



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0004765
(43) 공개일자 2025년01월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/54 (2017.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61P 19/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)
C07C 229/24 (2006.01) C07C 237/06 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/549 (2017.08)
A61K 31/7088 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7037543
(22) 출원일자(국제) 2023년04월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년11월11일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2023/088459
(87) 국제공개번호 WO 2023/198200
국제공개일자 2023년10월19일
(30) 우선권주장
202210386579.4 2022년04월14일 중국(CN)
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인
쑤저우 리보 라이프 사이언스 컴퍼니, 리미티드
중국, 215300 지양수, 운산 타운 쿤산, 유엔펑 로드 168
(72) 발명자
리양, 지카이
중국, 215300 지양수, 슈조우, 쿤산 씨티, 유산 타운, 유엔펑 로드 168
창, 홍안
중국, 215300 지양수, 슈조우, 쿤산 씨티, 유산 타운, 유엔펑 로드 168
가오, 산
중국, 215300 지양수, 슈조우, 쿤산 씨티, 유산 타운, 유엔펑 로드 168
(74) 대리인
특허법인뉴코리아

전체 청구항 수 : 총 53 항

(54) 발명의 명칭 **접합체 및 조성물 및 이의 제조 방법 및 이의 용도**

(57) 요약

본 개시는 접합체를 제공한다. 접합체는 하나 이상의 전달기 및 하나 이상의 작용기를 포함한다. 각각의 전달기는 공유 결합 또는 연결기를 작용기에 독립적으로 연결된다. 각각의 작용기는 종양에 치료 효과가 있는 소분자 치료제 기로부터 선택된다. 본 개시에 의해 제공되는 접합체는 종양 조직에 효율적으로 표적 전달됨으로써 종양 및 종양 관련 질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

대표도 - 도7

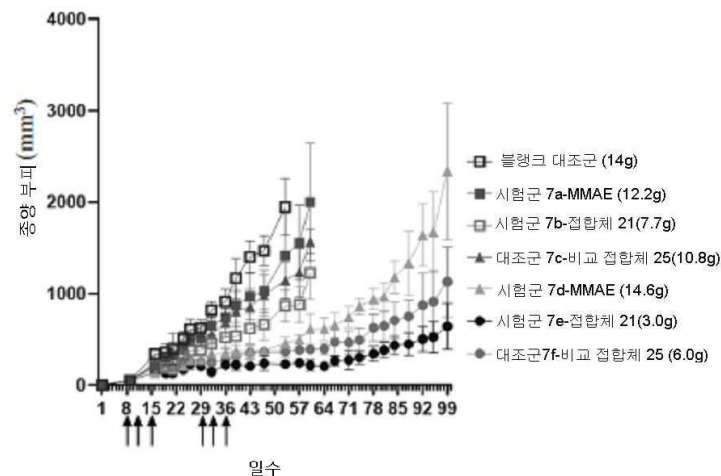


Figure 7

(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)
A61P 19/06 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 35/04 (2018.01)
C07C 229/24 (2013.01)
C07C 237/06 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)

(30) 우선권주장

202210377179.7 2022년04월14일 중국(CN)
202210401035.0 2022년04월14일 중국(CN)

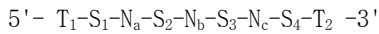
명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 전달기 및 하나 이상의 작용기를 포함하는 집합체로서, 상기 전달기는 앵타머로부터 하나 이상의 수소 원자 또는 하나 이상의 작용성 라디칼을 제거함으로써 형성되고, 상기 앵타머는 연속적인 뉴클레오타이드 서열의 세그먼트를 포함하고, 두 개의 인접한 뉴클레오타이드를 연결하는 기는 독립적으로 인산기이거나 변형된 기를 갖는 인산기이고, 각각의 뉴클레오타이드는 변형되거나 변형되지 않은 A, U, C 또는 G 중 하나로부터 선택되고, 상기 연속적인 뉴클레오타이드 서열은 하기 화학식 (1)로 표시된 바와 같은 서열을 갖고, 상기 전달기 각각은 공유 결합 또는 연결기를 통해 상기 작용기에 독립적으로 연결되고, 상기 작용기 각각은 종양에 치료 효과가 있는 소분자 치료제 기로부터 선택되는, 집합체:

[화학식 (1)]



상기 화학식에서, T_1 은 1 내지 3개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이고, T_2 는 0 내지 15개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이며, T_2 는 T_1 과 완전히 역상보적인 모티프를 포함하지 않고;

S_1 및 S_4 는 각각 3 내지 7개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이며, S_1 와 S_4 는 동일한 길이를 가지며 완전히 역상보적이고;

N_a 및 N_c 는 각각 1 내지 4개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이며, N_a 의 각 뉴클레오타이드는 N_c 의 각 뉴클레오타이드와 상보적이지 않으며, N_a 및 N_c 에서의 U의 총수는 N_a 및 N_c 에서의 모든 뉴클레오타이드의 총수의 50% 초과를 차지하고;

S_2 및 S_3 는 각각 1 내지 4개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이며, S_2 와 S_3 는 동일한 길이를 가지며 완전히 역상보적이고;

N_b 는 3 내지 6개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이며, N_b 의 양 말단의 뉴클레오타이드는 AU 또는 GC 상보체 (complementation)를 형성하지 않는다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 연속적인 뉴클레오타이드 서열은 18 내지 50개 뉴클레오타이드, 또는 20 내지 40개 뉴클레오타이드, 또는 21 내지 36개 뉴클레오타이드, 또는 24 내지 32개 뉴클레오타이드의 길이를 갖는, 집합체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, T_1 은 2개의 뉴클레오타이드로 구성되거나, T_1 은 2개의 뉴클레오타이드로 구성되고 적어도 하나의 C를 포함하거나, 또는 5'-3' 방향으로 T_1 은 CU, UC 또는 AC인, 집합체.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, T_2 는 0 내지 10개의 뉴클레오타이드로 구성되거나, 또는 5'-3' 방향으로 T_2 는 U로 시작하는 1 내지 9개의 뉴클레오타이드로 구성되는, 집합체.

청구항 5

제1항에 있어서, S_1 및 S_4 는 각각 3 내지 5개의 뉴클레오타이드로 구성되고 길이가 동일하거나, 또는 S_1 및 S_4 에 의해 형성되는 역상보체에서 GC 상보체는 모든 상보체의 총 수의 적어도 40%를 차지하거나, 또는 5'-3' 방향으로, S_1 은 GCU이고 S_4 는 AGC이거나, S_1 은 GAGU이고 S_4 는 GCUC이거나, S_1 은 GGAGU이고 S_4 는 GCUCU이거나, 또는 S_1 은

UAUGG이고 S_4 는 CCAUG인, 집합체.

청구항 6

제1항에 있어서, N_a 와 N_c 에서의 뉴클레오타이드의 수의 합은 2 내지 4의 정수이거나, 또는 N_a 와 N_c 에서의 뉴클레오타이드의 수의 합은 3 또는 4이고, N_a 와 N_c 에서의 U의 수의 합은 2 또는 3이거나, 또는 5'-3' 방향으로, N_a 또는 N_c 는 독립적으로 U, UU, UC 또는 CU인, 집합체.

청구항 7

제1항에 있어서, S_2 및 S_3 는 각각 2 또는 3개의 뉴클레오타이드로 구성되고 길이가 동일하거나, 또는 S_2 및 S_3 에 의해 형성되는 역상보체는 적어도 하나의 GC 상보체를 포함하거나, 또는 5'-3' 방향으로, S_2 는 CA이고 S_3 는 UG이거나, S_2 는 AC이고 S_3 는 GU이거나, 또는 S_2 는 GCC이고 S_3 는 GGU인, 집합체.

청구항 8

제1항에 있어서, N_b 는 4개 또는 5개의 뉴클레오타이드로 구성되거나, 또는 5'-3' 방향으로, N_b 는 GACG, GACGU, GACCG, UACU, GUUG 또는 GAUCU인, 집합체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 연속적인 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3에 표시된 바와 같은 서열을 갖는, 집합체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 연속적인 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 4에 표시된 바와 같은 뉴클레오타이드 서열을 갖는, 집합체:

5'- N_6 GGAGUUCAN₁N₂N₃N₄UGN₅GCUCN₇-3' (서열번호 4)

여기서 N_1 , N_2 , N_3 는 각각 독립적으로 A, U, C 및 G 중 하나이고; N_4 는 U, C 또는 G이거나 U, C 또는 G 중 2개로 구성된 모티프이고; N_5 는 U, CU 또는 UU이고; N_6 은 CU, UC 또는 AC이고; N_7 은 U, UU 또는 UUN₈이고, N_8 은 1 내지 15개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이다.

청구항 11

제10항에 있어서, N_1 , N_2 , N_3 및 N_4 로 구성된 모티프 $N_1N_2N_3N_4$ 는 GACG, GACGU, GACCG, UACU, GUUG 또는 GAUCU 중 하나인, 집합체.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 연속적인 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 5 내지 11 중 어느 하나에 표시된 바와 같은 뉴클레오타이드 서열을 갖는, 집합체.

청구항 13

제10항에 있어서, N_8 은 1 내지 8개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이거나, 또는 5'-3' 방향으로, N_8 의 뉴클레오타이드 서열은 CCGAUCUC이거나, 또는 상기 연속적인 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 12 내지 14 중 하나에 표시된 바와 같은 서열을 갖는, 집합체.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 연속적인 뉴클레오타이드 서열에서의 각각의 시토신 뉴클레오타이드는 플루오로 변형된 시토신 뉴클레오타이드이고/이거나 상기 연속적인 뉴클레오타이드 서열에서의 각각의 우라실 뉴클레오타이드는 플루오로 변형된 우라실 뉴클레오타이드이거나, 또는 상기 연속적인 뉴클레오타이드 서열에서의 각각의 뉴클레오타이드는 2'-

메톡시 변형된 뉴클레오타이드이거나, 또는, 상기 연속적인 뉴클레오타이드 서열에서의 N_b 및 S_3 모티프의 하나 이상의 우라실 뉴클레오타이드는 변형된 염기를 갖는, 집합체.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 연속적인 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 15 내지 33 중 하나에 표시된 바와 같은 뉴클레오타이드 서열을 갖는, 집합체.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 연속적인 뉴클레오타이드 서열에서 두 개의 인접한 뉴클레오타이드를 연결하는 적어도 하나의 기는 포스포로티오에이트 기이거나, 두 개의 인접한 뉴클레오타이드를 연결하는 각각의 기는 포스포로티오에이트 기인, 집합체.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 연속적인 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 34 내지 39 중 하나에 표시된 바와 같은 뉴클레오타이드 서열을 갖는, 집합체.

청구항 18

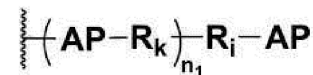
제17항에 있어서, 상기 집합체는 집합체는 하기 화학식 (101)로 표시된 바와 같은 구조를 갖는 집합체:

[화학식 (101)]



상기 화학식에서 각각의 R_{AP} 기는 독립적으로 하기 화학식 (102)로 표시된 바와 같은 구조를 갖는 기이다:

[화학식 (102)]



상기 화학식에서, 각각의 AP 기는 동일하거나 다르며, 독립적으로 상기 전달기 중 하나를 나타내고; R_j , 각각의 R_k 또는 각각의 R_i 는 동일하거나 다르며, 독립적으로 공유 결합 또는 연결기를 나타내고, R_i 및 R_k 는 동시에 공유 결합이 아니고; 각각의 n_1 은 독립적으로 0 내지 4의 정수를 나타내고;

각각의 A_0 기는 동일하거나 다르며, 독립적으로 상기 작용기 중 하나를 나타내고; m_0 은 1 내지 6의 정수이고; n_0 은 1 내지 6의 정수이고; $\sim$ 는 기가 공유 결합으로 연결되는 부위를 나타낸다.

청구항 19

제18항에 있어서, m_0 은 1 내지 4의 정수이고/이거나 n_0 은 1 내지 3의 정수이고/이거나 각각의 n_1 은 독립적으로 0 또는 1의 정수이거나; 또는, m_0 은 1이고/이거나 n_0 은 1이고/이거나 적어도 하나 또는 각각의 n_1 은 0인, 집합체.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 각각의 R_k 또는 각각의 R_i 는 독립적으로 길이가 1 내지 70개 탄소 원자인 직쇄 알킬렌기이거나, 상기 직쇄 알킬렌기의 하나 이상의 탄소 원자는 C(O), NH, O, S, CH=N, S(O)₂, OP(O)₂, OP(O)(S), C₅-C₈ 글리코실렌, C₂-C₁₀ 알케닐렌, C₂-C₁₀ 알키닐렌, C₆-C₁₀ 아릴렌, C₃-C₁₈ 헤테로시클릴렌 및 C₅-C₁₀ 헤테로아릴렌으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기로 대체되고; 상기 직쇄 알킬렌기는 C₁-C₁₀ 알킬, C₆-C₁₀ 아릴, C₅-C₁₀ 헤테로아릴, C₁-C₁₀ 할로알킬, -OC₁-C₁₀ 알킬, -OC₁-C₁₀ 알킬페닐, -C₁-C₁₀ 알킬-OH, -OC₁-C₁₀

할로알킬, $-SC_1-C_{10}$ 알킬, $-SC_1-C_{10}$ 알킬페닐, $-C_1-C_{10}$ 알킬-SH, $-SC_1-C_{10}$ 할로알킬, 할로젠 치환기, $-OH$, $-SH$, $-NH_2$, $-C_1-C_{10}$ 알킬- NH_2 , $-N(C_1-C_{10}$ 알킬)(C_1-C_{10} 알킬), $-NH(C_1-C_{10}$ 알킬), $-N(C_1-C_{10}$ 알킬)(C_1-C_{10} 알킬페닐), $-NH(C_1-C_{10}$ 알킬페닐), 시아노, 니트로, $-CO_2H$, $-C(O)O(C_1-C_{10}$ 알킬), $-CON(C_1-C_{10}$ 알킬)(C_1-C_{10} 알킬), $-CONH(C_1-C_{10}$ 알킬), $-CONH_2$, $-NHC(O)(C_1-C_{10}$ 알킬), $-NHC(O)(페닐)$, $-N(C_1-C_{10}$ 알킬)C(O)(C_1-C_{10} 알킬), $-N(C_1-C_{10}$ 알킬)C(O)(페닐), $-C(O)C_1-C_{10}$ 알킬, $-C(O)C_1-C_{10}$ 알킬페닐, $-C(O)C_1-C_{10}$ 할로알킬, $-OC(O)C_1-C_{10}$ 알킬, $-SO_2(C_1-C_{10}$ 알킬), $-SO_2(페닐)$, $-SO_2(C_1-C_{10}$ 할로알킬), $-SO_2NH_2$, $-SO_2NH(C_1-C_{10}$ 알킬), $-SO_2NH(페닐)$, $-NHSO_2(C_1-C_{10}$ 알킬), $-NHSO_2(페닐)$, 및 $-NHSO_2(C_1-C_{10}$ 할로알킬)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 치환기를 가질 수 있는, 집합체.

청구항 21

제20항에 있어서, 각각의 n_1 은 0이고, 각각의 R_1 는 독립적으로 공유 결합이거나, 또는 C_1-C_{20} 알킬렌, 인산 결합, 포스포로티오에이트 결합, 아마이드 결합, 에스테르 결합, 에테르 결합, 티오에테르 결합, 디설파이드 결합, 1,2,3-트리아졸리덴기, 폴리에틸렌 글리콜의 서브유닛, 피롤리디닐리덴기, 2-옥소피롤리디닐리덴기, 페닐렌, 시클로헥실렌, 2-숙신이미도일리덴기, 2-티오숙신이미도일리덴기, 아미노산의 서브유닛, 뉴클레오타이드의 서브유닛으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 연결기 또는 둘 이상의 연결기의 연결 조합인, 집합체.

청구항 22

제21항에 있어서, 각각의 R_1 는 독립적으로 공유 결합이거나, 또는 디설파이드 결합, 프로필렌 인산기, 2-티오숙신이미도일리덴기, 아미노산의 서브 유닛, 또는 GAU 트리뉴클레오타이드의 서브유닛으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 연결기 또는 두 개의 연결기의 연결 조합인, 집합체.

청구항 23

제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, R_j 는 공유 결합이고 m_0 는 1인, 집합체.

청구항 24

제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, R_j 는 연결기이고, 상기 연결기 R_j 는 주쇄 부분, 측쇄 부분 및 집합 연결 부분을 포함하고, 상기 주쇄 부분은 각각 상기 집합 연결 부분 및 상기 측쇄 부분에 연결되고, 상기 측쇄 부분 각각은 상기 주쇄 부분 및 R_{Ap} 기에 연결되고, 상기 집합 연결 부분 각각은 상기 주쇄 부분 및 작용기 A_0 에 각각 연결되고,

상기 주쇄 부분은 길이가 1 내지 70개의 탄소 원자인 직쇄 알킬렌기이거나, 상기 직쇄 알킬렌기의 하나 이상의 탄소 원자는 $C(O)$, NH , O , S , $CH=N$, $S(O)_2$, $OP(O)_2$, $OP(O)(S)$, C_5-C_8 글리코실렌, C_2-C_{10} 알케닐렌, C_2-C_{10} 알킬닐렌, C_6-C_{10} 아릴렌, C_3-C_{18} 헤테로시클릴렌 및 C_5-C_{10} 헤테로아릴렌으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기로 대체되고; 상기 직쇄 알킬렌기는 C_1-C_{10} 알킬, C_6-C_{10} 아릴, C_5-C_{10} 헤테로아릴, C_1-C_{10} 할로알킬, $-OC_1-C_{10}$ 알킬, $-OC_1-C_{10}$ 알킬페닐, $-C_1-C_{10}$ 알킬- OH , $-OC_1-C_{10}$ 할로알킬, $-SC_1-C_{10}$ 알킬, $-SC_1-C_{10}$ 알킬페닐, $-C_1-C_{10}$ 알킬-SH, $-SC_1-C_{10}$ 할로알킬, 할로젠 치환기, $-OH$, $-SH$, $-NH_2$, $-C_1-C_{10}$ 알킬- NH_2 , $-N(C_1-C_{10}$ 알킬)(C_1-C_{10} 알킬), $-NH(C_1-C_{10}$ 알킬), $-N(C_1-C_{10}$ 알킬)(C_1-C_{10} 알킬페닐), $-NH(C_1-C_{10}$ 알킬페닐), 시아노, 니트로, $-CO_2H$, $-C(O)O(C_1-C_{10}$ 알킬), $-CON(C_1-C_{10}$ 알킬)(C_1-C_{10} 알킬), $-CONH(C_1-C_{10}$ 알킬), $-CONH_2$, $-NHC(O)(C_1-C_{10}$ 알킬), $-NHC(O)(페닐)$, $-N(C_1-C_{10}$ 알킬)C(O)(C_1-C_{10} 알킬), $-N(C_1-C_{10}$ 알킬)C(O)(페닐), $-C(O)C_1-C_{10}$ 알킬, $-C(O)C_1-C_{10}$ 알킬페닐, $-C(O)C_1-C_{10}$ 할로알킬, $-OC(O)C_1-C_{10}$ 알킬, $-SO_2(C_1-C_{10}$ 알킬), $-SO_2(페닐)$, $-SO_2(C_1-C_{10}$ 할로알킬), $-SO_2NH_2$, $-SO_2NH(C_1-C_{10}$ 알킬), $-SO_2NH(페닐)$, $-NHSO_2(C_1-C_{10}$ 알킬), $-NHSO_2(페닐)$, 및 $-NHSO_2(C_1-C_{10}$ 할로알킬)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 치환기를 가질 수 있고;

상기 측쇄 부분은 길이가 1 내지 70개의 탄소 원자인 직쇄 알킬렌기이거나, 상기 직쇄 알킬렌기의 하나 이상의 탄소 원자는 $C(O)$, NH , O , S , $CH=N$, $S(O)_2$, $OP(O)_2$, $OP(O)(S)$, C_5-C_8 글리코실렌, C_2-C_{10} 알케닐렌, C_2-C_{10} 알킬닐

렌, C₆-C₁₀ 아릴렌, C₃-C₁₈ 헤테로시클릴렌 및 C₅-C₁₀ 헤테로아릴렌으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기로 대체되고; 상기 직쇄 알킬렌기는 C₁-C₁₀ 알킬, C₆-C₁₀ 아릴, C₅-C₁₀ 헤테로아릴, C₁-C₁₀ 할로알킬, -OC₁-C₁₀ 알킬, -OC₁-C₁₀ 알킬페닐, -C₁-C₁₀ 알킬-OH, -OC₁-C₁₀ 할로알킬, -SC₁-C₁₀ 알킬, -SC₁-C₁₀ 알킬페닐, -C₁-C₁₀ 알킬-SH, -SC₁-C₁₀ 할로알킬, 할로젠 치환기, -OH, -SH, -NH₂, -C₁-C₁₀ 알킬-NH₂, -N(C₁-C₁₀ 알킬)(C₁-C₁₀ 알킬), -NH(C₁-C₁₀ 알킬), -N(C₁-C₁₀ 알킬)(C₁-C₁₀ 알킬페닐), -NH(C₁-C₁₀ 알킬페닐), 시아노, 니트로, -CO₂H, -C(O)O(C₁-C₁₀ 알킬), -CON(C₁-C₁₀ 알킬)(C₁-C₁₀ 알킬), -CONH(C₁-C₁₀ 알킬), -CONH₂, -NHC(O)(C₁-C₁₀ 알킬), -NHC(O)(페닐), -N(C₁-C₁₀ 알킬)C(O)(C₁-C₁₀ 알킬), -N(C₁-C₁₀ 알킬)C(O)(페닐), -C(O)C₁-C₁₀ 알킬, -C(O)C₁-C₁₀ 알킬페닐, -C(O)C₁-C₁₀ 할로알킬, -OC(O)C₁-C₁₀ 알킬, -SO₂(C₁-C₁₀ 알킬), -SO₂(페닐), -SO₂(C₁-C₁₀ 할로알킬), -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁-C₁₀ 알킬), -SO₂NH(페닐), -NHSO₂(C₁-C₁₀ 알킬), -NHSO₂(페닐), 및 -NHSO₂(C₁-C₁₀ 할로알킬)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 치환기를 가질 수 있고;

상기 접합 연결 부분 각각은 독립적으로 공유 결합이거나, C₁-C₁₀ 직쇄 알킬렌, 인산 에스테르 결합, 포스포로티오에이트 결합, 아마이드 결합, 에스테르 결합, 에테르 결합, 디설파이드 결합, 1,2,3-트리아졸리덴기, 폴리에틸렌 글리콜의 서브유닛, 피롤리디닐리덴기, 2-옥소피롤리디닐리덴기, 페닐렌, 시클로헥실렌, 2-숙신이미도일리덴기, 2-티오숙신이미도일리덴기, 아미노산의 서브유닛, 뉴클레오타이드의 서브유닛으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 연결 구조 또는 둘 이상의 연결 구조의 연결 조합인, 접합체.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 연결기 R_j 내의 상기 접합 연결 부분 각각은 상기 주쇄 부분에 그리고 상기 작용기 A₀ 중 하나에 각각 연결되고; 상기 측쇄 부분의 개수는 n₀이고, 상기 측쇄 부분 각각은 상기 주쇄 부분에 그리고 상기 R_{AP} 기 중 하나에 각각 연결되는, 접합체.

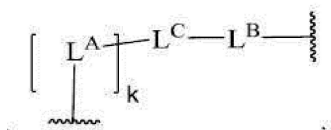
청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 측쇄 부분 모두는 상기 주쇄 부분의 동일한 원자에 연결되거나, 또는 상기 측쇄 부분 각각은 상기 주쇄 부분의 서로 다른 원자에 연결되어 있는, 접합체.

청구항 27

제26항에 있어서, m₀은 1이고, 상기 연결기 R_j는 하기 화학식 (301)로 표시된 바와 같은 구조를 포함하는, 접합체:

[화학식 (301)]



상기 화학식에서, k는 1 내지 3의 정수이고; L^C는 주쇄 부분이고, L^A는 측쇄 부분이고, L^B는 접합 연결 부분이고, 는 기가 공유 결합으로 연결되는 부위를 나타내고;

상기 주쇄 부분인 L^C는 공유 결합이거나 2 내지 4개의 직쇄 또는 분지쇄 C₁-C₂₅ 포화 히드로카르빌기이거나, 또는 상기 포화 히드로카르빌기의 하나 이상의 탄소 원자는 C(O), NH, O, S, CH=N, S(O)₂, OP(O)₂, C₅-C₈ 글리코실렌, C₂-C₅ 알케닐렌, C₂-C₅ 알킬닐렌, C₆-C₁₀ 아릴렌, C₃-C₈ 헤테로시클릴렌, 및 C₅-C₁₀ 헤테로아릴렌으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기로 대체되고; 상기 포화 히드로카르빌기는 C₁-C₅ 알킬, C₆-C₁₀ 아릴, C₅-C₁₀ 헤테로아릴, -O-C₁-C₅ 알킬, -OC₁-C₅ 알킬페닐, -C₁-C₅ 알킬-OH, -SC₁-C₅ 알킬, 니트로, -C(O)O(C₁-C₅ 알킬), -CON(C₁-C₅ 알킬)(C₁-C₅ 알킬), -CONH(C₁-C₅ 알킬), -CONH₂, -NHC(O)(C₁-C₅ 알킬), -NHC(O)(페닐), -N(C₁-C₅

알킬)C(O)(C₁-C₅ 알킬), -N(C₁-C₅ 알킬)C(O)(페닐), -C(O)C₁-C₅ 알킬, -C(O)C₁-C₅ 알킬페닐, -OC(O)C₁-C₅ 알킬, -SO₂(C₁-C₅ 알킬), -SO₂(페닐), -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁-C₅ 알킬), -SO₂NH(페닐), -NHSO₂(C₁-C₅ 알킬), 및 -NHSO₂(페닐)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 치환기를 가질 수 있고:

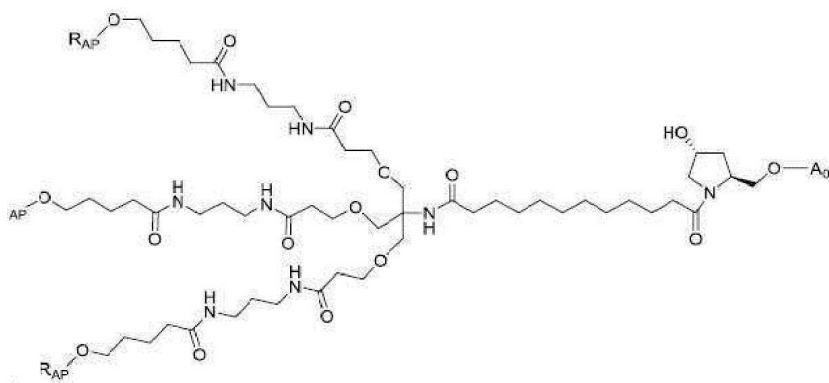
상기 측쇄 부분 각각은 독립적으로 공유 결합이거나 길이가 1 내지 70개의 탄소 원자인 직쇄 알킬렌기이거나, 상기 직쇄 알킬렌기의 하나 이상의 탄소 원자는 C(O), NH, O, S, CH=N, S(O)₂, OP(O)₂, C₅-C₈ 글리코실렌, C₂-C₅ 알케닐렌, C₂-C₅ 알키닐렌, C₆-C₁₀ 아릴렌, C₃-C₈ 헤테로시클릴렌, 및 C₅-C₁₀ 헤테로아릴렌으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기로 대체되고, 상기 직쇄 알킬렌기는 C₁-C₁₀ 알킬, C₆-C₁₀ 아릴, C₅-C₁₀ 헤테로아릴, C₁-C₁₀ 할로알킬, -OC₁-C₁₀ 알킬, -OC₁-C₁₀ 알킬페닐, -C₁-C₁₀ 알킬-OH, -OC₁-C₁₀ 할로알킬, -SC₁-C₁₀ 알킬, -SC₁-C₁₀ 알킬페닐, -C₁-C₁₀ 알킬-SH, -SC₁-C₁₀ 할로알킬, 할로젠 치환기, -OH, -SH, -NH₂, -C₁-C₁₀ 알킬-NH₂, -N(C₁-C₁₀ 알킬)(C₁-C₁₀ 알킬), -NH(C₁-C₁₀ 알킬), -N(C₁-C₁₀ 알킬)(C₁-C₁₀ 알킬페닐), -NH(C₁-C₁₀ 알킬페닐), 시아노, 니트로, -CO₂H, -C(O)O(C₁-C₁₀ 알킬), -CON(C₁-C₁₀ 알킬)(C₁-C₁₀ 알킬), -CONH(C₁-C₁₀ 알킬), -CONH₂, -NHC(O)(C₁-C₁₀ 알킬), -NHC(O)(페닐), -N(C₁-C₁₀ 알킬)C(O)(C₁-C₁₀ 알킬), -N(C₁-C₁₀ 알킬)C(O)(페닐), -C(O)C₁-C₁₀ 알킬, -C(O)C₁-C₁₀ 알킬페닐, -C(O)C₁-C₁₀ 할로알킬, -OC(O)C₁-C₁₀ 알킬, -SO₂(C₁-C₁₀ 알킬), -SO₂(페닐), -SO₂(C₁-C₁₀ 할로알킬), -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁-C₁₀ 알킬), -SO₂NH(페닐), -NHSO₂(C₁-C₁₀ 알킬), -NHSO₂(페닐), 및 -NHSO₂(C₁-C₁₀ 할로알킬)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 치환기를 가질 수 있고;

상기 접합 연결 부분 각각은 독립적으로 공유 결합이거나, C₁-C₁₀ 직쇄 알킬렌, 인산 에스테르 결합, 포스포로티오에이트 결합, 아마이드 결합, 에스테르 결합, 에테르 결합, 디설파이드 결합, 1,2,3-트리아졸리덴기, 폴리에틸렌 글리콜의 서브유닛, 피롤리디닐리덴기, 2-옥소피롤리디닐리덴기, 페닐렌, 시클로헥실렌, 2-숙신이미도일리덴기, 2-티오숙신이미도일리덴기, 아미노산의 서브유닛, 뉴클레오타이드의 서브유닛으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 연결 구조 또는 둘 이상의 연결 구조의 연결 조합인, 접합체.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (305)로 표시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체:

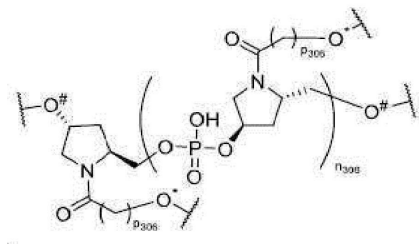
[화학식 (305)]



청구항 29

제27항에 있어서, 상기 연결기 R_j는 하기 화학식 (306)으로 표시된 바와 같은 구조를 갖는, 접합체:

[화학식 (306)]

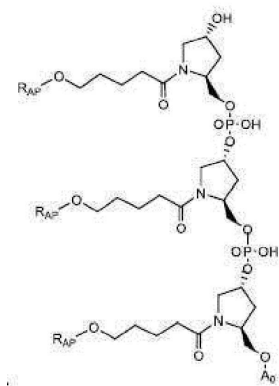


상기 화학식에서, n_{306} 은 0 내지 3의 정수이고, 각각의 p_{306} 은 독립적으로 1 내지 6의 정수이고, $\sim$ 는기가 공유결합으로 연결되는 부위를 나타내고; *로 표시된 산소 원자는 R_{AP} 기와 인산 결합, 에테르 결합 또는 에스테르 결합을 형성하고; #로 표시된 산소 원자 중 적어도 하나는 작용기 A_0 와 에테르 결합, 에스테르 결합 또는 인산 결합을 형성하고, #로 표시된 나머지 산소 원자는 수소 원자에 연결되어 히드록실기를 형성하거나, 또는 C_1-C_3 알킬기에 연결되어 C_1-C_3 알콕시기를 형성한다.

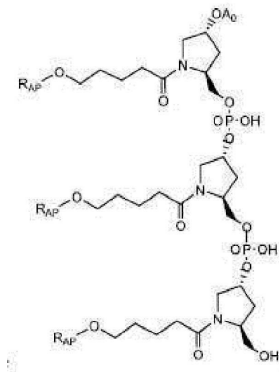
청구항 30

제29항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (307a), (307b) 또는 (307c)로 표시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체:

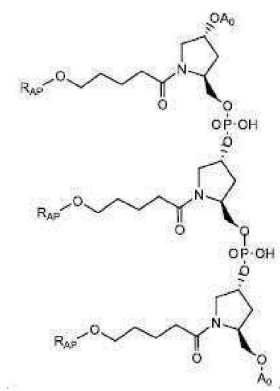
[화학식 (307a)]



[화학식 (307b)]



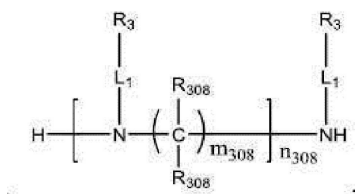
[화학식 (307c)]



청구항 31

제27항에 있어서, 상기 집합체는 하기 화학식 (308)로 표시된 바와 같은 구조를 갖는 집합체:

[화학식 (308)]



상기 화학식에서,

n_{308} 은 1 내지 10에서 선택된 정수이고;

각각의 m_{308} 은 독립적으로 2 내지 10에서 선택된 정수이고;

각각의 R_{308} 은 독립적으로 H, C_1-C_{10} 알킬, C_1-C_{10} 할로알킬 또는 C_1-C_{10} 알콕시이고;

각각의 R^3 는 독립적으로 작용기 A_0 이거나 R_{AP} 기이고, R_3 중 적어도 하나는 작용기 A_0 이고, R_3 중 적어도 하나는 R_{AP} 기이거나, 또는 R_3 중 하나는 작용기 A_0 이고 나머지 R_3 는 R_{AP} 기이고;

작용기 A_0 에 연결된 각각의 L_1 은 집합 연결 부분을 나타내고, R_{AP} 에 연결된 각각의 L_1 은 측쇄 부분을 나타낸다.

청구항 32

제31항에 있어서, 각각의 L_1 은 L_4 내지 L_{23} 기 및 이들의 임의의 연결 조합으로 이루어진 군에서 독립적으로 선택되는, 집합체.

청구항 33

제32항에 있어서, 각각의 L_1 은 L_4 내지 L_9 , L_{13} , L_{14} 및 L_{18} 기 중 적어도 두 개의 연결 조합으로 이루어진 군에서 독립적으로 선택되거나, 또는 각각의 L_1 은 L_4 , L_5 , L_7 , L_9 , L_{13} , L_{14} 및 L_{18} 기 중 적어도 두 개의 연결 조합인, 집합체.

청구항 34

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 L_1 의 길이는 독립적으로 3 내지 25개 원자이거나, 또는 각각의 L_1 의 길이는 독립적으로 4 내지 15개 원자인, 집합체.

청구항 35

제31항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, n_{308} 은 2 내지 6의 정수이고, R_3 중 2 내지 4개는 R_{AP} 기이고, 나머지 R_3 은 작용기인, 집합체.

청구항 36

제31항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 m_{308} 은 독립적으로 2 내지 5의 정수이고/이거나 각각의 m_{308} 은 동일한, 집합체.

청구항 37

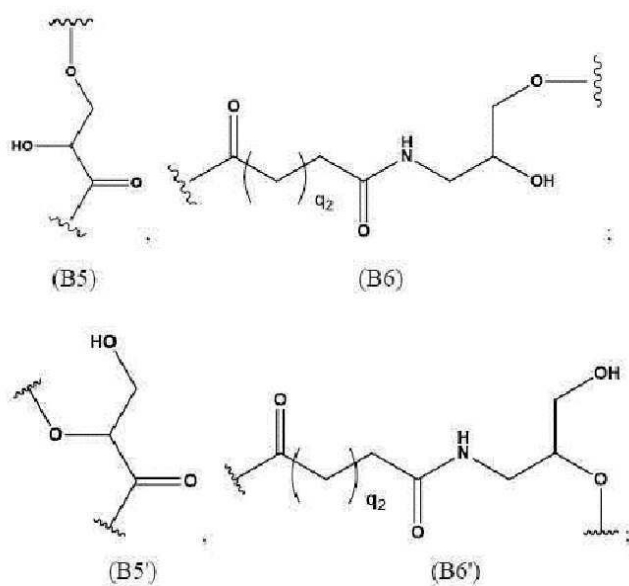
제31항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, n_{308} 은 2 내지 4에서 선택된 정수이고, 각각의 m_{308} 은 독립적으로 2 내지 4에서 선택된 정수이고, 각각의 R_{308} 은 H인, 집합체.

청구항 38

제37항에 있어서, R_3 중 하나는 작용기 A_0 이고 나머지 R_3 은 R_{AP} 기인, 집합체.

청구항 39

제37항 또는 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 L_1 은 질소 함유 골격의 N 원자에 부착되는 부착 부위와 작용기 A_0 또는 R_{AP} 기에 부착되는 부착 부위 모두를 갖고, 상기 질소 함유 골격의 N 원자에 부착되는 부위는 N 원자와 아미드 결합을 형성하거나, 하나 이상의 L_1 은 하기의 B5, B6, B5' 또는 B6'로부터 선택되는, 집합체:

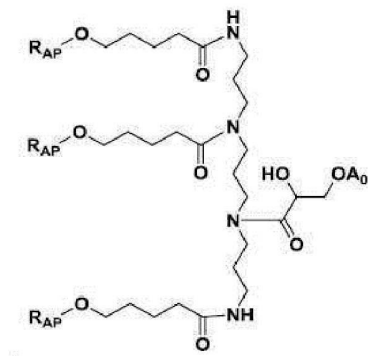


상기 화학식에서, $\sim$ 는 기가 공유결합으로 연결되는 부위를 나타내고, q_2 는 1 내지 10의 정수이거나, q_2 는 1 내지 5의 정수이다.

