515] LC-MS r.t. (min): 1.65^{1A}
- [0516] **3가 GalNAc-S-ApoB (또는 HSP27) 스크램블된 BNA 올리고 합성**
- [0517] ApoB 스크램블된 BNA 올리고 디설파이드(5.00 mg, 0.688 μ mol)에 2.5 mM TCEP(1.00 mL, 2.5 μ mol)를 포함하는 20 mM 중탄산암모늄 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 1시간 후, 반응 혼합물을 분자량 컷오프가 3000 Da인 원심 여과기를 사용하여 여과했다(30분 동안 5000 x g, 2 x 0.50 mL). 다음으로, 잔류물 용액을 2.5 mM TCEP(0.50 mL)를 포함하는 20 mM 중탄산암모늄 용액으로 2회 세척하였고, 매번 상기 기재된 동일한 조건 하에서 여과하였다. 다음으로, 잔류물 용액을 20 mM 중탄산암모늄/아세트니트릴(3:1, v/v, 1.00 mL)로 희석하고 생성된 용액을 3가 GalNAc-S-말레이미드(3.09 mg, 1.46 μ mol)에 직접 첨가했다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 1.5시간 후, 반응 혼합물을 분취용 LC-MS^{4A}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(5.91 mg, 93%)을 백색 숨털형 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 88% (매우 넓은 피크).
- [0518] LRMS (m/z): 2311 [M-4]⁴⁻
- [0519] LC-MS r.t. (min): 1.60^{1A}
- [0520] **3가 GalNAc-L-ApoB (또는 HSP27) BNA 올리고 합성**
- [0521] ApoB BNA 올리고 디설파이드(5.00 mg, 0.686 μ mol)에 2.5 mM TCEP(1.00 mL, 2.5 μ mol)를 포함하는 20 mM 중탄산암모늄 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 1시간 후, 반응 혼합물을 분자량 컷오프가 3000 Da인 원심 여과기를 사용하여 여과했다(30분 동안 5000 x g, 2 x 0.50 mL). 다음으로, 잔류물 용액을 2.5 mM TCEP(0.50 mL)를 포함하는 20 mM 중탄산암모늄 용액으로 2회 세척하였고, 매번 상기 기재된 동일한 조건 하에서 여과하였다. 다음으로, 잔류물 용액을 20 mM 중탄산암모늄/아세트니트릴(3:1, v/v, 1.00 mL)로 희석하고 생성된 용액을 3가 GalNAc-L-말레이미드(3.63 mg, 1.45 μ mol)에 직접 첨가했다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 1.5시간 후, 반응 혼합물을 분취용 LC-MS^{4A}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(6.68 mg, quant.)을 백색 숨털형 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 99% (매우 넓은 피크).
- [0522] LRMS (m/z): 2416 [M-4]⁴⁻
- [0523] LC-MS r.t. (min): 1.97^{1A}
- [0524] **3가 GalNAc-L-ApoB (또는 HSP27) 스크램블된 BNA 올리고 합성**
- [0525] ApoB 스크램블된 BNA 올리고 디설파이드(5.00 mg, 0.688 μ mol)에 2.5 mM TCEP(1.00 mL, 2.5 μ mol)를 포함하

는 20 mM 중탄산암모늄 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 1시간 후, 반응 혼합물을 분자량 컷오프가 3000 Da인 원심 여과기를 사용하여 여과했다(30분 동안 5000 x g, 2 x 0.50 mL). 다음으로, 잔류물 용액을 2.5 mM TCEP(0.50 mL)를 포함하는 20 mM 중탄산암모늄 용액으로 2회 세척하였고, 매번 상기 기재된 동일한 조건 하에서 여과하였다. 다음으로, 잔류물 용액을 20 mM 중탄산암모늄/아세트니트릴(3:1, v/v, 1.00 mL)로 희석하고 생성된 용액을 3가 GalNAc-L-말레이미드(3.68 mg, 1.47 μ mol)에 직접 첨가했다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 1.5시간 후, 반응 혼합물을 분취용 LC-MS^{4A}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(4.71 mg, 71%)을 백색 솜털형 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 96% (매우 넓은 피크).

[0526] LRMS (m/z): 2409 [M-4]⁴⁻

[0527] LC-MS r.t. (min): 1.93^{1A}

[0528] **덴드론(-L-S01861)₄-3가 GalNAc 및 덴드론(-L-S01861)₈-3가 GalNAc 합성**

[0529] 중간체 13:

[0530] **3가 GalNAc-아민 포르메이트**

[0531] 3가 GalNAc-아지드(36.5 mg, 21.6 μ mol)를 물(1.00 mL) 및 아세트니트릴(1.00 mL) 중 탄산칼륨(5.97 mg, 43.2 μ mol) 용액에 용해시켰다. 다음으로, THF(216 μ L, 216 μ mol) 중 1.0 M 트리메틸포스핀 용액을 첨가하고 생성된 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 45분 후 반응 혼합물을 진공에서 증발시키고 잔류물을 물/아세트니트릴(9:1, v/v, 1 mL)에 용해시켰다. 생성된 용액을 직접 분취용 MP-LC^{2B}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(36.1 mg, 98%)을 백색 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 100%.

[0532] LRMS (m/z): 1662 [M-1]¹⁻

[0533] LC-MS r.t. (min): 1.62^{1A}

[0534] 중간체 14:

[0535] **3가 GalNAc-DBCO**

[0536] 3가 GalNAc-아민 포르메이트(17.4 mg, 10.2 μ mol) 및 DBCO-NHS(6.14 mg, 15.3 μ mol)를 DMF(0.50 mL) 중 NMM(2.24 μ L, 20.3 μ mol) 용액에 용해시켰다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 2시간 후 반응 혼합물을 진공에서 증발시키고 잔류물을 물/아세트니트릴(8:2, v/v, 1 mL)에 용해시켰다. 생성된 용액을 직접 분취용 MP-LC^{2C}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(14.2 mg, 72%)을 백색 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 96%.

[0537] LRMS (m/z): 1950 [M-1]¹

[0538] LC-MS r.t. (min): 1.86^{1B}

[0539] 중간체 15:

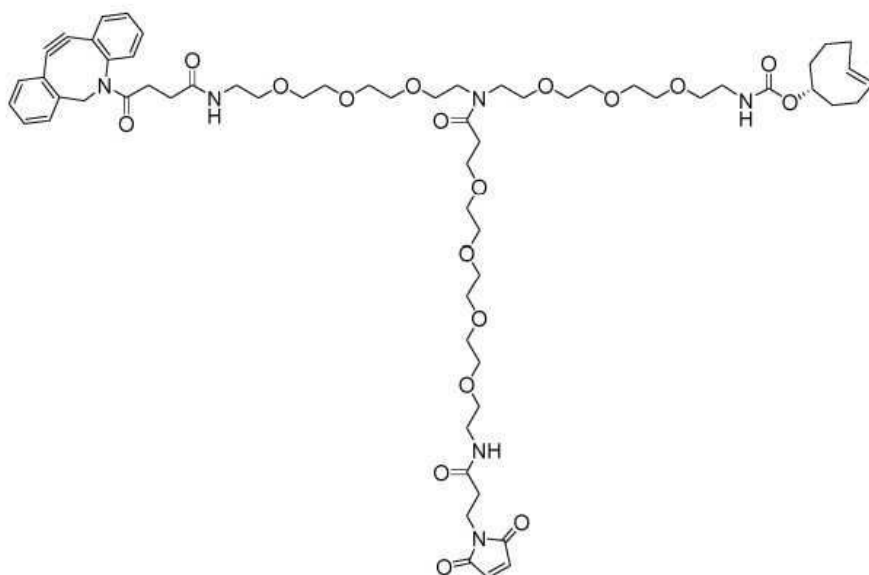
[0540] **덴드론(-L-S01861)₈-아지드**

[0541] 덴드론(-L-S01861)₈-아민(19.6 mg, 1.08 μ mol) 및 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 1-아지도-3,6,9,12-테트라옥사펜타데칸-15-오에이트(4.17 mg, 10.8 μ mol)를 DMF(1.50 mL)에 용해시켰다. 다음으로, DIPEA(1.87 μ L, 10.8 μ mol)를 첨가하고 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 밤새 방치하였다. 반응 혼합물을 분취용 LC-MS^{4B}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(11.7 mg, 59%)을 백색 솜털형 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 92% (매우 넓은 피크).

[0542] LRMS (m/z): 2316 [M-8]⁸⁻,): 2647 [M-7]⁷⁻

- [0543] LC-MS r.t. (min): 4.29^{1A}
- [0544] **텐드론(-L-S01861)₄-3가 GalNAc 합성**
- [0545] 텐드론(-L-S01861)₄-아지드(2.50 mg, 0.266 μ mol) 및 3가 GalNAc-DBCO(1.56 mg, 0.799 μ mol)를 물/아세트니트릴(3:1, v/v, 1.00 mL)의 혼합물에 용해시켰다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 2시간 후, 반응 혼합물을 분취용 LC-MS^{4B}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(2.74 mg, 91%)을 백색 솜털형 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 86% (매우 넓은 피크).
- [0546] LRMS (m/z): 2832 [M-4]⁴⁻
- [0547] LC-MS r.t. (min): 4.07^{1A}
- [0548] **텐드론(-L-S01861)₈-3가 GalNAc 합성**
- [0549] 텐드론(-L-S01861)₈-아지드(2.50 mg, 0.135 μ mol) 및 3가 GalNAc-DBCO(0.79 mg, 0.405 μ mol)를 물/아세트니트릴(3:1, v/v, 1.00 mL)의 혼합물에 용해시켰다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 2시간 후, 반응 혼합물을 분취용 LC-MS^{4B}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(2.03 mg, 74%)을 백색 솜털형 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 100% (매우 넓은 피크).
- [0550] LRMS (m/z): 2559 [M-8]⁸⁻, 2925 [M-7]⁷⁻
- [0551] LC-MS r.t. (min): 4.18^{1A}
- [0552] 중간체 16:
- [0553] **3가 GalNAc-티오아세테이트**
- [0554] 3가 GalNAc-아민 포르메이트(18.7 mg, 11.0 μ mol) 및 4-니트로페닐 3-(아세틸티오)프로파노에이트(5.90 mg, 21.9 μ mol)를 DMF(0.50 mL) 중 NMM(2.41 μ L, 21.9 μ mol) 용액에 용해시켰다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 2시간 후 반응 혼합물을 진공에서 증발시키고 잔류물을 물 중 0.1% 포름산 및 아세트니트릴 중 0.1% 포름산의 혼합물(9:1, v/v, 1 mL)에 용해시켰다. 생성된 용액을 직접 분취용 MP-LC^{2B}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(13.0 mg, 66%)을 백색 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 100%.
- [0555] LRMS (m/z): 1749 [M-43]¹⁻, 1792 [M-1]¹
- [0556] LC-MS r.t. (min): 1.24^{1B}
- [0557] 중간체 17:
- [0558] **DBCO-TCO-3가 GalNAc**
- [0559] 3가 GalNAc-티오아세테이트(13.0 mg, 7.25 μ mol)를 메탄올(0.50 mL)에 용해시켰다. 다음으로, 1 M 수산화나트륨 용액(7.98 μ L, 7.98 μ mol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 30분 후, 반응 혼합물을 20 mM 중탄산암모늄/아세트니트릴(3:1, v/v, 2.00 mL) 중 3기능 링커(Ls-t)(즉, 사포닌 모이어티 링커 Ls의 한 예임)(7.39 mg, 6.13 μ mol)의 신선하게 제조된 용액에 첨가하였다.
- [0560] 3기능 링커는 다음의 IUPAC 명칭을 갖는다: 5,8,11,18,21,24,27-헵타옥사-2,14,30-트리아자트리트리아콘탄산, 14-[16-(11,12-디데하이드로디벤즈[b,f]아조신-5(6H)-일)-13,16-디옥소-3,6,9-트리옥사-12-아자헥사데크-1-일]-33-(2,5-디하이드로-2,5-디옥소-1H-피롤-1-일)-15,31-디옥소-, (1R,4E)-4-시클로옥텐-1-일 에스테르. 3기능 링커는 하기 화학식 XVII을 갖는다:

[0561] [화학식 XVII]



[0562]

[0563] 생성된 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 2시간 후, 반응 혼합물을 분취용 MP-LC^{2A}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(3.83 mg, 21%)을 백색 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 89%.

