



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0098493
(43) 공개일자 2021년08월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7019995
(22) 출원일자(국제) 2019년11월27일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2021년06월25일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2019/053354
(87) 국제공개번호 WO 2020/109792
국제공개일자 2020년06월04일
- (30) 우선권주장
1819399.5 2018년11월28일 영국(GB)
- (71) 출원인
페다니우스 테라퓨틱스 리미티드
영국, 에스케이10 4티지 매클즈필드 체서, 앨덜리
파크, 바이오허브
- (72) 발명자
퀴벨, 마틴
영국, 에스케이10 4티지 매클즈필드 체서, 앨덜리
파크, 바이오허브, 페다니우스 테라퓨틱스 리미티
드 내
술츠 우터필, 티모시
영국, 에스케이10 4티지 매클즈필드 체서, 앨덜리
파크, 바이오허브, 페다니우스 테라퓨틱스 리미티
드 내
머리, 프레이저
영국, 에스케이10 4티지 매클즈필드 체서, 앨덜리
파크, 바이오허브, 페다니우스 테라퓨틱스 리미티
드 내
- (74) 대리인
안소영

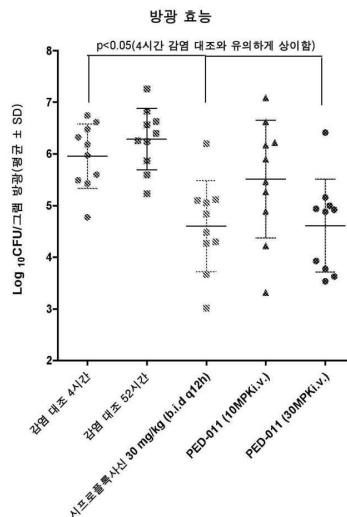
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 항생균성 안티센스제

(57) 요약

본 발명은 그람-음성 세균 감염의 치료를 위한 개선된 안티센스제에 관한 것이다. 본 발명의 화합물은 향상된 침투성을 통해 세균 세포로의 유입을 개선하는 항생제-보조 전좌; AAT' 플랫폼을 이용하여, 안티센스제의 개선된 세포내 노출 및 감염의 우수한 치료를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 31/00 (2018.01)

C12N 2310/11 (2013.01)

C12N 2310/3233 (2013.01)

C12N 2310/351 (2013.01)

C12N 2310/3535 (2013.01)

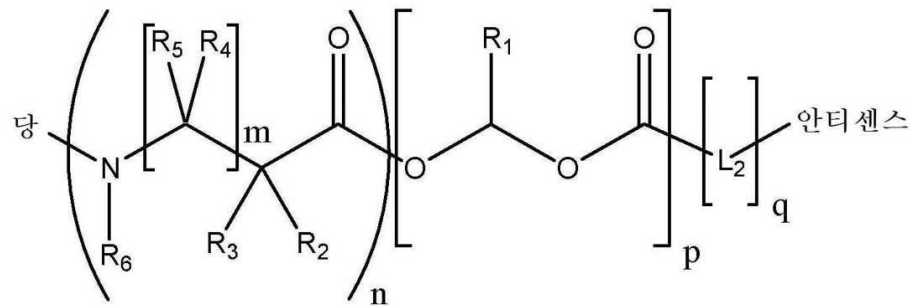
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염:

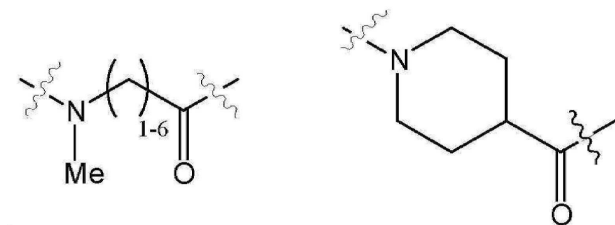
[화학식 I]



(상기 식에서,

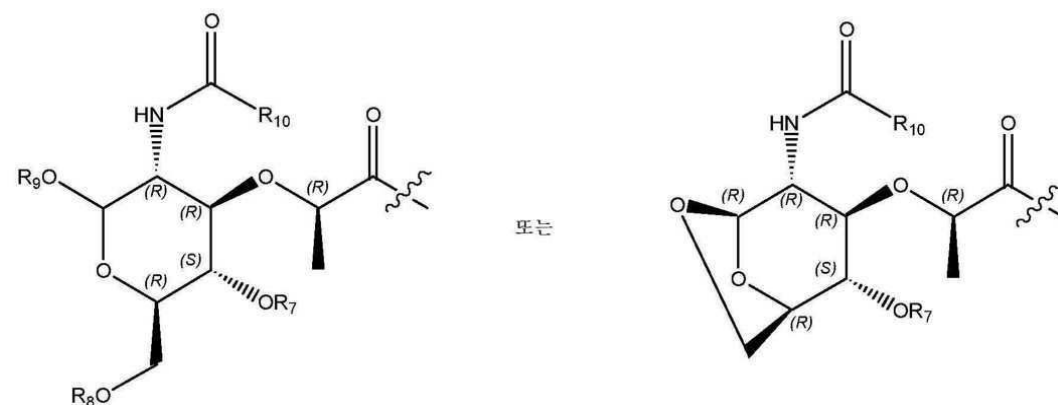
안티센스는 천연, 인공 및/또는 변형된 핵염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드이고, 올리고뉴클레오타이드는 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드(PDO), 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드(PSO), 포스포로디아미테이트 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드(PMO), 펩티드 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA), 2'-O-알킬 올리고뉴클레오타이드(2'-O-Me, 2'-O-Et, 2'-O-메톡시에틸) 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기서, 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 서열 내에 존재하는 말단 아미노기를 통해 화학식 I의 분자의 나머지에 결합되고;

L₂는 안티센스 서열 내에 존재하는 말단 아미노기에 대한 화학적 결합 및 화학식 I의 분자의 나머지의 말단 카르보닐에 대한 제2 화학적 결합을 형성하는 스페이서이고,



로 이루어진 군으로부터 선택되고;

당은 하기 구조



를 갖는 N-아실무람산 또는 1,6-안하이드로-N-아실무람산의 아실 단편의 임의의 호변이성질체 형태이고;

R_1 및 R_6 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬, C_{3-8} 치환된 사이클로알킬, 페닐 및 벤질로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬, C_{3-8} 치환된 사이클로알킬, 페닐 및 벤질로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 둘 모두 이들이 부착되는 탄소 원자와 함께 3개, 4개, 5개 또는 6개의 탄소 원자를 함유하는 고리를 형성하고;

R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬, C_{3-8} 치환된 사이클로알킬, 페닐 및 벤질로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 둘 모두 이들이 부착되는 탄소 원자와 함께 3개, 4개, 5개 또는 6개의 탄소 원자를 함유하는 고리를 형성하고;

또는

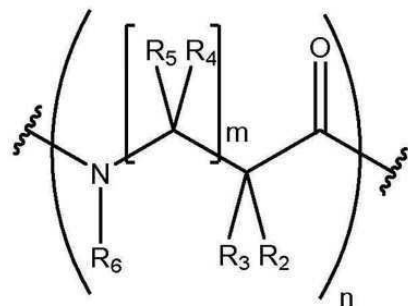
R_2 및 R_4 는 이들이 부착되는 인접한 탄소 원자와 함께 3개, 4개, 5개 또는 6개의 탄소 원자를 함유하는 고리를 형성하고; R_3 및 R_5 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬, C_{3-8} 치환된 사이클로알킬, 페닐 및 벤질로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 둘 모두 이들이 부착되는 탄소 원자와 함께 3개, 4개, 5개 또는 6개의 탄소 원자를 함유하는 고리를 형성하고;

R_7 , R_8 및 R_9 는 각각 독립적으로 H, 아세틸, 벤조일로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R_{10} 은 메틸, 에틸, 프로필로 이루어진 군으로부터 선택되고;

m 은 0 또는 1 또는 2이고;

n 은 0 또는 1 또는 2 또는 3 또는 4이고, n 이 2, 3 또는 4인 경우, 각각의



잔기가 독립적으로 선택되고;

p 는 0 또는 1이고;

q 는 0 또는 1임).

청구항 2

제1항에 있어서, 안티센스는 포스포로디아미테이트 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드(PMO) 또는 펩티드 핵산(PNA)인, 화합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, p 는 1인, 화합물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, R_1 은 H, C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 치환된 알킬로 이루어진 군으로부터 선

택되는, 화합물.

청구항 5

제3항에 있어서, R_1 은 H인, 화합물.

청구항 6

제3항에 있어서, R_1 은 Me인, 화합물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, p 는 0인, 화합물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, n 은 1인, 화합물.

청구항 9

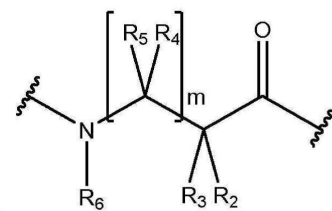
제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, R_2 및 R_3 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-6} 알킬인, 화합물.

청구항 10

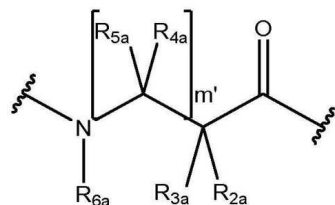
제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, m 은 0이고, R_4 및 R_5 는 존재하지 않는, 화합물.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, n 은 2이고, 하나의



잔기는



이고, R_{2a} , R_{3a} , R_{4a} , R_{5a} , R_{6a} 및 m' 는 제1항에 기재된 바와 같은 모이어티 R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 및 m 과 동일한 각각의 정의를 갖는, 화합물.

청구항 12

제11항에 있어서, R_2 및 R_3 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-6} 알킬이고, R_{2a} 및 R_{3a} 는 각각 H인, 화합물.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, m 은 0인, 화합물.

청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, m' 는 2인, 화합물.

청구항 15

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, R_{4a} 및 R_{5a} 는 H인, 화합물.

청구항 16

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, R_{6a} 는 H인, 화합물.

청구항 17

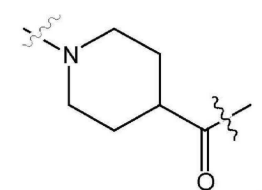
제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, R_6 는 H인, 화합물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, q 는 1인, 화합물.

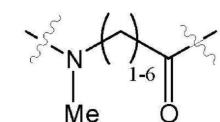
청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, L_2 는 하기 구조를 갖는, 화합물:



청구항 20

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, L_2 는 하기 구조를 갖는, 화합물:

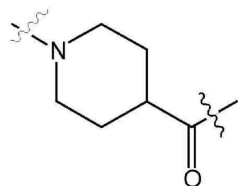


청구항 21

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, q는 0인, 화합물.

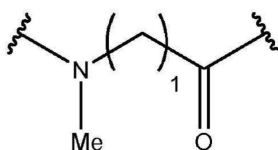
청구항 22

제1항 또는 제2항에 있어서, n은 1이고, m은 0이고, R₆는 H이고, R₂는 H이고, R₃는 Me이고, p는 1이고, R₁은 H 또는 Me이고, q는 1이고, L₂는 하기 구조를 갖는, 화합물:



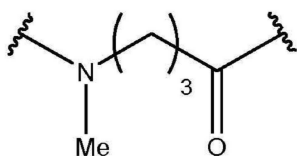
청구항 23

제1항 또는 제2항에 있어서, n은 1이고, m은 0이고, R₆는 H이고, R₂는 H이고, R₃는 Me이고, p는 1이고, R₁은 H 또는 Me이고, q는 1이고, L₂는 하기 구조를 갖는, 화합물:

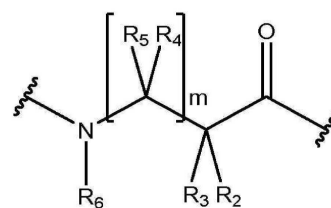


청구항 24

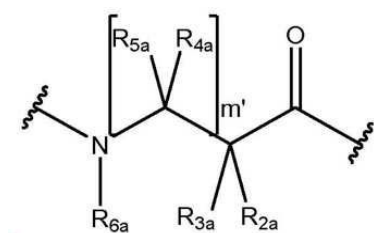
제1항 또는 제2항에 있어서, n은 1이고, m은 0이고, R₆는 H이고, R₂는 H이고, R₃는 Me이고, p는 1이고, R₁은 H 또는 Me이고, q는 1이고, L₂는 하기 구조를 갖는, 화합물:



청구항 25



제1항 또는 제2항에 있어서, p는 0이고, n은 2이고, q는 0이고, 하나의 잔기는



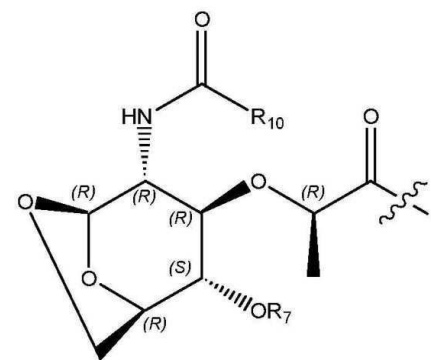
이고, R_{2a} , R_{3a} , R_{4a} , R_{5a} , R_{6a} 및 m' 는 제1항에 기재된 바와 같은 모이어티 R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 및 m 과 동일한 각각의 정의를 갖는, 화합물.

청구항 26

제25항에 있어서, R₂ 및 R₃는 각각 독립적으로 H 및 C₁₋₆ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, R_{2a} 및 R_{3a}는 각각 H이고, R₄, R₅, R_{4a} 및 R_{5a}는 각각 H이고, m은 0이고, m'는 2이고, R₆는 H이고, R_{6a}는 H인, 화합물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 당은 하기인, 화합물:



청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는, 화합물:

[표 1A]

예시적인 항생제 내성 표적화 서열		
표적 유전자	안티센스 서열 (5'-3')	서열 ID
NDM-1	TCA AGT TTT CC	1
NDM-1	TCC TTT TAT TC	2
NDM-1	CCA TCA AGT TT	3
NDM-1	GGC AAT TCC AT	4
adeA	ATA CTG TCC AA	5
OmpA	CAT GGA TAT CC	6
AcrA	ATG TAA ACC TC	7
AcrA	GTT CAT ATG TA	8
AcrA	ACC CCT CTG TT	9
AcrA	TGT TCA TAT GT	10
AcrB	GTC TTA ACG GC	11
AcrB	AGG CAT GTC TT	12
AcrB	TAG GCA TGT CT	13
AcrR	TAT GTT CGT GA	14
TolC	TTC ATT TGC AT	15
TolC	ATT CCT TGT GG	16
TolC	TTT GCA TTC CT	17
KPC	GAT ACA GTG AC	18
KPC 1-4	AAC GAT ATT CC	19

[표 1B]

예시적인 생물막 형성 표적화 서열		
표적 서열	안티센스 서열 (5'-3')	서열 ID
cepl	AAG GTC TGC AT	20
cepl	TCG GAT CTG TG	21
cepl	CAT GGA TGT CC	22
cepl	CGT GAA CGA AG	23
cepl	CGT GTG GCA AC	24
cepl	GCC CGA GAT CC	25
cepl	CTT TCG TTC GC	26
suhB	ATG CAT GAG CC	27
suhB	GGA TGC ATG AG	28
CsuE	TTA TAT TCA TGG	29
CsuE	TCA TGG CAA AG	30
CsuE	TTT CCT GTC AA	31
SecA	TTG CCA ACA TG	32
PglL	CAT TAC CCA AG	33
PilU1	TTA AAA TCC AT	34
AlgZ	TAG GCA TCG AC	35
AlgU	AAA GCT CCT CT	36
LasR	AGG CCA TAG CG	37
FleR	TTA CTC CTG AA	38
PeiF	TTC GGT CAT GT	39

[표 1C]

예시적인 지방산 생합성-관련 표적화 서열		
표적 유전자	안티센스 서열 (5'-3')	서열 ID
acpP	GTC CAT TAC CC	40
acpP	CAT TAC CCC TC	41
acpP	CCA TTA CCC CT	42
acpP	TCC ATT ACC CC	43
acpP	TGT CCA TTA CC	44
acpP	TTG TCC ATT AC	45
acpP	GTT GTC CAT TA	46
acpP	TGT TGT CCA TT	47
acpP	ATG TTG TCC AT	48
acpP	TTT ACA AGT GC	49
acpP	CCT CCG AGG GA	50
acpP	ACA CGT TGT TC	51
acpP	AGT TCA GCG AC	52
acpP	CTC ATA CCT TG	53
acpP	TGC TCA TAC TC	54
acpP	CTC ATA CTC T	55
acpP	CTC ATA CTA T	56
acpP	CTT CGA TAG TG	57
acpP	ATA TCG CTC AC	58
acpP	ATT CTC CTC AT	59
acpP	CAC AGG AAT TC	60
acpP	CAT TGC TTG TG	61
acpP	CAT ACC TTG TT	62
acpS	TTG CCA TTA GC	63
acp-E	CTG TAG TGA TTT CAC CA	64
fabA	TTA TCT ACC AT	65
fabB	CGT TTC ATT AA	66
fabB	GCA CGT TTC AT	67
fabI	AGA AAA CCC AT	68
fabI	GCT TTA ATC C	69
fabI	CCC ATA GCT T	70
fabI	CAT GTA AGA T	71
fabI	AGA TAA CTC C	72
gapA	TTG ATA GTC AT	73
accA	GCT TTT TTC AT	74
accA	AGG CTT CCG TC	75
fabD	GTC ATG TTT T	76
inhA	GTC ATT TGG T	77
inhA	CAT TTG GTG ACT	78

[표 1D]

다른 경로 또는 세포 과정과 관련된 예시적인 표적화 서열		
표적 유전자	안티센스 서열 (5'-3')	서열 ID
RpoD	TCA TCT TTG CT	79
RpoD	TTT TGC TCC AT	80
PolB	AGT AAC TCC AC	81
murA	TTT ATC CAT TG	82
rpsJ	GCA TTT GAC CT	83
rpsJ	TAG ACA TAC CA	84
rpsJ	TAC CAG TAA AC	85
rpsJ	TGG TTC TGC AT	86
rpsJ	CCT CAG ACT CC	87
rpsJ	GCA TTT GAC CT	88
ftsZ	AGT TTC TCT CC	89
ftsZ	GTT CAA ACA TA	90
ftsZ	TCA AAT GAG GC	91
ftsZ	AAT GAG GCC AT	92
ftsZ	ATA GTT TCT CTC C	93
gyrA	CGC TCA TCT AA	94
gyrA	CTA TAC ATA GAC	95
gyrA	GCC ATC TCG GAC ATC	96
gyrA	ATA CCA GGT GTT ATC T	97
dnaB	TTC CTG CCA TA	98
LpxC	TTT GAT CAT CG	99
LpxC	TGT TTG ATC AT	100
LpxC	TGT TTC ACC AT	101
LpxC	GTT GTT TGA TC	102
23S rRNA	AGT GCT CTA CC	103
23S rRNA	GCC TGT TAT CC	104
16S rRNA	CCA TGC AGC AC	105
16S rRNA	TTG CGC TCG TT	106
16S rRNA	GGC TGC TGG CA	107
fmsB	CCA TGA AAA A	108
polA	TTC ATG CCT GT	109
murA	ATC CAT TTA GT	110
murA	CAT TTA GTT TG	111
murA	AAT TTA TCC AT	112
murA	AAA TTT ATC CA	113
rpmB	ACT CGG GAC AT	114
rpmB	CTA TTC TCC AA	115
rpmB	GGC AGA CTC GG	116
rpmB	CTT AGA CAT GG	117
adk	ATG ATA CGC AT	118
adk	AGT GCC CTC C	119
infA	TCT TTG GCC AT	120

[표 1D]

기타 경로 또는 세포 과정과 관련된 예시적인 표적화 서열		
표적 유전자	안티센스 서열 (5'-3')	서열 ID
aroC	TTT CCA GCC AT	121
aroC	TTC CCT GCC AT	122
murF	ACG CTA ATC AT	123
murF	ACC TCC CAG GC	124
kdsA	AAT TCG AGC AT	125
boxA	TGT TTA AGA GC	126
boxA	CTC TTA ATG AT	127
boxC	ATC CAC CAC AG	128
rpoD-E	CTT GTA ACC ACA CCA	129
rpoD-E	TCC ACC AAG TCA CCA	130
pryC	GGT GCA GTC AT	131
pryC	AGA GTT CAA GG	132
pryA	GAC TTA ATC AA	133
lgt	CTA CTG GTC AT	134
folA	CAT TGA GAT TT	135
infB	ACA TCT GTC AT	136
nrdA	TTC TGA TTC AT	137
nrdB	GTA TAT GCC AT	138
zipA	TCC TGC ATC AT	139
caoA	ATA TAC CTC AT	140
gyrA-E	GTT ACC CTG ACC GAC CA	141
gyrA-E	GTT ACC CTG ACC ACC A	142
mrdA	TGT TTC ATA CG	143
LpxB	GGT TTG CCA AG	144
LpxB	TAA TCC GTC AG	145
carA	GGT GCT CAA AC	146
adeA	ATA CTG TAA AA	147
blaT	CTC TTC CTT TT	148
crml	TCC TTC TGA TT	149
folP	ATG TTA TCC C	150
fmhB	CCA TGA TTT A	151
hmrB	TCC ACG TCG A	152
rpmB	GTC TAT TCT CC	153
rpmB	GAC ATG TCT AT	154
hmrB	TCC ACG TCG A	155
FabG	TTC TCT CCT TT	156
RpmB	CTC TAG ACA TG	157
WaaC	AGC ACC CTC AT	158
MryA	TGA CTC TCC TC	159
MurC	CCA CCT CCA GG	160
LpxA	ATC AAA CTC AT	161
WaaG	GCC AGG GTC AT	162
WaaA	GTACGG TTC AT	163
murB	CAG TCG CCC CT	164
murE	AGG CTC ATA GG	165
AccB	CTA GCA CTC CC	166
FabZ	ATG TCC ATC AT	167
MurG	GCA AAG TCC TC	168
AmpR	GTC GAA CCA AT	169
LepB	ATT GAG TGT CAT	170
LptD	TGC CAT CTT GTT	171
MraY	CAG GAG CAT TAG	172

청구항 29

약제로서 사용하기 위한 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 30

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 화합물 및 약제학적으로 허용되는 또는 수의학적으로 허용되는 희석제, 부형제 및/또는 담체를 포함하는, 약제학적 또는 수의학적 조성물.

청구항 31

세균 감염의 치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 32

다중-약물 내성(MDR) 감염의 치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 33

그램-음성 세균 감염의 치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 34

유효량의 임의의 다른 항생제와 조합하여 치료제로서 사용하기 위한 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세균 감염, 특히 그람-음성 세균 감염에서 독력, 항생제 내성, 생물막 형성 또는 필수 성장 및 생존 과정에 기여하는 유전자에 대해 표적화된 안티센스 올리고머를 포함하는 화합물에 관한 것이다. 본 발명은 세균 감염의 단일요법 치료에 유용하거나, 공지된 항생제와의 병용 사용을 통해, 세균 감염에 대항하는 임상적으로 유의미한 개선된 활성(최소 억제 농도(minimum inhibitory concentration; MIC))을 제공하는 데 유용한 안티센스 올리고머를 포함하는 화합물에 관한 것이다. 특정 이론으로 국한시키려는 것은 아니지만, 본 발명의 화합물은 세균 세포에서 안티센스 올리고머의 세포내 농도를, 단독의 안티센스 올리고머를 사용함으로써 달성될 수 있는 것보다 더 높게 만들 수 있다. 본 발명의 화합물은 향상된 침투성을 통해 세균 세포로의 증가된 유입을 제공하는 항생제-보조 전좌(antibiotic-assisted translocation; AAT) 모이어티를 함유한다. 본 발명의 화합물은 단독의 안티센스 올리고머를 투여함으로써 달성되는 세포내 노출에 비해 안티센스 올리고머의 세포내 노출을 향상시킬 수 있다. 본 발명의 화합물은 단독의 안티센스 올리고머로의 치료에 비해 세균 감염의 치료를 개선할 수 있다.

배경 기술

[0002] 약물-내성 세균 감염은 이미 매년 전 세계적으로 상당한 사망수의 원인이 되고 있으며, 신규한 치료 접근법 및 신규한 항세균 약물의 개발이 점점 더 시급히 요구되고 있다. 이들 약물-내성 감염 중에서, *엔테로박터* (*Enterobacter*) 종, *아시네토박터 바우마니* (*Acinetobacter baumannii*), *슈도모나스 에루지노사* (*Pseudomonas aeruginosa*) 및 *클렙시엘라 뉴모니아* (*Klebsiella pneumoniae*)와 같은 MDR 그람-음성 병원균에 의해 초래된 것들이 가장 심각하게 건강을 위협한다. 다수의 그람-음성 세균은 이제 상당수의 기존 및 현재 항생제에 내성이며, 치료하기 어려운 감염을 초래할 수 있다.

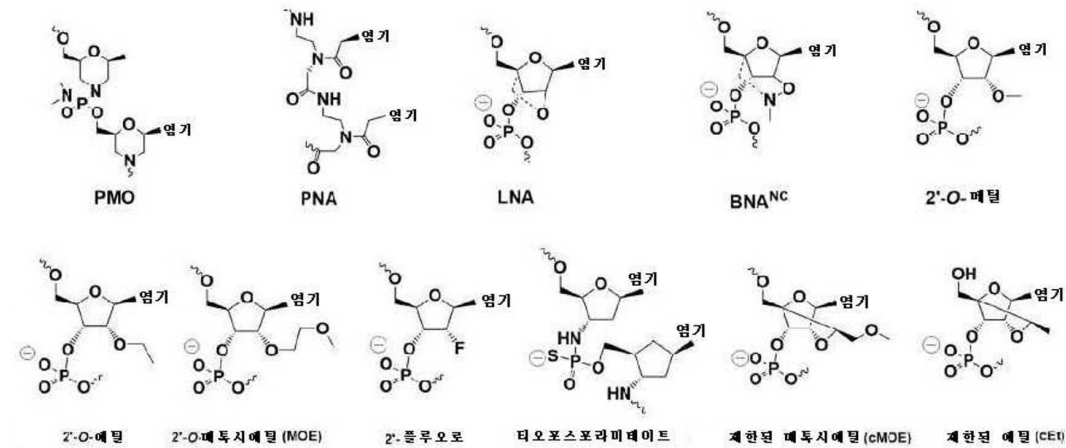
[0003] 인간 질환 및 감염의 치료에 대한 신규한 치료적 접근법은 긍정적인 치료 종점을 제공하는 유전 수준에서 단백질 생합성을 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide; ASO)를 사용하는 것이다. 이러한 원리에 기초한 수많은 제품들, 예를 들어, Fomivirsen®(면역손상 환자에서 시토크갈로바이러스 망막염(cytomegalovirus retinitis; CMV)의 치료에 사용된 안티센스 항바이러스 약물), Kynamro®(동형접합 가족성 고콜레스테롤혈증의 치료에 사용), 및 Alicaforsen®(인간 ICAM-1 단백질의 생산을 위한 mRNA 표적화 및 낭염용으로 지시)의 사용이 승인되었다.

[0004] 세균 성장, 생존 또는 내성 기전의 발달에 필수적인 유전자 산물을 표적화하는 ASO의 사용을 통한 세균 감염의 치료는 큰 잠재력을 갖는다(예를 들어, 문헌[(i) Bai, H. *et al.*, *Curr. Drug Disc. Tech.*, **7**, 76-85, **2010**; (ii) Hatamoto, M. *et al.*, *Appl. Microbiol. Technol.*, **86**, 397-402, **2010**; (iii) Geller, B. L. *et al.*, *J. Infect. Dis.*, **208**, 1553-1560, **2013**; (iv) Good, L. & Stach, E. M., *Frontiermicrobiol.*, **2**, 185, **2011**; (v) Hansen, A. M. *et al.*, *Bioconj. Chem.*, **27(4)**, 863-7, **2016**; (vi) Sully, E. K. & Geller, B. L. *Curr. Opin. Microbiol.*, **33**, 47-55, **2016**; (vii) Hegarty, J. P. & Stewart Sr, D. B. *Appl. Microbiol. & Biotech.*, **102(3)**, 1055-65, **2018**; (viii) Geller, B. L. *et al.*, *J. Antimicrob. Chemotherapy*, **73**, 1611-1619, **2018**; (ix) Howard, J. J. *et al.*, *Antimicrob. Agents & Chemotherapy*, **61(4)**, **2017**; (x) 제W02015/032968호; (xi)

제W02015/175977호; (xii) 제W02015/179249호; (xiii) 제W02016/108930호; (xiv) 제W02017/112885호; (xv) 제W02017/112888호] 참조).

[0005]

천연 올리고뉴클레오타이드는 엔도 및 엑소-뉴클레아제에 의해 전신 순환 시 빠르게 분해된다. 따라서, ASO의 기술은 천연 올리고뉴클레오타이드 당의 변형 및 각 모노머 단위 내 연결(도식 1 참조)을 통해 뉴클레아제에 대한 이들의 안정성을 개선하기 위해 다수의 반복(세대)을 통해 진보되었다. 세균성 ASO 분야에서, PMO(포스포로디아미데이트 모르폴리노) 및 PNA(펩티드 핵산) 변형 올리고뉴클레오타이드는 광범위하게 연구되고 있다.



[0006]

도식 1. ASO 서열에 사용되는 변형 올리고뉴클레오타이드 모노머 단위

[0007]

[0008]

세균성 ASO는 이들의 치료 효과를 발휘하기 위해 세균막에 침투하고 세포질로 이동해야 한다. 진핵 세포와는 달리, 세균은 핵막을 갖지 않는 세균 핵양체에 위치한 이중-가닥 DNA를 갖는다. 세균에서 RNA 전사 및 단백질 합성은 세포질에서 처리되며, 따라서 이러한 세포내 구획에 도달하는 안티센스 올리고머는 이들의 효과를 발휘할 수 있다. 천연 및 변형 ASO는 이를 달성하는 데 필요한 물리화학적 성질을 지니지 않으며, 현재 ASO의 거의 모든 세포내 전달에는 세포-침투 펩티드(CPP) 신호의 부착이 필요하다. 역사상, CPP는 HIV TAT 단백질 또는 침투 물 기원의 고도로 하전된 작은 펩티드 신호(6→20+개 아미노산 길이), *드로소필라 안테나피디아(Drosophila Antennapedia)* 유전자로부터 유래된 16-잔기 펩티드이다(예를 들어, 문헌[(i) McClorey, G & Banerjee, S., *Biomedicines*, 6(2), E51, 2018; (ii) Shiraishi, T and Nielsen, P. E. *Methods Mol. Biol.*, 1050, 193-205, 2014] 참조). CPP는 효과적이기는 하지만, 일반적으로 차별적이지 않으며, CPP에 부착된 안티센스 카고는 다수 조직 및 세포에 전달되어 관심 대상의 질환에 대한 낮은 치료 범위 및 독성을 초래한다. 따라서, CPP-ASO에 대한 독성 기전은 의도되지 않은 RNA의 상보적 영역에 대한 ASO의 결합으로 인해 잠재적으로 발생할 수 있는 건강한 세포에서의 혼성화-의존적 표적의 효과이다. 이러한 표적의 독성은 허용되는 불일치로 상보적 영역의 수가 급격히 증가함에 따라 더욱 더 중요한 고려 사항이 된다(예를 들어, 문헌[Yoshida, T. *et al.*, *Genes Cells*, 23(6), 448-455, 2018] 참조). 따라서, 건강한 인간 세포에 대한 세포내 노출을 최소화하고 이에 의해 원치 않는 표적의 효과에 대한 가능성을 유의하게 감소시키면서 세균성 ASO의 세균으로의 우선적 전달을 개선하는 방법이 최신 기술에 큰 진보를 제공할 것이다.

발명의 내용

[0009]

본원에서 구체화되는 세균 흡수 기전에는 자연 발생 당, 즉, 락트산과 N-아세틸글루코사민의 에테르이고 그람-음성 세균의 세포벽 펩티도글리칸의 골격을 형성하는 데 중요한 요소인 N-아세틸 D-무람산(MurNAc) 및 사이클릭 변이형, 즉, 1,6-안하이드로-N-아세틸무람산(anhMurNAc)이 사용된다. 직접적으로 또는 간접적으로 링커를 통한 ASO에 대한 이들 당의 화학적 부착은 본원에서 "AAT ASO" 또는 "AAT 안티센스제"라 칭해지는 본 발명의 화합물을 제공한다. AAT 안티센스제는 모 ASO를 방출하기 위해 세균 내에서 세포질-기반 효소를 필요로 하기 때문에, 말초 순환에는 단지 저수준의 모 ASO가 항상 존재한다. 또한, CPP 신호 펩티드가 본원에서 사용되지 않기 때문에, 본원에서 상세히 기술되는 AAT ASO는 건강한 포유동물 세포로의 매우 제한된 침투, 및 그에 따라 유익한 독성 프로파일에 대한 상당히 개선된 가능성을 나타낸다. 이는 가장 효과적인 AAT 안티센스제가 주로 세균 내에서 ASO의 세포내 노출을 제공하는 것이 목적이므로 본 발명의 중요한 양태이다.

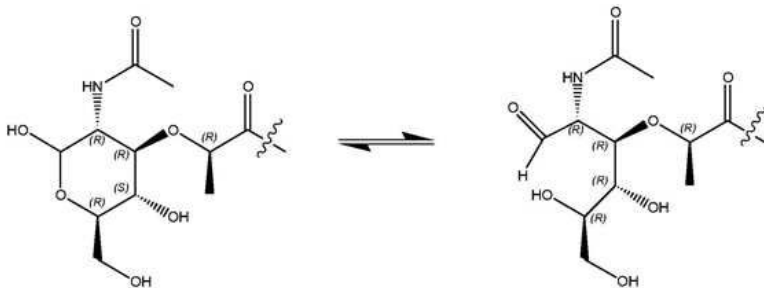
[0010]

세균 안티센스 서열은 당 모이어티에 직접적으로 또는 간접적으로 링커를 통해 접합되어(즉, 화학적으로 결합되어) AAT 안티센스제를 제공한다. AAT 안티센스제는 그람-음성 세균의 세포질로 세균막에 걸쳐 선택적 흡수를 나

타낼 수 있다. AAT 안티센스제의 설계에 좌우하여, 모 안티센스 올리고머는 후속적으로 절단되며, 선택적 리가제 및/또는 아미다제에 의해 촉매작용된 세균 효소 과정(들)을 통해 방출될 수 있다. 대안적으로, 전체 AAT ASO 작제물은 온전하게 유지되고, 유사하거나 동등한 안티센스 활성을 유발할 수 있다(예를 들어, CPP-ASO가 모 ASO에 대한 전체 효능을 보유하는 상기 Bai, H. 등의 상기 문헌 참조).