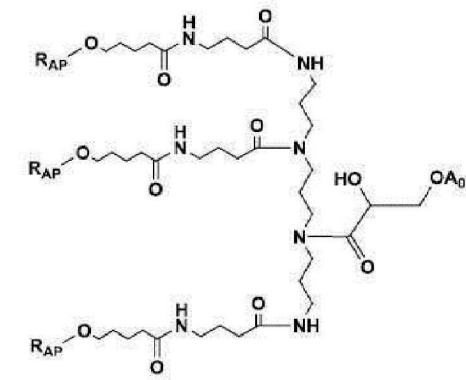
청구항 40

제31항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집합체는 하기 화학식 (403), (404), (405), (406), (407), (408), (409), (410), (411), (412), (413), (414), (415), (416), (417), (418), (419), (420), (421), (422), (423), (424), (425), (426), 또는 (427)로 표시된 바와 같은 구조를 갖는 집합체:

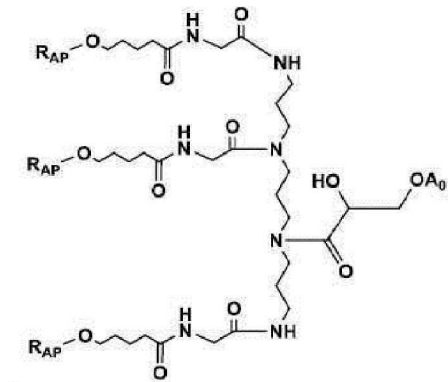
[화학식 (403)]



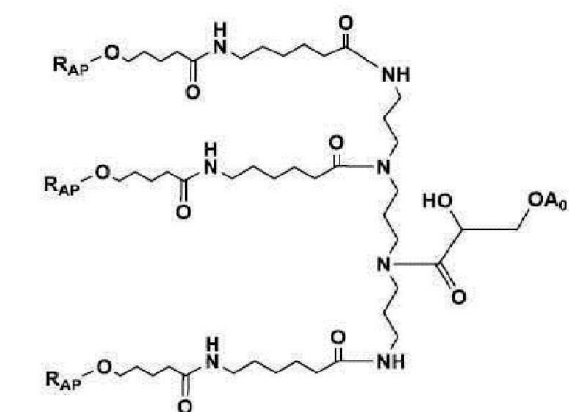
[화학식 (404)]



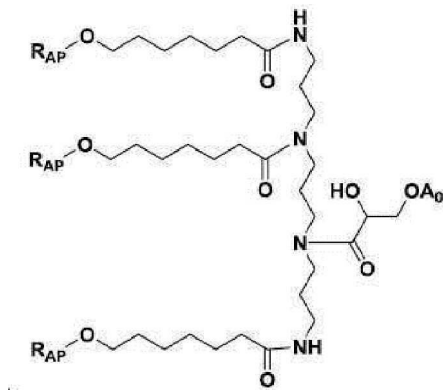
[화학식 (405)]



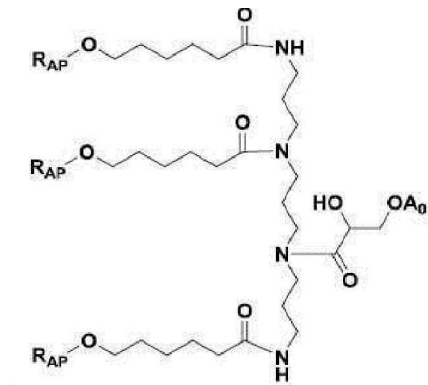
[화학식 (406)]



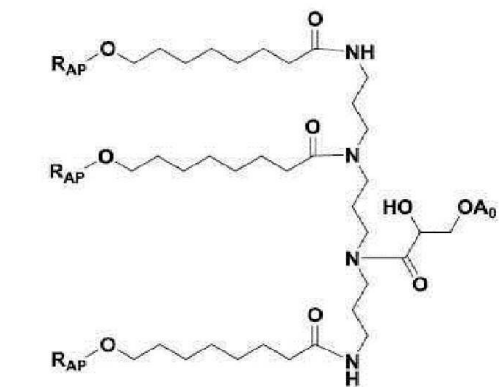
[화학식 (407)]



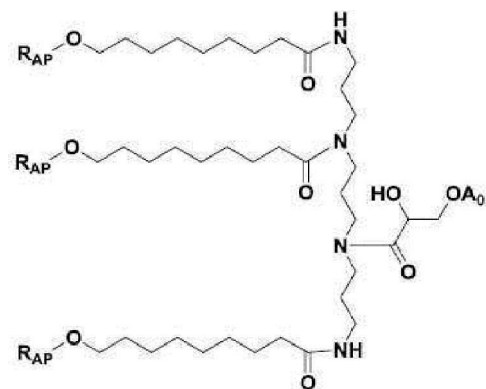
[화학식 (408)]



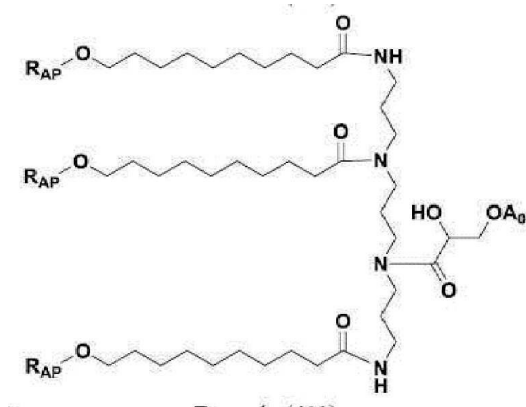
[화학식 (409)]



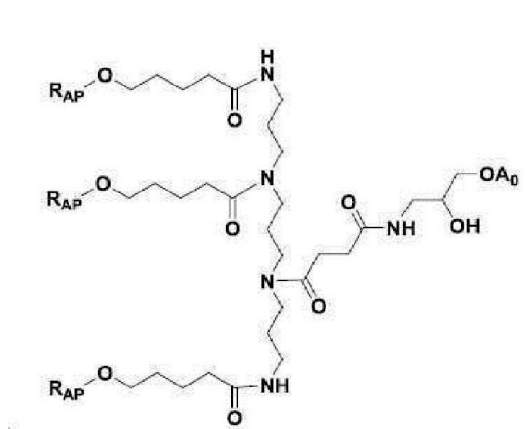
[화학식 (410)]



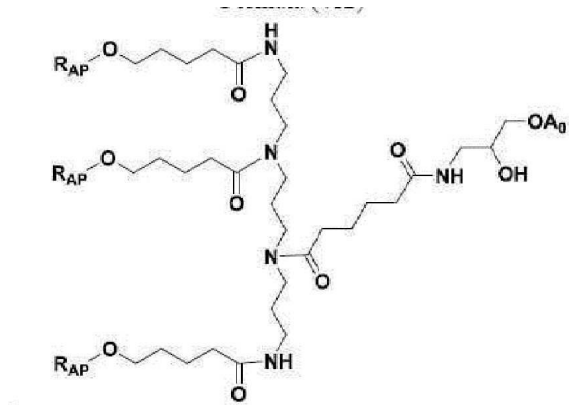
[화학식 (411)]



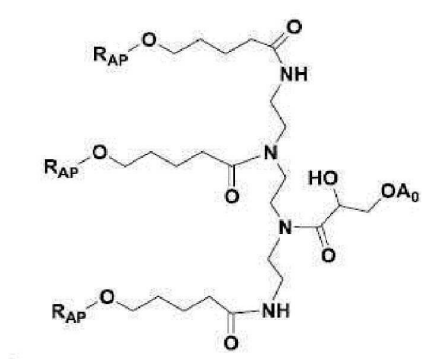
[화학식 (412)]



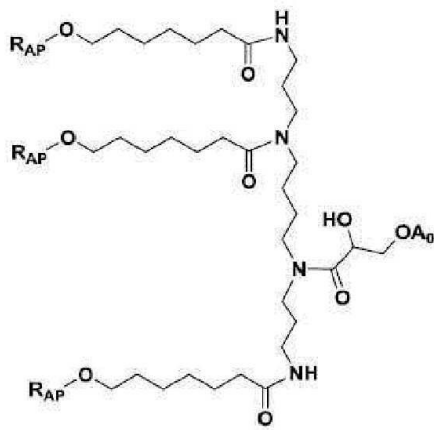
[화학식 (413)]



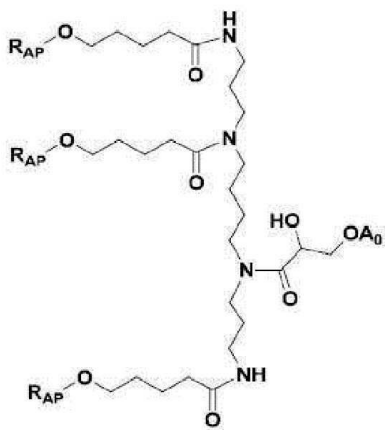
[화학식 (414)]



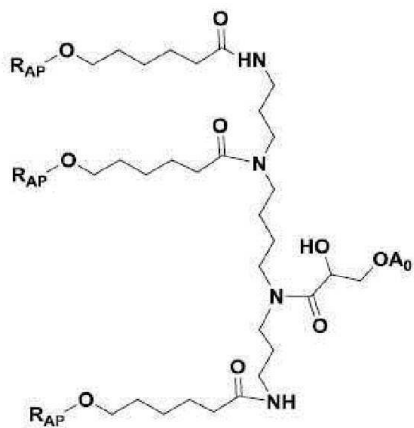
[화학식 (415)]



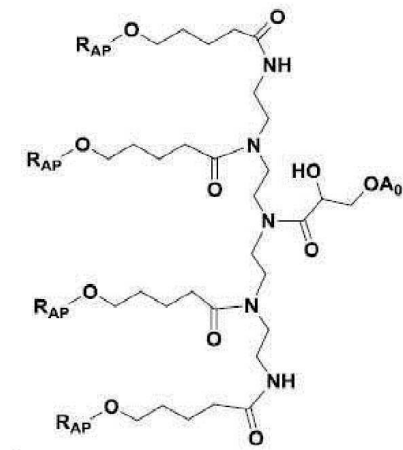
[화학식 (416)]



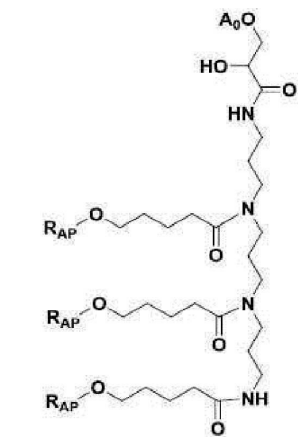
[화학식 (417)]



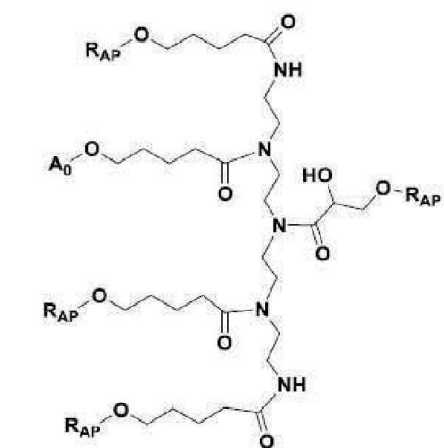
[화학식 (421)]



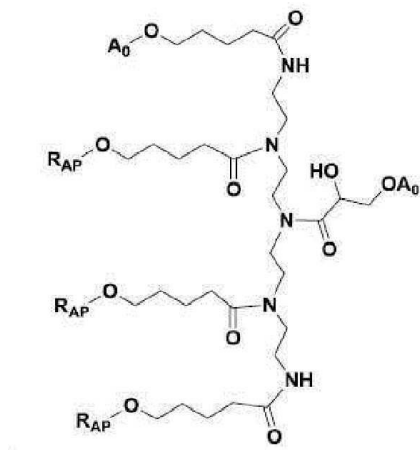
[화학식 (422)]



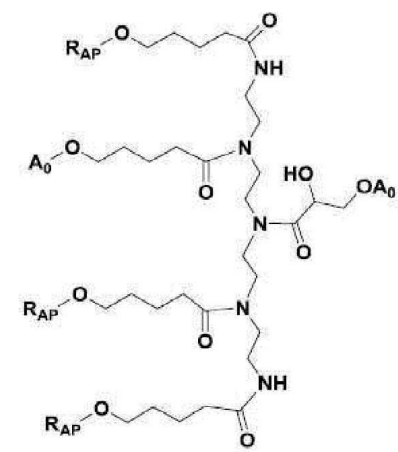
[화학식 (423)]



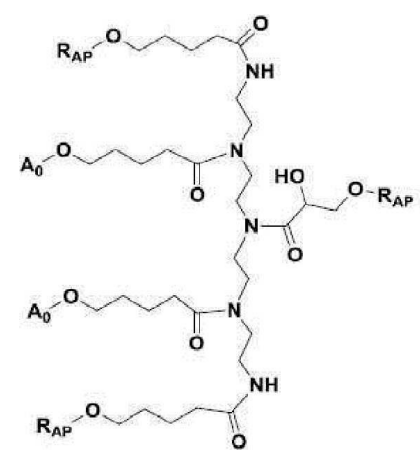
[화학식 (424)]



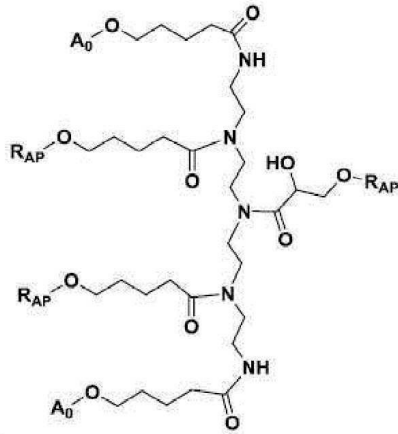
[화학식 (425)]



[화학식 (426)]



[화학식 (427)]



청구항 41

제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, R₃는 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II를 포함하고, 상기 뉴클레오타이드 서열 I 및 상기 뉴클레오타이드 서열 II는 각각 5 내지 25개의 변형되거나 변형되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 뉴클레오타이드 서열 I 및 상기 뉴클레오타이드 서열 II는 적어도 부분적으로 역상보적이고, 상기 전달기는 상기 뉴클레오타이드 서열 I에 연결되고, 상기 작용기는 뉴클레오타이드 서열 II에 연결되고, 상기 뉴클레오타이드 서열 I 및 상기 뉴클레오타이드 서열 II는 대상체에서 면역 반응 또는 독성 반응을 유발하지 않는, 접합체.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 전달기의 3' 말단은 인산 결합을 통해 상기 뉴클레오타이드 서열 I의 5' 말단 뉴클레오타이드의 리보스의 5' 위치에 연결되고, 상기 작용기는 상기 뉴클레오타이드 서열 II의 5' 말단 뉴클레오타이드의 리보스의 5' 위치에 연결되거나; 또는 상기 작용기는 뉴클레오타이드 서열의 세그먼트를 포함하고, 상기 뉴클레오타이드 서열의 3' 말단은 인산 결합을 통해 상기 뉴클레오타이드 서열 II의 5' 말단 뉴클레오타이드의 리보스의 5' 위치에 연결되는, 접합체.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 서열 I 및 상기 뉴클레오타이드 서열 II는 실질적으로 역상보적이거나 완전히 역상보적이거나; 또는 상기 뉴클레오타이드 서열 I 및 상기 뉴클레오타이드 서열 II는 길이가 같고 둘 다 10 내지 20개의 변형되거나 변형되지 않은 뉴클레오타이드이거나; 또는 상기 뉴클레오타이드 서열 I 및 상기 뉴클레오타이드 서열 II는 둘 다 17개의 뉴클레오타이드로 구성되고 완전히 역상보적이거나; 또는 상기 뉴클레오타이드 서열 I 및 상기 뉴클레오타이드 서열 II는 각각 서열번호 40 및 서열번호 41에 표시된 바와 같은 서열을 갖거나; 또는 상기 뉴클레오타이드 서열 I 및 상기 뉴클레오타이드 서열 II는 각각 서열번호 42 및 서열번호 43에 표시된 바와 같은 서열을 갖는, 접합체:

5'-GUACAUUCUAGUAAGCC-3' (서열번호 40)

5'-GGCUAUCUAGAAUGUAC-3' (서열번호 41)

5'- GmUfAmCfAmUfUfCfUfAmGmAmUfAmGmCfCf -3' (서열번호 42)

5'- GmGmCfUfAmUfCfUfAmGmAmAmUfGmUfAmCf -3' (서열번호 43).

청구항 44

제18항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, R₃는 절단 가능한 것인, 접합체.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 소분자 치료제 기 각각은 세포독소 기, 항생제 기 또는 혈관

신생 억제제로부터 독립적으로 선택되는, 접합체.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 소분자 치료제 기는 메토크세이트, 독소루비신, 빈카 알칼로이드, 오리스타틴, 칼리시 마이신, 메이탄신, 캄프토테신 및 칼리케아미신로 이루어진 군에서 선택된 하나의 소분자 치료제로부터 하나 이상의 수소 원자 또는 하나 이상의 작용성 라디칼을 제거함으로써 형성되는, 접합체.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 소분자 치료제 기는 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)로부터 하나 이상의 수소 원자 또는 하나 이상의 작용성 라디칼을 제거함으로써 형성된 기인, 접합체.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 따른 접합체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 49

종양 및 종양 관련 질환 또는 증상을 치료하기 위한 의약의 제조에서 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 따른 접합체 및/또는 제48항에 따른 약학적 조성물의 용도.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 종양은 신경교종, 신장암, 및 폐암 중 하나 이상인, 용도.

청구항 51

종양 및 종양 관련 질환 또는 증상을 진단 및/또는 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 따른 접합체 및/또는 제48항에 따른 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 종양은 신경교종, 신장암, 및 폐암 중 하나 이상인, 방법.

청구항 53

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 따른 접합체 및/또는 제48항에 따른 약학적 조성물을 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시는 앵타머(aptamer) 기반 전달기(delivery group) 및 작용기를 포함하는 접합체(conjugate) 및 약학적 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 개시는 접합체 및 약학적 조성물의 제조 방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 종양은 신체 내의 다양한 종양 형성 인자의 작용 하에서 국소 조직의 세포 증식에 의해 형성되는 신생물을 말한다. 그 중, 주변 조직으로 전이하여 침윤하는 종양 세포를 악성 종양이라고 한다. 발생한 종양의 근원 조직세포의 분류에 따라, 종양은 일반적으로 상피세포에서 유래한 악성종양(암), 중간엽조직세포에서 유래한 악성종양(육종), 혈액줄기세포에서 유래한 악성종양(백혈병 등), 및 신경교세포에서 유래한 악성종양(신경교종)으로 구분할 수 있다. 그 중에서도 신경교종은 가장 흔한 원발성 두개내 악성 종양으로, 뇌종양의 약 40% 내지 50%를 차지하며, 전 세계적으로 10만 명당 연간 발병률이 3 내지 8건이다. WHO 병리 분류 기준에 따르면, 신경교종은 신경상피 종양에 속하며, 이러한 종양에는 털모양 성상세포종, 확산성 성상세포종, 이형성 성상세포종, 신경교 모세포종, 희소돌기아교세포종(oligodendroglioma), 이형성 희소돌기아교세포종 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 많은 병리학적 유형이 포함된다.

[0003] 현재, 종양 진단 및 치료 분야, 특히 신경교종 분야에서 중요한 과제 중 하나는 진단제 및/또는 치료제를 종양

조직 및 세포에 특이적으로 전달하는 방법과 이러한 진단제 및/또는 치료제가 적절한 시기에 적절한 방식으로 해당 진단 및/또는 치료 효과를 낼 수 있도록 하는 방법이다.

[0004] 핵산 앵타머라고도 알려진 앵타머는 소분자 화합물, 단백질, 핵산과 같은 다양한 관심 분자, 및 심지어는 세포, 조직 및 장기 등에 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 분자이다. 앵타머는 "특정 분자를 인식"하는 중요한 특성을 제공할 수 있으므로, 항체와 유사하게 생명공학 및 치료에 일반적으로 사용된다. 앵타머는 시험관에서 설계할 수 있으며 화학적 방법으로 빠르게 합성할 수 있다. 또한, 앵타머는 보관하기 쉽고 면역원성이 낮거나 전혀 없다는 우수한 특성을 가지고 있다. 따라서, 앵타머는 최근에 당업계의 연구자들에게 점차 주목을 받아왔다. 그러나, 당업계에서는 종양을 표적으로 하는 전달에 적합한 앵타머를 개발하고 적용할 필요성이 여전히 존재한다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0005] 발명의 요약

[0006] 본 출원의 발명자들은 종양 세포, 특히 신경교종 세포를 특이적으로 표적할 수 있는 접합체를 예상치 못하게 발견했다. 이 접합체는 종양 세포, 특히 신경교종 세포에 높은 특이성을 나타내므로 종양 세포, 특히 신경교종 세포에서 효과적으로 농축될(enriched)되고 종양에 대한 표적 치료에 효과적일 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 하기의 발명을 이루었다:

[0007] 한 측면에서, 본 개시는 하나 이상의 전달기 및 하나 이상의 작용기를 포함하는 접합체로서, 전달기는 앵타머로부터 하나 이상의 수소 원자 또는 하나 이상의 작용성 라디칼을 제거함으로써 형성되고, 앵타머는 연속적인 뉴클레오타이드 서열의 세그먼트(segment)를 포함하고, 두 개의 인접한 뉴클레오타이드를 연결하는 기는 독립적으로 인산기이거나 변형된 기를 갖는 인산기이고, 각각의 뉴클레오타이드는 변형되거나 변형되지 않은 A, U, C 또는 G 중 하나로부터 선택되고, 연속적인 뉴클레오타이드 서열은 하기 화학식 (1)로 표시된 바와 같은 서열을 갖고, 각각의 전달기는 공유 결합 또는 연결기를 통해 작용기에 독립적으로 연결되고, 각각의 작용기는 종양에 치료 효과가 있는 소분자 치료제 기로부터 선택되는, 접합체를 제공한다:

[0008] [화학식 (1)]

[0009] $5' - T_1 - S_1 - N_a - S_2 - N_b - S_3 - N_c - S_4 - T_2 - 3'$

[0010] 상기 화학식에서, T_1 은 1 내지 3개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프(motif)이고, T_2 는 0 내지 15개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이며, T_2 는 T_1 과 완전히 역상보적(reverse complementary)인 모티프를 포함하지 않고;

[0011] S_1 및 S_4 는 각각 3 내지 7개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이며, S_1 과 S_4 는 동일한 길이를 가지며 완전히 역상보적이고;

[0012] N_a 및 N_c 는 각각 1 내지 4개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이며, N_a 의 각 뉴클레오타이드는 N_c 의 각 뉴클레오타이드와 상보적이지 않으며, N_a 및 N_c 에서 U의 총수는 N_a 및 N_c 에서의 모든 뉴클레오타이드의 총수의 50% 초과를 차지하고;

[0013] S_2 및 S_3 는 각각 1 내지 4개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이며, S_2 과 S_3 는 동일한 길이를 가지며 완전히 역상보적이고;

[0014] N_b 는 3 내지 6개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이며, N_b 의 양 말단의 뉴클레오타이드는 AU 또는 GC 상보체(complementation)를 형성하지 않는다.

[0015] 각 전달기는 공유 결합(covalent bond) 또는 연결기(linking group)를 통해 작용기(functional group)에 독립적으로 연결되고; 그리고 각 작용기는 종양에 대한 치료 효과를 갖는 저분자 치료제기로부터 선택된다.

[0016] 또 다른 측면에서, 본 개시는 또한 본 개시에 따른 접합체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 또 다른 측면에서, 본 개시는 또한 종양 및 종양 관련 질환 또는 증상을 치료하기 위한 의학의 제조에서 본 개

시에 따른 집합체 및/또는 약학적 조성물의 용도를 제공한다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본 개시는 또한 종양 및 종양 관련 질환 또는 증상을 치료하는 방법으로서, 본 개시에 따른 집합체 및/또는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체(subject)에게 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 개시는 또한 본 개시에 따른 집합체 및/또는 약학적 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.

[0020] 참조문헌으로서 포함

[0021] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 본 개시에 참조로 포함되는 것과 동일한 정도로 본 개시에 참조로 포함된다.

발명의 효과

[0022] 유익한 효과

[0023] 본 개시에 의해 제공되는 집합체 및 약학적 조성물은 종양, 특히 신경교종 조직 및 세포를 표적으로하는 우수한 능력을 가지고 있으며, 종양 및 종양 관련 질환 및/또는 증상을 유의하게 치료하거나 완화할 수 있다.

[0024] 한편, 본 개시에 의해 제공되는 집합체 내의 전달기는 다양한 소분자 약물 기(소분자 독소 기와 같은)을 종양 조직에 특이적으로 전달하고, 우수한 종양 억제 효과를 나타낼 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 집합체는 MMAE를 다양한 종양 조직에 효과적으로 전달함으로써 종양 표적화 능력을 보여주는 동시에 다른 조직에서 MMAE 분자의 분포로 인한 독성 위험을 줄일 수 있다. 더욱이, 다양한 투여 방법은 종양 부피 및 종양 무게의 증가 속도를 효과적으로 억제할 수 있으며, 이는 본 개시의 집합체가 종양 증식을 효과적으로 억제할 수 있음을 나타낸다. 또한, 집합체의 투여량을 더욱 증가시키면 시험 기간 동안 종양 부피가 거의 증가하지 않아 더욱 우수한 항종양 효과를 나타낼 수 있다.

[0025] 또한 본 개시의 발명자들은 예상치 못하게도 본 개시의 집합체 및/또는 약학적 조성물이 전신 투여의 경우 혈액-뇌 장벽을 효율적으로 통과하여 뇌의 신경교종을 표적할 수 있고, 대조군과 비교하여 종양 부피의 증가를 유의하게 억제하거나, 심지어 초기 부피의 1/10 이하로 감소시키거나, 심지어 1/100 이하로 감소시킬 수 있다는 것을 발견하였다. 이는 본 개시의 집합체는 혈액-뇌 장벽을 효과적으로 침투하고, 신경교종을 효과적으로 표적하여 진입하고, 종양 성장에 대해 우수한 억제 효과를 가짐으로써, 양호한 치료 순응도 및 종양을 효율적으로 억제하는 높은 약물 효능(druggability)을 보인다는 것을 나타낸다.

[0026] 상기 결과는 본 개시의 집합체가 종양 증식을 유의하고 효과적으로 억제할 수 있으며, 양호한 적용 가능성을 가짐을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1A 내지 도 1C는 각각 다양한 집합체를 투여한 후 1시간, 24시간 및 48시간에서 마우스의 형광 이미징 결과를 보여준다. 도 1D는 D5에서 마우스를 안락사시킨 후 각 군의 마우스의 종양 조직 및 신장의 형광 신호 이미징 이미지를 보여준다.

도 2A 내지 도 2C는 각각 다양한 집합체를 투여한 후 1시간, 24시간 및 48시간에서 마우스의 형광 이미징 결과의 이미지를 보여준다. 도 2D는 D6에서 마우스를 안락사시킨 후 각 군의 마우스의 종양 조직 및 신장의 형광 신호 이미징 이미지를 보여준다.

도 3은 본 개시에 의해 제공되는 집합체 또는 대조 화합물을 투여한 후 각 마우스 군에서의 종양 부피 변화를 나타내는 선 그래프이다.

도 4는 투여후 24시간 및 48시간에서 다양한 집합체를 투여한 후에 확립된 U118MG 동소(orthotopic) 종양 모델 마우스의 뇌 조직의 형광 이미징 이미지를 보여준다.

도 5는 본 개시에 의해 제공되는 집합체 또는 대조 화합물을 투여한 후 U118MG 동소 종양 모델 마우스에서 시간에 따른 종양 광 강도 값의 변화를 나타내는 선 그래프이다.

도 6은 본 개시에 의해 제공되는 집합체 또는 대조 화합물을 투여한 후 U118MG 피하 종양 모델 마우스에서 시간에 따른 종양 부피의 변화를 나타내는 선 그래프이다.

도 7은 본 개시에 의해 제공되는 다양한 농도의 접합체 또는 대조 화합물을 투여한 후 U118MG 피하 종양 모델 마우스에서 시간에 따른 종양 부피의 변화를 보여주는 선 그래프이다.

도 8은 본 개시에 의해 제공되는 다양한 농도의 접합체 또는 대조 화합물을 투여한 후 U118MG 피하 종양 모델 마우스에서 시간에 따른 종양 부피의 변화를 보여주는 선 그래프이다.

도 9는 본 개시에 의해 제공되는 다양한 농도의 접합체 또는 대조 화합물을 투여한 후 A549 피하 종양 모델 마우스에서 시간에 따른 종양 부피의 변화를 나타내는 선 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 발명의 상세한 설명
- [0029] 다음은 본 개시의 구체적인 구현예에 대한 상세한 설명이다. 본원에 설명된 구체적인 구현예는 오로지 본 개시를 예시하고 설명하기 위한 것으로 본 개시를 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다.
- [0030] 정의
- [0031] 본 개시에서 달리 명시하지 않는 한, A, U, C, G 및 T는 각각 아데닌 뉴클레오타이드, 우라실 뉴클레오타이드, 시토신 뉴클레오타이드, 구아닌 뉴클레오타이드 및 티민 뉴클레오타이드를 의미하고, 2-메틸시토신 뉴클레오타이드는 시토신 뉴클레오타이드의 시토신 염기의 2' 수소가 메틸기로 치환되어 있는 뉴클레오타이드를 의미한다. 이러한 뉴클레오타이드의 구조는 당업자에게 잘 알려져 있다. 본원에서 사용되는 "핵산 모티프" 또는 "모티프"는 하나 이상의 뉴클레오타이드로 구성되는, 올리고뉴클레오타이드의 핵산 서열의 단편을 의미한다. 몇몇 구현예에서, 모티프는 생물학적 기능을 갖는 핵산 서열의 단편이다.
- [0032] 본원에서 사용되는 "알킬"은 일반적으로 1 내지 20개의 탄소 원자, 예를 들어 1 내지 10개의 탄소 원자, 예를 들어 1 내지 8개 또는 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 및 분지쇄 포화 알킬을 의미한다. 예를 들어, C₁-C₆ 알킬은 1 내지 6개의 탄소 원자를 포함하는 직쇄 및 분지쇄 알킬기 모두를 의미한다. 특정 수의 탄소 원자를 갖는 알킬 잔기를 언급할 때는 해당 수의 탄소 원자를 갖는 모든 분지쇄 및 직쇄 형태를 포함하는 것을 의미한다. 따라서, 예를 들어, "부틸"은 n-부틸, sec-부틸, 이소부틸 및 tert-부틸을 포함하는 것을 의미하고, "프로필"은 n-프로필 및 이소프로필을 포함한다. 알킬렌은 알킬의 하위 집합으로, 알킬과 동일한 잔기를 의미하지만 두 개의 부착 지점을 갖는다.
- [0033] 본원에서 사용되는 "알케닐"은 모(parent) 알킬의 두 인접 탄소 원자로부터 하나의 수소 분자를 제거하여 얻은 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 불포화 분지쇄 또는 직쇄 알킬기를 의미한다. 이 기는 이중 결합(들)의 cis 또는 trans 배열일 수 있다. 대표적인 알케닐기로는 에틸닐; 프로페닐(예: 프로프-1-엔-1-일, 프로프-1-엔-2-일, 프로프-2-엔-1-일(알릴), 프로프-2-엔-2-일); 부테닐(예: 부트-1-엔-1-일, 부트-1-엔-2-일, 2-메틸-프로프-1-엔-1-일, 부트-2-엔-1-일, 부트-2-엔-2-일, 부타-1,3-디엔-1-일, 부타-1,3-디엔-2-일) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 알케닐기는 2 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 반면, 다른 구현예에서는 2 내지 10개, 2 내지 8개 또는 2 내지 6개의 탄소 원자를 갖는다. 알케닐렌은 알케닐의 하위 집합으로, 알케닐과 동일한 잔기를 의미하지만 두 개의 부착 지점을 갖는다.
- [0034] 본원에서 사용되는 "알킬닐"은 모 알킬의 인접한 탄소 원자로부터 수소 분자 두 개를 제거하여 얻은 하나 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 불포화 분지쇄 또는 직쇄 알킬기를 의미한다. 대표적인 알킬닐기로는 에틸닐; 프로피닐(예: 프로프-1-인-1-일, 프로프-2-인-1-일); 부티닐(예: 부트-1-인-1-일, 부트-1-인-3-일, 부트-3-인-1-일) 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 알킬닐기는 2 내지 20개의 탄소 원자를 갖고, 다른 구현예에서는 2 내지 10개, 2 내지 8개 또는 2 내지 6개의 탄소 원자를 갖는다. 알킬닐렌은 알킬닐의 하위 집합으로, 알킬닐과 동일한 잔기를 의미하지만 두 개의 부착 지점을 갖는다.
- [0035] 본원에서 사용되는 "헤테로시클릴"은 2 내지 12개의 탄소 원자 및 질소, 산소 또는 황으로부터 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 포함하는 안정한 3 내지 18원(membered) 비방향족 고리 라디칼을 의미한다. 본 명세서에서 달리 명시되지 않는 한, 헤테로아릴은 단환식, 이환식, 삼환식 또는 사환식 고리 시스템이며, 여기에는 융합 또는 가교 고리 시스템(들)이 포함될 수 있다. 헤테로아릴의 헤테로원자(들)는 선택적으로 산화된다. 하나 이상의 질소 원자가 존재하는 경우, 이는 선택적으로 4차화된다. 헤테로시클릴은 부분적으로 또는 완전히 포화된 것이다. 헤테로아릴은 고리(들)의 임의의 원자를 통해 분자의 나머지 부분에 연결될 수 있다. 이러한 헤테로시클릴의 예로는 디옥솔라닐, 티에닐[1,3]디티아닐, 데카히드로이소퀴놀릴, 이미다졸리닐, 이미다졸리디닐, 이소티

아줄리디닐, 이속사줄리디닐, 모르폴리닐, 옥타히드로인돌릴, 옥타히드로이소인돌릴, 2-옥사피페라지닐, 2-옥사피페리디닐, 2-옥사피롤리디닐, 옥사줄리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 4-피페리도닐, 피롤리디닐, 피라줄리디닐, 퀴누클리디닐, 티아줄리디닐, 테트라히드로푸릴, 트리티아닐, 테트라히드로피라닐, 티오모르폴리닐, 티아모르폴리닐, 1-옥소-티오모르폴리닐, 및 1,1-디옥소-티오모르폴리닐이 있으나 이에 제한되지 않는다. 헤테로시클릴렌은 헤테로시클릴의 하위 집합으로, 헤테로시클릴과 동일한 잔기를 의미하지만 두 개의 부착 지점을 갖는다.

[0036] 본원에서 사용되는 "아릴"은 고리 탄소 원자로부터 수소 원자를 제거하여 방향족 단환 또는 다환 탄화수소 고리 시스템에서 유도한 라디칼을 의미한다. 방향족 단환 또는 다환 탄화수소 고리 시스템은 수소와 6 내지 18개의 탄소 원자를 포함한 탄소만을 포함하며, 여기에서 고리 시스템의 하나 이상의 고리는 완전히 불포화되어 있다. 즉, 휘켈 이론(Huckel)에 따라 고리형의 비국소화된(delocalized) $(4n+2)\pi$ -전자 시스템을 포함한다. 아릴기로는 페닐, 플루오레닐, 나프틸과 같은 기가 있으나 이에 제한되지 않는다. 아릴렌은 아릴의 하위 집합으로, 아릴과 동일한 잔기를 의미하지만 두 개의 부착 지점을 갖는다.

[0037] "헤테로아릴"은 2 내지 17개의 탄소 원자와 질소, 산소 또는 황으로부터 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 포함하는 3 내지 18원 방향족 고리 라디칼로부터 유도한 라디칼을 의미한다. 본원에서 사용되는 헤테로아릴은 단환식, 이환식, 삼환식 또는 사환식 고리 시스템일 수 있으며, 여기에서 고리 시스템 내의 하나 이상의 고리는 완전히 불포화되어 있다. 즉, 휘켈 이론에 따라 고리형의 비국소화된 $(4n+2)\pi$ -전자 시스템을 포함한다. 헤테로아릴은 융합 또는 가교(bridged) 고리 시스템(들)을 포함한다. 헤테로아릴의 헤테로원자(들)는 선택적으로 산화된다. 하나 이상의 질소 원자가 존재하는 경우, 이는 선택적으로 4차화된다. 헤테로아릴은 고리(들)의 임의의 원자를 통해 분자의 나머지 부분에 연결된다. 헤테로아릴의 예로는 아제피닐, 아크리디닐, 벤즈이미다졸릴, 벤진돌릴, 1,3-벤조디옥사줄릴, 벤조푸라닐, 벤조옥사줄릴, 벤조[d]티아줄릴, 벤조티아디아줄릴, 벤조[b][1,4]디옥세피닐, 벤조[b][1,4]옥사진일, 1,4-벤조디옥사닐, 벤조나프토프라닐, 벤조옥사줄릴, 벤조디옥솔릴, 벤조디옥시닐, 벤조피라닐, 벤조피라노닐, 벤조푸라닐, 벤조푸라노닐, 벤조티에닐, 벤조티에노[3,2-d]피리미디닐, 벤조트리아줄릴, 벤조[4,6]이미다조[1,2-a]피리디닐, 카르바줄릴, 신놀리닐, 시클로펜타[d]피리미디닐, 6,7-디히드로-5H-시클로펜타[4,5]티에노[2,3-d]피리미디닐, 5,6-디히드로벤조[h]퀴나줄리닐, 5,6-디히드로벤조[h]신놀리닐, 6,7-디히드로-5H-벤조[6,7]시클로헵타[1,2-c]피리다지닐, 디벤조푸라닐, 디벤조티에닐, 푸라닐, 푸라노닐, 푸로[3,2-c]피리디닐, 5,6,7,8,9,10-헥사히드로시클로옥타[d]피리미디닐, 5,6,7,8,9,10-헥사히드로시클로헵타[d]피리다지닐, 5,6,7,8,9,10-헥사히드로시클로옥타[d]피리디닐, 이소티아줄릴, 이미다줄릴, 인다줄릴, 인돌릴, 이소인돌릴, 인돌리닐, 이소인돌리닐, 이소퀴놀릴, 인돌리지닐, 이속사줄릴, 5,8-메타노-5,6,7,8-테트라히드로퀴나줄리닐, 나프티리디노닐, 1,6-나프티리디노닐, 옥사디아줄릴, 2-옥소아제피닐, 옥사줄릴, 옥시라닐, 5,6,6a,7,8,9,10,10a-옥타히드로벤조[h]퀴나줄리닐, 1-페닐-1H-피롤릴, 페나지닐, 페노티아지닐, 페녹사지닐, 프탈라지닐, 프테리디닐, 퓨리닐, 피롤릴, 피라줄릴, 피라졸로[3,4-d]피리미디닐, 피리디닐, 피리도[3,2-d]피리미디닐, 피리도[3,4-d]피리미디닐, 피라지닐, 피리미디닐, 피리다지닐, 피롤릴, 퀴나줄리닐, 퀴녹살리닐, 퀴놀리닐, 테트라히드로퀴놀리닐, 5,6,7,8-테트라히드로퀴나줄리닐, 5,6,7,8-테트라히드로벤조[4,5]티에노[2,3-d]피리미디닐, 6,7,8,9-테트라히드로-5H-시클로헵타[4,5]티에노[2,3-d]피리미디닐, 5,6,7,8-테트라히드로피리도[4,5-c]피리다지닐, 티아줄릴, 티아디아줄릴, 트리아줄릴, 테트라줄릴, 트리아지닐, 티에노[2,3-d]피리미디닐, 티에노[3,2-d]피리미디닐, 티에노[2,3-c]프리디닐 및 티오펜일/티에닐이 있으나 이에 제한되지 않는다. 헤테로아릴렌은 헤테로아릴의 하위 집합으로, 헤테로아릴과 동일한 잔기를 의미하지만 두 개의 부착 지점을 갖는다.