[0564] LRMS (m/z): 2409 [M-546]¹⁻, 2955 [M-1]¹⁻

[0565] LC-MS r.t. (min): 2.66^{1B}

[0566] 중간체 18:

[0567] 메틸테트라진-L-ApoB BNA 올리고

[0568] ApoB BNA 올리고 디설파이드(5.00 mg, 0.686 μ mol)에 2.5 mM TCEP(1.00 mL, 2.5 μ mol)를 포함하는 20 mM 중탄산암모늄 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 1시간 후, 반응 혼합물을 분자량 컷오프가 3000 Da인 원심 여과기를 사용하여 여과했다(30분 동안 5000 x g, 2 x 0.50 mL). 다음으로, 잔류물 용액을 2.5 mM TCEP(0.50 mL)를 포함하는 20 mM 중탄산암모늄 용액으로 2회 세척하였고, 매번 상기 기재된 동일한 조건 하에서 여과하였다. 다음으로, 잔류물 용액을 20 mM 중탄산암모늄(1.50 mL)으로 희석하고 생성된 혼합물을 아세트니트릴(0.5 mL) 중 (E)-1-(4-((2-(6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노일)하이드라지닐리덴)메틸)벤즈아미도)-N-(4-(6-메틸-1,2,4,5-테트라진-3-일)벤질)-3,6,9,12-테트라옥사펜타데칸-15-아미드(1.36 mg, 1.73 μ mol) 용액에 직접 첨가했다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 30분 후 반응 혼합물을 동결시키고 밤새 동결건조하여 조 표제 생성물을 분홍색의 솜털형 고체로 얻었다. 조 생성물에 20 mM 중탄산암모늄 용액(1.50 mL)을 첨가하고 생성된 현탁액을 0.45 μ m 주사기 필터로 여과하였다. 여과액을 밤새 동결건조하여 표제 생성물(5.44 mg, quant)을 분홍색의 솜털형 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 90% (매우 넓은 피크).

[0569] LRMS (m/z): 2648 [M-3]³⁻

[0570] LC-MS r.t. (min): 0.62⁴

[0571] 중간체 19:

[0572] 메틸테트라진-L-ApoB 스크램블된 BNA 올리고

[0573] ApoB 스캐폴드된 BNA 올리고 디설파이드(5.00 mg, 0.688 μmol)에 2.5 mM TCEP(1.00 mL, 2.5 μmol)를 포함하는 20 mM 중탄산암모늄 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 1시간 후, 반응 혼합물을 분자량 컷오프가 3000 Da인 원심 여과기를 사용하여 여과했다(30분 동안 5000 x g, 2 x 0.50 mL).

다음으로, 잔류물 용액을 2.5 mM TCEP(0.50 mL)를 포함하는 20 mM 중탄산암모늄 용액으로 2회 세척하였고, 매번 상기 기재된 동일한 조건 하에서 여과하였다. 다음으로, 잔류물 용액을 20 mM 중탄산암모늄(1.50 mL)으로 희석하고 생성된 혼합물을 아세트니트릴(0.5 mL) 중 (E)-1-(4-((2-(6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노일)하이드라지닐리덴)메틸)벤즈아미도)-N-(4-(6-메틸-1,2,4,5-테트라진-3-일)벤질)-3,6,9,12-테트라옥사펜타데칸-15-아미드(1.34 mg, 1.70 μmol) 용액에 직접 첨가했다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 30분 후 반응 혼합물을 동결시키고 밤새 동결건조하여 조 표제 생성물을 분홍색의 숨털형 고체로 얻었다. 조 생성물에 20 mM 중탄산암모늄 용액(1.50 mL)을 첨가하고 생성된 현탁액을 0.45 μm 주사기 필터로 여과하였다. 여과액을 밤새 동결건조하여 표제 생성물(5.48 mg, quant)을 분홍색의 숨털형 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 84% (매우 넓은 피크).

[0574] LRMS (m/z): 2639 [M-3]³⁻

[0575] LC-MS r.t. (min): 0.58⁴

[0576] 중간체 20:

[0577] **DBCO-L-ApoB BNA 올리고-3가 GalNAc**

[0578] 메틸테트라진-L-ApoB BNA 올리고(5.44 mg, 0.684 μmol) 및 DBCO-TCO-3가 GalNAc(2.03 mg, 0.687 μmol)에 20 mM 중탄산암모늄/아세트니트릴(3:1, v/v, 1.00 mL)을 첨가했다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 2시간 후, 반응 혼합물을 분취용 LC-MS^{4C}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(2.87 mg, 39%)을 백색 숨털형 고체로 얻었다. LC-MS는 정확한 m/z 값과 함께 여러 개의 넓은 피크를 보여준다.

[0579] LRMS (m/z): 2175 [M-5]⁵⁻, 2718 [M-6]⁴⁻

[0580] LC-MS r.t. (min): 2.60-3.00^{1A}

[0581] 중간체 21:

[0582] **DBCO-L-ApoB 스크램블된 BNA 올리고-3가 GalNAc**

[0583] 메틸테트라진-L-ApoB 스크램블된 BNA 올리고(5.48 mg, 0.692 μmol) 및 DBCO-TCO-3가 GalNAc(1.80 mg, 0.609 μmol)에 20 mM 중탄산암모늄/아세트니트릴(3:1, v/v, 1.00 mL)을 첨가했다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 2시간 후, 반응 혼합물을 분취용 LC-MS^{4C}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(2.15 mg, 33%)을 백색 숨털형 고체로 얻었다. LC-MS는 정확한 m/z 값과 함께 여러 개의 넓은 피크를 보여준다.

[0584] LRMS (m/z): 2169 [M-5]⁵⁻, 2711 [M-6]⁴⁻

[0585] LC-MS r.t. (min): 2.58-3.20^{1A}

[0586] 중간체 22(도 21)

[0587] **3가 GalNAc-티올**

[0588] 3가 GalNAc-티오아세테이트(16.2 mg, 9.02 μmol)를 메탄올(500 μL)에 용해했다. 다음으로, 1.00 M 수산화나트륨 용액(11.0 μL , 11.0 μmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 30분 후, 반응 혼합물을 분취용 MP-LC^{1A}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(13.1 mg, 83%)을 백색 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 98%.

[0589] LRMS (m/z): 1748 [M-H]¹⁻

[0590] LC-MS r.t. (min): 1.78^{1A}

[0591] 중간체 23: (도 21)

- [0592] DBCO-TCO-3가 GalNAc
- [0593] 3기능 링커(Ls)(15.0 mg, 12.4 μmol)를 아세트니트릴(0.50 mL)에 용해시켰다. 다음으로, 20 mM 중탄산암모늄(1.50 mL) 용액을 첨가하고 생성된 용액을 3가 GalNAc-티올(22.7 mg, 13.0 μmol)로 직접 옮겼다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 1시간 후 반응 혼합물을 동결시키고 밤새 동결건조하여 조 표제 생성물을 백색 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 84%.
- [0594] LRMS (m/z): 2409 [M-546]¹⁻, 2955 [M-1]¹⁻
- [0595] LC-MS r.t. (min): 2.63^{1B}
- [0596] 중간체 25(도 22):
- [0597] **메틸테트라진-BNA 올리고**
- [0598] 티올-13- ApoB BNA 올리고 디설파이드(20 mg, 4.17 μmol)에 5.0 mM TCEP(2.00 mL, 10.0 μmol)를 포함하는 20 mM 중탄산암모늄 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 1시간 후, 반응 혼합물을 분자량 컷오프가 3000 Da인 원심 여과기를 사용하여 여과했다(30분 동안 5000 x g, 4 x 0.50 mL). 다음으로, 잔류물 용액을 20 mM 중탄산암모늄(3.00 mL)으로 희석하고 생성된 혼합물을 아세트니트릴(1.0 mL) 중 (E)-1-(4-((2-(6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노일)하이드라지닐리덴)메틸)벤즈아미도)-N-(4-(6-메틸-1,2,4,5-테트라진-3-일)벤질)-,6,9,12-테트라옥사펜타데칸-15-아미드(7.22 mg, 9.16 μmol) 용액에 직접 첨가했다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 1시간 후 반응 혼합물을 동결시키고 밤새 동결건조하여 조 표제 생성물을 분홍색의 숨털형 고체로 얻었다. 조 생성물에 20 mM 중탄산암모늄/아세트니트릴(2:1, v/v, 2.00 mL)을 첨가하고 생성된 용액을 분취용 LC-MS^{1A}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(20.3 mg, 89%)을 분홍색 숨털형 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 93% (넓은 피크).
- [0599] LRMS (m/z): 1817 [M-3]³⁻
- [0600] LC-MS r.t. (min): 0.59³
- [0601] 중간체 26(도 22):
- [0602] **(차단 DBCO)-TCO-3가 GalNAc**
- [0603] DMF(0.50 mL) 중 1-아지도-3,6,9-트리옥사운데칸-11-올(2.17 mg, 9.88 μmol) 용액을 DBCO-TCO-3가 GalNAc(14.6 mg, 4.94 μmol)에 첨가했다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 2시간 후, 반응 혼합물을 분취용 MP-LC^{1C}에 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물(10.00 mg, 64%)을 백색 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 98%.
- [0604] LRMS (m/z): 1750 [단편]
- [0605] LC-MS r.t. (min): 2.33^{1B}
- [0606] **Ls-(차단 DBCO)-BNA 올리고-3가 GalNAc(도 23)**
- [0607] (차단된 DBCO)-TCO-3가 GalNAc(10.0 mg, 3.15 μmol) 및 메틸테트라진-BNA 올리고(10.0 mg, 1.83 μmol)를 20 mM 중탄산암모늄/아세트니트릴(3:1, v/v, 1.00 mL) 용액에 용해시켰다. 반응 혼합물을 1분 동안 진탕하고 실온에 방치하였다. 3시간 후 반응 혼합물을 동결시키고 밤새 동결건조시켰다. 조 생성물을 20 mM 중탄산암모늄(1 mL)에 용해시키고 생성된 용액을 분취용 LC-MS^{1B}에 직접 적용하였다. 생성물에 해당하는 분획을 즉시 함께 모으고, 동결하고 밤새 동결건조하여 표제 화합물 (GalNAc)3-Ls-BNA(11.3 mg, 72%)을 백색 숨털형 고체로 얻었다. LC-MS 기반 순도 95%(위치이성질체로 인한 다중 (넓은) 피크).
- [0608] LRMS (m/z): 2149 [M-4]⁴⁻, 2866 [M-3]³⁻
- [0609] LC-MS r.t. (min): 2.92^{1A}

[0610] 항CD71-사포린 합성

[0611] 맞춤형 CD71mab-사포린 접합체는 Advanced Targeting Systems(미국 캘리포니아 주 샌디에고 소재)에서 생산 및 구입했다. CD71 항체(항-CD71, 클론 OKT-9, InVivoMab)는 BioXCell에서 구입했다.