[0011] 본 발명의 AAT ASO 화합물은 세균 성장 및 생존에 필수적인 단백질을 생산하는 유전자를 표적화할 때 내재성 항세균 활성을 가질 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 AAT ASO는 그 밖에 효과적인 항세균 약물에 대한 내성 기전으로서 유도된 단백질을 생산하는 세균 유전자를 표적화할 수 있다. 이러한 예에서, AAT ASO와 기존 항생제의 병용 투여는 세균 내성 기전의 동반되는 안티센스 억제에 의해 항생제의 항세균 활성을 개선할 수 있다.

[0012] 본 발명의 화합물의 당 부분(AAT ASO 작용제)은 열린 또는 환형(단환) 형태를 포함하여 임의의 호변이성질체 형태의 당일 수 있다. 용액 중에서 당 기는 이들의 열린 사슬 비환형 형태와 단환 환형 형태 사이에 평형으로 존재한다는 것이 당업자에게 이해될 것이다. 예를 들어, 본 발명에서 관심 대상의 하나의 당인 N-아세틸 무람산은 호변이성질체 평형에 나타난 바와 같은 형태로 존재한다(도식 2). 본 발명의 범위 내에서, 화합물은 열린 비환형 또는 단환 환형 형태 둘 다이거나 두 형태들 사이에 평형이다. AAT ASO 제제가 하나의 형태로 표시되는 경우, 이는 다른 호변이성질체 형태뿐만 아니라 열린 형태와 단환 형태 둘 모두에 평형인 형태를 포함하는 것으로 의도된다.

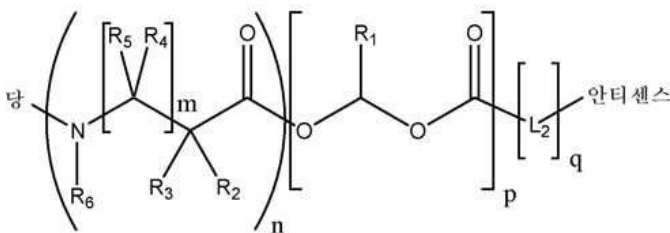


[0013]

[0014] 도식 2

[0015] 본 발명의 첫 번째 양태는 하기 일반식 I의 화합물, 및 이의 약제학적으로 허용되는 염에 관한 것이다:

[0016] [화학식 I]

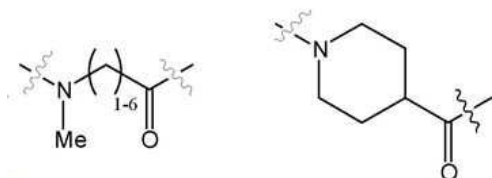


[0017]

[0018] (상기 식에서,

[0019] 안티센스는 천연, 인공 및/또는 변형된 핵염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드이고, 올리고뉴클레오타이드는 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드(PDO), 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드(PSO), 포스포로디아미테이트 모노폴리노 올리고뉴클레오타이드(PMO), 펩티드 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA), 2'-O-알킬 올리고뉴클레오타이드(2'-O-Me, 2'-O-Et, 2'-O-메톡시에틸) 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기서, 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 서열 내에 존재하는 말단 아미노기를 통해 화학식 I의 분자의 나머지에 결합되고;

[0020] L₂는 안티센스 서열 내에 존재하는 말단 아미노기에 대한 화학적 결합 및 화학식 I의 분자의 나머지의 말단 카르보닐에 대한 제2 화학적 결합을 형성하는 스페이서이고,



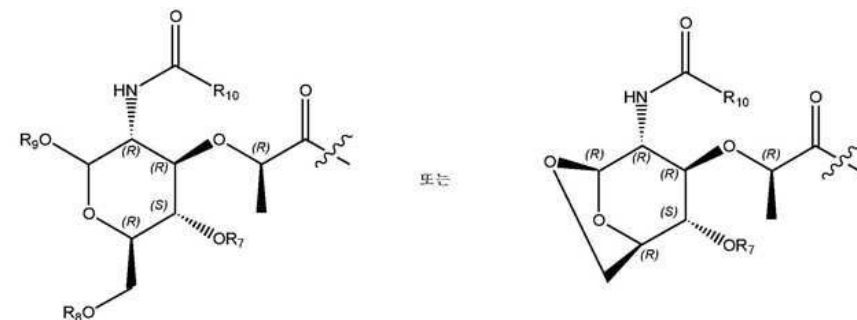
[0021]

[0022]

[0023]

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

당은 하기 구조



[0024]

[0025]

[0026]

[0027]

[0028]

[0029]

[0030]

[0031]

[0032]

[0033]

를 갖는 N-아실무람산 또는 1,6-안하이드로-N-아실무람산의 아실 단편의 임의의 호변이성질체 형태이고;

R_1 및 R_6 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬, C_{3-8} 치환된 사이클로알킬, 페닐 및 벤질로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬, C_{3-8} 치환된 사이클로알킬, 페닐 및 벤질로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 둘 모두 이들이 부착되는 탄소 원자와 함께 3개, 4개, 5개 또는 6개의 탄소 원자를 함유하는 고리를 형성하고;

R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬, C_{3-8} 치환된 사이클로알킬, 페닐 및 벤질로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 둘 모두 이들이 부착되는 탄소 원자와 함께 3개, 4개, 5개 또는 6개의 탄소 원자를 함유하는 고리를 형성하고;

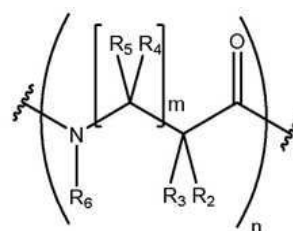
또는

R_2 및 R_4 는 이들이 부착되는 인접한 탄소 원자와 함께 3개, 4개, 5개 또는 6개의 탄소 원자를 함유하는 고리를 형성하고; R_3 및 R_5 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬, C_{3-8} 치환된 사이클로알킬, 페닐 및 벤질로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 둘 모두 이들이 부착되는 탄소 원자와 함께 3개, 4개, 5개 또는 6개의 탄소 원자를 함유하는 고리를 형성하고;

R_7 , R_8 및 R_9 는 각각 독립적으로 H, 아세틸, 벤조일로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R_{10} 은 메틸, 에틸, 프로필로 이루어진 군으로부터 선택되고;

m 은 0 또는 1 또는 2이고;



[0034]

[0035]

n 은 0 또는 1 또는 2 또는 3 또는 4이고, n 이 2, 3 또는 4인 경우, 각각의 독립적으로 선택되고;

p 는 0 또는 1이고;

- [0036] q는 0 또는 1임).
- [0037] 본 발명의 제2 양태는 약제로서 사용하기 위한 본 발명의 화합물에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명의 제3 양태는 본 발명의 화합물 및 약제학적으로 허용되는 또는 수의학적으로 허용되는 희석제, 부형제 및/또는 담체를 포함하는 약제학적 또는 수의학적 조성물에 관한 것이다.
- [0039] 본 발명의 제4 양태는 세균 감염의 치료에 사용하기 위한 본 발명의 화합물에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명의 제5 양태는 다중-약물 내성(MDR) 세균 감염의 치료에 사용하기 위한 본 발명의 화합물에 관한 것이다.
- [0041] 본 발명의 제6 양태는 그람-음성 세균 감염의 치료에 사용하기 위한 본 발명의 화합물에 관한 것이다. 이러한 그람-음성 세균 감염은 다중-약물 내성(MDR) 그람-음성 세균 감염일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 제7 양태는 임의의 다른 항생제와 조합하여 치료제로서 사용하기 위한 본 발명의 화합물에 관한 것이다.
- [0043] 본 발명의 제8 양태는 세균 감염을 치료하는 방법으로서, 세균 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료적 유효량의 본 발명의 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법에 관한 것이다.
- [0044] 본 발명의 제9 양태는 다중-약물 내성(MDR) 세균 감염을 치료하는 방법으로서, 다중-약물 내성(MDR) 세균 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료적 유효량의 본 발명의 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법에 관한 것이다.
- [0045] 본 발명의 제10 양태는 그람-음성 세균 감염을 치료하는 방법으로서, 그람-음성 세균 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료적 유효량의 본 발명의 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법에 관한 것이다. 이러한 그람-음성 세균 감염은 다중-약물 내성(MDR) 그람-음성 세균 감염일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 제11 양태는 다중-약물 내성(MDR) 세균 내에서, 예를 들어, MDR 그람-음성 세균 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 우선적 축적을 표적화하는 본 발명의 화합물의 사용을 통해 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 대한 전신 노출과 관련된 부작용을 감소시키는 방법에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명의 제12 양태는 치료적 유효량의 본 발명의 화합물을 대상체에게 정맥내 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0048] 본 발명의 제13 양태는 간 순환에서 통과 및 대사 전에 세균-감염 조직으로의 직접 분포를 제공하는 본 발명의 화합물의 정맥내 투여에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명의 제14 양태는 다른 포유동물 세포 및 조직과 비교하여 그람-음성 병원균 감염 세포에서 본 발명의 화합물의 우선적 축적을 제공한다.
- [0050] 본 발명의 제15 양태는 달리 기준 항생제의 경우에 관찰되는 최적의 약동학-약력학 관계에서 유리한 변화를 유도하는 기준 항생제와 조합한 본 발명에 따른 화합물의 용도에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0051] 도 1은 참조 및 시험 화합물로의 치료 후 마우스에서 *이.콜라이*(ATCC25922)의 Log₁₀CFU/g 방광의 산점도이다. 수직 및 수평 막대는 각각 SD 및 평균을 나타낸다.
- 도 2는 참조 및 시험 화합물로의 치료 후 마우스에서 *이.콜라이*(ATCC25922)의 Log₁₀CFU/g 신장(좌측 신장과 우측 신장의 합)의 산점도이다. 수직 및 수평 막대는 각각 SD 및 평균을 나타낸다.
- 도 3은 참조 및 시험 화합물로의 치료 후 마우스에서 *이.콜라이*(CFT073, ATCC®700928TM)의 Log₁₀CFU/g 방광의 산점도이다. 수직 및 수평 막대는 각각 SD 및 평균을 나타낸다.
- 도 4는 참조 및 시험 화합물로의 치료 후 마우스에서 *이.콜라이*(CFT073, ATCC®700928TM)의 Log₁₀CFU/g 신장(좌측 신장과 우측 신장의 합)의 산점도이다. 수직 및 수평 막대는 각각 SD 및 평균을 나타낸다.
- 도 5는 참조 및 시험 화합물로의 치료 후 마우스에서 *이.콜라이*(ATCC BAA-2340)의 Log₁₀CFU/g 방광의 산점도이다.

다. 수직 및 수평 막대는 각각 SD 및 평균을 나타낸다.

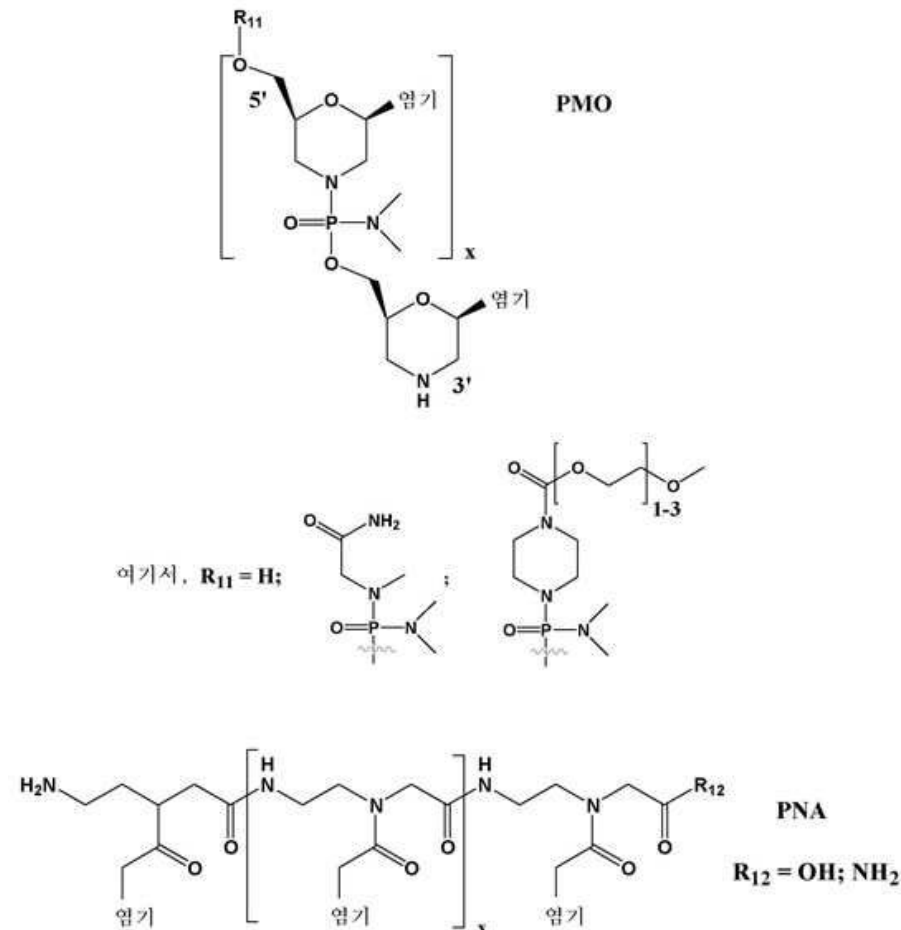
도 6은 참조 및 시험 화합물로의 치료 후 마우스에서 *이.콜라이*(ATCC BAA-2340)의 $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$ 신장(좌측 신장과 우측 신장의 합)의 산점도이다. 수직 및 수평 막대는 각각 SD 및 평균을 나타낸다.

도 7은 참조 및 시험 화합물로의 치료 후 마우스에서 *에이.바우마니*(ATCC19606)의 $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$ 폐의 산점도이다. 수직 및 수평 막대는 각각 SD 및 평균을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의:

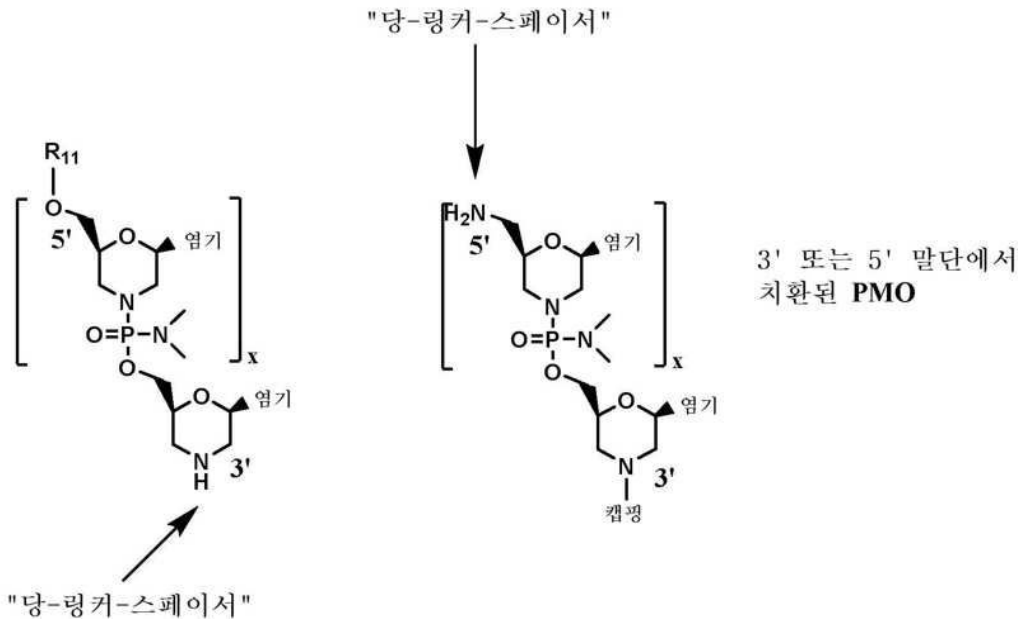
본원에서 사용되는 용어 "안티센스", "ASO" 또는 "올리고머"는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체의 선형 서열을 지칭하는 것으로서, 핵염기(예를 들어, 퓨린 또는 피리미딘)가 핵산의 구조를 모사하고 잘 특징화된 윗 스텝-크릭 염기 쌍형성을 통해 세균 DNA 또는 RNA에 결합하여 세균 성장, 생존 또는 내성 기전의 발달에 필수적인 단백질 산물의 생산을 막는 것을 가능하게 한다. 용어 "안티센스", "ASO" 또는 "올리고머"는 또한 5'-N-메틸글리신아미드와 같은 5'-말단 또는 3'-말단에서 접합된 하나 이상의 추가 모이어티를 갖는 서열을 포괄한다. 전형적으로, 합성 올리고머는 하기 도시된 바와 같은 PMO 또는 PNA로 칭해지는 변형된 서열이다.



안티센스 서열은 통상적인 5'에서 3' 방향으로 본원의 표에서 제시된다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 안티센스 서열의 3' 말단 또는 5' 말단은 말단 아미노기를 통해 본원에 기재된 분자의(화학식 I의) 나머지에 결합할 수 있다. 예를 들어, 상기 도시된 PMO 구조에서, 모르폴리노기는 본원에 기재된 분자의 나머지에 안티센스 서열을 결합하는 데 사용될 수 있고, 상기 도시된 PNA 구조에서 좌측 말단 아미노기는 본원에 기재된 분자의 나머지에 안티센스 서열을 결합하는 데 사용될 수 있다. 구현예에서, 이는 말단 아미노기를 통해 본원에 기재된 분자의(화학식 I의) 나머지에 결합된 서열의 3' 말단이다. 그러나, 대안적인 구현예에서, 이는 말단 아미노기를 통해 본원에 기재된 분자의(화학식 I의) 나머지에 결합된 서열의 5' 말단이다. 5' 말단에서 결합을 달성하기 위해, 5'-일차 아민(상업적으로 입수 가능함)으로 작용성화된 ASO는 3' 말단에서의 반응을 피하기 위해 3'-말단

에서 캡핑될 수 있다.

하기 도식은 PMO가 어떻게 3' 말단 또는 5' 말단에서 치환될 수 있는지를 도시한 것이다.



용어 "항생", "항세균" 또는 "항세균제"는, 달리 지시되지 않는 한, 그램-양성 세균 또는 그램-음성 세균에 대항하는 항세균 활성을 갖는 임의의 부류의 화합물을 지칭한다.

용어 "스페이스"는, 달리 지시되지 않는 한, "링커"에 "안티센스"를 화학적으로 결합시키는 단편(화학식 I에서 L₂)을 지칭하고, 링커는 화학적 결합이 안정하거나 세포내 세균 효소 과정에 의해 절단될 수 있도록 이후 "당"에 결합된다.

용어 "링커"는, 달리 지시되지 않는 한, "스페이스"에 "당"을 화학적으로 결합시키는 단편을 지칭하고, 스페이스는 화학적 결합이 안정하거나 세포내 세균 효소 과정에 의해 절단될 수 있도록 이후 "안티센스"에 결합된다.

용어 "당"은, 달리 지시되지 않는 한, "링커"에 화학적으로 결합하는 아실 단편을 지칭하고, 화학적 결합이 안정하거나 세포내 세균 효소 과정에 의해 절단될 수 있도록, 링커는 이후 "스페이스"에 화학적으로 결합하고, "스페이스"는 이후 "안티센스"에 화학적으로 결합한다. 본원에서, 용어 "당"은 구체적으로 N-아세틸 D-무람산 (MurNAc), 1,6-안하이드로-N-아세틸 D-무람산 (anhMurNAc) 및 일반식 I의 범위 내의 이의 간단한 N-아실 변이형을 지칭한다. "당" 내의 작용기 중 하나 이상은 보호될 수 있다. 적합한 아미노-보호기는, 예를 들어, 아세틸 및 아자이드를 포함한다. 적합한 하이드록시-보호기는, 예를 들어, 아세틸, 벤질, 벤조일 및 벤질리딘을 포함한다.

용어 "당-링커"는, 달리 지시되지 않는 한, "당" 및 "링커"의 화학적 결합에 형성되는 아실 단편을 지칭하고, 이후 "스페이스-안티센스"에 화학적으로 결합하여 전체 "당-링커-스페이스-안티센스제"를 형성한다.

용어 "당-링커-스페이스"는, 달리 지시되지 않는 한, "당" 및 "링커" 및 "스페이스"의 화학적 결합에 형성되는 아실 단편을 지칭하고, 이후 "안티센스"에 화학적으로 결합하여 전체 "당-링커-스페이스-안티센스제"를 형성한다.

본원에서 사용되는 용어 '알킬'은 선택적으로 치환될 수 있는 안정한 직쇄 및 분지쇄 지방족 탄소쇄를 포함한다. 바람직한 예로는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, t-부틸, 펜틸, 이소펜틸 및 헥실 및 이들의 임의의 간단한 이성질체가 포함된다. 바람직하게는, 알킬기는 C₁₋₄ 알킬기이다. 알킬기에 대한 치환기는 할로젠, 예를 들어, 불소, 염소, 브롬 및 요오드, OH 또는 C₁₋₄ 알콕시일 수 있다. 알킬기에 대한 다른 치환기가 대안적으로 사용될 수 있다. 알킬기에 대한 다른 치환기는 COOH 및 NH₂(및 이의 보호된 유사체)를 포함한다.

본원에서 적용되는 '할로젠' 또는 '할로'는 F, Cl, Br, I를 포괄한다.

- [0066] 본원에서 적용되는 '헤테로원자'는 O, S, P 및 N, 더욱 바람직하게는, O, S 및 N을 포괄한다.
- [0067] 본원에서 사용되는 용어 "사이클로알킬"은 치환(단일- 또는 다중-)될 수 있거나 비치환될 수 있는 사이클릭 알킬기(즉, 카르보사이클릭 고리)를 지칭한다. 사이클로알킬기에 대한 치환기는 할로겐, 예를 들어, 불소, 염소, 브롬 및 요오드, OH, C₁-C₄ 알킬 또는 C₁-C₄ 알콕시일 수 있다. 사이클로알킬기에 대한 다른 치환기가 대안적으로 사용될 수 있다. 적합한 치환기는, 예를 들어, 하나 이상의 할로기를 포함한다. 바람직하게는, 사이클로알킬기는 C₃₋₆-사이클로알킬이다. 예로는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실 등이 포함된다. 또한, 카르보사이클릭 고리 자체는, 예를 들어, 테트라하이드로푸란, 피롤리딘, 피페리딘, 피페라진 또는 모르폴린과 같은 헤테로사이클로알킬기를 제공하기 위해 선택적으로 하나 이상의 헤테로원자를 함유할 수 있다.
- [0068] 방향족 기(예를 들어, 페닐 및 벤질)는, 예를 들어, 하나 이상의 C₁₋₆ 알콕시, OH, COOH, COOMe, NH₂, NMe₂, NHMe, NO₂, CN, CF₃ 및/또는 할로기로 선택적으로 치환될 수 있다.
- [0069] 헤테로방향족 기는, 예를 들어, 하나 이상의 C₁₋₆ 알콕시, OH, COOH, COOMe, NH₂, NMe₂, NHMe, NO₂, CN, CF₃ 및/또는 할로기로 선택적으로 치환될 수 있다.
- [0070] 본 발명은 본 발명의 화합물의 모든 염, 수화물, 용매화물, 착물을 포함한다. 용어 "화합물"은 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 모든 그러한 염, 수화물, 용매화물, 착물 및 전구약물을 포함하는 것으로 의도된다.
- [0071] 본 발명은 또한 본 발명의 화합물의 중수소 유사체를 포함한다(예를 들어, 문헌[(a) Tung, R., "Deuterium medicinal chemistry comes of age", *Future Med. Chem.*, 8(5), 491-4, 2016; (b) Uttamsingh, V. *et al.*, "Altering metabolic profiles of drugs by precision deuteration", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 354(1), 43-54, 2015] 참조). 용어 "화합물"은 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 모든 중수소 유사체를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0072] 펩티드 및 화학 분야에서 일반적으로 사용되는 약칭 및 부호는 문헌[*Eur. J. Biochem.*, 158, 9-, 1984]에 기재된 바와 같은 IUPAC-IUB 생화학 명명 공동 위원회에 의해 제시된 일반 지침에 따라 본 발명의 화합물을 기재하기 위해 본원에서 사용된다. 화학식 I의 화합물 및 이의 제조에 사용되는 중간체 및 출발 물질은 특정 기가 주요 기로서 인용에 대한 우선 순위가 낮아지는 IUPAC 명명 규칙에 따라 명명된다.
- [0073] 본원에서 사용되는 용어 "AAT 안티센스제"는 표 1A 내지 표 1D에 열거된 안티센스 서열을 포함하는 본 발명의 화합물을 포함하나, 이로 제한되지 않고, 여기서 "당-링커-스페이서"는 상세히 기재된 바람직한 작용기를 통해 공유 부착된다. AAT 안티센스제는 절단되어 모 안티센스를 방출할 때까지 치료적으로 비활성일 수 있거나, 그 자체의 고유 항세균 활성을 보유할 수 있다.
- [0074] 용어 "모 안티센스"는 "당-링커-스페이서" 없이 AAT 안티센스제의 안티센스 올리고머 서열을 지칭한다. 용어 "모 안티센스", "모" 및 "모 화합물"은 본원에서 상호교환 가능하게 사용된다.
- [0075] 달리 명시되지 않는 한, 용어 "자연 발생"은 자연에서, 예를 들어, 세균 또는 포유동물(예를 들어, 인간)에서 발생하는 것을 지칭한다.
- [0076] 일 구현예에서, 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 알칼리 금속 염을 형성시키기 위해 그리고 유리 산 또는 유리 염기의 부가 염을 형성시키기 위해 일반적으로 사용되는 염을 포함한다. 이러한 염의 성질은 약제학적으로 허용되는 한 중요하지 않다. 적합한 약제학적으로 허용되는 산 부가 염은 무기산 또는 유기산으로부터 제조될 수 있다. 이러한 무기산의 예로는 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 질산, 탄산, 황산 및 인산이 있다. 적절한 유기산은 지방족, 지환족, 방향족, 아르알리파틱, 헤테로사이클릭, 카르복실산 및 설폰산 부류의 유기산으로부터 선택될 수 있고, 이의 예로는 포름산, 아세트산(예를 들어, 트리플루오로아세트산), 프로피온산, 석신산, 글리콜산, 글루콘산, 락트산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르브산, 글루쿠론산, 말레산, 푸마르산, 피루브산, 아스파르트산, 글루탐산, 벤조산, 안트라닐산, 메실산, 4-하이드록시벤조산, 페닐아세트산, 만델산, 엠본산(팜산), 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, 판토텐산, 2-하이드록시에탄설폰산, 톨루엔설폰산, 셀파닐산, 사이클로헥실아미노설폰산, 스테아르산, 알렌산, β-하이드록시부티르산, 살리실산, 갈락타르산 및 갈락투론산이 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 염기 부가염은 알루미늄, 칼슘, 리튬, 마그네슘, 칼륨, 나트륨 및 아연으로 제조된 금속성 염, 또는 N,N'-디벤질에틸렌디아민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 메글루민(N-메틸글루카민) 및 프로카인으로 제조된 유기염을 포함한다. 이들 염은, 예를 들어, 또 다른

구현예에서 적절한 산 또는 염기를 화합물과 반응시킴으로써 제조될 수 있다.

- [0077] 일 구현예에서, 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 0.01 M 내지 0.1 M 및 바람직하게는 0.05 M 포스페이트 완충액, 또는 또 다른 구현예에서 0.8% 염수를 포함하나, 이로 제한되지 않는다. 추가로, 이러한 약제학적으로 허용되는 담체는 또 다른 구현예에서 수성 또는 비수성 용액, 현탁액, 및 에멀전일 수 있다. 비수성 용매의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 예컨대, 올리브 오일, 및 주사 가능한 유기 에스테르, 예컨대, 에틸 올레이트가 있다. 수성 담체는 염수 및 완충 매질을 포함하여 물, 알콜/수성 용액, 에멀전 또는 현탁액을 포함한다. 일 구현예에서, 약제학적으로 허용되는 담체로서 사용되는 포스페이트 완충액의 수준은 약 0.01 M 내지 약 0.1 M, 또는 또 다른 구현예에서 약 0.01 M 내지 약 0.09 M, 또는 또 다른 구현예에서 약 0.01 M 내지 약 0.08 M, 또는 또 다른 구현예에서 약 0.01 M 내지 약 0.07 M, 또는 또 다른 구현예에서 약 0.01 M 내지 약 0.06 M, 또는 또 다른 구현예에서 약 0.01 M 내지 약 0.05 M, 또는 또 다른 구현예에서 약 0.01 M 내지 약 0.04 M, 또는 또 다른 구현예에서 약 0.01 M 내지 약 0.03 M, 또는 또 다른 구현예에서 약 0.01 M 내지 약 0.02 M, 또는 또 다른 구현예에서 약 0.01 M 내지 약 0.015 M이다.
- [0078] 본원에서 사용되는 용어 "진신 투여"는 경구, 설하, 협측, 경비, 경피, 직장, 근육내, 정맥내, 심실내, 척수강 내 및 피하 경로를 지칭한다.
- [0079] 용어 "정맥내 투여"는 주사 및 다른 방식의 정맥내 투여를 포함한다.
- [0080] 용어 화합물 "의 투여" 또는 "을 투여하는"는 정제, 캡슐, 시럽, 현탁액 등과 같은 경구 투여형; IV, IM, 또는 IP 등과 같은 주사용 투여형; 크림, 젤리, 분말, 또는 패치를 포함하는 경피 투여형; 구강 투여형; 흡입 분말, 스프레이, 현탁액 등; 및 직장 좌약을 포함하나, 이로 제한되지 않는, 치료적으로 유용한 형태 및 치료적으로 유용한 양으로 개체의 체내에 도입될 수 있는 형태로 본 발명의 화합물을 필요한 개체에게 제공하는 것을 지칭한다.
- [0081] 본 발명을 이용하여 유용한 투여형을 제조하기 위한 기술 및 조성물은 각각의 관련 부분이 본원에 참조로 포함되는 다음 참고문헌[Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms 2nd Edition (1976); Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985); Advances in Pharmaceutical Sciences (David Ganderton, Trevor Jones, Eds., 1992); Advances in Pharmaceutical Sciences Vol 7. (David Ganderton, Trevor Jones, James McGinity, Eds., 1995); Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms (Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Series 36 (James McGinity, Ed., 1989); Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol 61 (Alain Rolland, Ed., 1993); Drug Delivery to the Gastrointestinal Tract (Ellis Horwood Books in the Biological Sciences. Series in Pharmaceutical Technology; J. G. Hardy, S. S. Davis, Clive G. Wilson, Eds.); Modern Pharmaceutics Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol 40 (Gilbert S. Banker, Christopher T. Rhodes, Eds.), 등] 중 하나 이상에 기재되어 있다.
- [0082] 용어 "대상체"는 포유동물, 예컨대, 인간, 가축, 예컨대, 고양이과 또는 개과, 대상체, 농장 동물, 이로 제한되지는 않지만, 예컨대, 소과, 말과, 염소과, 양과, 및 돼지과 대상체, 야생 동물(야생이든 동물원이든), 연구 동물, 예컨대, 마우스, 랫트, 토끼, 염소, 양, 돼지, 개, 및 고양이, 조류 중, 예컨대, 닭, 칠면조, 및 명금을 지칭한다. 바람직하게는, 대상체는 인간이다. 대상체는, 예를 들어, 아동, 예컨대, 청소년, 또는 성인일 수 있다.
- [0083] 용어 "치료"는 포유동물, 특히, 인간에서 병리학적 상태의 임의의 치료를 지칭하며, (i) 질환에 걸리기 쉬울 수 있지만 아직 그러한 상태로 진단되지 않은 대상체에서 병리학적 상태가 발생하는 것을 예방하고, 이에 따라 치료가 질환 상태에 대한 예방적 치료를 구성하거나; (ii) 병리학적 상태를 억제하거나, 즉, 이의 발병을 저지하거나; (iii) 병리학적 상태를 완화시키거나, 즉, 병리학적 상태의 퇴행을 유발하거나; (iv) 병리학적 상태에 의해 매개된 상태를 완화시키는 것을 포함한다.
- [0084] 용어 "치료적 유효량"은 그러한 치료를 필요로 하는 포유동물에게 투여될 때 상기 정의된 바와 같은 치료를 야기하기에 충분한 본 발명의 화합물의 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 치료되는 대상체 및 질환 상태, 대상체의 체중 및 연령, 질환 상태의 중증도, 투여 방식 등에 좌우하여 달라질 것이고, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0085] **약제학적 조성물:**
- [0086] 약제학적 조성물은 윤활제(예컨대, 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트, 아연 스테아레이트, 분말형 스테아르산, 수소화 식물성 오일, 탈크, 폴리에틸렌 글리콜, 및 미네랄 오일), 착색제, 결합제(수크로스, 락토스,

젤라틴, 전분 페이스트, 아카시아, 트레가칸트, 포비돈, 폴리에틸렌 글리콜, 폴루란 및 옥수수 시럽), 유동화제(예컨대, 콜로이드성 실리콘 디옥사이드 및 탈크), 표면 활성제(예컨대, 소듐 라우릴 설페이트, 디옥틸 소듐 설페이트, 트리에탄올아민, 폴리옥시에틸렌 소르비탄, 폴록살콜, 및 사차 암모늄 염), 보존제, 안정화제, 접착제(예컨대, 점막접착제), 봉해제, 증량제, 향미제, 감미제, 약제학적으로 허용되는 담체, 및 기타 부형제(예컨대, 락토스, 만니톨, 글루코스, 프락토스, 자일로스, 갈락토스, 수크로스, 말토스, 자일리톨, 소르비톨, 칼륨, 나트륨, 및 마그네슘의 클로라이드, 설페이트 및 포스페이트 염)를 포함하나, 이로 제한되지 않는, 하나 이상의 부형제를 포함할 수 있다.

[0087] 본 발명의 AAT 안티센스제는 당분야에 공지된 방법에 의해 경구 투여형(예컨대, 정제 및 캡슐)으로 제형화될 수 있다. 투여형의 예는, 제한 없이, chewable 정제, 속용성 정제, 발포성 정제, 재구성 가능한 분말, 엘릭시르, 액체, 용액, 현탁액, 에멀전, 정제, 다층 정제, 이중 정제, 캡슐, 연질 젤라틴 캡슐, 경질 젤라틴 캡슐, 캐플렛, 트로키, 로젠지, chewable 로젠지, 비드, 분말, 과립, 입자, 마이크로입자, 분산성 과립, 카세, 얇은 스트립, 구강 필름, 경피 패치, 및 이들의 조합물을 포함한다.