[0038] 본 개시에 의해 제공되는 접합체

[0039] 한 측면에서, 본 개시는 하나 이상의 전달기 및 하나 이상의 작용기를 포함하는 접합체로서, 전달기는 앵타머로부터 하나 이상의 수소 원자 또는 하나 이상의 작용성 라디칼을 제거함으로써 형성되고, 각각의 전달기는 공유 결합 또는 연결기를 통해 작용기에 독립적으로 연결되고, 각각의 작용기는 종양에 치료 효과가 있는 소분자 치료제 기로부터 선택되는, 접합체를 제공한다. 본 개시의 접합체는 작용기를 종양에 전달할 수 있으며, 여기서의 접합체는 작용기를 공유 결합이나 연결기를 통해 연결함으로써 형성된다. 본 개시에 의해 제공되는 접합체에서, 전달기는 앵타머로부터 하나 이상의 수소 원자 또는 하나 이상의 작용성 라디칼을 제거함으로써 형성되고, 앵타머는 연속적인 뉴클레오타이드 서열의 세그먼트를 포함하고, 두 개의 인접한 뉴클레오타이드를 연결하는 기는 독립적으로 인산기 또는 변형된 기를 갖는 인산기이고, 각각의 뉴클레오타이드는 변형되거나 변형되지 않은 A, U, C 또는 G 중 하나로부터 선택되고, 연속적인 뉴클레오타이드 서열은 하기 화학식 (1)로 표시된 바와 같은 서열을 갖는다:

- [0040] [화학식 (1)]
- [0041] $5'-T_1-S_1-N_a-S_2-N_b-S_3-N_c-S_4-T_2-3'$
- [0042] 상기 화학식에서 T_1 은 1 내지 3개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이다. 본 발명자들은 T_1 의 존재는 본 개시에 의해 제공되는 접합체가 높은 종양 표적화 효과를 나타내도록 한다는 것을 확인했다. 몇몇 구현예에서, T_1 은 2개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 이 경우, 본 개시에 의해 제공되는 접합체는 더욱 우수한 종양 표적화 능력을 갖는다. 몇몇 구현예에서, T_1 은 2개의 뉴클레오타이드로 구성되고 적어도 하나의 C를 포함한다. 몇몇 구현예에서, T_1 은 5'-3' 방향으로 CU, UC 또는 AC이다.
- [0043] T_2 는 0 내지 15개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이다. 본 발명자들은 이러한 수의 뉴클레오타이드와 다양한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 T_2 가 본 개시에 의해 제공되는 접합체의 종양 표적화 능력에 유의한 영향을 미치지 않는다는 것을 확인했다. 몇몇 구현예에서, T_2 는 0 내지 10개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이다. 몇몇 구현예에서, 5'-3' 방향으로, T_2 는 U로 시작하는 1 내지 9개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 이 경우, 앵타머는 더욱 우수한 안정성을 가질 수 있다.
- [0044] T_2 는 T_1 에 완전히 역상보적인 모티프를 포함하지 않는다. 본 개시의 맥락에서, "역상보적"은 수소 결합 연결이 핵산 염기 페어링의 규칙에 따라 두 뉴클레오타이드 서열 세그먼트 또는 모티프 사이에 형성되고, 이어서 5'-3' 방향의 한 뉴클레오타이드 서열 세그먼트 또는 모티프의 각 뉴클레오타이드가 3'-5' 방향의 다른 말단 뉴클레오타이드 서열 또는 모티프의 각 뉴클레오타이드와 염기 쌍을 형성할 수 있음을 의미한다. 몇몇 구현예에서, "역상보체"에는 AU, GC 및 UG 상보체 중 하나 이상이 포함된다.
- [0045] S_1 및 S_4 는 각각 3 내지 7개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이고, S_1 및 S_4 는 길이가 동일하고 완전히 역상보적이다. 위의 S_1 및 S_4 모티프를 갖는 앵타머는 더 나은 안정성을 가지고 있으며 장기간에 걸쳐 종양 조직 및 세포를 표적할 수 있다. 몇몇 구현예에서, S_1 및 S_4 는 각각 3 내지 5개의 뉴클레오타이드로 구성되고 길이가 동일하다. 몇몇 구현예에서, S_1 및 S_4 에 의해 형성된 역상보체(reverse complementation)에서, GC 상보체는 모든 상보체의 총수의 40% 초과를 차지한다. 이 경우, 본 개시에 의해 제공되는 접합체는 더욱 우수한 안정성 및 종양 표적화 능력을 갖는다. 몇몇 구현예에서는, 5'-3' 방향으로 S_1 은 GCU이고 S_4 는 AGC이거나, S_1 은 GAGU이고 S_4 는 GCUC이거나, S_1 은 GGAGU이고 S_4 는 GCUCU이거나, 또는 S_1 은 UAUGG이고 S_4 는 CCAUG이다.
- [0046] N_a 및 N_c 는 각각 1 내지 4개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이다. N_a 의 각각의 뉴클레오타이드는 N_c 의 각각의 뉴클레오타이드와 상보적이지 않으며, N_a 및 N_c 에서 U의 총 수는 N_a 및 N_c 에서의 모든 뉴클레오타이드의 총 수의 50% 초과를 차지한다. 위의 N_a 와 N_c 모티프를 갖는 앵타머는 우수한 종양 조직 표적화 능력을 나타낸다. 몇몇 구현예에서, N_a 및 N_c 에서의 뉴클레오타이드의 수의 합은 2 내지 4의 정수이다. 몇몇 구현예에서, N_a 및 N_c 에서의 뉴클레오타이드의 수의 합은 3 또는 4이고, N_a 및 N_c 에서의 U의 수의 합은 2 또는 3이다. 몇몇 구현예에서, 5'-3' 방향으로, N_a 및/또는 N_c 는 U, UU, UC 또는 CU이다.
- [0047] S_2 및 S_3 는 각각 1 내지 4개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이고, S_2 및 S_3 는 동일한 길이를 가지며 완전히 역상보적이다. S_2 및 S_3 모티프를 포함함으로써, 본 개시에 의해 제공되는 접합체는 양호한 안정성 및 우수한 종양 표적화 능력을 나타낸다. 몇몇 구현예에서, S_2 및 S_3 는 각각 2 또는 3개의 뉴클레오타이드로 구성되고 길이가 동일하다. 몇몇 구현예에서, S_2 및 S_3 에 의해 형성되는 역상보체는 적어도 하나의 GC 상보체를 포함한다. 이 경우, 역상보체는 더 나은 안정성을 갖는다. 몇몇 구현예에서, 5'-3' 방향으로, S_2 는 CA이고 S_3 는 UG이거나, S_2 는 AC이고 S_3 는 GU이거나, 또는 S_2 는 GCC이고 S_3 는 GGU이다.
- [0048] N_b 는 3 내지 6개의 뉴클레오타이드로 구성된 모티프이며, N_b 의 양 말단에 있는 뉴클레오타이드는 AU 또는 GC의 상보체를 형성하지 않는다. 이론에 제한되지 않고, 위의 N_b 모티프를 갖는 앵타머는 공간의 측면에서 특정 배열을 유지함으로써, 본 개시에 의해 제공되는 접합체는 종양 조직 및 세포를 안정적이고 효율적으로 표적할 수 있다.

몇몇 구현예에서, N_b 는 4 또는 5개의 뉴클레오티드로 구성된다. 몇몇 구현예에서, 5'-3' 방향으로, N_b 는 GACG, GACGU, GACCG, UACU, GUUG 또는 GAUCU이다.

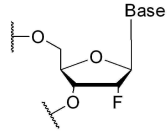
- [0049] 본 개시의 발명자들은 예상치 못하게도 상기 화학식 (1)로 표시된 바와 같은 서열을 갖는 앵타머에 의해 형성된 전달기가 종양, 특히 신경교종 조직을 효과적으로 표적함으로써, 본 개시에 의해 제공되는 접합체가 종양 세포에 특이적으로 진입하여 세포 수준에서 치료제 기를 보다 효과적으로 전달할 수 있다는 것을 확인했다.
- [0050] 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체에서, 연속적인 뉴클레오티드 서열은 18 내지 50개 뉴클레오티드, 또는 20 내지 40개 뉴클레오티드, 또는 21 내지 36개 뉴클레오티드, 또는 24 내지 32개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 이러한 길이의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 갖는 앵타머에 의해 형성되는 전달기 또는 접합체는 종양을 보다 용이하게 표적하고 합성 비용과 표적화 효과 사이의 양호한 균형을 달성할 수 있다.
- [0051] 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체에서, 연속적인 뉴클레오티드 서열은 하기와 같이 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3에 표시된 바와 같은 서열을 갖는다:
- [0052] 5'-CUGCUUCAGACGUGUUAGCUU-3' (서열번호 1)
- [0053] 여기서, 5'-3' 방향으로, T_1 은 CU, S_1 은 GCU, N_a 는 U, S_2 는 CA, N_b 는 GACG, S_3 은 UG, N_c 는 UU, S_4 는 AGC, T_2 는 UU이며'
- [0054] 5'-CUGAGUUCAGACGUGUUGCUCU-3' (서열번호 2)
- [0055] 여기서, 5'-3' 방향으로, T_1 은 CU, S_1 은 GAGU, N_a 는 U, S_2 는 CA, N_b 는 GACG, S_3 은 UG, N_c 는 UU, S_4 는 GCUC, T_2 는 U이며;
- [0056] 5'-UCUAUGGCGCCGAUCUGGUCUCCAUGUACGU -3' (서열번호 3),
- [0057] 여기서, 5'-3' 방향으로, T_1 은 CU, S_1 은 GAGU, N_a 는 U, S_2 는 CA, N_b 는 GACG, S_3 은 UG, N_c 는 UU, S_4 는 GCUC, T_2 는 U이다.
- [0058] 몇몇 구현예에서, 연속적인 뉴클레오티드 서열은 서열번호 4에 표시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 갖는다:
- [0059] 5'- N_6 GGAGUUCAN $_1$ N $_2$ N $_3$ N $_4$ UGN $_5$ GCUCN $_7$ -3' (서열번호 4),
- [0060] 여기서, N_1 , N_2 및 N_3 은 서로 독립적으로 A, U, C 및 G 중 하나이고, N_4 는 U, C 또는 G이거나 또는 U, C 또는 G 중 두 개로 구성된 모티프이고, N_5 는 U, CU 또는 UU이고, N_6 은 CU, UC 또는 AC이고, N_7 은 U, UU 또는 UUN $_8$ 이고, N_8 은 1 내지 15개의 뉴클레오티드로 구성된 모티프이다.
- [0061] 위의 뉴클레오티드 서열에서, 5'-3' 방향으로, T_1 은 N_6 으로 표시된 모티프이고, S_1 은 GGAGU로 표시된 모티프이고, N_a 는 U이고, S_2 는 CA이고, N_b 는 N_1 , N_2 , N_3 및 N_4 로 구성된 모티프인 $N_1N_2N_3N_4$ 이고, S_3 은 UG이고, N_c 는 N_5 로 표시된 모티프이고, S_4 는 GCUC와 N_7 의 첫 번째 뉴클레오티드로 구성된 모티프이고, T_2 는 N_7 의 나머지 뉴클레오티드로 구성된 모티프이다.
- [0062] 상기 서열번호 4에 표시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는 앵타머는 종양, 특히 신경교종을 더욱 효과적으로 표적할 수 있으며, 종양 조직에서 농축될 수 있다.
- [0063] 실험적 검증 결과, 서열번호 4에 표시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열에서, 상기 N_1 , N_2 , N_3 및 N_4 의 선택은 본 개시에 의해 제공되는 접합체의 종양 표적화 능력에 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 몇몇 구현예에서, N_1 , N_2 , N_3 및 N_4 로 구성된 모티프인 $N_1N_2N_3N_4$ 는 GACG, GACGU, GACCG, UACU, GUUG 또는 GAUCU 중 하나이며, 이들 모티프를 포함하는 앵타머는 더 높은 종양 특이적 표적화 효과를 갖는다.
- [0064] 몇몇 구현예에서, 서열번호 4에 표시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열에서 N_5 는 U 또는 UU이다. 이 경우, 본 개시에 의해 제공되는 접합체는 모두 우수한 종양 표적화 효과를 갖는다.
- [0065] 몇몇 구현예에서, 연속적인 뉴클레오티드 서열은 서열번호 5 내지 11 중 어느 하나에 표시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 갖는다:

- [0066] 5'-CUGGAGUUCAGACGUGUUGCUCUU -3'(서열번호 5)
- [0067] 5'- CUGGAGUUCAGACGUGUUGCUCUU -3'(서열번호 6)
- [0068] 5'- CUGGAGUUCAGACCGUGUGCUCUU -3'(서열번호 7)
- [0069] 5'- CUGGAGUUCAGACGUGUUGCUCU -3'(서열번호 8)
- [0070] 5'- ACGGAGUUCAGACGUGUUGCUCUU -3'(서열번호 9)
- [0071] 5'- CUGGAGUUCACUACUGUUGCUCUU -3'(서열번호 10)
- [0072] 5'- CUGGAGUUCAGUUGUGUUGCUCUU -3'(서열번호 11).
- [0073] 본 개시에 의해 제공되는 상기 뉴클레오티드 서열을 갖는 접합체는 높은 종양 표적화 효과를 나타낸다.
- [0074] 몇몇 구현예에서, 모티프 N₈은 1 내지 15개의 뉴클레오티드로 구성된다. 몇몇 구현예에서, N₈은 1 내지 8개의 뉴클레오티드로 구성된다.
- [0075] 몇몇 구현예에서, 모티프 N₈의 존재로 인해 본 개시에 의해 제공되는 접합체는 생체내 엑소뉴클레아제에 대해 더욱 안정적이게 됨으로써 장기간에 걸쳐서 생체내에서 종양 표적화 효과를 발휘할 수 있다. 몇몇 구현예에서, T₈은 본 개시에 의해 제공되는 접합체의 종양-표적화 효과를 증가시키거나 유지할 수 있다. 몇몇 구현예에서, 모티프 N₈은 안정성, 표적화 및 합성 효율 간의 균형을 고려하여 8개의 뉴클레오티드로 구성된다. 몇몇 구현예에서, 5'-3' 방향으로, 모티프 N₈은 CCGAUCUC이다. 몇몇 구현예에서, 연속적인 뉴클레오티드 서열은 서열번호 12 내지 14 중 어느 하나에 표시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 갖는다:
- [0076] 5'-CUGGAGUUCAGACGUGUUGCUCUCCGAUCUC-3'(서열번호 12)
- [0077] 5'-CUGGAGUUCAGACGUGUGUCUCUCCGAUCUC-3'(서열번호 13)
- [0078] 5'-CUGGAGUUCAGACCGUGUGUCUCUCCGAUCUC-3'(서열번호 14)
- [0079] 연속적인 뉴클레오티드 서열에서, 5' 말단 뉴클레오티드의 리보스의 5' 말단의 말단기 및 3' 말단 뉴클레오티드의 리보스의 3' 말단의 말단기는 독립적으로 히드록실기 또는 인산기이며, 이러한 말단기의 선택은 본 개시에 의해 제공되는 접합체의 표적화 능력을 변화시키지 않는다. 몇몇 구현예에서, 5' 말단 뉴클레오티드의 리보스의 5' 말단의 말단기와 3' 말단 뉴클레오티드의 리보스의 3' 말단의 말단기는 모두 히드록실기이다.
- [0080] 본 개시에 의해 제공되는 접합체에서, 각각의 뉴클레오티드는 변형되거나 변형되지 않은 뉴클레오티드일 수 있다. 일반적으로, 뉴클레오티드의 변형은 본 개시에 의해 제공되는 접합체의 안정성 및/또는 종양 표적화 능력을 변경할 수 있다. 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체의 적어도 하나의 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다. 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체에서 두 개의 인접한 뉴클레오티드를 연결하는 적어도 하나의 기는 변형기를 갖는 인산기이다.
- [0081] 뉴클레오티드의 변형은 당의 변형, 염기의 변형 및/또는 뉴클레오티드를 뉴클레오티드 유사체로 치환하는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체에서, 각각의 변형된 뉴클레오티드는 독립적으로 2'-할로젠 변형된 뉴클레오티드, 2'-알콕시 변형된 뉴클레오티드, 2'-알킬 변형된 뉴클레오티드, 2'-치환된 알킬 변형된 뉴클레오티드, 2'-아미노 변형된 뉴클레오티드, 2'-치환된 아미노 변형된 뉴클레오티드, 2'-테옥시 뉴클레오티드, 염기가 변형된 뉴클레오티드, 및 뉴클레오티드 유사체 중 하나이다.
- [0082] 본 개시의 맥락에서, "플루오로 변형된 뉴클레오티드"는 뉴클레오티드의 리보스기의 2'-히드록시를 플루오로기로 치환함으로써 형성된 뉴클레오티드를 의미하며, 이는 하기 화학식 (7)로 표시되는 바와 같은 구조를 갖는다. "비플루오로 변형 뉴클레오티드"는 뉴클레오티드의 리보스 기의 2'-히드록시를 비플루오로 기(non-fluoro group)로 치환함으로써 형성된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체를 의미한다. 몇몇 구현예에서, 각각의 비플루오로 변형 뉴클레오티드는 뉴클레오티드의 리보스 기의 2'-히드록시를 비플루오로 기로 치환함으로써 형성된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체로 이루어진 군에서 독립적으로 선택된다.
- [0083] 리보스기의 2'-히드록시를 비플루오로기로 치환함으로써 형성된 이러한 뉴클레오티드는 당업자에게 널리 알려져 있으며, 2'-알콕시 변형 뉴클레오티드, 2'-알킬 변형 뉴클레오티드, 2'-치환 알킬 변형 뉴클레오티드, 2'-아미노 변형 뉴클레오티드, 2'-치환 아미노 변형 뉴클레오티드 및 2'-테옥시 뉴클레오티드 중에서 선택된 것일 수

있다.

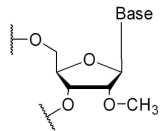
[0084] 몇몇 구현예에서, 2'-알콕시 변형 뉴클레오타이드는 하기 화학식 (8)로 표시된 바와 같은 메톡시 변형 뉴클레오타이드(2'-OMe)이다. 몇몇 구현예에서, 2'-아미노 변형 뉴클레오타이드(2'-NH₂)는 하기 화학식 (9)로 표시된 바와 같다. 몇몇 구현예에서, 2'-데옥시 뉴클레오타이드(DNA)는 하기 화학식 (10)으로 표시된 바와 같다:

[0085] [화학식 (7)]



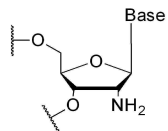
[0086]

[0087] [화학식 (8)]



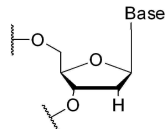
[0088]

[0089] [화학식 (9)]



[0090]

[0091] [화학식 (10)]



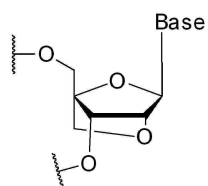
[0092]

[0093] 당업자는 뉴클레오타이드의 염기를 변형하는 다양한 방법을 알고 있다. 몇몇 구현예에서, 염기 변형은 염기에 하나 이상의 메틸기를 추가하는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 몇몇 구현예에서, 티민(T)은 변형된 염기를 갖는 하나의 우라실(U)로 간주된다. 몇몇 구현예에서, 2-메틸시토신은 변형된 염기를 갖는 하나의 시토신(C)으로 간주된다.

[0094] 뉴클레오타이드 유사체는 핵산 내의 뉴클레오타이드를 대체할 수 있는 기를 의미하며, 아데닌 리보뉴클레오타이드, 구아닌 리보뉴클레오타이드, 시토신 리보뉴클레오타이드, 우라실 리보뉴클레오타이드 또는 티민 데옥시리보뉴클레오타이드와 구조적으로 다르다. 몇몇 구현예에서, 뉴클레오타이드 유사체는 이소뉴클레오타이드, 가교된(bridged) 핵산(BNA로 약칭함) 뉴클레오타이드 또는 비고리형 뉴클레오타이드일 수 있다.

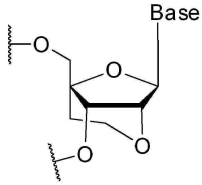
[0095] BNA는 제약을 받거나 접근할 수 없는 뉴클레오타이드를 의미한다. BNA는 "고정된" C3'-엔도 당 퍼커링(sugar pucker)이 있는 5-, 6-원 또는 심지어 7-원 고리 가교(ring bridged) 구조를 포함할 수 있다. 가교는 일반적으로 리보스의 2' 및 4' 위치에 통합되어 2',4'-BNA 뉴클레오타이드를 제공한다. 몇몇 구현예에서, BNA는 LNA, ENA, cET BNA 등일 수 있으며, 이들은 각각 하기 화학식 (12), (13) 및 (14)로 표시된 바와 같다.

[0096] [화학식 (12)]



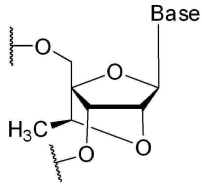
[0097]

[0098] [화학식 (13)]



[0099]

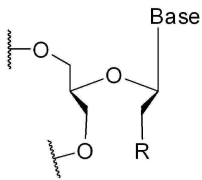
[0100] [화학식 (14)]



[0101]

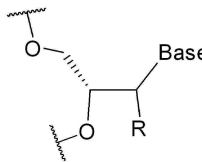
[0102] 비고리형 뉴클레오티드는 리보스 고리가 열려 있는 뉴클레오티드이다. 몇몇 구현예에서, 비고리형 뉴클레오티드는 잠금 해제(unlocked) 핵산(UNA), 글리세롤 핵산(GNA) 또는 펩티드 핵산(PNA)일 수 있으며, 여기서 UNA는 하기 화학식(15)로 표시된 바와 같고 GNA는 하기 화학식(16)으로 표시된 바와 같다:

[0103] [화학식 (15)]



[0104]

[0105] [화학식 (16)]



[0106]

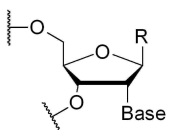
[0107] 상기 화학식 (15) 및 화학식 (16)에서, R은 H, OH, 또는 알콕시(O-알킬)로부터 선택된다.

[0108] 펩티드 핵산은 글리코시드-인산 골격을 폴리펩티드 골격으로 대체함으로써 형성된 뉴클레오티드 유사체의 부류이다. 몇몇 구현예에서, 펩티드 핵산은 예를 들어 글리코시드-인산 단위를 2-아미노에틸 글리신 결합으로 대체함으로써 형성된 뉴클레오티드 유사체일 수 있다.

[0109] 이소뉴클레오티드는 뉴클레오티드 내 리보스 고리의 염기의 위치를 변화시킴으로써 형성된 화합물이다. 몇몇 구현예에서, 이소뉴클레오티드는 하기 화학식 (17) 또는 (18)로 표시된 바와 같이, 염기를 리보스 고리의 1'-위치에서 2'-위치 또는 3'-위치로 전치함으로써 형성된 화합물이다.

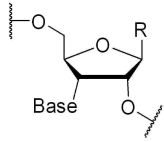
[0110] 화학식 (217) 및 (218)의 상기 화합물에서, "염기(Base)"는 A, U, G, C 또는 T와 같은 핵산 염기를 나타내고; R은 H, OH, F 또는 상기 비플루오로 기로부터 선택된다.

[0111] [화학식 (17)]



[0112]

[0113] [화학적식 (18)]



[0114]

[0115] 몇몇 구현예에서, 뉴클레오타이드 유사체는 이소뉴클레오타이드, LNA, ENA, cET, UNA 및 GNA로 이루어진 군에서 선택된다. 몇몇 구현예에서, 각각의 비플루오르 변형 뉴클레오타이드는 메톡시 변형 뉴클레오타이드이다. 본 개시의 맥락에서, 메톡시 변형 뉴클레오타이드는 리보스 기의 2'-히드록시를 메톡시 기로 치환함으로써 형성된 뉴클레오타이드를 의미한다.

[0116] 본 개시의 맥락에서, "플루오르 변형된 뉴클레오타이드", "2'-플루오르 변형된 뉴클레오타이드", "리보스기의 2'-히드록시가 플루오르기로 치환되어 있는 뉴클레오타이드" 및 "2'-플루오로리보실을 포함하는 뉴클레오타이드"는 동일한 의미를 갖는 것으로, 리보스기의 2'-히드록시가 플루오르기로 치환되어 있는 뉴클레오타이드를 의미하며, 화학식 (7)로 표시되는 바와 같은 구조를 갖는다. "메톡시 변형 뉴클레오타이드", "2'-메톡시 변형 뉴클레오타이드", "리보스기의 2'-히드록시가 메톡시로 치환되어 있는 뉴클레오타이드" 및 "2'-메톡시리보실을 포함하는 뉴클레오타이드"는 모두 동일한 의미를 갖는 것으로, 뉴클레오타이드 내의 리보스기의 2'-히드록시가 메톡시로 치환되어 있는 화합물을 의미하며, 화학식 (8)로 나타낸 바와 같은 구조를 갖는다.

[0117] 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체에서 연속적인 뉴클레오타이드 서열의 각각의 시토신 뉴클레오타이드는 플루오르-변형된 시토신 뉴클레오타이드이고/이거나 본 개시에 의해 제공되는 접합체에서 연속적인 뉴클레오타이드 서열의 각각의 우라실 뉴클레오타이드는 플루오르-변형된 우라실 뉴클레오타이드이다. 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체에서 연속적인 뉴클레오타이드 서열의 각각의 뉴클레오타이드는 2'-메톡시 변형된 뉴클레오타이드이다. 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체에서 하나 이상의 우라실 뉴클레오타이드는 변형된 염기를 갖는다. 몇몇 구현예에서, 티민 염기(T)는 메틸 변형을 갖는 우라실 염기(U)로 간주된다.

[0118] 두 개의 인접한 뉴클레오타이드를 연결하는 기는 인산기 또는 변형된 인산기일 수 있다. 예를 들어, 변형된 인산기는 인산기의 적어도 하나의 비가교 산소 원자를 황 원자로 대체함으로써 형성된 포스포티오에이트기 또는 포스포로디티오에이트기이다. 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체에서 두 개의 인접한 뉴클레오타이드를 연결하는 적어도 하나의 기는 포스포티오에이트 기이다. 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체에서 두 개의 인접한 뉴클레오타이드를 연결하는 적어도 하나의 기는 포스포로디티오에이트 기이다. 몇몇 구현예에서, 연속적인 뉴클레오타이드 서열의 5' 말단에 있는 처음 네 개의 뉴클레오타이드 사이의 두 개의 인접한 뉴클레오타이드를 연결하는 세 개의 기 중 적어도 하나의 기는 포스포티오에이트 기이다. 몇몇 구현예에서, 연속적인 뉴클레오타이드 서열의 3' 말단에 있는 처음 4개의 뉴클레오타이드 사이에 있는 두 개의 인접한 뉴클레오타이드를 연결하는 적어도 하나의 기는 포스포로디티오에이트 기이다. 몇몇 구현예에서, 연속적인 뉴클레오타이드 서열의 3' 말단에 있는 처음 네 개의 뉴클레오타이드 사이에 있는 두 개의 인접한 뉴클레오타이드를 연결하는 세 개의 기 중 적어도 두 개의 기는 포스포로디티오에이트 기이다. 몇몇 구현예에서, 연속적인 뉴클레오타이드 서열에서 두 개의 인접한 뉴클레오타이드를 연결하는 각각의 기는 포스포로디티오에이트 기이다.

[0119] 상기의 변형을 갖는 본 개시에 의해 제공되는 접합체는 비용이 낮을 뿐만 아니라, 내인성 리보뉴클레아제가 연결기를 절단할 가능성을 낮춤으로써, 본 개시에 의해 제공되는 접합체의 안정성을 증가시키고 뉴클레아제 가수분해에 대한 저항성을 더욱 향상시킬 수 있다. 한편, 상기 변형을 갖는 전달기를 포함하는 본 개시에 의해 제공되는 접합체는 종양 조직 및/또는 세포를 표적하는 더 높은 활성을 갖는다.

[0120] 몇몇 구현예에서, 연속적인 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 15 내지 39 중 어느 하나에 표시된 바와 같은 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:

[0121] 5'- CfUfGGAGUfUfCfAGACfGUfGUfUfGCfUfCfUfUfCfCfGAUfCfUfCf -3'(서열번호 15)

[0122] 5'- CfUfGGAGUfUfCfAGACfGUfGUfUfGCfUfCfUfUf -3'(서열번호 16)

[0123] 5'- CfUfGGAGUfUfCfAGACfGUfGUfUfGCfUfCfUfUfCfCfGAUfCfUfCf -3'(서열번호 17)

[0124] 5'- CfUfGGAGUfUfCfAGACfGUfGUfUfGCfUfCfUfUf -3'(서열번호 18)

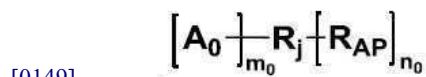
[0125] 5'- CfUfGGAGUfUfCfAGACfGUfGUfUfGCfUfCfUfUfCfCfGAUfCfUfCf -3'(서열번호 19)

- [0126] 5'- CfUfGGAGUfUfCfAGACfCfGUfGUfGCfUfCfUfUf -3' (서열번호 20)
- [0127] 5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmCmUmCmUmCmGmAmUmCmUmCm -3' (서열번호 21)
- [0128] 5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUm -3' (서열번호 22)
- [0129] 5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmUmGmUmGmCmUmCmUmUmCmCmGmAmUmCmUmCm -3' (서열번호 23)
- [0130] 5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmUmGmUmGmCmUmCmUmUm -3' (서열번호 24)
- [0131] 5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmCmGmUmGmUmGmCmUmCmUmUmCmCmGmAmUmCmUmCm -3' (서열번호 25)
- [0132] 5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmCmGmUmGmUmGmCmUmCmUmUm -3' (서열번호 26)
- [0133] 5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUm -3' (서열번호 27)
- [0134] 5'- CmUmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUm -3' (서열번호 28)
- [0135] 5'- CmUmGmCmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmAmGmCmUmUm -3' (서열번호 29)
- [0136] 5'- AmCmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUm -3' (서열번호 30)
- [0137] 5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmCmUmAmCmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUm -3' (서열번호 31)
- [0138] 5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmUmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUm -3' (서열번호 32)
- [0139] 5'- UmCmUmAmUmGmGmCmUmGmCmCmGmAmUmCmUmGmUmCmUmCmCmAmUmGmUmAmCmGmUm -3' (서열번호 33)
- [0140] 5'- CmsUmsGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUmCmCmGmAmUmCmsUmsCm -3' (서열번호 34)
- [0141] 5'- CmsUmsGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmsUmsUm -3' (서열번호 35)
- [0142] 5'- CmsUmsGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmUmGmUmGmCmUmCmUmUmCmCmGmAmUmCmsUmsCm -3' (서열번호 36)
- [0143] 5'- CmsUmsGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmUmGmUmGmCmUmCmsUmsUm -3' (서열번호 37)
- [0144] 5'- CmsUmsGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmCmGmUmGmUmGmCmUmCmUmUmCmCmGmAmUmCmsUmsCm -3' (서열번호 38)
- [0145] 5'- CmsUmsGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmCmGmUmGmUmGmCmUmCmsUmsUm -3' (서열번호 39)

[0146] 여기서 C, G, U 및 A는 뉴클레오티드의 염기 조성을 나타내고; m은 문자 m의 좌측에 인접한 뉴클레오티드가 메톡시 변형 뉴클레오티드임을 나타내고; f는 문자 f의 좌측에 인접한 뉴클레오티드가 플루오로 변형 뉴클레오티드임을 나타내고; s는 문자 s의 양쪽에 인접한 두 개의 뉴클레오티드가 포스포로티오에이트 결합에 의해 연결되어 있음을 나타낸다.

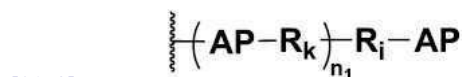
[0147] 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체는 하기 화학식 (101)로 표시된 바와 같은 구조를 갖는다:

[0148] [화학식 (101)]



[0150] 상기 화학식에서 각각의 R_{AP} 기는 독립적으로 하기 화학식 (102)로 표시된 바와 같은 구조를 갖는 기이다:

[0151] [화학식 (102)]



[0153] 상기 화학식에서, 각각의 AP 기는 동일하거나 다르며, 독립적으로 전달기 중 하나를 나타내고; 각각의 A_0 기는 동일하거나 다르며, 독립적으로 작용기 중 하나를 나타내고; R_j , 각각의 R_k 또는 각각의 R_i 는 동일하거나 다르며, 독립적으로 공유 결합 또는 연결기를 나타내고, R_i 및 R_k 는 동시에 공유 결합이 아니고; m_0 은 1 내지 6의 정수이고; n_0 은 1 내지 6의 정수이고; 각각의 n_1 은 독립적으로 0 내지 4의 정수를 나타내고; 는 기가

공유 결합으로 연결되는 부위를 나타낸다.

[0154] 몇몇 구현예에서, m_0 는 1 내지 6의 정수이고, 즉, 화학식 (101)로 표시된 접합체는 1 내지 6개의 작용기 A_0 를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 전달 효율 및 비용을 고려하면, m_0 는 1 내지 4의 정수이고, 즉, 화학식 (101)로 표시되는 접합체는 1 내지 4개의 작용기 A_0 를 포함한다. 몇몇 구현예에서, m_0 는 1이고, 즉, 화학식 (101)로 표시되는 접합체는 하나의 작용기 A_0 를 포함한다.

[0155] 몇몇 구현예에서, n_0 는 1 내지 6의 정수이고, 즉, 화학식 (101)로 표시되는 접합체는 1 내지 6개의 R_{AP} 기를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 전달 효율 및 비용을 고려하면, n_0 는 1 내지 3의 정수이고, 즉, 화학식 (101)로 표시되는 접합체는 1 내지 3개의 R_{AP} 기를 포함한다. 몇몇 구현예에서, n_0 는 1이고, 즉, 화학식 (101)로 표시되는 접합체는 하나의 R_{AP} 기를 포함한다.

[0156] 몇몇 구현예에서, 각각의 n_1 은 서로 독립적으로 0 내지 4의 정수를 나타내고, R_i 및 R_k 는 동시에 공유 결합이 아니므로, 각각의 R_{AP} 기는 1 내지 5개의 전달기 AP를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 각각의 n_1 은 서로 독립적으로 0 또는 1의 정수를 나타내므로, 각각의 R_{AP} 기는 1 또는 2개의 전달기 A_p 를 포함한다. 몇몇 구현예에서, n_0 는 1이고 n_1 은 0이고, 즉, 화학식 (101)로 표시되는 접합체는 하나의 작용기 AP를 포함한다.

[0157] R_{AP} 기에서, R_k 와 R_i 의 역할은 전달기 AP를 R_j 기에 공유결합으로 연결하고, R_j 기를 통해 작용기 A_0 에 연결하는 것이다. 따라서, 상기 언급된 연결이 달성될 수 있는 한, 전달기 A_p 와 작용기 A_0 에 부정적인 영향을 미치지 않는 임의의 R_k 또는 R_i 가 본 발명에서 사용될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 각각의 R_k 또는 각각의 R_i 는 독립적으로 길이가 1 내지 70개 탄소 원자인 직쇄 알킬렌기이거나, 직쇄 알킬렌기의 하나 이상의 탄소 원자는 C(O), NH, O, S, CH=N, S(O)₂, OP(O)₂, OP(O)(S), C₅-C₈ 글리코실렌, C₂-C₁₀ 알케닐렌, C₂-C₁₀ 알킬닐렌, C₆-C₁₀ 아틸렌, C₃-C₁₈ 헤테로시클릴렌 및 C₅-C₁₀ 헤테로아틸렌으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기로 대체되고; 여기서의 직쇄 알킬렌기는 다음으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 치환기를 선택적으로 가질 수 있다: C₁-C₁₀ 알킬, C₆-C₁₀ 아틸, C₅-C₁₀ 헤테로아틸, C₁-C₁₀ 할로알킬, -OC₁-C₁₀ 알킬, -OC₁-C₁₀ 알킬페닐, -C₁-C₁₀ 알킬-OH, -OC₁-C₁₀ 할로알킬, -SC₁-C₁₀ 알킬, -SC₁-C₁₀ 알킬페닐, -C₁-C₁₀ 알킬-SH, -SC₁-C₁₀ 할로알킬, 할로젠 치환기, -OH, -SH, -NH₂, -C₁-C₁₀ 알킬-NH₂, -N(C₁-C₁₀ 알킬)(C₁-C₁₀ 알킬), -NH(C₁-C₁₀ 알킬), -N(C₁-C₁₀ 알킬)(C₁-C₁₀ 알킬페닐), -NH(C₁-C₁₀ 알킬페닐), 시아노, 니트로, -CO₂H, -C(O)O(C₁-C₁₀ 알킬), -CON(C₁-C₁₀ 알킬)(C₁-C₁₀ 알킬), -CONH(C₁-C₁₀ 알킬), -CONH₂, -NHC(O)(C₁-C₁₀ 알킬), -NHC(O)(페닐), -N(C₁-C₁₀ 알킬)C(O)(C₁-C₁₀ 알킬), -N(C₁-C₁₀ 알킬)C(O)(페닐), -C(O)C₁-C₁₀ 알킬, -C(O)C₁-C₁₀ 알킬페닐, -C(O)C₁-C₁₀ 할로알킬, -OC(O)C₁-C₁₀ 알킬, -SO₂(C₁-C₁₀ 알킬), -SO₂(페닐), -SO₂(C₁-C₁₀ 할로알킬), -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁-C₁₀ 알킬), -SO₂NH(페닐), -NHSO₂(C₁-C₁₀ 알킬), -NHSO₂(페닐), 및 -NHSO₂(C₁-C₁₀ 할로알킬). 몇몇 구현예에서, 합성 비용, 합성의 어려움 및 접합체의 종양 표적 효과를 고려하여, 각각의 n_1 은 0이고, 각각의 R_i 는 독립적으로 공유 결합이거나, 또는 C₁-C₂₀ 알킬렌, 인산(phosphate) 결합, 포스포로티오에이트 결합, 아마이드 결합, 에스테르 결합, 에테르 결합, 티오에테르 결합, 디설파이드 결합, 1,2,3-트리아졸리덴기, 폴리에틸렌 글리콜의 서브유닛, 피롤리디닐리덴기, 2-옥소피롤리디닐리덴기, 페닐렌, 시클로헥실렌, 2-숙신이미도일리덴기, 2-티오숙신이미도일리덴기, 아미노산의 서브유닛, 뉴클레오타이드의 서브유닛으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 연결기 또는 둘 이상의 연결기의 연결 조합이다.

[0158] 몇몇 구현예에서, 연결기 R_j 는 항체-접합된 약물에 유용한 것으로 당업자에게 잘 알려진 연결기를 포함한다. 연결기 R_j 는 절단 가능하거나 절단 불가능할 수 있다. 몇몇 구현예에서, 연결기 R_j 는 절단 가능할 수 있다. 본 개시의 맥락에서, "절단 가능한"은 본 개시의 접합체가 종양을 표적한 후, 연결기 R_j 의 공유 결합이 종양 내부 환경 및/또는 종양 세포 내에서 절단됨으로써, 개별적인 치료제 기를 방출하여 치료적 효과를 생성하는 것을 의미한다. 몇몇 구현예에서, 연결기 R_j 는 활성 효소 연결기, 설파타아제로 절단 가능한 연결기, 갈락토스로 절단 가능한 연결기, 리소좀 프로테아제에 민감한 연결기, 펩티달 연결기, 글루쿠론산 연결기, 산에 민감한 절단 가능

한 연결기 또는 글루타치온에 민감한 이황화물 연결기 중 하나 이상을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 연결기 R_j 는 펩티딜 연결기를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 펩티딜 연결기는 발린-시트룰린 디펩티드 링커(Val-Cit), 알라닌-알라닌 디펩티드 링커(Ala-Ala), 발린-알라닌 디펩티드 링커(Val-Ala), 글리신-글리신-페닐알라닌-글리신 테트라펩티드 링커(Gly-Gly-Phe-Gly) 중 하나 이상으로부터 선택된다. 몇몇 구현예에서, 연결기 R_j 는 N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부티레이트(SPDB), N-숙신이미딜-4-(2-티오피리디닐렌) 펜타노에이트(SPP), (S)-2-((S)-2-아미노-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄산(Val-Cit-PAB-OH), N-숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트(SMCC) 또는 2-(포스페이트-(CH₂)₆-S)-말레이미도헥사노일-발린-시트룰린-p-아미노벤질 서브유닛 중 하나로부터 선택된다. 몇몇 구현예에서, 연결기 R^j 는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 문헌[Mckertish CM, Kayser V. Advances and Limitations of Antibody Drug Conjugates for Cancer. Biomedicines. 2021 Jul 23; 9(8): 872]에 나열된 연결기를 포함한다.

[0159] 몇몇 구현예에서, 연결기 R_j 는 발린-시트룰린 디펩티드 링커(Val-Cit), 폴리에틸렌 글리콜의 서브유닛, 이미노헥실렌기, N-숙신이미딜기 및 GAU 트리뉴클레오타이드 연결기 중 하나 이상을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 각각의 R_i 는 독립적으로 공유 결합, 디설파이드 결합, 도데칸다일기, 발린-시트룰린 디펩타이드 링커(Val-Cit), 폴리에틸렌 글리콜의 서브유닛, 이미노헥실리덴기, N-숙신이미딜기 또는 GAU 트리뉴클레오타이드의 서브유닛이거나, 또는 공유 결합, 디설파이드 결합, 도데칸다일기, 발린-시트룰린 디펩타이드 링커(Val-Cit), 폴리에틸렌 글리콜의 서브유닛, 이미노헥실리덴기, N-숙신이미딜기 또는 GAU 트리뉴클레오타이드의 서브유닛 중 둘의 연결 조합이다.