[0612] HSP27BNA, ApoB 및 ApoB_{scrambled} 올리고 서열

[0613] HSP27(5'-GGCacagccagtGCG-3')[서열번호 1](안티센스 BNA(HSP27)는 BNA였고, 더욱 구체적으로는 BNA^{NC}로서, Zhang 등 (2011)[Y Zhang, Z Qu, S Kim, V Shi, B Liao1, P Kraft, R Bandaru, Y Wu, LM Greenberger and ID Horak, Down-modulation of cancer targets using locked nucleic acid (LNA)-based antisense oligonucleotides without transfection, Gene Therapy (2011) 18, 326-333]에 따르면 5'-GGCacagccagtGCG-3'의 올리고 핵산 서열을 가짐), ApoB(ApoB#01로도 지칭됨)(5'-GCCTCagtctgcttcGCACC-3')[서열번호 2] 및 ApoB_{scrambled}(5'-GGCCTctctacaccgCTCGT-3')[서열번호 3] BNA 올리고, 및 뮤린 및 인간 서열에 적합한 ApoB#02(5'-GCatttggtatTCA-3')[서열번호 12] BNA^{NC} 올리고뉴클레오타이드를 Bio-Synthesis Inc.에서 5'-티올 C6 링커와 함께 주문하였고, BNA 염기는 대문자로 표시하였고, 완전히 포스포로티오에이트 백본을 함유하였다(미국 텍사스주 루이스빌).

[0614] 세포주로부터 RNA 단리 및 유전자 발현 분석

[0615] 세포로부터의 RNA를 단리하고 표준 프로토콜(Biorad)에 따라 분석하였다. 사용된 qPCR 프라이머는 표 A2에 표시되어 있다.

[0616] 표 A2. qPCR(인간 세포)에 사용된 프라이머는 아래에 제시되어 있다:

유전자	프라이머	서열(5'-3')
HSP27	정방향	GCAGTCCAACGAGATCACCA [서열번호 4]
	역방향	TAAGGCTTTACTTGGCGCA [서열번호 5]
ApoB	정방향	AGGGTCCGGGAATCTGATGA [서열번호 6]
	역방향	TGGGCACGTTGTCTTTCAGAG [서열번호 7]
HMS	정방향	CACCCACACACAGCCTACTT [서열번호 8]
	역방향	GTACCCACGCGAATCACTCT [서열번호 9]
GUSB	정방향	GAAAATACGTGTTGGAGAGCT [서열번호 10]
	역방향	COGAGTGAAGATCCCTTTTA [서열번호 11]

[0617]

[0618] 세포 생존능 검증

[0619] 처리 후 세포를 37℃에서 72시간 동안 인큐베이션한 후 제조업체의 지침(CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega)에 따라 수행된 MTS 검정으로 세포 생존능을 결정했다. 간략하게, MTS 용액을 10% FBS가 보충된 페놀 레드(PAN-Biotech GmbH)가 없는 DMEM에서 20x 희석하였다. 세포를 200 μL/PBS 웰로 1회 세척한 후 웰당 100 μL 희석된 MTS 용액을 첨가하였다. 플레이트를 37℃에서 대략 20~30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 Thermo Scientific Multiskan FC 플레이트 판독기(Thermo Scientific)에서 492 nm에서의 OD를 측정했다. 정량화를 위해 '배지 단독' 웰의 배경 신호를 다른 모든 웰에서 뺀 후, 비처리 웰의 배경 보정된 신호를 처리된 웰의 배경 보정된 신호로 나누어 (x 100)을 하여 비처리/처리 세포의 세포 생존능 비율을 계산하였다.

[0620] FACS 분석

[0621] 세포를 각 세포주에 대해 적절한 밀도의 T75 플라스크에서 10% 우태아 혈청(PAN-Biotech GmbH) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(PAN-Biotech GmbH)이 보충된 DMEM(PAN-Biotech GmbH)에 접종하고, 90%의 컨플루언시에 도달할 때까지 72~96시간 동안 인큐베이션했다(5% CO₂, 37℃). 다음으로, 세포를 트립신화(TrypLE Express, Gibco Thermo Scientific)하여 단일 세포로 만들고, 15 mL 팔콘 튜브로 옮기고, 원심분리하였다(1,400 rpm, 3분). 세포 펠렛을 침수시킨 채로 상청액을 버렸다. 500,000개의 세포를 둥근 바닥 FACS 튜브로 옮기고 3 mL의 차가운 DPBS(Mg²⁺ 및 Ca²⁺ 없음, 2% FBS)로 세척했다. 세포를 1800 rpm, 4℃에서 3분 동안 원심분리하고 200 μL의 차가

은 DPBS(Mg²⁺ 및 Ca²⁺ 없음, 2% FBS) 또는 195 μ L의 차가운 DPBS(Mg²⁺ 및 Ca²⁺ 없음, 2% FBS)에 5 μ L의 항체를 함유하는 200 μ L의 항체 용액에 재현탁시켰다. PE 항-인간 CD71(#334106, Biolegend)은 트랜스페린 수용체를 염색하는 데 사용되었고, PE 마우스 IgG2a, κ 이소형 Ctrl FC(#400212, Biolegend)는 일치하는 이소형 대조군으로 사용되었다. PE 항-인간 ASGPR1(#130-122-963, Miltenyi)은 ASGPR1 수용체를 염색하는 데 사용되었고, PE 마우스 IgG1, 이소형 Ctrl(#130-113-762, Miltenyi)은 일치하는 이소형 대조군으로 사용되었다. 샘플을 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 차가운 DPBS(Mg²⁺ 및 Ca²⁺ 없음, 2% FBS)로 2회 세척하고 DPBS(Mg²⁺ 및 Ca²⁺ 없음, 2% FBS) 중 2% PFA 용액을 사용하여 실온에서 20분 동안 고정시켰다. 세포를 차가운 DPBS로 1회 세척하고 FACS 분석을 위해 1000 μ L의 차가운 DPBS에 재현탁시켰다. Sysmex Cube 8 유세포 분석 시스템(Sysmex) 및 FCS Express 7 Research 에디션 소프트웨어를 사용하여 샘플을 분석했다. FACS 분석 결과는 표 A3에 요약되어 있다.

[0622] 표 A3. HepG2 및 Huh7 세포의 ASGPR1 및 CD71의 세포막 수용체 발현 수준

세포주	ASGPR1 발현 수준(MFI)	CD71 발현 수준(MFI)
HepG2	8.8	74.7
Huh7	1.6	109

[0623]

[0624] 1차 마우스 및 인간 간세포로부터 RNA 단리 및 유전자 발현 분석

[0625] 제조업체의 지침에 따라 TRI Reagent® Solution(Thermo Scientific)을 사용하여 세포로부터 RNA를 단리했다. iScript™ cDNA 합성 키트(BioRad)를 사용하여 표준 프로토콜을 사용하여 cDNA로의 전환을 수행했다. 표 A4(마우스) 및 표 A2(인간)에 열거된 특정 DNA 프라이머와 iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix(BioRad) 및 Light Cycler 480(Roche Diagnostics, 스위스 로트크로이츠 소재)을 사용하여 정량적 실시간 PCR 검정(qRT-PCR)을 사용하여 ApoB 발현 수준 및 특정 간세포 하우스키핑 유전자 수준을 결정했다. 2개의 간세포-특이적 하우스키핑 대조군 mRNA에 대한 ApoB 발현을 결정하기 위해 Δ Ct 방법에 의해 분석을 수행하였다. 각 분석 반응은 3회 반복 수행하였다.