[0088] 본 발명의 AAT 안티센스제는 본원에 인용된 기술 및 조성물 참고문헌에 상세히 기재된 임의의 적합한 방법에 의해 정맥내 투여형으로 제형화될 수 있다.

[0089] 본 발명의 AAT 안티센스제는 본원에 인용된 기술 및 조성물 참고문헌에 상세히 기재된 임의의 적합한 방법에 의해 비강내(경비) 투여형으로 제형화될 수 있다.

[0090] 제시되는 정제, 캡슐 및 정맥내 제형은 일일 용량, 또는 이의 적절한 분획의 본 발명의 하나 이상의 AAT 안티센스제를 편리하게 함유하는 개별 단위로 제공된다. 예를 들어, 단위는 약 1 mg 내지 약 1000 mg, 대안적으로 약 5 mg 내지 약 500 mg, 대안적으로 약 5 mg 내지 약 250 mg, 대안적으로 약 10 mg 내지 약 100 mg의 하나 이상의 본 발명의 AAT 안티센스제 또는 조합물을 함유할 수 있다.

[0091] **치료 방법:**

[0092] 본 발명의 AAT 안티센스제 및 약제학적 조성물은 단독으로 또는 다른 항생제와 조합하여 그램-음성 세균 및/또는 그램-양성 세균에 의해 초래된 세균 감염을 치료하기 위해 투여될 수 있다. 더욱 바람직한 본 발명의 AAT 안티센스제 및 약제학적 조성물은 단독으로 또는 다른 항생제와 조합하여 그램-음성 세균에 의해 초래된 세균 감염을 치료하기 위해 투여될 수 있다.

[0093] 전형적으로, 치료적 유효량의 AAT 안티센스제 또는 약제학적 조성물은 감염을 치료하기 위해 투여된다.

[0094] 성인 또는 소아 인간에 대한 용량 범위는 환자의 연령, 체중 및 상태를 포함한 다수 인자에 좌우될 것이다. 본 발명의 AAT 안티센스제의 적합한 경구 투여량은 약 1 mg 내지 약 2000 mg의 범위일 수 있다.

[0095] AAT 안티센스제 또는 항세균제(들)와 AAT 안티센스제의 조합물은 1일 1회, 또는 1일 2회, 또는 3회 이상 투여될 수 있다. 바람직하게는, AAT 안티센스제 또는 조합물은 바람직하게는 각 주입이 30분 내지 60분 동안 지속되면서, 1일 1회 내지 1일 4회의 정맥내 주입에 의해 투여된다.

[0096] **다형체**

[0097] 본 발명은 추가로 이들의 다양한 결정 형태, 다형 형태 및 (무)수화 형태의 본 발명의 화합물에 관한 것이다. 화합물은 이러한 화합물의 합성 제제에 사용되는 정제 방법 및 또는 용매로부터의 분리를 약간 달리함으로써 임의의 그러한 형태로 분리될 수 있다는 것이 제약 산업 내에 잘 확립되어 있다.

[0098] 상이한 구조적 이성질체가 존재하고/존재하거나 하나 이상의 키랄 중심이 존재하는 경우, 모든 이성질체 형태가 포함되는 것으로 의도된다. 거울상 이성질체는 이들의 키랄 중심의 절대 배열에 의해 특징화되고, 칸, 인골드 및 프렐로그(Cahn, Ingold and Prelog)의 R- 및 S-시퀀싱 규칙에 의해 기재된다. 이러한 관례는 당분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어, 문헌['Advanced Organic Chemistry', 3rd edition, ed. March, J., John Wiley and Sons, New York, 1985] 참조). 또한, 임의의 수소 원자가 중수소 원자로 치환된 일반식 I의 화합물을 포함하고자 한다.

[0099] **올리고뉴클레오타이드**

[0100] 본원에서 사용되는 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 둘 이상의 공유 연결된 뉴클레오타이드를 포함하는 분자로서 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 같이 정의된다. 이러한 공유 결합된 뉴클레오타이드는 또한 핵산 분자 또는 올리고머로 지칭될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 고체상 합성 그리고 이어서 정제에 의해 실험

실에서 제조된다. 올리고뉴클레오타이드의 서열을 언급할 때, 5'-말단에서 시작해서 3'-말단으로 종료되는(올리고뉴클레오타이드의 골격과 상관없이) 핵염기 모이어티, 또는 이의 변형, 공유 연결된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드의 서열 또는 순서가 언급된다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 인공이고, 화학적으로 합성되며, 전형적으로 정제되거나 단리된다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0101] **안티센스 올리고뉴클레오타이드**

[0102] 본원에서 사용되는 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 표적 핵산에, 특히, 표적 핵산 상의 인접 서열에 대한 혼성화에 의해 표적 유전자의 발현을 조절할 수 있는 올리고뉴클레오타이드로서 정의된다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 본질적으로 이중 가닥이 아니므로, siRNA 또는 shRNA가 아니다. 바람직하게는, 본 발명의 화합물에 사용되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥이다. 본 발명의 화합물에 사용되는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드는, 내부 또는 개재 자기-상보성의 정도가 올리고뉴클레오타이드 전장에 걸쳐 50% 미만인 한, 헤어핀 또는 분자간 듀플렉스 구조(동일한 올리고뉴클레오타이드의 두 분자 사이의 듀플렉스)를 형성할 수 있다는 것이 이해된다.

[0103] 용어 "안티센스"는 특정 핵산 서열의 "센스" 가닥에 상보적인 핵산 서열을 함유하는 임의의 조성물을 지칭한다. 세포에 도입되면, 상보적 뉴클레오타이드는 세포에 의해 생산된 자연적인 서열과 조합되어 듀플렉스를 형성하고, 전사 또는 번역을 차단하고, 이에 의해 유전자 발현을 변경하고/변경하거나 전사후 RNA 가공(예를 들어, 스플라이싱, 마이크로RNA 조절 등)에 간섭한다. 명칭 "음성" 또는 "마이너스"는 안티센스 가닥을 지칭할 수 있고, 명칭 "양성" 또는 "플러스"는 센스 가닥을 지칭할 수 있다.

[0104] "안티센스 올리고머", "안티센스 올리고뉴클레오타이드" 또는 "ASO"는 적어도 10개의 뉴클레오타이드 길이의 올리고머를 포함하는 안티센스 분자 또는 항-유전자 제제를 지칭한다. 특정 구현예에서, 안티센스 올리고머는 적어도 15개, 18개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 또는 50개의 뉴클레오타이드를 포함한다. ASO는 당분야에 공지된 표준 방법에 의해 합성될 수 있다. 예로서, 포스포로티오에이트 올리고머는 문헌[Stein et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16, 3209-3211]의 방법에 의해 합성될 수 있고, 메틸포스포네이트 올리고머는 제어형 기공 유리 폴리머 지지체의 사용에 의해 제조될 수 있다(Sarin et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 7448-7451). 모르폴리노 올리고머는 Summerton 및 Weller의 미국 특허 제5,217,866호 및 제5,185,444호의 방법에 의해 합성될 수 있다.

[0105] 본 발명의 AAT ASO에 포함되는 안티센스 올리고머는 세균에서 독력, 항생제 내성, 생물막 형성 또는 필수 성장 및 생존 과정에 기여하는 유전자를 표적화할 수 있다. 본 발명의 AAT ASO에 포함되는 안티센스 올리고머는 세균 감염의 단일요법 치료에 유용하거나, 공지된 항생제와의 병용 사용을 통해, 세균 감염에 대항하는 개선되고 임상적으로 유의미한 활성(최소 억제 농도; MIC)을 제공하는 데 유용할 수 있다.

[0106] **화학식 I의 바람직한 하위-구조**

[0107] 구현예에서, p 는 1이다.

[0108] 구현예에서, R_1 은 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬 및 C_{3-8} 치환된 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0109] 구현예에서, R_1 은 H, C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 치환된 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0110] 구현예에서, R_1 은 H이다.

[0111] 구현예에서, R_1 은 C_{1-6} 알킬이다. 바람직하게는, R_1 은 C_{1-4} 알킬이다. 더욱 바람직하게는, R_1 은 Me이다.

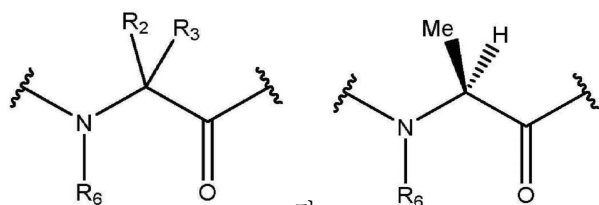
[0112] 구현예에서, p 는 0이다.

[0113] 구현예에서, n 은 1이다.

[0114] 구현예에서, n 은 2이다.

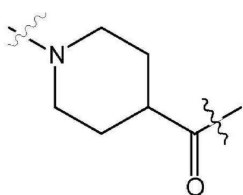
[0115] 구현예에서, R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬 및 C_{3-8} 치환된 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0116] 구현예에서, R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 치환된 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0117] 구현예에서, R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0118] 구현예에서, R_2 및 R_3 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-6} 알킬이다. 바람직하게는, R_2 및 R_3 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-4} 알킬이다. 더욱 바람직하게는, R_2 및 R_3 중 하나는 H이고, 다른 하나는 Me이다.
- [0119] 구현예에서, R_2 및 R_3 는 각각 H이다.
- [0120] 구현예에서, R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬 및 C_{3-8} 치환된 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0121] 구현예에서, R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 치환된 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0122] 구현예에서, R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 H 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0123] 구현예에서, R_4 및 R_5 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-6} 알킬이다. 바람직하게는, R_4 및 R_5 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-4} 알킬이다. 더욱 바람직하게는, R_4 및 R_5 중 하나는 H이고, 다른 하나는 Me이다.
- [0124] 구현예에서, R_4 및 R_5 는 각각 H이다.
- [0125] 구현예에서, m은 0이고, R_4 및 R_5 는 존재하지 않는다. 구현예에서, m은 0이고, R_4 및 R_5 는 존재하지 않고, R_2 및 R_3 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-6} 알킬이다. 바람직하게는, m은 0이고, R_4 및 R_5 는 존재하지 않고, R_2 및 R_3 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-4} 알킬이다. 더욱 바람직하게는, m은 0이고, R_4 및 R_5 는 존재하지 않고, R_2 및 R_3 중 하나는 H이고, 다른 하나는 Me이다. 가장 바람직하게는, m은 0이고, R_4 및 R_5 는 존재하지 않고, R_2 및 R_3 는 Me이다.



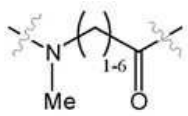
- [0126] 가. 가 되도록 선택된다.

- [0127] 구현예에서, m은 2이고, R_4 및 R_5 는 H이다. 구현예에서, m은 0이고, R_4 및 R_5 는 H이고, R_2 및 R_3 는 H이다.
- [0128] 구현예에서, R_6 는 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬 및 C_{3-8} 치환된 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0129] 구현예에서, R_6 는 H, C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 치환된 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0130] 구현예에서, R_6 는 H이다.
- [0131] 구현예에서, q는 1이다.
- [0132] 구현예에서, q는 1이고, L_2 는 하기 구조를 갖는다:



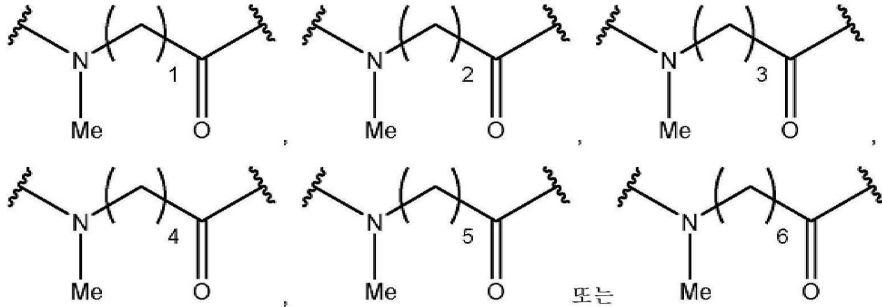
- [0133]

[0134] 구현예에서, q는 1이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



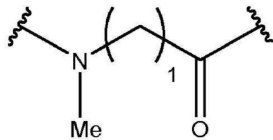
[0135]

[0136] 구현예에서, q는 1이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



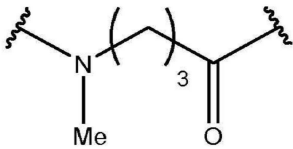
[0137]

[0138] 구현예에서, q는 1이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



[0139]

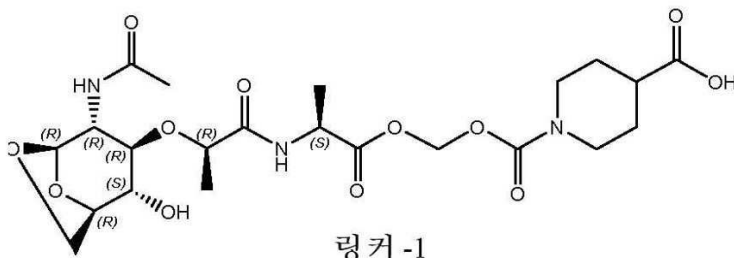
[0140] 구현예에서, q는 1이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



[0141]

[0142] 구현예에서, q는 0이다.

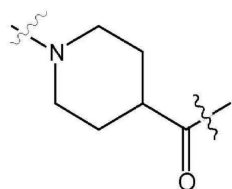
[0143] 링커-1:



[0144]

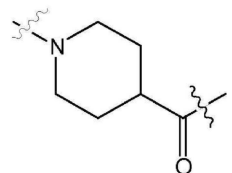
[0145] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이다.

[0146] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 H이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C₁₋₆ 알킬이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



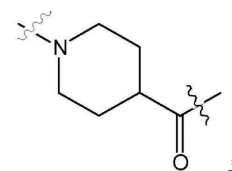
[0147]

[0148] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 H이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 Me이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



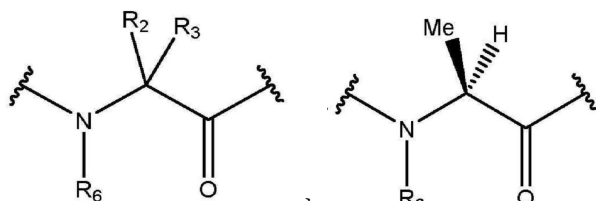
[0149]

[0150] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 H이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 Me, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조



[0151]

를 갖고, R₂ 및 R₃ 기는 모이어티

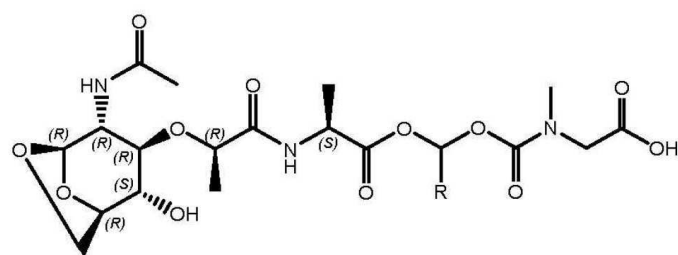


[0152]

가 가 되도록 선택된다.

[0153]

링커-2:

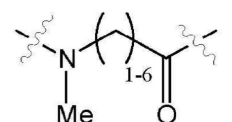


링커-2 (R = H)
링커 3 (R = Me)

[0154]

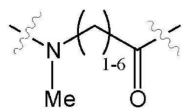
[0155] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이다.

[0156] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 H이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C₁₋₆ 알킬이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



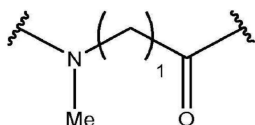
[0157]

[0158] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 H이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 Me이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



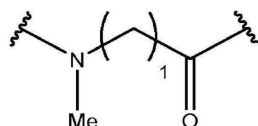
[0159]

[0160] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 H이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C₁₋₆ 알킬이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



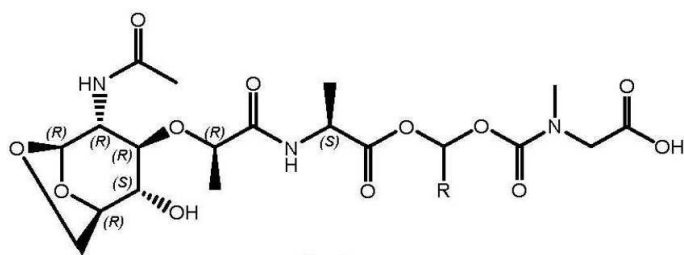
[0161]

[0162] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 H이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 Me이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



[0163]

[0164] 링커-3:



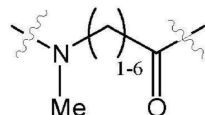
링커-2 (R = H)

링커 3 (R = Me)

[0165]

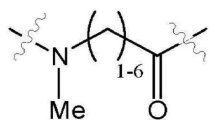
[0166] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이다.

[0167] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 C₁₋₆ 알킬이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C₁₋₆ 알킬이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



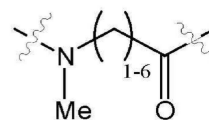
[0168]

[0169] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 C₁₋₆ 알킬이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 Me이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



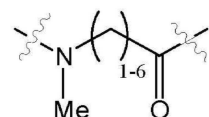
[0170]

[0171] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 Me이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C₁₋₆ 알킬이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



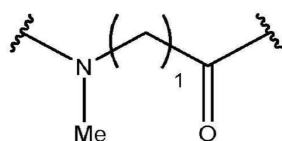
[0172]

[0173] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 Me이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 Me이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



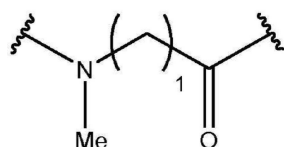
[0174]

[0175] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 C₁₋₆ 알킬이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C₁₋₆ 알킬이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



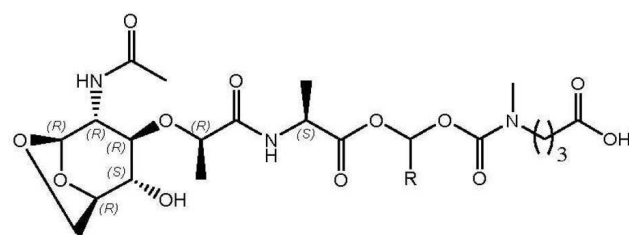
[0176]

[0177] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 Me이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 Me이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



[0178]

[0179] 링커-4:



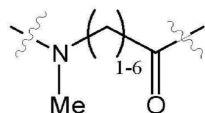
링커-4 (R = H)
링커-5 (R = Me)

[0180]

[0181] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이다.

[0182] 구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 H이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C₁₋₆ 알킬이

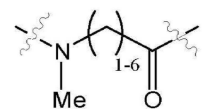
고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



[0183]

[0184]

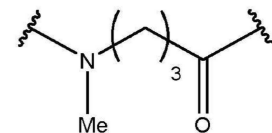
구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 H이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 Me이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



[0185]

[0186]

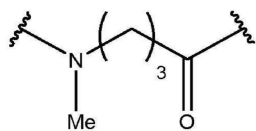
구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 H이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C₁₋₆ 알킬이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



[0187]

[0188]

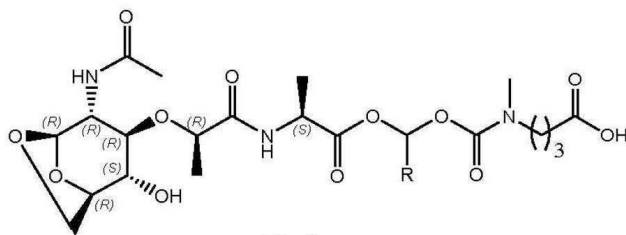
구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 H이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 Me이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



[0189]

[0190]

링커-5:



링커-4 (R = H)

링커-5 (R = Me)

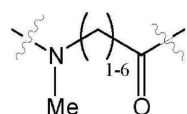
[0191]

[0192]

구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이다.

[0193]

구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 C₁₋₆ 알킬이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C₁₋₆ 알킬이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:

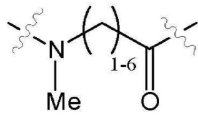


[0194]

[0195]

구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 C₁₋₆ 알킬이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 Me

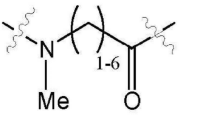
이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



[0196]

[0197]

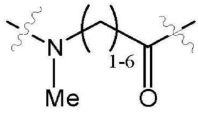
구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 Me이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C₁₋₆ 알킬 이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



[0198]

[0199]

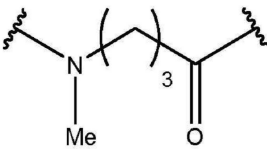
구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 Me이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 Me이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



[0200]

[0201]

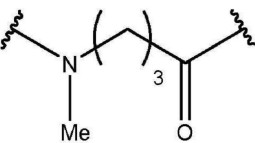
구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 C₁₋₆ 알킬이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C₁₋₆ 알킬이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



[0202]

[0203]

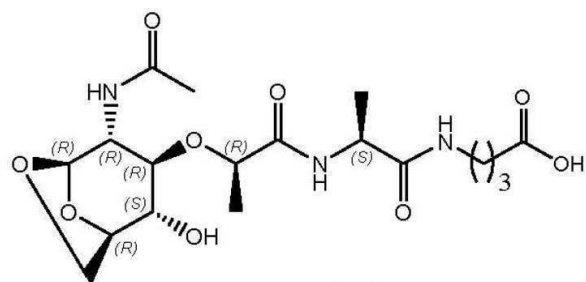
구현예에서, p는 1이고, n은 1이고, q는 1이고, R₁은 Me이고, R₂ 및 R₃ 중 하나는 H이고, 다른 하나는 Me이고, m은 0이고, R₄ 및 R₅는 존재하지 않고, R₆는 H이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



[0204]

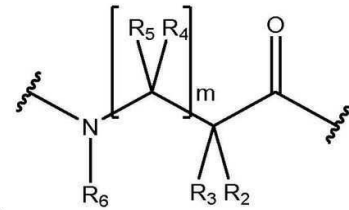
[0205]

링커-6:



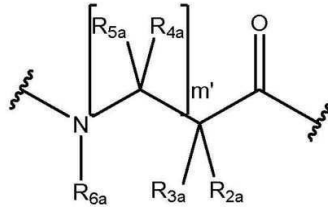
링커-6

[0206]



잔기는

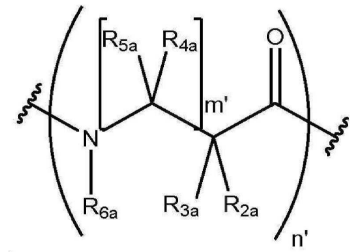
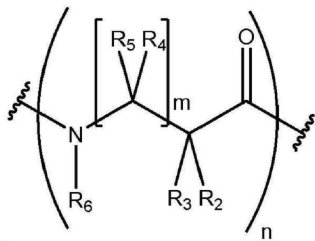
[0207] 구현예에서, p 는 0이고, n 은 2이고, q 는 0이고, 하나의



이고, R_{2a} , R_{3a} , R_{4a} , R_{5a} , R_{6a} 및 m' 는 모이어티 R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 및 m (본원에서 임의의 구현예에 기재된 바와 같음)과 동일한 각각의 정의를 갖지만, 이로부터 독립적으로 선택될 수 있다.

[0208] 구현예에서, p 는 0이고, n 은 2이고, q 는 0이고, R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, R_{2a} 및 R_{3a} 는 각각 H이고, R_4 , R_5 , R_{4a} 및 R_{5a} 는 각각 H이고, m 은 0이고, m' 는 2이고, R_6 는 H이고, R_{6a} 는 H이다.

[0209] 구현예에서, p 는 0이고, n 은 2이고, q 는 0이고, R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H 및 Me으로 이루어진 군으로부터 선택되고, R_{2a} 및 R_{3a} 는 각각 H이고, R_4 , R_5 , R_{4a} 및 R_{5a} 는 각각 H이고, m 은 0이고, m' 는 2이고, R_6 는 H이고, R_{6a} 는 H이다.



[0210] 구현예에서, 는 좌측의 당 모이어티에 결합되고, 는 우측의 안티센스 모이어티에 결합된다.

[0211] 구현예에서, R_1 은 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬 및 C_{3-8} 치환된 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬 및 C_{3-8} 치환된 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬 및 C_{3-8} 치환된 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R_6 는 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬 및 C_{3-8} 치환된 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.

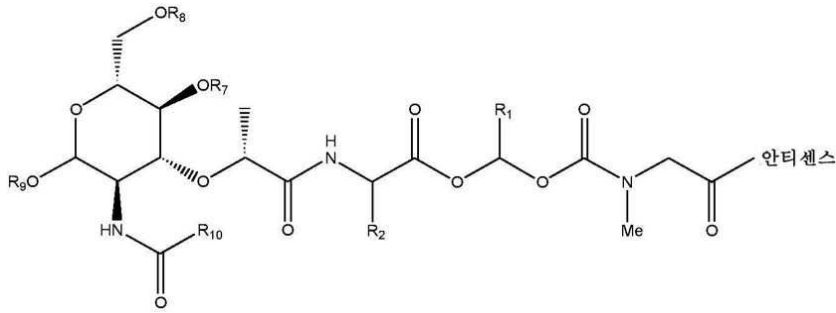
[0212] 구현예에서, R_1 은 H, C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 치환된 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 치환된 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 치환된 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R_6 는 H, C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 치환된 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0213] 구현예에서, R_1 은 H이고; R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 H 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R_6 는 H이다.

[0214] 구현예에서, R_1 은 H이고; R_2 및 R_3 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-6} 알킬이고, 바람직하게는, R_2 및 R_3 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-4} 알킬이고; R_4 및 R_5 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-6} 알킬이고, 바람직하게는, R_4 및 R_5 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-4} 알킬이고, R_6 는 H이다.

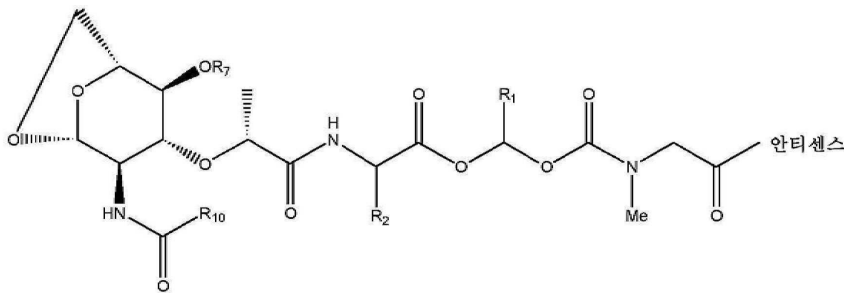
- [0215] 구현예에서, R_1 은 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬 및 C_{3-8} 치환된 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬 및 C_{3-8} 치환된 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; m 은 0이고; R_6 는 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 치환된 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬 및 C_{3-8} 치환된 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0216] 구현예에서, R_1 은 H, C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 치환된 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 치환된 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; m 은 0이고; R_6 는 H, C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 치환된 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0217] 구현예에서, R_1 은 H이고; R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; m 은 0이고; R_6 는 H이다.
- [0218] 구현예에서, R_1 은 H이고; R_2 및 R_3 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-6} 알킬이고, 바람직하게는, R_2 및 R_3 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-4} 알킬이고; m 은 0이고; R_6 는 H이다.
- [0219] 구현예에서, R_1 은 C_{1-6} 알킬이고; R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 H 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R_6 는 H이다.
- [0220] 구현예에서, R_1 은 C_{1-6} 알킬, 바람직하게는 C_{1-4} 알킬이고; R_2 및 R_3 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-6} 알킬이고, 바람직하게는, R_2 및 R_3 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-4} 알킬이고; R_4 및 R_5 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-6} 알킬이고, 바람직하게는, R_4 및 R_5 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-4} 알킬이고; R_6 는 H이다.
- [0221] 구현예에서, R_1 은 C_{1-6} 알킬이고; R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; m 은 0이고; R_6 는 H이다.
- [0222] 구현예에서, R_1 은 C_{1-6} 알킬, 바람직하게는 C_{1-4} 알킬이고; R_2 및 R_3 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-6} 알킬이고, 바람직하게는, R_2 및 R_3 중 하나는 H이고, 다른 하나는 C_{1-4} 알킬이고; m 은 0이고; R_6 는 H이다.
- [0223] 구현예에서, p 는 0이고, n 은 0이다.
- [0224] 구현예에서 p 는 1이고, n 은 1, 2, 3 또는 4이고, q 는 1이다. 구현예에서 p 는 1이고, n 은 1이고, q 는 1이다.
- [0225] 구현예에서 p 는 1이고, n 은 0이고, q 는 1이다.
- [0226] 구현예에서, p 는 0, n 은 0이고, q 는 1이다.
- [0227] 구현예에서, R_7 은 H이다. 구현예에서, R_7 은 아세틸이다. 구현예에서, R_7 은 벤조일이다.
- [0228] 구현예에서, R_8 은 H이다. 구현예에서, R_8 은 아세틸이다. 구현예에서, R_8 은 벤조일이다.
- [0229] 구현예에서, R_9 은 H이다. 구현예에서, R_9 은 아세틸이다. 구현예에서, R_9 은 벤조일이다.
- [0230] 구현예에서, R_{10} 은 메틸이다. 구현예에서, R_{10} 은 에틸이다. 구현예에서, R_{10} 은 프로필이다.
- [0231] 예로서, 본 발명에 따른 화합물은 하기 바람직한 하위구조를 포함하나, 이로 제한되지 않는다:

[0232] [화학식 Ib]



[0233]

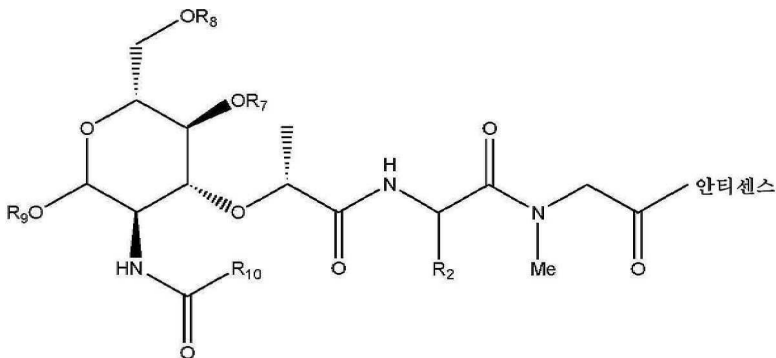
[0234] [화학식 Ic]



[0235]

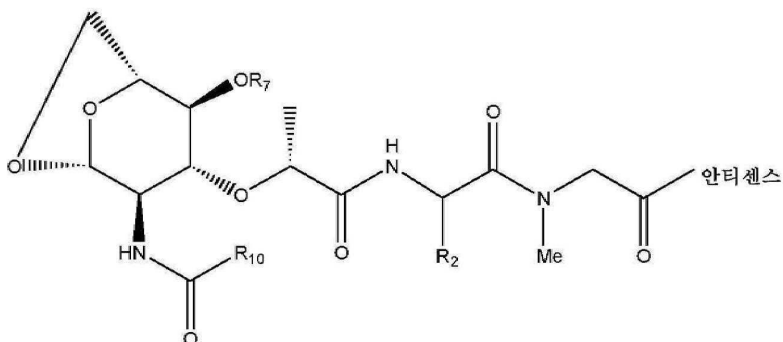
[0236] (상기 식에서, m은 '0'으로 선택되고, n은 '1'로 선택되고, p는 '1'로 선택되고, q는 '1'로 선택되고, R₃는 H이고, R₆는 H이고, "스페이스"는 N-메틸글리신이고, R₁, R₂, R₇, R₈, R₉ 및 R₁₀은 상기 정의된 바와 같음); 또는

[0237] [화학식 Id]



[0238]

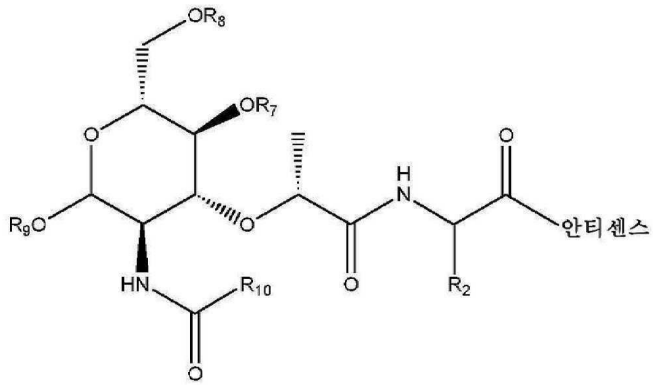
[0239] [화학식 Ie]



[0240]

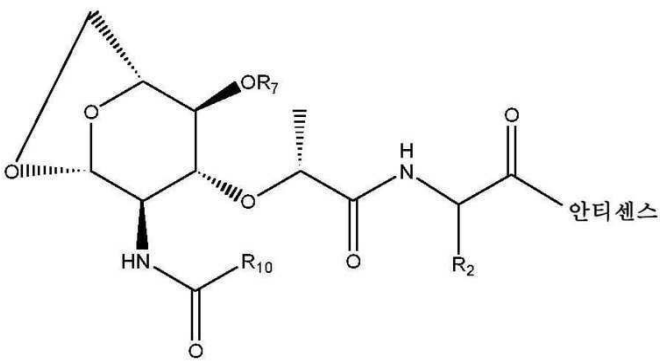
[0241] (상기 식에서, m은 '0'으로 선택되고, n은 '1'로 선택되고, p는 '0'으로 선택되고, q는 '1'로 선택되고, R₃는 H이고, R₆는 H이고, "스페이스"는 N-메틸글리신이고, R₂, R₇, R₈, R₉ 및 R₁₀은 상기 정의된 바와 같음); 또는

[0242] [화학식 If]



[0243]

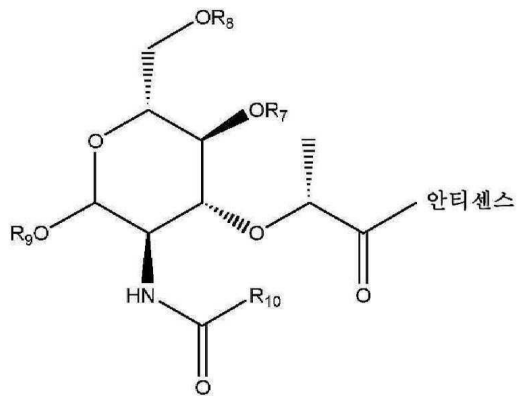
[0244] [화학식 Ig]



[0245]

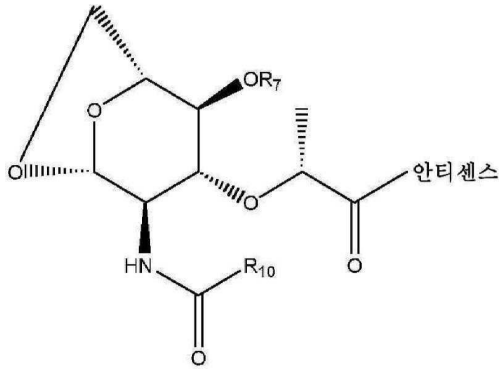
[0246] (상기 식에서, m은 '0'으로 선택되고, n은 '1'로 선택되고, p는 '0'으로 선택되고, q는 '0'으로 선택되고, R₃는 H이고, R₂, R₇, R₈, R₉ 및 R₁₀은 상기 정의된 바와 같음); 또는

[0247] [화학식 Ih]



[0248]

[0249] [화학식 Ii]



[0250]

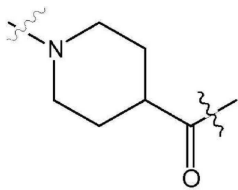
[0251] (상기 식에서, n은 '0'으로 선택되고, p는 '0'로 선택되고, q는 '0'으로 선택되고, R₇, R₈, R₉ 및 R₁₀은 상기 정의된 바와 같음).