[0160] R_j 기의 역할은 R_{AP} 기와 작용기 A_0 를 연결함으로써, 작용기 A_0 가 R_{AP} 기 내의 전달기 AP의 종양 표적화 효과를 통해 종양 조직 및/또는 세포에 특이적으로 전달되도록 하는 것이다. 따라서, 전달기 AP의 종양 표적화 기능과 작용기 A_0 의 효과에 영향을 미치지 않고 상기 언급된 연결을 달성할 수 있는 임의의 R_j 기는 본 발명의 목적을 달성하고 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 문제를 해결할 수 있다. 몇몇 구현예에서, 화학식 (101)로 표시되는 접합체가 종양 조직에 도달하고/하거나 종양 세포에 진입한 후, R_j 의 절단이 일어나서 작용기 A_0 에 상응하는 별개의 약학적 활성 분자가 방출된다. 몇몇 구현예에서, 생체내에서 R^j 의 절단이 일어나지 않는다. 이 경우, 접합체 내의 R_j 기 및 R_{AP} 의 존재는 작용기 A_0 가 치료적 역할을 하는데 영향을 미치지 않는다.

[0161] 몇몇 구현예에서, R_j 는 공유 결합이고, m_0 는 1이다. 이 경우, 화학식 (101)로 표시되는 접합체는 하나의 작용기 A_0 와 하나의 R_{AP} 기를 포함하고, 각각의 R_{AP} 기는 작용기 A_0 에 직접 연결된다. 몇몇 구현예에서, 각각의 R_{AP} 기는 작용기 A_0 의 동일한 원자에 연결된다. 몇몇 구현예에서, 각각의 R_{AP} 기는 작용기 A_0 의 다른 원자에 연결된다.

[0162] 몇몇 구현예에서, R_j 는 주쇄 부분(moiety), 측쇄 부분 및 접합된 연결(conjugated linking) 부분을 포함하는 연결기이다.

[0163] 주쇄 부분은 각각 접합 연결 부분(conjugated linking portion) 및 측쇄 부분에 연결된다. 몇몇 구현예에서, 주쇄 부분은 길이가 1 내지 70개 탄소 원자인 직쇄 알킬렌기이거나, 직쇄 알킬렌기의 하나 이상의 탄소 원자는 C(O), NH, O, S, CH=N, S(O)₂, OP(O)₂, C₅-C₈ 글리코시실렌, C₂-C₁₀ 알케닐렌, C₂-C₁₀ 알키닐렌, C₆-C₁₀ 아릴렌, C₃-C₁₈ 헤테로시클릴렌, 및 C₅-C₁₀ 헤테로아릴렌으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기로 대체되고, 여기서의 직쇄 알킬렌기는 다음으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 치환기를 가질 수 있다: C₁-C₁₀ 알킬, C₆-C₁₀ 아릴, C₅-C₁₀ 헤테로아릴, C₁-C₁₀ 할로알킬, -OC₁-C₁₀ 알킬, -OC₁-C₁₀ 알킬페닐, -C₁-C₁₀ 알킬-OH, -OC₁-C₁₀ 할로알킬, -SC₁-C₁₀ 알킬, -SC₁-C₁₀ 알킬페닐, -C₁-C₁₀ 알킬-SH, -SC₁-C₁₀ 할로알킬, 할로젠 치환기, -OH, -SH, -NH₂, -C₁-C₁₀ 알킬-NH₂, -N(C₁-C₁₀ 알킬)(C₁-C₁₀ 알킬), -NH(C₁-C₁₀ 알킬), -N(C₁-C₁₀ 알킬)(C₁-C₁₀ 알킬페닐), -NH(C₁-C₁₀ 알킬페닐), 시아노, 니트로, -CO₂H, -C(O)O(C₁-C₁₀ 알킬), -CON(C₁-C₁₀ 알킬)(C₁-C₁₀ 알킬), -CONH(C₁-C₁₀ 알킬), -CONH₂, -NHC(O)(C₁-C₁₀ 알킬), -NHC(O)(페닐), -N(C₁-C₁₀ 알킬)C(O)(C₁-C₁₀ 알킬), -N(C₁-C₁₀ 알킬)C(O)(페닐), -C(O)C₁-C₁₀ 알킬, -C(O)C₁-C₁₀ 알킬페닐, -C(O)C₁-C₁₀ 할로알킬, -OC(O)C₁-C₁₀ 알킬, -SO₂(C₁-C₁₀ 알킬), -SO₂(페닐), -SO₂(C₁-C₁₀ 할로알킬), -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁-C₁₀ 알킬), -SO₂NH(페닐), -NHSO₂(C₁-C₁₀ 알킬), -NHSO₂(페닐), 및 -NHSO₂(C₁-C₁₀ 할로알킬).

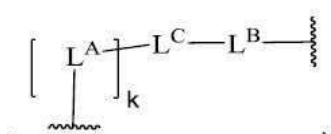
[0164] 측쇄 부분은 각각 주쇄 부분 및 R_{AP} 기에 연결된다. 몇몇 구현예에서, 각각의 측쇄 부분은 독립적으로 공유 결합이거나 길이가 1 내지 70개 탄소 원자인 직쇄 알킬렌기이거나, 직쇄 알킬렌기의 하나 이상의 탄소 원자는 C(O), NH, O, S, CH=N, S(O)₂, OP(O)₂, C₅-C₈ 글리코실렌, C₂-C₁₀ 알케닐렌, C₂-C₁₀ 알키닐렌, C₆-C₁₀ 아릴렌, C₃-C₁₈ 헤테로시클릴렌, 및 C₅-C₁₀ 헤테로아릴렌으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기로 대체되고; 여기서의 직쇄 알킬렌기는 다음으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 치환기를 갖는다: C₁-C₁₀ 알킬, C₆-C₁₀ 아릴, C₅-C₁₀ 헤테로아릴, C₁-C₁₀ 할로알킬, -OC₁-C₁₀ 알킬, -OC₁-C₁₀ 알킬페닐, -C₁-C₁₀ 알킬-OH, -OC₁-C₁₀ 할로알킬, -SC₁-C₁₀ 알킬, -SC₁-C₁₀ 알킬페닐, -C₁-C₁₀ 알킬-SH, -SC₁-C₁₀ 할로알킬, 할로젠 치환기, -OH, -SH, -NH₂, -C₁-C₁₀ 알킬-NH₂, -N(C₁-C₁₀ 알킬)(C₁-C₁₀ 알킬), -NH(C₁-C₁₀ 알킬), -N(C₁-C₁₀ 알킬)(C₁-C₁₀ 알킬페닐), -NH(C₁-C₁₀ 알킬페닐), 시아노, 니트로, -CO₂H, -C(O)O(C₁-C₁₀ 알킬), -CON(C₁-C₁₀ 알킬)(C₁-C₁₀ 알킬), -CONH(C₁-C₁₀ 알킬), -CONH₂, -NHC(O)(C₁-C₁₀ 알킬), -NHC(O)(페닐), -N(C₁-C₁₀ 알킬)C(O)(C₁-C₁₀ 알킬), -N(C₁-C₁₀ 알킬)C(O)(페닐), -C(O)C₁-C₁₀ 알킬, -C(O)C₁-C₁₀ 알킬페닐, -C(O)C₁-C₁₀ 할로알킬, -OC(O)C₁-C₁₀ 알킬, -SO₂(C₁-C₁₀ 알킬), -SO₂(페닐), -SO₂(C₁-C₁₀ 할로알킬), -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁-C₁₀ 알킬), -SO₂NH(페닐), -NHSO₂(C₁-C₁₀ 알킬), -NHSO₂(페닐), 및 -NHSO₂(C₁-C₁₀ 할로알킬).

[0165] 접합 연결 부분은 각각 주쇄 부분 및 작용기 A₀에 연결된다. 몇몇 구현예에서, 각각의 접합 연결 부분은 독립적으로 공유 결합이거나, C₁-C₁₀ 직쇄 알킬렌, 인산 결합, 포스포로티오에이트 결합, 아마이드 결합, 에스테르 결합, 에테르 결합, 디설파이드 결합, 1,2,3-트리아졸리덴기, 폴리에틸렌 글리콜의 서브유닛, 피롤리디닐리덴기, 2-옥소피롤리디닐리덴기, 페닐렌, 시클로헥실렌, 2-숙신이미도일리덴기, 2-티오숙신이미도일리덴기, 아미노산의 서브유닛 및 뉴클레오타이드의 서브유닛으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 연결 구조 또는 둘 이상의 연결 구조의 연결 조합이다.

[0166] 몇몇 구현예에서, 연결기 R_j의 각각의 접합 연결 부분은 주쇄 부분 및 하나의 작용기 A₀에 각각 연결되고, 측쇄 부분의 개수는 n₀이고, 각각의 측쇄 부분은 각각 주쇄 부분 및 하나의 R_{AP} 기에 연결된다. 따라서, 각각의 작용기 A₀ 및 R_{AP} 기는 각각 독립적으로 연결기 R_j에 연결된다. 몇몇 구현예에서, 모든 측쇄 부분은 주쇄 부분의 동일한 원자에 연결되거나, 각각의 측쇄 부분은 주쇄 부분의 다른 원자에 연결된다.

[0167] 몇몇 구현예에서, m₀는 1이고, 연결기 R_j는 하기 화학식 (301)로 표시된 바와 같은 구조를 포함한다:

[0168] [화학식 (301)]



[0169]

[0170] 상기 화학식에서 k는 1 내지 3의 정수이고, L^C는 주쇄 부분이고, L^A는 측쇄 부분이고, L^B는 접합 연결 부분이고, 는 기가 공유 결합으로 연결되는 부위를 나타낸다.

[0171] 주쇄 부분 L^C는 공유 결합이거나 2 내지 4개의 직쇄 또는 분지쇄 C₁-C₂₅ 포화 히드로카르빌기이거나, 또는 포화 히드로카르빌기의 하나 이상의 탄소 원자는 C(O), NH, O, S, CH=N, S(O)₂, OP(O)₂, C₅-C₈ 글리코실렌, C₂-C₅ 알케닐렌, C₂-C₅ 알키닐렌, C₆-C₁₀ 아릴렌, C₃-C₈ 헤테로시클릴렌, 및 C₅-C₁₀ 헤테로아릴렌으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기로 대체되고; 여기서의 포화 히드로카르빌기는 다음으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 치환기를 가질 수 있다: C₁-C₅ 알킬, C₆-C₁₀ 아릴, C₅-C₁₀ 헤테로아릴, -O-C₁-C₅ 알킬, -OC₁-C₅ 알킬페닐, -C₁-C₅ 알킬-OH, -SC₁-C₅ 알킬, 니트로, -C(O)O(C₁-C₅ 알킬), -CON(C₁-C₅ 알킬)(C₁-C₅ 알킬), -CONH(C₁-C₅ 알킬), -CONH₂, -NHC(O)(C₁-C₅ 알킬), -NHC(O)(페닐), -N(C₁-C₅ 알킬)C(O)(C₁-C₅ 알킬), -N(C₁-C₅ 알킬)C(O)(페닐), -C(O)C₁-C₅ 알킬, -C(O)C₁-C₅ 알킬페닐, -OC(O)C₁-C₅ 알킬, -SO₂(C₁-C₅ 알킬), -SO₂(페닐), -SO₂NH₂,

- $\text{SO}_2\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})$, - $\text{SO}_2\text{NH}(\text{페닐})$, - $\text{NHSO}_2(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})$, 및 - $\text{NHSO}_2(\text{페닐})$. 몇몇 구현예에서, L^C 는 2 내지 4개의 $\text{C}_1\text{-C}_{25}$ 포화 히드로카르빌기이거나, 포화 히드로카르빌기의 하나 이상의 탄소 원자는 $\text{C}(\text{O})$, NH , O , S , $\text{CH}=\text{N}$, $\text{S}(\text{O})_2$, $\text{OP}(\text{O})_2$, $\text{C}_5\text{-C}_8$ 글리코실렌, $\text{C}_2\text{-C}_5$ 알케닐렌, $\text{C}_2\text{-C}_5$ 알키닐렌, $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 아릴렌, $\text{C}_3\text{-C}_8$ 헤테로시클릴렌, 및 $\text{C}_5\text{-C}_{10}$ 헤테로아릴렌으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기로 대체되고, 여기서의 포화 히드로카르빌기는 다음으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 치환기를 가질 수 있다: $\text{C}_1\text{-C}_5$ 알킬, $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 아릴, $\text{C}_5\text{-C}_{10}$ 헤테로아릴, - $\text{O-C}_1\text{-C}_5$ 알킬, - $\text{OC}_1\text{-C}_5$ 알킬페닐, - $\text{C}_1\text{-C}_5$ 알킬 - OH , - $\text{SC}_1\text{-C}_5$ 알킬, 니트로, 및 - CONH_2 . 몇몇 구현예에서, L^C 는 길이가 5 내지 30개의 원자이고, 여기서 L^C 의 길이는 L^C 중, L^A 에 직접 연결된 원자 내지 L^B 에 직접 연결된 원자에 의해 형성된 가장 긴 원자 사슬의 사슬 형성 원자의 수를 의미한다. 구조를 단순화하기 위해, 몇몇 구현예에서, L^C 는 길이가 8 내지 25개의 원자이다.

[0172]

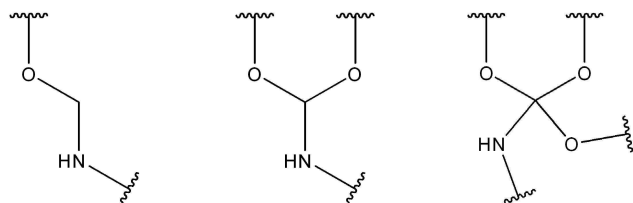
측쇄 부분 L^A 는 공유 결합이거나 $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ 알킬렌기이거나, 알킬렌기의 하나 이상의 탄소 원자는 $\text{C}(\text{O})$, NH , O , S , $\text{CH}=\text{N}$, $\text{S}(\text{O})_2$, $\text{OP}(\text{O})_2$, $\text{C}_5\text{-C}_8$ 글리코실렌, $\text{C}_2\text{-C}_5$ 알케닐렌, $\text{C}_2\text{-C}_5$ 알키닐렌, $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 아릴렌, $\text{C}_3\text{-C}_8$ 헤테로시클릴렌, 및 $\text{C}_5\text{-C}_{10}$ 헤테로아릴렌으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기로 대체되고, 여기서의 알킬렌은 다음으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 치환기를 가질 수 있다: $\text{C}_1\text{-C}_5$ 알킬, $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 아릴, $\text{C}_5\text{-C}_{10}$ 헤테로아릴, - $\text{O-C}_1\text{-C}_5$ 알킬, - $\text{OC}_1\text{-C}_5$ 알킬페닐, - $\text{C}_1\text{-C}_5$ 알킬 - OH - $\text{SC}_1\text{-C}_5$ 알킬, - $\text{SC}_1\text{-C}_5$ 알킬페닐, - $\text{C}_1\text{-C}_5$ 알킬 - SH , - OH , - SH , - NH_2 , - $\text{C}_1\text{-C}_5$ 알킬 - NH_2 , - $\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})$, - $\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})$, - $\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬페닐})$, - $\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬페닐})$, 니트로, - $\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})$, - $\text{CON}(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})$, - $\text{CONH}(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})$, - CONH_2 , - $\text{NHC}(\text{O})(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})$, - $\text{NHC}(\text{O})(\text{페닐})$, - $\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})\text{C}(\text{O})(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})$, - $\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})\text{C}(\text{O})(\text{페닐})$, - $\text{C}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_5$ 알킬, - $\text{C}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_5$ 알킬페닐, - $\text{OC}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_5$ 알킬, - $\text{SO}_2(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})$, - $\text{SO}_2(\text{페닐})$, - SO_2NH_2 , - $\text{SO}_2\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})$, - $\text{SO}_2\text{NH}(\text{페닐})$, - $\text{NHSO}_2(\text{C}_1\text{-C}_5 \text{ 알킬})$, 및 - $\text{NHSO}_2(\text{페닐})$.

[0173]

접합 연결 부분 L^B 는 하기 결합 중 하나이거나 하기 결합 중 1 내지 5개의 결합 중 하나 이상의 연결 조합이다: 포스포에스테르 결합, 포스포로티오에이트 결합, 아마이드 결합, 에스테르 결합, 에테르 결합, 디설파이드 결합.

[0174]

몇몇 구현예에서, k 는 1 내지 3의 정수이고; L^C 는 하기 화학식 (L1) 내지 (L3)으로 표시되는 기 중 어느 하나를 포함하고, 화학식 (L1) 내지 (L3)으로 표시되는 기의 에테르 결합을 통해 L^A 부분에 연결된다:



[0175]

(L1)

(L2)

(L3)

[0176]

[0177]

상기 화학식에서 는 기가 분자의 나머지 부분에 연결되는 부위를 나타낸다.

[0178]

몇몇 구현예에서, $k = 1$ 이고, L^C 는 화학식 (L1)로 표시되는 기를 포함하고, 기 (L1)의 산소 원자는 L^A 에 직접 연결된다. 몇몇 구현예에서, $k = 2$ 이고, L^C 는 화학식 (L2)로 표시되는 기를 포함하고, 기 (L1)의 두 산소 원자 각각은 하나의 L^A 에 직접 연결된다. 몇몇 구현예에서, $k = 4$ 이고, L^C 는 화학식 (L3)로 표시되는 기를 포함하고, 기 (L1)의 세 산소 원자 각각은 하나의 L^A 에 직접 연결된다.

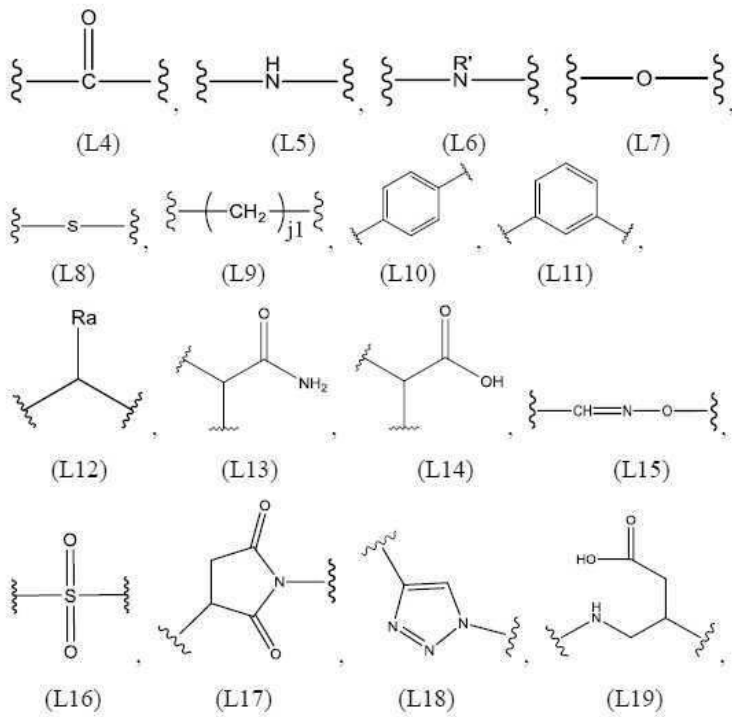
[0179]

L^B 는 포스포에스테르 결합 또는 디설파이드 결합이다.

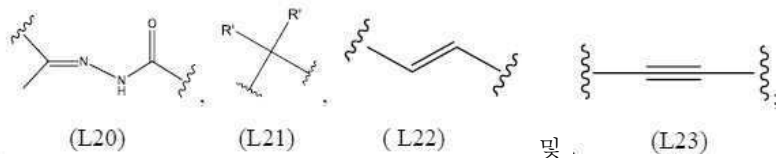
[0180]

각각의 L^A 는 공유 결합이거나, 각각의 L^A 는 하기 기 (L4) 내지 (L23) 및 이들의 연결 조합으로 이루어진 군에서

선택된다:



[0181]



[0182]

상기 화학식에서, 각각의 j1은 1 내지 10의 정수이고;

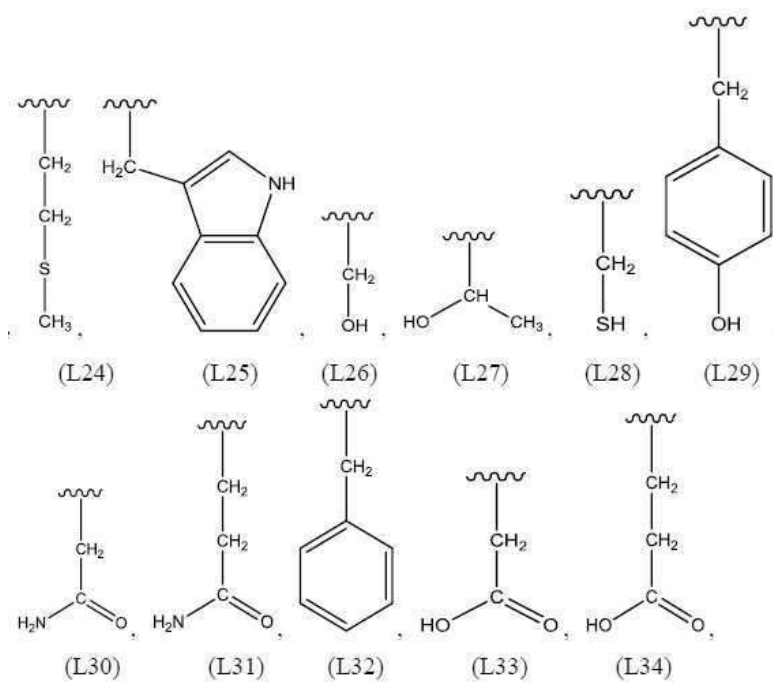
[0183]

각각의 R'은 C₁-C₁₀ 알킬이고;

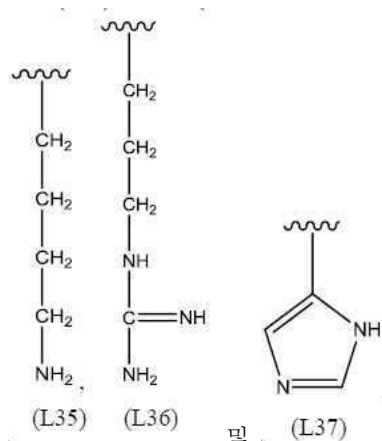
[0184]

각각의 Ra는 수소 원자, C₁-C₁₀ 알킬이거나 또는 하기의 기 (L24) 내지 (L37)로 이루어진 군에서 선택된다:

[0185]



[0186]



[0187]

[0188]

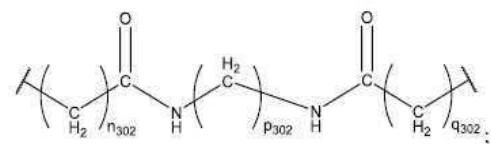
몇몇 구현예에서, L^A 는 길이가 3 내지 35개의 원자이고, 여기서 L^A 의 길이는 L^A 중, L^C 에 직접 연결된 원자 내지 R_{AP} 에 직접 연결된 원자에 의해 형성된 가장 긴 원자 사슬의 사슬 형성 원자의 수를 의미한다. 몇몇 구현예에서, 각각의 L^A 는 (L4) 내지 (L9), (L13), (L14), 및 (L18) 기 중 적어도 두 개의 기의 연결 조합이다. 몇몇 구현예에서, 각각의 L^A 는 (L4), (L5), (L7), (L9), (L13), (L14) 및 (L18) 기 중 적어도 두 개의 기의 연결 조합이다.

[0189]

몇몇 구현예에서, L^A 는 하기 화학식 (302)로 표시된 바와 같은 아마이드 결합 함유 구조를 갖고; L^B 는 하기 화학식 (303)로 표시된 바와 같이 N-아실피롤리딘, 카르보닐기 및 산소 원자를 포함하는 구조를 갖고; L^C 는 (히드록시메틸)아미노메탄, 비스(하이드록시메틸)아미노메탄 또는 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄을 기반으로 하는 연결기이다:

[0190]

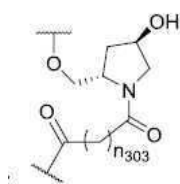
[화학식 (302)]



[0191]

[0192]

[화학식 (303)]



[0193]

[0194]

상기 화학식에서 n_{302} , q_{302} 및 p_{302} 는 각각 독립적으로 2 내지 6의 정수이고, 선택적으로 n_{302} , q_{302} 및 p_{302} 는 각각 독립적으로 2 또는 3이고; n_{303} 은 4 내지 16의 정수이고, 선택적으로 n_{303} 은 8 내지 12의 정수이고, 는 기가 공유결합으로 연결되는 부위를 나타낸다.

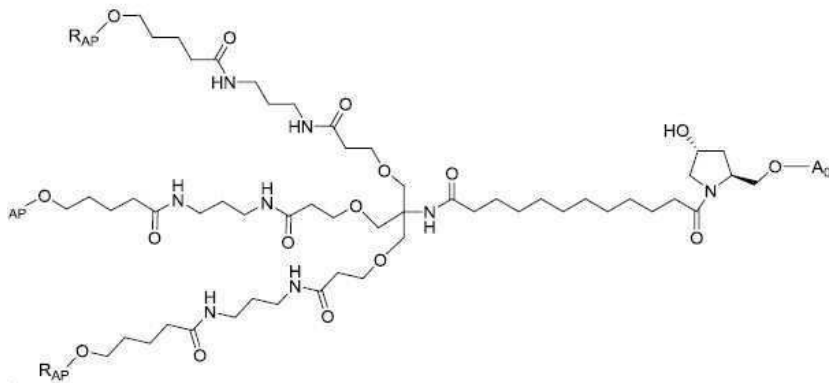
[0195]

몇몇 구현예에서, 각각의 측쇄 부분 L^A 는 인산 결합, 에테르 결합 또는 에스테르 결합을 통해 R_{AP} 기에 연결되고, 주쇄 부분 L^C 의 히드록시기의 산소 원자를 통해 에테르 결합을 형성함으로써 주쇄 부분 L^C 에 연결되고; 접합 연결 부분 L^B 는 화학식 (303)의 카르보닐기를 통해 아마이드 결합을 형성함으로써 주쇄 부분 L^C 의 아미노 기의 질소 원자에 연결되고, 화학식 (303)의 산소 원자를 통해 인산 결합, 에테르 결합 또는 에스테르 결합을 형성함으로써 작용기 A_0 에 연결된다. 몇몇 구현예에서, 주쇄 부분 L^C 는 (히드록시메틸)아미노메탄, 비스(히드록시메틸)아미노메탄 또는 트리스(히드록시메틸)아미노메탄을 기반으로 하는 연결기이고, 이는 히드록시기

의 산소 원자를 통한 에테르 결합을 통해 각각의 측쇄 부분 L^A 에 연결되고, 아미노기의 질소 원자를 통한 아미드 결합을 통해 접합 연결 부분 L^B 에 연결된다. 따라서, 연결기 R_j 의 1 내지 3개 측쇄는 동일한 아미노메틸기의 탄소 원자에 연결되고, 접합 연결 부분 L^B 를 통해 전달기를 포함하는 R_{AP} 기에 연결된다.

[0196] 몇몇 구현예에서, 접합체는 하기 화학식 (305)로 표시된 바와 같은 구조를 갖는다:

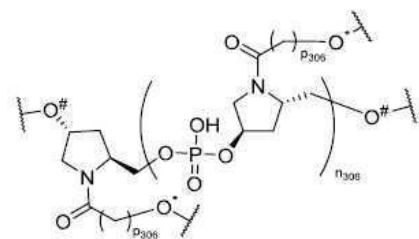
[0197] [화학식 (305)]



[0198]

[0199] 몇몇 구현예에서, 연결기 R_j 는 하기 화학식 (306)으로 표시된 바와 같은 구조를 포함한다:

[0200] [화학식 (306)]

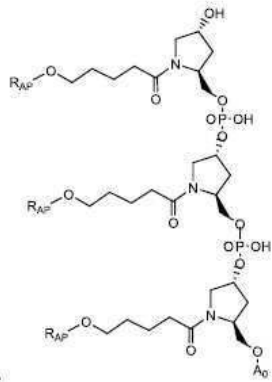


[0201]

[0202] 상기 화학식에서 n_{306} 은 0 내지 3의 정수이고, 각각의 p_{306} 은 독립적으로 1 내지 6의 정수이고, 는 기가 공유결합으로 연결되는 부위를 나타내고; 모든 피롤리딘렌기 및 임의의 가능한 포스포디에스테르기로부터 형성되는 연결 조합은 주쇄 부분을 구성하고, 피롤리딘렌기의 질소 원자에 연결된 카르보닐기와 *로 표시된 산소 원자 사이의 원자 사슬은 각각의 측쇄 부분을 구성하고, 측쇄 부분은 *로 표시된 산소 원자를 통해 에테르 결합을 형성함으로써 R_{AP} 기에 연결되고, #로 표시된 산소 원자 중 적어도 하나는 접합 연결 부분이고 에테르 결합, 에스테르 결합 또는 인산 결합을 형성함으로써 작용기 A_0 에 연결되고, #로 표시된 다른 산소 원자는 수소 원자에 연결되어 히드록실기를 형성하거나, C_1-C_3 알킬기에 연결되어 C_1-C_3 알콕시기를 형성한다. 따라서, 연결기 R_j 의 1 내지 3개 측쇄 부분은 주쇄 부분의 서로 다른 탄소 원자에 연결되고 산소 원자를 통해 전달기 함유 R_{AP} 기에 연결된다.

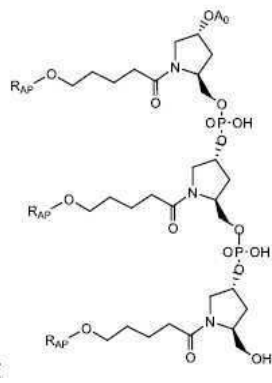
[0203] 몇몇 구현예에서, 본 개시의 접합체는 하기 화학식 (307a), (307b) 또는 (307c)로 표시된 바와 같은 구조를 갖는다:

[0204] [화학식 (307a)]



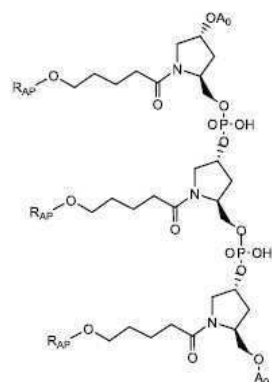
[0205]

[0206] [화학식 (307b)]



[0207]

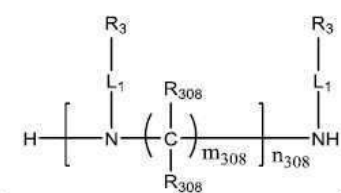
[0208] [화학식 (307c)]



[0209]

[0210] 몇몇 구현예에서, 본 개시의 접합체는 하기 화학식 (308)로 표시된 바와 같은 구조를 갖는다:

[0211] [화학식 (308)]

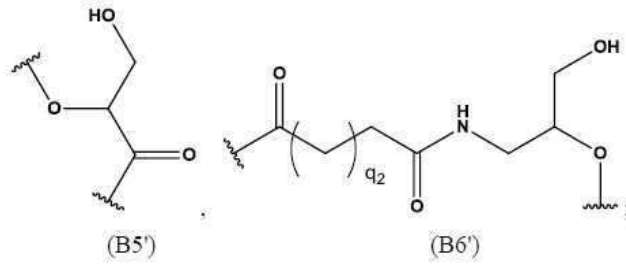
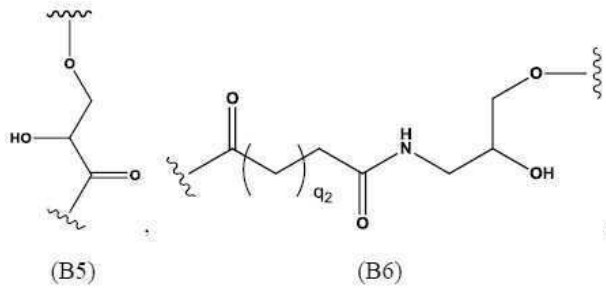


[0212]

[0213] 상기 화학식에서 n_{308} 은 1 내지 10의 정수일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 합성 편의성, 구조/공정 비용 및 종양 세포 특이성과 같은 다양한 요인을 고려하여, n_{308} 은 2 내지 6의 정수이다. 몇몇 구현예에서, n_{308} 은 3 또는 4이

다.

- [0214] 각각의 R_3 는 독립적으로 작용기 A_0 또는 전달기 AP-함유 R_{AP} 기이다. 몇몇 구현예에서, 적어도 하나의 R_3 는 작용기 A_0 이고, 적어도 하나의 R_3 는 R_{AP} 이다. 몇몇 구현예에서, 하나의 R_3 는 작용기 A_0 이고, 다른 R_3 는 R_{AP} 기이다.
- [0215] 몇몇 구현예에서, 각각의 m_{308} 이 독립적으로 2 내지 10의 정수일 경우, 접합체에서 다수의 전달기 AP 사이의 공간 및 위치는 중앙 세포 표면 상의 해당 수용체와 상호작용하기에 더 적합할 수 있는 것으로 여겨진다. 본 개시의 몇몇 구현예에 따르면, 화학식 (308)로 표시된 바와 같은 화합물이 보다 간단한 구조를 갖고, 합성하기 용이하고/하거나 감소된 비용을 갖도록 하기 위해, 각각의 m_{308} 은 독립적으로 2 내지 5의 정수이다. 몇몇 구현예에서, 각각의 m_{308} 은 동일하다.
- [0216] 당업자는 각각의 R_{308} 이 H, C_1-C_{10} 알킬, C_1-C_{10} 할로알킬 및 C_1-C_{10} 알콕시로부터 독립적으로 선택될 때, 이는 화학식 (308)로 나타난 바와 같은 접합체의 특성을 변경하지 않으며, 모두 본 개시의 목적을 달성할 수 있다는 것을 이해할 수 있다. 몇몇 구현예에서, 각각의 R_{308} 은 H, 메틸 또는 에틸로부터 독립적으로 선택된다. 몇몇 구현예에서, 각각의 R_{308} 은 H이다.
- [0217] 작용기 A_0 에 연결된 각각의 L_1 은 접합 연결 부분을 나타내고, R_{AP} 에 연결된 각각의 L_1 은 측쇄 부분을 나타낸다. 몇몇 구현예에서, 하나의 R_3 은 작용기 A_0 이고, 다른 R_3 은 R_{AP} 기이다. 몇몇 구현예에서, 측쇄 부분으로서 하나 이상의 L_1 은 R_{AP} 기를 질소 함유 골격의 N 원자에 연결하고, 접합 연결 부분으로서 다른 하나 이상의 L_1 은 작용기 A_0 를 질소 함유 골격의 N 원자에 연결한다. 질소 함유 골격은 함께 연결기 R_j 의 주쇄 부분을 형성한다. 본 개시의 맥락에서, "질소 함유 골격"은 화학식 (308)로 표시된 바와 같은 구조의 사슬 구조를 의미하며, 여기서 R_{308} 에 연결된 탄소 원자는 N 원자에 인접하여 연결된다.
- [0218] 몇몇 구현예에서, 전달 효율성 및 합성 비용을 고려하면, 각각의 L_1 은 독립적으로 3 내지 25개 원자의 길이를 갖는다. 몇몇 구현예에서, 각각의 L_1 은 독립적으로 4 내지 15개 원자의 길이를 갖는다. 당업자라면 편의상 L_1 이 선형 알킬렌으로 정의되어 있지만, 이는 선형기가 아니거나 상기 대체 및/또는 치환에 의해 생성된 아민 또는 알케닐렌과 같이 다른 이름을 가질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 본 개시의 목적을 위해, L_1 의 길이는 두 개의 부착 지점을 연결하는 사슬의 원자 수이다. 이러한 목적을 위해, 선형 알킬렌의 탄소 원자를 대체하여 얻은 고리(예: 헤테로사이클릴렌 또는 헤테로아릴렌)의 부착 지점 사이의 최소 원자 수에 따라, 사슬에서 고리의 해당 부분의 길이가 계산된다.
- [0219] 몇몇 구현예에서, L_1 은 상기 화학식 L4 내지 L23으로 나타낸 바와 같은 기 및 이들의 임의의 연결 조합으로 이루어진 군에서 선택된다. 몇몇 구현예에서, 각각의 L_1 은 L4 내지 L9, L13, L14 및 L18 기 중 적어도 두 개의 연결 조합으로 이루어진 군에서 독립적으로 선택된다. 몇몇 구현예에서, 각각의 L_1 은 독립적으로 L4, L5, L7, L9, L13, L14 및 L18 기 중 적어도 두 개의 연결 조합이다.
- [0220] 몇몇 구현예에서, 화학식 (308)으로 표시된 바와 같은 접합체에서, 각각의 L_1 은 질소 함유 골격의 N 원자에 부착되는 부착 부위와 작용기 A_0 또는 R_{AP} 기에 부착되는 부착 부위 모두를 갖고, 질소 함유 골격의 N 원자에 부착되는 부위는 N 원자와 아미드 결합을 형성한다. 몇몇 구현예에서, 하나 이상의 L_1 은 하기의 B5, B6, B5' 또는 B6'로부터 선택된다:



[0221]

[0222]

상기 화학식에서  는 기가 공유결합으로 연결되는 부위를 나타내고, q_2 는 1 내지 10의 정수이다. 몇몇 구현예에서, q_2 는 1 내지 5의 정수이다.

[0223]

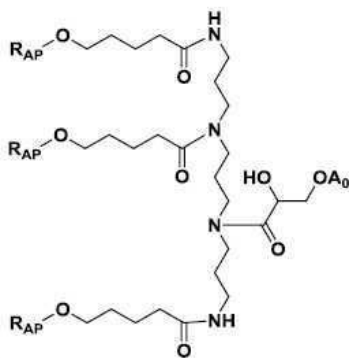
몇몇 구현예에서, 각각의 R_{AP} 기는 하나 이상의 전달기를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 화학식 (308)로 표시된 바와 같은 화합물은 다수의 작용기를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 화학식 (308)로 표시된 바와 같은 화합물의 각 작용기는 동일한 작용기이다. 몇몇 구현예에서, 화학식 (308)로 표시된 바와 같은 화합물의 각 작용기는 동일한 목적과 기능을 위한 작용기이다. 몇몇 구현예에서, 화학식 (308)로 표시된 바와 같은 화합물은 서로 다른 목적과 기능을 위한 서로 다른 작용기를 포함한다.