[0626] 표 A4. 마우스 1차 간세포의 qPCR 분석에 사용된 프라이머

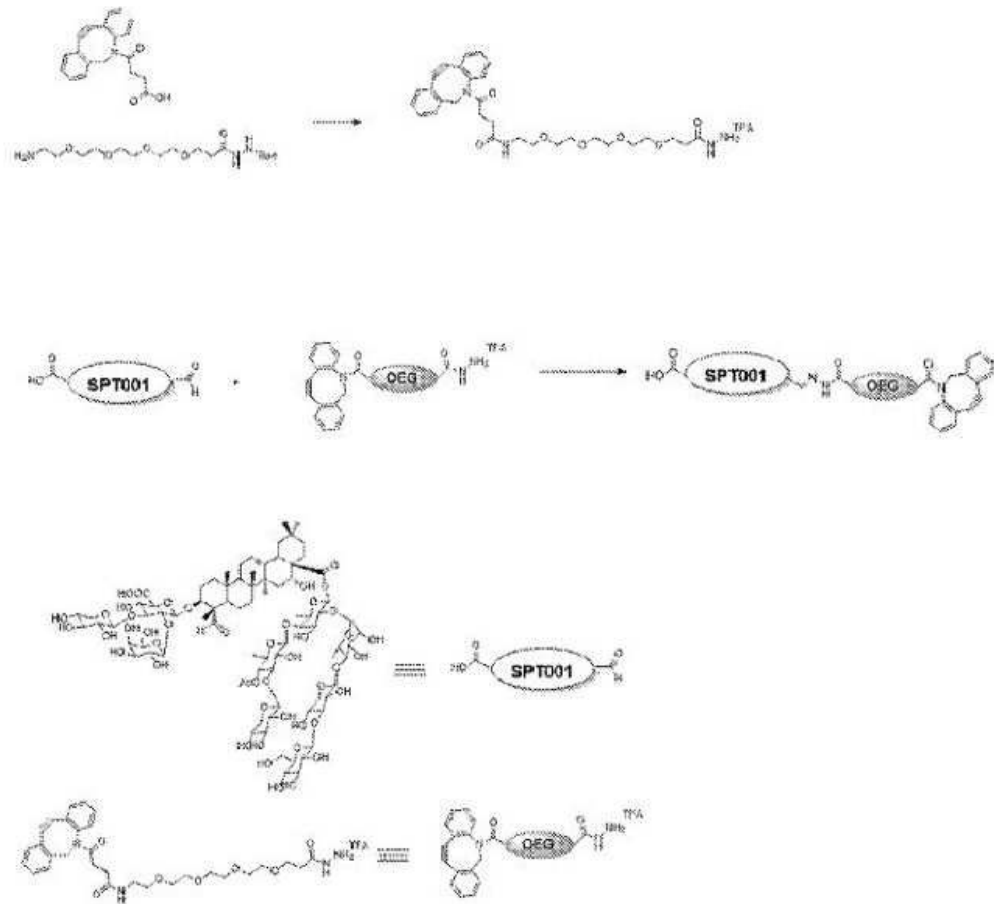
ApoB#02	정방향	GCTAACAATAAGAACCCAGAAGATC [서열번호 13]
	역방향	TGTCGGTCTAAGGATCCTGC [서열번호 14]
Mm PPIA	정방향	GCGGCAGGTCCATCTAAG [서열번호 15]
	역방향	GCCATCCAGCCATTCAGTC [서열번호 16]
Mm SIHA	정방향	GAGGAAGCACACCCCTCTCAT [서열번호 17]
	역방향	GGAGGGGATAGCAGGAGGTA [서열번호 18]

[0627]

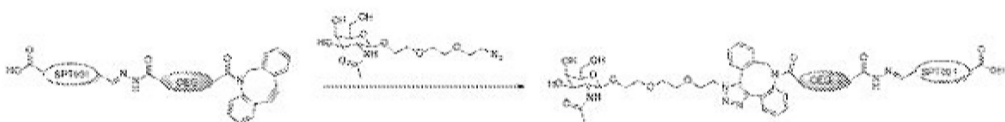
[0628] 마우스 1차 간세포 처리

[0629] 냉동 보존된 1차 마우스 간세포(PRIMACYT Cell Culture Technology GmbH, 독일)를 간세포 해동 배지(HTM, PRIMACYT Cell Culture Technology GmbH, 독일)에서 해동하고, 간세포 세척 배지(HWM, PRIMACYT Cell Culture Technology GmbH, 독일)로 1회 세척했다. 세포를 간세포 플레이팅 배지(HPM Cryo, PRIMACYT Cell Culture Technology GmbH, 독일)에 약 0.275×10^6 개 세포/ml의 밀도로 재현탁시켰다. 48 또는 96-웰 플레이트(Greiner BioOne)의 경우 88,000개 세포/웰 또는 26,400개 세포/웰의 밀도로 콜라겐-I 코팅된 플레이트에 세포를 접종하였다. 세포를 37°C에서 4~6시간 동안 사전배양하여 처리 시작 전에 세포 배양 플레이트에 세포 부착을 허용하였다. 플레이팅 배지를 315 μ l 또는 108 μ l 검정 배지(MHM, PRIMACYT Cell Culture Technology GmbH, 독일)로 교체한 후, PBS에서 10x 농축 모액으로부터 접합체를 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 배양하고