[0252] 바람직한 구현예에서, 하위구조 Ic, Ie, Ig, 및 Ii가 선택된다.

[0253] 더욱 더 바람직한 구현예에서, 하위구조 Ic 및 Ig가 선택된다.

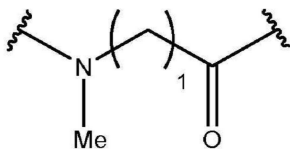
[0254] 예로서, 본 발명에 따른 화합물은 하기 특징들의 조합을 포함하나, 이로 제한되지 않는다:

[0255] ● n은 1이고, m은 0이고, R₆는 H이고, R₂는 H이고, R₃는 Me이고, p는 1이고, R₁은 H 또는 Me이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



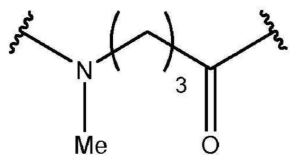
[0256]

[0257] ● n은 1이고, m은 0이고, R₆는 H이고, R₂는 H이고, R₃는 Me이고, p는 1이고, R₁은 H 또는 Me이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



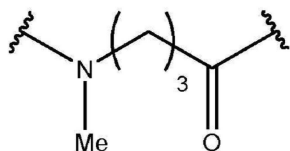
[0258]

[0259] ● n은 1이고, m은 0이고, R₆는 H이고, R₂는 H이고, R₃는 Me이고, p는 1이고, R₁은 H 또는 Me이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



[0260]

[0261] ● n은 1이고, m은 0이고, R₆는 H이고, R₂는 H이고, R₃는 Me이고, p는 0이고, L₂는 하기 구조를 갖는다:



[0262]

[0263] **바람직한 안티센스제**

[0264] 안티센스제는 일반식 I의 분자를 제공하도록 분자의 나머지와 화학적 결합 형성을 위한 말단 아미노 작용기를 함유한다. 하기 표 1A, 1B, 1C, 1D는 가능한 안티센스 표적의 완전한 목록인 것으로 의도된 것이 아니며, 안티센스제가 포함할 수 있는 염기 서열을 상세히 기재한 것이다.

[0265] 바람직한 ASO는 세균 생존 및 성장에 필수적인 생화학적 경로 및/또는 세포 과정에서 단백질을 인코딩하는 세균 핵산 표적에 특이적으로 혼성화하기에 충분한 길이 및 상보성으로 되어 있다. 이러한 생화학적 경로 또는 세포 과정의 일반적인 예로는 세포 분열, 뮤레인 생합성, 전반적인 조절 기전, 지방산 생합성, DNA 복제, 리보솜 단백질, 전사, 번역 개시, 지질다당류 생합성, 핵산 생합성, 생물막 성장 및 중간 대사가 포함된다. 생화학적 경로 및 세포 과정에서 유전자의 특정 예는 다음을 포함한다: RpsJ 및 RpmB(리보솜 단백질); LpxC, WaaC, WaaG, WaaA, WaaF, LpxA, LpxB(지질다당류 생합성); murA, mraY, murB, murC, murE, murF, murG(뮤레인 펩티도글리칸 생합성); acpP, accA, accB, fabG, fabZ(지방산 생합성); acpS(아실 운반 단백질 신타제); fabI(에노일-아실 운반 단백질 환원효소); fabD(말로닐 조효소 A 아실 운반 단백질 트랜스시클라제); folP(디하이드로프테로에이트 신타제); fmbB(글리신 부착에서의 단백질); gyrA(DNA 자이라제 서브유닛); adk(아데닐레이트 키나제, 세포 에너지 항상성); infA(단백질 생합성); ftsZ(세포 분열); rpoD(RNA 합성); aroC(방향족 화합물 생합성); inhA(에노일-아실 운반 단백질 환원효소); ompA(외막 단백질 A); blaT, cml, adeA(항생제 내성-관련 유전자); cepL, cepR, subB, CsuE, SecA, PglL, PilU1, AlgZ, AlgU, LasR, FleR, PelF(생물막 형성-관련).

[0266] [표 1A]

예시적인 항생제 내성 표적화 서열		
표적 유전자	안티센스 서열 (5'-3')	서열 ID
NDM-1	TCA AGT TTT CC	1
NDM-1	TCC TTT TAT TC	2
NDM-1	CCA TCA AGT TT	3
NDM-1	GGC AAT TCC AT	4
adeA	ATA CTG TCC AA	5
OmpA	CAT GGA TAT CC	6
AcrA	ATG TAA ACC TC	7
AcrA	GTT CAT ATG TA	8
AcrA	ACC CCT CTG TT	9
AcrA	TGT TCA TAT GT	10
AcrB	GTC TTA ACG GC	11
AcrB	AGG CAT GTC TT	12
AcrB	TAG GCA TGT CT	13
AcrR	TAT GTT CGT GA	14
ToIC	TTC ATT TGC AT	15
ToIC	ATT CCT TGT GG	16
ToIC	TTT GCA TTC CT	17
KPC	GAT ACA GTG AC	18
KPC 1-4	AAC GAT ATT CC	19

[0267]

[0268] [표 1B]

예시적인 생물막 형성 표적화 서열		
표적 서열	안티센스 서열 (5'-3')	서열 ID
cepl	AAG GTC TGC AT	20
cepl	TCG GAT CTG TG	21
cepl	CAT GGA TGT CC	22
cepl	CGT GAA CGA AG	23
cepl	CGT GTG GCA AC	24
cepl	GCC CGA GAT CC	25
cepl	CTT TCG TTC GC	26
suhB	ATG CAT GAG CC	27
suhB	GGA TGC ATG AG	28
CsuE	TTA TAT TCA TGG	29
CsuE	TCA TGG CAA AG	30
CsuE	TTT CCT GTC AA	31
SecA	TTG CCA ACA TG	32
PglL	CAT TAC CCA AG	33
PilU1	TTA AAA TCC AT	34
AlgZ	TAG GCA TCG AC	35
AlgU	AAA GCT CCT CT	36
LasR	AGG CCA TAG CG	37
FleR	TTA CTC CTG AA	38
PelF	TTC GGT CAT GT	39

[0269]

[0270] [표 1C]

예시적인 지방산 생합성-관련 표적화 서열		
표적 유전자	안티센스 서열 (5'-3')	서열 ID
acpP	GTC CAT TAC CC	40
acpP	CAT TAC CCC TC	41
acpP	CCA TTA CCC CT	42
acpP	TCC ATT ACC CC	43
acpP	TGT CCA TTA CC	44
acpP	TTG TCC ATT AC	45
acpP	GTT GTC CAT TA	46
acpP	TGT TGT CCA TT	47
acpP	ATG TTG TCC AT	48
acpP	TTT ACA AGT GC	49
acpP	CCT CCG AGG GA	50
acpP	ACA CGT TGT TC	51
acpP	AGT TCA GCG AC	52
acpP	CTC ATA CCT TG	53
acpP	TGC TCA TAC TC	54
acpP	CTC ATA CTC T	55
acpP	CTC ATA CTA T	56
acpP	CTT CGA TAG TG	57
acpP	ATA TCG CTC AC	58
acpP	ATT CTC CTC AT	59
acpP	CAC AGG AAT TC	60
acpP	CAT TGC TTG TG	61
acpP	CAT ACC TTG TT	62
acpS	TTG CCA TTA GC	63
acp-E	CTG TAG TGA TTT CAC CA	64
fabA	TTA TCT ACC AT	65
fabB	CGT TTC ATT AA	66
fabB	GCA CGT TTC AT	67
fabI	AGA AAA CCC AT	68
fabI	GCT TTA ATC C	69
fabI	CCC ATA GCT T	70
fabI	CAT GTA AGA T	71
fabI	AGA TAA CTC C	72
gapA	TTG ATA GTC AT	73
accA	GCT TTT TTC AT	74
accA	AGG CTT CCG TC	75
fabD	GTC ATG TTT T	76
inhA	GTC ATT TGG T	77
inhA	CAT TTG GTG ACT	78

[0271]

[0272] [표 1D]

다른 경로 또는 세포 과정과 관련된 에시적인 표적화 서열		
표적 유전자	안티센스 서열 (5'-3')	서열 ID
RpoD	TCA TCT TTG CT	79
RpoD	TTT TGC TCC AT	80
PolB	AGT AAC TCC AC	81
murA	TTT ATC CAT TG	82
rpsJ	GCA TTT GAC CT	83
rpsJ	TAG ACA TAC CA	84
rpsJ	TAC CAG TAA AC	85
rpsJ	TGG TTC TGC AT	86
rpsJ	CCT CAG ACT CC	87
rpsJ	GCA TTT GAC CT	88
ftsZ	AGT TTC TCT CC	89
ftsZ	GTT CAA ACA TA	90
ftsZ	TCA AAT GAG GC	91
ftsZ	AAT GAG GCC AT	92
ftsZ	ATA GTT TCT CTC C	93
gyrA	CGC TCA TCT AA	94
gyrA	CTA TAC ATA GAC	95
gyrA	GCC ATC TCG GAC ATC	96
gyrA	ATA CCA GGT GTT ATC T	97
dnaB	TTC CTG CCA TA	98
LpxC	TTT GAT CAT CG	99
LpxC	TGT TTG ATC AT	100
LpxC	TGT TTC ACC AT	101
LpxC	GTT GTT TGA TC	102
23S rRNA	AGT GCT CTA CC	103
23S rRNA	GCC TGT TAT CC	104
16S rRNA	CCA TGC AGC AC	105
16S rRNA	TTG CGC TCG TT	106
16S rRNA	GGC TGC TGG CA	107
fmbB	CCA TGA AAA A	108
polA	TTC ATG CCT GT	109
murA	ATC CAT TTA GT	110
murA	CAT TTA GTT TG	111
murA	AAT TTA TCC AT	112
murA	AAA TTT ATC CA	113
rpmB	ACT CGG GAC AT	114
rpmB	CTA TTC TCC AA	115
rpmB	GGC AGA CTC GG	116
rpmB	CTT AGA CAT GG	117
adk	ATG ATA CGC AT	118
adk	AGT GCC CTC C	119
infA	TCT TTG GCC AT	120

[0273]

[0274] [표 1D]

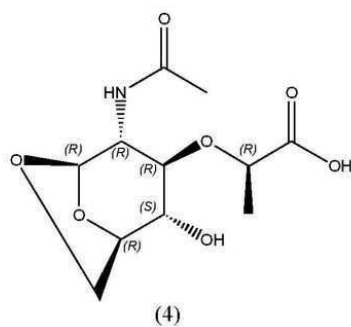
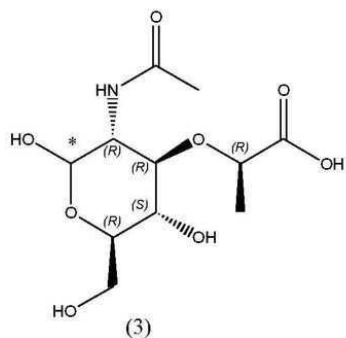
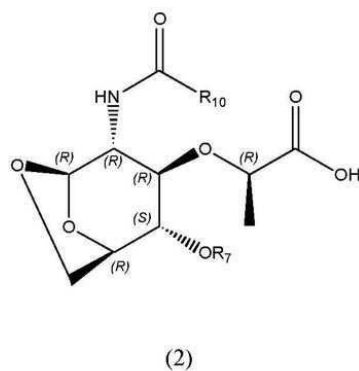
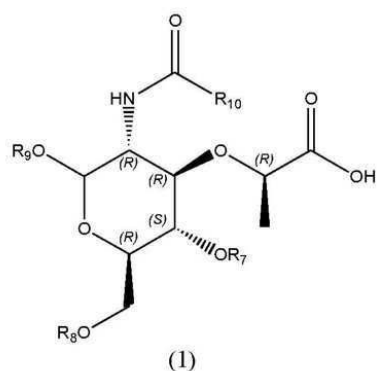
기타 경로 또는 세포 과정과 관련된 예시적인 표적화 서열		
표적 유전자	안티센스 서열 (5'-3')	서열 ID
aroC	TTT CCA GCC AT	121
aroC	TTC CCT GCC AT	122
murF	ACG CTA ATC AT	123
murF	ACC TCC CAG GC	124
kdtA	AAT TCG AGC AT	125
boxA	TGT TTA AGA GC	126
boxA	CTC TTA ATG AT	127
boxC	ATC CAC CAC AG	128
rpoD-E	CTT GTA ACC ACA CCA	129
rpoD-E	TCC ACC AAG TCA CCA	130
pryC	GGT GCA GTC AT	131
pryC	AGA GTT CAA GG	132
pryA	GAC TTA ATC AA	133
lgt	CTA CTG GTC AT	134
folA	CAT TGA GAT TT	135
infB	ACA TCT GTC AT	136
nrdA	TTC TGA TTC AT	137
nrdB	GTA TAT GCC AT	138
zipA	TCC TGC ATC AT	139
caoA	ATA TAC CTC AT	140
gyrA-E	GTT ACC CTG ACC GAC CA	141
gyrA-E	GTT ACC CTG ACC ACC A	142
nrdA	TGT TTC ATA CG	143
LpxB	GGT TTG CCA AG	144
LpxB	TAA TCC GTC AG	145
carA	GGT GCT CAA AC	146
adeA	ATA CTG TAA AA	147
blaT	CTC TTC CTT TT	148
crml	TCC TTC TGA TT	149
folP	ATG TTA TCC C	150
fmhB	CCA TGA TTT A	151
hmrB	TCC ACG TCG A	152
rpmB	GTC TAT TCT CC	153
rpmB	GAC ATG TCT AT	154
hmrB	TCC ACG TCG A	155
FabG	TTC TCT CCT TT	156
RpmB	CTC TAG ACA TG	157
WaaC	AGC ACC CTC AT	158
MryA	TGA CTC TCC TC	159
MurC	CCA CCT CCA GG	160
LpxA	ATC AAA CTC AT	161
WaaG	GCC AGG GTC AT	162
WaaA	GTACGG TTC AT	163
murB	CAG TCG CCC CT	164
murE	AGG CTC ATA GG	165
AccB	CTA GCA CTC CC	166
FabZ	ATG TCC ATC AT	167
MurG	GCA AAG TCC TC	168
AmpR	GTC GAA CCA AT	169
LepB	ATT GAG TGT CAT	170
LplD	TGC CAT CTT GTT	171
MraY	CAG GAG CAT TAG	172

[0275]

[0276] 당업자는 표 1A, 1B, 1C 및 1D에 열거된 서열이 표적화 안티센스 서열이며, 이들이 5'-말단 및 3'-말단 중 어느 하나 또는 둘 모두에 추가 모노머 단위의 부가를 통해 길이가 증가될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 또한, 표 1A, 1B, 1C 및 1D에 열거된 표적화 서열은 1개, 2개 또는 3개의 모노머 단위가 상이하고, 관심 대상의 세균 핵산에 결합하는 능력을 여전히 보유할 수 있다.

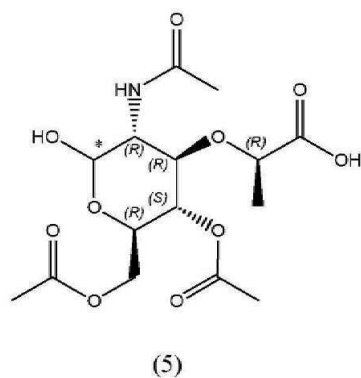
[0277] **바람직한 "당 시약"**

[0278] 본 발명의 "당"은 "당 시약"의 사용을 통해 제조된다. "당 시약"의 사용은 "당 시약"의 말단 카르복실산의 α-카르보닐과 일반식 I의 분자의 나머지 사이에 화학적 결합의 화학선택적 형성(주로 아미드 결합 형성)을 제공한다. "당 시약"의 말단 카르복실산이 "당"의 락틸 잔기의 α-카르보닐인 경우, 하기가 이들 단계를 위한 공지된 바람직한 시약(2-6)이다:



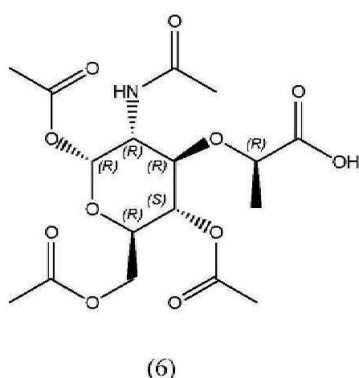
* 아노머 (S); CAS 61633-77-8 * 아노머 (R); CAS 61665-31-4

CAS 104430-66-2



CAS 25605-74-7

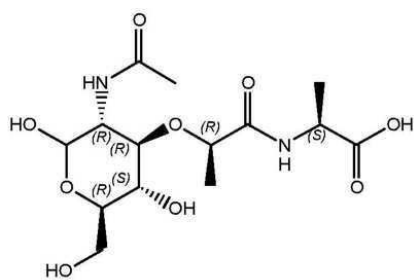
* 아노머 (S); CAS 149713-67-7



CAS 149622-52-6

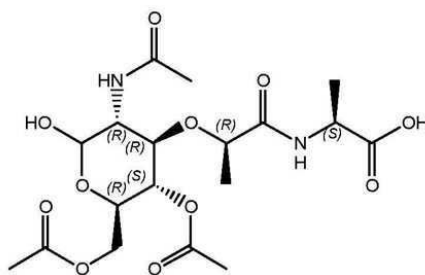
이들 시약은 상업적으로 입수 가능하거나 전체 합성 절차가 문헌에 기재되어 있다(예를 들어, (3)의 경우, 상업적으로 입수 가능하고, 문헌[Merten, H and Brossmer, R., *Carbohydrate Res.*, 191(1), 144-9, **1991**] 참조; (4)의 경우, 문헌[Paulsen, H *et al.*, *Liebigs Annalen der Chemie*, 4, 664-74, **1986**; Heseck, D. *et al.*, *JACS*, 131(14), 5187-93, **2009**; Wang, Q. *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* 14(3), 1013-23, **2016**; Calvert, M. B. *et al.*, *Beilstein J. Org. Chem.* 13, 2631-2636, **2017**] 참조; (5)의 경우, 문헌[Osawa, T *et al.*, *Biochemistry*, 8(8), 3369-75, **1969**] 참조; (6)의 경우, 문헌[Wacker, O and Traxler, P. EP541486] 참조).

'n'이 1로 선택되는 변형예에서, 예를 들어, "당 시약"의 말단 카르복실산이 L-알라닌 잔기의 α-카르보닐인 경우, 시약(2-6)을 연장하고, 이들 추가 중간체를 후속 반응에 사용하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 전략적 변형예에서, 하기가 이들 단계를 위한 바람직한 시약(7 내지 9b)이다:

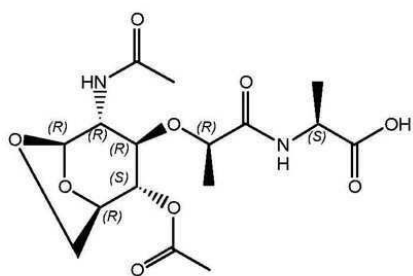


(7)

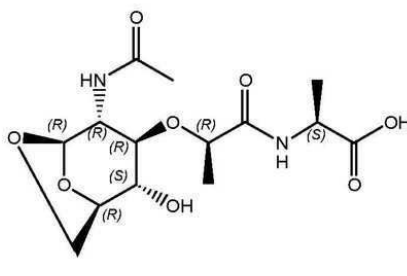
* 아노머 (S); * 아노머 (R);
CAS 14468-72-5 CAS 80996-07-2



(8)



(9a)



(9b)

[0283]

[0284]

이들 시약은 문헌에 기재된 전체 합성 절차를 갖거나, 간단한 개조로 입수 가능하다(예를 들어, (7)의 경우, 문헌[Chaturvedi, N. C. *et al.*, *J. Med. Chem.*, **9**, 971-3, **1966**; Klačic, B. *Carbohydrate Res.*, **110**(2), 320-5, **1982**] 참조; (8)의 경우, 문헌[Bacic, A. and Pecar, S. *Tet. Assym.*, **19**, 2265-71, **2008**] 참조; (9b)의 경우, 제W02014/002039호, cpd 17 pg 87 참조(여기서, (S)-아메타민은 간단히 L-알라닌 벤질 에스테르로 치환될 수 있고, 합성은 상업적으로 입수 가능한 CAS 55682-47-8 (2S, 3R, 4R)-4-아자이도-2-(벤질옥시)-6,8-디옥사바이사 이클로[3.2.1]옥탄-3-올로부터 시작함)). 또한, N-아세틸 시약(7-9b)의 N-아실 변이형에 대한 경로가 상세히 기재된 제W02016/172615호를 참조하도록 한다.

[0285]

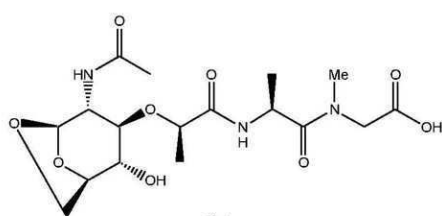
추가 변형예에서, 'n'이 1로 선택되는 경우, 링커-스페이스-안티센스 중간체를 제조한 후, (1-4)와 같은 시약을 사용하는 것이 유리할 수 있다.

[0286]

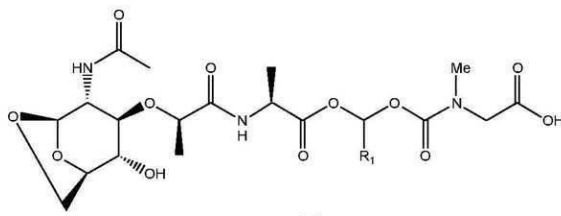
추가 변형예에서, 'n'이 1로 선택되는 경우, 스페이스-안티센스 중간체를 제조한 후, (7-9b)와 같은 시약을 사용하는 것이 유리할 수 있다.

[0287]

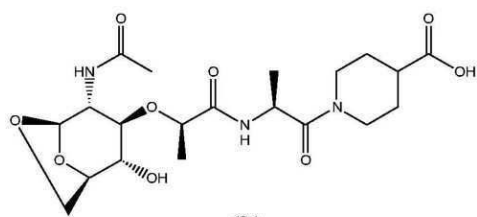
또 다른 추가 변형예에서, 안티센스 중간체를 제조한 후, (1-4, 7-9b 또는 9c-f)와 같은 시약을 사용하는 것이 유리할 수 있다.



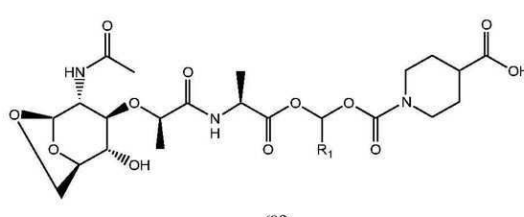
(9c)



(9d)



(9e)

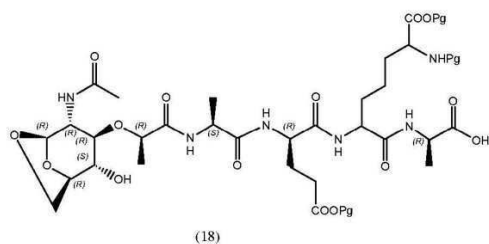
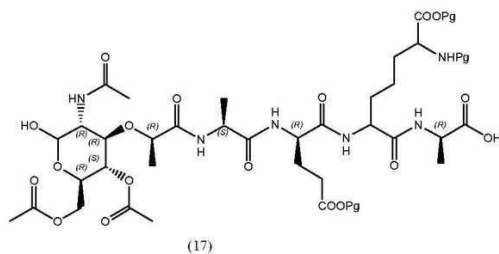
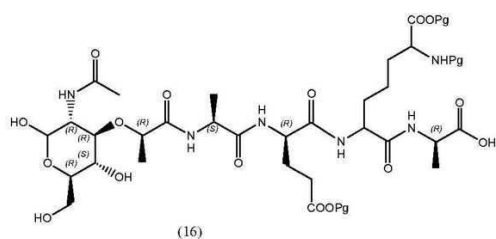
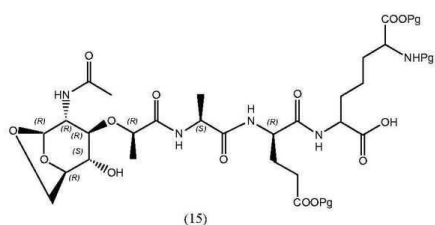
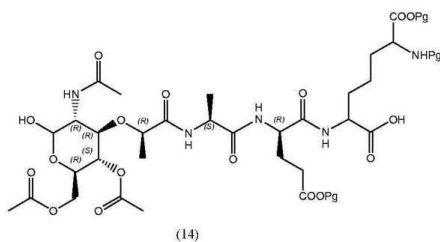
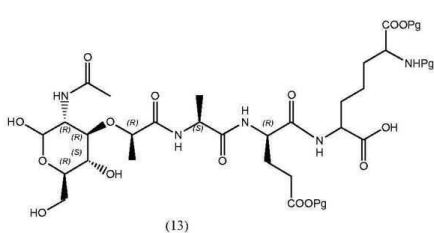
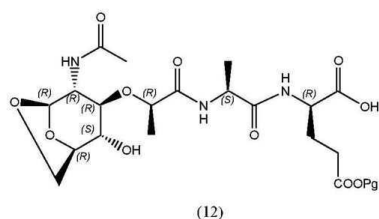
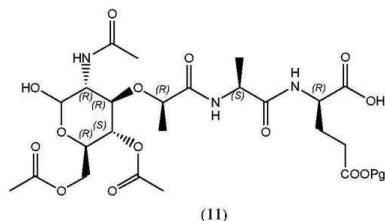
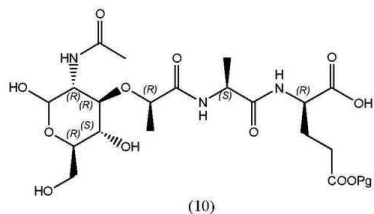


(9f)

[0288]

[0289]

추가 변형예에서, 'n'이 2, 3 또는 4로 선택되는 경우, "당 시약"(7-9b)을 연장하고, 후속 반응에서 세균 세포벽 펩티드(Nac-Mur-L-Ala-D-Glu-메조-DAP-D-Ala)의 전체 구조에 증가된 유사성을 갖는 이들 추가 중간체를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 전략적 변형예에서, 하기가 이들 단계를 위한 바람직한 시약(10 내지 18)이다. 시약 10 내지 18은 당분야에 널리 공지된 표준 펩티드 합성 방법에 의해 1 내지 9와 같은 시약으로부터 제조될 수 있다. "당 시약" 10 내지 18의 말단 α-카르복실산과의 화학선택적 반응을 제공하기 위해, D-글루탐산의 측쇄 카르복실산 작용기 및, 존재하는 경우, 메조-디아미노피멜산(DAP)의 측쇄 카르복실산 작용기 및 측쇄 아미노 작용기는 보호기 Pg로 보호된다. 바람직한 보호기는 벤질 또는 3차-부틸 에스테르 및 벤질옥시카르보닐(Cbz) 및 3차-부톡시카르보닐(Boc) 우레탄이다.

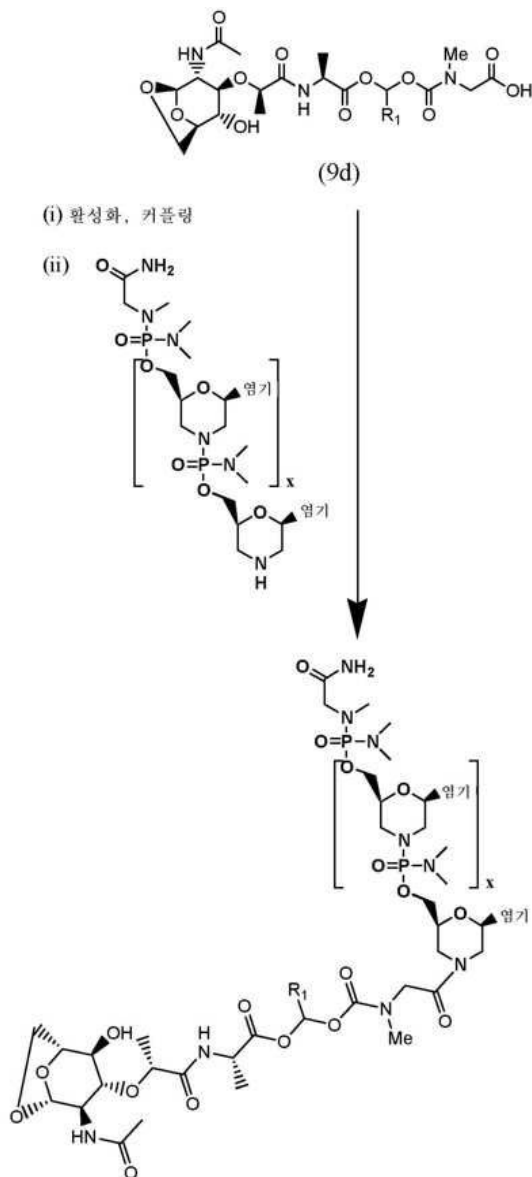


[0290]

[0291]

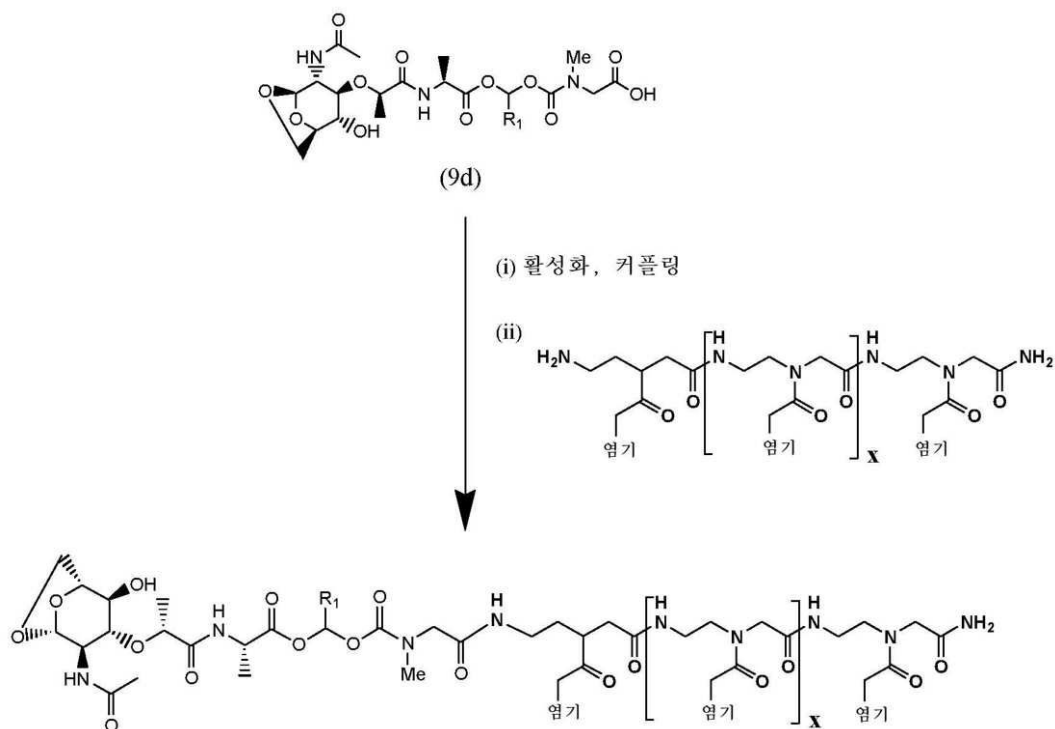
[0292] 본 발명의 '당-링커-스페이서-안티센스제'의 제조

[0293] 본 발명의 화합물은 본원에 제공된 일반적인 방법에 의해 제조되고, 도식 3 및 4에 상세히 기재되어 있다. 당업자는 상기 방법이 결코 완전한 설명이 아니며 유사한 화합물을 제조하기 위해 다른 경로가 이용 가능할 수 있다는 것을 알 것이다. 당업자는 또한 대다수의 안티센스제가 화학적 반응에 참여할 수 있는 하나보다 많은 작용기를 함유한다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 도식 중에서 "안티센스"는 핵염기가 합성 동안 일시적으로 보호된 중간체를 지칭한다. 모든 도식의 마지막 단계로서, 보호기(들) "PG"의 선택적 제거는 일반식 I의 화합물을 제공한다. PNA의 예시적인 합성의 설명에 대하여 문헌[*Lee, H. et al., Org. Lett.* 9(17), 3291-3, 2007]을 참조한다. PMO의 예시적인 합성의 설명에 대하여 문헌[*Summerton, J. and Weller, D. Antisense & Nucl. Acid Drug Dev.*, 7, 187-195, 1997]을 참조한다. PMO에 대한 예시적인 커플링의 설명에 대하여 문헌[*O'Donovan, L. et al., Nucl. Acid Ther.*, 25(1), 1-10, 2015]을 참조한다.