[0224]

몇몇 구현예에서, 화학식 (308)으로 표시된 바와 같은 화합물은 하기 화학식 (403), (404), (405), (406), (407), (408), (409), (410), (411), (412), (413), (414), (415), (416), (417), (418), (419), (420), (421), (422), (423), (424), (425), (426), 또는 (427)으로 표시된 바와 같은 구조를 갖는다:

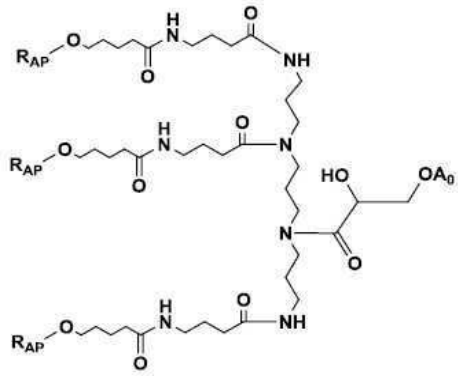
[0225]

[화학식 (403)]



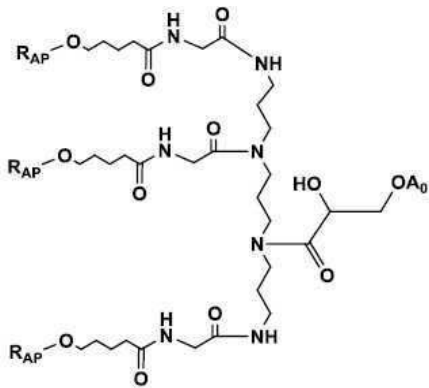
[0226]

[0227] [화학식 (404)]



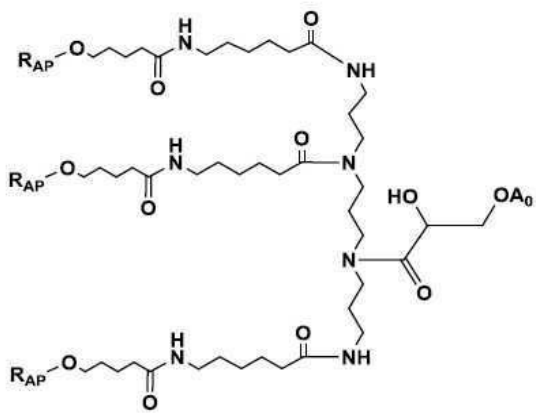
[0228]

[0229] [화학식 (405)]



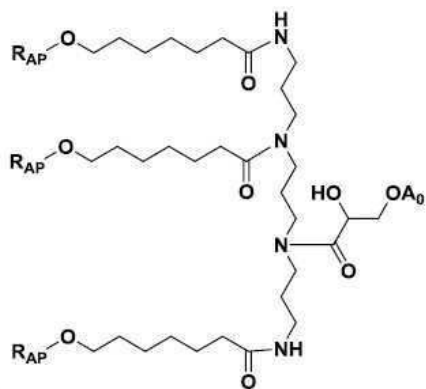
[0230]

[0231] [화학식 (406)]



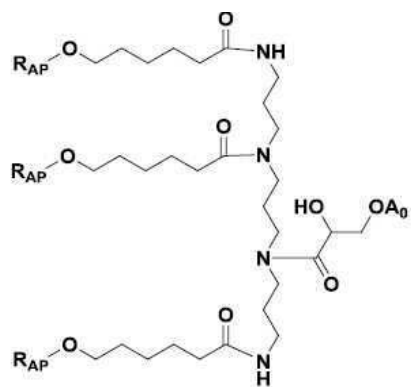
[0232]

[0233] [화학식 (407)]



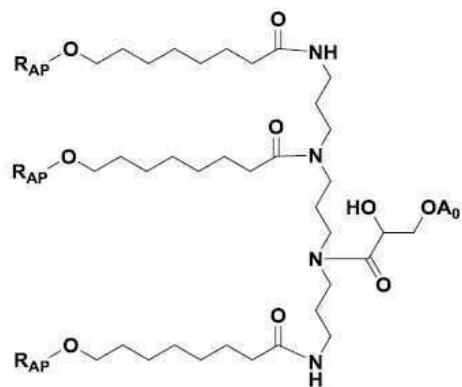
[0234]

[0235] [화학식 (408)]



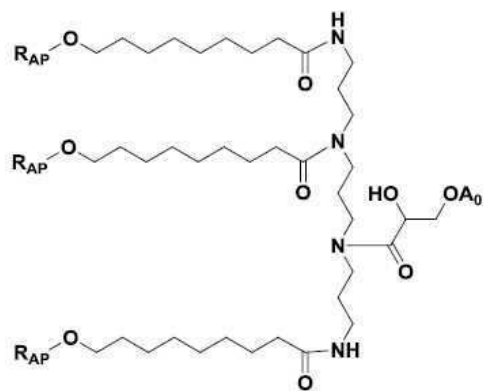
[0236]

[0237] [화학식 (409)]



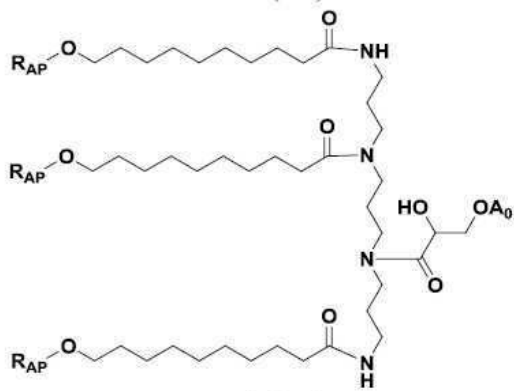
[0238]

[0239] [화학식 (410)]



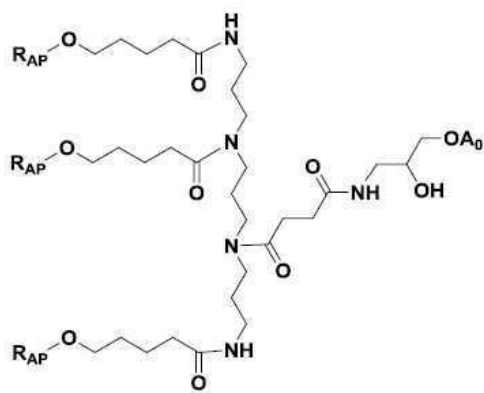
[0240]

[0241] [화학식 (411)]



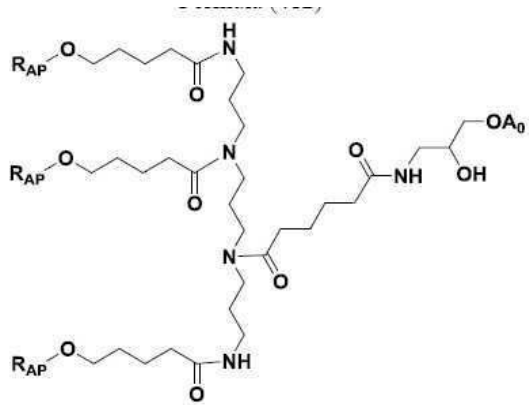
[0242]

[0243] [화학식 (412)]



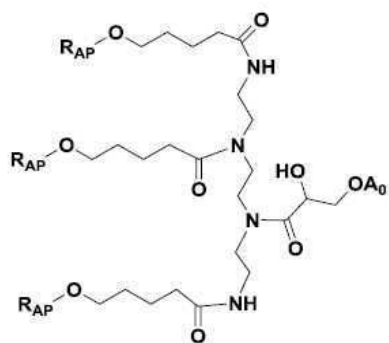
[0244]

[0245] [화학식 (413)]



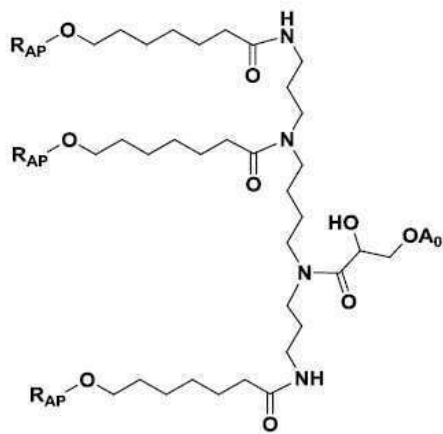
[0246]

[0247] [화학식 (414)]



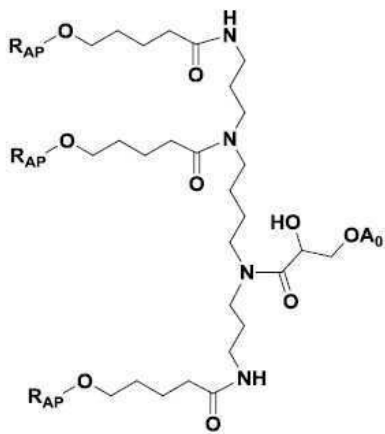
[0248]

[0249] [화학식 (415)]



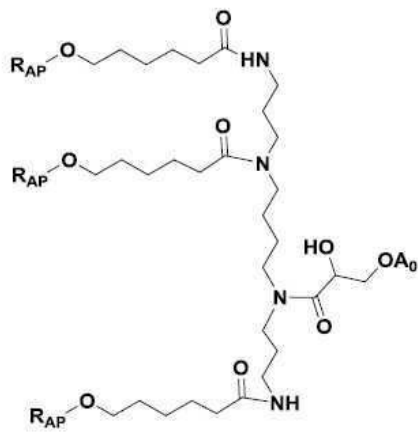
[0250]

[0251] [화학식 (416)]



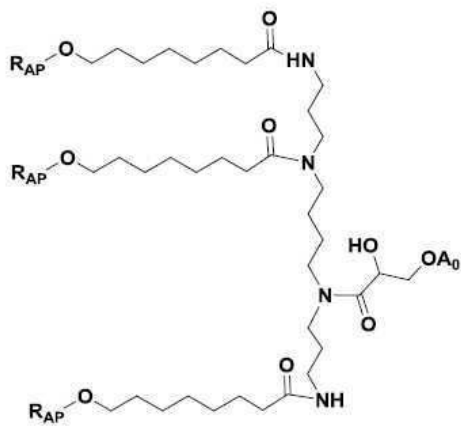
[0252]

[0253] [화학식 (417)]



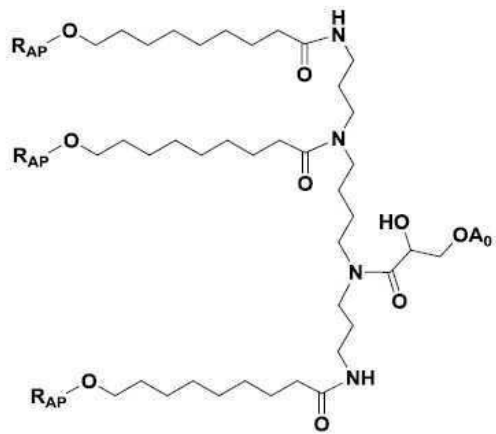
[0254]

[0255] [화학식 (418)]



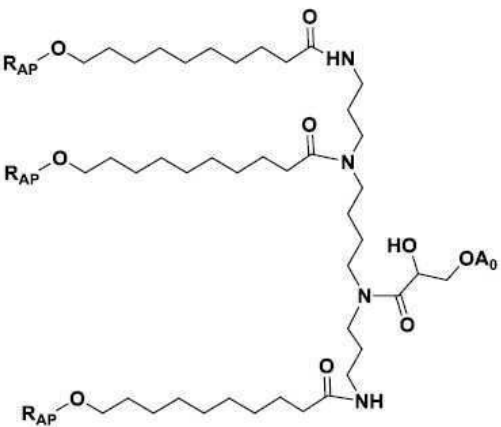
[0256]

[0257] [화학식 (419)]



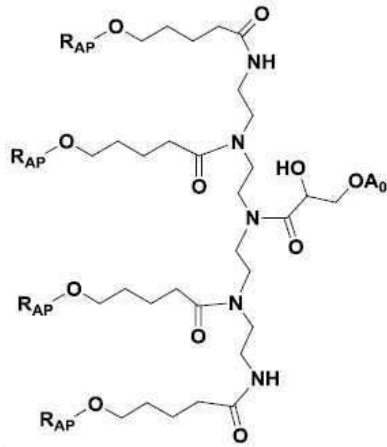
[0258]

[0259] [화학식 (420)]



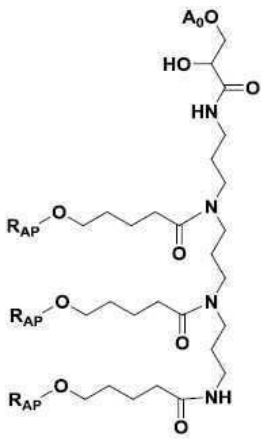
[0260]

[0261] [화학식 (421)]



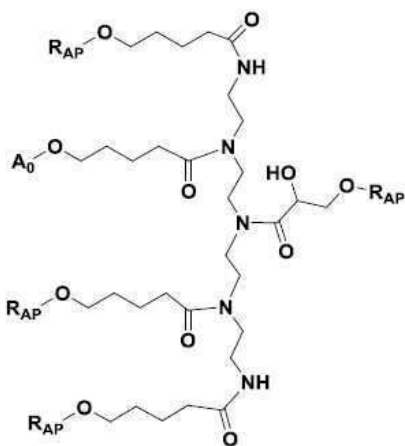
[0262]

[0263] [화학식 (422)]



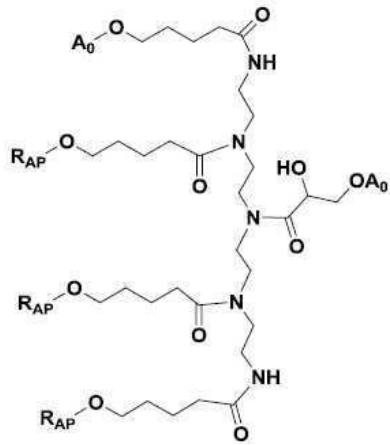
[0264]

[0265] [화학식 (423)]



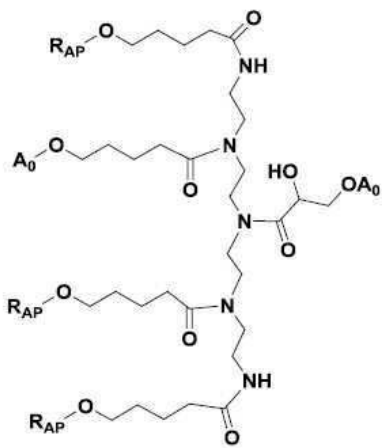
[0266]

[0267] [화학식 (424)]



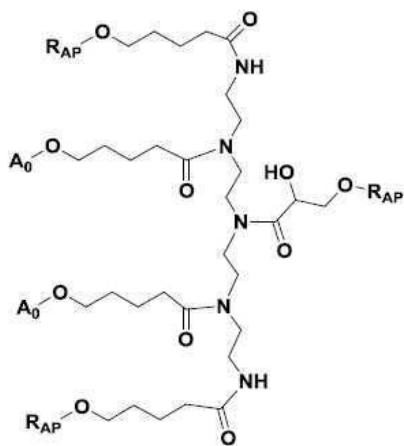
[0268]

[0269] [화학식 (425)]



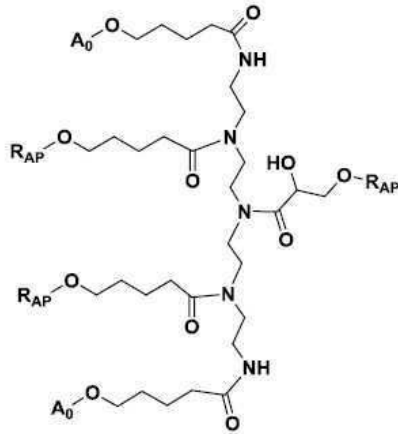
[0270]

[0271] [화학식 (426)]



[0272]

[0273] [화학식 (427)]



[0274]

[0275] 몇몇 구현예에서, 연결기 R_j 는 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II를 포함하고, 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II는 각각 5 내지 25개의 변형되거나 변형되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하고, 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II는 적어도 부분적으로 역상보적이고, 전달기는 뉴클레오타이드 서열 I에 연결되고, 작용기는 뉴클레오타이드 서열 II에 연결되고, 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II는 대상체 (subject)에서 면역 반응 또는 독성 반응을 유발하지 않는다. 몇몇 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II는 실질적으로 역상보적이거나 완전히 역상보적이거나, 또는 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II는 동일한 길이를 갖고 둘 다 10 내지 20개의 변형되거나 변형되지 않은 뉴클레오타이드이거나, 또는 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II는 둘 다 17개의 뉴클레오타이드로 구성되고 완전히 역상보적이다. 몇몇 구현예에서, 전달기의 3' 말단은 인산 결합을 통해 뉴클레오타이드 서열 I의 5' 말단 뉴클레오타이드의 리보스의 5' 위치에 연결되고, 작용기는 뉴클레오타이드 서열 II의 5' 말단 뉴클레오타이드의 리보스의 5' 위치에 연결되거나; 작용기는 뉴클레오타이드 서열의 세그먼트를 포함하고, 뉴클레오타이드 서열의 3' 말단은 인산 결합을 통해 뉴클레오타이드 서열 I의 5' 말단 뉴클레오타이드의 리보스의 5' 위치에 연결된다. 몇몇 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II는 각각 서열번호 40 및 서열번호 41로 표시된 바와 같은 서열을 갖는다:

[0276] 5'-GUACAUUCUAGAUAGCC-3' (서열번호 40)

[0277] 5'-GGCUAUCUAGAAUGUAC-3' (서열번호 41).

[0278] 몇몇 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II는 각각 서열번호 42 및 서열번호 43으로 표시된 바와 같은 서열을 갖는다:

[0279] 5'-GmUfAmCfAmUfUfCfUfAmGmAmUfAmGmCfCf-3' (서열번호 42)

[0280] 5'-GmGmCfUfAmUfCfUfAmGmAmAmUfGmUfAmCf-3' (서열번호 43)

[0281] 몇몇 구현예에서, 작용기는 종양에 치료 효과를 갖는 소분자 치료제 기이며, 각각의 소분자 치료제 기는 세포독소 기, 항생제 기, 또는 혈관신생 억제제로부터 독립적으로 선택된다. 상기 소분자 치료제 기를 포함함으로써, 본 개시의 접합체는 소분자 치료제 기를 종양에 특이적으로 전달할 수 있고, 따라서 소분자 치료제 기의 효과를 통해 종양의 질병 진행 또는 증상을 치료 및/또는 완화할 수 있다. 예를 들어, 세포독소 기는 본 개시의 접합체에 의해 종양에 특이적으로 전달되어 종양 내의 암세포를 특이적으로 사멸시키고, 세포독소 자체의 낮은 표적화 능력으로 인한 부작용을 줄이는 동시에 종양 내의 암세포 수를 현저히 감소시킴으로써 종양을 치료할 수 있다.

[0282] 몇몇 구현예에서, 소분자 치료제 기는 소분자 치료제로부터 하나 이상의 수소 원자 또는 하나 이상의 작용성 라디칼을 제거함으로써 형성된다: 소분자 치료제는 메토티렉세이트, 독소루비신, 빈카 알칼로이드, 오리스타틴 (MMAE 및 MMAF 포함), 칼리케아미신, 메이탄신 및 캄프토테신 중에서 선택된다. 몇몇 구현예에서, 소분자 치료제 기는 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE)로부터 하나 이상의 수소 원자 또는 하나 이상의 작용성 라디칼을 제거함으로써 형성된 기이다.

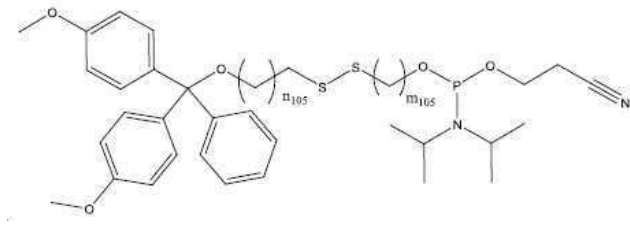
[0283] 작용기는 본 개시의 접합체에 임의의 적절한 방식으로 포함될 수 있다. 예를 들어, 작용기 A_0 는 상기 접합 연결 부분을 통해 주쇄 부분에 연결될 수 있다.

- [0284] 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체는 C₁₀-C₃₀ 히드록카르빌, 콜레스테릴 및 인지질 기 중 하나 이상에서 선택된 하나 이상의 전달 보조제 기를 추가로 포함한다. 전달 보조제 기를 포함함으로써, 본 개시에 의해 제공되는 접합체는 중추 신경계의 내부 환경과 더욱 잘 양립할 수 있고, 더 나은 생체이용률을 가질 수 있고/있거나 종양에 더욱 효과적으로 전달될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 전달 보조 기는 공유 결합 또는 연결기를 통해 전달기 또는 연결기에 연결된다. 몇몇 구현예에서, 전달 보조 기는 작용기에 연결된다.
- [0285] 당업자는 적절한 합성 경로를 사용하여 본 개시에 의해 제공되는 접합체를 제조할 수 있다.
- [0286] 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체의 합성 방법은 보호된 접합체를 탈보호(deprotection) 반응 조건 하에 용매에서 탈보호 시약과 접촉시키고, 본 개시에 의해 제공되는 접합체를 분리하는 것을 포함한다. 보호된 접합체는 본 개시에 의해 제공되는 접합체의 모든 활성 작용기를 보호기로 보호하여 형성된 화합물이다. 몇몇 구현예에서, 활성 작용기로는 히드록시, 아미노 및/또는 인산기가 있으나 이에 제한되지 않으며, 보호기는 이에 상응하게 하이드리드 보호기, 아미노 보호기 및/또는 인산 히드록시 보호기(예: 시아노에틸 보호기)이다. 사용할 용매, 탈보호 반응 조건 및 탈보호 시약은 서로 다른 보호기에 따라 선택되고 결정된다. 몇몇 구현예에서, 탈보호 반응 조건, 용매 및 탈보호 시약은 핵산의 고체상 합성에 사용되는 탈보호 반응 조건, 용매 및 탈보호 시약이다. 몇몇 구현예에서, 이 방법은 보호된 접합체를 메틸아민 수용액과 수성 암모니아의 혼합 용액에 첨가하는 것을 포함하고, 탈보호 반응 조건은 정상 온도 및 압력에서 1 내지 5시간 동안 반응시키는 것을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 수성 메틸아민과 포화 농축 수성 암모니아는 동일한 부피로 혼합되어 혼합 용액을 얻는데, 그 용액의 양은 보호된 접합체를 기준으로 0.1 내지 10 mL/ μ mol이다. 몇몇 구현예에서, 분리는 컬럼 크로마토그래피 분리를 통해 정제를 수행하고, 생성물 용출액을 수집하고 및 용매를 제거하는 것을 포함한다. 정제 조건은 예를 들어, 분취용 이온 크로마토그래피 정제 컬럼을 사용하여 염화나트륨 수용액 및 인산나트륨 수용액의 기울기 용리액(gradient eluent)으로 용리를 수행하는 것일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 구배 용리는 용리액 A: 20 mM 인산나트륨(pH 8.1)를 이용하여 수행되고, 용매는 9:1(v/v)의 물/아세트니트릴이고; 용리액 B는 1.5 M 염화나트륨, 20 mM 인산나트륨(pH 8.1)이고, 용매는 9:1(v/v)의 물/아세트니트릴이고, 용리 구배는 용리액 A: 용리액 B의 비율 = 100:0 내지 50:50이다.
- [0287] 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체는 화학식 (101)으로 표시된 바와 같은 구조를 갖는다. 보호된 접합체의 합성 방법은 활성기 R_{x1} 및 전달기를 포함하는 화합물을 활성기 R_{x2} 및 작용기를 포함하는 화합물과 유기 용매에서 커플링 반응 조건 하에 접촉시키고 반응시켜서 보호된 접합체를 얻는 것을 포함하고, 여기서의 전달기는 상기 앵타머로부터 하나 이상의 수소 원자 또는 하나 이상의 작용기를 제거함으로써 형성되고, 각각의 작용기는 독립적으로 종양에 대한 치료 효과를 갖는 소분자 치료제 기이고, 전달기와 작용기 내의 임의의 활성기는 보호기에 의해 보호되고, 활성기 R_{x1}과 활성기 R_{x2}는 반응하여 공유 결합 또는 연결기 R_i를 형성할 수 있는 기이다. 몇몇 구현예에서, 활성기 R_{x1}과 연결된 전달기 대 활성기 R_{x2}와 연결된 작용기의 몰비는 m₀:n₀이다. 몇몇 구현예에서, 전달기와 작용기 내의 활성기는 히드록시, 아미노 및 인산기 중 하나 이상을 포함하지만 이에 제한되지 않고, 보호기는 이에 따라 히드록실 보호기, 아미노 보호기 및 인산 하이드록실 보호기(예: 시아노에틸 보호기) 중 하나 이상이다.
- [0288] 당업자는 다양한 방법을 통해 활성기 R_{x1}과 전달기를 포함하는 화합물을 얻을 수 있다. 몇몇 구현예에서, 활성기 R_{x1}과 전달기를 포함하는 화합물은 예를 들어, 포스포아미다이트 고상 합성 또는 포스포디에스테르 방법/포스포트리에스테르 방법 액상 합성과 같은 당업자에게 잘 알려진 핵산 합성 방법을 통해 얻을 수 있다. 몇몇 구현예에서, 활성기 R_{x1}과 전달기를 포함하는 화합물은 포스포아미다이트 고상 합성법을 사용하여 얻어진다. 이 방법은 포스포아미다이트 고체상 합성을 위한 조건 하에 올리고뉴클레오타이드 단일 가닥의 뉴클레오타이드의 순서에 따라 뉴클레오타이드 단량체(적어도 하나의 뉴클레오타이드 단량체는 활성기 R_{x1}를 갖는 뉴클레오타이드 단량체임)를 순차적으로 연결하거나; 모든 뉴클레오타이드 단량체를 연결한 후, 포스포아미다이트 고상 합성법에 따라 포스포아미다이트 단량체 또는 활성기 R_{x1}를 갖는 보호된 포스포아미다이트 단량체를 연결한 후, 보호기를 제거하여 활성기 R_{x1}을 형성하는 것을 포함한다. 포스포아미다이트 고상 합성 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 그 과정 및 조건은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 문헌[Methods in Molecular Biology, vol. 288: Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications, P17-P31]에 자세히 개시되어 있다.
- [0289] 몇몇 구현예에서, 커플링 반응 조건은 축합 반응 조건 또는 티올-디설파이드 교환 반응 조건이다.

- [0290] 몇몇 구현예에서, 커플링 반응 조건은 축합 반응 조건이며, 이는 아실화 축합 반응 조건, 탈수 축합 반응 조건 또는 클릭 화학 반응 조건이며, 활성기 R_{x1} 및 활성기 R_{x2} 는 상기 축합 반응을 받을 수 있는 기이다. 몇몇 구현예에서, 축합 반응 조건은 아실화 축합 반응 조건이고, 활성기 R_{x1} 및 R_{x2} 는 R_f 를 형성하기 위해 아실화 축합 반응을 받을 수 있는 기이다. 몇몇 구현예에서, 축합 반응 조건은 탈수 축합 반응 조건이고, 활성기 R_{x1} 및 R_{x2} 중 하나는 아실 할라이드 또는 카르복실기를 포함하는 기이고, 다른 하나는 아미노 또는 히드록시기를 포함하는 기이다. 몇몇 구현예에서, 축합 반응 조건은 클릭 화학 반응 조건이고, 활성기 R_{x1} 및 R_{x2} 중 하나는 알킬닐기를 포함하는 기이고, 다른 하나는 아지드기를 포함하는 기이다. 몇몇 구현예에서, 축합 반응 조건은 마이클 부가 반응 조건이고, 활성기 R_{x1} 및 R_{x2} 중 하나는 설폰히드릴기를 포함하는 기이고, 다른 하나는 숙신아미도기를 포함하는 기이다. 몇몇 구현예에서, 축합 반응 조건은 N -히드록시숙신이미드-카보디이미드(NHS-EDC) 커플링 반응을 위한 조건이며, 활성기 R_{x1} 및 R_{x2} 중 하나는 N -히드록시숙신이미드(NHS)를 포함하는 기이고, 다른 하나는 카보디이미드(EDC)를 포함하는 기이다.
- [0291] 몇몇 구현예에서, 활성기 R_{x1} 과 전달기를 포함하는 화합물은 활성기 R_{x0} 을 갖는 앵타머를 커플링 반응 조건 하에서 가교제와 접촉시킴으로써 제조되며, 가교제는 클릭 화학 활성기 및 아실화기를 포함한다. 활성기 R_{x0} 와 아실화기는 커플링 반응을 통해 공유결합으로 연결되어, 클릭 화학 활성기를 본 개시의 앵타머에 연결한다.
- [0292] 몇몇 구현예에서, 활성기 R_{x1} 은 말단에 1 내지 3개의 클릭 화학 활성기를 갖는 활성기이며, 이는 말단 알킬닐기를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 아실화기는 활성 에스테르기이고, 예를 들어 NHS 에스테르기, 이미테이트기 및 펜타플루오로페닐 에스테르기 중 하나일 수 있다. 당업자는 다양한 방법으로 가교제를 얻을 수 있다. 예를 들어, 아실화기가 펜타플루오로페닐 에스테르기이고 클릭 화학기가 말단 알킬닐기를 포함하는 경우, 가교제는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 문헌[Østergaard, Michael E. 등. "Efficient synthesis and biological evaluation of 5'-GalNAc conjugated antisense oligonucleotides." Bioconjugate chemistry 26.8 (2015): 1451-1455]의 반응식 1a (A)에 기재된 방법에 따라 제조될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 활성기 R_{x0} 는 아미노기이다. 몇몇 구현예에서, 커플링 조건은 염기성 조건이다. 몇몇 구현예에서, 염기성 조건은 약염기 수용액이 존재하는 조건, 예를 들어 중탄산나트륨 수용액이 존재하는 조건이다.
- [0293] 당업자는 다양한 방법을 통해 활성기 R_{x0} 를 갖는 앵타머를 얻을 수 있다. 몇몇 구현예에서, 활성기 R_{x0} 를 갖는 앵타머는 앵타머 합성 동안 해당 위치에서 활성기를 갖는 포스포아미다이트 단량체를 사용하여 제조된다. 당업자는 다양한 방법을 통해 활성기를 갖는 포스포아미다이트 단량체를 얻을 수 있다. 몇몇 구현예에서, 활성기 R_{x0} 는 아미노기이고, R_{x0} 를 갖는 포스포아미다이트 단량체는 상업적으로 입수 가능하거나 당업자에게 잘 알려진 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들어, R_{x0} 를 갖는 포스포아미다이트 단량체는 상업적으로 쉽게 입수 가능한 6-(트리플루오로아세틸아미노)-헥실-(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)-포스포아미다이트 단량체일 수 있으며, 여기서 활성기 R_{x0} 는 아미노기이다. 활성기 R_{x0} 는 포스포아미다이트 고상 합성방법을 통해 포스포아미다이트 단량체를 올리고뉴클레오타이드 단일 가닥에 연결한 다음, 포스포아미다이트 고상 합성법에 따라 당업자가 쉽게 실현할 수 있는 탈보호 반응(예: 농축된 암모니아수에 의한 가암모니아 분해)을 통해 트리플루오로아세틸 보호기를 제거함으로써 얻을 수 있다.
- [0294] 몇몇 구현예에서, 커플링 반응 조건은 티올-디설파이드 교환 반응의 조건 중 하나이며, 활성기 R_{x1} 및 R_{x2} 중 하나는 설폰히드릴기를 포함하는 기이고, 다른 하나는 디설파이드 결합에 의해 연결된 이탈기를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 부반응을 피하기 위해, 활성기 R_{x1} 을 갖는 상기 포스포아미다이트 단량체의 R_{x1} 은 R_{x1}' 의 보호된 형태로 존재하고, 상기 제조 방법은 보호된 활성기 R_{x1}' 및 전달기를 포함하는 제조된 화합물을 탈보호 반응 조건 하에서 탈보호 시약과 접촉시켜서 활성기 R_{x1} 과 전달기를 포함하는 화합물을 분리하고 수득하는 단계를 더 포함한다. 몇몇 구현예에서, R_{x1}' 은 디설파이드 결합 이탈기를 포함하고, 탈보호 반응 조건은 티올-디설파이드 교환 반응 조건이고, 탈보호 시약은 디설파이드 결합 활성화제이다. 몇몇 구현예에서, 디설파이드 결합 활성화제는 디티오디피리딘이다. 당업자는 다양한 방법을 통해 활성기 R_{x1} 또는 R_{x1}' 을 갖는 상기 포스포아미다이트 단량체를 얻을 수 있다. 몇몇 구현예에서, 활성기 R_{x1} 또는 R_{x1}' 을 갖는 포스포아미다이트 단량체는 상업적으로 입수할 수 있다. 예를 들어, 하기 화학식 (105)로 표시된 바와 같은 포스포아미다이트 단량체는 상업적으로 입수

가능하다.

[0295] [화학적식 (105)]



[0296] 상기 화학식에서 n_{105} 와 m_{105} 는 각각 독립적으로 1 내지 10의 정수이다.

[0297] 당업자는 다양한 방법을 통해 활성기 R_{x2} 와 작용기를 포함하는 화합물을 얻을 수 있다. 몇몇 구현예에서, 커플링 반응 조건은 티올-디설파이드 교환 반응 조건이고, 활성기 R_{x2} 는 설프히드릴기를 포함하고, 활성기 R_{x2} 와 작용기를 포함하는 화합물은 당업자가 다양한 공지된 방법을 통해 얻을 수 있다. 예를 들어, 이는 포스포아미다이트 고상 합성 방법을 통해 설프히드릴기를 포함하는 포스포아미다이트 단량체를 이용하여 제조할 수도 있고, 상업적으로 구입할 수도 있다. 몇몇 구현예에서, 커플링 반응 조건은 포스포아미다이트 고상 합성 반응 조건이고, 활성기 R_{x2} 는 포스포아미다이트기이며, 활성기 R_{x2} 와 작용기를 포함하는 화합물은 예를 들어 포스포아미다이트기 및 소분자 치료제 기를 포함하는 쉽게 상업적으로 입수가능한 화합물일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 커플링 반응 조건은 마이클 부가 반응 조건이고, 활성기 R_{x2} 는 N -숙신이미도기이며, 활성기 R_{x2} 와 작용기를 포함하는 화합물은 예를 들어, N -숙신이미도기와 소분자 치료제기를 포함하는 상업적으로 쉽게 입수할 수 있는 화합물일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 활성기 R_{x1} 및 활성기 R_{x2} 는 각각 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II이고, 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II는 각각 5 내지 25개의 변형되거나 변형되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하고, 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II는 적어도 부분적으로 역상보적이다. 전달기는 뉴클레오타이드 서열 I에 연결되고, 작용기는 뉴클레오타이드 서열 II에 연결되고, 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II는 대상체에서 면역 반응이나 독성 반응을 유발하지 않는다. 커플링 반응 조건은 핵산 이중 가닥을 형성하기 위한 어닐링 반응 조건이다. 몇몇 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II는 모두 17개의 뉴클레오타이드로 구성되고 완전히 역상보적이다. 몇몇 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II는 각각 서열번호 40 및 서열번호 41로 표시된 바와 같은 서열을 갖는다. 몇몇 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열 I 및 뉴클레오타이드 서열 II는 각각 서열번호 42 및 서열번호 43으로 표시된 바와 같은 서열을 갖는다.

[0299] 전달기는 앵타머로부터 하나 이상의 수소 원자 또는 작용기를 제거함으로써 형성된다. 몇몇 구현예에서, 연속적인 뉴클레오타이드 서열의 5'-말단 뉴클레오타이드에 있는 리보스의 5' 위치의 기 및 연속적인 뉴클레오타이드 서열의 3'-말단 뉴클레오타이드에 있는 리보스의 3' 위치의 기는 그룹은 모두 히드록실기이고, 전달기는 앵타머의 5'-말단 뉴클레오타이드의 5'-히드록실 기로부터 수소 원자 하나를 제거함으로써 형성된다. 몇몇 구현예에서, 전달기는 앵타머의 3'-말단 뉴클레오타이드의 3'-히드록실기로부터 수소 원자 하나를 제거함으로써 형성된다. 몇몇 구현예에서, 전달기는 앵타머의 5'-말단 뉴클레오타이드로부터 5'-히드록실기를 제거함으로써 형성된다. 몇몇 구현예에서, 전달기는 앵타머의 3'-말단 뉴클레오타이드로부터 3'-히드록실기를 제거함으로써 형성된다. 몇몇 구현예에서, 전달기는 앵타머에 포함된 뉴클레오타이드의 리보스로부터 2'-히드록실기를 제거함으로써 형성된다. 앵타머는 당업계의 통상적인 앵타머 제조 방법(예: 핵산의 고체상 합성 및 액체상 합성 방법)을 통해 얻을 수 있다. 여기서, 핵산의 고체상 합성을 위한 상업적 맞춤형 서비스가 있다. 변형된 뉴클레오타이드기는 상응하는 변형을 갖는 뉴클레오시드 단량체를 사용하여 본 개시에 의해 제공되는 접합체에 도입될 수 있다. 상응하는 변형을 갖는 뉴클레오시드 단량체를 제조하는 방법 및 변형된 뉴클레오타이드기를 앵타머에 도입하는 방법도 당업자에게 잘 알려져 있다. 변형을 갖는 모든 뉴클레오시드 단량체는 상업적으로 입수 가능하거나 알려진 방법을 통해 제조될 수 있다.

[0300] 몇몇 구현예에서, 접합체는 또한 본 개시에서 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 전구체 화합물의 형태로 사용될 수 있다. 본 개시의 맥락에서, "약학적으로 허용가능한 염"은 인체에서 약학적으로 추가적인 부작용을 일으키지 않으면서 약물의 안정성, 용해도 및/또는 생체이용률을 증가시키기 위해 약물로부터 형성되는 상응하는 염, 예를 들어 칼륨 염, 나트륨 염 또는 카르복실산염을 의미한다. "전구체 화합물"은 구조 및 기능의 측면에서 접합체와 동일하지 않으나, 체내 또는 체액 환경에 유입된 후 반응하여 본 개시의 접합체를 형성함으로써 그 효

과를 발휘하고 본 개시의 목적을 달성할 수 있는 화합물을 의미한다. 특정 상황에서, 이러한 전구체 화합물은 약물의 안정성을 증가시키고, 방출 시간을 연장하고, 생체이용률을 증가시킬 수 있다. 몇몇 구현예에서, 전구체 화합물은 인체에서 반응하여 접합체의 모든 작용기 A_0 를 형성할 수 있는 전구체 기를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 전구체 화합물은 접합체의 모든 활성 히드록실기를 아세톡시기로 치환함으로써 형성된 화합물을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 전구체 화합물은 약물 전구체 기를 포함하는데, 이는 접합체의 작용기에 상응하는 치료제의 전구체 화합물로부터 형성되는 잔기이다. 몇몇 구현예에서, 약물 전구체 기는 예를 들어, 작용기 내의 히드록실 또는 아미노 작용기의 활성 수소를 아실, 알킬 또는 포스포릴기로 치환함으로써 형성된 기일 수 있다. 당업자는 이러한 약학적으로 허용가능한 염 및 전구체 화합물의 용도도 본 개시의 범위 내에 있음을 이해할 수 있다.

[0301] 약학적 조성물

[0302] 일 측면에서, 본 개시는 또한 본 개시에 의해 제공되는 접합체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0303] 약학적으로 허용가능한 담체는 당업계에서 통상적으로 사용되는 담체, 예를 들어, 물, 생리식염수, 자성 나노입자(예: Fe_3O_4 기반 또는 Fe_2O_3 기반 나노입자), 탄소 나노튜브, 메조다공성 실리콘, 인산칼슘 나노입자, 폴리에틸렌이민(PEI), 폴리아미도아민(PAMAM) 덴드리머, 폴리(1-리신)(PLL), 키토산, 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP), 폴리(d,l-락틱/글리콜산) 공중합체(PLGA), 폴리(2-아미노에틸 에틸렌 포스페이트)(PPEEA), 폴리(2-디메틸아미노에틸 메타크릴레이트)(PDMAEMA) 및 이들의 유도체 중 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0304] 몇몇 구현예에서, 약학적으로 허용가능한 담체는 생리학적으로 허용가능한 화합물을 포함하며, 이는 예를 들어 약학적 조성물을 안정화하거나 접합체 및/또는 약학적 조성물의 흡수를 증가 또는 감소시키는 기능을 발휘한다. 생리학적으로 허용가능한 화합물은 다음 화합물 중 하나 이상으로부터 선택된다: 포도당, 자당 및/또는 글루칸과 같은 탄수화물; 아스코르브산 및/또는 글루타치온과 같은 항산화제; 킬레이트제; 저분자량 단백질; 임의의 동시 투여되는 물질의 클리어런스 또는 가수분해를 감소시키는 조성물; 부형제; 안정화제 및 완충액. 또한, 조성물을 안정화하거나 약학적 조성물의 흡수를 증가 또는 감소시키기 위해 세제(detergent)를 사용할 수도 있다. 생리학적으로 허용가능한 화합물은 특히 미생물 성장 또는 작용을 방지하는데 사용되는 습윤제, 유화제, 분산제 또는 방부제 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 생리학적으로 허용가능한 화합물은 당업자에게 알려져 있으며, 본원에서는 자세히 설명하지 않는다. 당업자는 약학적으로 허용가능한 담체 및 생리학적으로 허용가능한 화합물의 선택이 예를 들어 투여 경로 및 임의의 동시 투여되는 물질의 특정 물리화학적 특성에 따라 달라진다는 것을 쉽게 이해할 수 있다.