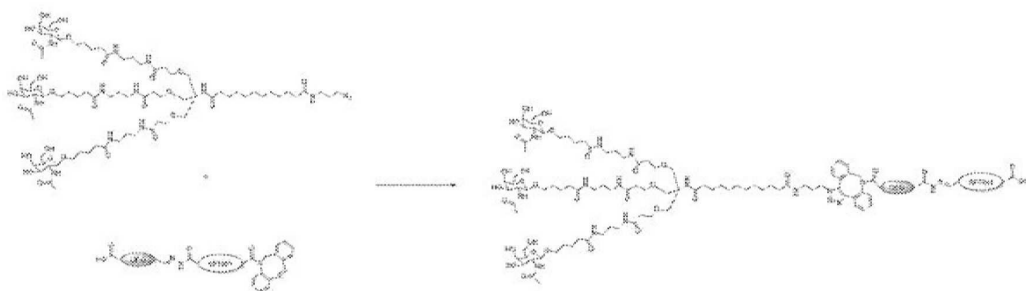
도면2



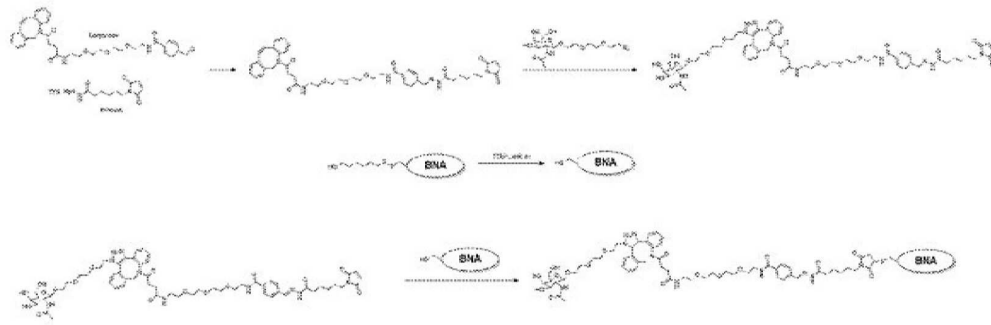
도면3



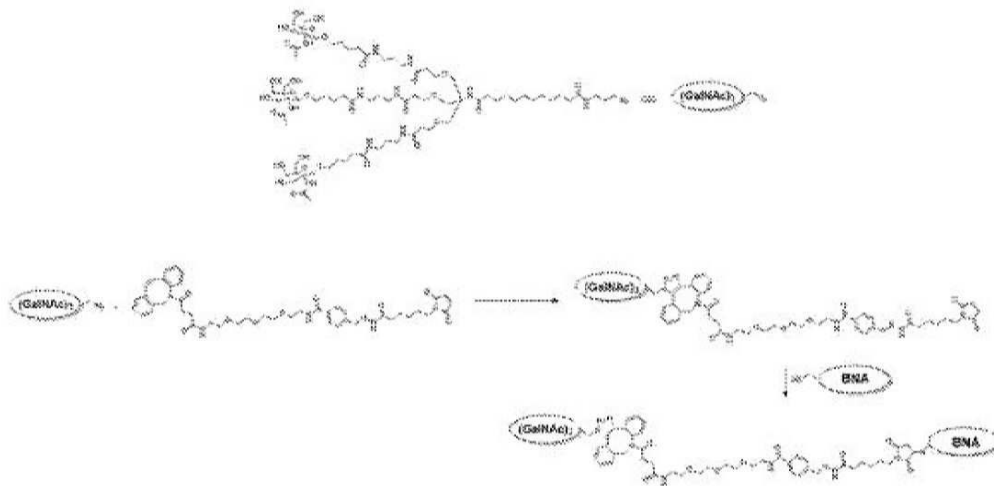
도면4



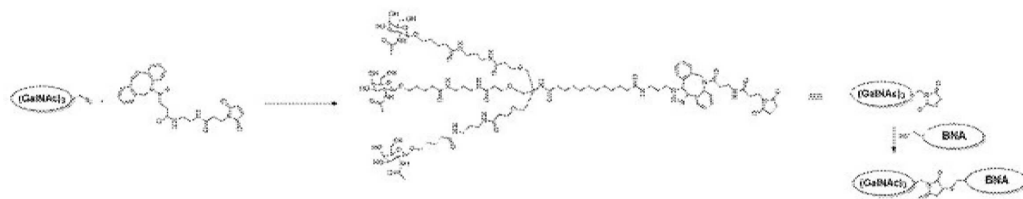
도면5



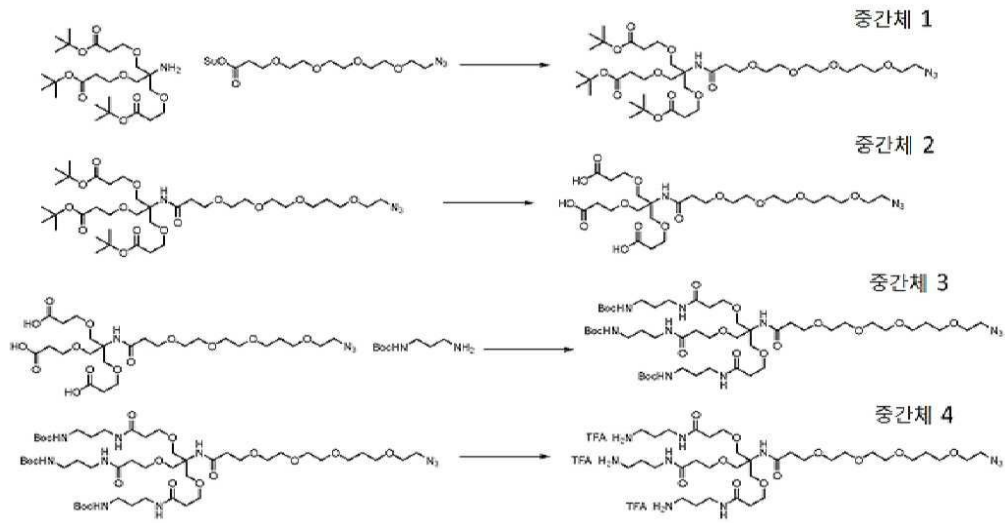
도면6



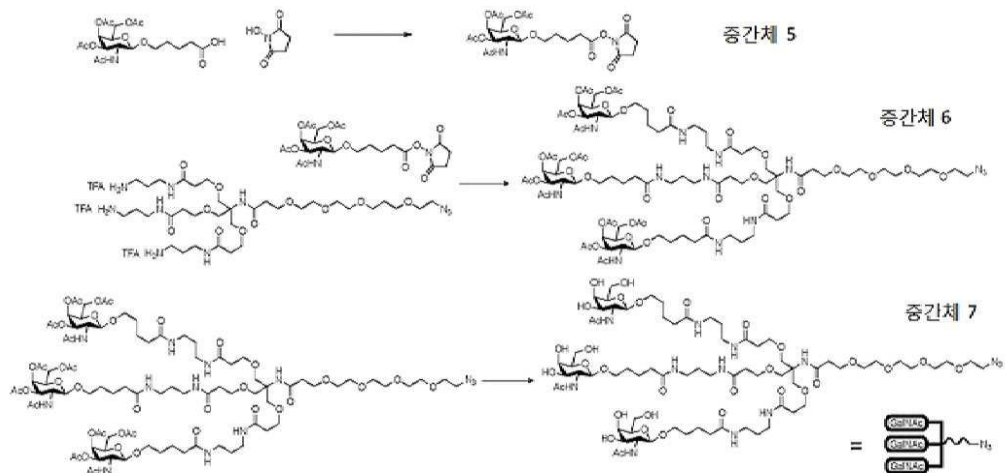
도면7



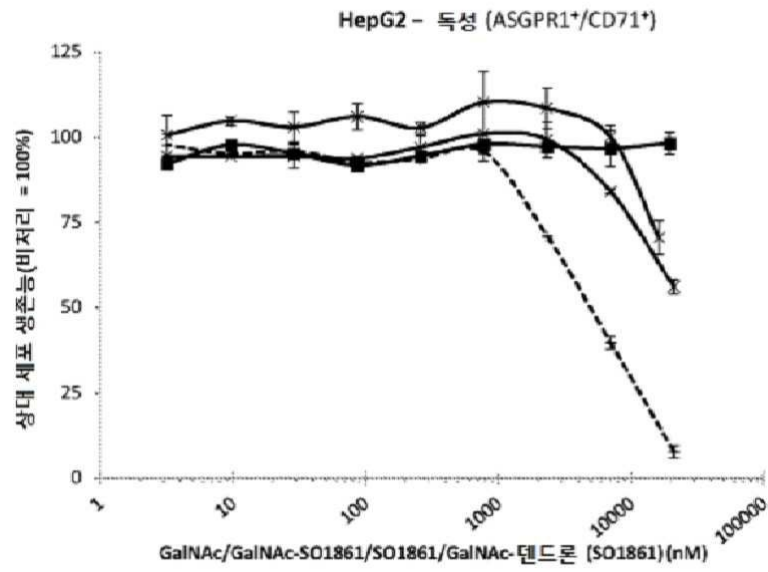
도면8a



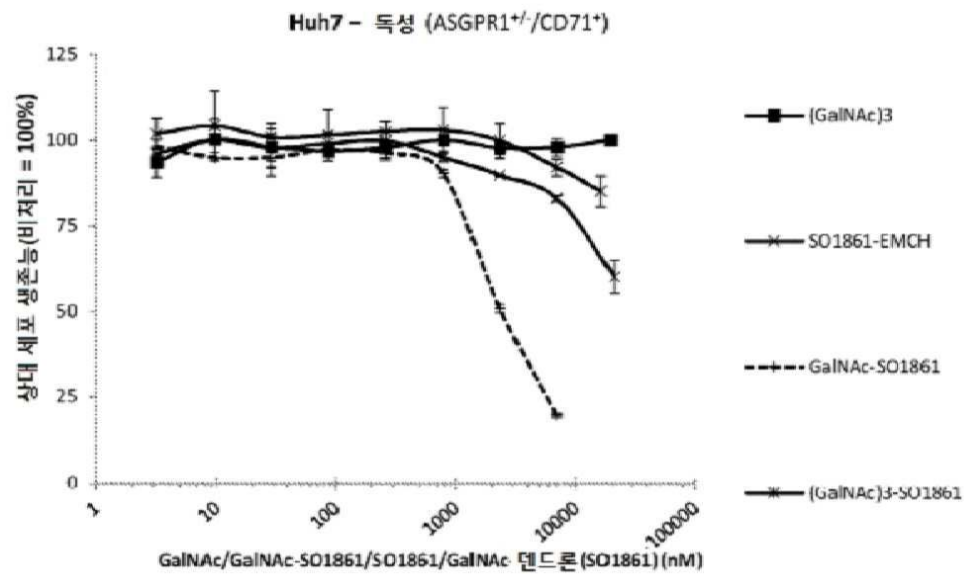
도면8b



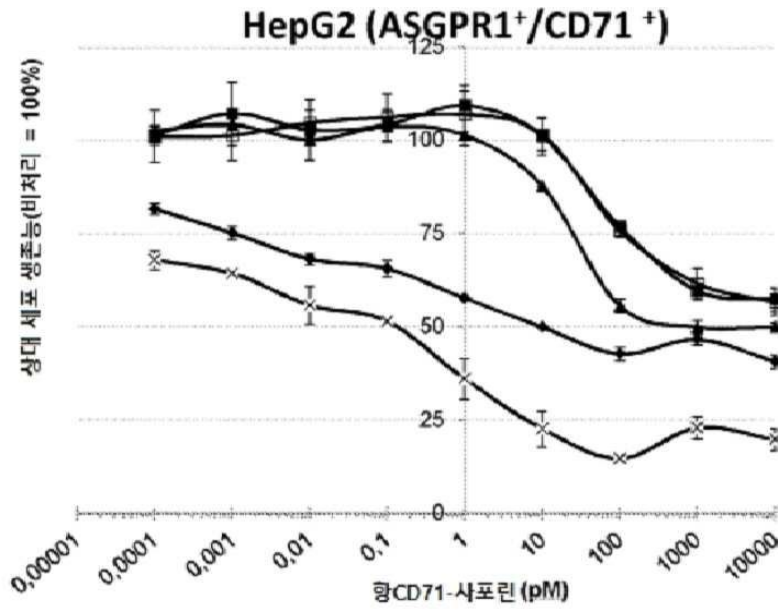
도면9a



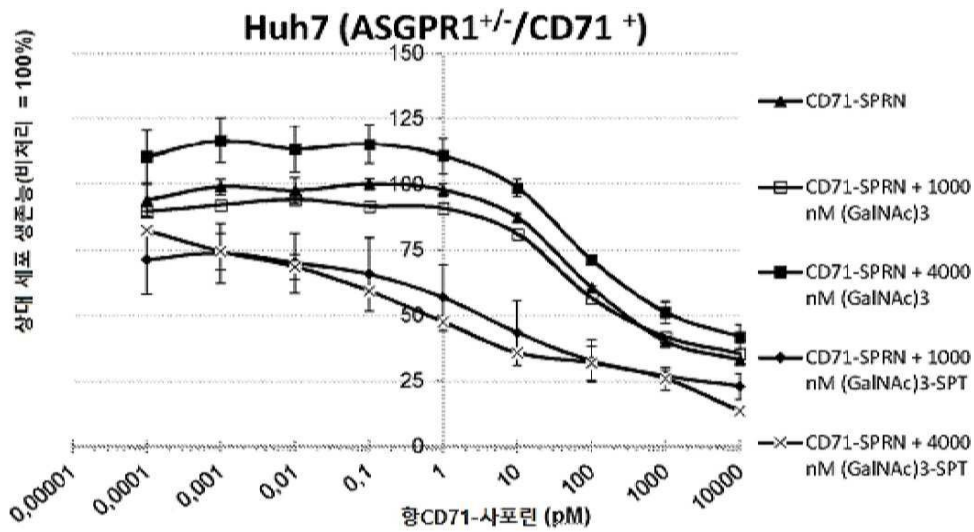
도면9b



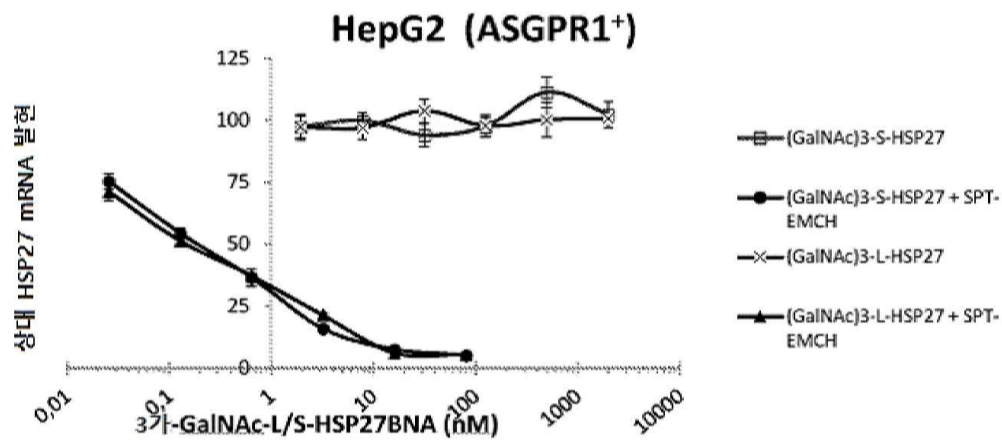
도면10a



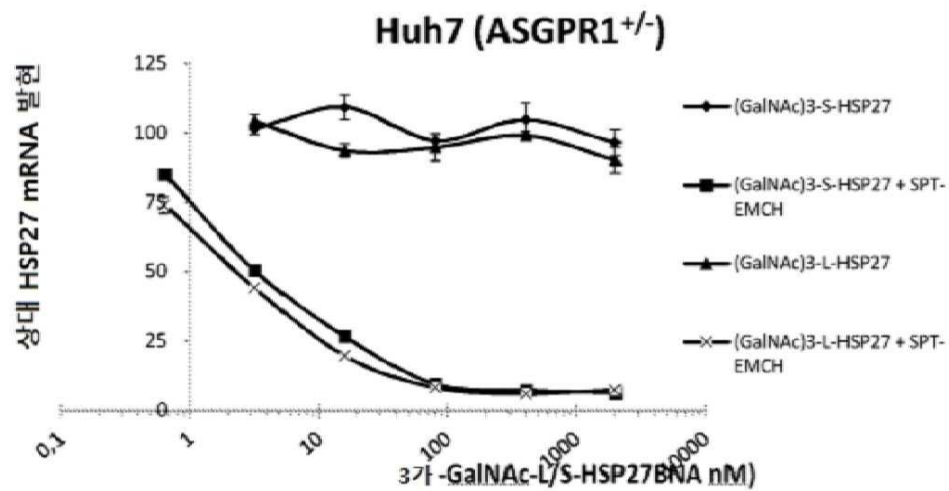
도면10b



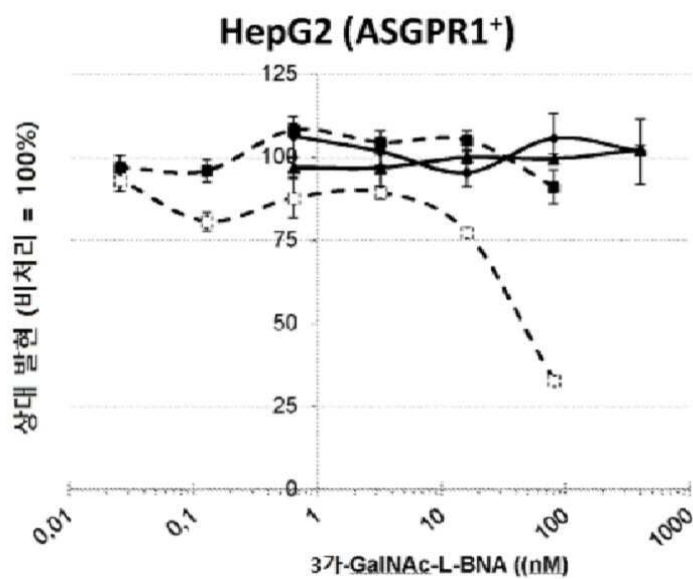
도면11a



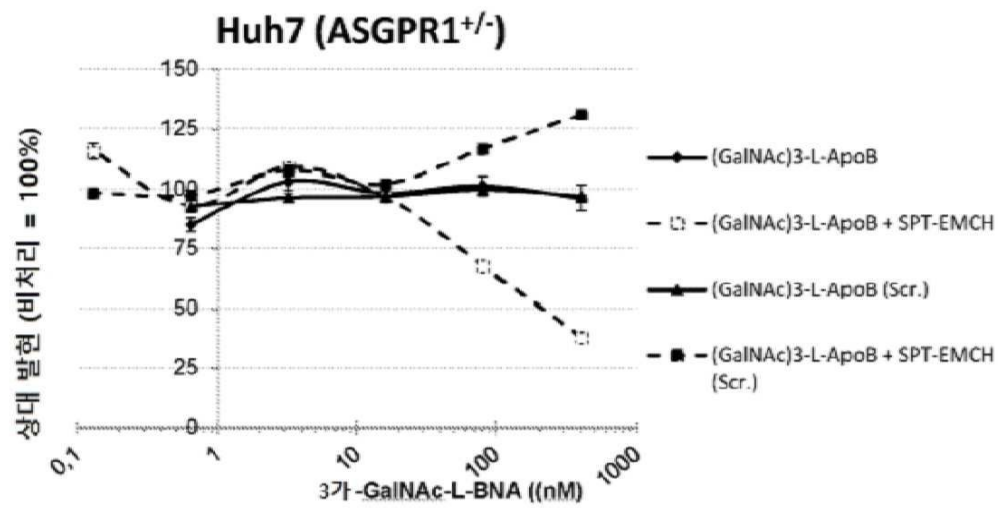
도면11b



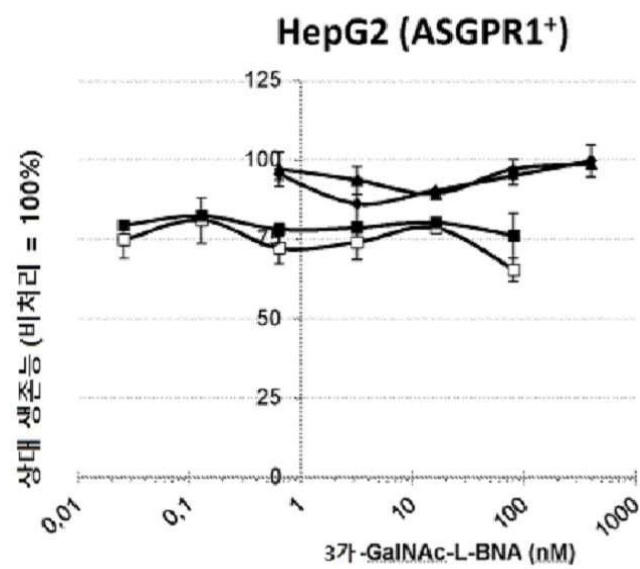
도면12a



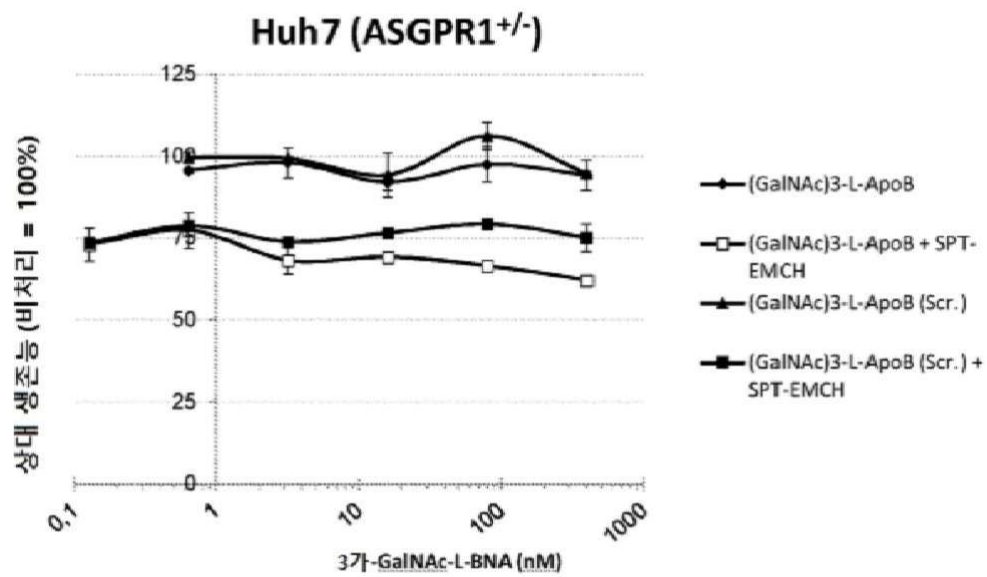
도면12b



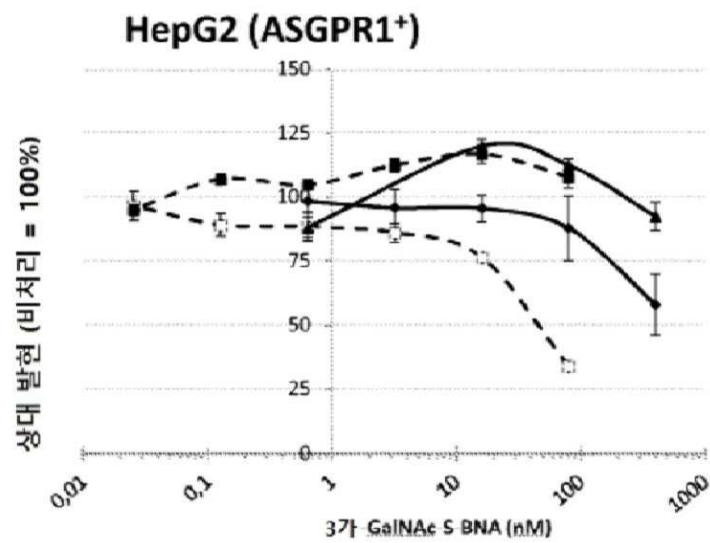
도면13a



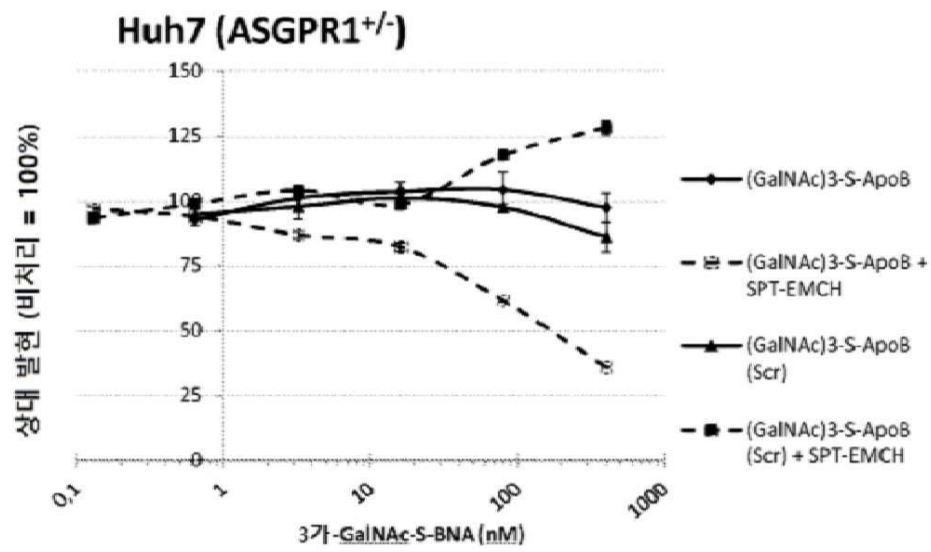
도면13b



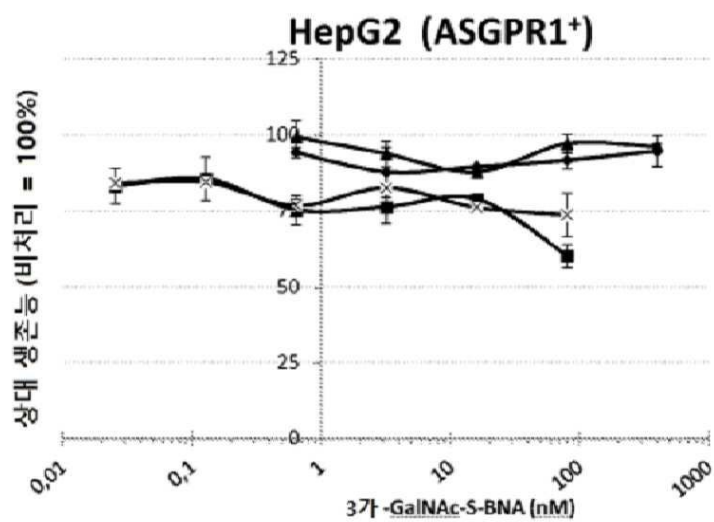
도면14a



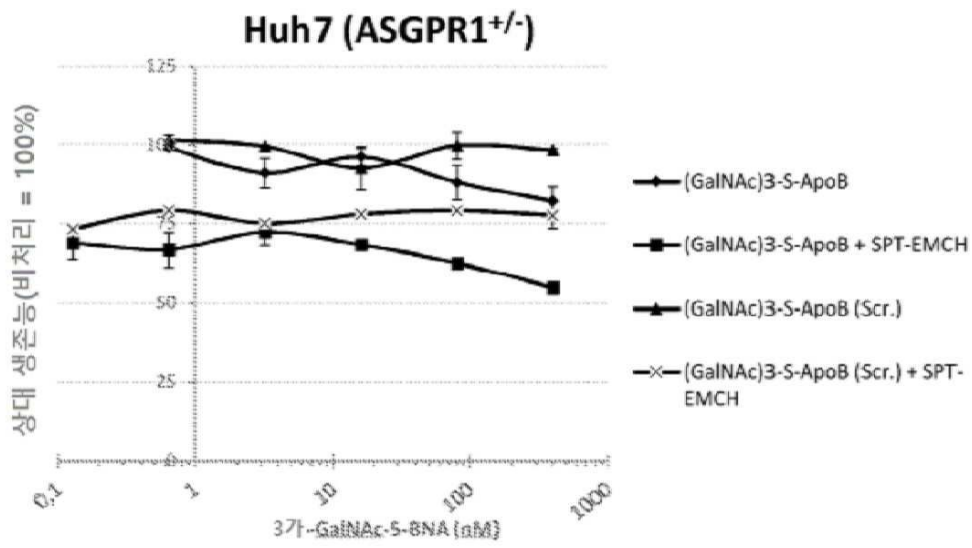
도면14b