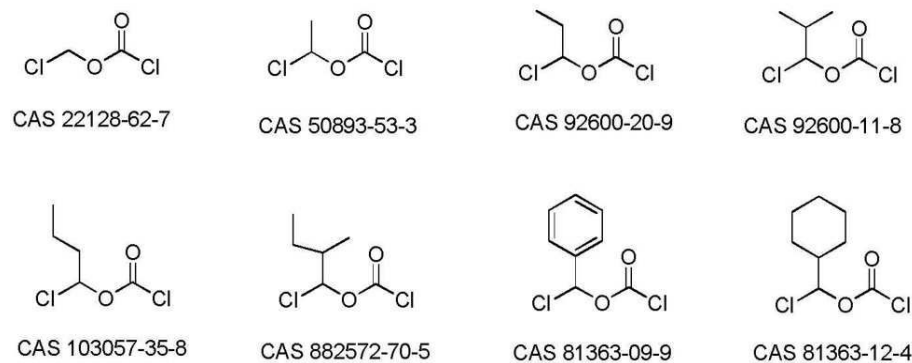
[0294]

[0295] 도식 3. "안티센스"가 당-링커-스페이서에 의해 3'-말단에 접합된 PMO인 화학식 I의 화합물의 일반적인 합성. 유사한 방식으로, 당 시약 (9d)은 1 내지 18과 같은 당 시약으로 용이하게 치환되어 화학식 I 내 범위의 정의를 포괄하는 변이형을 제공할 수 있다.



도식 4. "안티센스"가 당-링커-스페이서에 의해 N-말단에 접합된 PNA인 화학식 I의 화합물의 일반적인 합성. 유사한 방식으로, 당 시약 (9d)은 1 내지 18과 같은 당 시약으로 용이하게 치환되어 화학식 I 내 범위의 정의를 포괄하는 변이형을 제공할 수 있다.

R₁ 기의 변이형의 경우, 다양한 클로로알콕시아실클로라이드, 예를 들어,



은 공지되어 있거나 상업적으로 입수 가능하다.

실시예

본 발명은 추가로 하기 실시예를 참조로 예시된다. 그러나, 이들 실시예는 상술된 구현예와 같이 예시적인 것이며, 본 발명의 가능한 범위를 어떠한 방식으로든 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다는 것이 주지되어야 한다.

하기 실시예는 상술된 발명을 제조하고 사용하는 방식을 보다 충분히 기술하는 역할을 한다. 이들 실시예는 어떠한 방식으로든 본 발명의 실제 범위를 제한하는 역할을 하는 것이 아니라, 예시적인 목적으로 제시된 것으로 이해된다.

합성 화학

하기 실시예 및 합성 도식에서, 하기 약어는 하기 의미를 갖는다. 약어가 정의되지 않은 경우, 이는 이의 일반적인 용도로 허용되는 의미를 갖는다.

AcOH	아세트산
Ac ₂ O	아세트산 무수물
aq	수성
BOC (Boc)	N-3 차-부톡시카르보닐 또는 3 차-부틸옥시카르보닐
CBz	카르복시벤질
DCE	디클로로에탄
DCM	디클로로메탄
DCM/EA	디클로로메탄/에탄올
DIPEA (또는 DIEA)	N,N-디이소프로필에틸아민, 또는 휴니그 염기
DME	디메톡시에탄
DMF	디메틸포름아미드
DMP	데스-마틴 페리오디난
DMSO-d ₆	중수소 디메틸술폰사이트
DMSO	디메틸술폰사이트
EC ₅₀	50% 유효 농도
EDTA	에틸렌디아민테트라아세트산
Et	에틸
Et ₂ O	디에틸 에테르
EtOH	에탄올
EtOAc, EA, AcOEt	에틸 아세테이트
h	시(들)
HPLC	고성능 액체 크로마토그래피
IC ₅₀	50% 억제 농도
iPrOH	이소프로필 알콜 또는 이소프로판올
LCMS	액체 크로마토그래피 질량 분광법
LDA	리튬 디-이소프로필 아미드

[0306]

Me	메틸
MeOH	메탄올
NaBH(OAc) ₃	소듐 트리아세톡시보로하이드라이드
NMR	핵자기 공명 분광법
Pd ₂ (dba) ₃	트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐(0)
PE	페트롤륨 에테르 또는 페트롤
PPh ₃	트리페닐포스핀
Pr	프로필
SFC	초임계 유체 크로마토그래피
T3P	1-프로판포스포산 무수물 용액, 2,4,6-트리프로필-1,3,5,2,4,6- 트리옥사트리포스포리난-2,4,6-트리옥사이드
TFA	트리플루오로아세트산
THF	테트라하이드로푸란
uv	자외선

[0307]

[0308]

1: LC-MS 방법

[0309]

기기: Agilent 6130 단일 사중극자 질량 분광기와 Agilent 1260 infinity HPLC

[0310]

컬럼: Phenomenex Kinetex XB-C₁₈, 50 X 4.6 mm, 2.6 μm

[0311]

용리 프로파일: 하기 표 참조

시간 (분)	% 수성 (A) (물 중 0.1% 포름산)	% 유기 (B) (100% 아세토니트릴)
0	95	5
1.37	2	98
1.60	2	98
1.83	95	5
2.25	95	5

[0312]

[0313]

유량: 2 ml/min; 검출기 파장: 225 ± 50 nm 대역폭; 컬럼 온도: 40℃

[0314]

주사 부피: 1 μl.

[0315]

때때로, 동일한 조건을 이용하지만 10분 이상 더 긴 구배를 또한 이용하였다.

[0316]

질량 분광기 매개변수: 70 m/z 내지 1000 m/z에 걸쳐 ES⁺/− & APCI에서 스캐닝; 니들 세척: 바이알 4에서 MeOH 세척, 5회 니들 세척을 수행하도록 오토샘플러 설정(샘플 주사 전 니들의 외부 세척; 샘플 제조: 용해도 측면에서 샘플의 성질에 좌우하여 아세토니트릴 또는 DMSO 중 0.5 mg/ml 내지 1.0 mg/ml.

[0317]

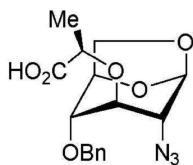
2. 분석용 NMR 방법

[0318]

Ultrashield magnet & B-ACS-60 오토샘플러와 Bruker Avance III 400 MHz. ¹H 및 ¹³C NMR 스펙트럼은 CDCl₃, DMSO-d₆ 및 D₂O에서 기록하였다. 화학적 이동은 내부 표준물질로서 Me₃Si를 사용하여 ppm(δ)으로 보고하였다.

[0319]

3. 분취용 HPLC 정제



[0335]

[0336]

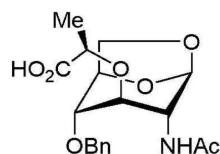
무수 1,4-디옥산(4 mL) 중 (1R,2S,3R,4R,5R)-4-아자이도-2-(벤질옥시)-6,8-디옥사바이사이클로[3.2.1]옥탄-3-올(200 mg, 0.72 mmol)의 용액에 소듐 하이드라이드(오일 중 60% 분산; 191 mg, 4.76 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 45℃에서 10분 동안 가열하였다. 현탁액을 실온까지 냉각시키고, (S)-2-클로로프로피온산(188 mg, 148 μ L, 1.73 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 90℃까지 2시간 동안 가열하였다. 갈색 현탁액을 실온까지 냉각시키고, 농축시켜, 담갈색 고형물을 제공하였다. 이 물질을 주의하여 물(10 mL)로 켄칭시키고, 용액을 고농도 염산으로 pH 3까지 산성화시켰다. 수성 현탁액을 디클로로메탄(7 X 10 mL)으로 추출하였다. 합한 유기층을 물(25 mL)로 세척하고, 건조시키고($MgSO_4$), 농축시켜, 녹색 오일을 제공하였다. 이 물질을 254 nm에서의 검출로 정상상 조건(실리카 컬럼, 디클로로메탄 중 0 $\rightarrow$ 100% 메탄올의 구배) 하에 Biotage Isolera 자동 크로마토그래피 시스템을 사용함으로써 정제하여, 표제 산(185 mg, 74%)을 녹색 오일로서 제공하였다. R_f = 0.40(메탄올 - 디클로로메탄, 8 : 92 v/v).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38 (m, 5H, 5 $\times$ ArH), 5.57 (m, 1H, CH), 4.69 (m, 3H, CH 및 벤질 CH_2), 4.00 (m, 2H, 2 $\times$ CH), 3.76 (dd, J = 7.5, 5.6 Hz, 1H, CH), 3.63 (m, 1H, CH), 3.38 (m, 1H, CH), 3.31 (m, 1H, CH), 1.40 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH_3).

[0337]

[0338]

단계 2. (R)-2-(((1R,2S,3R,4R,5R)-4-아세트아미도-2-(벤질옥시)-6,8-디옥사바이사이클로[3.2.1]옥탄-3-일)옥시) 프로판산의 제조



[0339]

[0340]

질소 하에 무수 메탄올(1 mL) 중 10% Pd-C(19 mg, 10% w/w)의 현탁액에 무수 메탄올(3 mL) 중 단계 1 산(185 mg, 0.53 mmol)의 용액을 첨가하고, 반응 혼합물을 수소 분위기 하에 1시간 15분 동안 교반하였다. 현탁액을 셀라이트를 통해 여과하고, 여과액을 농축시켜, 백색 고형물(172 mg)을 제공하였다. 이 물질을 무수 디클로로메탄(3.8 mL)에 용해시키고, 아세트산 무수물(1.56 mL)을 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 용액을 농축시키고, 잔류물을 디클로로메탄(10 mL)과 물 사이에 분배하였다. 층을 분리하고, 수성층을 디클로로메탄(2 X 10 mL)으로 추출하였다. 합한 유기층을 포화 염수(25 mL)로 세척하고, 건조시키고($MgSO_4$), 농축시켜, 무색 오일을 제공하였다. 이 물질을 254 nm에서의 검출로 정상상 조건(실리카 컬럼, 디클로로메탄 중 0 $\rightarrow$ 100% 메탄올의 구배) 하에 Biotage Isolera 자동 크로마토그래피 시스템을 사용함으로써 정제하여, 표제 산(173 mg, 89 %)을 백색 포움으로서 제공하였다.

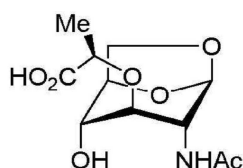
LCMS r.t. = 7.5 min, ESI-MS (m/z): 364 [$M-H$] $^-$

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.34 (m, 5H, 5 $\times$ ArH), 6.17 (d, J = 6.9 Hz, 1H, NH), 5.34 (m, 1H, CH), 4.61 (m, 3H, CH 및 벤질 CH_2), 4.23 (q, J = 6.8 Hz, 1H, CH), 4.12 (m, 2H, 2 $\times$ CH), 3.72 (dd, J = 7.3, 5.9 Hz, 1H, CH), 3.47 (m, 1H, CH), 3.39 (m, 1H, CH), 1.94 (s, 3H, CH_3), 1.41 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH_3).

[0341]

[0342]

단계 3. 1,6-안하이드로-N-아세틸무람산의 제조



[0343]

[0344]

질소 하에 메탄올(1 mL) 중 10% Pd-C(26 mg, 15 % w/w)의 현탁액에 메탄올(3 mL) 중 단계 2 산(171 mg, 0.47 mmol)의 용액을 첨가하고, 반응 혼합물을 수소 분위기 하에 55℃에서 4시간 동안 가열하였다. 현탁액을 실온까지 냉각시키고, 셀라이트를 통해 여과하고, 여과액을 농축시켜, 백색 고형물(136 mg, 1,6-안하이드로-N-아세틸 무람산과 1,6-안하이드로-N-아세틸무람산 메틸 에스테르의 혼합물)을 제공하였다. 이 물질을 메탄올(4 mL)에 용해시키고, 1 M NaOH 수용액(4 mL)을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 메탄올을 제거하고, 수용액을 고농도 염산으로 pH 3까지 산성화시키고, 농축시켰다. 이 물질을 210 nm에서의 검출로 역상 조건(C₁₈ 컬럼, 물 중 10 → 100% 아세토니트릴의 구배) 하에 Biotage Isolera 자동 크로마토그래피 시스템을 사용함으로써 정제하여, 1,6-안하이드로-N-아세틸무람산(87 mg, 67 %)을 백색 고형물로서 제공하였다.

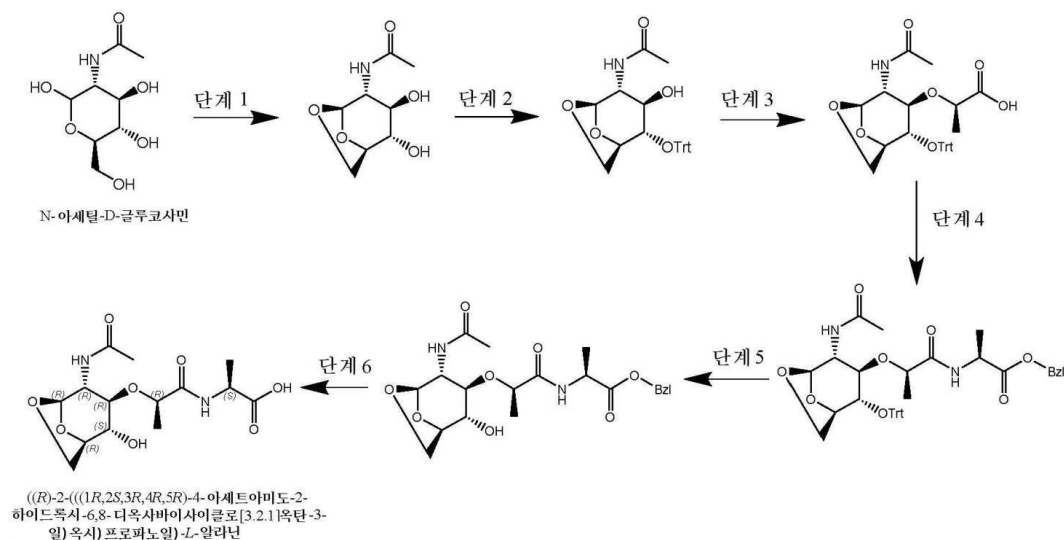
LCMS r.t. = 1.3 min ESI-MS (m/z): 276.00 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃CN) δ 6.76 (d, J = 8.7 Hz, 1H, NH), 5.51 (m, 1H, CH), 4.68 (m, 1H, CH), 4.44 (q, J = 6.9 Hz, 1H, CH), 4.30 (dd, J = 7.4, 1.0 Hz, 1H, CH), 4.05 (m, 1H, CH), 3.85 (m, 2H, 2 × CH), 3.56 (m, 1H, CH), 2.10 (s, 3H, CH₃), 1.56 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

[0345]

[0346]

파트 2: ((R)-2-(((1R,2S,3R,4R,5R)-4-아세트아미도-2-하이드록시-6,8-디옥사바이사이클로[3.2.1]옥탄-3-일)옥시)프로판노일)-L-알라닌; (1,6-안하이드로-N-아세틸 무람산-L-알라닌)의 합성



[0347]

[0348]

도식 6. 1,6-안하이드로-N-아세틸무람산-L-알라닌의 합성

[0349]

단계 1. N-((1R,2S,3R,4R,5R)-2,3-디하이드록시-6,8-디옥사바이사이클로[3.2.1]옥탄-4-일)아세트아미드의 제조

[0350]

0℃ 내지 5℃에서 피리딘(300 mL) 중 N-아세틸-D-글루코사민(30.0 g, 136 mmol)의 교반된 현탁액에 피리딘(200 mL) 중 4-톨루엔설포닐 클로라이드(31.0 g, 163 mmol)의 용액을 1시간에 걸쳐 적가하였다. 반응물을 0℃ 내지 5℃에서 4시간 동안 교반하였다. MeOH(20 mL)를 한 번에 첨가하고, 용매를 진공에서 제거하였다. 생성된 갈색 점성 오일을 에탄올(1 L)에 넣고, DBU(52.5 mL, 407 mmol)를 한 번에 첨가하였다. 혼합물을 RT에서 밤새 교반한 후, 진공에서 농축시켰다(50℃ 미만의 수조 온도). 갈색 점성 오일 잔류물을 실리카 상에서 플래시 크로마토그래피(용리액: EtOAc 중 5% 이후 10% MeOH)에 의해 두 개의 동일한 배치로 정제하였다. 요망되는 생성물(TLC에 의해 판단된 바와 같음)을 주로 함유하는 분획을 합하고, 진공에서 농축시켜, 황백색(off-white) 고형물을 수득하였다. NMR은 이 물질이 소수 방향족 불순물을 함유한다는 것을 지시하였다. 물질을 MeOH로부터 재결정화시켰다. 아이스 배스에서 냉각시킨 후, 표제 화합물을 진공 여과에 의해 백색 고형물로서 분리하고, 약간 차가운 MeOH로 세척하고, 3시간 동안 40℃의 진공 오븐에서 건조시켰다(13.8 g, 50.6% 수율).

¹H NMR (400 MHz, 메탄올-d₄) δ 5.25 (s, 1H), 4.48 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.18 (dd, J =

[0351]

7.2, 0.8 Hz, 1H), 3.83 (s, 1H), 3.68 (dd, J = 7.2, 6.0 Hz, 1H), 3.56–3.54 (m, 2H), 1.98 (s, 3H)

[0352]

단계 2. N-((1R,2S,3R,4R,5R)-3-하이드록시-2-(트리틸옥시)-6,8-디옥사바이사이클로[3.2.1]옥탄-4-일)아세트아미드의 제조

[0353] RT에서 DCM(300 ml) 중 단계 1 아미드(8.5 g, 41.8 mmol)의 현탁액에 2,4,6-트리메틸피리딘(10.15 g, 83.5 mmol)을 한 번에 첨가하였다. DCM(200 ml) 중 트리페닐메탄올(16.3 g, 62.5 mmol)의 용액에 TMSOTf(12.1 ml, 62.5 mmol)를 질소 하에 한 번에 첨가하였다. 생성된 주황색/갈색 용액을 질소 분위기 하에 교반하면서 아미드 용액에 15분에 걸쳐 적가하였다. 1시간 후, 반응물을 피리딘(10 ml) 그리고 이어서 메탄올(20 ml)로 켄칭시키고, 클로로포름(800 ml)을 첨가하였다. 용액을 물(300 ml), 1 M HCl(300 ml X 2), NaHCO₃ 포화 용액(300 ml), 및 물(300 ml)로 추출하였다. 유기상을 소듐 설페이트 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공에서 농축시켜, 오프 화이트색 고형물을 수득하였다. 이를 실리카 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액: 생성물에 의한 TrOH의 용리까지 1:1 EtOAc-헥산, 이후 100% EtOAc)에 의해 정제하였다. 순수한 분획(TLC에 의해 판단된 바와 같음)을 합하고, 진공에서 농축시켜, 백색 포움을 제공하였다.

[0354] 이 절차를 동일한 방식으로 반복하고, 생성물을 합하였다.

[0355] 합한 생성물을 1:1 디에틸 에테르-헥산(100 ml)으로 분쇄하여, 표제 화합물을 백색 분말 고형물로서 수득하였고, 이를 진공 여과에 의해 분리하고, 40℃ 진공 오븐에서 밤새 건조시켰다(16.8 g, 2 배치에 걸쳐 45% 수율).

¹H NMR (400 MHz, 아세톤-d₆) δ 7.57–7.54 (m, 6H), 7.38–7.33 (m, 6H), 7.31–7.27 (m, 3H), 6.66 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.18 (s, 1H), 4.08 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 3.93 (dd, J = 7.2, 0.8 Hz, 1H), 3.75–3.71 (m, 2H), 3.66 (s, 1H), 3.35–3.34 (m, 1H), 3.29 (dd, J = 6.8, 6.0 Hz, 1H), 1.95 (s, 3H)

[0356]

[0357] **단계 3.** (R)-2-(((1R,2S,3R,4R,5R)-4-아세트아미도-2-(트리틸옥시)-6,8-디옥사바이사이클로[3.2.1]옥탄-3-일)옥시)프로판산의 제조

[0358] RT에서 무수 디옥산(60 ml) 중 단계 2 아미드(4.00 g, 8.98 mmol)의 교반된 용액에 NaH(분산 오일 중 60%)(2.32 g, 60.6 mmol)를 질소 분위기 하에 소분획으로 15분에 걸쳐 첨가하였다. 생성된 현탁액을 45℃까지 10분 동안 가열하고, RT까지 냉각되게 하였다. (2S)-2-클로로프로판산(2.06 mL, 22.4 mmol)을 질소 하에 10분에 걸쳐 시린지를 통해 적가하였다. 혼합물을 이후 90℃까지 1.5시간 동안 가열하고, RT까지 냉각되게 하였다. 용매를 진공에서 제거하였다. 초기에 발포가 중단될 때까지 잔류물에 차가운 얼음물(100 ml)을 첨가하였다. 생성된 용액을 2 M HCl 용액으로 pH 3까지 산성화시켜, 걸쭉한 백색 고형물을 침전시켰다. 이를 EtOAc(2 X 100 ml)로 추출하였다. 추출물을 소듐 설페이트 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공에서 농축시켜, 황백색 포움같은 고형물을 수득하였다. 조생성물을 실리카 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액 EtOAc 중 5% MeOH + 0.1% AcOH)에 의해 정제하였다. 순수한 분획(TLC 분석에 의해 판단된 바와 같음)을 합하고, 진공에서 농축시켜, 백색 포움을 수득하고, 이를 헥산 중 5% 디에틸 에테르로 분쇄하여, 표제 화합물을 백색 분말 고형물(3.98 g, 85% 수율)로서 수득하였다. [α]_D = -51.3° (c = 클로로포름 중 0.0115, 20.8℃).

LCMS: 96.7% 순도; RT = 1.720 min; C₃₀H₃₁NO₇ [M-H]⁻에 대한 m/z 계산치 516, 실측치 516

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.14 (s, 1H), 7.60 (br d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.48–7.46 (m, 6H), 7.37–7.27 (m, 9H), 5.22 (s, 1H), 3.74–3.68 (m, 3H), 3.59 (d, J = 6.0 Hz), 3.49 (s, 1H), 3.32 (s, 1H), 3.25–3.33 (m, 1H, 물 용매 피크에 의해 가려짐), 1.93 (s, 3H), 1.06 (d, J = 6.8 Hz, 3H);

[0359]

[0360] **단계 4.** 벤질 ((R)-2-(((1R,2S,3R,4R,5R)-4-아세트아미도-2-(트리틸옥시)-6,8-디옥사바이사이클로[3.2.1]옥탄-3-일)옥시)프로판노일)-L-알라니네이트의 제조

[0361] 단계 3 산(8.00 g, 15.5 mmol) 및 L-알라닌-OBzl(3.67 g, 17.0 mmol)을 실온에서 DMF(150 ml, 0.1 M)에 용해시켰다. DIEA(8.88 mL, 51.0 mmol) 및 HATU(6.47 g, 17.0 mmol)를 이후 첨가하고, 혼합물을 RT에서 18시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 얼음물(2 L)에 첨가하고, 생성된 백색 침전물을 에테르 중 20% EtOAc(3 X 300 ml)로 추출하였다. 합한 추출물을 염수(2 X 300 ml)로 세척하고, 소듐 설페이트 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공에서 농축시켜, 백색 포움을 수득하였다. 이를 실리카 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액: 헥산 중 50% 내지 75% EtOAc 구배)에 의해 정제하였다. TLC에 의한 순수한 분획을 합하고, 진공에서 농축시켰다. 백색 포움 생성물을 디에틸 에테르 중 10% EtOAc로 분쇄하고, 진공 여과에 의해 분리하여, 표제 화합물을 백색 고형물(9.13 g, 87%)로서 수득하였다.

LCMS: 100% 순도; RT = 6.55 min; $C_{40}H_{42}N_2O_8$ [M-H]⁻에 대한 m/z 계산치 677, 실측치 677

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.85 (d, J = 8.0 Hz), 7.50-7.47 (m, 6H), 7.36-7.29 (m, 14H), 5.37 (s, 1H), 5.15-5.07 (m, 2H), 4.64-4.56 (1H, m), 4.04 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 3.98 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.78-3.73 (m, 2H), 3.68 (s, 1H), 3.45 (dd, J = 7.6 Hz 및 6.0 Hz, 1H), 3.12 (s, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.39 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.15 (d, J = 6.8 Hz, 3H)

[0362]

[0363] 단계 5. 벤질 ((R)-2-(((1R,2S,3R,4R,5R)-4-아세트아미도-2-하이드록시-6,8-디옥사바이사이클로[3.2.1]옥탄-3-일)옥시)프로판노일)-L-알라니네이트의 제조

[0364]

DCM(165 ml) 중 단계 4 에스테르(8.50 g, 12.5 mmol)의 용액에 TFA(9.30 mL, 125 mmol)를 RT에서 한 번에 첨가하였다. 황색이 즉시 발색되었다. 용액을 RT에서 3시간 동안 교반하였다. 용액을 교반된 고농도 NaHCO₃ 용액(500 ml)에 매우 서서히 첨가하고, DCM(2 X 250 ml)으로 추출하였다. 조생성물을 실리카 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액: EtOAc 중 5 내지 10% MeOH)에 의해 정제하였다. 순수한 분획(TLC에 의해 판단된 바와 같음)을 합하여, 표제 화합물을 백색 포움(5.05 g, 92% 수율)으로서 수득하였다.

LCMS: 98.1% 순도; RT = 1.402 min; $C_{21}H_{28}N_2O_8$ [M+H]⁺에 대한 m/z 계산치 437, 실측치 437

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.84 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.37-7.31 (m, 5H), 6.22 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.20-5.12 (m, 2H), 4.67-4.59 (1H, m), 4.52 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.26 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.17-4.05 (m, 2H), 3.99 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.76-3.73 (m, 2H), 3.44 (s, 1H), 2.86 (br s, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.44 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.38 (d, J = 6.8 Hz, 3H).

[0365]

[0366] 단계 6. ((R)-2-(((1R,2S,3R,4R,5R)-4-아세트아미도-2-하이드록시-6,8-디옥사바이사이클로[3.2.1]옥탄-3-일)옥시)프로판노일)-L-알라닌의 제조

[0367]

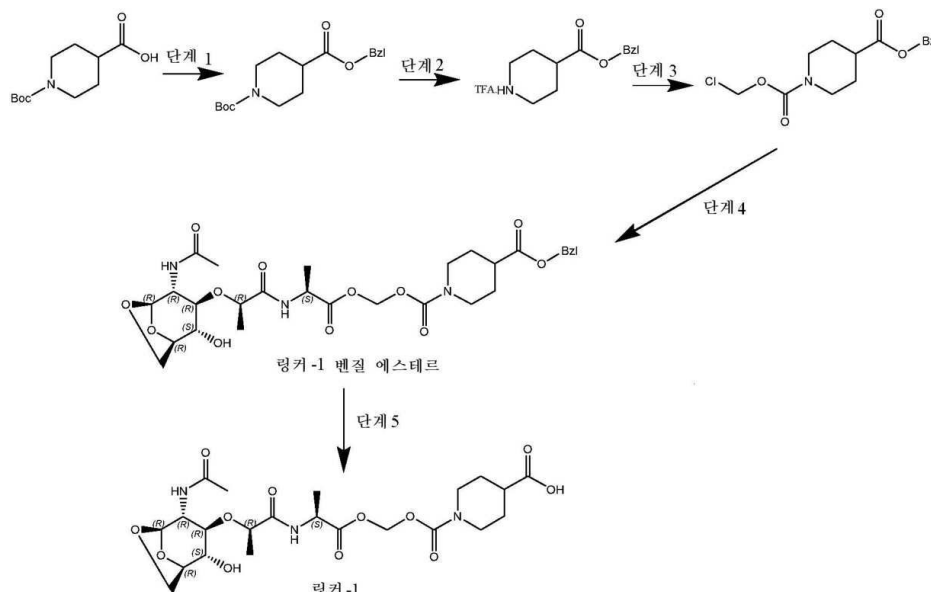
EtOH(100 ml) 중 단계 5 에스테르(3.58 g, 8.20 mmol)의 용액에 4 방울의 물로 습윤된 Pd/C(10.0%, 0.437 g, 0.410 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 스틸 오토클레이브에서 밤새 RT에서 수소(50 PSI) 하에 교반하였다. 반응 혼합물을 짧은 셀라이트 패드를 통해 여과하고, 여과 케이크를 에탄올로 세척하였다. 여과액을 진공에서 농축시켜, 무색의 점성 유리 고형물을 수득하였다. 이 물질을 디에틸 에테르(소니케이션에 의해)로 분쇄하였다. 침전물을 진공 여과에 의해 분리하고, 40°C 진공 오븐에서 일정한 질량으로 건조시켜, 표제 화합물을 백색 분말 고형물로서 수득하였다(2.62 g, 92%). $[\alpha]_D^{20} = -49.4^\circ$ (c = MeOH 중 0.0115, 20.8°C).

LCMS: 100% 순도; RT = 0.963 min; $C_{14}H_{22}N_2O_8$ [M+H]⁺에 대한 m/z 계산치 347; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.54 (br s, 1H), 7.70 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.29 (s, 1H), 5.24 (br s, 1H), 4.48 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.29-4.23 (m, 1H), 4.12-4.02 (m, 2H), 3.69 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.61 (dd, J = 7.2 Hz 및 6.0 Hz, 1H), 3.53 (s, 1H), 3.26 (물 용매 피크에 의해 가려진 신호), 1.98 (s, 3H), 1.29 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.24 (d, J = 6.8 Hz, 3H). 실측치 347

[0368]

[0369] 파트 3: 링커의 제조

(a) 링커-1의 합성



도식 7. 링커-1의 합성

단계 1. 4-벤질 1-(3차-부틸) 피페리딘-1,4-디카르복실레이트의 제조

DMF(70 ml) 중 1-3차-부톡시카르보닐피페리딘-4-카르복실산(7.00 g, 30.5 mmol)의 현탁액에 K_2CO_3 (11.0 g, 79.4 mmol) 및 이어서 벤질클로라이드(5.02 g, 39.7 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 RT에서 4일 동안 교반하였다. 혼합물을 차가운 물(1.5 L)에 붓고, 디에틸 에테르(2 X 300 ml)로 추출하였다. 추출물을 염수로 세척하고, 진공에서 농축시켜, 무색 오일을 수득하였다. 조생성물을 실리카 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액: 헥산 중 10 내지 50% EtOAc 구배)에 의해 정제하여, 표제 화합물을 무색 오일(9.50 g, 97% 수율)로서 수득하였다.

LCMS: 95% 순도; RT = 6.20 min; $C_{18}H_{25}NO_4$ $[M+H-Boc]^+$ 에 대한 m/z 계산치 220; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38–7.32 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.01 (br d, J = 10.4 Hz, 2H), 2.82 (t, J = 12 Hz, 2H), 2.53–2.46 (m, 1H), 1.88 (m, 2H), 1.69–1.59 (m, 2H), 1.45 (s, 9H)

단계 2. 벤질 피페리딘-4-카르복실레이트-트리플루오로아세트레이트의 제조

DCM(120 ml) 중 단계 1 에스테르(9.40 g, 29.4 mmol)의 교반된 용액에 TFA(13.1 mL, 177 mmol)를 한 번에 첨가하였다. 생성된 황색 용액을 18시간 동안 교반하였다. 용매를 진공에서 제거하고, 잔류물을 톨루엔(2 X 50 ml)과 공증발시켜, 미량의 TFA를 제거하였다. 표제 화합물(담황색 점성 오일, 11.8 g, 120%)을 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.

LCMS: 83% 순도; RT = 2.81 min; 유리 염기 $C_{13}H_{17}NO_2$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치 220, 실측치 220

단계 3. 4-벤질 1-(클로로메틸) 피페리딘-1,4-디카르복실레이트의 제조

DCM(60 ml) 중 단계 2 염(3.27 g, 9.81 mmol)의 교반된 용액에 TEA(2.73 mL, 19.6 mmol)를 한 번에 첨가하였다. 생성된 황색 용액을 빙/수조에서 냉각시키고, 클로로메틸 카르보노클로리데이트(0.960 mL, 10.8 mmol)를 질소 분위기 하에 교반하면서 15분에 걸쳐 적가하였다. 혼합물이 RT까지 가온되게 하고, 18시간 동안 교반하였다. 용매를 진공에서 제거하고, 잔류물을 DCM(150 ml)에 취했다. 이 용액을 1 M HCl(50 ml) 및 고농도 소듐 바이카르보네이트 용액(50 ml)으로 세척하고, 소듐 설페이트 상에서 건조시켰다. 용액을 진공에서 농축시켜, 표제 화합물을 무색 점성 오일(2.35 g, 76%)로서 수득하였다.

LCMS: 97% 순도; RT = 5.71 min; $C_{15}H_{18}ClNO_4$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치 312, 실측치 312; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38–7.30 (m, 5H), 5.16 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 5.13 (s, 2H), 4.13–3.99 (m, 2H), 3.10–2.91 (m, 2H), 2.60–2.50 (m, 1H), 2.03–1.85 (m, 2H), 1.85–1.61 (m, 2H)

단계 4. 링커-1 벤질 에스테르의 제조

무수 DMF(4 ml) 중 단계 3 에스테르(0.250 g, 0.722 mmol) 및 Cs_2CO_3 (0.259 g, 0.794 mmol)의 현탁액에 파트 2 단계 6 산 ((R)-2-(((1R,2S,3R,4R,5R)-4-아세트아미도-2-하이드록시-6,8-디옥사바이사이클로[3.2.1]옥탄-3-일)옥시)프로판노일)-L-알라닌)(0.225 g, 0.722 mmol)을 한 번에 첨가하였다. 반응 혼합물을 차가운 물(100 ml)에 붓고, EtOAc(3 X 30 ml)로 추출하였다. 추출물을 염수(2 X 50 ml)로 세척하고, 소듐 실레이트 상에서 건조시켰다. 조생성물을 실리카 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액: EtOAc 중 5 내지 10% MeOH)에 의해 정제하여, 표제 화합물을 무색 점성 오일(259 mg, 57%)로서 수득하였다.