[0305] 몇몇 구현예에서, 약학적으로 허용가능한 담체는 멸균되어 있으며 일반적으로 바람직하지 않은 물질을 포함하지 않는다. 본 개시에 의해 제공되는 약학적 조성물은 생리학적 조건에 접근하기 위한 실제적인 필요성에 따라 약학적으로 허용가능한 보조 물질, 예를 들어 pH 조절제 및 완충액 및 독성 조절제, 예를 들어 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 및 락트산나트륨을 추가로 포함할 수 있다. 본 개시에 의해 제공되는 접합체의 약학적 조성물 내 농도는 넓은 범위 내에서 다양할 수 있으며, 주로 체액 부피, 점도, 체중 등 및 특정 투여 방식에 따라 선택된다.

[0306] 몇몇 구현예에서, 약학적 조성물에서, 접합체와 약학적으로 허용가능한 담체의 함량에 대한 특별한 요구 사항은 없다. 몇몇 구현예에서, 접합체 대 약학적으로 허용가능한 담체의 중량비는 1:(1 내지 500)일 수 있고, 몇몇 구현예에서, 상기 중량비는 1:(1 내지 50)이다.

[0307] 몇몇 구현예에서, 약학적 조성물은 또한 다른 약학적으로 허용가능한 보조제를 포함할 수 있으며, 이러한 보조제는 당업계에서 통상적으로 사용되는 다양한 제형 및 화합물 중 하나 이상일 수 있다. 예를 들어, 상기 다른 약학적으로 허용가능한 보조제는 pH 완충액, 보호제 및 삼투압 조절제 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0308] pH 완충액은 pH 7.5 내지 8.5의 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 염산염 완충액 및/또는 pH 5.5 내지 8.5의 인산염 완충액, 예를 들어 pH 5.5 내지 8.5의 인산염 완충액일 수 있다.

[0309] 보호제는 이노시톨, 소르비톨, 수크로스, 트레할로스, 만노스, 말토스, 락토스 및 포도당 중 적어도 하나일 수 있다. 보호제의 함량은 약학적 조성물의 총 중량을 기준으로 0.01중량% 내지 30중량%일 수 있다.

[0310] 삼투압 조절제는 염화나트륨 및/또는 염화칼륨일 수 있다. 삼투압 조절제의 함량은 약학적 조성물의 삼투압이

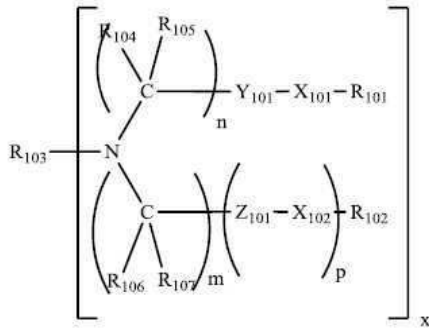
200 내지 700 mOsm/kg이 되도록 한다. 원하는 삼투압에 따라, 당업자는 삼투압 조절제의 함량을 쉽게 결정할 수 있다. 몇몇 구현예에서, 약학적 조성물로부터 제조된 제형(formulation)의 투여량은 투여 동안의 다양한 투여 방식에 따라 조정될 것이다.

[0311] 몇몇 구현예에서, 약학적 조성물은 액체 제형, 예를 들어 주사 용액이거나 주사를 위한 동결건조 분말일 수 있으며, 이 분말은 투여 시 액체 부형제와 혼합되어 액체 제형을 형성한다. 액체 제형은 피하, 근육 내 또는 정맥 주사에 의한 투여에 사용될 수 있지만 이에 제한되지 않으며, 약학적 조성물은 또한 천자(puncture) 주사, 구강 인두 흡입, 비강 투여 또는 기타 경로에 의해 전달될 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 몇몇 구현예에서, 약학적 조성물은 피하, 근육 내, 정맥 내 또는 척추강 내 주사에 의한 투여에 사용된다.

[0312] 몇몇 구현예에서, 약학적 조성물은 리포솜 제형의 형태일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 리포솜 제형에 사용되는 약학적으로 허용가능한 담체는 아민 함유 형질감염 화합물(이하 유기 아민이라고 함), 헬퍼 지질 및/또는 PEG화된 지질을 포함한다. 여기서, 유기 아민, 헬퍼 지질 및 PEG화된 지질은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 중국 특허 출원 CN103380113A호에 기재된 바와 같은 아민 함유 형질감염 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 유도체, 헬퍼 지질, 및 PEG화된 지질 중 하나 이상에서 선택될 수 있다.

[0313] 몇몇 구현예에서, 유기 아민은 중국 특허 출원 CN103380113A호에 기재된 바와 같이 하기 화학식 (201)로 표시된 바와 같은 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염일 수 있다:

[0314] [화학식 (201)]



[0315]

[0316] 상기 화학식에서,

[0317] X_{101} 및 X_{102} 는 각각 독립적으로 O, S, N-A 또는 C-A이고, 여기서 A는 수소 또는 C_1 - C_{20} 탄화수소 사슬이며;

[0318] Y_{101} 및 Z_{101} 은 각각 독립적으로 C=O, C=S, S=O, CH-OH 또는 SO_2 이고;

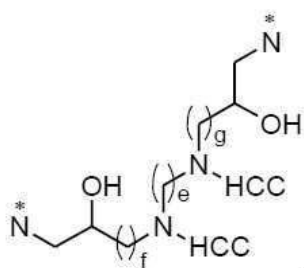
[0319] R_{101} , R_{102} , R_{103} , R_{104} , R_{105} , R_{106} 및 R_{107} 은 각각 독립적으로 수소; 고리형 또는 비고리형의 치환 또는 비치환된 분지쇄 또는 직쇄 지방족기; 고리형 또는 비고리형의 치환 또는 비치환된 분지쇄 또는 직쇄 헤테로지방족기; 치환 또는 비치환된 분지쇄 또는 직쇄 아릴기; 치환 또는 비치환된 분지쇄 또는 직쇄 아릴기; 또는 치환 또는 비치환된 분지쇄 또는 직쇄 헤테로아릴기이고;

[0320] x는 1 내지 10의 정수이고;

[0321] n은 1 내지 3의 정수이고, m은 0 내지 20의 정수이고, p는 0 또는 1이며, 여기서 $m = p = 0$ 인 경우 R_{102} 는 수소이고;

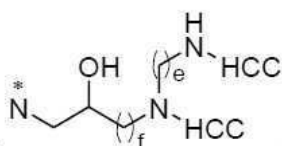
[0322] n과 m 중 적어도 하나가 2인 경우, 화학식(201)의 R_{103} 및 질소는 하기 화학식 (202) 또는 (203)으로 표시된 바와 같은 구조를 형성한다:

[0323] [화학식 (202)]



[0324]

[0325] [화학식 (203)]



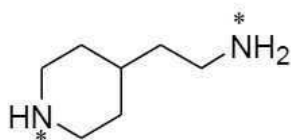
[0326]

[0327] 상기 화학식에서 g , e 및 f 는 각각 독립적으로 1 내지 6의 정수이고, "HCC"는 탄화수소 사슬을 나타내고, 각각의 *N은 화학식 (201)의 질소 원자를 나타낸다.

[0328] 몇몇 구현예에서, R_{103} 은 폴리아민이다. 다른 구현예에서, R_{103} 은 케탈이다. 몇몇 구현예에서, 화학식 (201)의 R_{101} 및 R_{102} 는 각각 독립적으로 임의의 치환 또는 비치환된 분지쇄 또는 직쇄 알킬 또는 알케닐이며, 여기서의 알킬 또는 알케닐은 3 내지 약 20개의 탄소 원자(예: 8 내지 약 18개의 탄소 원자) 및 0 내지 4개의 이중 결합(예: 0 내지 2개의 이중 결합)을 갖는다.

[0329] 몇몇 구현예에서, n 및 m 이 각각 독립적으로 1 또는 3인 경우, R_{103} 은 하기 화학식 (204) 내지 (213) 중 어느 하나일 수 있다:

[0330] [화학식 (204)]



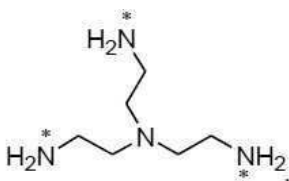
[0331]

[0332] [화학식 (205)]



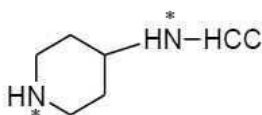
[0333]

[0334] [화학식 (206)]



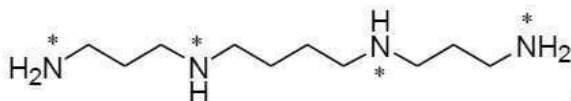
[0335]

[0336] [화학식 (207)]



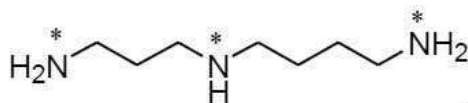
[0337]

[0338] [화학식 (208)]



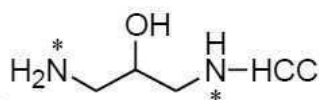
[0339]

[0340] [화학식 (209)]



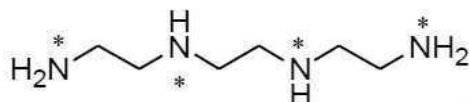
[0341]

[0342] [화학식 (210)]



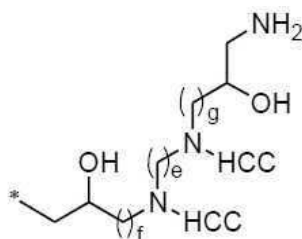
[0343]

[0344] [화학식 (211)]



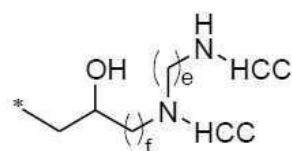
[0345]

[0346] [화학식 (212)]



[0347]

[0348] [화학식 (213)]



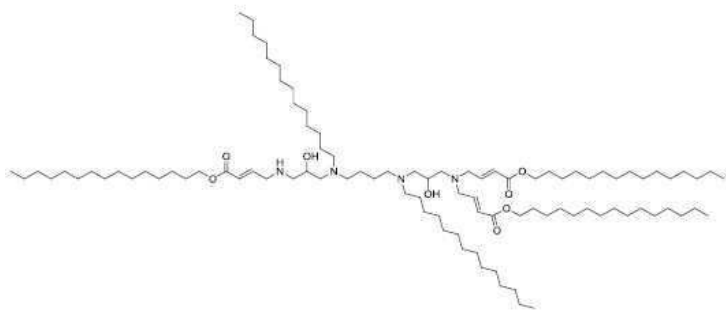
[0349]

[0350] 상기 화학식 (204) 내지 (213)에서, g, e 및 f는 각각 독립적으로 1 내지 6의 정수이고, 각각의 "HCC"는 탄화수소 사슬을 나타내고, 각각의 *는 화학식 (201)에서 질소 원자에 대한 R₁₀₃의 잠재적인 부착 지점을 나타내고, 여기서 임의의 * 위치에 있는 각각의 H는 화학식 (201)에서 질소 원자에의 부착을 달성하기 위해 대체될 수 있다.

[0351] 당업자는 화학식 (201)로 표시된 바와 같은 화합물을 임의의 적절한 방법으로 얻을 수 있다. 몇몇 구현예에서, 화학식 (201)로 표시된 바와 같은 화합물은 중국 특허 출원 CN103380113A호의 설명에 따라 제조될 수 있다.

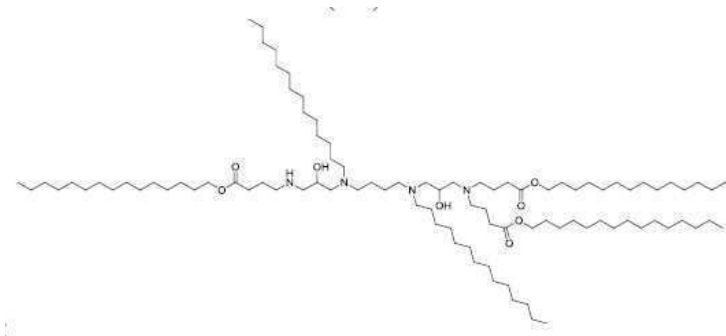
[0352] 몇몇 구현예에서, 유기 아민은 하기 화학식 (214)로 표시된 바와 같은 유기 아민 및/또는 하기 화학식 (215)로 표시된 바와 같은 유기 아민이다:

[0353] [화학식 (214)]



[0354]

[0355] [화학식 (215)]



[0356]

[0357] 헬퍼 지질은 콜레스테롤, 콜레스테롤 유사체 및/또는 콜레스테롤 유도체이고, PEG화된 지질은 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000]이다.

[0358] 몇몇 구현예에서, 약학적 조성물 중 유기 아민, 헬퍼 지질 및 PEG화된 지질 사이의 물 비는 (19.7 내지 80):(19.7 내지 80):(0.3 내지 50)이고, 예를 들어, 물 비는 (50 내지 70):(20 내지 40):(3 내지 20)일 수 있다.

[0359] 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체와 상기 아민 함유 형질감염 시약으로부터 형성되는 약학적 조성물 입자는 약 30nm 내지 약 200nm, 일반적으로 약 40nm 내지 약 135nm의 평균 직경을 갖고, 더 일반적으로 리포솜 입자의 평균 직경은 약 50nm 내지 약 120nm, 약 50nm 내지 약 100nm, 약 60nm 내지 약 90nm, 또는 약 70nm 내지 약 90nm이다. 예를 들어, 리포솜 입자의 평균 직경은 약 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 또는 160nm이다.

[0360] 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체와 상기 아민 함유 형질감염 시약으로부터 형성되는 약학적 조성물에서, 접합체 대 총 지질(예: 유기 아민, 헬퍼 지질 및/또는 PEG화 지질)의 중량 비율(중량/중량 비율)은 약 1:1 내지 약 1:50, 약 1:1 내지 약 1:30, 약 1:3 내지 약 1:20, 약 1:4 내지 약 1:18, 약 1:5 내지 약 1:17, 약 1:5 내지 약 1:15, 약 1:5 내지 약 1:12, 약 1:6 내지 약 1:12, 또는 약 1:6 내지 약 1:10의 범위이다. 예를 들어, 본 개시에 의해 제공되는 접합체 대 총 지질의 중량비는 약 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 또는 1:18이다.

[0361] 몇몇 구현예에서, 약학적 조성물은 각 성분이 분리된 상태로 시판될 수 있으며, 액체 제형의 형태로 사용될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 본 개시에 의해 제공되는 접합체와 상기 약학적으로 허용되는 담체로부터 형성되는 약학적 조성물은 단순히 기존의 애플타머 또는 접합체를 본 개시에 의해 제공되는 접합체로 대체하는 것을 통해 다양한 공지된 과정에 의해 제조될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 약학적 조성물은 하기의 과정에 따라 제조될 수 있다:

[0362] 유기 아민, 헬퍼 지질 및 PEG화된 지질을 상기 물 비율로 알코올에 현탁시키고 균일하게 혼합하여 지질 용액을 얻는다. 여기서 알코올은 얻어지는 지질 용액이 2 내지 25mg/mL(예: 8 내지 18mg/mL)의 총 질량 농도로 존재하도록 하는 양으로 사용한다. 알코올은 약학적으로 허용가능한 알코올이며, 예를 들어 에탄올, 프로필렌 글리콜,

벤질 알코올, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜 200, 폴리에틸렌 글리콜 300 및 폴리에틸렌 글리콜 400 중 하나 이상과 같이 대략 실온에서 액체 형태인 알코올이다.

[0363] 본 개시에 의해 제공되는 접합체를 완충 염 용액에 용해시켜서 접합체의 수용액을 얻는다. 완충 염 용액은 0.05 내지 0.5 M, 예를 들어 0.1 내지 0.2 M의 농도를 갖는다. 완충 염 용액의 pH는 4.0 내지 5.5, 예를 들어 5.0 내지 5.2로 조정된다. 완충 염 용액은 접합체가 0.6 mg/mL 이하, 예를 들어 0.2 내지 0.4 mg/mL의 농도로 존재하도록 하는 양으로 사용된다. 완충염은 가용성 아세트산염 및 가용성 시트르산염, 예를 들어 아세트산 나트륨 및/또는 아세트산 칼륨으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0364] 지질 용액과 접합체의 수용액을 혼합한다. 혼합하여 얻은 생성물을 40 내지 60℃의 온도에서 최소 2분(예: 5 내지 30분) 동안 인큐베이션하여 인큐베이션된 리포솜 제형을 제조한다. 지질 용액 대 접합체의 수용액의 부피비는 1:(2 내지 5), 예를 들어 1:4이다.

[0365] 인큐베이션된 리포솜 제형을 농축 또는 희석하고, 불순물을 제거한 후 멸균하여 본 개시의 약학적 조성물을 얻는다. 이 조성물은 하기의 물리화학적 매개변수를 갖는다: pH 6.5 내지 8, 캡슐화 효율 80% 이상, 입자 크기 40 내지 200nm, 다분산 지수 0.30 이하, 및 삼투압 250 내지 400 mOsm/kg. 예를 들어, 물리화학적 매개변수는 다음과 같을 수 있다: pH 7.2 내지 7.6, 캡슐화 효율 90% 이상, 입자 크기 60 내지 100nm, 다분산 지수 0.20 이하, 및 삼투압 300 내지 400 mOsm/kg.

[0366] 여기서, 농축 또는 희석 단계는 불순물 제거 전, 제거 후 또는 제거와 동시에 수행될 수 있다. 불순물 제거 방법은 다양한 기존 방법 중 하나일 수 있는데, 예를 들어, 접선 흐름 시스템 또는 100kDa 미만의 중공 섬유 컬럼을 사용하고 한외여과 교환 용액으로 pH 7.4의 인산 완충액(PBS)을 사용하여 한외여과를 수행한다. 멸균 방법은 다양한 기존 방법 중 하나일 수 있는데, 예를 들어 0.22 μm 필터를 이용한 여과 멸균이다.

[0367] 본 개시의 접합체의 용도

[0368] 또 다른 측면에서, 본 개시는 또한 종양 및 종양 관련 질환 또는 증상을 치료하기 위한 의학의 제조에서 본 개시에 의해 제공되는 접합체 및/또는 약학적 조성물의 용도를 제공한다.

[0369] 또 다른 측면에서, 본 개시는 종양 및 종양 관련 질환 또는 증상을 치료하는 방법으로서, 본 개시의 접합체 및/또는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0370] 본 개시의 접합체 및/또는 약학적 조성물을 투여함으로써, 본 개시의 방법은 종양 및 종양 관련 질환 또는 증상을 효과적으로 치료할 수 있으며; 본 개시에 의해 제공되는 접합체의 고도로 특이적인 표적화 효과로 인해, 신체의 다른 원하지 않는 장기/조직에서 치료제의 분포가 감소되어 잠재적인 부작용을 줄일 수 있는데, 이는 특히 종양 치료 분야에서 일반적으로 사용되고 유의한 부작용을 갖는 것으로 알려진 방사선 요법 및/또는 화학 요법 약물의 경우 매우 중요하고 가치가 있다.

[0371] 본원에서 사용되는 용어 "투여/투여하다"는 원하는 효과를 달성하기 위해 접합체 및/또는 약학적 조성물이 원하는 부위에 적어도 부분적으로 위치하는 방법 또는 경로에 의해 접합체 및/또는 약학적 조성물을 대상체에 도입하는 것을 의미한다. 본 개시의 방법에 적합한 투여 경로에는 국소 투여 및 전신 투여가 포함된다. 일반적으로, 국소 투여의 경우, 대상체의 전신에 비해 특정 부위에 더 많은 접합체 및/또는 약학적 조성물이 전달된다. 반면, 전신 투여의 경우, 대상체의 거의 전신에 접합체 및/또는 약학적 조성물이 전달된다.

[0372] 또한, 본 개시의 발명자들은 놀랍게도, 본 개시의 접합체 및/또는 약학적 조성물이 전신 투여 시 혈액-뇌 장벽을 효율적으로 통과하여 뇌의 종양을 표적함으로써, 작용기의 전달 효율을 더욱 향상시키고, 비용 및 바람직하지 않은 부작용을 감소시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

[0373] 대상체로의 투여는 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 경피 투여, 기관내 투여(에어로졸), 폐 투여, 비강 투여, 직장 투여 및 국소 투여(구강 투여 및 설하 투여 포함)와 같은 경구 또는 비경구 경로를 포함하나 이에 제한되지 않는, 당업계에서 알려진 임의의 적합한 경로를 통해 달성될 수 있다. 투여 빈도는 매일, 매주, 2주마다, 3주마다, 매월 또는 매년 한 번 이상일 수 있다.

[0374] 본 개시의 접합체 및/또는 약학적 조성물의 투여량은 당업계에서의 통상적인 투여량일 수 있으며, 이는 다양한 매개변수, 특히 대상체의 연령, 체중 및 성별에 따라 결정될 수 있다. 독성 및 효능은 세포 배양액이나 실험 동물에서 표준 약학적 절차를 통해 확인할 수 있다. 예를 들어, LD50(개체군의 50% 사망을 초래하는 투여량) 및 ED50(정량적 반응에서 최대 반응 강도의 50%를 일으킬 수 있는 투여량 또는 정성적 반응에서 실험 대상의 50%가 긍정적인 반응을 보이는 투여량)을 결정함으로써 확인될 수 있다. 인간에 대한 투여량 범위는 세포 배양 분석

및 동물 연구를 통해 얻은 데이터를 바탕으로 결정될 수 있다.

[0375] 본 개시의 접합체 및/또는 약학적 조성물을, 예를 들어, 6주령내지 12주령의 체중 18g 내지 25g의 수컷 또는 암컷 C57BL/6J 또는 C3H/HeNCr1Vr 마우스에 투여하는 경우(접합체 및/또는 약학적 조성물 내의 접합체의 양을 기준으로 계산됨): 접합체의 투여량은 체중 1kg당 0.001mg 내지 100mg, 몇몇 구현예에서는 체중 1kg당 0.01mg 내지 50mg, 몇몇의 추가 구현예에서는 체중 1kg당 0.05mg 내지 20mg, 몇몇의 더욱 추가의 구현예에서는 체중 1kg당 0.1mg 내지 15mg, 몇몇의 더욱 추가의 구현예에서 체중 1kg당 0.1mg 내지 10mg이다. 본 개시의 접합체 및/또는 약학적 조성물을 투여하는 경우, 상기 투여량이 바람직할 수 있다.

[0376] 키트

[0377] 본 개시는 본 개시의 접합체 및/또는 약학적 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.

[0378] 몇몇 구현예에서, 본 개시의 키트는 용기에 접합체 및/또는 약학적 조성물을 제공할 수 있다. 몇몇 구현예에서, 본 개시의 키트는 약학적으로 허용가능한 부형제를 제공하는 용기를 포함할 수 있다. 몇몇 구현예에서, 키트는 안정화제 또는 방부제와 같은 추가의 성분을 추가로 포함할 수 있다. 몇몇 구현예에서, 본 개시의 키트는 본 개시의 접합체 및/또는 약학적 조성물을 제공하는 용기 이외의 용기에서 적어도 하나의 추가의 치료제를 포함할 수 있다. 몇몇 구현예에서, 키트는 접합체 및/또는 약학적 조성물을 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 보조제 또는 기타 성분(있는 경우)과 혼합하기 위한 지침을 포함할 수 있다.

[0379] 본 개시의 키트에서, 접합체 및 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 보조제, 그리고 약학적 조성물 및/또는 약학적으로 허용가능한 보조제는 임의의 형태, 예를 들어 액체 형태, 건조 형태 또는 동결 건조 형태로 제공될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 접합체 및 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 보조제, 그리고 약학적 조성물 및 선택적인 약학적으로 허용가능한 보조제는 실질적으로 순수하고/하거나 멸균된 것이다. 몇몇 구현예에서, 본 개시의 키트에는 멸균수가 제공될 수 있다.

[0380] 이하, 본 개시를 실시예를 참조하여 더욱 자세히 설명하지만, 어떠한 면에서도 이에 제한되는 것은 아니다.

[0381] 실시예

[0382] 달리 명시되지 않는 한, 하기 실시예에서 사용된 시약 및 배양 배지는 모두 상업적으로 입수가 가능하고, 핵산 전기영동 및 실시간 PCR 등과 같은 사용된 절차는 모두 문헌[Molecular Cloning(Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989))]에 기재된 방법에 따라 수행된다.

[0383] **제조예 1 내지 8 및 18: 접합체 AP1 내지 AP18 및 AP18의 합성**

[0384] 하기 표 1의 AP1 내지 AP8 및 AP18로 번호가 매겨진 접합체는 각각 고체상 합성 방법에 의해 합성하였으며, 하기 표 1의 AP1 내지 AP8 및 AP18에 해당하는 뉴클레오타이드 서열에 따라 3'에서 5' 방향으로 모든 뉴클레오타이드 단량체를 순차적으로 연결한 다음, 뉴클레오타이드 포스포아미다이트 단량체(Suzhou GenePharma Inc.사에서 구입, Lot No. CY5P21H1B)를 연결하기 위한 고체상 합성 방법에 따라 Cy5 포스포아미다이트 단량체를 연결했다. 이어서, 뉴클레오타이드 서열을 동일 부피의 메틸아민 수용액과 암모니아 수용액의 혼합용액에 첨가하였고(올리고뉴클레오타이드에 대한 용액의 양은 0.5 ml/ μ mol임), 25°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 고체를 여과로 제거하고, 상층액을 진공 하에 농축 건조시켰다.

[0385] 제조된 접합체의 정제는 NaCl 수용액의 기울기 용리를 갖는 분취용 이온 크로마토그래피 정제 컬럼(Source 15 Q)을 사용하여 달성되었다. 구체적으로, 용리액 A는 20 mM 인산나트륨(pH 8.1)이고, 용매는 9:1(v/v)의 물/아세트오닐트릴이고; 용리액 B는 1.5 M 염화나트륨, 20 mM 인산나트륨(pH 8.1)이고, 용매는 9:1(v/v)의 물/아세트오닐트릴이었고; 용리 기울기로서 용리액 A: 용리액 B의 비율 = 100:0 내지 50:50였다. 생성되는 용출액은 역상 크로마토그래피 정제 컬럼을 사용하여 수집, 결합 및 탈염하였다. 특정 조건은 다음을 포함한다. 탈염을 위해 Sephadex 컬럼을 사용하고(필러: Sephadex G25), 탈이온수로 용출한다. 얻어지는 용출액을 농축하여 용매를 제거하고 동결 건조하여, 5' 말단 뉴클레오타이드의 리보스의 5' 위치가 인산 에스테르 연결기를 통해 Cy5 형광기에 연결되어 있는 접합체 AP1 내지 AP8 및 AP18을 각각 얻었다.

[0386] 전술한 접합체 AP1 내지 AP8 및 AP18을 합성한 후, 얻어진 접합체를 초순수(Milli-Q 초순수 기기를 이용하여 자체 제조, 저항률 18.2 M Ω ·cm(25°C))를 사용하여 0.2 mg/mL의 농도로 희석했다. 분자량은 LC-MS 기기(LC-MS, 액체 크로마토그래피-질량 분광분석, Waters Crop.사에서 구입, 모델: LCT Premier)로 측정했다. 그 결과, 측정된 값은 계산된 값과 일치하여 목표 접합체가 얻어졌음을 확인했다.

[0387] 각 접합체의 분자량 및 MS 값은 하기 표 1a에 나타낸다.

[0388] [표 1a]

[0389] 접합체의 질량 스펙트럼 특성 분석 결과

번호	계산된 MS 값	측정된 MS 값
AP1	11113.51	분자 이온 피크: 1850.9 (6-가) : 1586.3 (7-가)
AP2	11113.51	분자 이온 피크: 1850.9 (6-가) : 1586.3 (7-가)
AP3	8173.61	8171.39
AP4	7814.38	7812.23
AP5	7455.14	7452.96
AP6	8516.85	8514.56
AP7	8414.74	분자 이온 피크: 2101.9 (4-가) : 1681.4 (5-가)
AP8	8471.75	8469.53
AP18	10704.67	10703.27

[0390]

[0391] 비교 제조예 9 내지 17 및 19: 비교 접합체인 비교 AP9 내지 비교 AP17 및 비교 AP19의 합성

[0392] 표 1의 비교 AP9 내지 비교 AP17 및 비교 AP19로 번호가 매겨진 접합체를 각각 제조예 1의 방법에 따라 합성하였고 분자량을 측정하여 확인하였는데, 차이점은 표 1의 비교 AP9 내지 비교 AP173 및 비교 AP19에 해당하는 서열에 따라 각각 뉴클레오타이드 단량체를 순차적으로 연결하였다는 것이다. 따라서, 5' 말단 뉴클레오타이드의 리보스 5' 위치가 인산 에스테르 연결기를 통해 Cy5 형광기에 연결되어 있는비교 접합체인 비교 AP9 내지 비교 AP17 및 비교 AP19를 각각 얻었다.

[0393] [표 1]

[0394] 집합체의 뉴클레오티드 서열

제 조 예	집 합 체	뉴클레오티드 서열 5'-3'	서열 번호
제 조 예 1	AP1	CY5-UmCmUmAmUmGmGmCmUmGmCmCmAmUmUmGmUmGmUmCmUmCmAmUmGmUmAmCmCmUm	33
제 조 예 2	AP2	CY5-CmUmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmUmGmUmUmGmUmCmUmCmUmCmGmAmUmCmUmCm	21
제 조 예 3	AP3	CY5-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUm	27
제 조 예 4	AP4	CY5-CmUmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmUmGmUmUmGmCmUmCmUm	28
제 조 예 5	AP5	CY5-CmUmGmCmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmAmGmCmUmUm	29
제 조 예 6	AP6	CY5-AmCmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUm	30
제 조 예 7	AP7	CY5-CmUmGmAmGmUmUmCmAmCmUmAmCmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUm	31
제 조 예 8	AP8	CY5-CmUmGmAmGmUmUmCmAmGmUmUmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUm	32
비 교 제 조 예 9	비 교 AP9	CY5-GmGmAmCmAmUmGmGmAmUmUmCmUmUmGmUmCmUmGmUmCmUmCmCm	45
비 교 제 조 예 10	비 교 AP10	CY5-GmAmUmCmUmGmUmGmUmCmUmUmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmCm	46
비 교 제 조 예 11	비 교 AP11	CY5-GmAmUmCmGmUmGmAmCmGmAmCmUmCmUmUmGmUmCmUmGmCmUmGmUmCmUmAmUmCm	47
비 교 제 조 예 12	비 교 AP12	CY5-CmGmUmCmUmCmAmGmCmAmUmGmUmGmUmAmGmUmCmUmCmUmGmUmCmUmCmUmCmAm	48
비 교 제 조 예 13	비 교 AP13	CY5-GmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUm	49
비 교 제 조 예 14	비 교 AP14	CY5-CmUmGmAmGmUmUmCmGmUmUmGmCmUmUmCmUmUmCmGmAmUmCmUmCm	50
비 교 제 조 예 15	비 교 AP15	CY5-CmUmGmAmCmAmGmAmCmGmUmGmUmCmUmUmCmGmAmUmCmUmCm	51
비 교 제 조 예 16	비 교 AP16	CY5-CmUmGmAmGmUmUmCmAmGmAmUmCmAmGmAmCmUmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUm	52
비 교 제 조 예 17	비 교 AP17	CY5-CmUmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmUmGmUmAmGmCmUmCmUmGmUmGmAmUmCmUm	53
제 조 예 18	AP18	CY5-CfUfGGAGUfUfCfAGACfGUfGUfUfGCfUfCfUfUfCfCfGAUfCfUfCf	54
비 교 제 조 예 19	비 교 AP19	CY5-UfCfUfAUfGGCfUfGCfCfGAUfCfUfGGUfCfUfCfCfAUfGUfACfGUf	44

[0395]

[0396] 표 1에서, C, G, U 및 A는 뉴클레오티드의 염기 구성을 나타내고; m은 문자 m의 좌측에 인접한 뉴클레오티드가 메톡시 변형 뉴클레오타이드임을 나타내고; f는 문자 f의 좌측에 인접한 뉴클레오티드가 플루오로 변형 뉴클레오티드임을 나타내고; CY5는 앵타머에서 형광 염료기인 Cy5(시아닌 5) 기의 연결 부위를 나타낸다.

[0397] 제 조 예 20: 집합체 20의 합성

[0398] [표 2]

[0399] 접합체의 뉴클레오타이드 서열

제조예	접합체	서열	뉴클레오타이드 서열 5'-3'	서열 번호
제조예 20	접합체 20	올리고뉴클레오타이드 단일가닥	MMAE-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmUmGmCmUmCmUmUmUmCmGmAmUmCmUmCm	21
제조예 21	접합체 21	올리고뉴클레오타이드 단일가닥	MMAE-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmUmGmCmUmCmUmUmUmUmUm	24
제조예 22	접합체 22	올리고뉴클레오타이드 단일가닥	MMAE-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmUmUmGmCmUmCmUmUmUmUm	22
제조예 23	접합체 23	올리고뉴클레오타이드 단일가닥	MMAE-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmUmGmUmGmCmUmCmUmUmUmUm	26
제조예 24	비교 접합체 24	올리고뉴클레오타이드 단일가닥	MMAE-GmGmAmCmAmUmGmGmAmUmUmCmUmUmGmUmUmGmUmUmGmUmUmCmCmCm	45
제조예 25	비교 접합체 25	올리고뉴클레오타이드 단일가닥	MMAE-CmGmUmCmUmCmCmAmGmCmAmUmGmUmGmUmAmGmGmUmCmUmCmUmGmUmCmUmCmUmCmUmGmAm	48
제조예 26	접합체 26	올리고뉴클레오타이드 단일가닥	MMAE-CmUmGmCmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmAmGmCmUmUm	29

[0400]

[0401]

표 2에서, C, G, U 및 A는 뉴클레오타이드의 염기 구성을 나타내고; m은 문자 m의 왼쪽에 인접한 뉴클레오타이드가 메톡시 변형 뉴클레오타이드임을 나타내고; MMAE는 앵타머에서 소분자 약물기인 MMAE(모노메틸 오리스타틴 E) 기의 연결 부위를 나타낸다.

[0402]

이 제조예에서는, 접합체 20을 다음 단계에 따라 제조하였다. 접합체 20은 접합체 AP2의 염료기를 소분자 약물기 MMAE로 대체하여 얻었으며, 여기서 연결기는 2-(인산 에스테르 기-(CH₂)₆-S)-말레이미드 카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질리텐이었다.

[0403]

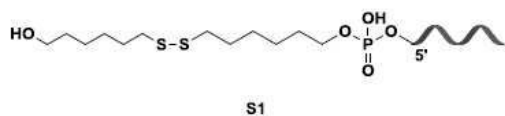
(20-1) 올리고뉴클레오타이드 S1의 제조

[0404]

표 2의 접합체 20의 올리고뉴클레오타이드 서열은 고상 합성 방법에 의해 합성하였으며, 차이점은 표 2의 접합체 20에 해당하는 올리고뉴클레오타이드 서열에 따라 뉴클레오사이드 단량체를 순차적으로 연결한다는 것이었다. 고상 합성 과정에서, 마지막 뉴클레오사이드 단량체를 5' 말단에 연결한 후, HO-(CH₂)₆-S-S-(CH₂)₆-기를 함유하는 포스포아미다이트 단량체(Hongene Biotech Co. Ltd.사에서 구입)를 뉴클레오사이드 포스포아미다이트 단량체 연결 방법에 따라 추가로 연결하고, 올리고뉴클레오타이드 단일 가닥을 고상 지지체로부터 절단하여 하기 화학식 (20-a)로 표시된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 단일 가닥 S1(70.00mg, 6.42 μmol)을 얻었다:

[0405]

[화학식 (20-a)]



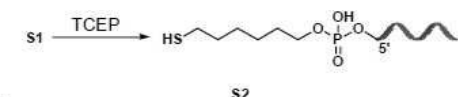
[0406]

[0407]

상기 화학식에서, 는 접합체 20에 해당하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.

[0408]

(20-2) 올리고뉴클레오타이드 S2의 합성

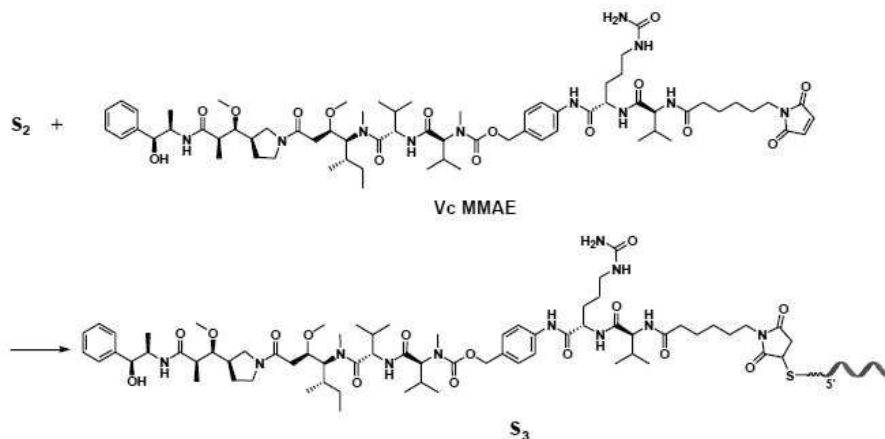


[0409]

[0410]

단계 (20-1)에서 얻은 70.0 mg S1 (6.42 μmol)을 정제수 10.0 ml에 용해시킨 후, 얻어지는 용액에, 105 mg TCEP (트리(2-클로로에틸) 포스페이트 에스테르(0.37 mmol, Bide Pharmatech Ltd.사에서 구입, 카탈로그 번호 BD155793)를 정제수 10.0 ml에 용해시켜 얻은 TCEP 수용액을 첨가하였다. 반응 용액을 혼합하여 실온에서 2시간 동안 반응시킨 다음, 정제수 10mL로 희석하고 여과하여 반응 용액 28mL을 얻었다. 얻어지는 반응 용액을 3K 크기의 한외여과 튜브로 옮기고 3900rpm에서 30분간 원심분리했다. 그런 다음 한외여과 및 원심분리 단계를 두 번 반복하여 필터 멤브레인에 생성물을 수집하여 올리고뉴클레오타이드 S2(67.0mg, 수율: 95.7%)를 얻었다.

[0411] (20-3) 올리고뉴클레오타이드 20의 합성



[0412]

[0413] 24 mg Vc MMAE(18.56 μ mol, 5 당량, CSN Company사에서 구입, 카탈로그 번호 CSN16143-005)를 6.0 ml의 DMF에 용해시키고, 60 μ l의 트리에틸아민을 첨가하여 Vc MMAE 용액을 얻었다. 단계(20-2)에서 제조한 올리고뉴클레오타이드 S2(3.71 μ mol, 1eq) 40.0 mg을 정제수 6.0 ml에 용해시킨 후, 얻어지는 용액에 상기 Vc MMAE 용액을 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 반응시켜 접합체 20 미정제 생성물(공정도에서 S3로 표시됨)을 얻었다.