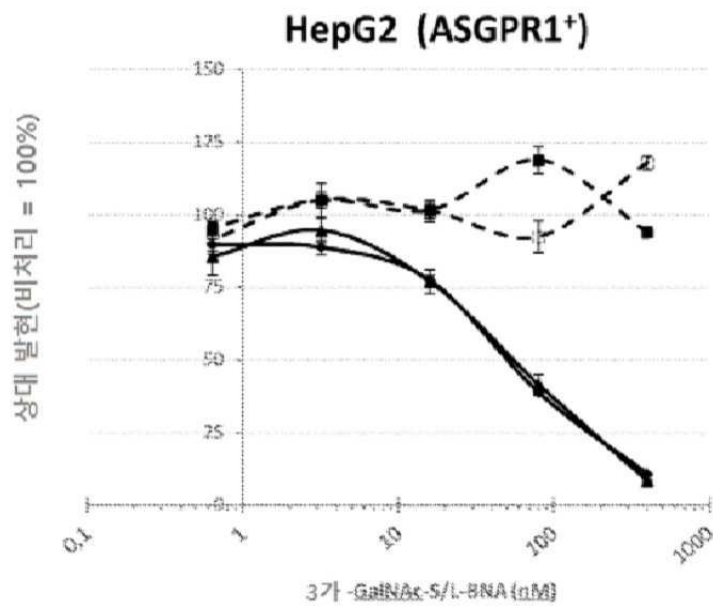
도면15a



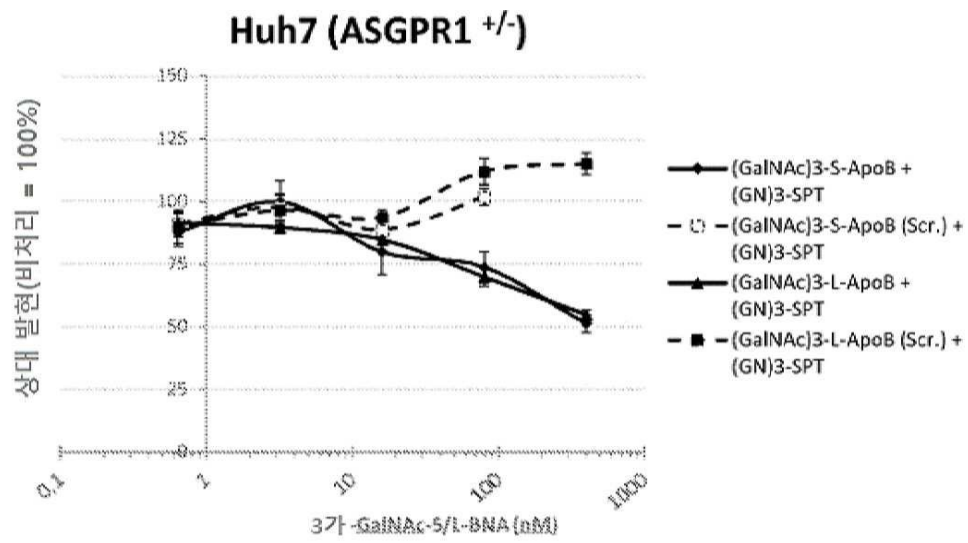
도면15b



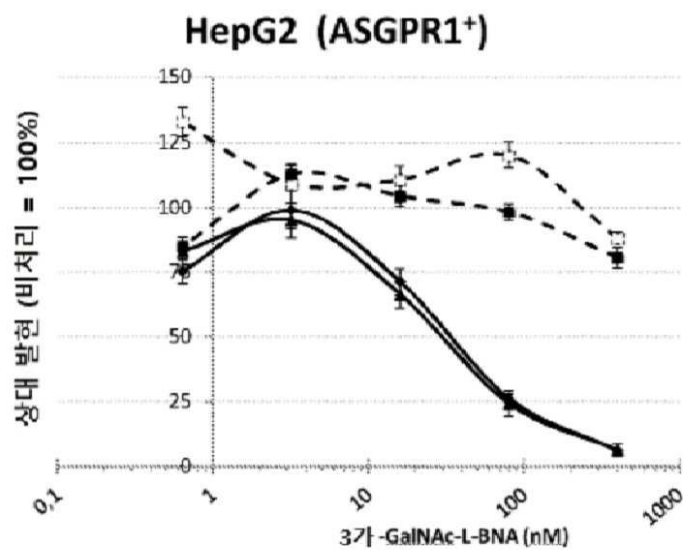
도면16a



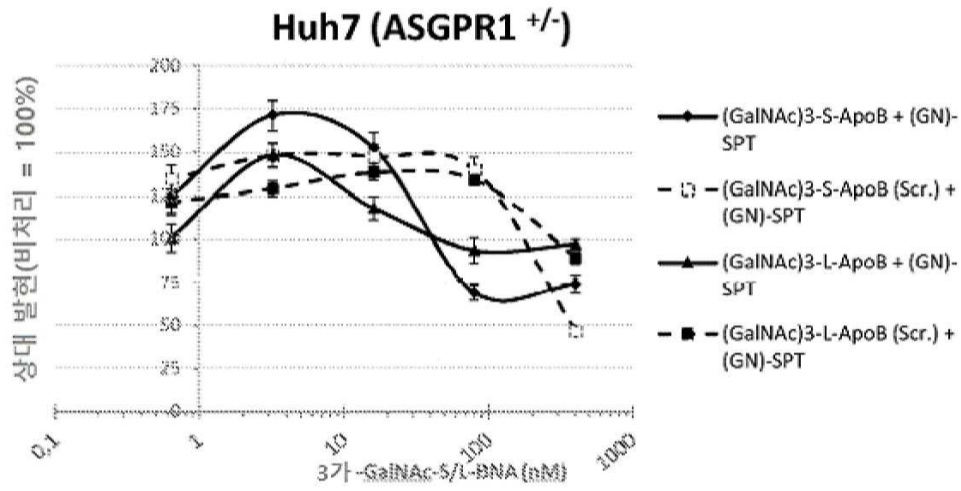
도면16b



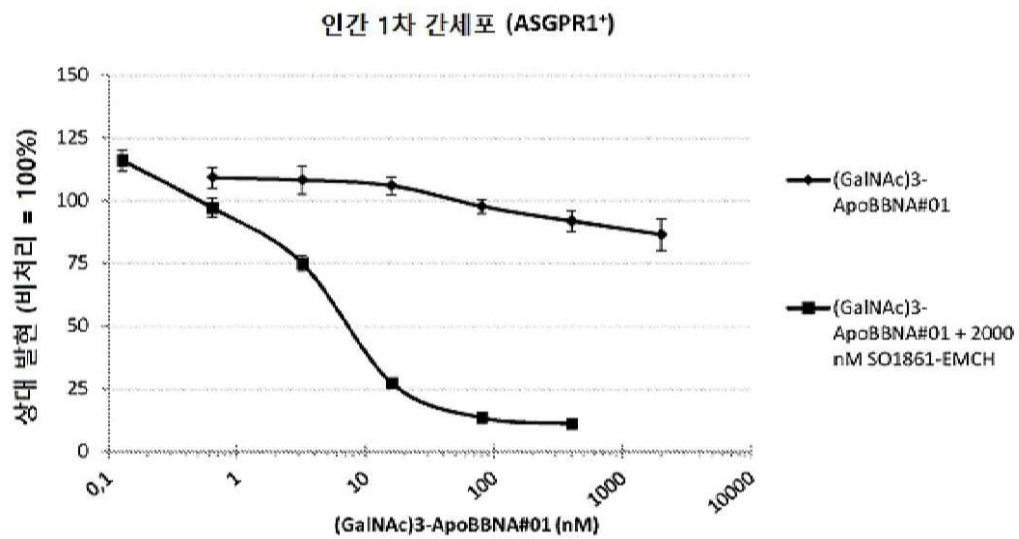
도면17a



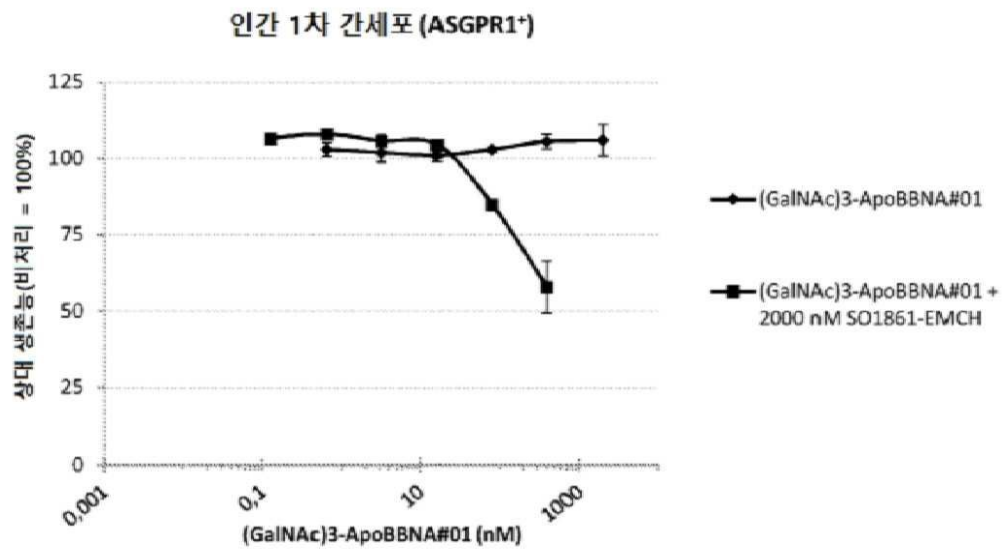
도면17b



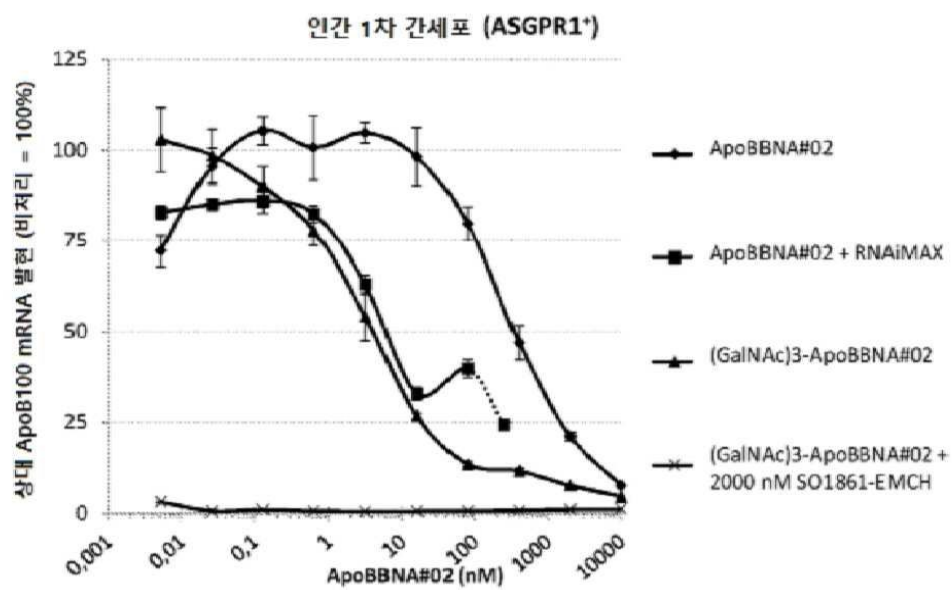
도면18a



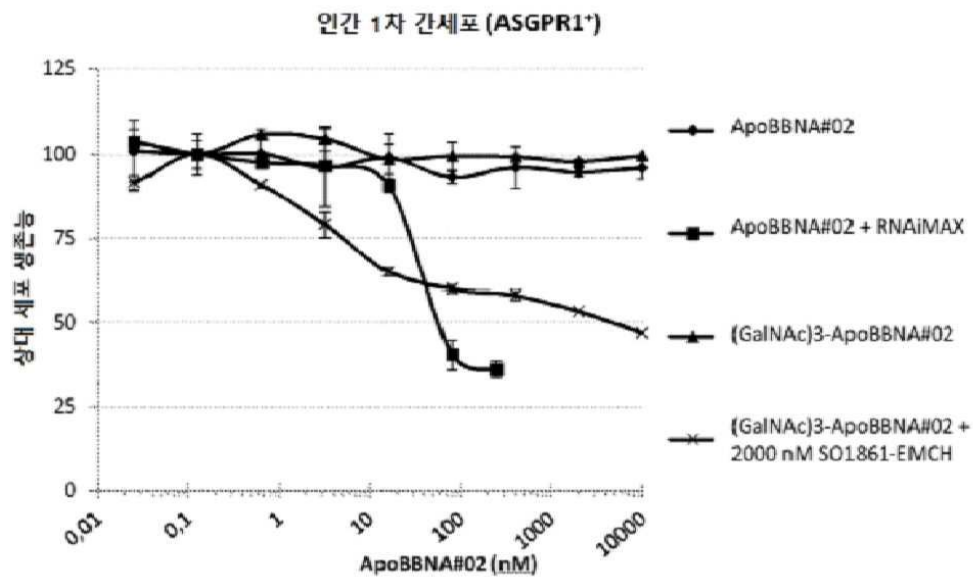
도면18b



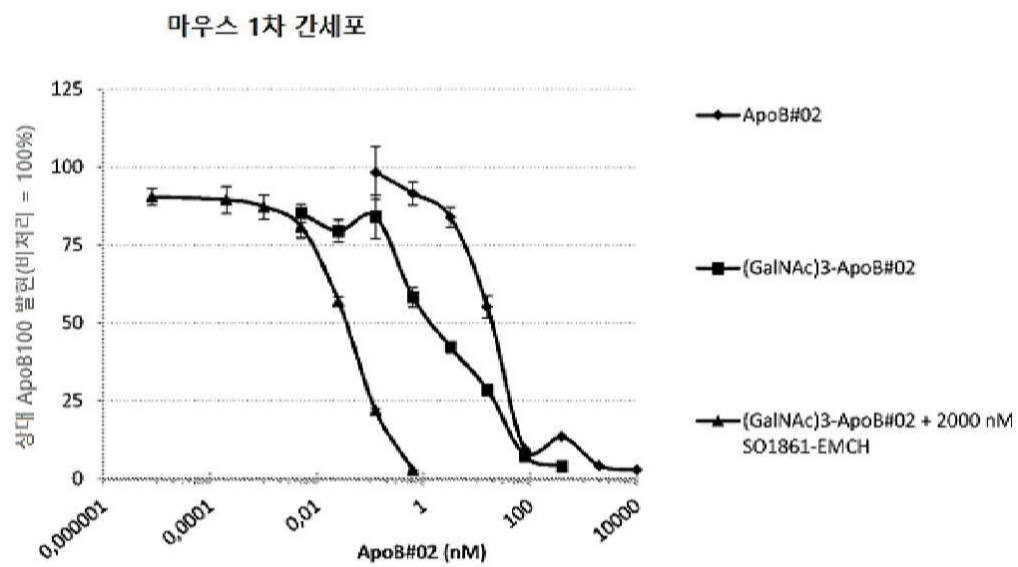
도면19a



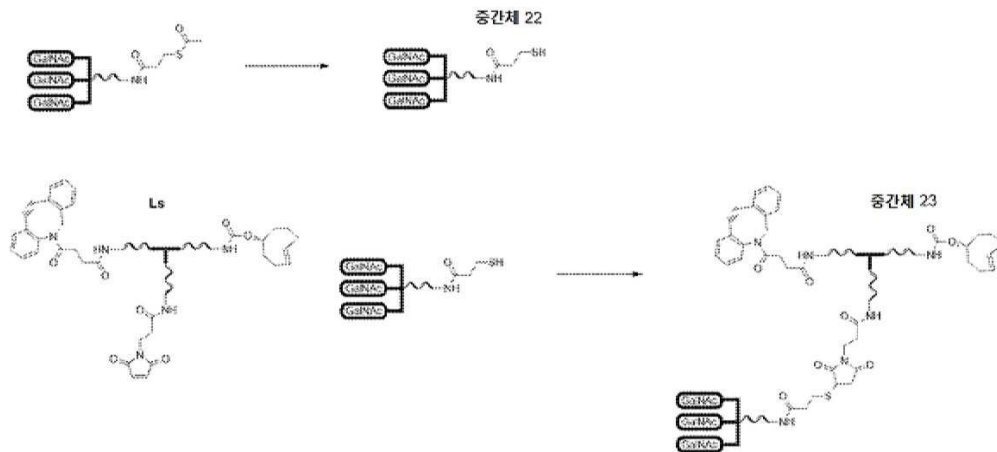
도면19b



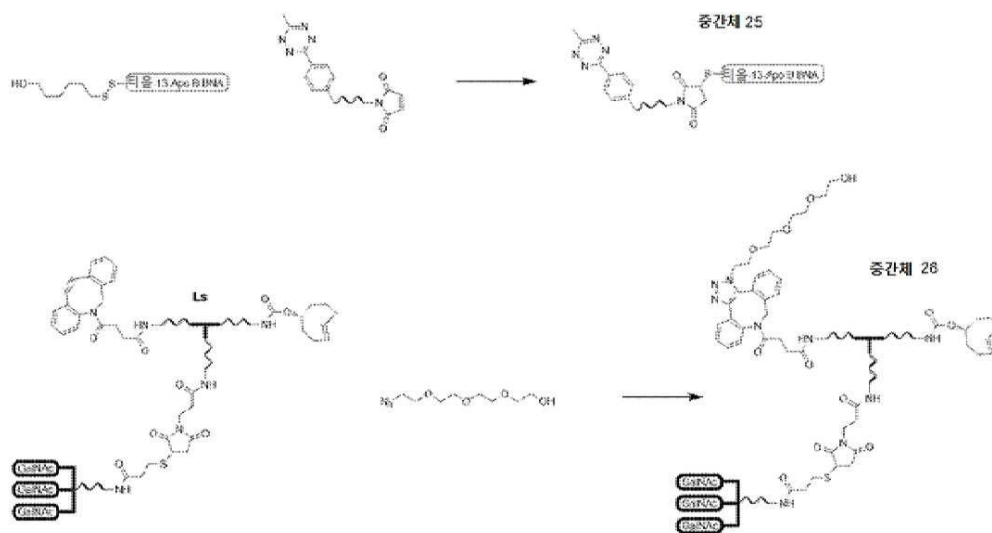
도면20



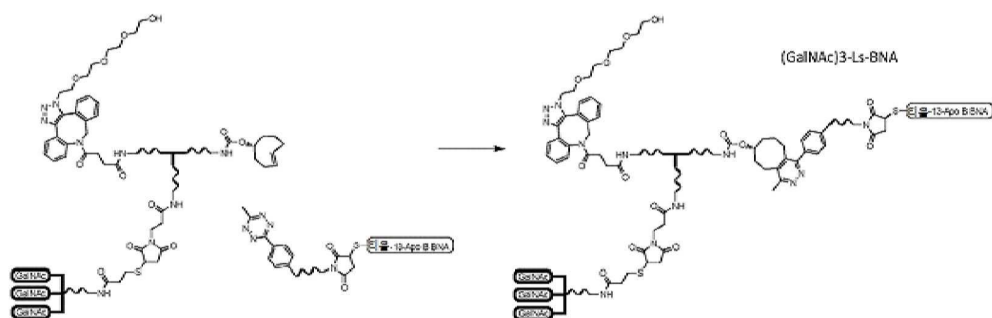
도면21



도면22



도면23



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Sapreme Technologies B.V.

<120> THERAPEUTIC COMBINATION OF GALNAC-OLIGONUCLEOTIDE CONJUGATE AND
SAPONIN, AND USES THEREOF

<130> P6093381PCT

<150> PCT/NL2021/050384

<151> 2021-06-18

<150> NL 2025902

<151> 2020-06-24

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense BNA (HSP27) oligo nucleic acid sequence