LCMS: 100% 순도; RT = 4.85 min; $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{12}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 에 대한 m/z 계산치 622, 실측치 622; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.73 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.38-7.30 (m, 5H), 6.19 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.79 (br s, 1H), 5.72 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.57 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.50-4.42 (m, 1H), 4.28 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.09-4.02 (m, 4H), 3.81 (dd, J = 7.2 Hz 및 5.6 Hz, 1H), 3.74 (s, 1H), 3.46 (s, 1H), 3.15 (br d, J = 10.4 Hz, 1H), 3.06-2.90 (m, 3H), 2.58-2.50 (m, 1H), 2.02-1.83 (m, 5H), 1.85-1.58 (m, 2H), 1.45 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.36 (d, J = 6.8 Hz, 3H)

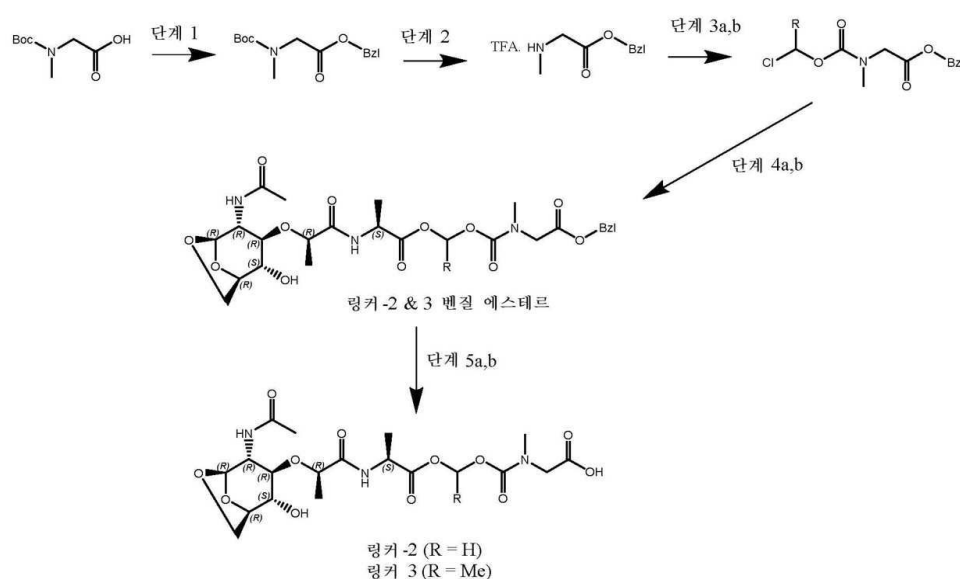
단계 5. 링커-1의 제조

EtOH(10 ml) 중 단계 4 에스테르(0.220 g, 0.354 mmol)의 용액에 한 방울의 물로 습윤된 Pd/C(10.0%, 0.0377 g, 0.0354 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 수소(50 PSI) 하에 RT에서 18시간 동안 교반하였다. 혼합물을 셀라이트의 패드를 통해 여과하고, 여과 케이크를 EtOH(2 X 10 ml)로 세척하였다. 여과액을 진공에서 농축시키고, 잔류물을 EtOAc(5 ml)로 분쇄하여, 표제 화합물을 백색 고형물(128 mg, 68%)로서 수득하였다.

LCMS: 100% 순도; RT = 1.19 min; $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_{12}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 에 대한 m/z 계산치 532, 실측치 532

^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOD}-d_4$) δ 8.19 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.88-5.73 (m, 2H), 5.39 (s, 1H), 4.56 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.51-4.42 (m, 2H), 4.25 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.20-4.15 (m, 1H), 4.00 (br d, J = 13.6 Hz, 2H), 3.09 (s, 1H), 3.72 (dd, J = 7.6 및 6.0 Hz, 1H), 3.69 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 3.41-3.40 (m, 1H), 2.57-2.49 (m, 1H), 1.90 (s, 3H), 2.00-1.82 (br s, 1H), 1.68-1.50 (m, 2H), 1.43 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.35 (d, J = 6.8 Hz, 3H)

(b) 링커-2 및 링커 3의 합성



도식 8. 링커-2 및 링커-3의 합성

단계 1. 벤질 N-(3차-부톡시카르보닐)-N-메틸글리시네이트의 제조

[0392] DMF(70 ml) 중 2-[3차-부톡시카르보닐(메틸)아미노]아세트산(7.00 g, 37.0 mmol)의 현탁액에 K_2CO_3 (13.3 g, 96.2 mmol) 및 이어서 벤질브로마이드(8.23 g, 48.1 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 RT에서 3일 동안 교반하였다. 혼합물을 차가운 물(1.5 L)에 붓고, 디에틸 에테르(2 X 200 ml)로 추출하였다. 추출물을 염수로 세척하고, 진공에서 농축시켜, 무색 오일을 수득하였다. 조생성물을 실리카 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액: 헥산 중 10 내지 50% EtOAc 구배)에 의해 정제하여 표제 화합물을 무색 오일(10.0 g, 96.8% 수율)로서 수득하였다.

LCMS: 100% 순도; RT = 1.77 min; $C_{15}H_{21}NO_4$ $[M+H-Boc]^+$ 에 대한 m/z 계산치 180; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.42–7.29 (m, 5H), 5.17 (d, J = 3.6 Hz, 2H), 4.02 (s, 1H), 3.93 (s, 1H), 2.92 (d, J = 9.6 Hz, 3H), 1.46–1.37 (app d, 9H)

[0393] **단계 2. 벤질 메틸글리시네이트. 트리플루오로아세테이트의 제조**

[0395] DCM(30 ml) 중 단계 1 에스테르(2.00 g, 7.16 mmol)의 교반된 용액에 TFA(3.19 mL, 43.0 mmol)를 한 번에 첨가하였다. 생성된 황색 용액을 18시간 동안 교반하였다. 용매를 진공에서 제거하고, 잔류물을 톨루엔(2 X 20 ml)과 공증발시켜 미량의 TFA를 제거하였다. 무색 점성 오일로서 표제 화합물(2.69 g, 128%)을 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.

LCMS: 92.8% 순도; RT = 0.87 min; 유리 염기 $C_{10}H_{13}NO_2$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치 180, 실측치 180; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.40–7.25 (m, 5H), 5.20 (s, 2H), 5.10–4.00 (br s, 2H), 3.87 (s, 2H), 2.80 (s, 3H)

[0396] **단계 3a. 벤질 N-((클로로메톡시)카르보닐)-N-메틸글리시네이트의 제조**

[0398] DCM(30 ml) 중 단계 2 염(2.10 g, 7.16 mmol)의 교반된 용액에 TEA(2.00 mL, 14.3 mmol)를 한 번에 첨가하였다. 생성된 황색 용액을 빙/수조에서 냉각시키고, 클로로메틸 카르보노클로리데이트(0.700 mL, 7.88 mmol)를 질소 분위기 하에 교반하면서 15분에 걸쳐 적가하였다. 혼합물이 RT까지 가온되게 하고, 18시간 동안 교반하였다. 용매를 진공에서 제거하고, 잔류물을 DCM(150 ml)에 취했다. 이 용액을 1 M HCl(50 ml) 및 고농도 바이카르보네이트 용액(50 ml)으로 세척하고, 소듐 설페이트 상에서 건조시켰다. 용액을 진공에서 농축시켜, 표제 화합물을 무색 점성 오일(1.49 g, 76%)로서 수득하였다.

LCMS: 98.7% 순도; RT = 5.32 min; $C_{12}H_{14}ClNO_4$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치 272, 실측치 272; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.42–7.28 (m, 5H), 5.79 (s, 1H), 5.71 (s, 1H), 5.18 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.10 (s, 1H), 4.04 (s, 1H), 3.02 (d, J = 8.8 Hz, 3H).

[0400] **단계 3b. 벤질 N-((1-클로로에톡시)카르보닐)-N-메틸글리시네이트의 제조**

[0401] DCM(30 ml) 중 단계 2 에스테르(2.50 g, 8.95 mmol)의 교반된 용액에 TFA(3.99 mL, 53.7 mmol)를 한 번에 첨가하였다. 생성된 황색 용액을 18시간 동안 교반하였다. 용매를 진공에서 제거하고, 잔류물을 톨루엔(2 X 20 ml)과 공증발시켜, 미량의 TFA를 제거하였다. TFA 염 조생성물을 DCM(50 ml)에 넣고, TEA(2.49 mL, 17.9 mmol)를 한 번에 첨가하였다. 용액을 빙/수조에 냉각시키고, 1-클로로에틸 카르보노클로리데이트(1.06 mL, 9.84 mmol)를 질소 분위기 하에 교반하면서 15분 동안 적가하였다. 혼합물이 RT까지 가온되게 하고, 18시간 동안 교반하였다. 용매를 진공에서 제거하고, 잔류물을 DCM(150 ml)에 취했다. 이 용액을 1 M HCl(50 ml) 및 고농도 소듐 바이카르보네이트 용액(50 ml)으로 세척하고, 소듐 설페이트 상에서 건조시켰다. 용액을 진공에서 농축시켜, 표제 화합물을 담갈색 점성 오일(2.43 g, 95%)로서 수득하였다.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.42–7.28 (m, 5H), 6.58–6.50 (m, 1H), 5.23–5.15 (m, 2H), 4.27–4.12 (m, 1H), 3.97–3.89 (m, 1H), 3.01 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.82 (d, J = 6.0 Hz, 1.5H), 1.68 (d, J = 5.6 Hz, 1.5H)

[0402] **단계 4a. (((2-(벤질옥시)-2-옥소에틸)(메틸)카르바모일)옥시)메틸 ((R)-2-(((1R,2S,3R,4R,5R)-4-아세트아미도-2-하이드록시-6,8-디옥사바이사이클로[3.2.1]옥탄-3-일)옥시)프로판노일)-L-알라니네이트의 제조**

[0404] 무수 DMF(2.5 ml) 중 파트 2 단계 6 산(0.150 g, 0.43 mmol) 및 Cs_2CO_3 (0.155 g, 0.47 mmol)의 현탁액에 단계 3a 클로라이드(0.129 g, 0.47 mmol)를 한 번에 첨가하였다. 현탁액을 RT에서 20시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 차가운 물(60 ml)에 붓고, EtOAc(3 X 30 ml)로 추출하였다. 추출물을 염수(2 X 50 ml)로 세척하고, 소

딥 셀페이트 상에서 건조시켰다. 조생성물을 실리카 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액: EtOAc 중 5 내지 10% MeOH)에 의해 정제하여 표제 화합물을 무색 점성 오일(168 mg, 66%)로서 수득하였다.

LCMS 97.0% 순도; RT = 1.45 min; $C_{26}H_{35}N_3O_{12}$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치 582, 실측치 582; 1H NMR

(400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.01 (br s, 1H), 7.75–7.33 (m, 5H), 6.19 (d, J = 9.2 Hz, 0.5H), 6.12 (d, J = 9.2 Hz, 0.5H), 5.79 (s, 1H), 5.72 (q, J = 5.6 Hz, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.18 (app d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.60–4.47 (m, 2H), 4.32–4.27 (m, 1H), 4.20–3.95 (m, 5H), 3.80 (dd, J = 7.6 Hz 및 6.0 Hz, 1H), 3.74 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 3.44 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 2.99 (s, 3H), 2.78 (br s, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.47–1.43 (m, 3H), 1.43–1.38 (m, 3H)

단계 4b. 1-(((2-(벤질옥시)-2-옥소에틸)(메틸)카르바모일)옥시)에틸 ((R)-2-(((1R,2S,3R,4R,5R)-4-아세트아미도-2-하이드록시-6,8-디옥사바이사이클로[3.2.1]옥탄-3-일)옥시)프로파노일)-L-알라니네이트의 제조

무수 DMSO(0.5 ml) 중 파트 2 단계 6 산(0.150 g, 0.433 mmol) 및 Cs_2CO_3 (0.169 g, 0.520 mmol)의 현탁액에 단계 3b 클로라이드(0.148 g, 0.520 mmol)를 한 번에 첨가하였다. 현탁액을 RT에서 20시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 차가운 물(50 ml)에 붓고, EtOAc(4 X 30 ml)로 추출하였다. 추출물을 염수(2 X 50 ml)로 세척하고, 소듐 셀페이트 상에서 건조시켰다. 조생성물인 갈색 점성 오일을 실리카 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액: EtOAc 중 5 내지 10% MeOH)에 의해 정제하여, 황갈색 점성 오일(81 mg, 31%)을 수득하였다.

LCMS 97.1% 순도; RT = 1.48 min; $C_{27}H_{37}N_3O_{12}$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치 596, 실측치 596; 1H NMR

(400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.88–7.76 (m, 1H), 7.42–7.30 (m, 5H), 6.90–6.73 (m, 1H), 6.17 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.17 (dd, J = 8.8 Hz 및 2.4 Hz, 2H), 4.62–4.45 (m, 2H), 4.38–4.30 (m, 2H), 4.22–4.08 (m, 2H), 4.08–3.90 (m, 2H), 3.85–3.73 (m, 2H), 3.44 (s, 1H), 2.70 (br s, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.52 (app t, J = 5.6 Hz, 2H), 1.44–1.37 (m, 8H)

단계 5a. 링커-2의 제조

EtOH(10 ml) 중 단계 4a 에스테르(220 mg, 0.378 mmol)의 용액에 한 방울의 물로 습윤된 Pd/C(10.0%, 40 mg, 0.0378 mmol)를 첨가하였다. 수소(50 PSI) 하에 혼합물을 밤새 교반하였다. 혼합물을 이후 짧은 셀라이트 패드를 통해 여과하고, 여과 케이크를 EtOH로 세척하였다. 여과액을 진공에서 농축시켜, 표제 화합물을 무색 유리질 고형물(149 mg, 80%)로서 수득하였다.

LCMS 100% 순도 ELSD 에 따름; RT = 1.13 min; $C_{19}H_{29}N_3O_{12}$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치 492, 실측치

492; 1H NMR (400 MHz, $MeOD-d_4$) δ 5.88–5.72 (m, 2H), 5.39 (s, 1H), 4.56 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.51–4.43 (m, 1H), 4.25 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.21–4.15 (m, 1H), 4.01–4.00 (m, 2H), 3.90 (s, 1H), 3.75 (dd, J = 7.2 Hz 및 5.6 Hz, 1H), 3.69 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 3.40 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 2.97 (d, J = 5.6 Hz, 3H), 1.97

(s, 3H), 1.44 (dd, J = 7.6 및 3.6 Hz, 3H), 1.36 (d, J = 6.8 Hz, 3H)

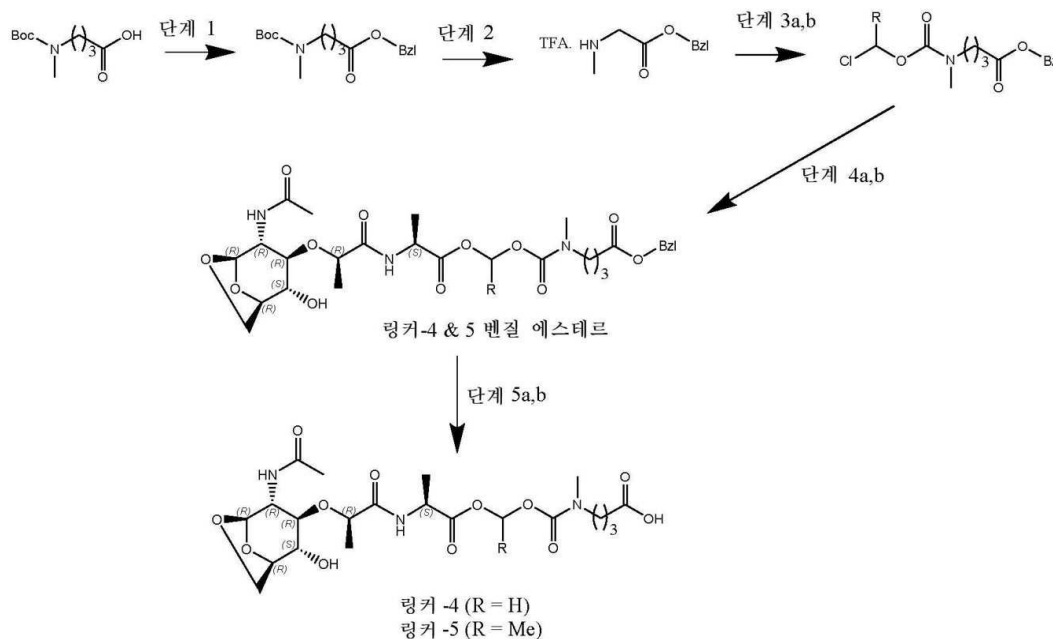
단계 5b. 링커-3의 제조

EtOH(10 ml) 중 단계 4b 에스테르(0.190 g, 0.319 mmol)의 용액에 한 방울의 물로 습윤된 Pd/C(10.0%, 0.0339 g, 0.0319 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 수소(50 PSI) 하에 밤새 교반한 후, 짧은 셀라이트 패드를 통해 여과하였다. 여과 케이크를 EtOH(2 X 5 ml)로 세척하고, 여과액을 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 에테르(5 ml)로 분쇄하여, 표제 화합물을 오프 화이트색 고형물(131 mg, 81%)을 수득하였다.

LCMS 100% 순도 ELSD 에 따름; RT = 1.17 min; $C_{20}H_{31}N_3O_{12}$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치 506, 실측치

506; 1H NMR (400 MHz, $MeOD-d_4$) δ 6.79–6.75 (m, 1H), 5.38 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 4.56 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 4.52–4.35 (m, 1H), 4.25 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.23–4.13 (m, 1H), 4.12–3.85 (m, 3H), 3.80–3.72 (m, 1H), 3.69 (s, 1H), 3.40 (s, 1H), 2.98–2.95 (m, 3H), 1.57–1.28 (m, 9H).

(c) 링커-4 및 링커 5의 합성



도식 9. 링커-4 및 링커 5의 합성

단계 1. 벤질 4-((3차-부톡시카르보닐)(메틸)아미노)부타노에이트의 제조

DMF(25 ml) 중 4-[3차-부톡시카르보닐(메틸)아미노]부탄산(2.50 g, 11.5 mmol)의 현탁액에 K_2CO_3 (4.13 g, 29.9 mmol) 및 이어서 벤질브로마이드(2.56 g, 15.0 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 RT에서 4일 동안 교반하였다. 혼합물을 차가운 물 (0.5 L)에 붓고, 디에틸 에테르(2 X 100 ml)로 추출하였다. 추출물을 염수로 세척하고, 진공에서 농축시켜 무색 오일을 수득하였다. 조생성물을 실리카 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액: 헥산 중 10 내지 50% EtOAc 구배)에 의해 정제하여, 표제 화합물을 무색 점성 오일(3.29 g, 10.7 mmol, 수율: 93.0%)로서 수득하였다.

LCMS: 95.5% 순도; RT = 1.87 min; $C_{17}H_{25}NO_4$ [M+H-Boc] $^+$ 에 대한 m/z 계산치 208; 1H NMR (400 MHz,

$CDCl_3$) δ 7.40–7.28 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 3.24 (app t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.82 (s, 3H), 2.36 (app t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.85 (dq, J = 7.2 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H)

단계 2. 벤질 4-(메틸아미노)부타노에이트. 트리플루오로아세테이트의 제조

DCM(50 ml) 중 단계 1 에스테르(3.29 g, 10.7 mmol)의 교반된 용액에 TFA(4.77 mL, 64.2 mmol)를 한 번에 첨가하였다. 생성된 황색 용액을 18시간 동안 교반하였다. 용매를 진공에서 제거하고, 잔류물을 톨루엔(2 X 20 ml)과 공증발시켜, 미량의 TFA를 제거하였다. 표제 화합물(4.10 g, 119%)을 황색 오일로서 수득하였다. 이 물질을 정제 또는 특성규명 없이 단계 3a 및 3b에 바로 사용하였다.

단계 3a. 벤질 4-(((클로로메톡시)카르보닐)(메틸)아미노)부타노에이트의 제조

DCM(30 ml) 중 단계 2 염(1.72 g, 5.35 mmol)의 교반된 용액에 TEA(2.24 mL, 16.1 mmol)를 한 번에 첨가하였다. 생성된 황색 용액을 빙/수조에서 냉각시키고, 클로로메틸 카르보노클로리데이트(0.524 mL, 5.89 mmol)를 질소 분위기 하에 교반하면서 15분에 걸쳐 적가하였다. 혼합물이 RT까지 가온되게 하고, 18시간 동안 교반하였다. 용매를 진공에서 제거하고, 잔류물을 EtOAc(150 ml)에 취했다. 이 용액을 0.5 M HCl (50 ml) 및 고농도 소듐 바이카르보네이트 용액(50 ml)으로 세척하고, 소듐 설페이트 상에서 건조시켰다. 용액을 진공에서 농축시켰다. 실리카 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액: 헥산 중 20 내지 50% EtOAc 구배)에 의해 정제하여, 표제 화합물을 무색 오일(0.92 g, CR-0056으로부터 2 단계에 걸쳐 57%)로서 수득하였다.

LCMS: 95.2% 순도; RT = 1.74 min; $C_{14}H_{18}ClNO_4$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치 300, 실측치 300; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.42–7.26 (m, 5H), 5.71 (d, J = 16.0 Hz, 2H), 5.12 (s, 2H), 3.50–3.20 (m, 2H), 3.01–2.80 (m, 3H), 2.42–2.28 (m, 2H), 2.00–1.80 (m, 2H)

단계 3b. 벤질 4-(((1-클로로에톡시)카르보닐)(메틸)아미노)부타노에이트의 제조

DCM(20 ml) 중 단계 2 염(1.33 g, 4.13 mmol)의 교반된 용액에 DIEA(2.12 mL, 12.4 mmol)를 한 번에 첨가하였다. 생성된 황색 용액을 빙/수조에 냉각시키고, DCM(5 ml) 중 1-클로로에틸 카르보노클로리데이트(0.407 mL, 4.13 mmol)를 질소 분위기 하에 교반하면서 15분에 걸쳐 적가하였다. 혼합물이 RT까지 가온되게 하고, 18시간 동안 교반하였다. 용매를 진공에서 제거하고, 잔류물을 DCM(150 ml)에 취했다. 이 용액을 물(100 ml)로 세척하고, 소듐 설페이트 상에서 건조시켰다. 조생성물을 실리카 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액: 헥산 중 10 내지 50% EtOAc)에 의해 정제하여 표제 화합물(0.91 g, 70%)을 무색 오일로서 수득하였다.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.42–7.28 (m, 5H), 6.56 (app dq, J = 5.6 Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 3.48–3.24 (m, 2H), 2.91 (app d, J = 8.8 Hz, 3H), 2.44–2.30 (m, 2H), 1.98–1.82 (m, 2H), 1.78 (app dd, J = 13.2 Hz 및 6.0 Hz, 3H)

단계 4a. 벤질 4-((((((R)-2-(((1R,2S,3R,4R,5R)-4-아세트아미도-2-하이드록시-6,8-디옥사바이사이클로[3.2.1]옥탄-3-일)옥시)프로파노일)-L-알라닌)옥시)메톡시)카르보닐)(메틸)아미노)부타노에이트의 제조

무수 DMF(2 ml) 중 파트 2 단계 6 산(0.150 g, 0.433 mmol) 및 단계 3a 클로라이드(0.260 g, 0.866 mmol)의 현탁액에 DIEA(0.156 mL, 0.910 mmol)를 한 번에 그리고 이어서 NaI(0.130 g, 0.866 mmol)를 첨가하였다. 현탁액을 48시간 동안 RT에서 교반하였다. 반응 혼합물을 차가운 물(100 ml)에 붓고, EtOAc(4 X 30 ml)로 추출하였다. 추출물을 염수(50 ml) 및 5% LiCl 용액(50 ml)으로 세척하고, 소듐 설페이트 상에서 건조시켰다. 조생성물인 갈색 점성 오일을 실리카 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액: EtOAc 중 5 내지 10% MeOH)에 의해 정제하여 표제 화합물을 무색 점성 오일(181 mg, 68%)로서 수득하였다.

LCMS: 99.3% 순도; RT = 1.49 min; $C_{28}H_{39}N_3O_{12}$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치 610, 실측치 610; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.71 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.42–7.28 (m, 5H), 6.20–6.10 (m, 1H), 5.82–5.66 (m, 2H), 5.41 (s, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.55 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.52–4.42 (m, 1H), 4.28 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.10–3.98 (m, 2H), 3.34–3.22 (m, 2H), 3.46 (s, 1H), 3.40–3.15 (m, 2H), 2.97 (dd, J = 16.5 Hz 및 3.6 Hz, 1H), 2.89 (d, J = 5.2 Hz, 3H), 2.44–2.30 (m, 2H), 1.97 (s, 3H), 1.88 (dd, J = 7.2 Hz 및 5.2 Hz, 3H), 1.40–1.30 (m, 3H).

단계 4b. 벤질 4-((((((R)-2-(((1R,2S,3R,4R,5R)-4-아세트아미도-2-하이드록시-6,8-디옥사바이사이클로[3.2.1]옥탄-3-일)옥시)프로파노일)-L-알라닌)옥시)메톡시)카르보닐)(메틸)아미노)부타노에이트의 제조

무수 DMF(3 ml) 중 파트 2 단계 6 산(0.200 g, 0.577 mmol) 및 단계 3b 클로라이드(0.362 g, 1.15 mmol)의 현탁액에 DIEA(0.208 mL, 1.21 mmol)를 한 번에 그리고 이어서 NaI(0.173 g, 1.15 mmol)를 첨가하였다. 현탁액을 RT에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 차가운 물(100 ml)에 붓고, EtOAc(4 X 30 ml)로 추출하였다. 추출물을 염수(50 ml) 및 5% LiCl 용액(50 ml)으로 세척하고, 소듐 설페이트 상에서 건조시켰다. 조생성물인 갈색 점성 오일을 실리카 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액: EtOAc 중 5 내지 10% MeOH)에 의해 정제하여, 표제 화합물(0.11 g, 30%)을 담황색 점성 오일로서 수득하였다.

LCMS: 98.6% 순도; RT = 1.53 min; $C_{29}H_{41}N_3O_{12}$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치 624, 실측치 624; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.86–7.78 (m, 1H), 7.42–7.28 (m, 5H), 6.90–6.74 (m, 1H), 6.10 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.41 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.68–4.48 (m, 2H), 4.35 (app t, J = 7.6 Hz, 1H), 4.18–4.10 (m, 1H), 3.99 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.86–3.74 (m, 2H), 3.44 (s, 1H), 3.40–3.16 (m, 2H), 2.87 (s, 3H), 2.49–2.35 (m, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.94–1.80 (m, 2H), 1.51–1.44 (m, 3H), 1.44–1.36 (m, 6H)

단계 5a. 링커-4의 제조

EtOH(10 ml) 중 단계 4a 에스테르(170 mg, 0.279 mmol)의 용액에 한 방울의 물로 습윤된 Pd/C(10.0%, 33.9 mg, 0.0319 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 수소(50 PSI)하에 밤새 교반한 후, 짧은 셀라이트 패드를 통해 여과하였

다. 여과 케이크를 EtOH(2 X 5 ml)로 세척하고, 여과액을 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 에테르(5 ml)로 분쇄하여, 표제 화합물을 무색 유리질 고형물(127 mg, 87%)로서 수득하였다.

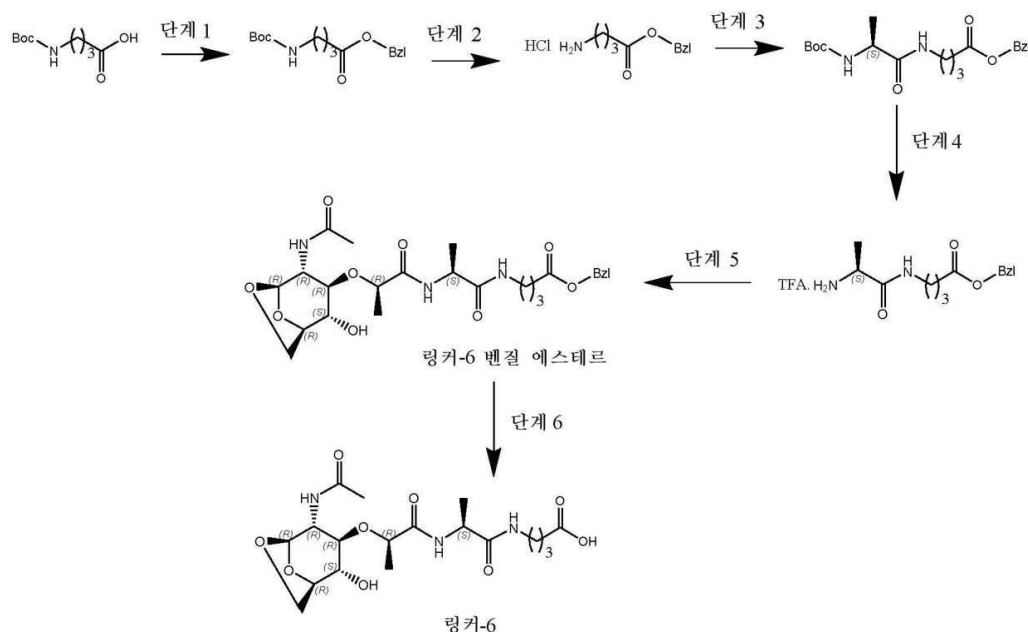
LCMS: 100% 순도 ELSD 에 따름; RT = 1.18 min; $C_{21}H_{33}N_3O_{12}$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치 520, 실측치 520; 1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4) δ 5.81-5.74 (m, 2H), 5.38 (s, 1H), 4.55 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.52-4.42 (m, 1H), 4.25-4.15 (m, 2H), 3.90 (s, 1H), 3.78-3.72 (m, 1H), 3.69 (s, 1H), 3.61 (dt, J = 6.0 Hz, 1H), 3.40 (s, 1H), 3.38-3.25 (m, 잔류 용매 피크에 의해 가려짐), 2.92 (s, 3H), 2.29 (dt, J = 7.6 Hz, 2H), 1.97 (s, 3H), 1.90-1.76 (m, 2H), 1.44 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.35 (d, J = 6.8 Hz, 3H)

단계 5b. 링커-5의 제조

EtOH(10 ml) 중 단계 4b 에스테르(110 mg, 0.176 mmol)의 용액에 한 방울의 물로 습윤된 Pd/C(10.0%, 33.9 mg, 0.0319 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 수소(50 PSI) 하에 밤새 교반한 후, 짧은 셀라이트 패드를 통해 여과하였다. 여과 케이크를 EtOH(2 X 5 ml)로 세척하고, 여과액을 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 에테르(5 ml)로 분쇄하여, 표제 화합물을 무색 유리질 고형물(90 mg, 95%)로서 수득하였다.

LCMS: 100% 순도 ELSD 에 따름; RT = 1.22 min; $C_{22}H_{35}N_3O_{12}$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치 534, 실측치 534; 1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4) δ 6.82-6.70 (m, 1H), 5.39 (s, 1H), 4.57 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.56-4.36 (m, 1H), 4.25 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.19 (dt, J = 6.4 Hz, 1H), 3.89 (s, 1H), 3.80-3.72 (m, 1H), 3.69 (s, 1H), 3.40 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 3.38-3.23 (m, 잔류 용매 피크에 의해 가려짐), 2.94-2.86 (m, 3H), 2.30-2.25 (m, 2H), 1.97 (s, 3H), 1.83 (qd, J = 6.8 Hz, 2H), 1.50 (dd, J = 5.6 Hz, 3H), 1.42 (dd, J = 7.2 Hz 및 3.2 Hz, 3H), 1.38-1.28 (m, 3H)

(d) 링커-6의 합성



도식 10. 링커-6의 합성

단계 1. 벤질 4-((3차-부톡시카르보닐)아미노)부타노에이트의 제조

DMF(50 ml) 중 4-(3차-부톡시카르보닐아미노)부탄산(5.00 g, 24.6 mmol)의 현탁액에 K_2CO_3 (8.84 g, 64.0 mmol) 및 이어서 벤질브로마이드(5.47 g, 32.0 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 RT에서 4일 동안 교반하였다. 혼합물을 차가운 물(1.5 L)에 붓고, 디에틸 에테르(2 X 300 ml)로 추출하였다. 추출물을 염수로 세척하고, 진공에서 농축시켜, 무색 오일을 수득하였고, 이는 정치 시 고화되었다. 이를 헥산으로 분쇄하고, 표제 화합물을 여과에 의해 백색 고형물(6.93 g, 96%)로서 분리하였다.

LCMS: 96.5% 순도; RT = 1.76 min; $C_{16}H_{23}NO_4$ [M+H]⁺에 대한 m/z 계산치 194; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.40–7.31 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.59 (br s, 1H), 3.23–3.07 (m, 2H), 2.40 (app t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.83 (app q, J = 6.8 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H)

단계 2. 벤질 4-아미노부타노에이트, 하이드로클로라이드의 제조

디옥산(30 ml) 중 단계 1 에스테르(1.00 g, 3.41 mmol)의 교반된 용액에 HCl(디옥산 중 4 M)(4.00 M, 12.8 mL, 51.1 mmol)을 첨가하였다. 생성된 용액을 3시간 동안 교반하였다. 용매를 진공에서 제거하고, 잔류물을 디옥산(2 X 20 ml)과 공증발시켜 미량의 HCl을 제거하였다. 에테르로 분쇄하고, 여과하여, 표제 화합물을 백색 분말(0.57 g, 72%)로서 수득하였다.

LCMS: 99.0% 순도; RT = 1.05 min; 유리 염기 $C_{11}H_{15}NO_2$ [M+H]⁺에 대한 m/z 계산치 194; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.02 (br s, 3H), 7.40–7.31 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 2.81 (app t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.55–2.45 (m, 물 용매 피크에 의해 가려짐), 1.85 (app q, J = 7.6 Hz, 2H)

단계 3. 벤질 (S)-4-(2-((3차-부톡시카르보닐)아미노)프로판아미도)부타노에이트의 제조

단계 2 HCl 염(0.500 g, 2.18 mmol) 및 N-Boc L-알라닌-OH(0.487 g, 2.57 mmol)를 실온에서 DMF(15 ml, 0.1 M)에 용해시켰다. DIEA(1.25 mL, 7.18 mmol) 및 HATU(0.910 g, 2.39 mmol)를 이후 첨가하고, 혼합물을 RT에서 18시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 얼음물(250 ml)에 첨가하고, 생성된 백색 침전물을 에테르 중 20% EtOAc(3 X 300 ml)로 추출하였다. 합한 추출물을 염수(2 X 300 ml)로 세척하고, 소듐 설페이트 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공에서 농축시켜, 무색 오일을 수득하였다. 이를 Biotage Flashmaster 시스템을 사용하여 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액: 헥산 중 10% 내지 90% EtOAc 구배)에 의해 정제하였다. TLC에 따른 순수한 분획을 합하고, 진공에서 농축시켜, 표제 화합물을 무색 점성 오일(0.541 g, 68.2 %)로서 수득하였다.