[0414] 얻어진 접합체 20 미정제 생성물을 정제수 0.5ml로 희석하고 0.45 μ m 필터 막으로 여과했다. 여과액은 Agilent 반분취 역상 컬럼 크로마토그래피로 정제했고, 사용된 크로마토그래피 컬럼은 Kromasil 100-10-C18, 100A, 10 μ m, 21.2*250mm이었다. 100mM 트리에틸아민 아세트산 완충액(TEAA, pH=7.0-7.3): 아세토니트릴 = 95:5 에서 35:65를 이동상으로 사용하여 기울기 용출을 수행했다. 생성물 피크의 용출액을 수집하고, 증발시켜서 용매를 제거하여 접합체 20(55mg, 수율 56.7%)을 얻었다. 분자량은 LC-MS로 측정하였고, 계산값은 12092.73, 측정값은 12091.39였으며, 측정값은 계산값과 일치하여 접합체 20이 S3으로 표시된 바와 같은 구조를 가지고 있음을 확인하였다. 여기서, 접합체 20은 접합체 AP2의 염료기를 소분자 약물기 MMAE로 대체하여 얻었으며, 연결기는 2-(인산 에스테르기)-(CH₂)₆-S)-말레이미드 카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질리덴(2-(인산 에스테르 그룹-(CH₂)₆-S)-MC-Val-Cit-PAB)이었다.

[0415] 제조예 21 내지 26: 접합체 21 내지 23 및 26 및 비교 접합체 24 및 25의 합성

[0416] 표 2의 접합체 21, 접합체 22, 접합체 23, 비교 접합체 24, 비교 접합체 25 및 접합체 26으로 번호가 매겨진 접합체를 제조예 20의 방법에 따라 각각 합성하였고, 분자량을 측정하여 확인하였는데, 차이점은 표 2의 접합체 21, 접합체 22, 접합체 23, 비교 접합체 24, 비교 접합체 25 및 접합체 26에 해당하는 서열에 따라 뉴클레오타이드 단량체를 순차적으로 연결하였다는 것이다.

[0417] 각 접합체의 분자량 및 MS 값은 아래 표 2a에 나타낸다.

[0418] [표 2a]

[0419] 접합체의 질량 스펙트럼 특성 분석 결과

번호	계산된 MS 값	측정된 MS 값
접합체 20	12092.73	12091.39
접합체 21	9473.03	9472.07
접합체 22	9473.03	9471.76
접합체 23	9472.05	9472.2
비교 접합체 24	9473.03	9471.41
비교 접합체 25	12092.73	12091.48
접합체 26	8434.37	8434.09

[0420]

[0421] 실험예 1: 마우스에서 접합체의 생체내 표적 활성

[0422] 이 실험예에서는, 얻어지는 접합체 AP2, AP3 내지 8 및 비교 AP9 내지 비교 AP12의 마우스에서의 생체내 표적

활성(targeting activity)을 조사하였다.

- [0423] 118MG 인간 신경교종 세포(Guangzhou Jennio Biotech Co., Ltd사에서 구입)를 10% 우태혈청(FBS, RMBIO 회사)이 첨가된 DMEM 완전배지(MACGENE사, 카탈로그 번호 CM15019)에서 37℃로 5% CO₂/95% 공기가 포함된 인큐베이터에서 배양했다.
- [0424] 대수적으로 성장하는 U118MG 인간 신경교종 세포를 선택하여 (0.25% 취장 효소)로 분해한 다음, 세포를 수집하고 원심분리하여 상층액을 제거한 다음, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에 현탁하여 농도가 1X10⁸ 개 세포/mL인 세포 배양액(cell culture medium)을 얻었다.
- [0425] 실험 동물은 24마리의 12주령의 수컷 NOD-SCID 마우스(SPF(Beijing) Biotechnology Co., Ltd사에서 구입)였다. 상기 세포 배양액을 마우스 당 100 μL의 접종 부피로 NOD-SCID 마우스의 오른쪽 앞다리의 피하 부위에 접종했다. 즉, 각 마우스에 1X10⁷ 개의 세포를 접종했다. 주사 후 20일 동안 마우스를 보관하여 U118MG 피하 종양이 접종된 마우스를 얻었다.
- [0426] 위에서 얻어진 앵타머 AP2, AP3 내지 8 및 비교 AP9 내지 비교 AP12는 각각 DMEM 배지를 사용하여 0.3mg/mL의 용액으로 제형화하였다.
- [0427] 투여는 U118MG 세포 접종 후 14일째에 시작하였고, 투여일은 D1로 지정하였다. 이 실험에서는 꼬리 정맥 주사의 투여 방법을 채택하였으며, 하루에 한 번, 총 3회 투여하였다.
- [0428] U118MG 피하 종양을 접종한 24마리의 마우스를 군당 2마리씩 12개 군으로 무작위로 나누었다.
- [0429] 7개 마우스 군의 경우, 각 군의 각 마우스에 AP2, AP3, AP4, AP5, AP6, AP7 또는 AP8을 각각 마우스 체중 1g당 10 μL의 단일 투여 부피로 투여했다. 단일 투여량은 3 mg/kg으로 계산되었으며, 각각 시험군 1A 내지 1G로 지정하였다.
- [0430] 4개 마우스 군의 경우, 각 군의 각 마우스에 비교 AP9, 비교 AP10, 비교 AP11 또는 비교 AP12를 각각 마우스 체중 1g당 10 μL의 단일 투여 부피로 투여했다. 단일 투여량은 3 mg/kg으로 계산되었으며, 각각 대조군 1H 내지 1K로 지정하였다.
- [0431] 마지막 군의 2마리 마우스의 경우, 각 마우스에게 마우스 체중 1g당 10 μL의 단일 투여 부피로 DMEM 배지를 투여하였고, 이를 블랭크(blank) 대조군 1Y로 지정하였다.
- [0432] 첫 번째 투여 후 1시간, 24시간 및 48시간 후에 소동물 생체 광학 이미징 시스템인 IVIS Lumina Series III를 사용하여 각 마우스의 생체 이미징을 실시했다. D5에서, 각 군의 마우스를 죽였고, 종양 조직과 신장을 채취하여 형광 이미징을 실시했다.
- [0433] 도 1A 내지 도 1C는 각각 서로 다른 접합체를 투여한 후 1시간, 24시간 및 48시간에서 마우스의 형광 이미징 사진을 보여주며, 각각의 작은 그림에서 세 마리 마우스 중 가장 왼쪽에 있는 마우스는 블랭크 대조군 1Y에 속하는 마우스이다. 도 1A에서 볼 수 있듯이, 블랭크 대조군은 형광 신호를 나타내지 않았지만, 투여 1시간 후, 모든 시험군과 대조군의 마우스 모두 피하 종양에서 형광 신호를 보였다. 도 1B 및 도 1C에서 볼 수 있듯이, 투여 24시간 및 48시간 후, 시험군 1A 내지 1G의 마우스는 피하 종양에서 강한 형광 신호만을 보인 반면, 대조군 1H 내지 1K의 마우스는 형광 신호를 거의 나타내지 않았거나 약한 형광 신호만을 보였다. 또한, 도 1D는 D5에 마우스를 죽인 후 각 군의 마우스의 종양 조직과 신장의 형광 신호 이미징 사진을 보여주며, 여기서 블랭크는 블랭크 대조군 15Y를 나타낸다. 도 1D에서 볼 수 있듯이, 블랭크 대조군 1Y와 대조군 1H 내지 1K의 마우스는 종양 조직에서 형광 신호를 거의 보이지 않거나 약한 형광 신호만 보인 반면, 본 개시의 접합체를 투여한 시험군 1A 내지 1G의 마우스는 종양 조직에서 강한 형광 신호를 보였고, 대사 기관인 신장에서는 약한 형광 신호만을 보였다. 이는 전달기를 포함하는 본 개시의 접합체가 대조 접합체에 비해 종양 조직을 더욱 안정적이고 효율적으로 표적할 수 있음을 나타낸다.
- [0434] **실험예 2: 마우스에서의 접합체의 생체내 표적 활성**
- [0435] 이 실험예에서는, 얻어지는 접합체 AP2, AP1 및 비교 AP13 내지 비교 AP17의 마우스에서의 생체내 표적 활성을 조사하였다.
- [0436] U118MG 인간 신경교종 세포(Guangzhou Jennio Biotech Co., Ltd사에서 구입)를 10% 우태혈청(FBS, RMBIO사)이 첨가된 DMEM 완전배지(MACGENE사, 카탈로그 번호 CM15019)에서 37℃로 5% CO₂/95% 공기가 포함된 인큐베이터에

서 배양했다.

- [0437] 대수적으로 성장하는 U118MG 인간 신경교종 세포를 선택하여 (0.25% 퀘장 효소)로 분해한 다음, 세포를 수집하고 원심분리하여 상층액을 제거한 다음, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에 현탁하여 농도가 1×10^8 개 세포/mL인 세포 배양액을 얻었다.
- [0438] 실험 동물은 16마리의 12주령의 수컷 NOD-SCID 마우스(SPF(Beijing) Biotechnology Co., Ltd사에서 구입)였다. 상기 세포 배양액을 마우스 당 $100 \mu\text{L}$ 의 접종 부피로 NOD-SCID 마우스의 오른쪽 앞다리의 피하 부위에 접종했다. 즉, 각각의 마우스에 1×10^7 개의 세포를 접종했다. 주사 후 마우스를 20일 동안 보관하여 U118MG 피하 종양이 접종된 마우스를 얻었다.
- [0439] 위에서 얻은 앵타머 AP2, AP1 및 비교 AP13 내지 비교 AP17은 각각 DMEM 배지를 사용하여 0.3mg/mL 의 용액으로 제형화하였다.
- [0440] 투여는 U118MG 세포 접종 후 21일째에 시작하였고, 투여일은 D1로 지정하였다. 이 실험에서는 꼬리 정맥 주사의 투여 방법을 채택하였으며, 하루에 한 번, 총 3회 투여하였다.
- [0441] U118MG 피하 종양을 접종의 16마리의 마우스를 군당 2마리씩 8개 군으로 무작위로 나누었다.
- [0442] 2개의 마우스 군의 경우, 각 군의 각 마우스에 AP2 또는 AP1을 각각 투여했으며 단일 투여 부피는 마우스 체중 1g 당 $10 \mu\text{L}$ 였다. 단일 투여량은 3 mg/kg 으로 계산되었고, 각각 시험군 2A 및 2B로 지정하였다.
- [0443] 다른 5개 마우스 군의 경우, 각 군의 각 마우스에 각각 비교 AP13, 비교 AP14, 비교 AP15, 비교 AP16 또는 비교 AP17을 마우스 체중 1g 당 $10 \mu\text{L}$ 의 단일 투여 부피로 투여했다. 단일 투여량은 3 mg/kg 으로 계산되었고, 각각 대조군 2C 내지 2G로 지정하였다.
- [0444] 마지막 군의 마우스 2마리의 경우, 각 마우스에게 마우스 체중 1g 당 $10 \mu\text{L}$ 의 투여 부피로 DMEM 배지를 투여하였고, 이를 블랭크 대조군 2Y로 지정하였다.
- [0445] 첫 번째 투여 후 1시간, 24시간 및 48시간 후에 소동물 생체 광학 이미징 시스템 IVIS Lumina Series III를 사용하여 각 마우스의 생체 이미징을 실시했다. D6에 각 군의 마우스를 죽였고, 종양 조직과 신장을 채취하여 형광 이미징을 실시했다.
- [0446] 도 2A 내지 도 2C는 각각 서로 다른 접합체를 투여한 후 1시간, 24시간 및 48시간에서 마우스의 형광 이미징 사진을 보여주며, 각각의 작은 그림에서 세 마리 마우스 중 가장 왼쪽에 있는 마우스는 블랭크 대조군 2Y의 마우스이다. 도 2A에서 볼 수 있듯이, 블랭크 대조군은 형광 신호를 보이지 않은 반면, 투여 1시간 후, 모든 시험군과 대조군의 마우스는 모두 피하 종양에서 형광 신호를 보였다. 도 2B 및 도 2C에서 볼 수 있듯이, 투여 후 24시간 및 48시간에서 시험군 2A 및 2B의 마우스는 피하 종양에서만 강한 형광 신호를 보인 반면, 블랭크 대조군 2Y 및 대조군 2C 내지 2G의 마우스는 형광 신호를 전혀 보이지 않았다. 또한, 도 2D는 각 군의 마우스의 종양 조직과 신장의 형광 신호 이미징 사진을 보여주며, 여기서 블랭크는 블랭크 대조군 2Y를 나타낸다. 도 2D에서 볼 수 있듯이, 블랭크 대조군 2Y 및 대조군 2C 내지 2G의 마우스는 종양 조직에서 형광 신호를 전혀 보이지 않은 반면에, 본 개시의 접합체를 투여한 시험군 2A 또는 2B의 마우스는 종양 조직에서 강한 형광 신호를 보이고, 대사 기관인 신장에서는 약한 형광 신호만을 보였다. 이는 화학식 (1)로 표시한 바와 같은 서열을 포함하는 앵타머가 대조 앵타머에 비해 종양 조직을 안정적이고 효율적으로 표적할 수 있음을 나타내며, 이러한 앵타머에 의해 형성되는 전달기를 포함하는 본 개시의 접합체가 종양 조직에 효율적으로 도달할 수 있음을 나타낸다.
- [0447] **실험예 3: 마우스에서 본 개시의 접합체의 생체내 활성**
- [0448] 이 실험예에서는, 얻어지는 접합체 20의 마우스에서의 생체내 항종양 활성을 조사하였다.
- [0449] 이 실험의 마우스는 SPF Co., Ltd사에서 구입했으며, 마우스의 생식계열(germline)은 NOD-SCID이고, 등급은 SPF이며, 수컷이고, 생후 6 내지 8주였다. U118MG 신경교종 세포는 Jennio사에서 구입했다.
- [0450] 대수적으로 성장하는 U118MG 세포를 선택하여 분해한 후, 10% 우태혈청(FBS, GIBCO사)이 첨가된 DMEM 완전배지(MACGENE사, 카탈로그 번호 CM15019)에 현탁시키고 세포 밀도가 1×10^8 개 세포/mL에 도달할 때까지 배양하여 U118MG 세포가 함유된 배양액을 얻었다. U118MG 세포를 함유한 상기 배양액을 마우스 오른쪽 앞다리의 피하 부위에 접종하였고, 주입 부피는 $100 \mu\text{L}$ 였다. 각 마우스에 1×10^7 개 U118MG 신경교종 세포를 접종하였다.

- [0451] 위에서 얻은 접합체 AP2를 PBS를 이용하여 1.94 mg/mL의 용액으로 제형하였다. 복합체 20은 PBS를 이용하여 각각 0.625 mg/mL, 1.25 mg/mL 및 2.06 mg/mL(모두 올리고뉴클레오타이드의 양을 기준으로 계산함)의 용액으로 제형화하였다. MMAE(Shanghai Macklin Inc.사에서 구입, 로트 번호 C12886583)는 10%DMSO+90%PBS(부피 비율)의 혼합 용액으로 용해시켜서 0.038 mg/mL의 용액을 얻었다.
- [0452] 세포 접종일을 D1로 지정하고, 각각 D8, D12, D16 및 D20에 한 번씩 접종했다.
- [0453] 36마리의 마우스를 군당 6마리씩 6개 군으로 무작위로 나누었다.
- [0454] 블랭크 대조군 3a의 경우, PBS를 꼬리 정맥 주사로 투여했으며 단일 투여 부피는 10 μ L/g였다.
- [0455] 대조군 3b의 경우, 상기 접합체 AP2 용액을 단일 투여 부피 10 μ L/g 및 단일 투여량 15.5 mg/kg으로 꼬리 정맥 주사로 투여하였다.
- [0456] 대조군 3c의 경우, 상기 MMAE 용액을 단일 투여 부피 10 μ L/g 및 단일 투여량 0.3 mg/kg으로 꼬리 정맥 주사로 투여하였다.
- [0457] 시험군 3d의 경우, 농도가 0.625 mg/mL인 상기 접합체 20 용액을 단일 투여부피 10 μ L/g 및 단일 투여량 5 mg/kg(올리고뉴클레오타이드의 질량을 기준으로 계산)으로 꼬리 정맥 주사로 투여하였으며, 이때 함유된 MMAE의 투여량은 0.3 mg/kg이었다.
- [0458] 시험군 3e의 경우, 농도가 2.06 mg/mL인 상기 접합체 20 용액을 단일 투여 부피 10 μ L/g 및 단일 투여량 16.5 mg/kg(올리고뉴클레오타이드의 질량을 기준으로 계산)으로 꼬리 정맥 주사로 투여하였으며, 이때 함유된 MMAE의 투여량은 1 mg/kg이었다.
- [0459] 시험군 3f의 경우, 농도가 1.25 mg/mL인 상기 접합체 20 용액을 단일 투여 부피 5 μ L/g 및 단일 투여량 5 mg/kg(올리고뉴클레오타이드의 질량을 기준으로 계산)으로 피하 주사로 투여하였으며, 이때 함유된 MMAE의 투여량은 0.3 mg/kg이었다.
- [0460] [3] 검출
- [0461] 종양의 긴 직경과 짧은 직경은 생체의 측정 방법으로 측정했다. 종양 부피는 다음 식 $1/2(\text{장경} \times \text{단경}^2)$ 에 따라 계산했다. D8에서 첫번째 투여하기 전에, 각 군의 종양 부피를 측정하고 평균 종양 부피를 기록했다. 각 군의 종양 부피는 D16부터 매주 2회 측정하여 기록했다.
- [0462] 도 3은 각 마우스 군에서 시간에 따른 종양 부피의 변화를 보여주는 선 그래프이다. 도 3에서 보듯이, PBS만 투여한 블랭크 대조군 3a와 AP2를 투여한 대조군 3b에서 종양 부피가 급격히 증가했다. MMAE만 투여한 대조군 3c에서는 종양 부피의 증가 속도가 감소하여, MMAE 자체가 종양 증식을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다. 또한, 대조군 3c와 유사한 MMAE 함량을 가진 시험군 3d 및 3f의 종양 부피는 시험 기간 동안 대조군 3c보다 유의하게 작아서, MMAE만을 투여한 대조군 3c보다 더욱 우수한 항종양 활성을 보였다. 이는 본 개시에 의해 제공되는 접합체가 MMAE를 종양 조직에 효과적으로 전달함으로써 종양 표적화 능력을 보이고 다른 조직에서 MMAE 분자의 분포로 인한 독성 위험을 감소시킬 수 있으며, 다양한 투여 방식이 종양 증식을 효과적으로 억제할 수 있음을 나타낸다. 또한, 시험군 3e의 투여량을 더욱 증가시키면 시험 기간 동안 종양 부피가 거의 증가하지 않아 더욱 우수한 항종양 효과를 나타낼 수 있다.
- [0463] 상기 결과는 본 개시에 의해 제공되는 접합체가 종양에 대한 억제 효과를 갖는 소분자 약물기를 종양 조직으로 효과적으로 전달함으로써 우수한 항종양 활성 및 용량-의존적 효과를 보임을 나타낸다.
- [0464] **실험예 4: U118MG 세포 동소 종양 모델 마우스에서의 접합체의 생체내 분포**
- [0465] U118MG 인간 신경교종 세포(Guangzhou Jennio Biotech Co., Ltd사에서 구입)를 10% 우태혈청(FBS, RMBIO사)이 첨가된 DMEM 완전배지(MACGENE사, 카탈로그 번호 CM15019)에서 37°C로 5% CO₂/95% 공기가 포함된 인큐베이터에서 배양했다.
- [0466] 세포를 0.25% 트립신 효소로 분해하고 수집했다. 상층액을 흡인하고 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에 현탁하여 농도가 4×10^7 개 세포/mL인 세포 배양액을 얻었다.
- [0467] 실험 동물은 6마리의 12주령의 수컷 NOD-SCID 마우스(SPF(Beijing) Biotechnology Co., LTD.사에서 구입)였다. 상기 세포 배양액을 NOD-SCID 마우스에 접종했다. 세포 배양액은 마우스 측뇌실 주사 방법으로 마우스의 오른쪽

선조체에 주입했으며, 위치는 AP(전후): 1mm, ML(내측): 1.5mm, DV(배측): 3.5mm였고, 주입 부피는 10 μ L였다. 즉, 각 마우스에게 4X10⁵개의 세포를 접종했다. 마우스는 주입 후 14일 동안 보관했다.

[0468] AP2와 비교 AP19를 1XDMEM 배지를 이용하여 용해시켜서 0.3 mg/mL(엡타머에 따라 계산)의 용액을 얻었다. 위에 설명한 바와 같은 4마리의 마우스를 취하고 각각 꼬리 정맥 주사로 AP2와 비교 AP19 용액을 주입했다. 모든 동물에의 투여량은 체중을 기준으로 계산하였으며, 투여 부피는 모두 10 μ L/g이고, 투여량은 동물당 3 mg/kg(엡타머 양을 기준으로 계산)이며, 각 군의 2마리 마우스에게 투여하여 각각 시험군 4a와 대조군 4b로 지정하였다.

[0469] 두 마리의 마우스 각각에게 10 μ L의 DMEM 배지를 주입하였고, 이를 블랭크 대조군 4Y로 지정하였다.

[0470] 투여 24시간 후, 각 군의 한 마리의 마우스를 각각 죽이고 뇌 조직을 채취하였고, 나머지 마우스는 투여 48시간 후 죽이고 뇌 조직을 채취하였다. 마우스의 뇌 조직은 채취하여 IVIS Lumina Series III에서 형광 이미지를 실시했다. 그 결과는 도 4에 나타낸다.

[0471] 도 4는 블랭크 대조군 4Y, 시험군 4a 및 대조군 4b를 투여한 후 24시간 및 48시간에서 확립된 U118MG 동소 중앙 모델 마우스의 뇌 조직에 대한 형광 이미징 사진을 보여준다. 그 중, 블랭크는 블랭크 대조군을 나타내고, Ith는 척추강내 주사를 나타내고, iv는 꼬리 정맥내 주사를 나타낸다. 도 4에서 볼 수 있듯이, 비교 AP19를 투여한 블랭크 대조군과 대조군 4b는 뇌에서 형광 신호를 전혀 보이지 않아 뇌 동소 신경교종에 대한 유의한 표적 효과가 없음을 확인하였다. 반면, 본 개시에 의해 제공되는 접합체를 투여한 시험군 4a는 24시간 및 48시간에서 접종 중앙 위치에서 강한 형광 신호를 보였으므로, 접합체 AP2가 꼬리 정맥 주사를 통해 투여될 때에도 여전히 뇌 신경교종에 도달하여 효과적으로 뇌 신경교종을 표적할 수 있음을 확인하였다. 이는 본 개시에 의해 제공되는 접합체가 전신 투여의 경우에도 혈액-뇌장벽(BBB)을 침투하여 뇌 신경교종에 진입함으로써, 우수한 표적 효과와 약물 효능(druggability)을 보임을 나타낸다.

[0472] **실험예 5: U118MG 세포 동소 중앙 모델 마우스에서의 접합체의 생체내 활성**

[0473] 루시페라제(*Photinus pyralis*) 리포터 유전자를 발현하는 U118MG 인간 신경교종 세포(이하 U118MG-luc 인간 신경교종 세포라함, Cobioer Biosciences Co., Ltd.사에서 구입))를 실험예 4의 방법에 따라 배양하였다. 대수적으로 성장하는 U118MG-luc 인간 신경교종 세포를 선택하여 0.25% 체장 효소로 분해시키고, 세포를 수집하여 원심분리 후 상층액을 흡인한 다음, 세포를 무혈청 DMEM 배지에 현탁시켜서 세포 밀도가 4X10⁷개 세포/mL인 세포 배양액을 얻었다.

[0474] 실험 동물은 24마리의 12주령의 수컷 Balb/C-nude 마우스(SPF(Beijing) Biotechnology Co., LTD.사에서 구입)였다. 상기 세포 배양액을 Balb/C-nude 마우스의 선조체에 접종했다. 세포 배양액을 마우스 선조체 주사 방법으로 마우스의 오른쪽 선조체에 주입했고, 위치는 AP(전후): 1mm, ML(내측): 1.5mm, DV(배측): 3.5mm였으며, 주입 부피는 10 μ L였다. 즉, 각각의 마우스에게 4X10⁵개의 세포를 접종했다. 마우스는 동소 중앙 주입 후 14일 동안 보관했다.

[0475] 접합체 20을 1XDMEM 배지(M&C Gene Technology(BEIJING) LTD.사에서 구입, 로트 번호. K1902200)를 사용하여 용해시켜서 농도 1 mg/mL(엡타머에 따라 계산)의 접합체 용액에 얻었다. 접합체 21과 비교 접합체 24를 각각 용해시켜서 농도 0.8 mg/mL(엡타머에 따라 계산)의 접합체 용액을 얻었다.

[0476] 동소 중앙 접종 후 15일째에, 각 마우스를 취하여 소동물 생체 광학 이미징 시스템 IVIS Lumina Series III를 사용하여 생체 이미지를 실시했다. 뇌의 형광 강도에 따라 마우스를 군당 6마리씩 군들로 나누고, 투여일을 D1(즉, 실험의 첫날, 그 다음 실험의 4일째와 8일째에 해당하는 D4, D8 등,)로 지정했다.

[0477] 생체 이미징 방법: 각 마우스에게 체중 농도가 15 mg/mL인 D-플루오레세인 칼륨염 용액(Yeasen Biotechnology(Shanghai) Co., Ltd.사에서 구입) 10 μ L/g를 복강내 주사하였고, 주사후 10분에 생체 이미징(IVIS® Lumina III 소동물 생체 이미징 시스템)을 수행하였다. 이미징 후, 마우스 뇌의 형광 영역(ROI)을 동그라미로 표시하고 소프트웨어로 형광 강도(Radiance)를 측정했다. 이러한 조건하에서, U118MG-luc 인간 신경교종 세포에서 발현되는 루시페라제(*Photinus pyralis*) 리포터 유전자는 형광 반응을 생성할 수 있으므로, 형광 강도는 신경교종 세포의 증식의 수를 반영할 수 있다. 형광 강도가 높을수록 신경교종 세포의 수가 더 많다.

[0478] 실험에서, 각 군의 마우스는 각각 D1, D4, D8 및 D12에서 피하 주사로 투여받았다. 투여 전에 마우스의 체중을 측정하고 체중에 따라 투여했다.

[0479] 시험군 5a의 경우, 각 마우스에게 마우스 체중 1g당 5 μ L의 단일 투여 부피로 접합체 20을 투여했다. 단일 투

여량은 5 mg/kg으로 계산되었으며, 이때 포함된 MMAE의 투여량은 0.3 mg/kg였다.

- [0480] 시험군 5b의 경우, 각 마우스에게 마우스 체중 1g당 5 μ L의 단일 투여 부피로 접합체 21을 투여했다. 단일 투여량은 4 mg/kg으로 계산되었으며, 이때 포함된 MMAE의 투여량은 0.3 mg/kg였다.
- [0481] 시험군 5c의 경우, 각 마우스에게 마우스 체중 1g당 5 μ L의 단일 투여 부피로 접합체 24를 투여했다. 단일 투여량은 4 mg/kg으로 계산되었으며, 이때 포함된 MMAE의 투여량은 0.3 mg/kg였다.
- [0482] 블랭크 대조군의 경우, 각 마우스에게 DMEM 배지를 투여하였으며 단일 투여부피는 마우스 체중 1g당 5 μ L였다.
- [0483] 상기 방법에 따라 각 군의 마우스를 각각 D1, D22, D31 및 D39에서 생체 이미징 분석하였고 형광 강도를 측정하였다. 그 결과를 도 5에 나타낸다.
- [0484] 도 5는 본 개시에 의해 제공되는 접합체 또는 대조 화합물을 투여한 후 U118MG 동소 종양 모델 마우스에서 시간에 따른 종양 형광 강도의 변화를 보여주는 선 그래프이다. 도 5에서 볼 수 있듯이, 관찰 시간이 길어짐에 따라, 투여 후 블랭크 대조군과 대조군의 종양의 형광 강도(Radiance)가 D1과 비교하여 유의하게 증가하였는데, 이는 U118MG 인간 신경교종 세포의 수가 현저히 증가하였음을 나타낸다. 이와 대조적으로, 본 개시에 의해 제공되는 접합체를 투여한 시험군 5a 및 5b에서의 종양의 형광 강도는 현저히 감소하였고, 감소의 정도는 대조군과 비교하여 최대 1 자릿수, 심지어는 2 자릿수 이상일 수 있었는데, 이는 U118MG 인간 신경교종 세포의 수가 유의하게 감소하여, 실험 시작 시와 비교하여 초기 수의 1/10로 감소하였고, 심지어 대조군의 1% 미만으로 감소하였음을 나타낸다. 본 개시에 의해 제공되는 접합체는 피하 투여만으로도 혈액-뇌 장벽을 효과적으로 침투하고, 뇌 교종을 효과적으로 표적하여 진입하고, 종양 성장에 대해 우수한 억제 효과를 나타냄으로써, 양호한 치료 순응도 및 종양을 효율적으로 억제하는 높은 약물 효능을 보였다.
- [0485] **실험예 6: 마우스에서 U118MG 피하 종양에 대한 접합체의 생체내 억제 활성**
- [0486] U118MG 인간 신경교종 세포(GuangZhou Jennio Biotech Co., Ltd사에서 구입)를 실험예 2의 방법에 따라 배양했다. 대수적으로 성장하는 U118MG 인간 신경교종 세포를 선택하여 0.25% 트립신 효소로 분해한 다음, 세포를 수집하고 원심분리하여 상층액을 제거한 다음, 세포를 무혈청 DMEM 배지에 현탁하여 농도가 1×10^8 개 세포/mL인 세포 배양액을 얻었다.
- [0487] 실험 동물은 36마리의 12주령의 수컷 NOD-SCID 마우스(SPF(Beijing) Biotechnology Co., Ltd사에서 구입)였다. 상기 세포 배양액을 마우스 당 100 μ L의 접종 부피로 NOD-SCID 마우스의 오른쪽 등의 피하 부위에 접종했다. 즉, 각 마우스에게 1×10^7 개의 세포를 접종했다. 마우스는 주사 후 7일 동안 보관했다.
- [0488] 접합체 20은 무혈청 DMEM 배지를 사용하여 용해시켜서 농도 1 mg/mL(애타머에 따라 계산)의 접합체 용액을 얻었다. 접합체 21, 접합체 22, 접합체 23을 각각 용해시켜서 농도 0.8 mg/mL(애타머에 따라 계산)의 접합체 용액을 얻었다. MMAE는 10% DMSO + 90% 무혈청 DMEM 배지(부피비)를 사용하여 용해시켜서 농도 0.06 mg/mL의 용액을 얻었다.
- [0489] 투여는 U118MG 세포 접종 후 7일째에 시작하였고, 투여일은 D8로 지정하였다. 이 실험에서는 복부내 피하 투여 방법을 채택하였으며, D8, D12, D16 및 D20에 1회씩 총 4회 투여하였다.
- [0490] 블랭크 대조군 6a의 경우, 각 마우스에게 DMEM을 투여하였으며 단일 투여 부피는 마우스 체중 1g당 5 μ L였다.
- [0491] 대조군 6b의 경우, 각 마우스에게 MMAE를 마우스 체중 1g당 5 μ L의 단일 투여 부피로 투여했다. 단일 투여량은 0.3 mg/kg으로 계산되었다.
- [0492] 시험군 6c의 경우, 각 마우스에게 접합체 20을 마우스 체중 1g당 5 μ L의 단일 투여 부피로 투여했다. 단일 투여량은 5 mg/kg으로 계산되었으며, 이때 포함된 MMAE의 투여량은 0.3 mg/kg였다.
- [0493] 3개의 마우스 군의 경우, 각 마우스에게 마우스 체중 1g당 5 μ L의 단일 투여 부피로 접합체 21, 접합체 22 또는 접합체 23을 각각 투여했다. 단일 투여량은 4 mg/kg이고, 이때 포함된 MMAE의 투여량은 0.3 mg/kg였다. 이들 마우스는 각각 시험군 6d, 6e 및 6f로 지정하였다.
- [0494] 종양 부피는 D16, D20, D25, D29, D33, D36, D41, D48 및 D60에 측정했다. 종양의 긴 직경과 짧은 직경은 생체 외 측정 방법으로 측정했다. 종양 부피는 다음 식 $1/2(\text{장경} \times \text{단경}^2)$ 에 따라 계산했다. 실험의 종료 시, D60에서 종양 조직을 채취하여 무게를 측정했다. 도 6은 서로 다른 접합체를 투여한 후 서로 다른 날에서 마우스의

종양 부피 변화를 시간 경과에 따라 보여주는 선 그래프이다. 도 6에서 볼 수 있듯이, 대조군 6b 또는 블랭크 대조군과 비교했을 때, 본 개시의 접합체를 투여한 시험군 6c 내지 6f의 마우스의 종양 부피 및 종양 무게는 유의하게 감소하였다. 상기 결과는 본 개시의 접합체가 종양 조직에 효과적으로 도달하고 우수한 항종양 활성을 나타낼 수 있음을 나타낸다.

[0495] **실험예 7: U118MG 피하 종양 모델 마우스에 대한 접합체의 장기 투여의 생체내 활성**

[0496] 실험예 2의 방법에 따라 U118MG 피하종양을 접종한 마우스 42마리를 얻었으며, 주사 후 마우스를 보관하였다.

[0497] MMAE를 10% DMSO + 90% 무혈청 DMEM 배지(부피비)를 이용하여 용해시켜서 0.03 mg/mL 및 0.01 mg/mL 농도의 용액을 얻었다. 접합체 21을 용해시켜서 0.5 mg/mL 및 0.165 mg/mL (엡타머에 따라 계산) 농도의 용액을 얻었다. 비교 접합체 25를 용해시켜서 0.5 mg/mL 및 0.165 mg/mL (엡타머에 따라 계산) 농도의 용액을 얻었다.

[0498] U118MG 세포의 접종 후 7일째에, 모든 마우스를 각 군당 6마리씩 7개 군으로 무작위로 나누고, 각 군의 마우스에 투여를 실시했다. 투여일은 D8로 지정했다. 이 실험에서는 복부내 피하 투여의 투여 방법을 채택했다. D8, D11, D15, D29, D32 및 D36에 한번씩 총 6회 투여했다. 투여 전에 마우스의 체중을 측정하고, 투여량은 체중에 따라 계산했다.

[0499] 블랭크 대조군의 경우, 각 마우스에게 DMEM 배지를 투여하였으며 단일 투여부피는 마우스 체중 1g당 10 μ L였다.

[0500] 시험군 7a의 경우, 각 마우스에 MMAE를 0.01 mg/ml 농도로 투여하였고 단일 투여 부피는 마우스 체중 1g당 10 μ L였다. 단일 투여량은 0.1 mg/kg으로 계산되었다.

[0501] 시험군 7b의 경우, 각 마우스에 접합체 21을 0.165 mg/ml 농도로 투여하였고, 단일 투여 부피는 마우스 체중 1g당 10 μ L였다. 단일 투여량은 1.65 mg/kg(해당 MMAE 투여량은 0.1 mg/kg)으로 계산되었다.

[0502] 시험군 7c의 경우, 각 마우스에 접합체 25를 0.165 mg/ml 농도로 투여하였고, 단일 투여 부피는 마우스 체중 1g당 10 μ L였다. 단일 투여량은 1.65 mg/kg(해당 MMAE 투여량은 0.1 mg/kg)으로 계산되었다.

[0503] 시험군 7d의 경우, 각 마우스에 MMAE를 0.03 mg/ml 농도로 투여하였고 단일 투여 부피는 마우스 체중 1g당 10 μ L로 계산되었다. 단일 투여량은 0.3 mg/kg으로 계산되었다.

[0504] 시험군 7e의 경우, 각 마우스에 접합체 21을 0.5 mg/ml 농도로 투여하였고, 단일 투여 부피는 마우스 체중 1g당 10 μ L였다. 단일 투여량은 5 mg/kg(해당 MMAE 투여량은 0.3 mg/kg)으로 계산되었다.

[0505] 시험군 7f의 경우, 각 마우스에 접합체 25를 0.5 mg/ml 농도로 투여하였고, 단일 투여 부피는 마우스 체중 1g당 10 μ L였다. 단일 투여량은 5 mg/kg(해당 MMAE 투여량은 0.3 mg/kg)으로 계산되었다.

[0506] 종양 부피는 D1, D9, D16, D19, D21, D24, D26, D29, D32, D36, D39, D43, D47, D53, D57, D60, D64, D67, D71, D74, D78, D81, D84, D88, D92, D95 및 D99에 측정하였다. 그 중, 블랭크 대조군은 D53에 측정하였고, 시험군 7a 및 7b와 대조군 7c는 D60에 측정하였고, 그 후 실험을 종료하였다.

[0507] 종양의 긴 직경 및 짧은 직경은 체외 측정 방법으로 측정하였다. 종양 부피는 다음식 $1/2(\text{장경} \times \text{단경}^2)$ 에 따라 계산하였다. 실험 종료 시, 각 군의 종양 조직을 채취하여 무게를 측정하고 평균값을 구하였다. 결과는 도 7에 나타낸다.

[0508] 도 7은 본 개시에 의해 제공되는 다양한 농도의 접합체 또는 대조 화합물을 투여한 후 U118MG 피하 종양 모델 마우스에서 시간에 따른 종양 부피의 변화를 보여주는 선 그래프이다.

[0509] 도 7의 결과에서 보듯이, 블랭크 대조군에서는 종양 부피가 급격히 증가하였지만, MMAE만을 투여한 시험군에서는 종양 부피의 증가율이 약간 감소하여 MMAE 자체가 종양 증식을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0510] 또한, 시험 기간 동안 시험군 7b의 종양 부피는 동등한 MMAE 함량을 가진 시험군 7a 및 대조군 7c의 종양 부피보다 유의하게 작았고, 시험 기간 동안 시험군 7e의 종양 부피는 동등한 MMAE 함량을 가진 시험군 7d 및 대조군 7f의 종양 부피보다 유의하게 작았으므로, MMAE만을 투여한 시험군 7a 및 7d 및 비교 접합체 25를 투여한 군보다 우수한 항종양 활성을 보였다. 실험이 종료된 후, 본 개시의 접합체를 투여한 마우스의 종양 무게도 MMAE 군 및 대조군의 종양 무게보다 유의하게 낮았다. 상기 결과는 본 개시에 의해 제공되는 접합체가 MMAE를 종양 조직에 효과적으로 전달함으로써 종양 표적화 능력을 나타내고 다른 조직에서 MMAE 분자의 분포로 인한 독성 위험을

감소시키며, 용량 의존성과 우수한 항종양 효과를 보임을 나타낸다.