<400> 1

ggcacagcca gtggcg

16

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> APOB BNA oligo

<400> 2

gcctcagtct gcttcgcacc

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> APOB scrambled BNA oligo

<400> 3

ggcctctcta caccgctcgt

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HSP27 primer forward sequence

<400> 4

gcagtccaac gagatcacca 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HSP27 primer reverse sequence

<400> 5

taaggtttta cttggcggca 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ApoB primer forward sequence

<400> 6

agggtccggg aatctgatga 20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ApoB primer reverse sequence

<400> 7

tgggcacgtt gtctttcaga g 21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBMS primer forward sequence

<400> 8

caccacaca cagcctactt 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBMS primer reverse sequence

<400> 9

gtacccacgc gaatcactct 20

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUSB primer forward sequence

<400> 10

gaaaatacgt ggttgagag ct 22

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUSB primer reverse sequence

<400> 11

ccgagtgaag atcccccttt ta 22

<210> 12

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ApoB#02

<400> 12

gcattggtat tca 13

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ApoB#02 forward primer

<400> 13

gctaacacta agaaccagaa gatc	24
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ApoB#02 reverse primer	
<400> 14	
tgtccgtcta aggatcctgc	20
<210> 15	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Mm PPIA forward primer	
<400> 15	
gcggcaggtc catctacg	18
<210>	
> 16	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Mm PPIA reverse primer	
<400> 16	
gccatccagc cattcagtc	19
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Mm SDHA forward primer	
<400> 17	
gaggaagcac acccttcat	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Mm SDHA reverse primer	

<400> 18

ggagcggata gcaggaggtta

20