LCMS: 100% 순도; RT = 1.62 min; $C_{19}H_{28}N_2O_5$ [M+H]⁺에 대한 m/z 계산치 365; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38–7.29 (m, 5H), 6.31 (br s, 1H), 5.11 (s, 1H), 4.92 (br s, 1H), 4.13–4.07 (m, 1H), 3.32–3.27 (m, 2H), 2.40 (app t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.85 (app q, J = 7.2 Hz, 2H),

단계 4. 벤질 (S)-4-(2-아미노프로판아미도)부타노에이트, 트리플루오로아세테이트의 제조

DCM(10 ml) 중 단계 3 에스테르(0.540 g, 1.48 mmol)의 용액에 TFA(1.10 mL, 14.8 mmol)를 RT에서 한 번에 첨가하였다. 용액을 RT에서 20시간 동안 교반하였다. 용매를 진공에서 제거하고, 잔류물을 톨루엔(10 ml X 3)과 공증발시켜, 잔류 TFA를 제거하였다. 표제 화합물을 무색 오일(0.75 g, 134%)로서 분리하였다. 물질을 다음 단계에 바로 사용하였다.

LCMS: 96.4% 순도; RT = 1.12 min; 유리 염기 $C_{14}H_{20}N_2O_3$ [M+H]⁺에 대한 m/z 계산치 265.

단계 5. 벤질 4-((S)-2-((R)-2-(((1R,2S,3R,4R,5R)-4-아세트아미도-2-하이드록시-6,8-디옥사바이사이클로[3.2.1]옥탄-3-일)옥시)프로판아미도)프로판아미도)부타노에이트의 제조

단계 4 염(366 mg, 0.966 mmol) 및 파트 1 단계 3 산(1,6-안하이드로-N-아세틸무람산)(266 mg, 0.966 mmol)을 실온에서 DMF(10 ml, 약 0.1 M)에 용해시켰다. DIEA(0.673 mL, 3.87 mmol) 및 HATU(404 mg, 1.06 mmol)를 이후 첨가하고, 혼합물을 RT에서 18시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 얼음물(300 ml)에 첨가하고, EtOAc(3 X 100 ml) 이후 1:1 클로로포름-IPA(3 X 80 ml)로 추출하였다. 유기 분획을 합하고, 소듐 설페이트 상에서 건조시키고, 진공에서 농축시켰다. 조생성물을 실리카 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액: DCM 중 5 내지 10% MeOH 구배)에 의해 정제하였다. TLC에 따른 순수한 분획을 합하고, 진공에서 농축시켰다. DMF로 오염된 분획을 합하고, 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 EtOAc(200 ml)에 넣고, 5% LiCl 수용액(2 X 50 ml)으로 세척하였다. 유기 용액을 소듐 설페이트 상에서 건조시키고, 진공에서 농축시켰다. 조생성물을 실리카 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(용리액: DCM 중 5 내지 10% MeOH 구배)에 의해 정제하였다. TLC에 따른 순수한 분획을 첫 번째 순수한 배치와 합하여, 표제 화합물을 무색 점성 오일로서 수득하였고, 이는 정치 시 백색 결정질 고형물로 서서히 고화되었다(387 mg, 76%).

LCMS: 100% 순도; RT = 1.36 min; $C_{25}H_{35}N_3O_9$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치 522; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.76 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.35–7.31 (m, 5H), 6.61 (app t, J = 5.6 Hz, 1H), 6.25 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.52 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.39–4.36 (m, 1H), 4.23 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.18–4.13 (m, 1H), 3.98 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.82–3.78 (m, 1H), 3.73 (s, 1H), 3.43 (s, 1H), 3.37–3.17 (m, 2H), 2.38 (app t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.98 (s, 3H), 1.84 (app q, J = 6.8 Hz, 2H), 1.38–1.35 (m, 6H)

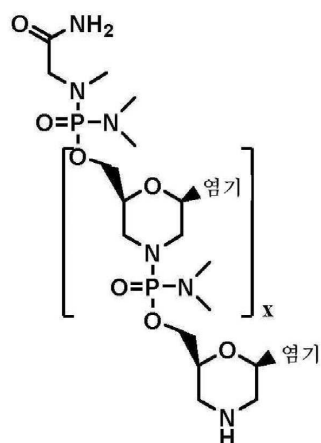
단계 6. 링커-6의 제조

EtOH(10 ml) 중 단계 5 에스테르(0.300 g, 0.575 mmol)의 용액에 한 방울의 물로 습윤된 Pd/C(10.0%, 0.0612 g, 0.0575 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 수소(50 PSI) 하에 밤새 교반한 후, 짧은 셀라이트 패드를 통해 여과하였다. 여과물을 EtOH(2 X 5 ml)로 세척하고, 여과 케이크를 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 에테르(5 ml)로 분쇄하여, 표제 화합물을 오프 화이트색 포움같은 고형물(180 mg, 72%)로서 수득하였다.

LCMS: 100% 순도; RT = 1.00 min; $C_{18}H_{29}N_3O_9$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치 432; 1H NMR (400 MHz, MeOD- d_6) δ 5.38 (s, 1H), 4.55 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.37–4.34 (m, 1H), 4.29 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.21–4.16 (m, 1H), 3.87 (s, 1H), 3.76 (dd, J = 7.6 및 6.0 Hz, 1H), 3.40 (m, 1H), 3.25–2.22 (m, 2H), 2.32 (app t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.97 (s, 3H), 1.78 (app q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.38–1.35 (m, 6H)

파트 4. "당-링커-스페이서-안티센스제"의 제조

도식 3에 상세히 기재된 일반적인 원리에 따라, PMO 안티센스 서열을 '링커-1→6'와 커플링하여 다양한 전체 '작제물'을 제공하였다. 하기 상세히 기재된 바와 같은 5' 말단 및 다양한 링커의 부착을 위한 유리 모르폴리노로서 3' 말단을 갖는 GeneTools Inc(<https://www.gene-tools.com/> 참조)로부터 미리 제조된 PMO 안티센스제를 구매하였다.



관련된 서열 ID에 기초하여 하기 10개의 PMO가 본원에서 하기와 같이 이들의 PED 번호로 지칭된다:

[표 2] PMO, 서열 ID 및 PED 명칭

PED 번호	서열 (5' → 3')	서열 ID
PED-1	CTT CGA TAG TG	57
PED-2	TCA AAT GAG GC	91
PED-3	CGC TCA TCT AA	94
PED-4	ATT GAG TGT CAT	170
PED-5	TGC CAT CTT GTT	171
PED-6	GTT GTT TGA TC	102
PED-7	CAG GAG CAT TAG	172
PED-8	GTC TAT TCT CC	153
PED-9	CCT CAG ACT CC	87
PED-10	AGT GCT CTA CC	103

(a) PMO PED-1과 커플링된 링커-1→6의 제조.

L1-PED-1(PED-006)의 제조

DMSO(127 μ L) 중 링커-1(파트 3(a) 단계 5 산)(2.32 mg, 4.36 μ mol)의 용액에 HBTU(DMSO 중 0.300 M, 15.9 μ L, 4.76 μ mol), HOAt(DMSO 중 0.300 M, 15.9 μ L, 4.76 μ mol) 및 DIEA(DMSO 중 0.600 M, 16.5 μ L, 9.91 μ mol)를 연속 첨가하였다. 이후 바로 혼합물을 PED-1(DMSO 중 0.01 M, 396 μ L, 3.96 μ mol)에 첨가하였다. 활성화된 산을 함유하는 바이알을 DMSO(2 X 50 μ L)로 세척하고, 세척물을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 LCMS에 의해 분석하였고, 요망되는 생성물을 관찰하였다. 반응 용액을 -25°C에서 밤새 저장하고, 분취용 HPLC에 의해 2회 등가 주사로 정제하였다. 이는 각각 약 10 ml의 2개의 생성물 분획을 제공하였다. 이들을 28 ml 유리 바이알에 합하고, 동결건조시켜, 표제 작제물을 백색 고형물(9.1 mg, 53%)로서 수득하였다.

LCMS 순도 (225 nm +/- 50) = 100%, RT = 1.109 min; [M]³⁺에 대한 m/z 계산치 1433.5, 실측치 1433.2

L2-PED-1 (PED-007)의 제조

DMSO(127 μ L) 중 링커-2(파트 3(b) 단계 5a 산)(2.14 mg, 4.36 μ mol)의 용액에 HBTU(DMSO 중 0.300 M, 15.9 μ L, 4.76 μ mol), HOAt(DMSO 중 0.300 M, 15.9 μ L, 4.76 μ mol) 및 DIEA(DMSO 중 0.600 M, 16.5 μ L, 9.91 μ mol)를 연속 첨가하였다. 이후 바로 혼합물을 PED-1(DMSO 중 0.01 M, 396 μ L, 3.96 μ mol)에 첨가하였다. 활성화된 산을 함유하는 바이알을 DMSO(2 X 50 μ L)로 세척하고, 세척물을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 LCMS에 의해 분석하였는데, 요망되는 생성물이 관찰되었다. 반응 용액을 -25°C에서 밤새 저장하고, 분취용 HPLC에 의해 2회 등가 주사로 정제하였다. 이는 각각 약 10 ml의 2개의 생성물 분획을 제공하였다. 이들을 28 ml 유리 바이알에 합하고, 동결건조시켜, 표제 작제물을 백색의 동결건조된 고형물(7.4 mg, 43%)로서 수득하였다.

LCMS 순도 (225 nm +/- 50) = 98.8%, RT = 1.100 min; [M]³⁺에 대한 m/z 계산치 1420.1, 실측치 1419.9

L3-PED-1(PED-008)의 제조

DMSO(127 μ L) 중 링커-3(파트 3(b) 단계 5b 산)(2.20 mg, 4.36 μ mol)의 용액에 HBTU(DMSO 중 0.300 M, 15.9 μ L, 4.76 μ mol), HOAt(DMSO 중 0.300 M, 15.9 μ L, 4.76 μ mol) 및 DIEA(DMSO 중 0.600 M, 16.5 μ L, 9.91 μ mol)를 연속 첨가하였다. 이후 바로 혼합물을 PED-1(DMSO 중 0.01 M, 396 μ L, 3.96 μ mol)에 첨가하였다. 활성화된 산을 함유하는 바이알을 DMSO(2 X 50 μ L)로 세척하고, 세척물을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 LCMS에 의해 분석하였는데, 요망되는 생성물이 관찰되었다. 반응 용액을 -25°C에서 밤새 저장하고, 분취용 HPLC에 의해 2회 등가 주사로 정제하였다. 이는 각각 약 10 ml의 2개의 생성물 분획을 제공하였다. 이들을 28 ml 유리 바이알에 합하고, 동결건조시켜, 표제 작제물을 백색의 동결건조된 고형물(8.5 mg, 50%)로서 수득하였다.

LCMS 순도 (225 nm +/- 50) = 96.6%; RT = 1.109 min; [M]³⁺에 대한 m/z 계산치 1424.8, 실측치 1424.5

[0478] L4-PED-1(PED-009)의 제조

[0479] DMSO(127 μ L) 중 링커-4(파트 3(c) 단계 5a 산)(2.27 mg, 4.36 μ mol)의 용액에 HBTU(DMSO 중 0.300 M, 15.9 μ L, 4.76 μ mol), HOAt(DMSO 중 0.300 M, 15.9 μ L, 4.76 μ mol) 및 DIEA(DMSO 중 0.600 M, 16.5 μ L, 9.91 μ mol)를 연속 첨가하였다. 이후 바로 혼합물을 PED-1(DMSO 중 0.01 M, 396 μ L, 3.96 μ mol)에 첨가하였다. 활성화된 산을 함유하는 바이알을 DMSO(2 X 50 μ L)로 세척하고, 세척물을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 40℃에서 2시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 LCMS에 의해 분석하였는데, 요망되는 생성물이 관찰되었다. 반응 용액을 -25℃에서 밤새 저장하고, 분취용 HPLC에 의해 2회 등가 주사로 정제하였다. 이는 각각 약 10 ml의 2개의 생성물 분획을 제공하였다. 이들을 28 ml 유리 바이알에 합하고, 동결건조시켜, 표제 작제물을 백색의 동결건조된 고형물(10.7 mg, 63%)로서 수득하였다.

[0480] LCMS 순도 (225 nm +/- 50) = 98.5%, RT = 1.111 min; [M]³⁺에 대한 m/z 계산치 1429.5, 실측치 1429.3

[0481] L5-PED-1(PED-010)의 제조

[0482] DMSO(127 μ L) 중 링커-5(파트 3(c) 단계 5b 산)(2.33 mg, 4.36 μ mol)의 용액에 HBTU(DMSO 중 0.300 M, 15.9 μ L, 4.76 μ mol), HOAt(DMSO 중 0.300 M, 15.9 μ L, 4.76 μ mol) 및 DIEA(DMSO 중 0.600 M, 16.5 μ L, 9.91 μ mol)를 연속 첨가하였다. 이후 바로 혼합물을 PED-1(DMSO 중 0.01 M, 396 μ L, 3.96 μ mol)에 첨가하였다. 활성화된 산을 함유하는 바이알을 DMSO(2 X 50 μ L)로 세척하고, 세척물을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 40℃에서 2시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 LCMS에 의해 분석하였는데, 요망되는 생성물이 관찰되었다. 반응 용액을 -25℃에서 밤새 저장하고, 분취용 HPLC에 의해 2회 등가 주사로 정제하였다. 이는 각각 약 10 ml의 2개의 생성물 분획을 제공하였다. 이들을 28 ml 유리 바이알에 합하고, 동결건조시켜, 표제 작제물을 백색의 동결건조된 고형물(11.2 mg, 65%)로서 수득하였다.

[0483] LCMS 순도 (225 nm +/- 50) = 100%, RT = 1.119 min; [M]³⁺에 대한 m/z 계산치 1434.2, 실측치 1434.0

[0484] L6-PED-1(PED-011)의 제조

[0485] 링커-6(파트 3(d) 단계 6 산)(무수 DMSO 중 용액)(0.0350 M, 109 μ L, 3.81 μ mol)에 HBTU(DMSO 중 용액)(0.300 M, 13.8 μ L, 4.15 μ mol), HOAt(DMSO 중 용액)(0.300 M, 13.8 μ L, 4.15 μ mol) 및 DIEA(DMSO 중 용액)(0.300 M, 28.8 μ L, 8.65 μ mol)를 연속 첨가하였다. 이후 바로 혼합물을 PED-1 올리고뉴클레오티드(DMSO 중 용액)(0.0100 M, 346 μ L, 3.46 μ mol)에 첨가하였다. 활성화된 산을 함유하는 바이알을 DMSO(2 X 50 μ L)로 세척하고, 세척물을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 40℃에서 2시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 LCMS에 의해 분석하였는데, 요망되는 생성물이 관찰되었다. 반응 용액을 -25℃에서 밤새 저장하고, 분취용 HPLC에 의해 2회 등가 주사로 정제하였다. 이는 각각 약 10 ml의 2개의 생성물 분획을 제공하였다. 이들을 28 ml 유리 바이알에 합하고, 동결건조시켜, 표제 작제물을 백색의 고형물(11.9 mg, 2.84 μ mol, 수율: 81.9%)로서 수득하였다.

[0486] LCMS 순도 (225 nm +/- 50) = 98.3%, RT = 1.114 min; [M]³⁺에 대한 m/z 계산치 1400.1, 실측치 1399.9

[0487] L6-PED-2(PED-012)의 제조

[0488] 링커-6(파트 3(d) 단계 6 산)(무수 DMSO 중 용액)(0.0350 M, 106 μ L, 3.70 μ mol)에 HBTU(DMSO 중 0.300 M, 13.5 μ L, 4.04 μ mol), HOAt(DMSO 중 0.300 M, 13.5 μ L, 4.04 μ mol) 및 DIEA(DMSO 중 0.300 M, 28.1 μ L, 8.42 μ mol)를 연속 첨가하였다. 이후 바로 혼합물을 PED-2 올리고뉴클레오티드(DMSO 중 0.0100 M, 337 μ L, 3.37 μ mol)에 첨가하였다. 활성화된 산을 함유하는 바이알을 DMSO(2 X 50 μ L)로 세척하고, 세척물을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 40℃에서 2시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 LCMS에 의해 분석하였는데, 요망되는 생성물이 관찰되었다. 반응 용액을 -25℃에서 밤새 저장하고, 분취용 HPLC에 의해 2회 등가 주사로 정제하였다. 이는 각각 약 10 ml의 2개의 생성물 분획을 제공하였다. 이들을 28 ml 유리 바이알에 합하고, 동결건조시켜, 표제 작제물을 백색 고형물(9.8 mg, 69%)로서 수득하였다.

[0489] LCMS 순도 (225 nm +/- 50) = 97.3%, RT = 1.117 min; [M]³⁺에 대한 m/z 계산치 1406.1, 실측치 1405.9

[0490] L6-PED-3(PED-013)의 제조

[0491] 링커-6(파트 3(d) 단계 6 산)(무수 DMSO 중 용액)(0.0350 M, 79.6 μ L, 2.78 μ mol)에 HBTU(DMSO 중 용액)(0.300 M, 10.1 μ L, 3.04 μ mol), HOAt(DMSO 중 용액)(0.300 M, 10.1 μ L, 3.04 μ mol) 및 DIEA(DMSO 중

용액)(0.300 M, 21.1 μ L, 6.33 μ mol)를 연속 첨가하였다. 이후 바로 혼합물을 PED-3 올리고뉴클레오타이드(DMSO 중 용액)(0.0100 M, 253 μ L, 2.53 μ mol)에 첨가하였다. 활성화된 산을 함유하는 바이알을 DMSO(2 X 50 μ L)로 세척하고, 세척물을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 40℃에서 2시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 LCMS에 의해 분석하였는데, 요망되는 생성물이 관찰되었다. 반응 용액을 -25℃에서 밤새 저장하고, 분취용 HPLC에 의해 2회 등가 주사로 정제하였다. 이는 각각 약 10 ml의 2개의 생성물 분획을 제공하였다. 이들을 28 ml 유리 바이알에 합하고, 동결건조시켜, 표제 작제물을 백색 고형물(9.30 mg, 2.25 μ mol, 수율: 89.0%)로서 수득하였다.

[0492] LCMS 순도 (225 nm +/- 50) = 96.6%, RT = 1.107 min; [M]³⁺에 대한 m/z 계산치 1376.5, 실측치 1376.2

[0493] L6-PED-4(PED-014)의 제조

[0494] 링커-6(파트 3(d) 단계 6 산)(무수 DMSO 중 용액)(0.0350 M, 86.7 μ L, 3.03 μ mol)에 HBTU(DMSO 중 용액)(0.300 M, 11.0 μ L, 3.31 μ mol), HOAt(DMSO 중 용액)(0.300 M, 11.0 μ L, 3.31 μ mol) 및 DIEA(DMSO 중 용액)(0.300 M, 23.0 μ L, 6.89 μ mol)를 연속 첨가하였다. 이후 바로 혼합물을 PED-4 올리고뉴클레오타이드(DMSO 중 용액)(0.0100 M, 276 μ L, 2.76 μ mol)에 첨가하였다. 활성화된 산을 함유하는 바이알을 DMSO(2 X 50 μ L)로 세척하고, 세척물을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 40℃에서 2시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 LCMS에 의해 분석하였는데, 요망되는 생성물이 관찰되었다. 반응 용액을 -25℃에서 밤새 저장하고, 분취용 HPLC에 의해 2회 등가 주사로 정제하였다. 이는 각각 약 10 ml의 2개의 생성물 분획을 제공하였다. 이들을 28 ml 유리 바이알에 합하고, 동결건조시켜, 표제 작제물을 백색 고형물(8.00 mg, 1.76 μ mol, 수율: 63.7%)로서 수득하였다.

[0495] LCMS 순도 (225 nm +/- 50) = 96.5%, RT = 1.155 min; [M]⁴⁺에 대한 m/z 계산치 1138.9, 실측치 1139.9

[0496] L6-PED-5(PED-015)의 제조

[0497] 링커-6(파트 3(d) 단계 6 산)(무수 DMSO 중 용액)(0.0350 M, 95.9 μ L, 3.36 μ mol)에 HBTU(DMSO 중 용액)(0.300 M, 12.2 μ L, 3.66 μ mol), HOAt(DMSO 중 용액)(0.300 M, 12.2 μ L, 3.66 μ mol) 및 DIEA(DMSO 중 용액)(0.300 M, 25.4 μ L, 7.63 μ mol)를 연속 첨가하였다. 이후 바로 혼합물을 PED-5 올리고뉴클레오타이드(DMSO 중 용액)(0.0100 M, 305 μ L, 3.05 μ mol)에 첨가하였다. 활성화된 산을 함유하는 바이알을 DMSO(2 X 50 μ L)로 세척하고, 세척물을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 40℃에서 2시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 LCMS에 의해 분석하였는데, 요망되는 생성물이 관찰되었다. 반응 용액을 -25℃에서 밤새 저장하고, 분취용 HPLC에 의해 2회 등가 주사로 정제하였다. 이는 각각 약 10 ml의 2개의 생성물 분획을 제공하였다. 이들을 28 ml 유리 바이알에 합하고, 동결건조시켜, 표제 작제물을 백색 고형물(8.70 mg, 1.94 μ mol, 수율: 63.7%)로서 수득하였다.

[0498] LCMS 순도 (225 nm +/- 50) = 100%, RT = 1.152 min; [M]³⁺에 대한 m/z 계산치 1493.9, 실측치 1493.8

[0499] L6-PED-6(PED-016)의 제조

[0500] 링커-6(파트 3(d) 단계 6 산)(무수 DMSO 중 용액)(0.0350 M, 78.8 μ L, 2.76 μ mol)에 HBTU(DMSO 중 용액)(0.300 M, 10.0 μ L, 3.01 μ mol), HOAt(DMSO 중 용액)(0.300 M, 10.0 μ L, 3.01 μ mol) 및 DIEA(DMSO 중 용액)(0.300 M, 20.9 μ L, 6.27 μ mol)를 연속 첨가하였다. 이후 바로 혼합물을 PED-6 올리고뉴클레오타이드(DMSO 중 용액)(0.0100 M, 251 μ L, 2.51 μ mol)에 첨가하였다. 활성화된 산을 함유하는 바이알을 DMSO(2 X 50 μ L)로 세척하고, 세척물을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 40℃에서 2시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 LCMS에 의해 분석하였는데, 요망되는 생성물이 관찰되었다. 반응 용액을 -25℃에서 밤새 저장하고, 분취용 HPLC에 의해 2회 등가 주사로 정제하였다. 이는 각각 약 10 ml의 2개의 생성물 분획을 제공하였다. 이들을 28 ml 유리 바이알에 합하고, 동결건조시켜, 표제 작제물을 백색 고형물(6.80 mg, 1.62 μ mol, 수율: 64.5%)로서 수득하였다.

[0501] LCMS 순도 (225 nm +/- 50) = 95.4%, RT = 1.163 min; [M]³⁺에 대한 m/z 계산치 1402.1, 실측치 1402.0

[0502] L6-PED-7(PED-017)의 제조

[0503] 링커-6(파트 3(d) 단계 6 산)(무수 DMSO 중 용액)(0.0350 M, 88.4 μ L, 3.10 μ mol)에 HBTU(DMSO 중 용액)(0.300 M, 11.3 μ L, 3.38 μ mol), HOAt(DMSO 중 용액)(0.300 M, 11.3 μ L, 3.38 μ mol) 및 DIEA(DMSO 중

용액)(0.300 M, 23.5 μ L, 7.04 μ mol)를 연속 첨가하였다. 이후 바로 혼합물을 PED-7 올리고뉴클레오타이드(DMSO 중 용액)(0.0100 M, 281 μ L, 2.81 μ mol)에 첨가하였다. 활성화된 산을 함유하는 바이알을 DMSO(2 X 50 μ L)로 세척하고, 세척물을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 40℃에서 2시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 LCMS에 의해 분석하였는데, 요망되는 생성물이 관찰되었다. 반응 용액을 -25℃에서 밤새 저장하고, 분취용 HPLC에 의해 2회 등가 주사로 정제하였다. 이는 각각 약 10 ml의 2개의 생성물 분획을 제공하였다. 이들을 28 ml 유리 바이알에 합하고, 동결건조시켜, 표제 작제물을 백색 고형물(7.00 mg, 1.53 μ mol, 수율: 54.4%)로서 수득하였다.

[0504] LCMS 순도 (225 nm +/- 50) = 97.5%, RT = 1.104 min; [M]⁴⁺에 대한 m/z 계산치 1143.7, 실측치 1143.5

[0505] L6-PED-8(PED-018)의 제조

[0506] 링커-6(파트 3(d) 단계 6 산)(무수 DMSO 중 용액)(0.0350 M, 94.4 μ L, 3.30 μ mol)에 HBTU(DMSO 중 용액)(0.300 M, 12.0 μ L, 3.60 μ mol), HOAt(DMSO 중 용액)(0.300 M, 12.0 μ L, 3.60 μ mol) 및 DIEA(DMSO 중 용액)(0.300 M, 25.0 μ L, 7.51 μ mol)를 연속 첨가하였다. 이후 바로 혼합물을 PED-8 올리고뉴클레오타이드(DMSO 중 용액)(0.0100 M, 300 μ L, 3.00 μ mol)에 첨가하였다. 활성화된 산을 함유하는 바이알을 DMSO(2 X 50 μ L)로 세척하고, 세척물을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 40℃에서 2시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 LCMS에 의해 분석하였는데, 요망되는 생성물이 관찰되었다. 반응 용액을 -25℃에서 밤새 저장하고, 분취용 HPLC에 의해 2회 등가 주사로 정제하였다. 이는 각각 약 10 ml의 2개의 생성물 분획을 제공하였다. 이들을 28 ml 유리 바이알에 합하고, 동결건조시켜, 표제 작제물을 백색 고형물(9.30 mg, 2.26 μ mol, 수율: 75.4%)로서 수득하였다.

[0507] LCMS 순도 (225 nm +/- 50) = 95.3%, RT = 1.112 min; [M]³⁺에 대한 m/z 계산치 1370.4, 실측치 1370.3

[0508] L6-PED-9(PED-019)의 제조

[0509] 링커-6(파트 3(d) 단계 6 산)(무수 DMSO 중 용액)(0.0350 M, 93.2 μ L, 3.26 μ mol)에 HBTU(DMSO 중 용액)(0.300 M, 11.9 μ L, 3.56 μ mol), HOAt(DMSO 중 용액)(0.300 M, 11.9 μ L, 3.56 μ mol) 및 DIEA(DMSO 중 용액)(0.300 M, 24.7 μ L, 7.42 μ mol)를 연속 첨가하였다. 이후 바로 혼합물을 PED-9 올리고뉴클레오타이드(DMSO 중 용액)(0.0100 M, 297 μ L, 2.97 μ mol)에 첨가하였다. 활성화된 산을 함유하는 바이알을 DMSO(2 X 50 μ L)로 세척하고, 세척물을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 40℃에서 2시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 LCMS에 의해 분석하였는데, 요망되는 생성물이 관찰되었다. 반응 용액을 -25℃에서 밤새 저장하고, 분취용 HPLC에 의해 2회 등가 주사로 정제하였다. 이는 각각 약 10 ml의 2개의 생성물 분획을 제공하였다. 이들을 28 ml 유리 바이알에 합하고, 동결건조시켜, 표제 작제물을 백색 고형물(8.20 mg, 2.01 μ mol, 수율: 67.6%)로서 수득하였다.

[0510] LCMS 순도 (225 nm +/- 50) = 97%, RT = 1.080 min; [M]³⁺에 대한 m/z 계산치 1363.4, 실측치 1363.4

[0511] L6-PED-10(PED-020)의 제조

[0512] 링커-6(파트 3(d) 단계 6 산)(무수 DMSO 중 용액)(0.0350 M, 87.7 μ L, 3.07 μ mol)에 HBTU(DMSO 중 용액)(0.300 M, 11.2 μ L, 3.35 μ mol), HOAt(DMSO 중 용액)(0.300 M, 11.2 μ L, 3.35 μ mol) 및 DIEA(DMSO 중 용액)(0.300 M, 23.2 μ L, 6.97 μ mol)를 연속 첨가하였다. 이후 바로 혼합물을 PED-10 올리고뉴클레오타이드(DMSO 중 용액)(0.0100 M, 279 μ L, 2.79 μ mol)에 첨가하였다. 활성화된 산을 함유하는 바이알을 DMSO(2 X 50 μ L)로 세척하고, 세척물을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 40℃에서 2시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 LCMS에 의해 분석하였는데, 요망되는 생성물이 관찰되었다. 반응 용액을 -25℃에서 밤새 저장하고, 분취용 HPLC에 의해 2회 등가 주사로 정제하였다. 이는 각각 약 10 ml의 2개의 생성물 분획을 제공하였다. 이들을 28 ml 유리 바이알에 합하고, 동결건조시켜, 표제 작제물을 백색 고형물(8.20 mg, 1.98 μ mol, 수율: 71.0%)로서 수득하였다.

[0513] LCMS 순도 (225 nm +/- 50) = 100%. RT = 1.100 min; [M]³⁺에 대한 m/z 계산치 1381.8, 실측치 1381.7

[0514] 안정성 시험 절차

[0515] (i) 혈장 안정성(인간, 마우스 및/또는 랫트)

[0516] 1시간 기간에 걸쳐 혈장에서 시험 화합물의 분해 정량화. 혈장에서 인큐베이션을 시작한 지 0분, 30분 및 60분

후에 존재하는 모 화합물의 퍼센트를 측정하였다. 화합물을 10 mM DMSO 스톱 용액에 넣고, 미리 37℃에서 인큐베이션된 혈장에 첨가하여, 25 μ M의 최종 농도를 제공하고, 다시 인큐베이션하였다. 분취량을 적절한 시점에 꺼내고, 등가 부피의 차가운 아세트니트릴로 켄칭시켰다. 격렬하게 혼합한 후, 침전된 단백질을 여과 (Multiscreen Solvinert 필터 플레이트, Millipore, Bedford, MA, USA)에 의해 제거하고, 여과액을 $[M+H]^+$ 종의 단일 이온 모니터링을 이용하여 질량 분광기 검출로 역상 HPLC에 의해 분석하였다. 대사 회전을 인큐베이션 전 및 후에 모체의 이온 크로마토그램으로부터의 피크 면적의 비교에 의해 결정하고, 각 시점에 남은 퍼센트로 표현하였다.

[0517] PED-1 및 링커-1→6으로부터 유래된 6개의 전체 접합체에 대한 혈장 안정성 데이터는 표 3에 상세히 기재되어 있다.

[0518] [표 3] 상이한 링커 작제물에 대한 혈장 안정성

표적	그람 음성 유기체	안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열	화합물	당-스페이서-링커	종	혈장 안정성
						반감기 (분)
AcpP	<i>E. Coli</i>	CTT CGA TAG TG (PED 1)	PED-006 (L1)	당 -L-Ala-OCH ₂ O-PIP-OH	마우스	161
					인간	133
			PED-007 (L2)	당 -L-Ala-OCH ₂ O-N-Me-Gly-OH	마우스	59
					인간	77
			PED-008 (L3)	당 -L-Ala-OCH(Me)O-N-Me-Gly-OH	마우스	136
					인간	83
			PED-009 (L4)	당 -L-Ala-OCH ₂ O-N-Me(CH ₂) ₂ COOH	마우스	6
					인간	47
			PED-010 (L5)	당 -L-Ala-OCH(Me)O-N-Me(CH ₂) ₂ COOH	마우스	26
					인간	101
			PED-011 (L6)	당 -L-Ala-NH(CH ₂) ₂ COOH	마우스	262
					인간	263

[0519] (ii) 마이크로솜 대사 안정성(인간, 마우스 및/또는 랫트)

[0520] 시험 화합물(3 μ M)을 풀링된 간 마이크로솜과 인큐베이션하였다. 시험 화합물을 45분 실험 과정에 걸쳐 5개 시점에 인큐베이션하고, 시험 화합물을 LC-MS/MS에 의해 분석하였다. 표준 오차 및 $t_{1/2}$ 값과 내재성 청소율 값(CL_{int})을 계산하였다.

[0522] 마이크로솜(최종 단백질 농도 0.5 mg/mL), 0.1 M 포스페이트 완충액 pH 7.4 및 시험 화합물(최종 기질 농도 3 μ M; 최종 DMSO 농도 0.25%)을 37℃에서 사전-인큐베이션한 후, NADPH(최종 농도 1 mM)를 첨가하여 반응을 개시하였다. 최종 인큐베이션 부피는 50 μ L였다. 마이너스 공동인자 대조 인큐베이션을 시험된 각 화합물에 대하여 포함시키고, 여기서 0.1 M 포스페이트 완충액 pH 7.4을 NADPH 대신에 첨가하였다(마이너스 NADPH). 두 개의 대조 화합물을 각 종과 포함시켰다. 모든 인큐베이션을 각 시험 화합물에 대하여 단일로 수행하였다. 각 화합물을 0분, 5분, 15분, 30분 및 45분 동안 인큐베이션하였다. 대조(마이너스 NADPH)를 45분 동안만 인큐베이션하였다. 20 μ L의 인큐베이션 물질을 적절한 시점에 60 μ L의 메탄올로 옮김으로써 반응을 중단시켰다. 종결 플레이트를 2,500 rpm에서 20분 동안 4℃에서 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 단백질 침전 후, 샘플 상청액을 최대 4개의 화합물의 카세트에 조합하고, 일반 LC-MS/MS 조건을 이용하여 분석하였다. 시간에 대한 피크내 면적 비율(화합물 피크 면적/내부 표준물 피크 면적)의 플롯으로부터, 선의 기울기를 결정하였다. 후속적으로, 반감기 및 내재적 청소율을 하기 식을 이용하여 계산하였다:

제거율 상수 (k) = (- 기울기)

$$\text{반감기 } (t_{1/2}) \text{ (min)} = \frac{0.693}{k}$$

$$\text{내재성 청소율 (CL}_{\text{int}}) \text{ (}\mu\text{L/min/mg 단백질)} = \frac{V \times 0.693}{t_{1/2}}$$

[0523]

[0524]

[0525]

[0526]

[0527]

여기서, V = 인큐베이션 부피 (μL)/마이크로솜 단백질(mg)

상대 대조 화합물을 평가하여 내재성 청소율 값이 지정된 제한치 내에 속하는 것을 보장하였다.