- [0511] 상기 결과는 본 개시에 의해 제공되는 접합체가 종양 억제 효과를 갖는 소분자 약물기를 종양 조직으로 효과적으로 표적 전달함으로써, 우수한 항종양 활성 및 용량 의존적 효과를 보임을 나타낸다.
- [0512] **실험예 8: U118MG 피하 종양 모델 마우스에 대한 접합체의 생체내 활성**
- [0513] 실험예 2의 방법에 따라 U118MG 피하종양을 접종한 마우스 42마리를 얻었으며, 주사 후 마우스를 보관하였다.
- [0514] MMAE를 10% DMSO + 90% 무혈청 DMEM 배지(부피비)를 사용하여 용해시켜서 0.02 mg/mL 농도의 용액을 얻었다. 접합체 20 및 비교 접합체 25를 용해시켜서 0.33 mg/mL(엡타머에 따라 계산) 농도의 용액을 얻었다. 접합체 21 및 접합체 23을 용해시켜서 0.26 mg/mL(엡타머에 따라 계산) 농도의 용액을 얻었다. 접합체 26을 용해시켜서 0.23 mg/mL (엡타머에 따라 계산) 농도의 용액을 얻었다.
- [0515] U118MG 세포의 접종 후 7일째에, 상기 접종한 마우스를 군당 6마리씩 군들로 나누고 각 마우스 군에 투여를 실시하였다. 투여일은 D8로 지정하였다. 투여 전에 마우스의 체중을 측정하고 투여 부피는 동물당 20g의 평균 체중에 따라 계산하였다.
- [0516] 이 실험에서는 복부내 피하 투여의 투여 방법을 채택하였으며, D8, D12, D15 및 D19에 한 번씩 총 4회 투여하였다.
- [0517] 블랭크 대조군의 경우, 각 마우스에게 DMEM 배지를 단일 투여 부피 100 μ L로 투여했다.
- [0518] 시험군 8a의 경우, 각 마우스에게 MMAE를 단일 투여 부피 100 μ L로 투여했다. 단일 투여량은 0.1 mg/kg으로 계산되었다.
- [0519] 시험군 8b의 경우, 각 마우스에게 접합체 20을 100 μ L의 단일 투여 부피로 투여했다. 단일 투여 부피는 1.65 mg/kg으로 계산되었다.
- [0520] 시험군 8c의 경우, 각 마우스에게 비교 접합체 25를 100 μ L의 단일 투여 부피로 투여했다. 단일 투여량은 1.65 mg/kg으로 계산되었다.
- [0521] 시험군 8d의 경우, 각 마우스에게 접합체 21을 100 μ L의 단일 투여 부피로 투여했다. 단일 투여량은 1.32 mg/kg으로 계산되었다.
- [0522] 시험군 8e의 경우, 각 마우스에게 접합체 23을 100 μ L의 단일 투여 부피로 투여했다. 단일 투여량은 1.32 mg/kg으로 계산되었다.
- [0523] 시험군 8f의 경우, 각 마우스에게 접합체 26을 100 μ L의 단일 투여 부피로 투여했다. 단일 투여량은 1.17 mg/kg으로 계산되었다. 상기 8b 내지 8f 군의 투여량은 포함된 MMAE의 투여량 0.1 mg/kg에 해당했다.
- [0524] 종양 부피는 D1, D9, D16, D19, D22, D26, D30, D36, D40, D43, D47, D50, D54, D57, D61, D64, D68 및 D71에 측정하였다. 이 중, 블랭크 대조군은 D54에 측정하였고, 8a 군(MMAE만 투여)은 D64에 측정한 후 실험을 종료하였다.
- [0525] 종양의 장경과 단경은 체외 측정법으로 측정하였다. 종양 부피는 공식 $1/2(\text{장경} \times \text{단경}^2)$ 에 따라 계산하였다. 실험 종료 시, 각 군의 종양 조직을 채취하여 무게를 측정하였다. 결과는 도 8에 나타낸다.
- [0526] 도 8은 각 마우스 군에서 시간에 따른 종양 부피의 변화와 D72에서 종양 무게를 나타내는 선 그래프이다. 도 8의 결과에서 보듯이, 블랭크 대조군의 종양 부피는 급격히 증가한 반면, 다른 군의 종양 부피 증가율은 약간 감소하였고; MMAE만을 투여한 시험군 8a 및 대조군 8c와 비교했을 때, 본 개시의 접합체를 MMAE의 단일 투여량인 0.1mg/kg에 해당하는 투여량으로 투여한 시험군의 종양 부피 증가율은 모두 유의하게 더 감소하였다. 또한, 실험 종료 시점 D72에서, 접합체 20, 접합체 21, 접합체 23 및 접합체 26 군의 종양 무게는 시험군 8a의 종양 무게에 비해 최소한 58% 감소하여 더욱 우수한 항종양 효과를 보였다.
- [0527] **실험예 9: A549 피하 종양 모델 마우스에 대한 접합체의 생체내 활성**
- [0528] A549 인간 폐선암 세포(GuangZhou Jennio Biotech Co., Ltd사에서 구입)를 10% FBS(Gibco사, 카탈로그 번호 10099-141)를 함유한 DMEM 완전 배지(MACGENE사, 카탈로그 번호 CM15019)에서 37℃로 5% CO₂/95% 공기가 함유된 인큐베이터에서 배양했다. 세포를 0.25% 트립신 효소로 분해하고 수집했다. 상층액을 흡인하고, 세포를 무혈청

DMEM 배지에 재현탁하여 세포 밀도가 1×10^8 개 세포/mL인 세포 배양액을 얻었다.

- [0529] 실험에 2의 방법에 따라 A549 피하종양을 접종한 마우스 30마리를 얻었으며, 주사 후 마우스를 보관하였다.
- [0530] 접합체 20 및 접합체 21을 무혈청 DMEM 배지를 사용하여 용해시켜서 농도 1 mg/mL(애타머에 따라 계산)의 접합체 용액을 얻었다. 비교 접합체 24를 용해시켜서 농도 0.8 mg/mL(애타머에 따라 계산)의 접합체 용액을 얻었다. MMAE를 10% DMSO + 90% 무혈청 DMEM 배지(부피비)를 사용하여 용해시켜서 농도 0.06 mg/mL의 용액을 얻었다.
- [0531] A549 인간 폐암세포의 접종 후 7일째에, 모든 마우스를 각 군당 6마리씩 군들로 나누고 각 마우스에게 투여를 실시하였다. 투여일은 D8로 지정하였다. 투여 전에 마우스의 체중을 측정하고, 투여 부피는 마우스 체중에 따라 계산하였다.
- [0532] 각 군의 마우스에게 D8, D12, D15 및 D19에 한 번씩, 총 4회 투여를 실시했다.
- [0533] 블랭크 대조군 9a의 경우, 각 마우스에게 DMEM을 마우스 체중 1g당 5 μ L의 단일 투여 부피로 투여하였다.
- [0534] 대조군 9b의 경우, 각 마우스에게 MMAE를 마우스 체중 1g당 5 μ L의 단일 투여 부피로 투여했다. 단일 투여량은 0.3 mg/kg으로 계산되었다.
- [0535] 시험군 9c의 경우, 각 마우스에게 접합체 20을 마우스 체중 1g당 5 μ L의 단일 투여 부피로 투여했다. 단일 투여량은 5 mg/kg으로 계산되었으며, 이때 포함된 MMAE의 투여량은 0.3 mg/kg였다.
- [0536] 시험군 9d의 경우, 각 마우스에게 접합체 21을 마우스 체중 1g당 5 μ L의 단일 투여 부피로 투여했다. 단일 투여량은 5 mg/kg으로 계산되었으며, 이때 포함된 MMAE의 투여량은 0.3 mg/kg였다.
- [0537] 시험군 9e의 경우, 각 마우스에게 비교 접합체 24를 마우스 체중 1g당 5 μ L의 단일 투여 부피로 투여했다. 단일 투여량은 5 mg/kg으로 계산되었으며, 이때 포함된 MMAE의 투여량은 0.3 mg/kg였다.
- [0538] 각 군의 마우스에게 D46, D50 및 D54에 1회 투여하였으며 단일 투여 부피는 마우스 체중 1g당 10 μ L였다. 단일 투여량에 포함된 MMAE의 투여량은 0.6 mg/kg인 것으로 계산되었다.
- [0539] 종양 부피는 D1, D9, D16, D19, D22, D26, D30, D36, D40, D43, D47, D50, D54 및 D57에 측정했다. 블랭크 대조군은 D50에 측정한 후, 실험을 종료했다.
- [0540] 종양의 장경과 단경은 체외 측정 방법으로 측정하였다. 종양의 부피는 다음 식 $1/2(\text{장경} \times \text{단경}^2)$ 에 따라 계산하였다. 결과는 도 9에 나타낸다.
- [0541] 도 9는 본 개시에 의해 제공되는 접합체 또는 대조 화합물을 다양한 농도로 투여한 후 A549 피하 종양 모델 마우스에서 시간에 따른 종양 부피의 변화를 보여주는 선 그래프이다. 도 9의 결과에서 보듯이, 블랭크 대조군 마우스의 종양 부피는 급격히 증가한 반면, 다른 군에서 종양 부피의 증가율은 모두 약간 감소했고, 각 시간대에서, 접합체 20 및 21을 투여한 마우스의 종양 부피는 대조군 9b 및 9e의 종양 부피보다 작았다. 상기 결과는 본 개시의 접합체가 A549 폐암의 종양 조직을 효과적으로 표적하여 도달할 수 있으며 우수한 항종양 활성을 보일 수 있음을 나타낸다.
- [0542] 본 개시의 바람직한 구현예가 위에서 상세히 설명되었지만, 본 개시는 상기 구현예의 구체적인 세부 사항으로 제한되지 않는다. 본 개시의 기술적 해결방안의 다양한 간단한 변형은 본 개시의 기술적 개념의 범위 내에서 이루어질 수 있으며, 이러한 간단한 변형은 본 개시의 범위 내에 있다.
- [0543] 상기 구현예에서 설명된 각각의 구체적인 기술적 특징은 모순이 발생하지 않는 한 임의의 적절한 방식으로 결합될 수 있다는 점에 유의해야 한다. 불필요한 반복을 피하기 위해, 다양한 가능한 조합은 본 개시에서 더 이상 설명되지 않는다.
- [0544] 또한, 본 개시의 다양한 구현예는 본 개시의 사상을 벗어나지 않는 한 임의로 결합될 수 있으며, 이러한 결합 역시 본 개시의 개시로 간주되어야 한다.

도면

도면1a

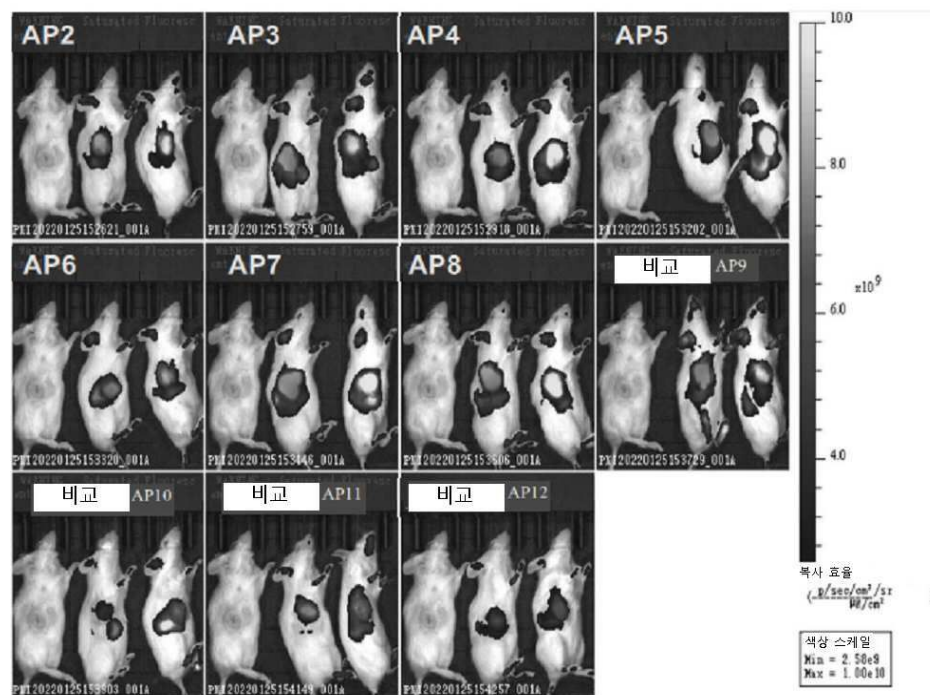


Figure 1A

도면1b

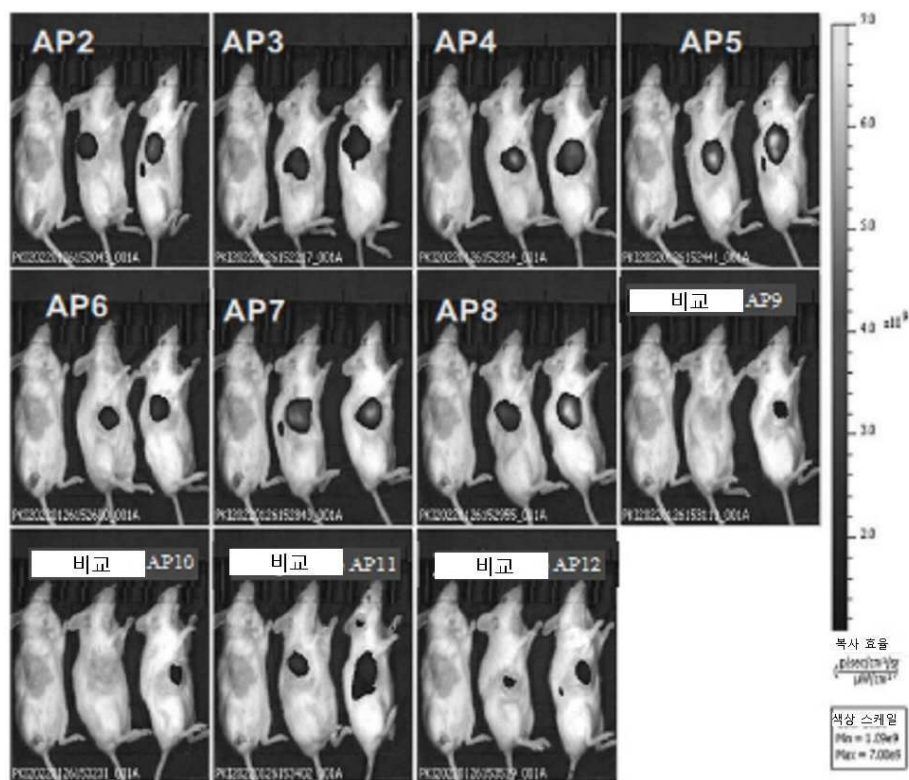


Figure 1B

도면1c

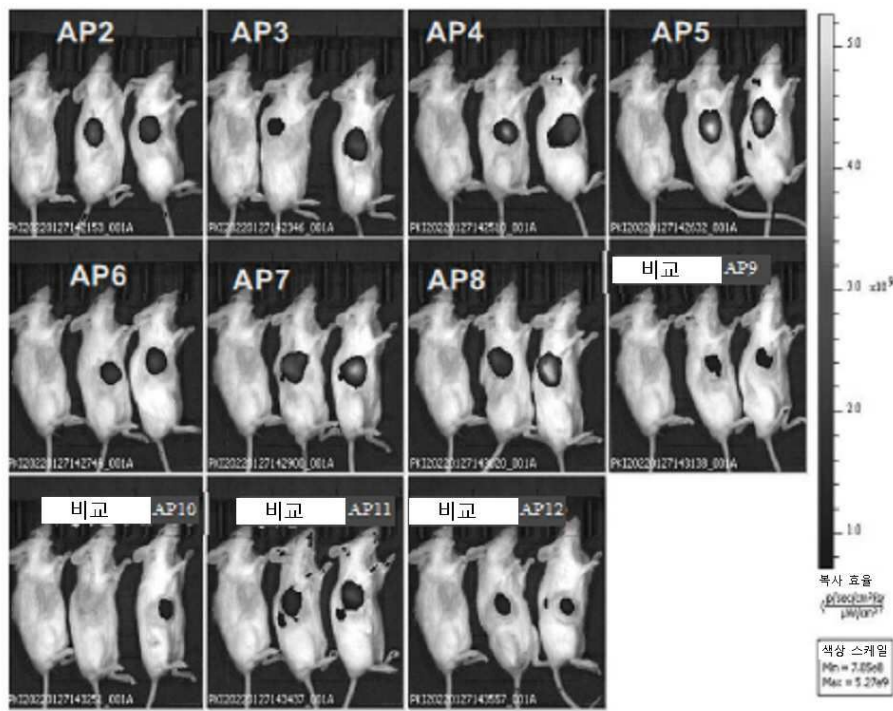


Figure 1C

도면1d

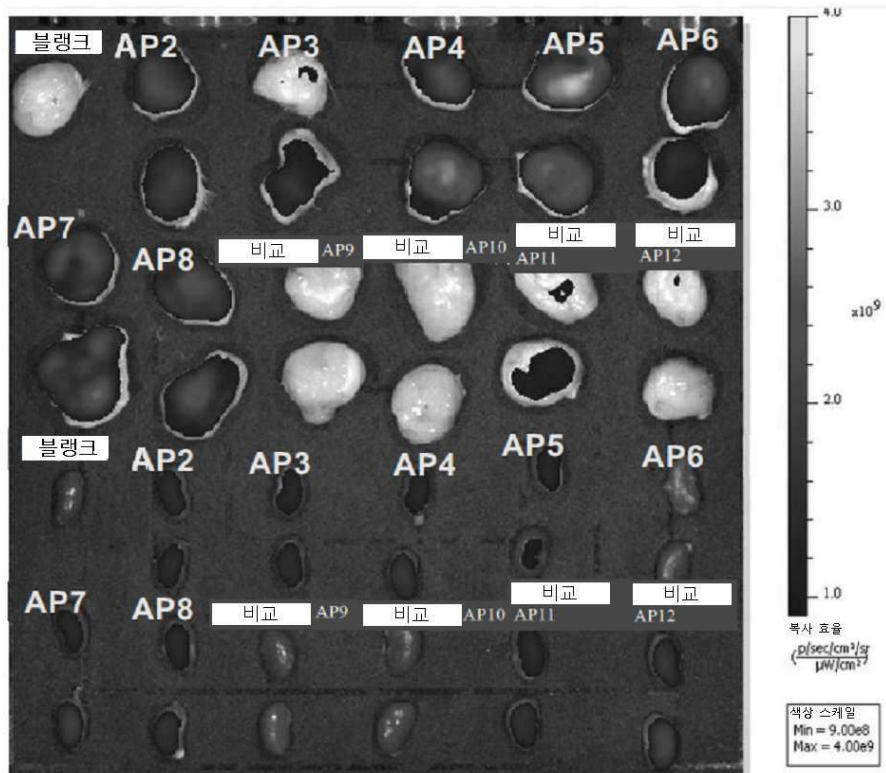


Figure 1D

도면2a

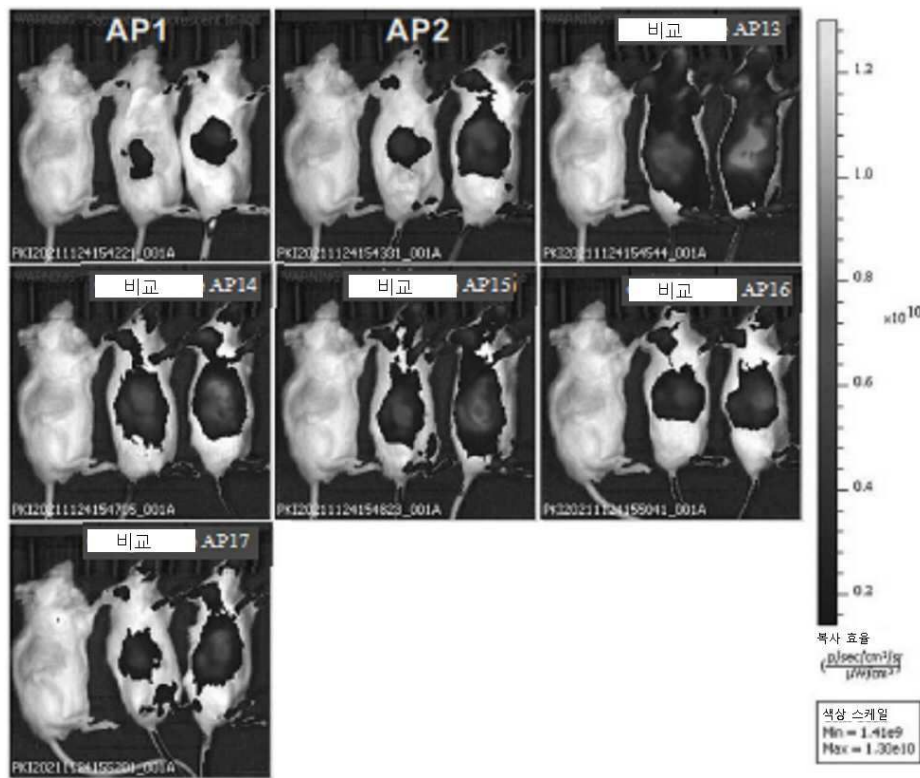


Figure 2A

도면2b

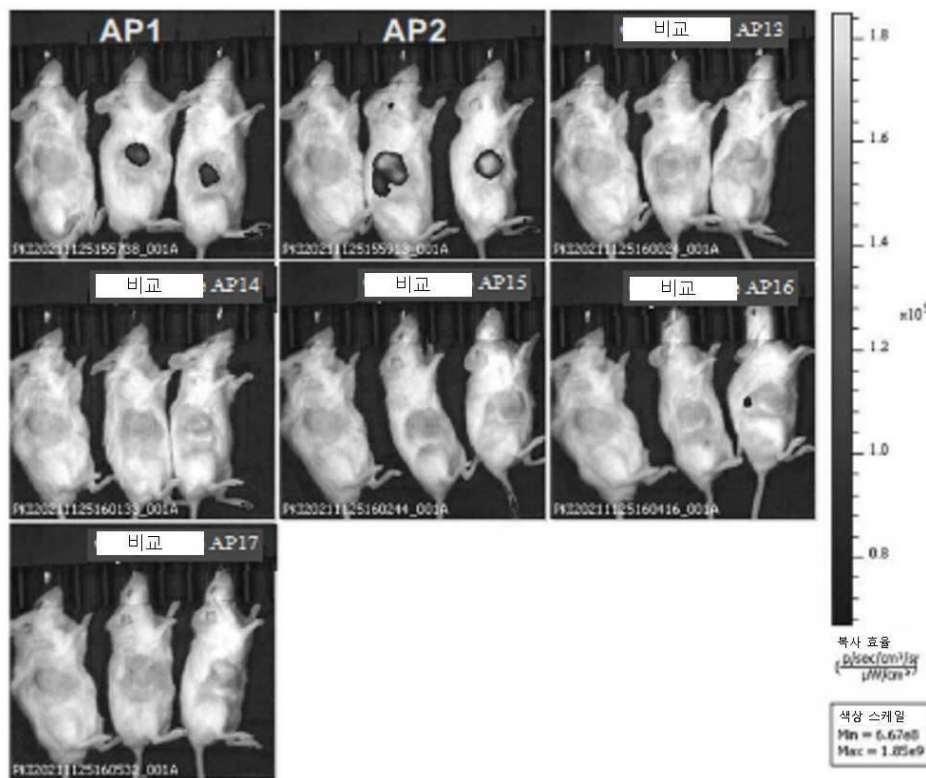


Figure 2B

도면2c

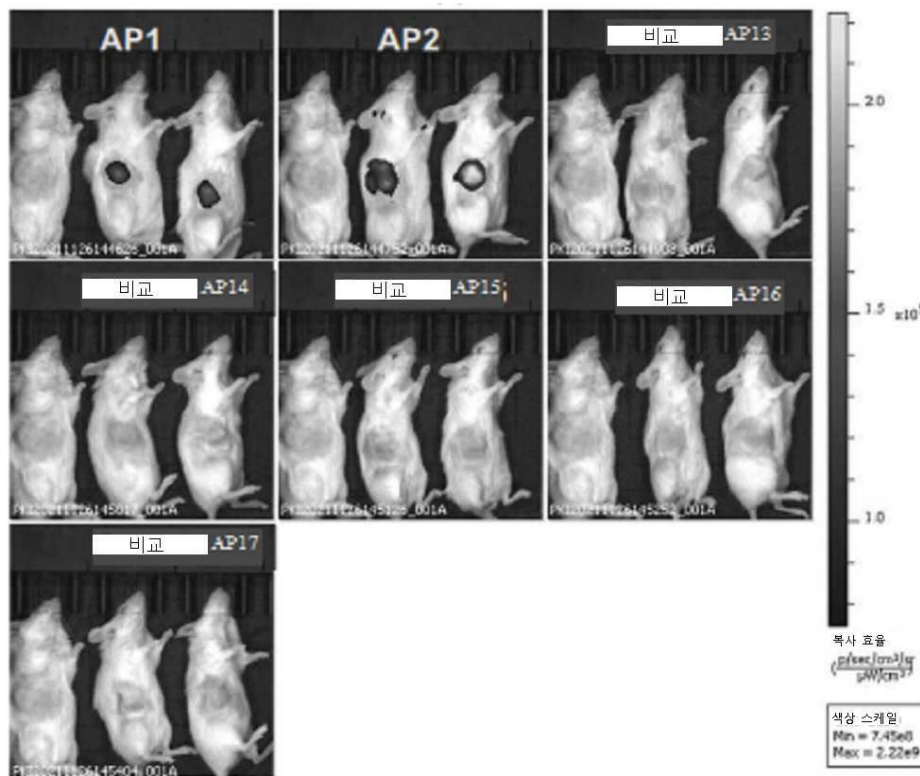


Figure 2C

도면2d

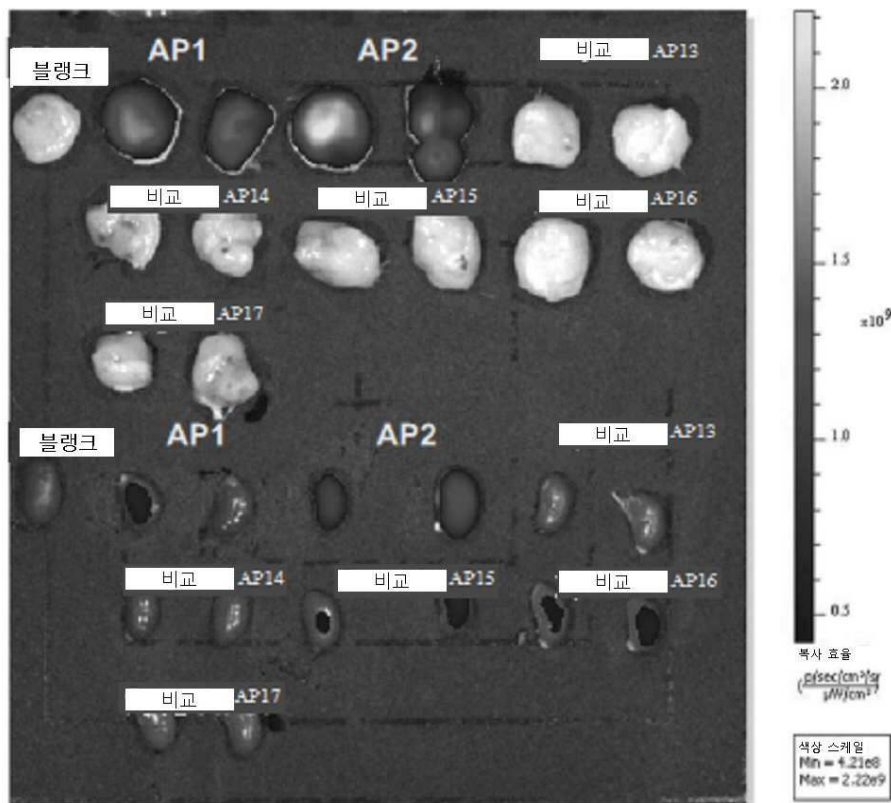


Figure 2D

도면3

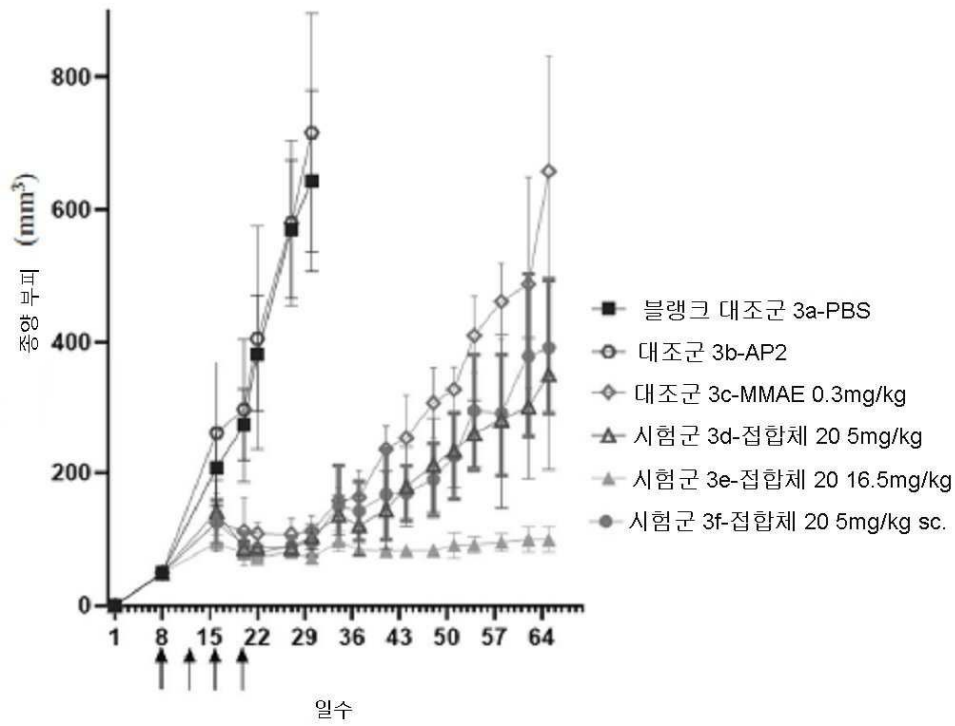


Figure 3

도면4

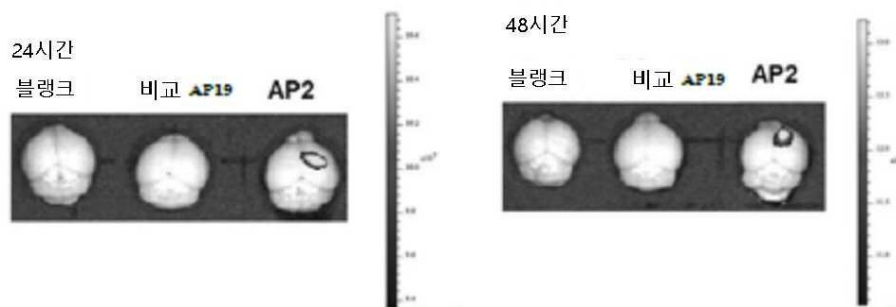


Figure 4

도면5

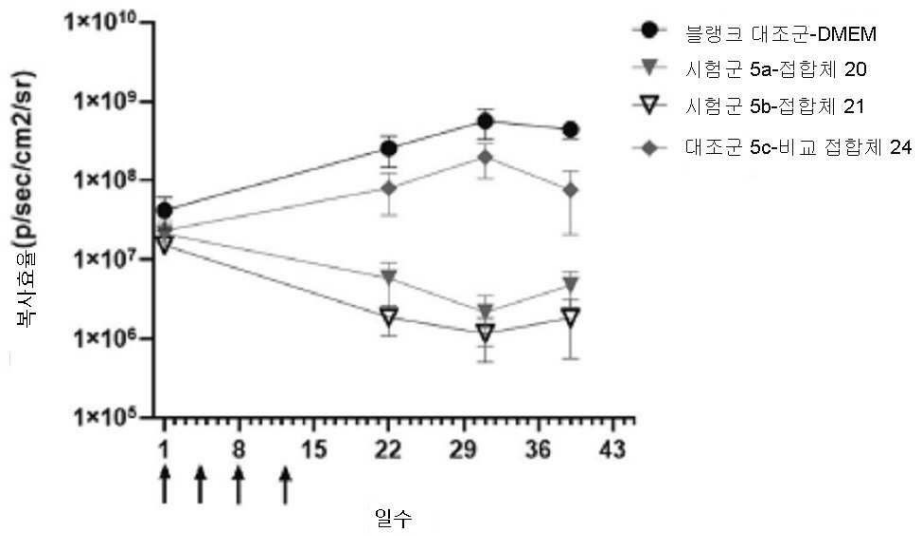


Figure 5

도면6

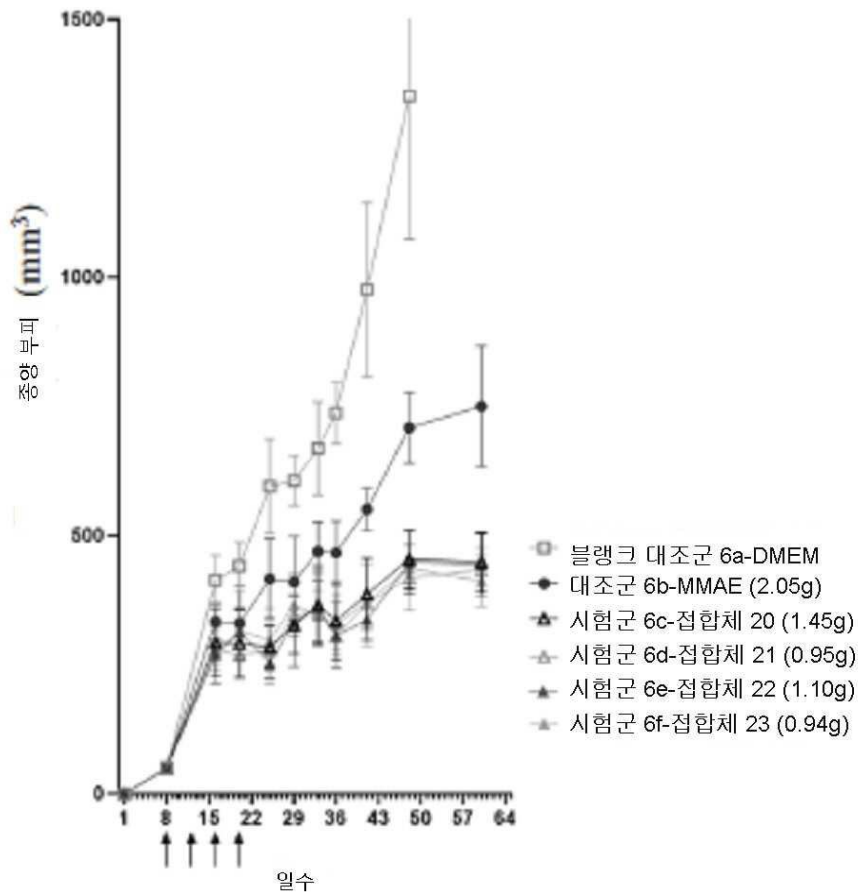


Figure 6

도면7

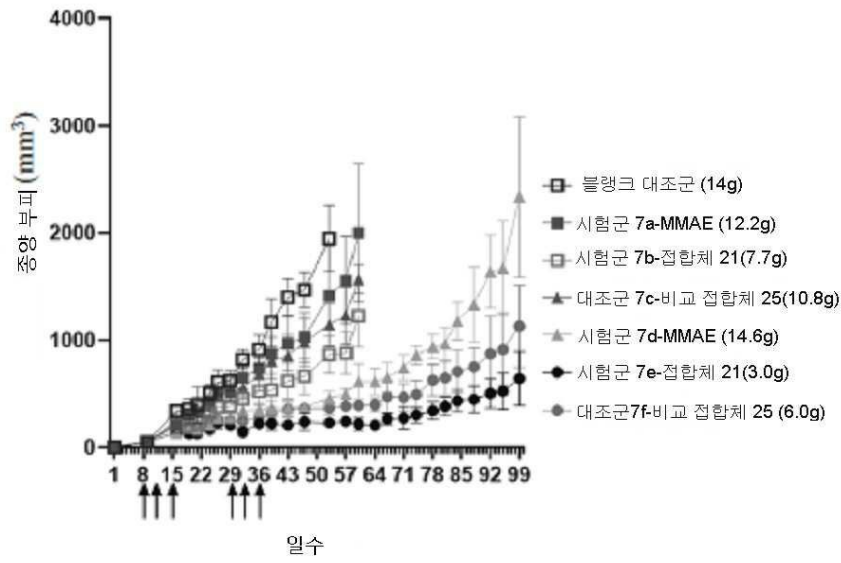


Figure 7

도면8

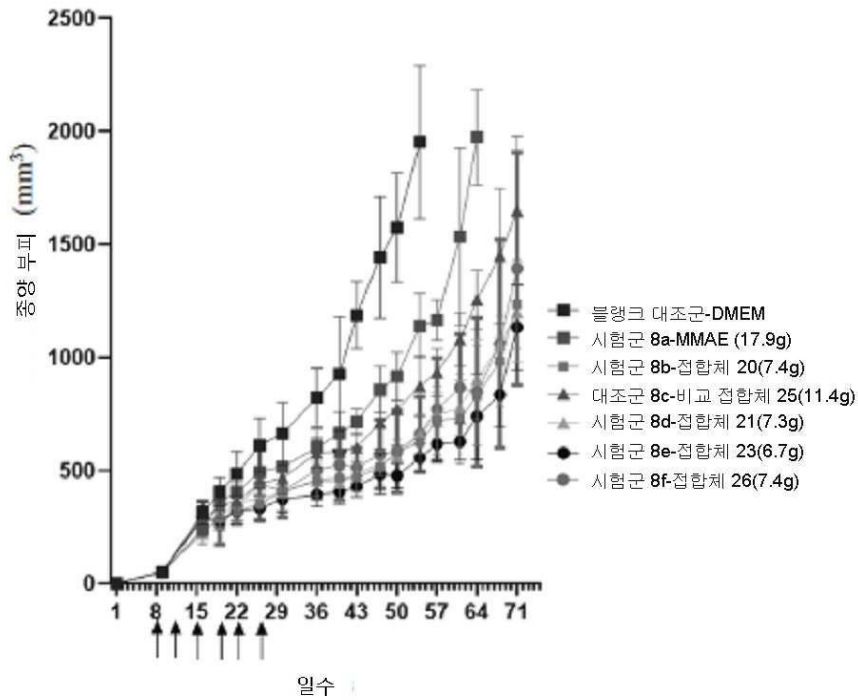


Figure 8

도면9

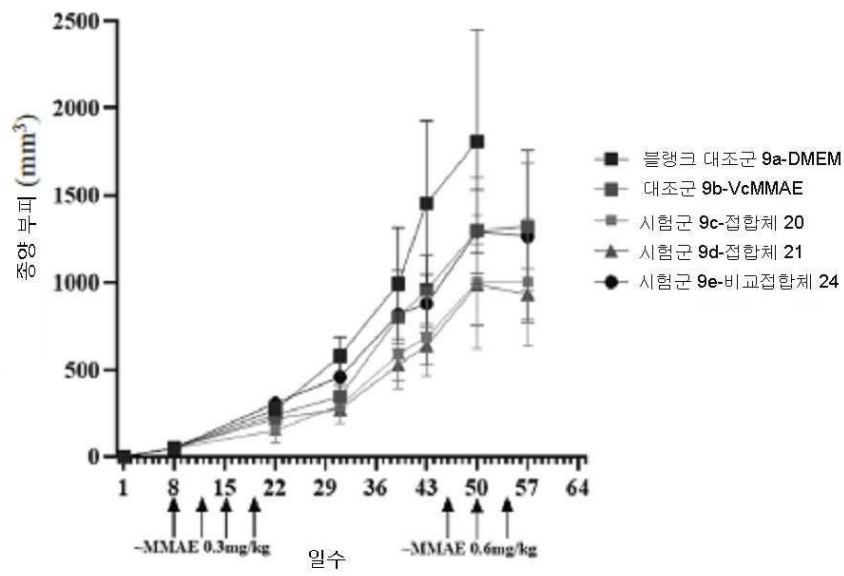


Figure 9

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.