(iii) 간세포 안정성(인간, 마우스 및/또는 개)

시험 화합물(3 μM)을 현탁액에서 저온보존된 간세포와 인큐베이션하였다. 샘플을 60분 실험의 과정에 걸쳐 6개 시점에 꺼내고, 시험 화합물을 LC-MS/MS에 의해 분석하였다. 표준 오차 및 반감기($t_{1/2}$)와 내재성 청소율 (CL_{int})을 계산하였다. 저온보존된 풀링된 간세포를 사용 전 액체 질소에서 저장하였다. 2 mM L-글루타민 및 25 mM HEPES가 보충된 Williams E 배지 및 시험 화합물(최종 기질 농도 3 μM; 최종 DMSO 농도 0.25%)을 37°C에서 사전인큐베이션한 후, 저온보존된 간세포의 현탁액(2 mM L-글루타민 및 25 mM HEPES가 보충된 Williams E 배지 중 최종 세포 밀도 0.5×10^6 개의 생세포/mL)을 첨가하여 반응을 개시하였다. 최종 인큐베이션 부피는 500 μL이었다. 대조 인큐베이션을 시험된 각 화합물에 대하여 포함시키고, 여기서 용해된 세포를 생세포 대신에 첨가하였다. 두 개의 대조 화합물을 각 종과 인큐베이션하였다.

[0528]

50 μL의 인큐베이션 물질을 적절한 시점에 100 μL의 내부 표준물을 함유하는 메탄올로 옮김으로써 반응을 중단시켰다. 대조(용해된 세포)를 60분 동안만 인큐베이션하였다. 종결 플레이트를 2500 rpm에서 30분 동안 4°C에서 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 단백질 침전 후, 샘플 상청액을 최대 4개의 화합물의 카세트에 조합하고, 일반 LC-MS/MS 조건을 이용하여 분석하였다. 시간에 대한 피크내 면적 비율(화합물 피크 면적/내부 표준물 피크 면적)의 플롯으로부터, 선의 기울기 결정하였다. 후속적으로, 반감기($t_{1/2}$)와 내재성 청소율 (CL_{int})을 하기 식을 이용하여 계산하였다:

제거율 상수 (k) = (- 기울기)

$$\text{반감기 } (t_{1/2}) \text{ (min)} = \frac{0.693}{k}$$

$$\text{내재성 청소율 (CL}_{\text{int}}) \text{ (}\mu\text{L/min/10}^6\text{개 세포)} = \frac{V \times 0.693}{t_{1/2}}$$

[0529]

[0530]

여기서, V = 인큐베이션 부피 (μL)/세포 수

[0531]

각 종에 대한 두 개의 대조 화합물을 검정에 포함시키고, 이들 화합물에 대한 값이 지정된 제한치 내에 있지 않는 경우, 결과를 무시하고, 실험을 반복하였다.

[0532]

■ 결과; 작제물 L6-PED-1(PED-011)은 모두 10 mL/분/ 10^6 개 미만의 세포의 저 CL_{int} 로 인간, 마우스 및 개 간세포 안정성을 나타냈다.

[0533]

(iv) 전체 인간 혈액 안정성(인간, 마우스 및/또는 랫트)

시험 화합물을 60분 기간에 걸쳐 5개 시점에 37°C에서 신선한 인간(성별 혼합) 혈액과 인큐베이션하였다. 샘플을 LC-MS/MS에 의해 분석하고, 각 시점에 남은 모 화합물의 퍼센트를 계산하였다. 각 시점에 남은 모 화합물 퍼센트를 결정하였다.

[0535]

신선한 인간(성별 혼합) 혈액을 사용하였다. 단일 인큐베이션을 37°C에서 혈중 1 μM의 시험 또는 대조 화합물

농도에서 수행하였다. 인큐베이션에서 최종 DMSO 농도는 0.25%였다. 대조 화합물을 각 종과 포함시켰다. 내부 표준물을 함유하는 아세토니트릴에 의해 0분, 5분, 15분, 30분 및 60분 후 반응을 종결시켰다. 샘플링 플레이트를 원심분리하고(3000 rpm, 45분, 4℃), 각 시점으로부터의 상청액을 LC-MS/MS에 의해 모 화합물에 대하여 분석하였다. 0분 샘플에 대한 각 시점에 남은 모 화합물의 백분율을 이후 LC-MS/MS 피크 면적 비율(화합물 피크 면적/내부 표준물 피크 면적)로부터 계산하였다.

(v) LogD 결정:

LogD_(PBS) 결정을 소형 "진탕-플라스크" 방법을 이용하여 96 웰 마이크로타이터 플레이트에서 수행하였다. 간략히, 10 mM DMSO 스톡 용액으로부터 화합물을 넣고, 등가 부피의 포스페이트 완충 식염수(10 mM; pH 7.4)(PBS) 및 1-옥탄올(Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, UK)을 함유하는 웰에 첨가하여 50 μM의 최종 농도를 제공하였다. 플레이트를 이후 캡핑하고, 마이크로타이터 플레이트 진탕기에서 1시간 동안 격렬히 혼합하였고, 그 후에 이를 정지시켜, PBS 및 옥탄올 상이 분리되게 하였다. PBS 층을 [M+H]⁺ 종의 단일 이온 모니터링을 이용하여 질량 분광기 검출로 역상 HPLC에 의해 분석하였다. 아세토니트릴/물(50:50)에 용해된 동일한 화합물의 50 μM 표준물과 PBS 상에서 화합물의 이온 크로마토그램으로부터의 피크 면적 비교에 의해 LogD_(PBS)를 결정하고, 하기 식을 이용하여 계산하였다:

$$LogD = \log \left[\frac{AUC_{std} - AUC_{pbs}}{AUC_{pbs}} \right]$$

여기서, *AUC_{std}* 및 *AUC_{pbs}*는 각각 표준물 및 시험 이온 크로마토그램으로부터의 피크 면적이다. 또한, 0.1 M HCL로 검정의 시작 전 완충액의 pH를 조절함으로써 pH 6.9 및 pH 5.5에서 PBS를 사용하여 LogD_(PBS)를 결정하였다.

■ 결과; 작제물 L6-PED-1(PED-011) LogD_{7.4} = 0.74

pH의 함수로서 화학적 안정성의 결정

본 발명의 화합물의 화학적 안정성을 pH 대 시간의 함수로서 연구하였다. 화합물의 손실 및 방출된 모체의 형성을 적절하게 RP-HPLC에 의해 정량화하였다.

HPLC 안정성 시험에 대한 일반적인 절차

모든 화학적 안정성 시험(0.2 mg/mL 내지 2.0 mg/mL)을 다음 pH 완충 용액에서의 용해도에 좌우하여 공용매(MeCN 또는 DMSO)의 존재 또는 부재 하에 이중으로 37℃에서 수행하였다. 결과는 초기 및 최종 시점에 존재하는 화합물과 항세균성 모체 둘 모두의 mol %로서 나타냈다(HPLC 피크 적분에 의해 측정). 형성된 항세균성 모체의 농도를 계산하기 위해, 임의의 소광 계수 차이를 고려하여 순수한 표준을 이용함으로써 HPLC를 보정해야 한다.

(i) pH 1.2 0.1 M 클로라이드 완충액

NaCl(0.2 g)을 90 mL의 증류수에 용해시키고, pH를 대략 5 mL의 1 M 염산에 의해 1.2까지 조절함으로써 이를 제조하였다. 부피를 증류수로 100 mL까지 구성하고, 필요한 경우, 몇 방울의 1 M 염산에 의해 pH 1.2까지 조절하였다. 시험 조건은 37℃이고, 총 시간은 1시간이었다.

(ii) pH 3.0 0.1 M 시트레이트 완충액

3.0의 pH가 얻어질 때까지 1 M 소듐 하이드록사이드(4 mL 내지 5 mL)를 100 mL의 0.1 M 수성 시트르산에 첨가함으로써 이를 제조하였다. 시험 조건은 20℃이고, 총 시간은 2시간이었다.

(iii) pH 6.8 0.1 M 포스페이트 완충액

6.8의 pH가 얻어질 때까지 1 M 소듐 하이드록사이드를 100 mL의 0.1 M 수성 소듐 디하이드로젠 포스페이트에 첨가함으로써 이를 제조하였다. 시험 조건은 37℃이고, 총 시간은 2시간이었다.

(iv) pH 7.4 0.1 M 포스페이트 완충액

7.4의 pH가 얻어질 때까지 1 M 소듐 하이드록사이드를 100 mL의 0.1 M 수성 소듐 디하이드로젠 포스페이트에 첨가함으로써 이를 제조하였다. 시험 조건은 37℃이고, 총 시간은 2시간이었다.

[0553] (v) pH 8.0 0.1 M 포스페이트 완충액

[0554] 8.0의 pH가 얻어질 때까지 1 M 소듐 하이드록사이드를 100 mL의 0.1 M 수성 소듐 디하이드로젠 포스페이트에 첨가함으로써 이를 제조하였다. 시험 조건은 20℃이고, 총 시간은 2시간이었다.

[0555] PED-1 및 링커-1→6로부터 유도된 6개 전체 접합체에 대한 화학적 안정성 데이터는 표 4에 상세히 기재되어 있다:

[0556] [표 4]

[0557] 상이한 링커-작제물의 화학적 안정성

표적	그람 음성 유기체	안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열	화합물	당-스페이서-링커	완충액 pH	화학적 안정성
						반감기 (min)
AcpP	E.Coli	CTT CGA TAG TG (PED-1)	PED-006 (L1)	당-L-Ala-OCH ₂ O-PIP-OH	3.0	143
					5.0	326
					7.4	276
			PED-007 (L2)	당-L-Ala-OCH ₂ O-N-Me-Gly-OH	3.0	438
					5.0	>480
					7.4	>480
			PED-008 (L3)	당-L-Ala-OCH(Me)O-N-Me-Gly-OH	3.0	>480
					5.0	303
					7.4	275
			PED-009 (L4)	당-L-Ala-OCH ₂ O-N-Me(CH ₂) ₃ COOH	3.0	316
					5.0	275
					7.4	241
			PED-010 (L5)	당-L-Ala-OCH(Me)O-N-Me(CH ₂) ₃ COOH	3.0	293
					5.0	>480
					7.4	>480
			PED-011 (L6)	당-L-Ala-NH(CH ₂) ₃ COOH	3.0	366
					5.0	159
					7.4	>480

[0558]

[0559] 생체내 감염 모델 연구

[0560] 요로 감염 마우스 모델에서 이.콜라이(ATCC25922)에 대한 PED-011의 효능

[0561] 약 5 X 10⁸개 CFU/동물 이.콜라이(ATCC 25922)로 암컷 BALB/c 마우스를 요도경유로 감염시켰다. 감염 4시간 후, 동물을 1일 2회(Q12h) 경구로 30 mg/kg의 시프로플록사신 및 10 mg/kg 및 30 mg/kg(u.i.d)으로 단일 IV 용량의 PED-011로 처리하였다. 각 그룹으로부터의 10마리 동물을 처리 48시간 후에 종료하고; 방광 및 신장을 수집하여 세균 부하를 결정하였다.

그룹	처리	처리	투여	조직내	동물 수
		기간	시간	세균 계수	
			PI (h)	시점 (h) PI	/그룹
1	조기 감염 대조	NA	NA	4	10
2	비히클 대조 (비히클, PBS, IV, Q24 h, 1 회 용량)	48 h	4h	52*	10
3	시프로플록사신 (30 mg/kg, p.o., b.i.d. Q12h)	48 h	4 h	52*	10
4	PED-011 (10 mg/kg, IV, Q24h, 1 회 용량)	48 h	4 h	52*	10
5	PED-011 (30 mg/kg, IV, Q24h, 1 회 용량)	48 h	4 h	52*	10

[0562] *처리 후 48 h

[0563] 시프로플록사신에 대한 비히클은 0.25%의 카르복시 메틸 셀룰로스(CMC)(w/v)이고, PBS는 PED-011에 대하여 사용하였다. PED-011을 2 mg/mL 및 6 mg/mL로 PBS에 용해시켰다. 감염 4시간 후, 동물을 제1 경구 용량의 시프로플록사신 및 단일 용량의 PED-011(10 mg/kg 및 30 mg/kg, IV, 단일 볼루스 용량, 5 ml/kg 용량 부피)로 처리하였다. 동물에게 투약 일정에 따라 추가 용량의 경구 시프로플록사신을 제공하였다.

[0564] 결과

[0565] 시프로플록사신(30 mg/kg, p.o., Q12h)은 처리 48시간 후에 4시간 대조 및 비히클 대조와 비교할 때 방광 및 신장에서 유의한 항세균 효과를 나타냈다($p < 0.05$)(도 1 및 도 2).

[0566] PED-011(30 mg/kg, IV, 단일 용량)은 처리 48시간 후에 4시간 PI 대조 및 비히클 대조와 비교할 때 방광에서 유의한 항세균 활성을 나타내고($p < 0.05$); PED-011(10 mg/kg, IV, 단일 용량)은 처리 48시간 후에 4시간 및 비히클 대조와 비교할 때 유의하게 효과적이지 않았다(도 1).

[0567] PED-011(30 mg/kg, IV, 단일 용량)은 처리 48시간 후에 4시간 PI 대조 및 비히클 대조와 비교할 때 신장에서 유의한 항세균 활성을 나타내고($p < 0.05$); PED-011(10 mg/kg, IV, 단일 용량)은 처리 48시간 후에 4시간 PI 대조 및 비히클 대조와 비교할 때 신장에서 유의한 항세균 활성을 나타냈다($p < 0.05$)(도 2).

[0568] 요로 감염 마우스 모델에서 *이. 콜라이*(CFT073, ATCC®700928™)에 대한 PED-011의 효능; 요로병원성 균주에 대한 도전

[0569] 암컷 BALB/c 마우스를 약 5×10^8 개 CFU/동물 *이. 콜라이*(CFT073, ATCC®700928™)로 요도경유 감염시켰다. 감염 24시간 후, 동물을 1일 2회(Q12h) 경구로 30 mg/kg의 시프로플록사신 및 3 mg/kg, 10 mg/kg 및 30 mg/kg(u.i.d)으로 단일 IV 용량의 PED-011로 처리하였다. 각 그룹으로부터의 10마리 동물을 처리 48시간 후(감염 72시간 후)에 종료하고; 방광 및 신장을 수집하여 세균 부하를 결정하였다.

그룹	처리	처리 기간	투여 시간	조직내 세균 계수	동물 수 /그룹
			PI (h)	시점 (h) PI	
1	조기 감염 대조	NA	NA	24	10
2	비히클 대조 (비히클, PBS, IV, Q24 h, 1 회 용량)	48 h	24h	72*	10
3	시프로플록사신 (30 mg/kg, p.o., b.i.d. Q12h)	48 h	24 h	72*	10
4	PED-011 (3 mg/kg, IV, 1 회 용량)	48 h	24 h	72*	10
5	PED-011 (10 mg/kg, IV, 1 회 용량)	48 h	24 h	72*	10
6	PED-011 (30 mg/kg IV, 1 회 용량)	48 h	24 h	72*	10

*처리 후 48 h; 감염 후 72h

[0570]

[0571] 시프로플록사신에 대한 비히클은 0.25%의 카르복시 메틸 셀룰로스(CMC)(w/v)이고, PBS는 PED-011에 대하여 사용하였다. PED-011을 0.6 mg/mL, 2 mg/mL 및 6 mg/mL로 PBS에 용해시켰다. 감염 24시간 후, 동물을 제1 경구 용량의 시프로플록사신 및 단일 용량의 PED-011(10 mg/kg 및 30 mg/kg, IV, 단일 볼루스 용량, 5 ml/kg 용량 부피)로 처리하였다. 동물에게 투약 일정에 따라 추가 용량의 경구 시프로플록사신을 제공하였다.

[0572] 결과

[0573] 방광에서, 시프로플록사신은 24시간 PI 대조 및 비히클 대조에 비해 72시간에 유의한($p < 0.05$) 세균 활성을 나타냈다($p < 0.05$)(도 3). 신장에서, 시프로플록사신은 24시간 PI 대조 및 비히클 대조에 비해 유의한 세균 활성을 나타냈다($p < 0.05$)(도 4).

[0574] 방광에서, PED-011(3 mg/kg, 10 mg/kg 및 30 mg/kg, IV, 1회 용량)은 비히클 대조에 비해 유의한 항세균 효과를 나타내지 않았지만($p > 0.05$), 방광에서 세균 계수의 용량 의존적 평균 감소가 나타났다(도 3). 신장에서, PED-011(3 mg/kg, 10 mg/kg 및 30 mg/kg, IV, 1회 용량)은 비히클 대조와 비교할 때 30 mg/kg에서 유의한 효과로 용량 의존적 항세균 효과를 나타냈다($p < 0.05$)(도 4).

[0575] 요로 감염 마우스 모델에서 *이. 콜라이(ATCC BAA-2340)*에 대한 PED-011의 효능; 내성 균주에 대한 도전

[0576] 암컷 BALB/c 마우스를 약 5×10^8 개 CFU/동물 *이. 콜라이(ATCC BAA-2340)*로 요도경유 감염시켰다. 감염 24시간 후, 동물을 1일 2회(Q12h) 경구로 30 mg/kg의 시프로플록사신 및 10 mg/kg 및 30 mg/kg(u.i.d)으로 단일 IV 용량의 PED-011로 처리하였다. 각 그룹으로부터의 10마리 동물을 처리 48시간 후에 종료하고; 방광 및 신장을 수집하여 세균 부하를 결정하였다.

그룹	처리	처리 기간	투여	조직내	동물 수 /그룹
			시간 PI (h)	세균 계수 시점 (h) PI	
1	조기 감염 대조	NA	NA	24	10
2	비히클 대조 (비히클, PBS, IV, Q24 h, 1 회 용량)	48 h	24h	72*	10
3	시프로플록사신 (30 mg/kg, p.o., b.i.d. Q12h)	48 h	24 h	72*	10
4	PED-011 (10 mg/kg, IV, 1 회 용량)	48 h	24 h	72*	10
5	PED-011 (30 mg/kg, IV, 1 회 용량)	48 h	24 h	72*	10

*처리 후 48 h

[0577] 시프로플록사신에 대한 비히클은 0.25%의 카르복시 메틸 셀룰로스(CMC)(w/v)이고, PBS는 PED-011에 대하여 사용하였다. PED-011을 2 mg/mL 및 6 mg/mL로 PBS에 용해시켰다. 감염 24시간 후, 동물을 제1 경구 용량의 시프로플록사신 및 단일 용량의 PED-011(10 mg/kg 및 30 mg/kg, IV, 단일 볼루스 용량, 5 ml/kg 용량 부피)로 처리하였다. 동물에게 투약 일정에 따라 추가 용량의 경구 시프로플록사신을 제공하였다.

[0579] 결과

[0580] 시프로플록사신(30 mg/kg, p.o., Q12h)은 처리 48시간 후에 24시간 대조 및 비히클 대조와 비교할 때 방광 및 신장에서 유의한 항세균 효과를 나타냈다($p < 0.05$)(도 5 및 도 6).

[0581] PED-011(30 mg/kg, IV, 단일 용량)은 처리 48시간 후에 24시간 PI 대조 및 비히클 대조와 비교할 때 방광에서 통계적으로 유의하지는 않았지만 항세균 활성의 감소를 나타냈고($p < 0.05$); PED-011(10 mg/kg, IV, 단일 용량)은 처리 48시간 후에 4시간 대조 및 비히클 대조와 비교할 때 유의하게 효과적이지 않았다(도 5).

[0582] PED-011(30 mg/kg, IV, 단일 용량)은 처리 48시간 후에 24시간 PI 대조 및 비히클 대조와 비교할 때 신장에서 유의한 항세균 활성을 나타냈고($p < 0.05$); PED-011(10 mg/kg, IV, 단일 용량)은 처리 48시간 후에 4시간 PI 대조 및 비히클 대조와 비교할 때 신장에서 유의한 항세균 활성을 나타냈다($p < 0.05$)(도 6).

[0583] 마우스의 호중구감소성 폐 감염 모델에서 *에이. 바우마니(ATCC19606)*에 대한 PED-012의 효능

[0584] 본 연구의 목적은 마우스의 호중구감소성 폐 감염 모델에서 *에이. 바우마니(ATCC19606)*에 대한 10 mg/kg 및 30 mg/kg 용량 수준에서 비강내 투여 후 PED-012의 효능을 규명하는 것이었다.

[0585] 0.02 ml(약 1×10^9 개 CFU/ml 함유)의 접종물을, 마취된 동물의 각 비공에 10 μ l 피펫을 사용하여 비강내로 10 μ l(약 2×10^7 개 CFU/동물)을 주사함으로써 암컷 BALB/c 마우스를 감염시켰다. 균일한 분포를 위해 두 마리의 동물 사이에 접종물의 약한 혼합이 이어질 것이다. 감염 4시간 후, 동물을 1일 2회(Q12h) 경구로 30 mg/kg의 시프로플록사신으로 및 10 mg/kg 및 30 mg/kg(PBS 중)로 단일 IN 용량의 PED-012로 처리하였다. 각 그룹으로부터의 10마리 동물을 처리 48시간 후에 종료하고; 폐를 수집하여 세균 부하를 결정하였다.

그룹	처리	처리 기간	투여	폐내	동물 수 /그룹
			시간 PI (h)	세균 계수 시점 (h) PI	
1	조기 감염 대조	NA	NA	4	5
2	후기 감염 대조 (비히클, 단일 용량, IN)	48 h	4 h	52*	5
3	시프로플록사신 (10 mg/kg, po, b.i.d., Q12 h)	48 h	4 h	52*	5
4	시험 화합물 PED-012 (10 mg/kg), IN, 단일 용량	48 h	4 h	52*	5
5	시험 화합물 PED-012 (30 mg/kg), IN, 단일 용량	48 h	4 h	52*	5

*처리 후 48 h; IN: 비강내

[0586]

[0587]

결과

[0588]

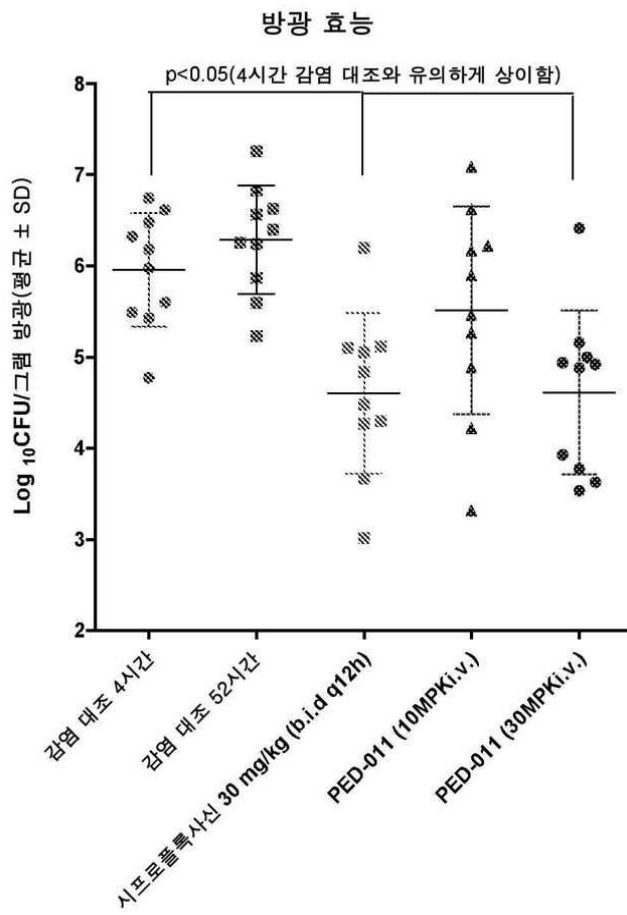
시프로플록사신(10 mg/kg, po, Q12h)은 52시간 비히클 대조와 비교할 때 유의한 항세균 효과를 나타냈다 ($p<0.05$).

[0589]

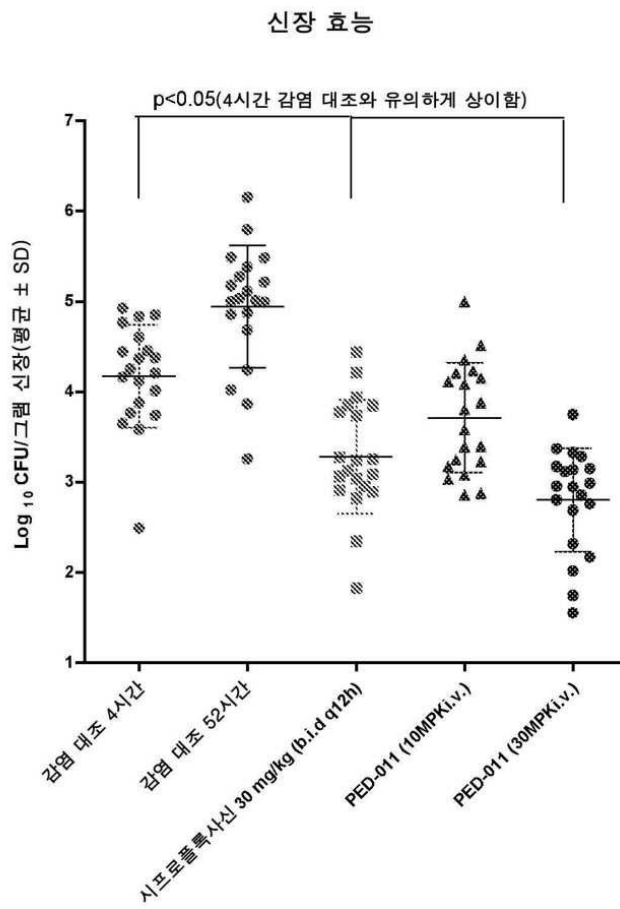
PED-012[30 mg/kg, IN, 단일 용량]는 52시간 비히클 대조와 비교할 때 유의한 항세균 활성을 나타냈고($p<0.05$); PED-012(10 mg/kg, IN, 단일 용량)는 52시간 PI에서 비히클 대조와 비교할 때 유의하게 효과적이지 않았다 ($p>0.05$).

도면

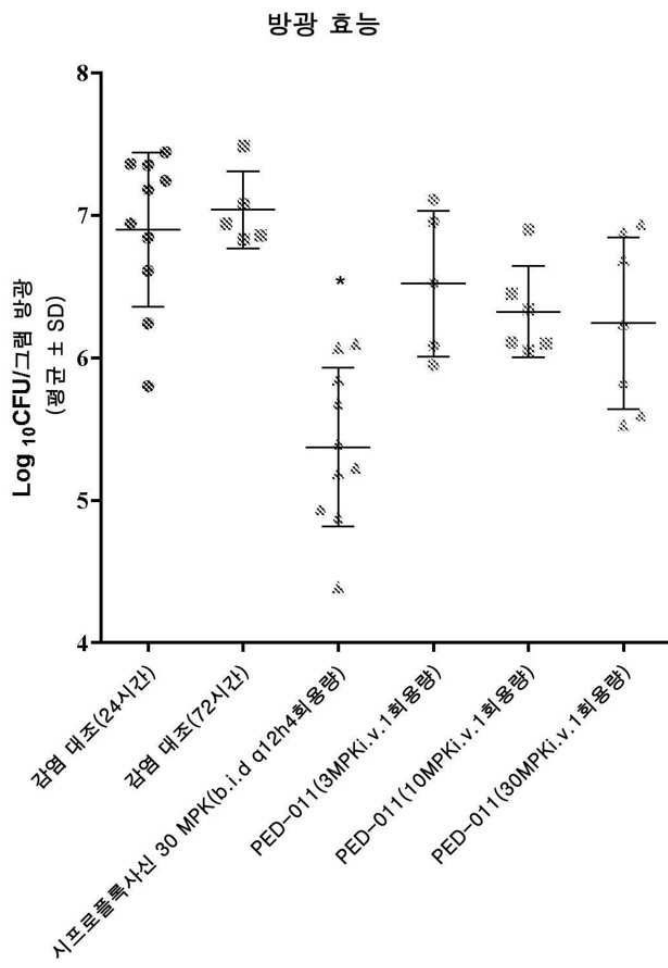
도면1



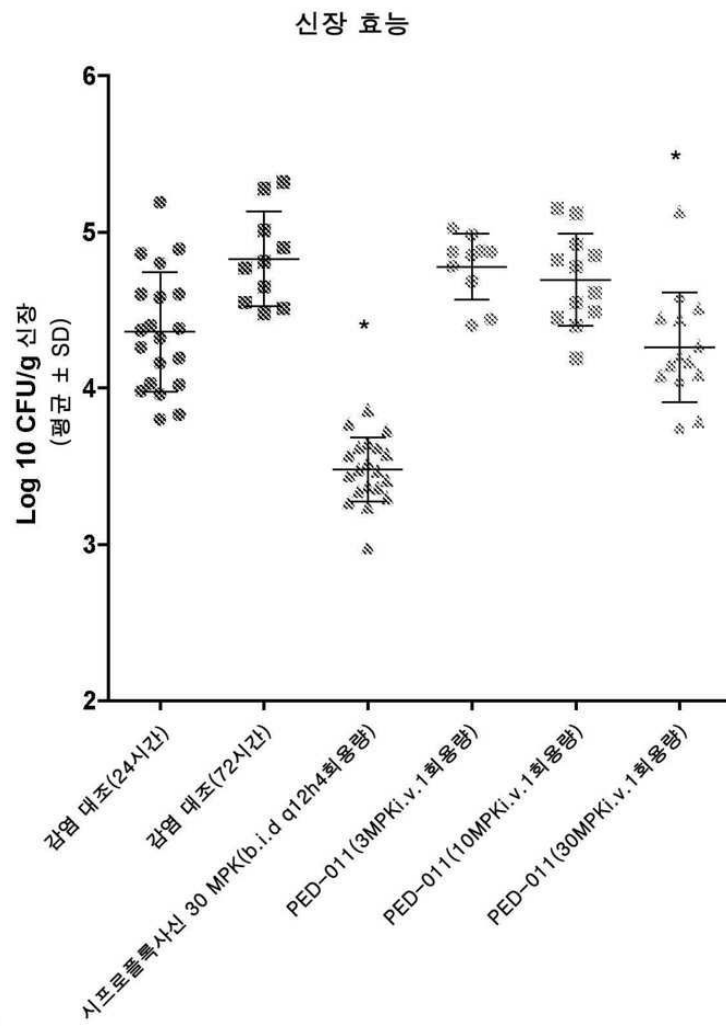
도면2



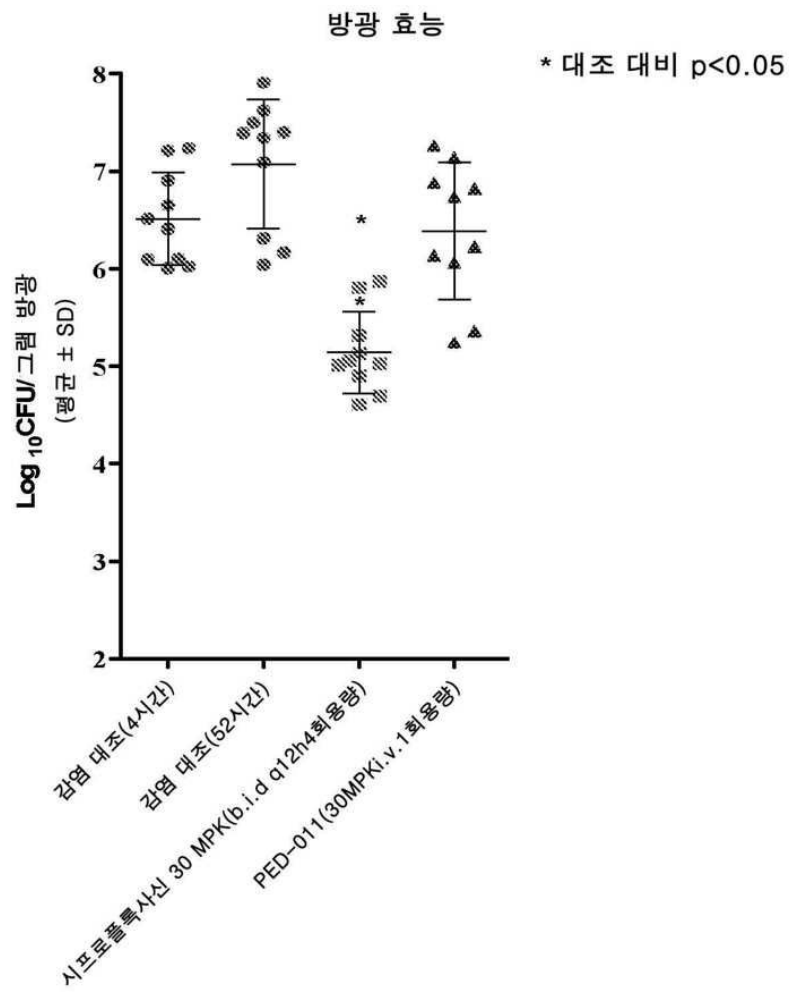
도면3



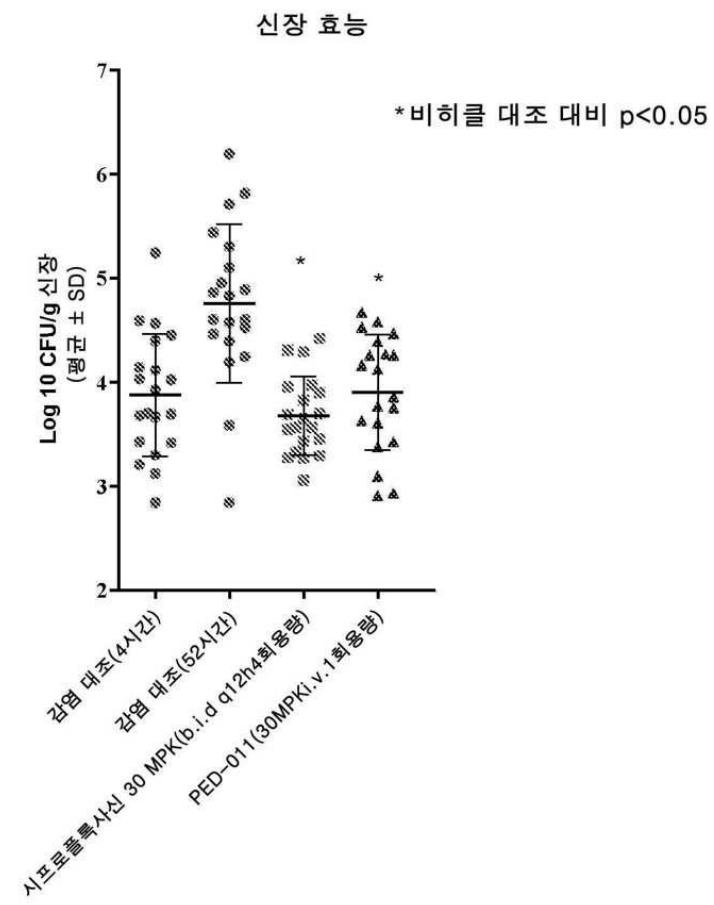
도면4



도면5



도면6



도면7

